[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 58, No. 6, pp. 567~573, 1984]

麴酸誘導体 (7-I-kojic acid) の作用による細菌からのアミノ糖含有ポリペプチドの遊離†

小谷 隆, 櫛本五男, 上田博夫, 酒井平一
(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 58 年 12 月 12 日 受 理

Excretion of Polypeptide Containing Aminosugar from Bacterial Cell by the Action of 7-I-Kojic Acid

Takashi KOTANI, Itsuo ICHIMOTO, Hiroo UEDA
and Heiichi SAKAI

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture, Sakai 591

The bacteriostatic effect of 7-I-kojic acid (IKA), a derivative of kojic acid, was investigated on *Staphylococcus aureus*. Cells exposed to IKA stopped growing, and excreted polypeptide containing K-compound, which contains both glucosamine and muramic acid, into the culture broth. As K-compound contains muramic acid, a substance found only in the bacterial cell wall, we assumed that K-compound was an abnormal precursor of the cell wall. The bacteriostatic action of IKA is probably due to its blocking cell wall formation.

(Received December 12, 1983)

緒 言

われわれは、以前、麴酸 (I; X=OH, Y=H) およびその誘導体の静菌作用と構造との相関関係に関する研究で、分子全体ならびに X, Y 置換基の疎水性および 5 位の OH 基に対する電子的因子を表す置換基定数をパラメーターとして用い、抗菌性を定量的に解析した。

その結果から、麴酸およびその誘導体の細菌における作用部位は、細胞表層に存在し、解離していない中性型分子種が、pH によって解離しない表層成分と相互作用を起し、静菌作用を発現することが示唆されることを報告した⁽¹⁾。

さらに前報において、増殖培地中で *Staphylococcus aureus* 209 P に 7-I-kojic acid (IKA, I; X=I, Y=H) を投与すると無投与区の菌体に比べて、菌体容積が膨潤することと細胞分裂における隔壁形成を完成した細胞が認められない等の現象を観察した。またリン酸塩緩

衝液中で IKA を作用させた *S. aureus* 209 P 菌体を増殖培地に移植すると、誘導期を経て増殖を開始することも認められた。これらのことから IKA は、*S. aureus* 209 P の細胞表層に修復可能な損傷を与え、その結果、静菌作用を表すものと推定した⁽²⁾。

また IKA を投与された細菌は、その作用で細胞表層物質を遊離することが予備実験で認められた。そこで、IKA の作用で細菌から遊離する物質を検索し、アミノ糖とポリペプチドよりなる菌体表層に関係のある物質 (K 物質) を確認したので、本報では、その結果を報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株と培養方法 供試菌株として *Staphylococcus aureus* 209 P を用いた。培養はペプトン 0.5

† 麴酸誘導体の抗菌性 (第 5 報)

%, 酵母エキス 0.4%, 肉エキス 0.3% の組成の溶液 (NaOH で pH 7 に調整) と 70 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7) を 1:1 に混合した培地 (PX 培地) を用い, 種菌を 0.5% 添加して 30°C, 14 時間振盪培養した. 種菌は PX 培地 100 ml を分注した 500 ml 振盪フラスコで 30°C で, 8 時間培養した.

2. 7-I-kojic acid (IKA) の合成 7-Cl-kojic acid (I; X=Cl, Y=H)⁽³⁾ のアセトン溶液に NaI のアセトン溶液を滴下しながら還流し反応させた.

反応終了後, 濾液を冷却して得た結晶をエタノール-水で再結晶した. mp 188°C, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3200, 1612, 1598, 1572, 1378, 1220, 930; ¹H-NMR (60 MHz) $\delta_{\text{TMS}}^{\text{(CD}_3\text{)}_2\text{SO}_4}$: 4.40 (2H, S), 6.56 (1H, S), 8.08 (1H, S); MS m/z : 252 (M⁺), 127 (base peak).

3. 薄層クロマトグラフィー (TLC) Kieselgel 60 F₂₅₄ (メルク社製) および Kieselgel G 60 (メルク社製) を用いた. 展開溶媒は, 特記しない限り *n*-BuOH/AcOH/H₂O (2:1:1, v/v/v) の混合溶媒を使用した. クロマトグラム上の物質スポットは, 10% リンモリブデン酸-EtOH 試薬を噴霧後 110°C, 5 分間の加熱による呈色反応⁽⁴⁾, I₂-ガスによる呈色反応, 塩素-トリジン試薬による呈色反応⁽⁵⁾で検出した.

