The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Alcaligenes 10C3とAgrobacteriumの細胞外多糖類の生産能力と特殊酵素を用いたサクシノグリカンタイプ多糖類の構造解明
Author(s)	久松, 眞
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1313
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Alcaligenes 10C3と*Agrobacterium*の細胞外多糖類の生産能力と特殊酵素を用いたサクシノグリカンタイプ多糖類の構造解明

1981

久松　　眞

目　　次

緒　　論 …… 1

第一章　*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3
　　における多糖類生産の自然変異 …… 5

第一節　緒　　言 …… 5

第二節　実験材料および方法 …… 6

第三節　実験結果 …… 9

1.　多糖類の生産能力の自然変異 …… 9

2.　化学変異剤や紫外線の影響、およびプラスミッド除去
　　剤の影響 …… 12

第四節　考　　察 …… 14

第五節　要　　約 …… 15

第二章　*Agrobacterium* の水溶性。水不溶性 β－グリカンの
　　生産能力の変異 …… 16

第一節　緒　　言 …… 16

第二節　実験材料および方法 …… 16

第三節　実験結果 …… 17

1.　*Agrobacterium* の保存培地にみられる異質タイプ菌
　　の共存 …… 17

2.　多糖類の生産能力の自然変異 …… 20

第四節　考　　察 …… 22

第五節　要　　約 …… 22

第三章　*Agrobacterium* の種々な菌株の生産するコハク酸含有酸性多糖類 …… 23

第一節　緒　　言 …… 23

第二節　実験材料および方法 …… 23

第三節　実験結果 …… 27

1. 酸性多糖類に含まれる有機酸 …… 27

2. 酸性多糖類に含まれる糖、および旋光度 …… 30

第四節　考　　察 …… 31

第五節　要　　約 …… 35

第四章　2つの特異な β－D－グリカナーゼによる分解とメチル化分析によって、サクシノグリカンおよび *Agrobacterium*, *Rhizobium* の酸性多糖類の構造解明 …… 36

第一節　緒　　言 …… 36

第二節　実験材料および方法 …… 37

第三節　実験結果 …… 42

1. サクシノグリカンの構造解明 …… 42

2. *Agrobacterium* の水溶性多糖類の構造 …… 50

第四節　考　　察 …… 51

第五節　要　　約 …… 53

第五章　サクシノグリカンの単位鎖オリゴ糖（SCG）の生産とその構造 …… 54

第一節　緒　　言 …… 54

第二節　実験材料および方法 …… 54

第三節　実験結果 …… 56
1.　オリゴ糖の生成 …… 56
2.　SCGの生成における抗生物質の影響 …… 57
3.　SCGの精製とその性質 …… 59
4.　SCGの構造 …… 59
第四節　考　　察 …… 63
第五節　要　　約 …… 66
総　　括 …… 67
謝　　辞 …… 71
引　用　文　献 …… 72
本論文に関係ある主な報文 …… 78

緒　　論

微生物の生産する多糖類は、細胞内多糖類，細胞壁多糖類，細胞外多糖類の三つに大別される。細胞内多糖類は、エネルギーの貯蔵を目的としたもので主にグリコーゲンである。細胞壁多糖類には、ペプチドグリカンやリポ多糖類などがある。これらの多糖類は細胞の構成成分であるために生産量は多くない。これに比べ、細胞外多糖類は最適培養条件で多量に生産される。また、これを生産できなくなった変異株でも野生株と同じように増殖できるので、細胞外多糖類は細胞の生命に必須のものではなく、ウィルスや食細胞などの攻撃に対して抵抗性を示したり、急激な乾燥を防止したりするものであると言われている。[1] また、*Xanthomonas* の生産する細胞外多糖類が宿主植物の導管をふさいで植物を枯死させたり、排水中に生育している *Zoogloea* の多糖類は自浄作用を示すと言われている。[1] マメ科植物の根に根瘤を作る *Rhizobium* の細胞外多糖類は、細菌が植物細胞に付着するのに役立っている。[2]

最近、細胞外多糖類のいくつかは、数個の単糖からなるオリゴ糖が単位鎖となって反復している構造であることが明らかにされた。[3) 4) 5)] そして、多糖類の構造と物性との関係について、基礎と応用の両面から興味がもたれるようになってきた。中でも、工業的に生産されている *Xanthomonas campestris* の多糖類、ザンサンガムについては、数多くの報告がある。[6) 7)] この多糖類は、低濃度で高い粘性を示し、しかもその粘性は比較的広い温度、pH範囲で安定[8]なため、油田さく井用粘滑剤などに使用されている。

原田，吉村[9]は1964年10％のエチレングリコールを唯一の炭素源として生育できる *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3を土壌より分離した。この菌株は、種々の炭素源からコハク酸を含む新しい酸性多糖類を生産することがわかり、このものはサクシノグルカンと命名された。[10) 11) 12)] このCa型の多糖類

は、無機塩の添加や、広い pH 範囲に対して安定な粘性を示す[13]ことから、食品添加物として利用価値の高いものと考えられる。

本論文において示すように、この多糖類は、D－グルコース，D－ガラクトース，コハク酸，ピルビン酸が7：1：1：1の割合で構成されるオリゴ糖の単位が反復した構造で、さらに0.1～0.2の割合で酢酸がところどころに結合していることが明らかにされた。最近、この多糖類の名称をサクシノグリカンと改めた。

A. faecalis var. *myxogenes* 10C3は、サクシノグリカンのほかに、少量の水不溶性多糖類を生産するが、この保存菌株中からサクシノグリカンを生産せず、水不溶性多糖類を多量に生産する変異株が分離された。[14] この多糖類は興味あることに、その水懸濁液を加熱すると冷やさなくても高い温度で凝固する性質があり、カードランと命名された。[15) 16) 17] カードランは、ほとんどすべてβ－1,3－D－グルコシド結合からなり、[18] β－1,4－D－グルコシド結合からなるセルロースとβ－1,3－D－グルコシド結合である点が異なる。カードランは、マウスの移殖ガンに対して抗腫瘍性を示すことが認められている。[19) 20] 簡単な構造をもつカードランが特有なゲルを形成する一方、抗腫瘍性を示すことから、この多糖類の高次構造の研究は非常に重要である。すでにこの高次構造に関しては、*X*線回析、[21) 22]^{13}C－NMR、[23] 電子顕微鏡[24) 25]などを用いて総合的に研究されている。

Nakanishi ら[26]は、醗酵研究所に保存されている *Agrobacterium* 17菌株中6菌株がカードランを生産することを見出した。さらに最近、Amemura ら[27]は、*Rhizobium* の菌株の中にもカードランを生産するものが存在することを認めた。また、これらの菌株は、細胞外にサクシノグリカンと糖組成の類似した水溶性多糖類をも生産することがわかってきた。

ところで、サクシノグリカンの構造については、Saito ら[28]が化学的な方法で研究を行なったが、構造が複雑なために解明するに至らなかった。一方、Harada ら[29]は、サクシノグリカンを唯一の炭素源として生育できる細菌、*Flavobacterum*

sp. M 64 を土壌より分離し、その菌株が生産する2つの酵素が、サクシノグリカンの構造解明に役立つらしいことがわかってきた。[30) 31)]

以上、細菌の生産する細胞外多糖類、主に *A. faecalis* var. *myxogenes* の生産するサクシノグリカンとカードランに関する研究経過を記述したが、これらの多糖類を生産する菌株の自然変異や、サクシノグリカン以外のコハク酸を含む多糖類の研究は、ほとんど報告されていないし、さらにサクシノグリカンの構造も解明されていない。そこで本論文では、これらの点を明らかにするため、次に示す点について詳細な研究を行なった。

第一章では、*A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3における多糖類生産の自然変異について、変異株を感度よく検出できるアニリンブループレートを使用し、変異株の出現する現象を調べた。

第二章では、*Agrobacterium* の水溶性,水不溶性β－グリカンの生産能力の変異について、第一章と同じ方法で調べた。

第三章では、第二章で調べた *Agrobacterium* の生産する水溶性多糖類について高速液体クロマトグラフィーとH^1－NMR分析により構成有機酸を、またガスクロマトグラフィーにより構成糖の分析を行なった。その結果、これらの多糖類は有機酸としてコハク酸とピルビン酸、それに少量の酢酸を、糖としてD－グルコースとD－ガラクトースを含むことが明らかとなった。

第四章では、サクシノグリカンおよび *Agrobacterium*, *Rhizobium* の酸性多糖類の構造研究を行なった。*Flavobacterium* の2つの特異なβ－D－グリカナーゼにより、サクシノグリカンを単位鎖8糖類を経て、2つの4糖類に分解し、これらのオリゴ糖および多糖類のメチル化分析の値を比較検討した結果、サクシノグリカンの構造は、単位鎖8糖類が反復した構造であることがわかった。一方、*Agrobacterium* と *Rhizobium* の酸性多糖類の構造についても同様にして調べたところ、有機酸の含量に違いはあるものの、その他はサクシノグリカンのものと

全く同じであった。

第五章では、サクシノグリカンの単位鎖オリゴ糖（ＳＣＧ）の生産とその構造について調べた。このオリゴ糖は、ある変異株によって多量に生産された物質で、サクシノグリカンの生合成の中間体と関連性のあるものと思われ、サクシノグリカンの生合成を考える上で、極めて重要な物質である。

第一章　*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 における多糖類生産の自然変異

第一節　緒　　言

1965年、コハク酸を含む新しい酸性多糖類、サクシノグリカンを得るため、*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3の大量培養が行なわれた。しかし、この時培養液の粘度は期待された程高くならず、サクシノグリカンはわずかしか得られなかったが、加えたグルコースは大部分消費されていた。原田らはこの培養液を調べ、加熱すると寒天やコンニャクのようなゲルになる多糖類、カードランを発見した。[14)～18)]

サクシノグリカンを生産しなくなった原因として、親株の10C3が変異を受け、培養中その変異株が主として生育するためにサクシノグリカンの生産が減少し、そのかわりにカードランが多量に生産されたと考えた。そして、保存菌株中からカードランのみを多量に生産する変異株（10C3K）の純粋分離に成功した。[14)] このように、菌株10C3の多糖類の生産能力の不安定性については以前から知られていた。

Nakanishi ら[26) 32)]はカードランがアニリンブルーの染料で特異的に青く染るのに対し、サクシノグリカンは染らないことを見出した。アニリンブルーを含むプレートに、菌株10C3を生育させると粘稠な白色コロニーとなり、変異株は青色コロニーとなった。このプレートを使用すると、変異株を高感度で検出することができるため、多糖類の生産能力の変異を研究するに極めて都合のよいものである。

本章では、*A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3における多糖類の生産能力の自然変異について、変異株の出現する条件および変異株の多糖類の生産性について調べた。

第二節　実験材料および方法

使用菌株

Alcaligenes faecalis var. *myxogenes* 10C3（IFO 13714）を親株として使用した。[11] 菌株10C3Kは、親株をエチレングリコールの含んだ合成培地で繰返し植えつぎを行なったものから純粋分離することによって得られた。[14]

培地組成

下記の培地組成を使用した。

1. PY培地（菌株の保存用培地として使用した。）

ポリペプトン	10 g
酵母エキス	5 g
食　塩	5 g
水道水	1,000 mℓ

pH　7.2

固体培地を作るときには、寒天を2％となるように加えた。

2. AB培地[26]（カードランを生産する菌株の検出に使用した。）

グルコース	10 g
酵母エキス	5 g
アニリンブルー	0.05 g
寒　天	20 g
水道水	1,000 mℓ

pH　7.2

グルコースは別に殺菌した。

3. 合成培地[33]（多糖類の生産用培地として使用した。）

グルコース	40 g	$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	10 mg
$(NH_4)_2HPO_4$	1.5 g	$ZnCl_2 \cdot 7H_2O$	70 μg

KH_2PO_4	1.0 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	50 μg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	20 μg
NaCl	10 mg	H_3BO_3	10 μg
$CaCl_2$	10 mg	$CaCO_3$	10 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10 mg	蒸留水	1,000 mℓ

pH 7.2

グルコース，$CaCO_3$ は別に殺菌した。特に、$CaCO_3$ は 120 ℃，5時間乾熱殺菌した。

アニリンブループレート（以後ＡＢプレートと略称す）における青色コロニーの検出

菌体懸濁液 0.1 mℓ を ＡＢ プレートに広げ、30 ℃ 5日間培養し、コロニーの染色性を調べた。多量のサクシノグリカンと少量のカードランを生産する菌株 10C3 はアニリンブルーとわずかに染まる粘稠な白色コロニーを形成した。カードランのみを生産する菌株 10C3K は、しわのある青色コロニーを形成した。白色のコロニーが優性に生育していると、青色コロニーを検出することは困難になるが、白色コロニーに対する青色コロニーの比が 5×10^{-7} までは正確に測定できた。

生理食塩水あるいはポリペプトン—酵母エキス培地で菌体を培養したときの、青色コロニーの出現頻度

新たに純化した菌株 10C3 を用い、そのＰＹ液体培地で対数期の菌体を遠心分離し、0.9 %食塩水で洗浄後、同溶液に懸濁した。その懸濁液の 1 mℓ（約 1.5×10^{10} 菌体）を500 mℓ容坂口コルベン中の 100 mℓの 0.9 %食塩水あるいはＰＹ液体培地に接種し、30 ℃で振盪培養した。定期的に試料を採取し、これを無菌水で適当な濃度に希釈してからＡＢプレートに広げ培養した。5日後、青色と白色のコロニー数を測定した。

化学変異剤と紫外線による処理

PY液体培地で対数期の菌体を集め、0.1 Mリン酸緩衝液（pH 7.0）で洗浄後、同緩衝液を使用して約10^8～10^{10}菌体／mℓ濃度の菌体懸濁液を調製し、これに種々の濃度のニトロソグアニジン、[34] エチルメタンスルフォネイト、[35] あるいは亜硝酸ソーダ[36]を加えた。30℃、60分間処理後、リン酸緩衝液で菌体を2度洗浄し同緩衝液に懸濁した。紫外線の影響を調べる実験では、菌体懸濁液を15 W紫外線燈で40 cmの高さから60秒間照射した。処理後、菌体懸濁液を適当に希釈しABプレートに広げ培養した。

プラスミッド除去剤による処理

PY液体培地で対数期の菌体を、0.1 Mリン酸緩衝液（pH 7.0）で希釈して、約10^5菌体／mℓ濃度にした。この0.1 mℓを、マイトマイシンC、[37] エチジウムブロマイド、[38] アクリジンオレンジ、[39] あるいはドデシル硫酸ソーダ[40]を含むPY液体培地に加え、30℃、2日間振盪培養した。培養液を適当に希釈後、ABプレートに広げ培養した。

多糖類生産の培養条件

PY寒天培地で2日間培養した新鮮な生育菌体の1白金耳を5 mℓの合成培地に接種し、2日間振盪培養した。これを500 mℓ容坂口コルベン中の95 mℓの同培地に接種し、30℃、5日間、1分間に120回転で振盪培養した。

サクシノグリカン、カードラン、および菌体量の測定

Haradaらの方法[41]に従って行なった。すなわち粘稠な培養液を20,000回転、60分間遠心分離後、上澄液にNaClを加え約1％濃度にし、これに2倍量のエタノールを加えた。沈殿した多糖類を遠心分離で集め、水－エタノール（1：2，V/V）の溶液で2回洗浄後、アセトンで脱水し真空乾燥してサクシノグリカンを調整した。はじめの遠心分離によって得られた沈殿物は、カードラン、菌体のほかに、$CaCO_3$を含んでいるので、まず0.1 M HClで$CaCO_3$を溶解して除去した。つぎに0.5 M

NaOH を加えて、カードランを溶解させ、20,000 回転、30 分間遠心分離した。上澄液に 1 M HCl を加えて中和するとカードランが沈殿した。これを遠心分離によって集め、水で洗浄した後、アセトンで脱水し真空乾燥した。また遠心分離で沈殿した菌体も、水で洗浄後、アセトンで脱水し真空乾燥した。

第三節　実　験　結　果

1．多糖類の生産能力の自然変異

多量のサクシノグリカンと少量のカードランを生産する菌株 10C3 を、PY 寒天培地に長く保存すると、その多糖類の生産能力は不安定となり、サクシノグリカンよりもカードランをより多く生産する菌株に変異した。この保存菌株を AB プレートに広げて培養すると、変異株は青色コロニーとして検出された。（Fig. 1－1 参照）

純化した菌株 10C3 を PY 寒天培地に接種し、30 ℃で培養した。 定期的に菌体を 1 白金耳採取し、無菌水で適当な菌体濃度に希釈した。これを AB プレートで培養してコロニーを調べた結果を Table 1－1 に示した。寒天培地で培養している日数が長くなるにつれて、青色コロニーが増加した。培養 60 日目では、白色コロニーに対する青色コロニーの比は約 $^{1}/_{100}$ であった。一方、60 日間のあいだ 2 日の間隔で植えつぎを行なったときには、青色コロニーは出現しなかった。このことから、菌株 10C3 の変異は細胞分裂の活発な時期には起らず、細胞分裂の停止した時期が長くなるにつれて、青色コロニーに変異しやすくなることが明らかとなった。しかし、固体培養では培養日数にともなう生菌体数と変異菌体数との関係を調べることは困難なため、つぎに、液体培地によって再検討した。

菌株 10C3 の菌体を第二節で記述したように調製した。これを 0.9 % 食塩水あるいは PY 液体培地に接種し、30 ℃で振盪培養した。定期的に培養液を採取し AB プレートで調べた結果を Table 1－2 に示した。

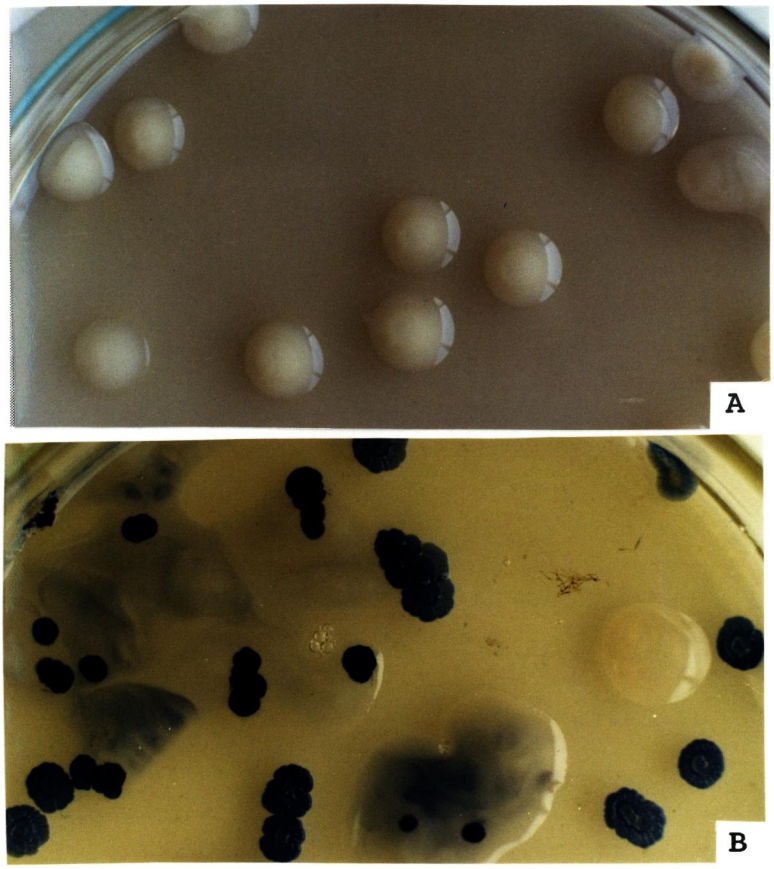


Fig. 1-1. Colonies of strain 10C3 after growth at 30°C for 5 days on AB medium.

