総 説

多 糖 鎖 認 識

畑 中 研 一

東京工業大学生命理工学部

Recognition of Polysaccharide Chain

Kenichi HATANAKA

Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology
(4259 Nagatsuta, Midori-ku Yokohama-shi, 〒227)

Sulfated polysaccharides show a lot of biological activities. There are two kinds of molecules which recognize sulfated polysaccharides. Non-specific recognition of sulfated polysaccharide depends on the degree of sulfation and the molecular weight of the sulfated polysaccharide. On the other hand, the chemical structure of sulfated polysaccharide affects on the specific recognition. In this review, recognition of sulfated polysaccharides is reported, taking the cases of anti-coagulant activity, activation of basic fibroblast growth factor, and anti-HIV activity.

Recognition of neutral polysaccharide is relatively weak but more specific. A synthetic approach to a branched polysaccharide, which shows hypoglycaemic activities, is also reviewed.

1 はじめに

糖鎖生物学が発展するにつれて、生体内における糖鎖の役割が徐々に解きあかされ、細胞表面などでは、ごく精密な糖鎖認識が行われていることがわかってきた。

一口に糖鎖認識といっても、単糖を認識する単純なものから、複雑なオリゴ糖鎖を認識する高度なものまで様々である。マクロファージのマノースやガラクトース認識、肝実質細胞のガラクトース認識、グルコーストランスポーターのグルコース認識、ある種のエキソグリコシダーゼの非還元末端糖認識などは、単糖認識の例である。これに対して、細胞表層の糖タンパク質糖鎖や糖脂質糖鎖の関与する認識では、複雑なオリゴ糖鎖の高度な認識が働く。

糖鎖を認識する分子も、レクチンや糖転移酵素などのタンパク質や、小島・箱守によって盛んに研究されている糖鎖(糖鎖-糖鎖相互作用)など様々である。また、認識の度合いも、糖鎖を認識する物質によって異なる。例えば、マノースを認識する植物レクチンであるコンカナバリンAは、マノース単糖も認識するが、ハイマノース型オリゴ糖と呼ばれるマノースを5~9個有するオリゴ糖には、より強く結合する(認識能が高い)。

タンパク質の認識においては、一次、二次、三次、四次構造が重要となるため、比較的大きな分子量が必要であるのに対し、糖鎖は数千以下の小さい分子量で多大な

情報量を有する。すなわち、(1)糖の種類、(2)結合位置(糖は多官能である)、(3)アノマー炭素の立体配置(α および β)、(4)分岐などにより、一次構造だけでも膨大な情報量を有するのである。したがって、糖鎖は生体における精密な認識に適した化合物であると言える。

多糖鎖の認識となると、糖鎖の一次構造に加えて、三次構造や分子量といった因子が増え、認識機構の解析は複雑化する。さらに、微量な生体成分による分子認識を調べるとき、生理活性という指標で評価することも度々あるが、認識(あるいは結合)と活性発現とは必ずしも対応していない場合もあるため、結論には注意を要する。

本稿では、生体分子による多糖鎖認識と、その機構解明のための合成多糖の活用について紹介する。さらに、天然多糖の生理活性を超えるような多糖鎖の構築についても触れる。

2 硫酸化多糖の認識

硫酸化多糖は、硫酸エステル基や硫酸アミド基を有するポリアニオンであり、様々な生理活性を示す。生体由来の硫酸化多糖は、その一次構造や硫酸化度の違いにより、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸などに分類される。また、天然多糖を硫酸化して得られるデキストラン硫酸、キトサン硫酸、キシラン硫酸なども類似の生理活性を示す。ヘパリン以外の硫酸化多糖は、ヘパリノイドとも呼ばれる。

硫酸化多糖を認識する分子は、大別して二種類ある。一つは、硫酸化多糖の硫酸化度や分子量などに対応して認識や生理活性の度合いを変化させるもので、一般に糖鎖構造にはあまり関与しない。極端な場合、ポリアニオンであればよい場合もある。例えば、デキストラン硫酸の有する脂血清澄活性などはこれに相当する。もう一つは、特異な化学構造に対する強い認識を有する物質である。

