



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

A 群連鎖球菌細胞壁に関する研究

2. L-11 酵素による溶解産物の低分子量画分より分離した ペプチドサブユニットの化学構造について

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8月4日]

序 言

著者は前報¹⁾においてA群連鎖球菌、12型(S. F. 42株)の細胞壁が *Flavobacterium* L-11酵素のある標品の作用によって可溶化されることを認め、かつ酵素の作用によって遊離するN-末端およびC-末端アミノ酸を同定・定量した結果に基いて、細胞壁の可溶化はペプチドグリカンを構築しているD-アラニン→L-アラニン結合およびペプチド部分とグリカン部分とを結ぶムラミン酸→L-アラニン結合が開裂されることによることを推論した。この推定の妥当なことは、細胞壁溶解産物をゲル口過すると、1) 可溶化した細胞壁(約80%)のヘキソサミンおよびラムノースのすべてと少量のペプチドを含む高分子量画分、2) ヘキソサミンを含まずペプチドないしアミノ酸のみから構成される低分子量画分とに分別されることを示すことによっても裏付けられた。

本報においては、低分子量画分をイオン交換クロマトグラフィーにかけ、細胞壁ペプチドグリカンのペプチド部分の構築単位と考えられる数種のペプチドを単離してその化学構造を決定し、S.F. 42株細胞壁ペプチドグリカンのペプチド部分の基本構造を明かにしようとして行った研究の結果に

ついて述べる。

材料と方法

1) 出発材料として用いた細胞壁溶解産物の低分子量画分

前報¹⁾で述べたA群連鎖球菌、12型(S.F. 42株)の細胞壁のL-11酵素による溶解産物をセファデックス G-50およびG-25の連結カラムによってゲル口過し、溶出量370mlから520mlに相当する部分(前報¹⁾の図4参照)を集め、ロータリーエバポレーターを用いて2.7mlに減圧濃縮したもの。

2) 構成、N-末端およびC-末端アミノ酸ならびにアラニンの光学異性体の同定と定量

前報¹⁾に記載した。

3) Edman 分解

適量の被験ペプチド(約100~150mμmoles)を減圧乾燥し、これに40μlのエチルモルフォリン緩衝液(pH 8.6, KONIGSBERGとHILL²⁾の記載による)を加えて溶解し、さらに1μlのフェニルイソチオシアネート(PTC)を添加して37°C, 2.5時間作用させた。ついで40μlの精製水を加え、150μlずつのエチルエーテルで3回抽出して過剰の試薬を除いた。このようにしてえられたフェニルチオカルバミルペプチドを含む水層を減圧乾燥

Studies on the cell walls of group A *Streptococcus pyogenes*. 2. Chemical structure of the peptides isolated from a low molecular weight fraction of the L-11 enzyme digest of the cell walls

By S. HAMADA (Department of Microbiology, Osaka University Dental School, Joan-cho, Kita-ku, Osaka)

* 大阪市北区常安町 32 (〒 530)

Jap. J. Oral Biol. 12 : 213-222, 1970.

し、これを4N HCl, 80 μ lに溶解して室温に6時間放置し、生じたN-末端アミノ酸の3-フェニル-2-チオヒダントインを150 μ lの醋酸エチルで3回抽出して除いた。水層部分を減圧乾燥し、適当量の精製水に溶解したものを構成およびN-末端アミノ酸の同定・定量に供した。Edman分解の必要回数に応じて、必要数の検体を上述のように分解し、醋酸エチル処理後の水層を次のEdman分解の出発材料とした。なお表2に0回処理と記載してあるのは、上記の系よりフェニルイソチオシアネートを抜いたもので1回操作したものである。

4) その他

イオン交換クロマトグラフィー、口紙電気泳動の実施法については結果の項で記載する。

結果

1) 細胞壁溶解産物の低分子量画分のAmberlite CG-120カラムによるクロマトグラフィー

2.7mlに濃縮した供試画分に0.3mlの20%ギ酸を加えて酸性とし、あらかじめ0.2Mピリジン-醋酸緩衝液(pH 3.1)で平衡化したAmberlite CG-120(Rohm and Haas, Pennsylvania, Pa., USA)のカラム(0.9×35cm)にかけ、まず上記緩衝液の500mlで溶出し、ついで250mlの0.2Mピリジン-醋酸緩衝液(pH 3.1)と2.0Mピリジン-醋酸緩衝液(pH 5.0)とのlinear gradientで溶出を行った。このさいカラムの外套管にLauda超恒温槽循環装置(Messgeräte-Werk Lauda, Germany)を用いて恒温水を環流し、カラムの温度を50°Cに保ち、また溶媒を定流量ポンプ(柳本製作所、京都)で加圧送液し、溶出速度が10ml/管/12分となるようにした。分取した溶出液の各管について総アミノ基、遊離アミノ基、総ヘキソサミン量を定量した結果が図1-1に示されている。すなわちジニトロフルオロベンゼン(DNFB)と反応するが、ヘキソサミンを全く含有しないAからIまでの9つのピークの分離が認められた。しかし画分Dは400mlの溶出が始った時点で定流量ポンプの故障によって3日間溶出が停止し、送

