**野** 

資 料

## 細 菌 多 糖 類 化 学 の 展 望

三. 倘 旭 (大阪大学工学部醱酵工学教室)

約30年前に AVERY, HEIDERBERGER 等が肺炎菌 多糖類 (Pneumococcus polysaccharide) について 免疫化学的な研究を 行つて 以来多くの 細菌の Endocellular, Exocellular 或いは Capsular polysaccharide が その抗原性とも関聯して生化学者及び化学者に興味を持たれその中構造も明かにされたものも多い<sup>1)</sup>

又第二次大戦後血漿増量剤として有効な Dextranが 工業生産される様になり醱酵工業に於ても新しい分野 を提供している。一般に細菌多糖類は生成量が少いた め構造についての知見を得る事は困難であつたが,近 年 Chromatography<sup>2),8)</sup>の発展に依り構成糖の分離, メチル 誘導体より 各成分の 分離等が 比較的容易とな り,更に合成高分子化学の発展に平行して粘度,超遠 心分離,或いは光散乱,赤外線等物理化学的測定に依 り分子の形,大きさについての知識が得られる様にな り<sup>4)</sup>,構造も次第に明かにされつゝある。

細菌多糖類の生成機構或はその生物学的な役割に関 しては未知の部分が多く今後の解明を待たねばならな いがこゝでは化学的な面から最近,二,三年の研究の 成果を紹介したい.

### 〔1〕 單純多糖類(Homopolysaccharide)

単一の糖より構成される Dextran, Levan, Bacterial Cellulose 及び Glycogen 等が挙げられ 生成量も比較 的大なる所から構造の明かにされたものが多い.

#### Dextran:

Leuconostoc 属菌に依り Sucrose から生産される主として  $\alpha$ -1:6 Glycosidic linkage より成る Glucose polymer で分子量数百万の Native dextran を部分分解して得る分子量75,000±15,000 ( $[\eta]$ =0.23±0.05)の Clinical dextran が血漿増量剤として有効なる所より米,英に於て大規模な生産が行われ本邦に於ても若干の生産が開始されている。

工業生産に使用される菌株は L. mesenteroides N.R. R.L. B-512で95%以上の  $\alpha$ -1:6 結合を有する分岐の少い dextran を生産するが工業的なデーターとしてはHINES 等(1953) $^{6}$ )の記述があり、最近 MARTIN 等(1955) $^{6}$ )は主として Clinical dextran の分子量分布

と生理的関係について概説している.

Dextran には 1:6 結合の外に 微量の 1:4 n 及び 1:3 結合の分岐があり STACEY 等8) (1954) は Betacoccus arabinosus (Leuconostoc?) の生産するDextran をメチル化して加水分解物より 2:3:4:6-tera-methyl-(17%), 2:3:4-tri-methyl-(51%) 及び 2:4-di-methyl-D-glucose (26%) を分離して 7個の α-1:6 Glucose unit 当り 1個の α-1:3 の分岐のある事を認めた. 最近 Dextran 分子中の 1:3 及び 1:4 結合の含量に就いては過沃素酸酸化法が発達し9つ10, Periodate の消費量と生成する蟻酸を定量する事に依り可なり正確に求められているがWOLFF等(1954)12)は種々のType のDextran の酸化物を還元して 1:6 結合よりは Glyceroを 1:4 結合よりは Erythritol を又 1:3 結合 よりは Glucose を分離して滴定法より正確なる事を報告している (Table 1).

(117)

Table 1. Determination of dextran structure by periodate oxidation<sup>12)</sup>

Dextran from L.	Titration analysis (%)			Oxidation Products (%)		
mesen te- roides NRRL*	1,6-	1,4-	1,3-	Glycerol	Erthritol	Glucose
512	95	5	0	95	0	5
742	58	18	24	64	8	28
523E	85	11	4	93	3	4
1054	95	5	0	95	2	3
1355	57	8	35	53	0	47

血漿増量剤の用途に関聯して適当な Size のDextran を得る方法が検討されているが通常の稀塩酸(pH 1~2) に依る分解の外に WOLFF 等 (1953)<sup>13)</sup> は 180~200°Cでの熱分解を報告し NADEL 等 (1953)<sup>14)</sup>は培養条件のコントロールに依る直接生産の方法を報告して居る. 又酵素合成の場合に Primer として 1~2%の低分子 (分子量15,000~20,000) を添加して高收率で Clinical dextran を得ている<sup>15)</sup>.