2・1 抗凝血活性

硫酸化多糖の生理活性のうちで最もよく知られているのは、抗凝血活性（血液凝固を阻害する活性）であるが、その中でもよく研究されてきたのが抗トロンビン活性である。硫酸化多糖の抗トロンビン活性は、硫酸化多糖が血液中の抗トロンビン物質（トロンビンの阻害剤）を活性化することによってトロンビン活性を強く抑制するために血液凝固を阻害するのであるが、この血液中の抗トロンビン物質は二種類知られている。

一つは、アンチトロンビンⅢ(ATⅢ)と呼ばれるもので、以前からよく研究され、ヘパリンを含むすべての硫酸化多糖がATⅢによって認識され、活性発現しているものと考えられてきた。しかしながら、Björk ら¹⁾によってヘパリン中のATⅢ結合部位（五糖）(Fig.-1)が明らかとなって以来、ATⅢはヘパリンとのみ特異的に結合しているらしいことがわかってきた。ヘパリン中に存在するATⅢに結合する五糖部分は、Petitou ら²⁾、市川³⁾、van Boeckel ら⁴⁾、によって別々の方法により化学合成された。合成五糖の生理活性を調べると、天然物と同様の活性を示し、Lindahl ら¹⁾の提案が正しいことを示唆した。また、活性五糖のうちの一部（四糖や三糖）では、ATⅢに結合しないとも報告されている。このように、標的化合物を化学合成し、その生理活性を調べることによって、認識される構造を確かめる方法は、手間はかかるが確実な方法である。特に、遺伝子制御のしにくい（あるいは制御できない）多糖鎖の一部分を得るためには、化学合成が最も適している。

それでは、ヘパリン以外の硫酸化多糖の抗トロンビン活性はどの様に説明されるのであろうか。ATⅢとは別の抗凝血因子、ヘパリンコファクターⅡが血液中に存在し、ヘパリン以外の硫酸化多糖とも結合し、その抗トロンビン活性を増強しているのである。

2・2 細胞増殖因子に対する結合性

多くの細胞増殖因子、細胞接着因子、サイトカインな

どが、ヘパリンやヘパラン硫酸に結合することが知られている。ヘパリン結合性増殖因子に分類される線維芽細胞増殖因子(FGF)は、ヘパリンやヘパラン硫酸と結合することにより安定化し、プロテアーゼによる分解から防御され、活性も増強される。FGFがヘパリンと結合することによって、FGFのコンホメーションが変化し、細胞膜上の高親和性レセプターに結合できるようになると考えられている。このように、FGFに対するヘパリンの作用については広く研究されているが、ヘパリンにおけるどのような化学的性質や構造がFGFとの相互作用において本質的であるのか、いまだ明らかにされていない。天然のヘパリンは、分子量や硫酸化度及び糖骨格の異なる多糖の混合物であるため、FGFとヘパリンやヘパラン硫酸との相互作用を分子レベルで解析するのは困難である。

最近、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)と強く相互作用するヘパリン中の糖鎖部分がLindahl ら⁵⁾によって提案された。さらに、ヘパリンよりも硫酸化度の低いヘパラン硫酸中の構造単位のうち、bFGFによって認識され、bFGFの細胞増殖活性を増強する二糖単位(Fig.-2)がTurnbull ら⁶⁾によって報告された。ただし、bFGFと高親和性を示すヘパラン硫酸由来のオリゴ糖鎖は、この二糖単位を3ユニット以上含む12糖以上の分子量であることが必要である。

それでは、bFGFが有する硫酸化多糖の認識能は、前出のATⅢのような特異的認識に相当するものであろうか。それだけではなさそうである。デキストラン硫酸のように、ヘパリンやヘパラン硫酸などとは構造を異にする硫酸化多糖でもbFGFと結合し、その活性を増強するのである。最近、我々は、ポリアクリル酸のような単なるポリアニオンでもbFGFの活性を増強することを発見した。ただし、ヘパリンは1 ng/mLでbFGFを活性化し、50 ng/mL以上では活性増強がplateauに達するのに対して、ポリアクリル酸がbFGFを活性

Fig.-2 A disaccharide portion in heparan sulfate which activates basic growth factor.