液再開後溶出した画分であり、溶出パターンが乱れている可能性が考えられた。そこで溶出液量400mlから550mlのフラクションを集め、減圧乾燥して溶出に用いたピリジン-醋酸緩衝液を蒸発除去したのち、2.7mlの蒸留水に溶解し0.3mlのギ酸を加え、第1回目と同一条件下で再クロマトグラフィーを行った。図1-2に示されているように、この操作によって2つのピークA'およびD'がえられた。ピークA'は図1-1のAと同じく、Amberlite CG-120に吸着されない通りぬけの画分であり、またピークD'は最初のクロマトグラフィーにおけるDの溶出位置よりややおくれて溶出された。

なお最初のクロマトグラフィーにおけるピークAは他のピーク画分とは異なり、4N HClによって100°C、8時間水解後DNP化したものが薄層クロマトグラフィー上でアミノ酸のスポットを与えないことが示されたので、以下述べる分析の対象から除外した。この画分はAmberlite CG-120の樹脂自体から溶出し、何らかの機序によりDNFBと反応する物質ではないかと考えられる³⁾。

2) イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーによって分離したピーク画分の口紙電気泳動

上述のようにして分離したピーク画分(B→I、およびA' と D')、たとえばピークBについていえば溶出液量70mlから100mlまでを集めたもの)のそれぞれに含まれているペプチドないしアミノ酸の単一性および荷電を調べる目的で、各画分の適当量を東洋口紙No.514上にスポットし、pH 5.0の0.1Mピリジン-醋酸緩衝液およびpH 1.6のギ酸-醋酸-水(5:15:80, v/v)を媒体として電気泳動を実施した。

図2に示されているように、いずれの画分も電気泳動的に単一ではなく、少なくともどちらかのpHで2つあるいはそれ以上のニンヒドリンと反応するスポットを与えた。ちなみにこれらのスポットはpH 1.6での泳動ではすべて陰極側に検出され、pH 5.0でも陰極側に認められるものが多く、一部が原点付近で発色した。

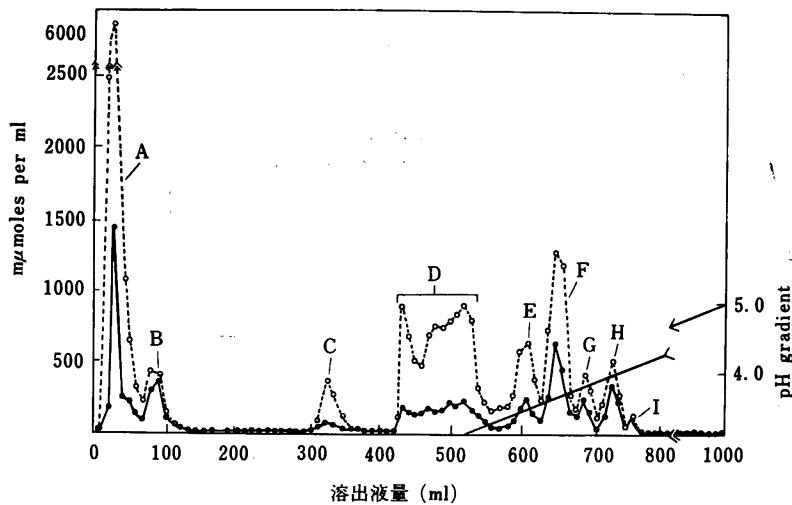


図 1-1 L-11 酵素により可溶化した A 群連鎖球菌, 12 型 (S.F. 42 株) 細胞壁のゲルロ過による低分子量画分を Amberlite CG-120 カラムによってクロマトグラフィーを行った成績

○-----○ 総アミノ基 ●——● 遊離アミノ基

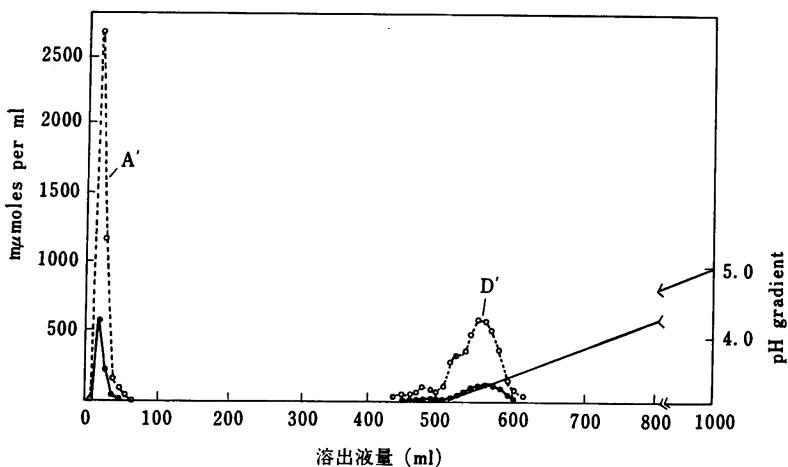


図 1-2 図 1-1 のピーケ D を Amberlite CG-120 の同じカラムで再クロマトグラフィーした成績

以上のような結果がえられたので、Amberlite CG-120カラムで分離したそれぞれの画分を濃縮したものと口紙電気泳動にかけ、分別・精製することを試みた。すなわち利用しうる量が少いため分離を断念した I を除く各画分を幅 20cm の東洋口紙 No. 514 上に帯状に塗布し、画分 B, C, A' および D' については pH 1.6 で、またピーケ E, F, G および H については pH 5.0 で 15v/cm, 3

