

特異的な酵素を用いた多糖類 の構造研究

雨村明倫*

1. はじめに

多糖類の一次構造を有機化学的方法で明らかにする場合の一般的方法は次の通りである。まず多糖類を加水分解して構成成分を分離同定しそれぞれを定量する。糖の結合の種類はメチル化分析、過ヨウ素酸酸化、スミス分解によって調べることができる。糖がどのように配列しているかということは部分水解、緩和スミス分解などによってオリゴ糖に分解しその構造を決定する。糖結合の配向 (α 配位, β 配位) は旋光度、赤外吸収スペクトル, NMR から決める。枝分れ構造を持つ場合はメチル化分析、過ヨウ素酸酸化によって分岐点の結合様式や枝分れの度合、また平均鎖長を決定することができる。

一方酵素を多糖類の構造の解明に用いることはひじょうに有用である。酵素は糖の種類、糖の結合様式に対して特異性がひじょうに高いので化学的方法のみでは繁雑で困難である複雑な構造を持つ多糖類の構造解明には威力を発揮する。グルコース、ガラクトース、マンノースなどはそれぞれの脱水素酵素で糖を分離することなく定量できる。 β -1,3-グルカナーゼ、 β -1,4-グルカナーゼ (セルラーゼ)、 α -1,4-グルカナーゼ (アミラーゼ) などのグルカナーゼは結合の種類を調べるのに役立つ。グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、マンノシダーゼ、フコシダーゼなどのエキソ型のグリコシダーゼは非還元末端より糖を逐次分解していくので非還元末端付近の糖の配列を決めるのに有効である。

私の属する研究室で見出された *Pseudomonas* という細菌のつくるイソアミラーゼはグリコーゲンやアミロペクチンの構造の解明にひじょうに

役に立つ酵素である。グリコーゲンやアミロペクチンは α -1,4 結合よりなるグルコース鎖が α -1,6 結合で枝分れしたグルカンであるが、イソアミラーゼはこの α -1,6 結合を完全に切断し直鎖のアミロース様物質を生成する。完全に枝が切断できるので平均鎖長や鎖長の分布を調べるのがひじょうに容易である。また β -アミラーゼ、ホスホリラーゼと併用することによってグリコーゲン、アミロペクチンの構造がより明らかにされた。イソアミラーゼは多糖類の構造解明に用られた酵素の一つの良い例である。

現在私はサクシノグリカンと呼ばれる複雑な構造を持つ多糖類を分解する酵素の研究に従事しているが、この酵素を用いることによってサクシノグリカンの構造が巧みに解明されたその方法について述べたいと思う。

2. サクシノグリカンの発見

サクシノグリカンとは原田教授らが土壌より分離した細菌 *Alcaligenes faecalis* var *myxogenes* 10 C 3 の作る細胞外水溶性多糖類であり、コハク酸を含んでいるのでそのように名付けられた。構成成分はグルコース、ガラクトース、コハク酸、ピルビン酸 (モル比で 7:1:1:1) である。旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ は -15° であり、また赤外吸収スペクトルから β -グリカンであることが示された。コハク酸は薄いアルカリで遊離すること、またヒドロキシルアミンとの反応性、赤外吸収スペクトルから糖部分にエステルで結合していることがわかった。ピルビン酸は薄い酸で容易に遊離するので糖部分にアセタールで結合していることが推定された。さて糖の配列がどのようになっているかということであるが、それを調べるためにサクシノグリカンを酸で部分水解するかわりに酵素を用いてフラグメントに分解することを試みた。

* 雨村明倫 (AkiNori AMEMURA), 大阪大学, 産業科学研究所, 生合成化学工業部門 (原田研究室), 講師, 工学博士, 応用微生物学

3. *Flavobacterium* の生産する 二つの β -グリカナーゼ

サクシノグリカンとは既知の β -グルカン分解酵素ではほとんど分解されない。そこでサクシノグリカン分解する酵素を得る目的でサクシノグリカンを含む培地で生育できる菌の分離を試み *Flavobacterium* M64 と名付けられた細菌が分離された。この菌はサクシノグリカンを含む培地で培養すると菌体外にサクシノグリカンデポリメラーゼと名付けられた酵素を生産し、サクシノグリカンに特異的に作用して単一の生産物を生じる。単一の生産物を生じるということはサクシノグリカンは規則的な繰返し構造を持っているということで、生産物はサクシノグリカンの繰返し単位鎖に相当する。この単位鎖の重合度は8で、組成を調べるとグルコース7分子、ガラクトース1分子、コハク酸1分子、ピルビン酸1分子より成り立っていた。ガラクトースは還元末端に存在することがわかった。

