カルボキシル基修飾 β -ラクトグロブリンの静菌作用 ——菌体内の tRNA の塩基組成に及ぼす影響——

宮 辺 豊 紀^{*,**}, 植 田 和 代^{*}, 延 岡 綾 乃^{*}

^{*} 香川大学農学部食品学科

^{**} 現在: 自宅

Antibacterial Property of Carboxyl Residue-Modified β -Lactoglobulin ——Effect of Modified Protein on Base Composition of tRNA in Bacteria Body

Toyoki MIYABE^{*,**}, Kazuyo UEDA^{*} and Ayano NOBEOKA^{*}

^{*}Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Kida-gun, Kagawa, 761-07

^{**}Present address: Omachi, Mure-cho, Kida-gun, Kagawa, 761-01

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 39, 295~302 (1986)

1) Antibacterial property of modified β -lactoglobulin (β lg) and modified α -lactalbumin (α la) in which carboxyl, amino, indol and guanidyl residues were blocked, was studied using *Streptococcus lactis* and *Str. pyogenes*. Modified proteins added to a culture of milk serum protein-free sterilized whey were 0.7% as protein concentration. Carboxyl residue-modified proteins (COOH-m β lg or COOH-m α la) showed the strongest inhibitory effect to microbial growth. Other amino acid residues-modified proteins did not show inhibitory effects. Unmodified β lg was somewhat effective but unmodified α la was ineffective for both bacteria.

2) Antibacterial property of COOH-m β lg and COOH-m α la was stronger for *Str. pyogenes* than for *Str. lactis*.

3) The effect of COOH-m β lg on base composition of tRNA in the body of *Str. lactis* was studied by ion-exchange chromatography of Dowex 1 $\times$ 2 Cl⁻ type. Addition of COOH-m β lg (0.7% as protein concentration) to a culture of *Str. lactis* gave a great change of base composition of uridylic acid and guanidylic acid. The ratio of purine/pyrimidine was raised.

4) By the addition of this modified protein, the intensity of fluorescence of the bacteria body was decreased: this phenomenon seemed to be due to the association between COOH-m β lg and the bacteria body. Ultraviolet absorption spectra of tRNA were also changed.

5) The inhibitory effect of COOH-m β lg on microbial growth was presumed to be due to that the disclosed or the free amino residue of modified proteins was associated by ionic bond with carboxyl residue of protein in bacteria membrane and this complex prevented a transport activity of bacteria.

(Received June 25, 1985)

牛乳の加熱殺菌や無菌充填など高度に技術の発達した先進国は別として、冷蔵・殺菌の設備がなく、生乳を直接、飲用する発展途上国において、人体に無害な生化学的静菌・抗菌物質が生乳の保存のために使用されるようになれば食品衛生的見地からみて有意義なことである。また、生乳で仔ウシや仔ブタを飼育する際に使用しても下痢の防止に役立つ。古く生乳の自己殺菌作用 (germicide action) とよばれた時期に、佐々木ら¹⁾の報告があ

るが、わが国ではあまり研究報告はみられない。国外にはかなり報告もあり、最近、Reiter²⁾や梅本³⁾の総説がある。これによると、現在、生乳中の抗微生物活性物質には12種類があり、特異的なものとして、免疫グロブリン、リンパ球、体細胞、補体および免疫グロブリン、非特異的なものとして、乳汁リゾチーム、ラクトフェリン、ラクトパーオキシターゼ、 β -リジン、乳汁アグルチニン、プロパージン、コングルチン、ビタミン B₁₂ およびヨウ酸結合タンパク質などが挙げられている。

著者らは、 β -ラクトグロブリン (β lg) および α -ラク

^{*} 〒761-07 香川県木田郡三木町池戸

^{**} 現在: 〒761-01 香川県木田郡牟礼町大町 670-9

トアルブミン (α la) が *Streptococcus lactis* (以下 *Str. lactis*) および *Streptococcus pyogenes* (以下 *Str. pyogenes*) に対して静菌作用があり、さらにタンパク質のポリペプチド鎖の側鎖Rのうち、水素結合とイオン結合に関係のあるアミノ基、カルボキシル基、グアニジル基、インドール基を化学修飾した修飾 β lg および修飾 α la のこれらの菌に対する静菌作用を調べた結果、カルボキシル基修飾 β lg は両菌に対して、カルボキシル基修飾 α la は、*Str. pyogenes* に対して顕著な静菌作用があるという新しい事実を見いだした。本研究ではカルボキシル基修飾 β lg の *Str. lactis* に対する静菌作用を中心に、さらに研究を進め、菌体と修飾 β lg との相互作用による蛍光スペクトルおよび菌体内の tRNA の紫外線吸収スペクトルの変化、tRNA の塩基組成の変化などについて調べ、興味ある結果を得たので報告する。