時間電気泳動を行った。泳動終了後口紙の両端から切り取った幅約 5 mm のガイド・ストリップについてニンヒドリン反応陽性物質の移動位置を確かめた上、残りの口紙からニンヒドリン陽性物質を精製水で溶出し、適当な量に濃縮した。ついでこのようにして精製したニンヒドリン反応陽性物質の純度を再び口紙電気泳動によって、また DNP 化後 tert-アミルアルコール—クロロフォルム—メ

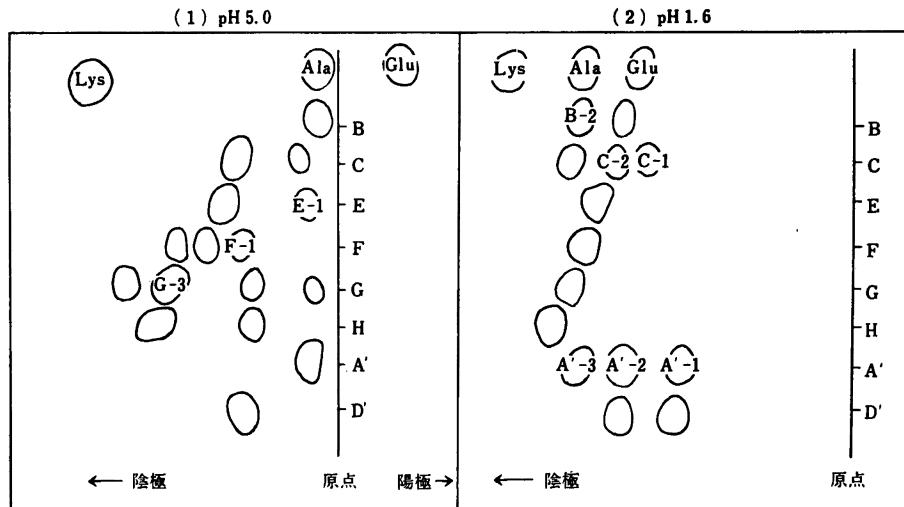


図2 Amberlite CG-120 カラムクロマトグラフィーにより分離した DNFB 反応性のピーク画分の口紙電気泳動図

E-1などの記号を付したニンヒドリン陽性のスポットに相当する移動度を示すペプチドないしアミノ酸について構造を推定するための分析を行った

緩衝液：(1) 0.2M ピリジン-醋酸, pH 5.0

(2) ギ酸-醋酸-水 (5:15:80), pH 1.6

泳動条件：15 v/cm, 3時間, 4°C

Glu: グルタミン酸, Lys: リジン, Ala: アラニン

チルアルコール-水-冰酢酸 (30:30:30:20:3, 容量比, 有機層) を溶媒とする薄層クロマトグラフィーによってチェックした。以上のようにして A'-1, A'-2, B-2, C-1, C-2, E-1, F-1, および G-3 の 9 種類のニンヒドリンと反応し pH 1.6 および 5.0 での電気泳動で单一のスポットを与える画分の分析必要量を分離した。これらの画分の電気泳動での移動度は図2のスポット中に記号を書き込むことによって示した。なお他のスポットに相当するニンヒドリン陽性物質については分析に必要な量を純化することが難かしいと判断されたので、分離精製を諦めた。

3) 単離したニンヒドリン反応陽性画分の化学分析およびその構造の推定

以上のようにして単離した 9 種類の DNFB およびニンヒドリン反応陽性画分について、そのアミノ酸組成、アンモニア含量および N-末端および C-末端アミノ酸の同定・定量を行い、また比較的利用しうる量の多い C-1, E-1, A'-1 および F-1 の 4 画分(ペプチド)については Edman 分解法に

より N-末端部分のアミノ酸配列を調べた。アミノ酸およびアンモニアの分析結果を表1に、Edman 分解による解析の結果を表2にまとめて示す。なお図3には、表1および表2の結果から推定される被検ペプチドの構造が示されている。

表1にみられるように、B-2および A'-3 を除く他のすべての画分はアラニン、グルタミン酸およびリジンよりなり、またグルタミン酸残基 1.0 モルあたりいずれも約 1 モルずつのリジンと D-アラニンを含んでいる点では差異はない。しかし L-アラニン含量は 1 ないし 3 モルとそれぞれの画分で異っている。なお B-2, A'-3 以外の画分にはグルタミン酸残基 1.0 モルあたり結合アンモニアが約 1 モルずつ存在するが、この事実はこれらのペプチドのグルタミン酸残基の 2 つのカルボキシル基のうちの 1 つは他のアミノ酸残基とのペプチド結合にはならず、アンモニアによって置換されカルボキシアミドとなっていることを示唆している。なおヘキソサミンはどの画分にも検出できなかった。以下個々の画分について記述する。

