

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III

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	中嶋,昭正
発行元	日本水産學會
巻/号	40巻7号
掲載ページ	p. 721-727
発行年月	1974年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



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—III

鯨軟骨ムコ多糖のエタノール分別沈殿*1

中 嶋 昭 正

(1974年5月13日受理)

Studies on the Precipitation of Whale Cartilage Chondroitin Sulfate with Ethanol—III Fractional Precipitation of Whale Cartilage Mucopolysaccharides with Ethanol

Akimasa NAKASHIMA*2

Whale nasal cartilage was liquefied by Pronase digestion, and mucopolysaccharides were prepared by Dowex 50W-X 1 treatment and precipitation with six volumes of ethanol in the presence of 0.1 M sodium acetate.

The behaviors of chondroitin sulfate (CS), hyaluronic acid (HA), and keratosulfate (KS) in the fractional precipitation of the mucopolysaccharides with ethanol and in the ion exchange chromatography of each fraction on Dowex 1 were examined, the following results being obtained.

1) The mucopolysaccharides were fractionally precipitated at ethanol concentrations of 36, 39, 44, 50, 60, 70, 80, and 85% in the presence of 2 M sodium acetate. Thus, Frs. 1-8 were obtained.

2) Frs. 1 and 2 were composed of CS-A and a small amount of CS-C; Fr. 3, CS-A and small amounts of CS-C and HA; Frs. 4 and 5, CS-A and small amounts of CS-C, HA and KS; Fr. 6, KS and a small amount of CS-A; and Frs. 7 and 8, almost KS.

3) A large portion of HA in Fr. 3 was separated from CS by the chromatography on Dowex 1. But only half of KS in Fr. 5 was separated from CS, and the separation of KS from CS in Fr. 6 was difficult.

著者^{1,2)}は、鯨軟骨コンドロイチン硫酸 (CS) がエタノール沈殿において多分散性を示すこと、沈殿に必要なエタノール濃度がケラト硫酸 (KS) と異なることを報告した。また、鯨鼻軟骨からアルカリ溶解法あるいはプロナーゼ溶解法によつて調製した粗 CS は、いずれもコンドロイチン硫酸 A (CS-A) を主成分とするが、そのほか少量のコンドロイチン硫酸 C (CS-C)、KS およびヒアルロン酸 (HA) を含むことを明らかにした³⁾。

鯨鼻軟骨から純度の高い CS を調製するためには、CS と KS、HA とを効率よく分離する方法についての資料を得る必要がある。それゆえ、プロナーゼ消化で得られた鯨鼻軟骨溶解液からムコ多糖混合物を調製し、そのエタノール分別沈殿によつて得られた各画分のムコ多糖組成を明らかにし、さらに各画分の Dowex 1-X 2 イオン交換クロマトグラフィー⁴⁾における CS、KS および HA の挙動を調べた。

実験材料および方法

鯨軟骨ムコ多糖混合物 100g の細碎鯨鼻軟骨を前報の方法²⁾で“プロナーゼ P”を用いて消化し、158 ml の軟骨溶解液を得た。その 130 ml を 130 ml の水で希釈後、5°C で Dowex 50 W-X 1 (H⁺) カラム (2.4 ×

*1 本報告の要旨は昭和 47 年 10 月日本水産学会秋季大会で講演した。

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

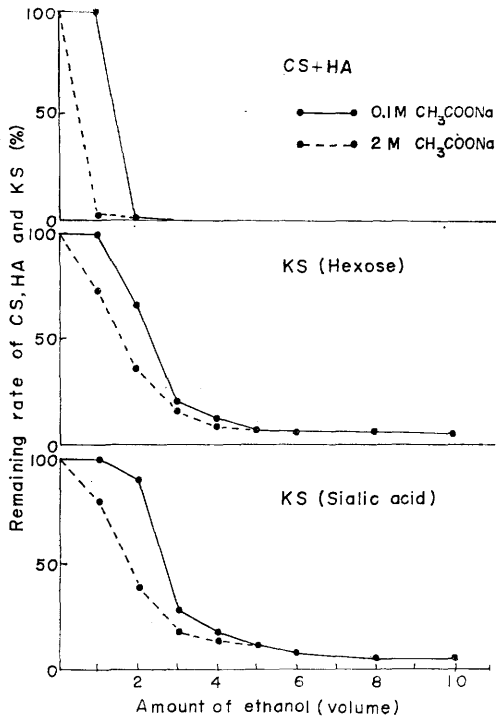


Fig. 1. Influence of the concentration of sodium acetate and amount of ethanol on the precipitation of mucopolysaccharides in the liquefied whale cartilage solution.

