

牡蠣のグリコーゲン — 微細構造と酵素分解 —

三 崎 旭¹⁾・松 井 元 子²⁾
(大阪市立大学 生活科学部*)

Oyster Glycogen : Fine Structure and Enzymic Degradation

Akira MISAKI and Motoko MATSUI
Osaka City University

Glycogen was prepared from the fresh oysters (*Crassostrea gigas*), collected every month from June 1990 to April 1991, cultured in Hiroshima bay, and the precise α -1, 4-unit-chain distributions of different glycogen preparations were analyzed by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) after complete debranching with isoamylase. The unit chains of the glycogen, in average chain length (\overline{CL}), 10~11 was found to distribute in a range of G2-G35 (G7-G12, predominant). However, there was a distinct difference in the pattern of unit-chain distributions between summer (spawning season) and autumn to winter (edible season). The fine structure of oyster glycogen (A : B-chains, 0.7 : 1) was elucidated mainly by repeating of the enzymic trimming, which involved in stepwise degradation by β -amylase and pullulanase, and quantitative analysis by HPAEC. The result showed that the multi-branched spherical molecule might be formed by 5 or 6 times inter-linking of the unit-chains (B-chains).

In the nutritional view point, the oyster glycogen was hydrolyzed by salivary (human) and/or pancreatic (hog) α -amylase, and the enzymic digest (amylolysis limit, 48%) was analyzed by HPAEC. There were produced a variety of maltosaccharides including double branched oligosaccharides. They were gradually hydrolyzed by the intestinal glucosidase (rat) to glucose, though small amounts of branched oligosaccharides appear to remain as non-digestible saccharides.

人間の食の歴史のなかで貴重な海の資源であった牡蠣は、ギリシャ語で *Ostreon*, ラテン語では

1) 名誉教授

2) 現 市邨学園短期大学 (犬山市字内久保61-1 〒484)

*所在地：大阪市住吉区杉本3-3-138 (〒558)

Ostreum とよばれ古代ヨーロッパ文明のなかで深く根をおろして来たようである。和名の牡蠣は中国からの渡来語といわれ、古事記(712)に加岐賀比として、また、平安時代(794-1192)に書かれた漢方医学の書「本草和名」には加岐之加比、さらに牡蠣と記されている。牡蠣は分類学的には斧足綱、イボタガキ科に属するが、世界的には其の棲息地帯により異なった名称で分類されている。なお、本研究で主としてグリコーゲンの分離源とした牡蠣は、広島湾で養殖されたマガキ(Pacific oyster: *Crassostera gigas*)である。

カキの種類

日本産	外国産
マガキ Pacific oyster	European flat oyster
<i>Crassostera gigas</i> (Thrunberg)	<i>Ostrea edulis</i>
スミノエガキ	Olympic oyster
<i>Crassostera ariakens</i> (Fujita)	<i>Ostrea lurida</i>
イワガキ	American oyster
<i>Crassostera nippona</i> (Seki)	<i>Crassostrea virginica</i>
イタボガキ	Portugese oyster
<i>Ostrea denselamellosa</i> Lischke	<i>Crassostrea angulata</i>
	Sydney Rock oyster
	<i>Saccostera commercialis</i>

牡蠣は生物学的には軟体動物門、斧足綱、イタボガキ科に分類されている。斧足綱ではあるが卵から孵化した幼生期に海中に浮遊するが、一度岩石や船腹などに付着すると、そこが一生の住処になる。4枚のエラで呼吸し、餌のプランクトンを濾して集める。雌雄同体であるが、ある時期になると性が分かれて来る。

牡蠣は、非常に消化吸収しやすい状態の各種栄養成分を多く含み、それらがバランスよく配合された優れた栄養食品である。栄養的には牛乳に匹敵する。ヨーロッパでカキを「海のミルク」と呼ぶのは、そのためである。例えば、生牡蠣0.5ℓ中には、成人が1人1日に必要とするタンパク質の2/3、磷のほぼ全量、カルシウムの1/3、鉄およびヨウ素の約4倍が含まれると言われており、一般の食品には、不足しがちのカルシウム、銅、鉄、マンガン、リンなどのミネラル類は豊富である。また甲状腺の働きを促すヨウ素も含まれる。これらに加えて牡蠣の重要な成分であるグリコーゲンは澱粉と違い、生で食べても容易に消化される性質があり、旨味成分として知られる、グリシン、アラニン、グルタミン酸、コハク酸、イノシン酸のほか、タウリンなどの含硫アミノ酸など、健康には欠かせない重要な栄養成分に富んでいる。

