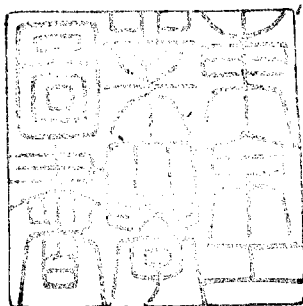


論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ノロゲンゲ体表面粘性物質に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	橋本弘信
Author(English)	HIRONOBU HASHIMOTO
出典(和文)	学位:理学博士, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第321号, 授与年月日:1969年9月24日, 学位の種別:課程博士, 審査員:吉村寿次
Citation(English)	Degree:Doctor of Science, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第321号, Conferred date:1969/9/24, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

ノロゲンゲ体表面粘性物質に関する研究



目次

序論

1.

第一章 1,2-ジアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースの合成および
卵白アルブミン中の糖とアミノ酸の結合様式に関する研究 6

緒言 6.

第一節 1-アミリアシルアミノ-2-アセチルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-
グルコピラノースの合成 8.

第二節 1-アセチルアミノ-2-アミリアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-
グルコピラノースの合成 12

第三節 卵白アルブミンより得られるグルコサミン-アスパラギン酸結合物
と合成物との比較検討 16

実験の部 21

結論 25

第二章 脱離反応による多糖の部分加水分解に関する研究

緒言 26

第一節 メチルグルコシドのO-メチル誘導体および3-O-(2,3,4,6'-
テトラ-O-アセチル-β-D-グルコピラニル)-2-O-メチルグリセリン酸
メチルエステルの合成 29

第二節 β-脱離反応の検討 35

実験の部 46.

結論 56

第三章 ノロゲンゲ"体表面粘性物質に関する研究

総 言

57

第一節

ノロゲンゲ"体表面粘性物質の単離および精製

59

第二節

プロナーゼ処理粘性物質の精製とその組成

66

実験の部

76

結 論

83

序 論

多糖類は広く自然界に分布しており、その機能にはセルロース、キチンに見られるように皮膜、支柱をつくる構造成分としての機能と澱粉、グリコーゲンに見られるように必要に応じて酵素的に分解されエネルギー源として用いる栄養成分としての機能があるが、生体内に種々の複合体として存在するオリゴ糖および多糖はより複雑な機能を有している。これらの中には、発熱性多糖類、血漿型多糖類などのように多くの細菌の免疫学的特異性の決定に重要な役割を演じているものもある。これらはいずれも生体内では蛋白質、脂質と結合して存在することが多く、中でも糖たんぱくと呼ばれる糖とたんぱく質の共有結合物は、近年その生理作用が注目され、動物のあらゆる組織、細胞中に見い出され、その糖とたんぱく質の結合部位を中心と構造も徐々に明らかになりつつある。糖たんぱくを構成するペプチドのアミノ酸組成は単純たんぱくとあまり変わらないが、糖としては例外なくグルコサミン、ガラクトサミンを主とするアミノ糖が含まれ、他にマンノース、ガラクトースなどの中性糖、それにシアル酸、ムラミン酸が見い出されている。糖とたんぱくの結合様式としては、グルコサミンの還元基とアスパラギンがアミド結合しているN配糖体結合と、セリンまたはスレオニンの水酸基と糖（ほとんどN-アセチルヘキソサミン）の配糖体結合とが知られている。このように多くの糖たんぱくに於いて、糖とたんぱく部分の結合にはグルコサミンが関与していることが知られているが、着者の研究室では糖たんぱくに於ける糖とたんぱく部分の結合様式と安定性を調らべる目的で、グルコサミンの種々の位置にエステルまたはアミド結合した化合物を合成し、その性質を検討してきた。着者はその一環として1,2-ジアシルアミノ-D-グルコースを合成し、卵白アルブミン中より単離したアスパラギン酸-グルコサミン化合物と比較し、その構造を明らかにしたが、これについては一章に述べる。

糖たんぱくは広義のムコ多糖の一つであるが、動物界を通じてムコ多糖で代表される粘性物質の作用については、生体機能の円滑化、外界環境に対する保護作用などが考えられるが、Dorfmanは更に詳しくムコ多糖の機能として ① 高分子アニオンの性質を利用してカチオンの交換および制御 ② 陰荷電の反発現象を利用する細菌の防御、③ たんぱく質とくにコラーゲン線維の生合成の調節 ④ 脂助血浄化作用などをあげている。

一般に動物の上皮粘性分泌物は中性ムコ多糖に属し、魚類の体表面粘性物質も類似のものと考えられる。近年その生理作用など興味もたれ、アミノ酸、糖などの化学組成を中心に研究が行われており、その詳細についてはオ三章緒言にゆずるが、現在まで含まれている糖たんぱくの糖とたんぱく部分の結合様式、糖の構造(いずれも明らかになっていない)。

ムコ多糖が生化学的および病理学的に生体に深い関係をもつ理由は、その構造上からくる特殊機能によるものと考えられる。すなわちムコ多糖、とくに酸性ムコ多糖は低分子のたんぱくに匹敵する程度の大きさであり、その生成はたんぱくの生成と関係が深く、アミノ酸連鎖上の特定のアミノ酸を基点として、多糖の連鎖が合成されていく。たんぱくや脂質が内部構造物とすれば、ムコ多糖は表面上の作用単位であり、触手であるとも考えられる。すなわち、たんぱく分子から線状に突出するムコ多糖連鎖はたんぱくの“active hand”的な役割をしていると考えられる。化学的物質の生細胞に対する影響、すなわち、薬理作用は細胞の膜表面に対する作用である場合が多いが、その場合にもムコ多糖の active hand が重要な機能を果たすと思われる。上に述べたようにムコ多糖の生理学的作用は多糖、オリゴ糖部分の構造に文に直接関係すると思われるが、着着は深水性の魚であるゲンゲの体表面粘性物質の糖と蛋白質部分の結合様式および糖部分の構造に興味をもち、研究を行なっているがオ三章でこのことについて述べる。

一方、多糖類の構造研究はもう一つの重要な生体高分子であるたんぱく質のそれと比べて遅れているが、多糖類の一次構造の解明には次の諸問題が

解決されねばならない。

1) 構成単糖の種類とモル比

2) 構成単糖間の結合位置, 例えば"ピラノースかフラノースか, α か β か, どの位置に結合しているかなど"

3) 構成単糖の配列順序

1)の問題に関しては, 多糖類を酸性条件で加水分解し, 生じる単糖類の分離定量法が近年発展し, 従来のペーパークロマトグラフィーなどより容易かつ迅速に行われるようになった。すなわち, すでに分離, 定量装置も市販されているイオン交換樹脂による方法と, 単糖類を適当な誘導体にしてガスクロマトグラフィーによる方法でいずれも最近よく用いられている。

2)の問題に関しては古くから Haworth のメチル化法が用いられている。これは多糖類の遊離の水酸基をジメチル硫酸, ヨウ化メチルなどで徹底的にメチル化した後, 加水分解し生成する単糖の O-メチル誘導体をカラムクロマトグラフィー, ガスクロマトグラフィーなどで分離定量する方法である。生成したメチル糖中の遊離の水酸基が結合に関与していたことがわかる。従って各構成単糖の種々の部分 O-メチル誘導体を分離定量できればある構成単糖の結合位置の比率を知ることができる。近年, メチル化多糖をメタノリシスし, 生じるメチルグリコシド誘導体混合物を直接ガスクロマトグラフィーで分離, 定量する方法も行なわれるようになった。また Haworth 法の補助手段として多糖類の過ヨウ素酸酸化を用いる Smith 分解と Barry 分解がある。過ヨウ素酸は α -グリコールの炭素-炭素結合を断裂させるので, 多糖類を過ヨウ素酸酸化することにより多くの構造に関する知見が得られる。例えば, 構成単糖がヘキソピラノースの場合, その向の結合が 1-3 結合の場合には過ヨウ素酸は消費されないが, 1 \rightarrow 2 または 1 \rightarrow 4 結合の場合は単糖/モルあたり 1モル消費し, ジアルデヒドを生成する。Smith 分解は過ヨウ素酸酸化した多糖と還元後加水分解して生じたグリコールアルデヒド, グリセリン, エリスリトール, グリセリンアルデヒドなど

を分離、定量し、多糖中の結合の種類を比知する方法である。過ヨウ素酸酸化した多糖をフェニルヒドラジンで処理し、オサゾン形成して分解する方法 (Barry 分解) も用いられるがいずれにしてもこれらの方法は Haworth 法で得られた結果を確認するため、あるいは過ヨウ素酸酸化されない部分構造を探るために有効である。グリコシド結合がみかぶかの向類に関しては旋光度、NMR スペクトルなどの手段とともに酵素が用いられている。

以上 1) と 2) の向類が解決されればある適当なくり返し単位を考え、統計的構造を描くことができるが、実際は多糖類の構造は必ずしもそれらと一致しない。また構成単糖の種類が多くなるとその統計的構造すら描けないので、確実な構造を把握するためには、更に 3) の向類解決が必要となるが、たんに質の一次構造を決める際に用いられる N 末端、C 末端分析のような手段のなり現時点に於いては二糖、オリゴ糖などの構成単位を単離することが、最も有効であると思われる。構成単糖は一般にグリコシド結合で相互に結合しているが、酸加水分解に対してはその安定性に差異がなく、特定のグリコシド結合を切断するような方法は見い出されていない。従って中性糖のみからなる多糖などでは、適当に酸加水分解し、低収量で構成単位を単離しうるが、部分構造を推定しうるにすぎないのが現状である。ゆずかに 2-アミノ糖を構成単糖として含む場合はアミノ糖のグリコシド結合がアミノ基のプロトン化により中性糖のそれより酸に対して安定であるのでこの性質を利用し、アミノ糖を含むオリゴ糖の構造決定に成功した例がいくつか知られている。酵素の基質特異性を利用することも考えられ、最近 1→3 グリコシド結合のみを切断するような酵素も見い出され、1→3 グルカンの構造決定などに利用されているようであるが、まだその例も少なく、能率的な酵素を単離するのは一般に困難である。このように 3) の向類解決にあたって有効な方法がない現状であるが、着着は化学的方法で選択的にあるグリコシド結合を切断することを目的として β -脱離反応を利用することを検討したがこれについて第二章で述べる。すなわち、ウロン類またはその誘導体

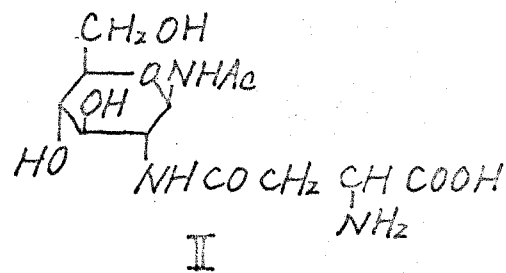
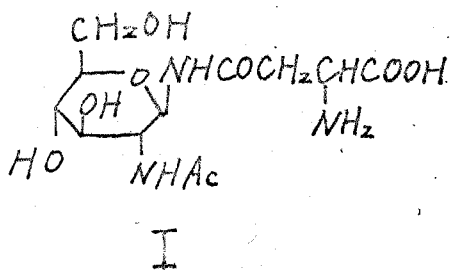
を、アルカリ条件で処理すると β -脱離反応を起し、不飽和酸を生ずるがこの反応を利用すれば1 \rightarrow 4結合のみを選択的に開裂しうるであろう。この方法はウロニ酸を含む多糖の構造決定に有効であるばかりでなく、多糖の一級水酸基を容易に酸化することができるようになれば、中性多糖特にペントースとヘキソースを同時に含むようなヘテロ多糖の構造決定にも有効と思われる。

本 論

第一章 1,2-ジアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースの合成および卵白アルブミン中の糖とアミノ酸の結合様式に関する検討

緒 言

卵白アルブミン中の糖たんぱく質は古くから知られているが、1961年、Neubergerら¹⁾は卵白アルブミンをペプシンなど酵素を用いて処理し、炭素-セライトのカラムおよびセルローズカラムを用いた電気泳動により、マンノース、グルコサミン、アスパラギン酸、ロイシンおよび少量のセリン、スレオニンを含むグリコペプチドを単離し、各成分の組成分析、このグリコペプチドが還元性を持たないこと、酸加水分解により1モルのアンモニアを発生すること、PKの測定より1個のカルボキシル基と1個のアミノ基のみが存在することなどの事実から、N-アセチルグルコサミンとβ-アスパラギンがアミノアシルグリコシド結合(I)をしていることを示唆した。しかし、ア



スパラギン酸のα-カルボキシルおよびβ-カルボキシルのいずれで結合しているかは明らかでない。更にグルコサミンの1位および2位のアシル基の入れ換った化合物(II)も種々の性質が類似していると思われ、これら三着のいずれであるかを決定するには合成による比較検討が必要である。そこで、種々のアミノ酸を用いて1,2-ジアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-β-D-グルコピラノースを合成し、その比較検討を行なつた。結果、卵白

ホ-節では1-アミノアシルアミノ-2-アセチルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースの合成、オ=節では1-アセチルアミノ-2-アミノアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースの合成について述べる。オ≡節で、ホ-オ=節で合成した化合物および卵白アルブミンより得たグルコサミン-アスパラギン酸化合物の比較検討について述べる。

カ-節 1-アミノアシルアミノ-2-アセチルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースの合成

グルコサミンの1位にアミノアシルアミノ基を導入するには、グリコシルアミンを用いる方法が最も良いと思われる。グリコシルアミンを得るには、アセトハロゲン糖をアシド化し、これを還元してうる方法と直接アンモニアによりアミノ化する方法が知られているが、前者の方法は一般にアセトハロゲン糖が熱的に不安定で扱いにくいゆえ、オキサゾリン誘導体を生成しやありなどの点で不適当と思われるので後者の方法を選んだ。N-アセチル-4,6-O-ベンジリデン-D-グルコサミン(Ⅲ)をアンモニアを飽和したメタノール中で2日間60~70°Cに加熱すると容易に相当するグリコシルアミン(Ⅳ)が生成することを見い出した。²⁾ Ⅳを焦水酢酸-ピリジンでアセチル化し、N,O-ジアセチル誘導体(Ⅳ')を、また、メタノール中で加熱還流し、相当するジグリコシルアミン(Ⅳ'')を得た。Ⅳは変旋光を示し、旋光度よりβ体であることが推定される。Ⅳを60% 酢酸水溶液中で、1時間沸とう水浴上で加熱、加水分解し、ペーパークロマトグラフィーにより検討したところN-アセチルマンノサミンのスポットは見られず、N-アセチルグルコサミンのみが検出された。このことはアミノ化の際にエピメリ化が起きていなることを示している。最近、Jeanlozら³⁾は、同じ方法でⅢのアミノ化を試みたがⅣが結晶化せず、着着が得たと同一のN,O-ジアセチル誘導体(Ⅳ')として確認している。

次にⅣとアミノ基および酸性アミノ酸の場合には一方のカルボキシル基を保護した種々のアミノ酸との結合をピリジンまたはジメチルホルムアミド中でジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を脱水剤として行なり、30~60%の収率で縮合物(Ⅴ)を得た。Ⅴはフェーリング試薬陽性であり、赤外吸収でウレタン、アミドのカルボニル、更に酸性アミノ酸の場合はエステルのカルボニルの吸収が見られることから確認したが赤外吸収の1例

図-1 Vaの赤外線吸収スペクトル

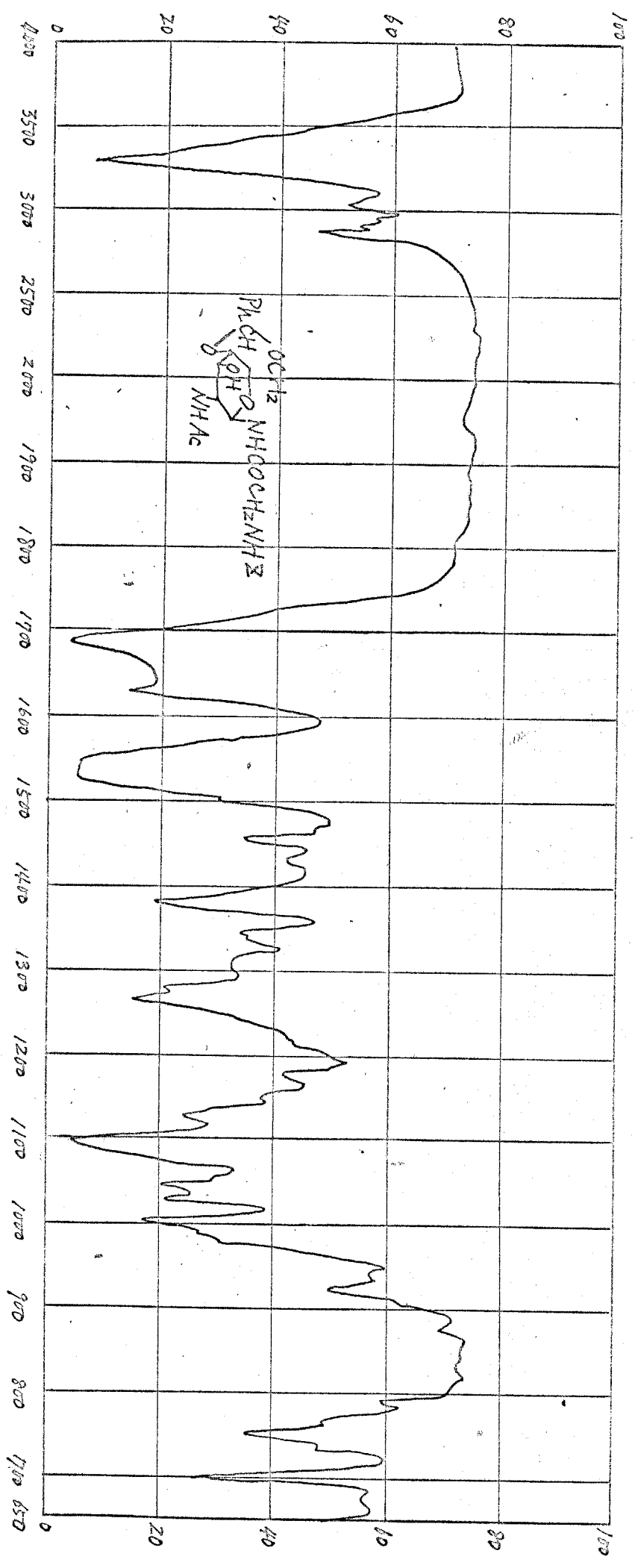
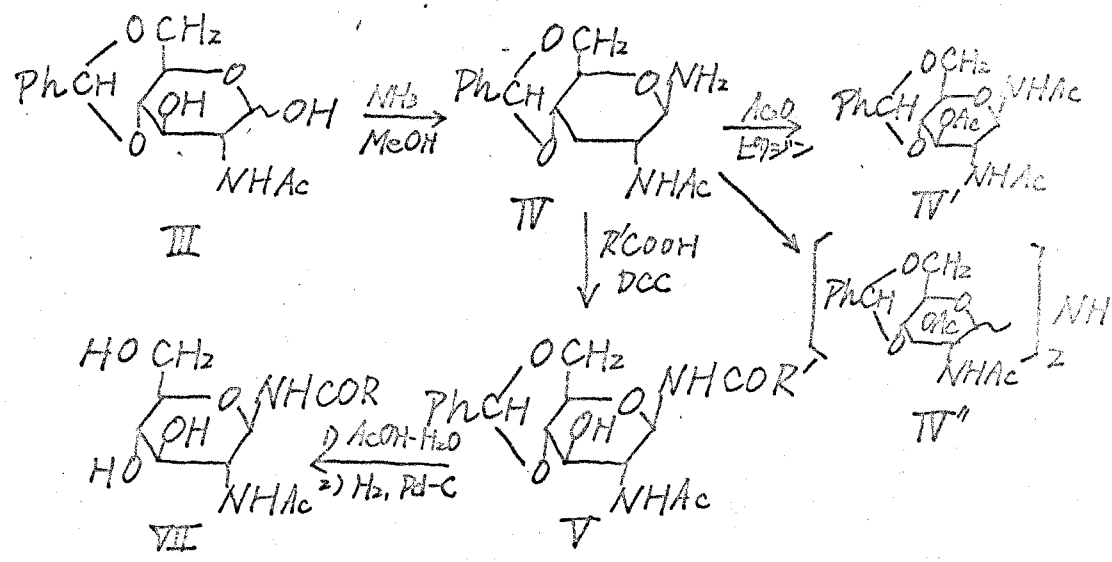


図-7 に示す。なお、アミノ酸としては中性アミノ酸として、グリシンおよびアラニン、酸性アミノ酸としてメチルサリチル酸のカルボキシル基を保護したアスパラギン酸、塩基性アミノ酸としてリジンを選んで行った。



- | | | | |
|-----|--|------|---|
| R a | CH ₂ NH ₂ | R' a | CH ₂ NHZ |
| b | CH(NH ₂) CH ₃ | b | CH(NHZ) CH ₃ |
| c | CH ₂ CH(NH ₂) COOH | c | CH ₂ CH(NHZ) COO BzL |
| d | CH(NH ₂) CH ₂ COOH | d | CH(NHZ) CH ₂ COO BzL |
| e | CH(NH ₂) (CH ₂) ₄ NH ₂ | e | CH(NHZ) (CH ₂) ₄ NHZ |
- Z = Ph CH₂ O CO ; BzL = Ph CH₂

ベンジリデン基は還元に対し抵抗を示したがアミノアシルグリコシド結合が酢酸水溶液に対し加熱しても安定であることが判明したので60~70%酢酸水溶液で約1時間沸とう水浴上で加熱することにより脱ベンジリデン誘導体(VI)を得た。更に、5~10%パラジウム-炭素を触媒として長時間水素還元を行ない、アミノ酸残基のベンジルオキシカルボニル基およびエステルのベンジル基を脱離し、目的とするグルコサミン-アミノ酸縮合物(VII)を水和物または塩酸塩として単離したがアラニンおよびリジンの誘導体は、結晶化しなかった。

得られた化合物の融点、旋光度、収量および元素分析値は表Iの通りである。

表I 1-メチルホルム-2-アセチルホ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースと
その誘導体

化合物	分子式	融点 °C. (分解)	旋光度 [α] _D [*]	収率 %	元素分析 %		
					炭素(計算値)	水素(計算値)	窒素(計算値)
IV	C ₁₅ H ₂₀ O ₅ N ₂	182-184	-82.6°(p) ^{**}	30~50	58.43(58.43)	6.40(6.54)	9.08(9.09)
IV'	C ₁₉ H ₂₄ O ₇ N ₂	300以上	-15.1°(d) ^{**}	90	57.90(58.15)	6.21(6.17)	7.18(7.14)
IV''	C ₂₀ H ₂₇ O ₁₀ N ₃	226-228	+35.5°(d) ^{**}	15	59.48(60.09)	6.38(6.21)	7.17(7.01)
Va	C ₂₅ H ₂₉ O ₈ N ₃	240	0.0°(d)	62	60.01(60.11)	5.88(5.85)	8.26(8.41)
Vb	C ₂₆ H ₃₁ O ₈ N ₃	—	—	50	60.23(60.81)	5.92(6.03)	8.07(8.13)
Vc	C ₂₄ H ₂₇ O ₁₀ N ₃	214-216	-0.6°(p)	55	63.07(63.05)	5.91(5.76)	6.67(6.49)
Vd	C ₂₃ H ₂₇ O ₁₀ N ₃	224	-26.9°(d)	45	63.25(63.05)	5.97(5.76)	6.73(6.49)
Ve	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₀ N ₄	228-229	0.0°(p)	30	62.69(63.05)	6.27(6.29)	7.73(7.95)
VIa	C ₁₈ H ₂₅ O ₈ N ₃	221-222	+130.2°(w)	60	52.76(52.55)	6.23(6.13)	10.50(10.21)
VIb	C ₁₉ H ₂₇ O ₈ N ₃	198-199	+14.4°(d)	75	53.77(53.64)	6.63(6.40)	9.90(9.88)
VIc	C ₂₇ H ₃₃ O ₁₀ N ₃	188-189	+13.6°(d)	80	57.84(57.95)	6.02(5.94)	7.62(7.51)
VId	C ₂₇ H ₃₃ O ₁₀ N ₃	218-220	-15.1°(d)	80	57.74(57.95)	5.98(5.94)	7.90(7.51)
VIe	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₀ N ₄	219-220	0.0°(d)	79	58.02(58.43)	6.28(6.54)	9.26(9.09)
VIa	C ₁₀ H ₁₁ O ₆ N ₃ ·H ₂ O	211	+21.6°(w) ^{**}	70	41.10(40.67)	7.37(7.17)	13.97(14.23)
VIb	C ₁₁ H ₁₃ O ₆ N ₃ ·H ₂ O	200	+43.8°(w)	80	42.14(42.71)	7.45(7.49)	13.33(13.59)
VIc	C ₁₂ H ₂₁ O ₈ N ₃ ·½H ₂ O	232-235	+25.0°(w)	70	41.90(41.26)	6.38(6.44)	11.93(12.21)
VIc	C ₁₂ H ₂₁ O ₈ N ₃ ·¾H ₂ O	230-240	+20.6°(w)	70	39.96(39.77)	7.06(6.68)	11.18(11.59)
VIe	C ₁₄ H ₂₃ O ₆ N ₄ ·2H ₂ O	エンプト	+17.8°(w)	90	43.84(43.13)	8.37(8.39)	14.51(14.57)

