

かき・グリコーゲンの微細構造について

三崎 旭¹⁾・角田みどり²⁾(¹⁾ 大阪市立大学生活科学部*, ²⁾ 日本クリニック株式会社**)

Elucidation of the Fine Structure of Oyster Glycogen

Akira MISAKI¹⁾ and Midori TSUNODA²⁾*Faculty of Science of Living, Osaka City University and Japan
Clinic Co., Ltd.*

Glycogen, a reserve polysaccharide of animals and microorganism, has a highly branched structure, consisting of α -(1-4) linked D-glucose residues some of which are branched at O-6 position. Although hitherto conducted extensive studies showed, unlike amylopectin, glycogen is present usually as a spherical molecules in the tissues of living organisms, its fine structural feature has not fully been elucidated. In the present study, the fine structure of multiple-branched oyster glycogen has been elucidated by successive peeling of the spherical molecule by using the actions of β -amylase followed by pullulanase. The oyster glycogen, purified by extraction with dimethyl sulfoxide, had molecule weight, 4×10^5 (hplc). Methylation analysis and also gel-filtration after isoamylase-debranching revealed that it has \overline{CL} , approx. 12. Debranching with pullulanase indicated that, average length of (1 \rightarrow 4)-unit is 6-9, corresponding to the length of A-chains, which consist of equal numbers of odd and even number of the glucosyl residues. Four times successive actions with β -amylase and pullulanase (to remove $G_2 - G_3$ glycosyl units originating from A-chains), yielded the corresponding degraded glycogen (stub-free β -dextrins). Comparison of the chain length and β -amylolysis limit in each step, indicated that the glycogen has truly multiple-branched

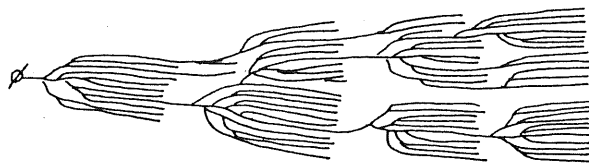
2) 大阪市立大学研究生

* 所在地：大阪市住吉区杉本 3-3-138 (〒558)

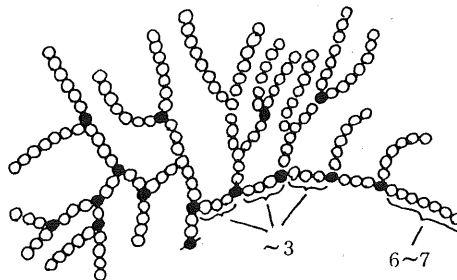
** 所在地：京都市右京区太秦開日町 10 (〒616)

structure, and the core portion of the chain length (I. C.) of 1.8–2.0, to form a compact spherical molecule. In addition, it may be noteworthy that the oyster glycogen may contain a small but significant proportion (ca. 2%) of peptide, consisting of taurine and other amino acids.

動物および微生物の貯蔵多糖であるグリコーゲンは、デンプンと同じく α -(1→6)分岐した α -(1→4)グリコシド結合鎖で構成されているが、後者に比べて分岐度が高く分子形態は生体での貯蔵に適した球状をとると考えられている。(図1) グリコーゲンの構造に関してはこれまでに多くの研究があるが球状構状をもつこの多糖の微細構造、特に分子内部鎖の存在様式に関しては必ずしも明確な知見が得られていない様である。我々は最近、グリコーゲンを主成分とするかきの抽出物が栄養補助食品として用いられている事実に注目して、かきの由来のグリコーゲンについて分岐酵素と β -アミラーゼを繰り返し作用させる新しい方法により、その微細構造を明らかにすることを目的として研究を行った。現在までに得られた若干の知見を報告する。



アミロペクチンの
房状構造 (Frenchら)



