



Title	NMRによるオリゴ糖の構造解析
Author(s)	高田, 祐輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	修士(農学)
Issue Date	2010-09-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/47342">https://hdl.handle.net/2115/47342</a>
Type	master thesis
File Information	takata.pdf



# NMR によるオリゴ糖の構造解析

応用生物学専攻 修士課程

高田 祐輔

# NMR によるオリゴ糖の構造解析

## 目次

第 1 章 序論	
1-1. NMR から見たオリゴ糖	1
1-2. 研究の目的	1
第 2 章 実験方法	
2-1. 使用機器および測定条件	2
2-2. 試料	2
2-3. メチル化分析	3
2-4. 手法の略称	4
第 3 章 ルーチン法によるオリゴ糖の構造解析	
3-1. 概要	6
3-2. 使用したルーチン法	6
3-3. 方法および結果	7
第 4 章 残基間の HMBC 相関が埋もれている場合の打開策	
4-1. 概要	13
4-2. HR-HMBC	14
第 5 章 残基内のプロトンが重なり合っている場合の打開策	
5-1. 概要	16
5-2. H2BC	17
第 6 章 考察	21
第 7 章 要旨	22
第 8 章 参考文献	23

## 第1章 序論

### 1-1. NMR から見たオリゴ糖

NMR は有機化合物の構造解析において欠かせない手段となった。NMR から得られる情報は分子の平面構造, 立体構造, さらには分子間の相互作用と多岐にわたる。装置の進歩と手法の改良のおかげで, 今では初心者でも容易に情報を取り出すことができる。一方で, 得られた多くの情報を正しく解釈することができずに誤った結論に至ることも少なくない。解析において困難が生じた場合には, 強引にシグナルの帰属を行わず, 手法の再選択や条件の最適化を行うべきである。直面する問題は分子の構造によって異なるため, 対処法も化合物の種類別に考える必要があるが, あらかじめ対策を練っておくことで明瞭なデータを効率的に得ることが可能である。

オリゴ糖は, NMR 解析において特有の問題を抱えるもののひとつである。NMR においてプロトンは感度が高いうえにカップリングによるシグナルの分裂を有することから解析の根幹となる重要な核種であるにも拘らず, オリゴ糖は官能基の多様性に乏しく, ほとんどのプロトンシグナルが 3~4 ppm に集中するため, スペクトル上でプロトンシグナルの重なり合いが生じる。還元糖の場合は水溶液中でアノマーの平衡混合物となり, シグナルの重なり合いが激化する。そこでオリゴ糖の解析では, プロトンシグナルの重なり合いおよびそれに起因する問題の克服が必要となる。

オリゴ糖は単糖が 2 から 10 個程度結合したものである。オリゴ糖のなかの単糖ひとつひとつを糖残基といい, 多くの場合, 糖残基の間はグリコシド結合でつながっている。グルコースのようなアルドースでは 1 位カーボン, フルクトースのようなケトースでは 2 位カーボンに酸素原子が 2 個結合しており, これらをアノメリック位と呼ぶ。グリコシド結合はアノメリック位を使った残基間の結合である。

オリゴ糖の構成糖は種類が多く, 様々なつながり方が可能であるため, その構造は多様性に富んでいる。代表的なオリゴ糖であるスクロースは人の体でエネルギー源として利用されるが, 他の多くのオリゴ糖は難消化性である。しかしながら, 腸内細菌に資化されるものがあり, その結果としての機能性が注目されている。糖が糖以外の分子と結合したものもあり, テルペノイドやフラボノイドの配糖体は広く天然に存在し, 様々な生理活性を有する。また, 特に近年では, タンパク質結合糖鎖の機能解明に向けた研究が盛んに行われている。ごく一部のオリゴ糖は既に構造解析がなされているが, 単純な二糖であっても報告のないものが多く, 網羅的なデータベースの構築には至っていない。

### 1-2. 研究の目的

本研究では, プロトンシグナルの重なり合いという問題を抱えるオリゴ糖を中心に NMR 解析を行った。まず, 日常的に用いられる手法の組み合わせにより簡潔に構造解析する手順を確立すること, つぎに, その手順では解析が困難であった事例に対して問題解決の手段を考え, それを用いて解析を行うことを目的とした。

## 第2章 実験方法

### 2-1. 使用機器および測定条件

NMR は Bruker AM500 ( $^1\text{H}$  : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$  : 126 MHz )で測定した. プローブは, 5 mm チューブの  $^{13}\text{C}$ -NMR 測定には 5 mm  $^{13}\text{C} / ^1\text{H}$  dual probe, 5 mm チューブのその他の測定には 5 mm  $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$  inverse probe, 2.5 mm チューブの測定には 2.5 mm  $^{13}\text{C} / ^1\text{H}$  dual probe を用いた. すべての測定は室温で行った. 重水中の測定では, 外部標準で TSP のプロトン, カーボンの化学シフトを 0.00 ppm とした. 重メタノール中の測定では, メチル基の残留プロトンの化学シフトを 3.30 ppm とし, メチル基カーボンの化学シフトを 49.0 ppm とした. オリゴ糖 **1** は 6 mg / 0.4 ml ( $\text{D}_2\text{O}$ ), 配糖体 **5** は 10 mg / 0.4 ml ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) に調製し, 5 mm チューブを用いた. オリゴ糖 **4** は試料が少量であったため, 2 mg / 0.06 ml ( $\text{D}_2\text{O}$ ) に調製し, 2.5 mm チューブを用いた.

二次元 NMR の測定条件は表 2.1. にまとめた. 表中にない項目はスペクトルの脚注に示した.

MS は JEOL JMS-AX500 を用いた. FAB-MS は TEA をマトリックスとした負イオンモードで測定した. GC/EI-MS では, GC は YOKOGAWA HP5890, カラムは DB-17HT (0.25 mm × 30 m) を使用した. 150°C から 250°C まで毎分 4°C で昇温し, スプリットレスモードで測定した.

表 2.1. 二次元 NMR の測定条件

	手法名	濃度	$F_1$		$F_2$		積算回数	測定時間 (hr)	展開時間 * (sec)
			測定幅 (Hz)	データ点数	測定幅 (Hz)	データ点数			
図3.2.	HSQC	6 mg	7246	512	1511	1024	8	2	
図3.3.	HSQC-TOCSY	/0.4 ml	7246	512	1511	1024	32	7	0.147
図3.4.	COSY		1511	256	1511	1024	2	0.3	
図3.5.	HMBC		72446	470	1511	1024	32	7	0.07
図3.6.									
図3.7.									
図4.2.a	HSQC	2 mg	6667	256	2762	1024	4	0.5	
図4.2.b	HMBC	/0.06 ml	7463	128	1458	1024	96	6	0.08
図4.2.c	HR-HMBC		7463	256	1887	2048	512	72	
図4.2.d									
図5.2.	HMQC	10 mg	11364	128	4065	1024	4	0.2	
図5.3.		/0.4 ml							
図5.4.	COSY		4348	128	4348	1024	2	0.1	
図5.5.	HMBC		17608	512	947	1024	8	2.5	0.08
図5.6.	H2BC		7295	234	947	1024	96	13	0.035

\*展開時間は HMBC については  $^{1\text{R}}J_{\text{CH}}$ , H2BC については  $J_{\text{HH}}$  を記した.

### 2-2. 試料

オリゴ糖 **1**, **3** は日本甜菜製糖株式会社より分与されたものである. オリゴ糖 **4** は大高酵素株式会社より貸与されたものである<sup>1)</sup>. 配糖体 **5** は当研究室の Hendra が合成したものである<sup>2)</sup>.

## 2-3. メチル化分析

オリゴ糖は松尾らの方法<sup>3)</sup>に従い、以下の反応により部分メチル化アルジトールアセテートとし、GC-MS 分析に供した。反応試薬およびスクロースは市販の特級品を用いた。

### 1. メチル化

- (1) 乳鉢で粉末状にした水酸化ナトリウム 20 mg に dimethyl sulfoxide(DMSO)を 1 g 加えて攪拌し、水酸化ナトリウム DMSO 溶液を調製した。
- (2) 10 ml 試験管にオリゴ糖試料を約 0.5 mg とり、水酸化ナトリウム DMSO 溶液を 0.5 ml 加えた。
- (3) そこにヨウ化メチルを 0.2 ml 加え、15 分間マグネチックスターラーで攪拌した。
- (4) 水を 2 ml 加えて攪拌したのち、クロロホルムを 0.5 ml 加えて、液液分配を行った。
- (5) 水層(上)を取り除いたのち、新たに水を 2 ml 加え、液液分配を行った。
- (6) 同様に水層を除去し、再び水を 2 ml 加え、液液分配を行った。
- (7) クロロホルム層(下)を別の 10 ml 試験管に移し、水共沸除去用にトルエンを約 0.2 ml 加え、ロータリーエバポレーターで濃縮、溶媒除去を行った。
- (8) 新たに調製した水酸化ナトリウム DMSO 溶液を 0.5 ml 加え、同じ手順で再度メチル化を行った。

### 2. 加水分解

2 M の TFA 水溶液を 0.5 ml 加え、90°C で 1 時間攪拌したのち、トルエンを加えてロータリーエバポレーターで濃縮、溶媒除去を行った。

### 3. 還元

- (1) 0.25 M の水素化ホウ素ナトリウム水溶液を 0.5 ml 加え、一晩攪拌した。
- (2) 酢酸を泡が出なくなるまで(5~10 滴)加えたのち、トルエンを加えてロータリーエバポレーターで濃縮・溶媒除去を行った。
- (3) メタノールを加えてロータリーエバポレーターで濃縮・乾固した。メタノール添加と濃縮・乾固はもう 2 回ずつ、計 3 回行った。

### 4. アセチル化

- (1) ピリジン 0.2 ml と無水酢酸 0.2 ml を加え、90°C で 20 分間攪拌したのち、トルエンを加えてロータリーエバポレーターで濃縮、溶媒除去を行った。
- (2) クロロホルム 0.5 ml と水 2 ml を加えて、液液分配を行った。
- (3) 水層(上)を取り除いたのち、新たに水を 2 ml 加え、液液分配を行った。
- (4) 同様に水層を除去し、水を 2 ml 加え、液液分配を行った。
- (5) クロロホルム層(下)を別の 10 ml 試験管に移し、トルエンを加えて、ロータリーエバポレーターで濃縮、溶媒除去を行った。

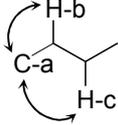
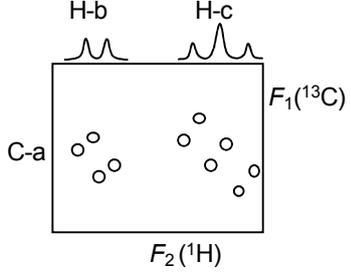
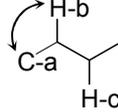
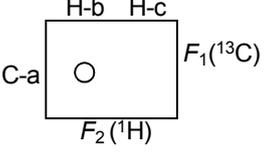
2-4. 手法の略称

ルーチン法を表 2.1.に, 新たに用いた手法を表 2.2.にまとめた.

