糖 類 の N M R

— ^{13}C NMRによる多糖の組成, コンホメーション, 動的構造の解析 —

斉 藤 肇*

NMR Studies on Carbohydrates.

— Application of ^{13}C NMR to Determine Composition, Conformation and Dynamics of Polysaccharides. —

Hazime SAITO*

A general NMR method is briefly described for the analysis of the conformational and configurational aspects of monosaccharides. It is also demonstrated that ^{13}C NMR provides an excellent tool for the determination of composition, sequence, conformation, and dynamics of polysaccharides, including those in the gel state. In addition, application of the method to elucidation of the dynamic structures of carbohydrates on the surfaces of intact cells is described.

Contents.

1. Introduction
2. Determination of conformational and anomeric aspects of monosaccharides
3. Tautomerism
4. ^{13}C NMR of oligosaccharides and polysaccharides
5. Polysaccharide gels
6. Carbohydrates on the surfaces of intact cells.

1. はじめに

糖類の溶液中での構造やコンホメーションの決定に, NMR 分析が欠かすことのできない手段となっていることはいうまでもない。測定装置のいちじるしい進歩によって, 測定対象も溶液試料にとどまらず, ゲルや intact な生体細胞組織における糖類の分析が可能となっている。後者の場合, 糖鎖の静的なコンホメーションにとどまらず, その動的構造が重要な機能をになっている可能性がきわめて大きい。

紙数の関係で, これまでに多数のデータが蓄積されている ^1H NMR の応用は他の総説¹⁻⁵⁾にゆずり, ここでは

ごく基本的な問題に触れるにとどめる。したがって, ^{13}C NMR のとくに多糖の組成, コンホメーション, 動的構造の解明への応用に重点をおいて解説することにした。

2. 単糖類のコンホメーションとアノマーの決定

ピラノースのコンホメーションは, 置換基同志の立体障害がない限り, いす型配置をとる。 α -D-グルコピラノースについて図1に示すように, C-2, C-3, C-5, O が作る平面に対して, C-4が上, C-1が下にくる構造⁴C₁と,

Fig. 1 Two conformers of α -D-glucopyranose.

* 国立がんセンター研究所 生物物理部 ()

* Biophysics Division, National Cancer Center Research Institute ()

その逆の ${}^1\text{C}_4$ の二通りのコンホマーが存在し得る。図 1 の α -D-グルコピラノースは当然 ${}^4\text{C}_1$ の方が安定であるが、糖の種類によって ${}^1\text{C}_4$ をとるとか、 ${}^4\text{C}_1 \leftrightarrow {}^1\text{C}_4$ の間の速い交換状態をとることもある⁴⁾。一般に、いす型構造をとると H-1 の ${}^1\text{H}$ NMR シグナルは axial にある方が equatorial にあるときよりも高磁場側にあることはよく知られている。したがって、 ${}^4\text{C}_1$ 構造では、 α - よりも β -アノマーの H-1 ${}^1\text{H}$ シグナルが高磁場側にあらわれている。図 2 (a) に示す 2-アミノ-2-デオキシガラクトース塩酸塩の ${}^1\text{H}$ NMR スペクトル⁶⁾ はこのような例の一つである。 ${}^1\text{C}_4$ 構造のときは、上で述べた場合の逆になることはいうまでもない。H-1, H-2 プロトン間の vicinal スピン結合定数 ${}^3J_{12}$ もコンホマー決定に用いることができるが、必ずしも一義的な結果を与えないことがあるので注意を要しよう。図 2 (b) に例示した ${}^{13}\text{C}$ NMR は、 ${}^1\text{H}$ NMR にくらべてピークの分離がよく、C-1 炭素のみならずすべてのピークが α -, β -アノマーの二種類に分裂しているのがみられる。同様に、アミノ基の ${}^{15}\text{N}$ NMR ピークも、 α -, β -アノマーの存在によって二本に

分裂するのがみられる (図 2 (c))。これらからわかるように、 ${}^{13}\text{C}$ や ${}^{15}\text{N}$ NMR スペクトルから、アノメリック炭素以外のピークからもアノマー比を決定できる利点がある反面、FTNMR 測定時のデータポイント、緩和時間とパルスの繰り返し時間の関係などに十分注意をはらっておく必要がある。単糖類やその誘導体の ${}^{13}\text{C}$ シフトデータおよびその帰属については、Rosenthal ら⁷⁾ の総説にくわしくまとめられている。ただし、初期の ${}^{13}\text{C}$ シフトの帰属は類似化合物との比較にもとづいて示されたものが多く、その後の研究でしばしば訂正されているので注意を要する。 $[1-{}^{13}\text{C}]$ 単糖類の ${}^{13}\text{C}$ - ${}^{13}\text{C}$ スピン結合にもとづく帰属 (表 1) や⁸⁾、 ${}^2\text{H}$ 置換による ${}^{13}\text{C}$ シフトの同位体効果にもとづく帰属⁹⁾ が最も信頼できる。その他、 ${}^2\text{H}$ 置換体を用いたものも信頼度が高い¹⁰⁻¹⁴⁾。 ${}^{13}\text{C}$ - ${}^1\text{H}$ スピン結合定数 ${}^1J_{\text{CH}}$ も、H-1 が axial にある時よりも equatorial にある方が約 10 Hz 大きく¹⁵⁻¹⁷⁾、後で述べるように多糖におけるヘキソースのコンホマー決定に利用することができる。また geminal ${}^2J_{\text{CC}}(\text{文献 18-21})$, ${}^2J_{\text{CC}}(\text{文献 8})$ がコンホマー依存性を示す他、vici-

Fig. 2 ${}^1\text{H}$, ${}^{13}\text{C}$ and ${}^{15}\text{N}$ NMR spectra of 2-amino-2-deoxy-D-galactose hydrochloride.⁶⁾

Table 1. ^{13}C chemical shifts and coupling constants of ^{13}C -labelled monosaccharides⁸⁾.

