- 620 (1947).
 (9) F. G. GASTAFSON ; *ibid.* 25, 150 (1950).
 (10) R. T. CONNER, J. G. STRAUB : *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 13, 385 (1941).
 (11) 八木, 太幡 : 化学の領域, 8, 45 (1954).
 (12) 八木 : ビタミン, 7, 493 (1954).
 (13) 桜井, 和田 : ビタミン, 3, 161 (1950).
 (14) K. YAGI : *J. Biochem.*, 36, 161 (1951).
 (15) O. A. BESSEY, O. H. LOWRY, R. H. LOVE : *J. Biol. Chem.*, 180, 755 (1949).
 (16) H. B. BURCH, O. A. BESSEY, O. H. LOWRY : *J. Biol. Chem.*, 175, 457 (1948).
 (17) 八木, 近藤, 鷺見 : 生化学, 27, 777 (1956).
 (18) 近藤, 村松 : 生化学, 28, 371 (1956).
 (19) 近藤, 鷺見 : 科学, 26, 149 (1956).

糸状菌の Fructosidase に関する研究 (第 8 報)*

蔗糖から生成される新寡糖 No. 2 (Fungitetraose) について

倉沢文夫, 山本幸正, 伊賀上郁夫, 中村 寧 (新潟大学農学部)

昭和 31 年 6 月 5 日 受理

緒 論

β -h-Fructosidase は saccharase, invertase, 又は sucrase 等と言われ, 植物界, 微生物界に広く分布して多くの研究者によって攻究されている. 此の酵素の作用は, 今まで β -h-fructoside 結合を切断して果糖を遊離させると考えられていた.

しかしてその作用の測定には旋光計によって旋光度の変化を測定する方法と, 生ずる還元糖を測定する方法とがある.

倉沢, 斎藤等は糖のペーパークロマトグラフィ (PC と略記) について研究し, 感度の高い呈色剤としてアルドースにはアニリン塩酸塩 (AC と略記), ケトースにはオルシン磷酸塩 (OP と略記) を見出し, この PC を利用して糸状菌による蔗糖の代謝を研究中興味あることを見出した. 即ち蔗糖は分解されて先ず寡糖が合成され, 更に寡糖が分解されて葡萄糖と果糖になることを知った. よって糸状菌の fructosidase の作用によって蔗糖は寡糖になり更に葡萄糖と果糖に分解される. 蔗糖の旋光度は $[\alpha]_D = +66.4^\circ$, 寡糖 No. 1 は $[\alpha]_D = +25.4^{(7)}$, No. 2 は $[\alpha]_D = +17.9^\circ$ (後述), 転化糖は $[\alpha]_D = -20^\circ$ であるため, fructosidase の作用能は従来の旋光度を測定する方法でも矛盾なく測定され, 一方寡糖は再び分解されて葡萄糖と果糖になるため, 還元糖を測定する従来の方法でも矛盾がなかった.

倉沢, 斎藤等⁽¹⁾は得られた結果を 1952 年 7 月の日本酵素化学シンポジウムで発表した. 同年 11 月 PAZUR 等⁽²⁾は糸状菌において蔗糖から寡糖が生成される事を認め, 此の酵素を transfructosidase とした. 一方 BACON 等⁽³⁾も同じような現象を見出し此の反応は fructosidase の作用によるものであるとした. 倉沢, 斎藤等⁽⁴⁾は更に実験を進め, 蔗糖を葡萄糖と果糖に分解する酵素, 及び蔗糖から寡糖を生成し, 更にこれを葡萄糖と果糖に分解する酵素は共に fructosidase であるが, 前者の場合には蔗糖を分解して生ずる fructoside 残基を H_2O 即ち水に転移させ, 後者の場合には R-OH 即ち糖に転移させる力が強いので前者を fructosidase (h), 後者を fructo-

* Studies on Mould Fructosidase. Part VIII. A New Oligosaccharide No. 2 (Fungitetraose) Formed from Sucrose.

