

Title	Flavobacterium L-11酵素のS. aureus細胞壁溶解機序 ならびに溶解因子の精製に関する研究
Author(s)	平田, 隆則
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/30100
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【11】

氏名・(本籍)	平	田	隆	則
学位の種類	歯	学	博	士
学位記番号	第	1947	号	
学位授与の日付	昭和45年3月30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	Flavobacterium L-11 酵素の S. aureus 細胞壁溶解機序 ならびに溶解因子の精製に関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授	小谷	尚三	
	(副査) 教授	竹田	義朗	助教授 加藤慶二郎 助教授 鈴木不二男

論 文 内 容 の 要 旨

S. aureus, group A S. pyogenes, cariogenic S. mutans (BHT 株), C. diphtheriae, M. tuberculosis などの病原細菌の細胞壁を可溶化する Flavobacterium L-11 酵素は、これら細菌の細胞表面物質の化学的ならびに免疫病理学的特性を解析するに当って役立つ、きわめて有用な酵素である。この酵素の S. aureus 細胞壁溶解機作について Kato と Strominger は、細胞壁の溶解過程を追って遊離してくる末端アミノ酸を同定、定量した結果に基づいて、この酵素が細胞壁 peptidoglycan の basal peptide unit を結ぶ pentaglycine bridge を開裂し、また glycan と peptide とを結ぶ N-acetylmuramyl-L-alanine (MurNAc-L-Ala) 結合を水解することを推定した。

著者は (I) S. aureus Copenhagen 株の細胞壁から L-11 酵素の水解作用によって生じた低分子量の構築単位を単離してその構造を決定することにより、上記の推定を裏付けるとともに、(II) peptidoglycan に対する作用点を異にする活性因子を分別、精製し、また粗酵素標品に含まれる caseinase から細胞壁溶解因子を分離することを試みた。

供試した S. aureus 細胞壁は Copenhagen 株の培養菌体を Braun の装置で破壊したものを分画遠沈し、分離した粗細胞壁画分を pronase で処理して精製したものである。L-11 酵素としては、I の実験では L-11 菌の0.1%カザミノ酸培地培養上清から硫酸塩析して、hydroxylapatite カラムクロマトにより精製したものを、II の実験では2%グルコース加ブローズ中でタンク培養した L-11 菌の培養上清を硫酸塩析して得た粗酵素標品を用いた。

I 細胞壁溶解物からの peptide 分離とその構造の決定

(1) L-11 酵素の作用により 83% optical density の減少を示した細胞壁消化物を Sephadex G-50 と G-25 との連結カラムにかけ、基質として用いた細胞壁のヘキソサミンと有機燐のほと

んど、およびアミノ酸の一部を含む高分子量画分とヘキサミンや有機燐を含まず、もっぱら NH_2 化合物からなる低分子量画分とを分別した。ついで後者を Amberlite CG-120 カラムにかけクロマトグラフィーを行って7種類の peptide 画分を得た。

(2) 電気泳動的に単一性が認められた6種類の peptide のうちの3種は Gly のみよりなり、電気泳動および DNP 化物の薄層クロマトに於ける移動度、総 Gly と C 末 Gly の比などから、それぞれ tetra-, tri- および di-glycine であることがわかった。他の3種は pH 5.0 での電気泳動で陰極に移動する塩基性 peptide で、構成、N 末および C 末アミノ酸の分析ならびに Edman 分解法による解析の結果、それぞれ N^{α} -(L-Ala-iso Gln)-L-Lys-D-Ala からなる tetra-peptide に L-Lys の ϵ - NH_2 基を介して Gly がそれぞれ1, 2 および5個結合した構造を有することが明らかになった。これら6種類の peptide は合計すると基質として用いた細胞壁に含まれるペプチド量の約50%に相当した。なお残りの1種はヘキサミンを含む糖ペプチドであったが、電気泳動で単一のスポットを与えなかったため構造決定を断念した。

