

メタノール資化細菌により生産される多糖類の性質

三 崎 旭*
 円 谷 陽 一*
 角 田 万 里 子*
 竹 本 久 雄
 五 十 嵐 辰 夫
 橋 本 勉

Characterization of a Polysaccharide Produced by the Methanol Assimilating Bacterium

Akira MISAKI
 Yoichi TSUBURAYA
 Mariko KAKUTA
 Hisao TAKEMOTO
 Tatsuo IGARASHI
 Tsutomu HASHIMOTO

Pseudomonas sp. no. TS-1004, a methanol assimilating bacterium isolated from the soil, produces an extracellular polysaccharide PS-1004. Based on the taxonomical characteristics, it is identified as a facultative methylotrophic Gram-negative bacterium and named *Pseudomonas viscogena* TS-1004 sp. nov. The yield of polysaccharide reaches 30% based on methanol under optimum conditions. As constituent sugars, PS-1004 contains D-allose (9.8%) which has not been found previously in nature, in addition to D-galactose (55.4%), D-mannose (13.3%), D-glucose (10.7%), and D-glucuronic acid (11.0%). Complete methylation of this polysaccharide followed by acid hydrolysis yields 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-D-galactose, 3, 4, 6-tri-O-methyl-D-mannose, 2, 4, 6-tri-O-methyl-D-galactose, 2, 3, 6-tri-O-methyl-D-glucose, 2, 6-di-O-methyl-D-galactose, and 2, 4-di-O-methyl-D-galactose, demonstrating that the main chain of PS-1004 consists of (1→3) linked galactose residues. The IR spectrum of PS-1004 and its reaction with a lectin from *Ricinus communis* indicates the presence of the β -D-galactoside linkages.

1. はじめに

これまでに、数多くのメタノール資化菌が分離され、代謝生産物、菌体成分等の研究がなされてきた。

我々は、土壌中より分離した一菌株がメタノールを主炭素源とした培地中で細胞外に多量の多糖類を生産することを見出したが、この細胞外多糖類はその構成糖として、D-ガラクトース、D-グルコース、D-マンノース、D-グルクロン酸の他に、天然にはこれまでその存在についての報告のなかったD-アロースを含むという

特色があることが分った。

今回は、この細胞外多糖類生産菌の分離同定およびその培養について、ならびに多糖類の構成成分およびその構造など若干の性質について検討したので報告する。

2. 実 験

〔1〕 供試菌株

Table 1 に示した培地を分離用培地として、集積培養法によって土壌より分離したメタノール資化細菌の内、TS-1004 株を用いた。

* 大阪市立大学生活科学部

Table 1 Medium for Isolation and Growth

CH ₃ OH	1.0 wt%
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.4
KH ₂ PO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.001
Yeast·Extract	0.02
pH	7.0

〔2〕 菌の同定

分離した多糖類生産菌株の菌学的諸性質の検討は、成書¹⁾²⁾³⁾の方法に準じて行なった。

同定は、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版⁴⁾に拠った。

〔3〕 多糖類生産菌株の培養

Table 1 に示した培地 4ℓ を丸菱理化社製 MD-500 型ジャーファメンターに仕込み、接種量 5%、30°C、48 時間、通気攪拌して培養を行なった。

〔4〕 多糖類の単離と精製

培養後の醗酵液に 2 倍量の水を加えて、遠心分離を行ない、その上澄液を 3 倍量のアセトン中に攪拌しながら加え、粗多糖類を析出させた。

粗多糖類水溶液をトリクロル酢酸で除タンパク処理を行ない、更に臭化セチルトリメチルアンモニウム塩を加え複合体形成し、沈殿させた。

過剰の臭化セチルトリメチルアンモニウム塩を除去した後、飽和食塩水で複合体を溶解し、流水中で透析を行ない、得られた透析後の試料に 3 倍量のエタノールを加えて沈殿させ、凍結乾燥の後、分析用の標品として実験に供した。

〔5〕 分光分析

赤外吸収スペクトルは、島津製 IR-27G を用いて KBr 錠剤法で測定した。また紫外吸収スペクトルは日立製 356 形自記分光光度計を用いて、濃度 0.9695 mg/ml の条件で測定した。

