

## 戦後における糖研究の流れを回顧する

東北大学農学部 松田和雄

### はじめに——農芸化学と多糖

多糖は重要な生体成分であり、とくに植物体においては生体成分としてもっとも多量に含まれている成分である。したがって、その研究は当然農芸化学の研究分野に包含される。しかし、戦前においてはこの分野における農芸化学関係の研究者の研究がとくに活発であったとはいえない。

多糖のなかでも、グリコーゲンやムコ多糖のような動物起源の多糖は主として医化学系の研究者により行われていた。また、植物多糖のなかでも歴史が古く、比較的純粋な形で得ることができ、利用価値も高いセルロースの研究が伝統的に、応用化学の研究者の手中にあったことも見逃せない事実である。これらの傾向は現在でもある意味では残っているというべきであろう。したがって、農芸化学における多糖の研究が少数の例外\*を除きセルロース以外の植物多糖および微生物多糖を中心として行われたことは否定できない事実である。以下、戦後筆者の専門分野の周辺で行われた農芸化学関係の研究者による研究にまつわる話題を随想的に述べてみることにしよう。

### I. 澱粉とデキストラン

戦後、比較的早い時期にわが国の農芸化学関係の研究者により研究が開始された多糖は澱粉とデキストランである。澱粉はもっともありふれた多糖でありながら、セルロースよりはるかに複雑な構造を有していたため、その本質が戦争直前に行われた K. Meyer の研究によってようやくある程度明らかになったという経過があった。したがって戦後二國らのグループが澱粉の研究を開始した時期は、諸外国より遅れていたとはいえ、その遅れを

とりもどすことが不可能なほどの時期ではなかった。事実、二國らのグループおよびその後継者たちによって行われた澱粉の研究は大きな発展を遂げ、世界におけるこの分野の研究のなかでも今や高い評価を与えられるに至っている。また、二國らが研究を開始した時期と相前後して行われた丸尾、小林らのイソアミラーゼの研究は、澱粉およびグリコーゲンの分枝点にのみ選択的に作用する分枝切断酵素 (debranching enzyme) の存在を世界にさきがけて明らかにしたもので、戦争により大きな痛手を受けていたわが国の生化学研究者の潜在能力の高さを世界に示した快挙であった。

一方、澱粉の研究と平行して行われた、澱粉系多糖の分解酵素であるアミラーゼ研究の驚異的な躍進も特筆すべきことである。第3のアミラーゼとして発見されたグルコアミラーゼは発見者の名前こそ外国に譲ったが、その後の研究におけるわが国の研究者の貢献はきわめて大きい。この酵素を用いて、諸外国よりも一足先に澱粉からのブドウ糖を工業的に製造することに成功したのも、この酵素の研究に精力的にとり組んだわが国の研究陣の輝かしい成果である。そして、これらの研究のなかでも中心的な役割を果たした福本を中心とする大阪市工研、大阪市大の研究グループ、上田を中心とした九大のグループの功績は忘れてはならないであろう。さらに、グルコアミラーゼの研究で見せたわが国研究者のレベルの高さが、その後の酵素によるブドウ糖の異性化の工業化、原田らによる実用酵素としての枝切り酵素、*Pseudomonas* 属イソアミラーゼの発見およびその応用であるマルトースの工業的製造などの輝かしい成果へとつながるのである。いまでは、グルコアミラーゼ以後発見された新しいアミラーゼの大部分は日本の研究者により発見されたものであり、この分野における農芸化学関係の研究者の業績はめざましいものがある。

デキストランは血漿増量剤もしくは代用血漿の基材と

\* たとえば、かつて京大の小野寺らにより行われたムコ多糖の研究や、現在行われている鳥取大平野らのキチンの研究など。

いう特殊な用途から、米国においていわば戦時研究の形で広範な研究が行われていた。わが国でもっとも早くデキストランの研究に着手したのは、小林(恒夫)、篠田らの研究グループである。この多糖は篠田(名糖産業)の努力によりわが国での工業化に成功し、米国においてこの多糖に対する関心の低下したこともあって、同社はいまでは世界で数少ないメーカーの1つとなっている。デキストランの研究は、類似多糖である口腔内細菌、*Streptococcus mutans* の生産する多糖 mutan がむし歯の有力な原因に関与しているということが明らかとなって、大多数の研究者の関心がこの多糖に移行した結果、最盛時に比べると問題にならないくらい少数の研究グループにより行われているにすぎない。筆者の研究室では十数年前から、デキストランの構造、合成酵素、分解酵素等について研究を続けてきたが、今では数少ない研究グループの1つとなってしまった。

