“DAP 型”の細菌細胞壁ペプチドグリカンを解体する *Streptomyces* L-3 酵素の精製に関する研究

1. 構造既知の可溶性基質の調製および D-アラニル→ *meso*-DAP-エンドペプチダーゼの分離

片 山 剛**

大阪大学歯学部 口腔細菌学教室* (主任 小谷尚三教授)

[受付: 昭和48年3月14日]

抄録: *Streptomyces* sp. L-3 菌が生成する粗 “L-3 酵素” 液を, DEAE-セルロース, CM-セルロースカラムによるクロマトグラフィー, および電気泳動的等電点分画法によって分画した。

分離された各フラクションの酵素活性, 作用点を *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) 細胞壁, この細胞壁の *Chalaropsis* 酵素あるいは/および *Flavobacterium* L-11酵素による消化産物から分離したグリコペプチド, ペプチドサブユニット, ならびにカゼインを基質として検定し, つぎの結果を得た。

1) *L. plantarum* その他の “DAP 型” の細胞壁ペプチドグリカンの D-アラニル→*meso*-DAP 結合を加水分解するエンドペプチダーゼを等電点7.9の蛋白質フラクションとして分離した。

2) このエンドペプチダーゼフラクションは, “粗 L-3 酵素” 液に含まれる N-アセチルムラミル→L-アラインアミダーゼ, DAP-カルボキシアミドアミダーゼ作用およびカゼイナーゼ作用を示さず, また免疫化学的にも均質であることが確認された。

緒 言

細菌細胞壁の基礎構造であるペプチドグリカン
を温和な条件で, かつ特定の化学結合を開裂する
ことによって可溶化する酵素は, 細胞表層の構築
と機能を探究してゆく際に, きわめて有力な “試
薬” として役立つ¹⁻³⁾。このような酵素には, リゾ
チーム⁴⁾をはじめとして数多くのものが知られて
いる。これらの内で, 著者の属する研究室で発見
された *Streptomyces* sp. L-3 菌が産生する酵素
は⁵⁻⁶⁾, *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)⁷⁾,
Corynebacterium diphtheriae (Park-Williams No.
8)⁸⁾, *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv)⁹⁾, BCG

(Takeo)¹⁰⁻¹¹⁾, *Listeria monocytogenes* (NCTC
7973)¹²⁾等, その細胞壁ペプチドグリカンの二塩基
アミノ酸が α , α' -ジアミノピメリン酸 (DAP) で
ある細胞壁に作用して, ペプチドサブユニット間
の-D-アラニル→*meso*-DAP-結合を開裂する。この
点で, L-3 菌が生成する酵素は 他に類例の少い,
特異な作用をもつものといえる。

しかしこれまでの研究⁷⁻⁹⁾によって, L-3 菌の培
養濾液中には, 上述のエンドペプチダーゼ活性の
ほかに, N-アセチルムラミン酸*¹⁾と N-アセチル
グルコサミンとが交互に β , 1→4 結合して構成さ
れたグリカン部分とペプチドサブユニットとの結
合を開裂する-N-アセチルムラミル→L-アラニン

Studies on purification of *Streptomyces* L-3 enzyme capable of degradating “DAP” containing bacterial cell wall peptidoglycans. 1. Preparation of well defined soluble substrates and isolation of -D-alanyl→*meso*-DAP-endopeptidase.

Tsuyoshi KATAYAMA (Department of Microbiology, Osaka University Dental School, Osaka)

* 大阪市北区常安町 32 (〒530)

** 現北海道大学歯学部第二保存学教室 (札幌市北区北13条西7丁目〒060)

Jap. J. oral Biol., 15: 168-185, 1973.

アミダーゼ、ならびに *meso*-DAP 残基のカルボキシアミドおよび-D-*iso*-グルタミン残基を脱アミドするアミダーゼ等の活性が存在することが明らかにされ、あるいは示唆されている。さらに培養濾液にはカゼインを消化するプロティナーゼ作用も検出される。

細胞壁溶解酵素をさまざまな研究目的に利用しようとする際に、そのペプチドグリカンに対する作用点が明確な酵素標品を用いることが望ましいことは論をまたない。また、プロティナーゼ活性の混在は、たとえば細胞表層物質のうち蛋白質性のもの（例えばA群 *Streptococcus pyogenes* および *Staphylococcus aureus* 細胞壁の構成成分と考えられるそれぞれM蛋白質、および蛋白質Aなど）を研究対象とする場合に、あるいはプロトプラスト経由で作製した細胞質膜の抗原性を追求する際¹³⁾などには、大きな障害となる。

この論文では、以上の観点から、L-3菌の培養濾液中に含まれる種々の活性を担う酵素蛋白質の内、前述のように他に例の少ない基質特異性を示すD-アラニル→*meso*-DAP エンドペプチダーゼを単離することを試みた研究の結果について報告する。

材料ならびに方法

1. 粗“L-3酵素”の調製

1) L-3菌の培養

0.1% Bacto-ペプトン (Difco) 寒天斜面培地に3~6カ月ごとに継代保存したL-3菌をまず上記培地に接種し、28°Cで7~10日間前培養した。大量培養にあたっては、この前培養菌の2~4白金耳量ずつを、50~100本の500ml容のRoux型培養ビンにいった各400mlの変法McCarty培地(Moriら, 1966)⁵⁾の液面に浮遊させることによって接種し、28°Cで7日間静置培養した。

培養液を合体し、10,000gで連続遠心を行ない、除菌してえた茶褐色の培養上清を“L-3酵素”の出発材料とした。

2) 硫酸塩析による濃縮

Moriら(1962)⁶⁾の記載を参考にして行なった。

*1 *Mycobacteria* および *Nocardia* に属する菌種ではN-グリコリルムラミン酸である。

すなわち前記培養上清に粉末硫酸アンモニウムを加え、30%硫酸飽和とした。一夜放置後、かすかに濁った溶液を10,000gで連続遠心し、えられた上清に80%飽和になるように硫酸を添加した。一夜放置したものをセライト503 (John-Manville Products, N.Y., U.S.A.)を厚さ約2cmに敷いた濾紙をとおして吸引濾過した。塩析された蛋白質を含むセライトに、あらかじめ氷冷した精製水の適量を加え、よく攪拌したのちガラスフィルターを通し、溶解した蛋白質をセライトから濾別した。セライトを精製水で処理する操作をさらに3~4回繰り返し、強く黒褐色に着色した濾液を0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.8)に対して一夜透析を行ない、粗酵素標品をえた。ちなみに上述の硫酸塩析によって培養濾液中の*C. diphtheriae*全菌に対する溶解活性の約70%が回収され、また蛋白質あたりの比活性は約15倍上昇した。本論文で述べる実験では、5回の大量培養でえた約3.1lの粗酵素液を“L-3酵素”の分画、精製に供した。

3) 粗酵素液の分画と精製に関して

(1) イオン交換セルロース: DEAE-セルロース (Brown Co., New Hampshire, U.S.A.) および CM-セルロース (Cellex-CM, Bio-Rad Lab., Calif., U.S.A) は常法にしたがって活性化し、それぞれ0.05Mリン酸緩衝液(pH 8.0)および0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.0)と平衡化したものを用いた。

