

私の研究遍歴

(最終講義)

1975・3・1

私がお茶の水女子大学の前身の東京女子高等師範学校に化学の教官として赴任したのは昭和16年です。したがって今年には昭和50年ですから、それから満34年になります。その間3年余りアメリカに留学しましたが、それを除いても31年間をこの化学教室で皆さんと一緒に研究に教育に毎日を送り、そして今日に至りました。ところで今日の題目として書きました「私の研究遍歴」というのはここに赴任した昭和16年よりも少し前から始っていました。私の経歴を示すこととなりますけれども（表1）東京女子高等師範学校を出てから旧制の東京文理科大学にいきました。若

表 1

昭和12（1937）東京文理科大学化学科卒業

- I. 昭和12～24（1937～1949），東大大学院及び理研。
 - 藪田貞治郎教授
 - カビの色素の化学構造
 - 脂質特にリン脂質の研究
 - 糖アルコール及びその無水物の化学的研究
- II. 昭和25～28（1950～1953），Ohio State University, Dept. of Chemistry.
 - M. L. Wolfrom 教授
 - 炭水化物化学—
 - NaBH₄による糖類の還元
 - D-Xylosamineの合成
 - 酸によるD-グルコースの逆反応
 - (1953年9月～10月), Purdue University, Dept. of Biochemistry.
 - A. K. Balls 教授
- III. 昭和28～50（1953～1975），本学理学部化学教室生物化学研究室。
 - 複合多糖の構造と機能—
 - 結核菌の多糖
 - 海藻の酸性多糖
 - ◎結合組織のムコ多糖
 - 臓器・腫瘍などの複合多糖

いあなた方はほとんどが東京文理科大学とはどんな大学なのだろうと思われるかもしれませんが、これは東京教育大学の前身です。今の筑波大学にもつながる大学ということになりますが昭和12年に私はその化学科を卒業しました。その時から、この大学を卒業した時から、私の研究への遍歴という言葉を使うならば、それが始ったということができると思います。

東京文理科大学を卒業いたしまして、私は研究をもう少し続けていきたいと思い、大学院生としてどこか研究室に入りたいと考えました。しかし、その当時の東京文理科大学には大学院がなかったのです。それでもやはり本格的に研究を進めるためには大学院に入りたと思ったのですが、当時は大学でさえ女子に対してはこの文理科大学、これは東京と広島にありましたが、とそれから黒田先生が初めて出られた東北帝国大学など僅かに道を開いているところではありましたが、しかし、それも定員に満たない時に2次募集する程度で、正式には入れない時代だったので。それでも私は、今から考えると当時としては随分無謀なことだったのですけれども、東京帝国大学の大学院にいかならうかと考えたのです。しかし、当然女子に対して門戸を開いておりませんから簡単に入るわけにはいきませんでした。そこで、文理大を出るところから有機化

学関係、特に天然有機物にだんだん興味を持つようになっていましたから、天然物の化学をやっているところがいいのではないかとある先輩がアドバイスしてくれたこともあって、東大の藪田貞治郎教授にお願いをしてみることにしました。藪田貞治郎教授につきましては皆様もご存知かと思えますけれども、昭和39年にジベレリンの発見や微生物化学に新分野を開拓されたということで文化勲章を受けていらっしゃいますし、そのほか昭和18年学士院賞また第1回藤原賞も受賞しておられる方です。その藪田先生にお願いしたわけですが、そういうことは規則にあるわけでもないから入れるわけにはいかない、その時もいろいろエピソードがあるのですが、とうとうまあ仕方がない研究室に来なさいとおっしゃって下さって、今でいえば研究生というようなものですが、とにかく実験だけさせてもらうことになりました。それは昭和12年のことですが、しかし私はまだあきらめませんでした。やはり正式に大学院の学生になりたいと思いました。藪田先生も、そういう無謀なことにお怒りにならないで、一生懸命規程等をお調べくださいました。そしてある日、その年の秋だったと思いますが、こういうものを持って来られました。実物も今ここにありますが、Tokyo Imperial University Calendar (1933-34) というもので、要するに英文の東京帝国大学要覧なのですから、その13ページに次のように書いてあるということ藪田先生が見つけたのです。“The person who proved himself or herself to be equal of the gakushi can become a candidate for admission to the post-graduate course.” 私は文理大の化学を出ていたので理学士だったわけで、そういうことからいえば女子だから大学院に入れないということはないのだというわけです。しかしながら日本語で書かれた東京帝国大学の規程にはひと言も女子ということは書かれていなかったものですから、それで先生はちょうど東大の評議員をしていられたんだらうと思いますが、そのことを説明して下さいまして、結局私が正式に大学院学生として入学を許可されたのは昭和13年の4月からでした。長與又郎総長の時で、それからあと平賀総長の時まで在学したことになります。

そこでどういう研究をしたかといいますと、ここに概略を書いてみましたが(表1)、カビの色素の化学構造とか、脂質特にリン脂質、レシチンを主にやちたのですが、そういう研究とか、糖アルコールおよびその無水物の化学的研究など、大変バラエティーに富んだ、あれをやったりこれをやったりという状態でした。それでいくつか和文の報告を出したのですが、この期間が昭和12年から昭和24年にまでわたっております。その間、昭和16年に母校、東京女子高等師範の先生になって帰ってきたということもありますし、昭和20年が終戦ですからちょうど戦争がはさまれているわけです。あなた方のように戦後に生れた人がほとんどなのだからわからないでしょうが、その前後というものはとても研究のできるような状態ではなかったのです。本郷の研究室にいても、空襲警報がなればすぐ防空ずきんをかぶってガス、電気、水道を止めて地下室へ行ってじっとしているというようなことで、例えば蒸溜をしていて途中でせっかく出はじめてきた時に止めて地下へ降りたのではまた初めから全部やり直さなければならないということで、仕事は非常にかどらず、この間は私のかかなり長い研究生生活の中で、一番暗い、憂うつな毎日だったように思います。よく思い出すのですが、春日町、今の文京区役所前から東大へ行くために真砂町の

方へ電車が坂を上っていくたびに、いつもあのあたりで何となく憂うつになって今日一日無事に実験が終えられるだろうかという思いをたえずしたものでした。したがってこの間は10年余りありますけれども、実際に研究できたのは普通の時と比べれば5、6年にもあたらないのではなかったかと思えます。それから終戦になりましてからは東大にもいろいろ問題があったので、藪田先生が今の理研、当時一時科研とっていたこともあったのですが、その藪田研究室で実験してもよいとおっしゃって下さったので、こちらで講義をしてそのあと当時駒込にあった理研まで行って実験をするという状態でした。非常に暗い時期だったのですが、次に写真をお目につけてみますけれども（写真略）、それにしても割とニコニコして、うれしそうな顔をしていたものだと思います。これは終戦後の理研で、大変原始的なものばかり並べてありますし、またぶくぶく着ぶくれているのは暖房が何もなかったからです。

ところで最初に話すのを忘れたのですが、私の30年以上にわたる研究生活を分けてみますと3つの時期に分けられると思うのです（表1）。今までお話したのが第一の時期で、その次は昭和25年（1950年）、終戦後あまり日がたたない頃、衣料キップがまだ終らないというような時期でしたけれども、幸いにもアメリカに留学できるという機会に恵まれた時から始まります。どういう所に留学しようかということで、その当時昭和20年をはさんで外国の雑誌が来なくなって Chemical Abstracts とか JACS などのある時期全然見られなかったのですが、昭和23年頃からでしたか東大のいわゆるロックフェラー図書館にそういう雑誌がだんだん入って来るようになったので、毎日毎日そこに通って、もう飢えたもののように外国の論文を読みあさりしました。その中で、糖アルコールおよびその無水物の化学構造についてその前に少しやっていたものですから、炭水化物関係の方面でどういう方がどれ位活潑に研究を発表しておられるかということを一生涯懸命になって調べました。そうしましたらオハイオ州立大学化学教室の Wolfrom 教授の所で非常に沢山の研究が発表されていることがわかりました。その内容をいろいろみましてそこを第一に希望することにしたわけですが、幸いにもそれが叶い、客員研究員として受け入れられることになりました。これが Wolfrom 教授の写真ですが（写真略）、先生は1900年生れで私は1910年生れですから、丁度10年違うわけですけれども、惜しくも1969年に心臓発作で亡くなりました。非常に沢山の炭水化物化学に関する研究をされ、言い古された言葉ではありますがそれでも文字通りの世界的権威であって、ご存知のように Advances in Carbohydrate Chemistry などの Editor もしていらっしゃいました。その先生の所で仕事をさせてもらうことができることになったわけですが、その時私は曲りなりにも既に学位をもらっていたものですから、学生の資格ではなくて postdoctoral fellow として研究室を一室与えられて実験をすることになりました。その研究室の大きさはここで言いますと大学院研究室と呼んでいる部屋位で、そこに実験台はもちろん、ドラフト、ロッカー、机もおいてありました。

そこでどんな仕事をしたかといいますと（表1）、まる3年いたのですが、主にやったことは NaBH_4 による糖類の還元、D-キシロサミン、これは最初のペントサミンなのですが、その合成とか、酸による D-グルコースの逆反応などをいたしました。そしてその結果を JACS に4報

