

## 細菌의 糖脂質에 關한 研究

### 第二報 *Selenomonas ruminantium* 의 糖脂質의 構造

金 教 昌

忠北大學 農化學科

(1974년 5월 15일 수리)

## Studies on Glycolipids in Bacteria

### Part II. On the Structure of Glycolipid of *Selenomonas ruminantium*

Kyo Chang Kim

Dept. of Agrochemistry., Chung Buk College

(Received May 15, 1974)

### Summary

The chemical structure of glycolipid of *Selenomonas ruminantium* cell wall was to be elucidated. The bacterial cells were treated in hot TCA and the glycolipid fractions were extracted by the solvent  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (1:3). The extracted glycolipids fraction was further separated by acetone extraction. The acetone soluble fraction was named as the spot A-compound. The acetone insoluble but ether soluble fraction was named as the spot B-compound. These two compounds were examined for elucidation of their chemical structure. The results were as follows:

1. The IR spectral analysis showed that O-acyl and N-acyl fatty acids were linked to glucosamine moiety in the spot A-compound. However in the spot B-compound in addition to O and N-acyl acids phosphorus was shown to be attached to glucosamine.
2. It was recognized by gas liquid chromatography that spot A compound contained beta-OH  $\text{C}_{13:0}$  fatty acid in predominance in addition to the fatty acid with beta-OH  $\text{C}_9:0$ , whereas the spot B compound was composed of the predominant fatty acid of beta-OH  $\text{C}_{13:0}$  with small amount of beta-OH  $\text{C}_9:0$ .
3. According to the paper chromatographic analysis of hydrazinolysis products of the spot A compound, a compound of a similar Rf value as the chitobiose was recognized, which indicated a structure of two molecules glucosamine condensed. The low Rf value of the hydrazinolysis product of the spot B-compound confirmed the presence of phosphorus attached to glucosamine.

4. The appearance of arabinose resulting from ninhydrin decomposition of the acid hydrolyzate of the spot A compound indicated that the amino group is attached to C<sub>2</sub> of glucosamine.

5. The amount of glucosamine in the N-acetylated spot A compound decreased in half of the original content by the treatment with NaBH<sub>4</sub>, indicating that there are two molecules of glucosamines in the spot A compound.

The presence of 1, 6-linkage between two molecules of glucosamine was suggested by the Morgan-Elson reaction and confirmed by the periodate decomposition test.

6. By the action of  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase the N-acetylated spot A compound was completely decomposed into N-acetyl glucosamine, whereas the spot B compound was not. This indicated the spot A compound has a beta-linkage.

7. When phosphodiesterase or phosphomonoesterase acted on <sup>32</sup>P-labeled spot B compound, <sup>32</sup>P was not released by phosphodiesterase, but completely released by phosphomonoesterase. This indicated that one phosphorus is linked to glucosamine moiety.

8. The spot A compound is assumed to have the following chemical structure: That is glucosaminyl  $\beta$ -1, 6-glucosamine to which O-acyl and N-acyl fatty acids are linked, of which the predominant fatty acid is beta-OH C<sub>18:0</sub> fatty acid in addition to beta-OH C<sub>9:0</sub> fatty acid

9. The spot B compound is likely to have the linkage of glucosaminyl- $\beta$ -1, 6-glucosamine to which phosphorus is linked in monoester linkage. Furthermore both O-acyl and N-acyl fatty acids contained beta-OH C<sub>18:0</sub> fatty acid predominantly in addition to beta-OH C<sub>9:0</sub> fatty acid.

## 一. 緒 論

細菌細胞의 表面 構造의 形態나 諸機能에 關한 研究가 進展됨에 따라 表面膜에 存在하는 脂質이 注目되어 表層膜의 構造와 機能面에서 脂質의 重要性이 밝혀지기 시작하였다. 表層膜의 構成成分에 하나인 lipopolysaccharide의 基礎的 構成成分은 lipid A<sup>(1)</sup>라고 불리우는 糖脂質과 多糖體인데 多糖體는 菌의 種類에 따라 單糖構成 또는 構造를 달리 하고 있다.<sup>(2)</sup> 脂質의 構成成分도 大部分의 菌種에 共通의이나 어떤 菌株에는 特殊한 糖脂質이 들어 있는 수도 있다. Gram 陽性細菌의 細胞膜에는 mucopeptide, teichoic acid, 多糖, 드물게 teichuronic acid가 들어있으나 比較的 構造는 簡單하다.

이것에 對하여 Gram 陰性細菌은 複雜한 表面構造를 갖고 있으며 表面 構造全體를 cell envelope라 부르며 脂質, lipopolysaccharide, lipoprotein, mucopeptide를 含有하며 各成分은 菌株에 따라 相當한 差異가 있는 것이 알려졌다.

Boivin<sup>(3)</sup> 등은 Gram 陰性菌의 細胞壁에 含有된 lipopolysaccharide의 한 研究로서 *Salmonella*에서

trichloroacetic acid (T.C.A.)로 抽出한 endotoxin을 醋酸으로 處理하여 처음으로 lipid 劃分과 多糖劃分을 分離하여 fraction A, fraction B라고 불렀다. 이것을 뒤에 各各 注射한 바 fraction A는 lipopolysaccharide 本來의 1/10의 毒性을 가지나 O-抗原의 性質은 없으며 fraction B에는 毒性은 없으나 O-抗原으로의 性質을 갖는 것을 發見하였다. Westphal<sup>(4)</sup> 등은 lipopolysaccharide를 稀鹽酸과 加熱하여 lipid 劃分을 抽出해 이것을 lipid A라고 命名하고 그의 化學構造의 推定에 着手하였다. 이들은 이 lipid A가 lipopolysaccharide의 毒性의 活性因子이나 그것만을 分離한 것은 活性이 本來의 lipopolysaccharide보다 減少하는 것을 밝혔는데 이것은 lipid A가 比較的 물에 不溶性이라는 것에 그 原因이 되는 것으로 生覺하였다.

이 研究가 發端이 되어 lipid A의 化學構造 決定이 lipopolysaccharide의 生物學的 性狀 特別히 毒素의 究明에 있어서 重要な 課題가 되었다.

Nakano<sup>(5)</sup>는 *Salmonella* 變異株의 lipopolysaccharide에 多糖類가 大部分 缺如하여 脂質含量이 50% 이상이나 되어도 完全한 化學構造를 갖는 lipopolysaccharide와 比較하여 뒤에 對한 致死毒性은 變化가 없었다고 報告하고 lipopolysaccharide

特有的 構成成分인 lipid A 는 生物活性에 重要한 役割을 하고 있는 것이라고 報告하였다.

Kasai<sup>(6)</sup> 등은 *Bordetella* 屬의 2種, *Escherichia coli* 및 *Shigella flexneri* 에서 Westphal 의 方法<sup>(1)</sup> 으로 調製한 lipopolysaccharide 의 lipid A 劃分을 TLC 로 分析한 結果 8種 以上의 脂質成分을 分離하고 이들 脂質成分의 比率는 菌株 및 培養條件등 이 다르면 變化하는 것을 밝혔다.

著者는 *Selenomonas ruminantium* 이 乳酸을 炭素源으로 한 경우에는 生育에 高濃度の Biotin 을 要求하며 glucose 를 炭素源으로 한 경우에는 C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> 의 直鎖飽和 脂肪酸中의 하나를 要求<sup>(6)</sup>하며 또 培養條件을 變化시켜도 lipid A 部分의 TLC pattern 에서는 별로 變化가 보이지 않음을 報告<sup>(7)</sup> 하였다.

Nowotny<sup>(8)</sup> Colsse<sup>(9)</sup> 은 *Escherichia coli* 08 및 0111의 lipopolysaccharide 의 lipid A 劃分에서 처음으로 glucosamine 의 磷酸 ester 를 分離하고 이들의 構造는 glucosamine-6-phosphate 와 glucosamine-4-phosphate 라 結論지었다. 또한 Nowotny<sup>(10)</sup> 는 *Salmonella* 의 lipid A 에서 glucosamine 磷酸結合體를 分離 確認하고 glucosamine 의 結合樣式에 對하여 磷酸이 3分子의 glucosamine 의 사이에 phosphodiester 結合을 하고 있는 것으로 推定하였다.

