薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
87 (10) 1268 ~ 1272(1967)

UDC 576.851.095.097

212. 坂口 平, 横田勝司, 鈴木益子: 真菌の生化学的免疫化学的研究 (第12報^{*1})
Aspergillus fumigatus 培養濾液および菌体 Galactomannan について^{*2}

Osamu Sakaguchi, Katsushi Yokota, and Masuko Suzuki: Biochemical
and Immunochemical Studies on Fungi. XL.^{*1} On the
Galactomannans obtained from Culture Filtrate
and Cells of *Aspergillus fumigatus*.^{*2}

(Institute of Hygienic Chemistry, Tohoku College of Pharmacy^{*3})

Two galactomannans have been isolated from culture filtrate and dried cells of *Aspergillus fumigatus* by Sephadex G-50, DEAE- and CM-cellulose column chromatography.

The cell-galactomannan ($[\alpha]_D^{20} -17.5, 2.1S$) was determined to be homogeneous by the ultracentrifugal and electrophoretic analysis. The culture filtrate-galactomannan ($[\alpha]_D^{20} -2, 1.8S$) was also homogeneous. Sugar components of galactomannans are composed of galactose and mannose in a molar ratio of 1:1.

On the partial hydrolysis, cell-galactomannan and culture filtrate-galactomannan removed 40% galactose and 9% oligosaccharide (Gal: Man=4:5), leaving 51% mannan fraction ($[\alpha]_D^{20} +38.8, 1.7S$) composed of galactose and mannose in a molar ratio of 2:15. From the results of periodate oxidation of cell-galactomannan, culture filtrate-galactomannan and the mannan fraction, it was found that periodates consumed were 0.90 mole, 0.84 mole and 0.80 mole, released formic acid were 0.8 mole, 0.8 mole and 0.6 mole per anhydrohexose unit, respectively. Sugar components of periodate-oxidized galactomannan were confirmed to be mannose, glycerol and small amounts of galactose.

Presumable structure of the galactomannan was attached galactofuranose residue and oligosaccharide (Gal: Man=4:5) as side chain to mannan core consisted of $\alpha_{1\rightarrow2}$, $\alpha_{1\rightarrow3}$, $\alpha_{1\rightarrow6}$ D-mannopyranose unit.

It was shown that cell-galactomannan and culture filtrate-galactomannan were similar in chemical and physical properties.

(Received May 23, 1967)

真菌多糖体が免疫学的ならびに表層構造といかなる関連性を有するかを究明すべく、これまでに数種の真菌多糖体について研究してきた。

われわれはすでに前報で *Aspergillus fumigatus* 菌体の saline 抽出および 90% PhOH 抽出により得られる画分は galactose, mannose の構成糖を有し、さらにその残渣の高圧熱水抽出で得られる画分には galactose, mannose, glucose を有することを述べた。¹⁾ さらに培養濾液中より galactomannan peptide を分離し,²⁾ 免疫学的に特異活性を有することを報告した。³⁾ また種々なる培養条件下での galactomannan の産生条件と血清学的活性についても報告したが,⁴⁾ galactomannan は菌体から saline 抽出で得られることから比較的表層部に分布すると考えられる。

英膜物質などの菌外層構造物と培養濾液中の血清学的活性物質との関連に関する報告はあるが、真菌菌体多糖体と培養濾液多糖体に関して化学的、血清学的に追求された報告はない。われわれはこれらの galactomannan を精製し、本報では化学分析の立場から *Aspergillus fumigatus* 培養濾液および菌体 galactomannan が、高度に類似性を有する物質であったことを報告する。

^{*1} 第11報: 第38回日本生化学会総会発表, Japan J. Microbiol., **11**, 4 (1967)

^{*2} 日本薬学会第87年年会に発表 (京都)。

^{*3} Odawara-Nankozawa, Sendai.

1) 鈴木, 鈴木, 横田, 坂口: 日本細菌, **21**, 114 (1966).

2) 坂口, 横田, 鈴木: 本誌, **87**, 82 (1967).

3) 坂口, 横田, 鈴木: 第39回日本細菌学会総会発表; 日本細菌学雑誌, **21**, 521 (1966).

4) 坂口, 横田, 鈴木: 日本細菌学雑誌, **22**, 151 (1967).

