

シアル酸の歴史 —シアル酸研究の始まりと私の関与—

山川 民夫 (理化学研究所フロンティア研究システム 客員主管研究員
日本学士院会員)



始まり

1930年までには脳の糖脂質として4種のセレブロシド(ガラクトシルセラミド)が知られており、19世紀末のJ. L. W. Thudichumの発見以来ドイツのE. Klenkが貢献した。その後スウェーデンのG. Blixがスルファチドつまりセレブロシド-6硫酸を発見したが、1952年山川がそれをセレブロシド-3硫酸と修正した。この3名が後年シアル酸の初期の研究に携わった(図1)。

これらの比較的単純な糖脂質とは別に1925-1927年にロックフェラー研究所のK. LandsteinerとP. A. Leveneはウマの腎臓からフォルスマンハプテンを分離精製中にオルチン-塩酸-硫酸銅の試薬と加熱すると赤紫色の呈色反応を示す粗製の糖脂質の存在を報告した。一方、ドイツの脂質研究の本山であるThierfelder門下のE. Walzは1927年にウシの脾臓に粗製の糖脂質がやはりオルチン-塩酸

—塩化鉄試薬で赤紫の呈色を示し、鉍酸と加熱すると黒い沈殿を生ずると記載した。これら両者の発見は後年のガングリオシド及びシアル酸の発見の端緒を示唆するものといえる。

しかしながら、Thierfelder門下であるケルンのKlenkが1936-41年に亘る研究によりTay-Sachs病の患児脳に蓄積する特殊な糖脂質としてガングリオシドを発見し、さらにその成分であるノイラミン酸を記載したことは、この問題に一つの区切りをつけたと言える。しかも彼は結晶化したノイラミン酸に対して $C_{10}H_{19}NO_8$ か $C_{11}H_{21}NO_9$ という分子式を与えた。

ところがそれより数年前、1936年にBlixはウシの唾液腺のムチンから「炭水化物I」と名付けた結晶を分離し、それはEhrlichのパラアミノベンツアルデヒド試薬で赤色を呈すると記載した。Blixは彼の物質はアセチルヘキソサミンと一種のデオキシヘキスロン酸の結合物でこれこそはガングリオシドの成分であると想像し、Klenkのノイラミン酸の存在を否定し、分子式

Cerebrosides or Galactosylceramides

Phrenosin	C24:0 – Sphingosine - Gal
Kerasin	C24:0 α OH – Sphingosine - Gal
Nervon	C24:1 – Sphingosine - Gal
Hydroxynervon	C24:1 α OH – Sphingosine - Gal
	Thudichum 1884
	Thierfelder, Klenk 1925
Sulfatide :	sulfated galactosylceramide
	Blix 1933

図1.

として $C_{14}H_{24}NO_{11}$ を提示した。1951年、Blixらは脳のグングリオシド中にガラクトサミンを検出し、Klenkのノイラミン酸なるものはグングリオシド中の「炭水化物I」が分離操作中に水酸化バリウムと長時間加熱したので生じた分解産物だと言った。同年Klenkは水酸化バリウムの操作なしにグングリオシドからノイラミン酸を得てBlixの批判に反論した。このように両者の論戦は熾烈を極めたが、そのうちにガラクトサミンもノイラミン酸もグングリオシドの成分であることが判って決着した。

その頃、日本では東北大学医学部の正宗一教室が糖質の生化学を広汎に研究しており、1938年門下の田辺は舌下腺ムチンからBlixの物質を分離しようとし、また檜山は1949年同様な挑戦を試みたが、Blixが記載する方法では結晶を得られなかった。しかし檜山は非結晶物質を強アルカリと加熱してピロール α -カルボン酸を得、それはEhrlich試薬陽性であった。更に彼はBlixの「炭水化物I」に対して推定構造式を提出したがこの式は後年1955年A. Gottschalkが正しい構造式を提示するに当たって非常に参考になった。

