

大腸菌の細胞表層構造形成  
に関する研究

富岡 茂雄

(1)

大腸菌の細胞表層構造形成に関する研究

富岡 茂雄

目次

	ページ
第一章 緒論	1
第二章 大腸菌のペニシリン結合蛋白質 1 A の ペプチドグリカン合成酵素活性	1 0
小序	1 1
方法	1 3
結果	1 8
考察	5 2
第三章 大腸菌の細胞内構造体形成蛋白質の検索、 精製、及び性質の検討	6 1
小序	6 2
方法	6 4
結果	6 8
考察	1 0 0
第四章 総合討論	1 0 8
引用文献	1 1 5
謝辞	1 2 2

## 略語表

以下の略号は多くのカ所で定義せずに使用した。アミノ酸の略号は三文字表記を用い、その他は、略号が統一されている場合はそれに従った。

6-APA : 6-aminopenicillanic acid

A<sub>2</sub>pm : meso-2,6-diaminopimelic acid

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA : Glycoetherdiaminetetraacetic acid

GlcNAc : N-acetylglucosamine

MurNAc : N-acetylmuramic acid

PBP : Penicillin-binding protein

PBS : Phosphate-buffered saline

SDS : Sodium dodecyl sulfate

## 第一章

### 緒論

## 1. 本研究の目的

細胞形態の形成と維持、細胞表面の保護、蛋白質やオルガネラの局在性の決定と維持、成長のあり方の決定とその推進、核分裂、細胞質分裂、運動など、細胞の構造維持的及び動的過程を担う成分は、機械的支持力と可変性を備えた機能性構造体と考えられる。細胞は状況に応じて構造体を構築、または組替えて細胞の構造を変え、細胞周期を全うしていると考えられる。従って細胞内の機能性構造体を摘出し、その挙動を明らかにする事は細胞周期の研究の基本である。本研究は大腸菌 (*Escherichia coli*) を材料とし、細胞構造の変化 (形態の形成と維持、伸長または肥大成長、核分裂、細胞質分裂など) の過程を担う構造成分を検索し、その過程を解析する生化学的基礎を提供する事を目的とする。

## 2. 細菌細胞の機能性構造体に関する従来の見解

真核生物の機能性構造体と言えば細胞骨格である。アクチン系及び微小管系細胞骨格は普遍的に分布し、繊維状構造体を形成する構造成分、これを支持体とする Mechanochemical enzymes、制御成分から成り、構造維持的にも動的にも機能して、細胞構造の維持及び変化に決定的な役割を果たしている。

これに対し細菌細胞では一般に細胞骨格に相当する細胞質内、細胞質膜上の構造体も、その成分も認められておらず、細菌細胞には細胞骨格に相当する機能性構造体は存在しないと考える事が、細胞周期に伴う細胞構造変化を考える際の前提となっている。細菌細胞では機械的支持力を備えた唯一の「剛構造」は細胞壁であり、その骨格的構造体であるサキュルス (Sacculus) が、細胞周期の全過程を通じて細胞の形態を規定し、膨圧を形成維持し、正常な成長分裂過程を保証する唯一の構造体と考えられている。そこで、細菌細胞ではサキュルスが一種の機能性構造体であり、ペプチドグリカン合成系がサキュルス形成を通じて細胞の成長分裂の過程を推進すると考える仮説が提出されている。この仮説を本研究では「サキュルス機能仮説」と呼ぶ事にする。この仮説には以下に述べるような困難があるが、現在なお成長及び細胞質分裂の基本的な説明原理として支持されている。大腸菌、サルモネラでは細胞の両極の基部と分裂溝陥入位置の両側に、外膜、ペプチドグリカン層、細胞質膜の三者が密着した、細胞を環状に取り巻く帯状の構造があり、Periseptal annuli と呼ばれ、細胞質分裂過程に何等かの関与をし

ていると考えられている(1)。

しかし数種の細菌には微小管状構造などの細胞内構造体が観察されており、大腸菌に Mechanochemical enzyme と思われる蛋白質成分が報告されるなど(表 1-1)、細胞骨格様機能性構造体の存在が示唆されており、サキュルス機能仮説の前提には疑問がある。

### 3. サキュルスの機能の範囲と機能性構造体の示唆

細菌細胞を Lysozyme 処理、 $\beta$ -ラクタム抗生物質処理などしてそのサキュルスを破壊すると、細胞は低張液中では破裂溶菌し、等張液中でも球形で脆弱な細胞、Spheroplast、Protoplast となり、固有の形態と分裂能を失う事が普通である。従ってサキュルスが細菌細胞の形態を規定し、膨圧を形成維持し、正常な成長分裂過程を保証する事は明かである。

しかし、細胞壁が剛構造性を失った変異株である L-form 細胞は、細菌細胞の成長分裂過程に於けるサキュルスの機能の範囲と、その他の構造要素の関与を示唆していると考えられる。Martin はグラム陰性菌由来の L-form 細胞を三種に分類した(2)。即ち、細胞壁構造とその成分を完全に欠失した Protoplast-type 株、細胞壁が著しく不完全になった Unstable、及び Stable spheroplast-type 株である。何れも等張の培地中でのみ増殖し、細胞は球形～不定形、多核で、基本的には出芽で増殖すると考えられ、低張液に移すと破裂溶菌する点で共通している。形態や生理の異常は細胞壁が支持力を失った結果と考えられ、サキュルスの上述の機能を改めて示唆する。しかし次の示唆は更に重要である。

第一に、Protoplast-type 株細胞は比較的高い生存率で増殖する事から、サキュルスを失っても、信頼性は低下するが、核の分離と分配、細胞質分裂(娘細胞の出芽と分離)は進行可能であり、これらの過程を支持推進する機能性構造体が細胞質内または細胞質膜上に存在する事が示唆される事である。この株の細胞では、細胞と出芽する膜小胞または娘細胞との境界は鋭利であり、その基部を支持する裏打構造の存在が推定される。

第二に、Stable spheroplast-type 株は明瞭な外膜及び細胞壁構造と、リボ蛋白質を結合した架橋ペプチドグリカン及び外膜成分とを持ちながら、細胞壁の剛構造としての機能を欠く事から、架橋ペプチドグリカン合成系はサキュルス構築

系と分離可能な過程であり、前者が必然的に後者を推進する関係にはない事が示唆される。但し、今の廻大腸菌にはこの型の株は知られていない。

第三に、Unstable spheroplast-type 株は高率に誘導され、高率に正常細胞に復帰する事から、細胞は僅かの変化で L-form 型の増殖様式に移行できる事が示唆される。Lederberg は大腸菌をペニシリン存在下に等張の寒天培地中で培養し、L-form 様細胞が可逆的に誘導されて増殖する事を報告した(3)。細胞の性質は生育が寒天依存性である事を除けば、Unstable spheroplast-type 株と一致する。誘導頻度は JE1011 株では約  $10^{-4}$  で、突然変異の頻度を遙かに上回る。この事から L-form 型の増殖様式は、正常細胞で機能している機構が細胞壁の支持を失う事により異常な形で現れたものと見る事ができる。

以上の三つの示唆を総合すると、細菌の成長分裂に伴う細胞構造変化を推進するのは細胞内の機能的構造体であり、サキュルスはその働きを保証する支持的構造体と考えると整合的である。

#### 4. 本研究の基本的考え方と研究対象

以上の考察を基に、本研究では次のように考える。

細菌の細胞質内または細胞質膜上には複数種類の機能的構造体が存在し、成長、分裂に伴う細胞の構造変化の過程に動的、構造維持的に機能する。サキュルスは機能的構造体の働きと相まって形成され、細胞の保護、形態の維持、膨圧の形成維持、足場として機能的構造体の支持など、支持的機能を現し、その働きを補完する。両構造要素は相互依存的で、正常な細胞構造変化に共に重要である。

以上の考え方は従来の知見と矛盾しないばかりでなく、マイコプラズマは細胞壁なしに一定の形態を維持しつつ、成長、核分裂、細胞質分裂を行う事(4)、大腸菌や枯草菌の核分裂後の娘核のポジショニング(5)(6)、*Myxococcus xanthus* のペプチドグリカンは連続したサキュルスを形成していないと考えられる事(7)、などの知見を説明する。これらの事実は従来の「サキュルス機能仮説」では説明されなかった。「細菌細胞ではサキュルス=細胞骨格」と言う考え方は説得力がない(1-6 ii) 参照)。

本研究は以上の考え方に立って二つの考察を行う。その一つはサキュルス形成とペプチドグリカン合成酵素の関係の考察であり、それは剛構造であるサキュル



スの形成過程の一端を明らかにするであろう。もう一つは機能性構造体の構成成分の検索及びその性質の考察であり、それは細胞構造変化の生化学的解析の基礎を与えられると思われる。

#### 5. 研究の背景-1. 細菌細胞の細胞骨格様構造体と関連成分

細菌細胞に報告されている細胞骨格様構造体と関連成分の例を表 1-1 に示す。

A 欄は電子顕微鏡による形態学的研究の知見であり、何れの構造体もその本態や機能は明らかではない。微小管状構造はグラム陰性菌にも陽性菌にも見いだされ、真核生物の微小管と形態的に良く似ていると言われている。

B 欄は真核生物の細胞骨格成分の生化学的性質を指標として検出された成分で、生化学的評価が可能である。アクチン様蛋白質、ミオシン様蛋白質の研究はその後の発展がなく、その存在には疑問がある。EF-Tu は構造蛋白質としての性格を持ち得ると考えられるが、その具体的な意義は明かでない。

C 欄は分子生物学的手法により摘出された細胞骨格成分様蛋白質である。MukB 蛋白質は核のポジショニング（核分裂後、娘核が急速に分離して一定の位置迄移動する現象）(5)に関与し、キネシン様の構造を持つと言われている。核のポジショニングに当たる現象は枯草菌でも知られ(6)、普遍的な現象と思われる。tdiC、tdiD も DNA の分配に関与する遺伝子で、推定アミノ酸配列が $\alpha$ -チューブリンと相同性を持つと言われている。これらの成分は核酸の分配と言う機能と結び付いており、細菌と真核生物の核酸分配機構の相同性を示唆して、極めて興味深い。しかしその生化学的な意義付けは今後の課題である。また、大腸菌に酵母ミオシン抗体と交叉反応する分子蛋白質が報告されている。

以上の結果は細菌細胞の機能性構造体の存在に就いて示唆的である。しかし細胞表面の支持や細胞質分裂過程に関与すると考えられる構成成分は、今の処指摘されていない。

#### 6. 研究の背景-2. 細胞壁の構造、構築と、サキュルス機能仮説

##### 1) 細胞壁の構造と構築

細胞壁の機械的強度を担う骨格的成分はペプチドグリカンと呼ばれる糖ペプチドの網状重合体である(23)。その部分化学構造を大腸菌を例に図 1-1、A に示す。

	構造名、蛋白質名	検出された菌種	文献
A	1. Rhabdosome	<u>Proteus</u> , <u>Saprosira</u>	(8)
	2. Microtubules	<u>Azotobacter vinelandii</u>	(9)
		<u>Proteus mirabilis</u>	(10)
	3. Microtubular structure	Spirochetes	(11)
		<u>E. coli</u> , L-form	(12)
	4. Intracellular periodic structure	Staphylococcal L-form	(13)
<u>Myxococcus xanthus</u>		(14)	
5. Apparatus of gliding motility	<u>M. fulvus</u>	(15)	
6. Spirosome	<u>E. coli</u> , <u>L. brevis</u>	(16)	
B	7. Actin-like protein	<u>E. coli</u>	(17)
	8. Myosin-like & Actin-like protein	<u>E. coli</u>	(18)
	9. Elongation factor Tu	<u>E. coli</u>	(19)
C	10. MukB protein	<u>E. coli</u>	(20)
	11. TdiC, TdiD protein	<u>E. coli</u>	(21)
	12. 180kD protein	<u>E. coli</u>	(22)

表 1-1 細菌細胞に報告されている細胞内構造体及び細胞骨格様蛋白質

今までに報告されている細胞内構造体と細胞骨格様蛋白質の例。構造名、蛋白質名は各文献での呼称に準拠した。A 欄は電子顕微鏡下に検出されている構造体。Rhabdosome は Microtubule に似た構造で、ウイルス粒子とも考えられている。B 欄は細胞骨格蛋白質の生化学的な性質を指標に検出された構造体形成蛋白質。C 欄はアミノ酸配列と抗原性から細胞骨格蛋白質と相同性のある蛋白質。5. の例はペリプラズムに局在。残りは全て細胞質内に局在。

即ち、N-acetylmuramic acid (MurNAc) と N-acetylglucosamine (GlcNAc) の共重合体の糖主鎖が MurNAc から分岐するペプチド側鎖で架橋された網状構造を持ち、切れ目なく細胞表面を包み込み、全体として細胞とほぼ同じ大きさと形を持つ閉じた袋状の構造体、サキュルス (Sacculus) (23) を形成する。ペプチド組成、架橋構造、化学修飾は、種によって多様だが、基本的構造は共通である (24)。糖主鎖は Lysozyme に加水分解され、二糖ペプチドを単位とした分解産物 (ムロペプチド) を生ずる。大腸菌の主要ムロペプチド (サキュルスの主骨格を成す) を図 1-1、B に示す。この他に含量の少ないムロペプチドが 30 種程あり、その幾つかにはシグナルとしての機能が推定されている (25)。

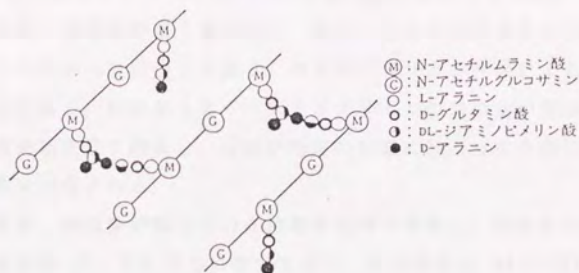
グラム陽性菌の細胞壁はペプチドグリカンが成層した多層構造を持ち、糖主鎖は同一層内は並行、各層間で斜交する走向を持ち、層間を酸性ポリマー (テイコ酸、テイクロン酸) が強化すると考えられている (26)。グラム陰性菌の細胞壁は薄い (2~3 層と言われる) ペプチドグリカン層とその外側を被う外膜構造から成り、一群のリポ蛋白質が両者を結び付けている (27)。外膜と細胞質膜に挟まれたペプチドグリカン層を含む空間をペリプラズム空間と呼ぶ。ペプチドグリカンの糖主鎖の走向は大腸菌では細胞の長軸に直交する事が明らかにされている (28)。

ペプチドグリカンは Undecaprenol-P-P-MurNAc(L-Ala-D-Glu-meso-A2pm-D-Ala-D-Ala)-GlcNAc (リビド中間体) を特異的な基質として細胞質膜上の酵素によりサキュルス上で合成され、余剰の D-Ala の切除を受けて完成する (29)。大腸菌ではペプチドグリカン合成酵素は高分子側のペニシリン結合蛋白質 (PBP) である (第 2 章、小序参照)。大腸菌では伸長成長期の新生ペプチドグリカンの組込はサキュルス全表面で起こり、分裂期にはその約 60% が分裂溝の両側の部分に集中する事が知られている (30)。ペプチドグリカンはサキュルスの内側から付加し、外側で分解廃棄されており、大腸菌、枯草菌では一世代当たり約 50% が代謝回転していると計算されている (31)。

#### ii) サキュルス機能仮説

廣田は大腸菌の系で、サキュルスの円筒部を側方に伸ばすペプチドグリカン合成反応が細胞の伸長成長を、それに直交して内側に向かうペプチドグリカン合成反応が隔壁形成 (= 細胞質分裂) を推進すると論じた (32)。しかしこの説明は核分裂を説明できず、また、ペプチドグリカン合成系は膨圧 (大腸菌で 2~3 気圧

A



B

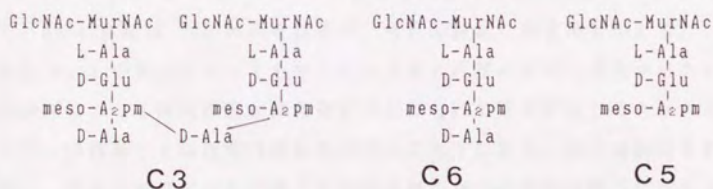


図 1-1 細胞壁ペプチドグリカンの部分構造と主要ムロペプチドの構造

A: 大腸菌の細胞壁ペプチドグリカンの部分構造 (松橋原図)。B: 大腸菌の細胞壁ペプチドグリカン由来の主要ムロペプチドの構造。C3 は架橋部分由来の架橋二量体で、架橋は meso-A<sub>2</sub>pm の D-光学活性中心 (遊離) のアミノ基と、隣のペプチド鎖の末端の D-Ala のカルボキシル基との間に形成される。C6 はペプチドグリカンの反復単位の二糖ペプチドの単量体。C5 は C6 の末端の D-Ala の外れたもの。

(33)、グラム陽性菌では 20 気圧(34)に及ぶ)に抗し、或は逆らいながらその支持構造体自身を構築する事になり、力学的に困難であった。

Koch はその力学的困難に理論的考察から次の説明を与えた(35)。

グラム陽性菌：細胞壁が厚く層分化し、膨圧による応力を担うのは細胞壁の中層である。その内側は無応力下であり、ペプチドグリカン付加による細胞壁内面の成形が可能である。細胞壁全面でペプチドグリカンの付加量が漸増すればサキュルスは代謝回転を経て伸長し、付加が特定の位置に起こって内側に向かって肥厚すれば隔壁が形成される。

グラム陰性菌：細胞壁が薄く応力支持層を期待できない。細胞を泡に近似して膨圧  $P$ 、体積変化  $dV$ 、表面張力に相当する  $T$ 、表面積変化  $dA$  の間に  $P \cdot dV = T \cdot dA$  ( $P \cdot dV$  は細胞周期を通じて一定) が成り立てば、 $T$  を変数として伸長成長と分裂溝陥入を記述できる。そこで次の解釈が可能である。1. 細胞は  $T$  を制御(局所的な pH 変化などを仮定)して成長分裂過程を制御する、2. Mechanochemical enzyme が関与する ( $T$  の制御)、3. 細胞質分裂時に分裂溝周辺で細胞壁合成が高まる ( $dA$  の増大)、4. 基本的にグラム陽性菌と同じ機構による ( $T$ 、 $dA$  によらない)。Koch 自身は 1. の解釈を採るが、何れの解釈にも支持者がある。

しかし Koch の仮説によってもサキュルス機能仮説の困難は克服されない。膨圧は浸透圧によって細胞質膜が細胞壁に押付けられて発生すると考えられる。従ってグラム陽性菌でも細胞壁内面は外向きの応力下であり、成形は制限される。隔壁陥入、桿菌の伸長成長を誘導する細胞表層の異方的抑制は膨圧に逆らって起こる筈であり、膨圧を克服する機構が必要である。また、ペプチドグリカンの糖鎖配向、隔壁部分への合成酵素の移動または場所特異的な活性化のために細胞壁以外に支持機構を必要とする。グラム陰性菌の説明原理は多義的であり、成長分裂に伴う変化をサキュルスに求める必然性は証明されない。

サキュルス機能仮説には説得力がない。

## 第二章

### 大腸菌のペニシリン結合蛋白質1Aのペプチドグリカン合成酵素活性

本章ではサキュルスの構築に関する考察を行う。サキュルスはペプチドグリカン構成成分とする支持的な構造体であって、細胞の保護、正常で効率的な成長分裂過程の推進など、生理的に重要な機能を果たしていると考えられる。ペプチドグリカン合成の前駆体は細胞質内で合成され、Undecaprenol-ピロリン酸の誘導体(リピド中間体)として細胞質膜のペリプラズム側へ供給される(49)。構造体としてのサキュルスの構築過程はリピド中間体を基質としたペプチドグリカン合成反応から始まる。

Izaki らは大腸菌の細胞膜画分が、UDP-MurNAc-pentapeptide と UDP-GlcNAc とからリピド中間体を經由してペプチドグリカンを生産し、その架橋形成反応を $\beta$ -ラクタム抗生物質が阻害する事を示し、ペプチドグリカン合成の研究の端緒を開いた(36)。Spratt and Pardee (37)は大腸菌にペニシリンと共有結合する蛋白質(ペニシリン結合蛋白質、PBP)群を見出し、それらが形態形成に機能分化している事を示唆した。以後、PBP はペプチドグリカン架橋酵素群に他ならず、細胞の成長、分裂、形態形成過程に重要な機能を持つと考えられ、その研究は生化学的、遺伝学的、薬理的な側面を糺い混ぜて進行した。

大腸菌の主要な PBP として 1A、1B、2、3、4、5、6 が知られている。何れも細胞質膜に局在する蛋白質である。何れの蛋白質にも欠損変異株が知られ、生理的機能が推定され、遺伝子が同定され、その塩基配列が決定されている。変異株の性質、 $\beta$ -ラクタム抗生物質の結合特異性と薬理作用の関係から、高分子側の PBP1A、1B は細胞の成長に、PBP2 は桿菌形態形成に、PBP3 は細胞質分裂に関与すると考えられている(37)。松橋は、PBP1A、1B、2、3 は何れもペプチドグリカン合成酵素で、PBP1A、1B は細胞側壁の、PBP2 は細胞伸長の開始部位の、PBP3 は隔壁のペプチドグリカン合成に役割分化していると考えた(38)。中川らは PBP 1B を精製し、リピド中間体を基質として糖鎖重合反応とペプチド架橋反応の両方を同時に触媒して架橋ペプチドグリカンを合成する二機能的(Bifunctional)ペプチドグリカン合成酵素である事を明かにした(39)。石野らは PBP1A(40)、2(41)、3(42)夫々にペプチドグリカン合成酵素活性を検出した。PBP4、5、6 は D-alanine peptidase 活性を持ち、新生ペプチドグリカン上の余剰の D-alanine を

除去すると考えられている。

PBP1A は見かけの分子量約 91,000 (塩基配列からの計算値 93,500) の蛋白質 (43) であり、遺伝学的及び薬理学的研究から、機能上 PBP1B (見かけの分子量約 85,000、計算値 94,100 と 88,800) (43) と相補的なペプチドグリカン合成酵素と考えられている。玉城らは mrcB (=ponB) 変異株を分離し、PBP1B がペプチドグリカン合成酵素である事を示すと共に、mreA 変異が PBP1A と 2 を補償的に増加させ、mrcB 変異の形質を抑制する事を示した(44)。鈴木らは、PBP1A の遺伝子 (mrcA=ponA) と PBP1B の遺伝子 (mrcB=ponB) は同時に欠損すると致死となるが、夫々単独で欠損しても細胞の生育には殆ど影響が無い事を示した(45)。PBP1A と PBP1B は通常の生育条件下では等価の機能を持つペプチドグリカン合成酵素と考えられるが、PBP1A は PBP2 と共に機能している可能性がある。

PBP1A が主要ペプチドグリカン合成酵素である mrcB 株は  $\beta$ -ラクタム抗生物質全般に高感受性を示し、過酷な条件 (低浸透圧培地、45°C) 下で温度感受性を示す他には親株と大きな差はない。しかしその細胞膜画分はペプチドグリカン合成酵素活性を示さなかった(44)。石野らは mrcB 株にプラスミドを導入し、PBP1A を増幅した膜画分を EDTA-Mg<sup>2+</sup> 処理してペプチドグリカン合成活性を検出し、更に PBP1A を分画し、ペプチドグリカン合成酵素活性を示した。しかしその活性は濾紙に依存するなど特殊な性質を示した(40)。本研究は以上の研究結果を受けて、PBP1A の精製とそのペプチドグリカン合成酵素活性に就いて検討したものである。

言うまでもなく、ペプチドグリカンはサキュルスに構築されて初めて支持構造体としての機能を発現する。概観した通り、ペプチドグリカン合成とサキュルス構築との関係は明かではない。本研究では PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性だけでなく、その性質や基質特異性を明らかにし、細胞壁構築系に於けるその位置づけを考察する。



## 方法

### 使用菌株及び培養条件

使用菌株 : PBP1A の精製には、大腸菌 K12 株の JST975srev6 株 (F<sup>-</sup>, thr、leu、trp、his、ilv、thy、thi、ara、lac、gal、mtl、xyl、rpsL、mrcB、mreA) (45) に Clarke and Carbon のプラスミド pLC29-47 (46) を導入した株を用いた。JST975srev6 は PBP1B 欠損 (mrcB)、PBP1A 過剰生産 (mreA) 変異株であり、pLC29-47 は PBP1A の過剰生産をもたらすプラスミドである。この株は石野により作成された (40)。

培養 : 培地にはチミン (20ug/ml) を添加した Lennox 培地 (47) (L' 培地) を用いた。ポリペプトンと酵母エキスは大五栄養化学社製を使用した。菌株の保存及び前培養には、無菌的に分画した Colicin E1 を加え、プラスミドの脱落を防いだ。本培養はジャーファーメンターを用い、30°C で通気攪はん培養した。菌体は 10,000xg で集め、標準緩衝液 (50mM Tris-HCl pH7.5, 0.1mM MgCl<sub>2</sub>) で洗浄した後、-80°C に凍結保存した。

### PBP1A の精製

膜画分の調製 : 菌体を湿重量の 7 倍の標準緩衝液 (同上) に懸濁し、超音波処理 (10kHz, 5min, 0°C) により破砕した。未破砕菌体を 10,000xg で遠心、除去した後、上澄を超速心 (100,000xg, 30min) し、沈澱画分を得た。この沈澱画分を標準緩衝液に懸濁して再び超速心し (条件同上)、得られた沈澱画分を標準緩衝液に懸濁し、-80°C に凍結保存した。これを RR fraction と呼ぶ。

Affinity chromatography 用ゲルの作製 : PBP1A 精製のリガンドには 6-アミノペニシラン酸 (6-Amino-penicillanic acid、以下 6-APA と略称) を選択した。6-APA のアミノ基と活性化-Sepharose とのカップリングは、中川ら (48) に従い、CNBr-Activated Sepharose 4B または Activated CH-Sepharose 4B 2g と 200mg の 6-APA を、10ml の 0.1M Na-Borate pH7.1、0.5M NaCl 中で 30°C、2.5 時間振とうして行った。この外の操作はファルマシア社の説明書に従った。6-APA は明治製菓株式会社より頂いた。CNBr-activated Sepharose、Activated CH-Sepharose はファルマシア社製品を購入して用いた。

Affinity chromatography : 蛋白質画分に 6-APA-ゲル (ベッド容約 2ml 分)

を懸濁し、30°Cで適当時間振とうし、ペニシリン結合蛋白質をゲルへ吸着させた。この懸濁液をカラムに通し、ゲルをカラムに集め、非吸着画分を溶出、回収した。ゲルから蛋白質を溶出する場合は、0°C下でカラムを、夫々大過剰量の、緩衝液 1 (50mM Tris-HCl pH7.5, 1% Triton X-100)、緩衝液 2 (緩衝液 1 + 1M NaCl)、緩衝液 3 (Triton X-100 を 0.1% とした緩衝液 1) で順次洗浄した。次に 5ml の溶出緩衝液 (50mM Tris-HCl pH7.8, 0.1% Triton X-100, 1M Hydroxylamine) で手早くカラムを洗い Eluate-1 を得た。次に、2.5ml の溶出緩衝液を加え、30°Cで 40 分加温してから溶出液を回収し、この画分を Eluate-2 とした。同じ加温溶出操作を更に二回繰り返す、得られた画分をそれぞれ Eluate-3、Eluate-4 とした。何れの画分も、保存緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.4, 0.1% Triton X-100, 20%(V/V) Glycerol) に十分透析し、-80°Cに保存した。

PBPIA 画分の検出 : PBPIA の溶出画分は、ペニシリン結合蛋白質を Spratt ら(37)に従って検出し、検定した。この間、各画分は -80°Cに凍結保存した。

ペニシリン結合蛋白質の検出と定量 : ペニシリン結合蛋白質は [<sup>14</sup>C]-Benzyl penicillin (50Ci/mol) を用い、Spratt ら(37)の方法により検出した。但し電気泳動のアクリルアミド濃度を 7.5% とし、フルオログラフィーに先立ってゲルを Coomassie brilliant blue により染色し、蛋白質のパターンを解析した。PBPIA の定量には、フルオログラム上の PBPIA のバンド部分を切り出し、トルエン系シンチレーション液中で計数した。計数効率は 78% である。

#### 使用基質

基質の調製 : PBPIA のペプチドグリカン合成酵素活性の測定には放射標識した Undecaprenolyl-pyrophospho-MurNAc(-L-Ala-D-Glu-meso-A<sub>2</sub>pm-D-Ala-D-Ala)-GlcNAc 画分を基質に用いた。これをリビド中間体 (画分) と呼ぶ。リビド中間体は UDP-GlcNAc と UDP-MurNAc-pentapeptide から *Micrococcus luteus* の系 (49) を用いて、石野及び松橋により調製され、精製された。基質溶液はリビド中間体を含むメタノールまたはクロロホルム・メタノール溶液である。

核種と標識部位 : 本研究では、[<sup>14</sup>C]-GlcNAc (346Ci/mol) 標識したリビド中間体、[<sup>3</sup>H]-GlcNAc (6.6x10<sup>3</sup>Ci/mol) 標識したリビド中間体、[<sup>14</sup>C]-meso-A<sub>2</sub>pm (44Ci/mol) 標識したリビド中間体、の三種類を目的に応じて利用した。通常の活性測定には [<sup>14</sup>C]-GlcNAc 標識のリビド中間体画分を利用した。

#### PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性測定法

標準法 : 8.5~26pmoles のリビド中間体を含む基質溶液 (3~5 $\mu$ l) を 0.5ml 容のガラス試験管にとり、デシケーター中で真空ポンプを用いて 3 分間減圧乾燥した後、5 $\mu$ l のメタノールを加え、37°C で、1 分間加温して溶解した。これに最終量 30 $\mu$ l の反応溶液と酵素標品 (最終濃度 10mM Tris-Maleate pH6.0, 0.045% Triton X-100, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8~2.4 $\mu$ g PBP1A) を順次加え、直ちに 37°C に加温し、適当時間保温して反応を行った。実験に依っては、PBP1A 標品を加える前に反応溶液を予め 37°C に保温し、これに PBP1A 標品を加える事で反応を開始した。反応停止には、反応溶液に 10 $\mu$ l のイソ酪酸を加えるか、または反応溶液を沸騰水浴中で 1 分間加熱した。何れの停止法によってもリビド中間体、ペプチドグリカン、ムロペプチドなどに分解、または化学修飾は起こらなかった。基質と反応産物は濾紙クロマトグラフィーにより分離した。この方法は中川らの方法を PBP1A 用に改良したものである。なお、反応液は 5 $\mu$ l のリビド中間体メタノール溶液と 30 $\mu$ l 反応溶液を含むが、加音処理などのため最終量は 35 $\mu$ l にはならない。従って、全ての濃度は便宜上メタノール分を無視し、反応液を 30 $\mu$ l とした場合の最終濃度で表示した。

反応産物の分離と検出 : 本研究で用いた全ての酵素反応について、反応産物は次の系の濾紙クロマトグラフィー法を用いて分離した。即ち、反応溶液全量を濾紙 (Whatman 3MM) にスポットし、展開溶媒に、イソ酪酸 : 1N アムモニウム = 5 : 3 (V/V) を使い、下降法で一晩展開した。濾紙はアセトンで十分洗浄し、以後の測定に用いた。一部の実験では反応産物の分離に二次元薄層クロマトグラフィーを利用した。薄層プレートにはメルク社製のシリカゲルプレートを用い、一次元目の展開溶媒に、イソ酪酸 : 1N アムモニウム = 5 : 3 (V/V) を、二次元目の展開溶媒に、95% エタノール : 1M 酢酸アムモニウム = 5 : 2 (V/V) を用いた。クロマトグラム上の放射性物質のスポットの位置はスパークチェンバーカメラ (英国、Birchover 社)、またはオートラジオグラフィーによって検出した。

反応産物の定量 : 各反応産物の量は、その計数値、計数効率、及び用いた基質の比放射能から計算し、含まれる GlcNAc 残基量で表示した。各スポットの計数値は、スポットを含む 3cmx4cm の大きさの濾紙片を切り出し、トルエン系シンチレーション液 (4g PPO, 0.1g POPOP / liter) 中で液体シンチレーションカウ

ンターにより測定した。計数効率は、各々の核種の既知量の UDP-GlcNAc を同じ大きさの濾紙片にスポットし、同じ条件で測定して得られた計数値から計算した。濾紙上での各核種の計数効率は  $^{14}\text{C}$  で 61.2%、 $^3\text{H}$  で 2.94% であった。

架橋度測定法：濾紙クロマトグラムの原点（反応産物ペプチドグリカン画分）を濾紙から切り出し、アセトンで十分洗浄の後細片化し、250 $\mu\text{l}$  の Lysozyme 溶液（10mM Tris-HCl pH7.5, 1mg/ml Lysozyme）を加え、トルエンを静菌剤として、37°C、16~24 時間反応し、沸騰水浴中で 2 分加温して反応を停止した。反応産物は濾紙クロマトグラフィーにより分離した。架橋度はこの反応で得られたムロペプチドの単量体（C6）架橋二量体（C3）架橋三量体（C2）の、GlcNAc 残基の量で表した量（放射能の計数値を利用）から、次の式を用いて計算した。

$$\text{CL}(\%) = ([\text{C3}]/2 + 2[\text{C2}]) / ([\text{C6}] + [\text{C3}] + [\text{C2}])$$

