

Title	Agrobacterium及びRhizobiumが生産した cyclic (1→2) -β-D-glucan (cyclosphoraose) 類に関する研究
Author(s)	岡田, 安代
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35583
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【3】

氏名・(本籍)	岡 田 安 代
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 7 4 2 9 号
学位授与の日付	昭 和 61 年 8 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	<i>Agrobacterium</i> 及び <i>Rhizobium</i> が生産した cyclic(1→2)-β-D-glucan (cyclosophoraose) 類に関する研究
論文審査委員	(主査)
	教授 近藤 雅臣
	(副査)
	教授 岩田平太郎 教授 三浦 喜温 教授 佐々木喜男

論 文 内 容 の 要 旨

Cyclic(1→2)-β-D-glucan (cyclosophoraose, CyS と略記する) 類は *Agrobacterium* 及び *Rhizobium* の多くの菌株が生産する側鎖のない環状糖で、これ迄にメチル化分析やペーパークロマトグラフィーなどの結果から、重合度 (DP) の異なる数種の多糖類の混合物であることが予想されていた¹⁾。そこで、先ずこれら CyS 類の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析条件を検討し、組成を明らかにすることを目的として研究を始めた。

一方、近年、包接化合物に関する研究が多分野で活発に行われ、特にシクロデキストリン (CyD) 類を宿主化合物とした医薬品の可溶化、安定化、生物学的利用性の向上等に関する研究が急速に進んでいる²⁾。しかし、研究が進むにつれて CyD 類の溶解性や毒性などの関係から応用に限界があることが明らかとなり、現在 CyD 類に代わるものの出現が強く望まれている。CyS 類も環状構造を持つ天然糖であることから、包接化合物の宿主化合物に利用できるのではないかと考え、各種医薬品に対する包接能について検討し、製剤への応用のための基礎研究を行った。

Agrobacterium 及び *Rhizobium* の種々の菌株を用いて調製した CyS 類の HPLC による分析条件を検討した結果、NH₂-カラム/アセトニトリル-水素及び ODS-カラム/メタノール-水系でこれら一連の CyS 類が分離・分析できることを確認した。そこで、*Agrobacterium* 6 菌株、*Rhizobium* 8 菌株が生産した CyS 類の百分率組成を HPLC で測定したところ、分布の特徴が認められ、菌株を Type I-IV に分類することができた。このうち Type III に属す *R. meliloti* I F O 13336 が生産した CyS 類には、少なくとも A から X に到る 24 種類もの成分が含まれていることが明らかとなった。また、NH₂-カラム及び ODS-カラム上での分離状況から、CyS 類の DP は A から X 迄順番に大きくなり、

水溶性は原則としてDPが大きくなるに従って低くなるが、CとD、EとF、JとK、OとPの4ヶ所で逆転していることが認められた。次に、CyS類をそれぞれ純粋に分離・分取するために、4種類のODS-カラム(移動相:5-6%メタル溶液)を用いて分離条件を検討したところ、カラム充てん剤の形状(球状型、破碎型)、粒子径、孔径、表面積、オクタデシル基の化学結合の方法及び割合、末反応シラノール基の処理方法及び残存量などの違いがCyS類の分離に影響を及ぼすことが明らかとなったので、数種類のODS-カラムを適宜使い分けることにより、CyS-A-Qの17種類を純粋に単離した。続いて、純粋に得た各CySのDPを決定するために、部分加水分解を行ない、生成した一連のグルコ-オリゴマーの分析条件を検討した結果、粒子径3 μm のNH₂-カラム上、アセトニトリル-水系の単一組成の移動相を用いたisocratic溶出法で、グルコースからDP40前後迄の(1 \rightarrow 2)- β -D-グルカンの一斉分析を短時間内に行なえることが判明し、この方法で得た各CyS部分加水分解物のクロマトグラムのピークの数から、それぞれのDPを疑う余地なく決定することができた。

なお、糖化学における一般的な分類法によると、DPが10以上であるCyS類は多糖類に属するが、これ迄に知られている多糖類の大部分はDPが80-100で、天然にはDP5-15の糖類は稀に存在するが、DP25-75のものはほとんど存在しないとされている。この観点からみるとDP17-40の一連のCyS類の存在は注目すべきことである。

