



Title	腸内細菌菌体蛋白のアミノ酸組成に関する研究
Author(s)	高木, 光造; TAKAGI, Mitsuzo; 飯田, 優 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 19(4), 288-292
Issue Date	1969-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23373
Type	departmental bulletin paper
File Information	19(4)_P288-292.pdf



腸内細菌菌体蛋白のアミノ酸組成に関する研究

高木光造*・飯田 優*

Amino Acid Composition of Cell Proteins in Some Species of Bacteria of the Enterobacteriaceae

Mitsuzo TAKAGI and Atsushi IIDA

Abstract

In their research to find the relation between the pathogenethity and the chemical components of bacterial cells, the authors have preliminarily determined the relative amounts of amino acids in hydrolysates of cell proteins.

In this paper, we report the results obtained from experiments with some bacteria of Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, and *Salmonella enteritidis*. The methods of preparations and hydrolysis of cell proteins were about the same as those described previously¹⁾. The amino acid composition was determined with a Hitachi Amino Acid Analyzer Model KLA-3. The results may be summarized as follows. The main constituents of these proteins were found to be glutamic acid, aspartic acid, leucine, alanine, lysine, valine, arginine, and isoleucine, and resembled as a whole those of biotype 1 and 2 of *Vibrio parahaemolyticus*¹⁾, and in a good part those of *Pseudomonas aeruginosa*²⁾. The detection of tryptophan and diaminopimelic acid was not carried out in this study. Several unknown ninhydrine positive substances were found in three kinds of bacteria respectively.

緒 言

細菌細胞のべん毛、莢膜、細胞壁などの表在成分は、細菌の抗原性の決定要素となったり、またそのうちのあるものは人体に対する毒素ともなるので、古くから研究されてきた³⁻⁷⁾。とくに多くのグラム陰性細菌の表在物質は内毒素と関連して究明され⁸⁻⁹⁾、その化学構成はリポ多糖類・蛋白質複合体、またリポ多糖類とされているが、近年細菌表面の形態学的微細構造とその化学組成が次第に明らかになるに伴って、各種の細菌における他の組成成分の生物学的活性も検討されるようになってきた。Muddら⁹⁾、Liら¹⁰⁾は *Staphylococcus aureus* の細胞壁タイコイン酸がヒト正常血清存在下の白血球の貪食作用と殺菌作用を阻止することを報告し、本間ら¹¹⁾は *Pseudomonas aeruginosa* から分離した蛋白質区分がウサギに対して発熱性と Shwarzman 現象性を示すことを認め、また多くの研究者によって多数の細菌における細胞壁またはムコペプチド区分の構成因子が定性的あるいは定量的に研究され¹²⁻²³⁾、また最近 Abdullaら²⁴⁾は *Streptococcus* 属およびその他の細菌のムコペプチド区分がウサギに対し皮膚壊死活性を示すことを報告していて、今後細菌表層物質とくに高分子窒素化合物の化学的構造と生物学的活性の関係は、ますます追求されていくものと思われる。

このような観点から、食中毒原因細菌の化学的組成成分と毒性との関係を追求することは、はなはだ興味ある問題と考えられる。著者らはその予備的な試験段階としてまず前報¹⁾で腸炎ビブリオの biotype 1 および 2 の各 1 株における菌体蛋白のアミノ酸組成について報告したが、ひき続き本報で

* 北海道大学水産学部食品化学第二講座
(Laboratory of Food Hygiene, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

は3種の腸内細菌 *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* および *Salmonella enteritidis* の各1株について同様に比較検討したので、その結果を報告する。

実 験 方 法

供試菌株：供試菌株 *E. coli* (serotype 0-5) と *P. vulgaris* SMLU 854 は本学部微生物学教室の保存菌株中より、また *S. enteritidis* 1891 は大阪府立衛生研究所より分与を受けて、本実験に供した。

