

A-4 紫外線の増加がヒトの健康に及ぼす影響に関する研究

A-4 (4)② 紫外線照射による白内障発症機序の解明に関する実験的研究

研究代表者 国立環境研究所 遠山千春

環境庁国立環境研究所

環境健康部 遠山千春

共同研究者 共立薬科大学 竹鼻 真

平成5年度－平成7年度予算額 20,632千円)

(平成7年度予算額 6,891千円)

[要旨]

白内障発症の原因の一つに紫外線があげられ、近年特にオゾンホールの破壊により、紫外線 B 波 (UV-B) の健康におよぼす影響が懸念されている。本研究では、器官培養法と細胞培養法を用いて水晶体に対する UV-B の影響について検討した。その結果、水晶体特有のタンパク質であるクリスタリンの分解、修飾が起こり、それは特に α と β -クリスタリンに生ずることが明らかとなった。さらに、発がん遺伝子の発現が、細胞の増殖、そして間接的にクリスタリンの発現に関与している可能性が示唆された。また、紫外線の照射により水晶体上皮細胞がアポトーシスを起こすことも判明した。以上の結果より、水晶体への紫外線の照射は、クリスタリンの分解、修飾による分子シャペロン機能の低下、および細胞の異常増殖など、水晶体の恒常性の崩壊を促進し、混濁へと導くのではないかと考えられた。

[キーワード] 紫外線、水晶体混濁、白内障、クリスタリン

はじめに

オゾン層の破壊により増加する紫外線は、白内障の発症・進行因子となるといわれている。紫外線による水晶体混濁化のメカニズムは未だ解明されておらず、本研究では混濁機構を明らかにするために、培養水晶体および上皮細胞に対する影響を検討した。

紫外線に対する生体眼の物理的防御機構としては、角膜は、短波長 (280nm 以下) の紫外線を除去し、水晶体および網膜への障害を減弱させるためのフィルターとして作用している (図 1)¹⁾。しかし、UV - B (280~320nm) および、UV - A (320nm~400nm) は角膜を通過してその奥にある眼球組織に達し、水晶体や網膜に障害をもたらす。水晶体は水晶体カプセル、上皮細胞、線維細胞よりなる透明無血管組織で、水晶体上皮細胞は前極部から赤道部のカプセル内に単層で存在してカプセル合成を行うと同時に、房水から多くの物質を水晶体内部へ輸送または排出する部位として活発なエネルギー代謝を行っている (図 2)²⁾。上皮細胞は赤道部よりわずかに中心部に存在する増殖帯で増殖を続ける一方、線維細胞に分化する。線維細胞は増殖能を持たず、先に分化した線維細胞の上に累積し、水晶体皮質を構成している。水晶体における透明性維持機構はこれら上皮細胞と線維細胞の細胞配列の規則性とタンパク質分子の秩序性が関係するといわれ、これらへの障害が水晶体混濁を誘発し、白内障を発症すると考えられている。

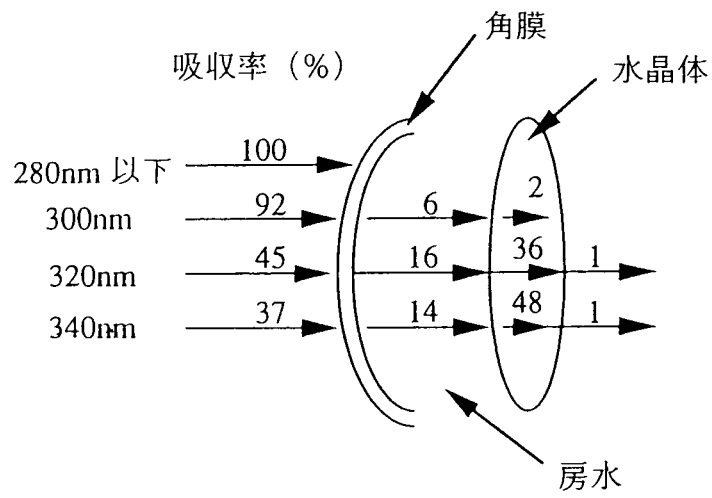


Fig. 1 : 生体眼における紫外線の吸収特性

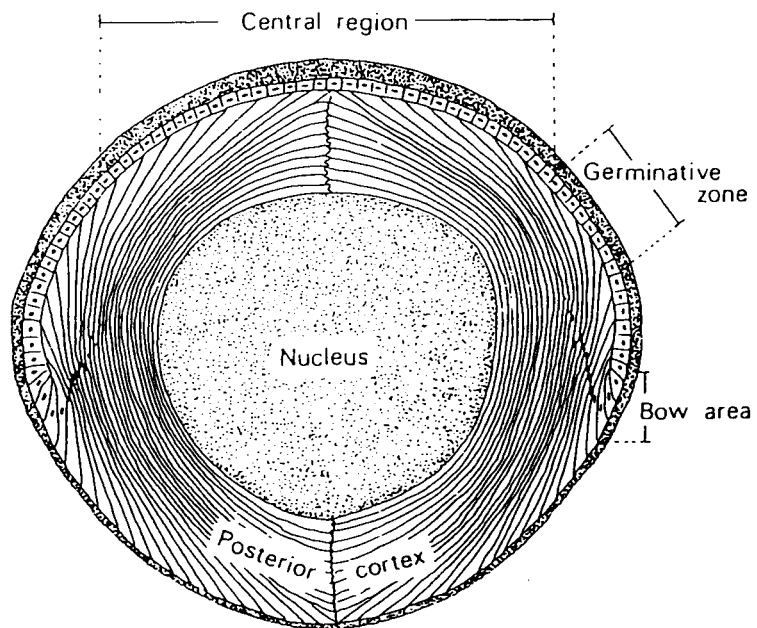


Fig. 2 : マウス水晶体の構造

水晶体の透明性は、その構成要素の水分66%、タンパク質33%、その他の微量物質群1%の3要素間の配置と均衡により保持されている。この均衡を保つための一つに、肝臓に匹敵するほど高濃度に水晶体に存在している還元型グルタチオン（GSH）とその関連酵素群の生体防御機構があり、血管系をもたない水晶体の異物代謝に大きく貢献している。紫外線曝露量の増加による光酸化が多くのラジカルを発生させ、GSHの低下の原因となる過酸化反応が進行して酸化障害に対する防御機構が崩れ、GSHの減少にともない水晶体の膜構造の変化、Na,K-ATPase活性の低下によるカチオンレベルの変化、クリスタリンの会合などを生じ、水晶体は混濁する³⁾。