デキストランは発酵法によって工業的規模で生産された世界で最初の多糖、そして、微生物多糖の実用的生産に途を拓いた歴史に残る多糖である。忘れてはならないことは、戦後比較的早い時期にわが国で開始されたこの多糖の研究で得られた成果が、わが国におけるその後の多糖の研究に大きく貢献していることである。

## II. 多糖研究の進歩

多糖の研究、とくに構造研究がしばしば敬遠された理由は、分離、精製に時間と手間がかかり、しかも、必ずしも満足すべき結果が得られるとは限らないこと、構造決定法、なかでも、有力な手段とされていたメチル化法がきわめて煩雑で、とくに、個々の部分メチル化糖の同定が容易でないことなどいくつか挙げるができる。たしかに、以前は多糖の研究というと、時間と手間を食う割には明快な結果の得にくい泥臭い研究の代表とみなされていた。しかし、この十数年間この分野の研究手段にも大きな進歩が認められ、多糖の研究も以前よりはずっとやりやすくなった。たとえば、分離精製法にしても、新しい有機試薬による選択的沈殿法や各種クロマトグラフィーの導入などにより、少量の試料の精製が可能となり、精製の度合いを高めることができた。また、構造解析の手段としてもいくつかの新しい方法がとり入れられたり、古典的なメチル化法がガスクロマトグラフィー(GLC)やマススペクトロメトリー(MS)の導入などにより、近代的分析手段に衣がえしたことなどもこの分野の進歩に大きく貢献したといえる。

戦後、もっとも早く取り入れられた多糖の新しい構造研究法は過ヨウ素酸酸化法である。この方法は米国でデ

キストランの構造解析に広く用いられ、澱粉系多糖の平均鎖長の分析法としてもメチル化法に代る方法として取り入れられた。たしかに、この方法はメチル化に比べれば、分析手段としてははるかに簡便であった。この方法をわが国でいち早く実施されたのは当時東大農学部におられた小林恒夫博士であったと記憶しているが、当時は肝心のメタ過ヨウ素酸ナトリウム( $\text{NaIO}_4$ )がわが国では試薬として市販されておらず、手作りで調製しなければならなかったと聞いている。過ヨウ素酸酸化法の延長として考案されたスミス分解法は、米国ミネソタ大学のF. Smith教授らにより考案された方法で、強弱二通りの分解条件を採用しているが、とくに弱いほうの条件での分解(controlled Smith degradation)は1,3結合を主鎖に有する多糖に適用すると、主鎖を損傷することなく、側鎖の1,3結合以外の結合のみを選択的に除去することができるから、1,3結合を主鎖とする多糖の構造研究には欠かすことのできない選択的分解法となっている。この方法は、Smith教授のもとで長年研究をされてきた三崎旭博士(大阪市大)が帰国後わが国に紹介されて以来、広く用いられるようになった。

もう一つの新しい選択的分解法としては加酢分解法があげられる。多糖の分解法として、もっとも一般的な方法である酸加水分解法では、1級アルコール基の関与する結合(ヘキソースから成る多糖の1,6結合)が2級アルコール基の関与する結合より抵抗性が強い。これに反し、加酢分解法では逆に1級アルコール基の関与する結合が2級アルコール基の関与する結合よりはるかに分解されやすいことが判明した。それゆえ、この方法は $\alpha$ -1,6結合を主鎖とする多糖、たとえばデキストランのなかの副結合の部分オリゴ糖として得るには好都合であった。また、この傾向はグルカン系多糖よりマンナン系多糖において顕著であるから、酵母マンナンのように主鎖が $\alpha$ -1,6結合より成り、側鎖が他の結合から成る多糖では加酢分解により側鎖の部分に相当するオリゴ糖を無傷で得ることができる。この加酢分解産物をゲル濾過にかけると、鎖長を異にする側鎖の分布を示すゲル濾過パターン(いわゆるフィンガープリント)を得ることができる。かくして、マンナン系多糖の構造解析においては、加酢分解法は欠くことのできない方法となった。

