

***Bacillus* sp. BS-0001が生産する酸性多糖について**

田寺謙次郎・中渡瀬久成・帖地美樹・溝神 妙

南 雄二・野口勝憲*

(生分子機能学研究室)

平成12年8月25日 受理

Studies on Acidic Polysaccharides Produced by *Bacillus* sp. BS-0001

Kenjiro TADERA, Hisanari NAKAWATASE, Miki CHOCHI,
Tae MIZOKAMI, Yuji MINAMI, and Katsunori NOGUCHI*
(Laboratory of Biochemistry and Nutritional Chemistry)

緒 言

Bacillus sp. BS-0001は土壌から新たに見い出された菌株で、培養液中に広い抗菌スペクトルを示す抗菌性物質と粘性物質を分泌する。前者は、赤外線スペクトル、二次イオン質量スペクトル、核磁気共鳴スペクトルおよび加水分解物の同定結果等からEM-49と呼ばれている抗生物質と考えられる(未発表)。本報告では、粘性を示す酸性多糖(AP)の精製、糖組成、その諸性質およびいくつかの酵素に対する阻害/活性化作用について述べる。

材 料 と 方 法

1. 試 薬

牛肉エキス、ペプトンおよび酵母エキスはディフコラボラトリーズ社、ダウエックス50W×8と1×4はダウケミカル社、透析膜(MWCO:2000)はスペクトラムメディカルインダストリーズ社、酵母 α -グルコシダーゼはオリエンタル酵母工業(株)、馬鈴薯酸性ホスファターゼおよびグルコース/ガラクトース定量用(酵素法)F-キットはベーリンガーマンハイム社、牛乳と小麦胚芽酸性ホスファターゼ、牛小腸アルカリホスファターゼ、豚胃粘膜ペプシンおよびペクチン酸はシグマ社、苦扁桃 β -グルコシダーゼ、*p*-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド、*p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド、

ペクチン(柑橘類)、コンドロイチン硫酸Aナトリウムおよびカラゲナンはナカライテスク(株)、*p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムは和光純薬工業(株)、N-アセチル-L-フェニルアラニン-3,5-ジヨード-L-チロシンはアクロスオーガニックス社、セパラックス酢酸セルロース膜は富士写真フィルム(株)、フナセルSF(セルロース薄層プレート)はフナコシ(株)、シリカゲルG/アルミニウム薄層プレートはワットマン社よりそれぞれ購入した。その他の試薬は、市販の特級製品を用いた。

2. 培地と使用菌株

グルコース10g、ペプトン5g、酵母エキス3gおよび牛肉エキス3gを蒸留水で1lに調整(pH6.8)後、120℃、20分間殺菌し、これを基本培地とした。菌株の保存は、寒天(20g/l)を含む基本培地に*Bacillus* sp. BS-0001を植え継いだ。

3. 培 養

菌株を基本培地5mlに植えて30℃、2日間静置培養した種培養液を、500ml容坂口フラスコに張り込んだ基本培地95mlに無菌的に接種し、30℃、6日間回転振とう培養した。

4. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量の分析

スーパーロース12カラムのかわりにスーパーロース6カラムを用い、Kitaharaらの方法⁸⁾に従って分析した。

*片倉チッカリン(株)筑波総合研究所 土浦市並木5丁目5511
(Tsukuba Research Institute, Katakura Chikkarin Co.
Ltd. Namiki 5-5511, Tsuchiura)

5. 相対粘度の測定

オストワルド型毛管粘度計を用いて、25℃における相対粘度を測定した。

6. 酢酸セルロース膜電気泳動

支持体にセパラックス酢酸セルロース膜 (6×12 cm)、緩衝液に10%ピリジン/0.3%酢酸/50mMエチレンジアミン四酢酸四ナトリウム (pH 6.5) を使用し、5 mA の定電流で20分間泳動を行った。酸性多糖の染色には0.5%トルイジンブルー/1%酢酸を使用した。