表 2.2. ルーチン法の概略

手法略称	参考文献	相関	スペクトル
COSY <u>c</u> orrelated <u>s</u> pectroscopy	4,5		
TOCSY <u>t</u> otal <u>c</u> orrelation <u>s</u> pectroscopy	6,7,8		
HSQC <u>h</u> eteronuclear <u>s</u> ingle <u>q</u> uantum <u>c</u> oherence	9,10		
HMQC <u>h</u> eteronuclear <u>m</u> ultiple <u>q</u> uantum <u>c</u> orrelation	11,12		
HSQC - TOCSY <u>h</u> eteronuclear <u>s</u> ingle <u>q</u> uantum <u>c</u> oherence <u>t</u> otal <u>c</u> orrelation <u>s</u> pectroscopy	10,13		
HMBC <u>h</u> eteronuclear <u>m</u> ultiple <u>b</u> ond <u>c</u> orrelation	12,14,15		
SPT <u>s</u> elective <u>p</u> opulation <u>t</u> ransfer	16,17		

表 2.3. 新たに用いた手法の概略

手法略称	参考文献	相関	スペクトル
HR -HMBC	<u>h</u> igh <u>r</u> esolution <u>h</u> eteronuclear <u>m</u> ultiple <u>b</u> ond <u>c</u> orrelation 18,19		
H2BC	<u>h</u> eteronuclear <u>2</u> bond <u>c</u> orrelation 20,21		

## 第3章 ルーチン法によるオリゴ糖の構造解析

### 3-1. 概要

NMR を用いたオリゴ糖の構造解析法は概ね確立されており<sup>22)</sup>, その方法に従うことで構造決定が可能な場合がある. 多少の違いはあるが, 基本的には COSY, TOCSY, HSQC, HMBC とこれらを組み合わせた手法を用いるものである. 甜菜から単離されたオリゴ糖 **1** (図 3.1.) の構造解析を行うに当たっては以下のルーチン法を用いた.

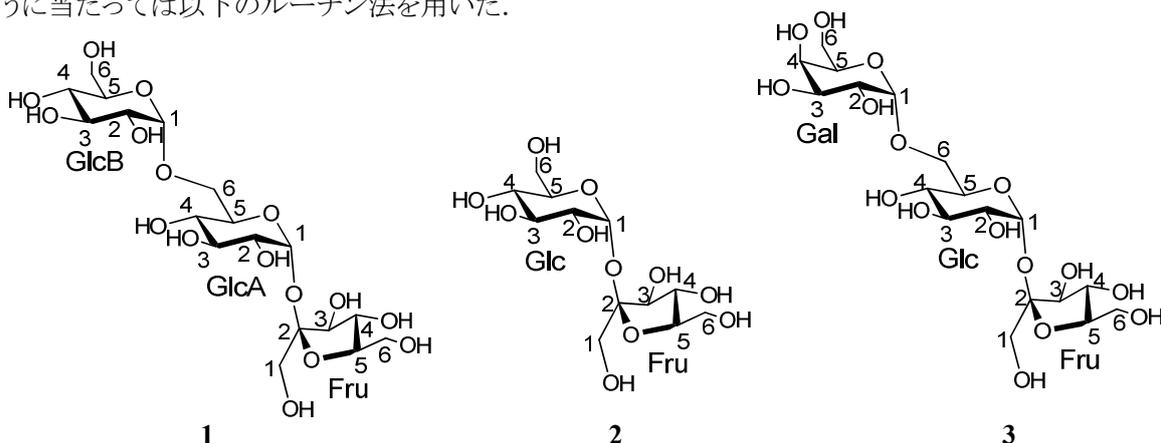


図 3.1. オリゴ糖 **1**, **2** (スクロース), **3** (ラフィノース) の構造

### 3-2. 使用したルーチン法

COSY は同じカーボンか隣のカーボンに結合している化学的に非等価なプロトンどうしを検出する. 例えば, グルコースであれば 1 位プロトンと 2 位プロトン, 2 位プロトンと 3 位プロトンに相関が出て, 1 位から 2 位, 3 位と順に追っていくことができる. HSQC は直接結合しているプロトンとカーボンを検出する. HSQC で相関の出ないカーボンは第四級だとわかり, さらにエディティング法を組み合わせた E-HSQC<sup>10,23)</sup>を用いることでメチレンをメチンやメチルと区別することができる. 直接結合したプロトンとカーボンを検出する手法としては HMQC もあるが, プロトン-プロトンスピンカップリングがある場合カーボン方向に線幅が広がるので, オリゴ糖には不向きだと判断される. HSQC-TOCSY は, 直接結合しているプロトンと同一スピン系のプロトンを検出する. グルコースであれば 1~6 位プロトン, フルクトースであれば 3~6 位プロトンが同一スピン系に属する. フルクトースの 1 位プロトンがスピン系に入らないのは, 2 位が第四級カーボンだからである. ほとんどの場合, 糖残基間は酸素を介するグリコシド結合でつながっており, そこでスピン系が途切れるため, HSQC-TOCSY では他残基のプロトンとは相関が出ない. TOCSY ではプロトンどうしの重なり合いにより, 解析が困難となる場合があるが, HSQC-TOCSY ではプロトンどうしの重なりがあってもカーボンを糖残基ごとにグループ分けすることができる. HMBC は 2 結合もしくは 3 結合はなれたプロトンとカーボンを検出する. アノメリックカーボンとグリコシド結合した他残基のプロトンとは 3 結合はなれているため, その HMBC 相関によって残基間の結合位置を決定できる. 通常の HMBC は上述

の HMQC と同様にカーボン方向に線幅がひろがるので、これを抑えたコンスタントタイム (CT) HMBC<sup>24)</sup>を用いた。本論文中ではすべての HMBC をコンスタントタイムで測定しており、以下、単に HMBC と記載する。SPT では任意のプロトンと他のプロトンとのカップリング定数がわかる。

### 3-3. 方法および結果

オリゴ糖 **1** の NMR 解析に入る前に、MS を測定した。負イオンモード FAB-MS で  $m/z$  503 にイオンピークが出たことから、分子量が 504 とわかり、オリゴ糖 **1** は三糖 ( $C_{18}H_{32}O_{16}$ ) であると推定した。

NMR 解析においては、 $^1H$ - $^{13}C$ -NMR を測定したのち、各種二次元 NMR 測定を行った。E-HSQC でそれぞれのカーボンに直結したプロトンのシグナルを確認し、オリゴ糖 **1** が 4 個のメチレンと 1 個の第四級カーボンを含んでいることがわかった (図 3.2.)。HSQC-TOCSY により、プロトン、カーボンのシグナルを糖残基ごとにグループ分けした (図 3.3.)。

3 個の糖残基のうち、まず、第四級カーボンが含まれる残基をフルクトース残基 (Fru) と考え、この残基の帰属を行った。第四級カーボンは 2 位であり、HMBC スペクトルにおいて 2 位カーボンと相関のあるメチレンプロトンを 1 位と帰属した (図 3.5.)。1 位カーボンと HMBC 相関のあるプロトンが 3 位とわかり、COSY で 3 位プロトンからたどって 4 位と 5 位を帰属した (図 3.4.)。HSQC-TOCSY で 3 位と相関のあるメチレンを 6 位と帰属した。2 位カーボンと 5 位プロトンに HMBC 相関が得られたことからフラノース型であることが確認でき、化学シフトとカップリング定数から 2 位の立体配置は  $\beta$  型であることがわかった<sup>25)</sup> (表 3.1.)。カップリング定数は  $^1H$ -NMR または SPT 差スペクトルから読み取った。6 位プロトン的一方 ( $\delta_H$  3.86 ppm) についてはシグナルが重度に重なり合うため、解析できなかった。

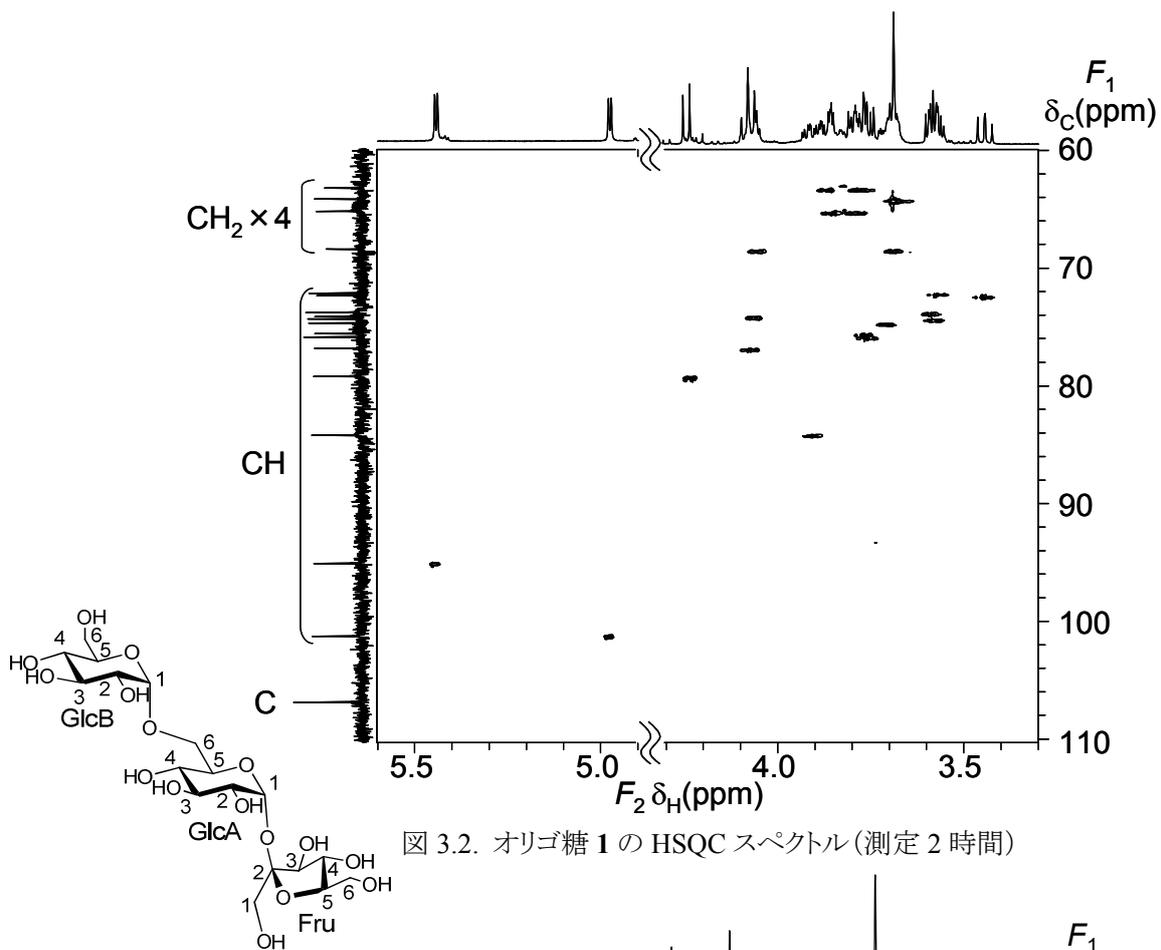


図 3.2. オリゴ糖 1 の HSQC スペクトル (測定 2 時間)

