グラム陰性桿菌の線毛のアミノ酸組成, 免疫学的性状および分子量の比較

堀 内 三 吉

東京医科歯科大学医学部 微生物学教室

文京区湯島1-5-45 〒113

〔受付：9月18日, 1974年〕

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila* および *Serratia marcescens* の5菌種の線毛を精製して得た標品は電子顕微鏡による観察, 寒天ゲル電気泳動, および超速心分析による検討から, かなり純度が高いことが示された。これらの線毛のアミノ酸組成, 免疫学的性状および分子量について比較検討した。

マンノース感受性 (MS) 型である *E. coli*, *S. flexneri* および *K. pneumoniae* の線毛はアミノ酸組成がかなりよく一致していた。これらの3菌種の線毛にはアラニン, アスパラギン酸, スレオニンが多く含まれていた。また, 中性アミノ酸および酸性アミノ酸が極めて多く, 塩基性アミノ酸はわずか3~5%であった。一方, 各種動物赤血球に対して凝集性を示さない *A. hydrophila* の線毛のアミノ酸組成はグリシン, アラニンおよびグルタミン酸が多く含まれており, 塩基性アミノ酸は少なかった。これに対して, MR 型である *S. marcescens* の線毛は塩基性アミノ酸であるリジンが最も多く含まれていた。またアラニン, アスパラギン酸なども多く含まれていた。

免疫学的検討では, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. flexneri* の線毛は極めてよく類似していることが示された。しかし, *A. hydrophila* および *S. marcescens* の線毛はいずれの線毛とも異なっていた。

5種の線毛を1% SDS を含む HCl-グリシン緩衝液 (pH 2.0) 中で加熱処理して subunit に分解し, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果, いずれの線毛の subunit も分子量が約17,000であった。

線毛 (fimbriae または pili) はある種の細菌に存在する organella の1つで, 電子顕微鏡によつてのみ観察される微細な線維状の構造物であり, 細菌細胞の表面から突出しているが, 長さ, 太さおよび形の点で鞭毛とは明らかに区別される⁹⁾。線毛には1個の細胞に100~300本ある周囲性の common pili^{1), 4), 8)} と, 伝達性細胞質遺伝子 (プラスミド) によつて合成を支配され, プラスミドそれ自身および染色体の伝達に関与する性線毛^{2), 3)} がある。Common pili を有する細菌は種々の動物赤血球や酵母細胞などを凝集する。この線毛はマンノースの存在によつてその凝集が抑制される mannose-sensitive (MS) 型と抑制されない mannose-resistant (MR) 型

に分けられている⁸⁾。

現在, 線毛の存在が報告されている細菌の大多数は腸内細菌科に属している。しかし, 最近, 亀山¹⁰⁾は腸内細菌以外の菌種である *Aeromonas hydrophila* にも線毛が存在することを確認し, この菌種の線毛は周囲性の線毛でありながら, 赤血球に対する親和性を示さず, 多くの線毛菌が赤血球を凝集するなかで, 数少ない菌種の1つであることを報告した。また, Kurosaka と Horiuchi¹²⁾ は *A. hydrophila* の線毛について血清学的に検討を加え, 抗原的に他菌種の線毛と異質であることを明らかにした。

これまでに, *Escherichia coli*¹¹⁾, *Corynebacterium*

renale¹¹⁾, *Bordetella pertussis*¹⁴⁾, *Mycobacterium smegmatis*¹⁷⁾, および *Neisseria gonorrhoeae*¹⁶⁾ などの線毛が多く研究者によって詳細に研究されている。著者らは *E. coli* の線毛の精製方法に準じて、MS 型の *Shigella flexneri* と *Klebsiella pneumoniae* の線毛、MR 型の *Serratia marcescens* の線毛、および各種動物赤血球に対して凝集性を示さない *A. hydrophila* の線毛の精製方法を確立しようと試みた。さらに、これらの線毛のアミノ酸組成、および subunit の分子量についても検討を加え、これらの実験結果と免疫学的実験で得られた結果とを比較検討したので報告する。

材料と方法

使用菌株：教室保存の 5 種の線毛菌を用いた。これらの菌種名を表 1 に示した。これらのうち、*E. coli* B は鞭毛喪失変異株で、*S. marcescens* K1 は寒天培地で継代培養することにより鞭毛を消失させた状態の菌株を用いた。

