

硬組織形成における蛋白ムコ多糖体 の生物学的役割*

小林 新二郎**

1. はしがき

軟骨におけるコンドロイチン硫酸 Chondroitin Sulfate (以下CSと略)の発見以来 (Fischer & Boedeker, 1861), 酸性ムコ多糖類 acid mucopolysaccharides (AMP S's) に関してはぼう大な数にのぼる研究が行われている。しかし, 1954年 Shatton & Schubert が軟骨内のCSはCSとして存在するのではなく, 非線維性蛋白と結合した蛋白-CS複合体のコンドロムコ蛋白として存在することを明らかにするまでは, これらの研究のほとんど全部がAMP S'sの精製, 同定および分布の研究に終始していたといっても過言ではない。鈴木(1967)はこの時代を“誤まれる単純化時代”と呼んでいる。その後, CS以外のAMP S'sも非線維性蛋白と結合した蛋白ムコ多糖複合体 protein-polysaccharide (PP)として組織内に存在することが明らかにされている。

組織の石灰化機構の問題に関しても, この誤まれる時代とその名残りの影響を受けて, CSが石灰化の抑制因子 (Glimcher, 1959, 1960)あるいは促進因子 (Sobel, 1955, 1961)であるとする2つの相対立する仮説のそれぞれの立証が研究方向の主流をなしていた。しかし, 最近, このPPの生化学的研究と平行して, 組織の石灰化現象におけるその生物学的機能に関する研究が, 技術の進歩とあいまって活発になってきている。その結果, CSの石灰化機構に関する仮説の対立も, このPP概念の導入によって矛盾することなく理解され解消しようとしている (Bowness, 1968)。

このような研究の歴史的背景からわかるように, 硬組織形成機構を考えると, 我々はいまAMP Sの時代にあるのではなく, PPの時代にあることを, この総説を通して強調したい。しかし, 硬組織のPPに関する現知識はほとんど高等動物の軟骨に限られており, 骨やその他の生物の硬組織に

* 1971年9月30日受理 Shinjirō Kobayashi

** 元北海道大学水産学部

関しては極めて不十分な状態にある。将来、この紹介を通して多くの生物種と多くの硬組織のPP研究の進展することを願ってやまない。

2. AMPSの定義

AMPSの定義づけについては色々と試みられているが、ここではGibian (1959) にしたがって、ウロン酸とヘキソサミンの1種を含むヘテログリカンだけをAMPS'sと呼ぶこととする。その代表的な種類の組成を分布とを第1表に示しておく (Suzuki, 1962)。この表に明らかなように、AMPS'sは硬組織に特有ではなく、広く軟組織にも分布する。

第1表. 酸性ムコ多糖類 (Suzuki, 1962)

Name	(α) D	Constituents ^a	Distribution
Hyaluronic acid	-70°	GNac, GA	Umbilical cord, skin, synovial fluid, vitreous humour, cock's comb, fowl tumours, groups A and C streptococci
Chondroitin	-37°	GalNAc, GA	Cornea
Chondroitin sulfates			
A	-32°	GalNAc-4S, GA	Cartilage, bone, cornea, aorta, chondrosarcoma, hen oviduct
B	-60°	GalNAc-4S, iduronic acid	Skin, tendon, heart valve, aorta, lung, urin of patients with Huler syndrome, hen oviduct
C	-12°	GalNAc-6S, GA	Umbilical cord, tendon, chordoma, electric eel
Chondroitin polysulfate ^b	-17°	GalNAc-6S, GA, GA-2 or -3S	Elasmobranch cartilage
Keratosulfate	+4.5°	GNac-6S, galactose	Cornea, rib cartilage, nucleus pulposus
Kerato-polysulfate	+5.4°	GNac, galactose, sulfate	Elasmobranch cartilage
Heparin	+49°	GN, GA, N-and O-sulfates	Lung, liver, thymus, spleen, blood, clams

Heparitin sulfate	+50 °	GN, GA, N-acetyl	Aorta, lung, liver, tissues
	-67 °	N-andO-sulfates	and urine of patients with amyloidosis or Huler syndrome, hen oviduct

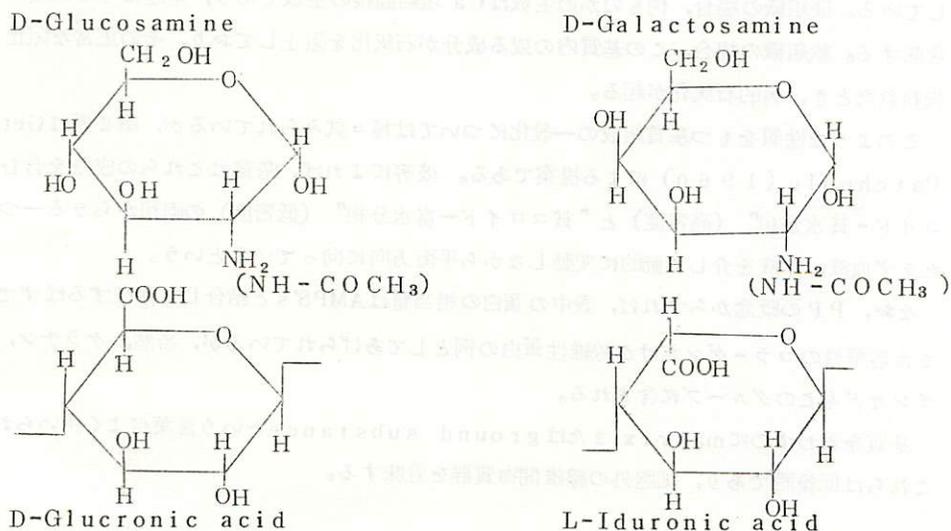
a) Abbreviations used are:GN, glucosamine;GNAc, N-acetylglucosamine;GalN, galactosamine;GalNAc, N-acetylgalactosamine;SA, glucuronic acid;GalNAc-4S and -6S, N-acetylgalactosamine-4 sulfate and-6 sulfate;GA-2 or -3S, glucuronic acid -2 sulfate or -3 sulfate.

b) Recently, chondroitin polysulfate was subdivided into CS-D and CS-E Ccf, e. g., Mathews et al., 1962;Kawai et al., 1966; Hirano, 1968).

