

# ラット正常水晶体及びガラクトース白内障水晶体タンパク質の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルによる解析

貝塚 由利子

京都府立医科大学眼科学教室

## 要 約

非侵襲的な測定法の一つであるプロトン核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H-NMR) スペクトロスコピー法を抽出した状態での正常及びガラクトース白内障ラット水晶体に適用し、**water suppression** と **resolution enhancement** を併用し高分解能<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを得、それらのタンパク質構造を検討した。抽出水晶体はメジウム中で NMR の測定を行った。正常ラット水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルでは乳酸のメチル基プロトンの共鳴線と水晶体タンパク質脂肪族アミノ酸側鎖プロトンによる幅広な共鳴線群が得られた。同一週齢ラット水晶体では線幅の狭小化は認められなかった。異なる週齢間ではスペクトルパターンに差異が認められたが線幅の変化は認められなかった。これに対しガラクトース白内障水晶体のスペクトルではタンパク質の共鳴線群に線幅の狭小化が認められた。この事実は白内障水晶体のタンパク質に生じた構造変化によるアミノ酸プロトン残基の易動性の変化がスペクトルパターンに反映されたことを示唆している。(日眼会誌 96:15-21, 1992)

キーワード：<sup>1</sup>H-NMR スペクトロスコピー、水晶体タンパク質、ガラクトース白内障

## <sup>1</sup>H-NMR Study on Protein of Normal and Galactose Cataractous Rat Whole Lenses

Yuriko Kaizuka

*Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine*

### Abstract

The non-invasive method of <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy was applied to rat whole lens. The alterations of aging and experimentally induced cataract on protein structures in rat lenses were examined by comparing high resolution <sup>1</sup>H-NMR spectra. <sup>1</sup>H-NMR measurements were carried out using the water suppression method and resolution enhancement method. The <sup>1</sup>H-NMR spectra of normal lens showed narrow resonance lines of lactate and broad ones of aliphatic amino acid residues of lens protein. There was no remarkable change in the spectral pattern of normal lenses within one week. There was also no effect of aging on the spectral pattern of normal lenses. On the other hand the lines due to the aliphatic amino acid residues of the galactose cataractous lens protein were narrower than those of normal lens. This finding suggests that the increase of mobilities of the residues caused by galactose cataract is reflected by the spectral pattern. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:15-21, 1992)

Key words: <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, Lens proteins, Galactose cataract

別刷請求先：602 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465 京都府立医科大学眼科学教室 貝塚 由利子  
(平成3年4月12日受付, 平成3年6月17日改訂受理)

Reprint requests to: Yuriko Kaizuka, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine.

465 Kajii-cho, Hirokojiagaru, Kawaramachidōri, Kamigyō-ku, Kyoto 602, Japan  
(Received April 12, 1991 and accepted in revised form June 17, 1991)

## I 緒 言

白内障の成因については未だ不明な点が多い、しかし水晶体重量の約30%を占める水晶体タンパク質の構造に変化を生じ、光の散乱を引き起こすため水晶体が白濁することはよく知られている<sup>1)2)</sup>、白内障における水晶体タンパク質の変化としては $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -クリスタリンの量的変化及び一次～高次構造の変化、高分子量タンパク質の増加と凝集による水溶性タンパク質の不溶化等がタンパク質の抽出、精製法を用いた生化学的研究によりこれまでに明らかになっている<sup>3)~7)</sup>。これらの変化が一次的に起こっているのか二次的なのかはまだはっきり解明されていないが、生体内での水晶体タンパク質の構造及びその変化を解析することは白内障の研究において重要と考えられる。

核磁気共鳴法(以下、NMR)は非侵襲的な実験方法の一つとして最近様々な分野で用いられている。ことに<sup>1</sup>H-NMR スペクトロスコピーは物質の分子構造、高次構造の解析方法のひとつとしてラマン分光法、X線回折法等と同様に広く用いられている。最近では水に含まれるプロトンの巨大な共鳴線を消去する手法が開発され、<sup>1</sup>H-NMR スペクトロスコピーを水分含有量の多い生体組織に適用することが容易になった。そのような方法のひとつが1331パルス系列を用いる water suppression 法である<sup>8)</sup>。しかし眼科領域では<sup>1</sup>H-NMR スペクトロスコピーを用いた研究としては Willis<sup>9)</sup>、Lerman<sup>10)</sup>、Garner ら<sup>11)</sup>の報告がわずかに見られるのみで、ことにタンパク質の解析方法として他の分野ほど<sup>1</sup>H-NMR スペクトロスコピーはまだ研究に取り入れられていない。