表 1. 使用菌株とその性状

菌 株	線毛とその型 ^a	赤血球凝集性	鞭毛 ^b
<i>Shigella flexneri</i> 2a Sh-1	+ MS	+	—
<i>Escherichia coli</i> B	+ MS	+	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1-10	+ MS	+	—
<i>Serratia marcescens</i> K1	+ MR	+	—
<i>Aeromonas hydrophila</i> YN	+ 不明	—	+

^a マンノースによって赤血球凝集反応が阻止されるものを MS、阻止されないものを MR と表わした。

^b + あり；— なし。

培地および培養：*S. marcescens* K1 は heart infusion agar (HIA と略す、栄研化学) に、他の 4 種の線毛菌は heart infusion broth (HIB と略す、栄研化学) に 37℃ で 48 時間培養した。これらの菌種は HIA あるいは HIB で 3 回以上前培養を行い実験に供した。

免疫血清：*S. marcescens* K1 株は HIA 培地上に発育した菌苔をコンラージ棒で集め、5%ホルマリン加生理食塩液に浮遊させ、Coleman 分光光度計 (Junior II) で光学密度 0.4 (波長 660 nm) の菌液とした。他の 4 種の線毛菌は HIB の培養菌液に直接ホルマリンを 5%に加えた。これらの菌液を抗原として、常法に従ってウサギ免疫血清を作製した。

線毛の精製：*S. flexneri* 2a Sh-1, *E. coli* B, *K. pne-*

umoniae 1-10 の線毛の精製は Brinton¹⁾ の方法に従った。すなわち、HIB で 48 時間培養した菌液 10 l を連続遠心機で遠心し、沈渣を 200 ml の生理食塩液に浮遊させた。これをワーリングブレンダー (日本精機工業) の No. 4 で 3 分間攪拌して線毛を菌体から切離し、遠心分離、等電点沈殿、および塩析操作で線毛を精製した。*A. hydrophila* YN 株の線毛の精製は Kurosaka と Horiuchi¹²⁾ の方法に従った。

S. marcescens K1 株の線毛は次のように精製した。まず、100 枚の HIA 平板に培養した線毛菌をコンラージ棒で集め、200 ml の生理食塩液に浮遊させ、ワーリングブレンダーの No. 4 で 3 分間攪拌した。これを 16,000 rpm で 30 分間遠心し、上清を 2 N の HCl で pH 3.5 に調整して線毛を等電点沈殿させた。つぎにこの試料を 4,000 rpm で 15 分間遠心して沈渣を精製水に再浮遊させ、pH を 7.0 に調整し、(NH₄)₂SO₄ を 80%飽和に添加して線毛を沈殿させた。この試料を 4,000 rpm で 15 分間遠心し、沈渣を 30 ml の精製水に浮遊させたのち、精製水に対して透析して (NH₄)₂SO₄ を除き、さらに Diaflo 膜 (Amicon MX100) で全量を 5 ml に濃縮した。この試料を、セファローズ 2B (生化学工業) を充填したゲル汙過用カラム (2.1×63 cm) にいれ、0.002 M のリン酸緩衝液を 2 ml/cm²h の流速で滴下した。この溶液を 5 ml ずつ分取し、各フラクションについて波長 280 nm (日立ダブルビーム分光光度計 365 型) における吸光度を測定した。その結果、強く吸収が認められたフラクションを電子顕微鏡で観察して線毛の存在と精製を確認し、このフラクションを Diaflo 膜 (MX100) で濃縮して精製線毛原液とした。これを精製水、あるいはリン酸緩衝液に浮遊させ 4℃ で保存した。なお、線毛原液の一定量を脱塩、凍結乾燥し、さらにデシケーターに 2 日間静置して乾燥させ、重量を秤量して線毛原液中に含まれる線毛量を算出した。

電子顕微鏡による線毛の観察：線毛浮遊液と 2%リンタングステン酸カリウムを等量ずつ混合し、この溶液の 1 滴を試料として、Fukami と Adachi⁷⁾ の方法で作製したマイクログリッドにのせ、ネガティブステイニングを行なった。この標本を日立 HU-11AS 型の電子顕微鏡で観察、撮影した。

免疫学的検討：Ouchterlony スライドガラス法によって検討した。バルビタール緩衝液 (pH 8.6, 常光産業) にチメロサル (丸石産業) を 10%、精製寒天末 (Difco) を 1%に加えた寒天ゲルを支持体とした。中央の小孔には 2.5 mg/ml の線毛浮遊液、周囲の小孔には 2 倍階段

