アルカリ溶解法による鯨鼻軟骨からの
コンドロイチン硫酸の製法—IV
蛋白分解酵素溶解法によつて得た標品との比較*

中 嶋 昭 正

(1972 年 4 月 21 日受理)

Studies on the Manufacture of Chondroitin Sulfate from Whale
Nasal Cartilage by Alkaline Liquefaction Method—IV
Comparison of Crude Chondroitin Sulfate Preparations obtained by
Alkaline Liquefaction Method and Protease Digestion Method.

Akimasa NAKASHIMA**

The differences in composition and properties of crude chondroitin sulfate preparations obtained by the alkaline liquefaction method (A-CCS) and the Pronase digestion method (E-CCS) were studied and the following results were obtained.

1) Both A-CCS and E-CCS contained mainly chondroitin sulfate A and a small amount of chondroitin sulfate C, keratosulfate and hyaluronic acid.

2) A-CCS contained less keratosulfate and protein than E-CCS, and the molecular weight of A-CCS was half that of E-CCS.

3) By fractional precipitation of A-CCS with ethanol, chondroitin sulfate which was slightly contaminated with keratosulfate and hyaluronic acid was obtained in about 70% yield.

4) A-CCS was stronger than E-CCS in antioxidative action on vitamin C and weaker in protective action on colloid.

前報¹⁻³⁾で、鯨鼻軟骨を NaOH 溶液で液化後、コンドロイチン硫酸 (CS) を抽出する方法について検討し、ビュレット反応陰性の製品を容易に収量よく得ることができた。軟骨からの CS の抽出剤として NaOH 溶液は古くから用いられている。その理由として、抽出効率がよいこと、アルカリによる β -位脱離反応で CS と蛋白中の L-セリンとの O-グリコシド結合を切ることが考えられる。しかし、NaOH は CS あるいは他のムコ多糖に作用することもあり得よう。それゆえ、軟骨をプロナーゼ消化で液化後除蛋白して得られた粗 CS (E-CCS) と、アルカリ溶解法によつて得られた粗 CS (A-CCS) とについて、一般分析値、ムコ多糖組成および二、三の性質について比較検討した。

実験材料および方法

A-CCS の調製 前報³⁾にしたがつて調製した。すなわち、200 g の細碎鯨鼻軟骨を 30 分間煮沸し、その 1/8 重量の 50% NaOH 溶液を加え、40°C、1.5 時間液化し、pH 3.5 で生じた沈殿を除去してから中和し、3 倍容量の 95% エタノールを加えた。生じた沈殿を遠心分離後 70% エタノールで洗浄し、常法により乾燥した (収量 16.4 g)。つぎに、その 10 g を 200 ml の水に溶解し、Dowex 50 W-X1(H⁺) カラム (2.5×41 cm) に通した後 NaOH 溶液で中和し、1%量の酢酸ナトリウムおよび 3 倍容量の 95% エタノール

* 本報告の概要は昭和 44 年 4 月日本水産学会年会で講演した。

** 福岡女子短期大学 (Fukuoka Women's Junior College, Dazaifu, Fukuoka Pref., Japan)

ルを加えて生ずる沈殿を常法により乾燥して A-CCS (Na 塩) を得た (収量 7.1 g)。

E-CCS の調製 200 g の煮沸した細砕軟骨に 60 ml の水と 200 mg の“プロナーゼ P”を加え、55-60°C で 3 時間攪拌して消化し、その間 NaOH 溶液で pH 7.5 に保った。消化液にセライトを加えて吸引ろ過し、ろ液に 20 g の塩化ナトリウムを加え⁴⁾、再ろ過後ろ液に 3 倍容量のエタノールを加えて生ずる沈殿を遠心分離し、70% エタノールで洗浄後常法により乾燥した (収量 16.8 g)。その 10 g を 200 ml の水に溶解し、A-CCS と同様に Dowex 50 W-X 1 (H⁺) 処理したのちエタノールで沈殿させ、E-CCS (Na 塩) を得た (収量 7.0 g)。

粘度平均分子量の測定法 0.2 M 塩化ナトリウムを含む 0.15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に試料を溶解し、オストワルド粘度計を用いて極限粘度 $[\eta]$ を得、MATHEWS⁵⁾ の式 $[\eta] = 3.1 \times 10^{-4} \bar{M}_v^{0.74}$ から粘度平均分子量 ($\bar{M}_v$) を求めた。