但し、ここで [C6]、[C3]、[C2] はそれぞれ C6、C3、C2 の量を表す。この方法を架橋度測定の定法とした。

細胞壁ペプチドグリカン及びムロペプチドの調製：非放射性の細胞壁ペプチドグリカン画分は、大腸菌 K12 株由来の W3110 株（F<sup>-</sup>）株を後期指数増殖期まで培養し、集菌洗浄後、SDS で煮沸し、蒸留水で洗浄し、調製した(50)。使用前には超音波処理して分散させた。放射性の細胞壁ペプチドグリカンは、CU4431 株（Hfr, dap, lysA）を [ $^{14}\text{C}$ ]-ジアミノピメリン酸（A<sub>2</sub>p<sub>m</sub>）（50Ci/mol, 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ）を加えた L 培地で定常期まで培養し、同様に調製した。ムロペプチドはその一部を Lysozyme で分解し、濾紙クロマトグラフィーにより単離精製した。ムロペプチド標品は比放射能 17Ci/mol と 0.04Ci/mol の二種類を使用した。

#### PBPIA の反応産物の同定

DD-Endopeptidase による処理：DD-Endopeptidase (51)画分は既に報告した方法で精製した。この画分は他に Anhydromuramidase (52)活性を含んでいたが、これら以外の「溶菌酵素」活性を含まず、C3 を基質とした時、架橋部以外を分解しなかった。ムロペプチドの分解は 10mM Tris-Maleate pH6.0, 5mM CoCl<sub>2</sub>、37°Cの反応条件下で行い、分解産物は濾紙クロマトグラフィーにより分離した。

A<sub>2</sub>p<sub>m</sub> と DNP-A<sub>2</sub>p<sub>m</sub> 量比の決定(53)：[ $^{14}\text{C}$ ]-A<sub>2</sub>p<sub>m</sub> で標識したムロペプチドのジアミノピメリン酸（A<sub>2</sub>p<sub>m</sub>）の遊離のアミノ基を Dinitrofluorobenzene (DNFB) 処理して Dinitrophenyl (DNP) 化し、これを塩酸加水分解し、生じた A<sub>2</sub>p<sub>m</sub> と

DNP-A<sub>2</sub>pm を一次元の薄層クロマトグラフィー（イソ酪酸：1N アムモニア = 5：3(V/V)）で分離し、定量した。実験条件は既に報告した方法によった。

平均糖鎖長の推定：Schindler (54)らの方法に準じ、ペプチドグリカンの糖鎖の非還元末端の GlcNAc 残基に UDP-Galactose と Galactosyltransferase を用いて Galactose を導入し、全 GlcNAc に対するその量比を求めて計算した。原報からの変更点は、非放射性的の UDP-Galactose と [<sup>14</sup>C]-GlcNAc 標識したペプチドグリカンを用い、生じた Galactosyl-ペプチドグリカンを DD-Endopeptidase と Lysozyme で完全に分解してから、濾紙クロマトグラフィーで C6 と Gal-C6 を分離定量した事である。

#### 免疫化学的方法

PBP1A の抗血清は、精製 PBP1A 標品と Freund の完全アジュバンドを用いて、メスのウサギ (2.5kg) を感作し、調製した。免疫ブロット法は Towbin ら (55)の方法によった。大腸菌の染色には JE1011 と JST975srev6/pLC29-47 株を用い、菌体をカバーガラス上に吸着させ、ホルマリンを滴下して固定し洗浄した後、500 倍に希釈した抗血清を一次抗体とし 4°C で 12 時間反応させ、同じ希釈率のローダミン標識した二次抗体 (Kappel 社製) を同じ条件で反応させた。対照実験には同じウサギ個体から免疫感作前に調製した血清を用いた。

#### 蛋白質定量法

蛋白質濃度は Wang (56)らによる Lowry 変法によりウシ血清アルブミンを標準蛋白質として測定した。

#### 試薬類

その他の一般試薬類は全て特級品を用いた。

## 結果

### 1. ペニシリン結合蛋白質 1 A の精製

大腸菌 JST975srev6/pLC29-47 株からペニシリン結合蛋白質 1 A (PBP1A と略記) を精製した。pLC29-47 は PBP1A をコードし、その過剰生産をもたらすプラスミド、JST975srev6 株は、PBP1B 欠損 (*mrcB*) と、PBP1A の過剰生産をもたらす変異 (*mreA*) の二重変異株である(40)。精製に当たっては、PBP1A 含量が高い事が望ましく、また、PBP1B はペニシリンと結合し、安定で、広い条件下でペプチドグリカン合成酵素活性を示すので、予めこれを欠損している事が望ましい。そこでこの株を選択した。

精製は次の手順で行った。実験操作は特に断わらない限り 0~4°Cで行なった。各精製段階の画分の蛋白質と PBP のパターンを図 2-1 (19 頁) に示す。標準緩衝液 (50mM Tris-HCl pH7.5) に懸濁した細胞膜画分 (RR fraction) に Triton X-100 を加え、最終濃度 0.93%、蛋白質/界面活性剤・重量比を 1.4 とし、20°C で 20 分間抽出した。100,000xg、1 時間遠心し、可溶画分 (Triton extract) を得た。PBP1A はこの操作で 95% 以上可溶化され、PBP2、3、4 は 30%、PBP5/6 は 50% 程度が可溶化された。可溶画分を 1% Triton X-100 を含む標準緩衝液中で DEAE-cellulose カラムに吸着させ、NaCl 濃度勾配により溶出した。PBP1A は、0.15M~0.25M NaCl の画分に溶出された (DEAE-cellulose fraction) とした。ここで PBP5/6 が除去された。DEAE fraction に 6-APA-Sepharose 4B を懸濁し、30°C で 12 分反応し、濾過してゲルを除去した。PBP1A はこのゲルには殆ど吸着しない (1% 未満) が、PBP2、3、4 は吸着し、除去された。次にこの画分に 6-APA-CH-Sepharose 4B を懸濁し、30°C、20 分反応した。PBP1A はこのゲルにはほぼ全量吸着され、緩衝液では溶出されず、Hydroxylamine 処理により溶出した。Hydroxylamine 処理は 0°C で一回、加温処理 (30°C 40 分) を三回行い、各画分を保存緩衝液に透析して Hydroxylamine を除き、Eluate-1、-2、-3、-4 とした。

Eluate-2、-3、-4 は何れも、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (図 2-1、g、h、i)、変性条件下の等電点電気泳動 (データは示さない) で単一の蛋白質バンドを示し、実質的に均一な単一蛋白質標品である。何れの画分もペニシリン結合活性と標準法によるペプチドグリカン合成酵素活性とを示す点で差は認められな

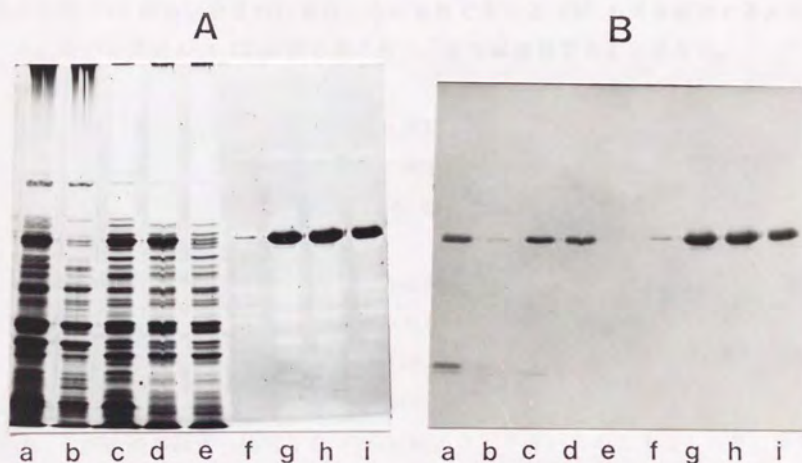


図 2-1 PBP1A の精製

大腸菌 JST975srev6/pLC29-47 株から PBP1A を精製する各段階の画分の蛋白質とペニシリン結合蛋白質のパターンを示す。各画分を Spratt に従って  $[^{14}\text{C}]$ -ペニシリンで処理し、SDS ポリアクリルアミドゲル (7.5%) 電気泳動により蛋白質を分離し、蛋白質を染色して記録した後、ペニシリン結合蛋白質をフルオログラフィーにより検出した。A: 蛋白質バンドを Coomassie brilliant blue で染色、検出したもの。B: フルオログラム。a、RR fraction、b、Triton 抽出の残渣、c、Triton extract、d、DEAE fraction、e、6-APA-CH-Sepharose への非吸着画分、f、Eluate-1、g、Eluate-2、h、Eluate-3、i、Eluate-4。

かったので、一括して「精製 PBP1A 標品」と扱う。ペニシリン結合活性、酵素活性は  $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存して1年以上安定であった。

ペニシリン結合蛋白質では Eluate-2、-3、-4 共に、PBP1A 以外に見かけの分子量 250,000~300,000 のバンドが認められた。類似のバンドは Hydroxylamine 処理した PBP 標品に普遍的に現れ、この処理で生じる PBP の架橋産物と考えられる。その含量はの 0.2% 未満と考えられ、寄与は無視できると考えた。

## 2. 精製過程の各画分のペニシリン結合活性

PBP1A の精製をペニシリン結合活性で測定した結果を表 2-1 (21 頁) に示す。ペニシリン結合活性は図 2-1 の各画分の PBP1A のペニシリン結合量とその画分の総蛋白質量から計算した。

PBP1A のペニシリン結合活性の最終回収率は Eluate-2、-3、-4 を合わせて約 39% であった。どの精製段階でも活性の大きな損失は認められないので精製 PBP1A 標品に大きな失活はなく、RR fraction とほぼ同じ比ペニシリン結合活性を保っていると考えられる。Affinity chromatography での回収率は約 55% と低かったが、これは溶出操作一回当りの PBP1A の回収率が低いためと考えられる。即ち、Eluate-2、-3、-4 への回収率はそれぞれ、18.3%、23.4%、13.5% であり、ゲルに固着して回収できない PBP1A がかなり存在する事は明かである。この事は、PBP1A とゲルの結合が強固で、容易には溶出されない事を示唆する。

PBP1A のペニシリン結合活性の比活性は Eluate-2 で最大値約 39 倍が得られた。その比活性から PBP1A 1mol 当りのペニシリン結合量は 0.108mol と計算された。この値は小さいが、PBP1A の大きな失活は考えられないので、PBP1A の本来の性質を現していると考えられる。Eluate-2、-3、-4 の順で比活性が低下する事は、Hydroxylamine 処理による PBP1A の失活を示唆するが、処理時間 120 分の Eluate-4 でも Eluate-2 の 78% の比活性を維持しており、PBP1A はこの処理に実質的には安定である。なお、精製倍率が低いのは、材料に PBP1A が増幅した株を用いたため RR fraction でのその含量が高いからである。

## 3. PBP1A の酵素活性の検出

Undecaprenol-P-P-MurNAc(L-Ala-D-Glu-meso-A<sub>2</sub>pm-D-Ala-D-Ala)-GlcNAc (リビ



Fraction	Protein (mg)	Penicillin bound (nmoles)	(pmoles/mg)	Purifi- cation	Recovery (%)
RR	797	24.3	30.5	1	100
Triton extract	159	23.7	150	4.9	98
DEAE-cellulose	62	17.3	280	9.1	71
6-APA-CH-Sepharose	(8.8)	(9.56)			(39)
Eluate-2	2.7	3.17	1178	39	
Eluate-3	3.6	4.05	1139	37	
Eluate-4	2.6	2.34	916	30	

表 2-1 PBP1A の精製表

湿重量 51g の大腸菌 JST975srev61/pLC29-47 株の菌体から PBP1A を精製した際の蛋白質量、結合ペニシリン量、及び精製度と回収率を示す。蛋白質量はウシ血清アルブミンを標準蛋白質として Lowry の方法により決定した。結合ペニシリン量は図 2-1 の PBP1A バンドを切り出して放射能を計数し、計数効率 (78%)、ペニシリンの比放射能 (50Ci/mol)、電気泳動に用いた蛋白質量、及びその画分の全蛋白質量から算出した。比ペニシリン結合量、精製度、回収率はそれらの数値を基に算出した。無細胞抽出液でのペニシリン結合蛋白質の検出は困難なので、精製度、及び回収率の計算は RR fraction を基準とし、夫々 1 及び 100% とした。6-APA-CH-Sepharose 欄の ( ) 内は Eluate-2 から 4 迄の和を表す。

ド中間体)を基質とし、精製 PBP1A 標品を用いて、緩衝液を 10mM Tris-HCl pH 7.5 に替え、標準法に準じて 37°C、30 分間反応した。これを濾紙クロマトグラムに展開したオートラジオグラムを図 2-2 (23 頁) A に示す。PBP1A 標品はリビド中間体から、クロマトグラムの原点に残る反応産物を生成した (b)。煮沸処理した PBP1A 標品はこれを生成しない (a) ため、これは PBP1A の酵素反応産物と考えられた。この反応産物はペプチドグリカン合成に特異的なリビド中間体を基質として生成したもので、加工や修飾を受けていないペプチドグリカンと考えられる。これ以外に反応産物は認められなかった。酵素反応産物は水溶性で、蒸留水で濾紙から抽出でき、原点のスポット内部は均一であった。PBP1B の酵素反応産物は水に不溶性で原点上に凝縮し、不均一なスポットを成(57)す事と対照的である。PBP1A の反応系にペプチドグリカンの架橋形成の阻害剤である Penicillin G (PCG) (c)、Cefalexin (CEX) (d) を加えると、同様に反応産物が原点上に検出された。反応産物は水溶性で、スポットの形状は標準法のそれと区別できなかった。一方、糖鎖の重合反応を阻害すると言われるマカレボマイシン (MA C) を加えると、PBP1A の反応は完全に阻害された (e)。

反応産物は Lysozyme で分解された。分解産物を濾紙クロマトグラムに展開したオートラジオグラムを図 2-2, B に示す。標準法の反応産物からは三種類の分解産物が得られ (a)、その展開パターンは細胞壁ペプチドグリカンの Lysozyme 分解産物 (ムロペプチド) のそれと基本的に一致し、二糖ペプチド単位の単量体 (C6)、架橋二量体 (C3)、架橋三量体 (C2) に相当する成分を含んでいた。従って、この反応産物は架橋ペプチドグリカンと考えられた。架橋度は極めて高く、この実験では 30.5% であった。架橋三量体 (C2) の含量が高く、架橋度への寄与が大きい。細胞壁ペプチドグリカンや、PBP1B の反応産物では架橋度は約 25% であり、架橋三量体含量は少ない。PCG、CEX は架橋形成を阻害し、夫々の反応産物 (夫々 b、c) は C6 に相当する分解産物を主に生成し、見かけの架橋度は夫々 0.7%、0.9% であった。

ペプチドグリカンの架橋度を「ペプチドグリカン中の全ジアミノピメリン酸分子 ( $A_{2pm}$ ) の内、架橋の受容体となっている分子の占める割合」と定義する。C2 は三分子の  $A_{2pm}$  の内二分子が、C3 は二分子の  $A_{2pm}$  の内一分子がそれぞれ架橋の受容体となっているから、架橋度 (CL) は次の式で計算できる。

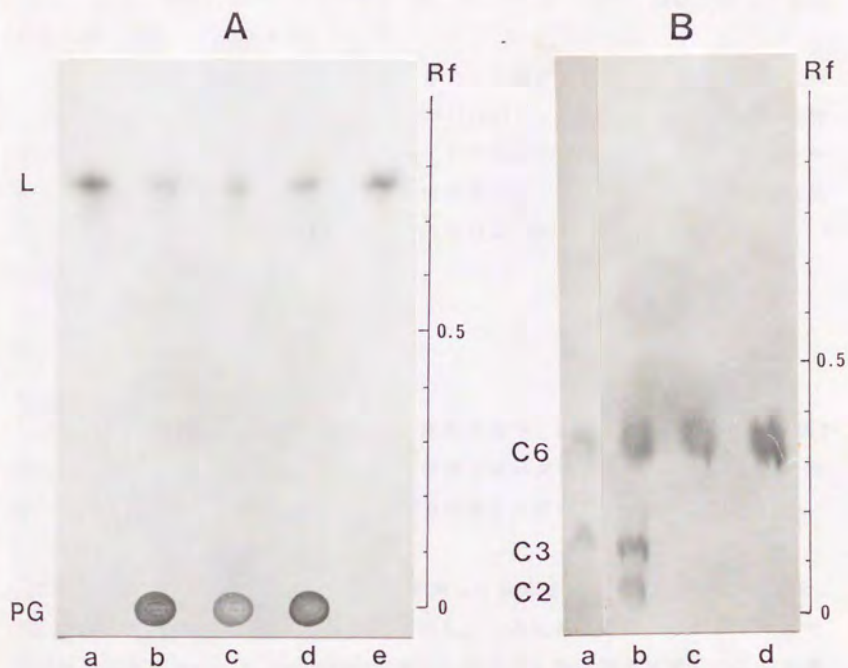


図 2-2 PBPIA による試験管内ペプチドグリカン合成反応の検出

A: 標準法(「方法」参照)に準じて  $[^{14}\text{C}]\text{-GlcNAc}$  標識したリピド中間体を基質とし、pH7.5 で  $37^\circ\text{C}$ 、30 分間反応を行い、反応液を濾紙クロマトグラフィー(展開溶媒、イソ酪酸:1N アムモニア=5:3(V/V))で展開し、ラジオオートグラムとしたもの。a、煮沸 PBPIA を含む反応系、b、完全反応系、c、完全反応系に Penicillin G (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 添加、d、完全反応系に Cefalexin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 添加、e、完全反応系に Macarbomycin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 添加。L はリピド中間体、PG は原点上のペプチドグリカン。B: A の b、c、d の原点を Lysozyme 処理し、A 同様に濾紙クロマトグラフィーに展開し、ラジオオートグラムとしたもの(「方法」参照)。a、細胞壁ペプチドグリカン由来のムロペプチド、b、完全反応系の反応産物由来のムロペプチド、c、PenicillinG 添加系の反応産物由来のムロペプチド、d、Cefalexin 添加系の反応産物由来のムロペプチド。C6、C3、C2 は細胞壁ペプチドグリカン由来のムロペプチドで、C6 は二糖ペプチド単位の単量体、C3 はその架橋二量体、C2 はその架橋三量体。

$$CL(\%) = ([C3]/2 + 2[C2]/3) / ([C6] + [C3] + [C2])$$

ここで [C6]、[C3]、[C2] はそれぞれ C6、C3、C2 の GlcNAc 残基の数 (= A<sub>2pm</sub> 残基の数) で表した量を表す。

以上の結果から、PBP1A はペプチドグリカンの糖鎖重合及びペプチド架橋の両反応を同時に触媒する「二機能的 (bifunctional)」なペプチドグリカン合成酵素 (Peptidoglycan synthetase) で、リピド中間体から架橋ペプチドグリカン合成すると結論される。そのペプチド架橋活性はβ-ラクタムに、糖鎖重合活性はマカレボマイシンに阻害される。以上の性質は PBP1B と同一である(57)が、その反応産物の性質は異なっていた。

#### 4. 反応産物の性質と同定

##### 1. 反応産物の性質

反応産物は、架橋の有無に関わらず水溶性であり、蒸留水で 60% 以上が濾紙から抽出、回収された。しかし何れの反応産物も濾紙クロマトグラフィーで全く展開、移動しないので、糖ペプチド鎖は相当な長さに重合していると考えられた。

##### 2. Lysozyme による分解

標準法で PBP1A の酵素反応を行い、煮沸して反応を停止した。この反応液を二つに分け、一方はそのまま Lysozyme 処理し、一方は濾紙クロマトグラフィーで展開後原点を切り出して Lysozyme 処理し、両者の分解産物を比較した。反応産物ペプチドグリカンは両者とも完全にムロペプチドに分解され、放射能は原点に残留しなかった。ムロペプチドの回収率は前者の方法が高かったが、その種類、量比、及び計算上の架橋度は二つの方法で変わらなかった(データは示さない)。以上から、PBP1A の反応産物はペプチドグリカン型の重合糖鎖構造を持つ事、本研究で用いた架橋度測定法は正確な架橋度を与える事、PBP1A は分子内プライマーとして分子内に共有結合したペプチドグリカン断片を持たない。

標準法と、ペニシリン (30ug/ml) 存在下での反応産物の Lysozyme 分解産物を二次元の薄層クロマトグラフィーに展開した。そのパターンを図 2-3 (25 頁) に示す。標準法の反応産物の主要分解産物 (A) は、細胞壁ペプチドグリカンの主成分ムロペプチド、C6、C3、C2 と良く似た展開パターンを示し、PBP1B の反応産物に見られる X、Y などの異常な架橋ムロペプチド(57)を含まなかった。C6、C3、

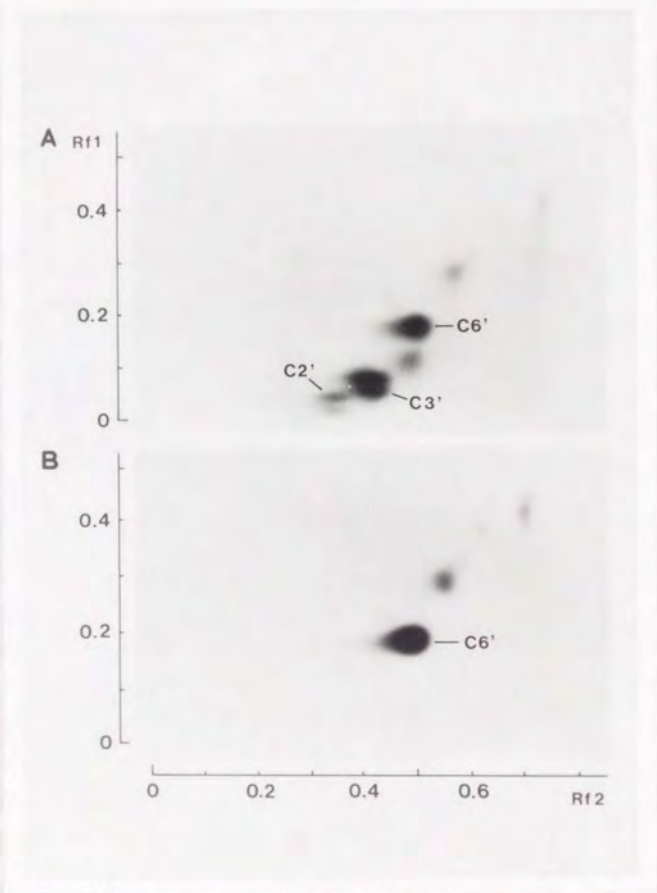


図 2-3 PBP1A 反応産物由来のムロペプチドの分析

$[^{14}\text{C}]$ -GlcNAc 標識したリピド中間体を基質とし、標準法とそれに  $30\mu\text{g/ml}$  の Penicillin G を添加した系で PBP1A の反応産物を作製し、濾紙クロマトグラフィーで精製し、その原点を Lysozyme 処理して可溶化された画分を、シリカゲル薄層板上で二次元に展開し（一次元目、イソ酪酸：1N アムモニア=5：3(V/V)、二次元目、エタノール：1M 酢酸アムモニウム=5：2(V/V))、ラジオオートグラムとした。A：標準法の反応産物由来のムロペプチド、B：Penicillin G 添加系の反応産物由来のムロペプチド。細胞壁ペプチドグリカンの主要ムロペプチドの C6、C3、C2 に対応するムロペプチド C6'、C3'、C2' を図中に示した。

C2 に対応する PBP1A の反応産物由来のムロペプチドを夫々、C6'、C3'、C2' と呼ぶ。ペニシリン存在下での反応産物 (B) は架橋ムロペプチドを含まず、C6' が主成分であった。

### 3. PBP1A 反応産物由来のムロペプチドの同定

#### a. C6' の同定

C6' の濾紙及び薄層クロマトグラム上での易動度は、リピド中間体を 0.01N 塩酸加水分解して得られる二糖ペンタペプチド、及び C6 (二糖テトラペプチド) と変わらなかった (データは示さない)。この事から、C6' を、二糖ペプチド単位 (GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-mesoA<sub>2</sub>pm-D-Ala-D-Ala) の単量体と同定した。但し二糖ペンタペプチドと二糖テトラペプチドの易動度は殆ど同じなため、C6' がペプチド鎖の五番目の D-Ala を保持しているかどうか明かではない。

#### b. C3'、C2' の同定

C3'、C2' が二糖ペプチド単位の架橋二量体、架橋三量体である事を次の実験により確かめた。

DD-Endopeptidase(53)による分解: C3'、C2' を基質として DD-Endopeptidase 処理を行い、分解反応の時間依存性を調べた。そのオートラジオグラムを図 2-4 (27 頁) に示す。C3' は経時的に C6/C6' 迄完全に分解された。C2' は初め C3/C3' を中間産物として生じつつ、最終的に C6/C6' 迄完全に分解された。この結果は C3' が DD-peptide 結合で架橋された C6/C6' の二量体、C2' が同様の三量体である事を示唆する。DD-Endopeptidase 画分は大腸菌から分画し、ムロペプチドでは、架橋ペプチド以外の部分を分解しない事を確認した上、使用した。

ジアミノピメリン酸の遊離アミノ基の量比決定: [<sup>14</sup>C]-ジアミノピメリン酸 (A<sub>2</sub>pm) で標識したリピド中間体を基質に用い、標準法及びペニシリン存在下での反応産物を作製し、これらから C6'、C3'、C2' を分離した。これらのムロペプチド分子内の A<sub>2</sub>pm の遊離のアミノ基をジニトロフェニル (DNP) 化した後加水分解し、その A<sub>2</sub>pm/DNP-A<sub>2</sub>pm の量比を決定した (53)。結果を表 2-2 (28 頁) に示す。実験誤差範囲内で C6'、C3'、C2' に於けるその量比は夫々、0、1、2 であった。ムロペプチド分子内の A<sub>2</sub>pm 分子の L-光学活性中心のアミノ基は全てペプチド主鎖を構成するペプチド結合に与り DNP 化されない。D-光学活性中心のアミノ基が、架橋のペプチド結合に与り DNP 化されないか、遊離で DNP 化されるかのどちら

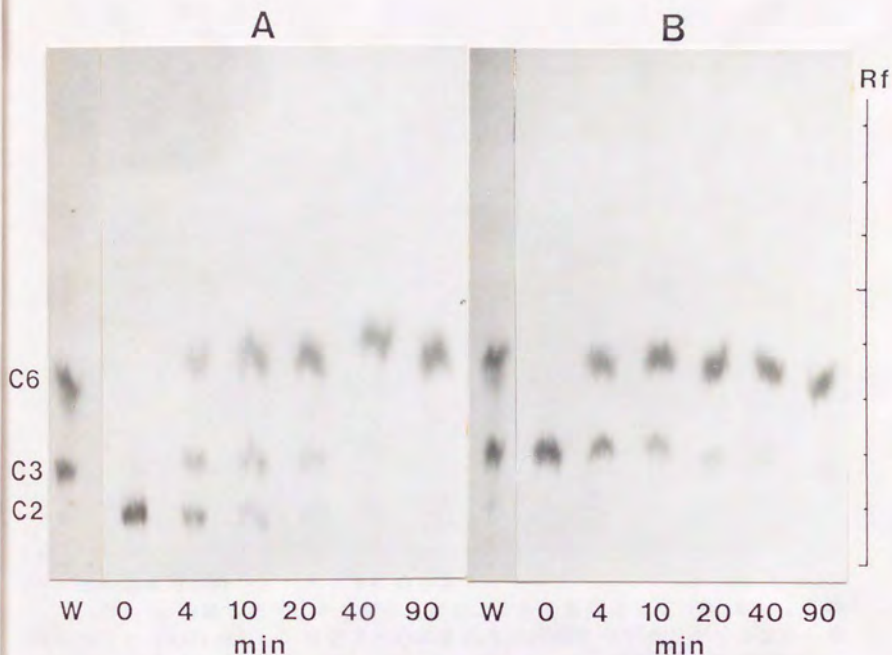


図 2-4 C3'、C2' の DD-Endopeptidase による C6/C6' への分解

標準法で PBP1A の合成した反応産物の Lysozyme 分解産物から、C3'、C2' を夫々単離精製し、これらを基質として 10mM Tris-maleate pH6.0、5mM CoCl<sub>2</sub> 中、37°Cで、大腸菌由来の DD-Endopeptidase 画分（「方法」参照）により処理し、経時的に一定量をサンプリングして煮沸して反応を停止し、これらを濾紙クロマトグラフィーで展開し、オートラジオグラムとした。A：C2' を基質としたもの。B：C3' を基質としたもの。Wは細胞壁ペプチドグリカン由来のムロペプチド。その主成分 C6、C3、C2 を図中に示す。数字は反応時間。

Compound	Ratio A <sub>2</sub> pm/DNP-A <sub>2</sub> pm
Reference	
GlcNAc-MurNAc(L-Ala-D-Glu-meso-A <sub>2</sub> pm -D-Ala-D-Ala)-P-P-Undecaprenol	0.04
Muropeptides from PBP1A product in the Standard method	
C6'	0.056
C3'	1.11
C2'	2.13
in the persence of Penicillin G	
C6'	0.033

表 2-2 PBP1A の反応産物ペプチドグリカン由来のムロペプチドのジニトロフェニル化による分子内ペプチド架橋数の決定

[<sup>14</sup>C]-A<sub>2</sub>pm 標識したリビド中間体、及び、これを基質として PBP1A により標準法または Penicillin G 存在下で合成された反応産物ペプチドグリカンから単離したムロペプチドの C6'、C3'、C2' を、ジニトロフルオロベンゼンで処理し、6N HCl 中で 100°C、8 時間加水分解し、シリカゲル薄層クロマトグラフィー（展開溶媒、イソ酪酸：1N アムモニア=5：3(V/V)）により遊離の A<sub>2</sub>pm とジニトロフェニル (DNP)-A<sub>2</sub>pm を分離、定量し、A<sub>2</sub>pm/DNP-A<sub>2</sub>pm 比を計算した。主要ムロペプチドは分子内に一残基の架橋に関与しない A<sub>2</sub>pm を含み、これは以上の処理で DNP-A<sub>2</sub>pm を生ずるが、架橋に与る A<sub>2</sub>pm 残基は化学修飾を受けず、遊離のそれを生ずるので、A<sub>2</sub>pm/DNP-A<sub>2</sub>pm 比の値は分子内ペプチド架橋数を表す。



かである。従って、C6' には架橋は無いので単量体、C3' は二分子の内一分子の  $A_{2pm}$  が架橋に関与し、架橋二量体、C2' は三分子の内二分子の  $A_{2pm}$  が架橋に関与し、架橋三量体と結論された。

以上の結果から C3'、C2' がそれぞれムロペプチドの架橋二量体、架橋三量体と同定した。この場合も架橋の受容側のペプチド鎖上に、五番目の D-Ala が保持されているかどうかは明かでない。

#### c. その他のムロペプチドの評価

この他に、架橋の有無に関わらず、リピド中間体と同じ易動度（高易動度）に展開されるムロペプチドが認められ（図 2-3）、反応産物ペプチドグリカンにウンデカブレノールピロリン酸残基が結合している可能性を示唆する。この他にもムロペプチドが認められるが、それらの含量は最大数%であり、量も量比も基質のリピド中間体により異なるため、リピド中間体の不均一（GlcNAc のアセチル化などが考えられる）に由来すると考えられる。架橋度などの計算では考慮しない。

#### 4. 平均糖鎖長の推定

水抽出した反応産物を用い、Schindler ら(54)の方法により、平均糖鎖長を推定した。即ち、酵素的に糖鎖の非還元末端の GlcNAc 残基にガラクトースを導入し、次いで Lysozyme と DD-Endopeptidase でこれを分解し、ガラクトシル化されないムロペプチドと、されたムロペプチドの量比を求め、これから平均糖鎖長を計算した。結果を表 2-3 (30 頁)に示す。計算は、反応産物のガラクトシル化の効率が、ムロペプチドのその平均（約 73%）に等しいと仮定して行った。得られた平均糖鎖長の値は、細胞壁ペプチドグリカンのそれと一致した。

#### 5. 反応産物の同定のまとめ

PBP1A が標準法で作る反応産物は、長い糖鎖を持つ架橋した初生ペプチドグリカンであり糖鎖と架橋の構造は細胞壁ペプチドグリカンのそれと同じである。糖鎖の還元末端にリピド残基を残す可能性がある以外に特殊なムロペプチドは含まれない。しかし細胞壁ペプチドグリカンとは、架橋ムロペプチドの量比が異なり、架橋度が高く、全体として水溶性である点で異なっている。

#### 5. 精製 PBP1A 標品の等電点電気泳動による解析

精製 PBP1A 標品を、0.1% Triton X-100、10% Glycerol、Ampholine (pH3-10)

Acceptor	C6 (pmoles)	Gal-C6 (pmoles)	Ratio (C6+Gal-C6)/(Gal-C6)	Chain length (Calculated)
Muropeptide				
C6'	1.59	4.12	1.39	
C3'	1.83	5.70	1.32	
Product Peptidoglycan of PBP1A				
Crosskinked	3.92	0.093	43	32
Linear	3.49	0.089	40	30

表 2-3 PBP1A の反応産物ペプチドグリカンの平均糖鎖長の推定

Schindler らの方法に準じてペプチドグリカン糖鎖の非還元末端の GlcNAc 残基にガラクトース残基を導入し、ガラクトシル化されたムロペプチドの量比から平均糖鎖長（二糖ペプチド単位数）を推定した。[<sup>14</sup>C]-GlcNAc 標識リビド中間体と精製 PBP1A 標品を用い、標準法、及び Penicillin G 存在下に作製した反応産物架橋ペプチドグリカン、直鎖ペプチドグリカン、及び架橋ペプチドグリカン由来のムロペプチド C6'、C3' を受容体とし、20mM Tris-HCl pH7.4、20mM MnCl<sub>2</sub>、30mM UDP-Galactose の条件下で Galactosyltransferase を加え、37°C、150 分反応させた。次にこれを Lysozyme 処理し、次いで大腸菌の溶菌酵素（DD-Endopeptidase/Anhydromuramidase）画分で処理した後、濾紙クロマトグラフィーにより Gal-C6' と C6' とを分離、定量した。C3'、C6' を受容体とした結果からガラクトシル化の効率を求め、架橋、及び直鎖ペプチドグリカンを受容体とした結果を用いて平均糖鎖長（二糖ペプチド単位にして）を計算した。

