アコヤガイ及びイケチヨウガイの生化学的研究—Ⅱ.

アコヤガイとイケチヨウガイの各組織より

Sulfomucopolysaccharides の分離

堀 口 吉 重

(三重県立大学水産学部)

Biochemical Studies on *Pteria (Pinctada) martensii* (DUNKER) and
Hyriopsis schlegelii (V. MARTENS)—Ⅱ.Separation of Crude Sulfomucopolysaccharides from Various Tissues of
Pteria (Pinctada) martensii (DUNKER) and *Hyriopsis schlegelii* (V. MARTENS).

Yoshishige HORIGUCHI

In order to establish whether sulfomucopolysaccharide and sulfatase participate in the formation of the pearl and shell, the amount of crude sulfomucopolysaccharides in various organs of *Pteria (Pinctada) martensii* (DUNKER) and of *Hyriopsis schlegelii* (V. MARTENS) was measured by the method of MEYER, and the chemical composition of them was investigated. The amounts of crude sulfomuco-polysaccharides were about 36 per cent in dried matter of mantle mucilage, 8.7 per cent in adductor muscle, and less than 3 per cent in other organs of *Pteria (Pinctada) martensii* (DUNKER), and 13.6 per cent in mantle, 12.5 per cent in viscera etc., and less than 1 per cent in gill of *Hyriopsis schlegelii* (V. MARTENS), respectively. Crude sulfomucopolysaccharide of *Pteria (Pinctada) martensii* (DUNKER) contains nitrogen, hexosamine, reducing sugar, sulfate and calcium, while that of *Hyriopsis schlegelii* (V. MARTENS) contains reducing sugar, sulfate, calcium and traces of nitrogen and hexosamine. From the fact that plenty of sulfomucopolysaccharide was found specially in mucilage of the mantle, the secretory organ for the shell matter, it may be considered more probable than before that sulfomucopolysaccharide participates in the formation of the shell and the pearl.

I. 緒 言

動物硬組織の石灰化の機構については、主に脊椎動物を対象とした多くの業績が報告されている。脊椎動物の骨格と、貝殻とでは、前者が主に磷酸石灰よりなるのに対し、後者は主として炭酸石灰よりなる違いがあり、骨化と貝殻形成がすべて同様機構で行われるとは考えられないが、貝殻形成機構を究明するのに際して骨化機構の知見は極めて役立つものと思われる。骨化機構に対しては、McLEAN¹⁾は非石灰化組織と石灰化組織を区別出来る因子を骨格形成の“局所因子”としたが、ARMSTRONG²⁾はこの局所因子は恐らく acid mucopolysaccharides 特に chondroitin sulfuric acid を有するであろうと言っている。又 SOBEL³⁾によれば in vitro における軟骨の骨化は chondroitin sulfuric acid の作用に基くものと考えられている。一方、貝類において左右田、江上⁴⁾はボウシュウボラ粘液より charonin sulfate と言う sulfomucopolysaccharide を分離し、又ボウシュウボラ、アワビ、マイマイ等に強力な sulfatase 作用⁵⁾を認めており、Ca に対する硫酸エステルの特性よりこれらの物質が貝殻形成に一要因として関係するものと推定している。一方田中、波多野⁶⁾はアコヤガイの外套膜粘液に酸性蛋白、又は誘導蛋白が存在し、これらが Ca と結合する性質より介殻形成に利用される可能性を予想した。

著者等⁷⁾は sulfomucopolysaccharides 及び sulfatase の反応系が貝殻の形成に関与すると言う左右田の推測を確める目的で、先にアコヤガイ各器官の sulfatase 作用力を比較し外套膜、肝臓等が強力であることを報告した。

今回はその基質である sulfomucopolysaccharides の分離を試みた。Sulfomucopolysaccharides は一般に蛋白質、炭水化物等と結合して存在するので、その分離抽出は定量的に行い難く、抽出中一部は変性、分解が生ずる。抽出には中性塩溶液、アルカリ液を用いる方法もあるが、本実験では比較的分解が少く、抽出率の良好と思われる MEYER 法⁸⁾に従いペプシン、トリプシンにより組織を出来るだけ水溶化した後、醋酸性、アルコール沈澱等により粗製の sulfomucopolysaccharides を分離した。その結果、アコヤガイでは外套膜、特にその粘液と閉殻筋に、イケチョウガイでは外套膜と、足を含む内臓に多量の粗 sulfomucopolysaccharides が存在することを認めた。

