海洋性 *Vibrio* の生産する抗腫瘍性多糖体 について—II*¹

多糖体の化学的および物理化学的性質 (1)

奥 谷 康 一

(1976 年 5 月 31 日受理)

Antitumor Polysaccharides Produced by a Marine *Vibrio*—II

Chemical and Physicochemical Properties of the Polysaccharide (1)

Koichi OKUTANI*²

Some chemical and physicochemical properties of an antitumor polysaccharide produced by *Vibrio* sp. No. 11-15 were investigated. *Vibrio* sp. No. 11-15, isolated from sea water, produced extracellular polysaccharide on cultivation in a sea water medium containing 0.5% peptone and 0.1% yeast extract for 5-7 days at 25°C. A crude preparation of the polysaccharide was obtained from the viscous fermentation broth by precipitation with acetone. The acetone-precipitated polysaccharide was redissolved in M/100 EDTA and lyophilized after dialysis against water.

The partially purified polysaccharide preparation seemed to be homogeneous according to ultracentrifugation behavior. However, the data on cetyltrimethylammonium chloride precipitation indicated that it probably contains two different polysaccharide fractions.

The chemical analysis indicated that the polysaccharide contained 11.2% carbohydrate (as mannose), 1.5% amino sugar (as glucosamine) and 34.9% protein (as bovine serum albumin). In the infrared spectrum of the polysaccharide, absorption bands around 1250 and 820 cm⁻¹ which are characteristic of ester sulfates were found.

The relative viscosity [η_{rel}] of the polysaccharide decreased rapidly with increasing concentration of NaCl above 0.1M. The neutralization equivalent, intrinsic viscosity and optical rotation of the polysaccharide were 972, 0.6 (g/100 ml)⁻¹ and [α]_D+151° (C=0.95, water), respectively.

海洋より分離した *Vibrio* sp. No. 11-15 が培養液中に抗腫瘍性粘質多糖体を生産することおよびこの細菌の分類学的位置については、既に報告を行なった。^{1,2)} 本報では、この多糖体の化学構造を明らかにする目的で行なった実験の内から多糖体の化学的および物理化学的性質について得られた結果について報告を行なう。

実験材料および方法

使用菌株 前報²⁾でのべた *Vibrio* sp. No. 11-15 菌株を用いた。

多糖体の調製 1 l 容の三角フラスコに培地 (ペプトン 5 g, 酵母エキス 1 g, 海水 1 l, pH=7) を 500

*¹ 香川大学農学部庵治臨海実習施設業績第4号

*² 香川大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kagawa University, Kagawa 761-07, Japan)

Fig. 1. Sedimentation patterns of the polysaccharide from *Vibrio* sp. No. 11-15. The polysaccharide was centrifuged at 60,000 rpm at 25°C in water. Sedimentation is from right to left and the photograph was taken at 63, 93 and 123 min after the rotor had reached the maximum speed. The bar angle was at 80°.

Fig. 2. Relative viscosity of the polysaccharide.

Viscosity was measured with a UBBELOHDE viscometer at 30°C. Samples were dissolved in water (●), or in 0.1% NaCl solution (○).

Fig. 3. Effects of NaCl concentrations on relative viscosity of the polysaccharide.

Viscosity was measured with a UBBELOHDE viscometer at 30°C.

ml を入れて 120°C, 20 分間加圧滅菌した後、あらかじめ同培地 5 ml に 2～3 日間前培養した *Vibrio* sp. No. 11—15 菌を接種し 25°C, 5～7 日間静置培養した。7000 rpm, 20 分間の遠心分離により培養液から菌体を除いて得られる上澄液に等量のアセトンを加え攪拌した。1 夜放置した後沈澱した多糖体を吸引濾過により東洋濾紙 No. 5B 上に集めた。濾過に際しては濾過助剤として Hyflosuper-cel を用いた。濾

Fig. 4. Intrinsic viscosity of the polysaccharide.

Viscosity was measured with a UBBELOHDE viscometer at 30°C. Samples were dissolved in 1% NaCl solution. Intrinsic viscosity was calculated by the following formula:

Intrinsic viscosity = $\lim [\eta_{sp}/C] = \lim [\ln \eta_{rel}/C]$ where η_{sp} is specific viscosity, η_{rel} is relative viscosity in 1% NaCl solution and C is concentration of polysaccharide expressed as g/100 ml.