を含む 5% ポリアクリルアミドスラブゲル中で 40V/cm、4°C、8 時間電気泳動した。泳動後、各スロットを切り離し、蛋白質を含むスロットの一つは適当な幅に切り分け、ゲル片を少量の保存緩衝液に漬け、同じ緩衝液に一晩透析して蛋白質を溶出して活性測定に用い、もう一つを Coomassie brilliant blue G-250 で染色した。活性測定は、溶出した蛋白質を用い、ペニシリン結合活性及び標準条件下のペプチドグリカン合成活性に就いて行った。

結果を図 2-5 (32 頁) に示す。精製 PBP1A 標品はこの電気泳動条件下では細かくバンドに分かれ、pH6.1 と pH6.4 を中心とする二つのバンド群を形成した。何れのバンド群に対応する部分にも、ペニシリン結合活性と架橋ペプチドグリカン合成活性の両方が認められ、ペニシリン結合活性、ペプチドグリカン糖鎖重合活性、ペプチドグリカン架橋活性は分離しなかった。この事からも、PBP1A がペプチドグリカン糖鎖重合活性と架橋活性 (及びペニシリン結合活性) を併せ持つ事が示唆された。但し、同じ標品は SDS 電気泳動及び変性条件下の等電点電気泳動では単一蛋白質バンドを示すので、活性な PBP1A 蛋白質は見かけ上の不均一をもたらす原因を持つと解釈される。

#### 6. 精製 PBP1A 標品中の他の関連する酵素の活性

精製 PBP1A を用い、標準法 (至適条件) で、37°C、120 分反応させ、次の酵素活性の検出を試みたが、何れの活性も全く認められなかった。

##### 1. DD-Carboxypeptidase 活性

基質: UDP-MurNac-L-Ala-D-Glu-meso-A<sub>2</sub>pm-D-Ala-D-Ala (D-Ala 標識)

##### 2. LD-Carboxypeptidase 活性

基質: UDP-MurNac-L-Ala-D-Glu-meso-A<sub>2</sub>pm-D-Ala (D-Ala 標識)

##### 3. DD-Endopeptidase 活性

基質: C<sub>3</sub>、細胞壁ペプチドグリカン (何れも meso-A<sub>2</sub>pm 標識)

##### 4. Anhydromuramidase (Transglycosylase) 活性

基質: 細胞壁ペプチドグリカン (meso-A<sub>2</sub>pm 標識)

##### 5. Transpeptidase 活性 (60)

基質: UDP-MurNac-pentapeptide と Gly (Gly 標識)

##### 6. Transpeptidase 活性

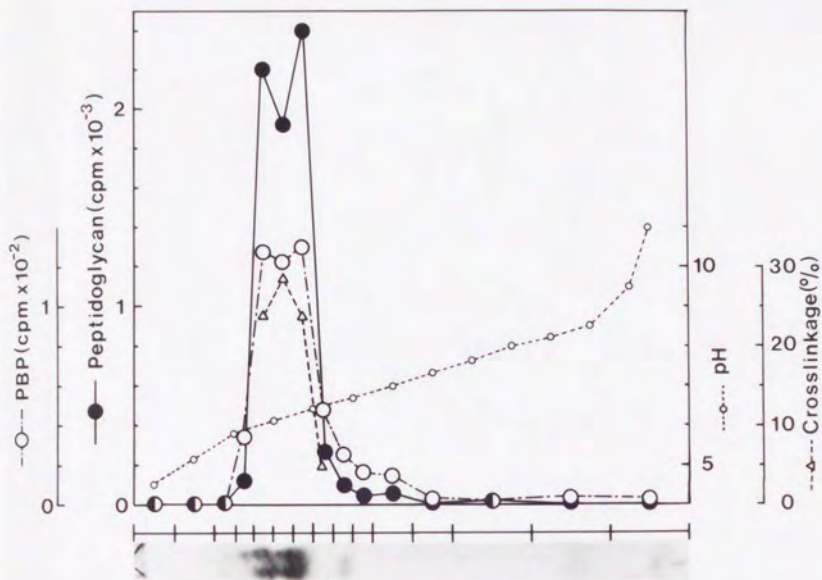


図 2-5 精製 PBPIA の等電点電気泳動による分析

精製 PBPIA 標品を 2% Ampholite (pH3-10)、10% Glycerol、0.1% Triton X-100 を含む 5% ポリアクリルアミドスラブゲルの 2 レーンに 47ug ずつ載せ、4°C で、300V、8 時間電気泳動した。泳動終了後、各レーンを切り離し、1 レーンは Coomassie brilliant blue により蛋白質を染色検出し、もう 1 レーンは適当な長さのスライスし、ゲルの 2 倍量の保存緩衝液（「方法」参照）に抽出、透析した後、これを酵素標品として、標準法によるペプチドグリカン合成酵素活性、反応産物の架橋度、ペニシリン結合活性を測定した。また、それらの両側のレーンは 5mm づつスライスして水に抽出し、4°C での pH を測定した。

基質：UDP-MurNAc-pentapeptide と  $A_2pm$  ( $A_2pm$  標識)

精製 PBPlA 標品はこれらの酵素に依って汚染されていない。また、この標品は、そのペプチドグリカン合成活性の至適条件下でこれらの酵素活性を示さない。

#### 7. PBPlA のペプチドグリカン合成酵素活性の Triton X-100 への依存性

PBPlA のペプチドグリカン合成酵素活性の性質は、反応液中の Triton X-100 濃度に依存して変化した。ここでは酵素活性の活性化と架橋活性の発現に就いて述べる。他の面に就いてはこの節の末尾に手短にまとめた。

PBPlA のペプチドグリカン合成酵素活性の Triton X-100 濃度依存性を図 2-6 (34 頁) に示す。酵素活性は、緩衝液に 10mM Tris-HCl pH7.5 を用い、標準法に順じて 37°C、45 分反応して測定した。酵素活性は Triton X-100 濃度 0.05~0.08% の非常に狭い範囲で活性化され、しかもこの範囲でのみ架橋活性を発現した。酵素活性の最大値は Triton X-100 最終濃度 0.05% 付近で、無添加に対して約 5 倍、架橋活性の至適濃度は 0.06% 付近であった。これより高濃度側では酵素活性は Triton X-100 濃度と共に低下し、1% では試験管内ペプチドグリカン合成活性を示さず、濾紙法で架橋の無い直鎖ペプチドグリカンを合成した(データは示さない)。一方、Triton X-100 無添加(0.02%未満)~0.03% では、PBPlA は架橋度5% 未満の直鎖ペプチドグリカンを合成し、その活性は Triton X-100 濃度が高まると共にかえって低下し 0.03~0.04% で極小値を示した。

以上の知見から、本研究では PBPlA のペプチドグリカン合成酵素活性測定の標準法には、0.045% の Triton X-100 を加えた系(最終約 0.05%)を採用した。

#### 8. PBPlA のペプチドグリカン合成酵素活性の pH 依存性

PBPlA のペプチドグリカン合成酵素活性の pH 依存性を測定した結果を図 2-7 (35 頁) に示す。緩衝液に Tris-酢酸、Tris-HCl を用い、 $MgCl_2$  を除き、pH4.5~pH8.5 の範囲で酵素活性を標準法に準じて測定した。

PBPlA 標品のペプチドグリカン合成酵素活性は pH6.1 付近に鋭い活性のピークを示した。架橋度も pH6.1 にピークを示したが、山の中心は塩基性側にずれていた。架橋度はペプチドグリカン合成量に左右されるので、架橋活性は pH6.5 付近に至適 pH を持つと考えられる。ペプチドグリカン合成酵素活性は pH6.1 付近で

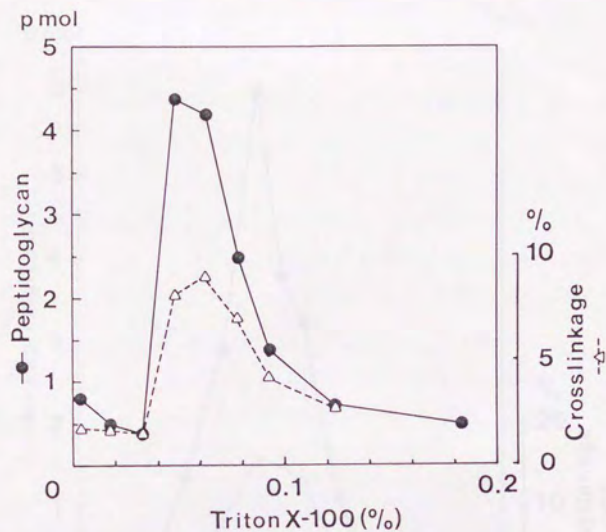


図 2-6 PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の Triton X-100 依存性

[ $^{14}\text{C}$ ]-GlcNAc 標識したリピド中間体を基質とし、精製 PBP1A 標品を用い、pH を 7.5 とし、Triton X-100 の最終濃度を変えて、標準法に準じて 37°C、45 分ペプチドグリカン合成反応を行い、反応を煮沸により停止した。濾紙クロマトグラフィーにより反応産物ペプチドグリカンを分離し、その定量と架橋度測定を定法により行った。

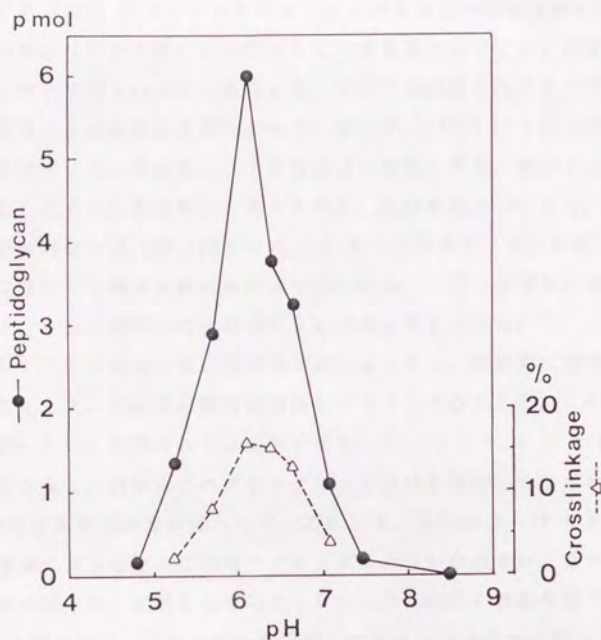


図 2-7 PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の pH 依存性

緩衝液に 25mM Tris-酢酸または Tris-HCl を用い、反応系から  $MgCl_2$  を除去し、 $[^{14}C]$ -GlcNAc 標識リビド中間体を基質とし、精製 PBP1A 標品を用いて、標準法に準じて 37°C、40 分ペプチドグリカン合成反応を行った後、煮沸して反応を停止した。反応産物ペプチドグリカンを濾紙クロマトグラフィーにより分離し、その定量と架橋度測定を定法に依って行った。

は、Tris-塩酸緩衝液でも Tris-Maleate 緩衝液でも変わらなかったもので、緩衝能を考慮して Tris-Maleate, pH6.0 を標準緩衝液として用いる事とした。

#### 9. PBP1A のペプチドグリカン合成反応の時間依存性

標準法での PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の経時曲線を図 2-8 (37 頁) A に示す。リビド中間体は時間と共に化学量論的にペプチドグリカンに変換され、クロマトグラムの原点に移行した。リビド中間体とペプチドグリカン以外に放射性産物の生成は検出されなかった。従って、PBP1A はリビド中間体を消費してペプチドグリカンを合成し、その反応は付加型であり、低分子の反応中間体は生じたとしてもその量は僅かと考えられた。反応開始後 90 分で、加えたりビド中間体の放射能 (14,000 cpm) の約 70% がペプチドグリカンに取り込まれた。反応初期にリビド中間体の回収量がばらつくのは、リビド中間体が試験管壁に吸着され易く、十分定量的には回収されないためと考えられる。

ペプチドグリカン合成の反応速度は初期には小さく、数分間に漸増し約 10 分後から定常化した。このため経時曲線はシグモイド型を示した。この反応速度変化は Triton X-100 が含まれる反応系で発生した。図 2-8, B に Triton X-100 の有無だけを変え、標準法でペプチドグリカン合成を測定した結果を示す。最初の約 5 分間は両者の速度は変わらず、これ以後、Triton X-100 を含む系では反応速度が急速に高まると共に架橋ペプチドグリカンが合成され、含まない系ではそのまま反応が進み、架橋形成も起こらなかった。PBP1A 標品を標準法の条件に、37°C、10 分間平衡化してから反応を開始しても反応速度変化は認められた (データは示さない)。以上からこの反応速度変化は架橋ペプチドグリカンの蓄積に伴う現象である事が示唆される。

反応産物ペプチドグリカンの架橋度も時間と共に増加し、反応開始後 30 分頃から飽和し、90 分後の最終架橋度は 35.5% に達した。C6'、C3'、C2' の量比はそれぞれ約 35%、46%、19% であった (データは示さない)。PBP1A の作るペプチドグリカンはこのムロペプチド量比、即ち 35% 程度の架橋度で、構造的な平衡に達すると考えられる。記録された架橋度の最高値は 39.1% である。C3'/C6' 比は初めの 30 分間は直線的に増加し 50 分後に約 130% で飽和した。また C2'/C3' 比も始めは直線的に増加し 50 分後には約 40% で飽和した (データは示さない)。



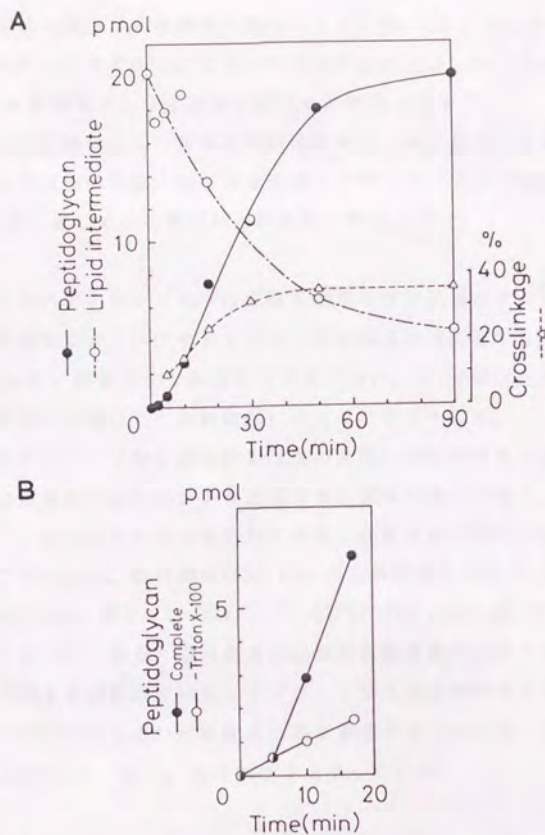


図 2-8 PBPIA のペプチドグリカン合成酵素活性の時間依存性

A: 標準法での PBPIA によるペプチドグリカン合成とリポド中間体消費のタイムコース。[ $^{14}\text{C}$ ]-GlcNAc 標識のリポド中間体を基質とし、精製 PBPIA 標品を用いて標準法により 37°C で反応を行い、経時的にサンプリングしてイソ酪酸を加えて反応を停止した。リポド中間体と反応産物ペプチドグリカンを濾紙クロマトグラフィーで分離し、両者を定量すると共に、反応産物ペプチドグリカンの架橋度を定法により測定した。B: 反応初期のペプチドグリカン合成量の時間依存性への Triton X-100 の効果。反応液中の Triton X-100 の有無だけを変え、A と同じ反応条件でペプチドグリカン合成反応を行い、その反応初期の時間依存性を比較した。図中に架橋度は表記しないが、Triton X-100 を含まない系では架橋は形成されていない。

この事は、架橋反応は反応初期から機能している事、C3'、C2' はそれぞれ C6'、C3' 残基を相手としてその量に見合うだけ形成される事、C6' を架橋相手とする反応が C3' を架橋相手とする反応に優先する事を示唆する。

シグモイド型の経時曲線、架橋度の経時的増加、及び最終架橋度の高さ等の性質は、PBP1B の反応の性質、及び反応産物ペプチドグリカンの架橋度が時間によらず約 25% と一定している事(57)と対照的である。

#### 10. PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の蛋白質濃度依存性

PBP1A の濃度を変えてペプチドグリカン合成酵素活性を測定した結果を図 2-9 (39 頁) に示す。酵素活性の測定は標準法で行い、30 分間に合成された反応産物量とその架橋度を算出し、蛋白質量に対してプロットした。

PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の発現には臨界濃度が認められた。酵素活性は蛋白質量約  $1\mu\text{g}/\text{tube}$  より低濃度側の領域で著しく低く、蛋白質量に比例しないが、これを超えて蛋白質を加えると、酵素活性は加えた蛋白質量に直線的に比例して増加した。臨界濃度は図 2-9 の比例区間を活性 0 に外挿して得られ、約  $0.8\mu\text{g}/\text{tube}$ 、即ち、 $22.8\text{mg}/\text{l}$  で、PBP1A の分子量を約 90,000 とすれば  $2.5 \times 10^{-7}\text{M}$  であった。また、原点を含む低蛋白質濃度側四点のペプチドグリカン合成量の立方根を蛋白質濃度に対してプロットすると直線を与えた。

本研究でペプチドグリカン合成酵素活性を測定するために用いた PBP1A 量は通常  $1.8 \sim 2.4\mu\text{g}/\text{tube}$  であり、臨界濃度を上回っている。

#### 11. PBP1A の直鎖ペプチドグリカン架橋活性

PBP1A の直鎖ペプチドグリカンを基質とした架橋活性を測定した。直鎖ペプチドグリカンは PBP1A により Penicillin G ( $30\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えて標準法で合成し、濾紙クロマトグラフィーで精製し、蒸留水で抽出した。活性測定は標準法に準じて行い、反応を煮沸により停止した後、定法に従って架橋度を測定した。

結果を表 2-4 (40 頁) に示す。直鎖ペプチドグリカンの架橋度は反応開始後 30 分迄は時間と共に増加する様に見えた。しかしその速度は遅い上、上限は低く、最終架橋度 3.8% に留まった。PBP1A がリビド中間体から架橋ペプチドグリカンを合成する場合の架橋形成はこれより遙かに速やかで、架橋度も遙かに高い。従

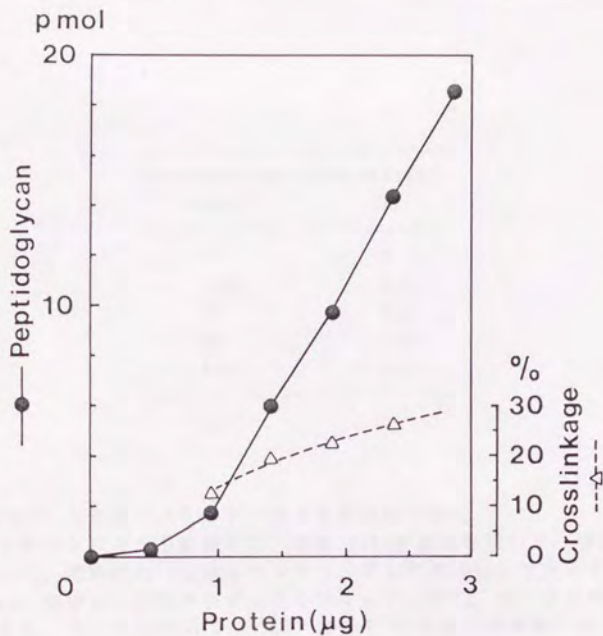


図 2-9 PBP1A のペプチドグリカン合成速度の蛋白質量依存性

反応液中の PBP1A 量を変えてペプチドグリカン合成反応の速度を測定した。[<sup>14</sup>C]-GlcNAc 標識のリピド中間体を基質とし、精製 PBP1A 標品を用い、標準法で 37°C、30分反応した後、イソ酪酸を加えて反応を停止した。反応産物ペプチドグリカンを濾紙クロマトグラフィーで分離、定量し、その架橋度を測定し、これらを加えた蛋白質量に対してプロットした。但し蛋白質量の最大の一点は 30 分の反応では比例区間を外れるため反応時間を 20 分として生じた反応産物量を 30 分に外挿した値をプロットし、架橋度は表記しなかった。

Reaction time (min)	Crosslinkage (%)
0	0
7.5	2.1
15	2.5
30	3.8
60	3.8

表 2-4 PBP1A の直鎖ペプチドグリカン架橋活性の検出

直鎖ペプチドグリカンを基質とし、精製 PBP1A 標品を用いて、標準法に準じて反応を行った。経時的に一定量をサンプリングして煮沸により反応を止め、これを Lysozyme 処理し、濾紙クロマトグラフィーで C6' と C3' を分離、定量し、架橋度を計算した。反応時間 0 の C3' 含量を 0 として架橋度の変化を示した。直鎖ペプチドグリカンは [<sup>14</sup>C]-GlcNAc 標識したリビド中間体を基質として精製 PBP1A 標品を用いて、30μg/ml の Penicillin G 存在下で標準法に準じて作製し、濾紙クロマトグラフィーで精製し、その原点から蒸留水で抽出した。

って、PBP1A は実質的に直鎖ペプチドグリカンを架橋する反応を行わないと考えられる。PBP1A の架橋反応は糖鎖重合反応と共役する場合にのみ発現すると考えられる。用いた直鎖ペプチドグリカン画分は、化学修飾を受けておらず、PBP1A による架橋ペプチドグリカンの合成も阻害しないので（次項参照）、ペニシリンの残留もないと考えられる。

12. 直鎖ペプチドグリカン存在下での PBP1A の新規架橋ペプチドグリカン合成  
直鎖ペプチドグリカンの、PBP1A のペプチドグリカン合成反応への影響を検討した。前項同様に調製した  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc (346mCi/mmol) 標識の直鎖ペプチドグリカンと、 $^3\text{H}$ -GlcNAc (6.6Ci/mmol) 標識したリピド中間体を基質とし、標準法で  $37^\circ\text{C}$  90 分間反応を行い、反応産物のムロペプチドを解析した。二重標識実験ではムロペプチドの C チャンネルの計数値の  $^3\text{H}$  寄与分と  $^{14}\text{C}$  寄与分を、各チャンネルの計数効率から算出し、計算に用いた。

結果を表 2-5 (42 頁) に示す。exp.1 は PBP1A 無添加の対照実験、exp.2 は前項と同様 PBP1A が直鎖ペプチドグリカンの架橋活性を測定した対照実験で、最終架橋度は 1.4% であった。exp.4 は、PBP1A によるリピド中間体からのペプチドグリカン合成を測定した対照実験で、架橋ペプチドグリカンが得られた。exp.3 は PBP1A が直鎖ペプチドグリカンとリピド中間体の存在下でペプチドグリカンを合成した実験である。exp.3 の解析結果を見ると、 $^{14}\text{C}$  を含む架橋ムロペプチドの C3'、C2' の量は共に exp.2 の結果よりやや高いが、その量は極めて少ない。仮に、検出された C3'、C2' の全てが直鎖ペプチドグリカンと新生ペプチドグリカンの架橋に由来する  $^3\text{H}$ - $^{14}\text{C}$ -架橋ムロペプチドとしても、その量は  $^3\text{H}$  標識 C3'、C2' (新生ペプチドグリカン内の架橋由来) 量の 10% に満たず、全架橋度 19.9% の内の 1.2% 分を説明するに過ぎない。実際は、 $^{14}\text{C}$  を含む架橋ムロペプチドの半分が直鎖ペプチドグリカン同士の架橋に由来し (exp.2)、この値は更に下がるであろう。一方、 $^3\text{H}$  ムロペプチドは通常の架橋ペプチドグリカンの量比を示した。

以上の結果から、PBP1A は反応系に直鎖ペプチドグリカンが存在しても、これを供与体または受容体とする架橋反応を実質的には触媒せず、これとは無関係にリピド中間体から架橋ペプチドグリカンを合成する事が示唆された。

Exp.	Substrate	PBP1A	Label	Muropeptides(pmoles)			Crosslinkage (%)
				C6'	C3'	C2'	
1	<sup>14</sup> C-Linear PG	-	<sup>14</sup> C	2.53	0.020	0.003	0.5
2	<sup>14</sup> C-Linear PG	+	<sup>14</sup> C	2.55	0.073	0.0004	1.4
3	<sup>14</sup> C-Linear PG	+	<sup>14</sup> C	2.66	0.130	0.031	3.0
	<sup>3</sup> H-Precursor		<sup>3</sup> H	4.14	1.45	0.444	19.9
4	<sup>3</sup> H-Precursor	+	<sup>3</sup> H	2.52	1.38	0.844	26.4

表 2-5 直鎖ペプチドグリカン存在下での PBP1A の de novo 架橋ペプチドグリカン合成

標準法に準じて、GlcNAc 量にして 3.9pmol の [<sup>14</sup>C]-GlcNAc 標識直鎖ペプチドグリカン (Linear PG) を基質とした反応系 (exp.1、2)、16.2pmol の [<sup>3</sup>H]-GlcNAc 標識リビド中間体 (Precursor) を基質とした反応系 (exp.4)、及び両者を共に基質として加えた反応系 (exp.3) を作製し、酵素無添加 (-) (exp.1)、または精製 PBP1A 標品を加えて (+) (exp.2、3、4) 37°C、90 分反応させ、イソ酪酸を加えて反応を停止した。反応産物ペプチドグリカンを濾紙クロマトグラフィーにより分離し、これを Lysozyme 処理して再び濾紙クロマトグラフィーにより C6'、C3'、C2' を分離し、トルエン系シンチレーション液中で放射能を計数した。計数値のチャンネル分布、計数効率、比放射能から夫々の核種のムロペプチド量、及び夫々の核種での架橋度を算出した (「方法」及び本文参照)。

### 13. ペプチドグリカン合成酵素活性へのムロペプチド及び DNA の効果

PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性への、ペプチドグリカン、ムロペプチド、DNA の影響を検討した。酵素活性は標準法により測定した。反応速度、反応速度変化、架橋度への影響は区別して評価する必要があるので、一部に就いては反応開始後 5 分と 10 分の二点の反応産物量と、10 分後の反応産物の架橋度を測定した。結果を表 2-6 (44 頁) に示す。

細胞壁ペプチドグリカン画分は PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性を約 2 倍活性化したが、速度変化へは影響しなかった。細胞壁ペプチドグリカン画分を、Trypsin または DD-Endopeptidase/Anhydromuramidase 画分で前処理すると、効果は低下するか消失した。この事は、PBP1A の酵素活性はペプチドグリカン構造とリポ蛋白質の双方が維持されている時に限って活性化される事を示す。ムロペプチドは、C6 は効果がなく、C5、C3 は阻害的であった。しかし C5 は速度変化を消去し、架橋度を有意に高めた。PBP1A の合成した新生架橋ペプチドグリカンは初期の反応速度変化を完全に消去し、反応の始めから定常化した速度を与えた事は注目に値する。この事は、新生架橋ペプチドグリカンは、PBP1A のペプチドグリカン合成反応を活性化 (Product activation) する事により定常化反応速度を与える事を示唆する。新生直鎖ペプチドグリカンは酵素活性に殆ど影響を与えなかった。

PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性を DNA が阻害した。架橋活性と初期低速度状態には影響しなかった。標準法で DNA の 50% 阻害濃度は約 30ug/ml であり、DNA を予め Micrococcal nuclease で分解しておくると阻害は起こらなかった。大腸菌の細胞抽出液は PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性を阻害したが、この阻害は Nuclease 処理で約半分回復した。

### 14. $\beta$ -ラクタム抗生物質の効果

PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性への  $\beta$ -ラクタム抗生物質の作用を検討した。活性測定は標準法で行い、薬剤は適宜希釈し、酵素活性の濃度依存性を調べた。結果を表 2-7 (45 頁)、図 2-10 (46 頁) に示す。

調べた  $\beta$ -ラクタム抗生物質は全て PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の架橋形成反応を阻害した。架橋度は  $\beta$ -ラクタムの濃度と共に単調に減少した (

Exp.	Addition	Peptidoglycan(pmoles)			Crosslinkage(%)	
		5min	10min	30min	10min	30min
1	No		0.27	1.65		16.4
	Cell wall PG (nmol)					
	No treatment	43	0.70	3.23		15.6
	Trypsin tr.	43	0.36	1.79		19.1
	C6	39	0.34	1.83		14.9
	C5	31	0.63	1.36		23.5
	C3	55	0.36	1.13		15.3
2	No		0.33	1.29		14.6
	Cell wall PG (nmol)					
	Trypsin tr.	43	0.44	1.68		17.2
	Lytic enzyme tr.	43	0.31	1.82		14.6
	PBP1A product PG (pmol)					
	Crosslinked	2.64	0.92	1.81		28.3
	Linear	3.55	0.48	1.53		19.9
3	No			14.7		30.7
	DNA (ug/ml)					
	No	4		12.4		29.3
	No	140		3.1		23.7
	Nuclease tr.	140		18.2		29.7

表 2-6 PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性へのペプチドグリカン、ムロペプチド、DNA の影響

[<sup>14</sup>C]-GlcNAc 標識リピド中間体と精製 PBP1A 標品を用い、反応液中に表記の物質を加えて、標準法により 37°C で 5 分及び 10 分、または 30 分反応し、イソ酪酸を加えて反応を停止した。反応産物ペプチドグリカンを濾紙クロマトグラフィで分離し、定量した後、10 分及び 30 分反応の反応産物ペプチドグリカンの架橋度を定法により測定した。5 分及び 10 分反応の反応産物ペプチドグリカン量、及び 10 分反応産物ペプチドグリカンの架橋度、または 30 分反応の反応産物ペプチドグリカン量及びその架橋度を示す。ペプチドグリカン及びムロペプチド量は含まれる GlcNAc 量で表記した。



Antibiotic	Concentration for 50% inhibition of TPase (ug/ml)	Residual TGase at that conc. (%)
Penicillin G	0.056	112
Mecillinam	153	95
Cefalexin	0.30	82
Cefaloridine	0.079	74
Cefmetazole	0.052	51
Cefotaxime	0.071	50
Cefminox	0.20	58
Latamoxef	0.14	47

表 2-7 PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性への $\beta$ -ラクタム抗生物質の影響

表記の $\beta$ -ラクタム抗生物質が PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の架橋形成を 50% 阻害する濃度と、その濃度での残存ペプチドグリカン合成酵素活性を示す。 $[^{14}\text{C}]\text{-GlcNAc}$  標識リピド中間体を基質とし、標準法に従って表記の各々の $\beta$ -ラクタム抗生物質の濃度を変えて加えた反応液を作製し、精製 PBP1A 標品を加えて反応を開始し、37°C、30 分反応した後イソ酪酸を加えて反応を停止した。反応産物ペプチドグリカンを濾紙クロマトグラフィーで分離し、定量した後、架橋度を測定した。50% 阻害濃度はその架橋度を抗生物質濃度に対してプロットして求めた。濃度は反応液量を最終 30 $\mu\text{l}$  として計算した値で表記した。

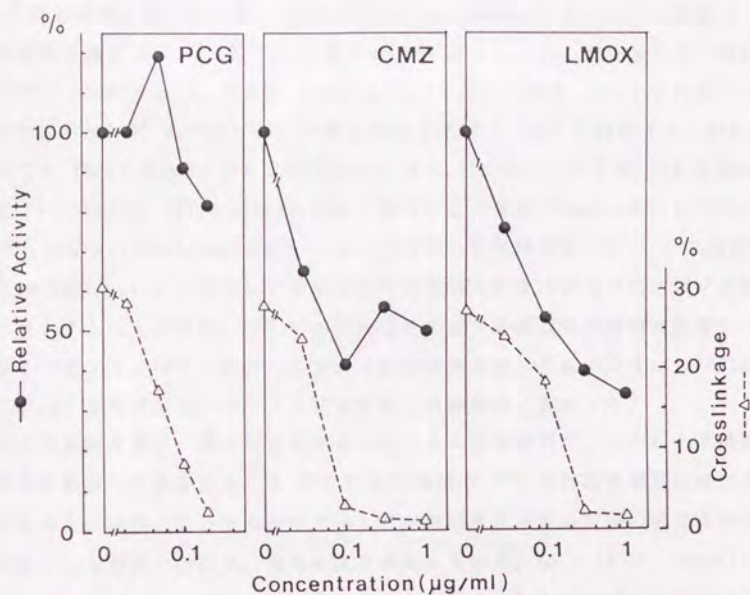


図 2-10 PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性のβ-ラクタム抗生物質による阻害

Penicillin G (PCG)、Cefmetazole (CMZ)、Latamoxef (LMOX) の PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性への影響を示す。 $[^{14}\text{C}]$ -GlcNAc 標識のリピド中間体を基質に用い、標準法に従い、各々の濃度にβ-ラクタム抗生物質を含む反応液を作製してこれに精製 PBP1A 標品を加える事により反応を開始し、37°C、30 分反応した後イソ酪酸を加えて反応を停止した。反応産物ペプチドグリカンを濾紙クロマトグラフィーで分離、定量し、その架橋度を測定し、これらを加えたβ-ラクタム抗生物質の濃度に対してプロットした。ペプチドグリカン合成酵素活性は無添加反応系でのペプチドグリカン合成量を 100% とした相対活性で表し、架橋度はそのままの数値を示した。なおβ-ラクタム抗生物質の濃度は反応液の最終量を 30µl として計算してある(「方法」参照)。

