[農化 第 37 卷, 第 4 号, p. 226~230, 1963]

Rhodotorula の生産する細胞外多糖類の構成糖について

原田篤也, 福井俊郎, 二国二郎 (阪大産研)

坂野 勲, 長谷川武治 (財団法人醸酵研)

昭和 37 年 11 月 24 日 受 理

Lodder, Kreger-van Rij⁽¹⁾ によれば, *Cryptococcus* と呼ばれる酵母は澱粉様物質を生産するとともに夾膜をつくる特徴をもっている. これに対し *Rhodotorula* 属酵母では澱粉様物質も夾膜も認められないとされていた. しかしながら最近長谷川, 浅野, 見方⁽²⁾および長谷川, 坂野, 見方⁽³⁾は *Rhodotorula* に属する菌株のなかにならずしもヨード反応は陽性を示さないが, 夾膜を有するものを見出している. この夾膜物質が多糖類成分であることは予想され得ることで, すでに Evans, Theriault⁽⁴⁾ により *Cryptococcus neoformans* の夾膜物質がグルキユロン酸, マンノース, キシロース, ガラクトースからなる多糖類であることが報告されている.

長谷川, 坂野, 山内^(5,6)は *Rhodotorula* 属を区別して 2 亜属, *Rubrotorula* と *Flavotorula* をもうけ, それらの分類上の基準の 1 つとして澱粉様物質の生産性をあげ, 一般的には *Flavotorula* にこの性質が片寄っていることをのべた. *Rhodotorula* 属菌ではその培養液のヨード反応および夾膜の存在が明瞭でない場合が少なくないが, それでも培養液の粘度が高まり, これが多糖類と思われる物質によることは推定される. しかしながら, 上記の点からみて, *Rubrotorula* と *Flavotorula* とでは澱粉様物質の生産性による差異の他に, 生産する多糖類の種類に相違があるのではないかと想像されるので, 私たちは合成培地を用い, *Rhodotorula* の菌株のなかで培地を特に強く粘稠にする *Rubrotorula* 3 菌株と *Flavotorula* 3 菌株とをえらび, これに従来より細胞外多糖類の研究に用いられている *Cryptococcus neoformans* を加えて, それらの菌体外に生産する多糖類の構成糖についてしらべた. その結果, *Rubrotorula* と *Flavotorula* とでは澱粉様物質生産性の有無のほか, 多糖類を構成する糖の種類に差異があることを認めた.

実 験 方 法

培養と細胞外多糖類の分離 *Rubrotorula* の 3 菌株, *Rhodotorula rubra* IFO 712, *R. glutinis* IFO 880, *R. pilimanae* IFO 931, *Flavotorula* の 3 菌株, *Cryptococcus laurentii* IFO 384, *C. laurentii* IFO 372, *R. penaeus* IFO 930 と, 対照菌として *Cryptococcus neoformans* IFO 545 を使用した. *Flavotorula* の 3 菌株と *Cryptococcus neoformans* IFO 545 は夾膜をつくり, 澱粉様物質を生産する菌株である. 多糖類生産用培地としては 1 l 中, グルコース 50 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, イノシット 2 mg, ビタミン B_1 0.4 mg, B_2 0.2 mg, B_6 0.4 mg, ニコチン酸 0.4 mg, パラアミノ安息香酸 0.2 mg, パントテン酸カルシウム 0.4 mg, ビオチン 2 μg , こんせきの H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KI , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ をふくんだものを使用し, この 50 ml 培地を 200 ml の坂口コルベンにとり殺菌後, 2 日間培養の同培地 2 ml を移植した. 28° で 4 日間振盪培養したのち, 3500 回転 10 分で酵母菌体のみを遠心分離し, 澄明な粘稠な上澄液を得た. これを pH 6 に苛性ソーダにて調整したのち終末容量濃度 70% になるようエタノールを加え, 沈澱物を得た. この沈澱物を 80% エタノール溶液で洗滌したのち熱水に溶解, ふたたび前記と同様エタノールを加え沈澱物を分離した. この沈澱物を熱水に溶解し, これに飽和酢酸ソーダ溶液を沈澱が生じなくなるまで加え, この沈澱物を遠心分離して集めた. この操作をさらに 1 回行い白色沈澱を得た. これを少量の熱水に溶解したのち 70% エタノール溶液中で沈澱濾別し, 99% エタノール, ついでエーテルで洗滌脱水したのちデシケーター中で乾燥し白色粉末を得た. これを粗多糖類標品とした. 収量は用いた菌株により異なるが 400 ml 培地中 0.6 から 1.3 g 程度得られた.

