

糖質化学的手法を活用するラマン分光法による診断法の開発

日本大学工学部 生命応用化学科 小林厚志

1 緒言

生物は時間の経過とともに老化する。これは、生物は誕生してから分子レベルでの不可逆的な変化を重ねていくためである。その分子レベルでの変化が視認可能、または、生化学検査などにより顕在化する前に、個体ごとにその老化のレベルを知ることは健康寿命を延ばす上で必要なことである。分子レベルでの変化は、個体への影響を考えると非破壊的な方法であることが望ましい。そこで本研究では、非破壊的な手段で分子の変化を追跡可能なラマン分光法に焦点を当て、生体内分子の変化を観察する方法の開発を目指した。そのモデル系として細胞外に豊富に存在する糖質を採用し、①多糖類である澱粉の状態変化の観察 ②糖脂質の酵素合成に適した酵素のハイスループットな検出法について検討したので報告する。

2 ラマン分光法による多糖類の構造解析

当グループではこれまでに、澱粉のゲル化に対するオキソ酸イオンの影響について検討してきた。特に影響の大きかったホウ酸イオン（ホウ酸イオン源として四ホウ酸ナトリウムを用いた）の影響について詳細に検討したところ、添加効果が澱粉の構成成分によって異なることが分かった。直鎖状のアミロースを主成分とする可溶性澱粉ではゲル形成能の低下が、分岐構造を有するアミロペクチンを主成分とする天然型澱粉ではゲル形成能の向上が見られた(Figure 2)。さらにこれら澱粉ゲルの保水能に対するホウ酸イオンの添加効果を調べるために、加温条件下(100 °C)での重量減少を測定したところ、可溶性澱粉ではその影響が見られなかったが、トウモロコシ澱粉では重量減少速度が小さくなった¹⁾(Figure 2)。以上のことにより、澱粉の種類によりホウ酸イオンの存在形態が異なることを予想した。

