

イカ軟骨コンドロイチン

硫酸E型の生合成

羽田脩躬

報告番号 案件第 736 号

四・本題

イカ軟骨コンドロイチン硫酸E型の生成

羽 淩 脩 身



# 序

コンドロイチン硫酸-タンパク質複合体は 動物の結合組織の細胞外マトリックスを構成する分子の一つである。この複合分子は、多糖鎖部分、橋渡部分、タンパク質部分の三つの部分よりなる巨大分子である。多糖鎖部分は N-アセチルガラクトサミンとウロン酸のくり返し糖より成り、それに硫酸エステルがついたヘテロ多糖であるが、ウロン酸の種類、くり返し糖当りの硫酸基の数、硫酸基の位置などにより多くの異性体が知られて いる。<sup>1), 2), 3)</sup> グルクロン酸-アセチルガラクトサミンのくり返し糖のアセチルガラクトサミン部分の4位に硫酸基がついたのがコンドロイチン硫酸A、6位についたのがコンドロイチン硫酸C、イヌロン酸-アセチルガラクトサミンのアセチルガラクトサミンの4位に硫酸基がついたのがコンドロイチン硫酸Bとして知られてきた。しかし実際にはコンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸Bという单一のくり返し糖よりなる多糖鎖を均一に得ることはできなくて必ず何パーセントかの他の成分を含んでいる。これは精製分画の方法に不十分であるためではなく、一本の多糖鎖の中にそれを他の成分を含んでいること（混成多糖鎖—hybrid）によることか最近わかつてきた。<sup>4), 5), 6)</sup> コンドロイチン硫酸の分布を動物界に広く求めると、哺乳動物を含む全ての脊椎動物の軟骨組織や皮膚、さらに無脊椎動物にも存在している。動物の種類、組織により多糖鎖部分の異性体の種類がそれなりでおり、哺乳動物には見られないいろいろな構造が見つかっている。例えばサメの軟骨にはコンドロイチン硫酸Cのくり返し糖のウロン酸部分にさらに一つの硫酸基がついたもの（コンドロイチン硫酸D<sup>7), 8)</sup>）、イガの頭部軟骨やメクラウナギの脊索にはグルクロン酸-アセチルガラクトサミンというくり返し糖のアセチルガラクトサミンの6位と4位の両方に硫酸基をもったもの（コンドロ

イケン硫酸 E<sup>3), 2)</sup>)、メクラウナギの皮膚にはイズロン酸-アセチルガラクトサミンと  
いうくり返し糖のアセチルガラクトサミンの6位と4位に硫酸基をもつたもの(コン  
ドロイケン硫酸 H<sup>4)</sup>)などが知られており、これらの構造は A, B, C 型と  
して知られている構造と混成鎖をついている。これらの特殊な構造が進化的に  
下等とされている動物に存在するということは、コンドロイケン硫酸の分子進化を  
考える上で興味がある。またコンドロイケン硫酸鎖の構造と、動物の棲んで  
いる環境との関係をみると、海産動物にはくり返し糖当たり1個以上の硫酸  
基をもつ(oversulfation をうけている)分子が多く、淡水あるいは陸上に  
棲む動物にはこうした分子が少ないとがいえると思われる。<sup>10)</sup> このことは  
同じ原索動物の円口類として分類されている海産のメクラウナギと淡水にすむ  
ヤツメウナギの脊索のコンドロイケン硫酸についてみるとはっきりしている。前者は  
くり返し糖当たり平均約2個の硫酸基をもっているが、後者は1個である。この  
ように oversulfation は海水という環境に適応したコンドロイケン硫酸  
の分子形態であるという考えも成立する。

本研究の第一の主題は、コンドロイケン硫酸鎖の多様性の一つである  
oversulfation がどのようにして起るのかを明らかにすることであり。  
イカの頭部軟骨を材料として生合成面から追求した。

硫酸基の位置、および数が異なる異性体の生合成はどんなメカニズムに  
よって起るのだろうか。その可能性をあげてみると、1. 特異性の高い酵素の  
働き——この場合は硫酸基転移酵素の働きにより合成される。2. 硫酸  
基をとりこむアセチラ分子(この場合はタンパク質に多糖鎖の枝がついた

分子と考えられる)が特異的な構造をもっている。3. 酵素とアクセプターといふ単純な関係ではなく、未知の中間体などを含んだ複雑な代謝経路により合成される、たむかある。1. の可能性については SUZUKI ら<sup>11)</sup> が輸卵管の硫酸基転移酵素を分離したところ、コンドロイチン硫酸 A, C およびヘパリチン硫酸に対するそれを特異的な酵素のあることを示したことや、KIMATA ら<sup>12)</sup> によりニワトリ胚軟骨にもアセチルガラクトサミン残基の位置に特異的な硫酸基転移酵素があることが見出されたことなどにより強く支持されている。一方 MEEZAN, DAVIDSON<sup>13)</sup> はニワトリ胚軟骨からプロタミンにより既存のアクセプターを除いた硫酸基転移酵素を調製し、アクセプターによる影響を調べたところ、既存のアクセプター(コンドロイチン硫酸タンパク質複合体)を加えた場合はコンドロイチン硫酸 A を合成し、タンパク質のついてない多糖鎖をアクセプターとして加えるとコンドロイチン硫酸 C を合成することを示し、アクセプターが大きな役割をもつ 2. の可能性を示した。KIMATA<sup>13)</sup> らはニワトリ胚軟骨のコンドロイチン硫酸タンパク質には二種類あり、ショ糖密度勾配遠心で重い分子と軽い分子にわけられ、軽い分子の方が生成速度が速いことを示した。このことはコンドロイチン硫酸タンパク質の段階でもさらに分子の修飾をうけるという可能性を示している。本実験では 1. の可能性に焦点をおおせ、イカの軟骨から特異的な酵素を抽出、精製することを試みた結果、oversulfation を行う性質をもった硫酸基転移酵素が得られた。

動物の軟骨組織は、島状の細胞をマトリックスがとりかこみ、マトリックス

部分は強いメタクロマシーを示すという形態的特徴をもつた組織である。このような組織は脊椎動物ばかりでなく無脊椎動物にも見出される。例えば軟体動物腹足類の歯舌軟骨、すでに述べた軟体動物頭足類の頭部などの軟骨<sup>14)</sup>、節足動物のカブトガニの魚心の軟骨<sup>14)</sup>、環形動物ケヤリの管の軟骨<sup>15)</sup>などが知られており、石灰化していない内骨骼をついている。このような無脊椎動物の軟骨がどのような分子よりなっているのか調べることは、軟骨組織の進化を考える上で重要であり、いろいろな報告がなされている。<sup>16), 17), 18)</sup>

本研究の第二の主題は無脊椎動物軟骨の一つであるイカの頭部軟骨に含まれる protein polysaccharide の構造を調べることである。ここに示す結果は、イカの軟骨には高等動物軟骨のコンドロイチン硫酸-タンパク質には全く含まれていないグルコースを、多糖鎖部分に組みこんでいるコンドロイチン硫酸-タンパク質分子が存在することを示している。

#### 試薬および実験方法

[試薬] イカは市販のスルメイカの生イカを魚屋より購入した。 [<sup>35</sup>S] PAPS\* (比活性約  $5 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ mole) は ROBBINS<sup>18)</sup> らの方法により調製した。コンドロイチナーゼ-ABC とコンドロ-6-スルファターゼは Proteus vulgaris より調製した。<sup>19)</sup>  $\Delta$ Di-OS,  $\Delta$ Di-4S,  $\Delta$ Di-6S および  $\Delta$ Di-diSE は コンドロイチン硫酸より。<sup>20), 19)</sup> 化学的に脱硫酸したコンド

\* 以下次のような省略記号を用いる。 PAPS, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate;  $\Delta$ Di-OS, 2-acetamido-2-deoxy-3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyluronic acid)-D-galactose;  $\Delta$ Di-4S,  $\Delta$ Di-6S,  $\Delta$ Di-diSE は  $\Delta$ Di-OS の硫酸化誘導体であり、それそれヘキソサミン部分の 4位、6位、および 4位と 6位の両方に硫酸基をもつている。

ロイケンはコンドロイチン硫酸 A より<sup>20)</sup> つくった。カロニン硫酸はホラガイより抽出精製した。<sup>21)</sup> アセチルガラクトサミン-4-硫酸 および アセチルガラクトサミン-6-硫酸は SUZUKI<sup>22)</sup> らの方法により調製した。魚軟骨のコンドロイチン硫酸 A, 魚軟骨コンドロイチン硫酸 C は生化学工業(東京)より、PAPS(非放射性)は武田薬品(大阪)より、フタ胃粘膜のコンドロイチン硫酸 B(テルマタン硫酸)は DR. J. A. CIFONELLI と DR. M. B. MATHEWS (University of Chicago, Chicago) より、牛角膜のケラト硫酸は中沢氏より、プロナーゼ-P (45000 unit/gr) は科研化成(東京)より それぞれ提供された。提供者の好意に感謝する。アセチルガラクトサミン、ヒアルロン酸は生化学工業(東京)より、ヘパリンは Calbiochem (Los Angeles, California) より、DEAE-Sephadex A-50 は Pharmacia (Uppsala, Sweden) より、プロタミン硫酸は Sigma (St. Louis) よりそれぞれ購入した。

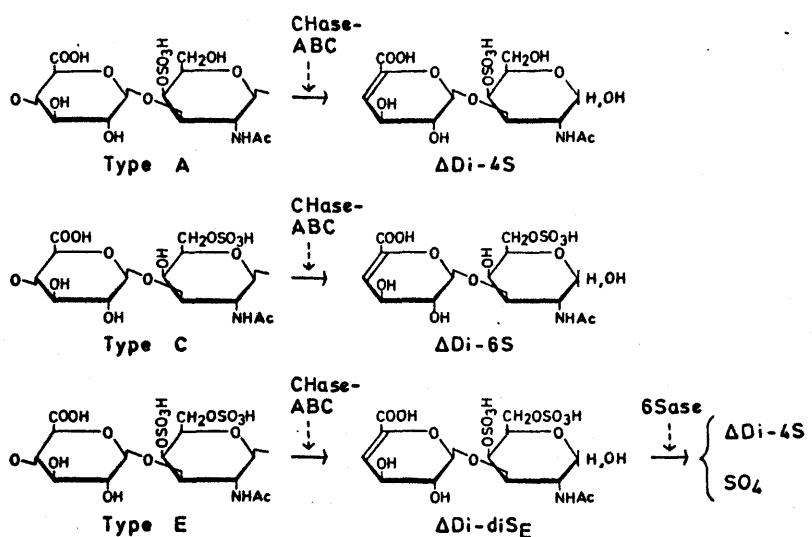
[粗酵素] 生のスルメイカ (Ommastrephes sloani pacificus) を魚屋より購入し、氷で冷やして実験室に運んだ。酵素を調製するために頭部軟骨を取り出し、カーボで他の組織の付着物を除いたあと、カミソリで切片とした。切片に4倍量の氷冷した Tris-HCl 緩衝液 (0.02M Tris-HCl pH 7.0, 0.5% Triton X 100, 10% クリセリン および 0.01M メルカプトエタノールを含む) を加え、冷した乳鉢で海砂と共にすりつぶした。得られたホモジエネートを遠心分離 (12000 g, 10分) し、上清を集め、10倍量の 10% クリセリンと 0.01M メルカプトエタノールを含んだ 0.02M Tris-HCl pH 7.0 の緩衝液に対して3回透析した。