さらに、水晶体の透明性と屈折性は、水晶体の主要タンパク質である α 、 β 、 γ -クリスタリンが水晶体透明性の維持に寄与している。これらクリスタリンは、 β と γ -クリスタリンが同じ進化の過程に属し、 α -クリスタリンは低分子量ヒートショックプロテイン群（sHSP）と高い相同性があり、起源の同じタンパク質であるといわれている⁴⁾。 α -クリスタリンは、分子量約20kDaの主な4種のサブユニット（A1、A2、B1、B2）から成る会合体として存在しており、A2、B2は水晶体上皮細胞で合成され、A1、B1はそれぞれA2、B2が修飾を受けて生成したサブユニットで、線維細胞に多く存在する。 α -クリスタリンのSH含量は β 、 γ -クリスタリンに比べ微量であるが、sHSPのタンパク質の凝集を防ぐ分子シャペロン活性を有し、透明性維持に寄与している⁵⁾。水晶体は比較的単純な構成をしているにもかかわらず、一つの秩序の乱れが多量の乱れを招き、混濁が進行する。生体眼へのUV-B照射により誘導された白内障は、上皮細胞、および水晶体前カプセル近傍の線維細胞の傷害が混濁の一因であると考えられることから、本研究では、培養水晶体のたんぱく質変化、および上皮細胞に対する影響についてタンパク質、および遺伝子の変化の面から検討を行なった。

方法

1. 水晶体器官培養および細胞培養

器官培養には、三協ラボサービスより入手した6~7週齢のWistar系ラットの水晶体を使用した。過剰量のペントバルビタールを腹腔内投与し、死後直ちに眼球を摘出してエタノール滅菌後、PBS（-）中で水晶体を摘出した。摘出水晶体は15%ウシ胎児血清を含むDMEM中、37℃、5%CO₂下で16時間培養して透明性を維持していたものを実験に供した。

細胞培養は、芝浦臓器（株）より入手したウシ眼球から水晶体を摘出して、滅菌PBS（-）で数回洗滌した後カプセルを分離し、37℃、30分間トリプシン処理を行い、上皮細胞を得た。得られた上皮細胞は、15%ウシ胎児血清を含むDMEM中、37℃、5%CO₂下で、プラスチックシャーレ上で単層培養を、また、セルロースメンブレン上でレントイドボディ（疑似水晶体）の作成に使用した。

2. 紫外線照射法

器官培養水晶体は、PBS（-）を入れたシャーレ中に直径4mmのガラスリングを置き、その上にラット水晶体の上皮側が常に上を向くように乗せ、波長の異なる紫外線をそれぞれ5 kJ/m²照射した。また、培養上皮細胞はシャーレ上でPBS（-）で洗滌後、312 nmの紫外線を10 ~ 400 J/m²の範囲で照射した。

3. 還元型グルタチオンの定量

水晶体重量を測定後、氷冷下に水でホモジナイズし、スルホサリチル酸で除タンパクした。除

タンパク後の上清に0.01 Mリン酸緩衝液とラベル化剤であるN-9-アクリジルマレイミド (NAM) を加え、液体クロマトグラフィーで解析を行った。溶出は、励起波長365 nm、蛍光波長435 nm、流速1 ml/min、室温で2段階の直線濃度勾配法により行った。

4. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびウエスタンブロット法

1次元電気泳動は、9~18%、15~25%のポリアクリルアミドゲルを作成し、Laemmliの方法により行い、クーマシーブルー染色した。2次元電気泳動は、O'Farrellの方法にしたがい、1次元目の等電点電気泳動にはImmobiline Drystrip (ファルマシア社) を用い、2次元目は9~18%ポリアクリルアミドゲルを作成して電気泳動後、クーマシーブルー染色、銀染色を行った。これらの電気泳動試料は、セミドライ法によるウエスタンブロット解析にも使用した。1次抗体には、ヒト水晶体を抗原にして作成した抗クリスタリンモノクローン抗体を使用し、2次抗体にはヤギ抗マウスIgG HRPを用い、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) により発色させた。

5. タンパク質一次構造の解析

2次元電気泳動終了後のクーマシー染色ゲルの目的スポットを切り出して乾燥後、トリプシン消化、メルカプトエタノール還元処理を行い、トリシン-SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、ポリビニリデンジフロリド (PVDF) 膜に転写し、染色後バンドを切り出し、島津プロテインシークエンサー PSQ2により解析を行った。

6. ノーザンブロット法

培養水晶体上皮細胞のシャーレ (10 cm) にTRIzol (ギブコ社) 3 mlを加えて細胞を溶解した。これにクロロホルムを加えて遠心した。上清に2-プロパノールを添加し、放置後、遠心によりRNAを得た。このRNAを1.5%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンフィルターへ転写した後、Random Primed DNA Labelling Kit (ペーリンガー社) を使用して調製したDNAとハイブリバック中で65℃、16時間ハイブリダイゼーションを行った。

7. シングルセルゲルアッセイ

Kleimanらの方法⁶⁾に従って行った。すなわち、紫外線を照射した水晶体上皮細胞を0.5%低融点アガロースに懸濁し、スライドガラス状に作成した0.5%アガロースゲル上に積層し、さらに0.5%アガロースを積層してアガロースをゲル化させた後、1%ラウロイルサルコシン、1%トリトンX-100を含む細胞溶解液で処理した。そして、サブマリン型泳動槽中で電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

