乳製品のアミノ・カルボニル反応に関する研究（第 6 報）*

無糖練乳中の蛋白質-糖系における窒素配糖体（その 3）

2 次的生成窒素配糖体の化学構造——特に糖部分について

足 立 達（東北大学農学部畜産利用学研究室）

昭和 30 年 10 月 10 日 受 理

加熱牛乳に於ては既存の糖蛋白質の他に新に糖・蛋白質結合体が生成するが、この結合体から粗窒素配糖体を分離しその中には少くとも 2 種類の新配糖体が成分となつてゐることを前報に示して、このものを 2 次的生成窒素配糖体と称すべきことを提案しておいた⁽¹⁾。蛋白質・糖結合体の示す諸性質の多くは、その基本的構成単位としての窒素配糖体に集約的に表現されていると考えられるので、牛乳のアミノ・カルボニル反応の大半が蛋白質・乳糖系反応に負うている以上、牛乳中の 2 次的生成窒素配糖体の諸性質を明らかにすることは、乳蛋白質糖間のアミノ・カルボニル反応に於いてその初期段階に形成される蛋白質・糖結合体検討の上に重要な役割を占めるであろう。併しながら 2 次的生成窒素配糖体については全く報告がないので、その諸性質検討の出発点として筆者は加熱牛乳中の 2 次的生成窒素配糖体の化学構造を決定する為に主としてその糖部分の構造の検討を行い、乳蛋白質・糖系に於けるアミノ・カルボニル反応の初期反応経移様式に AMADORI 転移段階の存在を示すことが出来た。本論文はこれを述べたものである。

無糖練乳から分離した粗窒素配糖体をペーパークロマトグラフによつて多重展開し、展開分離した各窒素配糖体の存在する部位からそれぞれを抽出単離して、前報に示したように 2 次的生成窒素配糖体と確認された No. 1, No. 3-*N*-glycoside を分離精製した。

No. 1-*N*-glycoside を 1 *N* HCl で加水分解しペーパークロマトグラフ展開を行つた結果、ガラクトース、グルコースを認め、エマルシンを PORTER 及び HOBAN が糖の微量加水分解に使用した方法⁽²⁾に従つて作用させて、分解生産物中にガラクトースを検出した。これによつて本糖成分にはガラクトース結合が β 構造を有し、アグリコン部の結合糖配置は α 型であろうと推察される。FEARON⁽³⁾, MALPRESS⁽⁴⁾, HOROWITZ⁽⁵⁾ 等によれば 1-4 結合を有する二糖類はアルカリ性メチルアミンの作用によつてピンク色に呈色するので、この呈色反応がマルトース、乳糖の検出或は定量に使用し得られるとされているが、本物質も明瞭にこの呈色反応を与え、吸収曲線も乳糖のそれと同様であつた。即ちこの糖成分は 1-4 結合を持つたガラクトース、グルコースから成る二糖類であることが結論される。しかもペーパークロマトグラム上の検出に当つては anilin hydrogen phthalate 等の糖検出指示薬に対する呈色が極めて遅く、これは糖成分が非還元性であること、即ち遊離のカルボニル基が閉鎖されていることを示している。したがつて以上の結果から本物質中の糖部分は 4-*O*- β -galactosyl- α -glucose であり、No. 1-*N*-glycoside は *N*-4-*O*- β -galactosyl- α -glucoside (I), 即ち *N*- α -lactoside と称すべきことが推定される。

No. 3-*N*-glycoside はペーパークロマトグラム上でレゾルシン反応陽性を示すのでケトースであることを思わせるが、最近 DISCHE, BORENFREUND はシステイン-カルパゾールによつてケトースが紫色に発色して 560 $m\mu$ に最大吸収を示し、ケトースに対する反応として極めて特異性が高く単糖類のみならず、そのエステルや重合物に対しても反応を呈することを明らかにしている⁽⁶⁾ので、この反応を本物質に試みたところフラクトースと同様の吸収曲線を示し前報の推定を確認した。又本物質を 1 *N* HCl で加水分解しペーパークロマトグラフ的に生産物を検索するとガラクトースしか検出されず、エマルシンによつても同様にガラクトースが検出される結果を示した。一方、アルカリ性 *o*-dinitrobenzene によつて直ちに紫色に呈色したが、これは KÜHN 等によつて 1-アミノヘキソースの AMADORI 転位によつて生じた 1-amino-1-deoxy-2-ketose の特性反応として使用された

