The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	グルコオリゴ糖の過ヨウ素酸酸化 : その酸化生成物の分析法及び糖鎖分析への応用について
Author(s)	掛樋, 一晃
Citation	大阪大学, 1975, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31207
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	掛樋一晃（かけひ かずあき）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 3323 号
学位授与の日付	昭和50年3月25日
学位授与の要件	薬学研究科薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**グルコオリゴ糖の過ヨウ素酸酸化** **—その酸化生成物の分析法及び糖鎖分析への応用について—**
論文審査委員	(主査)教授 滝浦 潔 (副査)教授 池原 森男　教授 吉岡 一郎　教授 枡井雅一郎

論文内容の要旨

緒　論

オリゴ糖は遊離の形あるいは配糖体として天然にも存在するが，各種多糖，糖蛋白，糖脂質などの部分構造をなすという意味において重要である。近年，これらの糖類の生理学的意義が深く認識されるようになり，その基本構造となるオリゴ糖の構造研究は益々必要性を増しつつある。

オリゴ糖の構造研究においてグリコシド結合の結合位置の決定は重要な問題の一つである。この目的に用いられる方法としてはメチル化分析法および過ヨウ素酸酸化分析法があり，現在は前者による方法がより広く用いられている。

過ヨウ素酸酸化に基づく方法も古くからこの目的に用いられてきたが，付随して起こりやすい過酸化のために過ヨウ素酸消費量の測定を中心とした分析では，糖鎖解析への応用に限界があり，現在はあまり用いられなくなっている。しかしこの酸化反応は優れた選択性を有するので，酸化生成物の分析を含めて分析法の開発が行われるならば，メチル化分析法に代わるべき方法となりうる可能性が期待できる。

オリゴ糖を適当な条件下で過ヨウ素酸酸化すると，α-グリコール結合が定量的に開裂してギ酸が遊離する。その際，ヘミアセタール環，ケタール環およびグリコシド結合はそのまま残るので，その結果分子内に対になったアルデヒドを持つ所謂ジアルデヒド体が生成する。このジアルデヒド体はグリオキサールおよびいくつかのオキシアルデヒドが互いにアセタール結合によって結合し合った構造を持っている。この酸化反応において，過ヨウ素酸の消費量は糖の構造に対して基本的な情報を与えるためヨードメトリーやU.V.吸収法による測定が行われてきた。従来，糖の過ヨウ素酸酸化分析とい

われてきたものはこの消費量測定に基づく分析を指している。しかしながら前述のジアルデヒド体については，従来殆んど手がつけられておらず，構成アルデヒドの存在がいくつかの方法が確認された程度である。僅かにSmith 分解とその生成物のオキシム化に基づく分析例があるが，実用化されていない。

ジアルデヒド体の構成アルデヒドの一斉定量が簡単に行えるようになれば，その結果からオリゴ糖の糖鎖に関して多角的で信頼できる情報がもたらされ，正確で迅速な糖鎖解析が可能となると考えられる。本研究はこのような観点から，これらのアルデヒドの一斉定量法を確立することを主眼としたものであり，単糖の代表とも言うべきD-グルコースから成るグルコオリゴ糖をモデルとして行った。

さらに過ヨウ素酸消費量の測定についても2，3の改良を試みて成果を収めたので，併せて記述する。

本　論

第1章　過ヨウ素酸消費量の測定

糖の過ヨウ素酸酸化において，ヨードメトリーによる従来の過ヨウ素酸消費量測定法では多量の試料を必要とする。また微量分析法として知られるU.V.吸収法は光酸化による誤差を免れないし，ポーラログラフ法は過酸化の著しい反応条件を用いる欠点がある。そこで微量の試料を用いて手軽に行える過ヨウ素酸消費量の測定法をめざし，いくつかの方法について検討を重ねた結果，フェノールフタリンによる新比色法を確立することができた。またヨウ素イオン選択電極を用いる簡便法をも考案した。

第2章～第4章における過ヨウ素酸消費量の測定はすべてフェノールフタリンによる比色法を使用した。

第1節　フェノールフタリン一比色法による過ヨウ素酸消費量の測定

本方法はフェノールフタリンがアルカリ性で過ヨウ素酸により選択的に酸化されて赤色に呈色することを利用した方法である。酸化の結果生成する赤色の色素はフェノールフタレインと同一の555nmに極大吸収を与えるので，酸化反応液をその吸収波長で比色して，未反応の過ヨウ素酸量を知り，この結果に基づいて過ヨウ素酸消費量を求めることができる。種々の条件を詳しく検討した結果，次の標準定量法を案出した。