(2) 電気泳動的等電点分画 (Isoelectric focusing): Ampholine(pH域が7~10のもの, LKB-Produkter AB, Stockholm-Bromma I, Sweden) と LKB 社の電気泳動用カラム (110 ml) とを用い、Vesterberg¹⁴⁾らの記載に従い実施した。すなわちカラム外とう管に冷水を流してカラム温度を1°Cに保持しつつ、700ボルトの定電圧で43時間泳動を行なったのち、カラム内容を酸性側より自然流下させ、1.5ml ずつのフラクションを分取した。直ちに各フラクションのpH (1°Cにおける)、ついで波長280mμでの吸光度 (O.D.₂₈₀) を測定した。

2. *Flavobacterium* L-11酵素と *Chalaropsis* B 酵素

1) L-11酵素

協和醸酵工業、富士工場において *Flavobacterium* sp. L-11 菌を 2% グルコース 加ブローズにタンク培養してえた培養上清を 硫酸アンモニウムで全飽和し、沈澱としてえた粗酵素の凍結乾燥標品 (Lot 45) を DEAE-および CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより部分精製して用いた (詳細については別に報告する)。

2) *Chalaropsis* B 酵素

D.A. Miller 博士 (LEDELE Laboratories, American Cyanamid, N.Y., U.S.A.) の好意により分与された標品 (3688C-51-16) を用いた。

3. 基質

1) *C. diphtheriae* 全菌

微研毒素製造用培地 (Taylor 培地を改変したもの) に 34~35°C で 2 日間振盪培養した *C. diphtheriae*, Park-Williams No. 8 の亜株 (Toronto-Harvard 株) の菌体を生食水、ついで精製水で十分に洗滌したのち、凍結乾燥したものを用いた。

C. diphtheriae 全菌は、L-3 酵素が元来この菌の細胞壁ペプチドグリカン を溶解する酵素として記載されたものであること (Mori ら, 1960, 1962)⁵⁻⁶⁾、ならびに L-3 酵素の作用に対する感受性が高い*2 ことなどの理由で、“L-3 酵素”の分画、精製の各ステップの活性を検定する目的に用いた。

2) *L. plantarum* 細胞壁

Matsuda ら (1968 a)⁷⁾ の記載にしたがって調製した。すなわち *L. plantarum* ATCC 8014 株を Archbald ら (1961)¹⁵⁾ の培地に 30°C で 24 時間静置培養してえた菌体を Braun の細胞破壊装置によって破壊し、破壊菌液を分画遠心して粗細胞壁を分離した。これを結晶トリプシンで消化し、凍結乾燥した。なお必要に応じ、0.1M ピロリン酸緩衝液 (pH 9.3) に 10mg/ml の割合に浮遊させ、37°C で 3 時間処理した。

この処理は、*L. plantarum* 細胞壁の特殊構造の一つであるテイコ酸にエステル結合しているア

ルカリに不安定な D-アラニン をあらかじめ除去しておき、酵素の作用によるのではなく、反応系のアルカリ性のために遊離する D-アラニンによって、後述する末端基の分析結果の解釈が混乱することがないようにする目的で行なった。

3) *L. plantarum* 細胞壁からの可溶性基質の調製に関して

(1) 細胞壁溶解産物の作製

トリプシン処理細胞壁標品の 5g を 2.5mg の *Chalaropsis* B 酵素¹⁶⁾ と、100ml の 0.01M 醋酸緩衝液 (pH 4.7) 中で 37°C で 7 時間反応させた。溶解産物のうち、細胞壁 1.5g 相当分をグリコペプチド画分の分離に、残りの 3.5g 相当分は *Flavobacterium* L-11 酵素でさらに消化し、ペプチドの分離に供した。

(2) イオン交換セルロースあるいはレジン

ECTEOLA-セルロース (Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg, Germany) および CM-セルロース (Cellex-CM) を常法にしたがって活性化し、前者は 0.5M 塩化リチウムと平衡化 (Cl⁻型) したのち、また後者は 0.2N 塩酸で活性化 (H⁺型) 後、精製水で十分に洗って実験に用いた。

一方、Dowex 1-×8 (200-400メッシュ, Dow Chemical Co., Midland, Mich., U.S.A.) および Amberlite CG-120 (Type E2, 200-400メッシュ, Rohm and Haas Co., Pa., U.S.A.) は常法にしたがって活性化し、前者は 0.5M 醋酸と平衡化したのち精製水で十分に洗滌したものを、後者は 0.2M ピリジン-醋酸緩衝液 (pH 3.1) と平衡化したものをを用いた。

(3) ゲルろ過

Sephadex G-50 (fine, bead form, Pharmacia, Uppsala, Sweden) カラム (1.9×97cm), G-50 (coarse, bead form) カラム (1.9×97cm) ならびに G-25 (coarse, bead form) カラム (2.5×97cm) をこの順にポリエチレン細管で連結し、最初の G-50 カラムに試料を添加し、精製水で溶出した (流速 10ml/時間, 1 管 10ml)。

(4) ヒドロキシメチル化による遊離アミノ基の修飾

L. plantarum 細胞壁から分離したグリコペプチドおよびペプチドは必要に応じて、Ghuysen,

*2 ただし全菌浮遊液を基質として用いた場合には、試料中に含まれるプロティナーゼの作用によって、細胞壁ペプチドグリカンの解体によらない濁度の減少が起る可能性があることを考慮に入れねばならない。

Tipper および Strominger (1966)¹⁷⁾ の記載を参考にしてヒドロキシメチル化した後、基質として用いた。すなわち約 1 mmole の遊離アミノ基を含む試料に、使用直前に調製した 19% (w/w) エチレンオキシド水溶液の 2~2.5 ml を手早く加え、軽く混和したのち、少量の 2 N NaOH で反応液の pH を 8 附近とした後密封し、この反应用試験管をゆるやかに振盪しながら、0°C の氷水中で反応を進行させた。

48時間後、反応液を減圧濃縮で、さらに濃硫酸とカセイソーダを入れた除湿器中で十分減圧乾燥し、残留するエチレンオキシドを除いた。ヒドロキシメチル化の程度は、乾固したヒドロキシメチル化物を精製水に溶解したものの一定量について、遊離のアミノ基を未処理の試料のそれと比べることにより調べた。上述の処理によって試料中の遊離アミノ基の 85~90% がヒドロキシメチル化されることが示された。

4. 酵素作用の検定

1) 全菌ならびに細胞壁に対する溶解活性

C. diphtheriae 全菌あるいは細胞壁浮遊液の 1.6 ml (1.28 mg の全菌あるいは 1.6 mg の細胞壁を含む) と所定量の酵素液とを、0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.8, 終末濃度) 中で、37°C の温浴中で反応させた (総量 3.2 ml, 12φ×100 mm の比濁用試験管を用いた)。Simadzu Baush & Lomb Spectronic 20 型光電光度計 (島津製作所, 京都) を用いて、O.D.₅₅₀ の変化を時間をおって測定した。酵素活性の強さは、以上の条件で酵素を作用させた際、15 ないし 30 分間の反応時間内に反応開始時の O.D.₅₅₀ を、全菌では 50%, 細胞壁では 35% だけ減少させる時間 (x 分) をはかり、60/ x を検定に供した量の酵素標品中に含まれている酵素単位数とし、単位容量中の単位数を算出した。

ちなみに検定に用いた *C. diphtheriae* 細胞壁標品は、松原の記載 (1965)¹⁸⁾ を参考にして、3-1) に記した *C. diphtheriae* 全菌体を音波処理によって破壊し、破壊菌液を分画遠心してえた粗細胞壁画分をプロナーゼによって消化したものである。