II. 実験の部

i) 試料貝

A. アコヤガイ *Pteria (Pinctada) martensii* (DUNKER)……1956年3月29日三重県英虞湾産の3~4年生アコヤガイ約50個を用い、閉殻筋、鰓、外套膜粘液、外套膜残渣、内臓等に分割した。外套膜は1個宛ピンセットを用いて出来るだけ粘液を分離した。

B. イケチョウガイ *Hyriopsis schlegelii* (V. MARTENS)……滋賀県琵琶湖産イケチョウガイを約7カ月間本学部内の溜池に飼育し、1956年3月18日3年貝10個につき鰓、外套膜、足を含む内臓に分割した。

ii) Sulfomucopolysaccharides の抽出分離法

MEYER⁸⁾がウシ角膜より分離した方法を応用した。

即ち各器官の新鮮物30gに150ccの水を加え5分間ホモジナイザーにかけ、トルオールを添加する。8N HCl で pH 1.5 とし、ペプシン 0.5g 宛を加え、37°C に保ち時々 pH を 1.5 に補正し、72 時間おく。次に 6N NaOH で中和しトリプシンを 0.7g 宛添加し 37°C で 24 時間おく。消化液は濾紙で濾過して不溶物を除き、固体の醋酸カルシウムを 1l 当り 25g を加え、氷醋酸を 0.25N 迄加える。次にエタノール 1.2 容を加え、24 時間 4°C に放置後遠心する。沈澱は 80% エタノールで洗い、100cc 5% の醋酸ソーダ、0.5N 醋酸混液にとかし、クロロホルム、アミルアルコール混液を加え攪拌する。遠心して水層をとり、1.5 容のエタノールを加える。沈澱を遠心してエタノールで洗い、0.5N 醋酸を含む 5% 醋酸カルシウム 100cc に溶かす。1.2 容のエタノールを加え 4°C で 24 時間放置後遠心し、沈澱はエタノールで洗い減圧乾燥して白色~灰白色の粉末を得た。

iii) Sulfomucopolysaccharides の各構成々分の分析

窒素……マイクロケルダール法。

還元糖……加水分解条件は 5% H_2SO_4 で 100°C、1 時間が適当である。水解後 $Ba(OH)_2$ で中和して $BaSO_4$ を除き、上澄液について SCHAFER, SOMOGYI 法⁹⁾により定量した。

Hexosamine……5% H_2SO_4 で加水分解し還元糖を測定した試料の一部をとり、ELSON, MORGAN 法¹⁰⁾を改良した SCHLOSS 法¹¹⁾に従いアセチルアセトン試薬とエールリッヒ試薬により発色させ、エルマ光電比色計を用い、530m μ で比色した。標準曲線は再結した glucosamine HCl と N.B.C. 社製 galactosamine HCl を用いて作製した。

Sulfate……2N HCl で 2 時間加水分解した後、ALICINO 法¹²⁾を応用した MEYER *et al* 法¹³⁾により定量した。即ち加水分解物は真空乾燥した後、水に溶かし 95% エタノールを加え、フェノールフタレイン中和後、ロジソン酸加里を指示薬として 0.02M $BaCl_2$ で滴定した。別に酸加水分解物を NH_4OH で中和し沈澱物を濾別した後、弱酸性下に $BaCl_2$ を加えて $BaSO_4$ として沈澱させ、重量法により定量した。

Ca……柳沢法¹⁴⁾に従い 1-hydroxy-4-chloro-2,2-diazobenzen-1,8-dihydroxynaphthalene-3,6-disulfonic acid disodium salt を用いて発色させ、エルマ光電比色計により 620m μ で比色した。

Ⅲ. 実験結果と考察

アコヤガイとイケチョウガイの各器官より分離した粗製の sulfomucopolysaccharides の量とその組成を Table 1 及び Table 2 に表示した。アコヤガイでは外套膜の粘液より乾物当り約 37%, 閉殻筋より 8.7%

