

かき・グリコーゲンの微細構造とコア糖蛋白質の分離

三 崎 旭¹⁾・矢 埜 みどり²⁾

(¹⁾大阪市立大学生活科学部,* ²⁾日本クリニック株式会社**)

Fine Structure of Oyster Glycogen and Isolation of Core Glycoprotein

Akira MISAKI¹⁾ and Midori YANO²⁾

¹⁾*Faculty of Science of Living, Osaka City University, and* ²⁾*Japan Clinic Co., Ltd.*

The highly multi-branched spherical structure of oyster glycogen (M. wt, 4×10^5 ; CL, 12) was confirmed by repeated debranching actions with pullulanase. Comparison of molecular distributions of α -(1 \rightarrow 4)-unit chains at each degradation step indicated that the outer-most unit chains (A-chain) have DP 6–9, and the middle layer consists of DP 6–12, while the inner-most region has DP 2 and 3 (molar ratio, 5 : 3). The core region, which corresponded 1% of the native glycogen, appeared to be a glycoprotein. The purified glycoprotein having M. wt., 1×10^4 , comprised 61.7% carbohydrate and 38.3% protein. The carbohydrate moiety contained glucose, mannose and galactose (6.1 : 1.5 : 1.0) together with N-acetylglucosamine. Amino acid analysis showed that the protein moiety consists of Gly., Lys., Glu., Asn., Ser., and Tau (molar ratio, 1.06 : 1.52 : 0.76 : 0.69 : 0.56 : 0.39). This glycoprotein may play an important role in biosynthesis of glycogen.

2) 現京都短期大学

* 所在地：大阪市住吉区杉本3-3-138 (〒558)

** 所在地：京都市右京区太秦開日町10 (〒616)

先に我々はかき・グリコーゲンに β -amylase と pullulanase を繰り返し作用させることによりその微細構造を調べ、この球状分子の内殻部ほど分岐点の間隔が短く激しい枝分れをなしていることを報告した。¹⁾ しかし、先の方法では2-3コの glucose stub を有する β -limit dextrin に pullulanase を作用させる時、その stub のみならず、 β -鎖の内部鎖も一部切断されるおそれのあることが示唆された。そこで本研究では Amylopectin の分枝切断酵素である pullulanase が glycogen 分子の外部鎖に選択的に作用するという特性を利用して、この酵素を段階的に繰り返し作用させて分子の外側から中心部に向かって鎖長分布が如何に変化するかを調べた。さらに先の研究で、この glycogen の内殻に糖蛋白のコアが存在することも示唆されたので、糖蛋白を分離精製し、その化学的特性を明らかにしようとした。

