腹壁内の糖ペプチドおよび酸性ムコ多糖の電気泳動*

増田 博・七條茂樹・武内睦哉**

Summary

A study has been made of the glycopeptide and glycosaminoglycan in the normal human abdominal wall. Both the hexose and uronic acid contents were highest in the skin, and values were lowest in the muscle. Cellulose acetate strip electrophoresis of concentrates revealed the presence of three alcian blue positive fractions in every case, numbered in order of increasing electrophoretic mobility, fraction I, II and III. The relative proportions of the fraction I was almost equal to that of fraction III in the skin as well as in the adipose tissue. Whereas the proportion of the fraction I was highest in the muscle, and that of fraction III was lowest in the fascia.

Key words : glycopeptide, glycosaminoglycan, abdominal wal.

は じ め に

糖蛋白質および酸性ムコ多糖は生体の各種臓器および組織に広く分布している。糖蛋白質は血清および消化管より分離されたものがよく分析され、一部はその構造も決定されている。^{1,2)} 酸性ムコ多糖の中ではヒアルロン酸は眼の硝子体および臍帯に多く含まれ、また、コンドロイチン硫酸AおよびCは軟骨に、コンドロイチン硫酸Bは皮膚に、更にヘパラン硫酸は肝臓にそれぞれ多く分布している。³⁾ 著者らは先に人の肝臓、腎臓および脾臓中の酸性ムコ多糖の分布を報告したので、⁴⁾ 今回は腹壁内の各層における分布を検索した。

実験材料並びに実験方法

1. 実験材料

解剖により得られた人の腹壁より死後12時間以内のもので、肉眼的および鏡検上に病的変化のないものを対象とした。いずれも30~40歳の男性である。腹壁を皮膚、皮下脂肪組織、腹直筋および腹直筋鞘の4層に分けて、それぞれより約15gずつの試料を採取し、分析に供した。これらの組織をいずれもアセトン中に保存し、細切したのちアセトンを数回かえて脱脂・乾燥した。乾燥試料をWiley millで60 meshの篩を用いて粉末とし、組織粉末はデシケーター内に入れて、冷室中に保存した。

2. 実験方法

1) 粗糖ペプチドおよび粗酸性ムコ多糖の抽出：抽出はSchillerらの方法⁵⁾を用いて実施した(Fig. 1)。ア

セトンで脱脂し、乾燥した組織粉末を先ずpH 6.4 磷酸緩衝液中でpapainで2日間消化したが、消化をよくするため65℃の高温で、EDTAとシステインを添加して酵素の失活防止を期した。消化後、上清をpH 7.8にあわせ、trypsinを添加して37℃でpH 7.8の磷酸緩衝液に対して透析しながら2日間消化した。透析内消化液を冷却し、三塩化酢酸を5%の割に加え、低温に2時間放置して遠心し、上清をとり、上清を脱イオン水に対して低温で3日間透析した。透析液に4倍量のアルコール(1%の酢酸と1%の酢酸カリウムを含む)を加え、低温に2日間放置して、粗糖ペプチド・ムコ多糖混合物を沈殿せしめた。沈殿物をアルコールで洗浄し、風乾し、これを一定量の脱イオン水に溶して分析に供した。

2) 構成糖の定量分析：ヘキソースの定量はWinzlerのOrcinol-H₂SO₄法⁶⁾により、シアル酸は5%三塩化酢酸中で100℃、15分間加熱したのちWinzlerのDiphenylamine法⁷⁾により、ウロン酸はDischeのCarbazole反応⁸⁾により、また、硫酸基は4N HCl中で100℃、6時間加水分解したのちDodgson-Priceの比濁法⁹⁾によりそれぞれ比色定量した。

3) セルロースアセテート電気泳動：セルロースアセテート電気泳動は1.2×8.5 cmのOxoid膜上でpH 8.6のペロナール緩衝液、 μ 0.06にて1 mA/cmで35分間行なった。泳動後、風乾し、alcian blue液(alcian blueの5%酢酸溶液)中で10分間染色し、5%酢酸で洗浄した。PAS(periodic acid Schiff)染色も常法にならって、過ヨード酸で酸化後、Schiff試薬を用いて試みた。な

* Electrophoresis of the glycopeptide and glycosaminoglycan from the human abdominal wall.