透析内液を粗酵素とて  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

[酵素活性の測定] SUZUKI ら<sup>2)</sup>によりイカ軟骨コンドロイチン硫酸には 4 つの型の硫酸基があることが明確にされている。つまりアセチルガラクトサミン残基の 4 位について硫酸 (A 型)、アセチルガラクトサミンの 6 位について硫酸 (C 型)、およびアセチルガラクトサミン-4,6-ジ硫酸残基の 4 位と 6 位について硫酸 (以下これらをそれぞれ E<sub>4</sub> 型、E<sub>6</sub> 型と呼ぶ) である。以下に述べる酵素活性測定法はこれらの 4 種類の位置にとり込まれた  $^{35}\text{S}$ -硫酸を定量的に測定するために用いられた方法であり、次のような段階よりなっている。

(a) 放射能ラベルされた多糖鎖をエタノールにより沈殿させ、過剰の放射性の低分子物質を除く。 (b) ラベルされた多糖鎖をコンドロイチナーゼ ABC により二糖 ( $\Delta\text{Di}-4\text{S}$ 、 $\Delta\text{Di}-6\text{S}$ 、 $\Delta\text{Di}-\text{diSE}$ ) に分解する。 (c) コンドロイチナーゼ ABC 分解により生じた二糖をペーパークロマトグラフィーにより分離し、おのおのに含まれる放射能を測定する。 (d) コンドロ-6-スルファターゼにより  $\Delta\text{Di}-\text{diSE}$  をさらに  $\Delta\text{Di}-4\text{S}$  と無機硫酸へと分解する。 (e) コンドロ-6-スルファターゼ分解により生じた  $\Delta\text{Di}-4\text{S}$  と無機硫酸を薄紙電気泳動により分離し、おのおのに含まれる放射能を測定する。以上で用いられた分解酵素の反応は 図 1 にまとめてある。図 1 からわかるように コンドロイチナーゼ ABC 消化により生じた  $\Delta\text{Di}-4\text{S}$  と  $\Delta\text{Di}-6\text{S}$  の放射能はそれぞれ A 型と C 型への  $^{35}\text{S}$ -硫酸のとりこみを示しており、コンドロ-6-スルファターゼ消化により生じた  $\Delta\text{Di}-4\text{S}$  と無機硫酸の放射能はそれぞれ E<sub>4</sub> 型と E<sub>6</sub> 型への  $^{35}\text{S}$ -硫酸のとりこみを示している。

Sulfotransferase の反応は、Tris-HCl pH 8.0 5  $\mu\text{moles}$ ,  $\text{CaCl}_2$



2 μmoles, ウルタオホ

2 μmoles, [<sup>35</sup>S]PAPS

$5 \times 10^5 \text{ cpm}$  (約 0.1 nmole),

酵素, アセトアーティを含む

100 μl の反応液を 25°C で

保温して行。T<sub>0</sub> 時照には

煮沸酵素を用いた。反応

図 1. イカコンドロイチン硫酸の二糖単位の構造と酵素活性測定に用いられた反応。Chase-ABC, コンドロイナーゼABC; 6Sase, コンドロ-6-スルアターゼ

終了後沸騰水で 1 分加熱し、反応を止めた。(Step

a) フロチ-β-P 0.4 mg を各反応液に加え、37°C で 1 時間保温後、200 μl の水と 700 μl の 95% エタノール溶液 (100 ml 95% エタノール当り、1 g 酢酸カリウムおよび 1 g EDTA を含む) を加え、ムコダ糖を沈殿させた。混合液を 0°C で 30 分放置後遠心分離 (11500 × 30 分) で沈殿を集めた。沈殿を 300 μl の水にとかし、700 μl の 95% エタノール溶液を加え、遠心分離により再び沈殿を集めた。この方法によるエタノール沈殿をさらに 3 回くり返し、反応液に含まれていた低分子の放射性物質を完全に除いた。ムコダ糖画分全体への放射能の割合を測定するために沈殿を 100 μl の水にとかし、その 20 μl を沪紙のテスク (直径 2.4 cm) にスポットした。テスクを約 60°C で乾燥した後、10 μl のシンケレーター (トルエン 1 l 当り 2,5-di-phenyloxazole 4 g と 2,2'-p-phenylene-bis-(5-phenyl-oxazole) 50 mg を含む) を入れたバイアルに入れ、堀場製液体シンケレーショントロメータ (LS-500型) で放射能を測定した。(Step b) 残りの 80 μl のムコダ糖溶

波を五酸化リンを入れたデシケーターで減圧乾燥し、 $4\mu\text{moles}$  Tris-Acetate pH 8.0、 $80\mu\text{g}$  仔牛血清アルブミン( BSA ) および 0.1 unit の コンドロイチナーゼ ABC を含む溶液  $80\mu\text{l}$  にとかした。この反応液を  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間保温した。( Step C ) コンドロイチナーゼ ABC による消化反応を終えた反応液の  $20\mu\text{l}$  を 内部標準物質として用いる それと  $0.1\mu\text{mole}$  の 非放射性  $\Delta\text{Di-diSE}$  ,  $\Delta\text{Di-6S}$  および  $\Delta\text{Di-4S}$  と共に 沖紙にスポットし、溶媒 A ( 後述 ) で 48 時間展開した。沖紙を乾燥させた後、紫外ランプで分離した二糖の位置を探し、その部分を切り抜き、シンチレーターの入ったバイアルに入れ、放射能を測定した。( Step d ) コンドロイチナーゼ ABC 消化を行った反応液から別に  $20\mu\text{l}$  と、内部標準物質としてそれと  $0.05\mu\text{mole}$  の 非放射性  $\Delta\text{Di-diSE}$  ,  $\Delta\text{Di-6S}$  および  $\Delta\text{Di-4S}$  と共に 50 分間 沖紙電気泳動を行った。沖紙を乾燥後、紫外ランプで  $\Delta\text{Di-diSE}$  の位置を探し、その部分を切り抜き、水で溶出した。溶出液を五酸化リンを入れたデシケーターで減圧乾燥し、 $2\mu\text{moles}$  Tris-Acetate pH 8.0、 $40\mu\text{g}$  BSA および 0.012 unit の コンドロ-6-スルファターゼを含む溶液  $40\mu\text{l}$  に落とした。この反応液を  $37^\circ\text{C}$  で 20 分間 保温した。( Step e ) コンドロ-6-スルファターゼ消化を行った反応液を 30 分間 沖紙電気泳動にかけ、生じた  $\Delta\text{Di-4S}$  と無機硫酸を分離した。沖紙を乾燥後、無機硫酸は 塩化バリウム-ロジゾン酸試薬<sup>23)</sup> を噴霧することにより、また  $\Delta\text{Di-4S}$  は 紫外ランプにより それと位置を探し、その部分を切り抜いて放射能を測定した。DEAE-Sephadex により sulfotrans-

ferase を精製したり、精製酵素の活性を測定したりする場合のように酵素標品中に既存のアクセプターを期待できない場合には、硫酸基のアクセプターにて粗酵素を加熱し、遠心分離して得た上清を添加した。

単糖、二糖をアクセプターとして用いる実験では、Sulfo transferase 反応が終了後、反応液を直接沪紙にスプレーし、溶媒 A で展開分離した。乾燥した沪紙を X 線フィルムの上に置き、2 日間感光させ、放射能をトリニティ生成物を探し、その場所をカリ抜き水で溶出した。溶出液を 30 分間沪紙電気泳動にかけた。沪紙を乾燥後同様に X 線フィルムで不トラジオグラフィを行い生成物の位置をきめ、その場所をカリ抜いて放射能を測定した。

[定量法] タンパク質は LOWRY<sup>24)</sup> の方法により、ウロン酸は DISCHE<sup>25)</sup> の方法により、ヘキソサミンは ELSON-MORGAN 反応<sup>26)</sup> により、硫酸は DODGSON<sup>27)</sup> の方法を改良した川合ら<sup>28)</sup> の方法により、ヘキソースは アンスロン法<sup>29)</sup> によりそれぞれ定量した。

[ペーパークロマトグラフィーおよび沪紙電気泳動] ペーパークロマトグラフィーは東洋 No. 51A 沪紙（長さ 60 cm, 幅 20 cm）を用い、下降法により約 20°C で行った。使用した溶媒は以下のとおりである。溶媒 A: m-酢酸 - 0.5N アンモニア 5:3 (v/v), 溶媒 B: m-ブタノール - エタノール - 水 13:8:4 (v/v/v), 溶媒 C: 酢酸エチル - ピリシン - 水 - 酢酸 5:5:3:1 (v/v/v/v)。沪紙電気泳動は長さ 60 cm の東洋 No. 51A 沪紙を用い、

MARKHAM, SMITH<sup>30)</sup> の装置で 30 volt/cm の電圧勾配で行つた。用いた緩衝液は 0.05M 酢酸アンモニウム-酢酸 pH 5.0 である。

[イカ軟骨切片の培養に用いた人工海水] 用いた人工海水の組成は次のとおりである。12 当り  $\text{CaCl}_2$  1,200g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  13,280g (洗淨用の人工海水は  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5,320g ×  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8,400g を代りに含む),  $\text{KCl}$  0.770g,  $\text{NaHCO}_3$  0.250g,  $\text{NaCl}$  28,130g を含む塩溶液に  $\text{NaHCO}_3$  で中和したヒルビン酸, フマル酸, クルタミン酸をそれぞれ 4.92 mM, 5.38 mM, 4.92 mM, および クルコース 0.1% によるように加えた。最終的に pH を  $\text{NaHCO}_3$  により 7.5 に合わせた。

## 結 果

[粗酵素による硫酸酸転移反応] イカ軟骨より得られた粗酵素を表 1 の条件で [ $^{35}\text{S}$ ]PAPS と保温すると [ $^{35}\text{S}$ ]PAPS の放射能の約 7% が 5 時間で粗酵素標品中に含まれる硫酸基の受容体(既存のアクセプター) に転移された。酵素の比活性は粗酵素調

表 1. 粗酵素及び精製酵素によるコンドロイシン硫酸酸の各位置への硫酸酸のとりこみ 酵素反応は "実験方法" に述べてある方法に従い、粗酵素 0.18 mg (タンパク質として)あるいは DEAE-Sephadex カラムから溶出された画分 II の濃縮液 0.07 mg (タンパク質として)を酵素として用い、1 時間おこなった。画分 II を用いた場合には硫酸基の受容体として、加熱処理を行つた粗酵素 0.04  $\mu\text{mole}$  (グルクロン酸として)を加えた。

Enzyme preparation	Acceptor added	Total <sup>a</sup> activity	Specific <sup>b</sup> activity	Distribution of $^{35}\text{S}$ <sup>c</sup>				
				Type A	Type C	Type E <sub>4</sub>	Type E <sub>6</sub>	Resistant
Crude extract	None	1610	2.55	0.50	0.24	0.50	0.85	0.07
DEAE-Sephadex (Fraction II)	None	1	0.03	trace	trace	trace	trace	trace
	Boiled crude enzyme	440	13.4	0.87	0.30	0.83	7.52	1.64