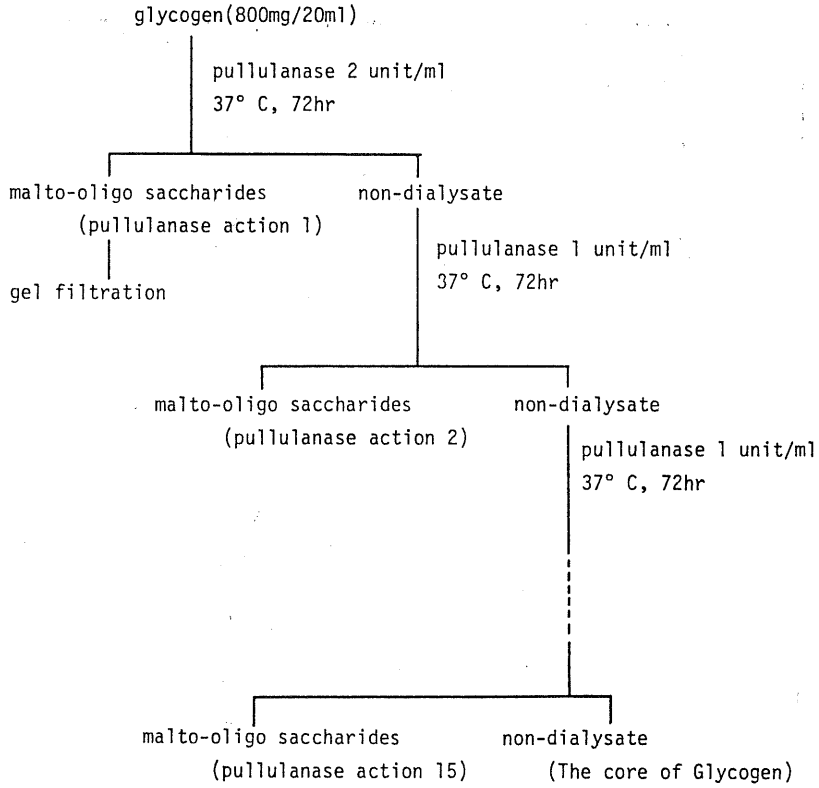
実 験 方 法

先の報告のように広島産のかき(3月-4月採集)の熱水抽出グリコーゲン(日本クリニック提供)を更に dimethylsulfoxide で抽出、アルコール沈殿により精製した。本グリコーゲンは分子量 4×10^5 (minor, 2×10^6), $[\alpha]_D + 140.5^\circ$ (C, 1, 0, 水) で平均鎖長 ($\bar{C}L$), 12~14 であり約5%の蛋白質を含む、pullulanase は林原生物化学研究所より提供されたものを用いた。

Scheme 1 に示すごとく glycogen (800 mg/20 ml water) に pullulanase (40 units) と pH 6.0 で、37°C, 72 hr 作用させた。反応物を透析し、透析外液を濃縮、遊離したマルトオリゴ糖の鎖長分布を Biogel-p2 および-p4 の連結カラムでゲルろ過することにより求めた。透析内液中の多糖画分に再度 pullulanase を作用させ、上と同様にして遊離オリゴ糖のゲルろ過を行った。この操作を、glycogen からオリゴ糖が遊離しなくなるまで繰り返し行った(計15回)。また、最終の高分子画分から糖蛋白の精製を行った。

結果および考察

上述の方法で精製 glycogen に繰り返し exo-type の分枝切断酵素である pullulanase ²⁾ を作用させると、合計15回の繰り返し反応でほぼ完全に枝切りされて約1%の収率で糖蛋白性の高分子物質が得られた。図1および表1には、酵素分解の各段階における、 α -(1 \rightarrow 4)鎖由来のマルトオリゴ糖の溶出プロファイルおよび鎖長分布を示す。すなわち、第1回の作用では glycogen 分子の最外鎖(A-鎖)の分枝切断により遊離したオリゴ糖は重合度(DP)4を中心に3~7の間の鎖長分布があるが、第2回以後第5回までの作用では DP 4~12 とやゝ長い鎖長分布が見られ、これは glycogen 分子の中層部を構成する(1 \rightarrow 4)鎖(B



Scheme 1. Procedure of repeated debranching actions of pullulanase on oyster glycogen

Table 1. Distributions of chain lengths of α -(1 \rightarrow 4)-unit chains of oligosaccharides on degradation steps of oyster glycogen

Step	Residue (mg) (non-dialysate)	Proportion wt. %												
		G	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G12
1	878.68	-	-	18.8	33.4	13.1	6.4	8.5	4.0	-	-	-	-	-
2	773.50	-	-	2.5	11.3	16.9	15.1	10.1	7.3	8.5	5.9	8.4	2.1	12.0
3	747.37	-	-	-	-	8.8	15.1	29.3	8.8	3.9	3.6	2.8	3.7	24.0
6	648.60	-	8.3	42.8	33.6	4.4	5.4	1.6	-	-	-	-	-	3.9
7	482.80	-	6.9	33.4	27.0	5.6	3.1	2.3	1.7	0.1	-	-	-	19.6
10	269.35	-	16.2	55.9	23.4	2.8	1.6	1.7	-	-	-	-	-	-
11	235.00	-	16.8	33.2	47.2	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-
13	60.42	-	21.1	44.9	28.3	5.7	-	-	-	-	-	-	-	-
15	8.63	-	53.9	46.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