The liquefied solution obtained by Pronase digestion was used after the Dowex 50W treatment. The abscissa is the number of volumes of ethanol added to one volume of the liquefied solution.

Table 1. Analytical data of eight fractions obtained by the fractionation of whale cartilage mucopolysaccharides with ethanol. Two g of mucopolysaccharides was dissolved in 2 M sodium acetate and precipitated fractionally with ethanol

Fraction	1	2	3	4	5	6	7	8
Ethanol concentration (%)	33-36	36-39	39-44	44-50	50-60	60-70	70-80	80-85
Yield (g)	0.10	0.31	0.53	0.26	0.31	0.30	0.05	0.07
Uronic acid (%)	34.1	32.1	35.6	31.4	25.4	9.5	2.0	2.4
Hexose (%)	1.4	1.4	1.7	2.6	5.8	15.8	19.6	18.2
Sialic acid (%)	0	<0.1	0.1	0.6	2.5	6.8	11.0	12.3
Hexosamine (%)	29.4	29.2	29.5	28.6	26.4	20.2	17.1	16.7
SO ₄ (%)	15.5	15.5	14.6	15.0	12.6	11.4	9.1	10.4
Protein (%)	2.3	2.7	4.3	11.0	14.7	31.2	19.2	20.9
Galactosamine:								
Glucosamine	100:0	99.2:0.8	85.8:14.2	80.5:19.5	—	36.5:63.5	—	17.6:82.4
HA (%)	0	<0.5	10.6	9.6	8.4	2.2	2.8	1.3
CS-C (%)	4.3	6.1	15.9	16.9	10.5	3.4	—	—
M _n	44,000	30,000	27,000	16,000	13,000	10,000	8,000	11,000

46 cm)に通し、流出液を中和後、0.1 M となるまでの酢酸ナトリウムと6倍容量のエタノールを加えた。生成した沈殿をエタノール、アセトンで洗浄後減圧乾燥してムコ多糖混合物(収量8.4 g)を得た。なお、CS, HA およびKSはFig. 1から明らかなように、0.1 M 酢酸ナトリウムの存在で6倍容量のエタノールによってほとんどが沈殿した。

分析法 ウロン酸、ヘキソース、ヘキサミンおよびSO₄の定量は前報の方法²⁾により、シアル酸(チオバルビツール酸法)、蛋白、HA およびCS-Cの定量、ならびにガラクトサミンとグルコサミンとの分別定量は既報の方法³⁾によつた。アルカリ処理後の数平均分子量 \bar{M}_n は試料を0.5N NaOH, 25°C, 24時間のアルカリ処理後、還元性末端基の定量(SOMOGYI-NELSON法)によつて得られたグルコース当量値より求めた。

実験結果および考察

ムコ多糖混合物のエタノール分別沈殿

2 gのムコ多糖混合物を200 mlの2 M 酢酸ナトリウムに溶解し、塩酸でpHを7.0に調整した。この溶液はエタノール濃度(V/V)33%までは沈殿を生じなかつた。36%になるようにエタノールをさらに加えて攪拌し、25°Cで24時間放置後、遠心分離し、沈殿を2 M 酢酸ナトリウム溶液で調製した36%エタノール

Table 2. Mucopolysaccharide composition of eight fractions obtained by the fractionation of whale cartilage mucopolysaccharides with ethanol

Fr.	Major component	Minor component
1, 2	CS-A	CS-C
3	CS-A	CS-C HA (KS)
4, 5	CS-A	CS-C HA KS
6	KS	CS-A (CS-C HA)
7, 8	KS	(CS HA)

Amount of mucopolysaccharide in parenthesis was trace.

