Osaka University Knowledge Archive

Title	細胞壁溶解酵素によりStaphylococcus aureus Copenhagen株の細胞壁から可溶化したファージ・レセプターに関する研究
Author(s)	村山, 洋二
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29833
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【10】

氏名・(本籍)	村山洋二（むらやまようじ）
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 1547 号
学位授与の日付	昭和 43 年 10 月 28 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	**細胞壁溶解酵素により Staphylococcus aureus Copenhagen 株の細胞壁から可溶化したファージ・レセプターに関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 小谷 尚三 (副査) 教授 山本 巌 教授 竹田 義朗

論文内容の要旨

バクテリオファージ・レセプターの化学的本態に関して，大腸菌，Shigella などのグラム陰性菌については，レセプター物質の単離が成功し，一応の結論がえられている。ところがグラム陽性菌では，Staphylococcus aureus, Bacillus megaterium, Micrococcus lysodeikticus などについて，ファージ・レセプターが細胞壁に局在していることが実験的に示されているに止り，レセプター物質を可溶化し，その化学的本質を明かにしようとする試みは，いずれも十分な成功をおさめていない。この論文では，S. aureus, Copenhagen 株の細胞壁について，細胞壁溶解酵素を利用することにより，ファージ・レセプター物質を可溶化して精製し，単離したレセプター活性物質がファージ「不活化」作用を発揮するのに必要とする化学構造を明かにした研究が述べられている。

1）被検菌株：S. aureus, Copenhagen 株。その ファージ型別は 3C/3B/55+(Ⅱ群)。 2）細胞壁：菌体を Braun cell homogenizer で破壊したものから，分画遠沈，プロナーゼ処理をおこなってえた。 3） L-11 酵素：Flavobacterium sp.（L-11菌）の培養上清の硫安濃縮物を，Sephadex でゲル沪過してえた部分精製酵素標品，ならびにこのものを Amberlite IRC-50 カラムクロマトグラフィーによってさらに分画し，上述の部分精製酵素には認められる muramyl-alanine amidase 活性を欠き，dalanyl-glycine および glycyl-glycine endopeptidase 作用のみを示す BS 酵素，の両者を用いた。 4）Chalaropsis B酵素：LEDERLE Laboratories の Dr. Miller より分与を受けた。 5）ファージ：神戸市衛研より分与された 3C, 3B, 42D および 53ファージ原液から衛生検査指針の方法で増殖させた。 6）レセプター「不活化」作用：S. I. Morse の記載にしたがい，ブイヨンを主体とする反応系（ブイヨン反応系）およびこれに $CaCl_2$ を終末濃度 2×10^{-2}M の割合に加えた反応系（Ca-ブイヨン反応系）の両者を併用し，供試ファージと検体とを作用させた際にみとめられるプラック形成単位の減少を指標としてしらべた。

えられた実験結果を要約すると，次のとおりである。

1. Copenhagen 株の細胞壁は 3C，3B ファージのみならず，Copenhagen 株を溶菌しない42Dおよび53にも強い「不活化」作用を示した。3C ファージについては，作用させた細胞壁量の対数と30分間作用後の不活化率との間に，直線関係がみられた。そこで，検定用平板当り約 1,000個のプラック形成単位を半減させる検体量（ID_{50}）を求めたところ，ブイヨン反応系では約 0.5 μg（有機燐当量では 0.3 mμmole），Ca-ブイヨン反応系では 0.28 μgであった。

2. BS 酵素による細胞壁の溶解産物からゲル沪過，ECTEOLA-cellulose カラムクロマトグラフィーにより，3Cファージを「不活化」する画分（BS-B）を分離することができた。その ID_{50} は，ブイヨン系では約 200 mμmole, Ca-ブイヨン系では 25 mμmole 有機燐当量で，Ca^{++} に強い「不活化」作用増強効果がみられた。構成アミノ酸，アミノ糖，有機燐，NH_2- および COOH- 末端アミノ酸の定量，ムラミン酸とグルコサミンとよりなる glycan の鎖長の測定の結果，ならびに Strominger ら，加藤ら，杉中らの研究成績を基礎として，BS-B は l-alanyl-d-isoglutaminyl-l-lysyl-d-alanine の構造の basal peptide 6 つが，主として glycan 部分，一部は pentaglycine bridge により重合した teichoic acid-peptidoglycan complex の polymer であることが示された。一方，溶解産物からえられた有機燐を含まない peptidoglycan polymer と考えられる画分には，3C ファージ「不活化」作用はみとめられなかった。

3. Chalaropsis B酵素による溶解産物からも，有機燐当量当り，BS-B とほぼ同じ強さの 3C ファージ「不活化」作用を示す Chala-Ⅲ 画分を，ゲル沪過，ECTEOLA-cellulose カラムクロマトグラフィーによって分離した。分析の結果，Chala-Ⅲは 9 つの basal peptide が pentaglycine bridge で結合した teichoic acid-disaccharide-peptide complex polymer であることが示された。

4. BS-B および Chala-Ⅲ の 3C ファージ「不活化」活性は，muramyl-l-alanine amidase 作用を示す部分精製L-11酵素処理により完全に消失したが，N-acetylmuramidase 作用によって細胞壁溶解活性を示す Chalaropsis B酵素で BS-B を，また BS 酵素で Chala-Ⅲ を処理した場合には，これら両活性画分の「不活化」作用はわずかに減弱するに止った。この事実は，3C ファージ「不活化」作用の発現に，glycan 部分と peptide 部分との結合は不可欠であるが，teichoic acid-disaccharide-peptide complex の重合は必ずしも必要でないことを示すものと考えられる。

5. 細胞壁の冷 5 % TCA 抽出液からえた粗 teichoic acid 画分にも 3C ファージ「不活化」作用がみとめられたが，部分精製L-11酵素処理によりその活性は消失した。すなわち，teichoic acid 自身には 3 C ファージ「不活化」活性はみとめられなかった。

以上，著者はこの研究で，S. aureus, Copenhagen 株の 3C ファージ・レセプターの可溶化に成功し，レセプター活性の発現に必要な最少単位が teichoic acid-disaccharide-peptide complex であることを明かにした。ただし，3C 以外のファージについては，BS-B および Chala-Ⅲ の両画分のいずれもが，細胞壁とは異り，Copenhagen 株を溶菌しない 42D および 53ファージのみならず，この株が感受性を示す 3B ファージにも「不活化」活性を欠くことが示された。3B ファージ・レセプターの単離，このものが 3Cファージ・レセプターとどのように異なるかなどの問題は，今後の興味ある研究課題といえよう。

論文の審査結果の要旨

この研究は，黄色ブドウ球菌の細胞壁をたがいに異る作用機序で解体する3種類の溶解酵素を利用し，3C ファージ・レセプター物質を細胞壁から単離するとともに，レセプター活性の発現に必要な化学構造を明かにした，きわめて重要な業績である。

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ものと認める。