図 2-10)。各々の薬剤の 50% 架橋阻害濃度を表 2-7 に示す。Nocardicin には 50% 架橋阻害濃度を検出できず、Mecillinam への感受性も低かったが、その他の薬剤に対しては PBP1A の架橋活性は何れの薬剤にも高感受性で、概ね PBP1B の 10 倍以上高感受性であった。これ以外には Cefalexin を除く全ての薬剤で、50% 架橋阻害濃度が用いた PBP1A の濃度の 50% を下回った。反応液中の PBP1A 濃度は約  $0.87\mu\text{M}$  であり、例えば Cefmetazole では、力価を 70% とすれば、50% 架橋阻害濃度は約  $0.08\mu\text{M}$ 、90% 架橋阻害濃度は約  $0.15\mu\text{M}$  と計算され、90% 阻害濃度でも PBP1A 濃度の 20% に満たない。また、Penicillin G の 50% 架橋阻害濃度 ( $0.12\mu\text{M}$ ) は PBP1A 濃度の 14% に当り、この値は Eluate-2 の比ベニシリン結合量の  $0.108\text{mol/mol}$  に近い。 $\beta$ -ラクタム抗生物質が PBP1A への飽和結合量の  $0.1\text{mol/mol}$  に大略等しい濃度比でその架橋反応をほぼ完全に阻害する事は、 $\beta$ -ラクタム抗生物質が、PBP1A の架橋活性を競合阻害以外の機構で阻害している事を示唆する。PBP1A の  $\beta$ -ラクタム抗生物質全般への高感受性は、PBP1B 欠損 (mrCB) 変異株の  $\beta$ -ラクタム抗生物質への感受性と調和する。

更に特徴的な事は、調べた全ての  $\beta$ -ラクタム抗生物質が、PBP1A の糖鎖重合活性をも阻害した事である。表 2-7 には各薬剤の 50% 架橋阻害濃度に於ける、残存糖鎖重合活性 (%) をも併せて示した。糖鎖重合活性の阻害の薬剤濃度依存性は必ずしも単調ではなく、薬剤により異なっていた。図 2-10 に、Penicillin G、Cefmetazole、Latamoxef の阻害パターンを示す。Cefmetazole は架橋活性の完全阻害濃度付近にも糖鎖重合活性の極大値を持つ二峰性の阻害パターンを示した。これは Cefminox を例外として、調べた Cephalosporin 系薬剤に共通していた。Latamoxef は薬剤濃度に応じた単調な阻害を示す例で、Cefminox が同様のパターンを示した。Latamoxef は糖鎖重合活性の 50% 阻害濃度が架橋活性のそれを下回った薬剤である。

#### 15. ペプチドグリカン合成酵素活性へのイオンの影響

PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性へのキレート剤及びイオンの影響を検討した。活性測定は標準法に準じ、 $\text{MgCl}_2$  をキレート剤または金属イオンに置き換えて行った。結果を表 2-8 (48 頁)、図 2-11 (49 頁) に示す。

ペプチドグリカン合成酵素活性は  $2\text{mM}$  の EDTA、EGTA で半減したが、何れも

Exp.	Addition	Concentration (mM)	Peptidoglycan (pmol)	Crosslinkage (%)
1	No		1.40	19.1
	EDTA	2	0.68	13.1
	EGTA	2	0.79	13.6
	MgCl <sub>2</sub>	2	12.4	27.4
	CaCl <sub>2</sub>	2	11.9	31.6
	MnCl <sub>2</sub>	2	17.5	30.3
	CoCl <sub>2</sub>	2	17.6	30.7
	NiCl <sub>2</sub>	2	14.6	17.7
	ZnCl <sub>2</sub>	2	6.29	2.4
	CuSO <sub>4</sub>	2	3.47	1.4
2	No		2.96	24.7
	NaCl	10	3.76	20.0
		100	4.12	7.7
	KCl	10	4.48	24.0
		100	4.13	9.3

表 2-8 PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性へのキレート剤及び金属イオンの影響

キレート剤及び金属イオンの表記の濃度での PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性と架橋度を示す。<sup>14</sup>C-GlcNAc 標識リビド中間体を基質とし、標準法に従ってキレート剤または金属イオンを加えた反応液を作製し、精製 PBP1A 標品を加えて反応を開始し、37°C、30 分反応した後、イソ酪酸を加えて反応を停止した。反応産物ペプチドグリカンを濾紙クロマトグラフィーで分離し、定量した後、架橋度を測定した。

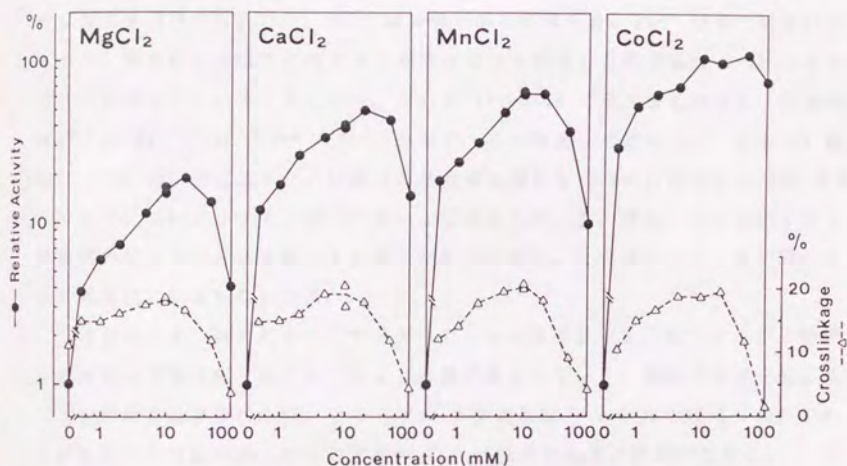


図 2-11 PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の二価金属イオンによる活性化  
 PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性への  $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $CoCl_2$  の活性化効果を示す。[<sup>14</sup>C]-GlcNAc 標識のリピド中間体を基質とし、標準法に従って、各々の濃度に塩を含む反応液を作製し精製 PBP1A 標品を加えて反応を開始し、37°C、適当時間（イオンにより異なる）反応させた後、イソ酪酸を加えて反応を停止した。反応産物ペプチドグリカンを濾紙クロマトグラフィーで分離、定量し、その架橋度を測定し、これらを加えた塩濃度に対してプロットした。ペプチドグリカン合成酵素活性は無添加反応系でのペプチドグリカン合成量を 1 とした相対活性の対数値で表し、架橋度はそのままの数値を示した。なお塩濃度は反応液の最終量を 30 $\mu$ l として計算してある（「方法」参照）。

1mM でも阻害は同じであった（データは示さない）。従って、この減少は阻害と言うより、精製 PBP1A 標品中及びリビド中間体画分に混入している二価金属イオンの除去に伴う効果と考えられた。Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> は酵素活性には余り影響を与えなかったが、高濃度では架橋形成を阻害した。二価金属イオンは調べた全てがペプチドグリカン合成酵素活性を活性化した。Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> は架橋活性を保持したまま活性化し、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> は架橋形成を阻害した。Ni<sup>2+</sup> はやや阻害的であった。前者による活性化のイオン濃度依存性を測定した結果を図 2-11 に示す。活性化曲線は何れもよく似ており、何れも 10~50mM で最大値を示した。活性化の強さは Mg<sup>2+</sup> < Ca<sup>2+</sup> < Mn<sup>2+</sup> < Co<sup>2+</sup> の順で、その程度は最低の Mg<sup>2+</sup> でも 20 倍、Co<sup>2+</sup> では 100 倍に及んだ。架橋度の最大値は何れも 10mM 付近で最大 20% 留まりであり、これよりイオン強度が高いと阻害された。この事は、これらのイオンが糖鎖の重合反応を活性化していることを示唆する。これらのイオンは初期の反応速度変化に影響しなかった。

二価金属イオンは何れもペプチドグリカン合成酵素活性を活性化するが、糖鎖重合反応と架橋反応ではイオンによる影響が異なっていた。架橋反応は一般に高いイオン強度で阻害され、KCl でも 100mM で架橋形成を 50% 以上阻害した。これは細胞質内の反応の多くが同じ濃度の KCl に依存する事と対照的である。

#### 16. Triton X-100 を含まない系でのペプチドグリカン合成反応

反応液に 0.045% の Triton X-100 を含まない反応系での結果を以下にまとめておく（何れもデータは示さない）。

Triton X-100 無添加の系でも、PBP1A はリビド中間体から化学量論的にペプチドグリカンを合成した。反応速度は小さく、反応速度の上昇は見られず、その経時曲線は単純な飽和曲線であった。反応産物は見かけの架橋度が最大 5% 程度の直鎖ペプチドグリカンであり、架橋度の経時的増加は認められなかった。二価金属イオンの多くがペプチドグリカン合成反応を活性化したが、何れも影響は小さく、活性化のパターンも異なっていた。活性化の最大値は、Mn<sup>2+</sup> で約 3 倍（5mM）、Co<sup>2+</sup> は阻害的（1mM で 50% 阻害）であり、Cu<sup>2+</sup> は影響がなかった。また、マカレボマイシンへの感受性が低下した(40)。

これらの結果は PBP1A が、Triton X-100 を含まない系でも糖鎖重合反応を

触媒する事を示している。しかし、その活性は Triton X-100 を至適濃度含み、十分架橋する条件下でのそれとは質的に異なっている事を示唆する。

#### 17. PBP1A の抗血清による細胞の染色

精製 PBP1A を用いて抗血清を作製した。抗血清はイミュノプロット法で大腸菌の粗抽出標品の PBP1A を特異的に染色した（データは示さない）。この抗血清を用いて大腸菌 JST975srev61、JE1011（前者の親株）株を間接蛍光抗体法により染色したところ、何れも細胞全体が染色され、PBP1A の、細胞上での特別な局在性は認められなかった（データは示さない）。

## 考察

### 1. PBP1A の酵素活性

大腸菌のペニシリン結合蛋白質 1 A (PBP1A) を電気泳動上単一蛋白質迄精製した。精製 PBP1A 標品は試験管内でリビド中間体を基質として架橋ペプチドグリカン合成を、その糖鎖重合活性、架橋活性、ペニシリン結合活性は精製過程でも等電点電気泳動でも分離しなかった。従って、PBP1A は糖鎖重合と架橋形成の両方の反応を触媒するペプチドグリカン合成酵素 (Peptidoglycan synthetase) と結論される。架橋活性は  $\beta$ -ラクタム抗生物質に、糖鎖重合活性はマカレボマイシンに阻害された。以上の生化学的性質は PBP1B のそれと共通していた(57)。

本研究で検出した試験管内架橋ペプチドグリカン合成活性は、PBP1A の生体内での酵素活性を反映していると考えられる。その根拠として、第一に PBP1A は特異的な基質から、細胞壁ペプチドグリカンと共通の化学構造を持つ架橋ペプチドグリカン合成を触媒する酵素活性を持つ事、第二にその酵素活性の基本的な性質が生理的に等価と考えられる、PBP1B と共通する事、第三にその酵素活性の  $\beta$ -ラクタム抗生物質への高い感受性から、mrcB (PBP1B 欠損) 株の  $\beta$ -ラクタム高感受性(58)が説明される事、を挙げる事ができる。

標準法での PBP1A の定常速度でのペプチドグリカン合成速度は図 2-8 A から約  $0.02 \text{ moles (GlcNAc) / min / mole (PBP1A)}$  と計算される。栄養増殖中の大腸菌のサキュルスは平均約  $3 \times 10^6$  残基の GlcNAc を含む(59)ので、世代時間を 30 分、一細胞当り  $10^4$  分子の PBP1A (後述) がペプチドグリカン合成するとすれば、その合成速度は  $10 \text{ moles (GlcNAc) / min / mole (PBP1A)}$  程度となる。従って、標準法でのペプチドグリカン合成速度は生体内の約  $1/500$  である。この反応速度低下は、本来細胞質膜近傍に高濃度かつ組織的に局在、配向する基質、PBP1A、受容体の新生ペプチドグリカンの何れもが、試験管内反応ではコロイド粒子として三次元的に希釈され、有効衝突確率が低い事で説明できると考えられる。

### 2. PBP1A の合成するペプチドグリカンの構造

PBP1A の合成したペプチドグリカンは通常のムロペプチドを主成分として構成され、異常ムロペプチドを含まなかった。しかし、その構造は細胞壁ペプチドグ



リカンと比べて特異であった。ムロペプチド組成を見ると、細胞壁ペプチドグリカンは株や生育条件に依らず C5/C6 と C3 をほぼ等量含み、架橋度は約 25% とほぼ一定で、C2 は僅か架橋度に殆ど寄与しないのに対し、PBP1A の反応産物ペプチドグリカンは架橋ムロペプチドに C3'、C2' を含み、架橋度に関わらず C2' は C3' に見合うだけ形成され、両者の性質は一致しなかった。最終架橋度は非常に高く（最高 39.1%）、架橋度 35.5% でのムロペプチド量比は、C6' 37%、C3' 46%、C2' 18% であり、この組成ではペプチドグリカンは薄いシート状構造を取り得ない。また、PBP1A の反応産物ペプチドグリカンはリビド残基（-P-P-Undecaprenol）を末端に保持している可能性が示唆されたが、細胞壁ペプチドグリカンはその様なムロペプチドは殆ど検出されない。第三に、細胞壁ペプチドグリカンは不溶性のシート状高分子なのに対し、PBP1A の反応産物ペプチドグリカンは長い糖鎖と高い架橋度を持つにも関わらず水溶性であり、小さくまとまった粒状の分子構造を持つ考えられる。糖鎖と架橋との関係は明らかではないが、架橋度の高さからみて、網状部分と樹枝状部分の両方を持つ、ひきつれた構造の分子と考えられる。これらの構造の違いからみて、PBP1A の反応産物ペプチドグリカンのまま細胞壁ペプチドグリカンを構成するとは思われない。

### 3. PBP1A の酵素活性発現の条件

PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の発現には蛋白質濃度に臨界値が認められた。この事は、PBP1A は臨界濃度を越えた分が会合し、多量体となって酵素活性を現す事を強く示唆する。低蛋白質濃度側の酵素活性の立方根が蛋白質濃度と比例したので酵素活性発現は三量体を基本にしているであろう。精製標品に混在する架橋産物の分子量が PBP1A の約 3 倍である事はこれと調和する。非変性等電点電気泳動で PBP1A が多数のバンドに分かれるのは、多量体状態を反映した可能性がある。臨界濃度の約 23 $\mu$ g/ml 即ち  $2.5 \times 10^{-7}$ M は生理的イオン強度でのアクチン重合の臨界濃度  $1 \times 10^{-7}$ M に近い。

PBP1A は非常に狭い濃度範囲（0.05~0.08%）の Triton X-100 で架橋ペプチドグリカン合成活性を発現すると共に特異的に活性化され、これより低濃度側でも高濃度側でも低い直鎖ペプチドグリカン合成活性を示した。この事は、PBP1A が基本的には直鎖ペプチドグリカン合成活性を持ち、特定の濃度範囲の Triton X-

100 は、PBP1A に作用してその分子状態を変え、架橋活性発現と活性化を惹き起こす事を示唆する。狭い濃度特異性と PBP1A の酵素活性の質的な変化から見て、Triton X-100 の効果が基質のリビド中間体を分散して利用性を変える事に由来するとは思われない。この濃度は水中での臨界ミセル濃度 0.24mM (0.015%) の 3~5 倍、ミセルの濃度は PBP1A の濃度の約 4~8 倍に当るので、Triton X-100 は単分子態ではなくミセル態で作用すると考えられる。Triton X-100 は、至適濃度では PBP1A 分子にミセル態で結合して適正な多量体形成と架橋活性発現に寄与するのであろう。

PBP1A の会合体形成による酵素活性の変化、及び Triton X-100 濃度による酵素活性の不連続で質的な変化は、PBP1A の活性な架橋ペプチドグリカン合成酵素活性がその会合状態に依存する事を示唆する。

#### 4. PBP1A への $\beta$ -ラクタム抗生物質の作用

PBP1A は 6-APA-CH-Sepharose と結合し、その溶出には Hydroxylamine 処理を必要とした。この事は PBP1A はリガンドの 6-Amino-penicillanic acid (6-APA) とエステル(ペニシロイル)結合する事を示唆し、ペニシリンの作用機作と調和する。PBP1A は 6-APA と担体との間にスパーサーの無い 6-APA-Sepharose とは結合しないので、そのペニシリン結合部位は深い Cavity 中にあると考えられる。PBP1A の 6-APA-CH-Sepharose からの回収率が低いのは、Cavity 中のペニシロイル結合が Hydroxylamine の攻撃を受けにくいためと考えられる。

精製 PBP1A 標品の比ペニシリン結合量は 0.108mol/mol であった。ペニシリン結合活性の回収率から見て、精製のどの過程でも大きな失活は認められないので、PBP1A 本来の比ペニシリン結合量はこの値に近いと考えられる。PBP1A は多量体を成す事、そのほぼ全量が 6-APA-CH-Sepharose にペニシロイル結合を介して吸着する事を考え合わせると、この事は、ペニシリンが多量体中の小数のサブユニットと結合してそれ以上の結合を阻害するか、またはペニシリン結合部位が多量体当り一ヶ所しかなく、約 0.1mol/mol で飽和すると解積される。多くの  $\beta$ -ラクタム抗生物質は異常な低濃度で PBP1A の架橋活性を阻害し、Cefmetazole に至っては臨界濃度分を差し引いても PBP1A 濃度の 23% 足らずで約 90% 架橋形成を阻害した。この事は上の解積を支持する。結合定数を考慮すれば薬剤の PBP1A へ

の結合量は更に少ない筈である。 $\beta$ -ラクタム抗生物質が PBP1A への飽和結合量に大略等しい濃度比でその架橋反応をほぼ完全に阻害する事から、その阻害が単なる競合阻害ではないか、または、PBP1A の架橋反応自体が多量体形成に伴って発現する反応であると解釈される。

以上から、PBP1A は多量体として $\beta$ -ラクタム抗生物質との結合性、架橋ペプチドグリカン合成酵素活性、Product activation の性質を現していると考えられる。ペプチドグリカン合成酵素活性の Triton X-100 濃度依存性から、PBP1A は単独では弱い糖鎖重合活性だけを持ち、至適濃度下で会合体を形成するとその協同作用に基づいてアロステリックな性質を獲得し、以上の性質を現すのであろう。 $\beta$ -ラクタム抗生物質は負のエフェクターとして作用し、PBP1A 分子の一部と結合して協同作用を破壊する事により、架橋活性と Product activation を阻害すると考えれば、Cephalosporin 系抗生物質に顕著な糖鎖重合活性の阻害が解釈される。抗生物質による阻害パターンの違いは協同作用への影響の与え方の違いを示唆するものと想像される。 $\beta$ -ラクタム抗生物質の結合量からは、PBP1A は最低九量体の大きさを持つと推定される。

以上の解釈に依れば $\beta$ -ラクタム抗生物質の PBP1A への結合反応も  $23\mu\text{g/ml}$  の臨界濃度を持つと考えられる。しかしこの濃度は低く、比ベニシリン結合量、回収率、比活性等の計算値には殆ど影響しない。

## 5. PBP1A の触媒する反応

PBP1A は反応にリビド中間体以外の基質を必要とせず、分子内に共有結合したペプチドグリカン断片も検出できなかった。従って、PBP1A はプライマーに依存せずにペプチドグリカン糖鎖重合反応を触媒できると考えられる。中間反応産物と考えられる糖鎖重合体、或はペプチド架橋体のオリゴマーは通常は検出されず、PBP1A は糖鎖またはペプチド鎖末端にリビド中間体からムロペプチドを付加する型の反応を触媒すると考えられる。反応産物の糖鎖の末端には Undecaprenol-ピロリン酸残基が結合していると考えられる。松橋は、PBP1A のペプチドグリカン合成酵素反応を阻害的な条件下で行い、末端にリビド残基を保持した糖ペプチドのオリゴマーと考えられる反応産物を検出した。これは反応初期に一時的に現れる低分子重合産物を検出したものと考えられる。糖鎖伸長の方向（還元末端側か

非還元末端側か)は明かではない。

PBP1A の酵素反応では反応産物ペプチドグリカンの架橋度は経時的に増加した。架橋はペプチドグリカン上の C6'、C3' 残基を相手に形成され、C6' 残基を相手する反応が優先した。ペプチドグリカン上の残基が架橋の受容体か供与体かは明かではない。PBP1A の架橋反応はリビド中間体から糖鎖重合反応と同時に進行し、新生ペプチドグリカンの架橋としてのみ認められた。直鎖ペプチドグリカンの架橋活性、直鎖ペプチドグリカンとリビド中間体との間の架橋活性、D-Alanine と Glycin の交換反応(60)、meso-A<sub>2</sub>pm を受容体とした疑似架橋活性を全く示さなかった。また、逆反応としての細胞壁ペプチドグリカン分解酵素活性を全く示さなかった。以上から、PBP1A は極めて特異性の高い酵素であり、糖鎖重合反応とペプチド架橋反応の間には厳格な共役の存在が推定される。反応産物の架橋ペプチドグリカンの長い糖鎖と高い架橋度を同時に説明するために、(架橋した)既存の糖鎖に沿った架橋を伴う糖鎖重合反応が想像される。

#### 6. PBP1A のペプチドグリカン合成酵素反応の性質

PBP1A のペプチドグリカン合成反応速度は初期に遅く、数分間に漸増して定常速度に至る過程が認められた。この初期低速状態は新生架橋ペプチドグリカンの添加により消失した。従って、PBP1A は自己の反応産物である新生架橋ペプチドグリカンによる活性化 (Product activation) を受けて定常速度に達すると考えられ、反応開始と共に反応産物が蓄積する結果シグモイド形の経時曲線が生ずると考えられる。この活性化は反応産物による正のフィードバック効果と思われる。Triton X-100 添加により PBP1A が架橋活性を発現するのに伴って見られる活性化はこの Product activation に他ならないと考えられる。

PBP1A が架橋活性を示すのはリビド中間体を基質として新生架橋ペプチドグリカン合成する場合に限られ、その反応産物が PBP1A のペプチドグリカン合成反応を特異的に活性化した。従って試験管内反応から見る限り PBP1A はリビド中間体からの *de novo* または新生架橋ペプチドグリカン断片の周辺での架橋ペプチドグリカン合成反応を触媒し、これ以外の反応を殆ど行わないと結論される。

Trypsin 処理した細胞壁ペプチドグリカン画分、これを大腸菌由来のペプチドグリカン分解酵素 (DD-Endopeptidase/Anhydromuramidase) 画分で部分分解処理

した画分は、PBPIA のペプチドグリカン合成酵素活性の反応速度曲線にも架橋度にも影響しなかった。細胞壁ペプチドグリカン画分は指数増殖期の菌体から分離し、反応系には GlcNAc 量に換算してリピド中間体の約 1000 倍量を加えてある。従って、細胞壁ペプチドグリカン画分は PBPIA の反応のリガンドになる構造を殆ど含まず、溶菌酵素処理しても露出しないと考えられる。また、ムロペプチドも PBPIA のペプチドグリカン合成酵素活性に殆ど影響を与えなかった。C5 は架橋反応の受容体となる可能性があるが、量を考慮すればその意義は小さい。従って、細胞壁ペプチドグリカンは、PBPIA の反応のリガンドとなる構造を実質的には含まず、PBPIA は細胞壁ペプチドグリカンに新生ペプチドグリカンを組込む活性を持たないと考えられる。PBPIA の酵素活性は無傷の細胞壁ペプチドグリカン画分に活性化を受けたが反応速度曲線と架橋度にも影響しないので、細胞壁ペプチドグリカンをリガンドとする反応に由来するものではと考えられる。

以上の解析から、PBPIA は新生ペプチドグリカン合成酵素であり、その新生ペプチドグリカンをサキュルス等に組込む反応は殆ど触媒しないと結論される。即ち、PBPIA は「初生ペプチドグリカン断片を合成する酵素」と考えるべきであり、その反応の開始（リガンド形成）、初生ペプチドグリカン断片のサキュルスへの組込は、別な酵素や蛋白質の活性に求めるべきである。

#### 7. PBPIA のペプチドグリカン合成酵素活性のその他の性質

PBPIA のペプチドグリカン合成酵素活性は DNA により阻害された。PBPIA はペリプラズムでペプチドグリカン合成に携わると考えられるので、DNA による阻害の生理的意義は明かでない。DNA はペニシリンとの結合は阻害しない。ポリアニオンによる一般的な酵素活性阻害の一例かも知れない。細胞質膜画分で PBPIA の反応がみられない原因の一部は DNA の共存による阻害と思われる。

PBPIA のペプチドグリカン合成酵素活性は二価金属イオンに依存しないが、これに活性化された。活性化の程度は  $\text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$  の順で、 $\text{Co}^{2+}$  では約 100 倍に達した。何れのイオンも至適濃度での活性化では反応速度曲線と架橋度には影響せず、糖鎖重合反応を活性化していると思われる。しかし Triton X-100 を含まない系では活性化の程度もパターンも異なり、以上の活性化は架橋ペプチドグリカン合成活性発現に伴う現象である。

PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性は、 $\text{Co}^{2+}$  を始めとする二価金属イオンによる活性化、その活性化の程度の順序、DNA による阻害、至適 pH などの性質が、大腸菌の溶菌酵素の DD-Endopeptidase とよく似ていた(51)。両者の構造的、及び生理的意義の関連は明かではない。

#### 8. PBP1A 分子の構造、局在、分布、細胞内含量

PBP1A は最終濃度 0.93% の Triton X-100 で容易に可溶化され、その濃度を 0.05% 迄下げても析出しなかった。従って PBP1A 分子は親水性が強く、疎水性部分は小さく、膜脂質以外の成分との相互作用は小さいと考えられる。PBP1A 遺伝子 (mrca=ponA) の推定アミノ酸配列から PBP1A 蛋白質は概ね親水性で、N 末端部分にシグナル配列と膜貫通部位を持つ「Anchored protein」と考えられ(43)、上の推定と調和する。PBP1A は N 末端部分で細胞質膜に結合し、活性中心を含む本体はペリプラズム側にあつて、そこにペプチドグリカンを合成するのであろう。PBP1A のペプチドグリカン合成酵素に好適な反応条件、即ち弱酸性の pH、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  の存在、低イオン強度等の条件は、ペリプラズムの環境に近いと考えられる。細胞質内の環境、即ち、弱塩基性の pH、0.1M を超える  $\text{K}^+$  濃度等の条件は、PBP1A のペプチドグリカン合成活性に対して阻害的であつた。

PBP1A の抗血清を用いた間接蛍光抗体法により、PBP1A には特別な局在性は認められず、細胞上に均一に分布すると考えられた。サキュルスの伸長の間にはペプチドグリカンはサキュルス上の随所に組込まれる事が報告されており(30)、この局在性の示唆する処と調和する。

JST975srev6/pLC29-47 株の PBP1A 含量は表 1 のペニシリン結合量から計算できる。即ち、51g の菌体は約  $1 \times 10^{13}$  個の細胞を含み、PBP1A の比ペニシリン結合量を 0.11 とすれば、総結合ペニシリン量から  $1.32 \times 10^{17}$  分子の PBP1A が含まれる計算になり、細胞当りの PBP1A 含量は約  $1.3 \times 10^4$  分子となる。プラスミド pLC29-47 による過剰生産を 30 倍とすれば野生株細胞では  $4 \times 10^2$  分子程度と推定される。この推定値は、従来 PBP1A 量を細胞当り 100 分子程度としたのと同じオーダーである。しかし、PBP1A には多量体形成や臨界蛋白質濃度が推定されるので、その量の評価基準を決めるに当たっては生体内での存在状態の検討が必要である。

### 9. PBP1A と PBP1B (57)の比較と関係

PBP1B は安定な蛋白質で、界面活性剤で抽出されにくく、細胞内では膜脂質以外の成分とも結合している可能性がある。PBP1B は膜画分中でもペプチドグリカン合成酵素活性を示し、その反応産物の架橋ペプチドグリカンは水に不溶性で架橋度は 20~25% と細胞壁ペプチドグリカンと似た性質を示したが、細胞壁ペプチドグリカンには含まれない異常架橋ムロペプチド X、Y が主構成成分として含まれていた。反応産物ペプチドグリカンの架橋度は反応初期からほぼ一定し、PBP1A と異なる反応機構を持つ事が示唆される。反応のキネティクスには特徴がなく、反応の至適 pH は弱塩基側にあり、 $MgCl_2$  以外の二価金属イオンは阻害的で、全般に  $\beta$ -ラクタム抗生物質への感受性は低い。

PBP1A と PBP1B は生理機能上等価であり、そのアミノ酸配列には相同性が認められ、共通の祖先に由来すると推定されている。しかし酵素活性は相互に個性的であり、生体内では異なった条件に緩い役割分担をしているのであろう。一般に野生型大腸菌株の主たるペプチドグリカン合成酵素は PBP1B で PBP1A は補助的な酵素と考えられている。しかしその根拠は結局の処 PBP1A の酵素活性の検出と評価が容易でない事に由来する。PBP1A のペプチドグリカン合成速度は大きく、その細胞への寄与は大きいと想像される。両者の相互関係、役割分担、活性制御などの研究は今後の課題である。PBP1B の反応産物ペプチドグリカンの構造もまた異常であり、そのままでは細胞壁ペプチドグリカンを構成せず、PBP1B もまたサキュルス形成酵素としての性格は示唆されない。PBP1B の酵素活性の性質の検討は未だ不十分ではあるが、PBP1A 同様「初生ペプチドグリカン断片合成酵素」であり、サキュルスへの組込みは異なった機構によると思われる。

### 10. まとめ、及び PBP1A の機能

以上に精製 PBP1A の性質を試験管内酵素活性を中心として解析した。PBP1A は Peptidoglycan synthetase であり、リピド中間体を基質として架橋ペプチドグリカンを合成した。その酵素活性と反応産物の検討から、試験管内酵素活性を見る限り、PBP1A は「初生ペプチドグリカン断片合成酵素」と言うべき酵素であり、サキュルス形成に直接関わる性格は示唆されなかった。また、指数増殖期の大腸菌の細胞壁ペプチドグリカンも、PBP1A の反応を受け入れるリガンドを含まず、

大腸菌の主要ペプチドグリカン分解酵素もリガンドを露出させなかった。

須藤と筆者は大腸菌の野生型株、*mrcA* 株、*mrcB* 株、PBP1A 過剰生産株、PBP1B 過剰生産株の細胞壁ペプチドグリカンのムロペプチド組成と架橋度を検討し、何れの株でもムロペプチドのパターン及び量比には殆ど違いがなく、PBP1A、1B 夫々の反応産物ペプチドグリカン独自の性格を示さない事、架橋度も *mrcB* 株、PBP1A 過剰生産株で僅かに高い(約 26%、野生型株は約 24%)に留まる事を明らかにした(61)(62)。PBP1A、1B の反応産物ペプチドグリカンは介在する反応系に大規模なトリミングを受け、細胞壁ペプチドグリカン型の構造となってサキュルスに組込まれていると考えられる。これらの事実から、PBP1A のペプチドグリカン合成反応はサキュルス形成過程の一段階であり、その前段階にはサキュルス上のリガンド形成に関わる反応系が、その後段階にはサキュルスへの組込に関わる反応系が介在すると考えられる。

PBP1A のペプチドグリカン合成酵素活性の制御については今後の課題である。PBP1A は多量体を成してアロステリックな性質を持ち、 $\beta$ -ラクタム抗生物質との結合性、架橋活性と Product activation を発現すると考えられる。ペリプラズム内に内在性エフェクターがあって、酵素活性を制御している可能性がある。また、PBP1A の会合状態を制御する成分があり、これにより活性制御がなされている可能性もある。更に他の蛋白質、例えば PBP2、PBP3 等がサブユニットとして加わる事により活性制御がなされている可能性も考えられる。

従来、漠然と、細胞壁ペプチドグリカンはムロペプチド残基が連続的に挿入される事で形成されると考えられ、ペプチドグリカン合成過程とサキュルス形成過程とは同義の様に扱われて来た。しかし前者は後者のサブシステムであり、両者は明確に弁別されるべき過程である。サキュルス形成機構に関する従来の研究では遺伝学的、薬理的アプローチの比重が高く、方法論上その弁別は必ずしも容易ではなかった。本研究では、PBP1A のペプチドグリカン合成酵素としての性質の検討を行い、そのサキュルス形成システム中での位置の考察に及んだ。しかし一方、本研究で得られた実験結果の一部はアーティファクトであり、PBP1A は生体内では連続的にサキュルスにムロペプチド残基を付加している可能性はなお否定できない。本研究で示した仮説の当否は各段階の生化学的反應の検出と遺伝子の検索から検証できる筈である。



### 第三章

#### 大腸菌の細胞内構造体形成蛋白質の検索、精製、及び性質の検討

第一章に述べた通り、細菌細胞でも細胞周期に伴う細胞構造の変化には、複数種類の機能性構造体が、細胞質膜の裏打ち、核の分離と分配、細胞質分裂の推進などの機能を持って関与すると考えられ、それらのあり方は真核細胞の細胞骨格ないしは膜骨格に類似していると考えられる。

従来、細菌細胞には細胞内構造体はまれにしか検出されず、その存在や意義は積極的には主張されなかった。しかしこの場合、構造体の検出の成否は超薄切片作製過程でその構造が維持されるか否かに懸かっている。細菌細胞は細胞壁の存在のため固定液の浸透が悪く、固定操作に時間を要するが、この間に構造体が消失する事は十分考えられる。真核細胞の細胞骨格は固定操作に不安定と言われており、厚い細胞壁を被った酵母細胞に明瞭な細胞骨格像が得られる様になったのは近年の事で、技術的進歩と洗練に負う処が大きい。細菌細胞の細胞内構造体の検出法は未だ確立しておらず、それらの検出と同定は今後の課題と考えるべきであろう。むしろ、既に数種の細菌と、特に L-form 細胞に共通して微小管状の構造体が報告されている(9-13)事は、これが普遍的な細胞内構造体である事を示すとも考えられる。