実験方法

1. β -ラクトグロブリン・ α -ラクトアルブミンの分離精製と純度の検定

供試乳は高松市内の某乳業会社のホルスタイン種約 300 頭の混合生乳を用いた。遠心分離した脱脂乳のカゼインを pH 4.6 の等電点法によって沈殿させ、5°C で一昼夜放置後、3,000rpm、10 分間遠心して除去し、上澄のホエーを得た。このホエーを用いて、Aschaffenburg ら⁴⁾⁵⁾の方法によって、 β lg および α la を分離精製した。 β lg と α la の純度の検定は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動⁶⁾と超遠心分析⁷⁾によった。

電気泳動は、ゲル用試薬として、トリス、TEMED、アクリルアミド、BIS、リボフラビン、槽用緩衝液用試薬として、グリシン、トリス、過硫酸アンモニウムを用いた。泳動条件は 200~300 V、3 mA/本、泳動時間約 120 分。ゲルはアミドブラック 10B で染色し、7% 酢酸で脱色した。

超遠心分析 (日立 55P72 型) 用の試料として、 β lg 15 mg を 0.8% 塩化ナトリウム溶液 1.5 ml に溶解、 α la 15 mg を 0.01 M イミダゾール・塩酸緩衝液 (pH 7.1) 1.5 ml に溶解したものを用いた。超遠心は、室温で 60,000rpm、144 分間回転させ、24 分ごとに写真を撮影し、沈降定数 S_0 、 S_{20w} を求めた。

2. タンパク質の化学修飾^{8)~10)}

1) カルボキシル基の修飾 タンパク質 (β lg もしくは α la) 300 mg を冷メタノール中に懸濁し、これに濃塩酸を加えて塩酸濃度を 0.1 N とし、25°C で 16~96 時間保った後、多量の氷冷水で希釈して反応を止めた。過剰の酸とメタノールは、0.001 N 塩酸で透析して除いた。透析後、凍結乾燥した。反応時間を変えることによって、タンパク質の修飾率を変えた。修飾率は酸・アル

カリ滴定法によって求めた。すなわち、修飾タンパク質 5~25 mg を水 10 ml に溶解し、フェノールフタレインを指示薬として、0.01 N カセイソーダ溶液で滴定した。

2) アミノ基の修飾 10% 濃度のタンパク質 (β lg, α la) 試料に等容量の飽和酢酸ナトリウム溶液を加えて、氷浴で冷却し、これに無水酢酸を 0°C で 1 時間のうちに 5 回に分けて加えた。この試薬の添加量は、タンパク質溶液と等容量である。反応処理後、透析して凍結乾燥した。無水酢酸の添加量を変えて修飾率を変えた。修飾率はニンヒドリン反応によって求めた。すなわち、修飾タンパク質 0.2 mg/ml の試料を常法により、クエン酸緩衝液、ニンヒドリン溶液、シアン化カリ溶液の一定量を加えて、15 分間煮沸し、60% アルコール溶液を少量加えて発色させ、570 nm の吸光度を測定した。

3) グアニジル基 (アルギニン) の修飾 タンパク質 (β lg, α la) 300 mg と同量の 1, 2-シクロヘキサジオンを 100 ml の水に溶解し、これにトリメチルアミン溶液を加えて、pH 11 とした。この反応液を室温で暗所に 10~43 時間放置後、透析して凍結乾燥した。反応時間を変えて修飾率を変えた。修飾率は坂口反応¹¹⁾によって求めた。0.5~2.5 mg/ml の濃度の修飾タンパク質溶液 5 ml に 0.1% ナフトール溶液と NaOBr 溶液を加えて発色させ、500 nm の吸光度を測定した。

4) インドール基 (トリプトファン) の修飾 タンパク質 (β lg, α la) 0.35 g を緩衝液 200 ml 溶解し、これに 0.01 M N-ブromosuccinimide を 0.4 ml 宛、搅拌しながら添加、30 秒後、そのつど、吸光度を測定した。吸光度が一定になるまで反応させた。反応処理後、透析して凍結乾燥した。緩衝液として 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 2.82)、リン酸緩衝液 (pH 4.80)、リン酸緩衝液 (pH 6.91) を用い、緩衝液の pH を変えることにより修飾率を変えた。

5) 修飾率の求め方 吸光度差をトリプトファンの分子吸光係数 5,500 で割り、その商に経験的ファクター 1.31 を乗じて酸化されたトリプトファンのモル濃度を求めた。この値をタンパク質濃度で割り、タンパク質 1 モル中の酸化トリプトファンのモル濃度を求めた。ただし、 β lg および α la の分子量は、それぞれ 18,000 および 16,000 とし、タンパク質 1 モル中に含まれるトリプトファンは 2.0 モルおよび 5.3 モルとした。