ほど論文にして発表することができました。最初の NaBH_4 による還元ですが (p. 1), NaBH_4 は LiAlH_4 などとともに今有機化学関係でよく使われている還元剤ですが、これはそのほんの 1, 2 年前にシカゴ大学の W. G. Brown 教授によって初めてつくられたばかりの頃だったので。Brown 教授の所では NaBH_4 はアルデヒドあるいはケトン還元してアルコールにすることは証明されていたのですが、ラクトンとかエステル、特にエステルは還元できないと報告されていた。それを私は Wolfrom 教授の御指導でエステルに対しての還元が可能であることを見出しました。特にウロン酸のカルボキシル基の所をメチルエステルにしておいて、それを還元してアルコールにするという方法、こういう研究では最初のものなのですが、これはモノマーについて行ったものですが (p. 7), 幸いにしてその後、この方法が何十回となくウロン酸を含む多糖類の構造研究に適用されるという結果になったわけです。次は先程もちょっと申しましたが D-キシロサミン、キシロースのアミンですが、その合成です (p. 9)。グルコサミンやガラクトサミンは生物化学の講義でも話していますし、今まで化学教室のコロキウムなどでも何回か出てきていますが、これは炭素 6 つのヘキソサミンです。ところが炭素 5 つのアミノ糖すなわちペンタサミンはこの時までには合成的にも天然物からも一つも知られておりませんでした。それを幸いにして D-グルコサミンから出発しまして、詳しいことは省略しますが、炭素を 1 つ過ヨウ素酸ではずして、炭素 5 つの D-キシロサミンを初めて合成しました。そして、これはペンタサミンだけれども Elson-Morgan 反応が陽性であることを証明しまして、要するに C-2 にアミノ基をもつ還元糖はヘキソサミンでなくても Elson-Morgan 反応を呈するというところを見つけました。このキシロサミンに関する研究を、その前のものも、アメリカ化学会の National Meeting に発表しましたが、これは自分で話せといわれて初めて Atlantic City で 1952 年に発表しました。この時一番前の席に有名な C. S. Hudson, それから Emil Fischer の令息である Hans O. L. Fischer が座って聞いておられて、後で個人的にもいろいろほめて下さって、うれしかったことを憶えています。次に行ったのはグルコサミンの誘導体についての研究で (p. 1), それからこれは D-グルコースの逆反応生成物についてですけれども (p. 11), 酸による逆反応によって理論的に脱水縮合する可能性のあるあらゆる結合の二糖が出来得るということを初めて明らかにし、そのうちで 2~3 の新しい二糖を単離、証明いたしました。

そういう実験をしながら、どういう所に居たかといいますと——今日は少しリラックスして聞いていただければいいのですが——これはオハイオ州立大学の化学教室のビルディングです (写真略)。正面に 4 階建てがあって、その両翼に古い 2 階建てがありコの字型になっています。3 階に化学図書室があり、4 階はその当時、あなた方にもなじみのある Chemical Abstracts の Editorial Office だったのです。今でも Chemical Abstracts の編集は Columbus, Ohio でやっているのですが、ここでは狭くなってしまって、今ではキャンパスの外側に、その後 10 年ばかりして訪ねた時に、大きい建物が建っていました。私は最初の 2 年間はこの赤レンガの 2 階建てのこちらの翼の 2 階にいたのですが、最後の年は向う側の翼の 2 階に、仕事の都合で移りました。また最初の 2 年間は生活を簡単にするために Baker Hall とよばれる dormitory, 寮の single

room にいたのですが、これはその女子学生寮です(写真略)。普通研究員は入れてもらえないのですが、特にたのんで入れてもらいました。ここに立っているのが私ですが、すごくロング・スカートで、ミニの時代でなくてよかったですね。この頃また長くなっていますから。またこれは一人の研究室をもらっていて、その研究室でデスクに向っているところです。これはWolfrom 教授のお宅へ遊びにいった時に外で撮ったものですが(写真略)、こちらの大変肥っていられるのが Mrs. Wolfrom, ピアニストですが、それと私の20何年か前の写真です。次にこれはオハイオ州立大学のキャンパスで、その当時は日本人がまだ少なかったのですが、これはあるウィーク・エンドの昼さがりにその何名かが集ったものです(写真略)。この左から2人目が今文部大臣をしておられる永井道雄さん、そのお隣りは東大工学部の電気工学の教授の山村昌さんです。永井さんとは3年、山村さんとは2年、同じ大学におりました。こういう風にくつろいでおしゃべりをしていた時もあったということです。

それで、オハイオ州立大学に3年おりました、1953年の秋こちらに帰って来たわけですが、それまでは比較的 low molecular weight のものだけを扱っていてどちらかというと有機化学に近かったものですから、今度帰って来て生物化学の講座を担当するようにとのことだったので、少しそちらの方面を見聞して来たらよかろうということで、Wolfrom 教授の御紹介で9月から10月にかけてPurdue 大学の Department of Biochemistry の A. K. Balls 教授の所へゆきました(表1)。Balls 教授はその少し前に α -アミラーゼや β -アミラーゼを結晶化されて、今では沢山の酵素が結晶化されていますけれども、その当時は酵素がはじめて結晶化されてからあまり間もない頃でしたから、大変有名でいらっしやいました。かなりもうお年をとっておられましたが、毎日御自分でも実験をしておられました。これが Purdue 大学の Department of Biochemistry で、こちらが Balls 教授と Mrs. Balls です(写真略)。Mrs. Balls もコロンビア大学の Biochemistry で Ph. D. をとられた方です。御夫妻はその後1957年に日本で Enzyme Chemistry の国際シンポジウムがあった時に御一緒に来られまして、このお茶の水女子大学にも寄って下さいました。またこれはその Balls 教授の所の大学院の女子学生と私の写真です(写真略)。

そういうことで1953年の秋、昭和28年10月30日だったと思うのですが横浜に帰って来ました。その当時はまだ飛行機はほとんど使えない状態で、私は行きも帰りも船で往復いたしました。それで帰って参りますとき、もとの女子高等師範学校の化学教室は知っておりましたが、その後大学に改組されて先生方も大分新しい方がおいでになってだんだん充実されてきているということは大体わかっていたのですが、しかし設備が充分でないだろうということは当然予想されました。それで私はそのことを心配いたしまして、帰ります年の1953年の夏、ロックフェラー財団に研究費の申請をしたのです。そうしましたら8月に向うの Director が会いたいといわれましたので、私は飛行機はその時初めてだったのですが、ニューヨークまで出かけていきました。そして幸いにして当時としてはかなりまとまった研究費をもらうことが出来まして、その時求めたもので現在も使われているものがあります。4階の一番隅の半暗室にある Rudolph の polarimeter (旋光計) はその時買ったものの一つです。

それで帰って参りましてこれからがこの大学での私の20年あまりの研究生活ということになるわけです(表1)。女高師の頃は、水圧がかかっていませんでしたから水流ポンプひとつ、デンケーターひとつ引くことができず、研究はできない状態だったのです。しかし、そういうことも先生方のご努力もあってだんだんと改善され、次第に研究もできるようになってきました。そして7年前にはこの理学部の本館もできてやっと少し研究室らしい状態になり、うれしいと思っています。さて、この間に私がやってきた研究をまとめて考えてみますと、複合多糖の構造と機能というようなことを目指して仕事をしてきたということができると思います。最初は結核菌の多糖をやりました。それから海藻の酸性多糖、これは現在でも全然止めているわけではありません。それから一番力を入れたのが結合組織、つまり細胞間マトリックスの主成分であるムコ多糖の研究です。このほか最近臓器とか腫瘍のムコ多糖について若干研究しています。それで一番力を入れた結合組織のムコ多糖につきましてももう少し詳しく話してみたいと思います。

先程も申しましたようにアメリカにいる時には Wolfrom 教授の所で低分子のものだけを研究していたわけですが、帰って参りまして、もっと生化学的な、つまり生物活性というようなものも念頭において研究を進めたいと考えまして、そういう場合に生体高分子というものが非常に重要になってくるのですが、そういう方向をだんだんと目指してきたわけです。それでこれは私にとりましては非常に印象深い一つの出来事なのですが、1958年の1月にノーベル賞の受賞者である Richard Kuhn 教授が日本に來られて神田の学士会館で講演されました。これはその時のスライドの一つで、あとでその年の Annalen に発表されたのですが(図略)、これはどういうことを表わしているかといいますと、ヒトの関節軟骨の中のグルコサミン (GlcN) とガラクトサミン (GalN) が年齢によってどういふ変化をするかを示したグラフなのです。生れる少し前の胎児からだんだん 20, 40, 60, 90 歳近くまでのヒトの関節軟骨について分析しています。これを見ますと GalN の方が初めは GlcN よりずっと多いのに年齢が20歳位までぐっと減ってきてそれから後は徐々に減少しています。一方、これに対して GlcN の方は非常にゆっくりと増加する傾向にあり、ついには GalN と GlcN の割合がほぼ等しくなっています。このことは私がその後研究を進めてゆく上に大きな影響を与えることになりました。この時私はこの講演を聞きながら——生物の先生もここにいらっしやいますけれどもこういう所が素人の非常に単純な所なんだろうと思いますが——Haeckel の有名な個体発生と系統発生との関係、つまり個体発生は系統発生をくり返すということが頭に浮んできたのです。こういうものが年齢によって変化するのなら、動物種によって、進化の程度の違いによっても差がみられるのではないかと思ったのです。それでいろんな動物の軟骨について GlcN と GalN を調べてみようということをはじめたわけです。この Kuhn の結果はペーパークロマトで出したものですが、私たちは丁度イオン交換クロマトが使えるようになったものですからそれを使って、より正確にアミノ糖を分析してみました。このグラフは(図1)いろいろな動物、クジラとかウシとか、それからエイ、サメ、イカなどの軟骨について GlcN と GalN の割合を求めたものです。そうしますと、ご覧になってわかりますように、その割合がそれぞれ動物種あるいは部位によって違うということが明らかに

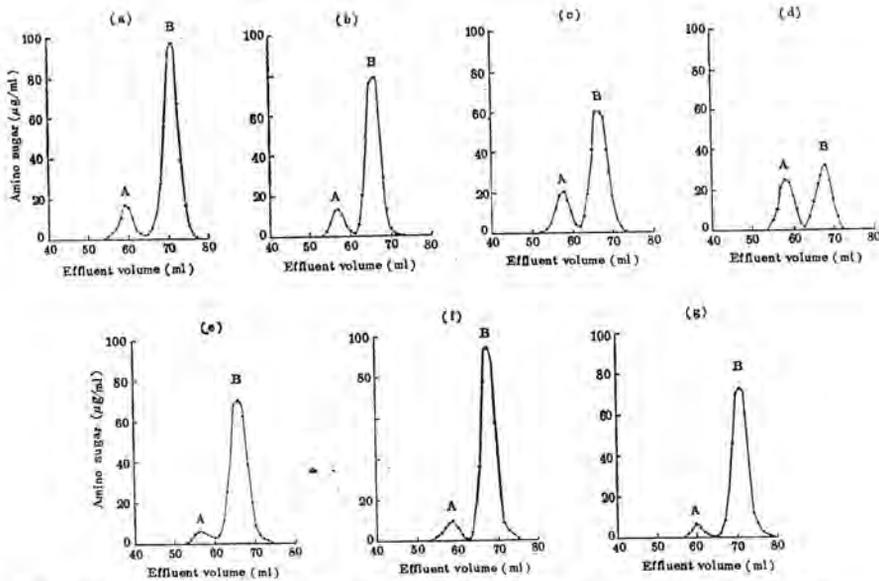


図1 Amino sugar patterns of adult cartilage. A, Glucosamine; B, Galactosamine.
 (a) Whale nasal cartilage. (b) Bovine nasal cartilage. (c) Bovine costal cartilage.
 (d) Bovine articular cartilage. (e) Ray cranial cartilage. (f) Shark cranial cartilage.
 (g) Squid cranial cartilage.