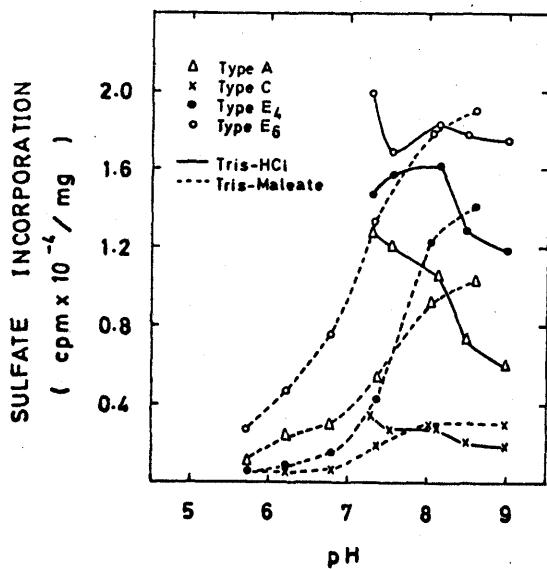
a) 粗酵素 630 mg (タンパク質として)あるいは画分 II 33 mg (タンパク質として)によくエタール不溶性多糖画分へとりこまれた全放射能 ( $\text{cpm} \times 10^{-4}$ )

b) 酵素標品のタンパク質 1 mg 当りのエタール不溶性多糖画分へとりこまれた全放射能 ( $\text{cpm} \times 10^{-4}/\text{mg}$ )

c) 酵素標品のタンパク質 1 mg 当り、各々の位置へとりこまれた全放射能 ( $\text{cpm} \times 10^{-4}/\text{mg}$ )

製に用いたイカが異なるに従い変化するので、それをこの実験ごとに示した。“実験方法”に述べた方法に従って放射能をとりこんだムコタ糖を取り出し、 $^{35}\text{S}$ -硫酸のとりこまれた位置を調べ表1に示した。この表から粗酵素には5つの硫酸基を転移する活性があることがわかる。つまりA型、C型、E<sub>4</sub>型、E<sub>6</sub>型およびコンドロイナーゼABCに抵抗性の高分子画分へ硫酸を転移する活性である。これらの5つの活性はそれぞれ異なり値を示すが、特にE<sub>6</sub>型活性が最も大きい。 $^{35}\text{S}$ -硫酸をとりこんだが、コンドロイナーゼABCにより低分子化されない物質についてはこの実験ではこれ以上追求しなかった。

以下で述べるように反応液のpHやイオン組成などが酵素反応にいろいろの影響を与えるが、イカの軟骨より抽出された粗酵素はE<sub>4</sub>型とE<sub>6</sub>型というアセチルガラクトサミン残基にある二つの硫酸基の転移を行っている点では全く獨得なものである。12日目のニワトリ卵軟骨より抽出された粗酵素を[ $^{35}\text{S}$ ]PAPSと保温した時には硫酸



基を二つもったくなり返しニ糖はつくられないか、つくられても微量であることがわかるている。<sup>31)</sup>

図2は反応液のpHを変えた時の活性の変化

図2、粗酵素による4つの異なる位置への硫酸のとりこみに対するpHの影響。緩衝液のpH以外は“実験方法”に述べてある条件に従つた。用いた緩衝液は酵素反応液100μl中にTris-HCl(pH 7.25から9.0)あるいはTris-Maleate(pH 5.75から8.6)を5μmolを含むものである。粗酵素0.2mg(タンパク質12)を加えて1時間保温した。外<sup>31)</sup>時にE<sub>4</sub>型、E<sub>6</sub>型、C型からは、アクセプターを加えなかつた。

の至適pHは8.2付近である

るが、A型では T2 である。また 総緩衝液を 0.05M Tris-Maleate にかえると全ての活性は高い pH の方へ至適 pH が移った。いずれの緩衝液を用いた場合も、E6 型の活性が全ての pH において他の活性よりも高かった。

アセチルガラクトサミン残基の各位置に硫酸基も転移する活性が陽イオンによりどんな影響を受けるかを調べた。図 3 に示されるように、KCl と NaCl は E6 型の硫酸基を転移する反応を活性化するけれども、他の三つの反応にはほとんど効果がないことがわかった。MgCl<sub>2</sub> と MnCl<sub>2</sub> は全ての反応に効果がないことはさう NacI と KCl による活性化は塩素イオン影響ではないと思われる。カリウムイオン

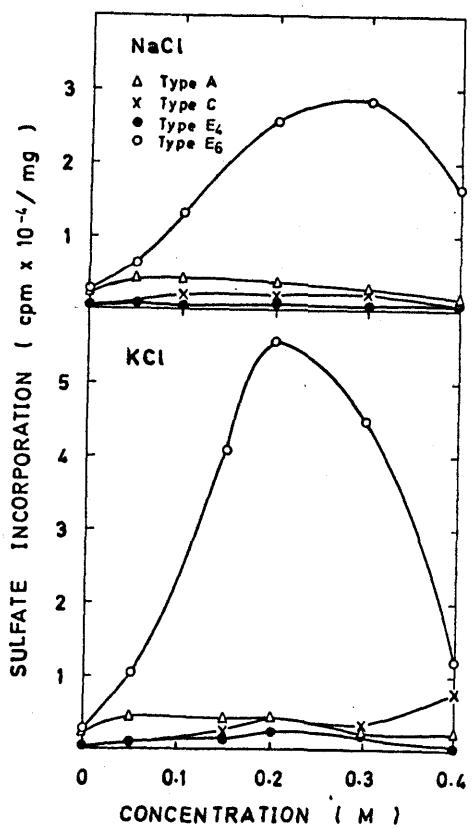


図 3. 粗酵素による 4 つの異、T-位置への硫酸基の転移に対する NaCl (上図) と KCl (下図) の濃度の影響。酵素反応は "実験条件" に述べてある方法に従つた。但し、CaCl<sub>2</sub> は示された濃度の NaCl あるいは KCl とあわせられた。粗酵素 0.18 mg (タンパク質として) を加え 1 時間保温した。外からはアクセプターを加えなかった。

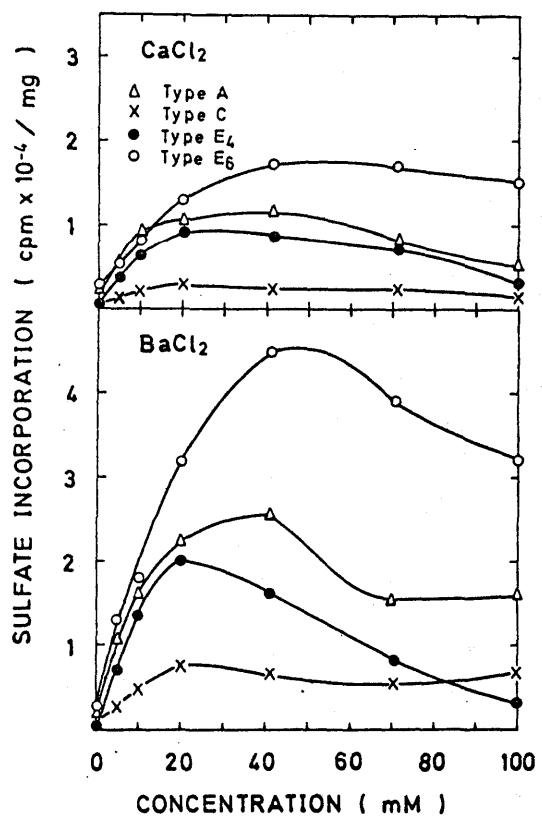


図 4. 粗酵素による 4 つの異、T-位置への硫酸基の転移に対する CaCl<sub>2</sub> (上図) と BaCl<sub>2</sub> (下図) の濃度の影響。酵素反応は "実験条件" に述べてある方法に従つた。但し、CaCl<sub>2</sub> の濃度を示された値にする。あるいは CaCl<sub>2</sub> を示された濃度の BaCl<sub>2</sub> とあわせられた。粗酵素 0.18 mg (タンパク質として) を加え 1 時間保温した。外からはアクセプターを加えなかつた。

の至適濃度 (0.2M)において E<sub>6</sub>型硫酸の転移反応は 加えない場合の 18 倍に活性化された。一方  $\text{CaCl}_2$  や  $\text{BaCl}_2$  は 4つの反応全てを活性化した。しかし最大の活性を与える濃度や活性化の程度はかなり異っている (図4)。カルシウムイオンでもバリウムイオンの場合でも至適濃度では E<sub>6</sub>型硫酸を転移する活性が最大であった。ここに示された  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  による活性化のパターンはニクトリ 月取骨より抽出された酵素の活性化のパターン<sup>31)</sup> とはかなり異っているが、これらのイオンが酵素に直接影響を与えているのか、それとも既存のアクロマー分子に影響を与えていているのかはこの実験ではわかっていない。

表2. 粗酵素による 4つの異なる位置への硫酸根の取り込みに対する SH 試薬の影響。酵素反応は “実験方法”に述べてある方法に従

つを行った。但し、control ではグルタチオンを加えないで、plus mercaptoethanol ではグルタチオンのみにメルカプトエタノールを加えた。0.02M Tris-HCl pH 7.0 にて 0°C で 24 時間透析した粗酵素 0.18 mg を加え 1 時間反応を行った。加えることにより、選択的

Condition	Total sulfate incorporation			
	Type A	Type C	Type E <sub>4</sub>	Type E <sub>6</sub>
$\text{cpm} \times 10^{-2}$				
Control	6.0	14.8	13.1	297
Plus mercapto- <sup>a</sup> ethanol	31.3	19.6	52.5	298
Plus glutathione <sup>a</sup>	37.1	22.6	53.3	385

a) 0.02M

な活性化が起こることか観察された (表2)。この実験では粗酵素を 0.02M Tris-HCl pH 7.0 にあらかじめ透析においておいたものを酵素として用いた。これらの試

薬は全ての反応を促進するけれども、E<sub>4</sub>型と A 型の硫酸根の転移反応の方が、E<sub>6</sub> 型や C 型の硫酸根の転移反応よりも強く活性化された。このことは少くとも アセチル α-ラクトサミン残基の 4 位と 6 位に硫酸根を転移する酵素は異なる酵素タンパク質であることを示唆しているが、このことは次の熱変性の実験からも支持されている。

