



# アルギン酸の酵素的分解でえられるオリゴウロナイドについて (IV) : 不飽和ジウロナイドについて

清原, 利文  
吉川, 三吉

---

**(Citation)**

神戸大学農学部研究報告, 10(1):111-114

**(Issue Date)**

1971

**(Resource Type)**

departmental bulletin paper

**(Version)**

Version of Record

**(JaLCD0I)**

<https://doi.org/10.24546/00228425>

**(URL)**

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00228425>



# アルギン酸の酵素的分解でえられるオリゴウロナイドについて (IV)

## 不飽和ジウロナイドについて

清原利文\*・吉川三吉\*

(昭和46年8月31日受理)

### Oligouronides Obtained by Enzymatic Cleavage of Alginate (IV)

#### Unsaturated diuronic acid

Toshifumi KIYOHARA and Mitsuyoshi YOSHIKAWA

さきにおかれわれは海水から分離した *alginomonad* の分泌する酵素によりアルギン酸を分解し、その分解生成物 (モノ-, ジ-, およびトリウロナイド) のうち、主要生成物であるトリウロナイドを単離し、その構造について調べ *0-4-deoxy- $\alpha$ -L-erythrohexopyranosyl-4-enyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-0- $\beta$ -D-mannopyranosyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-L-guluronic acid* であることを明らかにした<sup>1)2)3)</sup>。

本報においては上述のアルギン酸分解生成物のうち不飽和ジウロナイドについてその構造を明らかにするために研究をおこなった。

#### 実験方法および結果

##### 1) 試料の調製

既報<sup>1)</sup>のように *alginomonad* 海水細菌の分泌する

酵素によりアルギン酸を分解し、生成物をセルロースカラムクロマトグラフィーにより分離、精製した後、既報<sup>1)</sup>のジウロナイド (Rf. 0.21) に相当する区分を *Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>-型)* カラムに通して遊離のウロナイドとした。このものを活性炭で脱色し減圧濃縮によりシラップ状とした後、減圧デシケーター中で結晶化をおこない棒状結晶をえた。この結晶は水から再結した。

##### 2) 融点ならびに比旋光度

この結晶は m. p. 142-142.5°C (分解) であり、また比旋光度は  $[\alpha]_D^{21.5} -8^\circ$  (c 1.0, 水) であった。

##### 3) 誘導体の調製

遊離のウロナイドから既報<sup>2)</sup>のようにキニーネ塩ならびにブルシン塩を調製した。キニーネ塩は m.p. 153-154°C であり、ブルシン塩は m.p. 173-174.5°C

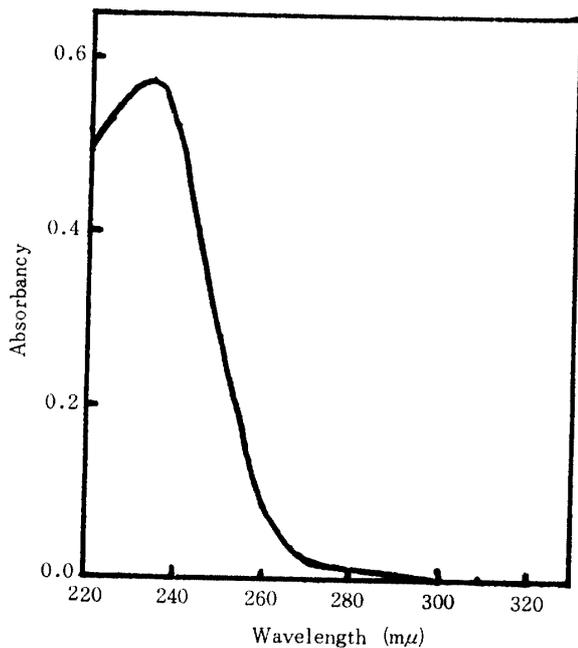


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the unsaturated diuronic acid.

