希少糖の分子構造と物性

結晶及び溶液中における単糖の多様な構造

深田和宏, 石井知彦, 何森 健

香川大学国際希少糖研究教育機構

はじめに

本連載第1回では、天然に多量にあるD-グルコースを出発原料とし、希少糖を含む炭素数6の単糖（ヘキソース：鏡像体を考慮しなければ計12種）のすべてを生産するための設計図であるイズモリング（Izumoring）について紹介し、遊離の単糖間の異性化や単糖と糖アルコール間の酸化還元を触媒する希少糖生産に用いられる各種酵素に関して解説した。そして希少糖研究の今後の課題として、実験室レベルでの希少糖生産から産業化につながる大規模生産へのシフトに必要な技術開発と、生産した各種希少糖をさまざまな用途（食品・医薬品・農業資材など）に利用する開発研究の促進が指摘されたが、これらの応用研究を進展させるには、希少糖の理化学的性質を理解しておくことが必須である。そこで本稿では、天然に多くある単糖の分子構造や物性にも言及しながら、2000年代以降に明らかにされた希少糖の基本物性を天然糖と対比して紹介したい。現時点で大規模生産が展望されている希少糖は、D-フルクトースの3位のエピ化で得られるD-プシコースと、D-プシコースをアルドースに変換したD-アロースなので（図1参照）、これら2種の希少ヘキソースに焦点を当てて解説する。なお、物質の物性は分子構造を基本として解釈されるが、遊離の単糖は多様な分子構造を取りうるため（コラム参照）、まずは研究対象の単糖がどのような構造にあるか

を明らかにし、その分子構造を踏まえて物性を考察することが重要である。以下本稿では、結晶状態での単糖の分子構造について述べ、次に単糖の水への溶解性と溶解に伴う分子構造変化にかかわる性質（変旋光挙動など）について記す。

図1 ■ 各種ヘキソースの分子構造（フィッシャー投影式で表記）と、異性化による天然糖からの希少糖生産経路

コラム

「水中の単糖の構造」水に溶かした単糖がその分子構造を変えつつ動き回っていることを実感している人は少ないと思われる。希少糖D-プシコース（英語ではD-allulose）を例に、水中での分子構造を図に示した。ある瞬間にBの構造をとっていたD-プシコース分子は、一瞬後にはAの構造を経てC（もしくはDやE）に変わる。A, B, C, D, E間の相互変換が止まることはなく、平衡状態ではそれぞれの存在比率が0.01 : 0.24 : 0.23 : 0.37 : 0.14の混合状態になっている。では、水溶液から析出する固体中の分子構造はどうだろうか。

「結晶中の単糖の構造」2000年にD-プシコースの大量生産法が香川大学で確立され、その結晶粉末を利用した研究が始まったが、結晶中の分子がどのような構造か特に意識することはなかった。分子構造を知らなくても、ネズミや植物にD-プシコースを与えたときの効果や、ヒトが食べた場合の安全性や生理機能に関する研究が着々と進んだ。当時はあえて分子構造を知る必要がなかったのである。その後D-プシコースの単結晶を作り、X線による構造解析が香川大学の研究者によって行われ、2006年の国際希少糖学会でその分子構造が公表された。結晶粉末中のD-プシコースは図中のC（ β -D-allulopyranose）であった。

「単糖の分子構造の表示法」単糖の分子構造は生物由来のメジャーな物質中にみられる構造で考えることが多い。たとえばデンプンやセルロースを構成するD-グルコースは通常 α -や β -ピラノース環状体として表記される。一方、多種類の単糖の構造を比較したいときにはフィッシャー投影式が用いられ、環状ではない鎖状構造（図中のAに相当）を基本として表記される。ところで、D-プシコース生産で用いられる異性化酵素が単糖に作用する際、単糖はどのような構造で酵素と結合するのだろうか。基質と生成物が平衡状態にあるとき、酵素の活性部位には水中で最もマイナーな鎖状体が主に存在していることが明らかにされている。研究が進むと単糖が実際にとっている構造を知ることが重要となり、その表示法についても改めて考えることが大切になっている。