なり、ここで私たちは‘しめた’と思ったわけです。次にこれを数値で表わしてみますと（表2）、脊椎動物では GalN があまり多くないのですが、だんだん下等になるほど GalN の割合が多くなっていることがわかりました。また年齢につきましては、クジラとエイの胎児について行ったのですが、やはり成体に比べて胎児の方が GalN が多く GlcN の割合が少ないという、先程の Kuhn のヒト関節軟骨の場合と同様の結果が得られ、こういう動物においてもその点は符合しているということができました。

そこで、それではこの GlcN とか GalN とかは生体内では一体どういう化合物として存在しているのだろうかということになるわけですが、これらアミノ糖を含む多糖はムコ多糖と総称されていますが、その当時、1950年代の終りから1960年頃のことなのですけれども、その頃までにわかっていたムコ多糖としましては次のようなものがありました（表3）。硫酸基を含んでいないヒアルロン酸とコンドロイチン、それとコンドロイチン硫酸AとB、これはデルマトン硫酸ともいいますがけれども、それからコンドロイチン硫酸C、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンです。この中で最初の2つは硫酸基がなく、これらのコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸、ヘパラン硫酸はヘキソサミンとウロン酸あるいはガラクトースからなる repeating unit に対して硫酸基1つをもつこと、そしてヘパリンだけが2～3の硫酸基をもつ over-sulfated のものであること、その程度のこと知られていました。次はそれらの構造式ですが（図2）、これは主としてコロンビア大学の Karl Meyer 教授の所で決められたものですがけれども、ヘキソサミンとし

表2 Glucosamine and Galactosamine contents of Adult Cartilage from Various Sources

| Cartilage | No. of animals used | Glucosamine % | Galactosamine % | Glucosamine + Galactosamine % | Glucosamine : Galactosamine |
|--------------------------------|---------------------|---------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Whale nasal ^{a)} | 3 | 2.5 | 14.4 | 16.9 | 1 : 5.8 |
| Bovine nasal ^{b)} | 1 | 1.8 | 11.5 | 13.3 | 1 : 6.6 |
| Bovine costal ^{c)} | 1 | 1.8 | 5.4 | 7.2 | 1 : 3.1 |
| Bovine articular ^{c)} | 1 | 2.1 | 2.7 | 4.8 | 1 : 1.3 |
| Ray cranial ^{d)} | 3 | 0.8 | 9.0 | 9.8 | 1 : 11.9 |
| Shark cranial ^{e)} | 3 | 1.2 | 14.6 | 15.8 | 1 : 12.0 |
| Squid cranial ^{f)} | 6 | 0.3 | 5.2 | 5.5 | 1 : 17.5 |

All data are based on dry weights.

^{a)} Male (body length, 19.9 m), female (body length, 20.2 m) and adult individuals (of unknown length).

^{b)} About 6-year-old male.

^{c)} About 6-year-old female.

^{d)} Cranial width, 25-30 cm.

^{e)} Cranial width, 25-30 cm.

^{f)} Cranial width, 3-4 cm.

Glucosamine and Galactosamine Contents of Fetal Cartilage of Whale and Ray

| Cartilage | No. of animals used | Glucosamine % | Galactosamine % | Glucosamine + Galactosamine % | Glucosamine : Galactosamine |
|---------------------------|---------------------|---------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Whale nasal ^{a)} | 1 | 1.6 | 17.4 | 19.0 | 1 : 10.9 |
| Ray cranial ^{b)} | 3 | 0.4 | 11.7 | 12.1 | 1 : 29.3 |

^{a)} Body length, 396 cm; female.

^{b)} Body length, 5-6 cm.

表3 結合組織酸性ムコ多糖の組成

| ムコ多糖 (グリコサミノグリカン) | アミノ糖 | ウロン酸または ガラクトース | AS/UA/SO ₄ (Gal) |
|---------------------------------------|-----------|---------------------|--------------------------------|
| 非硫酸化ムコ多糖 | | | |
| ヒアルロン酸 : HA | D-グルコサミン | D-グルクロン酸 | 1 : 1 : 0 |
| コンドロイチン : Ch | D-ガラクトサミン | D-グルクロン酸 | 1 : 1 : 0 |
| 硫酸化ムコ多糖 | | | |
| コンドロイチン硫酸 A : ChS-A (コンドロイチン-4-硫酸) | D-ガラクトサミン | D-グルクロン酸 | 1 : 1 : 1 |
| コンドロイチン硫酸 B : ChS-B (デルマトン硫酸 DS) | D-ガラクトサミン | L-イズロン酸 D-グルクロン酸 | 1 : 1 : 1 |
| コンドロイチン硫酸 C : ChS-C (コンドロイチン-6-硫酸) | D-ガラクトサミン | D-グルクロン酸 | 1 : 1 : 1 |
| ケラト硫酸 (ケラタン硫酸) : KS | D-グルコサミン | D-ガラクトース | 1 : 1 : 1 |
| ヘパリン硫酸 (ヘパラン硫酸) : HS | D-グルコサミン | D-グルクロン酸 L-イズロン酸 | 1 : 1 : 1 |
| ヘパリン : Hep | D-グルコサミン | D-グルクロン酸 L-イズロン酸 | 1 : 1 : 2.5 |

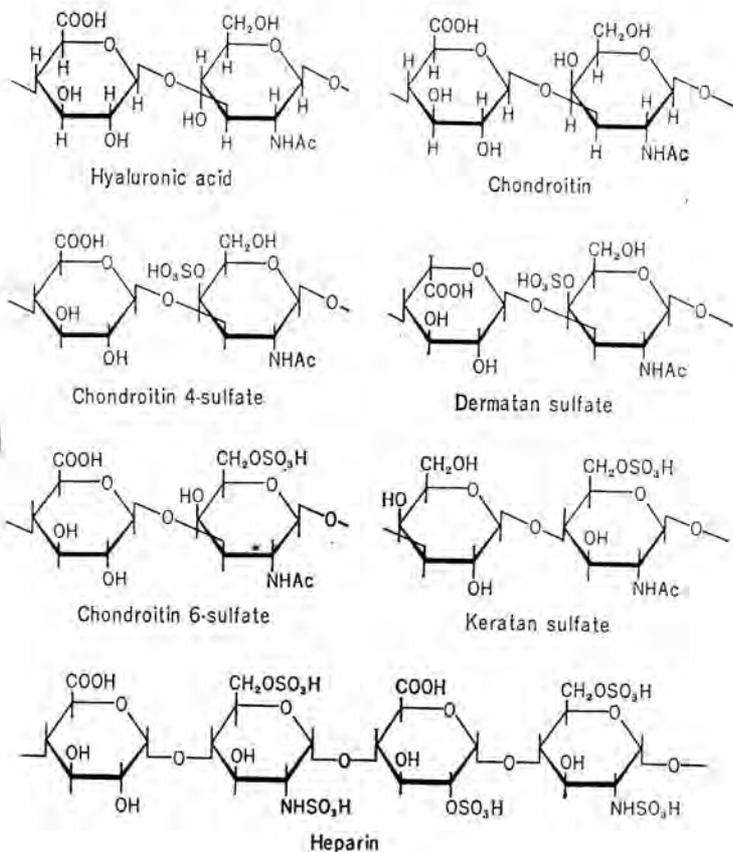


図 2

では D-グルコサミンと D-ガラクトサミン，ウロン酸としては D-グルクロン酸と L-イズロン酸，または D-ガラクトースを含み，硫酸基をもつものでは，その結合の位置が違ってきます。そこで私はいろいろな動物についてこれらムコ多糖の分布を調べてみようと思ったのです。

ところでこの研究は先程の個体発生は系統発生をくり返すという，いささか大それたことから始ったわけですが，ここに動物の系統樹を示します（図 3）。細かい所ではいろいろ意見があるらしいですが，私は今のような観点から比較生化学というようなことも考えまして，この系統樹に沿って研究材料を選んだわけです。哺乳類のあるものについては，コロンビア大学の Karl Meyer やシカゴ大学の M. B. Mathews らがいくつか仕事をしていましたが，脊椎動物と無脊椎動物の境にある原索動物（prochordata）—ナメクジウオの属する頭索類やホヤの仲間が属する尾索類がありますが—また軟体動物（mollusca）—スルメイカはこのうちの頭足類になるわけですが—すけれども—あるいは節足動物（arthropoda），これには '生きた化石' といわれているカブトガニが含まれますが，それらについての研究はほとんどありませんでした。そこで私たちはそういうものを研究材料に選びましてその結合組織のムコ多糖の構造研究を行なってみました。