By Humio KURASAWA, Yukimasa YAMAMOTO, Ikuo IGAUE and Yasushi NAKAMURA
 (Faculty of Agriculture, Niigata University)

sidase (s) とした。

一方蔗糖から生成される寡糖については、倉沢、斎藤等⁽⁴⁾は 2~3 個の寡糖類のうち、その R_F 値の大きく重合度の少なるものから順に寡糖 No. 1, No. 2 と名付け、いずれも非還元性で構成糖は果糖と葡萄糖より成る事その他 2, 3 の性質について報告した。その後 BACON⁽⁵⁾, BARKER⁽⁶⁾ 等は No. 1 に相当する部分を抽出し、メチル化糖を作りそれより構造決定を行った。倉沢、山本等⁽⁷⁾は BACON, BARKER 等の方法によって炭素柱を用いるクロマトグラフィにより BARKER 等の得たと同一物と思われる寡糖 No. 1 を粉末状に得たが不純であるので更に PC の切取抽出法を用いて寡糖を得、メタノールにて精製し純粋な白色粉末を得た。粉末の物理的、化学的性質をしらべ、更にメチル化糖について実験し、メチル化糖については全く BACON, BARKER 等と同一の結果を得た。しかして寡糖 No. 1 を isokestose と命名した。

本報では isokestose よりも R_F 値低く、重合度の大きい寡糖 No. 2 の単離を行い、No. 2 の物理的・化学的性質をしらべ、更にメチル化を行い、その構造について研究して此の寡糖は glucosyl-fructosyl-fructosyl-fructoside の構造を有する四糖類である事を確認して fungitetraose と命名した。得られた結果を報告する。

実 験 の 部

A. 寡糖 No. 2 の単離

Aspergillus oryzae (A-10002) の CZAPEK-DOX 5% 蔗糖培養液中に生成される非還元性寡糖は培養後 2~3 日とその量最大を示し No. 1 (R_F 0.14; AC により赤褐色, OP により黄緑) が最も多く No. 2 (R_F 0.11; AC により赤褐色, OP により黄緑) がこれにつぎ R_F 値の接近している関係上炭素柱による分離法のみでは No. 1 が混入し純粋に分離する事が不可能であった為に更にそれをペーパークロマトグラフィの切取抽出法⁽⁸⁾を行い単離精製した。前報⁽⁷⁾において寡糖 No. 1 単離に用いたと同様 2~3 日培養した培養液を 80° で 30 分加温し酵素作用を止め、イオン交換樹脂で除塩後濾液を濃縮し炭素柱を通し 5% エタノール約 10 l 以後に出て来る部分を集め濃縮し適当な濃度とし東洋濾紙 (No. 2, 40×40) の下端より 5 cm の所に直線状につけ展開剤ブタノール:メタノール:水=4:1:1.5 を用い常温で 3 回展開を行いガイドにより No. 2 に相当する部分を切取り 50% 熱エタノールで抽出し、95% エタノールで精製を繰返し PC では単一である白色吸湿性の粉末を得た。蔗糖 35 g を用いて上述の操作で約 0.5 g の割で No. 2 を得る事が出来た。

B. 寡糖 No. 2 の性質

i) 寡糖 No. 2 の構成糖: 寡糖 No. 2 は $N/20$ 硫酸で 85°, 30 分で No. 1 と同様完全に加水分解される。正確に中和後 PC を実施すると葡萄糖と果糖のスポットを示した (第 1 図参照)。なお展開剤並びに呈色剤は前項 A に用いたと同じものを使用した。次に加水分解物中の構成糖の割合を検する為に HANES の方法で全糖を求め WILLSTÄTER-SCHUDEL 法でアルドースを求め、更にその差をケトースとしてアルドースとケトースの比率を求めると 25.6%:74.4% を示し葡萄糖 1:果糖 3 の比率となった。更に加水分解液の旋光度は左旋性を示し、 $[\alpha]_D^{25} = -51.9^\circ$ (c 4.6) を与え葡萄糖 1 モル果糖 3 モルの混液の旋光度 -55.9° (計算値) と大体一致とした。

ii) 寡糖 No. 2 の加水分解中間生成物: 寡糖 No. 2 の加水分解最終産物は 3 モルの果糖と

第2図 寡糖 No. 2 の不完全加水分解物のペーパークロマトグラフィ

c : 対照糖液 (果糖, 葡萄糖, 蔗糖, 寡糖 No. 1, No. 2)

b : 寡糖 No. 2

1, 2, 4, 6 : 20% 酢酸で 50° で 1, 2, 4, 6 時間加水分解物

展開剤及び呈色剤は第1図と同じ

第1表 寡糖 No. 2 の諸性質

		性 質
融 点 (風乾物)	85°	
(無水物)	110~115°	
結 晶 水	1 分子	
還 元 力	な し	
甘 味	な し	
旋 光 度	$[\alpha]_D^{10} = +17.9$. (c 7.9, H ₂ O)	
加水分解物の旋光度	$[\alpha]_D^{10} = -51.9^\circ$	
(計 算 値)	果糖 3 : 葡萄糖 1 $[\alpha]_D = -55.9^\circ$	
構 成 糖 比	果糖 2.9 : 葡萄糖 1	
加水分解中間産物	isokestose (No. 1), 蔗糖	
分 子 量	628±20 (無水物) 氷点降下法	
(計 算 値)	666 C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	
元 素 分 析	C 41.64%, H 6.19%	
(計 算 値)	C 42.10%, H 6.47%	

