

Section 8

結合組織

結合組織を構成する主な成分は、下表に示すように、線維芽細胞を主とする細胞と細胞外マトリックスである。マトリックスは、不溶性の線維性タンパク質と線維や細胞間を埋めている可溶性のマトリックス物質からなり、これらは細胞成分によって合成される。

骨や軟骨のような硬組織の場合は、その有機成分の組成や含量には大差はなく、石灰化しない軟骨や皮膚の水分が、いろいろな程度に無機質におきかわった状態となっている。

結合組織の主な構成成分

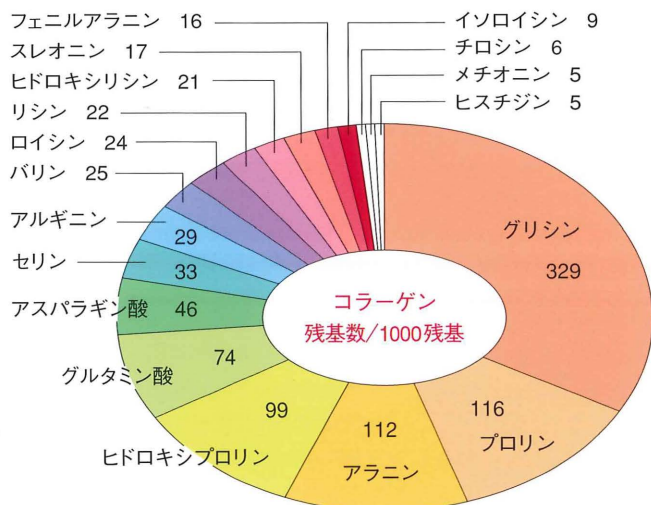
- | | |
|--------|--|
| 細胞 | ■ 線維芽細胞 (これから分化した軟骨細胞, 骨芽細胞, 象牙芽細胞) |
| | ■ その他, 脂肪細胞, マクロファージ, 形質細胞, 肥満細胞, 白血球など |
| マトリックス | ■ 線維性タンパク質
コラーゲン (膠原線維)
エラスチン (弾性線維) |
| | ■ 細胞間マトリックス物質
複合糖質 (プロテオグリカン, 糖タンパク質など) |
| | ■ 接着性糖タンパク質 (フィブロネクチン, ラミニン, ビトロネクチンなど) |
| | ■ リン脂質 |
| | ■ 水分 (軟骨: 73%, 皮膚: 70%) |

結合組織

コラーゲン collagen

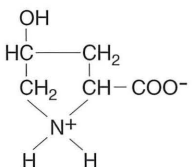
1 コラーゲンの化学組成と分子形態

コラーゲンは哺乳動物では最も多いタンパク質で、生体のタンパク質中の約30%、体重の約6%を占め、皮膚では乾燥重量の約80%を占める。

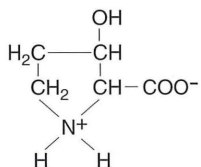


④ ヒト象牙質コラーゲンのアミノ酸組成

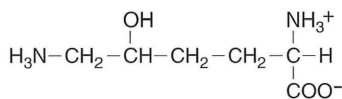
グリシン含量が異常に高く、全アミノ酸の約1/3に達する。アミノ酸配列はきわめて規則的で、3つ目ごとに必ずグリシン (Gly) がある。すなわち Gly-X-Y の繰り返しからなり、大部分のプロリンはXの位置に、ヒドロキシプロリンはYの位置にくる (右図下段参照)。



4-ヒドロキシプロリン



3-ヒドロキシプロリン

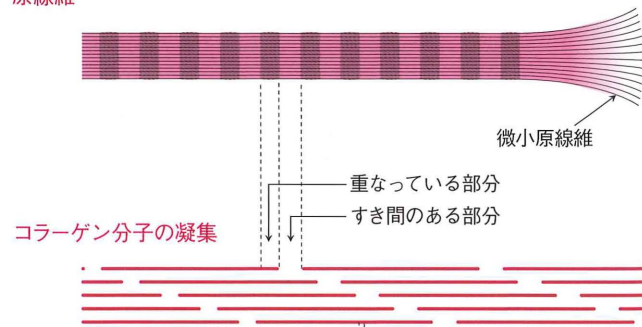


ヒドロキシリシン

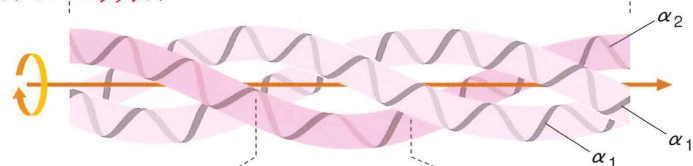
④ ヒドロキシプロリンとヒドロキシリシンの構造

コラーゲンは、他のタンパク質にはほとんど存在しないヒドロキシプロリンとヒドロキシリシンを含む。鳥類や哺乳類などの恒温動物では、Gly 以外の残りの2/3のうち約1/3はプロリンやヒドロキシプロリンなどのイミノ酸からなる。イミノ酸含量は、動物の種類 (特に棲息する体温の上限) によって異なる。ヒドロキシリシン残基のOH基を介して微量のグルコースとガラクトースが結合する。

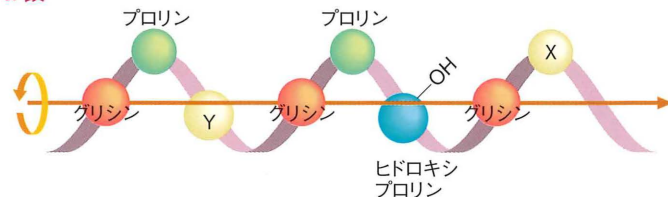
原線維



スーパーヘリックス



α鎖



④ コラーゲンの原線維からα鎖まで

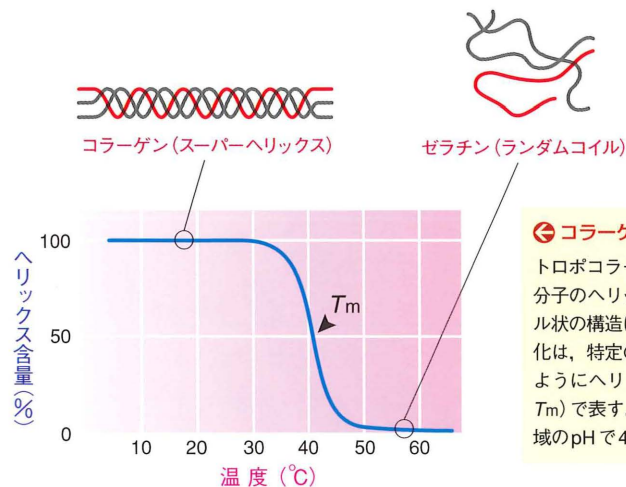
コラーゲンを構成している基本単位は、分子量約30万のトロポコラーゲンと呼ばれる分子で、同じ大きさ (15×3000 Å) のポリペプチド鎖3本が8.7 Åの周期で左巻きのらせん形になり、さらに3本のポリペプチド鎖が104 Åの周期で右巻きのゆっくりとしたヘリックス構造 (これをスーパーヘリックスあるいはコイルドコイル構造という) をとっている。この1本のポリペプチド鎖はα鎖と呼ばれ、約1000残基のアミノ酸からなる。

(Prockop, D.J., Guzman, N.A.: *Hospital Practice* 12; 62, 1977. 改変)

④ コラーゲンの主な型別の特徴

型	分子形式の α 鎖	分布組織	特 徴
I	$[\alpha_1(\text{I})]_2\alpha_2(\text{I})$	骨、象牙質、セメント質、歯根膜、歯肉、皮膚、腱、筋膜、血管、子宮壁	成熟した脊椎動物のコラーゲンの最も一般的な型。イミノ酸が約25%を占め、リシンの約15%がヒドロキシ化。ヒドロキシリシンへの糖の結合は少ない。
I トリマー	$[\alpha_1(\text{I})]_3$	腫瘍細胞、培養細胞、真皮に微量。歯肉の炎症時に増加。	
II	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	軟骨、脊索、椎間板髄核(大部分)	ヒドロキシリシンと糖含量が比較的高い。
III	$[\alpha_1(\text{III})]_3$	I型と共存(骨、腱を除く)、歯肉・歯根膜の15~20%。胎児組織、動脈壁、子宮壁に多い。	ヒドロキシプロリン含量が高く、分子内にS-S結合を持つ。I型 α 鎖と類似点が多い。
IV	$[\alpha_1(\text{IV})]_3$ $[\alpha_1(\text{IV})]_2\alpha_2(\text{IV})$ $[\alpha_2(\text{IV})]_3$	基底膜	ヒドロキシリシンと糖含量がきわめて高い。分子内にS-S結合を持つ。延長部が存在する。アラニン含量は少ない。
V	$[\alpha_1(\text{V})]_3$ $[\alpha_1(\text{V})]_2\alpha_2(\text{V})$ $\alpha_1(\text{V})\alpha_2(\text{V})$ $\alpha_3(\text{V})$	細胞表層、羊膜、胎盤、血管、歯肉(炎症時に特に増加)	$\alpha_1(\text{V})$ と $\alpha_3(\text{V})$ 鎖は特にヒドロキシリシンと糖含量が高い。アラニン含量は少ない。
VI	$\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_3(\text{VI})$	ほとんどの間質組織、軟骨細胞、基底膜近傍	I型の側面に結合、等間隔に球状ドメイン配置、ビーズ状線維形成型
IX	$\alpha_1(\text{IX})\alpha_2(\text{IX})\alpha_3(\text{IX})$	軟骨、ガラス体	II型の側面に結合、N末端側に球状ドメイン、グリコサミノグリカン結合
X	$[\alpha_1(\text{X})]_3$	成長板	短鎖コラーゲン、六角格子構造形成

