魚体表面の粘性物質に関する研究—V.

ドジョウの体表面粘性物質構成糖の再検討

榎 本 則 行・冨 安 行 雄

(1961 年 2 月 28 日受理)

STUDIES ON THE EXTERNAL MUCOUS SUBSTANCE OF FISHES—V.
REEXAMINATION OF COMPONENT SUGARS OF THE EXTERNAL
MUCOUS SUBSTANCE OF LOACH

Noriyuki ENOMOTO and Yukio TOMIYASU*

The component sugars of the mucus-polysaccharide from the external mucous substance of loach was reported in the previous paper¹⁾: mucus-polysaccharide acid hydrolyzate was separated into three fractions based on R_f values by paper chromatography, and the component sugars was identified.

In the present paper, the hydrolyzate was divided into neutral, basic and acidic fractions by using ion-exchange resins (Fig. 1), and the component sugars in each fraction were analyzed qualitatively. The results obtained are as follows:

- 1) In the neutral fraction, ribose, galactose and glucose were identified. Although the presence of arabinose was reported in the previous paper¹⁾, this sugar could not be detected clearly (Fig. 2).
- 2) In the basic fraction, glucosamine and galactosamine were identified indirectly as arabinose and lyxose, respectively, after degradation of the fraction with ninhydrin.
- 3) In the acidic fraction, a hexuronic acid was detected by the WILLIAMS's method (Fig. 3). The acid seemed to be glucuronic acid, as judged from the DISCHE's reaction (Fig. 4).

ドジョウの体表面粘性物質（以下粘質物と略称）を酵素分解して得られた polysaccharide の構成糖についてはさきに報告した¹⁾。そのさい用いた方法は polysaccharide を加水分解し全試料を濾紙の下端に帯状につけて paper chromatography を行ない、 R_f の差にもとづく 3 つの分別帯に分け各々を濾紙から抽出して構成糖を同定した。

今回はイオン交換樹脂を用いて、polysaccharide の加水分解物を中性糖、塩基性糖、酸性糖に分離し、これらの 3 区分を paper chromatography によつて再検討したところ、前報とは多少異なつた結果を得たので報告する。

実験および実験結果

I. 粘質物から polysaccharide の調製

前報¹⁾に準じて行なつた。生きたままのドジョウを ethanol (70% 前後) 中に投入し、白く凝固した粘質物を体表面から注意深くかきとり ethanol で数回洗滌後、acetone, ether で脱水、乾燥して粗製粉末を得た。これを堀口²⁾が行なつた方法に従つて pepsin, trypsin で加水分解し、白～灰白色の polysaccharide の粉末を得た。

* 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem., Fac. Agr., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan).

II. イオン交換樹脂による糖の分別

イオン交換樹脂による糖の分別は橋本³⁾, 中村⁴⁾が行なつた方法に準じた。試料に 30 倍容の $N-H_2SO_4$ を加え逆流冷却器を附し, $100^\circ C$, 5 時間加水分解後 $Ba(OH)_2$ で中和, $BaCO_3$ を加えて $60^\circ C$ で 15 分間

加熱した。遠心分離して上澄液を集め適宜濃縮してイオン交換樹脂にかけた。その概要は Fig. 1 に示した。

III. Paper chromatography による中性糖の同定

イオン交換樹脂によつて分離した中性区分を $60^\circ C$ 以下で減圧濃縮して syrup 状とした。東洋汙紙 No. 51 を用いて paper chromatography を行なつた結果を Fig. 2 に示した。4 種の溶媒を試みたが, そのうち 2 種についての結果である。前報¹⁾で報告した arabinose に相当する spot は非常に不明確で判定に苦しむ状態であつたので, その存在を確認できなかつた。中性糖区分からは ribose, galactose, glucose を同定し得た。

IV. Paper chromatography による塩基性糖の同定

前報¹⁾において塩基性糖としては glucosamine, galactosamine* の存在を報告したが, galactosamine は純品が入手できなかつたので chondroitin sulfate の加水分解物を用いて同定したためやや精度を欠くおそれがあつた。今回は塩基性糖区分のみを分離し得たので, これを ninhydrin 処理して同定を行なつた。

glucosamine, galactosamine 溶液を pyridine で pH を約 5 に調整し ninhydrin とともに $100^\circ C$, 90 分間加熱すると, 酸化されて炭素数の 1 つ少ない arabinose, lyxose に変わる⁵⁾ので, この方法によつて塩基性区分を酸化し, $n-Bu(OH): Et(OH): H_2O (4:1:2)$ で展開した。R_f 0.17, 0.23 の 2 つの spot を得, それぞれ arabinose, lyxose に相当することから glucosamine, galactosamine と同定した。

V. 酸性区分の検索

酸性区分を syrup 状に濃縮し, paper

Fig. 1. Separation of three fractions from mucus-polysaccharide acid hydrolyzate with ion-exchange resins.

* The eluate was neutralized with barium hydroxide and then centrifuged. The supernatant was passed through Amberlite IR-120.