希釈した線毛菌免疫血清をそれぞれ $5\mu\text{l}$ ずつ滴し、室温で72時間反応させて沈降線を観察した。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動: 5種の線毛をその subunit に分解する目的で、SDS を作用させて線毛の subunit への分解を試みたが、分解できなかった。そこで Brinton¹⁷⁾ の方法に準じて、すなわち 2.5 mg/ml の線毛浮遊液と 2 M の HCl-グリシン緩衝液 (pH 2.0, 2% SDS) を等量ずつ混合し、 90°C で30~90分間加熱して線毛を subunit に分解した。この subunit は疎水性であるために凝集しやすく、この凝集を防ぐ目的で HCl-グリシン緩衝液中に SDS を含ませた。この溶液を 0.01 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0, 0.1% SDS) に透析し電気泳動を行った。電気泳動は Weber と Osborn¹⁸⁾ の方法に準じてゲルを作製した。泳動用試料は 0.01 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0, 1% SDS, 2% β -メルカプトエタノール) と等量混合し、室温に2時間放置後 $10\sim 20\mu\text{g}$ の試料を泳動した。また、線毛の subunit の分子量を推定するための標準たんぱく質としてリゾチーム (M. W. 14,400, 生化学工業)、卵白アルブミン (M. W. 43,000, NBC) およびウシ血清アルブミン (M. W. 66,000, NBC) を用いた。

超速心分析: *S. flexneri* の線毛浮遊液 (20 mg/ml) を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した試料と同じ条件で処理し、これを 0.02 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0, 0.1% SDS) に対して48時間透析した。この試料を合成界面セルを用いて 20°C で $55,000\text{ rpm}$ で40分間遠心し、沈降パターンを観察して試料成分の単一性を検討した。日立 UCA-1A 超速心機を用いた。

交差凝集反応: Kurosaka と Horiuchi¹²⁾ の方法に従って線毛菌免疫血清のO抗体を吸収し、抗線毛血清を作製した。この血清を2倍階段希釈し、5種の線毛菌を抗原として交差凝集反応を行った。

免疫電気泳動: 線毛抗原の類似性を検討するために、前述の Ouchterlony 法で用いた寒天ゲルと同じゲルを支持体として、各種線毛菌免疫血清の $5\mu\text{l}$ を 4 mA/cm で40分間泳動した。抗原は 2.5 mg/ml の線毛浮遊液を用いた。

紫外部吸収試験: 5種の線毛を $1.5\sim 1.7\text{ mg/ml}$ の濃度に精製水に浮遊させ、日立ダブルビーム分光光度計 (365型) を用いて紫外部吸収試験を行った。

アミノ酸分析: Spackman, Smith と Moore¹⁵⁾ の方法に従って行った。すなわち、凍結乾燥した線毛 $2\sim 7\text{ mg}$ を 6 N の塩酸 1 ml に溶かし、 5 ml のアンプルに入れてドライアイスメタノールで凍結させ、真空ポンプ

で吸引しながら封管した。これを 110°C で22時間加水分解したのち、減圧蒸留によって塩酸を除去してアミノ酸分析機 (日立 KLA-3A 型) で分析した。

成 績

線毛の精製度の検討

セファローズ 2B によるゲル浮過: *S. marcescens* の線毛の精製は等電点沈殿、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80%飽和) による分画、およびセファローズ 2B によるゲル浮過法を行った。各フラクションの紫外部 (280 nm) 吸収を図1に示す。No. 10~18 のフラクションに 280 nm の吸収が認められた。このフラクションを電子顕微鏡で観察した結果、線毛が多数認められた。しかし、280 nm の吸収が認められなかった他のフラクションでは線維状構造物は観察されなかった。

図 1. *S. marcescens* K1 株の線毛のセファローズ 2B による精製。ゲルベッド、 $2.1\times 63\text{ cm}$; 溶媒、 0.002 M リン酸緩衝液; 流速、 $2\text{ ml/cm}^2\text{ h}$; 試料容積、 3 ml 。

電子顕微鏡による観察: 5種の線毛菌から調製した線毛の電子顕微鏡像を図2に示した。線毛の長さは一様で、短いものは $30\sim 40\text{ nm}$ 、長いものは $1\sim 2\mu\text{m}$ であったが短い線毛はブレンダー処理で切断されたものと考えられる。

免疫学的検討: 5種の線毛浮遊液を抗原とし、それぞれに対応する線毛菌免疫血清と寒天ゲル沈降反応を行った結果、図3に示すような沈降像が得られた。いずれの反応系でも単一の沈降線が認められ、これらの試料が免疫学的に単一の成分から成ることを示唆している。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動: 5種の線毛を 1% SDS を含む HCl-グリシン緩衝液 (pH 2.0) 中で加熱処理して subunit に分解し、電気泳動を行ったところ図4に示したような泳動パターンを得た。これら

図 2. 精製線毛の電顕像。A, *S. flexneri* 2a Sh-1; B, *E. coli* B; C, *K. pneumoniae* 1-10; D, *A. hydrophila* YN; E, *S. marcescens* K1.