表 1 L-11 酵素による細胞壁溶解産物から単離したペプチドないしアミノ酸の分析結果とその収量

画 分	構成アミノ酸およびアンモニア					N-末端アミノ酸		C-末端アミノ酸		回収率*
	グルタ ミン酸	アラニン	(うち) D型	リジン	アンモ ニア	アラニン	E-アミノ リジン	アラニン	リジン	
C-1	1.0	4.0	(1.0)	1.0	1.0	1.4	—	0.5	—	1.2
C-2	1.0	4.0	(0.9)	0.9	1.0	1.5	—	0.9	—	0.3
A'-2	1.0	3.9	(1.0)	1.3	1.0	1.5	—	1.0	—	4.1
E-1	1.0	2.9	(0.9)	1.1	0.8	1.8	—	1.1	—	2.6
F-1	1.0	2.2	(1.1)	1.2	0.9	0.9	1.0	0.7	0.5	3.4
G-3	1.0	1.8	(1.0)	1.1	0.9	0.8	0.6	0.5	—	1.5
A'-1	1.0	3.8	(1.0)	1.2	1.0	1.6	—	1.0	—	2.7
B-2	—	+	(0)	—	—	—	—	—	—	1.0
A'-3	—	+	(0)	—	—	—	—	—	—	0.1
										合 計
										16.9

* 出発材料として用いた細胞壁に含まれるペプチドに対する回収率、総アミノ基量に基いて算出した。

表 2 供試ペプチドの Edman 分解法による分析結果

ペ プ チ ド	分 解 回 数	N-末端アミノ酸*			アミノ酸組成*		
		グルタ ミン酸	アラ ニン	E-アミ ノリジ ン	グルタ ミン酸	アラ ニン	リジン
C-1	0	—	29	—	20	76	22
	1	17	13	—	21	60	20
	2	—	tr.**	6.5	10	37	23
	3	—	tr.	—	6	32	18
E-1	0	—	46	—	25	68	22
	1	19	tr.	9.4	26	25	20
	2	—	tr.	—	6	14	13
	3	—	tr.	—	6	12	6
F-1	0	—	54	32	54	90	56
	1	24	30	12	28	31	26
A'-1	0	—	40	—	25	96	30
	1	19	tr.	15	26	62	23
	2	8	tr.	5	20	54	19
	3	4.5	tr.	—	12	42	17
	4	—	tr.	—	8	30	13

* 数値は μmole で表わした

** 微量が検出された

ペプチド C-1: このペプチドは 1.0 モルのグルタミン酸、4.0 モルのアラニン、1.0 モルのリジンおよび 1.0 モルの結合アンモニアよりなり、D-アミノ酸化酵素を使って定量したところ、アラニンの 1/4 は D 型であることが示された。またこ

のペプチドではリジン残基の E-アミノ基は DNP 化されず、すなわち他のアミノ酸残基との結合に関与していることがわかる。以上の分析結果はペプチド C-1 はテトラペプチド (L-アラニン→(r)-D-グルタミン (α -CONH₂)→L-リジン→D-アラニン) のダイマーで、一方のペプチドサブユニットの C-末端アラニン残基のカルボキシル基と、他方のペプチドサブユニットのリジン残基の E-アミノ基の間に L-アラニン→L-アラニンのジペプチドが架橋として存在していると考えると (図 3-1) 矛盾なく説明できる。すなわちこの推定構造に基くアミノ酸およびアンモニアの組成、N-末端および C-末端アミノ酸含量の計算値と実測値とがよく一致する。

図 3-1 に示した推定構造は Edman 分解法による分析によっても支持された*。すなわち表 2 に示されているように、第 1 回の PTC 処理により

* ただしこの C-1 ペプチドのみならず分析に供した他のペプチドについても供試しうる検体量が限定されていたため数値の精度には問題があり、したがって量的な点についてはあまり厳密には云々することができないことを付記しておかねばならない。またグルタミン酸のようなモノアミノジカルボン酸やリジンのようなジアミノモノカルボン酸を構成アミノ酸として含み、かつこれらのアミノ酸の部位で分岐する構造のペプチドの Edman 分解には、加藤と小谷⁴⁾が指摘するように、結果の解釈を複雑にし、かつ現在なお解明されていない問題点のあることを指摘しておかねばならない。

