

氏 名 (本籍)	こ ばやし みき ひこ 小 林 幹 彦 (宮城県)
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 1 4 4 号
学位授与年月日	昭和 4 9 年 3 月 2 6 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻
学位論文題目	デキストランの構造とその生合成酵素に関する研究

(主 査)  
論文審査委員 教授 玉利 勤治郎 教 授 志 村 憲 助  
助教授 松 田 和 雄

# 論文内容要旨

## I 緒論

ヘテロ乳酸菌の一種である Leuconostoc mesenteroides は sucrose を炭素源として培養すると、菌体外に著量の多糖（デキストラン）を生成する。この多糖は、D-glucose を構成単位とするが、結合様式は主として  $\alpha$ -1.6 結合であり、菌株によっては  $\alpha$ -1.4、 $\alpha$ -1.3、 $\alpha$ -1.2 などの副結合も存在することが知られている。

本研究に用いた Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299 株のデキストランは  $\alpha$ -1.3、 $\alpha$ -1.2 結合の含有量が高く、免疫的にも特異な性質を示すことから、これらの結合が主鎖の  $\alpha$ -1.6 結合に対して組込まれている様式や、分岐点の結合などの微細構造を明かにすることは、種々のデキストランの構造を体系づける上からも意義があるものと考えられる。

デキストランの生合成に関する研究は古く 1950 年代より進められ、デキストランの合成を触媒する酵素は dextransucrase (E. C. 2. 4. 1. 5.,  $\alpha$ -1.6-glucan:D-fructose 2-glucosyltransferase) と名付けられているが、主結合である  $\alpha$ -1.6 結合の生成を触媒する polymerizing enzyme の他に  $\alpha$ -1.4、 $\alpha$ -1.3、 $\alpha$ -1.2 のような分岐点を形成すると考えられる結合の生成を触媒する branching enzyme が存在し、2 種以上の酵素の作用によってデキストラン合成が行なわれるのか、或は 1 種類の合成酵素によって総ての結合が合成されるのかについては、今日まで明確な結論が得られていない。本研究では、B-1299 株デキストランのような高分岐構造を有する多糖の合成酵素の解析を試みた。

## II B-1299 デキストランの構造研究

### 1) 方法及び結果

#### (a) デキストランの分画と均一性について

L. mesenteroides NRRL B-1299 株を炭素源として sucrose を含む培地で 27°C、5 日間培養して得られたデキストラン（対糖収率 10%）を MeOH 再沈殿法により精製し、これを borax 抽出、セタブロン分画、超速心分離法によって 5 面分に分画した。これらの画分は電気泳動、超速心、ゲルろ過による分析結果から均一標品であることが確認された。分子量は 15~20 万の画分 (CPS、BPS) と 200 万以上 (CPP、BPP、CS) のものがあり、水に対する溶解性の差異も認められた。(Fig.1)

## (b) 画分の構造の定性的分析

5画分のデキストランは完全酸水解によって glucose を構成成分とすることが分り、旋光度が  $200^\circ$  前後の高い値を有することから、 $\alpha$ -Glucanであろうと推定された。又、部分酸水解物には  $\alpha$ -1.6 結合の Isomaltose 系列のオリゴ糖が検出され、加酢分解物には  $\alpha$ -1.2 (Kojibiose)、 $\alpha$ -1.3 (Nigerose) が認められた。過ヨウ素酸々化の実験結果から、5画分のデキストラン中の  $\alpha$ -1.6 結合は 41~46%、 $\alpha$ -1.2 結合は 38~55%、 $\alpha$ -1.3 結合は 0~13% の値が得られ、画分相互の間では水溶性と  $\alpha$ -1.3 結合の含有率の関連性が示唆された。更に、concanavalin A との定量沈降反応パターンからも、5画分のデキストランの分子量と分岐構造の差異が示された。

