

論 文 内 容 要 旨

論文題名

海洋性細菌 *Pseudomonas* sp. WAK-1 菌株の生産するムコ多糖および
硫酸多糖の構造解析と機能に関する研究

氏名

松田 政広

内容

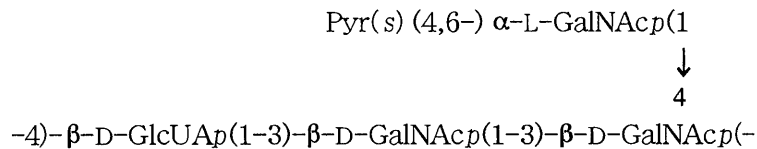
瀬戸内海沿岸でワカメ (*Undaria pinnatifida*) 葉体表面より分離された WAK-1 菌株は、3 % ショ糖添加 ZoBell 寒天培地上で異なった 2 種の多糖を生産することが認められた。本研究は WAK-1 菌株の同定を行うと共に、生産される 2 種の多糖の構造決定と抗ウイルス活性について明らかにした。

WAK-1 菌株はグラム陰性菌と認められ、TEM による電子顕微鏡観察で菌体は幅 0.5 - 0.7 μm 、長さ 1.3 - 1.9 μm の短桿菌で単極鞭毛を有しており、光学顕微鏡観察で運動性が認められた。本菌株の生育 pH 範囲は pH 6.0 - 12.0、生育食塩濃度は 2.0 - 10.7 %、生育温度範囲は 10 - 30 $^{\circ}\text{C}$ と認められた。このように本菌株は塩化ナトリウム無添加や酸性領域で生育できず、海水で調製した培地に良く生育することから、海洋性細菌と考えられた。WAK-1 菌株はオキシダーゼテスト、カタラーゼテスト、 β -ガラクトシダーゼテスト陽性、O/F テストで酸化型を示し、D-グルコースから酸を産生し、L-アルギニン分解、硝酸塩還元能で陰性を示した。これらの形態学的、生理・生化学的性状、DNA の GC 比 (59.7 %) から、本菌株は海洋性 *Pseudomonas* 属と同定された。

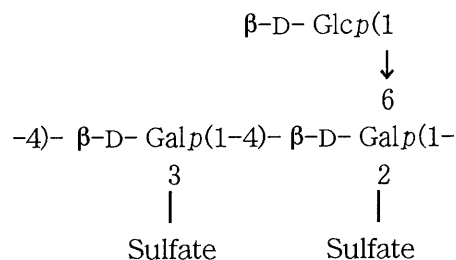
海洋性細菌 *Pseudomonas* 属 WAK-1 菌株が培養中に生じた粘質物から EtOH および CTAB 沈殿、DEAE-セルロースイオン交換クロマト分離によって多糖 A-1 および B-1 を

分離・精製した。得られた多糖は超遠心分析とセルロースアセテート膜電気泳動分析でそれぞれ均一性の高いことが認められ、平均分子量はそれぞれ 1.6×10^6 と 3.8×10^5 の値を示した。

多糖 A-1 は酸加水分解、カルボキシ基還元、ペーパークロマト、セルロースアセテート膜電気泳動、HPLC、イオンクロマト、GLC、 ^1H 、 ^{13}C NMR 分析などにより $\beta\text{-GlcUA}p : \beta\text{-GalNA}cp : \alpha\text{-GalNA}cp : \text{Pyr} = 1 : 2 : 1 : 1$ からなるムコ多糖と同定された。また、部分酸加水分解によって得られた精製オリゴ糖は $\beta\text{-D-GlcUA}p(1-3)\text{-D-GalNA}p$ のアルドバイオウロン酸の構造をもつと同定された。カルボキシ基還元多糖を脱アセトール処理、過ヨウ素酸酸化-スミス分解、箱守、および Purdie 法によるメチル化、GLC-MS、 ^1H 、 ^{13}C NMR 分析などを行った。これらの結果より多糖 A-1 は下記に示す構造と解析された。