2) 細胞壁あるいは可溶性基質に対する水解作用

被験酵素液と基質とを 0.02 M のリン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で 37°C で反応させ、遊離アミノ基、N-あるいは C-末端アミノ酸を定量した。処理条件の詳細はその都度記載することにする。

3) プロティナーゼ活性

プロティナーゼ活性はカゼイン (Hammersten, E. Merk, Darmstadt, Germany) を基質として、カゼイン-Folin 呈色法¹⁹⁾ により、平田 (1970)²⁰⁾ の記載を参考にして測定した。

5. 化学分析

1) 遊離および総アミノ基、N-末端および C-末端アミノ酸

Ghuysen, Tipper および Strominger (1960)¹⁷⁾ の記載にしたがって同定、定量した。なお、 α' -DNP-DAP の定量の標準として使用した mono-DNP-DAP は、Jušić ら (1963)²¹⁾ の記載を参考にして調製した。えられた試料の純度は、松田哲郎博士より分与を受けた mono-DNP-DAP 標品 (Matsuda ら, 1968a)⁷⁾ とともに東洋濾紙 51A にスポットし、メタノール-水-10 N HCl-ピリジン (80:17.5:2.5:10)²²⁾ を媒体として一次元下降法により室温で 16 時間展開し、ニンヒドリン法で発色することにより検定した。供試した DNP-誘導体が mono-DNP-DAP であり、かつ DAP および di-DNP-DAP を含まないことが確認された。

2) アミノ酸自動分析計によるアミノ酸およびアミノ糖の分析

試料のアミノ酸およびアミノ糖含量は、6 N 塩酸中で 100°C、12~14 時間加水分解したものを検体として、アミノ酸自動分析計 (KLA-3B 型, 日立製作所) で測定した。ただしムラミン酸とグルタミン酸の分離をよくする目的でクロマトカラムの温度を通常の 55°C に変えて、45°C に設定した。なお N-末端アミノ酸および還元末端のアミノ糖を分析する際には、試料をそれぞれ Ghuysen らの方法¹⁷⁾ で DNP 化後、あるいは Tipper と Strominger²¹⁾ の記載を参考にして 0.1 M NaBH₄ により室温暗所で 4 時間還元後、6 N HCl 中で 100°C、12 時間加水分解し、供試した。

3) 結合アンモニア (アミドアンモニア)

試料を 4 N HCl 中で 100°C、8 時間加水分解してアミドアンモニアを塩化アンモンとし、奥田、

藤井の方法(1960)²²⁾により総アンモニア量を測定した。結合アンモニア量は上の値から未水解の試料についての測定値(遊離アンモニア量)を差引くことによって求めた。Edman 分解物中のアンモニア量は、上記の方法では発色が阻害されるので(Matsuda ら, 1968a)⁷⁾, Conway の微量法により Kotani ら(1971)⁹⁾の記載を参考にして測定した。

4) Edman 分解

Konigsberg および Hill の方法を微量化した Tipper ら(1967)²⁴⁾の方法に従い、加藤と小谷(1970)²⁵⁾の記載を参考にして実施した。

5) その他

総ヘキソサミン量は Ghuysen, Tipper および Strominger (1966)¹⁷⁾の記載に従い、ヘキソースはアンスロン法(Aschwell, 1957)²⁶⁾, 還元糖は Park と Johnson (1949)²⁷⁾の方法により定量した。無機および総リンの定量は Lowry ら(1954)²⁸⁾の方法によった。また蛋白質量は、牛血清アルブミン(Armour Labo., U.S.A.)を標準にして Lowry 法²⁹⁾で測定した。

なお上述の比色定量は、アンスロン法を除き、いずれも400 μ l 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。

6. 免疫学的方法

1) 抗粗 L-3 酵素ウサギ血清

硫酸塩析によってえた粗 L-3 酵素液(1—1参照)を20% (w/v) ポリビニルピロリドンでさらに約4倍に濃縮したものの1.2ml (蛋白質量約40mg, *C. diphtheriae* 細胞壁に対する溶解活性が31.5単位/mlのもの)をペニシリンG 10,000単位, ジヒドロストレプトマイシン100mgを含む精製水0.8mlおよび4mlの Freund の完全アジュバント(Difco)とともに十分混和し、このものの2mlずつを、体重2.0~2.5kgの家兎の脊部筋肉内の2カ所に、1週間の間隔で3回注射して基礎免疫を行なった。1週間の休止期間後1mlの未濃縮の粗酵素液を耳静脈内にブースター注射し、最終注射から1週間後に全採血して抗血清をえた。

2) 免疫電気泳動法

Ouchterlony³⁰⁾の記載を参考にして行なった。

すなわち、0.01M バルビタール緩衝液, pH 8.0中に Difco 寒天 (Difco special noble agar) を1.0%の割合に加え、加熱溶解したものを5 $\times$ 7cmのガラス板上に厚さ約3mmになるように注加した。ゲル化するのを待ち、寒天平板上の2カ所に直径約5mmの円形くぼみを作り、抗原を注入した後、イオン強度0.05のバルビタール緩衝液(pH 8.6)中で6ボルト/cmの条件で4 $^{\circ}$ C, 90分間電気泳動を行なった。ついで電気泳動の方向と平行に上述のくぼみのそれぞれから約10mmの距離をおいて幅3mm, 長さ6mmの溝を切り、抗血清を満たしたのち室温においた湿気箱中に静置させた(図13参照)。24~72時間反応を進行させ、沈降線の出現状態を観察、記録した。なお実験に供試した抗原の濃度は予備実験において2倍連続希釈した抗原溶液と抗血清との反応を寒天ゲル内二重拡散法(Kabat と Mayer³¹⁾)により検定し、最も明瞭な、かつ最も多数の沈降線を与える濃度を調べることにより選択した。

成 績

I. *L. plantarum* (ATCC 8014) 細胞壁よりの可溶性基質の分離とその化学構造の決定

1. disaccharide-tripeptide amide および disaccharide-tetrapeptide (di- or monoamide)-tripeptide (di- or triamide)-disaccharide

詳細は別に報告するが、概要は次のとおりである。

1) *Chalaropsis* B酵素による細胞壁の溶解と溶解産物の分離

L. plantarum 細胞壁(5g)をエンド-N-アセチルムラミダーゼ作用を有する *Chalaropsis* B 酵素(2.5mg)により、0.01M 醋酸緩衝液(pH 4.7)中で37 $^{\circ}$ C, 7時間処理した。構成グルタミン酸残基1モルあたり約1.4モルの還元基の遊離と、100%に近いO.D.₅₅₀の減少がみられた。溶解産物(1.5g細胞壁相当分)をECTEOLA-セルロースカラム(2.5 ϕ $\times$ 45cm)にかけ、精製水で溶出した。ヘキソサミンとアミノ酸を多量に含む、中性ないし塩基性の画分を Sephadex の連結カラム(規格は3-3)-(2)項参照の事)によりゲルろ過した。図1に示すように、ヘキソサミンと遊離アミノ基との比

Fig. 1 Gel Filtration on Successive Columns of Sephadex G-50, G-50 and G-25 of the ECTEOLA-Cellulose-H₂O-Fraction from the *Chalaropsis* Enzyme Digest of *L. plantarum* Cell Walls

Table 1 Analyses of Amino Acid and Amino Sugar Compositions of Glycopeptides Isolated from the *Chalaropsis* Enzyme Digest of *L. plantarum* Cell Walls

Fraction	Treatment ^a	GlcN	Mur ^b	Ala	Glu	DAP	NH ₃ ^c
IC-1	1	0.90	0.86	1.16	1.00	1.03	2.06
	2	0.80	0.71	1.12	1.00	0.13	— ^d
	3	0.80	0.00	1.20	1.00	1.05	—
IB-1	1	0.88	0.84	1.56	1.00	1.04	1.93
	2	0.73	0.75	1.53	1.00	0.57	—
	3	0.93	0.00	1.68	1.00	1.11	—

Values are expressed as moles per mole of total glutamic acid residues

- a 1 : non-treated. 2 : dinitrophenylated. 3 : reduced by NaBH₄
- b Corrections for the destruction of muramic acid during the hydrolysis of a test specimen were not done.
- c By the method of Okuda and Fujii.
- d Not determined.