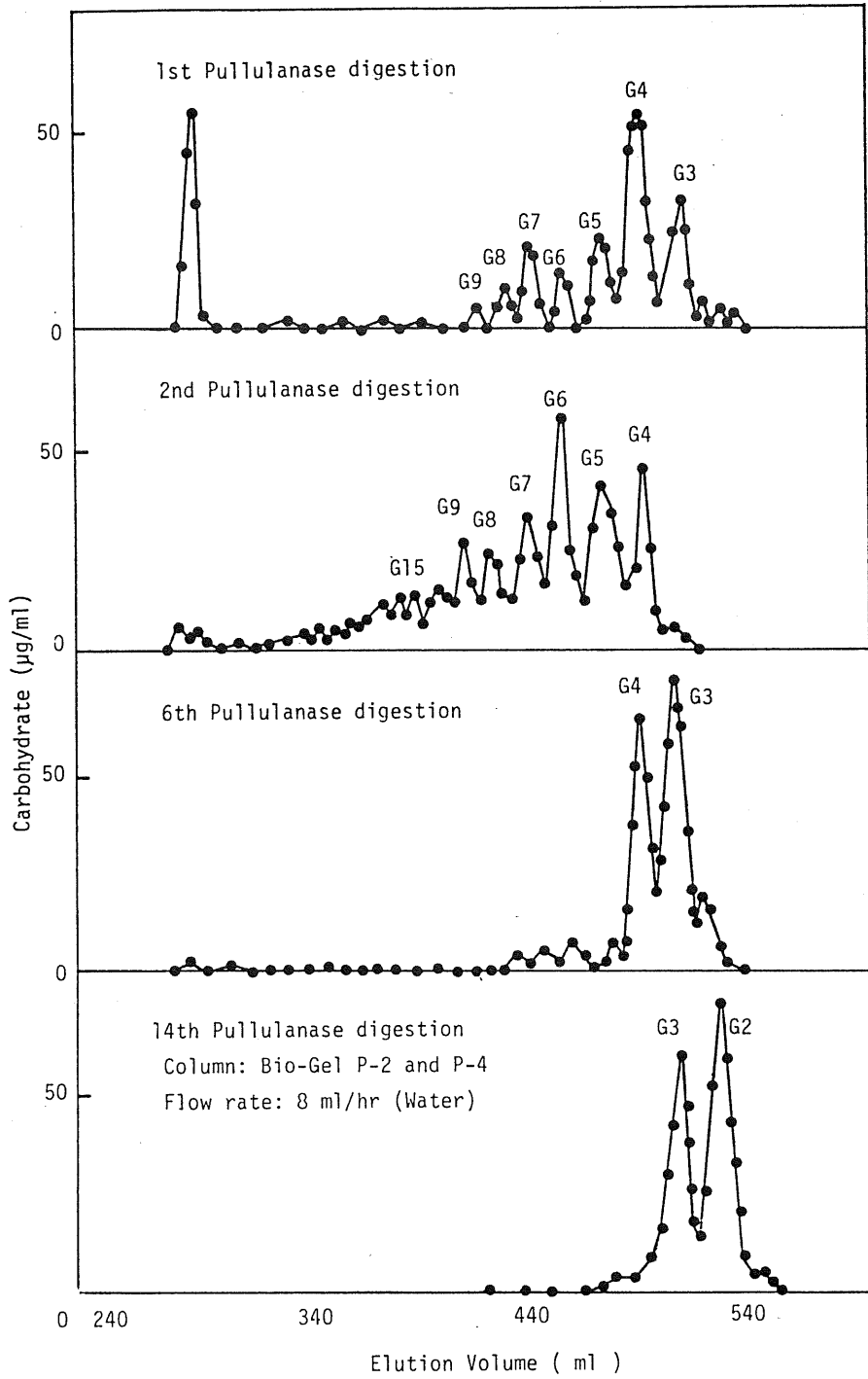


Fig. 1. Gel-filtration profiles of malto-oligosaccharides released by successive debranching actions with pullulanase

一鎖)に相当する。さらに分解が進むに従い、遊離オリゴ糖の鎖長は DP 3~4 とかなり短くなり(6回目)、最内部に相当する部分(14回目)では遊離オリゴ糖は maltose と maltotriose (モル比、5:3)のみとなった。

以上の結果と、先に我々が β -amylase-pullulanase の共同作用で得た結果と併せて、かき glycogen の構造は粒子の中心近くは激しく分岐し $G_2 \sim G_3$ の短い糖鎖が枝となっており、中層部では比較的長い α -(1 \rightarrow 4)-鎖の枝が伸びているが、最外殻層では再び比較的短い糖鎖(A鎖)が分布し、全体として図2に示すような球状分子を形成すると考えられる。

glycogen および amylopectin の構造の解明は、isoamylase や pullulanase などの α -(1 \rightarrow 6)分岐切断酵素の出現により盛んに行われるようになった。Akai 等(1971)は両者の分岐切断酵素の glycogen に対する作用から、isoamylase は glycogen の内部鎖を含めて完全に枝切りを行うに対し、pullulanase は glycogen の最外側を優先的に枝切りすることを報告している。³⁾ 最近 Palmer ら(1983)は新たに得た exo-wise に glycogen の分枝切断を行う *Cytophaga* の isoamylase をかきの glycogen に sequential に作用させた結果から、glyco-

