

氏名・（本籍）	たか がき ゆう こ 高 垣 裕 子
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 第 5 0 8 号
学位授与年月日	昭和 5 1 年 1 0 月 2 7 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最終学 歴	昭和 4 8 年 3 月 東北大学大学院理学研究科 (修士課程) 生物学専攻修了
学位論文題目	ブタ胃粘膜硫酸化糖タンパク質の抗ペプシン作用
論文審査委員	(主査) 教 授 小 西 和 彦 教 授 樋 渡 宏 一 助 教 授 四 釜 慶 治

論 文 目 次

第一章	序 論
第二章	材料と方法
第三章	結 果
第四章	考 察
第五章	要 約
	引 用 文 献

論 文 内 容 要 旨

第一章 序 論

タンパク質分解酵素であるペプシンが、濃厚な、しかも至適pHの塩酸酸性溶液として分泌されているのに、何故胃壁が胃液により消化されないかという疑問は、未だ解明されていない。しかし、胃液による胃壁の損傷が原因と考えられる病態も広く存在するところから、健康な生体において、胃壁を胃液の攻撃から保護している何らかの機構が予想される。

まず第一に、胃壁を構成する粘膜細胞の代謝回転を速くしている機構が考えられる。Leblondらの実験から、rat胃粘膜の胃腔に面した表在上皮細胞は、分裂から3—4日後には細胞の脱落を伴って粘液を全分泌することが知られている。代謝回転の速さは、胃液による損傷に対して、細胞を次々置き換えることで対抗する方法である。

第二は、厚い粘膜層の緩衝作用及び粘性などが、胃の内胞側から上皮細胞への塩酸とペプシンの侵入を防いでいる機構である。Heatleyは、粘膜分泌物が中性の溶液として分泌されているので、胃腔側からペプシンが拡散しても、粘膜層内で失活してしまうと述べている。

第三は、粘膜の表在上皮細胞が、塩酸不透過性であるとする考え方である。表在上皮層が塩酸不透過性で、腺細胞内からは塩酸の定常流が分泌されているならば、そこに不透過機構が存在する訳である。

第四には、粘膜の構成成分が、ペプシンの消化を受けにくい、あるいは積極的にペプシンの酵素作用を抑えているとの考え方がある。特にこの抗ペプシン作用は、胃腺の腺腔内で必要と考えられる。何故なら、胃底腺の外分泌細胞(chief cell: 酵素, parietal cell: 塩酸, mucous neck cell: 粘液)は混在しており、塩酸もペプシンも同一の腺腔に遊離・放出されるので、塩酸によってペプシノーゲンから活性化されるペプシンは、腺腔で既に活性を持った酵素として存在していると考えねばならない。しかも胃腺細胞は、表在上皮のような短いhalf-lifeを持たないことが報告されており、腺腔に分泌される物質の中に何らかの抗ペプシン作用を持つ物質を想定するのは必然ともいえる。

著者は、Lebの詳細なヒト胃粘膜の組織化学的研究結果などから、胃小窩深部と胃底腺に存在すると考えられ、又、合成硫酸多糖体が抗潰瘍剤として有効であるところから、同様の作用も期待される硫酸化糖タンパク質に注目した。そして、研究材料としては、新鮮な胃粘膜が大量に得られ、しかもヒトとほとんど同じ構造のペプシンを持つと考えられているブタを選んだ。粘膜糖タンパク質の精製に際しては、従来行なわれていたタンパク分解酵素処理を行わず、より本来の構造に近いと思われる硫酸化糖タンパク質の精製を試みた。そして、それがペプシン活性に及ぼす影響を検討するために、糖タンパク質も含めたタンパク基質に対する新しいペプシン活性測定法を開発

して測定を行なった。その結果、硫酸化糖タンパク質がペプシンによる加水分解を全く受けないこと、更には、タンパク質のペプシン水解に対して、見かけ上阻害作用を示すことを明らかにした。本論文では、この硫酸化糖タンパク質の性質及びそれが示す見かけ上の阻害作用の作用機作を検討すると共に、組織化学的に硫酸化糖タンパク質の組織内局在を確認し、それらの結果から、この硫酸化糖タンパク質の持つ生理的役割を考察した。

