耳垢中の糖ペプチドの分離および分析*

増田 博・七條茂樹・武内睦哉**

Summary

Glycopeptides and a uronic acid-containing glycosaminoglycan were isolated from human cerumen and were assayed by determining the carbohydrate content of the material which remained after proteolysis.

Fractionation of nondialyzable material by DEAE cellulose column chromatography yielded five fractions. The components consisted of peptide, hexose, glucosamine, galactosamine, sialic acid and fucose; peptide and hexose were main components in each fraction. Fractions were characterized by an increase in sialic acid as the molarity of NaCl increased at the molarity of NaCl ranging from 0.01 to 0.1 M. The fraction, which was eluted with 0.2 M NaCl solution, contained sulfate in addition to the above constituents, and the fraction, which was eluted with 0.45 M NaCl solution, contained both uronic acid and sulfate in addition to the above constituents, respectively.

Key words: glycopeptide, cerumen.

はじめに

糖蛋白質およびグリコサミノグリカンは生体内の各種臓器および組織内に広く分布している。ヒトおよび各種動物の皮膚,¹⁾ モルモットの蝸牛²⁾さらに正常人および慢性副鼻腔炎患者の副鼻腔粘膜³⁾中よりグリコサミノグリカンが分離され、報告されている。著者らは正常人の耳垢中より糖ペプチドおよびグリコサミノグリカンを分離し、分析したので報告する。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

年齢16～55歳の男女両性の約50人の正常人より約1年間にわたり耳垢を採取し、実験に供した。これらをプールしたのちアセトン中に保存し、アセトンを数回かえて脱脂・乾燥した。乾燥試料を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グリコサミノグリカンの抽出

抽出はSchillerら⁴⁾の方法を用いて実施した。アセトンで脱脂し、乾燥した試料をまず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cysteine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時間静置して遠心し、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日間静置して、粗糖ペプチドおよび粗グリコサミノグリカン混合物を沈殿せしめた。沈殿物をアルコールで洗浄し、風乾して、これを一定量の脱イオン水に溶したのち、その一部を用いて組成の分析を行ない、また、その残りを分画に供した。

2) 糖ペプチドおよびグリコサミノグリカンの分画

抽出された粗糖ペプチドおよび粗グリコサミノグリカンの混合物をDEAE cellulose カラムクロマトグラフィーによって分画した。DEAE cellulose (Brown社製; 米国, capacity 0.90 mEq/g) を0.5 N NaOH, 0.5 N HCl 再び0.5 N NaOHの順序でよく洗い、活性化したのち脱イオン水で充分に洗浄し、0.01 M NaCl 溶液中に1昼夜懸濁させ、1.7×31 cmのカラムに充填した。試料を

* Study on the glycopeptide from cerumen.

** Hiroshi Masuda, Shigeki Shichijo, Mutsuya Takeuchi, 久留米大学医学部臨床病理研究所。
(受付 1978年7月24日)

(268) 生物物理化学

0.01 M NaCl 溶液に対して 1 昼夜透析したのち、このカラム上に添加し、0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.45 M および 2.0 M NaCl 溶液によって溶出液中の食塩濃度を段階的にあげて溶出した。溶出速度は 1 時間に約 10 ml で、各 5 ml ずつの分画に集め、各食塩濃度段階ごとに合計 175 ml の食塩水で溶出した。各分画ごとに 231 nm における吸収、ヘキソース値⁹⁾ および ウロン酸値⁹⁾ を測定し、それぞれのピークに相当する分画を集め、脱イオン水に対して 3 日間透析したのち凍結乾燥し、その組成を分析した。