アルコールに依る分別とその分子量分布に関しては、

資

多数の報告があり $^{10-19}$ ,のぞましい大きさのFraction を高收率で[得る方法が検討されているが通常分解物 ( $\eta_r$ =2~2.5 at 5%conc.)を $^{45}$ ~ $^{50}$ %×タノール,又はエタノールにより分別沈澱せしめた部分を更に再分別して可及的に均一な分子量の Clinical dextran を得ている。分子量は粘度及び光散乱法で測定されているが SENTI等 ( $^{1955}$ ) $^{20}$ は二十数種のDextran fraction に就いて重量平均分子量 Mw と極限粘度 [ $^{19}$ ]の間に[ $^{19}$ ]= $^{9.78}$ × $^{10-4}$ M $_w$ 0.50 なる 関係のある 事を報告した。

最近 Dextran 分子の Heterogeneity について研究が進められているが JEANES (1954)<sup>21)</sup> は96株の菌の Dextran の性質を調べα-1:3 結合の含有量により Dextran を三つに大別したが彼は更に菌の Colonical type との関係<sup>22)</sup>及び Dextran 調製の際アルコール濃度と DextranのHeterogeneity の関係を調べている<sup>23)</sup>.

低分子 Dextran([ŋ]≅0.03) を Chlorosulfonic acid で硫酸エステル化した Dextran sulphate が Heparin と同様, Blood anticoagulant として有効な事が RICKETTS 等に依り報告されて居り²⁴), 25), 又S³5 labeled sulphate を Rabbit に注射すると Urine 中には低分子のものから先に排泄され注射後2日で30%が、更に4日後には50%が現われるという²6).

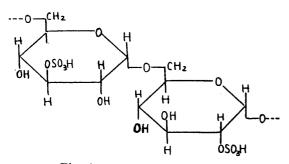


Fig. 1. Dextran Sulphate<sup>24</sup>)

#### Nigeran:

YUILL (1952)<sup>27)</sup>は Asp. niger の1 株を Sucrose (15%濃度) 培地で生育させその Mycelium を熱水抽出する事に依り冷水不溶の Starch 様の Glucosan ([@]D+283) を得た.

Fig. 2. Possible repeating unit of "Nigeran"

その構造は STACEY 等<sup>28)</sup> (1953) に依り明かにさ れた. 即ちメチル誘導体を加水分解すると同量の2:3: 6-tri-methyl- と2:4:6-tri-methyl-D-glucose が得られ Original polysaccharide を部分分解すると maltose 及 び Nigerose [3-o-a-glucopyranosyl-D-glucose] 及び少 量の isomaltose が得られる事より Fig.2 の如くα-1:4 とa-1:3の交互に連結した Unbranched polymer が 考えられた. 猶微量の1:6結合もあるとしている. 末端基定量に依り 300~350 Unit の Chain length が あり Mycodextran<sup>29)</sup>と同様なもので "Nigeran" と命 名した. 更に BARKER 等 (1953)30)は Zn の存在が Nigeran の生成を促進する事を認め、又種々の糖代謝 を Resting Cell 及び Cell-free enzyme を用いて行つ ているが Nigeran は Transglycosidaseに依り Disaccharide, Trisaccharide が Precursor となりa-1:4及  $\text{ } \vec{\alpha} \cdot 1:3$  結合が形成されるものとしている.

#### Bacterial cellulose:

Acetobacter xylinumが Cellulose を合成する事は古くから知られているが1)、MINOR 等31)(1954)は D-glucose-2-Cl<sup>14</sup>を用いて生成機構を調べた所 Cellulose 分子中の相当量が Glucose の直接重合に依り合成される事が分つた。 A. aceti genum も Glucose より Cellulose を生成する事が報告されているが32)、STACYE 等(1954)<sup>33)</sup>は、Acetalysis、Methylation 及び Infra-red 等に依り Cotton cellulose と同じくβ-結合で600 Glucose unit より成る事を確認している。又 Mannose を用いた場合にも Polysaccharide 中に Glucose 及び Cellociose のみを見出している。猶 STACEY 等(1954)<sup>34)</sup>は Glucose 誘導体及び種々の Glucosan の Infra-red spectrum をとつているが結合の種類により特有の吸收があり(Fig.3)、又α-結合では844cm<sup>-1</sup> にβ-結合では891cm<sup>-1</sup>に吸收のピークがある事が示されている。

