

Aminodextran に関する研究 (Ⅲ). Aminodextran の改良合成とその高分子的挙動*

三 好 康 之・前 川 一 之**

(食物栄養学科 食品衛生学研究室)

Studies on Aminodextran (III). The Modified Formation and the Polymeric Property of Aminodextran

Yasutaka Miyoshi and Kazuyuki Maekawa

(Department of Food Hygiene, Faculty of Food and Nutrition
Hiroshima Bunkyo Women's College)

Aminodextran was newly formed by reducing nitro groups of nitrodextran with the aid of Birch reaction¹⁾ in reasonable yield. According to the colloidal titration or 2, 4-dinitrophenylation, it has become apparent that the content of total amino groups of newly formed aminodextran was about two times that of aminodextran reduced by lithium aluminium hydride. The total amount of the glucose linkage resistant against periodate oxidation of Dextran T-70 agreed well with the calculated ones from the total sugar of nitrodextran hydrolyzed enzymatically by dextranase (3, 2, 1, 11). With the method of colloidal titration²⁾, the equivalent molecular weight per amino group of aminodextran was calculated as 576.

Aminodextran を構成している 4 種類の 3-amino-3-deoxy-hexopyranose の分離同定とそれらの定量, さらには aminodextran 誘導体の合成とそれぞれの生理作用については既に報告した³⁾。

今回は, nitrodextran のニトロ基を収率よく還元するための改良合成法を検討した。その結果, 平均分子量約10,000, 窒素含有量約7%の aminodextran を35%の高収率で得た。この新たに合成された aminodextran は既報のそれと機器分析で一致した。さらに, aminodextran の高分子電解質としての性質を利用したコロイド滴定により, その1アミノ基当りの当量分子量(EW値)は576と算出された。

高分子の脂肪族化合物に結合したニトロ基を還元するには, 低分子化合物に結合したニトロ基を還元するのに通常用いられる接触還元法⁴⁾では, ある部位の一部分のニトロ基が還元されるにすぎず, 最後まで反応を進行させることができなかった⁵⁾。Lithium aluminium hydride⁶⁾を用いるとその目的は達せられた。しかし, 反応途中での反応液の強アルカリ化のためと思われるニトロ基の脱離およびグルコシド結合の加水分解により, 生成物のアミノ基含有量の減少, 分子量の低下がみられた。これを改良すべく, さらに温和な反応として, Birch 反応を検討した。その結果, 生成物のアミノ基含有量, 窒素含有量, 分子量, 収率などで満足すべき値が得られた。

* 第II報; Y. Miyoshi and K. Maekawa; J. Hiroshima Bunkyo Women's College, 13 43 (1978)

** 福岡県立社会福祉短期大学 (福岡県飯塚市)

この aminodextran のアミノ基と 2,4-dinitrofluorobenzene を反応させて、DNP 誘導体⁷⁾を合成し、反応性アミノ基の定量を試みた。

さらに、dextran 分解酵素 dextranase (3, 2, 1, 11) を Dextran T-70 とその誘導体に作用させ、その作用により遊離された還元糖量を定量した。この値と Dextran T-70 が過ヨウ素酸に酸化されなかったグルコシド結合を持つグルコース残基量とを比較検討した。

ところで、glycolchitosan や DEAE-dextran は正の高分子電解質であるので単分子のアミノ糖とは異なる挙動を示す。たとえば、glycolchitosan は千手らにより、正のコロイド滴定試薬として、パルプ廃液の滴定などに広く利用されている⁸⁾。今回合成した aminodextran は正のコロイドであるから、potassium polyvinyl sulfate を負のコロイドとしてコロイド滴定を試みた。そして、aminodextran の 1 アミノ基当りの当量分子量の算出を試みた。また、RNA との complex を作り、aminodextran との結合比やこの complex 中の RNA が RNAase により分解されるかどうかも検討した。

