



Title	グリコシダーゼを用いた糖タンパク質糖鎖の構造解析
Author(s)	菅原, 一幸
Citation	京都大学. 博士(薬学)
Issue Date	1976
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/20092">http://hdl.handle.net/2115/20092</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	thesis.pdf



[Instructions for use](#)

主論文

グリコシダーゼを用いた  
糖タンパク質糖鎖の構造研究

菅原 一 幸

# 目 次

序 論 .....	1
第 1 章 $\beta$ -マンノシダーゼおよび $\alpha$ -N-アセチルグル コサミニダーゼの精製ならびにそれらの一般的性質 .....	3
第 1 節 マンノフラノシダーゼの検索 .....	4
第 2 節 $\beta$ -マンノシダーゼの精製 .....	5
第 3 節 精製 $\beta$ -マンノシダーゼの一般的性質 .....	8
第 4 節 $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの精 製およびその性質 .....	9
第 5 節 考察と総括 .....	15
実験の部 .....	17
第 2 章 精製 $\beta$ -マンノシダーゼおよび $\alpha$ -N-アセチル グルコサミニダーゼの糖ペプチドに対する作用 .....	20
第 1 節 ゾウゲヤシマンナン由来のトリマンノシド に対する作用 .....	21
第 2 節 卵アルブミン糖ペプチドに対する作用 .....	22
第 3 節 タカアミラーゼA糖ペプチドに対する作用 .....	27
第 4 節 ラット肝臓ミクロソーム膜より得られる糖 ペプチドに対する作用 .....	32
第 5 節 考察と総括 .....	34
実験の部 .....	36
第 3 章 アスパルチルグリコシラミン尿症 (AGU) に関する研究 .....	39
第 1 節 N-(L-アスパルト-4-オイル)-2- アセタミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グル	

	コピラノシラミン (GlcNAc-Asn) の合成 .....	41
第2節	AGU の酵素的診断法の確立 .....	43
第3節	AGU 患者尿中のグリコシルアスパラギンの 構造研究 .....	46
第4節	考察と総括 .....	64
	実験の部 .....	66
結 論	.....	70
謝 辞	.....	71
引 用 文 献	.....	72

生体内に広汎に分布する糖タンパク質は、種々の生物学的性質をもつと考えられている。特に、動物細胞の原形質膜<sup>1-5</sup>や赤血球膜<sup>6,7</sup>にも糖タンパク質が存在することが明らかになるにつれて、細胞表面で細胞と環境との相互作用に糖タンパク質が重要な意義をもっていると考えられるようになってきた。こうした情勢のもとで、糖タンパク質の糖部分の構造は、ますます興味ある研究対象となっている。

糖タンパク質は、糖部分とタンパク質との結合部分の構造の違いにより、いくつかの例外はあるが、<sup>8,9</sup> O-グリコシド型とN-グリコシド型の2種に大別される。<sup>10</sup> 前者では、セリン、トレオニンやヒドロキシリシンなどのアミノ酸の水酸基に糖鎖が結合し、後者ではアスパラギンのアミド基にN-アセチルグルコサミンを介して糖鎖が結合している。後者の糖部分の構造はより複雑で、構成糖の種類も多く、その結合順序および結合様式はそれぞれの糖タンパク質に特徴的であるといわれているが、同じタンパク質部分をもつものでも糖部分の構造には微細な相異があり、構造研究はかなり困難である。<sup>18</sup> このような糖タンパク質の糖部分の構造研究には、種々のグリコシダーゼを用いる方法が最も有効であると考えられる。

著者は主に種々のグリコシダーゼを用いることによって、N-グリコシド型に属する糖タンパク質の糖部分に関して二つの新しい基本構造を見い出した。すなわち、卵アルブミン、タカアミラーゼAおよびラット肝臓ミクロソーム膜から得られる糖ペプチドを $\alpha$ -マンノシダーゼで消化したところ、Man-(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asnの構造をもつと思われる糖ペプチドを得た。この糖ペプチドに含まれるマンノースは、もはや $\alpha$ -マンノシダーゼによっては遊離しなかったため、 $\beta$ -マンノシド結合の存在が推定された。著者は、カタツムリの臓器に強い $\beta$ -マンノシダーゼ活性を見い出し、これを精製して、はじめて高純度の $\beta$ -マンノシダーゼ標品を得た。<sup>11</sup> これを用いて、上記糖ペプチドの構造を研究した

結果、共通の構造が存在することを見い出した。<sup>11,12,13</sup>

次に、糖タンパク質の代謝異常症であるアスパルチルグリコシラミン尿症の患者の尿中に排泄される、糖タンパク質由来と考えられる、オリゴ糖とアスパラギンの結合物 5 種の構造を調べた結果、 $\beta$ -Gal-(1-4)- $\beta$ -GlcNAc-Asn という共通の基本構造が存在することを見い出した。<sup>14,15</sup>

以下、これらの結果を中心に、得られた知見について述べる。

## 第1章 $\beta$ -マンノシダーゼおよび $\alpha$ -N-アセチルグルコサ ミニダーゼの精製ならびにそれらの一般的性質

糖タンパク質の糖部分の構造を解析する手段としては、過ヨウ素酸々化、メチル化、酸やアルカリによる部分加水分解などの化学的方法<sup>16</sup>とグリコシダーゼを用いる酵素的方法がある。糖タンパク質においては、一般にタンパク質部分に比べて、糖部分は比較的小さく、その糖鎖の中で、数種の糖がさまざまな順序で結合しているため、特に試料の少い時などには、グリコシダーゼを用いる酵素的方法が最も有効である。従って、多くのグリコシダーゼが糖タンパク質の糖部分の構造解析の試薬とする目的で、種々の動植物材料から精製されている。グリコシダーゼを構造研究の試薬とする際には、多量の酵素を長時間作用させることが多く、その精製においては、他のグリコシダーゼの混入には充分注意を払わなければならない。

従来、最もよく用いられてきたグリコシダーゼは、 $\beta$ -N-アセチルヘキサミニダーゼ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどであるが、個々についてみると、それらの標品中に含まれているかもしれない、もう一方のアノマー構造を分解する酵素の混入については十分な注意が払われていないことが多かった。その第1の理由は、各種臓器におけるそれらの酵素活性が、合成基質を用いて調べた結果ではあるが、上記の諸酵素の活性に比べて著しく弱いことであり、<sup>17</sup> 第2の理由は、各種糖ペプチドに含まれるN-アセチルグルコサミニド結合は $\beta$ -活性をもつ酵素で、<sup>18</sup> マンノシド結合は $\alpha$ -活性をもつ酵素で、<sup>18</sup> またガラクトシド結合は $\beta$ -活性をもつ酵素で、<sup>19</sup> それらのほとんどすべての残基が切断されると判断されたためであった。

著者は、N-グリコシド型糖タンパク質のうち、グルコサミンとマンノースのみから成る糖鎖の構造に注目し、先ず、 $\alpha$ -マンノシダーゼによる分解を行った。その結果、非還元末端にありながら、 $\alpha$ -マンノシダーゼによって遊離しないマンノース残基の存在をみとめた。このマンノース残基がマンノフラノ

シドあるいは $\beta$ -マンノシドである可能性を考慮して、これらの結合を分解するマンノフラノシダーゼおよび $\beta$ -マンノシダーゼを検索した。また、N-アセチルグルコサミンにも、 $\beta$ -結合のほか、 $\alpha$ -結合のものも存在する可能性が考えられたので $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼを分離精製した。

## 第1節 マンノフラノシダーゼの検索

従来、糖タンパク質に存在するマンノース残基はすべてピラノース構造をとっていると考えられていたが、著者は、 $\alpha$ -マンノシダーゼ作用に抵抗するマンノース残基がフラノース構造をとっている可能性を調べる目的で、種々の材料についてマンノフラノシダーゼ活性の測定を試みた。

基質としては、合成メチル $\alpha$ -および $\beta$ -マンノフラノシドを用いた。メチル $\alpha$ -マンノフラノシドの合成は、Hirst, Percival の方法に従って行った。<sup>20</sup> 最終段階で脱カルボニル化後の酢酸エチル抽出物を、酢酸エチル：プロパノール：水＝6：1：3の溶媒でペーパークロマトグラフィーを行うと、文献記載の $\alpha$ -型の他に、それよりも移動度の遅いメチル $\beta$ -マンノフラノシドも単離することができた。分離した物質の同定は、ガスクロマトグラフィーによって行った（実験の部参照）。メチル $\beta$ -マンノフラノシドはシロップ状であったが、分析の結果、均一であることがわかった。

これらの合成基質を用いて、グリコシダーゼ調製のために一般によく用いられる種々の臓器について、マンノフラノシダーゼの活性を測定した。すなわち、ブタ腎臓、ラット腎臓、ラット肝臓およびカタツムリ臓器（主として肝臓）を5倍量の水でホモジナイズしたものを試料とし、0.15 M 第二リン酸ナトリウム-0.075 M クエン酸緩衝液、pH 4.6, の中で、基質濃度 16 mM および 32 mM で、防腐剤としてトルエンを1滴加え、70時間インキュベートした。反応は、トリクロロ酢酸を加えて停止し、遠心して得た上清について、Park-Johnson 反応で還元力を測定した。<sup>21</sup> しかし、いずれの材料を用いた場合も、還元力の増加は全く見られなかった。さらに、同じ組成の、pH 3.8 および pH 5.5 の緩衝液と、0.075 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.7 を用いて、同様



にインキュベートしてみたが、やはり還元力の増加は全くみられなかった。

以上の結果から、マンノフラノシドを分解する酵素は、少くとも上記の臓器のように一般的な酵素源には存在しないことがわかった。このように、分解酵素が存在しないことから推察して、糖タンパク質にマンノフラノシド構造の存在する可能性は少いと推論した。

次に、 $\alpha$ -マンノシダーゼ作用に抵抗性をもつマンノシド結合が $\beta$ -型である可能性を調べる目的で $\beta$ -マンノシダーゼを検索した結果、カタツムリの臓器に強い活性の存在することを見い出したので、この酵素の分離精製を行った。

## 第2節 $\beta$ -マンノシダーゼの精製<sup>12</sup>

一般に、動物の臓器中の $\beta$ -マンノシダーゼ活性は非常に低いため、その分離精製はなされていない。著者が研究をはじめの前は、わずかにサザエの臓器の $\beta$ -マンノシダーゼの部分精製が行われていたにすぎない。<sup>22</sup> 著者は、たまたま沖縄産カタツムリ（アフリカマイマイ、*Achatina fulica*）の臓器に強い $\beta$ -マンノシダーゼ活性が存在することを見い出したので、これを材料として精製を行った。精製に際しては $\alpha$ -マンノシダーゼと $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼの除去に、特に注意を払った。基質としては、合成フェニル $\beta$ -マンノシドを用いたが、その合成は、同時に多量のフェニル $\alpha$ -マンノシドが生成するため、かなり困難であった。従って、基質の純度には、充分に検討を加えた（実験の部参照）。

以下、 $\beta$ -マンノシダーゼの精製の方法について述べる。精製操作は、特に示さない限り、4℃にて行った。

### 第1項 硫酸分画

カタツムリ臓器のアセトン粉末10gに200mlの0.05Mリン酸緩衝液、pH 7.24を加え、Waring blender（10分間）処理後、遠心（13,000×g、20分）し、上清を得た。沈殿は、さらに50mlの緩衝液で抽出し、得た上清をはじめの上清と合わせ、ドライアイスアセトンで凍結後、室温で融解させて、生じた不溶物を遠心して除き、粗抽出液を得た。この粗抽出液に硫酸を加え32%飽

和とし、一夜4℃に放置後、遠心(13,000×g、20分)した。得られた上清に、さらに硫酸を加え59%飽和とし、同様にして32~59%硫酸沈殿画分を得た。この画分には95%のβ-マンノシダーゼ活性が回収され、比活性は2.5倍に上昇した(表1参照)。

TABLE I  
SUMMARY OF PURIFICATION OF β-MANNOSEDASE FROM SNAIL VISCERA

Fraction from	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	α-Mannosidase activity (units)	β-Acetylglucosaminidase activity (units)
0.05 M phosphate buffer extract (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2000	82	0.041	100	37	366
fractionation	753	78	0.103	95	32	266
Acetone fractionation	93	50	0.54	61	1.0	140
Lyophilization	93	40	0.43	49	0.4	122
Hydroxylapatite chromatography	19	27	1.41	33	0.0095	0.368
DEAE-cellulose chromatography	5.6	26.5	4.73	32	0.0023	0.096

## 第2項 アセトン分画

硫酸分画によって得られた沈殿(753mg タンパク質)をタンパク質濃度が0.3~0.4%になるように蒸留水に溶かした。このタンパク質溶液に、硫酸および酢酸亜鉛をそれぞれ最終濃度0.04M、0.01Mになるように加えた。さらに、1N NaOHにてpH6.0に合わせた後、-10℃に冷却した50%アセトン溶液(0.01M酢酸亜鉛緩衝液、pH5.9、とアセトンを等容量ずつ混合して調製)を徐々に加え、アセトン濃度40%とした。15~20分間攪拌後、遠心(13,000×g、20分)し、得られた上清に、さらに-10℃に冷却したアセトンを加え、アセトン濃度70%とした。得られた40~70%アセトン沈殿画分には、64%の収率でβ-マンノシダーゼ活性が回収され、比活性は約5倍に上昇した。この段階で大部分のα-マンノシダーゼ活性は消失したが、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性は依然として強く残存していた(表1参照)。これを除くために、次に、2種のカラムクロマトグラフィーを行った。

### 第3項 ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー

アセトン分画にて得られた40~70%アセトン沈殿(90mgタンパク質)は、いったん0.01Mリン酸カリウム緩衝液、pH 7.24、に溶かし、水に対して透析後、不溶物を遠心除去し、凍結乾燥した。この凍結乾燥物を6mlの0.005Mリン酸カリウム緩衝液、pH 6.8、に溶かし、あらかじめ同じ緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトのカラム(1.6×16cm)で処理した。約70%のβ-マンノシダーゼ活性は素通り画分に回収され、残りの活性は0.2M緩衝液でβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性と共に溶出された。この処理によって、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性は事実上消失し、比活性は、3.3倍に上昇した(表1参照)。

### 第4項 DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

さらに充分に精製するために、前段階で得られた試料の3分の1(10ml)を、あらかじめ0.005Mリン酸カリウム緩衝液、pH 6.8で平衡化したDEAE-セルロースカラム(1.6×16cm)にかけ、段階的に緩衝液の濃度を上げて溶出した。図1に示したように、大部分のβ-マンノシダーゼ活性は0.02M

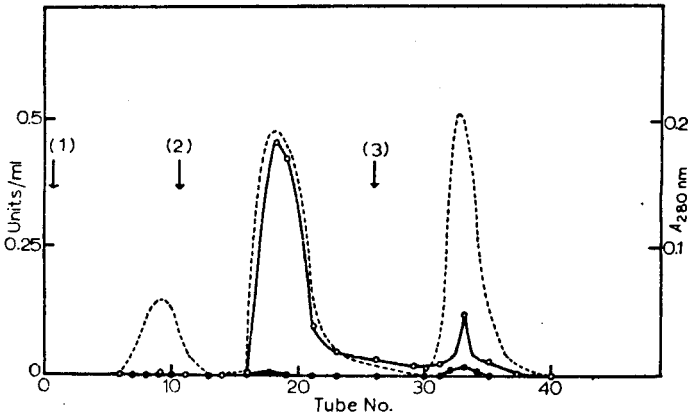


Fig. 1. Chromatographic purification of  $\beta$ -mannosidase on DEAE-cellulose. A 10-ml solution of the  $\beta$ -mannosidase preparation from hydroxylapatite chromatography in 0.005 M phosphate buffer, pH 6.8, was applied to a column of DEAE-cellulose (1.6 cm  $\times$  16 cm) equilibrated with the same buffer. Elution was carried out with phosphate buffer of stepwise increasing concentrations; (1) 0.005 M, (2) 0.02 M and (3) 0.1 M. Flow rate was 15 ml/h, and 4-ml fractions were collected. Aliquots were used for enzyme assays. Protein was determined by the absorbance at 280 nm.  $\circ$ — $\circ$ ,  $\beta$ -mannosidase activity;  $\bullet$ — $\bullet$ ,  $\beta$ -acetylglucosaminidase activity; ---, absorbance at 280 nm.

緩衝液で溶出した画分に回収された。この画分をメンブランフィルターで濃縮後、水に対して透析し、精製標品とした。粗抽出液に比べると、比活性は115倍に上昇し、収率は32%と良好であった。この標品はディスク電気泳動上、少なくとも4種のタンパク質を含んでいたが、事実上 $\alpha$ -マンノシダーゼおよび $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼを含んでいなかった(表1参照)。表には示さなかったが、この標品には $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼも、アスパラギンとN-アセチルグルコサミンの間の結合を切断する4-L-アスパルチルグリコシラミン-アミドヒドロラーゼ(以下アミダーゼと略す)も含まれていなかった。精製 $\beta$ -マンノシダーゼの比活性は、標準活性測定条件下では4.73 units/mg タンパク質であったがLineWeaver-Burk plotから求めた値は6.67であった。

### 第3節 精製 $\beta$ -マンノシダーゼの一般的性質

#### 第1項 至適pH

2種の緩衝液で至適pHを調べた。0.25Mクエン酸-0.125M第二リン酸カリウム緩衝液ではpHを2.5から5.0まで変化させて調べ、0.25Mクエン酸-1M水酸化カリウム緩衝液ではpHを4.0から6.5まで変化させて調べた。その結果、どちらの緩衝液においても、至適pHは4.5であったが、pH4.0からpH5.0の間では活性に大きな差はみられなかった。

#### 第2項 ミハエリス定数

フェニル $\beta$ -マンノシドを基質として、至適活性測定条件下で求めた $K_m$ 値は6.5 mMであった。

#### 第3項 熱安定性

精製 $\beta$ -マンノシダーゼは、その水溶液を $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存しておく限りでは、極めて安定であり、少なくとも2年間は活性の低下はみられなかった。熱安定性を調べるために、0.01Mクエン酸と0.01M第二リン酸カリウムから調

製した、pH 3.5 から 7.0 の種々の pH をもつ、緩衝液を用いた。各緩衝液に精製  $\beta$ -マンノシダーゼを 0.03 unit/ml の濃度に溶かし、55°C に 5 分間保った後、試料の一部をとり、標準の測定条件下で活性を測定した。その結果、pH 4.5 では約 40%、4.5 以下の pH では 80% 以上の活性の消失がみられたが、pH 5.0 から 7.0 の間では 10~20% の活性の低下がみられたにすぎなかった。

#### 第4項 PCMB (P-chloro mercuric benzoate) の効果

0.25 mM の PCMB を含む 0.4 ml の 0.01 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.5、の中で 32 munits の酵素（硫酸沈殿画分）をあらかじめ 37°C で 15 分間インキュベートしておき、次に 25 mM フェニル  $\beta$ -マンノシド水溶液 0.1 ml を加え、さらに 35 分間インキュベートして活性を測定した。その結果、カタツムリの  $\beta$ -マンノシダーゼは PCMB で全く阻害されなかった。同時に同じ標品中の  $\alpha$ -マンノシダーゼについても P-ニトロフェニル  $\alpha$ -マンノシドを基質として同様な実験を行ったが、全く阻害はみられなかった。しかし、フェニル  $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニドを基質として測定した  $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性は完全に阻害された。

#### 第4節 $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製およびその性質

この酵素に関しても、2、3 の報告があるのみであり、研究は不十分である。1967年 Weissmann らは、<sup>23</sup> ブタ肝臓からこの酵素を部分精製し、 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性と異り、 $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性と  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性は別々の酵素タンパク質に起因することを報告している。しかし、精製は充分でなく、天然基質に対する作用は全く調べられていない。翌年、Muramatsu は、<sup>24</sup> サザエの肝臓より  $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼを比活性 130 munits/mg タンパク質まで精製し、PCMB 阻害をうけるという性質などと共に、オボムコイドに対する作用を報告している。それによれば、この酵素標品によってオボムコイ

ドから少量のN-アセチルグルコサミンが遊離することを観察したが、酵素標品中にまだ少量の $\beta$ -活性が存在するため結合様式の決定にまでは至らなかった。その後、O'Brienは、<sup>25</sup>  $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼがムコ多糖代謝異常症の一種であるSanfilippo病Bの矯正因子の1つであることを示した。

著者は、 $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼをブタ肝臓およびカタツムリ臓器から精製し、その性質を調べた。精製操作は特に示さない限り4℃にて行った。

#### 第1項 ブタ肝臓の $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製およびその一般的性質

ブタ肝臓を水抽出し、硫酸分画（0～40%飽和）、アセトン分画（40～60%）およびDEAE-セファデックスA-50カラムクロマトグラフィーを行って $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼを精製した。基質としてはフェニル $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニドを用いた。図2に示すように、DEAE-セファデックスA-50で分画すると $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性は素通りし、 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性は、すべて0.4M食塩で溶出した画分に含まれるので、両者を容易に分離することができた。素通り画分を再クロマトグラフィーし、最終精製標品を得た（表2）。精製標品の比活性は52 munits/mg タンパク質で、粗抽出液の約230倍に精製された。回収率は5.3%と低かったが、この標品は、次に述べるカタツムリ臓器の酵素に比べると、かなり安定で、37℃の条件では5日間放置しても10%しか失活しなかった。また、この標品は事実上 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性を含まず、表には示してないが、 $\alpha$ -、 $\beta$ -マンノシダーゼおよびアスパラギンとN-アセチルグルコサミンの間の結合を切断するアミダーゼの各活性もなく、糖タンパク質の糖部分の構造決定の為の試薬としては使用に耐えるものである。0.025Mクエン酸および0.025M第二リン酸カリウムから調製した緩衝液を用いて調べた結果、この酵素の至適pHは4.0であった。

第2項 カタツムリ臓器の $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ  
の精製およびその性質

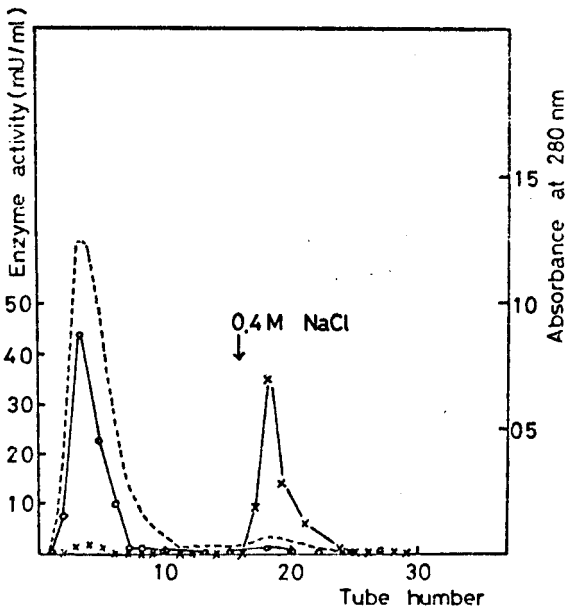


Fig. 2. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase from hog liver. A 10 ml solution of the  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase preparation (20 mg protein, 640 munits) from acetone fractionation in 0.006 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.01 M sodium citrate was applied to a column of DEAE-Sephadex (1,6 x 7 cm) equilibrated with the same buffer. Elution was carried out with the same buffer, then with buffer containing 0.4 M NaCl. Flow rate was 30 ml per hr, and 6 ml fractions were collected. Aliquots were used for enzyme assays. Protein was determined by the absorbance at 280 nm.  
o—o :  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase activity;  
x—x :  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase activity;  
----- : absorbance at 280 nm.