この表（表 4）はいろいろな種類の動物の軟骨および脊索のムコ多糖についてまとめたもので

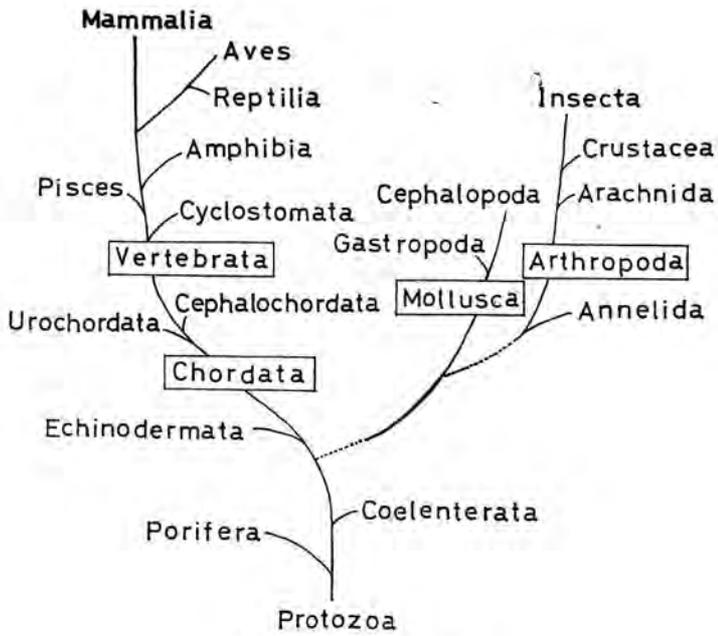


圖 3 Phylogenetic Tree

表 4 Mucopolysaccharides of Cartilage and Notochord from Various Animals

| Animal Species | | Cartilage | Notochord |
|----------------|---|--|----------------|
| 脊椎動物 | 哺乳類 Man Calf, Pig, Rabbit, Rat Whale | ChS-A, ChS-C, KS ChS-A > ChS-C ChS-A > KS > HA | |
| | 鳥類 Chicken | ChS-A > ChS-C > KS | |
| | 爬虫類 Alligator | ChS-A > ChS-C > KS | |
| | 兩生類 Bullfrog | ChS-A > ChS-C | |
| | 硬骨魚類 Trout, Carp, Cod Rock sturgeon | ChS-C > ChS-A ChS-C | ChS-A |
| | 軟骨魚類 Shark Ray Seven-gill shark | ChS-C, ChS-D, KS ChS-C, ChS-D ChS-C | ChS-A |
| | 四口類 Lamprey Hagfish | ChS-C ChS-E | ChS-A ChS-H |
| 無脊椎動物 | 頭足類 Squid | ChS-E | |
| | 刺尾類 King crab | ChS-K | |

す。先程も言いましたように、哺乳類についてはクジラは私たちがやりましたがそのほかはアメリカで報告されたものが主であります、それより下等なものにつきましてはほとんど私たちの研究室で行って得られた結果です。これを比べてみますと、ある傾向があることがわかります。軟骨については高等動物ではコンドロイチン硫酸 (ChS)-A タイプが主で、軟骨魚類になりますと ChS-C タイプが主になります。それから ChS-D, ChS-E あるいは ChS-K というのは硫酸基の多い over-sulfated のもので、ChS-E と ChS-K については私たちが発見して構造を決定したのですが、そういう新しいコンドロイチンポリ硫酸があるということもわかってきました。

それから脊索につきましても大変面白い結果が得られました。円口類というのは最も下等な脊椎動物でその中にヤツメウナギ (lamprey) とメクラウナギ (hagfish) の類があって前者が少し高等なのですが、ムコ多糖の成分からみますとこの両者の間で画然とした相違が認められました。このヤツメウナギとメクラウナギにつきましては、このほかにもヘモグロビンの研究とかまた種々の生理的性質についての研究をしている人がいますけれども、そういう方面のものを読んでもみましても、メクラウナギというのは脊椎動物というよりはむしろ無脊椎動物の方に近い性質をもっていると書かれています。ここに示しましたように軟骨および脊索のコンドロイチン硫酸の組成、構造からみましてもヤツメウナギは典型的な脊椎動物であり、メクラウナギはむしろ無

表5 Mucopolysaccharides of Adult Skin from Various Animals

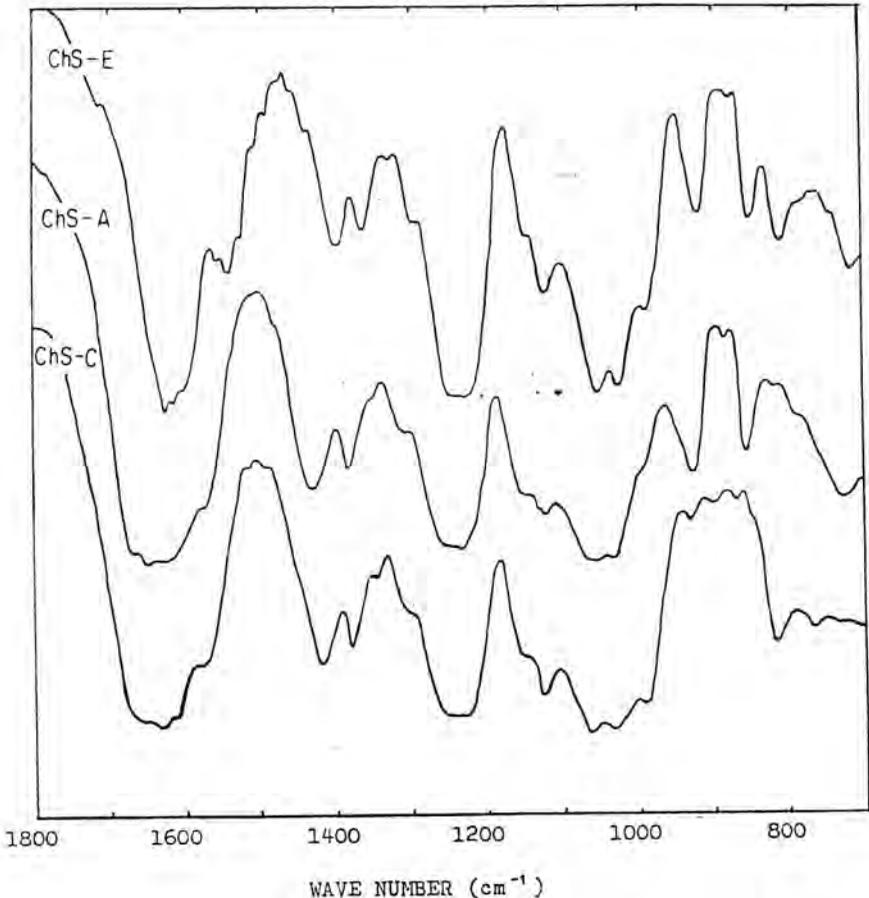
| Animal Species | | Mucopolysaccharides | |
|----------------|------|--|--|
| 脊椎動物 | 哺乳類 | Man Bull Pig Rabbit Rat | HA, DS > ChS-C DS > HA > ChS-C DS > HA > ChS-C, Hep, HS HA > DS HA > DS > ChS-C, -A, Hep, HS |
| | 鳥類 | Chicken | HA > DS > ChS-A > SDS, HS |
| | 両生類 | Toad | DS > HA > ChS-A, -C |
| | 軟骨魚類 | Shark Blue shark Sandber shark | HA > ChS-A, -C > SDS SDS > HA > ChS-A, -C |
| | 円口類 | Lamprey Hagfish | DS > HA HA > SDS |
| | 原索動物 | Amphioxus | HA > DS > SDS |
| 軟体動物 | 頭足類 | Squid Ommastrephes Loligo Octopus | Ch > ChS-E > ChS-A SChS > Ch Ch > ChS-E > ChS-A |

脊椎動物に類似しているといえます。

次に同じ結合組織でも skin, 皮膚について行ってみた結果です (表5)。だいたいヒアルロン酸とデルマタン硫酸が主体でありますけれども、特に注目したいのは軟体動物の頭足類からコンドロイチンという硫酸基を全然含まないものを見出したことです。このコンドロイチンにつきましては、Meyer がウシの眼の角膜から単離したという報告が一つあるだけで天然にはそのほかに見いだされていなかったのです。ところがスルメイカの皮とマダコの皮にはこれが非常に多く含まれていることがここで明かになりました。以上、種々の動物の結合組織におけるムコ多糖について大ざっぱに申しましたが、その中の主なものにつきましてもう少し詳しく、構造決定をした道筋を話したいと思います。

先ずスルメイカ頭部軟骨からのコンドロイチン硫酸E (ChS-E) についてですが、これは *over-sulfated* の新しいコンドロイチン硫酸として私たちの研究室で単離、証明した最初のものなのですが、その発見のきっかけとなったのはこの赤外吸収スペクトルです (図4)。二番目はクジラの軟骨からとった ChS-A の、下はサメ軟骨からの ChS-C の IR スペクトルですが、イカの

図 4



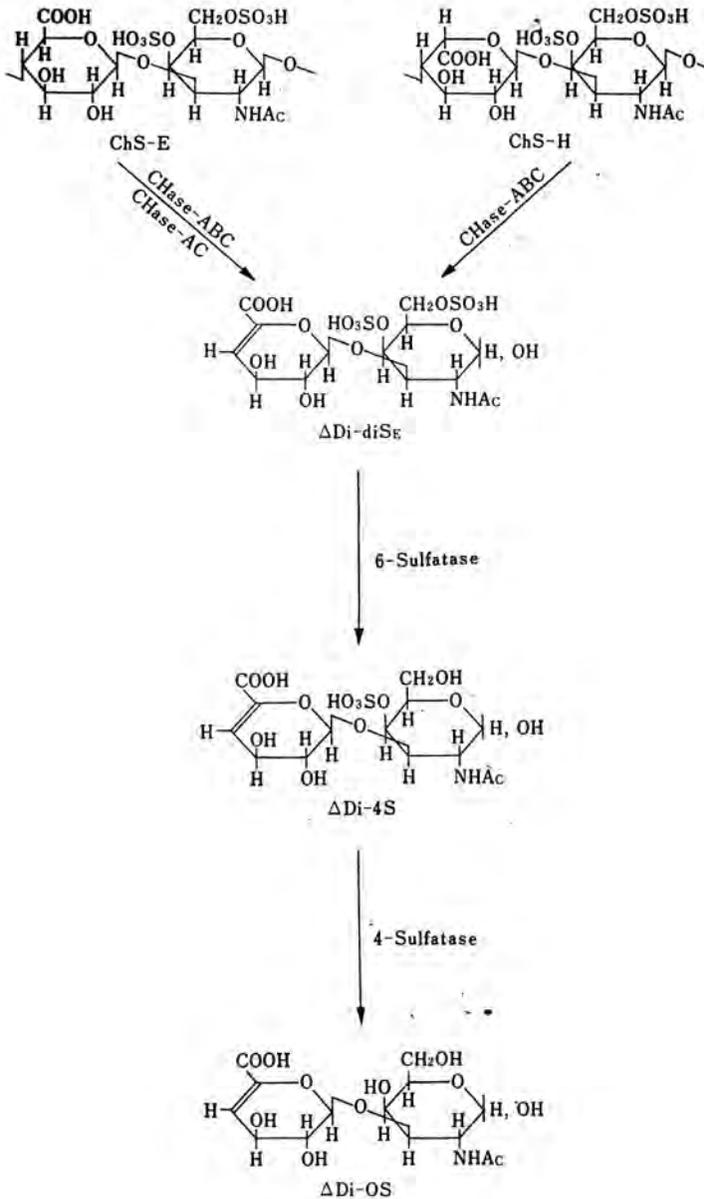
軟骨から同じような方法で単離した ChS 画分の IR をとってみましたところ（一番上）、前二者と歴然とした違いのあることがわかりました。すなわち ChS-A では GalN の 4 位の axial sulfate によると考えられている 850 cm^{-1} に吸収があり、また ChS-C の場合には GalN の 6 位の第一アルコール基についている equatorial sulfate による 820 cm^{-1} に吸収がみられます。ところがイカ軟骨の ChS 画分においては 850 cm^{-1} と 820 cm^{-1} の両方に非常に強い吸収がみられたのです。このような IR スペクトルはこれまで見たこともなかったもので、初めてとった時は非常にびっくりしました。何かの間違いではないか、あるいは A と C の混合物ではないかといろいろ考えて、何回も精製をくり返して確認をしました。