* [α]₅₇₈ および [α]₅₄₆ の値より次式に従い換算した値

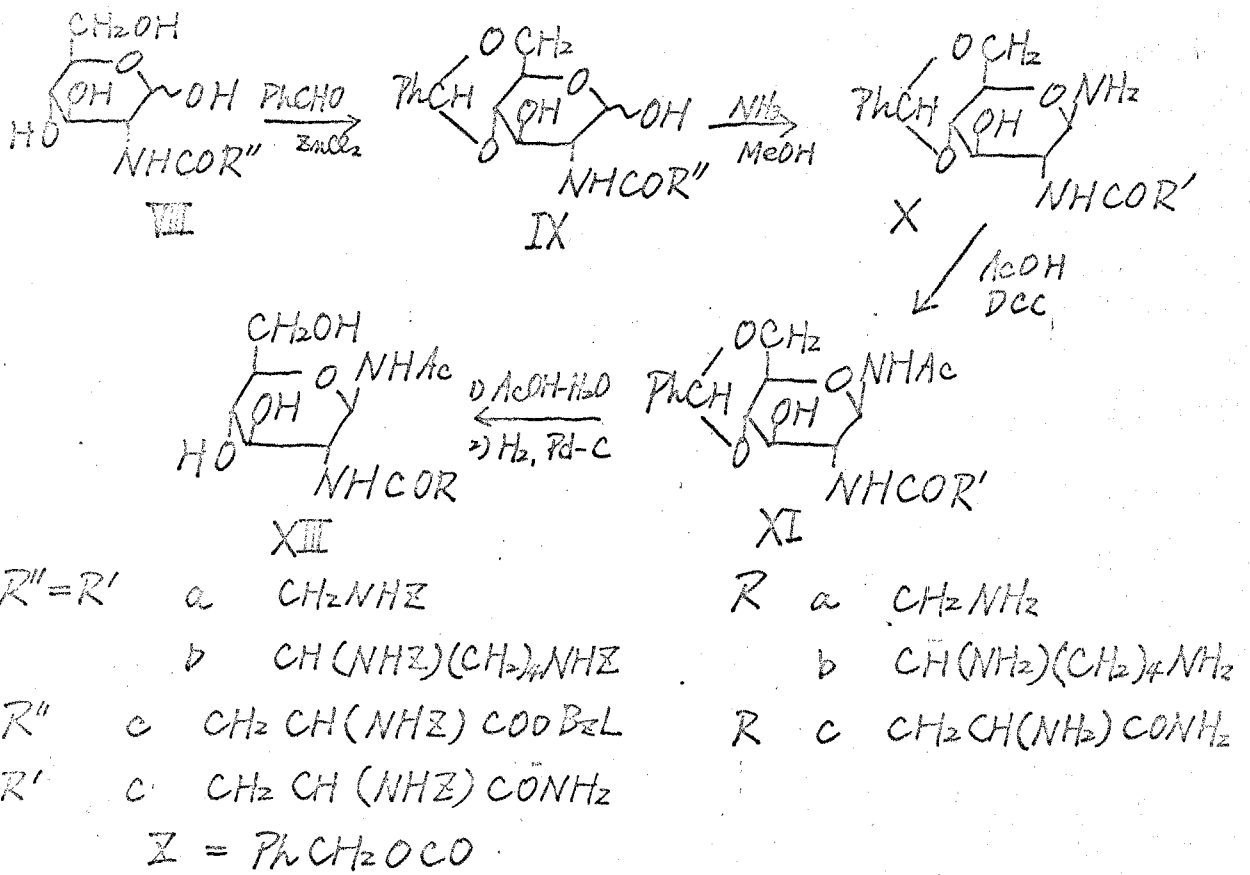
$$[\alpha]_D = \frac{100\alpha}{e \cdot c}, \quad \alpha = \frac{\lambda}{\lambda + 1} \alpha_{546}, \quad \lambda = 0.7285 \times \frac{\alpha_{578}}{\alpha_{546} - \alpha_{578}}$$

** [α]₅₇₈

p: エピロジン d: ジメチルホルムアミド w: 水

カニ節 1-アセチルアミノ-2-アミノアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースの合成

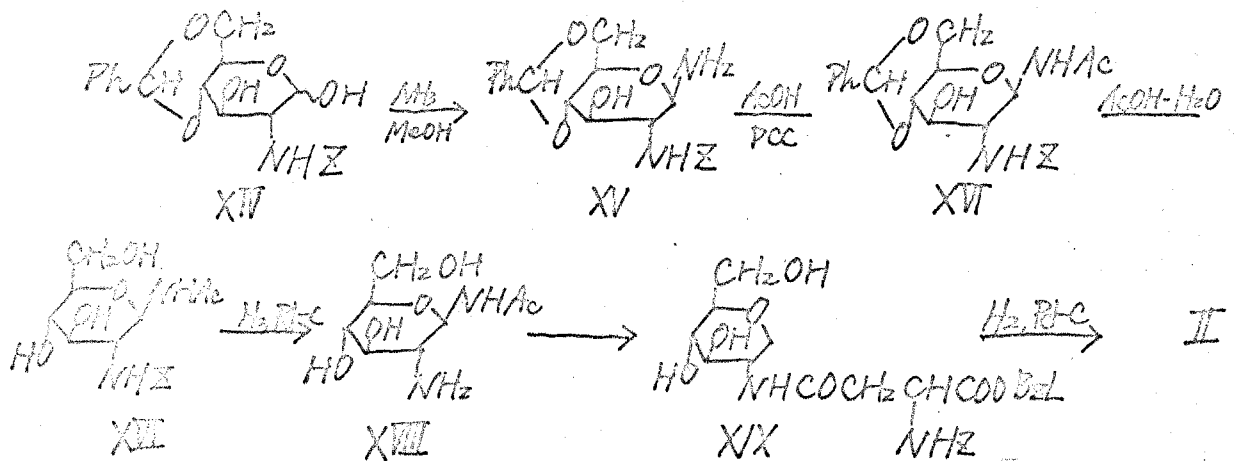
表題の化合物の合成はあらかじめグルコサミンのアミノ基にアミノアシル基を導入し、ベンジリデン化した後、カニ節で確立した方法に従って行えばよりと考えられる。実験の結果グリシン、リジンの結合物については目的物を得たが、アスパラギン酸の場合はα-カルボキシル基がアミノ化の際アミドになり、カルボキシルへの変換が困難で、後述する別法により合成した。



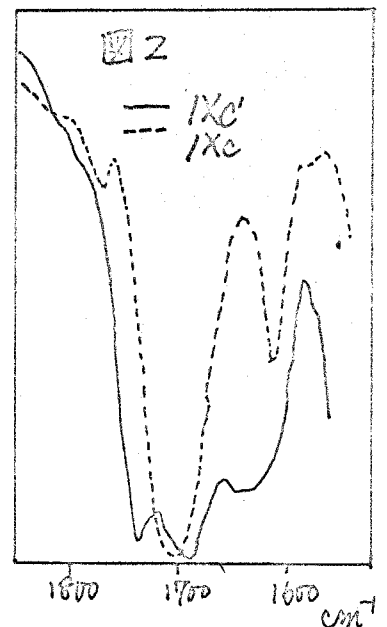
2-(β-L-アスパルテイルアミノ)-2-デオキシ-D-グルコピラノースはアセトン水溶液中でグルコサミンとα-ベンジル-N-ベンジロキシカルボニルアスパラギン酸をDCCを用いて縮合して得た。この場合通常行われているピリジン水溶液中で縮合させるとα-ベンジルエステルが加水分解され、ベンジリデン化の際にラクトンの生成が見られる。赤外吸収によ

って確認したがこれを図-2に示す。また、この化合物(XIc, R' = CH₂CH(NH₂)COOH[-H₂O])をアミノ化するとアスパラギン酸残基のα-カルボキシルがアミドになった融点、赤外吸収スペクトル共にXIcと同一の化合物を得た。

アスパラギン酸結合物を合成する際、アミドの生成を防ぐためにはアミノ化の後にアスパラギン酸残基を導入しなければならぬ。そこで2位のアミノ基をまずベンジルオキシカルボニル基で保護した化合物(XIV)をアミノ化、更にN-アセチル化してN-アセチルアミノ基を導入した後、酢酸水溶液で加熱してベンジリデン基をはずし、1-アセチルアミノ-2-アミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノース(XVIII)を得、これをアセトン水溶液中でDCCを用いてα-ベンジル-N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸と反応させ、還元により脱保護基を行なって目的物(II)を得た。



得られた化合物の諸性質は表II~IVのとおりである。



表II 1-アセチルアミノ-2-アミノアルアミノ-1,2-ジテオキソ-D-グルコピラノースと
その誘導体

化合物	分子式	融点℃ (分解)	旋光度 [α] _D [*]	収率%	元素分析 %		
					炭素(計算値)	水素(計算値)	窒素(計算値)
IXa	C ₂₃ H ₂₉ O ₇ N ₂	217-219	+15.0°(d)	52	60.25(60.25)	5.62(5.72)	6.18(6.11)
IXb	C ₂₅ H ₄₁ O ₁₀ N ₃	185-187	+15.8°(d)	60	63.08(63.33)	5.31(6.23)	6.33(6.33)
Xa	C ₂₃ H ₂₉ O ₇ N ₂	183-184	-26.5°(d)	42	59.53(60.38)	5.88(5.95)	9.07(9.19)
Xb	C ₂₅ H ₄₂ O ₉ N ₄	201-202	-27.4°(d)	50	63.27(63.43)	6.50(6.39)	8.32(8.45)
XIa	C ₂₅ H ₂₉ O ₈ N ₃	254-255	+6.6°(d)	55	60.02(60.11)	6.09(5.85)	8.68(8.41)
XIb	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₀ N ₄	234-237 ^{**}	+10.5°(d)	80	63.10(63.05)	6.19(6.29)	7.92(7.95)
XIIa	C ₁₀ H ₁₅ O ₈ N ₃	214-215	+18.2°(d)	89	52.14(52.55)	6.58(6.13)	10.42(10.21)
XIIb	C ₃₀ H ₄₀ O ₁₀ N ₄ ·H ₂ O	164-165 ^{**}	+11.0°(α)	80	57.23(56.85)	6.98(6.67)	8.54(8.83)
XIIIa	C ₁₀ H ₁₅ O ₈ N ₃ ½(COOH) ₂	205	+44.7°(w)	70	39.09(38.82)	6.79(6.47)	12.16(12.34)
XIIIb	C ₁₁ H ₂₀ O ₈ N ₄ ·2HCl	184-185	+29.7°(w)	60	40.22(39.92)	7.39(7.16)	13.25(13.33)

** 分解し得る.

表III

化合物	分子式	融点℃ (分解)	旋光度 [α] _D [*]	収率%	元素分析 %		
					炭素(計算値)	水素(計算値)	窒素(計算値)
IXc	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₀ N ₂	166-168	-7.6°(d)	32	63.03(63.36)	5.777(5.65)	4.79(4.62)
IXc'	C ₂₅ H ₂₆ O ₉ N ₂	179-181	-26.0°(d)	50	59.46(60.23)	5.28(5.65)	5.75(5.62)
Xc	C ₂₇ H ₂₀ O ₈ N ₄	208-209	-15.4°(d)	28	57.80(58.36)	6.10(5.88)	10.80(10.89)
XIc	C ₂₇ H ₂ O ₇ N ₄	252-254	0.0°(d)	50	57.92(58.26)	6.09(5.80)	10.28(10.07)
XIIc	C ₂₀ H ₂₈ O ₉ N ₄	237-238	+53.0°(α)	80	58.82(51.27)	6.30(6.02)	11.81(11.96)
XIIIc	C ₁₂ H ₂₂ O ₇ N ₄ ·H ₂ O	190-192	+21.9°(w)	70	49.65(40.91)	6.98(6.87)	15.72(15.92)

* [α]_D20 および [α]_D25 の値より換算

α: ジメチルホルムアミド, α: 酢酸, w: 水

表IV

化合物	分子式	融点 °C (分解)	旋光度 [α] _D ²⁰ _{578 mμ}	収率 %	元素分析 %		
					炭素(計算値)	水素(計算値)	窒素(計算値)
XIV	C ₂₁ H ₂₃ O ₇ N	240	-20.0°(d)	72	61.68(62.83)	5.99(5.78)	3.60(3.49)
XV	C ₂₁ H ₂₄ O ₆ N ₂	196	-26.0°(d)	50	62.06(62.99)	5.92(6.04)	7.29(7.00)
XVI	C ₂₃ H ₂₆ O ₇ N ₂	278-279	-12.5°(d)	90	61.93(62.43)	6.64(5.92)	6.73(6.33)
XVII	C ₁₆ H ₂₂ O ₇ N ₂	206	28.0°(m)	85	54.46(54.23)	6.45(6.26)	7.96(7.91)
XVIII	C ₈ H ₁₆ O ₅ N ₂	224-225	-4.3°(w)	90	41.14(43.63)	7.10(7.32)	13.79(12.72)
XVIII'	C ₈ H ₁₆ O ₅ N ₂ ·HCl	176	0.0°(w)	95	36.35(37.43)	7.16(6.67)	10.66(10.91)
XIX	C ₂₇ H ₃₃ O ₁₀ N ₃	222-223	26.0°(h)	40	58.18(57.95)	6.28(5.95)	7.77(7.51)
II	C ₁₂ H ₂₁ O ₈ N ₃ · $\frac{1}{2}$ H ₂ O	270	+23.6°(w)	60	41.67(41.90)	6.91(6.44)	12.54(12.20)

d: ジメチルホルムアミド, m: メタノール

w: 水, h: ヘキサメチルホスホアミド

カ三節 卵白アルブミンより得られたグルコサミン-アスパラギン酸結合物と合成物との比較検討

カ一節およびカ二節で合成したアスパラギン酸結合物の融点, 旋光度を最近 Bogdanov⁴⁾ 塚本⁵⁾らによって卵白アルブミン中の糖たんぱく質より得られたグルコサミン-アスパラギン酸(1:1)結合物のそれと比較すると下の表のようになる。

化合物	I(VIIc)	VIIa	II	Bogdanov	塚本
融点 _c (分解)	$\frac{1}{2}H_2O$ 232-235	$\frac{3}{2}H_2O$ 230-240	$\frac{1}{2}H_2O$ 270	200	H_2O 215-222 無水物 254-256
旋光度	$[\alpha]_D^{25} +25.0^\circ$	$[\alpha]_D^{25} +20.6^\circ$	$[\alpha]_D^{25} +23.6^\circ$	$[\alpha]_D^{25} +23.7^\circ$	無水物 $[\alpha]_D^{25} +24.6^\circ$

* $[\alpha]_{578}^{25}$ $[\alpha]_{546}^{25}$ より換算

また, Neuberger⁶⁾ 塚本ら⁵⁾は着着と時を同じくして1-アミノ-2-アセトアミド-1,2-ジデオキシ-3,4,6-トリ-O-アセチル-β-D-グルコピラノースを基とする別途合成を行い1-(β-L-アスパルトアミド)-2-アセトアミド-1,2-ジデオキシ-β-D-グルコピラノースを得ているが結晶水の量がやや異なるのみで旋光度は近い値を示している。

次に合成した I(VIIc), VIId, II と卵白アルブミンより得たグルコサミン-アスパラギン酸結合物のペーパークロマトグラフィ-および電気泳動の挙動を比較したが表Vに示すごとくはっきりした差は見い出せなかった。

表V

化合物 条件	ペーパークロマトグラフ ^a		電気泳動 ^b	
	A	B	C	D
I	0.47	0.40	3.9	5.2
VIIa	0.52	0.41	4.1	5.6
II	0.48	0.39	3.9	5.0
天然物	0.47	0.40	3.9	5.1

a: R_f 値, b: 泳動距離 (cm)

条件 A: 2-メチルプロピオン酸 - 0.5N アンモニア水 (5:3)

B: フェノール - 水 (10:1)

C: 5N 酢酸, 20 V/cm, 3.5 時間

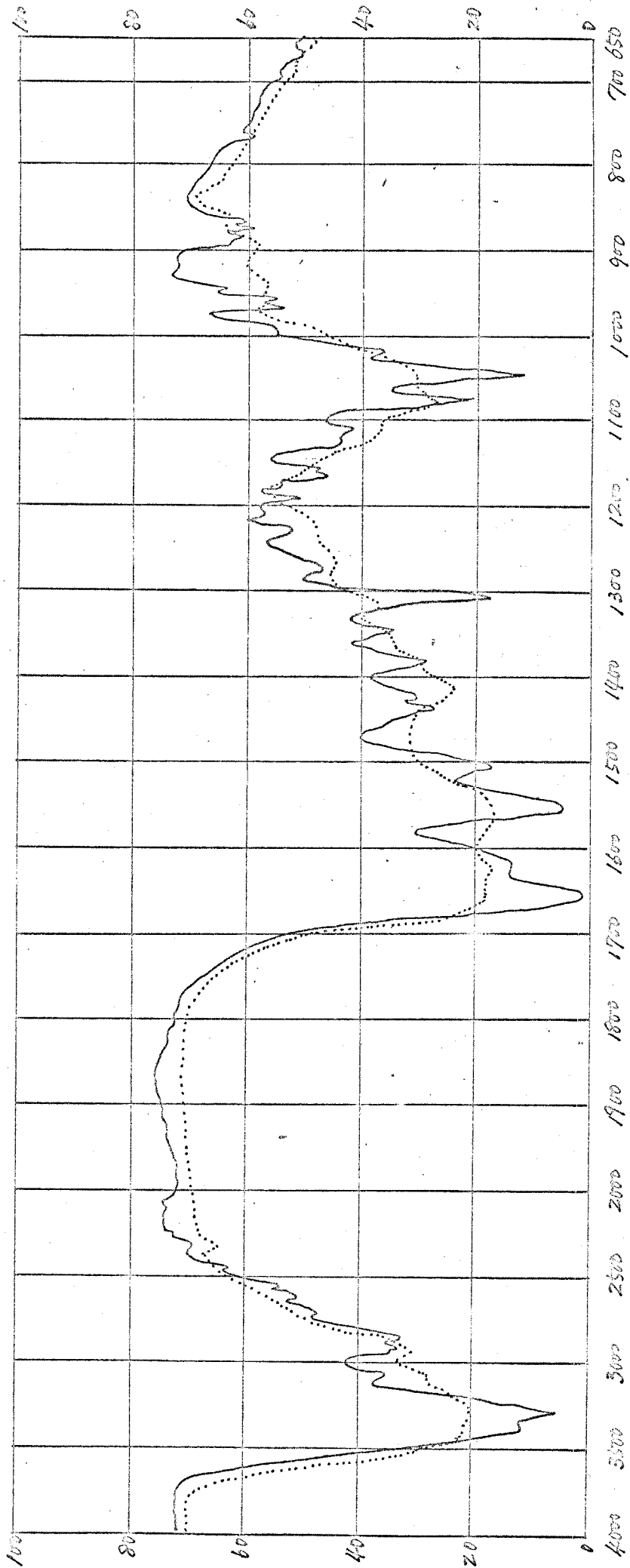
D: ホウ酸緩衝液 (PH 8.0), 20 V/cm, 2 時間

ニンヒドリン溶液 (アセトン-エタノール = 49:1)⁷⁾ で発色させる際に VII_a のみが紫色で他の三着は褐色を呈し, VII_d の可能性は除外された。しかし, I, II および天然物は赤外吸収スペクトル (図-3) でも区別はできなかった。また, 1-アミノアシルアミノ誘導体と 2-アミノアシルアミノ誘導体のペーパークロマトグラフィーおよび電気泳動の挙動を, グリシンおよびリジンの結合物でも比較してみたがやはり大きな差異は認められなかった。表Ⅵ

化合物	ペーパークロマトグラフィー n-BuOH:AcOH:H ₂ O = 2:3:5	電気泳動 20 V/cm PH 3.4 2.5 時間
VII _a 1-Gly	0.18 - 0.19	12.1 cm
VII _e Lys	0.14 - 0.17	15.3 cm
XIII _a 2-Gly *	0.16 - 0.18	11.6 cm
XIII _b 2-Lys *	0.10 - 0.13	14.7 cm

* アルカリで中和した後にスポット測定

そこで 1-アミノアシルアミノ誘導体と 2-アミノアシルアミノ誘導体ではそれぞれのアミド結合の加水分解に対する安定性が異なると考え各々のアミド結合の加水分解速度を測定した。I および II を 1N 塩酸 100°C で加水分解し, 生成するアンモニアおよびアスパラギン酸をアミノ酸自動分



合成した 1-(D-リソバルギン酸)・2-アセチルピリミド-1,2-ジチオキサチン-β-D-グルコシド-7-ス
 卵白アルブミン中の糖たんぱく質より得た グルコシド-7-アセチルピリミド-2-アセチルピリミド-1,2-ジチオキサチン-β-D-グルコシド

析機で定量し、二次反応として速度定数を求めた。

表Ⅶ アミド結合の一次加水分解速度^a

化合物	速度定数 ^b (10^3 min^{-1})		
	糖	アミノア	アスパラギン酸
卵白アルブミンから得たグリコペプチド	—	8.2	—
N-(β-L-アスパルテイル)-β-D-グルコシルアミン	4.9	—	—
N-グリニル-β-D-グルコシルアミン	7.8	—	—
2-[(β-L-アスパルテイル)アミノ]-2-デオキシ-D-グルコース	3.4	—	—
I	—	10.4 ^c	10.4 ^c
II	—	107 ^c	2.1 ^d
XX	—	87 ^c	—

a: 各々の化合物は 1N 塩酸中, 100°C で加水分解

b: 各々の値は遊離する物質より算出

c: C-1 のアミド結合より遊離

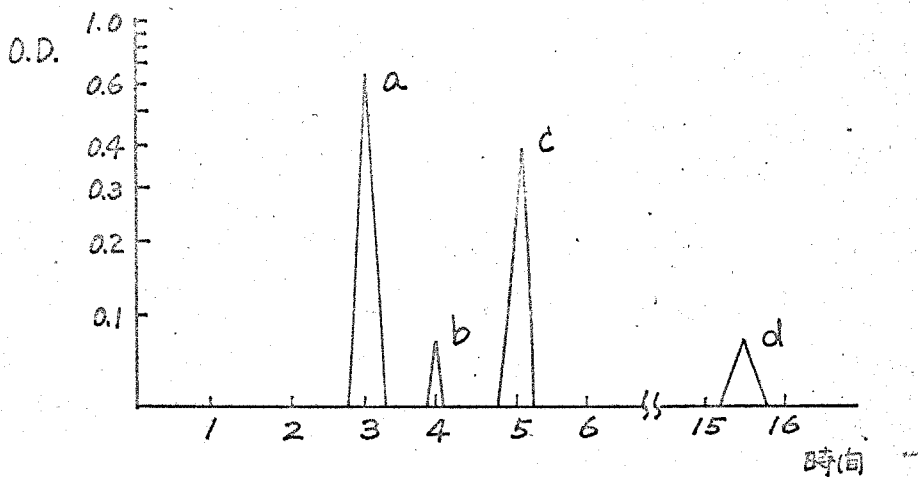
d: C-2 のアミド結合より遊離

この結果, C-1 のアミド結合は N-アセチル基の方が N-アスパルテイル基よりはるかに速く加水分解されること, また N-アスパルテイル基は C-2 より C-1 の方が速く加水分解されることが判明し, このことから I と II を区別できることがわかった。さらに Mark および Neuberger²⁾ は卵白アルブミンより得たグリコペプチドの加水分解により生成するアミノアを定量し、 $8.2 \times 10^{-3} \text{ min}$ の値を得ているがこれは I の値に非常に近く, 卵白アルブミン中のグルコサミン-アスパラギン酸結合物は I であることが確認された。

I の加水分解生成物のアミノ酸自動分析機によるクロマトグラフィーは図-4 のようにあるが, Michael ら³⁾ が報告しているように N→N 転移生成物である 2-[(β-L-アスパルテイル)アミノ]-2-デオキシ-D-グルコースのピ

一クが観測された。この $N \rightarrow N$ 転移を確認するため γ - N -アセチル-2-アミノ-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシルアミン(XX)を合成し、同じ条件下で加水分解を行なったが、相当する転移生成物である N -アセチルグルコサミンはペーパークロマトグラフィーでは検出できなかった。これは N -アセチル基の加水分解速度がアシル基転移速度に比べはるかに速いためと考えられる。またIは2-(ジメチルアミノ)-エタノール溶液中、室温で $N \rightarrow N$ 転移に際して必要と思われるアノメリゼーションを起すが、XXは同条件下では $N \rightarrow N$ 転移もアノメリゼーションもみられなかった。

図-4 Iの加水分解生成物のクロマトグラム
(150 cm カラム)



- a : 化合物 I
- b : 2-[(β -L-アスパルチル)アミノ]-2-デオキシ-D-グルコース
- c : アスパラギン酸
- d : 2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコース 塩酸塩.

