散乱法と分子モデリングで見る糖鎖の溶液構造

*Solution Structures of Polysaccharides in Aqueous Solutions
by Small Angle X-ray Scattering with Synchrotron Radiation and Molecular Modeling*

浦 川 宏

1. はじめに

糖鎖は、たんぱく質と並ぶ代表的生体高分子である。糖鎖の生理活性機能の重要性は認識されつつも、その機能と構造との相関を探る研究が注目され始めたのは比較的最近である。たんぱく質の多くが結晶化できるほどのリジッドな高次構造を有し、その構造研究には単結晶 X 線構造解析が有力な研究手段となる。現在も、単結晶 X 線構造解析法によるたんぱく質の三次元構造が、ポストゲノムのひとつの研究テーマとして官民をあげて強力に推進されている。一方、糖鎖の構造はそれほどリジッドではなく、結晶中における形態と機能発現時の構造が同等であるのかわかれ、機能が発現する条件下での構造観察がたんぱく質に比較してより強く要求されてきた。従って、たんぱく質の構造と機能が、単結晶 X 線構造解析から得た原子座標を用いて分子・原子の大きさのレベルで検討されるのに対して、糖鎖の場合には、その大きさのレベルでの重要な構造情報を欠いて進められてきた。これまで、糖鎖の分子鎖形態を論ずる場合、半屈曲性高分子としての取り扱いがほとんどであり、実験結果もこのモデルでよく説明できる。ところが、糖鎖の特徴であるゲル化や生理活性機能は、糖鎖の局所構造に由来すると考えられ、このような抽象的なモデルでは構造と機能の相関を十分に検討することはできない。

たんぱく質も同様であるが、糖鎖の多くが水溶液中で機能を発現する。この様子を直接観察する方法としては X 線、光、中性子線などの散乱法の利用が有効とされる。しかしながら、それらの結果から、分子・原子の大きさのレベルで構造を議論するには困難が伴う。散乱体の構造に関する情報が、空間的及び時間的に平均化されているためである。そのような平均化された情報を直接解析し、散乱体の詳細な構造モデルへと導くことは非常に難しい。これを克服する手段として、実空間で散乱体の構造モデルを構築、

その散乱強度の角度依存性(散乱曲線)を計算、実測データと比較検討することが行われてきた¹⁾。我々の研究グループは、近年目覚ましい発展と充実を遂げつつあるモンテカルロ法、分子力学法、分子動力学法、分子軌道法など、いわゆる分子モデリングを構造モデル構築の手法として積極的に取り入れてきた。シミュレーションした構造モデルを用いて、散乱実験と比較検討する手法を検証し、糖鎖の分子レベルでの構造の可視化を試みてきた。その結果を本稿では解説したい。

2. 放射光利用小角 X 線散乱実験と分子モデリング

分子モデルから平均化された散乱曲線を計算することは、決して目新しいことではない。散乱体を構成する原子の三次元座標がわかれば、次の Debye の式を用いて計算できる。

$$I(q) \approx \sum_{i=1}^n g_i^2 \phi_i^2(q) + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n g_i g_j \phi_i(q) \phi_j(q) \cdot \frac{\sin d_{ij} q}{d_{ij} q}$$

ここで g_i は原子散乱因子、 d_{ij} は i 番目原子と j 番目原子間の距離、

$\phi_i(q)$ は i 番目原子の形状因子である。原子が van der Waals 半径 R_i の剛体球であると仮定すれば、その形状因子は次式に従う。

$$\phi_i(q) = \frac{3[\sin(R_i q) - (R_i q) \cos(R_i q)]}{(R_i q)^3}$$

したがって、分子モデリングから提案される具体的構造を、散乱曲線とすることは比較的容易である。では、なぜ積極的に構造解析にこれまで用いられなかったのであろうか。分子モデリングの手法が特殊なハードとソフトを手にした者だけに限られたという理由だけではない。むしろ精度の高い散乱実験の難しさに原因があったと考える。溶液からの散乱実験は、単結晶からの回折実験と比較して、測定できる散乱強度は原理的に非常に小さい。さらに、目的とする散乱体の構造解析は、散乱体が溶液中で孤立状態であること、すなわち希薄溶液での測定を要求する。したがって、詳細な解析に耐えられるだけの散乱曲線を実測することは甚だ困難であった。これを克服する可能性が、電子蓄積リングから発生する放射光によって拓かれた。放射光から X 線を取り出して小角 X 線散乱実験に用いようとする試みである²⁾。実験室系の X 線発生装置と比べて、その輝度が数桁高く、実測散乱曲線の S/N 比の飛躍的な向上が見込