Compd	Chemical Shift (ppm) ^{a)}							Coupling constant (Hz) ^{b)}					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe	C-1,2	C-1,3	C-1,5	C-1,6	C-1, H-1	C-1, H-2
α -D-[1- ^{13}C]Glucose	93.6	73.2	74.5	71.4	73.0	62.3	—	46.0	—	~1.8	*	169.8	—
β -D-[1- ^{13}C]Glucose	97.4	75.9	77.5	71.3	77.4	62.5	—	46.0	~3.5	—	*	161.2	5.5
Methyl α -D-[1- ^{13}C]glucopyranoside	100.6	72.7	74.7	71.2	73.0	62.2	56.5	46.4	—	~1.7	3.2	*	—
Methyl β -D-[1- ^{13}C]glucopyranoside	104.6	74.6	77.4	71.2	77.3	62.4	58.5	46.8	~4.1	—	4.3	*	4.1 $\pm$ 1.0
α -D-[1- ^{13}C]Mannose	95.5	72.3	71.9	68.5	73.9	62.6	—	46.8	—	1.7	*	170.4	—
β -D-[1- ^{13}C]Mannose	95.2	72.8	74.8	68.3	77.6	62.6	—	42.4	4.3	—	*	160.7	c
Methyl α -D-[1- ^{13}C]mannopyranoside	102.2	71.4	72.1	68.3	73.9	62.5	56.1	47.0	—	2.3	3.0	*	*
Methyl β -D-[1- ^{13}C]mannopyranoside	102.3	71.7	74.5	68.4	77.6	62.6	—	43.8	3.4	—	4.0	*	*
α -D-[1- ^{13}C]Galactose	93.8	70.0	70.8	70.9	72.0	62.8	—	46.6	—	2.1	*	168.6	—
β -D-[1- ^{13}C]Galactose	98.0	73.6	74.4	70.4	76.6	62.6	—	46.0	3.7	—	*	162.7	5.7
α -D-[1- ^{13}C]Fucose	93.8	69.8	71.0	73.5	67.8	17.2	—	45.8	—	2.3	3.5	*	*
β -D-[1- ^{13}C]Fucose	97.8	73.4	74.6	73.1	72.3	17.2	—	46.0	4.1	—	3.5	*	*

a) TMS基準 b) *印はスピンの結合が存在することを示す。

nal $^3J_{\text{CCH}}$ がKarplusタイプの二面体角の依存性を示すことが知られている^{8, 20, 21)} (表1)。これらのデータは ^{13}C シフトの帰属のみならず、さらに多くのデータが蓄積されるとコンホメーション解析に有用な手段になることはいうまでもない。

フラノースのコンホメーションは、五員環上のすべての原子が同一平面にある構造ではなく、たとえば(1)

C(3') *endo* or 3E

のようにC-3'炭素が残りの原子で作られる平面より上にとびだした構造になる。これをC(3') *endo* または 3E であらわす。同様にC-2'炭素が上にとびだした 2E 構造もとて得るわけであるが、核酸中に存在するリボースやデオキシリボースのコンホメーションは $^3E \leftrightarrow ^2E$ 間の速い交換状態にある。それぞれのコンホマーの存在比は、 $^3J_{1',2'}$, $^3J_{3',4'}$ の ^1H , ^1H スピン結合定数の値から決定するのが常とう手段となっている²²⁾。フラノースの α - β -アノマーの決定は、化学シフト値によるのがよく(β -アノマーの ^1H シフトは α -アノマーよりも0.3 ppm 高磁場に

あらわれる), $^3J_{1',2'}$ による決定はあいまいさが残る^{23, 24)}。

3. 互変異性

ピラノース $\leftrightarrow$ フラノース平衡における互変異性体の存在比は ^1H および ^{13}C NMRスペクトルから容易に求めることができる。図3下段に示したD-リボースの ^{13}C スペクトルは、上段のD-リボース-5-リン酸にくらべて、はるかに多くのピークがみられる²⁵⁾。これは、後者はフラ

Fig. 3 ^{13}C NMR spectra of Rib 5P (Top) and Rib (bottom).²⁵⁾

ノース構造に固定されているのに対し、前者はピラノース(P)、フラノース(F)の混合物になっているからであ

る。初期のCW法による ^{13}C NMRデータはピラノースのみを検出しているので注意を必要があろう。図3下段のスペクトルから求めた、 β -リボピラノース、 α -リボピラノース、 β -リボフラノース、 α -リボフラノースの存在比は、58:22:13:8となり、 ^1H NMRから得られた値²⁶⁾ 56:20:18:6とほぼ一致している。 β -D-フラクトースを水に溶解すると、図4Aに示すように β -D-フラクトピラノ

を示している。一方、D-グルコース、D-マンノースは水溶液中で99%以上がD-ピラノース型であることが知られている。大容量試料管、高磁場(68 MHz)の ^{13}C NMR法によって、これらのフラノース体の検出が試みられた。この結果、 β -グルコフラノース($0.14 \pm 0.02\%$)、 α -グルコフラノース($\leq 0.05\%$)、 α -マンノフラノース($0.6 \pm 0.1\%$)、 β -マンノフラノース($0.3 \pm 0.1\%$)が検出されている^{28, 29)}。

4. オリゴ糖および多糖の ^{13}C NMR

オリゴ糖や多糖の結合様式や組成の決定には、かりに400 MHzクラスの高磁場NMRを用いても、 ^1H NMRのピークの分離が十分でなく、むしろ ^{13}C NMRスペクトルの方が威力を発揮する。オリゴ糖や多糖の ^{13}C NMRピークの帰属は³⁰⁻³⁶⁾表1に与えたような単糖類やその誘導体のデータをもとに、O-グルコシド結合に直接関与している炭素の ^{13}C シフトは低磁場側に5~10 ppmシフト、隣接炭素は高磁場側に約1 ppmシフトするという一般則によるのが普通である。表2に α -D-(1 $\rightarrow$ 4)グルカンについて例を示す³¹⁾。これらの帰属は、重水の中ではOH基がOD基に変ることにより、OH基に直接結合している炭素の ^{13}C シフトは0.11~0.15 ppm、隣接している炭素の ^{13}C シフトは0.03~0.06 ppmそれぞれ高磁場側にシフトすることがわかっており、帰属の確認に用いることができる⁹⁾。この方法で従来の帰属のいくつかが訂正されている。これらのデータ(特にアノメリック炭素の ^{13}C シフト)から、グルコシド結合の結合様式が容易に決定できるのである。