カタツムリ臓器のアセトン粉末を20倍量の0.05 Mクエン酸-0.05 M第二リン酸カリウム緩衝液、pH 5.2、で抽出し、硫酸分画(32~65%飽和)酸処理(酢酸でpH 3.5とし、5分間放置後アンモニア水でpH 4.5に再調整し、生じた沈澱を遠心除去)、アセ

トン分画(40~50%)およびCM-セファデックスC-50カラムクロマトグラフィーを行って精製した。CM-セファデックスカラムクロマトグラフィーの段階で $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性の大部分は0.05 M食塩を含む緩衝液で溶出され、 $\alpha$ -活性はより高濃度の食塩を含む緩衝液で溶出された。しかし、 $\alpha$ -活性画分中の $\beta$ -活性は依然としてかなり強く、この方法では、これ以上両者を分離することはできなかった(図3)。表3に示すように、ここに得られた標品は比活性268 munits/ $\mu$ gタンパク質で、粗抽出液の約50倍に精製され、前項のブタ肝臓の標品の約5倍、サザエ肝臓の精製標品の約2倍の比活性をもつことになるが、 $\beta$ -活性の混入が著しいため構

	Protein (mg)	$\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase			$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase	
		Total activity (mU)	Specific activity (mU/mgP)	Yield (%)	Total activity (U)	Specific activity (mU/mgP)
Extraction	16550	3750	0.227	100	152	9200
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation (0-40%)	10200	3000	0.294	80	429	4200
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation (0-40%)	2900	1360	0.470	36	29.8	10300
Acetone fractionation (40-60%)	46.1	437	9.47	12	0.61	13.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation (0-40%)	14.5	336	23.2	9.0	0.334	23.0
DEAE-Sephadex A-50	7.25	262	36.2	7.0	0.00464	0.64
DEAE-Sephadex A-50	3.83	199	52.0	5.3	0.00090	0.235

Table 2. Summary of purification of  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase from hog liver. 200 g of hog liver was used.

造決定のための試薬とするには不適當である。

この酵素の至適 pH は 3.5 であった。熱に対する安定性はあまりよくなく、例えば、37°C、1時間の条件では90%の活性が残存するが、50°C、1時間の条件では50%の失活があった。また、37°Cの条件でも1日放置すると、活性は50%以下に減少した。この酵素は、酢酸緩衝液中、0.2 mMのPCMBで完全に阻害された。そこで、PCMB-セファロースのカラムでクロマトグラフィーを行ってみると、 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性は素通りしたが、 $\alpha$ -活性は完全に消失した(図4)。しかし、素通り画分にシステインを加えると活性は完全に回復した。PCMB-セファロースカラムによって、ある種のSH化合物が除去されたために $\alpha$ -活性が消失したものと考えられるが、これ以上の詳しい研究は行っていない。上記の実験には、アセトン分画段階の試料を用いたが、同様の現象は最終標品においても、またブタ肝臓の標品においても観察された。分子量は、セファデックスG-200のゲル濾過の結果、約20万のものと約10万のもの2種が存在することがわかった(図5)。このゲル濾過時、および前述のCM-セファデックスカラムクロマトグラフィーでの $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの挙動は、O'Brienらの報告したSanfilippo病Bの矯正因子のそれと類似していた。従って、この



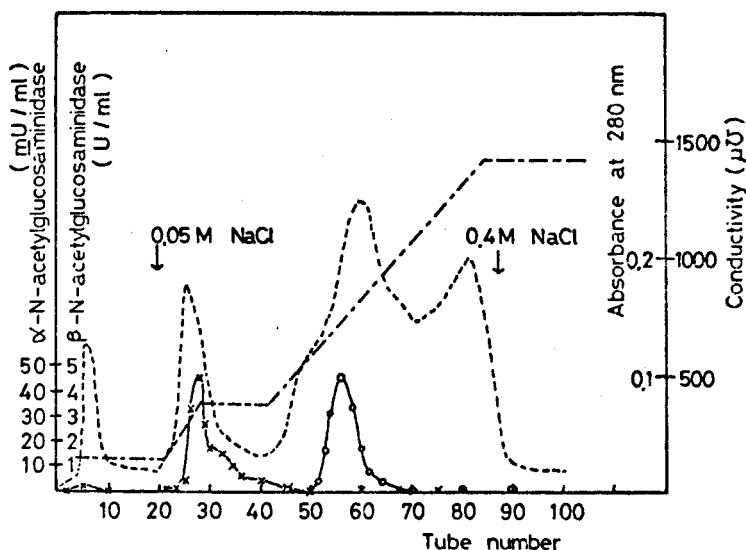


Fig. 3. CM-Sephadex C-50 column chromatography of  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase from snail.

A 6.9 ml sample corresponding to 16.8 mg protein in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.2, was applied to a column (1.1 x 6.5 cm) of CM-Sephadex C-50 equilibrated with the same buffer. Elution was carried out with the same buffer, then with a linear gradient from 0.05 M to 0.4 M NaCl in the buffer. Flow rate was 4 ml per hr, and 2 ml fractions were collected. Aliquots were used for enzyme assays. Protein was determined by the absorbance at 280 nm.

o—o :  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase activity;  
 x—x :  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase activity;  
 ---- : absorbance at 280 nm, - - - - : conductivity.

	Protein (mg)	$\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase			$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase	
		Total activity (U)	Specific activity (mU/mgP)	Yield (%)	Total activity (U)	Specific activity (mU/mgP)
Extraction	4200	23.1	5.5	100	1920	457
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation (32-65%)	2270	24.5	10.8	106	2030	897
Acid precipitation	1890	19.2	10.2	83	1460	772
Acetone fractionation (40-80%)	208	12.3	59.0	53	1590	7650
Dialysis	163	8.82	54.1	38	980	6000
CM-Sephadex C-50	21.8	5.85	268	25	5.7	262

Table 3. Summary of purification of  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase from snail. 30g of acetone powder was used.

酵素が、Sanfilippo病Bの患者の体内に蓄積するといわれているヘパラン硫酸に作用する可能性が考えられたので、以下のような実験を行った。ヒト肝臓より Schillerらの方法に従って調製したヘパラン硫酸(1.25 M食塩溶出画分)、<sup>26</sup> およびそれを酸処理(0.04 M HCl、100°C、1時間)して脱硫酸することによって得られた、<sup>27</sup> 遊離アミノ基をもつヘパラン硫酸の両者を上記酵素とインキュベートした。還元力の増加、<sup>21</sup> アミノ糖の遊離、<sup>28</sup> およびセファデックスG-50のゲル透過のパターンの変化とを指標として、分解の有無を調べたが、有意な分解は認められなかった。

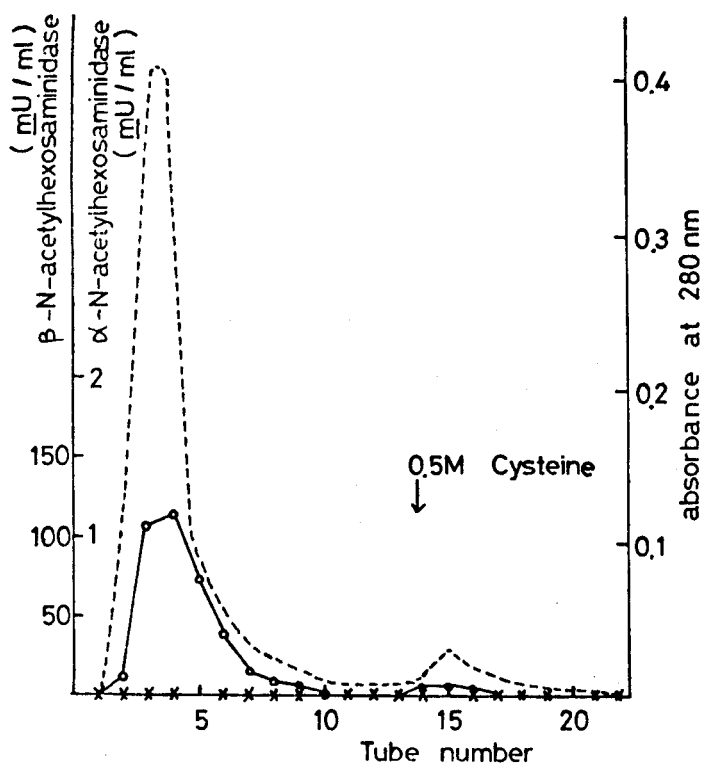


Fig. 4. PCMB-Sepharose column chromatography of  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase from snail. A sample (10.3 munits) from acetone fractionation was applied to a column (1.1 x 3.2 cm) of PCMB-Sepharose equilibrated with 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0. Elution was carried out with the same buffer containing 0.5 M cystein. The flow rate was 8 ml per hr, and 2.6 ml fractions were collected.

o—o :  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase activity;  
 x—x :  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase activity;  
 ----- : absorbance at 280 nm.

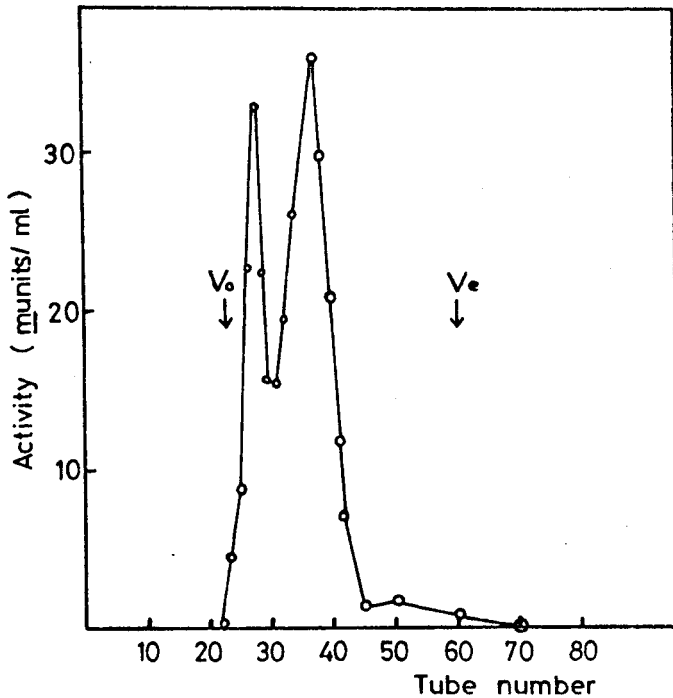


Fig. 5. Sephadex G-200 column chromatography of purified  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase from snail.

A sample (4.5 ml), corresponding to 870 munits, was applied to a column (1.5 x 105 cm) of Sephadex G-200 equilibrated with 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 6.0, and eluted with the same buffer. The flow rate was 3.8 ml per hr, and 2.8 ml fractions were collected.

o—o :  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase activity.

### 第5節 考察と総括

糖タンパク質の糖部分の構造解析の試薬とする目的で、いくつかのグリコシダーゼの精製を試みた。

まず、メチル $\alpha$ -、および $\beta$ -マンノフラノシドを基質として、ブタ腎臓、ラット肝臓、ラット腎臓およびカタツムリ臓器を用いてマンノフラノシダーゼ活性を測定したが、これらの材料には、ほとんど活性は認められなかった。従って、このような酵素および、その基質となるマンノフラノシドが高等動物に存在する可能性は少いものと考えられた。なお、ある種のカビの産生する多糖に $\alpha$ -マンノフラノシドの存在することが報告されている。<sup>29</sup>

次に、カタツムリ臓器から $\beta$ -マンノシダーゼを精製した。カタツムリは古

くから種々のグリコシダーゼ調製のためのすぐれた材料として知られているが、著者の用いた沖縄産カタツムリは通常の日本産カタツムリよりはかなり大きく、また他の動植物由来の材料とは異り $\beta$ -マンノシダーゼ活性が $\alpha$ -マンノシダーゼ活性よりも強く、 $\beta$ -マンノシダーゼ精製のための材料としては極めてすぐれていた。精製は、カタツムリ臓器のアセトン粉末を材料として、硫酸分画およびアセトン分画という比較的容易な方法で分画した後、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーおよびD E A E-セルロースカラムクロマトグラフィーを用いて行った。その結果、粗抽出液の115倍の活性をもつ、比活性6.67 units/mg タンパク質の標品を得ることができた。この標品は、ディスク電気泳動上、少なくとも4種のタンパク質を含み、まだ均一にはなっていないが、 $\alpha$ -マンノシダーゼ、 $\alpha$ -および $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ、アスパラギンとN-アセチルグルコサミンの間の結合を切断するアミダーゼのいずれをも含まず、糖タンパク質の糖部分の構造解析のための試薬としては十分に精製されたと考えられる。また、熱や凍結融解に対しても、かなり安定であり、凍結保存すれば少なくとも2年間は安定なので試薬として用いるのにはすぐれた標品である。フェニル $\beta$ -マンノシドを基質とした時の本酵素の $K_m$ は6.5 mMであった。本酵素はPCMBでは全く阻害されなかった。

$\beta$ -マンノシダーゼは、現在まで、このカタツムリの他にもニワトリ輸卵管<sup>30</sup>、サザエ肝臓<sup>22</sup>、およびパイナップル果軸<sup>31</sup>のものが、いずれも糖タンパク質の構造解析の試薬とする目的で精製されている。著者の用いたカタツムリ臓器は、もともと $\beta$ -マンノシダーゼ活性が強く、しかも32%という高収率で精製標品が得られる点ですぐれている。

次に、マンノースと共に糖タンパク質に最も頻繁にみられる糖成分であるN-アセチルグルコサミンのグリコシドの分解酵素である $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製を、2つの材料を用いて試みた。カタツムリのものは十分に $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性を除去できず、また安定性もあまりよくないので構造解析の試薬としては不適當であると思われた。しかし、ブタ肝臓のものはかなり安定であり、硫酸分画、アセトン分画およびD E A E

セファデックスA-50カラムクロマトグラフィーを行って、 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ、 $\alpha$ -および $\beta$ -マンノシダーゼ、アスパラギンとN-アセチルグルコサミンの間の結合を切断するアミダーゼのいずれをも含まぬ、構造解析の試薬として用いるに十分な純度をもつ標品を得ることができた。なお、 $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼは、いずれの材料の場合もPCMBで完全に阻害されることがわかった。

## 実 験 の 部

### A) 実験材料

カタツムリ臓器のアセトン粉末は、凍結した臓器（主として肝臓）をドライアイスで冷却したアセトンで繰り返し3回処理して調製した。ラットおよびブタの臓器は新鮮なもの、あるいは凍結保存（ $-20^{\circ}\text{C}$ ）したものを使用した。ヒドロキシアパタイトはSiegelmanらの方法に従って調製した<sup>32</sup>。DEAE-セルロースはBrown Co., (U. S. A.) の製品を使用した。セファデックスG-50およびG-200、CMセファデックスC-50、DEAE-セファデックスA-50およびセファロース4BはPharmacia (Sweden)の製品を使用した。PCMB-セファロースはCuatrecasasの方法に従って<sup>33</sup>、P-クロロ水銀安息香酸をジアミノジプロピルアミンを介してセファロース4Bに結合させることによって調製した。メンブランフィルター装置は、Diaflo Ultrafiltration, Model 200, Amicon Corp., (U. S. A.) の製品を使用した。ヒト肝臓のヘパラン硫酸は東京医科歯科大学の永井裕博士より提供された。

### B) グリコシダーゼの活性測定

フェニル $\beta$ -マンノシド<sup>34</sup>、P-ニトロフェニル $\alpha$ -マンノシド<sup>35</sup>、フェニル $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニド<sup>36</sup>およびP-ニトロフェニル $\beta$ -N-アセチルグルコサミニド<sup>37,38</sup>は、いずれも文献記載の方法に従って合成した。ただし、フェニル $\beta$ -マンノシドの純度についてはC)項で述べるように十分な検討を加えた。4-L-アスパルチルグルコシラミンの合成法は第3章の第1節に記す。

$\beta$ -マンノシダーゼの活性は基質（フェニル $\beta$ -マンノシド）を0.05 M クエン酸-0.025 M 第二リン酸カリウム緩衝液、pH 4.5、に5 mMの濃度に溶かし、酵素を加えて37°Cでインキュベートしたのち、遊離したフェノールをAsp,<sup>39</sup>あるいはKerrら<sup>40</sup>の方法で定量することにより測定した。 $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性は、ブタ肝臓の場合には0.05 M クエン酸-0.025 M 第二リン酸カリウム緩衝液、pH 4.5、カタツムリ臓器の場合には0.05 M クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 4.8、を用いて基質濃度10 mMでインキュベート後、遊離したフェノールを上記の方法で定量することにより測定した。 $\alpha$ -マンノシダーゼおよび $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼの活性はConchieらの方法に従って測定した。<sup>41</sup>すなわち、いずれもP-ニトロフェニルグリコシドを基質として、それぞれ基質濃度2 mM、0.2 M 第二リン酸ナトリウム-0.1 M クエン酸緩衝液、pH 4.6、および基質濃度5 mM、0.05 M クエン酸カリウム緩衝液、pH 4.3、の条件下で酵素を加えてインキュベート後、遊離したP-ニトロフェノールを、アルカリ性で430 nm における吸収を測定することによって、定量した。アミダーゼ活性は、基質（アスパルチル-N-アセチルグルコシラミン）を0.05 M 第二リン酸ナトリウム-0.05 M クエン酸緩衝液、pH 5.5、に5 mMの濃度に溶かし、酵素を加えて37°Cでインキュベート後、遊離したN-アセチルグルコサミンをReissigらの方法<sup>28</sup>に従ったMorgan-Elson 反応で定量することにより測定した。

酵素活性の単位 (unit) は、上記の各条件下において合成基質より1分間に1  $\mu$ mole のフェノール、P-ニトロフェノールあるいはN-アセチルグルコサミンを遊離する酵素量を1 unit とした。比活性は、mgタンパク質あたりのunit (unit/mg タンパク質) で表示した。

### C) 合成フェニル $\beta$ -マンノシドの純度の検討

フェニル $\beta$ -マンノシドの合成はかなり困難で、同時に生成する多量の $\alpha$ -体から注意深く分離しなければならない。得られた標品について、その純度をガスクロマトグラフィーおよび酵素消化によって確認した。ガスクロマトグラフはHitachi Gas-chromatograph Type K-23を用い、カラム(0.3 $\times$ 200 cm)には1.5%のSilicone gum (SE30) を塗布した

Chromosorb Wを充填した。試料はSweeleyらの方法に従って、<sup>42</sup>トリメチルシリル化後、160℃で注入し、2分後2℃/minの速度で230℃まで昇温した。N<sub>2</sub>およびH<sub>2</sub>ガスの流速は、それぞれ20 ml/minとした。この条件下でフェニルβ-マンノシドは単一ピークを与え、保持時間は24.16分であった。一方、Helferich、Winklerの方法<sup>34</sup>に従って合成したフェニルα-マンノシドの保持時間は22.12分であった。また、合成フェニルβ-マンノシドは、ブタ腎臓からOkumura, Yamashinaの方法<sup>17</sup>で精製したα-マンノシダーゼによって全く分解されず、今回精製したカタツムリ臓器のβ-マンノシダーゼ標品によって完全に分解され、等量のマンノースおよびフェノールを生成した。

#### D) タンパク質の定量

Lowryらの方法<sup>43</sup>により、卵アルブミンを標準として定量した。

#### E) ディスク電気泳動

Davisの方法<sup>44</sup>に従って調製したpH 9.4の7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。

#### F) メチルα-およびβ-マンノフラノシドの同定

合成メチルα-およびβ-マンノフラノシドの同定はガスクロマトグラフィーによって行った。ガスクロマトグラフ、カラムおよび樹脂はC)項と同様である。試料を115℃で注入し、2分後より、2℃/minの割合で昇温した。標準品としては、マンノースを0.1 Nメタノール塩酸中で、100℃、20時間加熱することによって合成したα-、β-マンノピラノシドおよびα-、β-マンノフラノシドの混合物を使用した。

## 第2章 精製 $\beta$ -マンノシダーゼおよび $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの糖ペプチドに対する作用

$\alpha$ -マンノシダーゼは種々の動植物から精製され、糖タンパク質の糖部分に含まれているマンノースのアノマー構造の解析に用いられてきた。<sup>45</sup> 初期の研究対象となったのは卵アルブミン、タカアミラーゼAおよびリボヌクレアーゼBなどの糖タンパク質であった。これらの糖タンパク質の糖部分においては、マンノースが非還元末端に露出していることが知られている。ナタ豆、<sup>46</sup> ブタ腎臓、<sup>17</sup>あるいはサザエ肝臓<sup>47</sup>から十分に精製された $\alpha$ -マンノシダーゼを用いて調べた場合、ほとんどのマンノースは $\alpha$ -マンノシダーゼによって遊離するが、還元末端に近い最内部のマンノシド結合のみは水解されないことがわかってきた。一方、Lee<sup>48</sup>は、NMRスペクトルに基いて、この最内部のマンノシドが $\alpha$ -結合であると結論し、さらに、植物から新しく調製した $\alpha$ -マンノシダーゼを用いれば、この結合を水解することができると報告した。ただし、その $\alpha$ -マンノシダーゼ標品の性質については報告されていなかった。

このような背景のもとで、当時支配的であったのは、 $\alpha$ -マンノシダーゼの限定された作用はアグリコン特異性によるものであるという考え方であった。事実、コーヒー豆の $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、<sup>49</sup>ラット脳皮質の $\alpha$ -フコシダーゼ、<sup>50</sup>黒麴カビの $\alpha$ -マンノシダーゼ<sup>51,52</sup>などは厳密なアグリコン特異性をもつことが知られていた。Okumura, Yamashina<sup>53</sup>は、ブタ腎臓の $\alpha$ -マンノシダーゼのアグリコン特異性について詳しく研究した。その結果、アグリコンがマンノースの場合には $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 2)、 $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 3)、 $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 4)、 $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 6)のすべての結合に作用し、またアグリコンがN-アセチルグルコサミンの場合にも、少なくとも $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 3)と $\alpha$ - (1 $\rightarrow$ 6)の結合には作用することがわかり、卵アルブミンなどに存在する最内部のマンノシド結合の $\alpha$ -マンノシダーゼ作用に対する抵抗性を、アグリコン特異性で説明するだけの積極的な証拠は得られなかった。また、Okumura, Yamashina<sup>17</sup>は、アスパラギン



の阻害効果を考え、卵アルブミン糖ペプチドからアミダーゼを用いてアスパラギンを遊離させることによって調製したオリゴ糖に $\alpha$ -マンノシダーゼを作用させたが、やはり1個のマンノースは遊離しなかった。