〔6〕 ¹³C-NMR 分析

日本電子製 JNM-FX-100-FTNMR を用いて、溶媒 D₂O、内部基準 P-ジオキサン、室温の条件下で測定した。

〔7〕 呈色反応

ニンヒドリン反応、アンスロン硫酸反応、システイン硫酸反応、デッシュのカルバゾール反応、エルソン-モルガン反応を行なった⁵⁾。

〔8〕 GC-MS 分析

メチル化多糖類の加水分解物のアルジトールアセテート化物の GC-MS 分析を、日立製 GC-063, MS-RMU-6E を用い、カラム; シリコン OV-17, 3%クロモゾーブ W. A. W. DMCS, 60~80 メッシュ, 3φ×3 m, ガラスカラム, 温度; 注入口, カラム, セパレーター, イオン源とも 200°C, 流量; He 30 ml/min, イオン化電圧; 70 eV の条件下で測定を行なった。

〔9〕 構成糖の分離同定

多糖類の酸加水分解物の分離同定の大部分は、成書⁶⁾に基づき、ペーパークロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、濾紙電気泳動等の分析方法を用いて行なった。

ウロン酸の同定は、Sone らの方法⁶⁾で、定量はカルバゾール硫酸法で行なった。

〔10〕 TG-DTA 分析

理学電機製自記示差熱天秤を用い、昇温速度 10°C/分で多糖類の TG-DTA 分析を行なった。

〔11〕 粘度測定

東京計器製 B 型粘度計を用い、室温で多糖類 1.0 wt% の粘度測定した。

3. 実験結果と考察

〔1〕 分離株の菌学的特性

多数分離されたメタノール資化細菌の中で、特に多量の細胞外多糖類を生産した TS-1004 株の菌学的諸特性を Table 2 に示した。

TS-1004 株は、桿菌でグラム陰性、極鞭毛で運動性を有する、絶対好気性でカタラーゼ、オキシダーゼ陽性であることから *Pseudomonas* 属に属する細菌であることが示唆された。

しかしながら、その生理的諸性質から、TS-1004 株は既存の種のいずれにも該当せず、我々は新菌種であると断定して *Pseudomonas viscogena* と命名した。

なお、*Pseudomonas viscogena* TS-1004 株は微生物工業技術研究所に寄託されている⁷⁾。

〔2〕 多糖類生産菌株の培養

TS-1004 株を種々の炭素源で培養した結果を Table 3 に示したが、これからも明らかな様に TS-1004 株は、種々の炭素源で生育することは出来るが、メタノールで一番良く生育する *Facultative* な *methylotroph* であることが分かった。

メタノールを唯一の炭素源とする TS-1004 株の培養は、pH スタットによる基質流加培養法で行なった。通常用いた中和液は C/N モル比 10 に調整されたメタノール含有 28% アンモニア水であった。

Table 2 The Taxonomical Characteristics of Methanol-Assimilating Bacterium TS-1004

