

# 鶏卵白中のシアル酸に関する研究

金森正雄・山田正明

MASAO KANAMORI and MASAAKI YAMADA: Studies on  
sialic acid of hen's egg white

**摘要** 鶏卵白から硫酸分別法によって調製した粗オボムチンから、*N*-acetylneuraminic acid を単離、同定する研究を行なった。

粗オボムチンから結合型シアル酸を遊離させるための、加水分解条件を検討した結果、0.1N 硫酸、80°C、1時間の条件が最も効果的で、加水分解回数も2度行なえば充分であることが確認された。この条件以上の硫酸濃度および温度では、かなりのシアル酸の分解がおこることが認められた。シアル酸の分離精製に用いた Dowex 1 (HCOO<sup>-</sup>型) 樹脂の再生方法を検討し、能率の良い簡易法を見出した。従来の再生方法とこの簡易法の併用により、短時間で樹脂の再生を行なうことができた。

粗オボムチンから、白色針状結晶のシアル酸を得たが、操作中の損失は最大限15.7%であり、粗オボムチン中のシアル酸含量は、アルカリ TBA 法で測定して、約0.5%であった。この結晶シアル酸は、すべての比色定量法に陽性であり、ペーパークロマトグラフィー、赤外吸収スペクトル、X線回折スペクトルをみたところ、*N*-acetylneuraminic acid の標準品と全く一致した。過沃素酸消費量は、シアル酸1モル当り5モル、フォルムアルデヒド生成量はシアル酸1モル当り1モル、アセチル基をシアル酸の1モル当り1モルを含み、グリコール基は検出されなかった。

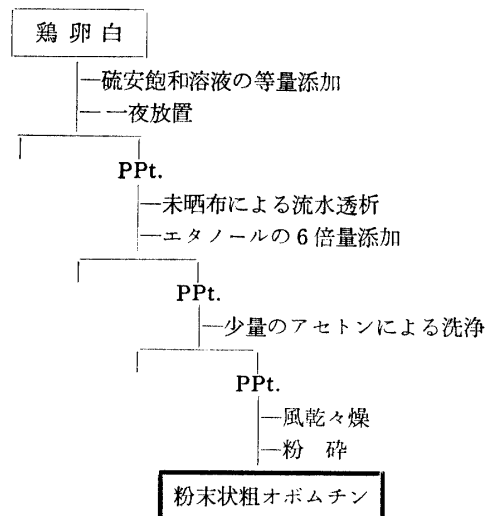
## I 緒 論

1936年に Blix が bovine submaxillary gland mucin の部分加水分解物より単離し結晶化した物質を1952年にシアル酸と名づけて以来、Klenk<sup>2)</sup>, Odin<sup>3,4)</sup>, Svennerholm<sup>5-8)</sup>, Gottschalk などからにより種々の動物の組織、粘膜 mucoprotein, Serum などから単離され、広い分布が知られている。シアル酸は次の2点に他の糖との顕著な相違が認められている。すなわち  
1) 多くは oligosaccharide chain の末端を占める。  
2) 他の糖に比べて結合が弱く、弱い酸加水分解により遊離する。

この2点とその分布の広さを考え合わせ、シアル酸が人体の生理作用に重要な役割を有するものと推察されて、種々検討もされているが、現段階では不明な点が多く、特に遊離型のシアル酸の有する生理作用については全く解明されていないといえる。今回は遊離型シアル酸の生理作用検討のためのシアル酸の調製法を鶏卵白中のオボムチンを主原料とする場合について検討したので報告する。

## II 実験方法

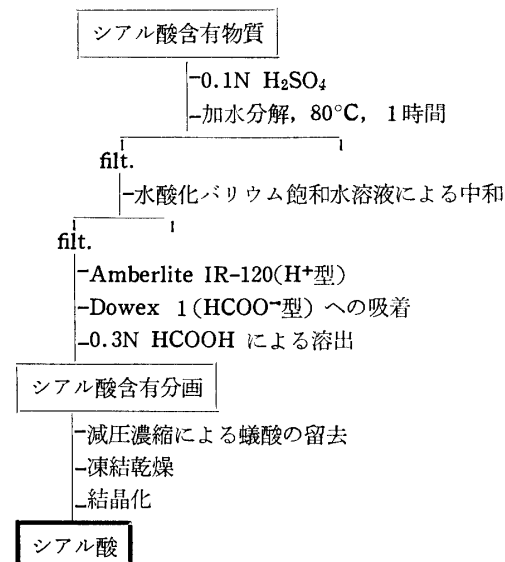
1. 粗オボムチンの調製法：鶏卵白中シアル酸含量の高いオボムチンおよびカラザを得るために鶏卵白を硫酸分別法により分画し粗オボムチンを得た(第1図)。鶏卵白に等容の硫酸飽和液を加え、一夜放置後



第1図 粗オボムチンの調製法

東洋ろ紙 No. 2 で自然ろ過し白色沈でんを得た。この沈でんを未晒布にて流水透析後得たゲル状の透析物に約6倍量のエタノールを加え、繊維状に沈でんさせ吸引ろ過によりろ取し、さらに少量のアセトンで洗浄した。この繊維状沈でんとして得た粗オボムチンを風乾して充分乾燥後、乳鉢で粉碎し室温保存した。

2. シアル酸の単離法：シアル酸の単離法を第2図に示した。



第2図 シアル酸の単離法

3. シアル酸の結晶化および同定：結晶化<sup>9)</sup>は、凍結乾燥品1gに対し、3mlの割合で水を加え溶解させ、10容の無水メタノールを加え、40°Cに加温後、15容のエーテルを加えた。生じた沈でんをろ別し、このろ液に10容のエーテルを加え、24時間冷蔵庫で保存後、更に10容のエーテルを加え48時間放置した。析出した結晶をメタノール：エーテル(1:3)液で洗浄し五酸化リンおよび水酸化カリウム上で乾燥させた。

シアル酸の同定には各種の発色反応〔alkaline thio-barbituric acid<sup>9)</sup> (TBA) method, orcinol reaction<sup>10)</sup>, resorcinol reaction<sup>11)</sup>, diphenylamine reaction<sup>12)</sup>, direct Ehrlich reaction<sup>13)</sup>, alkaline Ehrlich reaction〕赤外線吸収, X線回折および paper chromatography を用いた。シアル酸の構造の検討には periodate oxidation method<sup>14)</sup><sup>15)</sup> acetyl group の定性, 定量<sup>16)</sup><sup>17)</sup> glycol group<sup>18)</sup>の定性, 定量を行なった。シアル酸の標準品としては牛初乳より調製したシアル酸結晶を用いた。

### III 実験結果および考察

1. 粗オボムチンの調製：鶏卵白より硫酸分別法で得たこの粗オボムチンはオボムチン以外にカラザ、オボグロブリン等を含む沈でんで収率は卵白に対し1.8

%であった。

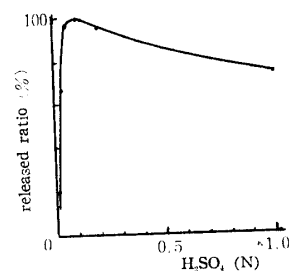
2. シアル酸の単離操作の検討：a) 酸加水分解における最適条件の検討

(1) 最適硫酸濃度：酸として硫酸以外に塩酸<sup>19)</sup>も用いられるが、シアル酸の遊離効果に差があり硫酸が一般に用いられている。粗オボムチン2.000mgを100mlマイエルにとり、1N, 0.2N, 0.1N, 0.05N, 0.03N, 0.01Nの硫酸を各50ml加え80°Cで1時間加水分解した。加水分解後、冷却、ろ過して加水分解液を得て、全容を100mlにfill upし、アルカリT.B.A法にて遊離シアル酸量を比色定量した。この結果を第1表、第3図に示した。この結果は0.1N硫酸が最も効果的

第1表 加水分解に於ける硫酸濃度の影響

硫酸濃度	遊離シアル酸量	ratio (%)*
1.0N	7.88mg	74.9
0.2	10.04	95.4
0.1	10.52	100
0.05	10.17	96.7
0.03	6.76	67.3
0.01	1.54	14.6

\* 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> による遊離量に対する比率



第3図

であり、0.05N以下および0.2N以上の濃度では明らかな差異のあることを示した。0.05N以下では明らかに硫酸濃度不足によるものであるが、0.2N以上、特に1Nの硫酸濃度による加水分解液および粗オボムチン残渣は淡褐色に着色することから遊離したシアル酸が分解をうけたために遊離シアル酸の低下という結果となったと考えられる。

