- (7) B. F. Boas : *J. Biol. Chem.*, 204, 553 (1953).
 (8) Z. Dische, E. Borenfreund : *J. Biol. Chem.*, 184, 517 (1950).
 (9) K. S. Dodgson, A. G. Lloyd : *Biochem. J.*, 68, 88 (1958).
 (10) B. Weissmann, K. Meyer, P. Sampson, A. Linker : *J. Biol. Chem.*, 208, 417 (1954).

細菌リゾチームの研究 (第2報)*

Muramic acid とリゾチーム感受性について

岡田茂孝, 福本寿一郎 (大阪市立大学理学部)

昭和34年8月24日受理

先に吾々は *B. subtilis* に属する一細菌が分泌する細菌リゾチームの特異性を明らかにする為、基質として *M. lysodeikticus* の細胞膜多糖類を使用し、その作用分解物を卵白リゾチームの場合と比較検討した。その結果卵白リゾチーム分解物から得られる主オリゴ糖は構成糖としてグルコースとヘキソサミンを含むに反し、細菌リゾチーム分解物中の主オリゴ糖はヘキソサミンだけからなっていることが分った。その上このヘキソサミンはグルコサミン以外に今一つの未知アミノ糖を含んでいることを知った⁽¹⁾。

かような点から未知アミノ糖を単離することを試み、その性質を明らかにした結果、このアミノ糖は近年 R. E. Strange 等によって *B. subtilis* 属、*B. megaterium* 属等の細菌の胞子中に見出されたミュラミン酸に一致すると見做されるに至った⁽²⁻⁵⁾。またグルコサミン及び未知アミノ糖の細胞膜多糖類中の含量と卵白リゾチーム並びに細菌リゾチームの作用について種々検討を加えたのでその結果について報告する。

実験の部

I. 実験方法 供試酵素、酵素力の測定、細胞膜多糖類の調製及びアミノ糖並びに還元性物質の定量は前報に準じた^(1,6)。胞子懸濁液は *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* を培養後、遠心洗滌、蒸留水に懸濁し2日間37°で振盪、胞子を形成せしめた後⁽⁷⁾、卵白リゾチームで細胞膜成分を分解して調製した。アミノ糖の Elson-Morgan 発色の吸収曲線は Hitachi Recording Spectrophotometer によって測定した。

濾紙電気泳動は酸性 (M 醋酸, pH 2.3, $\mu=0.1$)、中性 (pH 6.0, M/14 磷酸緩衝液, $\mu=0.1$) 及びアルカリ性 (M/20 硼酸ソーダ, pH 9.0) の各緩衝液中で 700 V/40cm, 2~8 mA の条件で30分乃至1時間で行った。

グルコサミン、未知アミノ糖 (ミュラミン酸) の存在比は Elson-Morgan 法発色後吸収曲線から算定すると共にブタノール：醋酸：水=4:1:1 を展開剤とするペーパークロマトグラフィーを行い、風乾後原点より2cm 間隙に切断、蒸留水にて溶出し、各区分について Elson-Morgan 法で呈色し、 R_F 0.1 附近をグルコサミン、 R_F 0.28 附近の溶出区分を未知アミノ糖とした。便宜上両アミノ糖の発色共 510 m μ の波長に於ける吸光度を測定し、グルコサミン標準曲線からグルコサミン換算値として算定することとした。

アミノ糖に対する細胞全還元性物質の比は洗滌細胞を4N HCl で100°, 2時間加水分解後、その分解液についてアミノ糖呈色と還元力から測定すると共に、イオン交換樹脂 Dowex-50 による通過部と吸着部 (1N HCl 溶出部) の還元力の比から測定した。

