

人眼老人性白内障, 猿, ラット水晶体におけるガングリオシド

齊藤 伸行

東邦大学医学部第一眼科学教室

要 約

我々は既に人眼老人性白内障水晶体に白内障の進行程度に伴い増加するポリシアロガングリオシドが存在し、このガングリオシドは脳のガングリオシドとは一致しない糖鎖構造を持つ可能性があることを報告した。今回、アカゲザル、ニホンザル、ラットの水晶体においてもこの特異なガングリオシドが存在するか否かを検討した。ガングリオシドを従来の方法に従い抽出し、ガングリオシドマッピング、二次元 TLC により比較検討を行なった。その結果、マッピングでは人眼老人性白内障水晶体に認められた特異なガングリオシドがすべてのサンプルに認められた。また、アカゲザル、ニホンザル水晶体の二次元 TLC パターンは人眼老人性白内障水晶体のパターンと非常に類似していた。以上の結果より水晶体中には神経系に見られるガングリオシドの合成経路に加えて、特異的な経路も存在することが示唆された。(日眼会誌 95:468-473, 1991)

キーワード: ガングリオシド, 水晶体, 人眼, 猿, ラット

Gangliosides in Human Senile Cataractous, Monkey, and Rat Lenses

Nobuyuki Saito

First Department of Ophthalmology, Toho University School of Medicine

Abstract

Our previous studies suggested that increases in certain polysialogangliosides are associated with the maturation of senile cataract and that these gangliosides possess an unknown sugar chain different from those of brain gangliosides. To study these gangliosides, crude ganglioside fractions from human, monkey, and rat lenses were isolated by solvent extraction and DEAE-Sephadex column chromatography, analyzed by thin-layer chromatography, and subjected to ganglioside mapping by high-performance liquid chromatography with DEAE-Iatrobeads. The distribution pattern of gangliosides obtained by mapping demonstrated the presence of the polysialogangliosides in monkey and rat lenses. The ganglioside pattern of monkey lens as shown by two-dimensional thin-layer chromatography was similar to that of human senile cataractous lens and was characterized by the presence of unidentified spots. These results indicate that certain polysialogangliosides are unique to lens and are synthesized by an unidentified pathway. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 468-473, 1991)

Key words: Ganglioside, Lens, Human, Monkey, Rat

別刷請求先: 143 大田区大森西 6-11-1 東邦大学医学部第一眼科学教室 齊藤 伸行
(平成 2 年 6 月 8 日受付, 平成 2 年 10 月 4 日改訂受理)

Reprint requests to: Nobuyuki Saito, M.D. First Department of Ophthalmology, Toho University School of Medicine.

6-11-1 Ohmori-Nishi, Ohta-ku 143, Japan

(Received June 8, 1990 and accepted in revised form October 4, 1990)

I 緒 言

老人性白内障の発症過程はなんらかの水晶体内の異常により Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase などの酵素活性に障害が生じ、蛋白質の構造変換を惹起し¹⁾, その結果水晶体の混濁に至ると考えられている。 ganglioside はシアル酸をもつスフィンゴ糖脂質の総称であり、スフィンゴ塩基と脂肪酸より成るセラミドと糖鎖により構成されている。ganglioside は主に細胞膜表面に存在し細胞認識、細胞間相互作用、およびコレラ毒などのレセプターなどの膜機能と密接に関連していることが報告されており^{2)~6)}, その質的、量的変化が水晶体においては混濁の要因となる可能性が十分考えられる。