私の関与

1944年、私は医学部を卒業して東大伝染病研究所(現在の医科学研究所)に入り薬学の研究者ばかり集まった化学研究部に所属して有機化学の手技を勉強していた。伝研は戦時中より医療用の抗血清やワクチン製造の国のセンターであり、その頃も数多くのウマが抗血清の生産のために飼われていた。製造工程で分離された血清は重要だが誰も残りの血餅には注意を払わず捨て去られていた。その頃の東京は空爆と敗戦の結果、廃墟となり研究材料もなく何を研究すべきか皆が迷っていた。私は種特異性の抗原が赤血球の表面の膜に存在していると考え、それを単離しようと思った。それまでに習い覚えた脂質を手始めに抽出することに着手した。莫大な量

の血機を生理食塩水でほぐし、遠心分離機で赤血球を集め、大量の希酢酸水で溶血し大遠心機で何度も遠心して洗うと多量のゴースト、つまり血球膜が得られる。それを当時流行し始めた凍結乾燥で乾燥した後、エーテルメタノールで抽出すると大量のコレステロールや磷脂質がえられる。残渣をクロロフォルムメタノール混液で連続抽出すると黒褐色の物質がとれてきたが、それはオルチン試薬で赤紫の呈色反応が陽性の糖脂質であった。その頃は戦後間もなくで国外からは学術文献は輸入されず、日本の生化学者は誰もグングリオシドやノイラミン酸の名前すら知らなかった。私は偶然入手したAnnual Review of Biochemistry (1943)にS. J. Thannhauserの書いた脂質の総説を読んでその存在を知り、赤血球のこの物質こそはグングリオシドではないかと思った。然し完全に同じ物質かどうかは判らないので、一応ヘマトシドと名付けて区別した。これは今ではGM3の名前で呼ばれる。やっと入手したKlenkの論文を参照してヘマトシドをメタノリシスして脂質部分をのぞき脱塩し冷蔵庫に放置すると、ある日コルベンの壁に綺麗な結晶が生じた。これこそKlenkのノイラミン酸(メトキシ体)と思ったが若干性状の記載に違いがあったので、一応ヘマタミン酸と名づけて区別した。私はそれに $C_{10}H_{19}NO_8$ の分子式を与えた。私はヘマトシドの構成は長鎖脂肪酸:スフィンゴシン:ガラクトース:ヘマタミン酸が1:1:2:1と考えた。

その頃、Ernst Klenkは正にドイツ生化学会の大御所で多くの門下生と共に輝かしい論文を多数発表し世界の脂質生化学会に君臨していた。我々の研究室には少量の脂肪酸分離のためにKlenkの装置があり、彼は雲の上の存在であった。それに引き替え私は一介の素人生化学者で日本でも全く無名の存在で、私の研究などはKlenkの名声の前には無視されるのではないかと思つた。私はヘマトシドの仕事を英文に纏めて日本生化学会が刊行しているJournal of Biochemistryに投稿するとともにKlenkへそ

の原稿を送り、彼の意見を尋ねた。数ヶ月後、彼から返書がきた。そのドイツ語の手紙にはまず私の仕事に非常に興味を持ったことが書かれていた。然し現在自分はヒトの赤血球の糖脂質の研究をしているがそれにはノイラミン酸がなく、その代わりにグルコース、ガラクトースの他にガラクトサミンがある。これまでに自分が分離した脳のガングリオシドの標品にはすべてガラクトサミンが含まれているが君のヘマトシドにガラクトサミンがあるかを検討してほしい。なおノイラミン酸とヘマタミン酸の異同については旋光度を測ってみたまえ。というものであったが私はすでに旋光度は測定してあり全く同一物質であることは疑っていなかった。