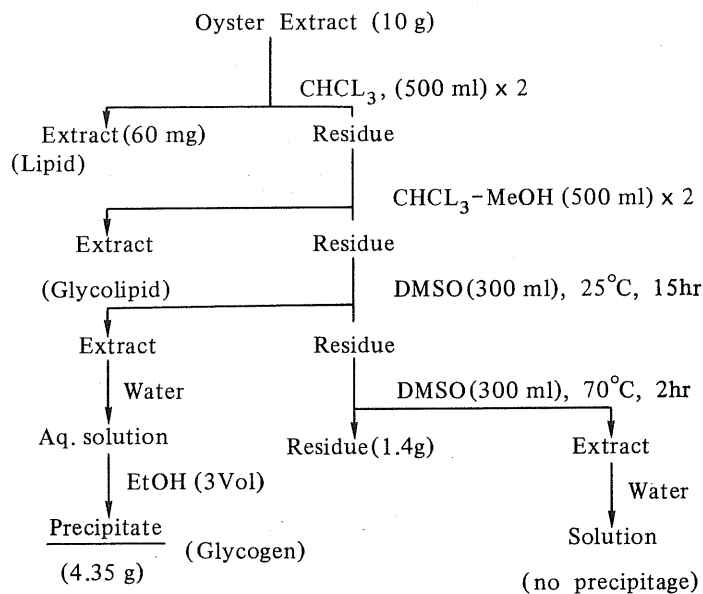
グリコーゲンの構造

Fig. 1. Comparison of structural models of starch and glycogen

I. グリコーゲンの精製と性質

新鮮なかきの熱水抽出、アルコール沈殿によって得られた抽出物粉末（日本クリニックより提供）を出発物質としたが、可及的にNativeな状態のグリコーゲンを得る目的で、脱脂後、Dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いて、Scheme 1 に示す方法で精製した。精製グリ

Scheme 1. Purification procedure of oyster glycogen



コーゲンは $[\alpha]_D^{25} + 140.5^\circ (c\ 1.0, H_2O)$ 、分子量 4×10^5 (hplc) で糖含量 94.5% (グルコース) の外に 5.2% の蛋白を含む。TCA 処理後も約 2% の蛋白質 (Lowry 法) が存在しこの蛋白質はゲル透過で多糖画分と同一のピーク上に顕われるので covalent に結合すると考えられる。このグリコーゲンは β -アミラーゼ (sweet potato) により 36.75% の分解をうける。メチル化により 2, 3, 4, 6-tetra-, 2, 3, 6-tri- 及び 2, 3-di-O-methyl-D-glucose が 1.0 : 10.16 : 0.98 の比で得られた事より約 12 コのグルコース 残基当り 1 コの分岐点 (平均鎖長 C. L. 12) を有し、既往の文献²⁾ と一致する。一方、*Pseudomonas* イソアミラーゼで分枝切断後の末端基定量法 (還元力) さらにゲル透過による分画結果より得られた平均鎖長 (C.L.) は、それぞれ、10.3 及び 13-14 となった。

II. β -アミラーゼ, 分岐切断酵素によるグリコーゲン鎖の逐次剥利作用による微細構造

β -アミラーゼはデンプン, グリコーゲンを非還元性末端よりマルトース単位で切断し, 分岐点手前2~3コのグルコシル基の stub を残すことが知られている。一方, 分岐切断酵素の中, イソアミラーゼはグリコーゲンの内部まで作用し完全に分岐切断を行なうのに反し, プルラナーゼはグリコーゲンの outer most の枝のみを切断する⁴⁾。又イソアミラーゼは, グルコシル基3ヶ以下では分枝を切断する能力がないが, プルラナーゼは短い分岐鎖を切断することが知られている。nativeグリコーゲンはイソアミラーゼにより完全に分岐切断をうけ, その時の unit chain の C.L. は13-14である。(c. f. Fig. 4)が, プルラナーゼを作用させると分解率約15%で図2の gel-filtration プロフィールより分かる如く大部分は高分子多糖として残