図 3. 線毛菌免疫血清と各種線毛による寒天ゲル沈降反応。中央の小孔には精製線毛 (Ag) を, 周囲の小孔には免疫血清 (Ab×1~×16) を 5 μl 添加し, 室温で72時間反応させた。A, *S. flexneri* 2a Sh-1; B, *E. coli* B; C, *K. pneumoniae* 1-10; D, *A. hydrophila* YN; E, *S. marcescens* K1.

図 4. 1% SDS を含む HCl-グリシン緩衝液 (pH 2.0) 中で加熱処理して得られた各種線毛の subunit と標準タンパク質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動。A, 標準タンパク質と *S. flexneri* 2a Sh-1 の線毛の subunit の混合試料; B, *S. flexneri* 2a Sh-1 の線毛の subunit; C, 標準タンパク質と *E. coli* B の線毛の subunit の混合試料; D, *K. pneumoniae* 1-10 の線毛の subunit; E, *S. marcescens* K1 の線毛の subunit; F, *A. hydrophila* YN の線毛の subunit; G, *S. flexneri* 2a Sh-1 の線毛を 95 C, pH 2.0 で 60分間分解した試料。

図 3.

図 4.

図 5. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動における易動度と分子量の関係。

図 6. 酸加熱処理して得られた *S. flexneri* 2a Sh-1 の線毛の subunit の超遠心パターン。左図、0 分；右図、40 分；回転速度、55,000 rpm；濃度、1 %；温度、20C，溶媒、0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.0, 0.1 % SDS)；合成界面セル使用。

のうち、A と C の 2 本のゲルは線毛の subunit と 3 種の標準たんぱく質を混合して泳動したものである。B は *S. flexneri* の線毛の subunit を泳動したもので明瞭な 1 本の band が観察された。一方、D、E、および F はそれぞれ *K. pneumoniae*, *S. marcescens* および *A. hydrophila* の線毛の subunit を泳動した結果であるが、いずれも明瞭な 1 本の main band の他に minor band が観察された。また、さきに単一の band が得られた *S. flexneri* の線毛も、95C で 60 分間強力に分解して電気泳動を行うと、図 4 の G に示すとおり band は 2 本あるいは 3 本になることが知られた。すなわち SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で得られる band の数は分解条件によつて変動するといえる。さらにこの実験から、5 種の線毛の subunit はいずれもほぼ同じ位置に main band が出現することがわかった。そこで 3 種の標準たんぱく質の分子量と易動度の比例関係から、図 5 によつてこれらの subunit の分子量を求めたところいずれも約 17,000 という結果を得た。

超遠心分析：*S. flexneri* の線毛を酸加熱処理して得

た線毛の subunit について超遠心分析を行った結果を図 6 に示す。これから明らかとなり、40 分間の観察で subunit の遠心パターンは左右対称の形を保っており、線毛試料の均一性を裏づけている。

精製線毛の比較

交差凝集反応：5 種の線毛菌で免疫して作製した抗線毛血清と各種線毛菌とで交差凝集反応を行い免疫学的に

表 2. 5 種の抗線毛血清に対する各種線毛菌株の交差凝集反応

抗線毛血清 ^a	抗原 (線毛菌株)	線毛凝集価 ^b
<i>S. flexneri</i> 2a Sh-1	<i>S. flexneri</i> 2a Sh-1	10,240
	<i>E. coli</i> B	10,240
	<i>K. pneumoniae</i> 1-10	5,120
	<i>A. hydrophila</i> YN	0
	<i>S. marcescens</i> K1	0
<i>E. coli</i> B	<i>S. flexneri</i> 2a Sh-1	5,120
	<i>E. coli</i> B	10,240
	<i>K. pneumoniae</i> 1-10	2,560
	<i>A. hydrophila</i> YN	0
	<i>S. marcescens</i> K1	0
<i>K. pneumoniae</i> 1-10	<i>S. flexneri</i> 2a Sh-1	1,280
	<i>E. coli</i> B	1,280
	<i>K. pneumoniae</i> 1-10	5,120
	<i>A. hydrophila</i> YN	0
<i>A. hydrophila</i> NY	<i>S. marcescens</i> K1	0
	<i>S. flexneri</i> 2a Sh-1	0
	<i>E. coli</i> B	0
	<i>K. pneumoniae</i> 1-10	0
<i>S. marcescens</i> K1	<i>A. hydrophila</i> YN	1,280
	<i>S. marcescens</i> K1	0
	<i>S. flexneri</i> 2a Sh-1	0
	<i>E. coli</i> B	0
	<i>K. pneumoniae</i> 1-10	0
	<i>A. hydrophila</i> YN	0
	<i>S. marcescens</i> K1	5,120