HIROSHI URAKAWA
京都工芸繊維大学 工学部 教授
工学博士
〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海
道町
Tel: 075-724-7567 Fax: 075-724-7564
E-mail: urakawa@chem.kit.ac.jp
専門 高分子物性、染色化学
趣味 家庭菜園、パソコンの自作と改良

めた。いまでは、数多くの構造研究が放射光利用小角X線散乱実験で行われている。我々の研究手法が一応の成果を収めつつあるのも、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光研究施設での放射光利用共同実験によるところが大きい。実際、ほとんどの散乱実験を同施設で行っている。小角X線散乱法は、約100nm程度までの大きさの構造を観察する手段として有力とされるが、分子レベルの構造の差をどの程度まで捉えることができるかを検討しておく必要がある。そこで、分子モデリングが比較的容易である染料分子の会合体構造について検討した³⁾。測定した銅フタロシアニン系染料は、大きな平面構造をもち、水溶液中で会合体として存在することが知られている。通常の方法による実測散乱曲線の解析から、会合体は棒状であり、低温になるほど会合度は増加し、棒の長さ方向に大きくなることが認められた。この結果は、分子の平面が互いに積み重なる会合様式を強く示唆した。そこで、分子間の距離と積み重ねの方向を構造パラメータとして会合体の構造モデルを提案した(図1の右図参照)。その原子位置座標から計算される散乱曲線と実測散乱曲線を比較することで構造パラメータの決定を試みた。図1に35における結果をクラトキープロット($q^2 I(q)$ vs. q , $I(q)$: 散乱強度、 q : 散乱ベクトルの大きさ)で示す。パラメータがそれぞれ8°と25°の時に、図1に示すような良好な一致を得た。どの温度においても、 $\pm 0.5^\circ$ 及び $\pm 5^\circ$ の精度で同様に最適モデルを提案できた。高温になると、分子間距離は広がり角度も大きくなり、会合体内で分子間のすべり運動が温度とともに激しくなることが解った。これらの結果は、分子モデリングを妥当な仮定の下で併用すると小角X線散乱実験データによっても散乱体を3次元分子モデルとして可視化でき、詳細な構造解析が行えることを意味している。

図1 図1 フタロシアニン系染料会合体の実測散乱強度(○)と分子モデルから求めた計算散乱曲線(実線)の比較。右図は、計算に用いた会合体モデル分子平面に平行な方向から眺めた概略図。矩形が1分子に対応する。

3. 糖鎖(キシログルカン)の溶液およびゲルの構造

これまでに多くの糖鎖の構造解析を、上述した手法で行ってきた^{4,5,6)}が、ここではモノマーからゲルまでの溶液構造を解析できたキシログルカン^{7,8)}について述べる。

3.1 キシログルカン

キシログルカンは種子や細胞壁に存在する非澱粉植物多糖の総称である。その分子鎖構造は、主鎖である(1→4)-β-D-グルコース(G)と側鎖となるキシロース基(X)やガラクトキシロース基(L)で構成される。繰り返し単位は、主鎖に4つのグルコース残基をもち、含まれる側鎖の数と種類の違いから図2の4種があるが、その比率は植物種子により異なる。これらは、アジア・アフリカ地域で食品や食品添加剤(主として増粘剤)として広く利用されてきた。近年では、その生理活性に関する研究が進み、種子の種類で異なる生理活性を示すことが明らかにされている。例えば、デタリウム由来のキシログルカンは食後の血中グルコースやインシュリン濃度増加を抑える効果があるが、タマリンド由来のものにはそのような効果は報告されていない。またキシログルカンは、アミロース以外でヨウ素呈色を示す多糖類として知られるが、デタリウムやタマリンド由来のものは非常に強くヨウ素呈色を示すものの、アフエツェリア由来のものは弱く呈色する程度であり、ジャトバ由来のものは全く呈色しない。このように、同じキシログルカンでも由来によって異なる生化学及び物理化学的特性を持つ。ここで最も興味を引かれる点は、キシログルカンの一次構造あるいは高次構造がその生理活性と関連があるのか、あるとすればどのように関連しているのか、を明らかにすることにある。このためには、まずキシログルカンの希薄溶液物性を詳細に理解する必要がある。キシログルカンは