ル 10 ml で洗浄後、乾燥した(Fr. 1)。上澄液と洗浄液を合わせた後、39%になるようにエタノールを加え、生成した沈殿を最初の画分と同様に処理した(Fr. 2)。さらに同様に、エタノール濃度 44, 50, 60, 70, 80 および 85% でそれぞれ沈殿する画分(Frs. 3-8)を得た。

Frs. 1-8 の収量と分析値とを Table 1 に示す。ウロン酸、ヘキソースおよびシアル酸の定量値から、Frs. 1-5 では CS が、Frs. 6-8 では KS が主成分であることは明らかで、とくに Frs. 7,8 はほとんど KS のみからなっていた。Frs. 1, 2 はグルコサミンをほとんど含まないので、CS のみからなっていると思われる。また、HA と CS-C とは Frs. 3-5 に多く含まれていた。蛋白含量は Fr. 1 から 6 まではエタノール濃度の高い画分ほど多くなる傾向が認められた。これらの結果からエタノール分別沈殿画分のムコ多糖組成を要約すれば Table 2 に示すようになる。

つぎに、Frs. 1-8 の Sephadex G-200 ゲルろ過を行ない、CS の指標としてウロン酸を、KS の指標として

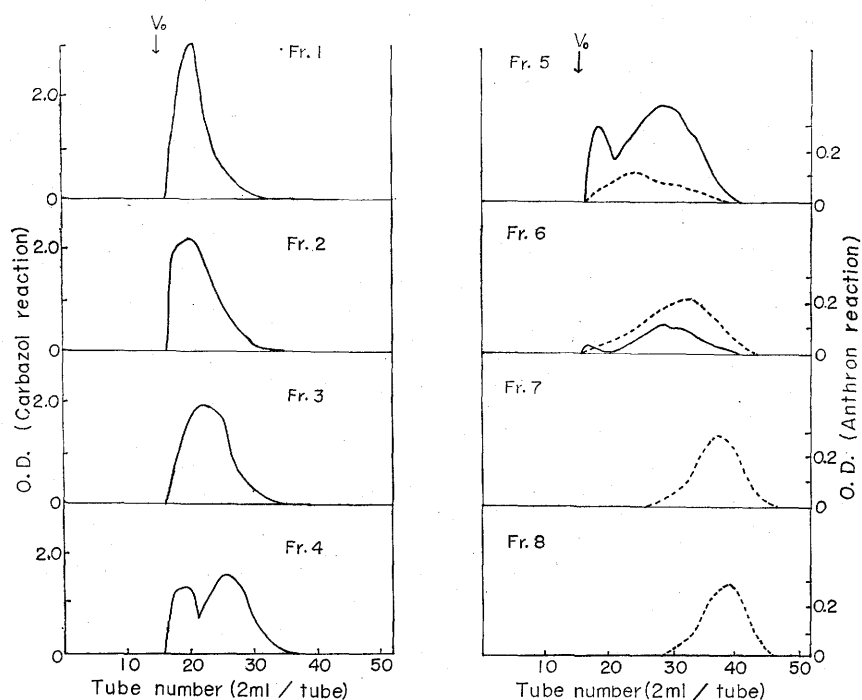


Fig. 2. Gel filtration of Frs. 1-8 on Sephadex G-200.

Ten mg of each fraction was applied to a column (1.3 × 75 cm) equilibrated with 0.1 M sodium chloride solution and eluted with the same solution.

