細菌細胞の複製とその阻害に関する研究 ——双頭酵素の発見と β -ラクタム系抗生物質の作用機作[†]

(昭和 59 年度鈴木賞受賞)

松 橋 通 生

(東京大学応用微生物研究所)

は し が き

Leewenhoek によって発見された細菌は、後に Spallanzani が観察したように、やたらに分裂して増える生物であったが、この特性こそ疑いなく細菌の生命現象のうちの最も重要なものであるばかりか、すべての生物にとっても一番の基本問題であった。ただ多細胞の高等生物は、その高次的体制の構築に伴って多くの華々しくも複雑な生命現象を備えて私たちの目を覆ってしまったが、細菌類はそのままの単一の細胞で、目に見える出来事は増えること以外にはあてもなく泳ぎ回るぐらいで、そのことがこの単純な生物を細胞の分裂と増殖の研究の一番手に据えたのである。細胞の分裂と増殖、すなわち細胞の複製は、染色体 DNA の複製の段階と、複製した DNA の分離および細胞の成長と細胞質分裂の 2 つの段階より成る。複製した DNA の分離は、複製しつつ分離するという面では第一の段階に入るが、それが細胞の成長に伴うという面を考えると第二の段階に数えられる。このうちで純粋な第一段階である DNA の複製は、大腸菌において他に追従をみない発展を遂げ、遺伝子の発現機構と並んで分子生物学の基礎を形づくるのであるが、第二の段階、すなわち細胞の成長、形態形成と細胞質の分裂は、その本質的な部分は DNA からの指令によって進行するとはいってもその指令の何であるかは明らかでなく、また DNA からの指令だけでは追跡できない部分が

多すぎる。とくに細胞質膜——この 1 ミリメートルの 10 万分の 1 の厚さの所に細菌の細胞の生活現象のほとんどが集約されている——の上に配列する蛋白質の形状、そのむき方、並び方などがはっきりわからないと細胞複製の正確な様相はつかみにくい。これらのことが、最近の酵素の精製と DNA の構造決定を基盤とする生化学と分子生物学の格段の進歩にかかわらず、それらからの接近のより所がないまま相変らず解けそうで解けない謎のブラック・ボックスとして、あたかも多くの有能な研究者をのみこんでしまった。

私たちの細菌細胞複製の研究も、こうした条件に制約されてではあったが、幸いにペニシリン(図 1)等の β -ラクタム剤の発見・開発が強力な後だてとなって、ようやく多少の骨組みの構成が可能になったものである。

I. ペニシリン

ペニシリンが最初に文献に現れたのは 1925 年ブラッセルの A. Gracia らの、炭疽病のカルチャーを空気中の青かび (*Penicillium glaucum*) が溶菌するという報告であろう⁽¹⁾。この 4 年後には有名なロンドン・セントメリー病院の A. Fleming の、黄色ブドウ球菌のプレートに空気中からまいこんだ青かび (*P. notatum*) が溶菌作用を示したという報告で、彼はこの青かびの作る有効成分をペニシリンと名づけた⁽²⁾。彼の菌株は Oxford に渡って、Florey ら (1940) によって世紀の抗生物質として世に出ることになるが⁽³⁾、この Oxford の研究室で A. D. Gardner (1940)⁽⁴⁾ は、ペニシリンが溶菌作用だけでなく、低い濃度で大腸菌やサルモネラ菌等のグラム陰性桿菌の細胞分裂(隔壁形成)を抑えて、しかし細胞の成長は止めないで、長いフィラメント状の細胞を作ることを見出した(図 2 参照)。一方、溶菌作用は、しさいに観察する

[†] Studies on the Mechanism of Cell Duplication and Its Inhibition in Bacteria ; Bifunctional Peptidoglycan Synthetases and Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics.

Michio MATSUHASHI (Institute of Applied Microbiology of the University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

と、これらでは細胞の中央の生長帯、または分裂帯に主に現れ、丸いふくらみができて細胞は中ぬけになる (J. Lederberg⁽⁵⁾ 1957) (図2参照)。したがってペニシリンは少なくとも2つの作用を持っていて、低い濃度では隔壁形成を止め、高い濃度では細胞の伸長にかかわる細胞壁形成を阻害して溶菌するのである。しかし当時は何もわからなかったで、ペニシリンはおそらく細胞に入って呼吸作用などに関する酵素にくっつくのであろう (ペ

図1 (ベンジル-) ペニシリン

図2 ペニシリン等 β -ラクタム剤によって引き起こされた大腸菌の溶菌 (左、アンピシリン) と隔壁を持たないフィラメント状細胞 (右、セファレキシリン).

