

人眼水晶体における Glutathione-S-Transferase 活性の局在について

—白内障水晶体と透明水晶体との比較検討—

関根 康生*, 本村 幸子**, 安部井誠人***, 原田 勝二****

*水戸済生会病院眼科, **筑波大学医学専門学群臨床医学系眼科

筑波大学附属病院内科, *筑波大学医学専門学群社会医学系法医学

要 約

全摘出された人眼水晶体を中心部と周辺部に分割しその各々の glutathione-S-transferase (GST) 活性を測定した。透明水晶体8例において周辺部のほうが中心部より GST 活性が高かった。これは、赤道部のほうが中心部より細胞の活動性が高いためと思われた。又、主に後嚢下混濁のために全摘出された老人性白内障水晶体15例と透明水晶体8例を比較したところ、周辺部 GST 活性は透明水晶体のほうが高いことが判明した。つまり白内障眼では水晶体周辺部のほうが中心部より GST 活性低下が著しい事がわかった。このことは、老人性白内障の初発がほぼ全て、周辺部から始まるということに関連しており、老人性白内障の発生機序を検索する場合、光エネルギーなどの外的要因より、水晶体細胞自体が持つ固有の特徴の検索のほうが重要であることを示唆している。(日眼会誌 95:591-594, 1991)

キーワード: 人眼白内障水晶体, グルタチオンSトランスフェラーゼ, グルタチオン, 異物代謝機構

Localization of Glutathione-S-Transferase in Transparent and Cataractous Human Lenses

Yasuo Sekine*, Sachiko Hommura**, Masato Abei***
and Shoji Harada****

*Eye Clinic, Mito Saiseikai Hospital

**Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, School of Medicine, University of Tsukuba

***Department of Internal Medicine, University Hospital of Tsukuba

****Department of Legal Medicine, Institute of Community Medicine, School of Medicine, University of Tsukuba

Abstract

The localization of glutathione-S-transferase (GST) activity was investigated in 15 cataractous lenses obtained by intracapsular extraction of senile cataract. Additionally, 8 clear lenses, obtained from donor eyes in cases of corneal transplantation or of traumatic lens luxation, were used as controls. The lenses were divided into the central and peripheral portions with a trephine. The activity of GST was quantitated in each portion according to the method described by Habig. GST activity in clear lenses was significantly higher in the peripheral portion than in the central portion and in the former it was significantly higher in clear lenses than in cataractous ones. The ratio of GST activity between central and peripheral portions (C/P) was significantly higher in cataractous lenses than in clear ones. These findings suggested that the scavenging system of the human clear lens is more active

別刷請求先: 317 日立市会瀬町4-5-3-304 関根 康生

(平成2年4月10日受付, 平成2年10月23日改訂受理)

Reprint requests to: Yasuo Sekine, M.D. Ousecho, Hitachi City, Ibaraki Prefecture.

(Received April 10, 1990 and accepted in revised form October 23, 1990)

in the equatorial portion than in the central portion. Nevertheless the activity of GST in human cataractous lenses decreased more significantly in the peripheral portion than in the central portion. These findings indicated that the human cataract usually develop from equatorial portion of lens. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 591-594, 1991)

Key words: Human cataractous lens, Glutathione-S-transferase, Glutathione, Radical scavenging system

I 緒 言

水晶体に於ける異物代謝機構を調べる事は、白内障発生機序の研究を行う場合重要な課題となっている。とくに還元型グルタチオンを高濃度で含有する水晶体には、異物代謝機構の initiator として glutathione-S-transferase [EC 2.5.1.18] (以下 GST と略す) が存在し、他の酵素に対する活性比率が他の臓器に比して高いことが報告されている¹⁾。又、一般に白内障では GST 活性が低下していると言われている²⁾³⁾。

そして GST の isozyme の一部は selenium independent glutathione peroxidase 活性も持っているとしており⁴⁾、活性酸素の除去にも重要な役割を演じているために GST は白内障発生防御酵素として注目を浴びている酵素でもある。このため多数の研究報告がなされてきている^{1)~6)}。