3. 細菌抑制試験の使用菌と培地の調製

細菌培地の調製や接種の操作は、すべて綿栓付乾熱滅菌試験管を使用し、無菌箱中で無菌的に行なった。

1) 使用菌 *Str. pyogenes* No. J17A4 および *Str. lactis* を使用した。

2) 使用培地 標準寒天培地 (*Str. pyogenes* の培養および平面培養用) の成分組成 (%) は、酵母エキス

0.25, ペプトン 0.5, ブドウ糖 0.1, 寒天 1.5 (pH 7.1 $\pm$ 0.1)。BCP 添加標準寒天培地 (*Str. lactis* の平面培養用) の成分組成 (%) は、酵母エキス 0.25, ペプトン 0.5, ブドウ糖 0.1, 寒天 1.5, BCP 0.005。

3) リトマス乳清培地 (*Str. lactis* の培養用) の調製 脱脂乳に等容の水を加え、40~50°C に温め、希塩酸を滴下してカゼインを凝固させ、これを濾過した濾液を Na_2CO_3 溶液でリトマスを指示薬として中和させ、1時間蒸気殺菌後、再び濾過し、リトマス液を2% 加えて紫色とした。

4) 乳清タンパク質除去殺菌乳清の調製 生乳を遠心脱脂して得た脱脂乳 100 ml に1% レニン溶液 (Sigma 社レニン使用) 2.8 ml を加え、40°C, pH 6.3 の条件で20分間作用させ、カゼインを凝固させた。これを濾過し、カゼインを除去して乳清を得た。この乳清をさらに100°C, 15分間加熱して乳清タンパク質を凝固させ、10,000 rpm, 20分間遠心後、吸引濾過して乳清タンパク質を除去した。得られた乳清タンパク質除去乳清を pH 7.0 に調節し、オートクレーブで120°C, 30分間殺菌した。

5) スターターの調製 乳清タンパク質除去殺菌乳清を試験管に5 ml とり、前記培地で培養した菌の1白金耳を接種し、37°C, 24時間培養した。この培養液を乳清タンパク質除去殺菌乳清 10 ml に対して1% 容接種し、37°C, 24時間培養してスターターとした。

4. 各種アミノ酸残基修飾タンパク質の細菌抑制試験 乳清タンパク質除去殺菌乳清 5 ml を試験管にとり、これにカルボキシル基、アミノ基、インドール基、グアニジル基の各種アミノ酸残基を化学修飾した修飾 β lg および修飾 α la をおのおの 35 mg (タンパク質濃度として0.7%) 添加し、これにスターター 0.5% 容を加えて、37°C, 8時間培養した。培養後、滅菌生理的食塩水で適切な濃度に希釈した。この希釈培養液 1 ml を滅菌シャーレに移し、あらかじめ殺菌しかつ 43~45°C に保温した培地を流しこんだ。希釈は2段階とし、1希釈につき、2枚の平板を使用した。*Str. pyogenes* は重層培養とした。37°C, 48時間 ($\pm$ 3時間) 培養し、集落数を算出した。平均集落数に希釈倍数を乗じた数値を対数値で表わした。

5. カルボキシル基修飾タンパク質の細菌抑制試験

乳清タンパク質除去殺菌乳清 5 ml に対して、未修飾 β lg, 未修飾 α la およびカルボキシル基修飾 β lg, カルボキシル基修飾 α la をそれぞれ 5, 10, 20, 35 mg (タンパク質濃度として, 0.1, 0.2, 0.4, 0.7%) を添加した。これにスターターを0.5% 容加え、37°C, 8時間培養した。その他の操作は4項と同じ。

6. 菌体の tRNA の分離

乳清タンパク質除去殺菌乳清 500 ml に *Str. lactis* のスターターを1% 容接種し、これに未修飾 β lg またはカルボキシル基修飾 β lg をそれぞれ 3.5 g (タンパク質濃度として0.7%) を加え、37°C で24時間培養した。*Str. lactis* の菌体からの tRNA の分離は、Schmidt-Thanhauser-Schneider変法 (STS 変法)^{12)~14)} によった。菌体 50 mg を0.05 M を含む 0.05 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) 1 ml に懸濁し、これに10% トリクロール酢酸 1 ml を加え、20分間氷冷後、遠心分離した。この上澄液に冷トリクロール酢酸を2 ml 加えてガラス棒で磨砕した。氷冷後、エチルエーテル 3 ml を加え、50°C に保温して遠心し、得られた沈殿物を数回、エチルエーテルで洗浄した。この沈殿物に0.3 N カセイカリ溶液 2 ml を加え、37°C, 18時間加水分解した。これに6 N 塩酸 0.1 ml と60% PCA (過塩素酸) 0.2 ml を加え、遠心して得た沈殿物に冷5% PCA 1.7 ml を加えて、再び遠心し、上澄液を合わせて tRNA の画分を得た。

