Bacillus polymyxa No. 271 の生産する高粘性多糖類* (第 5 報)

休止菌体による多糖類の生成

二宮 英治, 木崎 忠重

(明治製糖株式会社研究所)

昭和 44 年 12 月 12 日 受理

Highly Viscous Polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa* No. 271 Part V. Formation of Polysaccharide by Resting Cells

By Eizi NINOMIYA and Tadashige KIZAKI

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

Formation of the acidic heteropolysaccharide was studied by using the resting cells of *Bacillus polymyxa* No. 271. Manganese ions were required for the synthesis of the polysaccharide, and the cells recovered from a manganese-deficient culture fluid were not able to produce the polysaccharide even at the presence of manganese ions in the incubation mixture. Additives such as sodium cyanide, monoiodoacetic acid, sodium azide and 2,4-dinitrophenol inhibited strongly the synthesis of polysaccharide in concentrations from 10^{-2} to 10^{-3} mole, and sodium fluoride affected somewhat more weakly than the above. Oligosaccharides which were detected along with the polysaccharide in the reaction mixture were identified as D-glucopyranosyl-D-mannose, isomaltose and α -isomaltosyl-D-mannose, and the remaining one is unidentified. These oligomers were produced by cells grown in a culture fluid, regardless of the existence of manganese ions.

(Received December 12, 1969)

緒 言

微生物は *Bacillus* 属に限った場合でも孢子発芽, bacitracin, mycobacillin, bacillin, subtilin などの抗生物質, polyglutamic acid, α -アミラーゼ, プロテイナーゼなどの生成に Mn^{2+} を必要とすることが知られている⁽¹⁾。すでに著者らは本菌株がグルコースより生産する多糖類は、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 の糖構成比を有する単一な酸性複合多糖類で、非還元末端は D-マンノースで構成されており、(1 $\rightarrow$ 3) グリコシド結合をかなり多く有することを認めるとともに、多糖類の物理化学的性質、培養条件の検討を行ってきた⁽²⁻⁶⁾。そして多糖類生成のために培養液中に 3×10^{-6} モル程度の微量の Mn^{2+} を必要とし、 Mn^{2+} を添加しない場合には多糖類

が全く生産されないことを認めている。 Mn^{2+} が多糖類の生産に影響を与えることは *Arthrobacter*, *Cryptococcus*, *Hansenula* などの微生物によっても認められているが、 Mn^{2+} は一体いかなる点に有効であるだろうかということを究明することは、多糖類の生産機構を知る上にきわめて重要なことと思われる。本報では多糖類生産機構を調べる一端として、休止菌体を用いて多糖類生産反応系における Mn^{2+} の作用時期を求めるとともに、各種阻害剤を用いて多糖類合成酵素系の推定を行なった。また、多糖類に随伴して検出されたオリゴ糖の同定を試みた。

実験方法

1. 菌体懸濁液の調製 培地 (グルコース 3%, ペプトン 0.4%, KH_2PO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, 0.2% $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液 0.3%, $CaCO_3$ 0.5%, pH 6.0) 2~3 l を 100 ml ずつ 500 ml 容坂口フラスコに分注し、

* 前報までの題目「一有孢子細菌の生産する高粘性多糖類」を本報より表記のごとく変更する。

1 kg/cm² 15 分間滅菌したものに *Bacillus polymyxa* No. 271 を同組成の培地で 12 時間前培養したシードを 5 ml 接種し, 28°C で振盪培養 (振幅 7 cm, 毎分 130 往復) した。6 時間後に連続式遠心分離機 (佐久間連続式 6BF 型, 10,000 rpm) を用いて培養液から菌体と CaCO₃ の混合物を回収した。これを滅菌水に懸濁し超遠心分離機 (日立 55 P 型, 10,000 rpm, 10 分間) を用いて 3 回洗浄したのち, 遠心分離機 (佐久間 90-L 型, 1000 rpm, 10 分間) により菌体と CaCO₃ の混合物から CaCO₃ のみを沈殿させた。その上液である菌体懸濁液をさらに超遠心分離機にかけて 10,000 rpm にて菌体を回収し適量の水を加えて菌体懸濁液とした。

2. 菌体懸濁液を用いる多糖類の生成 100 ml 三角フラスコに緩衝液 5 ml, 菌体懸濁液 2 ml およびグルコース溶液, 阻害剤溶液などは 3 ml になるように調製し全量を 10 ml にした。反応液中のグルコース濃度は 2 %, Mn²⁺ 濃度は 0.4 ppm とした。前述の往復振盪機を用い, 28°C で 45 時間反応させて多糖類の生成を調べた。