現在 α 鎖はアミノ酸組成の違いによって約30種類あることが知られ、その組み合わせによって、少なくとも16種の異なった分子種の存在が明らかにされている。



⑤ コラーゲンの熱変性によるゼラチン化

トロポコラーゲン溶液を加熱すると、ある温度でコラーゲン分子のヘリックス構造が壊れ、ゼラチンと呼ぶランダムコイル状の構造に変化する。コラーゲン分子の熱による構造の変化は、特定の温度で突然起こるので、結晶の融解温度と同じようにヘリックス構造がちょうど半分壊れる温度(変性温度 T_m)で表す。温血動物のトロポコラーゲンの T_m は、中性領域のpHで40°C前後である。

歯根膜細胞 歯槽骨細胞 歯肉線維芽細胞



⑥ 歯槽骨由来細胞、歯根膜細胞、歯肉線維芽細胞の合成・分泌するコラーゲン型

ペプシン処理分泌 ^{14}C proline タンパク質の遅延還元法によるSDS-PAGEパターン。

$\alpha_1(\text{III})$: III型コラーゲンの α_1 鎖
 $\alpha_1(\text{I})$: I型コラーゲンの α_1 鎖
 $\alpha_2(\text{I})$: I型コラーゲンの α_2 鎖
 (佐藤和貴: 日大歯学 67: 364-372, 1993)

実験 NOTE

コラーゲンの抽出法

培養細胞が合成・分泌するコラーゲンを培養上清中から集める際、上清中にあらかじめリシルオキシダーゼ阻害剤の β -アミノプロピオニトリルを添加しておくことで架橋形成が抑制され、より多くのコラーゲンを抽出することができる。

MEMO

コラーゲン線維の T_m は55~60°C以上である。生体内では、コラーゲン分子の大部分は線維を形成しているため、40°C以上の風呂へ入ったり高熱を出しても熱変性してゼラチン化することはない。 T_m の大きさは、コラーゲン分子中のヒドロキシプロリン量に比例するといわれている。

結合組織

コラーゲン collagen

2 コラーゲンの生合成

コラーゲン分子を構成する α 鎖は、リボソーム上で生合成された後、細胞内外でいくつかの酵素の関与のもとで種々の修飾反応を受ける。

📌 コラーゲン分子の生合成から線維形成まで

1 コラーゲンタンパク質(α 鎖)の生合成

小胞体膜に結合したポリソーム上で合成される。

2 プロリンおよびリシンの水酸化

Gly-X-Yの繰り返し構造のうち、Yの位置のプロリンおよびリシンがそれぞれ小胞体中で水酸化されてヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリシンとなる。水酸化反応には、プロリル4-ヒドロキシラーゼ、プロリル3-ヒドロキシラーゼ、リシルヒドロキシラーゼの3つの酵素が関与する。この反応には、酸素、 Fe^{3+} 、 α -ケトグルタル酸および還元剤としてアスコルビン酸(ビタミンC)を必要とする。



ビタミンCが欠乏すると歯肉出血(壊血病)をきたす。この理由は、水酸化反応が抑制されるため、後に述べる3本鎖らせん構造がうまく組めず、粗な線維が形成されるためと考えられている。

3 ヒドロキシリシンのグリコシル化

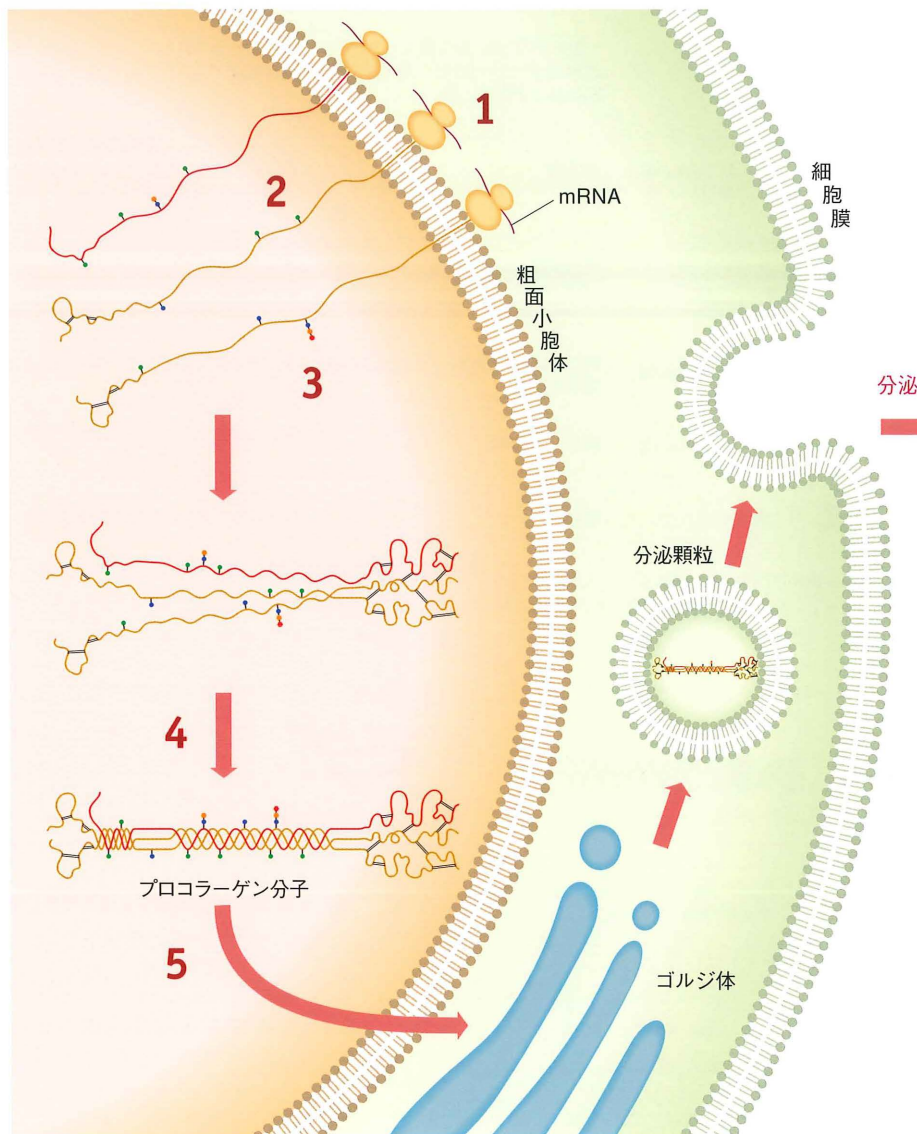
水酸化されたヒドロキシリシン残基にガラクトースあるいはガラクトース-グルコース鎖が結合する。この反応には、ガラクトシルトランスフェラーゼとグルコシルトランスフェラーゼの2つの酵素が関与する。糖の数は組織によって異なり、皮膚や腱などのI型コラーゲンでは α 鎖あたり1~2個であるのに対し、IV型およびV型コラーゲンでは30~50個と多い。

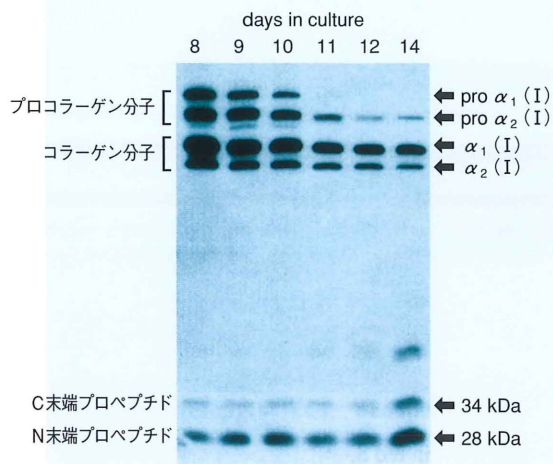
4 3本鎖ヘリックス構造をしたプロコラーゲン分子の形成

C末端プロペプチド鎖間にS-S結合が生じて3本の α 鎖の相互位置関係を決定し、ヒドロキシプロリンの水酸基がペプチド間に水素結合をつくり、3本鎖らせん構造の形成が始まる。

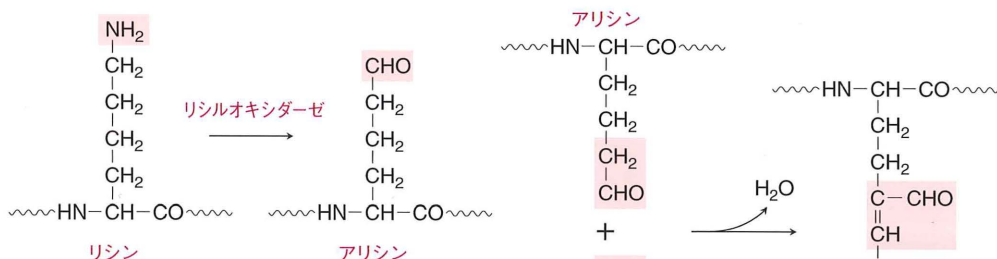
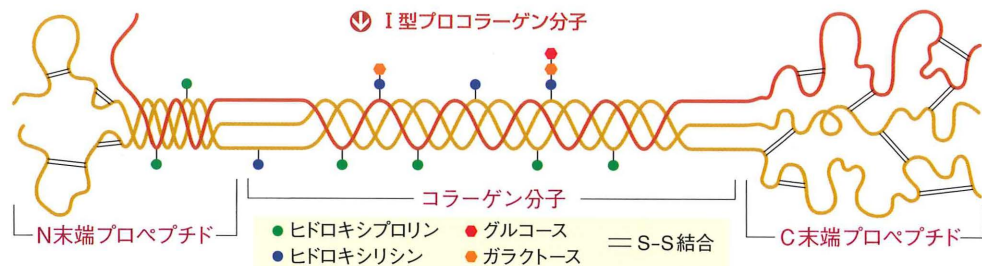
5 プロコラーゲン分子の細胞内移送と細胞外への分泌