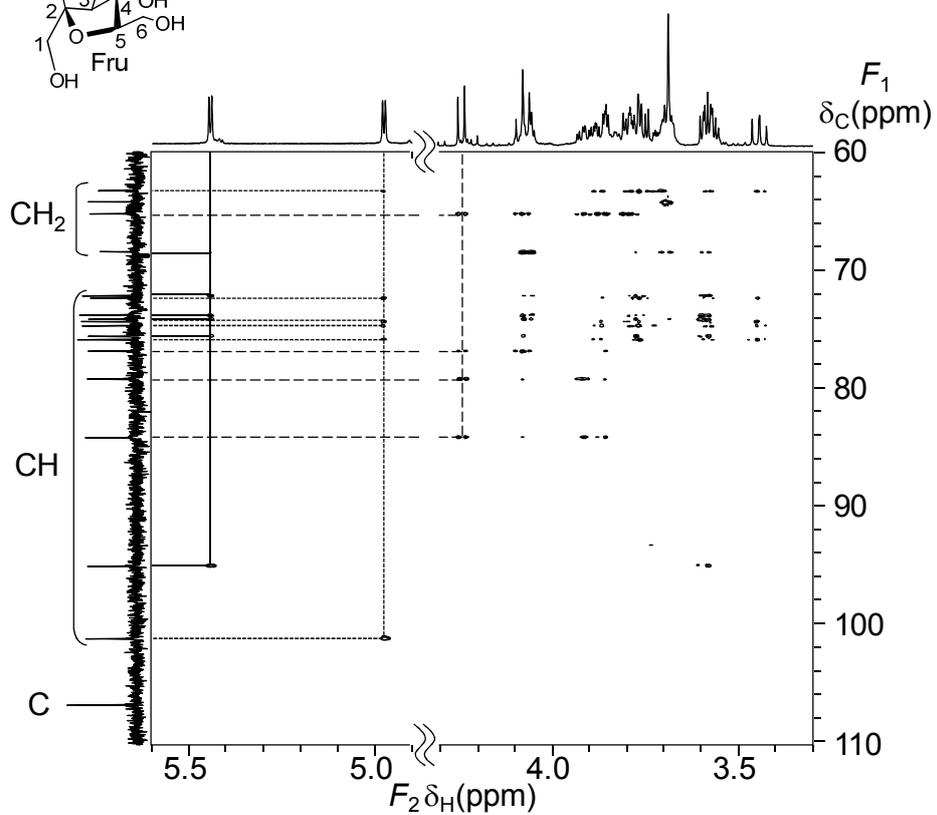


図 3.3. オリゴ糖 1 の HSQC-TOCSY スペクトル (測定 7 時間)

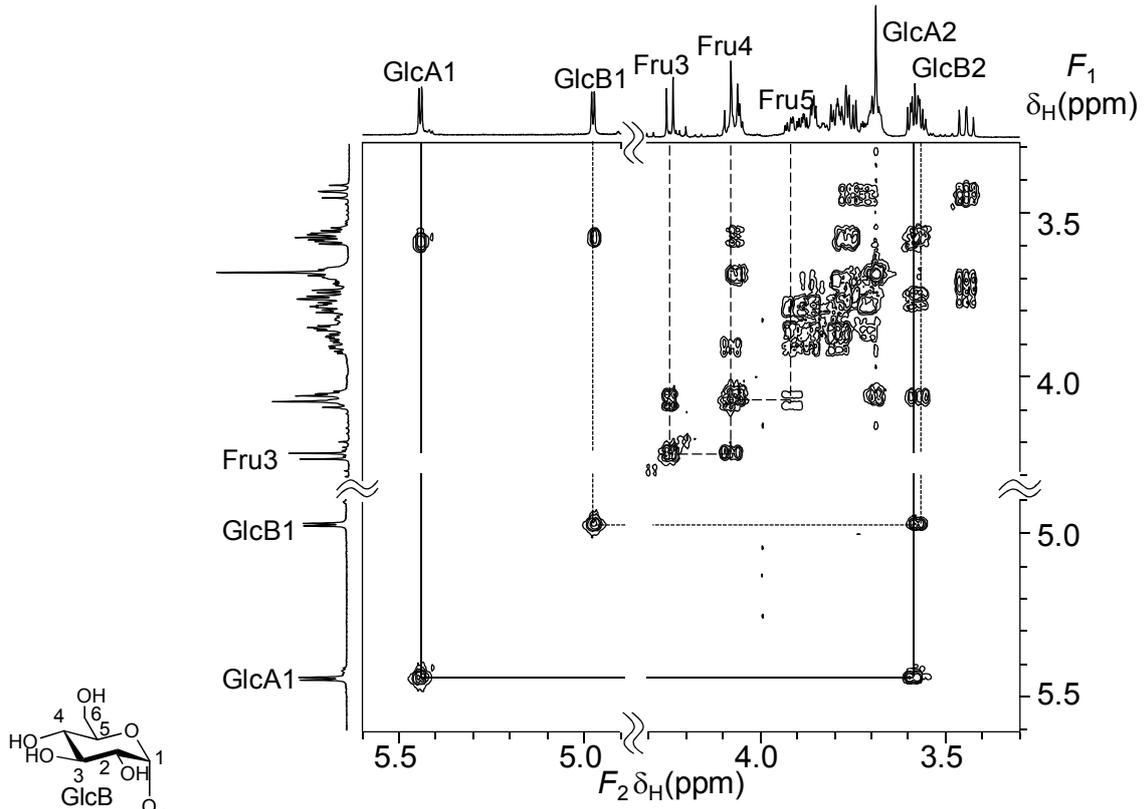


図 3.4. オリゴ糖 1 の COSY スペクトル (測定 15 分)

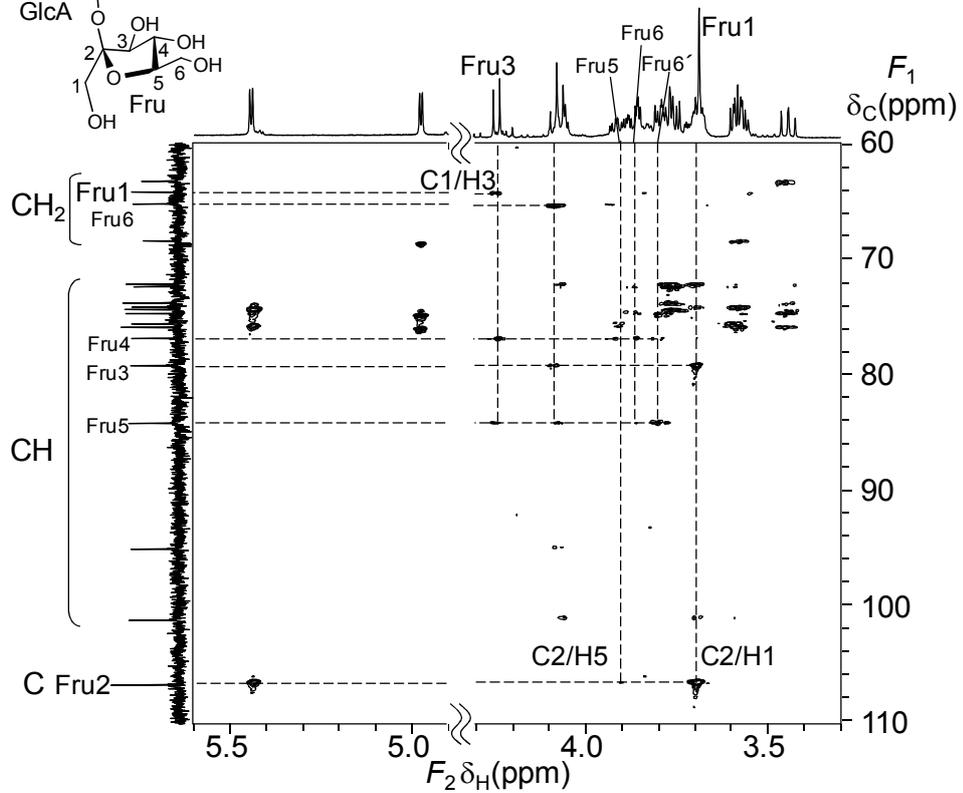


図 3.5. オリゴ糖 1 の HMBC スペクトル (測定 7 時間)

次に、最も化学シフトの大きいプロトン(5.45 ppm)を含む残基の帰属を行った。HSQC-TOCSYでこのプロトンと6つのカーボンに相関が得られたことから  $J_{2,3}$ ,  $J_{3,4}$ ,  $J_{4,5}$  が大きいグルコース残基と推定し、グルコース残基 A (GlcA) とした。前述の化学シフトの大きいプロトンはダブルレットになっており、これに直結するカーボンの化学シフトも大きいことから、これを1位と帰属した。COSYで1位と相関のあるプロトンを2位と帰属した(図 3.4.)。1位, 2位の両プロトンと HMBC 相関のあるカーボンを3位と帰属し、2位カーボンと3位プロトンの HMBC 相関も確認した。残る4, 5位のうち、1位プロトンと相関のあるカーボンを5位, 相関のない方を4位と帰属した(図 3.6.)。SPT 差スペクトルにより  $J_{1,2}$  が小さく,  $J_{2,3}$ ,  $J_{3,4}$ ,  $J_{4,5}$  が大きいことを確認した。化学シフトとカップリング定数から、1位の立体配置は $\alpha$ 型であることがわかった(表 3.1.)。

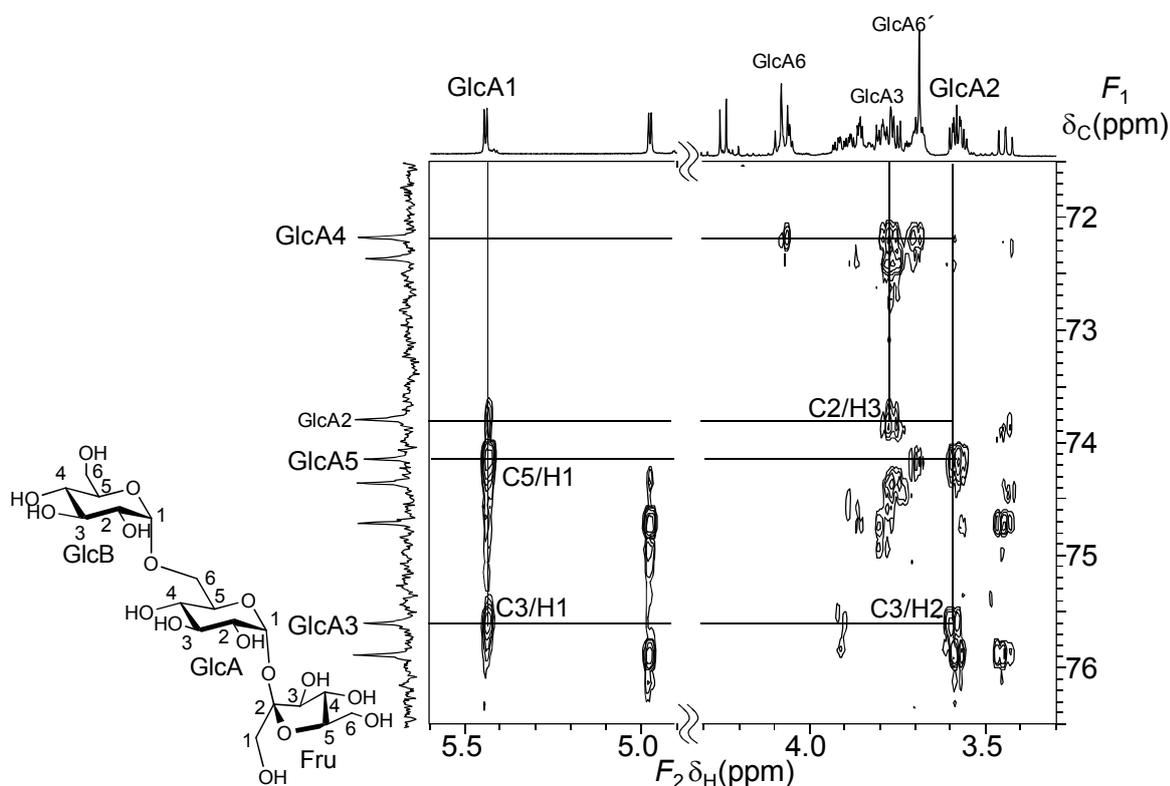


図 3.6. オリゴ糖 **1** の HMBC スペクトル(測定 7 時間)

最後に、残った6つのカーボンは HSQC-TOCSY から同じスピニン系に属することがわかり、グルコース残基 A と同様の手順で帰属した。5位プロトンと6位プロトンの一方は、化学シフトが近くストロングカップリングになっていた。ストロングカップリングとは化学シフト差とカップリング定数の比 ( $\Delta\delta/J$ ) が小さい状態であり、シグナルに歪みが生じるため一次解析はできない。化学シフトとカップリング定数から1位の立体配置は $\alpha$ 型であることがわかり、これをグルコース残基 B (GlcB) とした(表 3.1.)。

