

# *Eubacterium saburreum* T-110 株の抗原多糖の構造について

佐 藤 尚 美

新潟大学歯学部口腔細菌学教室（指導： 近藤亘教授）

（昭和 55 年 6 月 28 日受付）

## Chemical Structure of the Polysaccharide Antigen of *Eubacterium saburreum*, Strain T-110

Naomi SATO

Department of Oral Microbiology, Niigata University, School of Dentistry  
(Director: Prof. Wataru Kondo)

### 要 旨

*Eubacterium saburreum* は、人の歯垢に存在するグラム陽性の嫌気性レンサ桿菌である。既に吾々は歯垢における本菌の出現頻度が、*Bacterionema matrucholii* のそれに匹敵するものであることを蛍光抗体法を利用して証明した。*E. saburreum* の示す興味ある生物学的性状の一つは、この菌が glucose を利用して細胞内に大量の glycogen-amylopectin 型の多糖質を合成するということと、もう一つはその細胞壁に heptose (7 炭糖) だけで構成される多糖質抗原を産生するという性質である。heptose は自然界では非常に珍しい糖であって、これまでに細菌性抗原の中ではグラム陰性菌のリポ多糖（内毒素）の中に L-glycero-（あるいは D-glycero-）D-manno-heptose がその一つの構成因子として微量に存在していることが知られていただけであった。これに対して本菌の産生する多糖質抗原は、heptose だけで構成される homo-あるいは hetero-glycan であって、この点独特な細菌性の多糖質抗原であると言える。このグループの多糖質抗原の中、現在まで 3 種類の血清型についてその抗原構造が決定され報告されて来ているが、本研究ではこれに新しいタイプの多糖質抗原の存在を追加するものである。

### 緒 論

*Eubacterium saburreum* の多糖質抗原の中には

直鎖構造の D-glycero-D-galacto-heptose をその中心的なバックボーンとして含有する一群の菌株がある。これまでに、これらの菌株は 3 つの血清型に分類されて来た。この中、I 型抗原はこの糖の polymer であるが、II 型と III 型抗原はこの他にもう一つの共通な heptose として 6-deoxy-D-altro-heptose を含有することが明らかになり、I 型および II 型抗原の構造は Hoffman・等<sup>1),2)</sup>により、また III 型抗原の構造は吾々<sup>3)</sup>の教室で決定された。その結果、これらが一連の類縁構造を保ちながら順次その構造に複雑さの加わった抗原であることが明らかになった。その後、吾々はその主要な構成糖として上記 2 種類の heptose を含有し、上記 3 種類の血清型の何れとも異なる第 IV の血清型に属する菌株 (T-110 株) を分離し、その抗原構造について検討を加えたので、その成績を報告する。

### 実 験 方 法

#### 1. 細菌の性状検査

糖分解能の検査には基礎培地として Proteose peptone No. 3 (Difco), 10g; Yeast extract (Difco), 5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 g; NaCl, 5 g; 水, 1 L, (pH 7.0) を使用した。検査した糖類は全て濾過滅菌を施し、基礎培地に 1% の割合に加えた。

培養は滅菌パラフィンを重ねし、嫌気的条件下で 1 週間行った。糖の分解による酸の生成の判定は、pH メーターで測定し pH 6.0 以下となった

ものを陽性とした。有機酸を検出する培養液は、基礎培地に glucose を 1% となるように添加したものを、培養容器内の空気を窒素ガスで置換してから培養を 1 週間行い、培養液の遠心上清を直接ガスクロマトグラフに注入して分析した。インドールの産生、中性紅の還元、カタラーゼの産生、硝酸塩還元は通法<sup>4)</sup>に従った。

## 2. 培養菌体の調製

T-110 菌株と III 型 (02) 菌株は、基礎培地に glucose を 0.5% となるよう加えた培養液を用い、300 ml の三角コルベン中でパラフィン重層による嫌氣的条件下で 36 時間静置培養を行った。培養を終了した菌体は、遠心により集め生理食塩水で 3 回洗滌後、凍結乾燥し抗原抽出に使用した。

## 3. 抗原の抽出と精製

抗原の抽出は Krause, McCarty<sup>5)</sup> の方法に基づいて行った。即ち、凍結乾燥菌体 1 g につき formamide 20 ml を加え油浴中 150°C, 15 分間攪拌しながら抽出した。室温まで冷却後、抽出液に同量の酸アルコール (エチルアルコール 95 ml, 2N-塩酸 5 ml の混合液) を加え、0°C に冷却した。生じた不溶性物質を遠心 (8,000 rpm, 10 分) で除き、その上清液に 5 倍量の acetone を加え、遠心 (8,000 rpm, 10 分) して沈澱を集め 0.02% の割合に NaN<sub>3</sub> を加えた 0.02 M Tris buffer (pH 7.4) 10 ml に溶解した。その溶液に pronase (科研化学) 1 mg/ml を加え 37°C 24 時間消化を行った。消化の終了した溶液を Sepharose 6B のカラム (2.4×100 cm) にかける PBS (0.02 M phosphate buffer pH 7.2, 0.15 M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>) で溶出した。溶出された各画分について、中性糖と蛋白含量、および抗原活性をそれぞれ測定した。抗原活性の高い画分を集め 40°C 以下で濃縮し蒸留水で透析後、凍結乾燥を行い精製抗原として実験に供した。

## 4. 血清学的方法

III 型菌 (02株) および T-110 株を 0.02% formalin 含有生理食塩水に浮遊させてワクチンを作り、ウサギの耳静脈内に隔日に注射して抗血清を得た。抗原の力価は、毛細管法により抗血清 (原液) と倍数階段希釈をした抗原液との反応で測定

した。抗原活性は、陽性反応を示す最終抗原希釈倍数の逆数で表わした。

ゲル内沈降反応は Noble agar (Difco) を生理食塩水に 1% となるように溶解したものを使用した。

抗原の脱 acetyl 化は、抗原液に等量の 1 M NaOH を加え室温 30 分間処理した。

## 5. 分 析 法

中性糖はフェノール硫酸法<sup>6)</sup>により、蛋白は Lowry<sup>7)</sup> 法で定量した。

中性糖の g. l. c. 分析は alditol-TMS<sup>8)</sup> 誘導体として行った。即ち、抗原多糖を N-塩酸、100°C, 4 時間加水分解を行い、アンモニア水で中和後、Na-borodeuteride で還元し alditol に変え、ついで反応液を Dowex 50 (H<sup>+</sup>) の小カラムで脱塩、濃縮、乾固し、メタノールで硼酸を溜去した後、五酸化燐上で乾燥した。乾燥を終了した試料は内部標準として inositol (250 µg/ml) を含むピリジン 100 µl に溶解し、それに HMDS (hexamethyl disilazane) 50 µl と TMCS (trimethyl chlorosilane) 30 µl を加え室温で 20～30 分間放置した後、その 2 µl をガスクロマトグラフに注入して分析した。

多糖のメチル化は Hakomori<sup>9)</sup> の方法に基づいて行った。即ち多糖 5 mg を試験管に入れ五酸化燐を入れたデシケーター中で乾燥した。以後の操作は乾燥窒素ガスの気流下で行った。多糖に乾燥 dimethyl sulfoxide 0.2 ml を加え stirrer で攪拌しながら溶解し、新しく調製した 2 M の methylsulfinyl carbanion を 0.2 ml 加えた。添加と同時に反応溶液は gel 状となるが、攪拌を続けることにより約 20 分後液化した。反応は室温で 4 時間行い、終了後反応溶液を 20°C 以下に冷却しながら methyl iodide 0.2 ml を滴下してメチル化を行い、更に室温で 1 時間攪拌した。この反応液に水を少量加えて透析膜に移し、一夜蒸留水で透析を行い、その間 3～4 回蒸留水を交換した。次に透析内液を濃縮、乾固し、90% 蟻酸 (3 ml) を加え、100°C, 2 時間加水分解した。冷却後、蟻酸を濃縮により溜去し、残渣に 0.25 M 硫酸 3 ml を加え更に 100°C, 13 時間加水分解

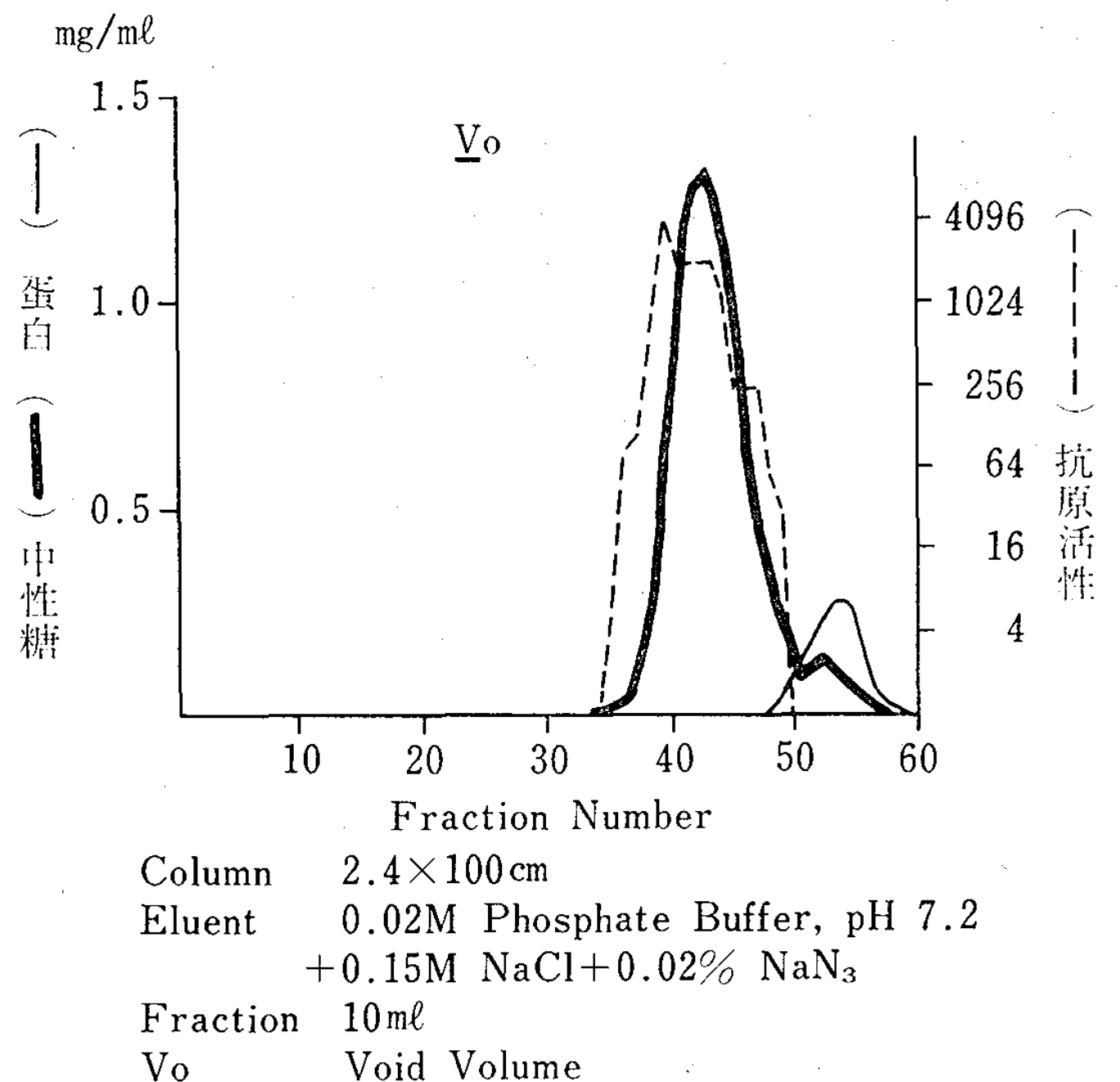
解を行った。水解終了後、炭酸バリウムを加えて中和し、生じた沈澱を遠心により除き上清を得た。その上清に Na-borodeuteride を加えて還元し、alditol に変えた。次に Dowex 50 ( $H^+$ ) の小カラムを通過させ、得られた溶液を濃縮後メタノールを加えて硼酸を溜去し、残った alditol にピリジンと無水酢酸 (1:1) を加え  $100^\circ C$ , 60 分間加熱して O-acetyl 化を行った。過剰の溶媒は濃縮により除去した。得られた alditol acetate は dichloromethane に溶解し、ガスクロマトグラフ (g. l. c.) およびガスクロマトグラフ-質量分析計 (g. l. c.-m. s.) で分析した。

