

カキ・グリコーゲンの分子形態および各種グリコーゲンの鎖長分布の比較

松井元子¹⁾・角田万里子²⁾・三崎 旭³⁾¹⁾市邨学園短期大学, ²⁾甲南女子大学, ³⁾大阪市立大学***Comparative studies for unit chain distributions of different glycogens and evidence of multiple branchings of oyster glycogen.**Motoko MATSUI¹⁾, Mariko KAKUTA²⁾, Akira MISAKI³⁾¹⁾Ichimura Gakuen Junior College, ²⁾Konan Women's University, ³⁾Osaka City University

In a series of investigation on properties of oyster glycogen, the fine structural features of glycogen was elucidated by a new analytical strategy. Thus, the multi-branched oyster glycogen molecule (A : B-chain, 0.7 : 1) involved 5 to 6 times interlinkings of B-chains. More information on the glycogen structure was investigated by peeling action by *Klebsiella* pullulanase. The first treatment liberated short unit-chains (dp2-5), but it was tended to produce longer unit chains (dp3-17), as the pullulanase actions proceeded. Interestingly, after the 7th treatments small proportions of longer unit-chains were still present, suggesting the presence of longer tires are in inner molecule. Based on these data, we proposed a computerized three-dimensional model of oyster glycogen.

The oyster glycogen was acted with human pancreatic amylase. The analysis by HPAEC indicated production of various maltosaccharides including double branched oligosaccharides. The afore mentioned isoamylolysis and HPAEC analysis was applied to the unit chain distributions of glycogens from different biological origins. It was also successfully applied for clarification of the glycogen of human glycogen storage disease.

グリコーゲンは、哺乳動物ばかりでなくカキなどの魚介類、かび、キノコや微生物などに広く分布する。これらのグリコーゲンは、基本的にはアミロペクチンと同様に α -1,4結合のグルコース鎖が1,6分岐した巨大分子であるが、限られた組織空間でエネルギー貯蔵と放出という重要な生理機能のためにより compact 密集型の分子形態をとっている。我々はこれまでの研究において、新鮮なカキから精製したグリコーゲンに β -アミラーゼと exo-type 分岐切断酵素 (プルラーナーゼ) を繰り返し作用させて分子

*名誉教授

の外側から peeling を行い、各段階での鎖長分布の解析という新しい strategy で、多重分岐した球状モデルを提唱した¹⁾。本研究ではさらに、プルラーゼがグリコーゲン分子を最外層の分岐を優先的に切断するという作用特異性²⁾を利用して逐次的にカキグリコーゲンの糖鎖の peeling を行った。各段階での鎖長分布はイソアミラーゼによる完全分岐切断と精密な陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC) を組み合わせて測定し、球状分子中での分岐の密集状態についてより詳細な知見を得ようとした。一方、カキに含まれる主要な食味成分であるグリコーゲンは古くから優れた栄養食品として用いられてきた。この観点から、ヒトの唾液アミラーゼを用いてグリコーゲンの消化性についても調べた。また、他の貝類、微生物、キノコ、植物由来のフィトグリコーゲンなど生物種の異なるグリコーゲンの α - (1 \rightarrow 4) unit 鎖の分布を比較し、我々が開発した分析法をグリコーゲン代謝異常の患者の肝臓グリコーゲンに適用して鎖長分布の解析を行った。

材料と実験方法

実験材料：カキグリコーゲンは、1989年から広島湾で養殖されたカキ (*Crassostrea gigas*) を1991年2月に採取し、ジメチルスルホキシド (DMSO) で調製したものをを用いた³⁾。また、ラットの肝臓、グリコーゲン代謝異常 (glycogen storage disease III ; GSD III) の患者と肺ガンの患者の肝臓より同様にグリコーゲンを調製した。bovine liver glycogen (type IX), rabbit liver glycogen (type III) はシグマ製を使用した。アスペルギウス症の起炎菌である *Aspergillus fumigatus* のグリコーゲン⁴⁾ は北大免疫研究所の東教授より頂いた。スイートコーンより得られたフィトグリコーゲンは、福山大学の不破教授より頂いた。

