

金属由来の組織損傷とプロテオグリカンの組成変化

略 題：金属による組織損傷とグリコサミノグリカンの変動

荒 川 泰 昭¹⁾, 西 村 加菜子¹⁾, 今 成 登志男²⁾

(¹⁾静岡県立大学・公衆衛生学・生体衛生学*, ²⁾千葉大学・薬学部・分析化学**)

Metal-induced histomorphological injury and the alterations in the amounts and proportion of unsaturated disaccharides of glycosaminoglycan derived from proteoglycan

Yasuaki ARAKAWA¹⁾, Kanako NISHIMURA¹⁾, and Toshio IMANARI²⁾

¹⁾Department of Hygiene & Preventive Medicine, Faculty of Health Science, The University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka-shi, Shizuoka 422-8526, Japan

²⁾Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, The University of Chiba, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8522, Japan

To determine the extent of the metal-induced histomorphological injury and degeneration of tissues, the relationship between organotin-induced histomorphological injury and the alterations in the amounts and proportion of unsaturated disaccharides of glycosaminoglycan derived from proteoglycan were analyzed by using a high performance liquid chromatography (HPLC). In this article, the alterations in the amounts and proportion of unsaturated disaccharides of glycosaminoglycan are discussed with a focus on the organotin-exposed hippocampus and thymus. The disaccharide compositions of glycosaminoglycan from the hippocampus and thymus were significantly altered by the exposure of organotin compounds. In the hippocampus, increases in the proportion of chondroitin (CS-OS) and dermatan (DS-OS) and decreases in the proportion of chondroitin 4-sulfate (CS-4S) and dermatan 4-sulfate (DS-4S) were seen in the one-week oral exposure of tributyltin. In the thymus, an increase in the proportion of unsaturated disaccharide units (Δ Di-diSB) derived from dermatan sulfate and a decrease in the proportion of unsaturated disaccharide units (Δ Di-OS) derived from chondroitin sulfate were seen in the one-week oral exposure of dibutyltin. An increase in the proportion of disaccharide units (Δ Di-OS) and a decrease in the proportion of disaccharide units (Δ Di-4S) were seen in the one-week oral exposure of tributyltin. These alterations in the thymus depend on a decrease in the absolute amounts of chondroitin sulfate derived from the atrophy of the thymus which contains lot amounts of chondroitin sulfate proteoglycan.

Key words: Metal, histomorphological injury, glycosaminoglycan

はじめに

ある種の金属（例えばマンガン、亜鉛、銅、スズなど）の過剰あるいは欠乏は組織の損傷や変性を誘発する。しかもこの組織の欠損や変化は組織の種類や部位、生物の発生や成長段階、病態などに対応して規則的に起こっているものと考えられる。そこで、このような組織の欠損や変化を定量的に把握するために、そのマーカーとして細胞外マトリッ

*所在地：静岡市谷田52-1（〒422-8526）

**所在地：千葉市稲毛区弥生町1-33（〒263-8522）

クスや細胞表層に存在し、情報伝達に関わる代表的な複合糖質プロテオグリカンを取り上げ、その組成変化の分析を試みた。その中で、今回は免疫毒性、脳神経毒性、内分泌毒性（環境ホルモン）など多彩な生体影響を同時発現する有機スズ¹⁻⁶⁾を取り上げ、その暴露による組織損傷の相互関係について検索した。