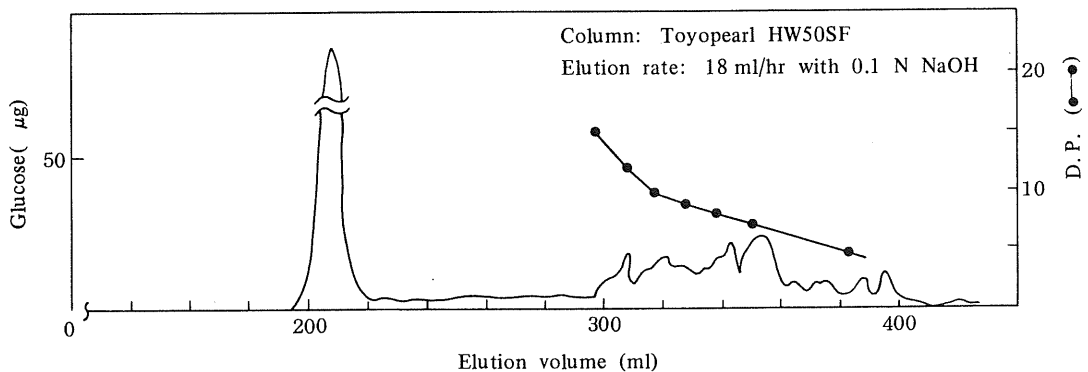


Fig. 2. Gel-filtration profile of pullulanase-treated oyster glycogen (distribution of outer-most unit chains)

る。一方, 切断された unit chain の C.L. は6-9 (ppc では maltotriose など低分子オリゴ糖も検出された)でこれはグリコーゲンの最外側の A 鎖の長さを示す。

この native のグリコーゲンに β -アミラーゼを作用 (36.75%) して得た β -dextrin にプルラナーゼを作用させると, 図3に示す様にマルトース (G_2) とマルトトリオース (G_3) のモル比が1:1であった。此の事は, グリコーゲンの A 鎖は奇数個, 偶数個のグルコシル残基がほぼ同数である事実に対応する。以上の様な pullulanase の性質を利用してグリコーゲン分子の所謂, “皮剥き”を行った。すなわち, グリコーゲンに β -アミラーゼを作用して得た β -limit dextrin にプルラナーゼを作用させ, 2~3ヶの Stub を除去して, 新たに生成した stub-free の dextrin (S.F.-dextrin) に第二段の β -アミラーゼ分解を行う。同様な方法で,

