

ウロン酸の代謝に関する研究 (3)

Erwinia aroideae によるペクチン酸の代謝中間生成物の性質—オゾン酸化と過沃素酸酸化による生成物

岡本賢一・小沢潤二郎

Linker ら (1956) は、ヒアルロン酸の酵素による分解には二通りあり、罌丸の hyaluronidase では N-acetylhyalobion 酸を構成単位とする少糖類を生じ、細菌の hyaluronidase では 4,5-不飽和二糖類を生成すると述べている。この不飽和二糖類はグリコシド結合の開裂と同時に、非還元性の糖残基に脱水が起きて生成したものと考えられている (Ludowieg etc. 1961)。*Erwinia aroideae* によるペクチン酸の代謝中間生成物 A は digalacturon 酸の代謝の途中で検出される (岡本, 小沢 1958, 1960)。したがって生成の過程は違っているが、同じく不飽和二糖類であると考えられ、構成糖は違うけれども類似した化学構造をしているように思われる。文献の上で Linker らの不飽和二糖類と比較しながら、代謝中間生成物 A の化学構造について行った実験の結果をここに報告する。

実験の方法と結果

熱水溶液中の変化

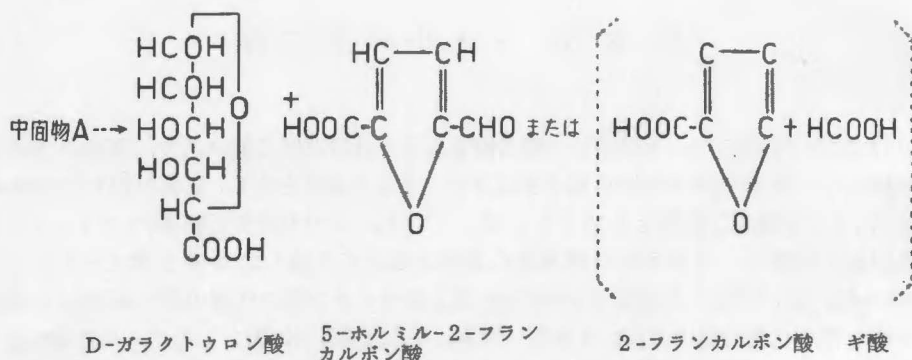
中間生成物 A は熱水溶液中で分解し、D-ガラクトウロン酸、2-フランカルボン酸、5-ホルミル-2-フランカルボン酸を生成することを前報で述べたが、さらにこれらの物質とギ酸の量的な関係を調べた。遊離の中間生成物 A の水溶液 (pH 3.0) を硬質ガラスでつくったアンプルに入れ、120°C で 30 分間加熱し、一定容量の反応液とそのエーテル可溶部の、N/100 NaOH の滴定値と Willstätter-Schudel 法による N/50 I₂ 消費量を量ると第 1 表のような結果になった。ギ酸はペーパークロマトグラフィと、マグネシウム末、稀塩酸で還元しクロマトロップ酸法でホルマリンを検出して、確認した。エーテル可溶部には 5-ホルミル-2-フランカルボン酸以外の還元性物質はペーパークロマトグラフィでは検出されなかった。標準の 2-フランカルボン酸または 5-ホルミル-2-フランカルボン酸の水溶液を硫酸アンモニアで飽和し、20 時間エーテルで処理すると、理論値の 99.5% が抽出された。純粋の 5-ホルミル-2-フランカルボン酸は酸度に対して 102.3% の還元力を示した。ギ酸は還元力に影響しないことを確かめた。5-ホルミル-2-フランカルボン酸はこの条件では 2-フランカルボン酸に変化しない。以上の結果からエーテル可溶部の還元力は 5-ホルミル-2-フランカルボン

第 1 表 中間生成物 A の熱水溶液の酸度と還元力の変化

	N/50 I ₂ 消費量 (ml)	N/100 NaOH 滴定値 (ml)
分 解 前	8.0	16.0
分 解 後	12.3	19.4
増 加 量	4.3	3.4
エーテル可溶部	4.3	11.3

