

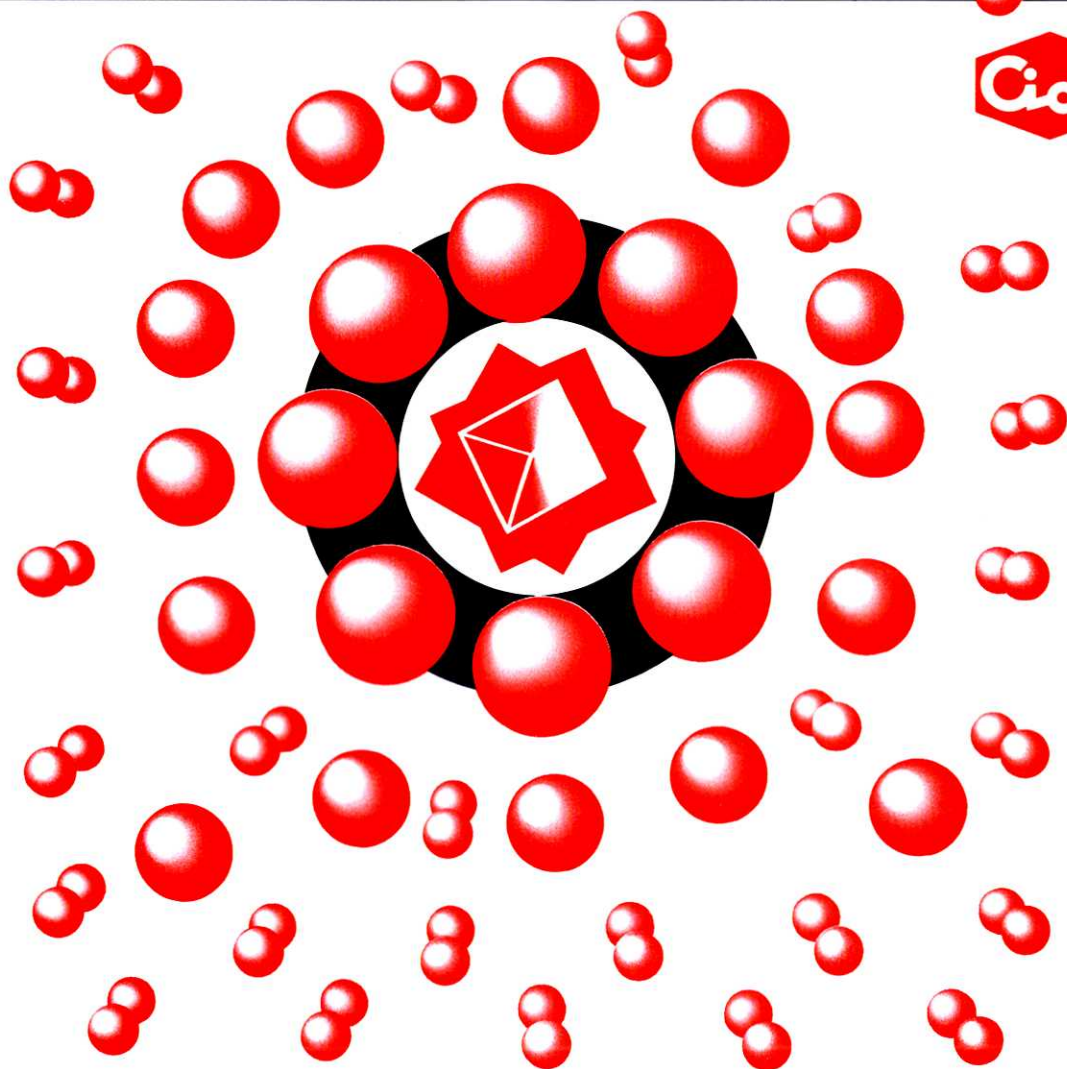
THE

CHEMICAL TIMES

ISSN 0285-2446

KANTO CHEMICAL CO., INC.

2002 No.1 (通巻183号)



目 次

新年を迎えて.....	野澤 俊太郎.....	2
野依分子触媒の最近の進歩.....	村田 邦彦.....	3
	碓屋 隆雄	
遺伝子情報を医薬品へ(その6).....	坂田 恒昭.....	10
バイオ産業振興へー大阪圏の取り組み		
農業分野で簡易分析計をさらに活用へ.....	鈴木 則夫.....	15
II 簡易小型反射式光度計(RQフレックス)を用いた作物・土壌の簡易測定法 その1		
ミルクオリゴ糖(乳中少糖)の比較生化学(VIII).....	齋藤 忠夫.....	20
化学構造的特徴とその利用性	浦島 匡	

編集後記.....		24
-----------	--	----



新年を迎えて

代表取締役社長 野澤 俊太郎

新年あけましておめでとうございます。

ケミカルタイムズの読者の皆様並びにご執筆の先生方には、良いお正月を迎えられたこととお喜び申し上げます。

新世紀を迎えた昨年は、化学、IT(情報関連)、自動車、機械、電気等の産業分野を中心に、“私たちの生活は環境との調和を図りながら、より豊かに、ゆとりのあるものにするという夢”をもった幕開けでありましたが、米国の同時テロ事件の発生及び長引く報復戦争で、世界経済に及ぼす負の影響は図り知れないものがあり、我が国における経済もGDPのマイナス成長予想、景気は「悪化の一途をたどっている」との状況判断が新聞紙上をにぎわし、企業においては雇用・生産調整、事業統合等のリストラが行われており、本年も景気の回復に明るい材料が見当たらない不透明な状況にあります。

しかし、21世紀の幕開けが“化学時代”であることの感動と夢を、全国民にもたらした傑出したニュースが「野依良治名古屋大学教授のノーベル賞受賞」であります。弊社は科学技術振興事業団の「野依分子触媒プロジェクト」の展開事業に参加し、その研究成果である触媒を試薬として製品化し提供致しております。このたびの野依教授の「不斉合成触媒の研究」の多大なる成果と貢献におけるノーベル賞受賞に、敬意と感謝を表し、心からお祝い申し上げます。

一方、このような状況下において、弊社を取り巻く環境はEL関連の不振、試薬における全国随所に散見される価格破壊等と厳しいものがありますが、我が国における半導体産業が衰退することはあり得ず、また試薬関連においても、環境、食品、バイオ、創薬等、今後の展開に期待するところに大きいものがあります。これらの製品化のより一層の充実を図るために、本年3月には草加工場内に溶剤工場が完成いたします。

年頭にあたり、変化の時代に素早く対応できるスピードを絶えず念頭におきながら、皆様のご期待に添える新製品を提供すべく“技術を生かした経営”を推進いたす決意を新たにしております。

今後とも倍旧のご支援、ご鞭達をお願い申し上げます。

皆様方におかれましては、この一年が実り多い年でありますよう祈念し、新年のご挨拶といたします。

野依分子触媒の最近の進歩

関東化学株式会社 技術・開発本部 中央研究所 第一研究室 室長 村田 邦彦
東京工業大学 大学院 理工学研究科 教授 碓屋 隆雄

1. はじめに

野依良治名古屋大学教授が、2001年ノーベル化学賞を受賞されました。昨年度の白川先生に続き、連続受賞の快挙です。野依先生は米国モンサント社のウィリアム・ノールズ博士とともに「不斉触媒による不斉水素化反応」を発見し、不斉触媒技術として確立したことが高く評価されました。「不斉触媒による不斉酸化反応」を発見、展開した米国スクリプス研究所のバリー・シャープレス先生も共同受賞されました。特に、野依先生のノーベル化学賞受賞理由として、不斉触媒反応の概念の発見と2つの画期的な不斉触媒の開発が挙げられています。

野依先生は、1966年に、それまで自然の力でしか造り得なかったキラル物質を、不斉金属触媒により人工的にはじめて合成できることを、不斉銅触媒による不斉シクロプロパン化反応で実証することに成功しております。次いで、1980年初頭にBINAP配位子の合成法を確立して、その不斉配位子をもつロジウムやルテニウム錯体触媒を開発しました。特に不斉ロジウム触媒によるアリルアミン類の不斉異性化を鍵反応とするメントールの工業化技術は世界に誇るわが国の不斉合成技術として高砂香料㈱で稼働しています。さらにこれらの不斉触媒を活用すればオレフィンのみならず種々のカルボニル化合物の不斉水素化が可能となり、光学活性なカルボン酸やアミノ酸さらに光学活性アルコール類の不斉合成の応用範囲が格段に広がりました。

加えて最近、画期的な発見が野依先生が主宰する科学技術振興事業団野依分子触媒プロジェクト(1991~1996)においてなされました。それまで工業化触媒として使われていたルテニウム-BINAP錯体にジアミン配位子を結合させた“第二世代の不斉ルテニウム錯体触媒”の開発であります。この進化型のルテニウム触媒の力量は群を抜いたもので、それまで不斉水素化されにくかった単純な構造のカルボニル化合物から様々な官能基を分子内にもつ複雑なカルボニル化合物までの多くのカルボニル化合物に対してカルボニル基のみが選択的にしかも極めて

高速で不斉水素化されて、対応する光学活性アルコールが高純度で得られます。実際に、これらの野依触媒は多くの医薬品、農薬、香料および液晶材料などの中間体合成に工業的に使われています。

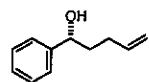
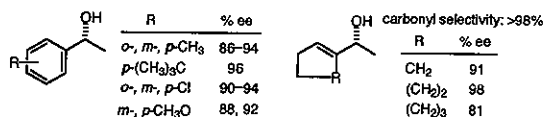
本稿では、野依分子プロジェクトで開発されたケトンの水素化および水素移動型還元触媒の最近の進歩に限って述べます。なお野依触媒に関しては優れた総説にまとめられておりますのでご参照ください。^{1a, 1b, 6i}

2. 水素化触媒の最近の進歩

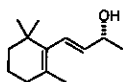
野依分子触媒プロジェクトにおいて、単純ケトン類の水素化触媒として当初BINAPルテニウム錯体と光学活性ジアミンおよび塩基からなる3成分系触媒として開発に成功しております。¹ この3成分系触媒は2-プロパノール中、様々なケトン類を速やかに水素化して、高い光学純度の光学活性アルコールを極めて高い効率で与える優れた力量をもっています。この不斉水素化反応の主な特徴として、以下の点が挙げられます。

- 1) 本触媒はルテニウムホスフィン錯体、1, 2-ジアミンおよび塩基の三成分が必須要素であり、一つでも欠けると100%の能力を発揮できず、特に、1級あるいは2級アミノ基を有するジアミン配位子は高活性発現のために不可欠であります。
- 2) 触媒活性は極めて高く、基質/触媒比 2,400,000 の条件でも高収率で水素化生成物が得られ実用性に優れています。
- 3) 分子内に炭素-炭素不飽和結合をもつケトン基質も、カルボニル選択的に還元されます。
- 4) 種々のアルキル置換環状ケトンの類に対して、高いジアステレオ選択性で反応は進行します。
- 5) アルキルフェニルケトンや種々の置換アセトフェノン類など、多くの基質に対して高いエナンチオ選択性を示すことなど、活性および選択性に優れています。具体的にスキーム1に示すように、単純ケトンはもとより分子内に不飽和結合を有するカルボニル化合物もカルボ

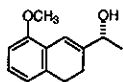
ニル基選択的に水素化され、それぞれ高い光学純度の光学活性アルコールを与えます。



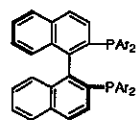
carbonyl selectivity: 90%
90% ee



carbonyl selectivity: >99%
92% ee



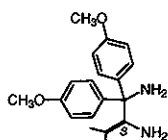
carbonyl selectivity: >99%
94% ee



Ar = C₆H₅: (S)-BINAP



(S,S)-DPEN



(S)-DAIPEN

Ru cat = RuCl₂[(S)-binap](dmf)_n-(S,S)-DPEN or (S)-DAIPEN-KOH (1:1:2)
ketone/Ru = 500, 11-30 °C

スキーム 1

三成分系触媒によるケトンの不斉水素化

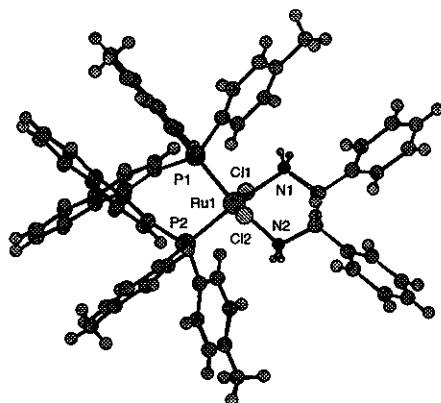
ジアミンとして、光学活性 DPEN (ジフェニルエタンジアミン) や DAIPEN (1,1-ビス(4-メトキシフェニル)-2-イソプロピルエタン-1,2-ジアミン) が用いられます。ケトン基質によっては、ジアミンとジホスフィン配位子の絶対