プルラーゼによる連続的分岐切断：グリコーゲン (100 mg) を蒸留水 5.0 ml に溶解し、200 mM の酢酸緩衝液 (pH 5.0, 5.0ml) を加えて38℃に保ちプルラーゼ (*Klebsiella*, 1 unit/5mg) を17時間作用させた。遊離してきたマルトオリゴ糖 (pullulanase action sup. 1: PAS1) と残ったデキストリン (pullulanase action ppt.: PAP1) をメタノール (1.5 vol.) による沈殿法により分離した。さらにプルラーゼ (1 unit/5mg) を繰り返し作用させ遊離してくるオリゴ糖 (PAS1~) およびそれぞれの段階で得られるデキストリン (PAP1~) をイソアミラーゼにより完全に枝切りし、生成マルトオリゴ糖を HPAEC により分析し α - (1 \rightarrow 4) unit 鎖の分布を明らかにした。

イソアミラーゼによる完全分岐切断：グリコーゲン (3 mg) を蒸留水 0.5 ml に溶解し、200 mM の酢酸緩衝液 (pH 3.5, 0.5ml) を加えて38℃に保ちイソアミラーゼ (*Pseudomonas*, 60 unit) を24時間作用させることにより α - (1,6) unit 結合の分岐点を完全に切断した。

ヒト唾液アミラーゼによる消化：グリコーゲン (3 mg) を蒸留水 0.5 ml に溶解し、5 mM のリン酸緩衝液 (PBS, pH 6.5, 0.5ml) を加えて38℃で、ヒト唾液アミラーゼに準じヒトから得られた唾液アミラーゼを作用させた。

分子量の測定： Toyo-pearl HW-65 (2.2 \times 100 cm) のカラムを用い 0.1M NaOH で溶出した糖を Phenol- 硫酸法でモニターし、標準化されたデキストランおよびプルランの分子量と比較した。

HPAEC (High performance anion exchange chromatography) : HPAEC は Dionex 社製の Bio LC Model 4500 i で, カラムは HPIC-AS6 (250×4mm i.d.) と HPIC-AG6 (50×4mm i.d.) のガードカラムを用い pulsed amperometric detector で検出した。溶出条件は 0.15M NaOH と 0.15M NaOH-M NaOAc のグラジュエントに依った。

結果と考察

カキグリコーゲンに β -アミラーゼと *exo*-type 分岐切断酵素 (プルラナーゼ) を繰り返し作用させて分子の外側から peeling を行い, 各段階での鎖長分布を解析した結果を Table 1 に示した。この結果より A : B1 : B2 : B3 : B4 : B5-鎖の割合として, 6.7 : 5 : 2 : 1 : 1 の値が得られた。本研究の結果からカキグリコーゲンは本質的には Meyer 型構造であるが, α -(1→4) unit 鎖は Fig. 1 に示すように, 少なくとも 5, 6 回分岐を繰り返した多重分岐構造をとることが明らかになった^{1),5)}。なお, Fig. 2 にはコンピュータグラフィック (モルグラフ) によりグリコーゲンの構造の一部をモデル化したものを示した。さらに, 我々のデータを用いて Dr. A. French (U.S. Department of Agriculture; USDA) が約100個のグルコース残基の立体構造モデルを作成している (私信)。一方, プルラナーゼを用いた研究から, 上

Table 1. Yields and average chain length (\overline{CL}) of β -dextrins and stub-free dextrins formed during repeated enzymic trimming of oyster glycogen.

Native glycogen - isoamylase → Total unit chains		Dextrin	Yield (%)	\overline{CL}^a
↓ β -amylase		Native glycogen	100 (800mg)	11
β -limit dextrin-1 (β -LD-1)		β -LD-1 ^b	72.0	6
↓ Pullulanase		SFD-1 ^c	56.0	6-7
Short stub	Stub free dextrin 1 (SFD-1)	β -LD-2	—	—
↓ β -amylase		SFD-2	23.8	7-8
β -LD-2		β -LD-3	—	5
↓ Pullulanase		SFD-3	14.0	8
Short stub	SFD-2	β -LD-4	—	6
↓ β -amylase		SFD-4	5.1	9
β -LD-3		β -LD-5	—	4
↓ Pullulanase		SFD-5	1.5	n.d.
Short stub	SFD-3	^a Estimated by methylation analysis		
↓ β -amylase		^b First β -limit dextrin		
β -LD-4		^c Stub-free β -dextrin-1		
↓ Pullulanase		n.d.: not determined		
Short stub	SFD-4			
↓ β -amylase				
β -LD-5				
↓ Pullulanase				
Short stub	SFD-5			
↓ β -amylase				
β -LD-6				

