

植物細胞壁多糖構成中性糖及び各種グルコ二糖類の 陰イオンクロマトによる分析

Analysis of neutral sugar composition of polysaccharide from the plant cell walls and of glucobioses by anion-exchange chromatography

加藤 陽 治*・伊藤 聖 子*†・渡辺 敏 幸**

Yoji KATO*, Seiko ITO*†, and Toshiyuki WATANABE**

【論文要旨】

植物細胞壁多糖を構成する主な中性単糖7種とグルコ二糖類を、短時間で連続的に分離同定する方法として、パルスドアンペロメトリー検出（金電極）付きのイオンクロマトDX-300（日本ダイオネクス社）による陰イオンクロマトグラフィー（HPAEC）を用いての条件検討を行った。

その結果、溶離液として超純水を用いることにより、目的の中性単糖7種（L-フコース、L-アラビノース、L-ラムノース、D-ガラクトース、D-グルコース、D-キシロース、D-マンノース）を分離することができた。また、中性単糖分析と同様のCarboPac PA1カラムを用い、グラジェント溶出によって、 α -グルコ二糖類 { α 、 α -トレハロース [α -D-Glc(1→1)- α -D-Glc]、コージビオース [α -D-Glc(1→2)-D-Glc]、ニゲロース [α -D-Glc(1→3)-D-Glc]、マルトース [α -D-Glc(1→4)-D-Glc]、イソマルトース [α -D-Glc(1→6)-D-Glc]} 及び β -グルコ二糖類 { β 、 β -トレハロース [β -D-Glc(1→1)- β -D-Glc]、ソホロース [β -D-Glc(1→2)-D-Glc]、ラミナリビオース [β -D-Glc(1→3)-D-Glc]、セロビオース [β -D-Glc(1→4)-D-Glc]、ゲンチオビオース [β -D-Glc(1→6)-D-Glc]} の分離・同定が可能であるとわかった。このことから、植物細胞壁多糖構成中性単糖及びグルコ二糖の分析が、ダイオネクスのCarboPac PA1カラムにより、多糖の酸加水分解物及び部分分解物の分離同定を迅速に行えることが示唆された。

キーワード：細胞壁多糖，中性単糖，グルコ二糖類，陰イオンクロマトグラフィー

1. 緒言

植物細胞壁を構成する多糖は、一般に熱水、シユウ酸アンモニウム、キレート剤EDTA、メタリン酸などによって抽出されるペクチン質画分、それに続く4～24%の水酸化カリウム（水酸化ナトリウム）などのアルカリで抽出されるヘミセルロース画分、そして、アルカリ抽出残渣、セルロース画分に大きく分けることができる¹⁾。

ペクチン質画分には、ラムノガラクトツロナン、アラビナン及びアラビノガラクトナンなどのガラクト系多糖、ヘミセルロース画分には、(1→3)- β -D-グルカン、(1→3)、(1→4)- β -D-グルカン、

アラビノキシランなどのキシラン系多糖及びキシログルカンであり、セルロース画分は、(1→4)- β -D-グルカンである。これら細胞壁、あるいはペクチン質、ヘミセルロース、セルロースの各画分から分離精製した多糖を構成している単糖組成を知る際、それぞれを酸で加水分解し、生成した単糖類を種々のクロマトグラフィーで分離同定している^{1,2)}。

高等植物細胞壁多糖を構成している単糖類は、ヘキソースとしてD-グルコース、D-ガラクトース及びD-マンノース、ペントースとしてL-アラビノース、D-キシロース、メチルペントースとしてL-ラムノースとL-フコース、それに酸性糖としてD-ガ

*弘前大学教育学部家政学科講座

Department of Home Economics, Faculty of Education, Hirosaki University

**福島大学教育学部

Faculty of Education, Fukushima University

†現(有)オリジン生化学研究所（東京）

Origin Biochemical Laboratory Inc.

