Arthrobacter グルカナーゼ-I が酵母グルカンおよび パキマンに作用した際に生じるオリゴ糖の同定

土井健二* 土井明美* 福井俊郎*

(昭和47年9月18日受理)

Identification of the oligosaccharides produced by the action of an
Arthrobacter glucanase on yeast glucan and pachyman

Kenji Dor*, Akemi Dor* and Toshio Fukui*

*The Institute of Scientific and Industrial
Research, Osaka University (Suita, Osaka)

The characteristic sugar spot, which was found most prominently on the paperchromatograms of the digests of yeast glucan and pachyman by a glucanase from an *Arthrobacter* bacterium, was identified with laminaripentaose. The less conspicuous sugar spots accompanying the above one were the individual members of a homologous series of β -1,3 laminaridextrins; the presence of the dextrins having DP's up to 10 was confirmed.

緒 言

われわれは先に生パン酵母の細胞壁をよく溶解する酵素を生産する細菌として腐敗したコンニャクの表面から *Arthrobacter* 属の一細菌を単離した¹⁾。この細菌をオートクレーブした市販の酵母菌体けん濁液を培地として培養したとき、作用様式の異なる少なくとも2種の β -グルカナーゼを生産する。われわれはこれらを仮にグルカナーゼ-I および-II とよぶことにした。グルカナーゼ-II は、これまでに比較的良好に調べられていた *Bacillus circulans* の β -1,3-グルカナーゼ²⁾ に類似していたが、グルカナーゼ-I は酵母グルカンを効果的に液化し、その際反応物のペーパークロマトグラム上には、ラミナリペンタオースと考えられる糖が顕著にみとめられた¹⁾。ペーパークロマトグラム上には他の糖も存在するのでわれわれはこれらの糖の同定を試み、これらが一連の β -1,3 ラミナリデキストリンであることを確認したので報告する。

グルカナーゼ-I が Chesters³⁾ らによって記載された

Myrothecium のグルカナーゼ複合体のうちの成分CまたはDに近いと考えられることはすでに指摘した¹⁾が、最近 BACON⁴⁾ らによって記載された *Cytophaga* の液化型グルカナーゼもやはり同じ種類の酵素と考えられる。ちなみに、前者の酵素はラミナリンから重合度5より大きいラミナリデキストリンを生産すると記され³⁾、後者の酵素は酵母グルカンまたはパキマンから低分子糖としては重合度5~6と考えられる糖を主に生産すると記されている⁴⁾がその詳細は報告されていない。*Arthrobacter* 属細菌の生産するグルカナーゼ-I の β -1,3 グルカンに対する作用形式については目下研究中である。

実験方法

1. 酵 素

a) グルカナーゼ-I すでに発表した方法¹⁾によって精製した。DEAE-Sephadex クロマトグラム上での活性のピークの分画をあつめフラッシュ-エバポレーターで濃縮し、蒸留水に対し透析後コロジオンバッグでさらに濃縮して用いた。酵素濃度は LOWRY らの方法⁵⁾で測定したタンパク質量で表わした(グルカナーゼ-II についても同じ)。

* 大阪大学産業科学研究所 (大阪府吹田市山田上)

b) グルカナーゼ-II グルカナーゼ-I を得た際の DEAE-Sephadex クロマトグラム上での活性のピーク¹⁾をあつめ、a) におけると同様に濃縮して用いた。

c) β -1,3 オリゴグルカンホスホリラーゼ MAREC-HAL⁹⁾ の方法により *Euglena gracilis* IFO No. 22001 の菌体より抽出し DEAE-セルロースのクロマトグラフによる分画をあつめて用いた。