Klenkの手紙の内容は1951年に論文で詳細に報告された。私は早速ヘマトシドにガラクトサミンが含まれていないかを検討したが加水分解後にヘキソサミンの特異反応であるElson-Morgan陽性の物質は検出されずヘマトシドと脳のガングリオシドは異なることが示された。その時、私は赤血球の糖脂質がヒトとウマで違うなどとは考えられないと思っていた。さらに、Klenkが使ったヒトの血液は8年間アセトン中で保存された古いものであるとの記載があったのでノイラミン酸が分解されてガラクトサミンになったのではないかと想像した。なぜならヘキソサミンはノイラミン酸の前駆物質の可能性

があると考えていたからである。その頃は売血によってブラッドバンクなどで乾燥血漿が製造されており、赤血球はいわば産業廃棄物として捨てられていた。そこでまだ新鮮なヒト赤血球をいただいてきて糖脂質を分離した。それにはグロボシドと命名したがノイラミン酸はなくKlenkの言うようにガラクトサミンが含まれていた。グロボの名称は現在スフィンゴ糖脂質の分類に用いられている。

その頃、ノイラミン酸類似の物質があちこちから報告されてきた。R. Kuhn(1954)はウシの初乳からラクタミン酸、P. Gyorgy(1955)は母乳からジャイナミン酸、山川(1955)はウマ血清からセロラクタミン酸を報告していた。1957年にはBlix, Gottschalk, Klenkは連名でNature誌上でノイラミン酸は置換基なしのコア構造、シアル酸とはそれにアシル基がついたグループを指すという命名法を唱えて整理した。それ以前にBlixのグループはアシル化されたノイラミン酸を唾液のギリシャ語に因んでSialic acid (日本語でシアル酸)と命名していた。

種差

ヒトとウマの赤血球糖脂質の糖鎖部分の構造が全く違うことが判ったので、入手し易い他の動物の赤血球糖脂質を調べてみた。ヘキソサミ

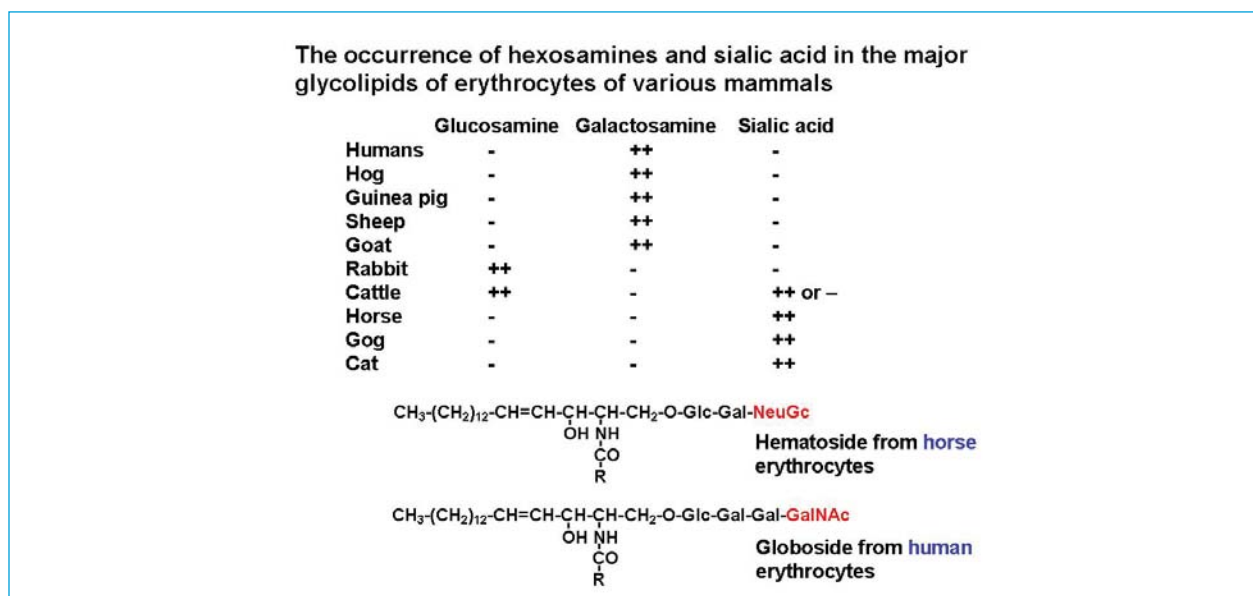


図2.

