

β -グルカンの(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコ-ス比の定量方法

(理学研究科技術部) 土居幹嗣、(理学研究科高分子科学専攻) 奥田 寛、上山憲一

mdoi@tech.sci.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

技術部は、大阪大学理学研究科の中で学生や教員の教育・研究を支援するだけでなく、大学法人化に伴い社会に開かれた活動をする技術部を目指して日夜努力している。その一環で技術部分析室が一年前から行ってきた固体核磁気共鳴装置(NMR)を使った一般社会に対する活動を紹介したい。

話は、突然、技術部の分析室のホームページを見た東京築地の水産会社からのメールが入り、始まった。酵母の細胞壁を原料としたサプリメントの糖部分の架橋構造を固体NMRで検出できないかということが質問の内容であった。糖の固体NMRの論文は多く報じられているが、架橋を定量した報告例はない。過去にポリエチレンの架橋に固体NMRが使われてきた例がある。そこで、試しにと送られてきた試料を測定してみると、糖の架橋部と直鎖部とが一見容易に識別できることが判明した。これは短期で解決する課題と思われる、安易に測定条件を吟味しながら進めていた。しかし、これが後に事務室に指摘される国立大学独立法人としての規約に抵触し、迷惑を掛けることとなった。簡単な測定依頼が研究の深みに嵌ってしまった苦い例である。実は糖の架橋部と直鎖部を容易に識別できたのであるが、糖の定量が研究課題になってしまうほど困難な分析であったグルカンは、グルコースを構成単位とする多糖類であり、グルカンの1種である β -グルカンは、免疫賦活活性や抗腫瘍活性等の種々の生理活性を有していることが知られている。なかでも、一部が β -(1,6)で分岐した β -(1,3)-グルカンは、優れた生理活性を有していることが知られており、健康食品や医薬等の有効成分として注目を浴びている。

β -(1,6)で分岐した β -(1,3)-グルカンは、パン酵母やキノコ類等から抽出することのできる天然に存在する多糖類であり、図1に示すように β -(1,3)グリコシド結合したグルコースを単位とする主鎖と、 β -(1,6)グリコシド結合によって主鎖に結合する分岐鎖とからなる。直鎖状の β -(1,3)-グルカンや β -(1,6)

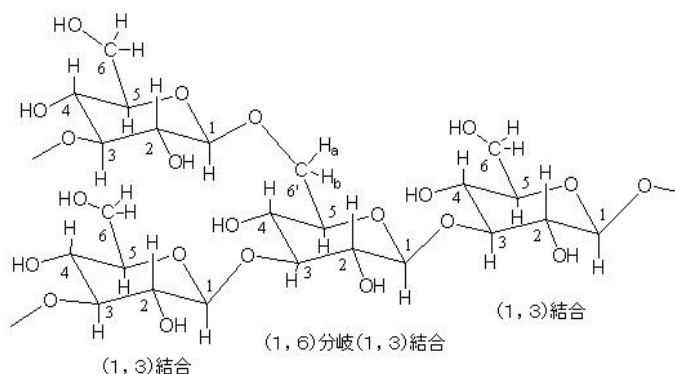


図1. β -(1,6)で分岐した β -(1,3)-グルカン.

-グルカンは水に可溶であるが、 β -(1,6)で分岐した架橋 β -(1,3)-グルカンは3次元的に広がった架橋構造を有しており、一般的に、水やジメチルスルホキシド、その他の溶媒に不溶である。

β -(1,6)で分岐した β -(1,3)-グルカンを健康食品や医薬に使う場合、 β -グルカンとしての純度や β -(1,6)で分岐した β -(1,3)-グルカンの(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比を決定することは非常に重要である。この比が架橋の程度を決め、製品の安全性や効能に非常に大きな影響を与え得るためである。

2. 従来の糖の分岐の分析法

これまで一般的なグルカンの構造は、化学分解した後に、GS/MS（ガスクロ-マススペクトラム）による分析方法が用いられている。または、架橋グルカンについては、 β -グルカンの純度のみならず β -(1,6)で分岐した β -(1,3)-グルカンの(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比を決定する方法として、結合位置に特異的に働き、結合を切断する酵素を用いて、切断された可溶性の単一糖鎖を吸収スペクトルで分析する方法や蛍光標識した物質と複合体をつくらせて分析する方法も使われている。^{1, 2)}すでに、上記のようにして切断された可溶性の単一糖鎖を溶液NMR法により分析する方法も報告されている。³⁾ 溶媒に溶解させた β -(1,6)分岐した β -(1,3)-グルカンについて、溶液NMR測定を行なった例はあるものの、³⁾ このNMR測定データに基づいて(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比を決定した例はない。これらの方法はいずれも β -グルカンを切断するという前処理を必要とし、操作が非常に煩雑であるという問題がある。また、分析に非常に長い時間を要するという難点もある。