さらに、最近の研究に依れば種々の重要な生理活性物質を含んでいることが明らかにされつつある(微量栄養素研究特集参照)。

牡蠣の主要な食味成分であるグリコーゲンは、グルコースの storage form として動物の肝臓をはじめ

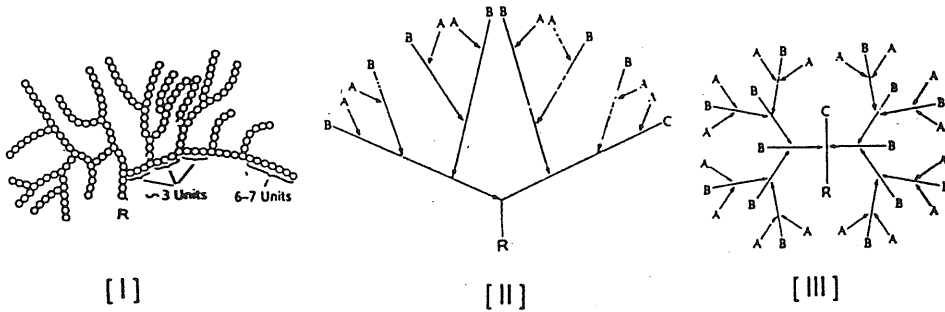


Fig. 1 Meyer model (I) and its modified models (II, III) for glycogen structure

種々の組織に含まれ、ホルモンを介して生体エネルギーの貯蔵と放出という最も重要な生理機能を担っている。グリコーゲンは哺乳類ばかりでなく、牡蠣以外の、貝類、魚類、かび、きのこ、細菌など植物以外の多くの生物にも貯蔵多糖として存在する。植物でもスイートコーンの phytyglycogen のようにグリコーゲン様多糖を含むものもある。

さて、生体内で UDP-グルコースを経て合成されたグリコーゲンは α - (1 → 4) 結合のグルコース鎖が α - 1, 6 分岐で枝分かれした構造であるが、澱粉のアミロペクチンよりも枝が密である。 α - (1 → 4) 結合の平均 10~18 のグルコース残基より成る unit 鎖は動物組織中でエネルギー貯蔵に適した球形の巨大分子 (分子量 $\sim 10^7$) として密集した形で分布している。

グリコーゲンの研究は主として牡蠣グリコーゲンについてなされ 1930 年代の Haworth 以来の化学的研究で基本的な構造が明らかにされたが、グルコース鎖がどのように枝分かれしているかという問題については、いろいろな説が出された。1943 年、Meyer は分岐切断酵素 (R 酵素) などを用いて研究した結果 α - (1 → 4) unit 鎖が樹枝状に枝分かれした構造を提唱した¹⁾。Meyer のモデルは現在でも基本的には正しいとされているが、アミロペクチンと異なってグリコーゲンの球状の分子形態を説明するために、Whelan のモデル (1970) をはじめ幾つかの可能な構造 (Fig. 1) が提唱されてきた²⁾。しかし、複雑に絡まった高分子の分枝鎖を精確に解析する手段の限界などで、その微細な構造や生合成糖鎖の processing を含む生合成機構などについてはまだ問題が残されている。我々はこれまで、多糖糖鎖の機能と構造との相関性について研究してきたが、その過程で種々の生物起源のグリコーゲンに興味をもった。原田ら (1968)³⁾ が見いだした isoamylase を用い、分岐切断で生成したマルトデキストリンのゲル濾過による分別で鎖長分布の解析をおこなった⁴⁾。さらに、 β - amylase と限定分岐切断酵素 (pullulanase) を繰り返して作用させる新しい構造解析法を用いてグリコーゲンの微細構造を検討してきた⁵⁻⁶⁾。しかし、conventional なゲル濾過法では unit 鎖の精密分画には限界があり、新しいタイプの陰イオンクロマトグラフィーの出現を待たねばならなかった。ここでは、我々の最近の研究を中心に、酵素による段階的 trimming と、精密陰イオンクロマトグラフィー (HPEAC) を組み合わせた新しい strategy を用いた牡蠣グリコーゲンの鎖長分布の解析、微細な分岐構造について述べる。また、これに関連して、牡蠣のライフサイクル (季節) による糖鎖の変動や、栄養の観点から α - amylase などによる酵素消化についての若干の知見も紹介する。

牡蠣グリコーゲンの調製・性質および季節変動

広島湾で養殖された牡蠣 (*Crassostrea gigas*) を1990年6月から1年間にわたり各月ごとに採取, 直ちにホモゲナイズ, 凍結乾燥後ジクロロメタン-メタノール (1:1および2:1) で脱脂した。nativeに近い状態でグリコーゲンを調製するため, 凍結乾燥, 粉末化した牡蠣からジメチルスルフォキシド (DMSO) で繰り返し抽出 (3回), 水にとかして透析後, アルコールで沈殿, 精製標品を得た。例えば1991年2月採取のグリコーゲンの化学的性質は次の如くである。

分子量: $8-15 \times 10^5$ (Toyopearl HW-65S カラムによるゲル濾過)