実験の部

汙液および菌体 Galactomannan の分離精製 汙液 galactomannan (以下 culture filtrate-GM と称す) は前報²⁾ の galactomannan peptide をさらに DEAE-cellulose acetate form にかけて水溶出した。透析後濃縮しついで CM-cellulose ammonium form に付してより水溶出ただちに透析、濃縮し終濃度 80% に冷 MeOH を加えることにより peptide 部分を除去した。菌体 galactomannan (以下 cell-GM と称す) は前報¹⁾ の変法を用いて精製した。すなわち培養日数 14 日後洗浄菌体を saline に浮遊し、室温で 15 min. ホモジネートした上清を 80% MeOH 沈殿物とし、アセトン脱脂乾燥粉末を Sephadex G-50, DEAE-, CM-cellulose column chromatography で culture filtrate-GM 同様にして得た。

Galactomannan の分析 i) 全糖量: Molisch 試薬による発色率の違いを考慮し発色後 galactose 量として換算した。

ii) 構成糖とその mole 比: 前報²⁾ に準じおのおのの galactomannan 100 mg. を加水分解、水解液は paper chromatography (PPC) に付し展開後 aniline hydrogen phthalate (AHP) で発色させ構成糖を求めた。構成糖の mole 比は残部の切抜き抽出液を Molisch 試薬ならびに Somogyi 法により測定した。

iii) 旋光度測定: $[\alpha]_D^{20}$ はいずれも 1% 水溶液として用いた。

iv) 赤外線吸収曲線: KBr 錠として自記日立赤外分光光度計で測定した。

v) 超遠心測定: 1% 水溶液を日立分析用超遠心機にかけ、16 min. 間隔で測定した。

vi) Tiselius 電気泳動: 試料を borate および acetate buffer に 2.5% 溶液として溶解し平衡化後 Tiselius 電気泳動装置にかけた。

vii) Somogyi 法による還元力測定: 常法どうり行ない galactose を 1.00 として求めた。

viii) 部分酸水解: 各 galactomannan 4 g. ずつを 0.01N H_2SO_4 100 ml. に溶解後その 10 ml. を control とし、ついで 100° で加熱し、時間の経過とともに 10 ml. ずつ取り中和後透析、透析外液は IR-120 H^+ form column で脱塩処理した。透析外液 (以下 GM-outside と略す)、透析内液 (以下 GM-inside と略す) をそれぞれ水を加えて 100 ml. とした。その一定量につき Molisch 試薬で糖量を求め、ついで残液を濃縮し、濃縮物は凍結乾燥に付してから各 10 mg. を加水分解し、PPC 展開後構成糖およびその mole 比を求めた。また GM-outside 部分についてはそのまま PPC に展開したものも行なった。

ix) GM-inside-mannan 画分の分析: 上記の部分水解による透析内液から mannan 画分が得られるのでさらに galactomannan 1 g. ずつを 0.01N H_2SO_4 , 100°, 10 hr. 処理し中和後透析、透析内液を濃縮後 MeOH 沈殿せしめ、このものについてつぎの分析を行なった。糖量、構成糖とその mole 比、過ヨウ素酸酸化、過ヨウ素酸酸化生成体の検索、Somogyi 法による還元力測定、Tiselius electrophoresis ならびに超遠心、 $[\alpha]_D^{20}$ 、赤外線吸収曲線などである。

x) 過ヨウ素酸酸化 2つの galactomannan と mannan 画分おのおの 125 mg. を水 2 ml. に溶かし、ついで 3% NaCl 15 ml. と 0.2M $NaIO_4$ 5 ml. 加えてより 3% NaCl で全量 25 ml. とし、同時に対照を用いて 20°, 暗所で時間の経過とともに酸化し、その 1 ml. ずつをとりつぎの分析を行なった。 IO_4^- 消費量は 2% KI 5 ml. 加え析出した I_2 を 0.02N As_2O_3 で滴定し同様な方法で求めた盲検値を差引いて求めた。ギ酸量はジエチレングリコール添加後 methyl red を加え 0.02N NaOH で滴定して求めた。ホルムアルデヒドは中和後クロモトロブ硫酸法を用いた。

xi) 過ヨウ素酸酸化生成体の検索: galactomannan 各 1 g. に 0.2M $NaIO_4$ 50 ml. 加え、冷暗所で 7 日間酸化反応後ジエチレングリコール 5 ml. 加え剰余の $NaIO_4$ を分解、透析、濃縮後 EtOH 沈殿し、このものに付き 2N H_2SO_4 , 100°, 5 hr. 水解し、水解液は PPC に付してより AHP 試薬とアンモニア性 $AgNO_3$ で検出した。

実験結果および考察

I) 汙液および菌体 galactomannan の精製とその性状: 前報²⁾ で得た特異的沈降活性を有する汙液 galactomannan peptide を DEAE-cellulose column (acetate form) にかけて水で溶出後、この溶出液をさらに CM-cellulose column (ammonium form) にかけて水