7. 菌体の tRNA の塩基的分析

tRNA の画分に0.3 N カセイカリ溶液 2 ml を加え、37°C, 18時間加水分解した。水解後、5% PCA を微量加え、pH 8.0 に調節した。これを10分間氷冷し、遠心して得た上澄液 0.05 ml をイオン交換カラムクロマトグラフィーの試料とした。樹脂 Dowex 1 $\times$ 2 Cl⁻ 型 (200~400 メッシュ) を用い、カラム 0.3 $\times$ 15 cm, 溶出液として0.004 N 塩酸の40 ml と0.1 M 塩化ナトリウムを含む0.01 N 塩酸の20 ml を用いて、1滴当たり40秒の速度で溶出した。

8. 分光的分析

1) 蛍光スペクトル 乳清タンパク質除去殺菌乳清 5 ml に、*Str. lactis* のスターターを1% 容接種し、未修飾 β lg またはカルボキシル基修飾 β lg をおのおの 35 mg (タンパク質濃度として0.7%) 添加し、37°C で24時間培養 (対照は菌体のみ培養) して試料とした。これらのタンパク質のみ (培養しないもの) の試料も用いた。これらの各試料は、日立 MPF-4 型蛍光分光光度計 (励起波長 285 nm) を用い、波長 250~450 nm の蛍光強度を測定した。

2) tRNA の紫外線吸収スペクトル 前記 (実験方法6項) と同じ方式で培養した *Str. lactis* の菌体から分離した tRNA を5% PCA に溶解し、波長 220~300 nm の吸光度を測定した。

実験結果

1. β -ラクトグロブリン・ α -ラクトアルブミンの純度の検定

生乳より分離精製した β lg および α la は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、単一バンドが得られた。 β lg の移動度は Rf 0.13, α la 0.35 であった。また、超遠心分析によって、沈降定数を測定した結果、 β lg 2.64S, α la 1.78S であった。超遠心によるシュリーレン図形も単一ピークを示し、両タンパク質ともに純粋であることが確かめられた。

2. 各種アミノ酸残基を修飾した β -ラクトグロブリン・ α -ラクトアルブミンの静菌力試験

β lg および α la のポリペプチド鎖の側鎖Rのうち、イオン結合および水素結合に関係のあるアミノ酸残基、すなわちカルボキシル基、アミノ基、インドール基、グアニジル基を化学修飾した。この修飾 β lg および修飾 α la の *Str. lactis* および *Str. pyogenes* に対する静菌力について比較検討した結果は Table 1 に示した。これら修飾タンパク質の添加量は、乳清タンパク質除去殺菌乳清に対して 0.7% である。この結果のとおり、カルボキシル基修飾 β lg およびカルボキシル基修飾 α la だけが顕著に静菌力があった。カルボキシル基以外のアミノ酸残基（アミノ基、インドール基、グアニジル基）を化学修飾した修飾 β lg および修飾 α la は、修飾率を高くしても静菌力は認められなかった。ただし、インドール基を修飾した修飾 β lg と修飾 α la のだけは、*Str. lactis* に対してわずかに静菌力を示した。

また、カルボキシル基修飾 β lg は、*Str. lactis* および *Str. pyogenes* の両菌に対して顕著な静菌力を示したが、

カルボキシル基修飾 α la は、*Str. pyogenes* に対してのみ顕著な静菌力を示した。*Str. lactis* に対してはあまり静菌力を示さなかった。カルボキシル基の修飾率は、他のアミノ酸残基の修飾率に比べて小さかったにもかかわらず、静菌作用は顕著であった。カルボキシル基の修飾率は、約 12~48%、アミノ基、インドール基、グアニジル基の修飾率は、約 62~90% である。未修飾タンパク質では、 β lg だけがわずかに静菌力があった。

3. カルボキシル基修飾 β -ラクトグロブリン・ α -ラクトアルブミンの静菌力試験

カルボキシル基修飾タンパク質のタンパク質濃度および修飾率と *Str. lactis* および *Str. pyogenes* に対する静菌力との関係について試験した結果は、Fig. 1 のとおりである。乳清タンパク質除去殺菌乳清に加えた修飾タンパク質の濃度は 0~0.7%、修飾率は、カルボキシル基修飾 β lg が 12.2% と 34.4%、カルボキシル基修飾 α la が 33.3% と 42.1% である。

未修飾 β lg は、*Str. lactis* および *Str. pyogenes* の両菌に対してわずかに静菌力があったが、未修飾 α la の静菌作用はなく、タンパク質濃度を 0.2% 以上に増加すると、細菌数がかえって増加した。カルボキシル基修飾タンパク質は、*Str. lactis* に対してよりも *Str. pyogenes* に対して静菌力が大であった。修飾 β lg および修飾 α la の *Str. pyogenes* に対する静菌作用は、タンパク質濃度 0.4% 以上で著しく大となり、修飾 β lg の *Str. lactis* に対する静菌作用は、タンパク質濃度 0.6% 以上で著しく大となった。修飾 α la の *Str. lactis* に対する静菌力はあまり強くなかった。また、修飾タンパク質の修飾率は、高くなるほど静菌力も大となった。このことは修飾タンパク質のカルボキシル基修飾が細菌に対する生育抑

Table 1. Antibacterial property of modified β -lactoglobulin and modified α -lactalbumin in which some aminoic acid residues were blocked.