供試菌体：各供試菌株をそれぞれブイオン培地で 37°C, 24 時間前培養を行ない、あらかじめマグネチック・スターラーの攪拌子を入れた 2l 容三角フラスコ中に用意したブイオン培地 1l に、前記前培養液の 2 白金耳量をそれぞれ接種し、以後マグネチック・スターラーによる攪拌培養を行ないつつ、一定時間毎に培地の所定量を無菌的に採取して、供試菌の増殖による培地の濁度を前報¹⁾と同様の方法で観察し、対数期直後におけるそれぞれの培養液から 5,000 r. p. m., 15 分間の遠心分離により菌体を集め、反復 7 回の洗滌によって培地成分を除去して得た洗滌菌体を、供試菌体として使用した。なお各供試菌株とも 2 回ずつ培養を行ない、それぞれ別個に供試した。

菌体蛋白の調製：前記の各供試菌体をナス型フラスコに移し、湿菌量として 10% 程度になるように水を加えて懸濁液としたのち、攪拌しながら 85.5% エタノールにドライアイスをして作った寒剤に浸して凍結させ、つぎに 30°~40°C の温湯に浸して融解し、この凍結—融解の操作を 7 回反復し、さらに沸騰水浴中に 10 分間浸漬して加熱処理を行ない、菌体を破壊するとともに菌体蛋白を凝固させ、菌体内エキス成分の完全な溶出を容易ならしめた。ついで遠心分離してエキスを捨て、固形物は 75% エタノールを用いて遠沈法でくり返し洗滌してエキス成分を除去したのち、少量の無水アルコールとエーテルで洗い、硫酸デシケーター中で乾燥恒量化したものを一応菌体蛋白と考え、これらを試料として供試した。

測定方法：各供試菌体蛋白について全窒素をケルダール法で測定した。また組成アミノ酸の測定には試料 12mg を 6N 塩酸 5ml とともに封管内で 110°C, 22 時間加熱後、生成したフミン質を濾別洗滌し、濾液を減圧濃縮して塩酸を除去し、pH 2.2 のクエン酸緩衝液で 10ml に定容化して供試液とした。アミノ酸の定量は Amberlite CG-120 を用い、日立アミノ酸分析計 KLA-3 型で測定した。なお測定値は各試料とも、別々に培養、調製して得た 2 検体における菌体蛋白の測定値の平均値を求めた。

結果ならびに考察

各菌体蛋白の組成アミノ酸の測定結果を Fig. 1 と Table 1 に示した。Table 1 によると菌種によるアミノ酸組成のいちじるしい差はみられなかった。全窒素は *E. coli* と *P. vulgaris* がそれぞれ 14.7%, *S. enteritidis* は 11.8% で、アミノ酸含量は *P. vulgaris* が他の 2 者に比べて多く、*S. enteritidis* と *E. coli* はほぼ同じ程度であったが、これらの含量は各供試菌の培養条件を規制して、さらに比較検討されねばならないと考えられる。3 種の供試菌体蛋白のアミノ酸組成について観察した結果では、グルタミン酸がもっとも多く 8~11.5%, ついでアスパラギン酸 7~11%, ロイシン 5.6~9% であった。さらにアラニン、リジン、バリン、アルギニン、イソロイシンなどが多く、アミノ酸の含有割合は各供試菌によって若干の相違が認められたが、前報¹⁾の *V. parahaemolyticus* (biotype 1 および 2) の菌体蛋白ともほぼ同様の傾向が認められた。

細菌のアミノ酸に関する研究の 1 つとして、前記のごとく細胞壁またはムコペプチド区分のアミノ酸組成が報告されている¹²⁻²³⁾ が、それらのアミノ酸組成は細菌の形態やグラム染色性などの相違によって多少異なることが認められており^{12-14, 17, 26-27)}、グラム陰性桿菌のムコペプチド構成アミノ酸はアラニン、グルタミン酸、ジアミノピメリン酸などであると推定されている²⁶⁻²⁷⁾。本実験の供試菌 3 種はいずれもグラム陰性菌であることから、前述のごとく供試菌体蛋白中にグルタミン酸やアラニン