本論文ではこの water suppression <sup>1</sup>H-NMR 法を抽出されたままの状態での、正常水晶体及び実験的糖尿病性白内障モデルとして広く用いられているガラクトース白内障ラット水晶体に適用して加齢や白内障によるタンパク質構造の変化が NMR スペクトルにどのように反映されるかを解析した。

## II 実験方法

実験動物として雄ラット(Wistar系、4~10週齢)を用いた。ペントバルビタールの腹腔内投与で致死麻酔を行い、眼球摘出後顕微鏡下で水晶体を分離した。摘出した水晶体をならん侵襲を加えずメジウム中に37℃で1時間置いた後 NMR の測定を行った。メジウムとして岩田ら<sup>12)</sup>の HEPES メジウム (HEPES 10.0

mM, NaCl 136.2 mM, KCl 5.3 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 mM, CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 1.7 mM, Glucose 5.5 mM) を用いた。pH は 7.4 (37℃) に調整し、浸透圧は 286 mOsm であった。

ガラクトース白内障ラットは雄ラット(Wistar系、3~4週齢)に50%ガラクトース含有食餌を投与して得た<sup>13)14)</sup>。摘出した白内障水晶体は全て正常水晶体と同様の方法で NMR 試料とした。

NMR 測定試料は試料管(5 mm 径)中に同一個体のラットの両眼から摘出した水晶体2個をメジウムと共に入れた。この NMR 測定を用いたメジウムは前記 HEPES メジウムに 1.5 mM DSS (4,4-ジメチル-4-シラペンタンスルホン酸ナトリウム)を加え、10%重水を含む水溶液とした。DSS は化学シフトの内部基準として、重水は静磁場のロックのために用いた。

NMR 装置は高分解能超伝導磁石 NMR (ニコレー、NT-300, U.S.A.)を用い、プロトン観測周波数は 300 MHz であった。パルス系列は 1331 パルス系列で、この water suppression 法としてのパルス系列により巨大な水のプロトン NMR 信号を縮小し、かつプロトン NMR スペクトルの分解能を向上させるため、FID (free induction decay) と sine 関数の積をフーリエ変換してスペクトルを得る resolution enhancement 法を用いた。積算回数は 2,048 回で、測定温度は 30℃ に保った。

## III 結 果

### 1. 正常ラット水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

正常ラット水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの代表例を図1に示す。図1上が5週齢の正常ラット水晶体のスペクトル、図1下がメジウムのみスペクトルである。横軸は DSS (D) を基準とする化学シフト値を示す。メジウムのスペクトルには DSS と HEPES (H) による共鳴線が著明にみられた。正常水晶体のスペクトルでは 1.8 ppm に乳酸のメチル基プロトンによる共鳴線(L)、そして 3~4 ppm に水晶体タンパク質の脂肪族アミノ酸側鎖プロトンによる共鳴線群(P)が認められた。低分子量物質の共鳴線に比べ、高分子量である水晶体タンパク質の共鳴線群の線幅が非常に幅広になっているのが特徴的であった。

### 2. 同一週齢の正常ラット水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

図2に異なる3個体で得た4週齢正常ラット水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示した。低分子量である乳酸

