

①

学位論文

黄色ブドウ球菌が産生する自己溶解酵素（ATL）の局在性
およびプロセッシングに関する研究

学位申請者 中畠 誠治

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座

（主任：赤川安正教授）

1996年

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学歯学部歯科補綴学第一講座赤川安正教授ならびに終始御懇篤なる御指導を賜りました前広島大学歯学部歯科補綴学第一講座教授津留宏道名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に際し、終始御懇切なる御教示、御校閲を賜りました本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授に心より感謝の意を表します。さらに、本論文作成上、御助言、御校閲を賜りました同口腔生化学講座加藤幸夫教授に深謝いたします。

研究遂行上および本論文作成上、御助言と御鞭撻をいただきました本学口腔細菌学講座菅井基行助教授に厚く御礼申し上げます。また、研究遂行上および本論文作成上御指導および御助言をいただきました徳島大学歯学部口腔細菌学講座三宅洋一郎教授、川崎医科大学微生物学講座山田作夫講師、田辺製薬株式会社押田忠弘博士および歯科補綴学第一講座松浦尚志博士に深謝いたします。さらに多大なる御支援、御協力をいただきました佐藤裕二助教授をはじめとする歯科補綴学第一講座教室員各位ならびに小松澤均博士をはじめとする口腔細菌学講座関係者各位に感謝いたします。

最後に、常に私を支えてくれた両親に感謝します。

本論文の要旨は以下の学会および研究会において発表した。

- 第68回 日本細菌学会総会 (1995年3月, 京都)
第40回 ブドウ球菌研究会 (1995年9月, 広島)
Gordon Research Conference (1995年10月, Irsee, Germany)
第48回 日本細菌学会中国・四国支部総会 (1995年10月, 高松)
第65回 日本感染症学会西日本総会 (1995年12月, 岡山)
第69回 日本細菌学会総会 (1996年3月, 福岡) (発表予定)

本論文の一部は以下の雑誌に掲載中あるいは投稿予定である。

Komatsuzawa, H., Sugai, M., Nakashima, S. and Suginaka, H. (1995) :
Alteration of bacteriolytic enzyme profile of *Staphylococcus aureus* during
growth. *Microbiology and Immunology*, 39 : 629-633.

Yamada, S., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Nakashima, S., Oshida, T.,
Matsumoto, A. and Suginaka, H. : An autolysin ring associated with cell-
separation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. (in press)

Nakashima, S., et al. : Processing of *atl* gene products in *Staphylococcus*
aureus. (in preparation)

Komatsuzawa, H., Sugai, M., Nakashima, S., Yamada, S., Matsumoto, A. and
Suginaka, H. : Cell-associated *atl* gene products in *Staphylococcus aureus*. (in
preparation)

Sugai, M., et al. : Effect of Cibacron Blue F3G-A on the processing of *atl* gene
products in *Staphylococcus aureus*. (in preparation)

目次

序論	1
第1章 菌体表層における自己溶解酵素遺伝子 (<i>atI</i>) 産物の局在性	5
第1節 概要	5
第2節 材料および方法	5
第1項 使用菌株および培養	
第2項 自己溶解酵素画分の調製	
第3項 抗GLおよび抗AMペプチド血清の作製	
第4項 SDS-PAGEおよびWestern blottingによる <i>atI</i> 遺伝子産物の検出法	
第5項 抗GLおよび抗AM IgGの精製	
第6項 電子顕微鏡を用いた <i>atI</i> 遺伝子産物の検出法	
第3節 結果	9
第1項 自己溶解酵素画分における酵素活性の比較	
第2項 抗GLおよび抗AMペプチド血清によるWestern blottingを用いた検討	
第3項 免疫電子顕微鏡による <i>atI</i> 遺伝子産物の局在性の検討	
第4節 考察	20
第2章 菌体からのクラスター分散酵素の精製および性状	26
第1節 概要	26
第2節 材料および方法	26
第1項 使用菌株および培養	
第2項 菌体からのクラスター分散酵素の精製法	
第3項 培養上清からのクラスター分散酵素の精製法	
第4項 SDS-PAGEおよびWestern blottingによる自己溶解酵素の検出法	
第5項 菌体および培養上清からの精製酵素の性状比較	
第3節 結果	31
第1項 菌体および培養上清からのクラスター分散酵素の精製	
第2項 精製酵素の性状比較	
第4節 考察	36

第3章 自己溶解酵素ATLのプロセシングに及ぼすCibacron Blue F3G-Aの影響	37
第1節 概要	37
第2節 材料および方法	37
第1項 Cibacron Blue F3G-A (CB)によるクラスター分離活性阻害	
第2項 培養条件および自己溶解酵素画分の調製	
第3項 SDS-PAGEおよびWestern blottingによる <i>atf</i> 遺伝子産物の検出法	
第4項 138kDaおよび115kDaタンパクの精製法	
第5項 自己溶解酵素のN末端アミノ酸分析法	
第3節 結果	40
第1項 Cibacron Blue F3G-A (CB)によるクラスター分離活性阻害	
第2項 自己溶解酵素ATLのプロセシングに及ぼすCBの影響	
第3項 138kDaおよび115kDaタンパクの精製	
第4項 138kDaおよび115kDaタンパクのN末端アミノ酸分析	
第4節 考察	50
第4章 自己溶解酵素ATLのプロセシング	53
第1節 概要	53
第2節 材料および方法	53
第1項 抗ATLウサギ血清の作製	
第2項 免疫沈降法による <i>atf</i> 遺伝子産物の検出法	
第3項 Processing enzyme画分の調製法	
第4項 <i>in vitro</i> におけるATLのプロセシング解析法	
第3節 結果	56
第1項 免疫沈降法によるATLのプロセシング	
第2項 <i>in vitro</i> におけるATLのプロセシング	
第4節 考察	60
総括	63
参考文献	65

本論文において、以下の略号を用いた。

アミノ酸

Ala : alanine

Glu : glutamic acid

Gly : glycine

Lys : lysine

糖

GlcNAc : *N*-acetylglucosamine

MurNAc : *N*-acetylmuramic acid

培地

TSB : trypticase soy broth

試薬

PBS : phosphate buffered saline

SDS : sodium dodecyl sulfate

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

トリス : tris(hydroxymethyl)aminomethane

その他

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PVDF : polyvinylidene difluoride

序論

黄色ブドウ球菌はヒトの鼻腔や口腔に常在し、化膿性疾患の最も重要な起炎菌である。近年、ペニシリン系抗生物質の1つであるメチシリンに対して耐性を示す黄色ブドウ球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA）が、院内感染の原因菌として臨床的に大きな問題となっている。また、口腔においても顎骨骨髄炎および膿瘍の多くは黄色ブドウ球菌により起こると言われており、本菌の生理的作用、病原性および抗生物質抵抗性のメカニズムを解明することは極めて重要であると考えられる。

細菌の細胞壁は、細菌の形と大きさを決定して、その菌固有の形態を維持し、細胞質を保護する役割を担っている。グラム陽性菌の細胞壁は大部分がペプチドグリカンと呼ばれる網目構造によって構成されており、タイコ酸、タンパクなどが細胞壁成分として存在している（図A）。一般に黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンは、*N*-acetylglucosamineと*N*-acetylmuramic acidが交互に β -1,4グリコシド結合したグリカン鎖を形成し、*N*-acetylmuramic acidからテトラペプチド（L-alanyl-D-glutamyl-L-lysyl-D-alanine）がアミド結合している。さらに、そのテトラペプチドのL-lysineのNH₂基と隣り合うテトラペプチドのD-alanineのCOOH基末端との間をglycineペンタペプチドがペプチド結合して架橋しており（図B）、その架橋度は90%程度である。このように複雑な構造をもつペプチドグリカンは、絶えず合成と分解が行なわれている。ペプチドグリカン合成については、数多くの研究がなされ、現在までに合成経路はほとんど解明されている。一方、ペプチドグリカンの分解については、細菌がこのペプチドグリカンの特異的に加水分解する酵素を産生していることが指摘され^{26,50,56)}、*Staphylococci*^{26,36,43,65)}、*Streptococci*^{6,10)}、*Bacilli*⁴⁵⁾、*Lactobacilli*⁸⁾、*Escherichia coli*⁷⁹⁾等様々な菌種からペプチドグリカン加水分解酵素（細胞壁分解酵素）が分離されているものの、その詳細については不明である。

