The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A群連鎖球菌細胞壁に関する研究
Author(s)	浜田, 茂幸
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/30229
rights	Copyright © 歯科基礎医学会
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

歯基礎誌 12：142-152, 1970.

A群連鎖球菌細胞壁に関する研究

1. *Flavobacterium* L-11 酵素による細胞壁の溶解機序について

浜田茂幸（はまだしげゆき）
大阪大学歯学部口腔細菌学教室*

〔受付：昭和45年6月9日〕

序　言

A群連鎖球菌はその感染に直接継起するきわめて多彩な化膿性疾患をひきおこすとともに，リウマチ熱，糸球体腎炎などの非化膿性疾患（nonsuppurative sequelae）を続発する点で特異な病原細菌であり，病原菌と宿主との相互作用，いわゆる host-parasite relationship を考究する際の最も魅力に富んだ研究対象の一つである。またA群連鎖球菌はあらゆる病原細菌のなかで最も多種類の酵素，その他の作用物質を菌体外に産生する菌種であるが，他方生物学的に，あるいは免疫学的に活性な多様な菌体成分を保有し，かつその大部分は菌体表面に存在することが知られている。すなわち SCHWAB 一派の研究によれば，A群連鎖球菌の細胞壁にはウサギへの皮内注射によって慢性に経過する反復性の多結節性病巣（chronic remittent multinodular lesion）を惹起し，マウスの腹腔内注射によって心臓に人のリウマチ熱の心臓病変によく似た病理変化を発生させる作用などが存在する。また KAPLAN らは，A群連鎖球菌のあるM型菌の細胞壁画分にヒトをはじめとする哺乳類の心臓組織の筋鞘および筋鞘下部に存在する蛋白質抗原と交叉反応を示す抗原性物質が存在することを明かにし，この心反応抗原がリウマチ熱の発症に関与する可能性についての研究を展開している。同様に GOLDSTEIN らはA群連鎖球菌細胞の特殊構造であるC多糖体がヒト，ウシなどの心弁膜のグリコプロティンと共通抗原性を示すことを報告し，リウマチ熱のさいにみられる弁膜の傷害がこのような交叉反応抗原に基く可能性を示している。さらにA群連鎖球菌の最も重要な virulence factor である型特異M蛋白質も細胞壁の構成成分の一つと考えられる。

以上のようにA群連鎖球菌の病原性の発揮に関与する免疫学的に，あるいは生物学的に活性な種々の因子が細胞壁に局在することが知られているが[1]，これらの因子の化学的本質や，これらの因子と細胞壁の物理的あるいは化学的特性の担い手であるペプチドグリカンとの関係，さらにペプチドグリカン自身の化学構造などについては不明の点が多い。これらの問題を解明する最も有力な研究方法の一つは，物理的にも化学的にも安定な細胞壁ペプチドグリカンを温和な反応条件で，しかも規制しうる様式で可溶化する細胞壁溶解酵素を利用する方法であろう。

著者は，著者の属する研究室で従来 *Staphylococcus aureus* の細胞壁を溶解する活性に注目し

Studies on the cell walls of group A *Streptococcus pyogenes*. 1. Mechanism of lysis of the cell walls by *Flavobacterium* L-11 enzyme.

By S. HAMADA (Department of Microbiology, Osaka University Dental School, Osaka)
* 大阪市北区常安町 32（〒 530）

Jap. J. Oral Biol. 12：142-152, 1970.

て研究が行われてきた *Flavobacterium* L-11 酵素(KOTANI ら，1959[2]：KATO ら，1962[3])の標品のあるものがA群連鎖球菌，12型菌の細胞壁に対しても明確な溶解作用を示すことを確認し，この酵素を利用してA群連鎖球菌の細胞壁をめぐる種々の問題を考究しようと考えた。本報告では，このような研究を展開して行くに当って基礎となると考えられる L-11 酵素によるA群連鎖球菌細胞壁の溶解機序についての研究結果を報告する。

材料と方法

1) 供試菌株

A群連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)，12型，S.F. 42 株。GRIFFITH(1934)[4] によって猩紅熱患者から分離されたもので，LANCEFIELD の研究室で保存されている標準菌株の一つである。大阪大学微生物病研究所菌株保存室より分与をうけた。

2) 細胞壁調製のための供試菌の大量培養

凍結乾燥して保存した上記供試菌を5％ヒツジ血液寒天平板に一度培養したものを Todd Hewitt ブロース(Difco Laboratories, Mich., USA, 120 °C, 15分間加熱滅菌したもの)に37°C で18時間静置培養し，大量培養の接種に用いた。すなわちこの前培養菌の100ml をあらかじめ37°C に温めた10l の Todd-Hewitt ブロースに接種し，37°C で静置培養を行い，18時間後殺菌の目的でフォルマリンを最終濃度が0.2% となるように加え，よく振とうした後4°C に一夜静置した。殺菌した培養菌を4°C で連続遠心して集菌した。こうしてえた菌体を培地容量の1/10量の精製水で5回洗滌したものの約50g（湿潤量）を細胞壁調製の出発材料とした。

3) 細胞壁の調製法

細胞壁調製の第一段階である細胞の破壊は，Braun の細胞破壊装置 (Model MSK, B. Braun Apparatebau, Melsungen, 西ドイツ）を用い，BLEIWEIS ら(1964)[5] の記載を参考にして行った。すなわち集菌した菌体の1容に精製水を3容の割合に加え，えられた濃厚菌浮遊液の 30ml ずつを Braun の装置に付属の Duran ガラス製のフラスコ(75ml 容量)に入れ，ついで30g のガラスビーズ〔0.17～18mm 直径，Glasperlen, Kat. Nr. 54150(2884)，B. Braun〕，および消泡済として 0.2ml のトリ-n-ブチルリン酸を加えた。フラスコにガラス栓をほどこし，ゴムバンドをかけて脱落しないように固定したものを液化炭酸ガスで冷却しながら，4,000回転/分の速さで旋転させた。時間を追って菌液をグラム染色して菌体の破壊の程度をチェックした。通常5分間の処理で大部分の菌体が破壊され，グラム陰性となった。