ラクツロン酸とD-グルクロン酸が主なものである。これら単糖類の分離同定には、種々の方法が知られている。我々はこれまで、これら細胞壁多糖構成単糖のなかでも、主要な中性単糖をアルジトールトリフルオロアセテートにした後、GLCにて分析を行っていた。一方、HPLCによる分析方法も用いられているが、誘導体化する必要があり迅速的ではない。さらに、現在では蛍光分析(HPLC)なども用いられている。

HPLCでは、単糖類2分子が縮合した二糖類なども分析されている。二糖類は、同一の単糖類の結合であっても、縮合するOH基の位置が異なれば、異なる二糖類が生成する。例えば、グルコースからなる二糖類でも、 α, α -トレハロース($\alpha 1-\alpha 1$ 結合)、コージビオース($\alpha 1-2$ 結合)、ニゲロース($\alpha 1-3$ 結合)、マルトース($\alpha 1-4$ 結合)、イソマルトース($\alpha 1-6$ 結合)があり、また、 β, β -トレハロース($\beta 1-\beta 1$ 結合)、ソホロース($\beta 1-2$ 結合)、ラミナリビオース($\beta 1-3$ 結合)、セロビオース($\beta 1-4$ 結合)及びゲンチオビオース($\beta 1-6$ 結合)がある。グルコ二糖の結合位置の違いは、物理的性質や生理的機能性の違いにも影響することが多数報告されている。

我々の研究室ではこれまで、糖組成分析の迅速化及びオリゴ糖の簡便な分析法の検討を進めてきた。今回、植物細胞壁多糖構成中性単糖とグルコ二糖類の分離同定について、陰イオンクロマトを用いて検討した結果を報告する。

2. 実験方法

1) 試料

市販の標準中性単糖であるフコース(L-Fuc)、アラビノース(L-Ara)、ラムノース(L-Rha)、ガラクトース(D-Gal)、グルコース(D-Glc)、キシロース(D-Xyl)及びマンノース(D-Man)の7種を超純水に溶解し、それぞれ0.1 μ mol相当量を含むスタンダード混合溶液1mlを試料として用いた。また、内部標準物質として2-デオキシグルコース(2-DG)を用いた。

また、グルコ二糖として、 α, α -トレハロース [α -D-Glc(1 \rightarrow 1)- α -D-Glc]、コージビオース [α -D-Glc(1 \rightarrow 2)-D-Glc]、ニゲロース [α -D-Glc(1 \rightarrow 3)-D-Glc]、マルトース [α -D-Glc(1 \rightarrow 4)-D-Glc]、イソマルトース [α -D-Glc(1 \rightarrow 6)-D-Glc]、 β, β -トレハロース [β -D-Glc(1 \rightarrow 1)- β -D-Glc]、ソホロース [β -D-Glc(1 \rightarrow 2)-D-Glc]、ラミナリビオース [β -D-Glc

(1 \rightarrow 3)-D-Glc]、セロビオース [β -D-Glc(1 \rightarrow 4)-D-Glc]及びゲンチオビオース [β -D-Glc(1 \rightarrow 6)-D-Glc]を用いた。

2) 中性単糖の分析

中性単糖のスタンダード溶液を、パルスドアンペロメトリー検出陰イオンクロマトグラフィー(HPAEC分析)にて分離・定量を行った。HPAEC分析は、パルスドアンペロメトリー検出(金電極)付きのイオンクロマトDX-300(日本ダイオネクス社)を用い、分離カラムはCarboPac PA1(日本ダイオネクス社)を、ガードカラムはCarboPac PA1 GUARD(日本ダイオネクス社)を用いた³⁾。分析条件は、はじめに溶離液として16mM水酸化ナトリウム(糖分析標準溶離液)を用い、グラジェントをかけるなどして最適分離条件を検討した。

3) グルコ二糖類の分析

グルコ二糖類の分析も上述の2)と同様に、パルスドアンペロメトリー検出陰イオンクロマトグラフィー(HPAEC分析)を行った。溶離液はA液として100mM水酸化ナトリウム、B液として100mM水酸化ナトリウム/500mM酢酸ナトリウムを用い、A液100%(開始0分)~70%(30分後)、B液0%(開始0分)~30%(30分後)の直線的グラジェントで1.0ml/分の流速で行った。

3. 結果及び考察

多糖の糖組成を分析するには、多糖を酸加水分解などで単糖類に分解し、それから種々の方法で中性単糖類(L-Rha, L-Fuc, L-Ara, D-Xyl, D-Glc, D-Gal, D-Man)の分離・定量を行う。