多糖 B-1 は酸加水分解など多糖 A-1 と同様の手法により $\beta\text{-D-Glcp} : \beta\text{-D-Galp} : \text{硫酸基} = 1 : 2 : 2$ からなる硫酸多糖と推定された。多糖 B-1 とこれの脱硫酸多糖をそれぞれ過ヨウ素酸々化-スミス分解、箱守、および Purdie 法によるメチル化、GLC-MS、 ^1H 、 ^{13}C NMR 分析などを行った。これらの結果より多糖 B-1 は下記に示す構造と解析された。



多糖 A-1 には各種ウイルスに対して抗ウイルス活性は認められなかったが、これに化学修飾により硫酸基を付与した A1-S には新たに抗インフルエンザウイルス A 型 (FluV-A) 活性、抗単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 活性が発現した。一方、多糖 B-1 には抗 HSV-1 活性が認められ、化学修飾より硫酸基含有量を増加させた B1-S には新たに抗 FluV-A と抗呼吸器系ウイルス A 型 (RSV-A) 活性が発現した。多糖 A-1 には各種動物培養細胞に対する毒性は認められなかったが、多糖 B-1 にはヒト T-リンパ系の白血病細胞 MT-4 細胞に対して細胞毒性が認められ、また黒色腫 HMV-2 と子宮頸ガン G-HeLa 細胞に対しても弱い細胞毒性が認められた。脱硫酸された多糖 B-1 には抗ウイルス活性および細胞毒性は認められなくなった。

海産多糖の分子量および硫酸基含有量による抗ウイルス活性効果

Samples	S(%)	MW	Anti-viruses					
			FluV-A	FluV-B	HSV-1	HIV-1	PFluV-2	RSV-A
B-1S	14.7	1.1×10^5	+	-	+	NT	-	+
A-1S	9.1	2.4×10^4	+	-	+	NT	-	+
C-1	8.2	1.3×10^6	+	+	+	+	-	+
B-1	8.2	3.8×10^5	-	-	+	-	-	-
C-2	6.8	6.3×10^6	+	+	-	+	+	+
B-1DeS	1.1	2.0×10^4	-	-	-	NT	-	-
A-1	0	1.6×10^6	-	-	-	-	NT	NT

MW ; 多糖の平均分子量、S (%) ; 多糖の硫酸基含有量 (%)。

+ ; 抗ウイルス活性陽性、- ; 抗ウイルス活性陰性、NT; 未試験。

A-1 ; *Pseudomonas* sp. WAK-1 の作るムコ多糖、B-1 ; *Pseudomonas* sp. WAK-1 の作る硫酸多糖、A-1S ; 多糖 A-1 の硫酸化物、B-1S ; 多糖 B-1 の硫酸化物、B-1DeS ; 多糖 B-1 の脱硫酸化物、C-1, C-2 ; *Cochlodinium polykrikoides* の作る硫酸多糖。

FluV-A, FluV-B ; インフルエンザウイルス A および B 型、

HSV-1 ; 単純ヘルペスウイルス 1 型、HIV-1 ; エイズウイルス 1 型、

PFluV-2 ; パラインフルエンザウイルス 1 型、

RSV-A ; 呼吸器系ウイルス A 型 (Long 株)。

これまでに研究を行ってきた海産硫酸多糖のうちで、分子量、硫酸基含有量の比較的類似する渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* が作る天然硫酸多糖と本多糖 B-1 の抗ウイルス活性を比較した結果、本多糖 B-1 は、前者に比べ抗ウイルススペクトラムがはるかに狭いことが認められた。しかしながら、化学修飾により硫酸基含有量を増加させることにより、本多糖に新たな抗ウイルス活性が発現した。このことから、本多糖の示す抗ウイルス活性は、硫酸基含有率および糖鎖構造が深く、関わっていることが推定される。