標準定量法——糖試料($2\times10^{-1}\mu$mole)を10倍モル比のIO_4^-で酸化して得た反応液(1.00ml)に，6×10^{-3}M フェノールフタリンアルコール溶液(5.00ml)および燐酸緩衝液(pH 11.6，10.0ml)を加え，8分間放置後2×10^{-1}M Na_2SO_3(空気酸化防止剤，1.0ml)を加えて555nmで吸光度を測定して，IO_4^-標準液で作った検量線から残存するIO_4^-濃度を求め，この結果に基づいて過ヨウ素酸消費量を算出する。

各種タイプの糖試料を過ヨウ素酸酸化し，本法によって過ヨウ素酸の消費量を測定した結果をTable Iに示す。同一の試料について，ヨードメトリーによる測定を行い，結果を比較したところ，よい一致をみた。

Table I　PERIODATE CONSUMPTION OF SELECTED CABOHYDRATES

Carbohydrate	Periodate Consumption (mole/mole of carbohydrate)			
	Phenolphthalin method		Iodometry	
	3h	24h	3h	24h
D-Glucose	4.80	4.97	4.94	4.94
D-Fructose	4.00	4.21	4.02	4.25
L-Rhamnose	3.58	3.62	3.56	3.64
D-Glucuronic acid	4.90	4.93	5.02	5.07
D-Glucono-δ-lactone	5.33	5.50	5.43	5.47
D-Sorbitol	5.02	5.00	5.02	5.01
Methyl α-D-glucopyranoside	1.85	2.03	1.85	2.01
Cellobiose	4.22	4.88	4.33	4.94
Sucrose	2.80	3.11	2.89	3.08
Raffinose	4.72	5.45	4.78	5.34

第2節　ヨウ素イオン電極ー電位差法による過ヨウ素酸イオンの定量

本法は糖類を酸化したあと残存する過ヨウ素酸を(1)式に従って少過剰のヨウ素イオンと反応させ，ヨウ素イオン選択電極を用いてヨウ素イオンの消費量を求め，間接的に過ヨウ素酸の消費量を求める方法である。

$$IO_4^- + 2I^- + H_2O = IO_3^- + I_2 + 2OH^- \quad (1)$$

ヨウ素イオン選択電極の感応は反応液中に共存する遊離ヨウ素によって阻害されるが，同容量の四塩化炭素で抽出することにより容易にこの影響を除くことができた。この原理に基づく過ヨウ素酸消費量の測定は操作が簡単であり，迅速定量が可能である。

標準定量法――糖試料($5\times10^{-1}\mu$mole)を0.1M酢酸緩衝液(pH 6.0)中，10倍モル比のIO_4^-で酸化

Table II　DETERMINATION OF PERIODATE CONSUMPTION FOR SELECTED CARBOHYDRATES *

Carbohydrate	Potentiometric method (mole/mole of carbohydrate)	UV absorption spectrophotometric method (mole/mole of carbohydrate)
D-Sorbitol	5.0	5.0
D-Glucose	4.8	4.9
D-Glucosamine hydrochloride	4.9	5.0
D-Glucuronic acid	5.1	5.0
D-Gluconic acid δ-lactone	4.7	4.8
Methyl α-D-Glucopyranoside	0.76	0.76

* oxidation in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) at 25° for 1h.

して得た反応液(2.0ml)に，5×10^{-3}MKI (同上緩衝液) を少過剰加え， 5分間放置後混合物を CCl_4 (同容量) で抽出し，水層中のI^-濃度をヨウ素イオン選択電極を用いて測定し，その結果から過ヨウ素酸消費量を算出する。

本法により数種の糖試料を過ヨウ素酸酸化してその消費量を測定したところ，U.V.吸収法の結果とよく一致した(Table Ⅱ)。

第2章　過ヨウ素酸酸化生成物の選択的定量

糖を過ヨウ素酸酸化すると各種のアルデヒドが生成するが，このうちギ酸およびグリオキサールは他のアルデヒドと異なった構造をもち，選択的定量が可能である。種々の方法を検討した結果，前者はP.M.R.法で，後者は2,7-ジニトロフェニルヒドラジン一比色法によって目的を達することができた。

第1節　P.M.R.法によるギ酸生成量の測定

糖の過ヨウ素酸酸化に際して生成するギ酸はいくつかの方法で定量が可能であるが，いずれの方法も煩雑で選択性に乏しい。そこでP.M.R.を用いたギ酸の選択的定量法について検討した。

糖試料の過ヨウ素酸酸化反応液のP.M.R.スペクトルでは，遊離したギ酸のアルデヒドプロトンは8.23ppmにsinglet として存在し，このシグナルは完全に分離して観察することができる。Methyl α-D-glucopyranoside の過ヨウ素酸酸化反応液を一例としてその典型的なP.M.R.スペクトルをFig. 1に示す。