E<sub>4</sub>型とE<sub>6</sub>型の硫酸基

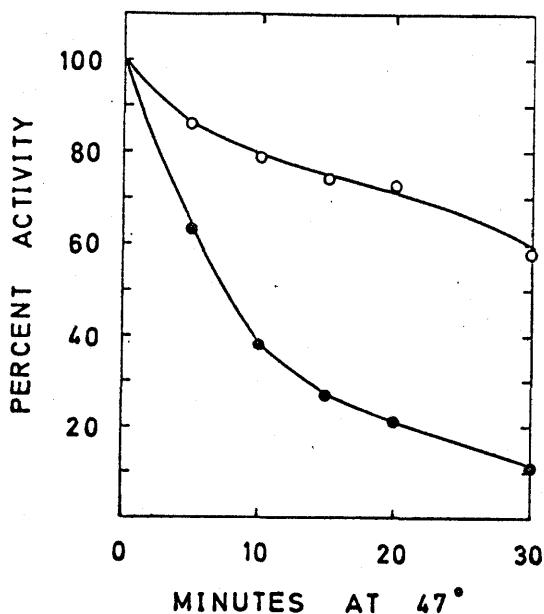


図5. 二つの異った硫酸転移活性の熱安定性。

粗酵素を 47°C で示された時間だけ保温した後活性を調べた。—●は E<sub>4</sub>型、—○は E<sub>6</sub>型硫酸のとりこみの活性を表わしている。酵素反応は 0.15 mg (タンパク質について) の酵素標品を加え、1時間行った。外からのアクセシビティは加えなかった。他の実験条件は“実験方法”に述べある条件に従つた。未処理の粗酵素による値を 100% とおいた。

硫酸には、異なる硫酸転移酵素が対応している可能性を示していると思われるか。酵素の精製を行うことにより、このことか部分的に確かめられた。

表3. 粗酵素による4つの異った位置への硫酸のとりこみに対するプロタミンの影響。酵素反応は“実験方法”に述べてある方法に従い粗酵素 0.18 mg (タンパク質について) を加え、25°C で 1 時間 反応した。

Condition	Total sulfate incorporation			
	Type A	Type C	Type E <sub>4</sub>	Type E <sub>6</sub>
cpm × 10 <sup>-2</sup>				
Control	1.4	1.1	1.4	4.4
Plus protamine <sup>a</sup>	6.1	4.7	3.1	51.7

a) 塩酸プロタミン 0.1%

を転移する活性が 47°C の熱処理により受けける影響を調べたのが 図5 である。この結果より、E<sub>6</sub>型の硫酸の転位活性は E<sub>4</sub>型のものよりも不安定なことがわかった。

47°C で 30 分間保温すると、E<sub>6</sub>型の活性は 40% 失活するに対し、E<sub>4</sub>型は 90% も失活した。この熱による失活の交差は、アセチレカラクトサミン残基の異なる位置の

[硫酸基転移反応に

及ぼすプロタミンの影響]

プロタミンは酸性ムコ多糖と結合し、不溶性の沈殿をつくるため酸性ムコ多糖の除去に用いられてきた。<sup>12)</sup> と

これがイカ軟骨の粗酵素にプロタミンを加え、酵素に

含まれているムコ多糖を沈殿状にすると硫酸基の脱離速度が10倍くらい活性化されることが観察された(表3)。塩酸プロタミンを0.1%の濃度で反応液に加えた時にA型とC型の硫酸の脱離活性は約5倍くらい活性化されたが、E6型の硫酸の脱離は10倍以上活性化された。E4型の硫酸の脱離にはあまり効果がなかった。この実験は反応液に加えられたプロタミンが酵素タンパク質のために影響を与えたというよりも、硫酸基の受容体となるムコ多糖分子がプロタミンと結合して、コンフォメーションが大きく変化したことにより酵素反応に促進的效果を与えたことを示していると考えられる。

[E6-Sulfotransferase の精製] 粗酵素を用いた実験によって、イカ軟骨から抽出された粗酵素の中にはPAPSを硫酸の供与体としてよくとも4つの異性体硫酸基の転移を触媒する活性のあることが示された。これらの活性はpH、陽イオンの濃度、熱処理などの条件でさまざまに変化し、複数個の硫酸基転移酵

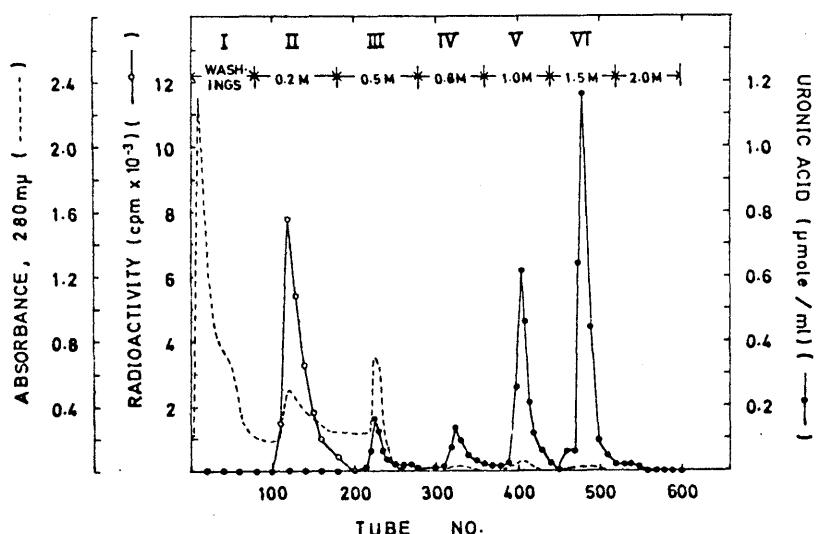


図6. DEAE-Sephadex A-50カラムの溶出曲線。

—○— sulfotransferase, ---- 紫外吸収(280 mμ), —●—ウロニ酸含量をそれぞれ表わす。酵素反応は「実験方法」に従って行なった。粗アセチルガラクトサミン-4-硫酸アグリベオースから0.04 μmole(グルクロン酸として)の加熱した粗酵素を加え、各画分から70 μlトリ酢酸で加え1時間反応した。

素の存在を示唆しているが、それらの活性が異なった酵素タンパク質の触媒作用を表わしているのみにつけばは、さりとてよい。

このことを知るために酵素の精製を行なうと、アセチルガラクトサミン-4-硫酸アグリベオースの6位に硫酸基を

転移する酵素（以下 E6-Sulfotransferase と呼ぶ）が得られた。このことは硫酸基の位置に特異的な硫酸基転移酵素が存在することをさらに確かなものとした。

粗酵素 200 ml を冷凍室で DEAE-Sephadex A-50 のカラム（5 cm × 45 cm）に吸着させ、10% グリセリン、0.01M メルカプトエタノールを含む 0.02M Tris-HCl pH 7.0 1.5 l で洗った。次いでカラムを同じ緩衝液中の 0.2M NaCl、0.5M NaCl 2 l, 0.8M, 1.0M, 1.5M および 2.0M 1.6 l で段階的に溶出した。流速は 60 min/hour で 20 ml ずつ集めた。溶出液の硫酸基転移活性を図 6 に示す。溶出液の紫外吸収およびウロニ酸含量も定量して同図に示した。硫酸を転移する活性は 0.2M NaCl で溶出される画分（画分 II）にのみ見出された。画分 III から画分 V は コンドロイチン硫酸-タンパク質を含んでいたが、溶出塩濃度が高くなるにつれてタンパク質含量は減少し、ウロニ酸含量は増加した。（詳しい分析値は表 4 に示した。）画分 II を集め、減圧透析により 20 ml に濃縮した。濃縮酵素を用いて硫酸基の各位置へのとりみを調べてみると、E6-Sulfotransferase は約 9 倍精製されたが、他の活性は非常に少くなかった（表 1）。DEAE-Sephadex のカラムクロマトグラフィーで画分 II 以外には硫酸基転移活性がないことから、この方法により E6-Sulfotransferase のみが精製できたのは、硫酸転移酵素の安定性の違いを反映しているものと思われる。つまり A型、C型、E4型のそれらの硫酸基を転移する活性は E6-Sulfotransferase よりもずっと不安定なため、精製の過程で失活したものと思われる。

[ E6-Sulfotransferase の性質 ] 精製した酵素標品を用いて行なわ

れる E6-型 硫酸基転移反応は 硫酸基の受容体となる物質を反応液に加えた時にのみ観察された。粗酵素に含まれている硫酸基の受容体ばかりでなく既知のムコ多糖鎖も硫酸基の受容体として働くことがわかった。ムコ多糖濃度と反応速度の関係を示したのが図7である。この実験では

比放射能の低い [ $^{35}\text{S}$ ]

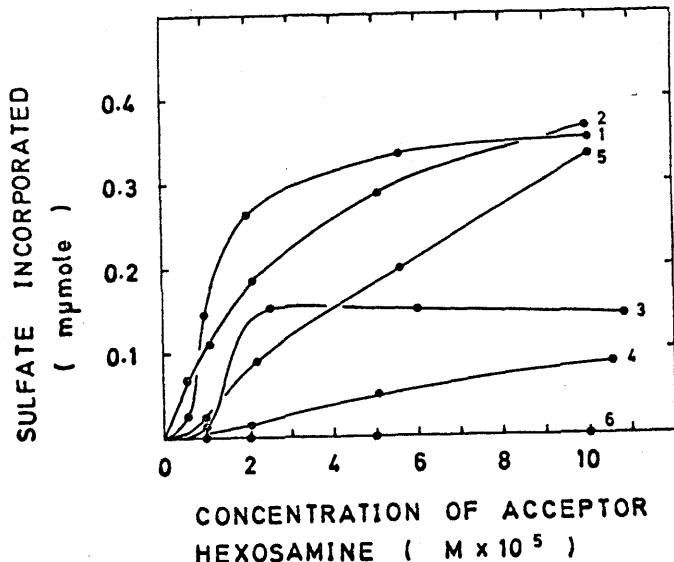


図7. いろいろな物質のアクアセプター活性。0.07 mg (ターハー質にて) の E6-Sulfotransferase を加え、“奥野方法”に述べてある条件に従い 5 時間酵素反応を行った。但し用いた PAPS の濃度は  $0.133 \text{ mM}$  ( $5 \times 10^5 \text{ cpm}$ ) であり、次のようなアクアセプターを示された濃度に加えた。1. コンドロイチン硫酸A；2. アセチルガラクトサミン-4-硫酸；3. コンドロイチン硫酸B；4.  $\Delta\text{Di}-4S$ ；5. コンドロイチン硫酸C (10%のコンドロイチン硫酸Aを含む)；6. コンドロイチン、ヒアルロン酸、カルニン硫酸 (濃度はグルコースのモル数で表わしてある)、アセチルガラクトサミン、アセチルガラクトサミン-6-硫酸、 $\Delta\text{Di}-0S$ 、 $\Delta\text{Di}-6S$ 、ヒアルロン酸、ケト硫酸 (濃度はガラクトース残基のモル数で表わしてある)。コンドロイチン、ヒアルロン酸、ヘパリン、牛角膜ケラト硫酸およびカルニン硫酸 (グルカン硫酸) は アクアセプターとして働かなかった。市販のコンドロイチン硫酸Cは高いアクアセプター活性を示している。しかし この活性は コンドロイチン硫酸Cそのものによるのではなく市販のコンドロイチン硫酸C標品に含まれているコンドロイチン硫酸Aによるものであることがわかっている。図7にはまた アセチルガラクトサミン-4-硫酸や  $\Delta\text{Di}-4S$