ンとシアル酸を比色法で測定してみると三つの群に大別された(図2)。1群はヒト、ブタ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ウサギなどでヘキサミンは在ってシアル酸が無いグロボシド型、2群はウマ、イヌ、ネコなどでシアル酸はあってヘキサミンはないヘマトシド型、3群はガングリオシド型で両者を含み、それにはウシが含まれる。グロボシド型でもウサギとウシではガラクトサミンの代わりにグルコサミンがある。このように哺乳動物の赤血球の主要糖脂質は動物種によって全く違った構造を持つことが判った。

化学構造の研究

シアル酸の化学構造の決定には多くの人携わり、いろいろな構造式が提出された。私が1952年にメトキシヘマタミン酸に対して分子式 $C_{10}H_{19}NO_8$ (分子量281)を提出した理由は滴定法とDumasの乾式窒素測定値によったが、一方Klenkのグループが $C_{11}H_{21}NO_9$ (分子量311)と考えた訳はKjeldahlの湿式窒素測定法によったもので、彼らは最後までノイラミン酸を骨格C10化合物と考えた。それに対してわたしは骨格C9を主張した。山川、Klenk, Gottschalkらはそれぞれ構造式を提出したが結局Gottschalk(1955)の式が正しいとされ、その後R. BrossmerやS. Rosemanが立体配置などを研究し、現在の式が決定された(図3)。

グリコリールノイラミン酸の問題

1955年にBlixのグループは顎下腺ムチンのシアル酸のアミノ基は動物の種によって異なる修飾を受け、ヒツジではアセチル、ブタではグリコリール、ウマではジアセチル、ウシではアミノ基と水酸基にアセチル基が付くと報告した(図4)。既に述べたように哺乳動物の赤血球はそれぞれ固有の糖脂質を持つ。ヘマトシド型ではウマは1モルのNeuGc、ネコは2モルのNeuGcを持っている。私のグループの飯田静夫は1964年にイヌではNeuAcが73%、NeuGcが27%と報告していたが、一方Klenk, Heuer(1960)はすべてNeuAcと報告しており、この違いは私どもにとって長い間の謎であった。1978年に我々の教室の安江(浜中)すみ子と飯田は他の実験のために使われたイヌ1匹ずつから採血して調べていたが、或るイヌではNeuAc、他のイヌではNeuGcを持っており、両方を持つイヌは無かった。1964年の我々の仕事では数匹のイヌの血液を混合して糖脂質を分離したために両者が混じたのであった。更に我々の用いたイヌは雑種であるので、どの品種のイヌがNeuAcをもつかNeuGcをもつかを決めたいと思い、東大農学部獣医学科の家畜病院の協力をえて、そこで診察を受けるいろいろな品種のイヌの血液を調べた。すると所謂ヨーロッパ系のイヌは例外なくNeuAc型のヘマトシ