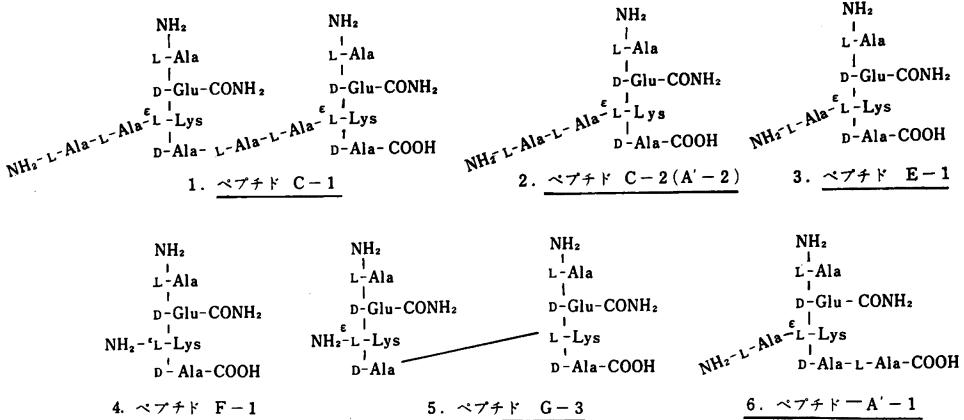


図3 A群連鎖球菌細胞壁の L-11 酵素による溶解産物から単離した 7種類のペプチドの推定化学構造

処理前に存在していた N-末端アラニンが減量し、かつ新しく N-末端グルタミン酸が出現する。したがって第1回の分解後にはグルタミン酸とアラニンの両者がN-末端アミノ酸として検出される。なおこの段階ではリジン残基の ϵ -アミノ基は遊離しない。ついで第2回目の PTC 処理によって N-末端グルタミン酸およびアラニンが消失し、かわって ϵ -アミノリジンが出現する。これらの結果はリジン残基の α -アミノ基はアラニン→グルタミン酸によって、一方 ϵ -アミノ基はアラニン→アラニンの側鎖によって置換されていることを推定させる。また第3回目の PTC 処理後においてもなおアラニン残基のかなりの量が残存していることは、これらがペプチド構造の内部に組み込まれていていることを示唆している。

なおペプチド C-1 の 300 m μ 当量を 0.6 単位の L-11 酵素でさらに 24 時間、37°C で処理を行ったが、N-末端および C-末端アミノ酸の増加は認められなかった。この所見は、このペプチドが L-11 酵素のエンドペプチダーゼ作用をたまたまぬがれて残存するテトラペプチドのダイマーではないことを示している。それならば何故このダイマーの架橋部の D-アラニン→L-アラニン結合が L-11 酵素の作用を受けないかが問題となるが、この点については後に考察する。

ペプチド C-2 および A'-2: これら 2 つのペプチドは Amberlite CG-120 カラムクロマトグラフ

イーにおいては別の位置に溶出されたが(図1)、電気泳動では同じ移動度を示し(図2)、また化学分析の結果も本質的には同一であった。さらにこれら両ペプチドはアミノ酸組成および N-末端アミノ酸の分析結果において前述のペプチド C-1 と区別できない。しかし C-末端アミノ酸については C-1 とは異なり、グルタミン酸残基 1.0 モルあたり C-1 では 0.5 モルのアラニンしか存在しないのに C-2 および A'-2 では約 1 モルのアラニンが検出された。これらの結果から図3-2 のようなペプチド構造を推定した。もっともこの構造が正しいとすると、N-末端アラニンは計算上グルタミン酸残基 1.0 モルあたり 2.0 モルでなければならないが、実測値は 1.5 モルであり、計算値より低い。このような違いに対する可能な説明の 1 つとして、リジンの ϵ -アミノ基に結合したアラニンペプチドの N-末端アラニンは何らかの理由で DNP 法による定量では過少に測定されるのではないかと考えられる。これと類似の現象が *Staphylococcus aureus*, Copenhagen 株の細胞壁を L-11 酵素で消化した産物より分離されたペプチドで、リジンの ϵ -アミノ基に結合したグリシンペプチドの N-末端グリシンの DNP 法による定量にさいしても経験されている(KATO ら⁵⁾, SUGINAKA ら⁶⁾)。

なお表1に示した分析結果のみからは L-アラニンの 1 モルのみがリジンの ϵ -アミノ基に結合され、他の 1 モルの L-アラニンがリジン残基に続く

D-アラニンにペプチド結合して C-末端に位置する構造も考えられる。しかもしもしそうとするならば、C-末端アラニンは L 型でなければならぬことになるが、酵素法による同定・定量の結果、C-2 および A'-2 ペプチドの C-末端アラニンは実際上すべてが D 型であることが示され、上述の可能性は否定された。なおリジン残基のカルボキシル基に L-アラニン→D-アラニンが結合している可能性は分析を行った限りでは除外されない。しかしこのような例は今まで知られておらず、また今回の実験で分離した他のペプチドにもこのような結合の存在を示す証拠が認められないので、最後に述べた可能性は除外しうると考えられる。

ペプチド E-1：このペプチドはグルタミン酸、アラニン、リジンおよびアンモニアを 1.0 : 2.9 : 1.1 : 0.8 のモル比で含有し、アラニン残基の 1/3 は D 型であった。また N-末端および C-末端アミノ酸としていずれもアラニンがグルタミン酸 1.0 モルあたりそれぞれ 1.8 および 1.1 モル存在すること、かつリジン残基の ϵ -アミノ基は置換されていて遊離していないことが示された。また Edman 分解(表 2)を行うと、1 回の PTC 処理によって処理前の N-末端アラニンが消失し、かわってグルタミン酸および ϵ -アミノリジンが新しい N-末端アミノ酸として出現した。