酸の量を、酸度は2-フランカルボン酸、5-ホルミル-2-フランカルボン酸およびギ酸の総量を示すものと考えて差し支えない。

第1表の結果から理論値に対する収率は5-ホルミル-2-フランカルボン酸53.8%、2-フランカルボン酸43.8%、ギ酸42.5%であって、中間生成物Aは第1図のように分解すると考えられる。



第1図 熱水溶液における中間生成物Aの化学変化

オゾン酸化

遊離の中間生成物Aの水溶液にオゾンを経5°Cで30分間通し、反応液の酸度と還元力の変化を調べた結果は第2表の通りであった。反応時間を10分、20分、30分にとった場合もあまり変化は認められなかった。

第2表 オゾン酸化による酸度と還元力の変化

	N/100 NaOH 滴定値 (ml)	N/50 I ₂ 消費量 (ml)
1 酸化前	685.94	359.45
2 酸化後	601.4	643.82
3 反応液のエーテル可溶部	55.83	30.14
4 反応液のエーテル不溶部	481.1	771.25
5 エーテル不溶部を100°Cで1時間分解	461.9	764.40
6 5のエーテル可溶部(修酸を含まず)	40.78	22.00
7 5のエーテル不溶部	393.9	648.38

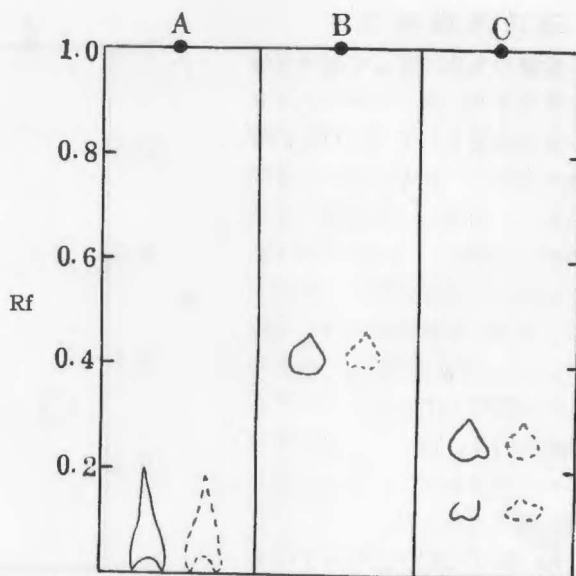
第2表の結果では、酸度は減少し、還元力は増加している。

つぎに反応液を湯煎上で加熱し、エーテルで抽出し、可溶部をペーパークロマトグラフィで検討した。第2図にその結果を示した。

R_F 値が修酸とグリコール酸に一致する二つのスポットが認められた。修酸はさらに酢酸酸性溶液中で生成するCa塩の沈澱と、Ca塩を水洗し2Nの硫酸に溶解してマグネシウム末と稀塩酸で還元し生成するグリコール酸を検出して、確認した。グリコール酸は2,7-ジオキシナフタリンと硫酸による呈色反応、クロモトロップ酸と濃硫酸による呈色

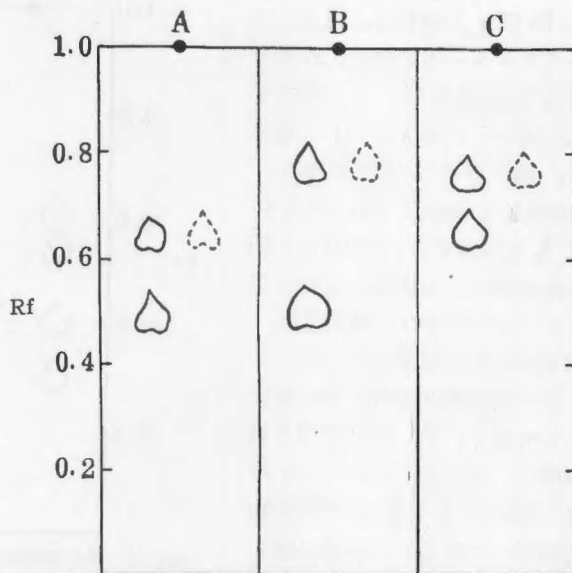
反応がともに陽性であることで証明した。Linker らの不飽和二糖類からは 25.5% 以上の収量で修酸が生成すると言う。第 2 表に示した通りエーテル可溶性の酸は少量であって、しかも修酸以外の酸も含まれているので、Linker らの不飽和二糖類に比べると修酸の生成量は遙かに少ないことになる。計算によれば酸化を受けた中間生成物 A に対する生成量は理論値の 4.3% に過ぎない。オゾン酸化によって二塩基性酸が生成するにもかかわらず、酸の総量がかえって減少するのは脱炭酸を伴っているためであると思われる。