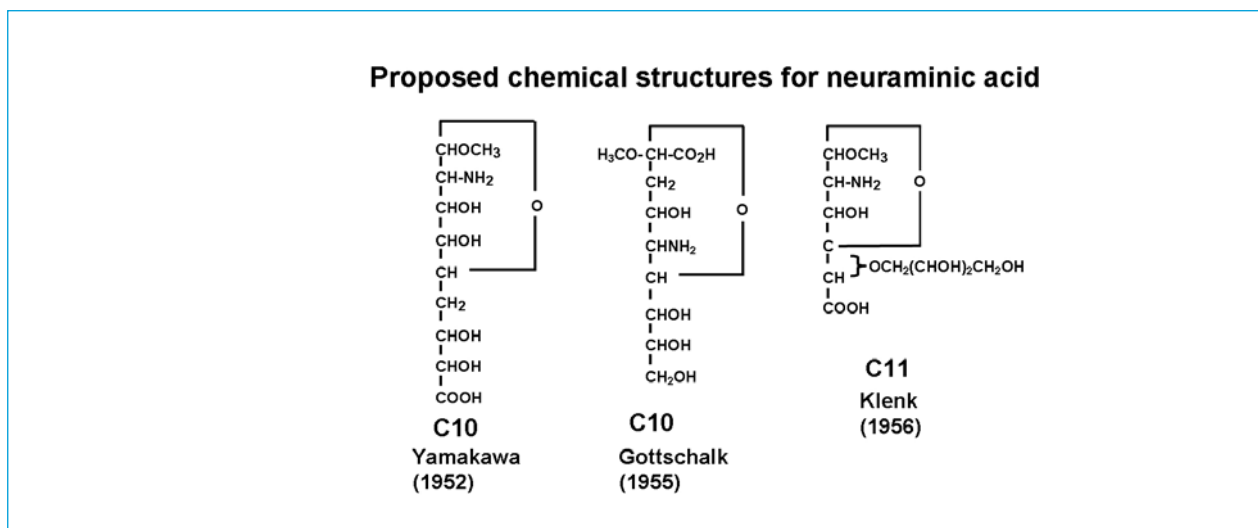


図3.

ドを持ち、東洋系の柴犬、甲斐犬、紀州犬、などの日本犬、韓国や中国産のチン、ペキニーズ、珍道犬などにはNeuGc型のヘマトシドが現れた(図5)。柴犬は天然記念物に指定されているが特別に保証された家系のイヌの血液を調べるとNeuGc型は常染色体優性で遺伝することが判った。当時岐阜大学の田名部雄一教授が多くのイヌの血清中の酵素蛋白の集団遺伝学的調査から日本犬の起源を研究されており我々の研究が図らずも同氏の研究にお役に立った。NeuGcはNeuAcよりも酸素1原子多く、NeuAcにある種のモノオキシゲナーゼが触媒して酸素が転移するが、その反応にはR.SchauerらによりCMP-NeuAcの段階で起こるとされていた。その詳細なメカニズムは私の協力者でこの講演の

座長である鈴木明身のグループにより解析され、Cytochrome b₅の関与する水酸化反応が本体であることが発見され、水酸化酵素がクローニングされた。さらにヒトではこの酵素遺伝子中に92塩基対の欠失があり、これがヒトの組織でNeuGcの欠損する原因であることが明らかにされた。ヒトの組織にはほとんど全くNeuGcは存在しないがチンパンジーには存在する。A.Varkiはその欠失はチンパンジーからヒトの祖先に移行した後に起こったと報告している。

シアル酸研究会

1980年にシアル酸の研究者が小倉治夫教授の肝煎りでシアル酸研究会を発足させ、毎年セ

Sialic acids in submaxillary mucin				
Species	Derivatives	Optical rotation	Degradation temperature	Formula
Bovine	N- and O-diacetyl	+8 ± 2°	152-3°C	C ₁₃ H ₂₁ NO ₁₀
Porcine	N-glycolyl	-31 ± 2°	185-7°C	C ₁₁ H ₁₉ NO ₁₀
Sheep	N-acetyl	+32 ± 2°	185-7°C	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉
Horse	diacetyl	-59 ± 2°	183-7°C	C ₁₃ H ₂₁ NO ₁₀

Blix et al.(1955)

図4.