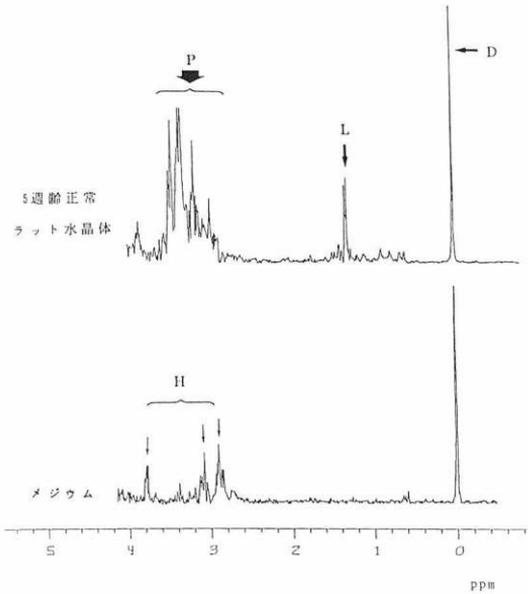


図1 正常ラット水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル。上が5週齢の正常水晶体のスペクトル、下がメジウムのみのスペクトルである。D: DSS, L: 乳酸, P: 水晶体タンパク質脂族アミノ酸側鎖, H: HEPES のそれぞれの共鳴線を示す。

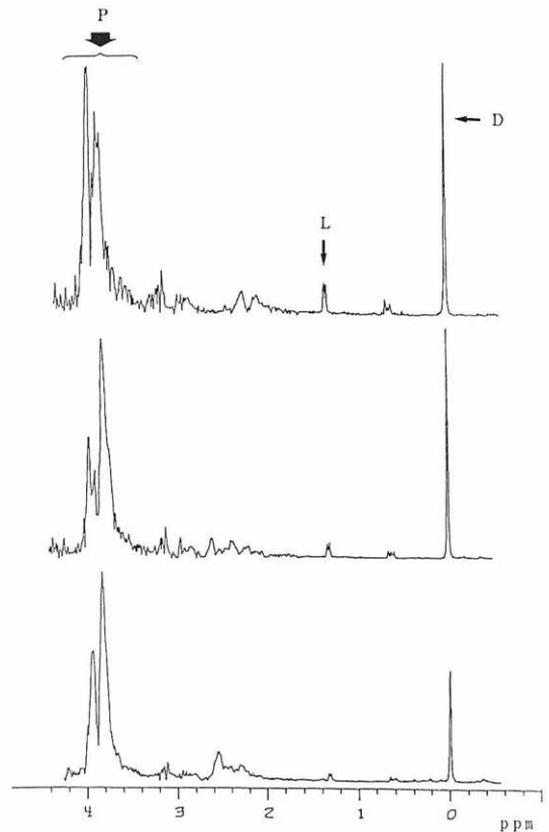


図2 同一週齢の正常水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル (4週齢)。同じ4週齢の異なる個体の正常ラット水晶体のスペクトルを示す。水晶体タンパク質による共鳴線群は2つの幅広な共鳴線群よりなる類似のスペクトルパターンを示した。

と DSS の共鳴線が 3 例とも認められた。また同一週齢の正常ラット水晶体において水晶体タンパク質脂族アミノ酸側鎖プロトンによる共鳴線群は、若干の個体差がみられるが 2 つの幅広な共鳴線群よりなる類似のスペクトルパターンを示した。

### 3. 異なる週齢の正常ラット水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

異なる週齢の正常ラット水晶体のスペクトルの代表例を図3に示した。上から5週齢、7週齢、10週齢の正常ラット水晶体である。同一週齢の場合と同様乳酸による共鳴線には差異は認められなかった。一方、水晶体タンパク質による共鳴線群には同一週齢の場合に比しスペクトルパターンに大きな変化が認められた。しかしいずれの週齢においてもタンパク質脂族アミノ酸側鎖プロトンによる共鳴線群は幅広なスペクトルパターンを示した。

### 4. ガラクトース白内障ラット水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

糖尿病性白内障モデルのひとつである実験的ラットガラクトース白内障水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの代表例を図4に示す。これは50%ガラクトース食餌開始後21日目、水晶体には検眼鏡的に皮質白内障及び

核白内障が認められた。

ガラクトース白内障の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルに乳酸の共鳴線が正常水晶体と同様に認められ、さらに正常水晶体には見られないガラクトールの共鳴線(G)が認められた。また正常水晶体では2つの幅広な共鳴線群からなっていた水晶体タンパク質脂族アミノ酸側鎖プロトンによる共鳴線群は、ガラクトース白内障水晶体では1群のみの共鳴線群のスペクトルパターンを示した。