各種ヘキソースの結晶構造

1. 希少ヘキソース

2000年代初頭時にケンブリッジ結晶構造データベース（CSD）に登録されていたヘキソースの単結晶構造は、アルドースではグルコース、マンノース、アロース、タロース、ガラクトースの5種、ケトースではフルクトース、ソルボース、タガトースの3種であった。そこでわれわれはいまだ知られていないヘキソースの結晶構造を明らかにすべく、大量生産が可能となったD-プシコースの単結晶を作成してX線構造解析を行い、2006年に開催された第3回国際希少糖学会でその結果を公表した（図2および表1参照⁽¹⁾）。図2に示すように、結晶中のプシコースは β -ピラノース（*1C*型）構造をとり、単位格子のac面上にピラノース環が綺麗に並ぶことが確認された。また、 β -ピラノース（*1C*型）構造のD-プシコースの3位と5位の水酸基は共にアキシャル配置で、水酸基間で水素結合（左上図中の破線）を形成していた。さらにピラノース環内を含めてプシコース分子中の酸素原子はすべて水素結合（右上図中の赤線）に関与しており、結晶全体に水素結合のネットワークが張り巡ら

図2 ■ D-プシコースの結晶構造（分子内および分子間水素結合とb軸方向から見た図）

されていることが明らかとなった。天然糖のフルクトースも結晶内で β -ピラノース（*1C*型）構造をとり、分子間の水素結合ネットワークを形成するが、プシコースの

図3 ■ D-アロースがつくる3種類の結晶の構造

表1 ■ 各種単糖の結晶構造

	単糖の種類	結晶の空間群	結晶中の単糖分子の構造	単位格子中の糖分子数	文献
希少糖	D-ブシコース	$P2_12_12_1$	β -ピラノース (1C型)	4	(1)
	D-アルトロース	$P3_2$	β -ピラノース (C1型)	3	(3)
	D-グルコース	$P2_12_12_1$	β -ピラノース (C1型)	4	(4)
	D-アロース Form I	$P2_12_12_1$	β -ピラノース (C1型)	4	(5)
	D-アロース Form II	$P6_2$	β -ピラノース (C1型)	6	(6)
	D-アロース二水和物	$P2_12_12_1$	β -ピラノース (C1型)	4	(7)
天然糖	D-フルクトース	$P2_12_12_1$	β -ピラノース (1C型)	4	(2)
	D-グルコース α 型	$P2_12_12_1$	α -ピラノース (C1型)	4	(8)
	D-グルコース β 型	$P2_12_12_1$	β -ピラノース (C1型)	4	(9)
	D-グルコース 一水和物	$P2_1$	α -ピラノース (C1型)	2	(10)
デオキシ希少糖	6-デオキシ-L-ブシコース	$P2_12_12_1$	α -フラノース (3T_4 or E_4 型)	4	(11)
	6-デオキシ-L-ソルボース	$P2_12_12_1$	α -フラノース ($^3T^4$ 型)	4	(12), (13)

ような分子内水素結合やピラノース環内酸素が関与する水素結合は見られない⁽²⁾。

後にわれわれはD-アルトロース（分子構造は図1参照）およびD-グルコース（D-アロースの4位エピマー）の単結晶も作成し、それぞれのX線構造解析の結果を報告した^(3,4)。D-アルトロースとD-グルコースは共に結晶中で β -ピラノース（C1型）構造をとるが、空間群と単位格子中の分子数は異なっていた（表1参照）。以上により、現時点で結晶構造が報告されていないヘキソースはイドースのみとなっている（ただし既報のマannoースの結晶構造データは分解能が低いので高精度での再測定が望まれる）。

2. D-アロースの結晶多形

一般的に有機化合物の結晶化では溶液から結晶を析出させることが多い。X線構造解析用の試料も、冷却や溶

媒蒸発で過飽和状態になった溶液から析出した単結晶が使われるが、単糖の結晶化では溶媒の種類や溶液濃度、結晶析出の際の温度や溶媒の蒸発速度などに依存して異なる構造の結晶が生成したり、水和物などの溶媒分子を取り込んだ結晶が得られたりすることが知られている。ここではD-アロースがつくる3種の結晶について紹介する。