エーテル不溶部には D-ガラクトウロン酸が検出され、ナフトレゾルシン法で定量した結果、その量は変化していないことが分った。酸や熱の作用で中間生成物 A のグリコンド結合が開裂するときには、ガラクトウロン酸とともに 2-フランカルボン酸が生成する。2-フランカルボン酸からはオゾン酸化で多量の修酸が生成する。したがってエーテル可溶性の修酸も 2-フランカルボン酸から二次的に生成したものであるかもしれない。エーテル不溶部には D-ガラクトウロン酸の外にもう一つの還元性物質が検出される。この物質は中性であって、2,4-dinitrophenylhydrazone の m. p. 181~186°, phenylhydrazone の m. p. 168° であるが、化学構造はまだ検討中である。



第 2 図 オゾン酸化生成物 (エーテル可溶部) のペーパークロマトグラム

..... 標準修酸 — 試料
 展開剤 { A.....ブタノール, ギ酸, 水 (4:1.5:1)
 B.....ブタノール, 醋酸, 水 (4:1:2)
 C.....フェノール, ギ酸, 水 (10:0.2:5)
 呈色剤.....0.1%, B.P.B の 95% のアルコール液



第 3 図 過沃素酸化合物 (エーテル可溶部) のペーパークロマトグラム

..... 標準オキザロ醋酸 — 試料
 展開剤 { A.....ブタノール, ギ酸, 水 (4:1.5:1)
 B.....ブタノール, 醋酸, 水 (4:1:2)
 C.....フェノール, ギ酸, 水 (1.5:0.2:5)
 呈色剤.....0.1%, B.P.B の 95% アルコール液

過沃素酸酸化

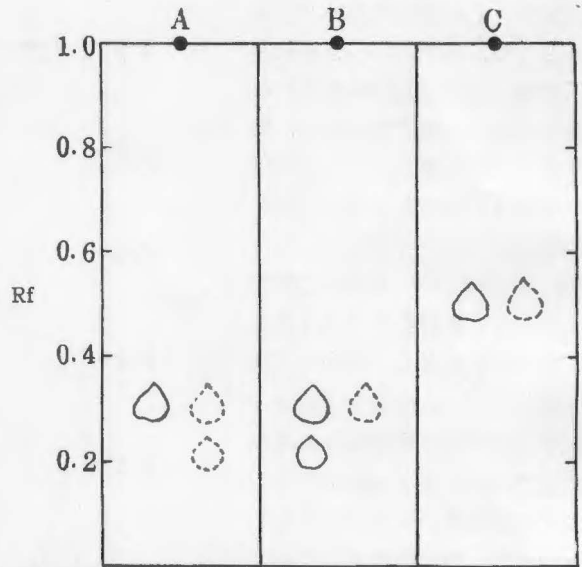
前報の方法に従って過沃素酸を作用させ、フェノールフタレンを指示薬として $\text{Sr}(\text{OH})_2$ 溶液で中和し、 5°C に約 30 分間放置し、濾過して沃素酸や過沃素酸塩を除く。さらに SrCO_3 を添加して減圧濃縮して濾過する。イオン交換樹脂で Sr を除き、 Ag_2CO_3 を添加、濾液の Ag を樹脂で除去し、エーテル抽出を行う。エーテル可溶部のペーパークロマトグラムは第 3 図の通りであった。

R_F 値の大きいスポットはオキザロ酢酸に一致するが再現性に乏しい。 R_F 値の小さい物質については後述することにする。

エーテル不溶部を $\text{Ba}(\text{OH})_2$ と BaCO_3 で中和し、濾過してからアルコールを加え、沈澱を濾過洗滌後乾燥する。粉末を水に溶かし、 Br_2 か I_2 で酸化し、減圧の下に空気を通し、 Ag_2CO_3 を加えて Br_2 あるいは I_2 を除去する。 120°C で 30 分間分解し、生成物をペーパークロマトグラフィで検討した。第 4 図にその結果を示した。