著者は、 $\alpha$ -マンノシダーゼ作用に抵抗するマンノースがフラノース構造をもつ可能性を検討するために、マンノフラノシダーゼを検索したが、少くとも用いた材料では酵素活性は検出されなかった(第1章第1節参照)。従って、次に $\beta$ -マンノシド結合の可能性を調べるために、精製 $\beta$ -マンノシダーゼを用いて検討を加えた。 $\beta$ -マンノシダーゼ活性も、一般に、動物の臓器に於いては他のグリコシダーゼに比べて著しく弱いことが知られている。<sup>17</sup>しかし、マンノフラノシダーゼと異り、やや特殊な材料を用いれば、かなりの $\beta$ -マンノシダーゼを見い出すことができる。事実、Muramatsu, Egami<sup>47</sup>はサザエ肝臓にかなりの $\beta$ -マンノシダーゼ活性を見い出して、これを精製した。しかし、この $\beta$ -マンノシダーゼも卵アルブミンやタカアミラーゼA糖ペプチドには作用しなかったと報告していた。著者は、卵アルブミン糖ペプチド、タカアミラーゼA糖ペプチドおよびラット肝臓ミクロソーム膜より得られた糖ペプチドに、先ず $\alpha$ -マンノシダーゼを働かせて大部分のマンノースを遊離させたのち、 $\alpha$ -マンノシダーゼ抵抗性の1モルのマンノースを含む糖ペプチドを単離した。次に、この糖ペプチドに、カタツムリ臓器から精製した $\beta$ -マンノシダーゼを作用させることによって、 $\alpha$ -マンノシダーゼ抵抗性のマンノシド結合が $\beta$ -結合であることを証明した。

#### 第1節 ゾウゲヤシマンナン由来のトリマンノシドに対する作用<sup>12</sup>

合成基質に対する分解能力を指標として精製した $\beta$ -マンノシダーゼが天然の基質にも作用することを確認する意味で、ゾウゲヤシマンナン由来の、すでに $\beta$ -マンノシド結合をもつことの知られているトリマンノシド、 $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Man-(1 $\rightarrow$ 4)-Man<sup>54</sup>を用いて、酵素の活性およびアノマー構造に対する特異性を検討した。

460 $\mu$ gのトリマンノシドとブタ腎臓より精製した0.4 unitの $\alpha$ -マンノ

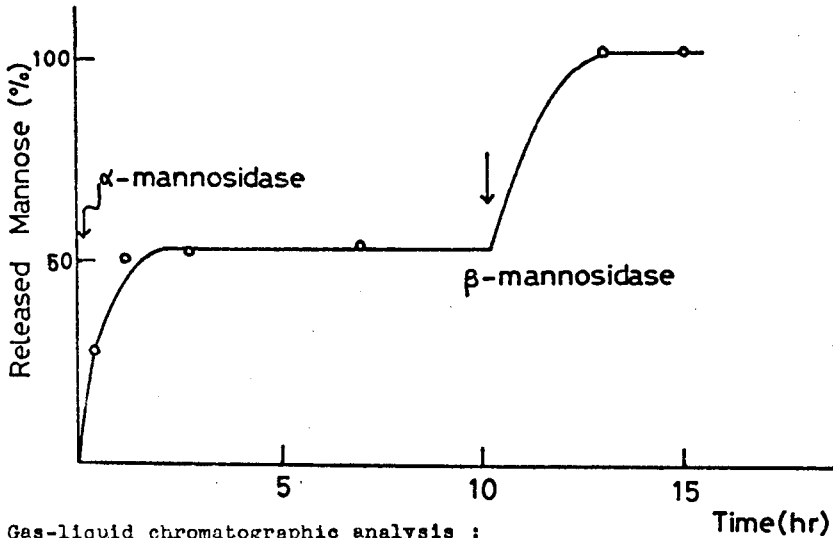
シダーゼを 2.0 ml の 0.06 M クエン酸 - 0.03 M 第二リン酸カリウム緩衝液 pH 4.5、の中で 37°C においてインキュベートし、還元力の増加を追跡すると 5~8 時間で還元力は一定値に達した。この値は、 $\alpha$ -および  $\beta$ -の 2 種のマンノシド結合が両方とも切断されたことにより生成する還元力を 100% とすると、その 50% に相当する値であった。次に、この反応液 0.8 ml をとり、0.2 ml の  $\beta$ -マンノシダーゼ (41 munits) を加え、さらにインキュベートすると、すみやかに還元力の増加を示した。還元力は 13~15 時間で一定値に達したが、その値は残っていたすべてのマンノシド結合が切断されたことを示すだけの還元力に相当していた (図 6)。また、 $\alpha$ -マンノシダーゼによる還元力の増加が終了したとき (反応開始後 8 時間)、および  $\beta$ -マンノシダーゼ添加による新たな還元力増加が終了したとき (反応開始後 15 時間) に、それぞれ反応液をガスクロマトグラフィーによって分析した結果、8 時間では約 33%、15 時間では 98% の遊離マンノースが検出され、用いたトリマンノシドが  $\alpha$ -マンノシダーゼによって 1 モルのマンノースを遊離した後、生成したジマンノシドが  $\beta$ -マンノシダーゼによって完全に水解されたことを示した。

これとは別に、0.12 unit の  $\beta$ -マンノシダーゼを 1 ml の上記緩衝液中で、直接トリマンノシド (230  $\mu$ g) とインキュベートしてみたが、12 時間後でも還元力の増加は全く認められなかった。従って、この酵素標品中には、天然基質を用いて測定した場合でも、 $\alpha$ -マンノシダーゼが混入していないことが分った。また、この  $\beta$ -マンノシダーゼは  $\beta$ -結合に特異的で、エンド型の活性を有しないことが確認された。

## 第 2 節 卵アルブミン糖ペプチドに対する作用<sup>12</sup>

卵アルブミンは早くから結晶化された糖タンパク質の 1 つである。特別な生物活性はないが、容易に大量の試料が得られるので、糖タンパク質のすぐれた研究試料として、よく研究されている。<sup>55</sup> 卵アルブミンからプロナーゼ消化によって得られる糖ペプチドの推定構造式は Huang らによれば、<sup>18</sup> 図 7 に示す通りである。非還元末端部分の構造が少しずつ異なる 5 種の糖ペプチド (A~E) が

存在することを示している。彼らは、ナタ豆の  $\alpha$ -マンノシダーゼを用いて、これらの糖ペプチドからすべてのマンノースが遊離したと報告していた。しかし、ブタ腎臓の  $\alpha$ -マンノシダーゼを用いた Okumura, Yamashina の研究

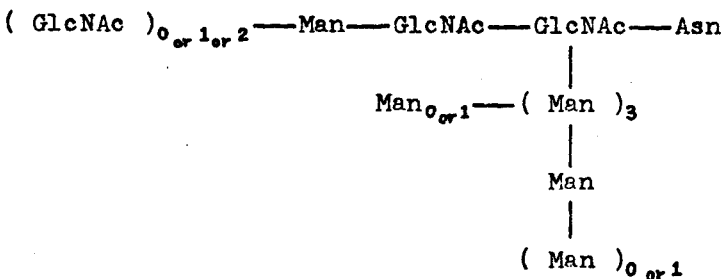


Gas-liquid chromatographic analysis :

	8 hr ( released Man % )	15 hr ( released Man % )
$\alpha$ -mannosidase digest	34.7	33.4
$\beta$ -mannosidase digest		98.0

Fig. 6. Release of mannose from a trimannoside,  $\alpha$ -Man-(1-4)- $\beta$ -Man-(1-4)-Man, by  $\alpha$ - and  $\beta$ -mannosidases.

The trimannoside corresponding to 460  $\mu$ g mannose was initially incubated with 0.4 unit of  $\alpha$ -mannosidase from pig kidney in 2.0 ml of 0.06 M citric acid - 0.03 M dipotassium phosphate buffer, pH 4.5, at 37°C. After 10 hr, 0.8 ml of  $\beta$ -mannosidase from snail (41 units) in the same buffer. Gas-liquid chromatographic analyses were performed at 8 and 15 hr on the initial reaction mixture and at 15 hr on the new reaction mixture.



によれば、<sup>17</sup>卵アルブミン糖ペプチドを  $\alpha$ -マンノシダーゼ消化すると、全マンノースの約 50

Fig. 7. Structure of ovalbumin GP proposed by Huang et al.<sup>18</sup>

%しか遊離せず、生成物は Bio-Gel

P-4を用いたゲル濾過によって2つの糖ペプチド画分に分れることがわかった。ナタ豆<sup>46</sup> やサザエ肝臓<sup>22</sup>から十分に精製された $\alpha$ -マンノシダーゼを用いても、やはり同様の結果が得られていた。しかし、Lee<sup>48</sup>は、ある種の植物の $\alpha$ -マンノシダーゼを用いれば、すべてのマンノシド結合が水解されると報告した。

著者は、 $\alpha$ -マンノシダーゼ消化で生成した糖ペプチドに $\beta$ -マンノシド結合の存在を推定して、以下の実験を行った。

卵アルブミン糖ペプチド(29mg)をブタ腎臓の $\alpha$ -マンノシダーゼ(7units)と5mlの0.05Mクエン酸-0.1M第二リン酸ナトリウム緩衝液、pH4.6、(0.5mM酢酸亜鉛を酵素安定化剤として含む)中、37°Cでインキュベートした。還元力の増加は、反応開始後30時間で停止した。消化物をBio-Gel P-4のカラム(0.9×130cm)でゲル濾過した。溶出パターンはOkumura, Yamashinaの報告<sup>17</sup>と全く同じであった(図8)。3つのオルシノール反応陽性のピークのうち、P-IIIはアミノ酸およびアミノ糖を含まないことから、遊離マンノースのピークと結論された。一方、P-IとP-IIは、アミノ酸分析の結果、いずれもアスパラギン酸およびグルコサミンを含む糖ペプチド画分であった。両者は、アスパラギン酸量から計算すると、ほとんど等量ずつ回収されていた。両者におけるマンノース、グルコサミンおよびアスパラギン酸の比は、表4に示したように、P-Iでは4~5:4:1であり、P-IIでは、ほぼ1:2:1であった。P-IおよびP-IIは、もう一度 $\alpha$ -マンノシダーゼとインキュベートしても全く分解はうけなかった。

次に、P-IとP-IIをカタツムリの精製 $\beta$ -マンノシダーゼとインキュベートしてみた。

まず、345 $\mu$ gのマンノースに相当するP-II糖ペプチドを0.12unitの $\beta$ -マンノシダーゼと共に、3mlの0.05Mクエン酸-0.025M第二リン酸カリウム緩衝液、pH4.5、の中でインキュベートした。図9に示すように、すみやかに還元力の増加がみられ、4時間ですべてのマンノースの遊離に相当する還元力の増加を示して、反応は終了した。消化物をガスクロマトグラフィ

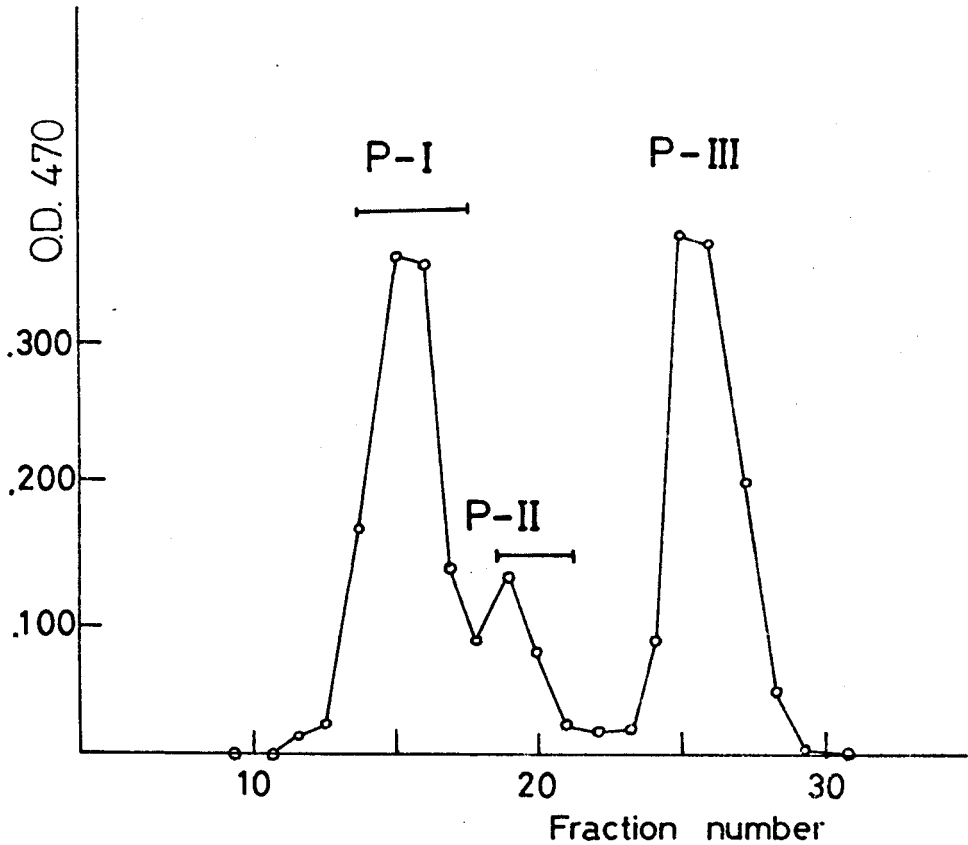


Fig. 8. Fractionation of  $\alpha$ -mannosidase digest of ovalbumin GP by gel filtration on Bio-Gel P-4.

The glycopeptide (29 mg) was incubated with 7 units of  $\alpha$ -mannosidase from hog kidney in 5.0 ml of 0.05 M citric acid - 0.1 M disodium phosphate buffer, pH 4.6, containing Zn acetate at 37°C for 30 hr. The digest was applied to a Bio-Gel P-4 column (0.9 x 130 cm). Elution was carried out with water at a flow rate of 15 ml per hr, collecting 3 ml in each tube. Samples from each fraction were used for the orcinol reaction.

一で調べることによって、還元力の増加がすべてのマンノースの遊離によることを確認した。この時、遊離のN-アセチルグルコサミンは全く検出されなかった。消化物をBio-Gel P-4 (0.9 x 90 cm)のカラムにかけ、水で溶出すると図10に示すパターンが得られた。2つのニンヒドリン反応陽性のピークのうち、大きい方のピークは分析の結果、アスパラギン酸とグルコサミンを1.00 : 1.97のモル比で含んでいた。遅れて溶出されたニンヒドリン反応陽性の小さなピークは、分析の結果、いくつかのアミノ酸が少量ずつ検出された

	Man	GlcNAc	Asp
Ovalbumin GP	5	3	1
$\alpha$ - Mannosidase digest P-I	4.5	3.88	1.00
$\alpha$ - Mannosidase digest P-II	1.16	1.86	1.00
$\beta$ - Mannosidase digest of P-II		1.97	1.00

Table 4. Compositions of glycopeptides from  $\alpha$ -, and  $\beta$ -mannosidase digests of ovalbumin GP.

マンノースが $\beta$ -マンノシダーゼ消化によって遊離し、 $(\text{GlcNAc})_2\text{-Asn}$ が生成したことを示している。

なお、 $\beta$ -マンノシダーゼを $\alpha$ -マンノシダーゼ消化していない糖ペプチド、および $\alpha$ -マンノシダーゼ消化で生成したP-I糖ペプチドとインキュベートしても、全く還元力の増加は認められなかった。

以上の結果より、P-II糖ペプチドは、もとの5種(A~E)の糖ペプチド

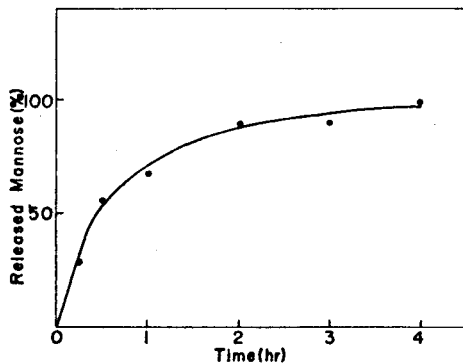


Fig. 9. Release of mannose by the action of  $\beta$ -mannosidase on a glycopeptide isolated from the  $\alpha$ -mannosidase digest of ovalbumin glycopeptide. The glycopeptide,  $\text{Man}_1(\text{GlcNAc})_2\text{-Asn}$ , corresponding to 345  $\mu\text{g}$  mannose, was incubated in 3 ml of the buffer, pH 4.5, containing 0.12 unit of the enzyme. The reaction was followed by determining the reducing power.

が、アスパラギン酸もグルコサミンも検出されなかった。このピークは酵素標品に由来すると思われる。オルシノール反応陽性のピークは、ガスクロマトグラフィーの結果、マンノースであることがわかった。これらの結果は、P-II糖ペプチド中に残っていた1モルのマン

のうち非還元末端にN-アセチルグルコサミンをもたない2種の糖ペプチド、DとE、に由来すると考えられ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ消化で残った最内部のマンノシド結合は $\beta$ -結合であることがわかった。一方、P-I糖ペプチドは、非還元末端にN-アセチルグルコサ

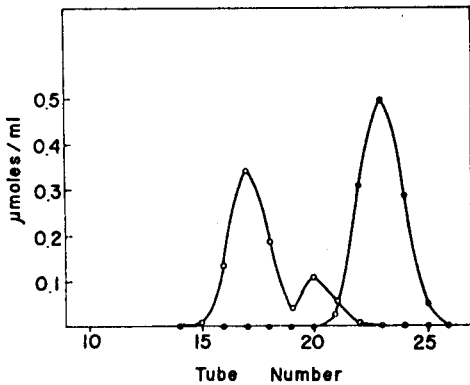


Fig.10. Gel filtration of the  $\beta$ -mannosidase digest (as shown in fig. 1) on Bio-Gel P-4. The digest was applied to a column (0.9 X 90 cm) and eluted with water at a flow rate of 15 ml/hr. Fractions of 2.2 ml were collected, then aliquots were used for the ninhydrin reaction and for the orcinol- $H_2SO_4$  reaction.  $\circ$ — $\circ$ , Aspartic acid equivalents ( $\mu$ moles/ml);  $\bullet$ — $\bullet$ , mannose equivalents ( $\mu$ moles/ml).

ミンをもつ3種の糖ペプチド A, B, C, に由来すると考えられる。Huangらによれば<sup>18</sup> A, BおよびCの合計とDおよびEの合計は、モル数にするとほぼ等しく、著者の実験において、P-IおよびP-IIがほぼ等モルづつ回収された事実とよく一致している。

P-Iは非還元末端にN-アセチルグルコサミンをもつため、 $\alpha$ -マンノシダーゼによって消化されなかったと考えられる。

A, BおよびC糖ペプチドの構造は、主に酵素消化によって決定されたものであったが、その際の $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ消化におけるN-アセチルグルコサミンの遊離は非常に遅いことが知られている。<sup>18</sup> 著者は、N-アセチルグルコサミンが $\alpha$ -結合をしている可能性を調べるために、A, B, およびCに由来すると考えられる上記P-I糖ペプチドに、ブタ肝臓から精製した $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ(第1章第4節参照)を作用させてみたが、全くN-アセチルグルコサミンは遊離しなかった。基質として、 $\alpha$ -マンノシダーゼ消化前の卵アルブミン糖ペプチドを用いた場合にも、同様の結果が得られた。従って、これらの糖ペプチドの少くとも非還元末端には、 $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニド結合は存在しないと判断した。 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼによるN-アセチルグルコサミンの遊離が遅いのは、アグリコン特異性などの理由によるものと思われる。

### 第3節 タカアミラーゼA糖ペプチドに対する作用<sup>11</sup>

タカアミラーゼAは、比較的容易に多量の結晶を得ることができるので、多

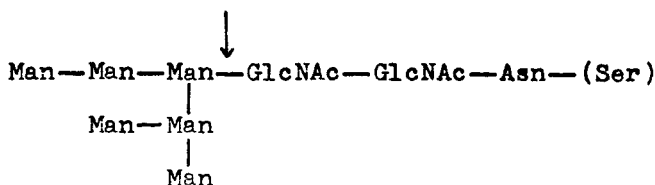


Fig. 11. Structure of Taka-amylase glycopeptide proposed by Yamaguchi *et al.*<sup>60</sup> The position of the  $\beta$ -mannosidic linkage as revealed by the present study is indicated by the arrow.

くの酵素化学的およびタンパク質化学的研究がなされている。<sup>56</sup> この酵素が糖タンパク質であることはかなり早くから主張されていたが、<sup>57</sup> 1955年、結晶化によって得られた均一な標品について確認された。<sup>58</sup> 糖部分の構造についても詳しい研究がなされ、卵アルブミンとは異り、非常に均一な糖部分の構造をもつとされてきた。<sup>59</sup> タカアミラーゼAからプロナーゼ消化で得られる糖ペプチドの構造は、Yamaguchiらによって、<sup>60</sup> 図11のように示されている。サザエ肝臓から精製した $\alpha$ -および $\beta$ -マンノシダーゼを用いた彼らの研究によれば、すべてのマンノースは $\alpha$ -結合であるとされていた。<sup>61</sup> しかし、ブタ腎臓より高度に精製された $\alpha$ -マンノシダーゼを用いたOkumura, Yamashinaの研究によれば、<sup>17</sup> 約60%のマンノースしか遊離せず、同様の結果はサザエ肝臓の $\alpha$ -マンノシダーゼを用いたMuramatsu, Egamiの報告<sup>22</sup> やナタ豆の $\alpha$ -マンノシダーゼを用いたLeeの報告<sup>48</sup> でも示されている。しかし、Leeは、その報告の中で、 $\alpha$ -マンノシダーゼ抵抗性を示すマンノース残基も、ある植物から精製された $\alpha$ -マンノシダーゼを用いれば、遊離しうると述べていた。

著者は、卵アルブミン糖ペプチドの場合と同様、 $\alpha$ -マンノシダーゼ消化で残ったマンノース残基が $\beta$ -結合をしている可能性を調べる目的で、以下の実験を行った。

タカアミラーゼA糖ペプチド(2.0 mgのマンノースに相当)を、ブタ腎臓の $\alpha$ -マンノシダーゼ(6 units)と4 mlの0.1 Mクエン酸-0.2 M第二リン酸ナトリウム緩衝液、pH 4.6、(5 mMの酢酸亜鉛を酵素安定化剤として含む)の中で、37°Cでインキュベートした。50時間で還元力の増加は一定値に達



し、その値は 6モルのマンノースのうち4モルが遊離したことを示した。さらに、このことは、遊離マンノースのガスクロマトグラフィーによる定量からも確かめられた。しかし、以下に述べるように、生成した糖ペプチドが不均一であることから、上記のマンノース遊離量は平均的な値であると考えなければならない。すなわち、消化物をBio-Gel P-4のカラム(0.9×90cm)にかけ、水で溶出すると、図12のAのように、2つのオルシノール反応陽性のピークがみられた。あとのピークが遊離したマンノースによるもので、はじめのピークが糖ペプチド画分であるが、このピークも、その非対称的な形から、さらに不均一であることが示唆される。図のように、この画分をP-IとP-IIにわけて組成分析を行った。結果は表5に示した通りであるが、用いた加水分解条件下では約20%のグルコサミンの破壊があるため、そのことを考慮すると、P-Iはアスパラギン酸1モルに対してグルコサミン2モル、マンノース3モルを含み、P-IIはアスパラギン酸1モルに対してグルコサミン2モル、

マンノース1モルを含むと考えられる。P-IとP-IIは、さらに $\alpha$ -マンノシダーゼとインキュベートしても、共に還元力の増加を全く示さなかった。P-IIに混入しているP-Iを除去するために、同様の条件で再クロマトグラフィーを行い、ピークの後の部分を図のように回収した(図12のB)。

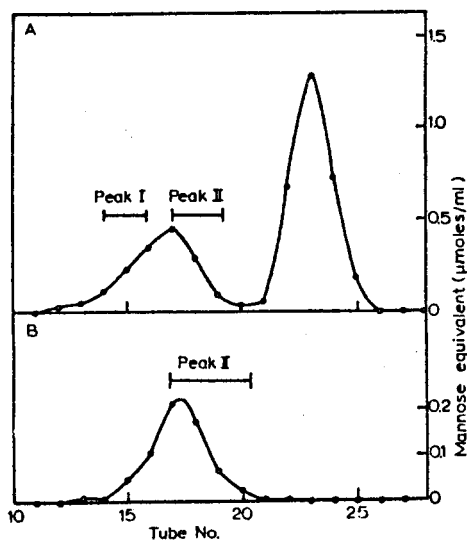


Fig. 12. A. Fractionation of the  $\alpha$ -mannosidase digest of Taka-amylase glycopeptide by gel filtration. The digest prepared as described in the text was applied to a column of Bio-Gel P-4 (0.9 cm  $\times$  90 cm), then eluted with water at a flow rate of 15 ml/h. Fractions of 2.2 ml were collected, and aliquots were used for the orcinol- $H_2SO_4$  reaction. B. Fractions in the Peak II of A were collected and concentrated, and the sample corresponding to 280  $\mu$ g mannose was rechromatographed as in A.