3. 多糖類の定量 反応液の pH を測定したのち, 水で約 3 倍に希釈して沸騰浴中で 5 分間加熱した。これを超遠心分離機を用いて 10,000 rpm, 10 分間処理し, 上液と菌体の洗液を合せた液に 2 倍量のアセトンを添加して 1 夜放置した。分離した繊維状の多糖類をアセトンで脱水後, 真空乾燥して秤量した。

多糖類回収後のアセトン混液中のグルコースを Somogyi 変法により定量し, グルコース消費量を求めた。

4. ペーパークロマトグラフィー 単糖類の同定には東洋濾紙 No. 51 (2×40 cm) を使用し, 少なくとも 3 回以上展開した。また糖類の分別には No. 51 (40×40 cm) 濾紙を使用した。発色剤にはアルカリ性硝酸銀溶液, Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 試薬, 過沃素酸-ベンジジン溶液などを必要に応じて使用した。展開剤の組成は下記のとおりである。

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 (10:4:3)

Solvent D; *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. 多糖類の生成に対する Mn²⁺ の影響

すでに報告したように, *Bacillus polymyxa* No. 271 の培養においては培養液中に微量の Mn²⁺ が存在しないと多糖類が生成されず, かつ最終 pH が低下する現象が見られた。Mn²⁺ が要求されるのは菌体生産時なのか, あるいは多糖類生産時なのかということを調べるために, Mn²⁺ を添加した培地から調製した休止菌体および Mn²⁺ 無添加培地から調製した休止菌体を用い, それぞれを Mn²⁺ 添加および無添加反応液に作用させた。なお, 菌体収量は Mn²⁺ 添加培地では Mn²⁺ 無添加培地の場合の約 2 倍であるので⁽⁴⁾, Mn²⁺ 添加培地 100 ml, Mn²⁺ 無添加培地 200 ml に相当する菌体量をそれぞれの反応フラスコに添加した。結果は第 1 表に示すように, Mn²⁺ 添加培地から回収した菌体を使用した場合に多糖類が生成され, 反応液中の Mn²⁺ の有無には無関係であった。

第 1 表 休止菌体による Mn²⁺ と多糖類生成量の関係

反 応 液	Mn ²⁺ 添加培養液から回収した菌体を使用 (乾燥菌体量, 各 18 mg)		Mn ²⁺ 無添加培養液から回収した菌体を使用 (乾燥菌体量, 各 27 mg)	
	多 糖 類 (mg/10ml)	最 終 pH	多 糖 類 (mg/10ml)	最 終 pH
Mn ²⁺ 添加緩衝液	35.7	5.74	0.0	5.31
Mn ²⁺ 無添加緩衝液	33.8	5.70	0.0	5.32

反応液組成 { 1/5 M リン酸緩衝液 (pH 6.1) 5 ml
10% グルコース溶液 2 ml
菌体懸濁液 2 ml
水または Mn²⁺ 溶液 (4 ppm) 1 ml
28°C, 45 時間振盪

第 1 図 pH と多糖類生成量の関係

反応液組成 { 1/5 M リン酸緩衝液 5 ml
10% グルコース溶液 2 ml
菌体懸濁液 3 ml (乾燥菌体量 20 mg)
28°C, 45 時間振盪

Mn^{2+} 無添加培地から回収した菌体を用いた反応液は最終 pH 5.3 で多糖類の生成は認められない。しかし第1図に示したように、 Mn^{2+} 添加培地から回収した菌体を pH 5.7 の反応液に作用させた場合にも最終 pH は 5.3 になるが、多糖類は多量に生成している。それゆえ、 Mn^{2+} 無添加培地から回収した菌体によって多糖類が生成しなかったのは、単に最終 pH が低下したためではないと思われる。この点をさらに明確にするために、1/4 M リン酸緩衝液 (pH 6.4) 中で反応させた結果、 Mn^{2+} 添加培地から回収した菌体 (乾燥重量 17 mg) を用いた場合は最終 pH 6.2、多糖類生成量 4 mg/10 ml、消費グルコース 27.7 mg/ml であり、リン酸塩濃度を大にすると反応中の pH は比較的安定であるが、多糖類生成量は著しく低下する。一方、 Mn^{2+} 無添加培地から回収した菌体 (乾燥重量 21 mg) を用いた場合には最終 pH 6.1、グルコース消費量は 39.1 mg/10 ml であるにもかかわらず、多糖類の生成は見られなかった。同様に、1/10 M リン酸緩衝液 (pH 6.9) 中で反応させた場合、最終 pH 6.1 であるにもかかわらず多糖類は生成されていなかった。