(A) freshly purified culture; (B) culture that had been maintained for 1 year with transfers every 2 weeks.

Table 1-1. Appearance of blue colonies in stocks of cells in polypeptone-yeast extract agar

Method of incubation	Ratio of blue to white colonies				
	2 days	10 days	20 days	45 days	60 days
Continuous stock	$<5 \times 10^{-7}$	4×10^{-6}	7×10^{-4}	5×10^{-3}	9×10^{-3}
Transfer at 2-day intervals	$<5 \times 10^{-7}$	$<5 \times 10^{-7}$	$<5 \times 10^{-7}$	$<5 \times 10^{-7}$	$<5 \times 10^{-7}$

Table 1-2. Appearance of blue colonies upon incubation of cells in sodium chloride solution and polypeptone-yeast extract medium

Incubation medium	Type of colonies	Dilutions	No. of colonies/plate[a]							
			Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 6	Day 11	Day 14
0.9% Sodium chloride solution	Blue	10	0	0	0	1	5	9	12	5
	White	10^5	156	153	140	132	115	48	10	8
1% Polypeptone-0.5% yeast extract-0.5% NaCl medium	Blue	10^2	0	0	1	20	15	7	5	6
	White	10^6	18	410	400	155	72	17	6	2

[a] Cell suspension (0.1 ml) was spread on plates of aniline blue medium. Values are averages of those in two separate experiments.

生理食塩水の場合、青色コロニーは3日目から現われ11日目まで増加し続けたが、白色コロニーは3日目から減少しはじめた。11日目では、生菌体数は初めの約4.6%となり、白色コロニーに対する青色コロニーの比は $1/1 \times 10^4$ であった。PY液体培地の場合、青色コロニーの数は、総菌体数が減少をはじめる3日目で最も多くなり、このときの白色コロニーに対する青色コロニーの比は約 $1/1 \times 10^5$ であった。

つぎに自然変異した青色コロニーのいくつかを純粋分離し、それぞれの多糖類生産性を調べた。その結果をTable 1－3に示した。

Table 1-3. Formation of succinoglycan and curdlan by spontaneous mutant strains derived from strain 10C3[a]

Strain	Succinoglycan formed (mg/100 ml)	Curdlan formed (mg/100 ml)	Cells formed (dry wt) (mg/100 ml)
10C3	1,190	98	129
10C3K	0	1,410	130
MB-11	0	1,800	180
MB-8	10	1,050	185
MB-10	10	850	157
MB-9	20	1,420	205
MB-6	22	975	130
MB-1	28	960	185
MB-2	41	1,770	235
MB-7	86	1,180	178
MB-4	92	1,260	203
MB-5	105	1,080	150
MB-3	150	1,380	190

[a] Cells grown for 2 days on PY agar slants were used.

この中で、菌株10C3Kと同じようにカードランのみを生産するものは、菌株MB－11のみで、他の菌株はいずれも、少量のサクシノグリカンと多量のカードランを生産した。これらの変異株はPY寒天培地で 1年以上も保存したが白色コロニーは現われず、多糖類の生産能力は安定であった。

2. 化学変異剤や紫外線の影響、およびプラスミッド除去剤の影響

ニトロソグアニジン、エチルメタンスルフォネイト、紫外線処理によって青色コ

ロニーの出現頻度は非常に高くなったが、亜硝酸ソーダでは、その頻度は低かった。（Table 1－4 参照）

Table 1-4. Effects of chemical mutagens and ultraviolet light irradiation on mutation of the ability for polysaccharide production[a]

Mutagen	Concn (per ml)	Survival (%)	Ratio of blue to white colonies
N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine	30 μg	75	1.4×10^{-3}
	100 μg	30	2.5×10^{-3}
	500 μg	14	1.1×10^{-2}
Ethyl methane sulfonate	6 mg	65	1.4×10^{-3}
	10 mg	15	4.0×10^{-3}
Sodium nitrite	4 mg	100	8.5×10^{-6}
	8 mg	75	6.6×10^{-6}
Ultraviolet light		0.1	2.0×10^{-3}

[a] Cells with a ratio of blue to white colonies of less than 5×10^{-7} were used.

一方、プラスミッド除去剤であるマイトマイシンC、エチジウムブロマイド、アクリジンオレンジ、ドデシル硫酸ナトリウムの影響は認められなかった。

第四節　考　　察

多量のサクシノグリカンと少量のカードランを生産する *A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3は、保存期間中に、多量のカードランと少量のサクシノグリカンあるいは多量のカードランのみを生産する菌株に自然変異することがわかった。そして、この変異現象は、菌体が活発に細胞分裂している時期には見られず、むしろ細胞分裂が停止してから死滅期にかけて起こることが明らかになった。このような核酸の複製とかかわりのない自然変異は、*Bacillus subtilis* の貯蔵した胞子、[42] *Escherichia coli* の乾燥菌体、[43] あるいは貯蔵したバクテリオファージ[44] で観察されている。

菌株10C3の変異株は、ABプレートで青色コロニーとして観察されるが、これらの菌株は、初めから親株と強く結合していて、寒天培地で保存中、あるいは液体培地で振盪中に親株から分離してきた可能性も否定できない。そこで、菌株10C3をニトロソグアニジンで処理し常法に従ってアミノ酸要求性の変異株を分離した。[45] この中から多糖類生産性が菌株10C3と類似し、しかもアミノ酸を要求する菌株M17（His^-）、菌株C（Leu^-）、菌株M86（Cys^-）を選んだ。（Table 1－5参照）。これらの菌株の多糖類の生産能力は、菌株10C3と同じように不安定であり、30℃、60日間の保存で青色コロニーが現われた。それぞれの青色コロニーを鈍化して菌株M17B、菌株CB、菌株M86Bとし、アミノ酸要求性を調べたところ、菌株M17Bはヒスチジン、菌株CBはロイシン、菌株M86Bはシステインを要求し親株と同じであった（Table 1－5参照）。これらの結果より青色コロニーは親株が変異したものであることが明らかとなった。

一方、ニトロソグアニジン、エチルメタンスルフォネイト、紫外線処理によって高頻度に青色コロニーが出現した。しかし、プラスミッド除去剤では少しも影響されなかったので、菌株10C3の多糖類の生産能力の変異には、プラスミッドは関与していないと思われる。

Table 1-5. Formation of succinoglycan and curdlan by amino acid auxotrophic strains and its spontaneous mutants

Strain		Succinoglycan (mg/100ml)	curdlan (mg/100ml)
M 17	(His^-)	1353	154
M 17B	(His^-)	75	890
C	(Leu^-)	1049	79
C B	(Leu^-)	41	845
M86	(Cys^-)	1214	82
M86B	(Cys^-)	565	609

ところで、菌株10C3Kと、菌株10C3をニトロソグアニジン処理して得られた菌株22は、それぞれ多量のカードランとサクシノグリカンのみを生産するが、これらの生産性は非常に安定していた。

第五節　要　　約

多量のサクシノグリカンと少量のカードランを生産する *A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3は、保存用寒天培地に長く保存していると、遺伝子が不安定になるためか、サクシノグリカンよりもカードランをより多く生産する菌株に自然変異した。この変異は、細胞分裂の停止時期を経た細胞に起り、また、ニトロソグアニジン、エチルメタンスルフォネイト、あるいは紫外線の処理によっても高頻度で起った。変異株の多糖類生産能力は安定していて、少なくとも1年間保存していても親株に復帰しなかった。

第二章　*Agrobacterium* の水溶性、水不溶性 β－グリカンの生産能力の変異

第一節　緒　　言

中西らは、アニリンブルー法により多数の醗酵研究所保存菌株を調べた。その結果、*Agrobacterium* の菌株中には、水不溶性多糖類（カードラン）生産株が存在すること、調べた *Agrobacterium* の菌株は、すべて水溶性多糖類を生産すること、さらに、これらの保存菌株中には、ABプレート上で青色と白色のコロニーの混在するものがあることがわかった。これらのことから、*Agrobacterium* の多糖類の生産能力は、*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 のものと類似しているものと思われる。

本章では、醗酵研究所から入手した9菌株の *Agrobacterium* について、まず保存菌株の多糖類生産性を調べ、ついでそれらの多糖類の生産能力の安定性について第一章で行なった方法に準じて調べた。

第二節　実験材料および方法

使用菌株

醗酵研究所保存の *Agrobacterium radiobacter* IFO12607、IFO12664、IFO12665、IFO 13127、IFO 13256、IFO 13532、IFO 13533、*Agrobacterium rhizogenes* IFO 13259、*Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 を使用した。

培地組成、多糖類の培養方法、多糖類および菌体量の測定、ＡＢプレートによる変異株の検出、以上の実験方法は第一章の記述に従った。

第三節　実　験　結　果

1. *Agrobacterium* の保存培地にみられる異質タイプ菌の共存

Agrobacterim の保存9菌株について、多糖類の生産性をABプレートで調べた結果をTable 2－1に示す。

Table 2-1.

Formation of water-soluble and water-insoluble polysaccharides by strains isolated from various stock cultures of Agrobacterium

Strain		Appearance on AB plates	Exocellular polysaccharide produced [mg (100 ml)$^{-1}$]		Wt of organisms formed [mg dry wt (100 ml)$^{-1}$]
			Water-soluble	Water-insoluble	
A. radiobacter	IFO12607	Blue	70	500	170
	IFO12664	White	270	0	155
	IFO12665	Blue and White	670	15	100
	IFO13127	Blue and White	400	80	120
	IFO13256	Blue (two types)	130	120	150
	IFO13532	White	300	0	100
	IFO13533	White	1200	0	80
A. rhizogenes	IFO13259	Blue (two types)	120	480	160
A. tumefaciens	IFO3058	White	180	0	60

菌株12665と菌株13127は、青色コロニーと粘稠な白色コロニーを混在して生じた。また、菌株13256と菌株13259では、粘性の高い青色コロニーと粘性の少ない青色コロニーを混在して生じた。そこで、前者の2菌株については白色コロニーを、後者の2菌株については粘性の高いコロニーを分離し、残りの5菌株は保存培養そのまま使用し、4％グルコースを含む合成培地で多糖類の生産性を調べた。（Table 2－1参照）青色コロニーのみが存在していた菌株は多量の水不溶性多糖類と少量の水溶性多糖類を生産した。白色コロニーのみが存在していた菌株は、水溶性多糖類のみを生産した。青色と白色のコロニーが混在して生じた保存菌株から

分離した白色コロニーよりのクローンは、多量の水溶性多糖類と少量の水不溶性多糖類を生産した。2種類の青色コロニーが混生した保存菌株から粘性の高い青色コロニーを分離し、それに由来するクローンは水溶性多糖類と水不溶性多糖類の両者を相当量生産した。（Table 2－1参照）

これらの保存菌株中、ABプレートで青色と白色のコロニーの色調が最も鮮明であったのは、*A. radiobacter* IFO 12665である。この菌株に由来する1株の白色コロニーと2株の青色コロニーを選び純粋分離した。それぞれ菌株12665 W、菌株12665 B_1、菌株12665 B_2とし、ABプレートに生育させた。（Fig. 2－1 A，C，D参照） この菌株12665 WをPY寒天培地で30℃、60日間培養した後ABプレートで調べるとFig. 2－1 Bに示したように高頻度で青色コロニーが出現した。しかし、菌株12665 B_1、菌株12665 B_2を同じ条件で培養してABプレートで調べたが、白色コロニーの分離は認められなかった。

つぎに、これらの菌株の多糖類の生産性を合成培地で調べた。Table 2－2に示したように菌株12665 Wは、水溶性多糖類を多量に生産するのに対し、水不溶性多糖類は少量であった。一方、菌株12665 B_1、菌株12665 B_2は、不溶性多糖類を多量に生産したが、水溶性多糖類は少量しか生産しなかった。

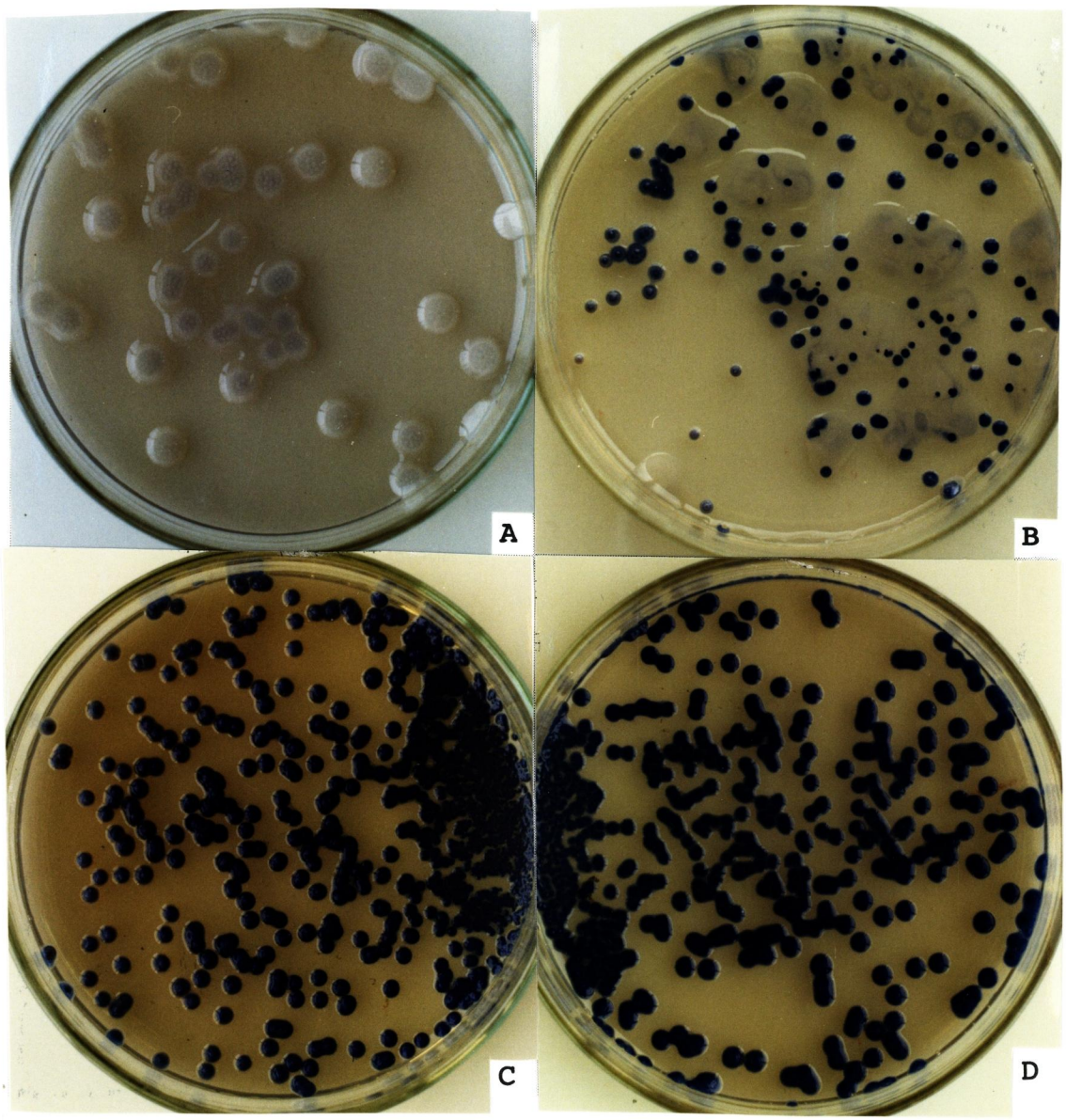


Fig. 2-1. Colonies of Agrobacterium radiobacter after growth at 30°C for 5 days on AB medium.

(A) strain 12665W (fresh pure culture); (B) strain 12665W (culture incubated for 60 days after purification); (C) strain 12665B1 (fresh pure culture); (D) strain 12665B2 (fresh pure culture).