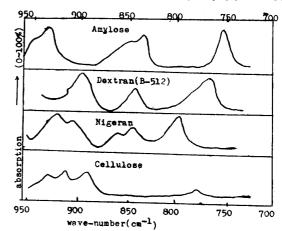


Fig. 3. Infra-red spectra of some glucose-polymers<sup>35</sup>?

#### 〔2〕 複合多糖類(Heteropolysaccharide)

構成糖としては Galactose, Mannose, Rhamnose, Fucose を含み稀に Glucose を含むものもある. 更に Glucuronic acid 及び Glucosamine を含むものが多く所謂抗原多糖類と称され免疫的にも興味あるものが多いが大部分は構造が明かにされていない.

Pneumococcus の多糖類: 1923年 AVERY 等の初期 の研究以来現在迄三十余種の Specific polysaccharide が分離されているがその中 S-■ のみが 構造が明かに されて居り他の型のものに就いては構造のはつきりし た他の多糖類との交叉反応等を利用して大体の構造を 知り得る. 最近 HEIDERBERGER (1953)35) はS-XVIII が D-glucose(5), L-rhamnose(1)及び燐(1)より構成さ れる事を報告した. 又 STACEY 等(1955)36)はS-Iの構 造を研究している. 構成糖は L-rhamnose, D-glucose 及び D-glucuronic acid であるがそのメチル誘導体よ り 2:4-dimethyl-L-rhamnose (7部), 2:3-dimethyl D-glucose (1部), 2:3-dimethyl-D-glucuronic acid (2部) 及び 2:3:4-D-glucuronic acid (1部) を分離 して 高度に 分岐した 構造を持ち 末端は Glucuronic acid で Glucose は  $\alpha$ -1:6 と $\alpha$ -1:4 で分岐している. このために S- ¶ の抗血清と Dextran の間に交叉反応 が起るものとしている.

Azotobacter chroococcum の多糖類37): 窒素固定菌だ る A. chroococcum 及び Rhizobium radicicolum は水浴 性の Dextran 様 Polysaccharide を生成する事が知 られているが STACEY (1954) は A. chroococcum の 多糖類が Glucose (3部), Galactose (1部) の外に 約4%の Glucuronic acid を含み Type III Pneumococcus の抗血清と交叉反応を起す事を見出し、又メ チル 誘導体 よりの 中性部分 として 2:3:6-trimethyl-(40%), 2:4:6-trimethyl-(15%) 及び少量の 2:3-dimethyl-D-glucose の外に 2:4:6-trimethyl-D-galactose (15%) を分離し、酸性部分より 2:4:6-trimethyl-(30 %), 2:3-dimethyl-D-glucose (30%) 及び少量の 2:3 dimethyl-D-glucuronic acid を分離し一方 Infra-red 分析で β-結合をなす事が明かにされた。 この 結果 Glucose と Galactose は1:3で、Glucose 同士は1: 4 及び1:3 で、Glucuronic acid は1:4 で結合して いるものと考えられる.

Streptococcus の Hyaluronic acid: Group A Streptococcus が Hyaluronic acid を生成する事は HEIDER-BERGER(1937)により明かにされているが最近 TOPP-ER 等<sup>38)</sup> (1953), DORFMAN 等<sup>39)</sup>(1953) はGlucose-l-C<sup>14</sup>を用いてその生合成の機構を調べて、Hyalur-

onic acid 中の Glucosamine の C-1に Radioactivity が集中している事から Glucose は解裂する事なくGlucosamine に変換しての時 Glutamine が必要とされる<sup>40)</sup>. 最初 Glucose→Glucosone の経路を通るものと考えられていたが其後 Glucosone-1-C<sup>14</sup> を用いた実験からこれは否定された<sup>41)</sup>. 又 Hyaluronic acid の Glucuronic acid 部分も Glucosamine と同様に Glucose から直接生成する。猶 Glucosamine は Precursor となるが Glucuronic acid は利用されない。