### 5. ガラクトース白内障の経過と<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

図5に50%ガラクトース含有食餌投与開始後の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを経時的に示した。ガラクトース食餌開始後初期(4日目)では化学シフト値3~4 ppmに2群の水晶体タンパク質の共鳴線群が認められる

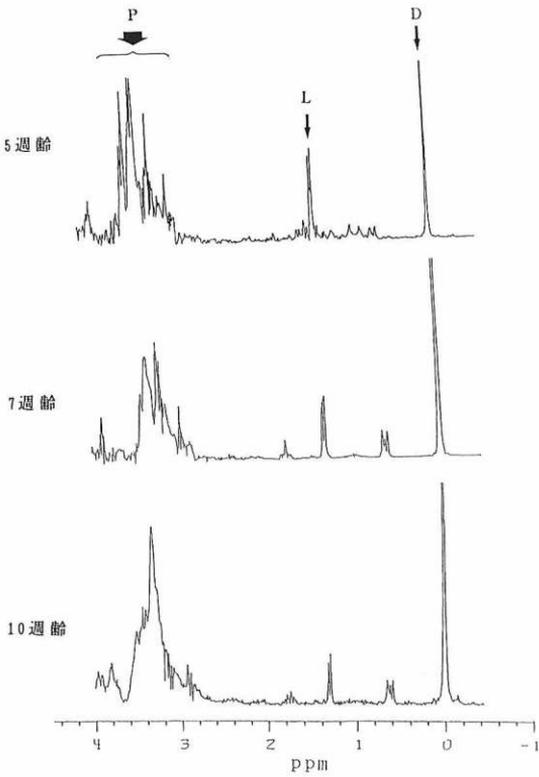


図3 異なる週齢の正常水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル。上から5週齢, 7週齢, 10週齢の正常ラット水晶体のスペクトルである。水晶体タンパク質の共鳴線群のスペクトルパターンは週齢により差異が認められたが、幅広である点で共通していた。

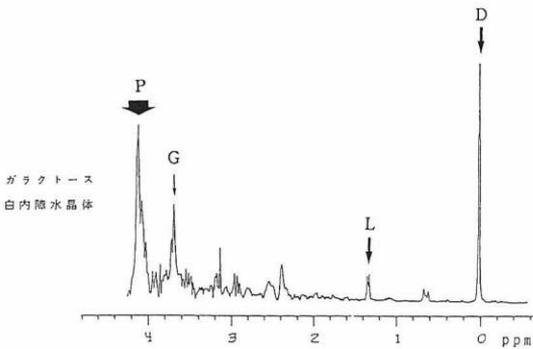


図4 ガラクトース白内障水晶体の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル。50%ガラクトース含有食餌投与開始後21日目の白内障水晶体のスペクトルである。G: ガラクチトールの共鳴線を示す。ガラクトース白内障の水晶体タンパク質の共鳴線群には線幅の狭小化が認められた。

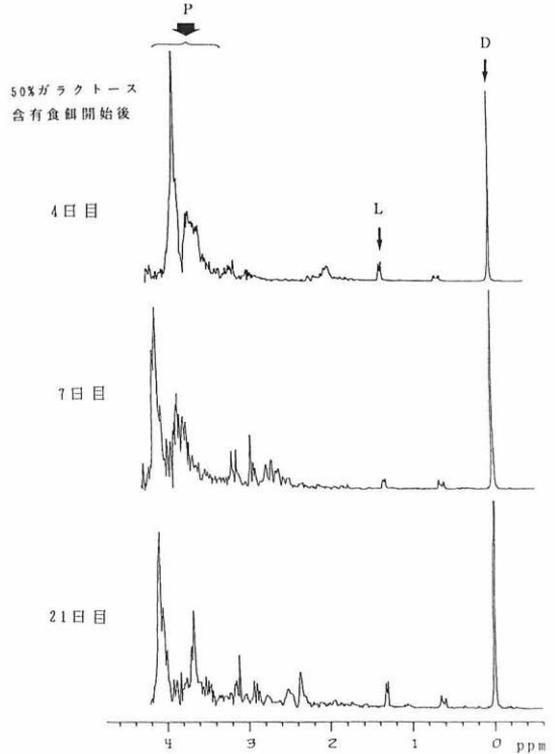


図5 ガラクトース白内障の経過と<sup>1</sup>H-NMR スペクトル。50%ガラクトース含有食餌投与開始後4日目, 7日目, 21日目のスペクトルを示す。白内障の進行に伴いスペクトルパターンの変化も著明に認められた。