がおよそ4 : 1の第39管を中心とする画分(MMW), およびこの比がおよそ2 : 1の第49管を中心とする画分 (LMW) とが分離した。これらの 両画分の各々 (ほぼ全量) を Dowex-1 カラム (0.9φ×3.5cm) につけ、終末0.5M に至る 醋酸によって linear gradient 溶出し、それぞれ IB-1および IC-1 と名付けた画分を分離した。

2) IB-1 および IC-1 画分の化学構造

分離した上記の アミノ糖 および アミノ 酸構成を アミノ酸自動分析計で分析したところ、表1の「1」の欄に示すような結果がえられた。すなわち IC-1の画分は、グルコサミン、ムラミン酸、アラ

ニン、グルタミン酸、DAP およびアンモニアを 0.9 : 0.9 : 1.0 : 1.0 : 1.0 : 2.0 のモル比に含むグリコペプチドアミドであることが推定された。そこで、この画分を DNP 化した後、酸加水分解したものについて分析を行なったところ、表1の「2」の欄に示すように、DAP 残基の大部分が DAP として検出されなくなることがわかった。一方この画分を NaBH₄ で還元したものについては、「3」の欄に示すような分析結果がえられ、ムラミン酸残基の消失が認められた。

以上の結果を Matsuda ら(1968a)⁷⁾の研究結果と考え合わせると、IC-1は図2左に示すように、

Buffer : 0.1M pyridine-acetate, pH 5.0

Condition : 14 volt/cm for 150 min at 4C

Fig. 4 Electrophoretic Mobilities of Peptide Fractions Isolated by Amberlite CG-120 Column Chromatography of the L-11 Enzyme Digest of the *Chalaropsis* Enzyme Lysate of *L. plantarum* Cell Walls

この実験に使用したロットの L-11 酵素が-D-アラニン→*meso*-DAP 結合の一部を切断することが推定された。L-11 酵素による消化産物を CM-セルロースカラム (1.9φ×40cm) にかける、精製水ついで 0.5M アンモニア水で溶出した。後で溶出される塩基性の画分を Amberlite CG-120 カラム (0.9φ×72cm) にかける、カラムの平衡化に用いた 0.2M ピリジン-醋酸緩衝液 (pH 3.1) の 500ml で洗滌したのち、500ml ずつの上記緩衝液と 2.0M ピリジン-醋酸 (pH 5.0) 緩衝液との linear gradient で溶出した。

図 3 に示すように、遊離アミノ基を指標として検出される 5 つのピーク画分 (IIB-1, 2, 3, 4

および 5) の分離がみとめられた。これらの画分 (ピークに当るもの) について、0.1M ピリジン-醋酸緩衝液 (pH 5.0) を媒体として、14 ボルト/cm の条件で 150 分間ろ紙電気泳動を行なった結果、IIB-3, 4 および 5 の 3 画分が単一のスポットを与え、かつ陰極に向かって移動することが分った (図 4)。

2) IIB-3, 4 および 5 画分の化学構造

上記 3 画分について、構成アミノ酸、N-末端および C-末端アミノ酸ならびにアンモニア量を定量した結果がグルタミン酸残基 1 モルあたりのモル比として表 2 に示されている。

IIB-3: アラニン, グルタミン酸, DAP および アンモニアをおよそ 2.0 : 1.0 : 0.9 : 3.0 のモル比に含むペプチドで、グルタミン酸残基 1 モルあたり N-末端アミノ酸としてアラニンおよび α'-NH₂-DAP がいずれも 1 モルずつ、また C-末端アラニンが約 0.8 モル 検出された。このペプチドは、図 5 左に示すような構造の tetrapeptide-triamide と考えられる。

IIB-4: 同様な分析結果から、アラニン, グルタミン酸, DAP を等モルずつ含み、グルタミン酸残基および DAP 残基の合計 3 つの COOH 基のうちの 2 つがアミド化されている tripeptide-diamide であることが分った (図 5 中央)。

IIB-5: アラニン, グルタミン酸, DAP および アンモニアをおよそ 1.5 : 1.0 : 1.0 : 2.0 の割合で含み、N-末端アミノ酸としてグルタミン酸残基 1 モルあたり約 1 および 0.6 モルの N-末端アラニン

Table 2 Analyses of Total, N-Terminal, and C-Terminal Amino Acids and Ammonia of Peptide Subunit Isolated from the L-11 Enzyme Digest of the *Chalaropsis* Enzyme Lysate of *L. plantarum* Cell Walls

Fraction	Amino Acid Composition ^a			NH ₂ -terminal ^b groups		COOH-terminal ^b groups		Ammonia
	Ala	Glu	DAP	Ala	α'-NH ₂ -DAP	Ala	DAP	
IIB-3	2.07	1.00	0.89	1.00	0.92	0.75	0.00	2.48 ^c (2.95 ^a)
IIB-4	1.18	1.00	0.90	1.00	0.87	0.00	0.00	1.97 (1.74)
IIB-5	1.60	1.00	1.12	1.16	0.61	0.00	0.00	2.00 (2.10)

Values are expressed as moles per mole of total glutamic acid residues

a: By Amino Acid Analyzer.

b: By thin layer chromatography.

c: By the method of Okuda and Fujii.

Fig. 5 Proposed Structures of Peptide Subunits Isolated from the L-11 Enzyme Digest of the *Chalaropsis* Lysate of *L. plantarum* Cell Walls

および α' -NH₂-DAP が検出された。以上の分析結果、および C-末端アミノ酸が検出されず、またグルタミン酸残基 1 モルあたり、約 0.5 モルの 1.0 モルを上廻るアラニンが存在する事実から、このペプチドは図 5 右に示すように、テトラペプチドとトリペプチドとが前者の (D-) アラニン残基の COOH 基と後者の DAP 残基の α' -NH₂ 基との間で結合した heptapeptide であり、かつアンモニアの定量値からグルタミン酸残基の 2 つ、および DAP 残基の 3 つ、合計 5 つの COOH 基のうち、4 つがアミド化された heptapeptide-tetramide と考えられる。

以上のように分離した *L. plantarum* 細胞壁ペプチドグリカンの構築単位のうち tripeptide-diamide と tetrapeptide-triamide を除く他のグリコペプチド、ペプチドを可溶性基質として、細胞壁とともに、実験に供試した*3。

II. 粗“L-3 酵素”液のイオン交換クロマトグラフィー

1. DEAE-セルロースカラムによる分画

1) パイロット実験

“粗 L-3 酵素”標品の 1,000 ml をさらに 20% (w/v) ポリビニルピロリドン(分子量約 7,000,000, 半井化学, 京都) に対して 96 時間透析することによって約 4 倍に濃縮後、0.05M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に対して一夜透析した。透析内液を 6,000 g