Table 2-2. Formation of water-soluble and water-insoluble polysaccharides by strains isolated from stock culture of A.radiobacter IFO 12665

Strain	Exocellular polysaccharides produced [mg $(100\ ml)^{-1}$]	
	Water-soluble	Water-insoluble
12665 W	670	15
12665 B1	87	990
12665 B2	89	560

2. 多糖類の生産能力の自然変異

菌株12665WをPY寒天培地で30℃、60日間培養すると青色コロニーが出現した。（Fig.2−1参照） この中から、コロニーの形態が少し異なるものを4個選び、純化して菌株12665Wb_1、菌株12665Wb_2、菌株12665Wb_3、菌株12665Wb_4とした。 それぞれの菌株の多糖類の生産性をTable 2−3に示した。また、これらの変異株をPY寒天培地で30℃、60日間培養したが、多糖類の生産能力には変化がみられなかった。

つぎに、菌株12665Wの菌体を、生理食塩水、あるいは0.02Mリン酸緩衝液中で振盪したときの影響を、第一章で記述した方法に従って調べた。すなわち菌体懸濁液1㎖（約1×10^{11}菌体）を、0.9％食塩水あるいは0.02Mリン酸緩衝液（pH 6.0）100㎖に加え、500㎖容坂口コルベン中30℃で振盪した。 定期的に菌体懸濁液を採取し、適当な菌体濃度に希釈し、その0.1㎖をABプレートに広げ培養した。得られた結果をTable 2−4に示したが、生理食塩水の場合、4日目から青色コロニーが急に増加を始め、8日目で最も多くなった。これに対し、白色コロニー

Table 2-3. Formation of water-soluble and water-insoluble polysaccharides by strains derived spontaneously from *A. radiobacter* strain 12665W

Mutant strain	Exocellular polysaccharide produced [mg (100 ml)$^{-1}$]	
	Water-soluble	Water-insoluble
12665Wb1	10	1100
12665Wb2	84	600
12665Wb3	72	330
12665Wb4	0	190

Table 2-4. Effect of incubation time in sodium chloride solution or phosphate buffer on the appearance of blue colonies on aniline blue plates

Incubation medium	Type of colonies	Dilutions	No. of colonies per plate after incubation for (days):							
			0	1	2	3	4	6	8	10
0.9% NaCl solution	Blue	1	0	0	1	1	14	80	102	9
	White	10^5							8	1
		10^6	132	101	93	90	62	21		
0.02 M-phosphate buffer pH 6.0	Blue	1	0	1	28	31	105			
		10					9	212	94	0
	White	10^5							297	2
		10^6	127	123	105	94	90	82	31	0

Agrobacterium radiobacter strain 12665W was incubated at 30°C in sodium chloride solution or phosphate buffer. Periodically samples were removed and 0.1 ml portions of appropriately diluted suspension were spread on aniline blue plates. Numbers of blue and white colonies were counted after 5 days at 30°C. Values are the averages from two experiments.

は自己消化によると思われるが、日数がたつにつれて減少した。生菌体数が約 0.6 %となる8日目では、白色コロニーに対する青色コロニーの比は約 $1/8\times10^3$ であった。一方、リン酸緩衝液の場合は、2日目から青色コロニーが急に増加を始め6日目で最も多くなった。その時の白色コロニーに対する青色コロニーの比は、約 $1/4\times10^4$ であった。

第四節　考　　察

A. radiobacter IFO 12665の菌株を、PY寒天培地で長く保存すると 高頻度で変異株が出現し、また、この菌体を無機塩の溶液中で振盪すると、生菌体数が減少を始めるころから、変異細胞は著しく増加することが明らかとなった。これらの結果より *A. radiobacter* IFO 12665 の多糖類の生産能力は、第一章で記述した *A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3 と同様に変異することがわかった。

このことから、*Agrobacterium* の保存菌株中に、多糖類の生産性の著しく異なる菌株の混在が認められるのは、水溶性多糖類を多量に生産する菌株の一部が、保存中に、水不溶性多糖類を多量に生産する菌株に自然変異したためであると言うことができる。

第五節　要　　約

保存されていた *Agrobacterium* 9 菌株中、4 菌株に、水溶性多糖類と水不溶性多糖類（カードラン）の生産性が著しく異なる菌株が混在していた。このうち、水不溶性多糖類を多量に生産する菌株は、保存中に自然変異したものである。

多量の水溶性多糖類と少量の水不溶性多糖類を生産する *A. radiobacter* IFO 12665 は、PY寒天培地で長期間培養したり、無機塩の溶液中で振盪したりすると、水不溶性多糖類を多量に生産する菌株に自然変異した。この変異様相は、*A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3 と全く同じであった。

第三章　*Agrobacterium* の種々な菌株の生産するコハク酸含有酸性多糖類

第一節　緒　　言

Nakanishi ら[26]は、*Agrobacterium* の菌株中にカードラン生産性のものを見出したが、同時に水溶性多糖類も生産することを見出した。また第二章では、多量の水溶性多糖類と少量の水不溶性多糖類（カードラン）を生産する *Agrobacterium* の菌株は、*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 と同様に多糖類の生産能力が不安定で、保存中に自然変異をおこすことを述べた。

Zevenhuizen[46)47)]は、*Agrobacterium tumefaciens* の水溶性多糖類の構造について報告した。その糖組成に関してはサクシノグリカンのものと類似していたが、エステル結合している有機酸に関しては、前者が酢酸で後者がコハク酸である点が異なる。

本章では、第二章で調べた *Agrobacterium* の生産する水溶性多糖類について、糖と有機酸の種類が多くなるとそれらの分析は困難になる。そこで、著者は多糖類に含まれる有機酸の分析を迅速かつ正確に行なうため、高速液体クロマトグラフィーによる方法を試みた。この結果、これらの多糖類は、有機酸としてコハク酸、ピルビン酸、酢酸を、また糖としてD－グルコース、D－ガラクトースを含むことが明らかとなった。

第二節　実験材料および方法

使用菌体

第二章と同じ、*Agrobacterium radiobacter* 7 菌株、*Agrobacterium rhizogenes* 1 菌株、*Agrobacterium tumefaciens* 1 菌株を使用した。このうち 4 菌株（*A. radiobacter* IFO 12665、IFO 13127、IFO 13256、*A.*

rhizogenes IFO 13259）については、第二章、第三節で記述したように、粘稠性の高いコロニーを親株として使用した。

培養方法

第一章の記述に従って行なった。

水溶性多糖類の調製方法

培養液を25,000回転、30分間遠心分離し、この上澄液にNaClを加えて約1％濃度にした。ついで上澄液の2倍量のエタノールを加え多糖類を沈殿させた。多糖類を遠心分離で集め、水－エタノール（1：2，V/V）の溶液で2回洗浄した。これを蒸留水に溶解し、蒸留水で2日間透析した。さらに、アンバーライト1R－120（H^+型）でカチオンを除去し、30℃で減圧濃縮した後、凍結乾燥して試料とした。凍結乾燥試料は、11.8－12.8％の水分を含んでいたので、構成成分の分析値は乾燥重量を基にして計算した。このようにして得られた試料は、超遠心分析より単一であり、ローリー法[48]よりタンパク質量を求めると0.4％以下であった。

有機酸のペーパークロマトグラフィー

多糖類100㎎を密栓付試験管の中で1MH_2SO_4 1㎖に溶解し、100℃、60分間窒素下で加水分解した。これをエーテルで48時間連続抽出した。このエーテル抽出物は東洋濾紙№50を使用し、ペーパークロマトグラフィーを行なった。展開溶媒はフェノール：水：ギ酸（75：25：1，V/V）[49]を使用した。展開後、溶媒を完全に除去してから、ブロムクレゾールグリーン溶液を噴霧し黄色のスポットとして有機酸を検出した。また、ヒドロキザム酸の誘導体についてもペーパークロマトグラフィーで展開溶媒として水飽和イソブチリック酸[49]を使用して調べた。

有機酸の定量分析

1. 高速液体クロマトグラフィー

PalmerとListの方法[50]に準じた。東洋曹達HLC－802型の装置に強アニオン交換樹脂をつめたカラムを使用し、次の条件で分析した。

カ　ラ　ム　：　ステンレス、4×600 mm

充　塡　剤　：　LS－222（東洋曹達社製）

溶　出　液　：　1Mギ酸ソーダ

流　　速　：　1.0 mℓ／min

温　　度　：　室　　温

検　出　器　：　示差屈折計

多糖類100 mgを密栓付試験管の中で1M H_2SO_4 1 mℓに溶解し、100 ℃、60分間窒素下で加水分解した。これに $BaCO_3$ を加えて H_2SO_4 を沈殿させ遠心分離した。この沈殿物を水で3回洗浄し、上澄液と洗浄液を合わせて減圧濃縮した。これを、1 mℓの溶出液に溶解し、分析器に注入した。また、有機酸の標準試料は種々の濃度に変え先と同じ方法によって調製した。各有機酸量はクロマトグラムのピーク面積を重量法で測定して求めた。

2. 比　色　法

ピルビン酸は、ヒドラゾンを形成させるKoepsell と Sharpe の方法[51]に従って測定した。また、エステル結合している有機酸は、ヒドロキシルアミンを使用する McComb と McCready の方法[52]に従って測定した。

構成糖の定量分析

多糖類20 mgを密栓付試験管の中で1M H_2SO_4 1 mℓに溶解し、100 ℃、4時間窒素下で加水分解した。$BaCO_3$ で H_2SO_4 を除去した加水分解物を減圧濃縮した。これに少量の水と水素化ホウ素ナトリウム20 mgを加え、30 ℃、12時間還元した。アンバーライトIR－120（H^+型）で Na^+ を除去し、これにメタノールを加えて減圧濃縮をくり返して H_3BO_3 を除去した。よく乾燥した後、ピリジン1 mℓと無水酢酸0.5 mℓを加えて、30 ℃、12時間、あるいは100 ℃、1時間反応させアルジトールアセテートとした。[53] これをまず冷却してから、適当量のメタノールを加えて過剰の無水酢酸をエステルに変えた。つぎにピリジンを共沸させるため少量のトルエ

ンを加え減圧濃縮した。これらを完全に除去した後、クロロホルムに溶解し、日立K－53型ガスクロマトグラフを使用して次の条件で分析した。

カ　ラ　ム　：　ステンレス、3×1,000 mm

充　塡　剤　：　3％ECNSS－M

キャリヤーガス　：　窒　素

流　　速　：　50 mℓ/min

温　　度　：　170 ℃

検　出　器　：　水素炎イオン化検出器

定量分析を行なうときには、加水分解後に5 mgのキシロースを加え内部標準とした。

一方、ウロン酸はガスクロマトグラフィーで検出できないため、カルバゾール反応を利用するBitterとMuirの方法[54]に従って比色法で測定した。

サクシノグリカンデポリメラーゼの調製

サクシノグリカンを炭素源とした合成培地で*Flavobacterium* sp. M 64を培養し、その培養液からAmemuraらの方法[30]に従って調製した。

サクシノグリカンデポリメラーゼによる酸性多糖類の加水分解

多糖類1 mgを200 μℓの0.1 M酢酸緩衝液（pH 5.8）に溶解し、サクシノグリカンデポリメラーゼ溶液（2単位）100 μℓを加え40 ℃、5時間反応させた。反応液を3分間沸騰させた後、アンバーライトIR－120（H^+型）で脱塩し、30 ℃で減圧濃縮した。この反応生成物は東洋濾紙No. 50を使用し、ペーパークロマトグラフィーを行なった。展開溶媒はn－ブタノール：ピリジン：水（6：4：3, V/V）を使用し、アルカリ性硝酸銀で還元糖を発色させた。

脱アシル化多糖類の調整

SloneckerとJeanesの方法[55]に従って調製した。0.01 M KOH（100 mℓ）に多糖類（100 mg）を溶解し、20 ℃、5時間窒素下で攪拌した。HClで中和後、蒸

留水で透析を行い凍結乾燥した。

旋光度の測定

0.25％濃度の多糖類水溶液を、パーキンエルマー241型施光度計で測定した。

ＮＭＲスペクトル分析

ＪＥＯＬ－ＦＸ100 NMR スペクトロメーターを使用した。試料を重水に約0.5％（Ｗ／Ｖ）になるように溶かし、85℃にて測定した。

第三節　実　験　結　果

1．酸性多糖類に含まれる有機酸

酸加水分解物のエーテル抽出物、およびそのヒドロキザム酸誘導体のペーパークロマトグラフィーでは、コハク酸とピルビン酸が検出された。ただし、菌株IFO 12665、菌株ＩＦＯ 13127、菌株ＩＦＯ 13256の多糖類ではコハク酸に相当するスポットは弱かった。さらに、菌株ＩＦＯ12607と菌株ＩＦＯ 13532の多糖類2ｇを酸加水分解し、このエーテル抽出液を濃縮すると結晶が得られた（約100 mg）。

このものの元素分析は

分　析　値	：	Ｃ 40.03	Ｈ 5.06
理　論　値	：	Ｃ 40.68	Ｈ 5.12

で、融点は184－185℃を示し、いずれもコハク酸のそれと一致した。また、ｐ－ブロモフェナシルエステル誘導体の融点も210℃を示し、コハク酸の誘導体（211℃）[56]と一致した。

次に、高速液体クロマトグラフィーで有機酸の分析を行なった。酢酸、コハク酸、ピルビン酸を混合した標準試料のクロマトグラムをＦｉｇ．３－１に示す。ピルビン酸は第二節で記述した方法で処理すると２本のピークになった。酸性多糖類に含まれる有機酸のクロマトグラムをＦｉｇ．３－２Ａ（ＩＦＯ 13532）とＦｉｇ．３－２Ｂ（ＩＦＯ 13256）に示す。いずれの多糖類にも、酢酸、コハク酸、ピルビン酸が検

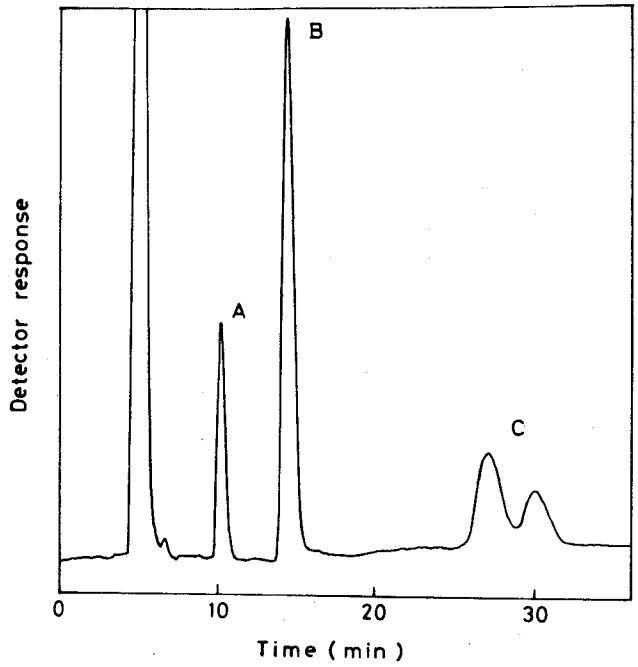


Fig. 3-1. High-speed liquid chromatogram of a calibration mixture containing 0.625%(w/v) of each of the indicated organic acids.

A, acetic acid; B, succinic acid; C pyruvic acid. Eluant, M sodium formate; separation column, 4x600 mm; flow rate, 1.0 ml/min.

出された。酢酸よりも少し早く溶出される微小なピークについては確認できなかった。

これらのクロマトグラムから、それぞれの有機酸の含量を求めた結果がTable 3－1である。

この酸性多糖類を0.01 M KOHで処理すると、酢酸とコハク酸は遊離されるが、ピルビン酸は遊離されなかった。（Fig.3－2C）この結果、酢酸とコハク酸はエステル結合で、ピルビン酸はアセタール結合で多糖類に結合しているものと考えら

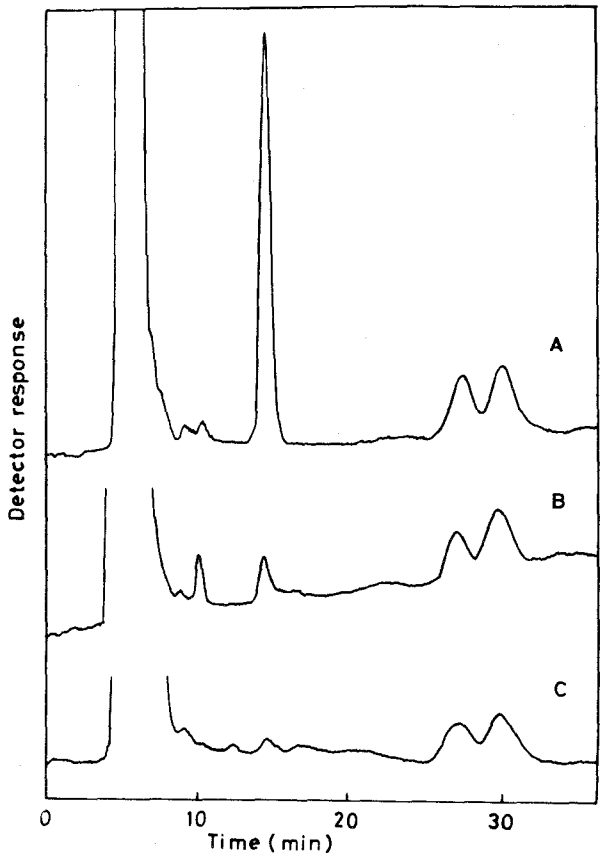


Fig. 3-2. Chromatograms of hydrolysates of water-soluble polysaccharides and deacylated polysaccharide.

A, polysaccharide of A.radiobacter IFO 13532; B, polysaccharide of A.radiobacter IFO 13256; C, deacylated polysaccharide of A.radiobacter IFO 13532.

れる。この点に関しては第四章でさらに詳しく検討した。

また、これらの有機酸を比色法によっても測定し、高速液体クロマトグラフィーの分析値と比較した。その結果、ピルビン酸の値については両方法とも一致してい

Table 3-1. Components of water-soluble polysaccharides

Strain	$[\alpha]_D^{25}$ (deg.)[a]	D-Glucose[b] (%)	D-Galactose[b] (%)	Pyruvic acid (%) I[c]	Pyruvic acid (%) II[d]	Succinic acid[c] (%)	Acetic acid[c] (%)	Acids as ester[e] (%) of succinic acid
Agrobacterium radiobacter								
IFO 12607	-14	78.0	9.4	5.5	5.6	5.6	0.5	6.0
IFO 12664	-18	77.5	9.3	6.2	5.9	6.1	0.4	6.8
IFO 12665	- 9	83.0	10.5	5.0	5.3	0.4	0.3	0.7
IFO 13127	- 9	82.5	11.6	5.8	5.5	0.4	0.4	1.3
IFO 13256	-17	82.0	11.5	5.0	5.2	0.5	1.5	2.4
IFO 13532	-17	79.0	10.4	4.9	5.3	5.6	0.5	6.4
IFO 13533	-10	77.0	11.0	6.3	6.0	5.2	0.4	6.5
A. rhizogenes								
IFO 13259	-16	76.0	10.9	5.7	6.0	7.4	0.5	7.9
A. tumefaciens								
IFO 3058	-11	78.5	10.2	5.8	5.7	4.8	0.5	5.8

[a] In water, c 1.0. [b] Assayed by gas chromatography. [c] Assayed by high-speed liquid chromatography. [d] Assayed colorimetrically by the method of Koepsell and Sharpe.
[e] Assayed colorimetrically by the method of McComb and McCready and expressed as succinic acid.