## 6. 分析機器

醗酵終末産物 (有機酸, アルコール) の分析は日本電子 K. K 製のガスクロマトグラフ JGC-20 K 型で行い、ガラスカラム ( $0.2 \times 200$  cm) を用い FID (水素炎検出器) で検出した。充填剤は Porapak Qs 50-80 mesh (Waters Assoc., Inc.) を用いた。

糖の alditol-TMS 化合物の分析には日立 063 型ガスクロマトグラフを使用しガラスカラム ( $0.3 \times 300$  cm) に 3% OV-17 を coating した Shimalit W (60-80 mesh, 和光純薬 K. K. 製) の充填剤をつめ FID で検出した。メチル化糖の alditol acetate の分析には日本電子 K. K. 製 JGC-20K 型のガスクロマトグラフを使用し、ガラスカラム ( $0.2 \times 200$  cm) に 3% OV-225 で coating した Gaschrom Q (100-120 mesh, ガスクロ工業製) をつめ FID で検出した。いずれのガスクロマトグラフにおいても窒素ガスを carrier gas として使用した。alditol-TMS 化合物および alditol acetate の質量分析は日立 M-5201 型ガスクロマトグラフに質量分析計 M-60 を直結した装置を使用した。alditol-TMS の分析条件は Oven Temp.  $150-250^\circ C$ ,  $5^\circ C$ /分昇温, イオン化電圧 70 eV で行い, alditol acetate の分析条件は Oven Temp.  $210^\circ C$  一定, イオン化電圧 30 eV で行い, その他の条件 (Injection Temp.  $250^\circ C$ , Chamber Temp.  $200^\circ C$ , HV 1.5 kV) は同じである。carrier gas はヘリウムを用いた。

図 1 T-110 抗原多糖の Sepharose 6B カラムクロマトグラフィー



糖の比旋光度は Perkin-Elmer 241 型旋光度計で測定した。

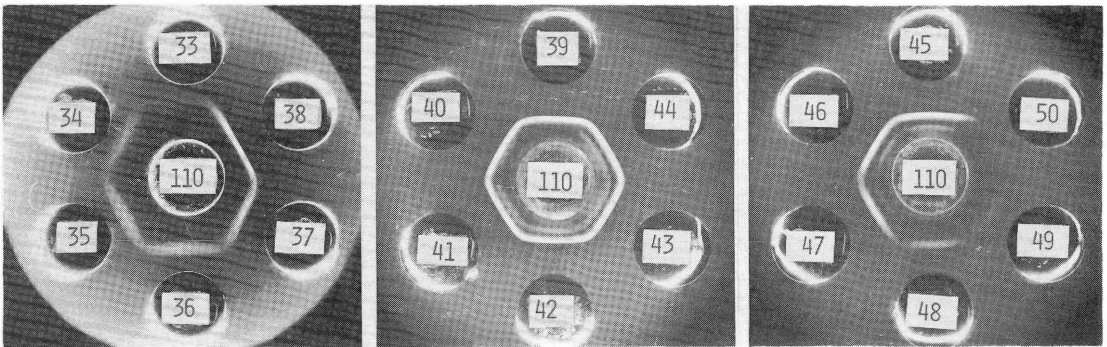
## 実験結果

### 1. 菌株の同定

今回新しく人の菌垢より分離した T-110 菌株は、グラム陽性、偏性嫌気性で芽胞を形成しない長いレンサ状桿菌である。本菌株の糖分解能について検査を行った結果, glucose, fructose, galactose, mannose, arabinose, xylose, sucrose, lactose, trehalose および raffinose を分解したが, inuline, sorbitol, dulcitol および mannitol は非分解性であった。その他, 中性紅を還元し, カタラーゼ反応陰性, インドール反応陽性であり, 1% glucose 加基礎培地においてガスを産生した。また 1% glucose 加基礎培地における醗酵終末産物を g. l. c. で調べた結果, ethanol, acetic acid, butanol, butyric acid および lactic acid が検出された。以上本菌株の検査結果は Bergy's Manual<sup>10)</sup> の *Eubacterium saburreum* に関する記載と完全に一致した。

2. T-110 株の多糖質抗原の精製とその構成糖  
乾燥した T-110 菌体から formamide で  $150^\circ C$ , 15 分間加熱抽出した抗原を pronase で消化

図 2 T-110 抗原の gel ろ過画分と抗 T-110 血清とのゲル内沈降反応



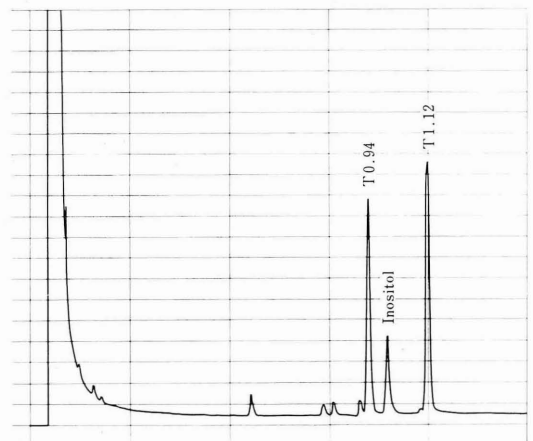
110: 抗 T-110 血清

周囲の数字は Sepharose 6B のカラムクロマトによる抗原の Fraction Number

後, Sepharose 6B (2.4×100 cm) のカラムで gel 濾過を行い, 各画分に含まれる中性糖, 蛋白量およびそれぞれの抗原活性を図 1 に示した。中性糖は 2 峰性のピークを示したが, 抗原活性は最初の大きなピークにだけ証明された。なお低分子側にだけ検出された蛋白は, pronase に相当するものである。次に抗原活性を示す各画分と抗 T-110 血清との間で gel 内沈降反応を行ってみた(図 2)。その結果, Fr. 33-40 までの画分は抗血清との間に太い一本の沈降線(主抗原)だけを形成するのに対して, Fr. 41 以下の画分はこの沈降線の他に血清側に近くやや拡散した薄い副抗原による沈降線があらわれた。このことから高分子側の画分は主抗原のみから成るのに対して, 低分子側の画分には, それ以外に副抗原が混在していることが判明した。

そこで次に高分子側の画分から Fr. 39 を選び, 低分子側の画分からは Fr. 43 と Fr. 48 を選んで, それぞれの構成糖について検討を加えてみた。この 3 つの画分を N-塩酸で加水分解後, Na-borodeuteride で還元し, その alditol-TMS 誘導体を g. l. c. で分析した結果は図 3~5 に示す如くである。高分子側の主抗原のみを含む Fr. 39 (図 3) からは, 内部標準 inositol に対する相対保持時間 (T) が 0.94 と 1.12 を示す 2 つのピークが検出されるのに対して, 低分子側の Fr. 43 (図 4) と Fr. 48 (図 5) からは T 0.61, T 0.94, T 1.09 および, T 1.12 を示す 4 つのピークが検

図 3 Fr. 39 の構成糖



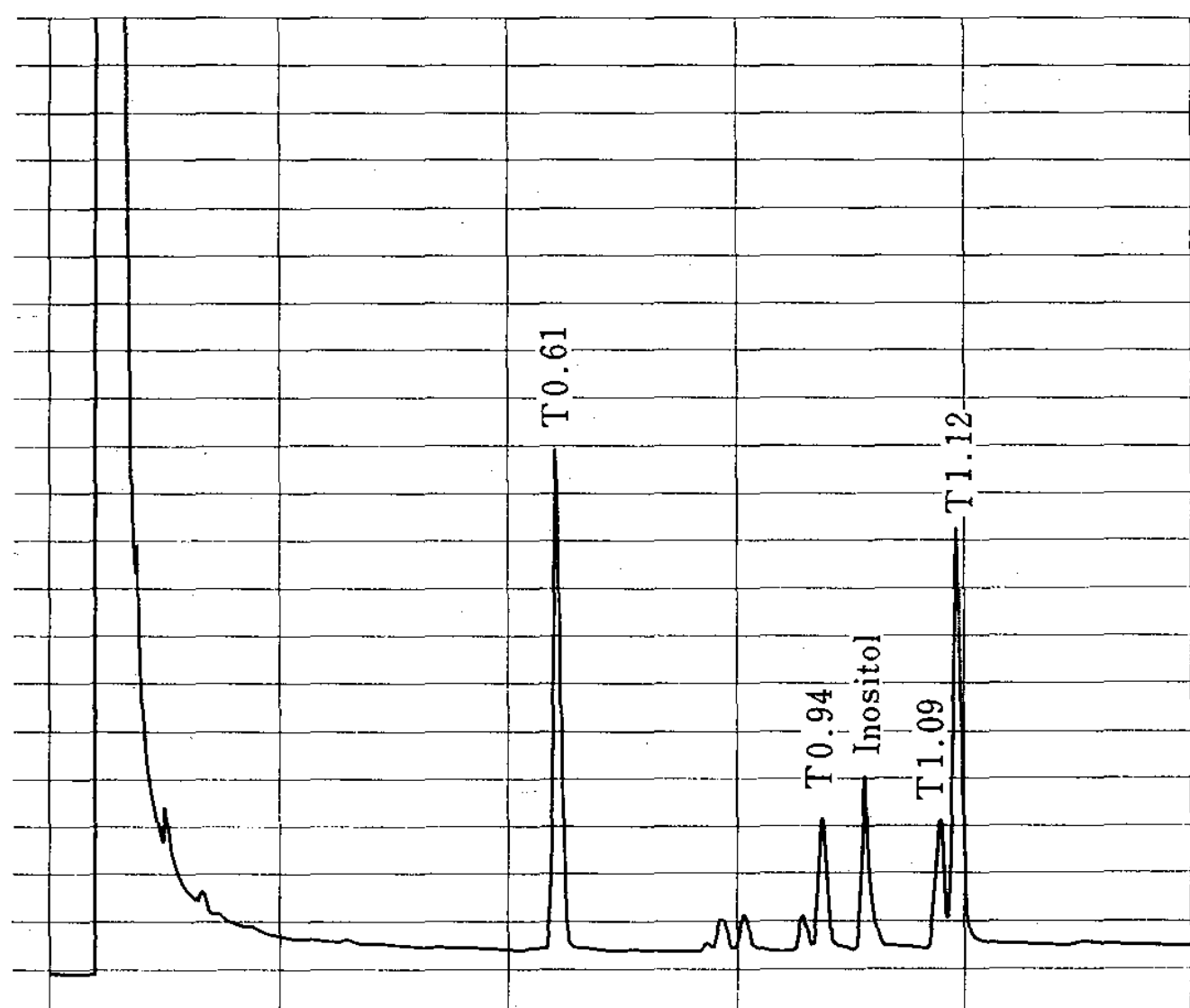
Fr. 39 に含まれる抗原多糖を N-塩酸で加水分解後, 還元し alditol (1-d) に変え TMS 誘導体として分析した

出された。この中 T 0.94 と T 1.12 は 3 つの画分に共通であったが, Fr. 43 と Fr. 48 にはそれ以外に 2 つの成分 (T 0.61 と T 1.09) が多量に含まれており, これらの糖が主抗原に混在する副抗原の成分であると考えられた。そこで以下の実験では主抗原のみからなる画分 (Fr. 35-39) をブールして分析を行った。

先づ T 0.94 のピークについて g. l. c.-m. s. 分析を行った結果 (図 6-1) m/e 73 (100), (カッコ内の数字は相対強度, %) 104 (15), 206 (15), 219 (33), 308 (6), 321 (8), 410 (0.1), 423