で 20 分間遠心し、沈澱は氷冷した前記リン酸緩衝液の 20ml で遠心洗滌した。洗液は 1 回目の遠心上清に合体した (350ml)。この操作により *C. diphtheriae* 細胞壁溶解活性の損失はなく、比活性は約 1.5 倍上昇した。

濃縮粗酵素標品の 2 ml (1 ml あたり 31.5 単位の *C. diphtheriae* 細胞壁溶解活性を示す) を前記緩衝液と平衡化した DEAE-セルロースカラム (2 ϕ × 4cm) に添加し、同じ緩衝液 (pH 8.0) の 150 ml で溶出したのち、0.2, 0.4, 0.6 および 0.8M の割合に食塩を加えた前記リン酸緩衝液の 550ml ずつで段階的に溶出を行なった (流速は 60ml/時間)。5~10ml ずつのフラクションについて *C. diphtheriae* 全菌に対する溶解活性、カゼイナーゼ活性、ならびに O.D.₂₈₀ を測定した。

図 6 にみられるように、溶菌活性およびカゼイナーゼ活性のほとんどすべてがカラムを通り抜けた。一方食塩濃度を段階的に上げたさいに溶出される部分には、O.D.₂₈₀ を指標として 1 つの明瞭なピークと 3 つの小さなピークの分離がみられたが、そのいずれにも溶菌活性およびカゼイナーゼ活性は全く認められなかった。

“通り抜け”画分 (DEAE-画分) への *C. diphtheriae* 細胞壁溶解活性の回収率は約 90% であり、一方酵素活性を欠く蛋白質の 50% 以上が上述の negative adsorption により除去された。なお粗酵素液が示す黒褐色の着色もその大部分が除かれた。

2) DEAE-画分の *C. diphtheriae* 細胞壁に対する作用 (遊離する末端基の解析)

アルカリ処理細胞壁 10mg に DEAE-画分の 2

*3 II B-3, 4 および 5 の各ペプチドの構造は先に Matsuda らが *L. plantarum* 細胞壁の L-11 酵素単独による消化物から単離したペプチドに対して想定したそれと本質的に一致しているが、アミド化の程度に若干の差異が認められる。

Fig. 6 Chromatography on a DEAE-Cellulose Column of the Crude Enzyme Preparation

Fig. 7 Lysis of *L. plantarum* Cell Walls with Liberation of Free NH₂-groups by Digestion with the DEAE-Cellulose Fraction

単位 (*C. diphtheriae* 細胞壁を用いて検定した) を、総量 1 ml のリン酸緩衝液 (終末濃度および pH は 4-2) の記載の通り、以下同じ) 中で 37°C、24 時間反応させた。時間をおって反応液の必要量を吸み出し、直ちに 100°C 3 分間加熱して酵素反応を停止させ、O.D.₅₅₀ と遊離アミノ基との変化を測定した。図 7 に示すように、反応系の O.D.₅₅₀ は 24 時間で約 95% 減少し、平行してグルタミン酸残基 1 モル当り (以下同じ)、約 2 モルの

アミノ基の遊離がみとめられた。

溶解に伴い遊離する N-および C-末端アミノ酸の分析を行なったところ、図 8 に示されているように、供試細胞壁ペプチドグリカンの D-アラニン→*meso*-DAP 結合の開裂に由来すると考えられる約 0.5 モルずつの α'-NH₂-DAP の増量、C-末端アラニンの遊離が認められ、またグリカン部分とペプチド部分との結合の切断に結果すると推定される、ほぼ 1 モルの N-末端アラニンの遊離がみられた*4。さらに DAP-カルボキシアミドアミダーゼ作用によって C-末端アミノ酸として検出される DAP 残基が約 0.8 モル増加することが示された。

3) DEAE-画分の大量調製

パイロット実験に用いたのと同じ濃縮粗“酵素”液の 345 ml (1 ml 当りの *C. diphtheriae* 細胞壁に対する溶解活性は 31.5 単位、したがって比活性は 9.3 単位/mg 蛋白量) を、DEAE-セルロースカラム (3.0×35 cm) に添加し、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) の 2 l により 200 ml/時間の流速で溶出した。*C. diphtheriae* 全菌に対して強い溶解作用を示す溶出液量約 200 ml から 1 l までの

*4 同時に遊離するはずの N-アセチルムラミン酸の COOH 基はヒドラジン分解法では検出されない。

Fig. 8 Liberation of N- and C-Terminal Amino Acids by Hydrolysis of *L. plantarum* Cell Walls with the DEAE-Cellulose Fraction

Fig. 9 Chromatography on a CM-Cellulose Column of the DEAE-Cellulose Fraction

フラクションを合体し、硫酸粉末を80%飽和になるように加え、4°Cで一晩放置した。塩析された酵素蛋白質をあらかじめ氷冷した精製水の25 mlに溶解し、多量の精製水に対して透析したのち、12,500 gで20分間遠心して透析中に生じた沈澱を除き、36 mlの部分精製標品をえた。

この実験での *C. diphtheriae* 細胞壁に対する溶解活性および蛋白質の回収率はそれぞれ約60%および20%であり、比活性は約3倍上昇した。

2. CM-セルロースカラムによる分画

前項で述べた DEAE-画分を0.01M リン酸緩衝

液 (pH 7.0) に対して透析し、その15 ml (1 ml 当りの *C. diphtheriae* 細胞壁に対する溶解活性は150単位、蛋白質量は6.35 mg 比活性26.3単位/mg蛋白質量)を上記緩衝液と平衡化した CM-セルロースカラム (3.0φ×21 cm)によりクロマトした。まず450 mlの前記緩衝液を流し、O.D.₂₈₀が無視できる程度になったことを確かめた上、各1,000 ml ずつの前記緩衝液とこれに0.2Mの割合に食塩を添加したものとの linear gradient で溶出を行なった (流速は60 ml/時間)。

分取した15 ml ずつのフラクションについて *C.*

Fig. 10 Chromatographa on a CM-Cellulose Column of the DEAE-Cellulose Fraction

diphtheriae 全菌に対する溶解活性, カゼイナーゼ活性および O.D.₂₈₀ を測定した結果が図9に示されている。0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出され, 蛋白質量が高く, かつ強いカゼイナーゼ活性を示すが溶菌活性は低い画分A, ならびに食塩の濃度こう配でクロマトされ, 蛋白質含量はきわめて低く, かつカゼイナーゼ作用も無視できる程度であるが, 強い溶菌作用を示す画分B, および溶菌活性とともにかなりのカゼイナーゼ活性を示す画分Cの分離が認められた。

1) 画分A, BおよびCの可溶性基質に対する作用

図10は, 上述の3画分の disaccharide-tripeptide diamide (IC-1) ならびに heptapeptide tetraamide (IIB-5)——いずれもヒドロキシメチル化したもの——に対する作用をアミノ基の遊離 (基質に含まれるグルタミン酸残基1モル当りのモル数) を指標として総量40μlの0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で検定した成績を示す。測定にあたっては各画分の活性の強さを半定量的なが

ら比べようよう^{*5} 供試する画分量と基質量の割合が disaccharide-tripeptide amide については20 μl/12μmoles, heptapeptide では20 μl/16 μmoles となるようにし, また反応時間はいずれの画分についても24時間とした。

