

カキのグリコーゲンの鎖長分布の精密測定とその季節変動について

松井元子¹⁾・角田万里子²⁾・三崎 旭¹⁾
(¹⁾大阪市大・食品栄養科学*, ²⁾甲南女子大・家政**)

Precise Chain-length Distribution of Shellfish Glycogens, and the Seasonal Variations in Unit-chains of Oyster Glycogen

Motoko MATSUI¹⁾, Mariko KAKUTA²⁾, and Akira MISAKI¹⁾

¹⁾Department of Food and Nutrition, Osaka City University, and ²⁾Konan Women's College, Japan

The precise distributions of the unit chains of alpha-(1→4) linked glucose residues in oyster and other shellfish glycogens were investigated mainly by a newly developed high performance anion exchange chromatography (HPAEC) with a pulsed amperometric detector under alkaline condition. These shellfish glycogens were debranched by *Pseudomonas* isoamylase, and applied to HPAEC. The chromatographic elution profiles appeared to be characteristic; unit chains in glycogens of slipper limpets (*Crepidula fornicata*) and mussel (*Mytilus edulis*) were distributed in a range of G5 to G25, while in the oyster glycogen distributed in a range of G2 to G25. There was a distinguished difference in the unit-chain distributions of oyster glycogen between summer (spawning season) and autumn to winter (most edible season). These results suggested seasonal alternation in unit chains of the oyster glycogen molecule, affected by the physiological condition. The fine structure of the multitype-branched, spherical molecule of oyster glycogen has been under investigation by successive enzymic peeling reactions.

我々は先に、グリコーゲンを主成分とするカキ (*Crassostrea gigas*) の抽出物が栄養補助食品として用いられていることに注目して、カキの熱水抽出物から精製したグリコーゲンについて β -amylase と pullulanase を繰り返し作用させ鎖長分布の変化を比較することによりグリコーゲン分子が球状構造をとるらしい事を報告した。^{1,2)}しかし、conventional なゲル濾過の手法では個々の鎖長を精密に測定することは困難であった。

*所在地：大阪市住吉区杉本 3-3-138 (〒558)

**所在地：神戸市東灘区森北町 6-2-23 (〒658)

この様な測定上の限界を克服するために本研究では、最近開発されたアニオンカラムを用いたパルスアンペロメトリー方式の高速液体クロマトグラフィー (high performance anion exchange chromatography, HPAEC) を導入しカキおよび他の貝類のグリコーゲンの鎖長分布を比較するとともに、カキについて、季節変動に伴う鎖長分布の変化、ならびにコレステロールや無機栄養素の変化を、食物学的及び栄養学的観点から明らかにしようとした。

カキのグリコーゲンの微細構造についても若干の知見を得たのでこれらについても報告する。

材料と方法

実験材料：1990年6月から1991年2月まで毎月20日頃、広島県結城水産(株)のご好意により直送された新鮮なカキを用いた。

グリコーゲンの調製：カキのグリコーゲンの分離に際しては、出来るだけ native な状態で調製するため、広島産の新鮮なカキを蒸留水で洗浄後 homogenize し、凍結乾燥後、脱脂 (methanol, dichloromethane 混液) した後、dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いて室温で24時間3回抽出した。調製されたグリコーゲンは、Phenol-H₂SO₄ 法により、糖含量は98% (グルコースとして) で、構成糖はガスクロマトグラフィーによってグルコースのみであった。また市販品の試料としては、Sigma 社製の Oyster (type II), Mussel (type VII), Slipper Limpets (type VIII) のグリコーゲンをを用いた。

分子量測定：Toyo-pearl HW-65 (2.2×100cm) のカラムを用い0.1N-NaOH で溶出した多糖を Phenol-H₂SO₄ 法でモニターし、標準化されたデキストラン及びプルランの分子量と比較した。

コレステロールの測定：凍結乾燥後のカキ粉末 (0.3g) を水酸化カリウム (KOH) で65°C, 30分間処理後、ヘキサンで抽出、イソプロパノールに溶かした後、Cholesterol Oxydase DAOS (N-Ethel-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-3,5-dimethoxyaniline, sodium salt) 法にて定量した³⁾。