7. 高性能アニオン交換クロマトグラフィーによる単糖類の分析

単糖類の定性および定量分析は、Salvador らの方法¹⁰⁾によった。

8. AP の加水分解と構成糖の分画

AP 15mg を 2 M トリフルオロ酢酸 (TFA) 2 ml に溶解し、110℃、5 時間 (最適反応時間) 加水分解した後、加水分解液を減圧下で濃縮乾固した。乾固物を蒸留水に溶解して 1 ml に定容し、その 0.3 ml は薄層クロマトグラフィー (TLC) および単糖類の定量分析に使用した。残りの 0.7 ml はダウエックス 50W×8(H⁺) と 1×4 (AcO⁻) を充填した小カラムに通した後、カラムを蒸留水で洗浄した。水洗液を濃縮し、中性糖画分とした。水洗後のダウエックス 1×4 (AcO⁻) をカラムから取り出して 0.5 M 酢酸で溶出した後、溶出液を濃縮し、これをウロン酸画分とした。また、アミノ糖を分析するために、AP 10 mg を 4 N 塩酸 2 ml に溶解した後、窒素ガス置換を行い、100℃、8 時間加水分解した。加水分解液の濃縮乾固をくり返し行った後、一部を TLC に使用し、残りをダウエックス 50W×8 (H⁺) の小カラムに供した。0.3 N 塩酸溶出液を濃縮し、これをアミノ糖画分とした。

9. 糖の定量

AP の TFA 加水分解物中のグルコースとガラクトースは F-キットを用いる酵素法、アミノ糖はエルソン-モルガン法⁵⁾によって定量した。全ヘキソースとガラクトツロン酸は、AP を加水分解せず直接にそれぞれアンスロン-硫酸反応⁴⁾とカルバゾール-硫酸反応³⁾を行って定量した。

10. タンパク質の定量

Lowry 法⁶⁾によった。

11. 酵素の阻害実験

(1) 酸性ホスファターゼ

20 mM *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム 100 μl, 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) 200 μl および AP または各種酸性多糖水溶液 80 μl (対照区では蒸留水) からなる反応混液を 30℃、5 分間保温した後、酸性ホスファターゼ溶液 20 μl を加えて 30℃、5 分間酵素反応を行った。反応終了後、0.05 N 水酸化ナトリウム 3 ml を添加して、生成した *p*-ニトロフェノールを 410 nm で測定した。なお、酵素量は対照区において 0.4~0.5 の吸光度を与える量とした。

(2) アルカリホスファターゼ

酵素は牛小腸アルカリホスファターゼ、緩衝液は 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.8) を使用し、酸性ホスファターゼと同様の反応を行った。

(3) α-グルコシダーゼ

酵素は酵母 α-グルコシダーゼ、基質は 10 mM *p*-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド、緩衝液は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) を使用し、酸性ホスファターゼと同様の反応を行った。

(4) β-グルコシダーゼ

酵素は苦扁桃 β-グルコシダーゼ、基質は 16 mM *p*-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを使用し、酸性ホスファターゼと同様の反応を行った。

(5) ペプシン

Rick と Fritsch⁹⁾の方法によった。すなわち、0.16 mM *N*-アセチル-L-フェニルアラニル-L-3,5-ジヨードチロシン 1.0 ml および AP または各種酸性多糖水溶液 (対照区では蒸留水) 0.25 ml の反応混液を 37℃、5 分間保温した後、ペプシンの 0.01 N 塩酸溶液 0.1 ml (酵素 0.15 mg を含有) を添加して 37℃、10 分間酵素反応を行った。反応生成物はニンヒドリン法によって分析した。

実験結果と考察

1. AP の精製

培養 6 日目の培養液 (2.41) を 12,000 rpm、20 分間遠心分離して菌体を除いた。上澄みに 3 倍容のエタノールを加えて攪拌、生成した沈澱をろ過した後、沈澱をエタノール、エーテルで順次洗浄し、乾燥物 0.30 g を得た。これを 300 ml の蒸留水に溶解した後、遠心分離し、上澄みに 5 倍容のエタノールを添