$\alpha$ -Mannosidase digest	Mannose	Glucosamine	Aspartic acid	Serine
Peak I	2.8 (3)	1.68*(2)	1.00	0.80
Peak II	1.1 (1)	1.49*(2)	1.00	0.87

Table 5. Amino acid and carbohydrate compositions of glycopeptide from the  $\alpha$ -mannosidase digest of Taka-amylase glycopeptide.

Analytical methods are described in the text. Values are expressed as molar ratios to aspartic acid. Nearest integers are shown in parentheses.

\* Under the hydrolysis conditions used about 20% destruction of glucosamine occurred, but figures shown are uncorrected for destruction.

精製した P-II 糖ペプチド (152  $\mu$ g のマンノースに相当) を 0.32 unit の  $\beta$ -マンノシダーゼと 3 ml の 0.05 M クエン酸 - 0.025 M 第二リン酸カリウム緩衝液、PH 4.5、の中で、37°C でインキュベートした。還元力は 1.5 時間で一定値に達し、その値はすべてのマンノースの遊離したことを示した (図 13)。遊離マンノース量はガスクロマトグラフィーによっても確認した。消化物は Bio-Gel P-4 のカラム (0.9  $\times$  90 cm) にかき、水で溶出した。図 14 に示すように、ニンヒドリン反応陽性のピークは二つ見られたが、早く溶出されたピークは Elson-Morgan 反応にも陽性で、加水分解してアミノ酸

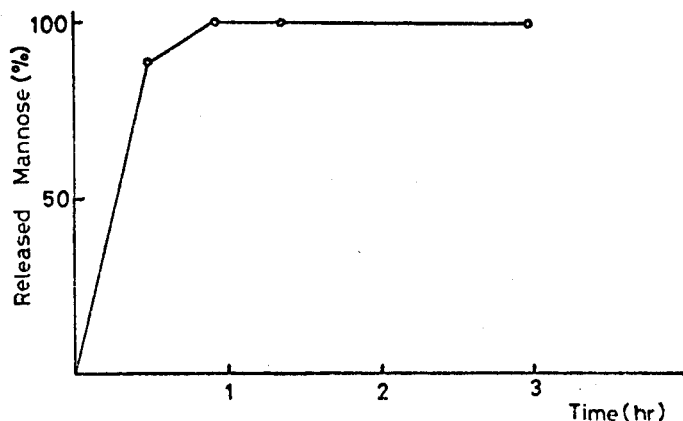


Fig. 13. Released mannose from Taka-amylase A glycopeptide P-II by  $\beta$ -mannosidase. Purified peak II glycopeptide corresponding to 152  $\mu$ g mannose was incubated with 0.32 unit of  $\beta$ -mannosidase from snail in 3 ml of 0.05 M citric acid - 0.025 M dipotassium phosphate buffer, pH 4.5, at 37°C. The reaction was followed by determining the reducing power.

分析した結果、アスパラギン酸 1 モルに対してセリン 0.83 モルおよびグルコサミン 1.56 モルの組成をもっていた。加水分解時のグルコサミンの破

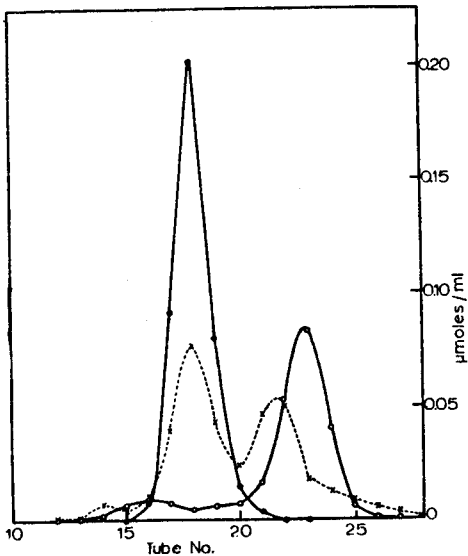


Fig. 14. Fractionation of the  $\beta$ -mannosidase digest by gel filtration. The digest (prepared as described in the text), corresponding to 102  $\mu\text{g}$  mannose, was applied to a column of Bio-Gel P-4 (0.9 cm  $\times$  90 cm), then eluted with water at a flow rate of 15 ml/h. Fractions of 2.2 ml were collected, and aliquots were used for the orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  reaction (○—○), the ninhydrin reaction (×---×), and the Elson-Morgan reaction (●—●), which was carried out after hydrolysis of aliquots of the fractions in 2 M HCl at 100 °C for 16 h. Values are expressed as equivalents of mannose, aspartic acid and glucosamine, respectively.

壊を考慮すると、この糖ペプチドはアスパラギン酸 1 モルに対して 2 モルのグルコサミンを含んでいると考えられ、タカアミラーゼ A 糖ペプチドの最内部の構造と一致している。ニンヒドリン反応陽性のピークのうち遅く溶出されたピークは Elson-Morgan 反応陰性で、酵素標品に由来する不純物と判断した。オルシノール反応陽性のピークは遊離したマンノースを示し、この画分を回収して定量すると、すべてのマンノースが検出された。

P-I (図 12 の A) は  $\beta$ -マンノシダーゼ消化をうけなかった。すなわち、充分に  $\beta$ -マンノシダーゼを作用させても、約 10% のマンノースしか遊離せず、それは P-II の混入に由来するものと考えられる。

以上の結果から、タカアミラーゼ A の糖部分は均一であるという従来の報告に反し、卵アルブミンの場合と同様、極めて不均一であることが明らかになった。これらの糖部分のうち、少なくとも直接  $\alpha$ -マンノシダーゼ消化を受けるものの最内部のマンノースは卵アルブミンの場合と同様、 $\beta$ -結合していること

が分った。タカアミラーゼAの糖部分の不均一性については、その後、Liらによっても報告されている。<sup>31</sup>

#### 第4節 ラット肝臓ミクロソーム膜より得られる糖ペプチドに対する作用<sup>13</sup>

ラット肝臓ミクロソーム膜には、膜の基本構造をなす構造タンパク質として糖タンパク質が存在することが知られている。<sup>62,63</sup> 未分画のミクロソーム画分のプロナーゼ消化によって得られる糖ペプチドの糖部分の構造については、Liらの報告がある。<sup>64</sup> 彼らは、ラット肝臓ミクロソーム画分より得られた2種の糖ペプチドの構造を、種々のグリコシダーゼを用いて研究したが、マンノースの一部はナタ豆の $\alpha$ -マンノシダーゼ作用に抵抗性を示した。しかし、その理由については不明であった。著者は、不溶性の膜タンパク質においても、卵アルブミンやタカアミラーゼAの場合と同様に、 $\beta$ -マンノシド結合が存在することを確かめる目的で、以下の実験を行った。

ミクロソームの糖タンパク質はすべてN-グリコシド型で、糖部分としてはシアル酸を含む酸性の糖鎖と、マンノースとグルコサミンのみから成る中性の糖鎖とが存在するといわれている。滑面ミクロソームと粗面ミクロソームとではこれらの糖鎖の分布が異り、前者ではその約90%が酸性糖鎖であるのに対し、後者では逆に中性糖鎖の方が多く約60%を占めることがわかっている。<sup>65</sup> 著者は、それらの糖鎖のうち比較的均一で存在量も多い、粗面ミクロソーム由来の中性糖鎖をもつ糖ペプチドを実験に用いた。すなわち、Dallnerらの方法<sup>66</sup>で分画した粗面ミクロソームの膜タンパク質より、Kawasaki, Yamashinaの方法に従って、<sup>65</sup> DEAE-セファデックスA-25クロマトグラム上でFr. Iと呼ばれる中性糖ペプチド画分を得た。ここでは粗面ミクロソームの糖ペプチド画分に含まれる約40%のアスパラギン酸が回収され、比較的均一である。この画分は、表6に示すように数種のアミノ酸とグルコースを含んでいるが、アスパラギン酸1モルに対し、グルコサミン2モルおよびマンノース6モルを含んでいる。この糖ペプチド画分(0.44  $\mu$ moleのアスパラギン酸に相当)をブタ腎臓の $\alpha$ -マンノシダーゼ(1.4 units)と1.0 mlの0.05 Mク

TABLE 6. Amino acid and carbohydrate compositions of glycopeptides from  $\alpha$ - and  $\beta$ -mannosidase digests of Fr. I glycopeptide from rat liver. Values are expressed as molar ratios to aspartic acid. Nearest integers are shown in parentheses.

	Glycopeptide Fr. I	$\alpha$ -Mannosidase digest		$\beta$ -Mannosidase digest
		Peak II	Peak III	Peak A
Aspartic acid	1.00	1.00	1.00	1.00
Serine	0.51	0.66	0.50	0.46
Threonine	0.43	0.40	0.45	0.41
Glycine	0.23	0.36	0.24	0.24
Alanine	0.16	0.22	0.16	0.21
Glucosamine	1.70†	2.47† (3)	1.46† (2)	1.48† (2)
Mannose	5.60	2.72 (3)	1.08 (1)	—
Glucose	1.35	—	—	—

† Under the hydrolysis conditions used about 20% destruction of glucosamine occurred, but figures are uncorrected for destruction.

エン酸— 0.1 M 第二リン酸ナトリウム緩衝液、pH 4.6、(酵素安定化剤として 0.5 mM の酢酸亜鉛を含む) の中で、37°C でインキュベートした。還元力は 98 時間で一定値に達した。消化物を Bio-Gel P-4 のカラム (0.9 × 120 cm) にかき、0.02 M 酢酸で溶出した。図 15 に示すように 4 つのオルシノール反応陽性のピークが得られた。Peak IV は遊離したマンノースで、その量は Fr. I の糖ペプチド 1 モルあたり 4.5 モルの遊離に相当した。Peak II と Peak III が糖ペプチド画分であり、Peak II はアスパラギン酸 1 モルあたり グルコサミンとマンノースをそれぞれ 3 モルずつ含んでおり、Peak III はアスパラギン酸 1 モルあたり グルコサミン 2 モルおよびマンノース 1 モルを含んでいると考えられる(表 6)。Peak II と Peak III のモル比はアスパラギン酸の量を基準にすると 1 : 4 であった。Peak I はグルコースのみが検出されたことから、糖ペプチド画分ではないと判断した。

Peak III 糖ペプチド (0.216  $\mu$ mol のアスパラギン酸に相当) を 0.04 unit の  $\beta$ -マンノシダーゼと 1.0 ml の 0.05 M クエン酸—0.025 M 第二リン酸カリウム緩衝液、pH 4.5、の中で、37°C でインキュベートした。還元力の増加がみられ、その値は 2.5 時間で一定値に達し、すべてのマンノースの遊離に相当した。消化物を Bio-Gel P-4 のカラム (0.9 × 120 cm) にかき、0.02 M 酢酸で溶出した(図 16)。オルシノール反応陽性の Peak B は遊離したマンノースを示し、消化に用いた Peak III 糖ペプチドのすべてのマンノース

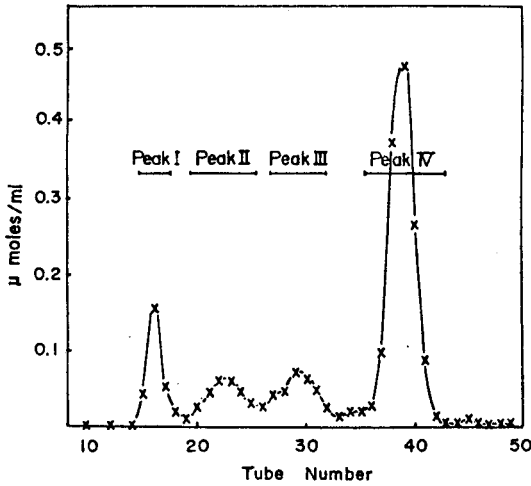


Fig. 15. Gel filtration of the  $\alpha$ -mannosidase digest of Fr. I glycopeptide from rat liver on Bio-Gel P-4. The digest was applied to a column (0.9×120 cm), equilibrated and eluted with 0.02 M acetic acid at a flow rate of 4 ml/hr. Fractions of 2.0 ml were collected, and aliquots were used for the orcinol- $H_2SO_4$  reaction. Values are expressed as mannose equivalents.

$\beta$ -結合していたことを示している。

Peak II 糖ペプチドは  $\beta$ -マンノシダーゼとインキュベートしても還元力の増加は全くみられず、それは N-アセチルグルコサミンが非還元末端に存在するためであろう。

### 第5節 考察と総括

$\beta$ -マンノシド結合は植物マンナン、<sup>67</sup> ガラクトマンナン、<sup>68,69</sup> グルコマンナン<sup>68,69</sup> 海藻由来のマンナン、<sup>70</sup> およびバクテリアの表面多糖<sup>71</sup> などに存在することは以前から知られていたが、糖タンパク質においてはすべてのマンノースは  $\alpha$ -結合であるとされていた。著者は、カタツムリから精製した  $\beta$ -マンノシダーゼを用いて、マンノースと N-アセチルグルコサミンのみからなる中性糖鎖をもつ卵アルブミン、タカアミラーゼ A、およびラット肝臓ミクロソームから得られる糖ペプチドに  $\beta$ -マンノシド結合が存在することを証明した。すなわち、いずれの場合も非還元末端のいくつかのマンノースを  $\alpha$ -マンノシダーゼで除

スが回収された。Elson-Morgan 反応にのみ陽性の Peak A をあつめ、加水分解後アミノ酸分析すると、アスパラギン酸 1 モルあたり 1.48 モルのグルコサミンが検出され、加水分解時におけるグルコサミンの破壊を考慮すると、この糖ペプチドはアスパラギン酸 1 モルあたり 2 モルのグルコサミンを含んでいると考えられる (表 6)。

以上の結果は、Peak III 糖ペプチドにおいて (GlcNAc)<sub>2</sub>-Asn に 1 モルのマンノースが

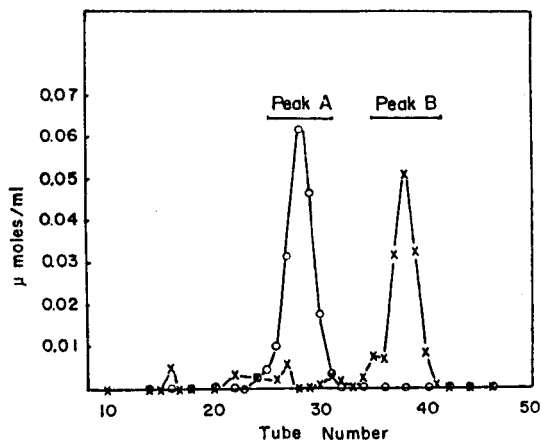


Fig. 16. Gel filtration of the  $\beta$ -mannosidase digest of Peak III glycopeptide (see Fig. 1) on Bio-Gel P-4. The digest was applied to a column (0.9×120 cm), equilibrated and eluted with 0.02 M acetic acid at a flow rate of 4 ml/hr. Fractions of 2.0 ml were collected, and aliquots were used for the orcinol- $H_2SO_4$  reaction (×), and for the Elson-Morgan reaction (○). The latter was carried out after hydrolysis of aliquots of the fractions in 2 N HCl at 100°C for 16 hr. Values are expressed as mannose and glucosamine equivalents, respectively.

去することによって  $\beta$ -マンノシドを含む糖ペプチド  $\beta$ -Man-(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asn を単離することができた。上記3種の糖ペプチドの中には、いずれの場合も、 $\alpha$ -マンノシダーゼによっても  $\beta$ -マンノシダーゼによっても全くマンノースを遊離しない成分が存在したが、それらは非還元末端に N-アセチルグルコサミンをもつものと判断した。著者は、また、Okumuraらと共に、ヒト血清中に見出される酸性の糖鎖、すなわち

シアル酸、ガラクトース、マンノースおよび N-アセチルグルコサミンからなる糖鎖、をもつ  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質より得られる糖ペプチド中にも  $\beta$ -Man-(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asn という構造が存在することを示した。<sup>72,73</sup>

以上の結果は、 $\beta$ -Man-(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asn という構造が可溶性の細胞外糖タンパク質や不溶性の膜タンパク質のいずれにも存在し、さらに、N-グリコシド型であれば中性糖鎖にも酸性糖鎖にも共通に存在することを示している。

時を同じくして、Sukenoらは、<sup>74</sup> 輸卵管の  $\beta$ -マンノシダーゼを用いて卵アルブミンとリボヌクレアーゼ B から調製した糖ペプチドについて同様の結果を得た。その後、Liらも、<sup>31</sup> パイナップルの  $\beta$ -マンノシダーゼを用いて卵アルブミンとタカアミラーゼ A の糖ペプチドについて同様の結果を得た。Leeらも、<sup>75</sup> 同じパイナップルの  $\beta$ -マンノシダーゼを用いて、卵アルブミン、タカアミラーゼ A のほか、パイナップルステムプロメラインの糖ペプチドについても同様の結果を得、あわせて各構成糖の結合位置についても研究し、 $\beta$ -Man-(1→4)

- $\beta$ -GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -GlcNAc-Asn が共通の内部構造であることを報告した。また、Toyoshima らは、<sup>76</sup> サザエ肝臓の $\beta$ -マンノシダーゼを用いて、酸性糖鎖をもつチログロブリン糖ペプチド中にも同じ構造の存在を確認した。最近、Kornfeld らは、<sup>77,78</sup> IgA や IgE などの免疫グロブリンにも同じ構造を見い出すに至っている。こうして、現在では、著者の提出した $\beta$ -Man-(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asn という内部構造は多くの糖タンパク質の糖部分の共通の内部構造として広く一般に認められている。また、カタツムリの $\beta$ -マンノシダーゼは、二枚貝より得られる糖脂質に存在する $\beta$ -マンノシド結合にも作用することが Sugita らによって明らかにされている。<sup>79</sup>

著者の精製した $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼは卵アルブミン糖ペプチドには作用せず、またヒト肝臓のヘパラン硫酸に対しても還元力の増加や分子量の変化をもたらすような作用は示さなかったが、その後 Baenziger らは、<sup>80</sup> ヒト免疫グロブリン IgE の糖ペプチド中に $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニド結合が存在することを、UDP-N-アセチルグルコサミンを基質として精製したブタ肝臓の $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いて、示した。このように、糖タンパク質に $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニド結合が存在すれば、その解析に $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼが有効であることを示している。

## 実 験 の 部

### A) 実験材料

ゾウゲヤシマンナンのトリマンノシドは Aspinall 教授 (カナダ、Trento 大学) より供与された。卵アルブミン糖ペプチドは、3 回結晶した卵アルブミンから、Yamashina, Makino の方法に従って調製した。<sup>81</sup> タカアミラーゼ A 糖ペプチドは松島祥夫博士 (大阪大学) より供与された。 $\alpha$ -マンノシダーゼは、Okumura, Yamashina の方法<sup>17</sup>に従って、ブタ腎臓から精製した。Bio-Gel P-4 は Bio-Rad Lab., (U.S.A.) の製品を使用した。



B) アミノ酸分析計による糖ペプチド中のアミノ酸およびアミノ糖の定量

糖ペプチド約  $0.05 \mu\text{mole}$  を  $0.4 \text{ ml}$  の  $6 \text{ N HCl}$  に溶かし、脱気後封管し、 $100^\circ\text{C}$  で  $16$  時間加水分解した。塩酸を減圧下除去後、アミノ酸分析計 (Hitachi amino acid analyzer, KLA-3B) を用いて定量した。

C) グルコサミンの定量

糖ペプチド中のグルコサミンは、上記のアミノ酸分析計による定量のほか、Elson-Morgan 反応によっても定量した。すなわち、 $20 \sim 50 \mu\text{g}$  の  $\text{N}$ -アセチルグルコサミンを含む試料を  $2 \text{ N HCl}$ 、 $100^\circ\text{C}$ 、 $16$  時間の条件で加水分解後、Svennerholm の変法<sup>82</sup>あるいはBlixの変法<sup>83</sup>によって測定した。

D) 中性糖の定量

中性糖は、マンノースを標準として、Hewitt の方法に従ってオルシノール硫酸法で定量した。<sup>84</sup> 酵素消化によって遊離したマンノースは、Park-Johnson 法による還元力の測定で定量した。<sup>21</sup> ガスクロマトグラフィーによる遊離マンノースの定量は、次のようにして行った。試料は  $\text{NaBH}_4$  還元、樹脂処理による  $\text{Na}^+$  の除去、メタノールによるホウ酸の除去後、減圧にて蒸発乾固した。Sweeley らの方法に従って、<sup>42</sup>  $1 \text{ ml}$  のピリジン、 $0.2 \text{ ml}$  のヘキサメチルジシラザンおよび  $0.1 \text{ ml}$  のトリメチルクロルシランからなるトリメチルシリル化剤  $0.1 \text{ ml}$  を残渣に加え、 $10$  分間室温に放置後ガスクロマトグラフィーの試料とした。ガスクロマトグラフとしてはHitachi-Perkin Elmer Gas-chromatograph Type F6Dを用い、カラム ( $0.3 \times 100 \text{ cm}$ ) には  $3\%$  のSilicone gum (SE30) をコーティングしたChromosorb W を充填した。上記試料  $2.5 \sim 5 \mu\text{l}$  を  $140^\circ\text{C}$  にて注入し、 $3$  分後  $2.5^\circ\text{C}/\text{min}$  の速度で  $190^\circ\text{C}$  まで昇温した。 $\text{N}_2$  および  $\text{H}_2$  ガスの流速はそれぞれ  $30$ 、 $20 \text{ ml}/\text{min}$  とした。この条件下でマンニトールと、標準物質のアラビニトールの保持時間は、試料注入後それぞれ  $18$ 、 $11$  分であった。この方法によるマンノースの定量は  $10 \sim 70 \mu\text{g}$  の範囲内で  $\pm 3\%$  の誤差で行うことができた。