## (c) 画分の構造の定量的分析

5画分のデキストランの微細構造を定量的に検討する目的でメチル化分析を行った。試料デキストランを予めアセチル化物にしておき、これを常法に従って、Haworth 法 (2回)、更に箱守法 (3~8回) のメチル化反応を行い、 $\text{CH}_3\text{O}$  含量 93.9% 以上のメチル化物を調製した。これを加水分解して得られた methylglucosides は GLC で分離同定を行い、次にモル比の定量、結晶化等を試みた。Table I に掲げた様に、各画分とも 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-glucose の含量が極めて高いこと分岐点は  $\alpha$ -1.2 結合が主で、水不溶性の画分 (BPS、BPP) には  $\alpha$ -1.3 結合の分岐点の存在も確認された。従来報告ではデキストランの  $\alpha$ -1.3  $\alpha$ -1.2 結合は分岐構造の部分にあるものと考えられていたが、3, 4, 6-tri-及び 2, 4, 6-tri-O-methyl-glucose が分離されたことから直鎖状の  $\alpha$ -1.3、 $\alpha$ -1.2 結合部分も含まれていることが明かにされた。

## (d) 加酢分解物の同定と NMR 分析

いわゆる加酢分解法は  $\alpha$ -1.3、 $\alpha$ -1.2 結合のオリゴ糖を得る目的には最良の方法であり、メチル化分析法との併用によって側鎖部分の構造等の知見を得ることが可能となる。ここでは加酢分解物を活性炭カラムにより分画し、 $\alpha$ -1.3、 $\alpha$ -1.2 結合を含む 9種のオリゴ糖を同定した。

更に、水溶性デキストラン画分 (CPS、CPP、CS混合物の形) についての C-13及び proton NMR 分析の結果も上記の構造分析の結果を支持するものであった。

## 2) 考 察

A. Jeanes ら NRR L 研究グループの報告によって、B-1299株のデキストランは L. S の 2画分に分画されたが、超速心分析及び電気泳動的均一性を指標に分画を進め

た結果、5画分が得られた。これらの画分は過ヨウ素酸々化、concanavalin Aとの沈降反応パターンなどから相互に構造上の差異が推定された。又、分子量の点でも約10倍の差を持つ2群が示された。(1)

メチル化分析、加酢分解物の同定の実験から、水溶性の画分(CS、CPS、CPP)は不溶性の画分に比べて $\alpha$ -1.3結合の含有量が低く、この種の結合の多少が水溶性に影響するものであることが示唆された。

分岐構造の特徴は $\alpha$ -1.6の主鎖に対して $\alpha$ -1.2結合が分岐点を構成している点であるが、不溶性画分には $\alpha$ -1.3結合を介する分岐も存在し、4-mono-methyl-glucoseが同定された事から、二重分岐構造の部分も存在するものと考えられる。更に、画分間に量的な差異も認められるが、 $\alpha$ -1.3、 $\alpha$ -1.2結合より成る連鎖部分(直鎖構造)も存在し、非還元末端の割合も一般の多糖に比べて極めて高い値を示すことから、枝分れ構造に富んだ複雑な形のものであることが考えられる。(2)

これらの構造分析の知見は、C-13、proton NMRによる解析結果とも良く一致するものであった。(3)

### III B-1299デキストラン合成酵素に関する研究

#### 1) 方法及び結果

##### (a) 酵素活性の分布と誘導性

L. mesenteroides NRR L B-1299株を2% sucroseを含む培地で培養すると、デキストラン合成酵素(dextranucrase)活性は12~18hrで最大に達した。酵素活性は培養液の遠心分離後の上清区分と沈殿区分(菌体区分)の両方に認められたが、全活性としては約3:2の割合で菌体区分に強く認められた。次に炭素源をsucroseから2% glucoseに変えて酵素活性を検討したところ、活性はsucroseを基質とした時のみ発現することが認められた。それ故、本菌株の合成酵素もL. mesenteroides NRR L B-512株と同様に誘導酵素であることが分った。

