トラウトサーモンからのコンドロイチン硫酸の抽出とその分析

Extraction of Chondroitin Sulfate from *Oncorhynchus Mykiss* and its Analysis

山　口　真　範
YAMAGUCHI Masanori
（和歌山大学教育学部化学教室）

2022年７月19日受理

Abstract

In the present study, chondroitin sulfate was extracted from the nasal cartilage of *Oncorhynchus mykiss*. Chondroitin sulfate derived from *Oncorhynchus mykiss* had a molecular weight of approximately 150,000. The structural component of chondroitin sulfate, glucuronic acid moiety was not sulfated, and the 4-*O*- and 6-*O*-positions of *N*-acetylgalactosamine were sulfated, and the ratio of sulfation was higher in the 6-*O*- position.

◆はじめに

動物組織中で遊離またはタンパク質複合体の形態で存在するアミノ糖を含む多糖をムコ多糖という。コンドロイチン硫酸はそのうちの一種である。

名称の由来は軟骨（*chondros*）から単離された硫酸基を含む多糖であることからコンドロイチン硫酸と名付けられた[1]。分子中にウロン酸や硫酸基をもち、酸性ムコ多糖（酸性グリコサミノグリカン）とも呼ばれる。その構成単糖は、グルクロン酸（GlcUA）、イズロン酸（IdoA）、*N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）から成り、GlcUAもしくはIdoAとGalNAcがグリコシド結合をした２糖を繰り返し単位として連結された直鎖型の構造をとる[2), 3), 4)]。ウロン酸の種類と硫酸基の結合位置によってコンドロイチンA，B，C，D，Eなどの型に分けられる。コンドロイチン硫酸の分子中に多数存在するヒドロキシ基の硫酸化は非常に多様性に富む。GalNAcのC４位またはC６位、GlcUAのC２位のヒドロキシ基の一部が硫酸化される。

例えば、コンドロイチン硫酸A[4)]とは分子中のGalNAcのC４位のヒドロキシ基が硫酸化されたものを指す。しかし分子中に存在する多数のGalNAcのすべてのC４位のヒドロキシ基が均一的に硫酸化されたものを天然から得ることは困難である。通常天然から得られるコンドロイチン硫酸Aは、C４位のヒドロキシ基に偏った硫酸化がされたものである。つまり分子中に多数存在するGalNAcの主な硫酸化部位はC４位のヒドロキシ基であるが、その中にはC６位のヒドロキシ基が硫酸化されたもの、もしくはC４、C６位のヒドロキシ基が共に硫酸化されていないものも同一分子中に混在している。この様に非常に多くの硫酸化のパターンが存在する。

コンドロイチン硫酸は軟骨や骨、皮膚の主要な成分であり、それらの構造を支持することが主要な機能と考えられてきた。近年の研究によりコンドロイチン硫酸は中枢神経の発達作用、創傷治癒作用、細胞増殖因子を介したシグナル伝達作用および感染など、生体内における様々な機能や生理活性を有することが明らかになってきた[5), 6), 7), 8)]。

これらの背景のもと、コンドロイチン硫酸は医療応用が行われ、関節痛、腰痛、神経痛、五十肩などの疼痛性疾患の薬やサプリメントとして活用されている[9)]。また血栓症抑制[10)]、音響外傷性難聴の改善[11)]、ドライアイ時の角膜保湿効果[12)]等が確認されている。

この様に、コンドロイチン硫酸は幅広い応用が実施され、社会的重要性が高まってきている。

本研究では、魚類（トラウトサーモン）からコンドロイチン硫酸の抽出を試み、その組成を明らかにしたので報告する。

◆抽出原材料の選定

軟骨は組織乾燥重量の約50％ものプロテオグリカンを含む組織である。プロテオグリカンはコアタンパク質とそれに結合するおおよそ50本のコンドロイチン硫酸から成る糖タンパク質である[13)]。よってコンドロイチン硫酸の抽出材料としてはプロテオグリカンを多く含んでいる軟骨が適しており、また軟骨は解剖学的に識別しやすく、単離が容易であるため本研究においても軟骨組織に存在するコンドロイチン硫酸を抽出することにした。