図3 (上) Park-メクレオチド (UDP-*N*-アセチルムラミル-L-アラニル-D-グルタミル-L-リジル [またはメソ-ジアミノピメルル]-D-アラニル-D-アラニン) と (下) ペプチドグリカン生合成のリピド中間体 (*N*-アセチルグルコサミル-*N*-アセチルラミル[-ペンタペプチド]-PP-ウンデカプレノール) (*Micrococcus luteus* の場合).

図 4 ペプチドグリカン合成のリビドサイクル (大腸菌の例. 多くのグラム陽性菌では meso-Dpm が L-Lys になる).

ニシリン結合 component), では ATP の量をみよう, といった方向の研究がいわゆる J. T. Park のヌクレオチド (UDP-*N*-アセチルムラミル・ペンタペプチド) (図 3) の発見となり⁽⁶⁾ (1952), 一方, *N*-アセチルムラミル・テトラペプチドが細胞壁ペプチドグリカンの基本成分として同定されるに及んで⁽⁷⁾, ペニシリンの殺菌作用と細胞壁生成とが結びついたのである.

II. リビド中間体の発見

私はこのころ西ドイツ・ミュンヘンの F. Lynen 教授の研究室で脂肪酸生成を学んだ後, 米国の J. L. Strominger 教授のもとに移り, 最初リボ多糖体の, 次にペプチドグリカンの生合成に取り組んだ. 放射能標識した基質 (Park のヌクレオチド) を使ってペプチドグリカン生合成を行わせていたところ, そのときいつも副産物として多量の標識された物質がペーパークロマトグラムの先端部に現れるのになやまされた. それを私たちは「ごみ」と呼んでいたが, 無標識基質を多量に加えて標識を「ごみ」から追い出してみると, それはペプチドグリカンのなかに入る. このことから「ごみ」はリビド性の中間体であることがわかった^(8,9) (1965 年). この中間体はピロリン酸を介してペプチドグリカンの最小単位 (二糖ペプチド) があるリビドとつながったものであることがわかったが⁽¹⁰⁾ (図 3), そのリビド部分が何であ

るかはわからなかった. 私が翌年帰国して, 東大農学部 の田村學造先生がメバロン酸 (火落酸) 要求性の火落菌 がユビキノ等既知のイソプレノイドを持たず, 取り込まれたメバロン酸がどこで使われるのか明らかでないが, ^{14}C で標識したメバロン酸が細胞膜画分に入ってゆくということを見出されたのを耳にしたとき, これが Lynen 教授の研究室で親しんできたイソプレノール・ピロリン酸のどれかに間違いないと考え, 共同してバシトラシン (リビド・ピロリン酸・ピロホスファターゼ阻害物質, 図 4) 存在下に ^{14}C -メバロン酸由来の化合物 (リビド・ピロリン酸) の蓄積を突きとめるところまでいったが, kg 単位の菌体から多量の試料の調製とガスマスによる構造決定なる方法にふみ切れなかった. しかし細菌のリビド中間体については元来私たちが行ったとはいえ米国で発見されたものであるから仕方がないという点もあったが, それに引き続いて高等動物で同様な多糖合成のリビド中間体——ドリコールリン酸・糖化合物——を見出すことをしなかったのはまことに残念な思いであり, 共同研究者として田村先生にも, また 1965 年にすでにその研究をすることをすすめられた恩師の Lynen 教授にも, 申し訳ない気持である.

III. トランスグリコシラーゼとペニシリン感受性のトランスペプチダーゼ, および細胞壁合成の遺伝学さて, リビド中間体からペプチドグリカンを合成する

酵素のほうは 1965 年に J. S. Anderson らと黄色ブドウ球菌およびマイクロコッカスの細胞壁で見出すことができたが、これらの酵素の作るペプチドグリカンが架橋していない、一本鎖であった⁽⁹⁾。しかしその後、現在東北大農学部におられる伊崎和夫博士の協力を仰いで行った大腸菌細胞膜の実験では、生成したペプチドグリカンは架橋しており、その架橋反応はペニシリンで阻害された。すなわち大腸菌の細胞膜には、リピド中間体から長いペプチドグリカン鎖を作る「トランスグリコシダーゼ」と、これのペプチド側鎖を結び合わせて架橋する、ペニシリン感受性の「トランスペプチダーゼ」が存在することがわかった⁽¹¹⁾。