(A) Morphological characteristics* ¹		6. Growth in milk	
1. Cell form	rods	a) Reaction	decolorization
2. Cell size	about 1.0 × 0.7 (μ)	b) Gas formation	none
3. Arrangement	single or pair	c) Coagulation or liquification	coagulation
4. Motility	motile	(C) Physiological Characteristics:	
5. Endospore	none	1. Reduction of nitrate	Reduction to N ₂
6. Gram stainity	negative	2. Denitrification	—
7. Acid-fast	negative	3. MR test	+
(B) Cultural characteristics		4. VP test	+
1. Nutrient broth agar plate* ²		5. Formation of indole	+
a) Rate for colony formation	usual	6. Formation of hydrogen sulfide	+
b) Form of colonies	circular, about 3.5 mm in diameter	7. Hydrolysis of starch	—
c) Surface of colonies	smooth	8. Utilization of citric acid	—
d) Elevation of Growth	convex	9. Utilization of inorganic nitrogen source	Nitrogen source in either NO ₃ or NH ₃ form is utilized.
e) Edge of colonies	entire	10. Formation of coloring material	Green fluorescent material is formed.
f) Content of colonies	amorphous	11. Ulease	+
g) Tint of colonies	pale yellow	12. Oxidase	+
h) Transmittance of colonies	opaque	13. Catalase	+
i) Glistening of colonies	glistening	14. Range for growth	4-10 in pH and at a temperature of 10-42°C
j) Formation of soluble coloring material	none	15. Oxygen requirement	aerobic
2. Nutrient broth agar slant* ²		16. O-F test	oxidation
a) Growth	abundant growth	17. Acid or gas formation from sugars;	
b) Form of growth	spreading	Sugar	Growth Acid Gas
c) Gross-sectional Elevation of colonies	flat	L-Arabinonose	+ + —
d) Glistening of growth	glistening	D-Xylose	+ + —
e) Surface of colonies	smooth	D-Glucose	+ (+) —
f) Transmittance of colonies	opaque	D-Mannose	+ — —
g) Tint of colonies	pale yellow	D-Fructose	+ + —
h) Rheological characteristics of colonies	viscid	D-Galactose	+ + —
3. Nutrient broth* ²		Maltose	+ — —
a) Growth on surface	membranous	Sucrose	+ — —
b) Turbidity	moderately turbid	Lactose	+ — —
c) Precipitate formation	compact	Threpharose	+ — —
d) Generation of gas	none	D-Sorbit	+ — —
e) Coloration of medium	none	D-Mannit	+ — —
4. Nutrient broth agar stab* ²		Inosit	+ — —
a) Location of growth	best at top	Glycerine	+ + —
b) Line of puncture	pappilate	Starch	+ — —
5. Nutrient gelatin stab* ³			
a) Liquification of gelatin	none		

*¹ after inoculation at 30°C for 6~24 hr*² after inoculation at 30°C for 2 days*³ after inoculation at 30°C for 2 weeks

Table 3 Growth of TS-1004 on Various Substrates as Carbon Source

Substrate	Growth (OD ₄₅₀)
Methanol	1.00
Ethanol	0.04
n-Propanol	0.03
n-Butanol	0.03
Ethylene glycol	0.21
Propylene glycol	0.13
1, 4-Butanediol	0.08
Glycerin	0.13
Acetic acid	0.02
Glucose	0.63
n-Hexane	0.21
n-Paraffin	0.20

TS-1004 株の培養は、中和液の C/N モル比、培地中のリン酸塩濃度、メタノール濃度に大きく影響を受けた。

高度に制御された培養において、TS-1004 株は細胞外多糖類収量 30 g/l, 対メタノール収率30%の成績を示した。

[3] 多糖類の呈色反応

ニンヒドリン反応、エルソン-モルゲン反応が陰性でカルバゾール反応陽性であることから、アミノ糖は存在しないが、ウロン酸は存在することが示唆された。

[4] 多糖類の構成糖

標品を2N-硫酸中、100°C、8時間加水分解し、反応後、炭酸バリウムで中和、濾過した。

中和濾液の酸性エーテル区分には有機酸が検出されずアセチル基等のエステル結合は存在しないと示唆されたが、¹³C-NMR スペクトルから、アセチル基のメチルシグナル、およびカルボニル吸収領域でのカルボキシルシグナルが観測された。しかし同領域でのアセチル基のカルボニルシグナルは確認されなかった。従って、¹³C-NMR 分析からは、水酸基の一部はアセチル化されてい

Table 4 The Color Reaction of PS-1004

Color reaction	
Ninhydrin	-
Anthrone-H ₂ SO ₄	+
Cystein-H ₂ SO ₄ (Dische)	+
Carbazole-H ₂ SO ₄ (Dische)	+
Elson Morgen method	-

るが、その割合は非常に小さいことが推定される。

多糖類の硫酸加水分解物の中和濾液について、展開溶媒 n-ブタノール-ピリジン-水 (容量比 6 : 4 : 3)、発色剤 3% p-アニンジン塩酸塩 (水飽和 n-ブタノール溶液) を用い薄層クロマトグラフィーを行なったところ、ガラクトース、グルコース、マンノース、およびウロン酸の存在が認められた。