한편 Burton<sup>(11)</sup> 등은 *Escherichia coli* 0111-B<sub>4</sub>에서 分離한 lipid A 의 構造는 2分子의 glucosamine 이 glucoside 結合을 하고 있으며 glucosamine 의 C<sub>4</sub>位置에 磷酸이 monoester 結合을 하고 있고 phosphodiester 結合의 可能性은 없다고 밝혔다. Heath<sup>(12)</sup> 등은 *Escherichia coli* 0111의 lipid A 를 alkali 및 弱酸을 次來로 處理하여 glucosamine 과 β-OH 酸 1:1인 oligosaccharide 를 分離하고 있다. 이 oligosaccharide 는 平均 3分子의 glucosamine 이 C<sub>3</sub> 또는 C<sub>4</sub>의 位置에 glucoside 結合을 하고 있는 것 같다고 하였다.

最近 Gmeiner<sup>(13)</sup> 등은 *Salmonella minnesota* Re 變異株의 lipopolysaccharide 를 hydrazine 으로 分解하여 glucosamininyl β-1,6-glucosamine 을 얻었다.

또 Adams<sup>(14)</sup> 등은 *Serratia marcescens* 의 lipid 劃分에서 β(1,6)結合이라고 生覺되는 2'糖體를 分離하고 그들은 또 *Escherichia coli* 및 *Shigella flexneri* 의 lipid A 劃分에서 1,4結合이라고 生覺되는 glucosamine 2'糖體를 分離하였다.

以上 細菌의 糖脂質의 研究는 全部好氣性 細菌에서 이루어진 것이며 嫌氣性 細菌에 對한 研究는 없었다.

著者는 *Selenomonas ruminantium* 의 糖脂質을 完全히 除去한 細胞에서 直接 lipid A 를 얻어 silica gel 薄層 chromatography 에 依하여 分析한 結果 約 12種의 脂質成分을 分離한 바 있다.<sup>(15)</sup>

本 研究에서는 lipid A 의 基本 骨格은 基本的으로는 glucosamine 과 glucosamine 의 結合 即 glucosamine-*p*-glucosamine 이라 推定되나 菌株에 따라 그 結合部位를 달리할 것이라 생각하고 앞서 *Selenomonas ruminantium* 의 糖脂質에서 얻은 12種의 脂質成分中 2個의 spot 化合物의 構造를 밝히고져 實驗하여 한개의 spot 는 glucosamine 에 脂肪酸이 結合하여 있으며 한개의 spot 에는 glucosamine 과 脂肪酸 및 磷酸이 結合되어 있음을 알았으므로 이에 報告하는 바이다.

## 二. 實驗 方法

### 1. 使用 菌株

既報<sup>(15)</sup>에서 使用하였던 菌株 *Selenomonas ruminantium* var *lactilytica* 菌을 糖脂質 分離用菌株로 使用하였다.

### 2. 菌의 培養方法<sup>(16)</sup>

*Selenomonas ruminantium* 을 前報의 表2의 glucose 培地에 valerate 또는 caproate 를 0.0019% 濃度가 되게 添加하여 37°C 에서 嫌氣의으로 8時間 培養하였다.

乳酸鹽을 energy 源으로 할때는 前報 表2의 乳酸鹽培地를 使用하여 18時間 37°C 의 嫌氣의 條件下에서 培養하였다.

培養液에서 菌體를 連續 遠心分離機로 集菌하여 물로 두번 씻고 糖脂質 抽出前에 冷藏庫에서 凍結시켜 一晝夜 두고 實驗하였다. <sup>32</sup>P 를 含有하는 糖脂質 分離用菌의 培養은 glucose 培地 100ml 에 50mci 의 <sup>32</sup>P 를 培地에 磷酸鹽 代身加하고 培養하였다.

### 3. 分析方法

#### (1) 糖脂質의 抽出 및 精製

凍結시켰든 菌體의 얼음을 녹인 다음 菌體를 ethanol : ether (3:1)로 10分씩 3回 抽出한 다음

에 chloroform : methanol (1 : 3)로 10분씩 3회 抽出하여 磷脂質을 完全히 除去하였다. 남은 菌體는 5% TCA 로 90°C 에서 15分處理하고 遠心分離하여 TCA 溶解部分을 除去하였다.

이 殘渣는 물로 두번 씻고 80°C 에서 60分間 chloroform : methanol (1 : 3)로 還流冷却裝置로 處理하였다.

遠心分離後 chloroform : methanol 劃分은 減壓 蒸溜濃縮시키고 다음에 chloroform : methanol (8 : 2)로 다시 抽出하여 얻은 劃分은 眞空에서 濃縮하고 acetone 可溶區分 (A)과 acetone 不溶部分에서 ether 可溶區分 (B)을 分離하여 chloroform : methanol : water (65 : 25 : 4), chloroform : methanol : 28% ammonia (80 : 20 : 0.4)을 展開液으로 使用하여 TLC 法으로 精製하였다.

### (2) 赤外線分析

TLC 로 精製한 spot A.B 化合物은 乾燥시킨 다음 KBr 結晶粉末과 섞어 tablet 를 만들어서 赤外線分析機(JR-E 型, 日本 分光工業會社製)로 分析하였다.

### (3) 旋光性的 測定

TLC 板에 展開精製된 spot A.B 化合物 (13mg)를 pyridine (1.2ml)에 溶解시키고 旋光性을 日本 分光工業會社의 DP-SL 型 polarimeter 로 測定하였다.

### (4) Spot A.B 化合物의 O-deacylation

Spot A.B 化合物의 O-acyl 脂肪酸, linkage 를 끊기 위하여 Wilkinson의 方法<sup>(17)</sup>에 따라 alkali 加水分解를 하였다.

即 spot A.B 化合物(各90mg)를 chloroform 5ml 에 溶解시키고 0.2M KOH methanol 溶液 5ml 를 加하여 37°C 에서 30分間 維持한 것에 새로 蒸溜한 ethyl formate (0.5ml)를 加하고 다시 같은 溫度에서 5分間 作用시켰다.

그 後에 溶媒는 眞空蒸溜로 除去하고 이 反應生成物은 물과 chloroform 으로 分別 分離하였다. 이때 脂肪酸의 methyl ester 는 chloroform layer 에 오며 deacyl 化한 spot A.B 化合物은 습과 같은 狀態로 chloroform 과 물의 中間에 位置하게 된다. 습과 같은 物質을 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 가든 desiccator 에서 乾燥시켰다.

### (5) Hydrazinolysis

Spot A.B 化合物을 Gmeiner 등의 方法<sup>(18)</sup>에 따라 hydrazine 分解를 시켰다. 即 이 化合物 90mg 를 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 가 든 desiccator 에 넣고 진공하에서 70°C

로 유지하여 完全히 乾燥시킨 다음 密封된 ampoule 속의 hydrazine 0.45ml 에 懸濁시키고 water bath 上에서 10時間 加熱하였다. 加熱이 끝나면 冷却시켜 開封하고 hydrazine 을 70°C 의 減壓下에서 蒸溜除去시키고 마지막으로 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 가든 desiccator 에서 完全히 除去시켰다.

殘渣는 물에 懸濁시키고 0.1N HCl 로 中和하고 遠心分離하였다. 遠心分離된 沈澱物은 물로 두번 抽出하고 이 抽出液은 遠心分離한 液과 混合하여 冷凍乾燥시켰다.

### 6) Deacyl 化한 Spot A.B 化合物의 酸分解

deacyl 化시킨 spot A.B 化合物을 100°C 에서 10 時間 4N HCl 로 分解시켰다. 分解物의 hexosamine 은 LKA-3B 型, 日立 amino acid 自動分析機로 分析하였다. 또한 一部試料은 Gardell<sup>(19)</sup> 이 改良한 Blix 의 方法<sup>(19)</sup>에 依하여 glucosamine 을 分析하였다.

### (7) 酸分解物의 Ninhydrin 分解

酸分解物의 glucosamine 을 確認하기 爲하여 Stoffyn 과 Jeanloz 法<sup>(20)</sup>에 따라 ninhydrin 分解를 하였다. 即 50μg glucosamine 을 녹인 水溶液을 表面張力을 利用하여 유리毛細管에 넣고 4% pyridine 水溶液에 2%가 되게 ninhydrin 을 녹인 水溶液 5μl 를 加하여 毛細管을 密封하고 끓는 물에서 30 分間 加熱處理하였다. 이 反應生成物은 paper chromatography 로 展開시켜 窒酸銀으로 發色시켰다.

