ヒエ種子中の水溶性 α -グルカンの構造[†]

加藤宏治*, 牧野正司*, 高木康好*
堀部厚子*, 山内 亮*, 上野良光*

Chemical Structure of α -D-Glucan in the Seed of Sawa Millet

Koji KATO, Shoji MAKINO, Yasuyoshi TAKAGI, Atsuko HORIBE,
Ryo YAMAUCHI and Yoshimitsu UENO

*Division of Utilization of Biological Resources, Gifu University
(1-1, Yanagido, Gifu 501-11, Japan)*

The polysaccharide composed of only D-glucose was extracted with cold water from the endosperm of Sawa millet and purified through a column of DEAE-cellulose (borate form). It was revealed to be a phytoglycogen from the results of IR-analysis, methylation study, and enzymic hydrolysis. The weight average molecular weight of the polysaccharide was determined to be about 11,000 by gel chromatography. β -Limit dextrin prepared from the polysaccharide by treating with β -amylase was digested with pullulanase and then isoamylase. A ratio of maltose and maltotriose to higher oligosaccharides in the digest supported Meyer's model for the structure of this polysaccharide.

先にわれわれはヒエ種子胚乳部から冷水にて抽出した高分子糖質を DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーで分画した結果、比旋光度が高く、D-グルコースのみを構成糖とする多糖が得られることを報告した¹⁾。ここでは、上記多糖がトウモロコシ²⁾や大麦³⁾にその存在が知られているフィトグリコーゲン様多糖と推定されたことから、その性状や構造について詳細な実験を行った結果を報告する。

実験材料および方法

1. 試 料

市販品のヒエ (*Echinochloa Crus-Galli* L., 青森県産) を粉砕機で粗挽きし護穎を取り除いた後、クロロホルム・メタノール混液 (1:1) を加え 1 時間加熱還流し脱脂した。脱脂物は風乾したのち、ボールミルにより粉末状とし実験に供した。

2. ガスクロマトグラフィー分析 (GLC 分析)

3% Silar 10 C/Unipore B(60~80 メッシュ) を充填したガラスカラム (0.3×200 cm) を装着した島津ガスクロマトグラフ GC-7A 型を用い、キャリアーガスとして窒素を 60 ml/min で流し、カラム温度は 160→220°C (5°C/min の昇温) で行った。化合物の検出は水素炎イオン化検出器 (FID) によった。検出された各化合物に相当するピークの面積は島津クロマトパック C-R1A を用いて求めた。

3. ガスクロマトグラフィー

質量分析 (GC-MS 分析) : 日立 M-52 型ガスクロマトグラフィー・質量分析計を用いて行った。ガスクロマトグラフィーの条件は GLC 分析と同じカラムを用い、カラム温度は 200→230°C (2°C/min の昇温) で、キャリアーガスとしてヘリウムを使用した。質量分析のイオン化電圧は 20 eV で行った。

4. 赤外線吸収スペクトル分析 (IR 分析)

日本分光 IRA-1 型赤外分光光度計を用い KBr 錠剤法あるいは薄膜法にて行った。

[†] 穀類の水溶性多糖に関する研究 (第 2 報) : 第 1 報は文献 1

* 岐阜大学農学部生物資源利用学科 (501-11 岐阜市柳戸 1-1)

実験結果

1. 水溶性多糖の抽出

脱脂粉末状にしたヒエ種子に、あらかじめ 4℃ に冷却しておいた 4 倍量の純水を加え、4℃ で 4 時間攪拌して水溶性多糖を抽出した。抽出液は 6000~7000 rpm で 15 分間遠心分離して上清と残渣とに分けた。上清液のモーリッシュ反応が、ほぼ陰性になるまでこの抽出操作を繰り返した。モーリッシュ反応陽性の上清液は合わせたのち、約 1/10 容になるまで減圧下に濃縮した。このとき生じた不溶物は遠心分離により除去した。濃縮液に 2 倍量のメタノールを加え多糖を沈澱させ、これを遠心分離により回収後再び水に溶解させセロファンチューブを用いて 48 時間流水中で透析を行った。透析内液を凍結乾燥して粗水溶性多糖を褐色粉末状に得た；収率 0.16%，糖含量（グルコースとして定量）68.3%，（Glu 86.7%，Gal 6.1%，Ara 7.1%），蛋白質含量 20.1%。