小胞体中のプロコラーゲン分子は、ゴルジ体に移行して分泌顆粒を形成し、エクソサイトーシスによって細胞外に放出されると考えられている。





④ $[^{14}\text{C}]$ proline 標識タンパク質のプロコラーゲンからコラーゲンへのプロセス
(Suzuki, et al.: J. Hard Tissue Biol. 2; 28-36, 1993)



6 プロコラーゲン分子からコラーゲン分子への転換と線維形成(細胞外)

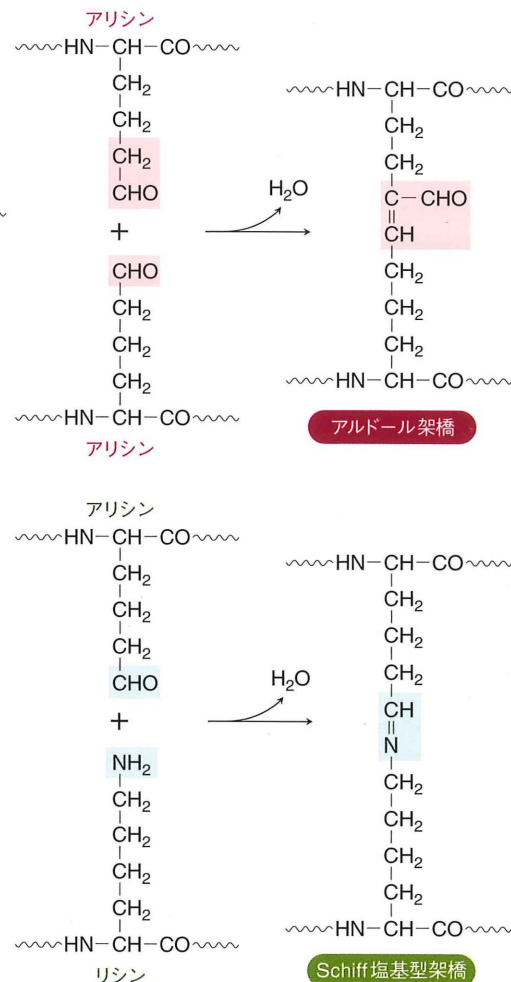
細胞外に分泌されたプロコラーゲン分子のN末端部とC末端部にみられるプロペプチドは、それぞれプロコラーゲンN-プロテアーゼとプロコラーゲンC-プロテアーゼによって加水分解され、コラーゲン線維の基本単位であるコラーゲン分子が生成される。

7 コラーゲン線維の形成

コラーゲン分子は細胞外マトリックス中で互いに規則正しく会合する。この際、コラーゲン分子は隣り同士約1/4ずつずれて配列し、架橋構造によって結合してコラーゲン線維となる。また、各列のコラーゲン分子間には約400 Åのすき間があり、骨や象牙質の石灰化の際に重要な役割を果たしている。

8 アリシンの形成と架橋

コラーゲン分子のリシン残基(またはヒドロキシリシン残基)の一部がリシルオキシダーゼの作用で脱アミノ反応を受け、アリシン(またはヒドロキシアリシン)と呼ばれるアルデヒドを生じる。このようにして生じたアリシンが、他のアリシンとの間で生じるアルドール縮合や、他のリシン残基との間で生じるSchiff塩基形成を介して、コラーゲンの分子内および分子間での架橋結合が生じる。



⑥ アルドール縮合およびSchiff塩基形成反応による架橋の形成

結合組織

エラスチン elastin

3 エラスチン

エラスチンはコラーゲンとともに結合組織を形成している線維性タンパク質で、組織の弾性作用に関与している。組織の伸び縮みに関与するタンパク質であることから、血管壁（特に大動脈）、靱帯などには多量に含まれている。口腔領域の組織では、歯肉固有層や歯髄の血管壁に見出される。

1 エラスチンの化学組成

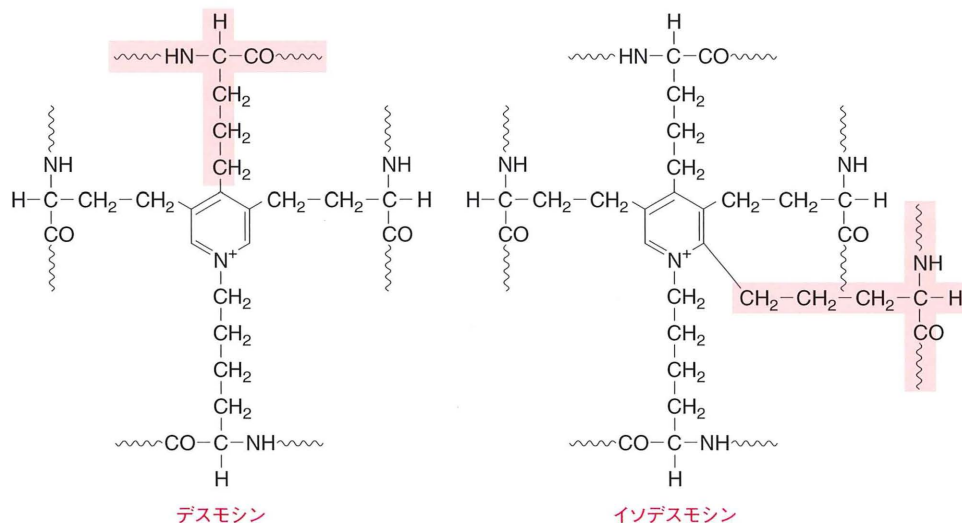
アミノ酸組成の特徴は、

- ① コラーゲンと同様にグリシン含量が約1/3を占め、プロリンも多い。
- ② ヒドロキシプロリン含量はコラーゲンに比べて著しく低く、ヒドロキシリシンは全く含まない。
- ③ 酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸など極性アミノ酸含量は著しく低く、分子全体としては疎水性を示す。なお、糖は全く含まない。

2 エラスチンの分子形態

エラスチンは組織学的には無定形の線維状物質であり、その線維は、電顕的観察によると2つの異なる成分から成り立っている。主成分は周期性を示さない無定形の枝分かれした線維（エラスチンタンパク質）で、エラスチン線維の90%以上を占めている。この無定形成分の周囲にエラスチン線維特有の細線維（直径約10～13nm）が配置されている。

エラスチンの全アミノ酸の約1/3を占めるグリシンは、コラーゲンに観察されるようなGly-X-Yの繰り返し構造はとらず、(Pro-Gly-Val-Gly-Val)_nの繰り返しからなる左巻き構造である。成熟したエラスチンは、コラーゲンと同様に多くの架橋構造をもっているが、デスマシンやイソデスマシンはエラスチンに特徴的なものである。



④ デスマシンとイソデスマシンの架橋構造

デスマシンとイソデスマシンは4個のリシン側鎖をもってペプチド鎖に結合しており、この架橋構造が不溶性で、かつ弾性を獲得するのに役立っている。

3 エラスチンの生合成

エラスチンの生合成も普通のタンパク質生合成機構と同様の機構で行われる。すなわち、DNAからmRNAへ転写されたのち、ポリソーム上でペプチドへと翻訳される。ペプチド（トロポエラスチン）は粗面小胞体に取り込まれ、微小管を通じてゴルジ体に輸送されたのち小胞に組み込まれ、細胞膜と融合して細胞外へ分泌される。細胞から分泌されたトロポエラスチンのリシン残基のε-アミノ基は、架橋形成酵素リシルオキシダーゼで酸化的に脱アミノ化されてアリシンになる。次いでデスマシンやイソデスマシンを形成して、弾性に富んだ不溶性の線維が形成される。

実験 NOTE

プロテオグリカンの
染色法

電気泳動後のゲルを染色してプロテオグリカンを検出する際の染色剤としては、タンパク質の染色剤として常用されているクマシーブリリアントブルー(CBB)や銀染色ではなく、Stains-allやアルシアンブルーが用いられる。

結合組織

複合糖質 glycoconjugate

4 プロテオグリカン proteoglycan

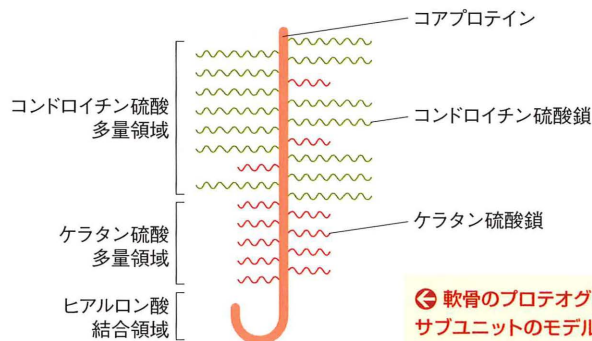
プロテオグリカンはコアプロテインにグリコサミノグリカンが結合したもので、骨、軟骨、象牙質、皮膚、靱帯などに見出され、骨では有機成分の約15%を占める。

1 プロテオグリカンの分子形態と化学組成

プロテオグリカンは、コアプロテインと呼ばれる1本のポリペプチド鎖にグリコサミノグリカンと呼ばれる糖鎖が共有結合した複合糖質の一種である。糖鎖は2種の単糖の繰り返し構造をもち、そのうち1つは必ずヘキサミン（グルコサミンまたはガラクトサミン）で、大部分はN-アセチル化している。もう1つは、窒素を含まないウロン酸である。ただし、ケラタン硫酸のみは、ウロン酸の代わりにガラクトースを含む。

