

希少糖分子の立体構造と安定性

深田 和宏^{1*}・石井 知彦²

あらゆる種類の単糖類（テトロース、ペントース、ヘキソース、および糖アルコール）を酵素反応の組み合わせで網羅的に合成する戦略「イズモリング（Izumoring）」が提唱されて以来^{1,2)}、天然にはほとんど存在せず化学的に合成することも困難な単糖（希少糖）を大量合成する研究が精力的に進められている。そして、いくつかの希少糖については高純度試薬として市販され、比較的容易に入手できるまでになってきた。

希少糖は従来は入手すること自体困難であったため、それらの理化学的な基礎物性は十分に調べられていない。そのため、単糖の分子構造と物性の関係を体系化する上で必要となる基本的なデータの不足が長く続いてきた。しかし各種希少糖の大量生産が実現するに至り、希少糖の理化学的性質に関する基礎研究も進展して、これまでは得られなかった実験データが集積されつつある。

今後、希少糖の用途開発を進めていく上で、糖分子の物理的・化学的性質（溶解性、化学反応性、光応答性、電気伝導性、磁性など）をよく理解しておくことが重要であるが、これらの性質はすべて分子の電子状態に起因する。つまり、希少糖分子の電子状態を正しく理解することが各種物性を理解することにつながる。精度の良い電子状態計算には分子の絶対構造に関する精度の良い情報が必要であり、ここで希少糖のX線結晶構造解析データが重要な意味を持つこととなる。

本稿は以上の状況を背景とし、希少糖の理化学的性質に関する最近の研究成果の中から、ヘキソース分子の結晶中での絶対構造と水溶液内構造の安定性に焦点を当てて解説するものである。

ヘキソースの分子構造と結晶

D体とL体の区別を無視すればヘキソースには8種のアルドースと4種のケトースがある。いずれのヘキソースもピラノース（六員環）型やフラノース（五員環）型に環化して構造を安定化する³⁾。環化に際してはカルボニル炭素が新たなキラル中心となるため二つの立体配置が生じ、それぞれ、 α -アノマーと β -アノマーと呼ばれている。溶液内ではピラノース型とフラノース型各々の α -および β -アノマーが開環構造を介して相互変換しており、これら計5種類の互変異性体が混在することになる。さらにピラノースには二つの椅子形コンフォメーション（C1と1C）、フラノースには封筒形とねじれ形のコンフォメーションが知られている³⁾。結晶化ではこれらの分子

形態のうちのどれかが優先して析出するが、結晶化条件（溶媒の種類、温度、結晶化速度など）によっては結晶化する分子構造が変わってくるので注意を要する⁴⁾。

ヘキソースの結晶構造

我々は種々の希少糖の単結晶を作製して、X線結晶構造解析によって分子の絶対構造を決定した。測定には、リガク社製イメージングプレート型単結晶X線回折装置RAPID-IIを用いた。

D-プシコースとL-タガトース プシコース（Psi）は従来までは結晶化が困難で、文献にはシラップとして記述されていた希少糖である。今回、高純度試料の濃厚水溶液からの単結晶作製に成功し、結晶構造解析を行った。決定された単位格子を図1に示す。

結晶中のD-プシコース分子は β -ピラノース（1C）型構造を有しており、ユニットセルは斜方晶系（ $P2_12_12_1$ ）を取り、セル中にプシコース四分子が配置される。六員環が積層する方向が**b**軸となり、ユニットセルの体積は $V = 753.1 \text{ \AA}^3$ であった。晶系やセルボリュームは、これまでに報告されている六単糖と同程度である。

我々はL-タガトース（L-Tag）の単結晶化とX線構造解析にも成功した。結晶中のTagはPsiと同様にピラノース（1C）型構造を有し、セルパラメータは $P2_12_12_1$ （#19）、 $a = 6.253 \text{ \AA}$ 、 $b = 17.735 \text{ \AA}$ 、 $c = 6.228 \text{ \AA}$ 、 $V = 720.5 \text{ \AA}^3$ 、

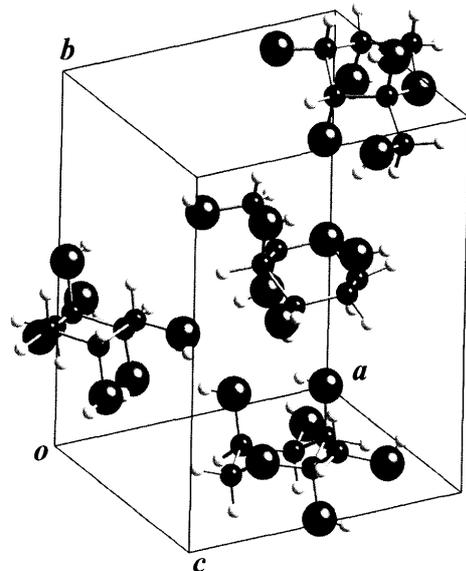


図1. β -D-プシコースの単位格子。 $C_6H_{12}O_6$, $P2_12_12_1$ (#19), $a = 6.253 \text{ \AA}$, $b = 17.735 \text{ \AA}$, $c = 6.228 \text{ \AA}$, $V = 753.1 \text{ \AA}^3$, $Z = 4$.

