一有孢子細菌の生産する高粘性多糖類 (第 4 報)

多糖類の部分構造について

二 宮 英 治

(明治製糖株式会社研究所)

昭和 44 年 5 月 1 日 受 理

High Viscous Polysaccharide produced by a Spore-forming Bacterium Part VI. Some Aspects of the Structure

By Eizi NINOMIYA

Research Institute, Meiji Sugar Mfg. Co., Ltd.

Periodate oxidation of the acidic polysaccharide (D-glucose : D-mannose : D-galactose : D-glucuronic acid=3 : 3 : 1 : 2) which was formed from glucose by *Bacillus polymyxa* No. 271 showed that 0.46 mole of periodate was reduced and 0.12 mole of formic acid was produced per sugar residue. It was recognized that D-mannose was linked as a terminal side-chain residue and that the polymer was constituted predominantly with (1→3) glycosidic linkages from the analytical results of oxidation products. Since the oligosaccharides isolated from the partial acid hydrolysates of the polysaccharide were identified as 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-mannose, O- α (?) -D-glucopyranosyl-(1→3)-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-(1→3)-D-mannose and gentiobiose, it was considered that these sugars form the skelton of the polysaccharide.

(Received May 1, 1969)

緒 言

Bacillus polymyxa No. 271 がグルコースから生産する酸性多糖類は、比旋光度および赤外吸収スペクトルの測定から、 α グリコシド結合が優先するが β グリコシド結合も存在することを予測した⁽¹⁾。著者は本報において、多糖類の過沃素酸酸化、スミス分解、部分加水分解などを行なった結果、本多糖類の非還元末端は D-マンノースで構成されており、(1→3)グリコシド結合をかなり多く有することを認めた。さらに部分加水分解物から多糖類の構造の一部を構成する酸性二糖類、酸性三糖類、および 2, 3 の中性二糖類を分離、同定して構造の一部を明らかにした。

実 験 方 法

1. 多糖類 前報⁽¹⁾に述べた K 型多糖類を用いて実験を行なった。この多糖類は D-グルコース : D-マンノース : D-ガラクトース : D-グルクロン酸 (3 : 3 : 1 : 2) のモル比で構成されている。

2. ペーパークロマトグラフィー 東洋濾紙 No. 51 を使用し上昇法で展開した。発色剤にはアルカリ性硝

酸銀溶液, triphenyltetrazolium chloride (T. T. C.) 試薬⁽²⁾, 過沃素酸-ベンジジン溶液⁽³⁾, パラ・アエジジン溶液⁽⁴⁾などを必要に応じて使用した。展開剤の組成は次のとおりである。

Solvent A : *n*-プロピルアルコール : 酢酸エチル : 水 (6 : 1 : 3)

Solvent B : *n*-ブタノール : ピリジン : 水 (6 : 4 : 3)

Solvent C : 酢酸エチル : ピリジン : 水 (8 : 2 : 1)

Solvent D : *n*-ブタノール : 酢酸 : 水 (2 : 1 : 1)

Solvent E : *n*-ブタノール : エタノール : 水 (4 : 1 : 5)

実験結果および考察

1. 部分加水分解物中のオリゴ糖

多糖類 5 g を 5% H_2SO_4 1 l に溶解し沸騰浴中で 2 時間加水分解した。BaCO₃ で中和したのち、濾液にエタノールを 5 倍量加えて酸性糖を Ba 塩として沈殿させ、さらに Amberlite IR-120 (H 型) で脱塩して酸性糖区分とした (収量 225 mg)。

a) 酸性オリゴ糖 酸性糖区分の Solvent D によるペーパークロマトグラムからグルクロン酸、グルクロ

ンのほかに R_{Rh} (=rhamnose) 0.41 および R_{Rh} 0.21 を示す 2 種類の酸性オリゴ糖の存在が認められた。これら酸性オリゴ糖を分離するために、Dowex-1 (酢酸型) カラム⁽⁵⁾を用いてオリゴ糖 A (R_{Rh} 0.41) およびオリゴ糖 B (R_{Rh} 0.21) をそれぞれ 156 mg, 51 mg 回収した。