実験方法および結果

1) Nitrodextran の還元

i) Aminodextran IV-b_s, IV-b_i の合成

アセトンドライアイス浴で、 -70°C に冷却した液体アンモニア 50 ml 中に 100 mg の金属ナトリウムを加えよく攪拌した。ついで、100 mg の nitrodextran を加え、10 分間反応させた。つぎに、深青色の反応混液が白色となるまで塩化アンモニウムを加えた。アンモニウムを室温で除去し、少量の水を加え、1 規定塩酸で中和した。これをセロファンチューブに入れ、水に対して 3 日間透析した。透析中に沈殿した水に不溶部と水に可溶部を個別に凍結乾燥した。水に可溶の生成物を IV-b_s、水に不溶のそれを IV-b_i とした。

ii) Aminodextran IV-C_s, IV-C_i, IV-d_s の合成

-70°C に冷却した液体アンモニア 50 ml 中に、nitrodextran 220 mg を加え、攪拌しながら金属リチウム 90 mg を加えた。反応 10 分後、塩化アンモニウム、または、乾燥エチルアルコールを反応液が白色となるまで加えた。室温でアンモニアを除去後、前者の場合は水を加えた後に 2 規定塩酸で中和、後者の場合はそのまま中和した。両者とも、セロファンチューブに入れ、水に対して 3 日間透析した。透析中に沈殿した水に不溶部と水に可溶部とに分けて凍結乾燥した。前者の水溶性生成物を IV-C_s、水不溶性生成物を IV-C_i、後者は水溶性生成物 IV-d_s のみを得た。これらの赤外吸収スペクトル図を Fig. 1 に、窒素含有量および収率を Table 1 に示す。

2) Aminodextran の DNP 化

IV-a_s, IV-c_s それぞれ 14 mg を 8 ml の水に溶解し、これに、2 ml のメチルアルコールを加えて反応溶液とし、pH 7.5, 30°C に設定した pH スタット (Radio-meter 社製, TTTIC) を用いて反応を行った。2, 4-Dinitrofluorobenzene 溶液 (20 μl を 0.5 ml のメチルアルコールに溶解) は記録開始 10 分後に加え、DNP 化の度合いを 0.01 規定水酸化ナトリウムで滴定した。Fig. 2 にみられるように、反応開始後 50 分間で IV-a_s が 0.53 meq, IV-c_s が 0.90 meq の水酸化ナトリウムを消費した。なおこの実験は窒素気流中で行った。

3) Aminodextran の dextranase (3, 2, 1, 11) による酵素分解

Dextranase (α -1, 6-glucon 6-gluconohydase) はシグマ社製の市販品を用いた。活性は 55 unit/mg であった。この酵素 4.0 mg を pH 6.0 の 0.1 M リン酸緩衝溶液 1 ml 中に溶かし