Table 1. Amount and chemical composition of crude sulfomucopolysaccharides found in various organs of *Pteria (Pinctada) martensii* (DUNKER)

Organ	Crude matter		Composition (%)					
	mg./fresh matter 1g.	mg./dry matter 1g.	N	Crude protein	Hexosa-mine	Reducing sugar	Sulfate-Sulfur	Ca
Adductor muscle	17.40	87.00	0.48	3.00	trace	55.50	0.48	6.00
Mantle-mucilage	19.30	371.15	6.89	43.08	4.35	39.00	1.76	2.30
Mantle-residue	4.04	31.36	5.21	31.99	2.91	34.40	0.48	1.90
Gill	1.50	21.90	2.40	15.01	3.24	37.60	0.91	2.20
Other organs	3.07	14.90	1.98	12.40	2.70	28.80	2.70	3.75

Table 2. Amount and chemical composition of crude sulfomucopolysaccharides found in various organs of *Hyriopsis schlegelii* (V. MARTENS)

Organ	Crude matter		Composition (%)					
	mg./fresh matter 1g.	mg./dry matter 1g.	N	Crude protein	Hexosa-mine	Reducing sugar	Sulfate-Sulfur	Ca
Mantle	6.80	136.00	0.43	2.61	trace	59.90	1.12	1.10
Viscera, Foot	18.55	125.34	0.64	3.92	trace	73.70	1.28	1.10
Gill	0.05	0.42	—	—	—	—	—	—

を分離したが、その他の器官には比較的少い。イケチョウガイでは外套膜より 13.6%, 足及び内臓より 12.5% を分離したが鰓には極めて少い。一般に、抽出された粗製の sulfomucopolysaccharides は数種類の混合物よりなることがあり、又夾雑物として蛋白、グリコーゲン等を含むので、正確に含量を比較するにはその組成を明らかにすると共に、不純物量を差引いて考慮する必要がある。

LEVENE¹⁵⁾ によれば chondroitin sulfuric acid は d-glucuronic acid, d galactosamine, acetyl, sulfate の等モルよりなる。従つてこれら各構成成分の検出と定量により、chondroitin sulfuric acid の存在が確認され、その含量が推定される。分析結果よりアコヤガイは各器官共窒素、還元糖、hexosamine, sulfate, Ca を含み glucuronic acid, acetyl は未確認であるが、chondroitin sulfuric acid の存在が推定される。又本物質は外套膜粘液の他、閉殻筋、内臓表面の粘質物中にも比較的多く含まれ、粘質物を除去した残渣中には少い。

アコヤガイ外套膜の粘液の主成分を chondroitin sulfuric acid と仮定し hexosamine 含量より計算すれば乾物当り約 5% の純 chondroitin sulfuric acid を分離したことになる。これを他の動物軟骨中の chondroitin sulfuric acid 含量と比較するのに、WINTER¹⁶⁾ はブタ鼻隔膜中 41%, 宮崎¹⁷⁾ はウシ、ウマ、ブタの気隔膜より 36~39%, MEYER & SMITH¹³⁾ は種類不明の乾燥軟骨より 25%, EINBINDER & SCHUBERT¹⁹⁾ は鼻管軟骨、ウシの気管軟骨より 13%, ウシの鼻隔膜より 19~23%, SHETLAR & MASTERS²⁰⁾ は人の肋骨より 3.2~19.1%, 左田田, 江上, 堀米²¹⁾ はサメ軟骨より 20% を分離しており、アコヤガイ粘液では軟骨に比してその含量は少い。然し抽出率を考慮すれば 5% 以上の含量である。イケチョウガイでは各器官共窒素と hexosamine が極めて少く chondroitin sulfuric acid は殆んど含まれず、polysaccharide と sulfate を主成分とする。外套膜は貝殻物質の主要分泌器官とされているので、外套膜と貝殻間に介在する粘液に多量含まれる sulfomucopolysaccharides は前記⁵⁾ の推定の如く貝殻の形成に関係する可能性がより一層増大した。然しアコヤガイとイケチョウガイの sulfomucopolysaccharides の構成成分には明瞭な差異があり、前者は hexosamine を含むが後者には殆ど存在しない。一方、両貝の共通点は加水分解により多量の還元を生ずることと sulfate を有することであり、Ca の代謝に sulfate が関係する可能性が強い。