2. 糖の分析法その他

a) ペーパークロマトグラフィー もっぱら *n*-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3) の系を溶媒として洗浄した東洋濾紙 No. 50 を用いて下降法で展開した。糖の検出にはアセトン性硝酸銀-アルコール性カセイソーダ法⁷⁾を用いた。

b) 糖量の測定 フェノール-硫酸法⁸⁾によった。

c) 還元力の測定 Somogyi-Nelson 法⁹⁾を用いた。この際加熱時間は 20分~30分を採った。

d) グルカナーゼ-I による反応生成物よりの L-5 の単離 水にけん濁させた酵母グルカンまたはパキマン (約 10 mg/ml) をグルカナーゼ-I (約 20~40 μ g/ml) と 35°C でゆるやかに振とうしつつ一夜反応させ、加熱して反応を停止させたのち遠心して上清を集め、凍結乾燥した。これより a) に記したペーパークロマトグラフィーを2回くりかえして L-5 (同定した糖をペーパークロマトグラム上での移動度の異なるものから順に L-2~L-10 と名づけた) を精製し、ついで濾紙より水で抽出し、抽出液を濃縮乾固後残渣をアセトンにけん濁させて洗い、さらにエーテルで洗ってのち CaCl₂ デシケート中で乾燥した。収量は約 13% であった。

e) L-6~L-10 の単離 d) での、凍結乾燥物の1回目のペーパークロマトグラムより L-6 から L-10 に相当する各バンドを切りとり、水で抽出し L~5 と同様に処理して乾燥した。

f) パキマン酸加水分解物よりのラミナリビオース、ラミナリトリオース、ラミナリテトラオースおよびラミナリペンタオースの調製 斎藤らの方法¹⁰⁾に従って調製したパキマンの加水分解物を WHELAN¹¹⁾ らの方法に準じて分画し、各糖はペーパークロマトグラフィーにより精製した。

g) β -1,3 オリゴグルカンホスホリラーゼによるラミナリデキストリンの調製 MARECHAL⁹⁾ の方法により、ラミナリビオースをプライマーとし α -D-グルコース-1-リン酸をグルコース供与体として反応させ、反応混合物よりラミナリトリオース~ラミナリヘプタオースをペーパークロマトグラフィーにより分離し d) の方法に準

図 1. 酵母グルカンおよびパキマンのグルカナーゼ-I による分解物のペーパークロマトグラム

分解条件: 酵母グルカン—1%の水けんだく液を 500 μ g/ml の酵素で 37°C で 10 分間反応させた。上ずみ 0.2 ml を展開。

パキマン—1%の水けんだく液を 80 μ g/ml の酵素で 35°C で 17 時間反応させた。上ずみ 0.15 ml を展開。

G: グルコース, G₂~G₅: パキマンの酸加水分解により調製したラミナリビオース~ラミナリペンタオース。

じて洗浄乾燥した。

h) L-5 のメチル化 斎藤ら¹²⁾ に準じて、箱守法を用いて L-5 のメチル化を行なった。メチル化糖のガスクロマトグラフィーは斎藤ら¹²⁾の方法によった。

i) グルカナーゼ-IIによるラミナリデキストリンの分解 デキストリン水溶液(約 5~10 mg/ml)をグルカナーゼ-II (約 50~100 μ g/ml)と 35°C で一夜反応させ結果は a)の方法で検出した。

結果および考察

1. グルカナーゼ-I を酵母グルカンおよびパキマンに作用させたときの反応生成物のペーパークロマトグラム

図1にグルカナーゼ-I を酵母グルカンおよびパキマンに作用させたときの反応生成物の典型的なペーパークロマトグラムを示す。生じた低分子糖は両者の場合に共通で、これらを、グルコースは別として、前述のごとく L-2~L-10 と名づけると L-5 がきわめて顕著なスポットであることがわかる。なお酵母グルカンの場合については、ほぼ完全に可溶化されたとき、L-5 の糖量は出発物に含まれるフェノール-硫酸法に陽性な物質(風乾量の約 90%)の約 20%を占めた。