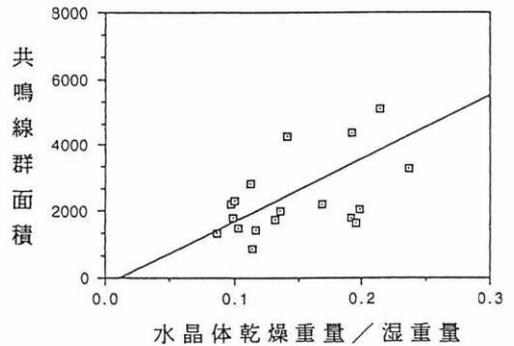


図6 白内障水晶体重量と水晶体タンパク質による共鳴線群の面積の関係。横軸はガラクトース白内障水晶体の乾燥重量と湿重量の比、縦軸はガラクトース白内障の水晶体タンパク質脂肪族アミノ酸側鎖プロトンによる共鳴線群の面積である。水晶体の相対的な乾燥重量成分の量的変化は<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの面積に反映されていた。

が、長期投与後(21日目)では4ppmに1群のみの共鳴線群のスペクトルパターンに変化している。

#### 6. 白内障水晶体重量と共鳴線群の面積の関係

ガラクトース白内障水晶体の重量と、その<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの水晶体タンパク質脂肪族アミノ酸側鎖プロトンによる共鳴線群の面積との関係を図6に示した。横軸は白内障水晶体の乾燥重量と湿重量の比をとったもので、これはガラクトース白内障の進行の程度を表す指標となると考えられる<sup>13)14)</sup>。縦軸は白内障水晶体タンパク質の共鳴線群の面積である。相関係数0.58で図に示す直線関係が得られた。水晶体の相対的な乾燥重量成分が少ないほど共鳴線の面積も小さく、多いほど面積も大きいという関係が得られ、水晶体タンパク質の相対的な量的変化が水晶体タンパク質による<sup>1</sup>H-NMRの共鳴線の面積に反映されると考えられた。

## IV 考 按

高い静磁場とラジオ波パルスを用いるNMR法は非侵襲的な測定法であり、また観測核は核スピンを持つ<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>31</sup>P、<sup>23</sup>Naなどの生体関連物質に多く含まれるものであるため生物を対象とする応用範囲の広い研究方法として最近各分野で多用されている。ことに<sup>1</sup>H-NMRスペクトロスコピーはほとんどの物質にも含まれているプロトンを観測する方法であり、特に適用範囲が広い。しかし従来、水溶液や水分含有量の多い生体組織では水に含まれるプロトンによる共鳴線が非常に大きく、他の低濃度物質の共鳴線をS/N比良く測定することは非常に困難であった。この欠点を克服する方法のひとつが水の共鳴周波数付近の共鳴線の信号強度を減少させる1331パルス系列のwater suppression法であり、これにより水分含有量の多い生体組織のスペクトルが水を重水と置換することなくS/N比良く観測されるようになった<sup>9)</sup>。本法の<sup>1</sup>H-NMRの水晶体での有用性は乳酸メチル基プロトンやガラクトール、脂肪族アミノ酸側鎖共鳴線を得たことから証明されたといえる。

水晶体タンパク質が規則的構造を保つことが水晶体の透明性を維持するのに非常に重要であることはよく知られている。しかしこれまでは水晶体タンパク質を精製した状態での研究がほとんどであり<sup>15)~17)</sup>、実際の生体内での水晶体タンパク質の状態とは必ずしも一致しないと考えられる。これに対し、<sup>1</sup>H-NMRスペクトロスコピーは非侵襲的な構造解析が可能である。また