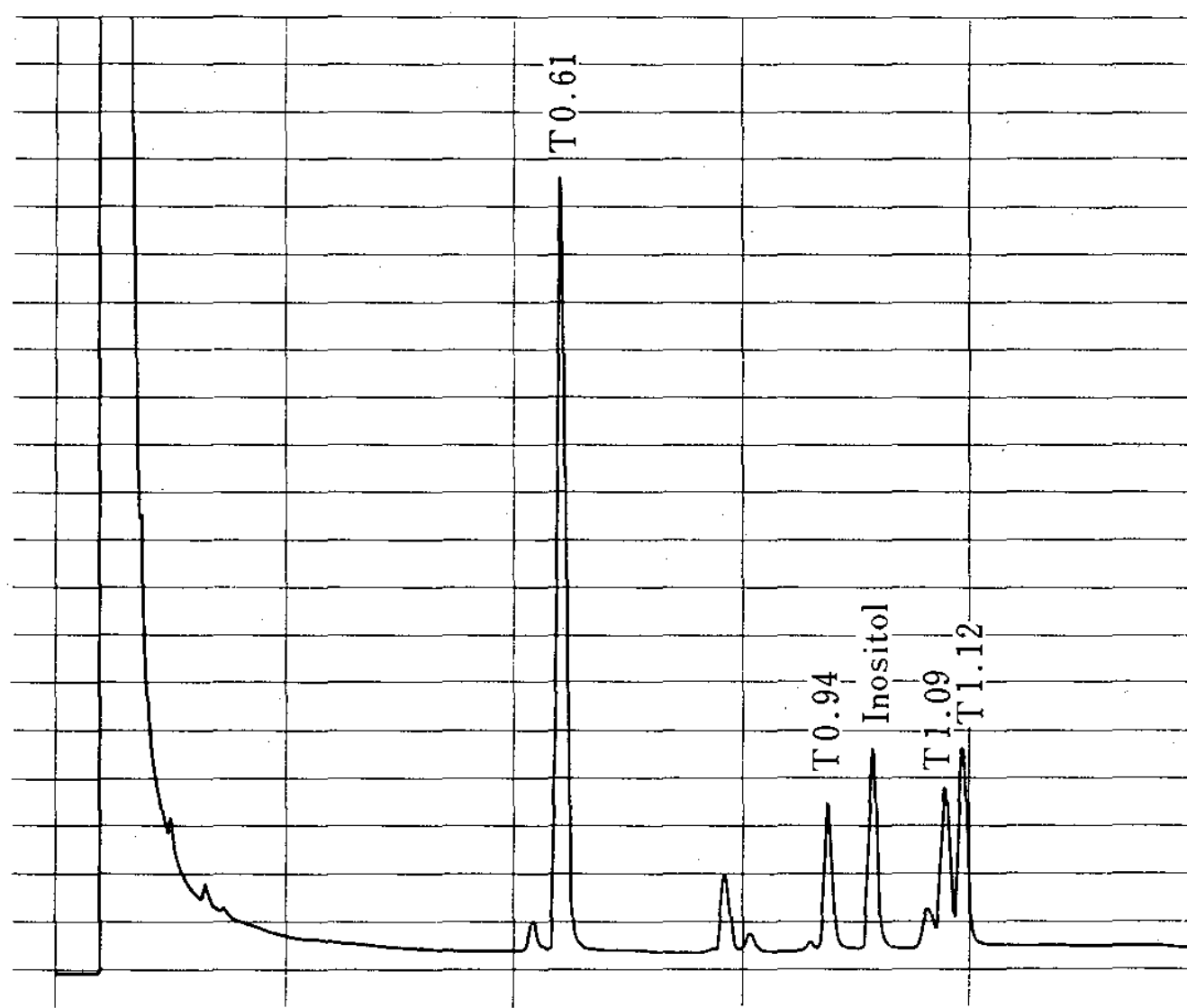


図 4 Fr. 43 の構成糖



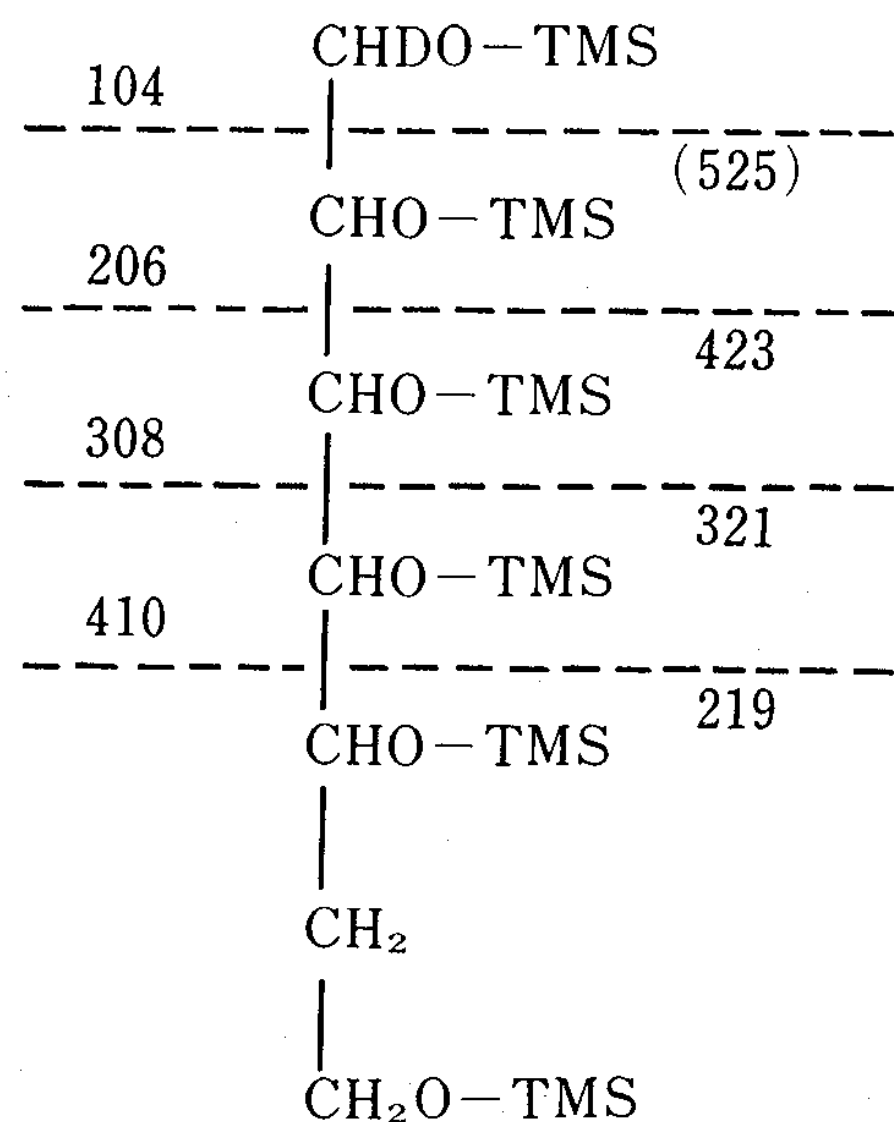
Fr. 43 に含まれる抗原多糖を N-塩酸で加水分解後、還元し alditol (1-d) に変え TMS 誘導体として分析した

図 5 Fr. 48 の構成糖



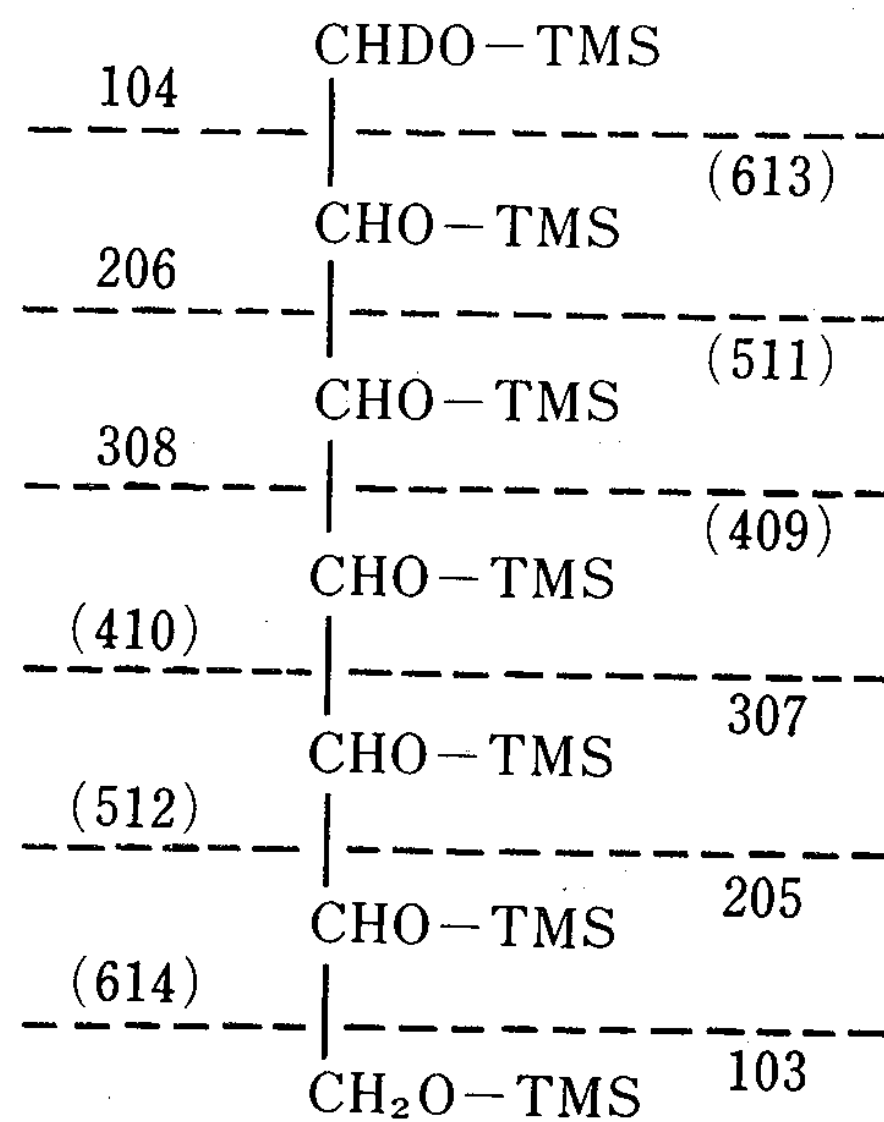
Fr. 48 に含まれる抗原多糖を N-塩酸で加水分解後、還元し alditol (1-d) に変え TMS 誘導体として分析した

図 6 T-110 抗原の構成糖 (alditol-TMS 誘導体, T 0.94 および T 1.12) の質量分析



6-Deoxy-D-altro-heptitol  
(T 0.94)

1



D-Glycero-D-galacto-heptitol  
(T 1.12)

2

(0.1) のイオン (primary fragment) と m/e 218 (10), 231 (12), 320 (14), 333 (3.5), 435 (0.4) のイオン (secondary fragment) が検出されることからこの糖は 6-deoxy-heptose であることが判明した。またこの糖の g. l. c. における保持時間 (T 0.94) が 6-deoxy-D-altro-heptose のそれと一致することと、その比旋光度

$[\alpha]_D^{25}$  が  $+35^\circ$  であることから、この糖は 6-deoxy-D-altro-heptose であると同定された。