実 験 の 部

カ-節およびカ=節

- 1) 1-アミノ-2-アシルアミノ-1,2-ジデオキシ-4,6-0-ベンジリデン-β-D-グルコピラノース (IV および X) の一般的製法

2-アシルアミノ-2-デオキシ-4,6-0-ベンジリデン-D-グルコピラノースを約10倍量のアンモニアを飽和したメタノールと共に封管中に入れ、70~90°Cに加熱すると1~2日で溶解する。通常室温まで放冷するだけで結晶が析出し、これをろ別し、ろ液を減圧濃縮すると更に結晶が得られる。IV および X は一般に有機溶媒にとけにくく更に熱に対して不安定であることなどを考慮すると再結晶は困難であるが、そのままでも充分純粋である。収率 30~60%

- 2) 1,2-ジアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-4,6-0-ベンジリデン-β-D-グルコピラノース (V および XI) の一般的製法

IV または X と等モルのアミノ酸誘導体または酢酸をピリジンまたはジメチルホルムアミドに溶解させ、これに攪拌しながら少量のピリジンにかした1.5倍モルのDCCを滴下し、終了後数時間室温で攪拌を続ける。析出したジシクロヘキシル尿素をろ別し、ろ液を濃縮して得られる結晶を熱エタノールで洗浄し、ジメチルホルムアミド-エーテルで再結晶を行なうと白色無定形の結晶が得られる。収率 40~60%

- 3) 1,2-ジアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノース (VI, VII および XII, XIII) の一般的製法

i) 脱ベンジリデン

1,2-ジアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-4,6-0-ベンジリデン-D-グルコピラノースを約10倍量の60%酢酸水溶液に懸濁させ、沸と

う水浴上で加熱させ、更に1~2時間加熱する。グリシンおよびアラニンの結合物の場合、同量の水を加えた後、エーテルで洗ってベンツアルデヒドを除き、減圧濃縮して得られた結晶を70% エタノール水溶液で再結晶した。アスパラギン酸結合物の場合は直接反応溶液を減圧濃縮し、得られた残滓を熱エタノールにとかし、少量の石油エーテルを添加すると無定形の結晶が析出する。リジン結合物は反応溶液に水を加えると結晶が析出する。これを別しエタノール、エーテルで洗浄する。収率は70~80%

ii) 脱ベンジルオキシカルボニルおよび脱ベンジル

脱ベンジリデンにより得た化合物 (VI および XII) を少量の酢酸または酢酸を含む50% エタノール水溶液に懸濁させ、等量の5~10%パラジウム-炭素を触媒として水素還元を行なった。約15~20時間で終了し、触媒を別し、溶液を減圧濃縮して得られた結晶は70% エタノール水溶液で再結晶した。

4) 2-アシルアミノ-2-デオキシ-4,6-O-ベンジリデン-D-グルコピラノース (IX および XIV) の一般製法

例として *N*-Z 誘導体について述べる。 *N*-Z-D-グルコサミン 50g
ベンツアルデヒド 300 ml の石油エーテルで二度洗い、残滓を米水中にあけよく攪拌し、別して、石油エーテル、水で洗浄する。ポリジン-メタノールより再結晶。 45g

5) 2-(α -ベンジル-N-ベンジルオキシカルボニル- β -アスパルテリ) アミノ-2-デオキシ-4,6-O-ベンジリデン-D-グルコピラノース

10g (0.047モル) のグルコサミン塩酸塩を冷却した *N*-カゼイソーダ 46 ml に溶かし、16.5g (0.045モル) の α -ベンジル-N-ベンジルオキシカルボニルアスパラギン酸を140 ml のアセトンに溶かした溶液と混ぜる。DCC 28.68g (0.139モル) を40 ml のアセトンにとかし、少しずつ滴下する。

空釜で数時間撹拌し、析出した沈殿物をろ別し、ろ液に酢酸を加え更に数時間放置するとジシクロヘキシル尿素が析出する。ろ液を濃縮し、残滓を熱エタノールに溶かし、冷蔵庫に放置すると O -(α -ベンジル- N -ベンジルオキシカルボニル- L -アスパルテイル)- N,N -ジシクロヘキシル尿素が析出する。融点 $97-98^{\circ}\text{C}$ エタノール母液を濃縮し熱酢酸エタールでシロップを洗浄しそのまま乾燥してベンジリデン化を行なう。得られたシロップは 10g であったが、これを 4) と同様にベンジリデン化し、 1Xc 9g を得た。エタノールより再結晶。

第 3 節

1) 加水分解速度の測定および生成物の分析

各化合物 (3~4 ミリ モル) を 1N 塩酸にとかし、封管中 100°C で加熱した。20~40 分後、加水分解液を 10 倍に蒸留水で希釈し、その 1~2 ml を Amberlite CG-20, Tyne III を充てんしたカラムを用いたアミノ酸自動分析機 (Hitachi Model KLA-2) で分析した。溶出液は 0.2N クエン酸緩衝液 (pH 3.25) を用いた。

2) 2-[(β-L-アスパルテイル)アミノ]-2-デオキシ-D-グルコース

2-[[α-ベンジル N-(ベンジルオキシカルボニル)-β-L-アスパルテイル]-アミノ]-4,6-O-ベンジリデン-2-デオキシ-D-グルコース (300 mg) を 60% 酢酸に懸濁し、沸とう水浴上で 1 時間加熱した。石油エーテルでベンジアルデヒドを抽出した後、溶液を濃縮すると白色残渣 (200 mg) を得た。そのまま 50% エタノール溶液中 Pd-C を触媒とし、24 時間室温で加水素分解後、触媒をろ別し、ろ液を濃縮し白色固体を得た。少量の水より結晶化すると、融点 > 275°C, $[\alpha]_D^{23} + 27.0 \rightarrow 25.5^\circ$ (5 時間後, c 0.5, 水) の結晶が得られた。 (89 mg, 60%) 文献値⁽¹⁰⁾ 融点 > 260°C, $[\alpha]_D + 29 + 22^\circ$ (c, 0.28, 水); ⁽¹¹⁾ 融点 300° dec.; $[\alpha]_D + 33.2 \rightarrow 28.2^\circ$ (c 0.184, 水)

分析値 C 40.75; H 6.57; N 9.36%

C₂₀H₂₈N₂O₈ との計算値 C 40.81; H 6.27; N 9.12%

3) 1-N-アセチル-2-アミノ-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシルアミン (XX)

1-N-アセチル-2-[(ベンジルオキシカルボニル)アミノ]-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシルアミン を 2) と同様に加水素分解した。エタノール水溶液より再結晶 (90%) 融点 224°-225° (dec.), $[\alpha]_D^{23} - 4.3^\circ$ (c 0.5, 水)

分析値 C, 43.14; H 7.10; N 12.79%

C₈H₁₆N₂O₅ との計算値 C 43.63; H 7.32; N 12.72%

結 論

本章では、1,2-ジアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースを合成し、卵白アルブミン中の糖とアミノ酸の結合様式を検討した。

カ一節では 2-アセチルアミノ-4,6-O-ベンジルリデン-D-グルコピラノースをメタノールアンモニアでアミノ化して得られたグリコシルアミンと種々のアミノ酸誘導体(グリシン, アラニン, アスパラギン酸, リジン)を DCC を用いて縮合させ、脱保護基をおこなって 1-アミノアシルアミノ-2-アセチルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースを得た。

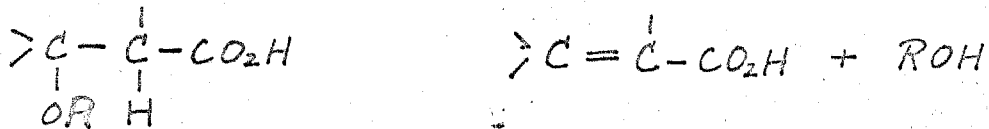
カ二節では、カ一節の方法を 2-アミノアシルアミノ-2-デオキシ-D-グルコピラノースに拡張し、1位にアセチルアミノ基を導入して、目的とする 1-アセチルアミノ-2-アミノアシルアミノ-1,2-ジデオキシ-D-グルコピラノースを得たが、アスパラギン酸誘導体ではエステルがアミノ化の際アンモノリシスを受け、酸アミドとなり目的物を得られない。そこで N-ベンジルオキシカルボニルグルコサミンを用い、1位にアセチルアミノ基を導入した後、ベンジルオキシカルボニル基をはずし、アスパラギン酸誘導体と縮合させる方法で目的物を得た。

カ三節では、卵白アルブミンより分離した D-グルコサミン-アスパラギン酸(1:1)結合物の赤外線吸収スペクトル、ペーパークロマトグラフィーおよび電気泳動の挙動、アミド結合の加水分解測定をカ一、カ二節で合成したアスパラギン酸結合物のそれと比較し、1-(β-L-アスパルチルアミノ)-2-アセチルアミノ-1,2-ジデオキシ-β-D-グルコピラノースであることを明らかにした。また、1-アミノアシルアミノ誘導体と 2-アミノアシルアミノ誘導体の間にペーパークロマトグラフィー、電気泳動などの挙動では大きな差異のないことも明らかにした。

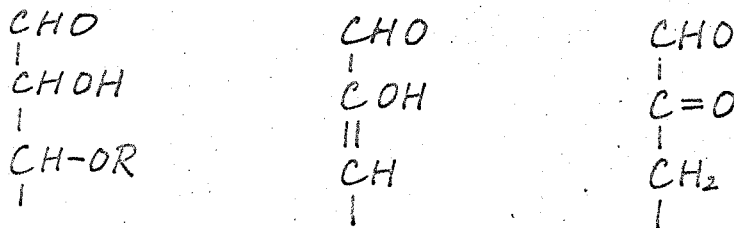
第二章 脱離反応による多糖の部分加水分解に関する研究

緒言

一般にβ-オキシ酸は、酸またはアルカリによってβ-脱離反応を起し、α,β-不飽和酸を生ずる。



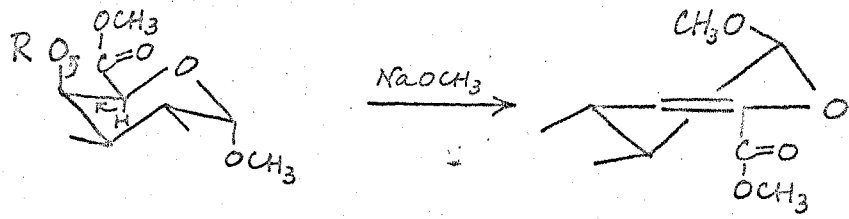
また、グルコースおよび3-O-置換グルコースをアルカリ処理すると、3-デオキシグルコソンが生成することが知られている¹²⁾が、これはアルデヒドカルボニル基に対しβ位の水酸基またはアルコキシ基が脱離し生成した不飽和アルデヒドがプロトトロピーを起して生成したと考えられる。



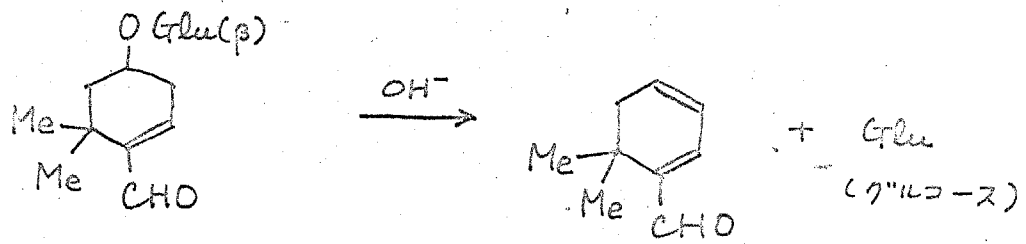
R = H, アルキル, グリコシル

ウロン酸またはポリウロン酸の脱離反応については、二、三報告もあるが、その反応の詳細な検討はまだ行われていない。Vallmert¹³⁾はペクチン(ポリガラクトン酸の部分メチルエステル)をアルカリ中20°Cで処理するとその粘性が落ちることを認め、これはペクチンのメトキシカルボニル基に対しβ位にあるグリコシル基がβ-脱離を起したためであると説明された。なお、不飽和糖の生成はDVスペクトルで確認している。また、Heimら¹⁴⁾はメチル α-D-ガラクトン酸メチルエステルおよびメチルβガラクト(シド)ジメチルエステルを前者は1.5Nナトリウムメテラート中45分加熱還流し、後者は1.0Nナトリウムメテラート中室温に24

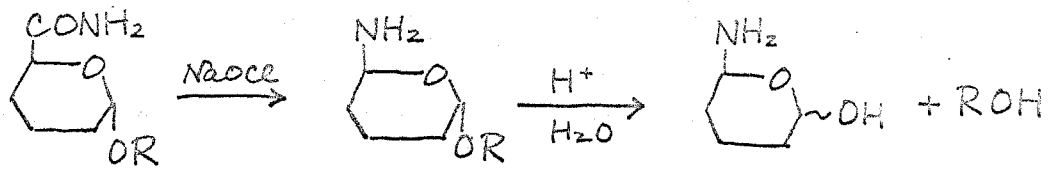
時向放置し、いずれも、メチル $\Delta^4,5\text{-}\alpha\text{-D}$ -ガラクトツロシドメチルエステルを得た。このものの構造はUVスペクトル、IRスペクトル、過ヨウ素酸酸化およびオゾン分解で蔞酸を生成することから証明しているが収量率の記載はなく、反応の詳細は明らかでない。



このようにウロン酸のβ-脱離反応を定量的に行なえば"化学的方法でウロン酸残基に対する1→4結合を選択的に切断する有効な方法になると思われる。また、Kuhn¹⁵⁾はα,β-不飽和アルデヒド構造をもち、カルボニル基から8位の炭素についた水酸基にグリコシル基の導入されている構造のヒドロクロシンを水酸化カリウム水溶液で処理するとβ-脱離反応が起るグルコースが遊離することと報告しているが、ウロン酸誘導体についてこの種の反応が起れば1→4結合の切断に続いて1→2結合をも選択的に切断しうる可能性も生じる。



一方、Kochetkovら¹⁶⁾はウロン酸アミド誘導体をホフマン分解した後、得られるグリコシルアミンを加水分解し選択的にウロシド結合を切断しうることを示しているがβ-脱離反応と併用することにより、ウロン酸を含む多糖に於いてウロン酸周辺での構造研究に有力な手段になると思われる。



最近、Reesら¹⁷⁾は落着と同じ目的でアルギン酸 2-ハイドロキシエチルエステルにナトリウムメテラートを用いて脱離反応を試み、ニ、三のオリゴ糖を得ているが、収量は悪く脱離条件の検討を要すると思われる。

落着はこの β -脱離反応に於いて定量的に進行する緩和条件を見出すことおよび反応に際して δ 脱離反応などの副反応の有無を明らかにすることを目的として、ニ、三のモデル化合物を用いてその脱離反応を検討した。

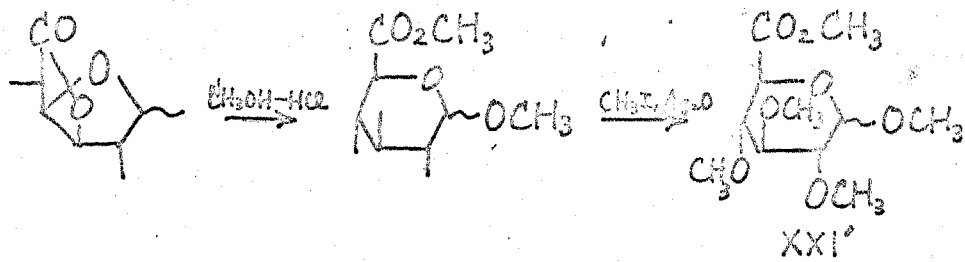
まず、 α -節ではモデル化合物として選んだ種々のメチルグリクロノシドのO-メチル誘導体および3-O-(2',3',4',6'-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコシル)-2-O-メチル-グリセリン酸メチルエステルの合成について、 α -節ではこれらを用いて脱離反応の条件およびその反応生成物について述べる。

オ - 節 メチルグルクロノシドの O-メチル誘導体および 3-O-(2',3',4',6'-テトラ-O-アセチル-β-D-グルコピラノシル)-2-O-メチル-グリセリン酸 メチルエステルの合成

まず β-脱離反応条件を検討するためのモデル化合物としてメチル 2,3,4-トリ-O-メチル-α-D-グルクロノシド メチルエステル(XXI)を用いたが、従来の D-グルクロン酸-3,6-ラクトンを出発原料とする方法では純粋な α-アノマーのみは得にくいため、新たにメチル α-D-グルコシドを原料として合成した。更に、1→4, 1→3, 1→2グリコシド結合をもったモデル化合物として、それぞれメチル 4-O-メチル α-D-グルクロノシド メチルエステル(XXI), メチル 3-O-メチル α-D-グルクロノシド メチルエステル(XXII), メチル 2-O-メチル α-D-グルクロノシド メチルエステル(XXIII)を用いたが、XXI は既知物質で XXII, XXIII は新たに合成したものである。これらいずれもメチル グルクロノシドとしたのは還元末端からのアルカリによる分解の影響をなくするためである。以上の化合物はいずれも脱離する基はメトキシ基またはヒドロキシ基であるが実際の多糖に於いてはグリコシルオキシ基であり、これらの相違も検討の必要があると思われるのでモデル化合物として新たに 3-O-(2',3',4',6'-テトラ-O-アセチル-β-D-グルコピラノシル)-2-O-メチル-グリセリン酸 メチルエステルを合成した。

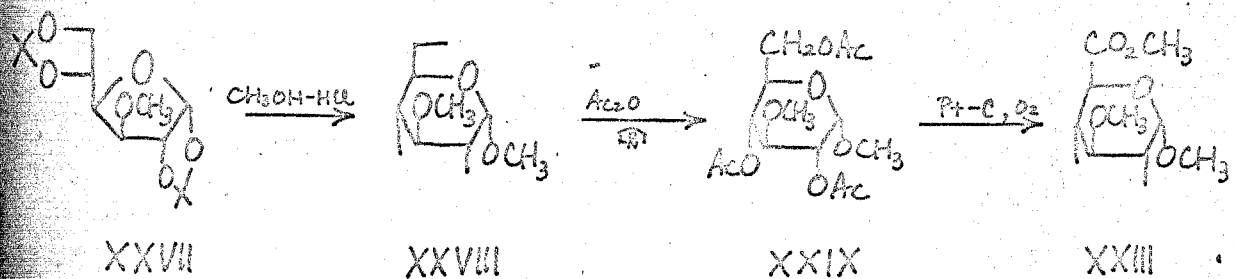
メチル 2,3,4-トリ-O-メチル-α-D-グルコピラノシド メチルエステル(XXI)の合成

既知の方法に従い D-グルクロン酸-3,6-ラクトン(XXIV)をメタノール-塩酸と加熱還流し、メチル D-グルクロノシド メチルエステルとし、更にメチル化してメチル 2,3,4-トリ-O-メチル-D-グルクロノシド メチルエステル(XXI')を得た。α-アノマー(XXI)の他に β-アノマーを除去ことがガスクロマトグラフィ-(GLC)および NMR スペクトルで確認された。



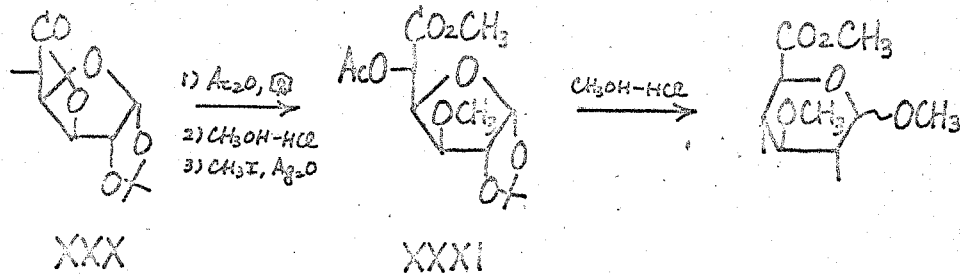
そこでメチル α -D-グルコピラノシドを常法により Pt-C を触媒として接触酸化して得られるメチル α -D-グルクロノシドをメチル化して XXI を得た。このものの旋光度は $[\alpha]_D + 140^\circ$ で NMR スペクトルでも α -3) マーのみであることを確認した。

メチル 3-O-メチル- α -D-グルクロノシド メチルエステル (XXIII) の合成
1,2:5,6-ジ-O-イソプロピリデン- α -D-グルコフラーノースを Purdie 法でメチル化し得られる 1,2:5,6-ジ-O-イソプロピリデン-3-O-メチル- α -D-グルコピラーノース (XXVII) を 3% 塩酸-メタノールとともに 20 時間加熱還流し、メチル 3-O-メチル- α -D-グルコピラノシド (XXVIII) を得たがこのものは結晶化せず精製が困難なので流水酢酸-ピリジンでアセチル化してメチル 2,4,6-トリ-O-アセチル-3-O-メチル- α -D-グルコピラノシド (XXIX) とし、蒸留し精製した。XXIX を炭酸水素ナトリウム水溶液に懸濁し、Pt-C を触媒とし接触酸化し得られたメチル 3-O-メチル- α -D-グルクロノシドをメタノール-塩酸でエステル化し目的物 XXIII を得た。



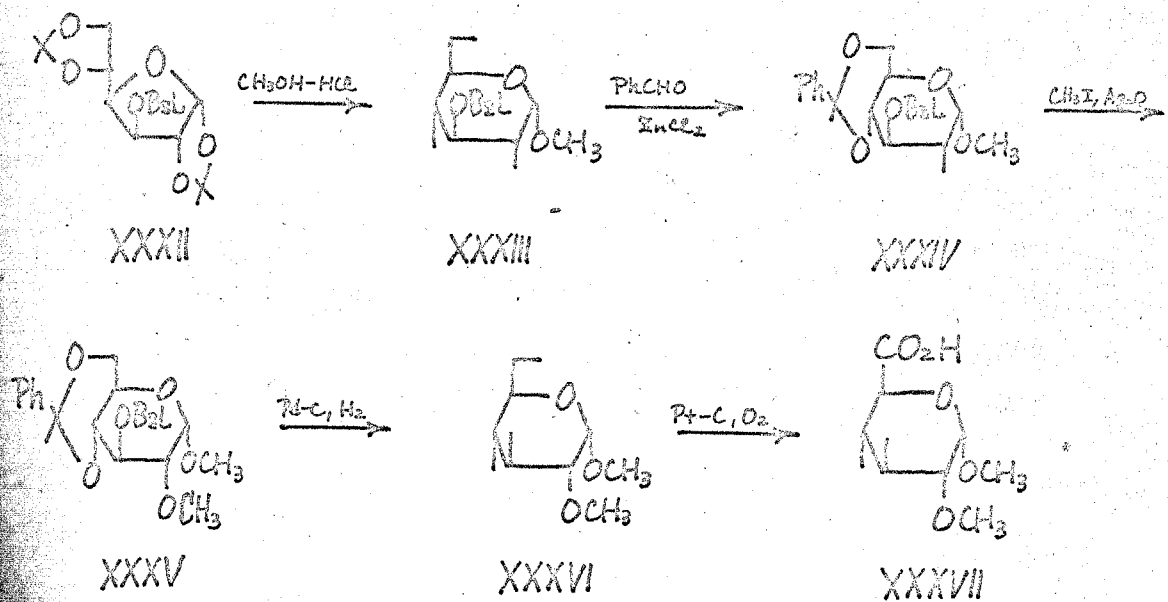
また、D-グルクロン酸 3,6-ラクトン (XXV) を出発物質として次の経路で XXIII を合成した。即ち、XXV をアセトン中 Amberlite IR-120 (H型) とともに加熱還流して 1,2-O-イソプロピリデン誘導体 XXX を得たが、従来の

硫酸と結晶とする方法に比べ収率が良く，生成物の結晶性もすぐれている。
 XXX をアセチル化した後，メタノール中 Amberlite IR-45 (OH型) と攪
 拌し，ラクトン環を開裂してメチルエステルとし，更に Purdie 試薬でメチ
 ル化を行ない 5-O-アセチル-1,2-D-イソプロピリデン-3-O-メチル- α -D
 -グルクロン酸メチルエステル(XXXI) を得た。これを 3% 塩酸-メタ
 ノール中で加熱還流すると，3-O-メチル-D-グルクロノシドメチルエステル
 XXIII' を得た。このものの旋光度の値はやや小さく，その NMR スペクト
 ルの様子からも β -アノマーをかなり含んでいると思われる。



メチル 2-O-メチル- α -D-グルクロノシド(XXIV)の合成

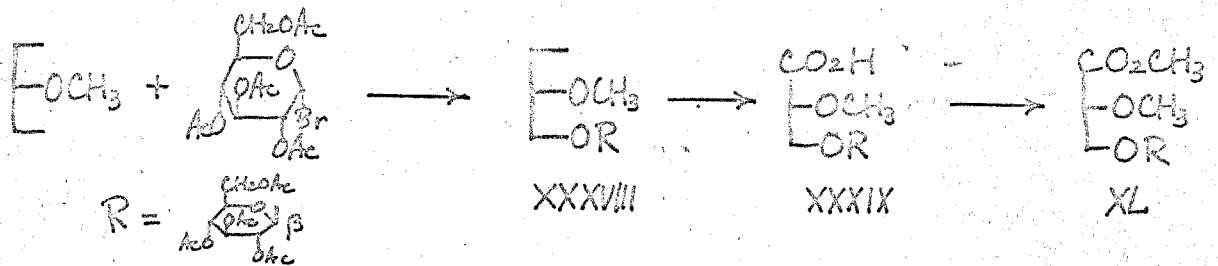
3-O-ベンジル-1,2:5,6-ジ-O-イソプロピリデン- α -D-グルコフ
 ラノース(XXXII)を出発原料として次のような経路で XXIV を合成した。



まずXXXIIを3%塩酸-メタノールでメタノリシスレ、得られるメチル3-O-ベンジル-D-グルコシドXXXIIIを常法によりベンツアルデヒドと塩化亜鉛でベンジリデン化し、メチル3-O-ベンジル-4,6-O-ベンジリデン- α -D-グルコピラノシド(XXXIV)を得た。このものはNMRスペクトル(図-5)にみられるごとくわずかに β -アノマーが混入していると思われるが旋光度から大部分は α -アノマーである。次にXXXIVをPurdie試薬でメチル化した後、5% Pt-Cを触媒とし、ベンジリデン基およびベンジル基を加水素分解すると、メチル2-O-メチル- α -D-グルコシド(XXXV)が得られた。これを10% Pt-Cを触媒とし酸化するとXXIIが得られた。

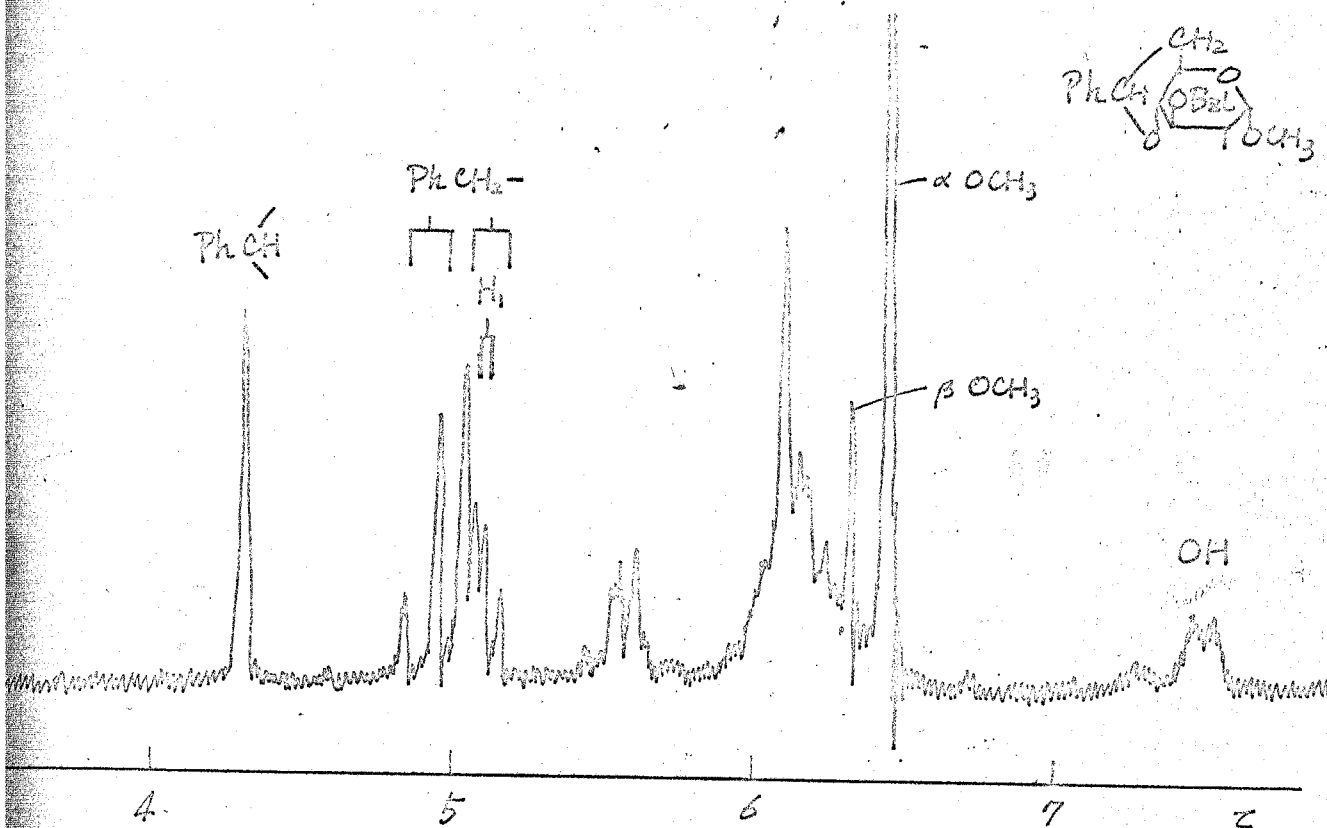
3-O-(2',3',4',6'-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル)-2-O-メチル-グリセリン酸メチルエステル(XXV)の合成

1. 3-O-ベンジリデングリセロールをナトリウムヒドライド、ヨウ化メチルでメチル化した後、加水分解して得られる2-O-メチルグリセロールを等モルの2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- α -D-グルコピラノシルプロマイドとクロロホルム中酸化銀を用いて縮合すると収率35%で3-O-(2',3',4',6'-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル)-2-O-メチル-グリセロール(XXXIII)が得られた。そのNMRスペクトルより β -アノマーで