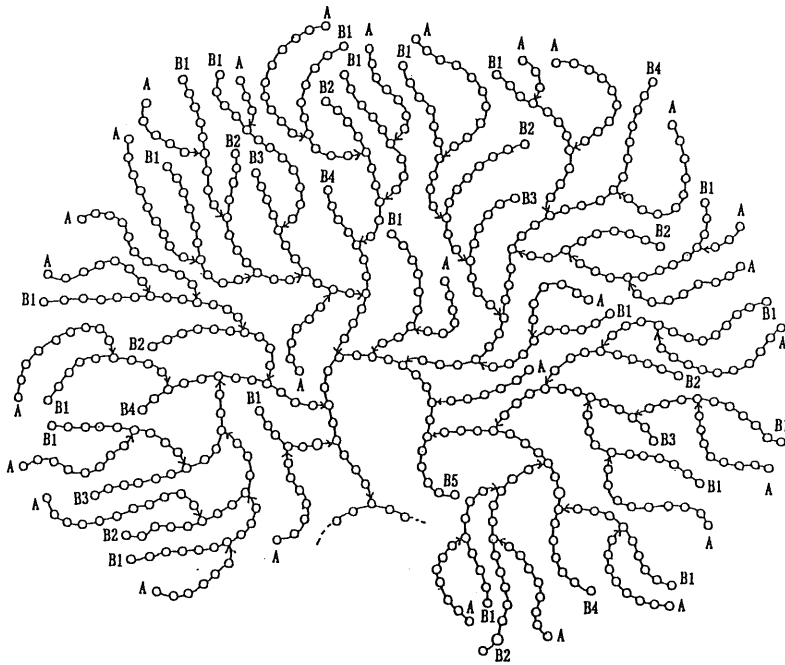


Fig. 1. A hypothetical molecular model for oyster glycogen.
○, glucose; —, α -(1→4) linkage; →, α -(1→6) linkage

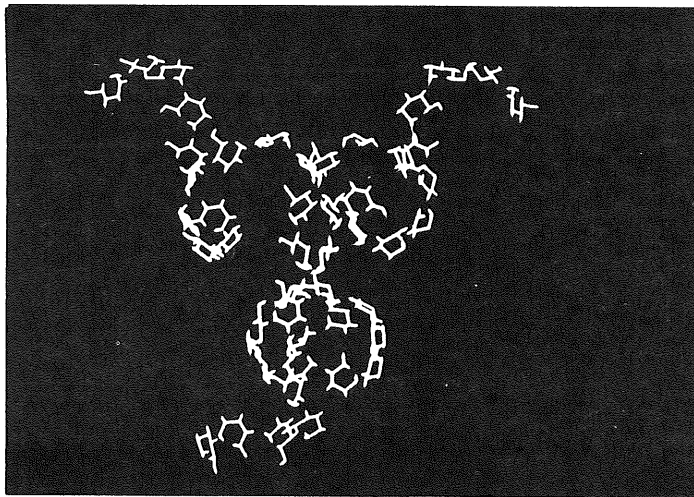


Fig. 2. A computerized three-dimensional model of a segment of oyster glycogen.

で得られたグリコーゲンの構造の内層部には比較的長い糖鎖 (tire) (DP30) が存在する可能性が示唆されている。本研究ではさらに、プルナーゼがグリコーゲン分子を最外層の分岐を優先的に切断するという作用特異性²⁾を利用して逐次的にカキグリコーゲンの糖鎖の peeling を行い、各段階での鎖長分布