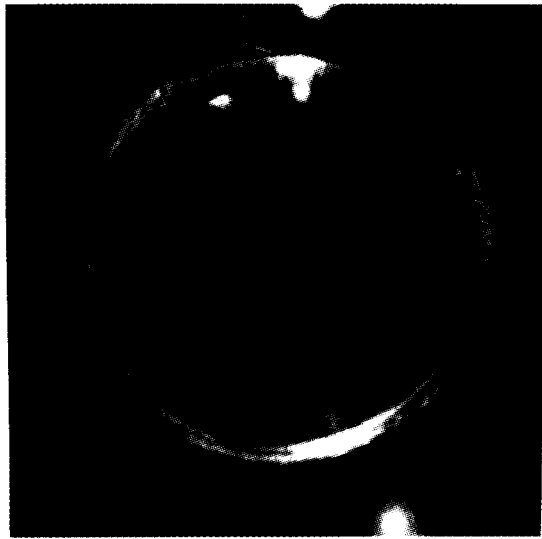
8. ヘキスト染色

カバーガラス上の培養水晶体上皮細胞に紫外線を照射した後、10 mMヘキスト3342 (シグマ社) で染色し、微分干渉顕微鏡および落射型蛍光顕微鏡で観察した。

結果および考察

1. 紫外線照射水晶体の混濁状態と還元型グルタチオンの変化

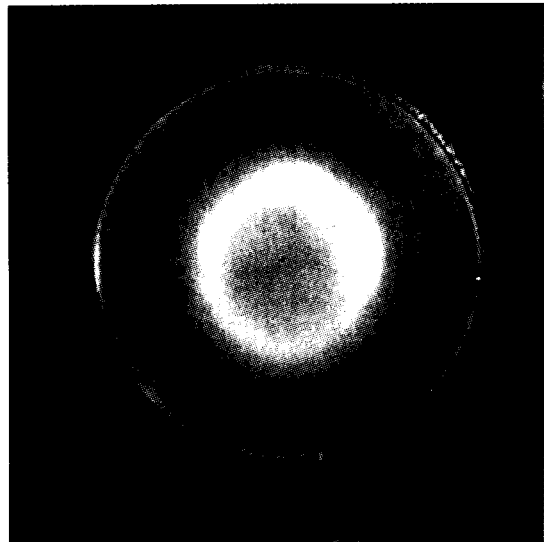
紫外線未照射の培養水晶体、及び紫外線照射後培養し混濁を生じた水晶体を、図3に示す。UV-B照射後24時間培養した水晶体は皮質浅層部に混濁を生じ (図3b)、GSH濃度は正常水晶体に比較して70%以上の減少が認められた (図4)。72時間後には皮質部の混濁が進行するとともに (図3c)、水晶体核部に強い混濁が観察され、GSH濃度は正常の10%以下に減少した。一方、UV-A照射水晶体は、照射直後に前部カプセル直下の透明性がわずかに低下してい



a) コントロール水晶体



b) UV-B照射24時間後水晶体



c) UV-B照射72時間後水晶体

Fig. 3 紫外線暴露水晶体の混濁状態

a) コントロール水晶体

障害を被っていない水晶体は透明性を維持している。

b) UV-B照射24時間後水晶体

水晶体皮質浅層部の混濁が観察される。

c) UV-B照射72時間後水晶体

水晶体皮質部および核部の混濁が明瞭に観察される。

るのが観察され GSH の減少も認められたが、24 時間後の透明性の回復とともに GSH 量も回復した。しかし、72 時間後には再び混濁が生じ、同時に GSH 量も減少した。このように GSH 量は紫外線照射水晶体の混濁度合とよい相関を示すことが明らかとなった。GSH は水晶体の透明性維持に深く関わっており、その濃度は通常肝臓と同等、またはそれを上回る量が存在していた。UV-A と UV-B の影響の大小はそのエネルギーに依存していると考えられ、UV-A に対しては水晶体の抗光酸化機能が比較的機能する範囲の傷害の程度と思われるが、UV-B の光酸化は細胞に容易に致命的な傷害を与え、混濁を導くものと思われる。

2. 水溶性タンパク質への影響

UV-B 照射 24 時間後からタンパク質への影響が開始したが、72 時間後により顕著な影響が観察されたため、照射後 72 時間培養の水晶体の水溶性タンパク質の解析を行った。図 5 に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と、抗 α -B-クリスタリン抗体を用いたウエスタンブロットの結果を示した。摘出直後の水晶体を正常とし、紫外線未照射の培養水晶体をコントロールとし

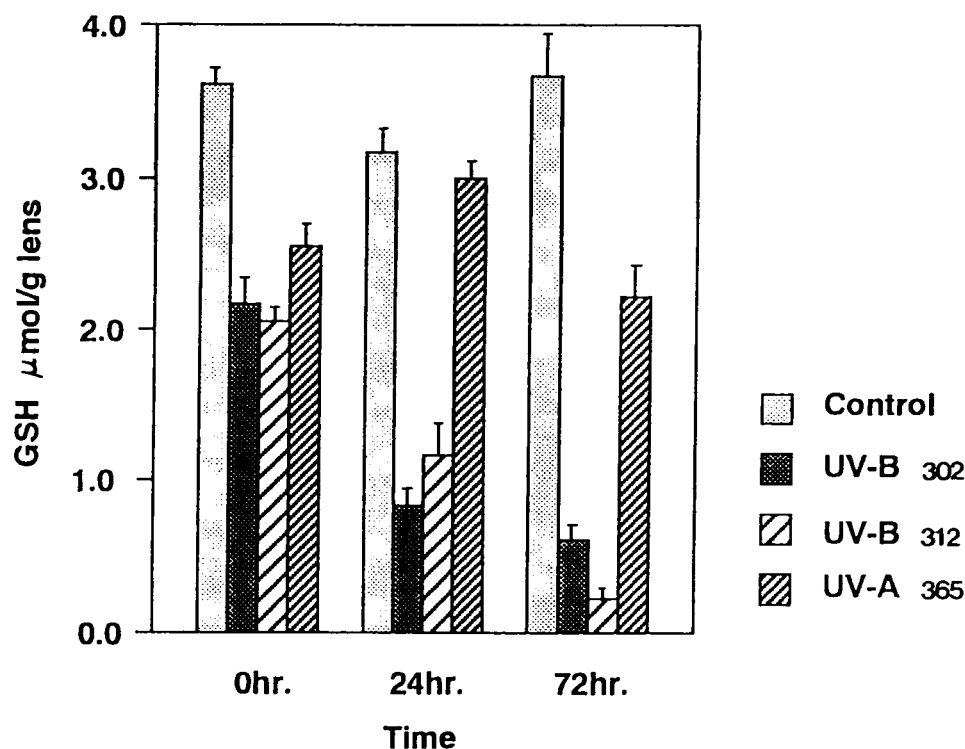


Fig. 4 紫外線照射による還元型グルタチオン量の変化

302nmと312nmのUV-B群は、ともに水晶体の混濁にしたがいGSHが著しく減少するが、365nmのUV-A群は、照射24時間後における透明性の回復にともないGSHも回復している。