蛋白含量: 0.5%以下

糖含量: 98.5% (グルコース)

平均鎖長: CL=11 (メチル化分析)

β -amylase 分解限度: 30.6%

グリコーゲン分子の分岐点を isoamylase で完全に切断し, 生成マルトオリゴ糖を陰イオンクロマトグラフィー (HPAEC; Dionex Bio LC) で精密分画する。その結果, 牡蠣グリコーゲンの α -(1 \rightarrow 4) unit 鎖 CL = 11は実際には G7~G12を中心に G2~G3 または 3から G35まで広く分布することが分かった (Fig. 2)。この HPAEC の Detector response は unit 鎖の OH 数に関係し, 厳密に定量的でないので, これを molar-base で補正する必要がある。これを用いて各種グリコーゲンの unit 鎖の分布を比較すると Table 1 に示すように生物種の違いにより若干異なることが分かる⁷⁾。また多重分岐の指標となる A, B 鎖 (Fig. 1 参照) の比は 0.6~1.2:1 でアミロペクチンとは異なる。

なお, 生理的サイクルとの関係を調べるために, 6月から翌年5月まで月毎に採取した牡蠣のグリコーゲンおよび他の成分の季節による変動を比較すると Table 2 の如くなる。グリコーゲンの含量, 分子量分布 (Fig. 3) と共に, 鎖長分布も変動し (Fig. 4), 産卵の夏期 (6-8月), 産卵後の秋期 (9-10月) と冬期 (12-2月) では G2~G5 鎖の短い鎖長分布に差があり, 食味のよい冬期では分子の外層の unit 鎖が長くなる傾向が観測された。

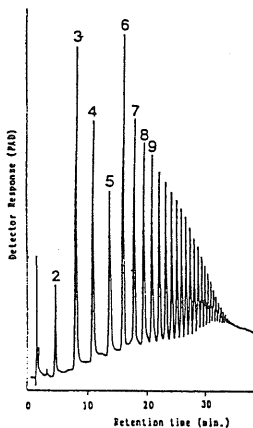


Fig. 2 Unit chain distribution of oyster glycogen (February, 1991)

Table 1. Characteristic properties of glycogens from different origins

Glycogen	Average chain length* \overline{CL}	β -Amylolysis limit (%)	\overline{ECL}	\overline{ICL}	Ratio of odd/even number of A-chain	A : B-Chain ratio
Bovine liver	11	45.9	7	3	1.09	1.2 : 1
Rabbit liver	13	45.2	8	4	0.99	1.2 : 1
<i>M. Abovis BCG</i>	7	26.0	4	2	1.02	0.6 : 1
<i>A. Fumigatus</i>	8	32.5	5	2	1.07	0.8 : 1
<i>V. volvacea</i>	12	38.4	7	4	1.04	1.2 : 1
Phytoglycogen (sweet corn)	11	44.7	7	3	0.96	1.0 : 1
Oyster	10	38.6	6	3	1.03	0.7 : 1
Mussel	12	40.7	7	4	0.99	1.0 : 1
Slipper limpets	11	36.2	6	4	0.98	1.0 : 1

*Estimated from methylation data. $\overline{ECL} = \overline{CL} \times (\beta\text{-amylolysis}(\%)/100) + 2.0$
 $\overline{ICL} = (\overline{CL} - \overline{ECL}) - 1.0$

Table 2. Seasonal changes in size and nutritional components of oyster

1. Size and weight

Season	1990							1991					
	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.
Day	6/19	7/17	8/29	9/21	10/17	11/16	12/18	1/25	2/15	3/15	4/11	5/16	6/13
Length (cm)	4.3	4.8	4.7	4.6	5.4	6.1	6.2	6.9	7.8	6.9	7.5	7.5	6.6
Width (cm)	2.2	2.3	2.2	3.0	3.0	3.4	3.5	3.6	4.0	3.4	4.0	4.2	3.9
Weight (g)	2.7	3.2	5.8	6.6	7.2	11.0	17.2	18.5	20.9	22.5	24.4	29.4	18.8

2. Glycogen

Season	1990							1991				
	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.
Glycogen ^{a)}	7.3	5.2	8.6	2.8	1.3	1.7	5.7	9.8	13.3	12.0	23.0	19.1
λ max	479.1	480.6	479.5	484.2	499.1	481.6	475.0	478.7	474.3	486.8	481.9	468.5

a) g / 100g Glycogen was extracted from lyophilized oyster with DMSO at 25°C.

b) Wavelength in λ max of iodine absorption.