コンドロイチン硫酸 C、ヒアルロン酸およびケラト硫酸の定量 コンドロイチン硫酸 C (CS-C) はコンドロイチナーゼおよびコンドロ-6-スルファターゼを用いる SAITO ら⁶⁾ の Method 2 により定量した。ヒアルロン酸 (HA) は *Streptomyces* のヒアルロニダーゼ (天野製薬) によって生成する還元力を NELSON-SOMOGYI 法⁷⁾ により測定し、HA (Sigma, Grade III-S) を標準として定量した。ケラト硫酸 (KS) はヒアルロニダーゼ抵抗性ヘキソースを測定し、その 3 倍量を KS とみなして定量した。なお、ヒアルロニダーゼ抵抗性ヘキソースはつぎの操作で求めた。0.15 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) の 20 ml に 20 mg の試料と 8 mg の辜丸ヒアルロニダーゼ (300 NF 単位/mg) を加え、37°C に 48 時間保った。3 倍容量の 99% エタノールを加え、4°C で一夜放置後遠沈し、沈殿に 4 ml の水を加えて溶解後、12 ml の酢酸ナトリウム飽和エタノールを加え、沈殿を常法により乾燥し、そのヘキソース量を求めた。

赤外吸収スペクトルの測定 日立赤外分光光度計 (EP 1-S) を使用し、KBr 法で測定した。

保護膠質性の測定 保護膠質性は ZSIGMONDY の方法⁸⁾ により調製した金ゾルを用いて測定した。すなわち、8 ml の金ゾルに 2 ml の試料を加え振盪したのち、1 ml の 10% 塩化ナトリウムを加えて混合し、その変色を肉眼で判定し、変色点における溶液中の試料の mg 数を ZSIGMONDY の金数として表わした。

ビタミン C 酸化防止作用の測定 木村の方法⁹⁾ に準じて行なつた。すなわち、10 ml の SØRENSEN の緩衝液 (pH 7.0) に 100 mg の試料を溶解し、10 ml の 0.2% ビタミン C 溶液を加え、トルオールを数滴添加後、37°C で 18 時間放置した。ビタミン C の定量は沃度法¹⁰⁾ で行ない、ビタミン C 残存率で酸化防止作用を表わした。

その他の分析法 N, S, ウロン酸、ヘキソースおよび蛋白は前報³⁾ の方法によつた。ヘキソサミンは 3 N 塩酸、100°C、15 時間の加水分解後 ELSON-MORGAN 法の BLIX の変法¹¹⁾ により、グルコサミンとガラクトサミンとの分別定量は GARDELL の方法¹¹⁾ により、シアル酸は 0.1 N 硫酸、80°C、1 時間の加水分解後 AMINOFF の方法¹²⁾ によりそれぞれ定量した。

実 験 結 果

A-CCS および E-CCS の分析値の比較 A-CCS および E-CCS の分析値を Table 1 に示す。A-CCS

Table 1. Analytical data of A-CCS and E-CCS.

	N %	S %	Uronic acid %	Hexosamine %	Hexose %	Sialic acid %	Protein %	$\bar{M}_v^*$	$[\alpha]_D$
A-CCS	2.7 (1.10)	5.9 (1.04)	35.2 (1.03)	31.5 (1.00)	1.8 (0.06)	0.1	0.5	22,600	-31
E-CCS	2.7 (1.33)	5.7 (1.04)	33.7 (1.03)	30.1 (1.00)	4.4 (0.15)	1.0	2.3	43,500	-32

* Viscosity-average molecular weight.

Fig. 1. Gel filtrations of A-CCS and E-CCS on Sephadex G-200. Ten mg of A-CCS or E-CCS was applied to a column (1.3×75 cm) of Sephadex G-200 equilibrated with 0.1 M NaCl. Elution was carried out with the same solution.

Table 2. Mucopolysaccharide composition of A-CCS and E-CCS.