多糖の研究にさらに大きな利点をもたらしたものは、クロマトグラフィーの進歩と、機器分析の応用である。クロマトグラフィーにはゲル濾過を含む液体クロマトグラフィーとGLCがあるが、前者は多糖またはその部分分解産物の分離精製に大きく貢献した。とくに、従来困難であった微量の試料の分画が可能となったこと

は、多糖の研究者にとっては大きな朗報であった。GLC のもっとも大きな効用は、この方法の導入により古典的な分析手段であったメチル化法が近代化されたことである。もちろん、メチル化法の近代化については箱守法のような画期的なメチル化の手法が出現したことも大きく寄与しているが、なんといってもメチル化多糖の分解産物である部分メチル化単糖を短時間で正確に分析することができるようになったことの意義はきわめて大きい。いまでは mg 単位の試料があれば、メチル化分析を行うことができるが、先人がたいへんな手間と時間をかけて分析された苦勞を思えば、隔世の感がある。GLC は多糖の構成単糖の分析にも用いることができるが、この目的のためにはむしろ飛躍的な進歩を遂げた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のほうが有用かもしれない。

多糖の機器分析といえば、かつては比旋光度の測定による結合配向の推定や、超速心分離による分子量の測定など、限られた範囲でしか用いられていなかった。その後、赤外線吸収スペクトル (IR) の測定により、多糖の結合配向を決定することができるようになったが、低分子物質に比べれば応用範囲は広いとはいえなかった。前述のように、GC と MS を結合したいわゆる GC-MS 法により、部分メチル化単糖の同定が正確に実施できるようになったことは、多糖の構造解析に大きな効用をもたらしたといえる。しかし、現在多糖の構造解析のための機器分析法として、もっとも注目されているのは核磁気共鳴スペクトル (NMR) であろう。NMR のなかでも、プロトン NMR は利用しうる範囲はそんなに大きくない (結合配向と一部結合様式の解析) が、 $C^{13}$ NMR は装置の性能の飛躍的な向上により、分析手段としてもっとも大きな期待が寄せられている。構成単糖の結合様式をこの方法だけで正確に決定することもけっして夢ではない。

### III. 多糖の構造解析と酵素の利用

多糖のような複雑な生体高分子の構造を化学的手段のみで解析することはきわめて難しい。酵素の基質特異性

をこの分野の研究に応用することは以前から考えられていたが、その利用は長い間オリゴ糖の結合配向の決定などに限定され、多糖の研究に直接用いられた例は少なかった。しかし、その後酵素の精製法の進歩により基質特異性に関して純度の高い酵素標品が得られるようになり、また作用点に関してきわめて特異性の高い分解酵素が発見されるにつれ、多糖の構造研究、とくに複雑な構造の解析に酵素を利用する例がつきつぎと報告されるようになった。この種の酵素としての最初の例はやはりイソアミラーゼであろう。その後、細菌多糖であるプルランを分解する酵素、プルランナーゼが澱粉系多糖の分枝切断酵素としても機能することがわかって、現在ではプルランナーゼと *Pseudomonas* 属から得られるイソアミラーゼが分枝切断酵素として利用されている。これらの酵素を用いてアミロペクチンやグリコーゲンの分枝点を切断すると分解産物は単位鎖に相当する直鎖デキストリンの混合物であるから、これをゲル濾過で分画することにより、直接鎖長分布を知ることができる。分枝を有する多糖は澱粉やグリコーゲンのみではないがこのように分枝点を選択的に分解する酵素は、その後意外なことにほとんど発見されていない。発見されたたぶんただ 1 つの例は筆者らの研究室で発見された *Flavobacterium* 属菌株の生産する dextran  $\alpha$ -1,2 debranching enzyme であろう。この酵素は、デキストランの  $\alpha$ -1,6 結合の主側に  $\alpha$ -1,2 で結合した単鎖のグルコース残基の切断のみを選択的に行う珍しい酵素である。