オリゴ糖 A : 比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 66.7$ ($c=1.1$, 水) であり, 結晶化はできなかった。ペーパークロマトグラム上のスポットは T. T. C. 試薬で発色するから (1→2) グリコシド結合ではない。Solvent B, C および E を用いるペーパークロマトグラフィーにより, 加水分解物からはグルクロン酸, グルクロン, マンノースが, また $NaBH_4$ を用いて還元し加水分解したものからは, グルクロン酸, グルクロン, マンニットが検出された。次にオリゴ糖 A (145 mg) を少量の水に溶かし, Haworth の方法により 2 回メチル化したのちメチル化物をクロロホルムで抽出, さらに Purdie 法によりメチル化した。エーテルで抽出して濃縮したが結晶化できず, シラップ 108 mg を得た。このものは $[\alpha]_D^{25} + 73.5$ ($c=1.0$, クロロホルム) であった。メチル化物 (104 mg) を少量のエーテルに溶かし $LiAlH_4$ (800 mg/30 ml エーテル) を徐々に加え 5 時間反応させたのち水を加えて $LiAlH_4$ を分解した。エーテルを除去後, HCl 酸性にしてクロロホルムで抽出した (62 mg)。クロロホルムを除去してシラップとし, 2 N H_2SO_4 1 ml とともに封管中 100°C で 10 時間加水分解した。BaCO₃ で中和, Amberlite IR-120(H 型) および Duolite A₄ (OH 型) に接触させて脱塩した。そして東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) を用いて Solvent E で分離, R_g (=2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-D-glucose) 1.0 および R_g 0.85 を示した区分を切り取って抽出した。 R_g 1.0 のメチル化糖はエーテル, 石油エーテル混液から結晶状に得られ (11 mg), mp 82~83°C で 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-D-glucose と混融しても融点降下は認められなかった。 R_g 0.85 を示したメチル化糖はパラアニジン溶液により赤色スポットを与えた。結晶化できなかったのち anilide としてエーテルから再結し, 針状結晶 5 mg を得た。mp 133°C, $[\alpha]_D^{25} - 142 \rightarrow +12.6$ ($c=0.2$, メタノール) を示したので 2, 4, 6-tri-O-methyl-D-mannose と同定した。2, 4, 6-tri-O-methyl-D-mannose の anilide は Haworth ら⁽⁶⁾ が mp 134°C, $[\alpha]_D - 150 \rightarrow +8$ を報告している。一方, 2, 3, 6-tri-O-methyl-D-mannose の anilide について Hirst ら⁽⁷⁾ は mp 133°C を, また Smith⁽⁸⁾ は mp 131°C, $[\alpha]_D - 155 \rightarrow -39$ を報告

しており, mp は近似しているが比旋光度に明白な差異があるので 2, 4, 6-tri-O-methyl-D-mannose の anilide と判別することができる。したがって, オリゴ糖 A は 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-mannose と認められる。この酸性オリゴ糖は近年, *Pseudomonas aeruginosa*⁽⁹⁾ および *Aerobacter* sp.⁽¹⁰⁾ の多糖類から見出されたもので, それぞれ $[\alpha]_D + 71$, $[\alpha]_D + 82$ が報告されている。

オリゴ糖 B : ペーパークロマトグラフィーにより加水分解物からはマンノース, グルコース, グルクロン酸, グルクロンが, また $NaBH_4$ を用いる還元, 加水分解物からはマンニット, グルコース, グルクロン酸, グルクロンが検出された。一方, オリゴ糖 B の部分加水分解物の Solvent D によるペーパークロマトグラムに R_{Rh} 0.41 を示すスポットが検出されたので, オリゴ糖 B はオリゴ糖 A の非還元部位にグルコースの C₁ 位が結合した酸性オリゴ三糖類である。オリゴ糖 B 15 mg を 0.024 モル H_5IO_6 溶液 30 ml に溶かし, 15°C で 10 日間過酸素酸酸化したのちスミス分解した。Solvent B, C, E を用いるペーパークロマトグラフィーにより, オリゴ糖 B のスミス分解物中にはヘキソースとしてグルクロン酸およびグルクロンのみが著明に検出され, マンノース, グルコース, エリスリン酸, グリセリン酸などは検出されなかった。これらの結果から, オリゴ糖 B はオリゴ糖 A のグルクロン酸残基にグルコースが (1→3) 結合した酸性オリゴ三糖類であることがわかる。オリゴ糖 B の比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 69.0$ ($c=0.8$, 水) であり, オリゴ糖 A よりも若干高い値なので, グルコースとオリゴ糖 A 間のグリコシド結合は α 型である可能性が強いが, その差が小さいために α 型とするには幾分の疑念が残っている。