### (8) deacyl 化한 spot A,B 化合物의 N-acetyl 化

deacyl 化한 spot A,B 化合物은 Strominger<sup>(21)</sup> 등이 改良한 Morgan, Elson 方法<sup>(21)</sup>을 써서 N-acetyl 化하였다. 即 먼저 물 15ml 에 約 90mg 을 녹인 것을 各各 4ml 의 飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液에 넣어 새로 만든 4ml 의 5% acetic anhydride 水溶液과 섞었다.

이용액을 20°C 에서 10分間 加溫後 100°C 에서 3 分 동안 加熱하고 그 後 ion 交換樹脂 (Dowex-50 H type 와 Dowex-1 OH type)를 使用하여 脫 ion 시켰다.

### (9) NaBH<sub>4</sub> 로 N-acetyl 化한 spot A 化合物의 還元

N-acetyl 化한 spot A 化合物 (glucosamine 으로 2.5μmole)에 75μl 의 0.2M NaBH<sub>4</sub> 溶液을 加하고 室溫에서 4時間 處理하였다.

이 反應이 끝나면 40μl 의 0.2M acetic acid, 40μl

의 0.1M sodium acetate 를 혼합한 acetate buffer (pH 4.5)와 200 $\mu$ l 의 물을 추가하였다. 이 용액의 일부분 (40 $\mu$ l)은 Blix<sup>(18)</sup>變法에 準하여 glucosamine 定量에 使用하였다.

#### (10) 過沃素酸化

N-acetyl 化한 spot A 化合物 (glucosamine 으로 2.38  $\mu$ mole)에 200 $\mu$ l 의 물을 加하고 40 $\mu$ l 의 0.1M NaIO<sub>4</sub> 을 混合하여 暗所에 放置하였다. 이때 經時的으로 10 $\mu$ l 식 꺼내어 물로 稀釋한 다음 담게 되는 過沃素酸의 量은 224nm 에서 吸光度를 測定하여 分析하였다.

다른 試料(8 $\mu$ l)는 80 $\mu$ l 의 1M Na<sub>2</sub>HAsO<sub>3</sub> 를 加하여 反應을 停止시켜 얼음中에서 保管하였다.

이 試料의 formaldehyde 는 chromotropic acid<sup>(22)</sup> 試藥으로 Strominger의 方法<sup>(23)</sup>으로 分析하였다.

#### (11) N-acetyl 化한 spot A 化合物의 Chromogen 의 形成

Painter 등의 方法<sup>(24)</sup>에 따라 chromogen 形成實驗을 하였다. 即 N-acetyl 化한 spot A 化合物과 N-acetyl 化한 chitobiose (glucosaminyl  $\beta$ -1,4-glucosamine)을 各各 約 50 $\mu$ g 을 0.1ml 의 0.79% pyridine 水溶液에 넣고 100°C 에서 4時間 동안 處理하였다. 이것은 다시 眞空蒸溜를 하여 溶劑를 除去시킨 다음 反應生成物을 물에 懸濁시키고 溶媒系 pyridine: butanol: water (4:6:3)을 써서 paper chromatography 로 展開시켜 分析하였고 檢出은 窒酸銀을 使用하였다.

#### (12) N-acetyl 化한 spot A,B 化合物의 $\beta$ -N-acetylglucosaminidase 에 依한 加水分解

加水分解에 使用한 酵素는 돼지 副辜丸에서 分離한 精製된  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase 를 使用하였다. 酵素活性은 Findlay 등의 方法<sup>(25)</sup>에 依하여 標準物質로 p-nitro- $\beta$ -N-acetyl glucosamine 을 使用하여 測定하였다. 加水分解는 N-acetyl 化한 Spot A,B 化合物 (50 $\mu$ l, N-acetyl glucosamine 으로 50  $\mu$ mole)에 酵素液 (167 units) 50 $\mu$ l 을 넣고 pH 4.25, Bovin serum albumine (20 $\mu$ g), toluene (1 $\mu$ l)를 含有한 0.2M 의 citrate buffer 60 $\mu$ l 을 加하였다. 이 溶液을 37°C 에서 24時間 反應시키고 다음 100°C 5分間 加熱로 反應을 中止시킨 다음 ion 交換樹脂 (Dowex 50 H type 와 Dowex 1 0 H type)로 脫鹽시켰다.

反應生成物은 pyridine: butanol: water(4:6:3)를 展開液으로 使用하여 paper chromatography

分析하였다. 酵素反應에 依하여 遊離되는 glucosamine 은 Somogyi의 方法<sup>(26)</sup>으로 定量하였다.

酵素活性의 單位는 37°C 에서 1시간에 p-nitro N-acetyl glucosamine 으로 부터 遊離되는 N-acetyl glucosamine 의  $\mu$ mole 로서 表示하였다.

#### (13) Spot B 化合物의 phosphodiesterase 에 依한 分解<sup>(27)</sup>

Phosphodiesterase 의 酵素活性度는 20 $\mu$ l 의 1.2  $\mu$ M p-nitrophenyl thimidine-3-phosphate 를 標準基質로 하여 50 $\mu$ M ammonium acetate buffer (pH 5.7) 5 $\mu$ l, 1% tween80 5 $\mu$ l, 송아지 脾臟에서 얻은 Phosphodiesterase (Beehringer 製) 100 $\mu$ l (0.1 mg/protein)을 混合하여 全體가 0.3ml 로 되게 蒸溜水를 加하고 37°C 에서 6時間 反應시켜 400nm 에서의 吸光度로서 活性을 測定하였다. spot B 化合物의 酵素分解는 hydrazine 分解를 시킨 spot B 의 <sup>32</sup>P 化合物 (50,000cpm)에 5 $\mu$ M ammonium acetate buffer (pH 5.7) 5 $\mu$ l, 1% tween80 5 $\mu$ l, 酵素 10 $\mu$ l (0.1mg/protein)을 加하여 全體가 0.3 ml 되게 물을 加하고 37°C 에서 6時間 反應시킨 다음 PC 法으로서 分解產物을 分離한 다음 Radioscanning 에 依하여 分解產物을 檢出하고 Rf 值를 比較하므로써 分解與否를 檢討하였다.

#### (14) alkaline phosphomonoesterase 分析<sup>(13)</sup>

phosphomonoesterase 의 活性度는 0.04M disodium nitrophenyl phosphate 를 標準物質로 하여 分析하였다.

spot B 의 <sup>32</sup>P 化合物(約 50,000cpm)에 0.1M sodium acetate 50 $\mu$ l, *E.coli* 에서 얻은 alkaline phosphatase (Sigma 製) 10 $\mu$ l (0.1mg/protein)을 加하고 37°C 에서 反應시켜 經時的으로 分離되어 나오는 燐을 PC 에 依하여 分離한 것을 Radioscanning 에 依하여 分析하였다.

#### (15) Spot A,B 化合物에서 分解된 脂肪酸 誘導體의 調製

O-deacylated 脂肪酸의 分析은 分析方法 (4)에서 와 같이 Wilkinson 의 方法<sup>(27)</sup>에 準하였다.

即 spot A,B 를 O-deacyl 化한 다음 chloroform 層에 存在하는 脂肪酸의 methylester 는 silicic acid column chromatography 를 利用하여 分離하였다. 脂肪酸 methyl ester 는 silica gel column 에서 chloroform 으로 溶出시켜 O-deacyl 脂肪酸 methylester 으로서 脂肪酸 種類는 GLC 法으로 分

析하였다.