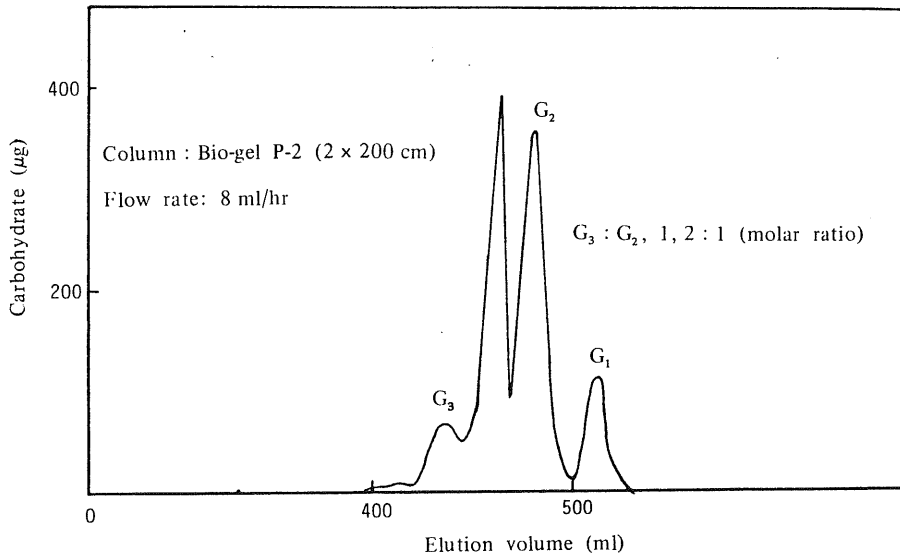
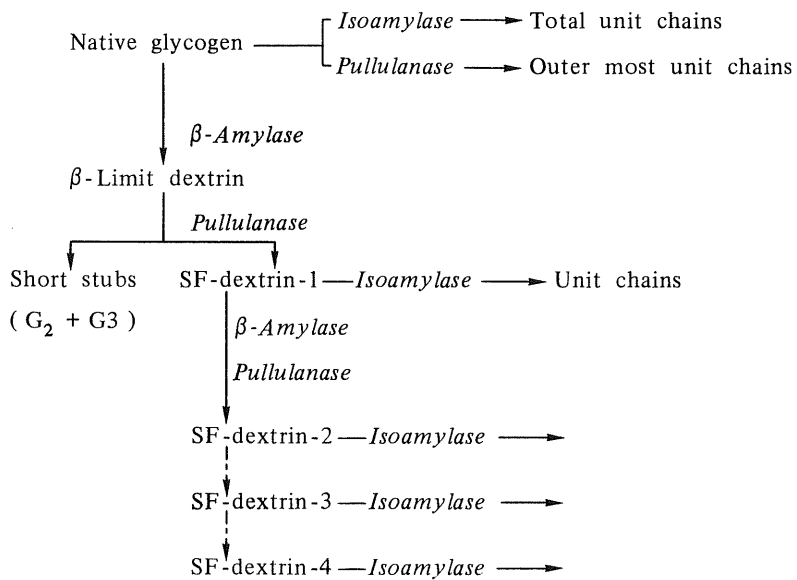


Fig. 3. Gel-filtration profile of pullulanase-treated β -limit dextrin



Scheme 2. Procedure for unit chain distribution analysis of glycogen

β -アミラーゼとプルラーゼを組み合わせて Scheme 2 に示すように球状構造のグリコーゲン分子を外側から逐次“皮剥き”を試み、(1)何回まで剥離反応が可能であるか (2)各段階の dextrin の収量と分子量 (3)平均鎖長 (メチル化、イソアミラーゼ作用後の末端基定量)、ゲル濾過による unit chain の鎖長分布 (4) β -アミラーゼ分解限度より外部鎖長 (E. L. = C. L. \times β -アミラーゼ分解率 + 2.5) 及び内部鎖長 (I. C. = C. L. - E. L.) などを比較した。その結果は表 1 に示す。

Table 1. Distribution analysis of α -(1 \rightarrow 4)-unit chain of oyster glycogen by four cycled β -amylolyses

Glycogen fraction	Recovery (%)	I ₂ -reaction (λ max)	Mol. wt. (hplc)	Average chain length			β -Amylo-lysis (%)	E. L.	I. L.
				Methylation	End-group analysis	Gel-filtration			
Native	100	448 nm	4×10^5	12	10.3	13-14	36.75	6.9	4.5
SF-dextrin-1	56.3	456	2×10^5	9.8	7.2	9-11	24.48	4.7	3.3
SF-dextrin-2	28.8	460	1.7×10^5	6.8	5.0	3-7	12.21	3.2	1.8
SF-dextrin-3	11.0	456	1.5×10^5	6.5	5.1	3-6	-	-	-
SF-dextrin-4	1.6	-	-	6.9	-	-	-	-	-