また、糖類のHPLCにおいてisocratic溶出法で一斉分析できるのは、せいぜいDP10余り迄であるとされていたのを、分離能の良いNH₂-カラムと脈流の少ないポンプ、高感度の示差屈折計を用いることにより、分析可能範囲を大幅に広げることができた。

以上の実験途上、CyS類の加水分解に対する反応に興味深い事実がみとめられたので、CyS-A-H(DP17-24)について加水分解反応を研究した。その結果、この加水分解は見かけ上一次反応で進むことがわかったが、CyS類はすべて同じ結合様式であるにもかかわらず、DPによって反応速度に相当の差を示した。加水分解速度の大きなものから順に並べると、CyS-G(DP23)>E(DP21)>B(DP18)>H(DP24)>F(DP22)>D(DP20)>C(DP19)>A(DP17)となり、DPとの間に一定の傾向は見い出せなかった。これは、CyS類の環構造が非常にflexibleであるために、環の結合角の歪がDPの増加につれて漸進的に増又は減するのではないということに起因していると考えられる。このことは¹³C-NMR及び施光度の測定結果にもDPの違いによる規則性がみとめられなかったことから裏づけられる。なお、CyS類の加水分解における開環の活性化エネルギーはいずれも30kcal/mol程度であった。

CyS類の包接能を検討するにあたり、単一DPのCySの相当量を必要としたので、最も分子量の小さいCyS-A(DP17)を比較的大量に分離・分取する方法を確立した。CyS-Aを比較的大量に分離・分取する方法を確立した。CyS-Aの性質を従来から包接化合物のホスト化合物として繁用されてきた β -CyDのそれと比較すると、水に対する溶解度は約90倍以上高く、また環の内径及び深さが大きいという特徴を有している。さらに、 β -CyDは低濃度(5mM)で溶血作用を示すが、CyS-Aは高濃度(80mM)でもまったく溶血作用はみとめられないというメリットを持つ。そこで、CyS-Aの包接能を溶解度法を用いて検討したところ、脂溶性ビタミン類(ビタミンD₃、E、K₁)や酸性非ス

テロイド系抗炎症剤（フルルビプルフェン、インドメタシン、メフェナム酸、フェニルブタゾン）と包接化合物を形成し、溶解度の上昇や安定化をもたらすことが認められた。また、CyS-Aはフルルビプルフェン及びインドメタシンの溶血作用を抑制し、製剤への利用の可能性を示唆された。

（引用文献）

- 1) M. Hisamatsu, A. Amemura, T. Matsuo, H. Matsuda, T. Harada, *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1873 (1982); A. Amemura, M. Hisamatsu, H. Mitani, T. Harada, *Carbohydr. Res.*, 114, 277 (1983).
- 2) D. W. Frank, J. E. Gray, R. N. Weaver, *Am. J. Pathol.*, 83, 367 (1976); 上釜兼人, フレグランスジャーナル, 63, 68 (1983); 上釜兼人, 入江徹美, 製薬工場, 5, 20 (1985).

論文の審査結果の要旨

*Agrobacterium*及び*Rhizobium*の種々の菌株から一連の環状多糖の分離に成功し、菌株より生産する多糖類への百分率組成が異なり、4種のタイプに分類できることを明らかにした。このうち*R. meliloti* I F O13336は最も多くの成分を生産することがわかり（24種類）、これを対象として各成分の単離方法を検討し、また、それぞれの重合度を決定する方法を考案した。これらの結果、これ迄に知られなかった重合度17~40のものが存在することが判明した。一方、これらの成分中最も分子量の小さいものを選び包接能を検討したところ、脂溶性ビタミン、酸性非ステロイド系抗炎症剤などと包接化合物を形成して溶解度の上昇や安定化をもたらすことが判明し、また、この物質自身の毒性が低いことから実用性のあることを示唆した。以上の研究成果は、薬学博士を授与するに値するものと判定した。

* : sophorose (β -(1→2)結合のグルコ2糖)の環状重合体という意味で命名された。