

氏名(本籍)	待木健司(宮崎県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第927号
学位授与年月日	平成5年11月30日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	蓋膜のグリコサミノグリカン及びプロテオグリカンの生化学的分析
主査	筑波大学教授 医学博士 中井利昭
副査	筑波大学教授 医学博士 工藤典雄
副査	理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター主任研究員 (筑波大学客員教授)
	医学博士 坂倉照好
副査	筑波大学教授 医学博士 林浩一郎
副査	筑波大学教授 理学博士 坂内四郎

## 論 文 の 要 旨

### 〈目的〉

内耳蓋膜の聴覚生理における機能は未だ不明の点が多い。この理由の1つとして、生理現象を裏付ける生化学的分析が十分なされていないことが挙げられる。本研究はコラーゲンとともに、蓋膜のmatrixを構成するグリコサミノグリカン(GAG)およびそのタンパク質との共有結合体であるプロテオグリカン(PG)について生化学的分析を行い、生理機能の特性を裏付けることを目的とする。

### 〈対象と方法〉

#### (1) 試料の作製及び採取

生後2～3週のマウスを使用。ペントバルビタール麻酔後直ちに断頭、蝸牛を摘出。実体顕微鏡下に骨壁、らせん靱帯および血管条を除去後、蓋膜を頂回転より摘出。

#### (2) 試料の抽出

蓋膜20個に対して100 $\mu$ lの4M塩酸グアニジンとプロテアーゼ阻害剤を含む抽出液中で4℃24時間抽出。エタノールで2度沈澱後、酢酸ナトリウムで塩酸グアニジンを除去しバイオドライ。

#### (3) 酵素処理

(a) Bacterial collagenase, 37℃, 24時間。

(b) ChondroitinaseABC, 37°C, 4時間。

(c) Keratanase II, Endo- $\beta$ -galactosidase, 37°C, 4時間。

(4) 色素化学法による分析

BioRad のバイオドット装置を用いて500  $\mu$ l の0.02%safranin-o と酵素処理前, 後の蓋膜試料を50  $\mu$ l に希釈し, ナイトロセルロース膜上に吸引沈着。クロマトグラムスペクトロフォトメーターのレフレクタンスモード,  $\lambda=490\text{nm}$  にて測定。

(5) 電気泳動および免疫化学的分析

(a) 10%ゲルによる SDS-PAGE (低分子型 PG の分析)。

(b) 0.6%アガロース, 1.2%アクリルアミドゲル電気泳動 (高分子型 PG の分析)。

(c) ナイトロセルロース膜上に電気的転写。抗 PG  $\angle$ Di-OS, 抗 PG  $\angle$ Di-4 S, 抗 PG  $\angle$ Di-6 S, 抗ケラタン硫酸, 抗ファイブロモデュリン抗体を用いたアルカリフォスファターゼ染色。

<結果と考察>

(1) 色素化学法による GAG の定性および定量

蓋膜中のウロン酸を含有する GAG は145ng, ケラタン硫酸は85ng, 総 GAG は230ng, 湿重量百分率で1 蓋膜あたり0.46%であった。

形態学的に蓋膜のコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸の存在を報告した論文はみられるが生化学的に蓋膜にウロン酸を含有する GAG を同定し得たのは今回が初めてである。ウロン酸を含有する GAG は, 大分子として存在し水やイオンを大量に吸収し得るため Steel の提唱する蓋膜における Donnan 平衡を担う物質となり得, また形態学的に見られているコラーゲンが埋め込まれている matrix として存在していると思われる。

(2) 電気泳動および免疫化学的分析

10%SDS-PAGE では, 抗ケラタン硫酸抗体に対し反応する3個のバンドが認められた。そのうちの1つ, 分子量約55,000Da のバンドは抗ファイブロモデュリン抗体とも反応が認められた。0.6%アガロース, 1.2%アクリルアミドゲル電気泳動では抗 PG  $\angle$ Di-6 S にのみ反応し染色されるバンドを認めた。

電気泳動, 免疫化学的分析で, 低分子型の PG は主にケラタン硫酸を側鎖に持ち, 高分子型の PG はコンドロイチン硫酸を側鎖にして存在していると思われた。また低分子型 PG の1つは, ファイブロモデュリンであると考えられた。

蓋膜においては GAG の量は硝子体と軟骨の中間であり, II 型コラーゲンは放射状あるいは長軸方向に配列し, 聴毛の配列方向に抵抗力を持つと考えられる。したがって蓋膜の聴覚生理における機能の1つとして音感受性の増強作用, 即ち蓋膜の聴毛の先端配列を一定に保ち, 静止状態で聴毛が傾かないように維持している事が考えられた。

## 審 査 の 要 旨

内耳蓋膜の聴覚生理における機能を明らかにするため、コラーゲンとともに蓋膜の matrix を構成する GAG の生化学的分析を行った。マウス蓋膜を用いた色素化学的分析で、ウロン酸を含有する GAG をはじめて同定し得た。この GAG はタンパク質と共有結合し PG の形で存在するので、つぎに PG の subtype を電気泳動、免疫化学的方法を用いて分析した。その結果、低分子型の PG は主にケラタン硫酸を側鎖に持ち、一方高分子型の方はコンドロイチン硫酸を側鎖にして存在していることが示唆された。蓋膜の生理機能の特性の一面を生化学的分析により裏付けた有意義な研究であると評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。