水晶体の ganglioside についての研究は1965年に Feldman ら⁷⁾の報告に始まり、以来数々の報告が続いている。Windeler ら⁸⁾は1970年にウシ水晶体を検討し GM_3 のみが含まれることを報告したが、ganglioside の抽出法の進歩により Swanson と Albers⁹⁾, Garg ら¹⁰⁾はウシの水晶体から多数の ganglioside を検出した。Sarkar と Cenedella¹¹⁾はヒト、ウシ、ブタの水晶体中の ganglioside の定量を行い、人眼には非常に多くの ganglioside が含まれていることを報告した。Tao ら¹²⁾は人眼白内障水晶体の ganglioside を検討し11種類の ganglioside を見出し、この中に複雑な構造を持った分子種が存在する知見を物理化学的手法により示した。我々はこれまでに発表した過去の実験において、アカゲザル水晶体と人眼白内障水晶体の蛋白質質量当たりの ganglioside 含量を定量した結果、アカゲザル水晶体の ganglioside 含量は加齢と関連した増加を示し¹³⁾¹⁴⁾, 人眼では加齢のみならず白内障の進行程度とも関連が見られることを明らかにした¹⁵⁾¹⁶⁾。さらに TLC による解析により、水晶体の混濁に伴って増加するポリシアロ ganglioside が認められ、特異な糖鎖構造を含む可能性もこれまでの発表ですでに示唆した¹⁶⁾。

今回の実験では、人眼老人性白内障、アカゲザル、ニホンザル、ラット水晶体の ganglioside 分子種構成についてマッピング、二次元 TLC を用い検討し、若干の興味ある知見を得た。

II 実験方法

1. 実験材料

64~86歳の老人性白内障患者より弁状嚢内摘出術に

て摘出した水晶体57個(60歳代13個, 70歳代29個, 80歳代15個), 実験動物中央研究所より供与された2~7歳のアカゲザル (*Macaca mulatta*) 正常水晶体6個(2歳2個, 4歳1個, 7歳3個), 京都大学付属霊長類研究所より試料提供を受けた2~6歳のニホンザル (*Macaca fuscata*) 正常水晶体9個(2歳4個, 3歳3個, 6歳2個), 三協ラボサービスより購入した6週齢 SD 系雄ラット水晶体100個を用いた(ラットに致死量以上の麻酔薬を投与した後, 水晶体を摘出した)。

2. 酸性糖脂質の分離

カプセルが付いた水晶体からクロロホルム-メタノール(2:1, V/V), さらに(1:2, V/V)により順次総脂質の抽出を行った。ついで, DEAE-セファデックス(A-25)カラムクロマトグラフィーを用い中性画分と酸性画分に分離し, ganglioside を含む酸性画分はアルカリ処理を行なった後, SEP-PAK C_{18} により部分精製を行ない試料とした^{12)~15)}。

3. 二次元薄層クロマトグラフィーによる ganglioside の分析

人眼老人性白内障, アカゲザル, ニホンザル, ラットの水晶体より得られた ganglioside 画分をそれぞれ HP-TLC プレート(メルク社製)にスポットし, クロロホルム-メタノール-0.25% CaCl_2 (55:45:10, V/V), クロロホルム-メタノール-2.5N アンモニア水(50:40:10, V/V)を展開溶媒に用いた二次元薄層クロマトグラフィーを行なった。ganglioside の検出にはレゾルシノール-塩酸試薬を用いた。また, 各動物種の ganglioside の分子種の差異を明確にするため人眼老人性白内障・アカゲザル, 人眼老人性白内障・ニホンザル, 人眼老人性白内障・ラット, アカゲザル・ニホンザル, アカゲザル・ラット, ニホンザル・ラット水晶体の混合サンプルを同様に展開し, 単独のサンプルのクロマトグラフィーとともに比較検討を加えた。さらに HP-TLC プレートを二波長 TLC クロマトスキャナー(島津製作所, CS-930)を用い, 580 nm の波長で各分子種を定量した。

4. ganglioside マッピング

各サンプルをメタノールで平衡化した DEAE-イアトロビーズ(4.6×250mm, イアトロン, 東京)カラムにアブライした後, メタノール中で0~50mM の酢酸アンモニウム濃度の濃度勾配により溶出し(1ml/分), 1ml ずつを分取した。それぞれの分画の一部を HP-TLC プレート上にスポットし, クロロホルム-メタノール-0.25% CaCl_2 (55:45:10, V/V)を展開溶媒に用い