加した。沈澱を促進するために飽和食塩水 3 ml を加えて一夜静置した。沈澱をろ過し、エタノール、エーテルで洗浄し、乾燥物 0.24 g を得た。

これを 10 mM 酢酸ナトリウム 240 ml に溶解し、さらにセチルトリメチルアンモニウムブロミド 720 mg を含む 10 mM 酢酸ナトリウム 15 ml を添加し、30℃ に一夜静置した。沈澱は遠心分離で集め、5% 食塩水 240 ml に溶解した後、5 倍容のエタノールを添加して一夜静置した。生成した沈澱をろ過し、エタノール、エーテルで洗浄して AP 200 mg を得た。これを少量の蒸留水に溶解し、ダウエックス 50 W × 8 (H⁺) カラム (1 × 10 cm) に供した。カラムに蒸留水を流し、溶出された画分を減圧濃縮した後、排除限界分子量 2000 の透析膜で蒸留水 3 l に対して 2 日間透析した。その間、蒸留水は 12 時間毎に新しいものに取り替えた。透析液を凍結乾燥し、AP (H 型) 140 mg を得た。その赤外線スペクトルには多糖類に特徴的な吸収帯に加えて、1720 cm⁻¹ にカルボキシル基を示す吸収帯が認められ、AP が酸性多糖であることを示している。以下に AP の諸性質、構成糖およびいくつかの酵素に対する作用について述べる。

2. AP の不均一性

AP にタンパク質が混在しないことを Lowry 法⁶⁾によって確認した。また、AP の酢酸セルロース膜電気泳動を行った結果、陽極側に 1 個のスポットが検出された。ペクチン酸に対する相対移動度は 0.42 であった。

AP のスーパーロース 6 / セファデックス G-25 ゲルろ過クロマトグラムを Fig. 1 に示す。A は各種分子量のアミロースの保持時間と分子量の関係を示す。AP のクロマトグラム (B) には、分子量約 1 万から約 27 万にかけて幅広いピークが、さらにポイドボリュームの位置に大きなピークが認められた。従って、AP は広範囲にわたりさまざまな分子量をもつ酸性多糖の混合物であることが分かった。

3. AP の相対粘度

AP の相対粘度と濃度の関係をカラゲナンのそれと比較した。AP の水に対する相対粘度は濃度にはほとんど依存せず、溶解度の上限である 0.2% ではカラゲナンの約 1/6 で、著しく低かった。

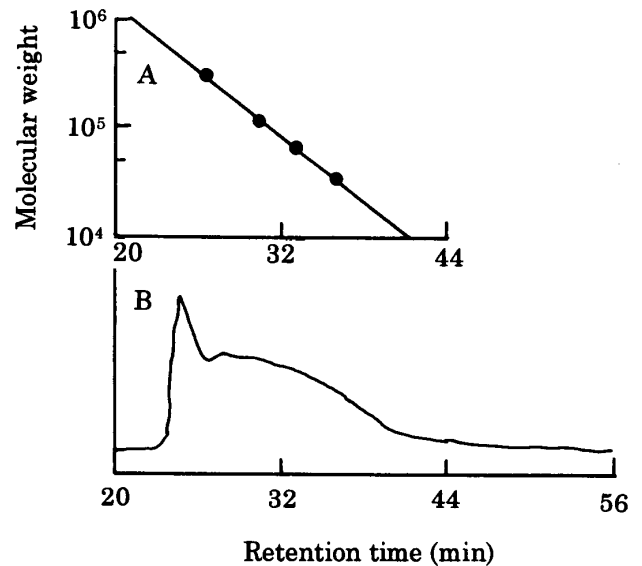


Fig. 1. Gel-permeation chromatogram of AP.