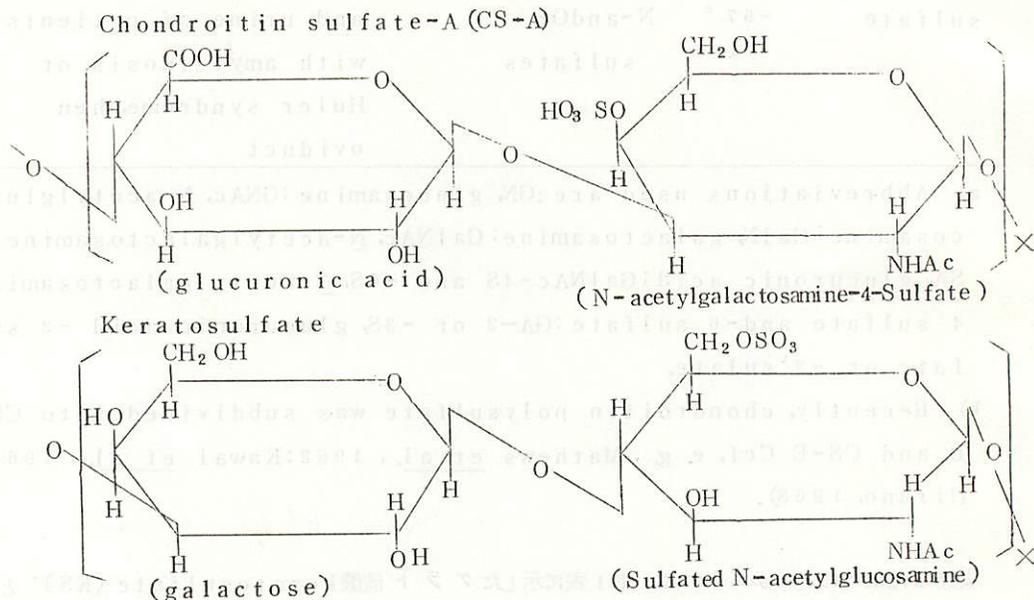
上述のAMPSの定義からすれば、第1表に示したケラト硫酸keratosulfate (KS)'とケラトポリ硫酸kerato-polysulfate (SKS)はウロン酸をもたず、その代りにガラクトースを含むものであるから除外さるべきであるが、後述するように、PP中に含まれて見出されるので、特に加えておく。なお、これから述べることの理解のために、ヘキシサミン、ウロン酸、CS-AおよびKSの構造を第1図および第2図に示しておく。

第1図 ヘキシサミンのグルコサミンおよびガラクトサミン、ならびにウロン酸の構造。()

内は天然物のアセチル化を示す。



第2図. コンドロイチン硫酸およびケラト硫酸のくりかえし単位構造



3. 基質

関与細胞の合成と分泌による基質の形成は組織の石灰化の先決条件であるばかりではなく (Schiffmann *et al.*, 1970), その性質は生成する結晶形をも決定する (Watabe & Wilbur, 1960)。

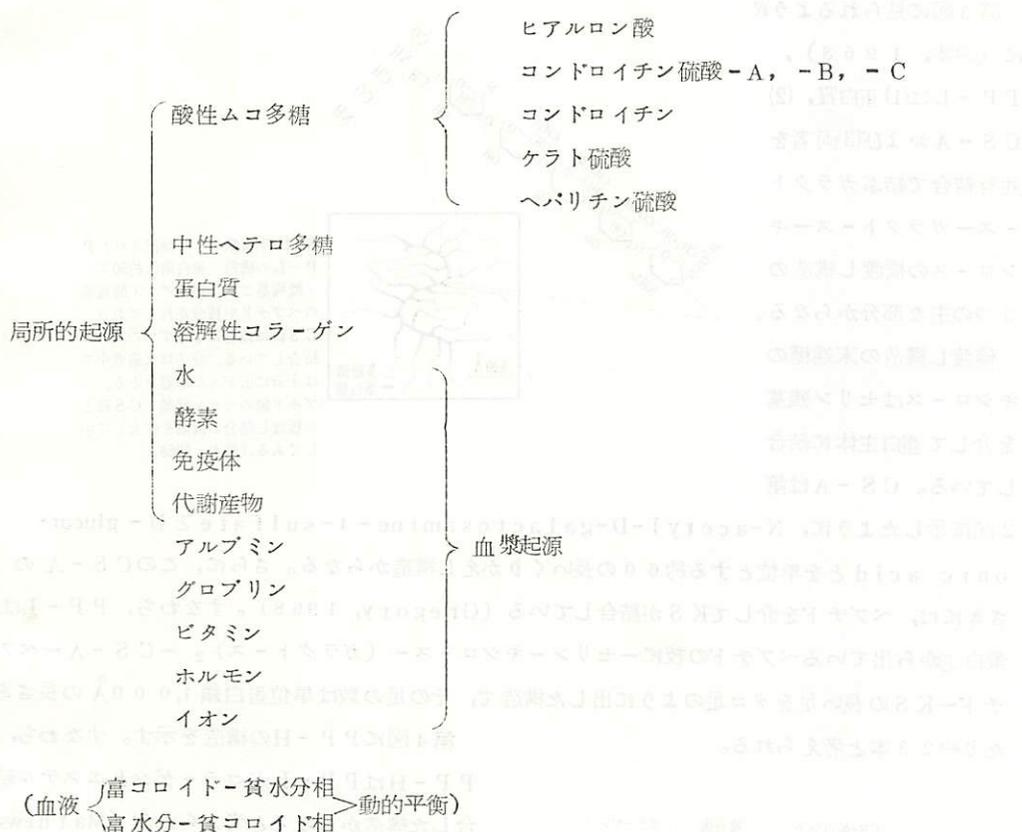
Eastoe (1964, 1968)は“基質とは何ものが生成発達する場または媒体である”と定義している。硬組織の場合、何ものかの生成はCa 塩結晶核の生成であり、発達はその結晶の成長を意味する。軟組織の場合、この基質内の或る成分が石灰化を阻止しており、その正常な阻止作用が失われたとき、病的石灰化が起る。

このような性質をもつ基質組成の一般化については種々試みられているが、第2表はGersh & Catchpole (1960)による提案である。彼等によれば、基質はこれらの成分を含む“富コロイド-貧水分相” (高密度)と“貧コロイド-富水分相” (低密度)の両相からなる一つの系で、たえず血液、体液を介して動的に変動しながら平衡方向に向っているという。

なお、PPの概念からすれば、表中の蛋白の相当量はAMPS'sと結合して存在するはずであるし、また溶解性のコラーゲンだけが線維性蛋白の例としてあげられているが、当然、ケラチン、エラスチンなどもこのグループに含まれる。

基質を表わすのにmatrix またはground substanceという言葉がよく用いられるが、これらは同義語であり、細胞外の線維間物質群を意味する。

第2表 基質組成 (Gersh & Catchpole, 1960)



4. PP-LとPP-H

牛の鼻の軟骨片を多量の水にひたし、低温で高速ホモゲナイザ-にかけると (45,000rpm), 粘性の高いコハク色の液が得られる。

この液にエタノールを加えて遠沈炉過するとppと軟骨残渣cartilage residue (CR) が得られる (Malamista & Schubert, 1958)。このPPは蛋白質30%, CS60% および水分10%からなりコンドロムコ蛋白とも呼ばれるが、一般には蛋白ムコ多糖複合体といわれている。それは、糖蛋白glycoproteinではその炭水化物成分がオリゴ糖であるのに対し、PPのそれは多糖類であることを強調しての呼称である。