るのに対し、エステル結合している有機酸については、高速液体クロマトグラフィーの酢酸とコハク酸の合計値が比色法の値とほぼ一致していることがわかった。ただし、これはつぎの仮定のもとで言えることである。

(1) コハク酸の1つのカルボキシル基は、糖の水酸基とエステル結合している。

(2) ヒドロキシルアミンとの反応で、コハク酸と酢酸のエステルは同一色調を示す。

2. 酸性多糖類に含まれる糖、および旋光度

いずれの多糖類もD－グルコース、D－ガラクトースを含み、Table 3－1 で示したように、それぞれ76.0～83.0％、9.3～11.6％であり、ウロン酸は含まれていなかった。

これらの多糖類の旋光度$[\alpha]_D^{25}$は－9°～－18°（C＝1.0，水）であり、β－グリカンであることを示唆した。

第四節　考　　察

ピルビン酸、酢酸を含む細胞外多糖類については、*Xanthomonas*[55]、*Rhizobium*[46]、*Azotobacter*[57]、*Arthrobacter*[58]、*Corynebacterium*[59]、*Pseudomonas*[60]、*Agrobacterium*[46]、*Klebsiella*[61]それに、そのほかの*Enterobacteriaceae*に属する菌株[62]においてすでに多くの報告がある。これに比べ、コハク酸を含む細胞外多糖類の報告は少ない。現在のところ、*A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3[10)12)]以外に*Agrobacterium radiobacter* strain A－1[63]、*Arthrobacter stabilis* NRRL B－3225[64]、それに本章で明らかにした9菌株の*Agrobacterium*の細胞外多糖類においてのみコハク酸が存在する。一方、細胞壁には、*Actinomyces violaceus*のタイコ酸[65]、*Mycobacterium phlei*のリポ多糖類[66]、*Escherichia coli*のグリセロリン酸－オリゴ糖[67]にコハク酸の含まれていることが報告されている。また、*Penicillium luteum*の生産する多糖類（ルテイン酸）にはマロン酸が存在する。[68]

1つの多糖類に含まれる有機酸は1種類か2種類であるため、それらの定量分析には滴定法や比色法などが用いられてきた。著者はこれらの有機酸の分析に初めて高速液体クロマトグラフィーを導入し、9菌株の*Agrobacterium*の水溶性多糖類にコハク酸、酢酸、ピルビン酸が含まれていることを明らかにし、かつそれらの有機酸の定量分析をより正確に行なった。このうち、コハク酸と酢酸は共にエステル結合で多糖類に結合しているので、これらの有機酸を従来の分析方法で正確に定量分析することは非常に困難である。最近、^{1}H－NMRの分析技術が進歩し多糖類を加水分解することなくコハク酸、酢酸、ピルビン酸のメチル、メチレンプロトンを検出できるようになった。[64)69)]　そこで、*Agrobacterium*の水溶性多糖類に

ついて ^{1}H−NMRで測定したところ、Fig. 3−3 に示したように、いずれもコハク酸、酢酸、ピルビン酸のピークが検出された。

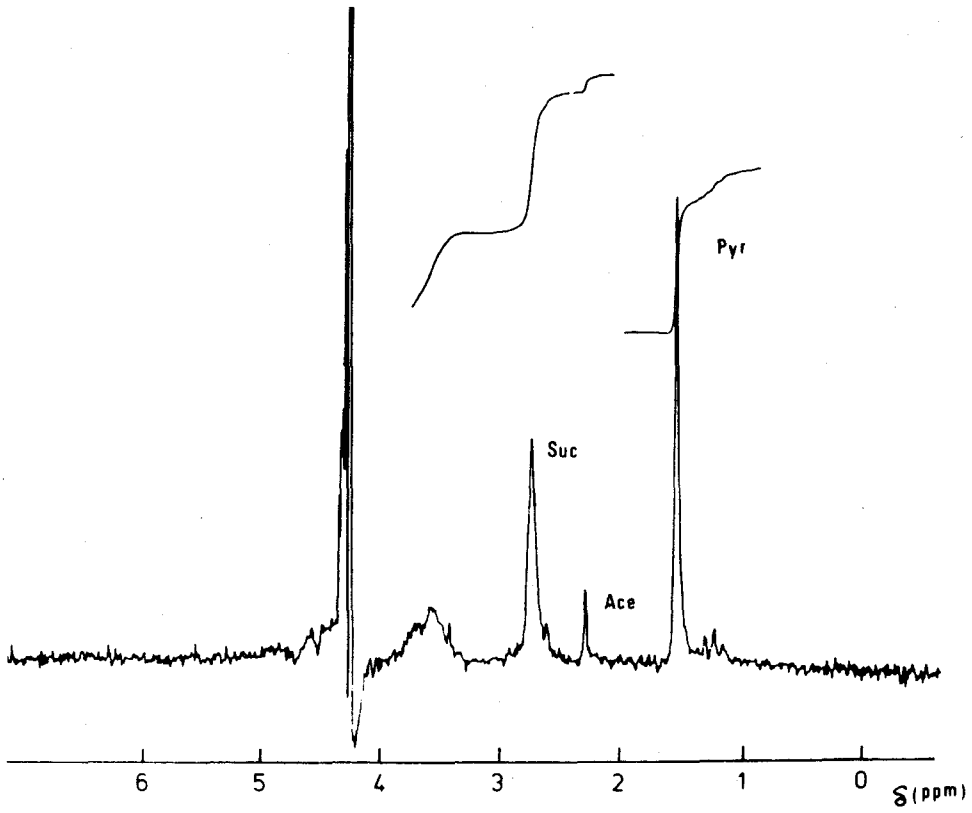


Fig. 3-3. High-resolution ^{1}H-n.m.r. spectrum of water-soluble polysaccharide from A.radiobcter IFO 13532.

Suc, succinic acid; Ace, acetic acid; Pyr, pyruvic acid.

Zevenhuizenは、[46) 47)] すでに *Agrobacterium tumefaciens* の酸性多糖類の構造について報告している。この多糖類の構成糖に関しては、本章で調べた9菌

株の *Agrobacterium* のものとよく一致しているが、コハク酸の存在を見逃した。細胞外多糖類にエステル結合している有機酸の多くは酢酸であることから、彼は比色法によってエステル結合している有機酸を測定し、その値をすべて酢酸としたようである。一方、著者らはサクシノグリカンにピルビン酸の存在を見逃していた。*A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3 のサクシノグリカン中のピルビン酸、コハク酸、酢酸の含量は、それぞれ 5.8 %、6.3 %、0.4 %であった。

次に、サクシノグリカンを炭素源として、*Flavobacterium* sp. M64 を培養し、その培養液より調製したサクシノグリカンデポリメラーゼを *Agrobacterium*

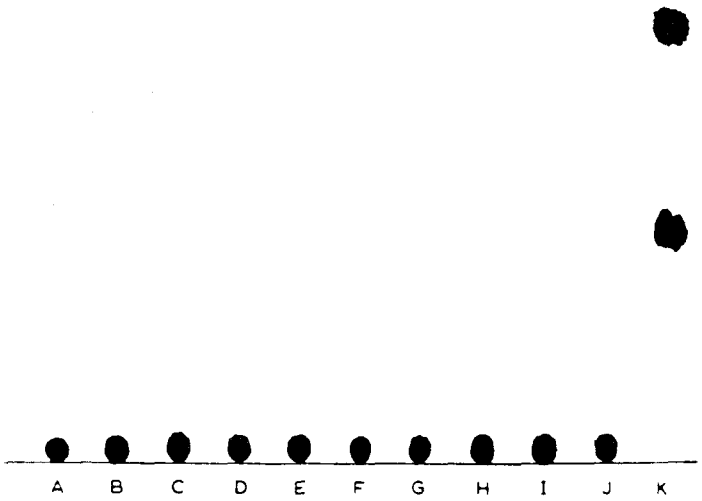


Fig. 3-4. Paper chromatogram of hydrolysis products of water-soluble polysaccharides produced by succinoglycan depolymerase.

A-J: polysaccharides of A.radiobacter IFO 12607, IFO 12664 IFO 12665, IFO 13127, IFO 13256, IFO 13532, IFO 13533, A.rhizogenes IFO 13259, A.tumefaciens IFO 3058, and Alcaligenes faecalis var. myxogenes 10C3; K, standard mixtures of glucose and gentiobiose.

の水溶性多糖類に作用させた。分解生成物をペーパークロマトグラフィーで調べると、いずれもサクシノグリカンの場合と同様なR_f値を示す1つのオリゴ糖が検出された。（Fig. 3－4参照） この酵素の基質特異性をTable 3－2に示したが、サクシノグリカンにしか作用しない。[29] これらのことから、*Agrobacterium* の水溶性多糖類の構造はサクシノグリカンのものと非常に類似していることがわかっ

Table 3-2. Substrate specificity of succinoglycan depolymerase

Substrate	Activity of crude enzyme prepared from culture medium of succinoglycan Specific activity (μmole/hr/mg protein)
Succinoglycan	12
Deacylated succinoglycan	13
Curdlan	0
Carboxymethyl cellulose	0
Lutean	0.07
Luteose	0.09
Laminaran (Eisenia bicyclis)	0.62
Laminaribiose	0
Cellobiose	0
Gentiobiose	0

Flavobacterium Sp. M64 was incubated in chemically defined medium (5 ml) containing 1% succinoglycan for 3 days at 30°C. The cultures were centrifuged and the supernatants were brought to 60% satn of $(NH_4)_2SO_4$. The precipitate was collected by centrifugation and dissolved in 5 ml of 0.01 M acetate buffer (pH 5.8). The solution was dialyzed overnight against the same buffer at 4°C.

た。ところでこれらの構造に関しては次章で詳しく記述する。

第五節　要　　約

9菌株の *Agrobacterium* の水溶性多糖類には、有機酸としてピルビン酸、酢酸の他にコハク酸が含まれていた。コハク酸はエステル結合で多糖類に結合し、その含量は0.4 − 7.4 %であった。一方、D−グルコース、D−ガラクトース、ピルビン酸の含量は、いずれの多糖類でもほぼ同じであった。これらの多糖類にサクシノグリカンデポリメラーゼを作用させると、いずれも単一のオリゴ糖が生じ、これらの構造はサクシノグリカンのものと類似していることがわかった。

第四章　2つの特異なβ－D－グリカナーゼによる分解とメチル化分析によって、サクシノグリカンおよび *Agrobacterium*、*Rhizobium* の酸性多糖類の構造解明

第一節　緒　　言

著者らは *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 の細胞外酸性多糖類、サクシノグリカンがD－グルコース、D－ガラクトース、コハク酸、ピルビン酸、それに少量の酢酸から成ることを明らかにした。Saito ら[28]はサクシノグリカンの構造を過ヨウ素酸酸化法、メチル化法、スミス分解法、部分加水分解法などの方法を用いて研究し、一応推定構造を提出したが、その構造解明にはいたらなかった。一方、原田ら[29)30)31)]は酵素によるサクシノグリカンの加水分解について研究してきた。その結果、*Flavobacterium* sp. M64 の生産する2つの酵素によって、サクシノグリカンは単位鎖8糖類を経て2つの4糖類に逐次分解されることが明らかにされた。

第3章では、*Agrobacterium* 9菌株の水溶性多糖類は、サクシノグリカンと類似の構造をしていることを明らかにした。また Zevenhuizen は[47]*Agrobacterium tumefaciens* と *Rhizobium meliloti* の細胞外多糖類についてメチル化分析を行っているが、それらの結果はサクシノグリカンのものと類似していた。また、Jansson ら[5]は、彼らが考案したメチル化分析と特異な化学的分解方法によって *R. meliloti* の細胞外多糖類の構造を解明した。一方、Harada ら[70]はメチル化分析、^{13}C－NMR、および酵素分解法によって *R. meliloti*、*A. faecalis* var. *myxogenes*、*A. radiobacter* の細胞外多糖類を比較検討した結果、これらの多糖類はアシル基を除いて同じ構造であることを報告した。

本章では、酵素を用いる方法によって、サクシノグリカンおよび *Agrobacterium* の水溶性多糖類の構造について調べた。その結果、いずれも単位鎖8糖類が

規則的に反復する構造であることがわかった。

第二節　実験材料および方法

使用した細胞外酸性多糖類

サクシノグリカン、および *Agrobacterium radiobacter* IFO 12665、*Agrobacterium rhizogenes* IFO 13259、*Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 の多糖類は、第三章で記述した方法で調製した。*Rhizobium meliloti* U 27 の多糖類は B. Lindberg 教授より御供与いただいた。

特異なβ－D－グリカナーゼによるオリゴ糖の精製

(a)　単位鎖 8 糖類（SG－D）

サクシノグリカンをサクシノグリカンデポリメラーゼで分解して得られるオリゴ糖を、雨村らは Succinoglycan depolymerized を略して SG－D と称した。このSG－Dの調製は Amemura らの方法[30]に従った。すなわち、サクシノグリカン 100 mg を 0.1 M酢酸緩衝液（pH 5.8）20 mℓに溶解し、これに、*Flavobacterium* sp. M 64 の細胞外酵素、サクシノグリカンデポリメラーゼ溶液（2単位）10 mℓと 1 滴のトルエンを加え、30 ℃、48 時間反応させた。反応後、1 分間沸騰させ生じた沈殿物は遠心分離で除去した。上澄液をコロジオンバックに入れ減圧下で透析した。透析外液を濃縮後、セファデックスG－15のカラムで脱塩し、SG－D を含む溶出液を集め減圧濃縮した。アセトンで脱水後、真空乾燥し約 80 mg の SG－D が得られた。

(b)　2つの 4 糖類（O I，O II）

脱アシル化した SG－D 40 mg を 0.1 M酢酸緩衝液（pH 5.8）10 mℓに溶解した。これに、Abe らの方法[31]によって調製した *Flavobacterium* sp. M 64 の細胞内酵素、エンド－（1→6）－β－D－グルカナーゼ溶液（2単位）5 mℓと 1 滴のトルエンを加え、30 ℃、24 時間反応させた。反応後、1 分間沸騰させ生じた沈殿

物は遠心分離で除去した。上澄液をアンバーライトIR－120（H^+型）でカチオンを除去し減圧濃縮した。この反応生成物を適当量の水にとかし、東洋濾紙No.50でペーパークロマトグラフィーを行なった。展開溶媒はn－ブタノール：ピリジン：水（6：4：3，V/V）を使用した。R_G値が0.25と0.07の物質を水で抽出し、それぞれ脱アシルオリゴ糖I（脱アシルOI）、オリゴ糖II（OII）とした。それぞれの収量は17 mg、15 mgであった。アシル基（主にコハク酸）の結合したSG－Dを、この細胞内酵素で分解しペーパークロマトグラフィーを行なうと、上記のOIはOIIの位置に重なり分離できなかった。このことは、アシル基がOIのどれかの糖に結合していることを示唆している。

メチル化分析

Hakomori の方法[71]に従った。試料0.5～2.0 mgをジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、メチルスルフイニルカルバニオンとヨウ化メチルを用いてメチル化反応を行なった。この反応溶液はアルカリ性が強く、エステル結合しているコハク酸と酢酸は反応中に遊離するが、アセタール結合しているピルビン酸はアルカリ性に強く反応中に遊離しない。それ故、ピルビン酸の結合位置についてはメチル化分析によって知ることができるが、コハク酸と酢酸の結合位置については知ることができない。

メチル化多糖類は、まず密栓付試験管に移し90％ギ酸1 mlを加え100℃、6時間窒素下で加水分解した。つぎに、エバポレーターでギ酸を除去した後、2Mトリフルオロ酢酸0.5 mlを加え、さらに100℃、6時間窒素下で加水分解した。一方、メチル化オリゴ糖の場合には、2Mトリフルオロ酢酸による加水分解のみで行なった。エバポレーターでトリフルオロ酢酸を除去した後、第三章に記述した方法で、アルジトールアセテートの誘導体にし、島津GC－7A型ガスクロマトグラフを使用してつぎの条件で分析した。

カ　ラ　ム　：　ステンレス、3×2,000 mm

充　塡　剤　：　0.3％ OV275 － 0.4％ GEXF 1150

キャリヤーガス　：　窒　素

流　　速　：　50 ㎖／min

温　　度　：　120 ℃で4分間保持後、1 ℃／minで180 ℃まで昇温

検　出　器　：　水素炎イオン化検出器

この条件で脱ピルビン酸サクシノグリカンをメチル化分析したときのガスクロマトグラムを Fig. 4－1に示す。ピークA，B，D，E，Fは、それぞれ、2，3，4，6－テトラ－O－メチル－D－グルシトール、2，4，6－トリ－O－メチル－D－グルシトール、2，3，4－トリ－O－メチル－D－グルシトール、2，3，6－トリ－O－メチル－D－グルシトール，2，3－ジ－O－メチル－D－グルシトールであることを、ラミナリビオース、ゲンチオビオース、マルトース、グリコーゲンのメチル化分析を行なって明らかにした。ピークCについては、まず、ガラスキャピラリーにこのピークのところを分取した。そして、これを従来よく使用されている3％ECNSS－Mのカラムで分析すると、その保持時間は、2，3，4，6－テトラ－O－メチル－D－グルシトールに対して2.28であった。この結果より、ピークCは、2，4，6－トリ－O－メチル－D－ガラクチトール[72]であることがわかった。現在、A～Fの6種類のメチル化糖を完全に分離することができる充塡剤は、著者が見出した 0.3％ OV 275 － 0.4％ GEXF 1150 だけである。