第二章 材料と方法

ブタ胃粘膜硫酸化糖タンパク質の精製は、アセトン脱脂粉末からの中性塩溶液抽出後、イオン交換クロマト (DE-32, CM-32), ゲル透過 (Bio-Gel A-1.5m及びA-1.5m) の手段で分画して行ない、硫酸含量の異なるSGP-1からSGP-4を得た。抽出物のうち、エタノール分画後に不溶化した画分については、従来法に習ってTrypsin 分解した後にクロマト操作を行なって精製し、SGP'-1からSGP'-3を得た。単一性の検討には、1% Agarose-1% Acrylamide, SDS disc electrophoresis, セルローズアセテート膜電気泳動, 超遠心分析, N末端分析の方法を使用した。

構成成分の定量分析には、通常用いられる呈色法の他に、タンパク質はアミノ酸分析法, 糖はガスクロマトグラフィー, 硫酸基は蛍光X線分析法を併用した。

ペプシン活性の測定には、既存の方法、合成基質APD水解法、ヘモグロビンを基質としたAnson 変法, Radial Diffusion Assay 法を使用し、又、初速度測定による反応解析のためには、 α -アミノ基のTNP化を原理とする、Dowex X-8樹脂を用いた新しいペプシン活性微量定量法を開発して使用した。

SGPとタンパク質間の相互作用の解析には、開発したペプシン活性測定法、組成分析による結合量、結合比の決定、CD測定などの方法を用いた。

SGPのタンパク結合性の構造的研究には、SGPのアルカリ処理法、塩酸水解法、neuraminidase 処理によるシアル酸除去、solvolysis による脱硫酸法、赤外吸収スペクトル測定法などの方法を用いた。

組織化学的研究には、Toluidine Blue 染色, PAS 染色した組織切片の光学顕微鏡観察及び、Chondroitinase ABC, neuraminidase 処理切片の同様染色と観察を行ない、細胞の同定には電子顕微鏡観察を行なった。

第三章 結 果

精製されたSGP-1からSGP-4は、DE-32からの溶出順序に従って硫酸含量が高くなる他は、糖組成やアミノ酸組成には、顕著な差はなかった。

SGPは通常用いられる方法で調べてほぼ単一であり、その化学的組成は、Protein 約20%、Hexosamine 約30%、Galactose 約30%、Fucose 約20%であった。アミノ酸組成はSerとThrが約半分を占めるmucin型糖タンパク質の組成を示した。

Trypsin処理して得られたSGP¹-1からSGP¹-3については、収量からも、化学的組成からも(タンパク含量が半減しており、アミノ酸組成も大きく変化している)、SGPのTrypsin部分分解物であって、生体中での状態を反映していないと考えられる。Trypsin処理したSGP¹では、SGPのアミノ酸のうち、Thr、Pro、Ser、Glyなどのアミノ酸だけがそのまま残って、他のアミノ酸が切断された組成が示されたので、これらのアミノ酸が糖鎖の結合部位に存在していると考えられる。

SGPは、従来のペプシン活性測定法により、タンパク質のペプシン水解にのみ影響を及ぼすことが示唆されたが、明らかではなかった。そこで、TNP法によるペプシン活性微量測定法を開発し、糖タンパク質も含めたタンパク質に適用できる方法を確立した。

この方法を用いてpepstatinのペプシン阻害定数を求めたところ、 3.4×10^{-8} Mという値が得られ、Frutonらが、合成基質で報告している値とほぼ同じなところから、この方法が阻害剤の反応解析に有効であることがわかった。

そしてこの方法でSGPのペプシン水解に及ぼす影響を調べたところ、SGP自体はペプシンにより全く水解されず、更に見かけ上の阻害作用が存在し、それは基質タンパクとSGPが結合する結果であることが示唆された。更にこのcomplexについて化学組成を調べたところ、硫酸基の多いSGP程全体として多くのSGPと基質タンパクが結合していた。又、complex自体の結合比率SGP/基質タンパクは、硫酸基の多いもの程小さく、結合の際の密度の高さが示唆された。