** Hiroshi Masuda, Shigeki Shichijo, Mutsuya Takeuchi, 久留米大学医学部臨床病理研究所。
(受付 1976年11月15日)

(26) 生物物理化学

Tissue, acetone-dried.

Ground with Wiley mill.

Homogenized in 30 ml of 1/15 M phosphate buffer, pH 6.4.

Digested with papain for 48 hrs at 65°C in the presence of EDTA and cysteine.

Digested with trypsin for 48 hrs at 37°C.

Dialyzed for 72 hrs in the cold.

Precipitated with adding 4 volumes of 95 % alcohol (containing 1 % acetic acid and 1 % K-acetate).

Washed with 80 % alcohol and air-dry.

Dissolved with deionized water (a mixture of the glycopeptide and glycosaminoglycan)

Fig. 1. Isolation of the glycopeptide and the glycosaminoglycan from the abdominal wall tissues.

お、デンストメトリー曲線は Lumicon P 2-B 型 densitometer (萱垣医理工工業社; 東京), filter 62 を用いて描かせた。セルロースアセテート電気泳動上での易動度を、対照に用いた標準試料のそれと比較して検討した。用いた標準試料はヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸 A, コンドロイチン硫酸 B および コンドロイチン硫酸 C であった。ヒアルロン酸は人臍帯に、ヘパラン硫酸は牛肝臓に、コンドロイチン硫酸 A は鯨軟骨に、コンドロイチン硫酸 B は豚皮膚に、また、コンドロイチン硫酸 C はサメ軟骨にそれぞれ由来するものである。ヘパラン硫酸は Dr. A. Cifonelli (シカゴ大; 米国) および田中幸男教授 (久留米大) より恵与されたものであり、その他の酸性ムコ多糖は生化学工業社 (東京) より購入したものである。

4) コンドロイチナーゼ ABC による分解: 腹直筋および腹直筋鞘組織由来の酸性ムコ多糖については如何なる分画がコンドロイチナーゼ ABC により分解されるかを検索した。コンドロイチナーゼ ABC (生化学工業社; 東京) を酸性ムコ多糖 1 mg 当り 2 単位加え、斎藤ら⁶⁾の方法により 1/30 M トリス-酢酸ナトリウム緩衝液, pH 8.0 中にて 37°C で 48 時間行ない、その間トリス-酢酸ナトリウム緩衝液を 1 回交換した。防腐剤として、n-オクチルアルコールを 1 滴ずつ加えた。酵素による消化後、50% 三塩化酢酸を加え終末濃度を 5% とし、冷室に 2 時間静置した。遠心したのち、上清を脱イオン水に

対して 4°C で 2 日間透析した。透析終了後、透析内液を濃縮し、前記の方法でセルロースアセテート電気泳動を行なって、如何なる分画がコンドロイチナーゼ ABC によって分解されたかを検索した。

実験成績

正常人の同一個体の腹部皮膚、腹部皮下脂肪組織、腹直筋および腹直筋鞘に含まれる糖ペプチドおよび酸性ムコ多糖量をヘキソース値、シアル酸値、ウロン酸値および硫酸基値として表示すると Table 1 に示す通りである。なまの組織重量 1 g あたりの糖ペプチドおよび酸性ムコ多糖含有量は皮膚に最も多く、次に筋鞘、皮下脂肪組織および筋肉の順であった。これに対して脱脂乾燥後の組織重量 1 g あたりの含有量では皮膚に最も多いのは同じであったが、皮下脂肪組織がこれに次いで多く、以下筋鞘、筋肉の順序であった。

人の腹壁の各層より抽出された粗酸性ムコ多糖をベロナール緩衝液, pH 8.6, μ 0.06 中でセルロースアセテート電気泳動したのち、alcian blue 染色を行なった結果は Fig. 2 に示す通りである。いずれの組織に由来するものでも 3 本の染色帯に分かれ、その易動度の最もおそいものはヒアルロン酸のそれに、中間のものはヘパラン硫酸のそれに、また、易動度の最もはやいものはコンドロイチン硫酸 A, B および C のそれに相当した。コンドロイチン硫酸 A, B および C は、この緩衝液では相互

Table 1. Glycopeptide and glycosaminoglycan contents in the normal human abdominal walls.^{a)}