II. 実験結果

(1) 未知アミノ糖の分離 : *M. lysodeikticus* 細胞膜多糖類に細菌リゾチームを作用せしめて得られる反応生産物を加水分解後、ブタノール：醋酸：水=4:1:1 を展開剤とするペーパークロマトグラフィーを行った。風乾後原点から2cm 間隙に濾紙を切断し、各区分を蒸留水で溶出した結果、第1図の如く明瞭にグルコサミンと未知アミノ糖に分別することが出来た。勿論この方法は細胞膜多糖類の酵素分解物だけでなく直接細胞膜多糖類内至は細胞にも適用出来、この結果未知アミノ糖の分離と共に細胞内に於ける未知アミノ糖対グルコサミンの含有比を推定出来るものと考えられる。

(2) 未知アミノ糖の性質 : 未知アミノ糖及びグルコサミンの両アミノ糖は、Elson-Morgan のアミノ糖呈

* Studies on Bacterial Lysozyme. Part II. Muramic Acid and Lysozyme Sensitivity.

By Sigetaka OKADA and Juichiro FUKUMOTO (Institute of Polytechnics, Osaka City University)

第1図 未知アミノ糖の分離
溶媒: 66% ブタノール, 17% 醋酸, 17% 水
Elson-Morgan (Boas 改良) 法

第2図 Elson-Morgan 反応の吸収曲線

- (1) 細胞多糖類から得られた未知アミノ糖
(2) " " グルコサミン
(3) 対照グルコサミン

第1表 未知アミノ糖及びグルコサミンの濾紙電気泳動

泳 動 条 件	細胞未知 アミノ糖	細胞グル コサミン	グルコ サミン	グルコ ース
pH 2.3 (1M CH_3COOH , $\mu=0.1$) 750 V/40 cm, 2~2.5 mA, 1 hr.	-2.5	-5.0	-5.0	0
pH 6.0 (M/14 燐酸緩衝液) 750 V/40 cm, 9 mA, 30 min.	0	-2.5	-2.5	0
pH 9.2 (M/20 硼酸ソーダ) 700 V/40 cm, 8~10 mA, 50 min.	+0.5	0	0	0

(原点から陽極の方向を + とし, 泳動距離は cm)

アミノ糖及びミュラミン酸対グルコサミンの含有比 (以下 MA/GA と略記する) を測定した。同時にこの多糖類区分に両リゾチームを作用せしめた所第3図に示す如く酵素作用によって生ずる還元糖は、卵白リゾチームの場合総アミノ糖含量に比例するに反し、細菌リゾチームの場合は MA/GA 比に比例する傾向を示した。

一方培養条件を種々変えて培養を行った場合菌の溶菌性が変化することについては先に報告したが⁽⁸⁾、その中特に肉汁生育細胞ではミュラミン酸含量が高く、逆に大豆粕生育細胞ではグルコサミン比が高くなる傾向があっ

色を行った場合、肉眼的にも色調を異し、Beckmann spectrophotometer で測定すると第2図に示す如くグルコサミンは 520 mμ 附近に最大吸収を示すに対し、未知アミノ糖は 505 mμ 附近に最大吸収を示した。なおこの吸収の測定は呈色後 1~2 時間の間に行ったものであり、室温 (約 10°) に一夜放置するとやや短波長側にずれると共にグルコサミンの吸光度は約 1.5 倍、未知アミノ糖の場合は 2 倍以上の増加を示したがこの原因については現在のところ不明である。

酸性、中性、アルカリ性の各条件で濾紙電気泳動を行った結果は第1表に示す如く酸性側ではグルコサミンは約 5 cm, 未知アミノ糖は約 2.5 cm 陰極側に泳動した。中性ではグルコサミンは約 2.5 cm 陰極側に泳動したが、未知アミノ糖は全く泳動せず、又アルカリ性では未知アミノ糖が僅かに陽極側に泳動することが認められた。

一方 Strange 等の云うミュラミン酸は *B. subtilis* の胞子を 4N 塩酸で 2 時間加水分解した後ペーパークロマトグラフィーによって分離した。未知アミノ糖とミュラミン酸の各種展開剤に対する R_F は第2表に示す如くよく一致し、Elson-Morgan のアミノ糖呈色の吸収が 505 mμ 附近にあることと考合せ、両者は同一物質と認めることが出来た。なお Strange は推定構造として、3-O- α -carboxyethyl-D-glucosamine を示しているが、事実吾々の未知アミノ糖は ninhydrin, anilin hydrogenphthalate によって呈色すると同時に陽イオン交換樹脂 Dowex-50, 並びに陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 の両者によって吸着、溶離出来ることなどはよくこの構造を支持した。