細胞壁分解酵素は、その作用点により4つに分けられる（図B）。すなわち、endo- β -*N*-acetylmuraminidase^{8,50)}、endo- β -*N*-acetylglucosaminidase⁷⁹⁾、*N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase⁵⁴⁾およびglycine endopeptidase⁶³⁾であり、これらの酵素の多くは、細菌の伸長^{14,66)}、分裂⁴⁹⁾、分離³²⁾、細胞壁の代謝^{20,34,78)}などの様々な生理作用に関与していると考えられている^{1,25,41,51,52,76)}。

また、黄色ブドウ球菌を含め種々の細菌感染症の治療には、 β -ラクタム系抗生物質がしばしば用いられる。 β -ラクタム系抗生物質は細胞壁合成の最終過程であるペプチドグリカン架橋形成反応を阻害することにより、菌を溶菌させ、殺菌的に働くと言われている。 β -ラクタム系抗生物質による溶菌の過程には自己溶解酵素と呼ばれる細胞壁分解酵素が関与していると考えられているが^{38,44,68)}、その詳細については未だ明らかではない。したがって、細菌の産生する自己溶解酵素についての研究⁷⁶⁾は、菌の生理作用を解明するだけでなく、抗生物質の殺菌作用のメカニズムを解明する上でも非常に重要であると考えられる。

黄色ブドウ球菌はendo- β -N-acetylglucosaminidase (GL), N-acetylmuramyl-L-alanine amidase (AM) およびglycine endopeptidaseの3種類の異なるペプチドグリカン分解酵素活性を持つことが報告されている^{21,26,27,36,43,54,65,67,70,71,72,73,74)}。GLはN-acetylglucosamineとN-acetylmuramic acidの間の β -1,4結合を切断し、N-acetylglucosamine由来の還元基を遊離する。AMはN-acetylmuramic acidとL-alanineの間を切断し¹⁶⁾、glycine endopeptidaseはpentaglycine架橋のglycine間を切断する(図B)。

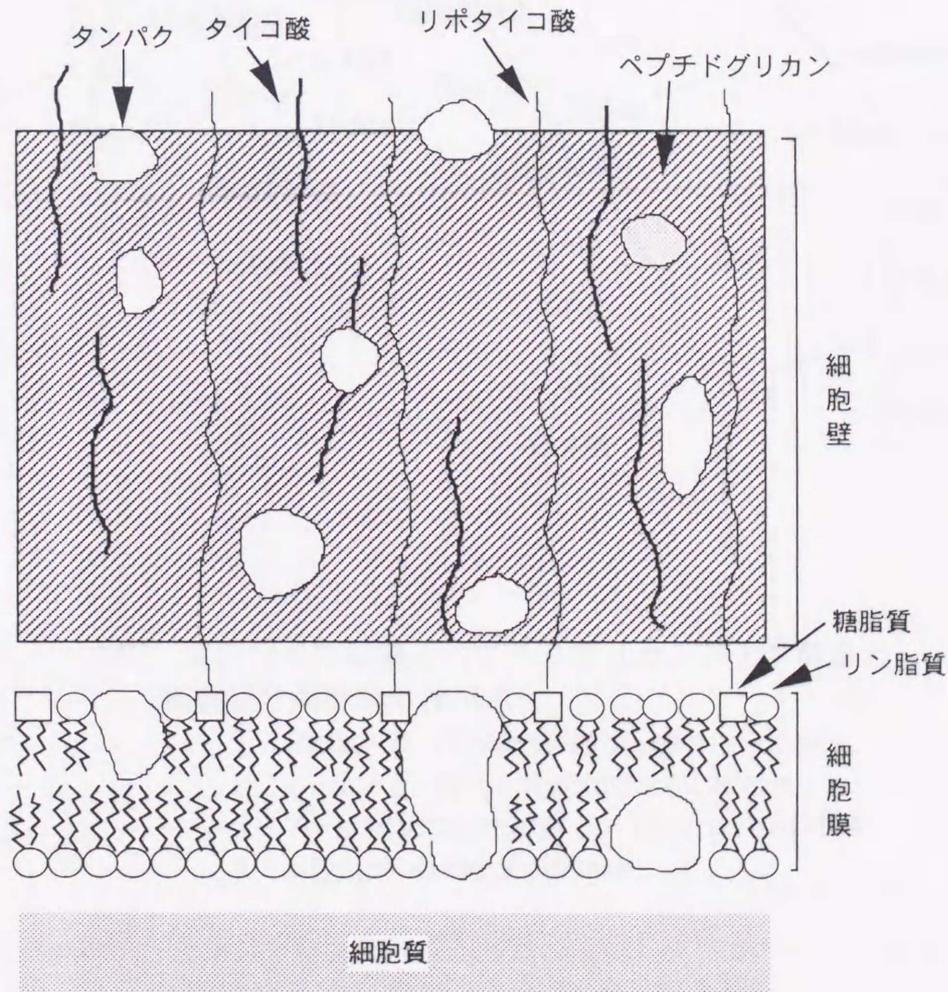
黄色ブドウ球菌が産生する細胞壁分解酵素は主に培養上清から精製され、GLおよびAM⁵⁴⁾に関して様々な報告がある。そのうち、SDS-PAGEで単一のバンドとして認められるまでに精製したのはWadstörmら⁷¹⁾およびValisenaら⁷⁰⁾が報告したGLのみであるが、これらは分子量や酵素学的諸性質が互いに異なっている。

また、現在まで黄色ブドウ球菌の細胞壁分解酵素遺伝子に関する報告はほとんどなく、プロファージに由来するAM遺伝子の塩基配列⁷⁵⁾、あるいは分子量80,000のglucosaminidase遺伝子断片のクローニングの報告³⁾があるのみで、自己溶解酵素遺伝子のクローニングおよび塩基配列に関する報告は全く見当たらない。

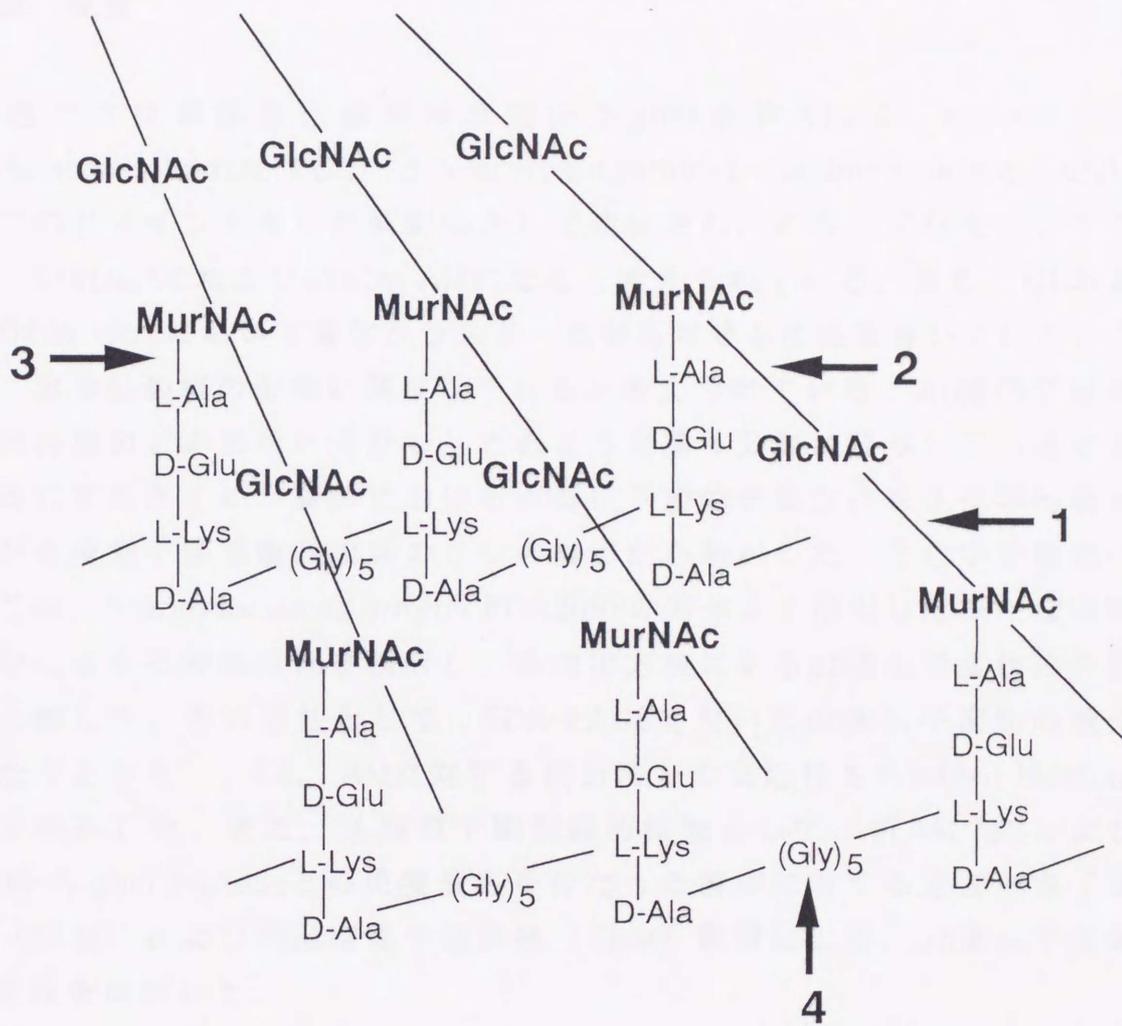
Sugaiらは黄色ブドウ球菌の培養上清から溶菌酵素を分離、精製したことを報告している^{57,62)}。この酵素は、分子量51kDaのGLと62kDaのAMであり、両酵素は溶菌活性を有すると共に、菌体クラスターを分散させる活性をも有していると示唆している。また、Oshidaらは黄色ブドウ球菌から自己溶解酵素遺伝子atlのクローニングを報告している⁴⁰⁾。得られた遺伝子の解析、ならびに既に精製されている培養上清中の51kDa GLおよび62kDa AMのN末