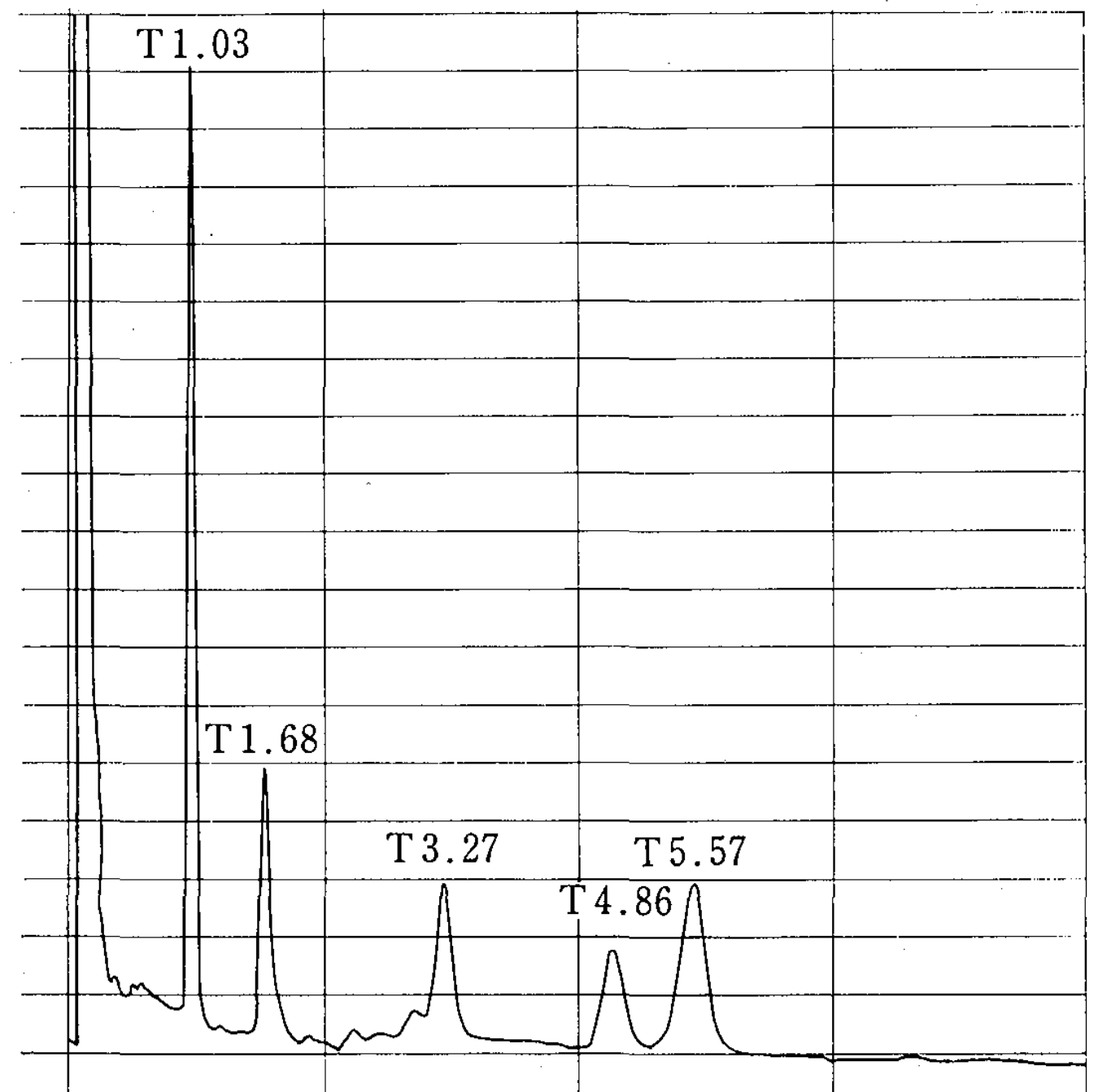
次に、T 1.12 のピークについて g. l. c.-m. s. 分析を行った結果 (図 6-2) primary fragment として m/e 73 (100), 103 (28), 104 (14), 205 (21), 206 (25), 307 (7), 308 (13), secondary fragment として m/e 319 (19), 320 (15), 421

(1), 422 (2), 523 (0.2), 524(0.2) のイオンが検出されることから heptose であることが判った。次にこの糖の g. l. c. における相対保持時間 (T 1.12) が D-glycero-D-galacto-heptose のそれに一致し, またその比旋光度 ( $[\alpha]_D^{25} + 57^\circ$ ) が D-glycero-D-galacto-heptose のそれ (+58°) と一致することからこの糖は D-glycero-D-galacto-heptose であると同定された。

### 3. 抗原多糖のメチル化分析

次に T-110 抗原多糖の結合様式を調べるため, 精製抗原多糖を Hakomori<sup>9)</sup> の方法でメチル化し希硫酸により加水分解後, Na-borodeuteride で還元して構成糖のメチル化 alditol を得, これを O-acetyl 化して g. l. c. で分析した。g. l. c. の結果は, 図 7 に示す如く 5 つのピークが検出された。これらのピークの 2, 3, 4, 6-tetra-O-Me-1, 5-di-O-Ac-D-glucitol に対する相対保持時間 (T) はそれぞれ 1.03, 1.68, 3.27, 4.86 および 5.57 であった。g. l. c.-m. s. 分析の結果, 最初のピーク (T 1.03) からは m/e 43 (71), 45 (100), 71 (49), 73 (46), 75 (25), 87 (21), 101 (39), 102 (38), 103 (59) (アンダーラインは primary fragment), 113 (21), 118 (50), 127 (16), 129 (23), 159(20), 162 (11), 187 (23), 219 (16), 263 (1) のイオンが検出されることから (図 8-1) 2, 3, 5, 7-O-Me-1, 4-O-Ac-6-deoxy-altro-heptitol であり, この誘導体の C-4 位に acetyl が結合していることから, この糖は furanose 型の非還元末端糖であることが判明した。2 番目のピーク (T 1.68) からは m/e 43 (57), 45 (100), 71(44), 73 (37), 88 (25), 101 (18), 103 (70), 127 (15), 129 (10), 130 (28), 159 (15), 171 (10), 190 (12), 219 (3), 246 (1) のイオンが検出されることから (図 8-2), 3, 5, 7-O-Me-1, 2, 4-O-Ac-6-deoxy-altro-heptitol であり, C-4 位に acetyl が導入されていることからやはり furanose 型であることが判った。また, この誘導体はその C-2 位に acetyl を結合しているので, 一見分岐糖のように思われたが, この糖は T-110 抗原を温和な条件で水解 (0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 80°C, 210 分) すると遊離の単糖として外れて来る

図 7 T-110 抗原多糖のメチル化 alditol acetate の分析

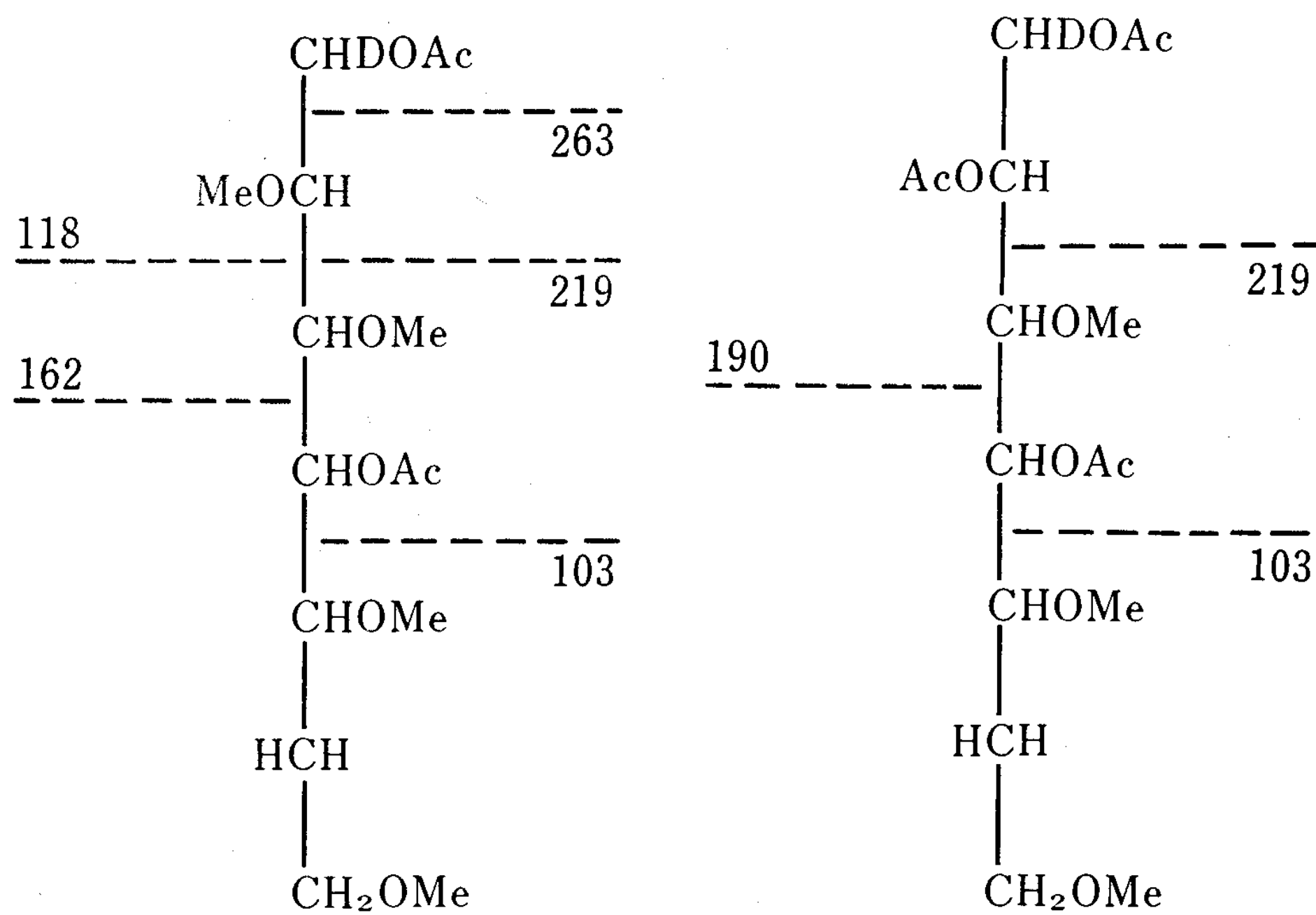


T: 2, 3, 4, 6-O-Me-1, 5-O-Ac-D-glucitol に対する相対保持時間

ので C-2 位に未知の物質を結合した非還元末端糖であることが判った。

3 番目のピーク (T 3.27) からは m/e 43 (100), 45 (38), 59 (10), 75 (18), 87 (20), 89 (11), 99 (26), 101 (16), 102 (63), 113 (43), 117 (13), 118 (57), 129 (17), 131 (12), 132 (6), 143 (34), 157 (12), 162 (23), 173 (5), 203 (7), 206 (1), 233 (25), 277 (10) のイオンが検出されることから (図 8-3), 2, 3, 4, 7-O-Me-1, 5, 6-O-Ac-galacto-heptitol であることが判明した。すなわち, この糖は C-5 位に acetyl が結合していることから pyranose 型であり, C-6 位に置換基をもつ chain sugar であることが判った。4 番目のピーク (T 4.86) からは m/e 43 (100), 45 (18), 59(26), 86 (30), 87 (23), 89 (91), 100 (26), 101 (40), 113 (24), 128 (50), 160 (10), 170 (20), 173 (8), 205 (27), 262 (31), 304 (13), 318 (2), 378 (2) のイオンが検出されることから (図 8-4), 4, 6, 7-O-Me-1, 2, 3, 5-O-Ac-galacto-heptitol であり, この糖も pyranose 型で, C-2 と C-3 位に置換基をもつ分岐糖