また *Flavobacterium* の菌体内からこの単位鎖を分解する酵素 β -グリカナーゼが分離された。この β -グリカナーゼは重合度8である単位鎖を二つの四糖類に分解した。その一つはグルコース4分子、コハク酸1分子、ピルビン酸1分子より成り、他の一つはグルコース3分子、ガラクトース1分子より成り立っていた。ガラクトースは還元末端にあるのでガラクトースを含んでいる四糖類の方が還元末端側に存在することがわかる。

このように特異的にある結合のみに作用する酵素を用いて多糖類を逐次分解していくと定まった生産物が生じ、酸で部分水解した時のように沢山の種類のオリゴ糖が無秩序にできるということがないので、オリゴ糖の分離がひじょうに容易であるのみならず、次に示すように糖の配列を決めるのもひじょうに簡単明確である。

4. サクシノグリカンの構造決定

多糖類を構成している個々の糖の結合の種類を知る一つの方法はメチル化法である。これは多糖類に存在するグリコシド結合にあずからないすべての遊離の水酸基をメトキシル基に変えた後に酸で水解すると、水解を受けたところのみが遊離の水酸基である部分メチル化糖が生じる。このメチル化糖をガスクロマトグラフィで分離、同定、定量すると多糖類の中にどんな結合をした糖がどの位存在するかがわかる。例えば 2,4,6-トリ-O-メチル-D-グルコースは (1 \rightarrow 3)-D-グルコース、2,3,4,6-テトラ-O-メチル-D-グルコースは非還元末端グルコース、2,3-ジ-O-メチル-D-グルコースは分岐点の (1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 6)-D-グルコースに相当する。ピルビン酸が非還元末端グルコースの4位と6位の炭素にアセタールで結合していると相当するメチル化糖は 2,3-ジ-O-メチル-D-グルコースとなり (1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 6)-D-グルコースと区別できないが、薄い酸で処理するとピルビン酸が除けるので酸処理後メチル化を行って調べるとどちらであるかわかる。