PPC及びTLC分析は、加水分解で調製したサンプルをそのまま濾紙及び薄層上に負荷して多重展開を行い、個々の単糖類を識別できる。しかし、その状態からは定量することはできず、さらに定量分析を必要とするものである。さらに、この分析は数時間から場合によっては半日以上の時間を要することもあり、数多くの試料を分析する時などは好ましくない。そして、当研究室で主に用いてきたGLC分析は、加水分解で得られた単糖をアルジトールアセテートなどの誘導体化する必要があり、この分析法によって分離・定量が同時に可能となるが、分析の前処理に非常に時間を要するものである。また、HPLC分析は、GLC分析に比

べると誘導体化の前処理なしに直接クロマトグラフィーにかけられ、PPCやTLCと同程度のサンプル量で数十分のオーダーで分析が可能となり、修飾することなく分離精製したものを分取できることなど利点が多い。しかし、HPLCの一つ、単糖に蛍光標識をつけて高感度選択的検出をする方法は、個々の糖を特異的に認識できないという欠点もある。もう一つ、そのままクロマトグラフィーにかける方法もあるが、これはカラムの種類によって分離できるものと分離できないものがあるため、その目的に合わせてその都度カラムを変えなければならない。これは、連続分析には適さないものと考えられる。

そこで、HPAEC分析は、多糖の酸加水分解物をすぐにクロマトにかけられ、分析に要する時間の短縮及び微量分析が可能で、多糖構成単糖の分析には非常に有効な方法である。HPAEC分析が最も簡便であるとし、その測定条件を検討した。これまで、HPAEC分析での中性単糖の分離には、16mM NaOHを溶離液として用いて行われてきたが、図1のAより、7種の中性単糖のいくつかのピークが重なって検出された。この条件ではすべてを分離できず、それぞれの糖を定量することもできなかった。そこで、7種の中性単糖を分離できるまで溶離液のアルカリ濃度を薄くしていった結果、図1のBに示したように超純水のみを使用することで、7種の中性単糖すべてを分離・定量することが可能であるとわかった。

一方、食品中の糖質の分析にも、各種クロマトが使用されている。食品中の糖質のなかでもグルコ二糖類に注目し、含有食品と構造を表1にまとめた^{2,4,5)}。 α -グルコシド結合のコージビオース [α -D-Glc(1 \rightarrow 2)-D-Glc] やニゲロース [α -D-Glc(1

\rightarrow 3)-D-Glc]、イソマルトース [α -D-Glc(1 \rightarrow 6)-D-Glc]は清酒中の酷味成分として知られており、コージビオースは抗う蝕性、イソマルトースはビフィズス菌の増殖を促進することなども報告されている⁶⁾。また、トレハロースは非還元性オリゴ糖で、デンプンの老化防止や骨粗鬆症改善効果などが報告されている^{7,8)}。近年では、グルコ二糖はインターロイキン12 (IL-12) 依存症の1型ヘルパーT細胞 (Th) タイプの免疫応答の活性化を通して免疫を賦活することが報告されるなど^{9,10)}、生理的機能が注目されている。 β -グルコシド結合のゲンチオビオースは、糖類の中でも甘味ではなく苦味を呈するグルコ二糖であり、構成糖が同じでも、結合位置によって様々な性質を示す。これらオリゴ糖の構造解析の一手法として、部分分解とそれに引き続くオリゴ糖分析が一般になされている。オリゴ糖分析にはHPLCが主に用いられ¹¹⁻¹³⁾、グルコ二糖のような結合位置異性体は高感度分析が必要となるが、迅速に行える方法は少な