た。クーマシーブルー染色の結果（図 5 a）は、顕著な核混濁を示した UV-B 照射水晶体（レーン 4、5）では、約 30 kDa タンパク質の消失と 20 kDa 前後のタンパク質の増減が認められたが、UV-A 照射水晶体（レーン 6、7）では正常およびコントロールと同様の泳動像を示し、タンパク質の変化は観察されなかった。また、 α B-クリスタリンを用いたウエスタンブロットによって、UV-B 照射水晶体（レーン 4、5）において α B-クリスタリンよりも低分子側に抗体陽性のバンドが検出された（図 5 b）。 α -クリスタリンは構造タンパク質としてだけではなくタンパク質の凝集を抑制する分子シャペロンとしても機能しており、低分子量ヒートショックプロテイン（sHSP）と高い相同性をもっているが低分子側に検出された抗体陽性バンドは分子量が 20 kDa 付近であることから、sHSP ではなく α B-クリスタリンの分解産物ではないかと考えられた。さらに詳細に検討するために 2次元電気泳動を行い、紫外線照射後著しく増加し、あるいは新たに出現したスポットについてプロテインシークエンサーによる解析を行った。UV-B 照射水晶体においてコントロール水晶体に比較して A、B、C で示されるスポットが出現した（図 6 b）。2次元電気泳動後のクーマシーブルー染色ゲルより各スポットを切り出してゲルごとトリプシン消化を行った後、トリプシン緩衝液で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、

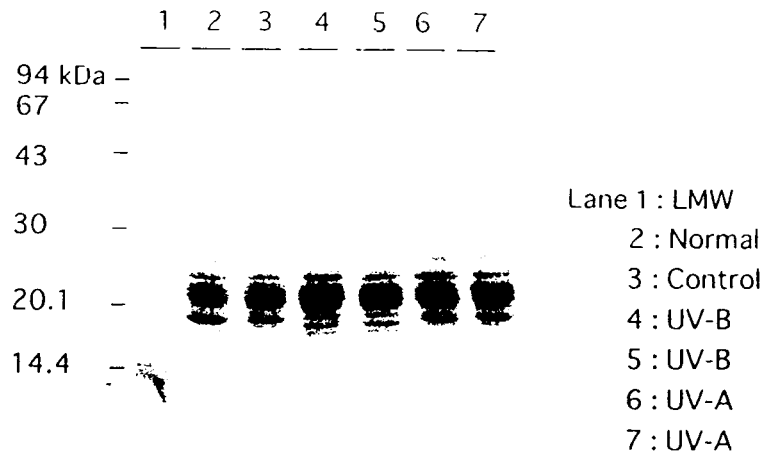
PVDF 膜に転写して染色したバンドを解析に使用した。その結果、A は β A4-クリスタリンの 133~144 残基（図 7）と、B は α A2-クリスタリンの 55~67 残基（図 8）に一致した。スポット C については一次構造解析ができなかったため、2次元電気泳動後にウエスタンブロットを行って検討したところ、 α B-クリスタリンであることが判明した。紫外線照射により出現したこれらのタンパク質は、等電点および分子量から、 α -クリスタリンが分解または修飾を受けて低分子化や等電点の酸性側への移行が起こったものと思われる。この α -クリスタリンの水晶体内での変化は、分子シャペロン機能の低下を招き、他のクリスタリンの凝集が促進され、混濁を加速し、白内障の進行を速める結果になると考えられる。

3. c-fos、c-jun 遺伝子の解析

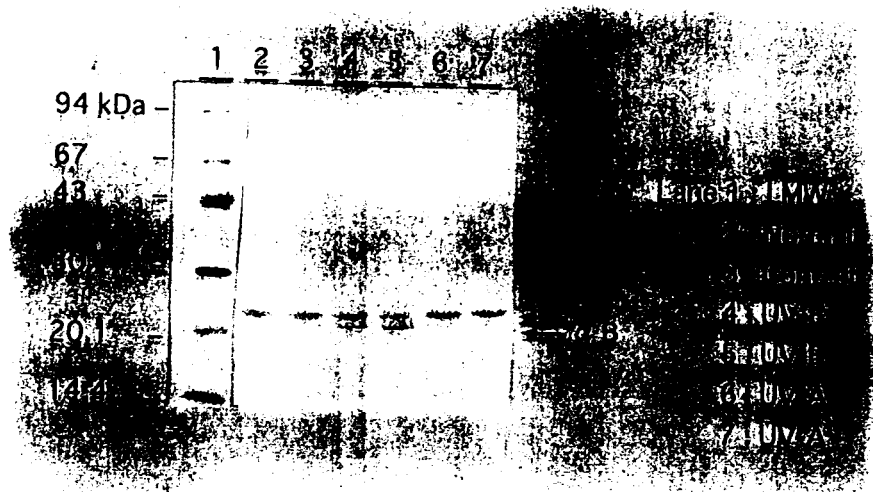
UV-B 照射量によっては水晶体上皮細胞は増殖の抑制を受け、その後増殖率の回復を示すことから、細胞の増殖に関与する遺伝子で発がん遺伝子でもある c-fos、c-jun 遺伝子の発現をノーザンブロット法を用いて検討した。発現は 100 J/m² 照射細胞で最も顕著であり、それ以上では発現が低下した（図 9）。また、100 J/m² 照射での発現の経時変化は、c-fos は照射後 30 分で、c-jun は 1 時間で最大の発現を示し、その後低下した（図 10）。これらの変化は培養上皮細胞の成長曲線の変化に対応しており、発現量の多い線量では増殖が確認されたが、それ以上の照射量ではほとんどの細胞が死に至った。これら発がん遺伝子の発現に対応して、がん抑制遺伝子の発現が起こるものと考え、その中の遺伝子の一つである p53 タンパク質に着目して解析を行ったが、紫外線照射による発現の増加は確認できなかった。しかし、発がん遺伝子の発現はこれまで過酸化水素処理水晶体で明らかにされている⁷⁾が、本実験における発現も、同様の機構が関与しているものと考えられる。