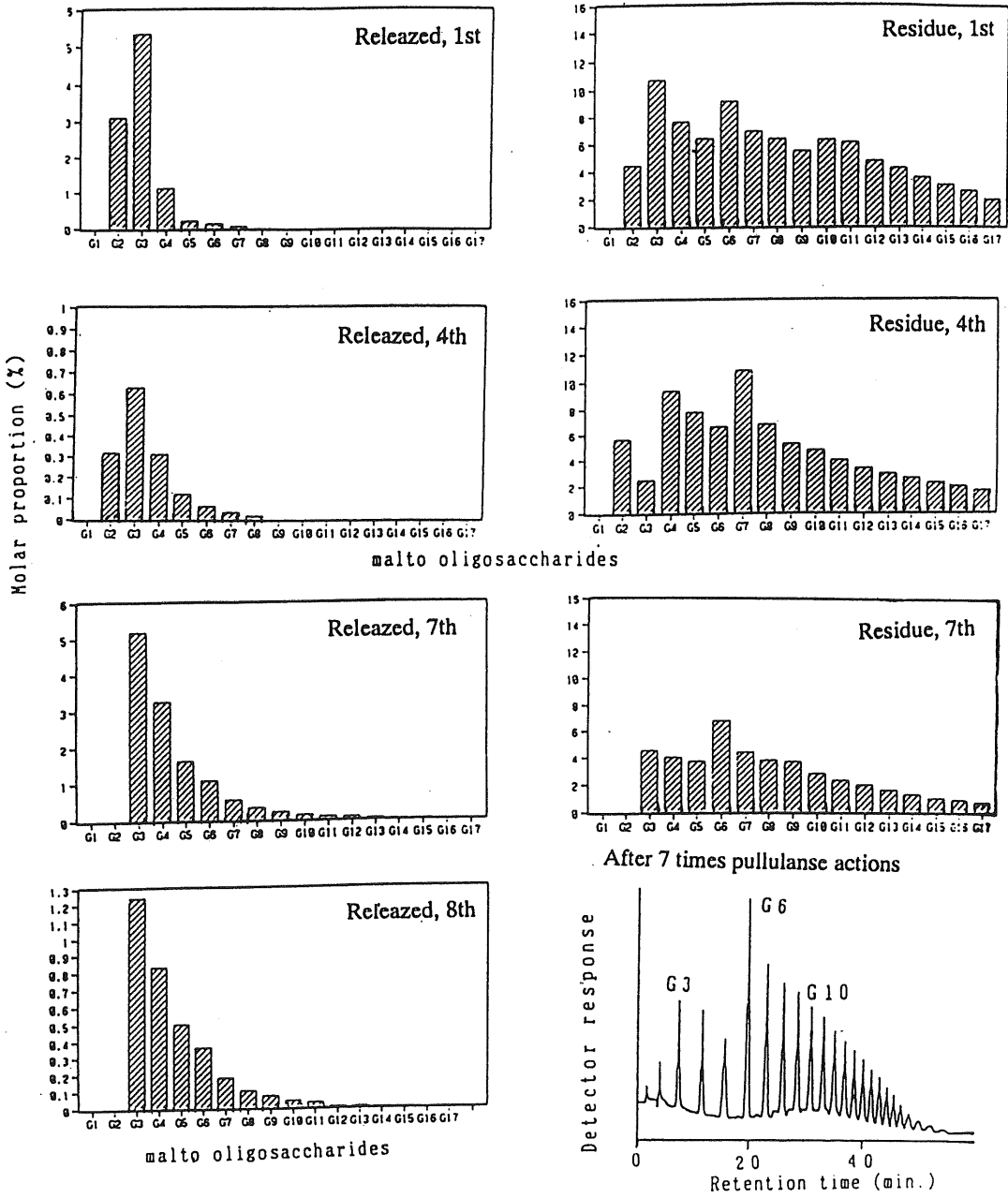


Fig. 3. Successive treatments of oyster glycogen with pullulanase.

はイソアミラーゼによる完全分岐切断と精密な HPAEC を組み合わせて測定し、球状分子中での分岐の密集状態についてより詳細な知見を得ようとした。

カキグリコーゲンを逐次、外層部の分岐点のみを切断する条件下でプルランナーゼを作用させ（皮剥きのトリミング； peeling）各 step で遊離してきたオリゴ糖（PAS）と、残った高分子（デキストリン；

