

ラット眼房水の遊離アミノ酸とその関連化合物

—I. 加齢経過と遺伝性白内障—

飯島 武¹⁾, 佐藤 永雄¹⁾, 門福 強樹¹⁾, 竹田 稔²⁾

紀平 弥生³⁾, 矢部 伸幸³⁾, 小出 良平³⁾

¹⁾昭和大学医学部第二生化学教室

²⁾昭和大学医学部第一生化学教室

³⁾昭和大学医学部眼科学教室

要 約

ラット房水の遊離アミノ酸とその関連化合物を正常ウイスター系ラット房水を対照に遺伝性白内障ラット (Ihara cataract f-strain/ICR) の加齢経過ごとに測定した。ラット房水中に一番多く検出されるアミノ酸は ICR ラット 16, 70 週齢以外はタウリンであった。加齢経過で増加するセリンとグルタミン, 減少するアスパラギン酸, プロリンとグリシンは加齢現象との関係が推察されるアミノ酸であった。水晶体混濁との関係で興味を示すアミノ酸は, ① ICR ラット 4, 16, 70 週齢でウイスター系ラットより減少するタウリン, ② ウイスター系

ラットで増加傾向を ICR ラットで減少傾向を示すアラニンとシトルリン, ③ ICR ラットで加齢に伴い増加するヒスチジンである。房水の遊離アミノ酸の変動は ICR ラットで大きく, 白内障, 血液や虹彩・毛様体からのアミノ酸の輸送などの考察に有意義と考える。(日眼会誌 99: 521—525, 1995)

キーワード: 遊離アミノ酸, 眼房水, 白内障, 加齢, タウリン

Distribution of Free Amino Acids and Related Compounds in Ocular Fluids of Rat

—I. Aging and Inherited Cataracts—

Takeru Iijima¹⁾, Tuneo Sato¹⁾, Tuyoki Kadofuku¹⁾, Minoru Takeda²⁾,
Yayoi Kinohira³⁾, Nobuyuki Yabe³⁾ and Ryouhei Koide³⁾

¹⁾Second Department of Biochemistry, Showa University School of Medicine

²⁾First Department of Biochemistry, Showa University School of Medicine

³⁾Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine

Abstract

The distribution of free amino acids and their related compounds has been determined in the aqueous humors of Wistar strain and Ihara cataract f-strain (ICR) aging rats. Taurine was the most abundant amino acid in aqueous humors except in ICR rats of 16 and 70 weeks. It was supposed that the increase of serine and glutamine, and the decrease of aspartate, proline and glycine in aqueous humors were related to aging. There were interesting changes in amino acids related to opacity of lens, concentration of taurine was lower than that of Wistar rats in ICR rats of 4, 16, and 70 weeks,

alanine and citrulline increased in Wistar rats and decreased in ICR rats, and histidine increased in ICR rats with aging. The changes in free amino acids in aqueous humors were the greatest in ICR rats, and these data will provide useful clues for the formation of cataract and the transportation of amino acids. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 521—525, 1995)

Key words: Free amino acids, Aqueous humor, Cataract, Aging, Taurine

別刷請求先: 142 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学医学部第二生化学教室 飯島 武
(平成6年10月24日受付, 平成6年12月27日改訂受理)

Reprint requests to: Takeru Iijima M.D. Second Department of Biochemistry, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

(Received October 24, 1994 and accepted in revised form December 27, 1994)

I 緒 言

水晶体の外部環境因子の一つである房水は、水晶体の透明性を維持するために必要な物質を含有している。房水成分の大部分は血漿由来であるが、毛様体における房水成分の産生は、血液-房水柵により調節されている。房水の成分組成を血漿や水晶体中の濃度に比較することは興味深く、ヒト¹⁾、ウサギ^{2)~4)}で数多くの研究者により報告されている。ラット房水の成分組成で、タンパク質については矢部ら⁵⁾の電気泳動法による解析がある。しかし、アミノ酸組成についてはカラムクロマトグラフィによる Reddy⁶⁾の報告のみである。

