

Title	表皮ブドウ球菌の1株が産生する黄色ブドウ球菌細胞壁溶解酵素の精製, 性状ならびに作用機序に関する研究
Author(s)	杉中, 秀壽
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29812
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)	杉 中 秀 壽
	すぎ なか ひで かず
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 1525 号
学位授与の日付	昭和43年7月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	表皮ブドウ球菌の1株が産生する黄色ブドウ球菌細胞壁溶解酵素の精製, 性状ならびに作用機序に関する研究
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

マウス臓器抽出液の *Staphylococcus aureus* に対する抗菌作用について研究中, 普通寒天平板に増殖した *S. aureus* の菌苔を溶解する迷入集落をみとめた。この集落から純培養菌をえて検討を重ねた結果, この菌が *S. aureus* を溶解する因子を産生することが明かになった。この論文では, この溶解因子の精製, 一般的性状ならびに *S. aureus* の溶解をもたらす作用機序についての研究が述べられている。

1) 細胞壁標品: 供試菌の菌体を Braun の装置あるいは音波処理によって破壊し, 分別遠沈, トリプシン消化をおこなって分離した。2) 溶解活性: 溶解因子を作用させた細胞壁あるいは全菌浮遊液の濁度の減少を経時的に追跡することにより測定した。3) NH_2 -基および還元基量: NH_2 -基量は FDNB 法により, 還元基量は Somogyi の方法にしたがって定量した。4) アミノ酸, NH_2 -および COOH -末端アミノ酸残基: アミノ酸は検体の酸加水分解物を DNP 化し, また NH_2 -末端アミノ酸は検体を DNP 化後酸水解し, 一方 COOH -末端アミノ酸はヒドラジン分解した検体を DNP 化したものについて, いずれもシリカゲル G を支持体とする薄層クロマトグラフィーにより分離定量した。5) アラニンの光学異性体: d-アミノ酸酸化酵素およびグルタミン酸・ピルビン酸・トランスアミナーゼを用いる酵素的により定量した。6) Edman 分解: Tipper らの方法を参考にしておこなった。

えられた実験結果を要約すると次のとおりである。

1. *S. aureus* 細胞壁を溶解する因子の産生菌, EP-K1 株はグラム陽性の球菌でぶどうの房状に配列し, 溶血作用およびコアグララーゼ産生能を示さない。以上の点およびその生化学的性状に基いて, EP-K1 株は *Staphylococcus epidermidis* の 1 株と同定された。
2. EP-K1 株の産生する溶解因子 (ALE) は, この菌を Trypticase soy broth に通気培養した

ものの遠沈上清から20~85%飽和硫酸で沈澱する部分を集め、50%飽和硫酸により再塩析することによって濃縮された。ついで1.8倍容のアセトンによって分画沈澱し、さらに DEAE セルロース・カラムクロマトグラフィーにより精製した。このようにして初回硫酸沈澱画分にくらべて、その比活性が約350倍に上昇した精製標品が好収率でえられた。

3. 精製 ALE は、非透析性で、60°C、30 分間の加熱により失活し、トリプシンにより破壊された。S. aureus (Copenhagen 株) 細胞壁溶解作用は 0.001M の Cu²⁺ で完全に、0.00008M でも著明に阻害され、また Fe²⁺、Ni²⁺ および Mg²⁺ も 0.001M の濃度では明瞭な阻害作用を示した。活性因子の作用の至適 pH は 6.8 附近で、また 0.05M の緩衝液に 0.1M の濃度に食塩を加えた時に最大の活性を示した。

4. 精製した ALE は、S. aureus のほか、Micrococcus lysodeikticus (NCTC 2665) の全菌および細胞壁をほぼ完全に可溶化し、また S. epidermidis (ATCC 155) にも弱いながら明瞭な溶解作用を示す。一方 A 群 Streptococcus pyogenes, Lactobacillus plantarum, Bacillus megaterium ならびに Corynebacterium diphtheriae の全菌 ならびに細胞壁、グラム陰性の Escherichia coli や Proteus vulgaris の全菌は、いずれも ALE の溶解作用に感受性を示さなかった。

5. ALE の S. aureus 細胞壁溶解機序については、まず溶解にともなって遊離する末端基の分析の結果、還元基の遊離は全くみとめられず、細胞壁グルタミン酸 1 モルにつき約 1 モルの NH₂-末端 L-アラニン、ならびにいずれもほぼ 0.7 モルずつの、NH₂-末端グリシンおよび COOH-末端グリシンが遊離することが示された。ついで ALE による細胞壁溶解産物を遠沈し、微量の不溶性残渣から分離した上清を Sephadex G-50 と G-25 との連続カラムにかけ、可溶部のヘキソサミンと有機燐との大部分をふくみ、おそらくはテイコイン酸ペプチドグリカン複合体と考えられる高分子量画分と、ペプチドを主とする低分子量画分とに分けた。低分子量画分をさらに Amberlite CG-120 カラムでクロマトグラフィーをおこなうことにより、1 種類の糖ペプチドと 7 種類のペプチドとを分離した。これらのペプチドについて、電気泳動により純度と荷電とをしらべたのち、構成、NH₂-および COOH-末端アミノ酸、アンモニアならびにアラニンの光学異性体の定量、アミノ酸配列の決定をおこなった。その結果 S. aureus ペプチドグリカンの素材であると考えられるこれら 7 種のペプチドが N^ε-(1-Ala-d-iso-Glu)-N^ε-(Gly)₀₋₄-l-Lys-d-Ala-(Gly)₁₋₃ の推定構造を有することが明かにされた。なお主成分は N^ε-(1-Ala-d-iso-Glu)-N^ε-(Gly)₃-l-Lys-d-Ala-(Gly)₂ の構造のペプチドで、その収量は細胞壁にふくまれる全ペプチドの約 40% に当ることが示された。これらの末端分析、および可溶化したペプチドの構造分析の結果から、ALE はグリシル-グリシン-エンドペプチダーゼ作用によりペンタグリシン・ブリッジを開裂するとともに、ムラミル-L-アラニン-アミダーゼ作用によりグリカン部分とペプチド部分との結合を切断することによって、S. aureus 細胞壁を溶解することが結論される。

以上、著者はこの研究で、S. epidermidis の 1 株が産生する新しい S. aureus 細胞壁溶解酵素を記載し、その酵素としての一般的性状ならびに作用機序を明かにした。ちなみに EP-K1 株は、同じく S. aureus 細胞壁溶解酵素である lysostaphin を産生する Schindler らが発見した K-6-W1 株に類似するが、両者はその生化学的性状において明かにことになっている。

論文の審査結果の要旨

この研究は、本研究者が分離した特定の表皮ブドウ球菌が産生する新しい黄色ブドウ球菌溶解酵素について、その精製法、一般性状および作用機序を明かにし、併せて黄色ブドウ球菌の細胞壁ペプチドグリカンの構造についても重要な知見をもたらした価値ある業績であると考え。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ものと認める。