The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	細菌細胞壁からえた抗原性多糖体の酵素的分解
Author(s)	加藤, 隆正
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30044
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【7】

氏名・(本籍)	加藤隆正（かとうたかまさ）
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 1870 号
学位授与の日付	昭和 45 年 1 月 10 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	**細菌細胞壁からえた抗原性多糖体の酵素的分解**
論文審査委員	(主査) 教授 小谷 尚三
	(副査) 教授 竹田 義朗 教授 山本 巌

論文内容の要旨

多糖体の構造を研究するために，メチル化，過ヨウ素酸酸化，Smith 分解，Barry 分解など，多くの化学的な解析方法が考案されている。しかし，これらの方法によって，分枝が複雑で重合度の高い多糖体の構造を決定するには限界があり，また細菌由来の多糖体などが示す免疫・生物学的活性がどのような化学構造と関連しているかを明かにしようとする場合などには，化学的方法が役立たない場合が多い。温和な条件下で，しかも特定の結合を開裂することによって多糖体を解体し，その免疫・生物学的活性を修飾する酵素は，当該多糖体の構造，特にその免疫・生物学的活性の担い手となっている構造を考究するに当って，その利用価値はきわめて大きいと考えられる。

著者は，ミコバクテリアやコリネバクテリアの細胞壁の抗原性多糖体を分解する酵素を産生する土壌菌を分離するとともに，この酵素の基本的性状を明かにし，かつこの酵素を利用することによって，上述の多糖体の構造，特に抗原決定基の化学的本質を解明しようと試みた。

酵素産生菌の分離は増強培養法によった。すなわちジフテリア菌（P. W. 8）の細胞壁多糖体（DPs,0.006～0.015％）を唯一のC源とする培地（N源は0.1％硫酸アンモン）に土壌標品を接種して，30°C で1週間前後培養した。その一部を遠沈し，その上清と抗ジ菌血清との沈降反応をしらべ，反応が消失ないし減弱している培養を上記培地に植えつぐ操作をくり返して，増殖にともなってジ菌細胞壁多糖体を分解し，沈降反応原性を消失させるグラム陽性の小球桿菌（M-2菌）を純培養としてえた。この研究に使用した多糖体分解酵素（M-2酵素）は，上述の菌を普通ブイヨン中で振盪培養し，えられた菌体をジ菌細胞壁のL-3酵素溶解産物（CDCL）をふくむ 0.1％カザミノ酸液に浮游し，30°C で4時間振盪することによって誘導し，上記浮游液の遠沈上清を硫安で全飽和することによって濃縮したものである。

硫安塩析によってえた M-2酵素の DPs に対する作用の至適 pH は 5.9で，イオン強度および2価カチオンによる影響はみとめられなかった。またその活性は，56°C, 15分間の加熱で58%，120分間の加熱では90%が減弱した。

M-2酵素の作用域については，BCG（竹尾株）細胞壁由来のアラビノガラクタン（AG），アラビノマンナン（AM），マンナン（M），人型結核菌（$H_{37}Rv$株）の細胞壁アラビノガラクトマンナン（AGM）およびジ菌細胞壁の AGM（DPs に当る）を，1 mg 基質当り，それぞれ600，300，100，760および550 mμmnle の還元基（R. P.）を遊離させつつ分解し，その沈降反応原性を消失させた。一方 BCG のグルカン（G）は，M-2酵素の作用により 500 mμmole の R. P. を遊離したが，沈降反応原性の減少は著明ではなく，また *Asp. fumifatus* のガラクトマンナンおよびGは，酵素作用によりそれぞれ210および 140 mμmole の R. P. を遊離したが，沈降反応原性の変化はみとめられなかった。なお市販のスタキオース以下の少糖，ならびにイヌリン，デキストラン，ベクチンなどの多糖体は M-2 酵素に対する感受性を示さなかったが，デキストリン，可溶性でん粉およびグリコーゲンは多量の R. P. を遊りつつ分解作用を受けた。

以上のように，デキストリンが M-2 酵素の作用を受けることが示されたので，このものが酵素産生の inducer となりうるかどうかについて検討した。その結果，デキストリンを inducer とした場合にも，デキストリン，グリコーゲンのみならず BCG の AG，ジ菌の AGM および青山B株からの AG と AM を分解して沈降原応原性を消失させる酵素の得られることが示された。しかし，この酵素の細胞壁多糖体を分解する活性は，デキストリン分解活性にくらべて著るしく弱かった。CDCL あるいはデキストリンで誘導した酵素をアセトンで分画し，えられた各画分について DPs およびデキストリンに対する作用の強さを比較した結果，デキストリンを分解する活性とアラビノースをふくむ細胞壁多糖体を分解する活性とは別個の酵素蛋白によるものであることを示唆する結果がえられた。

M-2酵素による細胞壁多糖体の分解産物の解析には，BCG（竹尾株）の AG，ジ菌（P. W. 8株）の AGM および人型結核菌（$H_{37}Rv$ 株）の AGM を基質として用いた。すなわち，これらの多糖体に CDCL で誘導した M-2 酵素を十分に作用させ，分解産物をゲル沪過して分離した種々の画分について，構成糖の種類とモル比，還元末端の糖の種類，平均重合度ならびに血清学的性状などをしらべた。その結果，Ara と Gal を1：1のモル比にふくむ BCG-AG からは Ara : Gal=1 : 4.6，平均重合度 12の画分と Ara : Gal=5 : 1，重合度6の画分，さらに少量のアラピノースオリゴサッカライドがえられた。またジ菌 AGM（Ara : Gal : Man=2 : 1 : 1 からは，Ara : Gal : Man=5 : 9 : 2 の Gal 含量の高い平均重合度約 34，Gal をほとんどふくまない重合度9，Ara : Man=2 : 1 の組成の重合度6などの画分がえられた。$H_{37}Rv$ 株の AGM（Ara : Gal : Man=6 : 4 : 1）も Gal 含量の高い部分と Ara を主な構成糖とする部分とから成っていることを示す結果がえられた。実験に用いた3種類の細胞壁多糖体の抗原性の決定にあづかる構造については，いずれの場合にも，Ara を主な構成糖とする平均重合度6～9の画分が，沈降原として用いた酵素未処理の多糖体1モルあたり10数モルの量で，分解前の多糖体と対応する抗血清との沈降反応を効率よく阻止することが明らかとなった。

なお，上記3種の多糖体のM-2酵素による分解産物からえられた画分は，すべてAraを還元末端としていた。このことは，CDCLで誘導したM-2酵素によって開裂をうけるのは，アラビノシル結合であり，ガラクトシルやマンノシル結合は作用を受けないことを示している。すなわちM-2酵素は，アラビノースをふくむ多糖体の内部構造のアラビノシル結合を切断するdepolymeraseであろうと考えられる。

論文の審査結果の要旨

この研究は，ミコバクテリアとコリネバクテリアの細胞壁からえたアラビノースを含む多糖体を分解してその沈降反応原性を消失させる，従来報告をみない酵素を土壌細菌の産物として分離するとともに，この酵素を利用して上記多糖体の化学構造，特に抗原決定基の構造の一端を明かにした重要な業績である。

よって，本研究者は，歯学博士の学位を得るに十分な資格があるものと認める。