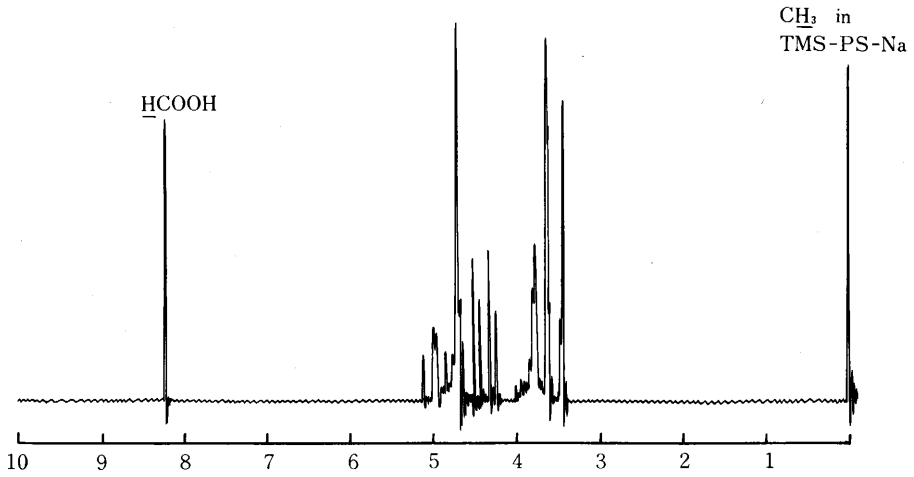


Fig. 1　90 MHz p.m.r. spectrum of the periodate oxidation mixture obtained from methyl α-D-glucopyranoside in D_2O

ギ酸のアルデヒドプロトンのシグナルがこのように他のシグナルから離れて現われるので，P.M.R.スペクトルによりギ酸を定量することが可能であると考え，種々条件を検討した結果次の標準定量法を案出した。

標準定量法——Sodium 3-(trimethyl silyl)-1-propane-sulfonate(TMS-PS-Na，内部標準5.0μmole)

を含む0.2M $NaIO_4 \cdot D_2O$ 溶液(150 ml)に糖試料(ギ酸予定量，45 μmole)を溶かし，遮光下25°に放置したのち，H_1 level 150 μgauss，Sweep speed 8 Hz/sec で積分法によりギ酸およびTMS-PS-Na のシグナルを5～10回測定し，平均相対強度を求め，この値からギ酸生成量を算出する。

実際に各種糖試料から生成するギ酸を，本法および直接アルカリメトリーによって測定し，両者を比較した(Table Ⅲ)。

Table Ⅲ LIBERATION OF FORMIC ACID FROM SELECTED CARBOHYDRATES BY PERIODATE OXIDATION

	Formic acid liberated (mole/mole)					
	P.m.r. method			Alkalimetry		
	1h	3h	24h	1h	3h	24h
Erythritol	2.0	2.0	2.0	1.98	2.01	2.00
D-xylitol	2.9	3.0	2.9	2.97	3.00	2.99
D-Mannitol	4.0	4.0	4.0	3.98	4.01	4.00
Methyl α-D-glucopyranoside	0.73	0.90	0.94	0.74	0.88	0.93
Methyl β-D-glucopyranoside	0.73	0.88	0.93	0.73	0.86	0.92
DL-Glyceraldehyde	0.2	1.5	2.0	1.19	1.47	1.90
D-Arabinose	2.2[a] 3.1[b]	2.3[a] 3.3[b]	3.2[a] 3.8[b]	2.90	3.03	3.58
D-Glucose	2.6[a] 3.6[b]	3.2[a] 4.1[b]	4.1[a] 4.6[b]	3.28	3.79	4.20
D-Fructose	1.1	1.2	1.8	1.81	1.96	2.67
D-Sorbose	1.2	1.4	2.2	1.91	2.15	3.10
D-Gluconic acid δ-lactone	1.5	2.3	2.6	2.87	3.47	3.84
D-Galacturonic acid	4.1	4.1	4.2	5.62	5.64	5.47
D-Glucuronic acid	3.9	4.0	4.0	5.39	5.49	5.40

a：free formic acid
b：total formic acid

その結果糖アルコールおよびグリコシドを過ヨウ素酸酸化して生成したギ酸の量は，両法による定量でよい一致をみた。またアラビノースなどのアルドース類は過ヨウ素酸酸化の過程においてホルミルエステルに由来すると考えられるアルデヒドプロトンが8.17 ppm に singlet として存在することが観察され，このことから本法により遊離およびエステル状のギ酸を区別して定量できることが明らかになった。一方ケートス，アルドン酸あるいはウロン酸は過ヨウ素酸酸化によりギ酸を遊離するばかりでなく，グリコール酸やグリオキシル酸などの有機酸を生ずるゆえ，単純な中和滴定法だけでは，これらの酸の影響のためにギ酸の正確な定量は困難である。これに対して本法ではギ酸をこれら有機酸の共存下で選択的に定量することができた。