3. 固体NMR装置を使った分析法の開発

これらの問題を解決するために、比較的短時間で、測定試料に前処理を施さなくても非破壊的に、 β -グルカンの(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比を定量する方法として固体NMR装置を使う方法を開発した。残念ながら分岐 β -(1,6)の ^{13}C シグナルは独立した位置には現れない。そこで、独立して観測される直鎖 β -(1,3)の側鎖 ^{13}C シグナルの減少度によって定量することにした。

具体的には、試料に含まれる β -グルカンの(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比を定量する方法を採用し、架橋試料の固体 ^{13}C -CP/MAS NMRスペクトルを測定し、グルコースのC-1炭素ピークの積分強度Aと、(1,3)結合グルコースのC-6炭素ピークの積分強度Bとの間の積分強度比A/Bを算出し、100%の(1,3)グルコース結合をもつ基準試料の積分強度比A₀/B₀の算出値で補正する。これにより精度の高い(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比を求めることができた。このような間接的な補正が必要な理由は、不均一なプロトン照射による ^{13}C シグナルの強度低下が起きることによるが、装置を含め、試料管のサイ

ズを同一にしてもパルスディレイ時間 (PDT) およびコンタクト時間 (CT) などに左右されることがわかってきたからである。さらに糖の2次構造や3次構造で ^{13}C シグナルが異方性による化学シフトや水素結合によるシフトで複雑になりこれらを配慮した条件で測定することも必要であることがわかった。そこで適当な基準試料を選び、種々の条件下での ^{13}C シグナルの強度を基準にして補正值を得る。基準試料の補正值 A_0/B_0 と測定したいグルカン試料の積分強度比 A/B と(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比と結びつける下の関係式に当てはめることにより、(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比を求めた。

関係式は

$$(1,6)\text{結合グルコース}/(1,3)\text{結合グルコース比} = (A/B) \times (B_0/A_0) - 1$$

である。

4. 使用した固体NMR装置とサンプルの調製

固体 ^{13}C -NMRの測定のために、理学研究科内に設置されているChemagnetics社製JNM-CMX-300装置を使用した。この装置の ^{13}C 共鳴周波数は75 MHzになる。試料管直径は4 mm ϕ あるいは7.5 mm ϕ 、測定温度は30、スキャン回数は256回、PD時間は15 s、コンタクト時間を1.0 msの条件で測定した。図2にこの装置の写真を示す。また、比較のために、他の装置、例えば日本電子株式会社製JMN-ECA-920 (^{13}C 共鳴周波数は231.510 MHz) を使用したが、ピーク分離はやや良くなるものの波形分離による定量のためにはそれほど改善されない結果が得られた。



図2. Chemagnetics社製JNM-CMX-300W装置。

この固体 ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル測定のために使われた測定モードは、 ^{13}C -CP/MAS (Cross Polarization) 法およびDP/MAS (Direct Polarization on ^{13}C with ^1H Decouple) 法であり、前者ではPD値およびCT値の最適を見出し、後者では現れるシグナルの T_1 値の長いものの6倍程度、すなわち100 sで測定し、試料および基準物質を同一条件で測定した。

パン酵母菌の細胞壁をそのまま測定試料管に詰め、水を含ませて2次構造および3次構造を崩して、(1,6)結合グルコースおよび(1,3)結合グルコースから構成される β -グルカンのそれぞれの特徴的なシグナルを観測した。これにより、試料に含まれる β -グルカンの(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比を、比較的短時間で、従来の化学的あるいは酵素分解法に比べて正確に定量することができる。従来のよう試料を化学的な前処理を施す複雑

さはなく、分岐して溶媒に溶けない試料でも固体状態のまま直接測定できるため、固体試料の本来の状態を忠実に反映した定量値を得ることができるとわかった。

5. 酵母細胞壁の固体 ^{13}C -NMRスペクトルの測定

測定モードとして、固体 ^{13}C -CP/MAS法と固体DP/MAS法の2法を併用した。 ^{13}C -CP/MAS法による測定では、グルコースの炭素ピークのシグナル強度が向上し、短時間で測定値が得られる利点があるが、構造的に堅い部分と柔らかい部分でシグナル強度が異なる。そのためコンタクト時間の最適条件を求め、その条件で常に対象資料の面積強度を基準物質の積分強度で補正し、同一プロトン照射条件と試料管サイズの条件を満たしたのち、純度を算出する必要がある。一方、固体DP/MAS法では感度が悪く、シグナル/ノイズが大きいために長時間の積算が必要であるが、補正因子は1に近く、そのままの積分強度比が使えるはずであるが、実際にはT1の長い部分に合わせた測定では、プロトン照射が十分で無い場合があり、T1の短い部分のシグナル強度は低下するためにこの場合にも補正值を使う必要がある。