以上の分析結果から推定されるペプチド E-1 の最も妥当な構造が図 3-3 に示されている。

ペプチド F-1：このペプチドのアミノ酸組成はモル比にしてアラニン、2.2 (うち D 型アラニン 1.1)；グルタミン酸、1.0；リジン、1.2 およびアンモニア、0.9 であった。グルタミン酸残基 1.0 モルあたり約 1 モルのアラニンが N-末端をしめ、またリジン残基の ϵ -アミノ基がすべて遊離している。以上の分析結果、ならびに Edman 分解による解析の限りでは、このペプチドは図 3-4 に示すような構造であろうと推定される。しかしこのペプチドをヒドラジン分解して C-末端アミノ酸を分析したところ、図 3-4 の構造からはグルタミン酸残基 1.0 モルあたり 1.0 モルの C-末端アラニンが証明されるはずであるのに、実際には 0.7 モルの

アラニンしか検出されず、一方 0.5 モルの C-末端リジンの存在が認められた。したがって F-1 画分がアラニンを C-末端アミノ酸とする (テトラ) ペプチドと、C-末端リジンをもつ (トリ) ペプチドとの混合物である可能性も否定できない。しかしこの画分が 2 種類の pH での電気泳動でも、またその DNP 誘導体を薄層クロマトグラフィーで展開したさいにも単一のスポットを与えること、また構成アミノ酸としてのアラニンの定量値から考えて、C-末端リジンの出現はヒドラジン分解中の副反応によるものとするのが妥当ではないかと考えられる。この点についてヒドラジン分解による C-末端分析をくり返して検討を加えたが決定的な結論はえられなかった。

ペプチド G-3：このペプチドはアミノ酸組成に関してはペプチド F-1 と等しい。しかし ϵ -アミノ基をもったリジン残基の量に明かな差が認められ、すなわち ϵ -アミノリジンがペプチド F-1 ではグルタミン酸残基 1.0 モルに対して約 1 モルであるのに、G-3 ではグルタミン酸残基量の約半量にすぎない。したがってペプチド G-3 はペプチドサブユニットのダイマーではあるが、前述したペプチド C-1 と異なって、一方のテトラペプチドサブユニットの C-末端位のアラニン残基のカルボキシル基が他方のテトラペプチドサブユニットのリジン残基の ϵ -アミノ基と直接結合した図 3-4 に示すような構造を有するものと推定される。

ペプチド A'-1：表 1 から明かなように、このペプチドは量的にも質的にもペプチド C-2 および A'-2 と区別できないアミノ酸組成および末端アミノ酸の分析結果を示す。しかし Edman 分解における態度は明らかに異なっている。すなわち A'-1 では 1 回の PTC 処理で N-末端アラニンがほぼ完全に消去されて、グルタミン酸のアミノ基とリジンの ϵ -アミノ基とがかわって遊離する。このことからリジン残基の ϵ -アミノ基に結合するのは (単体) のアラニンで、C-2 および A'-2 のようにアラニン→アラニンのジペプチドではないことが示唆される。そこでペプチド A'-1 に対しては図 3-6 のような推定構造が与えられた。この推定構造を

確認するためには C-末端アラニンの光学異性体を同定・定量しなければならないが、試料の量が足りないためにこの点を確かめることができなかつた。

画分 B-2 および A'-3：これらはいずれも遊離の L-アラニンであった。

4) 構造を推定したペプチドの回収率

前報に記したように A 群連鎖球菌、12型(S.F. 42株)細胞壁の浮遊液は L-11 酵素を作用させると約 80% の OD 減少を示し、酵素処理終了後の細胞壁溶解産物を遠心すると酵素処理に用いた細胞壁重量の約 20% が不溶性残渣として回収された。したがって重量比においても供試細胞壁の約 80% が可溶化されることになる。つぎにセファデックスでゲルロ過したさい低分子量画分として回収される総アミノ基量は供試細胞壁のそれの 85% でありさらに Amberlite CG-120 カラムクロマトグラフィーによる総アミノ基の回収率は約 44% であった。カラムクロマトで得た 8 種類の画分を口紙電気泳動的に純化し、単一性を確かめた後構造分析に供したペプチドないしアミノ酸画分の供試細胞壁にふくまれるペプチドに対する回収率(総アミノ基量に基いて算出した)は表 1 に示すとおりであり合計約 17% (ペプチドのみでは 15.9%) であった。このように分析に供したペプチドの回収率が低いが、これは口紙電気泳動によってペプチドを分離・精製するさいにかなりの損失があったためであり、図 3 に示す構造のペプチドが実際に細胞壁ペプチドグリカンのペプチド部分に占める割合は上述の実測値を大幅に上まわるであろうと推測される。

考 察

以上、A 群連鎖球菌、12型 (S.F. 42 株) の細胞壁の L-11 酵素による溶解産物の低分子量画分(ヘキソサミンを含まず)、細胞壁を構成する総アミノ基の 58% が回収されるのをイオン交換クロマトグラフィーおよび電気泳動によって分画して単離した数種のペプチドの構造決定を行った研究結果について述べた。これらのペプチドのうち F-1, E-1,