628±20 を示し四糖類 (C₂₄H₄₂O₂₁・MW 666) に大体一致し元素分析値からも考え合せ四糖類に相当する事が分った。今得られた結果をまとめると第1表の如くである。

C. 寡糖 No. 2 のメチル誘導体

i) 寡糖 No. 2 のメチル化 : 寡糖 No. 2 は不完全加水分解すると, その初期において isokestose と蔗糖並びに果糖を生ずる事からして isokestose の結合を有するものに果糖が非還元性になる如くに (果糖の 2 の位置) に結合しているものと推定したが, 更にその結合様式を確認する為にメチル誘導体を作り検討した。メチル化の方法は前報⁽⁷⁾において isokestose のメチル化を行ったと同様な方法で行った。即ち試料 0.5 g を 10 cc のジオクサン⁽⁹⁾及び 10 cc の 30% 苛性ソーダに溶解し強攪拌下に 60 cc の 30% 苛性ソーダ及び 30 cc のジメチル硫酸を交互に 10 区分に分けて添加し全試薬の添加後 100° に 30 分間保つ。12 時間放置後メチル化糖をクロロフォルムで抽出し, 溶媒を溜去後のシラップを 6 cc のジメチルフォルムアミド⁽¹⁰⁾に溶解し 2.5 cc のヨードメチルを加え強攪拌の下で 2.5 g の酸化銀を 40 分間に 10 区分に分けて添加する。酸化銀の凡そ半量を加えた後反応混合物を 30° に保つ。試薬添加後 30 分間強攪拌を継続した後 30° において 12 時間振盪する。未反応酸化銀を遠心分離によって溶液と分つ。液底の酸化銀は更に 5 cc のジメチルフォルムアミド及びクロロフォルムで洗滌する。洗液と合した溶媒層に 30cc の 5% シアン化カリ水溶液を加え分液ロート内で十分混合し生ずる沈澱を除いた後 5 cc のクロロフォルムで 3 回抽出する。抽出物は上記の操作で更に 2 回ヨードメチル法を繰返し, 最後のクロロフォルム抽出液は 10 cc の水で 3 回洗滌した後, 芒硝で脱水し溶媒層を溜去した後減圧下に 5 酸化リン上で乾燥した。メチル化物のメトキシル含量は 49.6% を示し (計算値 50.3%) 理論値に大体一致し 14 箇のメチル基を有する tetrahexaoose とした。

1 モルの葡萄糖から成る事が PC の結果と且つ定量結果から推定されたがその加水分解中間産物の確認は構造追究の上にも重要であるので稀薄な有機酸を用いて不完全加水分解を行い PC を実施し, その中間産物を時間的に追って見た (第2図参照)。即ち 20% 氷酢酸に溶解した寡糖 No. 2 を 50° の恒温水槽で徐々に加水分解を行いその分解液を各時間毎に PC で検すると, 中間生成物として isokestose の位置と蔗糖の位置にスポットが生じ次第に葡萄糖と果糖に分解して行く事がわかる。此の事は構成糖である葡萄糖と果糖の間の結合は前報⁽⁷⁾の isokestose (No. 1) の結合をし, 更にそれに果糖が非還元性の型で結合している事が推定される。

iii) 寡糖 No. 2 の物理恒数並びに諸性質 精製寡糖 No. 2 はペルトラン試薬により還元力を示さず吸湿性で甘味無く風乾物はその融点 85° を示し, アブデルハルデン乾燥器で 80° で無水物とせるものは融点 110~115° を示し, 約 2.5% の結晶水を有する事からして, 風乾物は結晶水 1 分子を有する。Lippich 旋光計でその 7.6% の水溶液についての旋光度は右旋性を与え $[\alpha]_D = +17.9^\circ$ であった。ベックマンの水点降下法でその無水物の分子量を求めると

ii) メチル化寡糖 No. 2 の加水分解 : メチル化寡糖 No. 2 を 0.05*N* 硫酸に約 2% になる如く溶解し 100° において 80 分処理すると完全に加水分解された。分解液は炭酸バリウムで中和した後減圧下に溶媒を溜去しシラップとし 5 酸化磷上で 40° で乾燥した。