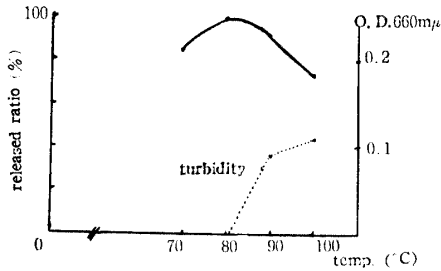
(2) 最適温度：粗オボムチン2.000mgに0.1N硫酸50mlを加え70°C, 80°C, 90°C, 100°Cの各温度で1時間加水分解後先述と同様の操作にて遊離シアル酸量を比色定量した。結果を第2表、第4図に示した。

この結果は80°Cによる加水分解が最も効果的であることを示し、硫酸濃度の場合と同様に、70°Cでは遊離が不充分であり、90~100°Cでは、遊離したシアル酸の分解がおこったと考えられる。90°Cおよび100°Cでの加水分解液には濁りが生じた。

第2表 加水分解に於ける温度の影響

温 度	遊離シアル酸量	ratio (%)*
70°C	8.61mg	85.2
80°C	10.10	100
90°C	9.31	92.2
100°C	7.43	73.6

\* 80°Cでの遊離量に対する比率



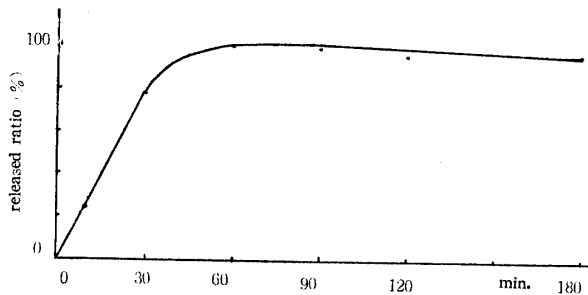
第4図

(3) 最適時間：粗オボムチン2.000mg について0.1 N硫酸50mlを加え、80°Cにて10, 30, 60, 90, 120, 180分間加水分解して、遊離したシアル酸を同様の操作にて比色定量した。その結果を第3表、第5図に示

第3表 加水分解に於ける分解時間の影響

分解時間	遊離シアル酸量	ratio (%)*
10分	2.36mg	22.4
30	8.28	78.5
60	10.54	100
90	10.47	99.3
120	10.05	95.4
180	10.17	96.5

\* 60分間の加水分解での遊離量に対する比率



第5図

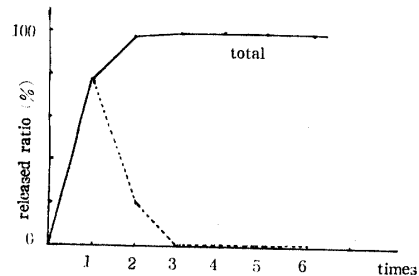
した。この結果は60分間の加水分解で遊離量は最高に達し、それ以上の長時間の加水分解においては徐々に減少していくが著しい減少のないことを示した。

(4) 加水分解回数：粗オボムチン10.000mg に、蒸留水100ml および0.1N 硫酸を100ml 加え、80°C, 1時間、加水分解した。冷却後ろ過し、沈でんを充分洗浄し、加水分解液および洗液を合わせて300ml とし、

ろ別した沈でんは、再び同様の操作にて加水分解した。以上の加水分解操作を6度繰り返し、6つの加水分解液を得て、それぞれの加水分解液について遊離シアル酸を比色定量した結果を第4表、第6図に示し

第4表 加水分解に於ける加水分解回数

回 数	遊離シアル酸量	ratio (%)
1回目	37.0mg	78.9
2	8.9	19.0
3	0.51	1.1
4	0.30	0.6
5	0.10	0.2
6	0.08	0.2
計	46.89mg	100



第6図

た。6回の加水分解により遊離した全シアル酸量の78.9%が、1回目の加水分解で得られ、2回目迄で97.9%に達した。この実験のみ硫酸の最終濃度を0.05 Nで加水分解を行なった。この結果から硫酸濃度0.05 Nの低い濃度でも、加水分解は2度行なえば充分であり、それ以上の加水分解は必要がないことがわかった。

(5) 前処理の必要性：これまででは、粉末状の粗オボムチンをそのまま加水分解しているが、前処理として、1昼夜水で膨潤させた後にホモジナイズして、0.1N 硫酸で加水分解し、従来の無処理の場合とその遊離状態を比較した。粗オボムチン10.000mg について前処理をした場合と無処理の場合についてそれぞれ2回加水分解した。この結果、前処理の有無は2回の加水分解で遊離するシアル酸の全量にはあまり影響せず、ほぼ一致したが第5表にみられるように1回目の加水分解で遊離するシアル酸量と2回目の加水分解で

第5表 加水分解に於ける前処理の効果

前 処 理	比 率 (%)*	
	1 回 目 加水分解	2 回 目 加水分解
無	83.3	16.7
膨潤, ホモジナイズ	91.8	8.2

\* 2回の加水分解で遊離した全シアル酸量に対する各々の比率

遊離するシアル酸量との比率には差が認められた。

以上の結果より加水分解の最適条件は硫酸濃度 0.1 N, 温度80°C, 分解時間1時間, 分解回数2回であり加水分解前に膨潤およびホモジナイズの前処理の必要はないと結論された。

この各条件の検討に用いた粗オボムチンは購入した鶏卵白中のカラザの量の多少およびその他の条件により調製した粗オボムチン中のシアル酸含有量に差が生じたために, 各検討実験における最適条件でのシアル酸遊離量に多少の差異があった。特に加水分解回数の検討実験において, 遊離した全シアル酸量は, 他の条件検討実験の結果と比較すると, 少し低い値を示しているのは, 加水分解条件によるものではなく, 使用した粗オボムチン中のシアル酸含量が低いためにおこったのである。

#### b) 陰イオン交換樹脂について

(1) Dowex 1×8 の吸着条件の検討: 陰イオン交換樹脂として Dowex 1×8 を使用し, 市販品は Cl<sup>-</sup>型であるので, 次の方法で HCOO<sup>-</sup>型に調製した。

Dowex 1×8 を30×300mm カラムに充填して, 1 N-水酸化ナトリウムで Cl<sup>-</sup>がなくなるまで流し, Cl<sup>-</sup>の検査には硝酸銀を用いた。次に 1 N-硫酸アンモニウムにより樹脂を SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>型にし, 更に 1 N-蟻酸ソーダを SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>が流出しなくなるまで流して HCOO<sup>-</sup>型に調製した。SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の検査には塩化バリウムを用いた。次にカラムを水で充分洗浄し, Na<sup>+</sup>を完全に除去したが Na<sup>+</sup>は焰色反応により検査した。

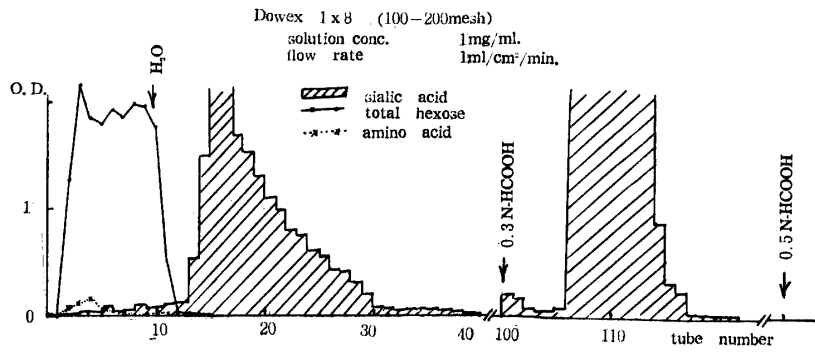
以上の調製法により調製した HCOO<sup>-</sup>型 Dowex 1×8 を用い, 粗オボムチンより抽出したシアル酸溶液すなわち粗オボムチンを加水分解し, 冷却後, 水酸化バリウム飽和水溶液にて中和し, Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>型) 樹脂にて過剰の Ba<sup>2+</sup>を除去して得た液を用いて, その吸着条件について検討した。