A'-1, C-2 および A'-2 はペプチドサブユニットのモノマーとして、一方 C-1 と G-3 はペプチドサブユニットのダイマーとしてえられた。これらのペプチドはいずれも供試細胞壁の basal layer を形成している不溶性のペプチドグリカンが L-11 酵素中の D-アラニン → L-アラニンエンドペプチダーゼおよびムラミン酸 → L-アラニンアミダーゼの両活性によってペプチド部分とグリカン部分に分解し、かつ前者はさらにそのサブユニットに解体された結果可溶性となり分離されたものである。

D-アラニン → L-アラニンエンドペプチダーゼ作用を有する L-11 酵素を十分に作用させてえた細胞壁溶解産物から、2 つのテトラペプチド (L-アラニン → (D)-グルタミン酸 → (L)-リジン → D-アラニン) が一方のテトラペプチドの C-末端位の D-アラニン残基のカルボキシル基と他方のテトラペプチドのリジン残基の ε-アミノ基との間に L-アラニン → L-アラニン架橋を介して結合した C-1 のようなペプチドダイマーが単離されるという事実はどのように解釈すべきであろうか？L-11 酵素の作用が不完全であったのではないかという可能性は、分離したペプチド C-1 に十分量の L-11 酵素をさらに作用させてもモノマーへの分解がおこらなかったことから排除される。したがって供試 A 群連鎖球菌の細胞壁ペプチドグリカンには、L-アラニン → L-アラニンによる架橋形成部位において 2 通りの立体配置が存在し、その一方は L-11 酵素の D-アラニン → L-アラニンエンドペプチダーゼの作用を受けるが、他方はたとえば立体障害によってこのエンドペプチダーゼの作用をまぬがれるのではないかと考えられる。ちなみに KATO と STROMINGER⁷⁾ は L-11 酵素による *S. aureus*, Copenhagen 株の細胞壁の溶解にさいして、エンドペプチダーゼに対するペントグリシン架橋の感受性について同様な可能性を想定している。なお供試細胞壁に L-11 酵素を作用させたさい、C-末端アラニンの増加がグルタミン酸残基 1.0 モルあたり 0.5 モルに止り、1.0 モルに達しない事実¹⁾も上述の可能性が考慮されるべきことを示している。一方 C-2 および A'-2 のようなリジン残基の

ϵ -アミノ基に L-アラニン→L-アラニンが置換したペプチドがえられたが、これらのペプチドは一方のテトラペプチドサブユニットの C-末端位の D-アラニンと L-アラニン→L-アラニンとの結合が C-1ペプチドでは異なり L-11酵素のエンドペプチダーゼ作用に感受性を示すよう(立体配置の)ペプチド部分に由来したものと考えられる。なおペプチド E-1あるいは A'-1のようにリジン残基の ϵ -アミノ基にアラニンのジペプチドではなく、単体のアラニンが結合したペプチドサブユニットも分離された。これらのペプチドが生じる機序については、B-2および A'-3画分のように(単体の) L-アラニンが溶解産物から分離される事実をあわせて考えると、一つの可能性としてこれらのペプチドは L-11酵素標品中に存在するアラニンアミノペプチダーゼの作用によって C-2あるいは A'-2 のペプチドから二次的に生じたのではないかとも考えられる。一方ペプチド A'-1のように C-末端側が D-アラニン→L-アラニンと考えられるペプチドの成因については現在のところ明らかではない。

さて A 群連鎖球菌の細胞壁ペプチドグリカン以外にペプチドサブユニット内にアラニン→アラニン架橋が存在すると報告されている菌種としては *Lactobacillus coprophilus* が知られている(PLAPP と KANDLER⁸⁾)。しかしながら彼らの結論は、供試細胞壁を塩酸で限定水解した産物からおそらくはかなり低收率で分離されたジ-あるいはトリペプチドの分析結果にのみ基いていることを指摘しておかねばならない。また最近著者の属する研究室で、井上ら⁹⁾によって *Streptococcus mutans*, BHT 株の細胞壁ペプチドグリカンのペプチドサブユニットもアラニン→アラニンによって結合されていることを示唆する結果がえられている。

なお供試した A 群連鎖球菌の細胞壁ペプチドグリカンには 2 つのテトラペプチドサブユニットが一方の C-末端位の D-アラニン残基のカルボキシル基と他方のリジン残基の ϵ -アミノ基との間で直接結合し、ダイマーを形成している部分が存在する可能性がペプチド G-3 の分離によって示唆され

た。ちなみに KATZ と STROMINGER¹⁰⁾ は *Micrococcus lysodeikticus* の細胞壁を *Myxobacterium* 酵素で消化したものから相隣るペントペプチドサブユニットが D-アラニン→N ϵ -リジンによって直接結合しているダイマーの分離を報告している。しかしこの細胞壁ペプチドグリカンについては後に D-アラニン→N ϵ -リジンの結合に加えて、テトラペプチド自体が架橋となっている結合、すなわち D-アラニン→L-アラニンの結合も存在することが報告されている¹¹⁾¹²⁾。もっともペプチド G-3 については、これが自然の細胞壁にあるものではなくて、たとえば L-11酵素の消化の過程でトランスペプチデーションによって生じた副産物である可能性も現在のところ全く否定できない。なお前報¹⁾で述べたように L-11酵素による細胞壁の溶解のさい、水解に基くと考えられるリジン残基の ϵ -アミノ基の増加が認められなかつたが、このことはこの酵素がアラニン→N ϵ -リジン間の結合には作用しないことを示している。したがって F-1 や G-3 のように、リジン残基の ϵ -アミノ