PAPS ( $3.7 \times 10^7 \text{ cpm}/\mu\text{mole}$ ) を用い、反応液における PAPS 濃度を  $1.33 \times 10^{-4} \text{ M}$  とした。この濃度は PAPS に関する飽和した条件である。A 型の硫酸基をもつているムコ多糖鎖、コンドロイチニン硫酸A、コンドロイチニン硫酸Bのみが硫酸基の受容体として働いている。

を アクセフター としても 同様の反応(つまり二つ目の硫酸基を リニンで アセチルガラクトサミン-4,6-ジ硫酸という構造をとる反応) が起きることも示されている。アセチルガラクトサミン-4-硫酸および  $\Delta Di-4S$  を アクセフター として 反応液に 加えた時に、酵素反応により生成した 硫酸化糖を調べると、ペーパークロマトグラフィー および 沖紙電気泳動で それぞれ アセチルガラクトサミン-4,6-ジ硫酸と  $\Delta Di-diSE$  に一致した。この他 UDP-アセチルガラクトサミン-4-硫酸にも 同様の反応が起こることがわかっている。 SUZUKI, STROMINGER<sup>32)</sup> は ニワトリ輸卵管中に アセチルガラクトサミンを含む オリコ糖に 硫酸を転移する 酵素が存在していることを報告した。しかレイカの軟骨から 得られた E6-Sulfotransferase は 硫酸基をもたない アセチルガラクトサミン残基を含む 糖(例えはアセチルガラクトサミン、 $\Delta Di-0S$ )には 活性を示さないといふ点で 輸卵管の酵素とは異なっている。アセチルガラクトサミン-6-硫酸あるいは  $\Delta Di-6S$  は いずれも アクセフター として 作用しなかった。これららの結果より アクセフター には アセチルガラクトサミンの 4位に 硫酸基をもつことが 必要であることがわかる。図7の実験より アセチルガラクトサミン-4-硫酸と  $\Delta Di-4S$  に対する  $K_m$  値は それぞれ 0.04 mM と 0.14 mM である。<sup>\*</sup>

$\Delta Di-4S$  を アクセフター として 用いた 反応は 反応生成物である  $\Delta Di-diSE$  によって 抗拮抗的に 阻害された(図8)。  $K_i$  値は 図8 から 求めると  $\Delta Di-diSE$  に対して 0.46 mM となつた。この結果より 硫酸転移酵素は 反応生成物から 阻害作用をうけて 反応生成物の 硫酸含量を一定とする 調節機能をも

\* コンドロイント硫酸AやBなどの多糖に対する  $K_m$  値は、アクセフター濃度に対する反応速度の変化がシグモイドになるため求められなかった。表4においてアクセフターに対する  $K_m$  値が求めてないのも同じ理由による。单糖、二糖では基質濃度に対して正常な飽和曲線になるのに多糖ではシグモイドになるのは興味ある事実であろう。

でいろいろ考えられる。

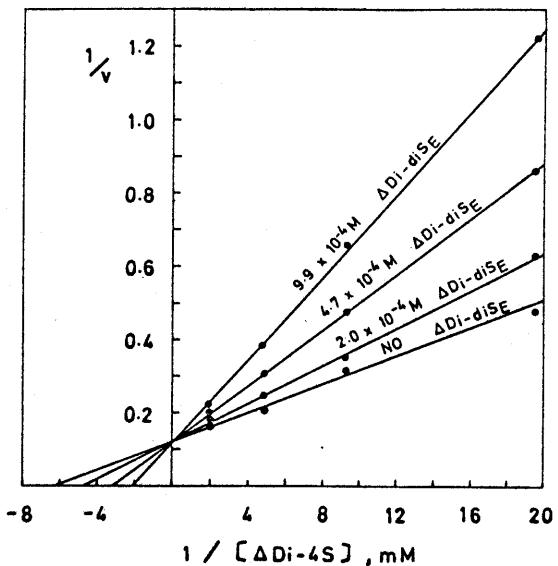


図8.  $ΔDi-diSE$  による阻害に対する  $ΔDi-4S$  濃度の影響。酵素反応は“実験方法”に述べてある条件に従い、0.07 mg (タンパク質として) の E6-Sulfotransferase を加え、1時間行った。但し示された濃度の  $ΔDi-4S$  をアクセプターとし、示さざる濃度の  $ΔDi-diSE$  を加えて行った。反応速度、v, は1時間につくられた  $[^{35}\text{S}]ΔDi-diSE$  の放射能を表わしている。

表4. 既存のコンドロイチン硫酸-タンパク質の分析値  
と硫酸受容体活性。

Fraction	Ratio to glucuronic acid			Chondroitinase digestible component	Disaccharide produced by <sup>c</sup> chondroitinase ABC				$V_{max}$ <sup>d</sup>	$K_m$ for PAPS
	galactosamine	sulfate	protein		$ΔDi-OS$	$ΔDi-4S$	$ΔDi-6S$	$ΔDi-diSE$		
III	1.56	0.72	2.93	37.3	41.8	40.9	8.9	8.4	0.19	0.33
IV	1.12	1.26	0.18	61.1	7.6	46.5	17.1	28.8	0.22	0.72
V	1.05	1.44	0.04	73.0	3.7	39.6	20.0	36.7	0.22	1.37
VI	1.02	1.56	0.02	81.0	2.1	29.5	20.1	48.3	0.20	

a) 図6を見よ。

b) コンドロイチン消化により生じた不飽和二糖の総量(μmole)/コンドロイチン硫酸-タンパク質標品のグルクロン酸量(μmole) × 100 画分III 25.2 μmole, 画分IV 25.4 μmole, 画分V 99.5

c) 4つの不飽和二糖の総量を100%とした。

d) アクセプター濃度は画分IV, V, VIについては0.1 mM(加以酸として)また画分IIIについては0.5 mMであった。

[粗酵素に含まれている硫酸基受容体の性質] 粗酵素に含まれていたウコン酸を含む物質は図6に示すように、DEAE-Sephadexによっていくつかの画分に分かれた。これらの画分の化学組成およびE6-Sulfotransferaseに及ぼす影響を調べ、アクセプター分子の構造と酵素反応との関係を明らかにする試みを行った。

DEAE-Sephadex

カラムより溶出されたウコン酸

を含む画分IIIからそれを

それ集め、減圧透析により

濃縮した。粗酵素に含ま

れていたグルクロン酸と2670

μmolesの物質を分画して

$\mu\text{moles}$ を得た。表4に示すごとく その化学組成は、グルクロン酸、ガラクトサミン、硫酸およびタンパク質を含むが、画分ⅢからⅣになるに従いタンパク質含量が減少し、ウロン酸あるいはガラクトサミンに対する硫酸含量は増加している。これら多糖の構造の違いはコンドロイチナーゼABC分解により生ずる二糖の組成を比較することによりはつきりする。表4に見るようにコンドロイチナーゼABC消化により得られる二糖の回収率は画分Ⅲの37%（グルクロン酸）から画分Ⅳの81%へと増加している。コンドロイチナーゼ消化により得られた二糖の組成を調べるとアセチルガラクトサミン-4,6-ジ硫酸をもつ二糖の割合は画分Ⅲから画分Ⅳになろにかけて8.4%から48%へと増加し、一方硫酸基をもたないあるいはアセチルガラクトサミン-4-硫酸をもつ二糖の割合は減少している。

4つの画分は全て E6-Sulfotransferase のアクセプターとして働いた。それらの画分の濃度の影響を調べた結果、最大速度は表4に示すように4つの画分でほとんどかわらなかつた。（19ページの脚注参照）この実験に用いたPAPS濃度は0.133 mMで、この濃度ではPAPSについては飽和した状態であり、 $^{35}\text{S}$ -硫酸の取りこみ速度は酵素濃度とアクセプター濃度にのみ依存している。PAPS濃度と反応速度との関係を、アクセプター濃度が飽和している状態で調べ、PAPSに対するKm値を表4に示して。この結果はアクセプターの硫酸含量が低いほど酵素とPAPSの親和力が大きくなることを示している。

[グルコースを含んだオリゴ糖の調製及びその分析] 表4に示される

ように、粗酵素中に含まれるウロン酸を含む物質はコンドロイチナーゼABCで部分的にか不飽和二糖にならなかった。このことはイカ軟骨のコンドロイチン硫酸タンパク質にはコンドロイチナーゼABCで分解されない構造が存在しているのか、あるいは全く別の高分子が共存していることに起因すると考えられる。硫酸受容体の性質をより明瞭化にするために、コンドロイチナーゼABCで不飽和二糖にならない部分を調べた結果、グルコースを含むオリゴ糖がコンドロイチナーゼABCによる分解物中に存在することを見出した。このことはイカの軟骨のコンドロイチン硫酸は oversulfation だけではなく新たな構造的特徴を持っていることを示しているが、その意義については“考察”で述べる。

表4の画分D 114 μmoles(グルコラニン酸とて), Tris-酢酸 pH 8.0 250 μmoles, BSA 0.5 mg, コンドロイチナーゼABC 30 Unit を含む 5 mL の反応液を 37°C で保温し、紫外吸収の増加を追った。2 時間保温したところ紫外吸収の増加は全くなくなったので、沸とう水に 1 分つけて反応を

止めた。反応液を 6 枚の東洋 No. 51A 沢紙にスポットレ溶媒 A で 60 時間展開した。沢紙を乾燥後、原点から  $\Delta Di-diSE$  までの間を全て水で溶出した。溶出液を 1 枚の東洋 No. 51A 沢紙

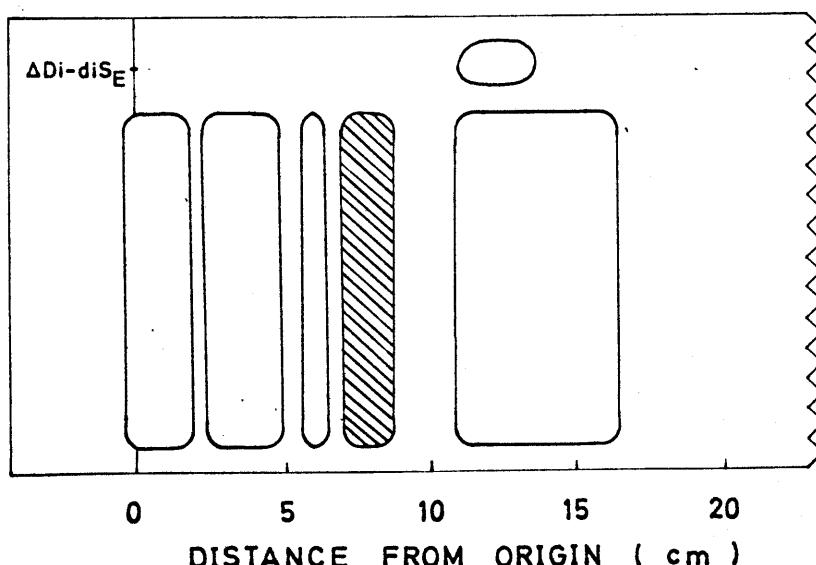


図9. ペーパークロマトグラフィーによるオリゴ糖の分離

にスポットし、再び溶媒 A で 60 時間展開した。この時の紫外吸収をもつ物質の移動パターンを図 9 に示す。図 9 で斜線を引いた部分を水で溶出し、溶出液を東洋 No.51 A にスポットし、沪紙電気泳動を行った。この時の紫外吸収をもつ物質の移動パターンを図 10 に示す。図