4. スペクトル分析 UV スペクトル分析は, UV-180 (島津製作所) を, アミノ酸分析は, 日立アミノ酸分析機 KLA-5 型を, IR スペクトルは, JASCO IR-2 型を, ¹H-NMR 分析は, JEOL JNM MH-60 型を, そして MS の測定には日立 RMU-6 MG 型を用いた.

実験結果

1. IKA の作用により遊離する物質の検索

S. aureus 209 P 菌株に IKA を作用させて得られた除菌上澄液について TLC で検討し, Fig. 1 の結果を得た.

Fig. 1 の T 区の試料は, 70 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7) で洗浄した菌体 (1.2 mg dry wt./ml) を M9 溶液⁽⁶⁾ (Na₂HPO₄·12H₂O 6 g, KH₂PO₄ 3 g, NaCl 0.5 g, NH₄Cl 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.13 g, D-glucose 2 g, H₂O 1000 ml, pH 6.7) に懸濁し, 1.0 mM の IKA を添加して 30°C, 5 時間インキュベートした除菌上澄液を酢酸酸性 (pH 4) にして *n*-ブタノールで抽出し, 濃縮したものである. TLC の発色は, 10% リンモリブデン酸-EtOH 試薬を用いた. R_f 0.7 に青色の陽性反応を認めた. IKA 無添加区 (C) では, 呈色反応が陰性であ

Fig. 1. TLC of *n*-BuOH-Extract of Reaction Mixture. The M9 solution containing washed cell (1.2 mg dry wt./ml) and 7-iodo-kojic acid (IKA; final concentration 1.0 mM) was incubated at 30°C for 5 hr. The pH of the supernatant of the mixture was adjusted to 4 with acetic acid, and then it was extracted with *n*-BuOH. TLC was performed on Kieselgel G 60 plate using a mixture of *n*-BuOH/AcOH/H₂O; 2:1:1 (v/v/v). A spot of "K-compound" was visualized by heating at 110°C for 5 min, after spraying of the 10% alcoholic solution of phosphomolybdic acid. C, IKA omitted; T, IKA added.

った.

さらに PX 培地や 70 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7) に洗浄菌体を懸濁し, 同様の処理をした場合の結果も IKA 添加区では, リンモリブデン酸反応に陽性を示すスポットが認められたのに対し, IKA 無添加区では, 発色が認められなかった.

Fig. 1 の結果から, *S. aureus* 209 P は, IKA の作用を受けて菌体からリンモリブデン酸反応に陽性を示す物質 (K 物質) を遊離することが確かめられた.

2. K 物質の分離・精製

IKA の作用で菌体から遊離してくる K 物質の単離を試みた. まず *S. aureus* 209 P の洗浄菌体に, M9 溶液中で 30°C, 5 時間 IKA を作用させ, その除菌上澄液を約 1/10 まで減圧濃縮し, 酢酸で pH を 3.5 に調整してから 2 倍量の *n*-ブタノールで抽出した. 抽出液を冷水で 2 回洗浄後ブタノールを減圧下低温で留去し, 残留物をクロロホルム・メタノール (7:1) に溶解し, シリカ

ゲルカラム (ワコーゲル C-200) で分画した。

クロロホルム・メタノール (7:1) の溶媒で先端の赤色帯を溶出後、クロロホルム・メタノール (3:1) の溶媒で溶出してくる画分を集めた。このものは、さらに精製するために溶媒を留去後、次に TLC (Kieselgel G 60) を行い、リンモリブデン酸-EtOH 試薬に陽性なスポットをかき取り、クロロホルム・メタノール (1:1) で溶出し目的物 (K物質) を得た。

3. K物質の物理化学的性質

単離された K 物質は、透析用セルローズチューブ (Visking tube, Union Carbide Corp. 製) を透過するので、分子量 12,000~14,000 以下の物質であると推定される。次に本物質の物理化学的性質について検討を試みた。

(1) TLC 種々の展開溶媒における K 物質の R_f 値は、 n -ブタノール/酢酸/水 (2:1:1, v/v/v) では、0.72, メタノール/酢酸/水 (2:1:1, v/v/v) では、0.67, クロロホルム/メタノール/酢酸 (6:4:1, v/v/v) では、0.70, クロロホルム/メタノール/水 (20:12:3, v/v/v) では、0.25 であった。この TLC スポットは、 I_2 -ガスおよび 10% リンモリブデン酸-EtOH 試薬にも、塩素-トリジン呈色反応にも陽性であった。またこれらの呈色試薬では、他のスポットは認められず単一のスポットを示した。以上の呈色反応から K 物質は、ペプチドであることが明らかとなった。なお Dittmer 試薬反応⁽⁷⁾は陰性で、リン脂質は含まれていないことが明らかとなった。