ところで、老人性白内障の発生原因として多数の要因が上げられてきたが、眼組織は他の組織と異なり、光エネルギーが侵入する組織であるため、眼病変の病態を考える上で、光の影響を考慮に入れる必要がある。特に白内障発症要因の一つとして紫外線、及び近紫外線の影響は活性酸素の発生と絡み、無視できないとされてきた。そこで本研究においてはヒト水晶体を光が通過する中心部と虹彩に隠されている周辺部に分割して白内障発症防御因子の一つである GST について活性を測定し、老人性白内障水晶体と透明水晶体との比較検討をした。

II 実験方法

試料として、全摘された糖尿病を合併していない43歳から82歳までの後囊下混濁を主体とした老人性白内障水晶体15例と、脱白水晶体、及び摘出眼球より得られた透明水晶体8例を用いた。これらの水晶体は可及的に、虹彩色素を取り除き使用まで -20°C に保存されたものを使用した。

方法として、水晶体をガラス板に置き固定し直径6

mm のパンチャーを当て、剃刀でそれに添って水晶体囊を切開したのち、図1に示すように核と皮質をそのまま打ち抜き、またその下の水晶体囊を剃刀で切開し、完全に分割して、水晶体を中心部と周辺部の二つのブロックとした。分割した水晶体を50mM, pH 7.8の phosphate buffer 2ml で homogenize したのち 4°C 12,000rpm にて30分間遠心し、その上清を水晶体中のグルタチオンや他の低分子還元物質を除くため centricon[®] (Amicon 社製) を用いて、2倍に濃縮したものを用いた。GST 活性測定は Habig ら⁷⁾の方法に依り、1-chloro-2,4-dinitrobenzen を基質として GST の活性値を測定した。蛋白定量は Bradford 法に従った。活性値は可溶性蛋白 mg あたりの吸光度 (340nm) の変化を国際単位 (mU) で表わした。

III 結 果

老人性白内障水晶体15例、及び透明水晶体8例の中心部と周辺部の GST 活性を測定した結果を表1に示す。透明水晶体の GST 活性は中心部(C)では、 8.54 ± 4.03 (mU/mg protein) であり、周辺部(P)では、 19.73 ± 6.57 (mU/mg protein) であった。

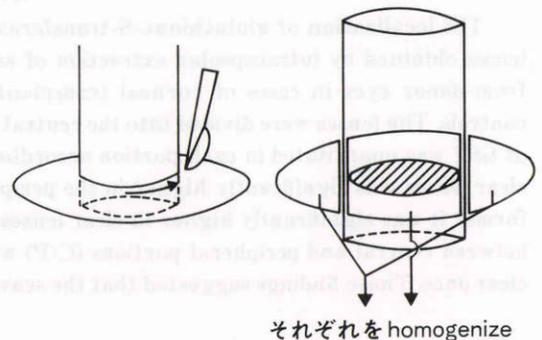


図1 <水晶体の打ち抜き法>。水晶体をトレフィンで打ち抜くとき、水晶体のカプセルが巻き込まれないように、ナイフでカプセルをトレフィンの形に切ってから打ち抜いている。

表1 GST 1単位 (U) : 1mM-CDNB, 1mM-GSH のもとで、25℃において、1分間に1μMのCDNB-GSTの抱合体を作り出す酵素量

透明水晶体			中心部 GST 活性 (C)	周辺部 GST 活性 (P)	C/P
年齢	混濁所見	核の色調			
53	透明	透明	13.80	24.30	0.570
72	透明	黄色	6.01	17.60	0.341
不明	透明	透明	14.60	20.73	0.678
不明	透明	淡黄色	6.42	16.84	0.381
20	透明	透明	11.97	31.70	0.378
78	透明	黄色	5.06	10.03	0.491
56	透明	透明	6.22	21.97	0.283
不明	透明	透明	4.70	14.69	0.320
平均値±S.D			8.54±4.03	19.73±6.57	0.430±0.137*