●: $\ln \eta_{rel}/C$, ○: η_{sp}/C

紙上の沈澱物は稀アセトン（アセトン：水＝1：1）で洗浄した後濾紙上に M/100 EDTA (2Na) 溶液を注ぎ沈澱している多糖体を再溶解した。これをセロファンチューブ (Visking) を用いて冷室中脱イオン水で十分に透析した。透析内液を濾過 (Whatman GF/C) し、凍結乾燥して得られる淡褐色粉末を多糖体標品とした。以下の実験にはこの標品を用いた。

元素分析 本標品の C, H, N および灰分の測定は CHN-corder MT-1 (柳本) を用いて行なった。リンの定量は多糖体をルツボ燃焼式装置 (三井東圧化学) により灰化後、バナドモリブデン比色法³⁾ により行なった。硫黄の定量は試料を酸素フラスコ法にて分解後、過塩素酸バリウムで滴定することにより行なった。

粘度の測定 ウベローデ粘度計を用い、30°C で測定した。

糖の定量 全糖の定量はフェノール硫酸法⁴⁾、アミノ糖の定量は Elson-Morgan 法⁵⁾ により行なった。

蛋白質の定量 Lowry らの銅-Folin 法⁶⁾ によった。

実験結果および考察

1. **細菌の培養と多糖体の調製** *Vibrio* sp. No. 11-15 は海水培地に極めて良好な発育を示し、培養液は 2～3 日で粘稠性を示しはじめこの粘稠性は 5～7 日間培養で最高となる。時として培養液の粘稠性が大き過ぎてそのままでは遠心分離による菌体の除去が困難なため、2.5% 食塩水で 2～4 倍に稀釈した後遠心分離を行なつて菌体を除去した。この多糖体は、アセトンの他エタノール、メタノールなどの水溶性溶剤を 50% の濃度になるように培養液に添加することにより沈澱した。凍結乾燥した多糖体は無味、無臭で冷水にも溶けその溶液は粘稠となる。

2. **多糖標品の物理化学的性質、超遠心分析** 本標品を脱イオン水に溶解し、1.1% とし日立 282 型分析用超遠心機を用い 60,000 rpm, 25°C で分析した。その沈降図は Fig. 1 に示すとおり単一のピークとなり、この標品が超遠心的にはかなり均一の挙動を示すがこの標品には第 4 級アンモニウム塩により酸性糖として沈澱する画分が含まれていることがあとでのべる実験により推定された。

Fig. 5. Infrared spectrum of the polysaccharide.

Infrared spectrum was obtained by examination of KBr pellet in a Hitachi model EPI-G2 infrared spectrophotometer.

比旋光度 Lippich polarimeter (エルマ光学) を用い, 20 cm 観測管で測定した比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 151^\circ$ ($C=0.95$, 水) であった。

粘度 まず試料の濃度と粘度との関係を Fig. 2 に示す。Fig. 2 から粘度は NaCl を添加することにより著しく低下することが認められたので次に塩類添加による粘度の変化について NaCl を用いて調べた。その結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 からこの多糖体の水溶液は NaCl を加えることにより粘度が急激に低下し, $I=0.1$ 以上では一定の値となることが認められた。これは多糖体の酸性基による分子のイオン性基が原因し, 伸びた構造の分子が無機塩の添加により縮んだ形となるからであろう。⁷⁾

この試料の極限粘度を求めるため多糖の各濃度と還元粘度 $[\eta_{sp}/C]$ および $\ln \eta_{rel}/C$ との関係をプロットした結果を Fig. 4 に示す。ここで得られた直線を $C \rightarrow 0$ に外挿して極限粘度 $[\eta] = 0.60$ が得られた。

赤外吸収スペクトル (IR) この多糖体の IR を日立 EPI-G2 型赤外分光光度計を用い試料は KBr 錠剤法で調製し測定した。その結果を Fig. 5 に示す。通常, 糖のエステル結合を示す 1735 cm^{-1} 付近の吸収ははつきりとは認められず 1250 cm^{-1} 付近にエステル硫酸基 S=O の伸縮振動にもとずくと思われる吸収があつた。更に硫酸基が糖の第 1 級 OH に結合する場合にみられる 820 cm^{-1} 付近にも小さい吸収がみられた。⁸⁾ これらのことからこの多糖体にはエステル結合に基づく硫酸基が存在しているものと推定される。

分子量の推定 本多糖体の分子量を推定するため, CPG-10 ($120 \text{ \AA}$ pore size) を用いてゲル濾過を行なった。その結果は Fig. 6 に示すとおりであり本多糖体は Blue dextran を指標として調べた void volume とほぼ同じ位置に単一ピークとして溶出された。このことからゲル濾過的には分子量はかなり大きいと推定されるが,⁹⁾ 一般に多糖体はゲル濾過的には過大の分子量を示すことが知られているので¹⁰⁾ なお超遠心分析法による詳細な検討を加えつつある。その結果については続報でのべる。

3. 多糖標品の化学的性質, 元素分析 CHN-corder による結果およびリン, 硫黄含有量について Table 1 に示す。Table 1 からこの試料には蛋白質と灰分がかなり多いことが判る。これら両成分の多糖体内存在様式については未だ明らかにしていないが, 蛋白質については超遠心分析およびゲル濾過の結果から多糖蛋白複合体となつていることも考えられる。

Fig. 6. CPG-10 column chromatography of the polysaccharide.

The CPG-10 column (2×38 cm) was eluted with water at a flow rate of 3 ml/min and 5 ml fractions were collected and assayed for carbohydrate by the method of phenol sulfuric acid reaction (OD 490 nm), and for protein by the method of Lowry et al. (OD 640 nm) and by determination of optical density at 280 nm. A peak of blue dextran was indicated by an arrow.