第2節　2,4-ジニトロフェニルヒドラジン一比色法によるグリオキサールの定量

オリゴ糖や多糖を過ヨウ素酸酸化するとジアルデヒド体が生成するがその構成アルデヒド中グリオキサールは非還元部分の1，2位部分から生ずる最も普遍的なアルデヒドであり，その生成量は糖鎖

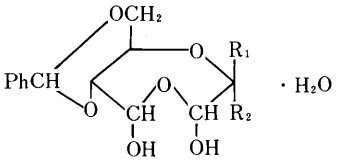
解析に対して重要な情報を提供する。

グリオキサールは酸性条件下で2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応してほぼ定量的にビスーヒドラゾンを生じアルカリ性で強く発色する。この発色は他のヒドロキシルアルデヒドでは見られず，極めて高い選択性を示し，$2\times10^{-6}\sim4\times10^{-5}$M の範囲でグリオキサールの定量が可能である。

グリオキサールはジアルデヒド体の分子内で他のヒドロキシルアルデヒドとアセタール結合を介して存在する。従ってこのような状態のグリオキサールにも適用できる定量法を求める必要がある。そこでMethyl 4,6-O-benzylidene-α および β-D-glucopyranoside を過ヨウ素酸酸化して得た結晶性のジアルデヒド**1**および**2**をモデルとして検討した結果，本法が結合状態のグリオキサールにも適用できることを確認した(Table Ⅳ)。

Table Ⅳ PRECISION OF THE DETERMINATION OF GLYOXAL IN DIALDEHYDES, **1** AND **2** (5 determinations were done in each case.)

Dialdehyde	Amount of dialdehyde added・10^{-2} (μmole)	Ave. glyoxal formed ・10^{-2} (μmole)	Standard deviation
1	1.00	1.00	0.00
1	1.90	1.88	0.01
1	2.50	2.46	0.05
2	1.00	1.00	0.00
2	1.90	1.83	0.03
2	2.50	2.52	0.03



1 R_1 = H, R_2 = OMe

2 R_1 = OMe, R_2 = H

標準定量法——$1\times10^{-2}\sim2\times10^{-1}$ μmole のグリオキサールを含む試料溶液(5.00ml)に0.1% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩の80%含水DMSO 溶液(1.00ml) を加えて100°，1.5時間反応させ，冷後12%アルコール性KOH 溶液(1.00ml) を加えて576nm で吸光度を測定し，検量線からグリオキサール濃度を求めその生成量を算出する。

本法によりいくつかのグルコシドを過ヨウ素酸酸化して生成するグリオキサール量を経時的に測定し，過ヨウ素酸の消費量と比較することによってグルコシドの酸化過程を考察することができた。

第3章　ジアルデヒド体の構成アルデヒドの一斉定量

オリゴ糖や多糖の過ヨウ素酸酸化の結果生成するジアルデヒド体は，グリオキサールおよびいくつかのヒドロキシルアルデヒドが互いにアセタール基で結合し合った構造をもつ。従ってこれらのアルデヒドの組成比を知ることができれば糖鎖の構造解明に極めて有力な手がかりが与えられることになる。結合状態で存在するこれらのアルデヒドは分析に先立って遊離させる必要があると考えられる。第2章，第2節に示した2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを使用することによってこの操作を省略し，

一挙にそれぞれのアルデヒドを対応する2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンに導くことができた。得られたヒドラゾン混合物はシリカゲル薄層または小カラムで容易に分離することができ，分離後吸光度測定により正確に定量することができた。

標準定量法——糖試料(50～250 μg) から得た酸化反応液をイオン交換樹脂により脱塩後，濃縮乾固して残渣をジメチルセロソルブ(0.1 ml) に溶かす。これに2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩(1.2 mg) を加えて，25°で3時間反応させ，反応液をシリカゲル薄層またはカラム(1φ×10cm) にかけ，クロロホルム-メタノール系の溶媒で分離する。分離した各アルデヒドのヒドラゾンのフラクションを (薄層の場合はアルコール5ml で抽出後) アルコールで希釈して25ml とし，その極大吸収位置で吸光度を測定する。但しグリオキサールのフラクションは希釈液(3.00ml) を濃縮乾固し，残渣についてグリオキサールの選択的定量を行う。

いくつかのジアルデヒドモデルについて，その構成アルデヒドを本法により定量したところ，理論値とよく一致しまた高い再現性を示した。

実際に methyl glucosides およびその4,6-O-benzylidene体の過ヨウ素酸酸化を行い，生成したアルデヒドを本法によって一斉定量しその結果を過ヨウ素酸消費量と比較したのがTable V である。

