水晶体における還元型ピリジンヌクレオシドの蛍光 (図4,表1)

坪田 一男*・Joel M. Krauss Hong-Ming Cheng**・Ronald A. Laing***** (*慶応義塾大学眼科,国立栃木病院眼科 **Harvard Medical School ***Boston University School of Medicine

Pyridine Nucleotide Autofluroescence in the Rabbit Lens

Kazuo Tsubota, Joel M. Krauss*, Hong-Ming Cheng* and Ronald A. Laing**

Keio University School of Medicine, National Tochigi Hospital *Harvard Medical School **Boston University School of Medicine

要 約

レドックスフルオロメーターは還元型ピリジンヌクレオシド (PN, 主に NADH)の蛍光を侵襲なく測定す る.この方法論を水晶体に応用するためには水晶体における PN 蛍光の特性を調べこの蛍光が代謝を反映する ことを示す必要がある.白色ウサギ水晶体を用いて460nm の蛍光に対して250~450nm の範囲の励起光スペク トルを,328nm と366nm の励起光に対して380~550nm の範囲の蛍光スペクトルを測定した.水晶体を Krebs-Ringer 液に浸し1時間半の経時的測定の後、ミトコンドリアの呼吸阻害剤である KCN を投与しさら に3時間半の測定を行なった.2つの蛍光シグナルが観察された.ひとつは328nm に励起光のピークを持ち、 460nm に蛍光のピークを持つ328/460シグナルであり,他は366nm に励起光のピークを持ち462nm に蛍光の ピークを持つ366/462シグナルである.最初の1時間半の間に両シグナルとも減少するが、KCN を投与すると 328/460シグナルは減少を続けるのに対して、366/462シグナルは増加した.純粋な NADH の蛍光パターンに 類似し、KCN 投与によりシグナルが増加することから366/462シグナルは水晶体における NADH 由来である と考えられた.(日眼 92:1657-1661,1988)

キーワード:レドックスフルオロメーター, NADH, ピリジンヌクレオシド,水晶体蛍光,代謝阻害剤

Abstract

Ex vivo fluorometric analysis of a rabbit lens was performed. The lens was kept in Krebs-Ringer solution during the experiment. Excitation wavelengths were surveyed between 250 and 450nm and the autofluorescence of the lens was measured at 460nm. Fluorescence wavelengths were surveyed between 380 and 550nm at the excitation wavelenths of 328 and 366nm. Rabbit lens pyridine nucleotide (PN, mainly NADH) fluorescence was found to have an maximum excitation at 366nm and an emission maximum at 462nm. The only other fluorescent chromophore in that region of the spectrum has excitation and emission peaks at 328 and 460nm, respectively. Anaerobic glycolysis in the lens was stimulated by KCN, a known inhibitor of mitochondrial respiration. Over the course of a 3.5-hour period following treatment with KCN, the 366/462 signal showed a statistically significant increase, whereas the 362/460 signal continued to decrease. The control lens showed continued decrease in both signal ratios. This result indicates that the 366/462 signal derives from NADH in the rabbit lens. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 1657-1661, 1988)

別刷請求先:320 字都宮市中戸祭1-10-37 国立栃木病院眼科 坪田 一男(昭和63年6月8日受付) Reprint requests to: Kazuo Tsubota, M.D. National Tochigi Hospital 1-10-37 Nakatomatsuri Utsunomiya, Tochigi, Japan 320 (Accepted for publication June 8, 1988)

日眼会誌 92巻 10号

90-(1658)

Key words: NADH, Pyridine nucleotide, Redox fluorometer, Lens autofluorescence, Lens metabolism, Repiratory inhibitor