端アミノ酸配列，分子量およびアミノ酸組成の結果から，*atl*遺伝子はGLおよびAMの2つのドメインを有していること，また，*atl*遺伝子より産生されるタンパクATLはGLおよびAMの2つのドメインを有した前駆体として産生され，後にプロセシングを受け，51kDa GLおよび62kDa AMとなって培養上清中に放出されることなどが示唆されている。しかし，これら一連のプロセスがどのような過程を追い，どこで起こるかについては未だ明らかでない。

そこで，本研究では，まず黄色ブドウ球菌が産生する自己溶解酵素ATLの菌体における局在性について生化学的検索および免疫顕微鏡的検索の2つの観点から検討した。そして，*atl*遺伝子産物，ATLからGLおよびAMが生ずるプロセスについての*in vivo*および*in vitro*での検討を行なった。



図A グラム陽性菌細胞表層の構造



図B 黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンの化学構造と細胞壁分解酵素の作用点

- 1 : endo- β -N-acetylmuraminidase
- 2 : endo- β -N-acetylmuraminidase
- 3 : N-acetylmuramyl-L-alanine-amidase
- 4 : glycine endopeptidase

第1章 菌体表層における自己溶解酵素遺伝子 (*atl*) 産物の局在性

第1節 概要

黄色ブドウ球菌自己溶解酵素遺伝子 *atl* の産物 ATL は、endo- β -N-acetylglucosaminidase (GL) と N-acetylmuramyl-L-alanine amidase (AM) の2つのドメインを有した前駆体として産生され、のちにプロセッシングを受け、51kDa GL および 62kDa AM になると考えられている。また、GL および AM は *in vitro* において菌体クラスターを分散させる活性を有していることから、菌体分裂後の分離に関与していると考えられている。AtI 遺伝子産物が菌体表層のどの部位に局在し、どのように菌体分離に関与しているかを明らかにするために、菌体における *atl* 遺伝子産物の局在性を生化学的検索および免疫電子顕微鏡的検索の2つの観点から検討した。生化学的検索においては、*Staphylococcus aureus* FDA209P の菌体より抽出した様々な粗酵素画分に対する酵素活性を検討し、各抽出方法による *atl* 遺伝子産物の局在性を比較した。その方法として、SDS-PAGE を用いた *atl* 遺伝子産物の検出を行なうとともに、GL、AM に対する抗血清との反応性を Western blotting により検討した。また、免疫電子顕微鏡的検索として、抗 AM IgG および protein-A gold particle との免疫反応を行なった菌体に対する走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により、*atl* 遺伝子産物の局在性を検討した。

第2節 材料および方法

第1項 使用菌株および培養

菌株は *S. aureus* FDA209P, RN450 および RN450 から transposon Tn551 挿入変異により分離した自己溶解変異株 RUSAL2 を使用した。培地は TSB (BBL, Becton Dickinson and Co., Cockeysville, MD, USA) を用いて 37 °C にて振とう培養を行ない、以下の実験に用いた。

第2項 自己溶解酵素画分の調製

S. aureus FDA209P, RN450およびRUSAL2を対数増殖期中期まで培養し、4つの画分を以下の方法で調製した。

菌体LiCl抽出画分（LiCl画分）：培養液を遠心（9,000 x g, 10 min, 4℃）して得られた菌体をPBS（pH7.0）にて2回洗浄し、湿菌体1gにつき0.6mlの3M LiClに懸濁し、氷温中で15分放置後、遠心（12,000 x g, 5 min, 4℃）して得られた上清を用いた。

菌体SDS抽出画分（SDS画分）：LiCl抽出後の菌体を10mM リン酸緩衝液（pH7.0）にて洗浄し、LiCl抽出と同量の4% SDSに懸濁し、室温で30分放置後、遠心（12,000 x g, 5 min, 4℃）して得られた上清を用いた。

菌体超音波破碎画分（菌体画分）：LiClおよびSDS抽出後の菌体を再び10mM リン酸緩衝液（pH7.0）にて洗浄し、LiCl抽出と同量の10mM リン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁した。懸濁液を氷中にて超音波発生機（UD-200, TOMY, 東京）に10秒間、6回作用させることにより菌体を破碎し、遠心（12,000 x g, 10 min, 4℃）して得られた上清を用いた。

Protoplast画分：培養液30mlを遠心（9,000 x g, 10 min, 4℃）し、得られた菌体をPBS（pH7.0）にて2回洗浄した後、0.145M NaClおよび30% raffinoseを含む50mM トリス塩酸緩衝液（pH7.5）1mlに懸濁し、lysostaphin 100 μg, deoxyribonuclease 100 μg, phenylmethylsulfonyl fluoride（以上、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA）1mMになるよう添加した。37℃にて30分振とうし、細胞壁が取り除かれ、protoplastが完全に形成されていることを検鏡により確認後、遠心（4,000 x g, 15 min, 4℃）して得られた沈澱をprotoplastとした。このprotoplastを0.145M NaClおよび30% raffinoseを含む50mM トリス塩酸緩衝液（pH7.5）にて洗浄し、1% SDSに懸濁し、室温で10分間放置後、遠心（12,000 x g, 5 min, 4℃）して得られた上清をprotoplast画分として用いた。

また、プロテアーゼ処理が自己溶解酵素の局在性に及ぼす影響を検討する目的で、緩衝液による洗浄後の菌体あるいはprotoplastを200 μg/mlのtrypsin（Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany）を添加したPBSに懸濁し、37℃にて30分作用させた後、上記の方法で各自己溶解酵素画分を抽出した。

第3項 抗GLおよび抗AMペプチド血清の作製

ATLのアミノ酸配列におけるGL domainのC末端領域およびAM domainのN末端領域に対する抗血清を作製するため、各々のアミノ酸配列に相当する合成ペプチド（GL：CGYYDKIGEVGKYFDIP, AM：CPKIEEDYTSYF-PKYAYR, 400 μ g peptide per ml）を作製した。Keyhole limpet hemocyanine (Pierce, Rockford, IL, USA)とconjugateした後、Ribi adjuvant (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO, USA)によりエマルジョン化し、各々を2週間毎に日本白色ウサギ（体重2 kg）2羽に皮下注射した。投与16-20週後、静脈内から各々1mgのペプチドを投与し、その1週間後に各抗血清を採取した。GLおよびAMに対するWestern blottingにおいては、各抗血清を各々1000倍希釈して用いた。

