

サケ鼻軟骨粉末から異なる溶媒で抽出した プロテオグリカンの性質の比較

三浦 絢子, 伊藤 聖子, 加藤 陽治*

弘前大学教育学部食物学研究室

Comparative Analyses of Proteoglycan-containing
Powder Prepared from Salmon Nasal Cartilage
and Extracted with Various Solvents

Ayako Miura, Seiko Ito and Yoji Kato*

Laboratory of Food Science, Faculty of Education, Hirosaki
University, 1 Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036-8560

Proteoglycan (PG)-containing powder was prepared from salmon nasal cartilage and extracted with the following solutions: distilled water; 4M guanidine hydrochloride; 7M urea; 0.5M sodium hydroxide; 4% acetic acid; 1% malic acid; 1% citric acid; and 1% ascorbic acid. Comparisons of PG between the solvent types revealed varying amounts of uronic acid and protein. DEAE Sephacel ion exchange chromatography showed that the PG elution patterns of all extracts were similar to those of PG prepared by the conventional 4% acetic acid extraction method, thus demonstrating their similar electrostatic properties. Sepharose CL-4B gel filtration chromatography was then used to investigate molecular weight distribution, and the rate of PG distribution in the high molecular weight fraction was shown to be higher in the water extracts than in both the acid and alkaline extracts. These results suggest that high-molecular-weight PG is the natural form of PG.

(Received Oct. 23, 2012; Accepted Jan. 31, 2013)

Keywords: salmon, nasal cartilage, proteoglycan
キーワード: サケ, 鼻軟骨, プロテオグリカン

プロテオグリカン (PG) はコアタンパク質にグリコサミノグリカン糖鎖が結合した糖タンパク質の一種である¹⁾。軟骨中の PG はコラーゲンやヒアルロン酸と共に凝集体を形成しており, 代表的な軟骨型 PG はアグリカンと称されている²⁾。現在までにアグリカンコアタンパク質のアミノ末端側 (G1 ドメイン) はヒアルロン酸およびリンクタンパク質結合領域であること, また, カルボキシル末端側 (G3 ドメイン) は上皮細胞増殖因子 (EGF) 様ドメイン, C 型レクチン様ドメインおよび補体制御タンパク質 (CRP) 様ドメイン構造を有することが明らかとなっている¹⁾²⁾。

PG は, かつては哺乳動物の限られた部位 (ウシの気管軟骨) やニワトリの鶏冠などからしか得ることができず,

非常に高価格な試薬として販売されていた (1g あたり 3000 万円; ウシ鼻軟骨由来 PG アグリゲートの試薬価格は, 現在も 1mg あたり約 3 万円)。しかし 1998 年以降, サケの鼻軟骨 (水頭) から PG を抽出する研究が進められ, 酢酸による大量抽出法が確立された³⁾。この抽出方法を生み出すヒントとなったのが, 北海道や東北地方の一部の地域で食されている「水頭なます」であり, 水頭を食酢に浸漬させると PG が溶出することを応用した技術であった⁴⁾。また, PG には抗炎症作用⁵⁾, 炎症性腸疾患の改善⁶⁾⁷⁾, ヒアルロン酸合成促進作用⁸⁾, 上皮細胞増殖因子 (EGF) 様作用⁸⁾ 等多くの生理機能を有することがその後の研究によって明らかとなり, 食料品や化粧品, 再生医療への応用にさらなる期待が寄せられている。

しかし, 水頭から PG の抽出を行う場合, 原材料であるサケ頭部の確保と貯蔵における問題に直面する。水頭の量はサケの漁獲量に左右されるため, PG を得るのに必要な量を必ずしも入手できるとは限らないのである。さらに, 頭部を保管するための冷凍貯蔵場所を確保し, 維持するにはコストがかかる他, 貯蔵中に油脂の酸化が起こるなど, 避けられない問題がある。そこで我々はこれらの問題を解決するため, サケ鼻軟骨の水脱脂粉末化方法を確認し⁹⁾, 得られた PG 含有粉末 (PGNP: プロテオグリカンナチュラルパウダー) の安全性評価結果について報告した¹⁰⁾。今回我々は, PGNP から各種溶媒で抽出した PG の収量とカラムクロマトグラフィー溶出パターンの比較を行ったので報告する。