た薄層クロマトグラフィーによりガングリオシドを検出した¹⁵⁾。

III 結 果

人眼老人性白内障水晶体の試料のガングリオシドマッピングではレゾルシノールにより青紫色に発色した多数のスポットが検出され、多数のガングリオシドの分子種が存在することが示唆された。図1の矢頭で示されるガングリオシドの分子種に注目し、マーカースと比較検討した結果、このガングリオシドはGT_{1b}より小さいRf値を示すことよりポリシアロガングリオシドと考えられた。しかもマーカースのGT_{1b}は22~24分の位置(丸印)に溶出されたが、このガングリオシドはGT_{1b}より少し早い時間に溶出され、特異な分子種であることが示唆された(図1)。

人眼老人性白内障水晶体のガングリオシドの種特異

性を検討するため、アカゲザル、ニホンザル、ラットの水晶体ガングリオシドのマッピングを行なった(図1)。人眼老人性白内障では約20種の分子種が認められ、アカゲザル、ニホンザル、ラットにおいても人眼老人性白内障の場合と同様に多種のスポットが認められた。アカゲザル、ニホンザルの水晶体にはその溶出位置とRf値との比較から、人眼で見られた特異な分子種と考えられるポリシアロガングリオシドが共通に存在し、このガングリオシドはラットにおいても認められた。

次に分子種構成をより詳細に検討するため二次元TLCを行なった。人眼老人性白内障、アカゲザル、ニホンザル水晶体ともGM₃、GM₂、GM₁、GD_{1a}、GD₃、GD_{1b}やRf値の小さい領域に多数のポリシアロガングリオシドのスポットが検出されそのパターンは非常に類似していた。これに対し、ラット水晶体ではGM₃、