第4項 SDS-PAGEおよびWestern blottingによる*atf*遺伝子産物の検出法

SDS-PAGEはLaemmliの方法³⁰⁾に従い、分離ゲルとして7.5%、濃縮ゲルとして4%ポリアクリルアミドゲルを作製し、得られた各画分からの自己溶解酵素の検出を行なった。タンパクは銀染色試薬（第一化学、東京）を用いて検出した。Western blottingはミニトランスブロット（Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA）を用いて行ない⁶⁹⁾、自己溶解酵素の検出には酵素抗体法を用いた。一次抗血清による処理として、PBSにて1000倍希釈した抗GL血清あるいは抗AM血清を37℃にて1時間反応させた。PBSによる洗浄後、二次抗体としてPBSにて1000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（Amersham, Buckinghamshire, UK）を37℃、1時間反応させた。発色はRenaissance 4CN plus（DuPont NEN, Boston, MA, USA）を用いて行なった。SDS-PAGEを用いたzymogramは、*Micrococcus luteus* ATCC4698あるいは*S. aureus*加熱死菌を0.5mg/mlになるよう分離ゲルに封入し、電気泳動を行なった³¹⁾。電気泳動後、ゲルを十分量の精製水で室温にて30分間緩やかに振とうしてSDSを除去し、次いで0.1Mリン酸緩衝液（pH6.8）にゲルを移し、37℃にて緩やかに振とうした。自己溶解酵素が再生することにより、ゲル内に封入した菌体を溶解し、出現したバンドを間接光にて検出した。

第5項 抗GLおよび抗AM IgGの精製

抗GLおよび抗AM IgGの精製は、抗GLおよび抗AM血清からMAPS-II kit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) を用いて行なった^{57,62)}。免疫電子顕微鏡観察における菌体との反応には各抗体を20倍希釈して用いた。

第6項 電子顕微鏡を用いた*atI*遺伝子産物の検出法

菌株は、*S. aureus* FDA209Pから自然突然変異により分離したプロテインA欠失株2PF-18を用いた⁶²⁾。本節第2項に述べた方法でLiCl処理あるいはprotoplast処理して得られた菌体を、各々PBS (pH7.0) あるいは0.145M NaClおよび30% raffinoseを含む50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) に懸濁した。コントロールとして、PBSに懸濁した未処理の菌体を用いた。各処理菌体に対し、1次抗体として20倍希釈した抗AM IgG 500 μ lを添加し、37°Cにて1時間作用させた後、各緩衝液で2回洗浄し、再び各々の緩衝液に懸濁した。SEMの試料に対しては、2次抗体としてprotein-A gold colloidal particles (E-Y Laboratories, inc., CA, USA) (直径20nm)⁴⁷⁾を300 μ l添加後、室温にて1時間作用させた。緩衝液にて数回洗浄した試料をカバーガラス上に載せ、2.5%グルタルアルデヒドおよび1% 四酸化オスミウムにより固定し、エタノールによる脱水後、S-570 electron microscope, 25kV (日立工機, 東京) あるいは4500FE backscatterd electron microscope, 10kV (日立工機, 東京) によりSEM観察を行なった。TEMの試料に対しては、2次抗体としてprotein-A gold colloidal particles (E-Y Laboratories, inc., CA, USA) (直径5nm) を300 μ l添加、室温にて1時間作用させた。緩衝液にて数回洗浄した試料を2.5%グルタルアルデヒドおよび1% 四酸化オスミウムにより固定し、エタノールにて脱水した後、Spurr's Eponに包埋、ダイヤモンドナイフおよびウルトラミクロトームにて超薄切片を作製し、JEM-2000 EX II electron microscope, 80kVあるいは100 kV (日本電子, 東京) によりTEM観察を行なった。

第3節 結果

第1項 自己溶解酵素画分における酵素活性の比較

菌体表層の自己溶解酵素画分は、培養した *S. aureus* FDA209P 菌体から 3M LiCl による抽出、LiCl 抽出後の菌体から 4% SDS による抽出さらに LiCl, SDS 抽出後の菌体の超音波破碎による抽出から得た。各自己溶解酵素画分の SDS-PAGE 後の銀染色を図 I-1a に、抗 AM 血清による Western blotting の結果を図 I-2 に示す。SDS-PAGE 銀染色において、LiCl 処理あるいは SDS 処理では菌体中のタンパクを完全に抽出できず、菌体画分において多数のタンパクバンドを認めた (図 I-1a)。菌体画分は、Western blotting において抗 AM 血清と反応するバンドを全く認めなかった (図 I-2)。一方、LiCl 画分においては、抗 AM 血清は 51kDa および 62kDa タンパクのみならず、138kDa, 115kDa および 85kDa タンパクと反応した。SDS 画分においても 138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDa および 51kDa タンパクが抗 AM 血清と反応したが、85kDa, 62kDa および 51kDa のバンドは反応性が低かった。抗 GL 血清による Western blotting においても同様の結果を得た (データ示さず)。 *M. luteus* および *S. aureus* を封入したゲルによる zymogram の結果を図 I-1b,c に示す。Western blotting の結果と同様に、菌体画分においては *M. luteus*, *S. aureus* ともに溶菌バンドを全く認めなかった。一方、LiCl 画分および SDS 画分においては、*M. luteus* の場合、138kDa, 115kDa および 51kDa の溶菌バンドを認め (図 I-1b), *S. aureus* の場合、138kDa, 115kDa, 85kDa および 62kDa の溶菌バンドを認めた (図 I-1c)。

図 I-3a に菌体表面の *atf* 遺伝子産物の局在性に及ぼす trypsin 処理の影響について、抗 AM 血清による Western blotting の結果を示す。Trypsin 未処理の LiCl 画分にて認められた 138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDa および 51kDa タンパクは、200 μ g/ml の trypsin 処理によりほとんど完全に消失し、60kDa に太いバンドの出現を認めた。一方、SDS 画分においては 138kDa, 85kDa, 62kDa および 51kDa タンパクが消失したものの、115kDa タンパクおよび他の少数バンドを認めた。また、protoplast における trypsin 処理の影響について、抗 AM 血清による Western blotting の結果を図 I-3b に示す。Trypsin 未処理の protoplast においては、138kDa, 115kDa, 62kDa および 51kDa にバンドを認めたが、200 μ g/ml の trypsin 処理によりすべてのバンドが消失した。

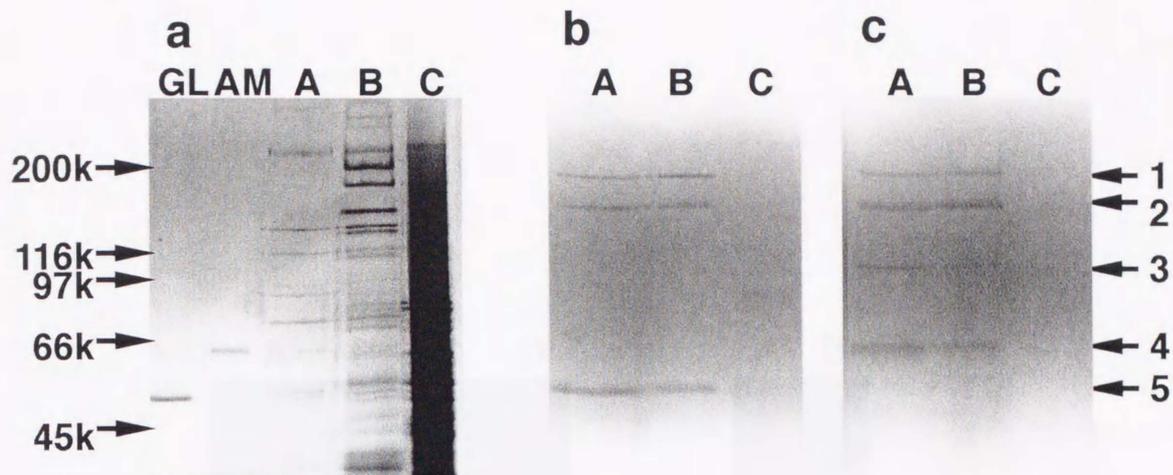


図 I -1 菌体から抽出した自己溶解酵素画分の SDS-PAGE 後の銀染色および zymogram による解析

- (a) 自己溶解酵素画分の SDS-PAGE 後の銀染色
 (b) *M. luteus* 菌体を封入したゲルによる zymogram
 (c) *S. aureus* 菌体を封入したゲルによる zymogram
 レーン : A, LiCl 画分 ; B, SDS 画分 ; C, 菌体画分