図 8 T-110 抗原多糖のメチル化 alditol acetate の質量分析

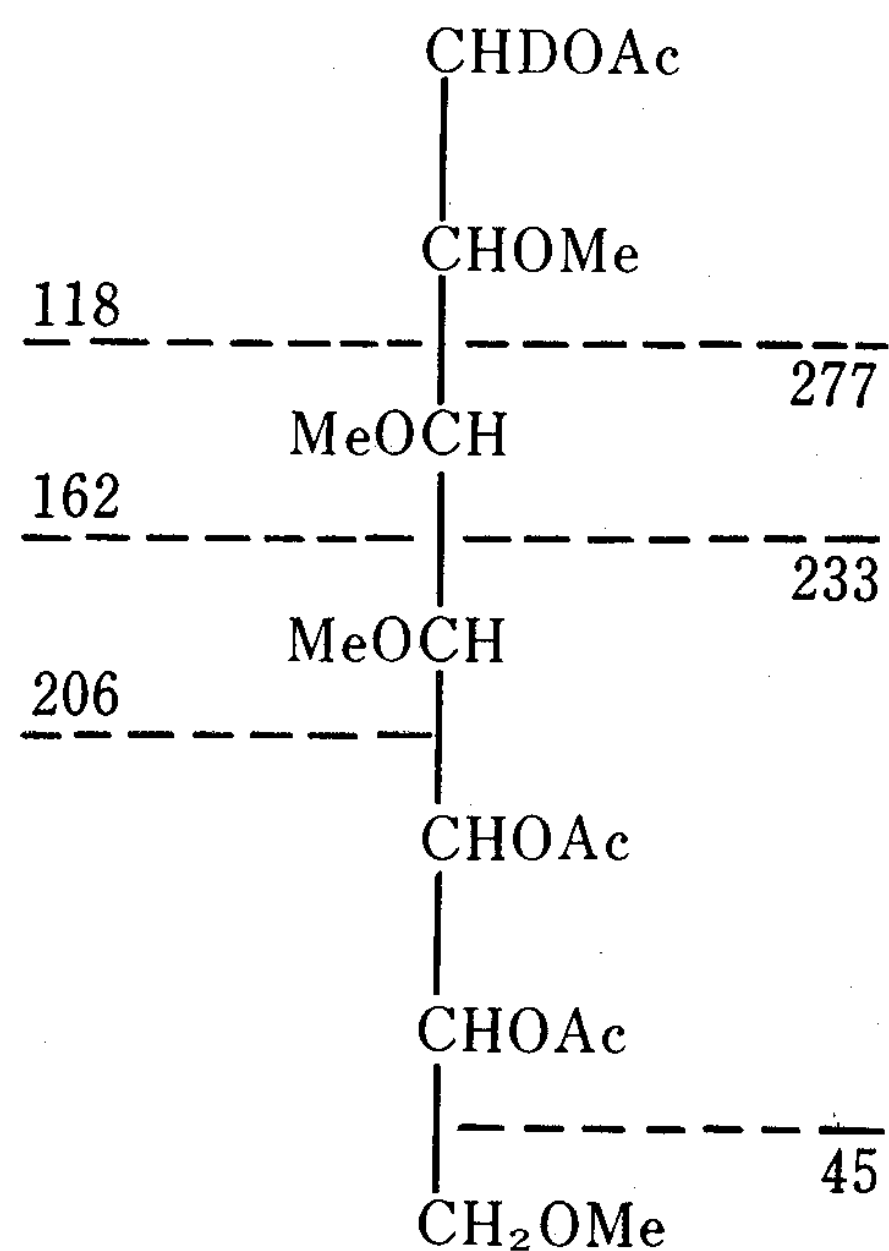


2, 3, 5, 7-O-Me-  
1, 4-O-Ac-6-deoxy-  
altro-heptitol  
(T 1.03)

1

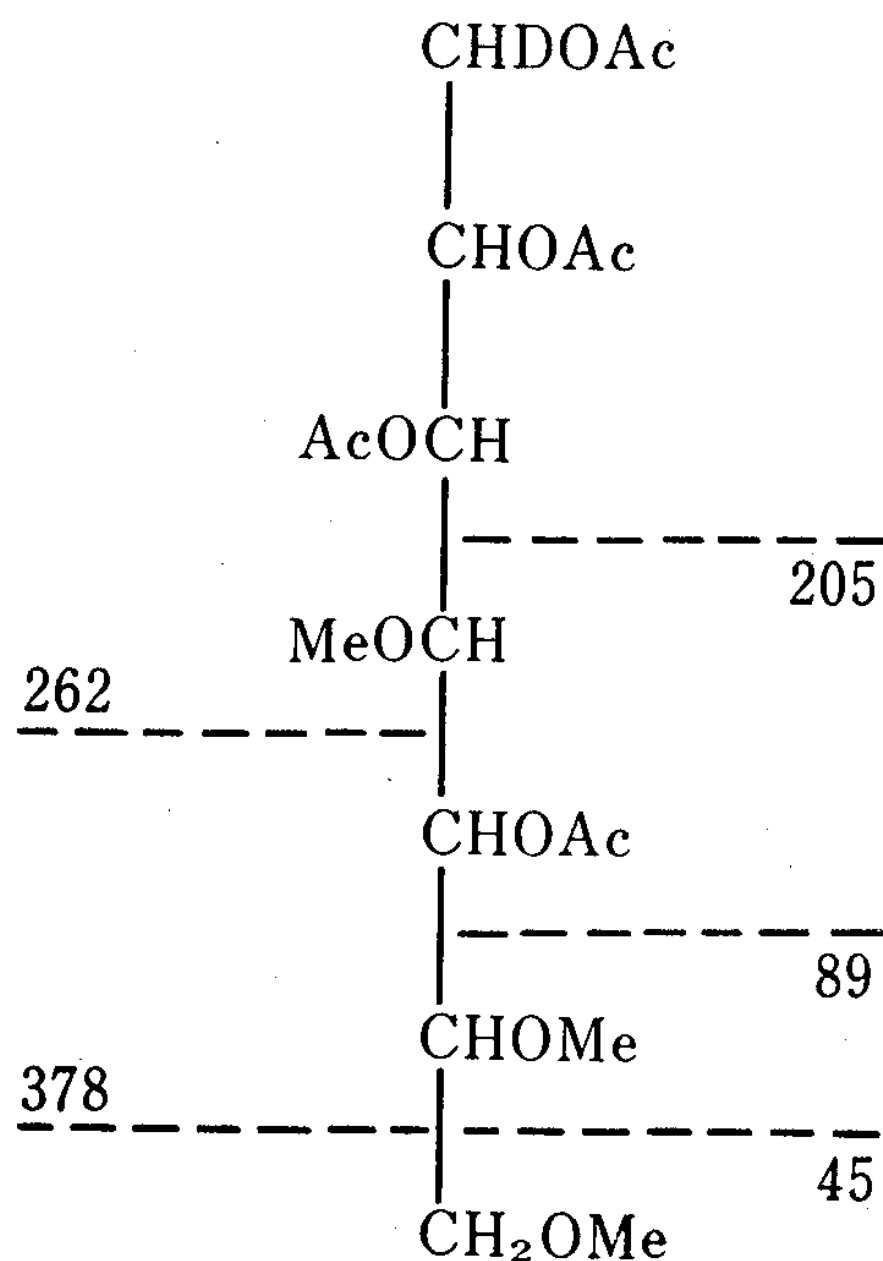
3, 5, 7-O-Me-  
1, 2, 4-O-Ac-6-deoxy-  
altro-heptitol  
(T 1.68)

2



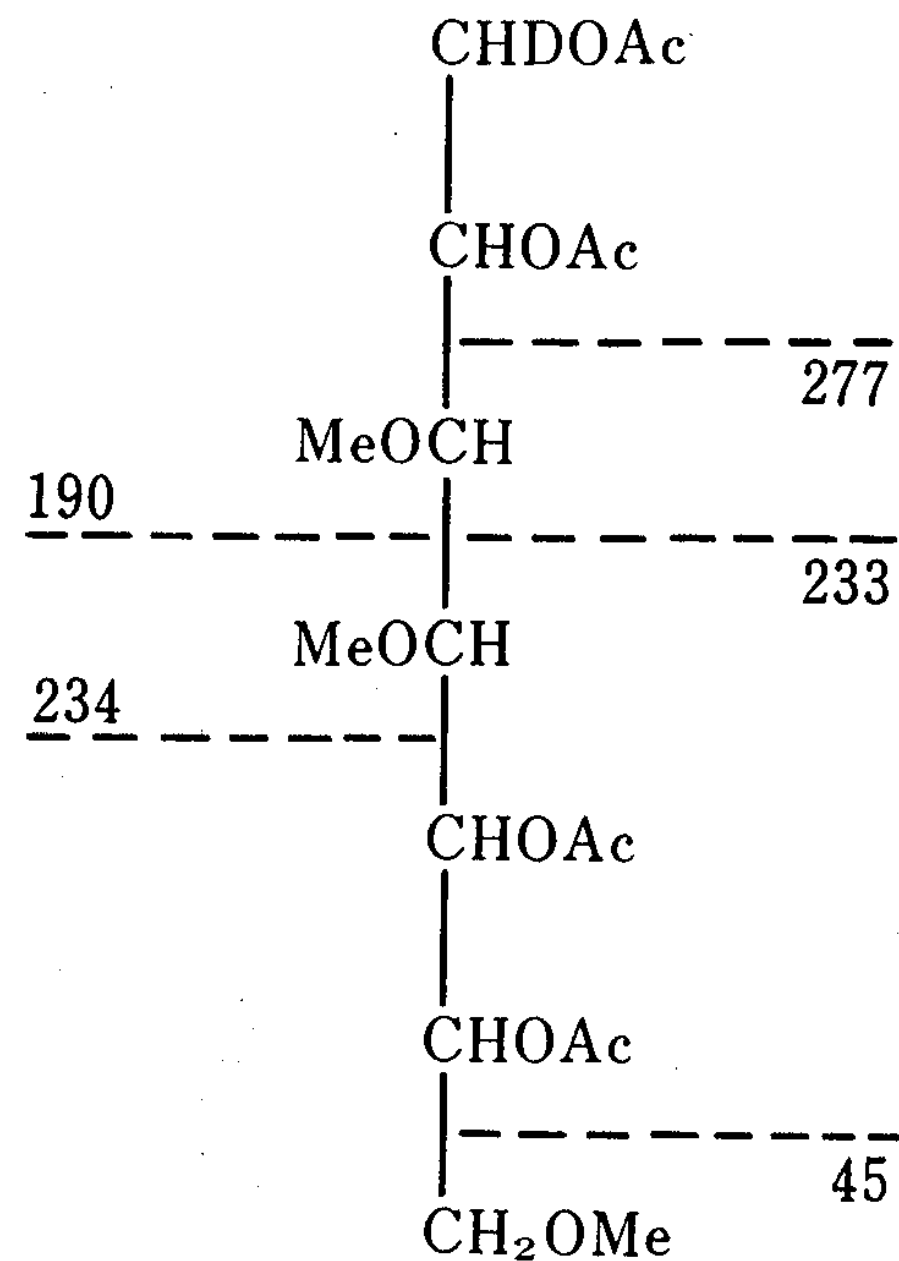
2, 3, 4, 7-O-Me-  
1, 5, 6-O-Ac-  
galacto-heptitol  
(T 3.27)

3



4, 6, 7-O-Me-  
1, 2, 3, 5-O-Ac-  
galacto-heptitol  
(T 4.86)

4



3, 4, 7-O-Me-  
1, 2, 5, 6-O-Ac-  
galacto-heptitol  
(T 5.57)