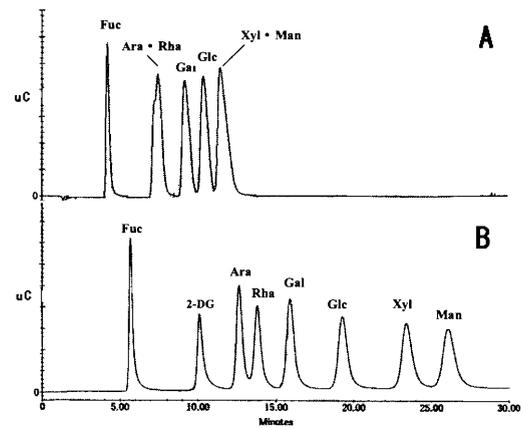


図1 中性単糖のHPAECクロマトグラム
溶離液…A: 16mM NaOH, B: 超純水

表1 食品中のグルコ二糖類

グルコ二糖	食品	構造
トレハロース	椎茸・しめじ・マッシュルーム・酵母	α -D-Glc(1 \rightarrow 1)- α -D-Glc
コージビオース	清酒・蜂蜜	α -D-Glc(1 \rightarrow 2)-D-Glc
ニゲロース	清酒・蜂蜜・みりん・ビール	α -D-Glc(1 \rightarrow 3)-D-Glc
マルトース	麦芽・蜂蜜・デンプン	α -D-Glc(1 \rightarrow 4)-D-Glc
イソマルトース	清酒・蜂蜜・水飴	α -D-Glc(1 \rightarrow 6)-D-Glc
ソホロース	エンジュ (薬用植物)	β -D-Glc(1 \rightarrow 2)-D-Glc
ラミナリビオース	褐藻 (コンブ,ワカメ)	β -D-Glc(1 \rightarrow 3)-D-Glc
セロビオース	野菜や果実などのセルロース	β -D-Glc(1 \rightarrow 4)-D-Glc
ゲンチオビオース	蜂蜜	β -D-Glc(1 \rightarrow 6)-D-Glc

い。微量で定量分析が可能な4アミノ安息香酸エチルエステル標識化法 (ABEE標識化法) を用いた高感度分析¹⁴⁻¹⁶ や α -グルコシダーゼ分解物 (マルトオリゴ糖・ニゲロオリゴ糖) のHPAEC分析¹⁷ について一部報告されているが、我々は、 α -及び β -グルコニ糖類を簡便に分離・同定する方法として、HPAEC分析を試みた。中性単糖分析と同様のCarboPac PA1カラムを用い、前処理なしにグラジェント溶出した結果、結合位置の異なる各 α -グルコニ糖 (図2) 及び β -グルコニ糖 (図3)

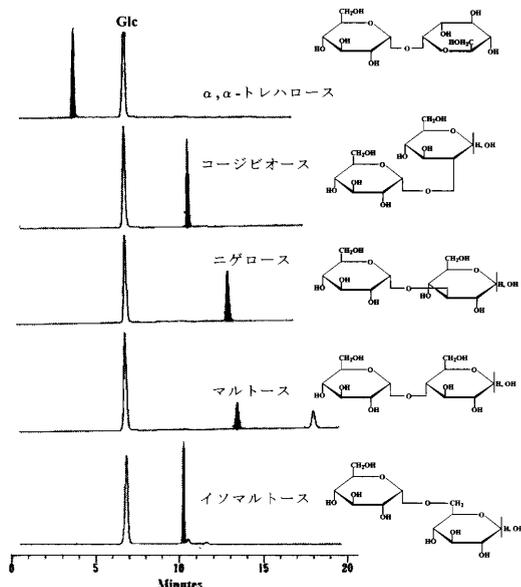


図2 α -グルコシド結合グルコニ糖類のHPAECクロマトグラム

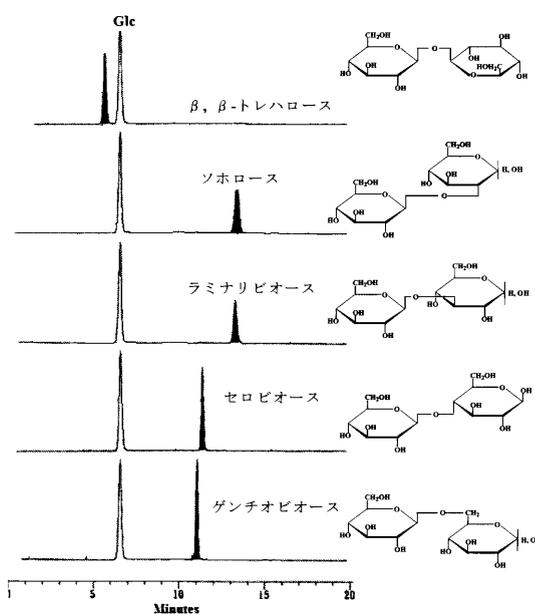


図3 β -グルコシド結合グルコニ糖類のHPAECクロマトグラム

の分離・同定が可能であるとわかった。

以上の結果から、HPAEC分析によって、中性単糖とグルコニ糖類の分離・定量を迅速に行えることが示された。我々は、細胞壁多糖の詳細構造解析法として、キシログルカン多糖の、HPAECを用いた構成オリゴ糖単位での分析結果を報告しており^{18, 19}, CarboPac PA1カラムを用い、溶離液や溶出グラジェントを検討することで、様々な糖質の微量分析が可能である。また、糖質の生理的機能についても注目される近年、詳細な構造解析ができると同時に、機能性食品素材の分析も簡便に行える方法として非常に有効であると考え

