

## 高速液体クロマトグラフィー

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

# 201

### 放線菌の化学分類(2)

Chemotaxonomy of Actinomycetes (2)

#### 還元糖の分析

Determination of Reducing Sugars

ほう酸緩衝液を移動相として用いるイオン交換分離とアルギニンを反応試薬として用いるポストカラム蛍光検出の組合せによるHPLCシステムは還元糖に対して選択的かつ高感度な分析法です。一方、放線菌の全菌体糖成分は細胞壁タイプと組み合わせて、放線菌の属の検索に有用であることが報告されています。今回は、島津還元糖分析システムを用いて放線菌の全菌体糖成分の分析を行うとともに、HPLC条件では分離不可能なマジュロース(Mad)とマンノース(Man)を酵素反応を利用して同定することにより菌株のタイプ分類を行いましたので紹介いたします。

#### ■放線菌の糖タイプ分類

Table 1に示しますように、2つの酵素の基質特異性の違いにより、ヘキソキナーゼはマンノース(Man)とグルコース(Glu)に対して、D-ガラクトースオキシダーゼはマジュロース(Mad)とガラクトース(Gal)に対して選択的に反応します。ヘキソキナーゼとD-ガラクトースオキシダーゼの2つの酵素の基質特性の違いを利用して、試料液を処理し、Madの同定を行いました。

注入試料として加水分解原液(tube 1)、ヘキソキナーゼを反応させた液(tube 2)、さらにD-ガラクトースオキシダーゼと反応させた液(tube 3)の3点を分析しました。

Man+Madの位置に溶出するピークは、Table 2のように判定できます。また、meso-A<sub>2</sub>pmを有する放線菌株についてはTable 3のように分類(Lechevalier, 1970)されますので、これに基づいて、放線菌の糖タイプ分類を行いました。

Table 1 酵素の基質特異性  
Substrate Specificity of the Enzymes

	Mad	Man	Gal	Glu
Hexokinase	-	+	-	+
D-Galactose oxidase	+	-	+	-

Table 2 Man+Madのピークの判定  
Judgement of (Mad+Man) peaks

tube 1	tube 2	tube 3	Judgement
+	+	-	Mad
+	-	-	Man

Table 3 菌株についての分類  
Classification of Actinomycetes

Sugar Types	Main Reducing Sugars
A	Ara, Gal
B	Mad
C	(Not Specified)
D	Ara, Xyl

Table 4 分析条件  
Analytical Conditions

<for separation>

Column : Shim-pack ISA-07/S2504  
(4.0mmI.D.×250mmL.)

Mobile Phase : gradient elution

A) 0.1M Boric Acid (pH8.0, KOH)  
B) 0.4M Boric Acid (pH9.0, KOH)

Temperature : 65°C

Flow Rate : 0.7mL/min.

<for detection>

Reagents : 1% L-Arginine/3% Boric Acid

Flow Rate of Reagents : 0.5mL/min.

Reaction Temperature : 150°C

Detector : RF-535

: Fluorescence Detector

WAVELENGTH : EX = 320nm, EM = 430nm

RESPONSE : SLOW

SENSITIVITY : LOW

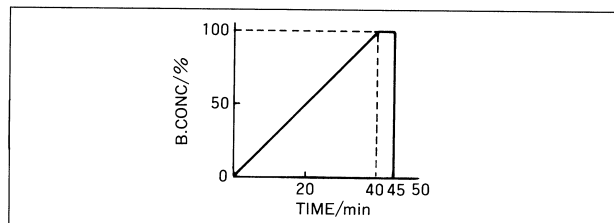


Fig.1 Gradient Curve

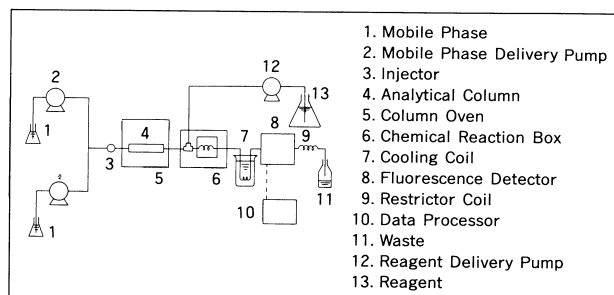


Fig.2 Flow Diagram

分析の結果、3放線菌株はつぎのように判定されました。

● *Rhodococcus equi*

Fig.3(a)でMan+Madのピークが確認されますが、Fig.3(b)でヘキシナーゼを反応させた液では、このピークが消滅しており、Manであると思われます。また、アラビノース(Ara)およびガラクトース(Gal)のピークが確認されますので、Aタイプと判定できます。

● *Actinomadura madurae*

Fig.4(a)でMan+Madのピークが確認されますが、Fig.4(b)でヘキシナーゼを反応させた液では、このピークが消滅せず、Fig.4(c)のさらにD-ガラクトースオキシダーゼと反応させた液で、このピークが消滅しており、Madであると思われますので、Bタイプと判定できます。

● *Micromonospora echinospora* subsp. *pallida*

Fig.5(a)でMan+Madのピークが確認されますが、Fig.5(b)のヘキシナーゼを反応させた液では、このピークが消滅しており、Manであると思われます。また、アラビノース(Ara)およびキシロース(Xyl)のピークが確認されますので、Dタイプと判定できます。

(データは、(財)発酵研究所主任研究員 横田明先生に提供していただきました。)