100~200mesh の Dowex 1×8 を用い, アルカリ TBA 法による測定で濃度が1.4mg/ml の上述のシアル酸抽出液を1.2ml/cm<sup>2</sup>/min の流速で吸着させたが, 0.3N 蟻酸による溶出液にはシアル酸は全く検出されず, 全然吸着しなかったことが確かめられた。次に同じ条件の樹脂に, 液濃度 1mg/ml の抽出液を 500ml とり, 1 ml/cm<sup>2</sup>/min の流速で吸着させ, 水で洗浄後 0.3N 蟻酸で溶出した Pattern を第7図に示した。シアル酸量はアルカリ TBA 法, 総ヘキソースはフェノール硫酸法, アミノ酸はニンヒドリン法により, 各々溶出液0.5ml, 0.2ml, 1.0ml について各 fraction を定量した。シアル酸は 555m $\mu$  の O.D. 値, 総ヘキソースは 480m $\mu$  の O.D. 値, アミノ酸は 580m $\mu$  の O.D. 値で表わした。第7図によれば, オーバーチャ

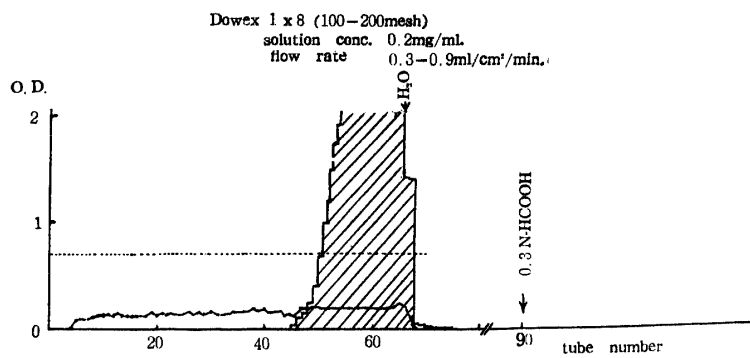
ージはおこっていないが, 吸着されず又吸着後の水による洗浄により吸着していたシアル酸の一部が流出するが, 十分に水が洗浄後, 0.3N 蟻酸で溶出すれば, 吸着されていたシアル酸が溶出された。フラクション 100—102 (1 フラクションは50ml) で溶出されたシアル酸は, 先に水洗浄で流出したシアル酸との関係によるものであり, 溶出による正常なシアル酸の出現は, フラクション106から始まっている。さらに0.5N 蟻酸による溶出で溶出されるものはなかった。シアル酸を吸着した樹脂の水による洗浄は, 吸着しない不純物質の完全除去のために充分行なう必要があり, この水洗浄により吸着したシアル酸の一部が流出するのはその吸着に問題があるためであり, すなわち吸着条件および樹脂の再生が悪い場合, ならびに粗オボムチンの加水分解後, 水酸化バリウム水溶液による中和により生成する BaSO<sub>4</sub> の沈でんのろ別が不完全な場合は次の Amberlite IR-120 樹脂処理により, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>が多量に混在するので Dowex 1×8 樹脂へのシアル酸の吸着が影響される。

第8図にはシアル酸濃度を低くして 0.2mg/ml, 流速を 0.3ml/cm<sup>2</sup>/min から 0.9ml/cm<sup>2</sup>/min に連続的に変化させて吸着させた場合の Pattern を示した。点線はシアル酸抽出液の濃度 (0.2mg/ml) をアルカリ TBA 法による 555m $\mu$  の O.D. 値で示したもので, この Pattern ではフラクション 45 から漏りはじめたシアル酸がフラクション 50 では吸着しなくなり, それ以後では先に吸着していたシアル酸を流出させてしまい, 水洗浄後 0.3N 蟻酸による溶出ではシアル酸は検出されず結果的には全く吸着されなかった。

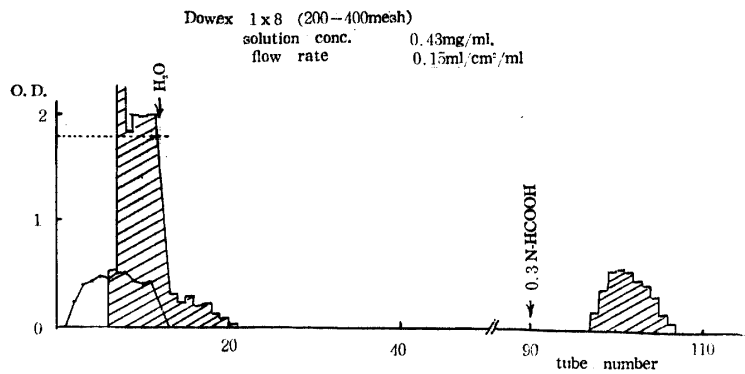
次に200~400mesh の Dowex 1×8 を用いて同様の吸着実験を行なった。第9図は液濃度 0.43mg/ml, 流速0.15ml/cm<sup>2</sup>/min の条件でオーバーチャージするまで吸着させ, オーバーチャージの部分の水で洗浄しさらに約4lの水で洗浄した (流速1.1ml/cm<sup>2</sup>/min)。次に0.3N蟻酸で溶出し (流速 0.9ml/cm<sup>2</sup>/min, 溶出開始後250ml~600ml のフラクションでシアル酸が溶出された。第9~15図および第18図はシアル酸および総ヘキソースを各々0.1ml, 0.2ml 中の含量を先と同様の方法で示した。第10図は第9図と同様の条件で行なったものでありほとんど一致し高い再現性をもっている。第11図では Dowex 1×8 (200~400mesh) 樹脂を用い, 流速0.27ml/cm<sup>2</sup>/min, 液濃度0.094mg/ml の条件で吸着させた Pattern を示した。第9, 10図に比較して吸着量が多く, 溶出に関しては, 溶出のはじまるフラクションは一致するがより高い濃度で溶出された。すなわち溶出曲線のピークが鋭い。さらに Dowex 1×8(200~400mesh)樹脂に液濃度0.04mg/ml,