	CS-A %	CS-C %	KS %	HA %	Galactosamine : Glucosamine
A-CCS	86.2	10.1	2.4	1.3	96.8 : 3.2
E-CCS	77.7	10.5	9.9	1.9	90.0 : 10.0

CS-A: Chondroitin sulfate A. CS-C: Chondroitin sulfate C. KS: Keratosulfate.
HA: Hyaluronic acid. CS-A=100-(CS-C+KS+HA)

に比べると E-CCS のヘキソース量は 2 倍以上で、蛋白含量も多かった。また、A-CCS にはシアル酸はほとんど含まれなかつた。粘度法で得た E-CCS の分子量は A-CCS の約 2 倍であり、Fig. 1 に示した両者の Sephadex G-200 ゲルろ過においても、E-CCS と A-CCS との分子量の相違は明らかである。なお、Nelson-Somogyi 法による還元性末端基定量によつて得られた A-CCS の数平均分子量は 19,000 であつた。

鯨鼻軟骨には KS, HA の存在が報告されているので^{13,14)}、A-CCS, E-CCS 中の CS-C, KS および HA の含量を明らかにするため、ムコ多糖組成についての分析を行ない、得られた分析値を Table 2 に示す。A-CCS のグルコサミンは総ヘキソサミンの 3 % であるのに、E-CCS には 10 % も含まれていた。グルコサミンは HA および KS に由来するものと考えられるが、両者の HA 含量は 1-2 % であつた。また、E-CCS に A-CCS よりもはるかに多くの KS が含まれていた。CS-C は両者に約 10 % 含まれ、KS, HA, CS-C 以外の主成分は赤外吸収スペクトルからみても CS-A である。

エタノール分別沈殿による A-CCS および E-CCS の分画 A-CCS および E-CCS のエタノール分別沈殿を行ない、得られた画分を分析した。400 mg の試料を 40 ml の 5 % 酢酸ナトリウム含有 0.5 N 酢酸溶液に溶解し、5°C で 45 % (v/v) になるようにエタノールを加え、24 時間放置後冷却遠心機にて遠心分離し、沈殿を同一塩濃度の 45 % エタノールおよび塩を含まず濃度の 10 % 高いエタノールで洗浄後、常法により乾燥した。上澄液および洗浄に用いた塩含有エタノールを合したのち 50 % になるようにエタノールを加え、生じた沈殿は最初の画分と同様に処理した。さらに 60 % エタノールで沈殿する画分を得、これらの画分の分析値を Table 3 に示す。A-CCS, E-CCS とも 40 % エタノールでは沈殿を生ぜず、45 % エタ

Table 3. Analytical data of fractions obtained by the precipitation of A-CCS and E-CCS in sodium acetate buffer with ethanol.

	Ethanol concentration %	Yield %	Uronic acid %	Hexose %	Sialic acid %	Protein %	CS-C %	Galactosamine : Glucosamine
A-CCS	40-45	71.1	34.7	1.3	<0.1	0.4	6.8	>99.8 : < 0.2
	45-50	20.1	36.2	1.3	<0.1	0.5	17.7	91.9 : 8.1
	50-60	5.3	35.5	3.8	0.5	1.5	15.3	—
E-CCS	40-45	65.3	38.0	2.3	0.1	1.8	9.6	99.2 : 0.8
	45-50	24.2	36.7	4.1	0.7	2.5	9.1	86.5 : 13.5
	50-60	3.7	14.5	17.2	6.2	5.8	1.8	—

Fig. 2. Infrared spectra of fractions shown in Table 3 (KBr).

ノールで約 70% 量が沈殿し、その画分はグルコサミンおよびシアル酸が微量であることから、KS, HA のほとんど混入していない CS と考えられる。とくに A-CCS からの画分のグルコサミンは極めて微量であつた。45-50% エタノールの画分は A-CCS, E-CCS とも全体の約 20% で、グルコサミンが多く、KS, HA がかなり混入していることを示している。50-60% エタノールの画分は A-CCS, E-CCS とも 5% 内外で、A-CCS では若干の KS を含むがその大部分が CS であり、E-CCS ではヘキソースがウロン酸より高い値を示すことから KS を 50% 以上含んでいると考えられる。この画分の蛋白含量は多かつた。また、A-CCS では 40-45% エタノール画分の CS-C 含量は 45-50% 画分よりもかなり少なかつたが、E-CCS ではほぼ同じであつた。Fig. 2 の各画分の赤外吸収スペクトルに示すように、エタノール濃度の高い画分ほど 850 cm^{-1} (CS-A の硫酸基の吸収波数) の吸収が小さくなり、 820 cm^{-1} (CS-C および KS の硫酸基の吸収波数) の吸収が大きくなつた。