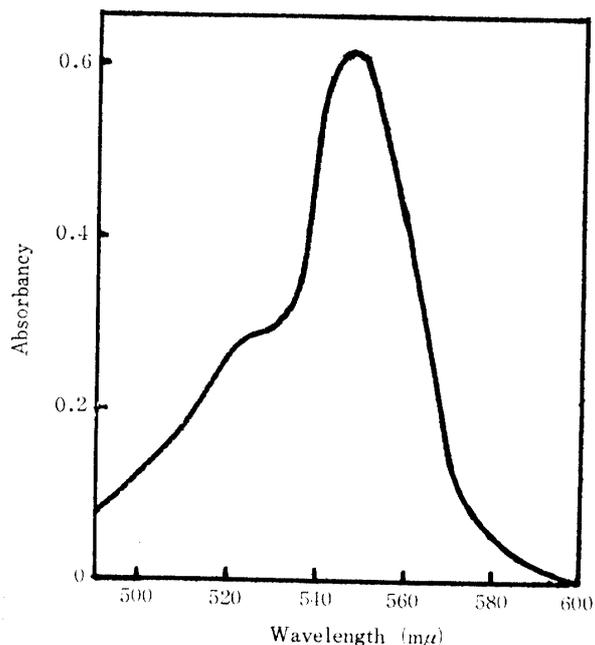


Fig. 2. Absorption spectrum of the unsaturated diuronic acid in thiobarbituric acid test.

Table 1. Color reaction of unsaturated diuronic acid.

reaction	maximum absorption of unsaturated diuronic acid	maximum absorption of control <sup>a)</sup>
L-cystein-sulfuric acid	390 m $\mu$ and 480 m $\mu$	390 m $\mu$ and 480 m $\mu$
phenol-sulfuric acid	485 m $\mu$	480 m $\mu$
L-cystein-carbazole-sulfuric acid	540 m $\mu$	not obserbed <sup>b)</sup>
carbazole-sulfuric acid	530 m $\mu$	530 m $\mu$
thiobarbituric acid	550 m $\mu$	—

a) D-mannuronic and L-guluronic acids were used as control.

b) Absorption maximum was not observed between 400 and 900 m $\mu$ .

であった。

#### 4) 元素分析

柳本C. H. N. コーダー MT-1 型により元素分析をおこない、C, 38.6%; H, 5.01%の値をえた。

#### 5) 紫外外部吸収スペクトル

このものの紫外外部吸収スペクトルを日立自記分光光度計 (EPS-2 型) を用いて測定した。その結果、既報<sup>2)</sup> のトリウロナイドの場合と同様にこのウロナイドもまた 232m $\mu$  附近に顕著な極大吸収 (分子吸光係数3.73) を示した (Fig. 1)。

#### 6) 赤外線吸収スペクトル

このウロナイドの赤外線吸収スペクトルを日立赤外分光光度計 (EPI-510 型) を用いて臭化カリ法で測定したところ二重結合にもとづくと考えられる 1645cm<sup>-1</sup> 附近の強い吸収ならびにカルボキシル基にもとづくと思なされる 1725cm<sup>-1</sup> 附近の強い吸収が観察された。

#### 7) チオバルビツール酸試験

WEISSBACH and HUROWITZ の方法<sup>4)</sup>にしたがった。この反応においても不飽和トリウロナイドの場合と同様に 550m $\mu$  に極大吸収 (分子吸光係数4.83) の存在することを認めた (Fig. 2)。このことはこのウロナイドの過沃素酸酸化により他の不飽和ウロン酸<sup>2)5)6)</sup> のように非還元性末端残基から  $\beta$ -ホルミルピルビン酸の生成したことを示しているように思われる。

#### 8) その他の呈色反応

このウロナイドについて各種糖類の呈色反応をおこなった。その結果を表-1に示す。

まず糖類の共通反応である L-システイン-硫酸反応<sup>7)</sup> およびフェノール-硫酸反応<sup>8)</sup> をおこなった。前者の反応においてはこのウロナイドおよび対照として用いたいづれのウロン酸も 390m $\mu$  および 480m $\mu$  に極大吸収を示す吸収曲線がえられた。一方、フェノール-硫酸反応では D-マンヌロン酸および L-グルロン酸は 480m $\mu$  附近に極大吸収が観察されたのに対して、このウロナイドは 485m $\mu$  附近に極大吸収を示した。

つぎに、ケトースの特異反応であるシステイン-カルバゾール-硫酸反応<sup>9)</sup> をおこなった。D-マンヌロン

酸および D-グルロン酸は 400m $\mu$  から 900m $\mu$  の範囲では殆んど吸収が認められないのに対してこのウロナイドは 540m $\mu$  に極大吸収を示す吸収スペクトルがえられた。