Table V　L. C. DETERMINATION OF ALDEHYDES FROM SELECTED GLYCOSIDES BY PERIODATE OXIDATION

Clycoside	Aldehyde formed	Amount of aldehyde formed (mole/mole of glycoside)			Molar proportion of aldehyde formed			Periodate consumption (mole/mole of glycoside)		
		*	found 3 h	24 h	*	found 3 h	24 h	*	found 3 h	24 h
Methyl α-D-glucopyranoside	glyoxal	1	0.98	0.95	1	1	1	2	2.03	2.16
	D-glyceraldehyde	1	0.97	0.93	1	0.99	0.98			
Methyl β-D-glucopyranoside	glyoxal	1	0.98	0.97	1	1	1	2	1.95	2.12
	D-glyceraldehyde	1	0.96	0.96	1	0.98	0.99			
Methyl 4,6-O-benzylidene-α-D-glucopyranoside	glyoxal	1	0.31	1.01	1	1	1	1	0.32	1.03
	D-erythrose	1	0.29	0.99	1	0.94	0.98			
Methyl 4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranoside	glyoxal	1	0.30	0.99	1	1	1	1	0.30	0.99
	D-erythrose	1	0.30	0.97	1	1.00	0.98			

* : theoretical

Methyl glucosides の場合，過酸化の影響を考えるならば，過ヨウ素酸の消費量と生成するグリオキサールおよびD-グリセルアルデヒドの量は理論通りであった。またいずれのグルコシドについても生成するヒドロキシアルデヒドのグリオキサールに対するモル比は反応時間にかかわらず1 に近い値を示した。

第4章　水素イオン濃度の過ヨウ素酸酸化に及ぼす影響と過酸化に関する考察

還元糖の過ヨウ素酸酸化において，反応の初期段階ではホルミルエステルの生成が見られ，多くの場合時間の経過とともにこの中間体が加水分解を受けてヒドロキシアルデヒドを遊離し，過酸化が進

行する。

過酸化については従来の研究では専ら過ヨウ素酸消費量の経時変化にのみ頼っていたので甚だ曖昧な考察しかできなかった。前章で述べたアルデヒド定量法を利用すれば，この過酸化の過程がはるかに正確に把握できるのみならず，反応条件の設定についても適当な措置がなされることになる。

過酸化は主としてホルミルエステルの加水分解に基づくものであるゆえ，水素イオン濃度の影響が極めて大きいと考えられる。そこで基本物質として methyl α-D-glucopyranoside を用いて種々の pH で過ヨウ素酸酸化を行い，グリオキサール生成量を指標として過酸化の過程を考察した。その結果反応温度が25°の場合，pH 3～6 では，2～5 時間のあいだ，過酸化が殆んど起こっておらず，生成アルデヒドの分析に際しては2～5 時間のあいだでサンプリングすることが最も適当であると考えられた。

さらにマルトースおよびゲンチオビオースをモデルとして還元性オリゴ糖の酸化の過程を検討してみたところ，2～5 時間までは通常の酸化過程を示したがそれ以後は還元末端部分から生成するアルデヒドの量が次第に減少することがつきとめられた。このことから還元末端部分のホルミルエステルの加水分解が起こり，これに伴って過酸化が進行するものと考えられた。

第5章　オリゴ糖におけるグリコシド結合の結合位置の解析

オリゴ糖の過ヨウ素酸酸化において，第3章で述べたジアルデヒド体の構成アルデヒドの定量に基づく糖鎖解析では，得られる情報が多角的であるし，試料の絶対重量を知らなくても生成アルデヒドのモル比から容易に結論に導くことができるという利点がある。

本章では生成アルデヒドの一斉分析に基づくオリゴ糖のグリコシド結合の結合位置決定について，いくつかの適用例を挙げる。

第1節　グルコビオースにおけるグリコシド結合の結合位置の解析

構成単糖がD-グルコピラノースのみからなる2糖は anomeric configuratton を別にしても1-1, 1-2, 1-3, 1-4 および1-6 結合の5種類が存在する。これらのグルコビオースは過ヨウ素酸酸化すると，非還元部分からはグリオキサールおよびD-グリセルアルデヒドをそれぞれ等モルの割合で生成し，還元部分からは1-2 結合の場合，2-ヒドロキシマロンアルデヒドおよびD-グリセルアルデヒドを1モルずつ，1-3 結合の場合はD-アラビノース，1-4 結合の場合はD-エリスローズそして1-6 結合の場合はD-グリセルアルデヒドをそれぞれ1モルずつ与えるはずである。

実際にこれらのグルコビオースを過ヨウ素酸酸化して生成アルデヒドの定量を行ったところ，1-1, 1-4 および1-6 結合の2糖については理論通りの結果を与えた。一方，1-2 結合の2糖はD-グリセルアルデヒドの量が理論値よりかなり低目に出たことから，還元部分のヘミアセタール基の開裂が起こりやすいためか，あるいはアルデヒド型で存在するためと考えられる(Table Ⅵ)。