3. Cholesterol

Season	1990							1991	
	Jun. ^{a)}	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	
Cholesterol (mg / 100g)	62.0	59.0	80.0	70.0	86.0	47.0	49.0	62.0	
Ash (g / 100g)	5.17	7.70	9.75	9.85	8.89	5.91	5.51	5.18	

a) Ca : 128mg, Fe : 38mg, Mg : 47mg, Zn : 47mg / 100g

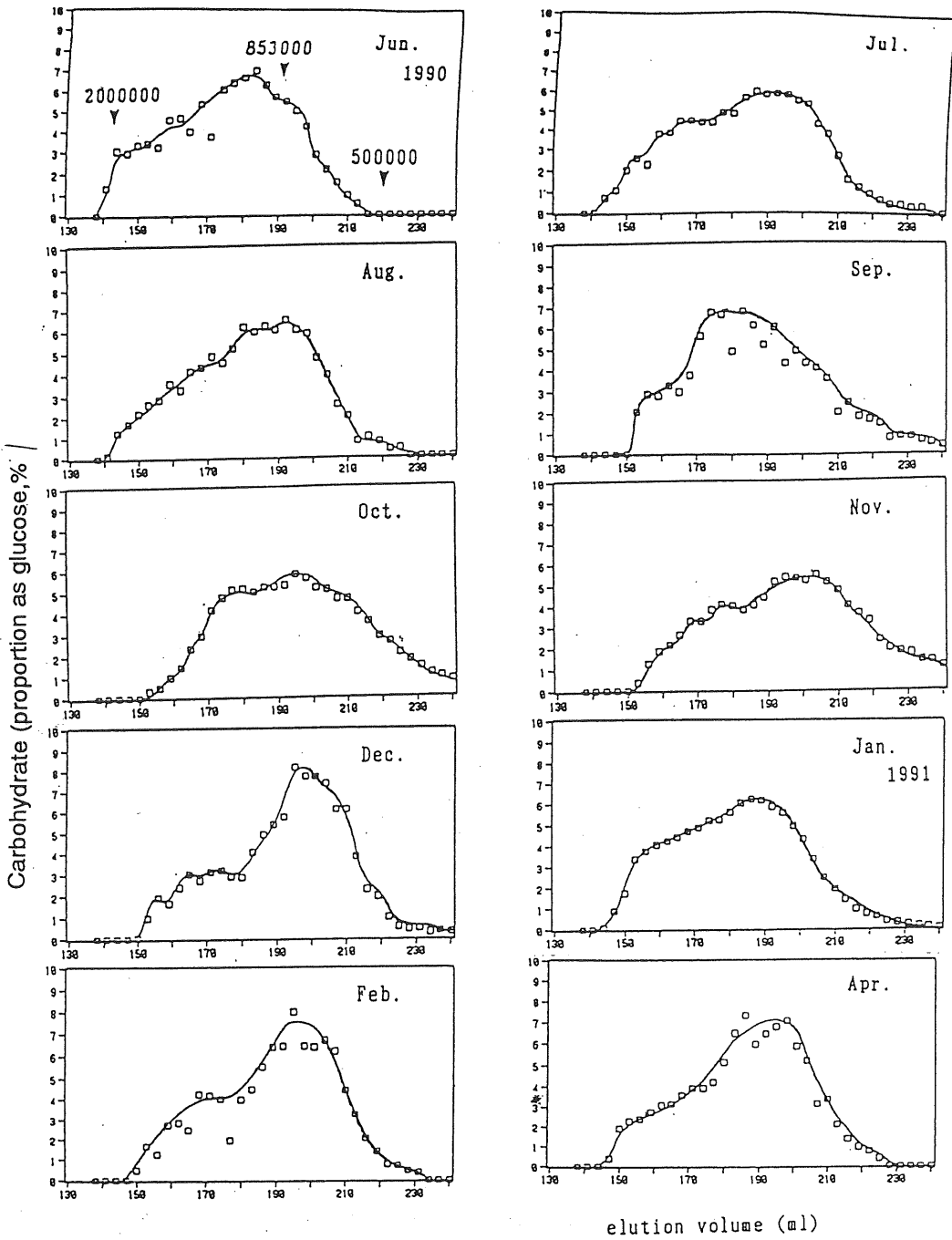


Fig. 3 Seasonal changes in molecular weight distribution of oyster glycogen (June / 90' to April / 92')
 Column : Toyopearl HW65s (2 × 100cm)