##### (b) 菌体外酵素(EE)の精製と性質

培養液上清から30~70%硫酸飽和画分に約70%の酵素活性が得られ、次いでhydroxyapatiteによる吸着と段階溶出により、活性は0.3M phosphate buffer pH 5.4にて溶出された。この画分を更にDEAE-cellulose columnに充填し、0~0.4M NaCl濃度勾配で溶出すると、活性は2~5ピークに分離して溶出された。

(Fig. 2) 0.1 M NaClで最初に溶出するピーク (EEp. 1) と、最後に 0.35 M NaClで溶出されるピーク (EEp. 2) についての反応の至適温度、至適 pH はそれぞれ、35°C, pH 5.2 及び 4.0°C, pH 6.0~6.7 であった。前者は pH 4.9~6.7, 33°C 以下で 80% 以上の活性が残存するが後者では pH 5.5~7.8, 40°C 以下で残存活性 80% の安定性が認められた。

(c) 菌体内酵素 (IE) の可溶化、精製及び性質

培養液の 8000 x g, 30 分遠心分離後の菌体を乳鉢磨碎 lysozyme 消化及び DOC 抽出法により順次溶出して得られた可溶化酵素画分は供試菌体の全活性の 41% を有した。又、これらの可溶化処理を経ても顆粒画分に残存する酵素活性 (BE) は 42% であることから、ほぼ等量の活性が可溶化されることが分った。

この様にして調製した IE は、hydroxyapatite 吸着により精製した後、DEAE-cellulose column に充填し、これを 0.1~0.4 M NaCl 濃度勾配で溶出すると、0.15, 0.3 M 付近で 2 ピークが溶出された。(Fig. 3) 前者 (IEp. 1) は至適温度 35~40°C、至適 pH 5.3~5.7 で、後者 (IEp. 2) は 45°C, pH 6.0~6.8 が最適条件であった。

両者は熱安定性の点では殆ど差が見られず、40°C で 90% の残存活性を有するが、pH 4.7~6.6 及び 5.2~7.2 付近で夫々の活性の 80% が保持された。

(d) disc 電気泳動による isoenzyme の検討

菌体外 (EE) 及び菌体内 (IE) デキストラン合成酵素は DEAE-cellulose column chromatography によって、EE は 2~5 ピーク、IE は 2 ピークに分離したが、この様に分画される各酵素画分の意義を調べる目的で disc 電気泳動による isoenzyme 型の検討を行った。

Hedrick-Smith 法に従って、異ったゲル濃度での各種酵素活性の泳動度をその分子量との相関でプロットした結果、IEp 1, p 2 は同分子量 (74,000) で charge isomer group に属する型の isoenzyme であることが分った (Fig. 4)。一方、EE では、column chromatography の条件以外の factor により、2~5 ピークに分離するものと考えられるが、この場合の各ピークは、サブユニット構造をとる各画分の混合物として溶出されて来ており、DEAE-column で最後に溶出するピークが分子量 42,000 の monomer (EEp. 2) で、最初に溶出するピークは分子量 45 万以上の会合体 (EEp. 1) であった。

泳動度のプロットから、両型の間には 83,000 (dimer)、127,000 (trimer)

も存在し、更に、分子量169000、212000、などの画分も存在することが推定された。

#### (e) 酵素合成デキストランの構造

DEAE-cellulose により分離精製した EEp. 1、EEp. 2、IEp. 1及びIEp. 2 を用いて、12.5% sucrose を基質として24 hr 反応を行った後、常法により合成多糖標品を得た。水溶性多糖は総ての酵素標品で合成されたが、不溶性多糖の生成は EEp. 2、IEp. 2 では認められなかった。これらの酵素合成多糖は部分酸水解によって isomaltose-series ( $\alpha$ -1.6 結合) のオリゴ糖を与えることから、菌の培養によって調製したデキストランと同様に  $\alpha$ -1.6 結合を主鎖とする構造を持つものと考えられる。

又、定性的には、加酢分解の結果から、Kojibiose ( $\alpha$ -1.2) は明瞭に検出されるのに対して、Nigerose ( $\alpha$ -1.3) の含量が低いことが注目される。