3) セルロースアセテート電気泳動

a) 緩衝液および電流量：シアル酸の濃度で約 200 $\mu\text{g/ml}$ の粗糖ペプチドおよび粗グリコサミノグリカン混合物試料の水溶液を 1.2 cm 幅の原線上に 2~4 μl つけた。これについて pH 8.6 のペロナール緩衝液 μ 0.06 を用い、1 mA/cm の定電流下で 30 分間、電気泳動した。

b) 染色：電気泳動終了後、セルロースアセテートを汙紙上に置き、余分の水分を除いたのちに alcian blue 染色液 (alcian blue 8 GX を 1% の割合に 5% 酢酸に溶したのもの) による染色を行なった。また PAS 染色および ponceau-S 染色も常法に従って試みた。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、コンドロイチン硫酸 C および標準人血清であった。ヒアルロン酸はヒト臍帯に、ヘパラン硫酸 A 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。全ての標準グリコサミノグリカンは生化学工業社 (東京) より、また、標準人血清は Sigma 社 (米国) よりそれぞれ購入したものである。

4) ヒアルロニダーゼによる分解

試料の 5 mg を 1/15 M 磷酸緩衝液, pH 5.0 (0.15 M NaCl を含む) 2 ml に溶かし、これにヒアルロニダーゼ (生化学工業社製; 東京, *Streptomyces hyalurolyticus* 由来のもの) 100 単位を加え 37°C で 48 時間消化を行なった。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。汙過したのち、汙液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、およびウロン酸値の測定を行なった。

5) 組成の分析

ヘキソースの定量は Winzler の Orcinol-硫酸法⁹⁾ により、ウロン酸は Carbazole 反応⁹⁾ により、ペプチドは Lowry の方法⁷⁾ により、シアル酸は Winzler の Diphenylamine 法⁹⁾ により、また、フコースは Gibbons 法⁹⁾ によりそれぞれ比色し、定量した。さらに硫酸基は 4 N HCl 中で 100°C、6 時間加水分解したのち、Dodgson-Price 法¹⁰⁾ により比濁し、定量した。グルコサミンおよびガラクトサミンの分離および定量は 4 N HCl 中で 100°C、6 時間加水分解したのち、KLA-3 形日立アミノ酸分析計により 20 cm カラムで 0.2 M クエン酸緩衝液 pH 5.28 (Na : 0.35 N) を用いて実施した。

実験成績

耳垢より抽出された粗糖ペプチドおよび粗グリコサミノグリカン混合物の重さは、もとの耳垢試料 1 g あたり 9.1 mg、また、脱脂乾燥後の耳垢試料 1 g あたり 12.5 mg であった。この粗糖ペプチドおよび粗グリコサミノグリカン混合物をセルロースアセテート電気泳動した結果は Fig. 1 に示す通りである。主成分は原線よりも陽極側に 1 本の alcian blue 染色陽性の染色帯として出現し、その易動度は各種のグリコサミノグリカンの中では最も易動度のおそいヒアルロン酸よりもさらにおそく、血清蛋白質の α_1 -グロブリンおよび α_2 -グロブリンのそれにほぼ相等した。なお、ヒアルロン酸の易動度に相当する部位にも非常に淡い染色帯が出現したが、鮮明ではなかった。なお、PAS 染色および ponceau-S 染色を試みたところ、主成分の分画は前者には染色されたが、後者には染色されなかった。さらにヒアルロニダーゼによって処理したのちの試料では、このヒアルロン酸の易動度に相当する非常に淡い染色帯は完全に消失したが、易動度のおそい染色帯は影響を受けずに、そのまま出現した。

耳垢より抽出された粗糖ペプチドおよび粗グリコサミノグリカン混合物の組成の分析を行なった。得られた結果は Table 1 に示す通りである。ペプチドおよびヘキソースを主成分として、この他にヘキソサミン、シアル酸、硫酸基およびフコースが含まれていた。ヘキソサミンとしてはガラクトサミンとグルコサミンの両者が含まれていたが、前者が後者の約 7 倍であった。さらに、ウロン酸は少量含まれていたが、ヒアルロニダーゼにより消化したのちに透析した試料について再びウロン酸値を測定したところ、半減した。

つぎに、耳垢より抽出された粗糖ペプチドおよび粗グリコサミノグリカン混合物を、DEAE cellulose カラムクロマトグラフィーによって分画した結果は Fig. 2 に

Fig. 1. Cellulose acetate electrophoretic patterns of the preparation from cerumen.