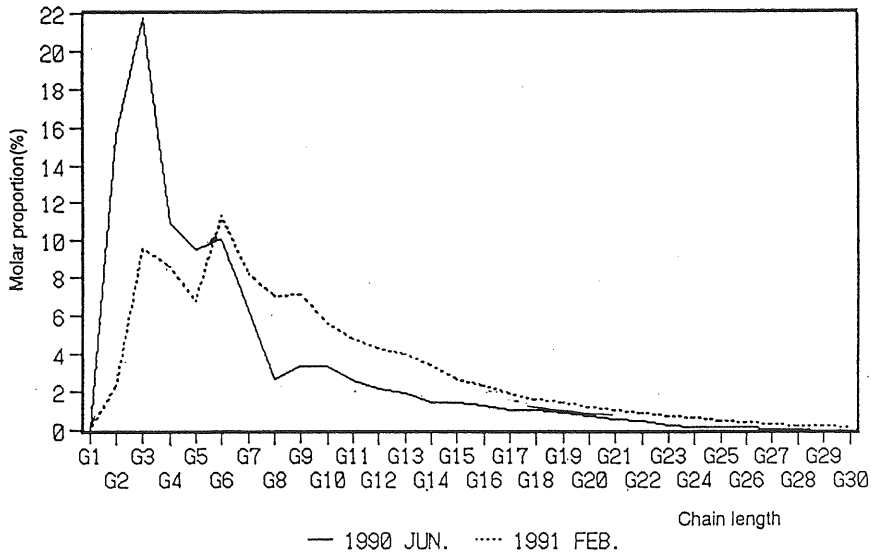


Fig. 4 Profile of chain-length distribution of glycogen

グリコーゲン分子の微細構造

グリコーゲンの多重分岐構造は Peat (1956)⁸⁾ の定義に従うと、枝を持たない A 鎖と、枝を持ちそれ自身も枝となっている B 鎖から構成される (Fig. 5)。その微細構造を調べるために、新しい方法として考えたのは β -amylase と、二種の分岐切断酵素 (isoamylase と pullulanase) の特異性の違いを利用して段階的な分子鎖の trimming と、生成デキストリンの unit 鎖に対応したオリゴ糖の陰イオンクロマトグラフィー (HPEAC) による精密分画を組み合わせる解析法の導入であった。すなわち、精製した牡蠣グリコーゲン (2月採取) に β -amylase を作用させる糖鎖の非還元末端からマルトース単位で切り取られ分岐点の 2 (G2) または 3 残基 (G3) 手前で酵素作用は止まる (Fig. 5 参照)。得られた β -limit dextrin (LD1) の G2 と G3 の stub (A 鎖に由来) を pullulanase で切断する。この結果から A : B-chain の比は 0.7 : 1 となりアミロペクチンの A : B = 1.3 : 1 と異なり multiple branching を示唆する。これを詳細に検討するために stub-free の LD1 に β -amylase を作用させて LD2 とし、その stub を pullulanase で除きさらに β -amylase 分解で新しく出来た A 鎖を攻撃する…… (scheme 1)。このようにして元のグリコーゲンが消失するまで酵素的 trimming を繰り返す。此の結果 5 回の皮剥きでグリコーゲンがほとんど完全に分解されることがわかった。このことは、牡蠣グリコーゲンの unit 糖鎖は少なくとも 5 ~ 6 回分岐を繰り返し多重分岐構造をしていることを強く示唆する。各段階で生成した LD の unit 鎖の分布の精密分析から A 鎖をつけた B1 鎖、B1 をもつ B2、B2 をもつ B3、B3 をもつ B4 鎖の割合は 6.7 : 5 : 2 : 1 と計算される。なお、LD5 のなかに G30 程度の長い糖鎖も存在するので、分子の内層には比較的長いコアの鎖があり、そこから、ある間隔でそれぞれの多重分岐セグメントがのびて全体として球状の巨大分子を形成するという可能性が大である。これらの研究データから考えられるグリコーゲンの構造モデルは Fig. 6 のごとくなる。^{9), 10)} 残された問題としては糖鎖の

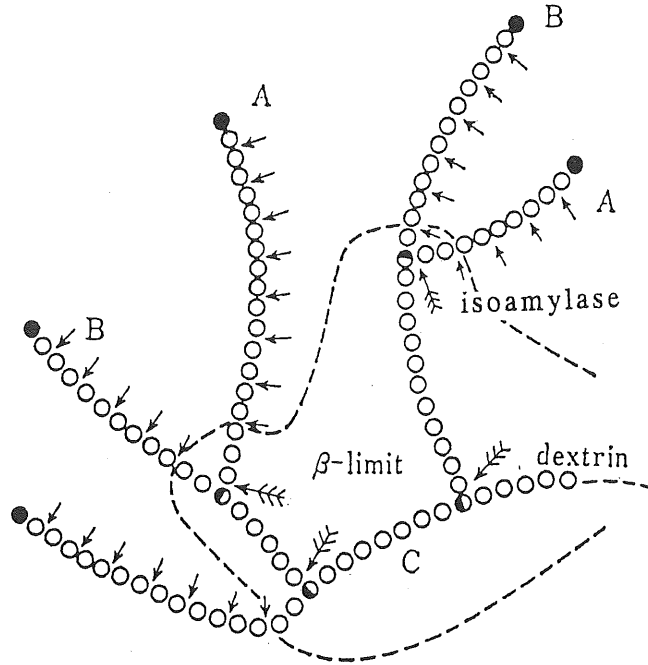
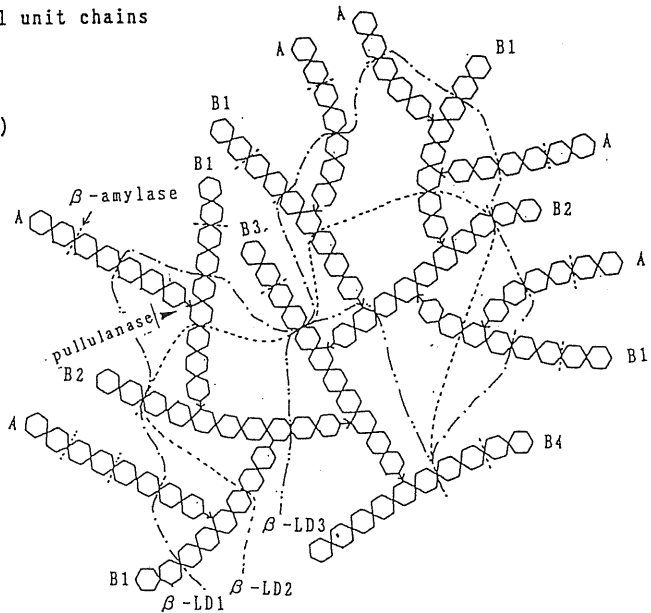


