薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (11) 1185-1189 (1983)

肺炎球菌細胞壁中に存在する、リゾチーム消化抵抗性因子

大野尚仁, 宿前利郎, 宮崎利夫*

東京薬科大学

Resistant Factors in *Streptococcus pneumoniae* Cell Wall to Lysozyme Digestion

NAOHITO OHNO, TOSHIRO YADOMAE and TOSHIO MIYAZAKI*

Tokyo College of Pharmacy, 1432-1 Horinouchi, Hachioji,
Tokyo, 192-03, Japan

(Received May 19, 1983)

Streptococcus pneumoniae cell is known to resist to lysozyme digestion. The resistant factor was examined by using cell and solubilized cell wall components (AS') prepared by the autoplast formation. Although the cell bound lysozyme at 4°C, it resists to lysozyme digestion. A certain component contained in AS' formed an insoluble complex with lysozyme and inhibited the activity of lysozyme. The insoluble complex was mainly composed of protein and phosphate ester. The inhibitory activity was destroyed by heat, protease, or nuclease treatment. This suggests that the resistant factor is a non-peptidoglycan component of the cell wall.

Keywords—*Streptococcus pneumoniae*; lysozyme; lysozyme inhibitor; non-peptidoglycan component; cell wall

緒 言

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は肺炎の主病因菌であり、現在でも感染症の中で重要な位置をしめている。肺炎球菌は常在細菌の1種であるが、通常は生体防御系により感染の成立を妨げられている。

生体防御系としては、特異的因子としての免疫グロブリンやT細胞因子および、非特異的な因子としてのリゾチームや多核白血球の存在などがあげられる。

肺炎球菌は、リゾチーム消化に対して抵抗性を示すと言われているが、その詳細な解析はなされていない。¹⁾ 一般に、細菌のリゾチーム消化抵抗性には、ペプチドグリカンの化学的置換度の違いが大きな要因であると考えられている。²⁾ 著者らは、肺炎球菌に対するリゾチームの種々の影響を検討する中で、消化に抵抗性を示す一方、リゾチームによって菌の自己融解が促進されることを見出す³⁾ と共に、細胞壁ペプチドグリカン中にN-アセチル化されていないグルコサミン残基の存在することを報告し、これがリゾチーム消化抵抗性の一因子であろうと推定した。⁴⁾ また、すでに著者らは、菌の自己融解酵素を利用することによって、高濃度の蔗糖の存在下に細胞質因子の夾雑無しに細胞壁を可溶化する方法を確立している。⁵⁾

本報においては、ペプチドグリカンの構造上の因子とは異なる新たなリゾチーム消化抵抗性因子を、可溶化細胞壁画分中に見出したので報告する。

実 験 の 部

材料 卵白リゾチームは Boehringer Mann Heim GmbH の製品を、また、*Micrococcus luteus* 菌体は Miles 社製のものを購入した。酵素分解には、pronase P (科研化学) trypsin (Boehringer), DNase (Boehringer), RNase (Boehringer) を使用した。*S. pneumoniae* R36a 菌株は、ATCC より購入した。

化学分析 蛋白含量、リン含量、アミノ糖含量は、ウシ血清アルブミン (BSA), Na₂HPO₄, GICNH₂·HCl を標準とし、Lowry-Folin 法,⁶⁾ Chen らの方法,⁷⁾ Morgan-Elson 法⁸⁾ で測定した。

菌体へのリゾチームの結合 Germaine らの方法⁹⁾ を用いて以下に述べる方法に従って行った。すなわち、*M. luteus* 菌体および *S. pneumoniae* R36a 菌体 (ホルマリン固定菌体) を 67 mM リン酸緩衝液にて、350 倍

希釈した時の 660 nm の吸光度が 0.08 となるように調製した。氷冷下、0—1 ml の各菌体懸濁液に、 $1 \times 10^{-3}\%$ のリゾチーム水溶液を加え、混和した後、水中に放置した。遠心分離 (1760 g, 20 分) 後、各上清 1 ml をそれぞれ 0.75 ml の *M. luteus* 菌体と混和し、37°C にて 20 分間反応の後、100°C、3 分間煮沸して酵素を失活させ、660 nm の吸光度を比較した。

