

Micrococcus lysodeikticus 細胞壁の化学構造

〔Glucose 含有多糖部(Glc-P)の構造について〕

田 中 昭 子

緒 言

細菌細胞壁は細胞質膜でとり囲まれた細胞の内部構造を外部環境から保護することを一つの主な機能とし、細菌細胞が生存、増殖するために極めて重要な構築単位である。

一方化学的には細菌一般に共通して存在する Basal layer としての Murein (又は Mucop-eptide) と呼ばれる基礎構造と、細菌によって異なる Special layer としての特殊構造から成る。この基礎構造である Murein (グリコサミニドペプチド、ペプチドグリカンとも呼ばれる) は、ムラミン酸、D型アミノ酸などの様に、細菌以外の生物細胞、細菌でも細胞壁以外の部分には一般に存在しない構成成分から成り、又特殊構造には夫々の細菌に特有の物質が含まれ、菌属、菌種に特異な構造を持ち、抗原性の原因となっているものが多い。

Micrococcus lysodeikticus においては、Perkins¹⁾ により、その特殊構造として、N-アセチルアミノマンヌロン酸とグルコースが(1→6)結合しているのではないかと推定されている。著者は比較的大量の Glc-P を用いて過沃素酸酸化を行ない、更に之を部分加水分解することにより、存在すると考えられるグリセリンのアミノマンヌロサミナイドの単離を試み、若干の知見を得たので報告する。

実験材料と方法

(1) Glc-Pの調製について。

(A) 実験材料 Micrococcus lysodeikticus の乾燥 cell は、Dr. James. T.Park より恵与されたものを使用した。

(B) 分析方法

○Hexose の定量～オルシノール-硫酸法²⁾ (Glucose を standard として使用)。

○Peptide の定量～Lowry³⁾ 法

○アミノ糖及びアミノ酸～日立アミノ酸自動分析計 KLA-2 形を使用。

○中性糖～柳本 Gaschromatography GCG-550F を使用。

○リン酸の定量～Chen, Toribara & Warner⁴⁾法を使用。

(C) 実験 (乾燥菌体よりグルコースポリマーの調製) Scheme 1

菌体20gずつを約2lのH₂Oに懸濁し、5%のトリクロル酢酸(TCA)を加えて37°C、6日間振盪し乍らGlc-Pを抽出した。TCA処理液は10,000r.p.m., 15分間遠心分離し、その上清を集めて濃縮し、H₂Oに対して透析を行い、TCAを除去した。透析終了後、非透析性部分を更に遠心分離した後、上清を濃縮し、DEAE-Cellulose column chromatographyを行った。

column size 2.2×66cm, 流速は13sec/dropとし、pH7.0 Phosphate buffer (1/200M) + (0.02M 及び 0.3M) NaCl で step-wise に溶出した。

各 tube より 5μl ずつ Sampling して Hexose の定量を行い、二つのピークを得たので夫々を集めて分画 I 及び II とした。

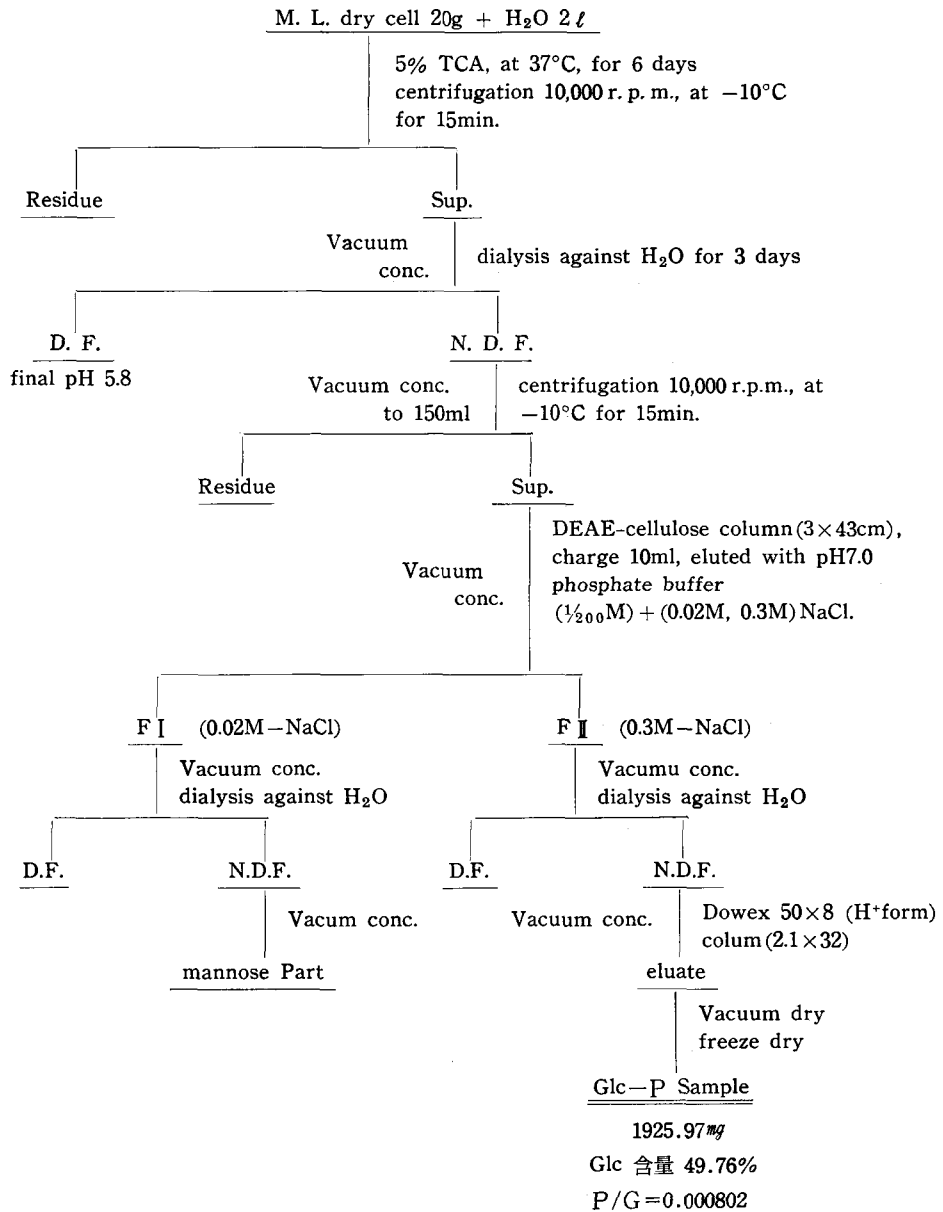
各分画は濃縮後再び H₂O に対して透析し、非透析性部分を夫々濃縮し、分画 I はその一部をとってガスクロマトグラフィーを行った。

