多糖(ポリサッカライド)の鎖が伸びるとき

鈴木 旺

Sakaru SUZUKI

名古屋大学理学部化学教室

1. 鎖には情報がある

“鎖が生体を作っている”といったら、禅問答のように聞こえるかもしれない。それは、“鎖”という言葉から、駅の改札口にとりつけてあるものとか、婦人のブローチのようなものを連想するからで、ひと通り生化学の洗礼を受けた人ならば、“鎖”という言葉から直ちに DNA, RNA, タンパク質, 長鎖脂肪酸, 多糖などの分子 1 次構造を思い浮かべ、その構造に秘められている“生物学的情報”の実体を追求し解明してきたここ 10 年ほどの生物科学的研究の幅と奥行きを読みとるに違いない。

さて、その 10 年ほどの研究をもう少し細かく分類してみると、スピードという点で過去に例をみないほどの進展をみせたのは、何といっても“遺伝情報”を担う物質の構造と、その情報伝達発現機構の研究であろう。ご承知の通り、その主役は DNA であり、RNA であり、そしてタンパク質である。さらに解説的につけ加えるならば、それら“分子鎖”を構成しているヌクレオチドやアミノ酸の配列様式と、それを複写したり翻訳したりする機構とが、広範囲にわたって明らかにされたのである。

ところで、長鎖脂肪酸や多糖は、その分子 1 次構造が長い“鎖”であるという点では DNA, RNA, タンパク質と異なるところはないにもかかわらず、上記の領域では、少なくとも主役としてはついぞ登場することはなかった。これら鎖には DNA, RNA, ポリペプチド鎖にみられるほどの複雑な構成単位配列様式がなく、したがってそれらを複写したり翻訳したりするような酵素系はないか、かりにあったとしても、はるかに単純なしかけのものに違いないというのが、今日までの一般的な考え方なのである。

しかし、脂肪酸や多糖という“鎖”は実にさまざまな分子形態をとって生体を形作っている。遺伝情報の伝達屋に比べれば、単純かもしれないが、その構成単位には一定の配列や繰返しがあるし、鎖の長さもある範囲内で固有の値をもっている。そして、これら構造因子がある許容範囲をこえて変化した場合には、生命はその存続をおびやかされるようになる。“遺伝情報”とは異質であるが、やはり何か“〇〇情報”とでもいうべきものが秘められていることには変わりがないはずである。

私たちは最近 6 年間ほど、現在の研究室を中心に、細菌細胞、あるいは動物の組織や細胞を用いて、いくつかの複合多糖の構造、機能、生合成を研究してきたが、研究の結果を語り合うにつけ、ジャーナルの論文を読み合うにつけ、いつかはそれぞれの研究が上記のような次元の議論に應えうるものへと近づくことを念願してきた。数年前、そのような私たちにとって大変興味深い発言をした人がある。その 1 人は University of Southern California の E. H. Eylar⁽¹⁾ であり、もう 1 人は MIT の P. W. Robbins⁽²⁾ である。どちらも多糖領域では著明な研究者であり、また問題の論文もすでに専門家の間ではかなりよく知れわたるようになってきたが、その解釈と評価には賛否両論があるようである。いずれにせよ、この 2 つの論文が私たち多糖研究者、いやもっと広く生化学者全般にいろいろ考えさせるものを含んでいることはまちがいない。ここでは、この 2 つの論文を出発点にして、多糖生合成に関する若干の私見を述べてみたい。

2. 糖はタンパク質が細胞外に出るためのパスポートである——Eylar

前にも述べたように、タンパク質 1 次構造の研究は目

覚ましい進展をなしとげている。それを支える柱の1つは、アミノ酸組成を決め、配列を決める方法の進歩であり、たとえばアミノ酸分析機やシーケンサー (sequencer) の開発にみられる実験の自動化、トリプトシンをはじめとするさまざまな特異的分解酵素の開発利用などを挙げることができる。しかし、このような方法をもってしても解析しきれない1次構造というものが、かなり多くのタンパク質に存在している。それは、特定のアスパラギン残基やセリン、スレオニン残基などに、それぞれ酸アミド基、水酸基を介して結合している糖残基である。分子全体に占める糖の割合は80%以上という多いものから1%以下という極端に少ないものまでいろいろあり、結合糖自体が1種のものから数種共存のもの、短い単糖からオリゴ糖あるいは多糖とよぶべき構造をもつものまで、広く分布している。とにかく、これらは分析、定量、配列決定など、すべて扱いにくいものばかりで、タンパク化学者からは敬遠されがちであった。