b) 中性オリゴ糖 中性糖区分を粒状炭カラム (ツルミコール GVA-100, 4×70 cm) に吸着させ, 脱塩水 33 l を用いて 5 ml/min の速度で溶出し単糖類を除去した。ついで 10% エタノールを 10 ml/min の速度で 13 l 通液して溶出されるオリゴ糖を回収した (183 mg)。Solvent A を用いるペーパークロマトグラフィーにより R_{G1} (=glucose) 0.80 (オリゴ糖 C), 0.69 (オリゴ糖 D), 0.63 (オリゴ糖 E) の 3 種類の還元性オリゴ糖の混在を認めたので濾紙から水で抽出してそれぞれ 28 mg, 34 mg, 17 mg を単離した。なお, これら 3 種類のオリゴ糖はいずれも T. T. C. 試薬で発色するから (1→2) グリコシド結合ではない。さらに粒状炭カラムから 20% エ

タノールで溶出した区分には R_{01} 0.56, 0.38, 0.31 に相当するオリゴ糖が存在し R_{01} 値から 3~4 糖類を推定された。

オリゴ糖 C: 比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 108$ ($c=1.0$, 水) で加水分解物には Solvent B, C, E を用いるペーパークロマトグラフィーによりグルコース, ガラクトースの存在が認められ, NaBH_4 を用いる還元, 加水分解物からはガラクトース, ソルビットが検出された。D-galactopyranosyl-D-glucose の比旋光度には α (1 $\rightarrow$ 6); $[\alpha]_D + 129.5^{(11)}$, β (1 $\rightarrow$ 6); $[\alpha]_D + 9.6^{(12)}$, $[\alpha]_D + 37.5^{(13)}$, β (1 $\rightarrow$ 4); $[\alpha]_D + 58.1^{(14)}$, β (1 $\rightarrow$ 3); $[\alpha]_D + 28^{(15)}$, α (1 $\rightarrow$ 2); $[\alpha]_D + 145^{(16)}$ が報告されており, オリゴ糖 C は比旋光度が高いので α グリコシド結合と考えられる。なお, α -D-galactopyranosyl の存在は多糖類の赤外吸収スペクトルからすでに推定されていた⁽¹⁾。

オリゴ糖 D: 比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 3.2$ ($c=0.8$, 水) であり, 上記手法により β -D-mannopyranosyl-D-glucose と思われるが構造確認には至らない。この種のオリゴ糖は α (1 $\rightarrow$ 6); $[\alpha]_D + 75^{(17)}$, β (1 $\rightarrow$ 6); $[\alpha]_D - 5^{(18)}$, β (1 $\rightarrow$ 4); $[\alpha]_D + 5.5^{(19)}$, $[\alpha]_D + 12^{(20)}$, $[\alpha]_D + 29^{(21)}$ が報告されている。

オリゴ糖 E: 加水分解物のペーパークロマトグラムから原物質とグルコースが検出され, グルコニ糖類であることが推定された。そして Solvent A, B および C を用いるペーパークロマトグラフィーにより, オリゴ糖 E の R_{01} はゲンチオビオースに一致し, 比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 10$ ($c=0.8$, 水) であることから, オリゴ糖 E は 6-O-(β -D-glucopyranosyl)-D-glucose と考えられる。部分酸加水分解物中にゲンチオビオースが認められたことから, 多糖類の糖構成比 (D-グルコース: D-マンノース: D-ガラクトース: D-グルクロン酸 = 3:3:1:2) におけるグルコース 3 モルのうち 2 モルが, 2 モルのグルクロン酸残基に 1 モルずつ (1 $\rightarrow$ 3) 結合してオリゴ糖 B の一部を構成し, その一方のグルコース残基に対して残る 1 モルのグルコースが β (1 $\rightarrow$ 6) 結合していると推定される。