Subject	Hexose		Sialic acid		Uronic acid		Sulfate	
	$\mu\text{g}/\text{wet tissue}^{\text{b)}$	$\mu\text{g}/\text{dry tissue}^{\text{c)}$	$\mu\text{g}/\text{wet tissue}$	$\mu\text{g}/\text{dry tissue}$	$\mu\text{g}/\text{wet tissue}$	$\mu\text{g}/\text{dry tissue}$	$\mu\text{g}/\text{wet tissue}$	$\mu\text{g}/\text{dry tissue}$
Skin	470 $\pm$ 144.1	1,823 $\pm$ 523.8	77 $\pm$ 25.5	299 $\pm$ 93.5	136 $\pm$ 28.1	527 $\pm$ 162.5	54 $\pm$ 15.7	215 $\pm$ 60.7
Adipose tissue ^{d)}	79 $\pm$ 21.6	1,393 $\pm$ 453.7	13 $\pm$ 5.2	198 $\pm$ 84.0	30 $\pm$ 6.9	520 $\pm$ 90.7	9 $\pm$ 3.2	144 $\pm$ 66.6
Muscle ^{e)}	72 $\pm$ 18.0	344 $\pm$ 88.1	8 $\pm$ 2.8	42 $\pm$ 11.6	21 $\pm$ 5.6	111 $\pm$ 27.1	4 $\pm$ 1.7	21 $\pm$ 9.4
Fascia ^{f)}	146 $\pm$ 8.6	976 $\pm$ 169.8	19 $\pm$ 3.2	128 $\pm$ 23.6	60 $\pm$ 4.6	403 $\pm$ 72.8	23 $\pm$ 2.4	159 $\pm$ 35.8

a) Results given are averages of 5 samples. Figures following $\pm$ sign are standard errors of the mean.

b) $\mu\text{g}/\text{g}$ of wet tissue.

c) $\mu\text{g}/\text{g}$ of dry tissue.

d) Subcutaneous adipose tissue of the abdominal wall.

e) Musculus rectus abdominis.

f) Sheath of musculus rectus abdominis.

Table 2. Relative proportions of fraction I, II and III on cellulose acetate strip in the normal human abdominal wall (%).^{a)}

Subject	Fraction I	Fraction II	Fraction III
Skin	50.4 $\pm$ 7.25	6.9 $\pm$ 2.14	42.6 $\pm$ 7.02
Adipose tissue ^{b)}	44.2 $\pm$ 9.92	10.5 $\pm$ 4.53	45.3 $\pm$ 8.26
Muscle ^{c)}	46.5 $\pm$ 14.29	19.9 $\pm$ 7.14	33.7 $\pm$ 7.39
Fascia ^{d)}	17.4 $\pm$ 1.95	8.5 $\pm$ 1.07	74.0 $\pm$ 2.86

a) Results given are averages of 5 samples. Figures following $\pm$ sign are standard errors of the mean.

b) Subcutaneous adipose tissue of the abdominal wall.

c) Musculus rectus abdominis.

d) Sheath of musculus rectus abdominis.

に分離されなかった。また、常法により PAS 染色も試みたが、これには染色されなかった。

つぎに各々の染色帯のデンストグラムを描かせたのち、各分画相互間の相対的な割合を算出した。得られた結果を Table 2 に示す。皮膚では易動度の最もおおい分画（以下分画 I と略す）と易動度の最もはやい分画（以下分画 III と略す）はほぼ同じ含有率であって両者の合計は全体の酸性ムコ多糖の約93%を占め、易動度の中間的分画（以下分画 II と略す）は、ごく少量しか含まれていなかった。皮下脂肪組織でもこれと大体似た結果が得られたが、分画 I と分画 II の合計が全体の約90%で、分画 II が前者よりやや多く11%であった。筋肉でもやはりこれらと近似した傾向を示したが、分画 I が分画 III よりやや多くなり、更に分画 II の含有率が前二者よりも更に増加して、全体の酸性ムコ多糖の20%を占めていた。最後に筋鞘では前三者とは異なる電気泳動のパターンを示し、分画 III の含有率が最も高く全酸性ムコ多糖の 3/4

を占め、これについて分画 I が多く、更に少量の分画 II が含まれていた。また、筋鞘においては他の三者と比較して標準偏差が最も少なかった。

最後に腹直筋および腹直筋鞘由来のこれらの3個の酸性ムコ多糖の分画がコンドロイチナーゼ ABC 消化によってどのように変化するかを検索した。いずれの組織に由来する試料でも分画 I および分画 III は、この酵素消化によって完全に消失し、また、分画 II は消化前と同じで変化を受けなかった (Fig. 3)。