Fig.-1 Antithrombin III binding heparin pentasaccharide.

化するためには $30 \mu\text{g/mL}$ の濃度が必要である。したがって、酸性ポリマーに対する bFGF の認識は、特異的な強い認識と非特異的な弱い認識が共存していると推測される。ただし、これら 2 種類の認識が同じレセプターを介するものか、異なるレセプターを介するものかについては不明である。

2・3 抗 HIV 活性

後天性免疫不全症候群 (AIDS) は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) によって引き起こされる極めて致死率の高い感染症である。HIV は、免疫の中枢機能に携わるヘルパー T 細胞の表面に存在する CD 4 抗原を認識して細胞内に侵入した後、逆転写酵素を用いて RNA を DNA に転写し、プロウイルスとなって潜伏する (ウイルスキャリアーの状態)。プロウイルスは宿主細胞の DNA 中に潜伏 (潜伏期間はヒトや環境によって異なる) し、何らかの引き金によってプロウイルス (DNA) から RNA への転写が開始される。次いで、ウイルスタンパクが盛んに合成されるようになり、ウイルス粒子が爆発的に増殖を始める。このウイルス増殖が異常なまでに急激であるため、リンパ球は穴だらけとなってしまい、免疫細胞としての機能を全く失い死んで行くのである。リンパ球の破壊が増加するに従い、ヒトの免疫機能は極端に低下し、カビや雑菌などの通常はほとんど問題にならない病原体にも抵抗できなくなってしまう。いわゆる日和見感染である。上記のウイルスの爆発的増殖を促すプロウイルス活性化については、現在のところあまりよくわかっていない。モンタニエは、ある種の (HIV とは異なる) 病原体がエイズ発症の引き金を引いているのではないかと提唱している。

1987 年、ヘパリンやデキストラン硫酸等の硫酸化多糖に抗 HIV 活性があることが報告された⁷⁾。硫酸化多糖の抗 HIV 活性が発見された当初、活性の本質は逆転写酵素阻害活性にあると考えられていたが、満屋らの研究により、ウイルス表面の外被糖タンパク質である gp 120 が T 細胞表面の CD 4 に吸着する過程が硫酸化多糖によって阻害されることがわかった⁸⁾。

菅原らは、種々の構造を有する酸性多糖、中性多糖の抗 HIV 活性を調べることによって、HIV の増殖阻害には、硫酸基が最も重要な役割を果たし、ヒドロキシル基やカルボキシル基のみを有する多糖には抗 HIV 活性が全くないことを報告している⁹⁾。すなわち、硫酸化の度合い (ポリアニオンの密度および解離度) が活性の強さに大きく影響していると思われる。後になってわかるのだが、抗 HIV 活性発現のためには、硫酸基の存在が不可欠であるとともに、高分子量の多糖であることが非常に重要な意味をもって来る。

硫酸化多糖の抗 HIV 活性は、前出の他の生理活性と同様に、硫酸化度依存性のもの (非特異的認識) と、硫

酸化多糖の化学構造、特に糖鎖構造に依存するもの (特異的認識) とが存在すると推測される。このことに関して詳細な情報を得るためには、天然の硫酸化多糖のみでは役不足であり、構造の微妙に異なる硫酸化多糖を化学合成することが必要となってくる。そこで、本項では、硫酸化度や糖鎖構造を変化させた合成硫酸化多糖の抗 HIV 活性について述べる。

筆者らは、(1→5)- α -D-リボフラナンを化学合成し、DMSO 中のピペリジン硫酸で硫酸化したりボフラナン硫酸 (RFS) を用いた。リボフラナンは抗体を作らず、核酸と類似の構造をしているため、体内における毒性が低いと考えられる。また、その分解生成物である D-リボースも無毒である。

ベンジル化 1, 5-無水リボースを五フッ化リンを開始剤としてカチオン開環重合し、得られた立体規則性ポリマーを脱ベンジル化、硫酸化して、種々の硫酸化度を有する RFS (Fig.-3) を合成した¹⁰⁾。