表2で興味があるのは、直鎖ポリマーのアミロースと環状のシクロデキストリンでC-1およびC-4の ^{13}C シフト値が最高4 ppmも異なっていることである³¹⁾。このような大きな違いは同一の結合様式をもつ多糖間ではみられないし、またシクロデキストリンの構造から考えて末

Fig. 4 ^{13}C NMR spectra of (a) D-fructose at pH recorded after dissolving the crystalline material, (B) equilibrium solution after 22 hr, and (C) equilibrium state of D-turanose at pH 5.²⁷⁾

ースの他に α -D-フラクトピラノースのピークが部分的に出現してくる²⁷⁾。22時間後のスペクトルは、 α -D-、 β -D-フラクトフラノースを含む4種類の糖の混合物に対応する。図4Cは、D-ツラノースの平衡状態での ^{13}C NMR

Table 2. Assignment of α -1 $\rightarrow$ 4 Polymers and Related Compounds³¹⁾

	Glucose α -anomer pD = 7	Methyl-4-O- methyl- α -D- glucopyrano- side pD = 14	Maltotriose pD = 7	Amylose		α -cyclodextrin		β -cyclodextrin	
				pD = 14	pD = 7	pD = 14	pD = 7	pD = 14	pD = 7
C1	93.1	101.1	101.0	102.9	100.9	103.3	102.5	104.0	102.9
C2	72.5	72.8	72.7	73.8	72.7	73.8	72.8	74.3	72.9
C3	73.8	76.1	74.5	75.4	74.5	75.3	74.4	75.1	74.1
C4	70.7	83.0	78.2	80.6	78.4	82.9	82.3	83.0	82.2
C5	72.5	72.1	72.4	72.6	72.4	73.2	73.1	73.1	73.1
C6	61.7	61.4	61.8	62.0	61.8	61.8	61.5	61.7	61.4

端基の影響でもない。Colsonらは、シクロデキストリンではグルコシド結合回りの自由回転が許されず、ある特定の二面角周辺の振動モードしかとり得ないための、コンホメーション依存性の ^{13}C シフト変化と説明している。 ^{13}C シフトは主として ^{13}C 核周辺の電子状態によって決定されるので、このようなコンホメーション依存性が当然あっていいはずであるが、通常の場合は速い分子内回転によって平均化された結果のみをみているのである。後でべるように、 β -D-(1 $\rightarrow$ 3)グルカンのグルコシド結合にあるC-1, C-3の ^{13}C シフトはヘリックス構造をとると約3ppm低磁場側にシフトすることが見い出されており³⁷⁻⁴¹⁾、糖類で ^{13}C シフトのコンホメーション依存性が存在することは確実である。オリゴ糖が蛋白に結合したとき、グルコシド結合の ^{13}C シフトがどのように変化をうけるかという問題はこれらの結果から見て興味ぶかい。

同一多糖で二種類以上の異なった結合様式をとる場合、それぞれの結合様式に応じて ^{13}C シグナルが分裂する。

Fig. 5 ^{13}C NMR spectra of the glucan from *Tremella mesenterica*.³¹⁾

これを利用して、結合様式のみならずシーケンスの決定に応用することができる。*Tremella mesenterica*のグルカンは、 α -D-(1 $\rightarrow$ 4), α -D-(1 $\rightarrow$ 6)結合が2:1の比で存在する。図5に示す ^{13}C NMRスペクトルでは、C-1, C-6 ^{13}C シグナル領域が明らかにそれぞれ3本に分裂して観測されている³¹⁾。これは、1 $\rightarrow$ 4, 1 $\rightarrow$ 6結合がランダムに分布しているのではなく、 $\cdots$ 1 $\rightarrow$ 4, 1 $\rightarrow$ 4, 1 $\rightarrow$ 6 $\cdots$ のくり返しシーケンスからなることを表わしているのである。同様に、*Serratia marcescens*から単離したマンナンの ^{13}C NMRスペクトル(図6)は⁴²⁾、ピーク強度を考慮すると $3 \times 6 = 18$ のピークに分裂している。 α -D-(1 $\rightarrow$ 2), α -D-(1 $\rightarrow$ 3)結合をもつオリゴマンナンの ^{13}C スペクトルピークと比較してこのマンナンは1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3

Fig. 6 ^{13}C NMR spectrum of mannan from *Serratia marcescens*.⁴²⁾

のシーケンスからなることがわかる。地衣から単離したグルカンは、その種類によって異なった組成比の α (1 $\rightarrow$ 3), α (1 $\rightarrow$ 4)結合からなっている。図7に示すように、1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4の結合の組成比はそれぞれC-3, C-4 ^{13}C シフトのピーク強度比から容易に決定することができ、地衣の分類に供することができる⁴³⁾。ただしこの場合は組成比が必ずしも整数にならず、シーケンス決定には至っていない。

さらに、1 $\rightarrow$ 4結合の β -D-マンヌロン酸と α -L-グルウロン酸のヘテロホモポリマー(2)のコンホメーション、シーケンス解析が ^{13}C NMRスペクトルによって行なわれ

Fig. 7 ^{13}C NMR spectra of lichen polysaccharides in aqueous solution (80 mg/ml, pH 14). [A. Lichenan, 72,900 transients; B. Isolichenan, 75, 120 transients; C. SJ-2-1, 13,000 transients; D. PC-3, 81, 168 transients; and E. SG-3.⁴³⁾