1. 実験方法

(1) サケ鼻軟骨微粉末の調製

前報に従ってサケ鼻軟骨微粉末の調製を行った⁹⁾。市販の水頭スライスの皮を剥離し, 鼻軟骨 100g (湿重量) を採取した (図 1)。凍結した鼻軟骨をコンパクトチョッパー (MKBC-22, 増幸産業製) で破碎し, 同容量の冷水を加えて冷却遠心分離 (CR21, HITACHI 製; 9000 rpm, 4°C, 30 分) により脱脂した。回収した軟骨を凍結乾燥 (FDU-830, EYELA 製) した後, 遠心式粉碎機 (MKA-21, 増幸産業製) で微粉末化し, 10 倍量 (v/w) のエタノールを加えて脱脂した。エタノールのろ過除去および風乾により, 湿重量 100g の鼻軟骨から約 6g のサケ鼻軟骨微粉末 (PGNP) を得た。

(2) PGNP の成分分析

水分は常圧乾熱乾燥法, タンパク質はケルダール法, 脂質は酸分解法, 灰分は直接灰化法で測定した。炭水化物は計算式 $\{100 - (\text{水分} + \text{タンパク質} + \text{脂質} + \text{灰分})\}$ より算出し, 食物繊維は酵素-重量法で測定した。エネルギーは栄養表示基準 (平成 15 年厚生労働省告示第 176 号) に基づくエネルギー換算により, タンパク質を 4kcal/g, 脂質を 9kcal/g, 炭水化物を 4kcal/g として算出した。ナトリウムおよび鉛は原子吸光度法により, カルシウムは ICP 発光

〒036-8560 青森県弘前市文京町 1

* 連絡先 (Corresponding author), ykato@cc.hirosaki-u.ac.jp

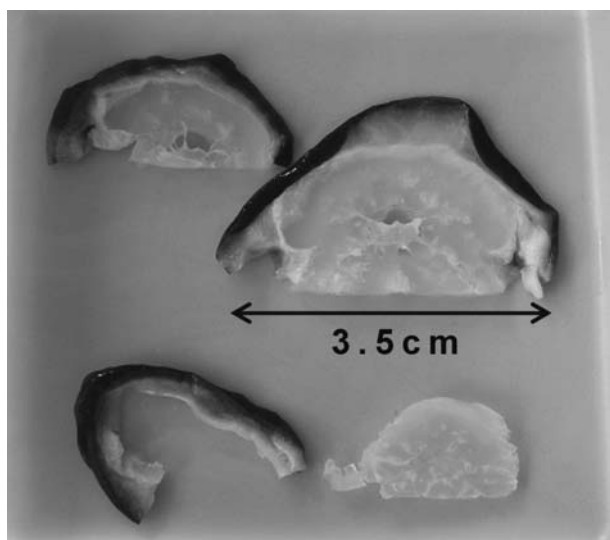


図1 氷頭スライスの写真

分析法により測定した。

(3) PGNP より各種溶媒による PG の抽出

PGNP に 30 倍量 (v/w) の抽出溶媒 [蒸留水, 4M グアニジン塩酸 / 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0), 7M 尿素 / 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4), 0.5M 水酸化ナトリウム, 4% (v/v) 酢酸, 1% (w/v) リンゴ酸, 1% (w/v) クエン酸, 1% (w/v) アスコルビン酸] を加えて攪拌した (4℃, 24 時間). 冷却遠心 (9000rpm, 4℃, 30 分) により上清と沈澱に分け, 沈澱画分に同操作を行った. 上清画分に 3 倍量 (v/v) のエタノールを加えて 4℃で一晩静置し, 遠心分離 (9000rpm, 4℃, 30 分) により上清と沈澱に分けた. 沈澱画分は蒸留水に溶解して透析し, PG 粗精製物として回収した. 各種溶媒による抽出で得られた PG 粗精製物について, ウロン酸およびタンパク質の定量を行った. ウロン酸はカルバゾール・硫酸法によりグルクロン酸 (GlcA) 相当量として, タンパク質はブラッドフォード法によりウシ血清アルブミン (BSA) 相当量として算出した.

