サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの 金属結合能

工藤重光[§], 伊藤聖子, 内山大史,
加藤陽治*, 高垣啓一**

弘前大学地域共同研究センター

* 弘前大学教育学部食物学研究室

** 弘前大学医学部生化学第一講座

Metal Binding Ability of Salmon Nasal Cartilage Proteoglycan

Shigemitsu Kudo[§], Seiko Ito, Daishi Uchiyama,
Yoji Kato* and Keiichi Takagaki**

Center for Joint Research, Hirosaki University,
3 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036-8561

* Laboratory of Food Science, Faculty of
Education, Hirosaki University, 1 Bunkyo-cho,
Hirosaki, Aomori 036-8560

** First Department of Biochemistry, Hirosaki
University School of Medicine, 5 Zaifu-cho,
Hirosaki, Aomori 036-8562

The metal binding ability of proteoglycan (PG) extracted from salmon nasal cartilage was investigated for various metals using a dialysis method. It was suggested that PG could increase the solubility of insoluble FePO_4 and have stronger interactions with Fe^{3+} than xyloglucan and pectin. Although Fe^{3+} formed an insoluble complex with PG at pH 5.5 and 7.4, Fe^{2+} did not bind with PG. Pb^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} also did not bind with PG. The amounts of Mg^{2+} , Ca^{2+} and Fe^{3+} binding with PG per mole of glucuronic acid in PG were 0.13, 0.08 and 1.22 moles, respectively. (Received Dec. 28, 2006; Accepted Feb. 19, 2007)

Keywords: salmon, proteoglycan, metal binding ability

キーワード: サケ, プロテオグリカン, 金属結合能

プロテオグリカン (PG) は, 分子量数万から数十万のコアタンパク質と呼ばれる 1 本のタンパク質に糖鎖グリコサミノグリカン (GAG) が数本から数十本結合した生体高分子であり, 動物組織における細胞外マトリックスの重要な構成成分である。従来, PG は, ウシやクジラの軟骨を原料として, クロロホルム, メタノール, グアニジン塩酸塩などの有毒性試薬類を使用し複雑な工程を経て精製していたため, 非常に高価であり, 主として実験用試薬としてのみ使用されていた。最近, 高垣ら¹⁾ は, サケ鼻軟骨を原料に

し, 食酢およびエタノールだけを使用した単純な工程で安価で大量に PG を精製する方法を確立した。そのため, サケ由来 PG の医療品, 化粧品および食品分野での応用の可能性がでてきた。

サケ鼻軟骨由来 PG の GAG は, ほとんどがコンドロイチン硫酸であり, コンドロイチン-4 硫酸よりもコンドロイチン-6 硫酸を多く含んでいる¹⁾。サケ由来コンドロイチン硫酸の機能性として, グルコースの腸管吸収阻害²⁾ およびすい臓リパーゼ活性阻害³⁾ が報告されている。また, サケ鼻軟骨から調製したコンドロイチン硫酸がアルカリ金属と親和性を有しないが, アルカリ土類金属と親和性を有することが報告されている⁴⁾。最近, サケ由来 PG がその構成糖鎖であるコンドロイチン硫酸よりも炎症応答の抑制効果が優れていることが報告された⁵⁾。このことは, 巨大分子である PG が, その構成糖鎖とは異なる機能性を発揮する可能性を示唆している。我々は, PG の種々の機能性を探るための一連の研究をコンドロイチン硫酸と比較しながら行っている⁵⁾⁶⁾。PG を医薬品, 化粧品および食品分野へ応用するために, PG の基本的諸性質を明らかにすることは重要である。本研究は, 動物性多糖である PG と種々の金属 (Fe, Ca, Mg, Zn, Pb, Cd) との結合能を調べることで, ミネラル吸収促進あるいは重金属吸収阻害を目的とする機能性食品成分としての可能性を探るために行った。

1. 実験方法

(1) 供試材料

サケ鼻軟骨由来プロテオグリカン (PG) は, 株式会社角弘 (青森市第二問屋町 3 丁目 10 番 10 号) から購入して使用した。この PG は, 高垣らの方法¹⁾ で製造されたものであり, 添付検査表によると, 水分 7.1%, タンパク質 3.6%, ウロン酸 30.0% である。また, この PG は, ヘキサミンを 1.00 としたモル比で, ウロン酸および硫酸をそれぞれ 0.99 および 0.67 含んでいる。コアタンパク質含量は, 6.99% (w/w) である。GAG のほとんどがコンドロイチン硫酸であり, コンドロイチン 4 硫酸 (25.1%) よりもコンドロイチン 6 硫酸 (59.4%) を多く含んでいる。中性多糖であるキシログルカン (XG) は, 大日本住友製薬製グリロイドを使用した。酸性多糖であるペクチン (PS) は, リンゴ搾汁残渣から当研究室で部分精製したものを使用した。