Fig. 2. Paper chromatograms of the neutral fraction.

Solvent { A; phenol: water (8:2)
multiple development
B; butylacetate: ethanol: acetic acid:
water (3:2:1:1)

Colour reagent; aniline hydrogen phthalate
Oblique lined spots show red colour and white
spots show brown colour.

* 前報では chondrosamine と表現した。同一物である。

chromatography によつて調べたが, spot は認められなかつた。

中村⁶⁾ はキリンサイ粘質物の研究において, イオン交換樹脂を用いて粘質物から酸性糖区分を分離し, この区分の成分として paper chromatography によつては認め得なかつた glucuronic acid を呈色反応によつて確認している。また数種の呈色法について検討し WILLIAMS の反応⁷⁾ がもつともよかつたと報告している。

本区分についても WILLIAMS の反応を試みた。吸光曲線を Fig. 3 に示したが, これにより hexuronic acid が存在することは明らかである。naphthoresorcinol を用いる本反応は hexuronic acid に共通であるから, Fig. 3 の結果によつて本区分中の酸性糖が glucuronic acid であるとは断定できない。glucuronic acid は mannose とともに硫酸に溶解し, thioglycollic acid と反応させると鮮やかなピンク色を呈するが, galacturonic acid, mannuronic acid は同じように処理しても不明瞭な褐色を示すだけである⁸⁾。これは glucuronic acid だけに適用される特有な反応であるから, この反応を本区分にも試みた。この反応物質の吸収曲線は Fig. 4 に示したように glucuronic acid のそれと吸収極大, 吸収曲線の形がやや異なるが, glucuronic acid と同様に鮮やかなピンク色を呈することから glucuronic acid の存在が推定された。paper chromatography によつては spot が認められなかつたのは, その量が少ないか, あるいはまた呈色試薬の感度が低いかのいずれかであろう。

Fig. 3. Absorption spectra of authentic glucuronic acid and acidic fraction of loach in the presence of WILLIAMS's reagent.

Fig. 4. Absorption spectra of authentic glucuronic acid and acidic fraction of loach in the presence of DISCHE's reagent.

考 察

前報¹⁾に報告したドジョウ粘質物構成糖は ribose, arabinose, galactose, glucose, glucosamine, galactosamine であつたが, このうち galactosamine の同定は純品が入手できなかつたこと, および glucosamine, galactosamine は paper chromatography では分離が悪いといわれているため精度を欠くおそれがあつた。R_fの差にもとづく前報の分別帯には塩基性糖と酸性糖が混在し, 本報のような ninhydrin 処理が適用し得るかどうか疑わしかつた。今回は塩基性糖区分のみを分離できたので, ninhydrin 処理によつてそれぞれ arabinose, lyxose とし glucosamine, galactosamine を同定した。前報でのべた arabinose は, 動物体成分として認められた報告がないので特に今回は注意して実験を行なつたが, その存在は不明確であつた。前回認められた spot が今回は不明瞭となつた理由の説明は困難だが, 季節的あるいは老犬魚, 幼少魚などによつて量的差異がもたらされることも考えられるので, これらの点についてはさらに検討を要するものと思われる。前回認め得なかつた hexuronic acid については, 酸性区分のみを分離し得たので WILLIAMS の反応⁷⁾ による吸光曲線からその存在を確かめた。このものは DISCHE の反応⁸⁾ により glucuronic acid であろうと推定された。

前報¹⁾の paper chromatography による分別法と本報のイオン交換樹脂による分離法とを比較すると、それぞれ一長一短はあるが、イオン交換樹脂法のほうが種々の点で利点が多いと思われる。

摘 要

1) ドジョウの体表面粘性物質の構成糖を再検討するため、polysaccharide の加水分解物をイオン交換樹脂法によつて3区分に分離した。

2) 中性糖区分からは ribose, galactose, glucose を同定したが、前報¹⁾でのべた arabinose は確認できなかった。

3) 塩基性糖区分からは glucosamine, galactosamine を同定した。

4) 酸性糖区分からは WILLIAMS の試薬による吸光曲線から hexuronic acid の存在を認め、DISCHE の反応による吸光曲線から glucuronic acid であろうと推定した。

本研究の一部は文部省科学研究費によつた。記して謝意を表する。

文 献

- 1) 榎本則行・冨安行雄：本誌，**26**，739 (1960).
- 2) 堀口吉重：本誌，**22**，463 (1956).
- 3) HASHIMOTO, Y. and SATO, T.: 本誌，**21**，352 (1955).
- 4) 中村武彦：本誌，**23**，647 (1958).
- 5) RUELIUS, H. W, and GIRARD, M. M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **50**, 512 (1954).
- 6) 中村武彦：本誌，**23**，652 (1958).
- 7) 赤堀四郎：“酵素研究法”，第 III 卷，朝倉書店，東京，(1957)，p. 658.
- 8) DISCHE, Z.: *J. Biol. Chem.*, **171**, 725 (1947).