ている⁴⁴⁾。すなわち、図8Aに示すように、C-1およびC-5 ^{13}C シグナルはMG, GG, MM, GMおよびGMM, GMG(MMM), MMG(M: β -D-マンヌロン酸塩, G: α -L-グルウロン酸塩)のようにピークが分裂しており、シーケンス解析が三つのとなりあった残基の組合せで決定できるのである。図8Bのスペクトルから ^{13}C - ^1H スピン結合定数が求まり、すでに2. で述べた手法に従って、G, Mそれぞれのヘキソースの構造は $^1\text{C}_4$, $^4\text{C}_1$ であることもわかる。

微生物の細胞表層にある抗原性多糖の分類には、抗血清を用いた反応性の比較がよく用いられる。Smith, Je-

Fig. 8 ^{13}C NMR spectra of manuronate for an alginate sample from *Ascophyllum nodosum*⁴⁴⁾. A. C-1 and C-5 region, B. proton-coupled spectrum.

nningsら⁴⁵⁾は、*Neisseria meningitidis*の種々の血清群多糖の構造およびアセチル化部位の決定を行なった。血清群A多糖(図9A)は、下段(C)に示す *S. Lactis*の多糖(2-アセトアミド-2-デオキシマンノシルリン酸が1→6結合でつながったもの)の ^{13}C NMRスペクトルと比較して、部分的に3-位にO-アセチル化されたものであることがわかる。さらに、脱アセチル化反応で、血清群A多糖の ^{13}C NMRスペクトルは(B)となり、(C)と全く同一パターンになる。C-3', C-3のピーク強度を比較するとアセチル化の度合いを容易に見積ることができる。(C)のスペクトルで興味があるのは、上部の拡大図から

Fig. 9 ^{13}C NMR spectra of (A), the native serogroup A polysaccharide; (B) the de-O-acetylated serogroup A, and (C) polysaccharide from *S. lactis*.⁴⁵⁾

わかるように、C-1、C-5、C-6、C-2の4種類のピークがそれぞれダブルットに分裂していることである。これは ^{31}P - ^{13}C スピン結合によって分裂したもので、リン酸基からみて α 、 β 炭素が影響をうける。この分裂パターンを説明できるのは1 $\rightarrow$ 6結合だけであるにとどまらず、O-C、P-O間の二面角と ^{31}P - ^{13}C 結合のKarplusタイプの関係⁴⁶⁾から、この多糖のコンホメーションは高度にのびきった状態にあることが示された。また、シアル酸の多糖である血清群B、C⁴⁷⁾は2 $\rightarrow$ 8- α -および2 $\rightarrow$ 9- α -

結合のホモポリマーであること、アセチル化部位はC-7、C-8であることが示された。これに対し、大腸菌Bos-12株のシアル酸多糖は2 $\rightarrow$ 8- α /2 $\rightarrow$ 9- α のヘテロ多糖であることが ^{13}C NMRから決定されている⁴⁸⁾。

ポリ(ADP-リボース)(3)は、クロマチン中の酵素によって β -NAD $^{+}$ のニコチンアミド部位がはずれ、リボース-リボース結合によって重合したポリマーである。5'-AMPやADP-リボースに比べ、ポリマーのC-2' ^{13}C シフトは低磁場側に5 ppmシフトしており、1'' $\rightarrow$ 2'結合

Poly(ADP-Rib) 3

ADP-Rib 4

であることが容易にわかる。さらに、C-1'' ^{13}C シフトについてメチル-D-リボフラノシドのデータ^{49,50)}との比較、およびグルコシド結合形式による ^{13}C シフトの変化、の両者を検討して α -D-(1'' $\rightarrow$ 2')であることが明らかにされている²⁵⁾。さらに ^1H NMRスペクトルを用いて、モノマー構造の一つであるリボシルアデノシン 5',5'-(ビスフォスフェイト) (Ado(P)-Rib-P; 5)の構造およびコン

ホメーションの研究結果は上記の結論を支持している⁵¹⁾。最近、フラクトースを構成単位とする多糖イヌリンやレバンの結合様式や分岐に対する知見が ^{13}C NMRスペクトルによって得られている^{52,53)}。

直鎖構造に対して、分岐構造が生じると分岐点周辺の炭素の ^{13}C シフト変化が、さきにのべたグルコシド結合形式によって誘起される。これらのピーク強度の測定はガスクロマトグラフィーによる分析に対応するが、 ^{13}C NMR法は非破壊分析である。分岐構造についての知見は、分岐(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルカン³⁹⁻⁴¹⁾や種々のデキストラン^{34,55)} Streptococcus mutansの多糖についてなされた^{55 a,b)}。コンドロイチン硫酸 A, B, C は主としてグリコサミノグリカンからなるが、それぞれの構造にはかなりの heterogeneity があることが ^{13}C NMRスペクトルによって明らかにされた⁶⁶⁾。化学シフト, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ 値, Gd誘起緩和時間変化の実験から、L-イドウロン酸残基は α -配位

で $^1\text{C}_4(\text{L})$ コンホメーションを、アセトアミドデオキシ-D-ガラクトース残基は β -配位の $^1\text{C}_1(\text{D})$ コンホメーションをとっていることが報告されている。なおヘパリン^{58,59)}、種々のマンナン⁶⁰⁻⁶¹⁾、Klebsiella カプセル多糖⁶²⁾の ^{13}C NMRスペクトルについてはそれぞれ原報を参照されたい。

本節の最後に、最近の糖脂質の報告に触れておく。ガングリオシドは生体膜上にあって蛋白やホルモンのレセプターとしての機能を有すると考えられている。もちろんこれらの機能は末端のオリゴ糖部位の構造による可能性が大きい。ウシ脳ガングリオシド $\text{G}_{\text{M}1}$ の水溶液中でミセル状態の ^{13}C NMRピークの帰属がすでにのべたオリゴ糖のデータをもとになされ、 Ca^{2+} イオンの代りに添加した En^{3+} イオンによるスペクトル変化をもとにオリゴ糖部位のコンホメーションの検討がなされている⁶³⁾。また、この構成糖の水溶液中でのコンホメーションの検討が、主として ^{13}C スピン格子緩和時間のデータにもとづいてなされている^{64,65)}。セレブロシドの ^{13}C NMRスペクトルから、グルコシル部位はピラノシド構造で β -アノマー結合であることが示された⁶⁶⁾。血液型活性を示すグリコスフィンゴ脂質の構造解析がメチル化操作の後に ^1H NMRによって行なわれている⁶⁷⁾。