Electrophoretic pattern;

Ultracentrifugal pattern;

59,780 r.p.m 1% sol. in H_2O

Fig. 1. Physical Properties of the Culture Filtrate-Galactomannan

Electrophoretic pattern;

Ultracentrifugal pattern;

Fig. 2. Physical Properties of the Cell-Galactomannan

見られるが, *Trichophyton* 属の galactomannan 画分^{5,6)} のそれは $+32.6^{\circ} \sim +80^{\circ}$ といずれも α 結合が優性なのと考え併せ興味ある点である。

沈降定数は culture filtrate-GM 1.8S ならびに cell-GM 2.1S で, 還元力, 沈降定数, 粘度, 偏比容からおよそ 25,000 の分子量を有するものと考ええる。

II) 部分酸水解: それぞれの galactomannan

Fig. 3. Sugar Contents after Partial Hydrolysis of the Galactomannan

* non-dialyzable inside solution obtained from partial hydrolysis of galactomannan

** dialyzable outside solution obtained from partial hydrolysis of galactomannan

で溶出 (この操作を数回反復する) することにより culture filtrate-GM を精製した。また cell-GM は生理食塩水抽出画分を culture filtrate-GM 同様にイオン交換カラム操作することにより容易に peptide 部分を除去し, 精製した。精製した 2 つの galactomannan の均一性に関しては Fig. 1 および Fig. 2 に示すように, いずれも単一な peak を示した。

この両 galactomannan は galactomannan peptide 同様特異的沈降活性を有す。

これらの化学分析値は Table I より全糖量は culture filtrate-GM 98.5%, cell-GM 97.8% でその構成糖と mole 比はいずれも galactose: mannose=1:1 からなる。この mole 比が galactomannan peptide と同一結果を示すことから peptide 部分のみが遊離したものと考ええる。窒素量は認められず還元力とはともに 0.008 であった。 $[\alpha]_D^{20}$ は culture filtrate-GM -2° , cell-GM -17.5° でいずれも β 結合が優性であるが, IR-吸収曲線から α , β 結合の混在が

TABLE I. Analyses of Galactomannans obtained from Culture filtrate and Cells

	Culture filtrate-GM	Cell-GM
Sugar components & molar ratio	Gal : Man=1 : 1	Gal : Man=1 : 1
Total carbohydrate	98.5%	97.8%
Total nitrogen	—	—
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1% in H ₂ O)	-2°	-17.5°
Sedimentation constant	1.8 S	2.1 S
Reducing power (Gal=1.0)	0.008	0.008

を 0.01N H₂SO₄ に可溶化後, 一部は中和, 透析に付しさらに残部は 100%, 一定時間ごとにとり同様透析する。透析後透析外液および透析内液を一定量とし, Molisch 試薬で糖量を求めた結果は Fig. 3 に示すような水解曲線が得られた。この部分酸水解の条件では culture filtrate-GM と cell-GM はまったく同一結果を与えた。すなわち室温で 0.01N H₂SO₄ に可溶化したものは, 透析外液 39% と透析内液 61% を示すが, 100%, 6 時間以後においては透析外液 49%, 透析内液 51% を与える。また 0.004N H₂SO₄, 室温処理では 18% の透析外液を示すことから

5) C. T. Bishop and M. B. Perry : Can. J. Chem., 43, 30 (1965).

6) S. A. Barker, C. N. D. Cruickshank and J. H. Holden : Biochim. et Biophys. Acta, 74, 239 (1963).

TABLE II. Analysis of Partial Hydrolyzed Galactomannan

	Gal. (%)	Man. (%)	Oligosac. (%)
GM (100%)	50	50	0
GM-inside (51%)	6	45	0
GM-outside (49%) ^{a)}	40	0	9
GM-outside ^{b)}	44	5	0
Gal : Man = 4 : 5			

Galactomannan was hydrolyzed with 0.01N H₂SO₄ at 100° for 10 hr.

a) was chromatographed directly after partial hydrolysis of galactomannan.

b) was obtained from further acid hydrolysis of GM-outside with 2N H₂SO₄ at 100° for 5 hr.