配置の組み合わせが反応結果に重大な影響を与えます。例えば、(S)-BINAP と (S)-ジアミン (または (R)-BINAP と (R)-ジアミン) の組み合わせが一般に優れていますが、カルボンの反応のように (S)-BINAP と (R)-ジアミン (または (R)-BINAP と (S)-ジアミン) の組み合わせが優れている場合もあります。また、溶媒としては、2-プロパノールが最も高い性能を与えることがわかっております。

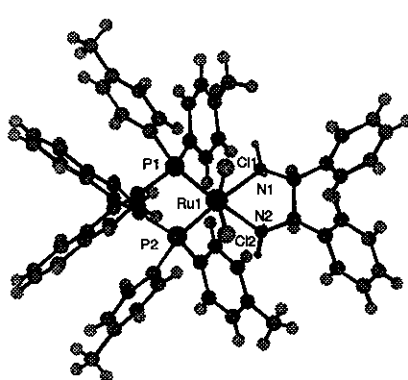
ジホスフィン配位子として BINAP 配位子が最適ですが、DIOP や CHIRAPHOS などの様々なジホスフィン配位子との組み合わせも可能であり、今後のさらなる展開が可能と思われます。^{1f,2}

その後、三成分系触媒は、さらに、操作性に優れた二成分系触媒に進化したしました。すなわち、配位不飽和な BINAP 錯体と DPEN や DAIPEN との反応により両配位子を有するルテニウム二塩化物錯体が収率良く合成できることがわかりました。^{1f,1h} この錯体は空気中でも安定に取扱いできることから反応操作性に優れ、さらに驚異的な触媒活性を発現することが明らかになりました。すなわち、わずか 2.2 mg の RuCl₂[(R)-binap][(R)-daipen] により、48 時間で、601 g のアセトフェノンが完全に水素化され、80% ee の光学活性フェネチルアルコールが定量的に得られます。

(R)-TolBINAP と (R,R)-DPEN および (S,S)-DPEN を配位子とする 2 種のジアステレオマー錯体は、X 線構造解析により図 1 に示すように、2 つの塩素原子がトランスに位置し、TolBINAP と DPEN が同一平面で配位する八面体構造をとっていることがわかります。興味深い



RuCl₂[(R)-tolbinap][(R,R)-dpn]

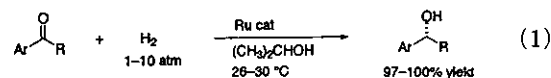


RuCl₂[(R)-tolbinap][(S,S)-dpn]

図 1. RuCl₂(tolbinap)(dpn) 錯体の構造

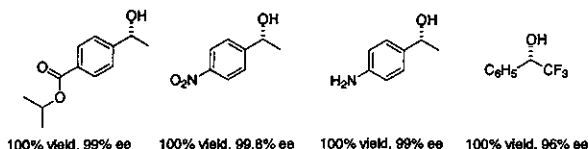
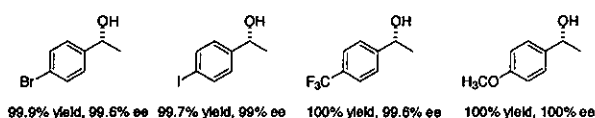
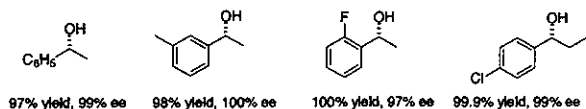
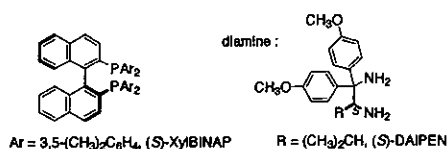
ことに、塩素原子とジアミン窒素上の一方の水素との距離が2.7 Åから2.8 Åと、それぞれのファンデルワールス原子半径から算出される3.0 Åよりも短く、塩素と水素が水素結合していることが示唆されます。

BINAPからToIBINAP、さらにXyIBINAPとジホスフィン配位子の構造を微細調整することにより、触媒機能は一段と向上します。式(1)に示すように、多くの芳香族ケトンの反応が、高速で、かつ高エナンチオ選択的に反応し、99% eeを越える高い光学純度の光学活性アルコールが効率良く得られます。¹¹

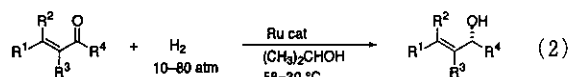


Ar = aromatic group

Ru cat: RuCl₂[(S)-xybinap](diamine)-KOtBu, S/C = 500-100,000



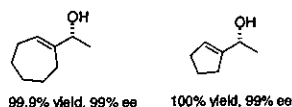
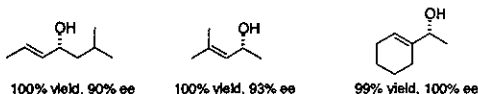
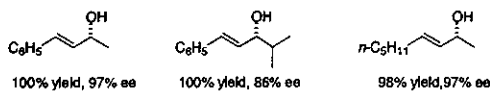
さらに、式(2)に示すように、光学活性アリルアルコールの合成にも応用可能です。例えば、ビタミンE鎖側の鍵中間体である90% eeの(S)-6-メチル-2-ヘプテン-3-オールが収率良く得られます。この反応では炭酸カリウムが塩基として使用できます。これにより、塩基に不安定なエノン、例えば、3-ノナン-2-オンからはほぼ定量的に光学活性アリルアルコールが合成できます。



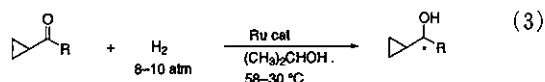
Ru cat: RuCl₂[(S)-xybinap](diamine)-K₂CO₃

diamine: (S)-DAIPEN or (S,S)-1,2-Cyclohexanediamine

S/C = 2000-100,000



二成分系触媒の適用範囲はさらに拡がり、式(3)に示すように、これまで、困難であったシクロプロピルメチルケトン³が円滑に水素化され、95% eeを越える高い光学純度のアルコールが合成できます。



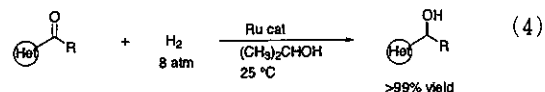
Ru cat: RuCl₂[(S)-xybinap]((S)-daipen)-KOtBu

S/C = 2000-11,000

R = CH₃, 96% yield, 95% ee (R)

C₆H₅, 99.7% yield, 96% ee (R)

加えて、式(4)に示すように、ヘテロ原子を含む芳香族ケトン類の反応により光学活性アルコールが得られるようになりました。¹¹ 特に、2-ピリジルケトンの反応では、配位性の強いピリジル基による触媒失活を防ぐためにホウ酸エステルの添加が効果的です。これらの光学活性アルコールは、生理活性物質のビルディングブロックや不斉配位子として有用な化合物です。

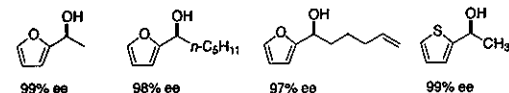


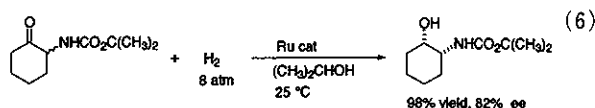
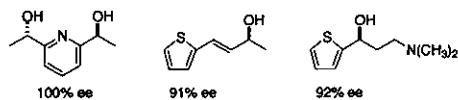
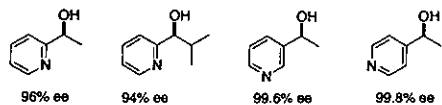
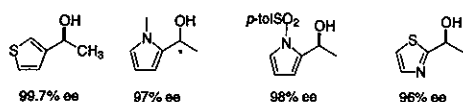
Het = hetero-aromatic ring

Ru cat: RuCl₂[(R)-xybinap]((R)-daipen)-KOtBu

S/C = 2000-40000

>99% yield





Ru cat: $\text{RuCl}_2[(R)\text{-xytlbinap}][(S)\text{-1,2-cyclohexanediamine}]\text{-KOtBu}$

この反応を利用して、 β 1レセプター拮抗剤である (*R*)-デノパミン、抗うつ剤である (*R*)-フルオキシセチンや向精神薬である BMS 181000 が効率的に合成可能であります。

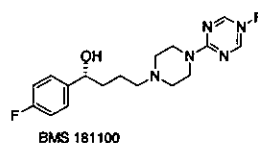
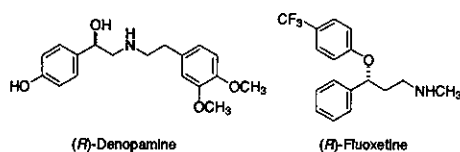
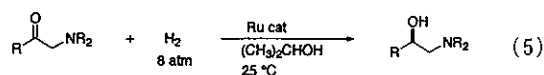
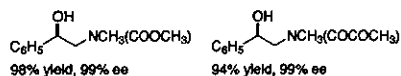
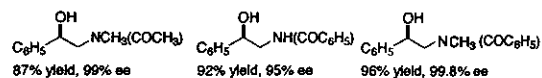
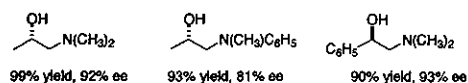


図2. 合成可能な光学活性アミノアルコール骨格をもつ医薬品の例



Ru cat: $\text{RuCl}_2[(R)\text{-xytlbinap}][(R)\text{-daipen}]\text{-KOtBu}$
 SC = 1000–2000



また、式(6)に示すように、ラセミ体の2-アミノシクロヘキサノンの反応は、動的速度論分割を伴って進行し、光学活性アミノアルコールを98%収率で与えることがわかります。

このように光学活性ジホスフィンとジアミンを配位子を有するルテニウム錯体は、ケトン類の優れた不斉水素化触媒となります。単純ケトン類から官能基をもつケトン類まで幅広いケトン類が効率良く水素化され、高い光学純度の光学活性アルコールが合成できます。

本触媒系の最も重要な特長は、高い触媒活性をもつ点にあります。その要因の一つとして、金属/NH基の酸・塩基複合効果による基質や水素分子の高効率的な活性化が考えられています。触媒活性種と推定されるジヒドリド錯体が配位飽和錯体であるため、基質は直接金属に配位することなく活性化されます。

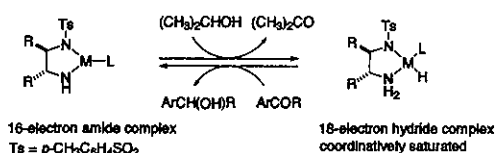
現在、多くの研究者により触媒の活性種の研究が進められています。触媒活性発現のためには、光学活性ジホスフィンとジアミンを配位子とする二塩化ルテニウムに対して、少なくとも2モル量の塩基が必要です。Morrisらは、単離したジホスフィンをもつルテニウムジヒドリド錯体とジアミンが、塩基の存在無しに触媒活性をもつことを報告しており、類似の錯体の構造を明確にしています。⁴ これらの実験事実は、ジヒドリド錯体が活性種であることを示しています。さらに、高い基質/触媒比で反応するためには過剰の塩基を使用する必要がありましたが、¹¹ 最近、塩基の役割に関する新たな説明がなされています。⁵

すなわち、塩基中のカチオン種、特にカリウムカチオンがルイス酸として水素の活性化やルテニウム中心からケトンへの水素の移動に関与している可能性が示されています。引き続き、反応機構の解明のために幅広い研究が必要と思われます。

最近、触媒の固定化を行い、触媒回収、触媒再利用の試みもなされています。すなわち、ポリスチレンビーズに固定化された BINAP 配位子にルテニウムベンゼン錯体、光学活性ジフェニルエタンジアミンを反応させることで調製した固定化触媒は、2-プロパノールと DMF の混合溶媒中、均一系の水素化触媒に匹敵する高いエナンチオ選択性を保ちつつ、高収率で生成物を与えます。^{1p} 1-アセトナフトンの反応では、14回の繰り返しでも、エナンチオ選択性や反応性の顕著な低下がないことが示されています。

3. 水素移動型不斉還元触媒の最近の進歩

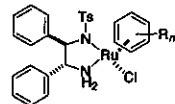
野依分子触媒プロジェクトでは、ケトン類の不斉水素化触媒とともに、非常に効率的なケトンの不斉還元触媒の開発にも成功しました。⁶ スキーム2に示すように、アレーンとトシルジアミンを配位子とするルテニウム錯体がケトンやイミン類の水素移動型還元触媒として実用性に優れていることを見いだしています。詳細な錯体化学的検討により、触媒前駆体であるクロロ錯体が塩基の作用により触媒活性種であるアミド錯体に変換されることが明らかにされています。^{6f}



catalyst:



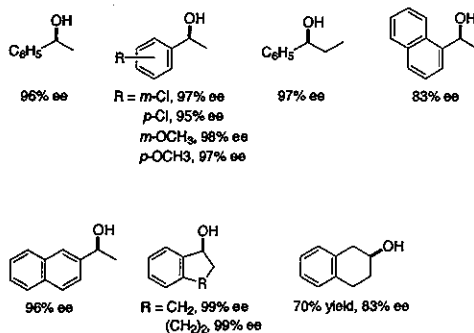
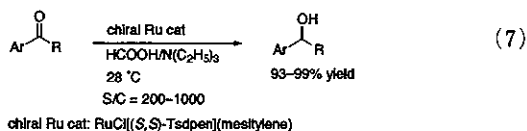
catalyst precursor:



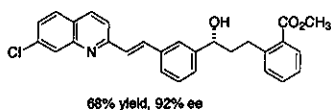
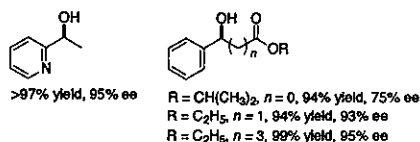
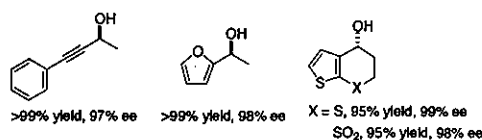
スキーム2

不斉水素移動型還元触媒およびその触媒前駆体

アミド錯体は水素源であるアルコールやギ酸と反応してヒドリド錯体を与え、このヒドリド錯体がカルボニル化合物へ水素を与えることで触媒サイクルが完成します。アミド錯体とヒドリド錯体のみが、サイクルに関与し、水素のやりとりをケトン基質および水素源と速やかに行うことが、高い触媒効率の理由であると推定されています。水素源として2-プロパノール以外にギ酸/トリエチルアミン混合物を利用できることがわかってからは、実用的な触媒系として大きな注目を集めております。水素ガスを利用する上述の水素化触媒と相補的に用いることによって、不斉還元可能なカルボニル化合物の種類は、いっそう拡大されました。式(7)に水素移動型還元反応例を示します。多くの芳香族ケトン類の反応で、高い触媒活性と高いエナンチオ選択性が実現されています。



この水素移動型還元触媒の特徴は、単純ケトンのみならず、官能基をもつケトン基質の反応に有効なことです。⁶⁻¹¹ 触媒活性種が、配位飽和なヒドリド錯体であることから、水素化触媒と同様に、隣接官能基の影響を受けずに反応が進行します。実際に、スキーム3に示すように分子内に炭素-炭素多重結合やヘテロ原子を含む官能基を持つケトン類の反応も、官能基を損なうことなく効率的に進行し、高い光学純度の光学活性アルコールを与えます。アセチレンケトンの反応により、97% ee のアセチレンアルコールが高い収率で得られます。また、フラン環やチオフェン環を持つケトン類の反応も良好に進行し、高い光学純度のアルコールを与えます。この反応は、分子内にピリ

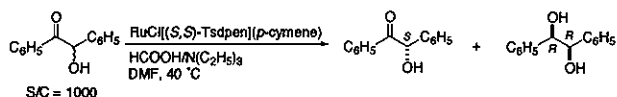


スキーム 3

官能基をもつケトン類の反応

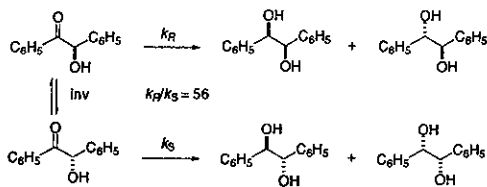
ジル基、炭素-炭素二重結合およびエステル基などの複数の官能基を持つケトンの反応に応用され、カルボニル基のみが選択的に還元され、例えば carbonic anhydrase inhibitor, MK-0417 の鍵中間体が合成できます。配位性の強い 2-ピリジルケトンの反応も円滑に進行して、95% ee の光学活性ピリジルアルコールが高い収率で得られます。この際も、ルテニウムが、ピリジン上の窒素と相互作用しないで反応が進行します。

最近、この触媒系を利用した光学活性ヒドロベンゾインの実用的な合成方法の開発に成功しております。^{7b} 1, 2-ジアリール-1, 2-ジケトン (ベンジル) はギ酸/トリエチルアミン中、不斉ルテニウム触媒の存在下に、効率よく還元されて高い光学純度の光学活性ヒドロベンゾインをほぼ定量的に与えます。この反応において、ラセミ体のベンゾインからも光学活性ヒドロベンゾインが定量的に得られることから、反応がベンゾインの動的速度論分割をともなっていることが示唆されます。基質/触媒比 2000 の条件でも合成可能です。シャープレスのジヒドロキシ化法に匹敵する不斉還元法による実用的な光学活性ヒドロベンゾインの合成法と言えます (スキーム 4)。



time, h	yield, %	ee, %	yield, %	dr:meso	ee, %
0.25	96	0	4.0	98.2:1.8	100
24	<1.0	4.4	>99	98.1:1.9	100

chiral Ru cat: 0.005 mmol, HCOOH/N(C₂H₅)₃ = 3.1/2.6, 0.95 M in DMF.



スキーム 4

4. 結びに

以上述べたように野依分子触媒において開発された触媒は、現在多くの実用プロセスで用いられ、あるいは利用を検討されております。

野依分子触媒は、先生の卓越した触媒設計における直感力と洞察力と、反応の本質を見極める鋭い眼力と論理的な思

考力によって生み出されたアイデアをもとに、たぐい希な根性と実験技量を兼ね備えた優秀な共同研究者によって創り出されたものと言えます。先生が金属アミド錯体を鍵とする有機金属化学や触媒化学が極めて重要になるであろうと予言されたことが、進化型野依触媒の発見によって具現化されたわけであり、ノーベル賞受賞の業

績の一つとして高く評価されたことは、プロジェクトに関わった筆者らにとっても望外の喜びでもあります。

「応用研究者は優れた基礎化学者でもあれ」との野依先生の教えは、本稿において紹介した最近の野依触媒の進化を振り返っても随所に現れております。触媒の活用はもとより、先生の著書論文の背景にある研究への高邁な理念を読みとるのも面白いと思われまします。現在、わが国の不斉合成研究者のレベルと意気は非常に高いものがあります。野依触媒に次ぐ実用に優れた触媒が次々と生まれるものと確信しています。そしてノーベル賞受賞者も。

5. 関連文献

- 1) (a) Ohkuma, T.; Ooka, H.; Hashiguchi, S.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2675-2676.
- (b) Ohkuma, T.; Ooka, H.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10417-10418. (c) Ohkuma, T.; Yamakawa, M.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4872-4873.
- (d) Ohkuma, T.; Ikehira, H.; Ikariya, T.; Noyori, R. *Synlett* **1997**, 467-468. (e) Ohkuma, T.; Doucet, H.; Pham, T.; Mikami, K.; Korenaga, T.; Terada, M.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1086-1087. (f) Doucet, H.; Ohkuma, T.; Murata, K.; Yokozawa, T.; Kozawa, M.; Katayama, E.; England, A. F.; Ikariya, T.; Noyori, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1703-1707. (g) Ohkuma, T.; Doucet, H.; Pham, T.; Mikami, K.; Korenaga, T.; Terada, M.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1086-1087. (h) Ohkuma, T.; Koizumi, M.; Doucet, H.; Pham, T.; Kozawa, M.; Murata, K.; Katayama, E.; Yokozawa, T.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13529-13530. (i) Noyori, R.; Ohkuma, T. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1493-1501.
- (j) Ohkuma, T.; Koizumi, M.; Ikehira, H.; Yokozawa, T.; Noyori, R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 659-662. (k) Ohkuma, T.; Ishii, D.; Takeno, H.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6510-6511. (l) Ohkuma, T.; Koizumi, M.; Yoshida, M.; Noyori, R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1749-1751. (m) Mikami, K.; Korenaga, T.; Ohkuma, T.; Noyori, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3707-3710. (n) Noyori, R.; Ohkuma, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 40-73. (o) Noyori, R.; Koizumi, M.; Ishii, D.; Ohkuma, T. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 227-232. (p) Ohkuma, T.; Takeno, H.; Honda, Y.; Noyori, R. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 369-375.
- 2) Burk, M. J.; Hems, W.; Herzberg, D.; Malan, C.; Zanotti-Gerosa, A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4173-4176.
- 3) Jiang, Q.; Jiang, Y.; Xiao, D.; Cao, P.; Zhang, X. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1100-1103.
- 4) (a) Abdur-Rashid, K.; Lough, A. J.; Morris, R. H. *Organometallics*, **2000**, *19*, 2655-2657. (b) Abdur-Rashid, K.; Lough, A. J.; Morris, R. H. *Organometallics*, **2001**, *20*, 1047-1049. (c) Abdur-Rashid, K.; Faatz, M.; Lough, A. J.; Morris, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7473-7474.
- 5) Hartmann, R.; Chen, P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3581-3854.
- 6) (a) Hashiguchi, S.; Fujii, A.; Takehara, J.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7562-7563.
- (b) Takehara, J.; Hashiguchi, S.; Fujii, A.; Inoue, S.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, 233-234.
- (c) Gao, J.-X.; Ikariya, T.; Noyori, R. *Organometallics* **1996**, *15*, 1087-1089. (d) Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Uematsu, N.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2521-2522. (e) Uematsu, N.; Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4916-4917. (f) Haack, K.-J.; Hashiguchi, S.; Fujii, A.; Ikariya, A.; Noyori, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 285-288. (g) Hashiguchi, S.; Fujii, A.; Haack, K.-J.; Matsumura, K.; Ikariya, T.; Noyori, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 288-290.
- (h) Matsumura, K.; Hashiguchi, S.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8738-8739. (i) Noyori, R.; Hashiguchi, S. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 97-102.
- (j) Yamakawa, M.; Ito, H.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1466-1478. (k) Yamada, I.; Noyori, R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3425-3427. (l) Noyori, R.; Yamakawa, M.; Hashiguchi, S. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7931-7944.
- 7) (a) Murata, K.; Ikariya, T.; Noyori, R. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2186-2087. (b) Murata, K.; Okano, K.; Miyagi, M.; Iwane, H.; Noyori, R.; Ikariya, T. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1119-1121.
- (c) Okano, K.; Murata, K.; Ikariya, T. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9277-9280. (d) Koike, T.; Murata, K.; Ikariya, T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3833-3836. (e) Watanabe, M.; Murata, K.; Ikariya, T. submitted for publication.
- 8) (a) Kanada, R. M.; Taniguchi, T.; Ogasawara, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1998**, 1755-1756. (b) Iura, Y.; Sugahara, T.; Ogasawara, K. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5735-5738.
- 9) Palmer, M. J.; Wills, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2045-2061.
- 10) (a) Alonso, D. A.; Brandt, P.; Nordin, S. J. M.; Andersson, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9580-9588.
- 11) Casey, C. P.; Singer, S. W.; Powell, D. R.; Hayashi, R. K.; Kavana, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1090-1100.