軟骨のプロテオグリカンは、分子量約250万の基本単位（プロテオグリカンサブユニット）が数多く集合し、分子量約3500万の巨大な凝集体を形成している。プロテオグリカンサブユニットの中心には柱となる分子量約25万のコアプロテインが位置し、約100本のコンドロイチン硫酸鎖（1本の鎖の分子量は約2万あるいはそれ以上）と約50本のケラタン硫酸鎖（1本の鎖の分子量は約5000）がコアプロテインのセリン残基を介して結合している。コアプロテインの末端にはヒアルロン酸が結合している。

骨のプロテオグリカンは、軟骨に比べて分子量がかなり小さく、分子量約4万5000のコアプロテインに分子量約4000のグリコサミノグリカンが1本あるいは2本結合した構造をしており、それぞれデコリンあるいはビグリカンと呼ばれている。

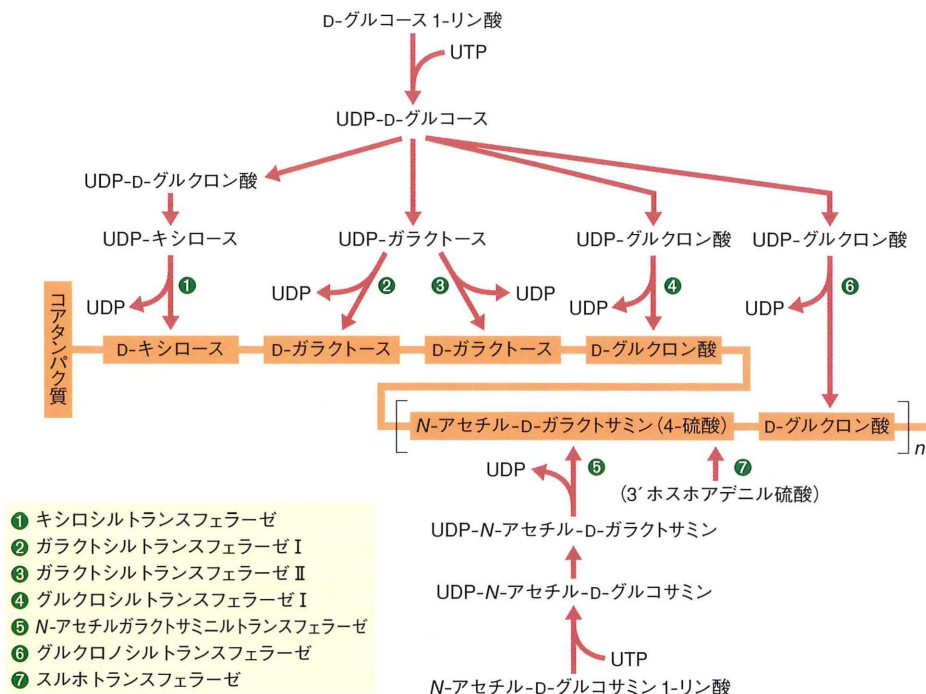


④ 軟骨のプロテオグリカンサブユニットのモデル

④ ヒト組織中のグリコサミノグリカンの構造と分布

組成	化学構造(繰り返し単位)	分布
ヒアルロン酸	グルクロン酸, N-アセチルグルコサミン	眼球の硝子体, 臍帯、関節液、 皮膚
コンドロイチン	グルクロン酸, N-アセチルガラクトサミン	角膜
コンドロイチン 4-硫酸 (コンドロイチン硫酸A)	グルクロン酸, N-アセチルガラクトサミン (4-硫酸)	骨, 象牙質, 軟骨
コンドロイチン 6-硫酸 (コンドロイチン硫酸C)	グルクロン酸, N-アセチルガラクトサミン (6-硫酸)	骨, 象牙質, 軟骨
デルマタン硫酸 (コンドロイチン硫酸B)	グルクロン酸, イズロン酸, N-アセチルガラクトサミン (4-硫酸)	皮膚, 動脈壁, 腱、骨, 象牙質
ケラタン硫酸	ガラクトース(6-硫酸), N-アセチルグルコサミン (6-硫酸)	軟骨, 椎間板, 角膜
ヘパラン硫酸	グルクロン酸, イズロン酸(2-硫酸), グルコサミン(N-硫酸), N-アセチルグルコサミン (6または3-硫酸)	細胞表面, 基底膜
ヘパリン	イズロン酸(2-硫酸), グルクロン酸, グルコサミン(6または 3-硫酸, N-硫酸),	小腸, 筋肉, 肺, 脾, 肝, 肥満細胞 (好塩基球)

(組成の項のカッコ内は硫酸基の位置を示す。ただし、これらの位置がすべて硫酸エステルになっているわけではない)
Ac=—CO—CH₃



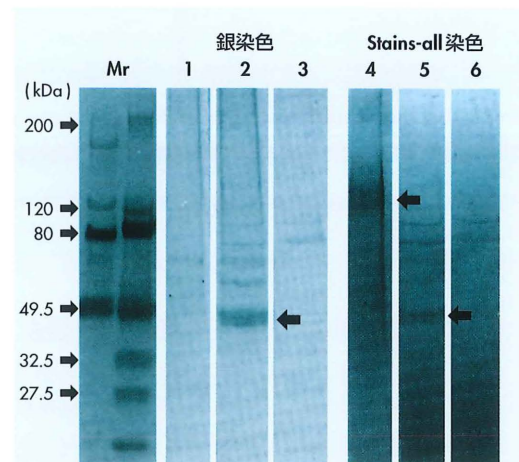
④ プロテオグリカン糖鎖の生合成経路

2 プロテオグリカンの生合成

プロテオグリカンの糖質部分の生合成は、上図に示した7種類の転移酵素によって触媒される。また、N-アセチルガラクトサミンへの硫酸基の導入はスルホトランスフェラーゼによって行われる。コアプロテインにキシロース-ガラクトース-ガラクトース-グルクロン酸の側鎖が導入されると、その後はN-アセチルガラクトサミン4-硫酸-グルクロン酸の糖鎖の繰り返し構造が酵素的に生成される。合成されたプロテオグリカンは細胞間に分泌される。

3 プロテオグリカンの働き

- ① 分子内に水酸基が多いので大量の水と結合し、クッションの働きによって組織の線維成分および細胞成分を保護し、組織表面への圧迫などの負荷に耐えるような弾性を与える。
- ② 粘性が大きいので、関節や腱鞘内では滑液の役目を果たす。
- ③ 分子内にカルボキシル基や硫酸基を有するため、陽イオンを引きつけて陽イオンの交換反応に関係し、それによって塩類調節を行う。
- ④ ヘパリンは、抗凝血作用やリポプロテインリパーゼを活性化することによって、血液中から中性脂肪を取り除く作用を高める。



④ ウサギ歯槽骨から抽出・精製したデコリンの銀染色およびStains-all染色

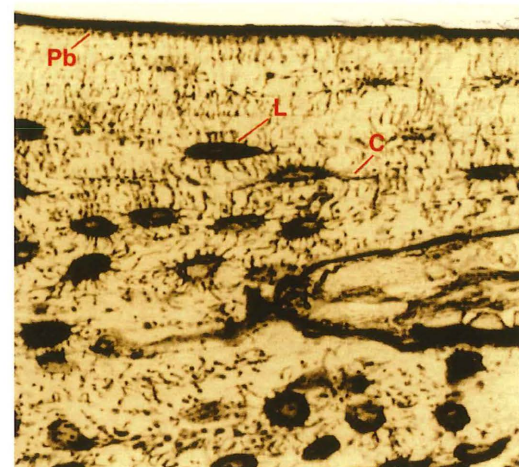
酵素処理を行うと、45 kDaの位置に太いバンドが認められる。

Mr：分子量マーカー

1・4：未消化

2・5：コンドロイチナーゼABC消化後

3・6：コンドロイチナーゼABC



④ ラット長管骨におけるミネラル結合性コンドロイチン硫酸およびデルマトン硫酸含有プロテオグリカンの局在

類骨 (Pb)、骨小腔 (L)、骨小管 (C) に局在がみられる。

(Takagi, M., et al.: J. Histochem. Cytochem. 39; 43, 1991)

4 主なプロテオグリカンの構造と機能

1 アグリカン aggrecan

軟骨に存在するプロテオグリカンの約90%を占める高分子量のプロテオグリカンである。軟骨基質のコラーゲン線維の間を埋め尽くすように存在し、組織に弾力性をもたせている。

2 パーシカン versican

培養ヒト線維芽細胞が合成・分泌する高分子量の間質プロテオグリカンの1つとして発見されたが、その後の研究で結合組織に広く分布することが明らかにされた。その機能として細胞接着阻害活性があげられ、形態形成期や癌化の過程でみられる細胞移動や細胞の形態変化などの調節への関与が考えられている。また、その遺伝子発現がTGF- β 1やIL-1 β などで調節されることから創傷治癒や炎症への関与も考えられている。

3 デコリン decorin, ビグリカン biglycan, フィブロモデュリン fibromodulin, ルミカン lumican

骨のプロテオグリカンは、軟骨に比べて分子量がかなり小さく、コアタンパク質にグリコサミノグリカン鎖が1本あるいは2本結合した構造をしており、それぞれデコリンあるいはビグリカンと呼ばれている。分子量はデコリンが約12万、ビグリカンが約20万である。これらは、骨のヒドロキシアパタイトやコラーゲンに対する親和性が高く、骨のEDTA脱灰抽出液やEDTA脱灰後のグアニジン抽出液中に多く存在する。