本研究は、ラット房水中の遊離アミノ酸とその関連化合物(両者を総称してアミノ酸と省略)量の測定から、水晶体の加齢と混濁について検討した。

II 方 法

1. 材 料

1) 実験動物

遺伝性白内障ラットは Ihara cataract rat f-strain (以下、ICR ラット)、対照はウィスター系ラットのいずれも 4, 8, 16, 70 週齢の雄を使用した。

2) 試 薬

スルホサリチル酸、クロロホルム、アミノ酸分析用試薬は和光純薬社から購入した。

2. アミノ酸分析

アミノ酸分析は既報のラット水晶体の測定法に準じて行った⁷⁾。

1) 試料の採取

エーテル麻酔したラットを頸椎脱臼で屠殺した。開胸して心臓から血液採取後、眼球摘出を行った。摘出眼球からの房水採取は、顕微鏡下で角膜から 30 G 針を刺入して軽く 1 回採取し、計量後凍結保存した。房水量は 4 週齢 5~6 μg 、8 週齢 11~16 μg を 1 個の眼球から採取した。16 週齢以上のラットでは 15 μg 以上採取できた。8 週齢以上では分析に必要な 10 μl 以上採取できるため片眼を使用した。水晶体を細隙灯顕微鏡で観察すると、ウィスター系ラット 4, 8, 16 週齢と ICR ラット 4 週齢水晶体は透明であった。ICR ラット 8 週齢水晶体は後囊被膜下の Y 字縫合部にかすかな白濁が認められ、16 週齢では前囊皮質下まで拡大した。ウィスター系ラット 70 週齢水晶体は後囊下にかすかな濁りを示すものもあった。

2) 試料の調整

採取した房水 10 μl に除タンパク質のためにスルホサリチル酸(終濃度 2%)と、脂質を除くためにクロロホルム(適量)を加え室温に 20 分間放置した。遠心分離(1,000 \times g, 20 分間)で得られた上清をアミノ酸分析計で測定した。4 週齢ラットの房水は少量しか採取できないため、両眼を合わせて試料の調整を行った。アミノ酸測

定は、ウィスター系ラット 4 週齢 8 個、ICR ラット 4 週齢 12 個、8, 16, 70 週齢はウィスター系ラット、ICR ラットとも 12 個使用した。

III 結 果

1. 房水中に検出されるアミノ酸

ウィスター系ラット房水中に一番多く検出されたアミノ酸は、4 週齢(960 nmoles/ml)、8 週齢(444 nmoles/ml)、16 週齢(545 nmoles/ml)、70 週齢(906 nmoles/ml)で、全週齢ともタウリンであった。ICR ラットの 4, 8 週齢はタウリン、16, 70 週齢はグルタミンであった。二番目はウィスター系ラット 4 週齢リジン、8, 16, 70 週齢グルタミン、ICR ラット 4, 8 週齢はグルタミン、16, 70 週齢はタウリンであった。三番目はウィスター系ラット 4, 16, 70 週齢アラニン、8 週齢リジンであった。ICR ラットは全週齢アラニンであった。

2. 加齢経過(4, 8, 16, 70 週齢)に伴うアミノ酸量

ウィスター系ラットの加齢経過に伴い、逐次増加するアミノ酸はみられなかった。しかし、タウリン、セリン、アスパラギン、グルタミン、アラニン、シトルリンは、16 週齢から加齢に伴い増加した。シスチンは 8 週齢(18.8 nmoles/ml)で 4 週齢(6.3 nmoles/ml)の 3 倍以上に増加するが、その後の加齢でも増加しなかった。

ICR ラットで加齢経過に伴って増加するアミノ酸は、セリン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジンであった。

ウィスター系ラットで加齢経過に伴って減少するアミノ酸は、アスパラギン酸、プロリン、グリシンであった。チロシン、リジン、アルギニンは 16 週齢まで減少し、70 週齢で増加した。

