

①

動物細胞間マトリックスタンパク質、
エラスチンの架橋アミノ酸に関する研究

1 9 9 2

東北大学大学院農学研究科
畜産学専攻
中村文彦

動物体の各器官は上皮組織、結合組織、筋組織および神経組織より構成されている。結合組織は細胞と細胞間物質（細胞間マトリックス）から成り、体のすべての部位に存在し、器官と器官の間や他の組織と組織の間を埋めてそれらを支えている。近年、結合組織は機械的支持作用だけでなく器官の形成および細胞の分化、移動、増殖、代謝などに影響する機能を持つように積極的に関与しているとともに、同一の細胞を認識する認識機構をも含む、高度な生命現象も担っていることが明らかになってきた¹⁻⁵。これらの機能は、生命維持にとって重要であるばかりでなく、個体の成長と老化にも関与していると考えられている⁶⁻¹¹。従って、細胞間マトリックスは、畜産物である乳、肉、卵などの生産にも基本的な関わりをもっており、また後述する多くの内因性、外因性の疾患が、ヒトばかりでなく、家畜動物においてもマトリックスと関わりを持っていると考えられている。

エラスチンは細胞間マトリックスを構成する弾性線維で、架橋アミノ酸によって形成されるネットワーク（架橋構造）を有することを特徴とするタンパク質である。同タンパク質は線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞および軟骨細胞などで合成され、水溶性の分子量約7万のトロポエラスチンとして細胞外に分泌されるが^{12, 13}、分子内および分子間で架橋を形成し、機能を発現するようになると考えられている。この架橋形成反応はリジン残基の ϵ -アミノ基がリジルオキシダーゼによって酸化的脱アミノ化され、アルデヒド基が生成することから開始される¹⁴⁻¹⁹（図-1）。

このようにして生成したアルデヒド基を有するアミノ酸は α -アミノアジピン酸- δ -セミアルデヒドであり、アリシンと称される。架橋形成の初期反応として、アリシン残基のアルデヒドとリジン残基の ϵ -アミノ基の間で起こるアミノ-カルボニル反応によるシッフ塩基（デヒドロリジノルルイシン）の生成^{20, 23}、および一級アミン触媒存在下でのアリシン残基のアルドール縮合反応によるアルドール架橋の生成が起こる^{19, 24, 25}。これらを中間体としてさらに反応が進行し、Partridgeらによってエラスチンの酸水解物中より分離同定されたデスモシンおよびイソデスモシン^{26, 28}のような四級のピリジニウム環を持つ架橋アミノ酸の生成へと反応が進むことが明らかにされてきた。これらの架橋形成は、前者のような構造上単純な架橋の場合は比較的迅速に行われるが、後者のように複雑な架橋の場合は極めて遅いことが知られており、老化との関連で注目されている^{29, 35}。

一方、アミノ-カルボニル反応は食品化学の分野では古くから研究されてきた反応で、須山らはデスモシンおよびイソデスモシンと同一の骨格をもつ四級のピリジニウムが n -プロパナールとグリシン（または n -ブチルアミン）をモデルとして用いた反応によって生成することを示した^{36, 37}。加えて、4分子の n -プロパナールと1分子のグリシン（または n -ブチルアミン）から生成する5分子縮合物も分離同定し³⁸、対応する架橋アミノ酸の存在を示唆していたが、最近Starcherらにより同化合物と同一の骨格をもつペンタジンが分離同定された³⁹。

架橋は器官でそれぞれ特徴を持ったパターンで分布し、動脈硬化、強皮症、肺気腫あるいは糖尿病などの各種疾患においても、正常とは異なったパターンを示し、しかも病気の推移と共に変化する^{40・51}。さらに、架橋の異常に起因する疾病の進行と共に異常を来す疾病も数多く知られている^{52・53}。特にエラスチンは動脈に多いことから、動脈硬化との関連についての報告例が多い。動脈硬化病巣部では、カルシウム塩の沈着（石灰化）が観察され、血管の硬化度にともない増加することが知られている。一方、病気とは無関係に動脈壁の石灰化はヒト誕生からすでに始まっており、年齢とともに着実に増加し、70～80歳になるとカルシウム含量は5～6%以上にも達することが知られている⁵⁴。これらエラスチンに特異的な石灰化には、タンパク質の三次元構造が関わっており、架橋アミノ酸との関連が注目されている。また、最近エラスチンペプチドが単球や線維芽細胞に遊走促進作用と血管平滑筋細胞に遊走阻止作用を示すことが明らかになった^{55・58}。この遊走阻止作用は、LDL（低密度リポタンパク質）や抗エラスチン抗体などエラスチンと極めて強い親和性を持つ物質により緩和されることが明らかになって確認されるに至った。一方、エラスチン受容体が線維芽細胞に存在することが明らかにされ¹、血管平滑筋細胞にもその存在が推定されている。エラスチンはまた、血管平滑筋細胞の増殖および細胞内代謝に影響することも示されている^{59・60}。これらの機能の発現には三次元構造が必須であり、三次元構造の形成には架橋が直接関与していると考えられている。さらに癌組織、