HMBC でグルコース残基 A の6位カーボンとグルコース残基 B の1位プロトン、フルクトース残基の2位カーボンとグルコース残基 A の1位プロトンに相関が得られたことから、オリゴ糖 **1** を  $\alpha$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -fructofuranoside(テアンデロース<sup>26,27</sup>)と推定した(図 3.7.)。

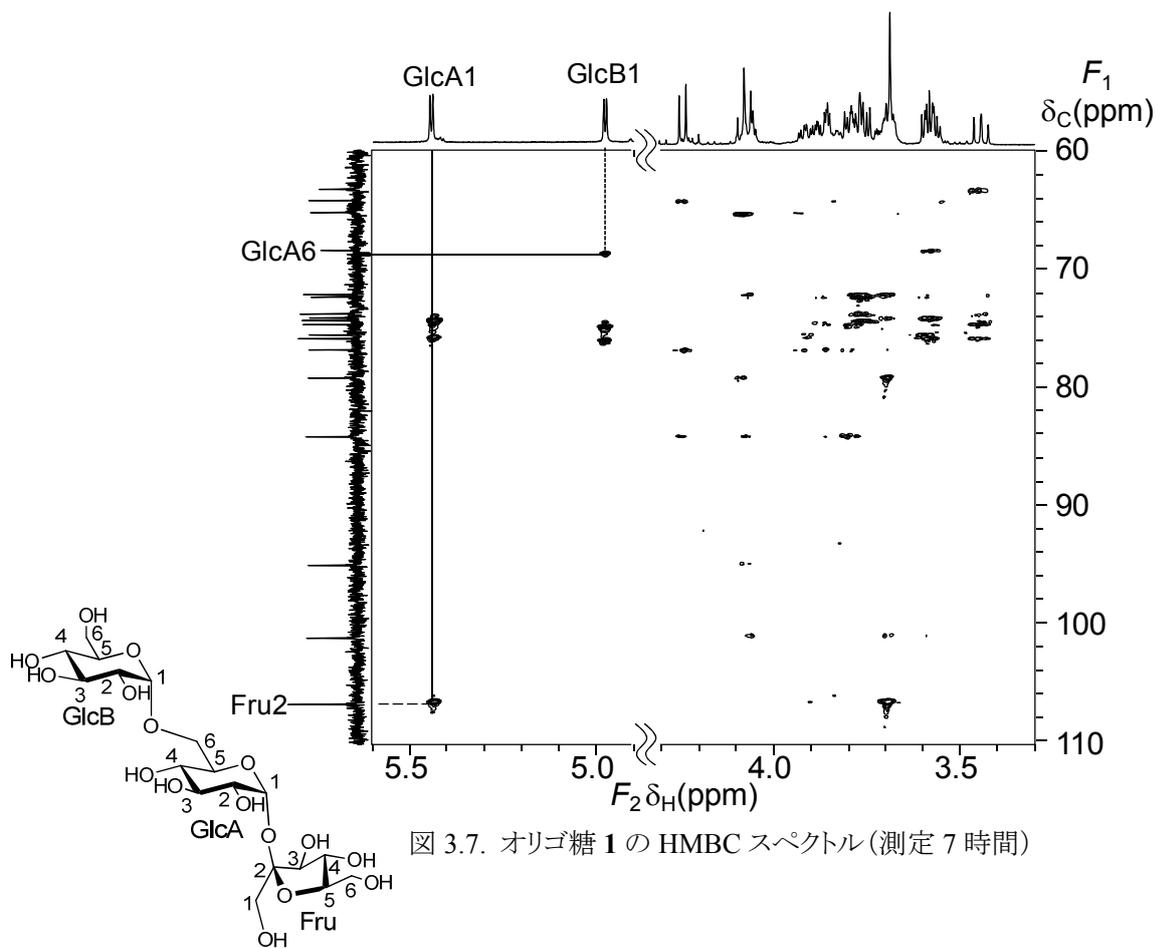


図 3.7. オリゴ糖 1 の HMBC スペクトル (測定 7 時間)

表 3.1. オリゴ糖 1 の NMR データ

		$\delta_C$	$\delta_H$		$J_{HH}$
Fru	1	64.26	3.69	s	
	2	106.64			
	3	79.18	4.24	d	8.9
	4	76.82	4.07	dd	8.9, 8.4
	5	84.13	3.91	ddd	8.4, 7.4, 3.0
	6	65.26	3.86	m	
			3.79	dd	12.3, 7.4
GlcA	1	94.95	5.45	d	3.9
	2	73.79	3.59	dd	10.2, 3.9
	3	75.58	3.77	dd	10.2, 9.5
	4	72.18	3.56	dd	9.5, 8.6
	5	74.14	4.06	m	
	6	68.46	4.05	m	
			3.69	dd	12.6, 3.0
GlcB	1	101.06	4.98	d	3.8
	2	74.35	3.57	dd	9.4, 3.8
	3	75.87	3.76	dd	10.0, 9.4
	4	72.36	3.44	dd	10.1, 10.0
	5	74.70	3.71	ddd	10.1, 5.1, 2.2
	6	63.32	3.86	dd	12.4, 2.2
			3.78	dd	12.4, 5.1

この推定構造を確認するため、オリゴ糖 **1**、スクロース(**2**)、ラフィノース(**3**)をそれぞれ完全メチル化、加水分解、還元、アセチル化して得た部分メチル化アルジトールアセテート混合物をGC-MS分析し、比較した。誘導体化は松尾らの方法<sup>3)</sup>に従った。一連の反応により、オリゴ糖 **1**からは末端のグルコース残基(GlcB)と末端のフルクトース残基(Fru)に由来するものの他、ラフィノースからも生じる 1,5,6-tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methylsorbitol が得られ、推定構造を支持した(図 3.8-12.)。

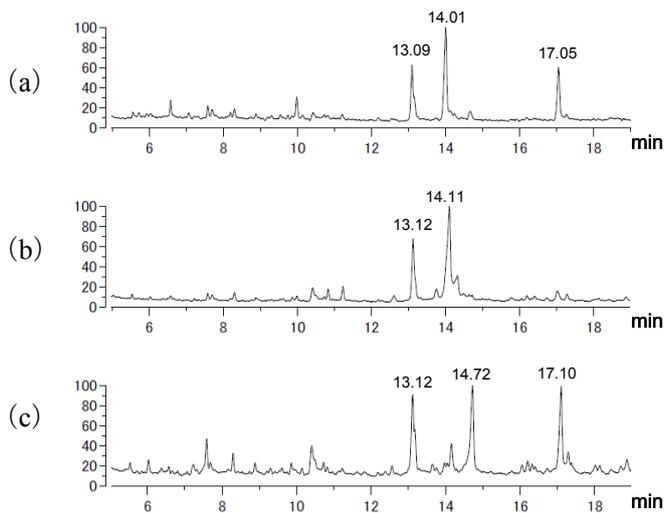


図 3.8. GC-MS のトータルイオンカレントクロマトグラム(TICC)  
(a はオリゴ糖 **1**, b はスクロース, c はラフィノースの反応産物)

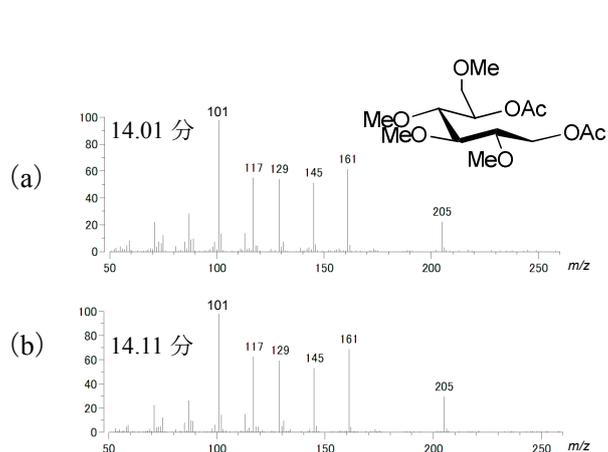


図 3.10. 各 TICC 中の保持時間 14 分  
付近のピークのマススペクトル

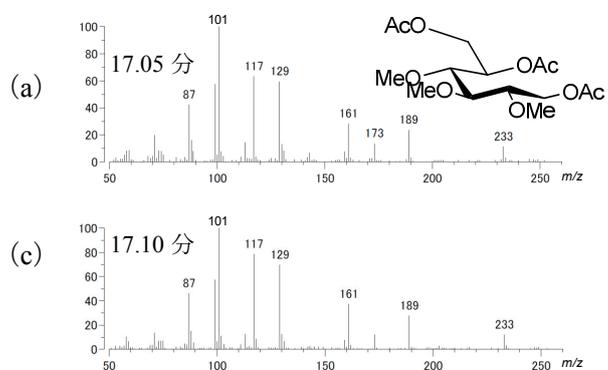


図 3.11. 各 TICC 中の保持時間 17 分  
付近のピークのマススペクトル

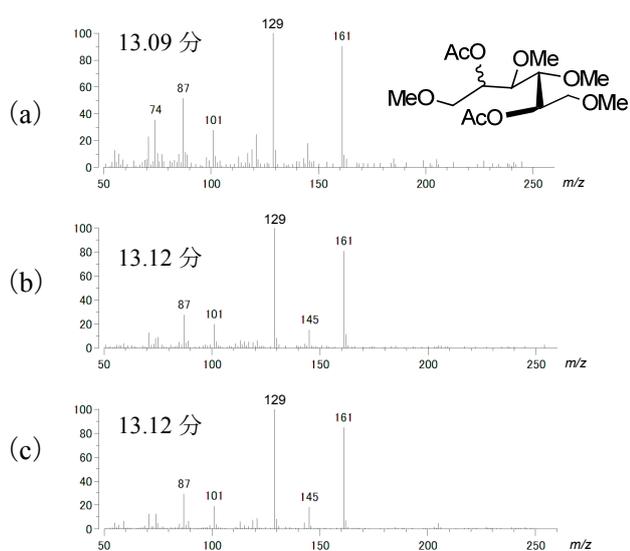


図 3.9. 各 TICC 中の保持時間 13 分  
付近のピークのマススペクトル

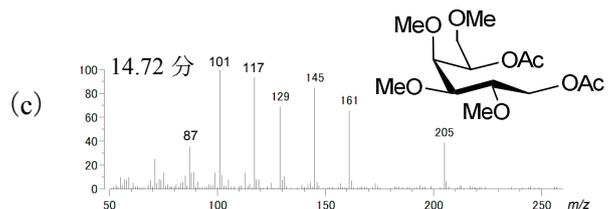


図 3.12. c の TICC 中の保持時間 14.7 分  
付近のピークのマススペクトル

## 第4章 残基間の HMBC 相関が埋もれている場合の打開策

### 4-1. 概要

グルコース残基やガラクトース残基のようなアルドース残基のアノメリック位が残基間の結合に使われている場合、そのつながりを示す HMBC 相関は2個ある。一方、フルクトース残基のようなケトース残基のアノメリック位が残基間の結合に使われている場合、そのつながりを示す HMBC 相関は1個だけである。例えば、ラフィノース(図 4.1.)においてガラクトース残基(Gal)とグルコース残基(Glc)の結合に対しては、Gal の1位カーボンと Glc の6位プロトン、Glc の6位カーボンと Gal の1位プロトンにそれぞれ HMBC 相関が出るが、Glc とフルクトース残基(Fru)の結合に対しては、Fru の2位カーボンと Glc の1位プロトンにのみ HMBC 相関が現れる。1-1.で述べたように、オリゴ糖においてはプロトンシグナルの重なり合いが激しいため、重要な残基間 HMBC 相関が他の残基内 HMBC 相関に埋もれることがある。