破壊された菌体浮遊液をフラスコにいれたまましばらく放置し，ガラスビーズが沈むのを待って上液を分け取った。一方ガラスビーズは菌体の破壊による菌体内物質の遊出により非常に粘調性をおびており，かつ破壊された菌体がまきこまれているので適当量の精製水で数回洗い，洗液は上液と合体した。このようにしてえた破壊菌液を300g で20分間ずつくり返し4回遠心し，残存する未破壊の菌を沈渣として除いた。最終回の遠心上清を 10,000g, 30分間遠心して細胞壁を沈澱させた。えられた沈渣は出発材料として用いた菌体の約10倍容量ずつの1M NaCl および精製水でそれぞれ2および18回洗滌したのち，凍結乾燥した。このようにして湿潤重量50g の全菌から乾燥重量約1.5g の粗細胞壁画分がえられた。粗細胞壁を0.05M リン酸緩衝液，pH 7.0の150ml に浮遊させ，15mg の結晶トリプシン（トリプシリン，持田製薬，東京)を加えて40°C で4時間処理した。このトリプシン消化をさらにもう一度繰返した細胞壁画分は精製水で十分洗滌したのち凍結乾燥した。トリプシン処理を行ってえた精製細胞壁は約400mg(乾燥重量)であった。

4) L-11 酵素の部分精製

200l 容量のタンクに容れた2％グルコース加ブロースの100l に，同じ培地に増殖させた *Flavobacterium* L-11 菌の培養液の3.6l を接種し，通気しながら28°C で培養した。適当な時間ののち，培養物を濾過し，濾液に硫酸アンモニウムを 80% 飽和になるように加えた。生じた沈渣を精製水に

溶解し，精製水に対して透析したのち，再び80%飽和硫酸アンモニウムで塩析し，えられた沈澱を透析によって十分に脱塩したのち凍結乾燥した(粗 L-11 酵素)。この酵素標品の1.2g を10ml の精製水に溶解し，これをセファデックス G-75(40～120μ, Pharmacia, Uppsala, Sweden) のカラム(4.5×80cm) にかけて，0.01M リン酸緩衝液(pH 8.0)で溶出して10ml ずつのフラクションを分取した。*Staphylococcus aureus* の細胞壁に対して溶解活性を示すフラクションを合体したもの (約330 ml)を透析用のセルロースチューブ(Visking Co., USA)に容れ，約800ml の20%ポリエチレングリコール6,000 (大日本製薬，大阪)溶液中にいれることにより約45ml に濃縮した。えられた酵素標品のA群連鎖球菌，12型，S.F. 42 株の細胞壁に対する溶解活性は2.4単位/ml であり，また *S. aureus* の細胞壁に対するそれは120単位/ml であった〔単位の測定は KATO ら(1962)[3]によって記載されている方法に従った〕。

5) 化学分析

(1) アミノ酸とアミノ基：総アミノ基と遊離アミノ基の測定，構成アミノ酸，N-末端アミノ酸，C-末端アミノ酸およびアラニンの光学異性体の同定と定量は GHUYSEN ら(1966)[6] の記載に従った。構成-および N-末端アミノ酸を同定・定量するさいには，試料をそれぞれジニトロフェニル化(DNP 化)する前およびした後に 4 N HCl とともに封管し，沸とう水中で(以下100°C と記載する) 8 時間加水分解した。また C-末端アミノ酸決定のためのヒドラジン分解は再蒸留した無水ヒドラジンを使用して100°C，6 時間行った。なお供試細胞壁の構成アミノ酸については，GHUYSEN らの方法 (DNP 化，薄層クロマト法)によるほか，4 N HCl 中で100°C，12時間加水分解した検体についてアミノ酸自動分析機 (Model LC-5，柳本製作所，京都)によっても測定した。

(2) アミノ糖：総ヘキソサミン量は GHUYSEN ら[6]によって改変された ROSEMAN と DAFFNER の方法(1956)[7]，ムラミン酸とグルコサミンは PRIMOSIGH ら(1961)[8]の方法に従ってアミノ酸とともに濾紙クロマトグラフィーによって定量した。測定に供する試料は 6 N HCl 中で100°C，12 時間加水分解した。

(3) 糖：試料の糖成分の分析はガスクロマトグラフ(Hitachi-Perkin Elmer, Model F6-D)を使用し，SWEELEY ら(1962)[9]の方法によって行った。すなわち 1 N HCl により100°C で 2 時間処理した細胞壁(0.2mg)の水解産物を減圧乾燥してHCl を除いたのち，50μl の TMS 試薬(0.1ml のトリメチルクロルシラン，1 ml の無水ピリジンおよび0.2ml のヘキサメチルジシラザンの混合物) を加えて室温で10分間処理した。えられた TMS 誘導体を50μl のクロロフォルムで 2 回抽出してピリジンを除いたのち減圧乾燥した。これに10μl のクロロフォルムを加えてよく攪拌した後，直ちにその 2 μl をガスクロマトグラフ分析に供した。なお TMS 化する試料には内部標準として D-マンニトールを加えた。

還元基の測定は PARK と JOHNSON(1949)[10]の方法にしたがって行った。このさい測定前に検体を遠心し，溶解酵素による作用をまぬがれた不溶性残渣を除き，その上清について比色定量を行った。メチルペントースは DISCHE と SHETTLES (1948)[11]のシスティン-硫酸法で測定した。

(4) その他：総リンおよびアンモニアの定量はそれぞれ LOWRY ら(1954)[12]の方法および FAWCETT と SCOTT(1960)[13]の方法に従った。

なお比色定量は300μl 容量の石英製セルを装着した日立-Perkin Elmer 分光光度計 (Model 139, UV-VIS, 日立製作所，東京)を使い，微量法で実施した。