* Studies on Amino-Carbonyl Reaction of Milk Products. Part VI. *N*-Glycosides in Protein-Sugar Complex of Evaporated Milk (3) The Chemical Structure of the Secondary Formed *N*-Glycosides with Special Reference to the Carbohydrate Residues.
By Susumu ADACHI (Laboratory of Animal Products Technology, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai)

ものである。即ち本物質の糖成分中に存在するケトースは 1-amino-1-deoxy-ketose であり、酸分解によつてケトースを検出することが出来なかつた理由もここに存するものと思われる。更にアルカリ性メチルアミン反応によつてピンク色に呈色し、乳糖とは同様の吸収曲線を与えた。したがつてこの糖成分は No. 1-*N*-glycoside 糖成分の AMADORI 転位生成物と考えるべきものであり、以上の事実は本物質の糖部分は 4-*O*- β -galactosyl-1-deoxy- α -fructose であり、No. 3-*N*-glycoside は *N*-4-*O*- β -galactosyl-1-deoxy- α -fructosamine (II) であること即ち 1-*N*- α -lactulosamine であることを立証している。

尚、第 7 報に詳報するが No. 1, No. 3-glycoside の 1*N* HCl の加水分解によつて生じたアグリコン部はリジン、ロイシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、ヒスチジン等の 8 種類のアミノ酸から成るペプチドで、ペーパークロマトグラフ的に同じ R_F を示し相等しいものと見做される。したがつて No. 1-*N*-glycoside は乳蛋白質中のペプチド・R に乳糖が結合したものであり、No. 3-*N*-glycoside はこの AMADORI 転位物と考えられるので、それぞれの化学構造は次式に示すように推定される。

実

験

I. 無糖練乳中の粗 2 次的生成窒素配糖体の分割単離

前報に示したように無糖練乳から分離した粗窒素配糖体は 5 種類の構成成分から成る混合系であるので、各成分を分離する為に多重ペーパークロマトグラフィ分割を試みた。この方法は富金原、村松等によつて清酒中の非酸酵性糖の分離に使用されたものである⁽⁸⁾。

(1) 試料 前報に於て示した無糖練乳から分離した粗窒素配糖体約 1,850 mg を 25% の溶液として使用した。

(2) ペーパークロマトグラフに用いる溶媒の選択 粗窒素配糖体のペーパークロマトグラフの分割に適当な展開溶媒を選択する為に、各種の溶媒の組合せによつてそれぞれの分離能の比較を行つた。使用濾紙は東洋濾紙 No. 50, 40×6 cm, 25° に於て 2, 4 回上昇法によつて多重展開し、発色剤としては醋酸ベンチジン、ニンヒドリンを使用し、噴霧後それぞれを 120°, 10 分; 100°, 8 分間加熱して充分に発色させた。溶媒には展開用にはしばしば使用されるブタノール:醋酸:水 (4:1:2), ブタノール:ピリジン:水 (3:2:1.5), ピリジン:醋酸エチル:水 (1:2.5:3.5) 及びフェノール (15%, 1% NH₃) 等を選んだが、これらの分離能を検討した結果、ピリジンを主体とする溶媒は糖類の分離には良い成績を与えるが、本窒素配糖体に対しては期待された結果を示さず分離能が良好とは認め難く、ブタノール:醋酸:水 (4:1:2) が最も優れていることが判明した。

(3) ペーパークロマトグラフによる 2 次的生成窒素配糖体成分の単離 試料約 250 mg を数回に分つて濾紙 (同上濾紙 40×40 cm) 上に下端から 3 cm の距離を保ち 35 cm の長さの一線にスポットし、ブタノール:醋酸:水 (4:1:2) の溶媒によつて濾紙の上端迄展開し、所謂 4 重展開を行つて各成分を充分に分離させる。その後両端を guiding strip として切り取りニンヒドリンで呈色させて各成分の存在位置を確認し、この結果に基づいて未呈色のクロマトグラムから各成分の存在する部分を帯状に切り離し、5 個の相当区分の濾紙片を集めてこれを 50°, 50 cc の温水で 3 回抽出し、遠心分離によつて透明液 140 cc を得た。この抽出液を 40° で減圧濃縮して 10 cc とし、真空硫酸デシケーター中で乾燥した。かようにして得られた各分割は、同様な多重濾紙クロマトグラフ再展開の結果、単一スポットしか与えないので純粋物と認められる。各成分の収量は Table 1 の通りである。尚この際の窒素配糖体の No. は前報と同様である。No. 2 及び No. 4-*N*-glycoside はニンヒドリン

TABLE 1. Fractionation of the Crude *N*-glycosides in Evaporated Milk.