濾液中の中性糖の定量を行なうために濾液を強酸性陽イオン交換樹脂 (H⁺ 型) のカラムに通し、得られた通過液を濃縮し、この濃縮物についてアルジトール・アセテート化を行ない、ガスクロマトグラフィー分析を行なった。その結果、ガラクトース、グルコース、マンノース、ならびに未知糖の存在が認められた。

未知糖ならびにウロン酸の同定を行なうために、多糖類の硫酸加水分解物からの単糖の分画を行なった。Whatman 社製 CF-11 を用いたセルロースカラムクロマトグラフィーで、第1溶出液 n-ブタノール-ピリジン-水 (容量比10 : 3 : 3)、第2溶出液エタノール水 (容量比 2 : 1) で中性糖、ウロン酸を分画分取した。各々の単糖は更に Whatman 社製 3MM 濾紙を用いて、ペーパークロマトグラフィーで単離精製した。

未知糖およびグルコースはペーパークロマトグラフィーでの易動度が等しく分画出来ず、両者の混合画分をグルコース・オキシダーゼで処理することにより未知糖を単離した。

ウロン酸画分は、Sone らの方法⁶⁾に従い、還元アルジ

Table 5 Identification of Sugar Compositions of PS-1004

	molar percent
D-allose	9.8
D-mannose	13.1
D-galactose	55.4
D-glucose	10.7
D-glucuronic acid	11.0
D-allose : R _{glc} 1.00, M _{glc} 0.86, T _{glc} 0.65 (g. l. c.), T _{glc} 0.77 (liquid chromatography), [α] _D ²⁰ +15°, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-benzoyl-β-D-allopyranose m. p. 220-221°, [α] _D -7.8°, C : H = 70.28 : 4.55 (%)	
D-mannose, D-galactose, and D-glucose : analyses of R _{glc} , T _{glc} (g. l. c.), and [α] _D	
D-glucuronic acid : carbazole-H ₂ SO ₄ method (Dische) methyl-esterification (Sone <i>et al.</i>)	

ツール, アセテート化を行ない, ガスクロマトグラフィーで分析を行なった。標準アルジツールアセテートとの保持時間を比較することで元のアルドン酸の同定を行なった。

Table 5 に多糖類の構成糖の分析結果をまとめて示した。

単離された未知単糖はペーパークロマトグラフィー, 濾紙電気泳動, ガスクロマトグラフィー, およびホウ酸型イオン交換樹脂を用いた液体クロマトグラフィーで単一であり, 標準 D-アロースと同一挙動を示した。その比旋光度, アセチル化誘導体, ベンゾイル誘導体の分析により, 本未知単糖を, D-アロースと同定した。

これまでに, 天然に D-アロースが存在するという報告はなく, 本多糖類が初めてである。

その他に, マンノース, ガラクトース, グルコースが同定され, またウロン酸はグルクロン酸と同定された。

いずれもその比旋光度の値より, D-型であった。

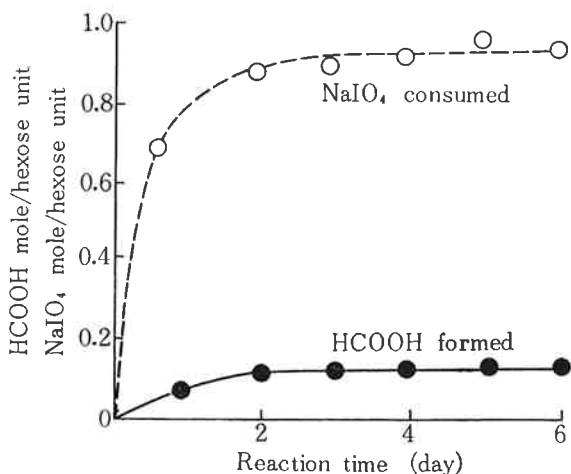
[5] 多糖類の構成糖残基のグリコシド結合

多糖類の構成糖残基のグリコシド結合の種類について検討を行なうために, 多糖類の過ヨウ素酸酸化, 完全スミス分解, 緩和スミス分解, メチル化分析を行なった。

また, 構成糖残基のグリコシド結合の配向性を知るために, 比旋光度の測定, 赤外吸収スペクトルの測定, ヒマ豆のレクチンとの反応を行なった。

[6] 多糖類の過ヨウ素酸酸化

本多糖類の過ヨウ素酸酸化の結果を **Fig. 1** に示した。標品を 0.05M メタ過ヨウ素酸ナトリウム水溶液中, 4°C, 6 日間処理すると, 最終的に, ヘキソース 1 モルに対して過ヨウ素酸が 0.95 モル消費され, ギ酸が 0.12 モル生成



Polysaccharide (3.5 g) was oxidized with 0.05 M NaIO₄ (200 ml), for 6 days at 4° in a dark.