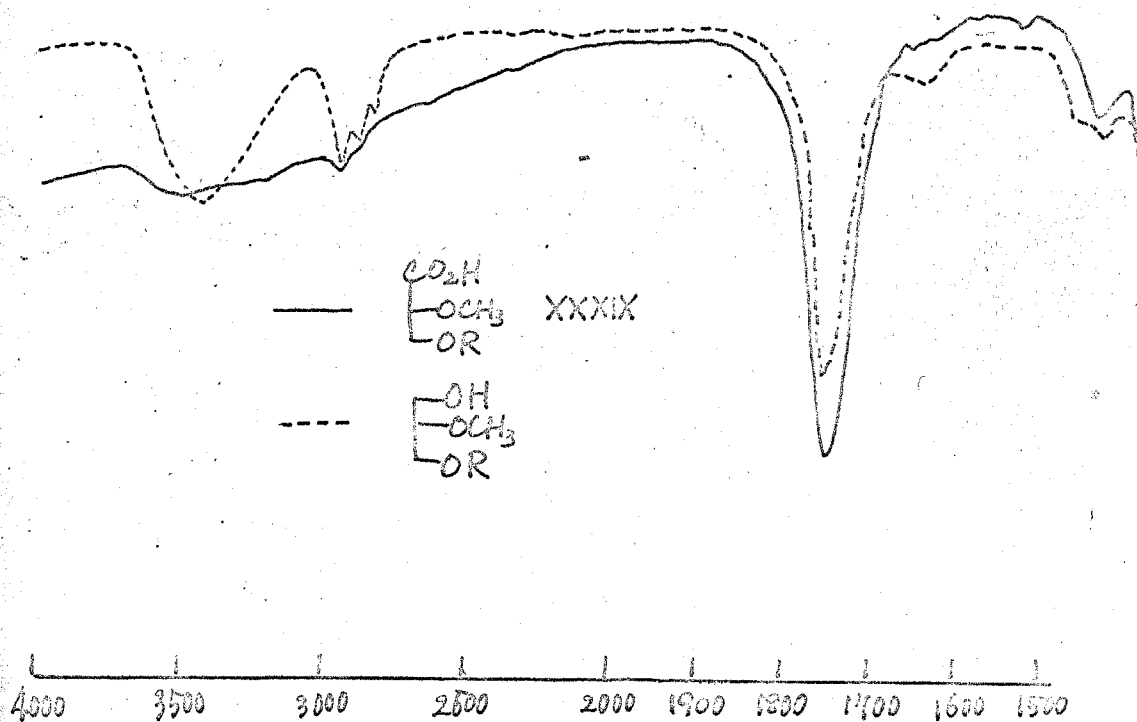


あることが確認された。更にXXXIIIを過マンガン酸-酢酸で酸化すると低収量ではあるが3-O-(2',3',4',6'-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル)-2-O-メチル-グリセリン酸(XXXIX)が得られた。なおこの際に原料が7-O-アセートとして多量に回収された。XXXIXの構造はIRスペクトルでカルボキシル基の吸収は確認できながら水酸基の吸収が減少すること、図-6

☑-5 XXXIV の NMR スペクトル

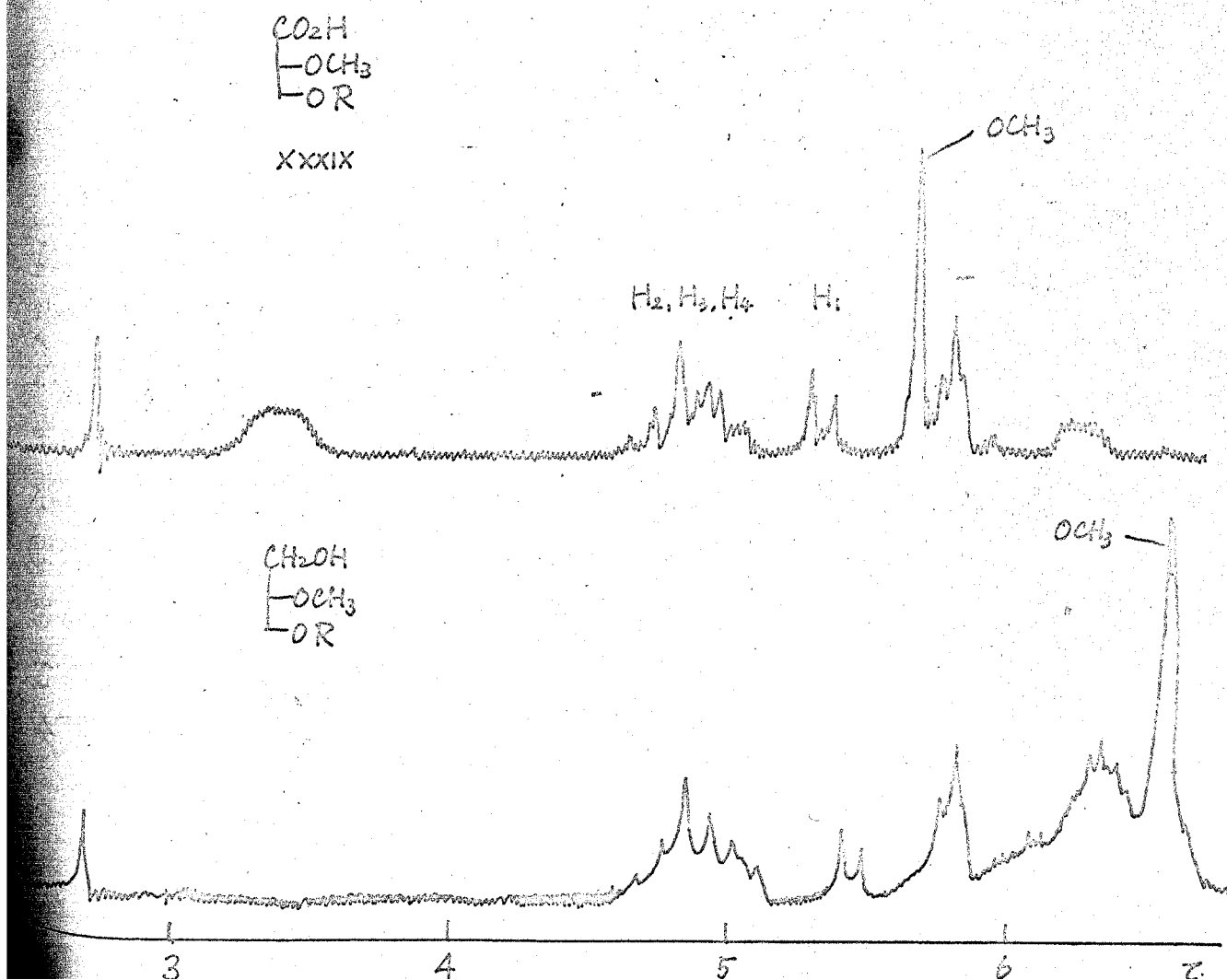


☑-6 XXXIX の IR スペクトル



NMRスペクトルでは通例より高磁場であるが $\tau=3$ 付近にカルボキシル基の水素が見られること、原料に比べ α -O-メチル基の水素が大きく低磁場にシフトすることなどから確認された。(図-7) なお、この酸化反応の収量を良くするためにクロム酸酸化(クロム酸-ピリジン, クロム酸-酢酸), DMF-DCCによる酸化, 接触酸化(Pt-C, O_2) など種々の酸化反応を行なったがいずれも目的物は得られなかった。次に XXXIX をジアゾメタンでエステル化し XL を得た。

図-7 XXXIX の NMR スペクトル



第二章 β-脱離反応の検討

まず、前章で合成したメチル D-グルクロノシドの種々の O-メチル誘導体の脱離反応の追跡方法としては、生成するメタノールまたは α、β-不飽和グルクロン酸誘導体の定量が考えられる。しかしメタノールの定量に際しては生成した微量のメタノールの反応液からの分離に難点があり使用できない。また NMR スペクトルで生成するメタノールのメチルプロトンを定量することも試みたが原料の O-メチル誘導体のメチルプロトンのケミカルシフトが接近しているので断念した。従って、生成する α、β-不飽和グルクロン酸誘導体の UV スペクトルの 238 mμ 付近の吸収および NMR スペクトルに於けるビニルプロトンの吸収によって反応の追跡を試みた。最初にメチル 2,3,4-トリ-O-メチル-D-グルクロノシドメチルエステル (XXI') を用いて次のようなアルカリ条件下で脱離反応の有無を調べることを行なった。

(i) アルカリ水溶液中の脱離反応

0.02N および 2N 炭酸ソーダ溶液

0.02N, 0.5N および 2N 水酸化ナトリウム溶液

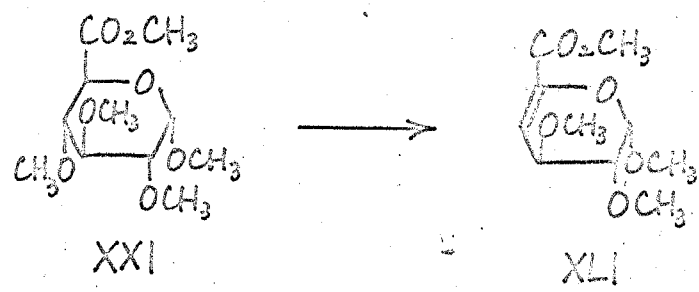
(ii) 1.3N 水酸化ナトリウム / エタノールによる脱離反応

(iii) 1.5N ナトリウムメテート / メタノールによる脱離反応

反応温度はいずれも 60-95°C で行ったが (i), (ii) の条件下では UV スペクトルに於いて不飽和カルボン酸にもとづく 235~240 mμ の吸収は全く見られなかった。薄層クロマトグラフィーでは原料のエステルが加水分解され生じたナトリウム塩のスポットのみが検出された。また (ii) の条件下、重水中 NMR スペクトルの変化も追跡したが何の変化も観測されなかった。

(iii) の条件は Heimら¹⁴⁾ が報告しているのと同じ条件であるが UV スペクトルおよび NMR スペクトルで脱離反応が起きていることが観測された。そこで反応の詳細な検討を行うために生成物であるメチル 2,3-ジ-O-メチル-^{4,5} α-D-グルクロノシドメチルエステル (XLI) の単離を試みた。XXI を

(III) の条件下で 45 分加熱還流した後、イオン交換樹脂を用いて炭イオンを
し、蒸餾するとシラップが得られるがこれを蒸留により精製すると沸点 75
~82°C / 0.03 mm Hg の XLI が 35% の収率で得られた。

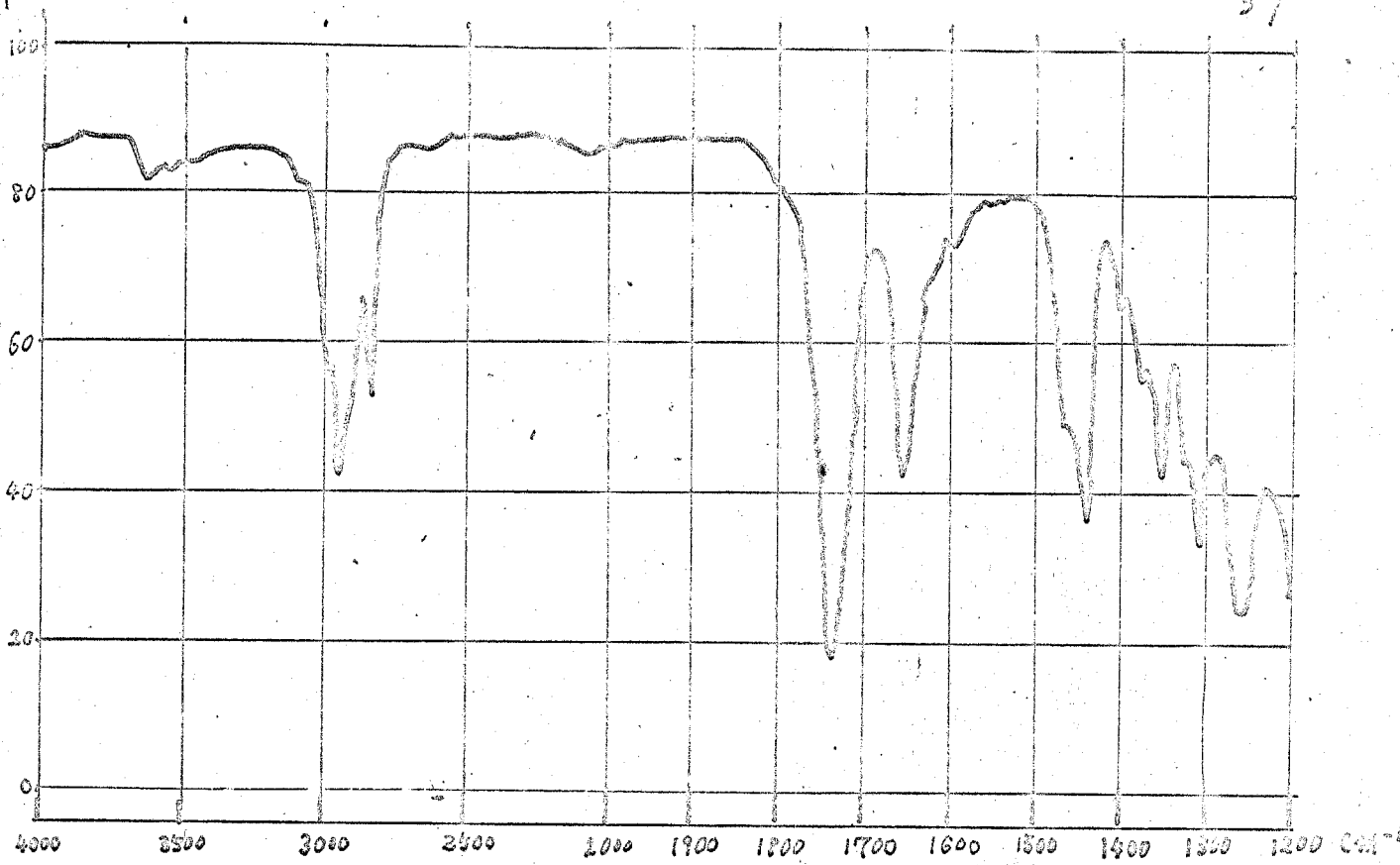


このものは IR スペクトル(四-8)では 1738 cm⁻¹ にエステルカルボニル、
1650 cm⁻¹ に炭素-炭素二重結合の吸収をもち、XLI の構造に一致する。
また NMR スペクトル(四-9)によってもこの構造は確認される。UV ス
ペクトル(四-10) は 238 mμ に吸収極大をもちその分子吸収係数は 5500
であった。次に(III)の条件で反応を行ない反応溶液を定期的に採取し、
0.02N 塩化水素 / メタノールで中和した後 UV スペクトルを測定すると図
-11) のようになつた。これからすでに得た XLI の分子吸収係数(5500)
を用いて反応百分率を求めグラフにすると 四-12) のようになり反応は 40%
程度しか進行していきなことがわかった。

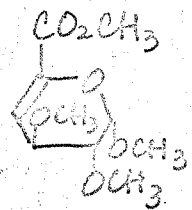
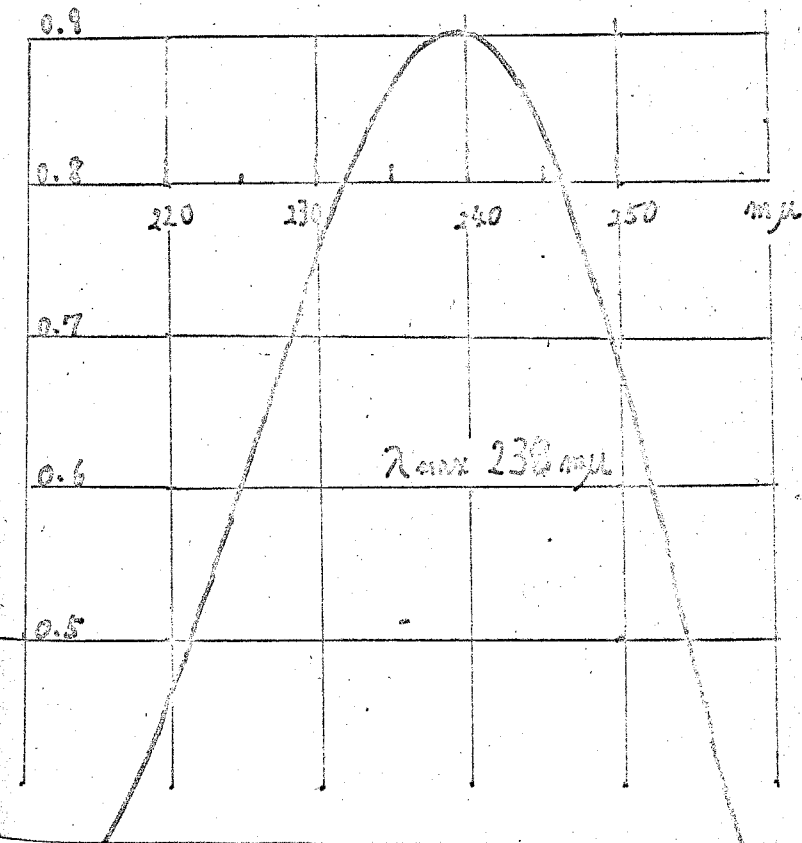
一方 NMR スペクトルによる反応の追跡は生成したビニルプロトンの交
換が認められるなど不適当であることがわかった。さらに脱離反応のよい
条件を探るためにカリウム セブテラート を塩基として用いて種々の条件下で
脱離反応を試みた。カリウム セブテラートを昇華によって一端単離し
メタノール、エタノール、ジオキサンなどの有機溶媒に溶解させるか、懸濁
して脱離反応を行なったがいずれも反応しなかつた。そこでカリウム セ
ブテラートを単離せず、すなわちカリウム セブテラート / セブテノール系
でできるだけ濃度を断つて脱離反応をおこなつたところ、室温でも非常にす
みやかに反応が進行することがわかった。XXI と塩基(カリウム)の割合を
三、三 変えて定期的に UV スペクトルで反応を追跡したがその結果を 四-13

☑ -8 XLI の IR スペクトル

37

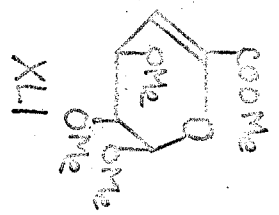
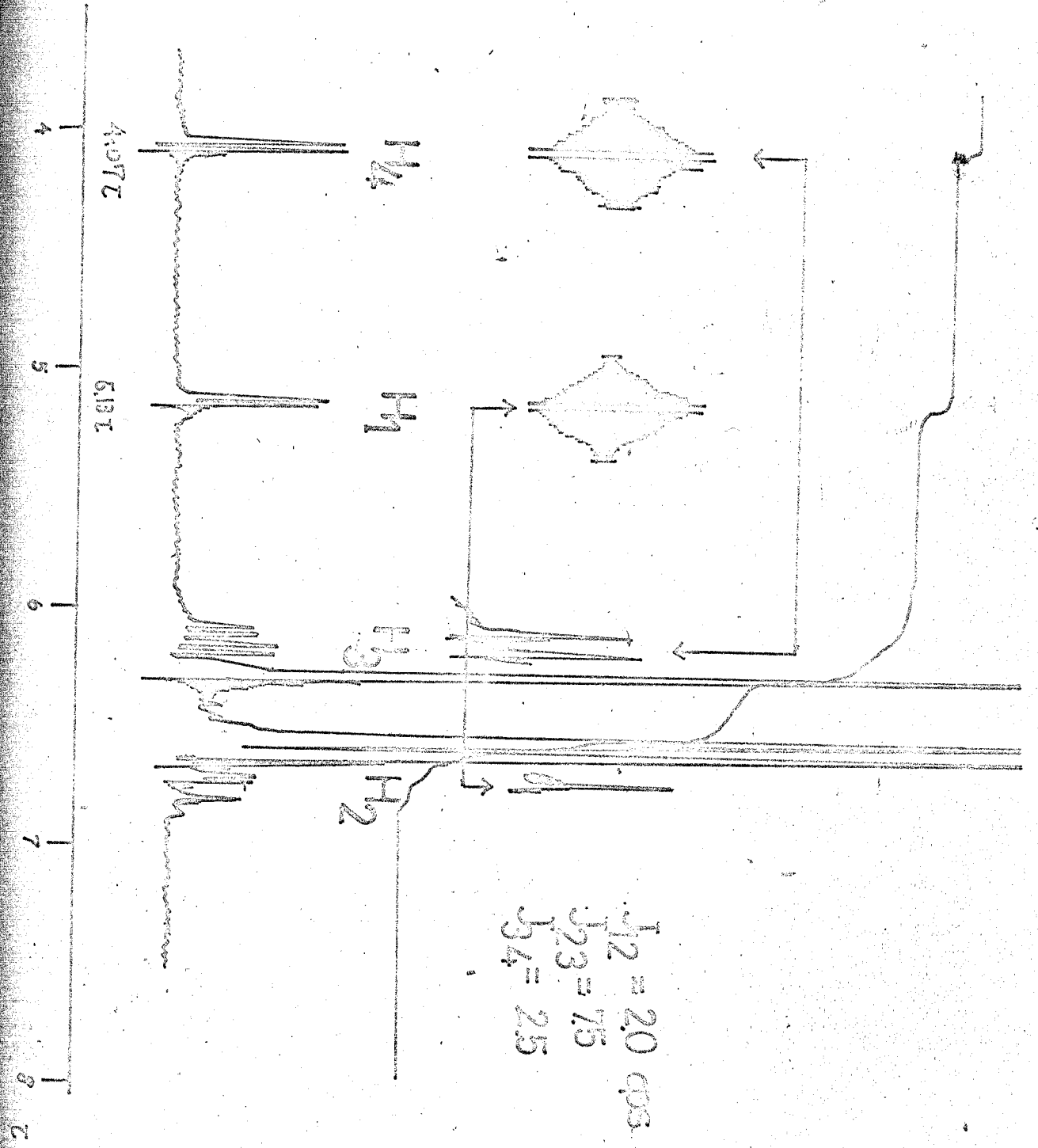


☑ -10 XLI の UV スペクトル



XLI

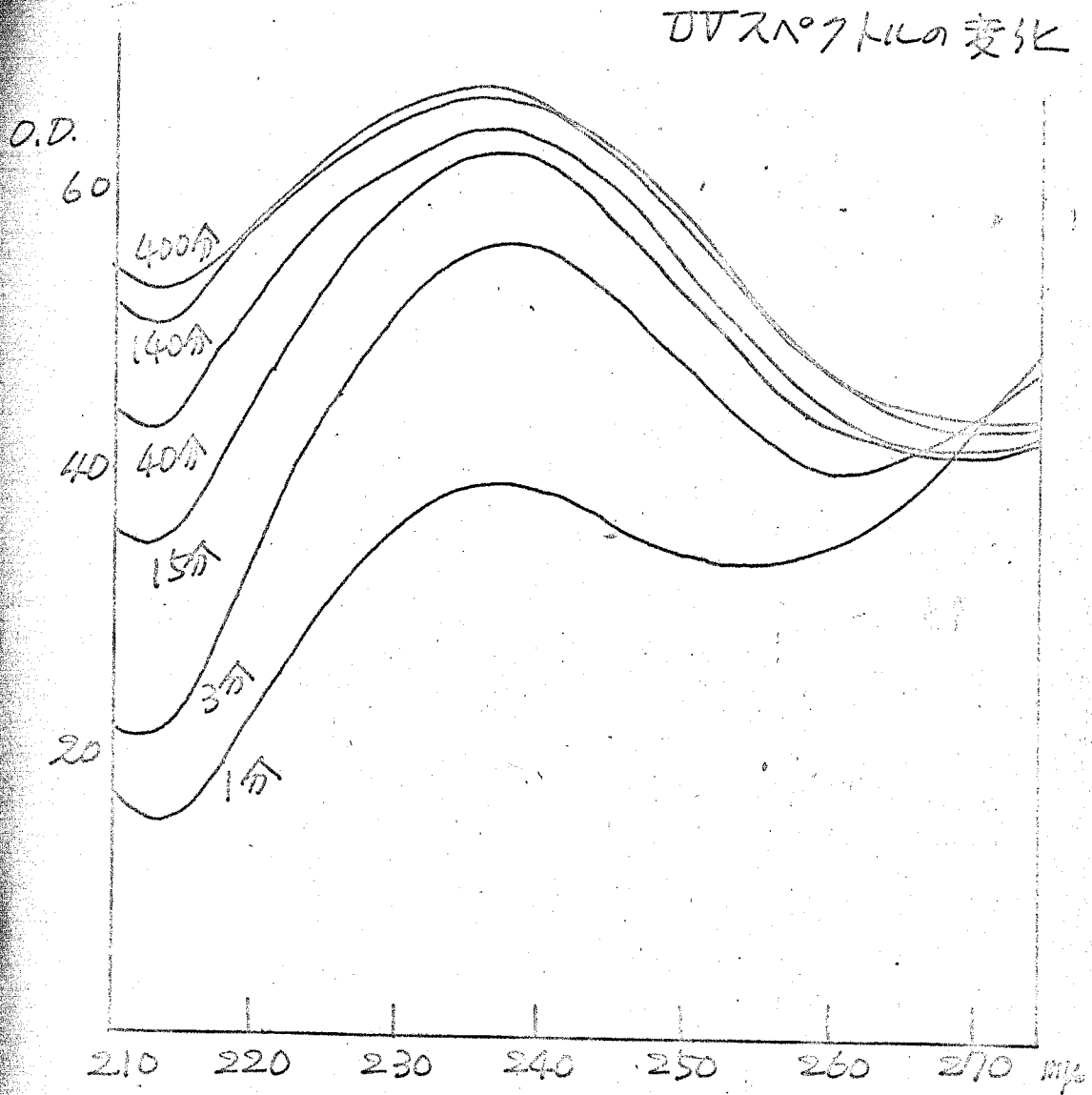
XL1 9 NMR 2R29KIV



⑦-11 XXI の $\text{NaOCH}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$ に於る反応