左側矢印は分子量マーカー (Da), 右側矢印は検出された溶菌バンド :
 1, 138kDa ; 2, 115kDa ; 3, 85kDa ; 4, 62kDa ; 5, 51kDa を示す。

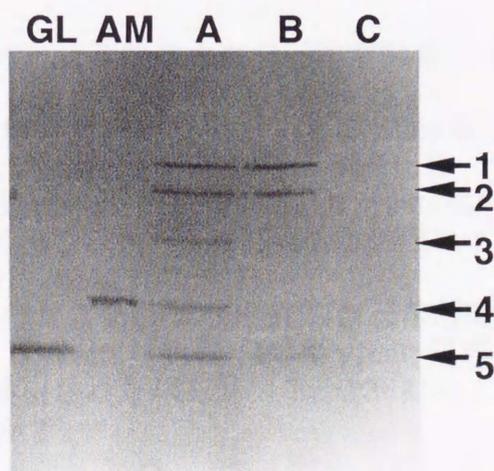


図 I -2 菌体から抽出した自己溶解酵素画分の抗 AM 血清を用いたイムノブロッティングによる解析

- レーン : A, LiCl 画分 ; B, SDS 画分 ; C, 菌体画分
 右側矢印は検出されたバンド : 1, 138kDa ; 2, 115kDa ; 3, 85kDa ;
 4, 62kDa ; 5, 51kDa を示す。

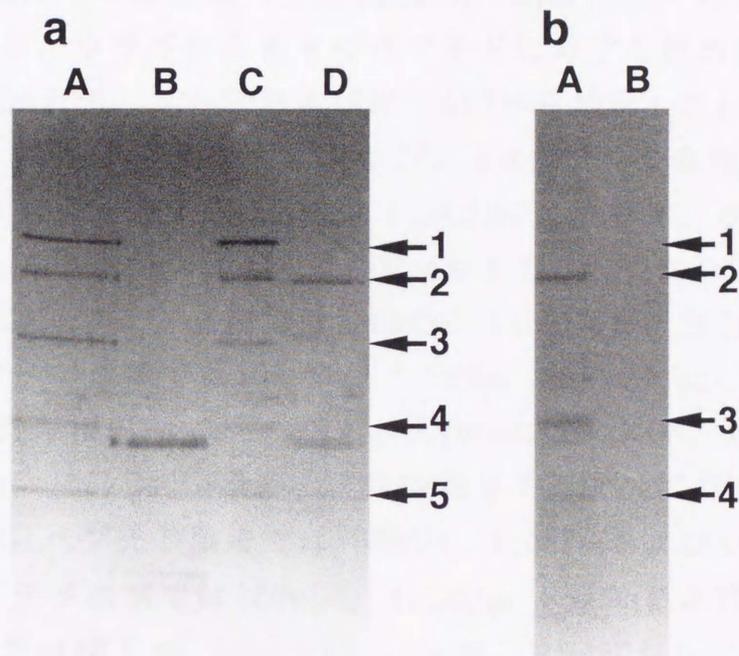


図 I -3 Trypsin 処理による菌体由来自己溶解酵素の感受性に対するイムノブロッティング解析

(a) Trypsin 処理による LiCl 画分および SDS 画分の自己溶解酵素の感受性

レーン : A, trypsin 非処理の LiCl 画分 ; B, trypsin 処理後の LiCl 画分 ; C, trypsin 非処理の SDS 画分 ; D, trypsin 処理後の SDS 画分

右側矢印は検出されたバンド : 1, 138kDa ; 2, 115kDa ; 3, 85kDa ; 4, 62kDa ; 5, 51kDa を示す。

(b) Trypsin 処理による protoplast の自己溶解酵素の感受性

レーン : A, trypsin 非処理 ; B, trypsin 処理

右側矢印は検出されたバンド : 1, 138kDa ; 2, 115kDa ; 3, 62kDa ; 4, 51kDa を示す。

第2項 抗GLおよび抗AMペプチド血清によるWestern blottingを用いた検討

前項で認められた138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDaおよび51kDaタンパクが*atl*遺伝子産物であるかどうかをさらに明らかにするため, ATLの遺伝子配列からAM domainのN末端領域 (CPKIEEDYTSYFPKYAYR), GL domainのC末端領域 (CGYYDKIGEVGKYFDIP) に対する合成ペプチドを作製し, ウサギから各々のペプチドに対する抗血清を作製した。S. aureus FDA209P, RN450およびRUSAL2から抽出したLiCl画分に対する抗AM血清, 抗GLペプチド血清および抗AMペプチド血清によるWestern blottingの結果を図I-4に示す。FDA209Pにおいて, 抗AM血清に反応する138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDaおよび51kDaにバンドを認めたのに対し, 抗GLペプチド血清では138kDa, 115kDaおよび51kDaにバンドが, 抗AMペプチド血清では138kDa, 115kDa, 85kDaおよび62kDaにバンドが検出された (図I-4, レーンA)。RN450においても, 抗AM血清に反応する138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDaおよび51kDaにバンドを認めたのに対し, 抗GLペプチド血清では138kDa, 115kDaおよび51kDaにバンドが, 抗AMペプチド血清では138kDa, 115kDa, 85kDaおよび62kDaにバンドが検出された (図I-4, レーンB)。一方, RN450からtransposonにより*atl*のGL domainを不活化した株であるRUSAL2は, すべての抗血清においてバンドを検出しなかった (図I-4, レーンC)。また, RUSAL2から抽出した自己溶解酵素画分を用いて, *M. luteus*および*S. aureus*ゲルによるzymogramの検討を行なった結果, SDS画分において36kDaにバンドを認めた以外は, 全く溶菌バンドを認めなかった (データ示さず)。

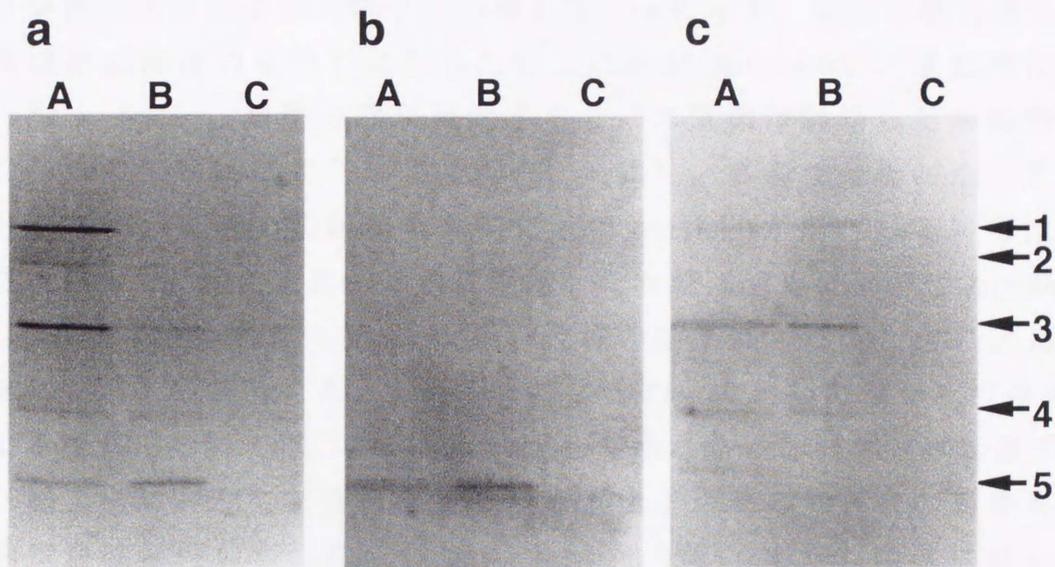


図 I -4 各菌株から抽出した LiCl 画分の各抗血清によるイムノブロッティングの比較

(a) 抗 AM 血清

(b) 抗 GL ペプチド血清

(c) 抗 AM ペプチド血清

レーン : A, FDA209P ; B, RN450 ; C, RUSAL2

右側矢印は検出されたバンド : 1, 138kDa ; 2, 115kDa ; 3, 85kDa ; 4, 62kDa ; 5, 51kDa を示す。

第3項 免疫電子顕微鏡による*atf*遺伝子産物の局在性の検討

図 I-5 上段に二次電子SEM, 下段に反射型SEMによる細胞表面の*atf*遺伝子産物の局在性の結果を示す。反射型SEM像で見られるprotein-A gold particles (gold particles)と同じ位置に, 二次電子SEM像でも隆起を認め, 細胞表面にgold particlesが規則的に並んで局在する像を認めた。各細胞分裂周期における二次電子SEM像を図 I-6に示す。細胞分離に先立って, 隔壁形成部位のくびれに沿った線上にgold particlesが二重に局在した(図 I-6a)。細胞分離が開始すると, 二重環は隣接した娘細胞上に2つ分かれて輪状に局在し(図 I-6b 矢頭), さらに分離が進行すると, 分かれた娘細胞の辺縁に対照的にgold particlesが局在している像を認めた(図 I-6c)。また, それに交差した次期隔壁形成部位にもgold particlesの局在を認めた(図 I-6d)。同様の結果は, 抗GL IgGによるSEM観察においても得られた。しかし, コントロールとして用いたウサギIgGによる観察においては, gold particlesを認めなかった(データ示さず)。