分画 II は Dowex 50×8 (H⁺ form) column (2.1×32cm) を通して脱塩し、溶出液を集めて凍結乾燥して之を試料とした。

(D) Glc-P (分画 II) 試料の検討

- (1) 試料3.27mgを6N-HCl 0.6mlに溶かして120°C, 2時間加水分解し、0.1N-NaOHでpHを2.32としてアミノ酸自動分析計にかけてアミノ糖及びアミノ酸を検討した。
- (2) 試料3.43mgを5mlのH₂Oに溶かし、之より50μl, 100μlをSamplingして夫々Hexose及びPeptideのtotal O.D.を測定し、純度決定の日安とした。
- (3) 試料5.67mgを0.5mlの2N-HClにとかし100°C, 4時間加水分解してガスクロマトグラフィーを行った。(同時に分画 I, Glucose 及び Mannose Standard についても比較検討した。)
- (4) 試料中のリン酸の定量を行い、Free P 及び Total P を測定し、結合Pの量を決定した。
- (5) 試料3.43mg/5ml H₂Oの中より一部とり出して紫外部(260mμ及び280mμ)の吸収を調べて核酸の有無を検討した。

Scheme 1. Preparation of Glc-P



(2) Glc-P の Smith 分解

(A) 実験材料

(1)で調製した Glc-P 標品をそのまま使用した。

(B) 分析方法

○Paper chromatography

濾紙：東洋濾紙 No. 51 を使用した。

溶媒：*n-BuOH : Pyr : AcOH : H₂O = 60 : 40 : 3 : 45

発色試薬及び方法：

還元糖 AgNO₃ 法,⁷⁾ KIO₄-KI-starch 法⁸⁾

N含有物質 Cl₂-KI-starch 法⁹⁾

Ninhydrin 法¹⁰⁾

非還元糖 KIO₄-KI-starch 法

ウロン酸 B・P・B 法¹¹⁾

ヘキソサミン Elson-Morgan 法¹²⁾

Nin hydrin 法

N-アセチルヘキソサミン

Morgan-Elson 法¹⁴⁾

*n-BuOH : n-butanol, Pyr: Pyridine, AcOH : acetic acid

○Free -COOH 基の測定

0.1N-NaOH (f=1.008) による titration.

○H・CHO 生成量の測定

Acetylaceten-ammonia 法⁵⁾を使用した。

○H・COOH 生成量の測定

0.1N-NaOH (f=1.008) による titration.

○還元糖の定量

Perk-jonson 法⁶⁾

(C) 実験 Scheme 2.

(1) Periodate oxidation¹³⁾

先に調製した Glc-P 標品724.18mg (Glucose として約2mmole) を 500ml の水に溶かし、之に1.847g (約8mmole) の KIO₄ を 300ml の水に溶かしたものを混じ、

30°C, 99時間暗所で Periodate oxidation を行った。同時に同じ濃度の KIO_4 溶液を調製し, control とした。之等より各1mlずつ Sampling して290m μ の吸収を測定して KIO_4 の消費量を決定した。酸化終了後, $\text{H}\cdot\text{CHO}$ 及び $\text{H}\cdot\text{COOH}$ の生成量を検討した。

(2) NaBH_4 による還元

Oxidation 終了後, 過剰の KIO_4 を消費させるために, 0.32ml の ethylenglycol を加え, 24時間放置後, 生じた dialdehyde を還元するために1.1g の NaBH_4 を加えた。次いで KIO_3 を除去する目的で48時間 H_2O に対して透析を行い, 透析性部分の IO_3^- を250m μ の吸光度測定により透析の終了を確認した。

(3) 部分加水分解

非透析性部分濃縮液172mlを0.1N- H_2SO_4 濃度として 30°C, 116時間加水分解を行い, (還元力を測定して加水分解の終了を確認した。) $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 溶液で中和し, $\text{pH}6.2$ としたものを 3000 r.p.m., 5分間遠心分離して, 生じた BaSO_4 を除去した。その後上清410mlに次々と NaBH_4 を加え (計 14m mole) 水解により生じた glycolaldehyde の還元を行った。次いで反応液にメタノールを加えて30°Cで減圧下において BO_3^{2-} を除去し中和後残存 Glucose の定量を行った。