一方、動物細胞のアクチン、ミオシン等の性質を指標として、大腸菌に相同の蛋白質が検索され、アクチン(12-13)、ミオシン、プロアクチン等の存在が主張されているが、これらの研究には進展がない。筆者もそれらの研究を基にアクチンの検索を続けたが検出できなかった。大腸菌の Elongation factor (EF)-Tu が見かけ上アクチンと似た性質を持つ事を指摘し、この検出法による大腸菌のアクチンを疑問とする見解(19)には説得力がある。

近年、大腸菌の核分裂に関与する遺伝子の mukB、tdiC、tdiD の推定分子構造から、mukB がキネシン様の(20)、tdiC、tdiD が $\alpha$ -チューブリン様の(21)蛋白質を各々コードする事が報告され、これとは別にミオシンに似た蛋白質(22)の存在も報告されている。これらの事は、大腸菌でも真核生物でも細胞周期上相同の過程には相同の成分が関与している可能性を示唆し、極めて興味深い。しかし何れの蛋白質もまた、対応する細胞骨格蛋白質と違いを持っている。一方また、細菌細胞は、真核生物の細胞骨格系蛋白質に対応しない、細菌細胞に固有の成分に

よる機能的構造体を持つ可能性がある。細菌細胞に新たに機能的構造体成分を検索し直す意義があるであろう。

本研究では大腸菌 (*Escherichia coli*) 細胞に構造体形成成分を検索する。機能的構造体が存在するならば、それは細胞内で構造体を成し、それ自身の構造変化、または相互作用する Mechanochemical enzyme を通じて構造維持的にも動的にも機能し、細胞内の構造変化を推進するであろう。そこで先ず、その機能の根幹を成すものとして構造成分に着目する訳である。構造成分は細胞質膜の内側で、或る広がりを持つ構造体の構築（と破壊）を繰り返すと思われるので、その候補としては存在量が多く、重合性の蛋白質が適当である。アクチン、微小管は細胞内では重合状態が安定であり、重合制御は重合体の切断や重合阻害によると考えられている(63)。従って、構造成分の候補として、細胞質内類似の環境下で重合、構造化でき、量の多い蛋白質を考える事にする。

細胞質内環境としては主にイオン組成を考える事が適当であろう。大腸菌の細胞内のイオン環境として報告されている結果を表 3-1 にまとめる。本研究で用いた条件はアクチンを重合させる条件に近い。

Ions and pH	Schultz (mM)	Kung (mM) <sup>1</sup>	Chang (mM) <sup>1</sup>	Gangola (μM) <sup>2</sup>	Padan	Slonczewsky
Na <sup>+</sup>	50	-	223	-	-	-
K <sup>+</sup>	210	170	320	-	-	-
Mg <sup>2+</sup>	-	64	114	-	-	-
Ca <sup>2+</sup>	-	32	0.8	0.1	-	-
Zn <sup>2+</sup>	-	1.3	-	-	-	-
Cl <sup>-</sup>	10	-	137	-	-	-
pH	-	-	-	-	7.6-7.8	7.6
	(64)(65)	(66)	(67)	(68)	(69)	(70)

表 3-1 大腸菌細胞内のイオン濃度の推定値

各イオンの推定細胞内濃度を表記。但し、1 は原報から 1g dry weight = 1.8 ml cell volume (68) として筆者が換算した値、2 は遊離 Ca<sup>2+</sup> イオン濃度の蛍光色素による測定値。カッコ内は原報。

## 方法

### 1. 研究方法

細菌細胞に機能的構造体の構成成分を検索する指標となる性質は不明である。そこで本研究では、先ず大腸菌細胞をスフェロプラストとし、これを様々に処理して細胞内構造体を検索した。次いでその結果から構成成分ならば持つであろう性質を仮定し、その仮定を満たす蛋白質画分に、高い再現性で繊維状などの構造体を形成する成分を検索し、その構造体の特徴を指標として成分の候補者を検索して 100K 蛋白質を検出した。最後に改めてその性質を調べ、目指す蛋白質であるかどうかを検討した。無細胞抽出液からの蛋白質の検索に用いた指標は、1.細胞質内または細胞質膜の細胞質側に結合する蛋白質である事、2.細胞質内類似の環境下で可逆的に規則的な重合体を形成できる事、3.細胞内で或る広がりを持つ構造体を形成するだけの量がある事、の三ヶ条である。

細胞質内類似の環境として、主要なイオンと二三の溶質の濃度を考慮した。本研究では Lennox 培地(47)で培養した大腸菌を材料とする事とし、細胞質内の主要なイオン濃度と pH に関する従来の研究結果(表 3-1)を考慮して、次の組成の溶液を選択した。即ち、10mM HEPES-KOH pH7.4、0.2mM ATP、0.2mM Dithiothreitol(DTT)、0.1-0.6M KCl、0.1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM EGTA である。なお Lennox 培地で培養した大腸菌の細胞内 K<sup>+</sup>濃度は約 0.3M と考えられる(67)。また Mg<sup>2+</sup>イオン濃度は生体内濃度まで高めると実験上不都合が生じたため、やむを得ず低濃度に抑えた。

### 2. 実験方法

#### 使用菌株、培地、培養方法

細胞内構造体形成蛋白質の検索及び精製には大腸菌 K12 株の JE1011 株 (thr、leu、trp、his、thy、ara、lac、gal、mtl、xyl、rpsL) を材料として用いた。変異株の検索には isogenic pair または spontaneous mutant と親株の組合せの前蛋白質を比較し、遺伝子背景の影響を最小にした。

通常の培養には Lennox 培地(47)に 20 μg/ml のチミンを添加して (L' 培地) 用いた。構造体の検出や蛋白質の検索には 100ml~1l の量で 30°C で振とう培養

した菌体を、蛋白質の精製には 30l の量でジャーファーメンター中で 37°C で通気かくはん培養した菌体を使用した。平板培地は 1.5% の寒天を加えて作製した。形質導入株の選択培地、アミノ酸要求性と糖資化性の検定には M9 最小寒天平板培地に必要なアミノ酸 (50  $\mu$ g/ml)、チミン (20  $\mu$ g/ml)、グルコースまたは資化性の検討を要する糖 (0.4%) を加えて使用した。培養温度は 30°C とした。

#### 緩衝液

構造体形成蛋白質の重合状態を維持する緩衝液としては、上述した通り、10mM HEPES-KOH pH7.4、0.2mM ATP、0.2mM DTT、0.1mM EGTA、0.1mM MgCl<sub>2</sub> を基本としてこれに 0.1-0.6M KCl を加えたものを用いた。通常は 0.1M KCl のものを用い、これを F-buffer と呼ぶ。L' 培地で培養した菌体をスフェロプラストとして細胞内構造体を検索する場合は KCl 濃度を 0.3M とした(67)。この培地中では細胞はこの程度の K<sup>+</sup> イオンを細胞内に蓄積していると言われている。構造体形成蛋白質を脱重合状態に維持する緩衝液として、2mM Tris-HCl pH8.0、0.2mM ATP、0.2mM DTT、0.1mM EGTA、0.1mM MgCl<sub>2</sub> の組成のものを用い、これを G-buffer と呼ぶ。この G-buffer 中で脱重合状態にある蛋白質を重合するためには、1/9 量の 100mM HEPES-KOH pH7.4、1M KCl を加えた。これを P-buffer と呼ぶ。本研究で用いた緩衝液は殆どが以上の緩衝液か、更にそれに個々の実験に必要な成分を加えたものである。

#### 電子顕微鏡

蛋白質の構造を検出する場合は、サンプルを Formvar でコートしたメッシュ上に取り、1% 酢酸ウランでネガティブ染色し、日本電子の JEOL200CX を用い、加速電圧 100kV 下で観察した。

超薄切片の作製、観察は、応用微生物研究所第一研究部の平田愛子さんとの協同研究として行った。Rod-spheroplast 懸濁液を 3% Glutalaldehyde で 2 時間室温で固定し、細胞を遠心で集め、50mM リン酸緩衝液 pH6.95 で洗浄し、同じ緩衝液に懸濁して一晩放置洗浄した。これを 1% OsO<sub>4</sub> で室温 1 時間固定し、蒸留水で 5 回洗浄した後、0.5% 酢酸ウランで室温 2 時間染色し、蒸留水で洗浄した。細胞を集め、2% Difco Agar 中に包埋し、そのブロックを 70% エタノール溶液に一晩浸漬した後、必要な大きさに切り出し、30分づつ 70%、80%、90%、95%、無水エタノール、無水アセトン・無水エタノール (1:1) 混合液に順次浸漬して脱水し、

更に無水アセトンに室温で 2-5 時間づつ 3 回洗浄した。このブロックを、無水アセトン: Spurr の 3:1, 1:1, 1:3 混合液に順次 1 時間づつ浸漬した後、カプセル中で Spurr に漬け、45°C に 5 時間、70°C に 30 時間処理して固化した。これを超薄切片に切り出し、上と同じ条件で観察した。Glutalaldehyde 固定以降の操作は全て平田さんによる。

#### 蛋白質の検出と定量

蛋白質は Leammli (71) に従って SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Coomassie brilliant blue R により染色し、検出した。分離ゲルのアクリルアミド濃度には通常 12.5% を用いた。精製各段階の 100K 蛋白質の挙動や、重合性の検定は全てこの電気泳動法に依った。蛋白質の定量は、ゲル上のバンドの染色強度をウシ血清アルブミンを標準蛋白質として比較決定した。

#### 抗血清の作製と精製

精製した 100K 蛋白質 1mg を Freund の完全アジュバントと混合し、体重約 3kg のメスのイェウサギに注射して免疫感作した。最初の注射から二週間置いて同じ条件でブーストを行い、抗体価を検定しながら、更に二週間飼育した後、心臓から採血した。その血清を回収し、55°C で 10 分間処理して補体を失活させた後、最終 3mM のアジ化ナトリウムを加え、4°C に保存した。感作前血清は、同じウサギ個体から免疫感作前に試験採血した血液から同様に作製した。

イミュノグロブリン画分は、抗血清から、50% 飽和硫酸沈澱を二回繰り返した後、10mM Na-Phosphate pH7.2 中で DEAE-cellulose カラムにかけ、非吸着画分を回収する事により精製した。抗 100K 蛋白質イミュノグロブリン画分の精製は、イミュノグロブリン画分を 100K-CH-Sepharose カラムに吸着させ、0.1M グリシン-塩酸緩衝液 pH2.3 で溶出し、直ちに Tris base を加えて中和し、PBS に透析してアジ化ナトリウムを加え、4°C に保存した。

#### 免疫化学的方法

イミュノプロットは Towbin らの方法(55)に従い、SDS 電気泳動で分離した蛋白質をニトロセルロース膜に転写し、BSA 処理し、PBS で 500 倍に希釈した抗 100K 血清処理し、やはり 500 倍に希釈したパーオキシダーゼ結合抗 IgG 抗体 (Kappel社製) を二次抗体として処理し、4-Chloro-1-Naphtol を基質とし、過酸化水素で発色させた。蛋白質は AuroDye<sup>®</sup> により発色、検出した。

100K 複合体の抗体による染色は次の様に行った。即ち、100K 複合体を重合させ、これを Formvar コートしたメッシュ上に吸着させ、一次抗体として 500 倍に F-buffer で希釈した抗 100K 抗体で処理し、二次抗体としてやはり 500 倍希釈した金コロイド結合抗 IgG 抗体 (Kappel 社製) で処理し、十分洗浄した後、酢酸ウランでネガティブ染色した。この実験では抗血清を予め大腸菌の細胞壁画分で吸収処理し、自然抗体を除去してから用いた。

蛍光抗体法は次の様に適用した。即ち、JE1011 株を指数増殖期後期まで培養し、カバーガラスに吸着させ、ホルマリンを滴下した後、乾燥させた。これを PBS で 500 倍に希釈した抗血清で処理し、ついでやはり 500 倍に希釈したローダミン結合抗 IgG を二次抗体として処理して染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。この実験でも細胞壁画分による吸収処理で自然抗体を除去した抗血清を用いた。

#### 遺伝的解析

ファージ Plkc による形質導入は Lennox の方法(47)に従った。

envA1 遺伝子の形質抑制実験はプラスミドの導入により行った。受容菌株には、JEE1002、JEE1009 を用い、プラスミドには pST103 を用いた。pST103 は envA 遺伝子をクローニングしたプラスミド、pBBA1 と、低コピー数ベクター、pLG339 (72)から作製した。pBBA1 は J. Lutkenhaus 博士より頂いた。pBBA1 は envA 遺伝子近傍の DNA の AsuII 断片 (ftsZ 遺伝子の C 末端側約 1/3、envA 遺伝子、geneX 遺伝子の N 末端側 1/3 を含む) (73)が pBR322 の ClaI site にクローニングされている (私信)。pBBA1 のクローン DNA は再切出し不能のため、これを含む BamHI-ScaI断片を切出し、pLG339 の BamHI-SmaI の大きい方の断片とつなぎ、JM109 株に導入し、Tet 遺伝子を指標として 25ug/ml Tetracyclin で選択した。得られた株から DNA を抽出し、実験に使用した。個々の実験操作方法は成書(74)に依った。

## 結果

### A. 細胞内構造体の検索

#### 1. 桿菌形態を維持したスフェロプラストの作製

JE1011 株を後期指数増殖期まで培養し、水中で冷却した後集菌し、冷生理食塩水で洗浄した後、F-buffer に 0.6M のアルカリ金属の塩化物と 0.34M のショ糖を加えた緩衝液中で Lysozyme 処理してスフェロプラストを作製した。

塩無添加及び LiCl を含む緩衝液中では通常の球状のスフェロプラストが形成された。NaCl を含む緩衝液中では細胞は始めは桿状で、約 1 時間かけて次第に球状のスフェロプラストに変化した。KCl、RbCl、CsCl を含む緩衝液中では大部分の細胞は桿菌形態、またはそれが湾曲した環状の形態（約 10%）を取り、4°C に一晩放置してもその形態は変化しなかった。この細胞を水に懸濁すると瞬時に球形化してから溶菌し、Triton X-100 処理しても溶菌した。pBR328 由来のペリプラズム酵素の  $\beta$ -lactamase はこの処理により約 70% 放出されるが、細胞質内酵素とされる Chloramphenicol acetyltransferase の放出は 3% 以下であった（データは示さない）。従ってこの細胞は桿菌形態を維持したスフェロプラストと考えられ、これを Rod-spheroplast と呼ぶ事にした。KCl 存在下に作製した Rod-spheroplast を塩無添加または LiCl を含む緩衝液に懸濁すると細胞は直ちに球状に変化した。従って桿菌形態の維持は塩特異的であり、ペプチドグリカンの分解不全によるものではない。但し、菌体を冷却する事なく Lysozyme 処理すると原形質分離が著しく、塩の特異性は不明瞭であった。

大腸菌細胞は外液の塩の種類と濃度を選べば細胞壁を破壊しても桿菌形態を維持したままスフェロプラストに成る事が明らかになった。この事は、大腸菌細胞が、特定のイオン環境下で、少なくとも表面張力に抗して桿菌形態を維持する機構を持つ事を示唆している。KCl が形態維持に有効であったが、大腸菌は細胞内に  $K^+$  イオンを蓄積し(65)、生理に重要と考えられる事(75)と符合し、興味深い。

#### 2. Rod-spheroplast の超薄切片による解析

KCl 存在下に作製した Rod-spheroplast の超薄切片を電子顕微鏡で観察した結果を図 3-1 (69 頁) に示す。Rod-spheroplast 細胞では細胞質膜が、細胞質自体



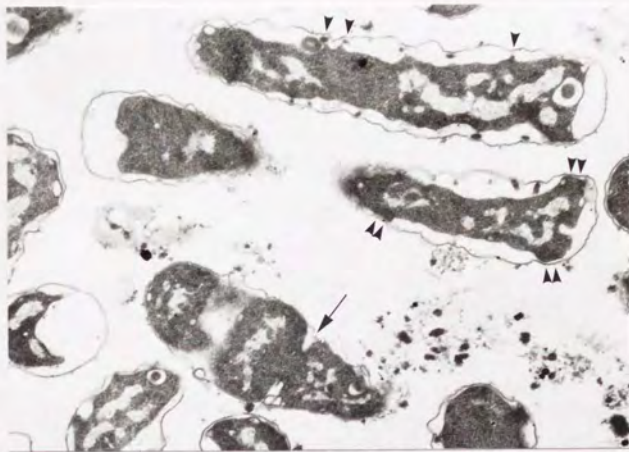


図 3-1 JE1011 株の Rod-spheroplast の超薄切片像

0.6M KCl を含む F-buffer 中で大腸菌 JE1011 株から Rod-spheroplast を作製し (本文参照)、その超薄切片を電子顕微鏡下に観察した (実験方法参照)。縦断面に近い断面を示す三細胞を示す。外膜は細胞のほぼ全面で剥離し、桿菌形態は細胞質と細胞質膜により維持されている様に見える。Periseptal annuli と思われる細胞質膜と外膜の大きな密着部 (二重短矢印)、小規模の密着部 (短矢印)、分裂溝様の細胞質のくびれ (長矢印) が維持されている事が観察される。それらの構造の内側は高電子密度になっている。最終倍率は 30,000 倍。固定、染色、包埋、切片作製、写真撮影は平田愛子さんによる。

が桿菌状の形態を保持している様に見える。外膜は細胞の殆どの部分で細胞質膜から遊離し、切目や剥離消失部分が認められた。ペプチドグリカン層と思われる構造は検出されず、細胞質膜外面を被覆する構造は検出できなかった。一方、溶菌して細胞質の大部分を失った細胞の細胞質膜内側に無定形の構造がしばしば観察された(データは示さない)。細胞の両極に接する部分には外膜と細胞質膜の密着部が認められ、細胞を環状に取り巻いて両極の基部を支持しているように見える。この構造は形態的な特徴から、Periseptal annuli(1)と考えられた。その細胞質側の部分は特に高電子密度であったが、特別な構造は認められなかった。Periseptal annuli 様構造以外にも外膜と細胞質膜との小規模な密着部が認められ、その密着部はしばしば細胞を環状にとりまく様に見える。

以上の観察から、Rod-spheroplast は細胞壁以外の構造要素によりその桿菌状の形態を維持していると考えられ、その機構に関与する成分は細胞質内、または細胞質膜上にあると考えられる。外膜はそのあり方から見て、ここでは形態維持に積極的な役割を果たしているとは考えられない。Periseptal annuli 様構造は細胞の極の基部周辺の支持に関与すると思われ、細胞質内構造の足場を成す可能性があるが、桿菌形態維持の主要素とは考えにくい。湾曲して環状となった細胞が存在する処から細胞質膜上に収縮性の構造が想像される。

### 3. Rod-spheroplast から放出される繊維状構造体

KCl 存在下で作製した Rod-spheroplast をメッシュ上に取り、1% の Triton X-100 を含む同じ緩衝液で処理して、細胞外に放出される構造体を観察した。結果を図 3-2 (71 頁) に示す。材料の JE1011 株は I 型線毛(76)を生産していると考えられるが Rod-spheroplast の表面に線毛は殆ど観察されず(A)、処理過程で脱落したものと考えられる。しかし、Rod-spheroplast を Triton X-100 で処理して溶菌させると、多数の繊維が細胞外に放出された(B)。単繊維は直径約 6nm で、中央を高電子密度の線が走り、細い微小管状、または二本の並行繊維と見られ、長軸に沿った周期性は認められなかった。この繊維は細胞を破裂させて初めて放出され、また、外膜の内側を束を成して走る事を示唆する電子顕微鏡像も得られている(C)ので、細胞内の構造と考えられる。この繊維の形状は I 型線毛のそれと極めて良く似ている(75)が、以上の事から線毛とは異なる構造と考

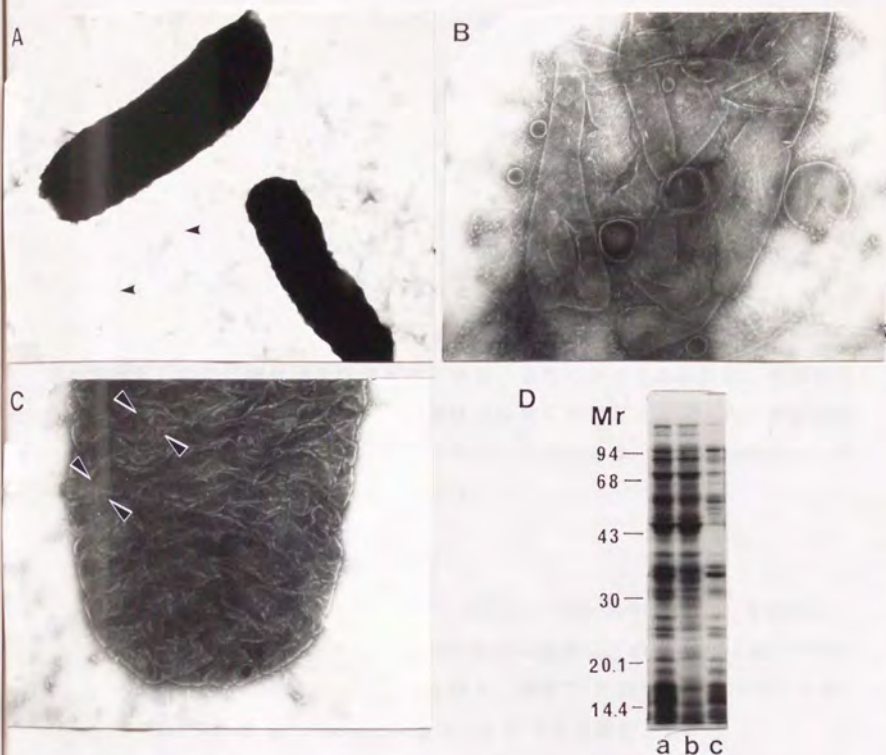


図 3-2 JE1011 株の Rod-spheroplast の Triton X-100 処理による破裂で放出される繊維と、同じ処理後の蛋白質の分布

A: 0.6M KCl 存在下に作製した Rod-spheroplast をメッシュに吸着させ、1% 酢酸ウランで染色して電子顕微鏡下で観察した。細胞表面には pili 等の繊維構造 (短矢印) は殆ど観察されない。倍率は 20,000 倍。B: A と同じサンプルを 1% Triton X-100 を含む同じ緩衝液を滴下した後同様に観察した。完全に破裂した細胞を示す。細胞周辺に多数の繊維が放出されている。倍率は 50,000 倍。C: B と同様に処理したサンプル中の破壊の不完全な細胞を示す。繊維は放出されたものの他に、側面会合してシート状をなし、細胞内を走る様に見えるものがある (細胞の左上、短矢印で挟まれた部分)。倍率は 50,000 倍。D: 0.3M KCl 存在下に作製した Rod-spheroplast を、0.5% Triton X-100 処理し、超遠心で分離したもの。a、全蛋白質。b、可溶性画分。c、沈澱画分。

えられる。この繊維の他にはリボゾームと見られる粒子が放出されている。

通常のスフェロプラストでも線毛など細胞外の繊維構造は脱落してしていたが、これをメッシュ上で、蒸留水または Triton X-100 処理で破裂溶菌させると繊維が細胞外に放出された。蒸留水処理で破裂させた実験では、繊維が細胞質と一緒に細胞の裂け目から放出されている電子顕微鏡像が得られており（データは示さない）、繊維状の構造が細胞質内に存在する事を支持する。その繊維は細い微小管状であり、Rod-spheroplast から放出された繊維と同じと思われる。しかしその保存は悪く、微細構造は不明瞭で、時に消失し、この繊維は蒸留水処理に不安定であると考えられた。

以上の観察から、大腸菌の細胞内には線毛に似た細い微小管状、または二本の並行繊維より成る繊維状構造体があり、細胞の破壊に伴って放出され、検出されると考えられる。この繊維状構造体は蒸留水処理に不安定と考えられ、構造体の維持がイオン環境に依存する事が示唆された。この性格は、Rod-spheroplast の形態維持成分に推定される性質と一致する。

#### 4. Rod-spheroplast 中の不溶性蛋白質

JE1011 株を冷却する事なく 0.3M KCl 存在下に Rod-spheroplast を作製し、細胞を集めた後 Lysozyme を除いた同じ緩衝液に懸濁し、最終濃度 0.5% Triton X-100、2mM MgCl<sub>2</sub>、50µg/ml DNase I を加え、室温で 5 分間処理して溶菌させ、Lysate を 100,000xg で 1 時間遠心分画し、蛋白質を解析した。

Rod-spheroplast の Lysate を超遠心で分画した、可溶性画分と沈澱画分の蛋白質のパターンを図 3-2, D に示す。繊維状構造体の構成成分は沈澱画分に回収されていると思われる。沈澱画分には主要外膜蛋白質の他に、幾つかの蛋白質が濃縮されていた。その中には見かけの分子量 100,000, 90,000, 55,000, 30,000 等の蛋白質が認められ、次に述べる KCl-沈澱性蛋白質と共通していた。

以上の結果から大腸菌細胞内には細胞質内類似のイオン環境で機能する構造維持機構と、同じ環境下で維持される繊維を始めとする細胞内構造体の存在が示唆された。どちらもイオン環境に敏感で、低イオン強度下では不安定と考えられ、両者が関連している可能性が示唆された。

## B. 細胞内の構造体形成蛋白質の検索

上の実験結果を受けて、大腸菌の無細胞抽出液から、細胞質内のイオン環境下で重合して構造体を作り、低イオン強度下では解離する蛋白質を検索する事とした。細胞質内のイオン環境を模した緩衝液、低イオン強度緩衝液は、従来の測定結果と、動物細胞のアクチン精製に用いられている方法を勘案して決定した（「方法」の項参照）。

### 1. 細胞質内で構造体を作り得る蛋白質の検索

大腸菌 JE1011 株から  $K^+$  イオン強度に依存して構造体を形成する蛋白質を検索した。菌体を低イオン強度の緩衝液中（G-buffer）で破砕し、これを同じ緩衝液に一晩透析した後、100,000xg、1 時間遠心し、膜画分を除去した。上澄画分に 1/10 量の重合緩衝液（P-buffer）を加え KCl 濃度を 0.1M、pH を 7.4 とし、4°C に一晩放置した後、100,000xg で 2 時間遠心すると沈澱が得られた。この沈澱を G-buffer に懸濁し一晩透析すると殆ど溶解したので 100,000xg、1 時間遠心して不溶性画分を除去した後、KCl-沈澱画分とした。この画分は P-buffer 処理により再び沈澱し、その沈澱は再び G-buffer に溶解し、この過程を数回繰り返す事ができた。本実験では沈澱と溶解を更に二回繰り返した画分を最終精製標品とした。

各画分の SDS 電気泳動による蛋白質のパターンを図 3-3（74 頁）に示す。KCl-沈澱画分には特定の蛋白質が濃縮されていた。特徴的な蛋白質として見かけの分子量が、100,000、90,000、70,000、55,000、34,000、30,000（以下それぞれ、100K、90K、55K、70K、34K、30K 蛋白質と呼ぶ）及び低分子量の蛋白質群が認められた。何れの蛋白質も量的に多く、毎回高い回収率で KCl-沈澱画分に移行した。KCl 濃度を 0.6M にしても結果は変わらなかった（データは示さない）。この事からこれらの蛋白質は何れも生理的な濃度範囲の KCl 存在下で可逆的に重合もしくは会合して高分子化し、低イオン強度下で脱会合する性質を持つと考えられる。KCl-沈澱性の蛋白質のパターンは Rod-spheroplast を TritonX-100 処理した後、超遠心で沈澱する蛋白質（図 3-2, D）と良く似ていた。

これらの蛋白質は何れも「方法」の項に論じた細胞内構造蛋白質の候補として

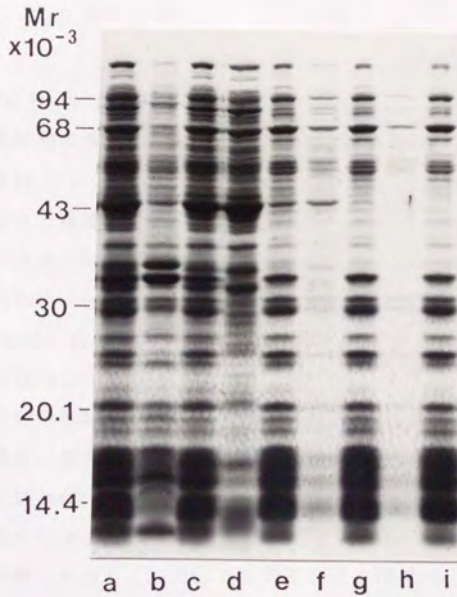


図 3-3 KCl-沈澱性蛋白質の検出

JE1011 株細胞を G-buffer 中で破碎、透析した粗抽出液を、細胞膜画分を除去した後 P-buffer 処理し、超速心で沈澱して来る蛋白質を SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (12.5%) で分離し、Coomassie brilliant blue で染色した。a、粗抽出液。b：細胞膜画分。c：可溶性画分。d：b の P-buffer 処理後なお可溶性の画分。e：b から P-buffer 処理後沈澱する画分 (KCl-沈澱性画分)。f：e を G-buffer に溶解し不溶性画分を除去した後、再び P-buffer 処理した可溶性画分。g：f の沈澱画分。h：同じ操作をもう一度繰り返して可溶性になった画分。i：h の沈澱画分。P-buffer 処理で繰り返し沈澱する蛋白質がある。

の性質を備えている。但し、KCl-沈澱画分の内、低分子量の蛋白質群はそのパターンからみてリボソーム画分と思われる。これらの蛋白質の中にアクチン、または Elongation factor (EF) -Tu (19) に対応する分子量 43,000 の蛋白質が含まれない事は注意すべきである。

## 2. KCl-沈澱画分中に形成される KCl 依存性構造体

前節での最終精製標品を P-buffer 処理し、生じた会合体を電子顕微鏡で観察した。結果を図 3-4 (76 頁) に示す。P-buffer 処理しない標品は無構造で、無定型なフロックと繊維の断片が僅かに見られるに過ぎない (A) が、P-buffer 処理後 1 時間の標品には、繊維状、粒状、小胞、無定型のフロックなど、多くの構造体が認められた (B)。小胞を除く全ての構造体はトリブシンによる前処理で消失した (D) ため、何れも蛋白質を構成要素とすると考えられた。出現する構造体の種類と形状は KCl 濃度を 0.6M としても変わらなかった (データは示さない)。

機能性構造体の候補と言う点で繊維状構造は注目に値する。繊維状会合体には単繊維と、繊維が側面で会合したシート状または束状の巨大な会合体 (B) がある。単繊維は直径約 6nm、長軸に沿った周期性は認められず、その中央部分が濃染されて、細い微小管か二本の繊維の並行会合体の様に見え、Rod-spheroplast から放出された繊維と酷似していた。この特徴を持つ繊維は P-buffer 添加後 1 分で既に短い繊維として出現し、緩い会合体を作るのが観察された (C)。巨大なシート状会合体はこれから成長したと考えられる。シート状会合体は、長軸に沿った長さが時に数ミクロンに達し、その一部は表面に粒子が付着して微細構造が観察しにくい、同じ単繊維から成る様に見える。しかし、これだけでは異なった複数の繊維構造を混同している可能性は否定できない。

単繊維の形状は I 型線毛と良く似ているが、I 型線毛が極めて安定な (76) 繊維構造なに対し、この繊維はイオン強度変化で重合と脱重合を繰り返すと考えられる事、側面会合してシート状になり易い事、などの点で異なっている。その重合特異性はアクチンを思わせるが、繊維構造はアクチンと異なり、また、ウサギ骨格筋由来の Heavy meromyosin との結合反応も認められない (データは示さない)。また、その繊維構造は Elongation factor Tu のそれとも異なっていた。形態上の特徴から粒子状会合体の一部はリボソーム、トリブシン耐性の小胞はリボ多

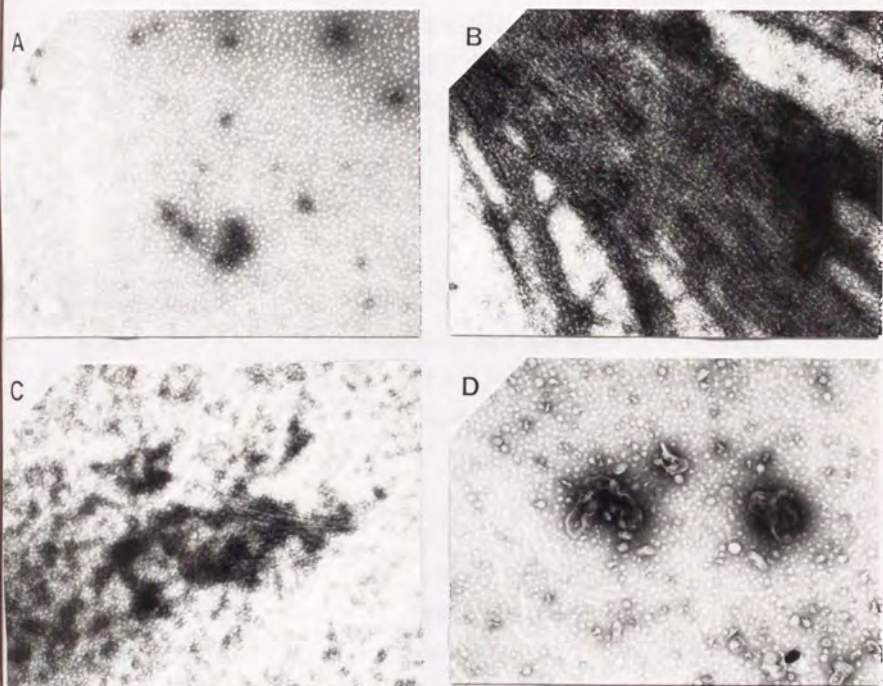


図 3-4 KCl-沈澱性蛋白質画分に P-buffer 処理で生ずる構造体

KCl-沈澱画分を P-buffer 処理し、生じる構造体を 1% 酢酸ウランで染色して電子顕微鏡で観察した。倍率は全て 50,000 倍。A: P-buffer 処理前の KCl-沈澱画分。B: P-buffer 処理 16 時間後のサンプルに生じた繊維状構造体。C: P-buffer 処理 1 分後のサンプルに見られる短い繊維の緩い会合体。D: B と同じサンプルをメッシュ上で Trypsin 処理したもの。