図 I-7にTEMによる細胞表面の*atf*遺伝子産物の局在性の結果を示す。隔壁形成部位の表面にgold particlesが局在し, また, 隔壁に対して菌体中心から70度から90度の部位にもgold particlesの局在を認めた(図 I-7a,b,c 矢頭)。しかし, gold particlesのほとんどは細胞に直接結合して局在せず, 細胞壁から20-50nm離れた位置に認められ, 細胞壁から伸びた線維状の菌体成分にgold particlesが結合して局在する像を呈していた。一方, 隔壁形成が完了し, 細胞分離が開始したとき, 分離開始部位の隣接した細胞表面にgold particlesの局在を認めた(図 I-7d 矢頭)。また, 次期隔壁形成部位の表面にもgold particlesの局在を認めた(図 I-7d 矢頭)。同様の結果は, 抗GL IgGによるTEM観察においても得られた。超薄切片作製後に抗AM IgGおよびgold particlesとの免疫反応を行なったTEM観察では, *atf*遺伝子産物の局在性を明らかにできなかった(データ示さず)。そこで, protoplast表面における*atf*遺伝子産物の局在性を検討した(図 I-8)。SEM像においては未処理の菌体と同様protoplast表面にgold particlesの局在を認め(図 I-8a), TEM像においてはgold particlesは細胞膜から離れた位置に局在していた(図 I-8b)。

図 I-9にLiCl処理の有無によるTEM像での菌体表面のgold particles数の変化を示す。LiCl処理により, 菌体表層のgold particles数の大幅な減少を認めた。

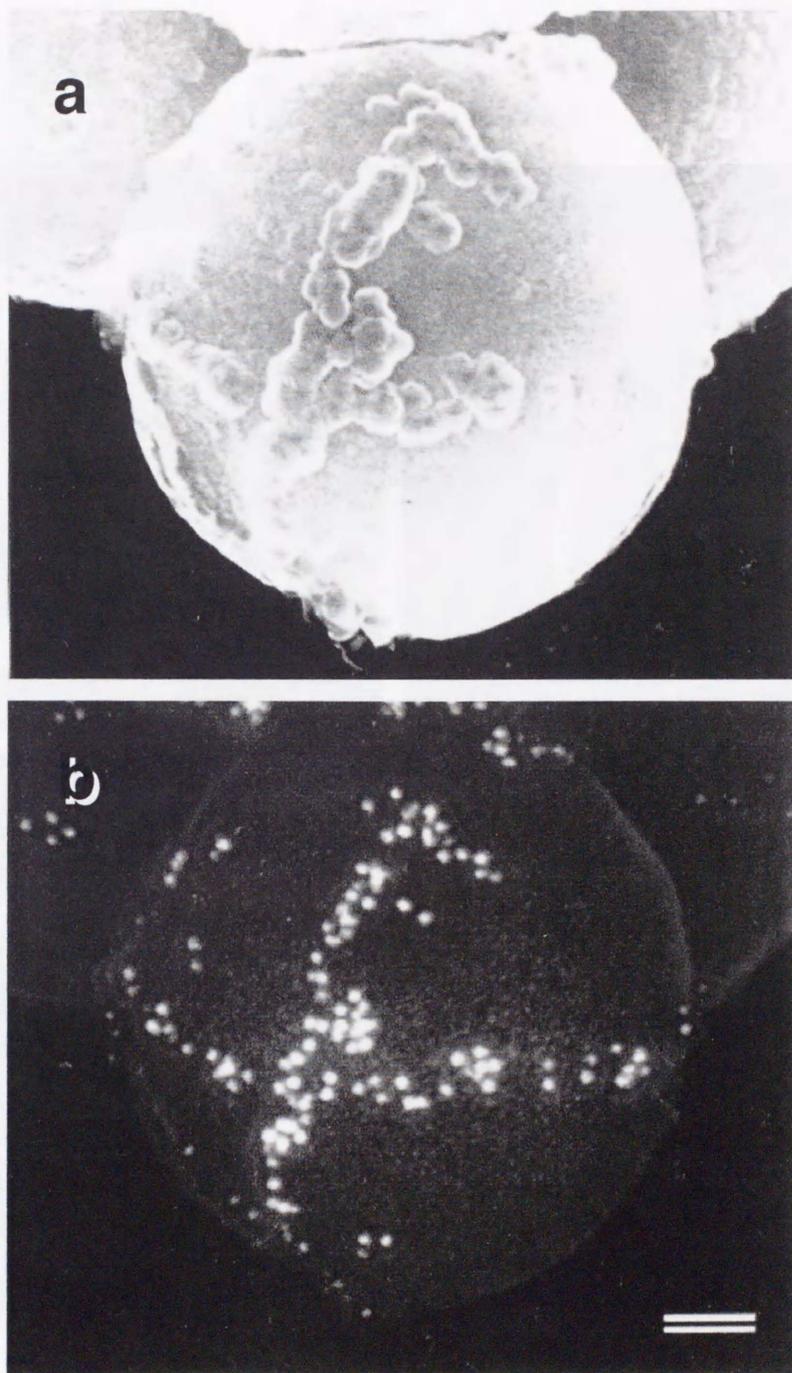


図 I -5 二次電子 SEM および反射型 SEM による菌体表層の *atI* 遺伝子産物の局在性
(a) 二次電子 SEM 像
(b) 反射型 SEM 像
バーは 100nm を示す。