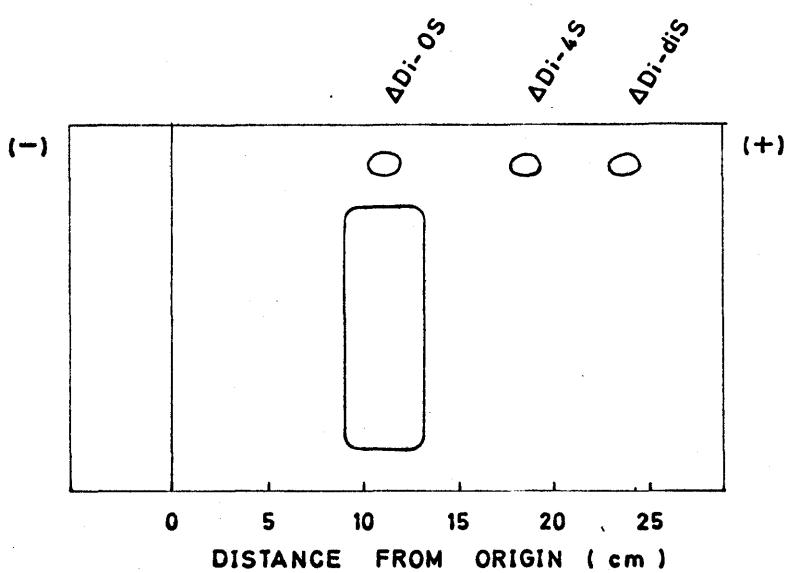


図 10. 沪紙電気泳動によるオリゴ糖の分離

10 で  $\Delta Di-OS$  と移動度の一

致する物質を溶出し、東洋

No.51 A 沪紙にスポットし、溶

媒 B で 48 時間展開した。

沪紙を乾燥後紫外吸収を

もつ物質を溶出した。この物

質をオリゴ糖-1 として以下の

分析に用いた。

得られたオリゴ糖-1 は溶媒 A, C によるペーパークロマトグラムおよび 0.05M 酢酸アンモニウム-酢酸 pH 5.0 による沪紙電気泳動において単一のスポットを与えた。またコンドロイチナーゼ ABC およびコンドロイチナーゼ ACI = 5 が全く分解されなかった。構成糖を調べるためにオリゴ糖-1 0.02 μmole (ウロニ酸 1%) を 6N 塩酸で 100°C で 4 時間および 1N 塩酸で 100°C 3 時間の二つの条件で加水分解した。加水分解したサンプルを水酸化ナトリウムと五酸化リンの入ったデシケータで減圧乾燥し、塩酸を除いたあと、東洋 No.51 A 沪紙にスポットし、溶媒 C で 15 時間展開した。沪紙を乾燥後硝酸銀試薬で染色し、糖の同定を行った。結果を図 11 に示す。6N 塩酸で 4 時間加水

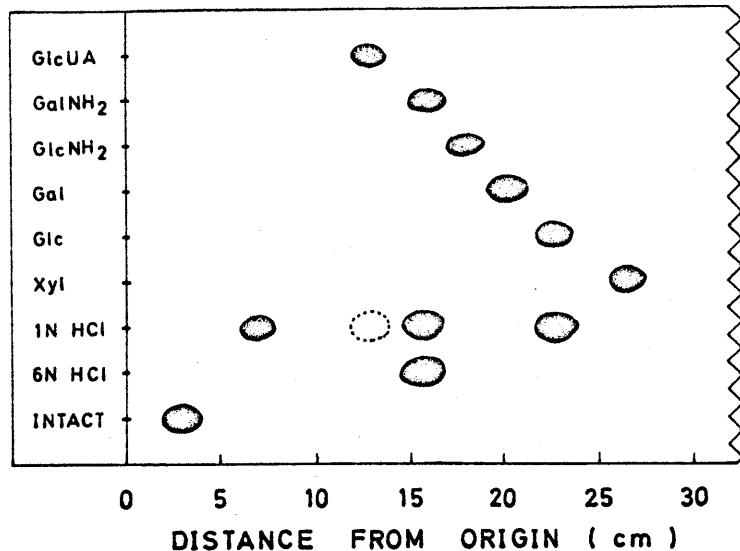


図 11. ペ-ペ-クロマトグラフによる塩酸加水分解物の分離

ドロイチン硫酸とタシパク質の橋渡し構造をつぶしているガラクトースとキシロースは全く検

表5. オリゴ糖-1の分析値

Yield <sup>a</sup>	Molar ratio to glucuronic acid			Ratio of reducing-end galactosamine to total <sup>b</sup> galactosamine	$\epsilon_{232\text{m}\mu}$ <sup>c</sup>
	galactosamine	glucose	sulfate		
0.43	0.88	0.94	0.34	0.45	2960

a) グルクロン酸として。  $\mu\text{mole}$

b)  $\text{NaBH}_4$ 還元により Elson-Morgan 反応で発色しなくなるガラクトサミンの割合。

c) ウロニ酸に対するモル分子吸光係数。

分解した場合にはガラクトサミンだけが確認できましたが、  
IN 塩酸で 3 時間 加水分解した場合にはガラクトサ  
ミンの他にグルコースと未分解物と思われるスポットが確認  
された。微量だがグルクロン酸のスポットも確認された。コン

ドロイチン硫酸、タシパク質はガラクトースとキシロースは全く検出されなかつた。

オリゴ糖-1の分析値を表5に示す。

分析値より、この物

質はガラクトサミン、グルク

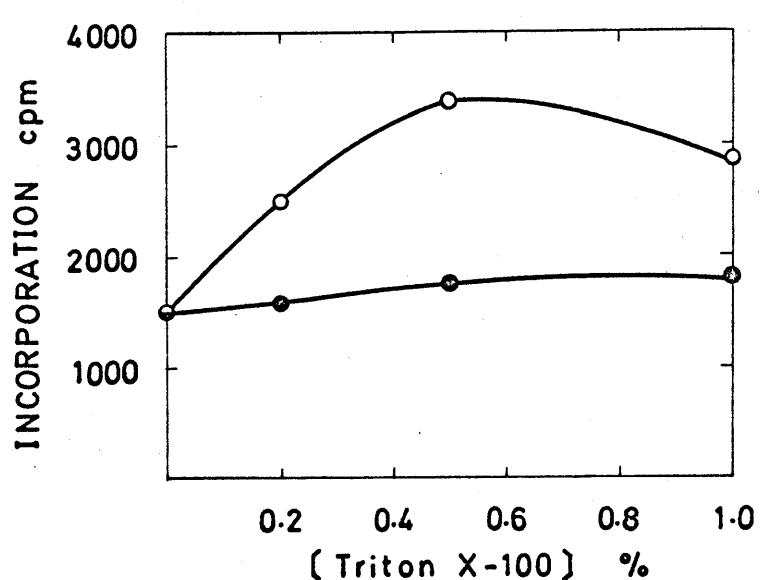
ロン酸、グルコースを 1:1:1

の割合に含み、硫酸を

もたないオリゴ糖であることがわかる。還元末端ガラクトサミンの全ガラクトサミンに占める割合は、ウロニ酸-アセチルガラクトサミンのくり返し二糖のみからなるオリゴ糖なら 4 糖の値を示している。この物質が  $232\text{m}\mu$  に吸収極大をもつ紫外吸収を持つことは、コンドロイチナーゼ ABC 消化によてコンドロイチン硫酸鎖中より得られたことを示している。またウロニ酸当りの分子吸光係数はコンドロイチナーゼ ABC 消化により得られる不飽和二糖の値<sup>2)</sup> の約二分の一の値

を示すことから、不飽和ウロン酸は全ウロン酸の2分の1であると考えられる。結局この物質は2個のくり返し二糖よりなる4糖に何らかの形でフルコースが2個結合した6糖と推定できる。

[硫酸基転移酵素の細胞内の分布について] 上記の硫酸基転移酵素に関する実験はすべて可溶性画分を用いて行なってきた。ニワトリ胚軟骨においては硫酸基の転移反応は細胞の顆粒画分で行なわれるこれが報告されている。<sup>33), 34)</sup> またイカの軟骨細胞には膜系が非常によく発達していることが電子顕微鏡によって調べられている。<sup>14)</sup> これらのこからイカの軟骨細胞でもコンドロイタン硫酸の生成は膜系の酵素により行なわれていることが考えられるので、



硫酸基転移酵素の細胞内の

分布について調べた。

Triton X-100 は中性  
の界面活性化剤にて細胞  
内膜系の破壊剤にてよく  
用いられている。抽出緩  
衝液に Triton X-100 を入れ、

図 12. Triton X-100 の酵素抽出に及ぼす効果。酵素反応は“奥験方法”に述べてある方法に従い、抽出液 50 μl を酵素として加え、1時間反応を行い、エターネル不溶性の多糖画分への融合に、酵素の收量は以下の如きを示した。—○— 酵素の抽出の緩衝液に示された濃度の Triton X-100 を加えた場合、—●— Triton X-100 が含まれた場合の酵素抽出を調べたのが図 12 である。2g のイカ軟骨切片を示された濃度の Triton X-100 を含む 0.02M Tris-HCl pH 7.0 10 ml とさせ、乳鉢を

び海砂と共にすりつぶし、ホモジエキートを遠心分離( $12000g \times 10\text{分}$ )にて上清を得た。上清を粗酵素として“実験方法”に述べた方法により酵素活性を測定した。ムコ多糖画分全体への放射能の割合を図12に示した。Triton X-100を0.5%抽出液に加えた時に酵素の収量は加えない時の2倍となった。これは膜に結合していた酵素が膜をこわすことにより可溶化したためと考えられる。

このように硫酸脱移酵素のかなりの部分が膜と結合して存在しているものと思われるが、膜と結合している酵素と可溶性の酵素の間には少しが変化がみられるかを調べた。イカ軟骨5gをおろし金ですりつぶしてPOTTER-ELVEJEHEMのガラス製ホモジナイザーで20mLの0.25Mショ糖溶液でホモジナイスし、ホモジエキートを遠心分離( $10,000g \times 20\text{分}$ )した。得られた上清を日立超遠心分離機65-P型を用い遠心分離( $100,000g \times 30\text{分}$ )を行い、上清10mLと沈殿を得た。沈殿は1mLの0.25Mショ糖でホモジナイスした。 $100,000g$

表6. イカ軟骨ホモジエキートの $100,000g$ 沈殿と上清画分による硫酸のとりこみ。酵素反応は“実験方法”に述べてある方法に従い50μlの各画分を酵素として加え、1時間反応を行った。

Fraction	Total <sup>a</sup> activity	Distribution of $^{35}\text{S}$ <sup>b</sup>			
		Type A	Type C	Type E <sub>4</sub>	Type E <sub>6</sub>
100,000g pellet	1.26	0.22	0.12	0.26	0.28
Supernatant	4.66	0.57	0.18	0.77	2.01

a) エタール不溶性の多糖画分にとりこまれた全放射能( $\text{cpm} \times 10^{-5}$ )/ $100,000g$ 沈殿画分1mLあるいは $100,000g$ 上清画分10mL

b) 各々の位置へとりこまれた全放射能( $\text{cpm} \times 10^{-5}$ )/ $100,000g$ 沈殿画分1mLあるいは $100,000g$ 上清画分10mL