このようなタンパク分子に存在する糖残基に積極的に取り組もうとする姿勢がとられるようになったのは、はっきりした生理機能をもったタンパク質のいくつか、たとえば酵素 (タカアミラーゼ、プロメライン、リボヌクレアーゼB)、抗体 (γ -グロブリン)、ホルモン (ゴナドトロピン)、 O_2 運搬タンパク (ヘモシアニン) などに明らかに糖が結合しているという知見が出はじめてからである。すなわち、結合している糖がそのタンパクの生理活性に直接あるいは間接に寄与しているのではないかという予想の背景には、すでに以前から詳しい研究がなされていた抗原物質の知識があった。たとえば、ヒトの血液型は、赤血球表面や各種分泌液に含まれる糖タンパクの糖部分によって決定されているという事実である。このように高い特異性が現われるのは例外だとしても、一般にタンパク質に糖が結合すれば、分子はその親水性と耐熱性を高めるであろうし、ひいてはそのタンパク分子の生理活性にも影響が及んでいると考えるには、それほど抵抗はなかったのである。しかし、何はともあれ、この予想の真偽を確かめるには、生理機能をもった多くのタンパク質について、それに結合している

糖の構造を決めることが要求される。こうして、タンパク質のポリペプチド鎖部分と同様に、ここ数年間に糖鎖部分の構造、そしてポリペプチド鎖との結合様式に関する研究が急速な進展をみせるようになった。

さて、そのようにして現在ある程度集積されたデータをもとに、タンパク質に糖が結合する意義を考えてみるとどうなるであろうか？ まず、機能別に分類した各種タンパク質について、それらの糖部分の構造、すなわち単糖組成や、さらに詳しい配列様式と機能との間に何か関連性がみられるかという点であるが、これについてはほとんど否定的な結果が得られている。さらに、酵素やホルモンのような容易に測定しうる生理活性をもったタンパク質について、その糖部分のみを選択的に遊離または破壊するような処理 (たとえば、シアリダーゼやフコシダーゼのような特異的分解酵素でそれぞれ末端のシアリ酸やフコースを離脱させたり、うすくて冷たい $NaIO_4$ 水溶液で注意深く処理して隣り合せの $-OH$ をもつ糖残基を破壊したりする) を加えてみても、必ずしも生理活性に大きな変化が現われるとは限らない。糖残基が分子の生理的特異性を決定するという予想は、少なくとも一般論としては成立しないといつてよい。

このような実験的否定の上に立って、Eylar は逆の考え方をする。すなわち、タンパク分子に結合する場合、糖はそのタンパク質本来の機能をなるべく変えないよう

表 1 細胞外に分泌される糖タンパク質

名称と存在場所	結合している糖の割合(%)	名称と存在場所	結合している糖の割合(%)
血 漿		内分泌系	
アルブミン	0.3~	ゴナドトロピン	31.5
フェッイン	23~	卵胞刺激ホルモン	3.6~
フィブリノーゲン	5.3	向甲状腺性ホルモン	21.4
α_1 -糖タンパク (オロソムコイド)	40	マトリックス	
パプトグロビン	18~19	コラーゲン (仔牛)	1.9
ヘモシアニン (貝)	0.38~	コンドロコンタンパク質	70~
α_2 -マクログロブリン	10.9~	甲 状 腺	
モノアミン酸化酵素	4.6~	チログロブリン	12
ブラズミノゲン	9.1~	唾 液	
など (計 47 種)		B 型 物 質	75~80
卵 白		囊 腫 液	
オボアルブミン	3.2	A 型 物 質	72
アビジン	10.8	胃 液	
オボムコイド	24.7	M糖タンパク質群	+
乳		精 漿	
ラクトトランスフェリン	7.2	P 4 糖タンパク	40
K-カゼイン	5.3	細胞膜	
尿		赤血球 M, N 型物質	+
Bence-Jones タンパク	3~4	Ehrlich 細胞	+
糖タンパク (多種)	40~90	卵 黄 膜	2.2~
		脾 臓	
		リボヌクレアーゼB	11.3

なものが、変えない位置に入るのであって、そのようなことをしなければならない必然性は、おそらく細胞が合成したタンパク分子をそれ本来の機能を失わないように細胞外に分泌することと関係があるというのである。

たとえば、前にも引用したヘモシアニン（貝）であるが、これには約0.4%の糖（ヘキソース）が結合している。これに対し、同じ O_2 運搬機能をもつヘモグロビン（哺乳動物）にはまったく糖は結合していない。ところで、両者の明瞭な相違は、前者が細胞外タンパクであるのに対し、後者は細胞内タンパクであるという点にある。この仮説をさらに一般化するために Eylar が集めたデータの一部を、表1に抄録引用させていただきたい。

まず、最も印象的なことは、典型的な細胞外タンパク質である血漿タンパクで、実に 47 種もの成分がすべて何らかの形で糖を結合しているという事実である。

この傾向は、他の細胞外タンパク質にもみられる。すなわち、卵白成分、乳の成分、尿の成分、視床下部から分泌されるタンパク性ホルモン、腹水分、滑液成分、髄液成分、結合組織の細胞外マトリックス成分、唾液成分、胃液成分、胎便成分、嚢胞液成分などがそれである。