第2節　合成オリゴ糖の構造確認

第6章で述べる1-6-β-グルコオリゴ糖 (ゲンチオオリゴ糖) の合成の際，6′位以外の水酸基をアセチル基で保護した2糖を用いて gentiotriose および gentiotetraose を合成したが，その際酸化銀中で Königs-Knorr 反応を行うとアセチル基が4′位から6′位へ移ることを見出した。

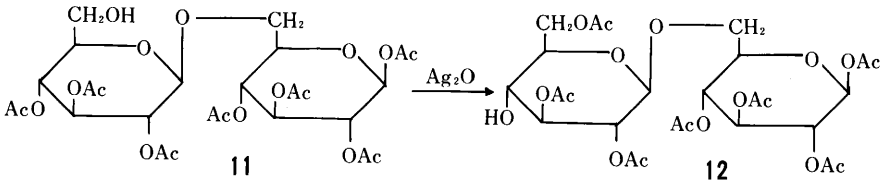


Table Ⅵ MOLAR RATIOS OF HYDROXY ALDEHYDES FORMED FROM GLUCOBIOSES BY PERIODATE OXIDATION

Linkage	Name of glucobiose	Molar ratio D-Glyceraldehyde Glyoxal	D-Erythrose Glyoxal	2-Hydroxy-malonaldehyde Glyoxal	D-Arabinose Glyoxal
Theoretical					
1-1		1	—	—	—
1-2		2	—	1	—
1-3		1	—	—	1
1-4		1	1	—	—
1-6		2	—	—	—
Found					
1-1 α, α	Trehalose	0.99	—	—	—
1-2 α	Kojibiose	1.68	—	detected	—
β	Sophorse	1.85	—	detected	—
1-3 β	Laminaribiose	1.04	—	—	0.91
1-4 α	Maltose	1.01	0.99	—	—
β	Cellobiose	1.01	1.00	—	—
1-6 α	Isomaltose	2.01	—	—	—
β	Gentiobiose	2.02	—	—	—

この結果合成した三糖および四糖中に1-4結合の混在する可能性があるので，合成した三糖および四糖を過ヨウ素酸酸化して，本法により生成するアルデヒドの分析を行ったところ，1-4結合が混在する場合に生ずると考えられるD-エクスローズは全く生成しなかった。このことから合成した三糖および四糖は，1-6結合のみからなるということが証明された。

第3節　セネガ根中の少糖の構造研究への応用

セネガ根からはシュクロース，メリビオース，ラフィノースおよびスタキオースなどの既知オリゴ糖が見出されているが，過ヨウ素酸酸化に基づく生成アルデヒドの一斉定量法をこれらのオリゴ糖に適用したところ，満足すべき結果を得た。

セネガ根からは，これら既知オリゴ糖の他に糖Aおよび糖Bなる構造未知の非還元性二糖が単離され，メチル化分析やp.m.r.スペクトルの解析により，それぞれ2-O-α-galactopyranosyl-1,5-anhydro-D-glucitol および6-O-β-D-glucopyranosyl-1,5-anhydro-D-glucitol の構造が提出された。

本法により，糖A および糖B の分析を行ったところ，Table Ⅶ に示すように上述の推定構造式の正しいことが確認された。

Table Ⅶ DETERMINATION OF ALDEHYDES FORMED FROM SUGAR A AND B BY PERIODATE OXIDATION

	Glyoxal (mole/mole of sugar)		Glycol aldehyde (mole/mole of sugar)		D-Glyceraldehyde (mole/mole of sugar)	
	Theoretical	Found	Theoretical	Found	Theoretical	Found
Sugar A	1	1.01	—	—	3	2.95
Sugar B	1	1.10	1	0.94	2	1.92

第6章　グリオキサール生成量に基づくオリゴ糖の重合度測定法

オリゴ糖の構造決定において重合度の測定は糖鎖解析とならんで重要な問題である。

本章では1-6 結合を有するグルコース系列のオリゴ糖を用いて，第2 章第2 節で述べたグリオキサールの選択定量による重合度測定法について検討し，併せてこれらのオリゴ糖の合成法についても述べる。

第1 節　1-6 グルコオリゴ糖の合成

1．1-6-α-グルコオリゴ糖の合成

1-6-α-グルコオリゴ糖であるイソマルトースおよびイソマルトトリオースはそれぞれ Chart 1 および Chart 2 に示す方法で合成し，それぞれ38.5% および46% の収率で得た。Königs-Knorr 反応においてブロマイドの2 位の隣接基の関与をできるだけ抑え，α 体の収率を高めるために2 位にベンジル基を導入し，反応はニトロメタン中シアン化水銀を用いて行った。この場合，同時に生成するβ体の比率はα体に対し30% 以下であり容易に分離できた。

