原

著

硬組織の含硫脂質について 第 I 報

桂 暢 彦*

東京医科歯科大学歯学部生化学教室

(昭和 38 年 2 月 21 日受付)

On the sulpholipid in hard tissues

by

Nobuhiko Katura

(Dept. of Biochemistry, School of Dentistry, Tokyo
Medical and Dental Univ.)

著者はイヌ歯胚の脂質分画 (70 % エタノール分画) 中にイオウ化合物の含まれることを見出したが、これは歯胚に限らず、軟骨および骨などの石灰化組織一般の脂質に含まれており、しかも、 ^{35}S -無機硫酸が、*in vivo* でも、*in vitro* でも代謝的にこれらの脂質分画にとりこまれることを見出した^{1) 2) 3)}。

石灰化組織における硫酸代謝を明らかにすることは、コンドロイチン硫酸などのムコ多糖類のこの組織における役割を明らかにする手がかりとなると考えられ、また、これらの組織における脂質の意義も、生化学的には殆んど未知である点からも、この現象は興味深い。

著者はまず、含硫脂質の存在を確認し、さらに、これを単離精製することを試みた。まだ完全に単離することには成功していないが、予備的な知見を幾つか得たので報告する。

実験方法

実験材料 生後 1 カ月ないし、3 カ月の雑種の仔犬を用いた。心臓穿刺またはストリキニーネ皮下注射により殺し、いずれの場合も充分脱血した。

歯胚は上下顎を頭部から外し、氷冷しつつ骨鉗子を用いて周囲の骨質を除き、歯胚を摘出した。

骨および軟骨は次のようにして得た。すなわち、長管骨 (大腿骨、脛骨、腓骨、上腕骨、橈骨および尺骨) を、その関節軟骨を傷つけないよう注意して関節から外し、氷冷しつつ付着している筋肉、骨膜、腱などを、切出し小刀および骨鉗子で丁寧に取り去り、切出し小刀で骨を長軸の方向に割つて骨髓を掻き出す。海綿骨の骨髓を充分除くことはむづかしいので、濾紙で強く圧迫して抽出し、拭き取った。しかる後、出来るだけ小片として実験に供したが、無標識の粗脂質を分離用として多量に集めるときはアセトンで第 1 回の抽出を行つて乾燥した後、乳鉢で粉碎した。この場合、粉碎機で微細な粉末にしても脂質の収量には

* 現在、愛知学院大学歯学部生化学教室より
Duke Univ. Cent. Durham, North Carolina, U.
S. A. へ留学中

あまり変りはなかった。

粗脂質の抽出 上記の材料を組織からの水分が 20～30 % 以上にならないように充分量のアセトン中に投入し、第1回の抽出を行う。次に濾過または遠心して残査をさらにソックスレーの装置を用いてアセトンで抽出するか、または 40 % メタノール・60 % クロロホルム 混液 (v/v) に浸漬して、40°C の水槽に置いて抽出した。以上の全ての抽出液を合せて 40°C 減圧下で、または 40°C N_2 ガス気流中で乾燥した後、真空ポンプで充分引いて水分を除いた。

***in vivo* の実験** 生後 1～2 カ月の仔犬に 0.25 mc の ^{35}S -無機硫酸 (Saclay 製) を 24 時間毎に 3 回、合計 0.75 mc 皮下注射し、最後の注射後 3 時間に屠殺し、実験に供した。

***in vitro* の実験** 生後 1～2 カ月の仔犬から摘出した新鮮材料を、歯胚はハサミで 3～4 片に切断し、軟骨は長管骨を割る前に、メスまたはカナで関節軟骨をスライスし、骨幹部は骨鉗子または切り出し小刀で出来るだけ小片とした。

これらの材料をガーゼの袋に入れて、フラスコ中で振盪しながら 38°C にインキュベートした。インキュベーションに用いた medium は磷酸緩衝液 (pH 7.4) であるが、それに 400 mg % のグルコースおよび約 50 μ c の ^{35}S -無機硫酸を加えた。

フラスコ内の空気に時々酸素ガスを吹き込み、嫌氣的にならないよう注意したが、詳しい条件は検討していない。窒素ガス置換下で行うと様子が異なるのでいずれ詳しく検討する予定である。

ペーパークロマトグラフ *in vivo* または *in vitro* で標識した脂質を前記のようにして取り、さらに 90 % アセトンで処理して、これに可溶の脂質を東洋濾紙 No. 51 を用い、0.2 % アンモニヤ水 : n-ブタノール : 酸酢 エチル = 200 : 175 : 25 の上層を展開液として、約 20 cm 展開した。

