コージビオースのエピメリ化による 2-O- α -D-glucosyl-D-mannose の調製

川村 杉生*, 松田 和雄

(東北大学農学部農芸化学科)

昭和 47 年 10 月 11 日 受理

Preparation of 2-O- α -D-Glucosyl-D-mannose by Epimerization of
Kojibiose (2-O- α -D-glucosyl-D-glucose) [Note]

By Sugio KAWAMURA* and Kazuo MATSUDA

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tohoku University, Sendai

Preparation of 2-O- α -D-glucosyl-D-mannose was attempted by epimerization of kojibiose (2-O- α -D-glucosyl-D-glucose). The epimerization product was obtained in the best yield by heating one part of the starting material with ten parts of 0.1 N potassium hydroxide in a boiling water bath for ten minutes. The product had $[\alpha]_D^{20} = +72^\circ$ (water), and was characterized as 2-O- α -D-glucosyl-D-mannose by paper chromatographic examination of the acid hydrolyzate of the original and the reduction products as well as its non-reactivity with triphenyltetrazolium chloride. The above structure was further confirmed by methylation analysis. (Received October 11, 1972)

* Present address: Fermentation Research Institute, Chiba

グルコース溶液にアルカリを作用させると、いわゆる Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein 転移⁽¹⁾により、フルクトースのほかにマンノースが生成することが知られている。また単糖類のみならず、マルトース^(2,3)、セロビオース⁽⁴⁾などのグルコ二糖類にアルカリを作用させると、各々に対応するグルコシルマンノースあるいはグルコシルフルクトースが生成することが認められている。1,2-結合のグルコ二糖類においては、還元末端側のグルコース残基の C-2 が結合に関与しているため、ケトースへの転移は起こらず、グルコシルマンノースのみが生成すると考えられる。Candida utilis マンナン⁽⁵⁾の構造研究の過程で、比較物質として α -1,2 結合のグルコシルマンノース (2-O- α -D-glucosyl-D-mannose) を必要としたので、この反応を応用して α -1,2 結合のグルコ二糖類であるコージビオースから、上記の糖の調製を試みた。

1. 反応条件の検討

エピメリ化の条件を検討するため、アルカリとして水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウムを用いてエピメリ化を行ない、反応生成物について検討を行なった。

コージビオース溶液 (10 mg/50 μ l) に、基質に対して 0.5% および 1% になるようにアルカリ溶液 50 μ l を加え、沸騰湯浴中でエピメリ化を行なった。反応液は塩酸で中和後、希釈してペーパークロマトグラフィー (PPC) に供した。

その結果、反応生成物のほかにグルコースおよび未反応のコージビオースの計 3 つのスポットが検出された。クロマトグラムから各糖に相当する区分を切り取り、水で溶出してフェノール硫酸法⁽⁶⁾により各糖の定量を行なった。その結果は Table I に示すとおりで、基質に対して 1% アルカリを使用した場合、反応生成糖は 10 分間加熱の条件では、水酸化ナトリウムと水酸化カリウムでほとんど差異は認められなかったが、コージビオースのグルコースへの分解率は、水酸化ナトリウムに比べ、水

* 現在、工業技術院微生物工業技術研究所。

Table I. Analysis of Epimerization Products

Reagent used	Sugars revealed by PPC	0.5%		1.0%	
		5 min	10 min	5 min	10 min
NaOH	glucose	2.7%	2.7%	3.9%	5.9%
	epim. product	28.1	31.3	33.1	37.1
	kojibiose	69.2	65.9	63.0	57.0
KOH	glucose	2.3	2.0	2.9	4.2
	epim. product	27.8	24.2	35.9	37.2
	kojibiose	79.9	73.7	61.2	58.6

酸化カリウムを使用した方が、いくらか小さかった。また、アルカリ濃度を 1% 以上に上げた場合、反応生成物の量はほとんど変わらないが、糖の分解は著しく増加するという貝沼ら⁽⁶⁾の報告もあるので、以後の実験は基質に対し水酸化カリウム 1% を使用、沸騰湯浴中で 10 分間加熱という条件で行なった。