D-アロースのX線結晶構造解析は1984年には報告されていた⁽⁶⁾。ところが、D-アロース水溶液にエタノールを添加して得られた結晶の構造はこれとは異なり、この結晶を不安定型（Form II, 融点128°C）、既報の結晶形を安定型（Form I, 融点は141°C）とする報告が2004年に出された⁽⁶⁾。一方われわれは、D-アロース水溶液を徐々に冷却するとアロース1分子当たり2個の水分子を含む水和物が析出することを見だし、その結晶構造を明らかにした（図3および表1参照）⁽⁷⁾。図3を見ると、

安定型 (Form I) と水和物の結晶では、アロース分子が形成した β -ピラノース環がbc面上に並び、1位と4位の水酸基が分子間で交互に水素結合していることがわかる。不安定型 (Form II) ではc軸方向に1位と4位の水酸基間の水素結合が存在する。水和物中の水分子 (結晶水) に注目すると、互いに水素結合で結びついたアロース分子の層間に水分子が配置されており、安定型 (Form I) 結晶内のアロース分子間相互作用の弱い部分に入り込んだものとして解釈できる。これらの結晶水はa軸方向に互いに水素結合し、無限に連なる水素結合鎖を形成している。このように遊離のヘキソース分子がさまざまな結晶形を取りうる理由としては、溶液中で互変異体の平衡混合物として存在して分子構造の揺らぎが大きいことや、水酸基を多くもつので水素結合しやすい溶媒分子を取り込む可能性が高いことが挙げられる。天然糖のD-グルコースでも複数の結晶形が知られており、それらの構造もわかっている⁽⁸⁻¹⁰⁾ (表1参照)。なお、アロース2水和物は常温で容易に水分子が揮散して無水物に変化するのに対し、グルコースの水和物 (1水和物) を無水物にするには加温して真空ポンプで乾燥処理することを要する⁽⁷⁾。

3. デオキシ希少糖

本連載第1回では、天然に存在するL-ラムノース (6-デオキシ-L-マンノース) などのデオキシ単糖を原料とすることでさまざまなデオキシ希少糖の生産が可能となっていることが述べられた。ここではプシコースの6位の水酸基から酸素を取り除いた6-デオキシ-L-プシコースのX線構造解析の結果を紹介する。

一般に遊離のケトヘキソース分子は、5位もしくは6位の水酸基がカルボニル基との分子内環化に関与しフラノース環もしくはピラノース環を形成して構造安定化することが知られている。ただしこれまで報告されてきたケトヘキソースの結晶内での分子構造はすべてピラノースであった。われわれは、ピラノース環を形成するのに必要な酸素分子を取り除いた6-デオキシ-L-プシコースではフラノース環が³T₄もしくはE₄構造をとって結晶化していることを確かめた (図4参照: 融点76°C)⁽¹¹⁾。分子中の酸素原子はすべて水素結合に関与して結晶構造を安定化しているが、6位デオキシ化前に比べて融点が約30°Cも低くなることが特徴的である (ほかの位置の水酸基をデオキシ化してもこれほどの融点低下は見られない)。なお、6位がデオキシ化されたケトースがフラノース環を形成して結晶となることは、ソルボース (プシコースの4位エピマー) でも報告されている^(12, 13) (表

図4 ■ 6-デオキシ-L-プシコースの結晶構造 (a軸方向から見た図)

1参照)。

水溶液中でのヘキソース分子

1. 水との二成分系相図

異性化酵素を用いた希少糖生産で得られる生成物は、未反応の原料単糖と目的とする希少糖が混合した水溶液である。ここから純粋な希少糖を取り出すにはクロマト分離と晶析操作を要し、これらの操作を最適化するには溶液状態の希少糖に対する各種データの整備が重要となる。以下には、溶液からの結晶化において最も基本となる溶解度について記す。

D-グルコースやD-フルクトースの水への溶解度は古くから測定され^(14, 15), 0°C以下の低温・低濃度域での氷点と合わせて二成分相図としてまとめられている⁽¹⁶⁾。一方、希少糖の溶解度は比較的最近明らかにされた^(1, 7)。図5には4種類のヘキソースの水との二成分系相図を示した。これらの図において水溶液 (一相) と固体ヘキソース共存域との境界が溶解度曲線、氷と水溶液の共存域との境界が氷点の組成依存性を表している。プシコース以外の相図では、ある温度以下になると水溶液と平衡に共存する固相が無水物から水和物に変わるため溶解度曲線に折れ曲がり点がある (図中矢印)。この温度以下での溶解度は実線で示されるが、無水物を水に溶解した場合は破線で示す濃度までの過飽和状態にすることができる (D-フルクトースには1/2-水和物と2水和物の2種類があるため2本の破線が示されている)。これらの相