以上のことから、 Mn^{2+} は多糖類合成酵素系の多糖類生成時における賦活剤ではなく、これらの酵素系は菌体生成時に Mn^{2+} が欠除した場合には生成されないことがわかった。原田ら⁽⁶⁾は糖の存在下 14~18 時間培養した *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10 C 3 K の休止菌体を用いた場合に、グルカンが菌体添加と同時に直線的に増加することを認めている。*Bacillus polymyxa* No. 271 では少なくとも 5 時間以内には多糖類の生成が見られない。このように多糖類合成酵素系の作用発現が遅れるのは、lag phase における菌体を用いたからであろう。なお Mn^{2+} 添加培地から回収した休止菌体を用いて、多糖類生成量と pH の関係を調べた結果、最適値は pH 6.1 近辺にあることがわかった (第1図)。また Mn^{2+} 無添加培地から回収した菌体を各 pH で反応させた場合は、多糖類の生成が認められなかった。培養による多糖類生産では初発 pH 7.0~6.5 (終末 pH 6.2~5.9) において最も良好な結果が得られたが⁽⁴⁾、培養途中の pH の変化を勘案すると休止菌体による実

験結果に一致する。

2. 多糖類生成に及ぼす緩衝液、阻害剤の影響

緩衝液としてリン酸、クエン酸、酢酸、トリスを用いた多糖類生産能の比較を行なった。これら緩衝液の最終濃度はいずれも 1/10 M である。初発 pH は 6.1 であるが 45 時間振盪後の最終 pH はそれぞれ 5.7, 5.9, 6.5, 5.9 に変化した。リン酸緩衝液を用いた場合の多糖類生成量を 100 とすると、クエン酸、酢酸およびトリス緩衝液によるそれはそれぞれ 0.6, 5.4, 1.4 であり、リン酸緩衝液が多糖類の生成に適していることがわかった。第2表は多糖類生成に及ぼす各種阻害剤の影響を示したものである。糖の酸化的リン酸化反応を阻害する窒化ソーダやジニトロフェノールなどのアンカップラーは多糖類の生成を強く阻害することが認められた。培養においても好気的条件が必要であり、また前述したようにリン酸緩衝液を用いる場合にのみ多糖類が生成することは、この菌の多糖類生成に酸化的リン酸化反応の過程が必要であることが明らかである。モノ沃素酢酸が低濃度において呼吸にさほど阻害がない場合でも多糖類の生成を 100% 阻害することは、多糖類の生成に SH 酵素が関与しているように見受けられる。シアン化ソーダの呼吸への影響は 5×10^{-8} M 以上において顕著であることがグルコース消費量の減退から推察される。呼吸阻害の影響は多糖類の生成量のみならず、その性状にも及んでいる。すなわち、シアン化ソーダを 10^{-8} M 添加した場合、阻害率は 80% で、生成した多糖類はアセトン添加によって軟質フロック状に沈殿した。回収した多糖類の加水分解物のペーパークロマトグラムによる判定から、構成糖は正常に生成した多糖類と同一であり、その構成比も変わらないと思われるが比粘度は約 1/3 であることから、呼吸酵素が阻

第2表 各種阻害剤の多糖類生成および糖消費に及ぼす影響

阻 害 剤	阻 害 剤 濃 度 (M)				多 糖 類 生 成 量 (mg/10ml)				グ ル コース消費量 (mg/10ml)			
	10^{-4}	10^{-8}	5×10^{-8}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-8}	5×10^{-8}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-8}	5×10^{-8}	10^{-2}
NaN_3	0.0	0.0	0.0	0.0	17	17	14	13				
NaCN	21.2	6.7	0.0	0.0	53	16	0	0				
NaF	30.5	19.5	4.0	2.7	54	50	26	14				
$(NO_2)_2C_6H_5OH$	33.7	0.0	0.0	0.0	51	13	11	4				
ICH_2COOH	0.0	0.0	0.0	0.0	9	6	2	0				

反応液組成 { 1/5 M リン酸緩衝液 (pH 6.1) 5 ml
10% グルコース溶液 2 ml
菌体懸濁液 2 ml (乾燥菌体量 17 mg)
阻害剤溶液 1 ml

28℃, 45 時間振盪

阻害剤を添加しない対照区は多糖類生成量 33.5 mg, グルコース消費量 49 mg.