次にその動物種の選定においては、主な研究対象となっているウシやニワトリなど[14)]の軟骨等は、ヒトへの応用利用を見据えた場合、人獣共通感染症の懸念が

ある。よって本研究のコンドロイチン硫酸の抽出研究においては、魚類をその抽出原材料として用いることにした。魚類を抽出原料とした報告においてはマアジ（使用部位；頭部、皮）、クロマグロ（使用部位；頭部、胃、心房）、カレイ（使用部位；脊椎、ヒレ）などから抽出を行った事例がある[15]。

水揚げされた魚の頭部は多くの場合、食用とならず廃棄されており産業廃棄物としての扱いになっている。それらを有効活用することは、水産資源の活用の観点からも大きな社会的意義をもつ。

本研究においては、廃棄されているトラウトサーモンの頭部を原料とすることにした。トラウトサーモンは、主にチリ、ノルウェーにおいて養殖され日本へ多量に輸入されている魚の一つである。養殖魚であることから、自然の漁獲高の変化に左右されず、安定的な供給が可能となる。原材料の選定において安定的供給は実社会へ応用する場合、非常に重要な項目である。

◆軟骨部分の切り出し

トラウトサーモンの頭部の鼻周辺において比較的大きく、識別しやすい軟骨が存在する。これを鼻軟骨といい、サケ目は大きく発達している特徴がある。

加工するにおいても表皮に近く、比較的容易に切り出すことができ他の組織とも分離がしやすい（図１）。包丁を用いて鼻軟骨部分を切りだした後、約５mm四方に裁断し軟骨原料とした（図２）。

図１　縦断面図：枠線内が鼻軟骨

図２　軟骨原料

サケ目以外の魚類においては鼻軟骨が小さく、このような加工にはあまり適さない。頭部のまま抽出を実施せざるを得ないため、後の精製工程で脂肪や肉組織の分離に手間がかかり、得られるコンドロイチン硫酸も少量となる。

◆軟骨のプロテアーゼ消化

軟骨は軟骨細胞とその周囲を埋める細胞外マトリックスから構成されている。細胞外マトリックスの主要成分としてコラーゲン繊維があり、それと相互作用する形で軟骨型プロテオグリカンがそのリンクタンパク質を介してヒアルロン酸に結合し巨大な会合体を形成している[13]。

プロテオグリカンはヒアルロン酸と結合するリンク部分をもつコアタンパク質に多数のグリコサミノグリカン鎖（コンドロイチン硫酸）が結合したものである（図３）。

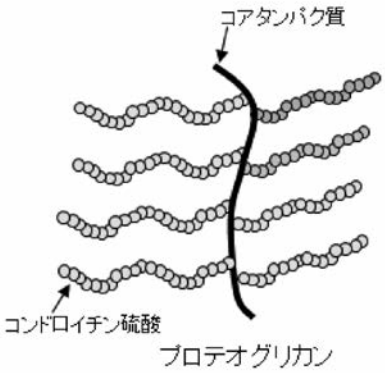


図３　プロテオグリカン模式図

これらの軟骨組織中からコンドロイチン硫酸を取り出すためには、組織内のタンパク質等を徹底消化して分解する必要がある。本研究においては、各種タンパク質に対して強力な加水分解力をもち遊離アミノ酸まで分解する能力をもつアクチナーゼE[16]を用いることにより、糖鎖以外のタンパク質の消化を行った。このプロテアーゼ消化によりプロテオグリカンはそのコアタンパク質が分解され、一本のコンドロイチン硫酸―オリゴペプチドとなる（図４）。

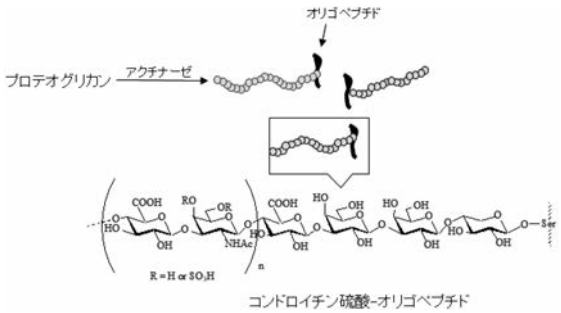


図４　プロテアーゼ消化の模式図

◆β脱離反応

得られたコンドロイチン硫酸―オリゴペプチドを弱アルカリ条件によりβ脱離反応[17]を実施した。このことにより、コンドロイチン硫酸をオリゴペプチドより切り出した。

◆コンドロイチン硫酸の分離(エタノール沈殿法)

