Streptococcus bovis の産生する dextranucrase によるオリゴ糖生成 (その 2)

林 俊郎*・五百蔵 良**・小原直弘**・小崎道雄**

Oligosaccharides Production by Dextranucrase of *Streptococcus bovis*

Toshiro HAYASHI*, Ryo IROI**, Naohiro OHARA**
and Michio KOZAKI**

* Mejiro-gakuen Women's College, 4-31-1, Nakaochiai,
Shinjuku-ku, Tokyo 161

** Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaka,
Setagaya-ku, Tokyo 156

Oligosaccharides production on presence of maltose as glycosylacceptor by dextranucrase of *Streptococcus bovis* No. 148 isolated from bovine rumen was investigated. Oligosaccharides produced by *S. bovis* dextranucrase were in agreement with those produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 on the paper chromatogram. The trisaccharide (MG-1), the tetrasaccharide (MG-2), and the pentasaccharide (MG-3) was identified as 4- α -isomaltosyl-D-glucose, 4- α -isomaltotriosyl-D-glucose, and 4- α -isomaltotetraosyl-D-glucose, respectively. The oligosaccharides production was influenced by the presence of certain salts. Cobaltous chloride stimulated the MG-1 production, while depressed the MG-3 production. Calcium chloride and CuSO₄ depressed the MG-1 production, and stimulated the MG-3 production. Influence of maltose as acceptor on the oligosaccharides production was examined on the reaction mixture of 5% sucrose. It was found that the pattern of oligosaccharides production was controlled by the change of molar ratio of sucrose and maltose. When the molar ratio of maltose per sucrose was lower than 0.05, MG-3 and higher DP of oligosaccharides were produced. On the other hand, when the molar ratio was higher than 1.0, MG-1 was produced mainly. The calculated yield of MG-1 for consumed sucrose was about 78% of the molar ratio of maltose per sucrose at 4.0.

(Received Jul. 30, 1991)

dextranucrase (DS-ase) は別名 sucrose 6-glucosyl-transferase と呼ばれ、ショ糖から生じる α -D-glucopyranosyl を受容体 (ショ糖や低分子デキストラン) に α -1, 6-結合で転移させて高分子のデキストランを生成する酵素である¹⁾。DS-ase 産生菌には *Leuconostoc mesenteroides* や *Streptococcus mutans*

がよく知られており、前者の酵素は代用血漿製剤の製造を始めとする多方面の利用を目的として、また後者はう歯の原因として歯科医療の観点から盛んに研究されてきた。

KOEPSSELL らは²⁾、*L. mesenteroides* の DS-ase を D-フラクトース、D-グルコース、D-ガラクトース、イ

(前報, 文献 5))

* 目白学園女子短期大学 (〒161 東京都新宿区中落合 4-31-1)

** 東京農業大学農芸化学科 (〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

ソマルトース, ラクトース, マルトース, メリビオースなどを受容体としてショ糖の存在下で反応させると種々のオリゴ糖が生成することを認め, さらに柴崎³⁾は *L. mesenteroides* を用い, 培養法でマルトースを受容体とした際に生じるオリゴ糖の構造を解析している。

著者らは⁴⁾, デキストラン製造において発酵法と異なり, 生成デキストランの分子量が調整できるなどの利点の多い酵素法を導入することを目的に牛のルーメンより分離した *Streptococcus bovis* No. 148 の DS-ase の産生ならびに分離精製条件について調べた。その結果, *L. mesenteroides* はデキストランを生じるショ糖培地でのみ DS-ase を産生し, そのため粘稠な発酵液からの除菌や, それに続く酵素の分離精製操作が極めて煩雑なものとなるが, *S. bovis* はデキストランを生じないグルコース培地においても高活性に DS-ase を産生することを明らかにした。この酵素はデキストラン非結合型であることから Sephadex gel に対し特異的に吸着し, この性質を利用することにより酵素の分離精製が容易に行うことができ, これにより酵素法によるデキストラン製造が可能となることを示した。前報⁵⁾においては, *S. bovis* の DS-ase を用いた酵素法によるロイクロースの生産条件について詳述し, *L. mesenteroides* との差異なども明らかにした。