^a 線毛菌で免疫した血清を加熱死菌を用いて O 抗体を吸収した。

^b 抗血清の凝集を示した最高希釈倍数で表わした。0 は 20 倍およびそれ以上の希釈で陰性であることを示す。吸収に用いたそれぞれの菌株の加熱死菌抗原に対しては 20 倍およびそれ以上の希釈で陰性であった。

図 7. 線毛免疫血清と各種線毛の免疫電気泳動による沈降線の検出。A, *E. coli* B の免疫血清; B, *K. pneumoniae* 1-10 の免疫血清; C, *S. flexneri* 2a Sh-1 の免疫血清; D, *A. hydrophila* YN の免疫血清; E, *S. marcescens* K1 の免疫血清; 1~5 の溝に図のように各種精製線毛浮遊液を滴し、それぞれの免疫血清と反応させた。

比較した。その結果は表 2 に示すとおりで、*S. flexneri*, *E. coli*, および *K. pneumoniae* の 3 種の線毛菌はこれらの 3 種の抗線毛血清に対して明らかな交差凝集反応を示した。しかし、*A. hydrophila*, および *S. marcescens* の線毛株を抗原として反応させた場合はまったく交差凝集反応が認められなかった。また、*A. hydrophila*, あるいは *S. marcescens* の抗線毛血清はそれぞれ対応する線毛菌株とは 1,280 倍、あるいは 5,120 倍の凝集素価を示したが、他の線毛菌株に対する交差凝集反応はまったく認められなかった。

免疫電気泳動による検討: それぞれの菌種の免疫血清を泳動し、5 種の精製線毛を抗原として反応させた。その結果を図 7 と表 3 に示すが、交差凝集反応で得られた成績とかなり一致する成績が得られた。すなわち、*E. coli*, *K. pneumoniae*, および *S. flexneri* の免疫血清と

これらの菌種の精製線毛の間では交差反応が認められたが、*A. hydrophila* と *S. marcescens* の線毛抗原の間には交差反応が認められなかった。同様に *A. hydrophila*, あるいは *S. marcescens* の抗血清はそれぞれ同種の線毛抗原に対しては沈降線が認められたが、他菌種の線毛抗原に対してはまったく沈降線が観察されなかった。

紫外外部吸収の測定: 各種線毛の紫外外部吸収実験を行い、その吸収スペクトルを比較した(図 8)。*E. coli*, *S. flexneri*, および *K. pneumoniae* の 3 種の線毛はいずれも 280 nm に極大吸収が認められ、また、260~280 nm にわたる波長帯の吸収スペクトルもかなり類似したパターンを示した。*A. hydrophila* の線毛も 280 nm に極大吸収が認められた。しかし、*S. marcescens* の線毛の紫外外部吸収パターンはいずれの線毛のそれとも異なつてい

表 3. 線毛菌免疫血清と各種精製線毛の電気泳動による沈降線の検出^a

免疫血清 ^b	各種精製線毛 (抗原) ^c				
	<i>E. coli</i> B	<i>K. pneumoniae</i> 1-10	<i>S. flexneri</i> 2a Sh-1	<i>A. hydrophila</i> YN	<i>S. marcescens</i> K1
<i>E. coli</i> B	+	+	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 1-10	+	+	+	-	-
<i>S. flexneri</i> 2a Sh-1	+	+	+	-	-
<i>A. hydrophila</i> YN	-	-	-	+	-
<i>S. marcescens</i> K1	-	-	-	-	+

^a + : 沈降線が認められたもの, - : 沈降線が認められなかったもの。

^b 1280~5120凝集単位の免疫血清の 5 μ l を 4 mA/cm で40分間泳動した。

^c 抗原は 2.5 mg/ml の精製線毛を 0.2~0.3 ml 用いた。

図 8. 精製線毛の紫外外部吸収スペクトル。

A. — *E. coli*, *S. flexneri*, --- *K. pneumoniae*
B. — *A. hydrophila*, *S. marcescens*

た。

アミノ酸組成の比較：これらの線毛のアミノ酸分析を試み、その組成を比較した。表4はトリプトファンとシステイン以外のアミノ酸のモル%を示した成績である。また、図9はその成績を図式化したものである。MS型である *E. coli*, *S. flexneri* および *K. pneumoniae* の