ちなみに以上の分析，定量法の技術的な詳細については加藤と小谷(1969, 1970)[14]の記載を参考にした。

実験結果

1) 供試細胞壁の化学組成

本研究に用いた細胞壁標品は表 1 に示すような化学組成を有する。すなわちグルタミン酸残基(500mμmole/mg, 7.3%) を基準として各構成成分

表 1　A群連鎖球菌，12型，S. F. 42株の細胞壁の化学組成

構成成分	mμモル/mg 細胞壁	グルタミン酸1.0あたりのモル比	細胞壁に対する重量%
グルタミン酸	500	1.0	7.3
アラニン	1,680	3.4	15.0
(うちD型)	(510)	(1.0)	(4.4)
リジン	550	1.1	8.0
グルコサミン	800	1.6	14.3
ムラミン酸	226	0.5	5.9
総ヘキソサミン	1,250	2.5	22.4
ラムノース	1,430	2.9	26.0
総リン	120	0.2	0.4
結合アンモニア	480	1.0	0.7

上記の主要アミノ酸のほか次のアミノ酸が検出されたが，いずれもグルタミン酸残基1.0モルあたりのモル比は0.1以下であった。グリシン，アスパラギン酸，バリン，セリン，ロイシン，スレオニン，ヒスチジン，イソロイシン，フェニルアラニン，チロジン，アルギニン（多い順に列挙した）。

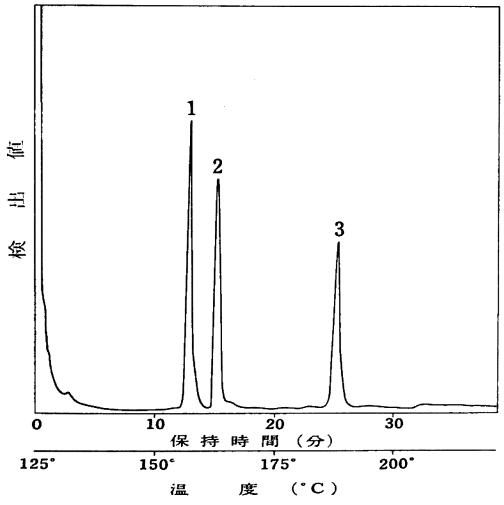

図1　S.F. 42株細胞壁の塩酸水解物のTMS誘導体のガスクロマトグラム
カラム：1.5% SE-52 on Chromosorb AW-DMCS, 0.3cm×100cm
ピーク1，2：ラムノース，3：D-マンニトール(内部標準として加えた)

のモル比を求めると，アラニン 3.4(うちD型アラニン，1.0)，リジン 1.1，グルコサミン 1.6，ムラミン酸 0.5，メチルペントース（ガスクロマトグラフィーによる分析の結果，図1に示すようにラムノースと同定された）2.9，総リン 0.24，結合アンモニア 1.0という結果がえられた。

以上のほかに，アミノ酸自動分析機による分析によってグリシン，アスパラギン酸，バリン，セリン，ロイシン，スレオニン，ヒスチジン，イソロイシン，フェニルアラニン，チロジンおよびアルギニン(以上モル比の大きさの順に並べた）が検出されたが，グルタミン酸残基1.0モル当りのモル比はいずれも0.1以下であった。

供試細胞壁を構成するアミノ酸のアミノ基およびカルボキシル基がどの程度遊離しているかについては，それぞれ DNP 化法およびヒドラジン分解法によって分析を行った。その結果，二塩基性アミノ酸であるリジン残基のε-アミノ基はグルタミン酸残基1.0モルあたり0.12モルのみが遊離の状態にあり，したがってリジン残基がペプチドの枝分れに当っているらしいこと，またグルタミン酸残基1.0モルあたり0.24モルの L-アラニンおよび0.18モルの D-アラニンがそれぞれN-およびC-末端アミノ酸として検出され，供試細胞壁のペプチド内部の結合，あるいはペプチドとグリカンとの結合にはところどころに開裂する部位が存在することが示された。

表1に列挙された構成成分の総計は細胞壁の約80％を説明しうる。

2)　供試細胞壁の L-11酵素による溶解

細胞壁標品の精製水浮遊液（10mg/ml)の23mlに，24単位の L-11酵素を含む0.01M のリン酸緩衝液，pH 8.0の23ml（両者ともあらかじめ2°Cに冷却したもの）を加え，さらに防腐の目的でアジ化ナトリウムを46mg 添加した。反応混合物を冷却しつつ十分に攪拌したのち，その500μl を0時間の検体としてくみ出し，ただちに100°C, 5分間加熱して酵素作用を不活化した。残りの反応混合物を37°C に温浴し，以後反応の経過を追って1，3，7，24，48および96時間後に各500μl ずつの検体をくみ出し，ただちに加熱して酵素作用を停止させた。なお対照として酵素を加えず細胞壁のみをふくむ反応系を作り，上記と同様にして検体の

くみ出しを行った。これらの各検体について反応系の濁度(O.D.)，遊離アミノ基および還元基を測定し，反応時間に対してプロットした結果が図2に示されている。

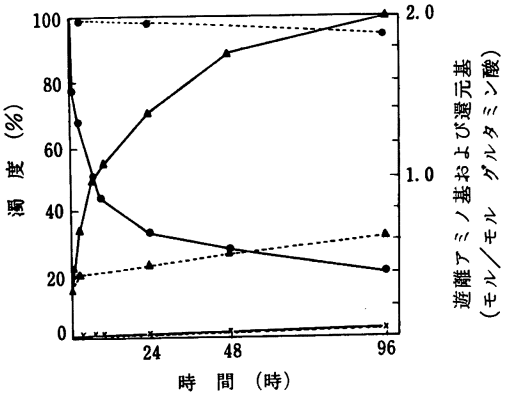

図2　L-11酵素による S.F. 42株細胞壁の溶解とアミノ基の遊離
●——●：濁度　▲——▲：遊離アミノ基
×——×：還元基
実線：L-11酵素＋細胞壁
点線：L-11酵素を含まない細胞壁対照