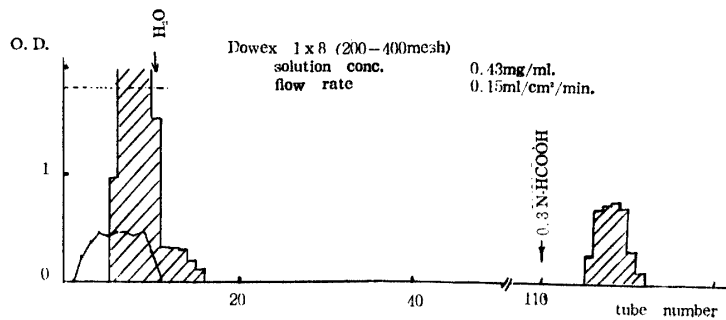
第 7 図



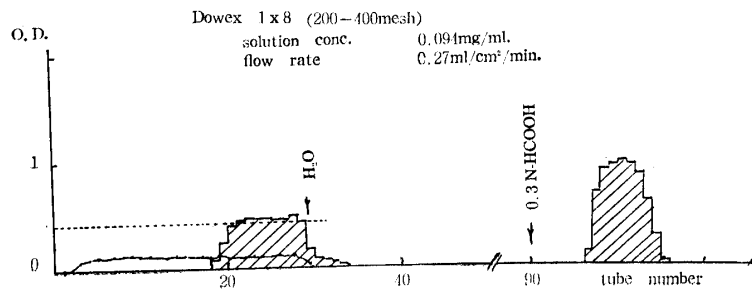
第 8 図



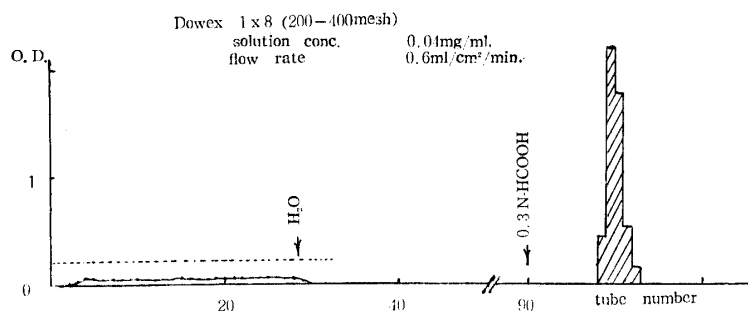
第 9 図



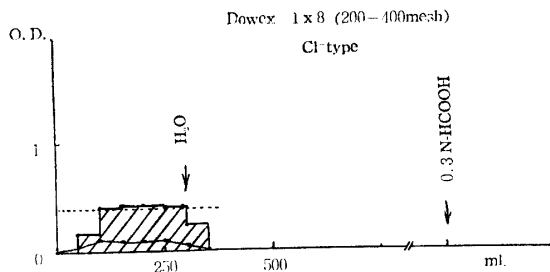
第 10 図



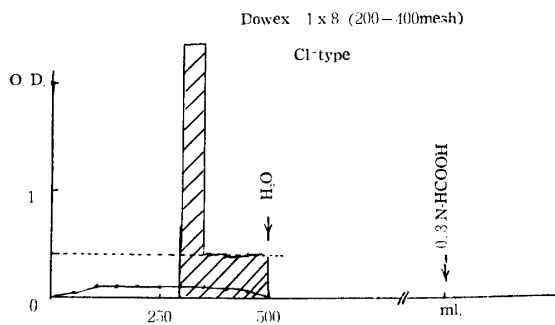
第 11 図



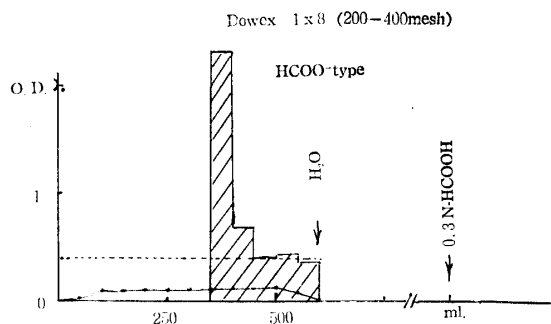
第 12 図



第 13 図



第 14 図



第 15 図

Dowex 1 x 8 によるシアル酸の吸着と溶出

流速 $0.6\text{ml/cm}^2/\text{min}$ でオーバーチャージを避けるためにシアル酸量として約 $50\text{mg}$ を吸着させた。このPatternを第12図に示したが、第9, 10, 11図に比較して溶出のピークは非常に鋭かった。

以上の結果よりオーバーチャージするまで吸着させた場合には、吸着および溶出の状態が試料液濃度および吸着させる流速に関係すると考えられ、特に試料液濃度は稀薄であるほうが良好な結果を得た。またオーバーチャージを避ける場合には試料液濃度および流速にはあまり関係がなく、オーバーチャージしない量を吸着させた場合には最良の溶出曲線を得た。ゆえに樹脂操作においてオーバーチャージは避ける必要がある。しかしオーバーチャージは理論吸着量に達する前におこり、シアル酸以外にも吸着されるものが混在するために実際に吸着されるシアル酸量は非常に少ない。

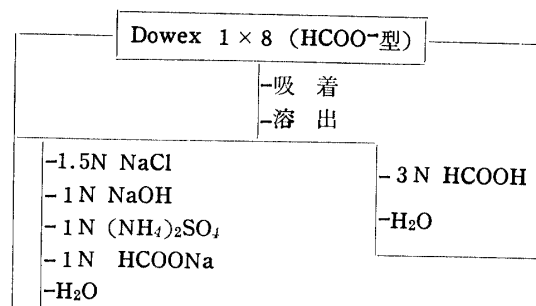
(2) Dowex  $1 \times 8$  の活性型の検討：後述する再生法に関連して Dowex  $1 \times 8$  の活性型について  $\text{Cl}^-$ 型、 $\text{OH}^-$ 型、 $\text{HCOO}^-$ 型を検討した。各活性型に調製した Dowex  $1 \times 8$  ( $200 \sim 400\text{mesh}$ ) を  $11 \times 150\text{mm}$  のカラムに充填した。粗オボムチンから抽出したシアル酸溶液のシアル酸濃度は $0.087\text{mg/ml}$ であった。このシアル酸溶液を各活性型の樹脂に流速 $0.6 \sim 0.7\text{ml/cm}^2/\text{min}$ で吸着させ、その流出液の各フラクションをアルカリ、TBA法、フェノール硫酸法によりシアル酸および総ヘキソースを測定した結果を、第13, 14, 15図に示した。 $\text{Cl}^-$ 型では全く吸着されず、 $\text{OH}^-$ 型および $\text{HCOO}^-$ 型ではほぼ同程度吸着され、 $\text{OH}^-$ 型においては著しい気泡の発生があり、樹脂層が乱れ流速が著しく低下した。各樹脂はオーバーチャージ後約 $400\text{ml}$ の水で洗浄し $0.3\text{N}$ 蟻酸で溶出したが、いずれの樹脂においてもシアル酸は溶出されなかった。第14, 15図より $\text{OH}^-$ 型および $\text{HCOO}^-$ 型樹脂ではオーバーチャージの際に先に吸着していたシアル酸の溶出がおこったことが容易に推察できる。

同様な現象が先の第8図に示されているが、しかしこの現象の原因は明らかでない。この結果より吸着量および操作上の問題から従来通り $\text{HCOO}^-$ 型が最も良いことが示された。

(3) Dowex  $1 \times 8$  の再生法について：前述の様に市販の $\text{Cl}^-$ 型のDowex  $1 \times 8$ を $\text{HCOO}^-$ 型に調製するには水酸化ナトリウム→硫酸アンモニア→蟻酸ソーダー→水を用いる方法によったが、一度使用した場合には、 $1 \sim 1.5\text{N}$ 塩化ナトリウムにより再び $\text{Cl}^-$ 型にして再び上記操作を繰り返した。しかしこの再生法によって再生する場合、時間的な損失が非常に大きい。そのために再生法の簡単化を検討した。すなわち $\text{HCOO}^-$ 型樹脂にシアル酸を吸着させ、 $0.3\text{N}$ 蟻酸で溶出後、

再生操作の塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム、硫酸アンモニア、蟻酸ナトリウムによる操作をはぶき、 $3\text{N}$ 蟻酸を流した後、水洗して再生を完了する方法を用いた。

この再生法で再生した樹脂にもシアル酸は吸着されて、従来の再生法により再生した樹脂との間に著しい相異はなく、時間的に2倍以上の短縮となった。しかしこの再生法を続けていると $3\text{N}$ 蟻酸で溶出されずにのこるものが蓄積し、吸着力がおとろえた。例えば $50 \times 300\text{mm}$ のカラムにおいて約 $250\text{mg}$ のシアル酸を含むシアル酸抽出液を吸着させ溶出するという操作を行ない、再び吸着させた場合、簡略した再生法を用いていると4回までの繰返しまでは完全に吸着されたが、5回目の吸着において吸着はするが吸着後の水洗浄により、吸着していたシアル酸の一部が流出してしまった。大部分のシアル酸は $0.3\text{N}$ 蟻酸で溶出された。このように吸着後の水洗浄で吸着しているシアル酸の一部が流出するという現象は先の第7図にもみられ、これは吸着力の低下を示すものと推察される。ゆえに簡略した再生法を続けて用いた場合には何度かに一度、この例においては5度に1度従来の再生法にて再生する必要がある。



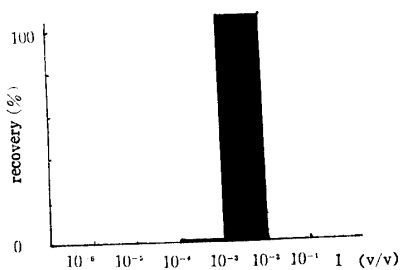
第16図 Dowex  $1 \times 8$  樹脂の再生法

c) DEAE-Cellulose の利用について：シアル酸単離操作中の陰イオン交換樹脂として Dowex  $1 \times 8$  の代りに DEAE-cellulose ( $\text{OH}^-$ 型)を用いることを試みた。DEAE-C ( $\text{OH}^-$ 型,  $11 \times 160\text{mm}$ ) カラムにあらかじめ $10^{-3}\%$  (v/v) 蟻酸を約 $200\text{ml}$ 流した後、結晶シアル酸 $35.5\text{mg}$ を水 $50\text{ml}$ に溶解させ、この液を流速 $3 \sim 4\text{ml/cm}^2/\text{min}$ で吸着させたところ、ほとんど全シアル酸が吸着され、その吸着率は $99.9\%$ であった。吸着後水洗浄し $10^{-8}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ,  $1\%$  (v/v) の蟻酸にて溶出し各濃度における溶出量は $250\text{ml}$ で、シアル酸の定量にはアルカリTBA法を用いた。その結果は第6表、第17図に示したとおりで、 $10^{-2}\%$  (v/v) 蟻酸で特異的に溶出された。しかし単離操作中での利用の場合、Amberlite IR-120の処理によりシアル酸抽出液が約 $\text{pH } 2$ となり DEAE-

