

鯨軟骨コンドロイチン硫酸のエタノールによる沈澱に関する研究II.

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	中嶋, 昭正
巻/号	38巻6号
掲載ページ	p. 621-626
発行年月	1972年6月

鯨軟骨コンドロイチン硫酸のエタノール による沈殿に関する研究—II.

軟骨溶解液からの沈殿における塩の効果

中 嶋 昭 正

(1971年12月17日受理)

Studies on the Precipitation of Whale Cartilage Chondroitin Sulfate with Ethanol—II.

Effect of Salt on the Precipitation of Chondroitin Sulfate in the Liquefied Cartilage Solution

Akimasa NAKASHIMA*

The influences of salt and ethanol concentrations on the precipitation of chondroitin sulfate (CS), keratosulfate (KS) and protein in the Pronase digest of whale nasal cartilage were examined, and the following results were obtained.

- 1) CS was precipitated almost completely with 1.5 volumes of ethanol, whether the salt was added or not.
- 2) Some amounts of KS could not be precipitated even with 3 volumes of ethanol, remaining in ethanolic supernatant.
- 3) The higher the salt concentration or the lower the ethanol concentration, the less protein was precipitated.
- 4) There was little difference between sodium chloride and sodium acetate in their influence on the precipitation of CS, KS and protein.
- 5) The attempt to remove the greater part of contaminating protein from crude CS by the washing with 50-59% ethanol saturated with sodium acetate was successful.

著者は前報¹⁾で、コンドロイチン硫酸 (CS) の水溶液を用いて、エタノールによる CS の沈殿におよぼす共存塩の影響について実験し、塩濃度を高めると CS の沈殿に必要なエタノール濃度が低下し、塩濃度と沈殿に必要なエタノール濃度との間に一定の関係があることを報告した。しかし、軟骨からの CS の調製においては、軟骨の蛋白分解酵素による消化液あるいはアルカリ抽出液にエタノールを加えて沈殿させるのであるから、共存する蛋白その他の成分の影響をうけ、CS のみの場合と異なる結果が予想される。それゆえ、プロナーゼ消化による鯨鼻軟骨の溶解液中の CS の沈殿におよぼす塩濃度およびエタノール量の影響について実験し、また CS の調製においては不純物であり除去せねばならないケラト硫酸 (KS) および蛋白の沈殿についても検討したので報告する。

実験材料および方法

軟骨溶解液 冷凍鯨鼻軟骨を解凍後肉ひき機で細碎し、その 1kg に 1l の水と 1g の“プロナーゼ P”を加え、55-60°C で 6 時間攪拌しながら消化し、その間水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.5 に保つた。消化液にセライトを加え吸引ろ過して軟骨溶解液 (1,840 ml) を得た。

* 福岡女子短期大学 (Fukuoka Women's Junior College, Dazaifu, Fukuoka, Japan)

Dowex 50 W-X1 処理粗 CS の調製 100 ml の軟骨溶解液を 100 ml の水で希釈後、5°C で Dowex 50 W-X1 (H⁺) カラム (2.4×44.4 cm) に通し、250 ml の水で流出した²⁾。流出液は水酸化ナトリウム溶液で中和し、0.5 M 濃度の酢酸ナトリウム (原液量に対して 0.5 M 濃度に相当する量の酢酸ナトリウムを加えた。酢酸ナトリウムの添加量はすべてこのように表示してある) と 3 倍容量のエタノールとを加えて生じた沈殿をエタノール、アセトンで洗浄後減圧乾燥した。

分析法 ウロン酸は BITTER らの改良カルバゾール法³⁾により定量したが、試料が硫酸試薬との加熱のみでも発色する場合には、カルバゾールエタノール試薬の代わりに、エタノールを加えて得られる発色の吸光度を差し引いて定量した。ヘキソースはアンスロン法⁴⁾により定量したが、ウロン酸による発色をおさえるために 5 分間の加熱とし、さらにウロン酸の影響を除くため、ウロン酸の発色の 620 mμ と 490 mμ とにおける吸光度が等しいところから、620 mμ の吸光度から 490 mμ の吸光度を差し引き D-ガラクトースとして定量した。また、シアル酸は鯨鼻軟骨から中川の方法⁵⁾で調製した N-アセチルノイラミン酸を標準として直接 EHRlich 法⁶⁾により、ヘキソサミンは 3 N 塩酸、100°C、15 時間の加水分解後、ELSON-MORGAN 法の BLIX の変法⁷⁾により、蛋白は結晶アルブミンを標準として GORNALL らのビューレット法⁸⁾により、N は KJELDAHL 法により、S は ANTONOPOULOS の方法⁹⁾により、それぞれ定量した。