* 著者紹介 ¹香川大学農学部（教授） E-mail: fukada@ag.kagawa-u.ac.jp

²香川大学工学部

特集

$Z = 4$ である。Tagが他の六単糖と異なる点は、ユニットセルの b 軸がきわめて長いことである。これは、六員環が ac 面に対して約30度傾いているため、環の積層方向である b 軸を押し広げていることによる。一方で、 a 軸、 c 軸方向の立体障害は軽減されて短くなり、その結果、セルボリュームは 720.5 \AA^3 程度になっている。

以上より、ケトヘキソース4種類のうち Psi および Tag について単結晶の絶対構造を決定することに成功した。残りのケトヘキソース（フルクトース（Fru）とソルポース（Sor））はすでに絶対構造が報告されており（いずれもピラノース（1C）型）、ケトヘキソース単結晶の絶対構造はこれで全て決定されたこととなる。

含水化合物 これまで無水の糖単結晶の X 線構造解析の結果を示してきたが、次に含水結晶の結果を示す。ヘキソースには糖分子のみで単結晶を作るものと、結晶水を取り込むものがある。希少糖の一つであるアロース（All）は、結晶化の温度・濃度条件を制御することで、無水の結晶と含水結晶を作り分けることができる。そこで、D-Allの含水結晶について単結晶 X 線構造解析を行ったので、その結果を紹介する。

図2に、D-アロース二水和物のユニットセルを示す。アロース分子は β -ピラノース（C1）型構造で、晶系は斜方晶系（ $P2_12_12_1$ ）、 $Z = 4$ であり、基本的なパッキングとしては他の六単糖と大差ないが、セルボリュームは $V = 952.3 \text{ \AA}^3$ ときわめて大きい。これは、アロース一分子に対して水が二分子の割合で取り込まれているので、取り込んだ水分子の分だけユニットセルの体積が増加したためである。比較のためにアロース無水結晶の X 線構造解析の結果を示すと、無水物のセルパラメータは（ $a = 4.9181 \text{ \AA}$, $b = 11.9252 \text{ \AA}$, $c = 12.805 \text{ \AA}$ ）であり、 b 軸方向のみが大きく異なる。含水結晶のユニットセル内の分子配列を見ると、アロース分子の層と水分子の層とが明瞭に分離しており、この水分子層の厚み分だけ、無水化合物よりも b 軸が伸びていることが分かる。

以上、我々は希少糖化合物を単結晶化し、それらの絶対構造を X 線結晶構造解析によって決定した。現在、これらの実験で得られた絶対構造データに基づき、希少糖分子の電子状態計算を進めている。

ヘキソースの溶液内構造と安定性

次に、溶液内におけるヘキソースの分子構造とそれらの構造安定性について考えてみる。

12種のヘキソースのうち、いくつかの単糖については 25°C での標準生成ギブズ自由エネルギー（ ΔG_f° ）の文献データがあり⁵⁾、これを利用すれば水溶液中での各々の単糖の熱力学的安定性と平衡存在比が議論できる。たとえばグルコース（Glc）とフルクトース（Fru）の異性化反応（ $\text{Glc} \rightleftharpoons \text{Fru}$ ）における両者の平衡存在比（ $[\text{Fru}]/[\text{Glc}] = K$ ）は以下のように ΔG_f° の差から算出される。

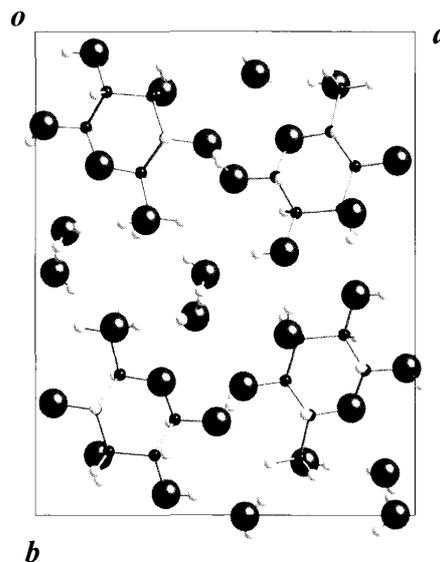


図2. β -D-アロース二水和物の単位格子を c 軸方向から見た図。
 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $P2_12_12_1$ (#19), $a = 4.817 \text{ \AA}$, $b = 15.623 \text{ \AA}$, $c = 12.655 \text{ \AA}$, $V = 952.3 \text{ \AA}^3$, $Z = 4$.