RFS は、硫酸化度 (糖残基当たりの硫酸基の数) が 1.19 以上で抗 HIV 活性を発現し、高硫酸化度になるにつれ指数関数的に上昇した。RFS の中で最高の活性を示した硫酸化度 1.80 のものは、硫酸化度 1.19~1.36 の RFS の約 100 倍の活性を持っている。

すなわち、RFS の抗 HIV 活性 (gp 120 による認識) は、硫酸化度依存的であり、非特異的な認識であると考えられる。天然多糖の硫酸化体であるデキストラン硫酸、カードラン硫酸、レンチナン硫酸に関しても同様の硫酸化度依存的な抗 HIV 活性が認められる。

これに対して、デキストラン硫酸と類似の構造を骨格とする純化学合成硫酸化多糖の (1→6)- α -D-マンノピラナン硫酸 (MPS) では、興味ある抗 HIV 活性 (構造-機能相関) を示す。(1→6)- α -D-マンノピラナンは、ベンジル化 1, 6-無水マンノースのカチオン開環重合により合成されるが、これを硫酸化すると、種々の硫酸化度の MPS が得られる。¹³C-NMR を用いて MPS を分析すると、まず C-3 位のヒドロキシル基が硫酸化され、次いで C-2 位のヒドロキシル基が硫酸化されることがわかった。C-4 位には硫酸基がほとんど導入されない。すなわち、硫酸化度が 1.0 ぐらいの MPS は大部分の C-3 位と少しの C-2 位が硫酸化されていて、硫酸化度が 2.0 に近い MPS では、すべての C-3 位とほとんどの C-2 位が硫酸化されている。このように、合成多糖のような構造が単純で明確な分子を用いて生体分

Fig.-3 Structure of ribofuranan sulfate.

子との相互作用（認識）を調べることは、認識機構を解明するにあたり非常に役立つものと期待できる。

MPS の抗 HIV 活性を調べると、硫酸化度が 0.98 以下では活性がなく、1.19~1.83 で最高の活性を示し、1.97 以上では活性がやや低下した。この結果は、他の種類の硫酸化多糖の抗 HIV 活性（高硫酸化度のものほど高活性）とは明らかに異なる。中程度の硫酸化度の MPS が最も高い抗 HIV 活性を有するのである。

一般に、硫酸化多糖の（非特異的な）認識や生理活性においては、高硫酸化度のものほど強く相互作用し、高い活性を示す。実際に、MPS の抗凝血活性やタンパク質（コンカナバリン A）への吸着は、高硫酸化度の MPS ほど活性が高く、タンパクとの相互作用も強い。したがって、中程度の硫酸化度の MPS は、HIV 表面に存在する gp 120 によって特異的に認識されている可能性が高い。ウイルスの外被糖タンパク質である gp 120 にも、硫酸化多糖に対する特異的認識機能と非特異的認識機能が混在しているようである¹¹⁾。

3 中性多糖の認識

タンパク質が関与している認識（例えば酵素反応）には極性基が関与している場合が多い。官能基以外の周囲のアミノ酸残基が非極性の場を形成しているからである。これに対して、糖鎖-糖鎖間の相互作用（認識）は、小島・箱守らが提案しているように²⁴⁾、疎水的相互作用であると思われる。生体系が血液や体液といった水溶液中に存在しているため、疎水部分が浮き彫りにされるのであろう。また、前項で述べた硫酸化多糖は、硫酸基が水溶液中でも強い極性基として働くため、電気的な相互作用が主であろうと考えられる。シアル酸（カルボキシル基を持つ糖）の関与する糖鎖認識に関しても同様のことが言える。それでは、中性多糖の（タンパク質による）認識はどの様な相互作用によるものであろうか。官能基はヒドロキシル基のみであるから、水素結合以外これといった強い相互作用は見あたらない。

中性多糖の認識においては、三次構造も含めた『形』が非常に重要なのである。すなわち、ヒドロキシル基の突き出ている方向（糖の種類）、糖主鎖の広がり（結合様式）、枝の有無などによって認識の度合いが異なる。中性糖鎖の認識が比較的弱い相互作用によるため、高い特異性を発揮するとも考えられる。ところで、中性多糖の認識においては、多糖が高分子（多価）であるが故に、細胞上に集合した複数のレセプター等との結合定数は、見かけ上、非常に大きくなる（高分子効果）。その結果、特異性が高く、結合も強い認識が行われるものと思われる。高分子効果に関しては、前述の硫酸化多糖についても考えられる。