グリコサミノグリカンを含む水溶液に塩を含むエタノールを加えることにより目的とするコンドロイチン硫酸を沈殿させることが出来る[18]。β脱離反応をした反応液に食塩飽和エタノールを添加し4℃にて24時間静置し目的としたコンドロイチン硫酸を白色沈殿物として得た(図5)。

図5 エタノール沈殿法によるコンドロイチン硫酸の抽出

◆コンドロイチン硫酸の分析

・セルロースアセテート膜電気泳動法による同定

セルロースアセテート膜電気泳動法はグリコサミノグリカンの酸性基の数により、その移動度が異なることを利用して種類を同定することができる[19]。得られたコンドロイチン硫酸を本手法により分析することとした。

スタンダードのコンドロイチン硫酸としてサメ由来コンドロイチン硫酸(生化学工業社製)(図6;レーン①)、抽出したサンプル(図6;レーン②)をそれぞれアプライし電気泳動の後、アルシアンブルー染色を行った。

抽出したサンプルは、コンドロイチン硫酸スタンダードと同等の位置に単一の染色バンドとして確認された。このことは、抽出したサンプルはコンドロイチン硫酸であることを示しており、単一バンドであることからそのサンプル中にはヒアルロン酸や他のグリコサミノグリカンが混在していないことを示している。

図6 セルロースアセテート膜電気泳動結果

・構造解析:分子量測定

得られたコンドロイチン硫酸の平均分子量を測定するため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)ゲルろ過カラム(TOSOH TSKgel G5000PW×L)による分析を行った(図7)。保持時間8.180 minのところにピークが観測された。プルランスタンダード(shodex社製)を用いて算出すると、その分子量は約15万であった。

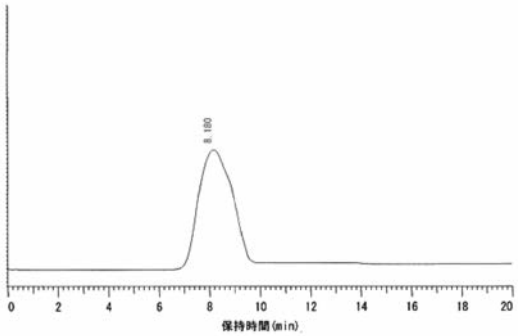
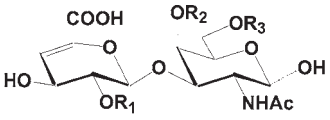


図7 ゲルろ過カラム HPLCチャート

・構造解析:硫酸化部位の特定

コンドロイチン硫酸の構造を解析するために不飽和二糖分析を行った。得られたコンドロイチン硫酸を、コンドロイチナーゼABC(生化学工業社製)にて徹底消化した。コンドロイチナーゼABCはエンド型のリアーゼであり、コンドロイチン硫酸のヘキソサミニド結合に作用して、その非還元末端に不飽和ウロン酸Δ4,5を形成した2糖単位に分解する[20](図8)。



	R_1	R_2	R_3
ΔDi-0S	H	H	H
ΔDi-4S	H	SO_3H	H
ΔDi-6S	H	H	SO_3H
ΔDi-diS$_D$	SO_3H	H	SO_3H
ΔDi-diS$_E$	H	SO_3H	SO_3H
ΔDi-triS	SO_3H	SO_3H	SO_3H

図8 不飽和2糖の種類とその構造

得られたコンドロイチン硫酸のコンドロイチナーゼABC消化物と各種不飽和2糖スタンダード(生化学工業社製)をポリアミンカラム(YMC polyamine II)を用い[21]、HPLC分析した。それぞれの化合物のカラム保持時間から生成した不飽和2糖を同定し、コンドロイチン硫酸の硫酸化部位を特定した。図9レーンaは抽出したコンドロイチン硫酸をコンドロイチナーゼABCにて消化したサンプルのチャート、レーンbは不飽和2糖スタンダードのチャートである(図9)。これらのピーク面積より生成した不飽和2糖のその割合を解析した(表1)。