Modified amino acid residues	β -Lactoglobulin		Modified amino acid residues	α -Lactalbumin	
	<i>Str. lactis</i>	<i>Str. pyogenes</i>		<i>Str. lactis</i>	<i>Str. pyogenes</i>
Carboxyl, {12.2% 34.4%	+++	+++	Carboxyl, {25.0% 48.2%	+	+++
Amino, 79.8%	—	—	Amino, 85.5%	—	—
Indol, 89.7%	+	—	Indol, 79.0%	+	—
Guanidyl, 61.8%	—	+	Guanidyl, 86.5%	—	—
Unmodified	+	+	Unmodified	—	—

Str. lactis, *Streptococcus lactis*; *Str. pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*.

Antibacterial property: +++ strong; + somewhat effective; — ineffective.

Modified proteins (0.7% as protein concentration) were individually added to 5 ml of milk serum protein-free sterilized whey and activated starter (0.5%) of bacteria was inoculated, after which it was cultivated at 37°C for 8 hours. The culture was diluted with a sterile, physiological saline and grown at 37°C for 48 hours by a plate culture.

制と密接な関係があることを示唆する。つまり、修飾タンパク質の静菌作用は、カルボキシル基の化学修飾によって露出したアミノ基が、細菌膜のタンパク質のカルボキシル基とイオン結合し、細菌の能動輸送を阻害することが原因であると推察される。

4. *Str. lactis* 菌体の tRNA の塩基組成に及ぼすカルボキシル基修飾 β -ラクトグロブリンの影響

乳清タンパク質除去殺菌乳清に *Str. lactis* のみ培養（タンパク質未添加）した菌体および未修飾 β lg、カルボキシル基修飾 β lg（タンパク質濃度として 0.7%）を加えて培養した菌体から tRNA を分離した。この菌体内の tRNA の塩基成分の分画は、樹脂 Dowex 1 $\times$ 2 Cl⁻型を用いたイオン交換クロマトグラフィーによった。

Fig. 1. Antibacterial property of modified β -lactoglobulin and modified α -lactalbumin in which carboxyl residues were blocked.

● Unmodified β lg or unmodified α la; ○, × COOH-m β lg or COOH-m α la.

Per cent of modification: A: COOH-m β lg, a, 12.2, b, 34.4; B: COOH-m α la, a, 33.3, b, 42.1. Carboxyl residues-modified proteins were shown by a sign of COOH-m β lg or COOH-m α la.

See an experimental method of Table 1 in which the bacteria cultivation was done by the same procedure.

Fig. 2 の結果のとおり、tRNA の塩基成分の分画ピークは、カルボキシル基修飾 β lg 添加 > 未修飾 β lg 添加 > タンパク質未添加の順に鈍化して、分画が不明瞭となり、塩基組成にも異常な変化が認められた。すなわち、

Fig. 2. Effect of the unmodified or the modified β -lactoglobulin blocking carboxyl residue on the base composition of tRNA in body of *Str. lactis*.

(1) tRNA of *Str. lactis* only; (2) tRNA of *Str. lactis* plus unmodified β lg; (3) tRNA of *Str. lactis* plus COOH-m β lg.

The proteins (0.7% as protein concentration) were added to milk serum protein-free sterilized whey which contains 1% starter of *Str. lactis* and its culture was cultivated at 37°C for 24 hours. After that, tRNA was separated from bacteria body by Schmidt-Thanhauser-Schneider's modified method.¹²⁾⁻¹⁴⁾

The chromatograms show base composition of tRNA in successive fraction of effluent following gel filtration of tRNA sample (0.5 ml) at 4°C, on a column (0.3 $\times$ 15 cm) of Dowex 1 $\times$ 2 Cl⁻ type (200 $\times$ 400 mesh); speed, 40 sec/drop; buffer, 0.004 N HCl (40 ml) - 0.01 HCl (20 ml) containing 0.1 M NaCl.

Table 2. Effect of the unmodified or the modified β -lactoglobulin blocking carboxyl residue on the base composition of tRNA in body of *Str. lactis*.