ヨウ素呈色 粗多糖類試料 20 mg を 2 ml の水にとかしたのち 10 ml にうすめ, 5 分間沸騰水中で加熱後,

* The Composition of Extracellular Polysaccharides of *Rhodotorula*.

By Tokuya HARADA, Toshio FUKUI, Ziro NIKUNI, Isao BANNO⁺ and Takezi HASEGAWA⁺ (The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University; ⁺ Institute for Fermentation, Osaka)

不溶物を遠沈してのぞき, この 0.5 ml を定容フラスコにとりヨウ素 (0.2%), ヨウ素カリウム (2%) 溶液 1 ml を加え, 全量 10 ml とする. ヨウ素・ヨウ素カリウム溶液を対照として 1.0 cm cell, 日立 grating photometer GPO-2 型を用い 500~750 m μ の間の波長の吸収曲線をとった.

構成糖のペーパークロマトグラフィー 粗多糖類標品のそれぞれ 80 mg を試験管にとり, これに 1.8 N の H₂SO₄ 2 ml を加え, これを溶封した後 1 時間沸騰水につけた. この加水分解液中の不溶物を濾紙で濾過した後, 固体 BaCO₃ を加え中和した. 生じた BaSO₄ を遠心分離で除いた後, 上澄液をペーパークロマトグラフィーに用いた. 通常この 50 μ l をマイクロピペットで東洋濾紙 52 番の濾紙にとり, n-ブタノール・酢酸・水 (4:1:5), あるいは n-ブタノール・ピリジン・水 (6:4:3) の展開剤を用い, 発色剤としてはアニリン・水素・フタル酸塩, アルカリ性硝酸銀, あるいはレゾルシン塩酸溶液を用いてしらべた.

構成糖の種類の決定のために比較に用いた糖の標準品はグルコース, ガラクトース, マンノース, ラムノース, キシロース, アラビノース, リボース, グルキユロン酸, ガラクチュロン酸の特級製品, あるいは市販の最も純化された製品である. これらの糖溶液とすでに多糖類の構成糖について研究されている⁽⁴⁾ *Cryptococcus neoformans* の粗多糖類の加水分解物とを同じペーパー上にスポットし, ペーパークロマトグラフィーを行って加水分解物中の糖の種類を判別した. この *Cryptococcus neoformans* の多糖類の加水分解物を対照にこれと *Rubrotorula* 3 菌株と *Flavotorula* 3 菌株の多糖類の加水分解物とを同じペーパー上にスポットし展開して, それぞれの構成糖の成分をしらべた. ペーパー上のアルドヘキソースとケトヘキソースとアルドペントースとのそれぞれの識別はアニリン・水素・フタル酸による発色の色調の相異^(7,8)などで判定した.

グルコースのスポットと他の類似の R_F 値をもつ糖のスポットとを区別するため, C¹⁴ で均一にラベルした D-グルコースを加水分解物の中和上澄液に加えて (0.01 μ c/ml) ペーパークロマトグラフィーを行い, ラジオオートグラムを X 線フィルムに 48 時間さらして得た.