DS-ase によるオリゴ糖生成に関する報告は *L. mesenteroides* について幾つか見られるものの, *S. bovis* についてはほとんどなく, ここではマルトースを受容体とした際の酵素法によるオリゴ糖の大量生産条件について *S. bovis* の DS-ase を用いて調べたことについて述べる。

実 験 方 法

1. 使用菌株

牛のルーメンより分離した *Streptococcus bovis* No. 148 を供試菌株とし, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 を対照菌株として用いた。

2. 培養方法

供試菌株の培養にはグルコースを炭素源とする PY 培地, 対照菌株はショ糖を含む PY 培地を用いてそれぞれ前報に従って培養を行った。

3. 酵素液の調製

S. bovis の酵素液は, 前報に従って調製した Sephadex gel からの溶出液を用いた。

L. mesenteroides の酵素液は, 培養液を遠心分離 (15 000×g, 15 min) して得られた上澄液に 0.8 飽和

濃度に硫酸アンモニウムを溶解させて塩析した後, 遠心分離 (15 000×g, 15 min) により得られた沈殿物を少量の蒸留水に溶解させて一夜透析を行い, 透析内液を遠心分離 (25 000×g, 15 min) して得た上澄液を酵素液として用いた。

4. 酵素活性の測定法

DS-ase 活性の測定は前報に準じて行い, 反応液 1 ml 当り 0.52 mg のフラクトースを生成する酵素活性を 1 単位とした。

5. マルトースをアクセプターとした際のオリゴ糖生産条件の検討

グルコシルアクセプターとしてマルトースを用いた時のオリゴ糖生産の基本的な酵素反応条件は次の通りである。

酵素反応液組成

5% ショ糖水溶液	1.0 ml
マルトース水溶液 (0~40%)	1.0 ml
0.05 M リン酸緩衝液 (pH 5.5)	2.0 ml
酵素液 (200 単位/ml)	0.5 ml
蒸留水	0.5 ml
計	5.0 ml

なお, 防腐剤として微量のトルエンとアジ化ナトリウムを反応系に添加し, 40°C, 24 時間静置下で酵素反応を行った。

(1) 温度の影響: ショ糖濃度, マルトース濃度各 5% とし, (4~45)°C の温度範囲で酵素反応を行いオリゴ糖生成を調べた。

(2) pH の影響: ショ糖濃度, マルトース濃度各 5% とし, 0.05 M リン酸緩衝液を用い pH (5.0~7.0) の条件下でオリゴ糖生成を調べた。

(3) 二価金属イオンの影響: ショ糖濃度, マルトース濃度各 5% の反応系に FeCl₂, MnSO₄, MgSO₄, CuSO₄, CoCl₂, CaCl₂ の各塩類をそれぞれ 1 mM の濃度に添加し, オリゴ糖生産への影響を調べた。

(4) 受容体濃度の影響: 5% 濃度のショ糖に対しモル比でそれぞれ (0~4) の割合でマルトースを添加した際のオリゴ糖生成を調べた。

6. オリゴ糖の定性分析

生成オリゴ糖はカーボンセライトカラム法⁶⁾により分離した。まず, カーボンセライトカラムに酵素反応液を流し糖類を吸着させた後蒸留水, 5% エチルアルコールで順次洗浄して単糖類や未反応の二糖類を流出させ, 次に 10% エチルアルコールで目的とする三糖類 (MG-1) を, 15% エチルアルコールで四糖類 (MG-2), 20% エ

チルアルコールで五糖類 (MG-3) をそれぞれ溶出させた。これらの溶出液をエバポレータで濃縮乾固した後、 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ で2時間加水分解し、中和後ペーパークロマトグラフィー (PPC) で構成糖を調べた。また *L. mesenteroides* の DS-ase を用いて同様に調製して得たオリゴ糖、三糖類、四糖類、五糖類及びパノース (シグマ社製) をスタンダードとして *S. bovis* の DS-ase で合成したオリゴ糖の PPC を行った。オリゴ糖の PPC は前報に従って上昇法で多重展開し、検出は硝酸銀法⁷⁾ により行った。