(2) 紫外吸収スペクトル K 物質の紫外吸収は、Fig. 2 に示すごとくクロロホルム/メタノール (1:1) 中での λ_{max} が 239, 250, 257, 263 nm にみられた。

(3) アミノ糖成分 K 物質は、TLC でアミノ糖検出のための α -ジメチルアミノベンズアルデヒド-アセチルアセトン試薬 (Morgan-Elson 反応)⁽⁸⁾ に陰性であるが、予備実験の結果、加水分解によりアミノ糖を遊離することが認められた。それで K 物質を 4N 塩酸溶液にして封管し、100°C で 3 時間反応した加水分解物を中和後、 N -アセチル化と Morgan-Elson 反応を同時に行う呈色反応⁽⁹⁾の吸収スペクトルを測定すると、Fig. 3 に示すごとく、D-グルコサミンを N -アセチル化し、Morgan-Elson 反応させた場合と同じく λ_{max} 585, 544 nm を示し、K 物質中にヘキソースアミンの存在するこ

Fig. 2. UV-Spectrum of K-compound in Chloroform-Methanol (1:1, v/v).

Fig. 3. Absorption Spectra of Acetylated D-Glucosamine (I) and Acetylated K-compound Hydrolyzated (II) with Morgan-Elson Reaction.

とが明らかになった。

次にアミノ糖の分析を行うために、K 物質を 4N 塩酸中で、封管中 100°C で 3 時間加水分解した後、蒸留水で希釈して 2N 塩酸溶液とし、セライト・炭末カラムでアミノ糖を分画した⁽¹⁰⁾。すなわち Celite No. 535 と Norit A 炭末の等量混合物を充填したカラムを 2N 塩酸で平衡にし、これに試料を吸着させ、水 15 ml で溶出してくるフラクションを F-1 とし、次いで 5% エタノール 15 ml で溶出してくるフラクションを F-2 とした。これらのフラクションを低温減圧下で濃縮して、東洋濾紙 No. 51 A を用いペーパークロマトグラフィーを行った (Fig. 4)。展開溶媒は、 n -ブタノール/酢酸/水 (2:1:1,

Fig. 4. Identification of Aminosugars in K-compound on Paper Chromatogram. K-compound was hydrolyzed by heating at 100°C for 3 hr in 4N HCl. Aminosugars in the hydrolyzate were separated by Celite No. 535-Norit A column chromatography. The first fraction (F-1) was eluted with 15 ml of water. The second fraction (F-2) was eluted with 15 ml of 5% ethanol solution. Paper chromatography was performed on Toyoroshi No. 51 A using a solvent of *n*-BuOH/AcOH/H₂O; 2:1:1 (v/v/v). Aminosugars were visualized by *p*-aminobenzaldehyde-acetylacetone reagent. Mur, muramic acid; Glu, glucosamine.

v/v/v) を用い、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド-*N*-アセチルアセトン試薬 (Morgan-Elson 反応)⁽⁶⁾ で発色させた。F-1 では、*R_f* 0.27 と 0.38 のスポットが得られ、D-グルコサミンの標品と一致した。F-2 では、*R_f* 0.51 のスポットが認められ、ムラミン酸標品の *R_f* 値と一致した。

さらに、F-1 と F-2 の濃縮液中のアミノ糖を Svennerholm 法⁽¹¹⁾による Elson-Morgan 反応で発色させ、その吸収スペクトルを測定した (Fig. 5)。その結果、F-1 では $\lambda_{\max}$ が 525 nm にあり D-グルコサミンを同様に発色させた場合の $\lambda_{\max}$ 530 nm とほぼ一致した。F-2 では $\lambda_{\max}$ が 508 nm でムラミン酸の Elson-Morgan 反応における $\lambda_{\max}$ 505 nm にほぼ一致した。

以上の結果から、K物質は少なくともグルコサミンとムラミン酸を含んでいることが示唆された。

(4) K物質の Morgan-Elson 反応 K物質は、*N*-アセチルヘキソサミンの呈色反応である Morgan-Elson 反応 (Reisig 法)⁽¹²⁾ では発色しない。しかしK物質には、ヘキソサミンの存在が確かめられているので、K物質の試料溶液 0.5 ml に対し 2% ホウ酸ナトリウムを

Fig. 5. Absorption Spectrum of Elson-Morgan Reaction Products of Aminosugars in K-compound. Samples (F-1, F-2) were prepared as described in Fig. 4, and colored by Elson-Morgan reaction (Svennerholm method).