ICR ラットで加齢経過に伴って減少するアミノ酸はみられなかった。プロリン、シトルリン、チロシン、リジン、アルギニンも 16 週齢まで減少し、70 週齢で増加した。

3. ウィスター系ラットと ICR ラットの比較

ウィスター系ラットと ICR ラットの同週齢間で比較して ICR ラットで 30% 以上の増加を示すアミノ酸は、4 週齢はオルニチン(+34%)だけである。8 週齢はメチオニン(+36%)、オルニチン(+49%)、ヒスチジン(+31%)である。16 週齢はヒスチジン(+40%)のみである。70 週齢はアスパラギン酸(+87%)、スレオニン(+57%)、グルタミン酸(+105%)、プロリン(+90%)、グリシン(+43%)、バリン(+33%)、シスチン(+114%)、メチオニン(+43%)、オルニチン(+56%)、ヒスチジン(+59%)である。

ウィスター系ラットと ICR ラットの同週齢間の比較で、ICR ラットで 30% 以上の減少を示すアミノ酸は、4 週齢タウリン(-48%)、アスパラギン酸(-77%)、セリン(-30%)、アスパラギン(-34%)、グルタミン酸(-

46%), グリシン (-34%), ロイシン (-31%), フェニルアラニン (-38%), エタノールアミン (-35%) である。8週齢はシスチン (-62%) である。16週齢はグルタミン酸 (-46%), シスチン (-62%), リジン (-39%) である。70週齢で減少を示すアミノ酸はなく、タウリンが-19%の減少を示した。

4. 加齢経過による変動のみられないアミノ酸

ウィスター系ラットではバリリン(112~143 nmoles/ml), メチオニン(43~54 nmoles/ml), イソロイシン(49~56 nmoles/ml), ロイシン(98~124 nmoles/ml), フェニルアラニン(86~103 nmoles/ml), オルニチン(21~23 nmoles/ml) である。ICRラットではみられず、アラニンが240~325 nmoles/mlを示した。

IV 考 按

房水は採取法によって、正常房水の性質が消失し二次房水の性質を帯びて血清の組成に類似してしまう。この点について、矢部ら⁵⁾がラット房水を電気泳動法でタン

パク質分析を行い、二次房水の影響もエーテル麻酔による影響も認めなかった。

4週齢ラットは採取できる房水量が少なく、両眼を使用した。8, 16, 70週齢は片眼で測定したが、同一個体の場合は左右差は認められなかった。

ウィスター系ラット, ICRラットとも房水中に検出されるアミノ酸は24種類であった。Reddy⁶⁾は7週齢ラット房水でシスタチオンを含む19種類のアミノ酸を報告している。しかし、アスパラギン, シスチン, グルタミンとエタノールアミンは報告されていない。今回の実験において、8週齢ウィスター系ラット房水中にアスパラギンとエタノールアミンは同量検出され、グルタミンはタウリンに次いで二番目に多いアミノ酸であった。ICRラット16, 70週齢以外、両ラット房水中に検出されるアミノ酸で一番多いのはタウリン、次がグルタミンであった。ICRラット16, 70週齢はグルタミン, タウリンの順であった。今回の測定でシスタチオンは痕跡程度であった。