5. 多糖ゲル

多糖はゲルを作るものが少なくない。ゲルは一般には、分子鎖が化学的または物理的な架橋によって無限につながったもので、見かけ上固体状の性質を示す。このため、ゲル状態でのNMR測定は通常の高分解能の条件では困難のようにみえる。高分解能NMRスペクトルが観測できるためには、分子のセグメント運動の相関時間(平均静止時間)が少なくとも 10^{-7} 秒よりは短くなければならないからである。実際、 ϵ -カラゲナンの ^{13}C NMRスペクトルはゲル状態ではまったく消滅してしまうことが報告されている⁶⁸⁾。一般に、ゲルの性質を大きく決定する要素に架橋度がある。架橋度を大きくするとより固体様になるし、逆に小さくすると固体的な要素はより減少すると期待される。もちろん、この場合は分子鎖自身のフレキシビリティも考慮しなければならない。ゲル状態で ^{13}C NMRスペクトルが観測可能かどうかはこの架橋度に依存すると考えられるので、人為的に架橋度を調節し得る合成高分子の化学架橋によるゲルの ^{13}C NMR測定を試みた⁶⁹⁾。この結果、架橋度を増加させると ^{13}C スペクトルの線幅が著しく増加すると同時に、 ^{13}C スペクトルピークの強度も減少する。これは、架橋数が増すにつれて、分子鎖のからまりあいの程度が増してゆき、このためセ

グメント運動の相関時間が長くなるからである。実際、ゲルの架橋点およびその周辺部の分子運動は極端におそくなり、スペクトルの観測にはかからなくなる。これ以外の領域でも、分子鎖のからまりあいの程度に応じて、速い運動状態からおそい運動状態まで、相関時間に分布が出てくると考えてよい。架橋ポリビニルピロリドンの含水ゲルの T_1 , T_2 , NOE などの ^{13}C 緩和パラメータを測定し、相関時間が $\log\text{-}\chi^2$ 分布⁷⁰⁾に従うと仮定して、平均相関時間は水溶液の場合の2~3倍の $4\sim 8 \times 10^{-9}$ 秒が得られた。これは溶液の場合と同程度の速いセグメント運動がゲル中に存在することを示しているが、同時におそい分子運動の影響をうけて線幅が広がり得るわけである。デキストランを化学的に架橋して得られたゲルであるセファデックス G-75 の ^{13}C NMR スペクトルは⁷¹⁾、架橋によってピーク強度が著しく減少しているものの、線幅、ピーク位置はデキストランとはほぼ同じであることが報告されている。これは上記の結果から容易に理解できることと思われる。

カードランは *Alcaligenes faecalis* 変異株が産出する細胞外多糖で、数平均分子量 $\overline{DP}_n$ が 540 の分岐および他のグルコシド結合を全く含まない $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -グルカンである⁷²⁾。中性 pH の水にはまったく不溶であるが、懸濁液を 55°C 以上に加熱後室温に放冷すると弾性のあるゲルが得られる。このゲルの ^{13}C NMR を測定してみると、図 10 B に示すようにきわめて線幅の広いスペクトルが得られた³⁷⁾。下段のスペクトルはカードランのギ酸分解物を分画した $\overline{DP}_n$ 13 の水溶性グルカンによるもので、線幅、C-1、C-3 ^{13}C シフト位置が上段のゲルと著しく異なっている。このグルコシド結合に関与する ^{13}C シフトは、水溶液にくらべてゲルでそれぞれ 2.8, 3.0 ppm 低磁

Fig. 10 ^{13}C NMR spectra of elastic curdlan gel (B) and acid-degraded fraction (Dpn 13) (A).³⁷⁾

場側にシフトしており、その理由は前節でのべたグルコシド結合の自由回転が阻害されることによる。カードランのファイバー状態の X 線回折データは^{73,74)}、水を含んだ状態では一重ヘリックスの他に三重ヘリックスも存在することを示し、さらに 100°C 以上の温度で熱処理すると三重ヘリックスにかわる。二重ないし三重ヘリックスはこのゲルの架橋点としての役割りをはたし、上でのべたように ^{13}C NMR スペクトルには寄与し得ない。実際に図 10 のゲル試料の ^{13}C スペクトルは本来の 20~30% だけが観測され、残りの 70~80% 部分はピーク領域から消滅しているのである。それゆえ、ゲルの ^{13}C NMR ピークは ^{13}C シフト変化を考慮して一重ヘリックスコンホメーションにもとずくことが結論できる。C-6 ピークはヒドロキシメチルの内部回転の自由度があるため、本来ならば主鎖のピークでは観測できないような領域もピークに寄与し、消滅するのは 40% にすぎない。0.22 M NaOH 存在下でヘリックス→コイル転移（ゲル→ゾル転移）が起り、架橋点が全く消滅するので 100% のピーク強度が観測できるようになる（図 11）。なお、カードランゲルの ^{13}C NMR スペクトルの線幅はより rigid なヘリックス構

Fig. 11 ^{13}C NMR spectra of curdlan under various NaOH concentrations.³⁷⁾ (A) no NaOH, (B) 0.06 M NaOH, (C) 0.19 M NaOH and (D) 0.22 M NaOH

造を反映して 150~170 Hz に達する。また緩和パラメーターから平均相関時間を求めると 4×10^{-8} 秒程度の値が得られた。

(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルカンが作るゲルは多重ヘリックスが架橋点となるのであれば次に生じる疑問は、どの程度の分子鎖長になるとヘリックス構造をとり、さらに二、三重ヘリックス生成によって架橋が起こるのか、あるいは無限網目構造になるか、ということである。この問題に対しては種々の分子鎖長をもつグルカンの ^{13}C スペクトルを比較するのがよい³⁸⁾。種々の水不溶性画分を含むため、この実験にはコンホメーション変化をともなわない程度の低アルカリ ($\ll 0.22\text{ M}$) 条件で行なうのがよく、ヘリックスかランダムコイルかは C-1, C-3 の ^{13}C シフト位置から容易に決定できる。この実験から得られる結論は $\overline{\text{DP}}_n \geq 49$ のグルカンはヘリックス構造を、それ以下では、ランダム構造になることが明らかにされた。興味