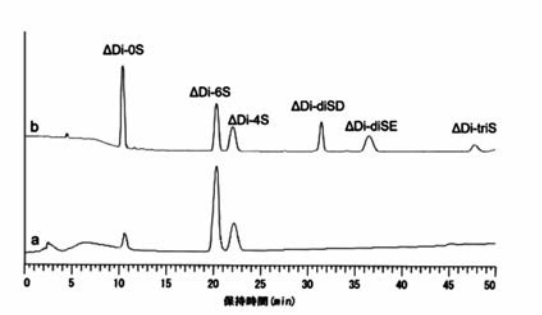


図 9　不飽和 2 糖分析 HPLCチャート

表 1　生成した不飽和 2 糖の割合

不飽和 2 糖	(%)
ΔDi-0S	5.5
ΔDi-4S	27.0
ΔDi-6S	67.5
ΔDi-diSD	0
ΔDi-diSE	0
ΔDi-triS	0

ΔDi-０S、ΔDi-４S、ΔDi-６Sのピークがそれぞれ観測されたことから、トラウト由来のコンドロイチン硫酸は、グルクロン酸部位は硫酸化されておらず、*N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)のC４位、C６位のヒドロキシ基がそれぞれ片方ずつ硫酸化されている、もしくは双方されていない構造をとっていることが明らかになった。またその割合はΔDi-６Sが最も多いことから、GalNAcのC６位のヒドロキシ基が多く硫酸化されたコンドロイチン硫酸であることが判明した。

◆まとめ

本研究においてはトラウトサーモンの鼻軟骨からコンドロイチン硫酸の抽出を行った。セルロースアセテート膜電気泳動は単一バンドを示し、HPLC分析によるゲルろ過チャートはシングルピークであることから純度の高いコンドロイチン硫酸が抽出できたと考えられる。その糖鎖の平均分子量は約15万であり、不飽和２糖分析の結果、GalNAcのC６位のヒドロキシ基を中心に硫酸化されたものであることが判明した。コンドロイチン硫酸の中でもコンドロイチン硫酸Cといわれる範疇に属するものであった。

コンドロイチン硫酸は硫酸化部位の多様性から、その構造は極めて多岐にわたる。類似性や確実な法則性は見いだせておらず、それぞれの魚類において固有のものとなっており、容易に推定できないことから個々に分析研究を実施する必要がある。本研究で明らかにしたトラウトサーモン由来のコンドロイチン硫酸は、近い種であるシロサケ由来のものと同じくコンドロイチン硫酸Cの範疇に属するが、その詳細な糖鎖組成をみると、シロサケの場合はΔDi-０S　８％、ΔDi-４S 31％、ΔDi-６S 61％であり近似しているものの完全に一致はしていなかった[22]。

またマアジの皮から抽出されたものを一例として比較すると分子量23万でコンドロイチン硫酸Aの範疇に属するものであり、同じ魚類由来のコンドロイチン硫酸であっても種によってその構造は大きく異なっていた[15]。

コンドロイチン硫酸の応用利用を考えた場合、構造によりその機能が異なることから、どの動物種が由来であるかを十分考慮する必要があるといえる。

コンドロイチン硫酸は健康サプリメントや医薬品にも多用されている。化学合成できない高分子化合物なので、天然物からの抽出に今後も依存することになる。漁獲高が自然環境にあまり左右されにくい養殖魚の不可食部を原料としたコンドロイチン硫酸の調製およびその構造を明らかにしたことは、大きな社会的意義を持つと考えられる。

◆実験の部

一般操作

プロテアーゼ(アクチナーゼE)は科研製薬社製、プルランスタンダード(P-82)はshodex社製、サメ由来コンドロイチン硫酸不飽和コンドロ-二糖キット(Cキット)は生化学工業社製を使用した。セルロースアセテート膜(separax)は常光株式会社製を使用した。アルシアンブルー８GXはSigma-Aldrich社製を使用した。無機塩類、有機溶媒およびHPLC溶媒は和光純薬工業株式会社製を使用した。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析