可溶化細胞壁画分の調製 Lacks と Neuberger の autoplast 化法¹⁾に準じ、下記のように行った。⁵⁾ すなわち、Todd-Hewitt broth (DIFCO) にて対数増殖後期まで培養した菌を氷水にて冷却、集菌後、次の条件でプロトプラスト化した。すなわち、氷冷下に 1 M sucrose, 1 mM MgCl₂, 3 mM 2-mercaptoethanol を含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液, pH 7.6 に、20 倍希釈した時の 660 nm の吸光度が約 0.2 のなるように懸濁し、その懸濁液を 37°C でゆっくり振盪した。経時的に一部を抜きとりプロトプラスト化を確認し、4 時間振盪後、遠心分離 (27000 g, 5 分) してプロトプラスト (沈殿) と可溶化細胞壁 (上清) に分け、上清を透析、濃縮後、凍結乾燥して可溶化細胞壁画分 (AS') を得た。

リゾチーム阻害活性の測定 *M. luteus* 菌体 (330 µg), リゾチーム (1 µg) を含む、46 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に検体を加え、18°C に放置し、660 nm の吸光度を経時的に測定した。比吸光度 (relative turbidity) は、反応 0 時間の吸光度の値を 100% として表わした。種々の処理による阻害活性の回収率の測定は、18°C、30 分間反応後、100°C、3 分間加熱することで反応を止めた後、下記の式から求めた。

$$\text{Recovery of activity} = \frac{\text{Test} - B}{A - B} \times 100(\%)$$

Test: AS' あるいは、種々の処理をした AS' を加えた時の吸光度

A: リゾチームを加えない時の吸光度

B: AS' を加えていない時の吸光度

可溶化細胞壁画分へのリゾチームの結合 AS' (200 µg) を 1 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 5.6 に溶解し、5% のリゾチーム水溶液を少量ずつ加え、その時の 660 nm の吸光度を測定した。

結 果

肺炎球菌細胞へのリゾチームの結合

肺炎球菌にリゾチームが何らかの効果を与えているか否かを検討するため、最も直接的な方法として、肺炎球菌へのリゾチームの結合能の有無を検討した。Fig. 1 に示すように、肺炎球菌細胞は *M. luteus* 菌体の場合より

Fig. 1. Adsorption of Lysozyme on Pneumococcal Cell Surface

The procedure was described in "Experimental Section".

○: *M. luteus* cell,

●: formalinized pneumococcal cell.

は少量ではあるがリゾチームを菌体表面に結合する能力を有していた。この事実は、肺炎球菌の示すリゾチーム消化抵抗性が、リゾチーム消化を受けにくいペプチドグリカンを持つという理由だけで生じているのではなく、菌自身の成分が積極的にリゾチームの酵素活性を阻害している可能性のあることを示唆している。

可溶化細胞壁成分へのリゾチームの結合

Fig. 1 で示した事実が、菌体表層成分中のいかなる物質へのリゾチームの結合によるのかを知るため、既報⁵⁾で確立した、細胞壁の可溶化法である autoplast 化法によって調製した可溶化細胞壁画分 (AS') を用いて検討した。この画分 AS' をリゾチームと反応させると、リゾチームを加えると同時に不溶性の複合体を生じた。この複合体の生成は、低濃度では濃度依存性を示し、高濃度では一定値を示した (Fig. 2)。

この不溶性複合体は、Table I に示したように、タンパク質およびリン酸を主成分として含む物質で

Fig. 2. Examination of Lysozyme Precipitable Materials in AS'

The procedure was described in "Experimental Section."

○: AS',

●: AS' digested with pronase and nucleases.

TABLE I. Compositions of Lysozyme-Lysozyme Precipitable Material Complex^{a)}

	Protein ^{b)} (mg)	Phosphate ^{c)} (μg)	Total hexosamine ^{d)} (μg)
Lysozyme	12.5	0.0	0.0
AS'	0.36	78.4	66.5
Complex	1.07 (8.3) ^{e)}	29.6 (37.8)	4.7 (7.1)

a) Preparation of lysozyme-lysozyme precipitable material complex was carried out as described in "Experimental Section" except that the reaction was performed by using 1.0 mg of AS' as a starting material.

b) reference 6).

c) reference 7).

d) reference 8).

e) parenthesis shows recovery from lysozyme + AS' as w/w%.

Fig. 3. Examination of Lysozyme Inhibitory Materials in AS'

The procedure was described in "Experimental Section."