UV吸収の変化

39



⑦-12

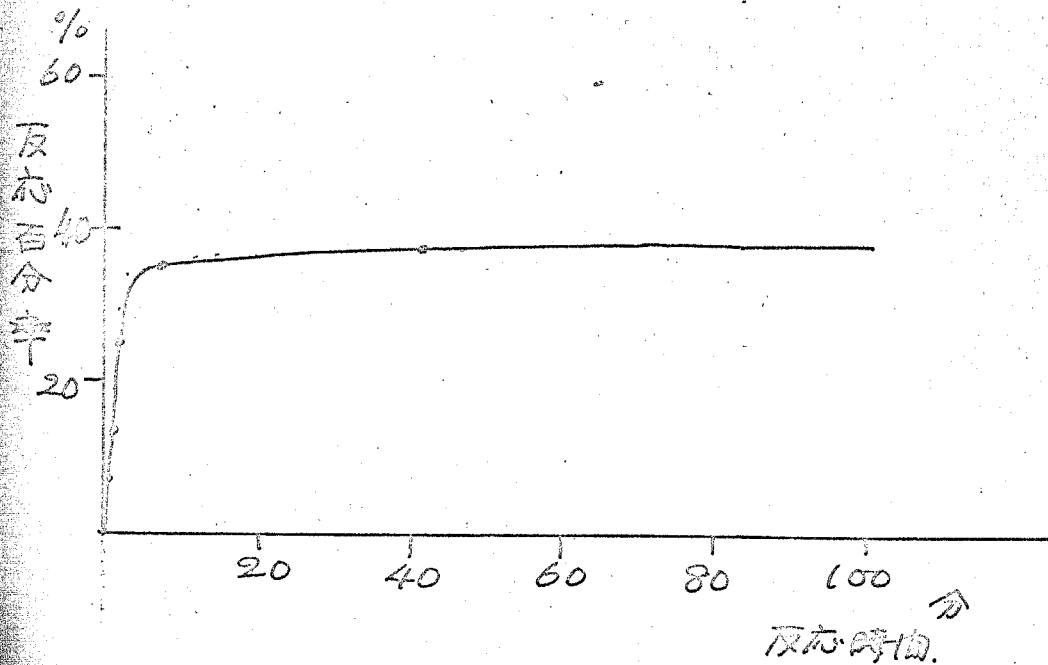
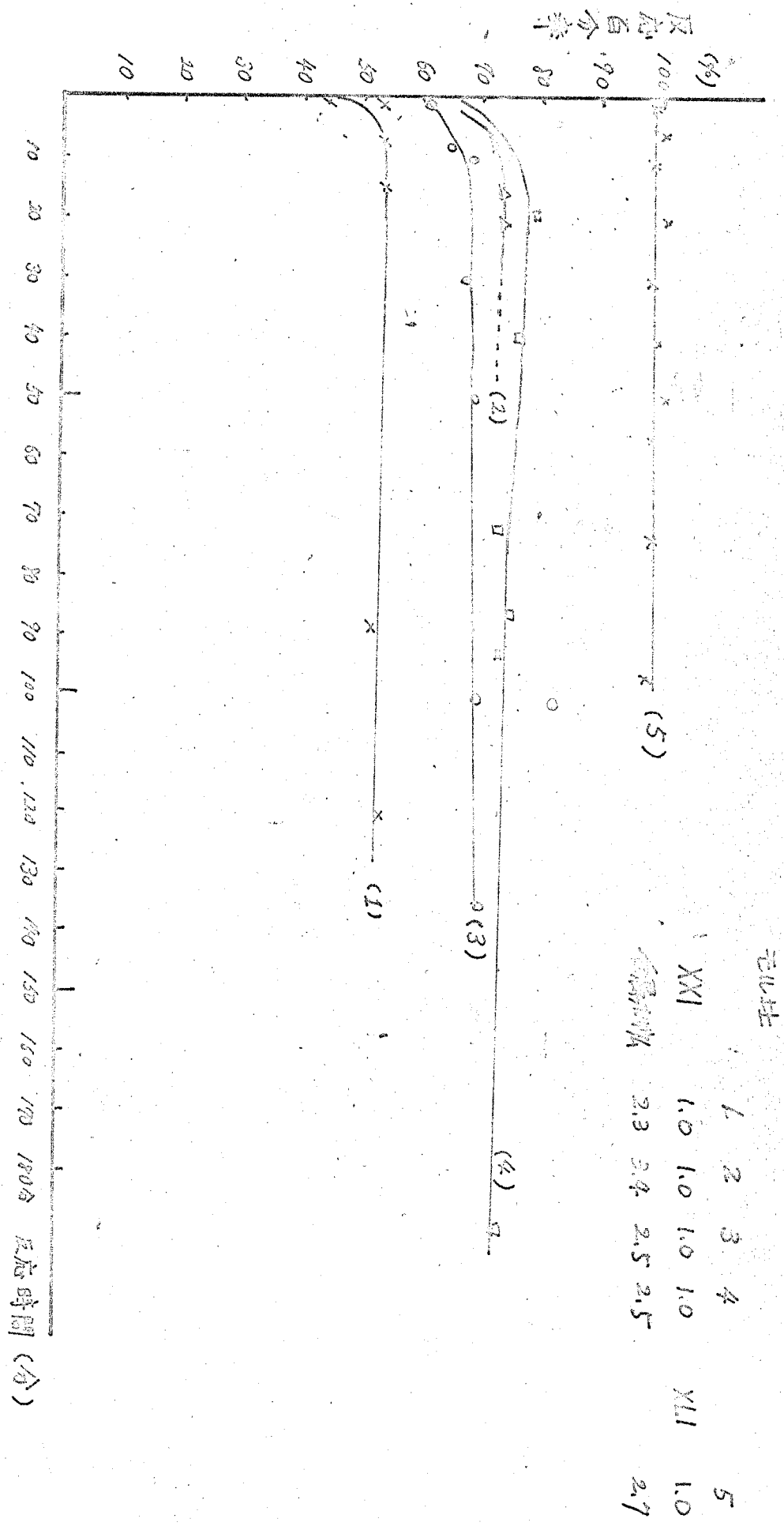


图-13. XXI 的 t-BuOK/t-BuOH 15:5 的分离及示



に示した。いずれもほとんど瞬間的に反応は終了し、10分以後は大きな変化は見られな。収率は50~80%であるがこの差は遊基の濃度などよりはむしろ反応溶液中の水分に基づくものと思われる。すなわち、金属ナトリウムまたはカルシウムハイドライドを加えて精留したばかりのセブタノールを用いた場合には常に70~80%脱離反応が進行することがわかった。

反応生成物についてより詳細に検討するためガスクロマトグラフィー(GC)を用いた。XXI'(D-グルクロン酸-3,6-ラクトンより合成したもの)のセブタノール溶液とカリウムセブテラート溶液とを室温で10分放置後中和してGCにかけると図-14のようなクロマトグラムが得られるが、保持時間の比較から各々のピークはそれぞれ図-14のように同定されるが、この結果から反応溶液中に未反応の原料(XXI)が少量含まれていること、生成したβ-不飽和カルボン酸エステルの一部が加水分解されたものがあることがわかる。また、原料のエステルが加水分解されたものも含まれており、反応が80%以上進行しないのは溶液中の水分、または反応操作の途中での空气中水分の混入によりエステルが加水分解され、XXIの一部がカリウム塩となるためと考えられる。従ってより厳密に湿気を断った系で反応を行えばさらに反応は進むと思われるがそのような検討は行なわなかった。ところでGCの結果からこのような条件下では当初に期待したような脱離反応すなわち、XLIよりさらに2位のメトキシ基が脱離するような反応は起きていないことがわかるが、これを確認するためにXLIをカリウムセブテラートとともに室温で放置するか、加熱(80°C)した後、GCで検出した。そのクロマトグラムは図-15のようになり、XLIのエステルが一部加水分解されたものが見られるのみで脱離生成物らしきものは存在しなかった。またUVスペクトルでも何ら変化が見られないのでこのような条件下では脱離反応は起らないと断定した。

以上の結果できるだけ湿気を断っておけばカリウムセブテラート/

図-14 XXI' の脱離反応生成物のGLC

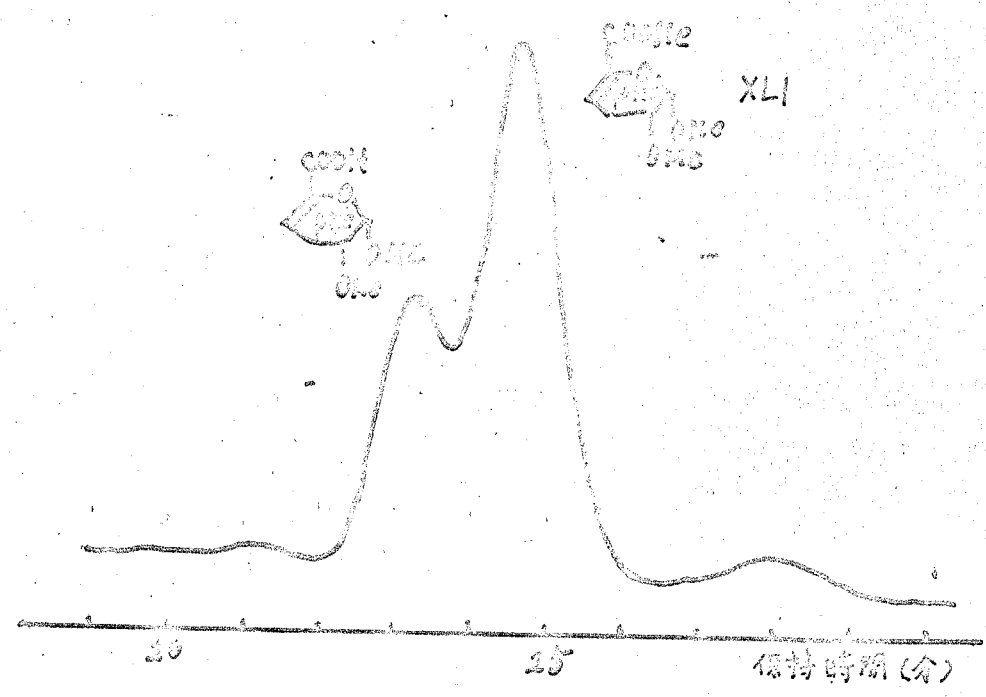
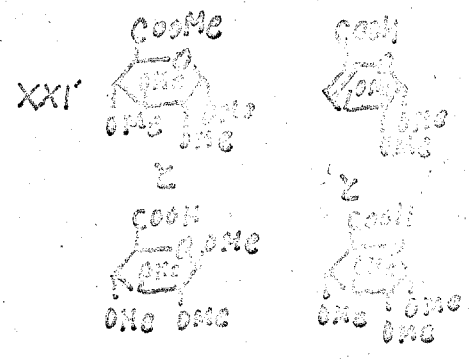
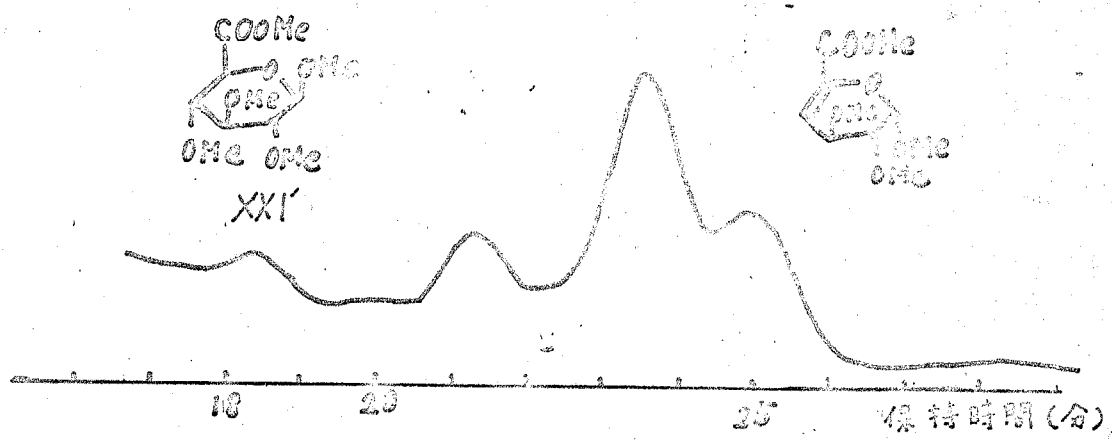
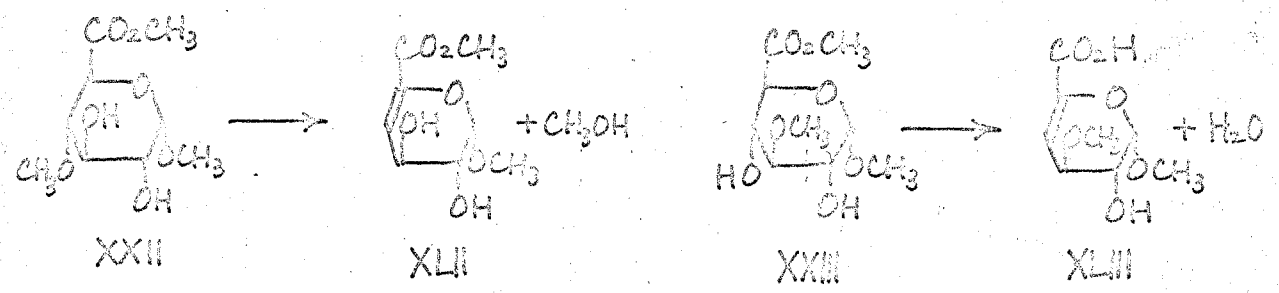


図-15 XLI の脱離反応生成物

α-D-グルコース系に於いてすみやかに高収率でβ-脱離反応が進行することがわかったがこれらの条件を用いてメチル 4-O-メチル-α-D-グルクロノシドメチルエステル (XXII) とメチル 3-O-メチル-α-D-グルクロノシドメチルエステル (XXIII) の脱離反応をおこなった。反応液を過酸-エタノールで中和し、IR-120 (H型) で脱カリウムイオンした後、アルミナカラムで生成物を分離した。それぞれ XXII からメチル Δ^{4,5}-α-D-グルクロノシドメチルエステル (XLII), XXIII からメチル 3-O-メチル-Δ^{4,5}-α-D-グルクロノシド (XLIII) を得たが後者は収率も悪く、エステルも加水分解されている。これは脱離反応によって水が副成するためと考えられる。構造は



いずれも NMR, IR, UV スペクトルなどから確認された。 図-16. 17
また 2-O-メチル糖環体の脱離反応は目下検討中である。

44

☑ -16

XLII a NMR 20° KIL 51500 IR 20° KIL

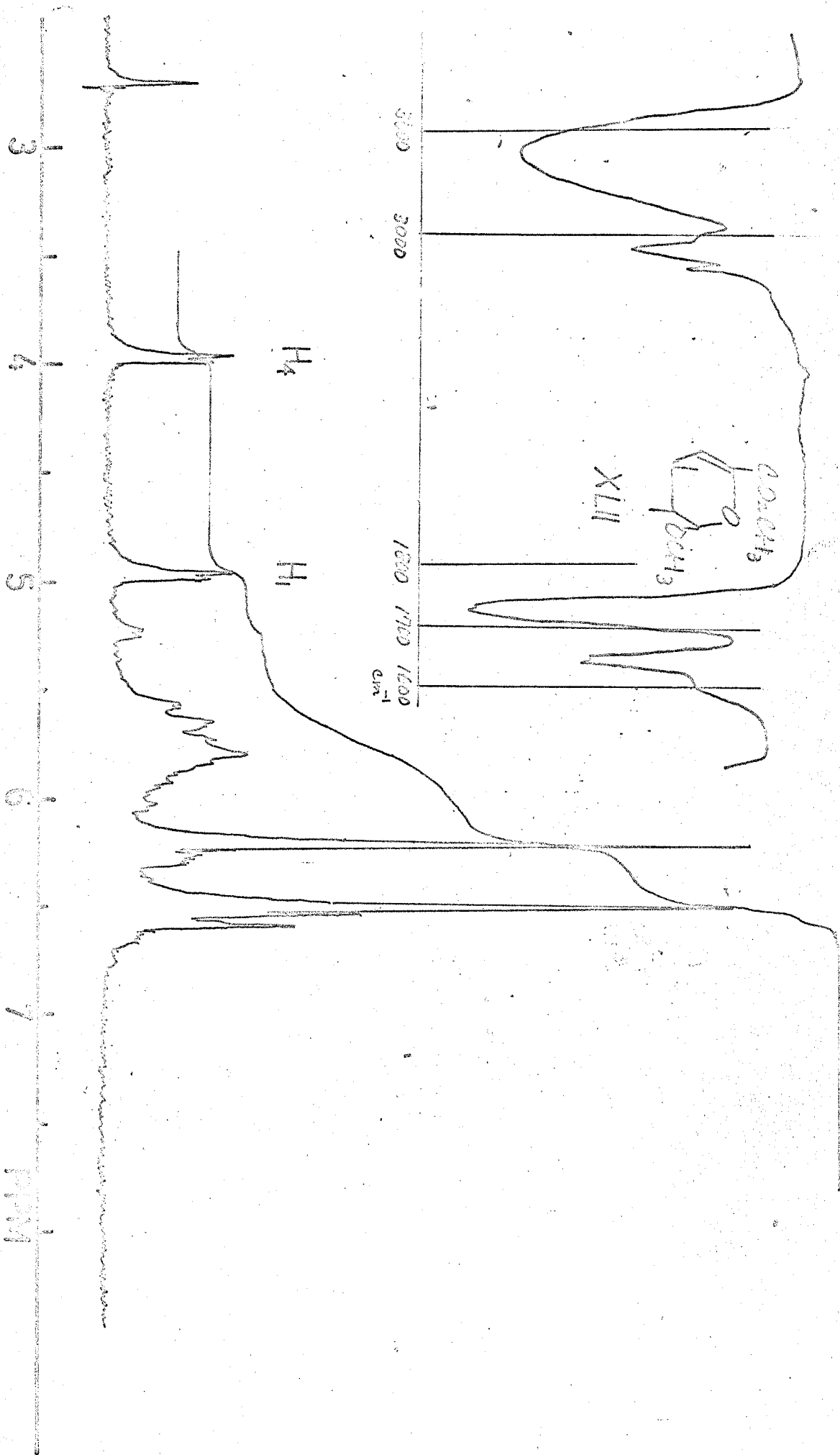
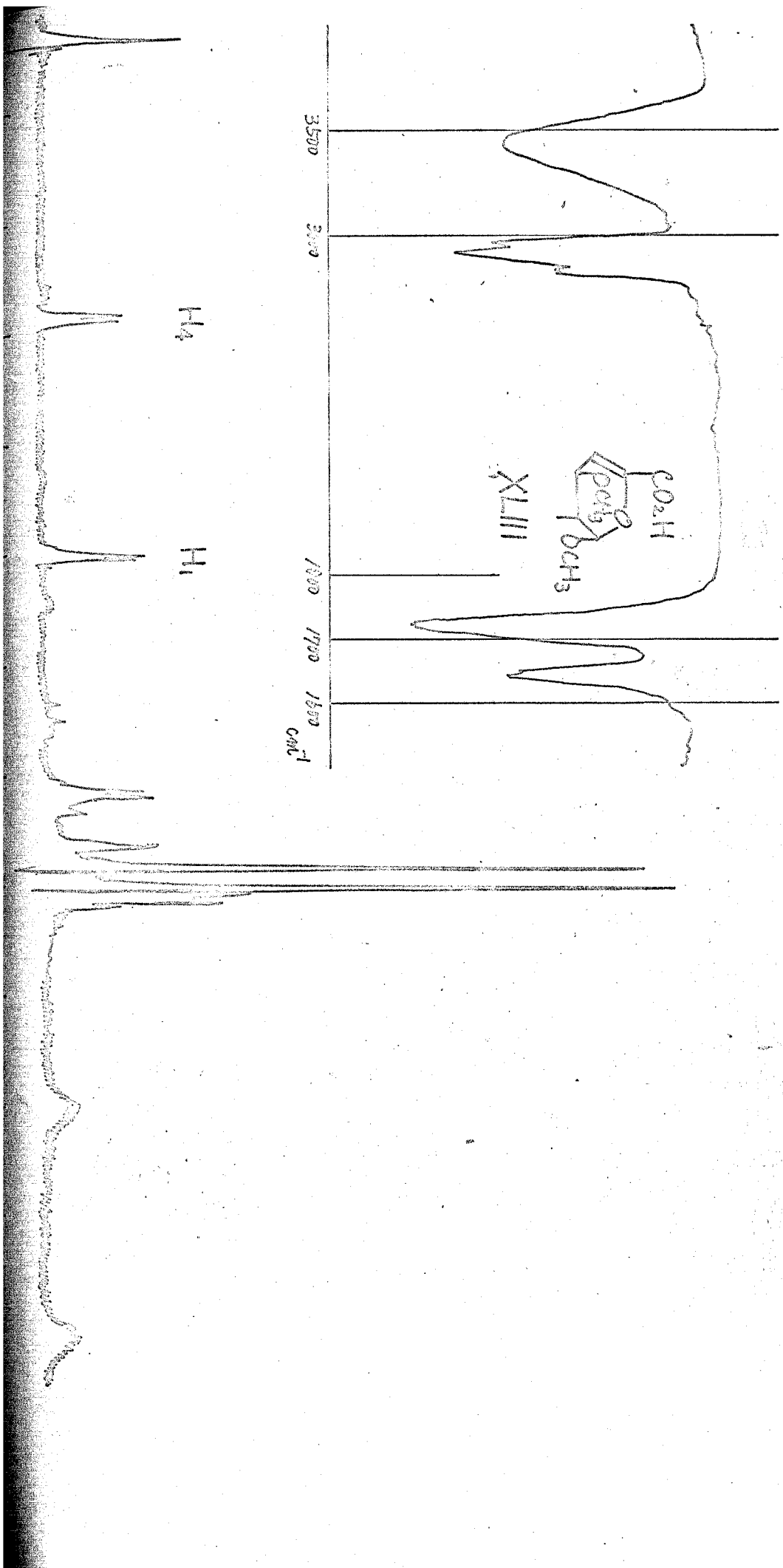


Fig-17 XLIII の NMR 測定結果の IR 測定結果



負 験 の 部

カ-節

種々の測定には次の機器を用いた。

- NMR スペクトル 日本電子 JMN 4H-100
- IR スペクトル 日立 EPI-G₂型
- UV スペクトル 日立 EPS 3T型
- ガスクロマトグラフ- 日立 K-53型

一般的メチル化法

メチル化は特にことわりなき場合は Purdie 法 およびその改良法である Kuhn 法 を用いた。すなわち、原料糖をクロロホルムまたはジメチルホルムアミド (DMF) にとかし、1.2 倍モルの酸化銀を乾燥剤として Drierite を適当量 (15~20g / 溶液 100 ml 当り) を加え、還元冷却器をつけ、氷冷し、攪拌しつつ、ヨウ化メチル 1.2 倍モルを滴下した。先をさえぎってそのまま室温で 2~4 日 攪拌した後、不溶物をろ別し、ろ液を濃縮して目的物を得た。

一般的接糖酸化法

原料糖の水溶液は約等量の 10% Fe-C を加え、還元冷却器をつけ、約 80~100°C に加熱、攪拌し、酸素ガス (1.5~2 気圧) を用いて吹き込み酸化をおこなった。時々 pH メーターで pH を測定し、水素ナトリウム水溶液で pH を 6~8 に保ちつつ反応をおこなった。反応の終点は薄層クロマトグラフ (TLC) で原料スポットが消失することを確認したが、全反応時間は 20~30 時間ぐらひであった。反応終了後、炭煤をろ別して除き、ろ液を濃縮すると相当するウロン酸のナトリウム塩を得るが、これを Amberlite IR 120 (H型) または Dewe x 50W x 8 (H型) カラムで脱塩し目的とするウロン酸誘導体を得た。

1) メチル 2,3,4-トリ-O-メチル-d-D-グルクロノシドメチルエステル (XXI)

(A) D-グルクロン酸-3,6-ラク톤を原料とする方法

Jones⁽¹⁸⁾の方法に従ってD-グルクロン酸-3,6-ラク톤より合成した。沸騰 88-90°C / 0.05 mm Hg, $[\alpha]_D^{20}$ 87° (c=1.0, メタノール)
 文献値⁽¹⁸⁾ 沸騰 120°C / 0.02 mm Hg, $[\alpha]_D^{20}$ 84° (c=1.0, メタノール)

元素分析値 C 49.94; H 7.01%

C₁₁H₂₀O₇としての計算値 C 49.99; H 7.63%

(B) メチル d-D-グルコピラノシドより合成する方法

メチル d-D-グルコピラノシド 124g を Pb-C を触媒として糖酸化し得られるメチル d-D-グルクロノシドを DMF を溶媒として常法によりメチル化し, XXI を得た。収率 35% 収量 5.6g

沸騰 94-97°C / 0.18 mm Hg, $[\alpha]_D^{20}$ 140° (c=1.2, メタノール)

元素分析値 C 50.33; H 7.46%

C₁₁H₂₀O₇としての計算値 C 49.99; H 7.63%

2) メチル 4-O-メチル-d-D-グルクロノシドメチルエステル (XXII)

Wacek⁽¹⁹⁾の方法に従い合成した。

沸騰 140°C / 0.15 mm Hg, $[\alpha]_D^{20}$ 135° (c=1.0, メタノール)

文献値⁽¹⁹⁾ 沸騰 130-140°C / 0.6 mm Hg, $[\alpha]_D^{20}$ 145° (メタノール)

3) メチル 2,4,6-トリ-O-アセチル-3-O-メチル-d-D-グルコピラノシド (XXIX)

1,2:5,6-ジ-O-イソプロピリデン-D-グルコフuranose を Purdie 法でメチル化して得られる 3-O-メチル糖母体 (XXVII) 57g を 3% 塩酸-メタノール (300 ml) で 20 時間加熱還流する。炭酸バリウムを加え一夜撹拌して中和し、3 液を濃縮するとシラップ 41g (収率 95%) をうる。これをよく減圧乾燥し沸水酢酸-ピリジンで常法によりアセチル

れし、蒸留により XXIX 33 g, (収率 50%) を得た。沸騰 115°-123°/0.01 mm Hg, $[\alpha]_D^{25}$ 91.5° (c 1.8, クロホルム)

4) メチル 3-O-メチル- α -D-グルクロノシドメチルエステル (XXIX)

(i) XXIX 5g を蒸留水に懸濁し, 10% Pd-C を加え, 約 80°C で酸素を流しながら待酵酸化した。約 30 時間を経た。IR-120 (H型) で脱ナトリウムイオンをし, 濃縮して得られる残渣を 10% 塩酸-メタノールにとかし一夜放置した後, 蒸気と減圧濃縮し, 蒸留して XXIII を得た。2.4 g (収率 68%) 沸騰 137°/0.07 mm Hg $[\alpha]_D^{25}$ 98.5° (c=1.1, メタノール)

元素分析値	C	44.97	H	7.09%
$C_9H_{16}O_7$ としての計算値	C	45.76	H	7.83%

(ii) 5-O-アセチル-7,2-O-イソプロピリデン-3-O-メチル- α -D-グルクロン酸メチルエステル (XXI), 5g を 3% 塩酸-メタノール (150 ml) にとかし 20 時間蒸気を断って加熱還流した。冷却後, Ausubel's IR-45 (OH型) 15g を加え中和した後, 樹脂をろ別し, 3液を濃縮し, XXIII' のシラップ (3.2g, 収率 82%) を得た。 $[\alpha]_D^{25}$ +30.8 (c=3.0, メタノール)

5) メチル 3-O-ベンジル-4,6-O-ベンジリデン- α -D-グルコピラノース (XXXII)

3-O-ベンジル-7,2:5,6-O-イソプロピリデン- α -D-グルコアラノース (XXXI) 30g を 3% 塩酸-メタノール (250 ml) にとかし, 10 時間加熱還流後, 炭酸バリウムで中和した。不溶物をろ別し, 3液を濃縮して得られるシラップ (26g) を減圧乾燥後, 乾法によりベンツアルデヒド, 塩化亜鉛でベンジリデン化し, 再結晶 19g (収率 60%) を得た。エタ