2. エピメリ化物の分離

コージビオース 2g を 0.1% の水酸化カリウム水溶液 20 ml に溶解し、沸騰湯浴中で 10 分加熱してエピメリ化を行なった。反応終了後塩酸で中和し、希釈したのちこれを厚手濾紙により PPC を行ない、エピメリ化物に相当する糖を濾紙より切り取り、水で溶出して溶出液を濃縮して、白色粉末状のエピメリ化物を分離した。収量 532 mg, R_D 0.87, R_M 0.80, $[\alpha]_D^{20} = +72.0$ (c, 2.0: 水)。現在まで、結晶化は成功していない。この糖は、アエリンハイドロゲンフタレート (AHP)⁽⁷⁾で発色し、トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) 試薬⁽⁸⁾により発色を示さないで、1,2-結合を有すると推定される。

3. エピメリ化物の同定

エピメリ化物を希酸で完全分解すると、構成糖としてグルコースおよびマンノースが PPC により検出された。また、還元後部分分解を行なうと、還元糖としてグルコースのみが認められた。従ってエピメリ化物は、グルコースを非還元末端とするグルコースとマンノースからなる二糖、すなわちグルコシルマンノースであることが確認された。さらに、この糖の構造を確定するため、メチル化分析を行なった。メチル化は箱守法⁽⁹⁾により行ない、メチル化物をメタノリシスにより分解し、分解物のガスク

ロマトグラフィーによる分析を行なった。分解物の一部は、さらにトリメチルシリル (TMS) 化後、メチル化糖の TMS 誘導体として、ガスクロマトグラフィー分析を行なった。その結果、Fig. 1 に示すように分解物中のトリメチル糖のグリコシドに相当するピークは、 α -1,2 結合のマンノビオースを同様にメチル化

後、メタノリシスして得られた分解物中のトリメチルマンノース誘導体のピークと一致した。また Fig. 2 に示すように、TMS 化後の分解物には同様に、上記メチルトリメチルマンノサイドの 2-TMS 誘導体を確認した。以上の結果から、エピメリ化物は 1,2-結合を有するグルコシルマンノースであることが確認された。さらに、この糖は比較的高い非旋光度を有し、またアルカリ処理により、結合 (linkage) が $\alpha \rightarrow \beta$ 転換を起こすという報告も見当たらないので、2-O- α -D-glucosyl-D-mannose であると考えられる。

実 験

1. 実験材料 コージビオースは, *Leuconostoc*

Fig. 1. Gas Chromatogram of Methyl Derivatives.

(A) 2-O- α -D-glucosyl-D-mannose, (B) 2-O- α -D-mannosyl-D-mannose.

a: Me-2,3,4,6-tetra-O-Me- β -D-glucoside, b: Me-2,3,4,6-tetra-O-Me- α -D-glucoside, c: Me-3,4,6-tri-O-Me- β -D-mannoside, d: Me-3,4,6-tri-O-Me- α -D-mannoside, e: Me-2,3,4,6-tetra-O-Me- α -D-mannoside, f: Me-2,3,4,6-tetra-O-Me- β -D-mannoside.

Fig. 2. Gas Chromatogram of TMS-Derivatives of Methylated Sugars.

(A) 2-O- α -D-glucosyl-D-mannose, (B) 2-O- α -D-mannosyl-D-mannose.

a: Me-3, 4, 6-tri-O-Me-(2-O-TMS)- α -D-mannoside, b: Me-3, 4, 6-tri-O-Me-(2-O-TMS)- β -D-mannoside, c: Me-2, 3, 4, 6-tetra-O-Me- β -D-glucoside, d: Me-2, 3, 4, 6-tetra-O-Me- α -D-glucoside, e: Me-2, 3, 4, 6-tetra-O-Me- α -D-mannoside.

mesenteroides NRRL-B-1299 の生産するデキストランから調製した⁽¹⁰⁾. α -1,2 結合のマノノビオース (2-O- α -D-mannosyl-D-mannose) は, 山陽国策パルプ株式会社小川和鋭氏より分与されたものである.

2. 完全分解および部分分解 試料 1 mg に, 0.1 ml の 1 N 塩酸あるいは 0.1 N 塩酸を加え, 沸騰湯浴中 2 時間完全分解および部分分解を行ない, これを PPC に供した.

3. 還元 試料 1 mg に 0.2% 水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) 溶液 0.5 ml を加え, 1 晩還元後アンバーライト IR 120 (H^+ 型) で脱塩, 減圧下に濃縮してシラップ状としたものにメタノールを加えて, 減圧濃縮することを数回繰り返す, 糖アルコールを得た.