があることに、ピーク強度を $\overline{\text{DP}}_n$ に対してプロットすると、 $\overline{\text{DP}}_n > 49$ の領域でシグモイダルな変化が起こり、 $\overline{\text{DP}}_n 300$ で一定値になる (図 12)。これは、分子がヘリックス構造をとると同時に多重ヘリックスによって網目構造が作られるが、少なくとも無限網目構造のゲルになるには $\overline{\text{DP}}_n > 300$ を要する、ということを示している。

主鎖が β -D-(1 $\rightarrow$ 3)結合で 3~5 残基あたり 1 個の割合で C-6 から分岐したグルカン (レンチナン, A_3 , シゾフィラン) が種々の茸から分離され、中性 pH でやわらかいゲルを形成する^{39~41)}。図 13 の最下段の ^{13}C NMR スペクトルには、レンチナンの β -D-(1 $\rightarrow$ 3)結合のピークは全く消滅しており、わずか 8% 含まれる β -D-(1 $\rightarrow$ 6)

Fig. 12 A plot of the peak intensities of C-1, C-3, and C-6, with respect to those of $\overline{\text{DP}}_n = 14$, by taking into account the differences in NOE values vs. $\overline{\text{DP}}_n$ of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans (0.06 M NaOH solution).³⁸⁾

Fig. 13 ^{13}C NMR spectra of lentinan under various NaOH concentrations.⁴¹⁾

結合のピークしか観測されていない^{40, 41)}。NaOHをゲル試料に加えていくと、0.06 M NaOHでカードランゲルでみられたのと全く同一のスペクトルが出現してくる。C-1, C-3の¹³Cシフトおよび線幅から、レンチナンの¹³C NMRで観測できる領域のコンホメーションは一重ヘリックスであり、ゲルの架橋は多重ヘリックスの生成によることが結論できる。ファイバー状態のX線回折データは、レンチナンは三重ヘリックスを示唆しており⁷⁵⁾、上の結論と矛盾しない。またランダムコイル構造(ゾル)への転換はカードランと同様0.19 M NaOH濃度に応じて徐々に変化していることである。レンチナンの β -D-(1 $\rightarrow$ 3)結合のピークが中性条件のゲルで全く消失することを考えあわせると、レンチナンの一次構造を高度に分岐した樹状構造と考えるのが妥当である⁴¹⁾。この場合、分岐構造のために種々の架橋構造ができ、架橋度の絶対量をふやすために¹³Cピークが消滅するわけである。しかし、直鎖状のカードランとは違って、アルカリ濃度に応じて切除される架橋点が異なるために、上でのべた転移が徐々におこるわけである。全く同様の結果が他の分岐(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルカン、シゾフィラン、A₃においてもみられる^{39, 41)}。

さらに、特異な粘性挙動をもつ多糖として*Xanthomonas campestris*から単離したXanthanガムがある^{76, 77)}。セルロースと同様に β -D-(1 $\rightarrow$ 4)グルカンの主鎖と一残基ごとに三個の糖からなる側鎖をもつが、室温ではヘリックス構造からなることが知られている。イオン強度にもよるが、70 $\sim$ 80 $^{\circ}$ 以上に加熱するとヘリックス $\rightarrow$ ランダム構造の転移がみられ、転移温度以上の温度では側鎖の末端にあるピルビン酸メチルとアセチルメチルの¹H NMRピーク強度が急激に増加するが、室温ではこれらがほとんど消滅している。筆者らが予備実験を試みたところ、これらのピークは室温においても¹³C NMRスペクトルでは十分観測可能であることがわかった⁷⁸⁾。これらの糖鎖のゆらぎの程度を知るには、¹³C NMRの方がより有利であろう。

酸がコア蛋白と結合しても、あるいはコラーゲンと相互作用があっても、スペクトルピークに全く変化がみられず、構造、運動状態には差異がみられないことを示している⁸⁰⁾。一方、コラーゲンのピークは高分解能スペクトルの条件では全く消滅しており、パパインで十分消化してはじめてスペクトル観測が可能になる⁸⁰⁾。この理由は、コラーゲンの分子運動の相関時間が10⁻⁶秒程度であり⁸¹⁾、¹³Cに隣接している¹Hからくる双極子磁場が十分に平均化されないためである。¹Hデカップリングのパワーを従来の40倍程度にあげた、いわゆる双極子デカップリング法を用いると^{80, 81)}、線幅を3 kHzに小さくすることができ、¹³C NMRピークの観測になる。¹³C-¹Hの交差分極(cross-polarization) NMR⁸²⁾は固体の高分解能¹³C NMRに適した手法で、試料を磁場に対して54 $^{\circ}$ かたむけて高速回転することによって双極子磁場を消去する“マジックアングル”スピニング⁸³⁾と組みあわせて用いると、固体高分子の¹³C NMRスペクトルが溶液中のスペクトルに匹敵する程度の線幅にすることができる。Schaeferら⁸⁴⁾は、この手法でセルロース、ヘミセルロース、リグニンなどからなる木材の高分解¹³C NMRスペクトルが観測可能になることを示している。同様に、ウシ鼻軟骨試料について、intact状態、凍結乾燥後、プロテオグリカンの抽出後、の¹³C NMRスペクトルを比較した⁸⁵⁾。プロテオグリカン中のmobileなコンドロイチン四硫酸のスペクトルはintactな状態でのみ観測されている。¹³C標識化合物を用いて、生合成的に¹³C標識を行ない、上記の手法によってさらに種々の細胞表層の多糖、糖脂質の状態がより明確になるであろう。