肝硬変組織および紫外線を浴びた皮膚組織にエラスチン含量が高くなると共に質的な変化が生じることも知られており^{61, 62}、これらの疾病と架橋構造との因果関係の解明も待たれている。また、癌細胞の浸潤（転移）との関連からメタロプロテアーゼによるエラスチンの代謝に関する研究が行われているが⁶³、架橋の代謝については全く知られていない。

架橋反応の進行にともないエラスチンは不溶化し、熱、アルカリおよびプロテアーゼに対して抵抗性を増すため、構造と機能を分子レベルで解明することは困難である。この解決法として、エラスチンペプチドが調製され、前述の種々の機能が明らかにされたが、架橋を含むエラスチンの機能解明のためには架橋構造の解析が必須であると考えられている。本研究が開始されるまでに明らかにされた架橋構造は図-1に示したように6種類であるが、機能の多様性からも構造未知の架橋の存在が多くの研究者によって指摘されている^{64, 65}。

細胞間マトリックスを構成するタンパク質は、動物体総タンパク質の3分の1以上を占めると言われており、畜産物の利用においても重要であるが、不溶性のためその利用範囲が限られている。特に、エラスチンは靱帯、肺および大動脈などの畜産物として利用されていない臓器に多く存在し（表-1）、架橋が生物資源として利用する上で障害となっている。また、架橋は死後硬直後の食肉の硬さに直接的に関与していると考えられているが、定量的な知見はほとんど得られていない⁶⁶。

第一章においては、エラスチンを構成する新規な架橋アミノ酸の分離と構造解析を行い、生成機構を考察して、架橋アミノ酸と架橋構造のもつ機能を明らかにするための基礎的な知見を得ることを目的として実験を行い、得られた成績を述べた。第二章においては、架橋アミノ酸の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析法を開発し、食肉結合組織の架橋アミノ酸の分析と共に、高血糖症および加齢にともなう牛およびラット結合組織の架橋アミノ酸の変化を調べ、エラスチンの機能解明の一助とすることを目的として、同様に実験成績を述べた。

表一 1 諸臓器のエラスチン含量 (成人, 成獣)

組織名	エラスチン (%乾燥重量)
項靱帯 (ウシ)	80
皮膚 (ヒト)	1.5~4.8
肺 (ヒト, ウシ, ラット)	3.5~26.0
腱 (ウシ)	0.3
動脈 (ヒト, ウシ, ブタ)	33~70
肝 (ラット)	0.30
腎 (ウシ)	1.65
脾 (ウシ)	1.25

” 生化学データブックI” 第1版、日本
生化学会編、東京化学同人 (1979) .
” 動物成分利用集成 (陸産動物編) ”
R&Dプランニング社.

その他のアミノ酸の検出にも適当と考えられた。アルドール架橋およびイソオキシデスモシンは、通常のエラスチン調製法である熱アルカリ処理によって分解され、検出されなかった。エラスチンの調製には、同法その他オートクレープ処理、5Mグアニジン塩酸処理および6M尿素処理などが知られているが^{64, 100}、いずれの処理においても純度100%のエラスチンは得られておらず、架橋の分析のためのエラスチンの単離法を今後検討する必要があると考えられた。

アルドール架橋はエラスチンの架橋の重要な中間体であるが、エラスチンと同様細胞間マトリックスを構成するコラーゲンにも架橋の存在することが知られている^{101, 115}。骨およびアキレス腱のコラーゲンを水解し、 Fe^{+++} /活性炭カラム処理後、HPLCに供した結果、ともにACAが検出された(図2-4-7)。同タンパク質にはI型からXIV型までの分子種が見いだされているが、骨および腱のコラーゲンはI型が主成分で、真皮、角膜、腱および各臓器の間質などにも存在することが知られている^{100, 116}。

本法によって、異常架橋が高い感度で検出され、老化や疾病の原因を解明するための重要な知見が得られると考えられた。

要 約

アルドール架橋は架橋反応の最も重要な中間体であるが、通常のアミノ酸分析器によっては分析不可能で、標識水素化ホウ素Naによって還元してから分析する方法が唯一の