E) アミノ酸の定量

アミノ酸は、Yemm and Cocking の方法に従って、<sup>85</sup> アスパラギン酸を標準としてニンヒドリン反応によって定量した。

### 第3章 アスパルチルグリコシラミン 症 ( A G U ) に関する研究

現在まで、多くの先天性代謝異常症が知られており、複合糖質の分解酵素の欠損症もいくつかあることがわかっている。複合糖質の分解酵素であるグリコシダーゼ群はリソソームにその多くが存在し、代謝をうけるべき物質はその中にとり込まれ、分解をうけて放出されると考えられている。あるグリコシダーゼが欠損している場合には、その酵素の基質となる未分解の化合物がリソソーム内に蓄積するため、一般にリソソーム蓄積症 ( Lysosomal storage diseases ) と呼ばれることがある。著者の研究したアスパルチルグリコシラミン尿症 ( A G U ) もその一つである。1966年、フィンランドにおいて、約2000人の精神薄弱の患者の尿中排泄物についてペーパークロマトグラフィーによるスクリーニングが行われた際、11人の尿からある未知のニンヒドリン反応陽性物質が発見された。<sup>86</sup> この段階では、この未知物質はアスパラギン酸を含むペプチドと考えられたため、この疾病はペプチド尿症 ( Peptiduria ) と名付けられた。<sup>86</sup> これらの患者は、種々の臨床所見上も特に類似していた。1967年、Jennerらは、それらの患者と同様の臨床所見を示すイギリスの2人の姉弟を見出し、尿中排泄物をペーパークロマトグラフィーによって検索した結果、2-アセタミド-N-(4'-L-アスパルチル)-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシラミン ( G1cNAc-Asn ) と思われるニンヒドリン陽性物質が多量に排泄されていることを見出し、<sup>87</sup> アスパルチルグルコサミン尿症と命名した。<sup>88</sup> Paloらは、後にこの物質を患者尿中から単離して同定した。<sup>89</sup> G1cNAc-Asnは患者の血漿や脳脊髄液中には極めて少量しか含まれていない。<sup>88</sup> 丁度その頃、われわれの研究室でG1cNAc-AsnをN-アセチルグルコサミン、アンモニアおよびアスパラギン酸に分解するアスパルチルグリコシラミンアミドヒドロラーゼ ( 以下アミダーゼと呼ぶ ) が動物の組織に広く分布し、細胞内ではリソソームに局在することが発見された。<sup>90,91</sup> Jennerらは、<sup>92</sup> A G U がア

ミダーゼの欠損によるものと考え、AGU患者の精液および血漿について、アミダーゼの活性を測定した。その結果、正常人の精液が2.5 munits/mlの活性を示したのに対し、AGU患者の精液はほとんど活性を示さなかった。また、血漿についても、正常人が0.1~0.2 munit/mlの活性をもつのに対し、AGU患者の活性は $0.9 \times 10^{-3}$  munit/mlと著しく低い値を示した。これらのことから、AGUがアミダーゼの欠損症であることが判明した。

その後、フィンランドでは精神薄弱者について、尿中のGlcNAc-Asnの検出が広汎に続けられ、その結果、1972年までに数十名のAGU患者が発見された。<sup>86</sup> 1971年、Paloらは、<sup>93</sup> 23才の女性と26才の男性AGU患者の脳および肝臓の生検を行い、両組織においてもアミダーゼ活性が低下しており、その値は正常人の場合の約5分の1程度であることを示し、あわせて電子顕微鏡下で核よりも大きく肥大したリソソームの存在を確認した。これによって、AGUが他の多くの糖質代謝異常症と同じく、リソソーム蓄積症であることが確かめられた。また、この年フィンランドにおいて、29才の女性AGU患者が死亡したため、剖検が可能となり、<sup>94</sup> 脳、肝臓、脾臓および腎臓の各臓器について十分量の試料を用いて、リソソームやミクロソーム由来の加水分解酵素の活性が測定された。その結果、脳と肝臓においては生検で得られたと同程度のアミダーゼ活性の低下がみられ、脾臓でも10~20%程度の低下がみられた。しかし、腎臓ではほぼ正常人と同程度の活性が検出された。同時に測定されたほとんどのグリコンダーゼの活性には全く変化がみられなかったが、 $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性は著しく上昇していた。このことや、腎臓でアミダーゼ活性が正常であることの原因は不明である。Paloらは、<sup>95,96,97</sup> 薄層クロマトグラフィー後ニンヒドリン反応を行うという簡便な方法で、患者の尿以外に、脳や肝臓にもGlcNAc-Asnが蓄積していることを示し、同時にGlcNAc-Asnの他にも異常な酸性糖質がそれらの組織や尿に存在することを示した。これらの物質が、GlcNAc-Asnにさらにシアル酸などが結合したものであることが推定されていたが、<sup>95,96,97</sup> 詳しい研究はされていなかった。

AGU患者は、現在までイギリスで2名、フィンランドで約60名の他に、

さらに最近アメリカ合衆国でも1名発見されている。<sup>98</sup> 著者らは、以下に述べる方法を用いて、主として近畿地方における300例の精神薄弱小児について、AGUのスクリーニングを行ったが現在までのところ患者を見い出していない。フィンランドでのAGU患者の出生率は、新生児26000人に1人の割合というかなり高い値を示している。<sup>86</sup> また、患者の家系の調査から、遺伝型は常染色体劣性遺伝であることが明らかとなった。<sup>86</sup> 従って、ホモ接合体(Homozygote)のみが発症する。ヘテロ接合体(Heterozygote)は見かけ上、全く正常な振舞いを示し、精液や血漿のアミダーゼ活性は正常値に近い値を示す。ヘテロ接合体は、培養繊維芽細胞(Fibroblast)のアミダーゼ活性を測定することによって、検出することができるといわれている。<sup>99</sup>

著者は、AGU患者の簡便なスクリーニングの方法の確立および患者の尿中に排泄されるアスパラギンとオリゴ糖の結合物の構造決定を目的として、以下の実験を行った。日本では患者がまだ発見されていないので、患者尿はフィンランドのP. Aula 博士(ヘルシンキ大学)より提供され、共同研究として行った。

#### 第1節 N-(L-アスパルト-4-オイル)-2-アセタミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシラミン(GlcNAc-Asn)の合成<sup>100</sup>

AGU患者の尿中に排泄されるGlcNAc-Asnの分解酵素であるアミダーゼを用いてAGUの診断法を検討するため、まず、アミダーゼの基質であるGlcNAc-Asnを、従来の方法を簡便化して合成した。<sup>100</sup>

従来、GlcNAc-Asnの合成は、いくつかの研究室で行われてきたが、いずれの場合も1-β-アミノ-1, 2-ジデオキシ-2-アセタミド-3, 4, 6-トリ-0-アセチル-D-グルコース(IV)と1-ベンジル-N-ベンジロキシカルボニル-L-アスパラギン酸をジクロヘキシルカルボジイミド(DCC)の存在下に縮合するものであった。<sup>101,102,103</sup> この際、アスパラギン酸誘導体としては、ベンジロキシカルボニルアスパラギン酸-1-ベンジルエステルが用いられるが、このものの合成の際には-4-エステルも同時に生ずるため、両者を分離する必要がある。著者は、アスパラギン酸の誘導体として、

Itoh の方法<sup>104</sup> で調製した 3-ベンジル-オキシカルボニル-5-オキソ-4-オキサズリジン酢酸 (V) を用いることによって、方法を簡便化した。この誘導体 (V) は、合成の際に異性体を生じない。

合成法は図 17 に示す通りであるが (I) ~ (V) は文献記載の方法に従って合成し、<sup>105,106,107,101,104</sup> (VI) の合成以後の段階に改良を加えた。以下、著者の改良を加えた段階について記す。

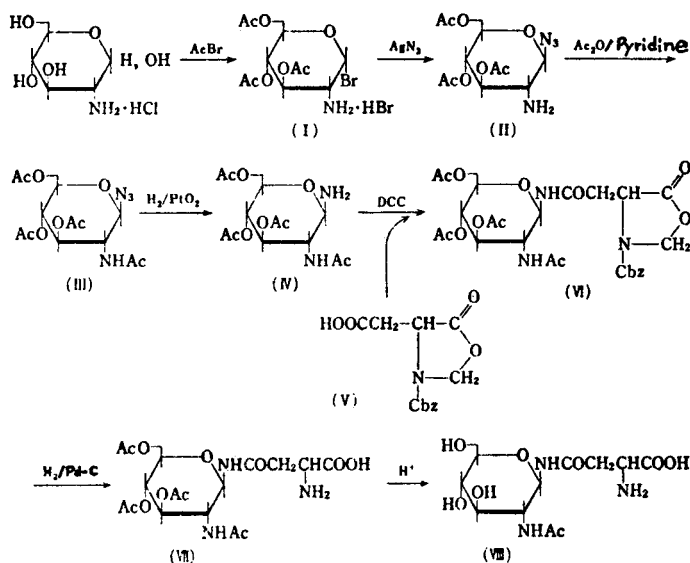


Fig. 17. Synthetic pathway of an aspartylglycosylamine.

第 1 項 1-(3'-ベンジルオキシカルボニル-5'-オキソ-4'-オキサズリジン)-アセタミド-2-アセタミド-3,4,6-トリ-O-アセチル-1,2-ジデオキシ- $\beta$ -D-グルコース (VI) の合成

(V) を酢酸エチルに懸濁し、ジシクロヘキシルアミン (DCHA) を加えると、DCHA 塩となって析出した。濾取してメタノールから再結晶して精製した。このものを酢酸エチルに懸濁し、1N 硫酸を加えるとただちに塩は溶解した。有機層をとり飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで一夜乾燥後、溶媒を減圧留去して無色のシロップを得た。このものの塩化メチレン溶液 (1.14 g/50 ml) に 0.845 g の DCC と (IV) の塩化メチレン溶液 (1.42 g/50 ml)

を順次加え、22時間後、さらに(V)の塩化メチレン溶液(423mg/3ml)とDCCの塩化メチレン溶液(337mg/3ml)を追加し、48時間反応を続けた。合計70時間後、析出したDCC尿素を濾取し、濾液を1N塩酸、5%炭酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去して無色のシロップを得た。このものは精製することなく、次の段階の反応に用いた。

第2項 1-N-(L-アスパルト-4-オイル)-2-アセタミド-3,4,6-トリ-O-アセチル-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシラミン(VII)

(VII)の全量をメタノール150mlに溶解し、パラジウム黒155mgを加え、5.5時間接触還元後、触媒を減圧留去して白色の固体を得た。このものも精製せずに、次の段階の反応に用いた。

第3項 N-(L-アスパルト-4-オイル)-2-アセタミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシラミン(VII)

(VII)の全量を2N硫酸40mlに溶解し、40時間室温に放置後、2.5%水酸化バリウム水溶液を加えアルカリ性とし、生成した白色沈澱を遠心して除去した。上清を再び1N硫酸で酸性とし、生じた白色沈澱を遠心して除去した。上清をDowex 1×8(ギ酸形)で処理し、溶媒を減圧留去後、残渣を水に溶解しエタノールを加えて結晶化した。融点は257~260℃で文献値と一致した。収量は550mgで、(IV)よりの収率は40%であった。

## 第2節 AGUの酵素的診断法の確立<sup>108</sup>

AGU患者の臨床所見の特徴は知能の発育不良、ガルゴイル顔貌および骨格異常などであるが、<sup>86</sup>同じ糖タンパク質の代謝異常症であるフコシドーシスやマンノシドーシスおよび種々のムコ多糖代謝異常症などでも、AGUと極めてよく似た臨床所見を示すことが知られている。このため、臨床所見だけからAGUと診断することは極めて困難である。しかも、一般に、これらの代謝異常症において上記の症状が現われるのは、少なくとも生後1~2年経過してからであり、そのことも発見を遅れさせる原因の1つとなっている。従って、この病気

の唯一の診断法は尿中に排泄されるGlcNAc-Asnを確認することである。この物質の排泄はすべてのAGU患者にみられる現象であり、現在知られているところでは生後7ヶ月の幼児でも検出されている。従来、AGUの診断には、患者尿をペーパークロマトグラフィーあるいはペーパー電気泳動後、ニンヒドリン反応によってGlcNAc-Asnを検出する方法がとられていた。<sup>86</sup>多量の尿素等を含む尿を直接ペーパークロマトグラフィー等にかけた場合には、正常なクロマトグラフィーの行なわれないことが多い。ゲル透過等の前処理が効果的であるが、煩瑣で多数の試料のスクリーニングには不適當である。

著者は西村らと共同で、ブタ腎臓より精製したアミダーゼを用いて、より迅速に、より簡便に、しかも確実にAGUを診断する方法を確立した。その原理は、患者尿にアミダーゼを加え、尿中に排泄されているGlcNAc-Asnを酵素的に加水分解し、生成したN-アセチルグルコサミンをMorgan-Elson反応によって比色定量するものである。

#### 第1項 アミダーゼによる、尿中でのGlcNAc-Asnの分解

0.24 mlの患者尿に、0.2  $\mu$ moleの合成GlcNAc-Asnを溶解し、0.01 ml (2 units)のアミダーゼを加えて、37°Cでインキュベートした。次にReissigらの方法に従って、<sup>28</sup>適当な時間に0.25 mlの水および0.1 mlの0.8 Mホウ酸緩衝液、pH 9.1を加えて3分間煮沸後、Ehrlich試薬を3 ml加え585 nmの吸光度を測定することにより、遊離したN-アセチルグルコサミンを定量した。N-アセチルグルコサミンの遊離は22時間で一定値に達し、この時、加えたGlcNAc-Asnはすべて分解されていたことがわかった。従って、患者尿中にはアミダーゼの阻害物質は排泄されておらず、アミダーゼが正常に作用することがわかった。ここで用いたGlcNAc-Asn量は、尿1 lあたりに換算すると280  $\mu$ gで、これまで知られているAGU患者の尿中に排泄されているGlcNAc-Asnとほぼ同じ程度の濃度である。しかし、正常人を含むいくつかの尿を使用して調べた結果、Reissigの方法では必ずしも正確にN-アセチルグルコサミンを定量し難いことが分った。その理由の1つは尿



のPHであり、例えば、PHが5.6の尿では標準条件の27.9%、PH7.0の尿では62.8%しか発色しなかった。以下、PHの低い尿中でもN-アセチルグルコサミンの定量ができるようにMorgan-Elson反応の条件に検討を加えた。

## 第2項 Morgan-Elson 反応による尿中でのGlcNAcの定量

PHの比較的低い尿 (PH 5.6) を使用して、まずMorgan-Elson反応におけるホウ酸緩衝液の量を0.20ml、0.30ml、0.35mlと増し、PHを上昇させると、発色率ももとの27.9%よりもはるかに高くなり、緩衝液量が0.35mlのときに標準条件の78%の発色率を示した。

さらに発色率を高めるために、煮沸時間に検討を加えた。0.24mlの尿、0.01mlのアミダーゼ溶液および0.35mlの0.8Mホウ酸緩衝液を混合し、煮沸時間をもとの3分から5,7,9,11分と長くすると、尿を使用せずに煮沸時間を同様に長くした場合に比べて、それぞれ81.5, 90.4, 89.1, 92.3, 92.3%と発色率が上昇した。以上の結果から、煮沸時間を9分と決定した。この条件下で、数種の尿を用いて、それぞれN-アセチルグルコサミンの発色率を測定してみると、その値は尿を使用しない場合の90~110%であった。従って、各尿における発色率を予め検定し、それによって酵素分解によって生ずるN-アセチルグルコサミンの示す吸光度を補正することにした。最終的に決定したGlcNAc-Asnの尿中での定量法を表7に示す。

<table border="0"> <tr> <td style="font-size: 2em;">{</td> <td>Urine</td> <td>0.24 ml</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Amidase</td> <td>0.01 ml (2 <u>m</u>units)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Toluene</td> <td>1 drop</td> </tr> </table>	{	Urine	0.24 ml		Amidase	0.01 ml (2 <u>m</u> units)		Toluene	1 drop	<p>↓ Incubation for 22 hr, at 37°C</p> <p>↓ Addition of 0.35 ml of 0.8 M sodium borate buffer, pH 9.1</p> <p>↓ Boiling for 9 min.</p> <p>↓ Cooling in ice-water</p> <p>↓ Addition of 3 ml of Ehrlich-reagent</p> <p>↓ Standing for 20 min. at 37°C</p> <p>Measurement of absorbance at 585 nm after cooling</p>	<p>この方法に従って、フィンランド人の5人のAGU患者、および8人のヘテロ接合体について、尿中のGlcNAc-Asnを定量した(表8)。その結果、ヘテロ接合体の判定は、この方法では困難であるが、</p>
{	Urine	0.24 ml									
	Amidase	0.01 ml (2 <u>m</u> units)									
	Toluene	1 drop									

Table 7. Diagnosis of aspartylglycosylaminuria (AGU)

Table 8. Excretion of GlcNAc-Asn in the urine of AGU patients

	GlcNAc-Asn (mg / liter of urine)	Creatinine* (mg / liter of urine)	$\frac{\text{GlcNAc-Asn}}{\text{Creatinine}}$
Patient A	377	1337	0.282
Patient B	126	620	0.203
Patient C	120	620	0.193
Patient D	102	346	0.295
Patient E	88	453	0.194
Heterozygote A	44	1387	0.032
Heterozygote B	6	1040	0.001
Heterozygote C	6	334	0.012
Heterozygote D	0	n.d.**	0
Heterozygote E	0	n.d.	0
Heterozygote F	0	n.d.	0
Heterozygote G	0	n.d.	0
Heterozygote H	0	n.d.	0

\* Creatinine was determined according to Taussey.<sup>121</sup>

\*\* n.d. : not determined.

AGU患者の診断は確実にできることが明らかになった。著者は、この方法で日本人の精神薄弱者の尿、209検体について調べたが、現在までのところ、AGU患者は未発見である。

### 第3節 AGU患者尿中のグリコシルアスパラギンの構造研究

尿中にGlcNAc-Asnが排泄されるのがAGU患者の特徴であるが、Paioらは薄層クロマトグラフィーにより、フィンランド人患者の尿中<sup>95</sup>および肝臓<sup>96</sup>や脳<sup>96</sup>に酸性の糖質も同時に排泄あるいは蓄積されていることを示した。しかし、血中にはこの化合物もGlcNAc-Asnと同様、ほとんど検出されなかった。<sup>97</sup>彼らは、この化合物を薄層ゲルから抽出後、酸水解して薄層クロマトグラフィーによって、その成分を調べ、アスパラギン酸とグルコサミンの他に、シアル酸やウロン酸の位置にスポットが得られることを報告している。<sup>95,96</sup>その後、彼らは患者尿をセファデックスG-25で処理した後、高圧紙電気泳動を行い、ニンヒドリン反応で発色させるとGlcNAc-Asnと同様の特徴的な色を呈するいくつかの中性および酸性の物質が存在することを指摘したが、<sup>109</sup> 詳しい構造

研究をなすには至らなかった。

著者は、AGU患者の尿中に排泄されるアスパラギンと糖の結合した、おそらく糖タンパク質由来と考えられる化合物(グリコシルアスパラギン)は糖タンパク質の糖部分の構造研究の試料として極めてすぐれた材料であると考えた。すなわち、アミダーゼの欠損によって体内の糖タンパク質の代謝が不完全となり、そのため糖タンパク質由来のグリコシルアスパラギンがAGU尿中に排泄されることが期待されるからである。事実、同じ糖タンパク質の代謝異常症の1つであるマンノシドーシスの患者の尿から得られるオリゴ糖は、糖タンパク質の糖鎖の内部構造を保持していることが見い出されている。従って、AGU患者の尿中に排泄されているグリコシルアスパラギンの構造の研究から、従来知られていなかった構造をもつ生体内糖タンパク質が見い出される可能性もあると考えられる。著者は以下に述べるような研究の結果、いくつかのグリコシルアスパラギンを単離し、その構造を決定することができた。その構造は、糖タンパク質には未だ見い出されていなかったものである。

#### 第1項 正常人尿とAGU患者尿のゲル濾過パターン

正常人尿およびAGU患者尿200mlを凍結乾燥後、20mlの0.05Mピリジン-酢酸緩衝液、pH 5.0、に溶かし、遠心(4000rpm, 30分間)し、不溶物はさらに同量の緩衝液で洗浄した。2回の遠心上清を同じ緩衝液で平衡化したセファデックスG-25のカラム(4×120cm)でクロマトグラフィーを行った(図18)。その結果、総シアル酸量は、正常人尿と患者尿でほとんど差異がなく、200mlの尿あたり約25mgであった。しかし、パターンを比較すると、患者尿では図に示すB画分とC画分にシアル酸の異常なピークがみられ、D画分では中性糖のピークが増大していた。著者は、これら3つの画分より、合計5種のグリコシルアスパラギンを単離精製し、その構造を研究した。

#### 第2項 D画分の中性グリコシルアスパラギン

D画分をエバポレーターで濃縮乾固した後、4.5mlの水に溶かしDowex 50

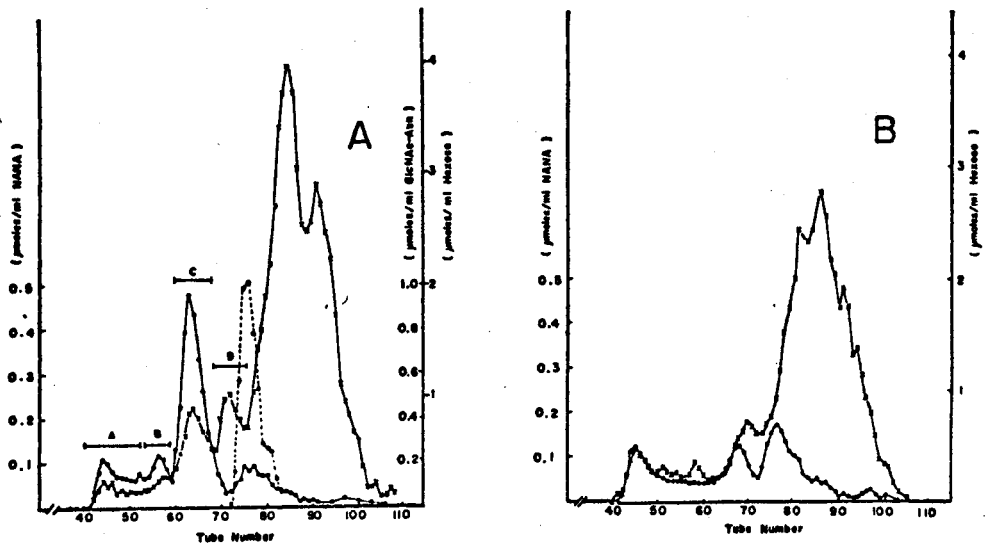


Fig. 18. Gel filtration on Sephadex G-25 of urine from an AGU patient and normal urine. A lyophilizate from 200 ml of each urine was dissolved in 40 ml of 0.05 M pyridine-acetic acid buffer, pH 5.0, then applied to a column (4 X 120 cm), equilibrated and eluted with the same buffer. The flow rate was 60 ml per hr, and 15 ml fractions were collected. Aliquots were analyzed for neutral sugars ( $\times$ ), sialic acid ( $\circ$ ), and GlcNAc-Asn ( $\bullet$ ). Galactose and N-acetylneuraminic acid were used as standards for the neutral sugar and sialic acid determinations, respectively. Glycoasparagine fractions other than GlcNAc-Asn which appeared to be characteristic of AGU urine compared with the pattern for normal urine were pooled and designated as A, B, C and D.  
 A : AGU urine, B : normal urine.