Albersheim によって単離された、エリシター活性

（ファトアレキシンという生体防御物質の分泌を促す活性）を有する多糖『オリゴサッカリン』の中には、中性多糖も含まれる。その活性オリゴ糖部位は七糖であり、(1→6)-β-結合したグルコペンタオースの 2 番目と 4 番目のグルコース残基に(1→3)-β-D-グルコースの枝があることが明らかにされた¹²⁾。分枝のないもの、枝の数や位置の違うものは、全く活性がない。このエリシター活性を有するオリゴ糖部分は化学合成され¹³⁾、天然物と同等の活性であることが確かめられている¹⁴⁾。

前述したように、認識糖鎖の構造を確定させるためには、化学合成によるのが（現在のところ）有力な手段である。ここでは、中性分枝多糖の合成法について触れる。オリゴサッカリンの活性部位のような分枝オリゴ糖の合成は、複雑ではあるが、基本的にはグリコシル化反応の繰り返しによって達成される。これに対して、分枝多糖の合成は、重合というステップがはいる。一般に、分枝多糖は Fig.-4 のようにして合成される。ただし、二糖モノマーの重合は、必ずしも達成されるわけではなく、1,6-無水マンノビオース¹⁵⁾などのような一部の高活性なモノマーに限られる。したがって、二種類の保護基を有する無水糖モノマーを重合し、選択的脱保護の後、グリコシル化反応によって枝を付与するのが、より一般的な方法と言えよう。

中国産オタネニンジン (*Panax ginseng* C.A. Meyer) は、古くから漢方薬として医用に用いられてきた。曳野らは、ニンジン抽出液中の血糖降下作用を有する多糖を単離¹⁶⁾、その構造解析について報告した^{17), 18)}。オタネニンジンの多糖画分は、セルロースクロマトグラフィ、透析、DEAE-セルロース、Sephacryl S-200、Sephacryl S-500 を用いることによって 5 種類に分画された。Panaxan（パナキサン）A~E と名付けられた 5 種類の多糖は、マウスへの腹腔（腔）内投与により、顕著な血糖降下作用を示した。

5 種類のパナキサンは、酸加水分解することにより、グルコースを主成分とし、いくつかのアミノ酸を含むことがわかった。パナキサン A についてさらに詳しい構造解析を行うと、パナキサン A は、分子量約 14 000 の D-グルコースを主成分 (92.1 %) とする多糖であり、正の大きな比旋光度 ($[\alpha]_D + 187^\circ$) と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにより、すべての D-グルコース残基は α 結合していることがわかった。次に、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルを解析すると、C-1、C-3、C-6 炭素のピークが、それぞれ 2 本ずつ観察された。したがって、 α -D-グルコースの結合部位は、1,3,6 位であると結論されたのである。さらに、パナキサン A は、箱守法によりメチル化、酸加水分解され、アルジトールアセテートとした後、GC-MS によって分析された。その結果は、2,3,4,6-テトラ-O-メチル-D-グルコース、2,3,4-トリ-O-メチル-D-グル

Fig.-4 Synthetic methods for branched polysaccharides.

コース、2,4-ジ-O-メチル-D-グルコースが1.0:2.0:1.2のモル比で検出された。また、過ヨウ素酸酸化により、酸化を受けないグルコース残基が25.6%あることも確認された。

以上の結果より推定されるパナキサンAの化学構造は、Fig.-5に示すような、 α -(1 $\rightarrow$ 6)-D-グルコピラナンを主鎖とし、C-3位に分岐を有する分岐多糖である。しかも、非還元末端グルコース残基、分岐点のグルコース残基、中間のグルコース残基の比は、約1:1:2である。しかしながら、これら3種の構造のうちのどれが真のパナキサンAの構造なのか、あるいは、パナキサンAは、これら3種の混合物（同一分子内の混合構造も含む）なのかは、依然として不明である。

