



Title	角膜多糖類の分離と同定
Author(s)	幸塚, 悠一
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28788
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	幸 塚 悠 一
	こう つか ゆう いち
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 6 3 5 号
学位授与の日付	昭 和 40 年 3 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	角膜多糖類の分離と同定
	(主査) (副査)
論文審査委員	教 授 水 川 孝 教 授 山 村 雄 一 教 授 山 野 俊 雄

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

角膜に多糖類物質の存在することは早くから知られていたが、1953 年 Meyer, K らはウシ角膜からコンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ケラト硫酸の 3 種を分離している。彼らはその後気管、鼻軟骨、軟骨などの多糖類を研究し、施光度、アルコールに対する溶解度などの相違からいわゆるコンドロイチン硫酸 A, B, C, を分離し、角膜のコンドロイチン硫酸は A であるとしている。一方 Mathews, M. B. らによる多糖類の赤外線吸収スペクトルの検討によりコンドロイチン硫酸 A, C, の差は硫酸基がヘキソサミンの 4 位および 6 位につくことによるとされ、角膜コンドロイチン硫酸もしたがって 4-硫酸であると考えられている。また近年多糖類の生物学的作用が注目されているが、角膜においても膨化、透明性の保持などに多糖類が重要な役割りを果たすることが知られている。Anseth, A, らは種々の条件下における角膜多糖類の変動を調べるため ECTEOLA セルロースカラムによる分離を行なったがその結果は、Meyer, K. らの成績とはかなり異っている。すなわち角膜には分子量、硫酸含量を異にするそれぞれ数種類のコンドロイチン硫酸およびケラト硫酸が存在し、いわゆるコンドロイチンは認められず、創傷治癒、透明性などに関しては高分子ケラト硫酸に意義があるとしている。しかし彼らの方法は材料を蛋白分解酵素で消化したのち直ちにカラムによる分離を行っており、彼らの定量結果でも低分子ケラト硫酸分画などはヘキソサミンに比して数倍の窒素量を示しているから蛋白-多糖類結合物、いわゆる glycoprotein と考えられる。これらの疑問を解決するため角膜多糖類の分離と同定を行ない、あわせて角膜におけるコンドロイチン硫酸とケラト硫酸の赤外吸収スペクトルを測定して構造推定の手掛りとした。

〔方法ならびに成績〕

ウシ角膜をアセトンにより脱脂し、ペプシン-トリプシンまたはパパイニンにより消化し、Sevag 法

によって除蛋白を行ない、えられた白色粉末について、セルロースを担体とするアルコール濃度勾配によるカラム、ECTEOAセルロースカラム、Sephadex カラムを行なった。おのおのの分画物につきヘキソース(anthrone 法)、ウロン酸(carbazole法)、ヘキソサミン(Elson-Morgan 法)、硫酸(Wagner 法)、蛋白質(Lowry 法と紫外部吸収)、コラーゲン(Mitoma らのオキシプロリン定量)、結合水(塩化コバルト法)を定量し、またカリウム塩に置換した試料についての赤外線吸収スペクトルを測定した。以上の結果えられた角膜多糖類は蛋白質およびコラーゲンを含まず、これをセルロース・アルコールカラムにかけるとコンドロイチン硫酸、ケラト硫酸の2分画に分離されることが分った。コンドロイチン硫酸はヘキソサミン、ウロン酸各1モルに対し硫酸0.56モル含まれ、ケラト硫酸はヘキソサミン、ヘキソース、硫酸を等モルに含み、これらの和に結合水量と塩類の計算値を加算すると全重量を満足するので両者は純粋な多糖類試料であると判断された。この両者をさらに ECTEOAセルロースカラムで分画するとコンドロイチン硫酸は主として1分画に溶出されるが、少量ながら第2, 第3のピークも認められた。しかし ECTEOA セルロースではコンドロイチン硫酸とコンドロイチン、あるいは Anseth, A. らのいう分子量差の分画は不十分であると思われる。ケラト硫酸分画は ECTEOA セルロースカラムにより微量の狭雑物が除かれるほかは全部が1分画に溶出された。したがって純粋な角膜ケラト硫酸はほぼ1種類の物質で分子量、硫酸含量などのばらつきは少ないと判断された。また Anseth らの方法を追試して蛋白分解酵素による消化物をそのまま ECTEOAセルロースカラムにかけると酵素の作用時間、温度などの条件によりその後の分画に変動が生じることが分った。したがって蛋白分解酵素を作用させて後に glycoprotein を含む分画の変動で生物学的作用を論ずることは注意を要すると考えられる。これらを赤外線吸収スペクトルにより検討するとコンドロイチン硫酸は4-硫酸、ケラト硫酸は6-硫酸としての吸収が認められ、化学的方法によるこれまでの同定と一致する結果を示した。

〔総括〕

ウシ角膜から蛋白およびコラーゲンを含まない純粋の多糖類を抽出し、これをセルロース、アルコールカラムと ECTEOA セルロースカラムにより分画し、化学的定量と赤外線吸収スペクトルによって chondroitin 4-sulphate と keratan sulphate の2種類であることを確かめた。上記のカラムによる分画では角膜ケラト硫酸は1種類の物質であった。コンドロイチン硫酸も大部分は1種で不飽和の4-硫酸物であると考えられたが少量ながら第2, 第3のピークとして分画するものも認められた。

論文の審査結果の要旨

〔研究目的〕

角膜は無血管性の透明な結合組織として特異な組織であるが、その構成成分の一つである酸性多糖類は角膜の膨潤性、透明性に重要な関連を有するといわれている。本研究は角膜に実際に存在する多糖類を純粋な形で抽出し、その化学的特性を研究して酸性多糖類の意義を検討する基礎にしようとしたものである。

〔研究方法〕

- 1) 多糖類の抽出はウシ角膜を材料として、蛋白分解酵素で分解したのち、Sevag法、カオリンの使用により十分除蛋白することを目標に行ない、最後に2%溶液でビュレット反応陰性の試料をえた。これを Gardell¹⁾のセルロースカラムによりケラタン硫酸とコンドロイチン硫酸に分離し、おのをおのさらに ECTEOLA セルロースカラムにより純化し、最後にセファデックスで脱塩した試料に必要量の電解質を加えてアルコールから沈澱させ白色粉末をえた。
- 2) 上記白色粉末について蛋白質(コラーゲンを含む)、ヘキソース、ヘキソサミン、ヘキスウロン酸、N, S, および塩化コバルト法による結合水量の定量を行なった。また KBr 錠剤法による赤外線吸収スペクトルを測定し、超遠心法による解析も行なった。

〔研究結果〕

- 1) 化学的定量によりえられた試料が蛋白質を含まないケラタン硫酸とコンドロイチン硫酸であることを確めた。
- 2) 両者の結合水量を測定し、また他の数種多糖類のそれと比較して結合水量は分子量および硫酸基、カルボキシル基の数に比例することを認めた。
- 3) 赤外線吸収スペクトルにより角膜に存在する多糖類の構造推定の根拠を求め、ことに硫酸基の位置についてケラタン硫酸はヘキソサミンの6-硫酸物、コンドロイチン硫酸は4-硫酸物であることを認めた。
- 4) カラムによる分画と超遠心解析により、以上の方法でえられた角膜多糖類はそれぞれほぼ一定の分子量数で揃っていることを確めた。

むすび

以上により角膜に存在する酸性多糖類がケラタン糖酸(6-硫酸物)とコンドロイチン4-硫酸であることを確認し、その化学的特性の幾つかを明らかにしたことは、角膜多糖類の意義を研究する上に基礎的知識を与えたものと考えらる。