の上清と沈殿を酵素として“実験方法”に述べた方法によて酵素活性を測定し、アセチルガラクトサミン残基の各位置への硫酸のとりこみを調べたのが表6である。表

6に示すように上清の酵素と沈殿の酵素の顕著な違いは、

A型、C型、E<sub>4</sub>型の硫酸を転移する活性の割合が、上清酵素では小さいのに、沈殿酵素では大きいことがある。この結果は表1に示される結果とあわせて考えると興味深い。表1の場合には精製を加えることにより、A型、C型、E<sub>4</sub>型の硫酸を転移する活性は著しく減少している。これは酵素の基質となるムコ多糖分子が酵素を安定に存在させるためには必須なものであることを示しているかも知れない。つまり 100,000 $\times$ の沈殿では A型、C型、E<sub>4</sub>型の硫酸を転移する酵素と基質のムコ多糖分子が膜上で緊密に結合していたものが、可溶化することによりその結合が弱くなり、さらに精製によりムコ多糖分子を完全に除いてしまうと、酵素は安定に存在できなくなるのである。一方 E<sub>6</sub>-Sulfotransferase はムコ多糖分子と共に存しても安定なため可溶化、精製が容易であると考えられる。

[イカ軟骨切片による<sup>35</sup>S-硫酸のとりこみ] 以上の実験でイカの軟骨には E<sub>6</sub>-Sulfotransferase があり、この酵素の働きで in vitro で oversulfation をうけたコンドロイチン硫酸が合成されることが明確にようになった。では実際にイカの軟骨組織でもこの酵素が働いて合成が行なわれるのだろうか。もし二つの反応が走っていれば、イカの軟骨では A型のくり返し二糖に富む多糖鎖から E型のくり返し二糖に富む多糖鎖への生成過程での変換が観察されるはずである。イカの軟骨切片での放射能のとりこみから上記のことと示唆する結果が得られた。

イカ軟骨切片 1g を 0.7mCi のキオリヤーフリーの[<sup>35</sup>S]Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む 4ml の人工海水（組成は“実験方法”参照）に浮かべ、20°C で 3時間保温した。

保温後 切片を人工海水で2回洗浄し、0.5% Triton X-100 を含む T= 0.02M Tris-HCl pH 7.2 2ml と 2g の海砂を加えて乳化しすりつぶした。木モジエネットを遠心分離 ( $10,000 \times 10$  分) し、上清を取り出しあと沈殿を同じ緩衝液 4ml で洗い、遠心分離した。上清と洗液をおおせて 0.01M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を含む T= 0.02M Tris-HCl pH 7.2 1l に 5 回、透析した。透析内液(全量 7 ml) 40  $\mu\text{l}$  を用い、“実験方法”に述べた方法によってムコ多糖全体 および アセチルガラクトサミン残基の各位置への放射能の割合を求めた。一方 200  $\mu\text{l}$  の透析液を用いて YAMAGATA<sup>35)</sup> らの方法により不飽和二糖の組成を定量

表 7. 1カ軟骨切片による  $^{35}\text{S}$ -硫酸の割合

	Ethanol insoluble polysaccharide	Type A	Type C	Type E <sub>4</sub>	Type E <sub>6</sub>
Total incorporation <sup>a</sup>	$1.53 \times 10^6$	$0.75 \times 10^6$	$0.05 \times 10^6$	$0.27 \times 10^6$	$0.29 \times 10^6$
Specific activity <sup>b</sup>	$1.19 \times 10$	$2.58 \times 10^5$	$0.40 \times 10^5$	$0.33 \times 10^5$	$0.36 \times 10^5$

a) エターレ不溶性多糖画分 および 各位置への割合を全放射能 (cpm)

b) エターレ不溶性多糖画分 および 各位置へのクドウロイケン硫酸当りの放射能の割合 (cpm/ $\mu\text{mole}$ )。但し Type A は  $\Delta\text{D}-4S$  Type C は  $\Delta\text{D}-6S$ , Type E<sub>4</sub> および Type E<sub>6</sub> は  $\Delta\text{D}-\text{dis}$  の割合を示す。

し、不飽和二糖当りの放

射能の割合を求めて。

その結果を表 7 に示す。

放射能の割合は A

型の硫酸に最も多く、

E<sub>4</sub> 型あるいは E<sub>6</sub> 型の

約 3 倍の値を示してい

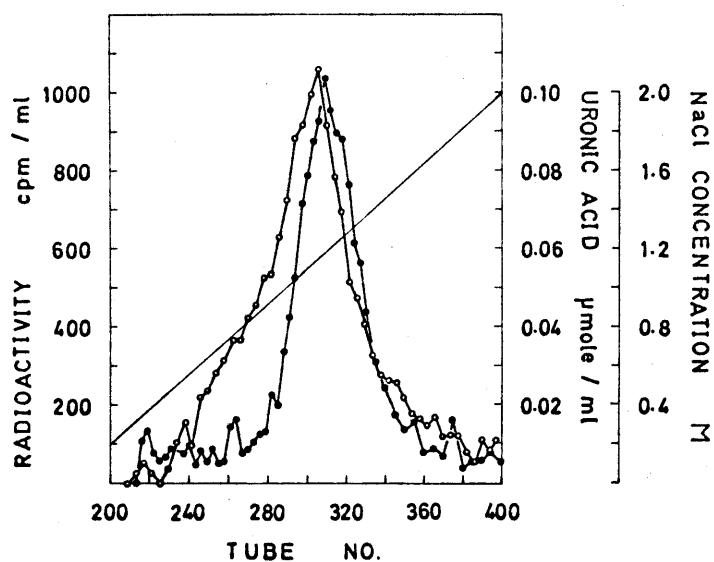
る。不飽和二糖当りの

二糖における A 型の割合は 他に較べてさらに多くである。

1カ軟骨のコンドロイケン硫酸-タンパク質を DEAE-Sephadex で分画すると表 4 に示されるように 硫酸含量が小さくて A 型と硫酸基をもたないくり返し二糖が多い分子から、硫酸含量が大きくて E 型のくり返し二

糖の多い分子へと分かれたり。二のようより多くの糖分子の変化と放射性硫酸の割合がいかでどんな関係にあるかを調べた。透析したカントル 6.6 ml を 0.1M NaCl を含んで 0.02M Tris-HCl pH 7.2 で平衡化して DEAE-Sephadex A-50 のカラム (2.2 cm × 20 cm) にのせ、同じ蒸留水 500 ml で洗った。次に 0.2M NaCl, 0.02M Tris-HCl pH 7.2 500 ml 流した後 0.02M Tris-HCl pH 7.2 存在下で 500 ml の 0.2M NaCl と 500 ml の 2.0M NaCl を用いて直線濃度勾配により溶出した。

### 溶出液の放射能とウロコ酸の量



を測定し、図 13 に示した。この図より 塩濃度の低いところでは ウロコ酸当りの放射能が大きく、塩濃度の高いところでは ウロコ酸当りの放射能が小さくなっていることがわかる。表 4 の結果と

図 13. DEAE-Sephadex A-50 カラムからの溶出曲線、あわせて 考えると、結局 硫酸溶出は本文に述べた方法で行つた。—— 放射能の割合、—— ウロコ酸含量。  
含量が低く、A型のくり返し二糖のタリ分子はウロコ酸当りの放射能が大きく、また硫酸含量が高くて E型のくり返し二糖の多い分子はウロコ酸当りの放射能が小さいことになり、前者から後者へと変化していく代謝経路の存在を唆している。

### 考 察

イカ軟骨から抽出精製された特異的な硫酸転移酵素（本論文で E-）

Sulfotransferase と名づけた酵素) は今までに知られている ハコ多糖の硫酸転移酵素と同じく、硫酸基供与体としての活性硫酸 (PAPS) の他に 硫酸基の受容体を 反応液に 加えた時にはじめて活性を示した。硫酸基の受容体としては 粗酵素に含まれている既存の硫酸受容体 (1カの軟骨のコンドロイチン硫酸 - タンパク質) ばかりでなく、タンパク質部分を除いた コンドロイチン硫酸鎖やさらに アセチルガラクトサミン-4-硫酸、 $\Delta$ Di-4S という低分子も働いたが、この受容体を用いた場合も E6-Sulfotransferase の触媒する 反応は 受容体中に存在する アセチルガラクトサミン-4-硫酸残基に二つ目の 硫酸基を転移して アセチルガラクトサミン-4,6-ジ硫酸残基をつくるという反応であった。つまり この E6-Sulfotransferase は 硫酸基を転移する 糖の位置に関しては厳密な特異性を持つが、受容体の分子サイズに対してはかなり 幅の広い 特異性を持つと思われる。受容体の構造は 酵素反応の速度にいろいろな影響を与える。表4には 分画された 既存の硫酸受容体が 酵素反応に及ぼす影響を示してあるが、注目される点は 画分 III, IV, V となるに従う PAPSに対する  $K_m$  値が 増加していくことである。これは分子中の硫酸含量が 増加するにつれて (いいかえれば、E型くり返し二糖の割合が ふえるにつれて) 反応が 起りにくくなることを示している。この結果は 図8 に示される結果、つまり  $\Delta$ Di-4S を受容体とした時 反応生成物となる  $\Delta$ Di-diSE によって 反応が 阻害される現象と同じことを意味しており、E6-Sulfotransferase には 生成物の E型くり返し二糖の割合を決めるような 調節作用があることを示している。

のかもしれまい。

イカ軟骨類酵素の中には E6-Sulfotransferase 以外に A型、C型、E4型の硫酸基を転移する酵素が存在している。これらの酵素は E6-Sulfotransferase とどんな点で異っているのだろうか。酵素タンパク質そのものの安定性や要求性にも大きな差がある（表2、図5）。そればかりでなく 酵素とコンドロイチン硫酸-タンパク質の相互作用にも大きな違いがあるのではないかと思われる。表6に示すように A型、C型、E4型の酵素は可溶化するだけでかなり活性が低下しており、細胞内では膜に緊密に結びついて存在し、機能しているのではないかと思われる。一方 E6-Sulfotransferase は可溶化しても安定に存在しており、このことは細胞内での二の酵素の働く時期が他の酵素とは異っていることを示しているのかもしれまい。例えば、E6-Sulfotransferase 以外の酵素は多糖鎖の伸長と平行して働くが、E6-Sulfotransferase は 多糖鎖合成のかなり後期に働き、一種の分子の修飾反応にて走っているかも知れない。このような硫酸基転移酵素の特異性と、その酵素の多糖鎖合成において働く時期との関係はまだ報告されておらず、今後の課題と思われる。また硫酸基の受容体となるムコ多糖が プロタミンと結合して沈殿状となる場合に非常に酵素反応を促進し、特に E6-Sulfotransferase については 10倍以上の活性化を示すこととは基質となる硫酸受容体のコンフォメーションが 酵素反応に大きな影響を与えると同時にコンドロイチン硫酸-タンパク質と酵素の相互作用が二の場合も E6-Sulfo-

transferase と他の酵素とでは異なることを示しており、興味ある事実である。

イカ軟骨の切片を  $^{35}\text{S}$ -硫酸を含む培地で培養した時、 $^{35}\text{S}$ -硫酸を含んだコンドロイチン硫酸-タンパク画分は イオン交換カラムクロマトグラフにおいて連続的に変化するかなり ヘテロな分子よりなっている(図13)。この図からウロン酸当りの比放射能は低い塩濃度で溶出される画分(つまり硫酸含量の低い画分)ほど高いことがわかる。ウロン酸の量はイカ軟骨に存在しているコンドロイチン硫酸-タンパク質の量を表わしており、放射能のとりこみはその時の軟骨での合成速度を表わしている。だから、ウロン酸当りの比放射能の値が大きいことは二つの可能性を示している。一つは比放射能のより小さい物質よりも合成速度が大きいけれども代謝的には関係がない場合、もう一つは比放射能の大きい物質が小さい物質の前駆体である場合である。このどちらかの場合ではまるかには、時間的変化とラベルされた物質の変化を調べなければほっきりとはわからない。しかし、同じ組織で硫酸含量の低いものの方が、硫酸含量の高いものよりもウロン酸当りの放射能が高いことは、二つの可能性の方が考えられやすい。つまり硫酸含量の低い多糖鎖から硫酸含量の高い多糖鎖が合成されてゆき、この時 A型の鎖が E型の鎖に変化していくという可能性がこの場合考えやすい。