ラジオオートグラフ ペーパークロマトグラフを医療用 X 線フィルムに密着し、1 週間後に指定現像した。

カラムクロマトグラフ 約 200 メッシュのシリカゲルを 110°C 約 5 時間加熱してデシケーター

中で放冷したものを純クロロホルムに懸垂し、15～25×1～6 cm のカラムとした。(カラムの大きさは脂質の量による)。

溶出はクロロホルム中のメタノール濃度を 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 80 % と step-wise に上げ、フラクションコレクターにより分割採取した。溶媒の量は、あるメタノール濃度で溶出される物質が充分溶出されたと思われるまで流すことによつて決定した。

粗脂質は最初の展開液に完全に溶解しないので、ペースト状のままカラムにかけたが、後に記すように、あらかじめ、クロロホルム : 水で振盪して分画し、溶液状でカラムにかけることも行つた。

なお、クロロホルムおよびメタノールは特級試薬を用い、殊にクロロホルムは蒸溜して、パラフィンなどの不揮発成分を除いたものを用いた。

放射能の測定 薄窓の端窓型 GM 計数装置または 2π ガスフローカウンタにより放射能を検出した。試料は濾紙またはポリエチレンフィルムになるべく一様の面積にうすく塗り測定したが、ポリエチレンフィルムを用いた方が、試料の回収に都合が良い。本報では定量的扱いはせず、単に定性的な検出にとどまるので、自己吸収などに関する補正は行わなかった。

実験結果

in vivo の実験により得られた脂質のラジオオートグラフは第 1 図のごとくである。これら歯胚、軟骨、骨の 3 種の硬組織について、いずれも Rf 0.34 に放射能が認められる。

in vitro の実験により得られたものは第 2 図のごとくであつて、組織により多少異なるが、Rf 約 0.5 に放射能が認められる。骨からのものは非常に弱い。しかし、*in vivo* で見られた Rf 0.34 のスポットはどれにも認められない。

第 3 図は *in vivo* で ^{35}S -硫酸を注射した仔犬の歯胚を二部に分け、その一部をさらに、*in vitro* で ^{35}S -硫酸を含む Krebs Ringer 液中でインキュベートしたもので、Rf 0.34 および 0.52 の 2 カ

図1 *in vivo* の実験によるラジオオートグラフ

図2 *in vitro* の実験によるラジオオートグラフ

図3 ^{35}S 硫酸を, *in vivo* で仔犬に注射した後, 更に, ^{35}S 硫酸を含む Krebs' Ringer 中でインキュベートしたもの

所に放射能が認められる。同一歯胚の他の一部は 100°C 5 分間処理して同様の条件でインキュベートしたが, この場合は Rf 0.34 にのみ弱い放射能が認められたに過ぎなかつた。

なお, これらのインキュベーション時間は 1 時間で, 展開した脂質は前述 (実験方法のペーパークロマトグラフ) のように 90 % アセトン可溶部である。

次にこれらの物質を単離精製することを試みた。すなわち, 2~4 匹の仔犬の歯胚および長管

骨を、*in vitro* で3~4時間インキュベートし、これから標識された粗脂質をとり、これを、他に約30匹の仔犬から得た未標識の脂質に混入してシリカゲルカラムクロマトグラフを行った。

第4図は、標識脂質だけを用いて行つたモデル実験の例である。仔犬2匹を用い、溶出した物質全部を試料皿にとり濾紙にしませて測定したものである。

図にみられるように放射能をもつた分画が3ないし4得られる。これらの分画は必ずしもメタノール濃度だけによつて規定されるものではないが、溶出される順序は変わらないので、それぞれの分画を仮りに BL 20, BL 30 のごとく、bone lipid の頭文字と溶出溶媒のメタノール濃度の数字で表わすことにした。

なお、第4図には溶出した各分画を乾燥して、その乾燥物重量を示してあるが、メタノール5~10%位でかなり多量の物質が溶出する。これはカラムから溶出した時には溶けているが、乾燥して再び同じ溶媒で溶かそうと思つても溶けないで、淡黄白色の沈澱物として残るものを多量に含んでいる。この物質は度々カラムクロマトグラフを繰り返しても完全には除くことが出来なかつた。

このカラムクロマトグラフによる展開脂質の各ピークをとり、前記と同様のペーパークロマトグラフを行つた結果、BL 20 は Rf. 0.5 を示し、*in vitro* でのとりにこみのスポットに一致することが確認出来た。しかしその他のピークのものは試料が1回のカラムクロマトによつて分画したもので精製が不十分であつたためか幾つかの弱いスポットに分れ、それぞれが前記のラジオオートグラフとどのような関係にあるかは確認出来なかつた。