$$K = \exp \left\{ - \frac{(\Delta G_f^\circ(\text{Fru}) - \Delta G_f^\circ(\text{Glc}))}{RT} \right\} \exp \left\{ - \frac{\Delta \Delta G_f^\circ}{RT} \right\} \quad (1)$$

ここで $\Delta \Delta G_f^\circ$ は Glc を基準にした時の標準生成ギブズ自由エネルギー差、 R は気体定数、 T は絶対温度である。

一方、「イズモリング（Izumoring）」に示された単糖のエピマー化やアルドース・ケトース間変換による希少糖合成の実験データからは反応物と生成物との水溶液内平衡存在比（ K ）の値が得られ⁶⁻⁸⁾、下式によって各種希少糖に対する $\Delta \Delta G_f^\circ$ の値が見積もられる。

$$\Delta \Delta G_f^\circ = -RT \ln K \quad (2)$$

Glc を基準とし、他の単糖の $\Delta \Delta G_f^\circ$ と平衡存在比（ K ）の値を以上の手続きにより求めた結果を表1に示す（ここでは12種のヘキソースのうち、 K の値を見積もることのできた9種について示した）。

表1を見ると Glc が熱力学的に最も安定であり、次に安定なのはフルクトース（Fru）で、Glc との平衡存在比は 1:0.85 に達している。以下、Psi, Sor, Tag の順に安定であり、Glc 以外のアルドヘキソース類（Man, Gal, All, Alt）はケトヘキソースに比較して不安定という結果になった。

前述したように、ヘキソース水溶液では5種類の互変異性体が共存している。すなわち、表1に示された $\Delta \Delta G_f^\circ$ の値は個々の糖分子が水溶液中でとり得る5種の分子構造の平均的な安定性を表す。ここで、各々の糖水溶液中に共存するピラノースとフラノースそれぞれの α -および β -アノマーと開環構造の平衡存在比に関する文献データ^{3,9)} を (2) 式に代入すれば、各々の互変異性体間の自由エネルギー差が求められる。その上で、ヘキソース間の自由エネルギーレベルを対比すれば、各分子構造に対応

した熱力学的安定性の全体像が明瞭となるだろう。こうした手続きを表1に適用した結果が図3である(図3では開環状態のGlcの自由エネルギーレベルを基準 = 0としてグラフ化した)。

図3を見ると、水中のヘキソースとして熱力学的に最も安定な分子形態は4つのエクアトリアル水酸基を有するGlcの β -ピラノースであり、次はFruの β -ピラノース、以下、Glcの α -ピラノース、Fruの β -フラノース、Sorの α -ピラノース、Psiの α -フラノース、Allの β -ピラノースと続く。また、開環構造のエネルギーレベルはいずれも高いが、ケトース類の方がアルドース類よりも低い傾向が見られる。水溶液から結晶として析出する際の分子構造は、各々の糖で最もエネルギーレベルの低い構造に対応している場合が多いが(たとえばFru, All, Galでは β -ピラノース、SorとTagでは α -ピラノース)、Glc水溶液からは通常 α -ピラノースが析出し、またPsi水溶液から得られた単結晶中の分子は β -ピラノース型であったので例外もある。

以上の結果をまとめると、最も身近に存在するGlcやFruは熱力学的にも安定であること、一方PsiやAllは天

表1. 25°C水溶液中での各種ヘキソースのGlcとのギブズ自由エネルギー差 ($\Delta\Delta G_i^0$) と平衡存在比 (K)。

| | $\Delta\Delta G_i^0 / \text{kJ mol}^{-1}$ | K |
|--------------|---|--------|
| グルコース (Glc) | 0 | 1 |
| マンノース (Man) | 5.90 | 0.093 |
| ガラクトース (Gal) | 6.97 | 0.0601 |
| フルクトース (Fru) | 0.39 | 0.85 |
| ソルボース (Sor) | 3.95 | 0.203 |
| アロース (All) | 5.22 | 0.122 |
| アルトロース (Alt) | 7.9 | 0.042 |
| プシコース (Psi) | 3.12 | 0.284 |
| タガトース (Tag) | 4.24 | 0.180 |