このPPを超遠心すると、10万g以上でない沈殿しない軽いlight PPのPP-Lと1万gでも容易に沈殿する重いheavy PPのPP-Hとに分画され、CRが残る (Gerber et al., 1960)。牛鼻軟骨での収量はPP-L30%, PP-H5%およびCR55%で、全CSの61%がPP-Lに、4%がPP-Hに、35%がCRに含まれる。コラーゲンに特異なアミノ酸

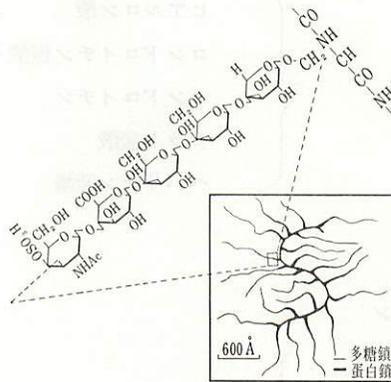
のhydroxyprolineはPP-Lには含まれず、PP-HとCRに多量に検出される(Pal & Schubert, 1965)。

第3図に見られるように(鈴木, 1968),

PP-Lは(1)蛋白質, (2)CS-Aおよび(3)両者を共有結合で結ぶガラクト-
-スーガラクト-
-キシロ-
-スの橋渡し構造の
3つの主要部分からなる。

橋渡し構造の末端糖の
キシロ-スはセリン残基
を介して蛋白主体に結合
している。CS-Aは第

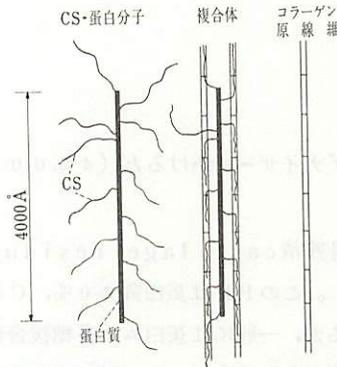
2図に示したように、N-acetyl-D-galactosamine-4-sulfateとD-glucuronic acidとを単位とする約60の長いくりかえし構造からなる。さらに、このCS-Aのさきには、ペプチドを介してKSが結合している(Gregory, 1968)。すなわち、PP-Lは蛋白芯から出ているペプチドの枝に-セリン-キシロ-ス-(ガラクト-ス)₂-CS-A-ペプチド-KSの長い足をタコ足のように出した構造で、その足の数は単位蛋白質1,000Åの長さあたり約23本と考えられる。



第3図牛鼻軟骨より抽出されたPP-Lの構造。蛋白質は約50アミノ酸残基ごとに約20アミノ酸残基のペプチドが枝分かれしており、CS鎖は後者に1本ずつの割合に結合している。分子は水溶液中では十分に広がった形態をとる。ペプチド鎖のセリン残基とCS鎖との橋渡し部分の構造を拡大して示してある。(鈴木, 1968)。

第4図にPP-Hの構造を示す。すなわち、PP-HはPP-Lがコラーゲンとエステル結合した構造からなると考えられる(Mathews, 1968)。

PP-LとPP-Hの割合は組織の種類によって相異なるが、第3表の結果はそれを示している。この場合、鼻軟骨は、関節軟骨に比べて、コラーゲンが少い割にCSが多い。このことは、鼻軟骨においてはコラーゲンと結合していない遊離のPP-Lの多量に存在することを意味している(Smith et al., 1967)。



第4図 牛軟骨のコラーゲンとCS-蛋白高分子単位の相互関係模式図。便宜上、CS鎖の数は $\frac{1}{3}$ にしてある。(Mathews, 1968)。

	Articular cartilage	Nasal cartilage
Moisture (% of fresh tissue)	78.7	74.0
Sulphated ash (% of fresh tissue)	7.7	13.1
Hydroxyproline*	9.7	4.6
Collagen*	72.4	34.5
Hexosamines*	4.7	14.8
Uronic acid*	5.0	14.9
Chondroitin sulphate*†	14.0	41.7

* Expressed as % of ash- and moisture-free material.
† Calculated from uronic acid content.

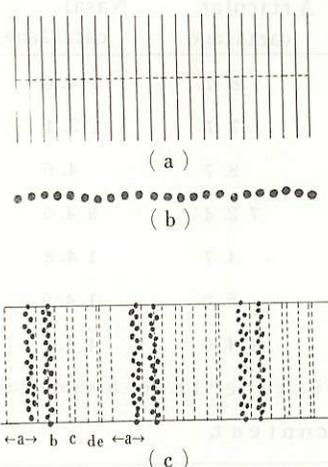
5. PP-LとPP-Hの電顕的研究

電顕レベルでの組織化学的および細胞化学的方法による硬組織内のAMPSやPPの検証が行われている。一般組織のMPSに対する電顕的染色法については「医学のあゆみ」76(5), 1971の特集号を参照されたい。

硝酸ビスマスbismuth nitrateの水溶をPP-LおよびPP-Hの溶液に加えると沈澱を生じる。この沈澱をグリッドにスプレーして電顕観察すると、CSとKSとはいずれも約 2.3 \AA の黒い微粒子として認められる。しかし、水溶硝酸ビスマス染色では個々のPP-L分子の形態は明瞭でない。これをアセトンに溶かして用いると、第5図に見られるように、径約 30 \AA の23個前後の数のCS粒子が $1,100 - 1,500 \text{ \AA}$ の長さの線上に配列している。黒い粒子と粒子との間の約 36 \AA は硝酸ビスマス不染の蛋白部分に相当する。PP-Hを水溶硝酸ビスマスで染めてから燐タングステン酸phosphotungstic acid (PTA)で後染すると、PP-Lのコラーゲンに付着している位置が認められる。(Serafini-Fracassini & Smith, 1966)。このような電顕的研究に基づいて、PP-LとPP-Hの関係を模式的に示したのが第6図a, bおよびcである(Smith et al., 1967)。PP-Lがコラーゲンに付着している位置については論議もあるが、これらの研究は、化学的構造と電顕的解析との一致の好例といえよう。



第5図 アセトンに溶かした硝酸ビスマスで沈澱、染色しグリッドにスプレーして見たPP-Lの電顕像。×350,000。(Serafini-Fracassini & Smith, 1966)。



第6図 電顕像から推定のPP-Lとそのコラーゲンへの付着の状態を示す模式図。(a) PP-L分子。横の破線は蛋白芯、縦の実線はCS-A鎖。(b) アセトン溶硝酸ビスマスで染色したPP-L分子。黒い粒々がCS-A鎖で、その間の染まっていない部分が蛋白部分に相当する。(c) PP-LのCS-A鎖がコラーゲン原線維のaおよびb,バンドの位置に付着している。(Smith et al., 1967).

