

学位論文の要約

題目 γ 線照射によって生じるクリスタリン中の酸化、脱アミド化部位の迅速分析

氏名 金 仁求 (Kim InGu)

結言

水晶体は光を透過させ焦点を網膜上に合わせるという機能を有する透明な器官である。水晶体成分は質量比で約33%がタンパク質であり、約66%が水、残り約1%がその他のミネラルなどである。また、全タンパク質のうち約90%がクリスタリンと呼ばれるタンパク質であり、水晶体質量の約30%を占める。クリスタリンの異常な凝集、不溶化は水晶体を混濁させ白内障を発症させる。白内障の原因となる代表的なストレスとして電離放射線（以下、放射線と記載）が挙げられるが、放射線照射によるクリスタリンの凝集機構および白内障発症機構には不明な点が多い。これまでに、クリスタリン溶液への γ 線照射によって、クリスタリン中に様々な翻訳後修飾が生成することが報告され、それらの修飾がクリスタリンの機能低下、ひいては白内障発症を引き起こすことが示唆されてきた。しかし、生理的条件とは異なったタンパク質溶液に対する放射線照射実験では、*in vivo*における実際的な現象を把握し、水晶体中におけるクリスタリンの凝集機構および白内障発症機構に関して正確に議論することは困難である。本研究では、ラット水晶体組織に直接 γ 線を照射し、*in vivo*における放射線照射によるクリスタリンの翻訳後修飾（酸化、脱アミド化、異性化）についてタンパク質を精製することなく one shot で、微量（500 ng）のサンプルを液体クロマトグラフ質量分析装置（LC/MS/MS）で迅速に分析することに成功した。第一部では、主として、 γ -クリスタリン中の酸化、第二部では主として α -、 β -クリスタリンの酸化、脱アミド化を一斉解析し、これらの修飾によるクリスタリンの凝集、不溶化機構および白内障発症機構について考察した。

1. ラット水晶体への γ 線照射による γ -クリスタリンのアミノ酸残基の酸化

クリスタリンは、会合体の大きさに従って α -クリスタリン、 β -クリスタリン、 γ -クリスタリンの3種類に分類される。 α -クリスタリンは、 αA -、 αB -クリスタリンの2種類のサブユニットから構成される約40量体の会合体として存在してい

ると考えられており、heat shock protein (HSP) family に属し、水晶体内においては β -クリスタリンや γ -クリスタリンの不溶化を防ぐ分子シャペロンとしての機能を持つ。 β -クリスタリンは β A1-、 β A2-、 β A3-、 β A4-、 β B1-、 β B2-、 β B3-クリスタリンの 7 種類に分類され、2-6 量体の会合体として存在している。 γ -クリスタリンは、 γ A-、 γ B-、 γ C-、 γ D-、 γ E-、 γ S-クリスタリンの 6 種類に分類され、それぞれ単量体として存在する。 β -クリスタリンと γ -クリスタリンは水晶体の透明性および屈折率の維持を担っている。

申請者は、第一部で、放射線白内障発症しきい線量相当の 5 Gy の γ 線を 4 週齢のラット水晶体に照射し、 γ -クリスタリン中のアミノ酸残基の酸化部位を以下のような方法により同定した。1) γ 線照射水晶体をホモジェナイズし、遠心分離により可溶性 (water soluble: WS) 画分と不溶性 (water insoluble: WI) 画分に分離した。2) WS および WI 画分をそれぞれトリプシン処理し、全タンパク質をペプチド断片化した。WI 画分はトリプシン処理に先立ち、8M 尿素で溶解し、尿素濃度を 1 M に減じた後、トリプシン処理した。3) 得られた両画分由来のトリプシンフラグメントを one-shot LC/MS/MS で一斉分析した。ペプチドの同定およびクリスタリン中のアミノ酸残基の翻訳後修飾に関しては Proteome Discover により、解析を行った。その結果、5 Gy の γ 線照射によりラット水晶体 WS 画分中の γ E- and/or γ F-クリスタリンの Trp 69、Met 70、および Met 102 残基が部位特異的に酸化されていた。これらの残基は ASA (solvent accessible surface area) 解析により分子表面に露出していることが判明し酸化ストレスを受けやすいと考えられた。WI 画分では、これらの残基に加えて、多数のアミノ酸残基が酸化されていた。これらの酸化部位は加齢性白内障のヒト水晶体中の γ -クリスタリンの酸化部位と一致していた。未照射の γ -クリスタリン中では酸化は見られなかった。

2. ラット水晶体への γ 線照射による α -および β -クリスタリンのアミノ酸残基の翻訳後修飾

第二部では、放射線の *in vivo* における水晶体含有タンパク質への影響の包括的な解明のため、5 Gy から 500 Gy という広い線量範囲の γ 線を 4 週齢のラット水晶体に照射し第一部と同様の方法で、WS および WI 画分中の α -クリスタリンと β -クリスタリンのアミノ酸残基の酸化、脱アミド化、異性化に関して、one-shot LC/MS/MS で一斉分析した。その結果、 α -および β -クリスタリンの酸化は未照射、および 5 Gy の照射では生じず、50 Gy 以上の照射によって、初めて Met、Trp、His 残基に生じた。第一部で述べたように γ -クリスタリン中のアミノ酸残基は 5 Gy の照射で酸化したことから、 α -および β -クリスタリンは、 γ -クリスタ

リンと比較して γ 線照射に対して酸化されにくいことが示された。 α -および β -クリスタリン中の Met、Trp、His 残基などの酸化部位はヒトの加齢性白内障のクリスタリン中で生じている酸化部位と共通していた。

次に、 γ 線照射後のラット α -、 β -クリスタリン中の Asn および Gln 残基の脱アミド化について検討した。 α -、 β -クリスタリン中の脱アミド化は、5 Gy 以上の γ 線照射によって多数の Asn および Gln 残基の部位に生じた。これらの部位もヒト加齢性白内障水晶体クリスタリンにおいて検出されている部位と共通していた。脱アミド化によって、Asn 残基は Asp へ、Gln 残基は Glu へと変化し、タンパク質側鎖に電荷がもたらされるため、 γ 線照射によって誘導された脱アミド化は α -、および β -クリスタリン間の相互作用に変化をもたらすと考えられる。これを反映し、脱アミド化は WI 画分に多く見られた。

加齢性白内障のクリスタリン中ではアミノ酸残基の酸化、脱アミド化に加え Asp 残基の異性化が検出されている。このことより、 γ 線照射ラット水晶体クリスタリンにおいても Asp 残基の異性化が予測された。しかし、どのクリスタリンにおいても Asp 残基の異性体は検出されなかった。過去の研究で、Asp 残基の異性化は照射後、一定の時間を要していたことから、本研究における照射直後の試料では異性化に至る時間が不十分であると考えられた。

結語

本研究において検出された全ての翻訳後修飾の部位の数は、WS 画分中のクリスタリンより WI 画分中のクリスタリンにおいて、はるかに多かった。また、本研究において検出された翻訳後修飾は、ヒト加齢性白内障水晶体クリスタリンにおける相当部位においても同様に認められた。これらのことより、 γ 線照射によって水晶体クリスタリン中に生じる翻訳後修飾はクリスタリンの凝集、不溶化を引き起こし、白内障を発症させる原因となることが強く示唆された。