また、動物細胞の原形質膜を構成する成分については、必ずしも確実な構造決定がなされたわけではないが、かなりの糖タンパクが存在していることは事実で、これも“細胞外”タンパクのカテゴリーに入れてよからう。

3. 細胞外タンパク質にも糖のついていないものがある——Eylar 仮説の批判

もし、タンパク質を分泌する細胞のすべてが上記のように糖をつけることによって分泌を行なっているとすれば、細胞外タンパク質のすべては糖タンパクであり、逆に細胞内タンパク質のすべては糖を結合していない純タンパク質であるという、all or nothing の関係がみられるはずである。しかし、実際はそれほど画然とした関係が成立しているわけではなく、糖の存在が実験的に否定された細胞外タンパクのいくつかが知られている。それらを表2に示す。

ここで注意しなければならないのは、前にも述べたように、あるタンパク質試料に糖残基がまったく存在しないということを立証するのは、かなり注意深い実験があって初めてできることで、現在のところそのような批判にたえられる研究はまだ多くないという点である。したがって、表2以外にも、いわゆる“純タンパク”性の細胞外タンパク質がこれまでの文献に記載されているかもしれないが、果たしてそれらがまったく糖を含まないも

表 2 糖をもたない細胞外タンパク質

存 在	名 称
膵 臓	α -キモトリプシン、リボスクレアーゼA、カルボキシペプチダーゼ、トリプシン、インシュリン、グルカゴン
胃	ペプシン
唾 液	α -アミラーゼ
下垂体前葉	ACTH、催乳ホルモン、生長ホルモン

のであるかどうか疑問である。

表2の中で気のつくことは、糖が結合していないのに細胞外に分泌されるタンパク質には、膵臓から分泌されるもの（トリプシン、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ、インシュリンなど）が多いことである。そこで、膵臓の細胞では、糖を結合することなしにタンパク質を細胞外に運び出す特別の機能がそなわっているのではないかという予想が生まれてくる。

このような予想に対する1つのヒントは、外分泌性膵

図 1 外分泌性膵臓細胞の構造とチモーゲンタンパクの合成分泌経路

タンパク質はリボゾーム上で合成されて粗面小胞体（r-ER）の内腔を経由してゴルジ装置（G）の膜に包まれた袋の中に入る。この袋はチモーゲン貯蔵量の増大とともに大きくなり（チモーゲン顆粒，Z），逐次原形質膜（PM）に接近し、ついにはそれと接合して細胞外、すなわち管腔（L）へチモーゲンを排出する。太い矢印がその経路を示す。M：ミトコンドリア，BM：管をとりまく基底膜，N：核。

細胞では“ゴルジ装置”，すなわち多数のスムーズな膜と空胞集団より成る細胞内構造が発達しており，膜に包まれたチモーゲン顆粒が，あたかもそのゴルジ装置から由来したかのような位置と形をとって多量に含まれているという電子顕微鏡の知見である（図 1）。

動物体，または培養液中に生かした組織切片に ^{14}C -アミノ酸を与え（pulse-labeling），つづいて正常な食餌または非放射性アミノ酸添加培養液に移して ^{14}C の行方を追う（chase）と， ^{14}C はまず細胞内の粗面小胞体（rough endoplasmic reticulum）に出現するが，時間とともにゴルジ装置の滑面膜の内腔から小さい空胞へ，つづいて大きなチモーゲン顆粒へと移行するのを見ることが出来る。このようにしてチモーゲンを包み込んだ袋のようなものは，ふくれながら細胞膜方向に近づき，最終的には細胞膜と融合し，そこにできた孔からチモーゲンを細胞外へ出す。以上の過程は主として電子顕微鏡ラジオオートグラフィによって詳しく観察されたことであるが⁽³⁾，これとほとんど同じような過程が小腸粘膜の goblet 細胞によるムチンの分泌⁽⁴⁾，ニワトリ胚軟骨細胞によるコンドロイチン硫酸-タンパク複合体分子の分泌⁽⁵⁾にも観察されている。

ある種の分解酵素は，それが活性型のまま細胞質内を移行するとすれば，その細胞にとってきわめて危険なことであり，自ら作ったものによって自らが破壊されることすらありうる。そのような場合，細胞はゴルジ装置の膜で問題の酵素タンパクを包み，細胞内を通過させると考えることができよう。

また，別の例としてあげた goblet 細胞のムチン分泌とか，軟骨細胞のコンドロイチン硫酸-タンパク分泌とかの場合は，同じ細胞がさらに別の分泌性タンパクをも合成しており，それらをうまく制御しつつ細胞外に運び出すしかけの 1 つにゴルジ装置が要求されるように思われる。たとえば，軟骨細胞の場合には明らかに同一細胞がトロポコラーゲンタンパクをも合成分泌しているが，このトロポコラーゲン集団とコンドロイチン硫酸-タンパク複合体とが具合よく細胞外で作用しあうことによって，美しく並んだコラーゲン繊維束が作られ，さらに高次のマトリックス構