—: Uronic acid -----: Hexose

ヘキソースを分析し、それらの溶出パターンを Fig. 2 に示す。CS も KS もエタノール濃度の低い画分ほどすみやかに溶出し、分子の大きさが大きいことを示している。しかし、Frs. 4-6 の CS でも高分子として挙動するピークが認められた。また、アルカリ処理後のペプチドより遊離したムコ多糖の数平均分子量 (\bar{M}_n) は Fr. 1 から 7 までエタノール濃度が高い画分ほど小さい傾向があつた (Table 1)。

MEYER らの酢酸カルシウム-酢酸緩衝液によるムコ多糖の分画法⁵⁾はよく用いられ、HA は 30% エタノール、CS-A は 30-40%、CS-C は 40-50%、KS は 50% 以上で沈殿すると報告されている。著者³⁾は、アルカリ溶解法あるいはプロナーゼ溶解法によつて調製した粗 CS を MEYER らの方法で分画すると、CS-A は 40-50% 画分にも存在し、CS-C は 30-40% 画分にも存在すること、酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液での分画では沈殿に必要なエタノール濃度は異なるが、各画分の分析値はほぼ同様な傾向を示すことを報告した。また、前報¹⁾で、CS の沈殿に必要なエタノール濃度範囲は広く、たとえば 2 M 酢酸ナトリウムの存在で 34-62% であつた。一方 KS については、TODA⁶⁾は、5% 酢酸ナトリウムの存在で、2 倍容量のエタノールで沈殿する画分から分離し、NAKAGAWA ら⁷⁾は、5% 酢酸ナトリウムの存在で、60% エタノールで生成する沈殿を除去した上澄液から分離している。このように、KS の沈殿に必要なエタノール濃度範囲も広い。また、HA についても同様と考えられる。したがつて、エタノール分別沈殿により 3 者を分離することは困難と考えられる。

本実験でのエタノール分別沈殿においても、Table 2 に明らかなように、CS、KS および HA、ならびに CS-A、CS-C は、画然と分離されることなく、混合した形で分画された。ただし、Frs. 1, 2 は CS のみからなり、Frs. 7, 8 はほとんど KS のみからなつていた。鯨鼻軟骨から分離した HA* の 1% 水溶液の比粘度を測定すると 29.0 であり、アルカリ溶解法³⁾によつて調製した CS の比粘度 1.2-1.6 と比べればはるかに大きく、分子量も大であると考えられるが、HA の pH 7.0 における“エタノール濃度-沈殿量曲線”は Fig. 3 に示

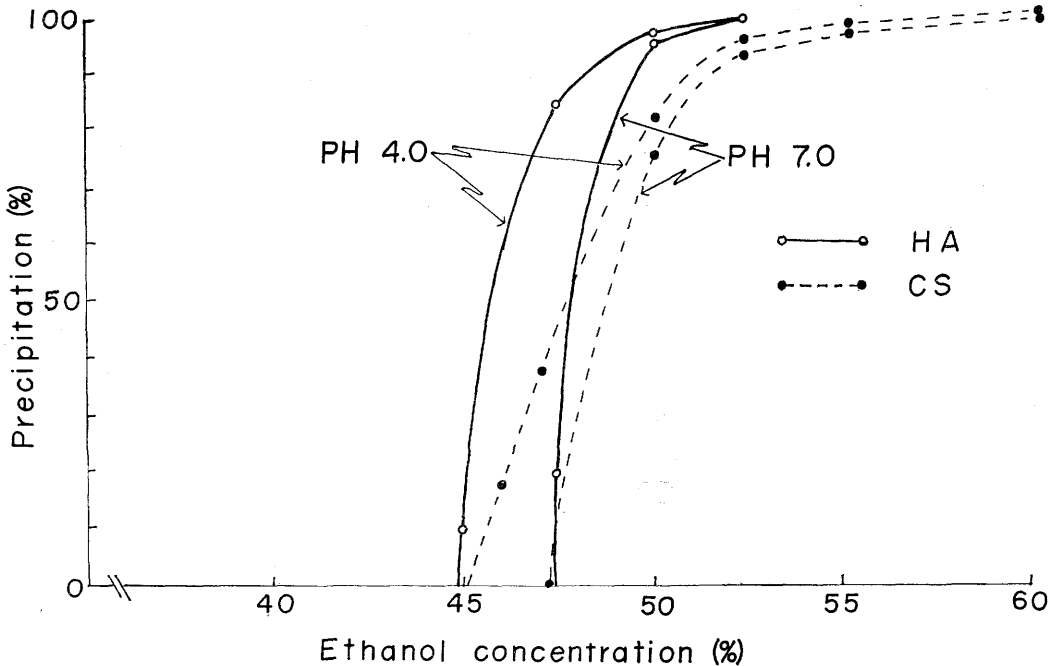


Fig. 3. Ethanol concentration—precipitation curves of CS and HA.

