水産物の糖蛋白に関する研究—Ⅲ.

フジコの itin 硫酸の結晶化について

元 広 輝 重

(1960 年 7 月 14 日受理)

STUDIES ON MUCOPROTEIN IN MARINE PRODUCTS—III.
CRYSTALLIZATION OF ITIN SULFATE FROM THE
MUCOPROTEIN IN *CUCUMARIA JAPONICA*

Terushige MOTOHIRO*

Itin sulfate was successfully crystallized as the calcium salt from the mucoproteins of a sea cucumber, *Cucumaria japonica*, by the procedure shown in Fig. 1. The chemical composition of the crystalline itin sulfate was found to be quite similar to chondroitin sulfate prepared by the SCHUBERT method, being composed of each equimole of hexosamine, hexuronic acid and sulfur. The values of nitrogen and sulfur were however slightly higher in the former than in the latter (Table 1).

The component sugars of the compound were identified by paper chromatography as galactosamine and glucuronic acid (Table 2) and the compound bears similarity to the chondroitin sulfate.

Itin 硫酸は高等動物においては heparin¹⁾, chondroitin 硫酸²⁾, mucoitin 硫酸³⁾, gastroitin 硫酸⁴⁾が得られている。一方谷川⁵⁾はナマコ (*Stichopus japonicus* SELENKA) に一種の itin 硫酸の存在を指摘し、真木・檜山⁶⁾らは同じくナマコより mucoitin 硫酸を分離している。

実 験 の 部

著者は前報⁷⁾においてフジコ (*Cucumaria japonica* SEMPER) 糖蛋白の配合族多糖類に poly-fucose 硫酸の存在することを報告した。しかし、フジコにはこの外になお itin 硫酸の存在することが考えられ⁸⁾、この点を究明するためフジコ糖蛋白から itin 硫酸の分離を試みてきた。ここで itin 硫酸を結晶状に分離することができたのでその結果を報告する。

従来の研究によれば硫酸基を有する複合多糖類の結晶は heparin¹⁾, chondroitin 硫酸²⁾ についてのみ得られ、その他に itin 硫酸の結晶は得られていない。したがって著者は本実験で得られた itin 硫酸の結晶の性質を調べるため、chondroitin 硫酸の結晶を調製し、これとも比較することとした。

1. フジコより糖蛋白の分離

糖蛋白を分離するために材料としては、根室近海で夏期に漁獲されたフジコの内臓を除去し、乾物としたものを用いた。一般に糖蛋白の分離には弱アルカリ、中性塩類溶液による抽出後、酸または有機溶媒により沈澱させる方法がとられているが、フジコより糖蛋白の分離、抽出には第Ⅰ報の方法⁷⁾によつた。すなわちフジコを Waring blender によつて細砕し、水抽出を行い、残渣を除いた後アルコールによつて糖蛋白を沈澱せしめた。

* 北海道大学水産学部 (Fac. Fish., Hokkaido Univ., Hakodate, Japan).

2. itin 硫酸の分離

上記のフジコ糖蛋白より itin 硫酸を分離するため、フジコ糖蛋白を前報 Fig. 1⁸⁾のように処理し除蛋白を行つた。

除蛋白後の沈澱〔前報 Fig. 1 の沈澱 (I)〕は水に易溶、やや褐色に着色し、Molisch 反応、Elson-Morgan 反応 (hexosamine), Naphthoresorcinol 反応 (hexuronic acid) の諸反応はいずれも陽性であつた。このものから itin 硫酸カルシウム塩を作るため Fig. 1 のように操作した。

Fig. 1. Crystallization method of itin sulfate from *Cucumaria japonica*.

Fig. 2. Crystals of the Ca salt of itin sulfate from *Cucumaria japonica*.