糖体より成る小胞と考えられる。なお、時に直径約 200nm の動物細胞の微小管によく似た構造体が見られるが、頻度は低く、検出条件は確定していない。

以上の結果から、大腸菌の低イオン強度下で可溶性の蛋白質の内には生理的なイオン環境下で会合または重合して一定の形態を持つ構造体を成すものがある事が示唆された。繊維状構造体は再現性高く再構成する事ができ、そのスフェロプラストから放出される繊維構造との類似、細胞骨格との類似から、機能的構造体の候補として注目される。

### C. 100K 蛋白質の精製と性質

上の実験で見いだされた繊維状構造体を形成する成分を検索した。KCl-沈澱画分を硫酸塩析で分画し、P-buffer 処理して繊維状構造体の分布を見た処、100K 蛋白質と繊維状構造体との分布に一致が見られた（データは示さない）。そこで、100K 蛋白質を繊維状構造体の構成成分と考え、これを精製した。

#### 1. 100K 蛋白質の精製

精製は JE1011 株を用い、操作は全て 4°Cで行った。各画分の蛋白質は SDS 電気泳動と染色により検出した。精製各段階の蛋白質を図 3-5 (78 頁) に示す。細胞を G-buffer 中で超音波処理により破碎し、P-buffer 処理して KCl-沈澱画分を得た。これを G-buffer 中で DEAE-cellulose カラムに吸着させ、KCl 直線濃度勾配 (0.02M→0.52M) をかけると 100K 蛋白質は 0.25M 付近に溶出された (DEAE fraction)。その画分を硫酸塩析すると 100K 蛋白質は 60%-80% 飽和硫酸画分に回収された (AS fraction)。これを G-buffer 中で、Sephadex G-100 カラムで分画した (G-100 fraction)。その 100K 蛋白質画分に硫酸を加えて 35% 飽和溶液とし、Butyl-Toyopearl に吸着させ、硫酸の直線濃度勾配 (35%→0% 飽和) をかけると 100K 蛋白質は 20% 飽和付近に溶出した (BT fraction)。これを濃縮、透析し、最終精製標品として水中に保存した。最終精製標品は SDS 電気泳動上 90% 程度の純度であり、見かけの分子量 30,000 付近に混入蛋白質のバンドが二本程僅かに認められた。最終回収率は 5% 程度と考えられた。

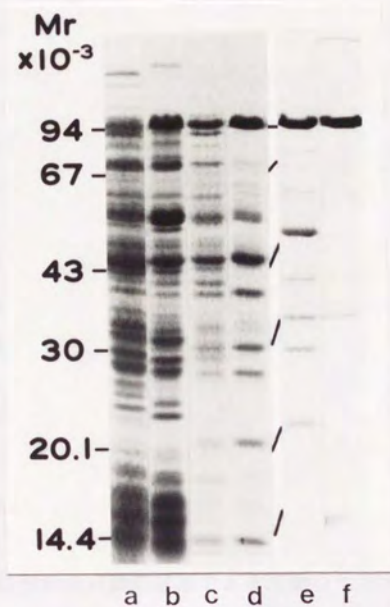


図 3-5 100K 蛋白質の精製

100K 蛋白質精製各段階の画分の蛋白質を SDS 電気泳動により分析した。実験方法と画分名は本文参照。a、可溶性画分。b、KCl-沈澱画分。c、DEAE fraction。d、AS fraction。e、G-100 fraction。f、BT fraction。

## 2. 精製 100K 蛋白質の性質

最終精製標品を P-buffer 処理するとフロックが生じたが、溶液の粘度増加は見られなかった。超速心で回収したフロックは 100K 蛋白質を含み、トリブシン処理で消失したため 100K 蛋白質の会合体と判断した。しかしこの会合体の超速心による回収率は 50% を下回り、KCl-沈澱画分の構造体と性格を異にした。

会合体を電子顕微鏡で観察した結果を図 3-6 (80 頁) に示す。P-buffer 処理により会合体が出現し、その構造は繊維が側方会合した巨大なシート状であった。しかし微細構造は不明瞭で、損傷が認められ、単繊維の構造までは見分けられなかった。以上の生化学的性質と会合体の形状は KCl-沈澱画分中に観察された構造体のそれとかなり異なっていた。

精製 100K 蛋白質は P-buffer 処理で繊維-シート状構造体を形成した。従って構造体形成蛋白質の候補となるものである。しかしその形状と性質は、KCl-沈澱画分に見られる繊維構造とは異なっていた。従って 100K 蛋白質は、KCl-沈澱画分中の繊維構造とは異なった構造体の成分であるか、変性または協働成分の喪失により失活したと考えられる。

## D. 100K 蛋白質に対する抗体の作製と免疫化学的解析

100K 蛋白質は構造体形成蛋白質の候補である。従って、その抗血清を作製し、協働成分の検索、構造体の検出、局在性の検討を行う事とした。局在性の検討は後述する。

### 1. 抗血清の評価と、100K 蛋白質と共沈する蛋白質

精製 100K 蛋白質でイエウサギを免疫感作し、抗血清を作製した。この抗血清と JE1011 株細胞の蛋白質画分を用いてイミュノブロット(55)を行った結果を図 3-7 (81 頁), A に示す。この抗血清は JE1011 株細胞の粗抽出液、KCl-沈澱画分の 100K 蛋白質を強く染色した。粗抽出液標品では見かけの分子量 30,000 付近に 2 本のバンドが検出された。これは抗原の精製 100K 標品中の混入蛋白質由来すると考えられるが、反応は極めて微弱であった。100K 蛋白質と交叉反応する

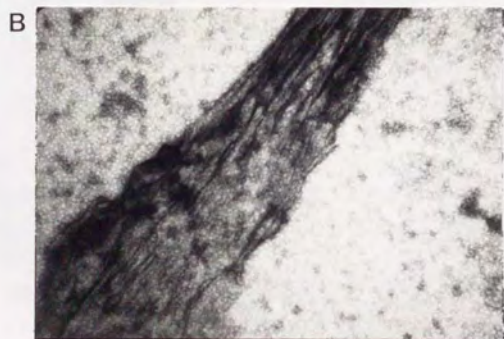
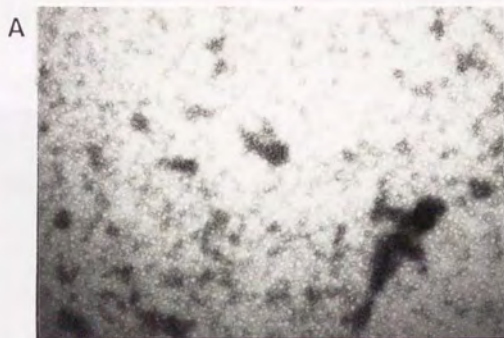


図 3-6 精製 100K 蛋白質が P-buffer 処理で作る構造体

精製 100K 蛋白質を P-buffer 処理し、16 時間後に生じた構造体を 1% 酢酸ウランで染色して電子顕微鏡下で観察した。倍率は 50,000 倍。A: P-buffer 無処理の対照実験。B: P-buffer 処理で生じたシート状構造体。

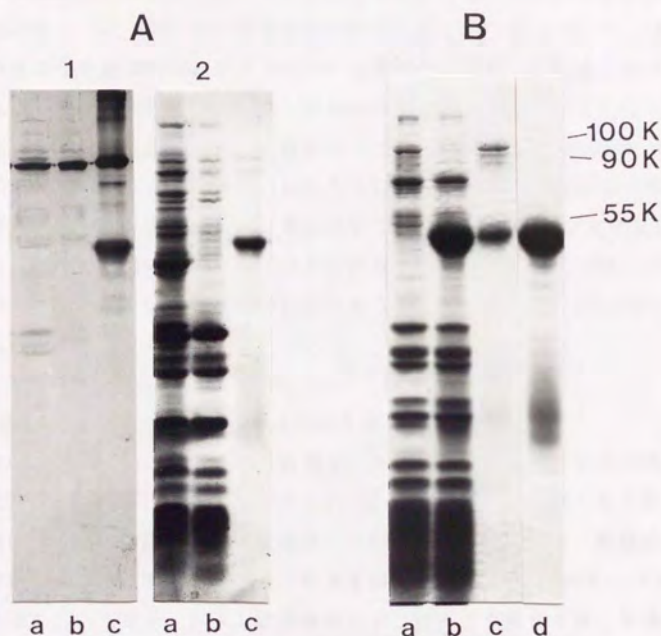


図 3-7 100K 蛋白質のイミュノブロット解析

A: 100K 蛋白質を含む各画分を SDS 電気泳動し、Towbin らのイミュノブロット法に従ってニトロセルロース膜に転写し、100K 抗血清と反応する蛋白質を検出した。1 はイミュノブロット、2 は蛋白質、蛋白質は AudoDye で染色した。a、粗抽出液、b、KCl-沈澱画分、c、粗抽出液から抗血清で沈澱した画分、B: 抗血清から精製したイミュノグロブリン画分を用いて JE1011 株の KCl-沈澱画分から 100K 蛋白質を沈澱させたもの。a、KCl-沈澱画分、b、イミュノグロブリン処理での可溶性画分、c、b の沈澱画分、d、イミュノグロブリン画分。

蛋白質バンドは認められず、この抗血清は 100K 特異的と考えると良い。

この抗血清を用いて粗抽出液及び KCl-沈澱画分から 100K 蛋白質を抗体沈澱させ、その沈澱画分の蛋白質のパターンを解析したところ、何れの画分からも 100K 蛋白質以外に 90K 及び 55K の蛋白質が共沈していた (図 3-7, B)。90K 蛋白質は見かけの分子量 85,000 から 90,000 に渡るバンド群、55K 蛋白質は単一バンドを成す。この二種類の蛋白質は、粗抽出液、KCl-沈澱画分のイミュノプロットで染色されない。抗体沈澱画分を改めてイミュノプロット解析しても 100K 蛋白質と Immunoglobulin の重鎖が検出されるに留まった。70K 程の蛋白質が検出される事があるが、再現性がなく、量的に少なく、90K、55K とは分子量が一致しないため 100K 蛋白質の分解産物と考えられる。以上の結果から 90K、55K 両蛋白質は 100K 蛋白質とは異なった蛋白質であり、100K 蛋白質は G-buffer 中では両者と結合していると考えられる。

## 2. 再構成繊維及びシート状構造体の免疫電顕法による解析

KCl-沈澱画分を P-buffer で一晩処理し、生じた会合体をメッシュに吸着させた後、血清を一次抗体、金コロイド結合抗 Ig G 抗体を二次抗体として用いて会合体を染色した。血清は予め、十分洗浄した細胞壁画分で処理し、外膜成分に対する自然抗体を除去してから用いた。結果を図 3-8 (83 頁) に示す。一次抗体として抗血清を用いた場合、シート状構造体は金コロイドで染色され、単繊維上にも金コロイド粒子の結合が認められた。一方、一次抗体として免疫感作前の同じイエウサギ個体の血清を用いた場合は金コロイド粒子はどの会合体にも殆ど全く結合しなかった。この結果から、少なくともシート状構造体は 100K 蛋白質を構成要素として含んでいると結論された。しかし、全ての繊維状会合体が染色されているかどうかは、この実験の分解能上、明かでない。

単繊維を抗体によって修飾する事によりその抗原性を証明するため、KCl-沈澱画分を P-buffer 処理し、これを抗血清処理して電子顕微鏡下で観察した。所期の電子顕微鏡像は得られなかったが、多量の抗原抗体反応によるフロックを生じ、繊維構造は消失した。また、KCl-沈澱画分を G-buffer 中で予め抗血清処理し、沈澱を除いてから P-buffer 処理し、構造体を電子顕微鏡で観察すると、6nm の微小管状繊維及びシート状構造体は殆ど認められず、繊維の断片が僅かに認めら

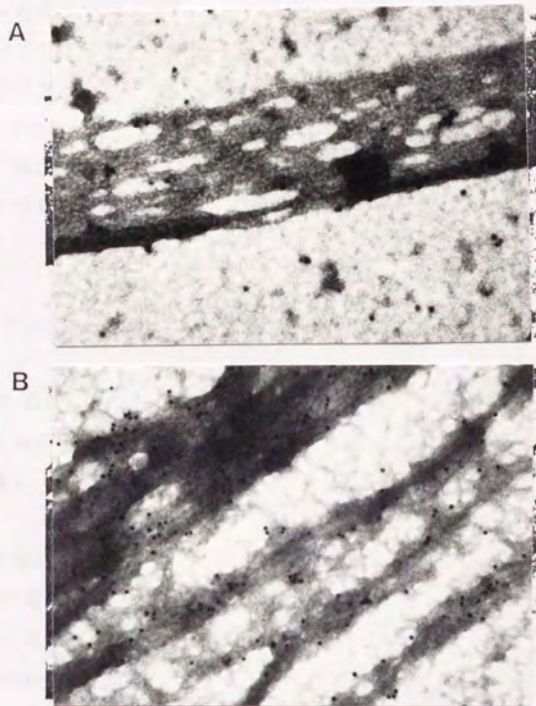


図 3-8 KCl-沈澱画分に生ずるシート状構造体の 100K 抗体による染色

100K 抗血清を一次抗体、金コロイド結合抗イミュノグロブリン抗体を二次抗体として KCl-沈澱画分に P-buffer 処理で生ずるシート状構造体を染色し、更にこれを 1% 酢酸ウランで染色して電子顕微鏡下で観察した。倍率は 50,000 倍。A : 免疫感作全の血清を一次抗体とした対照実験。B : 100K 抗血清を一次抗体としてシート状構造体が染色される事を示す。

れるに留まった（何れもデータは示さない）。この事から、KCl-沈澱画分中の繊維状構造体形成成分は 100K 抗体と反応して沈澱したと考えられた。

以上の結果から、100K 蛋白質は KCl-沈澱画分中の主たる繊維状構造体構成成分であり、G-buffer 中では別の蛋白質、90K、55K と結合していると考えられる。精製 100K 蛋白質は精製過程でこれらと解離したため、KCl-沈澱画分中とは異なった構造と性質を示したと考えられる。100K 蛋白質は、90K、55K 蛋白質の双方、または何れかと結合して繊維状構造体の構成単位となると考えられる。

#### E. 100K-複合体の精製と繊維状構造体の再構成

100K 蛋白質は他の蛋白質と会合して構造体の重合単位を成すと考えられたので、推定される蛋白質複合体を 100K-複合体と呼ぶ事とし、改めて精製を行い、その成分を分離し、再構成実験を行った。

##### 1. 100K-複合体の精製

100K-複合体を JE1011 株から精製した。精製は全て 4°Cで行った。各画分の蛋白質は SDS 電気泳動と染色により検出した。各画分の蛋白質を図 3-9 (85 頁) に示す。100K-複合体の回収率は 100K 蛋白質量から推定して約 20% であった。

菌体を G-buffer 中で超音波処理により破碎し、一晚 G-buffer に透析した (Crude extract)。これを 100,000xg で 1 時間遠心して上澄画分を取り (Cell sap)、その 60% 飽和硫酸に沈澱する画分を集めて G-buffer に溶解、透析の後 (60% AS fraction)、再び 35%-60% 飽和硫酸に沈澱画分を集めて G-buffer に溶解、透析した (35-60% AS fraction)。これに 1/10 量の P-buffer を加えて 4°Cに 48 時間置き、超遠心 (100,000xg、2.5 時間) で沈澱する画分を集め、G-buffer に溶解、透析し、不溶性画分を除去 (100,000xg、1 時間) した後 0°Cに保存した (KCl-ppt. fraction)。これに硫酸を加えて 25% 飽和とし、沈澱を除去し、25% 飽和硫酸を含む G-buffer で平衡化した Butyl-Toyopearl カラムに吸着させ、硫酸の直線濃度勾配 (25%→0% 飽和) により溶出した。100K、90K の大部分と 55K 蛋白質の一部が 21%-15% 飽和硫酸画分に共に溶出され、55K 蛋白質



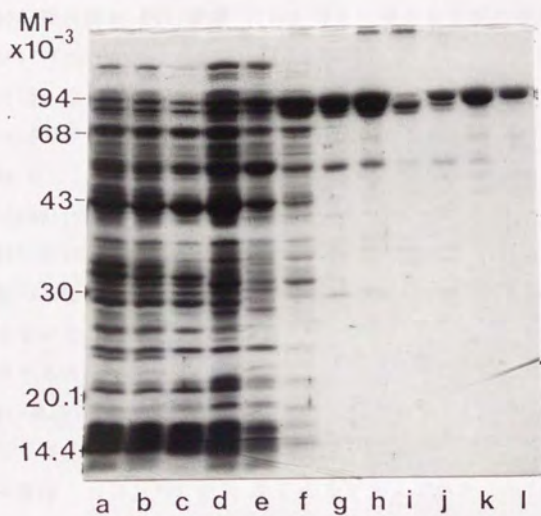


図 3-9 100K-複合体画分の精製

100K-複合体画分の精製各段階の画分の蛋白質のパターンを示す。精製法や画分の名称は本文参照。a、Crude extract. b、Cell sap. c、60% AS fraction. d、35-60% AS fraction. e、KCl-ppt. fraction. f、BT fraction. g、DEAE fraction. h、100K complex fraction. i、CL2B-90K fraction. j、CL2B-100KC fraction. k、CL2B-100K fraction. l、Purified 100K fraction.

の大部分は低濃度側に溶出された。両画分は G-buffer に透析して 0°C に保存した。前者の画分は P-buffer 処理で繊維状構造体を生じた（データは示さない）ので BT fraction と呼び、精製を続けた。これを F-buffer (20mM KCl) で平衡化した DEAE-Toyopearl に吸着させ、KCl の直線濃度勾配 (20-450mM) で溶出すると 100K-複合体が KCl 濃度 350mM 付近に他の蛋白質と離れて溶出した。この画分 (DEAE fraction) を F-buffer に一晚透析後、超遠心 (100,000xg、1 時間) すると 100K-複合体が選択的に沈澱回収され、混入蛋白質が除去された。この沈澱を G-buffer に溶解、透析した後不溶性画分を除去し、これを 100K complex fraction とし、0°C に保存した。

100K complex fraction は 100K、90K 蛋白質を約 2:1 の比で含み、55K 蛋白質を 100K 蛋白質の約 3% 含む。但しこの量比は精製標品により幾分変動した。画分中の 100K、90K、55K 蛋白質は大部分が解離しており、KCl-沈澱画分のそれと異なっていた。100K complex fraction を G-buffer 中で Sepharose CL2B により分画すると明瞭に三つの蛋白質ピークに分離した。見かけ上高分子側のピークは 90K 蛋白質と 100K 蛋白質を約 10:1 に含み、これは再び Sepharose CL2B で精製して限外濾過で濃縮し、精製 90K 画分 (CL2B-90K fraction) とした。中央のピークは、100K、90K を約 5:1 の比で含んでいた (CL2B-100K fraction)。低分子側のピークはほぼ純粋な 100K 蛋白質画分で、Sepharose CL2B で再精製して精製 100K 画分 (CL2B-100K fraction) とし、その一部を DEAE-Toyopearl で再精製し Purified 100K fraction とした。55K 蛋白質は分散し、各画分で相対含量が低下した。

## 2. 100K complex fraction の重合性と重合体の性質

100K complex fraction は P-buffer 処理で直ちに薄く乳濁し、処理後 1 時間で超遠心 (100,000xg、1 時間) すると蛋白質の殆どが沈澱した。しかし溶液の粘度増加は殆ど認められない。また P-buffer 処理した 100K-複合体を F-buffer 中で Cellulofine sf-2000 カラムを用いてゲル濾過すると溶出位置はポイド容 (分子量  $10^6$  以上) に移動した (Sepharose CL2B は F-buffer 中ではこれらの蛋白質と相互作用を持ち、利用できなかった)。従って 100K complex fraction は P-buffer 処理で重合、高分子化したと考えられた。100K complex fraction の重

合に要する時間は粗抽出液中でのそれよりかなり短い。

重合体の構造を電子顕微鏡下で観察した結果を図 3-10 (88 頁), A に示す。100K complex fraction には P-buffer 処理前には会合体は認められないが、処理後は巨大なシート状構造体が多数認められた。シート状構造体は側方会合した繊維の集まりから成り、長さは時に数ミクロンに達した。単繊維は約 6nm の均一な直径を持ち、良く連続し、長軸に沿う周期性は認められなかった。遊離の繊維は僅かで殆どの繊維がシートを成し、その形状は、Rod-spheroplast 中や、KCl-沈澱画分中に認められたシート状構造体と似ていた。これ以外の構造は粒子が少量認められるだけであった。生化学的解析結果を考え合わせて、この画分の蛋白質は P-buffer 処理により重合し、シート状構造体を形成したと判断された。溶液中ではシートがコロイド粒子として振舞うため粘度が増加しないと考えられた。CL2B-90K、CL2B-100KC、CL2B-100K 各画分を再度混合してから P-buffer 処理すると全く区別できないシート状構造体を生じた。

100K complex fraction は 55K 蛋白質含量が KCl-ppt.画分のそれと比べて少ないが、重合してシート状構造体を形成した。55K 蛋白質はシート状重合体の構成成分ではないと考えられる。

### 3. 精製 100K 蛋白質の性質と重合体

CL2B-100K fraction 及び Purified 100K fraction の重合性とその重合体の構造を検討した。何れの画分も P-buffer 処理で粘度増加は見られず、フロックを生じた。フロックは沈澱しにくく、超遠心でも高い回収率は得られなかった。

何れの画分も P-buffer 処理前には電子顕微鏡下に構造体は認められないが、処理後には繊維の側方会合によるシート状の構造が観察された。図 3-10, B に、CL2B-100K fraction の例を示す。シートは華奢で、メッシュに貼付いてから二次的に破損したような跡がしばしば見られた。単繊維は細くて内部構造がはっきりせず、連続性が悪く、無定型構造体に移行することがあり、全体としてシート状構造体と言うより方向性と粘弾性を持った膜の様にみえる。シート状会合体以外に構造体は認められず、遊離の単繊維は認められなかった。その構造は 100K-複合画分のそれとは著しく異なっていた。

以上の性質は C 節の 100K 蛋白質の性質と共通していた。また、CL2B-100K 画

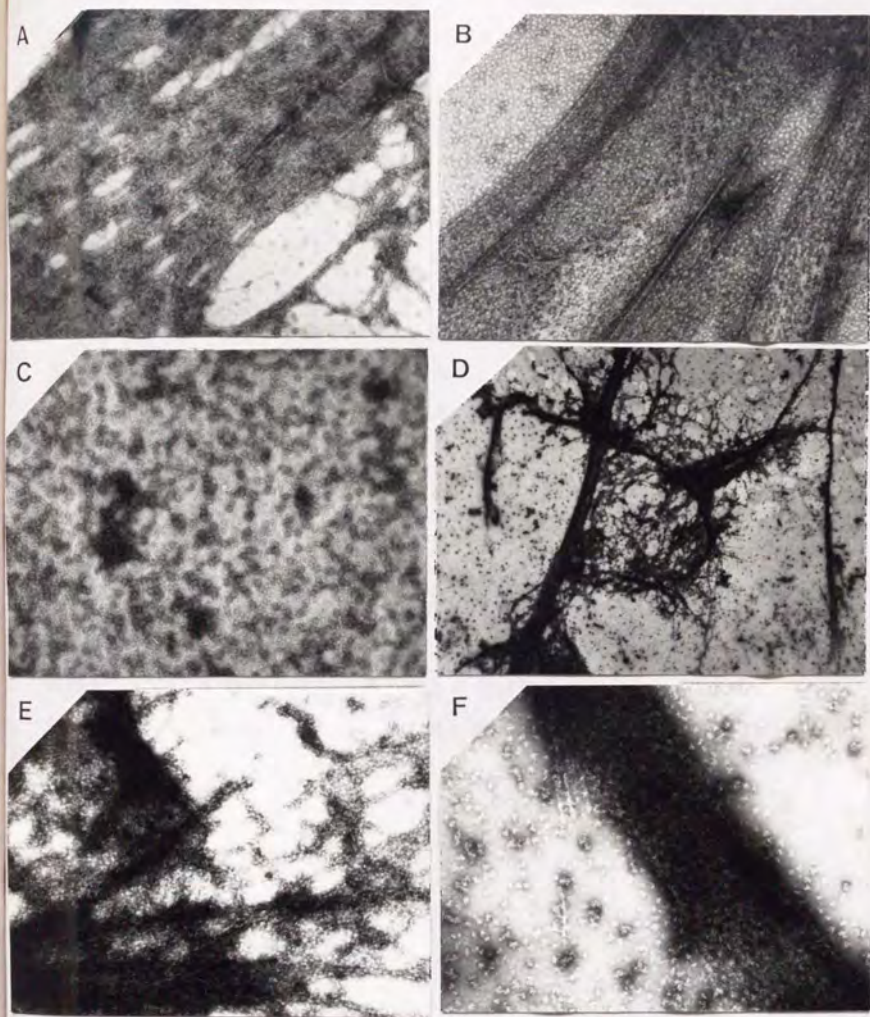


図 3-10 精製 100K、90K 蛋白質画分、及びその混合物が P-buffer 処理で作る構造体

各蛋白質画分及びその混合物を P-buffer 処理し、1 時間後に電子顕微鏡下に検出された構造体を示す。倍率は、D が 10,000 倍、その他は全て 50,000 倍。P-buffer 無処理の対照実験では何れも無構造であったので結果は示さない。A : 100K complex fraction. B : CL2B-100K fraction. C : CL2B-90K fraction. D : 100K:90K=2:1 混合物 (低倍率), E : D と同じ (高倍率), F : 100K:90K=2:3 混合物。

分は 55K 蛋白質を含み、Purified 100K 画分は含まないが、両者の性質に差はみられず、55K 蛋白質の影響は認められなかった。

#### 4. CL2B-90K 画分の性質と重合体

CL2B-90K 画分は 100K:90K=1:10 程度の混合物画分である。P-buffer 処理によって溶液の状態は変わらず、超遠心で沈澱物を生じない。

CL2B-90K 画分には P-buffer 処理前には電子顕微鏡下に構造体は認められないが、処理後には粒子状重合体が観察された。結果を図 3-10, C に示す。粒子は 4 つのサブユニットから成る四角形を単位とし、これが上下に重合して短い繊維を成していた。その構造は 100K-複合体の形成する繊維状構造体と共通性がなく、90K 画分が 100K とともに繊維状重合体を形成しているときは、全く異なった存在状態を取っていると考えられた。

#### 5. 100K、90K 画分からの繊維状構造体の再構成

CL2B-100K fraction と CL2B-90K fraction を量比を変えて混合し、P-buffer 処理し、4°C に 1 時間放置した後、生じた構造体を電子顕微鏡下に観察した。精製 100K complex fraction の蛋白質量比には 100K:90K=2:1 に混合したものが最も近かった。蛋白質標品として Purified 100K fraction を用いても結果は変わらなかった（データは示さない）。

100K:90K=2:1 の混合物は P-buffer 処理によりシート状構造体を生じ（図 3-10, D, E）た。構造体の形状は精製 100K complex fraction に再構成されるそれとよく一致し、直径約 6nm の繊維が側面会合してシート状をなし、遊離の繊維は認められなかった。しかし粒子や無定型構造体が目立ち、また重合体の超遠心による回収率は低く、100K complex fraction と比べて構造体形成能は不完全であった。90K 蛋白質の量比を増すと生じる構造体の形状は変化し、粒子性が強まった。100K:90K=2:3 の場合は突起の多い粒子が更に会合して小さなブロックを生じた（図 3-10, F）。しかしどの量比でも CL2B-100K、CL2B-90K 各々の画分の会合体の特徴を示さなかった。

以上の結果から、100K 蛋白質は 90K 蛋白質と 2:1 程度の量比で重合し、繊維

シート状構造体を形成する構成分と考えられる。この量比は細胞中の両蛋白質の量比に近い。しかしこれだけでは 100K complex fraction に見られる様な完全な繊維シート状構造体は再構成されず、他にも条件が必要と考えられる。55K 蛋白質は構造体の構成分とは考えられず、100K、90K 両者とは性格の異なる蛋白質と考えられる。CL2B-100K、CL2B-100KC、CL2B-90K 各画分を混合したものは 100K complex fraction での構造体が再構成された事を考え合わせれば、55K 蛋白質の、重合核形成など、重合の補助的機能が想像される。

#### F. 100K 蛋白質の局在性、及び存在量

##### 1. スフェロプラストを利用した解析

JE1011 株細胞を指数増殖期後期で集菌し、100mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA、15% Sucrose、0.1mg/ml Lysozyme を含む緩衝液に懸濁し、30°Cで 1 時間処理してスフェロプラストを作製した（通常の球形細胞を生じる）。先ずこれを二分し、細胞を遠心で集め、一方は 2mM MgCl<sub>2</sub> と DNaseI (50 µg/ml) を含む、2mM Tris-HCl pH8.0 の緩衝液に懸濁して破裂溶菌させ、一方は 15% Sucrose を含む同じ緩衝液に一度懸濁した後、最終 1% の Triton X-100 加えて破裂溶菌させ、超遠心 (100,000xg、1 時間) で可溶画分と沈澱画分に分けし、蛋白質を解析した。次に、スフェロプラスト懸濁液を四分し、一つはそのまま、一つには Proteinase K (50µg/ml) を加え、一つには Proteinase K と最終 1% の Triton X-100 を加え、30°Cで更に 30 分加温した。残る一つは細胞を集め、Proteinase K を含む 2mM Tris-HCl pH8.0 の緩衝液に急速に懸濁し、同様に加温した。1% の SDS を加え、直ちに煮沸して反応を停止し、各画分の蛋白質を解析した。

結果を図 3-11 (91 頁) に示す。100K、90K、55K 蛋白質は何れもスフェロプラスト作製過程で細胞に留まった (c)。細胞を低イオン強度下で破裂、溶菌させると 100K、90K、55K は何れも沈澱画分に回収された (e)。しかし Triton X-100 処理で破裂溶菌させると何れも可溶性画分に回収された (f)。低イオン強度破砕で得られた顆粒画分の 100K、90K、55K 蛋白質は G-buffer で洗浄しても溶出しなかったが、続いて Triton X-100 で抽出すると可溶化され、超音波処理によってもかなりの部分が可溶化された (データは示さない)。従って、これらの蛋白

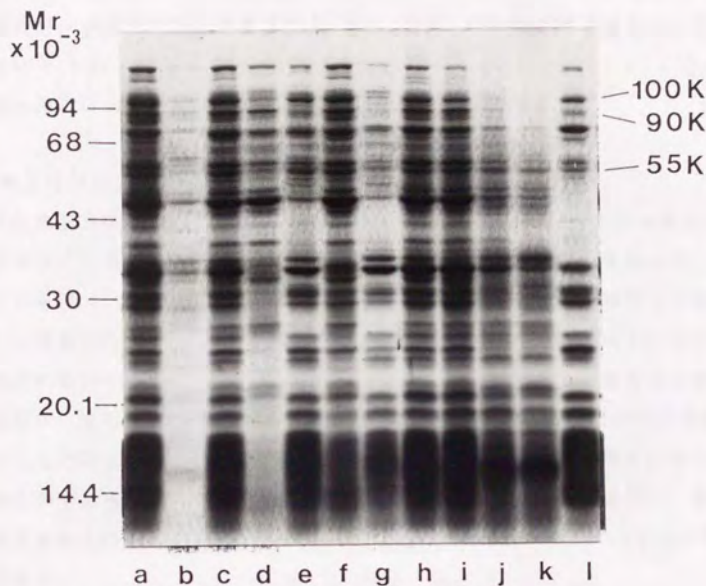


図 3-11 スフェロプラストの処理による 100K 蛋白質の局在性の検討

JE1011 株細胞を通常の方法でスフェロプラスト細胞とし、これに更に処理を加えてそれぞれの画分の蛋白質を解析し、100K 蛋白質の局在性を検討した。a、無処理細胞、b、スフェロプラストの外液、c、スフェロプラスト細胞、d、スフェロプラスト細胞を低イオン強度下で破裂させた可溶性画分、e、dの沈澱画分、f、スフェロプラストを Triton X-100 処理で破裂させた可溶性画分、g、fの沈澱画分、h、スフェロプラスト細胞 (cと同じ)、i、hを Proteinase K 処理したもの、j、hを低イオン強度下で破裂させると同時に Proteinase K 処理したもの、k、hを Triton X-100 処理で破裂させると同時に Proteinase K 処理したもの、l、KCl-沈澱性蛋白質画分

質は通常は細胞質膜と結合しており、超音波処理またはフレンチプレス処理の際のせん断力により細胞膜から可溶化されたと考えられた。

また、スフェロプラスト細胞を Proteinase K 処理し、外膜蛋白質の OmpC/F 蛋白質が一部分解される条件下でも 100K、90K、55K 蛋白質は実質的に分解を受けない (i) が、細胞質膜を破壊すると直ちに分解を受けた (j、k)。このことから、これらの蛋白質は細胞質膜の内側に存在すると考えられた。