Fig. 1 Periodate Oxidation of PS-1004

しました。反応後, 水素化ホウ素ナトリウムで還元して得られたグリカン-ポリアルコールは, 用いた多糖類の 73% の収量であった。

[7] 完全スミス分解

多糖類の過ヨウ素酸酸化で得られたグリカンポリアルコールを完全スミス分解した結果を **Table 6** に示した。

Table 6 Complete Smith Degradation of Glycan-Polyalcohol of PS-1004

Glycan-polyalcohol (20 mg) was hydrolyzed with 2 N H₂SO₄ (30 ml), for 3 h at 100°, and the hydrolysis products were analyzed by paper chromatography and by g. l. c.

compound	molar ratio
glycerol	0.36
erythritol	0.71
threitol	trace
mannose	0.03
galactose	1.00

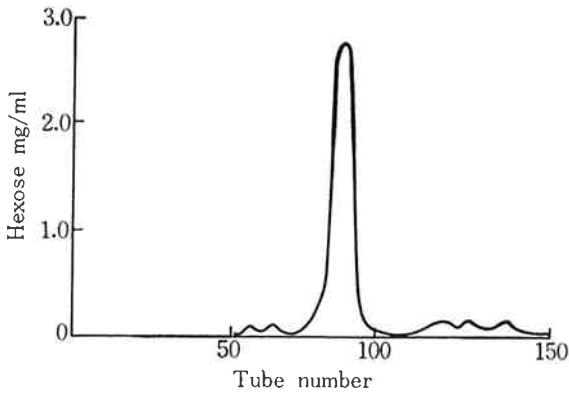
Table 6 から明らかなように, 分解生成物をペーパークロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーで分析した結果, グリセロール, エリスリトール, 微量のマンノース, およびガラクトースが得られ, スレイトールは極微量であった。このことは, 本多糖類中にガラクトースが (1 → 3) 結合した残基が含まれていることを示している。

[8] 緩和スミス分解

さらにグリカンポリアルコールを温和な条件で酸加水分解, いわゆる緩和スミス分解で得られた分解生成物のカラムクロマトグラフィーの結果を **Fig. 2** に示した。

緩和スミス分解を行なうと, グリセロール, エリスリトールおよびオリゴ糖が見い出された。

Fig. 2 に示したようにフラクション No. 90 に主ピークが認められ, フラクション No. 120 および 130 にはエリスリトールおよびグリセロールがそれぞれ分画溶出した。この主ピークを分析した結果, 収量はグリカンポリアルコールの 42%, 元の多糖類よりは 31% であった。本画分は非還元性で, マルトオリゴ糖の溶出パターンに基づくと重合度 (d. p) は, 8 であった。このものの酸加水分解物を分析した結果, ガラクトース, エリスリトースがモル比で 1 : 0.25 で得られた。また本成分をメチル化後, 酸加水分解してガスクロマトグラフィー分析した結果, 非還元末端ガラクトース残基由来のピーク, (1 → 3) 結合由来のピーク, および エリスリトースの部分



Glycan-polyalcohol (100 mg) was hydrolyzed with 0.1 N H₂SO₄, for 13 h, at 50°C compounds; glycerol, erythritol and oligosaccharides Bio-Gel P-2 column chromatography of the hydrolysis products column 2.6×100 cm, elution with water at 50°C, fraction 3 ml/tube, detection by phenol-H₂SO₄ method