2. 過沃素酸化とスミス分解

Smith ら⁽²²⁾の方法により, 多糖類 600 mg と 0.60 モル H_5IO_6 20 ml を用い希釈して 500 ml (H_5IO_6 濃度: 0.024 モル) となし, 18°C で酸化させた。反応の進行を経時的に調べたところ, 約 100 時間で反応は平衡に達し, ヘキソース残基当り H_5IO_6 0.46 モルを消費し, ギ酸 0.12 モルを生成していることがわかった (第1図)。酸

第1図 過沃素酸酸化の経時変化

酸化条件: 0.024 M H_5IO_6 , 18°C

●—● 過沃素酸消費量
○—○ ギ酸生成量

化終了液 200 ml を $\text{Ba}(\text{OH})_2$ で中和後, 濾過した。濾液に NaBH_4 100 mg を添加, 室温で 2 時間攪拌したのち, さらに NaBH_4 40 mg を追加して 16 時間放置した。その後 5% H_2SO_4 を pH 5.7 になるまで加えて NaBH_4 を分解し, H_2SO_4 濃度を 10% として封管中 100°C で 6 時間加水分解した。ついで BaCO_3 で中和, Amberlite IR-120 (H 型) で脱カチオン後濃縮してシラップ状となし, 1% 塩酸メタノールで脱ボレートしてスミス分解物試料 (アメ状物質 68 mg) とした。ペーパークロマトグラフィーにより, スミス分解物中にはグルコース, マンノース, ガラクトース, グルクロン酸, エリスリット, グリセリンが混在していることがわかった。そこでその 60 mg を 10 ml の水に溶かし, Amberlite A-4 (OH 型) カラムに通してグルクロン酸を吸着させ流出液と洗液を合わせて濃縮したのち, Dowex-1 (珪酸型) カラム⁽²³⁾を用いて各ヘキソースを分離し, フェノール硫酸法⁽²⁴⁾で比色定量した。一方, Duolite A-4 に吸着されたグルクロン酸を 0.2 N NaOH で溶出し, Amberlite IR-120 (H 型) で中和後, Dische 法⁽²⁵⁾により定量した。その結果, D-グルコース: D-マンノース: D-ガラクトース: D-グルクロン酸のモル比はそれぞれ 0.9:2.0:1.0:1.9 であった。また Solvent E を用いるペーパークロマトグラム (東洋濾紙 No. 50, 40×40 cm) からエリスリットおよびグリセリンに相当する部分を切り取り, 水で溶出して比色定量し⁽²⁶⁾, グリセリン: エリスリット = 1.00:1.86 のモル比が得られた。同様に多糖類 600 mg を

0.0048 モル H_5IO_6 溶液 500 ml 中において $5^\circ C$ で酸化させたところ, 約 400 時間後にギ酸の生成終了が認められたが過沃素酸消費はまだ徐々に進行していた. 600 時間後の部分酸化液 (ヘキソース残基当り: H_5IO_6 0.35 モル消費, $HCOOH$ 0.12 モル生成) をスミス分解し, 各ヘキソースのモル比を前記同様に分離定量して D-グルコース: D-マンノース: D-ガラクトース: D-グルクロン酸 = 2.4 : 1.9 : 1.0 : 1.9 を得た. 多糖類の過沃素酸酸化における立体障害は β グリコシドの C_2 , C_3 に配位する OH 基がトランス型のものが強いといわれているが⁽²⁷⁾, 本多糖類を構成するグルクロン酸は α 型であることがオリゴ糖 A の比旋光度から確認されているので, 少なくともグルクロン酸の立体障害により過沃素酸消費量が低いとは考えられない. スミス分解物の定量結果から低温下, 緩和な酸化条件においてさえ, 多糖類の糖構成比におけるマンノース 1 モルが容易に酸化されてギ酸生成量が平衡になることは, マンノースが多糖類の非還元末端基を形成していると解釈される. 完全酸化条件では多糖類の糖構成比におけるグルコース 3 モルのうちの 2 モルが酸化されたが, グルクロン酸とガラクトースは全く酸化されず, スミス分解物から未酸化のまま定量された. スミス分解物のペーパークロマトグラムからグリセリン酸あるいはエリスリン酸が検出されないのので, グルクロン酸残基は多糖類の主鎖内にあって過沃素酸酸化を受けない型をとっていることになるが, オリゴ糖 B の過沃素酸酸化結果からグルクロン酸の C_3 位にグルコースが結合していることがわかった.