これら酵素合成デキストランについて  $\alpha$ -1.6-glucan の水解酵素である dextranase を用いて測定した被分解性の点でも、直接培養法で調製したデキストランとの差異が認められた。

## 2) 考 察

H. M. Tsuchiya ら NRRL グループによって着手された dextransucrase の研究は主として  $\alpha$ -1.6 結合を95%含む L. mesenteroides NRRL-B-512 株の菌体外酵素を材料として行なわれ、この酵素の基質特異性、諸性質、反応機構などが検討され、今日の基礎となる知見が積重ねられた。

NRRL-B-1299 株のデキストラン合成酵素活性は、glucose 培地では現れず、sucrose によってのみ認められることから、B-512 株と同様に誘導酵素であると考えられる。活性分布は菌体区分が上清区分より高く3:2の分布比を示した。

EE を硫酸分画、hydroxyapatite 吸着によって精製し、DEAE-cellulose column にかけると2~5ピークに分離した(5)。2ピークで溶出した場合の活性画分を EEp. 1、EEp. 2 とし、disc 電気泳動法により、5ピークで溶出した場合と比較した実験結果から、EE はオリゴメリックな酵素で EEp. 2 が単量体 (MW 42000) であることが分かった。EEp. 1 は、移動度—ゲル濃度のプロットから会合体であることが推定されるが、デキストランなど他の成分と結合した形のものであることも考えられ、更に、5ピークに溶出された場合の中間の3ピークは各種オリゴマーの混合型と考えられる。

B-1299 株については顆粒酵素を用いた E. E. Smith (1970) の菌体酵素の報告

があるが、本研究に於ては、可溶性酵素の調製及びその精製、性質を検討した。(4)

I E は E E と同様の分離、精製によって 2 ピーク (I E p. 1, I E p. 2) を与え、還元力で測定した結果では常に I E p. 2 より高い活性が認められた。両者は分子量 74,000 の charge isomer であり、pH 7.5 Gel では I E p. 2 の移動度の方が高く、殆ど BPB marker 付近まで泳動された。至適温度、pH については、E E p. 1 と I E p. 1 が類似しており 35°C、pH 5.2 付近にあるのに対し、E E p. 2、I E p. 2 では 40°C、pH 6.0 付近に見られた。

一方、酵素作用の点でも、E E p. 2、I E p. 2 が不溶性デキストランを生成しないという共通性が認められたが、その詳細を解明する事は今後の課題になるであろう。又、E E p. 1、I E p. 1 はともに不溶性デキストランをも同時に生成するが、水溶性デキストランとの生成比や dextranase による被分解率の違いなどの理由から酵素作用の点では何らかの差異があるものと考えられる。

#### IV 総括

L. mesenteroides NRRL B-1299 株の生産するデキストランは、他菌株のデキストランに比べて  $\alpha$ -1.3、 $\alpha$ -1.2 結合含量が異常に高いという特徴を以つて知られていたが、その微細構造に関する研究成果はわずかに加酢分解物から Kojibiose、Nigerose 他のオリゴ糖の分離同定が本研究室の山内ら及び Hehre らによって報告されたのみであった。

本研究ではメチル化分析等の方法で B-1299 デキストランの構造を検討し、 $\alpha$ -1.2 結合の多くは分岐点を形成しているものであるが、一部直鎖状構造の部分にも含まれている事、水不溶性のデキストランには  $\alpha$ -1.3 の分岐点及び  $\alpha$ -1.3 直鎖部分が水溶性のものより多い事を明かにした。更に、平均鎖長 (CL) 3~4 の値をとることから、非還元末端分子の数が多く極めて分岐度の高い構造をとる事が分った。

又、本研究の完了と相前後して E. J. Bourne らにより B-1299 デキストラン L・S 画分に関する構造研究の報告が提出されたが、その大要に於て本実験の結果との矛盾はなく、分画法、サンプルの均一性、メチル化分析のフラグメントの同定などの点では、より詳細な知見が本研究を通して得られた。