分子量測定；日立製作所製Chromaster 5450 RI検出器を使用し、分析カラムはTOSOH社製 TSKgel G5000PW×L(300×7.8 mm)を用いた。移動相は、0.2 M NaCl； カラム温度 40℃； 流速 1 mL/min； 検出 示差屈折； 試料注入量 20 μLにて行った。不飽和２糖分析；日立製作所製Chromaster 5430 ダイオードアレイ検出器を使用し、カラムはYMC社製 polyamine II(250×4.6 mm)を用いた。移動相は注入時の組成、10 mM NaH_2PO_4：500 mM NaH_2PO_4＝100：０からリニアグラジエントで50分間かけて500 mM NaH_2PO_4 100％とした。カラム温度 40℃； 流速 1 mL/min； 検出 UV 232 nm； 試料注入量 10 μLにて行った。

軟骨処理

冷凍されたトラウトサーモン頭部(30匹)を自然解凍し、包丁にて鼻軟骨部分を切り出した。軟骨に付着している脂肪組織、肉組織をピンセットで取り除き、フードプロセッサ(Cuisinart，DLC-NXCS２)にて約５mm四方に細切した後に十分に水洗し、コンドロイチン硫酸抽出原料軟骨(70 g)とした。

コンドロイチン硫酸の抽出と調製

軟骨(70 g)に塩化カルシウム(50 mM)含有100 mM Tris-HCl b.f., pH＝8.0(150 mL)、アクチナーゼE(500 mg)を加えて、37 ℃にて4時間インキュベートしタンパク質を分解して、コンドロイチン硫酸―オリゴペプチドとした。反応液を100 ℃にて5分間加熱し、アクチナーゼを失活させ反応を停止した。次いで遠心分離操作(8,000 g×10 min)を行い、上清を回収した。更にその上清を定性分析用セルロースろ紙No. 5にてろ過した。得られたろ液を透析膜(MWCO 3500)を用いて水に対して透析し脱塩した。得られた透析内液(200 mL)に水酸化ナトリウム(4 g)を溶解し、4 ℃にて20時間静置し、β脱離反応によるコンドロイチン硫酸鎖のペプチドセリン残基からの切り出しを行った。次にこの溶液を氷冷しながら攪拌しつつ、食塩飽和エタノール390 mLを加えた。その溶液を3時間氷浴中静置した後、遠心分離操作(8,000 g×10 min)を行い、白色沈殿を得た。得られた沈殿を80 %エタノール水溶液(30 mL)で2回洗浄し、乾燥させ目的としたコンドロイチン硫酸(2.3 g)を得た。

コンドロイチン硫酸のセルロースアセテート膜電気泳動

得られたコンドロイチン硫酸を蒸留水に溶解させ、0.1 wt %水溶液を調製し、別途調製したスタンダード溶液(サメ由来コンドロイチン硫酸0.1 wt %水溶液)をそれぞれ(3 μL)を泳動用緩衝液(0.1 Mギ酸－ピリジン緩衝液(pH 3.0))を予め浸透させたセルロースアセテート膜上にスポットした。次いでそのセルロースアセテート膜を泳動槽にのせ、1 mA/cmにて15分間、電気泳動を行った。泳動後、セルロースアセテート膜をアルシアンブルー染色に供し、70 %エタノールで脱色した後、染色バンドを観察した。

コンドロイチン硫酸のゲルろ過クロマトグラフィー分析

得られたコンドロイチン硫酸を蒸留水に溶解させ、0.1 wt %水溶液を調製し、Φ0.45 nmフィルターにて濾過した後、HPLC分析に供した。t_R＝8.180 min.

コンドロイチン硫酸のコンドロイチナーゼABC消化および生成した不飽和2糖の分析

0.1 wt %コンドロイチン硫酸水溶液(40 μL)、0.4 M Tris-HCl b.f., pH＝8.0(10 μL)、0.4 M AcONa(10 μL)、コンドロイチナーゼABC(5 μL, 62 mU)を混合し、37 ℃にて24時間インキュベートした。反応液を100 ℃にて5分間加熱し、反応を停止した後、Φ0.45 nmフィルターにて濾過した後、HPLCにて分析を行った。ΔDi-0S t_R＝10.607 min, ΔDi-4S t_R＝22.200 min, ΔDi-6S t_R＝20.233 min.