2. フィトグリコーゲンの単離

粗水溶性多糖（300 mg）をあらかじめ調整した DEAE-セルロースカラム ($B_4O_7^{2-}$ 型, 4.5×90 cm) に供した。前報¹⁾で報告したように、純水で溶出される画分は、加水分解でグルコースのみを与えることから純水溶出画分を集め、3 M 塩酸で微酸性とした後、セロファンチューブを用いて流水に対して 48 時間透析した。透析内液を凍結乾燥し、白色粉末状の多糖 186 mg（全糖量 98%）を得た。この多糖は $[\alpha]_D^{+162}(c=0.3, M/10 \text{ NaCl 水溶液})$ を示し、酸による完全加水分解で D-グルコースのみを与え、IR スペクトル分析で 850 cm^{-1} に α -グルコシド結合に特徴的なタイプ 2a の吸収を示したことからフィトグリコーゲンであると推定した。

Fig.1. Determination of the molecular weight of the α -D-glucan.

3. 分子量の測定

多糖（3 mg）を少量の M/10 塩化ナトリウム溶液に溶解した後、あらかじめ同じ溶液で平衡、安定化させた Sepharose CL-6B カラム（Pharmacia 製, 1.5×95 cm）に供した。同溶液を 0.5 ml/min で流し、溶出液を 1.5 ml ずつ分取した。各フラクション中の糖含量はフェノール・硫酸法で測定した。また標準物質として Pharmacia 製デキストラン T-70 (Mw. 70,000), T-40 (43,500), T-20 (21,000), T-10 (10,500) を同一条件でゲルクロマトグラフィーに供し作製した溶出量/分子量の標準曲線 (Fig. 1) からこの多糖の重量平均分子量を求めたところ 11,600 と算出された。

4. メチル化分析

多糖（5 mg）をジメチルスルホキシドに溶解した後、箱守法⁴⁾に従ってメチル化を行った。メチル化終了後、反応液を水で稀釈し、セロファンチューブを用い流水に対し透析を行い、透析内液を凍結乾燥してメチル化多糖を回収した。メチル化多糖の IR 分析で水酸基に基づく吸収が消失するまで以上のメチル化操作を数回繰り返した。得られた完全メチル化多糖に 90% ギ酸（1 ml）を加え 100℃ に 2 時間加熱した後、減圧濃縮を行いギ酸を除去し、ついで 0.25 M 硫酸（1 ml）を加え 100℃ で 14 時間加水分解を行った。分解液を炭酸バリウムで中和、生じた硫酸バリウムを濾別後、分解液中の糖質を常法に従い水素化ホウ素ナトリウムで還元、無水酢酸・ピリジンでアセチル化し GLC 分析に供した結果、3 本のピーク A, B, C が 1.00 : 5.10 : 0.92 の面積比で検出された。各ピークはそれぞれ、GC-MS 分析から 2,3,4,6-tetra- (A), 2,3,6-tri- (B) および 2,3-di-O-methyl-D-glucitol (C) のアセチル誘導体であると同定した。以上の結果から、この多糖は (1→4) 結合を主鎖とし (1→6) 結合で分岐した α -グルカン、すなわちフィトグリコーゲンであることが確認された。また、この多糖の平均鎖長は部分メチル化アルジトールアセテートの比率から 7.02 と算出された。

5. 単位鎖長の測定⁵⁾

フィトグリコーゲンの単位鎖長の分布を知る目的で、ブルナーゼおよびイソアミラーゼによる α -(1→6) 結合の切断を試みた。すなわち、フィトグリコーゲン（60 mg）を M/20 酢酸緩衝液（pH 6.0, 20 ml）に溶解し、これに *Klebsiella* sp. 起源のブルナーゼ（240 units, 天野製薬）を加え振盪しながら 37℃ に 48 時間保持した。ついで M 酢酸により反応液の pH を 5.0 に調整し、これに *Pseudomonas* sp. 起源のイソアミラー

Fig. 2. Chain-length distribution of the unit chain of the α -D-glucan.