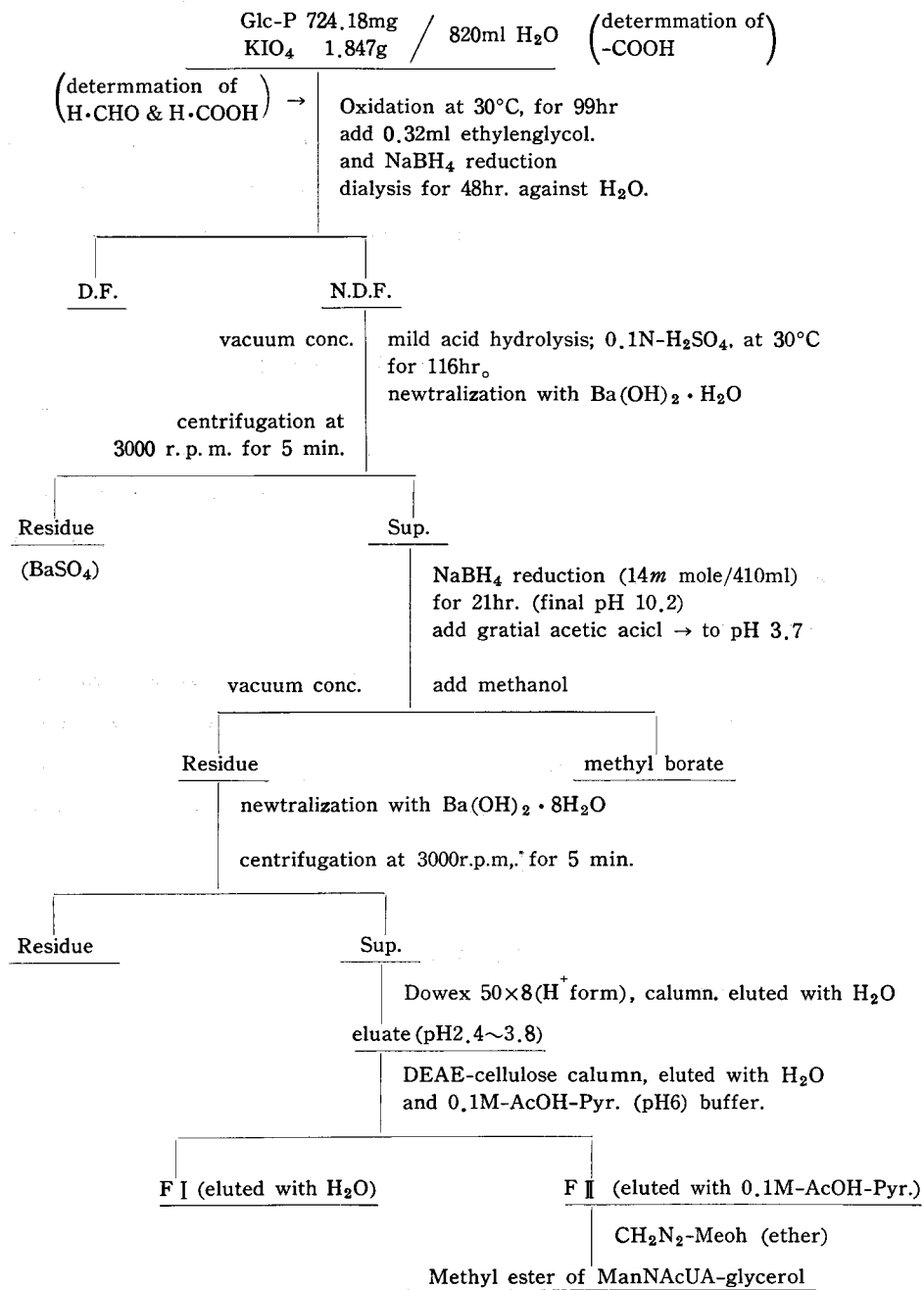
(4) DEAE-Cellulose column chromatography

(3)で得た反応液を 3000r. p.m., 5分間遠心分離し, 上清を濃縮後, Dowex 50 \times 8 (H^+ form) column (size 1.8 \times 15cm) を通し $\text{pH}2.4\sim 3.8$ の部分を集めて減圧濃縮し AcOH を除去した。更に DEAE-cellulose (400メッシュ, OH -form), column (size 2 \times 20.2cm) を用いて, H_2O 及び0.1M- AcOH -Pyr. ($\text{pH}6$)で stepwise elution を行い分画 I 及び II を得た。

(5) メチルエステル化

(4)で得た分画 II は $\text{CH}_2\text{N}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ でメチルエステル化を行い, P.P.C.により反応前後の物質を比較検討した。

Scheme 2. Smith degradation of Glc-P



実 験 結 果

I Glc-Pの調製

(A) 乾燥菌体20gからの TCA 処理による Glc-P の抽出における結果を Fig-1 に示す。

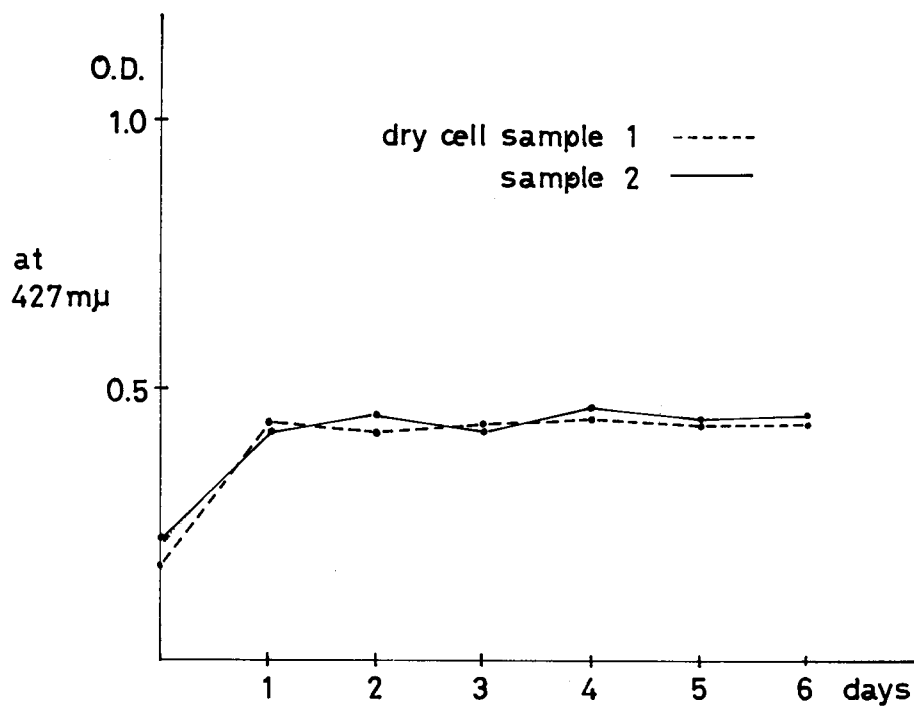


Fig 1. 抽出液より毎日 5 μ l ずつ Sampling, オルシノール硫酸法で追跡。(427m μ における吸光度を測定)
乾燥菌体20g + H₂O2 l + 5% TCA, at 37°, for 6 day.