Base composition	tRNA in bacteria body		
	<i>Str. lactis</i> only (%)	<i>Str. lactis</i> plus unmodified β lg (%)	<i>Str. lactis</i> plus COOH-m β lg (%)
Adenosine (A)	4.4	3.5	3.0
Cytidine-P (Cp)	25.9	24.5	21.3
Adenosine-P (Ap) $\left\{ \begin{array}{l} 2' \\ 3' \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 5.7 \\ 8.6 \end{array} \right.$ 14.3	$\left\{ \begin{array}{l} 6.0 \\ 8.8 \end{array} \right.$ 14.8	$\left\{ \begin{array}{l} 6.1 \\ 9.1 \end{array} \right.$ 15.2
Uridine-P (Up) $\left\{ \begin{array}{l} \Psi p \\ Up \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2.7 \\ 19.2 \end{array} \right.$ 21.9	$\left\{ \begin{array}{l} 8.6 \\ 14.0 \end{array} \right.$ 22.6	$\left\{ \begin{array}{l} 12.0 \\ 13.5 \end{array} \right.$ 25.5
Guanosine-P (Gp) $\left\{ \begin{array}{l} 2' \\ 3' \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 12.8 \\ 15.1 \end{array} \right.$ 27.9	$\left\{ \begin{array}{l} 16.0 \\ 12.6 \end{array} \right.$ 28.6	$\left\{ \begin{array}{l} 17.7 \\ 10.9 \end{array} \right.$ 28.6
5'-Guanosine-P (pGp)	5.6	6.0	6.4
Total	100.0	100.0	100.0
Purine/pyrimidine*	1.00	1.05	1.07

* This shows ratio of ribonucleotides : purine, Ap, Gp, pGp; pyrimidine, Cp, Up : COOH-m β lg, carboxyl residues-modified β -lactoglobulin.

未修飾 β lg またはカルボキシル基修飾 β lg を添加した場合、タンパク質未添加に比べて、ウリジルの Up のピークが小となり、反対に Ψp のピークが大となった。また、アデニルの 2'-Ap と 3'-Ap の分画が不明瞭となった。カルボキシル基修飾 β lg を添加した場合、グアニルの 2'-Gp と 3'-Gp の分画がいっそう、不明瞭となった。

Str. lactis 菌体内の tRNA の塩基組成の百分率については Table 2 に示したとおりである。カルボキシル基修飾 β lg 添加 > 未修飾 β lg 添加 > タンパク質未添加の順に変化が大であった。すなわち、ウリジルの Up が著しく減少して、 Ψp が著しく増加した。また、グアニルの 3'-Gp が著しく減少して、2'-Gp が著しく増加した。アデニン(A) とシチジン(Cp) はわずかに減少し、アデニル酸 (2'-Ap, 3'-Ap) および 5'-グアニル酸 (pGp) はわずかに増加したにすぎなかった。プリン/ピリミジンの比率は高くなった。

以上の結果のとおり、カルボキシル基修飾 β lg が *Str. lactis* に対して細菌抑制作用をする場合、菌体の tRNA の塩基、とくにウリジン酸とグアニル酸に変化をきたすことが認められた。

5. *Str. lactis* 菌体の分光的性質に及ぼすカルボキシル基修飾 β -ラクトグロブリンの影響

1) 蛍光スペクトル 乳清タンパク質除去殺菌乳清に *Str. lactis* のみ (タンパク質未添加) を培養ならびに未修飾 β lg, カルボキシル基修飾 β lg (タンパク質濃度として 0.7%) を加えて培養した試料について、蛍光強度

を比較検討した。

Fig. 3 に示した結果のとおり、菌体のみでは、波長 330 nm 付近の蛍光強度のピークは現われなかった。未修飾 β lg, カルボキシル基修飾 β lg を加えて菌を培養しなかった試料について測定したが、両タンパク質とも波長 330 nm 付近にピークが現われ、いずれもほとんど同じピークであった。しかし、カルボキシル基修飾 β lg + 菌体の試料の蛍光強度は、未修飾 β lg + 菌体の試料の蛍光強度に比べて、明らかに小さくなり、いわゆる、消光現象を生じた。この現象は、カルボキシル基修飾 β lg と菌体膜との会合により、トリプトファン周辺のポリペプチド鎖に変化が生じたことを示唆する。

2) tRNA の紫外線吸収スペクトル 実験方法 6 項によって分離した tRNA 試料を用いた。tRNA は 5% PCA に溶解して、波長 220~300 nm の吸光度を測定した。この結果は Fig. 4 に示した。菌体のみの tRNA に比べて、未修飾 β lg, カルボキシル基修飾 β lg 添加の tRNA では、波長 250~300 nm 付近で吸光度が著しく小さくなった。前者は後者に比べて、吸光度はわずかに大であったが、波長 250 nm 以下の吸光度に差が認められた。以上の結果は、未修飾 β lg およびカルボキシル基修飾 β lg が *Str. lactis* に対して細菌作用をする場合、tRNA の構造に変化をもたらすことを示唆する。

考 察

牛乳中の抗微生物活性物質には 12 種類が知られている。 β -リジンは膜透過性の損傷、免疫グロブリン (IgM

Fig. 3. Effect of the unmodified or the modified β -lactoglobulin blocking carboxyl residue on intensity of fluorescence when the proteins were added to the culture of *Str. lactis*.

