

森実祐基 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム循環生理学 院 4 年

課題番号：2005A0236-NL3-np

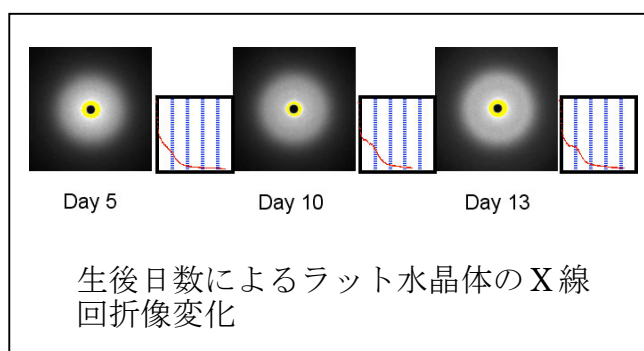
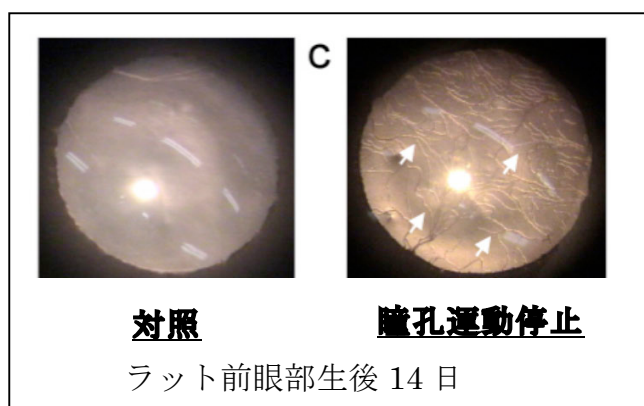
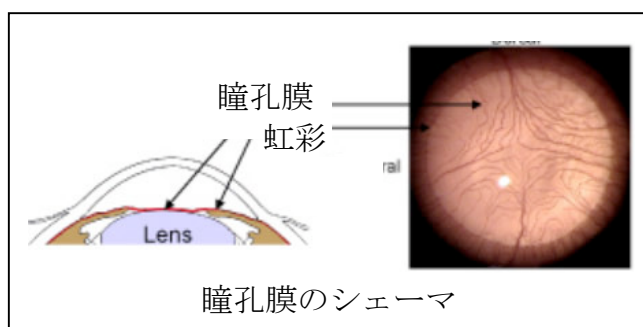
ビームライン：BL40B2

研究課題名：水晶体発達におけるクリスタリン会合調節因子の探索：培養水晶体と瞳孔膜残存モデルによる検討

研究概要

[目的および背景]

水晶体は発達過程において瞳孔膜と呼ばれる血管ネットワークに栄養されている（右図上）。組織成長の役割を果たした後、光路確保のためには障害となる血管構造物は除去されなければならない。我々はラットに於いて生後 8 日頃より瞳孔膜を取り囲む虹彩の機能的成熟により縮瞳・散瞳が開始し、瞳孔膜内の血流停止・再開を引き起こしていることを発見した。そして縮瞳・散瞳を薬剤により抑制することで瞳孔膜を残存させることに成功した（右図中）。一方で、水晶体の X 線回折像が生後 10 日頃から出現することをこれまで



の実験から発見した（右図下）。我々は瞳孔膜の消退と X 線回折像の出現が時期を同じくして起こっていることより、瞳孔膜を介した血管性の水晶体栄養が房水による栄養に変化することで水晶体細胞内のクリスタリン会合に影響しているという仮説を立てた。

水晶体はおよそ 1000 層におよぶ生きた細胞で構成され、透明性を獲得するために水晶体細胞同士が規則正しく密に配列することで光の散乱を防いでいる。また、水晶体細胞内においては光の散乱を招く細胞内小器官を分化の途中でアポトーシスにより破壊し、クリスタリンを高い濃度で残存させている。このうち、 α -クリスタリン（一分子：20kDa）が平均分子量 800kDa、直径 15nm の巨大分子を形成し秩序だった配列を成すことで水晶体細胞質内を光学的に均一に保っており、この構造が回折像を示すとされている。瞳孔膜内血管ネットワークの有無は、酸素濃度や pH など、水晶体を取り巻く環境に影響を与えることにより、発達過程において細胞内の分子レベルの制御を司っている可能性があると考えた。