Fig 1 より約 4 日間で大部分の Glc-P を抽出できることが確認された。

(B) DEAE-cellulose column chromatography による分離精製のパターンを Fig 2 に示す。

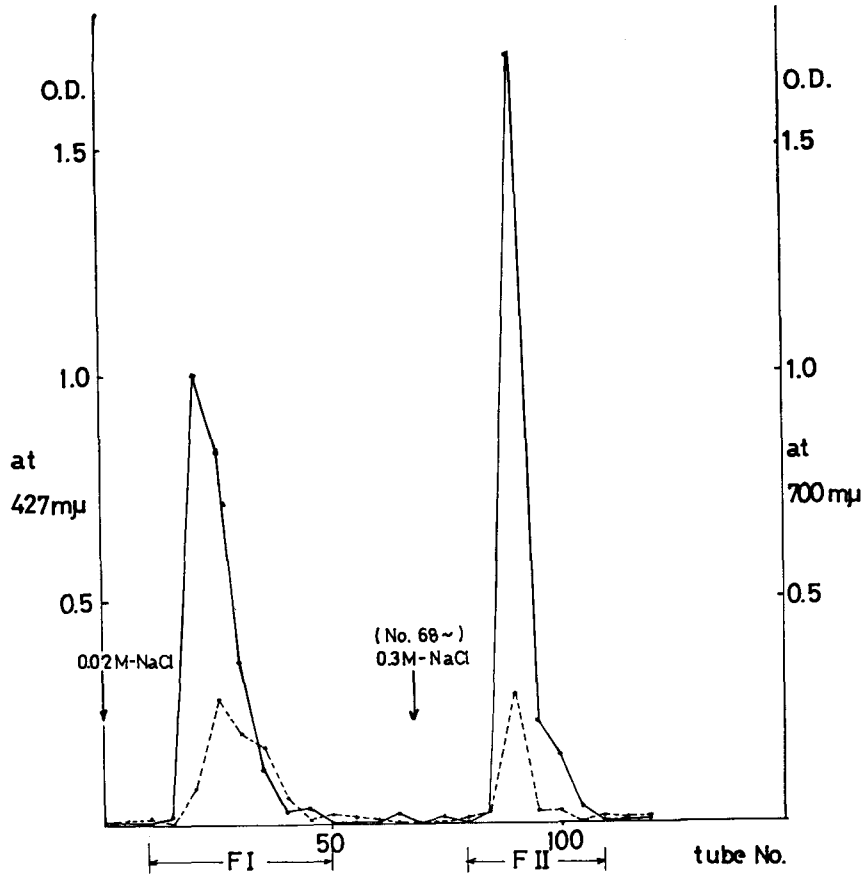


Fig 2. DEAE-cellulose column chromatography
 charge : 10ml, flow rate : 13sec/drop, column 2,2×66cm
 Fraction : 10 g, elute with phosphate buffer (pH7.0)
 determination { 5μl/tube orcinol-H₂SO₄ method at 427mμ —
 { 100μl/tube Lowry method at 700mμ

Micrococcus lysodeikticus 細胞壁の化学構造

次に F I, II 及び Mannose, Glucose 標準溶液の Gaschromatography のパターンを Fig 3 に示す。

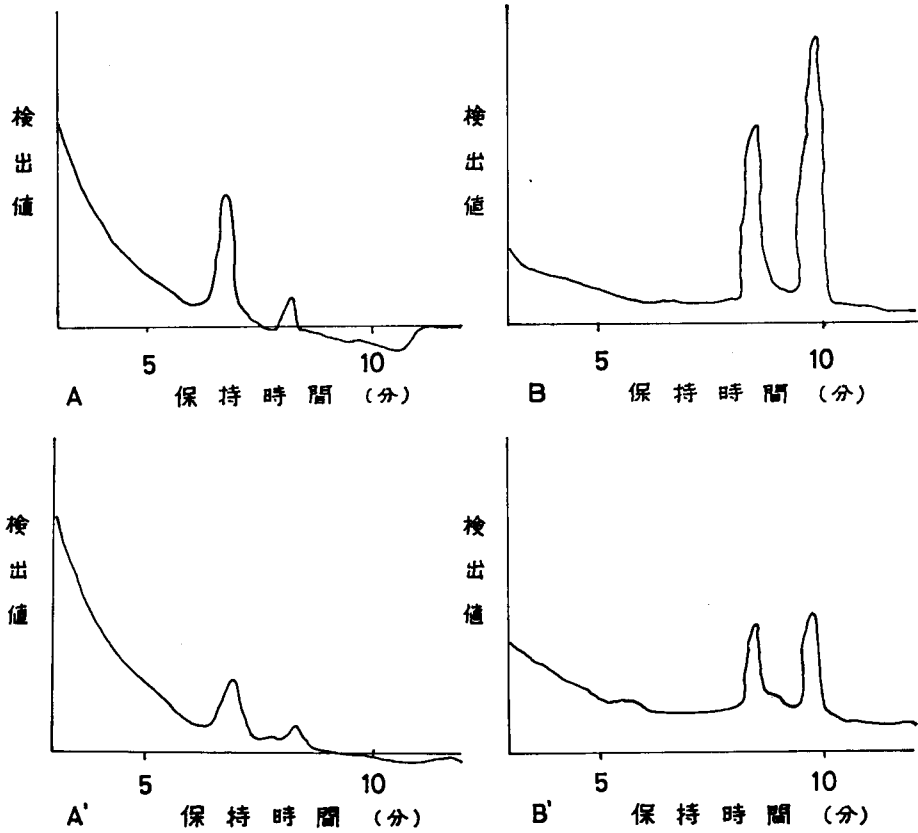


Fig 3. Gaschromatography (6°C/min 160°~210°C)