N-deacyl 脂肪酸에 分析은 O-deacylated spot A, B 化合物을 試驗管에 넣고 4NHCl 을 加하여 密封하고 100°C 에서 10時間 加水分解시키고 開封하였다. 이 加水分解에서 遊離되는 amide 結合脂肪酸는 ether 로 抽出하여 다음과 같이 BF<sub>3</sub> methanol 試藥으로 methyl 化시켰다. 即 試料에 0.5ml 의 0.05N methanolic NaOH 를 加하여 70°C 에서 5分間 加熱하고 冷却시킨 後 0.6ml 의 BF<sub>3</sub>-methanol 試藥(5g 의 BF<sub>3</sub>-etherate 를 無水 methanol 에 녹여 24.3ml 로 만든것)을 加한다. 이 溶液은 100°C water bath 에서 2分間 加熱하고 나서 冷却하고 3ml 의 飽和 NaCl 溶液을 加한다. N-deacyl 脂肪酸의 methylester 는 3ml 의 石油 ether (bp30-60°C) 로 두번 溶出한다. 이 N-deacyl 脂肪酸 methyl ester 는 GLC 로 分析하였다.

#### (16) Gas liquid chromatography

脂肪酸分析은 FID (Flame ionization detector) 을 裝置한 G-8型 日本 柳本製作所의 gas chromatography 에 依하여 分析하였다. 充填劑로서는 diasolid L (60-80mesh, 日本 Chromato 工業會社製) column 은 (3mm×3m)의 것을, 그리고 carrier gas 로는 He 또는 N<sub>2</sub> gas 를 使用하였다. Column 의 溫度는 195°C 가 되게 하였으며 流出되는 各 peak 는 methyl 化된 脂肪酸 標準品(日本 Chromato 工業會社製)과 retention time 을 比較하여 同定하였다.

#### (17) β-OH 脂肪酸의 合成

β-ketopelorgonic, β-ketocarpric, β-ketoundecanoic, β-ketolauric 그리고 β-ketotridecanoic acid 들을 Mitz 方法<sup>(28)</sup>에 依하여 合成하였다. 이들 β-keto 酸들은 70% methanol 水溶液에서 NaBH<sub>4</sub> 로 還元시키고 이 β-OH 酸들은 benzene-petroleum ether (bp30-70°C)에서 再結晶하였다.

### 4. 其他分析方法

Glycerol 의 定性實驗은 試料을 100°C에서 4NHCl 로 10시간 分解시킨 後 pyridine : butanol : water (4 : 6 : 3)을 展開劑로 使用하여 PC 로 展開하고 檢出劑로는 窒酸銀을 使用하였다. 磷과 amino 窒素의 檢出은 展開된 TLC 에 各各 zinazde 試藥<sup>(29)</sup>과 1.5% ninhydrin aceton 溶液을 撒布하여 發色시켰다.

試料의 磷酸의 定量은 King 의 方法<sup>(30)</sup>에 依하여 HClO<sub>4</sub>로 分解시켜 分析하였다.

還元糖은 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride reagent<sup>(11)</sup>로 發色시키고 sphingosine base 는 Gaver 와 Sweeley 法<sup>(31)</sup>을 따랐으며 그리고 3 keto-2 deoxy-octonate (KDO)는 Weissbach 와 Hurwitz 方法<sup>(32)</sup>을 使用하여 檢出하였다.

### 三. 結果 및 考察

#### (1) 分離된 糖脂質의 TLC

Valerate 또는 caproate 를 添加한 glucose 培地에서 生育한 菌體를 遠心分離하여 洗滌하고 磷脂質을 除去한 다음 TCA 로 處理한 것을 80°C chloroform : methanol(1 : 3) 可溶分을 分離하여 TLC 에 展開한 것은 그림 1과 같다. 이 그림 1에서 보는 바와 같이 12種以上の spot 를 볼 수 있으며 spot C 化合物에 對하여는 이미 構造를 決定한 바 있으며 本研究에서는 A, B 化合物에 對하여 檢討하였다.

分離한 糖脂質을 acetone 可溶部分(A) 과 acetone 不溶部分으로 區分하고 다음 acetone 不溶部分에서 溶出시킨 ether 可溶部分(B)을 分離한 다음 그 各各을 展開하면 그림 2와 같이 되었다.

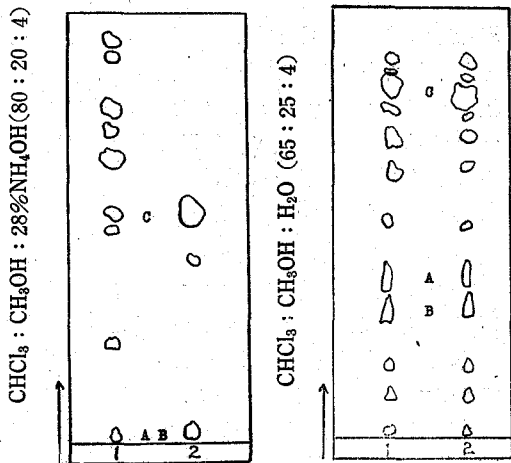


Fig. 1. Thin Layer Chromatogram of glycolipid fraction of *S. ruminantium*

1. From cells grown in caproate medium.
  2. From cells grown in valerate medium.
- A : represents the spot A component  
B : represents the spot B component  
C : represents the spot C component

또 spot A, B 와 같이 單一 spot 로 나타나 있는 것으로 보아 上述한 溶媒區分法은 A 와 B 의 純粹分離에 效果가 있는 方法이라고 認定되었다. 그림

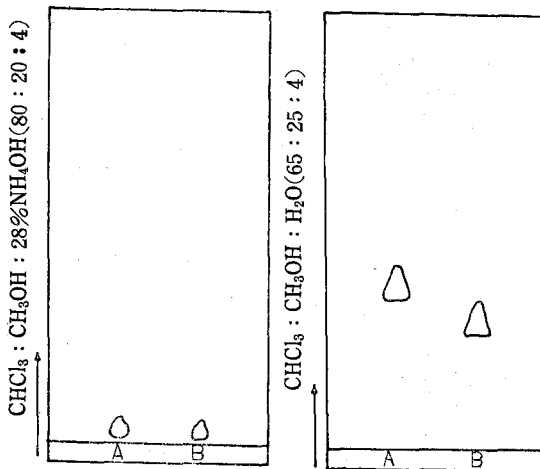


Fig. 2. Thin Layer Chromatogram of spot A and B compound

A : Isolated A component  
B : Isolated B Component

2에 나타난 spot A, B는 그 Rf 値로 보아 그림 1의 A 및 B와 同一하다는 것이 確認되었다.

(2) spot A, B 化合物의 物理的 性質

200 $\mu$ 의 glucose 培地에서 生産된 糖脂質을 溶劑 및 TLC 法으로 精製하여 spot B는 約 50mg 정도 spot A는 約 60mg 정도를 얻을 수 있었고 精製된 spot A, B 化合物은 粉末狀으로 얻었으며 spot B는 약간 黃色을 띄었으나 spot A는 白色의 粉末이었다.

spot A, B 化合物 多같이 加熱에 依하여 녹지 않고 炭化되었으며 spot B 化合物은 分解溫度가 168~170°C, spot A 化合物은 175~178°C로 spot B 化合物보다 약간 높으며, 177~180°C인 spot C<sup>(15)</sup> 化合物보다 약간 낮은 溫度를 나타냈다. 旋光度는 spot B 化合物이  $\alpha_D^{20} = -4.2$ , spot A 化合物이  $\alpha_D^{20} = -3.6$ 이었다. spot C는  $\alpha_D^{20} = -15$ 를 表示하고 있어 spot A, B, C 化合物이 各各 다른 數値를 나타내고 있음을 알 수 있다.

spot A, B 化合物 多같이 chloroform : methanol (8 : 2) 및 pyridine 에는 잘 녹으며 spot B 化合物은 ether 에 녹으며 spot A 化合物은 ether 에는 녹지 않으나 acetone 에 溶解한다. 이로 미루어 보아 spot A, B, 및 C 化合物은 相異하다는 것을 알 수 있다.

(3) spot A, B 化合物의 赤外線 分析

spot A, B 化合物의 赤外線 吸收 分析 結果는 그림 3 A, B 와 같다. 그림 3에서 보는 바와 같이 spot A, B 가 거의 같은 吸收를 나타내고 있는 것

을 알 수 있다.