Fig. 6. Absorption Spectra of K-compound in Morgan-Elson Reaction. (A), sample (0.5 ml) was boiled for 30 min with sodium borate (final concentration of 1%) in a test tube. After addition of *p*-dimethylaminobenzaldehyde, the solution was colored by holding for 20 min at 36~38°C. (B), (A) was kept for 3 days at room temperature.

通常の 5 倍量、すなわち 0.5 ml 添加し、煮沸時間も通常の 3 分間に対して 30 分間煮沸して反応させた。これに *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド試薬を加えて呈色させ、吸収スペクトルを測定した結果は、Fig. 6 の A に示すごとく 500 nm に肩のある吸収スペクトルが得られた。この溶液は、3 日間室温で放置すると B に示すような 507 nm に $\lambda_{\max}$ のある吸収スペクトルに変化した。

一方、*S. aureus* 209 P 菌体を殺菌水に懸濁して IKA

Fig. 7. Effect of IKA on Excretion of Morgan-Elson Reaction Positive Substance from Cells. The reaction mixture (60 ml), containing cells (1.9 mg dry wt./ml) and IKA (final concentration 1.9 mM), was incubated at 30°C for periods as indicated in the figure. The supernatant of the reaction mixture was colored by the Morgan-Elson reaction.

を作用させ、その除菌上澄液を濃縮後、通常の Morgan-Elson 反応 (Reisig 法)⁽¹²⁾ で発色させて吸収スペクトルを測定すると Fig. 7 のごとく 507 nm に $\lambda_{\max}$ が認められ、また IKA の作用時間が長いほど 507 nm の吸光度が増加した。

この Morgan-Elson 反応で 507 nm に $\lambda_{\max}$ を持つ物質は、IKA を作用させた除菌上澄液に出現するものであり、また上述のごとく K 物質を Morgan-Elson 反応させた際にも認められることから、K 物質の変化したものと推定できる。

(5) アミノ酸組成 K 物質を 6N 塩酸溶液にして封管中で 110°C、20 時間加水分解してアミノ酸分析した結果、Table 1 に示すようにグリシンを多く含むポリペプチドであることがわかった。

なお、リンの存在を確かめるために G. R. Bartlett の方法⁽¹³⁾で測定したが検出されなかった。

4. *S. aureus* 209 P に対する IKA の影響

前述のごとく、殺菌水中で *S. aureus* 菌体に IKA を作用させると、K 物質から変化したと推定できる、Morgan-Elson 反応で 507 nm に $\lambda_{\max}$ を持つ物質が除菌上

Table I. Amino Acid Composition of K-Compound

Component	The molar ratio to threonine contents
Aspartic acid (Asparagine)	1.8
Threonine	1.0
Serine	1.2
Glutamic acid (Glutamine)	2.2
Proline	2.1
Glycine	33.9
Alanine	1.9
Valine	2.3
Isoleucine	2.6
Leucine	3.7
Tyrosine	0.8
Phenylalanine	2.6
Aminosugar ^a (as glucosamine)	12.9

K-compound (4 mg) was hydrolyzed in 6N HCl at 110°C (in a sealed tube) for 20 hr, and amino-acid composition were determined.

^a Aminosugar was determined in the hydrolyzate of K-compound (hydrolyzed in 4N HCl at 100°C for 3 hr in a sealed tube).

澄液中に遊離することが認められ、また IKA の作用時間が長いほど 507 nm の吸光度が増加した (Fig. 7)。

一方、IKA を作用させ、その除菌上澄液に Morgan-Elson 反応で 507 nm に $\lambda_{\max}$ を持つ物質を遊離させた菌体を、再び殺菌水に懸濁し 30°C、60 分間インキュベートして、除菌上澄液を濃縮後、Morgan-Elson 反応で呈色反応を行うと対照区の吸収スペクトルと全く同じパターンを示した。すなわち K 物質の遊離は、IKA の除去とともに停止した。

次に 70 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7) 中で 38°C、20 分間 IKA (1.6 mM、0.7 mM) に接触させた菌体 (3 mg dry wt./ml) を同じリン酸塩緩衝液で洗浄後、再び 70 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7) に懸濁 (1 mg dry wt./ml) し、30°C に保ちながら除菌上澄液の 260 nm における吸光度を測定して菌体内からの核酸関連物質の漏出を経時的に測定した。その結果、Fig. 8 に示すごとく、IKA で処理したものは、無処理のものに比較して吸光度が高く、IKA の処理によって核酸関連物質が漏出してくることが認められた。しかし同時に、その吸光度の差からわかるように、漏出は IKA 処理濃度に比例しない。

Fig. 8. Effect of IKA-treatment on Excretion of UV-absorbing Substance from Cells. Cells (3 mg dry wt./ml) were treated with 70 mM phosphate buffer, pH 7.0 (40 ml), containing indicated concentrations of IKA for 20 min at 38°C. Then the cells were washed with 70 mM phosphate buffer, pH 7.0, and suspended in the same buffer. A portion of 5 ml of the suspension was taken, and OD at 260 nm was measured. Concentration of IKA : I, 1.6 mM; II, 1.7 mM; III, no IKA.