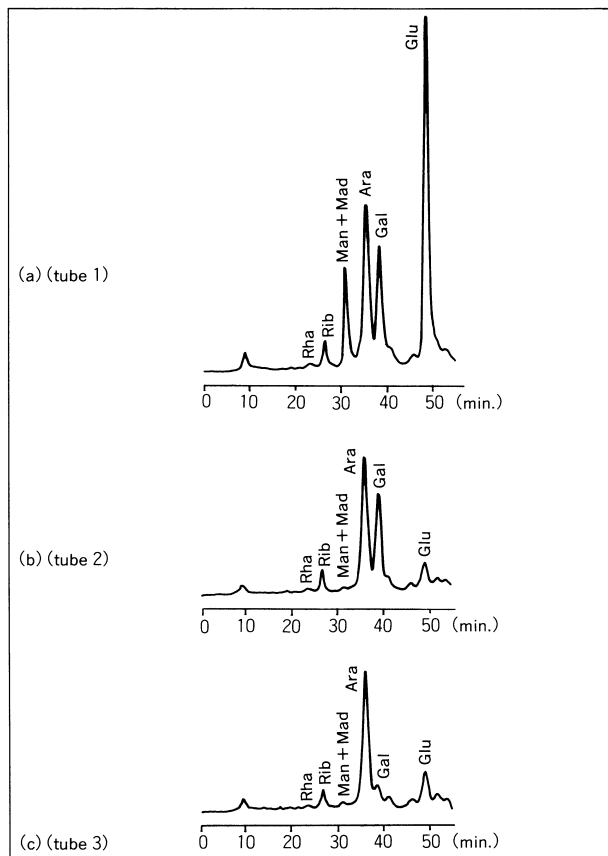


Fig.3 *Rhodococcus equi*の分析  
Chromatogram of *Rhodococcus equi*

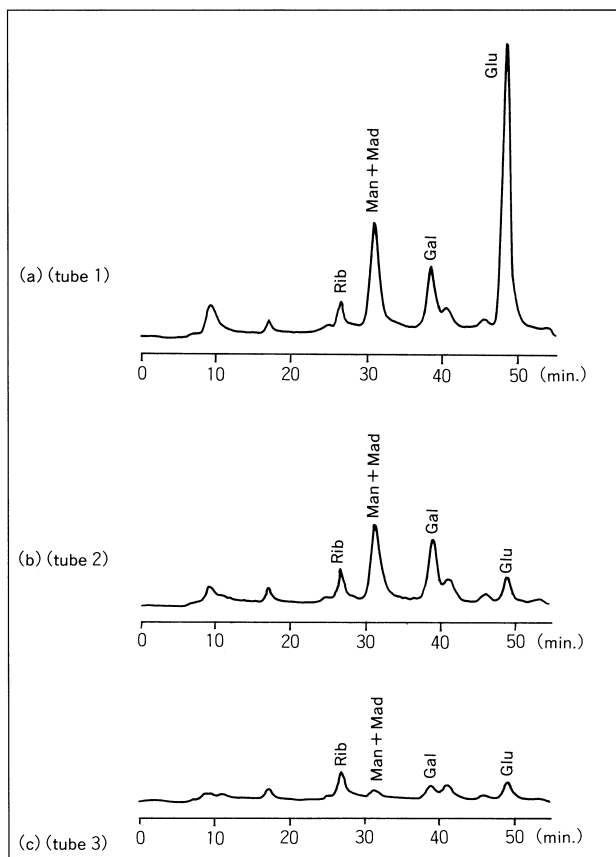


Fig.4 *Actinomadura madurae*の分析  
Chromatogram of *Actinomadura madurae*

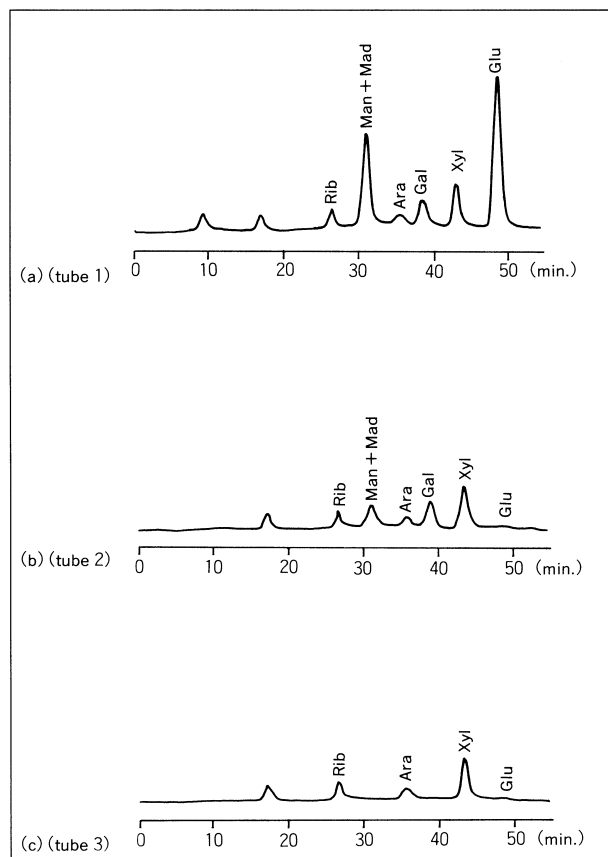


Fig.5 *Micromonospora echinospora* subsp. *pallida*の分析  
Chromatogram of *Micromonospora echinospora* subsp. *pallida*

初版発行：1990年3月

**島津製作所** 分析計測事業部 応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691(携帯電話不可)  
● 携帯電話専用番号(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>  
会員制Webの閲覧だけでなくいろいろな情報サービスが受けられます。