酵素反応：試料を0.1Mの酢酸緩衝液に溶解して38°Cに保ち、*Pseudomonas isoamylase* (pH 3.5) あるいは *Klebschilla pullulanase* (pH 5.0) を作用させた。枝切り操作終了後、沸騰水中で5分間加熱して酵素を不活性化させた後、HPAEC で分画し単位鎖長測定を行った。両酵素とも林原生物化学研究所から分与された純粋な標品を用いた。

また、β-デキストリン調製のために、グリコーゲンを0.1Mの酢酸緩衝液 (pH 4.8) に溶解して38°Cに保ち、β-amylase (生化学工業, sweet potato) の充分量¹⁾を添加して反応を開始させ、Park-Johnson 法により還元力を測定し、それが一定になったところで反応を止め、β-limit dextrin を調製したが、再度この反応を行い、それ以上マルトースが生成しないことを確認した⁴⁾。

HPAEC：HPAEC は DIONEX 社製の BIO LC MODEL 4500I で、カラムは HPIC-AS 6 (250mm × 4mm I. D.) と HPIC-AG 6 (50mm × 4mm I. D.) のガードカラムを用い Pulsed Amperometric Detector で検出した^{5,6)}。

溶出条件は、0.15M NaOH と 0.15M NaOH-m NaOH のグラジュエントに依った。この条件による陰イオン交換クロマトグラフィーでは単糖 (DP 1) から約30糖 (DP30) まで完全に分離することができた⁷⁾。

結果と考察

カキおよびアオガイ (Slipper Limpets: *Crepidula fornicata*), イガイ (Mussel: *Mytilus edulis*) などの貝類グリコーゲンを isoamylase で完全に枝切りし, その鎖長分布を HPAEC で比較した。結果は Fig. 1 に示した。カキのグリコーゲンでは, 我々の調製した精製物および市販品共に α -(1 \rightarrow 4) unit 鎖は, 他の貝類のグリコーゲンのそれとは若干異なり, 最短鎖はマルトース (G2) で G25 まで分布する。一方 Slipper Limpets と Mussel のグリコーゲンは, よく似たパターンを示し G5 から G25 の間に分布する。カキグリコーゲンの特徴としてはマルトース (G2), マルトトリオース (G3), マルトテトラオース (G4), マルトペンタオース (G5) が顕著に存在することで, グリコーゲンは短いグルコース鎖により成り密に枝分かれした分子であると考えられる。

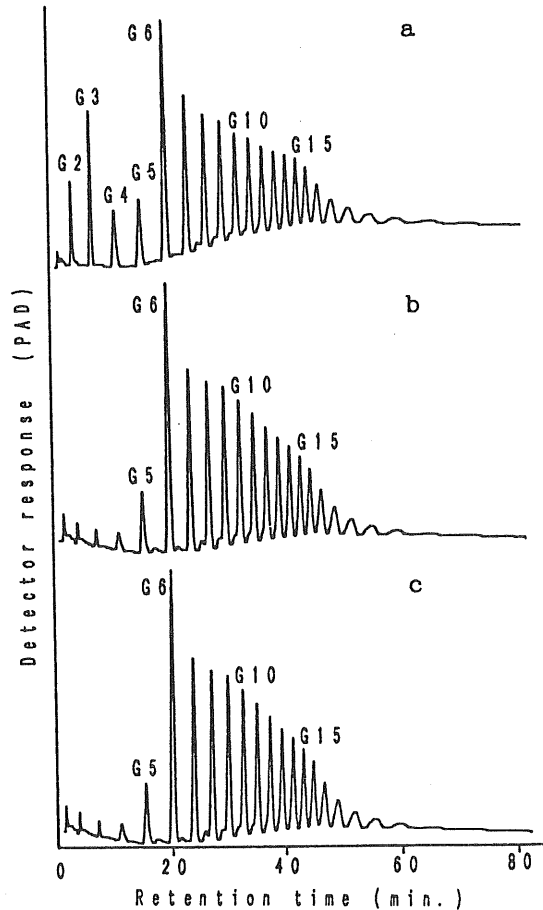


Fig. 1. Comparison of distributions of α -(1 \rightarrow 4) unit chains of some shellfish glycogens by pulsed amperometric anion exchange chromatography.