図 4 には、native、第 1 回、第 2 回、第 3 回剥離反応の各段階の dextrin をイソアミラーゼ、プルラーゼの併用により完全分枝切断のゲル濾過の profile (鎖長分布) を示す。その結果 native のグリコーゲンの鎖長分布のピークが、D. P. 13~14 であるのに対し、第 1 回剥離後 9-11、第 2 段 3~7 と酵素反応を繰り返すにつれて平均鎖長が低分子側に移行する傾向が認められた。一方、各段階の S.F.-dextrin のメチル化分析の結果では native では、repeating unit の大きさが約 12 であるのに対し、一段剥離後 9.8、第 2 段で 6.8 となるが、第 3 段以降では殆んど変化しなかった。又、逐次“皮剥ぎ”反応の生成 dextrin の収量は順次低下すると共に分子量は第一段ではほぼ半分になり、以後少しずつ低分子化されることが分る。結局、4 回の剥離反応でほぼ終了することになる。このことは、グリコーゲンの分子構造について重要な知見を我々に与える。もし、A 鎖と B 鎖の数が同数であれば、第 1 回剥離反応で A 鎖は完全に消失し、A-鎖のついた B-鎖が新しい A 鎖となり、これがただ一本しか存在しないと考えられる C 鎖に結合する以上、第 2 回の酵素反応で全て unit chain となり第 3 回以降の剥離反応は行われ得ないことになる。

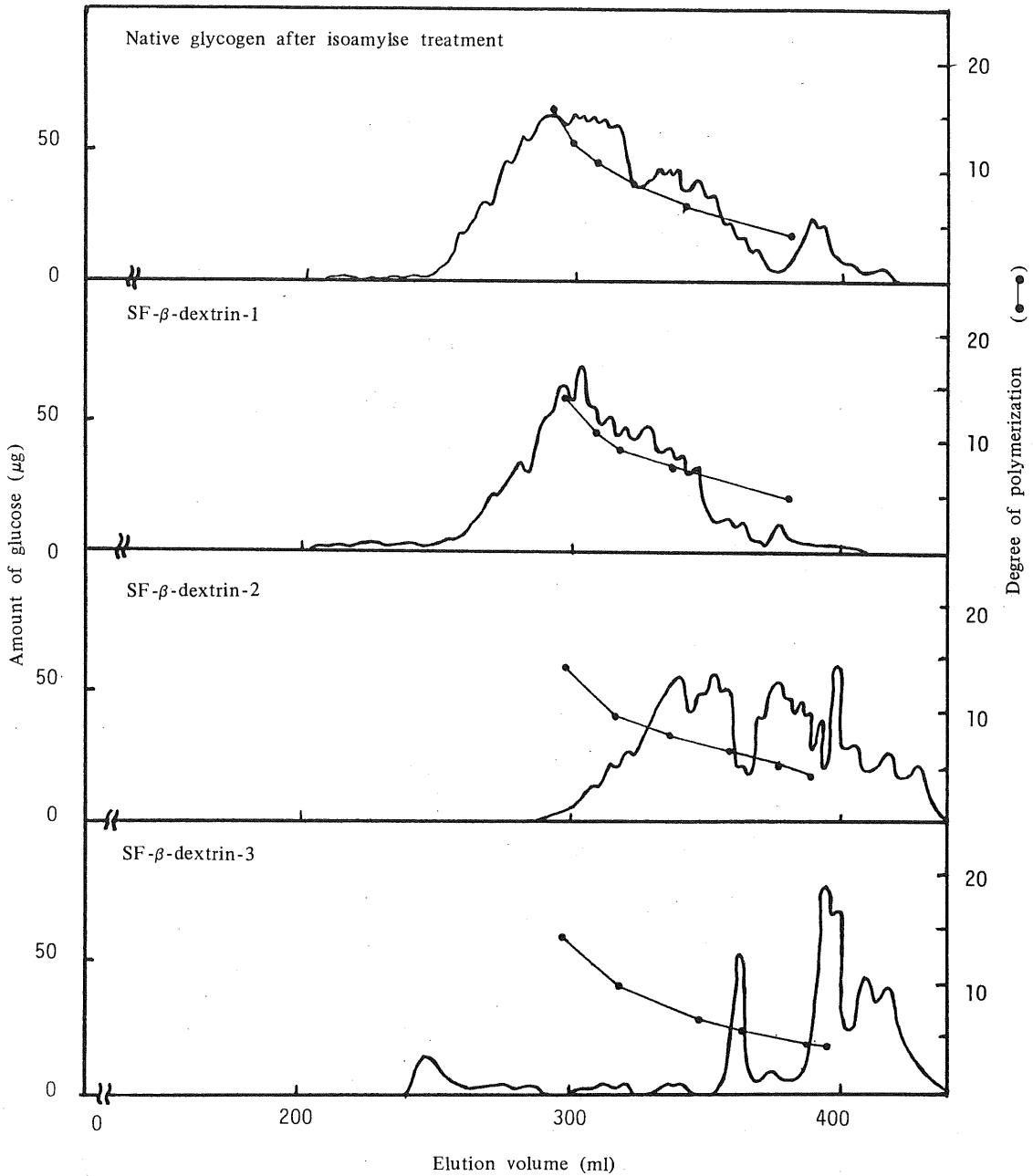
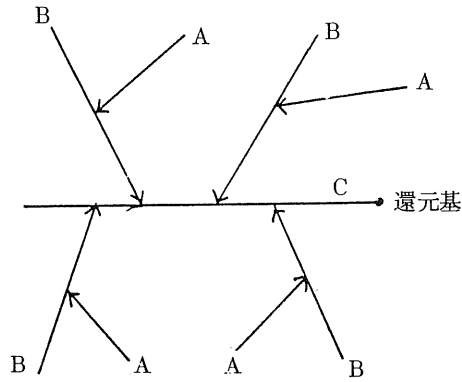