PAP) をイソアミラーゼで枝切り後 molar base^{6),7)} で補正した α -(1→4) unit 鎖の分布を Fig. 3 に示した。各段階での分子量の変化は、Native なグリコーゲンの平均分子量 8.5×10^5 から、4 回の peeling 後 5×10^5 、6 回では 1×10^5 と小さくなった。収率はプルラーゼ作用 1 回目 PAP 1 で 90%、PAP 2 で 85%、PAP 3 で 80%、PAP 4 で 78%、PAP 5 で 74%、PAP 6 で 56%、PAP 7 で 47%、PAP 8 で 40% であった。初期の反応で遊離してくる糖は短鎖のオリゴ糖が多い事から、カキグリコーゲンの外層部には短鎖が密に分布していることが示唆された。さらに、段階的な分解後の鎖長分布の結果からは、中層部における鎖は長鎖に移行することが示唆された。

消化酵素によるグリコーゲンの分解

グリコーゲンはアミロペクチンに比べて多重分岐構造のために、消化膜の終末酵素による分解は遅いことが予想され、ある意味では、難消化性多糖としての機能を考えても良いのではないかと考えられる。これまでに、ヒト唾液、豚膵液、ラット消化膜アセトンパウダーで消化性を調べた⁸⁾。今回ヒトの膵液アミラーゼが得られたので、カキグリコーゲンをこの消化酵素で分解し、HPAEC により種々のオリゴ糖を分離分析した結果を Fig. 4 に示した。 6^3 - α グルコシルマルトトリオース (B₄)、 6^3 - α グルコシルマルトテトラオース ("fast" B₅)、 6^3 - α マルトシルマルトトリオース ("slow" B₅)、 6^3 - α マルトシルマルトテトラオース ("fast" B₆)、 6^3 - α マルトシルマルトテトラオース ("2on4" B₆)、 6^3 - α マルトトリオシルマルトトリオース ("pullulan" B₆)、 6^3 - α マルトトリオシルマルトテトラオース ("3on4" B₇) などの α -1,6

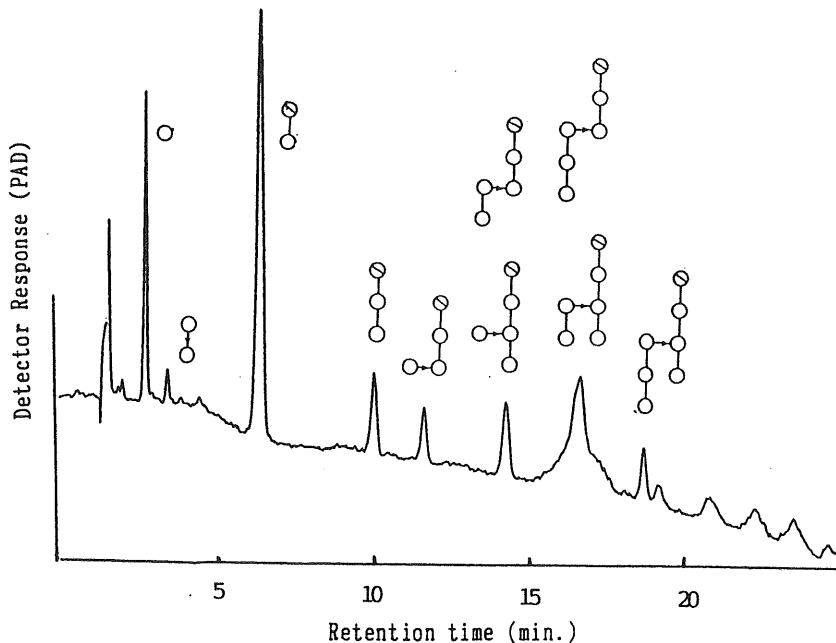


Fig. 4. HPAEC profile of human pancreatic amylase digestion products of oyster glycogen.