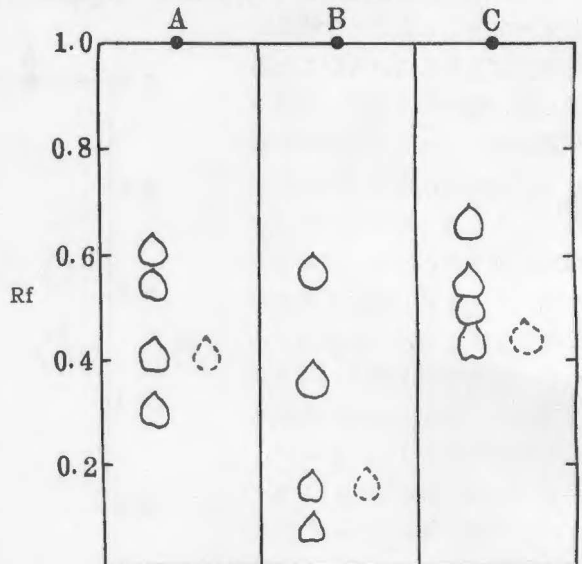
第 4 図の酸性物質は R_F 値ばかりでなく、Ca 塩の性質も酒石酸と一致した。エーテル不溶部の粉末の水溶液を Na-borohydride で還元し、加熱分解して生成物をペーパークロマトグラフィで調べた。

第 5 図からエリスロン酸が生成していることが分る。以上の結果から中間生成物 A の還元性



第 4 図 過沃素酸酸化物 (エーテル不溶部、ヨード酸化物の加水分解生成物) のペーパークロマトグラム

..... 標準の D-酒石酸 — 試料
 展開剤 { A.....ブタノール, ギ酸, 水 (4:1.5:1)
 B.....ブタノール, 醋酸, 水 (4:1:2)
 C.....フェノール, ギ酸, 水 (15:0.2:5)
 呈色剤.....0.1%, B. P. B 95% アルコール液



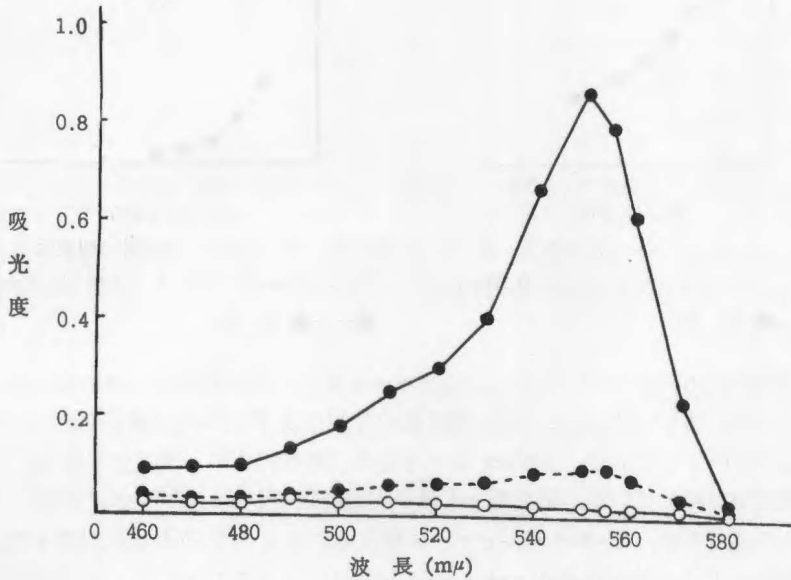
第 5 図 過沃素酸酸化物 (エーテル不溶部の Na-borohydride による還元生成物の加水分解物) のペーパークロマトグラム

—— グルコースのニトロベンゼンによる酸化生成物 (試料スポットと一致せるスポットがエリスロン酸) 試料
 展開剤 { A.....フェノール, ギ酸, 水 (15:0.2:5)
 B.....ブタノール, ギ酸, 水 (2:1:1)
 C.....ブタノール, 醋酸, 水 (4:1:2)
 呈色剤.....0.1%, B. P. B 95% アルコール液