Component	Yield(g)	Percentage	
No. 1-glycoside	0.186	10.0*	12.0**
No. 2-glycoside	1.050	56.5	68.1
No. 3-glycoside	0.108	5.8	7.0
No. 4-glycoside	0.063	3.4	4.0
No. 5-glycoside	0.138	7.4	8.9
Total	1.549	83.1	100.0

The components were eluted in warm water from the cut spot of paper chromatograms which were developed by multiple paper chromatography using the solvent; butanol: acetic acid: water (4:1:2).

Percentage: * as against to crude *N*-glycosides, ** as against to total yield of No. 1-5 *N*-glycosides.

試薬に対しては明瞭なスポットを与えず、ベンチジン試薬には No. 2-*N*-glycoside は明瞭なスポットを示した。そこで No. 2-*N*-glycoside と仮称した物質を熱水アルコールから再結晶し、前報に認めたように乳糖と同一 R_F を有する点から乳糖の存在を予想したので、乳糖との混融試験の結果融点の降下が見られず、本物質は乳糖と同定することが出来る。したがってこの粗室素配糖体の約半分近くを占める No. 2-*N*-glycoside は大部分が乳糖から構成され、室素配糖体はむしろ不純物として混在しているものと考えられる。

Table 1 に示した各成分は吸湿性、淡帯黄色の無定形物質である。

II. No. 1, No. 3-*N*-Glycoside における糖部分の化学構造の検討

無糖練乳から分離した室素配糖体の中、No. 2-*N*-glycoside は乳糖から成り No. 5-*N*-glycoside は乳蛋白質から由来する既存のものであることが判明したので、2 次的生成室素配糖体の主要なるものは No. 1 及び No. 3-*N*-glycoside であるとの結論は妥当と考えられる。そこで No. 1, No. 3-*N*-glycoside の化学構造推定の為、先ず糖成分の検討を行った。

(1) 酸加水分解による構成単糖類の確認 (I) に於て分離調製した No. 1, No. 3-*N*-glycoside 約 10mg に 1 *N* HCl 1 cc を加えて細管中に封じ込み、沸水中で 1 時間加熱して加水分解を行い、後内容物を真空苛性ソーダデンキター中で乾燥した。この物に極く少量の水を加えて溶解し、濾紙上にスポットしてブタノール：ピリジン：水 (3:2:1.5) の展開剤を用いて 3 重上昇展開(展開距離 35 cm)を行い、醋酸ベンチジン噴霧後 120°, 10 分加熱によつて発色させた。その結果 No. 1-*N*-glycoside 加水分解物にはガラクトース、グルコースが、No. 3-*N*-glycoside 加水分解物にはガラクトースのみが検出された。No. 3-*N*-glycoside 加水分解物中にはレゾルシン噴霧によつてもフラクトースの存在を認めなかつた。又ニヒドリン噴霧によつてもアミノ糖はいずれにも検出されなかつた。唯 $R_f=1.73$ 附近に 1 スポットを認めたが、これは醋酸ベンチジン, aniline hydrogen phthalate 等の糖指示薬に対して陰性で反応を現わさないで、加水分解によつて糖部分が除かれたそれぞれの *N*-glycoside のアグリコン部ペプチドと推定される(後出)。尚 No. 1-*N*-glycoside 加水分解物のペーパークロマトグラム上のグルコース、ガラクトースの示すスポットの面積と呈色度とはほぼ相等しく、その分子比は 1:1 と推定することが出来た。

(2) β -Glucosidase による被分解性 β -Glucosidase は扁桃から TAUBER 法に従つて調製したエマルシン⁽⁹⁾を使用した。実験方法としては松田、麻生が sake biose, koji biose の検討に際して採用した⁽¹⁰⁾条件を参照し、PORTER 及び HOBAN の方法を採用した。即ち試料 5 mg を pH 4.0 の *M*/10 醋酸緩衝液 1 cc に溶解してトルオール 1 滴を加えたものと、0.2% エマルシン溶液 (pH 4, *M*/10 醋酸緩衝液) にトルオール 1 滴を加えたものとを調製し、1.5×100 mm の毛細硝子管の両端からそれぞれを少量宛吸い入れ、硝子管の一端を封じた後遠心機によつて両液をこの底部に集め、一端から小毛細硝子棒を入れて攪拌混合してこの部を封管する。このようにして作製した反応管を 37° に 3 日間保持してエマルシンを作用させるが、この際 No. 1 及び No. 3-*N*-glycoside の他にラクトースを対照として設定し、作用前後のペーパークロマトグラムを酸加水分解物の検討に於けると同様な方法で求めた。その結果ラクトースはガラクトース、グルコースに分解され、No. 1, No. 3-*N*-glycoside からは共にガラクトースが生じていることが確認された。したがって、No. 1 及び No. 3-*N*-glycoside はエマルシンによつて分解を被ること、即ちこれらの糖成分には β 配置の結合が存在し、後述の成績と相俟つて末端配列糖類は両者共にガラクトースであることを示す根拠を提示している。