画分Aには disaccharide-tripeptide diamide (hydroxymethylated) と heptapeptide tetraamide (hydroxymethylated) との両者からアミノ基を遊離させる作用がみられるのに対し, 画分BおよびCは heptapeptide amide からのみアミノ基を遊離させることが明らかにされた。disaccharide-tripeptide は, N-アセチルムラミル→L-アラニンアミダーゼ, DAPカルボキシアミド (ないしイソグルタミン) アミダーゼの作用によりアミノ基ないしアンモニアを遊離するが, heptapeptide tetraamide は後2者の作用によりアミノ

^{*5} 利用できる基質が量的に限られていたために酵素量と遊離するアミノ基量との間の “dose-response curve” を描くことが出来なかった。したがって十分に定量的とはいえないことを附言しておかねばならない。

Table 3 Analyses for Terminal Groups Liberated by Hydrolysis of *L. plantarum* Cell Walls with the DEAE- and CM-Cellulose Fraction of the L-3 Enzyme

Fraction	Test dose (ml)	Increase for 48 hr incubation*				O.D. reduction (%)
		N-terminal		C-terminal		
		Ala	α' -NH ₂ -DAP	Ala	DAP	
Filtrate through DEAE CM fractions	1.00	1.00**	0.47**	0.46**	0.78**	95**
A	1.80	0.83	0.43	0.46	0.30	90
B	1.20	0.00	0.43	0.33	0.00	83
C	1.20	0.00	0.34	0.33	0.00	70

* Mole/mole of total G[u.

** Increase for 24 hr incubation

基ないしアンモニアを遊離しうが、N-アセチルムラミル→L-アラニンアミダーゼの基質とはなりえない。したがって、図10に示された結果から、画分Aには DEAE-画分に認められる酵素活性のすべてが、他方画分BおよびCには D-アラニル→meso-DAP エンドペプチダーゼ活性のみが存在すると考えられる*。

2) 3画分の *L. plantarum* 細胞壁に対する作用 (遊離する末端基の解析)

画分A, BおよびCに属するフラクションのそれぞれを合体 (図9参照) したものを限外濾過法によって濃縮し、0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.8) に対して透析した。表3は濃縮した各画分の用量 (それぞれ1.8, 1.2および1.2ml) を *L. plantarum* 細胞壁 (アルカリ処理) の12mgに、総量2.4mlのリン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で、37°Cで48時間作用させ、O.D.₅₅₀の減少、N-およびC-末端アミノ酸の遊離を調べた結果を示す。ちなみに供試する各画分の量は、予備実験の結果にしたがって、48時間の反応で70~90%のO.D.₅₅₀の減少を起すように、表3に示すように調節した。また表には示されていないが、酵素を加えない対照系では、反応前後のO.D.₅₅₀および末端アミノ酸残基量に有意の差は認められなかった。

(1) 画分A

*6 ただし heptapeptide tetraamide に画分Bを作用させた際にグルタミン酸残基1モルあたり0.7モルにおよぶアミノ基の遊離が認められる事実は、この画分に上記エンドペプチダーゼ作用のみが存在するとした場合の理論値が最大0.5モルであることと矛盾する。この事実が何に原因するかは現在のところ明らかでない。

供試細胞壁のグルタミン酸残基1モルあたり約0.8モルのアラニンのNH₂基の遊離、ならびに約0.45モルずつの α' -NH₂-DAP と C-末端アラニンの増加がみられ、さらに DAP 残基の30%が新しく C-末端アミノ酸として検出されるようになった*。

すなわち、画分Aには D-アラニル→meso-DAP エンドペプチダーゼ、N-アセチルムラミル→L-アラニンアミダーゼ、DAP-カルボキシアミドアミダーゼの3種の活性のいずれもが存在することが示された。

(2) 画分BおよびC

これら両画分の作用では、細胞壁のグルタミン酸残基1モルあたり各々0.3~0.4モルずつの α' -NH₂-DAP と C-末端アラニンの増加のみが認められ、画分Aを作用させた場合とは異なり、N-末端アラニンの増加ならびに C-末端 DAP の出現は認められなかった。すなわちこれらの画分には D-アラニル→meso-DAP エンドペプチダーゼ活性のみが存在することが示された。この結論は、*L. plantarum* 細胞壁ペプチドグリカン 構築単位を代表する disaccharide-tripeptide (di- or monoamide)-tripeptide (di- or triamide)-disaccharide (IB-1) を基質として、N-末端および C-末端アミノ酸の遊離をしらべた実験においても確認された。すなわち表4にみられるように、B, C の両画分はいずれも、48時間の作用により供試基質のグ

*7 この C-末端 DAP の増加は同時に調べたクロマト前の DEAE-画分の作用によるものに比べて明らかに低く、また画分BおよびCの作用では C-末端 DAP の増加は認められなかった。

Fig. 11 Fractionation by Isoelectric Focusing with the Carrier Ampholite (pH 7-10) of the CM-Cellulose Fraction B

Table 4 Hydrolytic Action of Fraction B or C on disaccharide-tetrapeptide(di- or monoamide)-tripeptide (di- or triamide)-disaccharide (IB-1)

Fraction	Increase for 48 hr incubation*			
	N-terminal		C-terminal	
	Ala	α' -NH ₂ -DAP	Ala	DAP
B	0	0.50	0.40	0
C	0	0.45	0.36	0

* Mole/mole of total Glu.

ルタミン酸残基1モル当り各々0.4~0.5モルずつの α' -NH₂-DAP および C-末端アラニンを遊離させ、D-アラニル→*meso*-DAP-結合をほぼ完全に開裂するが、N-末端アラニンおよびC-末端DAPの増加をもたらさず、したがってN-アセチルムラミル→L-アラニンアミダーゼおよびDAP-カルボキシアミドアミダーゼ作用を欠くことが示された。

III 電気泳動的等電点分画法による D-アラニル→*meso*-DAP エンドペプチダーゼの単離

D-アラニル→*meso*-DAP エンドペプチダーゼ活性を含む画分BとCのうち、画分Cに比べて蛋白質当りの *L. plantarum* 細胞壁溶解活性が高く、

かつカゼイナーゼ活性のきわめて低い画分Bの20ml (1ml 当り6単位の *C. diphtheriae* 細胞壁溶解活性を示し、0.09mg の蛋白質を含む、比活性6単位/0.09mg 蛋白質)を分画可能なpH範囲が7~10である Ampholine とともに電気泳動用カラムに充てんし、43時間泳動を行なった。1.5ml ずつのフラクションについて、pH (1°C における)、O.D.₂₈₀ および *C. diphtheriae* 全菌に対する溶解活性を測定した(図11)。

溶菌活性は pI 7.9および11.0のフラクションを中心として検出され、ほぼ左右対称の活性分布を示す2つの画分の分離が見られた。これらの2画分のそれぞれについて、*L. plantarum* 細胞壁溶解活性およびカゼイナーゼ作用を調べたところ、pI 7.9の画分は細胞壁に強い溶解作用を示し、かつカゼイナーゼ活性を全く欠いているが、pI 11.0の画分は逆に細胞壁には全く作用せず強いカゼイン分解活性を有することが認められた*8。

*8 *C. diphtheriae* 全菌に対する“溶解”作用は、細胞壁の解体によらず、菌体蛋白質の消化によるものと考えられる。

ちなみに画分Cについても電気泳動的等電点分画を行なったところ、図12に示す結果がえられた。画分Bの場合と同様 pI 9.3のフラクションに強いカゼイナーゼ活性が、また pI 7.9のフラクションに細胞壁溶解活性が認められたが、後者の活性はきわめて弱かった。したがって画分Cの示す *C. diphtheriae* 全菌に対する“見掛け”上強い溶菌活性は、菌体蛋白質の分解によるもので、細胞壁ペプチドグリカンの分解による部分は少いと考えられる。