引用文献

- 1) 桜井直樹, 山本良一, 加藤陽治: *植物細胞壁と多糖類*, 培風館 (1991)
- 2) 新家龍, 南浦能至, 北畑寿美雄, 大西正健: *食品成分シリーズ, 糖質の科学*, 朝倉書店 (1995)
- 3) 高性能イオン交換クロマトグラフィーとパルスドアンペロメトリ検出 (HPAE-PAD) 法による糖質の分析 (第4版), 日本ダイオネクス株式会社 (1999)
- 4) Aso, K., and Watanabe, T.: Studies on beer. Part II. Gluco-bioses in beer. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **35**, 1078-1082 (1961)
- 5) Weston, R.J., and Brocklebank, L.K.: The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chem.*, **64**, 33-37 (1999)
- 6) Kohmoto, T., Fukui, F., Takaku, H., Machida, Y., Arai, M., and Mitsuoka, T.: Effect of isomalto-oligosaccharide on human fecal flora. *Bifidobact. Microflora*, **7**, 61-69 (1988)
- 7) Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., and Carroll, J.D.: New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, **13**, 17R-27R (2003)
- 8) 久保田倫夫: トレハロースの新しい機能. *New Food Industry*, **44**, 1-8 (2002)
- 9) Murosaki, S., Muroyama, K., Yamamoto, Y., Kusaka, H., and Yoshikai, Y.: Immunopotentiating activity of nigerooligosaccharides for the T helper 1-like immune response in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**,

- 373-378 (1999)
- 10) Murosaki, S., Muroyama, K., Yamamoto, Y., Liu, T., and Yoshikai, Y. : Nigerooligosaccharides augments natural killer activity of hepatic mononuclear cells in mice. *Int. Immunopharmacol.*, **2**, 151-159 (2002)
 - 11) Koizumi, K., Okada, Y., and Fukuda, M. : High-performance liquid chromatography of mono- and oligo-saccharides on a graphitized carbon column. *Carbohydr. Res.*, **215**, 67-80 (1991)
 - 12) Shiota, M., and Kobayashi, S. : Analyses of α -linked disaccharides of D-glucose by high-performance liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, **215**, 203-209 (1991)
 - 13) Suzuki, J., Konda, A., Kato, I., Hase, S., and Ikenaka, T. : Analysis by high-performance anion-exchange chromatography of component sugars as their fluorescent pyridylamino derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 283-284 (1991)
 - 14) Yasuno, S., Murata, T., Kokubo, K., Yamaguchi, T., and Kamei, M. : Two-mode analysis by high-performance liquid chromatography of p-aminobenzoic acid ethyl ester-derivatized monosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1944-1946 (1997)
 - 15) Kobayashi, I., Yasuno, S., Hashimoto, H., Ikura, K., Nakano, H., and Kitahata, S. : Analysis of positional isomers of α -linked oligosaccharides by p-aminobenzoic acid ethyl ester-conversion method. *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 461-468 (2002)
 - 16) Kobayashi, I., Tokuda, M., Hashimoto, H., Konda, T., Nakano, H., and Kitahata, S. : Purification and Characterization of a new type of α -glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce α -1,3- and α -1,2-linked oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 29-35 (2003)
 - 17) Yamamoto, T., Unno, T., Watanabe, Y., Yamamoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Chiba, S., and Kimura A. : Purification and characterization of *Acremonium implicatum* α -glucosidase having regioselectivity for α -1,3-glucosidic linkage. *Biochim Biophys Acta.*, **1700**, 189-198 (2004)
 - 18) Konishi, Y., Mitsuishi, Y., and Kato, Y. : Analysis of the oligosaccharide units of xyloglucans by digestion with isoprimeverose-producing oligoxyloglucan hydrolase followed by anion-exchange chromatography. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **45**, 401-405 (1998)
 - 19) Kato, Y., Ito, S., and Mitsuishi, Y. : Study on the structures of xyloglucans using xyloglucan specific enzymes. *TIGG*, **16**, 393-406 (2004)
- (2005. 7. 29受理)