I 緒 言

水晶体における蛍光は19世紀より研究されており、 いくつかの蛍光物質が発見されている」。これらの蛍 光物質はすべて水晶体蛋白およびアミノ酸であり、加 齢や放射線障害などと関係するものが多くを占めてい る2)~5).水晶体蛋白の変化を蛍光の測定を通じて予測 することは,水晶体の構造変化を知る上で重要なこと であるが、微細な変化の初期段階にある代謝レベルで の情報を与えるものではない。一方代謝における重要 な補酵素である還元型ピリジンヌクレオシド (PN)の 特殊な蛍光を用いて組織の代謝レベルを測定しようと するレドックスフルオロメーターが開発されている。 Chance らはラットの肝臓のミトコンドリアを用いて PN 蛍光を初めて測定し、代謝レベルを予測できるこ とを示した6). 眼科領域では Laing らにより角膜上皮 において PN 蛍光測定がなされ⁷⁾, 最近 Tsubota らに より水晶体中の PN 蛍光測定が報告された⁸⁾⁹⁾.水晶体 には蛋白由来の蛍光が存在することが知られており. また PN 蛍光の励起および蛍光のピークは組織によ り異なっていることが報告されていることから今回水 晶体における還元型ピリジンヌクレオシドの励起およ び蛍光のスペクトルを詳細に測定し、他の蛍光物質に よる干渉の有無について検討を行なった.

II 実験方法

1. 励起光, 蛍光スペクトルの測定

白色ウサギ眼球より水晶体を傷つけることなく摘出 し、蛍光測定用の透明容器に入れた.水晶体が少しで も傷ついた場合はこの実験より除外した.この容器の 断面は10mm×4mmの大きさであり、水晶体を入れた 後図1に示す部位の蛍光測定を行なった.測定は水晶 体のどの部分でも行なえるが、物理的に刺激の全く加 わらない(容器に接しない等)水晶体上皮、皮質の方 が蛍光が安定しなおかつ KCN 投与により反応が速い ためこの部位を測定場所とした.容器中の Krebs-Ringer 液は5.5mM のグルコースを含み、浸透圧は300 mM, pH は7.4に補正した.蛍光測定には Perkin-Elmer, MPF-66 蛍光スペクトロフォトメーターを用 いた.この装置は波長による励起光の強弱と蛍光測定 の誤差をコンピューターにより補正できるようになっ



図1 蛍光測定容器中のウサギ水晶体と蛍光測定部位 (斜線の部分).測定部位は水晶体囊,上皮,皮質の 一部を含んでいる.

ている¹⁰⁾. 励起光の測定は蛍光測定を460nm に設定し て200nm より450nm の間にて行なった.一方蛍光の測 定は励起光を328nm および366nm に設定して380nm から550nm の間にて行なった.

2. KCN の蛍光に与える影響

励起および蛍光のビークを決定した後はこのビーク に合せて,経時的に蛍光の測定を行なった.1回の測 定は5回の平均値を用い,測定は22℃にて行なった. 10分毎に1時間半の測定を経時的に行なった後,20 mMのKCNを含むKrebs-Ringer液を容器中の Krebs-Ringer液の半分と置換した.即ち10mMの KCNを含むKrebs-Ringer液に水晶体が浸されたこ とになる.置換の後にさらに3時間半の経時的測定を 行なった.コントロールとしては,20mMのKCLを含 むKrebs-Ringerとの置換群を用いた.KCN投与群に 8個の水晶体を,コントロールのKCL投与群に5個 の水晶体を用い蛍光強度の変化を初期値を基準として 変化率として計算した.

III 結 果

1. 励起光, 蛍光スペクトルの測定 白色ウサギ水晶体にて蛍光測定を460nm に固定し た際,励起光のスペクトルは3つのビークを持っていた(図2). 蛍光測定の波長を460nm から440nm または580nm にずらすと,230nm の励起波長は同じようにずれるが,328nm および366nm の波長は変化しなかった.励起光を328nm および366nm に固定し,蛍光スペクトルを測定すると,460nm および462nm にそれぞれビークが存在した(図3).

2. KCN の蛍光に与える影響

表1は5時間にわたって測定された水晶体蛍光の変



図2 ウサギ水晶体の励起光スペクトル(蛍光測定は 460nm). 230nmのピークは蛍光測定波長を変化さ せると同時に変化するため真の励起波長ではない. 328nm および366nmの2つのピークが励起光を示 している.





表1 ウサギ水晶体蛍光の変化

溶液	実験数	1.5時間後の蛍光 強度変化(%)	5時間後の蛍光 強度変化(%)
366/462	シグナル		
KCN	8	-4.8 ± 5.6	$\pm 12.9 \pm 7.6$
KCL	5	-2.6 ± 3.4	-6.4 ± 5.1
328/460	シグナル		
KCN	8	-3.5 ± 5.2	-11.3 ± 6.1
KCL	5	-1.0 ± 2.6	$-3.2{\pm}1.1$

*KCN 投与群のみ5時間後に12.9±7.6の増加を示している.



