



Title	水晶体蛋白質に関する研究
Author(s)	三村, 康男
Citation	大阪大学, 1960, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28219
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【 44 】

氏名・(本籍)	三 村 康 男 み むら やす お
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 0 8 号
学位授与の日付	昭 和 35 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 外 科 系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	水 晶 体 蛋 白 質 に 関 す る 研 究 (主 査) (副 査)
論文審査委員	教 授 水 川 孝 教 授 天 野 恒 久 教 授 須 田 正 巳

論 文 内 容 の 要 旨

I 研究目的

水晶体は透明な無血管組織であり、従ってその主要構成成分である蛋白質も他の臓器蛋白質と可成り異なるものと思われ、更に免疫学的には臓器特異性を示し、過敏性眼内炎の主原因となると言われている。従って水晶体蛋白質の精製分離法を新たに考案し、また精製された蛋白質の諸性質を種々の方面より検討し、更に臓器特異性の見地から、諸種水晶体蛋白質を比較考察を行おうとした。

II 実験方法及び結果

- 1) 牛水晶体蛋白質の α -crystallin の精製分離法：牛水晶体から 4 倍量の水溶性成分で抽出，60000×g の遠心沈澱で不溶性蛋白を除去し，蛋白濃度を 2% として，pH=5.0 で 10 倍量の水を加え，生ずる沈澱を 1/10N.NH₄ OH に溶解し再び pH=5.0 で 10 倍量の水を加えて沈澱させた。本蛋白質は α -crystallin であって，電気泳動法でも超遠心沈澱法でも単一であった。
- 2) 牛水晶体 α -crystallin の諸性質の検討
 - i) 構成アミノ酸の定性 α -crystallin を 5.8N 塩酸で 19 時間加水分解を行い，二次元上昇 chromatography で構成アミノ酸を定性すると，aspartic acid, alanine, glutamic acid, serine, glycine, threonine, hydroxyproline, histidine, lysine, arginine, proline, tyrosine, valine, methionine, leucine, isoleucine, phenylalanine の各 spot を認め，過燐酸酸化で cysteic acid, 又定色反応より tryptophane の存在を確認して 19 種のアミノ酸よりなることを認めた。
 - ii) 紫外外部吸収曲線
Beckman DU 型で紫外外部吸収曲線を調べると 280m μ に極大吸収を示した。
 - iii) N 及び C 末端アミノ酸の定性
N 末端アミノ酸は Sanger 氏法の DNP 化法によった。但し末端に cysteine, cystine の存在す

ることを顧慮して、あらかじめ過燐酸で酸化した蛋白質でもN末端を定性した。同定は paperchromatography で行い、glutamic acid であった。C 末端アミノ酸は赤堀氏のヒドラジン分解法で行い、同じく paperchromatography で同定し glycine, alanine を認めた。

iv) 沈澱定数の測定

日立製分析用超心沈澱装置を用いて、沈澱定数を測定すると $S_{29.5} = 96.1 \times 10^{-13} \text{sec}^{-1}$ であった。
(1/40M, 燐酸緩衝液 pH: 7.6, μ : 0.07)

3) 諸種水晶体蛋白質の比較検討

i) 諸種動物水晶体水溶性蛋白質の電気泳動像

縦型の zone-electrophoresis を用いた。牛, 馬, 犬, 猫, 家兎及び蛙水晶体水溶性蛋白質は veronal- 緩衝液 (pH=8.6 μ =0.1) では二分層に分たれ, 第一分層 (V_1) は pH=5.0 で沈澱する α -crystallin, 第二分層 (V_2) は β -crystallin と考えられた。燐酸緩衝液(1/40M, pH=7.6, μ =0.07) では三分層で, 第一分層 (P_1) は pH=5.0 で沈澱するため V_1 と同じ分層で α -crystallin で, 第二 (P_2) 及び第三分層 (P_3) は V_2 が燐酸緩衝液中で更に二分したものと考えられた。ふ化後1日目の「ひよこ」水晶体では α -crystallin は認めなかった。

諸種動物水晶体水溶性蛋白質の差異については, zone-electrophoresis による泳動像では区別出来なかった。

ii) 馬及び家兎 α -crystallin の末端アミノ酸の定性

veronal 緩衝液中に単一像を示す馬及び家兎 α -crystallin で牛の場合と同じく N 及び C 末端アミノ酸を定性すると, 馬 α -crystallin は牛と同じ, N 末端は glutamic acid, C 末端は glycine, alanine 家兎では, N 末端は glutamic acid で共通するが, C 末端は glycine のみであった。

iii) 水晶体蛋白の抗原性の分析

牛水晶体 α -crystallin 及び β -fraction (V_2) 家兎に静注して免疫, 抗体を産生させ, Ouchterlony 氏のゲル内沈降反応, 及び Oakley 氏の double diffusion technique を用いて抗原性を分析した。

牛水晶体 α -crystallin の抗原性は一種類で, 馬, 家兎 α -crystallin を交叉反応を示すが, β -fraction とは, 反応しなかった。牛水晶体 β -fractionは, 三種類の抗原性があり, その中一種類のみが, 馬, 家兎水晶体蛋白と交叉反応を示した。