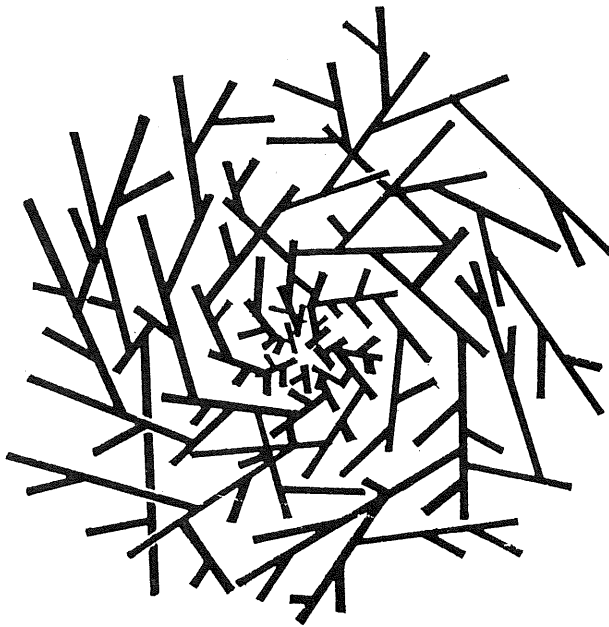


Fig. 2. Proposed structural model of oyster glycogen

gen は Myer 型の樹枝状構造を取るが amylopectin と異なり球状であることを報告している⁴⁾。彼等は、分解度の異なる各段階の glycogen から遊離されるマルトオリゴ糖の鎖長分布を調べた結果から内部に進むに従い鎖長分布が長くなることを示唆している。しかし、彼等の用いた分岐切断酵素の鎖長に対する特異性は必ずしも明確ではなく、また、glycogen の球状分子の形成を説明し難い。

本研究で我々の採用した方法では pullulanase は最外部鎖から順次分枝切断を行うという特性を利用したもので、図 2 に示す構造モデルは球状分子の形成をよく説明しうる。

コア・糖蛋白の分離と性質

glycogen の生合成機構についてはこれまで多くの研究者が興味を持ったが、未だ十分解明には至っていない。しかし、最近の Krisman (1973)⁵⁾ や Whelan (1976)⁶⁾ の報告は、他の多糖の生合成と同様に、glycogen の合成にはその初期段階で糖蛋白が initiator となることを示唆しているが、現在まで、糖蛋白を分離したという報告は見当たらない。我々はかき・glycogen に上述のように pullulanase を繰り返し 15 回作用させると最終産物として糖蛋白性の物質が残ることを見出した。1% の収率で得られたこの最終高分子画分を Sepharose CL-6 B のカラムにかけた結果は図 3 に示すとおりで、分子量約 1 万の糖および蛋白を含むピークは、用いた酵素 (pullulanase) の溶出位置とは明らかに異なる。さらに、この糖蛋白画分を Con A-Sepharose にかけると pullulanase は吸着されずに溶出されるに反し、この画分はカラムに吸着され、 α -methyl-D-mannoside 溶液により溶出されることを認めた (図 4)。Con A-affinity カラムにより精製された糖蛋白分子量約 1 万で糖 (フェノール硫酸法) と蛋白質 (ローリイ法) の組成比は 61.7 : 38.3 であった。これを酸で加水分解し、糖組成およびアミノ酸組成を調べた結果を表 2 に示す。すなわち、glucose のほかに、糖蛋白に特有な mannose, galactose および N-acetylglucosamine を含む。アミノ酸組成は比較的簡単であるが asparagine および serine を含むことから、糖鎖とペプチド鎖の結合は chitobiose 残基と asparagine の残基の間の N-グリコシド結合、あるいは galactose と serine の残基を介して O-グリコシド結合のいずれか、または両者を含むことが推定される。この glycogen のコア部分に存在する糖蛋白の初めての分離は、glycogen の生合成機構の解明に有力な手掛りを与えると思われるので、今後その構造を明らかにする予定である。