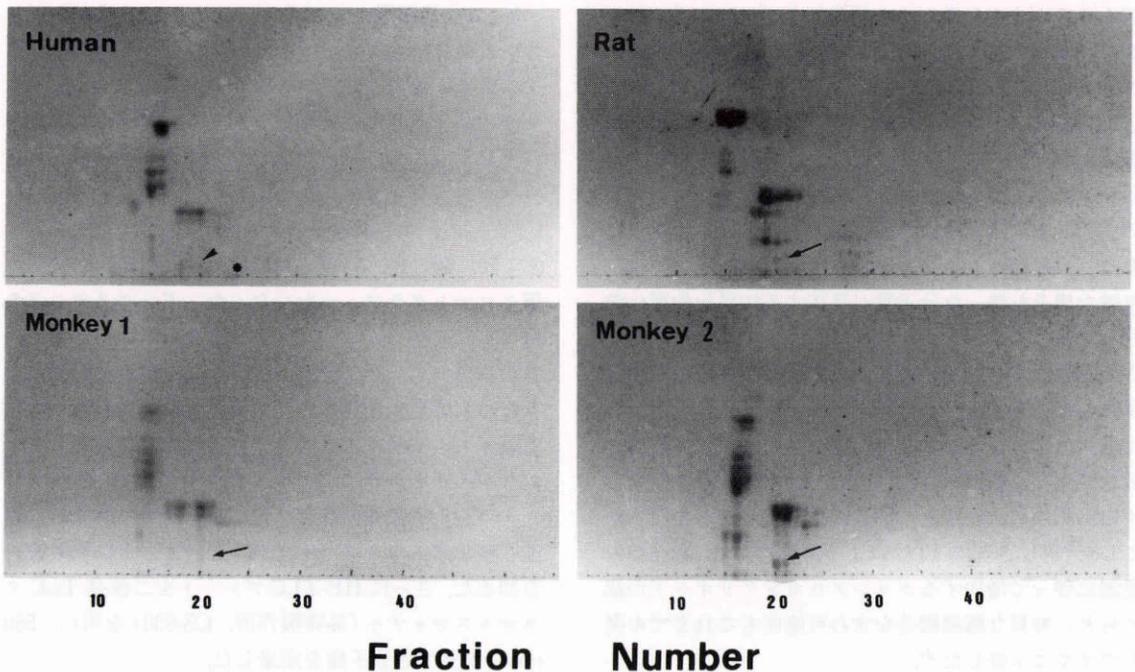


図1 人眼老人性白内障、アカゲザル、ニホンザル、ラット水晶体ガングリオシドのマッピングパターン。それぞれの水晶体より得られたガングリオシド画分(10~15 nmoles)をDEAE-イアトロビーズカラムにアプライし、高速液体クロマトグラフィーを用いてガングリオシドの持つシアル酸の電荷により分離を行なった。分離されたガングリオシドはクロロホルム-メタノール-0.25%CaCl₂(55:45:10, V/V)を展開溶媒に用いて展開しレゾルシノール-塩酸試薬により検出した。矢頭は人眼老人性白内障水晶体に見られたポリシアロガングリオシドのスポットを示し、丸印はGT_{1b}の溶出位置を示す。Monkey 1はアカゲザル、Monkey 2はニホンザルを示す。

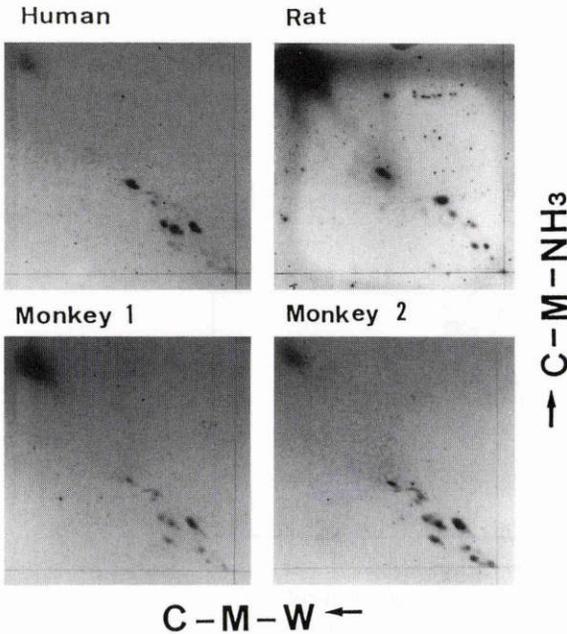


図2 人眼老人性白内障, アカゲザル, ニホンザル, ラット水晶体ガングリオシドの二次元 TLC による分離. 各試料をシアル酸に換算して1nmol ずつ TLC にアプライした. 一次元目は左方向にクロロホルム-メタノール-0.25%CaCl₂ (55:45:10, V/V) を展開溶媒として展開し, 十分に乾燥後二次元目を上方にクロロホルム-メタノール-2.5N アンモニア水 (50:40:10, V/V) を用いて展開した. Monkey 1はアカゲザル, Monkey 2はニホンザルを示す. (C-M-W=クロロホルム-メタノール-0.25%CaCl₂) (C-M-NH₃=クロロホルム-メタノール-2.5N アンモニア水)

GM₁と考えられるスポットが存在したがポリシアロガングリオシドと思われる分子種を含めてその数は非常に少なく, パターンも霊長類とはかなり異なっていた (図2).

さらに分子種の異同を明確にするため, 人眼老人性白内障・アカゲザル, 人眼老人性白内障・ニホンザル, 人眼老人性白内障・ラット, アカゲザル・ニホンザル, アカゲザル・ラット, ニホンザル・ラット水晶体の混合サンプルの二次元 TLC とそれぞれの単独のサンプルの二次元 TLC との差異を検討した. 今回の実験の結果認められた全てのガングリオシドの分子構成を模式化した (図3). ここで霊長類に共通に検出されたスポットは小文字で, またそれ以外のスポットは大文字で一次元目の Rf 値の大きい順に示している. 霊長類