単離の目的のためには第4図と全く同様のことを規模を大きくして行えばよいのであるが、第4図の示すように大部分の脂質は極性の低い溶媒で溶出され、これは放射能を持たないこと、および5%メタノール・クロロホルムでは粗脂質がペースト状であることから、初めに取り除くことを考

図4 シリカゲルカラムクロマトグラフ（一番下の数字は展開液の組成で、クロロホルム中のメタノール濃度 (v/v) を示す）

え、粗脂質を水：クロロホルム(1:1)で振盪した後、遠心分離した。この場合3層に分れ、下層のクロロホルム層には放射能は殆んどない。中層は乳白色のクリーム状で乾燥すれば褐色油状となり、BL 20, 30 が含まれており、上層は BL 80 が含まれている。

いずれの方法をとるにせよ放射能のある部分を集めて再びシリカゲルカラムにかけ、合計3回繰り返して精製した。

BL 20 は放射能は高いが量が少く、精製は極めて困難であり、BL 50, BL 80 は量的には多いが放射能が低く明瞭なピークを得ることが困難であつたので、比較的扱いの容易な BL 30 について若干の調査を行つた。

3回のカラムクロマトグラフを行い、BL 30 として粗脂質約30gから、約30mgのチーズ様の物質を得た(30匹程の仔犬を用いた)。約70°Cで褐色になり、水と激しく振れば乳白色の懸濁液となる。非常に極性の低い有機溶媒には不溶であるが、アルコール・アセトンなどに可溶である。

この物質は紫外部に強い吸収を示し、純メタノール溶液で、吸収極大261m μ 、極小233m μ であつた。メタノール性KOHで水解した後、脂溶性

図5 BLの紫外外部吸収曲線（純エタノール中での吸収はBL 30そのまま、pH 1.5及びpH 1.2のものは水解物の水溶液である）

部分をヘキサンで抽出して、残りの水溶液について、紫外部の吸収をみると、第5図のごとく、溶

液のpHの変化に対して、吸収極大の位置は殆んど移動しなかった。この物質はオルシノール塩酸試薬により⁵⁾、美しい緑色に発色し、その吸収スペクトルはリボースのそれに一致した。

この物質の赤外スペクトルは第6図のごとくであり、イオウ含量は2%強、窒素6%強および灰分約9%であつた。なお、磷酸も検出された。

考 察

in vivo および *in vitro* の実験で得られたラジオオートグラフは、それぞれ Rf 値の異なる3つの物質に ³⁵S-硫酸がとりこまれることを示している。これら2種の物質が、実験条件に対応して、それぞれ全く独立して生ずるものであるのか、相互になんらかの関連をもつものであるかは、さらに詳しく時間的経過を追つてみなければわからないが、第4図のように長時間のインキュベーションを行ったもののカラムクロマトグラフでは、2つ以上の分画が認められるから、*in vitro* で認められた Rf 0.5の物質は代謝速度が速いため、*in vivo* ではすでに認め難く、一方、Rf 0.34の物質は代謝速度が遅いため1時間程度のインキュベーションでは少量しか生成されないが、*in vivo* では比較的良く組織内にとどまつているため検出できたのではなかろうかと思われ

図6 BL 30の赤外吸収スペクトル

る。いずれにせよ、用いた展開液では無機硫酸は原点を動かないから、 ^{35}S -硫酸がなんらかの脂溶性化合物にとりこまれることは確かである。

第4図のようにシリカゲルカラムクロマトグラフによつて、放射能をもつた分画が2つ以上認められ、BL 20がラジオオートグラフにおけるRfに相当することは先に述べた通りである。しかし、BL 30がラジオオートグラフのRf 0.34に一致するかどうかは、1回の分画では精製不充分のため、また3回カラムにかけて精製したものについては無標識の脂質によつて放射能が希釈されたため、そのRf値を確認することが出来なかつた。

元来この試料の標識だけでは *in vitro* で3~4時間のインキュベーションしか行っていないので、Rf 0.34物質への ^{35}S のincorporationは僅かであろうと思われる。それ故、このような関係を明かにするためには *in vivo* での標識づけや、インキュベーションの時間なども考え、代謝的な経過を充分考慮して行う必要があるだろうと思う。