CS or HA was dissolved at a concentration of 1% in 0.5 M sodium chloride solution and the resulting solutions were mixed with ethanol after adjustment of pH to 7.0 or 4.0.

* 鯨鼻軟骨からの CS の調製中に酸性において分離したものである。

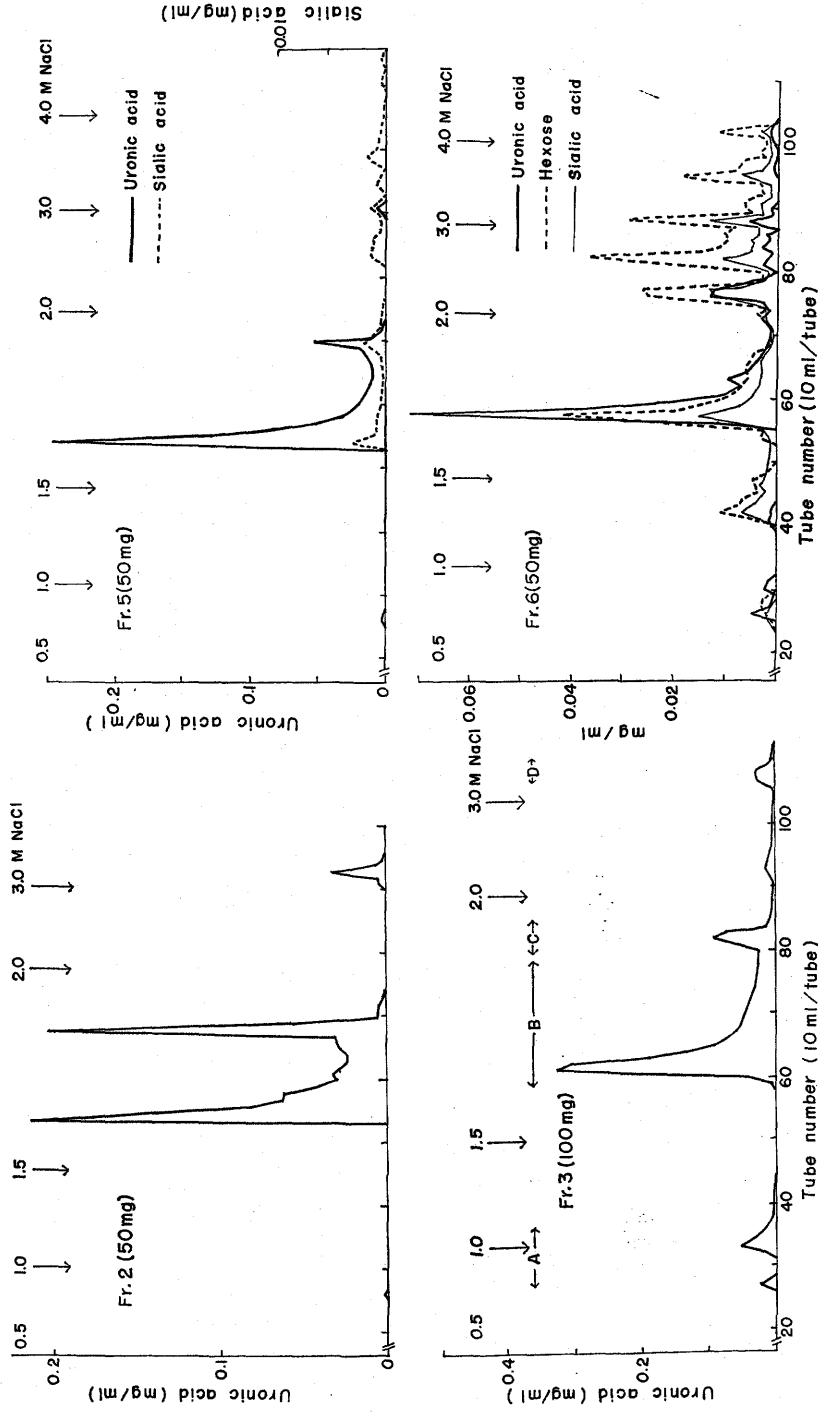


Fig. 4. Ion exchange chromatography of Frs. 2, 3, 5 and 6 on Dowex 1. Each fraction was dissolved in 10 ml of water, and applied to a column (1.8 × 50 cm) of Dowex 1-X2(Cl⁻). After washing the column with 150 ml of water, mucopolysaccharides were eluted stepwise with NaCl solutions as indicated in the figure.

すように pH 7.0 における CS のそれと大差なかつた。HA が Frs. 1, 2 に存在せず, Fr. 3 に存在したのは HA が CS に比べて量的にはるかに少ないからであろう。また, KS の沈殿に必要なエタノール濃度は CS の場合と比べて高く, KS は Frs. 4-8 に存在した。ムコ多糖の沈殿に通常用いられている 3 倍容量のエタノールでは沈殿せず, 6 倍容量のエタノールで沈殿する画分 (Frs. 7, 8) は, ほとんど KS のみからなつていた。