のガラクトウロン酸はC-4の位置で結合していると考えられる。

2-チオバルビツール酸反応

Weissbach ら (1959) の方法に従って、試料約 0.55 mg 0.4 ml の溶液に 0.025 N の Na IO_4 溶液を 0.5 ml 加え、20 分間室温で反応させる。0.5 N の塩酸に溶解した 2% 亜硫酸ソーダ溶液 1.0 ml を添加、よく攪拌してから 2 分間放置し、0.3% の 2-チオバルビツール酸 4.0 ml を加え、 100°C で 10 分間加熱して発色させる。吸収曲線は第 6 図の通りであった。



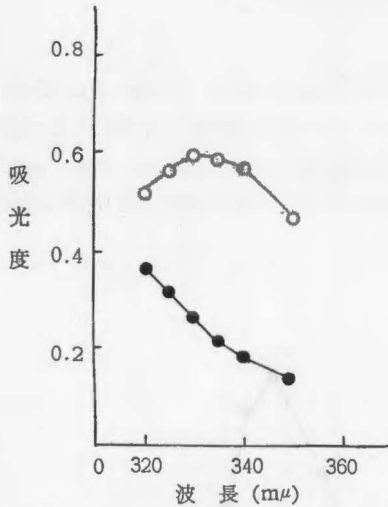
第 6 図 2-チオバルビツール酸反応による吸収スペクトル

- 中間物 A (0.54 mg)
-● 5-ケト-L-ガラクトン酸 (0.58 mg)
- デガラクトウロン酸 (0.55 mg)

中間生成物 A だけが $545\sim 550\text{m}\mu$ で明瞭な吸収を示している。前述の過沃素酸化エーテル可溶部の R_f 値の一番小さい物質は酸性であって、 $m. p. 118\sim 120^\circ$ の 2,4-di-nitro-phenylhydrazone を与え、アニリン塩酸やキノキサリン試薬特に後者で明瞭に呈色するが、セミカルバゾンとキノキサリン誘導体の紫外吸収スペクトルは第 7 図と第 8 図に示したようにケト酸の特性を示さない。したがってこの物質は 5-ホルミルピルビン酸とは考えられないが、2-チオバルビツール酸を加えると発色して $545\sim 550\text{m}\mu$ の極大吸収を示す。 $545\sim 550\text{m}\mu$ の吸収は普通ホルミルピルビン酸によると考えられているが、この結果から 4,5-unsaturated hexuronic acid や 2-keto-3-deoxy sugar acid 以外の物質が $545\sim 550\text{m}\mu$ の 2-チオバルビツール酸反応を示す場合もありうると言える。