またここに分析値は示しませんでしたでしたが、このイカ軟骨の ChS は硫酸基を GalN を 1 とすると 1.6 の割合に含む over-sulfated ChS であることが明らかになり、このことと赤外吸収スペクトルの結果から、この ChS は GalN の 4 位と 6 位の両方の位置に硫酸基が結合しているのではないかと推定されました。このことを確実に証明したのが次の実験です。

さてコンドロイチン硫酸を特異的に分解する酵素、コンドロイチナーゼやコンドロスルファターゼが使えるようになったということはこれら ChS の構造研究に非常に役立つようになったわけですが、これらの酵素をイカ軟骨から得た ChS—これを、それまでに ChS-A, B, C, D まで名前がつけられていたものですから、ChS-E と名づけることを提案したのですが—それに作用させてみました（図 5）。ここでコンドロイチナーゼ—ABC というのは ChS-A, -B および -C に作用して脱離的に分解して、二重結合をもつ不飽和二糖を生成します。またコンドロイチナーゼ—AC というのは ChS-A と -C には作用するけれども -B には作用しない、つまりウロン酸が L-イズロン酸であるムコ多糖には作用しないという酵素です。このイカ軟骨から得られた ChS-E は、どちらのコンドロイチナーゼによっても分解され、主生成物として同じ不飽和二糖（ $\Delta\text{Di-diSe}$ ）が得られました。この二糖の構造をさらに確かめるために、二糖の 6 位の硫酸基を特異的に分解するコンドロ-6-スルファターゼを作用させますと 6 位の硫酸基のみとれた不飽和二糖-4-硫酸（ $\Delta\text{Di-4S}$ ）が生成しました。次にこの生成物にコンドロ-4-スルファターゼを作用させますと、硫酸基を全然含まない $\Delta\text{Di-OS}$ が生成し、これはイカの皮から単離したコンドロイチンをコンドロイチナーゼで分解して得られた不飽和二糖と一致しました。したがって、以上行っただけの実験結果から、 $\Delta\text{Di-diSe}$ がここに示したような構造であることが証明され、結局イカ軟骨からの ChS-E は *N*-アセチルガラクトサミンの 4,6-ジ硫酸を含む新しいコンドロイチンポリ硫酸であることを明らかにすることができました。

次にそのほかのコンドロイチンポリ硫酸、あるいはデルマタンポリ硫酸の構造決定について私たちが行った実験の結果をお話いたします。その前にこの図（図 6）で ChS-D とありますのは、東大理学部生物化学の教授をしていられた左右田教授と当時まだ大学院の学生だった江上教授とがサメの軟骨から単離され、硫酸含量の高い ChS であるということを見つけて 1940 年の日本化学会誌に報告されたものです。この微細構造につきましては、後に江上教授のお弟子の、名古屋大学理学部の鈴木教授が酵素を使って研究され、ここに示しましたように GalN の

図 5



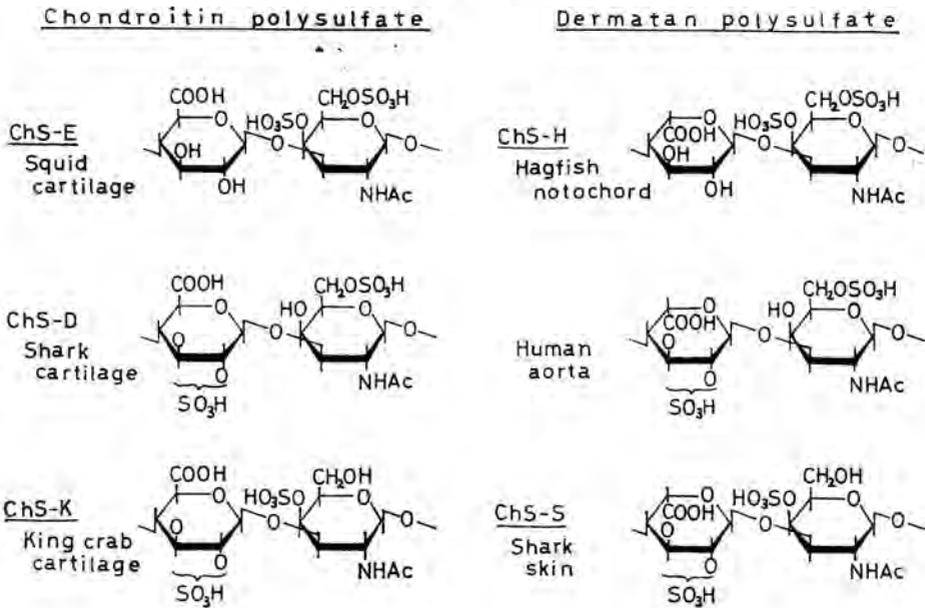
6位と、これはまだ決められていないのですが、ウロン酸の2位または3位に硫酸基をもつ不飽和二糖 (Δ Di-diS₆) が得られることを証明されました。このDだけが私たちが ChS-Eを見つけた時までに知られていたコンドロイチンポリ硫酸でした。

次に私たちが見つけたのはメクラウナギの脊索から単離した ChS-H です。これは、これからお話しますようにデルマトンポリ硫酸なのですが、hagfish にちなんでその頭文字Hをとってこのように名づけることを提唱しました。この硫酸含量は非常に高く GalN に対して 1:1.9 位

で、コンドロイチナーゼ -AC では分解されず、デルマトン硫酸タイプであることがわかりました。コンドロイチナーゼ -ABC を作用させますと、Gal N の 4 位と 6 位に硫酸基をもつ不飽和二糖が生成し、これは ChS-E から得られた 4Di-diSe と一致いたしました (図 5)。すなわち ChS-H は 4,6-disulfated GalN を含む新しいタイプのデルマトンポリ硫酸であることが証明できたわけです。

このほかサメ皮からもデルマトンポリ硫酸 (ChS-S) が得られ、これはコンドロイチナーゼでの分解の結果、Gal N の 4 位とウロン酸の 2 位または 3 位に硫酸基をもつことが明らかにされました (図 6)。

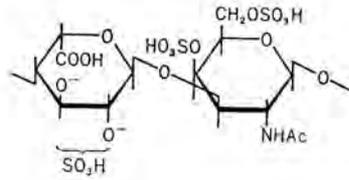
図 6



さらにメクラウナギの皮からは、これまた今まで天然に見いだされたことのない、二糖当り 3 つの硫酸基のついた trisulfated disaccharide 残基を含むデルマトンポリ硫酸が見いだされました。この微細構造につきましては、コンドロイチナーゼ分解およびスルファターゼの適用により、硫酸基が Gal N の 4 位と 6 位、およびウロン酸の 2 位または 3 位についていることがわかりました (図 7)。

それで今までに明らかにされたコンドロイチンポリ硫酸とデルマトンポリ硫酸をまとめてみますとこのようになります (図 6)。コンドロイチンポリ硫酸では *N*-アセチルガラクトサミンと *D*-グルクロン酸が、またデルマトンポリ硫酸では *N*-アセチルガラクトサミンと *L*-イズロン酸が骨格となっていますが、この二糖残基に対しまして、硫酸基の結合位置から考えて可能なものが

図 7



これで全部そろったことがわかります。ただウロン酸の2位か3位かというのはまだ決っていませんが、これは今私たちの研究室でも化学的に証明する方法を試みていますけれども、それですと試料がたくさん必要ですので、もしも特異的な酵素でも見つければ、さらに研究が促進されることと思われます。ここでアンダーラインをつけたものは、私たちの研究室で発見し、構造を明らかにしたのですが、そのほかのものではこの ChS-D については先程も申しましたように左右田、江上両教授が見い出されたもので、GalN の6位とウロン酸に硫酸基のあるデルマトンポリ硫酸というのは最近ヒトの動脈の中にあると報告されていますがこれはまだはっきりポリマーとして単離されてはいません。ChS-E、ChS-S につきましては先程お話ししました。それからこの ChS-K というのは、ごく最近私たちの研究室の大学院生がカブトガニの軟骨から単離し、構造決定をして、新しいタイプのコンドロイチンポリ硫酸であることを証明したもので、King crab にちなんでこのように命名したものです。

そこで、今まで説明してきました研究をどのようなものに発表したかということをごにまとめてみました(表6)。スルメイカの軟骨からコンドロイチンポリ硫酸を見つけたのが1966年、それを酵素的に証明したのが1968年です。Hagfish の脊索の ChS-H については1971年に、また皮からの trisulfated disaccharide については1972年に、ともに B. B. A. に発表しました。それから今の King crab の軟骨からの ChS-K については1974年になります。また先程出てきましたスルメイカの皮のコンドロイチンは1964年に見つけています。それからこのような研究に力を入れはじめた最初の頃なのですが、1961年にクジラの軟骨の中にヒアルロン酸があるということをお初めて見い出しました。これを発表しましたら、外国の方からも軟骨の中にヒアルロン酸があるなんておかしい、それはほかの結合組織が混っていたからではないかといろいろ質問を受けたり、手紙をもらったりしたのですけれども、現在ではいろいろな軟骨中に存在が認められ、むしろこのヒアルロン酸は硫酸化ムコ多糖とタンパクが結合した複合体、すなわち proteoglycan の aggregation に関与しているらしいということが問題になっています。