表1 ラット房水遊離アミノ酸とその誘導体

	4 週 齢				8 週 齢				16 週 齢				70 週 齢			
	ウィスター		ICR		ウィスター		ICR		ウィスター		ICR		ウィスター		ICR	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
タウリン	960.8	175.8	494.2	44.8	444.9	31.7	501.4	64.2	545.2	79.9	450.3	130.3	906.7	187.4	738.4	88.5
アスパラギン酸	21.1	4.0	4.8	0.5	13.2	2.1	13.4	2.0	8.3	3.9	9.0	1.2	5.7	1.9	10.7	1.8
スレオニン	210.2	24.7	192.5	11.1	233.6	26.1	206.0	17.7	185.5	30.4	135.8	12.2	241.9	11.4	224.1	38.7
セリン	127.2	18.9	90.3	10.2	110.5	16.5	115.3	15.8	146.5	15.2	127.7	17.9	191.3	15.0	206.8	14.5
アスパラギン	28.3	3.4	18.7	3.8	21.3	1.9	23.1	1.7	24.6	3.7	26.4	5.5	38.4	6.3	33.2	2.9
グルタミン酸	110.1	25.8	59.2	5.6	63.6	6.1	79.6	8.6	92.9	1.1	49.9	6.6	57.4	9.9	118.0	26.8
グルタミン	378.3	20.7	340.5	72.9	348.1	26.4	376.4	60.4	530.5	44.3	473.7	46.9	660.0	39.9	842.9	202.3
プロリン	100.1	16.8	91.3	14.5	70.6	11.7	90.3	9.3	65.4	18.6	55.7	7.0	63.0	4.7	120.2	7.1
グリシン	225.9	15.1	148.2	14.3	190.1	21.2	179.5	45.7	176.7	20.6	129.8	16.0	137.1	16.9	197.2	58.5
アラニン	378.5	22.3	325.0	64.3	277.7	49.1	296.0	58.8	293.4	36.9	239.8	24.9	333.2	29.8	313.8	17.5
シトルリン	39.1	5.9	48.4	3.5	32.0	6.3	33.4	4.6	37.7	10.1	29.9	6.5	55.0	6.4	57.3	12.1
バリリン	143.5	19.5	109.8	9.9	117.3	7.1	146.7	16.9	128.3	18.1	96.2	7.7	112.5	7.3	150.5	9.0
シスチン	6.3	2.9	5.6	1.2	18.2	5.1	6.9	1.1	16.1	3.9	6.1	2.6	9.0	3.7	19.4	11.2
メチオニン	47.0	5.0	43.5	3.2	43.2	5.5	58.9	2.1	49.2	5.8	58.2	5.7	54.6	2.8	78.1	15.2
イソロイシン	56.8	8.5	51.1	5.3	49.8	5.6	62.8	6.9	54.2	8.2	40.5	5.1	51.3	7.4	58.0	5.8
ロイシン	124.3	12.8	85.4	15.0	101.0	6.9	125.0	14.3	110.4	18.5	90.3	11.4	98.5	5.7	127.0	4.7
チロシン	132.3	29.2	145.9	14.6	94.5	23.1	115.2	11.6	89.0	16.6	74.6	9.6	100.2	6.4	111.6	12.1
フェニルアラニン	86.7	12.3	53.6	3.9	87.3	4.5	93.4	12.3	103.9	7.0	100.3	11.4	87.4	8.9	91.8	5.8
トリプトファン	30.5	2.9	18.2	1.7	24.4	2.3	28.5	5.1	23.4	3.7	23.4	3.8	24.2	1.7	29.1	2.9
エタノールアミン	27.5	3.7	17.7	1.5	20.2	3.5	24.1	3.5	16.7	6.9	19.3	4.2	27.3	3.6	22.9	2.9
オルニチン	22.3	2.6	29.9	4.2	21.3	4.9	31.8	5.6	21.8	3.7	21.7	3.9	23.9	3.6	37.4	5.5
リジン	398.4	40.8	293.4	20.9	305.2	25.3	216.9	9.5	273.9	36.0	167.7	19.8	309.8	17.3	258.2	44.7
ヒスチジン	50.9	5.5	40.6	4.2	47.6	6.9	62.7	5.7	50.4	4.2	70.8	7.3	61.1	4.9	97.7	13.3
アルギニン	104.9	6.5	133.6	16.1	96.9	41.4	102.5	3.2	76.1	17.0	81.4	11.2	114.1	8.0	127.2	15.4