以上の研究を終えて帰国し、東大応用微生物研究所に就職してからは、米国で行ったペプチドグリカン生合成の研究を継続するのは公正でない感じがしたので、方向を変えて、主に細胞壁生合成の遺伝学の研究を開始した。現在東大農学部の松沢洋君、広島大工学部の宮川

図 5 大腸菌染色体上に 8 分の 1 ずつはなれて存在するペプチドグリカン生合成の遺伝子群。本文中の *mra*, *mrb* 遺伝子群に加えて、*mrd* 遺伝子群は形態形成に参与する遺伝子群であり⁽¹⁴⁾、やはり *mra* と染色体上の 8 分の 1 隔たる。横に並んだ遺伝子名は同一の遺伝子の別名である。

都吉君、大阪市大医学部の杉野義信博士と共同して、大腸菌のペプチドグリカンの生合成に関する遺伝子が、染色体上少なくとも 2 つの位置にかたまっていること (*mra*, *mrb* 遺伝子群, 図 5) を見出したが、重要なことは、この 2 つの遺伝子群が染色体上、ちょうど染色体の全長の 8 分の 1 離れて存在することである^(12,13)。これは何かというと、現在の細菌は三十数億年くらい前に、今よりずっと短い染色体からできていて、それが倍化によって 2 倍、4 倍、8 倍……の長さの染色体になったという考えがあり (D. Zipkas & M. Riley⁽¹⁵⁾, 溝淵潔他⁽¹⁶⁾, 1975), これを認めると染色体上その全長の半分、4 分の 1、8 分の 1 の距離はなれている、互によく似た遺伝子は、染色体倍化についての 1 世代、2 世代、または 3 世代前には同一の遺伝子であったものが、この間に分化して、同様な、しかし多少異なった特異性を持つ酵素の遺伝子となったものと考えられるのである。*mra*, *mrb* 遺伝子群の存在はしたがって、今から 3 世代前に細菌の細胞壁の構造と機能が大きく変って複雑になった可能性を示していると考えられる (この問題は後出)。

このころ、蛋白質をポリアクリルアミド・ゲル電気泳動で分離する方法が進歩して、膜蛋白質も急速に明らかになってきた。そしてかつてのペニシリン結合蛋白質 (component) は細胞当たり複数種類のものがあり、それ

図 6 トランスペプチダーゼ、 β -ラクタマーゼの反応機構とペニシリン阻害機構。

図 7 トランスグリコシラーゼ活性とトランスペプチダーゼ活性を持つ双頭酵素。疎水性の高い部分で細胞質膜に埋め込まれていると思われる。

それが細胞の複製——伸長方向の決定、伸長、分裂——のどれかの段階に関与していることが明らかになった (B. G. Spratt⁽¹⁷⁾, 1975)。ペニシリンは架橋酵素のトランスペプチダーゼと共有結合してこの酵素活性を阻害するから⁽¹⁸⁾ (図 6 参照)、ペニシリン結合蛋白質とトランスペプチダーゼは同一のものであると考えられた。

さて私たちは国立遺伝学研究所の廣田幸敬博士のご好意を受け、東大農学部キャンパス紛争の末期、同研究所で大腸菌ペニシリン結合蛋白質の変異株の徹底的な検索を試みた。そしてまず低分子量 (42,000~49,000) のペニシリン結合蛋白質 (PBP と略す)、PBP-4 と PBP-5 の変異が全く細胞の生育、細胞壁の形成に影響しないことを見出し (1976)、細胞にはずいぶんと無駄にもみえる安全装置が働いていることを感じた⁽¹⁹⁻²¹⁾。それよりさらに衝撃的であったのは、共同研究者の玉城成夫君が高分子量 (約 10 万) の PBP-1 B の欠失株を分離し、これがトランスグリコシダーゼ活性 (およびおそらくトランスペプチダーゼ活性) を欠きながら、PBP-1 A (分子量約 10 万) を過剰に生成する変異が加わることによって生育を続けることを発見して⁽²²⁾、細胞中にこのような detour 系 (補償系) が存在することが明らかになったことである^(22,23) (1977、玉城君はこの研究および他の研究に関連して昭和 58 年度日本農芸化学会奨励賞を頂戴した)。

IV. 双頭酵素の発見

ペニシリン結合蛋白質 (PBP) は理論上トランスペプチダーゼのはずであったが、どうして PBP-1 B 欠失で細胞膜のトランスグリコシダーゼ活性までなくなったの