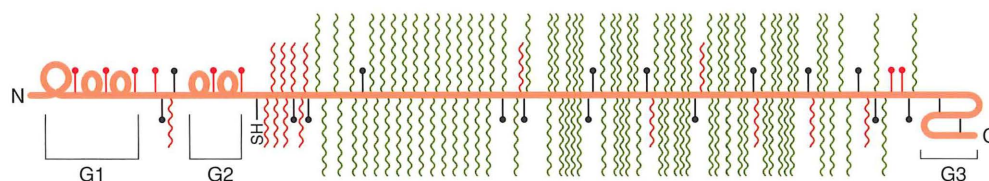
デコリンは、骨以外の結合組織にも広く分布しており、細胞外マトリックス成分や種々の成長因子と作用しあい、形態形成、癌化、創傷治癒などに中心的な役割を果たしていると考えられている。コラーゲン、フィブロネクチン、TGF- β などに親

和性を持ち、特に骨においては石灰化調節の主要因子の1つで、コラーゲン線維の hole zone に結合して石灰化を抑制している。また細胞増殖を抑制する作用があり、癌の治療に利用することも検討されている。

ビグリカンも骨以外の結合組織に広く分布しており、形態形成に関与していると考えられている。コアタンパク質のアミノ酸配列は、ヒトではデコリンと約55%の相同性を示している。しかし、培養骨芽細胞にTGF- β を作用させるとビグリカンはI型コラーゲンとともに産生が誘導されるが、デコリンの産生は抑制されることから、ビグリカンの遺伝子発現の制御は、デコリンとは別の機構で行われていると考えられている。

フィブロモデュリンは腱、軟骨に、ルミカンは角膜、心房に多く存在するプロテオグリカンで、これらはグリコサミノグリカン鎖にケラタン硫酸を含有している。フィブロモデュリンはコラーゲンに対する親和性が高く、*in vitro*でコラーゲン線維の形成を制御することが知られている。

コアタンパク質 コンドロイチン硫酸 ケラタン硫酸 O-オリゴ糖 N-オリゴ糖

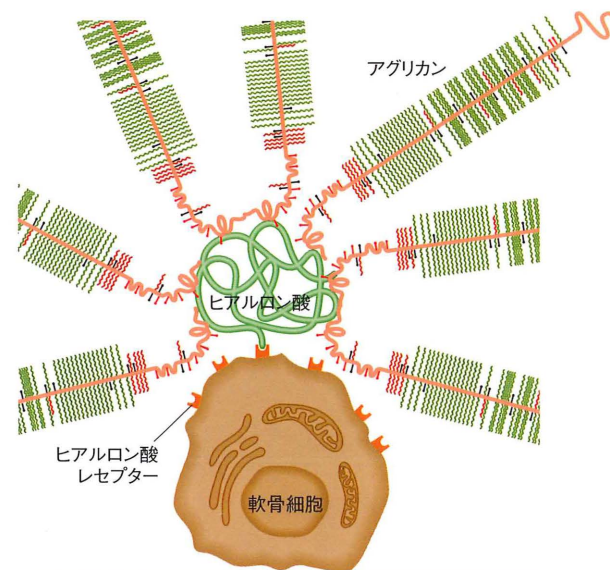
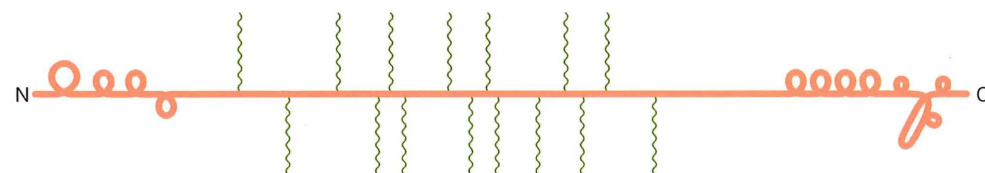


① アグリカンの構造

分子量約25万のコアタンパク質に約100本のコンドロイチン硫酸鎖(1本の鎖の分子量は約2万あるいはそれ以上)と約50本のケラタン硫酸鎖(1本の鎖の分子量は約5000)がセリン残基を介して結合している。コアタンパク質のN末端にG1とG2、C末端にG3と呼ばれる球状ドメインが存在する。G1ドメインはヒアルロン酸との結合能をもち、さらにリンクタンパクと呼ばれる接着性糖タンパク質がこの結合を安定化している。G3はレクチン様の構造をもっている。

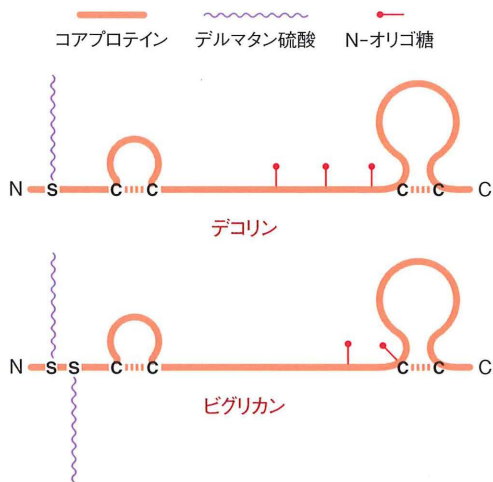
② パーシカンの構造

分子量約26万のコアタンパク質に約14本のコンドロイチン硫酸鎖が結合している。分子量は約100万あるいはそれ以上。コアタンパク質のアミノ酸配列の一部は、アグリカンと高い類似性を示している。



③ ヒアルロン酸を介したアグリカンの高分子凝集体

分子量約250万のアグリカンの基本単位(プロテオグリカンサブユニット)が数多く集合し、ヒアルロン酸と結合して分子量約3500万の巨大な凝集体を形成している。



4 シンデカン syndecan

ヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸を結合した膜貫通型プロテオグリカンで、シンデカン-1からシンデカン-5まで5つのファミリーで構成されている。最近の研究で、細胞増殖因子が細胞表面に分布するプロテオグリカンのグリコサミノグリカン部分と結合してその作用効率を高めていることが明らかにされている。また、細胞接着や血液凝固への関与も考えられている。

⑤ デコリンとビグリカンの構造

デコリンは、分子量約4万5000のコアタンパク質にグリコサミノグリカン鎖としてデルマタン硫酸がセリン残基を介して1本結合した構造をしている。ビグリカンは、分子量約4万5000のコアタンパク質にデルマタン硫酸あるいはコンドロイチン硫酸がセリン残基を介して2本結合した構造をしている。

5 パールカン perlecan

基底膜を構成するプロテオグリカンは、分子量約45万のコアタンパク質にグリコサミノグリカン鎖として主にヘパラン硫酸を含有するヘパラン硫酸プロテオグリカンで、パールカンと呼ばれている。上皮細胞、内皮細胞などの本来基底膜を構成する細胞だけでなく、線維芽細胞などの結合組織を構成する細胞によっても合成される。

パールカンはラミニンやⅣ型コラーゲンとの強い結合能をもち、基底膜を構成する主要分子相互間の接着に深く関与している。また、最近の研究では、シナプス基底膜に分布しニューロン膜表面のアセチルコリンエステラーゼのコラーゲン様テイル部分と結合することによって、エステラーゼの基底膜におけるアンカーとして機能していることが示唆されている。

⑥ シンデカン-1の構造

総分子量約20～26万で、4本のヘパラン硫酸鎖（分子量3万6000）と2本のコンドロイチン硫酸鎖（分子量2万6000）が分子量5万3000のコアタンパク質に結合しているハイブリッドプロテオグリカンの構造をもつと推定されている。コアタンパク質は膜貫通部、細胞外領域と、数十アミノ酸からなる短い細胞内領域に分けられる。

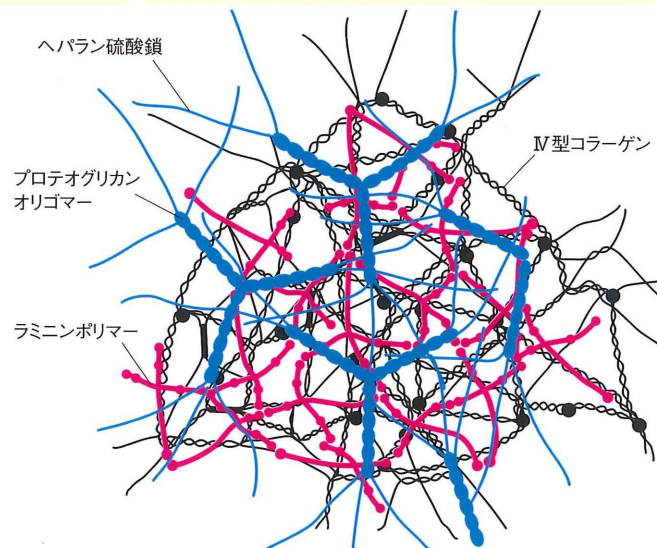
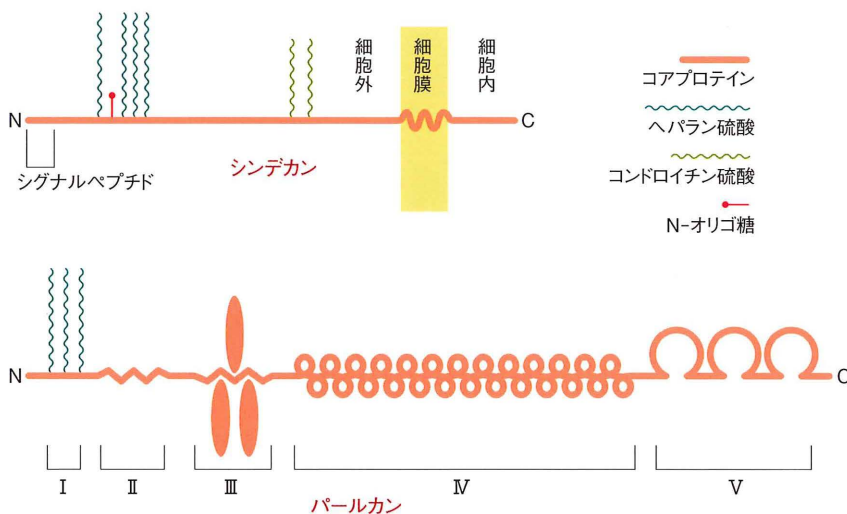
⑦ パールカンの構造