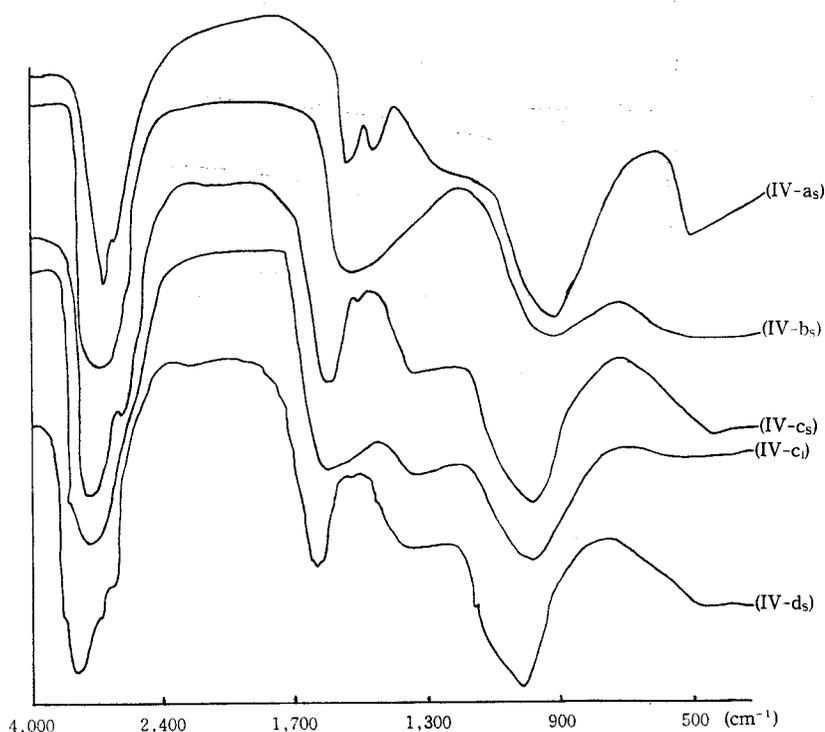


Fig. 1 Ir of Aminodextran obtained by reducing Nitrodextran with various Reagents as shown in Table 1. Nitrodextran was stirred in the liquid ammonia-metal sodium (or, lithium) mixture solution and ammonium chloride (or, ethyl alcohol) was added to the mixture. The solution was neutralized, dialyzed and lyophilized after evaporation of ammonia.

Table 1 Solubility in Water, Nitrogen Content and Yield of Aminodextran obtained by reducing Nitrodextran with Lithium aluminium hydride in Tetrahydrofuran and Sodium (or, Lithium) in liquid Ammonia.

Sample Number	Reducing Reagent	Proton Source	Solubility in Water	Nitrogen-content (%)	Yield (%)
IV-a _s	LiAlH ₄		soluble	4.68	15
IV-b _s	Na in NH ₃	NH ₄ Cl	soluble	5.93	18
-b _i			insoluble	7.35	45
IV-c _s	Li in NH ₃	NH ₄ Cl	soluble	6.90	35
-c _i			insoluble	7.08	40
IV-d _s	Li in NH ₃	EtOH	soluble	5.91	15

た。Aminodextran 5 mg を含む 5 ml の反応液に、上記酵素液 0.1 ml を加え、50°C で反応した。10分毎に反応液中から 1 ml を採取し、酵素により遊離した還元糖を 3, 5-dinitrosalicylic acid 法⁹⁾ を用いて定量した。標準として、グルコースを用いて標準線を算出した。この酵素分解反応は Dextran T-70, nitrodextran, guanidinodextran についても行った。この結果を Fig. 3 に示す。

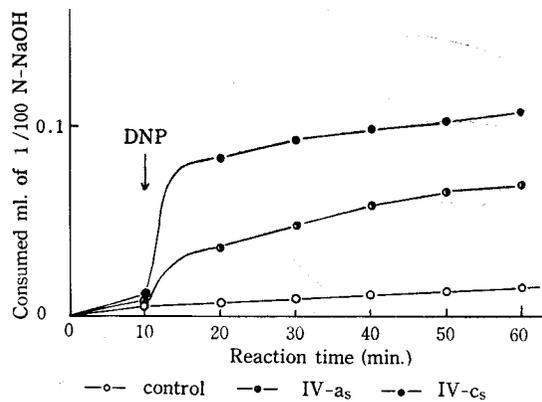


Fig. 2 Reaction of Aminodextran with 2, 4-Dinitrofluorobenzene. Aminodextran was resolved in water and methyl alcohol mixture (4: 1), which was allowed to react with 2, 4-dinitrofluorobenzene at pH 7.5 and 30°C using pH stat. Hydrogen fluoride liberated by the reaction was titrated with 1/100 normal sodium hydroxide spontaneously.