図 8 双頭酵素によるペプチドグリカン網目構造の形成とペニシリンによる架橋形成反応の阻害。(A) トランスグリコシラーゼ活性部位の上で、リピド中間体からの二糖ペプチド単位 (図 3 を参照) がつぎたされ、グリカン鎖が伸長する；(B) トランスペプチダーゼ活性部位の上で、向い合ったペプチド側鎖が架橋する。このとき一方のペプチド側鎖の末端の D-アラニン 1 分子はずれる。グリカン鎖は 1 反復単位の 2 糖ごとに 90° 回転して、4 ピッチごとに同じ側の隣のグリカン鎖と架橋すると考えられる (PBP-1 B の場合)；(C) PBP-5 または -6 はカルボキシペプチターゼとして働いて、架橋反応に直接関与しなかった末端 D-アラニンをはずして架橋反応を終結する；(D) こうして 25% 架橋したペプチドグリカンが整然と作られる；(E) もしペニシリン等の β -ラクタム剤が PBP-1 B のみならず、-1 A のトランスペプチダーゼもみな一緒に結合して阻害してしまうと、グリカン鎖の伸長は起きるが架橋形成反応は行われないで；(F) 溶菌する。

か⁽²²⁾、この疑問は PBP-1 B を純粋分離してゆく過程で明らかになった。PBP-1 B は他の PBP に比べて格段に高温や陰イオン性界面活性剤に対して安定であるという特性を有するが⁽²³⁾、細胞膜やその界面活性剤抽出画分によるペプチドグリカン生合成をみると、トランスグリコシダーゼ、トランスペプチダーゼ活性とも、PBP-1 B のペニシリン結合活性と同程度に高い高温、陰イオン性界面活性剤耐性があつた。さらに、PBP-1 B をできるかぎり純粋にしてみると、この標品は上記の 2 つの生合成酵素反応を行った⁽²⁴⁾。すなわち、PBP-1 B は 2 つの異なった酵素活性を持った双頭酵素であつて (図 7)、細胞膜

の上でリビド中間体から供給される二糖ペプチド単位を重合、架橋してペプチドグリカンの網目構造を一度に作り上げてしまう酵素である^(26,27) (図8)。遺伝子工学的操作により、この蛋白質のトランスグリコシラーゼ部分はトランスペプチダーゼ部分より N-末端側にあることも明らかになった⁽²⁸⁾。

PBP-1B は細胞伸長にかかわるペプチドグリカン合成酵素で、伊崎博士と私たちがかつて見出した細胞膜酵素活性はこれによるものである⁽¹¹⁾。では他の PBP 活性、すなわち PBP-1A (細胞伸長, 1B の detour), 2 (伸長方向の決定), 3 (細胞分裂における隔壁形成) はどこにあるのか、これはそれぞれに必要な酵素反応条件があるからであって、その詳細は別に報告する。いずれにしても研究室の若い人たち (中川純一、石野史敏、富岡茂雄そのほかの諸君) の努力によって、大腸菌の高分子量 PBP すべての双頭酵素活性が明らかになった⁽²⁹⁻³⁴⁾。PBP-2 の活性発現には PBP-2 の遺伝子と隣接する、ある遺伝子の存在が必要で、これはおそらく PBP-2 の活性制御に関係あると思われるが、東大農学部の本田隆久教授、ハーバード大学の J. L. Strominger 教授の研究室との共同研究で、現在これらの蛋白質の全構造を明らかにすることが進められている。

V. 将来の問題点

隔壁形成酵素や細胞の形を決める酵素がどのようにして細胞の適切な位置で機能を発揮するのか、という古くて新しい問題はまだ解決までに時間を要するが、それ以外にいくつかの興味ある問題がある。いわく、ペニシリンは以上に述べた以外の作用標的はないのか、ペニシリンは何のために細胞で作られるのか、他の細菌を殺すために、しかし本来は自分の細胞が、ある必須の反応の調節因子としてそれを必要としたのではないだろうか。いくつかの細菌からモノサイクリック β -ラクタムが見出されたのはこの考えに有力な支持を与える。また高等動物の睡眠物質、免疫調節物質などに細菌細胞壁類似の構造の関与するのはどのような機構によるのか、先に述べた遺伝子の倍化後変化した細菌の遺伝子が動物細胞の染色体上に残っていないだろうか。この分野における興味ある現象はまだ尽きないようである。