furanose type が予想された.⁷⁾ ついで 10 時間部分酸水解した外液と内液についての糖分析した結果は Table II より GM-outside 溶液を脱塩、濃縮後そのまま PPC に付すとまったく原点部から移動しない 9% の oligo-saccharide と 40% の galactose を検出した。さらに GM-outside 溶液を 2N H₂SO₄ で水解したものは 44% の galactose と 5% の mannose を含有することから原点部の oligosaccharide は galactose:mannose=4:5 よりなる。このことは Celite-charcoal column (1:1) の 30% EtOH 溶出画分に見られることと還元力が 0.1 である点から 9 個の糖残基を有するものと思われる。51% の糖量を有す GM-inside をさらに水解すると 45% の mannose と 6% の galactose からなることから mannan 画分と考える。

Ⅲ) 部分酸水解で得た透析内液 mannan 画分の性状：galactomannan の部分酸水解で得られた透析内液 mannan 画分の精製は Fig. 4 に示すように DEAE-cellulose borate form column で分画して得た。

Fig. 4. Chromatography of the Mannan Fraction

Column : DEAE-cellulose borate form

I : borate buffer pH 8.4

II : borate buffer+1M NaCl

Electrophoretic pattern; Ultracentrifugal pattern;

Fig. 5. Physical Properties of the Mannan Fraction obtained from Partial Hydrolysis of Galactomannan

得られた mannan 画分の均一性に関しては Fig. 5 より、電気泳動のおよび超遠心的に単一 peak を示す。精製 mannan 画分についての分析値は Table III に見られるように構成糖の mole 比は galactose:mannose=2:15 で $[\alpha]_D^{20} +38.8^\circ$ と右旋性の形をとるところから mannan core は主に α 結合からなり、side chain は主に β 結合であると考え。沈降定数は水解前の galactomannan と比較して幾分小さく 1.7 S を示すが、さらに還元力測定においても 0.012 といずれも分子量の低下が観察された。

Ⅳ) culture filtrate-GM, cell-GM と mannan 画分の過ヨウ素酸酸化：これらの IO₄⁻ 酸化の結果

TABLE III. Analysis of the Mannan fraction

Sugar components & molar ratio	galactose : mannose = 2 : 15
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1% in H ₂ O)	+38.8
Sedimentation constant	1.7 S
Reducing power (as Gal=1.00)	0.012

7) L. Hough and M. B. Perry : J. Chem. Soc., 2801 (1962).

は Table IV に示すがいずれも IO_4^- 消費量は 1 mole 以下で、蟻酸放出量 0.8 mole 以下、その他に微量のホルムアルデヒドが検出された。Fig. 6 の Smith 分解において mannan 画分は mannose, glycerol と微量の galac-

TABLE IV. Periodate Oxidation of the Cell-Galactomannan, the Culture Filtrate-Galactomannan and the Mannan Fraction

	Consumed IO_4^- (mole)	Released HCOOH (mole)	Released HCHO
Cell-GM	0.90	0.8	nil
Culture filtrate-GM	0.84	0.8	nil
Mannan fraction	0.80	0.6	nil

Fig. 6. Paperchromatograms of Periodate-oxidized Galactomannan

Solvent: pyridine-BuOH- H_2O (3:5:1)
(descending method)
A: culture filtrate-GM B: cell-GM
gal.: galactose man.: mannose
glycel.: glycerol glyc.: glycol

結 論

Aspergillus fumigatus 培養液および菌体より galactomannan を精製しつぎの結果を得た。

cell-GM は電気泳動的、超遠心的に単一で、構成糖 mole 比は galactose:mannose=1:1 で $[\alpha]_D^{20} -17.5^\circ$, 還元力 0.008, 沈降定数 2.1 S を示す。culture filtrate-GM の単一性、構成糖 mole 比、還元力は cell-GM と同一値を有し、 $[\alpha]_D^{20} -2^\circ$ と沈降定数 1.8 S を与える。

この両 GM の部分酸水解では 49% の透析外液と 51% の透析内液を与え、さらに透析外液は PPC より 40% の galactofuranose と 9% の oligosaccharide の存在が、また core 部分を形成する透析内液 mannan 画分は DEAE-cellulose borate column で精製し galactose-mannose=2:15, $[\alpha]_D^{20} +38.8^\circ$, 還元力 0.012, 沈降定数 1.7 S を示し過ヨウ素酸酸化分析より主に $\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合からなる。

以上の結果から cell-GM と culture filtrate-GM は化学的に高度に類似性を有する物質であることを認めた。

本研究において超遠心分析をして頂いた東北大学医学部細菌学教室 戸沢秀樹氏に感謝します。

東北薬科大学衛生化学研究所

8) F. Blank, M. B. Perry: Can. J. Chem., **42**, 2862 (1964).

9) C. T. Bishop, F. Blank, M. Hranisavljevic-Jakovljevic: Can. J. Chem., **40**, 1816 (1962).