キーワード：金属，組織損傷，グリコサミノグリカン

実験方法

- 1. 動物実験：**Wistar系幼若ラット（雄性，3週齢，40g前後）に，経口投与の場合ジブチルスズジクロリド（ Bu_2SnCl_2 ）もしくはトリブチルスズジクロリド（ Bu_3SnCl ）100ppmを含むNMF固形飼料を連続自由摂取させ，実験開始後0，7，14日目に，また腹腔内投与の場合それぞれ2.0 mg/kg body weightを1回投与し，実験開始後0，1，2，3日目に断頭し，それぞれ胸腺，海馬，嗅球，精巣を摘出した。
- 2. 組織中グリコサミノグリカン（GAG）の調整：**組織をアセトンで脱脂後，0.5% SDSでGAGを抽出し，1.0 M HClで洗浄後，エタノール沈殿（必要に応じてCPC沈殿を追加）によりGAGの粗精製画分を得た。
- 3. 不飽和二糖の分離：**GAG粗精製画分をさらにUltrafree-MC・DEAE膜に通して精製後，水に溶解し，コンドロイチナーゼABC（CSase ABC）とコンドロイチナーゼACII（CSase ACII）で37℃，3時間消化し，不飽和二糖を得た。
- 4. 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による不飽和二糖の分析：**HPLCはグラジエントポンプ：L-7100（日立製作所製），液送ポンプ：LC-10AD（島津製作所），検出器：FP-1520S（日本分光工業）より構成する。 Δ Di-OSや Δ Di-HAの分離分析はグラファイトカーボンカラム（Carbonex）（4.6 mm i.d.x100 mm，7 μm ）を用いたHPLCで，その他の不飽和二糖の分析はSenshu Pak Docosilカラム（4.6 mm i.d.x150 mm，5 μm ）を用いた逆相イオンペアHPLCで行った。
- 5. 試薬：1) 標準品：**ヒアルロン酸 hyaluronan（HA），コンドロイチン硫酸 chondroitin sulfate（CS），デルマタン硫酸 dermatan sulfate（DS），不飽和二糖標準品： Δ Di-HA: 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-gluc-4-enepyranosyl)uronic

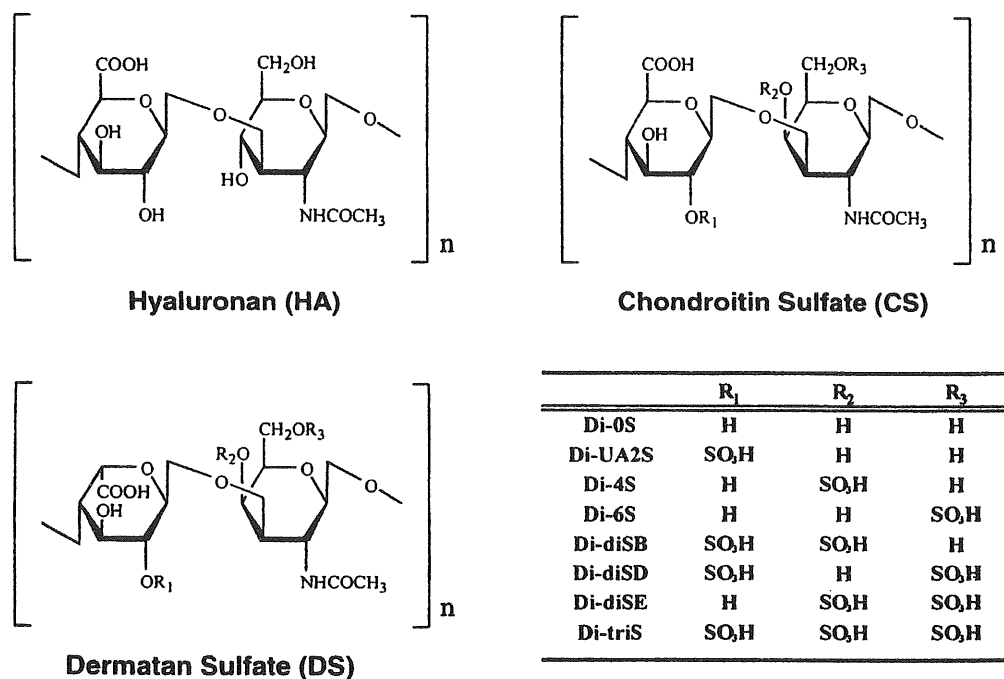


Fig. 1 Structures of glycosaminoglycans

acid)-D-glucose, Δ Di-0S: 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-D-galactose, Δ Di-4S: 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose, Δ Di-6S: 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose, Δ Di-UA2S: 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(2-O-sulfo- β -D-glucopyranosyluronic acid)-D-galactose, Δ Di-diSB: 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(2-O-sulfo- β -D-glucopyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose, Δ Di-diSD: 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(2-O-sulfo- β -D-glucopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose, Δ Di-diSE: 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-4,6-bis-O-sulfo-D-galactose, Δ Di-triS: 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(2-O-sulfo- β -D-glucopyranosyluronic acid)-4,6-bis-O-sulfo-D-galactose (以上, 生化学工業株式会社製)。