即 A, B 化合物은 多같이 OH group 에 該當하는 3,300~3,400 $\text{cm}^{-1}$ 에 吸收가 있으며 C-O와 C-O-C group 에 該當하는 1,000~1,150 $\text{cm}^{-1}$ 의 吸收를 볼 수 있다. 그리고 1,465 $\text{cm}^{-1}$ 과 1,380 $\text{cm}^{-1}$ 에서 吸收를 보여  $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$  bands 가 있는 것을 알 수 있다. 1,640 $\text{cm}^{-1}$ , 1,560 $\text{cm}^{-1}$ , 730 $\text{cm}^{-1}$ 의 吸收로서 amide group 이 存在함을 알 수 있다. 또한 1,735 $\text{cm}^{-1}$ 의 ester carbonyl band의 吸收를 볼 수 있으며 840 $\text{cm}^{-1}$ 의 吸收로서  $\beta$ -glucosidic linkage 를 하고 있는 것을 推測할 수 있다. 그러나 spot B 化合物은 spot A 化合物에는 없는 1,250 $\text{cm}^{-1}$ 에 吸收를 보여 磷이 存在함을 알 수 있다. 赤外線 分析의 結果로서 spot A, B 化合物의 構造는 多같이 OH, C-O, C-O-C,  $\text{CH}_2 + \text{CH}_3$ , ester carbonyl band 및  $\beta$ -glucosidic linkage 를 갖이고 있으나 spot B 化合物은 磷을 더 갖인 것이 spot A 化合物과 다르다.

(4) spot A 化合物의 0-acyl 과 N-acyl 構成 脂肪酸

Valerate 添加 glucose 培地에서 培養한 菌體로부터 分離한 spot A 化合物을 deacyl 化하여 얻은 0-acyl 脂肪酸 및 deacyl 化한 나머지 化合物을 鹽酸分解하여 얻은 N-acyl 脂肪酸을 分離하여  $\text{BF}_3$ -methanol 溶液으로 methyl 化한 다음 GLC 에 依하여 分析한 結果는 表 1과 같다.

表 1에서 보면 spot A 化合物의 0-acyl 脂肪酸은  $\beta$ -OH  $\text{C}_{13:0}$ 이 82.8%나 되며  $\beta$ -OH  $\text{C}_8:0$ 가 4.4% 들어 있는 것을 알 수 있다.

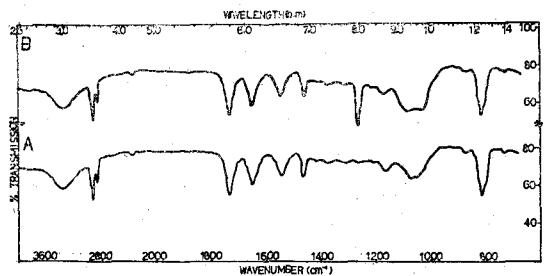


Fig. 3. Infrared absorption spectra of the spot A and B compounds (KBr).

以上の 結果를 spot A 와 spot C 化合物을 比較하여 보면 spot C<sup>(7)</sup> 化合物은  $\beta$ -OH  $\text{C}_{13:0}$ 의 含量이 47%인데 比較하여 spot A는 82.8%나 들어있고 N-acetyl 脂肪酸의 含量이 spot C 化合物에서는 86%인데 比較하여 spot A 化合物은 94.9%나 되어

**Table 1.** Analysis of fatty acid components of the spot A compound from valerate grown cells

Carbon number of fatty acids detected	Chemical composition (%)	
	0-acyl group	N-acyl group
13:0	6.6	0.4
13:2	2.7	0.4
$\beta$ -OH 9:0	4.4	3.4
15:0	2.5	0.3
unidentified	1.0	0.6
$\beta$ -OH 13:0	82.8	94.9

spot A 化合物의 0-acyl 脂肪酸 및 N-acyl 脂肪酸은 다 같이 spot C 化合物의 것 보다 높는데 특히 N-acyl 脂肪酸에서 顯著하게 높아 spot A 化合物에서는 大部分이  $\beta$ -OH C<sub>18:0</sub>인 것을 알 수 있다.

그리고 spot A 化合物에서는  $\beta$ -OH C<sub>9:0</sub>의 0-acyl 脂肪酸이 4.4% N-acyl 脂肪酸이 2.4% 들어 있으나 spot C에서는  $\beta$ -OH C<sub>9:0</sub>이 없는 것이 다르며 spot C 化合物에는  $\beta$ -OH C<sub>15:0</sub>가 존재하나 spot A에는 존재하지 않는 것이 다르다.

以上的 脂肪酸 patterns 으로 보아 spot C 化合物과 spot A 化合物은 分明히 다른 化合物이라는 것을 알 수 있다.

**(5) spot B 化合物의 0-acyl 과 N-acyl 構成 脂肪酸**

spot A 化合物과 마찬가지로 valerate 添加 glucose 培地에서 培養한 菌體에서 分離한 spot B 化合物의 0-acyl 과 N-acyl 脂肪酸을 spot A 化合物과 같이 methyl 化시켜 methyl 誘導體를 만든 다음 GLC 에 의하여 分析한 結果는 表 2와 같다. 表 2에서 보는 바와 같이 spot B 化合物의 0-acy 脂肪酸은  $\beta$ -OH C<sub>13:0</sub>이 57.3%로 spot A 化合物과는 거의 비슷한 數値를 나타냈으며 N-acyl 脂肪酸도 spot C 化合物과 비슷한 87.3%을 나타냈다. 그러나 spot B 化合物에는, spot C 化合物에는 없는  $\beta$ -OH C<sub>9:0</sub>가 있으며 spot C 化合物에는 spot B 化合物에 없는  $\beta$ -OH C<sub>14:0</sub> 및  $\beta$ -OH C<sub>15:0</sub>가 特殊하게 存在하는 것을 알 수 있다.

따라서 spot B 化合物과 spot C 化合物에 結合되고 있는 構成脂肪酸이 다른 것을 알 수 있다.

**(6) spot A, B 化學物的 化學的 組成**

spot A, B 化合物에 對하여 ketodeoxyoctonate, glycerol, neutral sugar, amino acid 그리고 sphingosine base 의 存在有無를 前記한 實驗方法

**Table 2.** Analysis of fatty acid components of the spot B compound from valerate grown cells

Carbon number of fatty acids detected	Chemical composition (%)	
	0-acyl group	N-acyl group
13:0	6.4	0.2
13:2	11.6	1.4
$\beta$ -OH 9:0	3.6	2.3
15:0	5.9	0.5
15:1	1.8	0.7
unidentified	2.0	—
17:0	2.7	0.3
17:1	9.0	7.3
$\beta$ -OH 13:0	57.0	87.3

에 의하여 試驗한 結果 다같이 없음이 確認되었다.

그리고 赤外線分析의 結果 spot B 化合物에는 磷이 結合되어 있으며 spot A 化合物에는 磷이 없음이 밝혀졌다.

다음 spot A, B 化合物을 4N-HCl 로 分解하고 pyridine : n-butanol : water (4:6:3)을 展開液으로 使用한 PC 에 의하여 spot A, B 化合物의 한構成成分인 glucosamine 이 確認되었다.

또 spot A, B 化合物을 ninhydrine 酸化를 시켜 butanol : ethanol : ether (4:1:1)을 展開液으로 使用하여 PC 에 의하여 arabinose 만을 確認하였으므로 spot A, B 化合物의 glucosamine 基는 2-amino-2-deoxy-glucose 임을 알 수 있었다.

spot A, B 化合物의 構成成分의 相對的인 量을 알기 위하여 amino acid autoanalyzer 로 glucosamine 을 定量하고 total fatty acid 와 磷의 含量比較를 爲하여 併記한 結果는 表 3과 같다.

**Table 3.** Composition of the spot A and B Compounds from *S. ruminantium*.

Components	Composition (%)	
	Spot A compound	Spot B Compound
glucosamine	23.2	24.4
total fatty acid	76.8	73.8
phosphorus		1.8

spot A 에서는 脂肪酸과 glucosamine 뿐인데 spot B 化合物에서는 脂肪酸과 glucosamine 以外에 磷이 結合되어 있는 것을 알 수 있다.