考 察

糖ペプチドの糖質成分としてはヘキソース、ヘキソサミンおよびシアル酸が最も多く含まれ、また、大部分の酸性ムコ多糖はウロン酸、ヘキソサミンおよび硫酸基よりなることは既に明らかになっているので^{10,11)}ヘキソースおよびシアル酸を定量して糖ペプチド量の指標とし、また、ウロン酸および硫酸基を定量して酸性ムコ多糖の

Fig. 2. Cellulose acetate electrophoresis patterns of glycosaminoglycans from normal human abdominal wall.

1: skin, 2: subcutaneous adipose tissue, 3: musculus rectus abdominis, 4: sheath of musculus rectus abdominis, HA: hyaluronic acid, HS: heparan sulfate, ChS-A: chondroitin sulfate-A, ChS-B: chondroitin sulfate-B, ChS-C: chondroitin sulfate-C.

指標とした。

人の皮膚に含まれている糖ペプチド量に関しては、Shetlar ら¹⁴⁾ はヘキソース値として 9.8 ± 0.1 mg, またシアル酸値として 0.80 ± 0.02 mg (いずれも乾燥組織重量 1 g あたり) であると報告しているが、彼らは糖蛋白質抽出の過程で、蛋白質消化および透析操作を行っていないのに対して著者らはこれらを行なったので、かかる差異が生じたものと考えられる。人の皮膚の酸性ムコ多糖量を Shetlar らは ウロン酸値として乾燥重量 1 g あ

Fig. 3. Cellulose acetate electrophoresis patterns of glycosaminoglycans from the muscle and the fascia after treatment with chondroitinase ABC.

1: musculus rectus abdominis, 2: sheath of musculus rectus abdominis, HA: hyaluronic acid, HS: heparan sulfate, ChS-A: chondroitin sulfate-A, ChS-B: chondroitin sulfate-B, ChS-C: chondroitin sulfate-C.

たり 0.72 ± 0.83 mg としている。¹²⁾ 著者らは前報⁴⁾ で人の諸臓器内の酸性ムコ多糖量を Dische のカルパゾール反応で測定したので前報との比較および次報でオルシノール値と比較する予定のために本法を用いたが、本反応は彼らの用いた Bitter and Muir 法よりもイズロン酸が低値を示すから、¹³⁾ 実際には Table 1 より若干多量の酸性ムコ多糖が含まれていると考えられる。皮膚の酸性ムコ多糖の構成に関してはヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸 B がほぼ等量ずつ含まれ、この両方で全体の

酸性ムコ多糖の約95%を占め、残りの数%はコンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸Cおよびヘパリンであるとされている^{16,17)} 今回の著者らの実験でもセルロースアセテート電気泳動でヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸の易動度に相当するものがそれぞれほぼ等量ずつ含まれ、全体の酸性ムコ多糖の約95%を占めていた。更に腹壁の各層に含まれている酸性ムコ多糖量は、筋肉以外では前報⁹⁾における腎臓、肝臓および脾臓中の含有量のほぼ中間の数値を示し、また、筋肉内の含有量は、これら諸臓器および組織中の最低値（いずれも脱脂乾燥組織重量1 gあたり）を示した。腹壁の各層相互間では皮膚、皮下脂肪組織、筋鞘および筋肉の順であった。酸性ムコ多糖含有量が皮膚に最も多く、筋肉に最も少ないことは、結合組織が前者に豊富で後者に乏しいことを示していると考えられる。