ともかく、BL 30の純度にはなお問題はあるが、3回のカラム処理で精製した標品について予備的に調査した結果は次のごときものであるらしく思われる。

赤外線スペクトルから

1. イオウ原子は硫酸エステルの形であるらしい。(1200~1300 cm^{-1})
2. CHに富んでいることは、この物質が脂溶性であることをうらずけている。(2800~3000 cm^{-1})
3. スペクトルの全体観は糖を含むことを思わせる。
4. 脂肪酸のエステルではないらしい。

さらに、オルシノール塩酸試薬により緑色に発色し、かなりの窒素を含むこと、および紫外部の強い吸収などから、ヌクレオチドを含むことを思わせる。紫外部の吸収はアデノシンまたはウリジンに似ており、溶媒のpHによつてスペクトルの形があまり変らないことは、ウリジンを思わせ

る。しかし、この点に関しては決定的証明はない。

結局、このBL 30はある種のリボヌクレオチドと炭化水素の複合体に、硫酸基がエステル結合したものではなからうかと思われる。

この物質の生理的意義については全く不明であるが、コンドロイチン硫酸などの代謝に係る硫酸代謝の中間体ではなからうかと想像している。

総 括

^{35}S -無機硫酸が発育しつつある仔犬の骨、軟骨、歯胚などの硬組織にいくつかの脂溶性化合物としてとりこまれることを示した。

1. 生後1~2カ月の仔犬に0.25 mcの ^{35}S -硫酸を24時間に3回(合計0.75 mc)皮下注射し、最終注射後3時間で屠殺し、骨、軟骨、歯胚から含水アセトン(20%位)およびアセトン(あるいはクロロホルム・メタノール)で抽出して得た試料(粗脂質)を90%アセトンに溶かしてペーパークロマトグラフィーを行つた。そのラジオオートグラフィーでRf 0.34にスポットを認めた。

2. 同じく仔犬の歯胚、軟骨、骨などの切片を、 ^{35}S -硫酸を含む燐酸緩衝液に1時間インキュベートし、これらのものから得た粗脂質を90%アセトンに溶かして上記と同様に、ペーパークロマトグラフィーを行うとRf 0.5にラジオオートグラフィーでスポットを認めた。

3. *in vivo* に ^{35}S -硫酸を与え、さらに ^{35}S -硫酸を含む液にインキュベートした仔犬歯胚からの粗脂質は、上記のペーパークロマトグラフィーでRf 0.34と0.5の2つのスポットを示す。この際 *in vitro* のインキュベーション前に組織を100°C 5分間処理すると、Rf 0.5のスポットは認められない。

4. 仔犬の歯胚、骨、軟骨の切片を ^{35}S -硫酸を含む液で3~4時間インキュベートし、これから得た粗脂質をシリカゲルカラムクロマトで分画した。展開にはメタノール濃度を順次高めたクロロホルムメタノールを用いた。それにより ^{35}S -の放

射能をふくむ3~4コの分画を得た。

5. 上記分画中, 比較的放射能が高く, 多量に得られる分画 (BL 30, 30%メタノールで溶出する) について同様のカラムクロマト処理を3回繰り返し精製し, 約30匹の仔犬から30mg位の試料を得た。

この物質は外観はチーズ様で, 約70°Cで褐色に変わり, 水に乳濁, アルコールまたはアセトンには可溶であるが, 極性の低い有機溶媒には溶けない。

エタノール溶液中261 m μ に吸収極大を示し, これをメタノール KOH で水解したアルカリ性水溶液においてもその吸収極大部は殆んど変っていない。またこのものはオルシノール塩酸試薬で緑色に発色し, その吸収スペクトルはリボースのそれと一致する。赤外吸収スペクトルからみると

この中のSは硫酸エステルらしい。この物質のS含量は約2%, Nは約6%, 灰分は約9%で, 燐酸も検出される。

荒谷真平教授の討論, 激励と文部省科学研究費の援助を与えられたことを深謝する。

文 献

- 1) 桂・清水: 硬組織の含硫脂質について, [I], 第32回日本生化学会口演.
- 2) 荒谷・桂・丸山: 硬組織の含硫脂質について, [II], 第33回日本生化学会口演.
- 3) 荒谷・桂・丸山: 硬組織の含硫脂質について, [III], 第34回日本生化学会口演.
- 4) Dische, Z. The nucleic acids (Edited by E. Chargaff and J. D. Davidson) Vol. 1, New York Academic Press, p. 1.
- 5) Ceritoti, G., Determination of nucleic acids in animal tissues, J. Biol. Chem., 214, 59, 1955.