なお、電顕レベルの硬組織内PP染色には、上記の硝酸ビスマスのほか、colloidal iron, Alcian blue, ruthenium red, colloidal thorium dioxide (Thorotrast) などが活用されているが、Bonucci (1967, 1969) は試料を包埋前に脱灰すると、Ca塩と共に基質成分も部分的に溶出するから、各種のチェックの必要であることを警告している。

6. PPの合成・分泌と微環境

硬組織基質成分の合成、分泌、変性などに関与する細胞の起源については、軟骨芽細胞が間充細胞由来であることには疑いがないが、造骨芽細胞に関しては組織培養法の著しい進歩にもかかわらず不明の点が多い。Hall (1968) は、造骨芽細胞はコラーゲン合成能が高く、軟骨芽細胞はAMPS合成能が高いが、基本的には、両細胞は共通の未分化状態にある胚種細胞 germinal cells と考えた方がよく、そして、胚種細胞から軟骨芽細胞に分化するか造骨芽細胞になるかのスイッチの切りかえは、その細胞がコラーゲンを多く合成するか、またはAMPSを多く合成するかの代謝過程の変化によるとの考えを提起している。もし、事実そうであるとするならば、石灰化におけるPPの作用を論ずる前に、細胞内の代謝と変化の過程が追及されなければならない。そのような代謝、特にAMPSの合成回路、硫酸化および蛋白との結合の重要課題については、組織培養と生化学的立場から多くの研究が進められている (Dingle & Webb, 1965, 鈴木, 1967, 1968; Horowitz & Dorfman, 1968)。ここには、そのあらましを知るため、胚種細胞に相当する線維芽細胞におけるPP-Lおよびコラーゲン前駆物質の合成と分泌の経路だけを第7図に示しておく (Ross, 1968)。

さらに、組織が石灰化するには、胚種細胞が造骨芽細胞に分化しその特性の機能を発現すること

が先決条件となるが、その細胞の分化と分泌される基質物質の組成は遺伝的情報と微環境条件によって規制される (Bassett, 1962; Dingle & Webb, 1965; Hadházy et al., 1968)。

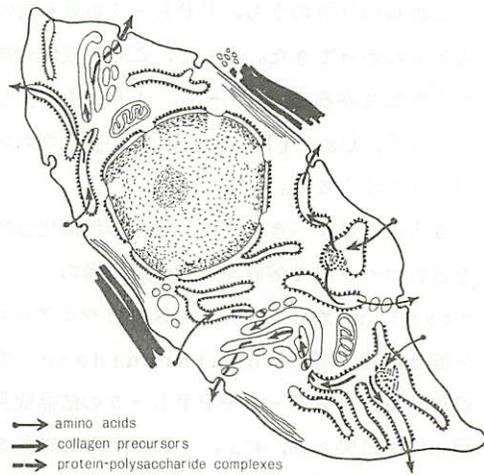
そして、微環境要因の重要な因子としては栄養、酸素供給、機械的作用、ビタミン、ホルモン、細胞の集塊の程度などがあげられている。

その上、細胞と基質の間には第8図に見られるような自動制御関係があり (Greer et al., 1968), それはさらに微環境に包まれて組織を形成している。PPはこのような組織の中にあつて、軟組織の場合は石灰化を阻止する一方、硬組織の場合は石灰化を誘導するという二重の生物学的機能を果たしている。

7. PP-LのCa結合能と結晶成長阻止作用

pH 7.5の緩衝液にCaCl₂溶液とK₂HPO₄溶液との適量を順次加えてゆくと、15分くらいでCa₃(PO₄)₂の沈澱を生じる。しかし、この混合液にPP-Lを加えると、Ca₃(PO₄)₂の沈澱は生じないで、液はコハク色の懸濁液となる。しかも、この液は安定で、懸濁物は1,000g以下の遠心では沈澱しない。1万gの超遠心でそれを採取して調べてみると、600Å程度のCa₃(PO₄)₂の微細結晶がPP-L分子内に抱合され、PPL-Ca₃(PO₄)₂の包接化合物を形成していることがわかった。すなわち、このような化合物を形成する結果、微晶はその成長を阻止され沈澱しないものと考えられる。

さらに、中性塩水溶液で抽出したPP-Lを、塩濃度を上げながら超遠心分離法にかけると、PP-LはPPL-2, -3, -4, -5および-6に再分画されるが、上述のようなCa₃(PO₄)₂の微晶を抱合して結晶の成長を阻止する作用力は、



第7図 線維芽細胞によるPPおよびコラーゲン前駆物質の合成・分泌の径路を示す模式図。アミノ酸は細胞膜を通つて粗面小胞体のリボゾームに入る、これらのアミノ酸は粗面小胞体中で蛋白に仕上げられる。これらの蛋白のうち、コラーゲン前駆物質としての蛋白がPP成分を形成する蛋白かによって、細胞内で少くとも2つの異なる径路をたどる。コラーゲン前駆物質は粗面小胞体から原形質、形質膜を通つて直接細胞外に排出される。PP成分の蛋白も粗面小胞体の中を通るが、さらに、Golgi体内に入つて多糖類と複合体を作つてから移動し、形質膜と融合するなどの経過をたどつて細胞外に排出される。

(Ross, 1968.)

これらの分画のうち、PPL-5が最も強いこともわかってきた。そして、この包接化合物を分析してみると、PPL-5 16.2%, 水分41.5%, $Ca_3(PO_4)_2$ 43.4%, ウロン酸3.4%からなる。

さらに注目すべきことは、上述の包接化合物を含むコハク色の溶液を蛋白分解酵素の

trypsin かCS-A, CS-Cやヒアルロン酸を消化分解するhyaluronidaseで処理すると、PP-LやPPL-5の結晶成長

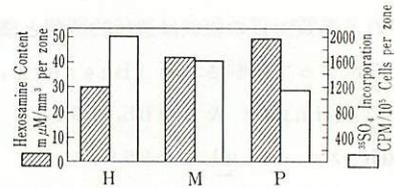
阻止作用は失われ、 $Ca_3(PO_4)_2$ の結晶を沈澱するに至ることである。その上、PP-LやPPL-5の上述の特性はCSには認められないことも明らかになった(Weinstein et al., 1963; Di Salvo & Schubert, 1967)。

以上の結果は、CSが蛋白と結合してタコの足状の分子構造をもつPP-Lとなることによつて、はじめて、Ca塩と強く結合するばかりではなく、結晶の成長を阻止するという生物学的機能を発現することを示唆している。

なお、硬組織内生成のhydroxyapatiteの結晶核は、上記の実験の場合と同じように600Å程度であるが、試験管内生成のその結晶はけたちがいに大きく2mmにも達するという発見も(Sobel & Laurence, 1960), invitroとinvivoの石灰化現象の差異を理解する上に重要なことと考える。