(3) No. 3-*N*-Glycoside におけるケトースの証明 No. 3-*N*-Glycoside はレゾルシンによつてペーパークロマトグラム上に赤褐色のスポットを与え、ケトース推定の可能性を示したので次の 2 方法によつてその確認を試みた。

(i) システイン-カルバゾール反応: DISCHE, BORENFREUND の方法に従つた。即ち試料 5 mg を 100 cc に溶解してこの 1 cc を採り、これに 1.5% システイン塩酸塩溶液 0.2 cc, 稀硫酸 (硫酸 450 cc を水 190

Fig. 1. Absorption Spectrum of the No. 3-*N*-glycoside reacted with Cysteine-Carbazol.

—●—●— Fructose
—▲—▲— No. 1-*N*-glycoside

Fig. 2. Absorption Spectrum of No. 1 and No. 3-*N*-glycosides reacted with Alkaline Methylamine.

—●—●— No. 1-*N*-glycoside
—▲—▲— No. 3-*N*-glycoside
—×—×— Lactose

cc で希釈したもの) 6 cc を順次に添加し、直ちに 0.12% カルバゾール酒精溶液 0.2 cc を加えて充分に混合し、30 分経過後冷却して 10 mm の cell に入れ、盲験液を対照として Beckman spectrophotometer によつてその吸収スペクトルを測定した。その結果は Fig. 1 に示すように試料の極大吸収部はフラクトースのそれに全く一致し、全体的に類似のスペクトラムを与える。したがつて、本反応の特異性の点から No. 3-*N*-glycoside 中にケトースが存在することは確実である。

(ii) *o*-ジニトロベンゼンの反応：試料 10 mg を 1 cc の水に溶解して *o*-ジニトロベンゼンの小結晶を加えて混合し、これに 5% NaOH 溶液 2~3 滴を加え 30° に保持すれば明瞭な紫色に呈色する。したがつて試料中に 1-amino-1-deoxy-2-ketose の存在を推定することが可能である。ここに使用した *o*-ジニトロベンゼンは *o*-ジニトロアニリンから合成した。m.p. 116°。

尚 No. 1-*N*-glycoside はシステイン-カルバゾール及び *o*-ジニトロベンゼン両反応はそれぞれ陰性であつた。但し後者は僅かな呈色を認め得る。

(4) 1,4-結合性二糖類の証明 HOROWITZ の方法に準じたが、呈色が弱いので FEARON, MALPRESS の

TABLE 2. The Determination of Components and Binding Properties of Sugars Constituting of the No. 1 and No. 3-*N*-Glycosides Obtained from the Evaporated Milk.

	Lactose	No. 1- <i>N</i> -glycoside	No. 3- <i>N</i> -glycoside
Hydrolysed products by 1 <i>N</i> HCl	glucose, galactose	glucose, galactose	galactose
Color reaction { Benzidine	brown ##	brown ++	brown ++
with developers { Resorcline	—	—	+
{ Ninhydrine	—	violet ##	violet ##
Hydrolysed products by β -glucosidase (emulsine)	glucose, galactose	galactose	galactose
Alkaline methylamine reaction (1-4-bound disaccharide)	positive	positive	positive
Cysteine-Carbazol reaction (ketose)	negative	negative	positive
Alkaline <i>o</i> -dinitrobenzene reaction (1-amino-1-deoxy-2-ketose)	negative	negative ? (±)	positive

The sugars were detected by means of ascending multiple paper chromatography using the solvent ; butanol:pyridin: water (3:2:1.5). The samples were hydrolysed by heating with 1*N* HCl at 100° for 1 hour and by emulsin using PORTER, HOBAN's method at 37° for 3 days. The coloration degree of the spots; # intense, ++ middle, — negative. The alkaline methylamine reaction for 1-4-bound disaccharide and cysteine-carbazol reaction for ketose were spectrophotometrically measured by the methods of HOROWITZ, DISCHE & BORENFRUND, respectively. The *o*-dinitrobenzene reaction was measured as follows; the samples are dissolved in water containing a small amount of *o*-dinitrobenzene and then are added a few drops of 5% NaOH.

