

ハプトースの精製と構造推定

Purification of Haptose and structure analysis

物質・環境システム工学コース

1085113

手嶋 勝之

要旨

海産性単細胞藻 *Phaeocystis* sp. は多糖を主成分とする分厚い外被にくるまれている。外被は熱処理または酸処理によって簡単に剥離する。私たちはこの多糖をハプトースと呼んでいる。多糖外被及び藻体は生分解性プラスチック、赤潮凝集材、簡易浄水材、マルチフィルムなどに応用研究されている。これまでの研究によれば、多糖外被の組成は糖質 40%、灰分 30%、水分 10%、粗タンパク質 4%、粗脂質 4%である。構成単糖はグルコースとキシロースがほぼ 1:1 で含まれていることがわかっている。多糖構造決定のために酸加水分解で採取したオリゴ糖の分析が試みられてきたが、多糖の構造はいまだ明確になっていない。その理由としては、外被多糖のゲル化、灰分、タンパクなどの夾雑物が分析の妨げとなっていたことがあげられる。そこでまず、多糖の精製を行うこととした。いくつかの実験によって、粉末多糖外被を海水に溶かした場合、多糖の上清と夾雑物の沈殿に分離できることが分かった。この現象を参考に酸と塩濃度を検討して精製法を開発した。多糖外被溶液またはゲルに酸と塩を適量加えることによって灰分、タンパク質などの夾雑物の沈殿物とハプトースのみを含む上清に分けることが出来た。

Sephacryl S-500 を用いたゲルろ過によって、精製ハプトースの分子量は約 10 万と推定された。精製ハプトースは濃度を上げてゲル化しなかったが、条件によっては Ca イオンで一部ゲル化が見られた。この精製ハプトースはこれまで不可能であった酵素による加水分解が可能であった。そこで酵素加水分解産物の生成糖を分析することによって構造の推定を行った。

精製ハプトースを、セルラーゼ (*Trichoderma viride*)、アミラーゼ (*Aspergillus oryzae*)、 α -グルコシダーゼ (*Bacillus stearothermophilus*)、 β -グルコシダーゼ (sweet almond)、キシラナーゼ 1 (*Thermomyces lanuginosus*)、キシラナーゼ 2 (*Trichoderma viride*)、プルラナーゼ (*Klebsiella pneumoniae*) によって、加水分解し、オリゴ糖、単糖の分析を HPLC、TLC 等で行った。

試用した酵素の中で精製ハプトースは β -グルコシダーゼ、キシラナーゼ 1、プルラナーゼによって加水分解されたので、得られた単糖オリゴ糖を分析した。TLC では原点に残存する(多)糖が見られた。この高分子の糖を、さらに異なる酵素で加水分解し単糖とオリゴ糖を得 TLC、HPLC によって単糖とオリゴ糖を分析同定した。その結果ハプトースは少なくとも 1,4- β グリコシド結合と 1,6- α グリコシド結合を持っていることがわかった。結果をもとに部分的ではあるが、これまでの実験結果を踏まえ結合様式のモデルを推定した。