A sample was injected onto a HPLC (Tosoh). Two sequentially linked columns of Superose 6 (1 × 30 cm, Pharmacia) and Sephadex G-25 (1 × 30 cm, Pharmacia) were eluted with 100 mM phosphate buffer (pH 6.2) containing 0.02% sodium azide at a flow rate of 0.7 ml/min at 40°C. The eluate was monitored by an RI detector (Tosoh RI-8022).

A, relationship between molecular weight of amylose and retention time. B, AP.

4. AP の構成糖

AP の TFA 加水分解物、その中性糖画分とウロン酸画分をシリカゲル TLC で分析した (Table 1)。加水分解物に 4 個、中性糖画分に 3 個、ウロン酸画分に 1 個のカルバゾール-硫酸試薬¹⁾に陽性のスポットが検出された。スポットの R_f 値から、これら 4 種の単糖はグルコース、ガラクトース、フコースおよびガラクトン酸であることが分かった。また、AP の TFA 加水分解物の高性能アニオン交換クロマトグラム (Fig. 2) には 4 本のピークが認められた。それらは保持時間からフコース、ガラクトース、グルコースおよびガラクトン酸と同定された。それらのピーク面積から計算した組成値を、全ヘキソース、グルコース、ガラクトース値とともに Table 2 に示す。なお、ガラクトン酸は酸に不安定であり、TFA 加水分解中に、AP から遊離されたガラクトン酸の一部が分解されると考えられたので、多糖そのものをカルバゾール-硫酸法³⁾で分析し、その結果も併せ示した。

さらに、AP の塩酸加水分解物およびそのアミノ糖画分について Table 1 の展開溶媒を用いてシリカ

Table 1. Rf values on silica gel G thin-layer chromatograms of TFA hydrolysate of AP, and its neutral sugar and uronic acid fractions*

Sample	Solvent		
	1	2	3
TFA hydrolysate of AP	0.12, 0.30, 0.33, 0.48	0.51, 0.55, 0.57, 0.60	0.26, 0.56, 0.65, 0.69
Neutral sugar fraction	0.30, 0.33, 0.48	0.55, 0.57, 0.60	0.56, 0.65, 0.69
Uronic acid fraction	0.12	0.51	0.26
Glucose	0.30	0.57	0.65
Galactose	0.33	0.55	0.56
Fucose	0.48	0.60	0.69
Mannose	0.40	0.58	0.64
Xylose	0.51	0.61	0.69
Galacturonic acid	0.12	0.51	0.26

*Detected by carbazole-sulfuric acid reagent.

Solvent 1: *n*-propanol/ammonia/water (6:2:1)

2: *n*-butanol/acetic acid/water (6:4:3)

3: *n*-butanol/pyridine/water (6:4:3)

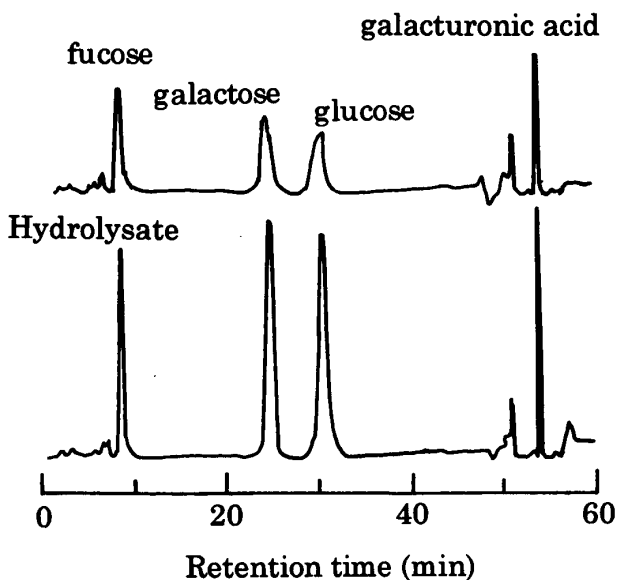


Fig. 2. High-performance anion exchange chromatogram of TFA hydrolysate of AP.