造が形成されるといわれている。表 1 にも示されているように，このコラーゲン自身，典型的な糖タンパクであり，まず粗面小胞体で合成されたあと，ゴルジ装置を経由することなく細胞膜を通過して外に出るといわれている。このどの段階で糖が結合し，それが細胞外への分子排出とどのような関係にあるのかはわからないが，前述のゴルジ装置を経由するムコ多糖-タンパク複合体とは異なる機構経路で細胞外に出るところに，何か奥深い細胞の制御機構がひそんでいるように思う。

4. 多糖鎖はポリペプチド鎖や脂肪酸鎖とは異なるメカニズムで伸びる？

生体高分子，すなわちタンパク質，核酸，脂質，多糖の生合成では，すべて“ある活性化された単位”が逐次転移することによって鎖が伸びるのであるが，その伸びる方向には理論的には 2 通りの可能性がある。それは，生体高分子鎖を構成する単位に方向性（極性）があり，その結果，鎖の両末端は互いに異なることに由来するもので，たとえばタンパク質には C-末端と N-末端，核酸には 3'-末端と 5'-末端，脂肪酸にはカルボキシル末端とメチル末端，多糖には還元末端と非還元末端とがあり，鎖はそのどちらの末端方向に伸びるか？ というのが，これから高分子生合成機構を考える上の，1 つの基本問題となってくるのである。

それでは，これまでの研究でこの問題がどのように説

図 2 ポリペプチド鎖の伸長メカニズム

Ala 残基が鎖の C-末端に付加する場合を示す。鎖の C-末端には Tyr-tRNA がついており，その t-RNA を追い出す（あるいは“とり残す”と表現したほうがよいかもしれない）ようにして Ala-t-RNA* が入る（左端に書いてある t-RNA (Pro) が一段階前に追い出されたもの）。

図3 脂肪酸鎖の伸長メカニズム

アシル基運搬タンパク (ACP*) の SH 基にチオエステル結合したマロン酸残基のメチレン基が、やはり末端に ACP を結合した長鎖アシル基のカルボキシル末端を攻撃し、ACP-SH を追い出すようにして付加する。反応はアシル-マロン-ACP 縮合酵素の触媒下に行進し、縮合と同時に 1 モルの CO_2 が遊離する。

明されてきたかを考えてみよう。

まず、タンパク質の生合成の場合では、図2に模式的に示した通り、いま、とくにアミノ酸をつけ加えようとするアミノアシル-t-RNA* は、生長しつつあるポリペプチド-t-RNA の t-RNA を追い出すような形をとって逐次付加することが証明されている。すなわち、N-末端方向ではなく、現に t-RNA が結合している C-末端側へと鎖が伸びるのである。messenger-RNA が t-RNA を介してアミノ酸配列を指示するためには、このメカニズムのほうが、それとは逆のメカニズム、すなわちアミノアシル-t-RNA からアミノ酸残基が逐次ポリペプチド鎖の N-末端側へ付加するメカニズムよりすぐれている。

長鎖脂肪酸の鎖が伸びる場合も、基本的には上記ポリペプチド鎖延長のメカニズムと似ている。すなわち、図3に示すように、“伸びつつあるポリペプチド鎖”の代りに“伸びつつある脂肪酸鎖”を、t-RNA の代りに acyl carrier protein (ACP) を、アミノアシル-t-RNA* の代りにマロン-ACP* を置き替えて考えればよい。伸びつつある脂肪酸鎖

のカルボキシル末端側、すなわち ACP の結合している側へと単位が付加していく。

このように、t-RNA や ACP は常に伸びつつある鎖の一方の端に位置して、新しいアミノ酸やマロン酸残基をそこへ導入する。すなわち、鎖の伸長 (elongation) になくはない因子であるという観点から、以下、このような物質を“エロンゲーター elongater”という新語で呼ぶことにする。

核酸 (ポリヌクレオチド鎖) の生合成については、その合成開始機構や鎖の延長機構に現在まだ論議の種が残されているようであるので、ここではふれないことにする。

さて、多糖鎖の生合成については、アルゼンチンの Leloir による“活性型グルコース”すなわち UDP-グルコースの発見、つづく動物グリコーゲンの α -1,4-グルカン鎖の試験管内生合成の成功によって、図4に示すような鎖伸長メカニズムが明らかにされた。すなわち、UDP の末端リン酸残基に結合したグルコース単位がグルカン鎖の非還元末端に転移することによって鎖が伸びる。その後、植物のアミロース (α -1,4-グルカン) やセルロース (β -1,4-グルカン) の生合成も、これと同様に鎖は非還元末端側に伸びることが、cell-free 酵素系の研究から明らかにされた。ただし、植物セルロースでは、UDP-グルコースではなく GDP-グルコースがグルコース供与体である。また、このように1種類の糖から成るポリマー (単純多糖) 以外でも、たとえば *Streptococci* が生産するヒアルロン酸の場合は、グルクロン酸とアセチルグルコサミンとが交互に非還元末端側に付加することによって鎖が伸びるメカニズムが支持されている (図5)。前述のタンパク質や脂肪酸の鎖が伸びるメカニズムと比べて本質的に違う点は、鎖の伸びる方向の末端に t-RNA や ACP に相当するような“エロンゲーター”