×8 (H<sup>+</sup>形、20～50 mesh) のカラム (1.2×25cm) でクロマトグラフィーを行った。大部分の中性糖は水で溶出した画分に回収されたが、その画分にはアスパラギン酸は10%しか回収されず、大部分のアスパラギン酸は2Nアンモニア水で溶出した画分(D-2)に回収された。この画分をセファデックスG-25のカラム(1.9×100cm)とBio-Gel P-2のカラム(0.9×110cm)を用いて精製した。生じた2つのオルソノール反応陽性ピーク(D-2-IとD-2-II)のうち、主成分であるD-2-Iをペーパークロマトグラフィー(溶媒a、22時間)にかけ、0.05%フルオレサミンアセトン溶液で調べると、主成分と微量成分の二つの成分が検出された。微量成分は

GlcNAc-Asnであった。主成分 ( $R_f^* = 0.65$ ) はアスパラギン酸 1 モルに対してグルコサミン 0.83 モルおよび中性糖 0.96 モルを含んでいた。ガスクロマトグラフィーの結果、中性糖としてはガラクトースのみが検出された。D-2-1 のガラクトースは  $\alpha$ -ガラクトシダーゼによっては遊離せず、すべて  $\beta$ -ガラクトシダーゼによって遊離した。D-2-1 は溶媒 a および溶媒 b でのペーパークロマトグラフィーで合成グリコシルアスパラギン  $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc-Asn と一致した。 $R_f$  値は二つの系でとも  $0.65$  であった。以上の結果から、D-2-1 はアスパラギンに N-アセチルラクトサミンが N-グリコシド結合したものであることがわかった。このものの収量は、患者尿 1  $\ell$  あたり  $17.6 \mu\text{moles}$  であった。

### 第 3 項 画分 C の二つの酸性グリコシルアスパラギン

#### A) グリコシルアスパラギンの単離精製

セファデックス G-25 によるゲル濾過の画分 C (図 18) を濃縮乾固後、2.5 ml の水に溶かし、糖の結合していないペプチドを除くために Dowex 50  $\times$  8 (20 $\sim$ 50 mesh,  $H^+$  形) のカラム (1.6  $\times$  18 cm) に通し、水で素通りした画分を回収した。この段階でアミノ酸分析を行った結果、尿 1  $\ell$  あたり約  $150 \mu\text{moles}$  のアスパラギン酸と、ほぼ等量のグルコサミンの他には、セリン、グルタミン酸、グリシン、およびガラクトサミンが少量含まれるのみで、他の中酸性アミノ酸はほとんど検出されなかった。

さらに精製するために、この画分を濃縮乾固後、1 ml の 0.02 M ピリジン-酢酸緩衝液、pH 5.2、に溶かし、そのうちシアル酸量として 4.8 mg をあらかじめ同じ緩衝液で平衡化した DEAE-セファデックス A-25 のカラム (1.5  $\times$  25 cm) を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った (図 19)。ピーク I はオルシノール反応にのみ陽性で、分析の結果、中性糖とアミノ糖を含み、シアル酸とアミノ酸が全く検出されなかったことから、中性オリゴ糖画分であることが分った。ピーク III は、オルシノール反応とレゾルシノー

\*脚注)  $R_f$  : GlcNAc-Asn に対する相対移動度

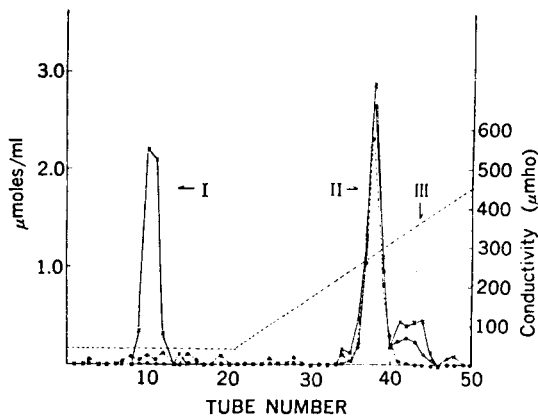


Fig. 19 Purification of the glycoasparagines by chromatography on DEAE-Sephadex A-25. A glycoasparagine fraction from the AGU urine (see Fig. 1), corresponding to 4.8 mg of N-acetylneuraminic acid, was applied to a column of DEAE-Sephadex A-25 (1.5×25 cm) equilibrated with 0.02 M pyridine-acetic acid buffer, pH 5.2. Elution was carried out first with the same buffer, then with a linear gradient from the same buffer to 1.14 M pyridine-acetic acid buffer, pH 5.47, at a flow rate of 7 ml per hr. Two ml fractions were collected. Aliquots were analyzed for neutral sugars (×), sialic acid (○), and free amino groups (●). Values are expressed as in Fig. 1, but the free amino groups determined by the ninhydrin reaction are expressed as μmoles of GlcNAc-Asn per ml.

かけ、ニンヒドリン反応で検出すると2つのスポットが得られ、それぞれ  $R_f = 0.45$  および  $R_f = 0.32$  であった。早く移動する主成分 (C-F) には、中性糖としてピーク II の 65% が回収され、移動度の低い微量成分 (C-S) には 11% が回収された。従って、尿 1 l あたり、それぞれグリコシルアスパ

TABLE 9 Amino acid and carbohydrate compositions of the glycoasparagines.

	Peak II from DEAE-Sephadex A-25	R=0.45 Component	R=0.32 Component
Aspartic acid	1.00 <sup>a</sup>	1.00 <sup>b</sup>	1.00 <sup>b</sup>
Glucosamine	0.79 <sup>a</sup>	0.92 <sup>b</sup>	0.90 <sup>b</sup>
Hexose	1.00	1.05	1.05
Sialic acid	1.20	1.13	1.06

<sup>a</sup> Analyzed after hydrolysis in 6 N HCl at 100° for 16 hr.

<sup>b</sup> Analyzed after hydrolysis in 2 N HCl at 100° for 16 hr.

ル反応に陽性であったが、アミノ酸はほとんど検出されなかったことから、酸性オリゴ糖画分であると考えられる。ピーク II は上記すべての反応に陽性であった。分析の結果、ただ1つのアミノ酸であるアスパラギン酸と、中性糖、グルコサミン、およびシアル酸を等モルずつ含んでいることがわかった (表 9)。中性糖としては、ガスクロマトグラフィーを行った結果、ガラクトースのみが検出された。この画分の収量は、尿 1 l あたり約 130 μmoles であった。この画分をペーパークロマトグラフィー (溶媒 a、40 時間) に

ラギンとして 82 μmoles および 14 μmoles 含まれていることになる。分析の結果、両者の組成は、共に等モルのシアル酸、グルコサミン、中性糖、およびアスパラギン酸よりなることがわかった (表 9)。中性糖としては、ガスクロマトグラフィーの結果、ガラク

トースのみが検出された。以下、両成分の構造研究を行った。

## B) ノイラミニダーゼ消化

DEAEセファデックスA-25のクロマトグラフィーで得られたピークIIのグリコシルアスパラギン(NANA\*として $1.79 \mu\text{moles}$ )を*Clostridium perfringens*のノイラミニダーゼ(90 munits)を0.5 mlの0.04 M酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0、の中で $37^\circ\text{C}$ でインキュベートした。2時間でシアル酸の遊離は一定値に達し、すべてのシアル酸の遊離を

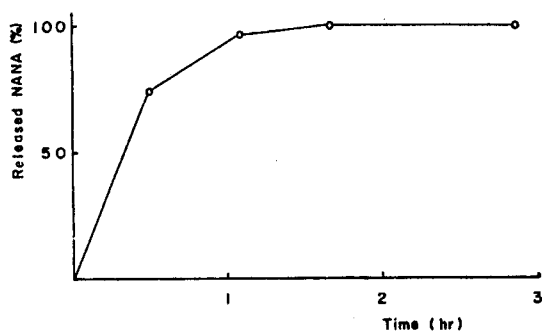


Fig. 20 Release of sialic acid from the glycoasparagines by the action of neuraminidase. A glycoasparagine fraction corresponding to  $1.79 \mu\text{moles}$  of N-acetylneuraminic acid was incubated with 90 munits of neuraminidase from *Clostridium perfringens* in 0.5 ml of 0.04 M acetate buffer, pH 5.0, at  $37^\circ$ . Aliquots of the reaction mixture were used to determine the released sialic acid by the thiobarbituric acid method. NANA: N-acetylneuraminic acid.

示した(図20)。消化物は、遊離したシアル酸を除去するため、あらかじめ0.02 Mピリジン酢酸緩衝液、pH 5.2、で平衡化したDEAEセファデックスA-25にかけ、同じ緩衝液でクロマトグラフィーを行った。素通り画分を、脱塩するためにBio-Gel P-2のカラムにかけ、2%酢酸で溶出した。グリコシルアスパラギンは定量的に回収

された。この、シアル酸を除去したグリコシルアスパラギンの組成は、アスパラギン酸1モルに対してグルコサミン0.91モルおよび中性糖1.17モルであった。ペーパークロマトグラフィーを行いニンヒドリン反応で検出すると、溶媒aでも、溶媒bでも単一スポットを与え、均一であった。シアル酸を除いたグリコシルアスパラギンの純度は、さらにDNS\*化誘導体をペーパークロマトグラフィーすることによっても確認した。すなわち、もとのグリコシルアスパラギンのDNS化誘導体は、溶媒bでペーパークロマトグラ

\*脚注) NANA: N-acetylneuraminic acid

\*脚注) DNS: Dansyl

フィーすると、 $R_f^* = 0.76$ の主成分と $R_f = 0.82$ の微量成分の2つのスポットが検出されたが、シアル酸を除いたグリコシルアスパラギンのDNS化誘導体は $R_f = 0.90$ であり、単一スポットを与えた。また、もとのグリコシルアスパラギンのDNS化誘導体の蛍光の色調が黄色を帯びているのに対し、シアル酸を除去したもののそれは青味を帯びており、両者を互いに識別することができた。

以上の結果から、C画分より単離された2つの酸性グリコシルアスパラギンは、共にシアル酸、ガラクトース、グルコサミン、およびアスパラギン酸からなり、互いにシアル酸の結合する位置の異なる異性体であることがわかった。

### C) ガラクトシダーゼ消化

シアル酸を除去したグリコシルアスパラギン(中性糖として $0.37 \mu\text{mole}$ )を、*Aspergillus oryzae*の $\beta$ -ガラクトシダーゼ(800 munits)

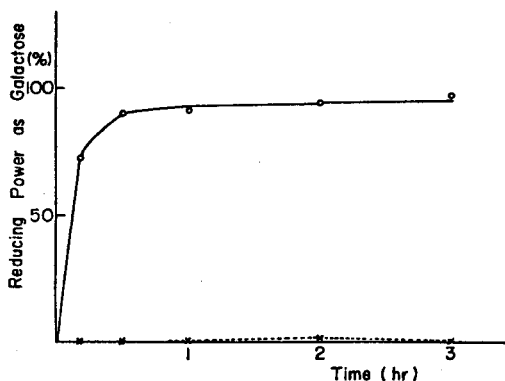


Fig. 21 Release of galactose from the sialic acid-free glycoasparagine by the action of  $\beta$ -galactosidase. The sialic acid-free glycoasparagine, corresponding to  $0.37 \mu\text{mole}$  of galactose, was incubated with a  $\beta$ -galactosidase preparation from *Aspergillus oryzae*, containing 800 munits of  $\beta$ -galactosidase activity and 19 munits of  $\alpha$ -galactosidase activity, or with 42 munits of an  $\alpha$ -galactosidase from ficin in 0.25 ml of 0.04 M citric acid-0.08 M disodium phosphate buffer, pH 4.5, at  $37^\circ$ . Reactions were followed by determining the increase in reducing power. ○, Reaction with  $\beta$ -galactosidase; ×, reaction with  $\alpha$ -galactosidase.

と $0.25 \text{ ml}$ の $0.04 \text{ M}$ クエン酸- $0.08 \text{ M}$ 第二リン酸ナトリウム、pH 4.5、の中で、 $37^\circ\text{C}$ でインキュベートすると、すみやかな還元力の増加がみられ、数時間で一定値に達した(図21)。還元力はすべてのガラクトースが遊離したことを示した。このことは、ガスクロマトグラフィーによっても確認した。しかし、使用した $\beta$ -ガラクトシダーゼ標品中には、少量の $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性(19 munits)が混在していたので、上の実験と

$R_f$  : DNS化誘導体の $R_f$ は、DNS化 $\text{GlcNAc}-\text{Asn}$ に対する相対移動度で示す。



は別に、イチジクの $\alpha$ -ガラクトシダーゼ(42 munits)を用いて、全く同じ条件下でインキュベートしてみたが、還元力の増加は全くみられなかった。また、シアル酸を除去する以前のグリコシルアスパラギンを $\beta$ -ガラクトシダーゼとインキュベートしても、全く還元力の増加はみられず、シアル酸を除去しない限り、 $\beta$ -ガラクトシダーゼは作用しないことがわかった。以上の結果から、シアル酸を除去したグリコシルアスパラギンの非還元末端にガラクトースが $\beta$ -結合していることがわかった。

#### D) アミダーゼの作用

シアル酸を除去したグリコシルアスパラギン(ガラクトースとして0.37  $\mu$ mole)をブタ腎臓のアミダーゼ(6 munits)と0.4 mlの0.1 Mクエン酸-0.1 M第二リン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5、(酵素安定化剤として0.01%ウシ血清アルブミンと0.1 M NaClを含む)中、37°Cでインキュベートした。還元力は5時間で一定値に達した。消化物を分画することなくアミノ酸分析計にかけることによって、アスパラギン酸が100%遊離していることを確認した。消化物はMorgan-Elson反応陰性であった。このことと、ガラクトースが非還元末端に存在していることを考えあわせて、 $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)結合をもつN-アセチルラクトサミンがアスパラギンにN-グリコシド型結合していると結論された。生成したN-アセチルラクトサミンの同定は、さらにガスクロマトグラフィーによって、次のようにして行った。先ず、消化物を、脱塩するためにBio-Gel P-2のカラムにかけ、水で溶出し、オルシノール反応陽性画分を回収した。この画分を濃縮乾固後、トリメチルシリル化してガスクロマトグラフィーを行った。図22に示したように、試料は標準品のN-アセチルラクトサミンと一致し、両者を混ぜてクロマトグラフィーにかけても単一であることを示した。N-アセチルラクトサミンの回収率は消化物に対して少なくとも85%以上であった。この、ガスクロマトグラフィーによるN-アセチルラクトサミンの同定に際しては、 $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc および $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 6)-GlcNAcの標準品は存在しないが、それらの保持時間はN-アセチルラクトサミンとは異ると仮

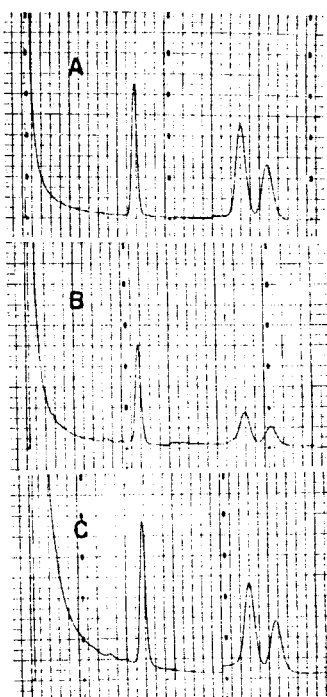


Fig. 22 Identification using the GLC of N-acetyl-lactosamine from the Amidase digest of the sialic acid-free glycoasparagine. The digest, corresponding to 44  $\mu$ g of galactose and prepared as described in the text, was desalted by passing it through a column of Bio-Gel P-2 with water. The effluents were evaporated to dryness. The dried material was dissolved in water together with a fixed amount of sucrose as an internal standard. The solution was incubated overnight at 37° for anomeric equilibration of the reducing sugar. The solution was then dried and used for GLC analysis after trimethylsilylation. A: authentic N-acetyl-lactosamine, B: sample, C: a mixture of the sample and authentic N-acetyl-lactosamine in a ratio of about 1:1. In each chromatogram, the first peak at a retention time of 11.7 min represents sucrose, and the second and third peaks at retention times of 23.0 min and 25.6 min represent two anomeric forms of N-acetyl-lactosamine.

定した。このことは、われわれの使用した条件下では、例えばラクトースは、<sup>110</sup>その異性体であるメリビオースとは異なる保持時間を持つほか、一般にグリコシド結合の位置の異なる二糖は異った保持時間をもつことから支持される。

#### E) 過ヨウ素酸々化

中性糖として、それぞれ 33.4nmoles および 61.2nmoles の C-S と C-F を、18.5 mM のメタ過ヨウ素酸ナトリウムを含む 0.1ml の 0.05M ホウ酸水溶液中、遮光して室温で放置し Hibl, Lands の方法<sup>111</sup> で生成したヨウ素酸イオンの量を測定することにより、過ヨウ素酸々化反応を追跡した。図 23 に示したように、アスパラギン酸 1 モルあたり、C-S では 2 モル、また C-F では 3 モルのヨウ素酸イオンの生成がみられ、シアル酸は C-S ではガラクトースの 2 位または 4 位の水酸基で、また C-F では 3 位の水酸基で置換していることを示唆した。

#### F) インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼによる消化

A0/PR8 512 \*\* A0/0.4ml, 11-5, 194 in 570 ml.  
NANA として、それぞれ 0.097  $\mu$ mole の C-F と 0.168  $\mu$ mole の C-S を 96 HAU\* のインフルエンザウイルスと 1.0 ml の 0.09 M トリスマレイン酸緩衝液、pH 4.5、(0.0045 M の CaCl<sub>2</sub> を含む) 中、37°C でインキュベートした。遊離シアル酸<sup>沈殿</sup>を測定し、反応を追跡すると、最終的

\* 脚注) HAU: Hemagglutination Unit

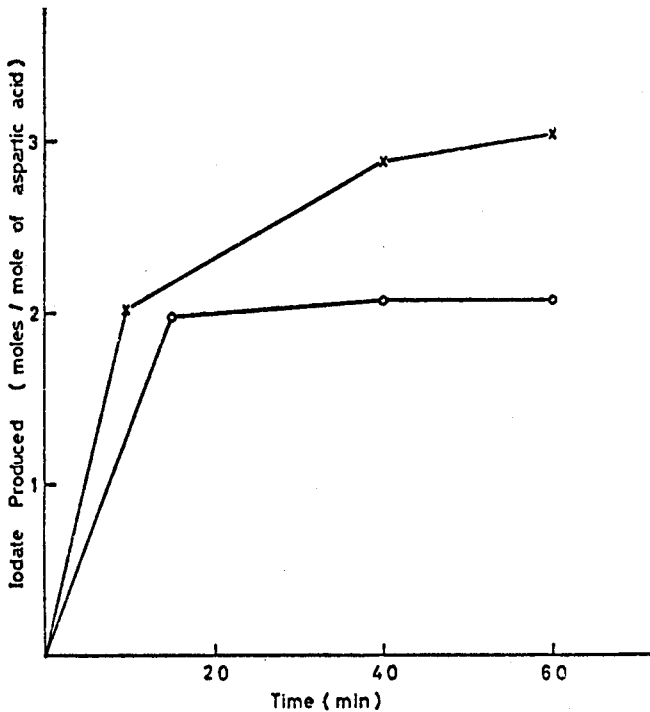


Fig.23. Periodate oxidations of the isolated glycosylated asparagines. C-S(x-x-x) corresponding to 33.4 nmoles galactose or C-F(o-o-o) corresponding to 61.2 nmoles galactose were incubated in 0.1 ml of 18.5 mM sodium metaperiodate in 0.05M boric acid solution in the dark. Periodate oxidations were monitored by determining the produced iodate.

には両者共にすべてのシアル酸を遊離したが、図 24 に示すように、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼは C-F には非常に作用しやすく、C-S には作用しにくいことがわかった。インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼは  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 3) 結合に特異的であることが知られているので、<sup>112</sup> C-F ではシアル酸は  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 3) 結合でガラクトースに結合していると考えられる。このことは過ヨウ素酸々化の結果とよく一致している。C-S ではシアル酸は  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 3) 結合以外の結合をしていると考えられるが、過ヨウ素酸々化の結果を考えあわせると、少なくとも  $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 6) 結合ではないと考えられる。のちに、このものはメチル化後、質量分析することによって、ガラクトースはすべて 1, 4, 5-トリ-O-アセチル-2, 3, 6-トリ-

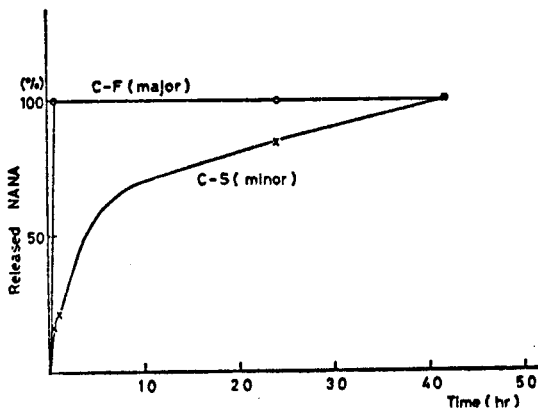


Fig. 24. Release of sialic acid from the glycosylated asparagines by neuraminidase (influenza virus). C-F corresponding to 0.097  $\mu$ mole NANA or C-S corresponding to 0.168  $\mu$ mole NANA were incubated with 96 HAU of neuraminidase from influenza virus in 1.0 ml of 0.09 M Tris-maleate buffer, pH 6.5, containing 0.0045 M  $\text{CaCl}_2$ . Aliquots of the reaction mixture were used to determine the released sialic acid by the thiobarbituric acid method. NANA : N-acetylneuraminic acid.