Fig. 2 Mild Smith Degradation of Glycan Polyalcohol of PS-1004

メチル化物と考えられるピークが得られた。

これらの事から、本成分はガラクトースが(1→3)ーグリコシド結合した直鎖の低分子オリゴ糖であり、その還元末端にエリスリトールが結合していると考えられる。

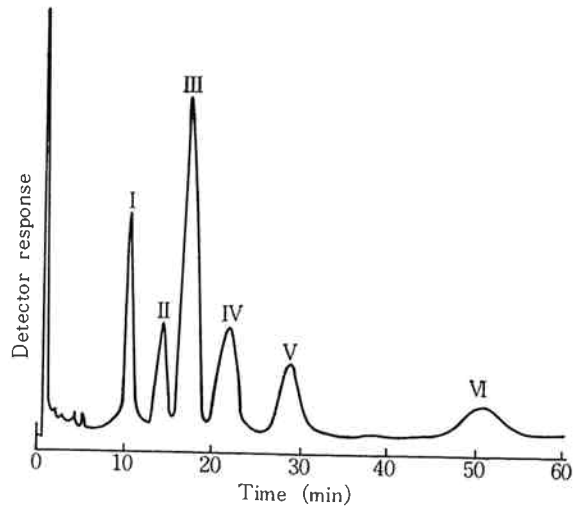
本成分の多糖類よりの収量は31%であり、多糖類中の55%がガラクトースであることを考えると、多糖類中のガラクトースの大部分は、重合度5から8と比較的短いフラグメントとして(1→3)ー結合していると考えられる。

[9] 多糖類のメチル化分析

Table 7, Fig. 3 に多糖類のメチル化分析の結果を示した。多糖類を箱注法⁵⁾にてメチル化し酸加水分解後、メチル化糖をアルジトールアセテート化してガスクロマトグラフィー分析を行なうと Table 7 に示したように、非還元末端ガラクトース残基由来のピーク(ピーク I),

Table 7 Methyl Sugar Fragments of PS-1004

methyl sugars	molar ratio
I 2, 3, 4, 6-Me ₄ -Gal	1.00
II 3, 4, 6-Me ₃ -Man or 2, 4, 6-Me ₃ -Glu	0.79
III 2, 4, 6-Me ₃ -Gal	2.39
IV 2, 3, 6-Me ₃ -Glu	1.03
V 2, 6-Me ₂ -Gal	0.93
VI 2, 4-Me ₂ -Gal	0.70

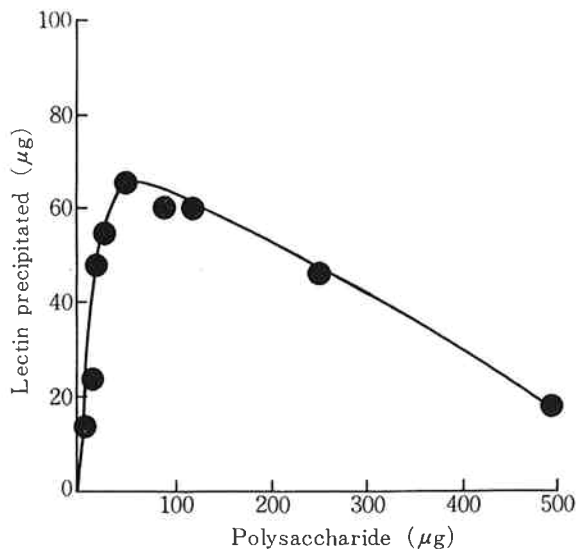


column 3% ECNSS-M on Gaschrom Q (2 m), sample methyl sugar fragments (alditol acetates), temperature 180°.

Fig. 3 Sugar Fragments of PS-1004

(1→3)ー結合したガラクトース残基由来のピーク(ピーク III), およびガラクトースが(1→3), (1→4)で分枝した残基(ピーク V), および(1→3), (1→6)で分枝した残基(ピーク VI)由来のピークが認められた。他のピークについてはアロースのメチル化糖の同定が困難であり現在、分析検討中である。

この結果は、前述の過ヨウ素酸々化の結果と同じく、ガラクトースが(1→3)ー結合した残基が多糖類中に含



Polysaccharide (0 to 500 µg) was incubated with the lectin (85 µg) in 0.15 M phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.9% NaCl (0.3 ml), for 3 days at 4°.