図4 グリコーゲンの α -1,4-グルカン鎖伸長メカニズム

グルコース残基は UDP から既成グルカン鎖 (プライマー) の非還元末端へ転移する。

図 5 ヒアルロン酸鎖の伸長メカニズム

GA: D-グルクロン酸残基, AG: N-アセチルグルコサミン残基.

がついていないことである。

これら結論の根拠は、糖部分を ^{14}C でラベルした UDP-sugar と、既成の多糖またはその部分分解物である少糖 (プライマー primer) とを、転移酵素系 (多くの場合顆粒状である) 共存下に反応させると、 ^{14}C がプライマー分子の非還元末端側に入ることにある。しかし、このような cell-free 系に加えられるプライマーというものとは多分に人工的なものであり、これだけの結果をもって、真に native な分子の合成が説明されるものではない。たとえば、多糖鎖合成の最も初期の段階では、プライマーになるような既成の多糖はまだ存在していないと考えるのが正当であるが、上記のメカニズムはその点について説明することができない。あえていうならば、たとえばグリコーゲン合成系では、まず 2 分子の UDP-グルコースが反応して UDP-マルトースのようなものができて、これに第 3 の UDP-グルコースからグルコースが転移して UDP-マルトトリオース、次に UDP-マルトテトラオース、……となるというようにして UDP-グルカンができるという可能性はあるが、実際にはこのような反応は証明されていないし、またこのようにして合成されたグルカンの還元末端には UDP がついているはずであるが、天然物としてそのようなものが見いだされたこともない。これはセルロースやヒアルロン酸の合成についてもいえることで、このような生合成機構を考える限り、その合成開始機構には十分な説明が加えられない。同じことは合成終結機構についてもいえる。特別の原因がない限り、多糖の鎖は非還元末端側へどんどん伸びて止まるところを知らぬとすれば、鎖の長さを識別して伸長をストップさせるその“特別の原因”とは一体何であろうか？

5. サルモネラ菌細胞膜の多糖鎖 (O-抗原側鎖) は還元末端方向に伸びる——Robbins

さて、もう一度前にもどって、生体高分子の鎖が伸びるメカニズムを一般論的に考えてみよう。2つの異なる鎖の伸長メカニズムを図6のように描くことができる。メカニズムAをとることがわかっているタンパク合成では、XやX*はそれに直結する各アミノ酸に特異的に対応する t-RNA であり、脂肪酸合成では ACP である。また、メカニズムBをとるグリコーゲン、セルロース、ヒアルロン酸生合成では、X*はUDP、GDPなどのヌクレオチドであるが、Xとして記入されるものは、果たしてそんなものが存在するかどうかすら不明である。

Robbins⁽¹⁾は図7に示すような長い3糖繰返し構造を含む *Salmonella anatum* の細胞膜リポ多糖の生合成を研究中、EDTA 処理で温和に調製した膜画分に UDP-

メカニズム A:

メカニズム B:

図 6 2つの異なる生体高分子鎖の伸長メカニズム

図7 サルモネラ菌 (例: *Salmonella anatum*)
細胞膜リポ多糖の主要構造

構成単位とその大体の配列様式を示す。O-抗原側鎖部分と core 部分の結合様式は確定していない。結合の矢印は非還元末端から還元末端へ方向を示す。

ガラクトース, GDP-マンノース, TDP-ラムノースを同時に与えて反応させると完全なり多糖が合成される (すなわち, backbone-core に結合した O-抗原側鎖が完成する) のに対して, たとえば3者のうち GDP-マンノースを除いて反応させた場合には, UDP-ガラクトースと TDP-ラムノースの糖残基は, 図8に示すようなポリイソプレノールに転移して蓄積することを見いだした。ちなみに, このようなポリイソプレノール同族体は元来, 植物界では広く分布することが知られていたが, 最近では微生物界, 動物界にもあまねく分布することがわかっているものである。

この発見とは別に Albert Einstein College of Medicine の Osborn⁽⁶⁾ らは, *Salmonella typhimurium* の core 部分 (図7参照) の合成に遺伝的欠損のある変異株を用いて, ポリイソプレノールに結合したかなり長い O-抗原多糖鎖 (Gal ← Rha ← Man)_n が菌体内に蓄積されることを見いだした。そして, このようなポリイソプレノール-多糖

は細胞膜リポ多糖の合成中間体であって, 野生株ではその多糖部分が backbone-core 部分に転移することによって細胞膜リポ多糖が完成するという証明を行なった。

さて, 以上の発見は, 多糖の鎖がその還元末端側でピロリン酸残基を介してポリイソプレノール分子に結合した形で成長することを示している。いいかえると, 図6のメカニズムAに描かれているXという部分が, ポリイソプレノールピロリン酸という形で多糖鎖伸長の場にも登場してきたのである。もし, このXが前に述べたような“エロンゲーター”であるならば, 今までの常識に反して, 還元末端側 (ポリイソプレノール側) に伸びるメカニズムが多糖鎖合成にもあてはまるのではないか?