(7) deacyl 化한 spot A,B 化合物의 分析

① diglucosamine 의 確認

spot A,B 化合物를 hydrazine 分解하여 脂肪酸를 除去하고 물에 溶解하는 化合物를 얻었다. 이 deacyl 化한 化合物를 얻어 chitobiose 와 glucosamine 을 標準으로 하고 展開液으로서 pyridine : butanol : water(4 : 6 : 3)을 使用하여 PC 로 展開시켜 ninhydrin 으로 發色시킨 結果는 그림 4와 같이 spot A 와 B 의 分解產物의 境遇 各各 하나의 spot 가 나타났으며 各化合物의 Rf 值를 比較하

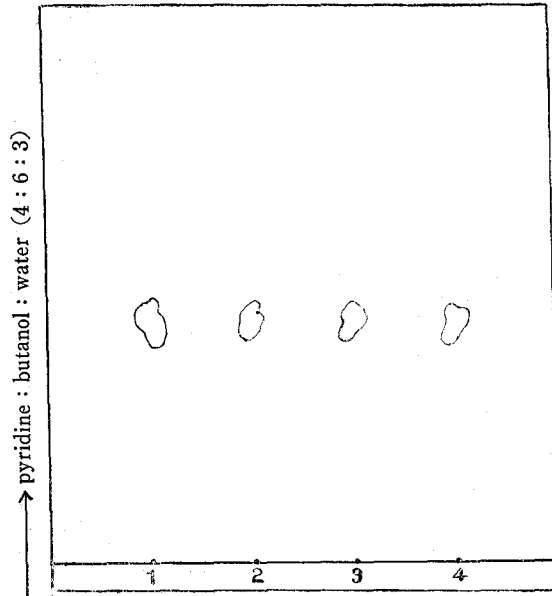


Fig.4. Paper chromatogram of deacylated spot A and B compounds

1. Sample from deacylated spot B compound
2. Sample from deacylated spot A compound
3. Chitobiose
4. Glucosamine

면 glucosamine 보다 낮고 spot A 의 境遇는 chitobiose 와 같으며 spot B 의 境遇는 chitobiose 보다도 약간 낮았다. 그리고 別途로 spot A 分解物과 chitobiose 를 cochromatography 로 展開시킨 것도 分離되지 않고 完全一致되었는데 이런 事實로서 deacyl 化한 spot A 化合物은 monoglucosamine 이 아니고 chitobiose 에 類似한 oligosaccharide 임을 알 수 있다. deacyl 化한 spots B 化合物이 Rf 值가 deacyl 化한 spot A 化合物보다 낮은 것은 隣이 結合되어 있는데 起因하는 것이라고 生覺된다.

② hydrazine 으로 deacyl 化한 A,B 化合物의 酸分解

hydrazine 으로 deacyl 化한 spot A,B 化合物

을 4NHCl 로 分解시켜 標準 glucosamine 과 함께 pyridine : butanol:water (4 : 6 : 3)을 展開液으로 하여 PC 에 依하여 展開시킨 結果는 그림 5와 같다. 그림 5에서 보는 바와 같이 spot A 과 spot B 分解產物의 各 Rf 值는 標準 glucosamine 의 그것과 같으므로 hydrazine 으로 deacyl 化한 spot A,B 化合物은 glucosamine 으로 構成되어 있음을 알 수 있고 또 前記한 ①의 結果에서 미루어 보아 이들은 chitobiose 와 같이 2個의 glucosamine 만으로 結合되어 있는 것을 알 수 있다.

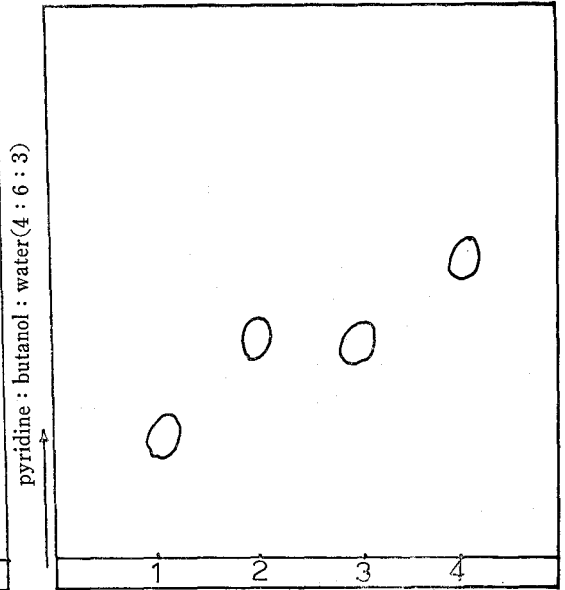


Fig.5. Paper chromatogram of acid hydrolysate of deacylated spot A and B compounds.

1. Sample from deacylated spot A compound
2. Sample from deacylated spot B compound
3. Cochromatogram of hydrolysate of spot A and glucosamine
4. Glucosamine

③ NaBH<sub>4</sub> 還元

hydrazine 으로 deacyl 化한 spot A 化合物을 N-acetyl 化한 다음 前記한 實驗方法으로 NaBH<sub>4</sub> 로 還元시키고 還元物質을 4NHCl 로 分解시켰을 때 glucosamine 의 減少는 49%였다. 이 結果로 deacyl 化한 spot A 化合物은 glucosamine 의 disaccharide 임을 알 수 있다.

以上の 實驗結果는 Burton<sup>(11)</sup> 등의 *E.Coli*, Gmeiner<sup>(13)</sup> 등의 *Salmonella* Re mutant 등의 lipid 가 2 分子의 glucosamine 이 結合되어 있는 것과 一致하였다.

④ Morgan-Elson 反應<sup>(21)</sup>

hydrazine 으로 deacyl 化한 spot A,B 化合物,

HCl로 분해한 spot A의 분해물 및 chitobiose를 Strominger의 방법<sup>(18)</sup>에 의하여 N-acetyl화시켰다. N-acetyl glucosamine을 alkali에서加熱한 다음酸性으로 하여 p-dimethyl aminobenzaldehyde試藥으로서 Morgan-Elson反應을 이르켜서 發色程度를觀察하였다. 이結果 N-acetyl化한 chitobiose는 이反應에서 發色되지 않아 1.4結合을 나타낸다. HCl로 분해하고 N-acetyl化한 spot A의 發色을 100%로 할때 hydrazine으로 분해하고 N-acetyl化한 spot A와 B化合物的 發色은 各各 70%程度였다. 이러한 發色結果로 보아 분해한 Spot A와 B化合物은 2分子的 glucosamine 사이의 結合이 다같이 1.4結合은 아니고 1.6 또는 1.3의 結合임을 알 수 있다. 또 1.3結合은 N-acetyl化한 glucosamine보다 發色이 더진한 것이므로 1.3結合의 가능성은 稀薄하며 1.6結合임을 推測할 수 있다.

#### ⑤ Chromogen 形成

N-acetyl化한 spot A化合物的 glucosamine 사이의 結合狀態를 確實히 하기 爲하여 0.79% pyridine水溶液으로 處理하여 chromogen을 形成시킨 다음 ethyl acetate : pyridine : acetic acid : water (5 : 5 : 1 : 3)를 展開液으로 하여 PC에 依하여 展開시킨 chromatogram의 Rf值를 測定한 것은 表 4와 같다. 이때 標準物質로서 N-acetyl chitobiose와 N-acetyl glucosamine도 함께 處理하였다. 表 4에서 보는 바와 같이 spot A化合物에서 形成된 chromogen의 Rf值는 N-acetyl glucosamine의 chromogen보다 낮으며 N-acetylchitobiose의 chromogen과 비슷한 Rf值를 나타내고 있다. 이것은 N-acetyl化한 1.3 glucosaminyl-glucosamine은 alkali에 弱하며 만약에 1.3 glucosaminyl-glycosamine이라고 하며는 分解하여 N-acetyl glucosamine과 같은 Rf值<sup>(22)</sup>를 나타낼 것이나 Rf值가 N-acetyl glucosamine보다 낮은 것은 alkali에 安定하므로 1.3結合이 아님을 確認할 수 있다. 따라서 Morgan-Elson反應의 結果 1.4結合의 可能性도 없으므로 spot A化合物的 disaccharide結合은 1.6結合임을 알 수 있다.