X 線回折解析は、水晶体透明性の分子レベルでの主たる決定因子である α -クリスタリン構造を評価する手段として用いられてきたが、その興味は主に白内障の病態解明であり、水晶体発達過程における分子制御機構を解明する試みにはこれまで用いられてこなかった。これにより得られる情報は分子制御機構や環境因子がどのように水晶体形成に影響しているか検討するための基礎情報として重要な役割を果たすと考える。

発達過程において水晶体のクリスタリン会合を制御する因子に関する報告は無く、水晶体透明性獲得のメカニズムを明らかに出来れば白内障の病態生理、治療法に重要な情報を供する事が出来ると考え本研究を申請した。また、水晶体は幼若期には低温に対して白濁し易いが発達に伴って次第に低温に晒されても透明性を維持できるようになることが知られているため、温度変化に伴う分子レベルでの構造変化と可視光透過性の関係を明らかにする第一歩として、水

晶体タンパク濃度を生化学的手法により計測すると共に、温度変化に伴うX線回折像の変化についても検討した。

[実験・解析方法]

1) 瞳孔膜血管ネットワーク遺残による水晶体発達への影響の検討

Wister ラットの同腹子を2群に分け、それぞれ対照群と虹彩運動抑制群として以下のような操作を行った。対照群：生後7日から13日まで生理食塩水を4時間毎に点眼。虹彩運動抑制群：生後7日から13日まで1%アトロピンを4時間毎に点眼し、虹彩を散瞳した状態で維持。点眼のプロトコールが完了した時点で、動物実験棟にてエーテル麻酔後塩化カリウムにて心停止した後に水晶体を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水に入れてビームラインまで運搬して37℃にて実験を行った。水晶体はマイラシートに挟み、固定用のプラスチックスケールにて光軸と同じ向きにX線が通過するようにセッティングした。X線の波長は1 Å、カメラ長は1.5mとした。

2) 発達水晶体のタンパク濃度およびX線回折像温度依存性変化

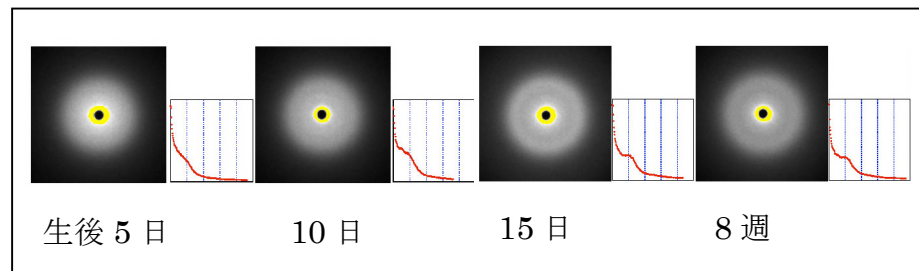
生後5日、10日、15日目のラット水晶体を proteinase inhibitor 含有リン酸緩衝生理食塩水内でヒスコトロンにて細胞破碎し、3000回転/分の遠心分離にて可溶成分と膜成分に分離した。分離された水溶性タンパクを Bicinchoninate 法を用いてウシ血清アルブミンを標準としてタンパク濃度計測を行った。水晶体体積は生理食塩水内に水晶体を入れ、高濃度または低濃度の食塩水を加えることで浮上も沈降もしない状態として比重を求めるとともに水晶体重量を計測することで算出した。また、X線回折像の温度依存性については $36 \pm 20^{\circ}\text{C}$ の範囲で 4°C おきに計測を行った。X線の波長は1Å、カメラ長は1.5mと同様の条件とした。

[結果]

瞳孔膜血管ネットワーク遺残による水晶体発達への影響を検討するため生後13日にて対照群と虹彩運動抑制群の水晶体を摘出し、X線回折像を記録したが、両群間にX線回折像に違いは認められなかった。

発達水晶体のタンパク濃度は、生後5日、10日、15日にてそれぞれ 274.4 ± 39.6 、 347.4 ± 41.6 、 569.0 ± 60.7 [mg/ml lens volume, mean \pm SD]であった。X線回折像