4. DNA ストランドブレイクの検出

UV-B 照射による DNA への影響を、ストランドブレイクの検出についてはシングルセルゲルアッセイ法で、核の形態についてはヘキスト染色法により検討した。紫外線未照射細胞の DNA



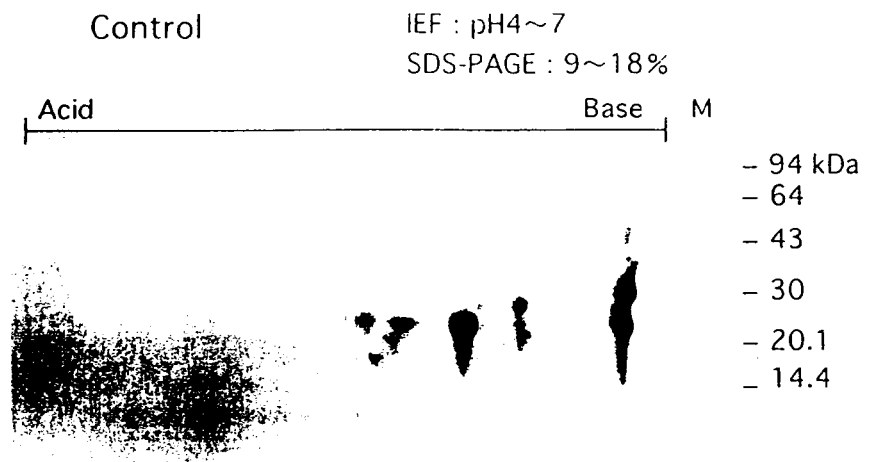
a) SDS-PAGE



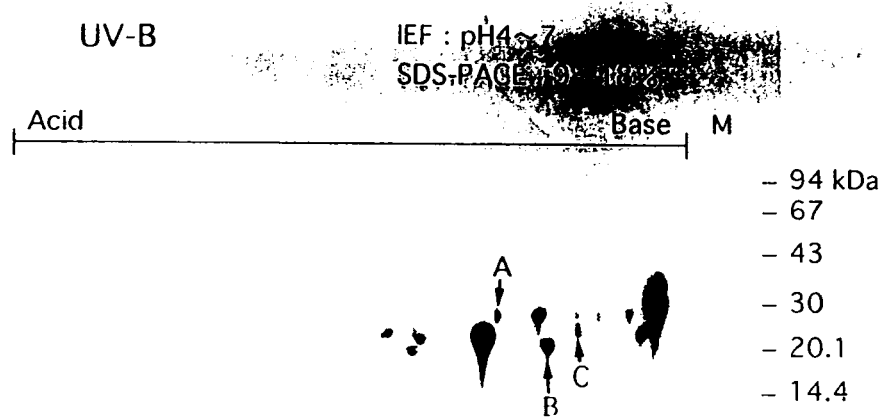
b) 抗 α B-クリスタリン抗体を用いたウェスタンブロット

Fig. 5 紫外線照射後72時間培養した水晶体のSDS-PAGEと
抗 α B-クリスタリン抗体を用いた
ウェスタンブロット法による解析

- a) UV-B暴露水晶体は約30kDaのバンドの消失と
20kDa前後のバンドの増減が観察される。
- b) コントロール水晶体の抗体陽性のバンド（約24kDa）より
UV-B暴露水晶体では、低分子に抗体陽性のバンド（約21.5kDa）
が出現する。



a) コントロール水晶体



b) UV-B暴露水晶体

Fig. 6 酸性側タンパク質の2次元電気泳動像

b) UV-B暴露水晶体に著しく増加したスポットと新たに出現したスポットを矢印A、B、Cに示す。

131 140
Gly-Arg-Lys-Gly-Glu-Leu-Ser-Asp-Asp-Tyr-
Lys-Gly-Glu-Leu-Ser-Asp-Asp-Tyr-

141 150
Pro-Ser-Leu-Gln-Ala-Met-Gly-Trp-Asp-Gly
Pro- X -Leu-Gln

Fig. 7 スポットAのアミノ酸配列

スポットAのアミノ酸配列に対応する
ウシ β A₄-クリスタリンのアミノ酸配列を
網かけ部分（133～144残基）に示す。
この部分は約92%の相同性を有している。

51 60
Ser-Leu-Phe-Arg-Thr-Val-Leu-Asp-Ser-Gly-
Thr-Val-Leu-Asp-Ser-Gly-

61 70
Ile-Ser-Glu-Val-Arg-Ser-Asp-Arg-Asp-Lys
Ile-Ser-Glu-Val-Arg- X -Asp

Fig. 8 スポットBのアミノ酸配列

スポットBのアミノ酸配列に対応する
ラット α A₂-クリスタリンのアミノ酸配列を
網かけ部分（55～67残基）に示す。
この部分は約92%の相同性を有している。