表1 人眼老人性白内障, アカゲザル, ニホンザル, ラット水晶体のガングリオシド組成とそれぞれの比率 (%)

spot	Human	<i>M.mulatta</i>	<i>M.fuscata</i>	Rat
a (GM ₃)	25.1	11.4	6.14	35.2
b (GM ₃)	6.50	1.37	0.66	7.79
c (GM ₂)	1.79	4.58	1.53	
d	1.81	2.54	0.96	
e (GM ₁)	10.9	5.84	3.09	2.37
f	0.53	5.23	2.50	
g (GD ₃)	0.11	0.61	0.51	
h	1.16	8.57	8.16	
i	16.8	12.6	14.4	
j	0.36	0.55	0.43	
k	3.51	10.0	0.23	8.00
l (GD _{1a})	20.5	0.55	41.5	
m	2.97	0.73	0.19	
n	1.23	2.99	3.60	
o	1.22	10.8	6.21	
p (GD _{1b})	1.03	9.55	0.56	
q	1.14	2.09	2.10	
r	2.05	7.54	4.00	1.39
A		0.63	0.62	
B			0.83	
C				0.518
D	0.58			
E				31.5
F		0.73	0.51	
G				3.72
H		0.35	0.11	
I				3.64
J				5.88
K	1.15			
L		0.67	1.16	

二次元展開を行なった TLC プレート进行スキャンし, 各スポットの濃度を全体に対するパーセントで表した. 括弧内は相当する脳ガングリオシドのマーカーを示す.

水晶体のガングリオシドはほぼ共通する分子種により構成されていることが明らかになり, ラット水晶体でも主要なガングリオシドは霊長類と共通であることが示唆された (図3). それぞれの試料のガングリオシド組成をクロマトスキャナーで各スポットの比率として求めた結果, 人眼老人性白内障ではスポット (a, e, i, l), アカゲザルでは (a, i, k, o), ニホンザルでは (i, l), ラット水晶体では (a, E) が10%以上の比率を占めた. マーカーの二次元 TLC での移動度との比較で (a, b) は GM₃, (c) は GM₂, (e) は GM₁, (g) は GD₃, (l) は GD_{1a}, (p) は GD_{1b} と考えられた. そ

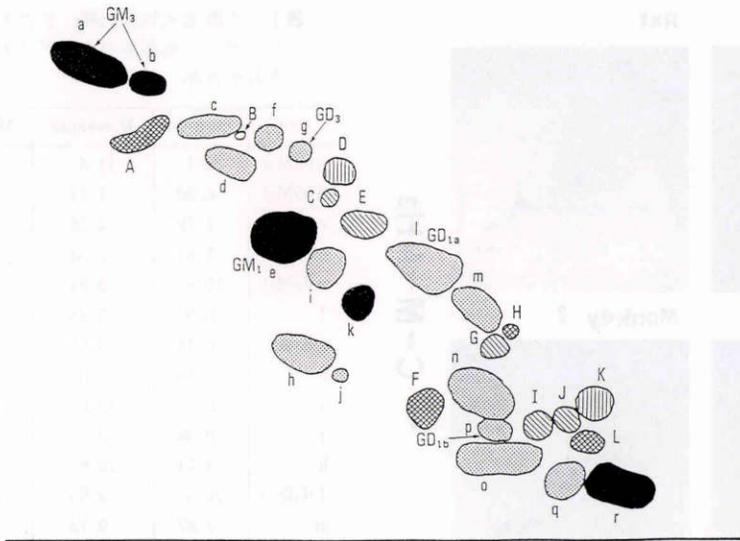


図3 人眼老人性白内障、アカゲザル、ニホンザル、ラット水晶体に存在するガングリオシドの分子種構成。人眼老人性白内障・アカゲザル、人眼老人性白内障・ニホンザル、人眼老人性白内障・ラット、アカゲザル・ニホンザル、アカゲザル・ラット、ニホンザル・ラット水晶体の混合サンプルをそれぞれ二次元 TLC で展開し、それぞれの単独のサンプルの二次元 TLC との差異を検討した。その結果から確認できた全てのガングリオシドの分子種構成を模式化した。霊長類に共通に検出されたスポットは小文字で、またそれ以外のスポットは大文字で一次元目の Rf 値の大きい順に示した。