次に、このような特異な構造を有するデキストランの酵素合成の機作を明かにする目的で B-1299 株のデキストラン合成酵素系について検討した。分岐点を生成する酵素及び hetero-linkage ( $\alpha$ -1.3、 $\alpha$ -1.2) を生成する酵素系の存在などの観点から

実験を進め、他菌株の dextranucrase とは多くの点で異った知見が得られた。酵素活性が sucrose なしでは発現しないという点は他の L. mesenteroides 株と一致するが、精製の過程で isoenzymes に分離されることが分った。disc 電気泳動による解析の結果から、I E については MW 74000 の charge isomer であり、E E は MW 42000 の monomer を基本とするオリゴメリックな酵素である事が分った。dextranucrase の isoenzyme に関する知見は L. mesenteroides では全く報告がないが、cariogenic bacteria の Streptococcus mutans による  $\alpha$ -1,6、 $\alpha$ -1,3-glucan の合成酵素が等電点電気泳動法により、isoenzymes に分離すると報告がある。

近年、多糖の生合成、分解経路に於ても、他の分野と同様に isoenzymes に関する知見が数多く報告されており、これらの isoenzymes は多糖の生合成、代謝反応の調節の役割をにやうなものとして、今後の研究に期待されるところが大きい。

文献)

- (1) Fractionation of the Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299 Dextran and Preliminary Characterization of the Fractions.  
M. Kobayashi, K. Shishido, T. Kikuchi and K. Matsuda  
Agr. Biol. Chem., 37, 357-365 (1973)
- (2) Methylation Analysis of the Fractions from  
Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299 Dextran.  
M. Kobayashi, K. Shishido, T. Kikuchi and K. Matsuda  
Agr. Biol. Chem., 37, (1973). 印刷中
- (3) Structural Determination of Water-Soluble Dextran  
by C-13 and proton NMR Spectroscopy.  
T. Usui, M. Kobayashi, N. Yamaoka, K. Matsuda  
K. Tuzimura, H. Sugiyama and S. Seto  
Tetrahedron letters, 3397-3400 (1973)
- (4) 農化大会講演要旨・1972年4月(仙台). P. 396  
小林 幹彦・松田 和雄
- (5) 農化大会講演要旨・1973年4月(東京). P. 200  
小林 幹彦・松田 和雄



参考論文)

\* Extracellular Polysaccharide from Escherichia  
Sp. Strain No. 1768.

T. Watanabe, M. Kobayashi, M. Seguchi, M. Shida,  
K. Matsuda, T. Ando and A. Nagata.

J. Ferment. Technol., 51, 415-422 (1973) .

Fig. 1

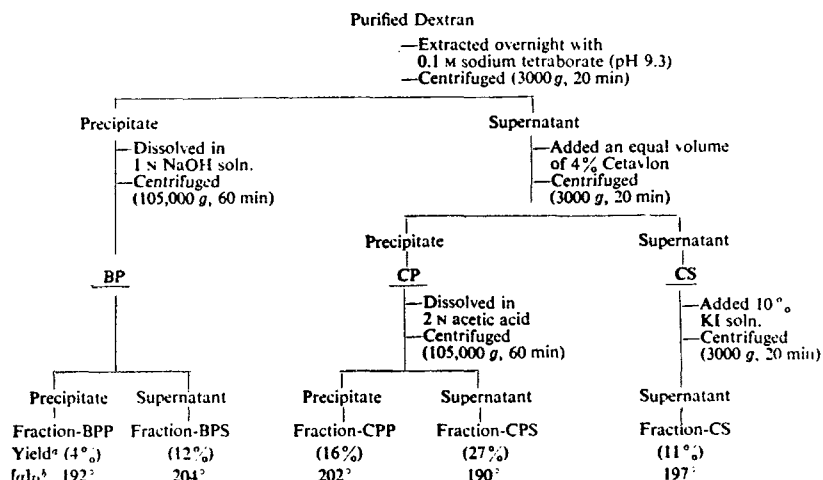


FIG. 1. Fractionation of the Purified Dextran.