試料を入れる試料管の直径は、3.2 mmφ、4 mmφ、5 mmφまたは7.5 mmφのものを使用することができるが、データの積算時間の短縮には直径の大きいもの程良い。しかし、装置によってはプロトン照射が均一ではなくなり、補正值は1からずれる。また試料管の回転速度は、できる限り高いことが好ましいが、現有装置では直径5 mmの試料管を用いた場合、5~10 kHzの回転速度である。また、CP/MAS測定では外部磁場に対して試料管をマジック角 (54.7°) で回転させる必要があり、この調整にも技術を要する。

化学シフトの外部標準物質としては、固体NMR装置において通常用いられているものとしてテトラキス (トリメチルシリル) シラン (TTMSS) を使うことが多く、TMS (テトラメチルシラン) スケールに換算すると0.2 ppmに現れる。

固体 ^{13}C -CP/MAS-NMRにおいて、試料分子の官能基の部分で堅い部分と柔らかい部分との間でシグナル強度が異なることがわかった。これはプロトン照射が不均一なときには著しく異なるためであり、グルカンでは糖の環構造内のC-1炭素と側鎖に存在するC-6は緩和時間が異なり、C-1シグナルは強く、C-6シグナルは弱く現れる。また、C-1とC-6のシグナル比が装置に依存する値であることから、構造の明確な100%の(1,3)結合グルコースを基準物質として使い、このシグナル比を補正してより精度の高い(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比を求める必要がでてきた。

6. 定量精度を上げるための基準物質

基準物質として、100% β -(1,3)結合グルコースであり、直鎖状で水可溶なカードランを選び、溶液 ^{13}C および ^1H -NMRで β -(1,3)結合グルコースの固体状態での特徴的なシグナルを確認した。このカードランは武田薬品製の純粋に近いものであるが、もともと大阪大学

産業科学研究所教授の原田篤也先生が発見されたもので、大阪大学には縁の深い糖物質である。水溶液中の ^{13}C シグナルは固体の場合とほとんど同じ化学シフトを示し、C-1は104.1 ppm、C-3は87.3 ppm、C-5は77.9 ppm、C-2は74.9 ppm、C-4は68.7 ppm、C-6は61.5 ppmに現れる。また、溶液C-H/MQC-2D-NMRスペクトルを測定することにより、従来カードランの ^{13}C シグナルのシフト値から経験的に帰属されていた ^{13}C シグナルがすべて論理的に帰属できた。図3にカードランの固体 ^{13}C -CP/MASスペクトルとそのシグナルをNMR解析ソフトDeltaにより得られた波形分離結果を示す。シグナル強度は測定条件のPD時間（2 s～16 s）に対してほとんど変化はないが、コンタクト時間に対しては図4のように大きく変化する。このC-1シグナル A_0 とC-6シグナル B_0 の比 A_0/B_0 が1 msで最大であることから、この条件における $A_0/B_0=1.1$ を補正因子として得た。

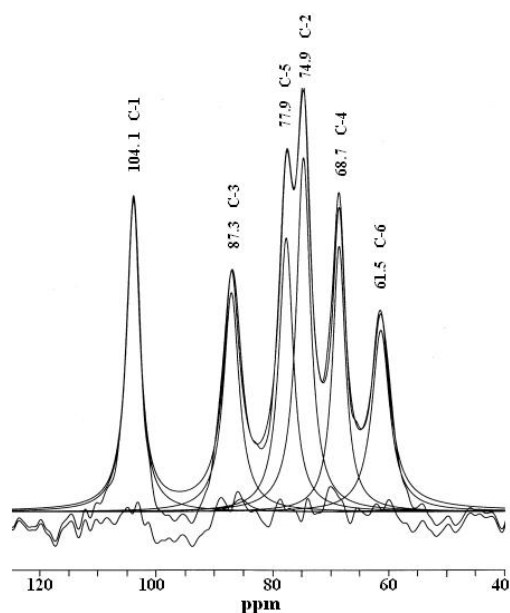


図3. カードランの固体 ^{13}C -CP/MAS-NMRスペクトル（PD=15 s, コンタクト時間=1.0 ms）と波形分離による面積強度の解析.

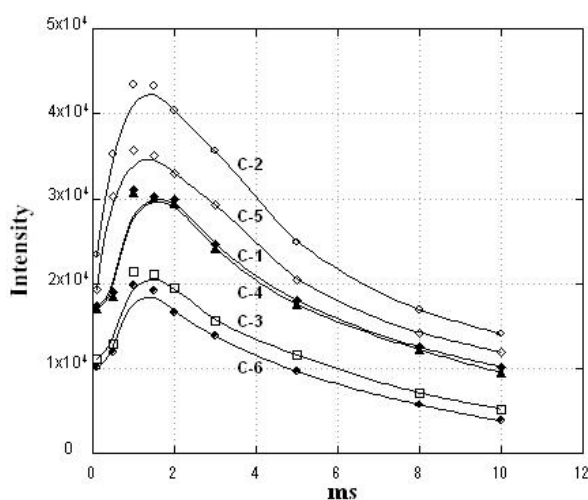


図4. 固体 ^{13}C -CP/MAS-NMRスペクトルにおけるコンタクト時間とシグナル強度との関係.