(4) 各 PG 粗精製物の DEAE Sephacel イオン交換クロマトグラフィー

各 PG 粗精製物 10mg (GlcA 相当量) を 7M 尿素 / 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した DEAE Sephacel (GE Healthcare 製) イオン交換クロマトグラフィーに供した ($\phi 2.5 \times 10$ cm). 試料の分画は塩化ナトリウムの最終濃度が 1.0M となるよう直線濃度勾配溶出で行い, 分取した溶出液のウロン酸をカルバゾール・硫酸法により GlcA 相当量として算出し, タンパク質を 280nm の吸光度より BSA 相当量として算出してそれぞれの溶出パターンを得た.

(5) 各 PG 粗精製物の Sepharose CL-4B ゲルろ過クロマトグラフィー

各 PG 粗精製物 1.0mg (GlcA 相当量) を 0.2M 塩化ナト

表1 PGNP の成分分析

項目	PGNP100gあたり*
水分	10.7±2.1 g
たんぱく質	51.8±1.1 g
脂質	1.4±0.1 g
灰分	17.8±0.9 g
炭水化物	18.4±0.7 g
食物繊維	23.3±0.2 g
エネルギー	293±6.0 kcal
ナトリウム	4.7±0.4 g
カルシウム	1.5±0.2 g
鉛	検出せず

* 試験ロット 4 検体平均

表2 PGNP 1g から得られる PG 量

抽出溶媒	ウロン酸 (mg)	タンパク質 (mg)	ウロン酸 / タンパク質
蒸留水	70.0	9.5	7.4
4M グアニジン塩酸	112.3	30.1	3.7
7M 尿素	109.2	38.6	2.8
0.5M 水酸化ナトリウム	128.0	27.1	4.7
4% 酢酸	64.6	3.7	17.5
1% リンゴ酸	52.9	2.7	19.6
1% クエン酸	56.9	3.2	17.8
1% アスコルビン酸	81.5	3.7	22.0

ウロン酸は GlcA 相当量, タンパク質は BSA 相当量として算出した。

リウム含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Sepharose CL-4B (GE Healthcare 製) ゲルろ過クロマトグラフィーに供した ($\phi 1.0 \times 45$ cm). 溶出液は 1.0ml ずつ分取し, 溶出液のウロン酸をカルバゾール・硫酸法により GlcA 相当量として算出し, タンパク質を 280nm の吸光度より BSA 相当量として算出してそれぞれの溶出パターンを得た。

2. 実験結果

PGNP の成分を分析した結果を表 1 に示す. また, PGNP より各種抽出溶媒で抽出して得られた PG 粗精製物のウロン酸量とタンパク質量を表 2 に示す. PGNP 100g あたりのウロン酸量は, 従来の酢酸抽出では 6.5g であり, 蒸留水や他の有機酸抽出においても同程度の収率であった. また, グアニジン塩酸や尿素, 水酸化ナトリウム抽出で得られるウロン酸量は, それぞれ 11.2g, 10.9g および 12.8g であったことから, これらの溶媒を用いた場合には酢酸抽出の時よりも収量が約 2 倍に増加することがわかった.

PGNP 100g あたりのタンパク質量については, 従来の酢酸抽出では 0.37g であり, 他の有機酸抽出においても同程度の値を示したが, 蒸留水抽出の場合にはこれよりも高い値 (0.95g) を示した. また, グアニジン塩酸や尿素, 水酸化ナトリウム抽出で得られるタンパク質量は, それぞれ