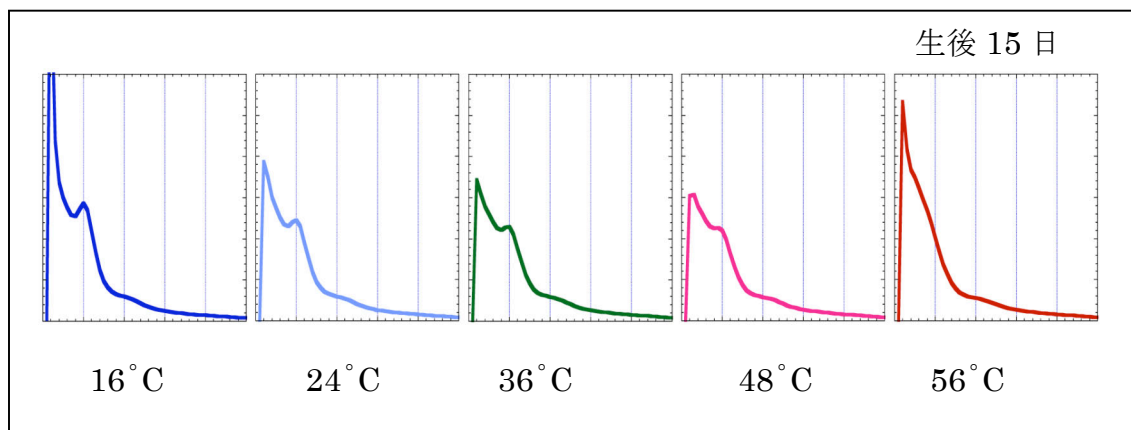
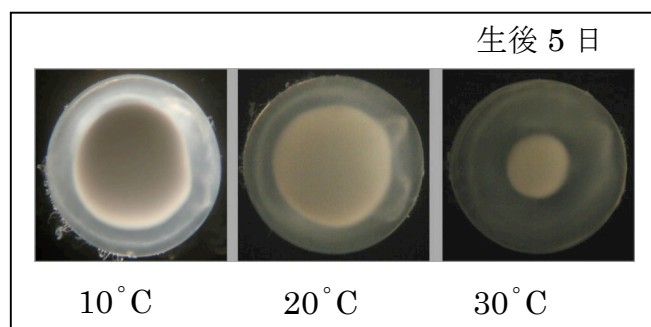
と比較すると、タンパク濃度が大きく増加した生後10日から15日の間



に spacing $\sim 15\text{nm}$ の回折像が出現していた。

温度変化によるX線回折像の実験では体温と比較して低い温度では肉眼的に水晶体の中心部に白濁を認めた。白濁の出現する温度は生後日数が進むにつれて低下した。しかし、X線回折

像 $\sim 15\text{nm}$ のピークは低温でも出現した。高温域に関しては 48°C までは体温と同様の回折像を示したが、 52°C からはピークが不明瞭になった。



[考察]

水晶体上皮細胞は胎生期よりクリスタリンを産生し、やがて脱核しながら水晶体内部へと進んでいく。一度産生されたクリスタリンは置換されることなく一生水晶体の機能を司らなければならない。水晶体は眼球内への光の屈折させるため高いタンパク濃度が必要であり、高濃度タンパクの凝集を防ぐためには α -クリスタリンの特殊な性質：シャペロン活性が機能していると言われている。 α -クリスタリンは熱ショックタンパクの一種であり、これまでも温度上昇に対してタンパク変性を防いで成ラット水晶体のX線回折像を 50°C まで保つことが報告されていた。我々の実験では生後15日の水晶体でも成ラット水晶体と同様のX線回折像が出現しており、やはり 50°C 程度までは $\sim 15\text{nm}$ のピークが保たれることを観察した。タンパク濃度も生後15日では $569.0\text{ [mg/ml lens]}$ であったが、これは従来の成ラット水晶体のタンパク濃度とほぼ同様であった。しかしながら、低温に対しては容易に白濁し、X線回折像では $\sim 15\text{nm}$ のピークが保たれていた。これまでの報告では低温による水晶体白濁の原因は $\sim 10\mu\text{m}$ の α -および γ -クリスタリンの凝集塊が形成される為とされてきたが、今回のわれわれの結果から $\sim 15\text{nm}$ のparticleは崩れていないことが示唆された。この成ラットと発達期ラット水晶体の違いについては、今後クリスタリン成分比について調べていく予定である。

また、瞳孔膜血管ネットワークの消退時期と水晶体X線回折像出現時期が一致するため酸素供給の減少などの環境変化が水晶体内のクリスタリン分子秩序に影響を及ぼしているという仮説を立てて検証したが、残念ながらX線回折像で評価する限り血管の消退とクリスタリン分子秩序構築の間には相互関係は認められなかった。