○, glucose; —, (1→4) linkage; →, α -(1→6) linkage

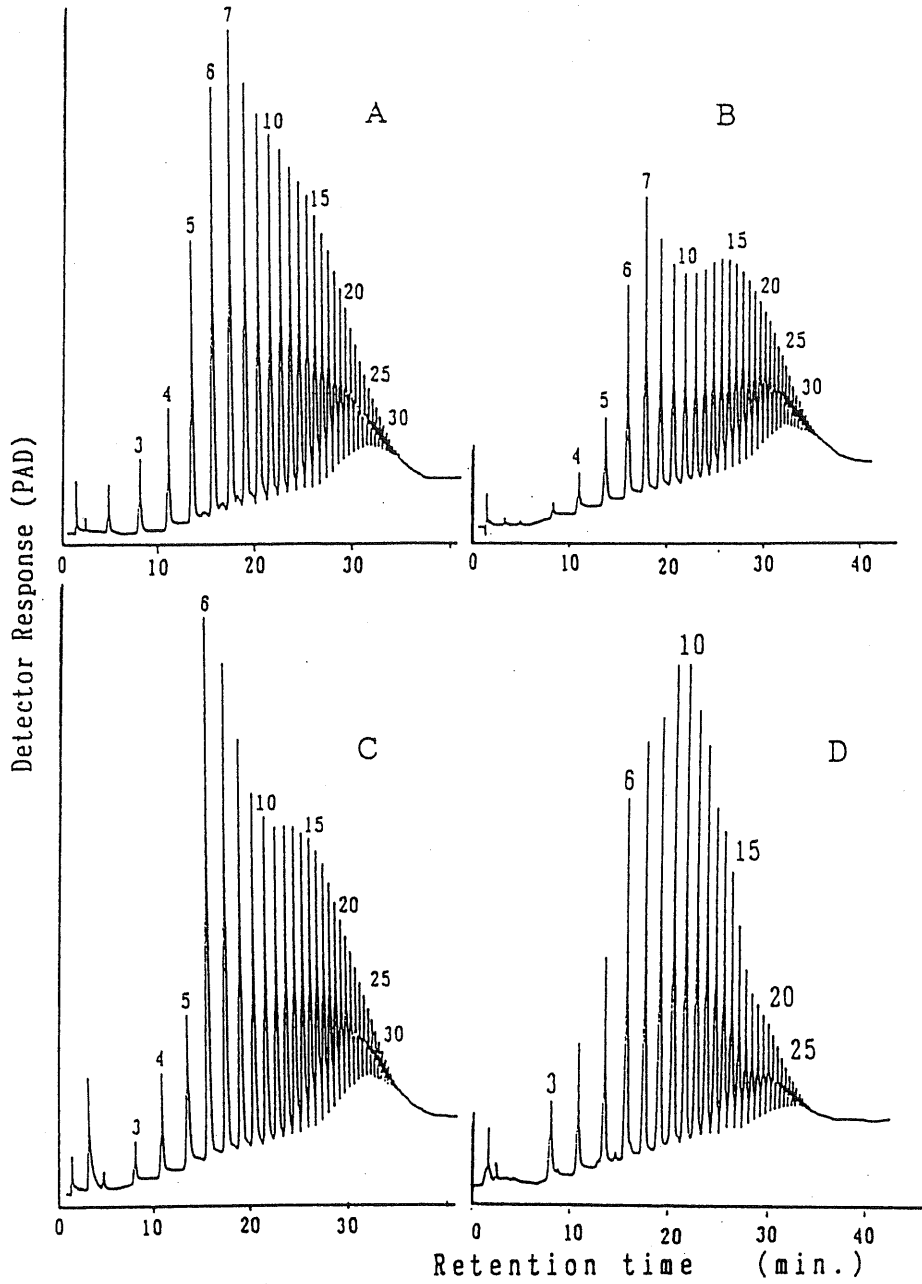


Fig. 5. HPAEC profiles of unit chain distributions of some glycogens.

A, bovine liver; B, rabbit liver; C, *A.fumigatus*; D, phytglycogen.

The number on each peak indicates its DP.

Chromatographic conditions: column, Carbo Pac PA-1 (250×4 mm i.d.) ; eluant A, 150mM sodium hydroxide solution; eluant B, 150mM sodium hydroxide solution containing 1M sodium acetate; gradient program, 95% eluant A (5% eluantB) at 0 min. 55% eluant A (45% eluantB) at 40 min.; flow rate, 1 ml/min.