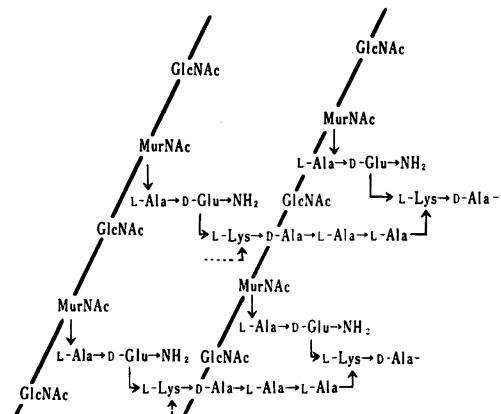


図 4 A 群連鎖球菌、12型菌(S.F. 42株)細胞壁ペプチドグリカンの推定化学構造
MurNAc : N-アセチルムラミン酸
GlcNAc : N-アセチルグルコサミン
Ala : アラニン, Glu : グルタミン酸,
Lys : リジン

基のすべて、あるいは半ばが遊離の状態にあるペプチドは細胞壁ペプチドグリカンの ϵ -アミノ基がもともと置換されていないペプチド部分から由来

したものではないかと考えられる。

最後に上記の結果から推定されるA群連鎖球菌、12型(S.F. 42株)の細胞壁ペプチドグリカンの可能な化学構造を図4に示しておく。

結論

A群連鎖球菌、12型(S.F. 42株)の細胞壁の*Flavobacterium L-11*酵素による溶解産物をゲル通過してえた低分子量画分からAmberlite CG-120カラムクロマトグラフィー、口紙電気泳動法によって7種類のペプチドを純粋な状態で単離した。これらのペプチドについてアミノ酸組成、N末端およびC末端アミノ酸を同定・定量し、かつEdman分解によってN末端部分の構造を解析し、これらの分析結果に基いてペプチドの化学構造を推定した。その結果供試細胞壁のペプチドグリカンのペプチド部分はL-アラニン→D-(iso)グルタミン→L-リジン→D-アラニンのテトラペプチドを基本的な構築単位とし、かつ相隣るテトラペプチドユニットの一方のC末端位のD-アラニン残基のカルボキシル基と他方のリジン残基のE-アミノ基との間にL-アラニン→L-アラニンを介する架橋が存在し、強固な網目構造が作られていることが推定された。なお供試菌のペプチドグリカンには2つのテトラペプチドがD-アラニン→N^ε-リジンによって直接結合した部分も存在することを示唆する結果がえられた。

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意なる指導と校閲の労をとられた小谷尚三教授に深謝する。

また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、および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。

文献

- 1) 浜田茂幸: 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。歯基礎誌, 12: 142-152, 1970.
- 2) KONIGSBERG, W. and HILL, R. J.: The st-

ructure of human hemoglobin. III. The sequence of amino acids in the tryptic peptides of the chain. *J. Biol. Chem.*, 237: 2547-2561, 1962.

- 3) 千谷見一、矢追義人: ペプチドの分画法。蛋白質核酸酵素(生物化学実験法IV), 10: 250-310, 1965.
- 4) 加藤慶二郎、小谷尚三: 細胞細胞壁の化学構造研究法(9)—細胞壁ペプチドグリカンの分子構造の決定—。蛋白質核酸酵素, 15: 795-809, 1970.
- 5) 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.
- 6) SUGINAKA, H., KOTANI, S., KASHIBA, S. and AMANO, T.: Action of a staphylolytic enzyme (ALE) of a strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Biken J.*, 11: 13-24, 1968.
- 7) 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.
- 8) PLAPP, R. und KANDLER, O.: Die Aminosäuresequenz des Mureins von *Lactobacillus coprophilus*. *Arch. Mikrobiol.*, 58: 305-312, 1967.
- 9) 井上昌一、松村敏治、森岡俊夫、浜田茂幸、小谷尚三、加藤慶二郎: Cariogenic streptococcusの細胞壁に関する研究。歯基礎誌, 10: 24, 1968.
- 10) KATZ, W. and STROMINGER, J. L.: Structure of the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* II. Study of the structure of the peptides produced after lysis with the *Myxobacterium* enzyme. *Biochemistry*, 6: 930-937, 1967.
- 11) SCHLEIFER, K. H. and KANDLER, O.: *Micrococcus lysodeikticus*: A new type of cross-linkage of the murein. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 28: 965-972, 1967.
- 12) GHUYSEN, J.-M., BRICAS, E., LACHE, M. and LEYH-BOUILLE, M.: Structure of the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus*. III. Isolation of a new peptide dimer, N^α-(L-alanyl-γ-(α-D-glutamyl-glycine)]-L-lysyl-D-alanyl-N^α-(L-alanyl-γ-(α-D-glutamyl-glycine)]-L-lysyl-D-alanine. *Biochemistry*, 7: 1450-1460, 1968.