ゼ (240 units, 天野製薬) を加え, 37°C で 24 時間インキュベートした. $\text{M}/10$ 水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に調整後, 沸騰湯浴中に 15 分間保持して酵素を失活させた. 不溶化した酵素蛋白質を濾別後, 濾液をイオン交換樹脂 Amberlite IR-120(H^{+} 型) および IRA-410 (OH^{-} 型) で処理, 脱塩した. 反応液の一部を後述するような条件で β -アミラーゼ分解に供し, 限界分解率を求めたところ, 90.4% となり, ほぼ完全に α -(1 $\rightarrow$ 6) 結合は切断されたものとみなすことができた. 残りの反応液はできるだけ少量まで濃縮した後, ゲルクロマトグラフィーに供した.

すなわち, あらかじめ $\text{M}/50$ 水酸化ナトリウム: 0.2% 塩化ナトリウムの 1:1 混液で平衡安定化した Toyo-pearl HW-50 S カラム (東洋曹達工業, $1.5 \times 90 \text{ cm}$) に酵素分解物をのせ, 同溶液を 0.1 ml/min で流した. 溶出液は 1.5 ml/min ずつ集め, 各フラクションは M 塩酸で中和した後, 全糖量および還元糖量 (還元末端残基量) をグルコースを標準としてそれぞれフェノール・硫酸法および Nelson-Somogyi 法で測定した. 全糖量と還元末端基量より各フラクションの重合度を求めた結果を Fig. 2 に示した. これから, この多糖の単位鎖の重合度は 3~20 に分布していることがわかった.

6. β -アミラーゼ分解

フィトグリコーゲン (100 mg) を $\text{M}/20$ 酢酸緩衝液 (pH 7.0, 50 ml) に溶解し, これに *Bacillus* sp. 起源の β -アミラーゼ (620 units , 天野製薬) を加え, 分解率が一定になるまで 37°C でインキュベートした. 分解率が 37.3% で一定となった反応液は, 沸騰湯浴中で 30 分間加熱し酵素を失活させた後, 沈殿した酵素蛋白質を濾別した. 濾液は減圧濃縮し, これに 2 倍量のエタノールを

Fig. 3. Elution profile for isoamylase-pullulanase digest of the β -limit dextrin prepared from the α -D-glucan.

加えることにより β -リミットデキストリン (β -LD) を沈澱させた. 沈澱物はエタノールで洗浄後乾燥し, 粉末状の β -LD 33.6 mg を得た. このデキストリンを前述の方法でメチル化分析したところ, 2,3,4,6-tetra-, 2,3,6-tri- および 2,3-di-O-methyl-D-glucitol のアセチル誘導体が 1.00:3.24:0.95 の割合で検出された. これよりこの β -LD の平均鎖長を 5.2 と算出した.

7. β -LD の鎖長分布測定⁵⁾

前述の β -LD (平均鎖長 5.2, 40 mg) を $\text{M}/20$ 酢酸緩衝液 (pH 6.0, 20 ml) に溶解し, これにブルラナーゼ (240 units) を加え 37°C で 48 時間インキュベートした. 次に反応液の pH を 5.0 に調整し β -アミラーゼ (240 units) を加え, 37°C で 24 時間インキュベートした. その後, 反応液の pH を 7.0 に調整し, 沸騰湯浴中で 15 分間加熱し, 酵素を失活させ不溶化した酵素蛋白質を濾過により除去した. 濾液の一部をとり, 前述の方法により β -アミラーゼ分解を行い, 限界分解率を求めたところ 94.8% となり, このことから β -LD の α -(1 $\rightarrow$ 6) 結合はほぼ完全に加水分解されたものとみなした. 残りの濾液はできる限り少量まで濃縮したのち, 50°C に保温した Bio-Gel P-2 カラム (Bio-Rad 社, $2.5 \times 90 \text{ cm}$) に供し, 0.5 ml/min で純水を流し酵素分解物を溶出させた. 溶出液は 4 ml ずつ集め, 各フラクションの糖量をフェノール・硫酸法で測定した. その結果を Fig. 3 に示した. 図からも明らかのように, 重合度 2 (マルトース) から 6 までのマルトオリゴ糖を確認することができたが, マルトースとマルトリオースの含量が他のものに比較して高いことがわかる. 重合度 2 および

3の画分の還元末端基量(A)と重合度4以上の画分の還元末端基量の和(B)との比(A/B)は約1.4となり、このことからこの多糖はHaworthやStaudingerのモデルではなくMeyerのモデルに近い構造をしている多糖である⁶⁾と結論した。