Table 1. Chemical composition of the polysaccharide

Components	Contents in per cent of the polysaccharide
C	34.0
H	4.9
N	8.3
P	1.6
S	1.3
Ash	10.8
Sugar (as mannose)* ¹	11.2
Amino sugar (as glucosamine)* ²	1.5
Protein (as albumin)* ³	34.9

*¹ By the phenol sulfuric acid method.

*² By the ELSON-MORGAN method after acid hydrolysis (4N-HCl, 100°C, 14 hr).

*³ By the method of LOWRY et al.

CTAC (cetyltrimethylammonium chloride) による沈澱 CTACにより沈澱する酸性多糖類の定量を行なった。多糖体水溶液 5 ml に 5% CTAC 1 ml を加え攪拌後 24 時間放置し酸性多糖と 5% CTAC とにより生じた沈澱を濾過 (Whatman GF/C) により除去し、未沈澱の多糖および未反応の CTAC を含む上澄液の糖量をフェノール硫酸法で測定した。この結果を Table 2 に示す。

Table 2. Fractionation of the polysaccharide by cetyltrimethylammonium chloride

Experiments	Polysaccharide contents (OD at 490 nm)	
	Total	Acidic
I	0.277	0.163
II	0.266	0.158

To the polysaccharide solution was added 5% aqueous solution of cetyltrimethylammonium chloride to precipitate the acidic polysaccharide as an insoluble complex, which was removed by filtration (Whatman GF/C). The clear filtrate was then subjected to the sugar analysis by the phenol sulfuric acid method.

Table 3. Fractionation of the polysaccharide by trichloroacetic acid

Experiments	Polysaccharide contents (OD at 490 nm)		Protein contents (OD at 640 nm)	
	Total	TCA-precipitable	Total	TCA-precipitable
I	0.274	0.013	0.335	0.059
II	0.274	0.000	0.335	0.056

To the polysaccharide solution was added equal volumes of 10% aqueous solution of trichloroacetic acid to precipitate the protein. The insoluble materials were removed by filtration (Whatman GF/C) and the clear filtrate was subjected to the sugar and protein analysis. Sugar was determined by the phenol sulfuric acid method and protein was determined by the method of Lowry et al.

この結果から CTAC により酸性糖区分として沈澱する画分がかなりの量認められた。

TCA (Trichloroacetic acid) による沈澱 TCA により沈澱する蛋白質または糖・蛋白質複合体を測定した。多糖体水溶液 5 ml に 10% TCA 5 ml を加え攪拌後 24 時間放置し、生じた沈澱を濾過 (Whatman GF/C) により除去し上澄液についてフェノール硫酸法で糖量を、銅-Folin 法で蛋白量を測定した。この結果を Table 3 に示す。この結果から TCA により沈澱する画分には多糖体は存在せず、蛋白がわずかに認められた。このことから、本標品中に多量に存在する蛋白質は 5% TCA ではほとんど除去し得ないことが認められた。

中和当量 上にのべたごとく、本多糖体には酸性多糖が含まれていることが推定されたのでその中和当量を求めた。試料 10 mg を水 10 ml に溶解し BCP を指示薬として 0.02N-NaOH で中和滴定した。その結果、中和当量は約 972 であることが示された。

要 約

海洋細菌 *Vibrio* sp. No. 11-15 の生産する抗腫瘍性多糖体は、菌体を除去した培養液からアセトンによる沈澱と EDTA による再溶解により得られた。透析後凍結乾燥して得られる多糖体は無味、無臭であり糖 11.2%, アミノ糖 1.5% および蛋白質を 34.9% 含んでいた。超遠心分析的には均一に見えたこの標品は、第 4 級アンモニウム塩により酸性多糖画分が分別された。中和当量、極限粘度それに比旋光度はそれぞれ 972, 0.6 (g/100 ml)⁻¹, $[\alpha]_D^{+151}$ (C=0.95, 水) を示した。

終りに、超遠心分析をしていただきました本学佐藤優行教官に深謝致します。

本報の概要は、昭和 50 年 10 月 12 日、日本水産学会秋季大会において発表を行なった。

文 献

- 1) K. OKUTANI: *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, **26**, 75-78 (1974).
- 2) 奥谷康一: 本誌, **42**, 367-370 (1976).
- 3) 関根隆光 他編集: 生化学領域における光電比色法, 各論 2, 南江堂, 東京, 1960, pp. 21-24.
- 4) 富士川龍郎他: 農化誌, **48**, 483-491 (1974).
- 5) 日本化学会編: 実験化学講座 **23**, 第 2 版, 丸善, 東京, 1963, pp. 428-429.
- 6) 同誌, pp. 37-39.
- 7) 江上不二夫: 多糖生化学 1, 共立出版, 東京, 1969, pp. 101-107.
- 8) 藤本寛之: 農化誌, **46**, 59-66 (1972).
- 9) ELECTRO NUCLEONICS, INC.: Operation instructions, CPG-10 Controlled Pore Glass, Electro Nucleonics, INC., U. S. A., 1973.
- 10) 森田尚文・林尾沢夫: 醸工, **52**, 438~444 (1974).