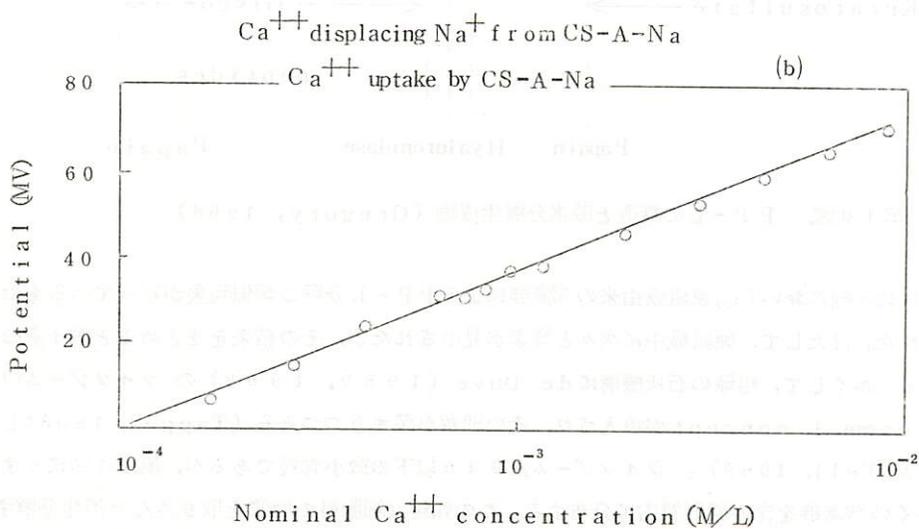
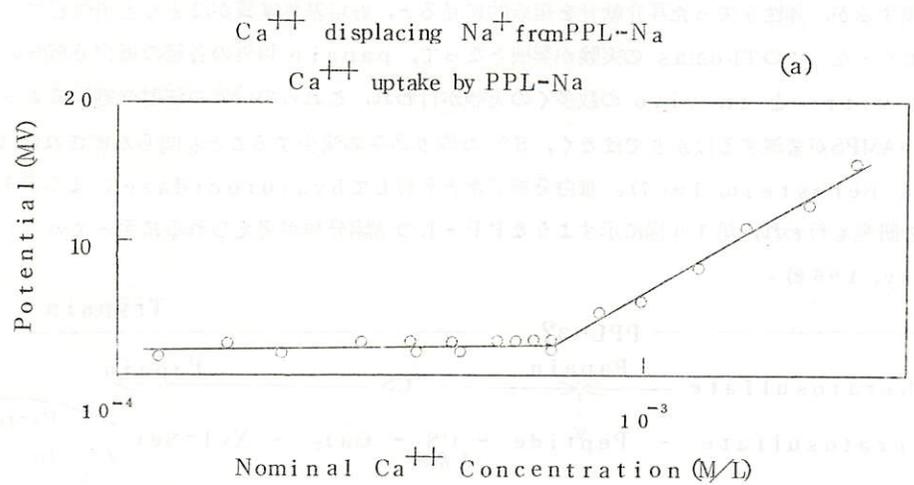
PP-Lの特性について、さらに紹介しておかなければならないのはWoodward & Davidson(1968)の研究である。豚の肋軟骨からのPP-LをEDTA-2Naで透析すると、PP-Lに結合していた Ca^{++} は Na^+ に置換されて Na^+ 型のPP-L(Na)となる。このPP-L(Na)を一連の Ca^{++} 溶液に溶かして Ca^{++} の取り込みをCa電極で測定する。CS-A(Na)でも同様の実験をする。

その結果が第9図aおよびbである。(a)では Ca^{++} は Na^+ を排除してPP-Lとすぐ結合するが、飽和状態に達すると結合しなくなってCa電極の電位差は増大する。しかし、(b)では Ca^{++} は全く取り込まれない。このことは、 Ca^{++} の結合能はPP-Lの構造ではじめて発揮されることを示し、前記のWeinstein et al. やDi Salvo & Schubertの結果とも一致する。Woodward & Davidsonはさらに、PP-Lは Ca^{++} 型になると安定であることを種々実証している。たとえば、 Ca^{++} 型のPP-Lは Na^+ のいかなる濃度でも置換されないし、 Mg^{++} の場合はウロン酸のカルボキシル基と多少結合する程度でほとんど置換されない。ただし、 Sr^{++} 型のPP-Lは Ca^{++} でも置換できない。おそらく、 Sr^{++} は Ca^{++} と相競的にPP-Lと結合するものと考えられる。これらの結果は、PP-LはCaキレーションの重要な役割を果たしていると同時に、PP-H, 糖蛋白, リボ蛋白などと共に安定したCa



第8図 白兔躍前骨骨端各部あたりのヘキソサミン量 (PP濃度の指標) と各部あたり3時間の細胞による³⁵SO₄の取り込み (細胞あたりのPP合成の指標)の比較。ヘキソサミン濃度が低下するにつれて、³⁵SO₄の取り込みが増加し自動制御関係の可能性を示している。H:肥大部; M:成熟部; P:増殖部。(Greer et al., 1968)。

複合物, いわゆる, Urist (1964) のいう "elastoid" を形成して組織内に存在することを示唆している。

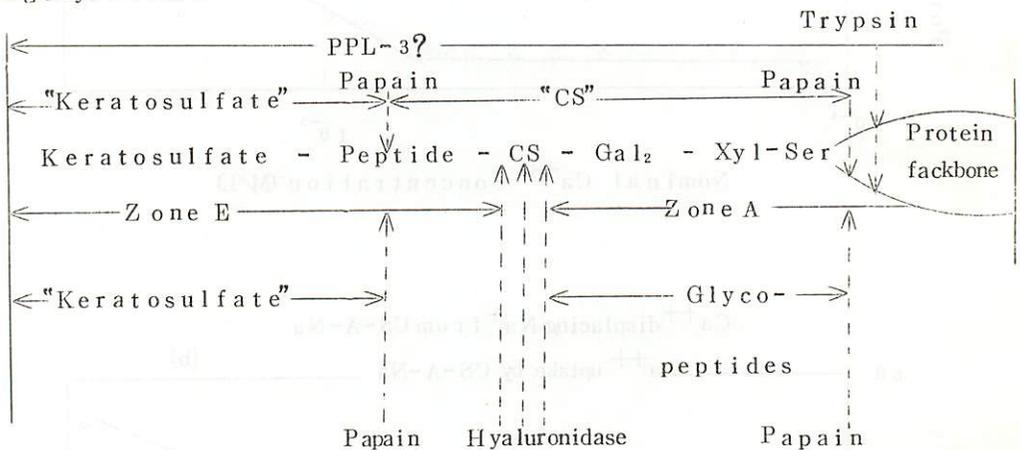


(Aliquots of 1.00×10^{-3} M CaCl_2 and 1.00×10^{-2} M CaCl_2 added. Temp. 26°C .)