白内障水晶体			(C)	(P)	C/P
76	後囊下, 皮質	黄色	7.25	7.41	0.979
43	後囊下	透明	9.63	19.07	0.505
82	成熟	黄色	1.95	3.92	0.497
57	後囊下, 皮質	黄褐色	24.20	24.18	1.000
78	後囊下, 皮質	透明	3.63	7.26	0.500
69	後囊下, 皮質	透明	9.50	14.83	0.641
78	後囊下, 皮質	黄色	6.31	9.72	0.650
73	核混濁, 皮質	褐色	20.69	13.01	1.590
70	後囊下, 皮質	黄色	4.57	9.56	0.478
80	後囊下, 皮質	黄色	3.42	6.75	0.507
78	後囊下, 皮質	黄色	6.55	9.92	0.660
80	後囊下, 皮質	黄褐色	8.02	6.14	1.306
69	後囊下, 皮質	透明	3.18	11.88	0.268
60	後囊下, 皮質	黄白色	21.33	12.89	1.650
72	後囊下, 皮質	黄色	4.41	9.96	0.443
平均値±S.D			11.17±9.90	11.09±5.23	0.778±0.431**

また中心部の周辺部に対する GST 活性の比率 (C/P) は 0.430 ± 0.137 であった。

t 検定により、透明水晶体では C/P は 1 より小さいという結果が得られ、($p < 0.005$) * 透明水晶体では周辺部のほうが中心部より GST 活性が高いことが判明した。

又、老人性白内障水晶体の GST 活性は中心部 (C) では、 11.17 ± 9.90 (mU/mg protein) であり、周辺部 (P) で 11.09 ± 5.23 (mU/mg protein) であった。そして中心部の周辺部に対する GST 活性の比率 (C/P) は 0.778 ± 0.431 であった。

そして更に、中心部 GST 活性の周辺部 GST 活性に対する比率 (C/P) は白内障のほうに有意に高いということが判明した ($p < 0.05$) **。

つまり、老人性白内障水晶体では、中心部よりも周辺部の GST 活性が低下している傾向が見られることがわかった。

IV 考 按

GST は親電子的な異物をグルタチオン抱合することにより、メルカプツール酸として、水晶体外に排出する機構の initiator として働く酵素であり、白内障発生を防御している酵素の一つである。又、これまで、白内障水晶体と透明水晶体の双方において、白内障発生に対する防御作用を持つ酵素の活性を測定した結果、白内障眼では低下が見られているという報告は GST のみならず、他の酵素についても行われてきた。

ところで、水晶体周辺部では GST のみならず、アスコルビン酸、グルタチオン⁸⁾、superoxide dismutase (SOD)⁹⁾ においても、周辺部のほうが中心部よりも活性が高いことが報告されている。しかも、周辺部水晶体は虹彩により光エネルギーからも防御されている。その一方で、水晶体の中心部は近紫外線などの光エネルギーに晒されており、またトリプトファンなどの photosensitizer が多量に含有されている水晶体¹⁰⁾ において活性酸素が発生し易い¹¹⁾ ことは容易に想像される。更にそれらの活性酸素は細胞膜脂質及び、上皮細胞の DNA 等を損傷したりし易いのではと考えられる。従って、活性酸素等の radical 種や、光エネルギーなどの外的影響だけに対して見ると、あまりにも水晶体中心部は防御機構が弱い様に見受けられる。そして仮に老人性白内障水晶体の中心部のほうが周辺部より酵素活性の低下が顕著であるならば、その酵素活性の低下は光などの外的影響が大きな因子ではないかと推測される。

しかしその推測に反し本研究では、細胞活動性が高く radical scavenging system、及び異物代謝機構を多量に持っている水晶体周辺部のほうが、白内障眼においては酵素活性の低下が著しいという結果が得られた。すなわち紫外線などの外的影響を受けやすい水晶体中心部よりも水晶体周辺部のほうが、GST 活性の低下が強かった。