Celluloseへの吸着条件に問題があるのでさらに検討が必要である。しかし凍結乾燥品の純化という必要性が生じた場合には充分利用できる。

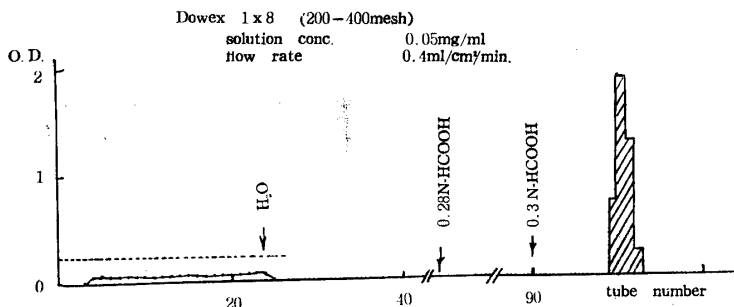
第6表 シアル酸溶出における最高蟻酸濃度

蟻酸濃度	溶出シアル酸量	回収率(%)
10 <sup>-3</sup> % (v/v)	0mg	—
10 <sup>-5</sup>	0	—
10 <sup>-4</sup>	0	—
10 <sup>-3</sup>	0.44	1.2
10 <sup>-2</sup>	37.99	107.2
10 <sup>-1</sup>	0	—
1	0	—
計	38.43mg	108.470



第17図

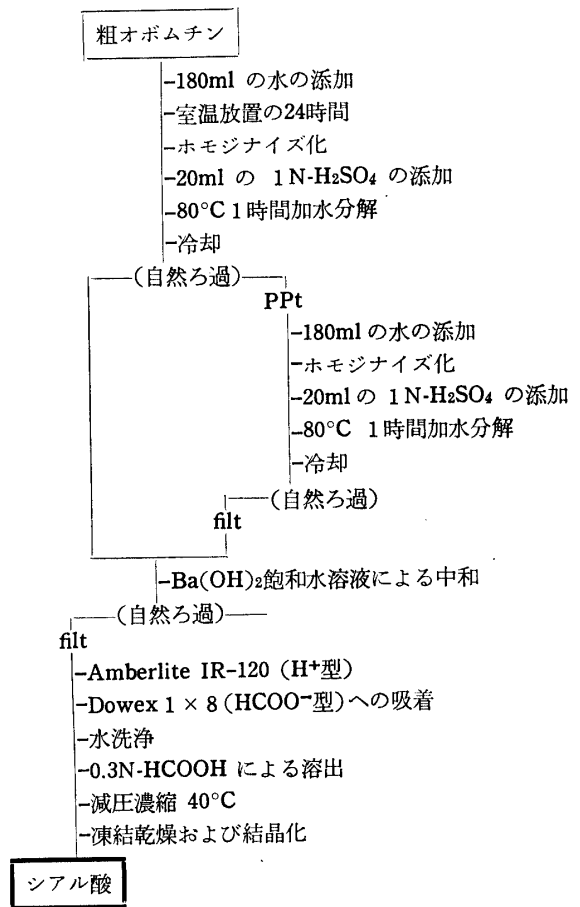
3. 粗オボムチンからのシアル酸の単離：先述の検討結果に基づき、粗オボムチンよりシアル酸を単離精製した。すなわち粉末粗オボムチン10,000mgに水180mlを加え24時間室温放置し充分膨潤させ、その懸濁液をそのままホモジナイザーにより1分間、2度ホモジナイズした。ホモジナイズ後、1N硫酸20mlを加え最終濃度を0.1Nとし、80°C、1時間加水分解した。冷却後、自然ろ過にて無色透明な加水分解液を得た。ろ別した沈下物はさらに水180mlを加え同様の操作でホモジナイズし、1N硫酸を20ml加え80°C、1時間、加水分解した。加水分解液を併せて水酸化バリウム飽和水溶液にて中和し、自然ろ過により無色透明のろ液を得た。このろ液中の過剰のBa<sup>++</sup>の除去のためにH<sup>+</sup>型のAmberlite IR-120 (30×250mm)に通



第18図 シアル酸の溶出曲線

した。流出液をHCOO<sup>-</sup>型に調製したDowex 1×8 (200~400mesh) (30×200mm)樹脂にシアル酸濃度0.05mg/ml、流速0.4ml/cm<sup>2</sup>/minで流しシアル酸を吸着させた。この液中に混在し樹脂に吸着しない糖類等の除去のために約2lの水にて充分洗浄し、洗浄後0.3N蟻酸にてシアル酸を溶出した。溶出液を50mlづつ分別し、TBA-positiveなフラクションを集めた。

なお0.28N蟻酸による溶出を0.3N蟻酸溶出の前に行ない、溶出されるものがないことを確かめた。この溶出曲線を第18図に示した。シアル酸を含むフラクションは40°C以下で減圧濃縮にて液中の蟻酸を留去した後、前述の方法で凍結乾燥および結晶化した。



第19図 粗オボムチンからのシアル酸の単離

次にこの単離操作の各段階におけるシアル酸量をアルカリTBA法により比色定量し、操作損失を求めた結果を第7表に示した。

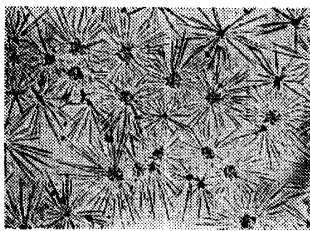
中和およびAmberlite IR-120での処理ではほとんど損失はなく、Dowex吸着—溶出の操作で生じた約7%の損失は樹脂操作上ある程度は避け得ないと考える。次に凍結乾燥段階での損失には凍結乾燥品採取



第7表 単離各段階におけるシアル酸の回収率

操 作	total volume	全シアル酸含量	比率(%)*
加水分解	ml	mg	
1回目	250	46.3	91.8
2回目	250	4.1	8.2
(Total)	(500)	(50.4)	100
中 和	700	49.6	98.3
Amberlite IR-120 1000		49.5	98.2
Dowex 1×8 溶出	200	46.1	91.5
凍結乾燥		42.5	84.3

\* 全加水分解液中のシアル酸量を100とした



第20図 単離シアル酸の結晶

の際に生ずる損失が含まれており、実際は数字以上のシアル酸が得られていることは明らかで、全操作中での15.7%の損失は損失の最高値を示している。第20図にはシアル酸結晶の顕微鏡写真を示したが結晶は白色の針状であった。この単離操作中、特に次の2点に留意せねばならない。

(1) 中和操作において水酸化バリウム飽和水溶液の添加の仕方により生じる硫酸バリウムの沈でんに差がある。すなわち十分に攪拌してある加水分解液中に徐々に添加した場合には生じる沈でんが比較的大きくろ過しやすいが、水酸化バリウム飽和水溶液を一度に添加した場合には非常にこまかい沈でんが生じ、東洋ろ紙 No. 5C でもろ別できない。硫酸バリウムの沈でんを完全にろ別できないと、後の Dowex 樹脂への吸着性にも影響がある。

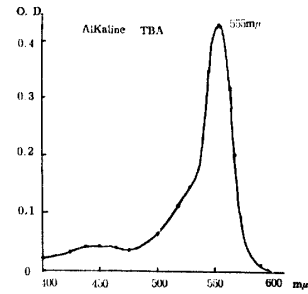
(2) Dowex 樹脂からの溶出液中の蟻酸を除去するための減圧濃縮の温度が後に得られる凍結乾燥品の着色と密接に関係する。すなわち 30~35°C ではほとんど着色がなく、凍結乾燥品は白色である。40°C 以上で濃縮すると黄~褐色に着色する。また溶出液を直ちに減圧濃縮で蟻酸を留去せず溶出液を室温で長時間放置しておく、低温で減圧濃縮しても着色がおこる。したがって溶出液は直ちに蟻酸を留去せねばならない。着色がどのようなメカニズムでおこるかは不明で検討中である。