Aerobacter **の多糖類**: WILKINSON (1955)<sup>42)</sup> は A. aerogenes の 1 株A<sub>3</sub>(S<sub>1</sub>)が Glucose, Galactose, Xylose 等を利用して Exocellular Polysaccharide (「a」<sub>D</sub>-50)を生成する事を 見出しその 加水分解物より Cellulose column を用いて D-glucose(50%), L-fucose (10%)及び Uronic acid (29%)を分離したが DUDMAN (1956)<sup>43)</sup>は Aerobacter-Klebsiella に属する数株の Capsular 及び slime を構成する多糖類を分離し、何れも Complex uronide で Uronic acid (17~30%)の外 Fucose(10%), Glucose(20~50%)等より構成される事を報告した。最近著者等も腐敗果実種子より分離した A. cloacase に属する菌が高濃度 (10%)の Sucrose 培地より Uronic acid の 外 hexose 及び Pentose を含む Complex polysaccharide を高收量で生成する事を認めた<sup>44)</sup>.

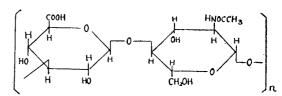


Fig. 4. Possible repeating unit of hyaluronic acid

B. anthracis の多糖類: Hapten としての 作用を 有する多糖類であるが CAVE 等46) (1954)はこの Capsular polysaccharide より血清学的に Active な二種の物質を分離し、バリタで沈澱せる区分より燐酸を含んだ Mannan(1:4結合?)を得、他の部分より得たものは D-galactose と N-acetyl-D-glucosamine (1:1)で構成される事を報告した。

最近 SMITH 等<sup>46)</sup> (1956) は In vivo で生育した 関体より mild な方法で精製して [a]p+79 の多糖類 を得ているが Galactose 38~43%, N-acetyl-glucosamine 38~43%及び a-carboxylamino N 0.3%を含み, 加水分解の経過より Glucosamine の結合に2種ある 事を示唆した。更に物理化学的 測定に 依り 分子量 29,000なる値を得ている<sup>47)</sup>。これとは別に B. anthracis には γ-carboxyl group で結合した Polyglutamic, acid も含まれ<sup>48)</sup> Extracellular のものは分子量216,000, Intracellular ものでは分子量75,000なる事が報告されている<sup>49)</sup>.

B. polymyxa 変株の多糖類50): 著者等が Lactose を 直接利用する菌を検索した際に得た B. polymyxa var. lactoviscosus が好気的条件下で Lactose を炭素源とし て培養する場合にのみ多量の Complex polysaccharide を生成する事を見出した. 5~10%の Lactose, 酵母 エキス又は硫安を含む炭酸カルシウム添加の培地で約 1 週間振盪培養すると粘稠な醱酵液が得られるが、最 近通気搏拌によりタンク培養で原料糖の25%の収率で 得ることに成功した.通常少量のカルシウムを含むが 稀酸及びアルカリ処理後透析を行うか銅塩として精製 すると窒素及び灰分を殆んど含まない精製物が得られ る. [α]<sub>D</sub>-75で Native なものは極限粘度 1.8~2.0で 相当分子量は大きいものと考えられるが稀酸(pH1~ 2)に依り容易に部分分解されてアルコール分別に依 り種々の分子量のものが得らる.メタノールでは沈澱 困難であるが 60% (V/V) プロパノールでは完全に沈 澱する.

抗原性, 毒性は認められず Pyrogen 陰性なる点よりその臨床的応用を期待している.

構成糖は Methylpentose と Aldohexose であり, はじめ Fucose 及び Glucose と考えていたが 其後加 水分解物を Cellulose column で分離すると L-rhamnose(2部)とD-galactose (1部)の結晶を得たがfucose は少量含まれるのみであつた. 現在メチル誘導体を調 製して構造を検討しているがその加水分解物は5成分 より成り Cellulose column で分離すると 2:3:4-trimethyl-L-rhamnose(13%), 2:4-dimethyl-L-rhamnose (41%), 2:4:6-trmethyl-D-galactose(30%) の外少量 の4:6 (?)-dimethyl-D-galactose 及び4(?)-monomethyl-L-rhamnose を得た事より Galactose と Rhamnose が 1:3 で結合した線状に近い構造で Galactose 及び Rhamnose が分岐点となり末端が Rhamnose よ りなる短い側枝があると思われる。猶過沃素酸酸化で も此の事は支持され更に加水分解に依る旋光度の変化 ([a]n-75→[a]n+39) よりβ-結合が想像される.