方法を参照して次のように改変して行つた。試料及びラクトース各 5 mg にアルカリ性メチルアミン (1.6% メチルアミン塩酸塩溶液 2 容に 5.4 N NaOH 溶液 1 容を加えた混合溶液) 溶液 0.3 cc を加えて溶解して 4 分間放置し、後水 5 cc を加え次いで太目の毛細管を液中に導き、無酸素の窒素ガスを 10 分間通じる。その後空気の流入を防ぎつつ毛細管を除いて密栓し、60° に 30 分間放置して発色させる。その結果ラクトース No. 1 及び No. 3-*N*-glycoside 共にピンク色に呈色するが、これらの吸収スペクトルは Fig. 2 の通りで 542 m μ 附近に極大吸収を有し、その波形も互に酷似している。尚この吸収スペクトルは 10 mm の cell を用い、Beckman spectrophotometer DU 型によつて測定した。既述のようにこの反応はラクトース、マルトース等の 1,4-glucoside 結合を持つた二糖類にのみ現われる特異的なもので、その他の糖はピンク色と異り黄色に呈色することが証明されている。したがつて、試料の両 *N*-glycoside の構成糖部分が 1-4 結合の二糖類であることは確実と考えられる。

以上の実験Ⅱの諸検討の結果を総括的に Table 2 に示した。

要 約

(1) 無糖練乳のトリプシン加水分解物中から分離した粗窒素配糖体をブタノール：醋酸：水 (4:1:2) を展開剤として多重ペーパークロマトグラフィによつて分離した後、抽出して 5 種類の構成成分に分割単離した。

(2) このクロマトグラムにおいてラクトースの真下 (No. 1-*N*-glycoside), 真上 (No. 3-*N*-glycoside) に位置する 2 種類の窒素配糖体の糖成分に就て検討を行い、前者は *N*-4-*O*- β -galactosyl- α -glucoside, 後者は *N*-4-*O*- β -galactosyl-1-deoxy- α -fructosamine であることを明らかにした。この結果から、両窒素配糖体は牛乳中に既存の糖蛋白質様物質から由来した glycoside ではなく、蛋白質・糖系のアミノカルボニル反応によつて生成した蛋白質・糖結合体から由来する 2 次的生成窒素配糖体であることを確認した。

終りに臨み、常に御指導と御鞭撻を頂いている佐々木林治郎教授、中西武雄助教授に厚く感謝致します。

(1) 足立 達： 本誌 30, 378, 383(1956)	(6), Z. DISCHE, L. B. BORENFREUND: <i>J. Biol. Chem.</i> , 192, 583 (1951).
(2) W. L. PORTER, N. HOBAN <i>Analy. Chem.</i> , 26, 1846 (1954).	(7) R. KUHN, F. WEYGAND: <i>Ber.</i> , 70, 769 (1937).
(3) W. R. FEARON: <i>Analyst</i> , 67, 130(1942).	(8) 富金原孝, 村松敬一郎: 本誌, 28, 529(1954).
(4) F. H. MALPRESS, A. B. MORRISON: <i>Biochem. J.</i> , 46, 307 (1950).	(9) H. TAUBER: <i>J. Biol. Chem.</i> , 99, 257 (1932).
(5) M. G. HOROWITZ: <i>Analy. Chem.</i> , 23, 375 (1951).	(10) 松田和雄, 麻生 清 <i>醸工</i> , 31, 211(1953).

Summary

(1) The crude *N*-glycoside obtained from the tryptic digestion products of evaporated milk were developed by multiple (4 runs) paper chromatography by use of the following solvent, butanol: acetic acid: water (4:1:2), and then 5 components were isolated by elution in warm water from the cut spot of the paper chromatograms. (Table 1)

(2) This investigation was undertaken to determine the chemical structure of sugars constituted of No. 1 and No. 3-*N*-glycosides (the glycoside were numbered Nos. 1~5 from the original spot successively) which had been assumed as the secondary formed *N*-glycosides. The results obtained are shown in Table 2 (Figs. 1~3). In view of these facts, the most reasonable conclusion for the chemical structures to be drawn from available data is shown as follows; (i) No. 1-*N*-glycoside.....*N*-4-*O*- β -galactosyl- α -gluco(pyrano)side, No. 3-*N*-glycoside.....*N*-4-*O*- β -galacto(pyrano)syl-1-deoxy- α -fructosamine, (ii) these samples are the secondary formed *N*-glycosides, as they do not contain the sugars, namely, mannose and hexosamine which are involved in glycoprotein-like substances.