要 約

Bacillus polymyxa No. 271 がグルコースから生産する多糖類 (D-グルコース: D-マンノース: D-ガラクトース: D-グルクロン酸 = 3 : 3 : 1 : 2) の過沃素酸酸化を行なった結果, ヘキソース残基当り 0.46 モルの過沃素酸を消費し, 0.12 モルのギ酸を生成することがわかった. スミス分解物の定量結果から, この多糖類は D-マンノースを非還元末端基とし, 結合部位に (1 $\rightarrow$ 3) グリコシド結合をかなり多く有することが認められた. 一方, 部分加水分解物から 3-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-D-mannose, O- α (?)-D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-(α -D-glucopyranosyluronic acid)-(1 $\rightarrow$ 3)-D-mannose およびゲンチオビオースを単離, 同定したので, これらのオリゴ糖類が多糖類の骨格を構成していると考えられる.

終りに, 本研究に協力いただいた当研究所木崎忠重氏, および 2, 3, 4, 6-O-tetramethyl-D-glucose を分与いただいた同所山口昌美博士に深謝します.

- (1) 二宮英治, 木崎忠重, 花田香一: 農化, **42**, 431 (1968).
- (2) K. Wallenfels: *Naturwiss.*, **37**, 491 (1950).
- (3) D. Waldi and F. Munter: *Naturwiss.*, **49**, 393 (1962).
- (4) L. Hough, J. K. N. Jones and W. H. Wadman: *J. Chem. Soc.*, **1950** 1702.
- (5) J. X. Khym and D. C. Doherty: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3199 (1952).
- (6) W. N. Haworth, R. L. Heath and S. Peat: *J. Chem. Soc.*, 833 (1941).
- (7) E. L. Hirst and J. K. N. Jones: *J. Chem. Soc.*, **1948** 1278.
- (8) F. Smith: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3249 (1948).
- (9) H. O. Bouveng, I. Bremner and B. Lindberg: *Acta Chem. Scand.*, **19**, 1003 (1965).
- (10) 三崎 旭: 生化学, **39**, 542 (1967).
- (11) F. J. Bates: "Polarimetry, Saccharimetry and the Sugars," National Bureau of Standards, Washington, 1942, p. 474.
- (12) R. Kuhn and H. H. Baer: *Chem. Ber.*, **87**, 1560 (1954).
- (13) M. Masamune and S. Kamiyama: *Tôhoku J. Exp. Med.*, **60**, 43 (1957).
- (14) E. J. C. Curtis and J. K. N. Jones: *Can. J. Chem.*, **37**, 358 (1959).
- (15) J. H. Pazur, C. L. Tipyon, T. Budovich and J. M. Marsh: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 119 (1958).
- (16) A. Wickström: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1473 (1957).
- (17) P. A. J. Gorin and A. S. Perlin: *Can. J. Chem.*, **37**, 1930 (1959).
- (18) P. A. J. Gorin and A. S. Perlin: *Can. J. Chem.*, **39**, 2474 (1961).
- (19) G. O. Aspinall, R. B. Rashbrook and J. Kesler: *J. Chem. Soc.*, **215** (1958).
- (20) O. Perila and C. J. Bishop: *Can. J. Chem.*, **39**, 815 (1961).
- (21) M. O. Gyaw and T. E. Timell: *Can. J. Chem.*, **38**, 1957 (1960).
- (22) F. Smith and R. Montgomery: "Methods of Biochemical Analysis," Vol. 3, Interscience Publishers, 1954, p. 153.
- (23) J. X. Khym: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2099 (1952).
- (24) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- (25) Z. Dische: "Methods of Biochemical Analysis," Vol. 2, Interscience Publishers, 1955, p. 342.
- (26) M. Lambert and A. C. Neish: *Can. J. Research*, **28 B**, 83 (1950).
- (27) E. F. Garner, I. J. Goldstein, R. Montgomery and F. Smith: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1206 (1958).