(3) ミュラミン酸含量とリゾチーム作用

(i) 細胞多糖類の場合: 卵白リゾチーム並びに細菌リゾチームに感受性を示す *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* の細胞を苛性ソーダで処理し第3表に示す如く6つの区分に分け、その各々について収量及び 4N 塩酸で 2 時間加水分解を行い形成される還元糖、

第2表 未知アミノ糖, ミュラミン酸の種々溶媒に対する R_F

溶媒	細胞未知アミノ糖	細胞グルコサミン	グルコサミン	Strange のミュラミン酸
75% フェノール	0.57	0.24	0.24	0.54
46% ブタノール, 31% ビリジン, 23% 水	0.32	0.23	0.23	0.33
66% ブタノール, 17% 醋酸, 17% 水	0.28	0.09	0.09	0.27
50% ブタノール, 25% 醋酸, 25% 水	0.47	0.26	0.26	0.52

第3表 細胞膜多糖類の分割と分析

細胞 (*B. subtilis* var. *amyloliquefaciens*)
大豆粕澱粉 37°, 2 日間表面培養
0.5 N NaOH, 2 時間処理

	pH 7.0	可溶部			不溶部		
		醋酸中和 CHCl ₃ -Octyl alc. 処理			2 N NaOH 処理, 醋酸中和 CHCl ₃ -Octyl alc. 処理		
		A 1 沈澱	A 2 0~1 容 アルコール沈澱	A 3 1~3 容 アルコール沈澱	B 1 沈澱	B 2 0~1 容 アルコール沈澱	B 3 1~3 容 アルコール沈澱
収量 (%)		25.6	16.5	14.3	20.7	8.8	14.1
還元糖 (%)		22.1	18.3		23.4	32.0	36.0
全アミノ糖 (%)		7.06	2.0	13.5	18.2	14.5	13.0
MA/GA		66.5	—	26.8	43.0	20.8	26.2

第3図 細胞多糖類の溶菌酵素による分解

200 mg 細胞膜多糖類, 0.1 μg リゾチーム, M/40 Phosphate buffer, pH 6.5
B: 細菌リゾチーム L: 卵白リゾチーム

た. そして卵白リゾチームは第4図の如く両細胞をよく溶菌したが, 細菌リゾチームはミュラミン酸含量の低い大豆粕生育細胞に対して著しい阻害を受けた. なお培養基の組成と共に培養時間についても種々検討したがその変動は培養基の組成の変動に比べて非常に僅少であった.

(ii) 細菌菌種との関係:

0.5% グルコースを含む肉汁培地に研究室で入手出来た第4表に示す菌株を 37° に約 16 時間振盪培養した後蒸留水で洗滌して得られる細胞懸濁液を基質とし, 卵白リゾチーム, 細菌リゾチームをそれぞれ加えて溶菌実験を行わしめた場合にこれら酵素に対する感受性は大別して次の3群に分けることが出来るように観察された. 即ち第1の群は卵白リゾチーム, 細菌リゾチーム何れによっても溶菌されるもので, *M. lysodeikticus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* (var. *amyloliquefaciens* Fukumoto, *B. subtilis* (教室保存 No. D 11)) はこれに属し, MA/GA 比

第4図 培養条件とリゾチーム感受性

細胞 I: プイオン, 0.5% グルコース 37°, 16 時間振盪培養, MA/GA 35.2
 細胞 II: 5% 大豆粕アルカリ抽出液, 3% 澱粉, 1% (NH₄)₂HPO₄, 37°, 2 日間振盪培養, MA/GA 24.5
 ...●... 5 μg/ml 卵白リゾチーム, —○— 25 μg/ml 細菌リゾチーム, — 対 照