- …人眼老人性白内障、アカゲザル、ニホンザル、ラット水晶体に共通したスポット
- ▨…人眼老人性白内障、アカゲザル、ニホンザル水晶体のみに共通したスポット
- ▩…人眼老人性白内障水晶体のみに認められたスポット
- ▧…アカゲザル、ニホンザル水晶体のみに共通したスポット
- ▦…ラット水晶体のみに認められたスポット

他のスポットはマーカーのガングリオシドに相当しないことより、何らかの修飾を受けたガングリオシドあるいはガングリオ系列以外のガングリオシドであることが示唆された。ガングリオシドマッピングで検討したポリシアロガングリオシドはスポット (r) としてヒト、アカゲザル、ニホンザル、ラットに認められた(表1)。

IV 考 按

我々はすでに過去の実験において次ぎのことを明らかにした。すなわち、①加齢に関係せず、水晶体の混濁の程度に伴って相対的に増加するポリシアロガングリオシドの分子種が存在する知見を得た¹⁵⁾¹⁶⁾。②このガングリオシドの糖組成についてガスクロマトグラフィーを用いて分析した結果、ガラクトース、グルコー

ス、シアル酸を1:2:4のモル比で含むことを見出した¹⁶⁾。③この組成はGM₃、GM₁、GD_{1a}などのガングリオ系列とは異なり他の主要なグロボ系列、ラクト系列、ネオラクト系列、ラクトガングリオ系列、ガラ系列、ムコ系列の糖脂質の糖組成とも一致しなかった。④さらにガングリオ系列の出発材料と考えられるGM₃とこのガングリオシドの脂肪酸組成は異なった組成を示したが、①~④の結果から、人眼老人性白内障水晶体には特異なガングリオシドの分子種が存在することを考察し報告した¹⁶⁾。

今回の実験で、人眼老人性白内障、アカゲザル、ニホンザル、ラットの水晶体のガングリオシドについてマッピングにより検討した結果、図1に示すように、このポリシアロガングリオシドに相当するスポットがすべての試料に認められ、このガングリオシドは水晶

体に特有の分子種であることが示唆された。また人眼老人性白内障、アカゲザル、ニホンザル、ラット水晶体のガングリオシド組成を二次元 TLC を用いて分離し TLC スキャナーにより定量を行なった結果、人眼老人性白内障水晶体では GM₃, GM₁, GD_{1a}, アカゲザルでは GM₃, GM₁, GD_{1b}, ニホンザルでは GM₃, GD_{1a}, ラットでは GM₃ が高い比率を示した。しかし、アカゲザル、ニホンザル、ラットは若齢個体の水晶体を用いたため老化によりこの合成過程に変化が生じることが考えられ、今後の検討が必要である。

他の動物のガングリオシド分子種についての報告は Sarkar と Cenedella が¹¹⁾、ウシの水晶体に GM₃, GM₂, GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT₁ が存在すること、Swindell ら¹⁷⁾はウサギ水晶体に GM₃, GM₂, GM₁, GD_{1a}, GT が存在することを報告した。これらの報告と我々の得た知見を合わせて考えると多くの動物種において a-pathway による合成が優位であるが、霊長類やウシには b-pathway も存在することが示唆された。人眼老人性白内障、アカゲザル、ニホンザル、ラットにはこれらの合成経路以外のポリシアロガングリオシドの分子種が多数存在し、脳のマーカーのスポットとも一致しなかったことを考慮すると、これらのガングリオシドは脂肪酸組成の差異、あるいは水酸化などの修飾を受けたことに由来するもの、あるいはガングリオ系列以外の合成過程により合成されたものであることが示唆された。