分枝切断酵素ではないが、分解酵素の特異性を利用して多糖の構造を決定した例としては、サクシノグルカンの構造解析の例がある。この多糖は構成糖としてグルコースのほか少量のガラクトースを有し、さらにマロン酸とコハク酸が一部の糖残基にエステル結合した複雑な多糖である。この多糖の構造解析には *Flavobacterium* に属する 1 菌株の生成する 2 種の酵素が用いられた。すなわち、1 つは菌体外酵素で、図 1 に示すように主鎖中の Gal  $\rightarrow$  Glc 結合に選択的に作用して八糖を生成する、この八糖に第 2 の酵素である菌体内酵素を作用させ

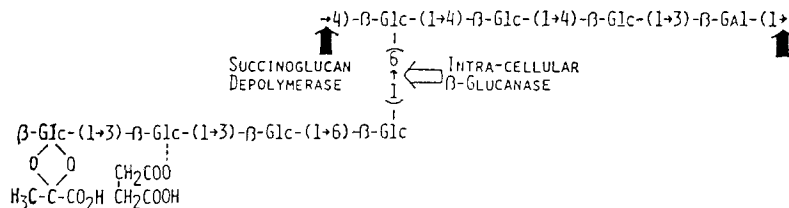


図 1 サクシノグルカンの *Flavobacterium* M 64 菌体外および菌体内酵素による分解 [原田篤也：農化, 53, R 61 (1979)].

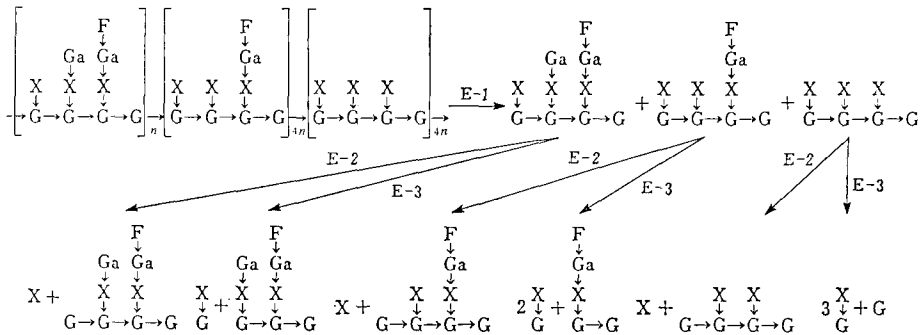


図 2 緑豆暗発芽下胚軸細胞壁キシログルカンの各種酵素による分解

F (L-フコピラノース) と Ga (D-ガラクトピラノース), Ga と X (D-キシロピラノース), X と G (D-グルコピラノース) および G と G の間の結合は, それぞれ  $\alpha$ -(1→2),  $\beta$ -(1→2),  $\alpha$ -(1→6) および  $\beta$ -(1→4) 結合である. E-1: *T. viride* endo セルラーゼ. E-2: *A. niger*  $\alpha$ -D-キシロシダーゼ. E-3: *A. oryzae* イソプリメベロース生成オリゴキシログルカン加水分解酵素.

[加藤陽治, 松田和雄: 化学と生物, 23, 697 (1985)].

ると, 2種の四糖が生成する. この第2の酵素の特異性もきわめて特異性が高く, 図示した個所以外にはまったく作用しない. この2種の四糖の構造を決定することにより, 多糖の構造を決定することができた. このような複雑な多糖は酵素の助けなしに構造を決定することはきわめて困難であったと思われる.