Fig. 5 Tree type structure of glycogen and action patterns of β -amylase (\downarrow) and de-branching enzyme (\downarrow).
 \bigcirc = α -(1 \rightarrow 4)-linked D-glucose residue, \bullet = nonreducing end, and \bigcirc = α -(1 \rightarrow 6)-linked branch point.

Native Glycogen $\xrightarrow{\text{isoamylase}}$ Total unit chains
 $\downarrow \beta$ -amylase
 β -limit dextrin-1 (β -LD-1)
 \downarrow Pullulanase
Short stub Stub free dextrin 1 (SFD-1)
 $\downarrow \beta$ -amylase
 β -LD-2
 \downarrow Pullulanase
Short stub SFD-2
 $\downarrow \beta$ -amylase
 β -LD-3
 \downarrow Pullulanase
Short stub SFD-3
 $\downarrow \beta$ -amylase
 β -LD-4
 \downarrow Pullulanase
Short stub SFD-4
 $\downarrow \beta$ -amylase
 β -LD-5
 \downarrow Pullulanase
Short stub SFD-5
 $\downarrow \beta$ -amylase
 β -LD-6



Scheme 1. Procedure of the step-wise enzymic trimming of oyster glycogen

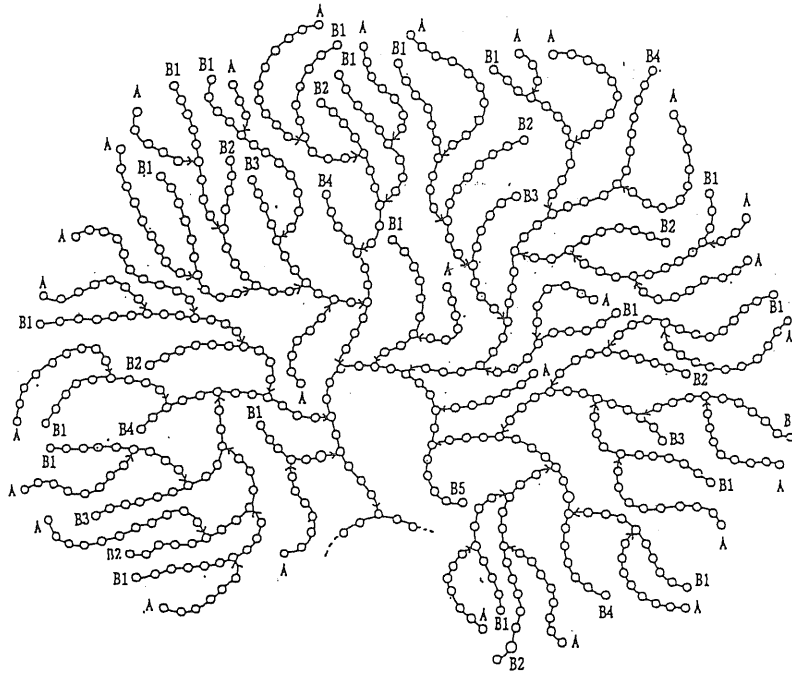


Fig. 6 Mode of multiple branching of glycogen molecule

- , glucose unit
- , α -1, 4-link.
- ↓, α -1, 6-link.