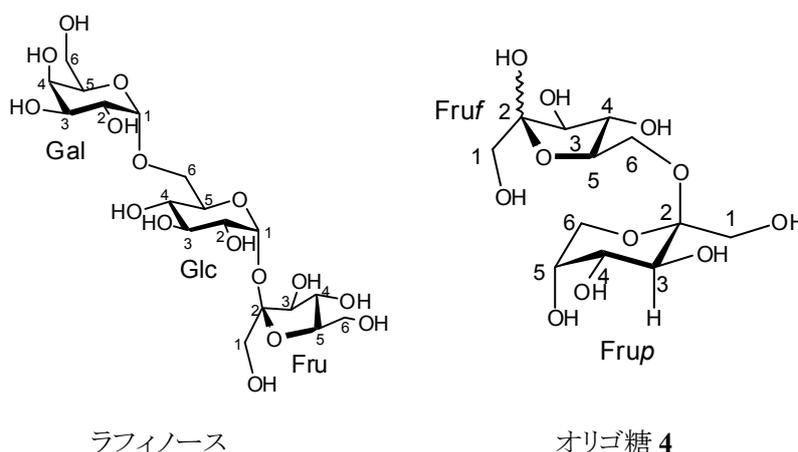


図 4.1. ラフィノースおよびオリゴ糖 4 の構造

植物エキス発酵飲料から単離されたオリゴ糖 4(図 4.1.)は、各種二次元 NMR により帰属を行った結果、 $\beta$ -fructopyranose 残基(FruP)と fructofuranose 残基(FruF)から成る二糖とわかった。通常、アノメリック位が結合に使われていないフルクトースは水溶液中でピラノース型が優先する<sup>28)</sup>。オリゴ糖 4 は FruF のアノメリック位が結合に使われていないのにも拘らず、ピラノース型に異性化したものが生じていないことから、FruF の6位が残基間の結合に使われていることが示唆された。しかし、FruF の6位プロトンと FruP の1位プロトンの化学シフトが近く(表 4.1.)、HMBC スペクトルにおいて、FruP の2位カーボンと FruF の6位プロトンとの残基間相関シグナルと、FruP の2位カーボンと FruP の1位プロトンとの残基内相関シグナルが重なっており、互いを区別できなかった(図 4.2a-b.)。

そこで、HMBC 相関シグナルの形状を変化させて、複数の相関の存在を明らかにすることを試みた。

#### 4-2. HR-HMBC

HR-HMBC はプロトン-プロトンカップリング定数 ( $J_{HH}$ ) および遠隔カーボン-プロトンカップリング定数 ( ${}^L R J_{CH}$ ) を読みとる手法である。測定時に設定するスケールリングファクター  $N$  によって、相関シグナルは、 ${}^L R J_{CH}$  の  $N$  倍で右上がりに、 $J_{HH}$  の  $(N+1)$  倍で右下がりに分裂する。

Frup の 1, 1' 位プロトンは互いに近接したダブルレット, Fruf の 6 位プロトンはダブルダブルレットであるので、 $J_{HH}$  による分裂パターンが異なる。それぞれの  $J_{HH}$  による分裂パターンは Frup 残基内の 3 位カーボンと 1, 1' 位プロトンとの HR-HMBC 相関ならびに、Fruf 残基内の 5 位カーボンと 6 位プロトンとの HR-HMBC 相関で確かめることができた (図 4.2c)。Frup1, 1' 位プロトンは  $\Delta\delta/J$  が 1.6 と小さく (表 4.1.), ストロングカップリング由来のシグナルも観測された。HR-HMBC (図 4.2d.) で Frup1, 1' 位プロトンおよび Fruf6 位プロトンの 2 種類の  $J_{HH}$  分裂パターンが検出され、2 個の HMBC 相関が重なっていることを明らかにできた。

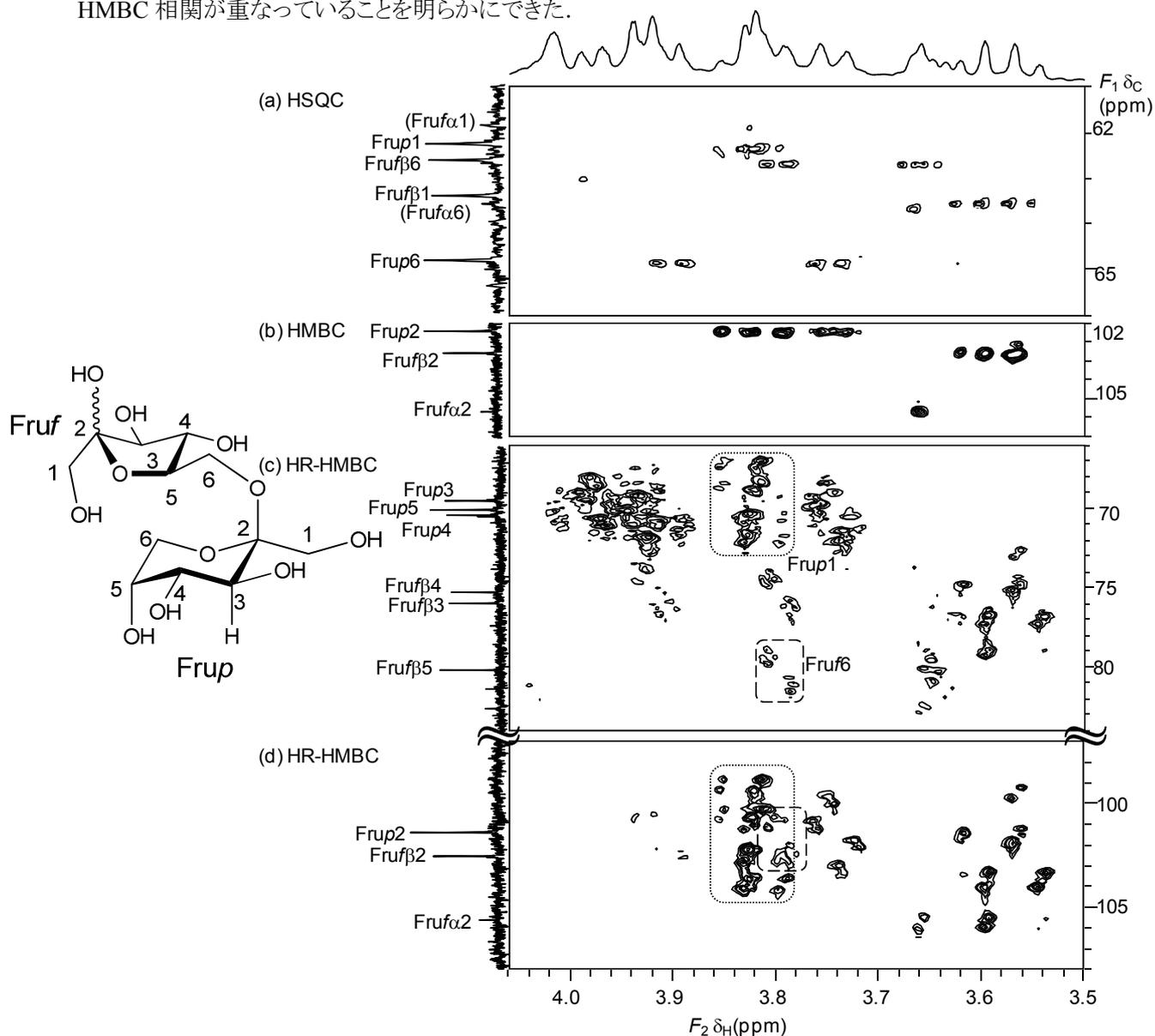


図 4.2. オリゴ糖 4 の HSQC (a: 測定 30 分), HMBC (b: 測定 6 時間), HR-HMBC (c, d: 測定 3 日,  $N=20$ ) スペクトル

HR-HMBC のパルス系列は図 4.3.に示した.

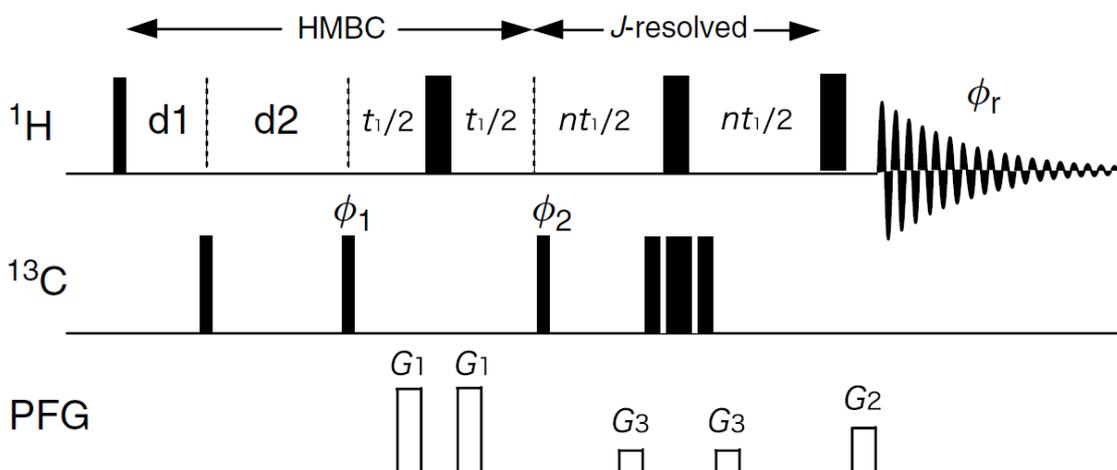


図 4.3. HR-HMBC のパルス系列(論文 18 より引用)

表 4.1. オリゴ糖 4 の NMR データ

		$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$		$J_{\text{HH}}$
Frup	1	62.30	3.84	d	12.3
	1'		3.80	d	12.3
	2	101.42			
	3	69.41	3.93	dd	10.0
	4	70.33	3.97	dd	10.0, 2.9
	5	69.99	4.02	dd	2.9, 1.7, 1.5
	6	64.85	3.91	dd	12.6, 1.5
	6'		3.74	dd	12.6, 1.7
Fru $\beta$	1	63.44	3.61	d	12.1
	1'		3.56	d	12.1
	2	102.57			
	3	75.88	4.14	d	8.4
	4	75.18	4.20	dd	8.4, 7.7
	5	80.09	3.91	ddd	7.7, 6.2, 2.5
	6	62.66	3.80	dd	10.8, 2.5
	6'		3.65	dd	10.8, 6.2
Fru $\alpha$	1	61.89	3.66	s	
	2	105.65			
	3	82.53	4.12	d	4.9
	4	77.35	4.03	dd	6.8, 4.9
	5	81.29	4.17	dd	6.8, 6.7
	6	63.61	3.68	d	6.7
		6'			

## 第5章 残基内のプロトンが重なり合っている場合の打開策

### 5-1. 概要

1-1.で述べたように、オリゴ糖においてはプロトンシグナルの重なり合いが激しく、そのために COSY や HMBC では帰属が困難な場合がある。配糖体においても、糖部分の NMR 解析はオリゴ糖の場合と同じ手順であり、抱える問題も同様である。前章では残基間の HMBC 相関について述べたが、本章では残基内のプロトンシグナルが重なり合っている場合について述べる。オリゴ糖の解析で用いられる手法のひとつに TOCSY-COSY<sup>29)</sup>があり、これは同一スピン系に属するプロトンシグナルだけの COSY スペクトルを得るものである。これを用いると残基ごとにプロトンを区別することができるが、残基内のプロトンどうしの重なり合いは解消されない。