グリコサミノグリカンの構造をFig. 1に示す。

2) 酵素: コンドロイチナーゼABC (CSase ABC), コンドロイチナーゼACII (CSase ACII) (以上, 生化学工業株式会社製)。

結 果

1. 組織中グリコサミノグリカンの分析

Fig. 2に示すように, 有機スズ暴露によって組織学的変化のみられる海馬や胸腺などの組織からプロテオグリカンを取り出し, その構成成分であるグリコサミノグリカンを不飽和二糖に分解し, 全不飽和二糖の組成比を蛍光ポストカラ

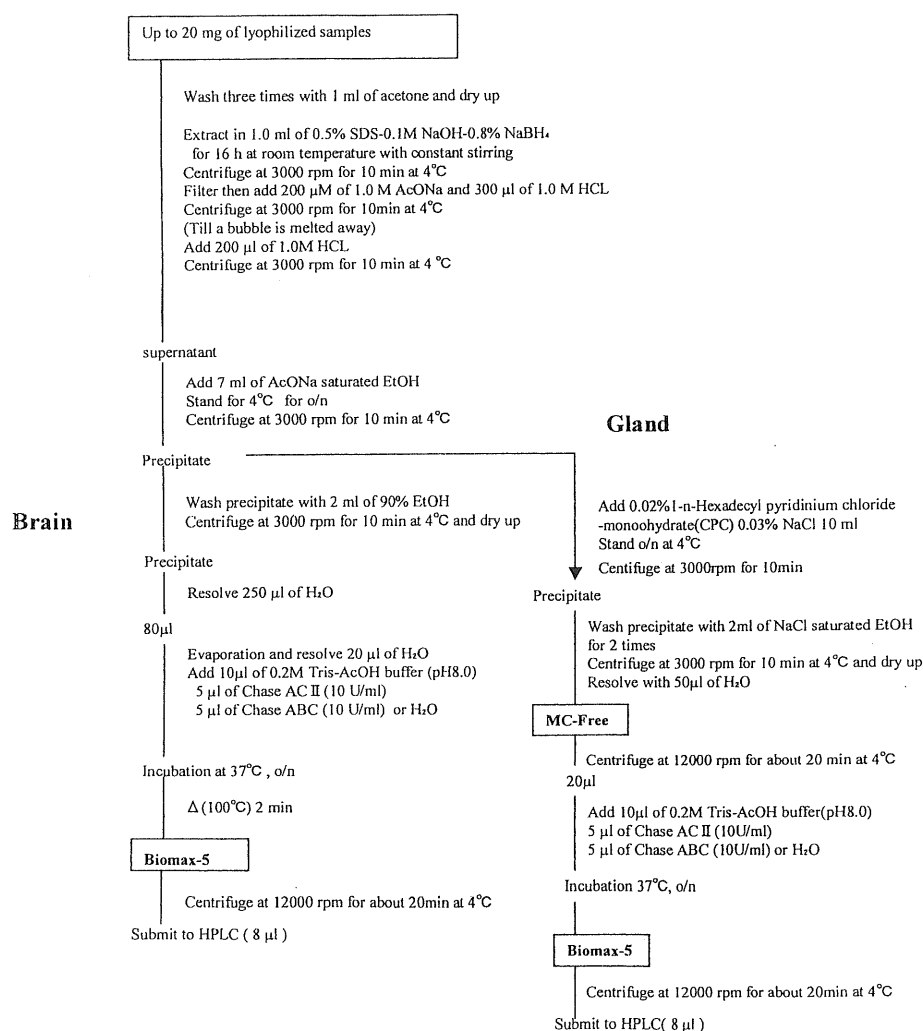


Fig. 2 Preparation of glycosaminoglycan from tissue

μ HPLCで測定した。すなわち、得られたグリコサミノグリカンはコンドロイチナーゼABC (CSase ABC) とコンドロイチナーゼACII (CSase ACII) で消化し、その不飽和二糖を逆相イオンペアHPLCで分析した。得られたクロマトグラムをFig. 3に示す。

胸腺における不飽和二糖の分析は基本的には海馬におけるコンドロイチン硫酸 (CS) やデルマタン硫酸 (DS) の組成分析と同様の方法であるが、萎縮した胸腺は脳よりもその絶対量が非常に少なく、高硫酸化不飽和二糖の分析が難しいため、全量を濃縮して行った。しかし、この時多量の不純物が残るため、エタノール沈殿の後にCPC (1-n-hexadecyl pyridinium chloride monohydrate) 沈殿の処理を加えた。この処理の追加は若干の回収率の低下を導くが、また本処理はヒアルロン酸ならびにコンドロイチンなど硫酸化されていない不飽和二糖が沈殿しにくいという欠点もあるが、糖を選択的に沈殿させる非常に優れた方法である。