遺伝子情報を医薬品へ(その6)

バイオ産業振興へー大阪圏の取り組み

塩野義製薬(株) 創薬研究所 主管研究員 坂田 恒 昭

本年8月下旬に、小泉内閣の都市再生本部(本部長・小泉純一郎首相)は2002年度から予算化する都市再生プロジェクトの第二次案をまとめた。その5つのプロジェクトの一つとして、大阪圏におけるライフサイエンスの国際拠点形成があげられた。これは具体的には大阪北部地域を医薬品の基礎研究と創薬産業、神戸地域を再生医療の基礎・臨床研究と先端医療の集積地として形成すること。また、集積拠点が連携協力できるよう、産学官連携による推進体制の整備、大学と各研究機関を高速大容量の通信回線で結ぶ情報ネットワークの構築である。ここではこのうち目玉の一つである大阪での取り組みを述べる。なお本稿を書くにあたって大阪商工会議所(大商)産業部次長 ベンチャー振興室長 児玉 達樹氏および同部 廣兼 順子氏には多大なご協力を得た。

6.1 大阪圏(大商を事務局として)が推進する 2プロジェクト

大商は、関西のバイオ分野の集積を活かして、関西の、ひいては日本の産業活性化を図ろうと、バイオビジネスコンペ JAPAN およびバイオ情報ハイウェイ構想という2つのバイオ産業振興事業に取り組んでいる。

6.2 バイオビジネスコンペ JAPAN

昨年6月、米国のベンチャーがゲノム情報の解読を終えたとの発表を行った。このニュースはわが国のマスコミでも大きく取り上げられ、わが国のゲノム研究、バイオ研究は遅れているのではないかと、ビジネスのネタになるバイオ研究は米国にしかないのではないかとといった懸念が産業界に広がった。

果たして、わが国にはビジネスにつながるバイオの研究シーズはないのか。こうした疑問を検証しようと、「バイオビジネスコンペ JAPAN」は開催されることになった。

6.2.1 応募案件からビジネス立ち上げを目指す

コンペは、①応募のあった大学や研究機関の研究シ-

ーズに基づくベンチャーの立ち上げ、②製薬会社への技術移転を目的とする。対象分野は、

- ① バイオメディカル(医薬品、医療機器など)。
- ② バイオサイエンス(遺伝子、たんぱく質、バイオインフォマティクスなど)。
- ③ アグリバイオ(微生物、遺伝子組換作物など)。

応募者は、法人、個人いずれでもよく、国公立大学、研究機関、企業、および研究者に応募を呼びかけることになった。その際、研究者からビジネスになりそうな研究成果をできるだけ多く応募してもらうため、最優秀(2件)には500万円、優秀(5件)には100万円の賞金を出すことにした。

主催は、大商、大阪府等10団体で組織する実行委員会(委員長:大野隆夫大商専務理事)(注1)。大阪大学、国立循環器病センター等の後援(注2)と、ライフサイエンス企業やベンチャーキャピタル、証券会社28社の協賛(注3)を得た。

6.2.2 応募56件、ビジネス化見える案件多い

昨年9月15日から研究シーズに基づくビジネスプランを募集。11月末に締切ったところ、全国各地と米国の大学、研究機関、企業等から56件の応募があった。(注4)

12月4日に書類審査を行い14件に絞ったが、落選したものの中にもビジネスにつながりそうなものが15件あり、これらは次点とした。書類審査を通過した案件のうちの1件は、事業の根幹に関わる反証データが出たため辞退。残り13件が、12月26日に協賛者を前にした事前発表会(ビジネスプラン発表会)へと進んだ。

事前発表会で本選に残る7件が選ばれたが、発表した13件はすべて協賛者が自由にアプローチして商談してよく、事前発表会以降約3ヶ月にわたって活発に商談が展開された。

6.2.3 最優秀、優秀案件とも続々ベンチャー設立へ

本選審査会(審査委員長:岸本忠三大阪大学総長)が4月17日に開催され、事業化の可能性を重点に科学性、新規性も加味しながら選考した結果、最優秀2件、優秀

5件が選ばれた。(注5)

これら7件のうち、最優秀の遠山阪大教授の案件は製薬会社に技術移転が進み、多比良東大教授の案件は製薬会社と研究開発ベンチャーを7月に立ち上げた。優秀の野田関西化学機械製作社長と福田神大教授の案件は7月、高田京都薬大教授の案件は8月、石川東工大教授の案件は年内にベンチャーが立ち上がる。中村阪大教授、審良阪大教授の案件もそれぞれベンチャー起業、技術移転を目指している。

こうした成果を踏まえ、大野実行委員長は「コンペから、多くのベンチャー起業や技術移転に結びついたことは、予想以上の成果だ。日本にもビジネスに結びつくバイオ分野の研究シーズが多くあるのが確認できた。今年度も引き続き第2回を開催する。コンペが、日本のバイオベンチャーを育成、バイオ産業の振興の一助になればと願っている。また、バイオベンチャー起業に必要なウエットラボ等は、大阪府等の自治体に整備を働きかけたい」と語っている。

なお、最優秀、優秀の7件以外の案件の商談進捗状況は、現在事務局で調査を進めている。

注1. バイオビジネスコンペ JAPAN 実行委員会は、大阪府、大阪商工会議所、(社)関西経済連合会、(社)大阪工業会、大阪証券取引所、(財)大阪科学技術センター、(財)千里ライフサイエンス振興財団、大阪医薬品協会、彩都建設推進協議会、国際文化公園都市(株)で構成。

注2. 後援は、大阪大学、大阪府立大学、国立循環器病センター、近畿経済産業局、産業技術総合研究所、近畿バイオインダストリー振興会議、大阪バイオサイエンス研究所。いずれも順不動。

注3. 協賛は、伊藤忠商事(株)、エース証券(株)、エンゼル証券(株)、大阪中小企業投資育成(株)、大塚製薬(株)、小野薬品工業(株)、塩野義製薬(株)、シスメックス(株)、新光証券(株)、スターフューチャーズ証券(株)、住友化学工業(株)、住友商事グループ(住商ファーマインターナショナル(株)・住商バイオサイエンス(株))、大日本製薬(株)、武田薬品工業(株)、田辺製薬(株)、(株)あおぞら銀行、日本新薬(株)、日本たばこ産業(株)、日本ベンチャーキャピタル(株)、野村證券(株)、(株)バイオフロンティア パートナーズ、(株)ビストナー、富士銀キャピタル(株)、藤沢薬品工業(株)、丸紅(株)、山之内製薬(株)、(株)リクルート、ライフサイエンス投資事業組合(MBLベンチャーキャピタル(株)・(株)レクメド)の28社。

注4. 応募案件56件の内訳 ●大学26、企業13、その他17 ●北海道2、関東18、中部2、関西27、四国3、九

州2、米国2 ●応募分野 バイオメディカル31、バイオサイエンス23、アグリバイオ6。

注5. <最優秀賞>「孤発性アルツハイマー病の早期診断法、治療法の開発」大阪大学大学院機能形態学講座(解剖学第二)教授 遠山正彌氏。「新規RNA-プロテインハイブリッド型高機能リボザイムライブラリーを用いた新規機能遺伝子探索法(ジーンディスカバリーシステム)の開発」東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻 教授 多比良和誠氏。<優秀賞>「細菌DNAによる免疫賦活作用を利用した新規な抗アレルギー剤及び癌免疫療法剤の開発」大阪大学微生物病研究所 癌抑制遺伝子分野 教授 審良静男氏。「癌浸潤・転移・血管新生阻止分子NK4/マリグノスタチンの製薬化」大阪大学大学院医学系研究科 バイオメディカル教育研究センター 腫瘍生化学 教授 中村敏一氏。「遺伝子組換え蛋白薬デリバリー用アシンメトリー・ミリ、マイクロ・カプセル」京都薬科大学・薬学部・薬物動態学教室 教授 高田寛治氏。「薬物輸送機構に基づく創薬分子デザインABC-HTS 戦略:大量スクリーニングとそのデータベース及び解析プログラムの開発」東京工業大学大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻 教授 石川智久氏。「未利用のバイオマスからのエネルギー生産を、最新の遺伝子操作で菌体の改造、酵素の探索など有機的に活かすプロセスを開発する。バイオ_エナジー.Com」関西化学機械製作(株) 野田秀夫氏・神戸大学 教授 福田秀樹氏。

6.3 バイオ情報ハイウェイ構想

6.3.1 なぜ今バイオに取組むことが必要か

生活習慣病、老人性疾患激減が国家的課題

食生活の欧米化にともない、わが国でも生活習慣病、老人性疾患が急激に増えている。生活習慣病、老人性疾患は今後も増大することが予測され、わが国の医療保険の大きな圧迫要因となることが懸念される。

生活習慣病、老人性疾患の激減は、国民の健康福祉を増進させる上で重要な課題である。生活習慣病、老人性疾患激減には、国民一人一人の生活、とくに食生活の改善が必要なことはいまでもないが、画期的新薬及び治療法の確立も待望されるところである。

6.3.2 欧米に勝つバイオビジネスの振興

生活習慣病、老人性疾患の画期的治療法を目指して遺伝子・細胞治療、ゲノム創薬等のポストゲノムが注目を集めている。こうした画期的新薬及び新たな治療法の開発は、生活習慣病、老人性疾患の患者数の多さから、大

きな市場を持つものと思われ、欧米では大手製薬会社はもちろんのこと、ベンチャービジネスも開発競争に参戦している。

生活習慣病、老人性疾患の新たな治療法の特許を外国に取られると、わが国でそうした治療を行う度に、膨大な特許料を医療保険から支払うことになる。わが国でも生活習慣病、老人性疾患の画期的新薬や新しい治療法の開発に取り組む必要がある。

その際重要なことは、遺伝子・細胞治療やゲノム創薬、SNP技術などの新技術を大学、研究所での研究レベルに止めず、産業化することである。すなわち、生活習慣病、老人性疾患激減には、バイオビジネスの振興が不可欠である。

6.3.3 なぜ関西で取組むのか—研究者、研究機関の集積高く、バイオコンペも主催する関西

動脈硬化、虚血性心疾患、高血圧、慢性関節リウマチ、肥満等の生活習慣病、老人性疾患は、関西に世界でもトップクラスの研究者や研究機関が集積している（例：京都大学、大阪大学、神戸大学、奈良先端大学院大学、国立循環器病センター、民間製薬研究所等）。

遺伝子・細胞治療やゲノム創薬を研究開発する上で必要なくぱく質の立体構造等のデータ収集・解析にも、SPRING 8、生物分子工学研究所 (BERI) 等世界のトップレベルの研究機関がある（図1）。

しかも、関西では先に述べた「バイオビジネスコンペ JAPAN」を実施しており、バイオベンチャー情報も集まりやすい。

6.3.4 バイオ情報ハイウェイとは何か

欧米に負けず生活習慣病、老人性疾患の画期的新薬や新規治療技術（例えば遺伝子・細胞治療やゲノム創薬等ポストゲノム）の研究開発を行い、産業化に結びつけるためには、質、量とも高水準の関西の研究開発集積を有機的に組み合わせ、研究開発から産業化の過程をスピードアップする仕掛けが必要である。

そのためには、

- ①産学官が参加する研究開発コンソーシアム「バイオビジネス・アクセラレータ（仮称）」（以下BA）を立ち上げる。
- ②大容量高速ネットでBAを構成する大学や研究機関、バイオベンチャーを結ぶとともに、個々の大学や研究機関、バイオベンチャーをあたかも1つの仮想研究所のように機能させるデータ処理・解析センター「バイオグリッドセンター」を開設する。
- ③画期的新薬や新規治療法の開発に必要なバイオベンチャーが入居するインキュベーションラボを設置する。

といった取組みが不可欠である（図2）。

6.4 バイオビジネス・アクセラレータ（仮称）

6.4.1 目標設定型、時限的取組み

BAでは、生活習慣病、老人性疾患のうち、例えば動脈硬化・虚血性心疾患、高血圧、慢性間接リウマチ、肥満等の疾患に絞り、5年間にいくつ創薬シーズを見出すかという目標を設定し、研究開発を進める。

6.4.2 産学官が参加する組織

設定目標を達成するために、京都大学、大阪大学、神戸大学、奈良先端大学院大学、国立循環器病センター、SPRING 8、生物分子工学研究所 (BERI)、民間製薬研究所等関連する産学官に、幅広くBAへの参加を呼びかける。

6.4.3 コーディネーターとピアレビューによる研究推進

BAには専任のコーディネーターを配置する。コーディネーターは、画期的新薬や新規治療技術の開発に向けて、各大学、研究所、民間企業およびそれぞれに所属する個々の研究者をコーディネートする。また、研究成果を外から判定し成果主義を維持するためピアレビュー制度を導入する。コーディネーターは、さらに、大学等の研究シーズが本当に商品価値を持っているかを吟味しなければならない、そのためには見極めラボを設置する必要がある。

6.4.4 NPO 法人として設立

BAは、補助金の受け皿、あるいは契約の当事者として法人格を有する必要がある。そこで、設立が比較的容易なNPO法人として組成する。国、自治体、民間企業の拠出により立ち上げ、運営する。当初想定を設置期間5年が過ぎた後、画期的新薬や新規治療技術の産業化という所期の目的に即した実績があがっていれば、以後株式会社化する。

6.5 高速大容量ネットとバイオグリッドセンター

BAに参加する大学、研究所、民間企業が、研究開発のデータをリアルタイムでやり取りし、研究者が意見交換するため、高速、大容量のバイオ情報ハイウェイが必要である。そこで、既存の学術研究用高速、大容量ネットワークのサイネット、あるいはギガビットネットワーク等の活用を図る。

また、例えば個々の大学、研究機関、民間企業が共通のたんぱく質の立体構造の画像を見、チャットで議論を交わし、データベースから別の化合物を取り出してきて画面表示するといったことができれば、関西の研究集積があたかも1つの仮想研究所として機能することができ、こうしたことを実現するためには、個々の大学、研

大阪・関西の保有するポテンシャルを生かしたバイオ情報ハイウェイ構想(フレーム)