図にみられるように，供試細胞壁は L-11酵素の作用によって可溶化し，その結果反応系の O.D. はしだいに減少し，96時間反応後の O.D. 減少は約80%に達した。このような O.D. 減少とほぼ並行してアミノ基の遊離がみられ，遊離アミノ基は0時間の160mμmole（1 mg 細胞壁中のグルタミン酸残基1.0モル当り0.32モル）から96時間反応後の1,000mμmole（2モル）まで840mμmole（1.68モル）増加した。一方，遊離還元基量には酵素作用による有意の増加は認められなかった。以上の結果は，A群連鎖球菌細胞壁の基礎構造であるペプチドグリカンが L-11酵素の作用によりそのペプチド部分が水解をうけ，あるいはまたペプチド部分とグリカン部分との結合が開裂された結果，本来の不溶性を失って溶解することを示している(グリカン部分は水解をこうむらない)。そこでつぎにペプチドグリカンの酵素による水解がどの部位で起るかについての手掛りを得る目的で，酵素作用によって新しく遊離するアミノ基が供試細胞壁のどの構成アミノ酸のものであるか，またアミノ基の遊離がペプチド結合の水解によるものならばL-11酵素の作用によってどの構成アミノ酸のカルボキシル基が遊離するかなどを明かにするために，供試細胞壁の酵素的溶解の経過を追ってくみ出した上記検体について，酵素の水解作用に伴って出現あるいは増量する細胞壁のN-末端およびC-末端アミノ酸を同定定量した。

図3に示されているように，上述のアミノ基の

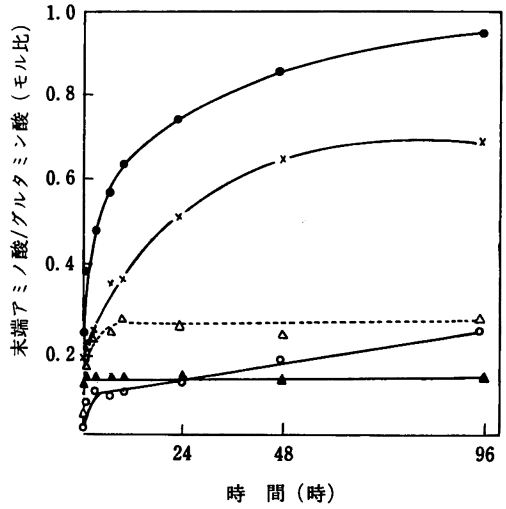

図3　S.F. 42株細胞壁の L-11酵素による可溶化にさいして遊離するN-末端アミノ酸，C-末端アミノ酸および遊離アミノ酸
●——●：N-末端アラニン，○——○：遊離アラニン，×——×：C-末端アラニン（ヒドラジン分解法による実験値から各時点における遊離アラニンの値を減じ補正したもの）
△……△：(N-末端アラニン)—(C-末端アラニン)，N-アセチルムラミン酸→L-アラニン結合の開裂によって遊離すると考えられるN-末端アラニン

増加は主としてアラニンのアミノ基の遊離によるもので，N-末端アラニンは酵素作用前（反応の0時間)の0.24モル(グルタミン酸残基1.0モル当り，以下同じ）から反応の進行に伴って次第に増加し，反応終了の96時間後には0.95モルに達した（増加は0.71モル)。一方酵素作用によりそのカルボキシル基が遊離するアミノ酸もアラニンであるがC-末端アラニンはN-末端アラニンに比べて遅れて増

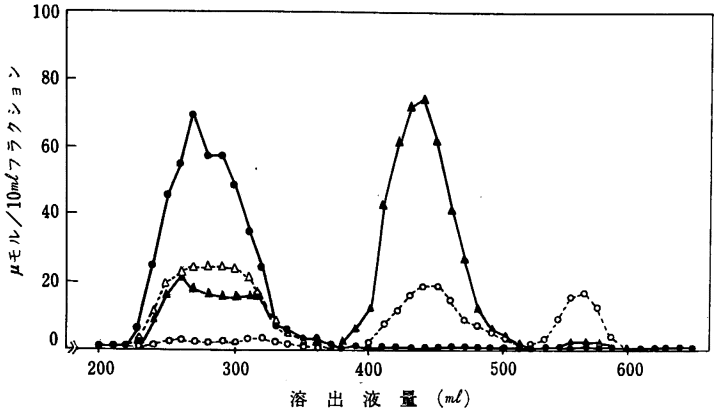

図4　S.F. 42株細胞壁の L-11酵素による溶解産物の セファデックス G-50 および G-25 連結カラムによるゲル濾過
▲——▲：全アミノ基　○……○：遊離アミノ基　●——●：ラムノース
△……△：総ヘキソサミン

加し，またその増分も酵素処理前の0.18モルから反応完結時の0.68モルまで，すなわち0.5モルとN-末端アラニンのそれに比べるとかなり低かった。ちなみにD-アミノ酸酸化酵素[15]を用いてGHUYSEN らの方法で調べたところ，C-末端アラニンはすべて D 型であり，一方 N-末端アラニンには D 型は全く含まれていないことが示された。

これらの結果から，A群連鎖球菌細胞壁に対する L-11酵素の作用点の1つは D-アラニン→L-アラニンの結合であることが推測される。しかしもし L-11酵素の作用によって水解をこうむるのがこの結合だけであるとすると，N-末端 L-アラニンとC-末端 D-アラニンの酵素作用による遊離に時間的にもずれがみられ，また量的にも差がある事実を説明できない。すなわち反応の経過の上でも，また量的にもC-末端アミノ酸の増加に伴われないN-末端 L-アラニンの増加は，供試細胞壁ペプチドグリカンの L-アラニン→D-アラニン以外の結合が L-11酵素によって切断されていることを示しているものと考えられる。L-11酵素は *S. aureus* (KATO と STROMINGER, 1968[16]：KATO ら，1968[17])，*Lactobacillus plantarum* (MATSUDA ら，1968[18])，BCG(KOTANI ら，1968[19])，*Mycobacterium tuberculosis* (柳田，1970[20])，*Listeria monocytogenes* (YANAGIDA ら[21])などの細胞壁に対して N-アセチルムラミン酸→L-アラニン結合の開裂するアミダーゼ活性を発揮することが教室のこれまでの研究で明かにされている。したがって上述のC-末端アミノ酸の遊離に伴われないN-末端 L-アラニンの増加は N-アセチルムラミン酸→L-アラニンの水解によるものではないかと推測される。このような推定はムラミン酸残基のカルボキシル基(乳酸基)の遊離を同定定量することにより最も直接的に説明されるはずであるが，現在のところ利用しうる適当な方法がない。しかし後述するように，L-11酵素による細胞壁の溶解産物をセファデックスでゲル濾過すると試料にふくまれる総アミノ基の約20%がペプチドあるいはアミノ酸のみを含有し，ヘキソサミンおよびラムノースを全く含まない低分子量画分としてえられたことは，A群連鎖球菌の細胞壁においてもグリカン部分とペプチド部分との結合に与る N-アセチルムラミン酸→L-アラニン結合が L-11酵素によって水解されることを間接的にではあるが示している。この結合の開裂の Kinetics を反応各時間におけるN-末端 L-アラニン量からC-末端 D-アラニン量を差引いてえた値(図3に点線で示した)を指