7. 糖の定量

単糖類から四糖類 (MG-2) までの定量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により行った。まずイオン交換樹脂 (IR (H^+) 120) で脱イオンさせた反応液 0.4 ml をアセトニトリル 1.5 ml とメチルアルコール 0.2 ml との混合液に攪拌しながら加え、次いで遠心分離 ($15000\text{ g} \times 5\text{ min}$) 後、上澄液 1 ml に内部標準液 (0.2% ラクトース水溶液) 1 ml を加え、 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 非水系フィルターで処理し、得られた調製試料溶液 $10\text{ }\mu\text{l}$ を HPLC に供した。HPLC に用いた分析機種は日本分光トリロータⅢ (日本分光(株)製)、検出器は高感度示差屈折計 (センシュー科学(株)製) である。

HPLC 分析条件

カラム: センシュー・バック NH_2 -1251-N (商品名, センシュー科学(株)製) $4\phi \times 250\text{ mm}$

流速: 1 ml/min

カラム温度: 30°C

溶出液 (溶量比): アセトニトリル/水-7/3

五糖類 (MG-3) の定量は次のいずれかの方法により行った。すなわち、PPC により六糖類以上のオリゴ糖の生成が認められない反応系については、HPLC による他の糖類の分析値より逆算して求めた。また、他の方法として、PPC により分離された MG-3 を濾紙より抽出し、フェノール硫酸法⁸⁾ により糖量を求めた。

結果及び考察

1. オリゴ糖の定性分析

グルコシールアクセプターとしてマルトースをショ糖を含む *S. bovis* の DS-ase の反応系に添加すると著量のオリゴ糖、三糖類 (MG-1)、四糖類 (MG-2)、五糖類 (MG-3) が生成した。これらのオリゴ糖をカーボンセライトカラムにより分別し、さらに加水分解して構成糖を見たところいずれもグルコースのみが検出された。

また *L. mesenteroides* の DS-ase で同様の反応を行い、さらに脱イオン化したものをスタンダードとして PPC を行ったところ、*S. bovis* の DS-ase により生成したオリゴ糖は *L. mesenteroides* の酵素により生成したものとそれぞれ一致した。

糖の定量は四糖類までを HPLC によって行ったが、Fig. 2 はカーボンセライトカラムにより分別したマルトース、MG-1、MG-2 をパノースと混合させて分析

Fig. 1 Paper chromatogram of oligosaccharides produced by the action of *S. bovis* and *L. mesenteroides* dextranucrase in the presence of maltose as acceptor

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of mixture of maltose, panose, and oligosaccharides (MG-1 and MG-2) produced by the action of *S. bovis* dextranucrase

したものである。MG-1 はパノースと一致している。また Fig. 3 はショ糖とマルトース濃度がそれぞれ 5% の反応系で 24 時間反応させた後の HPLC によるオリゴ糖の分析結果を示している。

KOEPEL²⁾ らは、*L. mesenteroides* (NRRL B-518) の産生する DS-ase をショ糖とマルトースを含む反応系で作用させると三糖類以上のオリゴ糖が生成することを認め、KILLEY⁹⁾ らはこのオリゴ糖のうちの三糖類はパノースであることを示している。

また柴崎³⁾ は同菌株を用い、ショ糖と等量のマルトースを含む培養基で 10 日間培養し、その培養法より 3 種のオリゴ糖を分別精製しそれぞれを 4- α -isomaltosyl-D-glucose (Panose), isomaltotriosyl-D-glucose, 4- α -isomaltotetraosyl-D-glucose と推定している。

2. マルトースをアクセプターとした際のオリゴ糖生産条件

(1) 反応温度の影響

オリゴ糖生産に及ぼす反応温度の影響をみたものが Table 1 である。*S. bovis* の DS-ase は酵素活性最適

Fig. 3 High performance liquid chromatogram of saccharides produced by the action of *S. bovis* dextranucrase

Enzyme reaction mixture: to 2.0 ml of 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5), 1.0 ml of 5% sucrose, 1.0 ml of 0.5% sucrose, 1.0 ml of 5% maltose, 0.5 ml of distilled water and 0.5 ml of *S. bovis* dextranucrase solution were added. Reaction and analytical condition were described in the method.

Table 1 Influence of temperature on oligosaccharides production by *S. bovis* dextranucrase

Temperature	MG-1	MG-2	MG-3
4°C	30.40	13.61	7.28
10	31.40	14.40	6.94
20	29.00	11.20	7.62
30	28.20	12.20	8.14
40	29.00	12.20	7.88
45	25.80	12.20	8.35

Values are expressed as mg per ml of incubation mixture.