本稿は昭和53年度有機合成化学講習会—糖類化学の進歩—で用いたテキストをもとに、日本学術振興会—NSE RC交換プログラムにより、National Research Council of Canada滞在中に加筆訂正してまとめたものである。これらの機関に謝意を表したい。

(昭和54年6月14日受理)

6. Intact細胞表層の糖類

文 献

結合組織はコラーゲンとコンドロイチン四硫酸を主としたプロテオグリカンマトリックスからできている。特にコンドロイチン四硫酸は、細胞表層にブラシの毛のような形で分布しており、全体としてrigidな結合組織にあってもその運動性は十分大きくなると考えられる。実際にウシ鼻軟骨の¹³C NMRスペクトルを測定してみると、コンドロイチン四硫酸と全く同一パターンのスペクトルが得られている⁷⁹⁾。興味あることに、コンドロイチン硫

- 1) L. D. Hall, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **19**, 51 (1964)
- 2) T. D. Inch, *Ann. Rev. NMR Spec.*, **2**, 35 (1969)
- 3) J. J. M. Rowe, J. Hinton, K. Rowe, *Chem. Rev.*, **70**, 1 (1970)
- 4) P. L. Durette, D. Horton, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **26**, 49 (1971)
- 5) B. Coxon, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*,

- 27, 7 (1972)
- 6) B. Coxon, *Pure and Appl. Chem.*, **49**, 1151 (1977)
- 7) S. N. Rosenthal, J. H. Fendler, *Adv. Phys. Org. Chem.*, **13**, 279 (1976)
- 8) T. E. Walker, R. E. London, T. W. Whaley, R. Barker, N. A. Matwiyoff, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5807 (1976)
- 9) P. E. Pfeffer, K. M. Valentine, F. W. Parrish, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 1265 (1979)
- 10) H. J. Koch, A. S. Perlin, *Carbohydr. Res.*, **15**, 403 (1970)
- 11) P. A. J. Gorin, *Can. J. Chem.*, **52**, 458 (1974)
- 12) P. A. J. Gorin, M. Mazurek, *Can. J. Chem.*, **53**, 1212 (1975)
- 13) P. A. J. Gorin, *Carbohydr. Res.*, **39**, 3 (1975)
- 14) D. R. Bundle, H. J. Jennings, I. C. P. Smith, *Can. J. Chem.*, **51**, 3812 (1973)
- 15) A. S. Perlin, B. Casu, *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 2921
- 16) K. Bock, I. Lundt, C. Pedersen, *ibid.*, **1973**, 1037
- 17) K. Bock, C. Pedersen, *J. Chem. Soc. Perkin II*, **1974**, 293
- 18) J. A. Schwarcz, A. S. Perlin, *Can. J. Chem.*, **50**, 3667 (1972)
- 19) J. A. Schwarcz, N. Cyr, A. S. Perlin, *ibid.*, **53**, 1872 (1975)
- 19a) N. Cyr, G. K. Hamer, A. S. Perlin, *ibid.*, **56**, 297 (1978)
- 20) A. Parafondry, N. Cyr, A. S. Perlin, *Carbohydr. Res.*, **59**, 299 (1977)
- 21) T. W. Walker, R. E. London, R. Barker, N. S. Matwiyoff, *Carbohydr. Res.*, **60**, 9 (1978)
- 22) たとえば C. H. Lee, F. S. Ezra, N. S. Kondo, R. H. Sarma, S. S. Danyluk, *Biochemistry*, **15**, 3627 (1976)
- 23) R. U. Lemieux, D. R. Lineback, *Ann. Rev. Biochem.*, **32**, 155 (1966)
- 24) F. H. Hruska, A. A. Gray, I. C. P. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4088 (1970)
- 25) M. Miwa, H. Saitô, H. Sakura, N. Saikawa, F. Watanabe, T. Matsushima, T. Sugimura, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 3997 (1977)
- 26) R. U. Lemieux, J. P. Stevens, *Can. J. Chem.*, **44**, 249 (1966)
- 27) D. Doddrell, A. Allerhand, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2779 (1971)
- 28) D. J. Wilbur, C. Williams, A. Allerhand, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5450 (1977)
- 29) C. Williams, A. Allerhand, *Carbohydr. Res.*, **56**, 173 (1977)
- 30) T. Usui, N. Yamaoka, K. Matsuda, K. Tuzimura, H. Sugiyama, S. Seto, *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1973**, 2425
- 31) P. Colson, H. J. Jennings, I. C. P. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 8081 (1974)
- 32) P. Colson, R. K. King, *Carbohydr. Res.*, **47**, 1 (1976)
- 33) D. Y. Gagnaire, F. R. Taravel, M. R. Vignon, *Carbohydr. Res.*, **51**, 157 (1976)
- 34) F. R. Seymour, R. D. Knapp, S. H. Bishop, *Carbohydr. Res.*, **51**, 179 (1976)
- 35) Y. Inoue, R. Chûjô, *Carbohydr. Res.*, **60**, 367 (1978)
- 36) A. Heyraud, M. Rinaudo, M. Vincendon, *Biopolymers*, **18**, 167 (1979)
- 37) H. Saitô, T. Ohki, T. Sasaki, *Biochemistry*, **16**, 908 (1977)
- 38) H. Saitô, E. Miyata, T. Sasaki, *Macromolecules*, **11**, 1244 (1978)
- 39) H. Saitô, T. Ohki, Y. Yoshioka, F. Fukuoka, *FEBS Lett.*, **68**, 15 (1976)
- 40) H. Saitô, T. Ohki, N. Takasuka, T. Sasaki, *Carbohydr. Res.*, **58**, 293 (1977)
- 41) H. Saitô, T. Ohki, T. Sasaki, *ibid.*, **74**, 227 (1979)
- 42) H. Saitô, T. Ikekawa, to be published
- 43) I. Yokota, S. Shibata, H. Saitô, *Carbohydr. Res.*, **69**, 252 (1979)
- 44) H. Grasdalen, B. Larsen, O. Smidsrod, *Carbohydr. Res.*, **56**, C11 (1977)
- 45) D. R. Bundle, I. C. P. Smith, H. J. Jennings, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2275 (1974)
- 46) I. C. P. Smith, H. H. Mantsch, R. D. Lapper, R. Deslauriers, T. Schleich, "Conformation of Biological Molecules and Polymers" pp. 381-402 (ed by B. Pullman and E. D. Bergman), Academic Press, New York, 1973
- 47) A. K. Bhattacharjee, H. J. Jennings, C. P. Kenny, A. Martin, I. C. P. Smith, *J. Biol. Chem.*, **250**, 1926 (1975)
- 48) W. Egan, T.-Yung Liu, D. Dorow, J. S. Cohen, J. D. Robbins, E. Gotschlich, J. B. Robbins, *Biochemistry*, **16**, 3687 (1977)
- 49) P. A. J. Gorin, M. Mazurek, *Carbohydr. Res.*, **48**, 171 (1976)
- 50) R. G. S. Ritchie, N. Cyr, B. Korsch, H. J. Koch, A. S. Perlin, *Can. J. Chem.*, **53**, 1424 (1975)
- 51) F. Inagaki, T. Miyazawa, M. Miwa, H. Saitô, T. Sugimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 415 (1978)
- 52) H. C. Jarrell, T. F. Conway, P. Moyna, I. C. P. Smith, *Carbohydr. Res.*, in press.
- 53) F. R. Seymour, R. D. Knapp, J. E. Zweig, S. H. Bishop, *ibid.*, **72**, 57 (1979)
- 54) F. D. Seymour, R. D. Knapp, S. H. Bishop,