第9図. PP-L (a) と CS (b) のカルシウム結合能
(Woodward & Davidson, 1968)

8. 石灰化前線におけるPP-Lの分解

Thomas (1956) は植物性蛋白分解酵素のpapain を兔に注射すると、その耳介軟骨は弾性を失い、16時間くらいで完全に垂れ下がることを見出した。この反応は可逆的で数週間後には回復するが、弾性を失った耳介軟骨を組織的に見ると、好塩基性基質がほとんど消失していることもわかった。このThomasの実験が契機となって、papain 以外の各種の蛋白分解酵素による *in vitro* と *in vivo* の数多くの実験が行われ、これらの酵素の注射や処理によって基質中のAMPSが著減するばかりではなく、S³⁵ の取り込みの減少することも明らかにされた (Guri & Bernstein, 1967)。蛋白分解酵素と平行してhyaluronidase によるPP-L 消化の研究も行われ、第10図に示すようなPP-Lの酵素分解が考えられるに至っている (Gregory, 1968)。



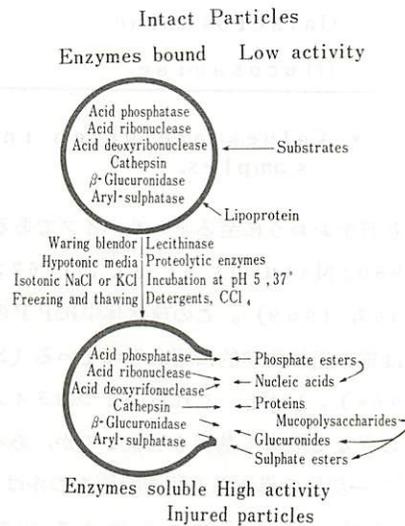
第10図 PP-Lの構造と酵素分解生成物 (Gregory, 1968)

石灰化前線においても、硬組織由来の酵素群によるPP-L分解の類似現象が起っているものと考えられた。はたして、硬組織中に次々と酵素が見出されたが、その結果をまとめると第4表の如くである。かくして、組織の石灰機構に de Duve (1959, 1963) のライソゾーム概念 lysosomal concept が導入され、その理解が深まりつつある (Tappel, 1968; Dingie & Fell, 1969)。ライソゾームは0.4 μ以下の微小顆粒であるが、第11図に示すように多くの酵素群を含み原形質内に分布する。この顆粒は細胞外の物質を取り込んで消化分解するとともに、微環境における物理化学的刺激や機械的刺激によってリポ蛋白からなる皮膜が破れて酵素群は細胞外に放出され、顆粒中にあるときよりも高い酵素活性を示す。

第4表 硬組織から知られているライソゾーム酵素の例

最適 pH 3.6	最適 pH 5.0
Cathepsins	β -glycerophosphatase
B-galactosidase	β -glucuronidase
Hyaluronidase	β -N-acetylaminodeoxyglucosidase
	Acid ribonuclease
	Acid deoxyribonuclease
	Acid phenylphosphatase

これらのライソゾーム系酵素群のうち、PP-Lを消化分解するのはcathepsinsのような蛋白分解酵素なのか、hyaluronidaseのような多糖類分解酵素なのかについては問題もあるが(第10図)、牛肋軟骨から調製したPP-Lを同じ組織から抽出した蛋白分解酵素を用いての詳細な生物学的定量法その他による研究(Dziewiatkowski et al., 1968)からすれば、その主役は蛋白分解酵素であるように考えられる。たとえば、第5表に示すように、消化生成物分析の比率を見ると、蛋白質が減少している反面、ヘキソサミン量が増大している。なお、第12図に示すようなPP-Lの消化にともなう粘性の著しい低下は、石灰化前線微環境における透過性を高め、その石灰化を有利にするに相異なる。



第11図 de Duveのライソゾームの概念を示す模式図 (de Duve, 1959)。

9. 結晶核の生成とPP-L

硬組織における結晶核生成の状態に関する従来の研究を総合すると、(1)線維状石灰化inotropic calcificationと(2)球状石灰化sphehitic calcificationの2つのタイプに分けられる(Orvig, 1967)。(1)の線維状石灰化は既述のepitaxyの名でよく知られている場合である。すなわち、既掲第6図cに示したコラーゲン原線維の一定部位に付着しているPP-Lの位置に結晶核が生成し、その上に次々の結晶が一定方向に配列して成長するタイプ

である。(2)の球状石灰化は電子密度のやや高い基質部位と低い基質部位との境界に電子密度の高い球状の微顆粒が現われ、その球状体の中心から放射状に微結晶が配列生成し、次々と融合成長し

第5表. PP-Lの蛋白加水分解生成物の組成*
(Dziewiatkowski et al., 1968)

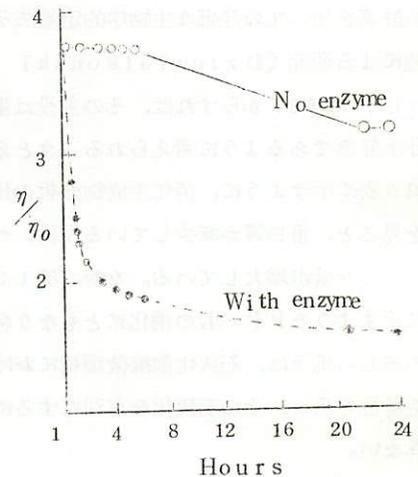
Component	PP-L	Product
Moisture	7.33	7.90
Ash	25.1	29.5
Nitrogen	4.87	3.83
Total sulfur	5.00	5.26
Protein	17.9	10.8
Glucronic acid	26.3	29.2
Galactosamine	21.5	25.4
Glucosamine	2.6	3.0

* Values are given in percentage of dry weight of samples.

て基質をおおりに至るというタイプである (Takuma 1960; Matukas et al., 1967; Bonucci, 1967, 1969)。この球状体中にPPの存在することは電顕組織化学的に認められている (Scherft, 1968)。しかし、これらの2つのタイプが結晶核生成の異なる機構に基づく現象なのか、あるいは連続した同一現象の異なる過程の断面なのかは不明である。可溶性から不溶性に転換する初期の線維性蛋白の電顕解像力と染色性などの問題があるし、さらに、最初に基質に沈着するhydroxyapatiteは無定形で、漸次結晶の形態を取ることも知られているから (Tarmine & Posner, 1967)、組織の石灰化における結晶核の生成には未だ多くの重要な問題が残されている。