A sample was injected onto a Dionex DX-500 Bio-LC system with a pulsed amperometric detector (Nippon Dionex K. K.). A CarboPac PA 10 column (4x250 mm, Nippon Dionex K. K.) was eluted at a flow rate of 0.8 ml/min at room temperature. Neutral monosaccharides were eluted with 0.5 mM sodium hydroxide, and then galacturonic acid with 125 mM sodium acetate in 200 mM sodium hydroxide.

Upper, specimens of monosaccharides.

Lower, TFA hydrolysate of AP.

Table 2. Sugar composition of AP (mg/mg AP)

Analytical method	Glucose	Galactose	Fucose	Galacturonic acid	Total hexose ^{*1}
For TFA hydrolysate of AP					
HPLC ^{*2}	0.25	0.21	0.07	0.15	
Enzymatic	0.24	0.20			
For AP					
Anthrone-sulfuric acid					0.5
Carbazole-sulfuric acid				0.19	

^{*1} Determined as glucose.

^{*2} High-performance anion exchange chromatography.

ゲル TLC を行った。カルバゾール-硫酸試薬¹⁾およびニンヒドリン試薬²⁾に陽性のスポットは検出されなかった。さらに、アミノ糖画分をエルソン-モルガン法⁵⁾で定量したが、アミノ糖含量はゼロであった。これらの結果は、アミノ糖は AP の構成成分でないことを示している。

TFA 加水分解物およびウロン酸画分について、Table 1 に示した展開溶媒を用いてセルロース TLC を行った後、pH 試薬のプロモフェノールブルーを噴霧して有機酸の検索を行ったが、ガラクトロン酸の他にはスポットを検出することができなかった。乳酸やフマル酸などの有機酸を構成成分とする多糖は多数知られているが、AP は不揮発性の有機酸を構成成分として含まない。AP の赤外線スペクトルにエステルカルボニルの吸収帯 (約 1740 cm⁻¹) が認められないことは、上記の結論を支持している。

以上の結果をまとめると、AP はグルコース、ガラクトース、フコースおよびガラクトロン酸の 4 種類の単糖類 (モル比, 7:6:2:5.5) から構成される広範囲の分子量をもつ酸性多糖の混合物である。

5. 酵素の阻害/活性化

大豆の酸性多糖とペクチン酸は馬鈴薯酸性ホスファターゼを阻害する¹¹⁾ので、酸性多糖のひとつである AP も馬鈴薯酸性ホスファターゼを阻害するのではないかと考えた。Fig. 3 に示されるように、AP は本酵素を阻害し、その阻害はペクチン、ペクチン酸およびコンドロイチン硫酸 A に比べて顕著であった。図に示していないが、AP およびペクチンの構成糖であるガラクトロン酸は阻害作用を示さなかった。一方、牛小腸アルカリホスファターゼは、これら 4 種の多糖によって全く阻害されなかった。

AP, ペクチン酸およびコンドロイチン硫酸 A に

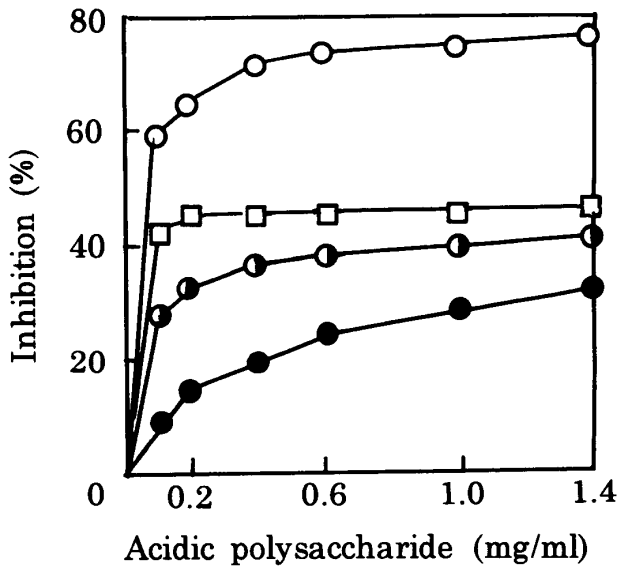


Fig. 3. Inhibition of potato acid phosphatase by acidic polysaccharides.
○, AP. ●, pectic acid. ●, pectin.
□, chondroitin sulfate A.