図2 種のキシログルカンモノマーの構造

親水性側鎖をもつために、溶液濃度を高めても粘度が上昇するだけで、ゲル化することはないが、酵素による分解反応で、側鎖を50%程度以上取り除くと室温でもゲル化できるようになる。このゲルは、温度を下げて、また温度を上げてゾルになる特徴をもつ。

3.2 キシログルカンモノマーとオリゴマー

キシログルカンを経験分解し、分離精製すると図2の4種のモノマーが得られる。また、部分加水分解の条件を吟味することで、それらの2, 3, 4量体を調整することができる。これらの水溶液の小角X線散乱実験の結果を図3に示す。7糖と9糖からなるモノマーの水溶液から実測された小角X線散乱強度のクラトキープロットである。一方、各モノマーを分子動力学法でモデリングしたところ図3に示すモデルが得られた。右側は骨格部分のみを取り出したものである。これらの原子座標から計算した散乱関数を図3中の実線で示したが、実測散乱強度をよく再現する。従って、シミュレーション結果は実際のモノマーの水溶液中の形態をよく反映していると考えられる。分子モデルを眺めてみると、その骨格はモノマーに依存せず、ピラノースリングを同一平面状に並べる、断面が扁平な形態をとる。また、側鎖はその平面に対して平行に突き出て、側鎖のピラノースリングが主鎖のピラノースリングと直角になるようにねじれていることがわかる。

オリゴマーについての解析でも、モノマーと同様に分子鎖形態が扁平な断面をもつリボン状であること、断面の回転半径がモノマーから4量体までほとんど変化しないことからキシログルカン鎖の剛直性が確認できた。

図3 キシログルカンモノマーの実測散乱強度(●)と分子モデルから求めた計算散乱曲線(実線)の比較と分子モデル。右の分子モデルは主鎖のみを表示。

3.3 キシログルカンポリマー

分子量が大きくなると、小角X線散乱法で分子鎖全体の構造を捉えることはできない。そこで光散乱測定と組み合わせた解析を試みた⁸⁾。動的・静的光散乱測定の結果、キシログルカンは、全体としてガウス鎖として振舞い、局所的には上述した剛直な棒状の構造をもつ。そこで、図4

図4 キシログルカンポリマーの構造モデル

のような構造モデルを考えた。すなわち、微視的な領域では、剛直な構造をとり、 ξ 程度の長さまでこの剛直性が持続し、 ξ より大きな領域では ξ 程度の大きさのブロップが連結され、全体では回転半径 R_g を持つガウス鎖として振舞うとするモデルである。このモデルを数式化すると次式となる。

$$I(q) = A(q)^2 \left[\frac{2}{x^2} (\exp(-x) - 1 + x) + \frac{c\xi^2 q^2}{1 + \xi^2 + q^2} \right]$$

ここで、 $x = R_g^2 q^2$ 、 c は右辺第2項の重みを決める定数である。右辺は形状因子 $A(q)$ と構造因子の積の形であり、 $A(q)$ は形状因子で、1つのブロップからの散乱振幅をあらわす。ここでは、キシログルカン分子鎖をXXXGの繰り返しでシミュレーションした分子モデルの散乱振幅を $A(q)$ とした。静的光散乱測定において濃度を0に外挿した散乱曲線及び小角X線散乱測定から得られた散乱曲線の両方に対して同時に上式をフィッティングした。その結果を図5に示す。明らかに、どの種子由来のキシログルカ