ドメインⅠ：3カ所のグリコサミノグリカン結合部位。
ドメインⅡ：LDL受容体のLDL結合部と相同性がある。
ドメインⅢ：ラミニンA鎖のN末端領域と高い相同性をもつ。
ドメインⅣ：2個のシステイン残基の架橋によって支えられたループ状構造の8回の繰り返し構造（免疫グロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質に特徴的）。
ドメインⅤ：ラミニンA鎖のC末端球状ドメインに相同性をもつ領域3つと、EGF様繰り返し配列。

⑧ 基底膜のⅣ型コラーゲン会合体のモデル

基底膜の網目構造はⅣ型コラーゲン会合体によって形成されている。Ⅳ型コラーゲン会合体からなる基本骨格にラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ヘパリンなどの高分子成分や細胞が結合し、各臓器・組織に特異的な構造が形成される。Ⅳ型コラーゲンには α_1 (Ⅳ)、 α_2 (Ⅳ)のほか、 α_3 (Ⅳ)、 α_4 (Ⅳ)など少なくとも4種類のプロ α 鎖に由来するものがあり、組織によってその含量は異なる。

(Cell Biology of Extracellular Matrix. ed. by Hay, ED, Plenum Press, p.407)



結合組織

複合糖質 glycoconjugate

5 糖タンパク質 glycoprotein

糖タンパク質とは糖とタンパク質からなる一群の化学物質の総称であり、糖部分は2～6種類の単糖からなり、タンパク質と共有結合している。

1 糖タンパク質の構造

プロテオグリカンとの違いは、2つの糖の繰り返し構造がないこと、一般にウロン酸(D-グルクロン酸とL-イズロン酸)と硫酸基が存在しないことである。糖タンパク質に含まれる主な単糖は、下表に示すように約10種類存在する。

糖タンパク質は、結合組織のほか、唾液、胃液および血液など生体内に広く分布しており、ほとんどのタンパク質は実際には糖タンパク質である。糖タンパク質1分子当たりの糖鎖の数は1本のものから800本に達するものもあり、多種多様である。糖鎖とタンパク質の結合様式には、次のような種類がある。

- ① N-アセチル-D-グルコサミンとアスパラギンの間に生じるN-グリコシド結合(右上図)
- ② N-アセチル-D-ガラクトサミンとセリンまたはスレオニンの間にできるO-グリコシド結合(右下図)
- ③ D-ガラクトースとヒドロキシリシンの間にできるO-グリコシド結合

糖タンパク質の単糖成分

糖タンパク質	構成する単糖
ヘキソース	ガラクトース, マンノース グルコース
デオキシヘキソース	L-フコース
ヘキソサミン	N-アセチルグルコサミン N-アセチルガラクトサミン
シアル酸	N-アセチルノイラミン酸 N-グリコリルノイラミン酸
ペントース	キシロース, L-アラビノース



アスパラギン型糖鎖のサブグループ

ムチン型糖鎖の母核構造



2 アスパラギン型糖鎖をもつ糖タンパク質

1 卵白アルブミン ovalbumin (高マンノース型)

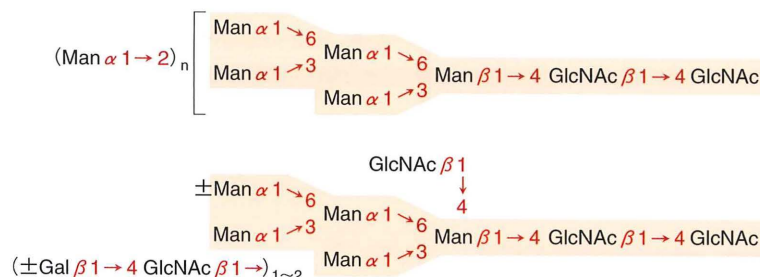
卵白のタンパク質の主成分。全タンパク質の約75%を占める。ニワトリから得られた標品は分子量約4万5000、等電点4.6を示す。球状タンパク質であり、約400のアミノ酸残基からなり、N末端残基はN-アセチル化されたグリシン、C末端残基はプロリンで、N末端から10番目と34番目のセリンがリン酸化されている。輸卵管で合成されたのち卵母細胞に取り込まれ、胚の栄養および物理的保護に関与すると考えられている。

2 トランスフェリン transferrin (複合型)

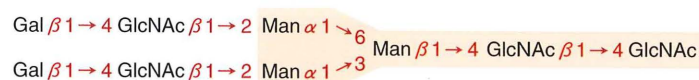
ジデロフィリン、鉄結合性グロブリンとも呼ばれる。血中の輸送鉄と結合する分子量7万5000のタンパク質である。正常成人では血清中に200～350 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ の鉄と結合しうる量のトランスフェリンが存在し、このうち約1/3が鉄と結合している。幼若赤血球はトランスフェリンと結合した鉄に対する受容体を持っており、血清鉄がヘモグロビンの合成に利用されるためには、トランスフェリンと結合していなければならない。

3 免疫グロブリン immunoglobulin (複合型)

抗体およびこれと構造および機能上関連をもつタンパク質の総称である。5つのクラスに分類される。それらの構造と機能については免疫の項(125ページ)を参照のこと。



卵白アルブミン由来糖鎖



ヒトトランスフェリン由来糖鎖

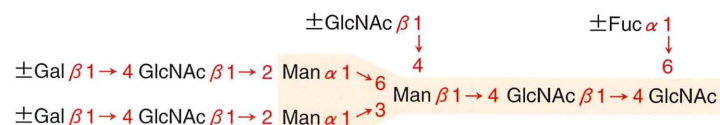
3 ムチン型糖鎖をもつ糖タンパク質

1 唾液腺由来ムチン

この糖タンパク質に含まれる糖の含有量は、顎下腺唾液で25～40%、舌下腺唾液で45～60%である。分子量は顎下腺由来のものが30万、舌下腺由来のものが56万2000で、等電点は両者ともに2～2.5である。このタンパク質は非常に粘度が高く、またヒドロキシアパタイトに対して強い吸着能をもっている。したがって、う蝕や歯周疾患の誘発と関連性があるブラーク形成への関与が推定されている。

2 フェチュイン fetuin

哺乳動物の胎児血清中に特徴的に見出されるシアロ糖タンパク質 ($\alpha 1$ -glycoprotein) で、ウシ胎仔血清由来のものは分子量4万8400、糖含量22%、平均シアロ酸残基数13.6である。脱シアロ体は速やかに肝細胞のリソソームで分解されるため、血中消失速度は速い。シアロ酸残基は、二次構造の安定維持に寄与している。種々の疾患、特に外傷時には成体の血中にも見出される。



ヒトIgG由来糖鎖

4 アスパラギン型とムチン型糖鎖の両方をもつ複合糖質

ケラタン硫酸含有プロテオグリカン

アスパラギン型のは目の角膜に、ムチン型のは髄核、椎間板、軟骨などに多くみられる。



フェチュイン

結合組織

接着性タンパク質

6 フィブロネクチンとラミニン

フィブロネクチンは細胞表面の主要な糖タンパク質で、細胞の癌化によってその量は減少する。ラミニンは基底膜を構成する主要な糖タンパク質である。

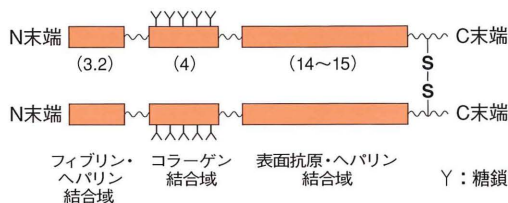
1 フィブロネクチン fibronectin

フィブロネクチンは、線維芽細胞や内皮細胞の表面、腸管上皮細胞の基底膜面、そのほか種々の細胞どうしの接着面に存在する糖タンパク質で、分子量約24万のポリペプチドがS-S結合で2量体または4量体になっている。この分子は、フィブリンやヘパリンと結合する領域、コラーゲンと親和性の高い領域、および細胞表面やヘパリンと結合する領域からなり、細胞を接着・伸展させる上で重要な働きを果たしている。細胞が癌化するとフィブロネクチンが減少または消失するので、癌細胞の特異な形態や転移性は、この糖タンパク質の喪失に起因するものと考えられている。

フィブロネクチンの生理活性は、細胞の接着や伸展の促進、細胞移動の促進、細胞分化の調節、組織修復など多岐にわたっている。

① 血漿フィブロネクチン：肝臓で合成・分泌され、ヒト血漿中に0.3mg/ml(血清中では0.2mg/ml)の濃度で存在する。中性領域のpHで溶解する。

② 細胞性フィブロネクチン：種々の動物細胞の表面に存在する。含量は細胞種によって異なり、培養したニワトリ線維芽細胞では総タンパク質の3%



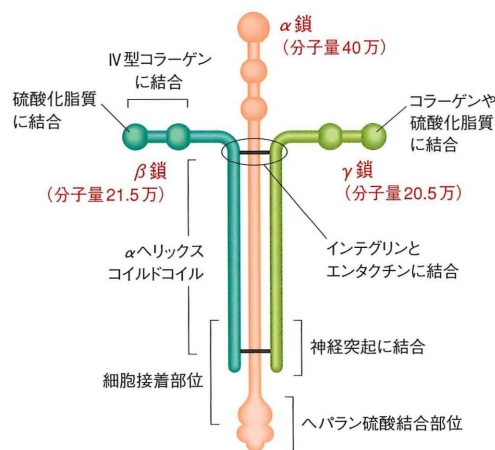
④ フィブロネクチンのドメイン構造

カッコ内は分子量(単位:万)