害されると多糖類の生成量とともに重合度の低下をもたらすことがわかる。弗化ソーダの多糖類生成に対する阻害について Chung ら⁽⁷⁾は酵母の菌体内グルカンの生成が 10^{-2} M では、また上田⁽⁸⁾は *Pullularia* 属の菌体外グルカン (プルラン) が 10^{-2} ~ 10^{-3} M では、いずれもほとんど阻害されないことを認めている。しかしながらヘテロ多糖類を生産する *Bacillus polymyxa* No. 271 では 10^{-2} M 添加によって呼吸は阻害されていないにもかかわらず、多糖類の生成は非常に少ない。

3. 振盪液中に生成したオリゴ糖

別々に滅菌したグルコース溶液と 1/5 M リン酸緩衝液を 500 ml 容坂口フラスコ 5 本に注加して、フラスコ 1 本当りグルコース 2%, 1/10 M リン酸緩衝液 100 ml になるように希釈した。休止菌体懸濁液をフラスコ 1 本当り 5 ml (乾燥重量 150 mg) ずつ加えて 28°C で 20 時間振盪したのち、アセトンを加えて生成した多糖類 (29 mg/10 ml) を濾別した。濾液中の還元性物質をペーパークロマトグラフィーにより検出したところ、第 2 図が得られた。グルコースより R_f の大きい A, B 2 物質はマンノースまたはフラクトースではない。メチルペントースあるいは C_6 以下の還元性物質と考えられるが、未同定である。オリゴ糖は 4 種類認められ、その R_{gl}

第 2 図 振盪液中に生成したオリゴ糖のペーパークロマトグラム

ペーパークロマトグラフィー: 酢酸エチル: 水 (6:1:3)
東洋濾紙 No. 51, 上昇法 2 回展開

(=glucose) は 0.82 (オリゴ糖 I), 0.73 (オリゴ糖 II), 0.52 (オリゴ糖 III), 0.33 (オリゴ糖 IV) であった。反応液 500 ml に相当する濾液を約 50 ml に濃縮して粒状炭カラム (ツルミコール GVA-100, $\phi 3.5 \times 30$ cm) に吸着させ、まず、脱塩水を用いて 2.5 ml/min の速度で溶出した。アンスロン法により 0.7~8.5 l の溶出区間中に糖の存在を認めたのでこれを集めて水溶出区とし、さらに 1.5 l 通水して洗浄した。水溶出区中にはペーパークロマトグラフィーにより A, B 2 物質の

ほかにグルコースの存在が確認され、多糖類を構成する他のヘキソースは検出されなかった。次いで 10% エタノールを用いて再び糖が検出されなくなるまで溶出するには 4 l を要した。10% エタノール区のペーパークロマトグラムからオリゴ糖 I とオリゴ糖 II が分離されたことがわかった。さらに粒状炭カラムを 25% エタノール 2 l で洗浄すると、オリゴ糖 III とオリゴ糖 IV が溶出された。そしてそれぞれのエタノール区からオリゴ糖を分別するためには、ペーパークロマトグラムから各オリゴ糖に相当する区分を切りとって水で溶出した。

オリゴ糖 I: 回収量 4 mg, 加水分解物には Solvent B, C, D 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とマンノースの存在が認められ、 NaBH_4 を用いて還元し加水分解したものからはグルコースとマンニットが検出されたので、オリゴ糖 I は D-glucopyranosyl-D-mannose である。比旋光度の測定ができなかったので結合様式を推定することができないが、TTC 試薬により発色するから (1→2) 結合ではないであろう。ちなみに、この種の 2 糖類には β (1→6)⁽⁹⁾, α (1→4)⁽¹⁰⁾ および β (1→4)⁽¹¹⁻¹³⁾ 結合のものが報告されている。

オリゴ糖 II: 回収量は 22 mg, 比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 121$ ($c=1.1$, 水) であった。加水分解物のペーパークロマトグラムからグルコースのみが検出されたのでグルコ 2 糖類と推定し既知のものと対比した結果、オリゴ糖 II はイソマルトースであることが確認された (文献値⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ $[\alpha]_D^{25} + 121$)。