MEYER ら¹⁵⁾ による Ca 塩を用いる ムコ多糖の分画法はよく用いられ、HA は 20-30% エタノール、CS-A は 30-40%、CS-C は 40-50% で沈殿すると報告されているので、次に 5% 酢酸カルシウムを含む 0.5 N 酢酸溶液でエタノール分別沈殿を試みた。その結果を Table 4 に示す。Ca 塩と Na 塩とでは沈殿に必要なエタノール濃度は異なつても、各画分の分析値はほぼ同じ傾向を示したが、詳細に検討すると E-CCS

Table 4. Analytical data of fractions obtained by the precipitation of A-CCS and E-CCS in calcium acetate buffer with ethanol.

	Ethanol concentration %	Yield %	Uronic acid %	Hexose %	Sialic acid %	Protein %	CS-C %	Galactosamine : Glucosamine
A-CCS	30-35	76.1	37.3	1.3	<0.1	0.5	9.5	99.6 : 0.4
	35-40	11.2	37.4	1.5	0.2	0.3	12.1	—
	40-50	9.5	31.0	2.1	0.3	0.7	18.9	—
E-CCS	30-35	72.9	38.2	2.1	0.1	1.8	7.0	98.2 : 1.8
	35-40	14.1	37.0	2.7	0.3	2.4	11.3	—
	40-50	7.3	30.1	6.1	2.4	5.4	23.1	—

Table 5. Protective action on colloid.

	A-CCS	E-CCS	Chondromucoid*	CS-C**	CS-D**	KS***
ZSIGMONDY's gold number	0.08	0.05	0.03	0.15	0.5	nil

* Prepared by the method described in the previous paper¹⁷⁾.

** Purchased from Seikagaku Kogyo Co., Ltd..

*** Kindly supplied by Dr. Kitamikado, Kyushu Univ..

Table 6. Antioxidative action on vitamin.

	A-CCS	E-CCS	CS-C	Glucose	Blank
Vitamin C remaining rate (%)	68.9	63.2	59.0	58.5	46.2

において最もエタノール濃度の高い画分の KS 含量がかなり低いこと、Na 塩の場合と異なりエタノール濃度の高いほど CS-C の含量が多いことなどで異なっていた。

A-CCS および E-CCS の保護膠質性およびビタミン C 酸化防止作用の比較 A-CCS と E-CCS は分析値以外に、その性質においても異なることが考えられる。まず、食品添加物としての CS の主要な性質である保護膠質性¹⁶⁾について実験し、Table 5 に結果を示す。E-CCS が A-CCS よりも保護膠質性が強かつた。chondromucoprotein¹⁷⁾ が E-CCS よりも強い保護膠質性をもつこと、KS にはその作用が全くないことから、A-CCS と E-CCS の保護膠質性の相違は分子の大きさにもとづくものと考えられる。

つぎに、木村⁹⁾ によつて報告されているビタミン C 酸化防止作用について測定した結果を Table 6 に示す。A-CCS が E-CCS よりもわずかに強かつた。E-CCS の還元基は蛋白と結合しているが、A-CCS では遊離しており、還元基による相違が考えられるので、グルコースと比較したが、Table 6 に示すようにグルコースのビタミン C 酸化防止作用は A-CCS、E-CCS よりも弱かつた。最近長沢¹⁸⁾ は豚胃ムチンおよび CS のビタミン C 酸化防止作用を比較し、これらの酸化防止作用の理由として、スルホン基、カルボキシル基の金属キレート作用やコロイド作用などをあげている。

考 察

A-CCS、E-CCS とともに、CS と他のムコ多糖との分画が十分でないで、両者はムコ多糖混合物であり、KS、HA の混在は当然考えられる。とくに E-CCS はブローナーゼ処理と除蛋白操作とで得られたのであるから、3 倍容量のエタノールで沈殿しない一部のムコ多糖⁴⁾ を除いて、軟骨ムコ多糖の大部分を含んでいる