現在までの知見を合わせて考えると、水晶体中のガングリオシドには特異な構造の糖鎖を持つものも存在し、人眼老人性白内障では白内障の程度に伴い、このガングリオシドが増加することが示唆された。従ってこのようなガングリオシドの量的、質的变化により、水晶体の膜機能に変化が生じることが予測される。今後水晶体での局在様式、特異なガングリオシドの構造決定、合成経路の解明などにより、ガングリオシドと白内障発症の関連が明らかにされると期待される。

擧筆にあたり御指導、御校閲頂きました恩師河本道次教授に深謝致します。また、御指導頂きました東邦大学医学部第2生理学教室の平野修助教授、小木曾学博士、御協力頂きました実験動物中央研究所の谷本義文博士、京都大学付属霊長類研究所の景山 節助教授に謝意を表します。

文 献

- 1) 岩田修造, 亀井 鏗, 竹鼻 眞, 他: 白内障に関する諸問題. 日眼 86: 1919—1943, 1982.
- 2) Lee PM, Grant CWM: Ganglioside head-group disorder as a sequel to lectin binding. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 1299—1305, 1980.
- 3) Ando S: Gangliosides in the nervous system. *Neurochem Intern* 5: 507—537, 1983.
- 4) Partington CR, Daly JW: Effect of gangliosides on adenylate cyclase activity in rat cerebral cortical membranes. *Mol Pharmacol* 15: 484—491, 1979.
- 5) Caputto R, Maccioni AHR, Caputto BL: Activation of deoxycholate solubilized adenosine triphosphatase by ganglioside and asialoganglioside preparations. *Biochem Biophys Res Commun* 74: 1046—1052, 1977.
- 6) Leon A, Facci L, Toffano G, et al: Activation of (Na⁺, K⁺)-ATPase by nanomolar concentrations of GM₁ ganglioside. *J Neurochem* 37: 350—357, 1981.
- 7) Feldman GL, Feldman LS: New concepts of human lenticular lipids and their possible role in cataracts. *Invest Ophthalmol* 4: 162—166, 1965.
- 8) Windeler AS, Feldman GL: The isolation and partial structural characterization of some ocular gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 202: 361—366, 1970.
- 9) Swanson AA, Albers B: Proteolytic activity on lens proteins and gangliosides in mammalian lens. *Interdiscipl Top Geront* 12: 241—252, 1978.
- 10) Garg HS, Hawkins LA, Srivastava SK: Lipid composition and lysosomal hydrolases in bovine ocular tissues. *Fed Proc* 39: 2185, 1980.
- 11) Sarkar CP, Cenedella RJ: Gangliosides in normal and cataractous lenses of several species. *Biochim Biophys Acta* 711: 503—508, 1982.
- 12) Tao RVP, Shen YW, Kovathana N, et al: A new family of fucose-containing gangliosides isolated from human senile cataracts. *Biochim Biophys Acta* 753: 89—96, 1983.
- 13) 齊藤伸行, 周藤憲治, 真砂めぐみ, 他: サル眼におけるガングリオシドの検索. *あたらしい眼科* 5: 887—889, 1988.
- 14) Ogiso M, Saito N, Sudo K, et al: Age-dependent changes in monkey lenticular gangliosides. *Exp Eye Res* 50: 51—57, 1990.
- 15) 齊藤伸行, 周藤憲治, 真砂めぐみ, 他: 老人性白内障におけるガングリオシドの検索. *あたらしい眼科* 6: 773—776, 1989.
- 16) Ogiso M, Saito N, Sudo K, et al: Increase in lens gangliosides due to aging and cataract progression in human senile cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 2171—2179, 1990.
- 17) Swindell RT, Bell VC, Slaughter S, et al: Incorporation of C¹⁴-galactose into gangliosides of rabbit lens. *Curr Eye Res* 6: 451—456, 1987.