表 4. 線毛のアミノ酸組成^a

Amino acids	<i>E. coli</i> B	<i>S. flexneri</i> 2 a Sh-1	<i>K. pneumoniae</i> 1-10	<i>A. hydrophila</i> YN	<i>S. marcescens</i> K1
Asp	12.5	14.1	14.4	8.9	11.8
Thr	12.0	12.8	14.7	7.7	9.0
Ser	6.0	5.1	6.8	7.9	4.5
Glu	8.3	7.5	6.4	9.8	6.9
Pro	1.4	0.8	1.4	7.4	3.9
Gly	10.9	9.8	10.1	15.0	9.6
Ala	21.2	18.8	20.4	12.7	11.5
Val	9.3	8.9	8.7	8.1	5.7
Met	trace	trace	trace	trace	trace
Ile	2.7	4.0	3.9	4.5	2.9
Leu	6.6	6.6	6.0	7.7	2.8
Tyr	0.8	1.7	1.2	0.2	3.4
Phe	3.4	4.3	4.0	5.0	3.4
Lys	1.8	2.6	1.5	4.7	16.1
His	1.4	0.5	0.6	0.2	1.6
Arg	1.6	2.3	1.1	trace	6.1
(NH ₃)	(ND) ^b	(6.7)	(9.3)	(11.0)	(7.7)

^a 凍結乾燥した精製線毛を 6N の塩酸に溶かし、110 C で22時間加水分解し、減圧蒸留によって塩酸を除去し、アミノ酸分析機で分析した。表中の数字は各アミノ酸のモル%を表わす。Trp, Cys は定量しなかった。

^b 定量しなかった。

図 9. 5 種の線毛のアミノ酸組成。A, 実線; *S. flexneri* 2a Sh-1, 点線; *E. coli* B; B, *K. pneumoniae* 1-10; C, *A. hydrophila* YN; D, *S. marcescens* K1.

線毛のアミノ酸組成のモル%の図形はよく似ている。しかし、*A. hydrophila* あるいは *S. marcescens* の図形はいずれとも異なっている。

これらの線毛のアミノ酸のモル%を比較してみると、MS 型線毛はアラニンがもつとも多く、約20%に含まれており、つぎにアスパラギン酸、スレオニンが比較的多く含まれている。*A. hydrophila* の線毛はグリシンおよびアラニンが多く含まれており、また、プロリンが MS 型線毛の約5倍量含まれていた。*S. marcescens* の線毛はリジンがもつとも多く、これは MS 型線毛のほぼ10倍であり、また、アラニン、アスパラギン酸なども多く含まれていた。さらに塩基性アミノ酸について検討してみると、MS 型線毛では塩基性アミノ酸がわずか3~5%にすぎなかったが、*S. marcescens* の線毛では約24%とかなり多く含まれていた。

考 察

1950年、Houwink と van Iterson⁹⁾ によつて、*E.*

coli の菌体表面に鞭毛とは明らかに異なる周囲性の線維状構造物がはじめて観察され、その後このような構造物は *Shigella*⁴⁾, *Salmonella*⁵⁾, *Klebsiella*⁶⁾, *Proteus*⁵⁾, *Serratia*⁸⁾ などの菌種にも存在することが知られた。これらの線毛をもつ細菌と動物赤血球を混合すると、赤血球の著明な凝集が観察される。しかし、最近報告された *A. hydrophila*¹⁰⁾ の線毛は動物赤血球に対して凝集性を示さなかった。著者らはこの *A. hydrophila* の線毛を含めて、*S. flexneri*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* の線毛の精製を企画し、その方法を確立するとともにこれらの線毛について比較検討した。

各種線毛菌から得た線毛の純度を検討するために、電子顕微鏡によつて観察した。その結果、形態的に線毛以外の構造物は混在していないことが確認された。また、ゲル内沈降反応で得られた鮮明な1本の沈降線からこれらの試料は純度の高い線毛標品であることが推定された。さらに *S. flexneri* の線毛においては超遠心分析の結果からも試料の均一性が証明された。