2. 糖の同定その他

a) L-2~L-4 について L-2~L-4 についてはペーパークロマトグラム上の移動度からおのおのラミナリビオース, ラミナリトリオース, ラミナリテトラオースであろうと推定した。

b) L-5 について L-5 は生成低分子糖のうちの主なものであるから、酵母グルカンのグルカナーゼ-I による分解物から調製した標品を主として用いて、ややくわしくその同定を行なった。

b-1) 元素分析値 得られた典型的な値は H : C = 6.12% : 40.86% であった。理論値は、L-5 が $C_{30}H_{52}O_{20} \cdot 4H_2O$ の組成式を持つとして、H : C = 6.67% : 40.00% である。

b-2) 分子量 溶媒に水を用い蒸気圧降下法で測定した値は 903 であった。

b-3) 構成糖および糖含量 1N 硫酸中で6時間100°C で加水分解すると、L-5 が $C_{30}H_{52}O_{20} \cdot 4H_2O$ の組成式を持つとして、94%の還元力が生成し、加水分解物を中和脱塩後、ペーパークロマトグラフィーを行なうとクロマトグラム上にはグルコースのスポットのみがみとめられた。またフェノール-硫酸法による糖含量は、L-5 が同じ組成式を持つとして、91% であった。

b-4) 旋光度 1.21% 水溶液中での測定から $[\alpha]_{25}^D = -8.4^\circ \pm 3.8^\circ$ と計算された。この値は Peat¹⁸⁾ らがラミナリペンタオースについて得た値 ($[\alpha]_{17-21}^D = -10.3^\circ$) とくらべられよう。

b-5) ペーパークロマトグラフィー 移動度はパキマンの酸加水分解物から調製したラミナリペンタオースおよび β -1,3 オリゴグルカンホスホリラーゼにより調製したラミナリペンタオースと完全に一致した。

b-6) メチル化 メチル化した L-5 の加メタノール分解物のガスクロマトグラムを図2に示す。ピークはそれ

図2. メチル化 L-5 の加メタノール分解物のガスクロマトグラム

条件は斎藤¹²⁾の記載にはほぼ等しい。I, II: メチル 2,3,4,6 テトラメチルグルコシド β および α アノマー; III, IV: メチル 2,4,6 トリメチルグルコシド β および α アノマー。

ぞれメチル 2,3,4,6-テトラメチルグルコシドおよびメチル 2,4,6-トリメチルグルコシドに相当することがカードランのメチル化物との同時比較により確認された。なお、ピーク下の面積の比を概算すると 1 : 3.5 となった。

b-7) グルカナーゼ-IIによる分解の結果 図3に示すように、L-5 はグルカナーゼ-IIによりグルコースとラミナリビオースとに分解されるが、その際逆反応物と考えられる Rg が L-5 より少し大きい未同定の物質も生成した。この分解パターンはグルカナーゼ-II をパキマン加水分解物から調製したラミナリペンタオースおよび β -1,3 オリゴグルカンホスホリラーゼにより調製したラミナリペンタオースに作用させた際みられるものと完全

図 3a. L-5 のグルカナーゼ-II による分解パターン

L-5 およびラミナリペンタオースの 0.5% 水溶液を 50~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のグルカナーゼ-II と 37°C で 20 時間反応させ、反応混合物の一部 (200 μg の糖に相当) を展開した。

G: グルコース。G₂~G₅: パキマンの酸加水分解物より単離したラミナリビオース~ペンタオース。G₅ (LDP): β -1,3 オリゴグルカンホスホリラーゼの反応を用いて調製したラミナリペンタオース。L-5 (Pach), L-5 (YG): それぞれパキマンまたは酵母グルカンのグルカナーゼ-I による分解物から単離した L-5。+E: グルカナーゼ-II による分解物。

に一致した。

以上 b-1)~b-7) の結果から L-5 はラミナリペンタオースと同定された。

c) L-6~L-10 について

c-1) ペーパークロマトグラフィー L-6~L-10 の R_g 値は β -1,3 オリゴグルカンホスホリラーゼによって生成したラミナリヘキサオース~ラミナリデカオースの R_g 値と一致した。

c-2) グルカナーゼ-II による分解の結果 図 3 に示すように L-6~L-10 はいずれもグルカナーゼ-II によってグルコースとラミナリビオースとに分解されたが、