実験結果および考察

軟骨溶解液中の CS, KS および蛋白の沈殿におよぼす塩濃度およびエタノール量の影響 55.2 ml の軟骨溶解液に、0-2 M 濃度の酢酸ナトリウムを添加後、1-3 倍容量のエタノールを加え、18-23°C で 24 時間静置した。生じた沈殿を 4,000 rpm で遠心分離し、その上澄液の一部をとり、エタノールを蒸散後分析し、軟骨溶解液中の各成分を 100 としたときのエタノール上澄液中の成分量を残存率 (%) で表わし、Table 1 に示す。また、沈殿をエタノール、アセトンで洗浄後減圧乾燥し、その収量、分析値を Table 1 に示す。CS の指標としてウロン酸を定量し、KS の指標としてヘキソースを定量したが、CS の末端の蛋白との橋渡し三糖は D-キシロース-D-ガラクトース-D-ガラクトースであるため¹⁰⁾、ヘキソースの存在は必ずしも KS のみの存在を意味しない。しかし、CS 中のガラクトース量は少ないので、軟骨溶解液中の

Table 1. Precipitation of CS, KS and protein in the liquefied cartilage solution by adding various amounts of sodium acetate and ethanol.

Sodium acetate M	Ethanol Volume	Remaining rate of component in supernatant				Analytical data of precipitate				
		Uronic acid %	Hexose %	Hexosamine %	Sialic acid %	Yield g	Uronic acid %	Hexose %	Sialic acid %	Protein %
0	3	0.7	11.0	2.6	19.5	4.7	15.7	6.6	2.4	33.0
	2	0.7	15.4	9.4	29.6	4.3	17.4	6.9	2.3	32.0
	1.5	0.9	32.9	11.0	48.4	4.1	18.8	6.1	2.0	31.4
	1	70.0	83.2	63.1	92.3	0.6	18.0	6.0	1.8	—
0.5	3	0.7	19.0	2.5	20.0	3.6	19.9	7.4	2.9	28.3
	2	1.0	26.1	7.3	30.8	3.3	22.6	6.9	2.9	24.8
	1.5	1.0	39.2	10.3	38.8	3.1	25.5	6.7	2.7	20.2
	1	2.6	64.6	22.4	77.6	2.5	28.6	3.4	1.3	18.5
2.0	3	1.1	33.2	6.0	27.7	3.0	23.0	6.7	3.0	15.9
	2	1.0	52.6	11.0	44.2	2.8	25.5	5.9	2.7	14.2
	1.5	1.3	57.4	12.3	53.3	2.7	26.8	4.7	2.1	13.5
	1	2.0	68.2	22.7	77.1	2.4	30.3	3.5	0.9	11.6

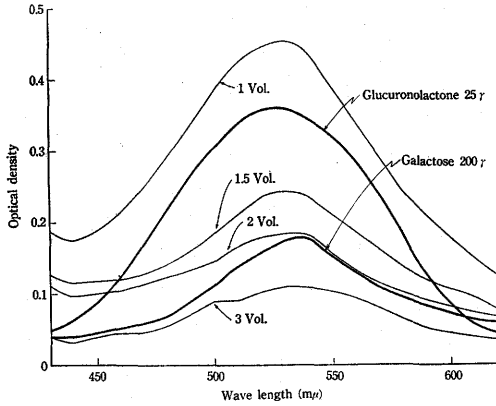


Fig. 1. Absorption spectra in BITTER's carbazol reaction for D-glucuronic acid, D-galactose and ethanolic supernatants of the liquefied cartilage solution.

Ethanolic supernatants were obtained by adding 1-3 volumes of ethanol in the presence of 2 M sodium acetate and 0.2 ml of them was used.

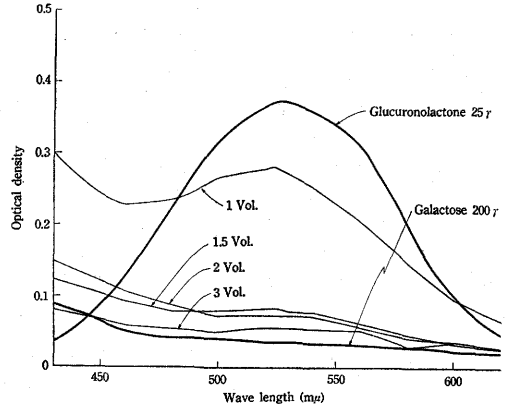


Fig. 2. Absorption spectra in GALAMBOS' carbazol reaction for D-glucuronic acid, D-galactose and ethanolic supernatants of the liquefied cartilage solution.

