

氏 名 (本籍)	さい 齊	とう 藤	ひろし 浩
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	医	第	9 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 5 1 年 9 月 8 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 3 年 3 月 東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業		
学 位 論 文 題 目	動 脈 の シ ア ロ 糖 ペ プ チ ド と 硬 化 症 (1) Sialoglycopeptides Isolated from Bovine Aorta (ウシ大動脈のシアロ糖ペプチド) (2) Sialoglycopeptides Isolated from Human Arteriosclerotic Tissue (ヒト大動脈の硬化部と非硬化部のシアロ糖ペ チド)		
	(主 査)		
論 文 審 査 委 員	教 授 吉 沢 善 作	教 授 立 木 蔚	
		教 授 菊 地 吾 郎	

論文内容要旨

動脈硬化症の発生と進展に動脈の糖蛋白（特に構造糖蛋白）が重要な役割を演ずるものと推定される。そこで著者らは、ウシ大動脈を用いて、構造糖蛋白のシアロ糖ペプチド（SGP）の分離、精製法を確立し、次いで、ヒト大動脈の硬化部位と非硬化部位よりSGPを単離し、硬化にともなうSGPの変動をしらべた。

1) ウシ大動脈のシアロ糖ペプチド — ウシ大動脈の内一内膜から、予め1%食塩水に可溶性糖蛋白を抽出除去し、残渣をエタノール、エーテルで脱脂した。脱脂粉末をTris-塩酸緩衝液（pH 8.0）中でプロナーゼで消化後、トリクロール酢酸で除蛋白した。その上清を水に透析後、エタノールで複合糖質画分を沈殿させた。次いで、セチルピリジニウムクロリド処理を行ない、その上清からエタノール沈殿法で粗糖ペプチド画分を得た。この画分は、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで、0.05 M Tris-塩酸緩衝液（pH 7.2）中、0-1 M 塩化カリウムの直線濃度勾配溶出を行ない、0.3 M 塩化カリウム付近の濃度で溶出されてくる粗SGPを集めた。この物質は、CM-セファデックスで処理してから、DEAE-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィーで、0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.2）中、0-0.5 M 塩化カリウムの直線濃度勾配溶出を行なった。得られたSGP画分は分離不十分なため、偶数画分と奇数画分を別々に集めて、上記と同じ条件で再クロマトを繰返して、電気泳動的に少しずつ移動度の異なる9種類のSGPを単離した。

いずれのSGPもヘテロ糖鎖を持ち、ヘキソース/ヘキソサミンおよびシアル酸/ヘキソサミンのモル比は、それぞれ1.71~0.98および0.27~1.01とかなりの巾を示した。SGP-8と9ではシアル酸を30%以上含有しており、ヘキソース：ヘキソサミン：シアル酸のモル比は、約6：4：1（SGP 1）~1：1：1（SGP 9）とかなり異なっていた。シアル酸/フコースのモル比も2.1~14.7と巾があり、著者らの分離したSGPは、これまで報告されたSGPに比し、はるかにシアル酸含量の高いことが注目された。ヘキソース、ヘキソサミンはそれぞれ、ガラクトース、グルコサミンを主成分とし、ガラクトサミン/グルコサミンのモル比は、SGP 1から9にかけて次第に大となり、特にSGP 1では、ガラクトサミンが検出されなかった。アミノ酸は、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン等が多かった。特にSGP 3, 4, 5はアスパラギン酸が多く、glycosylamine 結合の存在が、また、SGP 7, 8, 9はhydroxyamino 酸が多く、O-glycoside 結合の存在が示唆された。後者については、糖とペプチドとの結合のアルカリ感受性が、SGP 7~9で高いことから推定された。各SGPの赤外線吸収スペクトルに 1240 cm^{-1} と 820 cm^{-1} の吸収がみられ、硫酸基の存在が示唆

された。

2) ヒト大動脈の硬化部と非硬化部のシアロ糖ペプチド — ヒトの大動脈の内—中膜を硬化部位と非硬化部位とに分け、両組織共ウシ大動脈に適用した方法と略々同様な方法で複合糖質を抽出した。次いで、pH 7.2 でDEAEセファデックスA-25カラムクロマトグラフィーを行ない粗SGP画分を得た。さらに、pH 5.2 でDEAEセファデックスA-25カラムクロマトグラフィーを繰返して、それぞれ4種類のSGPを単離した。

