

Title	Lactobacillus plantarum (ATCC 8014) 細胞壁の酵素的溶解ならびに細胞壁ペプチドグリカンの化学構造に関する研究
Author(s)	松田, 哲郎
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29660
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	松 田 哲 郎 まつ だ てつ お
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 1 6 7 3 号
学位授与の日付	昭 和 4 4 年 3 月 2 8 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学基礎系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Lactobacillus plantarum (ATCC 8014) 細胞壁の酵素的溶解 ならびに細胞壁ペプチドグリカンの化学構造に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 小谷 尚三 (副査) 教授 山本 巖 教授 竹田 義朗

論 文 内 容 の 要 旨

細菌細胞の最外層に位置する細胞壁は、その基本構造である peptidoglycan に固有な物理的強剛性と化学的安定性とによって、生命の維持に不可欠な内部構造を外部環境から保護する重要な構造単位であり、またそれぞれの細菌に特徴的な免疫、生物学的活性物質を特殊構造として含み、近代微生物学の最も興味ある研究対象の一つとなっている。

機能的な意味で、口腔内微生物叢の重要な一員である乳酸桿菌の細胞壁については、その peptidoglycan が、ムラミン酸 (Mur), グルコサミン (GlcN), L-およびD-アラニン (Ala), D-グルタミン酸 (Glu), および α , α' -ジアミノピメリン酸 (DAP) あるいはL-リジンを主成分とし、また特殊構造としてテイコイン酸や多糖体をふくむことが、すでに明らかにされている。しかし、前記アミノ糖、アミノ酸がどのように結合して、強剛な "bag-shaped macromolecule" (Weidel) を形成しているか、また peptidoglycan と特殊構造との結合がどのようになっているかなどの問題については、その詳細が不明のままに残されている。

著者は、著者らの研究室で研究が進められている細胞壁溶解性の、Streptomyces L-3 および Flavobacterium L-11 酵素が、Lactobacillus plantarum ATCC 8014 株の細胞壁を溶解することを認め、これらの酵素を利用することによって、この菌の細胞壁の諸性状を明らかにすべく研究を行っているが、この論文では、これら両酵素の L. plantarum 細胞壁溶解機作と、この菌の細胞壁 peptidoglycan の peptide 部分の化学構造とについて明らかにされた研究結果が記載されている。

まず、被検細胞壁の化学組成についての分析が行われた。すなわち、培養菌体を Braun の装置で破壊し、分別遠沈後、トリプシン消化してえた細胞壁標品を加水分解し、薄層クロマトグラフィー (TLC) および 1 次紙クロマトグラフィー法によってアミノ糖およびアミノ酸の定量を行った結果 ATCC 8014 株の細胞壁は、L-Ala, Glu, meso-DAP, D-Ala, GlcN および Mur を約 1.0 : 1.0 :

1.0:0.6:1.0:1.0の割合に含むことが示された (D-Ala の内0.3モルは弱いアルカリ処理によって遊離し、恐らくはテイコイン酸にエステル結合した Ala と考えられる)。また DNP 法および hydrazine 分解法による分析によって、Glu 1モル当り約0.7モルの DAP の α' -NH₂ 基は遊離し、一方 C-末端アミノ酸は検出されないことが示された。なお、特殊構造の構成々分として Glu 1モルにつき約4モルのヘキソースと約2.0モルの有機燐の存在がみとめられた。

つぎに、被検細胞壁の酵素による溶解がどのような機序でおこるかについての手掛りをえる目的で、溶解にともなって遊離する末端基の分析が行われた。すなわち、還元基の暴露は Somogyi 法、N-末端基の遊離は DNP 化後酸水解し、また C-末端基のそれは hydrazine 分解後 DNP 化して、いずれも TLC 法で分離定量した。その結果、L-3 および L-11 酵素のいずれによる溶解の際にも、還元基の遊離はみとめられないが、L-3 酵素の作用では Glu 1モル当り0.6モルの L-Ala と0.4モルの DAP の NH₂-基が、また C-末端アミノ酸として、Glu 1モル当りそれぞれ0.4および0.8モルの D-Ala と DAP とが増加し、他方 L-11 酵素の作用では、約1モルの N-末端 L-Ala のみの増加がみとめられた。