最近、これらゲル中におけるホウ酸イオンの存

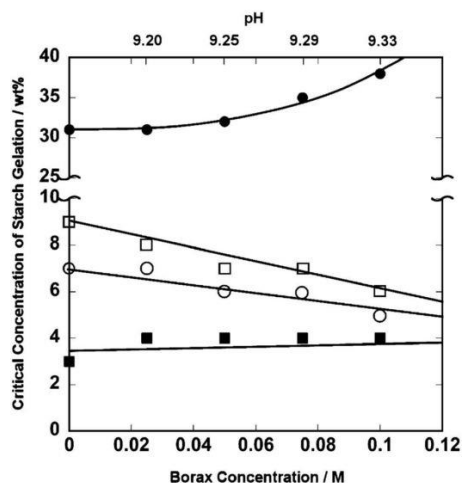


Figure 1 澱粉のゲル化に必要な最少濃度に対するホウ砂の添加効果。●可溶性澱粉、○トウモロコシ澱粉 ■バレイショ澱粉、□コムギ澱粉

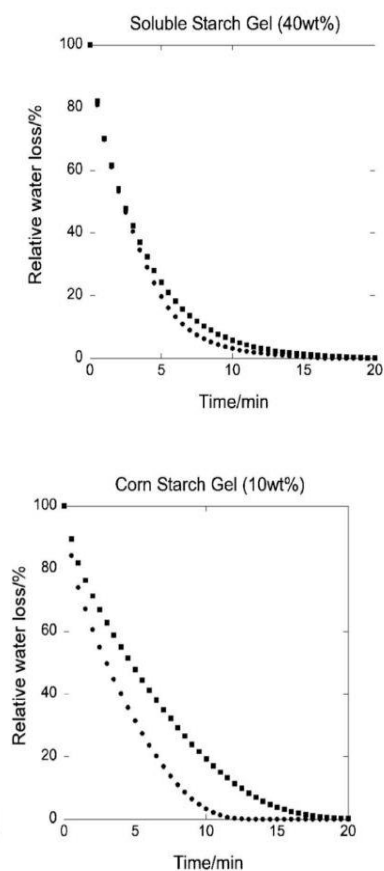


Figure 2 100 °Cにおける澱粉ゲルの水分量変化 ●ホウ砂無し。■ホウ砂あり

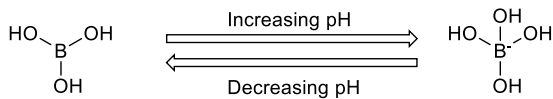


Figure 7 ホウ酸の水溶液中での平衡

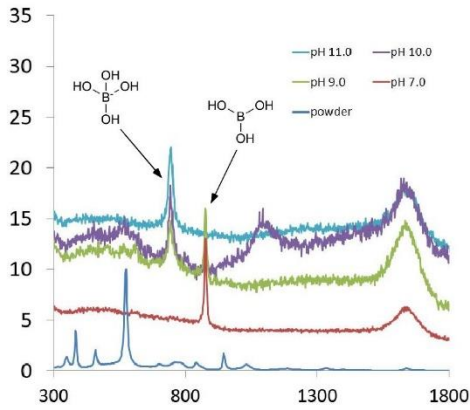


Figure 3 ホウ砂水溶液のラマンスペクトル

在形態を調べるために、ラマン分光法による解析を行った。ホウ酸イオンは中性付近では三配位が優勢であり、高塩基性条件下では四配位のホウ酸イオンになる(Figure 4)。

まず、0.10 M ホウ砂水溶液のラマンスペクトルを測定した。870-880 cm^{-1} が三配位ホウ酸で、740-750 cm^{-1} が四配位ホウ酸イオンである(Figure 4)。pH 値が大きくなるにつれて四配位ホウ酸イオンが優勢になることが分かる。**エラー! 参照元が見つかりません。**に 10 wt%の澱粉-ホウ砂溶液混合物のラマンスペクトルを示す。ホウ砂水溶液の pH は 7, 9, 10, 11 に調製したものを用いた。バレイショ澱粉と可溶性澱粉を比較してみたが、スペクトルに大きな違いは見られなかった。今後は引き続き、様々な澱粉とホウ砂の混合物に対してラマンスペクトルを測定することにより、澱粉構造の微細な構造の変化を捉える事を目標とする。

3 酵素反応産物の効率的検出法

生理活性を示す生体分子の一つに糖脂質がある。これまでに、糖脂質の合成研究は多くなされており、多種多様な糖脂質の合成が達成されている。糖脂質等が薬剤などに用いられる場

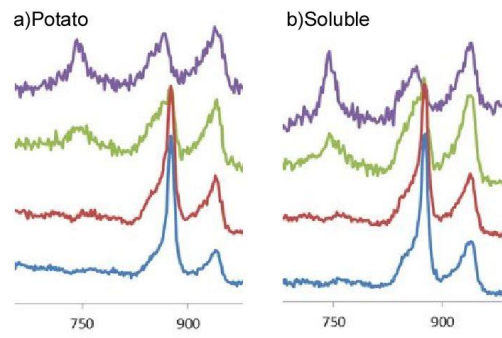


Figure 4 10wt%澱粉-ホウ砂溶液混合物のラマンスペクトル (下から pH7,9,10,11 の順)

