グラム陰性菌のリポ多糖類

とくにリピド部分について

堀 田 恭 子

北里研究所, 北里大学 (港区芝白金三光町)

Lipopolysaccharides of the Gram-Negative Cell Wall

About the Lipid Part

Kyoko Hotta

The Kitasato Inst., Kitasato Univ. (Sanko-cho, Shiba-shirogane, Minato-ku, Tokyo)

大腸菌, サルモネラ菌など一連のグラム陰性菌^{注1)}は, 菌体の表面にペン(鞭)毛を持ち, H抗原(ペン毛抗原)と呼ばれる抗原を持っている。細胞質を取り囲んだ細胞壁には, 大腸菌, サルモネラ菌などの類別に用いられるO抗原(菌体抗原)が存在する。これらの菌体の細胞壁からはO抗原性を持った高分子のタンパク質-リピド-多糖類複合体を得ることができる^{1)~3)}。1933年 Boivin^{4), 5)}がサルモネラの菌体から非透析性でO抗原性を持ったリピド-リポ多糖類-タンパク質複合体よりなる完全抗原^{注2)}を抽出し, これを Boivin 型抗原と名づけたことから, この研究が始められた。この複合体は生物学的に非常に興味があり, とくにその抗原性および毒素活性^{注3)}の問題は沢山の研究者により取り上げられた^{6)~11)}。Westphal と Lüderitz¹²⁾はフェノールを使用し, リポ多糖類を上述の完全抗原から分離し, このリピド部分をリピドA, および菌体または完全抗原より有機溶媒により抽出されたリピドをリピドBと命名した。

Westphal 一派は主としてリポ多糖類の構成糖を分析し, 多糖類の化学構造と抗原性の問題を解明し, すぐれた業績を多年にわたり発表している。この点に関する詳しい総説が発表されているので御参照いただきたい¹³⁾。

注 1) 細菌を分類する際, 特殊染色法を行ない, 染色されるかされないかで分類する方法がある。グラム染色法で脱色する細菌をグラム陰性菌, 脱色しないものをグラム陽性菌という。大腸菌, サルモネラ菌, 赤痢菌などのカン(桿)菌が陰性菌に属し, それぞれの抗原構造は, 菌株によりまちまちで, いずれの抗原構造を持つかで菌型分類がなされている。たとえばサルモネラ菌では, 900 種以上が知られている。

注 2) 試験管内で抗体と反応して沈殿物をつくるとともに生体に注射すれば対応する抗体をつくる抗原。

注 3) この抗原は小動物に対し致死の毒性を持ち, 白血球減少症や発熱を引き起こすなど毒素の性質を持っている。

近時細菌の細胞壁のムコペプチドの構造および生合成の研究が著しく発展しており¹⁴⁾, 同時に生物学的活性を有するリポ多糖類の化学構造, 生合成の過程, 細胞壁上での役割を知ることは非常に興味深い。

本稿ではおもにリポ多糖類より分離されたリピドAの構造と, リポ多糖類の生合成の際のリピドの役割についての研究の現状を紹介する。

1 リポ多糖類の抽出と性状

グラム陰性菌のリポ多糖類の抽出法は種々あるが, その代表的なものをあげる。

1・1・1 菌体(生のものまたはアセトン乾燥)に 0.25 N-三塩化酢酸を加え, 4°C で抽出する。この抽出液の2倍量のアルコールを加えてきた沈殿物をわずかな水に溶かし凍結乾燥する。これが Boivin 抗原^{4), 5)}と呼ばれるもので, リピド-リポ多糖類-タンパク質複合体で単一物質ではない。

1・1・2 菌体を超音波, 砂などで摩砕して得られた抽出液にフェノール(終濃度; フェノール 45: 水 55 の割合)を加え 68°C で 5~30 min 抽出する。冷却後上澄みを集め, 透折, 濃縮後 100.000 g で遠心, 得られたペレットを数回洗う。これはリポ多糖類で, O抗原性, 毒素活性を持つ^{13), 15), 16)}。

1・1・3 菌体から多糖類のみを得るためには, アルカリ抽出(0.25 N-カセイソーダ¹⁷⁾)または酢酸抽出(0.1

表-1 O抗原性を持った細菌抽出物の性状¹³⁾

	主要構成物	抗原性 (血清学的)	毒素 活性	分子量
Boivin 抗原	多糖類, リピドA タンパク質, リピドB	O-特異性	卅	数百万
リポ多糖類	多糖類, リピドA	O-特異性	卅	数百万
アルカリ抽出-多糖類	脱アセチル化された 多糖類, リピドA	O-特異性	±	200,000
酢酸抽出-多糖類	多糖類	O-特異性	—	20,000~ 30,000