事業の背景と目的

〇 背景

- ・ バイオ研究開発の活用による社会的な課題解決
- ・ バイオ産業による都市の活性化と雇用の創出
- ・ 関西圏のバイオ研究開発集積
 - 【京大大学、大阪大学、神戸大学、奈良先端科学技術大学院大学、国立京都国際センター、SPRING8、リサーチ・イノベーションセンター、生物分子工学研究所(BEFO)、形質ライブラリーセンター、バイオ基盤技術研究施設(阪大)等、神戸医歯薬総合研究センター(薬化学研究所等)など】
- ・ 「バイオビジネスコンソーシアムJAPAN」の実施

〇 目的

- ・ 関西圏のバイオ研究開発のポテンシャルを有機的に連携させ、創薬シーズや新治療技術の創出を旨とした研究開発を行い、バイオに関する研究開発から産業育成までの一貫した仕組みを構築
- ・ 創薬、新治療技術の創出、バイオ関連産業の創出
- ・ 大阪・関西の経済活性化による都市の再生と雇用の創出
- ・ 生活習慣病や老人性疾患の予防など社会的課題の解決

我が国の社会構造の改革

事業内容

バイオ情報ハイウェイ構想

基礎研究から応用研究、創薬シーズ・新治療技術の創出までを一貫して行う体制の整備

バイオビジネス・アクセラレータの設置

(NPO法人の設置：【例】大阪商工会議所)
⇒ 組織を越えた様々な連携(大学・公的研究機関・企業研究所など)

設置目的

- ① ガノム及びポストゲノム情報の利用・管理
- ② ガノム及びポストゲノム情報を基盤とした研究技術創出
- ③ 遺伝子産業を支えるバイオクラスターの形成とベンチャー育成

総合調整
(研究、技術移
転、産業支援等)

- (1) 関西バイオ研究開発戦略委員会の設置によるピアレビュー制度の導入 ⇒ 具体的な研究テーマを選定
- (2) コーディネータの設置
⇒ 各プロジェクトごとに専従のコーディネーターを配置

大学・研究機関のネットワーク化による広域連携(バイオ情報ハイウェイ)

- (1) 高速大容量のネットワーク環境の整備
- (2) バイオグリッド・センターの設置
⇒ 情報を解析処理し、双方向作業を行う施設の設置

⇒ ネットワークを活用した共同研究

当面の研究開発テーマ(注)

- 生活習慣病、老人性疾患のうち(社会的要請・関西に主要な研究者の存在)
 - ① 動脈硬化・虚血性心疾患・高血圧
 - ② 慢性関節リウマチ・喘息・アトピー性皮膚炎
 - ③ 肥満・糖尿病
- ⇒ 診断から副作用予測までをシステム化し実施

⇒ 研究成果の移転、事業化

バイオの産業化を加速化・バイオベンチャー創出の機軸

- インキュベーション施設など(新産業支援センター)の整備
⇒ 特許取得等ソフト面の支援を備えた貸しオフィスや貸しラボ、共通機器の設置

(注)・具体的な研究テーマの選定に際しては、原則としてミレニアムプロジェクトとの重複を避けることとしたが、関西にミレニアムプロジェクトの研究センターが置かれる高血圧(国立循環器病センター)と、成人だけでなく、若年者の発症としても克服が望まれる喘息、アトピー性皮膚炎、糖尿病は、国民的課題としてあえてとりあげている。
・バイオビジネス・アクセラレータのプレヤーとして参画している研究者、研究機関の中にも、ミレニアムプロジェクトに参画しているところがある。その理由は、バイオビジネス・アクセラレータに必要なプレヤーを新設するよりも、既に関連テーマを手掛けている研究者、研究機関に参画してもらう方が効率的であるからである。

図 2.

農業分野で簡易分析計をさらに活用へ

II 簡易小型反射式光度計 (RQ フレックス) を用いた 作物・土壌の簡易測定法 その1

静岡県農業試験場 東部園芸分場 鈴木 則 夫

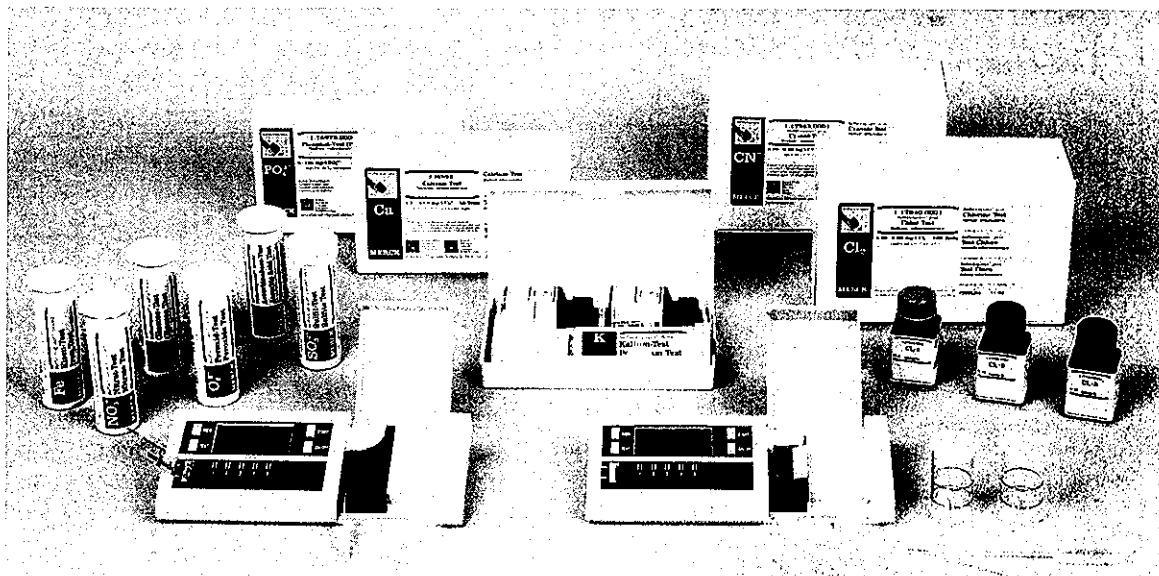


写真1. 小型反射式光度計 (RQ フレックス) の種類 (左が RQ フレックス, 右が RQ フレックスプラス)

近年、土壌や作物体の土壌診断や栄養・品質診断を生産現場で行う方法が脚光を浴びている。その理由はいくつかあるが、一つは生産現場で迅速簡易にかつ専門技術を要しなくても測定可能な機器が開発されてきたことによる。さらに、土壌や作物の栄養状態がすぐに分かることから、養分の過不足に対して直ちに作物に対しての施肥管理対応ができることなどがあげられる。

このような背景から、当県では簡易小型反射式光度計を用いた作物・土壌養分の簡易測定法の実用化を図る目的で、農産業振興奨励会実用化事業「小型反射式光度計システム (RQ フレックス) を用いた作物体・土壌診断技術の開発」の一環として、埼玉県園芸試験場、長野県南信農業試験場、関東化学㈱と協力して取り組んできた。

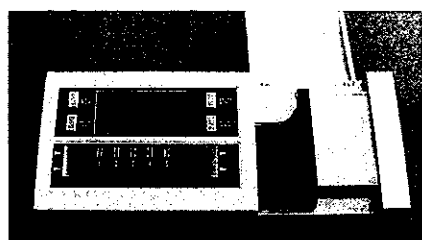
本県でも、当機器は農林事務所や農業団体等に設置されつつあり、使用法や生産現場での使い方の問い合わせが増えている。そこで、前記事業での報告書 (埼玉県園芸試験場山崎晴民氏、長野県南信農業試験場宮下純氏と

共同作成) を基に既存のデータや新たに収集したデータを含めて、当機器を利用した硝酸イオン、リン酸、カリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、ホウ素、ビタミンC (アスピルコン酸) の測定方法や測定事例について記す。

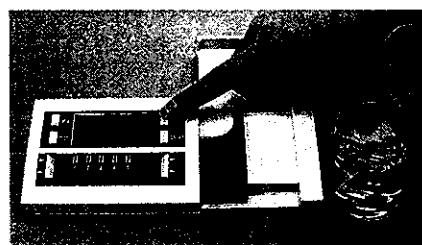
1. 小型反射式光度計とは

写真1のように、市販中の機器は RQ フレックスと RQ フレックスプラスの2種類があり、最近では他にも SQ-NOVA などが開発されている。いずれも、多項目の測定が可能であり、どこにでも持ち運びも可能であり、専門的な分析技術は必要としない。また、測定用試薬キットは30項目以上と多くの種類がすでに市販されており、順次測定可能な項目が増えつつある。測定の基本操作は写真2に示したが、他の項目もこの操作に準じる (詳細は取扱説明書を参照)。

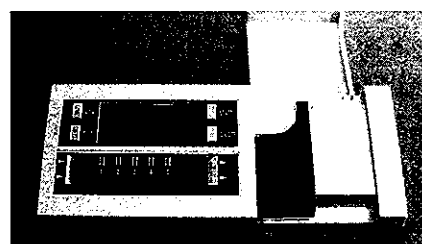
硝酸イオン測定例



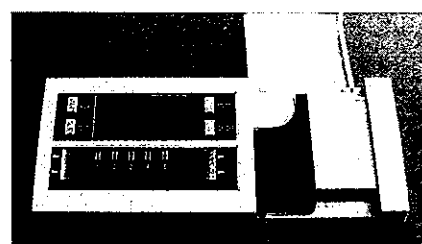
1 バーコードを記憶させる。STARTボタンを押す。反応時間60秒が表示される。



2 試験紙を試料に浸すと同時にもう一度STARTボタンを押す。



3 反応時間終了5秒前を知らせるアラーム音が鳴ったら、試験紙をアダプターにはさみ込む。



4 測定結果が液晶画面に表示される。結果はRQフレックスに自動的に保存される。

写真2. RQフレックスでの測定基本操作

2. 使用方法及び測定事例

(1) 作物・土壌の硝酸イオン診断への応用

ア 作物汁液を用いた診断

(ア) 汁液での従来分析法との比較事例

a トマトの場合

50倍希釈した8月21日採取のトマト葉柄(第2花房直下)汁液中の硝酸イオン濃度は、200ppmを越えるサンプルが多く、蒸留法との比較ではRQフレックス値が高くなる傾向となり相関は低かった。しかし、9月7日に採取した100倍希釈のトマト葉柄(第4花房直下)汁液中の硝酸イオン濃度は、RQフレックス値と蒸留法値とは高い相関を示し、回帰式の係数も1に近かった(表1)。

表1. トマト葉柄汁液の希釈液中硝酸イオンにおけるRQフレックス法と蒸留法との比較

(平成7年 長野県農試)

試料採取条件	希釈倍率	回 帰 式	相 関 係 数	N 数
8月21日				
2段花房直下	50	$Y = 0.56X + 51$	0.742	30
9月7日				
4段花房直下	100	$Y = 0.97X + 0.66$	0.929	29

回帰式のY: 蒸留法値, X: RQフレックス値

b セルリーの場合

作物体汁液の採取は外葉の第1節間の中位をおろし金で搾汁し、ガーゼ2枚でこした液を100倍に希釈してRQフレックスで測定し、同一の試料をイオンクロマト法で測定した結果の回帰式と相関係数を下記に示した。この結果、高い相関関係が認められ、硝酸イオン測定の実用性が認められた。

$Y = 0.985X + 159$ 相関係数: 0.981 サンプル数: 31

(Y: イオンクロマト法値, X: RQフレックス値)

(イ) 作物汁液を用いた診断

a 診断可能作物及び診断基準値(暫定)

検討してきた結果を基に、汁液による硝酸イオンの栄養診断が可能な作物を表2、診断基準値(暫定)を表3に示す。キュウリ、ナス、トマト等の果菜類は栄養診断の実用性が見られるが、葉菜類は診断までの技術化は今後の検討事項である。また、果樹についても実用化の可能性はある。

表2. 汁液による硝酸イオンの診断可能な作物一覧

(平成10年 埼玉農試)

実用性あり	可能性あり	可能性うすい
キュウリ	ハウレンソウ	セルリー
トマト	チンゲンサイ	
ナス	コマツナ	
イチゴ	ブドウ	

表3. 作物体(葉柄汁液中)硝酸イオンの
診断基準値(暫定)

(平成10年 埼玉園試, 長野南信農試)

作物	作型	硝酸イオン濃度 (mg/l)
キュウリ	半促成栽培 抑制裁培	4月上旬: 3500~5000, 5月~6月: 900~1800, 6月以降: 500~1500 収穫全期間: 3500~5000
イチゴ	促成栽培	1月まで: 1700~2600, 2月下旬まで: 1300~2200, 4月下旬まで: 900~1800
トマト	促成栽培 夏秋栽培	1月~2月: 4000~5000, 3月~4月: 1800~3600, 5月~6月: 500~1500 未作成
ナス	露地栽培	7月下旬まで: 3500~5000, 8月上旬以降: 2200~3600
ホウレンソウ	露地栽培	(収穫期: 2000~3500)
	雨よけ栽培	(収穫期: 6000~7500)
チンゲンサイ	雨よけ栽培	(収穫期: 3000~4500)
コマツナ	露地栽培	(収穫期: 5000~7000)

b 診断事例(供試部位, 汁液試料の作成等)