その原因は水晶体細胞自体の恒常性の維持に欠陥が生じたための酵素活性の低下ではないかと推測される。つまり、水晶体周辺部では細胞活動が高いがためにグルタチオンを中心とした水晶体の恒常性の維持に欠陥を生じる可能性及び確率が高く、それが白内障の発生を助長しているということを示唆している。そして、元来、光エネルギーは光酸化により、水晶体中のトリプトファンをキヌレニンに変え、クリスタリン分子の会合現象を促す¹²⁾ とされている。又、マニラなどの

紫外線の多い地域においては褐色核の白内障患者が多いこともいわれており¹³⁾、又、今回の実験でも褐色核白内障の中心部 GST 活性値が低下しているということは見られていない。従って光により発生する radical 種の処理は SOD などの酵素をあまり介さずにクリスタリン分子の会合、不溶化つまり核硬化現象によって行っている可能性が高い。以上の事実、老人性白内障の初発がほぼ全て周辺部から始まる¹⁴⁾という報告と照らし合わせてみると非常に納得がいくものがある。つまり、老人性白内障の発生に於いては水晶体周辺部に多く集まっている水晶体上皮細胞の内的環境の破綻のほうが、その発生に強く関わっており、それが水晶体周辺部の混濁、および白内障発生の防御酵素の一つである GST 活性の低下という形でも現れてくるのではないかと推測された。

今後は GST の遺伝的多型¹⁵⁾と白内障発症との疫学的相関について検索することも重要であると思われる。

本論文は第93回日本眼科学会総会において、関根が口演した。

文 献

- 1) **Awashi YC, Saneto RP, Srivastava SK:** Purification and properties of bovine lens glutathione-S-transferase. *Exp Eye Res* 30: 29—39, 1980.
- 2) **Rao GN, Sadasivudu B, Cotlier E:** Studies on glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in human normal and cataractous lenses. *Ophthalmic Res* 15: 173—179, 1983.
- 3) **Rathbun WB, Bovis MG, Holleschau AM:** Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione-S-transferase activities in the rhesus monkey lens as a function of age. *Curr Eye Res* 5(3): 195—199, 1986.
- 4) **Prohaska JR, Ganther HE:** Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 76: 437—445, 1977.
- 5) **Rathbun WB, Hanson SK:** Glutathione metabolic pathway as a scavenging system in the lens. *Ophthalmic Res* 11: 172—176, 1979.
- 6) **Ansari NH, Srivastava SK:** Role of glutathione in the prevention of cataractogenesis in rat lenses. *Curr Eye Res* 2(4): 271—275, 1982/1983.
- 7) **Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB:** Glutathione-S-transferase. *J Bio Chem* 249(22): 7130—7139, 1974.
- 8) **Reddy DVN, Klethi J, Kinsey VE:** Studies on the crystalline lens XII. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 5: 594—600, 1966.
- 9) 関根康生, 本村幸子, 原田勝二, 他: ヒト水晶体における SOD 活性の局在について. *眼臨* 82: 1003—1006, 1988.
- 10) **Cotlier E, Sharma YR:** Plasma tryptophan in senile cataract. *Lancet* 1: 607, 1980.
- 11) **Foote CS:** Mechanism of photosensitized oxidation. *Science* 162: 963—970, 1968.
- 12) **Kishida K, Paterson CA:** The influence of tryptophan and its metabolites upon rabbit lens electrolyte balance. *Curr Eye Res* 2: 309—315, 1982.
- 13) **Zigman S, Datiles M, Torczynsky E:** Sunlight and human cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 462—467, 1979.
- 14) 仁田正雄: 眼科学. 改訂第2版. 東京, 文光堂, 392, 1977.
- 15) **Harada S, Abei M, Goedde HW, et al:** Liver glutathione-S-transferase polymorphism in Japanese and its pharmacogenetic importance. *Hum Genet* 75: 322—325, 1987.