これらの研究を行ないますのに、実際にすでに精製されているムコ多糖分解酵素を使っていたのですが、そのほかに私たちは新たに研究方法開発のためにいろいろなムコ多糖分解酵素の検索を行いました。スルメイカの肝臓からヒアルロニダーゼをとり出し、またその肝臓から新しいタイプのコンドロスルファターゼを分離いたしました。先程でてきましたコンドロ-6-スルファターゼとか4-スルファターゼというのは細菌、つまりバクテリアからとられたもので、その基

表 6

結合組織—細胞間マトリックス—のムコ多糖

1961. The presence of hyaluronic acid in whale cartilage.
Biochim. Biophys. Acta, **49**, 407.
1962. A comparison of glucosamine and galactosamine content of
cartilage from various sources.
Biochim. Biophys. Acta, **58**, 87.
1964. Isolation of chondroitin from squid skin.
Biochim. Biophys. Acta, **83**, 348.
1966. Chondroitin polysulfate of squid cartilage.
J. Biochem., **60**, 317.
1966. Migration of sulfate groups of chondroitin sulfates at
elevated temperature.
Carbohydr. Res., **2**, 338.
1968. Formation of three types of disulfated disaccharides
from chondroitin sulfates by chondroitinase digestion.
J. Biol. Chem., **243**, 1543.
1971. A new dermatan polysulfate, chondroitin sulfate H,
from hagfish notochord.
Biochim. Biophys. Acta, **237**, 173.
1971. Mucopolysaccharides from chicken skin of three age groups.
Biochim. Biophys. Acta, **244**, 513.
1972. A novel dermatan polysulfate from hagfish skin,
containing trisulfated disaccharide residues.
Biochim. Biophys. Acta, **264**, 229.
1972. Isolation of heparan sulfate from chicken skin.
Biochim. Biophys. Acta, **279**, 260.
1974. Isolation and characterization of a new disaccharide
disulfate; 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(2- or 3-O-sulfo-
 β -D-glucopyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose.
Biochim. Biophys. Acta, **343**, 423.
1974. A chitin sulfate-like polysaccharide from the test of
the tunicate, *Halocynthia roretzi*
Biochim. Biophys. Acta, **362**, 215.
1975. Mucopolysaccharides from the connective tissues of
the amphioxus, *Branchiostoma belcherii*.
Comp. Biochem. Physiol., in press.
1975. Microheterogeneity of chondroitin sulfates from
various cartilages.
Connective Tissue Res., **3**, 87.

ムコ多糖分解酵素と研究方法の開発

1958. アミノ糖の過ヨウ素酸化
生化学, **30**, 529.
1969. A modified method for chondrosulfatase assay.
Anal. Biochem., **32**, 314.
1970. Improved method for electrophoretic separation and
rapid quantitation of isomeric chondroitin sulfates on
cellulose acetate strips.
Anal. Biochem., **37**, 197.
1971. Mucopolysaccharide-degrading enzymes from the liver
of the squid, I. Hyaluronidase.
Biochim. Biophys. Acta, **242**, 428.
1972. Chondrosulfatase of squid liver.
Biochem. J., **128**, 983.

1974. Substrate specificity of chondrosulfatases from *Proteus vulgaris* for sulfated tetrasaccharides.

Biochim. Biophys. Acta, **362**, 290.

結核菌の多糖

1960. Cell polysaccharides of the *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG).

Nat. Sci. Rept. Ochanomizu Univ., **11**, 28.

1961. BCG 脱脂菌体のアミノ糖

生化学, **33**, 765.

海藻の酸性多糖

1966. Isolation and purification of fucoidin from brown seaweed *Pelvetia wrightii*.

Agr. Biol. Chem., **30**, 495.

1969. Structural studies on fucoidan from *Pelvetia wrightii*.

Proc. Intl. Seaweed Symp., **6**, 421.

1970. Isolation of L-fucose 4-sulfate from fucoidan.

Carbohydr. Res., **13**, 167.

1972. Heterogeneity of fucoidan obtained from *Pelvetia wrightii*.

Proc. Intl. Seaweed Symp., **7**, 439.

臓器・腫瘍などの複合多糖

1972. Isolation and characterization of heparan sulfate from rat kidney.

J. Biochem., **72**, 479.

1974. Isolation and chemical characterization of mucopolysaccharides from rat tumors.

Cancer Res., **34**, 308.

1974. Pentose-containing polysaccharides from the liver of the squid, *Ommastrephes sloani pacificus*.

Nat. Sci. Rept. Ochanomizu Univ., **25**, 45.

1974. Mucopolysaccharides in the spleen of mice with Friend leukemia.

GANN, **65**, 451.

1975. Glycopeptides from the egg jelly coat of the toad, *Bufo vulgaris*.

Biochim. Biophys. Acta, **381**, 195.

質特異性は後で私たちが訂正することになるわけですが、最初は二糖硫酸でなければ作用しないと考えられていました。ところが私たちがイカの肝臓から分離精製したコンドロスルファターゼは、二糖のような小さいものではなく、高分子のコンドロイチン硫酸に直接作用して脱硫酸を行うということを見い出しました(1972年)。またこれに関連して、コンドロスルファターゼの活性を測定する新しい方法を開発いたしました(1969年)。

そのほか研究方法の開発として特に申し上げたいのは、セルロースアセテート膜の電気泳動についてであります。最近私たちの研究室の人たちが研究発表をします時にたくさん電気泳動図を出していますが、それを現在のように的確に使えるようにしたのは1970年で、*Analytical Biochemistry* に発表しました。先程も言いましたように、ChS-A, -B, -C というのは、いずれも repeating unit 当り 1モルの硫酸基をもっていて、Bはデルマタン硫酸で、他の2つがグルクロン酸を含むのに対してこれはイズロン酸を構成糖としているということだけが違うわけですが、それまではBとA, C とはある程度分けられるという電気泳動条件は見い出されていたのですけれども、AとCにつきまちは単に硫酸基の結合位置が4位か6位かというだけの違いなものですから、これらを電気泳動で分けたという報告は全然ありませんでした。そこで私たちの研究室では酢酸カルシウムを使いまして、0.2Mでも0.3Mでもよいのですが、ChS-A, B, Cをこのようにきれいに分離することができました(写真略)。その時は、あまりにはっきりと分かれたものですから、自分たちでも眼を疑ったほどでしたが、今では誰にでもできる確実な方法となっています。またこの方法は1 μ g以下でも明瞭なスポットが得られるという、非常に微量で同定できる方法なのですが、次にこれを定量することを試みました。この図(図略)は、試料を濃い方から順次1/2ずつ希釈してスポットして泳動したもので、上からアルシアン・ブルー、アクリジン・オレンジ、トルイジン・ブルーで染色したものです。このアルシアン・ブルーで

図 9

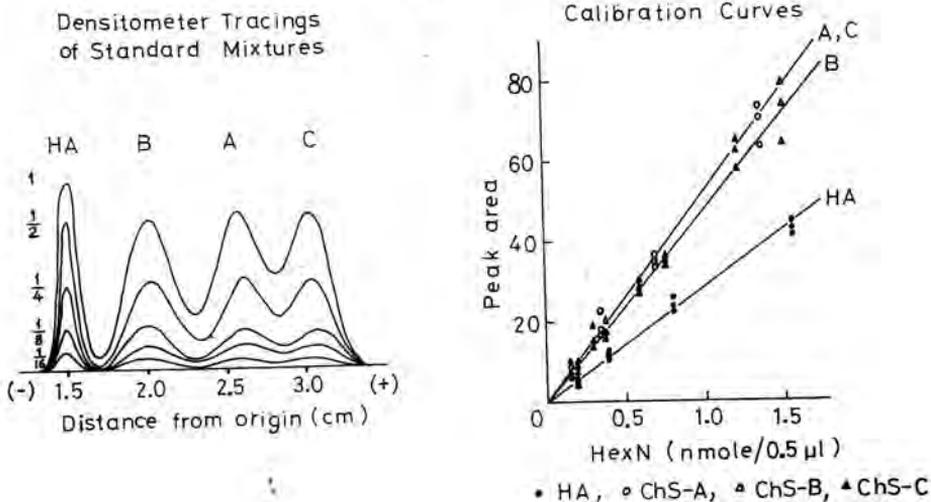
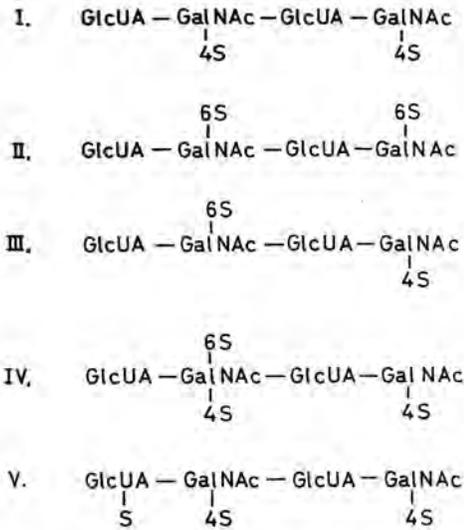


図 10

Structure of Tetrasaccharides
from Chondroitin Sulfate A, C, E and K.