(1): crude concentrate from cerumen, (2): hyaluronic acid, (3): heparan sulfate, (4): a mixture of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B and chondroitin sulfate C, (5): human serum (ponceau-S stain).

示す通りである。ヘキソース値を実線で、231 nm における吸収を白丸で、また、ウロン酸値を点線でそれぞれ表わしている。ヘキソース値のピークおよび 231 nm における吸収のピークは 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M および 0.45 M NaCl 分画に認められ、また、ウロン酸値のピークは 0.45 M NaCl 分画のみに出現した。ヘキソース値のピークと 231 nm における吸収のピークとは同じ溶出部位に現われ、0.01 M および 0.05 M NaCl 分画においては両者はほぼ同じ高さであったが、それ以後の食塩濃度分画では後者が前者よりも高くなり、この傾向は溶出液中の食塩濃度が上昇するに伴って強くなった。

さいごに、各ピークに相当する分画を集めて脱イオン水に対して透析したのち凍結乾燥し、その組成を分析した。得られた結果は Table 2 に示す通りである。いずれの分画もペプチドおよびヘキソースを主成分とし、これらの他にグルコサミン、ガラクトサミン、シアル酸およ

Table 1. Composition of the crude glycopeptide from cerumen.*

Components	Contents
Hexose	29.3
Peptide	48.1
Sialic acid	7.3
Sulfate	3.5
Fucose	1.5
Galactosamine	12.6
Glucosamine	1.7
Uronic acid	0.2

* Expressed as percentage of weight.

Fig. 2. Fractionation of the crude glycopeptide-glycosaminoglycan preparation from cerumen.

●—● : hexose, ○—○ : absorption at 231 nm, : uronic acid.

びフコースが含まれていた。0.01 M および 0.05 M NaCl 分画ではペプチドの含有量とヘキソースのそれとは近似していたが、0.1 M NaCl 分画以後では前者が後者よりも多く含まれ、その傾向は溶出液中の食塩濃度が上昇するに伴って強くなった。0.01~0.2 M NaCl 分画ではグルコサミンよりもガラクトサミンが多く含まれ、逆に 0.45 M NaCl 分画ではガラクトサミンよりもグルコサミンが多く含まれていた。シアル酸の含有量は 0.01 M NaCl 分画から 0.1 M NaCl 分画までは溶出液中の食塩濃度が上昇するにつれて増加した。ウロン酸は 0.45 M NaCl 分画にのみ含まれ、また、硫酸基は 0.2 M および 0.45 M NaCl 分画に含まれていて、その他の分画には含まれていなかった。

Table 2. Composition of fractions obtained from DEAE cellulose column chromatography.^{a)}

Fraction (Molarity of NaCl)	Peptide	Hexose	Gluco- samine	Galacto- samine	Sialic acid	Fucose	Uronic acid	Sulfate
0.01	40.1	31.4	3.3	5.8	2.6	1.3	N.D. ^{b)}	N.D.
0.05	41.0	35.2	1.3	13.6	7.1	1.1	N.D.	N.D.
0.10	43.3	28.7	1.5	11.2	9.2	0.8	N.D.	N.D.
0.20	57.4	28.6	4.0	6.3	6.9	1.6	N.D.	1.1
0.45	58.7	21.3	4.5	2.1	3.5	1.6	3.6	2.7

a) Expressed as percentage of weight.

b) Not detectable.