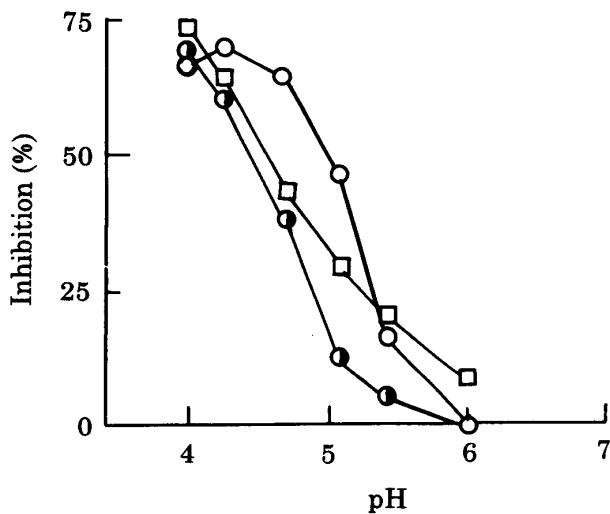


Fig. 4. Effect of pH on inhibition of potato acid phosphatase by 0.4 mg/ml of acidic polysaccharides.
○, AP. ●, pectic acid. □, chondroitin sulfate A. Acetate buffer (0.2 M) was used to adjust pH of a reaction mixture.

よる馬鈴薯酸性ホスファターゼの阻害と pH の関係を Fig. 4 に示す。いずれの酸性多糖においても阻害は pH 4.0 で強く、pH が高くなるとともに弱くなり、pH 6.0 ではほとんど認められなかった。

次に、酸性域に至適 pH を示す酵素の代表例とし

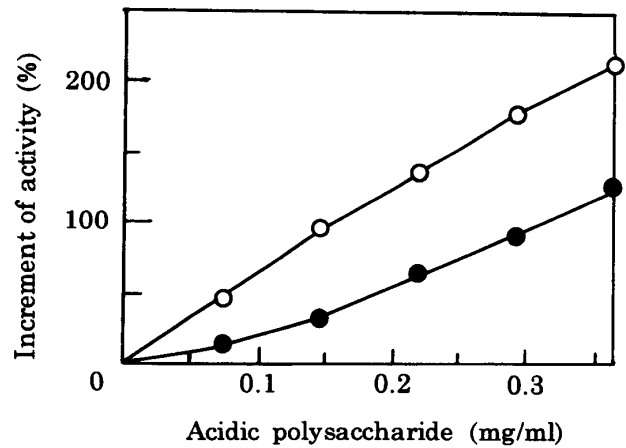


Fig. 5. Activation of pepsin from porcine stomach mucosa by acidic polysaccharides.
○, AP. ●, pectin

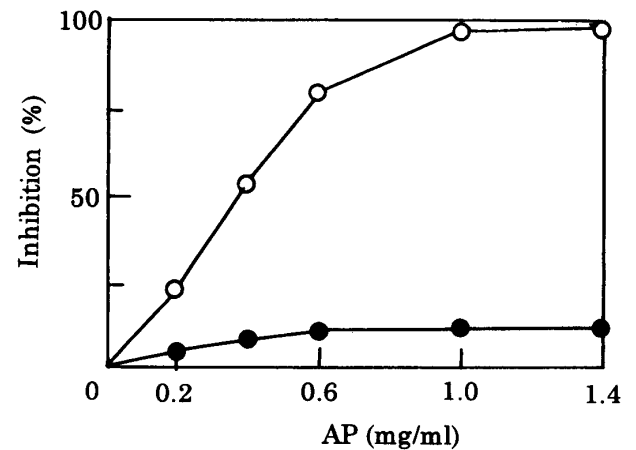


Fig. 6. Effect of AP on yeast α -glucosidase activity. Reaction was carried out at pH 4.7 (○) or 6.8 (●) in the presence of AP.