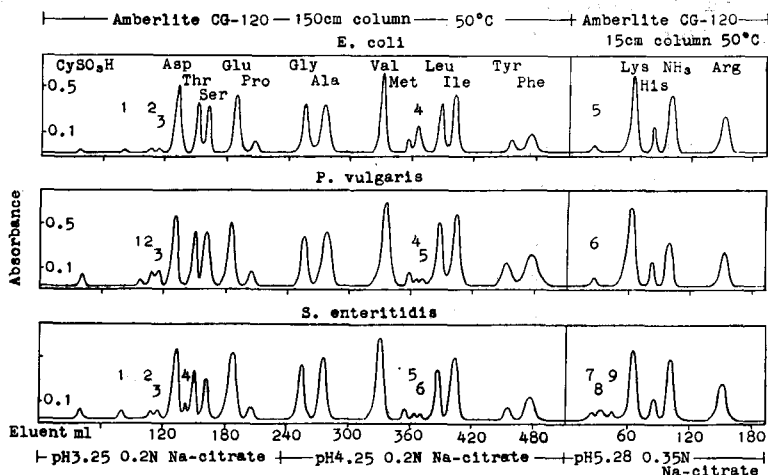


Fig. 1. Amino acid analysis of the cell protein hydrolysates of *E. coli*, *P. vulgaris*, and *S. enteritidis*. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9: unidentified substances.

Table 1. Amino acid composition of *E. coli*, *P. vulgaris*, and *S. enteritidis*. (g. of amino acid in hydrolysates per 100 g. of prepared cell protein)

Amino acid	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. enteritidis</i>
Cysteic acid	0.07	0.59	0.68
Aspartic acid	7.32	11.10	8.11
Threonine	2.83	4.50	3.44
Serine	2.13	3.44	2.33
Glutamic acid	7.96	11.48	8.97
Proline	2.55	2.87	2.64
Glycine	3.52	5.44	3.56
Alanine	4.69	7.50	5.38
Valine	4.72	6.20	5.04
Methionine	0.34	0.51	0.41
Isoleucine	3.62	5.95	4.03
Leucine	5.60	9.10	6.17
Tyrosine	1.94	3.32	1.59
Phenylalanine	2.62	4.92	2.70
Lysine	5.50	5.85	5.10
Histidine	1.53	1.49	1.49
Arginine	4.69	4.88	4.42
NH ₃	1.11	0.93	1.19
Total-N g. per 100g. of dried matter	14.66	14.73	11.83
N recovered (%)	66.10	86.69	86.05

が多いことは、それらの1部がムコペプチドに由来しているのものであるまいかと推定される。また Clarkeら²⁾が *Pseudomonas aeruginosa* の細胞壁区分について行なった結果によると、そのアミノ酸組成はグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンが多く、ついでロイシン、アルギニンの順になっているが、本実験の供試菌3種の菌体蛋白はほぼこれに似たアミノ酸組成を示している。さらに *Propionibacterium* 属の2,3の細菌¹⁰⁾, *Mycobacterium lepraemurium*¹⁹⁾, *Micrococcus radiodurans*²⁰⁾ などで行なわれた研究結果によると、細胞壁中のムコペプチド区分を精製することによって、構成因子以外のアミノ酸はいちじるしく減少することが認められているが、本実験の菌体蛋白の調製法はそれらの研究に比べると簡略であり、またアスパラギン酸、ロイシンなどの含有割合が多いことから、供試菌体蛋白中にはムコペプチド以外の結合状アミノ酸が存在していることが容易に推察される。