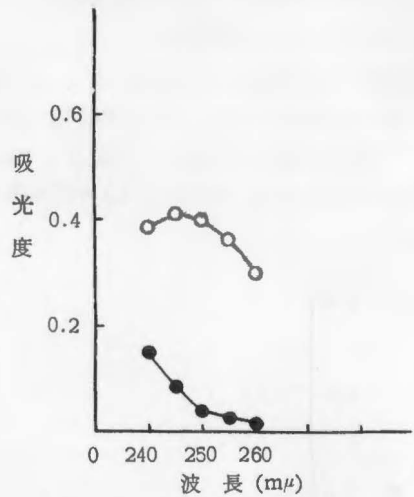
考 察

E. aroideae によるペクチン酸の代謝中間生成物 A は不安定な物質であって、糖類の化



第7図 セミカルバゾンの吸収スペクトル

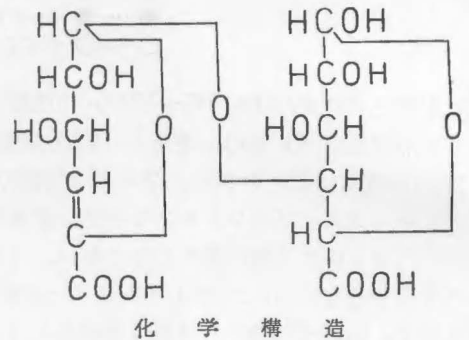
○—○ α-ケトグルタル酸 (0.032 mg)
●—● 試料



第8図 キノキサリン誘導体の吸収スペクトル

○—○ α-ケトグルタル酸 (0.04 mg)
●—● 試料

学構造の決定のため普通に用いられているアセチル化、メチル化あるいは水素添加などは分解を伴うため成功しなかった。それ故直接の分解生成物から化学構造を組み立てる以外には方法がないようである。Linker らの不飽和二糖類はもっと安定性があり、アセチル化や水素添加に耐えている。第2報と本報の実験結果の中で、232 mμの吸収、オゾン酸化による修酸の生成、2-チオパルピツール酸反応による545~550 mμの極大吸収などは、この物質が4,5-unsaturated sugar acidであることを示しているようである。したがって構成糖は異っているが、Linker らの不飽和二糖類と類似した次のような化学構造が一応考えられる。しかしオゾン酸化によって生成する修酸は Linker らの結果より遙かに少量であって、グリコシド結合の開裂に伴って生成する2-フランカルボン酸から二次的に出来ている可能性もないとは言えない。また2-チオパルピツール酸反応による545~550 mμの吸収もホルミルピルビン酸に特異的なものではないようであって、中間生成物Aが4,5-不飽和二糖類であると断定することはもちろんできない。



Linker らの不飽和二糖類は、ヒアルロン酸のN-アセチルグルコサミン 1,4 グルクロン酸の結合が、Oとグルクロン酸のC-4の間で切れ、同時にC-4とC-5の間に脱水が起きて生成するものと考えられている。普通の glycosidase では還元基のCとOとの間で切断し、二重結合は生じない。中間生成物Aは初めから多糖類のグリコシド結合の開裂とは関係なく、digalacturon 酸から生成する。したがって二重結合の位置も別に4,5に限っ

考える必要はない。

終りに御教示と御援助を頂いた岡大農学部岩佐順吉助教授に感謝致します。

文 献

- Feigl, F. 1956. Spot tests in organic analysis. Elsevier publishing company, Amsterdam.
- 今永勇二郎, 吉藤絹子, 百瀬允子, 釜井君枝, 松島祥夫. 1960. D-グルコサミンの代謝. 酵素化学シンポジウム 14 集 183—190.
- Kennedy, E. P. and Barker, H. A. 1951. Paper chromatography of volatile acids. Anal. Chem. 23 : 1033—1034.
- Linker, A., Hoffman, P., Meyer, K., Sampson, P. and Korn, E. D. 1960. The formation of unsaturated disaccharides from mucopolysaccharides and their cleavage to α -keto acid by bacterial enzymes. J. Biol. Chem. 235 : 3061—3065.
- Linker, A., Meyer, K. and Hoffman, P. 1956. The production of unsaturated uronides by bacterial hyaluronidases. J. Biol. Chem. 219 : 13—25.
- Ludowieg, J., Vennesland, B. and Dorfman, A. 1961. The Mechanism of action of hyaluronidases. J. Biol. Chem. 236 : 333—339.
- Magasanik, B. and Umbarger, H. E. 1950. The separation and identification of keto-acids by filter paper chromatography. J. Am. Chem. Soc. 72 : 2308—2309.
- Nakamura, S. and Ashida, K. 1953. The oxidation of sugar in alkaline solution (2). Memo. Inst. Sci. Ind. Res. Osaka Univ. 10 : 208—212.
- 岡本賢一, 小沢潤二郎. 1958. ウロン酸の代謝に関する研究. 1. *Erwinia aroideae* のウロン酸代謝. 農学研究 46 : 49—53.
- 岡本賢一, 小沢潤二郎. 1960. ウロン酸の代謝に関する研究. 2. *Erwinia aroideae* によるペクチン酸の代謝中間生成物の性質. 農学研究 48 : 39—47.
- Srinivasan, P. R., Shigeura, H. T., Sprecher, M., Sprinson, D. B. and Davis, B. D. 1956. The biosynthesis of shikimic acid from D-glucose. J. Biol. Chem. 220 : 477—497.
- Weissbach, A. and Hurwitz, J. 1959. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. 1. Identification. J. Biol. Chem. 234 : 705—712.