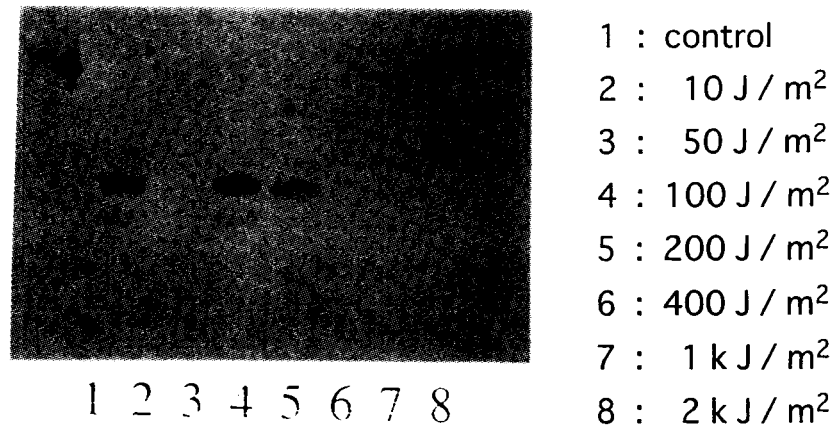


Fig. 9 : 紫外線照射量に対するc-fos、c-junの発現

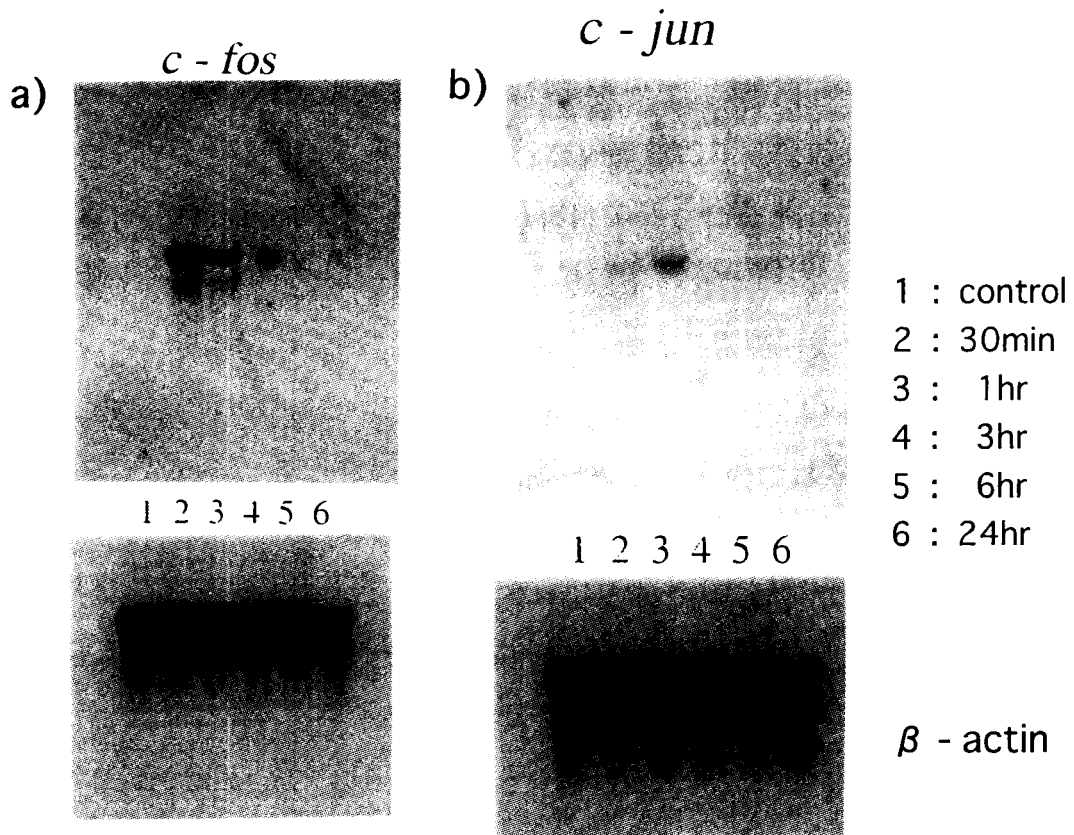


Fig. 10 : 100J/m²照射細胞における
 c-fos、c-jun遺伝子の経時変化

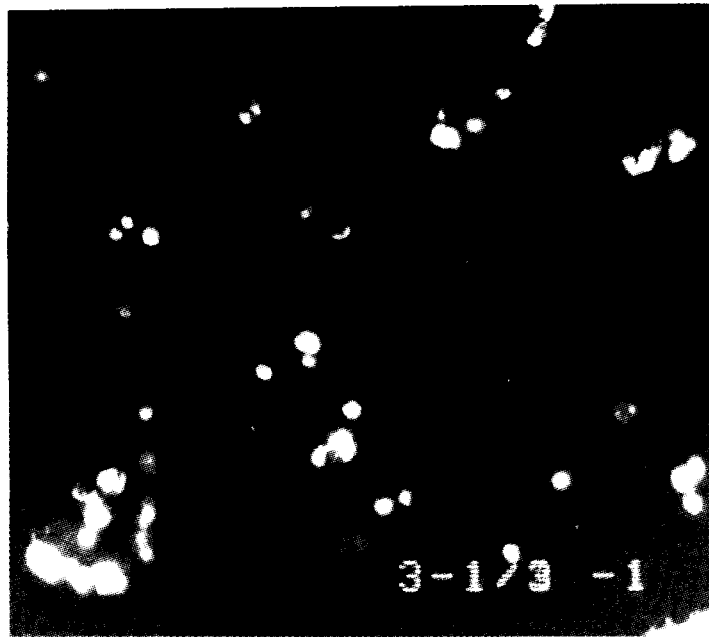
の場合には、核内に存在している状態と同様に球形を保っておりストランドブレイクは観察されなかった。紫外線照射細胞ではストランドブレイクを起こした DNA がコメット状に泳動された (図 1 1)。この移動度を照射線量ごとに測定したところ、図 1 2 a に示すごとく 100 J/m²照射の移動度を 1 とすると、400 J/m²で 1.5 倍、1 kJ/m²で 2 倍の移動度であり、照射線量に依存してストランドブレイクの程度が大きくなることが判明した。また、100 J/m²照射細胞では、照射 48 時間後に移動度の減少が観察され (図 1 2 b)、DNA が修復されたものと思われた。

紫外線照射後の核の形態観察の結果を図 1 3 に示す。未照射細胞の核 (図 1 3 a, b) は球状で大きく傷害は観察されなかったが、1 kJ/m²照射後 48 時間の細胞核 (図 1 3 d) では凝縮 (矢印 1)、断片化 (矢印 2) が生じていた。また、細胞にも変化が認められ (図 1 3 c)、細胞の縮小 (矢印 3) が観察され、アポトーシス小体⁸⁾と思われる球状物 (矢印 4) も確認された。当初、紫外線照射による細胞死はネクロシスではないかと考えられた。しかしネクロシスにおいては、主に細胞膜の傷害によるイオン勾配のアンバランスが生じていること、また形態的には細胞自体の膨潤による崩壊であることから、今回の結果とは矛盾しており、紫外線照射傷害による細胞死はアポトーシスであると思われる。