5

表 1 T-110 抗原より得られたメチル化  
alditol acetate のモル比

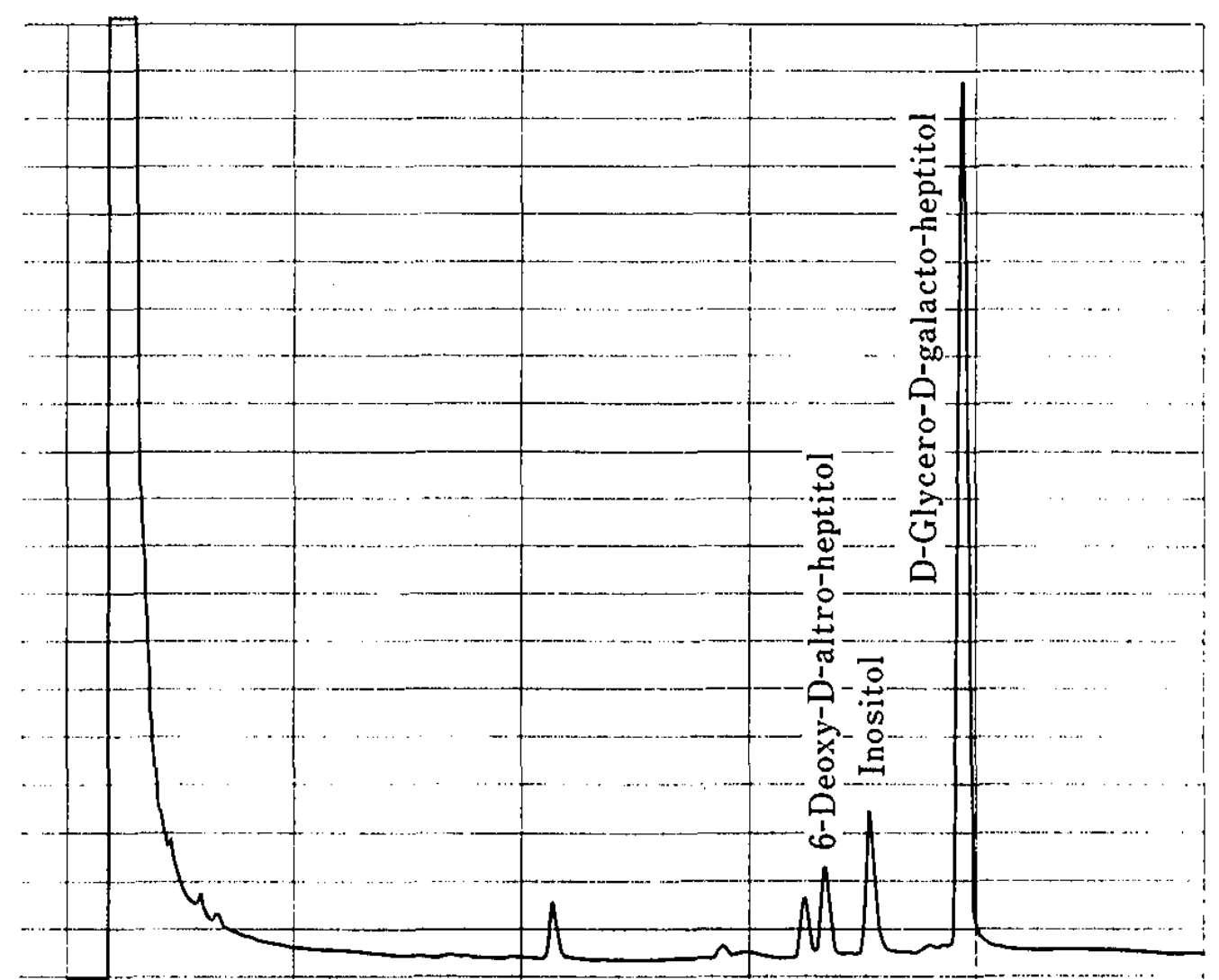
T Value	Sugar	Molar Ratio
1.03	2, 3, 5, 7-O-Me-6-Deoxy-heptitol*	1.00
1.68	3, 5, 7-O-Me-6-Deoxy-heptitol	0.57
3.27	2, 3, 4, 7-O-Me-Galacto-heptitol	0.45
4.86	4, 6, 7-O-Me-Galacto-heptitol	0.49
5.57	3, 4, 7-O-Me-Galacto-heptitol	0.97

\*2, 3, 5, 7-O-Me-1, 4-O-Ac-6-deoxy-altro-heptitol

であることが判明した。最後のピーク (T 5.57) からは  $m/e$  43 (100), 45 (36), 87 (31), 88 (36), 99 (44), 100 (54), 113 (62), 129 (20), 130 (70), 131 (31), 143 (21), 160 (10), 190 (32), 203 (5), 233 (39), 234 (16), 277 (5) のイオンが検出されることから (図 8-5) 3, 4, 7-O-Me-1, 2, 5, 6-O-Ac-galacto-heptitol であることが判明し, これも pyranose 型で C-2 と C-6 位に置換基をもつ分岐糖であることが判明した。

次にこれら 5 種類のメチル化 alditol acetate の g. l. c. におけるピーク面積を測定してモル比を計算した (表 1)。その結果 T 1.03 を示す 2, 3, 5, 7-O-Me-1, 4-O-Ac-6-deoxy-altro-heptitol を 1 モルとすると, 3, 5, 7-O-Me-1, 2, 4-O-Ac-6-deoxy-altro-heptitol, 2, 3, 4, 7-O-Me-1, 5, 6-O-Ac-galacto-heptitol, 4, 6, 7-O-Me-1, 2, 3, 5-O-Ac-galacto-heptitol および 3, 4, 7-O-Me-1, 2, 5, 6-O-Ac-galacto-heptitol のモル比は, それぞれ 0.57, 0.45, 0.49 および 0.97 であることが判った。このことから C-2 と C-3 位に置換基をもつ分岐糖 4, 6, 7-O-Me-1, 2, 3, 5-O-Ac-galacto-heptitol (T 4.86) と, C-2 と C-6 位に置換基をもつ分岐糖 3, 4, 7-O-Me-1, 2, 5, 6-O-Ac-galacto-heptitol (T 5.57) のモル比の合計 (1.46) は, 非還元末端糖である furanose 型の 6-deoxy-D-altro-heptose (T 1.03) と C-2 位に未知の物質を結合したやはり furanose 型の 6-deoxy-D-altro-heptose (T 1.68) のモル比の合計 (1.57) にほぼ一致することが明らかになった。即ち T 1.03 と T 1.68 を示す 6-deoxy-D-altro-heptose は T 4.86 を示す分岐性の D-

図 9 T-110 抗原 Core 多糖の構成糖



T-110 抗原の core 多糖を N-塩酸で加水分解後, 還元して alditol (1-d) に変え TMS 誘導体として分析した

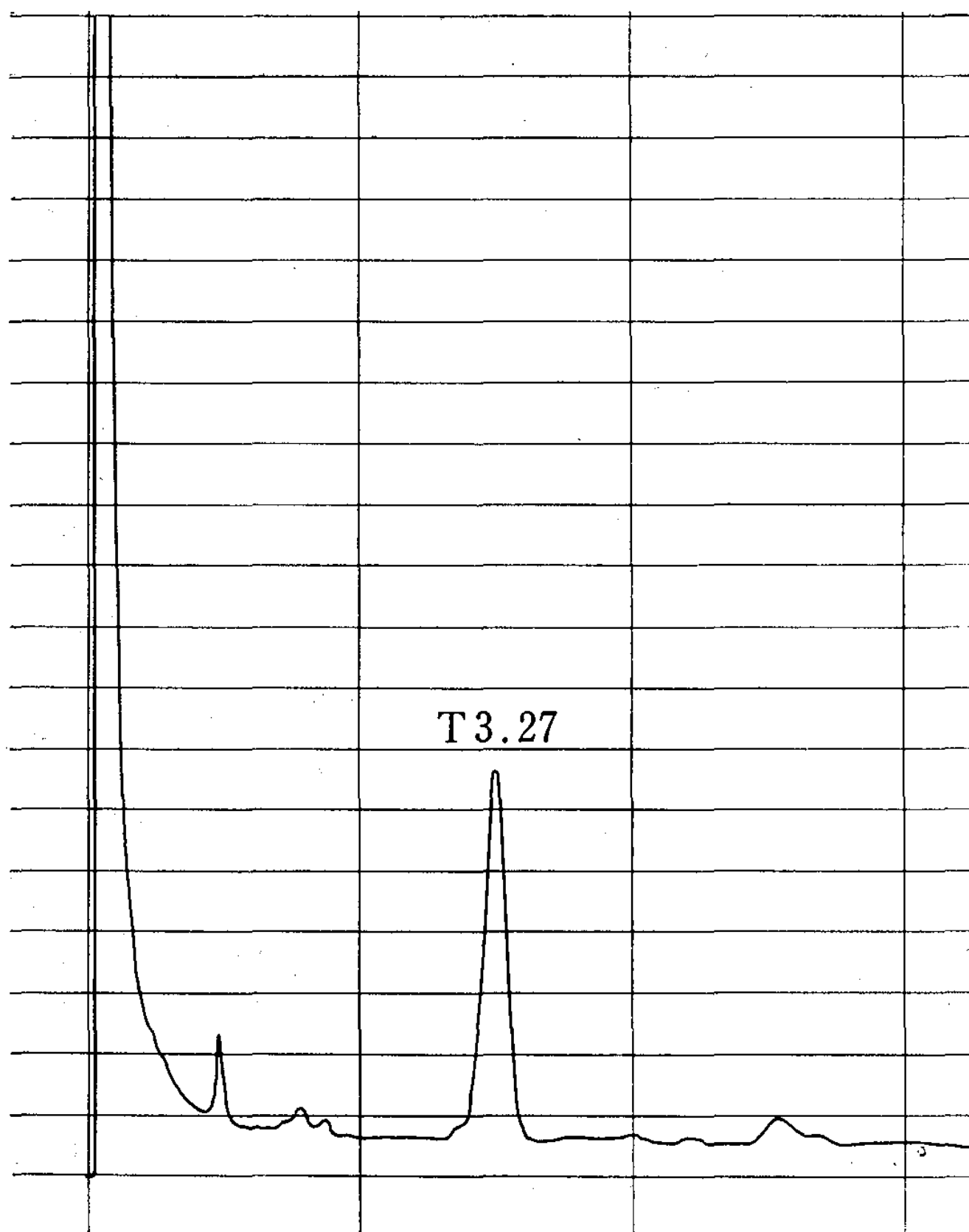
glycero-D-galacto-heptose の C-2 か C-3 位, また T 5.57 の D-glycero-D-galacto-heptose の C-2 か C-6 位のいずれかに結合しているであろうと推定された。

#### 4. T-110 抗原の core 多糖のメチル化分析

次に非還元末端の 6-deoxy-D-altro-heptose が分岐糖である D-glycero-D-galacto-heptose のどの位置に結合しているかを知るため, 6-deoxy-D-altro-heptose のみがはずれた core 多糖を調製し, 新しく生じた -OH 基の位置をメチル化分析で決定する実験を行った。一般に furanose 型の非還元末端糖は水解を受け易いことが知られているので, 先づ抗原多糖を温和な条件 (0.05 M  $H_2SO_4$ , 80°C, 210 分) で加水分解した後, 透析を行い, その透析内液に残る物質の構成糖を調べてみた (図 9)。その結果, 予想された如く透析内液に残る物質は主として D-glycero-D-galacto-heptose から構成される polymer (core 多糖) であることが判明した。そこでこの core 多糖を構成している D-glycero-D-galacto-heptose の結合様式を調べるため, メチル化を行い加水分解後, 還元し, O-acetyl 化して g. l. c. で分析した。その結果, T 3.27 を示す一つの大きなピーク (図 10) が出現し, 抗原多糖のメチル化糖のガスクロマト (図 7) にあった T 1.03, T



図 10 T-110 抗原 core 多糖のメチル化  
alditol acetate の分析



1.68, T 4.86, T5.57 を示すピークは殆んど消失していた。そこでこのピーク (T 3.27) について質量分析を行った結果, このピークには2種類のメチル化 alditol acetate が含まれていることが

明らかになった。即ち, このピークの前半から得られる mass spectrum からは  $m/e$  43 (100), 45 (25), 89 (29), 101(16), 118 (37), 205 (5), 234 (3), 276 (2), 350 (1) のイオンが検出されることから (図11-1), このピークの前半に溶出される誘導体は 2, 4, 6, 7-O-Me-1, 3, 5-O-Ac-galacto-heptitol であると同定された。またピークの後半からは  $m/e$  43 (100), 45 (36), 102 (31), 118 (28), 143 (12), 162 (4), 203 (3), 206 (0.2), 233 (7), 277 (2.3) のイオンが検出されることから (図11-2), ピークの後半に elute される誘導体は 2, 3, 4, 7-O-Me-1, 5, 6-O-Ac-galacto-heptitol であると同定された。このことから非還元末端の 6-deoxy-D-altro-heptose は分岐糖である2種類の D-glycero-D-galacto-heptose の何れも C-2 位に結合していることが明らかとなった。また, このことから core 多糖は (1-3) 結合をした D-glycero-D-galacto-heptose (0.49 モル, 分岐糖) と (1-6) 結合をした D-glycero-D-galacto-heptose (0.97 モル, 分岐糖) と, 同じく (1-6) 結合の D-glycero-D-galacto-heptose (0.45 モル, chain sugar) から構成されていることが判明した。