この結合の構造的な研究をCDスペクトル測定により行なったところ、基質アルブミンのCDスペクトルが、SGPとの混合により大きく変化し、 α -helixの消滅と何らか新しい規則構造の出現が示された。又、赤外吸収スペクトルから、この結合に硫酸基の関与することが示された。

更にSGPをアルカリ処理・脱シアル化等、硫酸基に影響を与えない方法で処理したところ、見かけ上の阻害は保たれ、脱シアル化しても、CDスペクトルに変化を与える作用は保たれていた。ところが、塩酸水解、脱硫酸化等、硫酸基を脱離させる方法で処理すると、見かけ上の阻害はなくなり、脱硫酸化した場合、基質アルブミンのCDスペクトルに変化を与える作用も消失した。

組織化学的研究からは、硫酸化糖タンパク質特有の染色性(Toluidine Blue染色でmetachromagyを起し、PAS染色で可染性)を示す細胞が、胃底腺内に広く分布していることが明らかになり、更にその細胞は、従来胃底腺底部にはあまり存在しないといわれていたmucous neck cellとほぼ同じ形態を持つことが知られた。

第四章 考 察

ブタ胃粘膜の胃底腺内で分泌されていると考えられる硫酸化糖タンパク質が精製された。このものは、それ自身約20%のタンパク質を含むにもかかわらずペプシンによる加水分解を受けず、更に基質タンパクと結合することにより基質をペプシン水解から保護する抗ペプシン作用を持つことが、著者の開発したペプシン活性微量測定法により示された。

更にこの硫酸化糖タンパク質のタンパク結合性は、硫酸基を介したもので、タンパクの二次構造に大きな変化を与えるものであることが明らかになった。

又、硫酸化糖タンパク質を分泌する細胞が胃底腺内に局在するところから、この物質が、細胞表面のタンパク質と結合して、ペプシンの攻撃から胃底腺細胞を保護していると推察された。

要 約

引 用 文 献

論文審査の結果の要旨

本論文は、ブタ胃粘膜から抽出、精製した硫酸化糖タンパク質の諸性質とくに、ペプシンのタンパク質加水分解酵素活性に対する作用を明らかにし、さらに組織化学的手法により、硫酸化糖タンパク質の胃における局在部位を検索、それらの結果からこの物質の生理的役割について論じたものである。

胃壁が胃液のペプシンのタンパク質加水分解作用から保護されている機構については、すでに幾つかの説が提示されているが、なお検討の必要がある生理学上の大きな問題である。

著者は、胃粘膜から多量にえられる硫酸化糖タンパク質(SGP)が、抗ペプシン作用をもつことを予想して研究を行った。まず、ブタの胃粘膜から、新しい方法で、従来報告されているものより、より本来の構造に近いと考えられるSGPを精製し、その硫酸含量、糖およびアミノ酸組成を明らかにした。このSGPは、硫酸含量の異なる4種類に分別出来るが、糖およびアミノ酸組成には大きな差はなかった。

次で、新しいペプシンの微量活性定量法を確立し、それを利用してペプシンの加水分解活性におよぼすSGPの影響を検討した。その結果このSGPはペプシンにより全く分解されず、むしろ他の基質タンパク質のペプシンによる加水分解に対し見掛上阻害効果を示した。これは、基質タンパク質がSGPと結合して、 α -ヘリックスが消滅する構造変化を起すためであることがCDスペクトルの変化から明らかにされ、また硫酸含量の多いSGPがより少量で基質タンパク質・SGP複合体をつくること、および赤外吸収スペクトル、さらに、脱硫酸処理したSGPが阻害効果をもたないことなどから、SGPの硫酸基が、基質タンパク質との複合体形成に重要な役割を担っていることが示された。

組織化学的研究から、SGP分泌細胞と見做しうる細胞が、胃底部でペプシノーゲン分泌のchief cellに入り混って存在しており、胃底腺内では酵素、塩酸およびSGPがともに分泌されていると指摘している。

以上の結果から、胃底腺腔内に面した細胞表面のタンパク質に、分泌された硫酸化糖タンパク質が結合することによって、腺細胞をペプシンによる分解から保護しているであろうと推論している。

以上の内容は、高垣裕子が自立して研究を行うに十分な研究能力をもつことを示しており、理学博士の論文として合格と証める。