A: — *Str. lactis* plus unmodified β lg; ---- unmodified β lg only (without *Str. lactis* as control); --- *Str. lactis* only (without unmodified β lg). B: — *Str. lactis* plus COOH-m β lg; ---- COOH-m β lg only (without *Str. lactis* as control); --- *Str. lactis* only (without COOH-m β lg).

The COOH-m β lg shows a sign of carboxyl residue-modified β -lactoglobulin. The proteins (0.7% as protein concentration) were added to the milk serum protein-free sterilized whey which contains 1% starter of *Str. lactis* and its culture was cultivated at 37°C for 24 hours.

または IgG) は、特異抗体による補体媒介性殺菌で赤血球表面の膜タンパク質 (抗原) に IgM または IgG が結合し、これに補体とよばれる多数のタンパク質が結合し、赤血球が溶かされる補体媒介性溶血作用である。初乳はグラム陽性菌に対して殺菌活性を示さない^{15)~17)}。これは初乳中に 90% の高い含有率で含まれる IgG が補体媒介殺菌作用を低下させるためである。補体を含む常乳または仔ウシの血清を含む生理的食塩水で初乳を希釈すると、大腸菌に対して殺菌活性を示すようになる¹⁸⁾。ラクトフェリンは、大腸菌の tRNA に異常なクロマトグラムをひき起こさせ¹⁹⁾、ラクトパーオキシダーゼ (LP) は、ラクトニン 2 (L₂) と同じもので、乳酸球菌の代謝によって生成する H₂O₂ によって、牛乳中のキノン化合物が酸化され、この酸化物質が菌の生育を阻止することが推定された²⁰⁾。その後、乳酸球菌の生育阻止因子として、チオシアニオン (SCN⁻) が見いだされている²¹⁾。この SCN⁻ は、もともと含硫アミノ酸の代謝産物として、牛乳中にわずかに存在しているが、乳牛の消化管内

Fig. 4. Effect of the unmodified or the modified β -lactoglobulin blocking carboxyl residue on ultraviolet absorption spectra of tRNA in body of *Str. lactis*.

● *Str. lactis* only; × *Str. lactis* plus unmodified β lg; ○ *Str. lactis* plus COOH-m β lg: sample of tRNA was prepared by the same method as written in Fig. 2.

では、牧草の分解により、CN⁻ が多量生成し、rhodanase によって解毒化され、SCN⁻ の濃度が高くなることが見いだされている²²⁾。また、LP は培地中のロイシン、グルタミン酸、リジンなどのアミノ酸やグルコースの菌への取り込みを抑制し、菌体膜の能動輸送を阻害する²³⁾。

細菌の細胞壁²⁴⁾の基本構造は、ペプチドグリカンで、N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミンが β -1,4 結合によって交互しているグリカン鎖の縦糸とムラミン酸の間をペプチドが架橋している横糸とから成り立っている。この横糸には、D-アミノ酸の含量が多く、グラム陽性菌では、酸性多糖、グリコリビド、タンパク質から成る複合多糖体を形成している。ペプチドグリカンは、ペプチド (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala) の D-Ala-COOH と L-Lys-NH₂ の間をペンタグリシンが架橋し、L-Lys と D-Ala が関与する。

もともとタンパク質分子の形態を保持している結合様式に、イオン結合、水素結合、van der Waal's 結合、共有結合 (-S-S-結合) がある。本実験において、 β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミンのポリペプチド鎖の側鎖 R のカルボキシル基を化学修飾した場合、カルボキシル基はイオン結合と水素結合に関係があるので、これらの結合が破壊される。イオン結合の破壊では、アミノ基が露出して遊離の状態となる。水素結合では、チロシンなどの水酸基との結合が破壊されて、水酸基が露出した状態となる。タンパク質のポリペプチド鎖

の側鎖Rの水酸基は、カルボキシル基のほかに、ヒスチジンのイミダゾール核やトリプトファンのインドール核の窒素とも水素結合する。しかし、本実験 (Table 1 参照) において、インドール基を修飾した修飾タンパク質は、静菌力があまり認められなかったので、水酸基はおそらく静菌作用にあまり関与しないものと判断された。

以上要するに、カルボキシル基修飾 β la およびカルボキシル基修飾 α la の *Str. lactis* および *Str. pyogenes* に対する静菌作用の原因は、これら修飾タンパク質の側鎖の露出したアミノ基が、細菌壁膜のペプチドグリカンのペプチド中のグルタミン酸などのカルボキシル基とイオン結合によって会合し、菌体膜の能動輸送を阻害することによるものと推定された。しかし、不明の点も多いので、詳細は今後の研究に待ちたい。