図5 静的光散乱曲線と小角X線散乱曲線を用いた種々のキシログルカン分子鎖形態の解析。A: アフェツェリア、B: デタリウム、C: ジャトバ、D: タマリンド

ンに対しても全領域で散乱現象が再現された。このことから、図4のような構造がキシログルカンの分子鎖形態となることが示された。最適なフィッティングを与えたパラメータで、注目すべきは ξ の値である。アフツェリアとジャトバが5.0nm, 9.0nmと小さいのに対して、タマリンドとデタリウムでは15.0nm, 13.0nmとなった。種子の違いに起因する分子鎖形態の差が、剛直な性質が持続する長さに現れたことになる。これが異なった生理活性を生み出す一因ではないかと推測している。

3.4 キシログルカン水溶液のゲル

前述したように、キシログルカン水溶液は、ガラクトキシロース側鎖の立体障害と親水性のためにゲル化しない。ガラクトース残基を50%程度酵素分解反応で取り除けば白濁したゲルを形成する。そこで、タマリンドキシログルカンが酵素分解していく過程を時分割小角X線散乱で観察した。その結果を図7にクラトキープロットの形で示す。酵素反応が進むに従って中角部分で顕著な変化が現れている。ゲル化後の実測散乱曲線をギニエ近似により解析すると、厚み1.1nmの薄層会合体の形成が認められた。水溶液中のキシログルカン分子鎖が剛直なりボン状の形態であるとの結果と合わせて、リボンの平面を積み重ねるように会合し、架橋ドメインを形成すると考え、架橋ドメインの分子モデルを図6に示すように構築した。モデルの構築に用いたキシログルカンは、(1-4)- β -D-グルカン40残基からなる骨格をもち、30個の(1-6)- α -キシロースの分岐をもち、分岐側鎖の一部は(1-2)- β -ガラクトキシロースで置き換えてある。このモデル鎖を規則的に14本並べて平板状の架橋ドメインとした。このドメインの厚みは実測

図6 キシログルカンの架橋ドメインと孤立鎖の分子モデル

図7 酵素分解の進行に伴うキシログルカン水溶液のゲル化の小角X線散乱による観察。実線は構造モデルから計算される散乱曲線。

表1 酵素分解時間に伴うゲル構造のパラメータの変化

反応時間 (分)	$(f-1)x$	b (nm)	重量分率	
			孤立鎖	架橋ドメイン
0	0.45	6.0	1.0	0.00
40	0.5	11.0	0.49	0.51
57	1.0	13.5	0.24	0.76
74	1.04	13.7	0.13	0.87
91	1.06	14.0	0.07	0.93
108	1.07	14.0	0.05	0.95

散乱曲線の解析から見積もられた値とほぼ同じである。1本鎖のシミュレーションは、同じモデル鎖を分子動力学計算することで行った(図6右)。

一方、ゲル構造からの散乱曲線を計算するために、ゲル化が古典的なフローリー・ストックマイヤーの多官能重縮合スキームに従い、樹木状に成長するとした。このゲル化のモデルから散乱強度は

$$I(q) = A(q)^2 (1 + \alpha\phi) / [1 - (f-1)\alpha\phi]$$

$$\phi = \exp(-b^2 q^2 / 6)$$

で計算される⁹⁾。fは架橋ドメインの官能基数(ここではドメインからの分岐数)、 α は反応度、 b^2 は隣り合う単位間の平均二乗距離、 $A(q)$ は各散乱単位の散乱振幅である。散乱単位が有限サイズのドメインで構成される場合、 $A(q)$ はそのドメインの散乱因子で与えられる。したがって、ここでは、キシログルカンの会合体と孤立鎖の散乱因子からなることになる。会合が進むと、ドメインが多官能性基として機能し、樹木が生長し、ゲル化に至るモデルである。作成したキシログルカンのモデルから散乱因子を計算し、このゲル化モデルに基づき、実測小角X線散乱曲線を解析した。結果は、図7中の実線で示すが、計算散乱曲線と実測散乱強度は、反応全過程でほぼ良好な一致を示す。解析で得た3つのパラメータ(b、 $(f-1)x$ (平均分岐度)、架橋ドメインの重量分率)の値を表1にまとめておく。酵素分解が進行するに従い、より多くの架橋ドメインが形成さ