てペプシンを選び、AP とペクチンの作用を調べた。酸性ホスファターゼの場合とは異なり、AP は豚胃粘膜ペプシンを顕著に活性化した (Fig. 5)。ペクチンも AP には及ばないが活性化作用を示した。0.36 mg/ml 濃度において前者は約200%、後者は約100%の活性化を示した。酸性多糖によるペプシンの活性化は初めての知見である。

酵母 α -グルコシダーゼは、至適 pH 6.8 では AP によってほとんど阻害されなかったが、pH 4.7 ではほぼ完全に阻害された (Fig. 6)。前述の馬鈴薯酸性ホスファターゼと同様、阻害は pH に依存し、pH 6 以上では阻害は認められなかった。

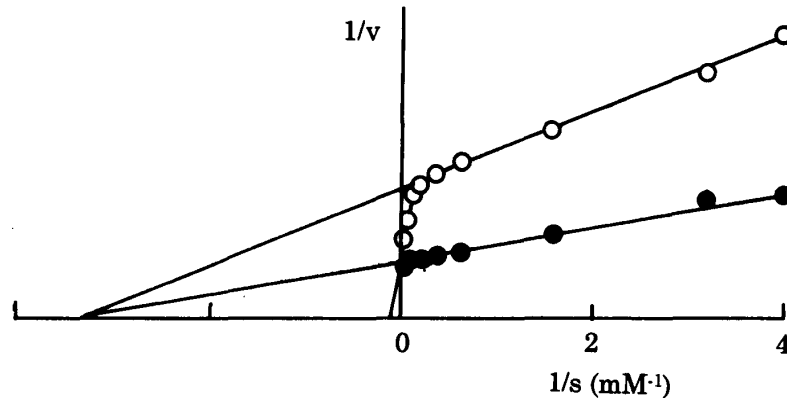


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of potato acid phosphatase.

●, in the absence of AP. ○, in the presence of 0.2 mg/ml of AP.

以上の実験結果を併せ考えると、酸性側では酵素と酸性多糖（APやペクチン等）との間に主にイオン結合によって複合体が形成され、その結果、酵素が阻害もしくは活性化されたと推測される。APの酸性ホスファターゼ阻害の機構を知るために動力学的検討を行った（Fig. 7）。Lineweaver-Burkプロットは曲線を描き、基質の低濃度域では非拮抗阻害、高濃度域では拮抗阻害を示し、阻害機構を明確に説明することはできない。

一方、 β -グルコシダーゼでは、その活性はAP、ペクチン、ペクチン酸およびコンドロイチン硫酸Aの存在によって全く影響を受けなかった。

Hummelら⁷⁾は、コンドロイチン硫酸Aは前立腺酸性ホスファターゼを全く阻害しないと報告している。我々の実験では、コンドロイチン硫酸Aは、Fig. 3に示されるように、馬鈴薯酸性ホスファターゼを約45%阻害した。また、AP（0.4 mg/ml）による酸性ホスファターゼの阻害率は、馬鈴薯酵素では約70%であったが、牛乳および小麦胚芽酵素においては24%にすぎなかった。このように、同じ反応を触媒する酵素であっても、その起源によって阻害率が著しく異なることは、酵素間に構造上の差異があることを示唆している。