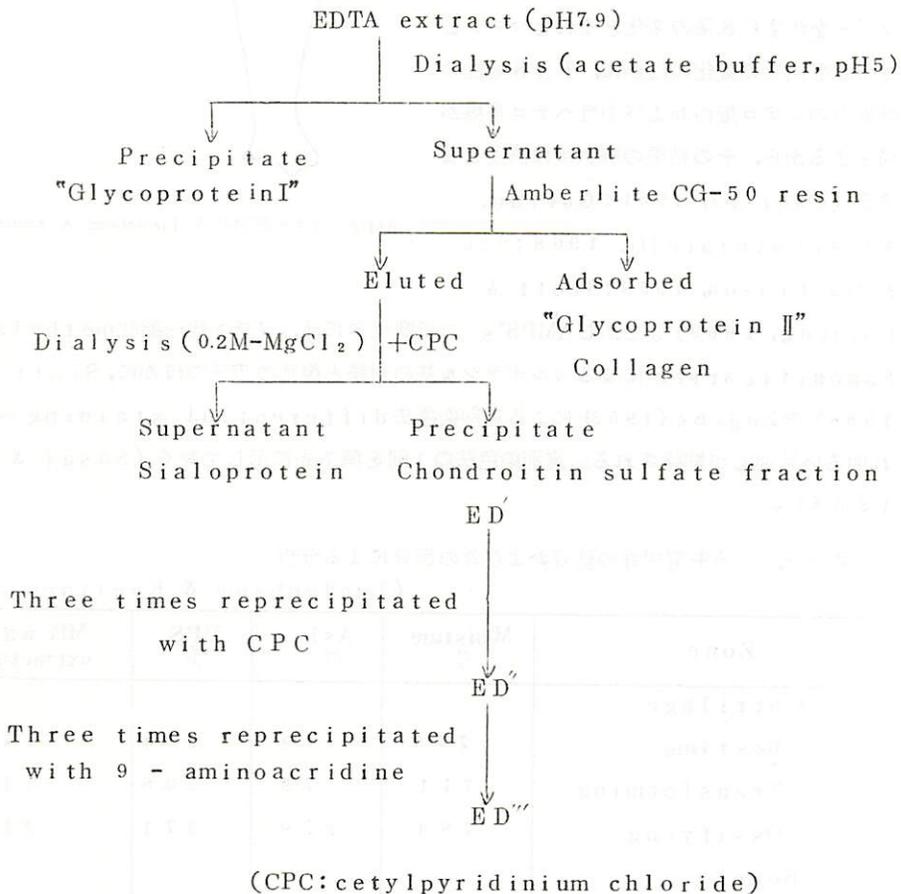
10. 石灰化前線と骨におけるPPの変性

これまで述べてきたことから明らかなように、組織の石灰化部位におけるPPは著るしい変性を受けていることは容易に推測できよう。十分に石灰化した緻密



第12図. 牛肋軟骨からの粗製酵素を0.1M 酸カリウム緩衝液、pH 3.95、に溶かした0.5% PP-L液に加えた場合の粘性変化、酵素-基質比：
1.7:25.0,
(Dziewiatkowski et al., 1968)

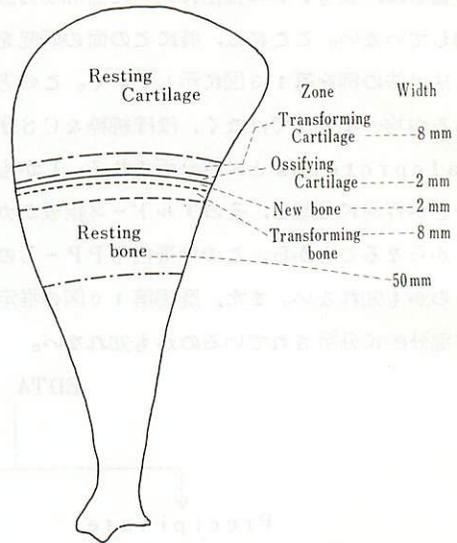
骨の場合は、軟骨PPの抽出に用いた温和な方法を適用しても、その変性したPPの抽出には未だ成功していない。ここでは、特にこの面の研究を重ねているHerring (1968) のEDTAによる抽出法の例を第13図に示しておく。この方法によって得られたED'は蛋白-CS複合体ではあるが均一な分子ではなく、ほぼ純粋なCS分画と多少組成を異にする2種類のシアロ蛋白 sialoproteins とに再分画される。しかも、このシアロ蛋白はアルカリ処理で蛋白部分と糖部分とが容易に分離し、そのアルドース組成がガラクトース、マンノース、フコースおよびキシロースからなることから、この糖蛋白もPP-Lの場合の橋渡し構造と類似の結合部が断片をもっているのかも知れない。また、既掲第10図の推定とあわせ考えると、PP-Lが蛋白分解酵素によって部分的に分解されているのかも知れない。



第13図. 牛の緻密骨粉末からCSとシアロ蛋白を含む画分の分離

(Herring, 1968).

石灰化前線のPPの変化は複雑である。たとえば、第14図に示すように、150mmの長さの子牛の肩胛骨の石灰化前線は2mmの骨化軟骨帯のうちの100μ程度の狭小部分にあたる。各帯ごとの分析結果を示したのが第6表である。それでも各帯ごとの変化は著るしい(Lindenbaum & Kuettner, 1967)。組織化学的検索においても、この部分にはAlcian blue 可染でメタクロマジ-を起すCS量の変化とそれをマスクしている蛋白量の変化のほかに、PAS陽性の糖蛋白のシアロ蛋白および中性ヘテロ多糖が局在するから、その結果の解釈には慎重を要する(Cabrini, 1961; Curran,



第14図 子牛肩胛骨略図 (Lindenbaum & Kuettner, 1967)。

1964; Cuintarelli, 1968; Scott & Harbinson, 1969; Scott & Dorling, 1969)。しかしAMPS'sの組織化学には、メチル化-鹼化methylation-Saponificationによるカルボキシル基の封鎖と復活の方法のほかに、Scott (1960, 1968)やZugibe (1963)による選別染色法 differential stainingが取り入れられ明るい見通しが期待される。選別染色法の1例を第7表に示しておく(Sasai & Akiba, 1968)。

第6表. 子牛肩甲骨の軟骨および骨の部分による分析

(Lindenbaum & Kuettner, 1967)

Zone	Moisture %	Ash %	MPS %	MP, water extractable %
Cartilage				
Resting	70.9	7.3	20.4	14.3
Transforming	71.1	7.9	20.8	14.7
Ossifying	78.3	22.9	37.1	31.2
Bone				
New	67.0	51.0	4.0	-
Transforming	57.4	53.1	2.0	-
Resting	44.6	55.0	-	-

MPS; mucopolysaccharides; MP: mucoprotein

第7表. AMPS'sのAlcian blueによるスポットテスト
(Sasai & Akiba 1968)

AMPS's	Nolarity of MgCl ₂									
	0.0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.65
Myaluronic acid	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
Chondroitin sulfate	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
Heparin	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-

なお、石灰化組織の組織化学において注意すべきことは、電顕的研究の項においても述べたように、脱灰操作中に変性をうけたPP, シアロ蛋白, 中性ヘテロ多糖などが溶出し易い状態にあるということである (Bertolin & Mattucci, 1962; Serafin-Fracassini & Abatangelo, 1965)。

1.1. おすびにかえて — 植物, 単細胞生物および無脊椎動物の石灰化とPP

従来発表されているほう大な数のPPに関する研究の大半は、これまで述べてきたこの紹介と同様に、高等動物の軟骨と骨に限られている。しかし、Pautard (1966, 1970) のいうように、硬組織形成機構を正しく理解するためには、高等動物ばかりではなく、植物, 単細胞生物, 無脊椎動物および下等脊椎動物の石灰化組織の研究が進められなければならない。事実、石灰化組織をもつ現生生物種全体の三分の二が無脊椎動物である (Travis *et al.*, 1967)。さらに、植物の石灰化は珍らしくないし、歯学におけるバクテリアの石灰化問題のほか、海洋細菌によるCa塩の沈積は生物地理学と生物地化学環の立場から注目されている (Drew 1914; Greenfield 1963)。生物全体としてみたその結晶形は第8表に見られるように多種多様であるが (Glimcher, 1960)、単細胞生物だけのCa塩の分布をみても、第9表に示すように多岐にわたっている (Pautard 1970)。また、無機成分の量をみると、サンゴ, エナメル, 魚類耳石のように98%以上の高度の石灰化を示すものがある一方、毛, ひげ, 爪, 鯨ひげなどのように微量のCa塩を含む組織もある。