1. *L. plantarum* 細胞壁ならびに disaccharide-tetrapeptide (di- or monoamide)-tripeptide (di- or triamide)-disaccharide (IB-1) に対する pI 7.9画分の作用

pI 7.9を中心とする画分（以下 pI 7.9画分と呼ぶ。第31~38管を合体したもの）を前記基質に 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で作用させ、遊離する N-および C-末端アミノ酸を同定、定量した。表5に示すように、細胞壁では約0.4モルずつ、また可溶性基質では約0.46モルずつの α' -NH₂-DAP と C-末端アラニンの増加が認められた。一方 N-末端アラニンおよび C-末端 DAP の増加は全く認められなかった。すなわち、D-ア

Table 5 Hydrolytic Action of pI 7.9 Fraction of the Fraction B on *L. plantarum* Cell Walls and disaccharide-tetrapeptide (di- or monoamide)-tripeptide (di- or triamide)-disaccharide (IB-1)

Substrate	Increase for 48 hr incubation*			
	N-terminal		C-terminal	
	Ala	α' -NH ₂ -DAP	Ala	DAP
Cell Wall	0	0.41	0.38	0
IB-1	0	0.46	0.46	0

* Mole/mole of total Glu.

ラニル→*meso*-DAP 結合を開裂するエンドペプチダーゼが pH 7.9を等電点とする蛋白質フラクションとして得られることが明らかになった。

2. pI 7.9画分の免疫学的均一性

粗“L-3酵素”液を抗原として Freund の完全アジュバントと共に免疫してえた家兎の血清を検定用抗血清として免疫電気泳動法により調べた。図13に示すように、DEAE-画分は少なくとも9本の沈降線を与えるに対して、pI 7.9画分は pH 8.6の媒体中では陰極に向かって移動する単一の沈降線を示した。すなわち pI 7.9画分が免疫学的な純度検定の基準に照らして均質であることが明ら

Fig. 12 Fractionation by Isoelectric Focusing with the Carrier Ampholite (pH 7-10) of the CM-Cellulose Fraction C

A: Crude preparation (DEAE-fraction)
 B: D-Alanyl→meso-DAP-endopeptidase (pI 7.9 Fraction)
 Buffer: Barbitol buffer, $\mu=0.05$, pH 8.6
 Condition: 6 volt/cm for 90 min at 4°C

Fig. 13 Determination of homogeneity of D-Alanyl→meso-DAP-endopeptidase (pI 7.9 Fraction) by immunoelectrophoresis

かにされた。

考 察

DAP を含む細胞壁ペプチドグリカンのペプチドサブユニット間のD-アラニル→meso-DAP-結合を開裂する、いわゆるD-アラニル→meso-DAP-エンドペプチダーゼについては、本論文で述べた *Streptomyces* sp. L-3 菌が生成するもののほかに、*E. coli* の自己融解液にこの活性を認めた Pelzer (1963)³⁴⁻³⁵⁾ の研究、および *Streptomyces albus* G により誘導的に作られるエンドペプチダーゼに関する Bricas らの報告 (1965)³⁶⁾ がある。しかし前者では、単に上記活性の存在が推定されているのみであり、また後者は、その細胞壁ペプチドグリカンに DAP を含む *Bacillus megaterium* KM 株の高圧滅菌菌体を培地に添加した場合にのみ誘導的に作られ、かつコントロールすることが困難な原因で生成量が一定しないと云う問題点があることを、報告者ら自身が記載している。

これに対して L-3 菌は、誘導物質を培地に特に加えない場合にも、安定して上述のエンドペプチダーゼを生産する。現在のところ表面培養によってでなければ高力価の酵素活性がえられず、したがってタンク培養による大量培養が行えないという技術的な難点が未解決のままに残されているが、労を惜しまなければ、通常の研究目的に必要な力価の酵素活性を得ることはさして困難ではない。

しかし、L-3 菌の培養上清ないしその硫酸塩析による濃縮液は、D-アラニル→meso-DAP エンドペプチダーゼ活性のほかに、細胞壁ペプチドグリカンの他の結合を開裂する作用、および強いプロティナーゼの存在を示し、これら各酵素活性の分別、特に他に類例の少ないエンドペプチダーゼの純化が“L-3 酵素”の利用価値を高めるためにも、また酵素学的な興味からも望まれていた。

本論文に述べた研究において著者は、CM-セルロースカラムクロマトグラフィー、電気泳動的等電点分画法を用いて D-アラニル→meso-DAP エンドペプチダーゼを少くとも作用の面から見たかぎりでは、純化することに成功した。ちなみに、

*9 しかし反面、粗酵素標品に対する抗血清は、目的とする酵素の精製の各段階での挙動を Ouchterlony 法などで追跡する場合には有用と考えられる。

この標品の蛋白質としての均一性は免疫化学的に証明された。ただしこの実験では粗酵素標品を免疫原とした抗血清を供試したので、pI 7.9画分に混在する微量の、また免疫原性が強くない蛋白質に対する抗体が供試した抗血清に十分量含まれていない可能性も一応考慮されねばならないであろう⁹⁾。したがって pI 7.9画分の純度は、たとえば SDS-ディスク電気泳動法、あるいは、超遠心分析法によっても調べる必要があるであろう。

ちなみに著者は、Matsuda らとともに粗“L-3 酵素”標品を、スターチブロックを支持体とする分域電気泳動および CM-セルロースカラムクロマトグラフィーによって分画し、エンドペプチダーゼ作用を示す画分を分離した研究を報告した (Matsuda ら, 1968)³⁷⁾。しかしこの研究ではプロティナーゼ活性は調べられておらず、また *L. plantarum* および *C. diphtheriae* の細胞壁のみを基質としたので、ペプチドグリカンの他の結合に対する作用の有無の検定も必ずしも万全ではなかった。さらにえられたエンドペプチダーゼ画分による D-アラニル→*meso*-DAP-結合の開裂も理論値の50%以下であったことを附言しておかねばならない。

稿を終えるにあたり、懇篤なるご指導、ご校閲の労をとられた小谷尚三教授に衷心より謝意を表す。

なお実験にさいして多大の教示と便宜を与えられた加藤藤二郎助教授、またいろいろと御援助をいただいた教室の諸氏、とりわけ松田哲郎博士に全面的な援助をえた。記して謝意を表す。

本論文の一部は昭和44年9月の第22回日本細菌学会関西支部総会(三重)、昭和46年10月の第44回日本生化学学会大会(仙台)および昭和47年5月第45回日本細菌学会総会(仙台)に於いて発表した。