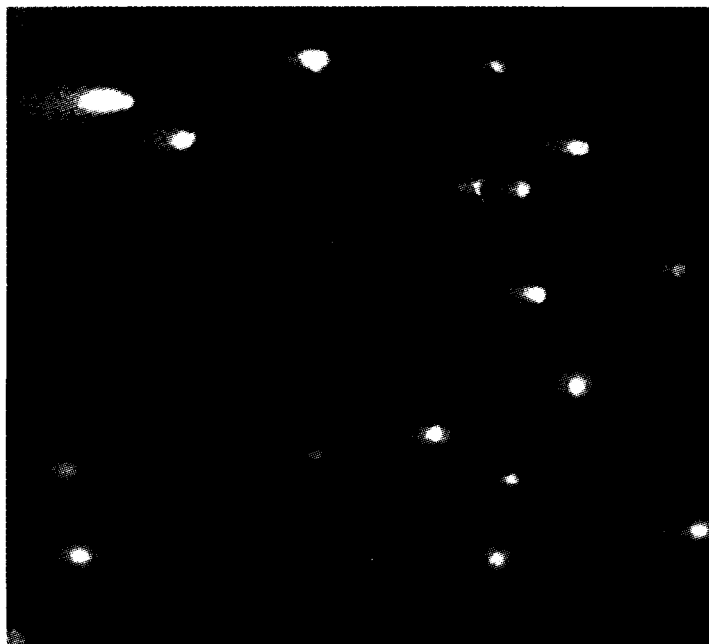
水晶体への紫外線照射による混濁機構の解明は、紫外線が白内障発症の一因であるとの認識が定着しつつある現在、老人性白内障の原因解明の一助ともなると考えられる。本研究では、水晶体の器官培養法と細胞培養法を用い、主にタンパク質と遺伝子に与える影響について検討した。その結果、器官培養水晶体への紫外線の照射では、還元型グルタチオン関連の水晶体防御機構の低下、タンパク質の低分子化や修飾が生じることによる水晶体内のシャペロン機能の低下などにより、水晶体の恒常性の崩壊につながるということが明らかとなった。また、細胞培養による結果では、紫外線照射により細胞の増殖能に変化が生じること、DNA が容易に障害を起こし修復困難な状況に発展すること、そしてアポトーシスをも生じることが明らかとなった。これらの結果を総合すると、水晶体への紫外線照射によって生じた本実験の変化は、生体眼水晶体の混濁状態で観察される細胞配列の乱れや、タンパク質の変化など、ある程度生体内の水晶体の混濁機構を説明し得るものであり、光酸化現象の蓄積が徐々に水晶体の秩序や規則性を乱す結果となり、混濁へと導くものと考えられた。

文献

1. Boettner, E. A. and Wolter, J. R., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1, 776 (1962)
2. 宇賀茂三, 水晶体、発生、構造; 眼科学大系、増田寛次郎編、1994年、中山書店、東京
3. Hikita, M. and Iwata, S., *Jpn. J. Ophthalmol.*, 26, 117 (1982)
4. Kelley, M. J., David, L. L., Iwasaki, N., Wright, J. and Shear, R., *J. Biol. Chem.*, 268, 1884 (1993)
5. Merck, K. B., Patricia, J. and Groenenf, T. A., *J. Biol. Chem.*, 268, 1746 (1993)
6. Kleiman, N. J. and Spector, A., *Curr. Eye Res.*, 12, 423 (1993)
7. Devary, Y., Lau, R. A. and Karin, M., *Mol. Cell Biol.*, 11, 2804 (1991)
8. Kerr, J. F. R., *Br. J. Cancer*, 26, 239 (1972)