馬鈴薯酸性ホスファターゼに対する阻害率がAP、ペクチン、ペクチン酸、コンドロイチン硫酸Aにおいて異なること（Fig. 3）は、酸性多糖の分子量、電荷や構造も複合体の形成もしくは阻害率に影響することを示唆している。今回精製されたAPは分子量的に不均一であるので、どの分子量のものが酵素と最も強く作用したかは今後の課題である。

要 約

土壌から単離された新菌株 *Bacillus* sp. BS-0001 が生産する酸性多糖（AP）を精製した。得られた標品は分子量的に不均一であり、1万以上の様々な分子量をもつ酸性多糖の混合物であった。構成成分はグルコース、ガラクトース、フコースおよびガラクトツロン酸で、モル比は7:6:2:5.5であった。乳酸やフマル酸のような不揮発性の有機酸は構成要素として検出されなかった。

APはpH 6以下で酸性ホスファターゼと α -グルコシダーゼを阻害し、ペプシンを顕著に活性化した。両酵素の阻害はペクチン、ペクチン酸、コンドロイチン硫酸Aにおいても、ペプシンの活性化はペクチンにおいても認められた。酸性多糖によるペプシンの活性化は初めての知見である。

謝辞：ゲルろ過および高性能アニオン交換クロマトグラフィーを行うにあたり、ご指導いただいた生物資源化学科北原兼文助教授に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Adachi, S.: Thin-layer chromatography (TLC) of carbohydrates in the presence of bisulfite. *J. Chromatog.*, **17**, 295-299 (1965)
- 2) Aminoff, D. and Morgan, W. T. J.: Hexosamine components of the human blood group substances. *Nature*, **162**, 579-580 (1948)
- 3) Bitter, T. and Muir, H. M.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334 (1962)
- 4) Dische, Z.: General color reactions. in Whistler, R. L. (ed.), *Methods in carbohydrate chemistry*, vol. 1. p. 479,

- Academic Press Inc., New York (1962)
- 5) Gardell, S.: Separation on Dowex 50W ion-exchange resin of glucosamine and galactosamine, and their quantitative determination. *Acta Chem. Scand.*, **7**, 207-215 (1953)
 - 6) Hartree, E. F.: Determination of protein. *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427 (1972)
 - 7) Hummel, J. P., Anderson, D. O. and Patel, C.: Anionic polymers. I. Inhibition of prostatic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **233**, 712-716 (1958)
 - 8) Kitahara, K., Suganuma, T. and Nagahama, T.: Bound free fatty acids in glucoamylase-digested starches of corn and sweetpotato. *Carbohydrates*, **71**, 439-443 (1994)
 - 9) Rick, W. and Fritsch, W. P.: Pepsin. in Bergmeyer, H. U. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*. 2nd ed. p.1046-1057, Academic Press Inc., New York (1974)
 - 10) Salvador, L. D., Suganuma, T., Kitahara, K., Tanoue, H. and Ichiki, M.: Monosaccharide composition of sweetpotato fiber and cell wall polysaccharides from sweetpotato, cassava, and potato analyzed by the high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection method. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3448-3454 (2000)
 - 11) Tadera, K., Minami, Y., Uehune, M., Nozaki, A., Yagi, F. and Suganuma, T.: Occurrence of acid-phosphatase inhibitors in soybeans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 387-388 (1997)

Summary

Acidic polysaccharides (AP) produced by *Bacillus* sp. BS-0001, a new bacterium isolated from soil, were purified from culture medium. AP consisted of acidic polysaccharides with a wide range of molecular weights over 10,000. The constituent sugars of AP were glucose, galactose, fucose and galacturonic acid in a molar ratio of 7 : 6 : 2 : 5.5. Non-volatile organic acid was not detected as a constituent.

At pH less than 6, AP inhibited various acid phosphatases and yeast α -glucosidase, while AP markedly activated pepsin. Inhibition of potato acid phosphatase and yeast α -glucosidase was found also in pectin, pectic acid and chondroitin sulfate A, and activation of pepsin in pectin. This paper is the first to describe activation of pepsin by acidic polysaccharides.