O-メチルガラクトールとして検出されたので、O-Sではシアル酸は $\alpha$  (2 $\rightarrow$ 4)結合でガラクトースに結合していると考えられる。<sup>113</sup>

#### 第4項 画分Bの2つの酸性グリコシルアスパラギン

##### A) グリコシルアスパラギンの単離精製

B画分(図18)はアミノ酸としてはアスパラギン酸を主として含むが、それ以外にトレオニン、セリン、グルタミン酸、およびグリシンを含んでいた。アスパラギン酸は尿1ℓあたり約40 $\mu$ moles含まれていた。原尿800ml相当のB画分を濃縮乾固後、5mlの0.02Mピリジン酢酸緩衝液、pH 5.2、に溶かし、DEAEセファデックスA-25のカラム(1.5 $\times$ 25cm)で分画した(図25)。シアル酸を含まぬ中性糖のピークB-1には18.3%のアスパラギン酸が回収された。この画分には中性のオリゴ糖および中性の糖ペプチドが含まれるものと考えられる。B-2とB-4にもアスパラギン酸は回収されたが、それぞれ7.4%、3.9%と少なかったので詳しくは調べなかった。最も大きいシアル酸のピーク、B-3、には、31.4%のアスパラギン酸が回収された。それ以外のアミノ酸としては、少量のグリシンが検出されたが、アミノ糖としてはグルコサミンのみが含まれていた。このB-3を溶媒aでペーパークロマトグラフィーすると2つのニンヒドリ

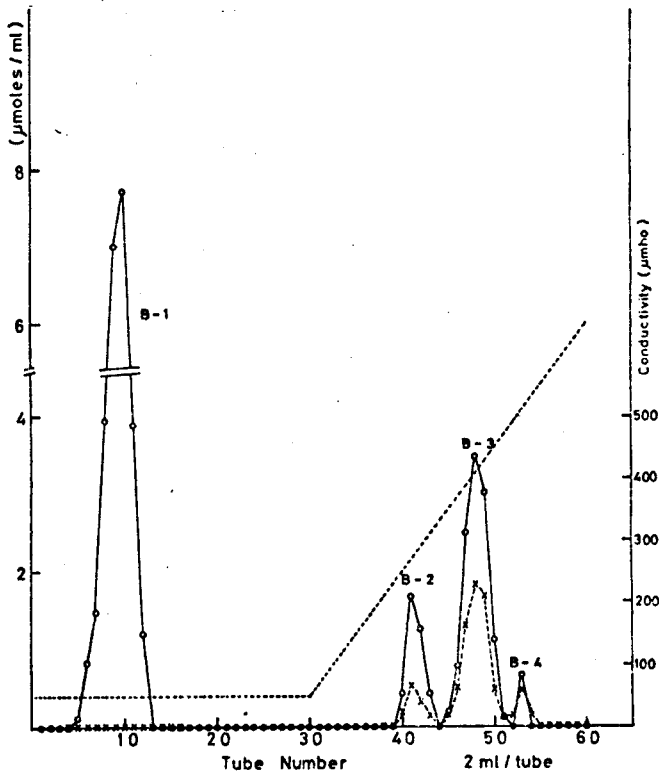


Fig. 25. Purification of glycoasparagines (Peak B of Fig. 18) by chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

The dried material from the pooled fractions of Peak B was dissolved in 5 ml of 0.02 M pyridine-acetic acid buffer, pH 5.2, and applied to a column (1.5 X 25 cm) of DEAE-Sephadex A-25, equilibrated with the same buffer. Elution was carried out with a linear gradient from 0.02 M to 1.14 M pyridine-acetic acid buffer, pH 5.47, at a flow rate of 10 ml per hr. Two ml fractions were collected and aliquots were analyzed for neutral sugars (—○—) and sialic acid (--x--). Values are expressed as in Fig. 18.

ン反応陽性のスポットが検出された。両者をペーパークロマトグラフィー（溶媒 a、70 時間）で分離精製した。早く動く成分（B-3-F）が主で尿 1 l あたりアスパラギン酸として 6.2 μmoles、遅い微量成分（B-3-S）は 1.6 μmoles 回収され、両者の比はおよそ 4 : 1 であった。両者の相対的な移動度は B-3-F を 1.00 とすると、B-3-S は 0.63 であった。また、両者の化学組成はほとんど同じで、ただ 1 つのアミノ酸であるアスパラギン酸 1 モルに対して、それぞれ 2 モルのグルコサミンと中性糖、および 1

**Table 10**

**Effects of glycosidases on two glycoasparagines, B-3-F and B-3-S**

Values indicate the numbers of residues remaining after treatments and are expressed as moles per mole of aspartic acid. No correction was made for destruction of glucosamine and aspartic acid during hydrolysis.

Treatments		Sialic acid	Galactose	Glucosamine	Aspartic acid
B-3-F	None	1.22	2.22	1.83	1.00
	Neuraminidase		2.22	1.92	1.00
	Then				
	$\beta$ -Galactosidase		1.05	1.90	1.00
	Then				
	$\beta$ -N-Acetylhexosaminidase		1.09	0.99	1.00
B-3-S	None	1.08	2.40	1.87	1.00
	Neuraminidase		2.40	1.80	1.00

モルのシアル酸を含んでいた(表10)。中性糖としては、ガスクロマトグラフィーの結果、両者共にガラクトースのみが検出された。

B) ノイラミニダーゼ消化

NANAとして1.65  $\mu$ molesのB-3-FとB-3-SをそれぞれClostridium perfringensのノイラミニダーゼ(540 munits)と0.5mlの0.04M酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0、の中で、37°Cでインキュベートした。シアル酸の遊離は10時間で一定値に達し、その値は100%のシアル酸の遊離を示した。消化物をBio-Gel P-2のカラム(0.9×110 cm)でゲル濾過し、シアル酸を含まぬグリコシルアスパラギンを定量的に回収した。分析の結果、両者の組成は共に、アスパラギン酸1モルに対してそれぞれ2モルのグルコサミンとガラクトースを含んでいると考えられた(表10)。両者を溶媒aと溶媒bでペーパークロマトグラフィーしても、共にそれぞれの系で単一のスポットを与えた。さらに、両者のR<sub>f</sub>値は二つの系で同一であり、溶媒aでは共に0.30、溶媒bでは共に0.50であった。また、シアル酸を除去したB-3-FとB-3-Sを等量混合し、ダンシル化後、溶媒aと溶媒bでそれぞれペーパークロマトグラフィーしたが、いずれの場合も単一のスポットを示し、R<sub>f</sub>値はそれぞれ0.66と0.76であった。

以上のように、B-3-FとB-3-Sからシアル酸を除去すると、同一のグリコシルアスパラギンを生ずることから、シアル酸を除去した糖鎖内部の構造研究は、主成分であるB-3-Fを用いて行った。

C) ガラクトシダーゼ消化

シアル酸を除去したB-3-F(中性糖として2.8  $\mu$ moles)を*Aspergillus oryzae*の $\beta$ -ガラクトシダーゼ(6 units)と0.25m $\ell$ の0.04 M クエン酸-0.08 M 第二リン酸ナトリウム緩衝液、pH 4.5、の中で、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。還元力は数時間で一定値に達し、その値は50%ガラクトースの遊離を示した(図26)。このことは、2モルのガラクトースのうち1モルは非還元末端に存在するが、もう1モルは分子の内部にくみこまれていることを示唆している。これとは別に、イチジクの $\alpha$ -ガラクトシダー

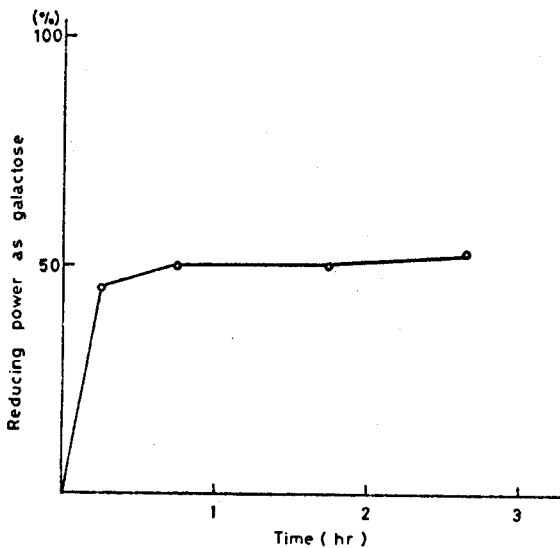


Fig. 26. Release of galactose from the sialic acid-free B-3-F (for its isolation from B-3 of Fig.25, see the text) by  $\beta$ -galactosidase.

The sialic acid-free B-3-F(2.8  $\mu$ moles as galactose) was incubated in 0.25 M citric acid - 0.08 M disodium phosphate buffer, pH 4.5, with 6 units of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* at 37 $^{\circ}$ C. Aliquots of the reaction mixture were used to determine reducing power. Values for the release of galactose are expressed as percentages of the total galactose in the substrate.

ゼも作用させてみたが、還元力の増加は全くみられなかった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化物をBio-Gel P-2のカラム(0.9 $\times$ 110cm)にかけ、水で溶出すると、ほぼ同じ大きさの二つのオルシノール反応陽性のピークが得られ、クロマトグラフィのパターン上での両者の比は、早く溶出されたピ

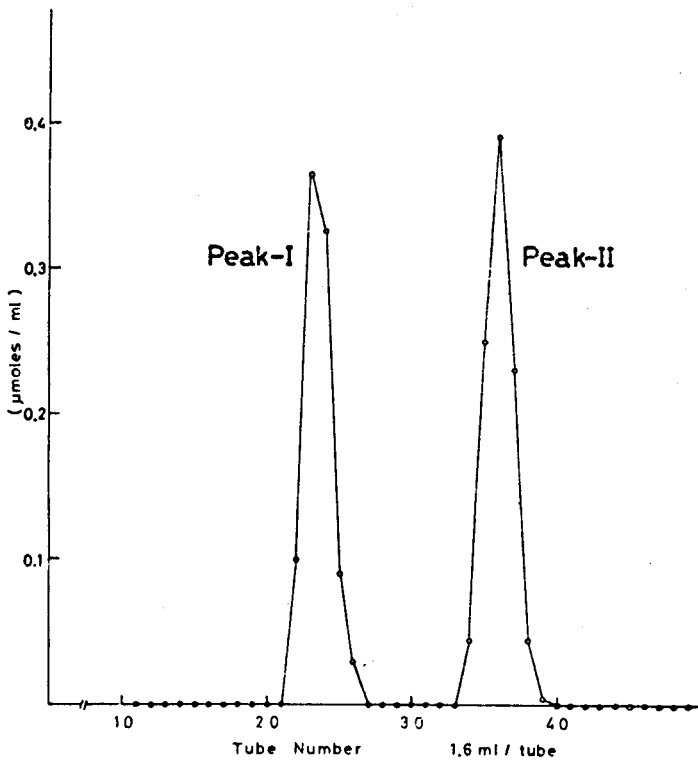


Fig. 27. Gel filtration on Bio-Gel P-2 of the  $\beta$ -galactosidase digest of the sialic acid-free B-3-F.

The digest from Fig. 26 was applied to a column (0.9 x 110 cm) of Bio-Gel P-2, then eluted with water at a flow rate of 5 ml per hr, collecting 1.6 ml per tube. Aliquots were used for the orcinol reaction, and values are expressed as  $\mu$ moles of galactose per ml of eluate. Peak I was glycoasparagine which was then used for further enzymatic degradations, and Peak II was the released galactose.

ークを1.00とすると後のピークは1.07であった(図27)。前者が生成したグリコシルアスパラギンのピークで、後者が遊離したガラクトースのピークである。グリコシルアスパラギンは定量的に回収され、その組成はアスパラギン酸を1モルとすると、グルコサミン1.90モル、中性糖1.05モルであった(表10)。このものはペーパークロマトグラフィー(溶媒a)してニンヒドリン反応でしらべると均一であり、 $R_f$ 値は0.71であった。

D)  $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ消化

シアル酸とガラクトースを除去したB-3-F(アスパラギン酸として



0.438  $\mu$ mole) を *Aspergillus oryzae* の  $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (1.02 units) と 0.5 ml の 0.04 M クエン酸 - 0.08 M 第二リン酸ナトリウム緩衝液、pH 4.5、の中で、37°C でインキュベートした。還元力の増加とアミノ糖の遊離を追跡したが、両者は共に数時間で一定値に達し、その値は2モルのN-アセチルグルコサミンのうち1モルが遊離したことを示した(図28)。これとは別に、ナタ豆の $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼを用いても同様の結果が得られた。消化物を Bio-Gel P-2 のカラム (0.9  $\times$  110 cm) にかき、水で溶出すると、早く溶出されるオルシノール反応にのみ陽性のピークと、遅れて溶出される Morgan-Elson 反応にのみ陽性のピークが得られた(図29)。両者は共に、ほぼ定量的に回収された。Morgan-Elson 反応陽性のピークは遊離したN-アセチルグ

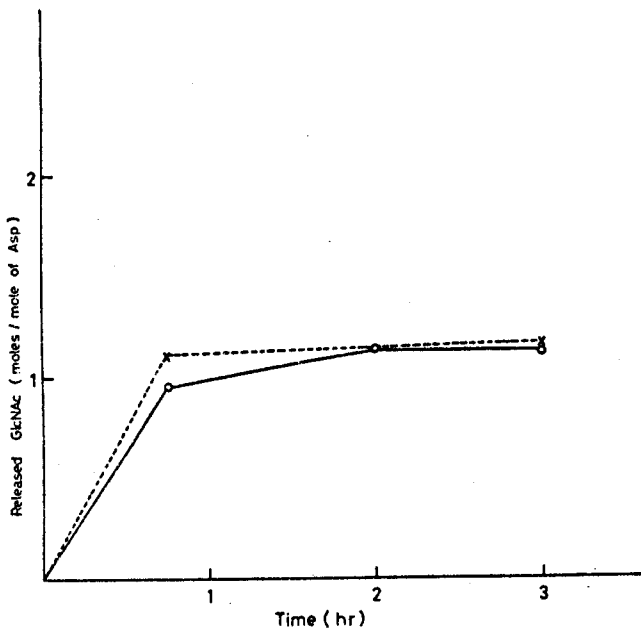


Fig. 28. Release of N-acetylglucosamine from Peak I of Fig. 27. by  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase.

Peak I from Fig. 27 (0.438  $\mu$ mole as aspartic acid) was incubated in 0.5 ml of 0.04 M citric acid - 0.08 M disodium phosphate buffer, pH 4.5, with 1.02 units of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* at 37°C. Aliquots of the reaction mixture were used for determinations of the released N-acetylglucosamine using the Park-Johnson (reducing power) (---x---) and Morgan-Elson (—o—) reactions. Values are expressed as moles of the released N-acetylglucosamine per mole of aspartic acid.

ルコサミンである。オルソノール反応陽性のピークはグリコシルアスパラギンの画分であり、その組成はアスパラギン酸を1モルとすると、グルコサミン0.99モルおよび中性糖1.09モルであった(表10)。このものは、ペーパークロマトグラフィー(溶媒a)で合成グリコシルアスパラギン $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -GlcNAc-Asnと一致し、R<sub>f</sub>値は0.65であった。

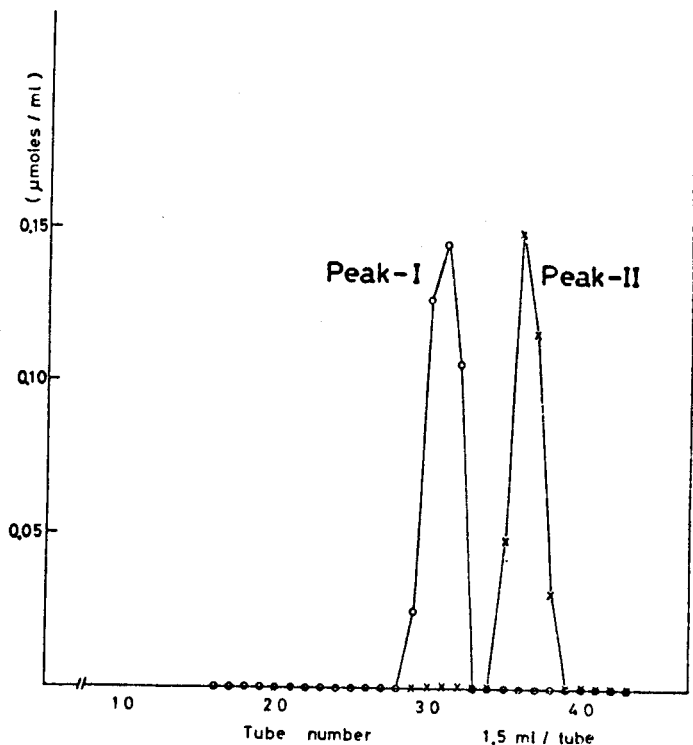


Fig. 29. Gel filtration on Bio-Gel P-2 of the  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase digest (Fig. 28.).

The digest was applied to a column (0.9 x 110 cm) of Bio-Gel P-2, then eluted with water at a flow rate of 5 ml per hr, collecting 1.5 ml per tube. Aliquots were used for the determination of neutral sugars representing the glycoasparagine produced by the digestion (—o—) and of the released N-acetylglucosamine (—x—). Values are expressed as  $\mu$ moles of galactose (Peak I) and of N-acetylglucosamine (Peak II) per ml.

#### E) ガラクトシダーゼ消化

$\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ消化で得られた上記のグリコシルアスパラギン(中性糖として0.074 $\mu$ mole)と *Aspergillus oryzae* の $\beta$ -

ガラクトシダーゼ ( 0.3 unit ) を 0.1 ml の水の中で、37°C でインキュベートした。還元力の増加は数時間で一定値に達し、その値はすべてのガラクトースの遊離を示した ( 図 30 )。消化物をそのままペーパークロマトグラフィー ( 溶媒  $\alpha$  ) したところ、合成 GlcNAc - Asn と一致し、ニンヒドリン反応陽性のスポットはそれ以外に検出されなかった。

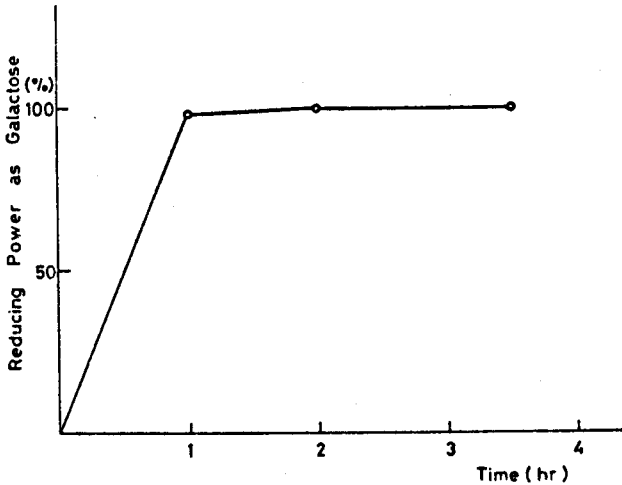


Fig. 30. Release of galactose from Peak I of Fig. 29 by  $\beta$ -galactosidase.

Peak I of Fig. 29 (0.074  $\mu$ mole as galactose) was incubated in 0.1 ml of water with 0.3 unit of  $\beta$ -galactosidase from Aspergillus oryzae. Aliquots of the reaction mixture were used for the determination of reducing power. Values for the release of galactose are expressed as percentages of the galactose in the substrate.

以上の結果から、B-3-Fにおける各糖の配列順序およびアノマー構造が明らかになった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼが無処理のB-3-Fに作用しなかったこと、 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼが、シアル酸のみを除去したB-3-Fに作用しなかったことを考えあわせると、この糖鎖は、枝分かれ構造をとらず、 $\alpha$ -NANA- $\beta$ -Gal- $\beta$ -GlcNAc- $\beta$ -Gal- $\beta$ -GlcNAc-Asnであると考えられる (表11)。また、B-3-Sは同じ内部構造をもち、シアル酸の結合位置の異なる異性体であると考えられる。

#### F) アミダーゼ消化

B-3-F (アスパラギン酸として 0.051  $\mu$ mole) をブタ腎臓のアミダー

Table 11

Proposed structures of the glycoasparagines from ACU urine

Glycoasparagines from*		
Peak D		$\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -GlcNAc-Asn
Peak C** Major		$\alpha$ -NANA-(2 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -GlcNAc-Asn
Minor		$\alpha$ -NANA-(2 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -GlcNAc-Asn
Peak B Major	$\alpha$ -NANA-(2 $\rightarrow$ ?) $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ ?) $\beta$ -GlcNAc-(1 $\rightarrow$ ?) $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -GlcNAc-Asn	
Minor		

\*For Peaks D, C and B, see Fig. 18.

\*\*see ref. 14.

ゼ ( 6 units ) と 0.16 ml の 0.1 M クエン酸 - 0.1 M 第二リン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5、( 酵素安定化剤として 0.01% ウシ血清アルブミンおよび 0.1 M NaCl を含む ) 中、37°C でインキュベートした。還元力の増加は約 5 時間で一定値に達し、その値は基質である B-3-F とほぼ等モルの N-アセチルグルコサミンに相当した。消化物は Morgan-Elson 反応陰性であった。従って、アスパラギンに結合する N-アセチルグルコサミンの 4-位が置換されていることになり、N-アセチルラクトサミンがアスパラギンに N-グリコシド結合していることが明らかである。

#### 第 4 節 考察と総括

予期されたように、AGU 患者の尿は糖ペプチドの構造研究の材料としては極めてすぐれたものであった。すなわち、均一なグリコシルアスパラギンを比較的容易に、構造研究に可能な量だけ得ることが出来、その結果、1 種の中性グリコシルアスパラギンと 4 種の酸性グリコシルアスパラギンの構造が明らかになった。表 11 に示すように、これら 5 種のグリコシルアスパラギンは、いずれも共通の基本構造  $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc-Asn をもっていた。現在まで、N-グリコシド型糖鎖をもつ糖タンパク質において知られていた基本構造の主なものは、著者が第 2 章で明らかにした卵アルブミン、タカアミラーゼ A、ラット肝臓ミクロソーム膜をはじめ、リボスクレアーゼ B、チログロブリン、免疫グロブリン A および E などの糖ペプチドなどにみられる  $\beta$ -Man

- (GlcNAc)<sub>2</sub> - Asn や、免疫グロブリン E から得られる一つの糖ペプチドにみられる  $\beta$ -Man-(1→4)- $\alpha$ -GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -Man-(1→4)-GlcNAc-Asn であるが、ここで明らかになった基本構造もまた糖タンパク質における N-グリコシド型糖鎖の一つの型を表現していると考えられる。また、C-S と C-F、あるいは B-3-F と B-3-S でみられるような異性体の存在は、それらの由来する糖タンパク質の糖部分の不均一性を表現しているのかもしれない。

時を同じくして、Pollitt, Pretty は、<sup>114</sup> イギリス人の AGU 患者の尿より、ゲル透過後、高圧紙電気泳動および Zeo-Karb 225 カラムによるクロマトグラフィーによって、9種の酸性グリコシルアスパラギンおよび4種の中性グリコシルアスパラギンを単離し、それらの構造を提出した。彼らが構造研究に用いた手段も、著者と同様に、酵素消化と過ヨウ素酸々化が主であるが、彼らが提出した構造と著者が提出したものとを比較すると、成分および組成は似ているものの、詳しい構造に関しては、ほとんどのものが異り、わずかに著者が D 画分より単離した中性のものが一致するのみであった。このことは、AGU にはいくつかの異った型が存在することを示すのかもしれない。事実、例えばブタ腎臓には、イオン交換クロマトグラフィーで異った挙動を示す3種のアミダーゼが存在することが知られている。<sup>115</sup> また、AGU 患者の腎臓においては、アミダーゼ活性が正常であるという事実からも、その可能性が支持される。<sup>94</sup>

著者の明らかにしたグリコシルアスパラギンの構造は、現在まで知られている糖タンパク質の糖部分とは異り、むしろある種の糖脂質の糖部分の構造に類似している。すなわち、例えば  $\alpha$ -NANA-(2→3)- $\beta$ -Gal-(1→4)-Glc-Ceramide の構造をもつヘマトシドや  $\alpha$ -NANA-(2→3)- $\beta$ -Gal-(1→4)- $\beta$ -GlcNAc-(1→3)- $\beta$ -Gal-Glc-Ceramide の構造をもつガングリオシドが知られている。<sup>116,117,118</sup> これらはヒト赤血球膜に存在している。しかし、AGU 患者の尿に排泄されるグリコシルアスパラギンが生体内のどの組織に由来するのかは、今のところ不明である。

A G U患者の尿中には、微量成分まで含めれば、著者の報告したもの以外にも、まだ多数のグリコシルアスパラギンが排泄されていると考えられ、それらの構造が決定されれば、上記以外のN-グリコシド型糖鎖が見い出されるかも知れない。また、尿以外に、A G U患者の種々の臓器を調べれば、尿のものとは異なる糖タンパク質に由来するグリコシルアスパラギンが得られる可能性もあると考えられる。特に、脳に存在する糖タンパク質の糖部分の構造については、現在まで全く知られておらず、興味をもたれる。また、患者の血液型と排泄されるグリコシルアスパラギンの構造との相関々係も興味深いが、まだ調べられていない。

