OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	白内障発症における蛋白分解酵素カルパインの役割に関する研究
Author(s)	東, 光佳
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39442
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 2 】

氏　　名	東（あずま）　光佳（みつよし）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬学）
学位記番号	第　12034　号
学位授与年月日	平成7年6月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	白内障発症における蛋白分解酵素カルパインの役割に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 馬場 明道 (副査) 教授 溝口 正　教授 田中 慶一　教授 西原 力

論文内容の要旨

カルパインはカルシウムで活性化されるシステインプロテアーゼで，カルシウム要求量の異なる，少なくとも2種類のカルパインが哺乳類など高等生物に広く分布している。カルパインⅠはμM濃度のカルシウム存在下で活性をもつのに対し，カルパインⅡはmM濃度のカルシウムを必要とする。カルパインⅠ，Ⅱとも分子量80kDaの互いに異なる大サブユニット（パパインと相同性の高いプロテアーゼの活性部位と，カルモデュイン様構造をもつカルシウム結合部位を含んでいる）と，分子量30kDaの小サブユニット（生体膜との相互作用部位と考えられているグリシンに富んだ疎水的な領域と，カルモデュリン様構造をもつカルシウム結合部位からなる）より構成されるヘテロ二量体である。このようにカルパインはシステインプロテアーゼとカルシウム結合蛋白質が複合化したキメラ蛋白質である。細胞内における低濃度のカルシウムによるカルパインの活性化機構は，生体膜のリン脂質がカルパインの活性化に必要なカルシウム要求量を低下させることにより，カルパインが生体膜へ結合することによると考えられている。その後自己消化し活性化されたカルパインは，種々の細胞内酵素や細胞骨格蛋白質を限定分解することによって，細胞の刺激応答あるいは分化増殖に重要な役割をなすと考えられている。水晶体は，増殖した細胞が脱落または剥離せず終生水晶体内に蓄積することが特色のひとつである。これを分子レベルから眺めると，水晶体は水66％，蛋白質33％，その他の成分1％から構成される親水性のゲル構築体である。水晶体蛋白質の約90％はcrystallinと呼ばれる水晶体に特有の構造蛋白質である。光を一定の規則で散乱，屈折させる透明な水晶体がこの透明性を失い混濁化するのが白内障という疾患である。水晶体においてカルシウムは膜の選択的透過性の維持と多くの物質の輸送，代謝に関与して，透明性維持に重要な役割を果たしている。しかし，水晶体でのカルシウム輸送異常は，水晶体内部におけるカルシウムの蓄積現象を誘発し，水晶体の混濁化に結びつく。我々はこの増加したカルシウムによってカルパインが活性化され，水晶体蛋白質を分解し，白内障が形成されると考えた。そこで白内障発症の前段階におけるカルパインの関与を以下の観点，1）白内障の発症がカルシウム依存的であり，2）白内障発症の前段階または平行してカルパインの活性化が起こっており，3）E64（(+)－(2S, 3S)－3－[(S)－3－methyl－1－(4－guanidinobutylcarbamoyl)－butylcarbamoyl]－2－oxiranecarboxylicacid）などのシステインプロテアーゼの阻害剤が蛋白質分解と平行して，白内障を抑制し，4）水晶

体蛋白質の切断部位が，試験管内でカルパインによって生じるものと同一であるということから検討した。

diamide，xylose，seleniteおよびcalcium ionophore A23187によって誘発した白内障（水晶体培養系）さらにselenite，galactoseおよびstreptozotocinで誘発した実験的白内障モデル（in vivo）において，白内障発症に伴い水晶体中カルシウムの上昇が起こった。さらに，カルパイン活性化の指標と考えられているカルパインの可溶性画分から不溶性画分への以降が起こった。そしてαおよびβ－crystallinの分解がおこり，これらの新しいフラグメントの蓄積がみられた。すなわち，白内障におけるカルパインの関与は，カルシウムの上昇にともない，サイトゾールに存在する不活性な前駆体カルパインが，活性化に必要なカルシウム要求量を低下させ，生体膜に移行する。生体膜に結合したカルパインは自己消化し，活性化体となる。そして水晶体蛋白質を分解した後，自己分解によって消失する。また，カルパインを含むシステインプロテアーゼの阻害剤であるE64dが，種々の誘発剤によって誘発した白内障およびそれに付随するcrystallinの分解を抑制したことによって，白内障におけるカルパインの関与をより確かにした。これは，種々の白内障誘発剤によって初期の障害をうけたラット水晶体において，カルシウムが上昇し，それによって活性化されたカルパインによる蛋白質分解が，白内障の共通の要因であることを示した。

また，白内障発症におけるカルパインの関与を直接明らかにするためにラット白内障水晶体の2次元電気泳動による蛋白質の分析，さらにN末端のアミノ酸配列の分析によって，白内障水晶体にみられるβ－crystallinの分解がカルパインによるものかどうかを検討した。ラットの年齢とともに，水晶体核部の不溶性蛋白質において部分的に分解されたcrystallinのフラグメントが出現し，4カ月齢では少なくとも17個のフラグメントが蓄積した。僅かな例外を除いて同様のフラグメントが，2週齢selenite白内障ラットの水晶体核部の不溶性蛋白質にみられた。これらのフラグメントは，可溶性crystallinを精製カルパインとインキュベートしたときに生じる不溶性crystallinのフラグメントと僅かな例外を除いて同一であった。これらのことは，ラット水晶体の成長に伴って蓄積するβ－crystallinのフラグメントは，活性化されたカルパインによって分解され不溶化されたもので，白内障水晶体ではこれらのことがより促進されており，水晶体混濁を生じるものと思われる。以上のことから，増加したカルシウムによって活性化されたカルパインが水晶体蛋白質を分解し，白内障が形成されると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は，白内障発症の機序としてCa^{2+}の流入に伴い蛋白分解酵素のカルパインが膜結合型となり活性化され，水晶体の主構成蛋白であるクリスタリンの分解・不溶化をひきおこす仮説を実証したものである。

数種類のラット実験的白内障モデルにおいて，水晶体の白濁化と平行してCa^{2+}濃度の増加，可溶性分画のカルパイン減少とそれに対応した膜分画での増加並びにα，βクリスタリンの減少がみとめられた。システインプロテアーゼ阻害剤のE64dにより水晶体の白濁化，カルパインの膜分画への移行・活性化並びにクリスタリンの減少は共に抑制された。

次に，加齢ラット，実験的白内障ラットの水晶体のペプチド分析を行いそのアミノ酸配列からクリスタリンの分解産物であることを同定した。

更に，クリスタリンを基質に試験管内でカルパイン反応を行いクリスタリン分解産物ペプチドが上記の白内障，加齢ラット水晶体の不溶性ペプチドフラグメントと同一であることを明らかにした。

以上の様に，本論文は学術的にも意義のある新知見を明らかにしたものであり薬学博士の授与に値するものと判断した。