平均値は nmoles/ml 房水

ウィスター：ウィスター系ラット, ICR：Ihara cataract rat f-strain

4週齢ウィスター系ラットのタウリンは790~1,100 nmoles/mlの範囲で検出され、再測定でもこの範囲内であった。タウリンがICRラット16,70週齢以外の各週齢で一番多く検出された。水晶体⁷⁸⁾と同様に房水においてもタウリンが最も多い。タウリンが白内障水晶体で減少する報告⁹⁾もある。タウリンはICRラット16,70週齢で同週齢のウィスター系ラットより少なく、水晶体混濁との関係で興味を示されるアミノ酸であった。

セリンとグルタミンは4週齢と8週齢の差が少なく、また、4週齢に比較して70週齢ではそれぞれ1.5倍と1.7倍に増加した。セリンの一般的代謝はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼによるグリシンと葉酸への開裂と、セリンデヒドロゲナーゼによるピルビン酸への変換である。放射性セリンを加えてウシ水晶体を培養すると放射能がグルタチオンに検出される¹⁰⁾。加齢経過に伴うセリンの増加は、眼房周囲組織でのこれらの代謝能の低下と、セリンを多量に含む虹彩・毛様体¹¹⁾の影響によると推察した。

ウィスター系ラット70週齢のアスパラギン酸は、4週齢の27%までに減少する。含有量は少ないが、加齢に関係するアミノ酸と考えられた。虹彩・毛様体ではタウリンに次いで含有量の多いアミノ酸であるにも関わらず¹¹⁾、房水で少ないのは虹彩・毛様体に運搬機構が存在し、老化により影響されたと考えられた。

加齢に伴って減少するグリシン、プロリンは、グルタチオンとコラーゲンのそれぞれ構成成分である。水晶体プロリンはグルタミン酸から酵素的還元によって生成される報告¹²⁾もあるが、房水中にこれらを触媒する酵素の存在は考え難い。グリシン、プロリンは濃度依存的に培養水晶体に流入し、加齢に伴って減少することから⁷⁾、水晶体など眼房周囲組織の濃度を反映していると考えられた。

房水中のグルタミンは、タンパク質構成アミノ酸20種類の中で最も多く(表1)、ヒトや¹⁾、イヌ¹³⁾の房水でも含有量の最も多いアミノ酸である。水晶体や虹彩・毛様体などの組織ではグルタミン酸がグルタミンより多く¹¹⁾、血漿や房水などの体液ではグルタミンがグルタミン酸より多い¹¹⁾。水晶体では、房水からグルタミンを取り入れてグルタミン酸として、タンパク質やグルタチオンの合成に利用している¹⁴⁾¹⁵⁾。ウィスター系、ICR両ラットとも房水ではグルタミン酸よりグルタミンの方が多く、70週齢でグルタミンの著しい増加が認められた。老化による眼房周囲組織のアミノ酸代謝の抑制が考えられた。アスパラギンはグルタミンに比べて含有量は少ないものの、両アミノ酸とも房水の酸塩基平衡に重要な役割をしているアミノ酸と考えられた。

ICRラット8週齢からの加齢経過に伴い増加するセリン、アスパラギン、グルタミンは、ウィスター系ラットでは16週齢から増加するアミノ酸であった。

ICRラット8週齢からの加齢経過に伴い増加する房水中のヒスチジンは、水晶体でも同様に増加する⁷⁾。ウィスター系ラット水晶体では加齢経過に伴い減少し、白内障との関係に興味あるアミノ酸であった。

ウィスター系ラットのシスチンは8週齢で一番多く、その後加齢で減少した。ICRラットでは4,8,16週齢と大差は認められない。房水中の含有量は少ないもののグルタチオンの合成材料であり、水晶体内でのグルタチオンの合成にも影響していることが考えられた。ラット肝単離細胞¹⁶⁾や松果体¹⁷⁾ではシスチンからタウリンの合成も報告されている。シスチンが70週齢で約3倍に増加し、老化に伴いタウリンやグルタチオンの合成が抑制され、透過しやすいシスチンが房水中に流出してくることも考えられた。