- A : Mannose std. Soln. 34.10mg/ml H₂Oより10入とって乾涸し, TMS化後5μlを注入
- A' : F I. 濃度不明, TMS化後 5μlを注入
- B : Glc. std. Soln. 40.50mg/ml H₂Oより10入とって乾涸し, TMS化後4μlを注入
- B' : F II. 5.67mg/0.5ml HCl, 100°C, 4hr hydro lysis 後10μlとして乾涸し, TMS化後, 4μlを注入

之等のパターンより, 中性糖としてF I.はMannose, F II.は Glucose を含んでいることが確認された。

(C) F IIの精製標品加水分解物のアミノ酸分析における結果は, グルコサミン及びアンモニアと思われるピークが表われたのみで, 細胞壁に由来するアミノ酸(Gly, Ala, Glu,

Lys) は殆んど認められなかった。

(D) 同じく F II . 精製標品を自記分光光度計にかけた結果, 280m μ 及び260m μ における吸収のピークは見られず, 従って核酸の存在は認められなかった。

(E) 又リン酸の定量的結果, 結合Pは 0.0034 μ mole/mg となり, リン酸はこの分画中殆んど含まれていないと考えて良いと思われる。

以上の結果を総合すると, 乾燥菌体40gより, 1,925.97mgのGlc-Pを得, そのGlucose含量は49.7%, P/G=0.000802となり, 相当純度の高いGlc-P標品がTCA直接処理法により得られた。

以前に行われたリゾチーム処理法*によるものとの比較を Table 1. に示す。

抽出方法	dry cell (g)	Glc-P (mg)	a) P/G	Glc含量 %	b) グルコサミン含量 %	Pの含量 μ mole/mg
T C A 直接処理	40	1,925.97	0.000802	49.76	1~2	0.0034
リゾチーム処理	20	891.93	0.0058	44.70		

Table 1 TCA直接処理法と従来のリゾチーム処理法との比較。

- a) total peptide (Lowry 法による発色) と total Glucose (Orcinol-硫酸法による発色) の割合 (Optical density の値)。Glc-P と mucopeptide の割合の目安となる。
 b) 標品をアミノ酸自動分析計にかけたピークより計算した。

*従来のリゾチーム処理法

リゾチーム10mgを0.05M酢酸アンモニウム (pH6.5) に溶かした溶液2lに cell 20gを suspension し, 5%TCA溶液として37°, 6日間処理し, 連続エーテル抽出により, TCAを除いたもの。

II Smith 分解

(A) 過沃素酸酸化

過沃素酸化において消費された KIO₄ 量は sample 及び control 溶液中より各1ml ずつとり出し, 3倍に希釈して290m μ の吸光度を測定して決定した。その結果を Fig 4. に示す。

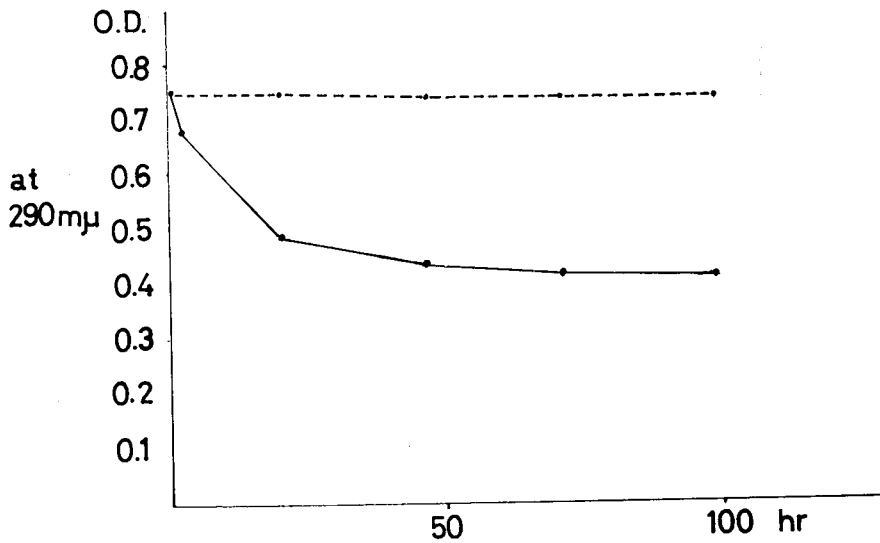


Fig 4 KIO₄ consumed in Periodate oxidation
(Optical density at 290mμ), Sampling 1ml

1.847 g (8m mole) KIO₄ / 819.55ml Sample —
724 g (2m mole as glc.) Glc—P / Control

このパターンより、約99時間で反応が完全に終了したこと及び、Glucose 1 mole につき約 2 mole の KIO₄ を消費することが明らかとなった。

(B) NaBH₄ による還元 (第1回目)

過沃素酸酸化により生じた dialdehyde の還元の結果、

還元前 (Sample 50μl) の還元力 (O.D. 0.546)

還元後 (Sample 50μl) の還元力 (O.D. 0.010)

約1.1gの NaBH₄ により還元が終了していることを確認し、次の操作段階に移った。

(C) 部分加水分解

dialdehyde の還元により生じた、アルコールを有する Polymer を希酸により部分加水分解を行い、生じた glycolaldehyde の還元力を測定した結果を Fig 5. に示す。