類似の例としては, 筆者らの研究室で行った幼植物の細胞壁多糖キシログルカンの構造決定がある. この場合も, 多糖をまず *Trichoderma viride* のセルラーゼで分解すると, 七糖, 九糖, 十糖の3種のオリゴ糖が得られた(図2). これら3種のオリゴ糖の構造決定にも特異性の高い酵素が利用された. すなわち, 1つはグルコース4, キシロース3のモル比から成る七糖に作用してイソプリメヴェロース ( $Xyl_1 \xrightarrow{\alpha} \text{Glc}_6$ ) 3モルとグルコース1モルを生成する酵素で, 粗タカアミラーゼ製品から得られた. この酵素はイソプリメヴェロースの構造を認識

して作用するらしく,  $Glc_1 \xrightarrow{\beta} \text{Glc}_4$  のような三糖にはまったく作用しないし, キシロースの先に他の糖が結合したような側鎖があると, その手前で作用は停止する. この酵素は前記七糖, 九糖の構造決定にきわめて有用であった. また, 十糖の構造決定に際しては, この酵素のほかに,  $\alpha$ -キシロシダーゼが十糖における  $Gal_1 \xrightarrow{\alpha} Xyl_2$  側鎖の結合位置の決定に大いに役立った. この $\alpha$ -キシロシダーゼは, 主鎖の非還元末端に結合したキシロース残基にのみ選択的に作用するという特異性を有している. この十糖には両酵素とも作用したことから十糖における側鎖の位置が最終的に決定された.

### おわりに——将来の展望

蛋白質, 脂質などと結合していない単純多糖が, 生化学者たちにとって魅力のある研究対象でなかったのは, 少数の例外を除いて貯蔵物質, もしくは骨格形成物質といった地味な機能しか考えられなかったからではないだろうか. とくに, 農芸化学関係の研究者が主として従事している, 植物, 微生物多糖, とりわけ, 中性多糖については, 特筆すべき生理活性はまったく報告されていなかった. しかし, 1960年代の半ばから, ある種の中性多糖について抗腫瘍活性が認められたことから中性多糖も注目されるようになった. この事実は最初, 植物多糖について報告されたが, 後にはある種の細菌の細胞壁多糖や担子菌の $\beta$ -グルカンに強い活性が認められ, 現在担子菌のグルカンを中心として研究が行われているようである. この抗腫瘍活性の詳細な機作は未だ完全には解明されていないが, 生体の免疫活性を増強する働きが中心となっていることは間違いないようである. また, 多糖ではないが, 最近植物組織に病原菌が侵入する際分泌するある種のグルコオリゴ糖が植物の病原菌に対する抵抗性物質の生産を促進することが報告された. このように, 従来生物活性の点ではほとんど関心のもたれなかった中性多糖やオリゴ糖にこのような生物活性が認められたのはきわめて興味深い. 今後の研究の発展を期待したい.

多糖の研究の分野で, 今後研究の進展の待たれるのは, その生合成に関する問題であろう. ここ20数年の間に多糖の生合成の分野ではいくつかの重要な知見が得られている. しかし, 現在でも蛋白質と比べると未解明の問題があまりにも多い. 多糖のなかにはかなり正確な

繰返し単位から成るものが多く、生合成において何らかの調節機構が作用していると思われるが、この点に関してまったく解明されていない。アミロペクチンやグリコーゲンのような分枝多糖では、主鎖の生成に関与する酵素と分枝点の形成に関与する酵素の存在が当然考えられる。アミロペクチンおよびグリコーゲンでは分枝点の形成に関与する酵素の存在が確認されているが、他の分枝多糖ではこのような分枝の形成機構についてはまったく判明していない。筆者らの研究室でも、永年デキストランの生合成について研究を行ってきたが、分枝の形成機構については何の知見も得られていない。さらに、多糖

の生合成で現在まで研究が行われているのは、いずれも primer を出発物質とする伸長作用についてであり、primer の形成を含めてその初発機構についてはほとんど解明されていない。

長い間蛋白質や核酸などの研究に遅れをとっていた多糖の研究も最近ようやく活発になってきたようであるがまだまだ未解明の点が多い。しかし、考え方によってはそれだけにやりがいのある問題が数多く残されているといえる。この分野の研究に農芸化学関係の若い優秀な研究者が数多く参加してくださることを切に望んでやまない。