またグルコースに近い R_F 値を示す他の糖類の存在を確認するため, 加水分解中のグルコースをのぞくのにグルコースオキシダーゼ処理を行った. グルコースオキシダーゼとして長瀬産業製品 deoxin を用い, この 1 mg をふくんだ 10 μ l 0.1 M くえん酸緩衝液 (pH 6.0) を 0.2 ml の加水分解溶液に加えて 30° で 1 時間振盪し作用させた.

実験結果

粗多糖類試料のヨウ素呈色 6 菌株より得られた多糖類試料の熱水溶液はいずれも粘性を示すが, ヨウ素反応プラスの菌株より分離した多糖類はマイナスのものよりはるかに粘度の高い溶液を示した. これらの多糖類試料のヨウ素による呈色の吸収曲線を第 1 図に示す. このように *Flavotorula* の 3 菌株および *Cryptococcus neoformans*, すなわちヨウ素反応プラスのものより分離した多糖類のみが青色に染り, その吸収頂点は 650 m μ 付近にあり, 高等植物より分別したアミロースと同様な吸収曲線を示す. この点についてはすでに Hehre ら⁽⁹⁾が *C. neoformans* の培地よりアミロースよう多糖類を分離しているので *Flavotorula* も同様な多糖類をつくっているものと考えられる. しかし彼等の実験においてもアミロースは全多糖類中数%しか得られておらず, ほかにグリコーゲンよう多糖類とペントースをふくんだ多糖類が存在していると彼等はのべている. *Flavotorula* 中のアミロースよう物質もおそらく全多糖類中の 1 部を示すもので, 後にのべる粗多糖類加水分解物中のグルコースの量はアミロース様多糖類の構成糖としてのグルコースの量以外に他の

第 1 図 *Flavotorula* 3 菌株と *Cryptococcus neoformans* との多糖類のヨウ素呈色

多糖類の構成糖としてのグルコースの量をもふくんでいるものと考えられる。一方培地がヨウ素で染らない酵母がつくった多糖類は、濃いヨウ素・ヨウ素カリウム溶液を用いると多少赤く染まるが、これはアミロース様物質とは明らかに異なる。

粗多糖類の構成糖 まず *Cryptococcus neoformans* の粗多糖類の加水分解物を種々な糖標品とともにペーパー上にとり展開剤としてブタノール・酢酸・水を、発色剤としてアニリン・水素・フタル酸を用いてしらべたが、少なくとも3つの主要なスポットがみられた。最も移動度の大きいスポットはキシロースの移動度と一致し、またその発色はアルドペントースの示す赤色の色調をなし、したがってこのものはキシロースとみなされた。なおラムノースはこれよりやや大きい移動度を示しこのものとは明らかに異なる。中程度の移動度を示すスポットとほぼ一致する移動度を示す糖はマンノースとソルボースとであったが、これに非常に近い移動度を示す糖にはアラビノースとフラクトースとがみられた。しかし中程度の移動度を示すスポットの色調は褐色を示し、またその色調は安定なことからしてアルドヘキソースと考えられた。なおこのスポットはレゾルシンを発色剤としては全く発色しない。これらのことよりしてこのスポットの糖はマンノースとみなされた。移動度の最も小さいスポットとほぼ一致する移動度を示す糖はグルコースであり、また発色の色調もアルドヘキソースの色調を示したのでグルコースとみなされた。しかしこのスポットにつづいてやや移動度の小さい部分にもう1つのスポットがあるらしい。その付近の移動度を示す糖にはガラクトースがある。このガラクトースの存在については、他の菌株の多糖類の加水分解物と共にさらに後にのべる如く検討を加えた。

このように *Cryptococcus neoformans* の粗多糖類の構成糖について充分にしらべたのち、この菌の構成糖と比較して他の6菌株の粗多糖類の標品の構成糖をペーパークロマトグラフィーによりしらべた。