<sup>a</sup>: Values are based on seven experiments.

<sup>b</sup>: Optical rotations were measured at c 1.0 in 1 N NaOH.

Table I

Proportions of the Methyl-D-glucoses in the Degradation  
 Products of the Methylated Dextrans

O-Methyl-D-glucose	Mode of Linkage	MOLE (%) OF LINKAGE				
		BPP	BPS	CPP	CPS	CS
2,3,4,6-Tetra	$G^1$	25.5	24.6	30.0	35.7	37.1
3,4,6-Tri	$2G^1$	--	5.0	4.6	9.0	1.6
2,4,6-Tri	$3G^1$	19.9	24.1	11.0	1.5	5.0
2,3,4-Tri	$4G^1$	27.0	16.7	24.4	17.1	28.4
2,4-Di	$\frac{5}{3}G^1$	1.6	4.1	--	--	--
3,4-Di	$\frac{6}{2}G^1$	23.6	19.1	28.2	26.9	20.4
4-Mono	$\frac{8}{2}G^1$	2.4	6.4	1.8	9.8	7.5
Methoxyl content(%)		44.3	45.0	44.4	43.6	42.8
[α] <sub>D</sub> (a)		--	196.0	--	196.5	192.0

(a) Optical rotations of the methylated dextran fractions were measured at c 0.5 in chloroform.

Fig. 2

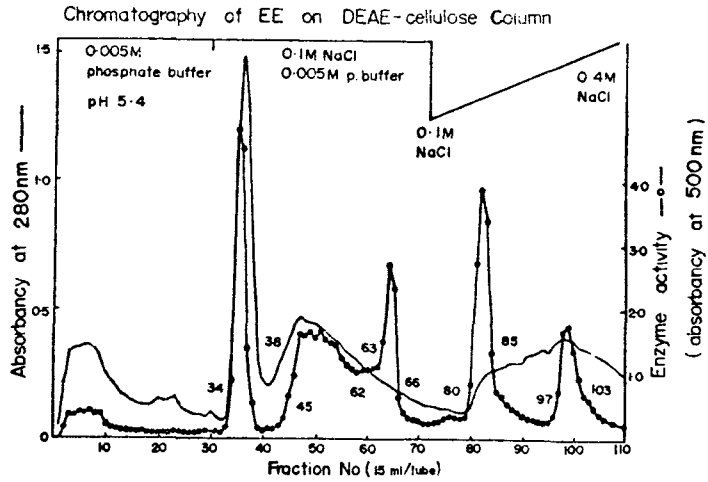


Fig. 3

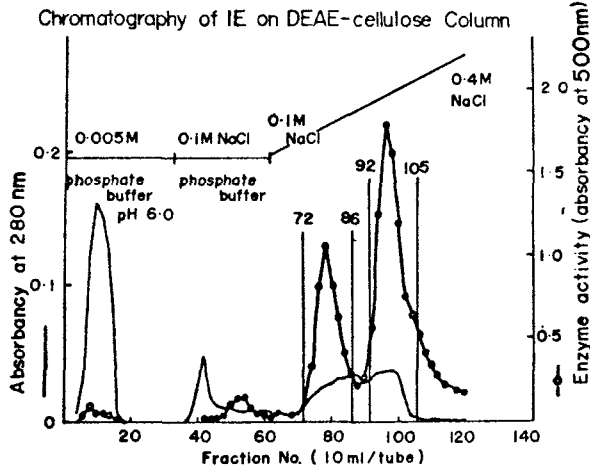
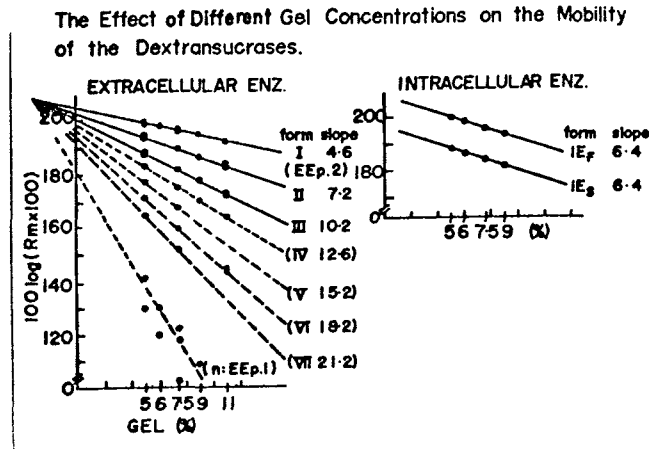