と考えられる。

上記実験結果を総合すると、A-CCS と E-CCS との主な相違点は次の3点である。1) A-CCS 中の KS はわずかであるが、E-CCS はかなりの量を含む。2) A-CCS の分子量は E-CCS の約 1/2 である。3) A-CCS 中の蛋白（ペプチド）はわずかであるが、E-CCS には 2% 以上含まれている。これらの相違がアルカリ処理に起因することを確認するには、E-CCS に対するアルカリの影響について検討する必要がある。A-CCS の KS、蛋白含量が少ないことはアルカリ溶解法による CS 調製のすぐれた点と考えられる。しかし、A-CCS の分子量が低いことがアルカリによる CS の分解によるかどうか問題であるが、従来から分解するだろうとの憶測が多く、詳しい報告は見当らない。最近、LYONS ら¹⁹⁾は 2 N NaOH、120 時間の処理によつても CS の糖鎖の内部における分解は起こらないであろうと述べている。したがつて、ANDERSON ら²⁰⁾の推論のように、CS の 2 分子が同じペプチドに結合しているため、E-CCS の分子量が大きいことも考えられる。E-CCS または CS へのアルカリの影響については今後詳しく検討する積りである。

要 約

鯨鼻軟骨からアルカリ溶解法によつて得た粗コンドロイチン硫酸 (A-CCS) とプロナーゼ溶解法によつて得た粗コンドロイチン硫酸 (E-CCS) とを比較し、次の結果を得た。

1. A-CCS および E-CCS の主成分はコンドロイチン硫酸 A であるが、そのほかコンドロイチン硫酸 C、ヒアルロン酸、ケラト硫酸を含み、ケラト硫酸および蛋白含量は E-CCS がはるかに多かつた。また、A-CCS の分子量は E-CCS の半分であつた。
2. エタノール分別沈殿によつて、ケラト硫酸、ヒアルロン酸のほとんど混入していないコンドロイチン硫酸を約 70% の収量で得ることができた。
3. 保護膠質性は A-CCS よりも E-CCS が強く、ビタミン C 酸化防止作用は A-CCS が強かつた。

本研究を行なうにあたり、終始懇切な御指導と御鞭撻とを賜つた九州大学農学部豊水正道教授ならびに北御門学助教授に謹んで謝意を表します。

文 献

- 1) 中嶋昭正・森永晃平・田中晴夫：本誌，**30**，500-505 (1964).
- 2) 中嶋昭正・田中晴夫：同誌，**32**，1049-1053 (1966).
- 3) 中嶋昭正・田中晴夫：同誌，**32**，1054-1058 (1966).
- 4) 中嶋昭正：同誌，**38**，621-626 (1972).
- 5) M. B. MATHEWS: *Arch. Biochem. Biophys.*, **61**, 367-377 (1956).
- 6) H. SAITO, T. YAMAGATA, and S. SUZUKI: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1536-1542 (1968).
- 7) M. SOMOGYI: *ibid.*, **160**, 69-73 (1958).
- 8) R. ZSIGMONDY: *Z. Anal. Chem.*, **40**, 697-719 (1901).
- 9) 木村正喜：東京医大雑誌，**16**，179-189 (1958).
- 10) 第7改正日本薬局法 第1部，C-13 (1961).
- 11) S. GARDELL: *Acta Chem. Scand.*, **7**, 207-215 (1953).
- 12) D. AMINOFF: *Biochem. J.*, **81**, 380-392 (1961).
- 13) 瀬尾信子：生化学，**33**，465-470 (1961).
- 14) 久保田穰・丸茂 高：J. Tokyo Univ. Fisheries, **54**，11-20 (1967).
- 15) K. MEYER, E. A. DAVIDSON, A. LINKER, and P. HOFFMAN: *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 506-518 (1956).
- 16) 柴田哲夫・井谷 彰：ニュー・フード・インダストリ，**5**，29-33 (1963).
- 17) 中嶋昭正：本誌，**34**，524-527 (1968).
- 18) 長沢太郎・清沢 功・饒村 護：栄養と食糧，**22**，414-420 (1969).
- 19) H. LYONS and J. A. SINGER: *J. Biol. Chem.*, **246**, 277-285 (1971).
- 20) B. ANDERSON, P. HOFFMAN, and K. MEYER: *ibid.*, **240**, 156-167 (1965).