また、ヘキサロン酸の反応であるカルバゾール-硫酸反応<sup>7)</sup> では対照の D-マンヌロン酸および L-グルロン酸と同じように 530m $\mu$  附近に極大吸収をもつ吸収曲線がえられた。

#### 9) 構成糖類の検索ならびに重合度の推定

このウロナイドを 2N 硫酸で 100°C, 2 時間加水分解をおこない、水酸化バリウムで中和し、計算量の硫酸ソーダーを加えてウロン酸のナトリウム塩とした後、減圧濃縮をおこない既報<sup>1)</sup> の条件にしたがってペーパークロマトグラフィーをおこなった。その結果は対照のマンヌロン酸ナトリウムに相当する唯一のスポットを観察した (Fig. 3)。

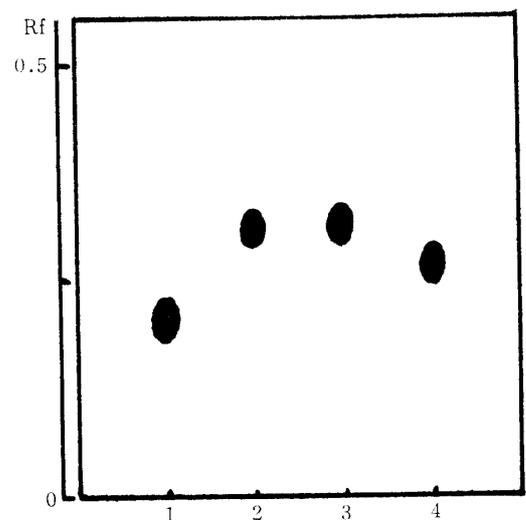


Fig. 3. Paper chromatogram of the acid hydrolysate of the unsaturated diuronic acid.

- 1; unsaturated diuronic acid
- 2; hydrolysate
- 3; Na-mannuronate
- 4; Na-guluronate

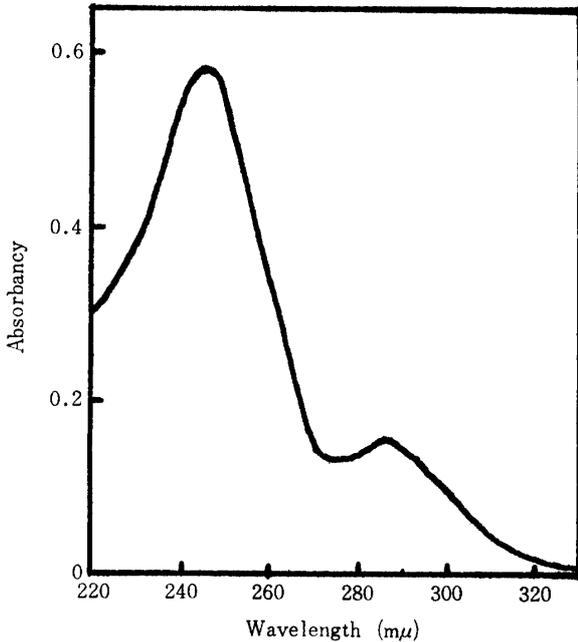


Fig. 4. Ultraviolet absorption spectrum of the products obtained from the unsaturated diuronic acid by acid hydrolysis.

なお、酸加水分解物の紫外外部吸収スペクトルを測定したところ  $245\text{m}\mu$  および  $285\text{m}\mu$  に極大吸収をもつ吸収曲線をえた (Fig. 4)。このことは不飽和トリウロナイドと同様に 2-フランカルボン酸および 5-ホルミル-2-フランカルボン酸の生成したことを示唆している。

また、このウロナイドの還元力を SOMOGYI 法<sup>10)</sup>で測定したところ D-マンヌロン酸の還元力の 49.3% の還元力を示した。

#### 10) 過沃素酸酸化

D-マンヌロン酸バリウムを対照としてこのウロナイドのバリウム塩 ( $51.5\text{mg}$ ) を  $2^\circ\text{C}$  で過沃素酸ナトリウムと反応<sup>11)</sup>させ経時的に過沃素酸塩の消費量を測定した。その結果ジウロナイド 1 モル (分子量 487 として) あたり過沃素酸塩の 3 モルを消費した (Fig. 5)。

### 考 察

われわれは *alginomonad* の分泌する酵素によりアルギン酸を分解し生成物としてモノ-, ジ-, およびトリウロナイドがえられることは既に報告<sup>1)</sup>した。ここで生成したウロナイドをセルロースカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し  $R_f$  0, 21 のウロナイドを結晶としてえた。