2. 組織中グリコサミノグリカンの変動

有機スズ暴露によって海馬や胸腺などにおけるプロテオグリカンの組成は著しく変化した。

2. 1. 海馬中グリコサミノグリカン

海馬では、Fig. 4に示すように、ジブチルスズ暴露の場合、有意の変化はみられなかったが、トリブチルスズ暴露の場合、暴露1週間目でコンドロイチン (CS-0S) およびデルマタン (DS-0S) の著しい増加とコンドロイチン4硫酸 (CS-4S) およびデルマタン4硫酸 (DS-4S) の低下がみられた。

2. 2. 胸腺中グリコサミノグリカン

胸腺では、Fig. 5に示すように、ジブチルスズ暴露の場合、デルマタン硫酸 (DS) 由来の不飽和二糖 Δ Di-SBの著しい増加、わずかではあるがコンドロイチン硫酸 (CS) 由来の Δ Di-0Sの低下や Δ Di-4Sの増加がみられた。おそらく、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの絶対量が減少し、デルマタン硫酸の値が増加したものと思われる。トリブチルスズ暴露の場合、不飽和二糖 Δ Di-0Sの著しい増加と Δ Di-4Sの低下がみられた。

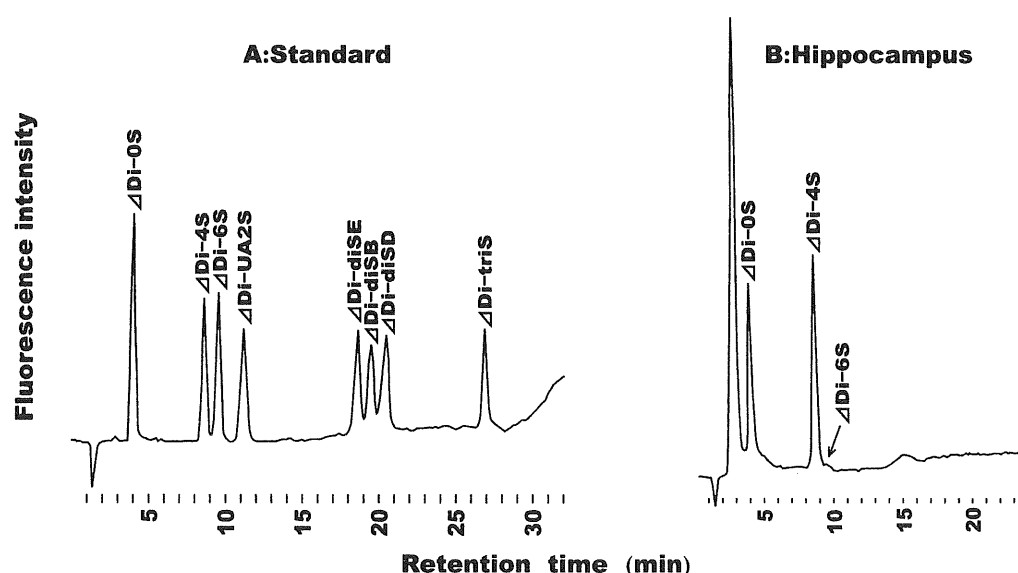


Fig. 3 Chromatograms of unsaturated disaccharides

A: standard unsaturated disaccharides (0.5 ppm, 8 mixtures)

B: unsaturated disaccharides derived from the fraction of rat tissue After digestion with chondroitinase ABC and ACII