しかし5種の線毛試料が強い紫外部吸収を示したことから、これらの試料中に核酸が含まれる可能性も否定できない。そこでこの点を検討するために、Warburg と Christian¹³⁾の方法に従って280 nmの吸収対260 nmの吸収の比を算出したところ、3種のMS型線毛では1.3~1.8であった。これは仮に核酸が含まれていたとしてもその量は全量の1.5%以下と考えられる。また、*A. hydrophila* および *S. marcescens* でもこの比が1.1~1.2であったので核酸の含有量は2.5%以下と考えられる。本研究で検討した線毛はかなり精製されていることが示唆された。

これらの線毛を1% SDSを含むHCl-グリシン緩衝液(pH 2.0)中で加熱処理してsubunitにまで分解し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、*S. flexneri*の線毛由来の試料では明瞭な1本のbandのみが認められた。これに対し、他の菌種の試料では明瞭な1本のmain bandの他にminor bandが観察された。しかし、*S. flexneri*の線毛も強力に分解するとminor bandが現われること、およびゲル内沈降反応ですべての線毛が1本の沈降線を形成したことを考慮すれば、これらの試料で見られたminor bandは線毛のsubunitがさらに部分的に分解されて形成されたものと考えてよいであろう。さらに5種の線毛のsubunitのmain bandの易動度がほぼ等しかったことは、これらの線毛のsubunitの分子量がほぼ同じであることを意味している。計算の結果、その分子量は約17,000と推定されたが、この数値はBrinton¹⁾らが*E. coli* K-12株の線毛のsubunitについて算出した16,600という数値にほぼ一致している。

つぎにこれらの精製線毛を免疫学的、物理化学的に比較検討した結果、これらの線毛はMS型、MR型、*A.*

*hydrophila*型の3種のパターンに整理できる成績が得られた。すなわち、5種の線毛菌の交差凝集反応、および、寒天ゲル免疫電気泳動法などの免疫学的実験の結果MS型線毛では明らかな交差反応が認められた。これに対してMR型である*S. marcescens*、あるいは*A. hydrophila*の線毛ではともに他の菌の線毛と交差反応は認められなかった。また、紫外部吸収スペクトルの比較でも、MS型の線毛は3種とも類似したパターンを示したが、MR型の線毛は異なるパターンを示した。

このように、5種の線毛の抗原性あるいは紫外部吸収スペクトルの違いは線毛を構成するタンパク質の分子構成、およびそのアミノ酸組成の違いに密接に関連しているものと推定されたので、これらの線毛のアミノ酸分析を行い、それぞれ比較検討した。その結果、3種のMS型線毛のアミノ酸組成はよく一致することが判明した。一方*A. hydrophila*の線毛のアミノ酸組成はMS型線毛ともMR型線毛とも異なっていた。*S. marcescens*の線毛ではリジンがMS型線毛に比べて約10倍量、*A. hydrophila*に比べて3倍量多く含まれていることが特徴的であった。さらに、MS型線毛では塩基性アミノ酸はわずか数%にすぎなかったが、MR型線毛は塩基性アミノ酸の含有量が高く、約24%であった。これらのことがMS型線毛とMR型線毛のマンノースに対する反応性、紫外部吸収パターンおよび抗原性の差異に密接に関連しているものと思われる。

以上の成績を表5にまとめた。5種の線毛の形態および分子量にはほとんど差が認められなかった。しかし、アミノ酸組成、免疫学的性状、および紫外部吸収スペクトルの成績は、3種のMS型線毛は極めて類似していたが、*S. marcescens*および*A. hydrophila*の線毛はそれぞれ異なっていることが知られた。今後、さらに他

表 5. 5種の線毛の比較

菌 種	線毛の形態 ^a	Subunit ^b の分子量	マンノースに ^c 対する感受性	主なアミノ酸	免疫学的性状	紫外部吸収 スペクトル
<i>S. flexneri</i> 2a Sh-1	1型 ^a	17,000	MS	Ala, Asp, Thr	交差反応	類似
<i>E. coli</i> B	1型	17,000	MS	Ala, Asp, Thr	交差反応	類似
<i>K. pneumoniae</i> 1-10	1型	17,000	MS	Ala, Asp, Thr	交差反応	類似
<i>A. hydrophila</i> YN	1型	17,000	(MR) ^d	Gly, Ala, Glu	特異的	やや異なる
<i>S. marcescens</i> K1	1型	17,000	MR	Lys, Asp, Ala	特異的	全く異なる

^a Brinton¹⁾の分類による。

^b SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定。

^c 赤血球凝集反応がマンノースによって阻止されるものをMS、阻止されないものをMRとした。

^d *A. hydrophila*の線毛菌は動物赤血球と凝集しないため、マンノースに対する感受性は不明であるが、カルミン色素との凝集反応はマンノースで抑制されないため、MR型に属すると考えられる。