結合を1つ含む重合度4~7のオリゴ糖⁹⁾ (single branched oligosaccharide) を主とし α -1,6結合を2つ以上含む重合度8以上の多分岐オリゴ糖 (multiple branched oligosaccharide) も生成され、前回の結果を再確認した。

種々の生物種のグリコーゲンの鎖長分布

起源の異なるグリコーゲン¹⁰⁾ の α - (1 \rightarrow 4) unit 鎖の分布を Fig. 5 に示した。牛の肝臓グリコーゲン (平均鎖長 (CL); 11)、ウサギの肝臓グリコーゲン (CL; 13)、*Asp. fumigatus* のグリコーゲン⁴⁾ (CL: 8)、植物由来としてスイートコーンのフィトグリコーゲン (CL; 11) はともに重合度3から30にオリゴ糖の分布が見られたが、それぞれのプロファイルが若干異なっていた。また、それぞれのグリコーゲンにカキグリコーゲンの場合と同様にしてプルラーゼを1回作用させた結果を比較した結果、短鎖が先に遊離して来ることからこれらのグリコーゲンの外層部はやはり短鎖が密に分布していることが示唆された。しかし、植物由来のフィトグリコーゲンの場合は遊離したオリゴ糖の平均鎖長 (CL) は9で、グリコーゲンとは異なりむしろ鎖長の短いアミロペクチンタイプであると考えられさらに検討を有する。

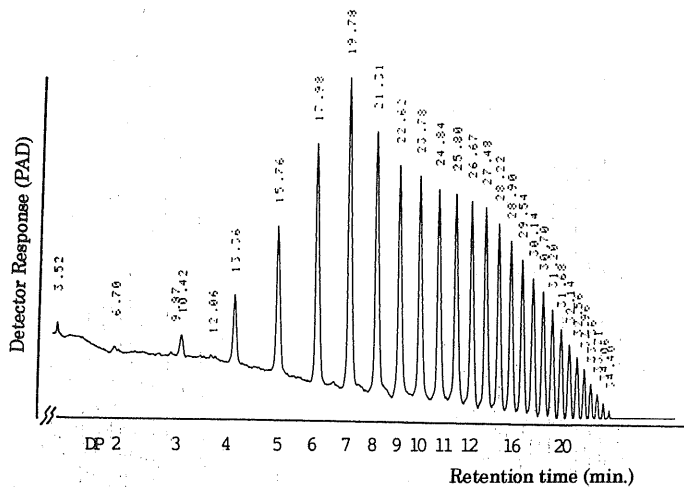


Fig. 6. α - (1 \rightarrow 4) unit chain distribution in rat liver glycogen (normal).

一方、ヒトにおけるグリコーゲン蓄積症は、酵素的・臨床的知見によりI~VI型に分類されているが、何れも特定の分解酵素の欠損によることが知られている。我々は新しいグリコーゲン構造解析法がこれらのグリコーゲン蓄積症患者のグリコーゲンの正確な化学構造と、欠損酵素を特定する新しい方法として提供されるか否かを検討しようとした。ここではその一例についての結果を記述した。まず、健康人の肝臓グリコーゲンの代わりに、ラット肝臓から分離したグリコーゲンの α - (1 \rightarrow 4) unit 鎖の分布を Fig. 6 に示した。重合度2~30と広い分布が見られた。次に、グリコーゲン蓄積症 (GSD III) の患者の肝臓より抽出したグリコーゲンの α - (1 \rightarrow 4) unit 鎖の分布を Fig. 7 に示した。マルトテトラオースの割