## 2. 蛍光抗体法による解析

指数増殖期後期の JE1011 株細胞を用い、100K 蛋白質の抗血清を利用して、蛍光抗体法による大腸菌細胞上の 100K 蛋白質の局在箇所の検討を試みた。

結果を図 3-12 (93 頁) に示す。蛍光は細胞上、両極と中央部分 (隔壁形成位置) に濃集した。免疫感作前の同じ個体の血清を対照として用いると細胞は殆ど染色されなかった。この結果から 100K 蛋白質は細胞上の、隔壁または隔壁であった部分、即ち両極に局在する傾向が示唆された。100K 蛋白質は細胞質膜に結合していると考えられるので、この結果は 100K 蛋白質の細胞質膜との結合部位の分布を示すと考えられる。この結果を 100K 蛋白質が細胞質に遍在し、核域だけが染色を免れたとは考えにくい。この局在性と Periseptal annuli との関係は明かでない。

## 3. 100K 蛋白質の存在量

大腸菌の全蛋白質を電気泳動で分離して Coomassie brilliant blue 染色した後デンストメーターで測定すると、100K 蛋白質は全蛋白質中の 0.5%-1% を占めた。100K 蛋白質は大腸菌の主要蛋白質の一つであり、その量は外膜主要蛋白質の OmpC/F 蛋白質の量をやや下回る。その細胞内含量は Growth phase、培地の種類、栄養状態 (ブドウ糖などの有無、量) などによって殆ど変化しない。100K 抗体による沈澱画分の測定から、100K と 90K の細胞内での量比は約 3:1 と考えられた。

## G. 100K 蛋白質に関連する変異株の検索と性質

### 1. 100K 蛋白質に影響をもたらす変異株の検索



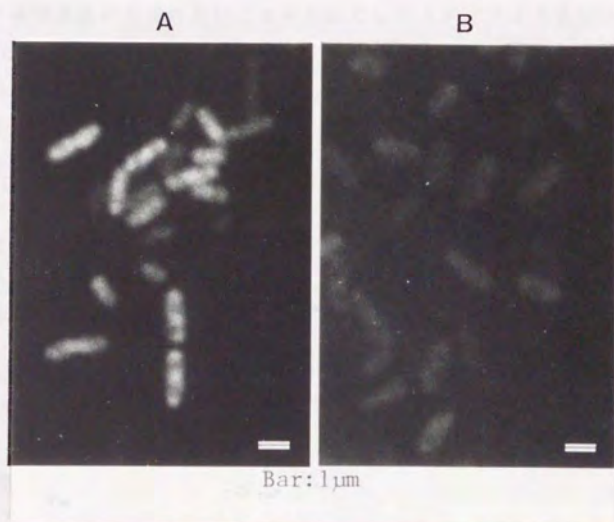


図 3-12 100K 蛋白質の抗血清を用いた蛍光抗体法による局在性の検討

A: 一次抗体にアフィニティークロマトグラフィーで精製した抗 100K 蛋白質イミュノグロブリン画分を、二次抗体にローダミン結合抗イミュノグロブリン抗体を用いて JE1011 株細胞を染色した蛍光顕微鏡写真。B: 一次抗体にアフィニティークロマトグラフィーに吸着されなかったイミュノグロブリン画分を用いた対照実験。

100K 蛋白質は機能性構造体形成蛋白質と考え、細胞の成長、分裂、形態形成過程に異常をもたらす既知の遺伝子の変異株の全蛋白質を SDS 電気泳動で解析することにより、その欠損、または量や分子量に変化の生じた変異株を検索した。

その結果 envA1 変異を持つ D22 株(77)に、分子量から見て 100K、90K、55K に相当する三種の蛋白質が特異的に過剰生産され、その isogenic 株の、D21 株にはこの過剰生産が見られないことを見いだした(データは示さない)。envA1 変異を JEE1011 株に形質導入してもこの過剰生産は同様であった(後述)。envA 遺伝子は大腸菌の遺伝子地図上 2 分(77)に位置し、生育に必須の遺伝子と考えられている(78)。envA1 変異株はそのミスセンス変異株であり(78)、疎水性薬剤への高感受性、生育速度低下、連鎖状菌体形成などの形質を併せ持つことが報告されている(77)。

この他の調べた全ての変異株 (ftsW、ftsQ、ftsA、ftsZ、ftsI、secA、mrcA、rodA、pbpB、mreB、 $\Delta$ (mreB、C、D + 1 ORF.)、cya、crp) は致死条件下でも構造体形成蛋白質に特に変化は認められなかった。

## 2. envA1 変異株に過剰生産されている蛋白質の同定

envA1 変異株に過剰生産されている蛋白質の同定は、D22 株から envA1 変異を JEE1011 株に形質導入して作製した isogenic 株の、JEE1002 株 (envA<sup>\*</sup>) と JEE 1009 株 (envA1) の蛋白質を比較検討することにより行った。

B 節で述べた方法に従い、細胞を G-buffer 中で破砕し、可溶性画分と膜画分に分離し、可溶性画分から KCl-沈澱性の画分を分離し、その蛋白質を SDS 電気泳動で分析した。結果を図 3-13 (95 頁) に示す。100K 蛋白質はそもそも細胞内含量が多く、過剰生産の結果細胞内で最も多い蛋白質となっている。JEE1009 株で過剰生産された 3 種の蛋白質は、全ての分画過程で JEE1002 (野生型) 株の 100K、90K、55K と挙動を同じくした。また、この図から、JEE1009 株の細胞膜画分に見かけの分子量 45,000 の蛋白質が過剰生産されている事が認められる。これを 45K 蛋白質と呼ぶ。

更に JEE1009 株の二度目の KCl 沈澱画分の蛋白質を抗 100K 抗血清によりイミュノプロットすると、過剰生産された 100K 蛋白質に対応するバンドだけが染色され、同じ画分を免疫グロブリン画分で処理すると、過剰生産された可溶性の

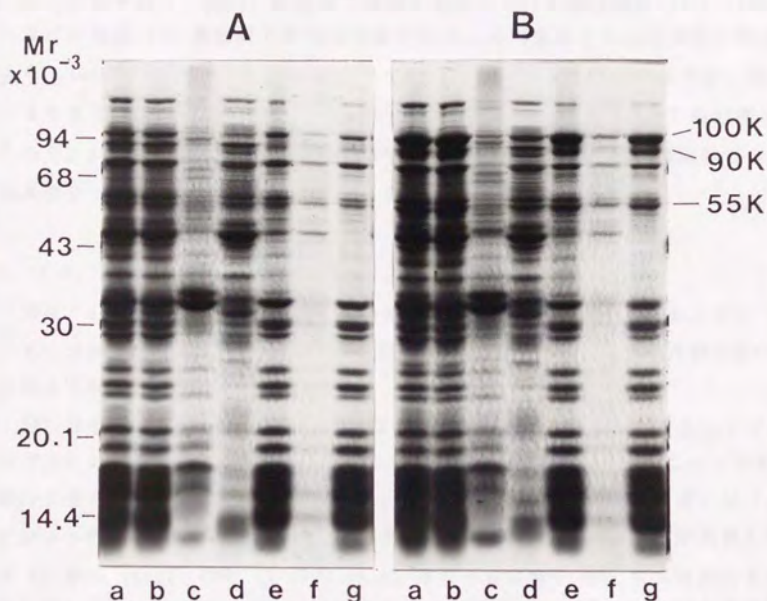


図 3-13 *envA1* 変異株に於ける 100K-複合体成分の過剰生産

*envA1* 変異株に過剰生産されている蛋白質が 100K-複合体蛋白質である事を、KCl-沈澱により確かめた。A: JEE1002 (*envA*<sup>\*</sup>) 株。B: JEE1009 (*envA1*) 株。  
 a、粗抽出液。b、可溶性画分。c、細胞膜画分。d、bの P-buffer 処理後なお可溶性の画分。e、bから P-buffer 処理後沈澱する画分 (KCl-沈澱性画分)。f、eを G-buffer に溶解し、不溶性画分を除去したのち P-buffer に可溶性の画分。g、P-buffer 処理で再び沈澱する画分。

3種の蛋白質が全て定量的に沈殿した(図 3-14、97頁)。即ち、過剰生産された 100K 蛋白質は 100K 抗体と反応し、90K、55K はそれと結合し、JE1011 株での結果(D節、図 3-7 B)と挙動を同じくした。

以上の結果から、envA1 変異株で過剰生産されている蛋白質は 100K、90K、55K 及び細胞膜 45K 蛋白質であると結論される。過剰生産される蛋白質は特異的であり、100K、90K、55K、45K に限られている。過剰生産の増加率は各蛋白質によりまちまちである。100K、90K は約 10 倍、55K は数倍、45K は 3 倍程度と考えられた。Spheroplast を低張液中で破壊した場合はこれらの蛋白質は殆ど全て細胞膜画分に回収され、局在性は変わらないと考えられた。

### 3. 100K、90K、55K 蛋白質過剰生産遺伝子の同定

100K、90K、55K、45K 各蛋白質を過剰生産する変異が envA1 である事は Plkc ファージによる遺伝子連関と、envA 遺伝子クローンの導入による過剰生産の抑制とにより確かめた。

D22 株を供与菌、JE1011 株を受容菌とし、leu<sup>+</sup> を選択マーカーとしてファージ Plkc により envA1 変異を形質導入し(47)、得られたアイソゲニック形質導入株の全蛋白質を解析した。envA1 変異の形質は菌体の鎖状集合体形成とリファンピシンの高感受性(77)により検定した。得られたアイソゲニック形質導入株の内 26 株の envA1<sup>+</sup> 株と 27 株の envA1 株の全蛋白質を SDS 電気泳動により分離解析した。その結果、envA1 の形質を持つ株は全て 100K、90K、55K 蛋白質を過剰生産し、envA<sup>+</sup> の形質を持つ株では全てそれらの蛋白質レベルは正常であった(データは示さない)。この事から、100K、90K、55K の過剰生産は envA1 変異により惹起されると考えられた。

この事を更に envA 遺伝子を含むプラスミドを JEE1009 株に導入し、その形質を解析する事により確かめた。プラスミド pBBA1 DNA は Lutkenhaus 博士から頂いた。このプラスミドは完全な envA 遺伝子と、ftsZ 遺伝子と geneX の一部を含む AsuII DNA 断片(73)が pBR322 に再切り出し不能な形でクローニングされている(私信)。

このプラスミドで JM109 株を形質転換すると、得られた株は極めて溶菌しやすく、寒天平板培地上では生育するが、液体培地中で振とうすると生育せず、生化

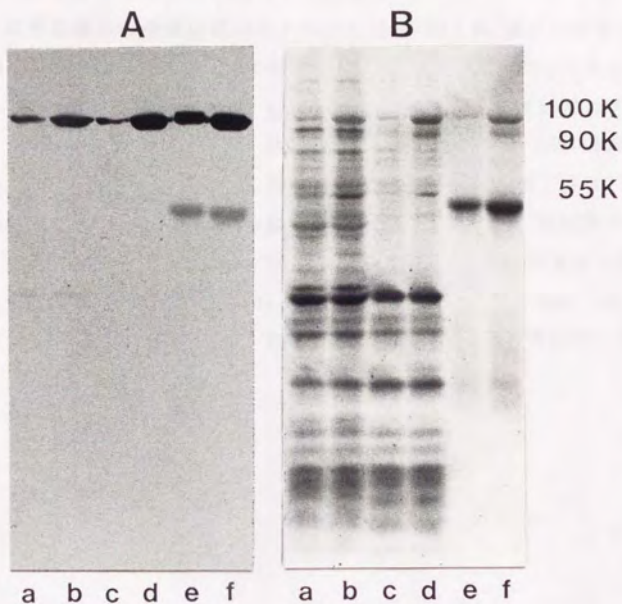


図 3-14 *envA1* 変異株で過剰生産される蛋白質と 100K 抗体との交叉反応  
*envA1* 変異株に過剰生産されている蛋白質を 100K 抗血清によるイミュノブロット法により検討した。A: イミュノブロット。B: 蛋白質。JEE1002 株 (a c e) と JEE1009 株 (b d f) の、粗抽出液 (a b)、KCl-沈澱性画分 (c d)、粗抽出液からの 100K 抗体による沈澱画分 (e f) について検討した。

学的解析に向かなかつた。そこで、envA 遺伝子を含む DNA 断片を低コピー数プラスミド、pLG339 (72)に再クローニングして利用した(「2. 実験方法」参照)。得られたプラスミド pST103 と、pLG339 を JEE1002 株及び JEE1009 株に導入し、25 $\mu$ g/ml テトラサイクリンで選択して形質転換株を得た。pST103 は JEE1009 株の Rifampicin 感受性を野生型細胞のレベルにした。

得られた形質転換株の全蛋白質のパターンを図 3-15 (99 頁)に示す。pST103 は JEE1009 株の 100K、90K、55K 量を抑制し、野生型株細胞のレベルに近づけた。従ってこれらの蛋白質の過剰生産は envA1 変異によって惹起され则认为られる。興味深い事に、pST103 は、JEE1002 株に於いても 100K、90K、55K 蛋白質の発現を強く抑制した。また、pST103 は、何れの株でも成長速度を低下させ、倍加時間を約 3 倍以に延長した。この時、細胞は著しく伸長しており、細胞質分裂を強く抑制したと考えられた。100K、90K、55K、45K 蛋白質はその分子量から見て何れも envA 遺伝子産物に当たらない(73)。以上の結果から 100K、90K、55K の量、細胞の成長速度、細胞質分裂過程は envA 遺伝子に抑制的に制御されていると考えられる。

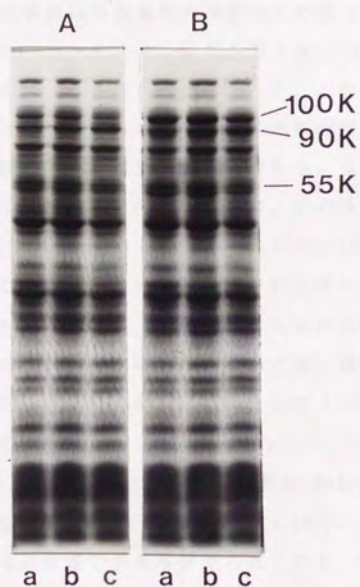


図 3-15 *envA* プラスミド導入による 100K 蛋白質生産の抑制

*envA1* 変異株に *envA* 遺伝子をクローニングし、その 100K 蛋白質量への影響を全蛋白質の SDS 電気泳動により解析した。A: JEE1002 株をレシピエントとしたもの。B: JEE1009 株をレシピエントとしたもの。a、プラスミドを持たない株、b、ベクターの pLG339 を持つ株、c、pLG339 に *envA* 遺伝子をクローンしたプラスミド pST103 を持つ株。

## 考察

### 1. 大腸菌の細胞内構造体

従来大腸菌細胞内には、細胞骨格に当たる構造体は検出されていなかった。しかし近年、大腸菌の核分裂過程の変異株の検索とその遺伝子解析の結果、それに関与する遺伝子の幾つかに推定アミノ酸配列上キネシン(20)やチューブリン(21)と相同性を持つ蛋白質の存在が示唆されるに至った。この事は大腸菌の核分裂過程にも真核生物のそれと相同の機構が機能している可能性を示唆する。

本研究は、大腸菌細胞の細胞内構造体形成成分を主に生化学的手法を用いて検索し、大腸菌の細胞内に繊維状構造体を見だし、その構成成分の候補として、見かけの分子量から、100K、90Kの蛋白質を抽出した。100K複合体には、今迄の如く ATPase 活性を始めとする動的な性格は検出されて居ない。また 100K複合体を支持体とする Mechanochemical enzyme と考えられる成分も見いだしていない。即ち 100K複合体は構造維持に関与する性格の強い成分であるか、または機能性構造体の構造維持的側面を主に検出していると考えられる事ができる。この事は本研究に採用した方法の帰結と考える事ができる。

高濃度の KCl を外液に加える事により、大腸菌を Rod-spheroplast にする事ができた。大腸菌は細胞質内に  $K^+$  イオンを蓄積し(65)、それが細胞内の反応系の維持(75)や膨圧の形成に重要である事が知られており、また、その濃度は外液の浸透圧に応じた能動輸送系の働きで維持され、代謝活性の低下に伴い放出される事が知られている(65)。従って Spheroplast 作製時に外液に KCl を加えれば、細胞質内の  $K^+$  イオンの漏出を補償できると期待される。Rod-spheroplast が形成され、それが KCl が外液にある限り維持され、その除去、LiCl への置換により通常のスフェロプラストに変化した事は、大腸菌に  $K^+$  イオン依存性の構造維持機構がある事を示唆する。真核細胞のアクチンは細胞質内濃度の  $K^+$  イオンで重合体を維持する事が知られており、大腸菌にもこれと類似した性格を持つ構成成分の存在が想像される。Rod-spheroplast が細胞質膜を界面としている事から、構造維持機構は細胞質膜上またはその内側から細胞表面を抑える様に分布していると考えられる。しかしこの電子顕微鏡像中に構造体を見いだす事はできなかった。ある種の構造体の存在を示唆するのは、Periseptal annuli(1)様構造の細胞



質側の高電子密度の部分である。動物細胞の Desmosome、Hemidesmosome、Focal patch などは先ず、Electron-dense plaque として見いだされており、それらの構造や機能は、Periseptal annuli の構造と機能を考える上で示唆的であり、興味深い。Periseptal annuli を細胞の両極周辺部に存在する構造に限って考えれば、これは、Rod-spheroplast の形態維持に直接関係を持たないと考えられるが、類似の構造が細胞の円筒部分にもタガをはめる様に分布する事は注意される。細胞表層の支持構造体に就いては更に研究が必要である。

Rod-spheroplast の破壊で放出された繊維は、外膜を除けばこの実験で見いだされた最も量の多い連続的な構造体で、その形態維持に関与する成分の有力候補である。この繊維が細胞内に局在し、蒸留水処理に不安定と考えられる事もこの事を支持する。この繊維の形状は I 型線毛と類似するが、これとは異なると考える根拠は「結果」の中に述べた。繊維を放出している細胞は何れも著しく損傷を受けている訳で、電子顕微鏡像から繊維の局在箇所や存在様式を推定する事は容易ではない。図 3-2、C では、繊維は外膜の内側を、束またはシート状を成して、細胞の長軸に斜交してラセン状に巻き付く様に分布する。この存在様式は線毛のそれとは異なっている。図 3-2、C の繊維と同様の存在様式を持つ繊維構造が、Spirochaeta にも報告されており(79)、この繊維の分布は細胞内の構造を反映している可能性がある。

## 2. 細胞内構造体成分の再構成

大腸菌を低イオン強度緩衝液中で破壊、抽出し、不溶性成分を除去した可溶性蛋白質画分には P-buffer 処理によって会合し、繊維-シート状構造体、粒状構造体、小胞などの高分子構造体を再構成する蛋白質性の成分が含まれ、超遠心分離で沈澱画分に回収された。何れの構造体も G-buffer 中ではほぼ完全に解離、可溶化しており P-buffer 処理により繰り返して再構成された。P-buffer 処理後のイオン環境は細胞質内のそれに類似する様に選んであるため、これらの成分が細胞質内に局在するならば、細胞内でも会合高分子化して同様な構造体を作っていると考えて良いであろう。Rod-spheroplast の繊維を含む不溶性蛋白質の内のかなりのものがこれと共通している事はこの推定と整合する。従って、この沈澱画分中に細胞内構造体形成蛋白質の幾つかが含まれると推定される。

機能性構造体は細胞内に、ある広がりを持つ構造体を構築すると考えられる。KCl-沈澱画分に再構成される構造体の内、その性格を持ち得るのは繊維-シート状構造体である。この構造体は G-buffer 中では殆ど全く検出されず、P-buffer 処理後 1 分では短い繊維の緩い会合体として検出される様になり、時間を置くと繊維-シート状構造体として検出される事から、G-buffer 中では脱重合状態にある成分から P-buffer 処理によって重合、再構成されたものと考えられる。この繊維は、その形状、低イオン強度下での不安定性、KCl 存在下での安定性、シート形成の傾向などが、Rod-spheroplast から放出された繊維と良く似ており、同じ繊維と考えて良いであろう。I 型線毛はこの単繊維と形状が似ているが、極めて安定な構造体で、蒸留水中はもとより、SDS 水溶液中で煮沸しても構造は崩れず、重合には  $Mg^{2+}$  を要する事が知られている(76)。ここで再構成された繊維-シート状構造体の生化学的性質は線毛とは異なる。そこで本研究では、この繊維-シート状構造体を大腸菌の機能性構造体の構成成分と考え、その成分を検索してその性質を検討した。なお、繊維-シート状構造体と共に見られる粒状構造体はリボゾーム、小胞は外膜断片と考えられる。

この P-buffer 処理による重合体検出方法では原理的に検出できない種類の成分が存在する。例えば動物細胞の中間径フィラメントやミオシンなどの低イオン強度の緩衝液に溶解しない構造体形成蛋白質は検出できない。また、重合または会合のために異なった条件を要する構造体、例えばチューブリンの様に、GTP や生体内濃度の  $Mg^{2+}$  を必要とする蛋白質が検出できない。大腸菌には多様な細胞内構造体形成蛋白質が見いだされる可能性がある。

### 3. 繊維-シート状構造体の構成成分

予備的な分画の結果、繊維-シート状構造体の形成能と 100K 蛋白質が同じ挙動を示したので、これをその成分の候補と考えて精製し、その抗血清を調製した。精製 100K 蛋白質は P-buffer 処理で微細構造のはっきりしない繊維の側面会合によるシートを形成し、直径約 5nm の細い微小管状繊維構造を示さなかった。しかし、一次抗体に抗 100K 血清、二次抗体に金コロイド結合 IgG 抗体を用いて、KCl-沈澱画分の構造体を染色すると、少なくともシート状構造体は特異的に染色され、KCl-沈澱画分を P-buffer 処理後、抗血清処理すると繊維-シート状構造

体は消失し、また、KCl-沈澱画分を抗血清で前処理すると P-buffer 処理で繊維シート状構造体を生じない事から、この画分中の繊維シート状構造体の大部分は 100K 蛋白質を構成成分としていていると考えられた。

KCl-沈澱画分を G-buffer 中で抗血清処理すると 100K 蛋白質以外に 90K、55K の、免疫学的に 100K 蛋白質とは異なる蛋白質が定量的に沈澱し、これらはその条件下で会合していると考えられた。従って、精製 100K 蛋白質が KCl-沈澱画分中の典型的な繊維状重合体を形成できないのは、精製過程で 90K 蛋白質などの重合の Co-factor が除去されたための可能性が考えられた。このため繊維構造の重合単位となる会合体を 100K-複合体と呼ぶ事とした。

100K 蛋白質は量が多く、外膜蛋白質の OmpC/F と比較して細胞表面のかなりの部分を被う事が可能である。

#### 4. 100K-複合体の精製と再構成

100K-複合体を画分を精製した。この画分は、100K、90K、55K 各蛋白質をほぼ、2:1:0.05 の比で含む。精製 100K-複合体は P-buffer 処理で直径約 6nm の繊維が側面会合したシート状構造体を形成し、それは超速心で沈澱回収された。単繊維の形状は KCl-沈澱画分に見られるそれと良く似ており、KCl-沈澱画分の繊維はこの 100K-複合体が構成単位をなすと考えられる。しかし、精製 100K-複合体は、KCl-沈澱画分中のそれと次の点で異なっていた。即ち、精製 100K-複合体画分は 55K 蛋白質含量が少なく、G-buffer 中では 100K、90K、55K 蛋白質はほぼ解離しており、P-buffer 添加による重合速度が速く、重合体の繊維は単繊維として分離せず、殆どがシートをなし、そのシートは更に重なり合って粒状となっていた。

100K-複合体から分離した精製 100K 蛋白質はそれだけでは P-buffer 処理で丈夫な構造体を作り得ず、先に精製した 100K 蛋白質画分と同じ性質を示した。また、精製 90K 画分だけでも繊維構造を作らなかった。100K 蛋白質と 90K 蛋白質両画分を 2:1 に混合すると初めて P-buffer 処理で 100K-複合体と良く似た構造体が再構成された。しかしこの量比から外れると、構造体は不完全であった。従って 100K-複合体に見られる繊維シート状構造は、100K蛋白質と 90K 蛋白質の重合体と考えられる。

興味深いのは、100K:90K=2:1 の再構成混合物と 100K-複合体の重合性の違いで

ある。前者は後者から CL2B-100KC fraction を除去したものと基本的には同じであるが、その構造体は後者のそれと比べて不完全で、超遠心での回収率も低かった。この事は CL2B-100KC fraction が重合体の完成に必要な事を示唆している。この画分は蛋白質質量としては僅かであるが、55K 蛋白質が 100K、90K 蛋白質と共に挙動している。この画分は一定の構造を持った三者会合体で、重合の「核」として機能している可能性がある。55K 蛋白質が、真核細胞のアクチン繊維の末端結合因子、または切断因子として、100K-複合体の、重合核の形成と、重合体の大きさの調節とに関与していると考えられる事は魅力的である。精製 100K-複合体に比べて 55K 蛋白質含量の多い KCl-沈澱画分から再構成される繊維に短いものが目立ち、シートになりやすく、重合速度が遅い事などは、55K 蛋白質の 100K-複合体への重合阻害効果を示唆するとも考えられ、この想定と調和的である。しかし以上の事は、更に詳細な検討を要する。

#### 5. 従来報告されていた構造体成分及び構造体との関係

100K-複合体は、分子量を始めとする蛋白質の性質も、再構成される構造体もアクチンとは異なっている。筆者は本研究の過程で、従来報告(17)(18)に従って動物細胞のアクチンの性質を指標にして、アクチン類似の蛋白質を検索したが、検出できなかった。大腸菌にアクチンに相当する成分があってもその性質は動物細胞のそれとはかなり異なると推測される。また 100K-複合体蛋白質は、分子量からも構造体の性質も Elongation factor Tu (19)と異なる。大腸菌を始め多くの細菌に Spirosome (16)と呼ばれる螺旋状の蛋白質構造体が報告され、その成分蛋白質は、大腸菌では見かけの分子量 97,000 と報告されている(16)。しかしこの蛋白質は細胞内含量が少ないと報告されている上、構造体の形状や安定性は異なり、100K-複合体とは異なると考えられる。真核生物の微小管に類似した構造体である Rhapsosome(8)、Microtubule (9-13)とは重合体の形状が異なっている。但し、本研究の過程で直径約 200nm の動物細胞の微小管に類似した構造体を何度か検出しており、大腸菌に相当する構造体が実在する可能性がある。以上の通り、100K-複合体の作る繊維-シート状構造体は従来細菌細胞に報告されている細胞内構造体のどれとも異なり、新たに見いだされた構造体と考えられる。

## 6. 100K-複合体蛋白質の細胞内での存在様式

100K-複合体蛋白質は細胞質内ではその大部分が構造体を形成していると考えられる。この事は、Rod-spheroplast を Triton X-100 で溶菌させた時には 100K 蛋白質の大部分が超遠心で沈澱し、高分子量の会合体が維持されていると考えられるのに対し、通常の Spheroplast を同様に溶菌させると 100K 蛋白質の大部分は可溶化され、脱会合状態にあると考えられる事による。その構造体は、直径約 6nm の細い微小管状の繊維と、それが側面会合したシート状構造体と考えられる。精製 100K-複合体画分に KCl 添加で再構成されるシート状構造、無細胞抽出液に KCl 添加で再構成される繊維-シート状構造、Rod-spheroplast を破壊したとき放出される繊維は、それぞれその形状の類似性、及び 100K 抗体との交叉反応性から、同じ構造体と推定した。しかし更に詳細な検討が必要であろう。

100K 蛋白質は Spheroplast の破壊分画実験、その Proteinase K 処理実験から、細胞質膜上に細胞質側を向いて局在すると考えられた。また、細胞上では細胞の両極及び将来の分裂溝形成部分に濃集すると考えられた。従って 100K 蛋白質、または 100K-複合体は分裂溝周辺の細胞質膜上でこれを裏打ちする様に、繊維状またはシート状構造体を成して存在していると考えられる。細胞内の 100K 蛋白質量は外膜の主要蛋白質 OmpC/F の量に近く、細胞表面のかかなりの面積を被う事ができると考えられ、この推定は量的には問題ない。しかしその具体的な存在のあり方は明かではない。Rod-spheroplast に観察された繊維-シート状構造が細胞内に螺旋状に分布していた例と、蛍光抗体法の結果とが整合し得るかなどについては今後の課題である。

100K 蛋白質がペリプラズム中の Periseptal annuli の構成要素である可能性は、本研究で用いた方法のみによっては否定できない。しかし Ishidate らは、Periseptal annuli には 100K 蛋白質に相当する分子量を持つ蛋白質が含まれない事、その構造は Spheroplast を低イオン強度下で破壊しても維持される事を報告している(80)。100K 蛋白質は Spheroplast を低イオン強度下で破壊すると速やかに Protease 感受性になるので、強固な構造体の中に巻き込まれた局在様式を取らず、細胞質側に露出していると考えべきであろう。

## 7. envA 変異株と 100K-複合体の過剰生産

envA1 変異株の D22 株及びこの変異を JE1011 株に形質導入した JEE1009 株は、100K、90K、55K、45K 蛋白質を特異的に過剰生産していた。バクテリオファージ Plkc による形質導入実験から、この過剰生産は envA1 変異と連関していると考えられた。この事は、envA 遺伝子をクローニングしたプラスミド、pST103 が envA1 変異株 JEE1009 の過剰生産を抑制する事から確かめられた。このプラスミドは更に envA 株の JEE1002 株の 100K、90K、55K 各蛋白質の生産を抑制した。45K 蛋白質は量が少ない上、増幅倍率も小さいので、個々の実験での変化は判断しないが、他の蛋白質と同じ挙動をすると考えられる。これらの蛋白質は何れも envA 遺伝子産物 (34K) (73) とは異なった見かけの分子量を持ち、異なった遺伝子の産物と考えられる。従って envA 遺伝子産物はこれらの蛋白質の生産を抑制的に調節しており、envA1 変異はその抑制機能を失った変異で、これらの蛋白質の過剰生産を惹起していると考えられた。JEE1009 株の過剰生産がプラスミド pST103 で完全には回復しないのは、envA1 遺伝子産物の共存による阻害のためと解釈される。100K 他の蛋白質の過剰生産が envA1 変異に伴う二次的な抑制変異である事は、形質導入の頻度から見て、考えられない。

envA1 変異株の解析からは、100K、90K、55K、45K 蛋白質の機能が示唆される。即ち、envA 遺伝子を含むプラスミド pST103 は JEE1002 株、JEE1009 株を問わず、これらの蛋白質の生産を抑制すると同時に、細胞の生育と細胞質分裂を抑制し、著しく伸長した細胞を生じた。この事はこれらの蛋白質が細胞質分裂の過程に深く関わっている事を示唆している。100K、90K 蛋白質には機能性構造体成分の、55K 蛋白質にはその調節成分の性格が推定され、100K 蛋白質は細胞の両極及び分裂溝付近に局在性する事を考え併せると、これらの蛋白質は分裂溝周辺に構造体を作って細胞質分裂過程を、推進するか、または支持する機能を持つと推測する事ができる。45K 蛋白質は細胞質膜蛋白質で、KCl 存在下に 100K-複合体と結合すると言う予備実験データが得られており、100K-複合体の細胞質膜への結合に関与すると考えている。

envA 遺伝子は大腸菌の生育に必須である事が報告されており (73)(78)、その過剰生産も生育を阻害した (G 節)。envA1 変異株の形質の一つに疎水性薬剤の透過性増大があり、もう一つの連鎖状菌体形成は、細胞の生育速度の速い場合に限って見られる事から、細胞質分裂活性の相対的な低下と解釈できる。従って env

A 遺伝子は大腸菌の表層構造の構築と細胞質分裂機構の「足場」として機能していると考えられる。上の段落に述べた推測は envA 遺伝子の機能として考えられている内容と矛盾しない。しかし以上の内容は作業仮説の段階にある。細胞表層形成や細胞質分裂の過程の生化学的理解のためには、先ずそれらに関与する成分を拾い出し、次いでそれらの機能を生化学的、分子生物学的、形態学的に解析する事が重要であろう。

## 8. まとめ

大腸菌細胞に、細胞内イオン環境類似の緩衝液中で維持される繊維シート状構造体が見いだされ、細胞内構造蛋白質と考えられた。大腸菌の低イオン強度下で可溶性の蛋白質中には、同じ緩衝液中で同様の繊維シート状構造を再構成する成分があり、その成分の候補として 100K 蛋白質並びに関連蛋白質を検出する事に成功した。100K 蛋白質は 90K 蛋白質と共に生理的イオン組成並びに強度下で重合し、直径約 6nm の繊維またはそれが側面会合したシート状構造体を形成した。55K 蛋白質は重合の核形成、重合阻害、側面会合阻害などの活性を持つと推定された。これらの蛋白質（100K-複合体）は細胞内では直径約 6nm の細い微小管様、または 2 本の繊維の並行会合体様の、繊維及びそれらが側面会合したシート状構造体を成し、細胞質側から細胞質膜に結合していると考えられる。その細胞質膜へのリガンドは 45K 蛋白質ではないかと思われる。100K 蛋白質を含む構造体は細胞上両極と分裂溝陥入予定部に濃集し、ここに局在すると考えられた。100K、90K、55K、45K の各蛋白質は envA 遺伝子に抑制的に制御され、envA 遺伝子の増幅株の性質から、この蛋白質が細胞質分裂過程に関与するか、またはその過程で細胞表面の支持に当たる性格を持つ事が示唆された。