(2) 各種金属の測定法

Ca および Mg は, o-クレゾールフタレンコンプレキソン法 (カルシウム C-テストワコー) およびキシリジルブルー法 (マグネシウム B-テストワコー) により, それぞれ和光純薬工業株式会社製キットを使用して測定した。Fe は, O-フェナントロリン法により測定した。

Cd, Zn および Pb は, 4-(2-ピリジルアゾ)-レゾルシン (PAR) 発色法により測定した。すなわち, 0~20 μM 濃度の金属を含む 0.5 ml の試料に 0.2 ml の発色液 (42 mg の PAR (同仁化学研究所) を 1 L の 3 M 水酸化アンモニウム/1

〒036-8561 青森県弘前市文京町 3 番地

* 〒036-8560 青森県弘前市文京町 1 番地

** 〒036-8562 青森県弘前市在府町 5 番地

[§] 連絡先 (Corresponding author), shige-k@cc.hirosaki-u.ac.jp

M 酢酸溶液に溶解) を添加後, 420 nm における吸光度を測定した. Cd, Zn および Pb のそれぞれに関して標準曲線を作成した.

(3) FePO_4 の可溶化に及ぼす PG および植物性多糖の影響

20 mg の PG, PS または XG を 4 ml の酢酸緩衝液 (1 M, pH 5.5) に溶解し, 10 mg の FePO_4 を加えソニックバスで 30, 60, 120, 180 および 240 分間反応させた. 遠心分離後, 上清を一部とり, O-フェナントロリン法を用いて上清に溶解した Fe を定量した. さらに, 上清に 4 倍量のメタノールを加えて遠心分離後, 上清中の Fe を定量した.

また, 20 mg の PG, PS または XG に 10 ml の FeCl_3 水溶液 (1 mg/ml) を加え, この溶液を蒸留水 (100 ml) に対して透析し, 15, 30, 45, 60, 90, 120 および 240 分後の透析外液の Fe を定量した.

(4) 各種金属との相互作用

1) Fe^{3+} とリン酸による不溶性塩形成に及ぼす PG の影響

0.5 ml の PG 水溶液 (0, 0.25, 0.5 または 1 mg/ml) に 0.5 ml の FeCl_3 水溶液 (10 mM) を添加・混合後, 1.0 ml のリン酸-塩酸緩衝液 (20 mM, pH 2.0) またはリン酸緩衝液 (20 mM, pH 5.5 もしくは pH 7.4) を添加した. このとき, 対照として, 1.0 ml の酢酸-塩酸緩衝液 (20 mM, pH 2.0), 酢酸緩衝液 (20 mM, pH 5.5), または, Tris-塩酸緩衝液 (20 mM, pH 7.4) を使用した. 37°C で 2 時間インキュベート後, 2000g で 30 分間遠心分離した. 上清中の Fe およびグルクロン酸量を測定した. グルクロン酸は, カルバゾール-硫酸法により定量した.

2) ゲルろ過による PG の重金属等の結合量の測定

0.2 M NaCl を含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に PG を溶解して, 1 mg/ml 濃度の PG 溶液を調製した. この溶液を 0.25 ml とり, これに 0.25 ml の金属溶液 (20 mM の CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 , PbCl_2 または FeCl_3 水溶液) を添加・混合後, 10 分間放置した. この混合液の全量 (約 0.5 ml) を Sepharose CL-2B カラム ($\phi 1 \times 40$ cm, 0.2 M NaCl を含む 20 mM 酢酸緩衝液 pH 5.5) に供しゲルろ過を行った. ゲルろ過後の各フラクション (約 1 ml) における各金属およびグルクロン酸を定量した.

3) 透析による PG の金属結合量の測定

0.5 ml の PG 溶液 (2 mg/ml) に 0.5 ml の金属水溶液 (CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 , PbCl_2 , FeCl_3) を添加・混合した. このときの金属溶液の濃度は, 溶解度の低い PbCl_2 の濃度を 20 mM とし, そのほかの金属溶液の濃度を 200 mM とした. 24 時間放置後, 蒸留水に対して 7 日間透析した. 透析中は, 一日 2 回蒸留水を交換した. 透析膜内液の各金属およびグルクロン酸を定量した.