4. ペーパークロマトグラフィー ペーパークロマトグラフィーは定性には東洋濾紙 No. 50, 定量用には No. 51 を用いた. また反応生成物の分離には, 厚手濾紙東洋濾紙 No. 514 を用いた. 展開剤はピリジン:ブタノール:水 (4:6:3)⁽¹¹⁾ を用い, 上昇法 2 回展開後アニリンヒドロゲンフタレート (AHP)⁽⁷⁾, およびトリフ

ェニルテトラゾリウムクロライド (TTC)⁽⁸⁾ により発色した.

5. メチル化およびメタノリシス メチル化は, 箱守法⁽⁹⁾により行なった. 水素化ナトリウム (NaH) 120 mg に, ジメチルスルホキシド 1 ml を加え, 窒素気流中 65°C で 1 時間攪拌後室温に冷却し, メチルスルホニルカルバニオンを調製した. エピメリ化物 100 mg を 3 ml のジメチルスルホキシドに溶解し, これにさきに調製したカルバニオン溶液を加え, 室温で 1 晩攪拌しながら反応させ, メチル化を行なった. これらの過程は, すべて窒素気流中で行なった. 反応終了後水を加え, クロロホルムで 3 回抽出, 水洗後濃縮してメチル化糖を得た.

メチル化糖は 0.85 N メタノール性塩酸に溶解し, 封管中で 1.5 時間沸騰湯浴中で加熱し, メタノリシスを行なった. 炭酸銀で中和後, 減圧下に濃縮してシラップ状となし, これを少量のメタノールに溶解してガスクロマトグラフィーに供した.

6. ガスクロマトグラフィー メタノ

リシスにより得た分解物は, 一部はそのまま, 一部は山川⁽¹²⁾の方法に従いメチル化糖の TMS 誘導体を作って, ガスクロマトグラフィーに供した. なお対照試料として, α -1,2 結合のマノノビオースを用い, 同様の操作を経てメチル化糖および, その TMS 誘導体を調製した.

ガスクロマトグラフィーは, メチル化糖には柳本 G-8 型装置を用いた. カラムは, 10% poly-DEGS on Diasolid (L) を担体とするガラスカラム (225 $\times$ 0.3 cm) を用い, 200°C で行なった. 検出器は FID, 窒素ガスは 0.5 kg/cm² で流した. また, TMS 誘導体については島津 GC-4 A 型を用い, カラムは 5% DEGS on Chromosorb W を担体とするステンレスカラムを用いた. 温度は 160°C, 検出器は FID, 窒素ガスは 1.15 kg/cm² で流した.

本研究を進めるに当たり, ご助言くださった玉利勤治郎教授, 貴重な試料をくださり, またガスクロマトグラフィーに関してご助言くださった山陽国策パルプ株式会社, 小川和鋭氏に深謝いたします.

なお、本報告の要旨は1971年10月10日、日本農芸化学会東北支部第62回例会で発表した。

-
(1) C. A. Lobry de Bruyn and W. Alberda van Ekenstein : <i>Rec. Trav. Chim.</i> , 14 , 203 (1895).	A. Rebers and F. Smith : <i>Anal. Chem.</i> , 28 , 350 (1956).
(2) L. Hough. J. K. N. Jones and E. L. Richards : <i>J. Chem. Soc.</i> , 1953 , 2005.	(6) 貝沼圭二, 鈴木繁男 : 農化, 38 , 556 (1964).
(3) S. Peat, P. J. Roberts and W. J. Whelan : <i>Biochem. J.</i> , 51 , xvii (1952).	(7) S. M. Partridge : <i>Nature</i> , 164 , 443 (1949).
(4) S. N. Davilov and P. T. Postukhov : <i>Zhur. Obshchei Khim.</i> , 16 , 923 (1946).	(8) K. Wallenfels : <i>Naturwissenschaften</i> , 37 , 491 (1950).
(5) M. Dubois, K. A. Billes, J. K. Hamilton, P.	(9) S. Hakomori : <i>J. Biochem.</i> , 55 , 205 (1964).
	(10) 杉田和雄, 藤本健太郎, 麻生 清 : 農化, 35 , 1232 (1961).
	(11) A. Jeans, C. S. Wise and R. J. Dimler : <i>Anal. Chem.</i> , 23 , 415 (1951).
	(12) T. Yamakawa, N. Ueta and I. Ishizuka : <i>Japan J. Exp. Med.</i> , 34 , 231 (1964).
-