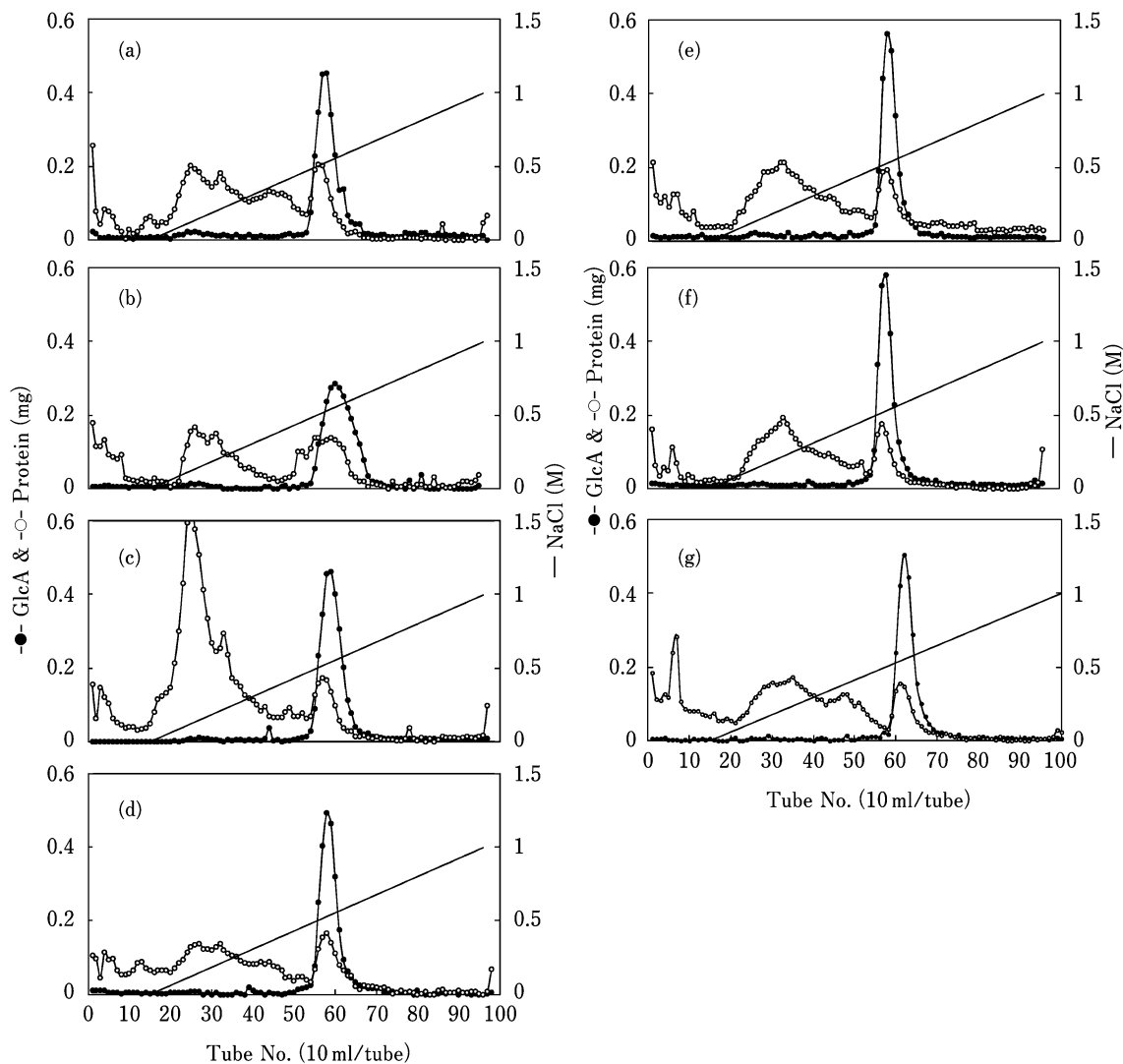


図 2 各種溶媒抽出物の DEAE Sephacel イオン交換クロマトグラフィー

抽出溶媒：(a) 蒸留水, (b) 4M グアニジン塩酸 /50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0), (c) 7M 尿素 /50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4), (d) 4% 酢酸, (e) 1% リンゴ酸, (f) 1% クエン酸, (g) 1% アスコルビン酸

3.0g, 3.9g および 2.7g となり, 従来の酢酸抽出に比べてはるかに高い値を示した.