（一）  
（二）  
（三）

#### 第四章

#### 総合討論

（一）  
（二）  
（三）  
（四）  
（五）  
（六）  
（七）  
（八）  
（九）  
（十）  
（十一）  
（十二）  
（十三）  
（十四）  
（十五）  
（十六）  
（十七）  
（十八）  
（十九）  
（二十）  
（二十一）  
（二十二）  
（二十三）  
（二十四）  
（二十五）  
（二十六）  
（二十七）  
（二十八）  
（二十九）  
（三十）  
（三十一）  
（三十二）  
（三十三）  
（三十四）  
（三十五）  
（三十六）  
（三十七）  
（三十八）  
（三十九）  
（四十）  
（四十一）  
（四十二）  
（四十三）  
（四十四）  
（四十五）  
（四十六）  
（四十七）  
（四十八）  
（四十九）  
（五十）  
（五十一）  
（五十二）  
（五十三）  
（五十四）  
（五十五）  
（五十六）  
（五十七）  
（五十八）  
（五十九）  
（六十）  
（六十一）  
（六十二）  
（六十三）  
（六十四）  
（六十五）  
（六十六）  
（六十七）  
（六十八）  
（六十九）  
（七十）  
（七十一）  
（七十二）  
（七十三）  
（七十四）  
（七十五）  
（七十六）  
（七十七）  
（七十八）  
（七十九）  
（八十）  
（八十一）  
（八十二）  
（八十三）  
（八十四）  
（八十五）  
（八十六）  
（八十七）  
（八十八）  
（八十九）  
（九十）  
（九十一）  
（九十二）  
（九十三）  
（九十四）  
（九十五）  
（九十六）  
（九十七）  
（九十八）  
（九十九）  
（一百）



1. ペプチドグリカン合成とサキュルス形成

本研究で、筆者は大腸菌のペニシリン結合蛋白質 1 A (PBP1A) を精製し、これが架橋ペプチドグリカン合成酵素である事を明らかにし、その酵素活性が多量体形成に依存したアロステリックな性質を持つ事を示唆し、その活性の発現や制御機構の研究への方向を示唆した。しかし PBP1A はリビド中間体から *de novo* に、特殊なムロペプチド組成を持つ可溶性の架橋ペプチドグリカン断片を合成する反応を特異的に示し、基存のペプチドグリカンをリガンドとしてペプチドグリカン断片を挿入する反応を示さなかった。そこで、PBP1A は「初生架橋ペプチドグリカン合成酵素」と言うべき性格の酵素と考えられた。

PBP1A のペプチドグリカン合成酵素としての基本的性質は PBP1B (57) と共通しており、遺伝学的(44)(45)及び薬理学的研究結果(37)を考え合わせれば、両者は共に大腸菌の主要ペプチドグリカン合成酵素として相補い合ってサキュルス形成に機能していると考えられる。従って、PBP1A のペプチドグリカン合成系は、前後に別の反応系の関与を受けてサキュルスに構築されると想像される。興味深い事に、PBP1B の反応産物の架橋ペプチドグリカンは、細胞壁ペプチドグリカンには含まれない異常な架橋ムロペプチドを主成分として含み(57)、サキュルス構築には別な反応系が関与する事を示唆していた。

従来の研究から、サキュルス形成過程に於て新生ペプチドグリカンは可溶性中間体を經由せず(81)、サキュルス上の、ブラウンのリボ蛋白質を結合した低架橋度の画分として出現する事(82)、その画分はペプチドグリカン分解酵素の働きで容易に分離され、可溶性ペプチドグリカン断片を生ずる事(82)が報告されている。また、ムロペプチド組成から、その過程の初期に特殊なムロペプチドが一時的に出現して速やかに消失し(25)(83)、続いて幾つかのムロペプチドの量に一過性的変動があり、架橋の組替えが起こる事が報告されている(84)。これらの報告をまとめると、細胞壁ペプチドグリカンは、新生ペプチドグリカン断片(既にリボ蛋白質を結合)が特殊な結合(ペプチドグリカン分解酵素に特に感受性)を介してサキュルスに結合した状態を経て、架橋の組替えを受けて完成すると解釈する事が可能である。この解釈は本研究から得られる推定と調和する。

以上の一致に基づき、大腸菌の細胞壁ペプチドグリカン合成反応は次の段階を経て完了する複合反応と考えられるであろう。即ち、1. 開始反応（細胞壁ペプチドグリカン上のリガンド形成反応）、2. リガンド依存性の初生ペプチドグリカン断片合成・リポ蛋白質等の結合、3. サキュルスへの組込（架橋組替とトリミング）である。PBP1A、1B の関与するペプチドグリカン合成は 2. 段階で、サキュルス形成の素材供与の性格の強い過程と思われる。1. 段階の具体的反応は明かではない。 $A_2pm-A_2pm$  架橋形成反応(85)、D-アミノ酸のペプチドグリカンへの取り込み反応(86)(87)(88)を候補として挙げる事ができよう。後者はペニシリン非感受性で、 $A_2pm$  をペプチドグリカンに取り込む反応の錯誤反応と思われる(88)。また、DD-Endopeptidase (51)など内在性ペプチドグリカン分解酵素はこの段階に作用している可能性がある。3. 段階の反応は架橋ペプチドグリカン合成と区別される反応で(84) PBP4 などが触媒していると思われる。更にこの後にペプチドグリカンの分解と代謝回転の反応がある。ペプチドグリカン分解酵素の多くはここに関与し、一定の生理機能を果たすと考えられる。例えば筆者は N-acetylmuramyl-D-alanine amidase の変異株を分離し(89)、その株が Cefalexin 寛容性となっている事を報告している(90)。以上の仮説的機構は反応の種類とその順序を指摘するに過ぎず、その間には多くの反応が介在すると考えられ、また、野生型の大腸菌では PBP1Aを主要素とする系と PBP1Bを主要素とする系が並存し、反応系が複雑になっていると思われる。それにも関わらずこの仮説には符合する事実が多く、その蓋然性は高いと思われる。

従来 PBP1A、PBP1B は夫々相補い合って細胞の伸長成長に、PBP2 は伸長開始に、PBP3 は隔壁形成に関与すると考えられてきた(29)。しかし近年 PBP1B が隔壁形成にも関与する事が示唆された(91)。PBP1A は PBP1B の欠損をほぼ完全に補償するので、PBP1A も隔壁（分裂溝陥入部）のペプチドグリカン合成に関与すると解釈できる。両者がサキュルスの素材のペプチドグリカンを供給する酵素ならば、細胞周期全般で機能するのは自然である。一方、松橋らは PBP1A と PBP2、PBP1B と PBP3 が協同している可能性を強調してきたが、近年、PBP1A は PBP2 と共に細胞壁形成に機能する事が示唆され(91)、両者は一つの系を成す可能性が示唆された。Ishino らとの共同研究で筆者は PBP2 が RodA 蛋白質と共に機能してペプチドグリカン合成を行う事を示した(92)。PBP2 は精製すると活性を失い、架橋

を阻害しても不溶性のペプチドグリカンを合成したが、この事は PBP2 が上の仮説の「開始反応」に関与する可能性を示唆し、興味深い。

サキュルス構築機構について現在明らかになっている事は、ペプチドグリカン合成酵素と関連する要素の幾つかであり、サキュルス構築に関与する反応、そこでの各要素の機能、相互作用、制御、その他の関連要素などの多くは明かではない。従って具体的にどの様な場の中でサキュルスと言う立体的な構造体が構築されるのかは概観できない。関連する要素と反応の枚挙と解析が必要である。筆者は大腸菌の細胞質膜上に裏打ち構造体の存在を指摘したが、その構造体はサキュルス構築の際に、支持体として、または組織化要素として機能し得るものである。

## 2. 細胞骨格様構造体の存在と機能

本研究で筆者は大腸菌には細胞質内イオン環境で維持され、細胞構造の変化や維持に関わる構造体の存在を推定した。その中には、機能的には、細胞質膜の支持に関与するもの、収縮性の変化に関与するものなどが推定され、構造的には、繊維、微小管、帯状構造などが見いだされた。従って、細菌細胞にも複数種類の細胞内構造体があり、その構造は細胞質内のイオン環境（主に  $K^+$  イオンの存在）下で維持され、細胞骨格的な機能を果たしていると想像された。従来、細菌細胞には電子顕微鏡下に細胞内構造体が認められず、これがサキュルス機能仮説の根拠の一つとなっていた。しかし検出例は少ないが、既に数種の細菌細胞に繊維や微小管構造が知られており(9-13)、細菌細胞には細胞内構造体が存在し、機能しているが、その検出が難しいと考えるべきであった。近年、急速凍結置換法の普及により電子顕微鏡下でのオルガネラの検出が著しく改善し、従来の固定、染色法が微細構造を損なっていた事が明らかに成りつつある。改めて細菌細胞を検索すれば細胞内構造体が検出される可能性がある。

Rod-spheroplast の解析から、大腸菌細胞内に細胞質膜を抑える構造と収縮性の構造が示唆された事は興味深い。前者は通常のスフェロプラストでは機能せず、細胞質内の環境、具体的には高濃度の  $K^+$  イオンが存在する事で安定化されると思われ、その支持力はサキュルスよりはるかに小さいであろう。収縮性の構造は、Rod-spheroplast が高頻度（約一割）に湾曲して環状となる事から推定され、細胞の長軸に沿って、細胞質膜と結合していると考えられる。また、図 3-1 には、

Rod-spheroplast が分裂溝を維持している様子が示されており、収縮環様の構造の存在も推定される。遺伝子の上から大腸菌の核酸の分配に関わる構造要素が既に示唆されており、細菌細胞でもその細胞周期には多様な機能性構造体が機能していると考えらるべきであろう。

細胞の構造変化に関与する機能性構造体を検索する上では、収縮性のもの、微小管構造などが興味深い。今までの処、検出方法が確定していない。そこで本研究では細胞内構造体形成蛋白質に期待される性質を仮定し、その仮定を満たす蛋白質成分の中から、高い再現性で構造体を作る成分を検索し、これを候補者としてその性格を検討する事とした。従って、本研究の検索の範囲には限界があり、見いだした構造体成分はその範囲に入った一例であり、他に性格を異にする構造体成分があると考えらるべきである。本研究で用いた検索基準では支持的構造蛋白質が主に選択され、活性な機能性構造体をむしろ排除した可能性がある。

検索の結果見いだした 100K、90K 蛋白質 (100K-複合体) は細胞内では繊維シート状構造体を形成し、細胞質膜に内側から結合していると考えられた。55K 蛋白質はその重合性を制御し、45K 蛋白質が細胞質膜へのリガンドである可能性がある。しかしそれらの蛋白質には ATPase 活性は認められず、また、これと特異的に反応すると思われる Mechanochemical enzyme も見いだされなかった。従って今の処 100K-複合体は細胞質膜の特定部分を裏打ちし、細胞質膜を抑える機能を持つ、支持的構造蛋白質と考えている。しかし、その局在性、それらの蛋白質の減少が細胞質分裂を阻害すると見られる事 (envA 遺伝子増幅株の性質) は、100K-複合体が細胞骨格様機能性構造体として細胞質分裂過程に機能している事を示唆する。Mechanochemical enzymes は触媒であり、量的には少ないと考えられるので、見落としている可能性がある。100K-複合体が機能性構造体の構成成分として動的な機能を持つ可能性については今後の検討の余地がある。局在カ所とそこでの繊維の配向性を明らかにする事は特に重要である。100K 蛋白質の局在性は、Periseptal annuli に近いが、その構成要素とは思われない。

構造維持的であれ動的であれ、機械的支持力を持つ細胞内構造体の意義は重要である。高等植物細胞では、細胞質膜上に微小管が一定方向に配向することがセルロース繊維の配向性を決め、細胞の伸長方向を決める事が報告(93)され、組織化の維持が結果的に動的変化をもたらしている。大腸菌では伸長成長期には細胞

全面に分布していたペプチドグリカン合成活性の 60% が、分裂溝の陥入が始まると分裂溝の両側に局在（おそらく移動）する事が報告されている。局在性変化を伴う細胞内組織化機構には移動と支持の両方の機構が必要である。

本研究で用いた検索方法は、構造体形成蛋白質のあるべき性格の仮定に立っている。その仮定は真核細胞の細胞骨格系蛋白質の例から見て不自然ではなく、またその性質を局在性と変異株に渡って検討した。しかし 100K-複合体蛋白質の構造蛋白質としての性格がアーティファクトで、その本態については疑問とする余地はある。これらの蛋白質の遺伝子の検出、解析、変異株の作製とその解析などの研究が更に必要である。

### 3. 細胞表層構造体形成システムについての試論

大腸菌の細胞壁ペプチドグリカンの糖鎖の配向は細胞の長軸にほぼ直交する事が報告されている。糖鎖は主鎖方向の引張り強度が大きく、伸びにくいのに対し、ペプチド鎖は螺旋構造を取り、引張りに対して余裕がある。従って、ペプチドグリカンの糖鎖はタガの様に細胞を抑制し、膨圧をペプチド鎖の伸長へ逸す事で細胞を異方的に抑制し、細胞の伸長成長と桿菌形態の形成をもたらすと思われる。従って、糖鎖の配向決定が、正常な成長、分裂、形態の決定、維持に重要であると考えられ、糖鎖配向決定を含むサキュルス構築過程が細胞の形態形成や維持を行うと考えられる。この糖鎖配向に、細胞内の繊維状構造体が関与すると考える事は合理的である。即ち、サキュルス構築系は細胞質膜上（細胞質側）の繊維状構造体と相互作用してペプチドグリカンを沈着させていくと考える訳である。この機構は、高等植物細胞の成長機構のモデルに依っているが、植物細胞では糖鎖配向決定に微小管が機能している事が知られている(93)。

サキュルス構築過程に異常を来した場合、サキュルスは規則的な糖鎖配列がとれず、細胞表面の異方的抑制機構が崩壊する結果、細胞は破裂するか球形になるであろう。Spheroplast-type L-form 細胞の存在はこの推定と調和する。興味深い事は、大腸菌には球状の形態を持つ変異株が、二重変異株を含めて、幾つか報告されている一方、Spheroplast-type L-form 細胞が見いだされていない事である。Martin は大腸菌の球形変異株と Spheroplast-type L-form 細胞とが強い類似性を持つ事を指摘した（私信）。大腸菌は、3.段階の架橋組替（二次的架橋形

成) 活性が強いため、初生ペプチドグリカンが未組織のまま架橋して、膨圧に従った形態のサキュルスを生じるのであろう。すると球形変異株にはサキュルス構築過程の変異株が含まれている筈である。PBP2 の変異株、lpp ompA 二重変異株(94)などが球形になる事は興味深い。

しかし、球形変異株自身、及び L-form 細胞から明かな通り、以上の過程は核の分離分配機構、細胞質分裂機構とは異なった機構であり、形態の形成、維持機構と考えるべきである。以上の考え方は作業仮説と言うべきものであり、その当否は今後の検討に待つべきものである。

引用文献

- 1 MacAlister, T.J., MacDonald, B. and Rothfield, L.I. (1983), The periseptal annulus: an organelle associated with cell division in Gram-negative bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 1372-1376
- 2 Martin, H.H. (1983), Protoplasts and spheroplasts of gram-negative bacteria (With special emphasis on *Proteus mirabilis*). Protoplasts 1983 (Lecture proceedings)(eds. Potrykus, I., Harms, C.T., Hinnen, A., Hutter R., King, P.J. and Shillito, R.D.), Experimentia Supplementum, 46, pp213-2250
- 3 Lederberg, J. and St.Clair, J. (1958), Protoplasts and L-type growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 75, 143-160
- 4 Razin, S. (1978), The Mycoplasmas. Microbiol. Rev. 42, 414-470
- 5 Hiraga, S., Ogura, T., Niki, H., Ichinose, C. and Mori, H. (1990), Positioning of replicated chromosome in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172, 31-39.
- 6 Sargent, M.G. (1974), Nuclear segregation in *Bacillus subtilis*. Nature, 250, 252-254.
- 7 White, D., Dworkin, M. and Tipper, D.J. (1968), Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: Structure and relation to morphogenesis. J. Bacteriol. 95, 2186-2197
- 8 Yamamoto, T. (1967), Presence of Rhabidosomes in various species of bacteria and their morphological characteristics. J. Bacteriol., 94 1746-1756
- 9 Pope, L.M. and Jurtshuk, P. (1967), Microtubule in *Azotobacter venelandii* strain O. J. Bacteriol., 94, 2062-2064
- 10 van Iterson, W., Hoeninge, J.F.M. and Nijman van Zanten, E. (1967) A "Microtubule" in a bacterium. J. Cell Biol., 32, 1-10
- 11 Margulis, L., To, L. and Chase, D. (1978), Microtubules in prokaryotes. Science, 200, 1118-1124
- 12 Eda, T., Kanda, Y. and Kimura, S. (1976), Membrane structures in stable L-forms of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 127, 1564-1567
- 13 Eda, T., Kanda, Y., Mori, C. and Kimura, S. (1977), Microtubular structures in a stable Staphylococcal L-form. J. Bacteriol., 132, 1024-1026
- 14 Burchard, A.C., Burchard, R.P. and Kloetzel, J.A. (1977), Intracellular, periodic structures in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 132, 666-672
- 15 Lünsdorf, H. and Reichenbach, H. (1989), Ultrastructural Details of the apparatus of gliding motility of *Myxococcus fulvus*. J. Gen. Microbiol., 135, 1633-1641
- 16 Kawta, T., Masuda, K. and Ueki, Y. (1979), Presence of spiroosomes in *Escherichia coli*. Microbiol. Immunol. 23, 555-558
- 17 Minkoff, L. and Damadian, R. (1976), Actin-like proteins from *Escherichia coli*: concept of cytotonus as the missing link between

- cell metabolism and the biological ion-exchange resin. *J. Bacteriol.*, 125 353-365
- 18 Nakamura, K. and Watanabe, S. (1978), Myosin-like protein and actin-like protein from *Escherichia coli* K12 C600. *J. Biochem.* 83, 1459-1470
  - 19 Beck, B.D., Arscott, P.G. and Jacobson, A. (1978), Novel properties of bacterial elongation factor Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 1250-1254
  - 20 仁木宏典、アリン・ジャフエ、今村 龍、小椋 光、平賀壯太 (1990), 大腸菌における染色体分配: mukB 遺伝子とその産物. 日本分子生物学会第 13 会年会 (京都) 講演要旨集 pp158
  - 21 清水博喜、村山信浩、三木健良、堀内忠郎 (1990), 大腸菌に於ける DNA 分配・細胞分裂開始の調節. 日本分子生物学会第 13 会年会 (京都) 講演要旨集 pp158
  - 22 Casaregola, S., Norris, V., Goldberg, M. and Holland, I.B. (1990), Identification of a 180kD protein in *Escherichia coli* related to a yeast heavy-chain myosin. *Mol. Microbiol.* 4, 505-511
  - 23 Weidel, W. and Pelzer H. (1964), Bag shaped macromolecule. *Adv. in Enzymol.* 26, 193-232
  - 24 Schleifer, K.H. and Kandler, O. (1972), Peptidoglycan types of bacterial cell wall and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36, 407-477
  - 25 Glauner, B. and Schwarz, U. (1983), The analysis of murein composition with high-pressure-liquid chromatography. In: *The Target of Penicillin*, (ed. by Hakenbeck, R., Höltje, J.-V. and Labischinski, H.), Walter de Gruyter and Co., Berlin, New-York, pp29-34
  - 26 Labischinski, H., Barnickel, G., Bradaczek, H. and Giesbrecht. (1979), On the secondary and tertiary structure of murein. *Eur. J. Biochem.* 95, 147-155
  - 27 Lugtenberg, B., and van Alphen, L. (1983), Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 737, 51-115
  - 28 Verwer, R.W.H., Beachey, E.M., Keck, W., Stoub, A.M. and Polederman s, J.E. (1980), Oriented fragmentation of *Escherichia coli* sacculi by sonication. *J. Bacteriol.* 141, 327-332
  - 29 Matsuhashi, M., Nakagawa, J., Tamaki, S., Ishino, F., Tomioka, S. and Park, W. (1983), Biosynthesis of murein (peptidoglycan). In: *The Target of Penicillin*, (ed. by Hakenbeck, R., Höltje, J.-V. and Labischinski, H.), Walter de Gruyter and Co., Berlin, New-York, pp499-504
  - 30 Wientjes, F.R. and Nanninga, N. (1989), Rate and topography of peptidoglycan synthesis during cell ldivision in *Escherichia coli*: Concept of leading edge. *J. Bacteriol.* 171, 3412-3419
  - 31 Doyle, R.J., Chaloupka, J. and Vinter, V. (1988), Turnover of cell walls in Microorganisms. *Microbiol. Rev.* 52, 554-567



- 32 廣田幸敬 (1974), 細菌の分裂機能の解析 I. 科学 44, 694-700
- 33 Koch, A.L. (1984), Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells through osmotic challenge. *J. Bacteriol* 159, 914-924
- 34 Mitchell, P. and Moyle, J. (1956), Osmotic function and structure of bacteria. *Symp. Soc. Gen. Microbiol* 6, 150-180
- 35 Koch, A.L. (1990), The surface stress theory for the case of *Escherichia coli*: The paradox of Gram-negative growth. *Research in Microbiology* 141, Cell shape and division in *Escherichia coli*. 4th Forum in Microbiology. pp119-130
- 36 Izaki, K., Matsushashi, M. and Strominger, J. (1968), Biosynthesis of peptidoglycan of bacterial cell walls XIII. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243 3180-3192
- 37 Spratt, B.G. and Pardee, A.B. (1975), Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* 254, 516-517
- 38 Matsushashi, M., Tamaki, S., Nakagawa, J., Ishino, F., Doi, M., Nakajima-Iijima, S., Matsuzawa, H., Nikaido, T. and Tomioka, S. (1980), Functional biosynthesis of the cell wall peptidoglycan in *Escherichia coli* and mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. In: *Beta-lactam Antibiotics-Drug Action and Bacterial Resistance*. (ed. by Mitsushashi, S.), Japan Scientific Society Press, Tokyo.
- 39 Nakagawa, J., Tamaki, S. and Matsushashi, M. (1979), Purified penicillin-binding protein 1Bs from *Escherichia coli* membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 43, 1379-1380
- 40 Ishino, F., Mitsui, K., Tamaki, S. and Matsushashi, M. (1980), Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 287-293
- 41 Ishino, F., Tamaki, S., Spratt, B.G. and Matsushashi, M. (1982), A mecillinam-sensitive peptidoglycan crosslinking reaction in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 689-696
- 42 Ishino, F. and Matsushashi, M. (1981), Peptidoglycan synthetic activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: A septum-forming reaction sequece. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 905-911
- 43 Broome-Smith, J.K., Edelman, A., Yousif, S. and Spratt, B.G. (1985) The nucleotide sequences of the *ponA* and *ponB* genes encoding penicillin-binding proteins 1A and 1B of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* 147, 437-446
- 44 Tamaki, S., Nakajima, S. and Matsushashi, M. (1977), Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein 1Bs and in enzyme activity for peptidogly-

- can synthesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5472-5476
- 45 Suzuki, H., Nishimura, Y. and Hirota, Y. (1978), On the process of cellular division in Escherichia coli: a series of mutants of E. coli altered in the penicillin-binding proteins. Prot. Natl. Acad. Sci. 75, 664-668
- 46 Clarke, L. and Carbon, J. (1976), A colony bank containing synthetic col E1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. Cell 9, 91-99
- 47 Lennox, E.S. (1955), Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology 1, 190-206
- 48 Nakagawa, J. and Matsubashi, M. (1982), Molecular divergence of a major peptidoglycan synthetase with transglycosylase-transpeptidase activities in Escherichia coli---penicillin-binding protein 1Bs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 1546-1553
- 49 Katz, W., Matsubashi, M., Dietrich, C.P. and Strominger, J.L. (1967) Biosynthesis of peptidoglycan of bacterial cell wall. IV. Incorporation of glycine in Micrococcus lysodeikticus. J. Biol. Chem. 242, 3207-3217
- 50 Weidel, W., Frank, H. and Leutgeb, W. (1963), Autolytic enzymes as a source of error in the preparation and study of Gram-negative cell wall. J. Gen. Microbiol. 30, 127-130
- 51 Tomioka, S. and Matsubashi, M. (1978), Purification of penicillin-insensitive DD-endopeptidase, a new cell wall peptidoglycan-hydrolyzing enzyme in Escherichia coli, and its inhibition by Deoxyribonucleic acids. (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 978-984
- 52 Höltje, J.-V., Mirelman, D., Sharon, N. and Schwarz, U. (1975), Novel type of murein transglycosylase in Escherichia coli. J. Bacteriol. 124, 1067-1076
- 53 Tomioka, S., Ishino, F., Tamaki, S. and Matsubashi. (1982), Formation of hyper-crosslinked peptidoglycan with multiple crosslinkages by a penicillin-binding protein, 1A, of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 1175-1182
- 54 Schindler, M., Mirelman, D. and Schwarz, U. (1976) Quantitative determination of N-acetylglucosamine residue at the non-reducing ends of peptidoglycan chains by enzymic attachment of [<sup>14</sup>C]-D-Galactose. Eur. J. Biochem. 71, 131-134
- 55 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon J. (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Prot. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354
- 56 Wang, C-S. and Smith, R. (1975), Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100. Analyt. Biochem. 63, 414-417
- 57 Nakagawa, J., Tamaki, S., Tomioka, S. and Matsubashi, M. (1984), Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. J. Biol. Chem. 259, 13937-13946

- 58 Matsubashi, M., Tamaki, S., Nakajima, S., Nakagawa, J., Tomioka, S. and Takagaki, Y. (1979), Properties and functions of penicillin-binding proteins and related enzymes in *Escherichia coli*. In: *Microbial Drug Resistance Vol2* (ed. by Mitsuhashi, S.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp389-404
- 59 Braun, V., Gnirke, H., Henning, U. and Rehn, K. (1973), Model for the structure of the shape-maintaining layer of the *Escherichia coli* cell envelope. *J. Bacteriol.* 114, 1264-1270
- 60 Pollock, J.J., Nguyen-Disteche, M., Ghuysen, J.-M., Coyette, J., Linder, R., Salton M.R.J., Kim, K.S., Perkins, H.R. and Reynolds, P. (1974), Fractionation of the DD-carboxypeptidase-transpeptidase activities solubilized from membranes of *Escherichia coli* K12, strain 44. *Eur. J. Biochem.* 41, 439-446
- 61 Tomioka, S., Ishino, F. and Matsubashi, M. Enzymatic synthesis of peptidoglycan-crossbridges in *E. coli*. (1983) In: *The Target of Penicillin*. (ed. by Hakenbeck, R., Höltje, J.-V. and Labischinski, H.), Walter de Gruyter and Co., Berlin, New-York, pp505-510
- 62 須藤 敦、大腸菌の細胞分裂に関する遺伝・生化学的研究。第一章。(1984) 東京大学大学院農学系研究科。修士論文
- 63 Stossel, T.P. (1989), From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. *J. Biol. Chem.* 264, 18261-18264
- 64 Schultz, S.G. and Solomon, A.K. (1961), Cation transport in *Escherichia coli*. I. Intracellular Na and K concentration and net cation movement. *J. Gen. Physiol.* 45, 355-369
- 65 Schultz, S.G., Wilson, N.L. and Epstein, W. (1962), Cation transport in *Escherichia coli*. II. Intracellular chloride concentration. *J. Gen. Physiol.* 46, 159-166
- 66 Kung, F.-C., Raymond, J. and Glaser, D.A. (1976) Metal ion content of *Escherichia coli* versus cell age. *J. Bacteriol.* 126, 1089-1095
- 67 Chang, C-F., Shuman, H. and Somlyo, A.P. (1986), Electron probe analysis, X-ray mapping, and electron energy-loss spectroscopy of calcium, magnesium, and monovalent ions in log-phase and in dividing *Escherichia coli* B cells. *J. Bacteriol.* 167, 935-939
- 68 Gangola, P. and Rosen, B.P. (1987), Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262, 12570-12574
- 69 Padan, E., Zilberstein, D. and Rottenberg, H. (1976), The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells. *Eur. J. Biochem.* 63, 533-541
- 70 Slonczewsky, J.L., Rosen, B.P., Alger, J.R. and Macnab, R.M. (1981) pH homeostasis in *Escherichia coli*: Measurement by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance of methylphosphate and phosphate. *Prot. Natl. Acad. Sci.* 78, 6271-6275
- 71 Laemmli, U.K. and Favre, M. (1973), Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packing events. *J. Mol. Biol.* 80, 575-599
- 72 Stoker, N.G., Fairweather, N.F. and Spratt, B.G. (1982), Versatile

- low-copy-number plasmid vectors for cloning in Escherichia coli. Gene 18, 335-341
- 73 Beall, B. and Lutkenhaus, J. (1987), Sequence analysis, transcriptional organization, and insertional mutagenesis of the envA gene of Escherichia coli. J. Bacteriol. 169, 5408-5415
  - 74 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989), Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  - 75 Kopecky, A.L., Copeland, D.P. and Lusk, J.E. (1975), Viability of Escherichia coli treated with colicin K. Prot. Natl. Acad. Sci. 72, 4631-4634
  - 76 Eshdat, Y., Silverblatt, F.J. and Sharon, N. (1981), Dissociation and reassembly of Escherichia coli type 1 pili. J. Bacteriol. 148, 308-314
  - 77 Normark, S. (1970), Genetics of chain-forming mutant of Escherichia coli. Genet. Res. 16, 63-78
  - 78 Sullivan, N.F. and Donachie W. (1984), Transcriptional organization within an Escherichia coli cell division gene cluster: Direction of transcription of the cell separation gene envA. J. Bacteriol. 160, 724-732
  - 79 Holt, S.C. (1978) Anatomy and chemistry of Spirochetes. Microbiol. Rev. 42, 114-160
  - 80 Ishidate, K., Creeger, E.S., Zrike, J., Deb, S., Glauner, B., MacAlister, T.J. and Rothfield, L.I. (1986), Isolation of differentiated membrane domains from Escherichia coli and Salmonella typhimurium, including a fraction containing attachment sites between the inner and outer membranes and the murein skeleton of the cell envelope. J. Biol. Chem. 261, 428-443
  - 81 Cooper, S. (1989), The constraint hoop: an explanation of the overshoot in cell length during shift-up of Escherichia coli. J. Bacteriol. 171, 5239-5243
  - 82 Mett, H., Bracha, R. and Mirelman, D. (1980), Soluble nascent peptidoglycan in growing Escherichia coli cells. J. Biol. Chem. 255, 9884-9890
  - 83 Kraus, W., Glauner, B. and Hölting, J.-V. (1983), New insights in the process of in vitro murein synthesis in E. coli revealed by murein-analysis with high-pressure-liquid-chromatography. In: The Target of Penicillin, (ed. by Hakenbeck, R., Hölting, J.-V. and Labischinski, H.), Walter de Gruyter and Co., Berlin, New-York, pp511-516
  - 84 de Pedro, M.A. and Schwarz, U. Heterogeneity of newly inserted and preexisting murein in the sacculus of Escherichia coli. Prot. Natl. Acad. Sci. 78, 5856-5860
  - 85 Glauner, B., Hölting, J.-V. and Schwarz, U. (1988), The composition of the murein of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 263, 10088-10095
  - 86 Lark, C. and Lark, K.G. (1959), The effects of D-amino acids on

- Alcaligenes fecalis*. Can. J. Microbiol. 5, 369-379
- 87 Lark, C., Bradley, D. and Lark, K.G. (1963) Further studies on the incorporation of D-methionine into the bacterial cell wall - its incorporation into the R-layer and the structural consequences. Biochim. Biophys. Acta 78, 278-288
- 88 Tsuruoka, T., Tamura, A., Matsuhashi, Y., Takei, T., Inouye, S., Tomioka, S. and Matsuhashi, M. (1985), Binding of D-methionine to peptidoglycan in the presence of inhibitors of cell wall synthesis in *Escherichia coli*. Agric. Biol. Chem. 49, 2489-2490
- 89 Tomioka, S., Nikaïdo, T., Miyakawa, T and Matsuhashi, M. (1983), Mutation of the N-acetylmuramyl-L-Alanine amidase gene of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 156, 463-465
- 90 Nikaïdo, T., Tomioka, S. and Matsuhashi, M. (1979), Mutation of *Escherichia coli* tolerant to the lysis induced by cephalixin. Agric. Biol. Chem. 43, 2639-2640
- 91 del Portillo, F.G. and de Pedro, M.A. (1990), Differential effect of mutational impairment of penicillin-binding proteins 1A and 1B on *Escherichia coli* strain harboring thermosensitive mutations in the cell division genes *ftsA*, *ftsQ*, *ftsZ*, and *pppB*. J. Bacteriol. 172, 5863-5870
- 92 Ishino, F., Park, W., Tomioka, S., Tamaki, S., Takase, I., Kunugita K., Matsuzawa, H., Asoh, S., Ohta, T., Spratt, B.G. and Matsuhashi, M. (1986), Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein. J. Biol. Chem. 261, 7024-7031
- 93 Hensel, W. (1984), A role of microtubules in the polarity of statocytes from roots of *Lepidium sativum* L. Planta 162, 404-414
- 94 Sonntag, I., Schwarz, H., Hirota, Y. and Henning, U. (1978), Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: Multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. J. Bacteriol. 136, 280-285

## 謝辞

本研究は、東京大学応用微生物研究所第一研究部に於て成されたものである。本研究を行うに当たって指導、討論に当たられた松橋通生教授に感謝致します。また、電子顕微鏡に関する技術指導、討論、一部の写真の撮影に当たられた平田愛子さんに感謝致します。日常の研究生活に於て様々に便宜を計り、討論に応じて下さった日下助教授を始めとする第一研究部の教職員の方々、第一研究部に在籍された大学院生、研究生の方々に感謝致します。また、私の日常生活を支え、励まし、協力を惜しまなかった妻、典子、母、俊子に感謝します。また、長きに渡って時間を共にし、私の支えとなってくれた、故清水成悟君と、亡父寅雄に感謝すると共に、心から哀悼の意を表します。