7. パン酵母細胞壁の(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース含有比の分析

パン酵母細胞壁の β -グルカン部分の ^{13}C -CP/MAS-NMRスペクトルの具体例を示す。水に不溶である試料はNMR測定にあたり前処理はなされておらず、そのままの乾燥した状態と湿気を含んだ状態で測定した。混入している脂質の ^{13}C シグナルはDP/MAS法では観測されるがCP/MAS法では観測されない。また、タンパク質の ^{13}C シグナルも糖部分の ^{13}C シグナル領域（50 ppmから125 ppm）から離れているために、スペクトルの解析より定量分析できる。図5は、一部 β -(1,6)で分岐した β -(1,3)-グルカンを含むパン酵母菌の細胞壁の ^{13}C -CP/MAS-NMRスペクトルの一例である。(1,3)グルカン部のC-6シグナルは61.6 ppm

に現れる。ただし、100% β -(1,3)グルカンであり分岐のないパスツランの ^{13}C -CP/MAS-NMRスペクトルを参考にすると、分岐した(1,6)グルカン部のC-6は70.2 ppmに現れていると考える。また、いずれのC-1も104.0 ppmに現れるC-3シグナルは87.5 ppmと85.2 ppmに重なって現れ、C-5およびC-2は76.9 ppmと74.1 ppmにそれぞれ現れる。またC-4は68.8 ppmに現れる。これらの化学シフト値を基にしてシグナルを合成し、波形分離法によりC-1とC-6の積分強度比から $A=1.0$ 、 $B=0.9$ が得られた (C T時間, 1 ms; 待ち時間, 5s)。これに A_0/B_0 の補正因子を掛けて、(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比は0.10になり、アノマー部分の β -(1,3)-グルカンの純度は90%になる。

なお、試料が含有する水分量に依存して、分離能は幾分変化するが、スペクトルのプロファイル自体に変化はほとんどなく、(1,6)結合グルコース/(1,3)結合グルコース比の定量性に影響はない。

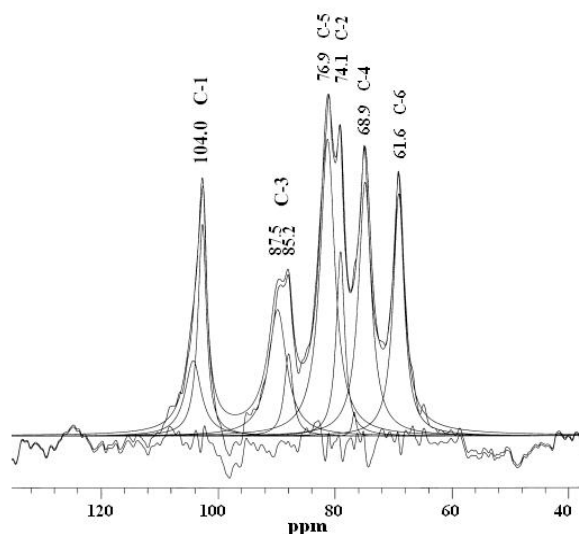


図5. β -D-(1,6)分岐した β -D-(1,3)-グルカンを含むノールウエ産パン酵母菌の細胞壁の ^{13}C -CP/MAS-NMRスペクトル。

8. まとめ

以上のように糖そのものの構造的な特徴のためにプロトン照射が完全ではなく、機械的な要因のみならず、糖の3次元構造を壊す条件下でカードラン基準物質と比較することが最も良いことがわかった。この定量法は一部 β -(1,6)で分岐した β -(1,3)-グルカンを含むパン酵母菌の細胞壁の分岐の程度を決定する初めての方法ではあるために⁴⁾ N水産会社と共に特許を共同出願した。もちろん、この分析の前段階では固体試料のまま脂質やタンパク質含量の決定もできるため、この有用性も糖の分析に役立つものと考えている。

9. 謝辞

本研究は中島水産（株）との共同研究であり、謝意を表します。

参考文献

- 1) B. V. McCleary, R. Codd, *J. Sci. Food Agric*-55, 303–312 (1991).
- 2) M. Iza wa, *US Patent* 6,008,054 (2000).
- 3) Y. -T. Kim, E. -H. Kim, C. Cheong, D. L. Williams, C. -W. Kim, S. -T. Lim, *Carbohydr. Res.* 328, 331–341 (2000).
- 4) 土居、奥田、上山、井上、児玉；特許（2006）.