各 PG 粗精製物を DEAE Sephacel イオン交換クロマトグラフィーに供したときの溶出パターンを図 2 に示す (アルカリ抽出物は除く). 従来の方法, すなわち, サケ鼻軟骨から酢酸で抽出して得た PG のイオン交換クロマトグラフィーでは, 塩化ナトリウム濃度が 0.5M 付近に PG (ウロン酸) の溶出が認められた (図 3). 今回の各 PG 粗精製物においても, 図 3 と同じ位置に PG 画分が得られたことから, 抽出した PG は溶媒の種類によらず, 電荷的に等しいものであることが示された.

各 PG 粗精製物を Sepharose CL-4B ゲルろ過クロマトグラフィーに供したときの溶出パターンを図 4 に示す. 蒸留水やグアニジン塩酸, 尿素で抽出した場合には, ウロン酸の溶出がボイド容量に認められ, 高分子量の PG が得られ

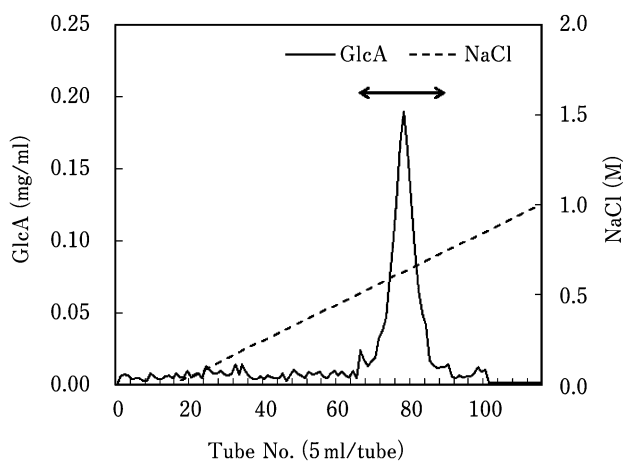


図 3 4% 酢酸抽出プロテオグリカンの DEAE Sephacel イオン交換クロマトグラフィー

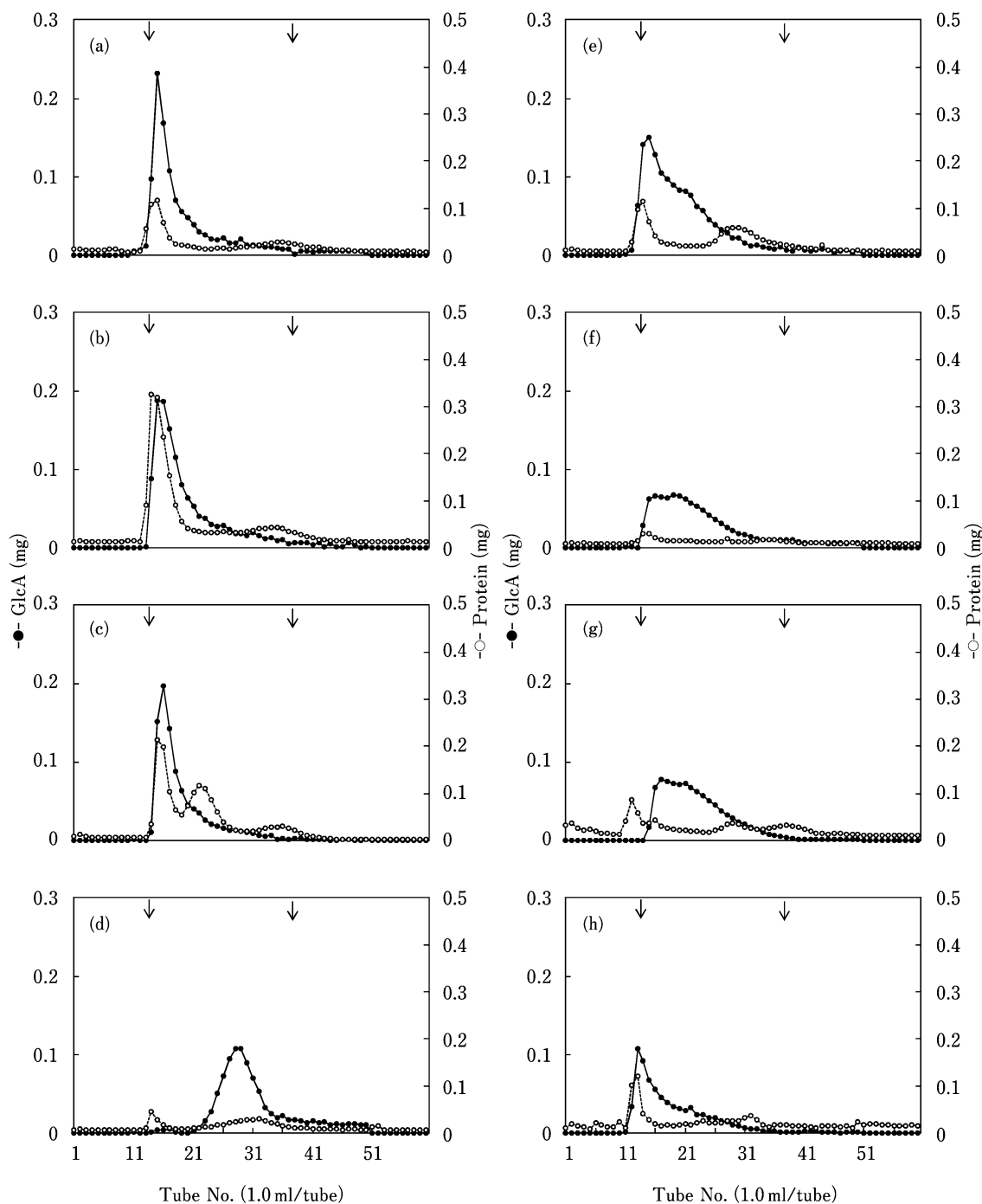


図4 各種溶媒抽出物の Sepharose CL-4B ゲルろ過クロマトグラフィー

抽出溶媒：(a) 蒸留水, (b) 4M グアニジン塩酸 /50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0), (c) 7M 尿素 /50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4), (d) 0.5M 水酸化ナトリウム (e) 4% 酢酸, (f) 1% リンゴ酸, (g) 1% クエン酸, (h) 1% アスコルビン酸