以上の実験結果から、被検細胞壁の peptidoglycan がこれら両酵素の作用によって peptide subunit, glycan その他の building block に解体されていることが予想された。そこで、L-3 および L-11 酵素による溶解物のそれぞれを Sephadex G-50 と 25との連結カラムにかけ、まず peptide を主成分とする低分子量画分と、teichoic acid-(peptido) glycan complex と考えられる高分子量画分とに分離した。この論文では、もっぱら前者についての研究結果が述べられている。すなわち低分子量画分を、Amberlite CG-120 カラムによるクロマトグラフィーならびに 10% 酢酸水溶液による電気泳動によって分離し、L-3 酵素溶解物からは、1つの sugar-peptide と電気的に中性あるいは酸性の4種の peptide を、また L-11 酵素溶解物からは、塩基性の3種の peptide を分離した。これらの peptide について、その構成、N-および C-末端アミノ酸の定量、Edman 分解による分析、Ala の光学異性体の定量、amide アンモニアの分析を行い、その結果、L-3 酵素による消化産物の低分子量画分が、L-Ala-D-(iso)-Gln-meso-DAP-D-Ala と L-Ala-D-(iso)-Gln-meso-DAP (Gln はグルタミン)、およびこれらの peptide が L-Ala を介して Mur の carboxyl 基に amide 結合した sugar-peptide よりなること、一方 L-11 酵素溶解物から分離された peptide は、上述の tetra- および tri-peptide の DAP の遊離の carboxyl 基がアミドにより置換されたもの、ならびにこれらの両 peptide が、前者の C-末端 D-Ala と後者の DAP の α' -NH₂ 基との間で結合した hepta-peptide であることが明らかにされた。

なお、L-11 酵素溶解物よりえた3種の peptide に L-3 酵素を作用させたところ、L-3 酵素は、tri- および tetra-peptide に対しては、DAP amide を脱アミドし、hepta-peptide に対しては、脱アミド作用に加えて、D-Ala-meso-DAP の結合を開裂することが示された。

以上の研究結果から、L. plantarum ATCC 8014 の細胞壁 peptidoglycan の peptide 部分は、L-Ala-D-(iso)-Gln-meso-DAP (monoamide)-D-Ala および L-Ala-D-(iso)-Gln-meso-DAP diamide をその peptide 部分の subunit として、tetra-peptide の大部分がその D-Ala を介して、隣接する tri-peptide の DAP の α' -NH₂ 基と peptide 結合した分子構造を有することが結論された。ちなみ

に、本研究終了直前ほぼ同様な推定構造を提案している Plapp らの報文に接した。しかし彼等の推定は、細胞壁の塩酸による非特異的な水解物から、恐らくは微量にえらた di- および tri-peptide の構造決定に基づいたもので、tetra- あるいは hepta-peptide の分離には成功していない。

また、L-3 酵素および L-11 酵素の *L. plantarum* 細胞壁溶解機序については、前者は Muramyl-L-alanine-amidase 作用および D-alanyl-meso-DAP-endopeptidase 作用によってその溶解作用を発揮し、L-11 酵素は Muramyl-L-alanine-amidase 作用のみによって、被検細胞壁を溶解することが明らかにされた。

論文の審査結果の要旨

この研究において松田は、微生物由来の2種の細胞壁溶解酵素を *Lactobacillus plantarum* 細胞壁に作用させ、溶解にともなって遊離する末端基を分析するとともに、溶解産物を分画してえたペプチドの構造決定を行っている。その結果、従来不明であった *L. plantarum* 細胞壁ペプチドグリカンのペプチド部分の化学構造が明らかにされ、また使用した2種類の溶解酵素がそれぞれどのような結合を開裂する活性を有するかが示された。このような重要知見をもたらした松田の研究は、きわめて価値の高い重要な業績と考える。

よって本研究者は歯学博士の学位を得るのに十分な資格があると認める。