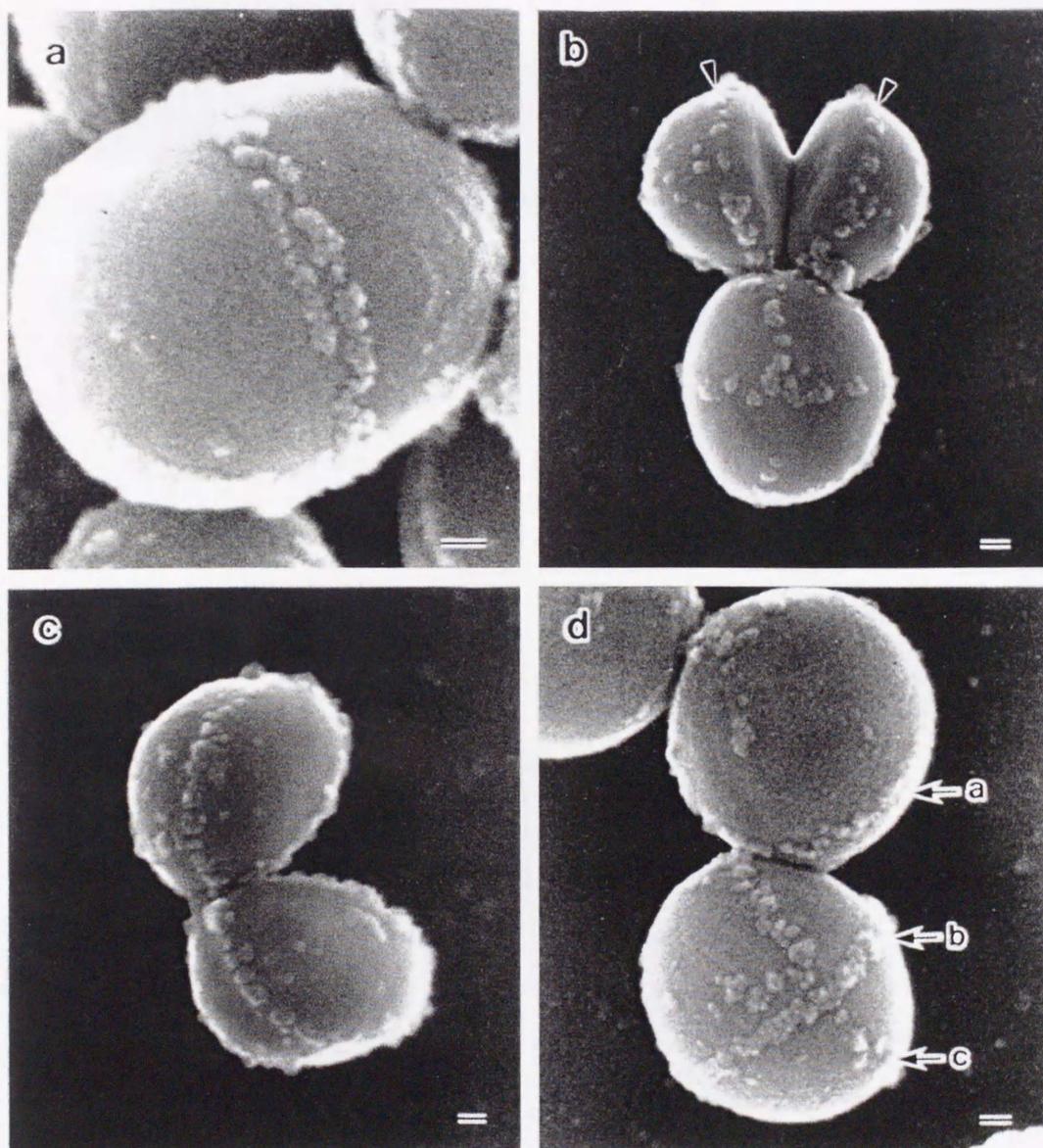
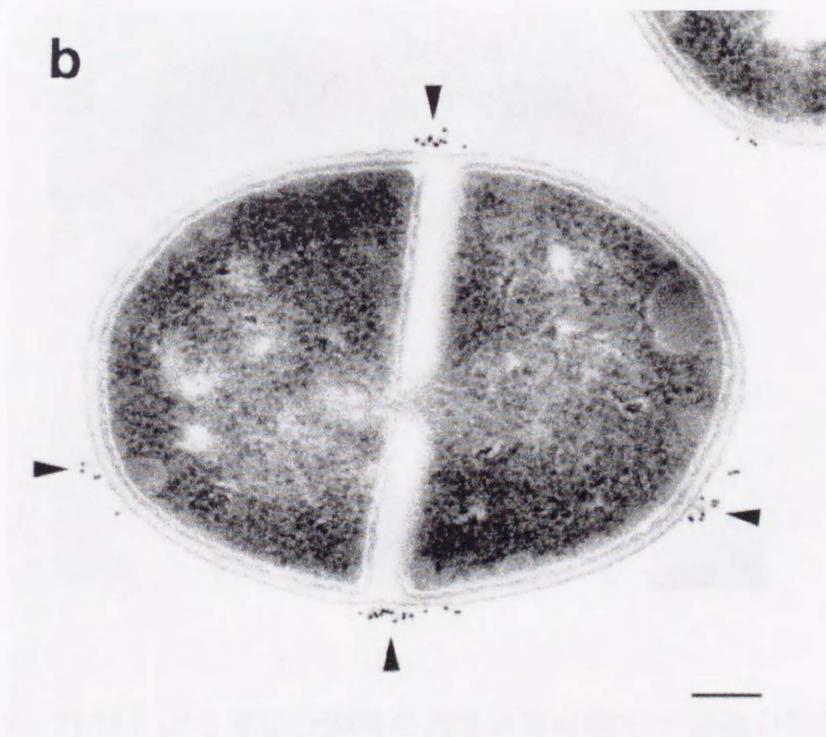
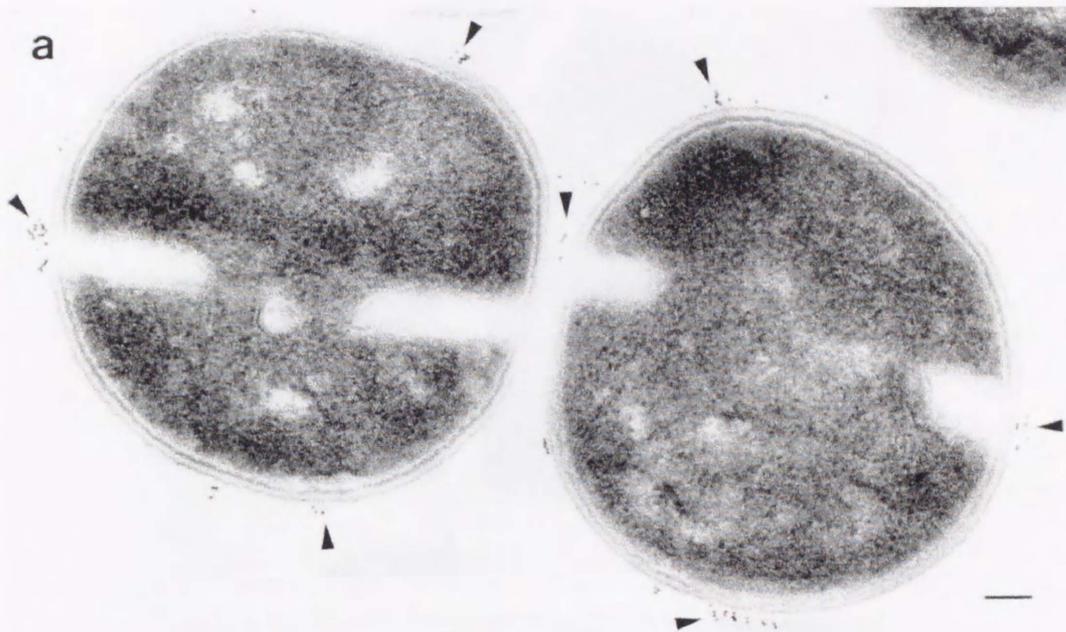


図 I -6 二次電子SEMによる様々な細胞分裂段階での菌体表面*at*遺伝子産物の局在性 (a-d)