このウロナイドの還元力は対照の D-マンヌロン酸の還元力の約半しか示さないこと、およびペーパークロマトグラフィーでジウロナイドと考えられる  $R_f$  値を示したことからジウロナイドと推定した。

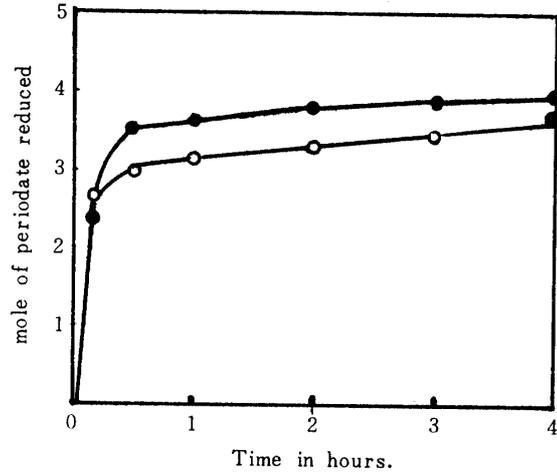


Fig. 5. Periodate oxidation of the diuronic acid.

—○—; unsaturated diuronate  
—●—; D-mannuronate

また、このものを硫酸で加水分解すると D-マンヌロン酸に相当する唯一のスポットをうるとともに不飽和トリウロナイドの場合のように  $245\text{m}\mu$  および  $285\text{m}\mu$  に極大吸収をもつ吸収曲線がえられた。岡本, 畑中, 小沢は不飽和ガラクトウロナイドの加熱処理により不飽和ウロン酸残基から 5-ホルミル-2-フランカルボン酸, 2-フランカルボン酸およびギ酸の生成することを述べ紫外外部吸収における  $245\text{m}\mu$  は 2-フランカルボン酸, また  $285\text{m}\mu$  は 5-ホルミル-2-フランカルボン酸によるものであると報告<sup>12)</sup>している。われわれのジウロナイドにおいてもまた両極大が認められ両酸が生成しているものと推察した。

このジウロナイドは糖 1 モルあたりブロム約 1 モルを消費<sup>11)</sup>し,  $232\text{m}\mu$  附近に極大吸収を示し, またチオバルビツール酸試験の結果は  $\beta$ -ホルミルピルビン酸の生成を示していると思われる吸収スペクトルがえられた。以上のことは既報<sup>2)</sup>の不飽和トリウロナイドと同様に  $C_4$  と  $C_5$  の間に二重結合をもつ不飽和ジウロナイドであることを示唆する。

このジウロナイドを過沃素酸で酸化すると糖 1 モルあたり過沃素酸塩の 3 モルを消費したことはアルギン酸内の 1 $\rightarrow$ 4 結合と同じ 1 $\rightarrow$ 4 結合であるという可能性を示している。

また、アルギン酸の比旋光度が低いのは D-型残基が  $\beta$ -配位で, また L-型残基は  $\alpha$ -配位で結合しているためとされている。われわれのジウロナイドもまた比較的低い比旋光度をもつことからアルギン酸中のウロン酸残基と同じ配位で結合しているものと推察される。

以上の結果から判断して、このジウロナイドの構造は 0-4-deoxy- $\alpha$ -L-erythrohexopyranosyl-4-enyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-D-mannuronic acid と推定される。

またこの構造は元素分析の結果 (C, 38.6%; H, 5.01%, 理論値  $C_{12} \cdot H_{16} \cdot O_{12} \cdot H_2O$  C, 38.94%; H, 4.86%) に一致するとともに赤外吸収スペクトルから二重結合ならびにカルボキシル基の存在を示す吸収がえられたことは上述の構造に矛盾しない。

辻野および齊藤はアワビの肝臓からえたアルギナーゼによりアルギン酸を分解し、D-マンヌロン酸を含む不飽和ジウロナイド 4-O-( $\beta$ -D- $\Delta^4, 5$ -mannoseenpyranosyluronic acid)-D-mannuronic acid を単離したと報告し<sup>6)</sup>, また西沢, 藤林および柏原はタツナミガイの中腸腺のアルギン酸リアーゼが辻野らと同じジウロナイドを生成したと報告<sup>13)</sup>している。