ここに得られた結晶は Fig. 2 にみられるように板晶または柱晶をなしている。

Fig. 2 で Frac. I にも結晶性沈澱が得られるが、主として Frac. II に典型的な結晶形が得られる。また、Frac. II を除いた残液に更にアルコールを注加して Frac. III の得られる場合もある。Frac. III は Frac. II と結晶形の差異はなく Frac. II と同一のものと考えられる。Frac. I は再び水に溶解し、再結を反覆することにより Frac. II と同様な結晶形が得られる。このことから Frac. II における結晶が最も安定した結晶形であろうと考えられる。

Frac. II の結晶は水に易溶で水溶液は強い流動複屈折を示す。除蛋白割分 20g に対し 100mg の収量

で収率は 0.05% である。Elson-Morgan 反応, Naphthoresorcinol 反応, 水解性硫黄の諸反応はいずれも陽性である。

3. itin 硫酸の組成

前項に示したような方法で得られた itin 硫酸カルシウム塩結晶の化学的性質を知るため構成成分の定量を行つた。

hexosamine は Elson-Morgan の比色法⁹⁾, hexuronic acid は Dische 法¹⁰⁾, 水解性硫黄は Osaki 法¹¹⁾により、試料を塩酸で加水分解後、遊離する硫酸基をバリウム塩とし重量法により定量した。窒素は micro-Kjeldahl 法により、カルシウムは常法にしたがい硫酸カルシウムを過マンガン酸カリにより滴定して求めた。

フジコの itin 硫酸カルシウム塩結晶および SCHUBERT¹²⁾らの方法により調製した chondroitin 硫酸カ

ルシウムの組成の分析結果は Table 1 のようである。

Table 1. Analytical data on itin sulfate in *Cucumaria japonica*.

Component	Sample Itin sulfate in <i>Cucumaria japonica</i>	Calc.*	Molar ratio	Chondroitin sulfate	Calc.	Molar ratio
Hexosamine (%)	26.7	30.5	1.00	25.8	30.5	1.00
Hexuronic acid (%)	27.6	33.1	0.95	28.4	33.1	0.92
Sulfur (%)	5.9	5.45	1.23	4.41	5.45	0.96
Nitrogen (%)	3.3	2.39	1.58	2.47	2.39	1.22
Calcium (%)	6.2	6.81	1.03	5.44	6.81	0.95
Water (%)	15.8	15.3	5.88	14.6	15.3	5.15

* Calc. as $C_{14}H_{19}O_{14}NSCa \cdot 5H_2O$.

Table 1 の結果をみるに窒素、硫黄の値がフジコの itin 硫酸カルシウム塩結晶では多いうようにみうけられる。このため試料を再び上記処理法にしたがつて結晶化を繰り返して定量を行つたが、窒素、硫黄量には変化が認められなかつた。また、蛋白反応でも陰性を示した。このことから、実験試料に供したフジコの itin 硫酸カルシウム結晶は他種蛋白を夾雑したものでなく、したがつて、このものの分析の結果得られた窒素、硫黄量は個有の値を示すものであることが推察される。

各組成分のモル比は hexosamine : hexuronic acid : S = 1 : 1 : 1 である。SCHUBERT らによる chondroitin 硫酸カルシウム結晶の分析結果と比較するに hexosamine, hexuronic acid, カルシウム量はそれぞれ大差ないが硫黄、窒素量はいずれもフジコの itin 硫酸カルシウム結晶ではそれぞれ 0.5%, 0.8% 高い値を示した。これらの値は前述のように本実験に供したフジコの itin 硫酸カルシウムの個有値と考えられる。

hexosamine : hexuronic acid : S のモル比が SCHUBERT らの得た chondroitin 硫酸と同じく等モルに含有される事実からみれば、少くともフジコの itin 硫酸は chondroitin 硫酸と同様な化学的性状を有するものと考えられるが、この点については後報に詳述する。

4. itin 硫酸構成成分の検討

前項の実験よりフジコの itin 硫酸は hexosamine, hexuronic acid を等モルに含有することを知つたが本項ではこれらの構成成分の種類がいかなるものであるかを知るため実験した結果をのべる。

(1) hexosamine, hexuronic acid の検索法

試料 0.5g を 100cc 容フラスコにとり、6N 塩酸 50cc を加え還流冷却器を附し、100°C, 20 時間加水分解を行つた後、2% 塩化バリウム溶液を加え、加水分解によつて生じた遊離硫酸を沈澱させてこれを除去し、残液を減圧下に濃縮して paper chromatography の試料とした。展開溶媒には 1% アンモニア水飽和フェノール、コリジン⁽¹³⁾を用い、顯色にはアニリン・フタル酸溶液⁽¹⁴⁾を噴霧し、出現する色斑によつて検出した。

(2) 結果

フジコの itin 硫酸の hexosamine, hexuronic acid の種類を検索するために行なつた paper chromatography の結果は Table 2 に示した。

Table 2 にみられるように hexosamine としては galactosamine, hexuronic acid としては glucuronic acid が検出された。この結果からみ

ればフジコの itin 硫酸は構成糖成分として galactosamine, glucuronic acid を有する chondroitin 硫酸と近似の化合物と考えられる。

Table 2. R_f values of galactosamine and glucuronic acid.