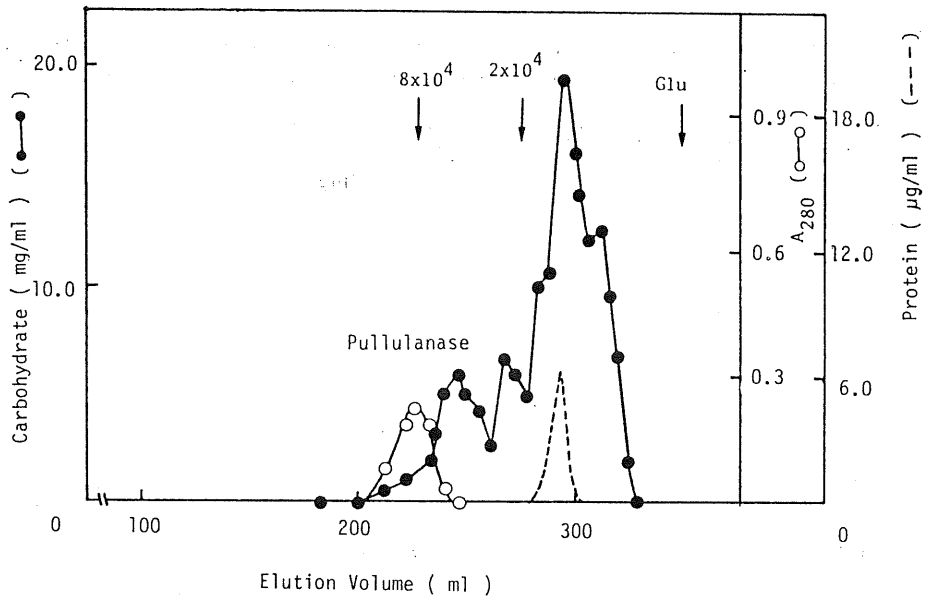


Fig. 3. Gel-filtration profile of the final residue of glycogen after 15-time actions with pullulanase
 (Column: Separose CL-6B, elution with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, at the flow rate, 10 ml/hr)

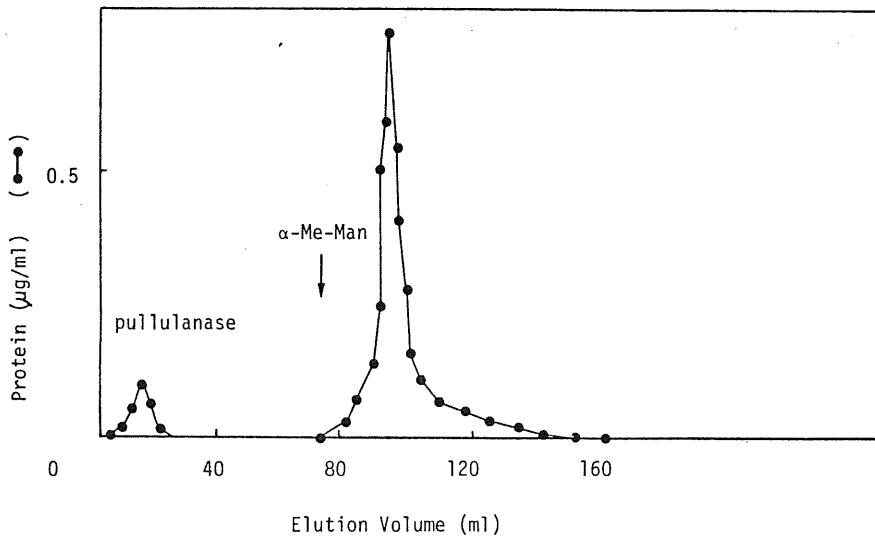


Fig. 4. Con-A affinity chromatographic profile of the core-glycoprotein

Table 2. Property of core-glycoprotein isolated from oyster glycogen
Molecular weight 1×10^4 , Carbohydrate; protein, 61.7; 38.3

Carbohydrate moiety		Protein moiety	
D-Glc.	6.1 (ratio)	Tau.	0.39 mole/mg
D-Man.	1.5	Asn.	0.69
D-Gal.	1.0	Ser.	0.56
GlcNAc.	++	Glu.	0.76
		Gly.	1.06
		Lys.	1.52

謝 辞

本研究は日本クリニック株式会社からの研究補助費により行われたものである。

文 献

1. 三崎 旭, 角田みどり (1984) : 微量栄養素研究 1 : 27.
2. HARADA, T., A. MISAKI, H. AKAI, K. YOKOBAYASHI and K. SUGIMOTO (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 263 : 497.
3. AKAI, H., K. YOKOBAYASHI, A. MISAKI and T. HARADA (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 237 : 422.
4. PALMER, T. N., L. E. MACASKIE and K. L. GREWELL (1983) *Carbohydr. Res.* 115 : 139.
5. KRISMAN, C. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 210 : 81.
6. WHEALAN, W. J. (1975) *Trends in Biochem. Soc.* 1 : 13.