考 察

トウモロコシ²⁾、大麦³⁾、米⁷⁾などの種子の胚乳部に、フィトグリコーゲンと呼ばれる水溶性の α -グルカンが存在することはよく知られているが、それらの化学構造に関する研究報告は多くない。トウモロコシのフィトグリコーゲンは14,000gの遠心分離で上清およびpelletの両画分に存在していることが指摘^{8,9)}され、上清画分のフィトグリコーゲンの平均鎖長は12.2、 β -アミラーゼによる分解率は27.5%であり、pellet画分のフィトグリコーゲンの平均鎖長は8.3、分解率は45.7%であると報告されている。このようにフィトグリコーゲンが遠心分離あるいはゲルクロマトグラフィーで2画分に分画されることはソルガムでも認められ、上清画分のフィトグリコーゲンの平均鎖長は13.4、pellet画分のそれは9.4であると報告されている¹⁰⁾。米に見出された平均鎖長8.6のフィトグリコーゲンもゲルクロマトグラフィーで2画分に分画される⁷⁾ことが認められている。われわれが今回ヒエ種子胚乳部から得たフィトグリコーゲンはゲルクロマトグラフィーにおいて単一のピークを与え、トウモロコシ、ソルガム、米に見られたような2成分に分かれる(bimodal distribution)という現象は見られなかった。またメチル化分析より求めたヒエフィトグリコーゲンの平均鎖長は約7であるが、イソアミラーゼおよびブルナーゼで枝切りした後の生成物をゲルクロマトグラフィーに供して求めた単位鎖長は重合度4~5にピークを有しながら、広く3~20に分布しているのが認められた(Fig.2)。これはソルガムのフィトグリコーゲンのイソアミラーゼ分解生成物が重合度5~25に分布しているが、重合度10~15の画分がピークになっているということと対照的である。ソルガムにおいてBoyerら¹⁰⁾が平均鎖長9.4と13.4の2画分を混合物のままで酵素処理したために、前述のような結果になったのではないかと推定されるが、今後同じ手法による実験結果の比較検討が必要であるように思われる。

要 約

ヒエ種子胚乳部から水で抽出され、DEAEセルロースカラムクロマトグラフィーにより精製されたグルコースからのみ成る多糖はゲルクロマトグラフィー、IR分析、メチル化分析、酵素分解の結果から、重量平均分子量約11,000、平均鎖長およそ7のフィトグリコーゲンであると同定した。さらにこの多糖を β -アミラーゼで処理し調製した β -リミットデキストリンをイソアミラーゼおよびブルナーゼで分解し、その分解物の鎖長分布を求めたところFig.3のような結果となった。重合度2および3の画分の還元末端基量(A)と重合度4以上の画分のそれ(B)の比A/Bが約1.4であったことから、この多糖の構造はMeyerのモデルに近い構造を有しているものと推定した。

本研究の一部は(株)東海製粉機製作所からの奨学研究費を使用して行ったものであります。同製作所代表取締役社長、西田千代一氏に対して深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 加藤宏治, 高木康好, 堀 正彦, 山内 亮, 上野良光: 岐阜大農研報, **53**, 327-331 (1988).
- 2) S. PEAT, W. J. WHELAN and J. R. TURVEY: *J. Chem. Soc.*, 2317-2322 (1956).
- 3) K. A. GILLES and W. O. S. MEREDITH and F. SMITH: *Cereal Chem.*, **29**, 314-316 (1952).
- 4) S. HAKOMORI: *J. Biochem.*, **55**, 205-208 (1964).
- 5) 貝沼圭二: 「澱粉科学ハンドブック」, 二國二郎監修, 朝倉書店, 東京, p. 198 (1977).
- 6) S. PEAT, W. J. WHELAN and G. J. THOMAS: *J. Chem. Soc.*, 3025-3030 (1956).
- 7) M. ASAKA, K. OKUNO, Y. SUGIMOTO, M. YANO, T. OMURA and H. FUWA: *Stärke*, **37**, 364-366 (1985).
- 8) N. K. MATHESON: *Phytochemistry*, **14**, 2017-2021 (1975).
- 9) C. D. BOYER, P. A. DAMEWOOD and E. K. G. SIMPSON: *Stärke*, **33**, 125-130 (1981).
- 10) C. D. BOYER and K.-C. LIU: *Phytochemistry*, **22**, 2513-2515 (1983).

(昭和63年12月7日受付, 平成元年2月6日受理)