1-ールより再結し、融点 172-174°C の結晶 9.2g (収率 29%) を得た。

[α]_D +30.4° (c=1.1, エタノール) NMR ではわずかに β-アマーを含む。

元素分析値 C 67.55 ; H 6.58 %

C₂₁H₂₄O₆ としての計算値 C 67.73 ; H 6.50 %

6) メチル 3-O-ベンジル-4,6-O-ベンジリデン-2-O-メチル-α-D-グルコピラノース (XXXIV)

XXXIV 9.0g を Purdie 法によりメチル化し、粗結晶 8.9g (収率 95%) を得た。エタノールより再結晶 (7.8g) 融点 103~104°C

[α]_D +16.7° (c=1.5, エタノール)

元素分析値 C 68.63 ; H 7.00 %

C₂₂H₂₆O₆ としての計算値 C 68.63 ; H 6.98 %

7) メチル 2-O-メチル-α-D-グルコピラノース (XXXV)

XXXV 7.8g を 50% エタノール水溶液 100ml にとかし、Pt-C 3.0g を触媒として加水分解し XXXVI のシラップ 4.5g (収率 100%) を得た。

[α]_D +128° (c=1.5, エタノール) 文献値²⁰⁾ [α]_D +155°

元素分析値 C 45.85 ; H 7.86 %

C₈H₁₆O₆ としての計算値 C 46.15 ; H 7.75 %

8) メチル 2-O-メチル-α-D-グルコリシト (XXXVII)

XXXVII 1.2g を Pt-C を触媒として特種酸化し XXXVIII のシラップ 1.0g 収率 84% を得た。 [α]_D +71.2°

元素分析値 C 40.01 ; H 6.35 %

C₆H₁₄O₉ · H₂O としての計算値 C 40.00 ; H 6.71 %

9) 3-O-(2',3',4',6'-テトラ-O-アセチル-β-D-グルコピラノシル)-2-O-メチル
-グリセロール (XXXIII)

2-O-メチル-グリセロール 6.0g をクロロホルム 50ml にとかし、これに酸化銀 11.2g, Drierite 15g, 少量のヨウ素を加えた。氷水冷却し、2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-グルコシルブロマイド 15g をクロロホルム 40ml にとかした溶液を撹拌しつつ滴下した。先をさえぎってそのまま2日間撹拌し、不溶物をろ別し、ろ液を濃縮するとXXXIIIの結晶が析出する。エタノール-石油エーテルより再結晶 収量 6.8g (収率 33%)
融点 110-111°C $[\alpha]_D^{25} -25.0$ (C=17, エタノール)

元素分析値 C 49.86 ; H 6.53 %
C₁₀H₂₀O₁₂ としての計算値 C 49.54 ; H 6.47 %

10) 3-O-(2',3',4',6'-テトラ-O-アセチル-β-D-グルコピラノシル)-2-O-
メチル-グリセリン酸 (XXXIX)

XXXIII 5.0g を精製した酢酸 50ml にとかし、マグネチックスターラーで撹拌しつつ、過マンガン酸カリウム 4.2g を少量ずつ、4時間にかたまって加え、室温で2~3日撹拌を続けた。そのとき減圧濃縮し、残渣をクロロホルムで抽出し、これに炭酸水素ナトリウム溶液を加え、生成物を水層に移した。この際に懸濁している酸化マンガンをろ別した。水層を分取し、2N 塩酸で酸性にした後、再びクロロホルムで抽出した。クロロホルム層は2~3回水洗し、沸水炭酸ナトリウムで炭酸した後、濃縮するとXXXIXの結晶が得られた。エタノールより再結晶 収量 248mg
収率 5% 融点 134-136°C, $[\alpha]_D^{25} -41.1$ (C=1.0, エタノール)

元素分析値 C 46.88 ; H 5.76 %
C₁₀H₁₆O₁₃ としての計算値 C 46.0 ; H 5.78 %

また、炭酸水素ナトリウム溶液で抽出した際のクロロホルム層からはNMRスペクトル, IRスペクトルから原料の1-O-アセテートと思われるシラップ(4.8g)を得た。

11) 3-O-(2,3,4,6'-テトラ-O-アセチル-β-D-グルコピラニル)-2-O-メチル
グリセリン酸メチルエステル (XL)

XXXIX 115mg をクロロホルム 10ml にとかし、氷水冷却しつつ、
ジアゾメタンのエーテル溶液 (22mg/ml) 10ml を加え、そのまま室温に
もどし、ろ過した。そのまま濃縮するとはじめシラップが得られるが、
やがて XL が結晶する。エタノール-石油エーテルより再結晶 収量 60
mg (収率 52%) 融点 85-88°C、 $[\alpha]_D^{20}$ -36.4° (c=0.8, エタノール)

カニ節

1) NMRスペクトルによるXXI'の脱離反応の検討

NMR試料管中に0.02Nおよび2Nの炭酸ナトリウム重水溶液, 0.02N, 0.5N および2Nの水酸化ナトリウム重水溶液または1.5Nナトリウム重メチラート/重メタノール溶液を入れ, XXI'を約10%の濃度になるように加えて溶かし, 窒素置換して封管し, 60~95°Cに昇温し, スペクトルを測定した。

2) UVスペクトルによるXXI'の脱離反応の検討

XXI'を0.02Nおよび2Nの炭酸ナトリウム水溶液, 0.02N, 0.5N および2Nの水酸化ナトリウム水溶液, 1.3N水酸化ナトリウム/エタノール溶液, 1.5Nナトリウムメチラート/メタノール溶液にそれぞれ濃度2~3%になるようにとかし, 60~95°Cで加熱し, 経時的にUVスペクトルを測定した。

3) TLCによるXXI'の脱離反応の検討

プレートはワコーゲルB-0を, クロロホルム-メタノール(7:2)に懸濁した液にガラス板を浸し, そのまま風乾したものを利用した。これに上の反応液をスポットし, (A)酢酸エチル/酢酸/ギ酸/水(18:3:1:4), (B) *m*-ブタノール/酢酸/水(4:1:5), (C)クロロホルム/メタノール/酢酸(9:7:7)の三種の展開溶媒で展開した。発色は0.5%ナフトールレゾルシン/エタノール-リン酸(10:1)を粉霧し, 100°C, 30分保っておこなった。

4) UVスペクトルによるXXI'の脱離反応の追跡

(1) ナトリウムメチラート/メタノール系に於ける脱離反応

XXI 77.8mgを1.5Nナトリウムメチラート/メタノール 5ml

にとかし、還流器をつけて湯浴上で還流し、各時間毎に0.05 mlをピペットで正確にとり、0.02N塩酸/メタノール溶液3.75 mlを加えて中和し、UVスペクトルを測定した。

(ロ) カリウム セブテラート/セブタノール系における脱離反応

それぞれ次のような濃度のXXIのセブタノール溶液およびカリウムセブテラート/セブタノール溶液をあらかじめ調製しておき、湿気の入らない

	1	2	3	4
XXI	186.9 mg/5ml	194.0 mg/5ml	180.9 mg/5ml	183.5 mg/5ml
金属カリウム	70.9 mg/5ml	110.6 mg/5ml	75.4 mg/5ml	77.0 mg/5ml

ようにあはやくませあわせ、経時的に0.01 mlをサンプリングし、エタノール/塩酸で中和して全量5 mlとし、UVスペクトルを測定した。なお、1~3の実験においては蒸留後数日を経たセブタノールを用いたが、4~7の実験では蒸留後まもないセブタノールを用いた。

5) GLCによるXXI'の脱離反応生成物の検討

XXI'のセブタノール溶液とカリウムセブテラートを空過で反応させ、10分後にメタノール-塩酸で中和して注入した。GLCの測定条件は下記のとおりである。

カラム充填剤	20% デクサン-1,4-ジオールサクシネート (Chromosorb WAW 60~80 メッシュ)
カラムの長さ	1 m
水素圧力	試料側 0.80 kg/cm ² , 補償側 0.80 kg/cm ²
窒素圧力	0.64 kg/cm ²
空気圧力	2.0 kg/cm ²
温度	150-190°C 2°C/分で昇温
注入温度	340°C
試料濃度	30 μg/μl

6) メチル 2,3-ジ-0-メチル- $\Delta^{4,5}$ - α -D-グルクロノシドメチルエステル (XLI)

XXI 15g を 1.5N ナトリウムメタレート/メタノール 30ml と共に 45 分間還流し, IR 120 (H型) で脱イオン後濃縮すると, シラップを得た。これを高真空蒸留して, XLI 1.6g (収率 35%) を得た。沸点 $75 \sim 82^\circ\text{C}$ / 0.03mm Hg $[\alpha]_D^{20}$ 189° ($c=1.0$, メタノール) λ_{\max} 238 μm ($\epsilon = 5500$)

元素分析値 C 51.04 ; H 6.84 %
 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_6$ としての計算値 C 51.72 ; H 6.94 %

7) メチル $\Delta^{4,5}$ - α -D-グルクロノシドメチルエステル (XLII)

XXII 3g を テ-ブタノール 20ml にとかし, 此れに金属カリウム 680mg を テ-ブタノール 50ml にとかした溶液を窒素気流下ですばやく加え 8~9 分静かに振り混ぜた。塩酸-メタノールで中和し, 低温で減圧濃縮した。さらに乾燥メタノールを加えて濃縮し得られるシラップにエタノールを加えて不溶物を別して溶液を減圧濃縮し, XLII を得た。 $[\alpha]_D$ 177° ($c=1.1$, エタノール) λ_{\max} 238 μm ($\epsilon = 4050$)
 これを精製するためにアルミナカラム (30g) に試料を充てんし, はじめに石油エーテル-エタノール (95:5) 400ml を流し, 原料 (XXII) を除き, 次にメタノール-水 (7:3) 50ml を流し, 溶出した液を濃縮すると XLII 2.2g を得た。 $[\alpha]_D$ 184° , λ_{\max} 238 μm ($\epsilon = 4600$)

8) メチル 3-0-メチル- $\Delta^{4,5}$ - α -D-グルクロノシド (XLIII)

XXIII 5g を テ-ブタノール 20ml にとかした溶液に金属カリウム 160mg を テ-ブタノール 6ml にとかした溶液を窒素気流下に加え, 室温に 45 分放置した。塩酸/エタノールで中和し, IR 120 (H型) で脱カリウムイオンをおこなひ, 濃縮して得られるシラップをアルミナカラム (100g) で精製を試みた。まず, 石油エーテル/エタノール (95:5) 300ml で溶

出ると、粗XLIII 40mgが得られた。これをもう一度アルミナカラム
(1g)で精製するとXLIII 22mgが得られた。 $[\alpha]_D^{20}$ 170° (C=1.0,
エタノール)。 λ_{max} 238 m μ ($\epsilon = 4/100$)

結 論

本章では、合成したメチル D-グルクロノシドの種々の O-メチル誘導体を用いて、その β -脱離反応を検討した。

カ-節では、メチル α -D-グルクロノシドメチルエステルの 2,3,4-トリ-O-メチル、3-O-メチル および 2-O-メチル誘導体をメチル α -D-グルコピラノシド誘導体を出発原料として合成した。一部は D-グルクロン酸-3,6-ラク톤を用いる合成もおこなったが、いずれも単一のモノマーのみの生成物は得られなかった。また 2-O-メチルグリセロールと 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- α -D-グルコピラノシルブフロマイドを縮合した後、酸化、続いてエステル化をおこなった。3-(2',3',4',6'-テトラ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル)-2-O-メチル-グリセリン酸メチルエステルを合成した。

カニ節、カ-節で合成した、メチル 2,3,4-トリ-O-メチル- α -D-グルクロノシドメチルエステルを種々のアルカリ条件下で反応させた結果、アルカリ水溶液では脱離反応は起らずナトリウムメチラート/メタノール およびカリウムセブテラート/セブタノールで起ることを明らかにした。とくに後者の条件では室温で短時間(10分以内)に 70~80% 進行することを明らかにした。更に、 δ 脱離反応についてはカリウムセブテラート/セブタノールの条件下では加熱しても起らないことを確認した。メチル 4-O-メチル- α -D-グルクロノシド および メチル 3-O-メチル- α -D-グルクロノシドに脱離反応をおこなった。それぞれメチル $\Delta^{4,5}$ - α -D-グルクロノシドメチルエステル、メチル 3-O-メチル- $\Delta^{4,5}$ - α -D-グルクロノシドを得た。前者は高収率で得られたが、後者は低収率で、その上、エステルが加水分解されていた。これは反応により副成する水が原因と考えられる。

第 3 章) ロゲンゲ 体表面粘性物質に関する研究

緒 言

序論でも述べたように、魚体表面粘性物質は上皮分泌物であり、中性ムコ多糖に属しているが、魚によりその外見的形状、分泌の仕方、働きなど幾分異なるようである。一口に体表面粘性物質といってもドロドロで粘性の弱いもの、軟かくても粘性の強いもの、固いゼリー状のものなどがあるようである。また、魚体を水中から揚げた場合容易に脱落するものと、そうでないものもある。組織学的にも発生源である腺も魚によって異っており、うなぎの大きい粘液腺のように特殊な腺構造、単純な小袋様の上皮器官および単細胞のさかづき形の腺などがある。着着らが選人だゲンゲのように体表面をおおっている様なものもあるれば、めくらうなぎのように刺激によって多量に分泌されるものもある。これら粘性物質は機能的には魚体の保護的な役割をにんっているか、単なる排せつ物と考えられるが、いずれ何らかの機能的差異、構造的差異があるものと思われるが、現状では粗粘性物質のアミノ酸組成、糖組成およびそれを酵素分解して得られる多糖の糖組成の報告がある程度でその解明まではほど遠いものがある。

Wessler²¹⁾ は plaice, cod, whiting, eel, pike, ray, hagfish の粘性物質のアミノ酸組成、糖組成をペーパークロマトグラフィーで調べ、その結果、哺乳動物、鳥類、両性類などの高等な脊椎動物の上皮粘性物質と同種の糖たんぱくを含むこと、あなわち、ヘキソサミン、ガラクトース、フコース、シアル酸を含むことを報告している。他に糖として、リボース、グルコース、マンノースも検出しているが、これらはそれぞれ、核酸、グリコーゲン、血清または組織に由来するのではないかと述べている。

榎本ら²²⁾ はどじょう、まあなごなど、海産魚、水産魚、軟骨魚、硬骨魚の 11 種にわたってアミノ酸組成および糖組成をしらべ、魚の棲息環境、粘性物質の粘度、外観的差異との強い関連性は見出しがたいとしている。

糖成分としてはいずれもグルコサミン, ガラクトサミン, ガラクトース, フコース, リボース, グルコースを含むが, マンノースは Wesslerらの結果と異なって見い出されてはいない。

更に, Lehtonenら²³⁾は *hagfish* の粘性物質を *Papain* 分解して得られる多糖と CPC の複合体を分別し, それぞれ糖含量をガマクロマトグラフィで定量しているが, いずれのフラクションにもグルコサミン, ガラクトサミン, ガラクトース, フコースが存在しており, マンノースとシアル酸は存在しないフラクションもある。また硫酸エステルもはじめて定量しているが, いずれのフラクションにも存在しており, 電気泳動の挙動では, コンドロイチン硫酸, ヒアルロン酸に類似したものが含まれているようである。

最近, Fletcherら²⁴⁾は, *Plaice, cod, dab, sole* の粘性物質を G-200 で1つの主成分と2つの副成分に分けたが, それらは後者が硫酸エステルを有することによって異なるが, 他の組成は似ており, フコース, ガラクトース, グルコース, マンノース, グルコサミン, ガラクトサミンを含み, アミノ酸はセリン, スレオニンが多いことを報告している。

以上述べた粘性物質の単離, 精製の仕方はそれぞれ異なるが, 共通して言えることはその糖組成から核酸, グリコーゲンなどが混入している可能性があることで, より厳密な検討のためには, 粗粘性物質または多糖(糖ペプチド)の分別が必要である。著者の研究室では糖とたんぱくの結合様式に興味をもち, とくにアミノ糖(グルコサミン)とアミノ酸の結合物の研究をおこなってきたが, 著者は富山湾に産する深海性のノロゲンゲの体表面の粘性物質に注目し, その糖とたんぱくの結合様式および糖部分の構造に興味をもって研究をおこなった。まず「カニ節」では, ノロゲンゲの体表面粘性物質の種々の条件下での単離と精製について述べ, カニ節でそれらを酵素分解して得られる糖ペプチドの単離, 精製および糖とたんぱくの結合様式について述べる。

第一節) ロゲンゲ体表面粘性物質の単離および精製.

ロゲンゲの体表面粘性物質の単離は次のようにおこなった。体表面粘性物質はロゲンゲを捕獲後大体1日以内に表皮とともにはぎとり、メタノールに浸して冷所に保存した。処理に際して、メタノール-水層は捨て沈んでおける粘性物質を二分し、一方はミキサー粉碎後希アルカリで抽出し他方はガーゼで軽くしぼり表皮様物質を分けとり、しぼった液にエタノールを加えて、粗粘性物質をそれぞれ得た。前者はアルカリ抽出液を遠心分離して不溶物を除いた後、塩酸で中和しエタノールを加えるとゆるやかに沈んでおける。 (P-1) これを遠心分離し、上澄を塩酸で pH 5.6 にすると粘性のある沈んでおけるが得られ、遠心分離後減圧乾燥して粗粘性物質を得た。(P-2) 後者のエタノールで沈んでおける粘性物質を P-3 とする。粘性を比較すると P-1, P-3, P-2 の順に大きくなるが、P-3, P-2 の間にあまり差がないが P-1 はほろかに小さく粘性物質の主成分と思われる。P-2, P-3 では前者の方が N 分析値が大きくなるほく含量も多いようであるが、銅-Folin 法による定量で異常に大きな値を与えた。

表 VIII

P-1	銅-Folin 法による たんぱく含量*	N 分析 %	粘度 ^a	収量 ^b
P-1	0.89	11.12	0.18	8.0 g
P-2	5.4	12.90	0.56	19.2 g
P-3	0.52	10.85	0.43	44.2 g

a. $c=0.4$ にあたる η_{sp}/c の値. $\eta_{sp} = \eta_r - 1$, $\eta_r = \frac{t}{t_0}$ とし計算.

b. 約 2000 匹より. * アルブミンの値との比をとったもの.

このように、P-2 は糖たんぱくの他にほとんど糖を含みぬたんぱくなどいくつかの成分を含んでいると考えられるが、このことは、二、三の異なる緩衝液に P-2 をとかし透析して得られる粘性物質の N 含量が異

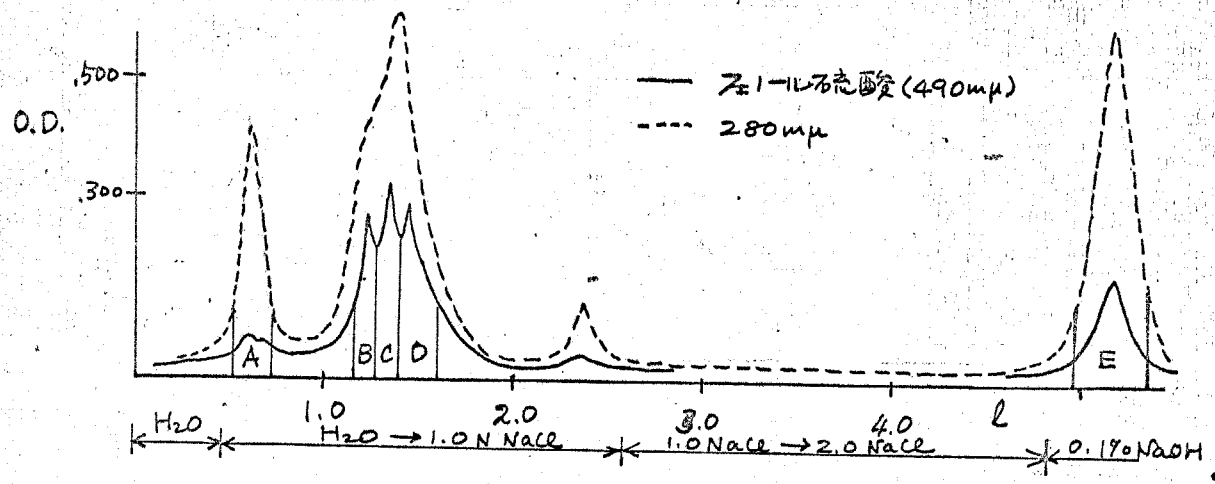
なることから裏付けされる。中性付近ではN含量の少ない成分がとけ、PHが高くなるに従いN含量が多くなる。

	N分析%	回収率
P-2	12.90	—
A P-2, 2gを 0.025N NaOH (PH 10.2) 100mlにとかし遠心分離した上澄	13.10	865 mg (48.0%)
B P-2, 2.3gを 0.1M リン酸緩衝液 (PH 8.0) 100mlにとかし遠心分離した上澄	10.82	405 mg
C Bの不溶部分をさらに同じ緩衝液 65mlにとかし遠心分離した上澄	11.28	100 mg

} 22%

水に酸緩衝液 (PH 8.0) に可溶性 P-2 の成分を DEAE セロース (OH型) を用いて分別を行なった。水 - 1N 食塩水 - 2N 食塩水 - 0.1% 苛性ソーダの順に流し、UV 280 mμ および フェール硫酸で測定した。分離はよくなり、図のようなフラクションに分け得られる成分のたんぱくと糖含量の相対的な値を出してみたが、はじめに流出する成分ほどたんぱく含量が少ないことがわかった。

図 18 P-2 の分別



図には 0.1% 苛性ソーダで流出する成分は省略したが、ほとんどたんぱくと思われる成分がかなりある。

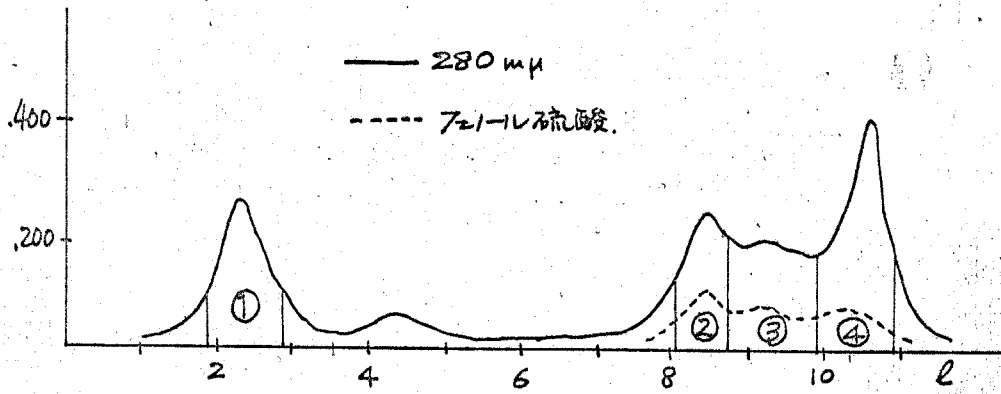
表 IX

P-2	A	B	C	D	E
たんぱく ^a	0.30	0.67	1.49	0.59	2.00
糖 ^b	1.00	1.16	1.70	1.88	1.46

a 銅-Folin 法 アルブミン基準
b 721-μ-硫酸 (P-2A E 基準)

一方、P-2のメタホウ酸可溶部分(P-2A)をDEAE-セルロースで分別すると、主に4成分に分かれる(図-19)が各々の成分の分析結果は表Xのようになるが、明らかに糖のないたんぱくがはじめに溶出されてくるのが特徴的である。このように事象からP-2の糖たんぱく成分は主にP-2B中に含まれると思われるのでこれをゲル3過を行なったのち、DEAE-セルロースで分別した。

図-19 P2の DEAE-セルロース (メタホウ酸塩型) による分別



	N分析%	中性糖	シアル酸	UDP=酸
①	14.9	0.97%	0.3%	0%
②	11.9	3.6	2.6	5.2
③	12.1	3.5	1.5	5.0
④	10.8	4.5	1.4	2.9

まず P-2Bを G-200を用いて分別すると図-20のように I, II =成分に分けられた。それぞれの成分のN分析値、グルコサミン含量、中性糖(D-ガラクトースとして)は次のとおりで、II成分の方がいく分糖含量が多い。

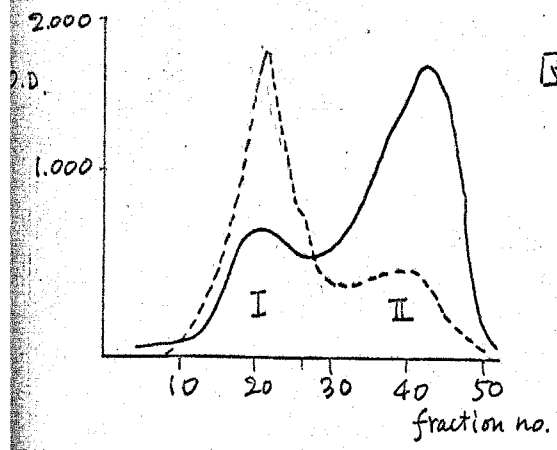


図-20

	P-2B-I	P-2B-II
N分析%	7.11	6.84
中性糖%	5.0	8.8
グルコサミン%	0.39	1.7

次にP-2B-I, P-2B-II それぞれをDEAE-セルロースカラム(メタホウ酸塩型)で、メタホウ酸ナトリウム溶液(0.025N→0.1N→0.25N)で溶出すると図-21, 図-22のような溶出曲線が得られ、糖含量の多い成分は前者に1成分、後者に3成分得られた。それらの成分について、アミノ酸分析、中性糖定量、一部についてシアル酸、ウロン酸を測定したがその結果は表XIのとおりである。

図-21 P-2B-IのDEAE-セルロースによる分別

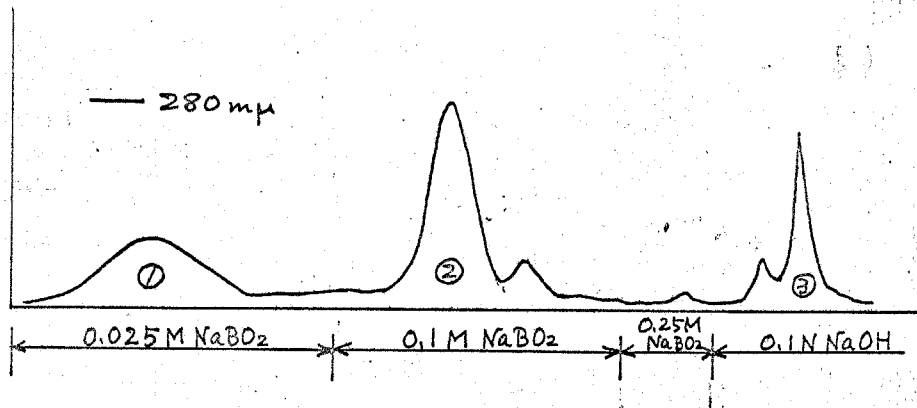
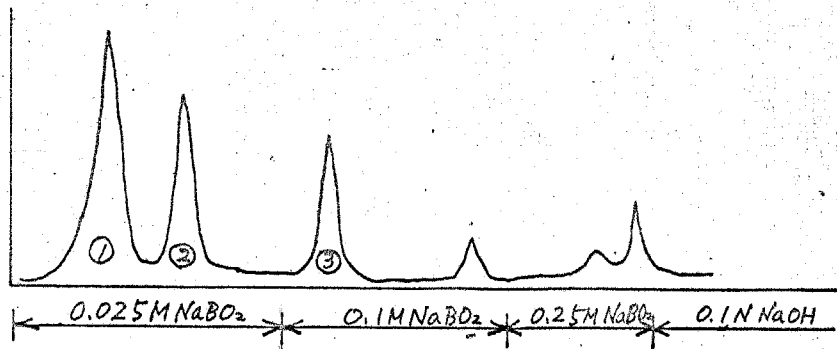