エタノール分別沈殿画分の Dowex 1 クロマトグラフィーによる CS と KS, HA との分離 50-100 mg の Frs. 2, 3, 5, 6 を 10 ml の水に溶解し, Dowex 1-X 2 (200-400 mesh, Cl⁻) カラム (1.8×50 cm) に加え, 150 ml の水で洗浄後, 0.5-4.0 M NaCl で段階的に溶出させ, CS および HA の指標としてウロン酸を, KS の指標としてヘキソース, シアル酸を定量し, その溶出パターンを Fig. 4 にそれぞれ示す。

Table 1 の分析値からほとんど CS のみと考えられる Fr. 2 では, CS の溶出画分である 1.5 M NaCl 溶出画分⁴⁾に 2 つの大きいピークが出現した。そのほか, 小さいピークが 3.0 M NaCl 溶出画分にも認められた。Fr. 3 では, 1.5 M NaCl 溶出画分に大きいピークが出現し, そのほか, 0.5-1.0 M および 3.0 M NaCl 溶出画分に小さいピークが認められた。Table 3 の分析値から明らかなように, 0.5-1.0 M NaCl 溶出画分は HA

Table 3. Analytical data of fractions obtained by Dowex 1 chromatography of Fr. 3

Fraction* ¹	Uronic* ² acid	Hexosamine	SO ₄ * ²	Galactosamine : Glucosamine		Protein (%)
A	1.1	1.0	<0.10	0* ³		
B	1.0	1.0	1.01	98.5	:	1.5
C	1.0	1.0	0.91			9.0
D	1.0	1.0	1.58			
Before fractionation	1.1	1.0	0.92	85.8	:	14.2

*¹ See Fig. 4.

*² Expressed as molar ratio to hexosamine.

*³ Examined qualitatively by the modified ELSON-MORGAN reaction⁸⁾.