MG-1: trisaccharide

MG-2: tetrasaccharide

MG-3: pentasaccharide

Table 2 Influence of pH on oligosaccharides production by *S. bovis* dextranucrase

pH	MG-1	MG-2	MG-3
5.0	24.20	10.80	8.95
5.5	29.00	12.20	7.88
6.0	29.60	12.00	7.45
6.5	30.00	13.20	7.63
7.0	30.00	12.20	7.55

Values and symbols are same as Table 1.

温度を 40°C 近辺にもち、45°C 以上で急速に失活するが、かなりの低温条件、4°C においても作用し得る特徴がある。

(2) pH の影響

S. bovis の DS-ase 活性の最適作用 pH は 5.5 近辺にあるが、5.0 未満で急速な失活を示す。pH (5.5~7.0) の範囲においてオリゴ糖生産パターンにはほとんど変化はみられないが、pH 5.0 で MG-1 の生成が減少し、MG-3 が増加する傾向が見られた (Table 2)。

(3) 金属塩の影響

Table 3 はオリゴ糖生産に及ぼす金属塩の影響をみたものである。CoCl₂ 添加により MG-1, MG-2 の生成が高まり、一方 MG-3 の生成が抑制される傾向がみられた。また CaCl₂ や CuSO₄ の添加は CoCl₂ とは逆に MG-3 の生成を促進し、MG-1, MG-2 の生成を抑制する傾向にあった。

(4) 受容体濃度の影響

5% のショ糖濃度に対し、それぞれ (0~4) 倍濃度にマルトースを添加した際に生成するオリゴ糖を分析したものが Table 4 である。また Fig. 4 にその際のオリゴ糖生成を調べた PPC を示した。これらの結果は、マルトースをグルコシルアクセプターとしてショ糖溶液中で DS-ase を作用させるとマルトース濃度によってオリゴ糖生成パターンが大きく変動することを示している。

柴崎³⁾はオリゴ糖の生成機構についてマルトースの非還元部よりグルコースが α -1,6-結合形式で順次転移することを推定しているが、ここでそれぞれのオリゴ糖の生成について、ショ糖 (ドナー) とマルトース (アクセプター) のモル比を変えた反応式で示すと次のようになる。

Table 3 Influence of various salts on oligosaccharides production by *S. bovis* dextranucrase

Salt	MG-1	MG-2	MG-3
None	29.00	12.20	7.88
CoCl ₂	34.80	17.00	5.28
MgCl ₂	28.60	14.20	6.42
MnCl ₂	29.60	15.60	6.51
FeSO ₄	29.60	15.60	7.20
CaCl ₂	27.60	10.60	8.54
CuSO ₄	23.80	11.80	8.24

Values and symbols are same as Table 1.

Table 4 Influence of maltose as glycosylacceptor on oligosaccharides production by *S. bovis* dextranucrase

Molar ratio of sucrose and maltose	MG-1		MG-2		MG-3		Total** %
	mg/ml	%*	mg/ml	%	mg/ml	%	
1 (Su) : 0 (Mal)	0	0	0	0	0	0	0
1 : 0.05	0	0	0	0	3.60	8.2	8.2
1 : 0.25	8.00	13.8	7.10	18.4	10.58	33.1	65.3
1 : 0.50	15.3	26.3	10.70	27.8	14.08	44.0	98.1
1 : 1.00	23.4	39.5	12.40	32.1	8.80	27.6	99.2
1 : 2.00	33.8	58.0	10.20	26.4	2.64	8.3	92.7
1 : 4.00	45.2	77.6	6.60	17.1	0	0	94.7

* Expressed as percentages of theoretical weights of oligosaccharides for consumed sucrose.