##### 5. T-110 抗原多糖の結合様式

次に構成単糖の anomeric な結合様式を知るた

図 11 T-110 抗原 core 多糖のメチル化 alditol acetate の質量分析

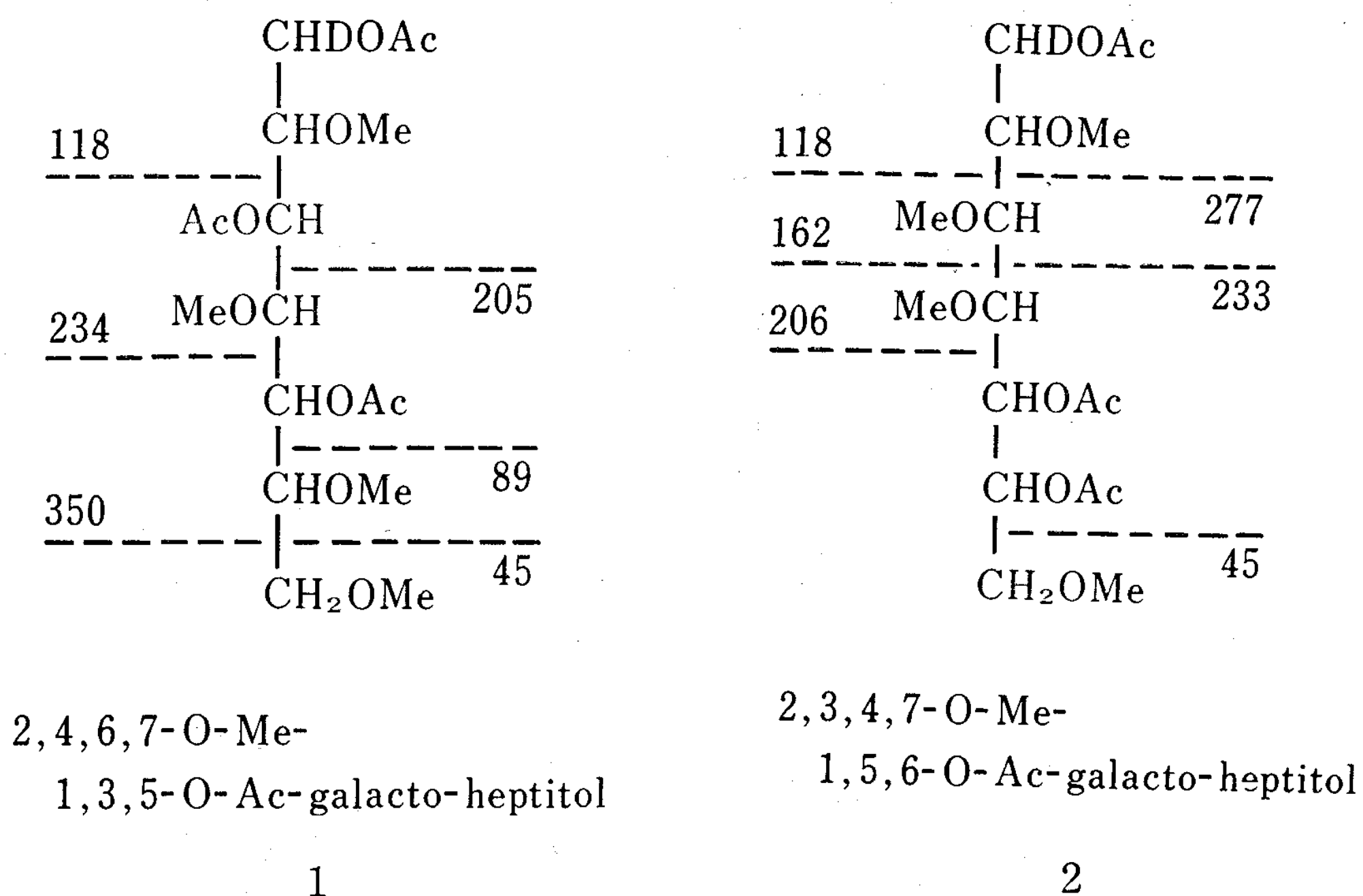
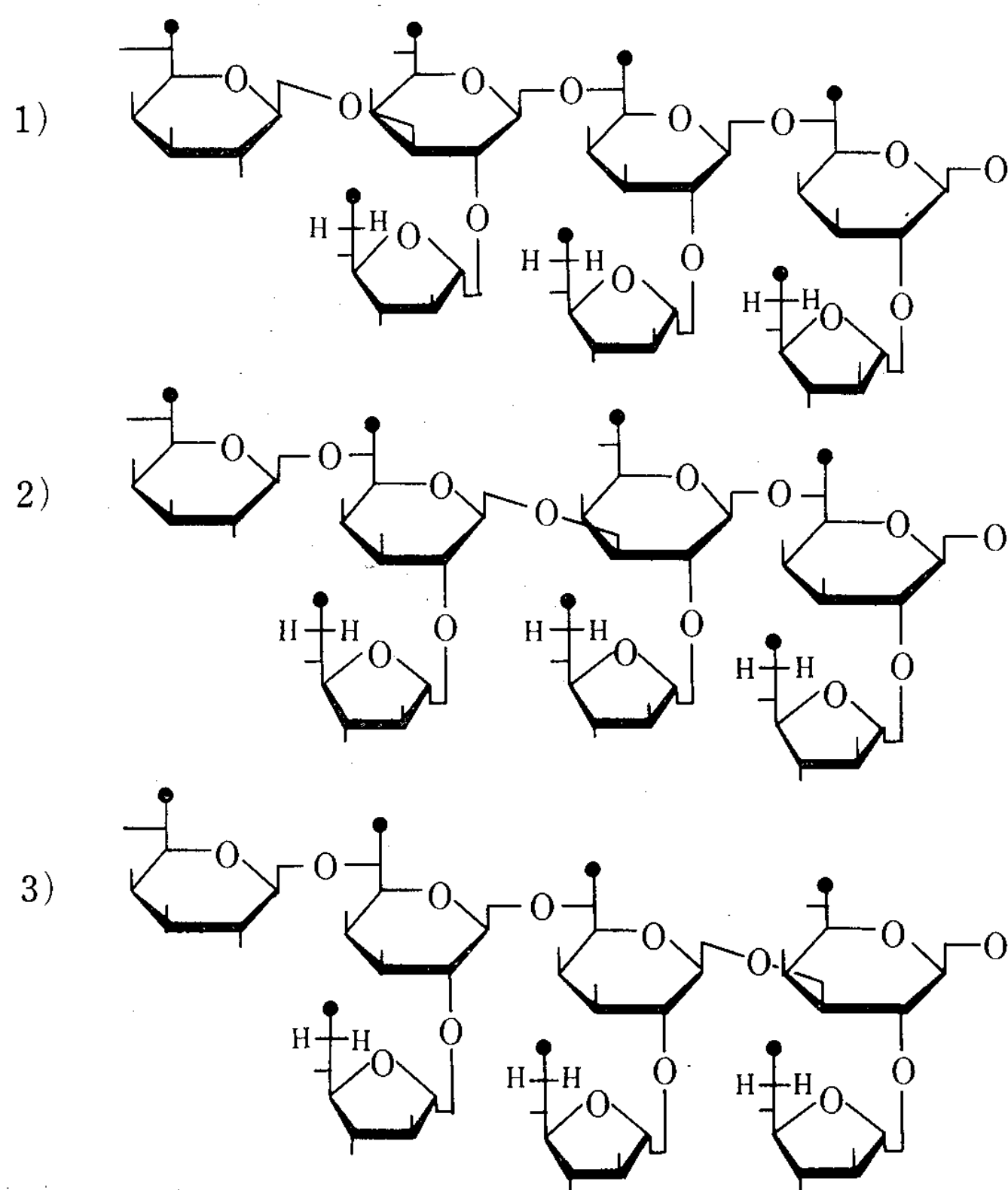


図 12 T-110 抗原多糖の構造

● : CH<sub>2</sub>OH

非還元末端の 6-deoxy-D-altro-hepto-furanosyl 残基の 1/3 はその C-2 位が未同定の物質で置換されている

め出発抗原と core 多糖の比旋光度を測定してみた。その結果、T-110 抗原の比旋光度  $[\alpha]_D^{25}$  は  $-0.5^\circ$  (c 0.6%, 水) であり、core 多糖の比旋光度  $[\alpha]_D^{25}$  は  $-20^\circ$  (c 0.4%, 水) であることから T-110 抗原多糖を構成している core 多糖の D-glycero-D-galacto-heptose の結合は  $\beta$  結合であり、その C-2 に結合している 6-deoxy-D-altro-heptose は  $\alpha$  結合をしていることが判明した。

一般に細菌由来の多糖質抗原は、オリゴ糖の繰り返し単位から構成されていることが知られているので、上記の実験結果から T-110 抗原多糖の繰り返し単位は 7 単糖から構成され、そのうちの 4 ケは D-glycero-D-galacto-heptose であり、残りの 3 ケは 6-deoxy-D-altro-heptose であって、その構造は図 12 に示す 3 種類のうちの 1 つであろうと考えられた。

図 13 I 型 (L 44 株) 抗原多糖の構造

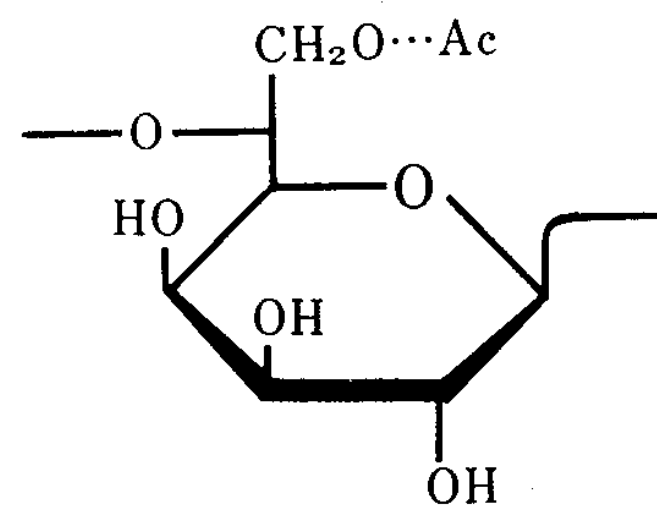
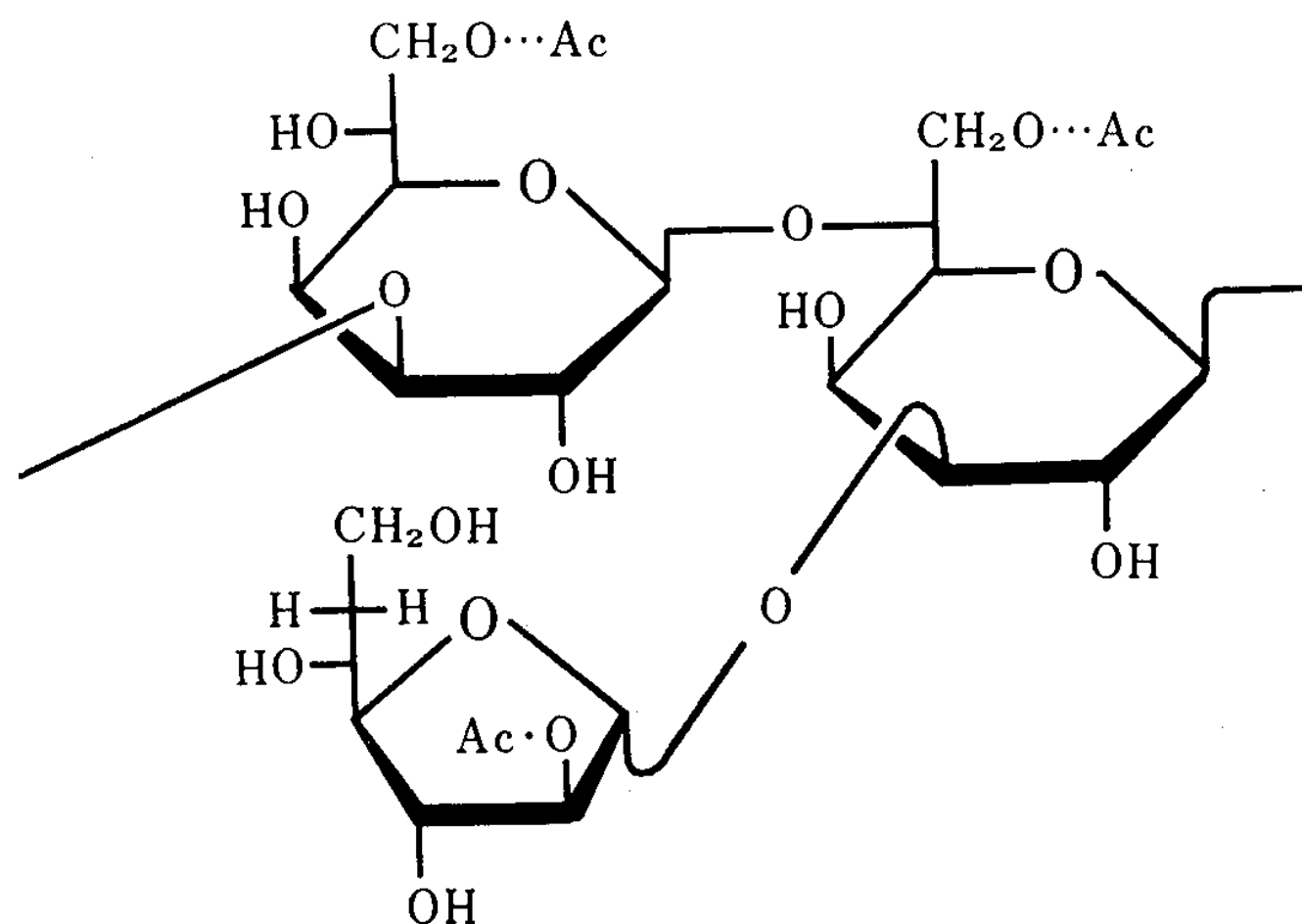