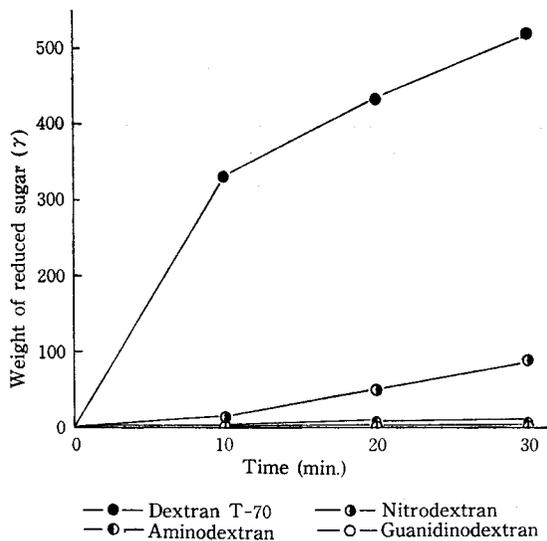


Fig. 3 Reduced Sugar produced by Dextranase from Dextran T-70 and its Derivatives. The reactions were carried out for 30 min. at 50°C in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) and the sugar liberated was measured by use of 3, 5-dinitrosalicylic acid method.

4) Aminodextran のコロイド滴定

モデル実験の試料として、IV-c₀を正のコロイドとした。負のコロイドは和光純薬製の0.025規定の potassium polyvinyl sulfate (1/400 N PVS-K と略記) $f=1.02$ を用いた。コロイド滴定の終点は反応液中の指示薬 toluidine blue が青色から赤色に変色し、正負のコロイドが凝集する点とした。

i) コロイド滴定に及ぼす温度の影響

IV-c₀ 103.5 mg に 200 ml の蒸留水と 10 ml の 1 規定酢酸を加え、30°C に加温して溶解し

た後放冷して正のコロイド溶液を作った。各々 21 ml ずつをビーカーにとり, 15°C から 55°C まで負のコロイドで滴定した。その結果を Fig. 4 に示す。

ii) コロイド滴定に及ぼす中性塩の影響

IV-c₀ 約 30 mg に 10 ml の蒸留水, 1 ml の 1 規定酢酸を加え, 30°C で溶解した。この 3 ml を採取し, 1 M 塩化ナトリウム溶液を加えて各濃度の中性塩溶液とし, コロイド滴定した。この結果を Fig. 5 に示す。

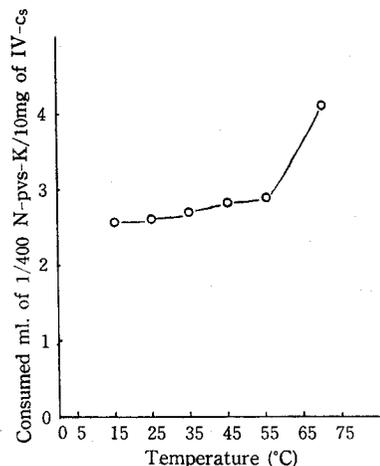


Fig. 4 Effect of temperature in colloidal titration of Aminodextran. The colloidal titration was carried out by use of 1/400 N-potassium polyvinyl sulfate as an anionic colloid and toluidine blue as an indicator respectively.

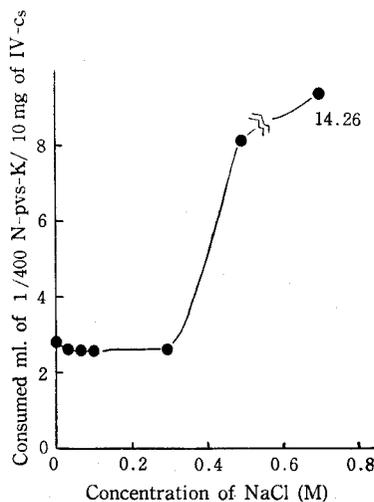


Fig. 5 Effect of sodium chloride in colloidal titration of Aminodextran. The reaction was carried out at 25°C. Other experimental conditions were the same as shown in Fig. 4.