4. 単離シアル酸の同定および構造について

a) 各種比色定量法による同定：シアル酸の同定に

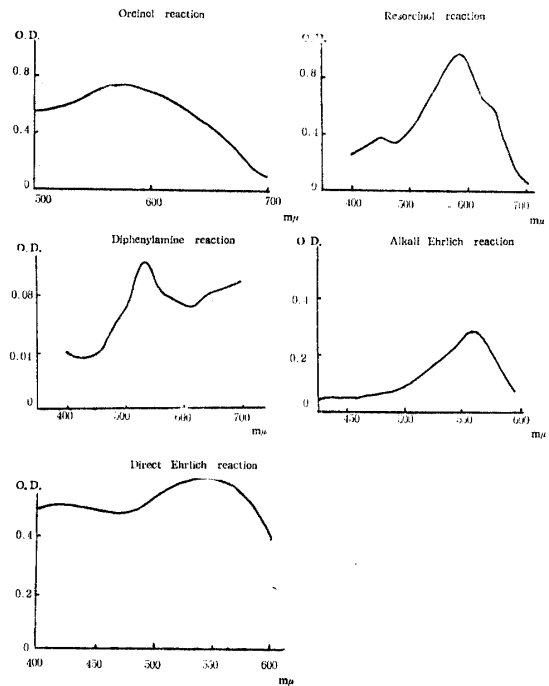
用いられている6種の比色定量法により同定した。

alkaline TBA 法, orcinol reaction 法, resorcinol reaction 法, diphenylamine reaction 法, direct Ehrlich reaction 法, alkali Ehrlich reaction 法の全ての反応に対し positive である。各反応の吸収曲線を第21図および第22図に示した。第21図にはアルカリ



第21図 単離シアル酸のアルカリ TBA 吸収曲線

TBA 法による発色の400~600mμ の吸収曲線を示しその他の反応は第22図に示した。



第23図 単離シアル酸の各種呈色反応のスペクトル

b) 赤外吸収スペクトル法による同定：標準品として牛の初乳から単離したシアル酸を用い、赤外吸収スペクトルを第23図に示した。

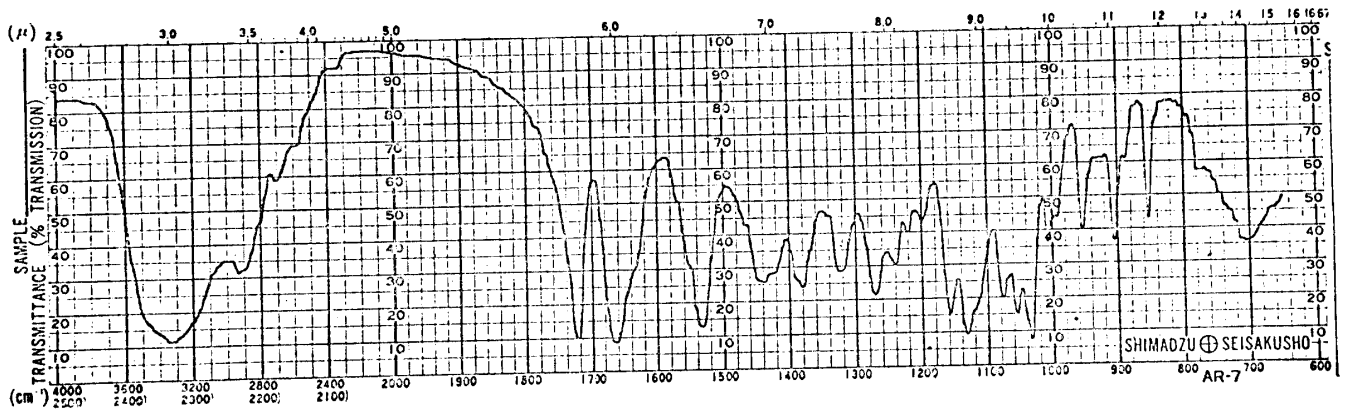
c) X線回折スペクトル法による同定：標準品として牛の初乳から単離したシアル酸を用いた。スペクトルを第24図に示した。

a), b), c) の同定により粗オボムチンから単離した物質はシアル酸であることが同定された。更にその構造の検討のために以下の実験を行なった。

d) 過沃素酸酸化：メタ過沃素酸ソーダにより過沃

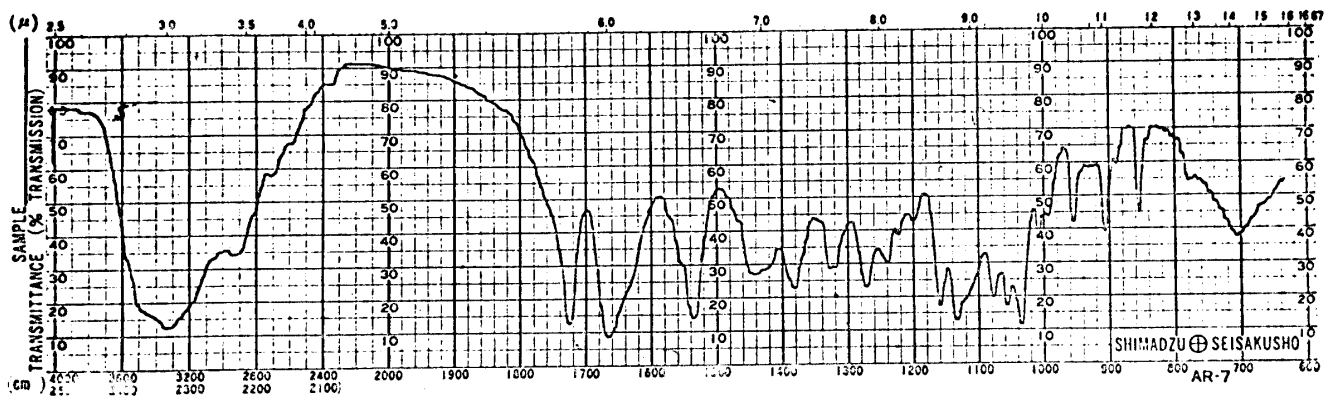
## Infrared Spectrum

## Colostrum-sialic acid



## Infrared Spectrum

## Ovomucin-sialic acid



第23図 シアル酸の赤外吸収スペクトル

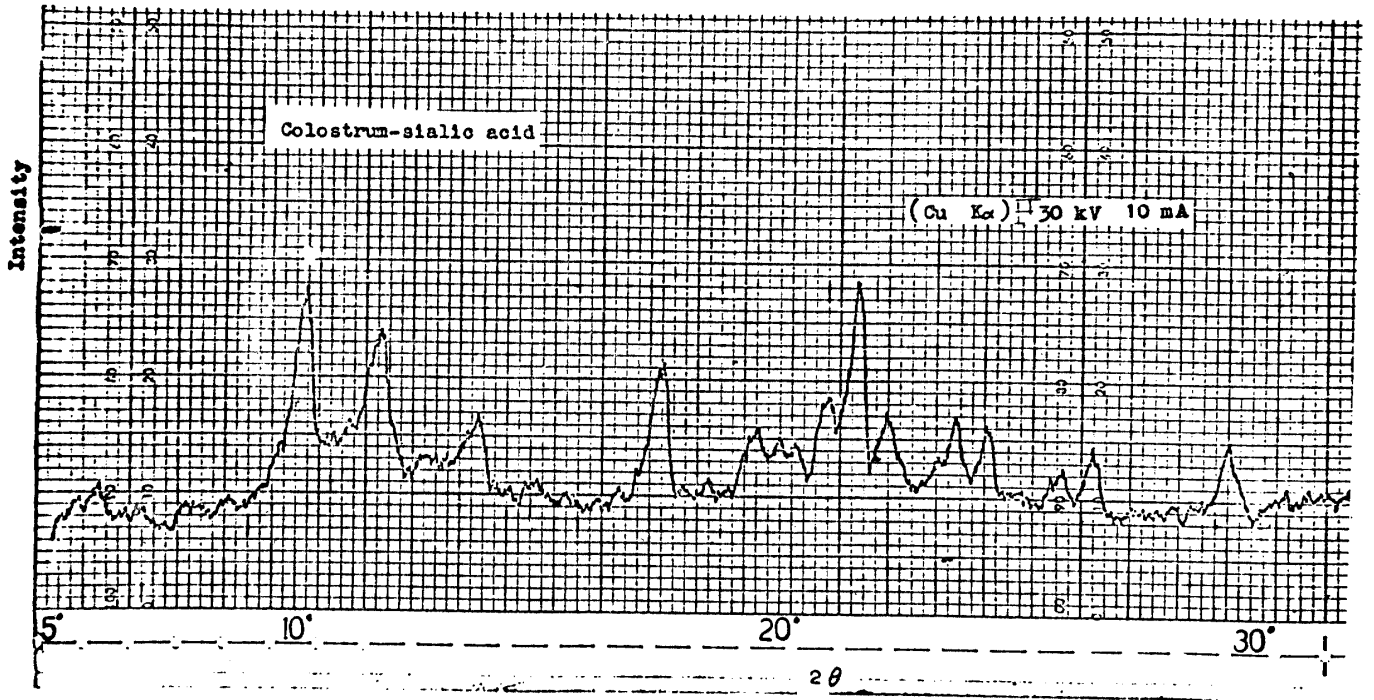
素酸酸化を行なった。シアル酸 10.3mg (*N*-acetylneuraminic acid として  $\frac{1}{3} \times 10^{-4}M$ ) およびメタ過沃素酸ソーダ  $0.5 \times 10^{-3}M$  を酢酸緩衝液 pH 4.0 ( $\mu = 0.05$ ) 50ml に溶解させて暗室中に約 17°C で放置した。同時にシアル酸のみを除いたすべてを含む盲検を調製した。この反応液について一定時間毎の過沃素酸消費量およびフォルムアルデヒド生成を各々 Fleury-Lange 法および chromotropic acid 法を用いて測定した。