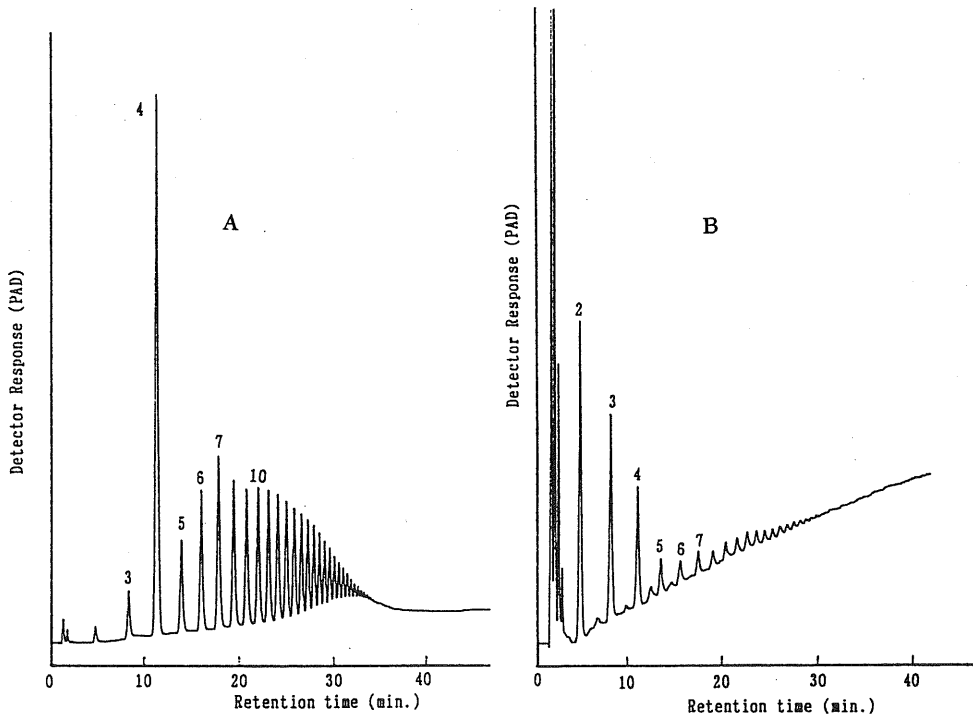


Fig. 7. Unit chain distributions human liver glycogen of A glycogen storage disease (type III) and B with lung cancer.

合が異常に高く ϕ 限界デキストリンの構造であった。GSD IIIはグリコーゲン代謝に關与する酵素の先天的な障害によるグリコーゲンの異常症で、グリコーゲンの異常蓄積や構造的異常をきたす疾患である。通常肝臓中のグリコーゲンは全重量の6%と言われているが、GSD IIIの肝臓から抽出したグリコーゲンの収率は12.5%であった。グリコーゲンの分解は、ホスホリラーゼが α -1,6結合の分岐点からグルコース4分子を残したところまで外側の分子を分解する(ϕ 限界デキストリン)。この後、1,4-グルカントランスフェラーゼで分岐点から3つのグルコースをはずし別のグルコース鎖に転移され、分岐点に α -1,6結合のグルコースを1つだけ残す。次に、アミロ-1,6-グルコシダーゼにより α -1,6結合のグルコースを加水分解し分岐を切断し、更にグリコーゲン分解が進行するが、このGSD IIIでは、アミロ-1,6-グルコシダーゼの欠損により、 ϕ 限界デキストリンが蓄積したことを明確にすることが出来た。一方、肺ガン末期患者の肝臓グリコーゲンではFig. 7に示すように α -(1 \rightarrow 4) unit鎖の分布では、非常に短い鎖がほとんどで、収率が0.34%と少なくグリコーゲンがほとんど使い果たされ、coreに近い構造のものが残っていると推定された。なお、これらのグリコーゲンにも他のグリコーゲンと同様に重合度30以上の長い α -(1 \rightarrow 4) unit鎖もわずかであるが存在していた。このことは、グリコーゲンの多重分岐鎖は内層部の比較的長い糖鎖(tire)の分岐点から成長する可能性を考えさせるものである。

文 献

1. Matsui, M., M. Kakuta and A. Misaki (1996) *Carbohydr. Polym.*, 31 : 227.
2. Akai, H., K. Yokobayashi, A. Misaki and T. Harada (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 237 : 422.
3. 松井元子, 角田万里子, 三崎 旭 (1991) 微量栄養素研究, 8 : 105.
4. Azuma, H., H. Kimura, F. Hirano, E. Tsubura, Y. Yamamura and A. Misaki (1971) *Japan. J. Microbiol.*, 15 : 237.
5. 三崎 旭, 松井元子 (1994) 微量栄養素研究, 11 : 1.
6. Koizumi, K., Y. Kubota, T. Tanimoto and Y. Okada (1989) *J. Chromatogr.*, 454 : 303.
7. Koizumi, K., Y. Kubota, T. Tanimoto and Y. Okada (1989) *J. Chromatogr.*, 455 : 365.
8. 松井元子, 角田万里子, 三崎 旭 (1992) 微量栄養素研究, 9 : 1.
9. Kainuma, K. and D. French (1970) *FEBS Lett.*, 6 : 182.
10. Matsui, M., Kakuta and A. Misaki (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 623.