iii) Equivalent molecular weight (EW 値) の算出²⁾

IV-c₀ 約 30 mg に 10 ml の蒸留水, 1 ml の 1 規定酢酸を加え, 30°C で溶解した。これを 0.025 規定 PVS-K (f=1.02) で滴定して, 10.0 ml を用した。この 10 倍量のスケールで同じ滴定を行い, 凝集沈殿物をガラスフィルターでろ過し, 105°C で乾燥して, 178.1 mg を得た。

計算

1/400 N PVS-K (f=1.02) 1 ml 中の PVS の重量;

$$(162-39) \div (400 \times 1.000 \times 0.93) \times 1.02 = 0.34 (\text{mg/ml})$$

$$\text{ただし} \left(\begin{array}{l} 162; \text{PVS-K の分子量} \quad 39; \text{K の分子量} \\ 0.93; \text{PVS-K の純度} \end{array} \right)$$

沈殿物中の aminodextran 量;

$$178.1 - 34.0 = 144.1 (\text{mg})$$

したがって IV-c₀ の EW = 144.1 × 400 ÷ 100 = 576.4 同様にして, 還元法の異なる aminodextran の EW 値を求め Table 2 に示す。

5) Aminodextran と RNA との complex

パン酵母から得た RNA のカリウム塩 (y-RNA-K) 49.81 mg を 60 ml の蒸留水に溶かし, その 10 ml を採取した。別に IV-c₀ を 6.57 mg 秤量し, さらに 10 ml の蒸留水, 1 ml の 1 規

Table 2 Equivalent Molecular Weight of Aminodextran obtained by various reducing Reagents calculated from colloidal Titration with 1/400 N-Potassium polyvinyl sulfate at 25°C.

Sample Number	E W
IV-a _s	1,236
IV-b _s	784
IV-c _s	576
IV-d _s	719

Table 3 Combining Ratio of Aminodextran with γ -RNA-K calculated from the Weight of Complex precipitated after mixing colloidal Aminodextran with RNA-K from Yeast in Water.

Sample Number	Ratio (AD/RNA) (w/w)
IV-a _s	1/0.81
IV-b _s	1/0.28
IV-c _s	1/1.26
IV-d _s	1/0.74

定酢酸を加えて溶解した。両者を混合して、生じた沈殿を遠心分離し、105°C で乾燥して、13.00 mg を得た。また上澄の A 260 nm とコントロールのそれとの差から、沈殿物中の RNA 量を算出した。こうして求めた aminodextran と RNA との結合比を Table 3 に示す。

またこれら complex 中の RNA が RNAase に対し抵抗性を示すかどうか橋部の報告¹⁰⁾ に従って行った。その結果、すべての complex は pancreatic RNAase に対し分解された。

考 察

Nitrodextran のニトロ基を還元するのに用いたこの反応の特徴は、プロトン源として乾燥エチルアルコールを使用した場合に得られた aminodextran はすべて水溶性であったが、塩化アンモニウムを用いた場合に得られた生成物の約半量が水に不溶性となり、水溶性の aminodextran は半減したことである。この原因の一つには、アンモニアを室温で除去した後、前者の場合は生成物が溶液状のまま中和、透析、ろ過、凍結乾燥の手順で生成物を得る。しかし、後者の場合には一度固型状となった反応物を中和後、前者同様にして生成物を得るからであると考えられる。しかし、前者の方法では分子量の減少をきたし、収率が後者の方法にくらべて悪いので、後者の方法がより適切であると判断した。また、従来の方法で得た IV-a_s および改良合成法により得た IV-c_s のコロイド滴定法により求めた EW (IV-a_s; 1236, IV-c_s; 576) から計算すると、等重量当りのアミノ基含有比は $IV-c_s/IV-a_s \approx 2.1$ と推定される。このことは、改良合成法による aminodextran、特に、IV-c_s が等重量当りのアミノ基含量、水可溶性、収率などの点から最適であると考えられる。なお IV-c_s の DNP 誘導体のメタノリシス生成物の薄層クロマトグラフィ、ペーパークロマトグラフィでは aminodextran を構成する methyl 3-amino-3-deoxy-hexopyranoside の DNP 誘導体を分離することはできなかった。