を占める。細胞を癌化させると、細胞表面のフィブロネクチンは顕著に減少する。一方、*in vitro*でビタミンA、酪酸、デキサメタゾン、上皮成長因子(EGF)、トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)を添加すると増加する。中性領域のpHでは不溶で、アルカリ性領域(pH 11付近)で溶ける。

2 ラミニン laminin

ラミニンはⅣ型コラーゲン、ニドゲン(エンタクチン)、パールカンとともに基底膜を構成する主要成分の1つであり、基底膜への細胞接着において中心的役割を果たす。ラミニンを構成する3本のサブユニット(α 、 β 、 γ)には各々複数の種類があり(α 鎖5種、 β 鎖3種、 γ 鎖3種)、それらの組み合わせによって少なくとも12種類の異なるアイソフォームが存在する。なお、ラミニンは他の基底膜成分とともに



④ ラミニンのドメイン構造

にショウジョウバエや線虫にも存在しており、インテグリンの場合と同様、多細胞動物体制(特に上皮組織)の構築に深く関わっていると推定される。

3 テネイシン tenascin

ラット胎児期の乳腺、毛包、歯の周囲の間質に特異的に存在する細胞外マトリックスのタンパク質。240kDのサブユニットをもち、通常はヘキサブラキオンのように6本の腕をもつ1000kD以上の六量体である。テネイシンは、細胞性フィブロネクチン標品に混在し、細胞外マトリックスタンパク質の赤血球凝集活性の原因になることが多い。EGF様ドメインの繰り返し構造を14個もつ。

4 ビトロネクチン vitronectin

70kDの血清タンパク質。培養組織細胞の接着や伸展を促進する活性をもっているために血清中伸展因子としても知られている。フィブロネクチンで最初に発見された細胞結合配列Arg-Gly-Asp(RGD)をもっている。

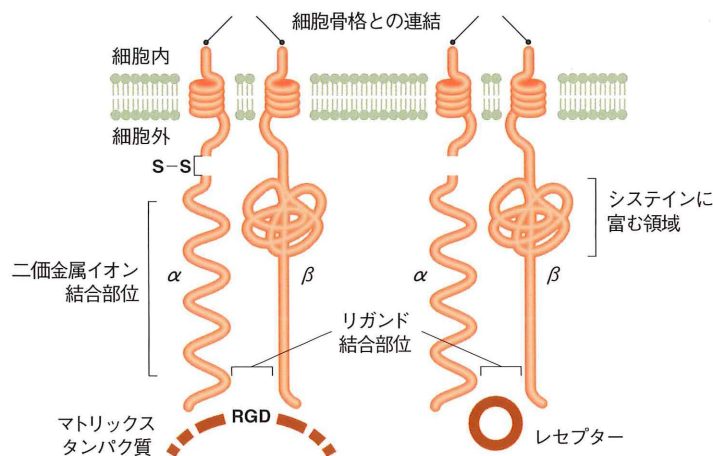
④ ラミニンのアイソフォーム

	三量体構成	主な分布	インテグリン結合特異性	細胞接着活性
LN-1	$\alpha_1\beta_1\gamma_1$	胎児組織	$\alpha_6\beta_1$	弱
LN-3	$\alpha_1\beta_2\gamma_1$			
LN-2	$\alpha_2\beta_1\gamma_1$	筋肉、神経	$\alpha_7\beta_1$	中
LN-4	$\alpha_2\beta_2\gamma_1$			
LN-12	$\alpha_2\beta_1\gamma_3$			
LN-5	$\alpha_3\beta_3\gamma_2$	皮膚、肺	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$	強
LN-6	$\alpha_3\beta_1\gamma_1$		$\alpha_6\beta_1$	
LN-7	$\alpha_3\beta_2\gamma_1$			
LN-8	$\alpha_4\beta_1\gamma_1$	血管、肺	$\alpha_6\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$	弱
LN-9	$\alpha_4\beta_2\gamma_1$			
LN-10	$\alpha_5\beta_1\gamma_1$	腎臓、肺	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$	強
LN-11	$\alpha_5\beta_2\gamma_1$	脾臓、血管		

5 細胞接着ペプチドと インテグリンスーパーファミリー

フィブロネクチンやラミニンのA鎖の細胞接着ドメインには、Arg-Gly-Asp-Asn (RGD) というアミノ酸配列があり、このRGD配列が細胞との接着に深く関与している。その後の研究で、RGD配列はビトロネクチン、フィブリノーゲン、コラーゲン、オステオポンチン、骨シアロタンパク質、テネイシンなどの接着機能を持つ他の糖タンパク質にも見出されている。また、ラミニンの β 鎖にはTyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) やPro-Asp-Ser-Gly-Arg (PDSGR) など別のアミノ酸配列が見出され、上皮性細胞との接着に関与すると考えられている。

一方、接着性タンパク質と結合する細胞表面には、膜貫通型の糖タンパク質である細胞接着レセプターが存在する。このレセプターは下図に示すように α および β の2つのサブユニットから構成され、分子量はそれぞれ13~16万および9~14万である。これらのサブユニットにはさらにいくつかのサブクラスが存在し、それら α 鎖と β 鎖の組み合わせで、結合するリガンドの種類が決まることが明らかにされている(右表)。これらのレセプターのアミノ酸配列には相同性が見出され、インテグリンスーパーファミリーと呼ばれる遺伝子ファミリーを構成する。



細胞接着域のインテグリンの構造モデル

(Cell Biology of Extracellular Matrix. ed. by Hay, ED, Plenum Press, p.344)

インテグリンスーパーファミリーの特異性

β 鎖	アイソフォーム	リガンド	主な分布
β_1	$\alpha_1\beta_1$ (VLA-1)	コラーゲン	単球, 活性化T細胞, 活性化NK細胞, 培養神経細胞, 平滑筋細胞, メラノーマ
	$\alpha_2\beta_1$ (VLA-1)	コラーゲン, ラミニン, エコーウイルス-1	単球, B細胞, T細胞, 血小板, 線維芽細胞, 血管内皮細胞, メラノーマ
	$\alpha_3\beta_1$ (VLA-3)	ラミニン-5, -10/11, フィブロネクチン, I・IV型コラーゲン, エンタクチン, トロンボスポンジン, VLA-2, -3	表皮細胞, 上皮細胞, 線維芽細胞, 活性化リンパ球
	$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)	フィブロネクチン (EILDV), VCAM-1, オステオポンチン	単球, B細胞, T細胞, NK細胞, 好酸球, 好塩基球, メラノーマ, 胸腺細胞, 筋細胞
	$\alpha_5\beta_1$ (VLA-5)	フィブロネクチン	上皮細胞, リンパ球, 単球, 血小板
	$\alpha_6\beta_1$ (VLA-6)	ラミニン	単球, 胸腺細胞, T細胞, 血小板, 上皮細胞, 腫瘍細胞
	$\alpha_7\beta_1$	ラミニン-2/4, -12	
β_2	$\alpha_8\beta_1$	フィブロネクチン, ビトロネクチン, テネイシン	
	$\alpha_V\beta_1$	フィブロネクチン, ビトロネクチン	
	$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1)	ICAM-1, -2, -3	すべての白血球
	$\alpha_M\beta_2$ (Mac-1)	C3bi, ICAM-1/2, フィブリノーゲン, Factor X, ヘパリン, LPS	顆粒球, 単球, マクロファージ, NK細胞
β_3	$\alpha_X\beta_2$ (p150/95)	C3bi, ICAM-1, フィブリノーゲン, LPS	単球, 活性化T細胞, 活性化NK細胞, 樹状細胞, 顆粒球, マクロファージ
	$\alpha_D\beta_2$	ICAM-3	末梢血リンパ球, 顆粒球, 単球
	$\alpha_2\beta_3$ ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	フィブロネクチン, ビトロネクチン, フィブリノーゲン, トロンボスポンジン	血小板, 巨核球系
β_4	$\alpha_V\beta_3$	フィブロネクチン, ビトロネクチン, トロンボスポンジン, オステオポンチン	血管内皮細胞, 破骨細胞, マクロファージ, 血小板, メラノーマ
	$\alpha_6\beta_4$	ラミニン-1/3, -2/4, -5	上皮細胞
β_5	$\alpha_V\beta_5$	ビトロネクチン	上皮細胞
β_6	$\alpha_V\beta_6$	フィブロネクチン, テネイシンC, ビトロネクチン, LAP	炎症・創傷治癒時の上皮細胞
β_7	$\alpha_4\beta_7$	MAdCAM-1, VCAM-1, フィブロネクチン	B細胞, T細胞, NK細胞, 活性化単球, 好酸球, 好塩基球, 肥満細胞
	$\alpha_E\beta_7$	E-カドヘリン	上皮内リンパ球