標として調べると，N-アセチルムラミン酸→L-アラニン結合の開裂は反応初期の3時間で完結し，開裂する結合はグルタミン酸残基1.0モル当り最大約0.24モルであることがわかる。一方D-アラニン→L-アラニン結合の水解は持続的に進行し，反応48時間以後に至ってはじめてほぼ完了する。

なお末端アミノ酸としてではなく単体のL-アラニンの少量ではあるが有意の遊離（96時間後にグルタミン酸1.0モル当り0.24モル）が認められた。これはL-11酵素にアミノペプチダーゼが含まれており，その作用によってN-末端L-アラニンが遊離するためではないかと考えられる。ちなみに図3に示されているC-末端D-アラニン量の遊離曲線は，各時点において検出される単体L-アラニンの値を補正して描いたものである。

3) 供試細胞壁のL-11酵素による消化産物のゲル濾過法による分画

前項で述べた細胞壁のL-11酵素による96時間消化産物（細胞壁の200mg相当量）を10,000gで1時間遠心して，不溶性残渣（38.2mg，出発細胞壁量の約20%に相当する）と上清とに別け，残渣は適当量の精製水で2度洗い，洗液を上清と合体した。この溶解物を減圧下にロータリーエバポレーターで約3mlに濃縮し，これをセファデックスG-50 (bead form, coarse, Pharmacia) のカラム（1.9×95cm）とG-25 (bead form, coarse) カラム（2.5×95cm）とをポリエチレン細管で連結したもののG-50側に添加し，精製水を40ml/時間の割合で流してゲル濾過を行った。溶出液を1管10mlずつのフラクションとして分取し，各管について総ヘキソサミン，ラムノース，総アミノ基および遊離アミノ酸量を測定した（図4）。その結果2つの画分の分離が認めれら，その1つはブルーデキストラン2000 (Pharmacia) の溶出によって予め定めた連結カラムの *Vo* 直後に溶出され，この画分（高分子量画分）には添した細胞壁溶解物にふくまれるヘキソサミンとラムノースとの実際上全部が含有されているが，総アミノ基は22%のみがこの画分に存在すること，一方第2の画分，すなわち低分子量画分にはアミノ基の大部分が溶出され，この部分にはヘキソサミンおよびラムノースは全く検出されないことが明かとなった。ちなみにNaClが溶出される位置である *Vi* 近くに遊離アミノ基の測定の際検出される第3のピークの存在が認められたが，これはL-11酵素による細胞壁消化のさいに防腐剤として加えたアジ化ナトリウムによるものであった。

考　察

A群連鎖球菌細胞壁に溶解活性を示す酵素としては次のものがこれまでに報告されている。すなわち1957年 MAXTED[22] と KRAUSE[23] とはそれぞれ独立に，C群連鎖球菌にファージを感染させたさいにC群のみならずA群およびE群連鎖球菌の細胞壁に作用する溶解（酵）素（group C streptococcal phage-associated lysin）が誘発産生されることを発見した。その後同様な phage-associated lysin がエンド-N-アセチルグルコサミニダーゼ活性によって細胞壁溶解作用を示すことが，精製した lysin 標品を用いて BARKULIS ら (1964)[24] によって明かにされた。一方少くともみかけ上はファージの関与を待つことなく産生されるA群連鎖球菌溶解酵素としては *Streptomyces albus* のある株によって作られる酵素についての報告がみられる。この酵素は1952年 MCCARTY[25][26] によって発見されたが，その後 MUÑOZ ら (1966)[27] および PETIT ら (1966)[28] は MCCARTY の発見したものとは菌株は異なるようであるが，同じく *Streptomyces albus* G が産生する酵素を用いて研究を行い，F_1-エンド-N-アセチルムラミダーゼおよびSA-エンドペプチダーゼがA群連鎖球菌の細胞壁に溶解活性を発揮することを明かにした。

さて本研究に使用した *Flavobacterium* sp, L-11菌が産生する酵素は，最初0.1% Bacto-カザミノ酸培地に静置培養したL-11菌の培養上清から塩析，ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによって部分精製されたが（KOTANI ら，1959[2]：KATO ら，1962[3]），この酵素標品は *S. aureus* および *Micrococcus lysodeikticus* の細胞壁を溶解するが，A群連鎖球菌，089株の細胞壁に

は溶解活性を示さなかった（KATO ら，1962[3]）。しかし L-11菌はA群連鎖球菌細胞壁を唯一の栄養源とする寒天平板上に培養すると，生じた集落の周囲に細胞壁の溶解に基ずく明瞭な透明帯を生じることが，L-11菌が土壌標品から分離された当時に確認されていた（KOTANI ら，1959[6]）。

A群連鎖球菌細胞壁を溶解する L-11酵素は，この細胞壁が存在する場合にのみ誘導的に産生されるのではないかと考えられたこともあったが，溶解酵素を産生させるための L-11菌の培養条件について種々検討が加えられた結果，L-11菌をグルコース加ブロースに通気培養した培養上清から塩析によって得た粗酵素標品の少くとも一部のロットにはA群連鎖球菌の細胞壁に対しても明確な溶解作用を示すことが明かになった。もっともこのような酵素標品についてみても，A群連鎖球菌に対する溶解活性は *S. aureus* の細胞壁に対するそれと比較するとかなり弱い（今回の実験に用いた酵素標品の両者に対する溶解単位の比は約1：50であった）。