N-酢酸¹⁸⁾を行なう。

1・2 性 状

表-1 にこれらの抗原の性状を示した¹³⁾。分子量数百万のリポ多糖類を酸性で加水分解すると、リピドと多糖類間の結合が切れて、分子量 2,000~3,000 のリピド A¹⁹⁾と分子量 20,000~30,000 の多糖類²⁰⁾が得られる。多糖類を酸で加水分解し、その構成糖を調べるとほとんどの O 抗原は 5~8 種類の糖よりなる。菌の種類に関係なく共通する糖は、グルコサミン、ヘプトース、グルコース、ガラクトース、2-ケト-3-デオキシオクトン酸 (KDO) で、これらの共通糖以外にマンノース、ラムノース、チベロースなどが菌の種類により構成糖として加わる。O 抗原性を失った変異株^{注 4)}より得られるリポ多糖類の収量は、野生型^{注 1)}より得られるリポ多糖類より少なく (野生型 リポ多糖類 2~3%, 変異型 リポ多糖類 <1%) 50% 以上がリピドよう物質よりなっている。構成糖も野生株の共通糖である 5 種のうちの二、三種類欠いているものが多く、野生株より得られるリポ多糖類は著しく異なる^{13), 21)}。

2 リピド A の構造

Westphal により報告されたリピド A¹²⁾ は、菌体または完全抗原からフェノール抽出により得られたリポ多糖類を 0.1 N-酢酸で加水分解して、リピド A を遊離させる。これらの構成成分は、ヘキソサミン 20%, 脂肪酸 50%, リン 7~8%, わずかなペプチドを含む。Ikawa ら^{22), 23)}は、グルコサミン、エタノールアミン、アスパラギン酸、ネクロサミン、脂肪酸を構成成分とするリピド A を分離したと報告している。Nowotny²⁴⁾ は従来使用されていたリポ多糖類からリピド A を分離させるための加水分解の方法に検討を加え、0.1 N-ギ酸による方法が、もっともすぐれていると述べている。リピド A に関する詳しい検討は、Burton, Carter¹⁹⁾により、大腸菌 O₁₁₁B₄ を使用して行なわれた。乾燥菌体を冷フェノールで抽出し、得られたリポ多糖類 (収量 4~5%) を、0.1 N-塩酸で 85°C, 30 min 加水分解後、クロロホルムで抽出し、粗リピド A を得る。クロロホルム可溶部に温アセトンを加え、沈殿を集める。このアセトンによる沈殿操作を数回繰り返す、遊離の脂肪酸を除く。このようにして得られたアセトン沈殿物をクロロホルムに溶かし、ケイ酸セライト (4:1) カラムクロマトにかけ、クロロホルム-メタノールで溶出する。クロロホルム:メタノール (9:1) で溶出される分画部分を集め、再クロマトを行なう。得られた精製リピド A は、粗物質の 94% の収量

注 4) 細菌のある性状が変化して新しい性状がある程度永続的に保持される現象を変異と呼ぶ。グラム陰性菌ではペンを喪失し、抗原性の変異を伴う。近時、血清学的に特異性抗原 (たとえば O 抗原, H 抗原) を持つものを野生型 (S 型)、それを持ったものを変異型 (R 型) といっている。

表-2 精製リピド A の分析値¹⁹⁾ (分子量 1,700)

構 成 分 (%)	脂 肪 酸 の 組 成 (%)
脂 肪 酸 60~70	ラウリン酸 8
アセチル基 9.2	ミリスチン酸 37
窒 素 1.62	β-オキシデカン酸 19
リ ン 1.83	β-オキシミリスチン酸 27
ヘキソサミン (グルコサミン) 20	パルミチン酸 極少
	未確認脂肪酸 8

で、表-2 に分析値を示した。

構成成分の分析値から明らかなように、精製リピド A は 2 分子のグルコサミン、1 分子のリン酸、3~4 個のアセチル基、5 分子の長鎖の脂肪酸よりなる。おのおのの分子の結合状態は、Na-ボロヒドリド還元やアルカリ加水分解などの結果から、アセチル化された二つのグルコサミンがグリコシド結合をしていると考えられている (図-1 参照)。

R = 長鎖の脂肪酸
図-1 リピド A の構造¹⁹⁾

リポ多糖類を温和な状態で酸加水分解し、リピド A を多糖類からはずすと、KDO が多糖類の還元末端として得られることから、リピド A はリポ多糖類内にあっては KDO のカルボニル基へグリコシド結合をしていることが¹¹⁾、ほぼ明らかとなっている。リピド側の多糖類への結合位置は、β-キシミリスチン酸またはグルコサミンの水酸基が予想されるが確証はない。

3 リピド B について

菌体または完全抗原より有機溶媒により抽出されるリピド B は^{12), 25)}、Kurokawa ら²⁶⁾により大腸菌では中性脂肪、糖脂質、リン脂質 (ホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルセリン) よりなっていることが報告されている。その後、Kaneshiro, Marr²⁷⁾の報告では、リピド B のほとんどはホスファチジルエタノールアミンで、わずかのホスファチジルセリン、遊離脂肪、エステル化された脂肪酸などが共存している。Bishop, Work²⁸⁾も同様の報告をしている。