であつた。1.5 M NaCl 溶出画分には Fr. 2 と同様にピークが 2 つ認められたが, 後のピークには蛋白含量が多かつた。3.0 M NaCl 溶出画分は SO₄ 含量が多く, コンドロイチンポリ硫酸であろう。鯨鼻軟骨に CS-D あるいは CS-E が存在するという報告は見当たらないが, 岩田⁹⁾ は人軟骨から, CS-D および CS-E の構成二糖を分離している。結局 Fr. 3 では CS と HA とは大部分が相互に分離された。Fr. 5 では, ウロン酸の溶出パターンは Fr. 3 と同じ傾向である。シアル酸の溶出パターンから, Fr. 5 に少量含まれる KS の溶出は 1.5-4.0 M NaCl 溶出画分にわたり, KS の約 1/2 量が CS と同一画分に溶出した。Fr. 6 では, KS は 0.5-4.0 M NaCl 溶出画分に溶出した。CS 溶出画分にも KS はかなりの量が溶出し, CS と KS との分離は困難であつた。なお, NAKAGAWA ら¹⁰⁾ は 0.5 M NaCl で溶出する KS ではシアル酸含量が多く, SO₄ 含量が少なく, NaCl 濃度が高くなるほど, シアル酸含量が少なく SO₄ 含量が多くなる傾向があることを報告している。結局, エタノール分別沈殿によつて分画され, 同一画分に含まれる CS と KS, HA との Dowex 1-X 2 による分離の度合は各画分のムコ多糖組成によつて異なつた。すなわち, Fr. 3 では CS と HA とはほとんど相互に分離されたが, Fr. 5 では KS の約 1/2 量が CS から分離され, Fr. 6 では CS と KS との相互の分離は困難であつた。

これらの結果を総合すると, エタノール分別沈殿法と Dowex 1-X 2 クロマトグラフィーとによつて, 鯨軟骨ムコ多糖混合物中の CS から KS, HA の大部分を分離しうると結論できる。なお, 既報¹¹⁾ で述べたように, アルカリ処理を併用すると CS と KS との分離がより容易になることから, KS の一部は CS と同一のペプチドに結合しているものと思考される。

要 約

鯨軟骨ムコ多糖混合物のエタノール分別沈殿を行ない、得られた各画分のムコ多糖組成を検討し、また各画分のコンドロイチン硫酸 (CS) とケラト硫酸 (KS)、ヒアルロン酸 (HA) との分離を試み、次の結果を得た。

1. 2 M 酢酸ナトリウムの存在で、エタノール濃度 36, 39, 44, 50, 60, 70, 80, 85% で鯨軟骨ムコ多糖混合物の分別沈殿を行ない、Frs. 1-8 を得た。

2. Frs. 1, 2 は CS-A を主成分とし、そのほか CS-C を、Fr. 3 は CS-A を主成分とし、そのほか CS-C, HA を、Frs. 4, 5 は CS-A を主成分とし、そのほか CS-C, HA, KS を、Fr. 6 は KS を主成分とし、そのほか CS-A をそれぞれ含み、Frs. 7, 8 はほとんど KS のみからなっていた。

3. Sephadex G-200 ゲルろ過において、Fr. 1 から Fr. 8 へ順次低分子の挙動を示した。アルカリ処理後の数平均分子量 (\bar{M}_n) も Fr. 1 から Fr. 7 まで順次低下した。

4. Dowex 1-X 2 イオン交換クロマトグラフィーによつて、ムコ多糖組成の異なる画分の CS と KS, HA, との分離を試みた。Fr. 3 では CS と HA とは大部分が相互に分離され、Fr. 6 では CS と KS との分離は困難であつた。

文 献

- 1) 中嶋昭正: 本誌, **38**, 148-154 (1972).
- 2) 中嶋昭正: 同誌, **38**, 621-626 (1972).
- 3) 中嶋昭正: 同誌, **38**, 1061-1066 (1972).
- 4) S. SCHILLER, G. A. SLOVER, and A. DORFMAN: *J. Biol. Chem.*, **236**, 983-987 (1961).
- 5) K. MEYER, E. A. DAVIDSON, A. LINKER, and P. HOFFMAN: *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 506-518 (1956).
- 6) N. TODA: *Nat. Sci. Rep. Ochanomizu Univ.*, **20**, 69-98 (1969).
- 7) H. NAKAGAWA and K. SATAKE: *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **17**, 75-98 (1972).
- 8) J. LUDOWIEG and J. D. BENMAMAN: *Anal. Biochem.*, **19**, 80-88 (1967).
- 9) 岩田 久: 日整会誌, **43**, 455-473 (1969).
- 10) H. NAKAGAWA and K. SATAKE: *This Bull.*, **37**, 197-202 (1971).
- 11) 中嶋昭正: 本誌, **39**, 289-293 (1973).