合成の出発点となる還元末端をもつC-鎖が果してあるかと言う事であるが、グリコーゲンを上述の方法で徹底的に分解したあとを調べると、糖ペプチド性の物質が得られた。これがグリコーゲン糖鎖合成に関係するのかもしれない。

牡蠣グリコーゲンの酵素消化¹⁰⁾

牡蠣は生食できることからその主成分であるグリコーゲンの酵素消化性とどのように分解されるかは栄養学的には興味ある問題である。そこで、2月および6月採取の牡蠣からの精製グリコーゲンに唾液(ヒト)、膵液(ブタ)の α -amylaseをそれぞれ24hr作用させ、生成マルトオリゴ糖をHPAECで解析した。唾液あるいは、膵液の α -amylaseによるグリコーゲン分解率は48% (2月) および36.6% (6月) でアミロペクチン(モチトウモロコシ)の58%に比して可なり低い。オリゴ糖のHPEACによるprofileはFig. 7に示すが、グリコーゲンの多重分岐の内部鎖に由来する種々の分岐オリゴ糖が遊離する。これらの分岐オリゴ糖の主要部分はHPEACで分取、種々の酵素を作用させるとなどして構造が決定された(Fig. 8)。アミロペクチンおよび採取月の異なった牡蠣グリコーゲンの唾液 amylase 分解液中のオリゴ糖の比率も Fig. 8 に示した。

これらのオリゴ糖にラット小腸膜酵素(アセトン粉末; Sigma社)を作用(24hr)させると分解率

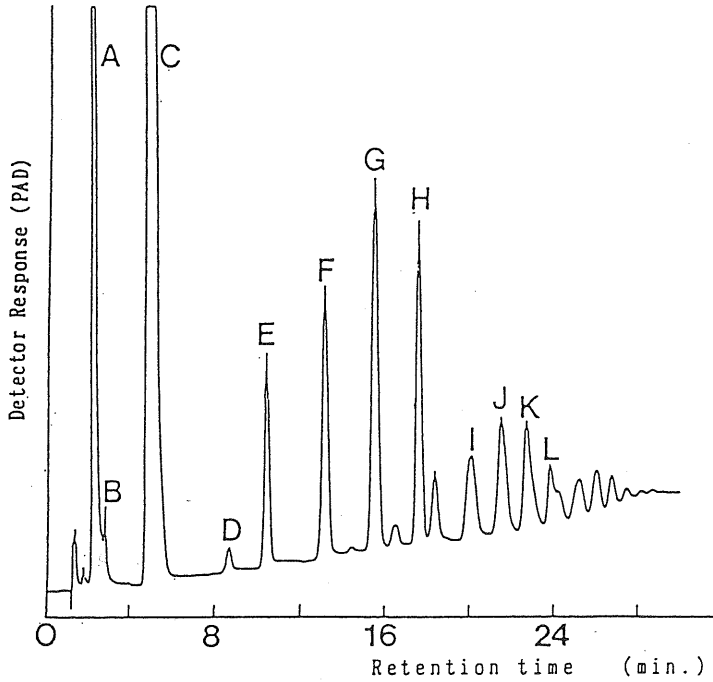


Fig. 7 Elution profile of α -amylase degradation products prepared from glycogen of oyster.

Chromatographic condition : column HPIC-AS6 (250 × 4mmI. D.) eluent A, 150mM sodium hydroxide. eluent B, 150mM sodium hydroxide containing 1M sodium acetate; gradient program, 95% eluent A (5% eluent B) at 0 min. 55% eluent A (45% eluent B) at 40 min; flow rate, 1ml / min.

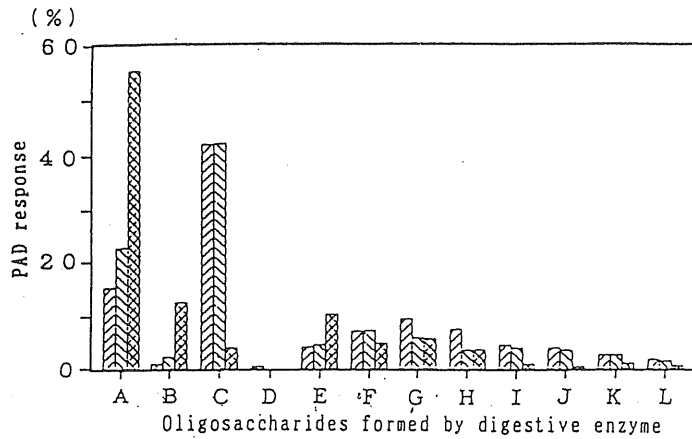
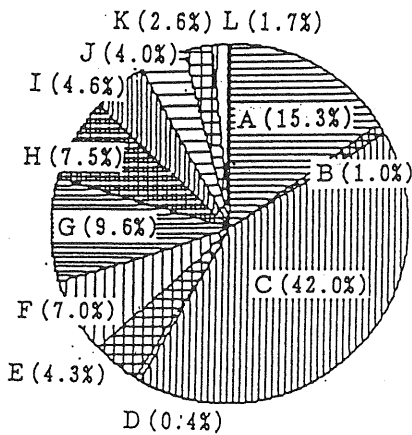