(a) 雨よけ夏秋トマト(品種: 桃太郎)の汁液診断
(長野南信農試)

- ① 供試部位: 果実がピンポン玉大となった果房直下の葉柄を供試する。
- ② 汁液試料の作成: ニンニク絞り器等で葉柄中の汁液を搾汁する。得られた汁液は生育前半は100倍程度, 生育後半は50倍程度に希釈して硝酸イオン試験紙5~225mg/%で測定する。
- ③ 標本数: 調査に必要な標本数は, 信頼度90%で精度を20%とすると, 4段果房までは8~9株程度, 5段果房以上は20~30株程度が必要となる(表4)。

表4. 夏秋トマト葉柄汁液中硝酸イオン測定に
必要な標本数(株)

果房段位	1	2	3	4	5	6	7
精度 10%	12	18	35	33	128	48	75
精度 20%	3	5	9	8	32	12	19

信頼度90%, 平成8~10年の3か年の標準施肥区のデータより作成。

必要標本数 = $t^2 C^2 / P^2$ なお, t : t 値, C : 変動係数, P : 目標精度

- ④ 実態及び診断の特徴: 葉柄汁液中硝酸イオン濃度の特徴は, 低段果房調査時は比較的高濃度で個体差は少ないが, 生育が進むにつれて急速に硝酸イオン濃度が低下する。一方, 中段~高段果房の調査時は, 硝酸イオン濃度の減少速度は緩くなり, 果房間の差は少なくなると, 個体差が広がり, 測定値の変動係数が高くなる。個体差が大きくなり始めるのは, 収穫開始前後の着果数が最大となって果実への樹体負担が大きくなる頃と考えられる(図1)。

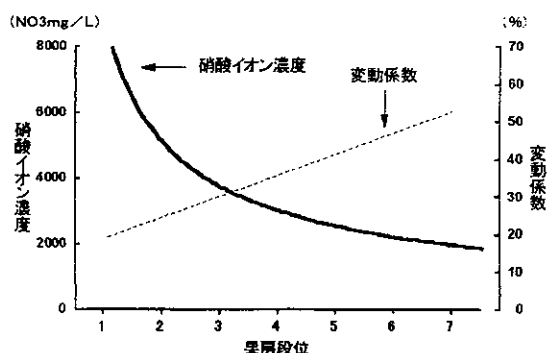


図1. 夏秋トマト葉柄汁液中硝酸イオン濃度と
その変動係数の推移(模式図)

平成8~10年での標準施肥区の平均値より近似曲線を求めた

(b) ブドウ(巨峰)の汁液診断(埼玉園試)

- ① 供試部位・標本数: 6月~8月上旬に果樹園の3樹から, 結果枝の中位葉(基部から3葉目以上の葉)を2, 3枚ずつ, 1樹あたり10~15枚採取し, 供試する。
- ② 汁液試料の作成: ニンニク絞り器等で搾汁し, 得られた汁液を5~100倍に希釈して試験紙5~225mg/%にて測定する。
- ③ 実態及び診断の特徴: 9年度では果樹園間で葉柄汁液中の硝酸イオン濃度は17~1,500mg/%と88倍, 葉中窒素含量は1.85~2.34%と1.3倍の差を示し, 10年度では果樹園間で葉柄汁液中の硝酸イオン濃度は23.4倍, 葉中窒素含量は1.4倍の差を示し, 両年とも葉中窒素含量に比べ, 葉柄汁液中硝酸イオン濃度の果樹園による差が顕著であった。また, 土壤中硝酸含量と葉柄汁液中硝酸イオン濃度との間に相関係数0.801と高い相関が認められた。

以上から、ブドウにおける汁液診断は従来の葉分析による栄養診断に比べ、樹体栄養の変化を反映できると判断され、測定法も簡易なことから、現場での栄養診断技術として適用の可能性があり、収量・品質との関係から葉柄汁液中の養分濃度の適正域を明らかにしていくことが可能と思われる。

(c) セルリーの汁液診断

- ① 供試部位・標本数：追肥前に各処理区内で10株の外葉の第1節間の中位を供試する。
- ② 汁液試料の作成：おろし金で搾汁し、ガーゼ2枚でこした液を100倍に希釈して試験紙5～225mg/％にて測定する。
- ③ 実態及び診断の特徴：施肥量を変えた試料間で含まれる硝酸イオン濃度は明確な差はなかったが、供試した試料の太さとの関係には負の相関が認められた(図2)。このことから、施肥量の違いによる樹体内栄養状態よりも生育の大小による影響が大きいことから、汁液に含まれる硝酸イオンを測定する栄養診断結果を施肥管理に生かすことは難しいと考えた。

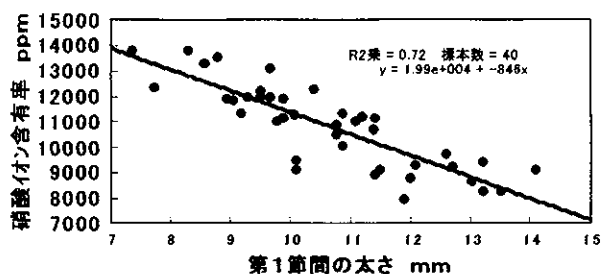


図2. セルリーの第1節間の太さと硝酸イオン濃度との関係

な相関関係が見られた(図3)。RQフレックスによる測定時間は希釈を伴っても1検体2～3分で可能である。

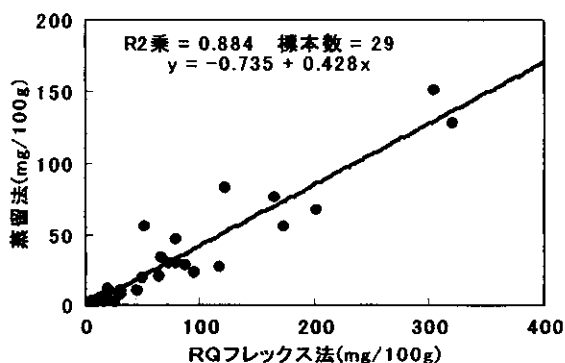


図3. RQフレックス法による硝酸イオン濃度の測定

(2) 作物・土壌のリン酸診断への応用

ア 作物汁液を用いた診断

(ア) リンの精度

リンの標準液(Pで5, 10, 20, 30, 40, 50mg/％)とキュウリ、イチゴ、トマト及びブドウの葉柄汁液を従来法(トルオーグリン酸測定用の発色試薬を加えた比色法)と、同液をRQフレックスにより測定して精度を確認した結果、キュウリ、イチゴ、トマト及びブドウの葉柄汁液とも同様の傾向がみられ、RQフレックス測定値がやや低いものの、相関係数はキュウリ($r=0.993^{**}$)、イチゴ($r=0.974^{**}$)、トマト($r=0.803^{**}$)と高く、汁液における診断機器としての精度は高いと判断された。

表5. 葉柄汁液中無機リン濃度の診断基準値(暫定)

(埼玉園試)

作物	作型	リン濃度 (mg/％)
キュウリ	半促成栽培	5月上旬まで: 80~100 5月中旬以降: 30~50
	抑制栽培	収穫全期間: 80~100
イチゴ	促成栽培	12月~3月: 200~400
トマト	促成栽培	収穫全期間: 60~70

(イ) 簡易栄養診断としての利用事例

a 果菜類(埼玉園試)

- ① 供試部位・標本数：キュウリは、第14～16葉の本葉または側枝第1葉、トマトは収穫果房周辺の小葉、イチゴは展開第3～5葉の葉柄について5～10枚を供試する。
- ② 汁液試料の作成：ニンニク絞り器で汁液を搾り、汁液を20～100倍になるように希釈して測定する。

イ 土壌溶液、土壌抽出液を用いた診断

(ア) 容量法による土壌生土中の硝酸イオン濃度簡易測定

- ① 目的：現場でも測定可能な容量法による土壌生土中の硝酸イオン測定法を検討した。
- ② 分析操作：容量比で土壌1：水5の場合は100mlの蒸留水を加えておいた円筒型容器にそれぞれ容積で120mlに達するまで生の土壌を加えて、1分間かき混ぜ、上澄み液あるいはろ液を得、RQフレックスを用いて硝酸イオンを測定した。供試した土壌は風乾後、常法の蒸留法にて硝酸イオンを測定した。
- ③ 実態及び診断の特徴：容量比1：5の場合、RQフレックスで測定した硝酸イオンは6～320ppmであり、常法により求めた硝酸イオンとの間で有意

- ③ 実態及び診断の特徴：キュウリ、イチゴ、トマトの葉柄汁液中のリン濃度と収量との関係から、収量低下を招かないための暫定的な診断基準値を作成した(表5)。

b 果樹(ブドウ)(埼玉園試)

- ① 供試部位・標本数：6月～8月上旬に果樹園の3樹から、結果枝の中位葉(基部から3葉目以上の葉)を2,3枚ずつ、1樹あたり10～15枚採取し、供試する。

- ② 汁液試料の作成：ニンニク絞り器で汁液を搾り、汁液を20～100倍になるように希釈して測定する。

- ③ 実態及び診断の特徴：巨峰園では葉柄汁液中のリン濃度は果樹園間で82～734mg/ℓと9倍、葉中含量は0.14～0.20%と1.4倍の差を示し、葉中含量に比べ葉柄汁液中濃度の果樹園による差が顕著であった。また、葉中リン含量と葉柄汁液中リン濃度との間に相関係数0.620と高い相関があった。

以上から、果樹園によって葉柄汁液中濃度が異なる傾向を示したことから、現場での診断としてRQフレックスを用いることにより土壌診断だけではなく、作物体診断により適正施肥に結びつけていく可能性が示された。

イ 土壌溶液、土壌抽出液を用いた診断

(ア) 土壌抽出液

- ① 抽出法：可給態リン酸の測定として、トルオーグ法(風乾土壌1gに対して、0.002N硫酸200mlを加えて抽出)を用いる。

- ② リンの精度：抽出液は土壌中の有効態リン酸が75mg/100gでP 1.6mg/ℓとなるため、低い含量の測定ができない。ただし、高感度の測定ができるRQフレックスプラスを用いることによって低いリン酸含量の土壌でも測定が可能になる。土壌中の

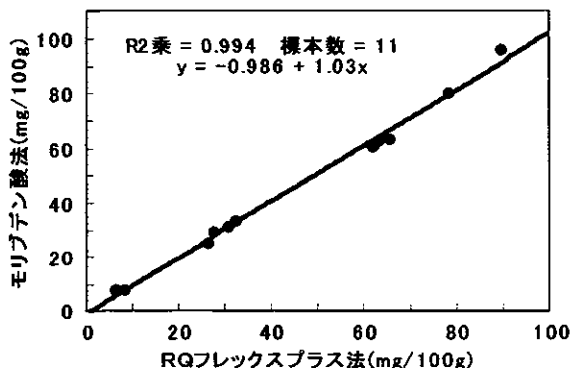


図4. RQフレックスプラスによる土壌中リン濃度の測定

リン酸含量に応じて両方を用いることにより、精度の高い測定が可能である(図4)。

(イ) 土壌溶液

- ① 採取法：土壌溶液はミズツールを用いて採取する。

- ② リンの精度：原液をRQフレックスで測定した結果、土壌溶液の濃度は下限域(PO_4^{3-} のレンジは5～120mg/ℓ)に近い事例が多いが、イオンクロマト法による測定値との相関は高く、実用性はあると考えられる(図5)。

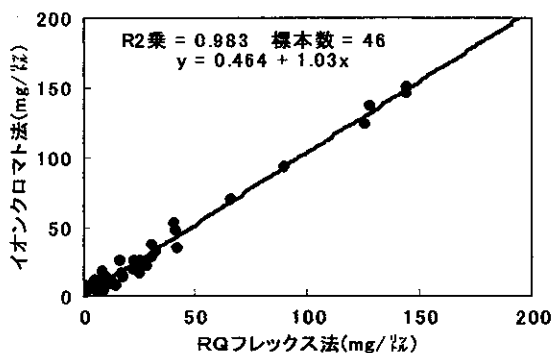


図5. RQフレックスによる土壌溶液中リン濃度の測定

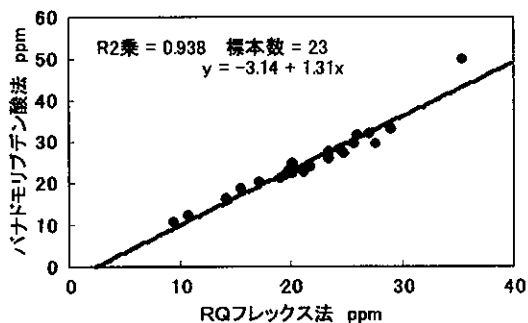


図6. 培養液中のリン酸濃度の測定

(ウ) 水耕培養液を用いた診断

- ① 採取法：バラの養液栽培培養液(6生産者の給液と排液の12サンプル、場内の養液のスラブ、キュウブ内液4点を含む14サンプルの計26サンプル)について調べた。