Fig. 4 Quantitative Precipitation Curve of PS-1004 with a Lectin From *Ricinus communis*

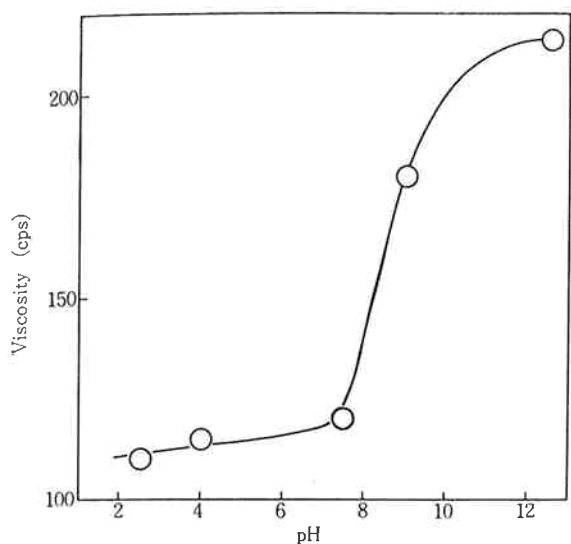


Fig. 5 Effect of pH on Viscosity of PS-1004 1.0 wt% Room Temp.

まれていることを示している。

〔10〕 多糖類とレクチンの反応

多糖類の非還元末端にガラクトース残基が存在することを確認するために、ヒマ豆から得られたレクチンとの定量沈降反応を行なった。

ヒマ豆からのレクチンは β -ガラクトシル基残基と特異的に結合することが知られており、Fig. 4 の結果は、

本多糖類中、非還元末端のガラクトース残基は β 結合していることを示している。

この事は多糖類の比旋光度 $[\alpha]_D^{23} + 32.2^\circ$ と小さい値を有すること、赤外吸収スペクトルで 880 cm^{-1} に吸収が認められる事からも推察される。

〔11〕 多糖類の物理学的性質

本多糖類は、水には溶解するが、メタノール、エタノール、エーテル、アセトン、クロロホルム等有機溶媒に

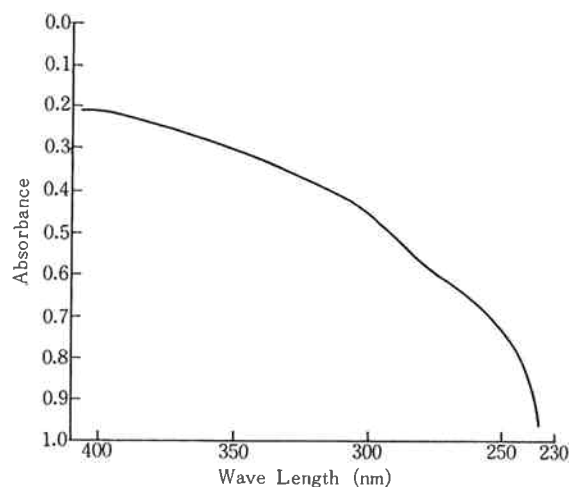


Fig. 7 UV Spectrum of PS-1004 (0.9695 mg/ml aq. solution)