iii) メチル化寡糖 No. 2 の加水分解物のペーパークロマトグラフィ : メチル化寡糖 No. 2 の加水分解物は PC により検すると 3 個のスポットを示し (第 3 図), その R_F 値はそれぞれ 0.76~0.77 (AC にて赤褐, OP にて黄緑) 0.85~0.86 (AC にて赤, OP では呈色せず) 及び 0.88~0.89 (AC にて赤褐, OP にて黄緑) を呈し色調, R_F 値より判断すると前報で報告した isokestose のメチル化物の加水分解物と同一のものが得られている事になる。即ち 3,4,6-tri-*O*-methyl-D-fructose⁽⁶⁾, 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucose⁽⁶⁾ 及び 1,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-fructose⁽⁶⁾ に一致した (第 3 図の 1, 2 を参照。1 は呈色剤として AC, 2 は呈色剤として OP を用いた)。更にメチル化寡糖 No. 2 の加水分解物中 1,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-fructose を前報の isokestose の場合と同様に 0.25% のメタノール塩酸処理 (2 日) で methyl tetramethyl-fructoside にして PC にかけた。結果は第 3 図の如くである。呈色剤は OP。蔗糖から調製した methyl tetra-*O*-methyl-fructoside と R_F が同じ位置にスポットが生じた。よつて寡糖 No. 2 からのスポットは methyl tetra-*O*-methyl-fructoside と推定した。寡糖 No. 2 の methyl tetra-*O*-methyl-fructoside の下に 1 個スポットが生じたがこれは methyl tri-*O*-methyl-fructoside であろうと思われるがたしかではない。Isokestose の場合には tetramethylfructose と trimethylfructose を分離して tetramethylfructose のみを fructoside にしたが今回は加水分解物の量が少く両者を分離することが出来なかった。以上の諸実験の結果は寡糖 No. 2 が 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucose 1 モル, 3,4,6-tri-*O*-methyl-D-fructose 2 モル, 1,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-fructose 1 モルから成るものと考えたとよく説明出来る。

iv) メチル化寡糖 No. 2 加水分解物の旋光度 : メチル化寡糖 No. 2 加水分解物の 2% 水溶液はその旋光度 $[\alpha]_D^{10} = +41.5^\circ$ (c 2.0 H₂O) を示した。これは 1 モルの 2,3,4,6-tetramethylglucose ($[\alpha]_D = +81.3^\circ$)⁽⁶⁾ と 2 モルの 3,4,6-trimethylfructose ($[\alpha]_D = +29.5^\circ$)⁽⁶⁾ 並びに 1 モルの 1,3,4,6-tetra-methylfructose ($[\alpha]_D = +30.3^\circ$)⁽⁶⁾ の混液の示す旋光度の計算値 $[\alpha]_D = +42.7^\circ$ と一致する。

考 察

以上の実験結果を総括すれば糸状菌の蔗糖含有培養液中並びに菌体抽出液の作用で蔗糖から生産される寡糖のうち、我々が No. 2 と名付けた非還元性寡糖を単離精製すると、(1) 酸により容易に加水分解を受け最終産物として果糖と葡萄糖を生じそのモル比は 3:1 である。(2) 加水分解中間産物として isokestose, 蔗糖が生成され、最後に果糖と葡萄糖に分解されていく。(3) 非還元性で甘味を有しない。旋光度 $[\alpha]_D^{10} = +17.9^\circ$ (4) 無水物は分子量 628 ± 20 (計算値 C₂₄H₄₂O₂₁ MW 666) で 4 糖類に相当し、風乾物は 1

第 3 図 メチル化寡糖 No. 2 の加水分解物並びにそのフラクトシッドのペーパークロマトグラフィ

- 1: メチル化寡糖 No. 2 の加水分解物 呈色剤 AC
2: 同上 呈色剤 OP
3: 寡糖 No. 2 のメチル化物より得られるメチルフラクトシッド 呈色剤 OP
展剤: ブタノール: エタノール: 水: アンモニア = 40: 10: 49: 1
S: メチル化蔗糖の水解物
A: メチル化寡糖 No. 1 の水解物
B: メチル化寡糖 No. 2 の水解物
D: 蔗糖のメチル化物より得られるメチルフラクトシッド
E: 寡糖 No. 2 のメチル化物より得られるメチルフラクトシッド