●: in the presence of AS',

○: control.

あり、ペプチドグリカンやテイコ酸の主成分であるアミノ糖は、わずかにしか含まれていなかった (Table I).

この事実は、リゾチームの肺炎球菌細胞への結合に関与する物質は、細胞壁ペプチドグリカンや、テイコ酸以外の細胞壁成分であることを示唆する。さらに、この複合体は AS' を、あらかじめタンパク分解酵素、核酸分解酵素で処理した場合には生じなかったことから (Fig. 2), この場合は非ペプチドグリカン成分を介して起こることを示唆している。この非ペプチドグリカン成分は、リゾチームを吸着し、ペプチドグリカンへのリゾチームの接近を妨げるた

め、菌のリゾチーム消化抵抗性を増しているものと考えられる。

可溶性細胞壁成分によるリゾチーム活性の阻害

リゾチームとの間に不溶性複合体を形成することが、リゾチームの酵素活性にいかなる影響を与えるか、*M. luteus* 菌体を基質として用い、菌体消化速度への AS' 添加の影響を検討した。

Fig. 3 に示したように、AS' 共存下では、*M. luteus* 消化速度は低下し、肺炎球菌細胞壁中にリゾチームの活性を阻害する物質の存在することが推定された。AS' 中には、Table I から示唆されるように、ペプチドグリカン断片も含まれるため、基質が競合的に作用して、見かけ上 *M. luteus* 菌体の溶菌速度を遅くしているという可能性も残されるが、この点に関しては、Fig. 4 に示したように、AS' をあらかじめ熱処理、酸処理、あるいは酵素処理をすることによって活性が消失したことから、この可能性は否定し得た。

さらにこの阻害活性が、ペプチドグリカン成分に由来しないことを確認するため、Sephacrose 4B カラムを用いて AS' を分画し、活性物質の溶出位置と、ペプチドグリカン成分の溶出位置を比較した。Fig. 5 に示したように、この阻害活性は、ペプチドグリカンおよび、テイコ酸を含むと考えられるアミノ糖とリン酸の主成分では検出されず、より高分子量側で検出された。

この画分は 280 nm の吸収に基づくタンパク質と少量のリン酸を含有しており、Table I で示した不溶性成分

Fig. 4. Properties of LIM

Effect of several kinds of pretreatments on the lysozyme inhibitory activity were determined. The assay of lysozyme inhibitory activity was described in "Experimental Section". Pretreatments were performed as follows; (1) Each 200 μ g of AS' was heated at 100°C for 1, 10, 30, and 60 min, and then cooled by water. (2) Each 200 μ g of AS' was hydrolyzed with 0.01, 0.1, and 1 M HCl at 100°C for 3 h, and then lyophilized. (3) Each 200 μ g of AS' was digested by pronase (20 μ g, 10 mM phosphate buffer containing 0.1% MgCl_2 and 1.25% NaCl pH 7.4), trypsin (20 μ g; 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0), DNase (1 μ g, the same buffer as pronase), and RNase (1 μ g; the same buffer as pronase) for 36 h at 37°C, and then heated at 100°C for 3 min.

Fig. 5. Elution Profile of LIM on a Sepharose 4B Column Chromatography

AS' was applied on a column (1.9 $\times$ 70 cm) of Sepharose 4B. The column was eluted with saline and 2.8 ml fractions were collected.

- : phosphorus,⁷⁾
- : total hexosamine,⁸⁾
- : OD 280,
- : LIM activity.

との類似性が観察された。我々は、この阻害活性物質を、lysozyme inhibitory material (LIM) と命名した。

考 察

既報³⁾において、肺炎球菌菌体はリゾチーム消化抵抗性を示し、その抵抗性の一因子として細胞壁中に存在する *N*-アセチル化されていないグルコサミン残基が考えられることを報告した。さらに今回の実験で得られた結果から、リゾチームは肺炎球菌菌体に対する結合能を有しており、この結合は細胞壁中に存在する非ペプチドグリカン成分によること、さらに、この非ペプチドグリカン成分中には、リゾチーム活性を阻害する熱不安定な高分子物質が含まれていることを明らかにした。この非ペプチドグリカン成分もまた、消化抵抗性の一因と考えられる。