ファターゼの基質特異性をみるために、種々の ChS から四糖の単離とその同定を行ないました (図10)。ChS-A からの 4S-4S [I] と ChS-C からの 6S-6S [II] はこれまでも知られておりました。しかし 6S-4S [III] と ChS-E から得た 4,6 diS-4S [IV], それからカプトガニ軟骨の ChS-K から得た UA-S, 4S-4S (V) というのはここで新しく単離された四糖です。これらを基質にしてコンドロ-4-スルファターゼを作用させますと (図11), 4S-4S の場合, 同じ 4S でも還元末端にある 4S の方が先にはずれ, さらに作用させますと硫酸はすべて切れて, コンドロイチンから得られた四糖と同じ OS-OS [XI] になります。そのほかのものでも同様で, 4-スルファターゼによって還元末端についた 4S が先はずれます。このように二糖硫酸にしか働かないといわれていた4-スルファターゼが四糖にも作用するという事を見出したわけですが, 一方 6-スルファターゼの方は四糖にはほとんど作用しないということも明らかにいたしました。

そのほかには結核菌の多糖とか海藻の酸性多糖, これは主に褐藻エゾイシゲの fucan sulfate について行いました。また最近では臓器とか腫瘍のムコ多糖についても少し研究し, Cancer Research (1974年) にも発表したりしています。

それから結合組織のムコ多糖の研究の続きなのですが, ホヤの外皮の酸性多糖についても研究しました。このように私は先程お目にかけました動物の系統樹に沿って研究材料を選んできたわけですが, このホヤというのは原索動物の尾索類で, 古くからその被囊にセルロースが含まれているといわれていました。動物でセルロースを含んでいるのは非常にめずらしいのですが, セルロースは水に溶けないのに, その他に水に溶ける酸性の多糖がかなりたくさん含まれていることがわかりました。その構造研究をしましたところ, キチン硫酸で, 硫酸基は主としてグルコサミン

染色したものについて densitometry を行ってみますと, このようにきれいに分かれまして (図9), 検量線もうまく直線にのり, 定量にも使えることがわかりました。このように非常に微量での同定ならびに定量が可能なのでから, 現在国内だけでなく国外でも, 非常に多方面で, 特に生化学方面や医学方面で利用されるようになっております。

それからさらに, 先程ちょっとふれましたけれども, 細菌のコンドロスルファターゼの基質特異性をもう少し確実にして, それを構造研究に利用できないかという目的で行った研究があります (1974年)。コンドロイチン硫酸をヒアルロニダーゼで充分に消化しますと四糖が最も多く生成しますが, 四糖に対するコンドロスル

図 11

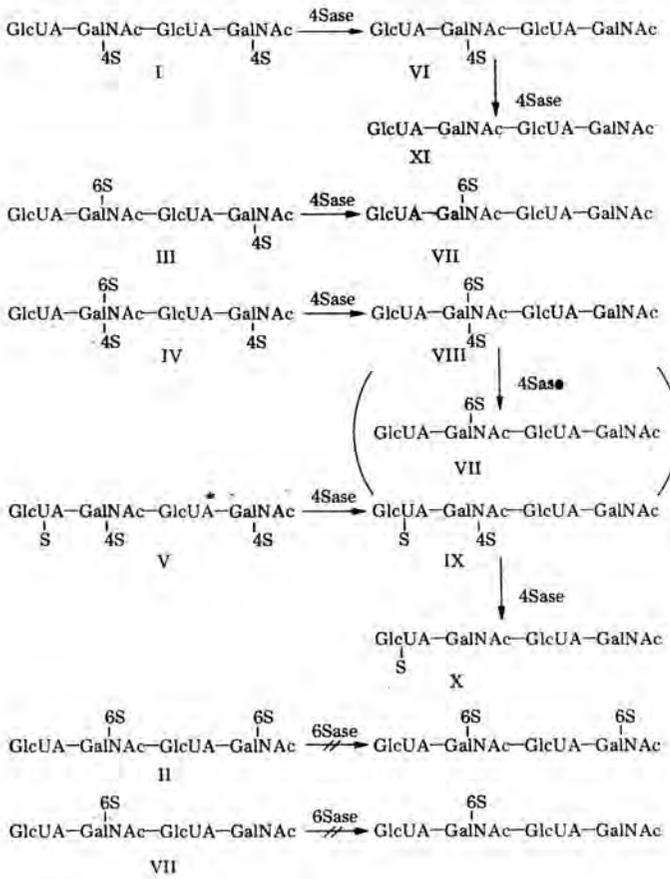
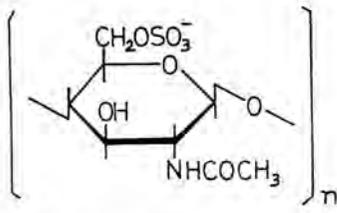


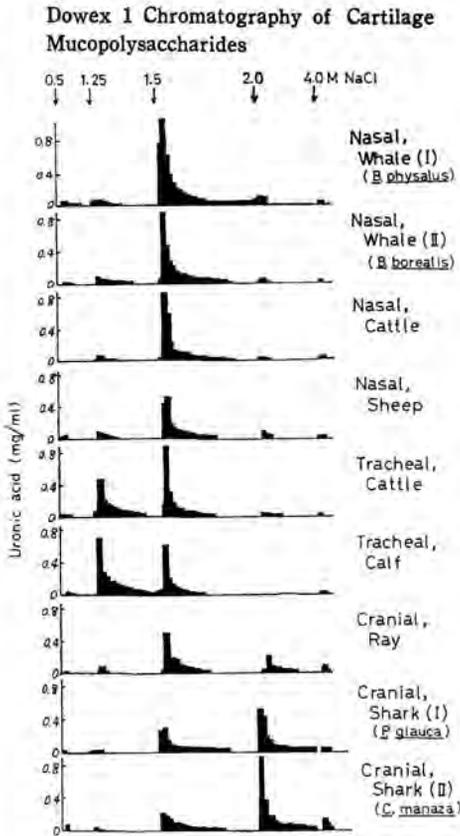
図 12



の6位に結合しているということが明らかになりましたので1974年に発表しました(図12)。タンパク質との結合部分のところはまだ少しははっきりしませんでしたので、-like と書いておいたわけです。

キチンというのは、ご存知だと思いますけれども、天然に非常に莫大な量が存在しています。カニやエビ、あるいは昆虫の殻はキチンが主ですが、ある文献によりますと、甲殻類に属するプランクトンが年間に生産するキチンだけでも数十億トンになると推定されています。地球上で一番多く生産される有機化合物はセルロースで、これは年間1千億トンといわれていますが、キチンはそれに次ぐ存在量ということになります。キチンは化学的に申しますとN-アセチル-D-グルコサミンのポリマーで、水に溶けませんし、薄い酸にも薄いアルカリにも溶けません。ところがそれに硫酸がつきますと水に溶けるようになります。しかし硫酸基の結合した水溶性のキチン硫酸というものは、キチンがこれほどポプラーであるのに、今まで天然には見つかっていなかったのです。

図 13



も、これによって粗ムコ多糖を得まして、それを Dowex-1 のカラムにかけ NaCl の濃度を段階的にあげて溶出しました (図 13)。このパターンだけを見ても同じ軟骨でも非常に違っていることがわかります。1.5M NaCl では普通コンドロイチン硫酸が溶出されてきますが、軟骨魚類やスルメイカでは 2 M NaCl で溶出されるものが多く、これは先程お話しした硫酸基の多い over-sulfated な ChS-D や -E にあたりますが、今度は 1.5M NaCl の画分に着目しました。

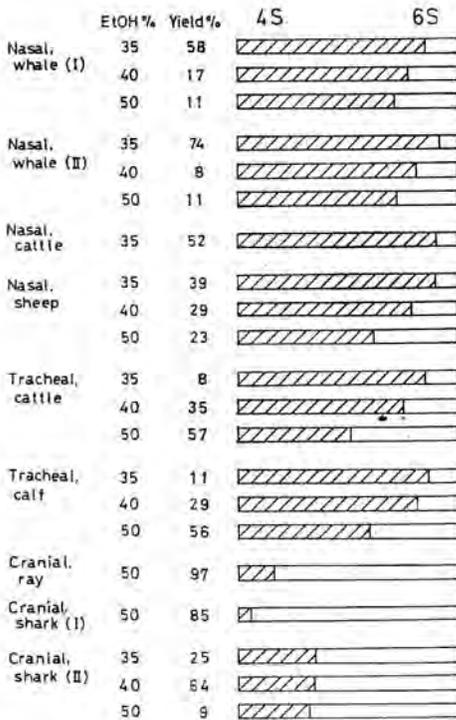
軟骨の場合、1.5M NaCl で溶出されるコンドロイチン硫酸として従来 2 種類が知られていました。一つは ChS-A で Gal N の 4 位に硫酸基が結合し、他の一つは ChS-C で Gal N の 6 位に硫酸基がついているものです (図 2 参照)。これらに対して 1961 年ハーバード大学の Jean-loz は新しい命名法を提案して、ChS-A をコンドロイチン 4-硫酸、また ChS-C をコンドロイチン 6-硫酸と名づけた方が化学的に正確ではないかと言っていますが、私たちはこの命名法を修正しなければならないことを見つけることになりました。すなわち、それぞれの動物の軟骨から得られた 1.5 M NaCl 画分を Ca 塩の存在下でエタノール分画し、エタノール濃度を 35, 40, 50 % と順次あげていき、それぞれの濃度で沈澱する画分を集めて、その収率を求めてみました (図 14)。そうしますと動物の種類や軟骨の種類によってある傾向がみられまして、哺乳類の鼻軟骨ではいずれも 35% 画分が最も多いのですが、気管軟骨ではウシの場合も子ウシの場合も 50% 画分の方が多くなっています。軟骨魚類ではバラツキがあって、いずれも頭部軟骨なのですが、エイ

こういうものが見つかったので、そのものの生理的あるいは生物学的意味を調べてみたら面白いのではないかと考えています。

最後に、先程も四糖に対する基質特異性について研究したと言いましたが、そのコンドロ硫酸ターゼを利用して最近行った研究をもう少し話したいと思います。最初の頃にいろいろな動物の軟骨のムコ多糖の種類とか構造とかを研究していたことはお話ししましたが、その後新しい研究方法をいくつか開発しましたので、さらにもう一度、種々の軟骨ムコ多糖、コンドロイチン硫酸が主なのですが、その微細構造を研究してみたいと思いました。材料としてはクジラ、ウシ、ヒツジの鼻軟骨、ウシの気管軟骨、サメとエイの頭部軟骨を用いました (図 13)。それらからプロナーゼ消化と TCA 処理という、今では常法となっている方法ですが、これは私たちが数年かかって確立し現在では他の研究室の方々もよく使われていますけれど