ウィスター系ラットの加齢経過で変動のみられないアミノ酸は、分枝アミノ酸のパリン、ロイシン、イソロイシン、芳香族アミノ酸のチロシン、フェニルアラニン、含硫アミノ酸のメチオニンであった。ICRラットではアラニンのみであった。ICRラット房水中のアミノ酸の変動の方がウィスター系ラットより大きいという特徴を示した。

本研究は文部省科学研究費一般研究C(課題番号05671474)の補助により行われた。

文 献

- 1) Dickinson JC, Durham DG, Hamilton PB: Ion exchange chromatography of free amino acids in aqueous fluid and lens of the human eye. Invest Ophthalmol 7: 551-563, 1968.
- 2) Reddy VN, Rosenberg C, Kinzey VE: Steady state distribution of free amino acids in the aqueous humors, vitreous body and plasma of the rabbit. Exp Eye Res 1: 175-181, 1961.
- 3) Reddy DVN, Kinsey VE: Studies on the crystalline lens. IX. Quantitative analysis of free amino acids and related compounds. Invest Ophthalmol 1: 635-641, 1962.
- 4) Reddy VN: Transport of organic molecules in the lens. Exp Eye Res 15: 731-750, 1973.
- 5) 矢部伸幸, 土屋 明, 飯島 武, 佐藤永雄, 長谷部康子, 中島 潔, 他: 二次元電気泳動によるラット眼房水タンパク質の解析—加齢に伴う変化—. 昭和医学会誌 53: 501-506, 1993.
- 6) Reddy DVN: Distribution of free amino acids related compounds in ocular fluids, lens, and plasma of various animals. Invest Ophthalmol 6: 478-483, 1967.
- 7) 飯島 武, 土屋 明, 矢部伸幸, 門福強樹, 佐藤永雄: ラット水晶体の遊離アミノ酸とその誘導体. 日眼会誌 96: 1234-1239, 1992.
- 8) Heinamaki AA, Lindfors ASH: Free amino acids in rat ocular tissues during postnatal development. Biochem Intern 16: 405-412, 1988.
- 9) Gupta K, Mathur RL: Distribution of taurine in the crystalline lens of vertebrate species and in

- cataractogenesis. *Exp Eye Res* 37: 379—384, 1983.
- 10) **Trayhurrn P, van Heyningen R**: Metabolism of amino acids in the bovine lens. Their oxidation as a source of energy. *Biochem J* 136: 57—75, 1973.
 - 11) **Heinamaki AA, Muhonen ASH, Piha RS**: Taurine and other free amino acids in the retina, vitreous, lens, iris-clary body, and cornea of the rat eye. *Neurochem Res* 11: 535—542, 1986.
 - 12) **Adams E, Frank L**: Metabolism of proline and the hydroxyproline. *Ann Rev Biochem* 49: 1005—1061, 1980.
 - 13) **Bito LZ**: The physiology pathophysiology of intraocular fluids. *Exp Eye Res* 25: 273—289, 1977.
 - 14) **Jernigan HM Jr**: Metabolism of ¹⁵N-labeled amino acids in rat lens. *Exp Eye Res* 37: 77—84, 1983.
 - 15) **Jernigan HM Jr, Laranang AS**: Metabolism of the α -amino nitrogen of glutamine in rat lens. *Exp Eye Res* 39: 113—122, 1984.
 - 16) **井田修二, 大熊誠太郎, 田村潤一, 栗山欣也**: 肝臓における taurine 生合成に関する研究 (第一報) —単離肝細胞における [¹⁴C] cystine の取り込みと代謝について—. *含硫アミノ酸* 4: 203—211, 1981.
 - 17) **Ebels I, Benson B, Larsen BR**: Biosynthesis of taurine by rat pineals *in vitro*. *J Neural Trans* 48: 101—117, 1980.
-