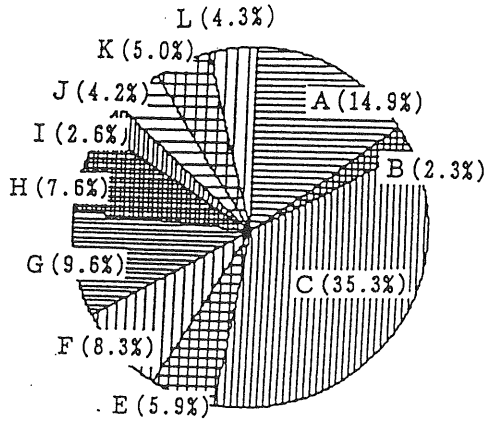
Fig. 9 Distribution of oligosaccharides during successive enzymic degradations of oyster glycogen

- a). salivary α -amylase
- b). pancreas α -amylolysis of a)
- c). intestinal glycosidases (acetone powder) of b)

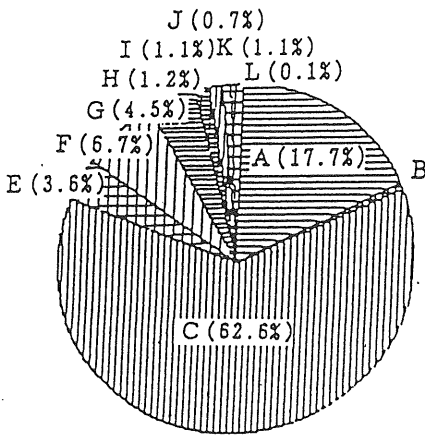
Structure of products (A~H). see Fig. 8



Glycogen (February)



Glycogen (June)



Amylopectin (waxy maize)

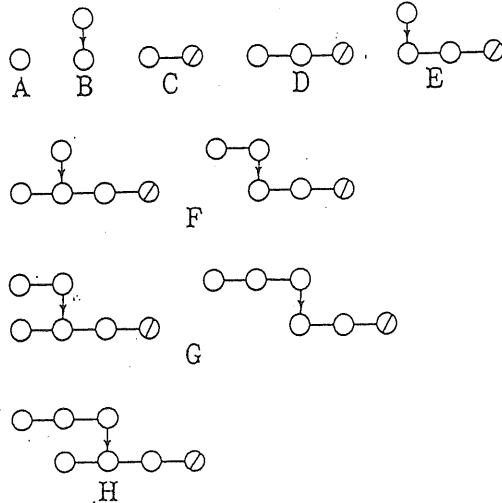


Fig. 8 Structures and constitutions of Maltosaccharides in the slavery α -amylase digests

86.0%であった。このことからグリコーゲンも最終的には小腸膜の終末酵素 (α -glucosidase) でグルコースとなり吸収されると思われる。Fig. 9 にはグリコーゲンに唾液、腺液 amylases, 次いで小腸膜酵素を、それぞれ、24hr ずつ作用させ分解物を HPEAC で追跡した結果をしめす (Fig. 9)。膜酵素作用後もアミロペクチンと異なり、少量の分岐オリゴ糖が残ることは生理的な面から興味あるところである。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、新鮮な牡蠣を提供して下さった広島結城水産株式会社、入手に協力していただいた日本クリニック株式会社に感謝します。また、イソアミラーゼ、プルラナーゼを供与して下さった林原生物化学研究所に感謝します。

文 献

1. Meyer, K., and Flud, M., (1941) *Helv. Chem. Acta* 24 : 375
2. Gunja-Smith, Z., Marshall, J. J., Mercier, C., Smith, E. E. and Whelan, W. J. (1970). *FEBS Letters*, 12 : 101.
3. Harada, T., Yokobayashi, K. and Misaki, A. (1968). *Appl. Microbiol.*, 16 : 1439.
4. Akai, H., Yokobayashi, K., Misaki, A. Harada, T. (1971). *Biochim. Biophys. Acta*, 237 : 422.
5. 三崎 旭, 角田みどり (1984). *微量栄養素研究*, 1 : 27.
6. 三崎 旭, 角田みどり (1985). *微量栄養素研究*, 2 : 161
7. Matsui, M., Kakuta, M., and Misaki, A (1993) *Biosci., Biotech., Biochem.* 57 : 625.
8. Peat, S., Whelan, W. J. and Thomas, G. J. (1956). *J. Chem. Soc.*, 3025.
9. Matsui, M., Kakuta, M. and Misaki, A. (1992). Fine structure of oyster glycogen. *Abstr. paper of the 16th international carbohydrate symposium*, p. 487, Paris. : *Carbohydr. Polymers* (in press).
10. 松井元子, 角田万里子, 三崎 旭 (1992). *微量栄養素研究*, 9 : 87-93.