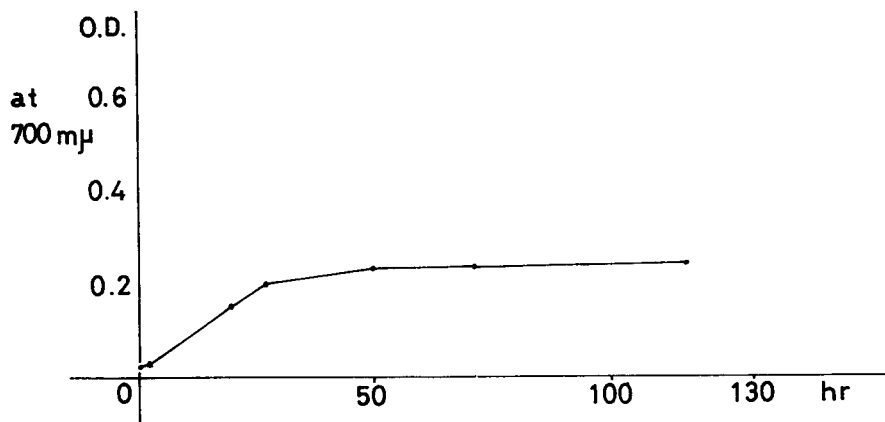


Fig 5. Mild acid hydrolysis (0.1N-H₂SO₄, 30°C, 116hr.)
Sampling 5μl, Park-jonson method (700mμの吸光度を測定)

Fig 5 のパターンより71時間以後116時間迄還元力の増加が見られないので加水分解が終了していると判定して反応を打ち切った。

(D) NaBH₄ による還元 (第2回目)

部分加水分解後中和して遠沈で BaSO₄ を除き, 14mmole の NaBH₄ で glycolaldehyde の還元を行ない, Sample 400ml 中より 0.5ml とり出して還元力を測定した結果, 2.208μmole/400ml の還元力を有していることが確認された。次に還元後の残存グルコース量をオルシノール-硫酸法により測定し, 76.98μmole/69ml という値を得た。

以上 Smith 分解の結果を総合して Table 2. に示す。

Table 2 Result of Smith degradation Molar ratios to Original Glc.

Glc-P 中の ManNAcUA の -COOH	1.08
過沃素酸酸化における KIO ₄ の消費量	2.07
過沃素酸酸化により生成した H·CHO	0.0018
過沃素酸酸化により生成した H·COOH	1.05
部分酸加水分解後の還元力	0.346
第2回目 NaBH ₄ 還元後の残存 Glc 量	0.038

(E) Paper pertiton chromatography

(i) 部分加水分解後の還元生成物を Dowex 50×8 に通し, H₂O で溶出した画分A及び Glycerol, Ethylenglycol の標準溶液を比較したP.P.Cのパターンを Fig 6 に示す。

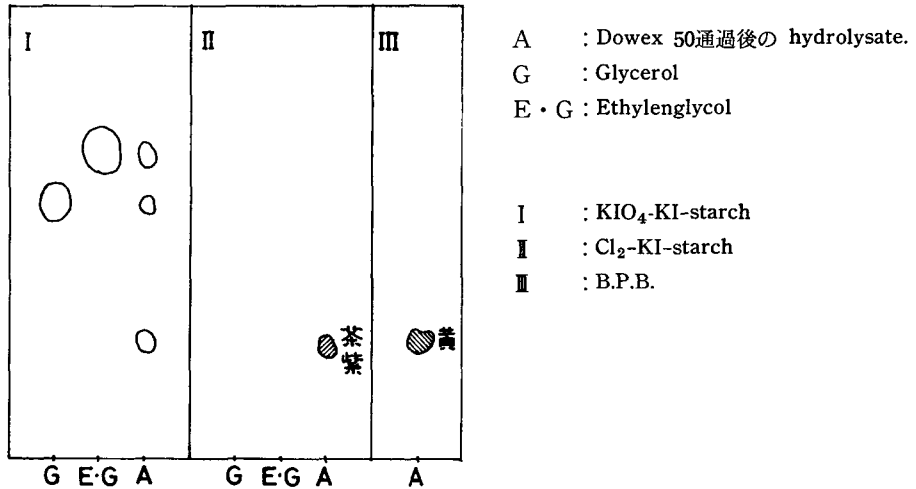


Fig 6. P.P.C of Partial acid hydrolysate. (Dowex 50通過, pH3.8以下の画分)

Fig 6.より, E·G. 及び Glycerolの存在の他, KIO₄-KI-starch, Cl₂-KI-starch 陽性の酸性物質が Smith 分解生成物中に含まれていることが明らかとなった。

(ii) Fig 6 のAをDEAE-Cellulose column 上 H₂O で elute した画分 (F I.) と, 0.1M-Pyr-AcOH (pH6) で elute した画分 (F II.) 及びF II.を2N-HCl, 100°C, 2hr. 加水分解したもの (F II h.) を比較したパターンを Fig 7. に示す。

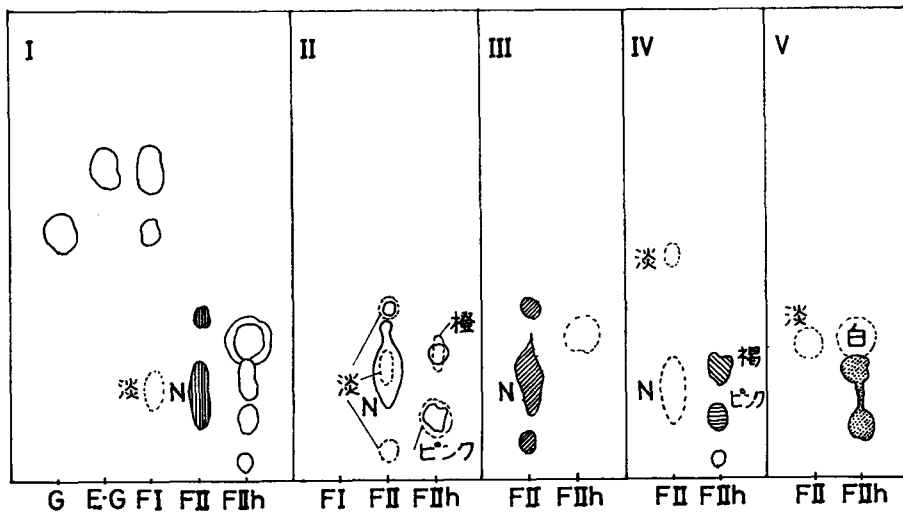


Fig 7. P.P.C of F I, F II and F II h.