Fig. 4. Gel-filtration profiles of unit-chains in oyster glycogen and its stub-free β -dextrins, after debranching with isoamylase (Column: Toyo pearl HW 50 SF, eluted with 0.1 N NaOH, at 18 ml per hr)



(A鎖, B鎖同数の場合の構造モデル)

我々の実験結果はグリコーゲンではB鎖がA鎖よりも多い多分岐の球状構造をもつことを支持する。又、各段階の S.F.-dextrin の外部鎖長 (E. L.) は当然のこと乍ら剝離反応が進むにつれて短くなるが、分岐点間の長さを示す内部鎖長 (I. L.) は、分子の内側程短くなり、S.F.-dextrin - 2 では分岐間の距離は平均グルコシル残基 2 コ程度となる。(表 1) 本研究の結果から、かき・グリコーゲンの可能な多分岐構造モデルと β -アミラーゼとプルラーナーゼの併用による逐次“皮剥ぎ”反応を示せば図5のごとくなる。グリコーゲン分子はでん粉と異な

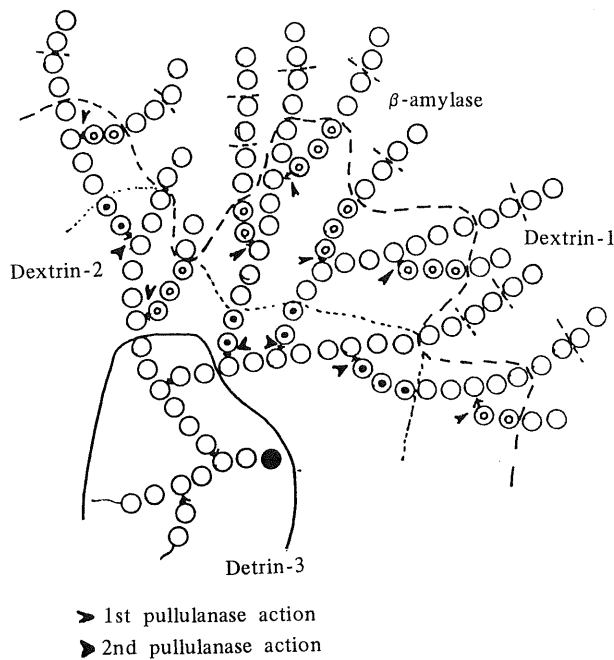


Fig. 5. Structural model of oyster glycogen, elucidated by successive actions of β -amylase and pullulanase