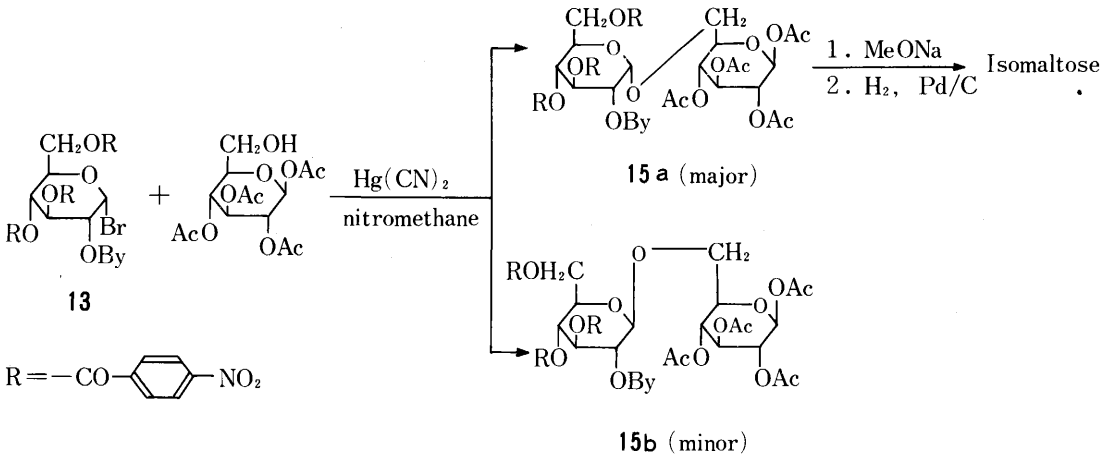


Chart 1

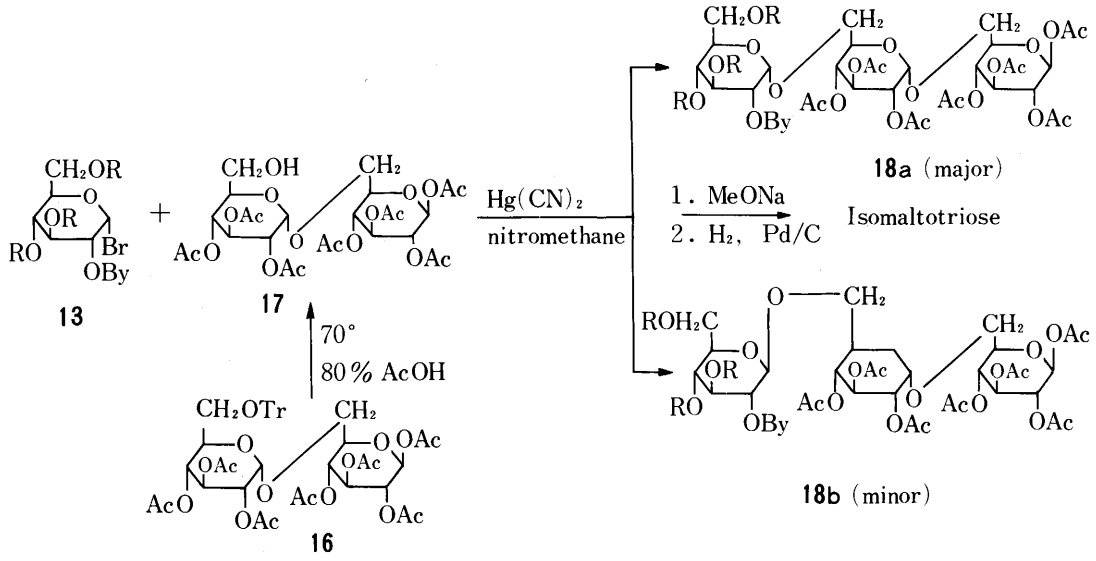
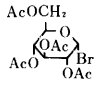
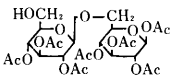
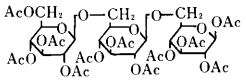
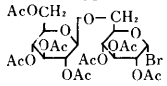
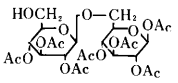
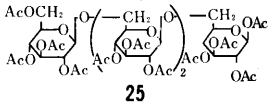
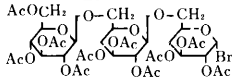
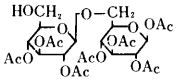
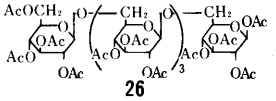
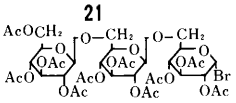
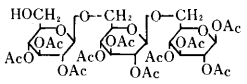
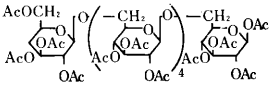