◆謝辞

本研究は和歌山大学、平成28年度独創的研究支援プロジェクトAの助成を受けて行った。トラウトサーモンの頭部をご提供いただきました丸徳水産株式会社、花木明氏に感謝申し上げます。

◆参考文献

1) 長谷川栄一、鈴木旺、瀬野信子、平野茂博「ムコ多糖の構造と機能」南江堂、1968年、pp 7-24.
2) Hoffman P., Linker A., Meyer K. “The acid mucopolysaccharides of connective tissue III. The sulfate linkage” *Biochem. Biophys. Acta.*, 30, 1958, pp 184-185.
3) Matin B. Mathews. “Isomeric Chondroitin Sulphates” *Nature*, 181, 1958, pp 421-422.
4) Jeanloz R.W. “The nomenclature of mucopolysaccharides” *Arthritis Rheum*., 3, 1960, pp 233-234.
5) Sugahara K., Kitagawa H. “Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans” *Curr. Opin. Struct. Biol*., 10, 2000, pp 518-527.
6) Janet M Trowbridge, Richard L Gallo. “Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan” *Glycobiology*, 12 (9), 2002, pp 117-125.
7) Jeremiah E. Silbert, Geetha Sugumaran. “A starting place for the road to function” *Glycoconjugate J*., 19 (4/5), 2002, pp 227-237.
8) Sugahara K., Mikami T., Uyama T., Mizuguchi S., Nomura K., Kitagawa H. “Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate” *Curr. Opin. Struct. Biol*., 13 (5), 2003, pp 612-620.
9) Bourgeois B., Chales G., Dehais J., Delcambre B., Kuntz J.L., Rozenberg S. “Efficacy and tolerability of chondroitin sulfate 1200 mg/day vs chondroitin sulfate 3 x 400 mg/day vs placebo” *Osteoarthritis and Cartilage*. 6, 1998, pp 25-30.
10) Conrozier T. “Anti-arthorosis treatments: efficacy and tolerance of chondroitin sulfates” *Presse Med*., 27, 1998, pp 1862-1865.
11) Yasumoto Y. “An experience in the use of chondroitin sulfate in nervous deafness and traumatic deafness” *Jibi Inkoka Otolaryngology*., 33, 1961, pp 561-567.
12) Nepp J. “The clinical use of viscoelastic artificial tears and sodium chloride in dry-eye syndrome” *Biomterials*, 22, 2001, pp 3305-3310.
13) Hascall V. C., Sajdera S. W. “Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage. The function of glycoprotein in the formation of aggregates” *J. Biol. Chem*., 244, 1969, pp 2384-2396.
14) Kimata K., Okayama M., Oohira A., Suzuki S. “Cytodifferentiation and proteoglycan biosynthesis” *Mol. Cell. Biochem*., 1, 1973, pp 211-228.
15) Arima K., Fujita H., Toida R., Shirade, S., Tamura J. “Amounts and compositional analysis of glycosaminoglycans in the tissue of fish” *Carbohydr. Res*., 366, 2013, pp 25-32.
16) Nomoto M., Narahashi Y., Murakami M. “A Proteolytic enzyme of streptomyces griseus: VI. hydrolysis of protein by strepomyces griseus protease” *J. Biochem*., 48 (4), 1960, pp 593-602.
17) Anderson B., Hoffman P., Meyer K. “The *O*-serine linkage in peptides of chondroitin 4- or 6-sulfates” *J.*

Biol. Chem., 240, 1965, pp 156-167.

18) Davidson E., Hoffman P., Linker A., Meyer K. “The acid mucopolysaccharides of connective tissue” *Biochem. Biophys*. *Act*., 21 (3), 1956, pp 506-518.

19) Hata R., Nagai Y. “A rapid and micro method for separation of acidic glycosaminoglycans by two-dimensional electrophoresis” *Anal. Biochem*., 45, 1972, pp 462-468.

20) Saito H., Yamagata T., Suzuki S. “Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates” *J. Biol. Chem*., 243 (7), 1968, pp 1536-1542.

21) Yoshida K., Miyauchi S., Kikuchi H., Tawada A., Tokuyasu K. “Analysis of unsaturated disaccharides from glycosaminoglycuronan by high-performance liquid chromatography” *Anal. Biochem*., 177 (2), 1989, pp 327-32.

22) 奥崎文一、サケ鼻軟骨からの酸性ムコ多糖の抽出とその応用研究、平成３年度青森県地域研究者養成事業人材養成研修論文集、青森市、1992年、pp 9-14.