Each glycogen was completely debranched by isoamylase.

- a; Oyster (Sigma type II),
- b; Slipper Limpets (Sigma type VI)
- c; Mussel (Sigma type VII)

一方、調理科学的な観点から見ると、カキは季節的に美味な時期と食に適さない生殖の時期があることが知られている⁸⁾。そこで、1990年の6月から毎月採取したカキに含まれるグリコーゲンの鎖長変化と質的な変化の関係を追跡した。各月のカキの大きさ、グリコーゲン、コレステロール、灰分量を比較した結果は、Table. 1に示す。例えば、1990年6月のカキと7カ月後の1991年1月のカキでは大きさにおいて、縦、横、厚みとも約1.5倍、重量は、約10倍であった。DMSOで抽出されたグリコーゲン量は、2月には100g(乾燥重量)のカキ当り最高の13gであった。産卵後にはグリコーゲン量の有意な減少がみられた。コレステロール含量には季節による大きな変動はなかったが灰分は産卵後の回復時期である秋(9月)にやや増大する傾向があった。無機塩の組成に関しては、例えば6月のカキでは100g当り、カルシウム128mg マグネシウム108mg、鉄38mg、亜鉛47mgが含まれていた。

Table 1. Seasonal variations of some nutritional components in hirosima-oyster

SEASON	1990							1991
	JUN.	JUL.	AUG.	SEP.	OCT.	NOV.	DEC.	JAN.
SIZE	4.3	4.8	4.7	4.6	5.4	6.1	6.2	6.9
(cm)	×	×	×	×	×	×	×	×
	2.2	2.3	2.2	3.0	3.0	3.4	3.5	3.6
GLYCOGEN a) (g/100g)	7.33	5.20	8.57	2.79	1.26	1.72	5.65	9.79
CHOLESTEROL (mg/100g)	62.0	59.0	80.0	70.0	86.0	47.0	49.0	62.0
ASH (g/100g)	5.17	7.70	9.75	9.85	8.89	5.91	5.51	5.18

a) Glycogen was extracted from lyophilized oyster with DMSO at 25°C.

先に述べたようにカキの季節による生理学的変動に対応してエネルギー貯蔵物質としてのグリコーゲンの重量に大きい変化が見られるが、その際、グリコーゲン分子を構成する α -(1→4) unit鎖がどのように変動しているかを知ることは重要である。この観点から1990年6月、7月、8月のカキのグリコーゲンについて isoamylase により分枝切断後 HPAEC を行い、detector response の値を molar response で補正し⁹⁾、それぞれの unit chain の数の比率(%)で示すと Fig. 2 のようになった。すなわち6月ではG2からG5の短鎖が多いが7月、8月と月が進むにつれて短鎖が減少しG8以上の長い unit chain が増加することがわかった。さらに1990年6月とそれから7ヶ月後の1991年1月のグリコーゲンの鎖長分布を比べると、Fig. 3 に示すように産卵期の夏から産卵後の秋では、G3などの短い chain が比較的多いが、グリコーゲン含量が高くて美味な時期の12月から1月では、短い鎖が減少し、長い鎖が増大している。この短い unit chain は、A 鎖由来と考えられるが、生殖期にはグリコーゲンがエネルギー源として利用されるために、phosphorylase により分解が起こり、一方冬期のグリコーゲン蓄積の時期には生合成が盛んになり鎖長を長い方に移行すると推定されるが、この点に関しては各時期の酵素活性を把握する必要がある。