其の他の多糖類: SCHMIDT<sup>51)</sup>(1952)は streptococcus の菌体をペプシン消化する事に依り Rhamnose 5 モル, Glucosamine 2 モルの比で構成される 沈降 恒 数  $S_{20}=1.17$ なる多糖類を分離したが、St. pyogenes の或る株は maltose より Starch 様の多糖類を生成する事が報告されている $^{52}$ )。赤痢菌多糖類もよく知られて居

るが SCHNELL<sup>58)</sup> (1953) は Shigella flexneri の菌体より N-acetylglucosamine (15%), glucose(37%), Rhamnose(30%) の外1.7%の燐より成る 多糖類を分離した. 最近 DAVIES<sup>54)</sup> (1956) は Pasteurella pestisの hapten としての作用をもつ Lipopolysaccharide に就いて詳細なる研究を行いてれがGlucose, Glucosamine 及び未知の Aldopentose より成り Polysaccharide 部分の分子量は10,000~15,000なることを明かにしている.

終りに臨み御指導,御校閲を賜わつた寺本教授に深謝し,又協力して戴いた八木,石川両君に感謝します.

#### 文 献

1) EVANS, T.H. and HIBBERT, H.: Advance in Carbohydrate Chem. 2, 203 (1946). 2) Kow-KABANY, G.N.: Ibid 9, 304 (1954). 3) BIN-KLEY, W.W.: Ibid 10, 55 (1955). 4) GREE-NWOOD, C.T.: Ibid 7 289 (1952) 5) HINES, C.E.: Ind. Eng. Chem. 45, 692 (1953). 6) MARTIN, C.E.: Chem. & Ind. 184 (1955). 7) STACEY, M. et al: J. Chem. Soc. 1555 (1948) 8) STACEY, M. et al.: Ibid. 2395 (1954). JEANES, A. et al.: J. Am. Chem. Soc. 72, 2655 (1950)10) LOHMAR, R. et al.: Ibid 74, 4974 (1952).11) RANKIN, J.C. et al.: Ibid 76, 4435 (1954)12) WOLFF, I.A. et al.: Ibid 76, 4429 (1954)13) WOLFF, I'A. et al.: Ind. Eng. Chem. 45, 755 (1953) 14) NADEL, H. et al.: App. Microbiol. 1, 217 (1953). 15) HELLMAN, N.N. et al.: Ind. Eng. Chem. 47, 1593 (1955). 16) WOLFF, I.A. et al.: Ibid 46, 370 (1954) 17) WOLFF, I.A. et al: Ibid 46,2605 (1954). 18) RIDDICK, J.A. et al.: Anal. Chem. 26, 1149(1954). 19) ZIEF, M. et al.: Ind. Eng. Chem. 48, 119(1956). 20) SENTI, F.R. et al.: J. polym. Sci. XVII, 527 (1955).21) JEANES, A. et al.: J. Am. Chem. Soc. **76**, 5041 (1954). 22) JEANES, A.: J. Bact. **71**, 167 (1956). 23) WILHAMS, C.A. et al.: Arch. Biochem. Biophy. 59, 61 (1955). 24) RICKETTS, C.R.: Biochem. J. 51 129 (1952). 25) RICKETTS, C.R. et al.: Nature 173, 31 (1954). 26) RICKETTS, C.R. et al.: Biochem. J. 58, 532 (1954)27) YUILL, J.L.: Chem. & Ind. 755 (1952). 28) STACEY, M. et al.: J. Chem. Soc. 3084 (1953). 29) Dox, et al: J. Biol. Chem.