オリゴ糖 III: 回収量は 26 mg, 比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 136$ ($c=1.3$, 水) であった。ペーパークロマトグラフィーにより加水分解物中にグルコースとマンノースの存在を認め、一方、 NaBH_4 により還元し加水分解するとグルコースとマンニットが検出された。本オリゴ糖の部分加水分解物中には原物質のほかにオリゴ糖 I およびオリゴ糖 II に相当する物質と、グルコースおよびマンノースが検出されたので、オリゴ糖 III を α -isomaltosyl-D-mannose と同定した。

オリゴ糖 IV: 回収量 6 mg, R_{gl} 値が低いので 4 糖類と推定されるが詳細な検討は行っていない。加水分解物中にはグルコースとマンノースが検出された。

以上に述べたオリゴ糖 4 種類のうち、少なくともオリゴ糖 I, II, III には構造的に関連性が認められるので生成起源は同一なものであろう。振盪液中にマンノースが認められないので逆合成により生成したものではないと考

えられる。第2図に示したペーパークロマトグラムは、 Mn^{2+} 添加培地から回収した休止菌体をグルコースを含むリン酸緩衝液中で振盪した場合に、多糖類に随伴して生成したオリゴ糖を示したものであるが、一方、これら4種類のオリゴ糖は Mn^{2+} 無添加培地から得た休止菌体を用いても生成される。オリゴ糖はすべてグルコースとマンノースから構成されており、多糖類を構成するその他のヘキソース、すなわちガラクトースとグルクロン酸を含むオリゴ糖が見当らない。これらのことはオリゴ糖の生成経路が多糖類の生成経路と異なって Mn^{2+} の影響を受けない全く別の経路であることを意味し、検出されたオリゴ糖類は一旦生成した多糖類の分解物でもなく、また、これらが多糖類の前駆体になるものではないであろう。

要 約

Bacillus polymyxa No. 271 の休止菌体を用いて多糖類の生成機構について実験を行ない、次の結果を得た。

(1) 多糖類はリン酸緩衝液中で pH 6.1 近辺において最も多量に生成し、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液およびトリス緩衝液中ではほとんど生成しなかった。

(2) 多糖類の生成に影響を与える Mn^{2+} は菌体増殖時に必要であり、 Mn^{2+} を添加しない培養液から回収した休止菌体は反応液中に Mn^{2+} を添加しても多糖類を生成することができなかった。

(3) シアン化ソーダ、モノ沃素酢酸、ジニトロフェノール、アジドなどを反応液に添加すると多糖類の生成は強く阻害されたが、弗化ソーダによる阻害は比較的緩

和であった。

(4) 培養液中の Mn^{2+} の存在に関係なく4種類のオリゴ糖が生成され、そのうちの3種類を D-glucopyranosyl-D-mannose, isomaltose, α -isomaltosyl-D-mannose と同定した。

- (1) E. D. Weinberg : *Appl. Microbiol.*, **12**, 436 (1964).
- (2) 二宮英治, 木崎忠重, 花田香一 : 農化, **42**, 178 (1968).
- (3) 二宮英治, 木崎忠重, 花田香一 : 農化, **42**, 431 (1968).
- (4) 二宮英治, 木崎忠重 : 農化, **43**, 552 (1969).
- (5) 二宮英治 : 農化, **43**, 780 (1969).
- (6) 原田篤也, 藤盛 健, 正田万都江 : 醸工, **45**, 145 (1967).
- (7) C. W. Chung and W. J. Nickerson : *J. Biol. Chem.*, **208**, 395 (1954).
- (8) 上田誠之助 : 化工, **67**, 757 (1964).
- (9) H. J. Dauben and W. L. Evans : *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 886 (1938).
- (10) W. N. Haworth, E. L. Hirst and R. J. W. Reynolds : *J. Chem. Soc.*, 302 (1934).
- (11) J. K. N. Jones and I. J. Painter : *ibid.*, 669 (1957).
- (12) A. J. Mian and T. E. Timell : *Can. J. Chem.*, **38**, 1511 (1960).
- (13) O. Perila and C. T. Bishop : *ibid.*, **39**, 815 (1961).
- (14) S. Peat, W. J. Whelan and H. G. Lawley : *J. Chem. Soc.*, 729 (1958).
- (15) P. A. J. Gorin and A. S. Perlin : *Can. J. Chem.*, **37**, 1930 (1959).
- (16) I. J. Goldstein and W. J. Whelan : *J. Chem. Soc.*, 170 (1962).