配糖体 **5**<sup>2)</sup> (図 5.1.) ではグルコース残基 (Glc) の 2'', 3'', 5'' 位プロトンの化学シフトが近く (表 5.1.), シグナルが重なり合っていた (図 5.2-3.). Glc 部分は、化学シフトがプロトン、カーボン共に大きいものを 1'' 位, メチレンを 6'' 位とし、これらを手がかりに解析を進めた。HMBC で 1'' 位プロトンと 6'' 位プロトンの両方と相関のあるカーボンを 5'' 位, HMBC で 6'' 位プロトンと相関があり, 1'' 位プロトンとは相関のないカーボンを 4'' 位と帰属した (図 5.5.). 残りは 2'' 位と 3'' 位だけであるが, 2'' 位プロトンと 3'' 位プロトンのシグナルが重なっているため COSY では帰属できなかった (図 5.4.). 5'' 位プロトンに対しては, 2'' 位カーボンは 4 結合はなれていて, 3'' 位カーボンは 3 結合はなれている。5'' 位との HMBC 相関が使えれば 2'' 位と 3'' 位の帰属が可能であるが, 5'' 位プロトンは 2'', 3'' 位両プロトンとも重なっておりこの目的には使えなかった。1'' 位プロトンに対しては, 2'' 位カーボン, 3'' 位カーボンともに 3 結合以内であるので, HMBC での 1 位との相関は使えなかった。同様に, 4'' 位プロトンに対しても 2'' 位カーボン, 3'' 位カーボンともに 3 結合以内であるので, HMBC での 4'' 位との相関は使えなかった。一方, 6'' 位プロトンに対しては, 2'' 位カーボン, 3'' 位カーボンともに 3 結合以上はなれているため, HMBC での 6'' 位との相関は使えなかった。

1'' 位, 4'' 位とは HMBC 相関があっても解析に用いることができないのは, HMBC では相関のあるプロトンとカーボンを隔てる結合の本数が識別できないためである。2 結合はなれたプロトンとカーボン, 3 結合はなれたプロトンとカーボンの両者を区別することができれば 2'' 位と 3'' 位の帰属ができると考え, 2 結合はなれたプロトンとカーボンのみを検出する手法を用いることにした。

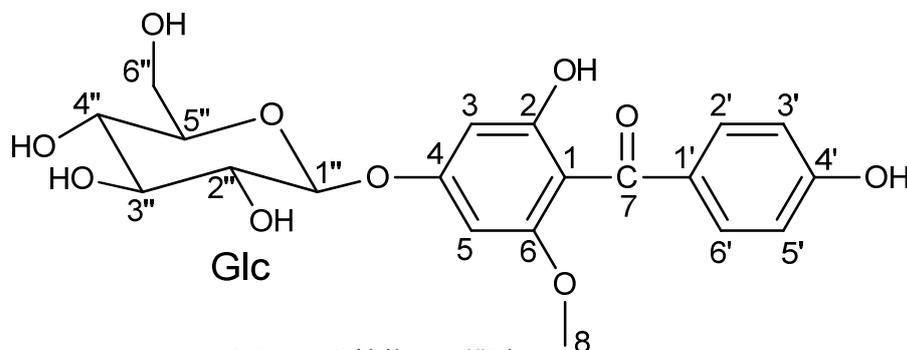


図 5.1. 配糖体 **5** の構造

## 5-2. H2BC

HMBCが2および3結合はなれたプロトンとカーボンに相関を与えるのに対し、H2BCは2結合はなれたプロトンとカーボンにのみ相関を与える。H2BCは $^1J_{CH}$ と $^3J_{HH}$ による二段階の磁化移動を経る。

74.8 ppmと78.0 ppmの2個のカーボンが帰属できていなかったが、H2BCスペクトルで74.8 ppmのカーボンと1''位プロトンに相関が得られ、これを2''位と帰属した(図5.6.)。また、78.0 ppmのカーボンと4''位プロトンとの相関も得られた。

強度は小さいが、3結合はなれた4''位プロトンと2''位カーボンにもそれぞれ相関が得られた。これは、2''位プロトンと3''位プロトンの化学シフトが近く、2''位プロトンと4''位プロトンとがバーチャルカップリングしているためである。H2BCでは、あるカーボンに直結したプロトンに対してカップリングしているプロトンと相関が出る。配糖体5の2''位と4''位のようにバーチャルカップリングしている場合以外でも、 $^4J_{HH}$ が大きいと3結合はなれたプロトンとカーボンに相関が出る。ただし、通常は $^3J_{HH}$ が $^4J_{HH}$ より大きいので、H2BCでは2結合はなれたプロトンとカーボンとの相関が3結合はなれたものより強く出て識別できる。

HMBCでは $^2J_{CH}$ が小さい場合には相関が出ないが、H2BCでは $^2J_{CH}$ が小さくても対応 $^3J_{HH}$ が大きければ相関が出る。例えば配糖体5では、2''位カーボンと1''位プロトンにHMBCでは相関が出なかったが、H2BCではその相関が得られた。

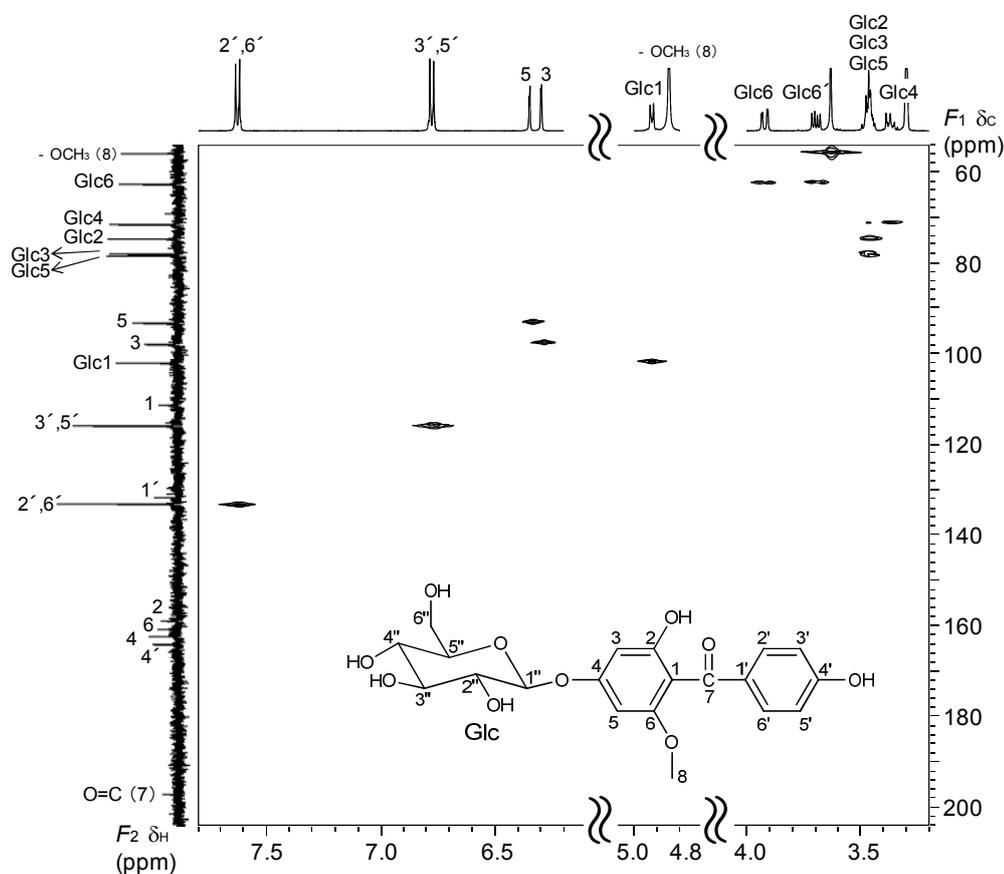


図 5.2. 配糖体 5 の HMBC スペクトル (測定 12 分)

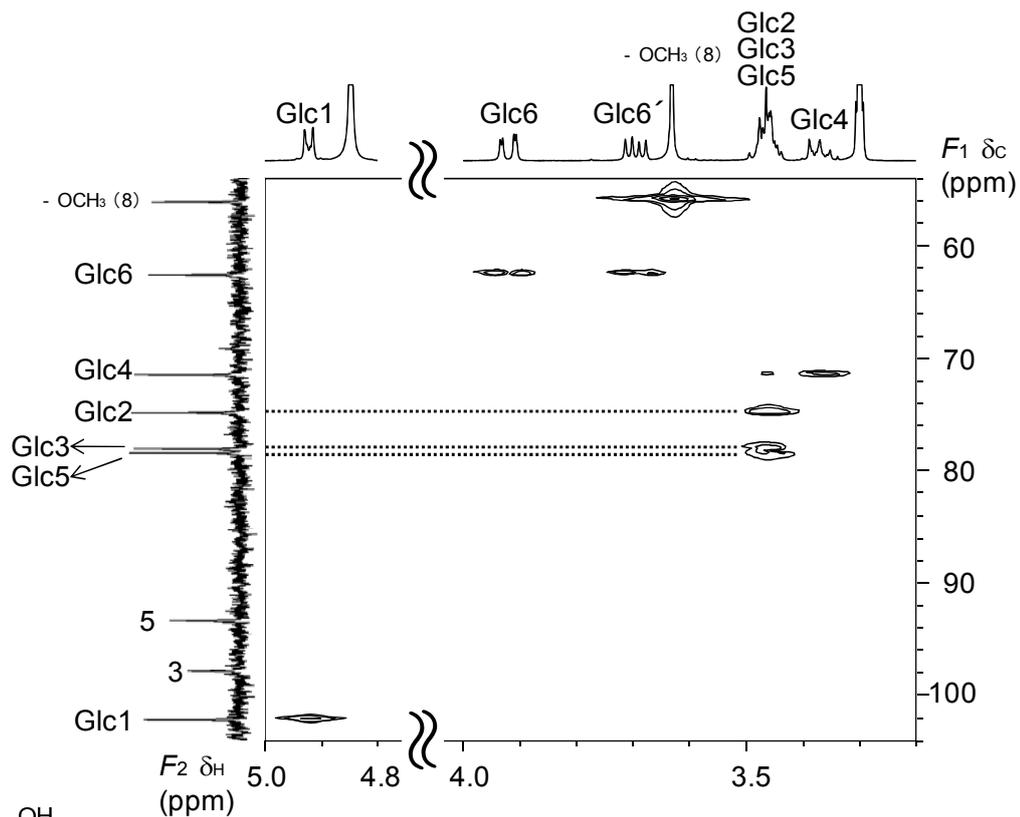


図 5.3. 配糖体 5 の HMQC スペクトル (測定 12 分)