展開剤としてブタノール・酢酸・水、発色剤としてアルカリ性硝酸銀の場合、*C. neoformans* および *Flavotorula* 3菌株のヨウ素反応プラスのものにはキシロース、マンノース、グルコースに相当するものがみられ、ヨウ素反応マイナスの *Rubrotorula* 3菌株にはキシロースがみられず、マンノース、グルコースに相当するものがみられた(第2図)。

なお *R. peneaus* 930 をのぞいてグルコースのスポット以外にガラクトースのスポットがあるらしい(*C. laurentii* 372 ではやや不明瞭であるが)。レゾルシンを発色剤とした時には全くスポットがみられないのでケトースは存在しないらしい。なお硝酸銀で発色させた際にウロノラクトンとウロン酸と思われるスポットも見出されたが、先にのべた主な糖に比しはるかに量が少ないと思われたので同定はしなかった。同じ加水分解物を *n*-ブ

第2図 *Rhodotorula* 菌株の多糖類の加水分解物のペーパークロマトグラフィー

タノール・ピリジン・水を展開剤としてアルカリ性硝酸銀で発色させると、キシロースとマンノースとの分離がやや不明瞭であるが、グルコースのスポットに連って移動度の小さい部分(ガラクトース?)がやや明瞭に発色してきた(第3図)。同様なクロマトグラフィーをあらかじめ C^{14} でラベルしたグルコースとまぜた試料について行ない、ラジオオートグラムをつくると放射性の区域はグルコースの部分に限られ、それに連なる部分はガラクトースの移動度に一致することがわかった。そこでこの点をさらに確かめるために加水分解した試料の一部をグルコースオキシダーゼで処理してから *n*-ブタノール・ピリジン・水の展開剤を用いてクロマトグラフィーを行った。その結果ガラクトースのスポットが明らかにみられるようになった(第4図)。 *R. peneaus* の菌株のみにこのスポットがみられないので、この酵母の多糖類のみがガラクトースを含まれているのか、あるいはその量が他の菌株の多糖類とくらべてはるかに少ないものと考えられる。

以上の結果をまとめてみると、各酵母の菌体外に生

n-butanol-pyridine-water

第3図 Rhodotorula 菌株の多糖類の加水分解物のペーパークロマトグラフィー

n-butanol-pyridine-water

第4図 Rhodotorula 菌株の多糖類の加水分解物 (グルコースオキシダーゼ処理) のペーパークロマトグラフィー

第1表 Rhodotorula 菌株の菌体外多糖類の構成糖

	キシロース	マンノース	グルコース	ガラクトース
<i>C. neoformans</i> 545 (+)*	++**	++	+++	+
<i>C. laurentii</i> 384 (+)	+++	++	+++	+
<i>C. laurentii</i> 372 (+)	+++	++	++	+
<i>R. penaeus</i> 930 (+)	+++	++	++	—
<i>R. rubra</i> 712 (—)	—	+++	++	++
<i>R. glutinis</i> 880 (—)	—	+++	++	+
<i>R. pilimanae</i> 931 (—)	—	++	++	+

* (+) はヨウ素・ヨウ素カリウム溶液で青色呈色を示すもの。

(—) は青色呈色を示さないもの。

** ペーパー上の呈色スポットを肉眼にて観察し呈色の強度を +++ 強い, ++ 中程度, + 弱い, — 呈色しない, で示した。

産する多糖類の主な構成糖は第1表の如くなる。キシロースは *C. neoformans* と *Flavotorula* の3菌株のみにみられ、みかけの量はかなり多い。この点、*Rubrotorula* とは明らかに異なる。マンノースとガラクトースはいずれの菌株にもみられ、ガラクトースは他の糖の量よりいずれもその量が少ないようであり、*R. penaeus* にはこれがみとめられなかった。