Type of Hematoside from Dog RBC					
European Dogs			Oriental Dogs		
Breeds	NeuAc	NeuGc	Breeds	NeuAc	NeuGc
Beagle	371	0	Japanese origin	546	329
Collie	10	0	(Shiba-, Kai-, Kishu-dogs)		
Maltese	43	0	Chinese origin		
Pointer	38	0	(North)	13	0
Shepherd	41	0	(South)	5	8
St. Bernard	5	0	Korean native	50	151
Yorkshire terrier	22	0	Taiwanese native	97	11
Others	102	0	Eskimo	18	1
Total	632	0		729	500

図5.

ミナーを開き時々日本を訪れる外国の研究者を招待して講演を依頼した。1988年の5月にはSchauer教授と私が組織してベルリンの日独センターで大シンポジウムを行い、440名が参加した(図6)。これらの活動は国際シアル酸会議の礎となった。

最後にこの機会を与えて下さった鈴木康夫、木曾真、北島健の諸教授に感謝します。

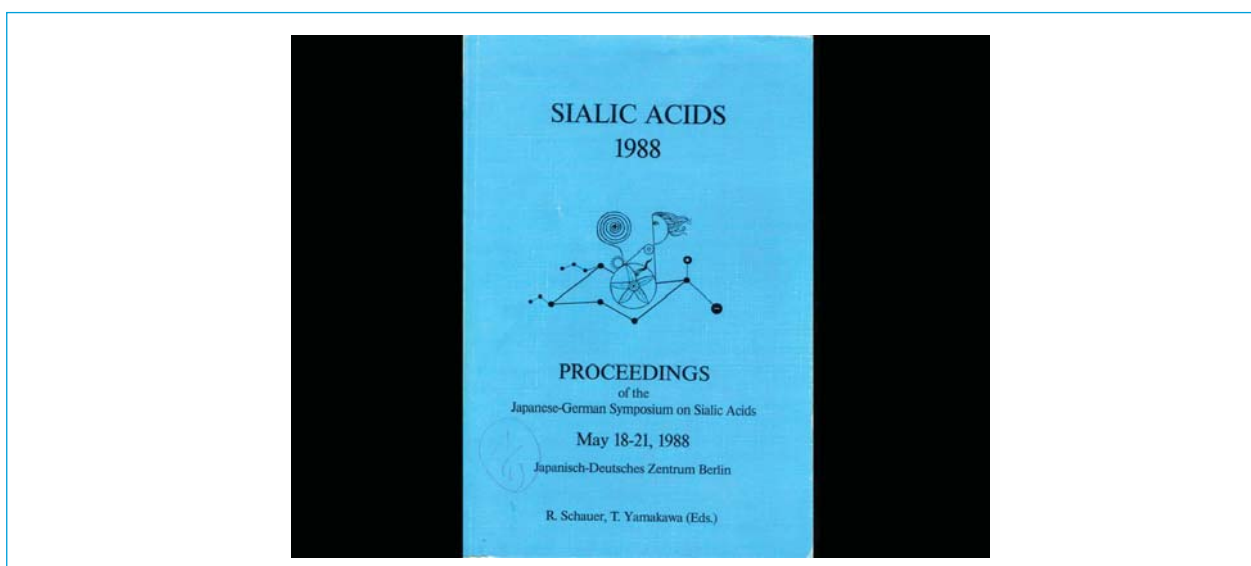


図6.

Profile



1921年生れ。東京大学医学部卒業後、東京大学伝染病研究所(現医科学研究所)で分岐脂肪酸の代謝の研究で研究生活を開始した。1950年ウマ赤血球膜から糖脂質ヘマトシド(GM3)を分離精製、構造をJ. Biochem.に報告、生体膜にシアル酸をもつ糖脂質の存在することを発見した。ほ乳動物赤血球膜の糖脂質に種差があること、ABO血液型抗原が糖脂質であることを発見した。1959年伝染病研究所教授、1966年東京大学医学部生化学教授。糖脂質生化学のパイオニアの一人。多くの糖鎖生物学研究者を育成した。東京都臨床医学総合研究所所長、東京薬科大学学長。1975年朝日賞、1976年日本学士院賞受賞、1988年から日本学士院会員。