たことがわかった。また有機酸で抽出した場合には分子量が低下する傾向が認められ、水酸化ナトリウム抽出においては分子量が最も小さくなることがわかった。

3. 考察

グアニジン塩酸や尿素のような変性剤で抽出した場合、PGの抽出効率があがるとともに、分子量の大きいものが得られることがわかった。しかし変性剤の濃度が高いため

その除去が容易ではなく、PGの大量抽出を目的とした場合には選択し難い溶媒である。また、水酸化ナトリウムによる抽出ではウロン酸量は最も高い値を示したものの、分子量が著しく低下し、PGがアルカリで分解したことが示唆された。従来の酢酸抽出を含む有機酸抽出では、収量は水抽出と同程度であるにも関わらず、分子量は水抽出よりも小さいことがわかった。原因の特定には至っていない

が、食酢に浸した氷頭スライスからカルシウムイオンが溶出するという報告例があることから⁴⁾、PG分子内でキレート構造を形成していたミネラルが酸性条件下で解離し、キレート構造が崩れたためとも考えられる。

一方でPGの低分子化に関しては、ヒト軟骨のオートリシス分解物をSephacrose 2Bゲルろ過クロマトグラフィーに供した例がBaylissらによって報告されている¹¹⁾。この時のウロン酸の溶出パターンは、保持容量に広く分布した形であった。またBaylissらは、軟骨片から抽出したPGのゲルろ過クロマトグラフィーについても報告している¹¹⁾。この場合、保持容量の他にボイド容量にもウロン酸のピークが認められた。このことから、軟骨片から抽出したPGのゲルろ過クロマトグラフィーでは、低分子化したPGが保持容量に溶出し、分解されなかったPG(天然型PG)がボイド容量に得られたと考えられる。このような結果がサケ鼻軟骨についても同様であるならば、PGNPから抽出された高分子量のPGは、天然型PGであると推定される。特に水抽出で得られたPGは、従来の酢酸抽出で得たPGよりも高分子量の割合が高いという点で、より天然型に近いPGが得られたと考えられる。