4 リポ多糖類合成の際のリピドの役割

細胞壁リポ多糖類の生合成には多くの因子が関与して

いる。要約すると“core”リポ多糖類は、リピド A-KDO-ポリヘプトース-リン酸複合体にグルコースが取り込まれ、ついでガラクトースが取り込まれる²⁹⁾。

リポ多糖類生成の一連の研究は、変異株(たとえば、UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼを欠いた株など)により進められ、“core”リポ多糖類に特異的な O 抗原側鎖が結合して O 抗原リポ多糖類を形成していると考えられている。これらの反応に関与する酵素は Rothfield ら²⁹⁾により菌体から分離され、興味ある結果を得ている。すなわち菌体を超音波で碎き、抽出液を 12,000 g で遠心、上澄みをさらに 105,000 g で遠心する。各分画は数種の酵素活性を示すがリポ多糖類転移酵素について検討を加えている³⁰⁾。

大部分の酵素活性は、12,000 g 沈殿、12,000~105,000 g 沈殿に得られ、105,000 g 上澄みにはまったく酵素活性はみられない。ところが酵素活性のみられる 12,000 g 沈殿、105,000 g 沈殿を 10 min 加熱し、酵素活性を除き、これに 105,000 g 上澄みを加えると酵素活性が現われる。特定の構造を持つ受容体が存在すると糖の取込みがなされる。この報告^{29), 30)}はこの種の酵素が受容体から分離されて可溶性の形で取り出された最初のもので生合成の研究の大きな助けとなった。この受容体(12,000 g 沈殿)にエタノールを加え室温で 60 min 抽出し、リピドを除くと受容体としての働きがなくなる。抽出されたリピドをこの不活性の受容体に添加すると、ふたたび受容体としての働きをする。表-3 は、リピド抽出と受容体としての働きへの影響を示した³⁰⁾。

上述のフェノール抽出で得たリポ多糖類は、受容体としての活性がないが、これに 12,000 g 沈殿より抽出されたリピドを加え加熱し、除々に冷やしたものである。UDP-グルコース-¹⁴C の取込みがみられる。

このように菌体より抽出されたリピドは、リポ多糖類の生合成の際の酵素の受容体としての働きに欠くべからざるものであると同時に、精製リポ多糖類を酵素の受容体としての働きを持つようにもする。この反応はつぎの

表-3 受容体のリピド抽出が UDP-ガラクトース-リポ多糖類-ガラクトース転移反応に及ぼす影響について³⁰⁾

受 容 体	UDP-ガラクトース- ¹⁴ C の取込み (m ¹⁴ mol/10 min)	
	A	B
なし (酵素のみ, 105,000 g 上澄み)	0.07	0.04
未処理の 12,000 g 沈殿	1.04	0.60
リピド抽出された 12,000 g 沈殿	0.09	0.08
リピド抽出液	0.08	0.08
リピド抽出された 12,000 g 沈殿+リピド抽出液	0.45	0.33
リピド抽出された 12,000 g 沈殿+リピド抽出液 (加熱・徐冷)*	0.97	0.63

* 60°C, 30 min 加熱後, 25°C 2 hr 放置

表-4 リピド抽出液がリポ多糖類に及ぼす影響³⁰⁾

受 容 体	UDP-ガラクトース- ¹⁴ C の取込み (m ¹⁴ mol/10 min)
なし (酵素のみ, 105,000 g 上澄み)	0.07
未処理の 12,000 g 沈殿	0.93
リポ多糖類	0.05
リピド抽出液	0.08
リポ多糖類+リピド抽出液	0.09
リポ多糖類+リピド抽出液 (加熱・徐冷)	0.94

ように考えられる。

リピドは酵素側へ働くのではなくリポ多糖類と複合体を作り、できた複合体に酵素が働く。この菌体より抽出されたリピドをシリカゲルカラムにかけ分画を行なうと、この有効成分はホスファチジルエタノールアミンを含む画分に得られる。グラム陰性菌から得られた精製ホスファチジルエタノールアミンには、この作用があるが、合成ホスファチジルエタノールアミンにはこの作用がない。ホスファチジルコリン、オレイン酸、トリオレインなどにもこの作用はみられないが、ホスファチジルセリンにはわずかに活性がある。リポ多糖類のリピド A はエタノール室温 60 min 抽出では抽出されない。リピド B の主成分であるホスファチジルエタノールアミンがこの有効成分として必要であることは興味深い。

1965 年 Weiner ら^{31), 32)}は、O 抗原特異性を示す多糖類側鎖の酵素による生合成の過程で、リピドを含んだ中間体を分離した。UDP-ガラクトース欠損変異株の菌体を超音波で碎き、抽出液を 40,000 g で遠心、沈殿物について UDP-ガラクトース-¹⁴C, TDP-ラムノース-¹⁴C, GDP-マンノース-¹⁴C の取込みを調べ、フェノール抽出でリポ多糖類を抽出除去後、カラムクロマトにより中間体を精製した。クロロホルム-メタノール抽出物をろ紙および薄層クロマトグラフ、加水分解を行なっ