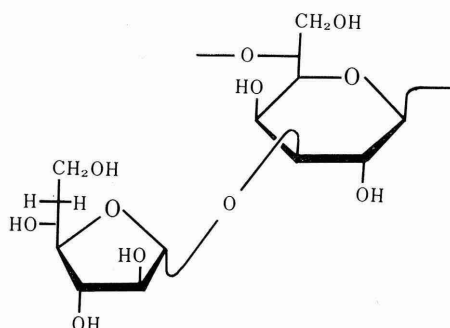
図 14 II 型 (L 49 株) 抗原多糖の構造



## 考 察

1974 年、*Eubacterium saburreum* の多糖質抗原が自然界では珍しい heptose の polymer で構成されていることが、Hoffman・等<sup>1)</sup>によって初めて報告された。彼等は *E. saburreum* L 44 株 (血清型 I) の抗原多糖が D-glycero-D-galacto-heptose だけから構成される homo-glycan であって、それらが互いに  $\beta$ -(1-6) 結合を繰り返した直鎖状の構造 (図 13) をとっていることを報告した。次いで *E. saburreum* L 49 株の抗原 (血清型 II) は D-glycero-D-galacto-heptose の他に 6-deoxy-D-altro-heptose を含有する 2 種類の heptose の hetero-glycan であって、この抗原の core 多糖を構成する D-glycero-D-galacto-heptose は、 $\beta$ -(1-3) と  $\beta$ -(1-6) 結合を交互に繰り返した直鎖構造をとっており、 $\beta$ -(1-6) 結合の D-glycero-D-galacto-heptose 残基の C-3 位に furanose 型の 6-deoxy-D-altro-heptose が非還元末端糖として結合した構造 (図 14) をとっていることを報告した<sup>2)</sup>。次いで Kondo・

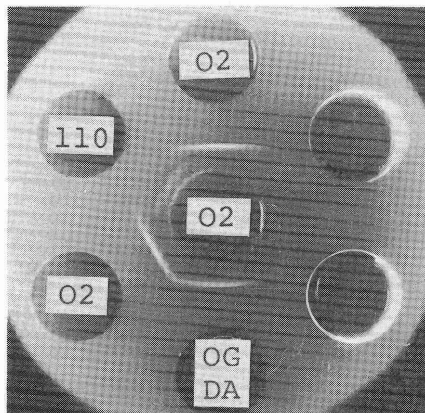
図 15 III 型 (O2 株) 抗原多糖の構造



等<sup>3)</sup>は III 型抗原 (O2 株) は II 型抗原と同じく D-glycero-D-galacto-heptose と 6-deoxy-D-altro-heptose から構成されているが、この抗原の core 多糖を構成する D-glycero-D-galacto-heptose は、それらが互いに  $\beta$ -(1-6) 結合をした直鎖状の構造をとっており、各 D-glycero-D-galacto-heptose の C-3 位に furanose 型の 6-deoxy-D-altro-heptose が非還元末端糖として結合した構造 (図 15) をとっていることを報告した。従って III 型抗原の core 多糖は、I 型抗原と全く同一であり、また、この抗原の繰り返し単位の構造は、II 型抗原の繰り返し単位の構造と一部共通していることが明らかにされた。

次に、T-110 抗原多糖は II 型および III 型抗原と同じく、6-deoxy-D-altro-heptose と D-glycero-D-galacto-heptose から構成される hetero-glycan であるが、その構造は、II 型および III 型抗原のそれといくつかの点で異なっている。その相違点の一つは core 多糖を構成する D-glycero-D-galacto-heptose の結合様式であって、T-110 抗原では  $\beta$ -(1-6) 結合をした 3 ケの D-glycero-D-galacto-heptose 毎に  $\beta$ -(1-3) 結合をした 1 ケの D-glycero-D-galacto-heptose が付け加わっていて、これが繰り返し単位の core となっている。これは II 型や III 型ではみられなかった新しい構造である。次の相違点としては II 型と III 型抗原では furanose 型の 6-deoxy-D-altro-heptose が  $\beta$ -(1-6) 結合の D-glycero-D-galacto-heptose の C-3 位に結合していたが、T-110 抗原の場合には furanose 型の 6-deoxy-

図 16 抗 III 型 (O2 株) 血清に対する III 型 (O2) 抗原、脱アセチル化 II 型 (OG-DA) 抗原および T-110 抗原の反応



中央の O2: 抗 III 型 (O2 株) 血清  
110: T-110 抗原  
O2: III 型 (O2 株) 抗原  
OG: II 型 (OG 株) の脱アセチル化抗原  
DA

D-altro-heptose が  $\beta$ -(1-6) 結合をした分岐性の D-glycero-D-galacto-heptose 並びに、 $\beta$ -(1-3) 結合の D-glycero-D-galacto-heptose の何れも C-2 位に結合していることであって、この構造も II 型や III 型ではみられなかった新しい構造である。

図 16 は抗 III 型 (O2 株) 血清 (中央) に対して III 型 (O2 株) 抗原と II 型 (OG 株) の脱 acetyl 化抗原 (OG-DA, II 型抗原の 6-deoxy-D-altro-heptose の一部はその C-2 位に O-acetyl が結合している) および T-110 抗原のゲル内沈降反応を行った結果である。III 型 (O2) 抗原の沈降線と II 型 (OG-DA) 抗原の間には spur 形成が認められるが、これは既にのべた如く、この 2 つの抗原の間には共通な抗原構造部分 [6-deoxy- $\alpha$ -D-altro-heptofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glycero-D-galacto-heptopyranosyl] があるからである。一方 III 型 (O2 株) 抗原の沈降線と T-110 抗原の沈降線の間には融合も spur 形成も認められない。これは T-110 抗原の非還元末端の 6-deoxy-D-altro-heptose が D-glycero-D-galacto-heptose に結合する部位 [6-deoxy- $\alpha$ -D-altro-heptofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glycero-D-

galacto-heptopyranosyl] が異なるためであって、III 型血清側に形成されている不鮮明な沈降線は、III 型抗原と T-110 抗原がその非還元末端に furanose 型の 6-deoxy- $\alpha$ -D-altro-heptose を含有していることを反映した結果であると考えられる。従って、T-110 抗原は II 型および III 型抗原と構成糖が同じであっても、その抗原構造は全く異なるものであり、血清学的に全く新しい血清型であることが証明されたわけである。

次に、6-deoxy-D-altro-heptofuranosyl 残基の C-2 位に結合している末同定の置換基についてであるが、この置換基は O-acetyl 基とは異なるものと推定される。その根拠は使用したメチル化の条件では、反応が強アルカリ中で行われるため存在する O-acetyl 基は全てはずれ、水酸基が裸となり置換基のない水酸基と同様にメチル化されるからである。また C-2 位に置換基をもつ 6-deoxy-D-altro-heptose のピークが core 多糖のメチル化 alditol acetate (図 10) にもわずかながら残っていることから、末同定の置換基は 0.05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 80°C, 210 分の加水分解条件でははずれず (O-acetyl 基ははずれる), 0.25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 100°C, 13 時間の加水分解条件によって初めてはずれることが判る。従ってこの置換基は酸水解に対して O-acetyl 基よりも、より安定な結合をしていると考えられる。また T-110 抗原多糖の比旋光度 ( $[\alpha]_D^{25} - 0.5^\circ$ ) は、これまで 6-deoxy-D-altro-heptose と D-glycero-D-galacto-heptose を含む抗原多糖の比旋光度 (II 型抗原<sup>2)</sup>  $[\alpha]_D + 49^\circ$ , III 型抗原<sup>3)</sup>  $[\alpha]_D + 58^\circ$ ) に比較して異常に低い値を示している。その理由は 6-deoxy-D-altro-heptose の C-2 位に結合している末同定の置換基の存在によるものであらうと考えられる。

## 結 論

*Eubacterium saburreum* T-110 株の多糖質抗原の構造について研究を行い、次の結果を得た。

1. T-110 抗原多糖は 6-deoxy-D-altro-heptose と D-glycero-D-galacto-heptose から構成され、その構成比は 1.5 : 2.0 の割合である。

2. この抗原に含まれる 6-deoxy-D-altro-heptose は全て furanose 型の非還元末端糖として存在しているが、D-glycero-D-galacto-heptose は全て pyranose 型であって、その 25% は 6-linked の chain sugar であり、25% は 2,3-linked の分岐糖、残りの 50% は 2,6-linked の分岐糖として存在している。

3. この抗原の core 多糖の構造は  $\beta$ -(1-6) 結合をした 3 ケの D-glycero-D-galacto-heptopyranosyl 残基毎に  $\beta$ -(1-3) 結合をした 1 ケの D-glycero-D-galacto-heptopyranosyl 残基が結合した 4 糖の繰り返し単位を基本構造としている。

4. 非還元末端の 6-deoxy-D-altro-heptofuranosyl 残基は、2,3-linked 並びに 2,6-linked の D-glycero-D-galacto-heptopyranosyl 残基の何れも C-2 位に  $\alpha$ -結合をしている。

また 6-deoxy-D-altro-heptofuranosyl 残基の 1/3 はその C-2 位に O-acetyl とは異なる未知の置換基が結合している。

5. 以上の結果から *E. saburreum* T-110 株の抗原多糖の構造は、図 12 に示す 3 種類の構造の何れかであると結論した。

## 謝 辞

稿を終わるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました近藤亘教授に衷心より謝意を表します。また、本研究に御教示と御助力を賜りました明治製菓中央研究所、伊藤定一郎博士に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Hoffman, J., Lindberg, B., Svensson, S. and Hofstad, T.: Structure of the polysaccharide antigen of *Eubacterium saburreum*, strain L 44., Carbohydr. Res., **35**: 49-53, 1974.
- 2) Hoffman, J., Lindberg, B., Lönngrén, J. and Hofstad, T.: Structural studies of the polysaccharide antigen of *Eubacterium saburreum*, strain 49. Carbohydr. Res., **47**: 261-267, 1976.



- 3) Kondo, W., Sato, N. and Ito, T.: Chemical structure of the polysaccharide antigen of *Eubacterium saburreum*, strain 02. Carbohydr. Res., **70**: 117-123, 1979.
- 4) 東京大学伝染病研究所学友会編: 細菌学実習提要. 139-145 頁, 丸善, 東京, 1958.
- 5) Krause, R. M. and McCarty, M.: Studies on the chemical structure of the Streptococcal cell wall. J. Exp. Med., **114**: 127-140, 1961.
- 6) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., **28**: 350-356, 1956.
- 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265-275, 1951.
- 8) Sweely, C. C., Bentley, R., Makita, M. and Wells, W. W.: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. J. Am. Chem. Soc., **85**: 2497-2507, 1963.
- 9) Hakomori, S.: A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J. Biochem. (Tokyo), **55**: 205-208, 1964.
- 10) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.: Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed., P 641-657. Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1974.