L-11酵素のA群連鎖球菌細胞壁の溶解機序を論ずるまえに，この研究で供試した細胞壁標品の化学的性状について述べておきたい。この細胞壁は二塩基性アミノ酸としてリジンをふくむ，いわゆるリジン型のペプチドグリカンを基礎構造としているが，他の菌種のペプチドグリカンに比べて L-アラニン含量が高いことが従来の研究によって明かにされている（HAYASHI と BARKULIS, 1959[29]：TEPPER ら，1960[30]：KRAUSE と MCCARTY, 1961[31]：HEYMANN ら，1961[32]：MICHEL と GOODER, 1962[33]：JAMES ら，1965[34]：MUÑOZ ら，1966[35]）。末端アミノ酸の分析の結果，すなわちリジン残基の ε-アミノ基の約90%がDNP化されず，また D-アラニン残基のうち C-末端に位置するのは約20%にすぎないという事実は，他のグラム陽性菌のリジン型の細胞壁ペプチドグリカンの構造より類推して，また *Streptomyces albus* G 酵素を用いた MUÑOZ ら[35]の研究結果に基いて，L-アラニン→D-グルタミン酸→L-リジン→D-アラニンよりなると考えられるこの細胞壁のペプチドサブユニットの大部分がそのリジン残基の ε-アミノ基を介して隣り合うペプチドサブユニットのC-末端アラニンのカルボキシル基との間になんらかの架橋が形成されていることを示唆している。一方 MUNOZ ら[35]が推定しているように相隣るペプチドサブユニット間にジ-L-アラニンあるいはトリ-L-アラニンの架橋が存在するとすれば，C-末端 D-アラニン残基（0.18モル）と ε-アミノ基が遊離しているリジン残基（グルタミン酸残基1.0モルあたり0.12モル）との差（0.06モル）はN-末端 L-アラニンであるはずである。実際には0.24モルのN-末端 L-アラニンが存在するので，過剰のN-末端 L-アラニン（0.18モル）は，供試菌の培養中，あるいは細胞壁標品の調製中にムラミン酸との結合が切断されたペプチドサブユニットのN-末端部分の L-アラニンであると考えられる。

なおムラミン酸の分析値がグルタミン酸残基1モルあたり0.5モルと異常に低いが，これは MUÑOZ ら（1967）[36]によって報告されているように，ムラミン酸のかなりの部分（MUÑOZ ら[36]の細胞壁では50mμequiv/mg 細胞壁）が N-アセチルムラミン酸-6-リン酸となっているためかもしれない。ちなみに ROGERS と PERKINS（1968）[37]はリン酸化されたアミノ糖残基は加水分解のさい収率よくアミノ糖としてえられないと記載している。しかし HEYMANN ら[32]は，14型のA群連鎖球菌の細胞壁はグルタミン酸残基1モルあたり1モルのムラミン酸を含むと報告しているので，供試細胞壁のムラミン酸含量については，種々の加水分解の条件をえらんで今後検討を重ねることを要する。なお供試細胞壁にはグルタミン酸残基1.0モルあたり約1.6モルのグルコサミンが存在するが，1モルをこえる部分のグルコサミンはラムノースとともにA群連鎖球菌の群特異C多糖体の構成に与っていると考えられる。ちなみにA群連鎖球菌細胞壁に，C多糖体以外の特殊構造として5～6モルの D-グルコース，1モルのグルコサミンおよび4～5モルのヘキソサミン（いずれも1モルのグリコペプチドあたり）よりなるポリマーであるG多糖体なるものの存在が MUÑOZ ら（1967）[36]によ

り14型菌の細胞壁について報告されている。しかし彼らが14型菌細胞壁の本質的な構成成分であり，1mg当り250mμmoleも含有されていると記載しているグルコースは，本研究に供試した12型菌，S.F. 42株の細胞壁標品には全く検出されなかった。ROBERTS と STEWART (1961)[38]の研究によれば，彼らが調べた5株のA群連鎖球菌中グルコースを含むものはわずか1株であり，また SLADE と SLAMP(1962)[39]の研究によってもグルコースを含むものは9株中2株にすぎず，かつグルコースを含む株であってもその含量は少量であった。従って MUÑOZ ら[36]の使用した14型菌の細胞壁がかなり大量のグルコースを有しているのは，A群連鎖球菌にあってはむしろ例外に属するものというべきであろう。

さて供試A群連鎖球菌の細胞壁に対するL-11酵素の作用機序については，酵素作用に伴って遊離する末端基を解析することによって，実験結果の項でも考察したように，供試細胞壁の可溶化はその基礎構造であるペプチドグリカンのペプチドサブユニット間の架橋部分のD-アラニン→L-アラニン結合の開裂およびグリカン部分とペプチド部分とを結ぶムラミン酸→L-アラニン結合の加水分解によるペプチドグリカンの解体に基くことが示された。またD-アラニン→L-アラニン結合の酵素による加水分解の程度はC-末端D-アラニンの遊離を指標としてみると，グルタミン酸残基1.0モルあたり最大約0.50モルに止り，またムラミン酸→L-アラニン結合の水解に基くと考えられるN-末端L-アラニンの遊離は約0.24モルにすぎない。したがって酵素作用前からペプチドサブユニットのそれぞれC-末端およびN-末端アミノ酸として存在するD-アラニン（0.18モル）およびL-アラニン(0.18モル)を考慮に入れても，L-11酵素の水解作用完了時にグルタミン酸残基1モルあたりD-アラニン→L-アラニン結合の約0.32モル，ムラミン酸→L-アラニン結合の約0.58モルは開裂されないままに残されていることになる。これらの結合がなぜL-11酵素のそれぞれエンドペプチダーゼおよびアミダーゼの作用をこうむらない（あるいはこうむりにくい）のかについてはさまざまな可能性は考えられるが，今後の検討を要する問題といわねばならない。