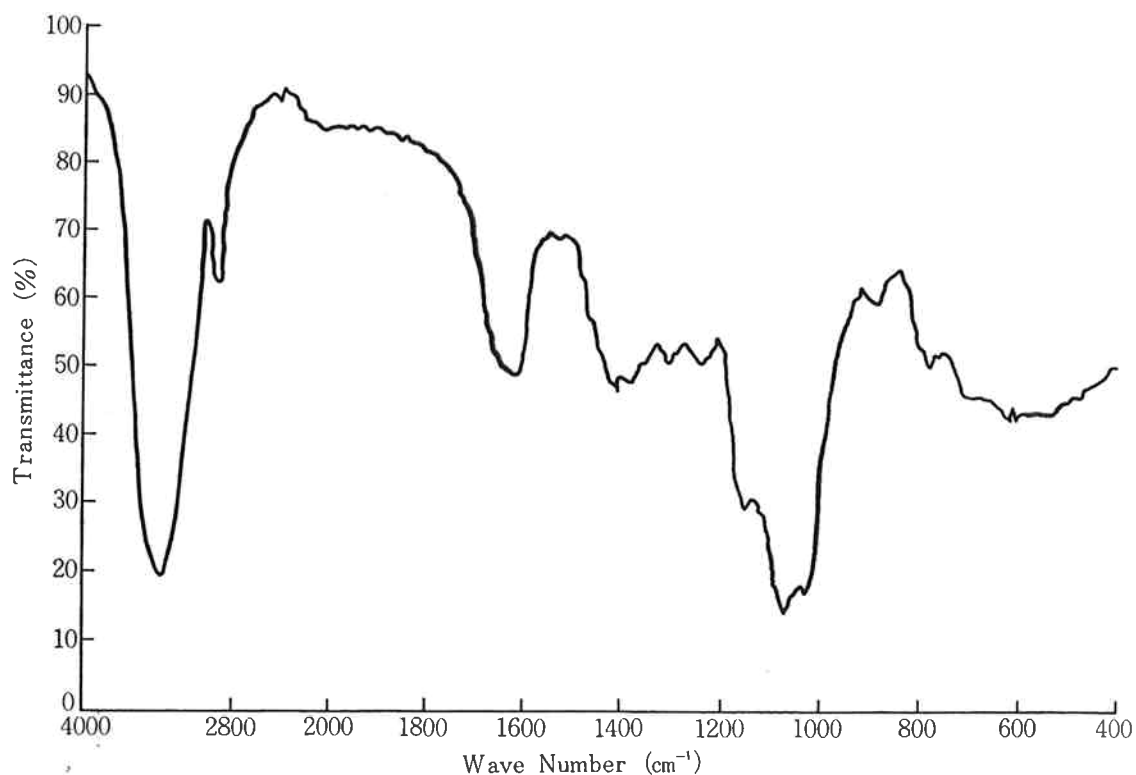


Fig. 6 IR Spectrum of PS-1004 KBr tablets.

不溶であった。1.0 wt% 水溶液の粘度の pH 依存性について Fig. 5 に示したが、アルカリ側で急激に増加する現象が認められた。この様な状態に例えば CaCl_2 などのカルシウム塩の溶液を加えると、多糖類はゲル化して水に不溶になる。この機構については多糖類の構成糖の1つであるグルクロン酸によるものと考えているが詳細は検討中である。

また、本多糖類は、TG-DTA 分析によると、明確な融点を示さず、210 ないし 220°C から始まる発熱を伴った重量減少が認められた。

4. 結 論

土壤中より分離したメタノール資化細菌 TS-1004 株が、培地中に細胞外多糖類を著量蓄積することを見出した。

TS-1004 株は、その菌学的諸特性から新菌種であると判断して、*Pseudomonas viscogena* と命名した。

細胞外多糖類は、メタノールを唯一の炭素源とした TS-1004 株の培養で、30 g/l、対メタノール収率30%の成績で得られた。

多糖類はその構成糖として、D-ガラクトース、D-マンノース、D-グルコース、D-グルクロン酸の他にこれまで天然にその存在についての報告がなかった D-アロ

ースを含んでいることが明らかとなった。

過ヨウ素酸酸化、スミス分解、メチル化分析より、多糖類中の大部分のガラクトースは、比較的短いフラグメントとして β -(1→3)-結合していることが示唆された。

本多糖類の化学的性質、および諸物性、ならびに詳細な構造解析については、現在検討中である。

文 献

- 1) *Society of American Bacteriologists, Manual of Microbiological Methods*, McGraw-Hill, (1957).
- 2) 長谷川編著；“微生物の分類と同定”，東大出版，(1975).
- 3) C. H. Collins and Patricia M. Lyne; *Microbiological Method*, 4th ed., Butterworths, (1976).
- 4) De Ley, J., Frateur, J.; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Co., (1974).
- 5) 原田篤也，小泉岳夫編；“総合多糖類化学”，講談社，(1975).
- 6) Sone, et al.; *Agric. Biol. Chem.*, 42, 417 (1978).
- 7) “日特公開 53—118585”.