** Expressed as total percentages of theoretical weights of oligosaccharides (MG-1, MG-2, MG-3).

Fig. 4 Paper chromatogram of oligosaccharides produced by *S. bovis* dextranucrase on the mixture of sucrose and maltose

1: fructose 2: glucose 3: maltose

4: MG-1 5: MG-2 6: MG-3

S: standard

* expressed as molar ratio of sucrose and maltose

本研究で得られた各オリゴ糖の生成傾向はショ糖とマルトースのモル比で方向づけられ、ここで示した反応式にはほぼ一致している。すなわち、ショ糖に対しマルトースのモル比が 1 以上の場合は MG-1 の生成が高まり、またマルトースのモル比が低下していくに従い MG-2, MG-3 の生成が増加していく傾向にある。

これらオリゴ糖の消費ショ糖に対する収量は計算上ほぼ 100% であり、ほとんどデキストランを副生していないことから DS-ase はマルトースや MG-1, MG-2 等のオリゴ糖をアクセプターとして特異的に用いていることが分かる。マルトースをアクセプターとした場合生じる糖の鎖長はアクセプターのモル濃度に強く依存することから、DS-ase が巨大分子（数百万から一千万といわれる）のデキストランを生成する原因もアクセプターが深くかかわっていることが推察される。

要 約

Streptococcus bovis No. 148 の産生する dextran-sucrase (DS-ase) を用いてショ糖をドナー、マルトースをグルコシルアクセプターとした反応系でのオリゴ糖生成条件について調べた。

(1) ショ糖、マルトース濃度各 5% の反応系で *S. bovis* DS-ase を作用させ生じた三糖類 (MG-1)、四糖類 (MG-2)、五糖類 (MG-3) を分離精製した。これらを加水分解した後オリゴ糖の構成糖を調べたところいずれもグルコースであった。また、*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 の産生する DS-ase により同様にオリゴ糖を合成し、これらのオリゴ糖を PPC と HPLC で比較したところ *S. bovis* DS-ase により合成したオリゴ糖と一致したことから、MG-1 は 4- α -isomaltosyl-D-glucose (Panose), MG-2 は 4- α -isomaltotriosyl-D-glucose, MG-3 は 4- α -isomaltotetraosyl-D-glucose と推定した。

(2) オリゴ糖生産における温度の影響を調べたところ、4~45℃ の条件ではオリゴ糖生成のパターンに変化はみられなかった。

オリゴ糖生産における pH の影響を調べたところ、pH 5.0 近辺で、MG-1 の生成が抑制され、MG-3 の生成が促進される傾向がみられた。

オリゴ糖生産における金属塩の影響を調べたところ、CoCl₂ 添加により MG-1 の生成が促進され、MG-3 の生成が抑制された。また CaCl₂, CuSO₄ の添加により MG-1 の生成が抑制、MG-3 が促進される傾向がみられた。

オリゴ糖生産におけるマルトースの影響をみたところ、ショ糖に対するマルトースのモル比を高めるに従ってより低分子のオリゴ糖が生成し、逆にモル比を下げるにより大きな分子のオリゴ糖が生成する現象がみられ、オリゴ糖生成パターンはアクセプターの濃度に依存することが明らかとなった。

本研究に御助言を賜りました東京農業大学内村 泰教授に深謝致します。

文 献

- 1) HEHRE, E.J.: *Advances in Enzymol.*, 11, 297 (1951).
- 2) KOEPESELL, H.J., TSUCHIYA, H.M., HELLMAN, N.N., KAZENKO, A., HOFFMAN, C.A., SHARPE, E.S. and JACKSON, R.W.: *J. Biol. Chem.*, 200, 793 (1953).
- 3) 柴崎 一雄: 農化, 32, 133 (1956).
- 4) HAYASHI, T., IOROI, R., OHARA, N. and KOZAKI, M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34, 213 (1988).
- 5) 五百蔵 良・林 俊郎・小原直弘・小崎道雄: 日食工誌, 37, 355 (1990).
- 6) WHELAN, W.J.: *Methods in Carbohydrate Chemistry* 1 (Editors WHISTER, R.L. and WOLFROM, M.L., Academic Press, New York) p. 321 (1962).
- 7) TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. and HARRISON, J.S.: *Nature*, 166, 444 (1950).
- 8) 福井作蔵: 還元糖の定量法 (生物化学実験法 1), 瓜谷郁三・志村憲助・中村道徳・船津 勝編集, 第八版 (学会出版センター, 東京), p. 45 (1982).
- 9) KILLEY, M., DIMLER, J.R. and CLUSKEY, E.J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3315 (1955).

(平成 3 年 7 月 30 日受理)