- Carbohydr. Res.*, **51**, 179 (1976)
- 55) F. D. Seymour, R. D. Knapp, S. H. Bishop, A. Jeans, *ibid.*, **68**, 123 (1979)
- 55a) T. Usui, H. Sugiyama, S. Seto, S. Araya, T. Nishizawa, S. Imai, K. Kosaka, *J. Biochem* (Tokyo), **78**, 225 (1975)
- 55b) P. Colson, H. C. Jarrell, B. L. Lamberts, I. C. P. Smith, *Carbohydr. Res.* **71**, 265 (1979)
- 56) G. K. Hamer, A. S. Perlin, *Carbohydr. Res.* **49**, 37 (1976)
- 57) A. S. Perlin, N. M. K. Ng Ying Kin, S. S. Bhattacharjee, L. F. Johnson, *Can. J. Chem.* **50**, 2437 (1972)
- 58) A. S. Perlin, N. M. K. Ng Ying Kim, S. S. Bhattacharjee, L. F. Johnson, *Can. J. Chem.*, **50**, 2437 (1972)
- 59) A. S. Perlin, *Fed. Proceedings*, **36**, 106 (1977)
- 60) P. A. J. Gorin, J. F. T. Spencer, *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1709 (1972)
- 61) P. A. J. Gorin, R. H. Haskins, L. H. Travassos, L. M. -Previato, *Carbohydr. Res.* **55**, 21 (1977)
- 62) J. M. Berry, G. G. S. Dutton, L. D. Hall, K. L. Mackie, *Carbohydr. Res.*, **53**, C 8 (1977)
- 63) L. O. Sillerud, J. H. Prestegard, R. K. Yu, D. E. Schafer, W. H. Konigsberg, *Biochemistry*, **17**, 2619 (1978)
- 64) M. F. Czarniecki, E. R. Thorton, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8273 (1977)
- 65) M. F. Czarniecki, E. R. Thorton, *ibid.*, **99**, 8279 (1977)
- 66) T. A. W. Koerner, Jr., L. W. Cary, S. -C. Lin, Y. -T. Li, *J. Biol. Chem.*, **254**, 2326 (1979)
- 67) K. -E. Falk, K. -A. Karlsson, B. O. Samuelsson, *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 164, 177, 191 (1979)
- 68) T. A. Bryce, A. A. McKinnon, E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom, *Farad. Discussion Chem. Soc.*, **1974**, 221
- 69) K. Yokota, A. Abe, S. Hosaka, I. Sakai, H. Saitô, *Macromolecules*, **11**, 95 (1978)
- 70) J. Schaefer, *ibid.*, **6**, 882 (1973)
- 71) A. J. Benesi, J. T. Gerig, *Carbohydr. Res.*, **53**, 278 (1977)
- 72) T. Harada, "Extracellular Microbial Polysaccharide" ACS Symp No. 45, pp. 265-283 (1977)
- 73) H. Takeda, N. Yasuoka, N. Kasai, T. Harada, *Polymer J.*, **10**, 365 (1978)
- 74) R. H. Marchessault, Y. Deslandes, K. Ogawa, P. Sundarajan, *Can. J. Chem.*, **55**, 300 (1977)
- 75) T. L. Bluhm, A. Sarko, *Can. J. Chem.*, **55**, 293 (1977)
- 76) E. R. Morris, D. A. Rees, G. A. Young, M. D. Walkinshaw, A. Darke, *J. Mol. Biol.* **110**, 1 (1977)
- 77) E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom, E. J. Welsh, "Cell Surface Carbohydrates and Biological Recognition" V. T. Marchesi, V. Ginsburg, P. W. Robbins and C. F. Fox (ed.) Alan R. Lis Inc. New York, 1977, pp. 11-26
- 78) H. Saitô, et al. unpublished
- 79) C. F. Brewer, H. Keiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 3421 (1975)
- 80) D. A. Torchia, M. A. Hasson, V. C. Hascall, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3617 (1977)
- 81) D. A. Torchia, D. L. Vander Hart, *J. Mol. Biol.* **104**, 315 (1976)
- 82) A. Pines, M. G. Gibby, J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.*, **59**, 569 (1973)
- 83) J. Schaefer, E. O. Stejskal, R. Buchdahl, *Macromolecules*, **8**, 291 (1975)
- 84) J. Schaefer, E. O. Stejskal, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1031 (1976)
- 85) J. Schaefer, E. O. Stejskal, C. F. Brewer, H. D. Keiser, H. Sternlicht, *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 657 (1978)