考 察

耳垢より糖ペプチドおよびグリコサミノグリカンを分離して、分析した。糖ペプチドは DEAE cellulose カラムクロマトグラフィーで 0.01~0.45 M NaCl 分画に溶出され、また、グリコサミノグリカンは 0.45 M NaCl 分画のみに溶出された。シアル酸含有量は 0.01 M から 0.1 M NaCl 分画までは溶出液中の食塩濃度が上昇するにつれて増加し、さらに 0.2 M および 0.45 M NaCl 分画ではシアル酸の他に硫酸基が検出され、その含有量は前者よりも後者に多かった。これらのことより、この両者が糖ペプチドに酸性の性質を与えている原因であろうと考えられる。これに対して、0.45 M NaCl 分画ではシアル酸および硫酸基のほかにウロン酸が含まれており、この三者がこの分画に含まれている成分に酸性の性質を与える主たる原因であろうと考えられる。また、0.45 M NaCl 分画にはウロン酸が証明されたが、ヒアルロニダーゼにより消化したのちの試料では、この量が半分に減少したこと、DEAE cellulose カラムクロマトグラフィーにおける溶出状況¹¹⁾ および グルコサミンとガラクトサミンの相対的な割合が 0.01~0.2 M NaCl 分画では後者が多かったが、0.45 M NaCl 分画のみでは前者が多かったことより考えて、0.45 M NaCl 分画にはヒアルロン酸が含まれていると考えられる。しかし、このウロン酸含有のグリコサミノグリカンの正確な同定、およびこれが単に共存しているのか、あるいは、糖ペプチドと hybrid 構造をしているのか、などの点に関しては、この物質を単離したのちに分析し、さらにその構造研究を行なわねばならないであろう。

Endo ら¹²⁾ は動脈壁に発生した囊腫より cytylpyridinium chloride による沈殿法および DEAE cellulose カラムクロマトグラフィーにより、ヒアルロン酸・蛋白質複合体を分離し、また、著者ら¹³⁾ はさきに、脾臓囊腫

の内容物より DEAE cellulose カラムクロマトグラフィーにより数種の糖ペプチドとヒアルロン酸を分離し、それぞれ報告しているが、これらと今回著者らが耳垢中より分離した糖ペプチドとは、それらの組成が異なっていた。

お わ り に

耳垢より糖ペプチドとウロン酸含有のグリコサミノグリカンを分離した。糖ペプチドは DEAE cellulose カラムクロマトグラフィーで 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M および 0.45 M NaCl 分画で溶出され、また、ウロン酸含有のグリコサミノグリカンは 0.45 M NaCl 分画で溶出された。いずれの分画でもペプチドおよびヘキソースの主成分であり、これらの他に、グルコサミン、ガラクトサミン、シアル酸およびフコースが含まれていた。0.01~0.1 M NaCl 段階では溶出液中の食塩濃度が上昇するにつれてシアル酸含有量が増加した。

文 献

- 1) Shetlar, M.R. et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **139** : 544, 1972.
- 2) Saito, H. and Daly, J.F. : Acta Oto-Laryng., **69** : 333, 1970.
- 3) 佐藤良暢 : 耳咽会報, **69** : 1038, 1966.
- 4) Schiller, S. et al. : J. Biol. Chem., **236** : 983, 1961.
- 5) Winzler, R.J. : Methods of Biochemical Analysis, Vol. 2, Interscience, New York, 1955, p. 279.
- 6) Dische, Z. : Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 1, Academic Press, New York, 1962, p. 477.
- 7) Lowry, D.H. et al. : J. Biol. Chem., **193** : 25, 1951.
- 8) Winzler, R.J. : Methods of Biochemical Analysis, Vol. 2, Interscience, New York, 1955, p. 298.

- 9) Gibbons, M. N. : Analyst., **80** : 268, 1958.
- 10) Dodgson, K.S. and Price, R.G. : Biochem. J., **84** : 106, 1962
- 11) 瀬野信子他 : ムコ多糖実験法, I, 南江堂, 東京, 1972, p. 118.
- 12) Endo, M., et al. : Chin. Chim. Acta, **47** : 417, 1973.
- 13) 増田 博他 : 生物物理化学, **21** : 31, 1977.