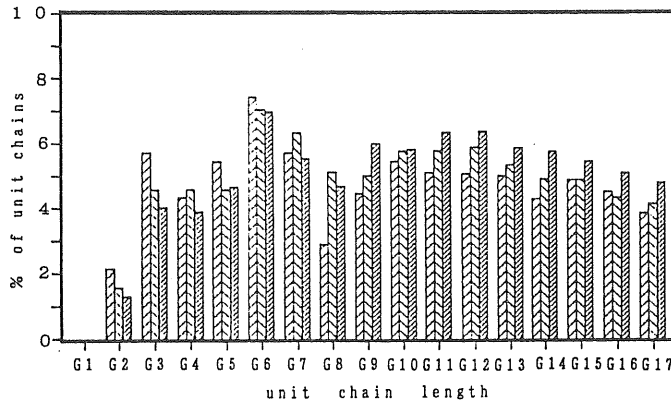


Fig. 2. Seasonal changes in chain length distribution of fresh oyster glycogen, analyzed by HPAEC.

The values were expressed as molar proportions, computed by responses of each chain length.

- ▨; June (1990)
- ▤; July (1990)
- ▥; August (1990)

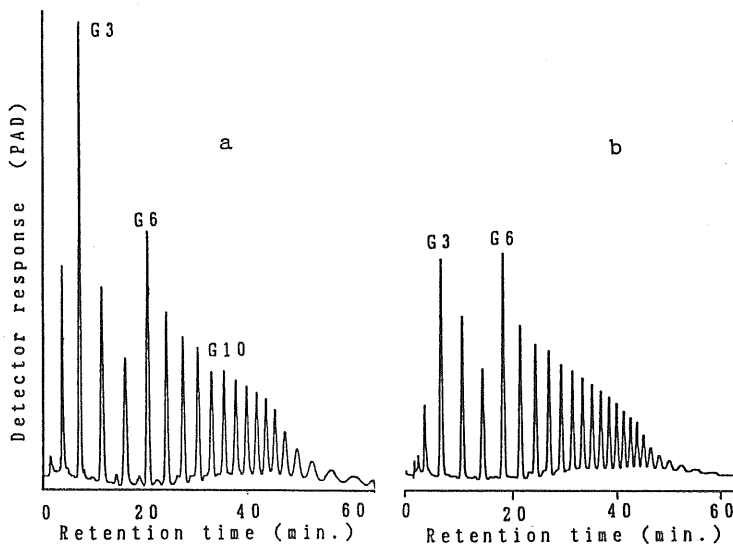


Fig. 3. Comparison in profiles of chain length distribution of oyster glycogen in June (1990) and January (1991), analyzed by HPAEC.

- a; June (1990)
- b; January (1991)

つぎにカキ・グリコーゲンの微細構造を調べるために1990年6月の新鮮なカキから精製されたグリコーゲン(分子量60万)に β -amylaseを作用させ(分解率28%), β -limit dextrin(収率77%)を調製し, さらにその切株(G2及びG3残基)だけを可及的に切断する条件下でpullulanase(pH5.0, 17hr)を作用させた。その結果は, Fig. 4に示すようにマルトース(G2)とマルトトリオース(G2)がモ

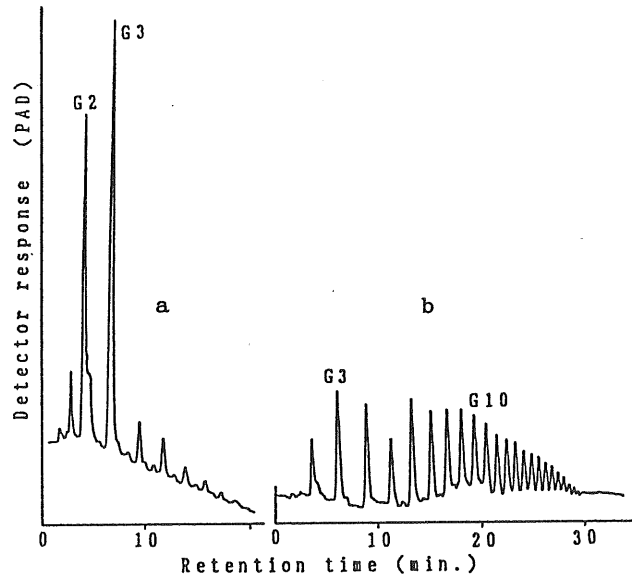


Fig. 4. HPAEC profiles of unit chain distribution of β -limit dextrin of oyster glycogen (June, 1990) after pullulanase treatment.