考 察

S. aureus 209 P の菌体を IKA を含む培地中で培養すると、TLC 上、リンモリブデン酸反応、 I_2 -ガスおよび塩素-トリジン試薬に対する反応に陽性を示す物質を遊離することが確かめられた (Fig. 1)。この物質 (K 物質) を単離・精製し、その物理化学的性質を検討した結果、K 物質は、分子量 12,000~14,000 以下の比較的低分子で、成分中にグルコサミンとムラミン酸を含み (Fig. 3, 4, 5)、さらにグリシンを多く含むポリペプチドであることが明らかになった (Table I)。このような分析結果から、K 物質は壁ペプチドグリカンと関連のある物質と考えられる。

さらに K 物質は、リン脂質を検出する呈色反応⁽⁷⁾やリンの測定⁽¹³⁾から、リンの含量も無視できることが明らかになった。

次に IKA を作用させた洗浄菌体をリン酸緩衝液に懸濁し、その上澄液中の紫外線吸収物質の量を測定した結果は、無処理菌体の場合と比べて細胞内よりの漏出に大きな差がないことを示している。すなわち、細胞の死滅を示す一つの指標となっている紫外線吸収物質の細胞内よりの漏出が、IKA の作用で顕著には起らないこと

を示している。

また前報⁽²⁾において、生育中の *S. aureus* 209 P に IKA を投与した場合の菌体切片の電子顕微鏡の観察から、正常菌と比べて菌体が膨潤し、隔壁の形成が妨げられることが認められた。

以上のことから、IKA の *S. aureus* 209 P 菌に対する静菌作用を考察すると、IKA の作用で異常なペプチドグリカン前駆体を生成し、そのために正常な細胞壁の合成が阻害されていると考えられる。そしてその結果、異常な細胞壁前駆体を K 物質として菌体外へ遊離し、他方細胞分裂の停止を招いたと考えられる。

要 約

S. aureus 209 P に対する IKA の影響を調べた。その結果、IKA の作用を受けた *S. aureus* 209 P 菌は、ヘキソースアミンを含むポリペプチド (K 物質) を遊離することを認めた。K 物質は、ヘキソースアミンとして少なくともグルコサミンとムラミン酸を含み、アミノ酸としてはグリシンを多く含んだポリペプチドであった。K 物質中には、*S. aureus* 株のペプチドグリカンに含まれているリジンが含まれていないが、IKA の作用で生成する異常なペプチドグリカン前駆体であると推論した。

本研究について、ご助言を賜った大阪府立大学農学部農芸化学科の坂井拓夫博士ならびにご教示いただいた京都大学農学部藤田稔夫教授に深く感謝いたします。

- (1) T. Kotani, I. Ichimoto, C. Tatsumi and T. Fujita: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1311 (1975).
- (2) 小谷 隆, 樺本五男, 酒井平一: *農化*, **56**, 553 (1982).
- (3) T. Yabuta: *J. Chem. Soc.*, **125**, 575 (1924).
- (4) D. Kritchevsky and M. R. Kirk: *Arch. Biochem. Biophys.*, **35**, 346 (1952).
- (5) 矢島治明:「生化学実験講座 1」, タンパク質の化学 IV, 東京化学同人, 1977, p. 393.
- (6) J. Foulds: *J. Bacteriol.*, **107**, 833 (1971).
- (7) J. D. Dittmer and R. L. Lester: *J. Lipid Res.*, **5**, 126 (1964).
- (8) S. M. Partridge: *Biochem. J.*, **42**, 238 (1948).
- (9) G. A. Levvy and A. McAllan: *Biochem. J.*, **73**, 127 (1959).
- (10) H. R. Perkins and H. J. Rogers: *Biochem. J.*, **72**, 647 (1959).
- (11) L. Svennerholm: *Acta Soc. Med. Upsal-*

- iensis*, **61**, 287 (1956).
 (12) R. D. Marshall and A. Neuberger : "Glycoproteins," ed. by A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, Part A, p. 224 (1972).
 (13) G. R. Bartlets : *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959).
-