本実験においてはトリプトファンとジアミノピメリン酸は定量しなかったが、Fig. 1に示したように不明のニヒドリン反応陽性のピークが認められ、その数は *E. coli* で5コ、*P. vulgaris* で6コ、*S. enteritidis* で9コあり、ジアミノピメリン酸のピークはこれらのうちのいずれかに相当するものと考えられる。3種の供試菌体蛋白のアミノ酸分析による窒素の回収率は66~87%で、貝類²⁸⁻³¹⁾などの動物性蛋白質の場合に比べて値が低い、細菌細胞壁で行なわれた実験例^{3,16)}ではこれと同程度の値を示しており、これは細菌がアミノ糖や多糖類などを多量に含むことによるものであろう。

なお本実験の結果では、3種の供試菌間のアミノ酸組成に顕著な差違が認められなかったが、今後各菌種についてそれぞれ多数の菌株を供試し、またこれらの菌体蛋白をより分画精製することなどにより、各菌種の特徴が見出されることが予想され、さらにそれらの精製画分についての生物活性について比較検討も行ないたい所存である。

終わりに臨み、本稿を御校閲下さった本学部微生物学講座坂井稔教授に、深い謝意を表する。

文 献

- 1) 高木光造・飯田 優 (1967). 北大水産彙報 18(3), 271.
- 2) Clarke, K., Gray, G.W. & Reaveley, D.A. (1967). *Biochem. J.* 105, 749.
- 3) 本間 遜 (1961). 蛋白質核酸酵素 6, 76.
- 4) ——— (1961). 同誌 6, 151.
- 5) 伊藤英治 (1963). 同誌 8, 146.
- 6) 武谷健二・久恒和二 (1966). 同誌 11, 863.
- 7) 内田孝宏 (1966). 科学 36, 21.
- 8) 加藤 巖 (1964). 蛋白質核酸酵素 9, 70.
- 9) Mudd, S., Yoshida, A., Li, I.W. & Lenhart, N. (1963). *Nature* 199, 1200.
- 10) Li, I.W., Mudd, S. & Kaprel, F.A. (1963). *J. Immunol.* 90, 804.
- 11) 本間 遜・鈴木奈智子 (1961). 日本細菌学雑誌 16, 917.
- 12) Cummis, C.S. & Harris, H. (1956). *J. gen. Microbiol.* 14, 583.
- 13) Work, E. (1957). *Nature* 179, 841.
- 14) Cummis, C.S. (1962). *J. gen. Microbiol.* 28, 35.
- 15) Salton, M.R.J. & Marshall, B. (1959). *Ibid.* 21, 415.
- 16) Allsop, J. & Work, E. (1963). *Biochem. J.* 87, 512.
- 17) Perkins, H.L. & Cummis, C.S. (1964). *Nature* 201, 1105.
- 18) Wood, W.H. & Wissemann, C.L. (1967). *J. Bacteriol.* 93, 1113.
- 19) Cummis, C.S., Atfield, G., Rees, R.J.W., & Valentine, R.C. (1967). *J. gen. Microbiol.* 49, 377.
- 20) Manire, G.P. & Tamura, A. (1967). *J. Bacteriol.* 94, 1178.
- 21) Bhattacharyya, P. & Bose, S.K. (1967). *Ibid.* 94, 2079.

- 22) Work, E. & Griffiths, H. (1968). *Ibid.* 95, 641.
- 23) Kingan, S. L. & Ensign, J. C. (1968). *Ibid.* 95, 724.
- 24) Abdulla, E. M. & Schwab, J. H. (1966). *Ibid.* 91, 374.
- 25) 伊藤英治 (1966). 生化学 38, 808.
- 26) 松橋通生 (1966). 蛋白質核酸酵素 11, 875.
- 27) 健部 到 (1966). 自然 21, 25.
- 28) 須山三千三・関根康雄 (1965). 日水誌 31, 635.
- 29) 鴻巣章二・藤田健四郎・高島良子 (1965). 同誌 31, 681.
- 30) 奥村彩子・村田喜一・高木光造・大石圭一 (1966). 北大水産彙報 17(3), 147.
- 31) 藤田真夫・葉 守仁・早川万彦・池田静徳 (1968). 日水誌 34, 150.