り内部程，分岐点間の距離が短かく緻密となり，外側の枝分れは比較的疎であり，この結果全体として球状構造をとることが分る。外側の所謂，A鎖は Manners の報告⁵⁾のごとく奇数個と偶数個のグルコース鎖より構成され，短かいものでは2ケ～3ケのグルコシル基を含むが平均して6～9である。グリコーゲン中の鎖長分布に関しては最近，Palmerらが，イソアミラーゼの枝切り作用が exo 型であることを利用して，反応過程で鎖長分布を調べた結果，反応が進むにつれて，長鎖側へ移行することから内部程鎖長が長くなることを示唆している。⁶⁾この結果は一見我々のそれとは相反する様であるが，彼等の得た結果は主としてB鎖の分布を示すこと，我々の場合は，各段階の β -dextrin について調べたものであり，矛盾するものではない。ただ，我々の研究ではプルラナーゼが β -dextrin の短い stub に 選択的に作用すると言う事 (c.f. 図 2, 3) を利用して行っているが，この結果が，A鎖由来の stub のみでなく，反応が進むにつれてB鎖の一部の枝切りを行う可能性⁷⁾も考慮しなければならない。此の点を確認するために，剝離各段階の β -dextrin に対するプルラナーゼの作用を現在検討中である。

なお，本研究に用いたかき熱水抽出物によるグリコーゲンは，一般的なグリコーゲンに比べて比較的分子量 (分子量 40万) であるが，多くの多糖が天然状態では二重或は三重鎖として存在すると言われており我々の用いた DMSO 抽出では，水素結合切断の結果，全て一重鎖と考えられ，これが比較的分子量の小さい結果を与えると思われる。

また，他のグリコーゲンと異なりかき・グリコーゲンでは約5%の蛋白質を含む。TCA処理により遊離の蛋白質を除去した後も約2%含まれ，ゲル濾過では多糖画分のピークに一致すること，さらに4回剝離反応後も少量の蛋白質が含まれる事実，および，この蛋白質部分のアミノ酸としてセリンの外にタウリンヒポタウリンが検出された事から，かき・グリコーゲンには，これらのアミノ酸残基を含むペプチドが covalent に結合しているという可能性も充分考えられ，その存在様式及び意義については，グリコーゲンの栄養的価値，特に，生体への取り込みと共に，今後検討すべき重要な課題であろう。

謝 辞

かき・グリコーゲン粗試料を提供された日本クリニック株式会社，isoamylase 及び pullulanase を分与された林原生物化学研究所に感謝します。なお，本研究は，日本クリニック株式会社よりの研究補助費に依り行われた。

文 献

- 1) 三崎 旭, 山田晴宙, 角田万里子 (1983) 生化学 (ライフサイエンスの基礎) p. 53 培風館
- 2) 三崎 旭 (1969) 多糖生化学 I (鈴木, 松村, 山科編) p. 240
- 3) HARADA, T., K. YOKOBAYSHI and A. MISAKI (1971) Appl. Microbiol. **15** : 492.
- 4) ABDULLAH, M., B. J. CATLEY, E. Y. LEE, J. ROBYT, K. WALLENFELS and W. J. WHELAN (1966) Cereal. Chem. **43** : 111
- 5) BATHGATE, G. N. and D. J. MANNERS (1966) Biochem. J. **101** : 3C
- 6) PALMER, T. N., L. E. MACASKIE and K. K. GREWAL (1983) Carbohydr. Res. **115** : 139
- 7) 山本武彦, 梅木公雄 (1980) アミラーゼシンポジウム集 p. 19