IV. 要 約

1. 貝殻形成に関係する一因子として推定されている sulfomucopolysaccharides を MEYER 法に従ってアコヤガイとイケチョウガイの各器官より分離した。

2. アコヤガイでは外套膜粘液より乾物に対し約 37%, その他器官では 10% 以下, イケチョウガイでは外套膜より 13.6%, 足及び内臓より 12.5% の粗製 sulfomucopolysaccharides を得た。

3. アコヤガイとイケチョウガイの sulfomucopolysaccharides ではその構成々分上明瞭な差異があり, アコヤガイでは窒素, 還元糖, hexosamine, sulfate, Ca を含むが, イケチョウガイでは窒素, hexosamine が殆どなく, 還元糖, sulfate, Ca よりなる。

終りに, 本研究に種々御指導を賜った三宅正人教授に対し謹んで感謝の意を表する。又東京大学農学部橋本芳郎助教授より galactosamine HCl を, 滋賀県漁業協同組合連合会よりイケチョウガイの提供を賜った。併せて深謝の意を表する。

追記: 1956 年 8 月 25 日開催された第一回日本アイソトープ会議(東京)の論文抄録集によれば, 田中正三, 波多野博行氏(京都大学理学部)はアコヤガイ粘液中のアセトン沈澱非透析性可溶区分の Ca^{45} 比放射能が特に大きく, その成分は硫酸を含んだ酸性の強い糖蛋白であることを認め, アコヤガイの介殻形成における糖蛋白の重要性を指摘された。詳細は「第一回日本アイソトープ会議論文集」として刊行される予定であり参照され度い。

文 献

- 1) McLEAN: *Ann. Rev. Physiol.*, **5**, 79 (1943).
- 2) ARMSTRONG: "A Symposium on Phosphorus Metabolism," Baltimore, WILLIAM & BENTLEY II, (1952) pp. 698.*
- * 佐々木哲丸: "物質代謝" (1), 医歯薬出版, 東京, (1955), pp. 650 より引用
- 3) A. E. SOBEL, A. HANOK: *J. Biol. Chem.*, **199**, 669 (1952).
- 4) T. SODA, F. EGAMI: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **13**, 652 (1938).
- 5) 左右田徳郎: 化学の研究, **1**, 49 (1948).
- 6) 田中正三, 波多野博行: 日化, **74**, 8 (1953).
- 7) 堀口吉重, 三宅正人: 日水誌, **19**, 957 (1954).
- 8) K. MEYER, A. LINKER, E. A. DAVIDSON, D. WEISSMANN: *J. Biol. Chem.*, **205**, 611 (1953).
- 9) 江上不二夫: "多糖類化学," 共立出版社, 東京, (1955), pp. 54.
- 10) L. A. ELSON, W. T. J. MORGAN: *Biochem. J.*, **27**, 1824 (1933).
- 11) B. SCHLOSS: Thesis, New York University (1948).*
- * J. EINBINDER, M. SCHUBERT: *J. Biol. Chem.*, **185**, 725 (1950). より引用
- 12) J. F. ALICINO: *Anal. Chem.*, **20**, 85 (1948).
- 13) K. MEYER, M. M. RAPPORT: *Arch. Biochem.*, **27**, 287 (1950).
- 14) 柳沢 文正: "カルシウム及びマグネシウム新定量法と代謝," 光文堂, 東京, (1955), pp. 5-8.
- 15) D. A. LEVENE: "Hexosamines and Mucoproteins," (1922).*
- * 9) の pp. 314 より引用
- 16) W. WINTER: *Biochem. Z.*, **246**, 10 (1953).
- 17) T. MIYAZAKI: *J. Biochem. Japan*, **20**, 211 (1943).
- 18) K. MEYER, E. A. SMITH: *J. Biol. Chem.*, **119**, 507 (1937).
- 19) J. EINBINDER, M. SCHUBERT: *J. Biol. Chem.*, **185**, 725 (1950).
- 20) M. R. SHETLER, Y. R. MASTERS: *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **90**, 31 (1955).
- 21) 左右田徳郎, 江上不二夫, 堀米悌二: 日化, **61**, 43 (1940).