文 献

- 1) GHUYSEN, J.-M.: Use of bacteriolytic enzyme in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.*, **32**: 425-464, 1968.
- 2) GHUYSEN, J.-M.: Bacterial cell walls. *Comprehensive Biochemistry* (edited by Florkin, M. and Stotz, E.H.), vol. 26 A., American Elsevier Publishing Co., New York, 1968.
- 3) 小谷尚三: 細菌細胞壁を溶解する微生物由来の酵素。蛋白質 核酸 酵素, **13**: 1136-1149, 1968.
- 4) FLEMING, A.: On a remarkable bacteriolytic element in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* **94**: 306-317, 1922.
- 5) MORI, Y., KATO, K., MATSUBARA, T. and KOTANI, S.: Lysis of the cell walls of *Corynebacterium* by extracellular enzymes of *Streptomyces* sp. I. Purification and concentration of the lytic factor. *Biken J.* **3**: 139-149, 1960.
- 6) MORI, Y., KOTANI, S.: Lysis of the cell walls of *Corynebacterium diphtheriae* by extracellular enzymes of *Streptomyces* sp. II. Production of "Protoplast" by treatment with a purified cell wall lytic enzyme. *Biken J.* **5**: 55-66, 1962.
- 7) MATSUDA, T., KOTANI, S. and KATO, K.: Structure of the cell walls of *Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014. 1. Isolation and identification of the peptides released from cell wall peptidoglycans by *Streptomyces* L-3 enzyme. *Biken J.* **11**: 111-126, 1968.
- 8) KATO, K., STROMINGER, J. L. and KOTANI, S.: Structure of the cell wall of *Corynebacterium diphtheriae*. 1. Mechanism of hydrolysis by the L-3 enzyme and the structure of the peptide. *Biochemistry*, **7**: 2762-2773, 1968.
- 9) KOTANI, S., YANAGIDA, Y., KATO, K. and MATSUDA, T.: Studies on peptides, glycopeptides and antigenic polysaccharide-glycopeptide complexes isolated from an L-11 enzyme lysate of the cell walls of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. *Biken J.*, **13**: 249-275, 1970.
- 10) KOTANI, S., YANAGIDA, Y., KATO, T., MURAYAMA, Y. and KITAURA, T.: Fractionation of BCG cells into subcellular and structural unit. *Proc. the 3rd Leprosy and Tuberculosis Conference, U. S.-Japan Cooperative Medical Science Program*, 126-150, 1968.
- 11) KOTANI, S., KATO, T., YANAGIDA, Y. and KATO, K.: Studies on antigenic polysaccharides and peptidoglycans of BCG cell walls. *Proc. the 3rd Leprosy and Tuberculosis Conference, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program*, 391-407, 1968.
- 12) YANAGIDA, et al.: in Press
- 13) HIRACHI, Y., KOTANI, S., SUGINAKA, H. and KATO, K.: Preparation of cytoplasmic membranes of *Staphylococcus aureus* FDA 209P through protoplasts made with the L-11 enzyme and a preliminary analysis of membrane antigens. *Biken J.*, **14**: 11-28, 1971.
- 14) VESTERBERG, O. and SVENSSON, H.: Isoe-

- lectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradient. *Acta Chem. Scand.*, 20 : 820-834, 1966.
- 15) ARCHIBALD, A. R., BADDILY, T. and BUCHANAN, J. G.: The ribitol teichoic acid from *Lactobacillus arabinosus* walls. Isolation and structure of ribitol glucosides. *Biochem. J.*, 81 : 124-134, 1961.
 - 16) HASH, J. H. and ROTHLAUF, M. V.: The N, O-diacethylmuramidase of *Chalaropsis* species. 1. Purification and crystallization. *J. Biol. Chem.*, 242 : 5585-5590, 1967.
 - 17) GHUYSEN, J.-M., TIPPER, D. J. and STROMINGER, J. L.: Enzymes that degrade bacterial cell walls, *Methods in Enzymology* (edited by Neufeld, E. F. and Ginsburg, V.), Vol. III : Complex carbohydrates, Academic Press, New York. 685-699, 1966.
 - 18) 松原敏明: ジフテリア菌細胞壁の化学的ならびに免疫学的性状とその酵素の溶解に関する研究. 奈医学誌, 16 : 358-376, 1965.
 - 19) 萩原文二: Proteolytic enzyme, 酵素研究法 (赤堀四郎編), 2 版, 2 : 237-246, 朝倉書店, 東京, 1958.
 - 20) 平田隆則: *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. 阪大歯学誌, 15 : 26-41, 1970.
 - 21) TIPPER, D. J. and STROMINGER, J. L.: Isolation of 4-O- β -N-acetylmuramyl-N-acetylglucosamine and 4-O- β -N, 6-O-diacetylmuramyl-N-acetylglucosamine and the structure of the cell wall polysaccharide of *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22 : 48-56, 1966.
 - 22) 奥田拓道, 藤井節郎: 血中アンモニア直接比色定量法. 最新医学, 21 : 622-627, 1966.
 - 23) KONIGSBERG, W. and HILL, R. J.: The structure of human hemoglobin. III. The sequence of amino acids in the triptic peptides of α -chain. *J. Biol. Chem.*, 237 : 2547-2561, 1962.
 - 24) TIPPER, D. J., KATZ, W., STROMINGER, J. L. and GHUYSEN, J.-M.: Substituents on the α -carboxyl group of D-glutamic acid in the peptidoglycan of several bacterial cell walls. *Biochemistry*, 6 : 921-929, 1967.
 - 25) 加藤慶二郎, 小谷尚三: 細菌細胞壁の化学構造研究法 (9), 一細胞壁 ペプチドグリカンの分子構造の決定- 蛋白質 核酸 酵素, 15(7) : 795-809, 1970.
 - 26) ASHWELL, G.: Colorimetric analysis of sugars. (edited by Colowik, S. P. and Kaplan, N. O.), *Methods in Enzymology*, vol III, pp. 73-105. Academic Press, New York. 1957.
 - 27) PARK, J. T. and JOHNSON, M. J.: A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 181 : 149-151, 1949.
 - 28) LOWRY, O. H., ROBERTS, N. R., LEINER, Y. K., WU, M.-L. and FARR, L.: The quantitative histochemistry of brain. 1. Chemical methods. *J. Biol. Chem.*, 207 : 1-16, 1954.
 - 29) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
 - 30) OUCHTERLONY, O.: *Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis*, 2nd ed., Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 1968.
 - 31) SUŠIĆ, D., ROY, C., SCHOCHER, A. J. and WATSON, R. W.: Preparation and properties of isomeric 2,4-dinitrophenyl derivatives of alpha-epsilon diaminopimelic acid. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41 : 2715-2718, 1963.
 - 32) HOARE, D. S. and WORK, E.: The stereoisomers of $\alpha\epsilon$ -diaminopimelic acid 2. Their distribution in the bacterial order *Actinomycetales* and in certain *Eubacteriales*. *Biochem. J.* 65 : 441-447, 1957.
 - 33) KABAT, E. A. and MAYER, M. M.: In *Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry*, 2nd ed., pp. 78-90, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1961.
 - 34) PELZER, H.: Mucopetidhydrolasen in *Escherichia coli* B. 1. Nachweis und Wirkungsspezifität. *Z. Naturforsch.*, 18 b : 950-956, 1963.
 - 35) PELZER, H.: Mucopetidhydrolasen in *Escherichia coli* B. 2. Quantitative Bestimmungsvorverfahren und säurechromatographische Trennung einiger Mucopetidhydrolasen. *Z. Naturforsch.*, 18 b : 956-964, 1963.
 - 36) BRICAS, E., GHUYSEN, J.-M. and DEZELEE, P.: The cell wall peptidoglycan of *Bacillus megaterium* KM. 1. Studies on the stereochemistry of α , α' -diaminopimelic acid. *Biochemistry*, 6 : 2598-2607, 1967.
 - 37) MATSUDA, T., KOTANI, S., KATO, K., KATAYAMA, T., MORIYAMA, T. and YONEDA, M.: Isolation of D-alanyl-meso- α , α' -diaminopimelic acid endopeptidase from a crude preparation in *Streptomyces* "L-3 enzyme". *Biken J.*, 11 : 145-148, 1968.