## 実 験 の 部

### A ) 実験材料

A G U患者の尿は、共同研究者であるDr. P. Aula (University of Helsinki, Finland) より提供された。A G Uのスクリーニングに用いた精神薄弱者の尿は須藤正克博士(京都大学)、北条博厚博士(京都大学)より提供された。アミダーゼは、Kohno らの方法に従って、ブタ腎臓より精製した。<sup>115</sup> Clostridium perfringens のノイラミニダーゼは微生物化学研究所の青柳高明博士より供与された。Aspergillus oryzae の $\beta$ -ガラクトシダーゼは、東京田辺製薬の田中勇次博士から供与された標品、あるいは Akasaki らの方法に従って精製した標品を使用した。<sup>119</sup> Aspergillus oryzae およびナタ豆の $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼは、それぞれ松島祥夫博士(大阪大学)と木幡陽博士(神戸大学)より供与された。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼは、Li らの方法に従って、<sup>120</sup> フィシンから精製した。合成グリコシルアスパラギン、 $\beta$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc-Asn、はDr. R. W. Jeanloz (Harvard Medical School, Boston, U. S. A.)より供与された。

### B ) ペーパークロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーは、下降法で、次の二つの溶媒を用いて行っ

た。溶媒 a は酢酸エチル：ピリジン：酢酸：水（5：5：1：3、 $\sqrt{V}$ ）、溶媒 b はイソ酪酸：水：アンモニア水（28%）（66：33：1、 $\sqrt{V}$ ）である。グリコシルアスパラギンの検出には、ニンヒドリンの2%アセトン溶液、またはフルオレサミンの0.05%アセトン溶液を噴霧した。濾紙上での移動度  $R_f$  は、GlcNAc-Asn との相対比で表わし、ダンシル化したグリコシルアスパラギンの場合には、ダンシル化 GlcNAc-Asn との相対比で表わした。

#### C) ダンシルグリコシルアスパラギンの調製法

グリコシルアスパラギン（0.22  $\mu\text{mole}$ ）をダンシルクロリド（0.59  $\mu\text{mole}$ ）および炭酸ナトリウム（16  $\mu\text{moles}$ ）と160  $\mu\ell$  の50%アセトン溶液中、37°Cで、遮光して一夜インキュベートした。生成したDNS-グリコシルアスパラギンは、セファデックスG-25あるいはBio-Gel P-2のカラムで2%酢酸を溶媒として、ゲル濾過して回収した。

#### D) アミノ酸分析計によるグリコシルアスパラギン中のアミノ酸およびアミノ糖の定量

6N HCl または2N HCl, 100°C、16時間の加水分解条件を用いて、第2章の実験の部に示した方法で、同様に定量した。

#### E) 中性糖の定量

中性糖は、Hewitt の方法に従い、<sup>84</sup> オルシノール硫酸法で定量した。グリコシルアスパラギン中の中性糖の同定には、Clamp らの方法に従って、ガスクロマトグラフィーで行った。<sup>122</sup> ガスクロマトグラフとしてはHitachi Gas-chromatograph 073を用い、カラムとしては3.2% Silicone gum (SE30) を塗布したChromosorb Wを充填したガラスカラム(0.3×200cm)を使用した。試料(中性糖として30~50  $\mu\text{g}$ )は内部標準のキシロース(30  $\mu\text{g}$ )と共に、1.0Nメタノール塩酸1.5  $\text{ml}$  に溶かし、100°C、24時間メチル化した。反応終了後、炭酸銀で中和し、0.1  $\text{ml}$  の無水酢酸を加え、暗所に6時間放置して、時々攪拌した。この溶液を遠心し、上清を回収し、炭酸銀はさらに2回メタノールで洗浄した。ついで、エバポレーターでメタノールを完全に溜去し、得られたメチルグリコシドに、0.1~

0.05 ml のトリメチルシリル化剤（ピリジン：ヘキサメチルジシラザン：トリメチルクロロシラン＝10：2：1）を加えて3時間室温で時々攪拌して反応させたのち、2.5～5  $\mu$ l の試料をカラムに注入した。クロマトグラフィーは、115℃で2分間おき、その後毎分2℃の割合で240℃まで昇温しつつ、行った。N<sub>2</sub> およびH<sub>2</sub> ガスの流速は、それぞれ40, 20 ml/min とした。

#### F) シアル酸の定量

グリコシルアスパラギン中に含まれているシアル酸は、Jourdainらの方法に従い、<sup>123</sup> レゾルシノール反応で定量した。遊離のシアル酸は、Warrenの方法に従い、<sup>124</sup> チオバルビツール酸反応で定量した。いずれの場合も、N-アセチルノイラミン酸を標準とした。

#### G) GlcNAc-Asn

セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーにおけるGlcNAc-Asnの定量は、次のようにして行った。カラムの溶出液0.15 ml をとり、乾燥後、ブタ腎臓のアミダーゼ（2 munits）を含む0.25 ml の0.1 Mクエン酸-0.1 M第二リン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5、（酵素安定化剤として0.01%ウシ血清アルブミンおよび0.1 M NaCl を含む）を加え、21時間インキュベート後、遊離したN-アセチルグルコサミンをReissigらの方法に従って、<sup>28</sup> Morgan-Elson 反応で定量した。DEAE-セファデックスA-25カラムのクロマトグラフィーにおけるGlcNAc-Asnの定量は、Yemm, Cockingの方法に従い、<sup>85</sup> 合成したGlcNAc-Asnを標準として、ニンヒドリン反応で行った。

#### H) 酵素反応の追跡

$\alpha$ -、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ、およびアミダーゼによるグリコシルアスパラギンの消化は、Park, Johnsonの方法に従って、<sup>21</sup>還元力の増加を測定することによって追跡した。ただし、 $\beta$ -N-アセチルヘキササミニダーゼ消化の場合には、Reissigらの方法により、<sup>28</sup> Morgan-Elson 反応で遊離したアミノ糖を測定することによ



ても追跡した。遊離したガラクトースの量は、TMS化して、Sweeley らの方法に従って、<sup>42</sup> ガスクロマトグラフィーによって確認した。

#### I) 酵素の単位

酵素の単位 (unit) は、以下に示す各基質を 1 分間に 1  $\mu$ mole 加水分解する酵素量として表わした。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ：オルトニトロフェニル  $\beta$ -ガラクトシド、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ：フェニル  $\alpha$ -ガラクトシド、 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ：パラニトロフェニル  $\beta$ -N-アセチルグルコサミニド、ノイラミニダーゼ：ヒト血清  $\alpha_1$  酸性糖タンパク質、アミダーゼ：GlcNAc-Asn。

#### J) N-アセチルラクトサミンのガスクロマトグラフィーによる同定

グリコシルアスパラギンのアミダーゼ消化によって生成した N-アセチルラクトサミンはガスクロマトグラフィーにより同定した。試料は、消化物を Bio-Gel P-2 のカラムで脱塩し、内部標準のスクロースを加え、アノマーの平衡化のために 37°C で一夜放置後、乾燥し、TMS 化して調製した。分析は定温分析 (235°C) で行ったが、ガスクロマトグラフ、カラム、樹脂、およびガスの流速は、(E) 中性糖の定量と同様の条件である。標準品の N-アセチルラクトサミンは吉沢善作博士 (東北大学) より供与された。

著者は、カタツムリ臓器より $\beta$ -マンノシダーゼを精製し、それをはじめとするグリコシダーゼを用いて、主に酵素的手段で糖ペプチドの糖部分の構造に関する研究を行い、次のような知見を得た。

1. カタツムリ臓器のアセトン粉末から、硫安分画、アセトン分画、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより、粗抽出液の115倍の比活性をもち、構造研究に支障のある他のグリコシダーゼ活性を含まぬ $\beta$ -マンノシダーゼ標品を得た。
2. 精製 $\beta$ -マンノシダーゼは、pH 4.5に至適pHをもち、熱や凍結融解に対しても安定であった。フェニル $\beta$ -マンノシドを基質としたときのミハエリス定数 $K_m$ は6.5 mMであった。PCMBでは阻害されなかった。
3. ブタ肝臓より、硫安分画、アセトン分画、DEAE-セファデックスA-50カラムクロマトグラフィーによって、粗抽出液の230倍の比活性をもつ $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ標品を得た。本標品は、構造研究に支障のある他のグリコシダーゼを含まなかった。この酵素はPCMBで完全に阻害された。
4. 精製 $\beta$ -マンノシダーゼは、卵アルブミン、タカアミラーゼA、およびラット肝臓ミクロソーム膜より得られるMan-(GlcNAc)<sub>2</sub>-Asnの構造をもつ糖ペプチドに作用し、この糖ペプチド中のマンノシド結合が $\beta$ -型であることが明らかとなった。
5. GlcNAc-Asnの合成を、3-ベンジルオキシカルボニル-5-オキソ-4-オキサゾリジン酢酸を用いることによって簡便化した。
6. アスパルチルグリコシラミン尿症(AGU)を酵素を用いて簡便に診断する方法を確立した。
7. アスパルチルグリコシラミン尿症の患者尿より5種のグリコシルアスパラギンを単離し、その構造を決定した。

## 謝

## 辞

終りに臨み、本研究に際し、終始多大なる御指導と御鞭撻を賜った恩師山科郁男教授に深甚の謝意を表します。

また、本研究に際し、種々の有益なる御助言を賜った京都大学薬学部生物化学教室の林恭三助教授に謹んで感謝致します。さらに、本研究に種々の御協力をいただいた京都大学薬学部生物化学教室教室員の方々に感謝します。

## 引 用 文 献

1. P.Emmelot, C.J.Bos, E.L.Benedetti, and P.H.Rümke, *Biochim. Biophys. Acta*, 90 (1964) 126
2. M.Takeuchi and H.Terayama, *Exptl. Cell Res.*, 40 (1965) 32
3. W.L.Stahl and E.G.Trans, *Biochim. Biophys. Acta*, 163 (1968) 459
4. N.Miyajima, T.Kawasaki and I.Yamashina, *FEBS Lett.*, 11 (1970) 29
5. I.Funakoshi, H.Nakada and I.Yamashina, *J.Biochem.*, 76 (1974) 319
6. S.Hakomori, "The Amino Sugars," ed. by E.A.Balazs and R.W.Jeanloz, Vol. II A, Academic Press, New York, p.353 (1965)
7. V.T.Marchesi and E.P.Andrews, *Science*, 174 (1971) 1247
8. J.B.Weiss, C.J.Lote and H.Bobinski, *Nature New Biol.*, 234 (1971) 25
9. C.J.Lote and J.B.Weiss, *FEBS Lett.*, 16 (1971) 81
10. A.Neuberger, A.Gottschalk, R.D.Marshall and R.G.Spiro, "Glycoproteins," ed. by A.Gottschalk, p.450 (1972)
11. K.Sugahara, T.Okumura and I.Yamashina, *Biochim. Biophys. Acta*, 268 (1972) 488
12. K.Sugahara, T.Okumura and I.Yamashina, *FEBS Lett.*, 20 (1972) 44
13. T.Kawasaki, K.Sugahara, T.Okumura and I.Yamashina, *J.Biochem.*, 75 (1974) 437
14. K.Sugahara, S.Funakoshi, I.Funakoshi, P.Aula and I.Yamashina, *J.Biochem.*, 78 (1975) 673
15. K.Sugahara, S.Funakoshi, I.Funakoshi, P.Aula and I.Yamashina, *J.Biochem.*, in preparation.
16. A.Neuberger and R.D.Marshall, "Glycoproteins," ed. by A.Gottschalk, p.322 (1972)
17. T.Okumura and I.Yamashina, *J.Biochem.*, 68 (1970) 561
18. C.C.Huang, H.E.Mayer, Jr., and R.Montgomery, *Carbohyd. Res.*, 13 (1970) 127
19. M.Sato and I.Yamashina, *J.Biochem.*, 76 (1974) 1155
20. E.L.Hirst and E.Percival, "Methods in Carbohydrate Chemistry," ed. by R.L.Whistler and M.L.Wolfrom, Vol. II, Academic Press, New York and London, p.349 (1963)
21. J.T.Park and M.G.Johnson, *J.Biol.Chem.*, 181 (1949) 149
22. T.Muramatsu and F.Egami, *J.Biochem.*, 62 (1967) 700
23. B.Weissmann and D.F.Hinrichsen, *Biochemistry*, 8 (1969) 2034

24. T.Muramatsu, J.Biochem., 64 (1968) 521
25. J.S.O'Brien, Proc. Nat. Acad. Sci., 69 (1972) 1970
26. S.Schiller, G.A.Slover and A.Dorfman,  
J.Biol.Chem., 236 (1961) 983
27. D.H.Brown, Proc. Nat. Acad. Sci., 43 (1957) 783
28. J.L.Reissig, J.L.Strominger and L.F.Leloir,  
J. Biol. Chem., 217 (1955) 959
29. C.T.Bishop, M.B.Perry, F.Blank and F.P.Cooper,  
Can. J. Chem., 43 (1965) 30
30. T.Sukeno, A.L.Tarentino, T.H.Plummer and F.Maley,  
Biochemistry, 11 (1972) 1493
31. Y.T.Li and Y.C.Lee, J. Biol. Chem., 247 (1972) 3677
32. H.W.Siegelman, G.A.Wieczorek and B.C.Turner,  
Anal. Biochem., 13 (1965) 402
33. P.Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245 (1970) 3059
34. B.Helferich and S.Winkler, Chem. Ber., 66 (1933) 1556
35. J.Conchie and G.A.Levvy, "Methods in Carbohydrate  
Chemistry," ed. by R.L.Whistler and M.L.Wolfrom,  
Academic Press, New York, Vol. II, p.345 (1962)
36. S.Roseman and A.Dorfman, J. Biol. Chem., 191 (1951) 607
37. D.H.Leaback, "Biochemical Preparations," ed. by  
G.B.Brown, J.Wiley and Sons, Inc., New York, Vol. 10,  
p.118 (1963)
38. J.Findlay, G.A.Levvy and C.A.Marsh,  
Biochem. J., 69 (1958) 467
39. N.G.Asp, Anal. Biochem., 40 (1971) 281
40. L.M.H.Kerr, A.F.Graham and G.A.Levvy,  
Biochem. J., 42 (1948) 191
41. J.Conchie, J.Findlay and G.A.Levvy,  
Biochem. J., 71 (1959) 318
42. C.C.Sweeley, R.Bentley, M.Makita and W.W.Wells,  
J. Amer. Chem. Soc., 85 (1963) 2497
43. H.O.Lowry, J.N.Rosebrough, L.A.Farr and J.R.Randall,  
J. Biol. Chem., 193 (1951) 265
44. B.J.Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 121 (1964) 404
45. V.Ginsburg and E.F.Neufeld,  
Ann. Rev. Biochem., 38 (1969) 371
46. Y.T.Li, J. Biol. Chem., 241 (1966) 1010
47. T.Muramatsu and F.Egami, J. Biochem., 62 (1967) 700
48. Y.C.Lee, Federation Proc., 30 (1971) 1223
49. I.Bensaule, J.Callahan and M.Philippart,  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 43 (1971) 913
50. H.B.Bosmann and B.A.Hemsworth,  
Biochim. Biophys. Acta, 242 (1971) 152

51. H.Swaminathan, K.L.Matta, L.A.Donoso and O.P.Bahl,  
J. Biol. Chem., 247 (1972) 1775
52. K.L.Matta and O.P.Bahl,  
J. Biol. Chem., 247 (1972) 1780
53. T.Okumura and I.Yamashina, J. Biochem., 73 (1973) 131
54. G.O.Aspinall, R.B.Rashbrook and G.Kessler,  
J. Chem. Soc., p.215 (1958)
55. R.D.Marshall and A.Neuberger, "Glycoproteins," ed. by  
A.Gottschalk, p.732 (1972)
56. S.Akabori, T.Ikenaka and B.Hagihara,  
J. Biochem., 41 (1954) 577
57. S.Hayashi, J. Chem. Soc., Japan, 62 (1941) 1
58. H.Hanafusa, T.Ikenaka and S.Akabori,  
J. Biochem., 42 (1955) 55
59. H.Yamaguchi, T.Ikenaka and Y.Matsushima,  
J. Biochem., 65 (1969) 793
60. H.Yamaguchi, T.Ikenaka and Y.Matsushima,  
J. Biochem., 70 (1971) 587
61. H.Yamaguchi, T.Mega, T.Ikenaka and Y.Matsushima,  
J. Biochem., 66 (1969) 441
62. N.Miyajima, T.Kawasaki and I.Yamashina,  
FEBS Lett., 11 (1970) 29
63. N.Miyajima, M.Tomikawa, T.Kawasaki and I.Yamashina,  
J. Biochem., 66 (1969) 711
64. Y.T.Li, S.C.Li and M.R.Shetlar,  
J. Biol. Chem., 243 (1968) 656
65. T.Kawasaki and I.Yamashina, J. Biochem., 74 (1973) 639
66. G.Dallner,  
Acta Pathol. Microbial. Scand., Suppl., p.166 (1963)
67. G.O.Aspinall, R.B.Rashbrook and G.Kessler,  
J. Chem. Soc., p.215 (1958)
68. G.O.Aspinall, "The Carbohydrates," ed. by W.Pigman and  
D.Horton, Vol. II B, Academic Press, New York,  
p.515 (1970)
69. R.L.Whistler and E.L.Richards, "The Carbohydrates," ed.  
by W.Pigman and D.Horton, Vol. II A, Academic Press,  
New York, p.447 (1970)
70. E.Percival, "The Carbohydrates," ed. by W.Pigman and  
D.Horton, Vol. II B, Academic Press, New York,  
p.537 (1970)
71. M.Fukuda, F.Egami, G.Hämmerling, O.Lüderitz, G.Bagdian  
and A.M.Staub, Eur. J. Biochem., 20 (1971) 438
72. T.Okumura, Dissertation for Ph.D. (Kyoto University)  
p.33 (1972)

73. K.Sugahara, T.Kawasaki and I.Yamashina,  
SEIKAGAKU, 45 (1973) 861
74. T.Sukeno, A.L.Tarentino, T.H.Plummer, Jr. and F.Maley,  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 45 (1971) 219
75. Y.C.Lee and J.R.Scocca, J. Biol. Chem., 247 (1972) 5753
76. S.Toyoshima, M.Fukuda and T.Osawa,  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 51 (1973) 945
77. J.Baenziger and S.Kornfeld,  
J. Biol. Chem., 249 (1974) 7260
78. J.Baenziger, S.Kornfeld and S.Kochwa,  
J. Biol. Chem., 249 (1974) 1897
79. M.Sugita, S.Shirai, O.Itasaka and T.Hori,  
J. Biochem., 77 (1975) 125
80. J.Baenziger, S.Kornfeld and S.Kochwa,  
J. Biol. Chem., 249 (1974) 1889
81. I.Yamashina and M.Makino, J. Biochem., 51 (1962) 359
82. L.Svennerholm, Acta Soc. Med. Upps., 61 (1957) 287
83. G.Blix, Acta Chem. Scand., 2 (1948) 467
84. L.F.Hewitt, Biochem. J., 31 (1937) 366
85. E.M.Yemm and E.C.Cocking, Analyst, 80 (1955) 209
86. S.Autio,  
J. Mental Deficiency Res., Monograph Series I, (1972)
87. F.A.Jenner and R.J.Pollitt. Biochem. J., 103 (1967) 48p.
88. R.J.Pollitt, F.A.Jenner and H.Mersky,  
Lancet, ii (1968) 253
89. J.Palo and K.Mattson, J. Chromatogr., 50 (1970) 534
90. M.Makino, T.Kojima and I.Yamashina,  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 24 (1966) 961
91. T.Ohgushi and I.Yamashina,  
Biochim. Biophys. Acta, 156 (1968) 417
92. R.J.Pollitt and F.A.Jenner,  
Clin. Chim. Acta, 25 (1969) 413
93. J.Palo, P.Riekkinen, A.Aristila and S.Autio,  
Neurology, 21 (1971) 1198
94. J.Palo. P.Riekkinen, A.Aristila, S.Autio and T.Kivimäki,  
Acta Neuropath., 20 (1972) 217
95. J.Palo and H.Savolainen, Clin. Chim. Acta, 36 (1972) 431
96. J.Palo and H.Savolainen, J. Chromatogr., 65 (1972) 447
97. J.Palo and H.Savolainen, Ann. Clin. Res., 5 (1973) 156
98. J.N.Isenberg and H.L.Sharp, J. Pediatr., 86 (1975) 713
99. P.Aula, V.Näntö, M.L.Laipio and S.Autio,  
Clinical Genetics, 4 (1973) 297
100. 菅原一幸, 山科郁男 “生化学実験講座”, (編集: 鈴木旺, 山川民夫,  
山科郁男) 第4巻, P 34 (1976)

101. G.S.Marks, R.D.Marshall and A.Neuberger,  
Biochem. J., 87 (1963) 274
102. I.Yamashina, K.Ban-i and M.Makino,  
Biochim. Biophys. Acta, 78 (1963) 382
103. H.Tsukamoto, A.Yamamoto and C.Miyashita,  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 15 (1964) 151
104. M.Itoh, Chem. Pharm. Bull., 17 (1969) 1679
105. M.L.Wolfrom and T.M.Shen Han,  
J. Org. Chem., 26 (1961) 2146
106. A.Bertho and A.Revesz, Ann., 581 (1953) 161
107. F.Micheel and H.Wulff, Chem. Ber., 89 (1956) 1521
108. K.Sugahara, K.Nishimura, P.Aula and I.Yamashina,  
in preparation.
109. J.Palo, R.J.Pollitt, K.M.Pretty and H.Savolainen,  
Clin. Chim. Acta, 47 (1973) 69
110. J.Havrekamp, J.P.Kamerling and J.F.G.Vliegenthart,  
J. Chromatogr., 59 (1971) 281
111. H.Eibl and W.E.M.Lands, Anal. Biochem., 33 (1970) 58
112. M.L.Shneir and M.E.Rafelson, Jr.,  
Biochim. Biophys. Acta, 130 (1966) 1
113. K.Sugahara, unpublished data
114. R.J.Pollitt and K.M.Pretty,  
Biochem. J., 141 (1974) 141
115. M.Kohno and I.Yamashina,  
Biochim. Biophys. Acta, 258 (1972) 600
116. L.Svennerholm, Acta Chem. Scand., 17 (1963) 860
117. B.Siddiqui and S.Hakomori,  
Biochim. Biophys. Acta, 330 (1973) 147
118. S.Ando, K.Kon, M.Isobe and I.Yamakawa,  
J. Biochem., 73 (1973) 893
119. M.Akasaki, M.Suzuki, I.Funakoshi and I.Yamahsina,  
SEIKAGAKU, 47 (1975) 699
120. Y.T.Li and S.C.Li, "Mehtods in Enzymology," ed. by  
V.Ginsburg, 28 (1972) 714
121. H.H.Tausskey, Clin. Chim. Acta, 1 (1956) 210
122. J.R.Clamp, G.Dowson and L.Hough,  
Biochim. Biophys. Acta, 148 (1967) 342
123. G.W.Jourdian, L.Dean and S.Roseman,  
J. Biol. Chem., 246 (1971) 430
124. L.Warren, J. Biol. Chem., 234 (1959) 1971