結合組織

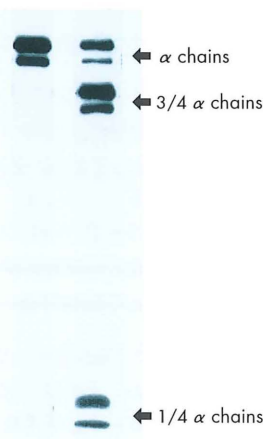
細胞外マトリックスの分解とその調節

7 マトリックス金属プロテアーゼ matrix metalloprotease ; MMP

コラーゲンを中心とする線維成分やコラーゲン以外の線維間基質成分は、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロムライシンなどによって分解される。これらの酵素は、その活性発現にカルシウムイオンや亜鉛イオンなどの金属イオンを必要とし、また1つの遺伝子ファミリーに属するので、マトリックス金属プロテアーゼとして1つのグループにまとめられている(下表)。

1 コラゲナーゼ collagenase

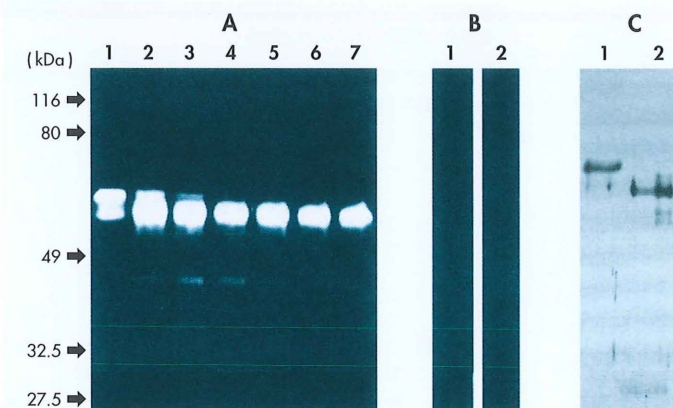
動物性コラゲナーゼと細菌性コラゲナーゼの2種類が知られている。動物性コラゲナーゼには、線維芽細胞や骨芽細胞など組織を構成する細胞によって産生され組織のリモデリングに関わる間質コラゲナーゼ(MMP-1)と、組織の炎症時に出現し好中球やマクロファージによって産生される好中球コラゲナーゼ(MMP-8)があり、いずれもコラーゲン分子を3本鎖ヘリックス構造のままN末端から約3/4のところで切断する。一方、ガス壊疽菌などの細菌が産生する細菌コラゲナーゼは、コラーゲン分子中のグリシン残基の前を加水分解する。したがって、ペプチド鎖は200カ所以上で切断されて、Gly-X-Yのようなペプチド断片を生じる。



⑤ $[^{14}\text{C}]$ proline 標識 I 型コラーゲンの間質コラゲナーゼによる分解後の SDS-PAGE パターン

⑥ ヒト歯根膜細胞の活性型ゼラチナーゼ (MMP-2) のザイモグラフィーとウエスタンブロッティング

A: AMPA 処理後のザイモグラフィー。1はコントロール。2～7は潜在型 MMP-2 を 37℃, 1.0 mM AMPA によりそれぞれ 20 分, 40 分, 60 分, 120 分, 240 分処理したもの。
B: 金属プロテアーゼ阻害薬添加後のザイモグラフィー
C: 抗 MMP-2 抗体によるウエスタンブロッティング。1: 潜在型 MMP-2, 2: AMPA 処理後の活性型 MMP-2



⑦ マトリックス金属プロテアーゼの基質特異性

酵素	間質コラゲナーゼ (MMP-1)	好中球コラゲナーゼ (MMP-8)	ストロムライシン 1 (MMP-3)	72kDa ゼラチナーゼ (MMP-2)	92kDa ゼラチナーゼ (MMP-9)
I 型コラーゲン	+	+	—	—	—
II 型コラーゲン	+	+	—	—	—
III 型コラーゲン	+	+	—	—	—
IV 型コラーゲン	—	—	+	+	+
V 型コラーゲン	—	—	+	+	+
ゼラチン	+	+	+	+	+
フィブロネクチン	—	—	+	+	+
ラミニン	—	—	+	+(?)	+(?)
プロテオグリカン	—	—	+	+	+
エラスチン	—	—	+	+	+
プラスミノゲン	—	—	—	—	—

2 ゼラチナーゼ

分子量の違いから 72 kDa と 92 kDa の 2 種類のゼラチナーゼが存在し、それぞれ MMP-2, MMP-9 と呼ばれ、MMP-2 は間葉系細胞によって、MMP-9 は上皮細胞や炎症性細胞によって合成されることが知られている。これらの酵素は、間質コラゲナーゼで分解され体温で変性してゼラチン化したコラーゲン断片を低分子化する。また、基底膜を構成する IV 型コラーゲンを分解することから IV 型コラゲナーゼとも呼ばれる。

3 ストロムライシン

ストロムライシン 1 は基質特異性が低く、細胞外マトリックスの主要成分の 1 つであるプロテオグリカンのコアプロテインを分解するほか、種々のマトリックス成分を分解する。

4 セリンプロテアーゼ

セリンプロテアーゼは活性中心にセリン残基をもち、主に細胞外で働くプロテアーゼである。トリプシンやキモトリプシンのようにタンパク質の消化に関与するもの、トロンビンや血漿カリクレインのように血液凝固に関与するもの、プラスミンやプラスミノゲンアクチベーターのように線溶系で働くもの、好中球エラスターゼやカテプシンGのように食作用に関与するものなどがある。血漿中には α_1 -アンチトリプシン、 α_2 -マクログロブリンをはじめとする多種のインヒビターが存在する。セリンプロテアーゼのうちいくつかは細胞外マトリックスの分解に関与するほか、マトリックス金属プロテアーゼの活性化にも関与する。

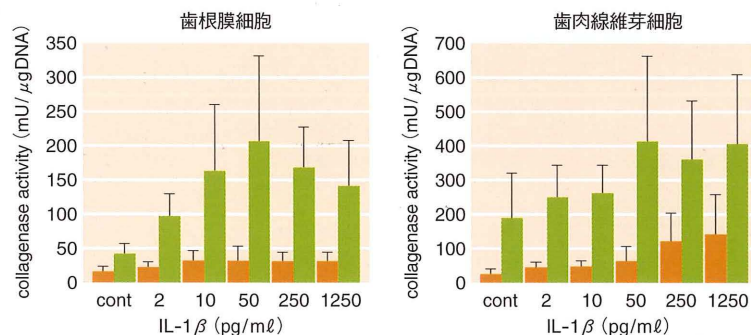
④ 好中球のセリンプロテアーゼ

酵素名	分解される細胞外マトリックスと生物活性
好中球エラスターゼ	エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、III・IV・VI型コラーゲン 殺菌能、サイトカイン、免疫グロブリンの分解
カテプシンG	VI型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、エラスチン、プロテオグリカン 殺菌能、免疫グロブリンの分解
プラスミノゲン アクチベーター	プラスミン生成によるフィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカンの分解、 pro-MMPの活性化

④ ヒト歯根膜細胞および歯肉線維芽細胞のコラゲナーゼ産生に及ぼすインターロイキン1 β の影響

ヒト歯根膜細胞および歯肉線維芽細胞のコラゲナーゼ(MMP-1)産生量は、IL-1 β の添加によっていずれも増加する。

(Ohshima, M., et al.: J. Periodont. Res. 29: 424, 1994)



5 マトリックス成分の分解調節機構

正常な結合組織中でのマトリックス成分の代謝調節は、細胞レベルの調節のほか、細胞外で起こる潜在型MMPの活性化、内因性インヒビターによる活性酵素の阻害などによって行われる。

1 細胞レベルの調節 細胞によって産生されるマトリックス金属プロテアーゼ(MMP)や金属プロテアーゼ組織インヒビター(TIMP)量は、炎症や組織修復に関与する種々のサイトカインによって調節される。たとえば、インターロイキン1によって、線維芽細胞の間質コラゲナーゼ産生は顕著に亢進する。

2 潜在型MMPの活性化 細胞によって産生されるMMPは、N末端に分子量約1万のプロペプチドが結合したプロMMPという潜在型(不活性型)として合成・分泌される。プロMMPは、プラスミン、血漿カリクレイン、カテプシンB、ストロムライシンなどのアクチベーターと総称されるプロテアーゼによって活性化される。なお*in vitro*でのプロMMPの活性化は、4-アミノフェニル酢酸第二水銀(APMA)などの水銀製剤の添加によって行われる。

3 内因性インヒビター 組織中のMMPは、通常内因性インヒビターによって不活性化されている。すなわち、活性化されたMMPは、必要なマトリックス成分の分解を終えると、インヒビターの結合によって分解機能が抑制される。内因性インヒビターには組織由来のものと血漿由来のものがある。組織由来のものとしては、MMPに共通で特異性の高いTIMPが知られている。血漿由来のものとしては、あらゆる種類のプロテアーゼを阻害する α_2 -マクログロブリン、好中球エラスターゼに比較的特異性の高い α_1 -プロテアーゼインヒビター、カテプシンGに強く作用する α_1 -アンチキモトリプシンなどが知られている。TIMPも血漿中にわずかに存在する。

4 エラスチンの分解 エラスチンの分解はエラスターゼによって行われ、エラスチン分子のバリン、アラニン、グリシンなどの側鎖の小さい疎水性アミノ酸の近隣を分解する。この酵素は、脾臓、動脈壁、癌細胞、好中球、マクロファージなどに見出されている。好中球がその細胞内にエラスターゼやコラゲナーゼなど結合組織分解酵素を含んでいるのに対し、マクロファージはそれらを細胞内に含まず、貪食刺激を受けてこれらの酵素を産生・放出することは興味深い。

5 プロテオグリカンの分解 プロテオグリカンの分解は、次に示す順序で進行する。①ストロムライシンやエラスターゼなどのプロテアーゼによるコアプロテインの加水分解、②コンドロイチナーゼやヒアルロニダーゼによる糖鎖部分の切断、③コンドロスルファターゼによる硫酸基の除去、④グルコシダーゼによる単糖への分解