(1) 過沃素酸消費量の測定<sup>20)</sup>: 暗室中で反応液 5 ml をとり重炭酸ソーダ飽和液 10ml, 0.01N 亜砒酸ソーダ 10ml, 20%沃素カリ 2 ml をとりよく振とうして 15 分間暗室に放置後, 0.01N, ヨード液により 1% でん粉液を指示薬として滴定して過沃素酸消費量を算出した。

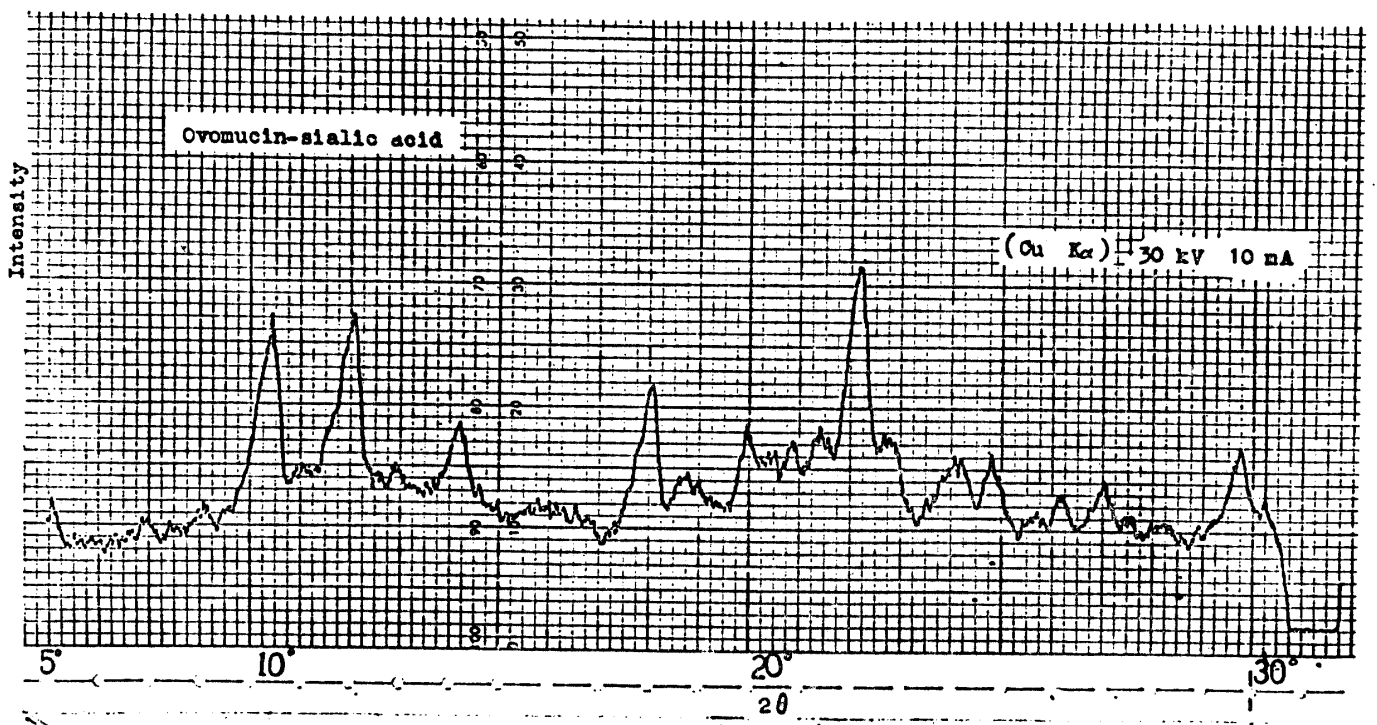
(2) フォルムアルデヒド生成量の測定<sup>21)</sup>: 反応液 0.5ml を共栓付試験管にとり, 1N 硫酸 1 ml, 1M 亜砒酸ソーダ 0.2ml を加え, ゆっくり振とうして褐

色を消失させてから chromotropic acid 試薬 10ml を加え, 30分間沸騰浴中で加熱して冷却後 570m $\mu$  の O. D. を測定した。chromotropic acid 試薬は chromotropic acid 1g を 100ml の水に溶解させ不溶性物質をろ別後, 約 1.25M 硫酸を加えて 500ml に fill up して調製した。この試薬は暗所に保存すれば 2~3 週間は安定である。同時に *N*-acetylglucosamine を用いて標準曲線を作成した。*N*-acetylglucosamine  $2 \times 10^{-4}M$  とメタ過沃素酸ソーダ  $10^{-2}M$  を pH 4.0 酢酸緩衝液 50ml に溶解し 37°C 一夜放置後, この反応液の 25 ml を 4 倍に稀釈し, この稀釈液について chromotropic acid 試薬によりフォルムアルデヒド生成量を測定した。粗オボムチンより単離したシアル酸についての過沃素酸消費量およびフォルムアルデヒド生成量の結果を各々第 8 表, 第 25 図および第 9 表, 第 26 図に示した。

X-ray diffraction



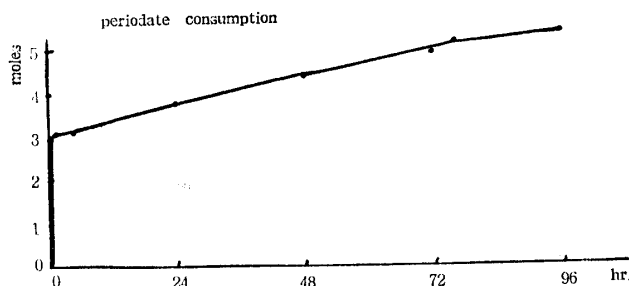
X-ray diffraction



第24図 シアル酸のX-線回折スペクトル

第8表 過沃素酸消費量

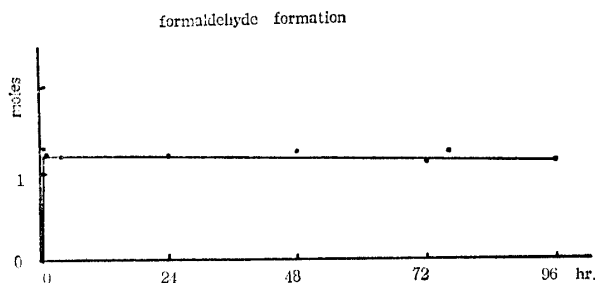
時間	全消費モル	シアル酸1モル当りのモル数
0.5 hr.	$0.98 \times 10^{-4} M$	2.94 moles
1	1.02	3.06
5	1.04	3.10
24	1.25	3.76
48	1.47	4.39
72	1.63	4.89
77	1.73	5.17
96	1.78	5.35



第25図

第9表 フォルムアルデヒド生成量

時間	全消費モル	シアル酸1モル当りのモル数
0.5 hr.	$0.46 \times 10^{-4} M$	1.38 moles
1	0.44	1.32
5	0.41	1.23
24	0.40	1.20
48	0.42	1.26
72	0.37	1.11
77	0.41	1.23
96	0.38	1.14