Fig. 4



## 審 査 結 果 の 要 旨

ヘテロ乳酸菌の一種である *Leuconostoc mesenteroides* はシヨ糖を炭素源として培養すると、菌体外に著量の多糖（デキストラン）を生産する。この多糖は、D-glucose を構成単位とするが、その結合様式は主として  $\alpha$ -1, 6 結合であり、菌株によっては  $\alpha$ -1, 4 ;  $\alpha$ -1, 3 ;  $\alpha$ -1, 2 等の副結合も存在することが知られている。

*L. mesenteroides* NRRL B. 1299 のデキストランは、 $\alpha$ -1, 3 ;  $\alpha$ -1, 2 結合の含量が高く、免疫的にも特異な性質を示すものである。しかし、その化学構造に関しては知見が少なく、多くの不明な点があった。

本研究では、B-1299 株のデキストランが成分的に不均一なものであることを確認し、各種分画法の併用により、これを超遠心、電気泳動的に均一な五画分に分離する方法を確立した。これらの画分には、ゲル濾過等により分子量15~20万の画分（GPS, BPS）と200万以上の画分（CPP, BPP, CS）とが存在し、画分間には、部分分解法、過ヨウ素酸々化法及び concanavalin A との沈降反応パターンの比較から、構造上の差異のあることが示唆された。更に、メチル分析法及び加酢分解物の同定が試みられた結果、各画分に含有量の高い  $\alpha$ -1, 2 結合は主として分岐点を構成しており、一部は直鎖構造としても存在すること、 $\alpha$ -1, 3 結合は主として直鎖構造を形成しており、その含量の多少がデキストランの水溶性に影響を与えることを認めた。又、2重分岐構造も存在することから、各画分とも極めて複雑な高分岐構造のものであると結論づけられた。

デキストランの生合成に関する研究は1950年代より進められ、この反応を触媒する酵素は dextranucrase (EC 2, 4, 1, 5) と名付けられているが、分岐点の形成を触媒する分岐酵素の存在等に関しては明確な結論が得られていない。そこで、本菌株のように高分岐構造のデキストランが合成される機構を明らかにすることを目的として更に研究を進めた。

本菌株の dextranucrase はシヨ糖による誘導性の酵素で、培養液上清と沈澱の菌体区分とに活性が認められた。菌体外酵素は DEAE セルロースカラムにより2~5個のピークに分離し、サブユニット構造のものであることが明らかにされた。菌体区分から可溶化処理によって調製した菌体内酵素は2画分に分離し、等分子量で荷電状態の異なるアイソザイムであることが示された。各酵素画分はその至適作用条件を異にし、 $K_m$  値にも差異が認められた。更に、これらの酵素により合成された多糖は、相互に構成オリゴ糖の差異、水溶性の違いなどが認められたことから、個々のアイソザイムがデキストランの合成反応の中で異なる役割を持っていていものと推定された。

このようなアイソザイムは *Streptococcus* 属の醗触性菌株に存在することが報告されているが、*Leuconostoc* のデキストラン生産菌株の合成酵素に関しては他に報告がないことから、以上の結果は高分岐デキストランの生合成を検討する上で極めて興味深い現象と考えられる。

以上の研究成果に対して審査員一同は農学博士の学位を授与するに充分値いすると判定した。