図-22 P-2B-IIのDEAE-セルロースによる分別



一般に上皮分泌物中には糖をほとんど含まないたんぱくの外に、二種類の糖たんぱくが含まれていることが知られている。すなわち、糖部分に、*N*-アセチルヘキソサミン、シアル酸を含むものと、*N*-アセチルヘキソサミン、ガラクトース、フコースを含むものである。P-2B-I-②はグルコサミン、シアル酸の含量が高いことで前者に類似しているが、魚類の体表面粘性物質

表 XI

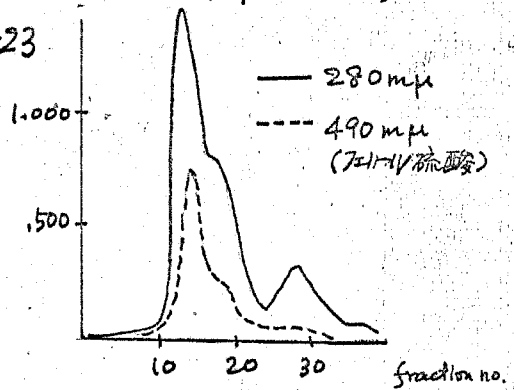
	P-2B-I	P-2B-I-②	P-2B-II	P-2B-II-①	P-2B-II-③
Asp	29.0	18.9	28.6	35.1	31.5
Thr	14.2	16.1	17.0	18.0	10.8
Ser	12.9	7.63	17.6	18.3	10.1
Glu	32.3	18.7	31.6	27.3	19.2
Pro	ca 9.78	ca 4.52	ca 21.7	6.9	ca 4.88
Gly	20.4	9.41	16.7	21.7	13.6
Ala	18.3	7.99	17.8	14.7	13.5
Val	ca 17.6	ca 7.54	ca 22.2	13.7	1.17
Met	9.10	ca 1.81	6.56	2.0	
Ileu	12.5	7.34	15.9	10.1	9.70
Lew	17.7	8.06	23.7	19.2	12.4
Tyr	ca 13.3		ca 9.41	ca 8.9	
Phe	ca 12.5	ca 24.4	ca 12.7	3.14	ca 19.9
Lys	15.6	4.34	10.5	9.5	9.10
His	6.36	0.89	ca 2.52	ca 1.88	ca 1.31
Arg	ca 20.4	ca 4.52	ca 5.74	ca 8.60	ca 4.85
GluNH ₂	3.85 %	28.5 %	ca 17.2	22.9	11.3
中性糖		6.5-7 %		16 %	6.9-7.1 %
三了儿酸		1.6 %		—	0.8 %
ウロン酸		3.6 %		—	—

アミノ酸およびアミノ糖の数値は試料mg中のμg数。

より単離した例は見られないので比較はできない。P-2B-II-①は中性糖含量が多いが、他の実験でフコースを含まないことがわかってるので違ったタイプの糖たんぱくと思われる。P-2には特徴的な2つの糖たんぱくを含め、4種の糖たんぱくが存在しているように思われる。P-2はかなり交雑たんぱくを含んでいるようであるが、アルカリで抽出した処理に原因があるとも考えられる。糖部分とたんぱく部分の結合様式によってはアルカリ処理により切断する可能性もある。そこでできるだけ中性の条件で粘性物質の抽出、単離、精製をおこなってみた。

表皮様物質とともに単離した粘性物質をジュースミキサーにかけた後0.5M リン酸緩衝液 (pH 6.6-6.8) に加え、遠心分離した上澄をそのまま分別した。(このものをP-4とする。)

図-23



P-4をG-200で分別を行なうと図-23のような溶出曲線が得られるが、P-2に比べるとP-2B-IIに相当する成分がほとんど存在しない。

P-2をDEAE-セルロースカラム(リン酸塩型)でpH 7.0のリン酸緩衝液で溶出し、分別すると主として5つの成分に分かれるがそれぞれの組成の分析は表XII のようになる。粘性についてのデータも付記したが、これらはいずれもP-2に比してかなり小さいので、アルカリで

表 XII

	N	中性糖	シアル酸	ウロン酸	粘度 ^a
P-4-I	11.88%	6.1%	0.81%	0.6%	0.20
II	8.25	6.3	0.52	0.5	0.12
III	11.40	7.8	1.3	1.4	0.20
IV	10.65	8.3	1.3	1.6	0.25
V	9.91	4.4	0.5	2.3	0.21

^a c=0.3% における η_{sp}/c

抽出される部分が粘性が大きいと考えられる。また、P-2とP-4 それぞれから得られた成分に同じ成分が見い出されないがこれは抽出条件の差によるものと思われる。

以上のことからノロゲンゲ体表面粘性物質は高等な脊椎動物の上皮分泌物と同様に単糖たんぱくと糖たんぱくより成り、後者は比較的少ないことがわかる。魚体表面の粘性物質に含まれる糖たんぱくとしては、ただ一つ、Plaiceより単離したものが報告されている²⁴⁾が、その組成に於いてはかなりの相違が見られる。すなわち plaiceの場合、糖類としてはフコース、ガラクトース、グルコース、マンノース、ガラクトサミン、グルコサミン、シアル酸を含み、その総量は約25%であり、とくにフコース(5.8%)、ガラクトース(4.7%)、ガラクトサミン(8.4%)が多い。一方ノロゲンゲの場合には、ガラクトース、マンノース、ガラクトサミン、グルコサミン、シアル酸、ウロン酸を含み、グルコースは痕跡程度である。またフコースは全く含まれない。これらの総量は10~20%である。ノロゲンゲには糖組成からは、主として2種類の糖たんぱくが見られる。すなわち、主としてグルコサミン、中性糖、ウロン酸を含み、比較的糖含量の少ない(10~15%)ものと、グルコサミンと中性糖を含むが特に後者の含量の多い(16%)ものである。一方アミノ酸組成は plaiceの場合、スレオニン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸が多く、これらのみで25%を占める。ノロゲンゲの場合、グルタミン酸とアスパラギン酸は比較的多いが、スレオニンとセリンはそれほどでもなく、これら4着と合わせても9~11%前後である。さらに粘性物質の組成は多くの魚について報告されているが、これらと比較するとアミノ酸組成に於いては大きな相違はみられない。一方、ノロゲンゲの糖たんぱくは、糖としてグルコサミン、ガラクトサミン、ガラクトース、シアル酸を含む点に於いては、その量の多少は別として殆んど変らないうが、すべてにマンノースが含まれることと、フコースが全く見られないことは特徴的であり、今後の研究に興味をもたれる。

第ニ節 プロナーゼ処理粘性物質の精製とその組成

前節で述べた P-2, P-3, P-4 各々を種々の条件で酵素消化をおこなって、二、三の糖ペプチドを得たが それらについて述べる。

P-2より糖ペプチドおよび多糖の単離

図-24 に示すように厳密には P-2 を一たん単離し、酵素処理したものではなく、希アルカリ抽出液を中和後そのままプロナーゼで酵素分解をおこなった。酵素分解をおこなった液に約40%になるようにエタノールを加えると、沈でんが生じた。(P-5) これを遠心分離し得られる上澄を減圧濃縮し、生じた沈でんを再び遠心分離して除き、上澄に約4倍量のエタノールを加え、放置するとゴム状の沈でんが生じた。上澄をデカントして、ゴム状沈でんを少量の水にとかし、凍結乾燥すると粗糖ペプチド (GP-1) が得られた。一方、P-5 は更に二度プロナーゼで酵素分解し、トリクロル酢酸で除たんぱく後、粗多糖 (GP-2) を得た。GP-1, GP-2 を精製するため、それぞれを Dowex 50W x 2 カラムを用い、ポリジーン酢酸 (pH 2.45) 緩衝液で溶出した。しかし図-25 に見られるように、いずれも糖の多い成分はほとんど分離されずに流出し、初期の目的は果せなかったが、最初の糖の多い成分を凍結乾燥し、それぞれ GP-1A, GP-2A を得た。そこでこれら二者の成分などの差異を明らかにするため、アミノ酸分析、中性糖、ウロン酸およびシアル酸などの定量をおこなったが、その

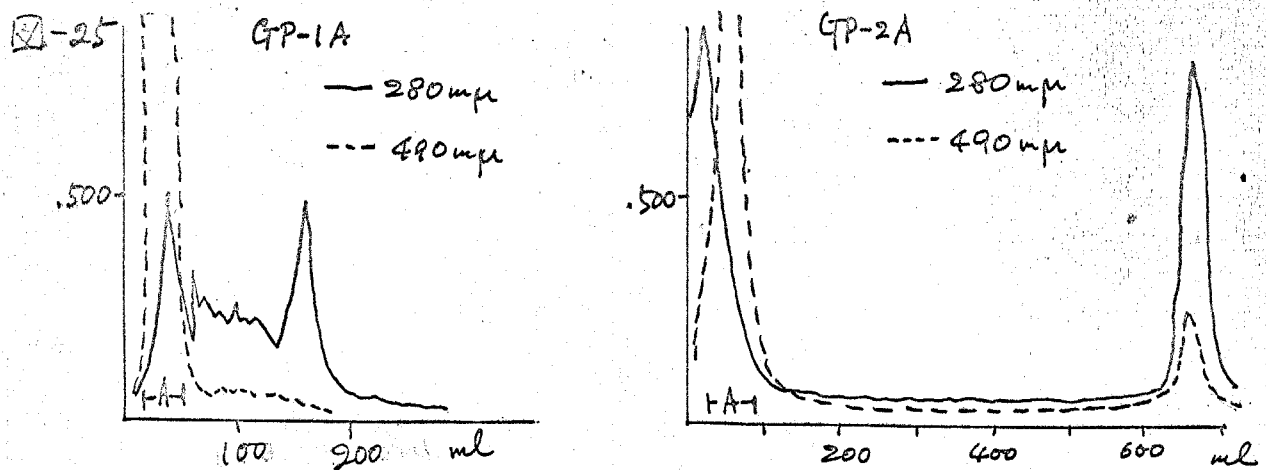
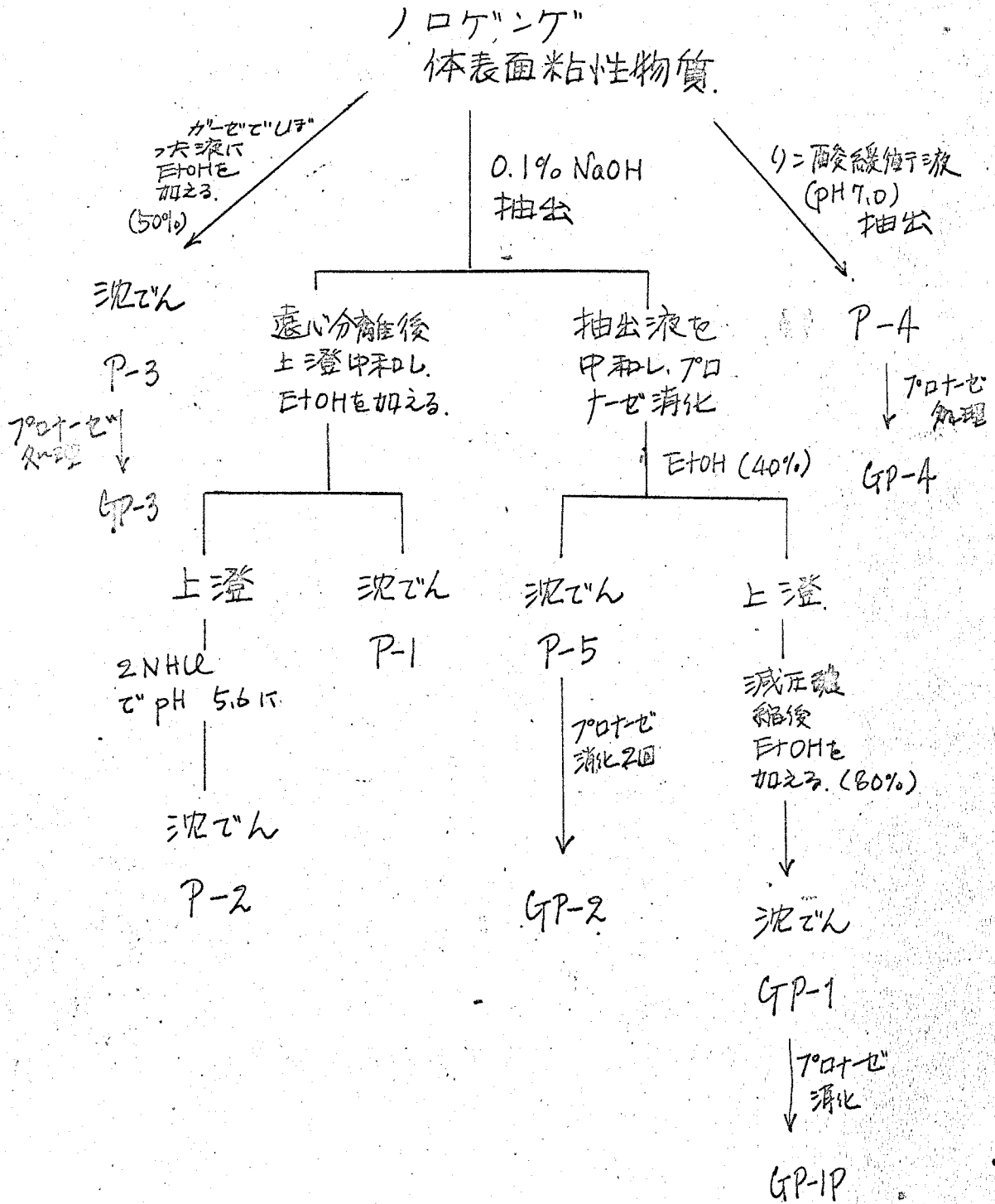


図-24 ノロゲンゲ"処理概要



結果は表 XIII のようであった。

表 XIII

	GP1A	GP2A
アミノ酸	16.5%	1.5%
N	5.87	3.68
グルコサミン ^a	17	26.5
ガラクトサミン ^a	6	3.4
中性糖 ^b	24	5
ウロン酸 ^c	21.8	34
シアル酸 ^d	11	0

a : アミノ酸分析機で定量

b : アンソロン法

c : カルバゾール硫酸法

d : ケオバルビツール法

GP-1A はグルコサミン、中性糖、シアル酸含量の多いことが特徴的であった。たんぱくもかなり含まれており、アミノ酸、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニンのみで前二着が多い。一方 GP-2A はほとんどグルコサミンとウロン酸からなっており、コンドロイチン様のものであると思われる。アミノ酸はいずれも痕跡程度しか含まれていない。このことから糖とたんぱくの結合を知るためには、GP-1A に於いてはさらに精製する必要があると思われる。GP-2A ではアルカリ処理したため、すでに糖とたんぱくの結合が切断されたものであるが、後述べるように中性条件で抽出した場合にはこのものは得られないことから、アルカリによって表皮層組織より抽出されたものである。事実このものの粘度は GP-1 より得られる糖ペプチドよりはるかに小さい。GP-2A を DEAE-セルロースカラム(メタホウ酸塩型)で分別すると、三成分に分けられるが、その各々の成分を加水分解し、糖成分をペーパークロマトグラフで調べると、互換してグルコサミン、グルクロン酸を含むことがわかった。

次に GP-1 の精製に際して Dowex 50Wx2 カラムを使用してピリジニ-酢酸緩衝液 (PH 4.00) で溶出すると 図-26 のように交雑たんぱくとの分離がよいことを見出したので、この条件で交雑たんぱくを除去した後、得られる糖ペプチドを DEAE-カラム (メタホウ酸塩型) でさらに分別をおこなうと、図-27 のように主として三成分が得られるが、各々の成分は蒸留水に対し透析して脱塩し、凍結乾燥した。これらの成分のアミノ酸分析、中性糖含量は表 XIV のようになるが、糖とたんぱく部分の結合に関する知見は得られないようで、更に酵素によるたんぱく部分の消化が必要と思われる。そこで GP-1 をプロナーゼで処理し、Dowex 50Wx2 カラムで大部分のアミノ酸ペプチドなどを除去し、得られる粗糖ペプチド (GP-1A) をさらに DEAE-セルロース (ホウ酸塩基) カラムで 0.05 M → 0.2 M ホウ酸緩衝

図-26 GP-1 の Dowex 50Wx2 に於ける分別

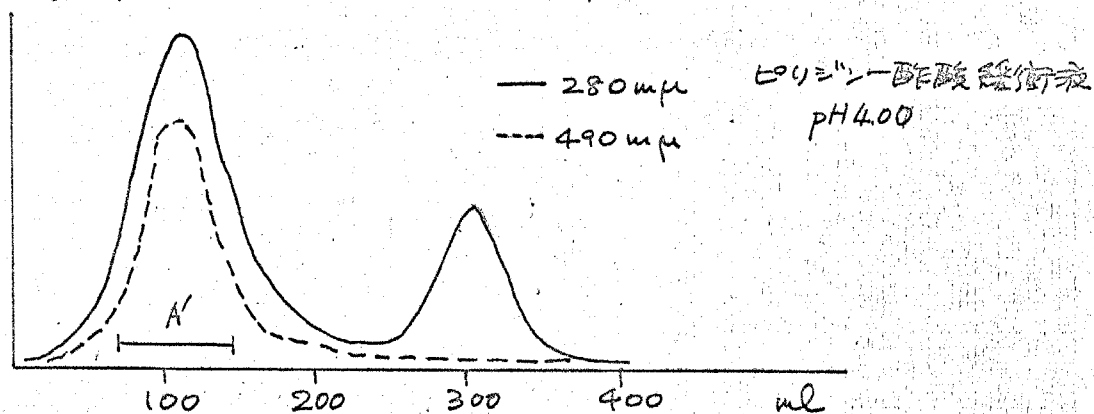
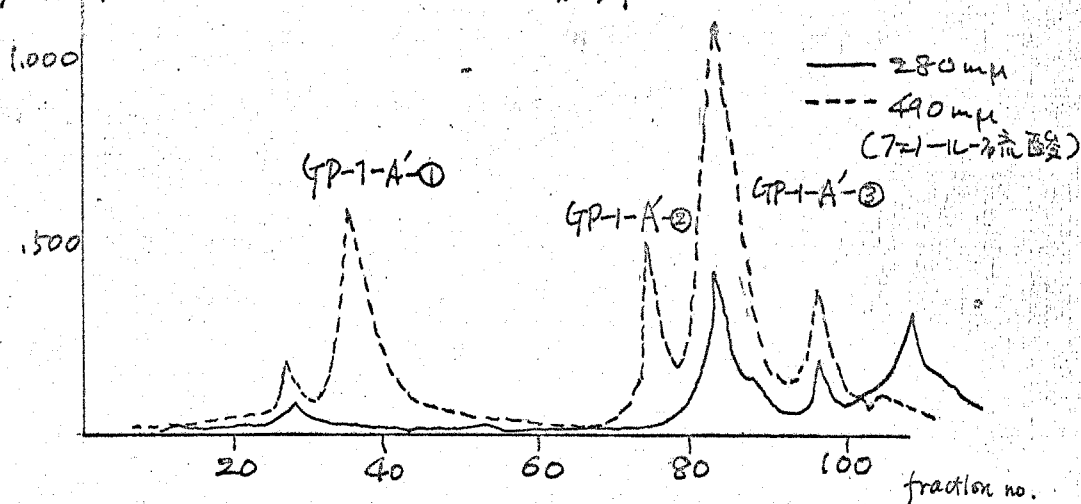
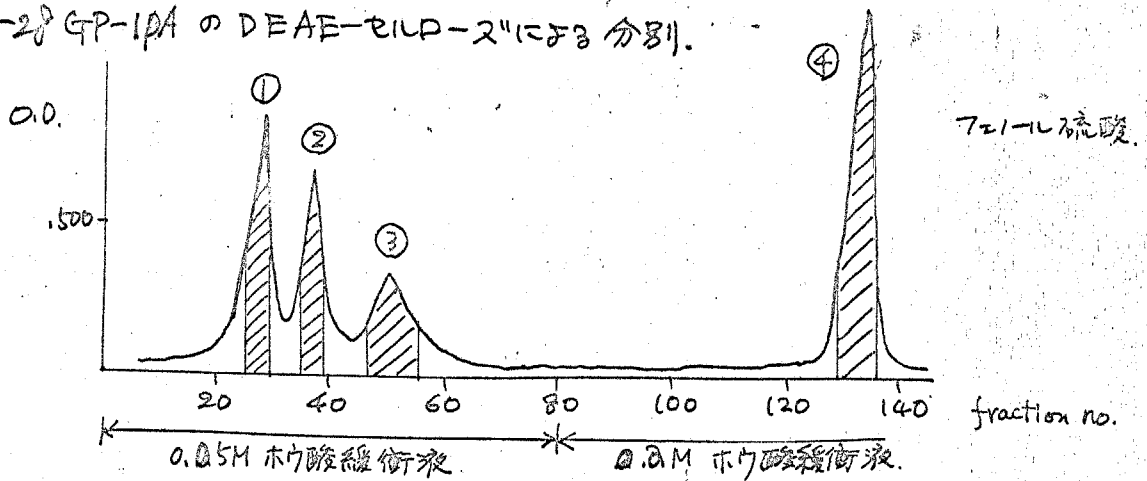


図-27 GP-1A' の DEAE-セルロース" に於ける分別



液 (PH 8.0) → 0.1N 苛性ソーダの順に落出した。(四-28)

図-28 GP-IPA の DEAE-セルロースによる分別.



透析による脱塩は一般に回収率は悪いので、それぞれ G-25 によって脱塩後凍結乾燥し、糖ペプチドを得た。そのアミノ酸分析、糖組成などは表 XV のようであるが、糖とたんぱく部分の結合に関してはグルコサミン-アスパラギン酸ではないかと想像できるが、その詳細については後述する。

P-3 より糖ペプチドの単離

最初に糖部分の組成の概要を知る目的で Meyerら²⁵⁾の方法により粗糖ペプチドを得た。アミノ酸分析の結果はアスパラギン酸が多く、グルコサミンが多いことからやはりグリコサミン-アスパラギン酸結合が想定される。糖部分の組成を知るためにこの粗糖ペプチドを希硫酸で加水分解後 IR 120 (H型), IRA 410 (CO₂型) でつづいて処理し得られた塩基性、中性、酸性区分をペーパークロマトグラフィーで検索した。その結果、酸塩基区分には 6 炭糖としてガラクトース、やや不明瞭であるがマンノースが存在し、5 炭糖ではリボースが存在し、多くの魚類の体液粘着性物質中に含まれるフコースの存在は確認できなかった。また P-3 をプロナーゼで連続的に 3 回処理し、得られる粗糖ペプチド (GP-3) を G-25 の場合と同様に DEAE-カラムで分別し、三種の糖ペプチドを得た(図-29)がそのアミノ酸分析、糖組成は GP-1P から得られたものと非常に近く、やはり糖とたんぱく部分の結合としてはグルコサミン-アスパラギン酸が考えられる。

表 XV 糖ペプチドの構成アミノ酸およびアミノ糖のモル比

	GTP-1PA-①	GTP-1PA-②	GTP-1PA-③	GTP-1PA-④
Asp	1.00	1.00	1.00	1.00
Thr	0.37	0.34	1.14	2.08
Ser	0.26	0.28	0.47	0.77
Glu	—	0.16	0.32	0.87
Pro	—	—		0.69
Gly	0.34	0.21	0.36	0.51
Ala	0.10	0.10	0.20	0.44
GtN	2.02	1.49	1.97	1.52

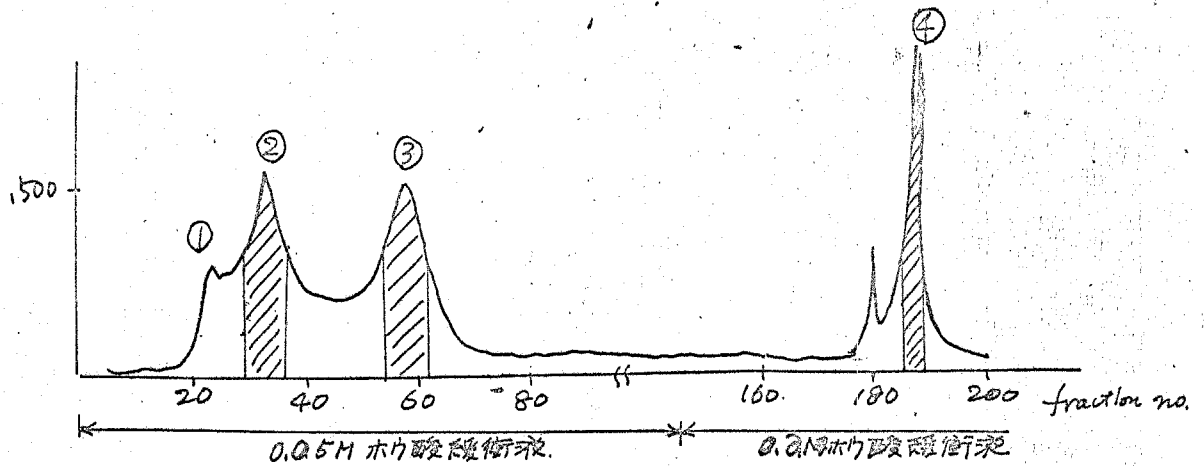
表 XVI 糖ペプチドの構成アミノ酸およびアミノ糖のモル比

	GTP-3-②	GTP-3-③	GTP-3-④	GTP-4-①
ASP	1.00	1.00	1.00	1.00
Thr	0.15	0.44	1.19	0.64
Ser	0.14	0.29	0.42	0.48
Glu	0.09	0.27	0.52	0.29
Gly	0.16	0.20	0.33	0.40
Ala	0.05	0.12	0.27	0.17
GtN	1.65	1.57	0.95	2.72
GalN	0.30	—	0.61	