Component	R_f	
	Collidine	Phenol saturated with 1% NH_4OH
Galactosamine	0.28	0.62
Glucuronic acid	0.16	0.13

chondroitin 硫酸は D-glucuronic acid, N-acetylchondrosamine, 硫酸を構成成分とし、これらが等モルの割合に含有されている¹⁵⁾が、前項および本項の実験結果から推してフジコの itin 硫酸の構成糖成分も chondroitin 硫酸と同様であろうと考えられる。

考 察

本実験ではアセチル基の検出、旋光度測定、構成糖成分の分離確認などは行わなかったが、フジコより分離した itin 硫酸カルシウム塩結晶は chondroitin 硫酸または近似の化合物のように考えられる。

真木・檜山⁶⁾によればナマコ内臓より分離した itin 硫酸は mucoitin 硫酸様のものであるといわれるが、元来 mucoitin 硫酸は N-acetyl-D-glucosamine, glucuronic acid およびエステル硫酸の当量より構成される多糖類硫酸エステルに対する名称であり、従来の報告では牛角膜³⁾および豚胃粘膜ムチン¹⁶⁾より分離されているに過ぎない。しかも、角膜の mucoitin 硫酸はその後再検討され、hyalonic acid に chondroitin 硫酸, kerato 硫酸が混在したものと考えられるに至っている。したがって mucoitin 硫酸の存在は現在では疑問とされている。

一方、下等動物体から分離された itin 硫酸としては *Helix laeda* より分離された limacoitin 硫酸が報告されているに過ぎない。このようなことから真木・檜山⁶⁾らのナマコから分離した itin 硫酸が果して mucoitin 硫酸であるか否かは再検討の必要があるものと思われる。

要 約

フジコ (*Cucumaria japonica* SEMPER) より itin 硫酸をカルシウム塩として結晶状に分離し、その化学的性質をしらべた。その結果 galactosamine : glucuronic acid : S = 1 : 1 : 1 の割合で結合する一種の itin 硫酸であることを知った。

終りに本研究に懇篤な指導を賜った本学谷川英一教授、論文の校閲を賜った東海区水産研究所右田正男先生に謹んで感謝の意を表する。

文 献

- 1) A. F. CHARLES and D. A. SCOTT: *Trans. Roy. Soc. Can.* **28**, 55 (1935).
- 2) K. MEYER and M. M. RAPPORT: *Science* **113**, 596 (1951).
- 3) K. MEYER and E. CHAFFEE: *Am. J. Ophthalmol.* **23**, 1320 (1940).
- 4) R. SATOH: *Tohoku J. Expl. Med.* **56**, 387 (1952).
- 5) E. TANIKAWA: *Memoirs of Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, **3**, 74 (1955).
- 6) 真木正博・檜山 登: 弘前医学 **7**, 150 (1956).
- 7) 元広輝重: 本誌, **26**, 1171-1174 (1960).
- 8) 元広輝重: 本誌, **26**, 1175-1178 (1960).
- 9) L. A. ELSON and W. T. J. MORGAN: *Biochem. J.* **27**, 1824 (1933).
- 10) Z. DISCHE and L. B. SCHETTLES: *J. Biol. Chem.* **175**, 595 (1948).
- 11) S. OSAKI and K. TURUMI: *Tohoku J. Expl. Med.* **49**, 11 (1947).
- 12) L. E. EINBINDER and M. SCHUBERT: *J. Biol. Chem.* **191**, 591 (1951).
- 13) 檜山 登・竹森繁晴: 弘前医学 **3**, 200 (1952).
- 14) S. M. PARTRIDGE: *Nature*, **163**, 177 (1949).
- 15) P. A. LEVENE: "Hexosamine and Mucoproteins". Longmans, Green and Co., London, (1922).
- 16) K. MEYER, E. M. SMYTH and J. W. PALMER: *J. Biol. Chem.* **119**, 73 (1937).