脱脂組織あたりの総SGPは、硬化組織の方が非硬化組織より多く、前者より得られたSGPはいずれも、後者より得られた対応するSGPよりも多かった。また、赤外線吸収スペクトルと水素核磁気共鳴スペクトルから、両組織から得られた対応するSGPは類似の骨核構造をもつものと推定された。

一方、精製SGPはいずれも構成成分を同じくしていたが、その含量にはかなりの差が認められ、糖鎖、ペプチド鎖共不均一性が示唆された。また、同一組織より得られたSGP間には、ウシ大動脈より得られたSGPと同様の傾向が認められ、総体的に、DEAEセファデックスカラムから、低塩濃度で溶出されたものは、ヘキソース、ヘキソサミン、アスパラギン酸を多く含み、高塩濃度で溶出されたものは、シアル酸とhydroxyamino酸を多く含んでいた。また、アルカリ処理の結果から、後者は、前者よりO-glycoside結合が多いものと推定された。さらに、赤外線吸収スペクトルから、SGP4には硫酸基の存在が示唆された。

構成成分については、シアル酸/ヘキソサミン、シアル酸/フコースのモル比は、硬化組織よりのものが、非硬化組織よりの対応するものより稍低い傾向を示したが、有意の差ではなかった。ヘキソースの主成分はガラクトースとマンノースで、マンノース/ガラクトースのモル比は、硬化組織よりのSGPは対応する非硬化組織よりのものより低い傾向を示した。

以上の結果は、これまでの大部分の報告が硬化にともない、シアル酸またはシアロ糖蛋白が減少すると述べた結果を正し、matrixに強く結合している構造糖蛋白としてのSGPは硬化にともない増加することを示す。さらに、そのSGPは骨核構造は同様でも、外殻の微細な構造に変化をもたらすことを示すもので、このようなSGPの変動は大動脈における硬化症の発生と進展に重要な意義をもつものと考えられる。

審査結果の要旨

動脈硬化症の発生と進展に動脈の糖蛋白（特に構造糖蛋白）が重要な役割を演ずるものと推定されるので、著者はまず、ウシ大動脈を用いて、構造糖蛋白のシアロ糖ペプチド（SGP）の分離、精製法を確立し、次いでその方法を用いて、ヒト大動脈の硬化部位と非硬化部位よりSGPを単離し、硬化にともなうSGPの変動をしらべた。

すなわち、上記大動脈の内一中膜から、1%食塩水で抽出される糖蛋白を除去、残組織を脱脂してから、プロナーゼで消化し、粗複合糖質を分離した。これをセチルピリジニウムクロリドで分画し、さらにDEAE-セルロースまたはセフアデックス（pH 7.2）、CM-セフアデックス、DEAE-セフアデックス（pH 5.2）を順次に用いたカラムクロマトグラフィーで分画、精製し、ウシ大動脈からは9種類のSGPを、またヒト大動脈の硬化部と非硬化部からはそれぞれ4種類のSGPを単離した。

精製SGPはいずれも、ほぼ構成成分を同じくしていたが、その含量にはかなりの差が認められ、糖鎖、ペプチド鎖共不均一なことを示した。一方、同一組織より得られたSGP間には総体的に、DEAE-セフアデックスカラムから、低塩濃度で溶出されたものは、ヘキサース、ヘキサミン、アスパラギン酸を多く含み、高塩濃度で溶出されたものは、シアル酸とヒドロキシアミノ酸を多く含むことを明らかにした。また、アルカリ処理の結果から、後者は前者よりO-グリコシド結合が多いものと推定した。

ウシより得られたSGP 8と9はシアル酸を30%以上含有しており、大動脈中にこのようなシアル酸含量の高いSGPの存在は新知見である。

また、ヒトの場合、脱脂組織あたりの総SGP量は、硬化組織の方が、非硬化組織より多く、前者より得られた標品はいずれも、後者より得られた対応する標品よりも多かった。この成績はこれまでの大部分の報告が、硬化にともない、シアル酸またはシアロ糖蛋白が減少すると述べた結果を正し、matrixに強く結合している構造糖蛋白としてのSGPは硬化にともない増加することを示すものである。さらに標品の化学分析結果と赤外線吸収スペクトルおよび水素核磁気共鳴スペクトルから、硬化と非硬化組織から得られた、対応するSGPは、骨核構造は同様でも、外殻の微細な構造に差があることを明らかにした。このことはSGPの外殻の微細な構造が硬化にともない変化することを示す。

以上の成績は、大動脈における硬化症の発生と進展に重要な手がかりを与えたものといえる。よって本論文は学位を授与するに値する。