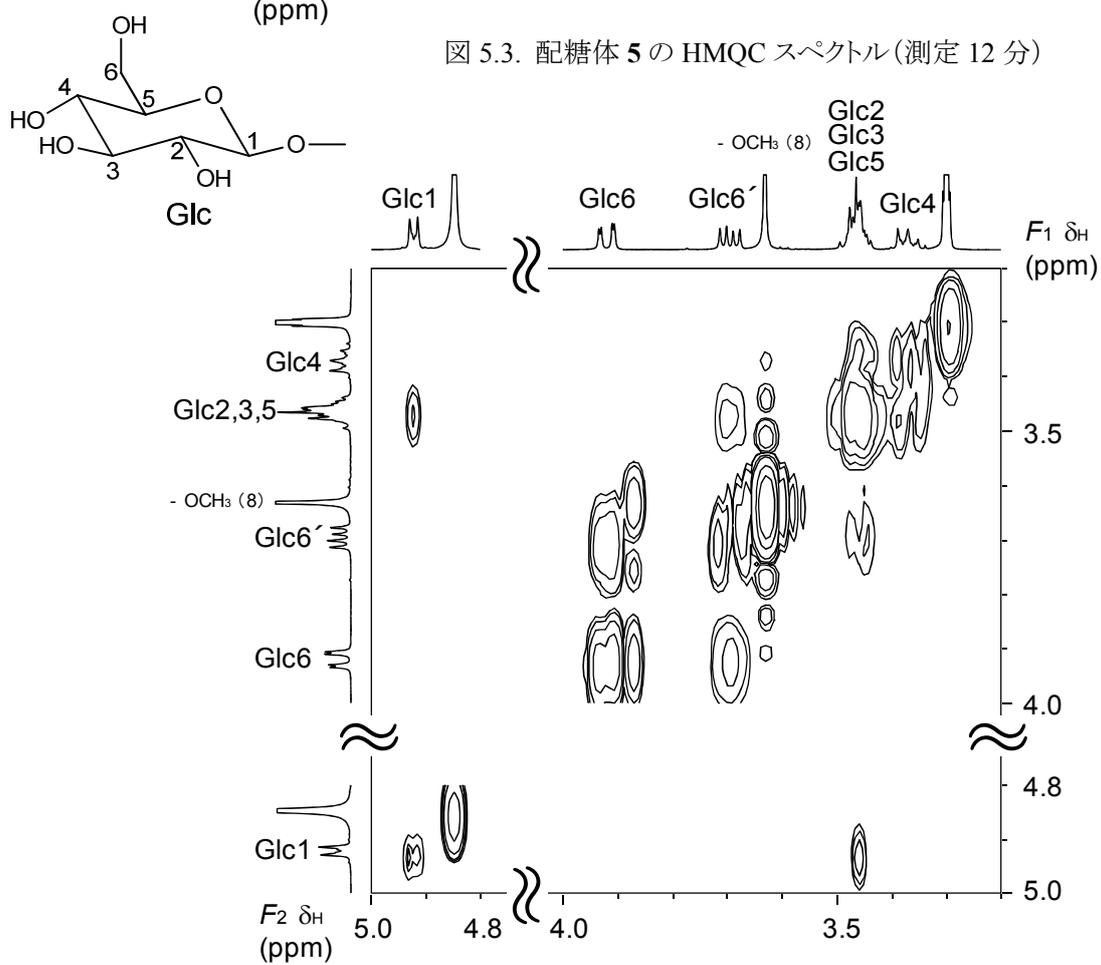


図 5.4. 配糖体 5 の COSY スペクトル (測定 8 分)

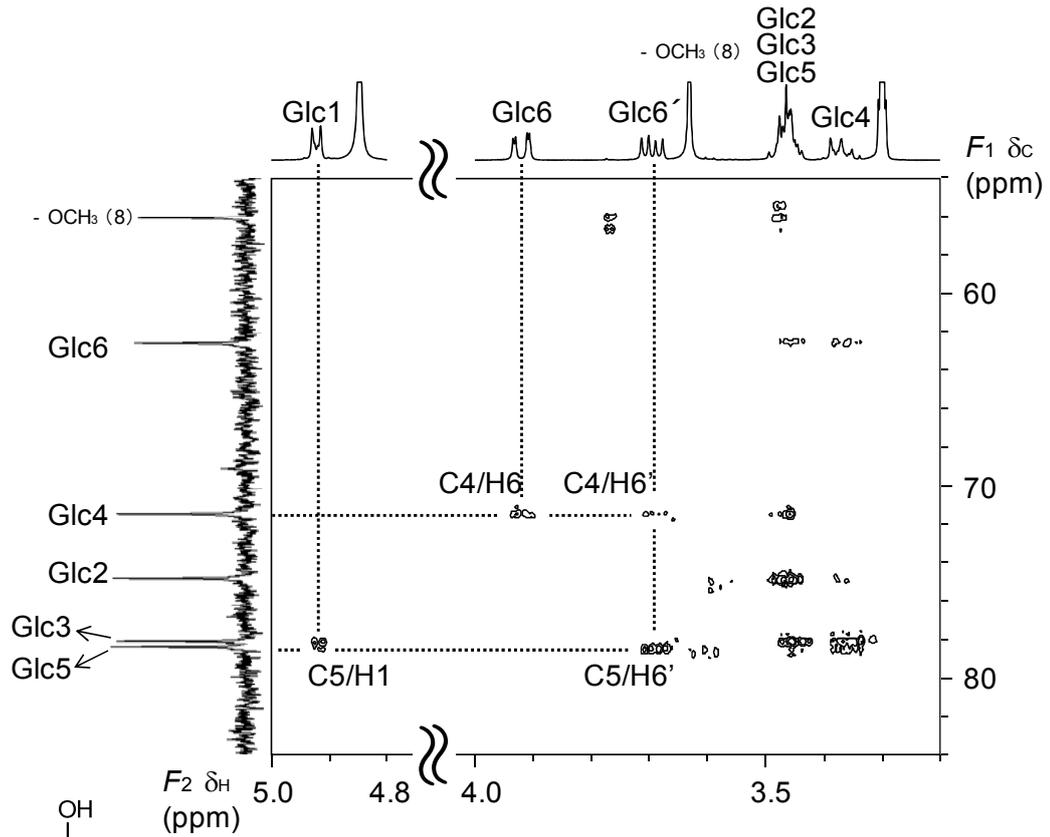


図 5.5. 配糖体 5 の HMBC スペクトル (測定 2 時間 30 分)

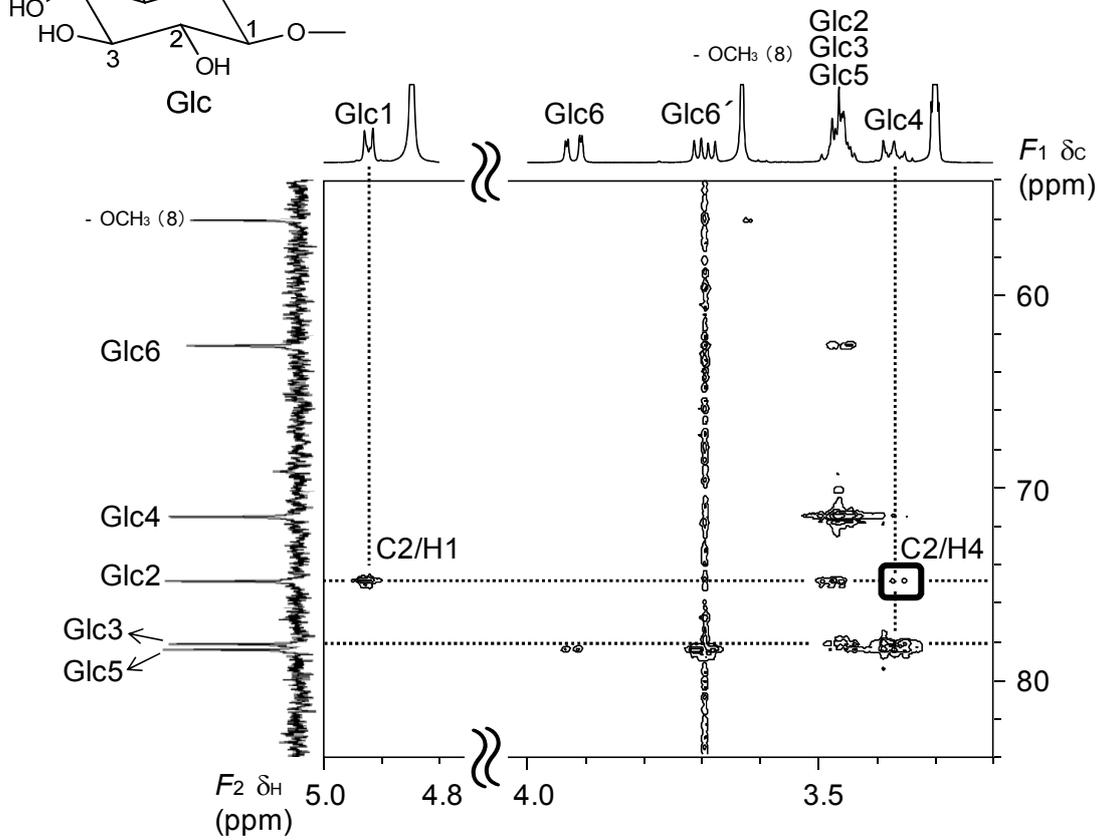


図 5.6. 配糖体 5 の H2BC スペクトル (測定 13 時間)

H2BC のパルス系列は図 5.7.に示した.

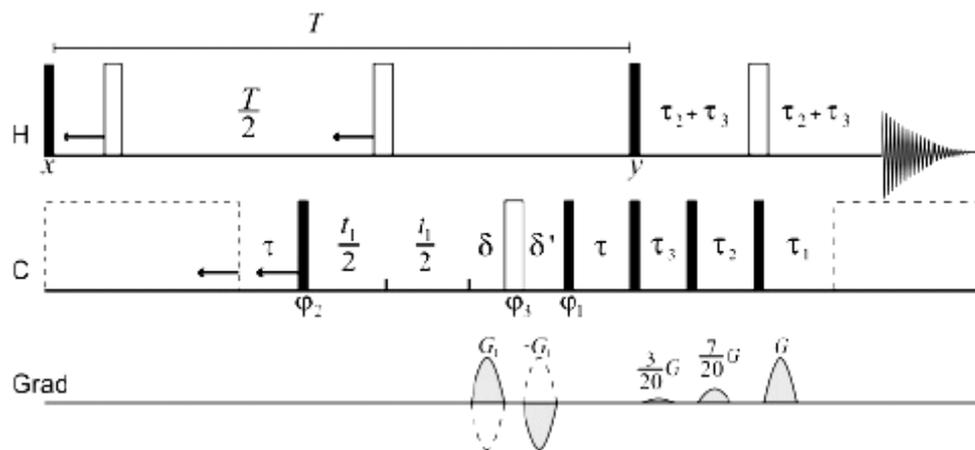


図 5.7. H2BC のパルス系列(論文 20 より引用)

表 5.1. 配糖体 5 の NMR データ

	$\delta_C$	$\delta_H$		$J_{HH}$
1	111.6			
2	158.8			
3	97.8	6.30	d	2.0
4	162.1			
5	93.3	6.35	d	2.0
6	160.6			
O=C(7)	197.1			
OCH <sub>3</sub> (8)	56.1	3.63	s	
1'	131.6			
2',6'	133.2	7.63	d	8.8
3',5'	116.0	6.78	d	8.8
4'	164.0			
Glc1	102.1	4.92	d	7.4
Glc2	74.8	3.45	m	
Glc3	78.0	3.47	m	
Glc4	71.4	3.37	m	
Glc5	78.4	3.46	m	
Glc6	62.6	3.92	dd	12.0, 2.2
		3.69	dd	12.0, 6.1

## 第6章 考察

オリゴ糖の構造解析をルーチン NMR 法で行うにあたっては、まず、HSQC-TOCSY によって糖残基ごとにシグナルをグループ分けし、つぎに、COSY, HMBC によって帰属を行い、最後に、HMBC によって糖残基間の結合位置を決定するという手順をふむことで、簡潔に解析を行うことができる。ピラノース型においてはアノメリック位と6位に、フラノース型においてはアノメリック位と5位に HMBC 相関が現れる。ピラノース型かフラノース型かは化学シフトによって見分けることができるため、それを踏まえたうえで解析を行うと効率的である。

複数のプロトンシグナルが重なり合っているところに HMBC 相関が得られた場合、その相関の解釈は困難である。特定のプロトンだけが相関を与えている可能性もあれば、複数のプロトンが相関を与えている可能性もある。HR-HMBC スペクトルにおけるシグナルの分裂を利用すると、分裂したシグナルの重なり合いによるスペクトルの煩雑化と強度の分散による感度減少を伴うが、重なり合った複数のシグナルを見出すのに有効である。HR-HMBC の測定に際しては、データ点数を縦、横とも HMBC の2倍以上とした上で、可能な限り多く積算する必要がある。