#### ⑥ 過沃素酸化

hydrazine으로 분해한 spot A化合物的 基本構造가 glucosaminyl-1.6-glucosamine임을 더 確實하게 하기 爲하여 N-acetyl化한 spot A化合物을 過沃素酸으로 酸化시킨 다음 224nm에서의 吸光度를 測定하여 分析하는 한편 酸化生成物인 formaldehyde의 生成與否를 檢討하였다. 過沃素酸化

Table 4. Relative Rf values of chromogens

Substances	Relative Rf value
N-acetyl glucosamine	1.0
chromogen from N-acetyl glucosamine	1.30
N-acetyl chitobiose	0.43
chromogen from N-acetyl chitobiose	0.61
N-acetylated spot A	0.47
chromogen from N-acetylated spot A	0.67

의 結果 24時間 經過하였을 때 disaccharide의 完全 還元에 所要된 過沃素酸의 molar ratio는 2.8이었다. 이 値는 glucosaminitol基의 C<sub>3</sub>과 C<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>와 C<sub>6</sub>사이, 그리고 N-acetyl glucosamine의 C<sub>3</sub>과 C<sub>4</sub>의 部分이 過沃素酸에 依하여 完全히 酸化된 것에 該當된다. 이 實驗結果에서 다시 두개의 glucosamine基 사이에 1.6 linkage가 存在하는 것을 알 수 있다.

以上の 結果는 *Salmonella minnesota* Re, *Serratia marcescens* 등 lipid A의 結合 構造와 같은 糖脂質인 것을 알 수 있다.

#### ⑦ β-N-acetyl glucosaminidase의 加水分解

N-acetyl化한 spot A化合物과 B化合物을 먼저 돼지의 副寧丸에서 얻은 β-N-acetyl glucosaminidase를 써서 酵素적으로 加水分解시켰다. 이 分解生成物은 pyridine : butanol : water (4 : 6 : 3)을 展開液으로 하여 PC로 展開分離시켜 遊離되는 N-acetyl glucosamine을 Blix의 方法으로 定量하였다. 酵素를 作用시켜 6時間 정도 지나면 分解生成物이 酸으로 直接 加水分解하여 얻어지는 量과 거의 같게 되며 酵素로서 거의 完全히 分解되는 것을 알 수 있었다.

이 結果로 부터 spot A化合物은 β-glucosaminyl-1.6-glucosamine임을 確認할 수 있었다.

spot B化合物은 spot A化合物과 같이 β-N-acetyl glucosaminidase를 作用시켰으나 反應치 않으므로 spot B에는 磷이 結合되어 있으므로 phosphodiester結合을 하고 있는 것으로 推測된다.

그림 6은 spot A를 β-N-acetyl glucosaminidase 處理後 PC에 依하여 分離한 것이다. 이것은 100% 分解되어 glucosamine과 같은 Rf值를 나타내며 co-chromalography에서도 一致하는 것을 알 수 있다.

그림 7은 spot B를 β-N-acetyl glucosaminidase

를 反應시킨 結果 作用치 않으므로 分解되지 않는 것을 알 수 있다.

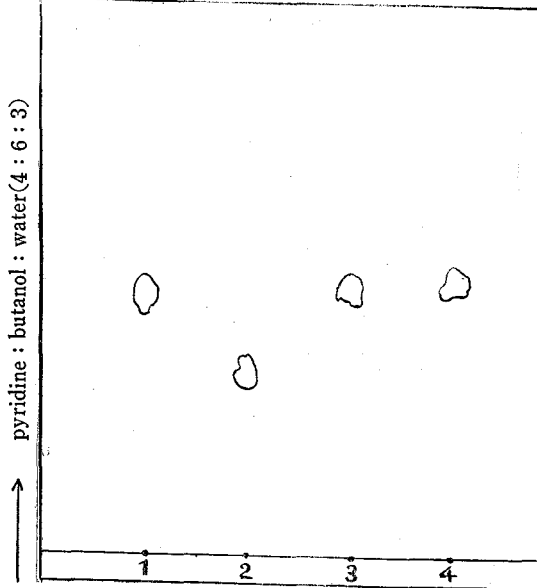


Fig. 6. Paper chromatogram of the spot A compound treated with  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase

1. N-acetyl glucosamine
2. N-acetylated spot A compound
3.  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase treated spot A compound
4. 1+3 Cochromatogram

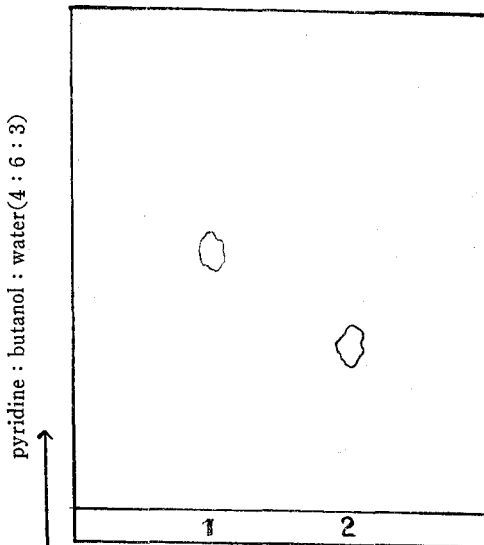


Fig. 7. Paper chromatogram of the spot B compound treated with  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase

1. N-acetyl glucosamine
2.  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase treated spot B compound.

本菌에 磷酸源으로  $^{32}\text{P}$ 를 培地에 加하여 培養後 前記方法으로 分離한 spot B의  $^{32}\text{P}$ 化合物과 Label 시키지 않은 spot B를 TLC에 依하여 分離하고  $^{32}\text{P}$ 化合物은 radioautogram을 行한 것이며 native의 spot B는 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 撒布하여 炭化시킨 것으로 그림 8에서 보는 바와같이 一致하는 것을 볼 수 있다.

以上の 結果로 磷이 化合物中에 結合되어 있는 것이 確實하며 이 결합을 알기 위하여 放射能의 spot B를 分離하여 다음의 實驗을 施行하였다.

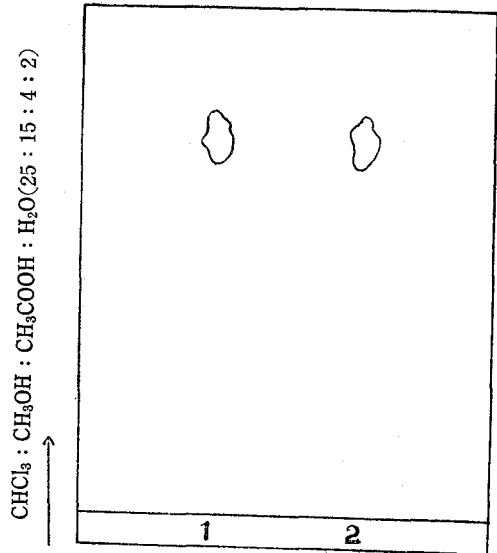


Fig. 8. Paper chromatogram of the unlabeled and  $^{32}\text{P}$  labeled spot B compound.

1. Sample of unlabeled spot B compound
2. Sample of  $^{32}\text{P}$  labeled spot B compound.

#### ⑧ phosphodiesterase 및 alkaline phosphomonoesterase 處理

위 實驗에서 分離한  $^{32}\text{P}$ 含有 spot B를 hydrazine 處理하여 deacyl化한 다음 phosphodiesterase로 分解시켰든 바 glucosamine에 結合된 磷은 遊離되지 않았으므로 phosphodiester 結合이 아닌 것을 알 수 있으며 따라서 phosphomonoester 結合의 可能性이 있어 deacyl化한 試料를 alkaline phosphomonoesterase와 反應시켜 反應液을 經時的으로 sampling하여 遊離되는  $^{32}\text{P}$ 를 paper chromatography에 依하여 檢討한 바 原點에서 全然 移動치 않는 遊離磷을 分析한 結果는 表 5와 같다.

以上の 結果로 spot B化合物에는 磷酸이 monooester 結合을 하고 있음을 알았고 30分內에 大部分의  $^{32}\text{P}$ 가 遊離되는 것을 볼 수 있으며 1時間後에는 거의 全部 磷이 遊離되는 것을 表 5에서 알 수 있다. spot B化合物은 Burton<sup>(11)</sup>등이 *E. coli*

**Table 5.** Rate of Hydrolysis of  $^{32}\text{P}$  labeled spot B compound by alkaline phosphomonoesterase

Incubation time	Released $^{32}\text{P}$ (cpm)
0	0
30 min	42,050
60 min	6,530
120 min	170

에서 推定한 바와 같은 glucosamine 의 두 分子사이에 phosphodiester 結合 및 3個의 glucosamine 사이에 2개의 磷이 phosphodiester 結合을 한 것과는 全然 다르며 Nowotny<sup>(8)</sup>가 *E. coli* 08, 0111에서 推定한 glucosamine-6-P, 또는 glucosamine-4-P 와 같은 結合인 것으로 生覺된다.