れ、平均分岐度が増すことがわかる。ゲル化点 $((f-1)^{-1})$ においては、約75%の鎖が、108分後ではほとんどの鎖が架橋ドメイン形成に関与している。散乱単位間距離 b は反応時間と共に増加するが、ゲル化後はほぼ一定値となる。架橋ドメインの分子モデルからわかるように、会合した鎖は平板な形をした濃厚相を形成している。正確に14本の鎖が並列しているとは言えないが、厚みが1.1nmであることから、架橋ドメインはキシログルカン鎖一層で、細胞状の網目を構成する薄い壁になると考えられる。

4. まとめ

これまで、溶液構造を散乱実験で検討しても、分子の大きさのレベルでの解析は困難とされてきた。しかしながら、上で述べたように、散乱体の構造に関する情報を十分に収集し、分子モデリングに活用すれば、三次元分子モデルとして構造を可視化しながら、散乱実験の結果を検討できる可能性が十分にあることがわかった。糖鎖水溶液の構造解析において、その有用性を示すことができ、糖鎖の機能と構造の相関に関する研究を進める一つの方向として期待できる。

文 献

1) 例えば、O. Glatter and O. Kratky(eds), Academic Press,

London(1982)

- 2) 例えば、野島修一、新高分子実験学6「高分子の構造(2)」2.3 放射光X線解析、共立出版(1994)
- 3) H. Santo, M. Shimode, H. Urakawa and K. Kajiwara, *Proceedings of "ATC '97 (The 4th Asian Textile Conference)"*, Taiwan, 787(1997)
- 4) B. T. Stokke, K. I. Draget, O. Smidsrød, Y. Yuguchi, H. Urakawa and K. Kajiwara, *Macromolecules*, 33, 1853(2001)
- 5) M. Dentini, P. Desideri, V. Crescenzi, Y. Yuguchi, H. Urakawa and K. Kajiwara, *Macromolecules*, 34, 1449(2001)
- 6) T. T. T. Thanh, Y. Yuguchi, M. Mimura, H. Yasunaga, R. Takano, H. Urakawa and K. Kajiwara, *Macromol. Chem. Phys.*, 203, 15(2002)
- 7) H. Urakawa, M. Mimura and K. Kajiwara, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 14, 355(2002)
- 8) 家入大輔、河村幸伸、安永秀計、湯口宜明、浦川 宏、梶原莞爾、*繊維学会誌*, 59, 93(2003)
- 9) H. Urakawa, Y. Ikeda, Y. Yuguchi, K. Kajiwara, Y. Hirata and S. Kohjiya, *Polymer Gels and Networks*, Osada and Khokhlov(eds) Marcel Dekker 1(2001)

第 17 回複合材料セミナー

-- 先端産業から地球環境まで -- 産業用途を中心に発展する炭素繊維

主 催：炭素繊維協会 協 賛：(社)繊維学会ほか

日 時：平成16年3月2日(火) 10:00~17:00(セミナー) 17:15~19:15(懇親会)

会 場：東京大学「山上会館」東京都文京区本郷7-3-1 TEL:03-3818-3008

〔交通〕地下鉄：丸の内線「本郷3丁目」、千代田線「根津」、南北線「東大前」下車

都バス：東大構内行き(学01)「上野松坂屋前から」「東大病院前」下車

プログラム、参加申込の詳細は、下記にお問い合わせ下さい。

〒104-0061 東京都中央区銀座2-11-8 第22中央ビル (社)強化プラスチック協会内 炭素繊維協会
複合材料セミナー事務局 TEL:03-3543-1531 FAX:03-3543-1536

第 1 回キンカ高分子化学研修コース

高分子化学の実学を身につけさせたい上司、身につけたい新人に朗報

主 催：近畿化学協会 協 賛：(社)繊維学会ほか

日 時：平成16年3月22日(月) 9:30~18:30

会 場：大阪科学技術センター8階中ホール [大阪市西区靱本町1-8-4]

プログラム、参加申込の詳細は、下記にお問い合わせ下さい。

〒550-0004 大阪市西区靱本町1-8-4 社団法人近畿化学協会高分子化学研修コース係
TEL:06-6441-5531 FAX:06-6443-6685 E-mail:mail@kinka.or.jp