その際 b) で言及した逆反応物も生じた。この分解パターンから L-6~L-10 はそれぞれラミナリヘキサオース~ラミナリデカオースであろうと推定した。L-6~L-8 の場合、パキマンから調製したものと酵母グルカンから調製したものについてグルカナーゼ-II による分解パターンは全く同一であるが L-9, L-10 については酵母グルカンから調製したものはグルカナーゼ-II による分解の際上記の糖のほかに 3- α - β -ゲンチオビオシルグルコースと思われる糖を少し生成し、この L-9, L-10 標品には β -1,6 結合を含む糖が混在することを示している。

d) L-2~L-10 が直鎖のラミナリデキストリンの系列

図 3b. 酵母グルカンのグルカナーゼ-I による分解物より単離した L-6~L-10 のグルカナーゼ-II による分解パターン。各糖の 0.5~1.0% 水溶液を 70 μ g/ml のグルカナーゼ-II と 37°C で 20 時間反応させ、反応混合物の一部 (150~300 μ g 相当) を展開した。
GBG: 3-O- β -グルコシルグルコースと思われる糖。

を構成すること 上記 L-2~L-10 の Rf 値をもとめ $\log \alpha' = \log R_f / (1 - R_f)$ を期待される重合度に対してプロットした結果を図 4 に示す。各点の一つの直線にのると考えられ、これらの糖が一つの同族系列に属することを示している。

e) ラミナリデキストリンの還元力 パキマンの酸加水分解によって調製したラミナリピオース~ラミナリペ

ンタオース、パキマンのグルカナーゼ-I による分解によって調製した L-5~L-9 および酵母グルカンのグルカナーゼ-I による分解によって調製した L-5 の還元基当たりの還元力 (実験法 2-c) 参照) を図 5 に示した。 β -1,3 デキストリンの系列においても Somogyi-Nelson 法で求めた還元基当たりの還元力は一定の値 (グルコースの約 60%) を持つようにみえる。この結果は、グル

図 4. 酵母グルカンおよびパキマンのグルカナーゼ-I による加水分解物中にみられる L-2~L-10 のペーパークロマトグラム上での位置と重合度との関係

図 5. 直鎖ラミナリデキストリンの還元基当たりの還元力

●: パキマンの酸加水分解にて調製したもの; ○: パキマンのグルカナーゼ-I による加水分解物から単離したもの; ○: 酵母グルカンのグルカナーゼ-I による加水分解物から単離したもの。

カナーゼ-I の作用形式を還元力の測定結果から解析する際有用であろう。

結 語

Arthrobacter 属細菌が生産するグルカナーゼ (グルカナーゼ-I) が酵母グルカンおよびパキマンに作用して特異な分解パターンを与える際に生ずるオリゴ糖を同定した結果重合度 2 から 10 までの直鎖のラミナリデキストリンが含まれることを確認した。

謝 辞

糖のメチル化に際しては大阪大学産業科学研究所の三崎旭氏にご助言をいただいた。また標準物質としての 3-*o*-β ゲンチオビオシルグルコースおよびラミナリビオースを東北大学の松田和雄氏よりいただいた。あわせて謝意を表する。

引 用 文 献

- 1) K. DOI, A. DOI, T. FUKUI: *J. Biochem.*, **70**, 711 (1971).
- 2) H. TANAKA, H. J. PHAFF: *J. Bacteriol.*, **89**, 1570 (1965).
- 3) C. G. C. CHESTERS, A. T. BULL: *Biochem. J.*, **86**, 28 (1963).
- 4) J. S. D. BACON, A. H. GORDON, D. JONES, I. F. TAYLOR, D. M. WEBLEY: *Biochem. J.*, **120**, 67 (1970).
- 5) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 6) L. R. MARECHAL: *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 431 (1967).
- 7) W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER, J. S. HARRISON: *Nature*, **166**, 444 (1950).
- 8) M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS, F. SMITH: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 9) N. NELSON: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- 10) H. SAITO, A. MISAKI, T. HARADA: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1261 (1968).
- 11) W. J. WHELAN: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. I, Whistler and Wolfrom Ed., 330 (1962).
- 12) H. SAITO, A. MISAKI, T. HARADA: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1683 (1970).
- 13) S. PEAT, W. J. WHELAN, H. G. LAWLEY: *J. Chem. Soc.*, **1958**, 724.