図4 ウサギ水晶体の蛍光強度の変化.実線は KCN 投与群,破線は KCL 投与のコン トロール群. KCN の投与により366/462シグナルは増加する.

化を示している 全体の蛍光強度に大きなばらつきが あるがこれは個体間のばらつきが大きいためで、測定 自体は安定しておりその測定のばらつきは5回測定に より0.1%以下であった. KCN 投与群の蛍光強度は最 初の1時間半の間に366/462シグナルにおいて4.8%の 減少、328/460シグナルにて3.5%の減少となっている。 KCN 投与後は、328/460シグナルは減少を続けるのに 対して (11.3%), 366/462シグナルは蛍光強度を平均 12.9% 増加した. コントロール群においては最初の1 時間半の間に同じような蛍光強度の減少が見られた が. KCL 投与後も引き続き両シグナルにおいて減少を 続け366/462シグナルにて6.4%、328/460シグナルにて 3.2%の減少を示した. KCN 群とコントロール群を比 べると366/462シグナルにおいて有意の差(p< 0.0002) を示した。図4は5時間にわたる水晶体蛍光 強度の変化を示した1例であるが、366/462シグナルが 大きく変化しているのが観察された。

IV 考 案

水晶体の透明性を維持するためには正常の糖代謝が 必要である。白内障の発生の前段階として代謝レベル での異常が存在するとすれば、白内障発生の機構を研 究する上で代謝レベルを生体にて測定する方法論は有 用であると思われる¹¹⁾.レドックスフルオロメーター は還元型ビリジンヌクレオシドの蛍光を用いて代謝レ ベルを測定しようとするものであるが侵襲なく生体に おいて使用できるという点で注目されている^{7)~9)}.還 元型ビリジンヌクレオシドにはNADH および NADPH が含まれるがウサギ水晶体において99%以 上がNADH であると報告されている¹²⁾.NADH は糖 代謝の重要な補酵素であり水晶体の皮質において嫌気 性解糖と深く結びついている.

水晶体における蛍光物質には主に2つの重要なもの が報告されている¹³⁾.ひとつは290nmに励起光のピー クを持ち,340nmに蛍光のピークを持つパーブル蛍光 であり、もうひとつは340nmに励起光のピークを持ち 420nmに蛍光ピークを持つブルー蛍光である.パープ ル蛍光は水晶体の蛍光のうち一番強く,加齢に対して 安定で蛋白結合トリブトファンに由来するとされてい る³⁾.ブルー蛍光はやはり蛋白由来であり anthranilic acid, bityrosine などから発していると考えられ加齢 により増加するとされている¹⁴⁾.これらの蛍光はどち らも蛋白由来であるので安定していると考えられ る¹⁵⁾. 今回の実験では230nm あたりの励起波長は蛍光測 定をずらすとそれに伴ってずれるため蛍光ではなく, 328および366nmのピークのみが蛍光励起波長のピー クであると考えられた.即ちウサギ水晶体の還元型ピ リジンヌクレオシドの蛍光領域において2つの蛍光パ ターンが測定された.ひとつは328nmに励起光のピー クを持ち,460nmに蛍光ピークを持つ328/460シグナ ル.もうひとつは366nmに励起光のピークを持ち462 nmに蛍光のピークを持つ366/462シグナルであった. 蛋白由来の蛍光は補酵素などの微量物質の蛍光に比べ て非常に強いが,励起および蛍光波長が PN シグナル よりずれているため今回の測定では影響を与えること がなかった.

ミトコンドリア中の PN シグナルを測定するのに Chance らは340nm の励起と440nm の蛍光の組み合せ を用いた⁶⁾. 我々は水晶体における PN シグナルは366 nmにて励起され462nmにて蛍光を発することを確認 したがこの領域におけるもうひとつの蛍光として328 nmにて励起し460nmにて蛍光を発するものも同時に みつかった。ミトコンドリアの呼吸抑制により嫌気性 糖代謝が活性化され PN シグナルは増加すると考え られるが、今回の実験において正に366/462nm シグナ ルのみが KCN の投与により増加を示したことは、こ のシグナルが PN シグナルに一致するものであるこ とを裏ずけている. KCN を投与しない場合の蛍光強 度のゆっくりとした減少は代謝レベルの低下を示して いるものと思われる.水晶体と同様無血管組織である 角膜を培養液中に保存すると PN レベルの低下が起 きるが,これは摘出角膜自体の代謝系の低下や,培養 液中のグルコースなどが減少するためと考えられてい Z 16)

328/460シグナルの由来についてははっきりしてい ない. Avi-Dor らは肝ミトコンドリアの蛍光を測定し 290/440シグナルと335/440シグナルを測定し、335/440 シグナルが PN 由来で、290/440はなんらかの蛋白由 来であるとしている¹⁷⁾. 更にこのシグナルの由来につ いては検討を加えていく必要があると思われる.