一般にリゾチーム消化抵抗性は細胞壁の構造上の因子のみで論じられており、²⁾ 上述のような因子が肺炎球菌細胞壁中に存在することを見出したのは、これが初めてである。

リゾチームの蛋白化学的および酵素化学的解析は、詳細に行われており、基質との反応ばかりでなく、基質以外の物質、例えば、cytochromes, insulin, protamine のような蛋白、chondroitin sulfate, heparin, nucleic acid のようなポリアニオン、detergents などとの反応についても解析がなされている。¹⁰⁾ リゾチームは塩基性蛋白であることから、種々のポリアニオンと結合性を示し、その酵素作用が阻害されることが明らかにされている。¹⁰⁾ 本報中で示した阻害活性が核酸分解酵素で消失することおよび、リゾチームとの間に生じた不溶物のリン酸含量が高いことから、酸性蛋白や核酸が重要な役割をはたしていると考えられる。しかしながら、この活性は、同時に熱不安定であることから、それらの一次構造のみに起因する非特異的なものでなく、高次構造あるいは特別な結合を要求するような特異的な反応と考えられる。さらにこの反応は二価陽イオンの存在下にも消去されなかった (c.f. Fig. 4, pronase). これらの点を考え合わせると、本報中で得られたリゾチーム阻害活性物質は、少なくとも基質類似物ではなく、高分子性物質であることを、強く示唆するものである。

高分子性の酵素阻害物質は、酵素反応機構の解析において重要な位置をしめており、SSI (*streptomyces subtilisin inhibitor*)¹¹⁾ や SBTI (*soy been trypsin inhibitor*)¹²⁾ などに関して精力的に研究が進められている。上にも述べたように、リゾチームは結晶構造¹³⁾や、基質との反応性¹⁴⁾など詳細な解析のなされている酵素の1つであるが、本報中に示した阻害活性物質の解析は、肺炎球菌の病原性を考える上で重要な性質であるのみならず糖加水分解酵素の活性阻害機構の解析においても役立つものと思われる。

本報中で得た阻害活性物質は、生菌体を高濃度の蔗糖の溶液中で **autoplast** 化し、菌体内成分の夾雑なしに細胞壁画分を得ることによって初めて得られる物質であり、非常に緩和な調製条件下にしか得られない物質であることから、細胞膜、あるいは細胞質成分の夾雑が全く無いとは言い切れず、この阻害活性にこれらの物質が何らかの影響を与えている可能性については現時点では否定し得ず、今後の問題であろう。

引用文献

- 1) S. Lacks, M. Neuberger, *J. Bacteriol.*, **124**, 1329 (1975).
- 2) H. Hayashi, Y. Araki, E. Ito, *J. Bacteriol.*, **113**, 592 (1973).
- 3) N. Ohno, T. Yadomae, T. Miyazaki, *Microbiol. Immunol.*, **26**, 347 (1982).
- 4) N. Ohno, T. Yadomae, T. Miyazaki, *Carbohydr. Res.*, **107**, 152 (1982).
- 5) N. Ohno, T. Yadomae, T. Miyazaki, *Microbiol. Immunol.*, **25**, 1229 (1981).
- 6) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 7) P. S. Chen, Jr., T. Y. Toribara, H. Warner, *Anal. Chem.*, **28**, 1756 (1956).
- 8) J. M. Ghuyssen, D. J. Tipper, J. L. Strominger, "Methods in Enzymology: Complex Carbohydrates," Vol. 8, ed. by E. F. Neufeld, V. Ginsburg, Academic Press, Inc., New York, 1966, pp. 685—699.
- 9) G. R. Germaine, L. M. Tellefson, *Infect. Immun.*, **26**, 991 (1979).
- 10) T. Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips, J. A. Rupley, "The Enzymes: Elimination and Addition, Aldol Cleavage and Condensation other C-C Cleavage, Phosphorolysis, Hydrolysis; 3rd ed." Vol. 7, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, Inc., New York, 1972, pp. 665—868.
- 11) S. Murao, S. Sato, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 160 (1972).
- 12) V. Frattali, R. F. Steiner, *Biochemistry*, **7**, 521 (1968).
- 13) C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, *Nature* (London), **206**, 757 (1965).
- 14) F. W. Ballardie, B. Capon, M. W. Cuthbert, W. M. Dearie, *Bioorganic Chem.*, **6**, 483 (1977).