我々は、まず、単糖の枝を有するグルカンの合成を計画した。分枝デキストランの合成には、1,6-無水グルコース（単糖）誘導体を重合した後、位置選択的に脱保護してからグリコシル化を行うという方法をとる。この場合、分枝化反応の立体特異性（枝となる糖の α , β ）は

ほぼ100%でなければならない。なぜなら、同一ポリマー鎖上への反応であるので、同一多糖鎖上に α と β 両方の枝が生成した場合、一方のアノマーのみを分離精製して取り出すことが不可能であるためである。

1,6-無水グルコースの3つのヒドロキシル基を2種類の保護基で保護したモノマー、1,6-アンヒドロ-2,4-ジ-O-ベンジル-3-O-*t*-ブチルジメチルシリル- β -D-グルコピラノース、あるいは、1,6-アンヒドロ-2,4-ジ-O-ベンジル-3-O-ベンゾイル- β -D-グルコピラノースを五フッ化リンを開始剤としてカチオン開環重合すると、(1 $\rightarrow$ 6)- α -型の立体規則性ポリマーが得られた。ポリマー中のC-3位の保護基を選択的に脱保護し（シリル基はフッ素イオン、ベンゾイル基はナトリウムメトキシドを用いる）、2,4-O-ベンジル-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-グルコピラナンを合成した (Fig.-6)^{19),20)}。このポリマーへの β -グルコシレーション及び α -マンノシレーションは、比較的立体特異性のよいオルソエステル法により達成される。しかしながら、目的とする100% α -グルコースの枝を付

Fig.-5 Three possible structures of Panaxan A proposed by Hikino *et al.*

Fig.-6 Synthetic scheme of 2,4-di-O-benzyl-(1→6)- α -D-glucopyranan.

与することは非常に困難である。

そこで、我々は、全く新しい合成スキームを考えた。すなわち、 α -rich なグルコシル化（枝を付与する反応）を行った後、不必要な方の β -グルコースの枝を酵素で切り放すという方法である。セルラーゼを用いた加水分解によって得られた分枝多糖の ^{13}C -NMR スペクトル中には、 β -グルコピラノースに由来するピークが消失しており、 α -グルコピラノースの枝のみを有する分枝多糖であることがわかる²⁰⁾。

多糖の分枝化反応は3種類の方法が考えられる。まず、糖転移酵素を用いる方法は、(いくつかの場合を除いて)酵素が不安定で、しかも基質が糖ヌクレオチドなどの高価な化合物であるため、一般的な糖鎖合成に応用するには幾分困難である。次に、加水分解酵素の逆反応を利用した分枝化反応によっても分枝多糖が合成される。しかしながら、パナキサン類似多糖のように主鎖と側鎖が類似の結合（同一の酵素の基質となる構造：パナキサンの場合は主鎖も側鎖も α -グルコピラノシド結合）の場合には、この方法は用いることができない。しかも、生成する枝の長さを制御することは困難と考えられる。さらに、糖転移酵素を用いても、加水分解酵素を用いても、枝ユニットの多糖鎖上における分布は制御できない。それどころか、生成した枝の分布を分析することすら難しいのである。これに対して、化学反応により枝を付ける反応では、アノマー選択性が良くないために、これまであまり利用されなかった。しかしながら、化学反応によりグリコシル化した後、加水分解酵素を本来の加水分解反応に用いて、多糖への分枝化を“完結”させることにより、枝がすべて単糖である立体規則性分枝多糖が得られる。しかも、この方法は、他の方法では制御できなかった枝の分布を、ランダムに分布させられるという特長を有する。すなわち、ポリマー鎖上にランダムに導入される各アノマー(α と β)の一方を加水分解するのであるから、残った方のアノマーはランダムに分布するということである²¹⁾。ただし、これは、グリ

コシル化のアノマー選択性がポリマー鎖上の局所的な環境によらないという仮定のもとでの結論であり、同一反応条件でのグリコシル化のアノマー選択性が、低分子と高分子とで異なる場合には注意を要する。このようにして開発された第3番目の分枝化法（化学的なグリコシル化と酵素による加水分解を組み合わせた方法）は、弱点がないようにも思えるが、酵素によって切断される結合と主鎖の結合が類似の場合には、加水分解反応の際に主鎖切断が起こる可能性があり、エキソグリコシダーゼを用いるなどの工夫が必要である。また、オリゴ糖分枝を有する分枝多糖の合成には不向きである。