図5 ■ 各種ヘキソースと水との二成分系の相図

図に基づいて、それぞれのヘキソースを結晶化の際の溶液濃度と温度が設定される。たとえばD-アロースの場合は60wt%以上の糖液を40℃以上に加温して調製し、これを徐冷して2水和物の結晶を析出させ高純度の粉末試料としている。

2. ケトヘキソース鎖状体

結晶中のヘキソースは分子内環化したピラノース構造(6-デオキシケトヘキソースではフラノース構造)をとっていることを先に述べたが、水溶液中でも遊離のヘキソースの大部分は環化していることがわかっている。それ故ヘキソース水溶液が示す性質の多くは環状構造に基づいて解釈するのが適切である。しかし、複数ある環状体間の相互変換過程や単糖間の異性化反応、あるいはカルボニル基の関与で進む化学反応について考える際は環化していない鎖状体が重要と考えられる。ヘキソースでは一般にアルドースよりもケトースの方が水溶液中での鎖状体の存在比は高いが、それでも1%に満たない程度と知られている。以下にはそのようなケトヘキソース鎖状体に焦点を当てた研究の一端を紹介する。

環化した単糖は紫外光を吸収する官能基が無いいため糖溶液の紫外線スペクトルに吸収ピークは存在しないと思われがちだが、高濃度のケトヘキソース溶液では鎖状体がつもつカルボニル基による280nm付近の吸収を検出できる⁽¹⁷⁾ (図6)。ケトヘキソースをデオキシ化すると鎖

図6 ■ 各種ケトヘキソースおよびカルボニル化合物水溶液の吸収スペクトル

状体の存在比が2%以上に増加し、より低濃度の水溶液でも吸収ピークが見られる⁽¹⁸⁾。各種ケトヘキソース水溶液の鎖状体濃度と吸光度の値からカルボニル基に対する吸光係数を求めたところ、フルクトースでは77、プシコースでは47 (6-デオキシプシコースだと $44 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) となり、3位水酸基の立体配置の相違で大きな差が見られた^(17, 18)。この原因は不明だが、ケトヘキソースの種類によって鎖状体の立体構造が異なっており、それが吸光係数に影響していると思われる。最後に、D-プシコース結晶を水に溶解した後の280nm付近の吸収度の時間変化を、ナトリウムD線(589 nm)で見た変旋光挙動と共に示す⁽¹⁷⁾ (図7)。結晶中でβ-ピラノース構造をとっていたプシコース分子が水溶液中で徐々に構造を変化させ、1,500秒後には平衡状態に到達していることがわか

図7 ■ D-プシコース結晶溶解後の変旋光と吸光度の時間変化

るが、鎖状体の存在量を反映する吸光度のほうが早く一定値になっている。今後は、鎖状体を経て進行する環状構造の変換について、速度論的解析を行う際にこれらのデータを活用していく。

今後の展望

本稿では希少糖を含む各種ヘキソース分子の結晶内での構造、水への溶解度、水溶液中での分子構造と鎖状体による紫外光吸収に関して紹介したが、ここで記したことは単糖の物性のごく僅かな一部に過ぎない。D-グルコースなどの通常の単糖に関するさまざまな物性データは膨大に蓄積されているが⁽¹⁹⁾、それらに対応する希少糖の物性値の多くは未知のままである。希少糖生産技術の進展と並行して希少糖類の物性研究を進めていくことで、単糖が示す諸性質の全体像が明確になるものと期待している。

文献

- 1) K. Fukada, T. Ishii, K. Tanaka, M. Yamaji, Y. Yamaoka, K. Kobashi & K. Izumori: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **83**, 1193 (2010).
- 2) J. A. Kanters, G. Roelofsen, B. P. Alblas & I. Meinders: *Acta Crystallogr. B*, **33**, 665 (1977).
- 3) Y. Watanabe, H. Yoshida, K. Takeda, T. Ishii & S. Kamitori: *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online*, **65**, o280 (2009).
- 4) T. Ishii, S. Ohga, K. Fukada, K. Morimoto & G. Sakane: *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online*, **70**, o569 (2014).
- 5) L. M. J. Kroon-Batenburg, P. van der Sluis & J. A. Kanters: *Acta Crystallogr. C*, **40**, 1863 (1984).