図 14

Proportion of 4S and 6S in 1.5M NaCl-EtOH Fractions



とは非常に変わっていることがわかりました。軟骨魚類では逆に6Sの方が多くなっています。

そこでこの非常に変わっているところに着目しまして、ウシの気管軟骨の1.5M NaCl-50% EtOH 画分をさらに研究してみることにいたしました。まず化学分析をしてみますと、アミノ糖はガラクトサミンだけで、ウロン酸、硫酸との比はほぼ1:1:1でした(表7)。ところがその赤外吸収スペクトルをとって見ますと非常に特徴のあるものが得られました。つまりChS-AやCの場合とは全然違って、axial と equatorial と両方の硫酸基による吸収がみられ、ChS-Eの時と同じようなものでした。しかもこれはover-sulfatedではなく、硫酸基はGalNに対して1:1なのです。

そこで次にこの構造を明らかにするために、酵素分解を行いました。まずヒアルロニダーゼで

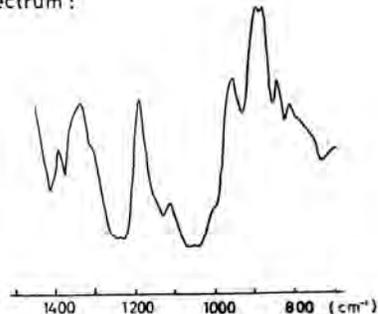
とヨシキリザメでは50%画分が多く、ホシザメでは40%画分が多いという結果が得られました。そこで各画分を先程申しましたようにセルロースアセテート膜で電気泳動してみますと、いずれもきれいなsingle bandを与え、単一物質であることを示していました。ところがこれらをコンドロイチナーゼで分解して、先程からたびたび出てきました不飽和二糖の4-硫酸(Δ Di-4S)と6-硫酸(Δ Di-6S)の生成の割合を分析してみますと、いずれの画分にも、その比率は異なりますが、4Sと6Sが含まれていることがわかりました。そして鼻軟骨ではどの動物でも、一番収率の多い35%画分はほとんどが4Sで80%以上を占め、エタノール濃度が上っていくと6Sの割合がだんだん多くなってきています。この傾向は気管軟骨の場合にも見られ、50%画分になりますと、これは収率が一番多いのですが、ウシでも子ウシでも、4Sと6Sの割合がほぼ等しくなり、今までのChS

表 7

Analysis of 1.5 M NaCl-50% EtOH Fr. from Bovine Tracheal Cartilage

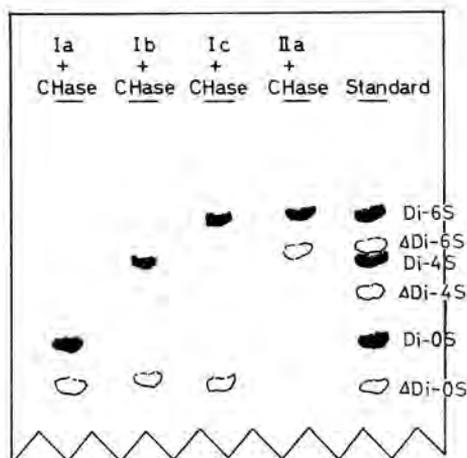
| | % | Molar ratio |
|---------------------------------|------|-------------|
| Galactosamine | 31.0 | 1.00 |
| Uronic acid | 34.0 | 1.01 |
| Sulfate | 17.6 | 1.06 |
| % | 1.67 | |
| Δ Di-4S/ Δ Di-6S | 1.02 | |
| $[\alpha]_D^{25}$ (c 10, water) | -32* | |

IR Spectrum:



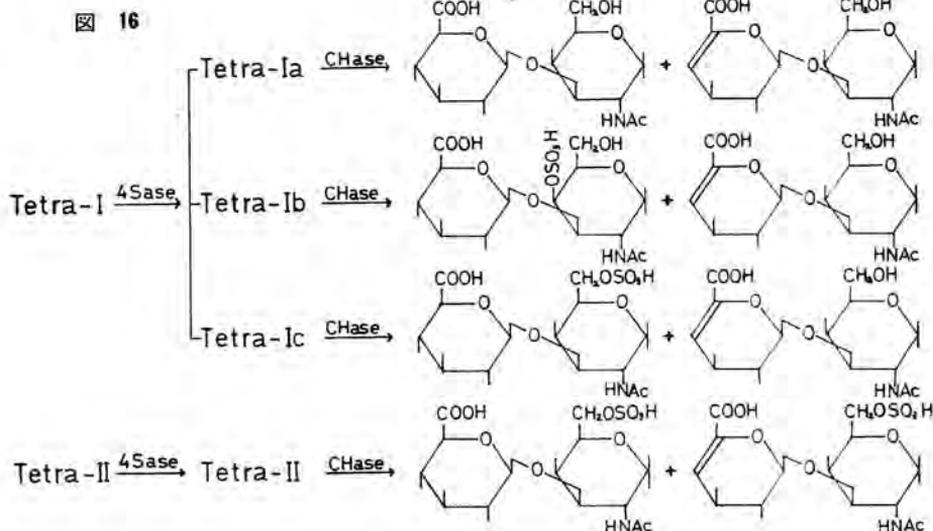
分解して、その生成物をペーパークロマトで分離してみますと、気管軟骨の ChS からは2つの四糖に相当するスポットが得られました(図略)。移動度の大きいものを Tetra-I, 小さいものを Tetra-II としまして、それぞれに 4-スルファターゼを作用させてみますと、Tetra-II の方は全然変わりませんでした、Tetra-I では元の位置のスポットはなくなり、それより移動度の大きい3つのスポット、Ia, Ib, Ic があらわれました。このことは先程の 4-スルファターゼの四糖に対する基質特異性から考えて、Tetra-II では還元末端の GalN の 4 位に硫酸基はなく、Tetra-I ではその位置が全て硫酸化されているということを示しています。

図 15
Chondroitinase Digestion Products



そこでこれら四糖の構造をさらに追求するために、コンドロイチナーゼ消化を行ない、生成物をペーパークロマトで分離しました(図15)。ここで黒で書いたのが飽和の二糖で、白いのが不飽和の二糖を示していますが、四糖を分解していますので、飽和の二糖は非還元末端から、また不飽和の二糖は還元末端から出て来るわけです。その結果、Ia からは硫酸基のない飽和と不飽和の二糖が、Ibからは飽和の 4S と硫酸基のない不飽和二糖が、また Ic からは飽和の 6S と硫酸基のない不飽和二糖が、そして IIa からは飽和の 6S と不飽和の 6S がそれぞれ得られました。これを構造式で書いてまとめてみ

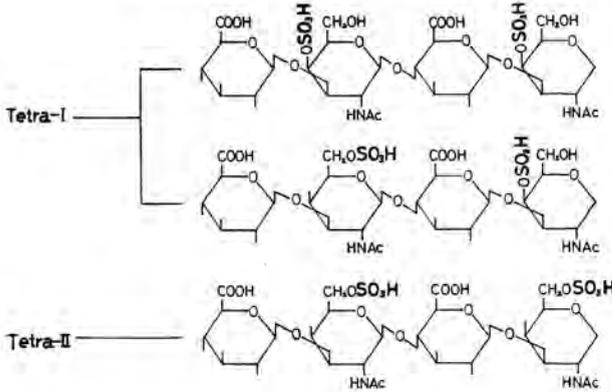
ると図16のようになりますが、これから元の四糖の構造が明らかになるわけです。その前にそれが四糖であるということを確認するために、コンドロイチナーゼ消化で得られた飽和二糖と不飽



和二糖の比から重合度を求めましたところ、いずれも四糖であることがわかりました(表略)。

図 17

Structure of Tetra-I and Tetra-II



以上の結果から、ウシの気管軟骨の 1.5M NaCl-50% EtOH 画分をヒアルロニダーゼで分解して得られた四糖は、結局こういう 3 種類のものであったということが出来ます(図17)。このことは同一のコンドロイチン硫酸の多糖鎖の中に Gal N の 4-硫酸と 6-硫酸の両方が存在する hybrid 構造を持っていると考えれば説明がつくわけで、今まで ChS-A と C という別々のポリマーがある

と考えていたけれども、そういうものはほとんどなく、repeating unit の n 倍すなわち、(repeating unit) $_n$ というように書くのは正しくなく、したがってコンドロイチン 4-硫酸とかコンドロイチン 6-硫酸とか命名するのは実際上不可能ではないかと思っています。

今までお話ししてきましたように、私たちが行って来ましたことは基礎的な研究に過ぎないわけですが、最近ムコ多糖を主成分とする結合組織の基質、つまり細胞間マトリックスの生物学的な重要性が非常に注目されるようになりました。すなわち多細胞生物の発生や分化がマトリックスの形成によって初めて行われるようになるとか、また先程も出てきましたが、老化あるいは種々の疾患——この頃難病といわれているもので結合組織病が非常に多くなっていますが——そういう疾患によるムコ多糖の量的、質的变化というようなことが知られるようになり、最近では生化学者だけでなく、生物学や医学方面の方たちからも注目されています。私はもともと信条としましてオポチュニストが大きらいなものですから、研究でもおはやりとか主流とかいうのがあってもそれをわざと避けてしまうような少し偏屈な所があるのですけれども、今のような研究生活におきまして、私自身の基礎的な興味から低分子のものから高分子のものへと研究して参りましたが、最近たまたま今のような観点から生物学者や医学方面の方からも非常に関心を持たれるようになったということは私の全く予期しない、望外のことであったわけです。

考えてみますと、最初に申しましたように私がこの大学に赴任してから34年たちますが、そのうちで実際に仕事が出来たのは、やはり大学になって研究室での卒業研究が始り、ここ10年間は大学院ができて修士の人達が仕事をするようになってからではないかと思えます。私は昭和30年卒の第3回の化学科の人たちから卒業研究を指導してきましたが、思い出してみると随分長いようでもあるし、たってみればまことにあっけない、アッという間であったような気もいたします。その間、今のような研究ができましたことは、生物化学研究室において研究をされた30年来の学生の方々や研究室員の方々の御協力によるものでありまして、ここに皆さまに厚く御礼申し上げます。これをもって、この大学における、この教壇からの私の講義はおしまいだというこ

となのですけれども、まだいろいろ研究の途中のものもありますので、少し落ち着いて整理を試みたいと思っています。

最後に、長時間にわたって私の話を聞いて下さった皆さまに感謝いたします。またこういう機会を与えて下さり、いろいろお世話いただきました化学教室主任立花教授ならびに化学教室の皆さまに厚く御礼申し上げます。