2. 実験結果および考察

(1) FePO_4 の可溶化に及ぼす PG および植物性多糖の影響

図 1 FePO_4 の可溶化に及ぼすプロテオグリカンおよび植物性多糖の影響

図 2 Fe^{3+} の透析膜透過性に及ぼすプロテオグリカンおよび植物性多糖の影響

合後, 所定の時間放置し, 遠心分離後の上清中の Fe^{3+} を測定した. その結果 (図 1), いずれの多糖を使用しても上清中に Fe^{3+} が検出された. 上清液にメタノールを添加することにより多糖類を沈殿させ, 再度遠心分離した. その上清中には Fe^{3+} が検出されず, 沈殿画分だけに Fe^{3+} が検出された. このことは, 多糖類 (PG, PS または XG) が Fe^{3+} と結合して, 不溶性の FePO_4 を可溶化したことを示している.

次に, PG, PS または XG と FeCl_3 を混合後, 蒸留水に対して透析し, 透析外液中の鉄を経時的に測定した. 透析中に, PG および PS では凝集物が観察されたが, XG では凝集物が観察されなかった. PG は, Fe^{3+} が透析膜を透過するのを PS および XG よりも抑制した (図 2). 従って, PG が PS および XG よりも Fe^{3+} と強く相互作用すると考えられた.

図 3 Fe^{3+} -リン酸不溶性塩形成に及ぼすプロテオグリカンの影響

(2) Fe^{3+} とリン酸による不溶性塩形成に及ぼす PG の影響

Fe^{3+} は、リン酸と結合して不溶性の塩 (FePO_4) を形成する。このとき PG が不溶性塩の形成を阻害するかを調べた結果を図 3 に示した。

リン酸緩衝液 pH 2.0 (図 3a)) および 5.5 (図 3b)) では、白色の FePO_4 塩が形成し、 Fe^{3+} がほぼ沈殿したことから、PG の沈殿抑制効果が見られなかった。リン酸緩衝液 pH 7.4 (図 3c)) でも、白色の FePO_4 塩の形成が見られたが、PG の添加量に関係なく Fe^{3+} 濃度がほぼ一定であった。

酢酸緩衝液 pH 5.5 (図 3b)) および Tris 緩衝液 pH 7.4 (図 3c)) では、赤色の浮遊物が観察され、PG の添加量の増加に伴い、上清中の鉄の減少が見られた。そこで、PG 濃度 0.25 mg/ml における遠心分離後の上清について、グルクロン酸量を測定して PG 残存量を算出した。その結果 (図 4), 酢酸緩衝液 pH 5.5 および Tris 緩衝液 pH 7.4 において、上清中のグルクロン酸量が著しく低下していること

図 4 プロテオグリカンの溶解性に及ぼす Fe^{3+} の影響

P=リン酸緩衝液, A=酢酸緩衝液, T=Tris 緩衝液

図 5 ゲルろ過によるプロテオグリカンの各種金属結合量の測定

から、PG と Fe^{3+} が結合して、沈殿していることがわかった。この現象が Fe^{3+} に特有であるかを調べるために、モル塩 $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を使用して Fe^{2+} に関しても同様の実験を行った結果、 Fe^{2+} は、いずれの pH においても PG を沈殿しなかった。このことから、pH 5.5 および 7.4 で、 Fe^{3+} が PG と強く結合することが示唆された。

(3) ゲルろ過法による PG の金属結合量の測定

Sepharose CL-2B カラムを用いたゲルろ過により、PG の各種金属結合量を測定した。Ca と PG 溶液を混合後、ゲルろ過を行った結果を図 5 に示した。 Fe^{3+} を除く他の金属でも同様の溶出パターンを示した。PG の溶出ピークにおけるグルクロン酸と金属のモル比を表 1 に示している。

Ca, Zn, Mg, Pb および Cd は、PG 中のグルクロン酸 1 モルに対して、それぞれほぼ 0.07, 0.03, 0.00, 0.04 および 0.08 モルが結合し、非常に少ない量であった。サケ由来コンドロイチン硫酸は、グルクロン酸 1 モルあたり 0.699 モルの Ca^{2+} を保持することが報告されている⁴⁾。また、アル

表 1 プロテオグリカンの金属結合量 (ゲルろ過法)