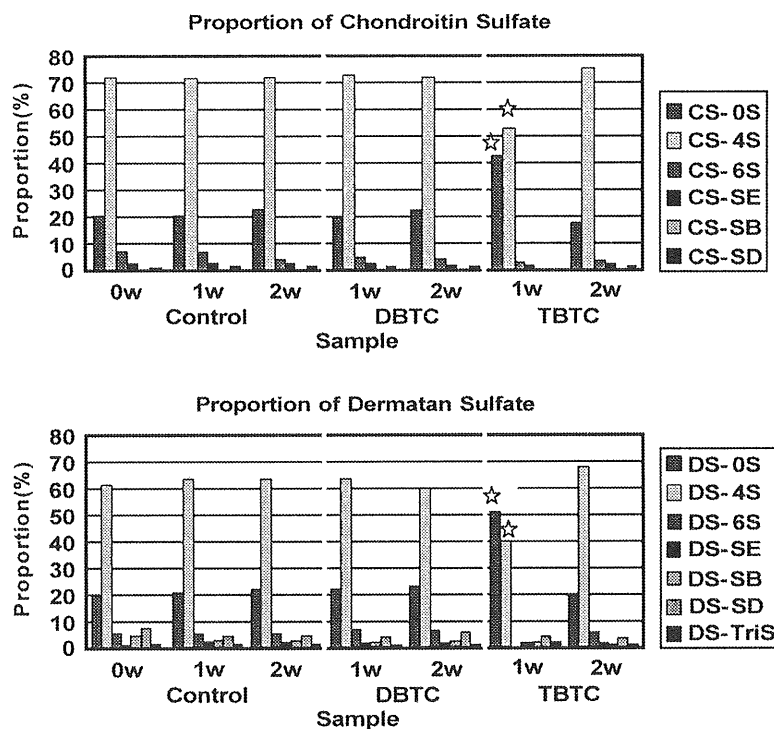


Fig. 4 Alterations in the proportion of unsaturated disaccharides of glycosaminoglycan derived from proteoglycan in organotin-exposed hippocampus of rat. Each value represents the mean of five independent experiments; those marked with asterisks differ significantly (Student's t-test) from the corresponding control value ($\star p < 0.001$). Dibutyltin dichloride (DBTC), Tributyltin chloride (TBTC).

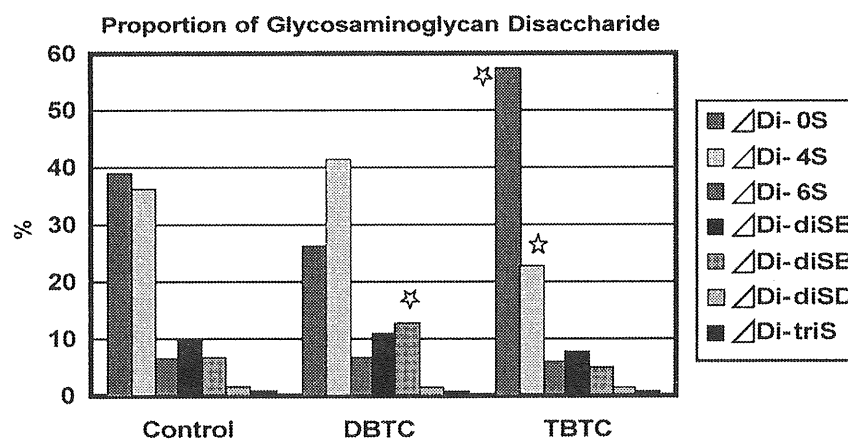


Fig. 5 Alterations in the proportion of unsaturated disaccharides of glycosaminoglycan derived from proteoglycan in organotin-exposed thymus of rat. Each value represents the mean of five independent experiments; those marked with asterisks differ significantly (Student's t-test) from the corresponding control value ($\star p < 0.001$). Dibutyltin dichloride (DBTC), Tributyltin chloride (TBTC).

考 察

有機スズ暴露によって、胸腺では臓器の萎縮、胸腺T細胞の消失、T細胞膜表面抗原の欠落、ゴルジ体/小胞体の構造破壊、脳では海馬硬化（錐体細胞の変性、脱落など）、苔状線維の異常発芽（苔状線維の脱落により誘発）、海馬亜鉛の消失、嗅球における嗅覚神経細胞の消失、精巣では精細管を取り巻く間質組織（間細胞やテストステロンを産生するライディッヒ細胞が存在する）の著しい損傷や脱落などがみられる¹⁻⁶⁾。また、このような病理学的変性は金属とは無

関係と思われる疾患, 例えばてんかん患者やそのモデル実験動物の脳においても認められ, 歯状回門神経や錐体細胞の変性, 脱落などの海馬硬化⁷⁾や歯状回門に存在する苔状線維の脱落により誘発される苔状線維の異常発芽⁸⁾など数多くの病理学的変性が海馬において確認されている。