SG－Dの還元末端糖の分析とその重合度

SG－D 2 ㎎を水2 ㎖に溶解し、これに、水素化ホウ素ナトリウム4 ㎎を加え、30 ℃、12時間還元した。還元後、アンバーライトIR－120（H^+型）とメタノールでカチオンとH_3BO_3を除去した。これに2 M HCl を加えて試料を溶解し、密栓付試験管に移した。100 ℃、2時間窒素下で加水分解後、エバポレーターでHClを除去し、ピリジンと無水酢酸でアセチル化を行なった。得られた糖と糖アルコールのアセチル誘導体をクロロホルムに溶解し、島津GC－7A型ガスクロマトグラフ

を使用してつぎの条件[74]で分析した。

カ　ラ　ム　：　ステンレス、3 × 2,000 mm

充　塡　剤　：　1.5 %シリコンOV－17

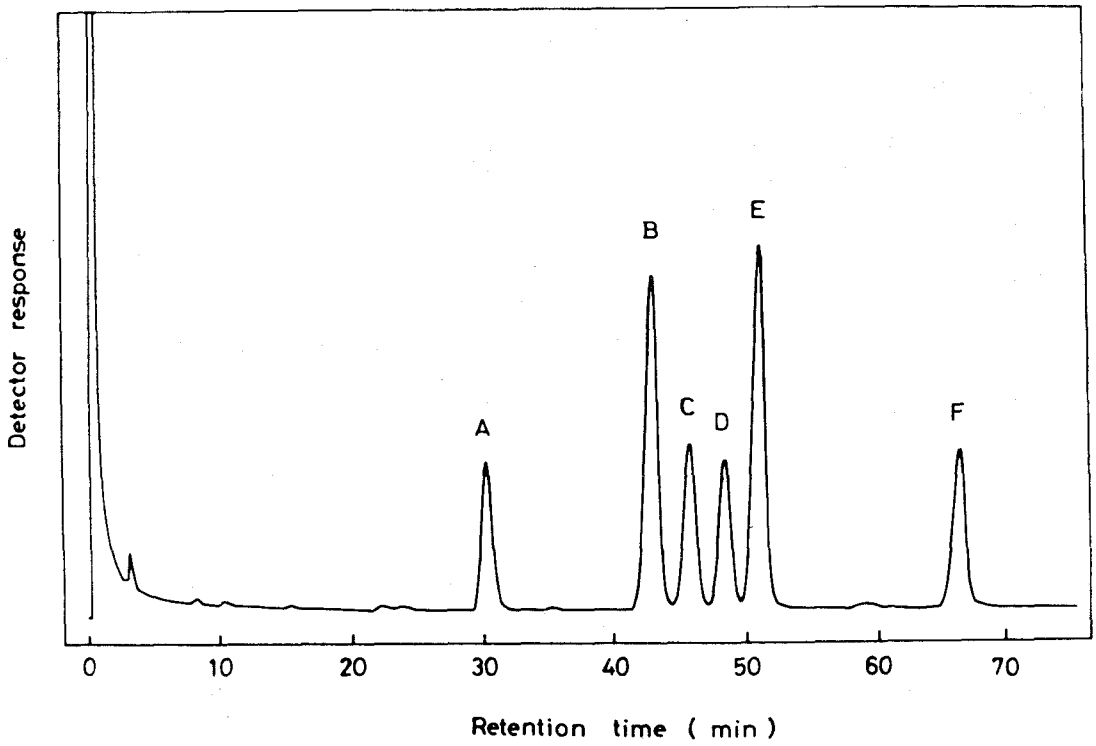


Fig. 4-1. Gas-liquid chromatogram of the alditol acetates of methylated sugars from depyruvylated succinoglycan on an OV275-GEXF1150 column.

(A) 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol
(B) 1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl-D-glucitol
(C) 1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl-D-galactitol
(D) 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol
(E) 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-D-glucitol
(F) 1,4,5,6-tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-D-glucitol

キャリャーガス　：　窒　素

流　　速　：　60 mℓ／min

温　　度　：　190 ℃

検 出 器　：　水素炎イオン化検出器

ガスクロマトグラフの試料採取口にガラスキャピラリーを取り付け、これに糖アルコールを分取した。分取した試料をクロロホルムに溶解し、3％ECNSS－Mのカラムで再びガスクロマトグラフィーを行ない同定した。

脱アシル化の条件

第三章に記述した条件で行なった。オリゴ糖の場合は、反応後透析のかわりにアンバーライトIR－120（H^+型）で脱塩した。

脱ピルビン酸の条件

Chaudhari らの方法[73]に準じた。0.01 M HCl（100 mℓ）に多糖類あるいはオリゴ糖（100 mg）を溶解し、窒素下で100 ℃、90分間反応した。多糖類は、NaOHで中和後、蒸留水で透析した。オリゴ糖は、アンバーライトIR－45（炭酸型）で脱塩した。

アーモンドのβ－D－グルコシダーゼによるオリゴ糖I（OI）の加水分解

脱アシルOIを、弱酸性の条件で脱ピルビン酸化した。この0.2 mgを50 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）100 μℓに溶解した。これにアーモンドのβ－D－グルコシダーゼ（シグマ化学社製）20 μg を加え、40 ℃、2時間反応させた。この分解生成物をペーパークロマトグラフィーで調べた。展開溶媒には、n－ブタノール：ピリジン：水（6：4：3，V／V）を使用し、発色剤にはアルカリ性硝酸銀を使用した。

アーモンドのβ－D－グリコシダーゼによるサクシノグリカンの側鎖の分解

脱ピルビン酸、脱アシルサクシノグリカン5 mgを50 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）50 mℓに溶解した。これに、アーモンドのβ－D－グルコシダーゼ5 mgと1滴のトルエンを加え、30 ℃、72時間反応させた。反応後、1分間沸騰させ生じた沈殿物

を遠心分離によって除去した。上澄液を蒸留水で透析後、凍結乾燥した。

構成成分の分析および旋光度測定

第三章に記述した方法で行なった。

第三節　実　験　結　果

1　サクシノグリカンの構造解明

サクシノグリカンとその関連オリゴ糖の構成成分および重合度をTable 4－1に示す。サクシノグリカンの旋光度〔α〕$^{25}_{D}$ は－11°（C＝1.0，水）であった。これはサクシノグリカンがβ－グリカンであることを示唆している。

SG－Dを水素化ホウ素ナトリウムで還元すると、還元末端の糖だけが糖アルコールになる。これを完全加水分解してアセチル誘導体にし、シリコンOV－17のカラムでガスクロマトグラフィーを行なうと、Fig. 4－2のクロマトグラムが得ら

Table 4-1. Components and degree of polymerization of succinoglycan and related oligosaccharides

	Molar ratio				
	D-Glucose	D-Galactose	Pyruvic acid	Succinic acid	D.P.
Succinoglycan	7.1	1.0	1.1	0.9	1600[a]
Octasaccharide of succinoglycan (SG-D)	7.2	1.0	1.1	0.9	8[b]
Deacylated oligosaccharide I (DA OI)	4.1	0	1.0	0	4[b]
Oligosaccharide II (OII)	2.9	1.0	0	0	4[b]

[a] Estimated by taking the molecular weight as 3×10^5

[b] Determined by gas chromatography

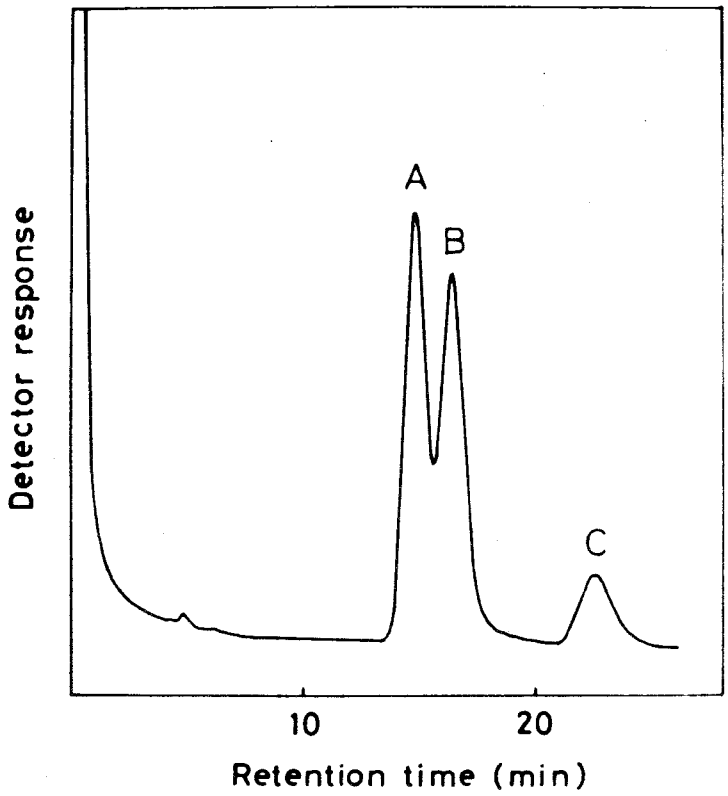


Fig. 4-2. Gas-liquid chromatogram of the acetyl derivatives of an acid hydrolysate of reduced octasaccharide(SG-D) on an OV-17 column.

A, α-D-glucose pentaacetate; B, β-D-glucose pentaacetate;
C, D-glucitol hexaacetate or D-galactitol hexaacetate.

れた。ピークA、ピークBは、それぞれα－D－グルコースペンタアセテート、β－D－グルコースペンタアセテートである。ピークCが糖アルコールのヘキサアセテートである。このピークを分取して3％ECNSS－Mのカラムで分析すると、Fig. 4－3のクロマトグラムが得られた。このピークの保持時間がD－グルシトールヘキサアセテートに対して0.87であることから、Fig. 4－2のピークCは、D－

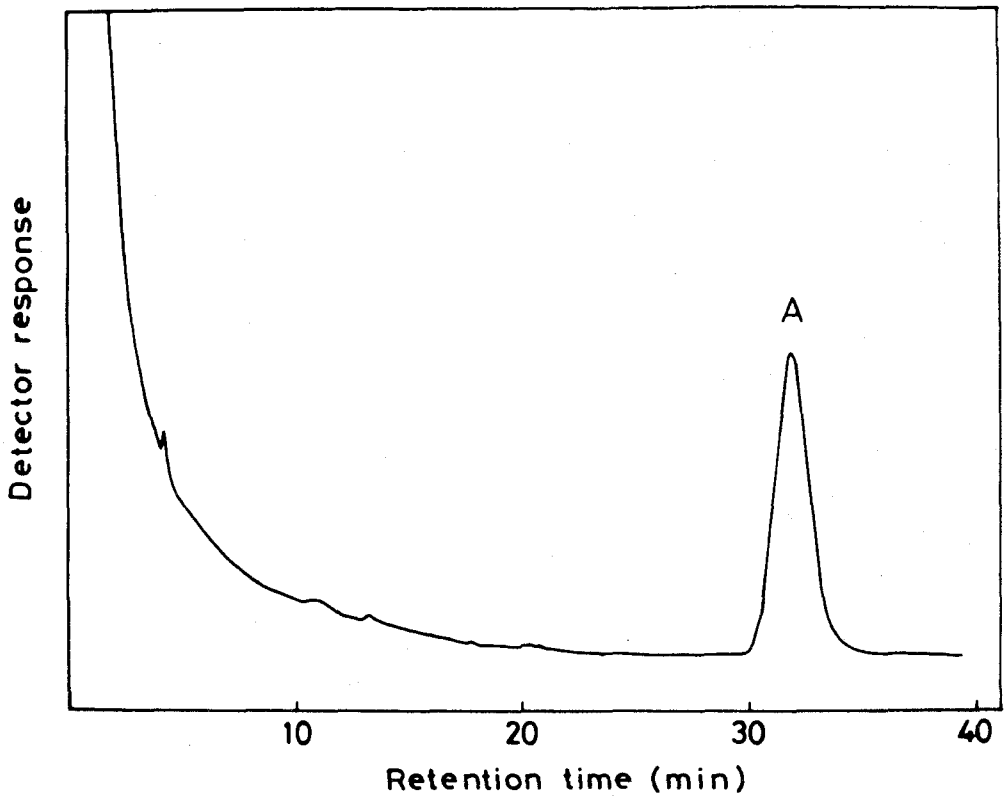


Fig. 4-3. Gas-liquid chromatogram of peak C in Fig.4-2 on an ECNSS-M column.

Peak A corresponds to D-galactitol hexaacetate

ガラクチトールヘキサアセテートである。この結果よりSG－Dの還元末端糖は、D－ガラクトースであることがわかった。またFig. 4－2において、ピークAとBの面積をピークCの面積で割ると、ほぼ7になった。この結果よりSG－Dの重合度は8であることがわかった。

つぎに、0.3％OV 275－0.4％GEXF 1150 のカラムを使用して、サクシノグリカン、脱ピルビン酸サクシノグリカン、アーモンドのβ－D－グルコシダーゼ処

Table 4-2. Methylation analysis of succinoglycan, repeating unit of succinoglycan, oligosaccharides I and II and their derivatives

	Methylated sugar (relative proportions)					
	2,3,4,6-Glc (T=1.00[a])	2,4,6-Glc (T=1.39[a])	2,4,6-Gal (T=1.48[a])	2,3,4-Glc (T=1.56[a])	2,3,6-Glc (T=1.64[a])	2,3-Glc (T=2.11[a])
Succinoglycan	0	1.9	0.9	0.9	2.1	2.0
Depyruvylated succinoglycan	1.0	2.1	1.1	1.0	2.3	1.1
β-Glucosidase digested, depyruvylated, deacylated succinoglycan	1.0	0.2	1.0	0.3	2.3	1.2
Octasaccharide of succinoglycan(SG-D)	0	2.3	0.8	2.2	2.1	1.0
Depyruvylated SG-D	1.0	2.2	0.7	2.1	2.0	0
Deacylated oligosaccharide I	0	1.9	0	0.8	<0.1	1.0
Depyruvylated, deacylated oligosaccharide I	1.0	2.1	0	0.8	<0.1	0
Oligosaccharide II	1.0	<0.1	0.9	0	2.4	0

[a] Retention time of the corresponding alditol acetate relative to 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol. Column; 0.3% OV275-0.4% GEXF1150 on Shimalite W.

理したサクシノグリカン、SG－D、脱ピルビン酸SG－D、脱ピルビン酸脱アシルOI、およびOIIのメチル化分析を行なった結果をTable 4－2に示す。

これらの分析結果をもとにして、サクシノグリカンの構造を解明するため、つぎの6項目を明らかにした。

(a) ピルビン酸の結合位置

サクシノグリカンを弱酸性（pH 2）の条件で処理してピンビン酸をのぞくと、2モルあった2,3－ジ－O－メチル－D－グルシトールが1モル減少し、かわりに1モルの2,3,4,6－テトラ－O－メチル－D－グルシトールが増加した。（Table 4－2参照） この結果、1モルのD－グルコース残基が（1→4，1→6）結合で分岐に関与していること、また1モルのピルビン酸が非還元末端のグルコースの0－4，0－6にアセタール結合していることがわかった。（Fig. 4－5参照）

(b) サクシノグリカンデポリメラーゼの切断点

脱ピルビン酸SG－Dのメチル化分析では、2,3－ジ－O－メチル－D－グルシトールが認められないので、SG－Dは直鎖のオリゴ糖である。一方、(a)で記述したようにサクシノグリカンは分岐構造をしているから、この細胞外酵素は分岐に関与している結合を切断していることになる。そこで、脱ピルビン酸サクシノグリカンと脱ピルビン酸SG－Dのメチル化糖を比較すると、2,3,6－トリ－O－メチル－D－グルシトールは共に2モルで変わっていないが、オリゴ糖の2,3,4－トリ－O－メチル－D－グルシトールは1モル増加し2モルとなった。この結果より、サクシノグリカンデポリメラーゼは、（1→4，1→6）結合で分岐しているD－グルコース残基の（1→4）結合を切断していることがわかった。

(c) 脱アシルOIの構造

メチル化分析より、2モルの（1→3）－D－グルコース残基、1モルの（1→6）－D－グルコース残基、および(a)で説明したようにピルビン酸の結合した非還元末端のD－グルコース残基1モルから成ることがわかった。また、脱ピンビン酸

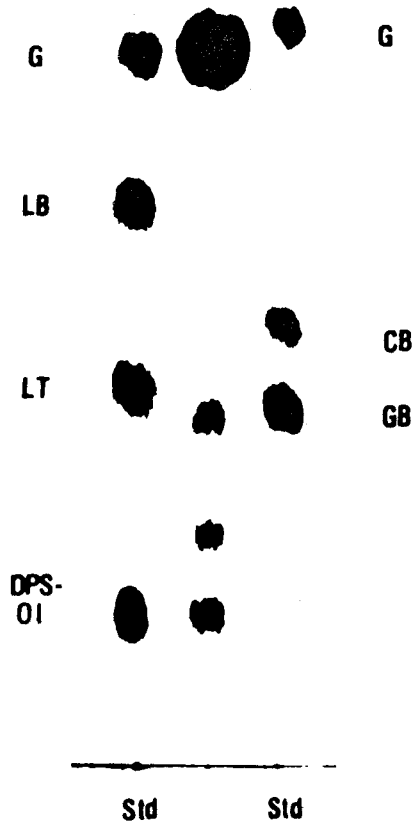


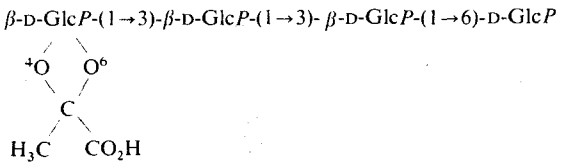
Fig. 4-4. Paper chromatogram of the products formed by partial hydrolysis of depyruvylated,deacylated oligosaccharide I with β-D-glucosidase of almond.