III 結 論

1. 牛水晶体水溶性蛋白質の中, α -crystallin を大量に精製分離する方法を新たに考察し, その物理化学的性状を調べて次の結果を得た。

i) 構成アミノ酸は aspartic acid, alanine, glutamic acid, serine, glycine, threonine, hydroxyproline, histidine, lysine, arginine, proline, tyrosine, valine, methionine, leucine, phenylalanine, isoleucine, tryptophan, cysteine (cystine) の19種であった。

ii) N 末端は glutamic acid, C 末端は glycine, alanine であった。

iii) 沈澱定数は $S_{29.5} = 96.1 \times 10^{-13} \text{sec}^{-1}$

2. 臓器特異性の検討の目的で諸種水晶体水溶性蛋白質の性質を比較, 且つ抗原性を検討して次の結

果を得た。

- i) 牛, 犬, 家兎, 馬, 蛙水晶体水溶性蛋白は zone-electrophoresis では, 各分層に量的差異を認めるだけで, 泳動像では区別出来なかった。
- ii) 末端アミノ酸では, N末端アミノ酸は馬, 家兎 α -crystallin は牛と同じく glutamic acid, C 末端アミノ酸では, 馬は牛と同じく, glycine, alanine であるが, 家兎では glycine のみであった。
- ii) 新たに分離した牛の α -crystalline の抗原性は一種で, 馬, 家兎水晶体 α -crystallin と交叉反応を示し, β -fraction は三種類でその中一種のみが, 家兎, 馬 β -fraction と交叉反応を示した。

論文の審査結果の要旨

研究目的

水晶体は透明な無血管組織であり, 従ってその構成成分である蛋白質も他の蛋白質と可成り異なるものと思われ, 更に免疫学的には臓器特異性を示し, 水晶体過敏性眼内炎の主原因となると言われている。従って水晶体蛋白質の分離精製法を新たに考案し, また精製された蛋白質の諸性質を種々の面より検討し, 更に臓器特異性の見地から諸種水晶体蛋白質の性質を比較検討している。

実験方法

1. 牛水晶体 α -crystallin の精製分離法は, 牛水晶体を4倍量の水で抽出し, $60000 \times g$ の遠心沈澱の上清を蛋白質濃度を2%として, pH=5.0 で10倍量の水を加え, 沈澱を 1/100N. NH_4OH に溶解し, 再び pH=5.0 で 10倍量の水を加える著者考案による方法を採用している。
2. 牛水晶体 α -crystallin の諸性質の検討,
 - i) 構成アミノ酸の定性には二次元上昇クロマトグラフィーを用い, ii) 紫外部吸収曲線は Beckman D.U 型で測定し, iii) 末端アミノ酸の定性には DNP 化法, ヒドラジン分解法を用い, iv) 沈降定数の算出には沈降速度法を用いている。
3. 諸種動物水晶体水溶性蛋白質の比較及び抗原性の検討には zone-electrophoresis, 末端アミノ酸の定性及び, Ouchterlony 氏の寒天ゲル内沈降反応, Oakley 氏の double diffusion method を採用している。

実験結果

1. 牛水晶体は水溶性蛋白質の中 α -crystallin を大量に精製分離する方法をあらたに考案し, 電気泳動法超遠心沈澱法により単一であることを認めている。
2. 牛 α -crystallin の物理化学的性質を調べ
 - i) 構成アミノ酸はアスペラギン酸, アラニン, セリン, グルタミン酸, グリシン, スレオニン, ヒドロキシプロリン, ヒスチジン, リジン, アルギニン, プロリン, チロジン, バリン, メチオニン, ロイシン, フェニールアラニン, イソロイシン, トリプトファン, シスチン (システイン) の19種類を認めている。
 - ii) N 末端アミノ酸についてグルタミン酸, C 末端はグリシン, アラニンを定性している。
 - iii) 沈降定数は $S_{295} = 9.61 \times 10^{-13} \text{sec}^{-1}$ である。
3. 臓器特異性の検討の目的で諸種動物水晶体水溶性蛋白質を比較, 且つ抗原性を検討して次の結果を得

ている。

i) 牛, 馬, 犬, 家兎, 蛙水晶体水溶性蛋白質は zone-electrophoresis では各分層に量的差異を認めるだけで泳動像では区別できない。

ii) 末端アミノ酸では, N 末端アミノ酸は牛, 馬, 家兎 α -crystallin は同じグルタミン酸, C 末端アミノ酸では, 馬は牛と同じくグリシン, アラニンであるが, 家兎ではグリシンのみである。

iii) 新たに分離した牛 α -crystallin の抗原性は一種で馬・家兎 α -crystallin と交叉反応を示し, β -fraction の抗原性は三種で, その中一種のみが家兎, 馬 β -fraction と交叉反応を示す。

む す び

本研究は水晶体蛋白質の臓器特異性の問題中論点の中心となっている抗原の純化を試み独自の方法で単一な抗原を得ることに成功し免疫性とともに物理化学的諸性質を明らかにしたもので水晶体過敏性眼内炎の本態を解明する端緒を与えるものと考えられる。