**18**, 167 (1914). 30) BARKER et al: J. Chem. Soc. 3588 (1953). 31) MINOR, F.W. et al.: J. Am. Chem. Soc. 77, 1244 (1954). 32) KANSHAL et al.: Biochem. J. 48, 618 (1951). 33) STACEY, M. et al.: J. Chem. Soc. 1501 (1954). 34) STACEY, M. et al.: Ibid 171 (1954). 35) HEIDERBERGER, M. et al.: J. Am. Chem. Soc. **26**, 1317 (1953). 36) STACEY, M. et al.: J. Chem. Soc. 1537 (1955). 37) STACEY, M. et al.: Ibid 1925 (1954) 38) TOPPER, Y.J. et al.: J. Biol. Chem. 203, 135 (1953). 39) Dor-FMAN, A. et al.: Ibid. 203, 213 (1953). LOWTHER, D.A. et al.: Biochem. J. 62, 304(1956). 41) DORFMAN, A. et al.: J. Biol. Chem. 216, 549 (1955)42) WILKINSON, J.F. et al.: Biochem. J. **59**, 446 (1955) 43) DUDMAN, W.F. et al.:

Ibid **62**, 289 (1956) 44) 寺本, 三崎, 東: 大阪 酸造学会(1956年10月) 45) CAVE-BROWN-CAVE, J.E. et al.: J. Chem. Soc. 3866 (1954). SMITH, H. et al.: Biochem. J. 63, 447 (1956). 47) RECORD, B.R. et al.: Ibid 63, 453 (1956). 48) ZWARTOUW, T. et al.: Ibid 63, 437 (1956). 49) RECORD, B.R. et al.: Ibid 63, 443 (1956). 50) 寺本, 三崎等: 本誌, 32, 148, 191, 311, 315, 342, (1954), 大阪醸造学会 (1954年10月, 1956年10 月), 日本農芸化学会 (1956年4月), MIDT, W.C.: J. Exp. Med. 95, 105 (1952). CROWLEY et al.: J. Gen. Microbiol. 13, 226 (1955). 53) SCHNELL, G.W. et al.: J. Biol. Chem. 203, 837 (1953) 54) DAVIES, D.A.L.: Biochem. J. **63**, 105 (1956)

# 雑 報

#### 醱酵学熟話会 2 月例会

2月26日 (火) 午後4時半より首題の会を阪大工学 部坪井記念館で開催した。

講演

1. 酵母の遺伝育種について

阪大工醱酵 大嶋 泰治

 微生物のフェノール、スルフアターゼについて 阪大産研 助教授 原田 篤也

#### 異 動

美 田 沈氏 吹田市千里山虹ケ丘テラスハウスに 転居

河 野 正 夫氏 山口市中市39に転居

近 末 賞氏 奈良市あやめケ池北2丁目1204へ移 転

八 木 住 明氏 名古屋市西区新福寺町乗越 名糖産業KKへ就職

#### 新入会員

川口 東一氏 京都市左京区北白川 京都大学農学部 農芸化学教室

広瀬 嘉夫氏 鹿児島市山之口町 味噌醬油組合 三省製薬KK 大牟田市黃金町1丁目495 摂津酒造KK長野工場 長野県更級郡更北村人字中氷 鉋 代 田 稔氏 京都市左京区吉田下大路 49 ヤクルト 研究所

西山 正之氏 三重県桑名市片町 桑原酒造KK 吉田 俊美氏 大阪市浪速区日本橋4丁目 外山食品 KK

播磨食糧工業KK研究課 姫路市飾磨区英賀甲194 武田薬品工業KK東京支店 東京都中央区日本橋本町 2丁目9

三共KK田無工場 東京都北多摩郡田無町1450 依田 公介氏 弘前市大字吉野町2ノ1 朝日シードル工場KK弘前工場

川 义 尚氏 群馬県前橋市神明町76

山田 俊一氏 大阪市大淀区本庄川崎町3丁目 田辺製薬研究所

渡辺 清俊氏 東京都遊谷区幡ヶ谷笹塚町 KK中村屋笹島工場

上原 勤氏 名古屋市南区呼続町山大醸造合資会社 小坂 順造氏 静岡市小鹿 静岡薬科大学生化学教室

#### 辞 信

上部 楠切氏 本会費助会員江井ヶ島酒造株式会社 々長同氏は2月21日重役会議中に発病し急逝せらる。 誠に哀悼に堪えず謹みて敬弔の意を表す。氏は同社現 会長卜部退三氏の令弟で謹厳篤実な人格者で業務に熱 心な傍ら稀に見る趣味豊かな持主であつた。内外の信 望厚く斯界より悼く惜まる。