- ② リンの精度：明らかに低濃度等の異常値であった試料を除いた23点では、バナドモリブデン酸法による測定値と相関は高く、実用性はあると考えられる(図6)。

ミルクオリゴ糖 (乳中少糖) の比較生化学 (VIII)

—— 化学構造的特徴とその利用性 ——

東北大学大学院農学研究科 教授 農学博士 齋 藤 忠 夫
 帯広畜産大学畜産学部 助教授 農学博士 浦 島 匡

1. はじめに

哺乳動物の泌乳初期に限定されて生合成・分泌される「初乳」には、多種多様な構造をした「ミルクオリゴ糖 (milk oligosaccharides)」と呼ばれるオリゴ糖群が存在する。乳中におけるその量は初乳期にとくに多く、常乳期には激減するが、種によってはその低下がさほど認められないものもある。これまでに本シリーズでは、ヒト¹⁾、ウシ²⁾、ウマ³⁾、ヒツジ^{3,5)}、ヤギ⁴⁾、イヌ⁶⁾、およびカモノハシ⁷⁾らのミルク中に存在するミルクオリゴ糖の化学構造解析を通して、比較生物学的に哺乳類の最大の特徴であるミルクを考察してきた。人乳 (ヒトミルク) には、これまでに実に100種類近くの多種多様なミルクオリゴ糖の存在することが明らかにされている¹⁾。いくつかの動物種において、泌乳の初期の非常に短い時期に限定され、ある程度の濃度でミルク中に分泌される成分は、その生物の初期成長にとくに必要な成分であることが示唆される。ミルクオリゴ糖には、乳仔腸管内の有用細菌であるビフィズス菌に対する特異的増殖活性、また有害微生物の排除や毒素の中和作用などの感染防御活性などが知られてきているが、その生合成理由と生理機能の全貌は未解明である。

ミルクオリゴ糖は、電荷のない「中性ミルクオリゴ糖」とマイナスの電荷をもつ「酸性ミルクオリゴ糖」の大きく2つのグループに分けられ、プラスに荷電したオリゴ糖は存在しない^{5,6)}。酸性ミルクオリゴ糖の中のマイナス電荷は、シアル酸に含まれるカルボキシル基 ($-\text{COO}^-$) や、糖残基に結合した硫酸基 ($-\text{SO}_3^{2-}$) などに由来する。マイナス電荷のオリゴ糖やその誘導体に関しては、ヒツジ初乳中に抗ウィルス活性の期待される3'-シアルラクトースラクトンの発見⁵⁾ や、イヌ乳中に網膜や脳の発達に重要な無機硫酸基の供与体としての硫酸化ラクトース (ラクトース-3'-O-硫酸) の発見⁶⁾ を紹介した。ミルクオリゴ糖研究に関しては、筆者らによる原著論文を概説した総説⁸⁻¹³⁾ があるので、興味のある方は是非参考にして頂きたい。

本稿では、最近シアル酸や硫酸基ではなく、リン酸基が結合してマイナス電荷を示す酸性ミルクオリゴ糖をウマ初乳中に見出した知見を通して、ミルクオリゴ糖における「リン酸基」の示すマイナス電荷の機能性とこの糖質の利用性を考察したい。

2. 糖ヌクレオチド

生体内での糖鎖の生合成には、3つの成分が必要である。それらは、糖転移酵素 (グリコシルトランスフェラーゼ) とドナー (供与体) としての糖質およびアクセプター (受容体) である。アクセプターには、タンパク質やペプチド、セラミドなどの脂質、核酸そして糖質自体の場合も存在する。転移するドナーとしての糖質は単糖であるが、そのままではエネルギー順位が低く転移されない。一般に糖質がアクセプターに転移する際には、単糖から高エネルギー糖である「糖ヌクレオチド (sugar nucleotide)」が合成される必要がある。しかしながら、この場合に合成される糖ヌクレオチドは、糖残基にグルコース (Glc)、ガラクトース (Gal)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) など糖代謝にとって基本的な糖をもったものに限定されている。その他のものは、これらの糖ヌクレオチドの糖残基が酵素的な構造変換や修飾を受けて生成することを理解する必要がある。

糖ヌクレオチドは、ヌクレオチド糖やヌクレオチド二リン酸糖とも呼ばれることもあり、一般的な化学構造を図1に示した。ここでは、ヌクレオシド5'-二リン酸残基の末端リン酸基と糖残基の還元基 (1位の水酸基, C1-OH) から水が一分子脱水してエステル結合した構造をしている。塩基と糖質の違いにより、多種類の糖ヌクレオチドが生成することになる。糖鎖の構成糖として一般的なガラクトースやマンノース (Man) は、塩基部分はウリジン (U) であり、UDP-Gal や UDP-Man となり、受容体に転移することができるようになる。また、やはり複合糖質糖鎖に一般的なL-フコース (Fuc) は、塩基がグアニン (G) に代わっており、GDP-Fuc となることで転移可能となる。

例外としてヌクレオチド残基がシチジン 5'-リン酸の場合も存在する。糖鎖の末端に位置することが多いシアル酸 (N-アセチルノイラミン酸, NeuAc) は, CMP-NeuAc となることで転移する。このように, 糖ヌクレオチドは, ヌクレオチド残基の種類により, ADP 糖, GDP 糖, UDP 糖, dTDP 糖に分類される。また, 糖残基の方にも種類は多く, 各種ペントース, ヘキソース, ヘプトース, ウロン酸, デオキシ糖, アミノ糖, 分岐糖, アミノウロン酸, ケトース, 糖硫酸, オリゴ糖からなるものが知られている。

糖ヌクレオチドは, 微生物から藻類, 動植物に至るあらゆる生物体の中に見いだされている。これらの多くは細胞内の可溶性成分として存在するが, ミルクの中には分泌型で存在している。

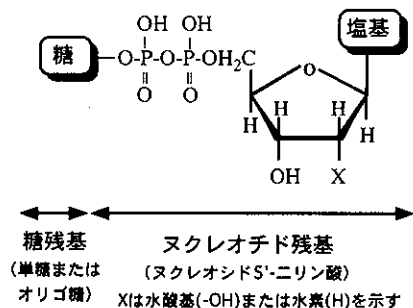


図1. 糖ヌクレオチドの化学構造 (一般式)

3. リン酸化2糖 (N-アセチラクトサミン- α 1-O-リン酸) の発見¹⁹⁾

筆者らは10年以上前に, サラブレット種のウマ初乳より中性ミルクオリゴ糖を分離し, その化学構造を検討した³⁾が, 酸性ミルクオリゴ糖の解析は行なわなかった。そこで, 帯広市近郊の幕別町にあったダービースタッド競争馬牧場より初乳を入手した。初乳の採集は時として危険を伴うが, 帯広畜産大学生物資源科学科に在籍し, 同牧場でアルバイトをしながら卒論研究を行った学生自らの手により搾乳された。

初乳 100 ml に対し, 4 倍量のクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) を加えて攪拌した後, 遠心分離によって得られた水・メタノール上層を糖質画分とし, Bio Gel P-2 によるゲルろ過 (2.6×90 cm) に供した。フェノール・硫酸法 (ヘキソース) とレゾルシノール・塩酸法 (シアル酸) によりモニターし, カラムのボイド付近に溶出した糖質画分 A を強塩基性イオン交換樹脂 (Dowex 1-X2) カ

ラム (2.6×20 cm) による陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。ついで, 樹脂吸着性画分を, TSK gel Amido-80 カラム (4.6×250 mm) による順相 HPLC (溶媒: 15 mM リン酸緩衝液 (pH 5.2) を含む 50 および 80% アセトニトリル) に供し, 各オリゴ糖の分離を行った (図 2)。溶出は, 40℃ で 57.5% から 80% までのアセトニトリルによる濃度勾配によって行った。クロマトグラム上の 3 つのピーク成分 (HA-1, HA-2, HA-3) は, プロトン・核磁気共鳴スペクトル法 (¹H-NMR) に供して構造解析した。HA-2 は, 特徴的なシグナルから直ちに 3'-シアリルラクトース (Neu5Ac (α 2-3) Gal (β 1-4) Glc) と決定された。

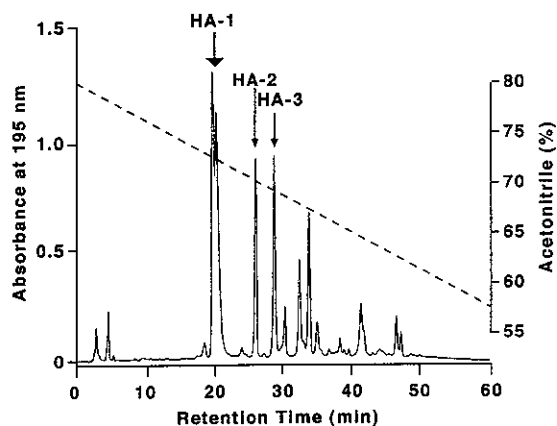


図2. ウマ初乳より調製した酸性オリゴ糖の HPLC

溶出パターン

ポンプ: Tosoh CCPM-II intelligent

カラム: Tsk gel Amido-8

(4.6×250mm, pore size 80 μ m, particle size 5 μ m)

移動相: 15 mM リン酸 buffer (pH 5.2) を含む 50% および 80% アセトニトリル

溶 出: 40℃ で 80% から 57.5% までのアセトニトリルの濃度勾配

しかしながら, HA-1 と HA-3 では, 筆者らはこれまでに経験したことのない特徴的なダブルレット状のアノメリックシグナルの存在に目を見張った。HA-3 の ¹H-NMR スペクトラムを図 3 に示した。本成分は, アニオン交換樹脂吸着性であるから陰電荷を有しているに違いないが, シアル酸の H-3 エクアトリアル (eq) およびアキシアル (ax) に特徴的な 1.8 ppm および 2.7 ppm 付近のトリプレット またはダブルレットダブルレットのシグナルが認められず, 陰電荷はシアル酸カルボキシル基に由来しないことが判った。また,

HA-3 のアノメリックプロトンは、5.430 ppm と 4.486 ppm に 2 種類のシグナルが 1:1 の割合で観察された。4.486 ppm のシグナルは、遊離単糖や遊離オリゴ糖の還元末端残基の β -アノマーシグナルとはあまりの高磁場側にあるため

到底考えられず、むしろラクトースや N-アセチルラクトサミンの Gal (β 1-4) 残基のアノマーシグナルに近い位置にあった。

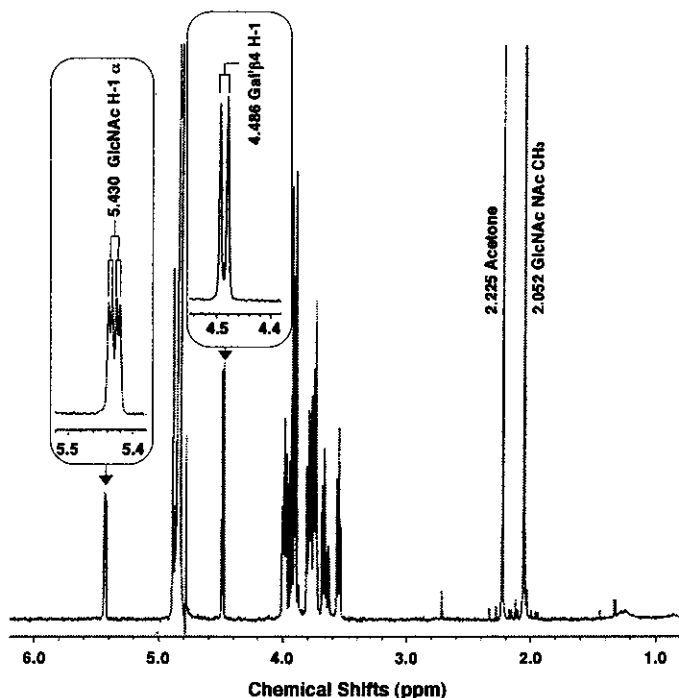


図3. ウマ初乳より分離した HA-3 の重水 (D_2O) 中での 600MHz 1H -NMR スペクトラム

遊離オリゴ糖の還元末端残基のアノマーシグナルは、 α -および β -の 2 つの配向性のために一定のシグナル強度比で、2 種類が観察されるはずである。もし HA-3 が Gal (β 1-4) 残基を含む 2 糖であるのなら、還元末端側のシグナルは 5.430 ppm の α -アノマーシグナルしか認められないことになり、還元末端側の残基の 1 位が α -配向性で何らかの官能基と結合していることが予想された。また、5.430 ppm のシグナルは糖のアノマーシグナルとしては異例のダブルレットダブルレットの形状をしており、アノマー位の官能基との結合によるためと考えられた。また、2.052 ppm のシングレットのシグナルは、HA-3 中の N-アセチルヘキソサミン残基の N-アセチル基に由来するもので同残基の存在を示しており、基本骨格は中性 2 糖の N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) と予想された。

