



Title	Crystalline Degradation and Insolubilization in Regions of Young Rat Lens With Calcium Ionophore Cataract
Author(s)	岩崎, 直樹
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40456
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

氏 名	いわ 崎 直 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 9 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 9 月 30 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	Crystalline Degradation and Insolubilization in Regions of Young Rat Lens With Calcium Ionophore Cataract (若年ラットでのカルシウムイオノフォア白内障におけるクリスタリンの分解と不溶化の部位による差について)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田 野 保 雄 (副査) 教 授 高 井 義 美 教 授 谷 口 直 之

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

カルパインはカルシウムによって活性化される中性のプロテアーゼであり、様々な哺乳類の細胞に見られる。カルパインには μM 単位のカルシウムで活性化されるカルパイン I と mM 単位のカルシウムを要求するカルパイン II の二種のアイソザイムが存在するが、ラット水晶体内にはカルパイン II しか存在しない。

生後10日前後の幼若ラットにセレン酸を投与すると5日前後で核白内障を生じるが、このセレン白内障以外にも、ガラクトース、カルシウムイオノフォア等でも同様の白内障を *in vitro* 又は *in vivo* で発生させることが可能である。これらの実験的白内障では細胞膜のバリアーが破綻することでカルシウムが細胞内に流入し、カルパイン II を活性化して水晶体のクリスタリン、特に β クリスタリンを限定分解することが知られている。我々はこの蛋白分解によりクリスタリンが水に不溶化して白内障を発生しているのではないかという仮説を持っている。

一方最近我々の研究により通常の透明な水晶体でも老化によりカルパイン II は活性化されて蛋白分解が起こっており、その分解パターンは幼若ラットでの実験的白内障と同様であることが示された。それなら幼若ラットより成体の方がより蛋白分解が進んでおりそのためカルシウムイオノフォアによる白内障をより簡単に起こす可能性があると思われた。この実験の一つの目的は老化により水晶体がより実験的白内障を起こしやすくなるか調べることである。

もう一つの目的は水晶体の場所によって蛋白分解の様式が変化するのかを調べることにある。実験的白内障では核白内障は容易に作成できるが皮質白内障は作成が困難であるので、その原因を探るために核と皮質で蛋白分解の様式が異なるかどうかについて検討した。

[方法]

生後4週(若年群)と12週(成体群)のSDラットの水晶体を各々4群に分け、水晶体培養をしないコントロール群(NC群)、培養コントロール群(C群)、10 mM のカルシウムイオノフォア A23187 存在下培養群(I群)、A23187 とカルパイン II の阻害薬である E64 存在下培養群(I+E64群)として MEM+10%FCS 内で1週間器官培養し、水晶体の混濁をビデオに取り込み測定した。その後それぞれの水晶体を核と皮質に分け、20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM

EGTA (pH=7.2) の buffer でホモジネート, 10,000 g で30分遠沈し, 水可溶性の分画と不溶性の部分に分離した。各群の蛋白濃度を測定し, 不溶化率の測定を行った後, pI と分子量により SDS-PAGE 二次元電気泳動を行い, そのフィンガープリントを各群で比較した。一部のゲルは PVDF membrane にブロットし, スポットを切り抜き分離して, N末端のアミノ酸配列をペプチドシーケンサーで調べた。

[結果]

若年の I 群では 7 日目には軽度の皮質白内障と高度の核白内障を認め, 若年の I+E64 群ではその核白内障の発生は抑制されたが, 皮質白内障は抑制されなかった。それに対し, 成体の I 群では軽度の皮質白内障のみで核白内障は形成されず, I+E64 群でも変化はなかった。

若年の C 群の核では水に不溶化した蛋白の率は 34%, I 群で 60% に増加し, I+E64 群では 36% と抑えられていた。それに対し, 成体の核では C 群ですでに 50%, I 群で 69%, I+E64 群では 65% に達していたが, 核は全く透明であった。以上のことから, 不溶性蛋白の比率の絶対値だけで白内障の発生を説明できないことが明らかとなった。またむしろ不溶性蛋白の比率の増加速度がより白内障形成と密接に関係していると考えられた。

二次元電気泳動の結果で, 若年群の皮質の I 群でカルパイン II によるクリスタリン $\beta B1$ と $\beta B3$ の分解がみられ, アミノ酸配列の結果からも, クリスタリンを直接カルパイン II に作用させたのと同じ位置でペプチドの切断が見られた。またこの分解は E64 によって抑制された。つまり若年群の皮質ではカルパイン II の活性化がおこりクリスタリンを分解していた。しかし上記のように皮質白内障は E64 では抑制されないで, 皮質白内障は核白内障とは別のメカニズムが関与していると思われた。

[総括]

以上の結果より, ラットでは加齢によりかえって実験的核白内障を形成しにくくなることがわかった。またこの実験では皮質と核は同様にカルパイン II によって限定分解を受けるが, 皮質白内障は, カルパイン II の活性化とは無関係であることが示された。またクリスタリンの不溶化の絶対値だけでは白内障の発生を説明できないことが示された。

これらの事実から, 成体での白内障形成は, カルパインの活性化による水晶体蛋白の不溶化による, と短絡的に考えることは難しいことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

カルシウムイオノフォア白内障は, カルシウムの水晶体内流入によるカルパイン II の活性化によってクリスタリンが不溶化して白内障を形成するとされていた。本研究では若年ラットと成熟ラットの水晶体器官培養をカルシウムイオノフォア存在下で行い, 白内障形成について観察した後, 各々の皮質と核の可溶性蛋白と不溶性蛋白を分離して不溶性蛋白の比率を測定した。これによって若年ラット核では不溶性蛋白の量と白内障の程度は相関しているが, 成熟ラット水晶体核では不溶性蛋白は 50-65% に達するにも関わらず白内障は形成されないことを証明した。また上記各分画のクリスタリンを二次元電気泳動で分解してカルパイン II によるクリスタリンの限定分解を検討したところ, 若年ラットの皮質ではカルパインの活性化と蛋白限定分解が起こっているが, 白内障の形成はそれとは別の機序であることが明らかとなった。以上の新知見は, 不溶性蛋白の量で白内障形成が説明されるとしていた従来の説に問題点を提起し, 白内障形成にクリスタリンの不溶化の速度などが関与していることを示した点で学位に値すると考えられる。