同じく非侵襲的な解析法であるラマン分光法<sup>18)19)</sup>と比較してもNMRはラマン分光における測定対象である分子振動ではなく原子そのものを直接観測できるという利点がある。NMRスペクトロスコピーを用いた研究としては、これまで眼科領域では<sup>31</sup>P-NMRスペクトロスコピーによるエネルギー代謝の研究が中心であり、これに対し<sup>1</sup>H-NMRスペクトロスコピーはWillisらのhexose monophosphate shuntの研究<sup>9)</sup>、あるいはGarnerらの $\gamma$ -IIクリスタリンの構造解析の研究<sup>11)</sup>にわずかに用いられているのみである。

タンパク質の構造解析は4つの段階に分けられる。すなわち一番基本的な一次構造はアミノ酸の配列順序であり、二次構造はそのアミノ酸の鎖が軸方向に沿ってつくる規則的な構造であり $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シート構造と言われる。三次構造は鎖が折り畳まれてつくられた球状構造で、四次構造はその三次構造が集まってできる大きな複合構造体である。このようにタンパク質は非常に複雑な構造をとるが、<sup>1</sup>H-NMRスペクトロスコピーはそのようなタンパク質を構成するアミノ酸のプロトンの共鳴線を得ることによりその高次構造まで分析することができる点で有用である。

本実験では1331パルス系列によるwater suppression法を用い、水晶体をホモゲナイズすることなく水晶体タンパク質による共鳴線群を得ることができた。タンパク質を構成するアミノ酸には芳香族アミノ酸と脂肪族アミノ酸の二種類がある。このうち前者はNMRスペクトルでは水のピークより低磁場側に化学シフトし、後者は水より高磁場側に化学シフトしてピークが現れる。水晶体を構成するタンパク質のアミノ酸分析では脂肪族アミノ酸がより多くを占める<sup>20)21)</sup>。本実験においては水のピークより高磁場側に共鳴線がみられることが知られている脂肪族アミノ酸領域のスペクトルについて検討した。正常水晶体においては水晶体タンパク質構成脂肪族アミノ酸プロトンは幅広い共鳴線群を示した。このようなスペクトルパターンは水晶体タンパク質が高分子量で秩序だった構造を持ち、タンパク質を構成するアミノ酸の側鎖プロトンの易動性が低い、すなわちプロトンが動きにくいことを示唆している。同一週齢ではほぼ同じスペクトルパターンを示した。一方異なる週齢の正常ラット水晶体ではスペクトルパターンに違いが認められた。水晶体タンパク質では加齢にともない水溶性タンパク質の減少、不溶性タンパク質の増加、また巨大分子量会合体の形成が知られている<sup>11)~17)</sup>。このスペクトルパ

ターンの違いは4~10週齢というラットの成長に伴うこのような水晶体タンパク質の構造変化がスペクトルパターンに反映されたためと考えられる。しかし本実験での週齢の範囲内では成長に伴う特異的なスペクトルの変化は特定されなかった。しかしいづれの週齢においても正常水晶体では幅広い共鳴線群を示す点で共通していた。

これに対しガラクトース白内障水晶体ではタンパク質の共鳴線群は線幅の狭小化を示し、正常水晶体のような幅広いスペクトルパターンではなかった。DSSや乳酸などの低分子量物質の共鳴線には線幅の変化がみられないことから、このタンパク質の共鳴線群のパターン変化が静磁場の不均一性によるものではないことは明らかである。従ってこの線幅の狭小化は白内障における水晶体タンパク質の変化を反映するものと考えられる。すなわち水晶体タンパク質の秩序だった構造が乱れたことにより、アミノ酸側鎖がより動きやすくなるような構造変化が生じたことが<sup>1</sup>H-NMRの共鳴線のスペクトルパターンに反映されたと言える。ガラクトース白内障においてタンパク質量が減少することが知られている<sup>13)14)</sup>。この水晶体タンパク質の量的及び質的变化は図6に示したように共鳴線群の面積に反映されている。

本実験のように水晶体を破碎することなく水晶体タンパク質の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルが測定できたことは今後の *in vivo*, *in situ* での水晶体へのNMRの適用、白内障の臨床診断にとって有意義であると考えられる。