Glc ~ Sor の K は $\Delta\Delta G_i^0$ からの (1) 式による計算値。All ~ Tag の K は実測値⁶⁻⁸⁾、 $\Delta\Delta G_i^0$ は (2) 式による K からの計算値。

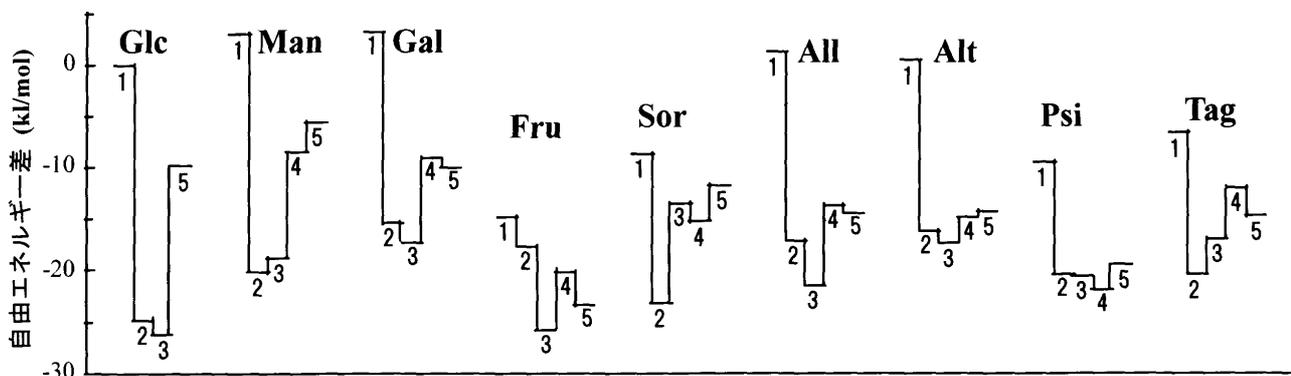


図3. 水溶液中 (25°C付近) でのヘキソース分子の各種異性体構造に対応する自由エネルギーレベル。1, 2, 3, 4, 5はそれぞれ開環構造、 α -ピラノース、 β -ピラノース、 α -フラノース、 β -フラノースを示す。

然にはほとんど存在しない希少糖であるが、それほど不安定な分子ではないことがわかる(ただし、図3に示されていないイドース (Ido)、グロース (Gul)、タロース (Tal) はかなり不安定な希少糖と予測される)。Glcの β -ピラノースが安定なのは六員環形成時に嵩高い基がすべてエクアトリアルに配置するC1椅子形コンフォメーションをとり、分子内立体障害を小さくしているためと定性的に理解できる。しかし、他の構造体におけるエネルギーレベルの高低は単純には解釈できない。

分子が持つエネルギーは分子力学法により比較的簡単にコンピュータ計算できるようになってきたが、通常の計算プログラムでは孤立分子の立体配座に対応したエネルギーのみを見積もる。周囲の分子との相互作用が重大な影響を及ぼしている結晶中や水溶液中の糖分子に対し、孤立した分子のエネルギー計算の結果をそのまま適用することはできない。(多くの単糖の結晶中では分子間水素結合ネットワークにより結晶構造が安定化されている⁴⁾。また水溶液中の糖分子の安定化には水構造との適合性が重要と考えられている¹⁰⁾。)

ここで紹介した結晶内の単糖の分子形態や水溶液内での各互変異性体のエネルギーレベルに関するデータは、周囲の分子との相互作用をトータルに反映した結果であり、孤立分子エネルギー計算との対照から、分子間相互作用に関する知見が得られると期待される。

文 献

- 1) Izumori, K.: *Naturwissenschaften*, **89**, 120 (2002).
- 2) Granström, T. B. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 89 (2004).
- 3) 後藤良造ら: 単糖類の化学, 第2章, 丸善 (1988).
- 4) Jeffrey, G. A., Saenger, W.: *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, 2nd ed., Chap. 13, Springer (1991).
- 5) Alberty, R. A.: *Thermodynamics of Biochemical Reactions*, p. 52, Wiley-Interscience (2003).
- 6) Takeshita, K. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 453 (2000).
- 7) Menavuvu, B. T. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 340 (2006).
- 8) Menavuvu, B. T. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 436 (2006).
- 9) *Dictionary of Natural Products*, Chapman & Hall (1994).
- 10) 上平恒, 逢坂昭: 生体系の水, 第5章, 講談社 (1989).