D-アラニン→L-アラニン結合とN-アセチルムラミン酸→L-アラニン結合のどちらの水解がL-11酵素による供試細胞壁の可溶化により大きな役割を果たしているかについては，後者の水解がほぼ完了した時点(反応10時間後)におけるO.D.減少は約50%にすぎず，以後前者の水解の進行に伴ってさらに30%近くのO.D.減少がみられることから，供試細胞壁のペプチドグリカンの低分子量化にはD-アラニン→L-アラニンの結合の開裂の関与がより大きいと考えられる。なお単体のL-アラニンの放出(グルタミン酸残基1.0モルにつき0.24モル)によってその存在が推測されるL-11酵素の(アラニン)アミノペプチダーゼ活性はペプチドグリカンの可溶化には一次的な役割を示さず，供試細胞壁にはじめから存在し，あるいはL-11酵素のアミダーゼおよびエンドペプチダーゼ作用によって生じたN-末端L-アラニンと次のアミノ酸とのペプチド結合をいわば2次的に切断するのではないかと考えられる。

結　論

1)　本研究に供試したA群連鎖球菌，12型(S.F. 42株)の細胞壁はグルタミン酸残基(500mμmole/mg)1.0モルあたり2.4モルのL-アラニン，1.0モルのD-アラニン，1.1モルのリジン，1.6モルのグルコサミン，(0.5)モルのムラミン酸，2.9モルのラムノース，0.2モルの総リンおよび1.0モルの結合アンモニアを主な構成分とすることが示された。グルコースは全く検出されなかった。

2)　この菌の細胞壁の浮遊液に *Flavobacterium* sp. が産生するL-11酵素を作用させると最大80%に達する濁度の減少がみられ，このさいグルタミン酸残基1.0モルあたり0.71モルのN-末端L-アラニン，0.50モルのC-末端D-アラニンおよび0.16モルの単体L-アラニンが遊離した。

3)　L-11酵素により溶解した細胞壁の可溶性部分(重量として供試細胞壁の約80%にあたる)をセ

ファデックス G-50および G-25の連結カラムを用いてゲル濾過することにより，可溶性の溶解産物のヘキソサミンとラムノースのすべてと，少量のペプチドとを含む高分子量画分と，ペプチドないしアミノ酸のみからなる低分子量画分との2画分が分離された。

4) 上記の結果から，L-11酵素によるA群連鎖球菌，12型(S.F. 42株)細胞壁の溶解は基礎構造であるペプチドグリカンを構成しているペプチドサブユニットの D-アラニン→L-アラニン結合ならびにペプチド部分とグリカン部分とを結ぶムラミン酸→L-アラニン結合がそれぞれエンドペプチダーゼおよびアミダーゼ作用によって開裂されることに基くものと推論される。

本論文の一部は昭和43年9月の第21回日本細菌学会関西支部総会(於大阪)および昭和43年10月の第41回日本生化学会大会(於東京)において発表した。

稿を終るにあたり，懇篤なる指導ならびに校閲の労をとられた小谷尚三教授に深謝する。

なお実験にさいし多大の教示と便宜を与えられた加藤慶二郎助教授，杉中秀寿博士，またいろいろと援助をいただいた教室のみなさんに感謝する。なおガスクロマトグラフィーの実施にあたっては松田哲郎博士の全面的なバックアップをえた。記して謝意を表する。

文　献

1) 小谷尚三，浜田茂幸：リウマチ性心臓病の成立機転．細菌学および免疫学の立場から．日本臨床，28：1717-1736，1970.

2) KOTANI, S., HIRANO, T., KITAURA, T., KATO, K. and MATSUBARA, T.: Studies on the isolation of bacteria capable of lysing the cell walls of various lysozyme-resistant, pathogenic bacteria. *Biken J.*, **2**: 143-150, 1959.

3) KATO,, K., KOTANI, S., MATSUBARA, T., KOGAMI, J., HASHIMOTO, S., CHIMORI, M. and KAZEKAWA, I.: Lysis of *Staphylococcuus aureus* cell walls by a lytic enzyme purified from culture supernatants of *Flavobacterium* species. *Biken J.*, **5**: 155-179, 1962.

4) GRIFFITH, M. B.: The serological classification of *Streptococcus pyogenes*. *J. Hyg.*, **34**: 542-584, 1934.

5) BLEIWEIS, A. S., KARAKAWA, W. W. and KRAUSE, R. M.: Improved technique for the preparation of streptococcal cell walls. *J. Bacteriol.*, **88**: 1198-1200, 1964.

6) GHUYSEN, J.-M., TIPPER, D. J. and STROMINGER, J. L.: *Methods in Enzomology* (edited by Neufeld and Ginsburg.), Vol. VIII. pp. 685-699, Academic Press, New York, 1966.

7) ROSEMAN, S. and DAFFNER, I.: Colorimetric method for determination of glucosamine and galactosamine. *Analyt. Chem.*, **28**: 1743-1746, 1956.

8) PRIMOSIGH, J., PELZER, H., MAASS, D. and WEIDEL, W.: Chemical characterization of mucopeptides released from the *E. coli* B cell wall by enzymatic action. *Biochim. Biophys. Acta*, **46**: 68-80, 1961.

9) SWEELEY, C. C., BENTLEY, R., MAKITA, M. and WELLS, W. W.: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**: 2497-2507, 1963.

10) PARK, J. T. and JOHNSON, M. J.: A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **181**: 149-151, 1949.

11) DISCHE, Z. and SHETTLES, L. B.: A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.*, **176**: 595-603, 1948.

12) LOWRY, O. H., ROBERTS, N. R., LEINER K. Y., WU, M.-L. and FARR, L.: The quantivative histochemistry of brain. I. Chemical methods. *J. Biol. Chem.*, **207**: 1-16, 1954.

13) FAWCETT, J. K. and SCOTT, J. E.: A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Invest.*, **13**: 156-159, 1960.

14) 加藤慶二郎，小谷尚三：細菌細胞壁の化学構造研究法(3)～(11)．蛋白質核酸酵素，**14**：920-925, 1011-1016, 1095-1099, 1176-1185, 1969. **15**：59-66, 716-729, 795-809, 882-887, 978-988, 1970.