我々は、人工パナキサンの合成の際、市販のセルラーゼを用いて β -1,3結合したグルコースの枝のみを切断除去したのであるが、セルラーゼのどの成分が1,3- β -D-グルコースを認識して切断したのかを調べてみた。*Trichoderma viride*由来のセルラーゼは、主に3種類の構成成分からなり、それぞれ、エンドグルカナーゼ（セルロースやカードランの加水分解）、エキソグルカナーゼ（セロビオースの加水分解）、 β -グルコシダーゼ（*p*-ニトロフェニル β -D-グルコピラノシドの加水分解）とよばれる。我々は、セルラーゼをゲルクロマトグラフィーによって分画することによって、合成分枝多糖の β -1,3結合したグルコースの枝を認識して加水分解するのは、3つの成分のうちの β -グルコシダーゼであることを発見した²²⁾。

合成した多糖の血糖降下作用は正常マウスを用いて測定した。正常マウス5匹の腹腔内に合成多糖を投与し、5, 10, 24 h後の血中グルコース濃度を測定することにより評価した。 α -D-グルコースの枝を有する分枝多糖(置換度: 0.38; 数平均分子量: 1.8×10^4)では、5, 10 h後には投与直前の血糖値の65~81%に低下し、24 h後に投与前の値に回復した。投与量は、10 mg/kgでも30 mg/kgでもほぼ同様の傾向が見られた。セルラーゼ処理前の α , β -の枝が混在している分枝多糖を投与した場合も同様に68~89%に低下した。したがって、 β -D

-グルコースの枝があっても、血糖降下作用の障害にはならないことがわかった。これに対して枝のない直鎖状の(1→6)- α -D-グルカンや、 α -D-マンノースの枝を有する(1→6)- α -D-グルカンでは血糖値が低下しないこともわかった²³⁾。

さらに、 α -D-グルコースの枝を有する分枝多糖において、枝の含量が血糖降下作用に及ぼす影響についても調べた。枝の含量が33%と44%の場合には強い活性を示したのに対し、16%と63%では活性が若干低下した。また、予備的な実験ではI型糖尿病マウスには効果がなく、パナキサンによる血糖降下にはインスリンが関与していると考えられる。

合成分枝多糖の血糖降下作用のメカニズムを解明するために、*in vitro*の実験を行った。ブタのすい臓から単離抽出したラ氏島 β 細胞を分枝多糖存在下で培養し、分枝多糖に対するラ氏島 β 細胞の応答性を調べた。ラ氏島 β 細胞を α -グルコースの枝を有する分枝多糖で刺激すると、インスリンの分泌は著しく増加した。これに対して、直鎖状の(1→6)- α -D-グルカンには、インスリンの分泌を増加させる効果は見られなかった。この結果より、分枝多糖の血糖降下作用のメカニズムは、インスリンを介していることが推測される。また、合成分枝多糖がラ氏島 β 細胞とどのように相互作用しているのかを調べるため、蛍光物質(FITC)でラベルした合成分枝多糖の存在下でラ氏島 β 細胞を培養し、細胞の蛍光を観察した。FITCラベルの分枝多糖存在下で培養したラ氏島 β 細胞からは強い蛍光が観察されたのに対して、FITCラベルの直鎖状(1→6)- α -D-グルカンと培養したラ氏島 β 細胞は、強い蛍光を持たないことがわかった。さらに、FITCラベルの分枝多糖存在下で培養したラ氏島 β 細胞を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察すると、細胞の断面図からも蛍光が観察されることから、分枝多糖はラ氏島 β 細胞の中に入っていることがわかった。

最近になって、天然パナキサンの血糖降下作用は解糖系酵素の活性化によるグルコース消費量の促進のためである、という報告もあり、『インスリン関与』ということと合わせ、2種類の機構が関係していると考えられる。