の線毛について同様の検討を試みる事が望まれる。

この論文を終るに当り、御懇篤な御指導を戴き、また御校閲の労を賜った中谷林太郎教授、ならびに御指導を賜った橋本雅一前助教授に心から御礼申し上げます。同時に御助言と御協力をいただいた谷口博一助教授、寺脇良郎助教授、美譽志 康助教授に厚く感謝致します。また超遠心分析実験に関し御指導御協力をいただいた理化学研究所松山 晃博士、アミノ酸分析および紫外部吸収実験に関し、御助言と御協力をいただいた永井 裕教授、ならびに森永乳業中央研究所水口建治氏に感謝致します。また電子顕微鏡の撮影に際して御指導をいただいた中央電顕室宮本博泰氏に感謝致します。

文 献

- 1) Brinton, C. C., Jr. (1965): Trans. N. Y. Acad. Sci., ser 2, **27**, 1003-1054.
- 2) Brinton, C. C., Jr., Gemski, P., and Carnahan, J. (1964): Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **52**, 776-783.
- 3) Crawford, E. M., and Gesteland, R. F. (1964): Virology, **22**, 165-167.
- 4) Duguid, J. P., and Gillies, R. R. (1957): J. Pathol. Bacteriol., **74**, 397-411.
- 5) Duguid, J. P., and Gillies, R. R. (1958): J. Pathol. Bacteriol., **75**, 519-520.
- 6) Duguid, J. P., and Gillies, R. R. (1959): J. Gen. Microbiol., **21**, 271-286.
- 7) Fukami, A., and Adachi, K. (1965): J. Electron Microscop., **14**, 112-118.
- 8) 橋本雅一 (1965): 医学のあゆみ, **54**, 577-581, 641-648.
- 9) Houwink, A. L., and van Iterson, W. (1959): Biochim. Biophys. Acta., **5**, 10-44.
- 10) 亀山佳浩 (1970): お茶の水医誌, **18**, 131-140.
- 11) Kumazawa, N., and Yanagawa, R. (1973): Jap. J. Microbiol., **17**, 13-19.
- 12) Kurosaka, R., and Horiuchi, S. (1974): Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., **21**, 7-23.
- 13) Layne, E. (1957): Protein Estimation by Ultraviolet Absorption, p. 451-454, In Calowick, S. P., and Kaplan, O. N. (eds), Methods in Enzymology, III. Academic Press Inc., New York.
- 14) 佐藤勇治, 新井秀雄 (1972): 蛋白質, 核酸, 酵素, **17**, 139-149.
- 15) Spackman, D. H., Stein, W. H., and Moore, S. (1958): Analy. Chem., **30**, 1190-1206.
- 16) Swanson, J., Kraus, S. J., and Gotschlich, E. C. (1971): J. Exp. Med., **134**, 886-906.
- 17) 徳永 徹, 水口康雄, 須賀清子 (1973): 日細菌誌, **28**, 461.
- 18) Weber, [K., and Osborn, M. (1969): J. Biol. Chem., **244**, 4406-4412.

Comparison of Amino Acid Composition, Immunological Properties, and Molecular Weight of Fimbriae of Gram-Negative Bacteria

Sankichi HORIUCHI

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tokyo
Medical and Dental University, Tokyo

The fimbriae of the genera *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, and *Serratia* were purified. Their purities were proved by electron microscopy, immunodiffusion, and SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The purified fimbriae were used to determine the molecular weight of the fimbrial subunits, and the amino acid composition and immunological properties of the fimbriae.

The mannose-sensitive (MS-type) fimbriae of *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* had some similarities in amino acid composition, containing more alanine, aspartic acid, and threonine. In them, neutral and acidic amino acids were abundant, but the molar percentage of basic amino acids ranged from 3 to 5. The fimbriae of *Aeromonas hydrophila* contained more glycine, alanine, and glutamic acid than those of any other organism. In contrast, the mannose-resistant type fimbriae of *Serratia marcescens* contained more lysine, which is a basic amino acid, aspartic acid, and alanine than those of any other organism. The molar percentage of basic amino acids was about 24. These results indicated that there was a marked difference in the characters of the fimbriae between *Serratia* and any others species.

The MS-type fimbriae of the 3 species also shared remarkable similarity in immunological properties, but those of the other 2 species differed a little from each other.

The molecular weights of the subunits of the fimbriae of all the bacterial species studied were estimated to be about 17,000 by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.