このように広範囲にわたる生物の硬組織のPPを考えると、一つの難問に遭遇する。それは、植物や単細胞生物においては、硫酸基をもつCSのようなAMPSの未だ見出されていないことである。既に述べたように、AMPSやPPの合成, 分泌には細胞の適度の集塊と接触を必要とすることが、組織培養の研究が進むにつれて明らかになってきている (Bassett, 1962; Kuroda, 1963; Dingla & Webb 1965)。従って、植物や単細胞生物における石灰化の機構は、これまで述べてきたものとは異なるのかも知れないし、あるいはPP類似の物質がそれを代行しているのかも知れない。事実、枯草菌が細胞膜には、硫酸基を欠くがウロン酸とガラクトサミンをもち、

コンドロイチンによく似た構造のテイクロン酸という AMP S が存在するし、溶血性連鎖球菌の夾膜にはヒアルロン酸が含まれている(第1表参照)。また、原生動物の *Spirostomum* (第9表参照) の石灰化は、PP は認められていないが、既述の球状体内にはじまることが知られている (Pautard, 1960, 1970)。

第8表. 硬組織の例 (Glimcher, 1960)

Species	Tissue Mineralized	Crystal Chemistry	Mineral Form	Major Organic Matrix Components
Plants	Cell wall	CaCO ₃	Calcite	Cellulose, pectins, lignin
Radiolaria	Exoskeleton	SrSO ₄	Celestite	(?)
Diatoms	Exoskeleton	Silica	(?)	Pectins
Mollusks	Exoskeleton	CaCO ₃	Calcite, aragonite	Conchiolin (Protein)
Arthropods	Exoskeleton	CaCO ₃	Calcite	Chitin, ptotein
Vertebrates	Endoskeleton			
	Bone	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hydroxyapatite	Collagen
	Cartilage	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hydroxyapatite	Collagen, acid mucopolysaccharides
	Tooth			
	Dentin	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hydroxyapatite	Collagen
	Cementum	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hydroxyapatite	Collagen
	Enamel	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hydroxyapatite	Eukeratin

第9表. 単細胞生物のCa塩の分布 (Pawtard, 1970)

Group	Carbonate	Oxalate	phosphate	Sulphate
Bacteria	Marine forms Salivary flora	Some species?	<i>Bacterionema matruchotii</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Actinomyces</i>	
Lower plants	<i>Amphora licelata</i> (Diatomaceae)			Desmidiaceae
Coccolithophorids	Most species		Traces	
Protozoa	Foraminifera tests, shells and cement <i>Parazuadrula</i> Trichocysts, "statocysts," and crystals in many cells	Some species?	<i>Ameba</i> <i>Paramecium</i> <i>Spirostomum</i>	

CS-AとCS-Cの軟骨および骨の中の割合が、個体発生と系統発生の立場から論じられている。第10表と第11表に示すように、石灰化した軟骨と骨ではCS-Aの割合が軟骨に比べて大きく、系統発生および個体発生的にみると、進化したまたは成長するにつれてCS-A量の増大する傾向が認められる。また、高等動物のCSでは $S/N=1$ であるが、ツノザメのように $S/N<1$ のものが認められる一方、ホシザメやイカの軟骨のように硫酸含量が高く $S/N\leq 2$ を示すコンドロイチンポリ硫酸(CS-D, CS-E)の存在も知られている。さらに、個体発生的には成体においてSKSも見出されている(瀬野, 1968)。しかし、このようなAMPS'sの分布や硫酸含量の多少が生物学的にどのような意味をもつのかは今後の課題である。

第10表 軟骨, 石灰化軟骨および骨のAMPS's組成 (瀬野, 1968)

動物	軟骨	石灰化軟骨 または骨	備考
	CS-A%	CS-A%	
ツノザメ	25	75	軟骨中心部
チョウザメ	0	-	頭骨
コイ	30	75	骨
タラ	30	70	骨
ニワトリ	65	100	胸部軟骨, 大腿骨
ウサギ	65	85	胸部軟骨, 脛骨
ウシ	70	90	大腿骨
ヒト(♂, 58才)	0 (40SKS)	83	関節軟骨, 大腿骨

CS-C% = 100 - 表中の値

第11表 軟骨の成長とAMPS's組成 (瀬野, 1968)

動物試料	成長度	組成 (%)				
		CS-A	CS-C	SCS-C	D-CS	SKS
ツノザメの胎児	長さ20cm	0	80	10	10	0
ツノザメの成体	長さ80cm	25	65	10	<2	3
食用カエルのオタマジャクシ	$L/O=0.00$	39	24	0	37	0
食用カエルのオタマジャクシ	$L/O=0.20$	45	47	0	8	0
食用カエルの成体	長さ15cm	70	30	0	0	0
ニワトリの胚	14日	28	50	0	22	0
ニワトリの成体	4ヵ月	65	30	0	0	5

L/O = 脚長と全長の比. SCS-C: S含量高く $S/N>1$ のCS-C.
D-CS: S含量低く $S/N<1$ のCS. SKS: S含量高く $S/N>1$ のKS

無脊椎動物や下等脊椎動物の石灰化機構に関する研究は決して少なくはない。しかし、そのほとんど全部がAMPSの立場からの研究であって、PPの立場からは追及されていない。さらに、その研究の主流は組織化学的のものであるため、技法と結果の解釈については再検討を要するものが少なくなく、比較総括することが極めて困難であるというのが実状である。このようなPP研究の立ち遅れは、PP-Lが組織の石灰化核生成の鍵を握る担体である(Dantini et al., 1968)といわれながら、その研究の難しさがために、硬組織の他の成分に比べて長い間マモコ扱いされてきたことにもよると考えられる(Scherft, 1968)。それにもかかわらず、組織の石灰化にPPが必須なりやの問いに答えてくれるのは、これら下等生物の研究の進展以外にはないといえよう。生化学者との協力のもとに、改善された多くの技法を併用しながら、AMPSではなく、PPの硬組織形成における生物学的役割を確証する研究の進展を期待する。それらの結果は、当然、古生物学各分野の研究に大きな寄与をもたらすものと信ずる。

最後に、PP-Lが組織の石灰化を阻止する唯一の物質ではなく、ピロリン酸(Simkiss 1964)、ブラミン(Howard et al., 1967)、その他(Wadkins 1968)も同様な作用をもつものとして研究の進められていることを付け加えておく。

引用文献は拙著Acid Mucopolysaccharides in Calcified Tissues, International Review of Cytology 30, 257-371, 1971を参照されたい。