以上のようにして、L-11 酵素が Copenhagen 株細胞壁の peptidoglycan に作用する際、glycan と peptide との MurNAc-L-Ala 結合、basal peptide unit の C 末端 Ala と pentaglycine の N 末端との結合、ならびに pentaglycine bridge 内部の Gly-Gly 結合を水解することにより、peptidoglycan を解体し、可溶化することが決定的に明らかにされた。

II MurNAc-L-Ala amidase, endopeptidase および caseinase 活性因子の異同と各因子を分離する試み

(1) L-11 酵素の細胞壁溶解活性を阻止することが知られている種々の要因、ならびに各種の protease 阻害剤が粗酵素標品の溶解活性ならびに caseinase 活性に及ぼす影響をしらべた。溶解活性は $\mu=0.05$ 以上のイオン強度の反応系では明瞭に阻止されたが、caseinase 活性は $\mu=0.25$ でも殆んど影響されず、また 0.001M の EDTA は caseinase 活性に対して、一方 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} は溶解活性により強い阻害を示した。なお soy bean trypsin inhibitor, leupeptin, ϵ -aminocaproic acid はいずれの活性をも阻害しなかった。

(2) 粗酵素標品を CM-cellulose カラムにかけ、燐酸緩衝液のモル数と pH を段階的に上げて溶出を行った。その結果 caseinase 活性の大部分を含み、細胞壁活性の弱い画分 A, caseinase の一部を含み溶解活性も弱い画分 B, および溶解活性の約80%が回収され、かつ caseinase 活性の弱い画分 C がこの順に分離された。クロマト前の粗酵素標品にくらべて画分 C は蛋白質当りの比活性が約14倍上昇し、また溶解活性当りの caseinase 活性は約 $\frac{1}{2}$ に低下した。上記3画分を細胞壁に作用させて N および C 末端アミノ酸の分析を行った結果、画分 C は D-Ala-Gly および Gly-Gly endopeptidase 活性を有するが MurNAc-L-Ala amidase 活性をほとんど欠くことが示された。一方 MurNAc-L-Ala amidase 活性は画分 B に認められたが、この部分には弱いながら endopeptidase 作用も認められた。なお、画分 C を Sephadex G-75 カラムでゲル濾過して溶解活性を示す画分を集めることにより、さらに比活性を約 2.5 倍上昇させ、溶解活性に対する caseinase 活性の比を約 $\frac{1}{2}$ に低下させることができた。

以上著者は Flavobacterium L-11 酵素の S. aureus Copenhagen 株細胞壁 peptidoglycan に

対する作用点を確定するとともに、pentaglycine bridge の D-Ala-Gly および Gly-Gly 結合を分解するが MurNAc-L-Ala amidase 作用を欠き、また caseinase 活性も著しく弱い画分を粗酵素から精製分離できることを示した。

論文の審査結果の要旨

著者は *S. aureus* Copenhagen 株の細胞壁に L-11 酵素を作用させ、ペプチドグリカンの解体によって生じたサブユニットを単離し、その構造を決定した。その結果、この酵素が Copenhagen 株細胞壁のグリカンとペプチドのアミド結合、ならびにペプチド間のペンタグリシン架橋の D-アラニル-グリシンおよびグリシル-グリシン結合を開裂することを確定した。またこれらの結合に作用する活性因子、ならびに粗酵素標品にふくまれるカゼイナーゼを分別・精製することを試み、ペンタグリシン架橋に作用する活性因子をかなりの程度に純化することに成功した。

以上の研究は、*S. aureus* のみならず *S. pyogenes* (A群)、cariogenic *S. mutans* (BHT 株)、*C. diphtheriae*、*M. tuberculosis*、*L. plantarum* などの細胞壁を溶解する L-11 酵素を、これらの菌の細胞表面物質の化学構造や免疫・病理学的特性の研究に利用する際に役立つ重要な事実を明らかにしたものであり、著者の論文は歯学博士の学位論文として十分な価値があるものと認める。