a) 未照射細胞



b) 1 kJ/m²照射細胞

Fig. 11 : single cell gel assay法によるDNA strand breakの観察

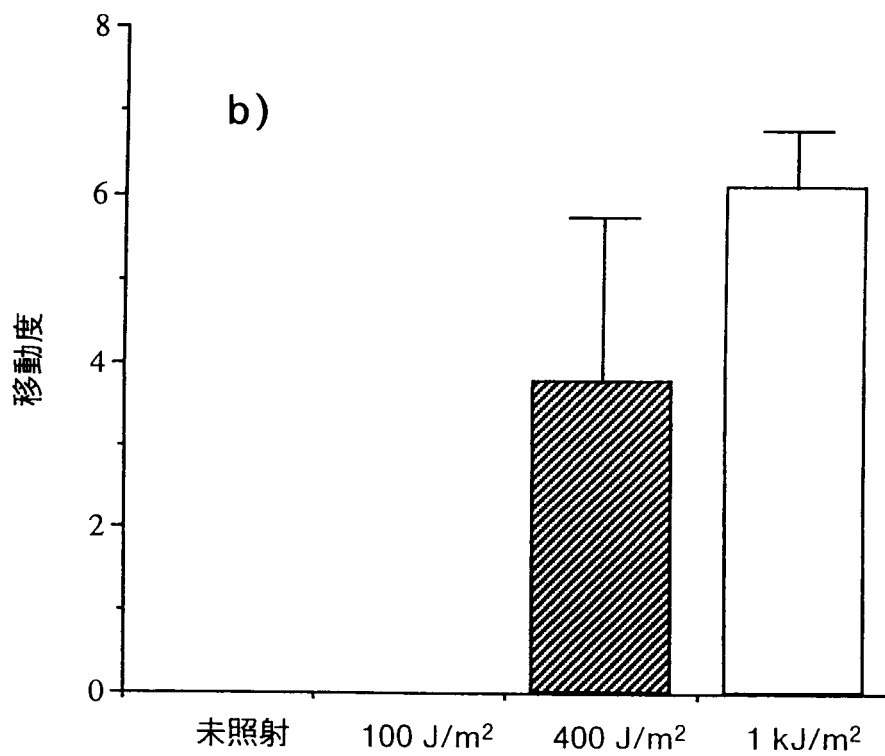
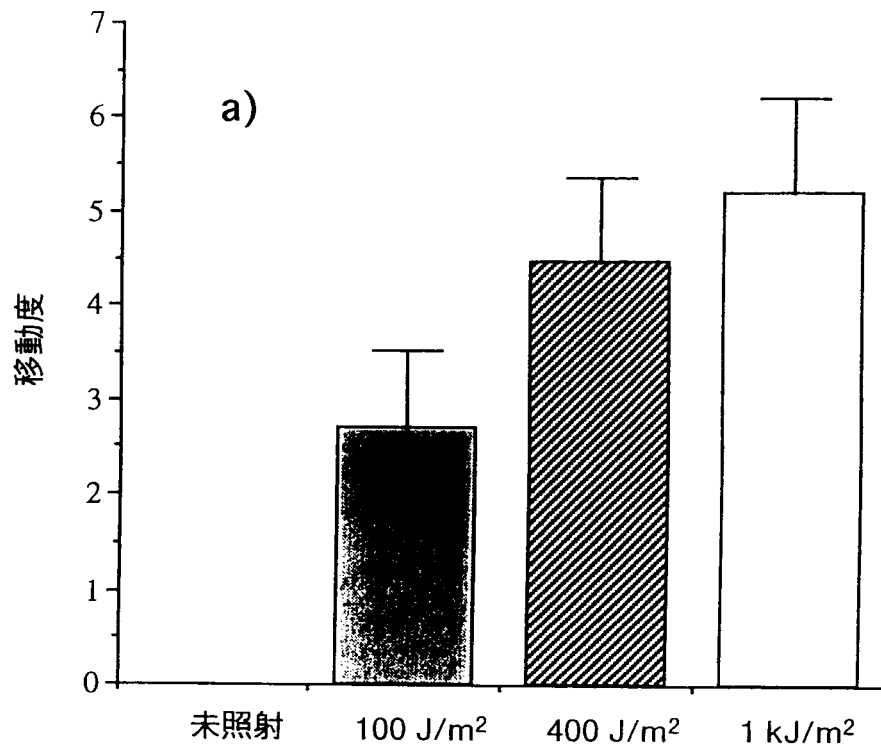
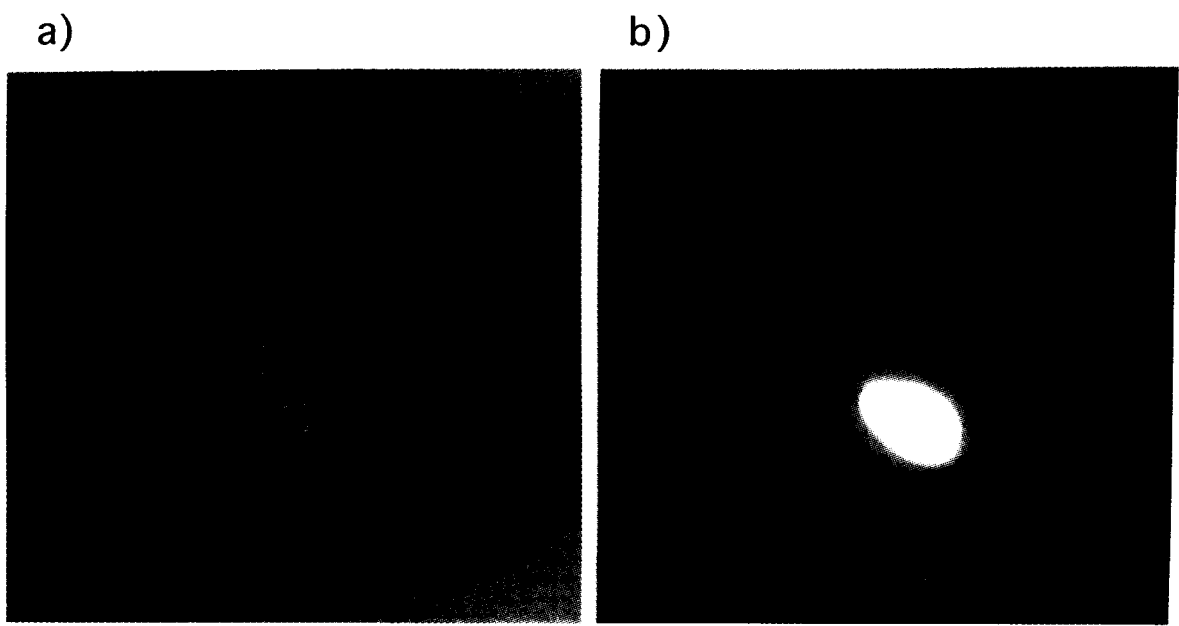
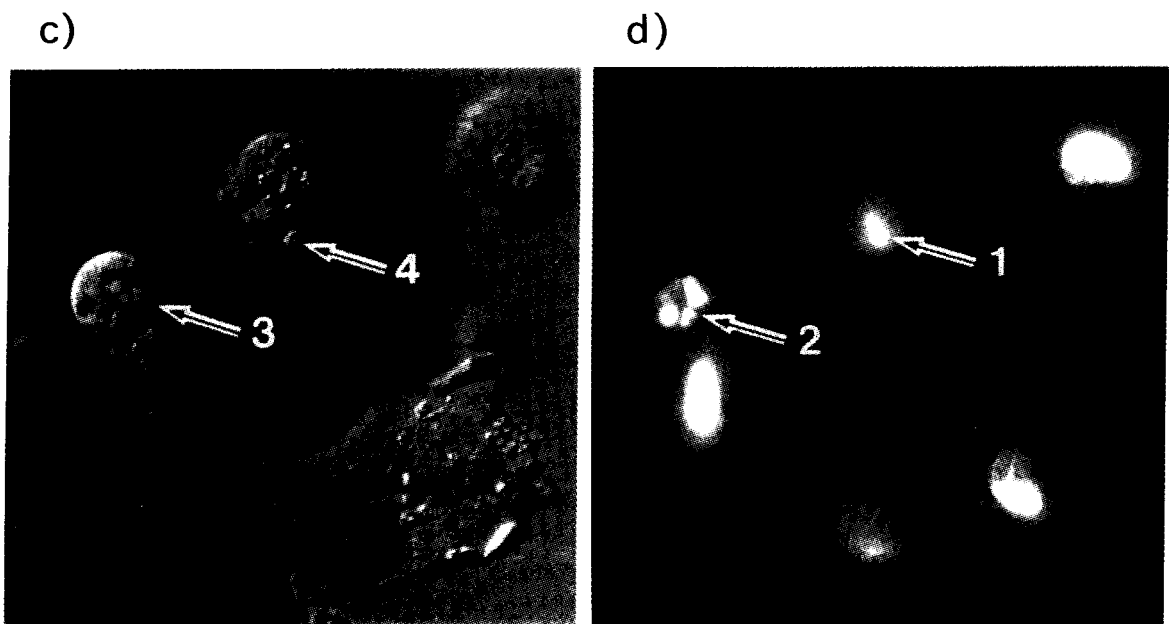


Fig. 12 : UV-B照射細胞におけるDNA移動度



未照射細胞



1 kJ/m²照射細胞

Fig. 13 : 細胞および細胞核の観察