Robbins は, 菌体そのまま, さらに前述の EDTA 処理で得た cell-free 膜画分を用いて, それぞれ ¹⁴C-グルコースまたは UDP-¹⁴C-ガラクトースを瞬間的に投与 (pulse labeling) すると, ¹⁴C は多糖鎖の還元末端側に優先的にとり込まれることを確認し, つづいてラベルされていないグルコースまたは UDP-ガラクトースでそれぞれ“chase”を行なうと, 先にとり込まれた ¹⁴C はしだいに還元末端側から遠ざかっていくことをも確かめた。この結果をわかりやすく図示すると, 図9のようになる。予想通り, 多糖の鎖は還元末端側に伸びたのである!

このメカニズムをさらに詳しく説明したのが図10であ

図8 サルモネラ菌細胞膜リポ多糖の生合成中間体として発見されたポリイソプレノールピロリン酸~2糖の構造
Gal: ガラクトース, Rha: ラムノース。

メカニズム A (図6):

メカニズム B (図6):

図9 Pulse-Chase 実験

図6に示したメカニズムAとメカニズムBがまったく逆の結果を与えることを示した図。 ¹⁴C でラベルされた糖残基を黒い三角形で示してある。

図 10 リボ多糖鎖の伸長メカニズム

Lipid-P-P: ポリイソプレノールピロリン酸 (図8 参照).

る. ここでわかるように, 繰返し単位となる3糖はポリイソプレノールに結合したガラクトースから始まって, 従来の常識通り, その非還元側へハラムノース, マンノースの順で逐次付加することによってできるのであるが, こうしてできたポリイソプレノール-3糖が互いに反応して6糖, 9糖, 12糖, ……と大きくなっていくのは, ポリペプチド鎖や脂肪酸鎖と同じメカニズムA (図6) をとるのである. ここで, 多糖鎖とポリイソプレノールを結んでいる2個のリン酸残基のうち, 多糖に直結しているリン酸残基は UDP-ガラクトースの β -リン酸に由来し, 3糖単位が1つ完成して転移するごとにポリイソプレノールピロリン酸として遊離し, さらに特異的なホスファターゼによってオルトリン酸となる. エネルギー論的にみると, このホスファターゼによる脱リン酸が, 3糖単位を重合して多糖鎖を伸ばすための回路にとって, 大きな推進力になっている.

また, 多糖鎖がある程度伸びたところで, backbone-core 分子が還元末端からポリイソプレノールピロリン酸を追い出す. これが結果的には鎖の伸長をストップさ

せることになるから, メカニズムBではとらえどころのない “termination” が, ここでははっきり具体化されてくる.

この一連の研究は, 単に *Salmonella* 菌のリボ多糖合成を説明するという以上の重要な示唆を含んでいるように思われる. まず注目してよいことは, ポリイソプレノールに t-RNA や ACP に匹敵するような “エロンゲーター” としての機能のあることが示されたことである. いや, それのみでなく, このポリイソプレノールが細胞膜の成分であることを考え合わせると, 膜の内側にある糖スクレオチドを素材にして, 多糖鎖を伸ばし, それをさらに転移させてリボ多糖を完成するとともに, その製品を膜の外側へと運び出すしかけにも一役買っているようである.

もう1つの示唆は, このようなポリイソプレノール関与の多糖鎖合成メカニズムの一般化である. たとえば, 前述のヒアルロン酸の場合だと, それによく似た繰返し構造をもつコンドロイチン硫酸で, 動物細胞によって合成分泌されるものは, ほとんどすべて図11に示すようなタンパク質との複合体分子であることがわかっている.

これら分子の生合成はすでにかなり詳しく研究されているが, その2糖繰返し部分が, ちょうど *Salmonella* の3糖繰返しのよう, ポリイソプレノールの “エロンゲーター” を還元末端にもちつつ伸長し, 最後に別途完成したタンパク質←キシロース←ガラクトース←ガラクトース部分が “エロンゲーター” を追い出して入ることによって終結するというメカニズムは, 検討する価値がありそうである.