Std,standard mixtures; G,glucose; LB,laminarabiose; LT,laminaratriose; DPS-OI,depyruvylated,deacylated oligosaccharide I; CB,cellobiose; GB,gentiobiose.

脱アシルOIを、アーモンドのβ－D－グルコシダーゼで作用させ、反応生成物をペーパークロマトグラフィーで調べると、Fig. 4－4 に示されているように唯一の2糖類としてゲンチオビオースが検出された。この酵素は、非還元末端からエキ

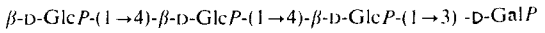
ソ型に作用することから、OIの還元末端側の構造はβ－D－Glcp－（1→6）－D－Glcpであることがわかった。

以上の結果より、脱アシルOIの構造はつぎのように決定された。



(d) OIIの構造

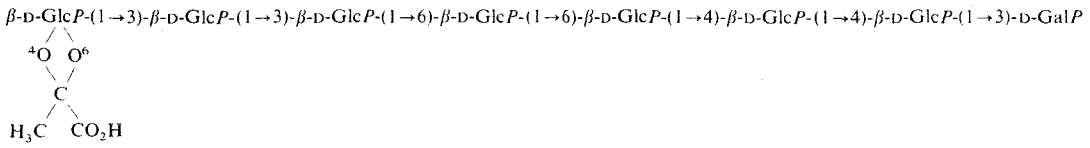
メチル化分析より、2モルの（1→4）－D－グルコース残基、1モルの（1→3）－D－ガラクトース残基、および非還元末端のD－グルコース残基1モルから成ることがわかった。すでに、SG－Dの還元末端はD－ガラクトースであることを明らかにしたので、OIIの還元末端の糖はD－ガラクトースである。以上の結果より、OIIの構造はつぎのように決定された。



(e) 脱アシルSG－Dの構造

メチル化分析より、2モルの（1→3）－D－グルコース残基、2モルの（1→4）－D－グルコース残基、2モルの（1→6）－D－グルコース残基、1モルの（1→3）－D－ガラクトース残基、およびピルビン酸の結合した非還元末端のD－グルコース残基1モルから成ることがわかった。つぎに、脱ピルビン酸SG－Dのメチル化糖の値と、脱ピルビン酸脱アシルOIとOIIのメチル化糖の値の和とを比較すると、後者の場合、2,3,4,6－テトラ－O－メチル－D－グルシトールが1モル多く、2,3,4－トリ－O－メチル－D－グルシトールが1モル少なくなっていた。このことは、OIとOIIとが、（1→6）－D－グルコシドで結合してSG－

Dになることを意味している。以上の結果より、脱アシルSG－Dの構造は、つぎのように決定された。



(f) 分岐に関与する糖の決定

脱ピルビン酸サクシノグリカンと脱ピルビン酸SG－Dのメチル化糖を比較すると、2,3－ジ－O－メチル－D－グルシトールおよび2,3,4－トリ－O－メチル－D－グルシトールの値に、それぞれ1モルの差が見られるので、サクシノグリカンは（1→6）－D－グルコシド結合で分岐していることがわかる。SG－Dには、2個の（1→6）－D－グルコース残基が存在するので、この中のいずれが分岐に関与するかを明らかにする必要がある。そこで、非還元末端のD－グルコースから逐次加水分解するアーモンドのβ－D－グルコシダーゼを、脱ピルビン酸脱アシルサクシノグリカンに作用させ、どこまで分解されるかをメチル化分析で調べた。この結果、酵素作用を受けた多糖類は作用前のものに比べ、2,4,6－トリ－O－メチル－D－グルシトールがほぼ90％、2,3,4－トリ－O－メチル－D－グルシトールが70％減少することがわかった。（Table 4－2参照） これより、サクシノグリカンの側鎖には、（1→3）－D－グルコース残基と（1→6）－D－グルコース残基の存在することがわかると同時に、SG－Dの非還元末端側（1→6）－D－グルコース残基がサクシノグリカンの側鎖に位置し、還元末端側の（1→6）－D－グルコース残基が分岐に関与することが明らかとなった。（Fig. 4－5参照）

一方、アシル基、主にコハク酸であるが、OIのどの糖に結合しているかは明らかでない。

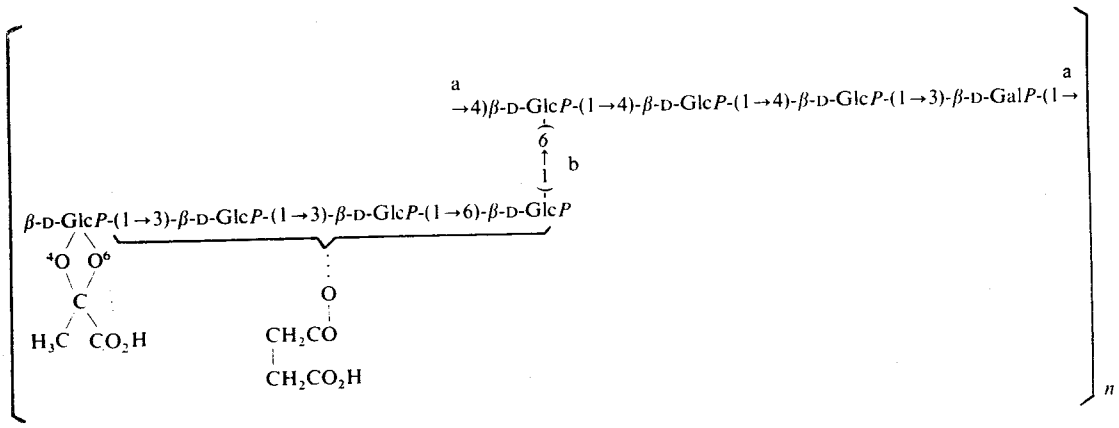


Fig. 4-5. Structure of succinoglycan.

Linkages a and b are hydrolyzed by succinoglycan depolymerase and the intracellular β-D-glycanase, respectively.

以上の結果を総合することにより、サクシノグリカンの構造をFig. 4－5 に示すことができた。

2. *Agrobacterium* の水溶性多糖類の構造

第三章で使用した *Agrobacterium* 9菌株の水溶性多糖類は、*Flavobacterium* sp. M 64 の2つの特異なβ－D－グリカナーゼの逐次分解を受け、サクシノグリカンと同じようなペーパークロマトグラムのパターンを示した。また、本章で明らかにしたサクシノグリカンの構造は、Jansson ら[5)] が報告した *R. meliloti* U 27 の多糖類の構造とアシル基を除いてまったく同じである。そこで、これらの多糖類の構造について、本章で記述した分析方法に従って調べることにした。

まず、*A. radiobacter* IFO 12665、*A. rhizogenes* IFO 13259、*A. tumefaciens* IFO 3058、*R. meliloti* U 27 の多糖類に、サクシノグリカンデポリメラーゼを作用させオリゴ糖を調製し、これらの多糖類とオリゴ糖のメチル

化分析を行なった結果をTable 4－3に示す。 これらすべてのメチル化糖の値はサクシノグリカンのものとよく一致していた。この結果、*Agrobacterium* の水溶性多糖類はサクシノグリカンと同じ構造をしていると結論した。ただし、第三章で記述したようにコハク酸および酢酸の含量には相違がある。また、サクシノグリカンと、*R. meliloti* U 27 の多糖類は、アシル基を除いて共に同じ構造であることが本章においても確認された。

第四節　考　　察

本章で、サクシノグリカンは、重合度8の単位鎖オリゴ糖（SG－D）が反復し

Table 4-3.

Methylation analysis of the extracellular acidic polysaccharides (PS) from strains of Alcaligenes, Agrobacterium and Rhizobium, and of their products (OS) obtained with succinoglycan depolymerase

	Methylated sugar (relative proportions)					
	2,3,4,6-Glc	2,4,6-Glc	2,4,6-Gal	2,3,4-Glc	2,3,6-Glc	2,3-Glc
Al. faecalis var. myxogenes						
10C3 PS	0	1.9	0.9	0.9	2.1	2.0
10C3 OS (SG-D)	0	2.3	0.8	2.2	2.1	1.0
Ag. radiobacter						
IFO 12665 PS	0	2.3	1.2	0.8	2.4	2.0
IFO 12665 OS	0	2.0	0.8	1.9	2.1	1.0
Ag. rhizogenes						
IFO 13259 PS	0	1.8	0.9	0.7	2.0	2.0
IFO 13259 OS	0	2.3	0.8	2.3	2.3	1.0
Ag. tumefaciens						
IFO 3058 PS	0	1.8	1.0	0.8	2.2	2.0
IFO 3058 OS	0	2.4	0.9	2.2	2.4	1.0
Rh. meliloti						
U 27 PS	0	1.8	1.0	0.8	2.0	2.0
U 27 OS	0	2.3	0.9	2.4	2.2	1.0

Column; 0.3% OV275-0.4% GEXF1150 on Shimalite W.

た構造であることを明らかにしたが、この構造は、Jansson ら[5]が提出した *R. meliloti* の多糖類の構造とアシル基を除いてまったく同じであった。彼らは、側鎖の非還元末端から糖を1つづつ化学的に分解して得られる多糖類について、それぞれメチル化分析、スミス分解などの方法によって分析し構造を決定した。このような複雑な構造をしている多糖類の構造を明らかにするには、従来一般に行なわれている構造研究の方法のみでは不可能で、Jansson らの考案した化学的な方法か、特異な酵素を使用する著者の方法を採用すべきものと思われる。

数多くの菌株の生産する細胞外多糖類中、サクシノグリカンタイプの多糖類の存在を調べるためには、サクシノグリカンデポリメラーゼとエンド－（1→6）－β－D－グルカナーゼは大変有用な酵素である。本論文の中でも、9菌株の *Agrobacterium* の水溶性多糖類にこれらの酵素を作用させペーパークロマトグラフィーで調べたところ、すべての多糖類の構造はサクシノグリカンの構造と基本的に同じであることが明らかとなった。このほか、13菌株の *Rhizobium* の多糖類について同じようにして調べたところ、*R. meliloti* 5菌株、*R. trifolii* 1菌株がサクシノグリカンと基本的に同じ構造の多糖類を生産することがわかった。[27] また、これらの研究中、*Flavobacterium* sp. M 64 の2つの特異なβ－D－グリカナーゼの作用を受けるものの、サクシノグリカンとは構造の異なる *R. meliloti* IFO 13336 の細胞外多糖類を見出すことができた。この多糖類は側鎖の構造がサクシノグリカンと著しく異なっていた。[75]

細胞外多糖類を単位鎖オリゴ糖に分解する酵素に関する研究は、細菌由来の酵素、サクシノグリカンデポリメラーゼのほかは、バクテリオファージ由来の酵素である。多糖類を生産している細胞にファージをかけるとプラークができるが、ときには拡散した酵素がその周辺の多糖類を分解して暈（halo）ができる。[76] [77] ファージ由来の可溶性酵素あるいはファージ粒子そのものを多糖類に作用させると、単位鎖オリゴ糖の他に、分子量がその2倍あるいは3倍のものも生ずる。このような研究の

対象となっている多糖類は、*Escherichia coli*[78]と *Klebsiella*[79) 80)]の多糖類であり、これらの構造は比較的簡単なため、従来一般に行なわれている分析方法（部分水解法、過ヨウ素酸酸化法、スミス分解法、メチル化分析法）で解明され、ファージの酵素は構造解明の手段としては利用されていない。ファージは単位鎖オリゴ糖をさらに分解する酵素を生産していないようである。したがって、ファージ由来の多糖類分解酵素に対する関心は、その酵素作用点にある。種々な微生物やバクテリオファージの多糖類分解酵素の性質が明らかになれば、今後、多糖類の構造研究において役立ってくることであろう。

第五節　要　　約

A. faecalis var. *myxogenes* 10C3 の細胞外多糖類、サクシノグリカンの構造は、まずサクシノグリカンを *Flavobacterium* sp. M 64 の細胞外酵素、サクシノグリカンデポリメラーゼで重合度8の単位鎖オリゴ糖に分解し、ついで、これを細胞内酵素、エンドー（1→6）－β－D－グルカナーゼで分解して2つの4糖類にし、これらのオリゴ糖、および多糖類のメチル化分析の値を比較検討して解明された。

A. radiobacter、*A. rhizogenes*、*A. tumefaciens*、*R. meliloti* の細胞外多糖類について、本章で記述した方法により分析した結果、いずれの多糖類もアシル基を除いてはサクシノグリカンの構造と同じであることがわかった。

また、サクシノグリカンの構造は、Jansson らが報告した *R. meliloti* U 27 の細胞外多糖類の構造と、アシル基を除いて同じであった。

第五章　サクシノグリカンの単位鎖オリゴ糖（ＳＣＧ）の生産とその構造

第一節　緒　　言

Haradaら[41]は、*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 をニトロソグアニジン処理して、多量のサクシノグリカンのみを生産する変異株 22 を分離した。著者は、この菌株 22 をさらにニトロソグアニジン処理して得た変異株 22－33 を酵母エキスを含む合成培地で培養すると、かなりの量のオリゴ糖が生産されることを見出した。

微生物の生産するいくつかの多糖類は、数個の単糖からなるオリゴ糖の単位が規則的に反復する構造であることが明らかにされている。[3)4)5)] サクシノグリカンの構造についても、SG－Dの単位鎖からできていることを第四章で明らかにした。しかし、多糖類の構造研究だけでは、多糖類の生合成サイクルが単位鎖オリゴ糖のいずれの単糖から始まるかについて、知ることができない。ところで、多糖類の生合成系の中間代謝物質、あるいは、それと関連性のある物質が得られれば、生合成サイクルを考えることができる。

本章では、変異株 22－33 の生産するオリゴ糖について、サクシノグリカンの生合成中間代謝物質との関連性に注目しつつ、それが生産される培養条件、ならびにその構造を調べた。その結果、このオリゴ糖はサクシノグリカンの単位鎖（SG−D）と全く同じ構造をしていることが明らかとなった。

第二節　実験材料および方法

使用菌株

Alcaligenes faecalis var. *myxogenes* 菌株 22[41]は、*A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3 を、ニトロソグアニジンで処理してサクシノグリカン

のみを多量に生産する変異株として得られた菌株である。この菌株22をさらにニトロソグアニジンで処理してかなりの量のオリゴ糖を生産するようになった変異株22－33を分離した。この両菌株を実験に使用した。

培養条件

4％グルコースを含んだ合成培地に0.1％の酵母エキス、あるいは種々の濃度のペニシリンG（明治製菓製）、バシトラシン（P－L Biochemicals製）を加えて、30℃で振盪培養した。

サクシノグリカン、オリゴ糖、および菌体の調製

培養液にNaClを加えて1％濃度にした後、2倍量のエタノールを加え5,000回転、20分間遠心分離した。この沈殿物には、サクシノグリカン、菌体、それに過剰の$CaCO_3$が含まれ、オリゴ糖は上澄液に含まれていた。この上澄液を約$^1/_{10}$の量まで減圧濃縮し、まだわずかに混在しているサクシノグリカンを除去するために再び2倍量のエタノールを加え遠心分離した。上澄液を減圧濃縮後、4倍量のエタノールを加えてオリゴ糖を沈殿させた。さらにつぎの操作によって精製した。分子量が10,000以上の物質を分画することができるダイアフロー膜PM10（アミコン社製）を使用して、オリゴ糖の溶液を限界沪過した。この沪液に4倍量のエタノールを加え、遠心分離によってオリゴ糖を集めた。これを、水－エタノール（1：4，V／V）溶液で3回洗浄した。このオリゴ糖を再び水に溶解し、アンバーライトIR－120（H^+型）とアンバーライトIR－45（炭酸型）のカラムに通して脱塩した。溶出液を減圧濃縮した後、4倍量のエタノールを加えてオリゴ糖を回収した。これをアセトンで脱水し、真空乾燥した。一方、サクシノグリカン、菌体などを含む沈殿物に約100倍量の水を加え十分攪拌した。この懸濁液を第一章で記述した方法に従って処理し、サクシノグリカンと菌体を得た。

高圧沪紙電気泳動

富士理研の高圧沪紙電気泳動装置を使用した。ヘキサンを冷媒として使用し、

40 volts／cmの電圧をかけた。緩衝液としてピリジン：酢酸：水（20：20：960，V／V，pH 4.7）を使用した。スポットの発色にはアルカリ性硝酸銀を使用した。

構成糖および有機酸の分析、エンドー（1→6）－β－D－グルカナーゼによるオリゴ糖の分解、およびその分解生成物の調製、メチル化分析、以上の実験方法は第三章と第四章の記述に従った。

第三節　実　験　結　果

1．オリゴ糖の生成

A. faecalis var. *myxogenes* 菌株22をニトロソグアニジンで処理し、種々の変異株を分離した。これらの変異株の培養生産物をペーパークロマトグラフィーで調べたところ、原点付近に還元性を示すオリゴ糖の存在を認めた。このような変異株の中で、とりわけ菌株22－33がオリゴ糖を多量に生産した。また、この菌株を少量の酵母エキスを加えた合成培地で培養すると、オリゴ糖の生産量が非常に増大することを認めた。当初このオリゴ糖はShort－chain glycan（SCG）であると考えた。以後、これをSCGと略称する。

そこで、菌株22と菌株22－33について、4％グルコースを含む合成培地、あるいはこれに0.1％酵母エキスを加えた培地で、サクシノグリカンとSCGの生産性を調べた。

Table 5－1に示した結果より明らかなように、菌株22によるサクシノグリカンとSCGの生産量は、6日目で最大に達するのに比べ、菌株22－33はかなり遅くそれらの生産量は9日目で最大に達した。この菌株22－33は、合成培地では100 mℓ当り85 mgのSCGしか生産しなかったが、この培地に0.1％酵母エキスを加えると100 mℓ当り366 mgのSCGを生産した。菌株22は、いずれの培地でもそれほど多くは生産しなかった。

SCGは、いったん生成したサクシノグリカンが酵素により分解して生成する可

Table 5-1. Formation of SCG and succinoglycan in synthetic media by *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* strain 22 and strain 22-33

	Incubation time (days)	Production (mg/100 ml) of SCG succinoglycan by	
		Strain 22	Strain 22-33
Without yeast extract			
SCG	3	11	11
	6	16	55
	9	17	85
Succinoglycan	3	950	145
	6	1050	725
	9	1060	764
With 0.1% yeast extract			
SCG	3	58	95
	6	67	166
	9	71	366
Succinoglycan			
	3	980	50
	6	1150	480
	9	1190	640

能性が考えられた。そこで、これらの菌株がサクシノグリカンをオリゴ糖に分解する酵素を生産しているのかどうかについて検討を行なった。0.1％酵母エキスを含む合成培地で、菌株22と菌株22－33を3，6，9日間培養した。菌体を遠心分離によって集め、その一部は超音波処理を行なった。リン酸緩衝液（pH 7と8）を使用して、培養上澄液、生菌体、および細胞破砕液を長時間サクシノグリカンに作用させた。それらの反応生成物をペーパークロマトグラフィーで調べたところ、いずれの場合にもオリゴ糖の存在は認められなかった。

2. SCGの生成における抗生物質の影響

菌株22－33はサクシノグリカンを分解する酵素を生産していないので、この菌株が多量のSCGを生産する要因として、多糖類の生成に関与する細胞表層の変化が考えられる。そこで、細胞壁の生合成糸を阻害する抗生物質としてペニシリンG[81)]

とバシトラシン[82]を、また、界面活性剤としてはドデシル硫酸ナトリウムを選択し、これらの適当量を合成培地に加えて、菌株22を振盪培養した。サクシノグリカンとSCGの生産量を調べた結果をTable 5－2に示す。これよりペニシリンG、特にバシトラシンの添加は、サクシノグリカンの生産量を減少させ、かわりにSCGの生産量を増加させることがわかった。一方、ドデシル硫酸ナトリウムの影響は認められなかった。

Table 5-2. Effects of some reagents on formation of oligosaccharide (SCG) and succinoglycan by Alcaligenes faecalis var. myxogenes 22

	Concentration (μg/ml)	Production of SCG (mg/100 ml)	Production of Succino-glycan (mg/100 ml)	Production of Cells (mg/100 ml)	Glucose consumption (%)
None		15	1075	175	100
Penicillin G	1.2	17	956	174	100
	6.0	37	767	150	100
Bacitracin	10	43	675	174	100
	50	87	535	151	100
	100	106	527	147	100
Sodium dodecyl-sulfate	10	18	558	145	100
	20	15	415	149	100

Cultures were harvested after 9-day incubation.