筆者らは当初、2 糖である HA-3 の還元末端側の 1 位に結合した官能基として、UDP (ウリジン二リン酸) など

のヌクレオチドを予想した(図1参照)。人乳に N-アセチルラクトサミンやフコシル N-アセチルラクトサミンと UDP の結合した「オリゴ糖ヌクレオチド」の存在することは、1960年代の木幡 陽 先生らの有名な発見として広く知られていた²⁰⁾ ことが、筆者らの当初の予想の根拠であった。そこで、UDP-GlcNAc の 1H -NMR を測定してみると、UDP 部分に由来する低磁場側のシグナル (7.964 ppm, 5.974 ppm) と 4.385 ppm の強い立ち上がりのシグナルが観察された。これらのシグナル群は HA-3 にはなく、UDP の存在は否定された。しかし、重要なポイントとして、UDP-GlcNAc のスペクトラムにもダブルレットダブルレット状の特徴的な形状のアノマーシグナル (5.510 ppm) が認められた。このことから、このダブルレットダブルレット状のシグナルは、アノマープロトンと 2 位のプロトンとのカップリングとともに、アノマープロトンとリン酸基の ^{31}P の long range のカップリングによってこのような形に分裂する

ことが考えられた。そこで次に GlcNAc α -1-PO₃ の ¹H-NMR を測定してみると、やはり 5.382 ppm に特徴的なダブルレットダブルレット状のアノマーシグナルが観察された。以上の観察に基づき、HA-3 は、還元末端側の 1 位が α 配向でリン酸基と結合した 2 糖と推定された。

さらに、HA-3 の構造決定のために HSQC スペクトラムを測定した(図 4)。HA-3 は、N-アセチルラクタサミンの還元末端側に 1 位が α -配向性においてリン酸基と結合した構造が推定されたので、関連化合物として N-アセチルラクタサミンの ¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトラムのシグナルの化学シフト値と比較した。その結果、各シグナルの化学シフト値は、N-アセチルラクタサミン

の還元末端側の GlcNAc が α -配向である場合の各化学シフト値との良い対応を示したので、HA-3 は予想された化学構造をしていることが証明された。

最終的に、時間飛行型質量分析機 (MALDI-TOFmass) により HA-3 の分子量を測定した結果、*m/z* 226, 231 および 393 のフラグメントが検出された。標準物質としての GlcNAc α 1-リン酸では、*m/z* 226 (*M*⁺+5) の分子イオンが検出された。HA-3 の *m/z* 231 および 393 のイオンは、GlcNAc α 1-リン酸に由来する [*m/z* 226+5], および [*m/z* 226+ヘキソース+5] にそれぞれ解釈される。すなわち、一リン酸を含む糖よりもさらに 5 マスほど加算されたフラグメントイオンが検出されたわけである。以上より、HA-3 は N-アセチルラクタサミン- α 1-二リン酸 (Gal(β 1-4)GlcNAc α 1-(PO₃)₂) と推定された。HA-1 は、同様の解析から GlcNAc α 1-リン酸と他の HexNAc α 1-リン酸の混合物と考えられた。

4. 他にも見いだされているリン酸化オリゴ糖

筆者らの報告に先行して、ウシ初乳からはシアル酸を含み、同時にリン酸化されている 2 種類の酸性 3 糖が報告されている²¹⁾。すなわち、6'-シアリル-N-アセチルラクタサミン- α 1-リン酸 (Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc α 1-PO₃) と 6'-シアリル-N-アセチルラクタサミン-6-リン酸 (Neu5Ac(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc-6-PO₃) である。しかしながら、本稿のミルクオリゴ糖は新化合物である。本研究結果も含めて、これまでに見出されたリン酸化ミルクオリゴ糖は、ウシ、ウマという種を越えて、リン酸化された還元末端糖残基が GlcNAc という特徴がある。その理由、意義は現在のところ良くわかっていない。

また健康なヒト尿中にも、3 種類の遊離のリン酸化オリゴ糖の存在が知られている²¹⁾。すなわち、3'-シアリル-N-アセチルラクタサミン- α 1-リン酸 (Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc α 1-PO₃)、6'-シアリル-N-アセチルラクタサミン- α 1-リン酸およびリン酸化酸性 3 糖 (Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc α 1-PO₃) である。さらに、腎臓病末期の患者尿の赤血球濾過物からも、3 種類のリン酸化オリゴ糖が同定されている²²⁾。すなわち、シアリルガラクトース-1-リン酸 (Neu5Ac(α 2-3)Gal α 1-PO₃)、ジシアリル 4 糖-1-リン酸 (Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)[Neu5Ac(α 2-6)]GlcNAc α 1-PO₃) およびジフコシル-N-アセチルラクタサミン-1-リン酸 (Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc α 1-PO₃) である。これらは、複合糖質の代謝産物と考えられている。

本稿でも、また他のリン酸化オリゴ糖にも見いだされる基本的なオリゴ糖単位である「N-アセチルラクタサミ

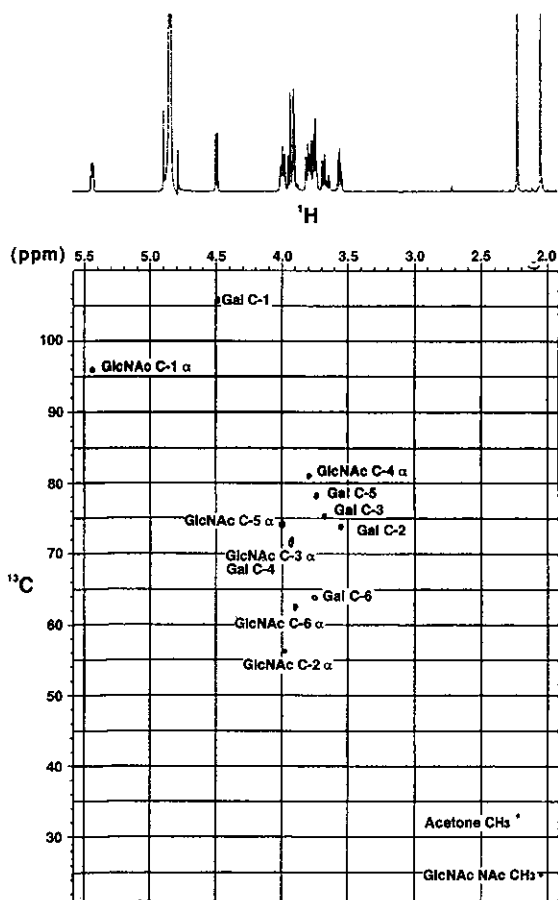


図 4. ウマ初乳より分離した HA-3 の重水 (D₂O) 中での HSQC スペクトラム横軸は ¹H-NMR (プロトン)、縦軸は ¹³C-NMR (カーボン)

HSQC: Heteronuclear Simple Quantum Coherence

ン(Gal β 1-4GlcNAc)」は、複合糖質糖鎖の内部ユニットとしては一般的であるが、自然界での遊離形での存在は知られていなかった。1984年、筆者らはウシ初乳中に同糖の存在を初めて見だし²³⁾、また最近ではブタ初乳中にもその存在を認めている²⁴⁾が、人乳には発見されていない。

5. リン酸化オリゴ糖の生理機能とその利用性

リン酸化ミルクオリゴ糖の乳児に対する生理的意義は、まだ未解明である。しかしながら、乳中でリン酸カルシウムと可溶性の複合体を作ることによってその沈殿形成を妨げ、乳児腸管からのカルシウムの吸収を促進する作用や乳児の成長に必要な無機リン酸塩の乳児への運搬などが考えられる。安価で安全であるラクトースあるいはその β -ガラクトシダーゼによる転移反応で誘導したビフィズス因子としてのガラクトオリゴ糖などにリン酸基を導入することで、リン酸化オリゴ糖を人工的に大量調製し、腸管内におけるカルシウム吸収促進などの性質を向上させた機能性食品への応用も考えられる。

また、本稿で論じたN-アセチラクトサミン α 1-二リン酸は、やぎの初乳²⁵⁾やヒトの乳汁²⁰⁾において存在の確認されているオリゴ糖ヌクレオチドの生合成前駆体である可能性もあり、その生合成過程に興味を持たれる。

筆者らの研究を通じて、ミルクオリゴ糖にはシアル酸や硫酸基だけでなく、リン酸基という官能基の結合したユニークな分子の存在することが明らかになった。このようなオリゴ糖の合成後の修飾に関しては、その生合成の合目的性から機能性の獲得と発現までの機構研究はまだ途についたばかりであるが、ミルクオリゴ糖の生理的機能をより機能別に特化させていることは十分に予想され、その生物の知恵を利用して同様の成分を添加することにより、新しい機能性食品の構築も可能である。

参考文献

- 1) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 154, 13-21 (1994).
- 2) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 165, 15-20 (1997).
- 3) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 167, 3-9 (1998).
- 4) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 173, 2-8 (1999).
- 5) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 175, 3-8 (2000).
- 6) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 176, 18-21 (2000).
- 7) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *The Chemical Times*, No. 177, 11-16 (2000).
- 8) 浦島 匡, 齋藤忠夫, *化学と生物*, **31**, 80-82 (1993).
- 9) Messer, M., 浦島 匡, *化学と生物*, **33**, 816-824 (1995).
- 10) 浦島 匡, 中村 正, 齋藤忠夫, *ミルクサイエンス*, **46**, 211-220 (1997).
- 11) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **37**, 401-403 (1999).
- 12) 浦島 匡, 齋藤忠夫, *バイオサイエンスとインダストリー*, **57**, 619-620 (1999).
- 13) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *畜産の研究*, **53**, 1155-1160 (1999).
- 14) 齋藤忠夫, *ミルクサイエンス*, **48**, 199-205 (1999).
- 15) 齋藤忠夫, 浦島 匡, 中村 正, *シーブジャパン*, **33**, 11-13 (2000).
- 16) 齋藤忠夫, 浦島 匡, *化学と生物*, **38**, 3447-3451 (2000).
- 17) 齋藤忠夫, *乳業技術 (創立50周年記念号)*, **50**, 38-57 (2000).
- 18) 浦島 匡, 齋藤忠夫, 中村 正, 荒井威吉, *ミルクサイエンス*, **49**, 195-202 (2000).
- 19) Nakamura, T., S. Amikawa, T. Harada, T. Saito, I. Arai and T. Urashima, *Biochim. Biophys. Acta*, **1525**, 13-18 (2001).
- 20) Kobata, A., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 346-350 (1962).
- 21) Parkkinen, J. and J. Finne, *Methods Enzymol.*, **138**, 289-300 (1987).
- 22) Iwanowitsch, A., H. Friebohn, R. Carganico, M. Errenst, G. Weisschaar, H. Brunner and H. Mann, *Biol. Chem.*, **379**, 737-741 (1998).
- 23) Saito, T., T. Itoh and S. Adachi, *Biochim. Biophys. Acta*, **801**, 147-150 (1984).
- 24) 齋藤忠夫, 渡辺 浩, 北澤春樹, 川井 泰, 伊藤敏敏, 浦島 匡, *日本農芸化学会 2001年度大会 (京都) 講演要旨集* p. 387 (2001).
- 25) Ebner, K. E. and F. L. Schanbacher, In "Lactation" (B. L. Larson and V. R. Smith), Vol. 2, pp. 77-109, Academic Press, New York (1974).

〈編集後記〉 あけましておめでとうございます。

激動の2001年において、名古屋大学野依教授がノーベル化学賞を受賞され、化学関係者はもとより全国民が興奮と感動に沸き、12月の記念式典・祝賀会に当社からも出席

しお喜びとお祝いを申し上げます。2002年の新春を迎え、いよいよ「サッカー・W杯」が日韓共催で行われます。日本の初優勝となる活躍と感動を期待したいものです。本年も皆様方のご愛顧をお願い申し上げます。(三城 記)



関東化学株式会社

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3丁目2番8号
電話 (03) 3279-1751 FAX (03) 3279-5560
インターネットホームページ <http://www.kanto.co.jp>
編集責任者 三城 侑三 平成14年1月1日 発行