4 おわりに

多糖鎖の認識においては、主鎖構造、枝構造、官能基の位置のほかに、分子量というファクターが重要な場合もある。天然多糖が他の生体分子と相互作用する際、多糖鎖のどの構造が必要不可欠なのか、あるいは、特別な構造である必要がないのはどの部分か、などについて合成多糖を用いて研究を進めるうち、天然物を超える認識(相互作用)や生理活性を有する多糖鎖に出会うこともしばしば起こることである。

(平成6年(1994年)4月13日受理)

文 献

- 1) I. Björk, U. Lindahl, *Mol. Cell. Biochem.*, **48**, 161 (1982)
- 2) M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, P. Sinaÿ, J.-C. Jaquinet, G. Torri, *Carbohydr. Res.*, **147**, 221 (1986)
- 3) Y. Ichikawa, R. Monden, H. Kuzuhara, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 611 (1986)
- 4) C.A.A. van Boeckel, T. Beets, J.N. Vos, A.J.M. de Jong, S.F. van Aelst, R. H. van den Bosch, J. M.R. Mertens, F.A. van der Vlugt, *J. Carbohydr. Chem.*, **4**, 293 (1985)
- 5) M. Maccarana, B. Casu, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.*, **268**, 23898 (1993)
- 6) A. Walker, J.E. Turnbull, T. Gallagher, *J. Biol. Chem.*, **269**, 931 (1994)
- 7) H. Nakashima, Y. Kido, N. Kobayashi, Y. Motoki, M. Neushul, N. Yamamoto, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 1524 (1987)
- 8) H. Mitsuya, D.J. Looney, S. Kuno, R. Ueno, F. Wong-Staal, S. Broder, *Science*, **240**, 646 (1988)
- 9) K. Mizumoto, I. Sugawara, W. Ito, T. Kodama, M. Hayami, S. Mori, *Jpn. J. Exp. Med.*, **58**, 145 (1988)
- 10) K. Hatanaka, I. Nakajima, T. Yoshida, T. Uryu, O. Yoshida, N. Yamamoto, T. Mimura, Y. Kaneko, *J. Carbohydr. Chem.*, **10**, 681 (1991)
- 11) K. Hatanaka, Y. Kurihara, T. Uryu, O. Yoshida, N. Yamamoto, T. Mimura, Y. Kaneko, *Carbohydr. Res.*, **214**, 147 (1991)
- 12) J.K. Sharp, M. McNeil, P. Albersheim, *J. Biol. Chem.*, **259**, 11321 (1984)
- 13) P. Ossowski, Å. Pilotti, P.J. Garegg, B. Lindberg, *J. Biol. Chem.*, **259**, 11337 (1984)
- 14) J.K. Sharp, P. Albersheim, P. Ossowski, Å. Pilotti, P.J. Garegg, B. Lindberg, *J. Biol. Chem.*, **259**, 11341 (1984)
- 15) K. Kobayashi, K. Nomura, M. Okada, *Carbohydr. Res.*, **242**, 161 (1993)
- 16) C. Konno, K. Sugiyama, M. Kano, M. Takahashi, H. Hikino, *Planta Medica*, **1984**, 434
- 17) M. Tomoda, K. Shimada, C. Konno, K. Sugiyama, H. Hikino, *Planta Medica*, **1984**, 436
- 18) M. Tomoda, K. Shimada, C. Konno, H. Hikino, *Phytochemistry*, **24**, 2431 (1985)
- 19) T. Uryu, M. Yamanaka, M. Henmi, K. Hatanaka, K. Matsuzaki, *Carbohydr. Res.*, **157**, 157 (1986)
- 20) K. Hatanaka, S.C. Song, A. Maruyama, T. Akaike, A. Kobayashi, and H. Kuzuhara, *J. Carbohydr. Chem.*, **11**, 1027 (1992)
- 21) K. Hatanaka, S.C. Song, A. Maruyama, A. Kobayashi, H. Kuzuhara, T. Akaike, *Polym. J.*, **25**, 373 (1993)
- 22) S.C. Song, T. Akaike, K. Hatanaka, *Polym. J.*, **26**, 387 (1994)
- 23) K. Hatanaka, S.C. Song, A. Maruyama, A. Kobayashi, H. Kuzuhara, T. Akaike, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 16 (1992)
- 24) 小島直也, 箱守仙一郎, 細胞工学, **9**, 177 (1990)