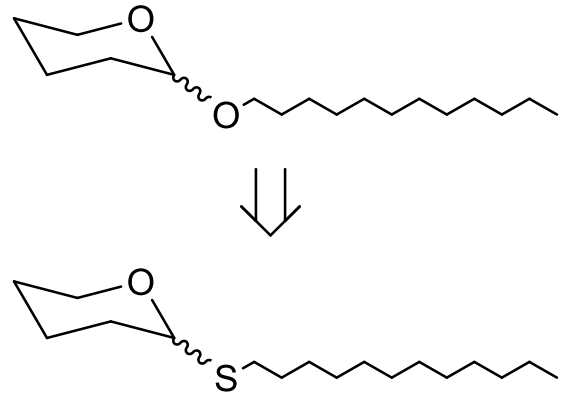
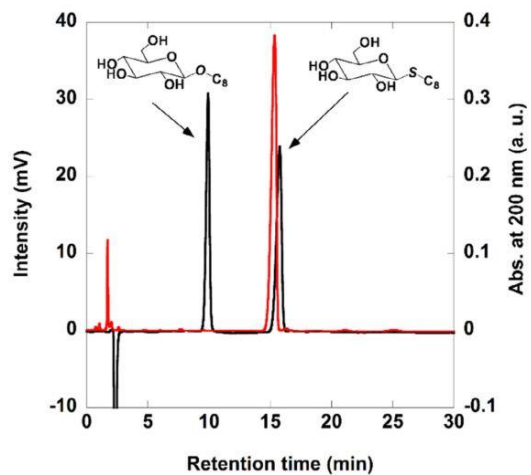


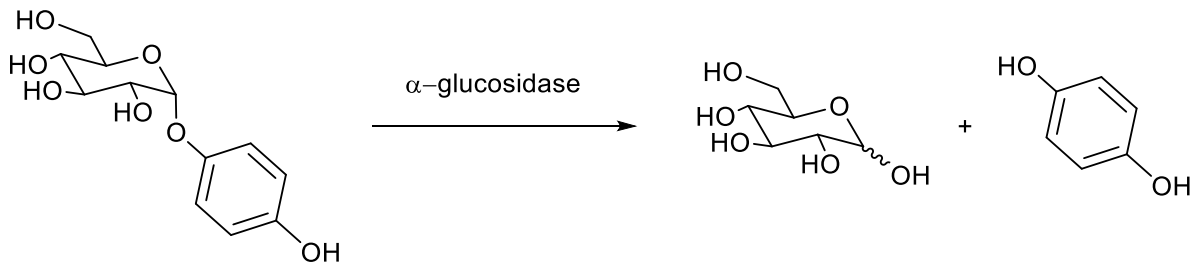
Figure 5 O-グリコシドとS-グリコシド



合には、天然の構造体と同じものを用いるより

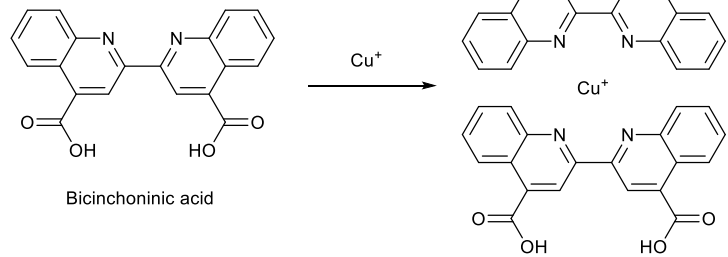
Figure 6 O-グリコシドとS-グリコシドのクロマトグラム

も部分的に構造を変えていることが多く、特に安定性向上のために Figure 6 に示すように、本来酸素原子が存在する部位を硫黄原子に置換したアナログ体を用いることがある。例えば酵



素的に分解されるのを防ぐためである。

このような化合物は安定性に優れているために利用価値は高いが、定量を行うための紫外可視領域に吸収が見られないため、各種解析のための吸光光度計の活用は難しいとされてきた。最近、我々のグループでは、このようなチオグリコシドが UV 領域において吸収を示すことを明らかにした²⁾。