純粋な NADH の蛍光を測定したところ (pH9.0, 22℃), 337/466シグナルが測定された.これは366/462 シグナルと若干ずれているが, 組織においては PN シ グナルの励起光のビークがずれることはよく知られて おり¹⁸⁾, 励起光はほぼ同一の波長であり, 366/462シグ ナルが水晶体組織中の NADH 由来と考えられる.以 上のように今回の実験において我々はウサギ水晶体に 昭和63年10月10日

て PN シグナルが他の蛍光物質に邪魔されることな く測定可能なことを示した.

本論文の要旨は第14回水晶体研究会にて発表した.稿を 終えるにあたり御校閲いただきました植村恭夫教授に深謝 致します.

References

- Regnauld J: Analyse et conclusion d'un travail sur la fluorescence des milieuz de l'oeil. Bull Acad Natl Med (Paris) 25: 267-274, 1859.
- Bando M, Ishii Y, Nakajima A: Changes in blue fluorescence intensity and coloration of human lens protein with normal lens aging and nuclear cataract. Ophthalmic Res 8: 456-463, 1976.
- Satoh K: Fluorescence in human lens. Exp Eye Res 16: 167-172, 1973.
- Grover D, Zigman S: Coloration of human lenses by near ultraviolet photo-oxidized tryptophan. in De. Davson H (ed): The Eye. London, Academic Press, 207-492, 1984.
- Yu NT, Kuck JF, Askren CC: Red fluorescence in older and brunescent human lenses. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 1278–1280, 1979.
- Chance B, Baltscheffsky H: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. J Biol Chem 223: 736-741, 1958.
- 7) Laing RA, Fischbarg J, Chance B: Noninvasive measurements of pyridine nucleotide fluorescence from the cornea. Invest Ophthalmol 19: 96-102, 1980.
- 8) Tsubota K, Laing RA, Kenyon KR: Noninvasive measurements of pyridine nucleotide and flavoprotein in the lens. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 785-789, 1987.
- 9) Tsubota K, Laing RA, Davis TL, Miglior S,

Kenyon KR, Cheng HM : Redox fluorometric analysis of diabetic lens. Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl) 28 : 280, 1987.

- Cantor CR, Timasheff SN: Optical spectroscopy of proteins. 3. Fluorescence. In The Proteins, 3rd Edition Academic Press, London, 230 -278, 1982.
- Spector A: Aspects of the biochemistry of cataract. In The Ocular Lens. Maisel H (ed), Marcel Dekker, New York, 405-438, 1985.
- 12) Stewart A, Augusteyn RC: Pyridine nucleotides in normal and cataractous human lens. Exp Eye Res 39: 307-315, 1984.
- 13) Zigman S: Photobiology of the lens. In The Ocular Lens Maisel H (ed), Marcel Dekker, New York, 347-404, 1985.
- 14) Garcia CS, Dillon J, Spector A: Nontryptophan fluorescence associated with human lens protein. Exp Eye Res 26: 461-476, 1978.
- 15) Harding JJ, Crabbe MJC: The lens. Development, proteins, metabolism and cataract. In The Eye Davson H (ed). Academic Press London, 207-492, 1984.
- 16) Tsubota K, Laing RA, Chiba K, et al: Noninvasive metabolic analysis of preserved rabbit cornea. Accepted to Arch Ophthalmol, 1988.
- 17) Avi-Dor Y, Olson JM, Doherty MD, Kaplan NO: Fluorescence of pyridine nucleotides in mitochondria. J Biol Chem 237: 2377-2383, 1962.
- 18) Davis RP, Canessa-Fischer M: Spectrofluorometric identification of reduced pyridine nucleotide in the intact isolated urinary bladder of the toad. Natl Biochem 10: 325–343, 1965.