金属種	金属/グルクロン酸モル比
Ca ²⁺	0.07
Fe ³⁺	—
Zn ²⁺	0.03
Mg ²⁺	0.00
Pb ²⁺	0.04
Cd ²⁺	0.08

Fe³⁺ は、ゲルに吸着したため測定不能

表 2 プロテオグリカンの金属結合量 (透析法)

金属種	金属/グルクロン酸モル比
Ca ²⁺	0.08
Fe ³⁺	1.22
Zn ²⁺	0.00
Mg ²⁺	0.13
Pb ²⁺	0.00
Cd ²⁺	0.00

カリ土類金属とサケ由来コンドロイチン硫酸が親和性を有することが¹H-NMRにより確認されている⁴⁾。PGを用いた我々の結果は、コンドロイチン硫酸の結果と異なるものであった。コンドロイチン硫酸は一本鎖として存在しているのに対して、PGは、コアタンパク質に多数のコンドロイチン硫酸鎖が結合した構造をしており、コンドロイチン硫酸鎖どうしが近い位置に存在する。このような構造上の違いが、金属結合能に影響するものと考えられた。

Fe³⁺は、PG溶液と混合直後には褐色の透明液であったことからゲルろ過実験に供給したが、カラム中のゲル上部に吸着されることが肉眼的に観察された。溶出後の各フラクションにFe³⁺およびグルクロン酸は、検出されなかった。この結果は、図3および図4の結果と同様に、Fe³⁺がPGと強く結合し、PGを凝集・不溶化することを示唆した。

(4) 透析によるPGの金属結合量の測定

透析後の内液について、金属およびグルクロン酸を定量し、金属/グルクロン酸モル比を算出した結果を表2に示した。Pb²⁺、Zn²⁺およびCd²⁺は、ほぼ0でありPGと結合しなかった。

Mg²⁺およびCa²⁺は、PG中のグルクロン酸1モルに対して、それぞれ0.13および0.08モルが結合し、非常に少ない量であった。

Fe³⁺は、赤褐色の透析内液中に赤褐色の凝集体の形成が観察されたが、よく分散後にそのまま分析に供した。Fe³⁺は、グルクロン酸1モルあたり1.22モルが結合した。

3. 要 約

サケ鼻軟骨由来PGと各種金属との結合に関して検討を行い以下の結果を得た。

(1) PGは、不溶性FePO₄のFe³⁺と結合し、可溶化する可能性が示唆された。

(2) PGは、同一質量濃度でXGおよびPSよりもFe³⁺

に対してより強い親和性を示した。

(3) Fe³⁺は、PGと結合して不溶性複合体を形成したが、Fe²⁺は、PGと結合しなかった。

(4) PGと二価陽イオン(Mg²⁺、Cd²⁺、Pb²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺)は結合しないか、または、弱い結合であった。

本研究は、文部科学省都市エリア産学官連携促進事業(弘前エリア)により行ったものである。

文 献

- 1) 株式会社角弘、高垣啓一、軟骨型プロテオグリカンの精製方法、特許第3731150号(2005.10.21)。
- 2) 武田忠明、真嶋光雄、奥田拓道、サケ鼻軟骨由来コンドロイチン硫酸のグルコース腸管吸収に及ぼす影響、*栄食誌*, **51**, 213-217 (1998)。
- 3) Han, L.K., Sumiyoshi, M., Takeda, T., Chihara, H., Nishikiori, T., Tsujita, T., Kimura, Y. and Okuda, H., Inhibitory effects of chondroitin sulfate prepared from salmon nasal cartilage on fat storage in mice fed a high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, **24**, 1131-1138 (2000)。
- 4) 内沢秀光、高谷芳明、奈良岡哲志、市田淳治、松江 一、地域未利用資源の有効利用—海洋生物由来高機能性複合糖質の開発—、青森県産業技術開発センター キープロジェクト研究報告書, Vol. 3, pp. 43-84 (1996)。
- 5) Sashinami, H., Takagaki, K. and Nakane, A., Salmon cartilage proteoglycan modulates cytokine responses to *Escherichia coli* in mouse macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 1005-1010 (2006)。
- 6) Majima, M., Takagaki, K., Sudo, S., Yoshihara, S., Kudo, Y. and Yamagishi, S., Effect of Proteoglycan on Experimental Colitis, in *New Developments in Glycomedicine*, in: M. Endo, S. Harata, Y. Saito, A. Munakata, M. Sasaki, S. Tsuchida (Eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, the Netherlands, pp. 221-224 (2001)。

(平成18年12月28日受付, 平成19年2月19日受理)