さてサクシノグリカンとそれを二つの酵素で

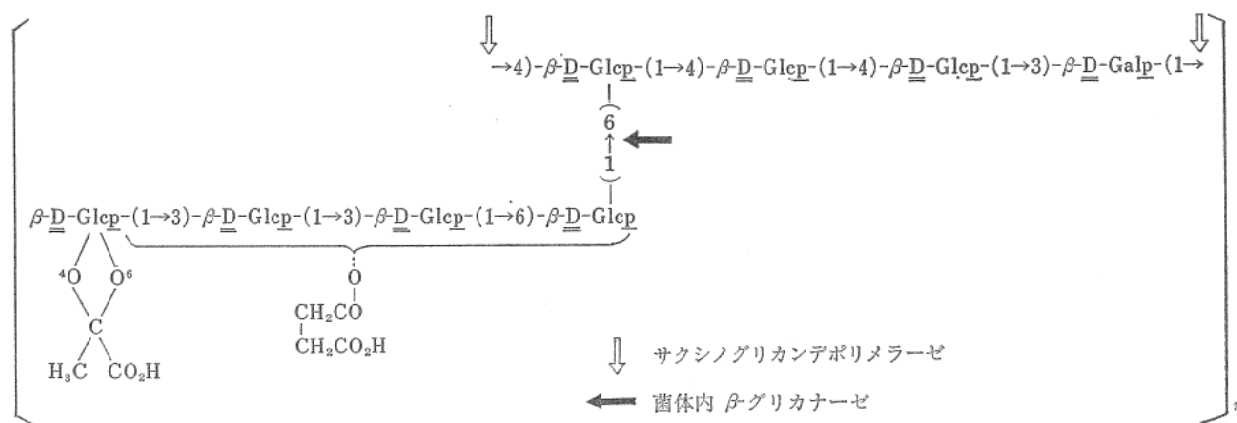


図1. サクシノグリカンの構造と *Flavobacterium* の二つの β -グリカナーゼの作用点

逐次分解して得られた重合度8の単位鎖と二つの四糖類をそれぞれメチル化し、水解してメチル化糖を調べ比較すると、それぞれがどのような結合糖から構成されているか、また酵素で分解された時どの結合糖が消失あるいは減少したかがわかる。メチル化だけでは糖の配列順序はわからない。しかし四糖類であれば配列順序を決めるのはやさしく、還元末端の糖とその結合様式がわかればメチル化のデータとから簡単に決まることが多い。四糖類の構造が明らかになればそれを八糖類の単位鎖、サクシノグリカンへと逆に組み立てていくと簡単に多糖類の構造が解明できるという訳である。そのようにして明らかにされたサクシノグリカンは図1のように示される。サクシノグリカンは分岐構造を持ち、側鎖の非還元末端にピルビン酸が4-O, 6-Oでアセタール結合をしている。コハク酸の位置はまだ決定していないが側鎖のグルコースのいずれかにエステル結合している。*Flavobacterium* の二つのβ-グリカナーゼの切断点が矢印で示されているが、まず菌体外のサクシノグ

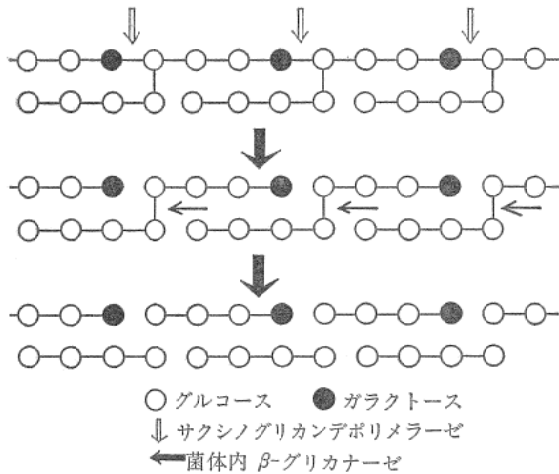


図2. *Flavobacterium* の二つのβ-グリカナーゼによるサクシノグリカンの逐次分解

リカンデポリメラーゼが分岐点の横の(1→4)-β-D-ガラクトシド結合を切断し、その結果として重合8の直鎖構造の単位鎖が生じ、このものが、菌体内に入り、さらに菌体内のβ-グリカナーゼが(1→6)-β-D-グルコシド結合を切断し二つの四糖類を生じる。分解様式を模式的に描いたものが図2である。

5. おわりに

サクシノグリカンを特異的に分解する二つの酵素を見つけ、それぞれをサクシノグリカンに逐次作用させて生じるオリゴ糖を分析し、未分解のものとメチル化のデータを比較することなどにより比較的簡単にしかも正確に多糖類の構造を決定することができた。重要なことは多糖類をフラグメントに分解する良い酵素を見つけることである。私共の見つけたサクシノグリカンデポリメラーゼと菌体内β-グリカナーゼは *Alcaligenes* のこの多糖類のみならず、植物に寄生してガンを作る *Agrobacterium tumefaciens* や *A. radiobacter* のいくつかの株、また豆科植物の根瘤菌である *Rhizobium meliloti* のある株の作る多糖類にも逐次作用し、同様のオリゴ糖を生じることがわかり、私共はこれらの多糖類がアシル基の含量を除いては同じ構造を持つことを明らかにした。植物に寄生、共生するこれらの細菌が類似の多糖類を作るということで、私共は植物と細菌とのかかわり合いに多糖類がどのような役割を持っているのかということに興味を持ち研究を進めている。

複雑な多糖類の構造を解明するのに新しい有機化学的方法も種々考案されているが、今後新しい多糖類分解酵素が次々に見つめられるとそれらは多糖類の構造解明の有力な武器となるであろう。