See the notes in Fig. 1 for samples.

ヘキソースはその大部分がKSに由来するものと考えられる。鯨鼻軟骨のKSはシアル酸を多く含むことが報告されているので^{11,12}シアル酸もあわせて定量した。また、沈殿中に混入する蛋白系物質を蛋白として定量した。

Table 1の上澄液中の残存ウロン酸量から明らかのように、塩を添加してもしなくても、1.5倍容量以上のエタノールによりCSの大部分は沈殿した。0.5 Mあるいは2 M濃度の塩を添加すると、同容量のエタノールによりCSの大部分は沈殿し、塩を添加しなくてもCSの30%が沈殿した。塩の無添加、同容量のエタノールの場合とは別として、上澄液中に0.7-2.6%のウロン酸が残存しているが、定量に用いたBITTERらのカルバゾール反応ではFig. 1に示すようにD-ガラクトースも530 mμにD-グルクロン酸の約6%の吸収があり、共存するヘキソースの影響をうけてかなりの定量誤差があるものと考えられる。それゆえ、ヘキソースによる妨害を除去できるといわれるGALAMBOSの改良カルバゾール反応¹³によるD-ガラクトースおよび軟骨溶解液に2 M濃度の塩と1-3倍容量のエタノールを加えた場合の上澄液(Table 1)の発色の吸収スペクトルについてFig. 2に示す。530 mμにおけるD-ガラクトースの吸光度はFig. 1のBITTERらのカルバゾール反応における吸光度よりも著しく小さくなった。また、1.5, 2および3倍容量のエタノールを加えた場合の上澄液の吸光度も同様であった。これらの上澄液中のヘキソースによる発色を考慮すれば、ウロン酸はほとんど残存しないものと考えられる。しかし、同容量のエタノールを加えた場合には、上澄液の両反応による吸収スペクトルからウロン酸が少量

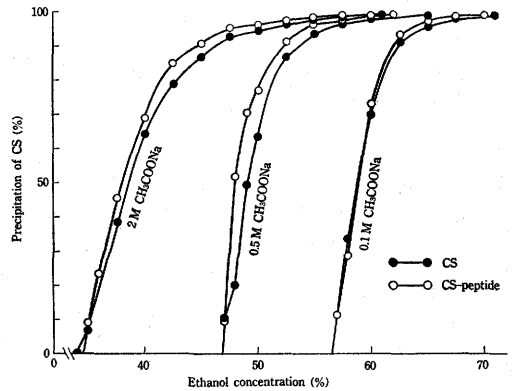


Fig. 3. Ethanol concentration-precipitation curves of CS and CS-peptide at various concentrations of sodium acetate.

しかし、同容量のエタノールを加えた場合には、上澄液の両反応による吸収スペクトルからウロン酸が少量

残存しているように思える。これらの結果から、塩を添加してもしなくても、1.5 倍容量のエタノールにより CS はほとんど完全に沈殿することが明らかになった。

前報¹⁾で、水溶液中の CS は塩を添加しないとエタノールにより沈殿しないと報告したが、本実験では軟骨溶解液中の CS は塩を添加しなくても沈殿した。軟骨溶解液中の CS は CS-ペプチドであり、アルカリ処理によつてペプチドを除いた CS とはエタノールによる沈殿において異なる可能性が考えられる。それゆえ、アルカリ処理 CS を前報¹⁾にしたがつて調製し、CS-ペプチドをアルカリ処理を省略して同様に調製し、両 CS の 0.1, 0.5 および 2M 酢酸ナトリウム溶液での“エタノール濃度-CS 沈殿量曲線”を求めた (Fig. 3)。両 CS の曲線において大きい相違はなかつた。しかも、塩を添加しないと CS および CS-ペプチドともエタノール濃度 95% でも沈殿しなかつた。また本実験に用いた軟骨溶解液を透析すると、エタノール濃度 95% でも沈殿を生じなかつた。したがつて、本実験で塩を添加しなくても CS が沈殿したのは、軟骨溶解液中に存在する塩が関与しているからと考えられる。