分子の結晶水を有す (5) メチル化物の水解物は PC では 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucose と 1,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-fructose と 3,4,6-tri-*O*-methyl-D-fructose に相当する 3 個のスポットを示し, その旋光度は trimethylfructose 2 個と tetramethylglucose 並びに tetramethylfructose おのの 1 個より成る旋光度の計算値 $[\alpha]_D = +42.7^\circ$ とほぼ一致している. もしも 3,4,6-tri-*O*-methyl-D-fructose の部分が 1,3,4-tri-*O*-methyl-D-fructose より成るものとする (即ち glucosyl (1→2) fructosyl (6→2) fructosyl (6→2) fructoside 結合) 加水分解物の旋光度の計算値 $[\alpha]_D = +0.5^\circ$ (2,3,4,6-tetramethylglucose $[\alpha]_D = +81.5^{(9)}$, 1,3,4,6-tetramethylfructose $[\alpha]_D = +30.6^{(9)}$, 1,3,4-trimethylfructose $[\alpha]_D = -55.0^{(9)}$) 前後となる為, このような結合は考えられず 1→2, 1→2, 1→2 の結合で成立っているものと推定される. よって此の寡糖 No. 2 の構造を *O*-α-D-glucopyranosyl (1→2) *O*-β-D-fructofuranosyl (1→2) *O*-β-D-fructofuranosyl (1→2) *O*-β-D-fructofuranoside と推定した.

蔗糖を炭素源としたとき酵母並びに糸状菌により生成される非還元性寡糖については ALBON⁽⁹⁾ 等の報ずる酵母 invertase により glucosyl (1→2) fructosyl (6→2) fructoside の構造を有する kestose があり, 倉沢等, BACON 等, BARKER 等の報ずる糸状菌 (*Asp. oryzae* 又は *niger*) により生成される寡糖 glucosyl (1→2) fructosyl (1→2) fructoside の非還元性三糖類があり, 倉沢等はこのものを isokestose と命名した. 更に同様培養液中に生成される No. 2 と称していた寡糖は, 前述のような構造を有し isokestose に更にフラクトースが 1→2 の位置で結合した非還元性四糖類である事を認め, 此の糖を fungitetraose と命名する.

要 約

Asp. oryzae の蔗糖含有培養液並びに菌体抽出液の作用で蔗糖から生成される非還元性寡糖のうち isokestose (生成される寡糖のうち R_F 値の一番高い三糖類) の次に生成される糖 No. 2 について炭素柱の応用とペーパークロマトグラフィーの切取抽出法で単離精製し, 構成糖 (果糖 3 : 葡萄糖 1), 融点 $110 \sim 115^\circ$ (無水物), 旋光度 $[\alpha]_D = +17.9^\circ$, 分子量 628 ± 20 の四糖類, 分子式 $C_{24}H_{42}O_{21} \cdot H_2O$, 更にメチル化により 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucose, 3,4,6-tri-*O*-methyl-D-fructose 及び 1,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-fructose の存在が推定されたので, その構造は *O*-α-D-glucopyranosyl (1→2) *O*-β-D-fructofuranosyl (1→2) *O*-β-D-fructofuranosyl (1→2) *O*-β-D-fructofuranoside であると推定しこれを fungitetraose と命名した.

終りに当り種々御指導を賜った三宅 捷先生, 中村幸彦先生, 小幡弥太郎先生, 阿武喜美子先生並びに元素分析を担当して下さいた東京大学農学部分析室の方方に感謝致します.

* 既報までは「糸状菌において蔗糖から非還元性寡糖を生成する酵素」として発表したが一報では表題の如く変更した.

(1) 倉沢文夫, 斎藤昭三, 本間伸夫, 山本幸正 : 日本酵素化学シンポジウム 1952. 7 月発表.	2528.
(2) J. H. PAZUR <i>J. Biol. Chem.</i> , 199, 217 (1952).	(6) S. A. BARKER : <i>J. Chem. Soc.</i> , 1954, 2125.
(3) J. S. D. BACON, F. J. BEALING : <i>Biochem. J.</i> , 53, 277 (1953).	(7) 倉沢文夫, 山本幸正, 伊賀上郁夫, 中村 寧 : 本誌, 30, 624 (1956).
(4) 倉沢文夫, 斎藤昭三, 本間伸夫, 山本幸正 : 本誌, 28, 818, 822 (1954); 29, 211, 332, 336, 461 (1955).	(8) 服部静夫, 代谷次夫 : 日本植物誌, 64, 137 (1951).
(5) J. S. D. BACON <i>J. Chem. Soc.</i> , 1953,	(9) N. ALBON, D. J. BELL : <i>J. Chem. Soc.</i> , 1953, 24.
	(10) R. KUHN : <i>Angew. Chem.</i> , 67, 32 (1955)-