

氏名	武藤 誠太郎 むとう せい たらう
学位の種類	薬学博士
学位記番号	薬博第188号
学位授与の日付	昭和55年7月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科製薬化学専攻
学位論文題目	腹水肝癌細胞の原形質膜に存在する複合糖質の化学的性質および構造に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 山科郁男 教授 富田謙吉 教授 高木博司

論文内容の要旨

動物細胞の原形質膜に存在する糖タンパク質、プロテオグリカンなどの複合糖質は、細胞と細胞あるいは細胞と外環境因子との相互作用に関与することが示唆され、細胞表面の化学的、生物学的性質を決定する重要な成分と考えられている。

著者の所属する研究室では、ラット腹水肝癌細胞 AH 66, AH 130 およびラット正常肝、再生肝細胞の原形質膜に存在する糖タンパク質、プロテオグリカンの化学的性質を明らかにしてきた。ラット腹水肝癌細胞には、腹水中で細胞が接着して存在する島型と、遊離して存在する自由型があり、AH 66, AH 130 はいずれも島型に属する。著者は AH 130 の亜系で、自由型である AH 130 FN を用い、原形質膜の糖タンパク質、プロテオグリカンの化学的性質を、島型の腹水肝癌細胞および正常肝、再生肝細胞と比較した。

AH 130 FN 細胞より原形質膜を単離し、それをプロナーゼ消化して、糖タンパク質、プロテオグリカンを糖ペプチド、ムコ多糖の形にした。それらをゲル濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、セルロースアセテートブロック電気泳動により分画した結果、糖ペプチドとしてはN-グリコシド型とO-グリコシド型が検出された。O-グリコシド型糖ペプチドはラット正常肝、再生肝細胞では検出されず、これまで島型の腹水肝癌細胞に特徴的に見いだされてきた。これにより、O-グリコシド型糖ペプチドは島型だけでなく、自由型の腹水肝癌細胞にも存在することが明らかになった。しかし、その分子量はゲル濾過の溶出位置より、島型細胞に比べて小さいことが示され、糖鎖がポリペプチド鎖に粗に結合していると推定された。また、その化学組成はそれぞれの細胞により、少しずつ異なっていた。

一方、ムコ多糖はコンドロイチン硫酸Aであることが、セルロースアセテート電気泳動、コンドロイチナーゼ AC 消化により示された。島型の腹水肝癌細胞および正常肝、再生肝細胞ではヘパラン硫酸が存在しており、細胞が遊離して存在する自由型細胞では、ムコ多糖が著しく異なることが示された。

このような原形質膜のムコ多糖は、ポリペプチドと共有結合した複合体すなわちプロテオグリカンとし

て存在している。原形質膜のプロテオグリカンは、ムコ多糖部分については多くの研究がなされているが、全体の性質はほとんど明らかにされていない。そこで、著者はつぎに原形質膜のプロテオグリカンを単離し、その化学的性質および構造を明らかにした。

実験材料としては、大量の原形質膜の調製法が確立されている腹水肝癌細胞 AH 66 を用いた。著者は大量の原形質膜を調製し、そこからプロテオグリカンをドデシル硫酸ナトリウムにより可溶化した。そして、ゲル濾過、セチルピリジニウムクロリドを用いた分別沈殿により、プロテオグリカンを90%の収率で単離した。このプロテオグリカンは糖鎖としてヘパラン硫酸のみから成るプロテオヘパラン硫酸であることが、アルカリ分解物のセルロースアセテート膜電気泳動および糖組成により示された。プロテオヘパラン硫酸は10.6%のタンパク質を含み、その主要なアミノ酸は結合組織のプロテオグリカン同様、グルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、グリシン、スレオニン、セリンであった。

プロテオヘパラン硫酸にはキシロースとガラクトースが1:2のモル比で存在することが、マスフラグメントグラフィによる中性糖の定量で明らかにされ、結合組織のプロテオグリカン同様、ガラクトース→ガラクトース→キシロースの連結領域が存在することが示された。

さらに、プロテオヘパラン硫酸は60,000~90,000の分子量分布をもち、その重量平均分子量は71,000であることが沈降平衡により求められた。一方、ヘパラン硫酸も16,000~26,000の分子量分布を有することがゲル濾過により示され、重量平均分子量は沈降平衡により、21,000と決定された。ヘパラン硫酸の分子量は化学組成、ゲル濾過によっても求められ、いずれも沈降平衡で得られた値とほぼ一致した。プロテオヘパラン硫酸のポリペプチド部分の平均分子量は、化学組成比より7,500と計算された。

以上の分子量より、プロテオヘパラン硫酸は、平均して3本のヘパラン硫酸鎖がポリペプチド鎖に結合して成り立っていると推定された。この分子サイズは、数種類のムコ多糖がポリペプチド鎖に多数結合し、分子量が百万のオーダーに達する結合組織の細胞間質に存在するプロテオグリカンにくらべ、著しく小さく、しかもヘパラン硫酸のみから成る単純な構造であることが明らかになった。

以上、著者は自由型の腹水肝癌細胞 AH 130 FN の原形質膜より単離した糖ペプチドおよびムコ多糖の化学的性質を明らかにした。また、AH 66 細胞の原形質膜よりプロテオグリカンを単離し、その化学的性質および構造を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

動物細胞の原形質膜に存在する複合糖質は細胞間および細胞と外環境因子との相互作用に關与する重要な因子であり、ムコ多糖およびその母体であるプロテオグリカンもその一つである。しかし、その存在量が微量のためプロテオグリカンの諸性質についての研究は極めて乏しい。

本論文は腹水肝がん細胞を材料とし、その原形質膜からプロテオグリカンを単離して、その化学的性質と構造をはじめて明らかにしたものである。

著者は腹水肝がん細胞 AH 66 より原形質膜を相当量調製したのち、界面活性剤を用いてプロテオグリカンを抽出し、ゲル濾過、カチオン型界面活性剤による分別沈殿により均一なプロテオヘパラン硫酸を調製している。その化学分析により、糖鎖が典型的なヘパラン硫酸であること、また、ペプチド含量が約10

%であることを明らかにした。次いで、マスフラグメントグラフィーにより連結領域がキシロース1分子、ガラクトース2分子より成ることを明らかにした。この値はヘパラン硫酸鎖の数平均分子量を求めるのにも用いられている。さらに、ゲル透過および沈降平衡法によりプロテオヘパラン硫酸およびそのアルカリ分解によって得られるヘパラン硫酸の分子量を求めている。その結果と上記の数平均分子量の値とから、ヘパラン硫酸、プロテオヘパラン硫酸の分子量をそれぞれ約2万、および約7万と決定している。その結果、プロテオヘパラン硫酸が分子量7,500のペプチド鎖に3本のヘパラン硫酸鎖が結合していると結論している。この構造は結合組織マトリックスのプロテオグリカンについて知られている巨大分子構造とは著しく異なるものである。

以上の知見は、細胞膜のプロテオグリカンについて初めて化学的性質、構造を示したものであり、結合組織マトリックスとは異なるユニークな性質、構造をもつことを明らかにしたものである。これらの成果は、がんのような深刻な疾病に密接な関係をもつといわれる細胞膜複合糖質の意義を理解する上で極めて重要なものである。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。