今回の実験結果より、抽出溶媒が異なると、得られるPGの分子量も異なることが明らかとなった。このような性質がPGNPのような粉末加工品にさえ明確に表れたことを考慮すると、未加工のサケ鼻軟骨中にはより多くの高分子量PGが存在すると考えられる。また、分子量の違いによる生理効果の違いがGotoらによって報告されている¹²⁾。分子量と生理活性の関係を明確にするうえでも、PGの分子量の差が構造的にどの部分に由来するのかを明確にする必要があると考えている。

4. 要約

本研究では、サケの鼻軟骨から経口摂取可能なPG含有微粉末(PGNP)を調製し、各種溶媒を用いて抽出したPGの収量とカラムクロマトグラフィー溶出パターンの比較を行った。それぞれのウロン酸およびタンパク質の収量は抽出溶媒によって異なり、水抽出では従来の酢酸抽出と同程度の収量でPGが得られることが分かった。また、各PG粗精製物をイオン交換クロマトグラフィーに供したところ、すべての試料において同じ塩濃度でPGの溶出が認められ、これらが軟骨から従来の酢酸抽出で得られたPGと

電荷的に等しいものであることが示された。各PG粗精製物の分子量分布からは、有機酸抽出で得られたPGの分子量が低化したことが示唆され、水抽出で得られたPGにおいては、従来の酢酸抽出のものよりも高分子量の割合が高く、天然型のPGに近いものと推定された。

本研究データをまとめるにあたり、PGNPの成分分析をして下さいました(財)日本食品分析センターに感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kjellén, L. and Lindahl, U., Proteoglycans : structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 443-475 (1991).
- 2) Heinegård, D., Proteoglycans and more-from molecules to biology. *Int. J. Exp. Pathol.*, **90**, 575-586 (2009).
- 3) 株式会社角弘, 高垣啓一, 軟骨型プロテオグリカンの精製方法, 特許第3731150号(2005.10.21).
- 4) 畑江敬子, 大沼葉子, 島田淳子, サケ鼻軟骨のテクスチャーに及ぼす食酢浸漬の影響, 日本食品工業学会誌, **37**, 505-510 (1990).
- 5) Sashinami, H., Takagaki, K. and Nakane, A., Salmon cartilage proteoglycan modulates cytokine responses to *Escherichia coli* in mouse macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 1005-1010 (2006).
- 6) Ota, S., Yoshihara, S., Ishido, K., Tanaka, M., Takagaki, K. and Sasaki, M., Effects of proteoglycan on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Digest. Dis. Sci.*, **53**, 3176-3183 (2008).
- 7) Mitsui, T., Sashinami, H., Sato, F., Kijima, H., Ishiguro, Y., Fukuda, S., Yoshihara, S., Hakamada, K. and Nakane, A., Salmon cartilage proteoglycan suppresses mouse experimental colitis through induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 209-215 (2010).
- 8) 国立大学法人弘前大学, サケ軟骨に含まれるプロテオグリカンの新規な薬理用途, 特開2008-247803(2008.10.16).
- 9) 国立大学法人弘前大学, プロテオグリカンの抽出方法, 特開2009-173702(2009.8.6).
- 10) 工藤重光, 伊藤聖子, 吉原秀一, 加藤陽治, プロテオグリカンを主成分とするサケ鼻軟骨粉末の安全性評価, 日本食品科学工学会誌, **58**, 542-547 (2011).
- 11) Bayliss, M.T. and ALi, S.Y., Isolation of proteoglycans from human articular cartilage. *Biochem. J.*, **169**, 123-132 (1978).
- 12) Goto, M., Yamazaki, S., Kato, Y., Yamamoto, K. and Katagata, Y., Anti-aging effects of high molecular weight proteoglycan from salmon nasal cartilage in hairless mice. *Int. J. Mol. Med.*, **29**, 761-768 (2012).

(平成24年10月23日受付, 平成25年1月31日受理)