要 約

1) β -ラクトグロブリン (β lg) および α -ラクトアルブミン (α la) のカルボキシル基、アミノ基、インドール基およびグアニル基を化学修飾した修飾タンパク質 (タンパク質濃度として 0.7%) の *Str. lactis* および *Str. pyogenes* に対する静菌作用について調べた結果、カルボキシル基修飾が最も静菌力が強かった。他のアミノ酸残基修飾による静菌作用はほとんど認められなかった。未修飾 α la の静菌作用はなく、未修飾 β lg はわずかに静菌作用があることが認められた。

2) カルボキシル基修飾タンパク質は、*Str. lactis* に対してよりも *Str. pyogenes* に対する静菌作用が強かった。

3) *Str. lactis* の菌体の tRNA の塩基組成に及ぼすカルボキシル基修飾の影響について、Dowex 樹脂・イオン交換クロマトグラフィーによって調べた結果、ウリジル酸とグアニル酸の塩基組成の変化が大であった。また、プリン/ピリミジンの比率が高くなった。

4) また、菌体の tRNA の紫外線吸収スペクトルに変化を生じ、菌体と修飾タンパク質との会合によると思われる蛍光強度の減少 (消光現象) が現われた。

5) カルボキシル基修飾タンパク質の静菌作用の原因は、この基の化学修飾によって露出したアミノ基が、細菌膜のタンパク質のカルボキシル基とイオン結合によって会合し、菌体膜の能動輸送を阻害したこと起因すると推定された。

終りに、*Str. lactis* の菌株は、岡山大学農学部中江利孝教授、*Str. pyogenes* 菌株は国立予防衛生研究所から分売していただいた。ここに深謝の意を表します。

文 献

- 1) 佐々木林治郎, 粟飯原景昭: 農化, 29, 865 (1955)
- 2) Reiter, B.: *J. Dairy Res.*, 45, 131 (1978)
- 3) 梅本弥一郎: 酪農科研, 30, A31 (1981)
- 4) Aschaffenburg, R. and Drewry, L.: *Biochem. J.*, 65, 273 (1957)
- 5) 津郷友吉, 山内邦男: 牛乳の化学, 27 (1975), 地球社 (東京)
- 6) 電気泳動学会編: 電気泳動実験法, 241 (1967), 文光堂 (東京)
- 7) 藤田 博, 河原一男: 新しい生物物化学研究法 (上), 化学増刊 28, 97 (1967), 文光堂 (東京)
- 8) 日本生化学会: タンパク質の化学IV, 化学修飾とペプチド合成, 生化学実験講座 1, 10 (1977), 東京化学同人 (東京)
- 9) 安藤鋭郎, 今堀和友, 伊勢村寿三, 早石 修: タンパク質化学 3, 高次構造, 2 (1973), 共立出版 (東京)
- 10) Means, G.E. and Feeney, R.E.: *Chemical Modification of Proteins* (Translated by Ishii, S.), 244 (1974), Hirokawa Book Co. (Tokyo)
- 11) 関根隆光, 笹川泰治, 森田茂広, 木村徳次, 倉富一興: 化学の領域, 増刊33, 生化学領域における光電比色法, 各論 1, 65 (1958), 南江堂 (東京)
- 12) 水野重樹著: 核酸の一般的分離・定量法 (瓜谷郁三, 志村憲助, 中村通徳, 船津 勝編集: 生化学実験法(2)) 17, 195 (1979), 学会出版センター (東京)
- 13) Schmidt, G. and Thanhauser, S.J.: *J. Biol. Chem.*, 161, 83 (1945)
- 14) Schneider, W.C.: *J. Biol. Chem.*, 161, 293 (1945); 164, 747 (1946)
- 15) Carroll, E.J. and Jain, E.C.: *Am. J. Vet. Res.*, 30, 1123 (1969)
- 16) Bullen, J.J., Roger, H.J. and Leigh, L.: *Br. Med. J.*, 1, 69 (1972)
- 17) Wilson, M.R.: *Immunology*, 23, 947 (1972)
- 18) Reiter, B. and Brock, J.H.: *Immunology*, 28, 71 (1975)
- 18) Griffith, E. and Humphry, J.: *Eur. J. Biochem.*, 82, 503 (1978)
- 20) Wright, R.C. and Tramer, J.: *J. Dairy Res.*, 25, 104 (1958)
- 21) Reiter, B., Pickering, A., Oram, J.D. and Pope, G.S.: *J. Gen. Microbiol.*, 33, xii (1963)
- 22) Vertnen, A.I.: *Experientia*, 17, 241 (1964)
- 23) Marshall, V.M. and Reiter, B.: *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, 3, 109 (1976)
- 24) 小山卓美: 細菌の解剖分子レベルからみた図譜一 (水島昭二, 三浦謹一郎編), 7 (1979), 講談社サイエンティフィック (東京)

(昭和 60 年 6 月 25 日受理)