つぎに、KS の沈殿について述べると、Table 1 に示すように、塩濃度を低くしても、エタノール量を少なくしても、沈殿中に含まれるヘキソース、シアル酸の量はウロン酸との量比において少なくなつた。とくに 0.5 M あるいは 2 M 濃度の塩と同容量のエタノールとによる沈殿中に含まれるヘキソース、シアル酸量は少なく、CS と KS との分画がかなりよく行なわれた。また、3 倍容量のエタノールを加えても上澄液中にヘキソース、シアル酸のかなりの量が残存したが、これは KS の一部がこのエタノール濃度でも沈殿しないことを示している。

沈殿中の蛋白含量は塩濃度を高くすると著しく少なくなり、またエタノール量を少なくしても少なくなつた。このように、塩濃度を高くすることは除蛋白処理としても非常に有効であることがわかつた。これは軟骨溶解液中の蛋白が塩の存在で含水エタノール溶液に溶けやすくなるためと考えられる。このことは酢酸ナトリウム飽和含水エタノールでの洗浄により粗 CS 中の蛋白含量を著しく低下させた次項の結果からも明らかである。

前報¹⁾で同一濃度の酢酸ナトリウムあるいは塩化ナトリウムを含む CS 水溶液における“エタノール濃度-CS 沈殿量曲線”はほぼ同じであることを報告したが、軟骨溶解液中の CS, KS および蛋白の沈殿におよぼす影響においては異なることが考えられるので、酢酸ナトリウムの場合と同様に塩化ナトリウムを用いて実験した (Table 2)。その結果は酢酸ナトリウムの場合とほぼ同じであつた。

酢酸ナトリウム飽和含水エタノールによる洗浄の除蛋白効果 55.2 ml の軟骨溶解液に 3 倍容量のエタノールを加え、24 時間静置後遠心分離して得られた沈殿をそのまま試料とした。試料を 100 ml 酢酸ナトリウム飽和 50-74% エタノールに浸し、6 時間スターラーで攪拌し、さらに 18 時間静置後遠心分離して得られた沈殿をエタノールで洗浄後乾燥し、Table 3 にその分析値および洗浄液中に溶出した成分の移行率を示す。Table 3 から明らかなように、蛋白含量の多い粗 CS を酢酸ナトリウム飽和含水エタノールによ

Table 2. Precipitation of CS, KS and protein in the liquefied cartilage solution by adding various amounts of sodium chloride and ethanol.

Sodium chloride M	Ethanol Volume	Remaining rate of component in supernatant				Analytical data of precipitate				
		Uronic acid %	Hexose %	Hexosamine %	Sialic acid %	Yield g	Uronic acid %	Hexose %	Sialic acid %	Protein %
0.5	3	0.6	12.2	2.5	15.6	3.8	19.4	6.9	2.5	28.8
	1.5	1.7	45.7	12.1	49.5	2.9	25.0	6.7	2.1	20.0
2.0*	3	0.8	24.4	4.2	15.6	2.9	22.7	7.4	3.0	19.6
	1.5	1.7	55.5	13.5	49.5	2.7	26.8	5.9	2.4	12.2

* The precipitates were washed with 70% ethanol to remove sodium chloride.

Table 3. Deproteinization of crude CS with aqueous ethanol saturated with sodium acetate.

	Analytical data of the washed crude CS							Rate of component dissolved in the washings*		
	N %	Uronic acid %	Hexose %	Hexosamine %	Sialic acid %	S %	Protein %	Uronic acid %	Hexose %	Sialic acid %
Crude CS**	9.2	15.7	6.6	14.7	2.4	2.2	33.0			
Washed with 74% ethanol saturated with sodium acetate once	4.8	27.7	7.0	23.9	3.0	4.4	13.7	0.7	23.9	27.2
Washed with 66% ethanol saturated with sodium acetate once	4.1	30.3	6.3	25.0	3.1	5.2	11.6	1.0	47.3	43.7
Washed with 59% ethanol saturated with sodium acetate twice	3.3	33.2	3.5	28.0	1.4	5.2	8.4	0.5 [0.3]	69.1 [56.7]	63.4 [51.6]
Washed with 50% ethanol saturated with sodium acetate twice	2.9	35.3	2.3	30.3	0.9	5.4	7.0	2.3 [1.7]	80.2 [71.4]	70.4 [62.1]
Treated with Dowex 50 W-X 1	3.1	30.3	6.6	27.1	3.3	4.9	6.0			

* The figures in brackets are rates of components dissolved in the first washings.