Micrococcus lysodeikticus 細胞壁の化学構造

- | | | |
|---------------------------------|---|---|
| I : KIO ₄ -KI-starch | | G : Glycerol |
| II : Cl ₂ -KI-starch | ○ | E·G : Ethylenglycol |
| Ninhydrin | ○ | F I : DEAE-cellulose (H ₂ Oでの溶出画分) |
| III : B.P.B | | F II : DEAE-cellulose |
| IV : Elson-Morgan | ○ | (0.1M-Pyr-AcOHの溶出画分) |
| Morgan-Elson | ○ | F II h : F IIの加水分解物 |
| V : AgNO ₃ | | (注) F II hにはHClの影響がみとめられる。 |

Fig 7.より F I .は Ethylenglycol を含み, F II .は Cl₂-KI-starch 及び KIO₄-KI-starch 陽性で, しかも酸性を示しM・E陽性, Ninhydrin ではわずかに発色した。又 F II h は glycerol の存在を示し, Cl₂-KI-starch, KIO₄-KI-starch, E・M 陽性で, Ninhydrin は明らかに陽性, 更に還元力を示すことが確認された。

(iii) F II と之をメチルエステル化したもののパターンを Fig 8 に示す。

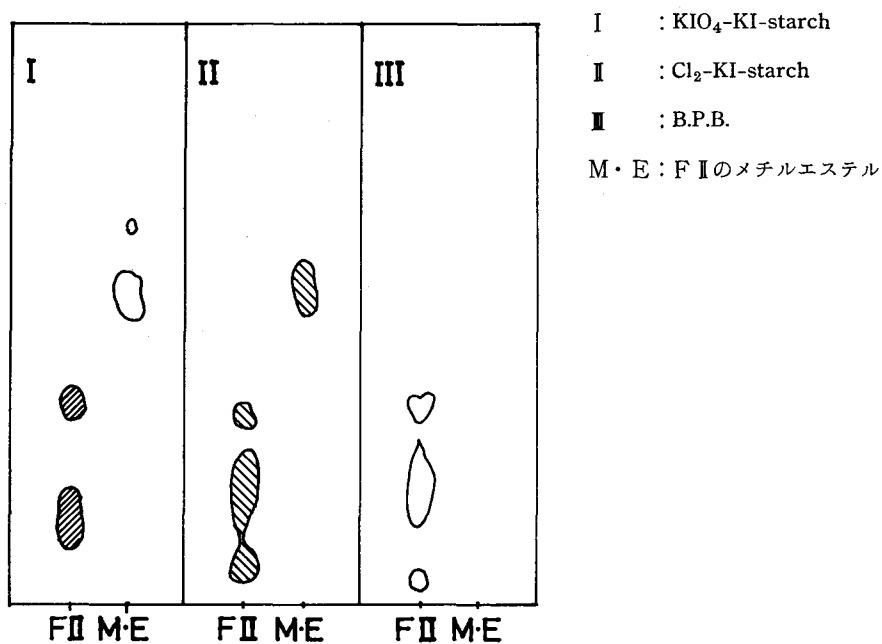


Fig 8. F I及びF IIのメチルエステル

Fig 8 より, KIO₄-KI-starch 及び Cl₂-KI-starch 陽性で, しかも, もはや酸性を示さない物質が P.P.C.上検出された。

考 察

〔1〕グラム陽性菌の基礎構造と特殊構造の分離には、ホルムアミド抽出法、TCA抽出法及びフェノール抽出法などが知られている。今回は *Micrococcus lysodeikticus* 細胞壁中の特殊構造に着目し、今永、羽田の方法により、¹⁵⁾ 厄介な細胞壁調製操作を省いて、直接に乾燥菌体からその特殊構造としてのGlc-Pを比較的純粋に好収量で分離精製することができた。

〔2〕精製 Glc-P について Smith 分解を行った結果、Smith 分解生成物の P.P.C (Fig 7 の F II) 上、NHを含んでいる部分 (Cl₂-KI-starch 陽性) を分離することができ、spot N に相当する分画は次の理由により Glycerol 2-acetamide-2-deoxy-mannuronide であると考えられる。(Fig 9)

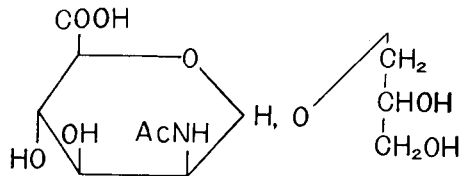
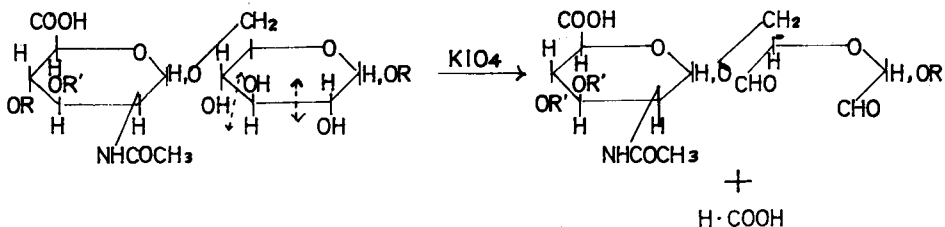