一方, 柏原, 鈴木および西沢らはアルギン酸の分別実験でえたポリグルロニドを *Pseudomonas* 属細菌からえた酵素により分解し不飽和ジグルロニド, 飽和ジグルロニド, 不飽和トリグルロニドを生成したと述<sup>14)</sup>べている。

われわれのえたジウロナイドは融点の点では僅かに異なるが赤外吸収スペクトルおよびその他の点でほぼ同一と考えられる結果をえたことから多分辻野らの不飽和ジウロナイドと同一物質と考えられるが, 柏原らの不飽和ジグルロニドとは異なっているように思われる。

## 要 約

alginomonad 海水細菌の分泌する酵素によりアルギン酸を分解したときに生成する不飽和オリゴウロナイドのうち不飽和ジウロナイドについて調べた。

この不飽和ジウロナイドをセルロースカラムクロマトグラフィーにより分離, 精製し結晶 [m. p. 142–142.5°C (分解),  $[\alpha]_D^{21.5} -8^\circ$  (c 1.0, 水)] として単離した。

このものの構造は D-マンヌロン酸を含む不飽和ジウロナイド 0-4-deoxy- $\alpha$ -L-erythrohexopyranosyl-4-enyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-D-mannuronic acid と推定した。

## Summary

A diuronic acid, which was separated by cellulose column chromatography from the cleavage products of alginate by the action of a lyase preparation from alginomonad, was isolated as rod crystals of m. p. 142–142.5°C (decomp),  $[\alpha]_D^{21.5} -8$  (in water). Two crystalline derivatives of the diuronic acid were also prepared, one was quininate, m. p. 153–154°C, and the other brucinate, m. p. 173–174.5°C.

Ultraviolet absorption analysis and thiobarbituric acid test revealed that the diuronic acid had a double bond in the molecule, which was similar to that of unsaturated triuronic acid previously reported. Mannuronic acid, 2-furancarboxylic acid and 5-formyl-2-furancarboxylic acid were detected on hydrolyzing the diuronic acid with sulfuric acid. Infrared spectral analysis of the diuronic acid also showed the presence of carboxylic group and double bond in the molecule. The reducing power of the diuronic acid was found to be approximately one-half of that of mannuronic acid. Three moles of periodate were consumed by one mole of the diuronic acid in periodate oxidation.

These results mentioned above suggest that the structure of this diuronic acid is 0-4-deoxy- $\alpha$ -L-erythrohexopyranosyl-4-enyluronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)-D-mannuronic acid.

また, アルカロイド誘導体として結晶キニーネ塩 (m. p. 153–154°C) および結晶ブルシン塩 (m. p. 173–174.5°C) を調製した。

終りにあたり, 不飽和ジウロナイド標品を恵与していただいた北海道大学辻野勇博士に深甚の謝意を表します。

## 文 献

- 1) 吉川三吉: 生化学, **33**, 30 1960; 科学, **31**, 552 1961.
- 2) 吉川三吉, 清原利文: 兵庫農大研報, **6**, 51, 1963
- 3) 清原利文, 吉川三吉: 神大農研報**10**, 107, 1971.
- 4) A. WAISBACH and J. HUROWITZ: *J. Biol. Chem.* **234**, 705, 1959.
- 5) P. ALBERSHEIM, H. NEUKON and H. DEUEL: *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1422, 1960.
- 6) I. TSUJINO and T. SAITO: *Nature*, **192**, 970, 1961; *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 115, 1962; T. TSUJINO: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 236, 1963.
- 7) Z. DISHE: In R. L. WHISTLER and M. L. WOLFLOM, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, vol' I, Academic Press, New York and London, p. 477, 1962.
- 8) 日本化学会編: 実験化学講座, 23, 丸善, p. 421 1964.
- 9) Z. DISHE, E. BORENFRED: *J. Biol. Chem.*, **192**, 583, 1951.
- 10) M. SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **160**, 61, 1945.
- 11) P. F. FLEURY and J. LANGE: *J. Pharm. Chim.* **17**, 107, 196, 1933.
- 12) 岡本賢一, 小沢潤二郎: 農学研究, **48**, 39, 1933
- 13) K. NISHIZAWA, S. FUJIBAYASHI and Y. KASHIWABARA: *J. Biochem.* **64**, 25, 1968.
- 14) Y. KASHIWABARA, H. SUZUKI and K. NISHIZAWA: *J. Biochem.* **66**, 503, 1969.