GtN : グルコサミン

GalN : ガラクトサミン

図-29 GP-3 の DEAE-セルロース上での分別



このP-3の場合はP-2の場合のGP-2に相当する様な成分は何ら得られなかった。

P-4より糖ペプチドの分離

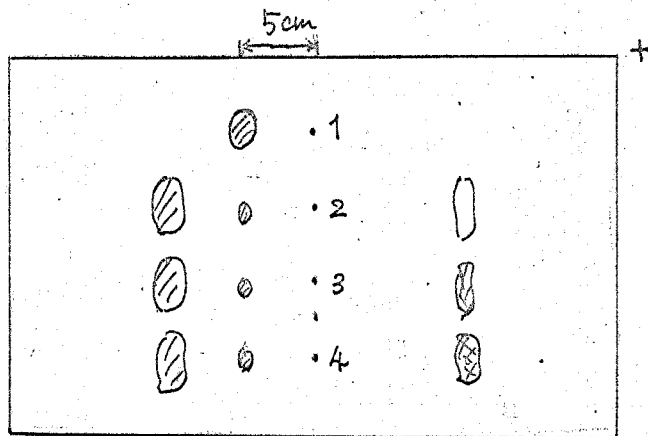
P-4をニ炭プロナーゼで処理し、(いずれもリン酸緩衝液中 pH 7.2~7.4 位) 得られる糖ペプチド(GP-4)をDEAE-カラム(リン酸塩型)でリン酸緩衝液で溶出するとこの場合はほとんど一成分しか得られないが、そのアミノ酸組成、糖分析の結果(表 XVI)はやはり前二者の糖ペプチドと同様にグルコサミン-アスパラギン酸の結合を示している。

糖とたんぱく部分の結合様式に関する検討

ノロゲンゲの粘性物質からは糖ペプチドまたは多糖が二種類得られた。すなわち、糖とたんぱく部分の結合がグルコサミン-アスパラギン酸であると思われる一群の糖ペプチド(GP-1, GP-3, GP-4)とコンドロイチン様多糖(GP-2)である。後者は通常O-グリコシド結合によってたんぱくと結合していると言われており、当然アルカリ処理によって切断されると思われる。それでアルカリ処理をいっさいおこなっていないP-4をほぼ中性の条件で酵素処理し、O-グリコシド結合物を得ようとしたが見つからなかった。このことは、GP-2は粘性物質の中に含まれているものではなく、アルカリ抽出によって表皮などの組織から抽出されたものと考えられる。またGP-2とGP-2とGP-IP-A(GP-1をプロナーゼ処理した後Dewex 50 WX8を通

したものの粘度を比べると後着がはるかに大きく、GP-2は粘性物質の主成分とは考えられない。(図-30) GP-1, GP-3はともにDEAE-セルロースカラムで分別するとグルコサミン-アスパラギン酸の結合をもつと思われる二成分とスレオンが約アスパラギン酸の2倍存在する成分とに別れた後着は、プロナーゼで再処理してもほとんど変わらず、前二着となかなり異なるようである。グルコサミン-アスパラギン酸の結合を確認するため、GP-1, GP-3の各成分を部分加水分解し、電気泳動の挙動を一章で合成したグルコサミン-アスパラギン酸の共有結合のそれと比較してみたが、相当するスポットがわずかにではあるが見られた。(図-31) また、部分加水分解生成物をアミノ酸自動分析器で分析し、わずかにグルコサミン-アスパラギン酸結合物に相当するピークを認めた。(図-32) これらの事実よりグルコサミン-アスパラギン酸結合が明らかになったが、各々の各三成分については検討の余地がある。

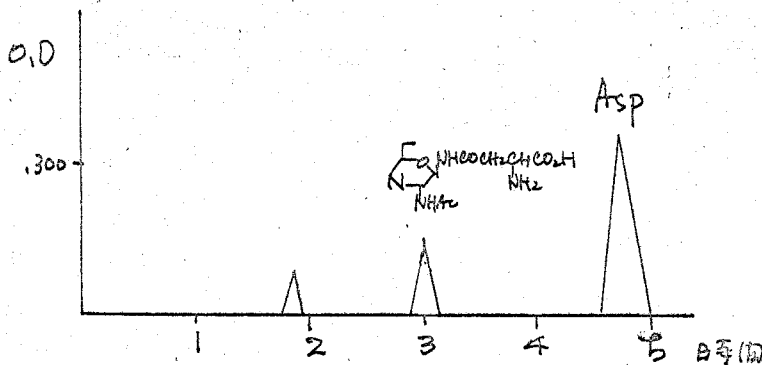
図-31



500V 12A, 2時間
発色ニヒドリン

1. 化合物 I (VIIc)
2. GP1PA-O
3. GP-3-O
4. GP-3-②

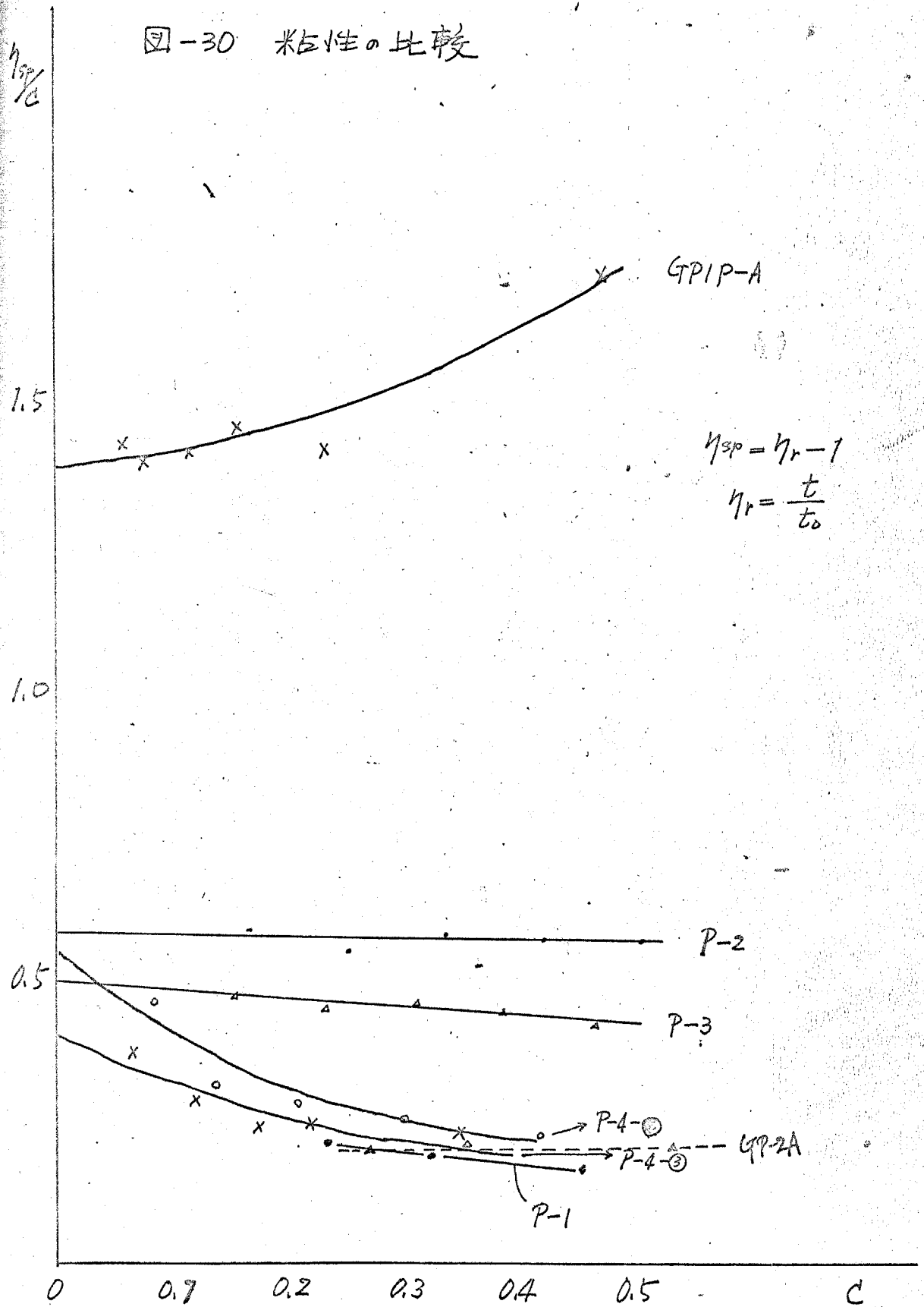
図-32



GP-3)-①

を INHCl
(100°C, 3時間加熱)

図-30 粘性の比較



一方、これら糖ペプチドの糖部分の組成については、グルコサミン、シアル酸の他に中性糖としてガラクトースとマンノースを含むことがわかった。中性糖の定量はガスクロマトグラフィーでおこなったが、ガラクトースとマンノースのモル比は表 XVIII のようである。

表 XVIII

	GP-1PA	GP-1PA-①	GP-1PA-②	GP-1PA-③
ガラクトース	1.00	1.00	1.00	1.00
マンノース	0.87	0.53	1.12	1.14
	GP-3-②	GP-3-③	GP-3-④	GP-4-①
ガラクトース	1.00	1.00	1.00	1.00
マンノース	1.26	1.10	0.80	0.98

この結果からわかるように、ガラクトースとマンノースの比は、GP-1PA-①を除きほぼ 1:1 であることがわかる。このように糖ペプチドの糖部分はグルコサミン(場合によってはガラクトサミンも)、シアル酸、ガラクトース、マンノースからなるがその詳細な構造は今後検討したい。

実験の部

カ-節

はじめに、種々構成成分の分析法について述べる。

中性糖 : アンスロン法²⁶⁾を用いた。個々の糖成分の定量は後述するよりにGLCを用いた。

アミノ糖 : アミノ酸自動分析法 15cm カラムを用いておこなった。

ウロン酸 : カルバソール硫酸反応²⁷⁾を用いた。

シアル酸 : ケオバルビツール酸法²⁸⁾を用いた。

カラム流出液中の糖量、たんぱく量の定量には、それぞれフェール硫酸法²⁹⁾、銅-Folin法³⁰⁾または280 m μ の吸収を用いた。

粘度の測定

オストワルド粘度計を用いて、溶媒が流下に必要な時間(t_0)と、試料溶液のそれとを濃度を加えて測定し、相対粘度の最も荒い近似式である $\eta_r = \frac{t}{t_0}$ を用いて $\eta_{sp} = \eta_r - 1$ として求め、 η_{sp}/c をたて軸に、 c (濃度, g/100ml) をよこ軸にとってグラフを描いて粘度のめやすとした。

薄層ガスクロマトグラフィーによる定量

Albersheimら³¹⁾の方法を用いた。すなわち、多糖を2Nトリフルオロ酢酸中 121°Cに1時間加熱して、加水分解後、水素化ホウ素ナトリウムで還元し糖アルコールとし、アセチル化して、それをサンプルとした。カラムの充てん剤は液相に0.2%ポリエチレングリコールサクシネート、0.2%ポリエチレングリコールアジペイト、0.4%シリコンXFF 1150の混合物を用いて固定相にはGas-Chrom P (100-120メッシュ)を用いた。測定条件は色々検討したところ^{120°C}780°Cまで1°C/分の割合で昇温して行う場合が最適の結果を得た。定量の際は加水分解時に標準物質としてイノシトールを入れ、これを基準として定量をおこなった。

1) P-2の単離

ノロゲンゲは水上げの日に手に入れ、腹の部分から表皮をむくようにしてとちにとり、メタノールブケにして冷所に保存した。メタノール水溶液を傾斜して除き、約ク~800匹分を0.1%苛性ソーダ10ℓにとかし、冷凍室に3日放置した。約6000rpmで連続遠心分離して上澄をとり、半分の5ℓはプロナーを処理用にまわし、残りの半分(5ℓ)にエタノールを3.5~4ℓ加え、冷凍室に放置した。泥でん(P-1, 8g)を連続遠心により除き、前と同様に得られる上澄に2N塩酸を加えて、PH 5.6にするとゲル状泥でんが多量に析出する。泥でんは真空ポンプで乾燥する。P-2 19.2g

2) P-3の単離

メタノールブケの粘性物質をガーゼでおすようにしてしぼり、しぼった液にメタノールを同量位加えて冷凍室に放置し、生じた泥でんを連続遠心分離してとり、真空ポンプで減圧乾燥する。P-3 44.2g

3) P-2のDEAE-セルロース(OH型)による分別

DEAE-セルロースカラム(OH型) 3.2×22cmにP-2 558mgをホウ酸緩衝液(PH 8.00) 180mlにとかして充てんし、水(0.5ℓ), 水→1.0N食塩水(1ℓずつ、計2ℓ), 1.0N食塩水→2.0N食塩水(1ℓずつ、計2ℓ), 1%苛性ソーダの順に流した。30mlずつフラクションをとり、フェール・硫酸(480mp)および銅-Folin法(500mp)で溶出曲線を描く。各ピークに相当する部分をあつめ、濃縮して透析により脱塩し、凍結乾燥して、A 11.6mg, B 25.2mg, C 21.7mg, D 55.8mg, E 47.6mgを得た。

4) P-2のDEAE-セルロース(BO₂型)

DEAE-セルロースカラム(BO₂型) 7.5×29cmにP-2 2gを0.025N NaBO₂ 100mlにとかして充てんし、0.025N NaBO₂ (5ℓ)→0.025N→

0.1N NaBO_2 (1.9ℓずつ)計 3.8ℓ, 0.1N NaBO_2 (1.9ℓ), 0.1N NaOH の順に流した。図-19のような溶出曲線が得られ ① 157.4 mg ② 105.0 mg ③ 57.0 mg ④ 52.4 mg を得た。

5) P-2B の G-200 による分別

G-200 のカラム, $2.4 \times 40 \text{ cm}$ に P-2 657.6 mg を 0.1M リン酸緩衝液 (PH 8.0) 17 ml に加え, 10000 rpm で 20 分遠心分離した上澄を充てんし同じ緩衝液で溶出する。4.8 g ずつ 7 フラクションをとる。I (7 フラクション番号 15-24) 33 mg, II (34-47) 35.6 mg を得た。

6) P-2B-I, II の DEAE-セルロース (BO_2 型) による分別

ともに $2.4 \times 47 \text{ cm}$ の DEAE-セルロースカラム (BO_2 型) を用い, それぞれ試料 210 mg, 94 mg をもちいて 0.025N, 0.1N, 0.25N NaBO_2 , 0.1N NaOH の順に流し, 図-21, 図-22 の溶出曲線を得た。P-2B-I-② 34 mg, P-2B-II-① 9.6 mg, P-2B-II-③ 5 mg を得た。

7) P-4 の DEAE-セルロース (PO_3 型) による分別

DEAE-セルロースカラム, $5.1 \times 73.5 \text{ cm}$ にノゲンゲ体表面粘性物質を粉砕後, リン酸緩衝液に加え, 遠心分離した上澄 (P-4) 330 ml を充てんしはじめ 0.05M (2.5ℓ) について 0.2M (2.5ℓ) のリン酸緩衝液を流し, 最後に 0.1% 苛性ソーダを流した。20 g ずつの 7 フラクションをとる。各々のピークに相当する部分を集めて透析した後, 適当に濃縮して凍結乾燥した。P-4-I (7 フラクション番号 60-100) 92 mg, P-4-II (107-128) 118 mg, P-4-III (178-196) 137 mg, P-4-IV (199-225) 122 mg, P-4-V (0.1% NaOH 洗液より) 370 mg を得た。

* 節

ペーパークロマトグラフィー

東洋口紙 No 50 および No 51 を使用. 展開溶媒としては.

a) $n\text{-BuOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1:2), b) $n\text{-BuOH} : \text{C}_5\text{H}_5\text{N} : \text{H}_2\text{O}$ (6:4:3)

c) $i\text{-PrOH} : \text{C}_5\text{H}_5\text{N} : \text{H}_2\text{O} : \text{AcOH}$ (8:8:4:1)

を用いた. 発色は $\text{P} = \text{リン}$ ハイドロゲンフタレート または ベンジジン TTC (トリフェニルテトラゾリウムクロライド) でおこなった.

口紙電気泳動.

東洋口紙 No 51A を用いた. ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) を使用し. 500V, 12A の条件でおこなった.

1) GP-1 の単離.

P-2 を得る際に半分残したアルカリ抽出液 (4.5L) を中和し. 80°C に 2 時間加熱した. これに冷却後. 塩化カルシウム 10g, エタール 200ml を加え 37°C に保って. フォナーゼ 0.9g を加えた. そのまゝ. 約 30 時間反応させた後が途中 pH を 7.6 付近に保つた 2N 苛性ソーダを時々加えた. 反応液に エタール 5L を加え冷凍室に放置し. 生じた沈殿 (P-5) を遠心分離した. 上澄を濃縮し. 約 5 倍量のエタールを加え放置すると コム状の沈殿を生じる. この沈殿を少量の蒸留水にかき混ぜ乾燥すると GP-1 12.7g を得た.

2) GP-2 の単離.

1) で得られた P-5 は 3.7g であるが. 内 3.0g をホウ酸緩衝液 800ml に懸濁し. 塩化カルシウム 0.9g, エタール 20ml, フォナーゼ 100mg を加え. 37°C . 45 時間保った. 不溶物を遠心分離して除去. 上澄を濃縮して約 70ml とし. これに 10 倍量のエタール (700ml) を加え冷凍室に放置した. 生じた沈殿を遠心分離してとり.

前と同様にプロナーで消化をもう一度おこなった。(48時間) 再び同じようにエタールで沈んでんせ。得られる粗多糖を5%トリクロル酢酸5%溶液にとかして除去しおとした。n-ブタール:酢酸エタールでトリクロル酢酸を抽出し。濃縮した後、エタール10倍量を加えた。得られた沈んでんはエタールで洗い乾燥。 GP-2 250mg

3) GP-1 の Dowex 50Wx2 による分別

Dowex 50Wx2 のカラム, 1.2x90cm に 酢酸-ヒリジン緩衝液 1.5L を流した後, GP-1 1.018g を同じ緩衝液 15ml にとかしてんし。16ml ずつ分取しながら 酢酸-ヒリジン緩衝液 (pH 3.18) を流す。フラクション 3~9 を濃縮し、凍結乾燥すると 190mg の GP-1A を得た。

4) GP-2 の Dowex 50Wx2 による分別

Dowex 50Wx2 のカラム, 1.2x90cm に 酢酸-ヒリジン緩衝液 (pH 2.50) を 2L 流した後, GP-2, 250mg を充てんし。同じ緩衝液を流す。5ml ずつ分取した。フラクション 1~24 を透析(静水に対し6時間)後、濃縮し凍結乾燥し。GP-2A 170mg を得た。

5) GP-1A' の DEAE-セルロース (BO₂型) による分別

DEAE-セルロースカラム (BO₂型), 2.5x33cm に GP-1A' 330mg を充てんし。0.025N NaBO₂ で流した。各々のボークに相当するフラクションをまとい一晩透析後凍結乾燥した。① (フラクション 35-44) 2.6mg, ② (69-74) 11.6mg, ③ (75-81) 12.8mg

6) GP-1PA の単離

GP-1 を常法によりプロナーで消化し得られる反応液を遠心分 (9.4g)

離し、得られる上澄を、Dowex 50WX2 カラム 4.4x18.5cm に充てんした。
水で溶出し、15gずつ分取した。フракション 6-46 をまとめて濃縮した後、IRA410 で脱酸をおこなう。凍結乾燥した。GP-IPA 1247 mg.

7) GP-IPA の DEAE-セルロース (BO₃型) による分別.

DEAE-セルロース カラム 4.2x26.5cm (BO₃型) に、GP-IPA 265mg を充てんし、0.05M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0)、つづいて 0.2M ホウ酸緩衝液で溶出した。10g ずつ分取、0.05M (1ℓ)、各々のピークをまとめて濃縮し、G-25 を用いて脱塩後、凍結乾燥をおこなった。
① (フракション 26-35) 22.4mg, ② (37-45) 18.6mg, ③ (50-62) 13.5mg, ④ (131-150) 43.6mg.

8) GP-3 の単離およびその DEAE-セルロース (BO₃型) による分別.

P-3, 14g を ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 中で「プロナール」消化を3度おこなう。反応液を透析後凍結乾燥すると GP-3 284mg が得られた。これを GP-IPA の場合と全く同様に DEAE-セルロースにより分別をおこなうと、① (フракション 30-40) 11.1mg, ② (53-70) 17.8mg, ③ (178-184) 41.2mg を得た。

9) GP-4-① の単離.

P-4 を 常法に従い、pH 9.0 程度のリン酸緩衝液中「プロナール」消化をおこなった。得られた GP-4, 306mg を DEAE-セルロース カラム (PO₄型) 4.2x26.5cm に充てんし、リン酸緩衝液を流すと、フракション 19-30 から主成分が得られる。GP-4-① 91.1mg.

10) グルコサミン-アスパラギン酸結合の確認.

上で得られた糖ペプチド. GP-1A-①, ②, GP-3-①, ②, GP-4-①
などを希酸 (1N塩酸, 1N硫酸) 中で 2~4 時間, 加熱 ($80 \sim 100^{\circ}\text{C}$)
したものを電気泳動またはアミノ酸分析の試料とした。

結 論

本章ではノロゲンゲ体表面粘性物質の単離、精製をおこない、さらに含まれる糖たんぱくの糖とアミノ酸の結合部位の構造について検討した。

第一章では魚体表面粘性物質を単離することを目的として、アルカリ条件と中性条件とでおこなったが、精製して得られる糖たんぱく成分にかなりの相違が見られた。アルカリ条件で抽出して得られる粗粘性物質はかなり高い糖含量を示す糖たんぱくから単純たんぱくまで混合しているようであるが、かなりの粘性を示すのに対し、中性条件での抽出物ほどの成分もかなり粘性は低いことがわかった。Sephadex G-200, DEAE-セルロースを用いて分離、精製をおこない、中性糖の含量に於いて差の見られる2つのタイプの糖たんぱく質を得たが、いずれにもフコースが見い出されないことが特徴的である。

第二章では種々の条件のもとに単離した粗粘性物質をプロナーゼで処理して、糖とたんぱく部分の結合がアスパラギン酸とグルコサミンである一群の糖ペプチドを得た。この糖ペプチドを希酸で短時間加水分解し、電気泳動およびアミノ酸分析機で検討したところ、微量のため単離するまでにはいっていないが、第一章で合成した $1-(\beta\text{-L-アスパルカルアミノ})\text{-2-アセチルアミノ-1,2-ジデオキシ-}\beta\text{-D-グルコピラノース}$ と同じ挙動を示すものが見られた。これらの事実と糖ペプチドの化学組成から、糖とペプチドの結合様式は卵白アルブミン中糖たんぱくに於けるものと同じであることが推定される。またこれらの糖ペプチドは粘性もはるかに大きく、粘性の本体が糖部分にあることがわかった。アルカリ抽出した部分からはグルコサミンとグルクロン酸よりなるコンドロイチン様物質も得られたが、粘性は比較的小さく、粘性物質の成分というよりはむしろ組織から抽出されたものと思われる。

文 献

- 1) P. G. Johannsen, R. P. Marshall and A. Neuberger :
Biochem. J., 78, 518 (1961); R. H. Nuenke and L. W.
Cunningham : J. Biol. Chem., 236, 2452 (1961)
- 2) 吉村齊次, 橋本弘信 日化誌 85, 239 (1964)
- 3) C. H. Bellon and R. W. Jeanloz : J. Org. Chem. 28, 3228 (1963)
- 4) V. P. Bogdanov, E. D. Kaverzheva and A. P. Andreyeva :
Biochem. Biophys. Acta, 83, 69 (1964)
- 5) H. Tsukamoto, A. Yamamoto and C. Miyashita : Biochem.
Biophys. Res. Commun., 15, 151 (1964)
- 6) G. S. Marks, R. D. Marshall and A. Neuberger : Biochem.
J., 87, 274 (1963)
- 7) A. P. Fletcher, G. S. Marks, R. D. Marshall and A.
Neuberger, Biochem. J., 87 (1963) 265
- 8) G. S. Marks, R. D. Marshall and A. Neuberger : Biochem.
J., 85 (1962) 15 ; 87 (1963) 274
- 9) F. Michael, Y. Tanaka and K. R. Römer, Tetrahedron
Letter (1964) 3913
- 10) G. S. Marks and A. Neuberger : J. Chem. Soc., (1961) 4872
- 11) F. Michael, Y. Tanaka and K. R. Römer, Tetrahedron
Letters, (1964) 3913.
- 12) D. Wohl, Angew. Chem., 20 1109 (1907)
- 13) B. Vollmert, Makromol. Chem., 5, 110 (1950)
- 14) P. Heim, H. Neukom, Helv. Chim. Acta, 45, 1735 (1962)
ibid., 45, 1737 (1962)
- 15) R. Kuhn, I. Low. Chem. Ber., 74, 219 (1941)
- 16) N. K. Kochetkov, O. S. Chizko, A. F. Sviridov ; Carbohydr.
Res., 4 (1967) 362-363

- 17) C. W. McCleary, D. A. Rees, J. W. Samuel, I. W. Steele
Carbohydr. Res. 5 (1967) 492-495
- 18) W. J. G. Jones, L. N. Owen, S. Peat, J. Chem. Soc., 1941 339
- 19) A. Wack; Monats. Chem. 90 562 (1957)
- 20) Harvorch et al. J. C. S. 2838 (1931)
- 21) E. Wessler and I. Werner; Acta. Chem. Scand. II (1957)
1240-1247
- 22) 橋本則行, 中川浩毅, 冨安行雄; Bull. Sci. Fish., 32
6 (1964)
- 23) A. Lehtonen, J. Kärkkäinen and E. Haakki, Acta.
Chem. Scand. 20 (1966) No 6
- 24) T. C. Fletcher and P. T. Grant; Proceeding Biochem.
Soc. Biochem. J. 106 12 (1968)
- 25) Meyer, K., Linker, A., Davidson, E. A., and Weissmann, B.;
J. Biol. Chem., 205, 611 (1953)
- 26) E. A. Nikkilä and R. Pessala, Scand. J. Clin. Invest. 12
209 (1960)
- 27) E. Z. Dischi; J. Biol. Chem. 167 189 (1947)
- 28) D. Aminoff; Biochem. J. 81 384 (1961)
- 29) Mr. Dmbis, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Refers,
F. Smith, Nature 168 107 (1951); Anal. Chem. 28
350 (1956)
- 30) G. L. Miller, Analyt. Chem. 31 964 (1959)
- 31) P. Albersheim, D. J. Nevins, P. D. English, A. Karr; Carbohydr.
Res. 5 340 (1967)

謝 辞

本研究に際し、終始 御指導、御鞭撻を賜りました本学教授 吉村博次先生、故佐藤敏雄先生に感謝致します。

本研究に際し、有益な助言をいただきました本学助手 文部恵明氏、舟橋秀彦氏、安藤皓章氏をはじめとする吉村研究室の皆様へ感謝致します。

また、野宗嘉明先生をはじめとする野宗研究室の皆様へ感謝致します。

協同研究者の 奥山武司氏、小川信文氏、坂井美男氏、本間万智子氏へ感謝致します。

NMRの測定としていただきました福川清史氏、元素分析を担当していただいた本学有機分析教室の皆様へ感謝致します。