3. SCGの精製とその性質

菌株22－33を使用してSCGの生産分離を行なった。4％グルコースを含む合成培地に0.1％酵母エキスを加え、500㎖容坂口コルベンを使用して30℃、10日間振盪培養した。SCGの精製は、第二節で記述した方法で行ない、5ℓの培養液から約15ｇのSCGを得た。このオリゴ糖の元素分析値は、C 43.80 ; H 6.27 で、その組成を調べると、D－グルコース、D－ガラクトース、コハク酸、ピルビン酸が7：1：1：1の割合で含まれていた。これは、第四章で記述した、サクシノグリカンをサクシノグリカンデポリメラーゼで加水分解して得られるオリゴ糖（SG－D）と同じであった。そこで、菌株22および菌株22－33の培養液から精製したオリゴ糖（SCG）と、サクシノグリカンの酵素分解物のオリゴ糖（SG－D）について、高圧沪紙電気泳動で調べたところ、いずれも陽極側に同じ移動度の1つのスポットを示した。（Fig. 5－1参照） また、脱ピルビン酸、脱アシル化したこれらのオリゴ糖に、*Flavobacterium* sp. M64 の細胞内酵素、エンド－（1→6）－β－D－グルカナーゼを作用させ、ペーパークロマトグラフィーで分解生成物を調べると、いずれも同様なR_f値を示す2つのオリゴ糖に分解された。（Fig. 5－2参照） これらの結果から、SCGとSG–Dは同じ構造をしているものと思われた。

4. SCGの構造

Fig. 5－2 において、移動度が大きい方をオリゴ糖A（OA）、小さい方をオリゴ糖B（OB）とした。 第四章で記述した方法で、OAとOBの物質をペーパークロマトグラフィーにより分取した。そこで、SCG、脱ピルビン酸SCG、OA、OB について、メチル化分析を行なった。その結果をTable 5－3に示す。

SCGのメチル化分析では、2,4,6－トリ－O－メチル－D－グルシトール、 2,4,6－トリ－O－メチル－D－ガラクチトール、2,3,4－トリ－O－メチル－D－グルシトール、2,3,6－トリ－O－メチル－D－グルシトール、2,3－ジ－O－メ

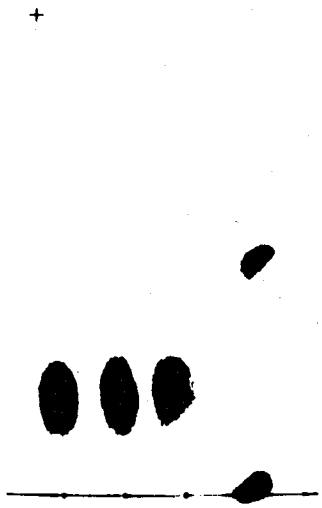


Fig. 5-1. A B C D

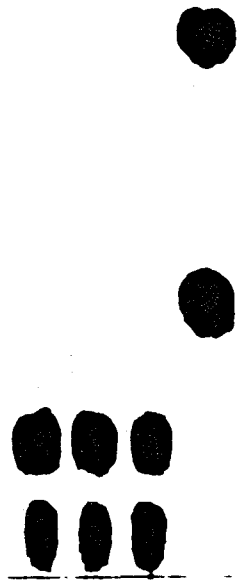


Fig. 5-2. A B C D

Fig. 5-1. Chromatogram of SCG from strain 22 (A) and 22-33 (B), and SG-D (C) by high-voltage paper electrophoresis.

Controls, glucose and glucuronic acid (D).

Fig. 5-2. Chromatogram of hydrolysates of SCG from strain 22 (A) and 22-33 (B), and SG-D (C) by end-(1→6)-β-D-glucanase of Flavobacterium sp. M64.

Control, glucose and gentiobiose (D).

チル－D－グルシトールのモル比が、2：1：2：2：1であった。ここで、ジ－O－メチル－D－グルシトールは、分岐に関与するグルコース残基ではなく、O－4，O－6でピルビン酸がアセタール結合している非還元末端のグルコース残基由来のものである。これは、SCGを脱ピルビン酸化すると、ジ－O－メチル－D－グ

Table 5-3. Methylation analysis of SCG, depyruvylated SCG and oligosaccharides A and B

	Methylated sugar (relative proportions)					
	2,3,4,6-Glc (T=1.00[a])	2,4,6-Glc (T=1.39[a])	2,4,6-Gal (T=1.48[a])	2,3,4-Glc (T=1.56[a])	2,3,6-Glc (T=1.64[a])	2,3-Glc (T=2.11[a])
SCG	0	2.1	0.8	2.2	2.2	1.0
Depyruvylated SCG	1.0	2.2	0.9	2.3	2.0	0
Oligosaccharide A	1.0	2.1	0	0.9	0	0
Oligosaccharide B	1.0	0	0.9	0	2.2	0

[a] Retention time of the corresponding alditol acetate relative to 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol on an OV275-GEXF1150 column.

ルシトールのピークが無くなり、テトラ－O－メチル－D－グルシトールが現われることからわかる。この結果より、SCGは直鎖のオリゴ糖で、

(a) ピルビン酸と結合した非還元末端のD－グルコース残基、1モル

(b) (1→3)－D－グルコース残基、2モル

(c) (1→3)－D－ガラクトース残基、1モル

(d) (1→6)－D－グルコース残基、2モル

(e) (1→4)－D－グルコース残基、2モル

から構成されていることがわかった。一方、SCGの還元末端の糖について、第四章で記述したのと同じ方法で分析したところ、D－ガラクトースであった。

メチル化分析よりOAは、

(a) 非還元末端のD－グルコース残基、1モル

(b) (1→3)－D－グルコース残基、2モル

(c) (1→6)－D－グルコース残基、1モル

から構成されていることがわかった。このOAを、第四章で記述したのと同じ方法により、アーモンドのβ－D－グルコシダーゼで処理すると、唯一の2糖類として

ゲンチオビオースが検出された。この結果、OAの還元末端側の構造は、β－D－Glcp－（1→6）－D－Glcpであることがわかった。

以上の結果より、OAの構造はつぎのようになる。

β-D-Glc*P*-(1→3)-β-D-Glc*P*-(1→3)-β-D-Glc*P*-(1→6)-D-Glc*P*

メチル化分析よりOBは、

(a) 非還元末端のD－グルコース残基、1モル

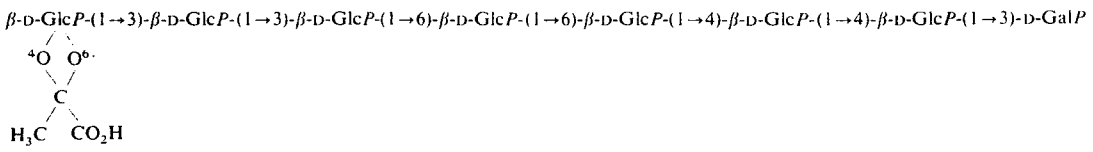
(b) （1→4）－D－グルコース残基、2モル

(c) （1→3）－D－ガラクトース残基、1モル

から構成されていることがわかった。SCGの還元末端はD－ガラクトースであるから、ガラクトースを含むOBはSCGの還元末端側の構造を示し、その還元末端もD－ガラクトースである。また、アーモンドのβ－D－グルコシダーゼで処理すると、唯一の3糖類として3－O－β－D－セロビオシルガラクトース[28]が検出された。以上の結果より、OBの構造はつぎのようになる。

β-D-Glc*P*-(1→4)-β-D-Glc*P*-(1→4)-β-D-Glc*P*-(1→3)-D-Gal*P*

つぎに、OAとOBのメチル化糖の値の和と、脱ピルビン酸SCGのメチル化糖の値を比較すると、前者の場合、2,3,4－トリ－O－メチル－D－グルシトールが1モル少なくなっている。これより、OAとOBは（1→6）－D－グルコシド結合によってSCGとなることがわかった。脱アシルSCGの構造をつぎに示す。



この構造は、サクシノグリカンを酵素分解して得られた脱アシル単位鎖オリゴ糖

（SG−D）と全く同じである。アシル基の位置に関しては、SG−Dと同様、解明されていない。

第四節　考　　察

細胞壁ペプチドグリカン生合成系に作用するペニシリンGやバシトラシンを適当量作用させると、細胞壁の構造が一部変化することが考えられる。実際、これらの抗生物質を加えた合成培地で *A. faecalis* var. *myxogenes* 菌株22を培養すると、サクシノグリカンの生産量が減少し、SCGの生産量が増加した。この菌株はサクシノグリカン分解酵素を作っていないので、SCGの増加は抗生物質による細胞壁の変化によるものと考えられる。すなわち、細胞壁の構造が変化すると、サクシノグリカン生合成系に影響が現われ、その中間代謝物質の一部はサクシノグリカンに移行されず、そのかわりに細胞外へSCGとして遊離されたものと考えられる。菌株22−33は、合成培地のみでも多少のSCGを生産するが、酵母エキスを加えるとその生産量は著しく増大した。この菌株もサクシノグリカン分解酵素を作っていないので、細胞壁の構造が変化したものであると思われる。

バシトラシンは、細胞壁ペプチドグリカン生合成系において、C_{55}ポリイソプレノール2リン酸と結合してリピッドサイクルを阻害する。[82] このC_{55}ポリイソプレノールは、細胞壁ペプチドグリカン、リポ多糖類、タイコ酸、それに細胞外多糖類の生合成に、構成糖の運搬役として利用されていることがわかってきた。[83] それ故C_{55}ポリイソプレノールはキャリヤーリピッドとも呼ばれている。このリピッドの細胞中の量には限りがあるため、増殖が活発な間はもっぱら細胞壁ペプチドグリカンの合成に働き、ついでリポ多糖類の合成に、増殖が終って停止期に入ってから細胞外多糖類の合成に働くとされている。（Fig. 5−3参照）[83]

このような細胞外多糖類の生産は、細胞の増殖が完了してから活発に行なわれることを、原田らは早くから（1964年、[10] 1965年[15]）報告している。（Fig. 5−4）

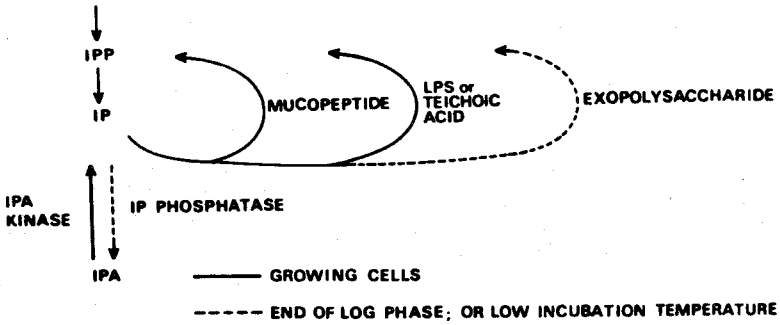


Fig. 5-3. Carrier lipid utilization.

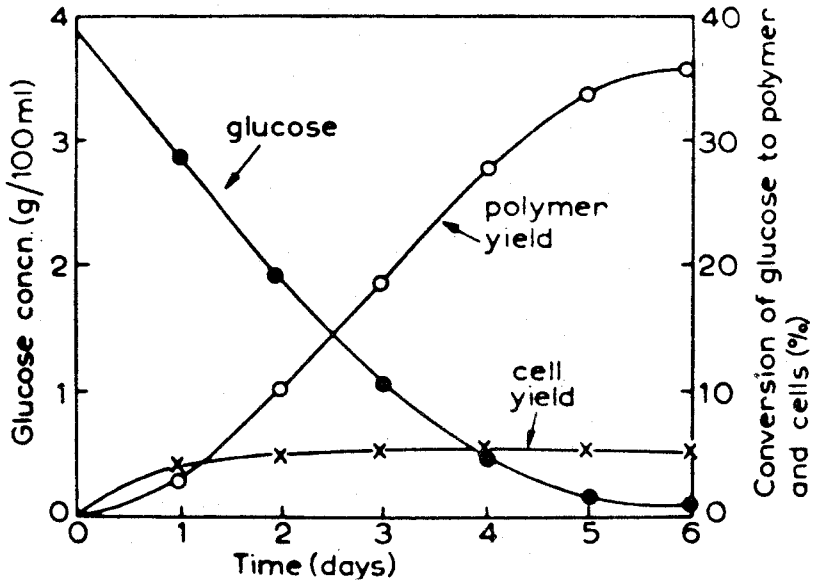


Fig. 5-4. Time course of production of polysaccharide containing succinic acid and cells of Alcaligenes strain 10C3.

培養液から得られたSCGは、

規則性のある反復構造を有するサクシノグリカンの単位鎖物質そのものであり、また生合成中間代謝物質と関連のある物質と考えられるため、規則性のある反復構造を有するサクシノグリカンは、Fig. 5－5 に想定した生合成サイクルより作られるものであると考えられる。

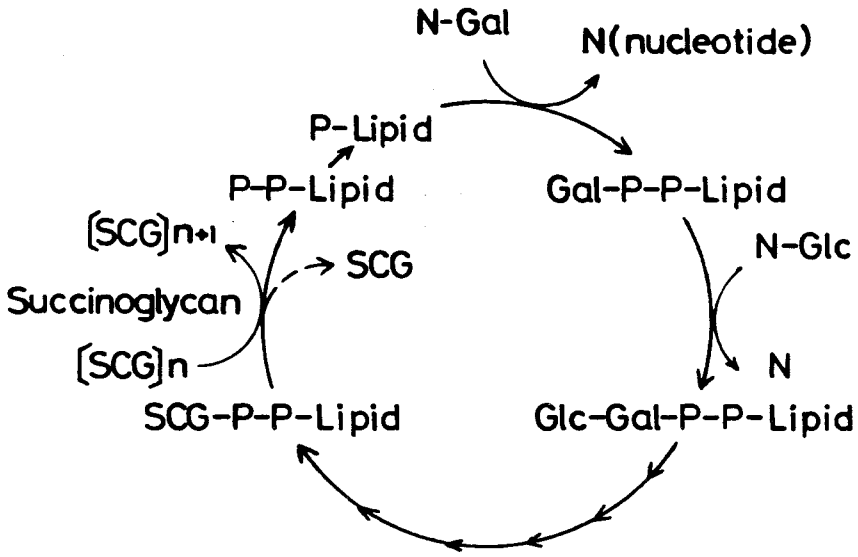


Fig. 5-5. Proposed scheme for the biosynthesis of succinoglycan. Sugars are transferred from sugar nucleotides to form the octasaccharide repeating units (SCG) of succinoglycan. Lipid, polyisoprenol; N,nucleotide; P,phosphate.