し、これを活用するアッセイ系の構築を計画した。遊離したヒドロキノンの還元力の測定法の

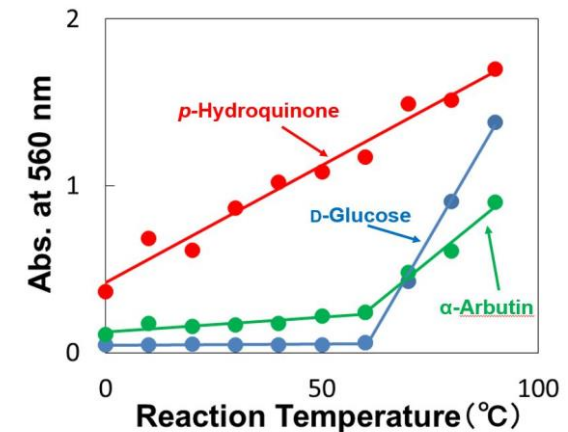
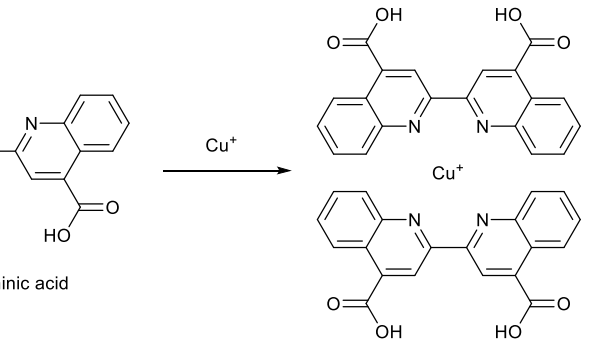
Figure 9 α -グルコシダーゼによるアルブチンの加水分解反応

この事実を活用して、HPLC においてチオグリコシドの選択的検出可能性について確認したところ、Figure 7 に示すような結果を得た。赤線で示すクロマトグラムは UV 検出によるものであり、チオグリコシドの吸収のみ確認され、黒線で示すクロマトグラフは RI 検出によるもので Figure 8 BCA 法の発色原理

あり、両グリコシドが検出された。現在、この現象の普遍性を検証するために、グルコース以外の糖のチオグリコシド体の UV 吸収について検証しているところである。

4 新規酵素探索のための酵素活性測定法の開発

糖鎖の化学合成においては、常に立体及び位置選択性の問題が生じる。従って、合理的な反応経路の選択は非常に重要である。その反応経路を合理化するために、しばしば酵素触媒の選抜の必要性が生じることがある。従って、酵素の性能評価をするアッセイ系の構築は重要である。我々のグループでは、合成が簡単で水溶性の高い人工基質であるアルブチン（エラー！参照元が見つかりません、化合物 1）に着目



活用が有力であるものの、同時に生成するグルコースの還元力も検出される。従って、ヒドロ

Figure 10 各種還元性物質の BCA 法による発色に対する反応温度の影響

キノンのみ選択的に検出可能な方法を用いる必要がある。

まず、還元糖の代表的な検出法の一つである、BCA（ビシンコニン酸）法（Figure 9）を用いることとした。通常は反応温度 90 °C で行うが、より低い温度にすることによりグルコースとヒドロキノンの還元力に差が生じると仮定し

て温度の効果の検証を行った。

Figure 10 に還元性物質による BCA 試薬の発色に対する温度の影響に関するグラフを示す。グルコースにおいては、約 60 °C を境目として、それより低い温度ではほとんど発色を示さなかった。一方、*p*-hydroquinone においては、発色の度合いは温度の影響を受けるものの、0 °C 付近においても発色を確認することができた。 α -アルブチンは 90 °C を境目として発色の度合いは低下したものの、若干の発色を示した。従って、温度を下げるだけでは基質による還元力の影響を受けるため、他の要因を変更することにより発色の選択性を向上させる必要がある。

発表論文

- 1) デンプンのゲルに対するホウ砂の添加効果およびゲルの保水能評価、高分子論文集、**75**, 99-102 (2018) DOI:10.1295/koron.2017-0055
- 2) UV Absorption of *n*-Alkyl 1-thio- β -D-glucopyranosides and its Utilization in Chromatographic Separation, *Tetrahedron Letters*, **58**, 3678-3680 (2017) DOI:10.1016/j.tetlet.2017.08.022