그리하여 spot B 는 2分子의 glucosamine 이  $\beta$ -glucosaminyl-1.6-glucosamine 의 結合을 하고 있으며 4 또는 6의 位置에 phosphomonoester 結合을 하고 있는 것으로 生覺되며 O-acyl 및 N-acyl 脂肪酸이 結合하였는데 主脂肪酸은  $\beta$ -OH C<sub>18:0</sub>의 脂肪酸인 것이 確認되었다.

## 摘 要

*Selenomonas ruminantium* 菌體를 TCA 로 加熱分解한 후 chloroform : methanol (1 : 3)로 抽出한 糖脂質을 分離하고 이 糖脂質을 acetone 可溶部分 spot A 化合物과 acetone 不溶部分에서 ether 로 다시 可溶部分을 抽出한 spot B 化合物의 두 部分으로 分離하고 이 두 化合物에 對하여 各各 그 化學構造를 究明하며 糖脂質의 構造를 推定한 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 두 化合物의 赤外線吸收分析結果 spot A 는 amino 糖에 O-acyl 및 N-acyl 脂肪酸이 結合하였으며 spot B 는 amino 糖에 O-acyl 및 N-acyl 脂肪酸이 結合하고 磷을 含有하고 있음을 알았다.

2. 두 化合物을 GLC 에 依하여 脂肪酸組成을 調査한 바 spot A.B 化合物中에 있는 O-acyl 및 N-acyl 脂肪酸은  $\beta$ -OH C<sub>18:0</sub> 脂肪酸이 大部分이 있는데 低級의 hydroxy 脂肪酸인  $\beta$ -OH C<sub>9:0</sub>도 特異的으로 含有되어 있음을 알았다.

3. 두 化合物을 hydrazine 分解를 시킨 結果를 paper chromatography 로 調査한 바 spot A 化合物은 glucosamine 이 2分子 結合하여 있는 chitobiose 와 같은 Rf 值를 나타냈으므로 2分子의

glucosamine 이 結合됨을 確認하고 spot B 化合物의 낮은 Rf 值는 glucosamine 에 磷이 結合되어 있음을 알았다.

4. spot A 化合物의 酸分解物을 다시 ninhydrine 으로 酸化分解 시키면 arabinose 만이 생기는 것으로 보아 glucosamine 의 amino 基는 C<sub>2</sub>의 位置에 結合하여 있음을 알았다.

5. N-acetyl 化한 spot A 에 NaBH<sub>4</sub>를 處理한 結果 glucosamine 의 全量이 半減하는 것으로 보아 2分子의 glucosamine 이 結合되어 있는 것을 알 수 있고 Morgan-Elson 反應 및 NaIO<sub>4</sub>分解에 依하여 2個의 glucosamine 은 1.6結合임을 確認하였다.

6. N-acetyl 化한 spot A.B 化合物에  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase 를 反應시킨 結果 spot A 化合物은 100% N-acetyl glucosamine 으로 分解되고 spot B 化合物은 分解되지 않았으므로 spot A 化合物만이  $\beta$ 結合을 하고 있음을 알았다.

7.  $^{32}\text{P}$  含有 spot B 化合物에 phosphodiesterase 및 phosphomonoesterase 를 作用시킨 結果 phosphodiesterase 는 反應치 않고 phosphomonoesterase 에 依하여 100%  $^{32}\text{P}$  가 遊離되는 것으로 보아 glucosamine 2分子에 한개의 磷이 monoester 結合을 하고 있음을 알 수 있다.

8. spot A 化合物은 glucosaminyl  $\beta$ -1.6-glucosamine 의 結合을 하였고 O-acyl 및 N-acyl 脂肪酸이 結合되어 있으며 主脂肪酸은  $\beta$ -OH C<sub>18:0</sub>임을 알았다.

9. spot B 化合物도 glucosaminyl  $\beta$ -1.6-glucosamine 의 結合을 하고 O-acyl 및 N-acyl 脂肪酸이 結合되어 있으며 主脂肪酸은  $\beta$ -OH C<sub>18:0</sub>이나 磷이 monoester 結合을 하고 있는 것이 spot A 化合物과 特異함을 알았다.

## 引 用 文 獻

1. Westphal, O. and Lüderitz, O.: *Angew Chem.*, **66** 407 (1954)
2. Lüderitz, O and Jann, K. and Wheat, R.: *Comprehensive Biochem.*, **26A** 105 (1968)
3. Boivin, A., Mesrobian, I. and Mesrobian, L.: *C.R. Seances Soc. Biol.*, **114** 307 (1933)
4. Nakano, M.: *Nature* **196** 1118 (1962)
5. Kasai, N and Yamano, A.: *Japan, J. Exp. Med.*, **34** 329 (1964)

6. Kanegasaki, S. and Takahasi, H.: *J. Bacteriol.* **93** 456 (1967)
7. Kamio, Y., Kim, K.C. and Takahasi, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36** 2425 (1972)
8. Nowotny, A.: Conference on Biological Effects of Endotoxins in Relation to Immunity, Freiburg, Germany (1959)
9. Closse, A.M.: Thesis. Universität, Freiburg, Germany (1960)
10. Nowotny, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **83** 501 (1961)
11. Burton, A.J. and Carter, H.E.: *Biochemistry* **3** 411 (1964)
12. Heath, E.C., Mayer, R.M., Edstrom, R.D. and Beaudreau, C.A.: *Ann. N.Y. Acad. Soc.*, **133** 315 (1966)
13. Gmeiner, J., Lüderitz, O. and Westphal, O.: *European J. Biochem.*, **7** 370 (1969)
14. Adams, G.A. and Singh, P.P.: *Biochem. Biophys., Acta.*, **202** 553 (1970)
15. Kamio, Y. and Kim, K.C. and Takahasi, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36** 2195 (1972)
16. Kamio, Y. and Kim, K.C. and Takahasi, H.: *J. Gen. Appl.*, **16** 291 (1970)
17. Wilkinson, G.: *Biochem. Biophys. Acta*, **164** 148 (1968)
18. Strominger, J.L., Park, J.T. and Tompson, R.E.: *J. Biol. Chem.*, **234** 3263 (1959)
19. Gardell, S.: *Acta Chem. Scand.*, **7** 207 (1953)
20. Stoffyn, P.J. and Jeanloz, R.W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **52** 373 (1954)
21. Morgan, W.T. and Elson, L.A.: *Biochem. J.*, **26** 988 (1934)
22. Macfadyen, D.A.: *J. Biol. Chem.*, **158** 107 (1954)
23. Suzuki, S. and Strominger, J.L.: *ibid* **235** 2768 (1960)
24. Painter, T.J., Cheese, J.A. and Morgan, W.T.: *J. Chem. Ind.*, **9** 1535 (1962)
25. Findlay, J., Levvy, G.A. and March, C.A.: *Biochem. J.*, **69** 467 (1958)
26. Somogyi, O.M.: *J. Biol. Chem.*, **195** 19 (1972)
27. Sidney, Colowick, P. and Kaplan, N.O.: *Method in Enzymology VI* p.245
28. Mitz, M.A., Axelrod, A.E. and Hofmann, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **72** 1231 (1950)
29. Dittmen, J.C. and Lester, R.L.: *J. Lipid Res.*, **5** 126 (1964)
30. King, E.J.: *Biochem. J.*, **26** 292 (1932)
31. Gaver, R.C. and Sweeley, C.C.: *J. Am. Oilchem. Soc.*, **42** 294 (1965)
32. Weissbach, A. and Hurwitz, J.: *J. Biol. Chem.*, **234** 705 (1959)
33. Kuhn, R., Baer, H.H. and Gauhe, A.: *Chem. Ber.*, **87** 289 (1954)
34. Jeanloz, R.W. and Tremege, M.: *Federation Proc.*, **15** 282 (1956)