考 察

Cryptococcus laurentii の菌体外多糖類については別に Abercrombie ら⁽¹⁰⁾がヨウ素で青色を示さないグルコースのみからなる多糖類と、マンノース、キシロース、グルキロン酸からなる多糖類を分離、報告した。一方 *Cryptococcus neoformans* の多糖類については多くの研究がなされており、アミロース様多糖類のほかグリコーゲン様の多糖類、さらにグルキロン酸、マンノース、キシロースからなる多糖類、またガラクトースを成分とする多糖類も少量ふくまれているようである⁽⁴⁾。

これらの結果からみて、*Flavotorula* の生産する菌体外多糖類もおそらく2種以上の多糖類からなるものと考えられる。この試験に用いた *Flavotorula* 亜属の3菌株ではアミロース様の多糖類がみとめられたが、前記の Abercrombie らが研究した菌株ではヨウ素で青色を示さない 1→3, 1→4, 1→2 とあるいは 1→6 の結合をもつグルカンを生産することから、*Flavotorula* 菌株は一般的にはアミロースよう物質を生産し、菌株によってはグルコースのみからなるヨウ素青色呈色を示さないグルカンを生産するものと考えられる。一方 *Rubrotorula* 亜属菌株の生産する菌体外多糖類についての研究はほかにはないので、いままでの研究ではこれが1つの多糖類か2つのあるいは3つの多糖類からなるものかはっきりしない。*Flavotorula* 菌株はキシロースをふくんだ多糖類を生産することは明らかであるが、構成糖としてガラクトースがかならず存在するものであるかどうかという点ではさらに検討する必要がある。*Flavotorula* 菌株の多糖類が構成成分としてキシロースをふくむのに対して、実験

に使用した *Rubrotorula* 菌株のどれからも私共はキシロースを認めることができなかった。この事実はこの 2 亜属の相違点として系統学的観点からも重要な意味を持つものと考えられる。一般にヨードで青色を呈する性質とキシロースをふくんだ多糖類を生産する性質とは相伴ってくるようである。

要 約

(1) *Flavotorula* 3 菌株と *Rubrotorula* 3 菌株の生産する菌体外多糖類について、アミロース様多糖類の存在の有無と多糖類の構成糖の種類についてしらべた。

(2) *Flavotorula* 3 菌株はヨード呈色で 650 m μ 付近に最大頂点を有するアミロース様多糖類を生産した。

(3) 多糖類の構成糖をペーパークロマトグラフィーによりしらべ、*Flavotorula* 3 菌株は主にキシロース、マンノース、グルコース、ガラクトース (*R. peneaus* のみにガラクトースがみられない) からなること、*Rubrotorula* 3 菌株はマンノース、グルコース、ガラクトースからなることがわかった。後者の 3 菌株にはキシロースは全くみとめられなかった。

(1) J. Lodder, N. J. W. Kreger-van Rij: "The Yeast", A Taxonomic Study (1952).	(6) T. Hasegawa, I. Banno, S. Yamauchi: <i>ibid.</i> , 6 , 196 (1960).
(2) 長谷川武治, 浅野 勇, 見方洪三郎: 真菌と真菌症, 1 , 156 (1961).	(7) E. Malyoth: <i>Naturwiss.</i> , 38 , 478 (1951).
(3) 長谷川武治, 坂野 勲, 見方洪三郎: 醸酵工学, 39 , 157 (1961).	(8) F. H. Isherwood: <i>Brit. Med. Bull.</i> , 10 , 202 (1954).
(4) E. E. Evans, R. J. Theriault: <i>J. Bact.</i> , 65 , 571 (1953).	(9) E. J. Ehre, A. S. Carlson, D. M. Hamilton: <i>J. Biol. Chem.</i> , 177 , 289 (1949).
(5) T. Hasegawa, I. Banno, S. Yamauchi: <i>J. Gen. Appl. Microb.</i> , 5 , 200 (1960).	(10) M. J. Abercrombie, J. K. N. Jones, M. V. Lock, M. B. Perry, R. J. Stoodley: <i>Can. J. Chem.</i> , 38 , 1617 (1960).