残基内プロトンの重なり合いが原因でカーボンの帰属ができない場合、2結合隔てたプロトンとカーボンを検出する H2BC を用い、隣り合うあるカーボンを順に追って帰属していくことが有効である。このような事例は5章で述べたものの他にもある。例えば、アルドース残基の2, 3, 5位プロトンが重なり合っている場合は5章のグルコース残基の場合と同様で、2, 3位カーボンの帰属ができない。ケトース残基の4, 5位プロトンが重なり合っている場合は4, 5位カーボンの帰属ができない。同じくケトース残基で3, 4位プロトン, 5, 6位プロトンがそれぞれ重なり合っている場合にも4, 5位カーボンの帰属ができない。いずれも H2BC で解決することが可能である。H2BC の測定に際しては、データ点数と積算回数を HMBC と同程度以上に設定する必要がある。

以上のように、ルーチン法に加えて HR-HMBC, H2BC という新しい手法を用いることで、プロトンシグナルの重なり合いによる問題を抱えるオリゴ糖の解析を容易に行うことができる。

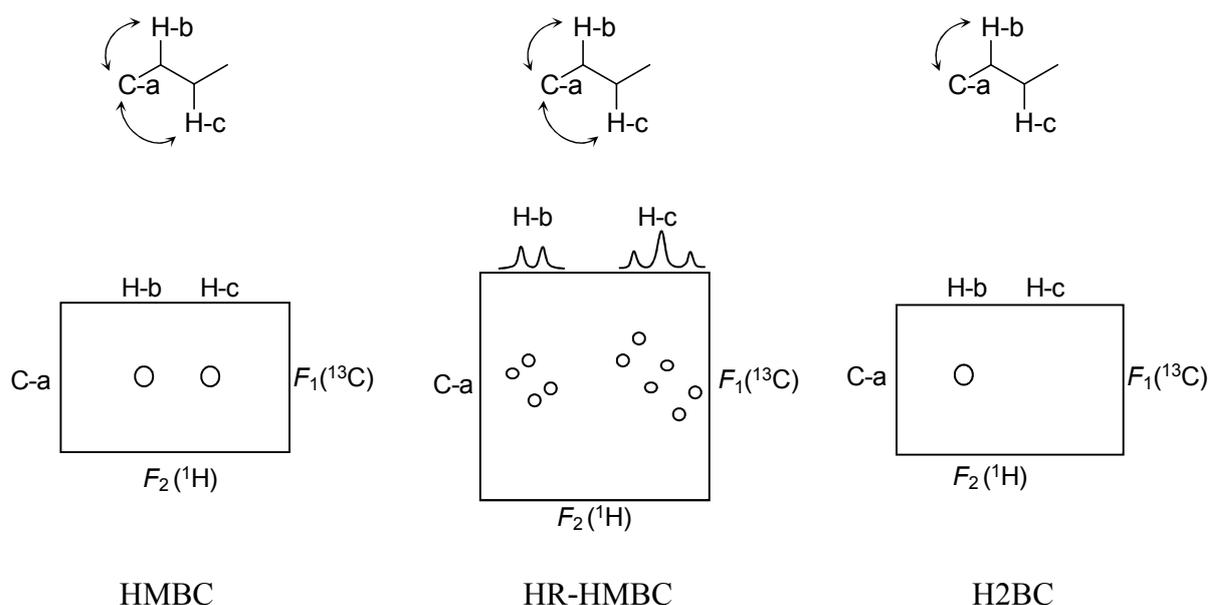
## 第7章 要旨

本研究では、プロトンシグナルの重なり合いという問題を抱えるオリゴ糖を中心に NMR 解析を行った。まず、日常的に用いられる手法の組み合わせにより簡潔に構造解析する手順を確立すること、つぎに、その手順では解析が困難であった事例に対して問題解決の手段を考え、それを用いて解析を行うことを目的とした。

オリゴ糖の構造解析をルーチン NMR 法で行うにあたっては、まず、HSQC-TOCSY によって糖残基ごとにシグナルをグループ分けし、つぎに、COSY, HMBC によって帰属を行い、最後に、HMBC によって糖残基間の結合位置を決定するという手順をふむことで、簡潔に解析を行うことができる。

糖残基間の結合位置を証明するには残基間 HMBC 相関を見出すことが必要であるが、プロトンシグナルの重なり合いのため、残基間 HMBC 相関が他の残基内 HMBC 相関に埋もれることがある。そのような状況を打開するため、HMBC 相関シグナルの形状を変化させて、複数の相関の存在を明らかにすることを試みた。 $^{1R}J_{CH}$ を求めるために考案された HR-HMBC は、測定時に設定するスケールリングファクター  $N$  によって、相関シグナルが  $^{1R}J_{CH}$  の  $N$  倍で右上がりになり、 $J_{HH}$  の  $(N+1)$  倍で右下がりになり分裂する。この手法を用いたところ、 $J_{HH}$  分裂パターンの違いにより、複数の HMBC 相関が重なっていることを確認できた。

同じ糖残基に属するプロトンシグナルの重なり合いのため、カーボンシグナルの帰属が困難な場合がある。そのような状況を打開するために、H2BC を用いた。HMBC が 2 および 3 結合はなれたプロトンとカーボンに相関を与えるのに対し、H2BC は 2 結合はなれたプロトンとカーボンにのみ相関を与える。H2BC を用いると、隣り合うカーボンを順に追って帰属していくことができ、問題を解決することができた。



## 第 8 章 参考文献

- 1) Okada, H., Fukushi, E., Yamamori, A., Kawazoe, N., Onodera, S., Kawabata, J., and Shiomi, N., Novel fructopyranose oligosaccharides isolated from fermented beverage of plant extract. *Carbohydr. Res.*, **345**, 414-418 (2010).
- 2) Hendra, P., Fukushi, Y., and Hashidoko, Y., Synthesis of benzophenone glucopyranosides from *Phaleria macrocarpa* and related benzophenone glucopyranosides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2172-2182 (2009).
- 3) Matsuo, K., Isogai, E., and Araki, Y., Occurrence of  $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow)]_n$  units in the antigenic polysaccharides from *Leptospira biflexa* serovar patoc strain Patoc I. *Carbohydr. Res.*, **328**, 517-524 (2000).
- 4) Aue, W. P., Batholdi, E., and Ernst, R. R., Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, **64**, 2229-2246 (1975).
- 5) von Kienlin, M., Moonen, C. T. W., van der Toorn, A., and van Zijl, P. C. M., Rapid recording of solvent-suppressed 2D COSY spectra with inherent quadrature detection using pulsed field gradients. *J. Magn. Reson.*, **93**, 423-429 (1991).
- 6) Braunschweiler, L., and Ernst, R. R., Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, **53**, 521-528 (1983).
- 7) Hurd, R. E., Gradient-enhanced spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, **87**, 422-428 (1990).
- 8) Parella, T., Sánchez-Ferrando, F., and Virgili, A., Quick recording of pure absorption 2D TOCSY, ROESY, and NOESY spectra using pulsed field gradients. *J. Magn. Reson.*, **125**, 145-148 (1997).
- 9) Bodenhausen, G., and Ruben, D. J., Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, **69**, 185-189 (1980).
- 10) Willker, W., Leibfritz, D., Kerssebaum, R., and Bermel, W., Gradient selection in inverse heteronuclear correlation spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.*, **31**, 287-292 (1993).
- 11) Müller, L., Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4481-4484 (1979).
- 12) Hurd, R. E., and John, B. K., Gradient-enhanced proton-detected heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, **91**, 648-653 (1991).

- 13) Domke, T., A new method to distinguish between direct and remote signals in proton-relayed X, H correlations. *J. Magn. Reson.*, **95**, 174-177 (1991).
- 14) Bax, A., and Summers, M. F.,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093-2094 (1986).
- 15) Summers, M. F., Marzilli, L. G., and Bax, A., Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments of coenzyme  $\text{B}_{12}$  through the use of new two-dimensional NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 4285-4294 (1986).
- 16) Pachler, K.G.R., and Wessels, P.L., *J. Magn. Reson.*, **12**, 337-339 (1973).
- 17) Uzawa, J., and Yoshida, S., A new selective population transfer experiment using a double pulsed field gradient spin-echo. *Magn. Reson. Chem.*, **42**, 1046-1048 (2004).
- 18) Furihata, K., Tashiro, M., and Seto, H., High resolution-HMBC (HR-HMBC), a new method for measuring heteronuclear long-range coupling constants. *Magn. Reson. Chem.*, **48**, 179-183 (2010).
- 19) Würtz, P., Permi, P., Nielsen, N. C., and Sørensen, O. W., Clean HMBC: suppression of strong-coupling induced artifacts in HMBC spectra. *J. Magn. Reson.*, **194**, 89-98 (2008).
- 20) Nyberg, N. T., Duus, J. Ø., and Sørensen, O. W., Heteronuclear two-bond correlation: Suppressing heteronuclear three-bond or higher NMR correlations while enhancing two-bond correlations even for vanishing  $^2J_{\text{CH}}$ . *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 6154-6155 (2005).
- 21) Petersen, B. O., Vinogradov, E., Kay, W., Würtz, P., Nyberg, N. T., Duus, J. Ø., and Sørensen, O. W., H2BC: a new technique for NMR analysis of complex carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, **341**, 550-556 (2006).
- 22) Duus, J. Ø., Gottfredsen, C. H. and Bock, K., Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitations. *Chem. Rev.*, **100**, 4589-4614 (2000).
- 23) Davis, D. G., Improved multiplet editing of proton-detected, heteronuclear shift-correlation spectra. *J. Magn. Reson.*, **91**, 665-672 (1991).
- 24) Furihata, K., and Seto, H., Constant time HMBC (CT-HMBC), a new HMBC technique useful for improving separation of cross peaks. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7337-7340 (1998).

- 25) Fukushi, E., "Recent advances in fructooligosaccharides research", eds. Shiomi, N., Research Signpost, Kerala, India, p.119-134 (2007).
- 26) Morel du Boil, P. G., Theancrose - distinguishing cane and beet sugars. *Int. Sugar J.*, **99**, 102-106 (1997).
- 27) Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., and Hecht, H. J., Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr. Res.*, **341**, 2335-2349 (2006).
- 28) Doddrell, D., and Allerhand, A., Study of anomeric equilibria of ketoses in water by natural-abundance carbon-13 fourier transform nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2779-2781 (1971).
- 29) 瀬戸治男, 降旗一夫, Time sharing 照射磁場を用いた新しい差スペクトル法(TSD-COSY, TSD-relayed-COSYおよびselective HOHAHA-COSY)について. 日本電子ニュース, 30, 31-34 (1990)
- 30) 高田祐輔, 福士江里, 菊池裕人, 有塚 勉, 福士幸治, 橋床泰之, 甜菜に含まれるオリゴ糖の構造解析, 日本農芸化学会北海道支部合同学術講演会, 2008年11月, 帯広, 要旨集 B-7.
- 31) 岡田秀紀, 高田祐輔, 福士江里, 山森 昭, 川添直樹, 小野寺秀一, 川端 潤, 福士幸治, 塩見徳夫, 植物エキス発酵飲料中の三糖類の単離と構造解析, 日本農芸化学会2009年度大会, 2009年3月, 福岡, 要旨集 p. 52.
- 32) 高田祐輔, 福士江里, 岡田秀紀, 山森 昭, 川添直樹, 小野寺秀一, 川端 潤, 福士幸治, 塩見徳夫, 植物エキス発酵飲料に含まれる三糖のNMR解析, 日本農芸化学会2009年度大会, 2009年3月, 福岡, 要旨集 p. 52.