イカ軟骨のコンドロイチン硫酸より コンドロイチナーゼ ABC 消化で得られるフルコースを含んだオリゴ糖は表5に分析値を示したオリゴ糖-1だけでは

く、他にも多く存在する。図9のペーパークロマトグラムで示されるように斜線をつけてオリゴ糖のバンド以外にも原点近くに多くの紫外吸收をもつバンドが存在する。これらのバンドも不飽和ウロン酸を非還元末端に持ち、グルコースを含むオリゴ糖であるが、ウロン酸に対するグルコースや硫酸の割合が様々な値をとることがわかっている。これらのオリゴ糖全部合せると、コンドロイチナーゼABC消化前の高分子のウロン酸の約2%に相当する。この割合は高等動物のコンドロイチン硫酸還元末端の中性糖の含まれる割合とはほぼ同じであり、イカ軟骨コンドロイチン硫酸には100個のくり返し糖に1個の割合でグルコースを含む不規則な構造が存在することになる。

コンドロイチン硫酸標品中に中性糖が含まれていることはいろいろな材料から抽出された標品について知られている。その中でキシロースとガラクトースはコンドロイチン硫酸鎖とタンパク質部分をつなぐ橋渡レ構造の構成糖であることがわかっているが、その他の中性糖の役割は不明である。イカの皮のムコ多糖についてはグルコース、ガラクトース、グルコサミンを含む核はコンドロイチン硫酸鎖とは別にタンパク質からのびていることが報告されているが<sup>36)</sup>、本実験の示すところによるとイカの軟骨では多糖鎖の還元末端以外のどこかでグルコースはコンドロイチン硫酸鎖に組み込まれている。高分子の中でグルコースがどんな役割をしているかはまだわからない。しかしイカ軟骨のコンドロイチン硫酸-タンパク質が牛鼻軟骨やニワトリ胚軟骨のそれとは非常に異っている（タンパク質含量が低く、アル

カリ処理によって分子はほとんど変化しない。また多糖鎖そのものが非常に高分子である。硫酸基含量の高いことは、いまでもない。ことを考えると、グルコースが多糖鎖の巨大化と関係があるかもしれない（例えば枝別れ構造の分歧点）。

グルコースが多糖鎖に含まれていることは生合成、分解経路の研究にも新たな面をひらいている。現在コンドロイチン硫酸鎖のくり返し糖部分は UDP-グルクロン酸と UDP-N-アセチルガラクトサミンより糖部分が転移されて糖鎖ができると考えられている。グルコースの導入がこれらの糖の転移とどんな関係があるかは興味があることである。また軟骨におけるコンドロイチン硫酸タンパク質の分解は特殊なタンパク質分解酵素や、ヒアルロニダーゼなどで行なわれるが、イカ軟骨コンドロイチン硫酸タンパク質のようにタンパク質含量が低く、多糖鎖にグルコースを持つような分子では特異的な分解経路を持ついろいろかもしれない。私はイカ軟骨の抽出液中にセルラーゼ活性（カルボキシメチルセルロースに作用して還元力の増加及び粘度の低下を引き起す活性）があるのを見つけたが、このような活性とイカ軟骨コンドロイチン硫酸タンパク質の分解とは何らかの関係をもつているかもしれない。

軟骨組織の酸性多糖を進化的な側面から見ると興味深い。海産巻貝のある種には歯舌軟骨という軟骨組織があるが、この組織にはホリグルコース硫酸が含まれていることが知られている。<sup>(17)</sup>しかし高等動物の軟骨組織ではコンドロイチン硫酸、ケラト硫酸などがほとんどで

グルコースを含む高分子は知られていない。このような例から ホリグルコース硫酸から コンドロイチン硫酸への進化が軟骨組織の進化と関連を持つのではないかと考えられる。またイカの軟骨のコンドロイチン硫酸はこの進化の中間の段階に位置するのではないかとも考えられるが、今後いろいろな面からの実験を通してこの仮説を追求するのは意義あることである。

(後記) 本論文を構成する内容の大半は共同研究者の成果とあわせて The Journal of Biological Chemistry<sup>37)</sup> に印刷発表された。

## ま　　と　　め

3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホガルフェートを硫酸供与体として、既存のコンドロイチン硫酸-タンパク質に硫酸を転移する酵素をイカ軟骨より抽出し、その性質を調べた。この酵素はすでに 4 位に硫酸基をもつアセチルガラクトサミン残基の 6 位に硫酸を転移するという点で特異的であった。

この硫酸転移酵素は DEAE-Sephadex A-50 により既存のコンドロイチン硫酸-タンパク質と分離された。こうして得られた酵素は外から硫酸受容体を加えた時にのみ活性があった。硫酸受容体としては单糖、二糖、多糖が働くが、いずれの場合もアセチルガラクトサミン残基の 4 位に硫酸基をもつことが必須であった。

軟骨切片への  $^{35}\text{S}$ -硫酸のとりこみ実験により、A型に富んだ多糖鎖から E 型に富んだ多糖鎖に変化することが示唆された。このことは上記の特異性をもつ硫酸転移酵素が実際に働いて生合成が進行することを支持している。

これらのことにより系続発生あるいは個体発生に伴うコンドロイチン硫酸の異性体の変動は硫酸基の位置に特異的な硫酸転移酵素の出現によってひきおこされる可能性が大である。

イカ軟骨のコンドロイチン硫酸はくり返レニ糖当りの硫酸基の数が多いだけでなく、グルコースが多糖鎖にくみこまれて存在する点で高等動物のコンドロイチン硫酸と異なることが示された。このことはコンドロイチン硫酸の分子進化を調べるために新たな手がかりを与えている。

文 献

- 1) Suzuki, S., J. Biol. Chem., 235, 3580 (1960).
- 2) Suzuki, S., Saito, H., Yamagata, T., Anno, K., Seno, N., Kawai, Y., and Furuhashi, T., J. Biol. Chem., 243, 1543 (1968).
- 3) 山形達也, 蛋白質 核酸 酶素, 14, 1152 (1969).
- 4) Fransson, L.-Å., and Roden, L., J. Biol. Chem., 242, 4170 (1967).
- 5) Fransson, L.-Å., J. Biol. Chem., 243, 1504 (1968).
- 6) Fransson, L.-Å., Havasmark, B., J. Biol. Chem., 245, 4770 (1970).
- 7) Suzuki, S., J. Biol. Chem., 235, 3580 (1960).
- 8) Kawai, Y., and Anno, K., J. Biochem., 60, 317 (1966).
- 9) Anno, K., Seno, N., Mathews, M. B., Yamagata, T., Suzuki, S., Biochem. Biophys. Acta, 237, 173 (1971).
- 10) Mathews, M. B., Clin. Orthop., 48, 267 (1966).
- 11) Suzuki, S., Trenn, R. H., and Strominger, J. L., Biochem. Biophys. Acta, 50, 169 (1961).
- 12) Meezan, E., and Davidson, E. A., J. Biol. Chem., 242, 4956 (1967).
- 13) Kimata, K., Okayama, M., Suzuki, S., Biochem. Biophys. Acta, 237, 606 (1971).
- 14) Person, P., and Philpott, D. E., Annals N. Y. Acad. Sci., 109, 113 (1963).
- 15) Person, P., and Mathews, M. B., Biol. Bull., 132, 246 (1967).
- 16) Mathews, M. B., Duh, J., and Person, P., Nature, 193, 378 (1962).
- 17) Lash, J. W., and Whitehouse, M. W., Biochem. J., 74, 351 (1960).
- 18) Robbins, P. W., in S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Editors), Method in Enzymology, Vol. 5, Academic Press, New York, 1962, p. 964.
- 19) Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O., and Suzuki, S., J. Biol. Chem., 243, 1523 (1968).
- 20) Kantor, T. G., and Schubert, M., J. Amer. Chem. Soc., 79, 152

(1957).

- 21) Egami, F., Asahi, T., Takahashi, N., Suzuki, S., Shikata, S., and Nishizawa, K., Bull. Chem. Soc. Jap., 28, 685 (1955).
- 22) Suzuki, S., and Strominger, J. L., J. Biol. Chem., 235, 2768 (1960).
- 23) Schneider, J. J., and Lewbart, M. L., J. Biol. Chem., 222, 787 (1956).
- 24) Lowry, O. H., Rosebrough, N. L., Farr, A. L., and Randall, R. J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 25) Dische, Z., J. Biol. Chem., 167, 189 (1947).
- 26) Strominger, J. L., Park, J. T., and Thompson, R. E., J. Biol. Chem., 243, 3263 (1959).
- 27) Dodgson, K. S., Biochem. J., 78, 312 (1961).
- 28) Kawai, Y., Seno, N., and Anno, K., Anal. Biochem., 32, 314 (1969).
- 29) Trevelyan, W. E., and Harrison, J. S., Biochem. J., 50, 298 (1952).
- 30) Markham, R., and Smith, J. D., Biochem. J., 52, 552 (1952).
- 31) Kimata, K., and Suzuki, S., 未発表.
- 32) Suzuki, S., and Strominger, J. L., J. Biol. Chem., 235, 257 (1960).
- 33) Deluca, S., and Silbert, J. E., J. Biol. Chem., 243, 2725 (1968).
- 34) Silbert, J. E., and Deluca, S., J. Biol. Chem., 244, 876 (1969).
- 35) Saito, H., Yamagata, T., and Suzuki, S., J. Biol. Chem., 243, 1536 (1968).
- 36) Radhakrishnamurthy, B., Srinivasan, S. R., Dalferes, E. D., and Berenson, G. S., comp. Biochem. Physiol., 36, 107 (1970).
- 37) Habuchi, O., Yamagata, T., and Suzuki, S., J. Biol. Chem., 246, 7357 (1971).

87  
167