第五節　要　　約

A. faecalis var. *myxogenes* 菌株22の変異株22－33は、0.1％酵母エキスの入った合成培地100㎖から、約370㎎のオリゴ糖（SCG）を生産した。また、菌株22は、合成培地にペニシリンG、特にバシトラシンを加えて培養すると、サクシノグリカンの生産量が減少し、かわりにオリゴ糖の生産量が増加した。

このオリゴ糖（SCG）は、D－グルコース、D－ガラクトース、コハク酸、ピルビン酸がモル比で7：1：1：1からなり、*Flavobacterium* sp. M64の細胞内酵素、エンド－（1→6）－β－D－グルカナーゼで2つの4糖類に分解された。これらのオリゴ糖のメチル化分析より、SCGは、第四章で記述したサクシノグリカンの単位鎖オリゴ糖（SG—D）とまったく同じ構造をしていることがわかった。

総　　括

微生物の生産する細胞外多糖類の中には、特徴のある物性や生理活性を示すものがあり、多くの研究がなされている。しかしながら、微生物多糖類の総合的な科学としての発展を示しているものは少ない。原田が中心となって進めてきた *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* の細胞外多糖類（カードランとサクシノグリカン）の研究は、菌株の改良や培養条件の検討、多糖類の構造と物性、食品や医薬品への応用、さらには多糖類の分解酵素の研究など、基礎から応用まで幅広く総合的に行なわれている。これらの研究は多糖類科学の発展に寄与している。本論文は、これら一貫した研究において大いに貢献するものである。

第一章では、*A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3 における多糖類の生産能力の変異について研究した。多量のサクシノグリカンと少量のカードランを生産する菌株10C3は、保存用寒天培地で長く培養すると、サクシノグリカンよりもカードランをより多く生産する菌株に自然変異した。この現象について、生理食塩水、あるいはポリペプトン・酵母エキス・食塩の液体培地で培養して調べた結果、この自然変異は、細胞分裂が活発な時期には起りにくく、むしろ細胞分裂がおさえられて細胞が死につつある時期に起りやすいことがわかった。

そして、この変異は、ニトロソグアニジン、エチルメタンスルフォネイト、あるいは紫外線の処理で促進された。なお、これらの多糖類の生産には、プラスミッドは関与していないものと考えた。

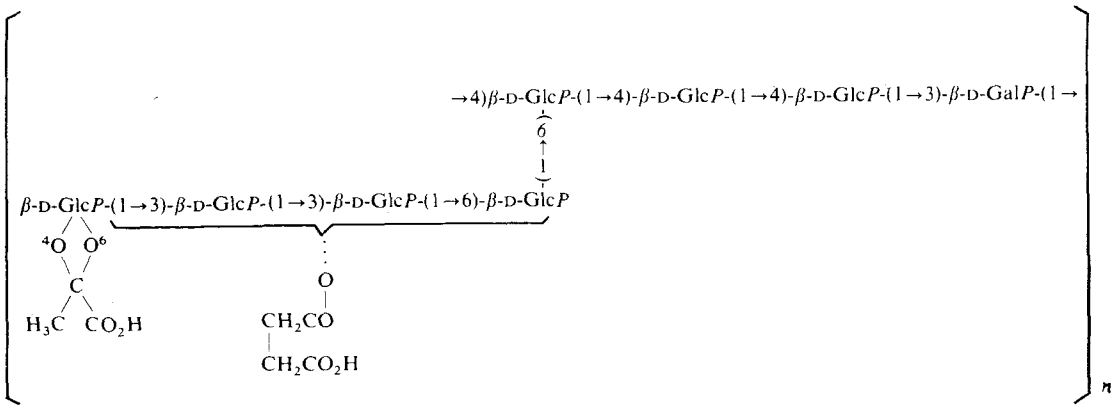
第二章では、*Agrobacterium* の細胞外多糖類の生産能力の変異について研究した。醗酵研究所に保存されていた9菌株のうち4菌株に、水溶性多糖類とカードランの生産性が著しく異なる菌株が混在していた。*A. radiobacter* IFO 12665 の多糖類の生産能力を調べたところ、*A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3と同様な条件下で自然変異することがわかった。この菌株 IFO 12665は、多量の水

溶性多糖類と少量のカードランを生産し、自然変異した菌株は多量のカードランと少量の水溶性多糖類、あるいはカードランのみを生産した。このような変異株あるいは水溶性多糖類のみを生産する菌株の多糖類の生産能力は安定であった。保存菌株に混在していたカードランを多量に生産する菌株は、保存中に自然変異したものである。

第三章では、第二章で調べた9菌株の *Agrobacterium* の水溶性多糖類に、コハク酸、酢酸、ピルビン酸が含まれていることを、高速液体クロマトグラフィーと ^{1}H−NMR 分析により明らかにした。酢酸、ピルビン酸を含む細胞外多糖類は数多く知られているが、コハク酸を含むものは著者の研究以外には、*Arthrobacter stabilis* NRRL B−3225 と *Agrobacterium radiobacter* strain A−1 の細胞外多糖類に知られているにすぎない。一方、*Agrobacterium* 9菌株の水溶性多糖類の構成糖は、いずれもD−グルコース、D−ガラクトース（モル比で7〜8：1）であった。

また、これらの多糖類は *Flavobacterium* sp. M64 のサクシノグリカンデポリメラーゼによって、サクシノグリカンの場合と同様の R_f 値を示す1つの単位鎖オリゴ糖に分解された。従って、*Agrobacterium* 9菌株の水溶性多糖類は、サクシノグリカン型多糖類であることが示唆された。

第四章では、サクシノグリカンの構造を特殊な酵素を使用して明らかにした。サクシノグリカンに *Flavobacterium* sp. M64 の細胞外酵素（サクシノグリカンデポリメラーゼ）と細胞内酵素（エンド−（1→6）−β−D−グルカナーゼ）を逐次作用させ、単位鎖8糖類（SG−D）を経て、2つの4糖類を得た。まず、この2つの4糖類の構造をメチル化分析、還元末端糖の分析、β−D−グルコシダーゼの分解パターンより明らかにし、ついで、多糖類、8糖類、それに2つの4糖類のそれぞれのメチル化糖の数値を比較検討することによって、サクシノグリカンの構造を次のごとく決定した。



この構造は、Jansson らが特殊な化学的方法によって明らかにした *Rhizobium meliloti* U 27 の細胞外多糖類の構造とアシル基を除いて同じであった。

基質特異性の高い *Flavobacterium* sp. M 64 の 2 つの酵素は、数多くの細胞外多糖類の中から、サクシノグリカン型の多糖類を検出することができる。すなわち、これらの酵素による分解物をペーパークロマトグラフィーで調べ、その展開パターンがサクシノグリカンのものと同じ多糖類は、メチル化分析においてもサクシノグリカンのものと同じであった。このようにして、*A. radiobacter*、*A. rhizogenes*、*A. tumefaciens*、それに *R. meliloti* の水溶性細胞外多糖類は、アシル基を除いてサクシノグリカンと同じ構造であることがわかった。

第五章では、変異株により生産されるオリゴ糖について調べた。*A. faecalis* var. *myxogenes* 菌株 22 の変異株 22－33 は、0.1 %酵母エキスを含む合成培地で培養すると、培養液 100 mℓあたり約 370 mgのオリゴ糖（SCG）を生産した。一方、菌株 22 もペニシリンGやバシトラシンを加えた合成培地で培養すると、サクシノグリカンの生産量が減少し、かわりにSCGが増加した。このSCGは、サクシノグリカンの分解によって生じたものでなく、サクシノグリカンの生合成中間体と関連のある物質であることが示唆された。その構造は、サクシノグリカンをサクシノグリカンデポリメラーゼで分解して得られた単位鎖オリゴ糖（SG－D）と同じであ

った。このように、このオリゴ糖が、微生物によるサクシノグリカンの酵素分解の際の単位物質であると共に、生合成の際の単位物質でもあることは興味深い。

以上、多糖類生産能力の自然変異、および多糖類の構造解明について記述したが本論文は、基礎的にも応用面でも微生物の多糖類科学の発展に寄与するものと確信する。

謝　　辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤な御指導を賜りました大阪大学産業科学研究所・原田篤也教授に厚くお礼申し上げます。

又本研究の御指導、御協力下さいました雨村明倫博士、御協力下さいました安部淳一氏に心から感謝いたします。さらに、終始御協力を頂きました原田研究室の皆様に深く感謝いたします。

本論文の御校閲を頂きました大阪大学工学部醱酵工学科・芝崎　勲教授、岡田弘輔教授、ならびに大嶋泰治教授に厚くお礼申し上げます。

引 用 文 献

1. 原田篤也：総合多糖類科学下，講談社，P 124（1974）
2. F. B. Dazzo and D. H. Hubbel: Appl. Microbiol., 30, 1017 (1975)
3. P. E. Jansson, L. Kenne and B. Lindberg: Carbohydr. Res., 45, 275 (1975)
4. H. Thurow, Y. M. Choy, N. Nobbert, H. Hiemann and S. Stirm: Carbohydr. Res., 41, 241 (1975)
5. P. E. Jansson, L. Kenne, B. Lindberg, H. Ljunggren, J. Lönngren, U. Rudèn and S. Svensson: J. Am. Chem. Soc., 99, 3812 (1977)
6. ACS Symposium, Ser. No 45, Extracellular Microbial Polysaccharides, ed. by P. A. Standford and A. Laskin (1977)
7. J. Pettitt: Polysaccharides in Food ed. by J. M. V. Blanshard and J. R. Mitchell, Butterworths, p 263 (1979)
8. A. Jeanes, J. E. Pittsley and F. R. Senti: J. Appl. Polymer. Sci., 5, 519 (1961)
9. 原田篤也，吉村　正：醱工，42，615（1964）
10. T. Harada and T. Yoshimura: Biochem. Biophys. Acta, 83, 374 (1964)
11. T. Harada, T. Yoshimura, H. Hidaka and A. Koreeda: Agric. Biol. Chem., 29, 757 (1965)
12. T. Harada: Arch. Biochem. Biophys., 112, 65 (1965)
13. T. Harada and T. Yoshimura: Agric. Biol. Chem., 29, 1029 (1965)
14. T. Harada, M. Masada, K. Fujimori and I. Maeda: Agric. Biol. Chem., 30, 196 (1966)

15. 原田篤也，正田万都江，日高秀昌，高田正生：醱工，44，20（1966）

16. T. Harada, K. Fujimori, S. Hirose and M. Masada: Agric. Biol. Chem., 30, 764 (1966)

17. I. Maeda, H. Saito, M. Masada, A. Misaki and T. Harada: Agric. Biol. Chem., 31, 1184 (1967)

18. T. Harada, A. Misaki and H. Saito: Arch. Biochem. Biophys., 124, 292 (1968)

19. T. Sasaki, N. Abiko, Y. Sugino and K. Nitta: Cancer Res., 38, 379 (1978)

20. T. Sasaki, N. Abiko, K. Nitta, N. Takasuka and T. Sugino: Europ. J. Cancer, 15, 211 (1979)

21. R. H. Marchessault, Y. Deslandes, K. Ogawa and P. R. Sundarajan: Can. J. Chem., 55, 300 (1977)

22. H. Takeda, N. Yasuoka, N. Kasai and T. Harada: Polymer J., 10, 365 (1978)

23. H. Saito, T. Ohki and T. Sasaki: Biochemistry, 16, 908 (1977)

24. A. Koreeda, T. Harada, K. Ogawa, S. Sato and N. Kasai: Carbohydr. Res., 33, 396 (1974)

25. T. Harada, A. Koreeda, S. Sato and N. Kasai: J. Electron Microsc., 28, 147 (1979)

26. I. Nakanishi, K. Kimura, T. Suzuki, M. Ishikawa, I. Banno, T. Sakane and T. Harada: J. Gen. Appl. Microbiol., 21, 1 (1976)

27. A. Amemura, M. Hisamatsu, J. Abe, S. K. Ghai and T. Harada: Abstracts of X th international symposium on carbohydrate chemistry (1980)

28. H. Saito, A. Misaki and T. Harada: Agric. Biol. Chem., 34, 1683 (1970)

29. T. Harada, K. Moori and A. Amemura: Agric. Biol. Chem., 36, 2611 (1972)

30. A. Amemura, K. Moori and T. Harada: Biochem. Biophys. Acta, 334, 398 (1974)

31. J. Abe, A. Amemura and T. Harada: Agric. Biol. Chem., 44, 1877 (1980)

32. I. Nakanishi, K. Kimura, S. Kusui and E. Yamazaki: Carbohydr. Res., 32, 47 (1974)

33. A. Amemura and T. Harada: J. Ferment. Technol., 49, 559 (1971)

34. E. A. Adelberg, M. Mandel and G. C. C. Chen: Biochem. Biophys. Res. Commun., 18, 788 (1965)

35. S. Kondo, H. Ichikawa, K. Iwo and T. Kato: Genetics, 66, 187 (1970)

36. M. Novel and G. Novel: J. Bacteriol., 127, 406 (1976)

37. J. G. Rheinwald, A. M. Chakrabarty and I. C. Gunsalus: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 885 (1973)

38. D. H. Bouanchaud, M. R. Scavizzi and Y. A. Chabbert: J. Gen. Microbiol., 54, 417 (1969)

39. P. Kahn and D. R. Helinski: J. Bacteriol., 88, 1573 (1964)

40. S. A. Sonstein and J. N. Baldwin: J. Bacteriol., 109, 262 (1972)

41. T. Harada, A. Amemura, H. Saito, S. Kanamaru and A. Misaki: J. Ferment. Technol., 46, 679 (1968)

42. S. Zamenhof, H. H. Eichhorn and D. Rosenbaum-Oliver: Nature, 220, 818 (1968)

43. S. J. Webb: Nature, 213, 1137 (1967)

44. J. W. Drake: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 55, 738 (1966)

45. Experiments in microbial genetics, ed. by R. C. Clowes and W. Hayes, Blackwell Scientific Publications, p 17 (1968)

46. L. P. T. M. Zevenhuizen: J. Gen. Microbiol., 68, 239 (1971)

47. L. P. T. M. Zevenhuizen: Carbohydr. Res., 26, 409 (1973)

48. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)

49. B. J. Block, E. L. Durrum and G. Zweig: A manual of paper Chromatography and paper electrophoresis, 2nd rev. edition, Academic Press, New York, p 215 (1958)

50. J. K. Palmer and D. M. List: J. Agric. Food Chem., 21, 903 (1973)

51. H. J. Koepsell and E. S. Sharpe: Arch. Biochem. Biophys., 38, 443 (1952)

52. E. A. McComb and R. M. McCready: Anal. Chem., 29, 819 (1957)

53. J. S. Sawardeker, J. H. Sloneker and A. Jeanes: Anal. Chem., 37, 1602 (1965)

54. T. Bitter and H. M. Muir: Anal. Biochem., 4, 330 (1962)

55. J. H. Sloneker and A. Jeanes: Can. J. Chem., 40, 2066 (1962)

56. 船久保英一：有機化合物確認法II，養賢堂，P104（1969）

57. G. H. Cohen and D. B. Johnstone: J. Bacteriol., 88, 329 (1964)

58. J. H. Sloneker, D. G. Orentas, C. A. Knutson, P. R. Watson and A. Jeanes: Can. J. Chem., 46, 3353 (1968)

59. P. A. J. Gorin and J. F. T. Spencer: Can. J. Chem., 42, 1230 (1964)

60. D. G. Orentas, J. H. Sloneker and A. Jeanes: Can. J. Microbial., 9, 427 (1968)

61. B. J. Gormus, R. W. Wheat and J. F. Porter: J. Bacteriol., 107, 150 (1971)

62. I. W. Sutherland: Biochem. J., 115, 935 (1969)

63. T. Nagahama, S. Fujimoto and M. Kanie: Agric. Biol. Chem., 41, 1847 (1977)

64. A. Darke, E. R. Morris, D. A. Rees and E. J. Welsh: Carbohydr. Res., 66, 133 (1978)

65. I. B. Naumova, A. Belozerskii and F. A. Shafikova: Dokl. Akad. Nauk U.S.S.R., 143, 730 (1962)

66. J. M. Keller and C. E. Ballou: J. Biol. Chem., 243, 2905 (1968)

67. L. M. G. van Golde, H. Schulman and E. P. Kennedy: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 1368 (1973)

68. H. Raistrick and M. I. Rintoul: Trans. Roy. Soc. (London) Ser. B 220, 255 (1931)

69. E. R. Morris, D. A. Rees, G. Young, M. D. Walkinshaw and A. Darke: J. Mol. Biol., 110, 1 (1977)

70. T. Harada, A. Amemura, P. E. Jansson and B. Lindberg: Carbohydr. Res., 77, 285 (1979)

71. S. Hakomori: J. Biochem. (Tokyo), 55, 205 (1964)

72. B. Lindberg: Methods in Enzymology, ed. by V. Ginsburg, Academic Press Inc., New York, 28, 183 (1972)

73. A. S. Chaudhari, C. T. Bishop and W. F. Dudman: Carbohydr. Res., 28, 221 (1973)

74. 山田哲也，久松　真，滝　基次：農化，49，163（1975）

75. A. Amemura, M. Hisamatsu, S. K. Ghai and T. Harada: Carbohydr. Res., in press.

76. E. C. Yurewicz, M. A. Ghalambor, D. H. Duckworth and E. C. Heath: J. Biol. Chem., 246, 5607 (1971)

77. W. Bessler, E. Freund-Mölbert, H. Knüfermann, C. Rudolph, H. Thurow and S. Stirm: Virology, 56, 134 (1973)

78. Y. M. Choy, F. Fehmel, N. Frank and S. Stirm: J. Virol., 16, 581 (1975)

79. H. Thurow, H. Niemann and S. stirm: Carbohydr. Res., 41, 257 (1975)

80. H. Niemann, H. Beilharz and S. Stirm: Carbohydr. Res., 60, 353 (1978)

81. E. M. Wise and J. T. Park: Proc. Natl. Acad. Sci., 54, 75 (1965)

82. G. Siewert and J. L. Strominger: Proc. Natl. Acad. Sci., 57, 767 (1967)

83. I. W. Sutherland: ACS Symposium, Ser. No 45, Extracellular Microbial Polysaccharides, ed. by P. A. Standford and A. Laskin, p 40 (1977)

本論文に関係ある主な報文

1. Spontaneous Mutation of Polysaccharide Production in *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3
   Applied and Environmental Microbiology, 34, 617-620 (1977)

2. Change in Ability of *Agrobacterium* to Produce Water-soluble and Water-insoluble β-Glucans
   Journal of General Microbiology, 103, 375-379 (1977)

3. Acidic Polysaccharides Containing Succinic Acid in Various Strains of *Agrobacterium*
   Carbohydrate Research, 61, 89-96 (1978)

4. Structural Elucidation on Succinoglycan and Related Polysaccharides from *Agrobacterium* and *Rhizobium* by Fragmentation with Two Special β-D-Glycanases and Methylation Analysis
   Agricultural and Biological Chemistry, 44, 1049-1055 (1980)

5. Formation of an Oligosaccharide, the Repeating Unit of Succinoglucan, by *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*
   Carbohydrate Research, 66, 289-294 (1978)

6. Structure of the Linear Repeating Unit of Succinoglycan Accumulated in Cultures of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*
   Agricultural and Biological Chemistry, 44, 461-462 (1980)