最後に私を糖生化学に結びつけてくださった二國二郎先生、研究を温く見守ってくださった丸尾文治先生に感

謝します。

- (1) A. Gratia and S. Dath: *C. R. Soc. Biol.*, **92**, 461 (1925).
- (2) A. Fleming: *Br. J. Exptl. Pathol.*, **10**, 226 (1929).
- (3) E. Chain, H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jenkins, J. Orr-Ewing and A. G. Sanders: *Lancet*, **239**, 226 (1940).
- (4) A. D. Gardner: *Nature*, **146**, 837 (1940).
- (5) J. Lederberg: *J. Bacteriol.*, **73**, 144 (1957).
- (6) J. T. Park: *J. Biol. Chem.*, **194**, 897 (1952).
- (7) M. R. J. Salton: "Bacterial Cell Walls," Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London and New York, 1964.
- (8) J. S. Anderson, M. Matsushashi, M. A. Haskin and J. L. Strominger: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **53**, 881 (1965).
- (9) M. Matsushashi, C. P. Dietrich and J. L. Strominger: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 587 (1965).
- (10) J. L. Strominger, M. Matsushashi, J. S. Anderson, C. P. Dietrich, P. M. Meadow, W. Katz, G. Siewert and J. M. Gilbert: "Methods in Enzymology," Vol. 8, ed. by E. F. Neufeld and V. Ginsburg, 1966, p. 473.
- (11) K. Izaki, M. Matsushashi and J. L. Strominger: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 656 (1966).
- (12) H. Matsuzawa, M. Matsushashi, A. Oka and Y. Sugino: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 682 (1969).
- (13) T. Miyakawa, H. Matsuzawa, M. Matsushashi and Y. Sugino: *J. Bacteriol.*, **112**, 950 (1972).
- (14) S. Tamaki, H. Matsuzawa and M. Matsushashi: *J. Bacteriol.*, **141**, 52 (1980).
- (15) D. Zipkas and M. Riley: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 1354 (1975).
- (16) K. Mizobuchi and H. Saito: "Proceedings of the 1975 Molecular Biology Meeting of Japan," 1975, p. 60.
- (17) B. G. Spratt: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 2999 (1975).
- (18) D. J. Tipper and J. L. Strominger: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 1133 (1965).
- (19) M. Matsushashi, Y. Takagaki, I. N. Maruyama, S. Tamaki, Y. Nishimura, U. Ogino, H. Suzuki and Y. Hirota: "Abstracts from the 8th International Symposium on Carbohydrate Chemistry," 1976, Tokyo, p. 105.
- (20) M. Matsushashi, Y. Takagaki, I. N. Maruyama, S. Tamaki, Y. Nishimura, H. Suzuki,

- U. Ogino and Y. Hirota : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 2976 (1977).
- (21) M. Matsuhashi, I. N. Maruyama, Y. Takagaki, S. Tamaki, Y. Nishimura and Y. Hirota : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 2631 (1978).
- (22) S. Tamaki, S. Nakajima and M. Matsuhashi : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5472 (1977).
- (23) H. Suzuki, Y. Nishimura and Y. Hirota : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 664 (1978).
- (24) J. Nakagawa, H. Matsuzawa and M. Matsuhashi : *J. Bacteriol.*, **138**, 1029 (1979).
- (25) J. Nakagawa, S. Tamaki and M. Matsuhashi : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1379 (1979).
- (26) M. Matsuhashi, F. Ishino, S. Tamaki, S. Nakajima-Iijima, S. Tomioka, J. Nakagawa, A. Hirata, B. G. Spratt, T. Tsuruoka, S. Inouye and Y. Yamada : "Trends in Antibiotic Research—Genetics, Biosynthesis, Actions & New Substances," Japan Antibiotics Research Association, Tokyo, 1982, p. 99.
- (27) M. Matsuhashi, J. Nakagawa, S. Tamaki, F. Ishino, S. Tomioka and W. Park : "The Target of Penicillin," Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, 1983, p. 499.
- (28) J. Nakagawa, S. Tamaki, S. Tomioka and M. Matsuhashi : *J. Biol. Chem.*, in press.
- (29) J. Nakagawa and M. Matsuhashi : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 1546 (1982).
- (30) F. Ishino, K. Mitsui, S. Tamaki and M. Matsuhashi : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 287 (1980).
- (31) F. Ishino and M. Matsuhashi : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 905 (1981).
- (32) F. Ishino, S. Tamaki, B. G. Spratt and M. Matsuhashi : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 689 (1982).
- (33) S. Tomioka, F. Ishino, S. Tamaki and M. Matsuhashi : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 1175 (1982).
- (34) S. Tomioka, F. Ishino, S. Tamaki, A. Sudo, J. Nakagawa and M. Matsuhashi : "Penicillin Target Enzymes," Walter de Gruyter Co., Berlin, New York, 1983, p. 505.