第4表 MA/GA 比とリゾチーム感受性

細菌種	溶菌作用		MA/GA (%)
	卵白リゾチーム	細菌リゾチーム	
I { <i>M. lysodeikticus</i>	++	++	104
<i>B. subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i>	++	+	35.2
<i>B. subtilis</i> (D-11)	++	+	38.6
<i>P. aeruginosa</i>	++	+	42.0
<i>P. fluorescens</i>	++	+	24.9
II { <i>B. subtilis</i> PCI 219	++	±	10.5
<i>B. subtilis</i> Cohn	++	±	21.8
<i>B. subtilis</i> K	++	±	13.7
<i>B. prodigiosum</i>	++	±	14.8
<i>B. butyricum</i>	+	±	16.4
III { <i>B. subtilis</i> (mesentericus vulgaris)	—	—	17.1
<i>B. subtilis</i> (mesentericus vulgaris)	—	—	20.6
<i>P. riboflavinus</i>	—	—	21.6
<i>St. aureus</i>	—	—	74.2

細胞: プイオン, 0.5% グルコース, 37°, 16 時間振盪培養

反応: M/20 リン酸緩衝液, pH 7.0, 40°, 10 分

25 μg/ml 細菌リゾチーム又は 5 μg/ml 卵白リゾチーム

溶菌率: ++ 100%, + 99~80%, ± 80~40%, — 40~5%, — 5% 以下

は Elson-Morgan の吸収, 電気的性質, ペーパークロマトグラフィー等の性質から Strange 等の云うミュラミンに一致した。

更に *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto を対象菌とした時, その細胞膜多糖類に対する作用や, 培養条件からも, 又その他多くのリゾチーム感受性細菌種についてもまず細胞全還元性物質中のグルコサミン含量が卵白リゾチームの溶菌性を支配し, その中ミュラミン酸含量の高い場合だけが細菌リゾチームによって溶菌される事実を知った。

は 1.2~0.4 の間に入るものが多く, 第2の群は卵白リゾチームでは溶菌されるが, 細菌リゾチームでは殆ど作用を受けない菌株で *B. subtilis* PCI 219, *B. subtilis* Cohn, *B. subtilis* K, *B. prodigiosum*, *B. butyricum* がこれに属し MR/GA 比は大約 0.2~0.1 を示し, 第1の群に比べ低い値を示した。なお細菌リゾチームの場合も添加後数時間放置すれば, 細胞の自己溶菌系との共動作用で漸次溶菌するのは勿論である。第3の群は両酵素によって作用を受けないもので, この群の中 *B. subtilis* (mesentericus vulgaris) の1株は他の感受性細菌に比べて細胞多糖類中のヘキササミン含量の少い為溶菌されないものと考えられるが⁽⁹⁾, 他はアミノ糖含量が高いにもかかわらずこれら酵素によって作用を受けないのは構造上の差異によるものではないかと考えられる。

要 約

細胞膜多糖類を基質とした際にリゾチーム分解物として得られるオリゴ糖中の未知アミノ糖

(1) 岡田茂孝, 福本寿一郎: 本誌, 34, 128(1960).

(2) R. E. Strange, F. A. Dark: *Nature*, 177, 186 (1956).

(3) R. E. Strange: *Biochem. J.*, 64, 23(1956).

(4) L. H. Kent: *Biochem. J.*, 67, 5 (1957).

(5) E. Work: *Nature*, 179, 841 (1957).

(6) 里村幸男, 岡田茂孝, 福本寿一郎: 本誌, 31,

285(1957).

(7) W. A. Hardwick, J. W. Foster: *J. Gen. Physiol.*, 35, 907 (1952).

(8) 里村幸男, 岡田茂孝, 福本寿一郎: 本誌, 31, 801 (1957).

(9) A. Sohler, A. H. Romano, W. J. Nikerson: *J. Bacteriol.*, 75, 283 (1958).