Chart 2

2．1-6-β-グルコオリゴ糖の合成

従来，オリゴ糖の合成はオリゴ糖に単糖を1個ずつ縮合させるStepwise methodのみが知られており，この方法で四糖まで合成されているにすぎないが，オリゴ糖同士を縮合させるBlock condensationの方法を用いて，初めて六糖まで能率良く合成することができた(Chart 3)。

Chart 3　Synthesis of Gentio-oligosaccharides by Block Condensation

Reactant: Bromide	Reactant: Alcohol	Product	Yield (%)
 **19**	 **22**	 **24**	43
 **20**	 **22**	 **25**	31
 **21**	 **22**	 **26**	31
 **21**	 **23**	 **27**	19

第2節　1-6-グルコオリゴ糖の重合度測定

グリオキサールはオリゴ糖を過ヨウ素酸酸化したとき，非還元性の単糖部分から一定の規則性をも

って生成する。

1-6-グルコオリゴ糖の場合，過ヨウ素酸酸化の際に生ずるグリオキサールと重合度の関係は n＝M＋1で表わされる。n は重合度，Mはオリゴ糖1モルから生成するグリオキサールのモル数である。そこで第1節において合成した1-6-グルコオリゴ糖を用いて，上述のことを確認し，本法がオリゴ糖の重合度測定の一手段となることを見出した。

その結果，Table Ⅷ に示すように，用いたオリゴ糖1モル当たり生成するグリオキサールのモル数は理論値とよく一致し，本法が重合度測定に使用できることが明らかになった。

Table Ⅷ DETERMINATION OF THE DEGREE OF POLYMERIZATION OF GENTIO- AND ISOMALTO-OLIGOSACCHARIDES

	Theoretical amount of glyoxal (mole/mole of oligosaccharide)	Amount of glyoxal found (mole/mole of oligosaccharide)
Gentiobiose	1	0.99
Gentiotriose	2	1.96
Gentiotetraose	3	2.96
Gentiohexaose	5	4.97
Isomaltose	1	0.98
Isomaltotriose	2	1.97

結　論

1．微量の糖試料を用いた場合の過ヨウ素酸消費量測定法として，フェノールフタリンによる新比色法を確立した。またヨウ素イオン選択電極を用いる簡便法をも考案した。

2．糖を過ヨウ素酸酸化した結果生ずる各種アルデヒドの中で，最も普遍性のあるギ酸およびグリオキサールの選択的定量法について検討し，それぞれ P.M.R. 法および2,4-ジニトロフェニルヒドラジン一比色法を開発した。

3．オリゴ糖を過ヨウ素酸酸化した際に生成するジアルデヒド体の構成アルデヒドの定量法について検討し，2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンのシリカゲル薄層またはカラム法による一斉定量法を確立した。

4．糖類の過ヨウ素酸酸化に最も大きい影響を与える水素イオン濃度の効果について，グリオキサール生成量を指標として考察し，弱酸性領域が本分析法に最も適していることを明らかにした。またグルコ二糖を用いて過酸化の過程を検討し，ホルミルエステルの加水分解が過酸化の主原因であることを証明した。

5．アルデヒドの一斉分析に基づいて各種のオリゴ糖のグリコシド結合の結合位置を調べ，本法が結合位置決定に有用な方法であることを明らかにした。

6．オリゴ糖の構造決定上，結合位置とともに重要な重合度は，過ヨウ素酸酸化により生成するグリオキサール量の測定に基づく方法により，決定できることを1-6-グルコオリゴ糖を用いて確認した。

またこれらオリゴ糖の合成法についても検討し，α- 結合のオリゴ糖については三糖まで，β- 結合のオリゴ糖については六糖までの合成に成功した。

論文の審査結果の要旨

Malaprade のグリコール開裂反応を分析化学的に研究し，まず過ヨウ素酸の反応量の測定法の改良を志して，フェノールフタリンを用いる比色法およびヨウ素イオン選択電極を用いる電位差滴定法が感度と精度において優秀であることを確かめ，新しい微量定量法として推称している。次に糖類の過ヨウ素酸酸化における開裂成績体の分析法を追究して，ギ酸は p.m.r. 法で選択的に定量し得ることを明らかにし，グリオキザールその他のジアルデヒド類はビス-2, 4- ジニトロフェニルヒドラゾン（青紫色）に誘導して比色定量する方法を確立し，複雑な酸化成績体の分離定量に成功している。そして上述の分析法を応用して，Malaprade 反応の条件を調べ，特に過酸化の原因がフォルミルエステルの加水分解にあることを明らかにし，またオリゴ糖の分析に上記の定量法を適用して，グリコシド結合位置および糖単位の重合度の決定が可能であることを論証した。

以上の研究成果は，薬学博士の学位を授与するに値する。