Fig 9. Glycerol 2-acetamide-2-deoxy-mannuronideの構造

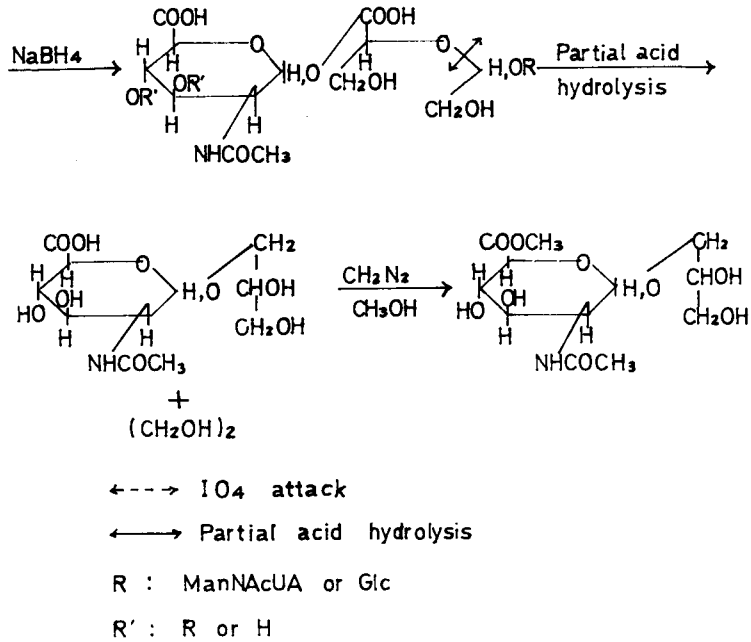
- (1) 加水分解により、多量のフミン様の物質が形成された。即ち Glc-Pを含む分画(F II)の酸加水分解 (2N-HCl, 120°C, 2hr.) により aminomannuronide の分解による典型的な現象が起ったと考えられる。
- (2) Smith 分解生成物(F II.)を更に加水分解 (2N-HCl, 100°C, 2hr)したものとP.P.C. (Fig 8 F IIh) は、glycerol の存在を示し、更に Elson-Morgan, Ninhydrin 陽性の main product が存在することを示している。

Table 2 と上述の(1), (2)の結果より Glc-P は Fig 10 に示す様な部分構造を有することが推定される。

Fig 10. Glc-Pの部分構造及び Smith 分解中の各段階における推定構造。



Micrococcus lysodeikticus 細胞壁の化学構造



又この Glc—P は Glucose : Aminomannuronic acid=1 : 1 であり, unit disaccharide structure (ManNAcUA¹→⁶Glc) が可能であることがほぼ確認される。しかし, 部分加水分解物中に既に glycerol が形成されており, 他の disaccharide Part (Glc¹→⁶Glc) の存在する可能性も考えられる。(Fig 11)

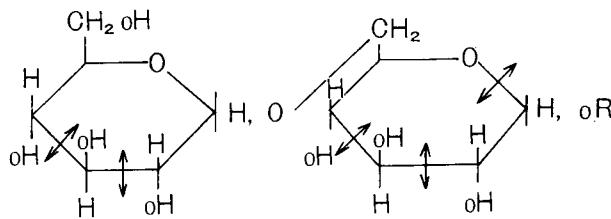


Fig 11. 可能な disaccharide の推定構造。

〔Ⅲ〕次にこの Smith 分解生成物を結晶化させる目的で $\text{CH}_2\text{N}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ によりエーテル溶液中でメチルエステル化を試み, P.P.C.上 ManNAcUA-glycerol の methylester に相当する one spot を得た。しかし未だ結晶を得ることは出来なかったので, 今後, アセチル化その他の方法を試み, 結晶の検討を行うべきであると考えている。

要 約

1. 乾燥菌体より直接TCA処理により、グルコースポリマーを比較的純粋に好収量で得ることが出来た。
2. グルコースポリマーのSmith 分解により、glycerol 2-acetamido-2-deoxymannuronide を単離した。
3. 更にメチルエステル化を行い、ManNAcUA-glycerol の methylester に相当する spot を Paper chromatogram 上で得ることが出来た。

文 献

- 1) H. R. Perkins : (1963) Biochem. J., 86, 475
- 2) Brückner, J. : (1955) Biochem. J., 60, 200., C. Francois, R. D. Marshall, A. Neuberger : (1962) Biochem. J., 83 335
- 3) Lowry, et al : (1951) J. Biol. chem., 193 265
- 4) P. S. Chen, J. R. T. Y. Toribara & H. Warner : (1956) Anal. chem, 28, 1756
- 5) Method in carbohydrate chemistry (1962) 1, 443
- 6) J. T. Park, M. J. Johnson : (1949) J. Biol. chem., 181, 149
- 7) W. E. Trevelyan., D. D. Procter, J. S. Hanison : (1950) Nature 166, 444
- 8) R. L. Metzberg, H. K. Mitchell : (1954) J. Am. chem. Soc., 76, 4187
- 9) H. N. Rydon & P. W. G. Smith : (1952) Nature 169, 922
- 10) D. Aminoff, W. J. Morgan : (1948) Nature 162, 579
- 11) R. L. Reid & M. Lederer : (1951) Biochem. J., 50, 60
- 12) S. M. Partridge, R. G. Westall (1948) Biochem. J. 42, 238
- 13) Tokuji Ikenana : (1968) J. Biochem 54, 328
- 14) J. L. Reissig, J. L. Strominger et al : (1955) J. Biol. chem. 217, 959
- 15) 今永勇二郎, 羽田貞子 (奈良女子大理学部化学教室) 未発表