一方, プロテオグリカン(細胞外マトリックスや細胞表層に存在する代表的な複合糖質の一つであり, 情報伝達など種々の細胞活動に関与している。とくに, その構成成分であるグリコサミノグリカン鎖は硫酸基の位置や結合数, 糖鎖長の違いなどにより極めて多彩な構造をとることができる。そのため, 同じコア蛋白質をもつプロテオグリカンでも分子全体の大きさや構造は著しい多様性を示す。しかも, グリコサミノグリカンの多様な構造変化は組織の種類や部位, 生物の発生や成長段階, 病態などに対応して規則的に起こっているものと考えられる。そして, これらの変化はそれぞれの現象の結果であると同時に, また現象を引き起こす原因とも成り得る。従って, グリコサミノグリカンの存在や構造変化を解析することはその構造多様性の意義や機能を解明する上で極めて重要であるばかりでなく, 細胞外マトリックスや細胞表層あるいは組織における構造変化や損傷を構成成分の組成変化として捉える有効な手段となる。

そこで, 実際に有機スズ暴露によって組織学的変化のみられる海馬や胸腺などにおけるプロテオグリカンを不飽和二糖に分解し, 全不飽和二糖の組成比を蛍光ポストカラムHPLCで測定した。その結果, 有機スズ暴露によって海馬や胸腺などにおけるプロテオグリカンの組成は著しく変化した。

すなわち, Fig. 4に示すように, 海馬では, ジブチルスズ暴露の場合, 有意の変化はみられなかったが, トリブチルスズ暴露の場合, 暴露1週間目でコンドロイチン(CS-0S)およびデルマタン(DS-0S)の著しい増加とコンドロイチン4硫酸(CS-4S)およびデルマタン4硫酸(DS-4S)の低下がみられた。

また, 胸腺では, Fig. 5に示すように, ジブチルスズ暴露の場合, デルマタン硫酸(DS)由来の不飽和二糖 Δ Di-SBの著しい増加, わずかではあるがコンドロイチン硫酸(CS)由来の Δ Di-0Sの低下や Δ Di-4Sの増加がみられた。おそらく, コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの絶対量が減少し, デルマタン硫酸の値が増加したものと思われる。トリブチルスズ暴露の場合, 不飽和二糖(Δ Di-0S)の著しい増加と Δ Di-4Sの低下がみられた。胸腺にはコンドロイチンが多く, ヒアルロン酸が非常に少ないので, この不飽和二糖(Δ Di-0S)の著しい増加はコンドロイチンの増加によるものである。

一般に組織の成熟化あるいは成長に伴って Δ Di-4Sの増加, Δ Di-0Sの低下, Δ Di-6Sの低下が見られるが⁹⁾, 有機スズ暴露では逆に Δ Di-4Sの低下, Δ Di-0Sの増加が観察された。これは有機スズ暴露によりコンドロイチン4-O-スルホトランスフェラーゼとコンドロイチン6-O-スルホトランスフェラーゼの両酵素活性が障害を受けていることを示している¹⁰⁾。また, 海馬におけるコンドロイチン(CS-0S)およびデルマタン(DS-0S)の著しい増加はアルツハイマー病患者の脳内におけるコンドロイチン鎖の特徴的な蓄積¹¹⁾と考え合わせると非常に興味深い。

参考文献

- 1) Arakawa Y. (1988) Tin and Malignant Cell Growth (CRC Press, Boca Raton, Florida, USA).
- 2) Arakawa Y. (1992) Chemistry and Technology of Silicon and Tin (Oxford University Press, Oxford, UK).
- 3) Arakawa Y. (1993) Metal Ions in Biological Systems, Vol. 29 (Marcel Dekker Inc., New York, USA).
- 4) Arakawa Y. (1996) Main Group Elements and Their Compounds (Narosa Publishing House, New Dehli, India).
- 5) Arakawa Y. (1998) Chemistry of Tin (Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Glasgow, UK).
- 6) 荒川泰昭 (1996) 脳の機能と微量金属－記憶・学習と亜鉛－(総説), ぶんせき (日本分析化学会雑誌6, 46-53).
- 7) Sloviter RS, Dean E, Sollas AL, Goodman JH. (1996) J. Comp. Neurol. 366, 516-533.
- 8) Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. (1997) J. Neurosci. 17, 3727-3738.
- 9) Jenkins HG, Bachelard HS. (1988) J. Neurochem. 51, 1634-1640.
- 10) Kitagawa H, Tsutsumi K, Tone Y, Sugahara K. (1997) J. Biol. Chem. 272, 31377-31381.
- 11) Salinero O, Garrido JJ, Wandosell F. (1998) Biochim. Biophys. Acta. 1406, 237-250.