Dextranase による nitrodextran の酵素分解溶液から、原料 Dextran T-70 の酵素分解還元糖総量の約15%の還元糖を検出した。すでに第 I 報で報告した過ヨウ素酸酸化反応において、1 グルコース残基当り、過ヨウ素酸消費量1.87モル、ギ酸生成量0.857モル、ホルムアルデヒド生成量0.857モルであった³⁾。この値から計算された α -(1-6)-glucoside 結合量は86%であるから、残りの約14%が α -(1-3)-glucoside 結合であると推定される。この枝分れの部位の glucoside 結合が dextranase により分解されたと考えると両者の値はよく一致する。

コロイド滴定に及ぼす諸条件の検討により、滴定に通常用いられる 15°C から 35°C までの滴定範囲での誤差は 2% 以内であることがわかった。また、塩化ナトリウムの濃度は 0~0.3 M までは一定の滴定値を与えたが、それ以上の濃度では大きな値を与えた。これは高分子

Aminodextran に関する研究 (Ⅲ). Aminodextran の改良合成とその高分子的挙動 (三好・前川)

電解質である aminodextran の力価が変化したからである。従って、中性塩の影響を避けるためには透析を充分行うことが必要である。コロイド滴定により求めた EW 値は理論値161よりかなり大きな値であった。IV-c₈ の EW 値576の場合、aminodextran を構成する糖残基の3分の1が 3-amino-3-deoxy-hexopyranose であると推定される。また平均分子量は約10,000であるから、IV-c₈ は糖残基約50からなる塩基性多糖であると計算される。

DEAE-Dextran と RNA が complex を作ると RNAase の分解に対して強い抵抗力を持つという報告がある¹¹⁾。しかし、aminodextran と γ -RNA との complex は RNAase により分解された。なお、aminodextran と γ -RNA との complex 形成比 (IV-c₈/IV-a₈≒1.6) と DNP 化の度合い (IV-c₈/IV-a₈≒1.7) はよく一致し、さらに、この complex 形成比と EW 値の逆数比 (IV-c₈/IV-a₈≒2.1) もかなりの一致をみた。また、この complex はマウス Ehrlich 腹水がん細胞の移植を阻止した³⁾。

参 考 文 献

- 1) A. J. Birch and H. Smith; *Quart Rev.*, **12** 17(1958)
- 2) 千手諒一; *和光純薬時報*, **37** 4 (1968)
- 3) K. Maekawa, Y. Miyoshi and K. Tsuru; *Agr. Biol. Chem.*, **40** 1951 (1976) および第 II 報
- 4) R. Mozingo; *Organic Synthesis*, **26** 77 (1958)
R. Adams, V. Voorhees and R. L. Shriver; *Organic Synthesis Coll. Vol II* p. 463 (1968) など多数
- 5) 三好康之; 3-Aminodextran に関する研究 (九州大学農学部農薬研究室報告) p. 25 (1975)
- 6) W. G. Brown; *Organic Reactions II* 471 (1951)
- 7) K. H. Meyer and D. E. Schwatz; *Helv. Chim. Acta*, **33** 1651 (1950)
- 8) 千手諒一; コロイド滴定法 (南江堂) p. 52 (1969)
- 9) 福井作蔵; 還元糖の定量法 (東大出版会) p. 19 (1971)
- 10) 榊部政久; Ehrlich 腹水がん細胞の減力化に関する研究 (愛媛大学農学部生物化学研究室報告) p. 31 (1968)
- 11) H. Liehhaben and K. K. Takemoto; *Virology*, **14** 502 (1961)

(食物栄養学科 助教授)

—昭和 56 年 8 月 28 日 受理—