** Obtained from the liquefied cartilage solution by adding three volumes of ethanol in the absence of sodium acetate.

つて洗浄すると著しく蛋白含量が少なくなり、エタノール濃度の低いほど除蛋白効果は大きく、酢酸ナトリウム飽和 50% エタノールで2回洗浄すると、簡単で効果的な除蛋白法として著者が常用している Dowex 50 W-X 1 処理によつて得た粗 CS の蛋白含量程度まで除蛋白された。また、エタノール濃度が低いほど洗浄エタノール中に移行するヘキソース、シアル酸量すなわち KS の量が多く、一方ウロン酸の移行はわずかで、CS はほとんど溶出しなものと考えられる。

酢酸ナトリウム飽和含水エタノール洗浄による除蛋白効果をさらに確かめるため、アルカリ処理によつて CS と蛋白(ペプチド)との結合を切り、遊離した蛋白を除去することを試みた。軟骨溶解液から 2 M 酢酸ナトリウムと 1.5 倍容量のエタノールで沈殿として得た粗 CS (Table 1) を 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液に溶かし、25°C, 24 時間後中和し、1.5 M 濃度の酢酸ナトリウムと 1.5 倍容量のエタノールとを加えて生じた沈殿を酢酸ナトリウム飽和 59% エタノールで2回洗浄した。得られた粗 CS の蛋白は 0.5% 以下であつた。

軟骨からの CS の調製法への本実験結果の適用について 軟骨からの CS の調製においてセチルピリジニウムクロライドなどの沈殿剤で CS を沈殿する場合以外は、まずエタノールを加えて粗 CS を沈殿したのち、再び水に溶解して精製するから、この粗 CS に含まれる不純物はできるだけ少ない方がその後の精製操作を容易にする。この観点にたつて本実験結果を軟骨からの CS の調製法へ適用すると、軟骨溶解液に 2 M 濃度の酢酸ナトリウムと 1.5 倍容量のエタノールとを加えて得られる沈殿を酢酸ナトリウム飽和 59% エタノールで洗浄すると、軟骨溶解液中の CS をほとんど完全に回収し、蛋白および KS 含量が少ないものが得られる。また、この際エタノールを同容量とし、洗浄液を酢酸ナトリウム飽和 50% エタノールとすると、CS の収量は若干低下するが、蛋白および KS 含量をより少なくすることができよう。

要 約

ブロナーゼ消化により得られた鯨鼻軟骨溶液中のコンドロイチン硫酸 (CS), ケラト硫酸 (KS) および蛋白の沈殿におよぼす共存塩濃度およびエタノール量の影響について実験し、次の結果を得た。

1. 塩を添加してもしなくても、1.5 倍容量のエタノールを加えることによつて CS はほとんど完全に沈殿した。
2. KS の一部は 3 倍容量のエタノールを加えても沈殿せず上澄液中に残存した。
3. 塩濃度が高いほど、エタノール濃度が低いほど沈殿する蛋白は少なくなった。
4. 酢酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムの影響を比較したが、両者の間にほとんど相違がなかつた。
5. 蛋白含量の多い粗 CS を酢酸ナトリウム飽和含水エタノールで洗浄することによつて、著しく蛋白含量を少なくすることができた。

本研究を行なうにあたり、終始懇切な御指導と御鞭撻とを賜つた九州大学農学部豊水正道教授ならびに北御門学助教授に謹んで謝意を表します。

文 献

- 1) 中嶋昭正: 本誌, 38, 148-154 (1972).
- 2) 中嶋昭正・田中晴夫: 同誌, 32, 1054-1058 (1966).
- 3) T. BITTER and H. M. MUIR: *Anal. Biochem.*, 4, 330-334 (1962).
- 4) W. E. TREVELYAN and J. S. HARRISON: *Biochem. J.*, 50, 298-303 (1952).
- 5) 中川浩毅: 日本水産学会昭和 44 年秋季大会講演要旨 (1969).
- 6) I. WERNER and R. ODIN: *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, 57, 230-241 (1952).
- 7) S. GARDELL: *Acta Chem. Scand.*, 7, 207-215 (1953).
- 8) A. G. GORNALL, C. S. BARDAWILL and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, 177, 751-766 (1949).
- 9) C. A. ANTONOPOULOS: *Acta Chem. Scand.*, 16, 1521-1522 (1962).
- 10) L. RODÉN and R. SMITH: *J. Biol. Chem.*, 241, 5949-5954 (1966).
- 11) N. TODA: *Nat. Sci. Rep., Ochanomizu Univ.*, 20, 69-98 (1969).
- 12) H. NAKAGAWA: *This Bull.*, 37, 197-202 (1971).
- 13) J. T. GALAMBOS: *Anal. Biochem.*, 19, 119-132 (1967).