- 6) P. A. Bonnet, J. van de Streek, A. V. Trask, W. D. S. Motherwell & W. Jones: *CrystEngComm*, **6**, 535 (2004).
- 7) T. Kozakai, K. Fukada, R. Kuwatori, T. Ishii, T. Senoo & K. Izumori: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **88**, 465 (2015).
- 8) G. M. Brown & H. A. Levy: *Acta Crystallogr. B*, **35**, 656 (1979).
- 9) M. L. C. E. Kouwijzer, B. P. van Eijck, H. Kooijman & J. Kroon: *Acta Crystallogr. B*, **51**, 209 (1995).
- 10) E. Hough, S. Neidle, D. Rogers & P. G. H. Troughton: *Acta Crystallogr. B*, **29**, 365 (1973).
- 11) A. Yoshihara, T. Ishii, T. Kamakura, H. Taguchi & K. Fukada: *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online*, **71**, o993 (2015).
- 12) P. Swaminathan, L. Anderson & M. Sundaralingam: *Carbohydr. Res.*, **75**, 1 (1979).
- 13) S. T. Rao, P. Swaminathan & M. Sundaralingam: *Carbohydr. Res.*, **89**, 151 (1981).
- 14) F. E. Young: *J. Phys. Chem.*, **61**, 616 (1957).
- 15) F. E. Young, F. T. Jones & H. J. Lewis: *J. Phys. Chem.*, **56**, 1093 (1952).
- 16) L. Ben Gaïda, C. G. Dussap & J. B. Gros: *Food Chem.*, **96**, 387 (2006).
- 17) K. Fukada, M. Okamitsu & M. Sato: *Chem. Lett.*, **41**, 1686 (2012).
- 18) A. Yoshihara, M. Sato & K. Fukada: *Chem. Lett.*, **45**, 113 (2016).
- 19) R. N. Goldberg & Y. B. Tewari: *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **18**, 809 (1989).

プロフィール

深田 和宏 (Kazuhiro FUKADA)

＜略歴＞1989年名古屋大学大学院理学研究科博士課程修了（化学専攻）／同年京都大学化学研究所にて日本学術振興会特別研究員／同年東京都立大学理学部化学科助手／1993年アメリカ国立衛生研究所（NIH）Visiting Fellowとして留学／2001年香川大学農学部助教授／2005年同大学農学部教授／2016年同大学国際希少糖研究教育機構（併任）。現在に至る＜研究テーマと抱負＞希少糖の物理化学的諸性質の解明＜趣味＞電子書籍で昔の小説を読む＜所属研究室ホームページ＞<https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/fukada/index.html>

石井 知彦 (Tomohiko ISHII)

＜略歴＞1996年東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻博士後期課程修了／同年いわき明星大学理工学部物性学科助手／1997年東京都立大学大学院理学研究科化学専攻助手／2002年香川大学工学部材料創造工学科助教授／2010年同大学工学部材料創造工学科教授／2016年同大学国際希少糖研究教育機構（併任）／2018年同大学創造工学部先端材料科学領域教授，現在に至る＜研究テーマと抱負＞電子論錯体化学．自然界の原理・原則・現象を明らかにし，材料が発現させるあらゆる物性を予測したいと思っています＜趣味＞旅行，海外での車の運転＜所属研究室ホームページ＞<http://www.eng.kagawa-u.ac.jp/~tishii/Lab/>

何 森 健 (Ken IZUMORI)

＜略歴＞1965年香川大学農学部農芸化学科卒業／1968年同大学農学部助手／1982年同大学農学部助教授／2003年同大学農学部教授／2008年希少糖研究センター教授／同年香川大学特任教授／2012年株式会社希少糖生産技術研究所代表取締役／2014年国際希少糖研究教育機構研究顧問，現在に至る＜研究テーマと抱負＞希少糖の生産と利用／100年の空白であった単糖研究を希少糖という形で復権できないかという夢をもつ＜趣味＞マイナーな音楽として古楽／世界のサイコロコレクション

Copyright © 2018 公益社団法人日本農芸化学会

DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.56.804