図 11 コンドロイチン硫酸 A-タンパク複合体 (ウシ鼻軟骨) の1次構造

6. 多糖の真に“native”な構造はまだよくわかっていない

以上の議論はまだ多分に仮説的なものを含んでいる。しかし、それだからこそ、いくつかの予想がそこから生まれ、それが私たちをひきつける。私たちの経験の中で上記仮説がどのような意味をもつかは、すでに軟骨細胞によるコンドロイチン硫酸-タンパク複合体分子の分泌、生合成、のメカニズムとして、上に述べてきた通りである。ここでは、さらにこの仮説をひろげて、多糖生化学が現在提示している一般的知識というものが果たしてわれわれを十分に満足させうるものであるかどうか、検討してみたい。

軟骨は特徴ある物理的・化学的・生理的性質をもった組織で、哺乳類をはじめ、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、無顎類、さらには、意外かもしれないが軟体動物であるスルメイカやマダコにまでわたって広く分布している。

この軟骨組織の性質を支える物質の主体は、細胞外マトリックスを作りあげているコラーゲンとコンドロイチン硫酸であることは、すでに古くからいわれてきたことである。この2大成分のうち、コンドロイチン硫酸の化学構造について最も広範な研究をしたのは、1940年代から50年代にかけて、当時コロムビア大学にいた K. Meyer である。こうして提出されたのが“2糖繰返し構造説”で、それは軟骨をはじめ多くの動物結合組織のコンドロイチン硫酸には *N*-アセチルガラクトサミン-4-硫酸と *D*-グルクロン酸よりなる2糖が規則正しく繰返されたもの(A型)と、その *D*-グルクロン酸が *L*-イズロン酸に代ったもの(B型)と、A型の硫酸基が4-位ではなく6-位についたもの(C型)との3型があるというものであった⁽⁷⁾。この結論を導くまでの実験は、(1)まず組織をタンパク分解酵素で徹底的に消化し；(2)アルカリ水溶液で多糖成分を抽出し；(3)混在するアミノ酸、ペプチドがまったく検出されなくなるまで精製し；(4)酸分解、酵素分解などで生成する主な断片について、その構造を決める；という手順で行なわれた。

この実験の指導原理は、コンドロイチン硫酸というもののは“比較的単純な構造の純多糖である”という前提によるもので、いわゆる“ものの構造を決める”という化学者の原理が優先し、“真に native な、機能する分子は何か”という生化学者の原理は棚上げされていたように思われる。それは、“より単純なもの”ほど“より純粋”であるという抽出精製の方法が採用された点からみてもいえることである(断わっておくが、化学者の原理

が優先したから悪いといっているのではない)。

同じ頃、New York 大学の M. Schubert は同じ軟骨のマトリックス成分を native な構造をこわさないように分離しようとして、軟骨切片を大量の冷水中で繰返しホモジナイズして、可溶化してくる多糖成分を超遠心分離法で分離精製した⁽⁸⁾。このようにして得られた多糖画分について部分構造の研究が行なわれ、前に図11に示したような多糖-タンパク複合体構造が明らかにされたのである。Schubert の仕事は上述の Meyer の仕事と違っていたのは、抽出という出発点において、“多糖をとり出そう”という原理ではなく、“軟骨のマトリックスを支えている機能分子をとり出そう”という原理を用いた点に在る。

一方、筆者の所属する研究室では、コンドロイチン硫酸鎖を、そのアセチルガラクトサミニド結合の部分で定量的に切片する酵素(コンドロイチナーゼ-ABC とコンドロイチナーゼ-AC)と、そうして生成する不飽和糖断片から硫酸を除く酵素(コンドロ-4-スルファターゼとコンドロ-6-スルファターゼ)を開発し⁽⁹⁾、それを構造探索の道具として多糖鎖部分の構造を微細に検討した結果、コンドロイチン硫酸鎖そのものも単純な2糖繰返し構造が主体であることはまちがいないが、多かれ少なかれ微細な不均一構造単位が多糖鎖の中に分散して挿入さ

図12 コンドロイチン硫酸鎖の microheterogeneity

古くから知られていたものは C_5' の立体配置が図に示すような *D*-グルクロン酸型で、 C_4 -OH が硫酸エステルになったもの(A型)、同じく C_6 -OH が硫酸エステルになったもの(C型)、 C_5' の立体配置が図とは逆の *L*-イズロン酸型で C_4 -OH が硫酸エステルになったもの(B型)の3種で、それぞれ均一な繰返し構造をもつとされていた。ところが、サメ軟骨から *D*-グルクロン酸型で C_6 -OH と C_2' (または C_3')-OH の両方が硫酸エステルになったもの、イカ軟骨から同じく C_4 -OH と C_6 -OH の両方が硫酸エステルになったもの、ブタ皮膚から *L*-イズロン酸型で C_4 -OH と C_2' (または C_3')-OH の両方が硫酸エステルになったものなどが見いだされた。いずれの場合も、既知 A, B, C 型鎖の中に hybrid 状に存在している。

れていること (図 12), その微細不均一性が動物種により, あるいは発生, 加齢により, いろいろなパターンをとり, しかも一定のルールのもとに変化していることを明らかにした^(10,11). すなわち, コンドロイチン硫酸鎖には, 微細不均一性 (microheterogeneity) と多形態 (polymorphism) が存在することが示されたのである.