各酸性ムコ多糖分画の相互間の相対的な比率は皮膚、皮下脂肪組織および筋肉ではほぼ近似していたが、この三者と筋鞘とは著しい差異を示した。この理由は現在のところ不明である。他の生体内各種組織についても同様の検索を行ない、相互に比較検討すべきであろう。人の皮膚の酸性ムコ多糖に関しては既に報告があるので¹⁴⁾ 著者らは筋肉および筋鞘由来の酸性ムコ多糖をコンドロイチナーゼABCで消化した。消化後の試料はセルロースアセテート電気泳動上で単一の染色帯を示し、その易動度はヘパラン硫酸のそれに相当した（Fig. 3）。コンドロイチナーゼABCによって分解されない酸性ムコ多糖はヘパラン硫酸、ケラタン硫酸およびヘパリンのみであり、他の酸性ムコ多糖は全て分解されると考えられている。pH 8.6のペロナール緩衝液、 μ 0.06 中でのセルロースアセテート電気泳動では、酸性ムコ多糖は相互に易動度の異なる3個の分画に分かれ、ヒアルロン酸は易動度の最もおそい分画に、ヘパラン硫酸およびケラタン硫酸は易動度の中間の分画に、また、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、コンドロイチン硫酸Cおよびヘパリンは易動度の最もはやい分画に含まれている¹⁶⁾ 従って、今回腹壁の各組織より分画された酸性ムコ多糖は分画Iはヒアルロン酸に、分画IIはヘパラン硫酸およびケラタン硫酸に、また、分画IIIはコンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸Bおよびコンドロイチン硫酸Cにそれぞれ相当し、ヘパリンは含まれていないと考えられるが、正確な同定には多種類の酸性ムコ多糖分解酵素の使用、分解物の同定、他の電解質溶液中での電気泳動、更に各々の酸性ムコ多糖の単離・分析が必要であると考えられる。

おわりに

正常人の腹壁を皮膚、皮下脂肪組織、腹直筋および腹直筋鞘の4層に分け、各々における糖ペプチドおよび酸性ムコ多糖の分布を検索した。

乾燥組織重量1 gあたりの糖ペプチドおよび酸性ムコ多糖含有量は皮膚に最も多く（ヘキソース値として $1,823 \pm 523.8 \mu\text{g}$ 、ウロン酸値として $527 \pm 162.5 \mu\text{g}$ ）、筋肉に最も少なくて（ヘキソース値として $344 \pm 88.1 \mu\text{g}$ 、ウロン酸値として $111 \pm 27.1 \mu\text{g}$ ）、また、皮下脂肪組織および筋鞘では両者のほぼ中間であった。

各組織より抽出された酸性ムコ多糖は、ペロナール緩衝液中でのセルロースアセテート電気泳動で3個のalcian blue 染色陽性の分画に分かれ、その易動度の最もおそいものはヒアルロン酸に、易動度の中間のものはヘパラン硫酸に、また、易動度の最もはやいものはコンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸Bおよびコンドロイチン硫酸Cにそれぞれ相当した。皮膚、皮下脂肪組織および筋肉より分離された酸性ムコ多糖はほぼ近似した電気泳動のパターンを示し、易動度の最もはやい分画と最もおそい分画とはほぼ同量か前者がやや多かった。これに対して筋鞘では易動度の最もおそい分画が主成分をなし、全酸性ムコ多糖の約3/4をしめていた。

文 献

- 1) Jeanloz, R.W.: Glycoproteins, Elsevier, New York, 1966, p. 362.
- 2) Slomiany, B.L. and Meyer, K.: J. Biol. Chem., **25**: 5062, 1972.
- 3) 長谷川栄一: ムコ多糖実験法, 第1巻, 初版, 南江堂, 東京, 1972, p. 328.
- 4) 増田 博他: 生物物理化学, **19**: 64, 1974.
- 5) Schiller, S. et al.: J. Biol. Chem., **236**: 983, 1961.
- 6) Winzler, R.J.: Methods of Biochemical Analysis, Vol. 2, Interscience, New York, 1955, p. 279.
- 7) Warren, L.: J. Biol. Chem., **234**: 1971, 1959.
- 8) Dische, Z.: Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 1, Academic Press, New York, 1962, p. 477.
- 9) Dodgson, K.S. and Price, R.G.: Biochem. J., **84**: 106, 1962.
- 10) 山科郁男: 多糖生化学, 第1巻, 初版, 共立出版, 東京, 1969, p. 497.
- 11) 長谷川栄一: ムコ多糖実験法, 第1巻, 初版, 南江堂, 東京, 1972, p. 4.

(30) 生物物理化学

- 12) Shetlar, M.R. et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **138** : 298, 1971.
- 13) 松村 剛 : 多糖生化学, 第 1 卷, 初版, 共立出版
東京, 1969, p. 53.
- 14) Shetlar, M.R. et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **139** : 544, 1972.
- 15) 田中幸男 : 久留米医会誌, **30** : 899, 1967.
- 16) 増田 博他 : 生物物理化学, **19** : 430, 1975.