- a; Stub-chains distribution of β -limit dextrin, released by pullulanase.
 b; After isoamylase treatment of Stub-free β -limit dextrin.

ル比 1 : 1.2 で生成し、A 鎖はほぼ同数の偶数の枝と奇数個の枝によりなるというこれまでの結果¹⁾を再確認した。なお β -amylase による分解率 28% は非常に低いが、これは用いた試料 (6 月) には短い鎖が多いためと考えられる。さらに、pullulanase を作用させた Stub-free β -limit dextrin に isoamylase を作用させ完全に枝切りする (Fig. 4) と、この場合にもマルトリオース (G3) が認められた。pullulanase による β -limit dextrin の stub の除去は十分であることを確認しているため、この短鎖は、グリコーゲン内部のコア部分が密で短い鎖が存在し、pullulanase の作用を受けにくいと思われる。カキ・グリコーゲンの微細構造については現在再検討中であるが、一般に球状に近い分子形態と考えられているので、外層部から逐次、最外側の分岐点のみを切断する条件下²⁾に pullulanase を作用させ、外側の分枝切断後の分子量の変化を調べると、4 回の peeling 後、平均分子量は 85 万から 50 万に、また 6 回の酵素反応では 10 万と小さくなった。なお収率は最初の 60% に相当する。この 6 回 pullulanase 作用後の生成物と元の native グリコーゲンの isoamylase による全分枝切断後の鎖長分布を比べると、平均的に鎖長分布は長い方に移行していた。現在、さらに酵素による徹底的 peeling が進行中である。

以上の結果より、アニオンカラムを用いたパルスアンペロメトリック方式の HPAEC によりカキなどのグリコーゲンの鎖長を精密分画できた。また我々の研究室で得た先の結果と併せて、カキ・グリコーゲンの A 鎖はほぼ同数の奇数鎖、偶数鎖からなること、グリコーゲンの外層部には短鎖が密に分布することが示唆された。一方、カキの生物学的ライフサイクルからグリコーゲンの変動をみると、例えば、1990 年 6 月より 1991 年 2 月の間のグリコーゲンの生成量と鎖長分布は季節に対応することが分かる。産卵期を含む夏期 (6 月 ~ 9 月) と食味のすぐれた冬季 (12 月 ~ 2 月) では、グリコーゲン分子中のマル

トース (G2) 鎖からマルトペンタオース (G5) 鎖に至る短い鎖長分布に顕著な差が見られた。この事実は、季節によってグリコーゲンの量的変化ばかりでなく分子構造の質的な変化もあることを強く示唆する。

定期的に新鮮なカキ試料を供支して載りました結城水産(株)に感謝します。また、分析に協力された甲南女子大一丸井晶子助手に感謝します。

文 献

1. 三崎旭, 角田みどり (1984) 微量栄養素研究, 1: 27-36
2. 三崎旭, 矢埜みどり (1984) 微量栄養素研究, 2: 161-168
3. 金井泉, 金井正光 (1983) 「臨床検査法提要」, 金原出版, 29: 453-458
4. 中村道徳, 貝沼圭二 (1989) 生物化学実験法19, 「澱粉・関連糖質実験法」, 学会出版センター, 105
5. HARDY, MARK R., R. REID TOWNSEND, and YUAN C. LEE (1988) *Anal. Biochem.*, 170: 54
6. HARDY, MARK R. and R. REID TOWNSEND (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 85: 3289-3293
7. KOIZUMI, KYOKO, YOKO KUBOTA, TOSHIKO TANIMOTO and YASUKO OKADA (1989) *J. Chromatogr.*, 464: 365-373
8. 山崎妙子 (1991) 調理科学, 24: 88-93
9. 小泉京子, 福田正子, 桧作 進 (1991) 日本農芸化学大会講演要旨集, 97