最近, Rockefeller 大学の Hascall⁽¹²⁾ は前述の Schubert 法をさらに批判し, 3 M MgCl₂ 水溶液中に軟骨切片を浮かべて攪拌する方法で抽出されてくるコンドロイチン硫酸成分は, Schubert 法のそれに比べて “より native” であり, たとえば見かけの S-value も Schubert 法のそれが約 20 S であるのに対し, Hascall 法のそれは約 32 S を示すこと, 後者を冷たい KCl 水溶液に溶かしてウォーリングブレンダー中 30 分間処理すると, 約 18 S, さらに音波破壊器中で 2 分間処理すれば約 7 S にまで小さくなることを示した. すなわち, 冷水抽出という Schubert の用いた方法ですら, “shearing force” のため天然な分子は破壊されており, その結果, 可溶性化してきたのは天然分子の断片であったというわけである.

Schubert 標品と Hascall 標品の構造的違いは, まだ詳しく研究されたわけではないが, 前者のポリペプチド鎖が 1 本であるのに対し, 後者ではその数本が S-S-架橋でもっと複雑な 2 次構造を作っている点にあるといわれる.

このように, 軟骨のマトリックスを形成する多糖成分の化学を歴史的に追ってみて感ずることは, より研究しやすいものから手をつけるという理由から, 生化学者はややもすれば複雑な生体高分子構造を必要以上に単純化し普遍化する方向で成果をあげてきており, その逆の方向の問題に対してはまだ十分な究明を行なうにいたっていないということである. デンプンやセルロースのようないわゆる最も単純な多糖といわれているものですら, 植物細胞中ではその還元末端に異質の構造体が結合している, と予言したとしても, 誰がそれを一笑に付すことができるか? *

生体高分子の中でも最も単純な構造をもち, したがって最も単純なメカニズムで生合成が行なわれると考えられていた多糖であるが, 実はその核心にふれる研究とい

うものは, まだこれから行なわれる段階であるといっべくよからう. しかし, 考えてみれば, これは多かれ少なかれ他の生体高分子, たとえばタンパク質, 核酸, 複合脂質についてもいえることではなからうか? すでに, タンパク質分子における微量な糖残基の存在については, 前に述べた通りである. このような microheterogeneity がもっと一般的に生体高分子に存在するという点について, 生化学者はさらに積極的に追求する必要があるように思う. また, 生物種による違い (系統発生), 発生, 加齢による違い (個体発生), 組織間の違い, など, 同じ機能をもった分子の polymorphism の実体を解明することも, 今後の生物科学の幅と深さを増すために, ぜひ行なわなければならない仕事のように思う.

文 献

- 1) E. H. Eylar : *J. Theoret. Biol.*, 10, 89 (1965).
- 2) P. W. Robbins, D. Bray, M. Dankert and A. Wright : *Science*, 158, 1536 (1967).
- 3) J. D. Jamieson and G. E. Palade : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 55, 424 (1966).
- 4) M. Peterson and C. P. Leblond : *J. Cell Biol.*, 21, 143 (1964).
- 5) S. Suzuki, M. Okayama, K. Kimata, T. Yamagata, H. Saito, M. Hoshino and I. Suzuki : 7th International Congress of Biochem., Abstract IV, 704 (1967).
- 6) J. L. Kent and M. J. Osborn : *Biochem.*, 7, 4396, 4409, 4419 (1968).
- 7) K. Meyer : *Federation Proc.*, 17, 1075, 1078 (1958).
- 8) M. Schubert : *Federation Proc.*, 25, 1047 (1966).
- 9) T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi and S. Suzuki : *J. Biol. Chem.*, 243, 1523 (1968).
- 10) H. Saito, T. Yamagata and S. Suzuki : *J. Biol. Chem.*, 243, 1536 (1968).
- 11) S. Suzuki, H. Saito, T. Yamagata, K. Anno, N. Seno, Y. Kawai and T. Furuhashi : *J. Biol. Chem.*, 243, 1543 (1968).
- 12) S. W. Sajdera and V. C. Hascall : *J. Biol. Chem.*, 244, 77 (1969).

~~~~~新 刊~~~~~

生 物 環 境 調 節

Vol. 7, No. 1

日本生物環境調節研究会 編

B 5 判・100 頁・750 円

植 物 の 化 学 調 節

Vol. 4, No. 2

植物化学研究会 編

B 5 判・100 頁・500 円

* すでに, デキストラン (グルコースポリマー) ではフルクトースを, 細菌レバン (フルクトースポリマー) ではグルコースを, ヘミセルロース (数種の糖よりなるポリマー) ではフェノールを, それぞれ鎖の還元末端に結合しているものが見いだされている.

東京都文京区 振替 東京 59964
本郷東大橋内 発売 東京大学出版会 電話 811-8814