第26図

過沃素酸消費量は反応開始後5時間までの通常の過沃素酸消費量を測定する時間内ではシアル酸1モル当り3モルの消費を示した。この3モルの消費は急速にすすみ停滞するが、さらにそのまま、数日反応させると非常に徐々に消費がすすみ4日目でシアル酸1モル当

り5モルの消費を示した。この結果はシアル酸として *N*-acetylneuraminic acid の構造を仮定すれば容易に理解できる。すなわち過沃素酸3モルの消費は阻害がなく速やかに消費されるが、C-5のアミノ基は過沃素酸酸化を阻害し消費の速度を著しく低下させたものである。フォルムアルデヒド生成量はシアル酸1モル当り1モルの結果を得た。

e) アセチル基について：アセチル基の定性、定量には Freudenberg の方法を用いた。シアル酸の凍結乾燥品43.1mg について測定を行ない、アセチル基の含有率は7.2%であった。この値はシアル酸1モル当り0.52モルとなる。しかしシアル酸が凍結乾燥品であり、又試料量が微量であることを考慮すれば、シアル酸1モル当りアセチル基が1モル含まれていると解釈し得る。

f) グリコール基について：シアル酸凍結乾燥品2.7mg を共栓付試験管にとり1N-硫酸1mlにより1時間沸騰浴中にて加水分解した。分解後活性炭を加える過し全容を10mlとし、その0.1ml および2.0ml について定量した。試薬は次の方法で調製した。100mlのconc. 硫酸に10mgの2,7-dihydroxynaphthaleneを加えた。この試薬2mlを検査液に加え20分間沸騰浴中で加熱し、冷却後546m $\mu$ の吸光度を測定した。この2種の試料量において殆んどnegativeであり、このシアル酸にはグリコール基は含まれていないことを確かめた。

g) ペーパークロマトグラフィについて：次の溶媒系でペーパークロマトグラフィを行なった。

- (1) *n*-butanol-*n*-propanol-0.1N hydrochloric acid<sup>22)</sup> (1:2:1 v/v)
- (2) *n*-butanol-pyridine-water (6:4:3 v/v)
- (3) *n*-butanol-pyridine-water (9:5:8 v/v)

標準品としては牛初乳より単離したシアル酸を用いたが、この標準シアル酸はほとんどグリコール基を含んでおらず、アセチル基をシアル酸1モル当り1モル含む *N*-acetylneuraminic acid と同定されている。発色剤として Ehrlich reagent を用い100°C 10分間加熱した。この発色剤は *P*-dimethylaminobenzaldehyde 0.5g と trichloroacetic acid 5g を50%水-ethanol 20ml に溶解させ、*n*-butanol 60ml を加えて調製した。各溶媒系で得られた R<sub>f</sub> 値を第10表に示した。

solvent system (1) では単一の spot のみ現われた。

この solvent system (1) は *N*-acetylneuraminic acid と *N*-glycolylneuraminic acid の分別に用いており、標準品の R<sub>f</sub> 値および文献の R<sub>f</sub> 値<sup>22)</sup> (*N*-acetylneuraminic acid : 0.45, *N*-glycolylneuraminic acid : 0.34) より *N*-acetylneuraminic acid と判定され、

第10表 シアル酸のペーパークロマト Rf 値

Solvent system	粗オボムチンシアル酸	牛初乳シアル酸
n-butanol 1		
(1)n-propanol 2 0.1N HCl 1(v/v)	0.47	0.49
n-butanol 6		
(2)pyridine 4 water 3(v/v)	0.09, 0.13, 0.21	0.10, 0.13, 0.20
n-butanol 9		
(3)pyridine 5 water 8(v/v)	0.10, 0.24, 0.30	0.11, 0.25, 0.32

*N*-glycolylneuraminic acid は含まれていないことはこのペーパークロマトグラフィにおいても確かめられた。solvent system (2)および(3)では3つの spot が現われた。このような現象は borine submaxillary mucin からの sialic acid についても報告されている<sup>28)</sup>。この3つの spot の各々はいくつかの報告でそれぞれ *N*-acetylneuraminic acid として報告されている Rf 値と一致した<sup>28-25)</sup>。しかしこの3つの spot がどんな相違により分別されるのかについては不明である。この solvent system (2)における3つの spot の量的割合を測定した。展開後充分乾燥させ各 spot を切りとり試験管内で水 1 ml により30分間抽出し紙片を除去後、この抽出液をアルカリ TBA 法にて比色定量した。その結果を第11表に示した。

第11表 シアル酸の Rf 値と比率

	spot No.	Rf 値	割合(%)
牛初乳シアル酸	1	0.10	20
	2	0.13	16
	3	0.20	64
粗オボムチンシアル酸	1	0.09	23
	2	0.13	16
	3	0.21	61

以上の結果より粗オボムチンより単離したシアル酸はグリコール基を含まず、アセチル基をモル当り1モル含む *N*-acetylneuraminic acid であることを同定した。

## 引用文献

- 1) G. Blix (1936): Z. Physiol. Chem. **240**: 43.
- 2) E. Klenk & G. Uhlenbruck (1957): Z. Physiol. Chem. **307**: 266.
- 3) G. Blix, E. Lindberg, L. Odin & I. Werner (19

- 56): Acta. Soc. Med. Upsal. **61**: 1.
- 4) L. Odin (1955): Acta. Chem. Scand. **9**: 1235.
- 5) L. Svennerholm (1956): Acta. Chem. Scand. **10**: 694.
- 6) S. Petterson, R. Sivertson, S. Sjogren & L. Svennerholm (1958): Biochim. Biophys. Acta. **28**: 444.
- 7) E. Martensson, A. Real & L. Svennerholm (1958): Biochim. Biophys. Acta. **30**: 124.
- 8) P. Atlerpelt, I. Blomme, A. Morrby & L. Svennerholm (1958): Acta. Chem. Scand. **12**: 359.
- 9) D. Aminoff (1961): Biochem. J. **81**: 384.
- 10) L. Svennerholm (1957): Archiv. Kemi. **10**: 577.
- 11) L. Svennerholm (1957): Biochim. Biophys. Acta. **24**: 604.
- 12) A. Saifter & S. Gerstenfeld (1957): J. Lab. Clin. Med. **50**: 17.
- 13) L. Warren & L. Odin (1952): Acta. Soc. Med. Upsal. **57**: 230.
- 14) J. R. Dyer (1956): Methods of Biochemical analysis **3**: 111.
- 15) R. D. Guthrie (1962): Methods in carbohydrate chemistry **1**: 432-441.
- 16) Freudenberg (1923): Ann. **433**: 230.
- 17) M. L. Wolfrom & A. Thompson (1962): Methods in Carbohydrate Chemistry **1**: 448.
- 18) E. Klenk & G. Uhlenbruck (1957): Z. Physiol. Chem. **307**: 266.
- 19) E. Klenk & H. Faillard (1954): Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **298**: 230.
- 20) R. D. Guthrie (1962): Methods of carbohydrate chemistry **1**: 432-441.
- 21) J. C. Speck, Jr. (1962): Methods of carbohydrate chemistry **1**: 441.
- 22) E. Svennerholm & L. Svennerholm (1958): Nature **181**: 1154.
- 23) G. Blix, E. Lindberg, L. Odin & I. Werner (1956): Acta. Soc. Med. Upsal. **61**: 1.
- 24) G. T. Barry, F. Chen & E. Roark (1963): J. gen Microbiol. **33**: 95.
- 25) W. R. Clark, R. H. Jackson & M. J. Pallansch (1962): Biochim. Biophys. Acta. **58**: 129.

### Summary

The sialic acid, N-acetylneuraminic acid, was isolated from the crude ovomucin fraction of hen's egg white which contained about 0.5 per cent sialic acid, and the yield of the purified sialic acid from ovomucin was about 84.3 per cent.

To isolate the sialic acid from ovomucin, a range of hydrolysis and purification procedures were examined, and it was confirmed that the most effective hydrolytic condition to liberate the sialic acid in the free state, was heating at 80°C for 1 hour with 0.1N sulfuric acid. The hydrolysis had

to be repeated twice to liberate 98 per cent of total sialic acid.

The sialic acid obtained was identified as N-acetylneuraminic acid, by means of paper chromatography, six colour reaction, infra-red spectrum and also X-ray diffraction spectrum. Using the periodate oxidation procedure, the consumption of periodate per 1 mole of sialic acid was 5 moles and the formation of formaldehyde was 1 mole. It also contained 1 mole of the acetyl group but the glycol group was not detected.