本論文の要旨は第94回日本眼科学会総会(1990年5月24日~26日, 岡山市)にて発表した。

稿を終えるにあたり、研究の機会を与えてくださった京都府立医科大学眼科学教室糸井素一名誉教授、また研究全般にわたりご指導、御校閲を賜りました明治鍼灸大学生理学教室西川弘恭教授、ならびに終始ご指導いただきました京都府立医科大学第一生理学教室森本武利教授及び化学教室森山祥彦教授に深謝致します。

#### 文 献

- 1) **Mostafapour MK, Schwartz CA**: Age-related changes in the protein concentration gradient and the crystallin polypeptides of the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 606-612, 1982.
- 2) 山本覚次: 白内障に関する諸問題. 1. 水晶体の加齢と老人性白内障の発症過程について. *日眼会誌* 86: 1859-1892, 1982.
- 3) **Jedziniak JA, Kinoshita JH, Yates EM, et al**: On the presence and mechanism of formation of heavy molecular weight aggregates in human normal and cataractous lenses. *Exp Eye Res* 15: 185-192, 1973.
- 4) **Kuck JFR, Kuck KD**: The Emory mouse cataract: Loss of soluble protein, glutathione, protein sulfhydryl and other changes. *Exp Eye Res* 36: 351-362, 1983.
- 5) **Barron BC, Kuck JFR, Kuck KC**: The Emory mouse cataract: Changes in the  $\beta$  and  $\gamma$ -crystallins during aging and cataractogenesis as revealed by isoelectric focusing of the native soluble proteins. *Curr Eye Res* 3: 1365-1372, 1984.
- 6) 山本覚次, 錦織敏治, 栗本良子, 他: 老人性白内障水晶体の蛋白凝集について. *眼紀* 35: 1789-1794, 1984.
- 7) **Krivandin AV, Lvov YM, Ostrovski MA, et al**: Structural conversions of crystallins under senile cataract, dehydration and UV-irradiation studied by X-ray diffraction. *Exp Eye Res* 49: 853-859, 1989.
- 8) **Hore PJ**: Solvent suppression in Fourier transform nuclear magnetic resonance. *J Magn Resonance* 55: 283-300, 1983.
- 9) **Willis JA, Williams WF, Schleich T**: Dynamic assessment of hexose monophosphate shunt activity in the intact rabbit lens by proton NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 1068-1073, 1986.
- 10) **Lerman S**: In vivo and in vitro biophysical studies on human cataractogenesis. *Lens Res* 3: 137-160, 1986.
- 11) **Garner WH, Balaji VN**: Structure analysis of bovine lens calf gamma-II crystallin: Residue assignments of the five histidine CE1 resonances observed by proton-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Curr Eye Res* 7: 777-788, 1988.
- 12) 岩田修造: 水晶体. 東京, メディカル葵出版, 429-430, 1986.
- 13) **Kinoshita JH**: Cataracts in galactosemia. *Invest Ophthalmol* 4: 786-799, 1965.
- 14) **Kador PF, Zigler S, Kinoshita JH**: Alterations of lens protein synthesis in galactosemic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 696-702, 1979.
- 15) **Wagner BJ, Fu SCJ**: Characterization of lens proteins. II.  $\gamma$ -crystallin of normal and cataractous rat lenses. *Exp Eye Res* 26: 255-265, 1978.
- 16) **Siezen RJ, Bindels JG, Hoenders HJ**: The quaternary structure of bovine  $\alpha$ -crystallin. *Eur*

- J Biochem 111: 435—444, 1980.
- 17) **Tardieu A, Laporte D, Licinio P**, et al: Calf lens  $\alpha$ -crystallin quaternary structure. J Mol Biol 192: 711—724, 1986.
- 18) **Ozaki Y, Mizuno K, Yoshiura M**, et al: Raman spectroscopic study of age-related structural changes in the lens proteins of an intact mouse lens. Biochem 22: 6254—6259, 1983.
- 19) **尾崎幸洋, 入山啓治**: 水晶体の老化・白濁化と水晶体蛋白質の構造変化. 蛋核酵 33: 1098—1110, 1988.
- 20) **植木 厚**: 生化学データブック [ I ]. 東京, 東京化学同人, 291—292, 1979.
- 21) **岩田修造**: 水晶体. 東京, メディカル葵出版, 65—111, 1986.
-