15) MASSEY, V., PALMER, G. and BENNET, R.: The purification and some properties of D-amino acid oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **48**: 1-9, 1961.

16) KATO, K. and STROMINGER, J. L.: Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus* IX. Mechanism of hydrolysis by the L-11 enzyme. *Biochemistry*, **7**: 2754-2761, 1968.

17) KATO, K., HIRATA, T., MURAYAMA, Y., SUGINAKA, H. and KOTANI, S.: Studies on the mode of action of *Flavobacterium* L-11 enzyme on the cell walls of *Staphylococcus*

aureus strain Copenhagen. Identification of isolated cell wall peptides. *Biken J.*, **11** : 1-12, 1968.

18) MATSUDA, T., KOTANI, S. and KATO, K. : Structure of the cell walls of *Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014. 2. Cross linkage between D-alanine and α,α'-diaminopimeric acid in the cell wall peptidoglycans studied with an L-11 enzyme from *Flavobacterium* sp. *Biken* J., **11** : 127-138, 1968.

19) KOTANI, S., YANAGIDA, I., KATO, T., MURAYAMA, Y. and KITAURA, Y. : Fractionation of BCG cells into subcellular and structural units. 昭和43年度日米医学協力計画 結 核 専門部会合同会議要旨, pp. 126-150, 1968.

20) 柳田勇夫 : *Mycobacterium tuberculosis*, $H_{37}Rv$ 株細胞壁の化学構造と免疫学的性状に関する研究, 阪大歯誌, 印刷中.

21) YANAGIDA,, I. et al.: 未発表.

22) MAXTED, W. R. : The active agent in nascent phage lysis of streptococci. *J. Gen. Microbiol.*, **16** : 584-595, 1957.

23) KRAUSE, R. M. : Studies on bacteriophages of hemolytic streptococci. I. Factors influencing the interaction of phage and susceptible host cell. *J. Exp. Med.*, **106** : 365-385, 1957.

24) BARKULIS, S. S., SMITH, C., BOLTRALIK, J. J. and HEYMANN, H. : Structure of streptococcal cell walls. IV. Purification and properties of streptococcal phage muralysin. *J. Biol. Chem.*, **239** : 4027-4033, 1964.

25) MCCARTY, M. : The lysis of group A hemolytic streptococci by extracellular enzyme of *Streptomyces albus*. 1. Production and fractionation of the lytic enzymes. *J. Exp. Med.*, **96** : 555-568, 1952.

26) MCCARTY, M. : The lysis of group A hemolytic streptococci by extracellular enzymes of *Streptomyces albus*. II. Nature of the cellular substrate attacked by the lytic enzymes. *J. Exp. Med.*, **96** : 569-580, 1952.

27) MUÑOZ, E., GHUYSEN, J.-M., LEYH-BOUILLE, M., PETIT, J.-F. and TINELLI, R. : Structural variations in bacterial cell wall peptidoglycans studied with *Streptomyces* F_1 endo-N-acetylmuramidase. *Biochemistry*, **5** : 3091-3098, 1966.

28) PETIT, J.-F., MUÑOZ, E. and GHUYSEN, J.-M. : Peptide cross-links in bacterial cell wall peptidoglycans studied with specific endopeptidases from *Streptomyces albus* G. *Biochemistry*, **5** : 2764-2776, 1966.

29) HAYASHI, J. A. and BARKULIS, S. S.:Studies of streptococcal cell walls. III. The amino acids of the trypsin-treated cell wall. *J. Bacteriol.*, **77** : 177-184, 1959.

30) TEPPER, B. S., HAYASHI, J. A. and BARKULIS, S. S. : Studies of streptococcal cell walls. V. Amino acid composition of cell walls of virulent and avirulent group A hemolytic streptococci. *J. Bacteriol.*, **79** : 33-38, 1960.

31) KRAUSE,, R. M. and MCCARTY, M. : Studies on the chemical structure of the streptococcal cell wall. I. The identification of a mucopeptide in the cell walls of group A and A-variant streptococci. *J. Exp. Med.*, **114** : 127-141, 1961.

32) HEYMANN, H., ZELEZNICK, L. D. and MANNIELLO, J. A. : On the mucopeptide fraction of streptococcal cell walls. *J. Amer. Chem. Soc.*, **83** : 4859-4860, 1961.

33) MICHEL, M. F. and GOODER, H. : Amino acids, amino sugars and sugars present in the cell wall of some strains of *Streptococcus pyogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, **29** : 199-205, 1962.

34) JAMES, A. M., HILL, M. J. and MAXTED, W. R. : A comparative study of the bacterial cell wall, protoplast membrane and L-form envelope of *Streptococcus pyogenes*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **31** : 423-432, 1965.

35) MUÑOZ, E., GHUYSEN, J.-M., LEY-BOUILLE, M., PETIT, J. F., HEYMANN, H., BRICAS, E. and LEFRANCIER, P. : The peptide subunit N^{α}-(L-alanyl-D-isoglutaminyl)-L-lysyl-D-alanine in cell wall peptidoglycans of *Staphylococcus aureus* strain Copenhagen, *Micrococcus roseus* R 27, and *Streptococcus pyogenes* group A, type 14. *Biochemistry*, **5** : 3748-3764, 1966.

36) MUÑOZ, E., GHUYSEN, J.-M. and HEYMANN, H. : Cell walls of *Streptococcus pyogenes*, type 14. C polysaccharide-peptidoglycan and G polysaccharide-peptidoglycan complexes. *Biochemistry*, **6** : 3659-3670, 1967.

37) ROGERS, H. J. and PERKINS, H. R.: *Cell walls and membranes*, E. and F. N. Span Ltd., London, 1968.

38) ROBERTS, W. S. L. and STEWART, F. S. : The sugar composition of streptococcal cell walls and its relation to haemagglutination pattern. *J. Gen. Microbiol.*, **24** : 253-260, 1961.

39) SLADE, H. D. and SLAMP, W. C. : Cell-well composition and the grouping antigens of streptococci. *J. Bacteriol.*, **84** : 345-351, 1962.