矢頭は gold particle を, バーは 100nm を示す。



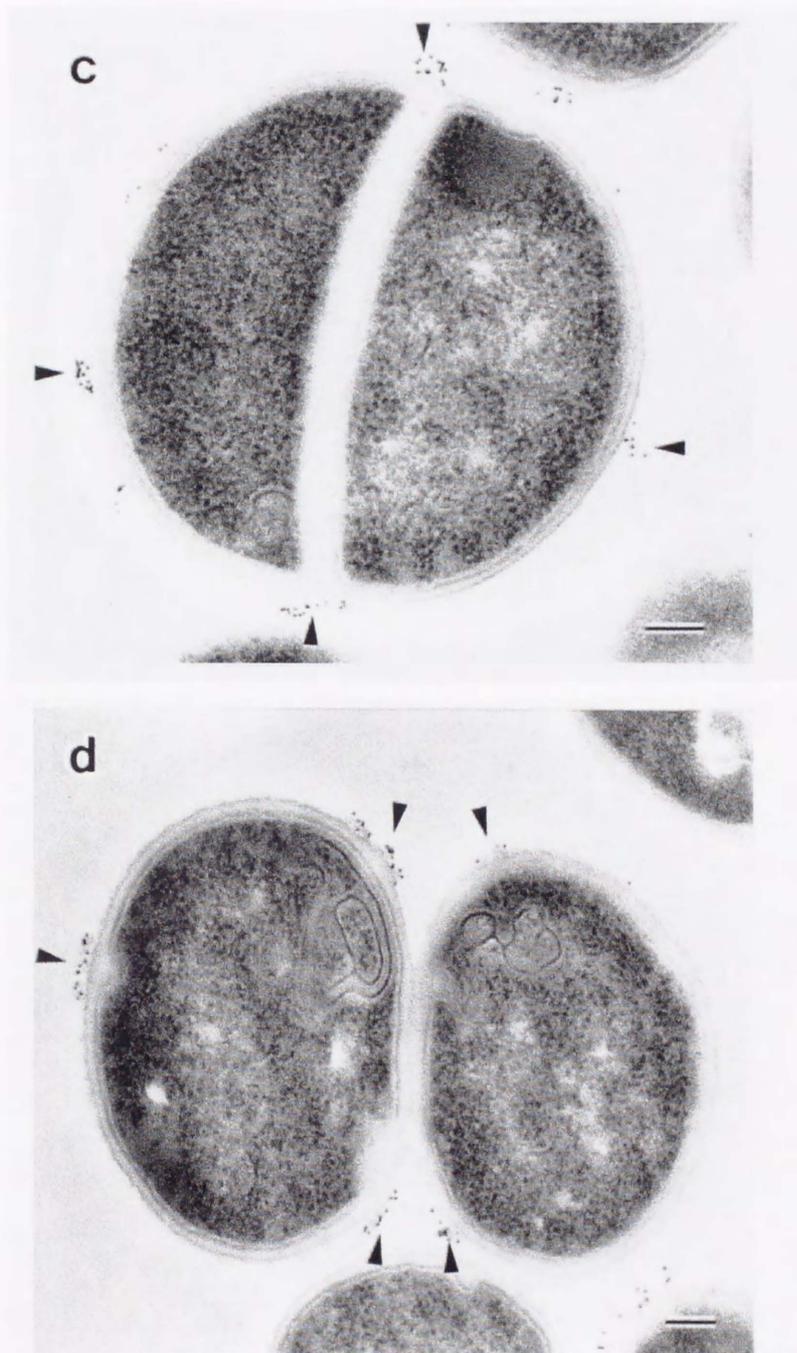


図 I -7 TEM による細胞分裂時の菌体表層 *atf* 遺伝子産物の局在性 (a-d)
矢頭は gold particle を, バーは 100nm を示す。

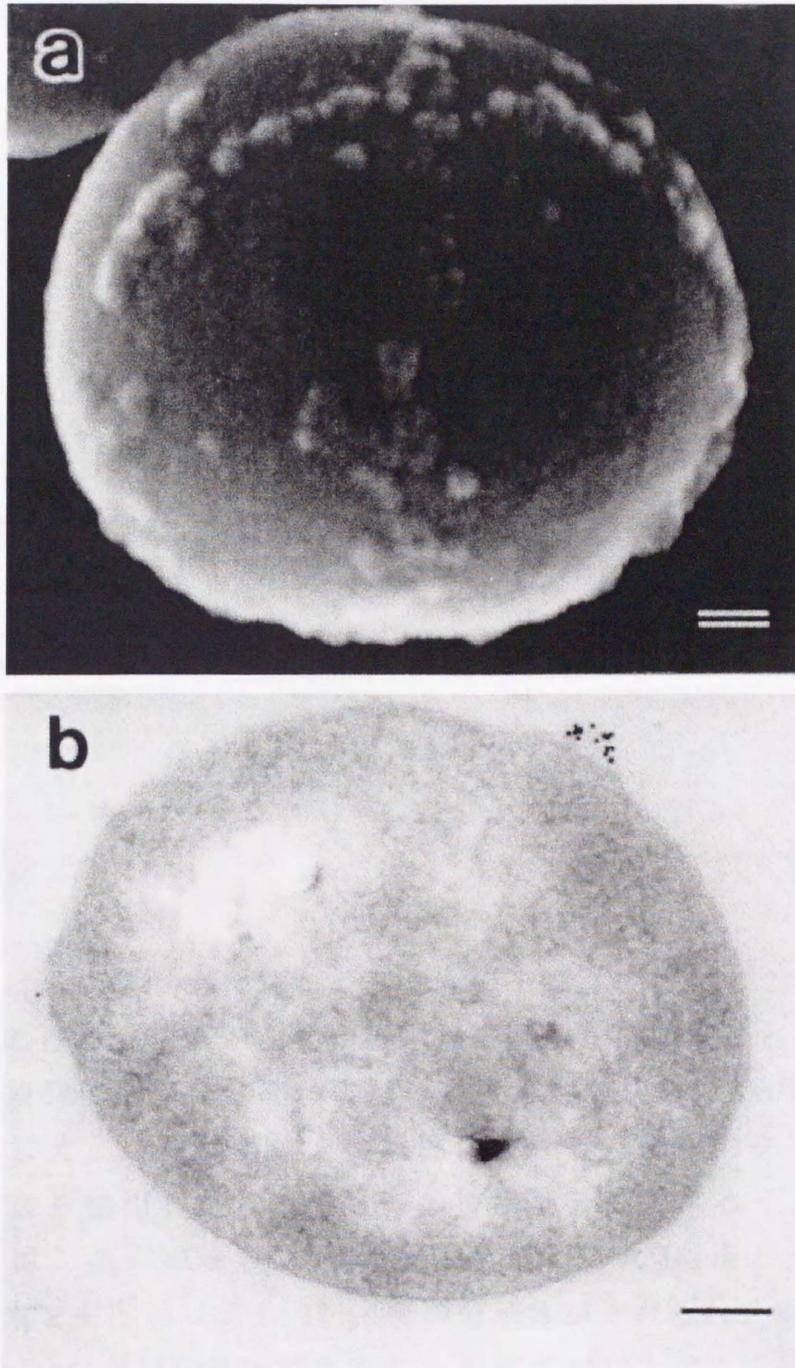


図 I -8 二次電子 SEM および TEM による protoplast 表層の *at* 遺伝子産物の局在性
(a) 二次電子 SEM 像
(b) TEM 像
バーは 100nm を示す。

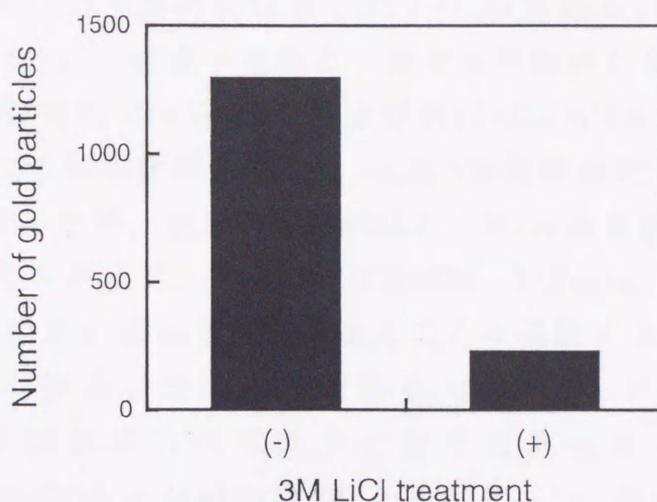


図 I -9 3M LiCl 処理による菌体表層の *atI* 遺伝子産物への影響 (-), LiCl 非処理 ; (+), LiCl 処理を示す。

第 4 節 考察

本研究では、生化学的検索および免疫電子顕微鏡検索の 2 つの観点から、菌体表層における *atI* 遺伝子産物の局在性を明らかにすることを目的とした。

生化学的検索において、菌体表層の自己溶解酵素を、3M LiCl, 4% SDS による抽出に加え、さらに菌体を機械的に破砕し、細胞内タンパクを可溶化することにより抽出した。この 3 つの抽出画分に対するイムノブロッティング解析では、抗 51kDa GL 血清および抗 62kDa AM 血清と反応する 5 つの自己溶解酵素を検出し (表 I -1), その分子量がそれぞれ 138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDa および 51kDa であることを明らかにした。Oshida らによる遺伝子解析では、*atI* 遺伝子は 1,256 のアミノ酸から構成された分子量 137,381Da の GL および AM domain を有した bifunctional なタンパク (ATL) を産生し、後にプロセッシングを受けて 51kDa GL および 62kDa AM の 2 つのペプチドグリカン加水分解酵素を生ずるとされている⁴⁰⁾。シグナル配列切断後の ATL およびプロセッシング途中の中間産物と考えられるタンパクの計算上の分子量は、134,443Da, 116,662Da および 80,872Da であり、また成熟型の

51kDa GLおよび62kDa AMの分子量はそれぞれ62,954Daおよび53,580Daであることから、分子的には抗51kDa GL血清あるいは抗62kDa AM血清と反応したバンドが*atl*遺伝子産物と一致する可能性が高い。また、51kDa GLと62kDa AMは抗51kDa GL血清および抗62kDa AM血清の両方に反応する。これは、AMのC末端領域に2つ、GLのN末端領域に1つの遺伝子の繰返し構造が存在するため、抗AM血清はGLと、抗GL血清はAMと交差反応を起こすものと考えられる⁴⁰⁾。さらに、138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDaおよび51kDaタンパクが*atl*遺伝子産物であることを確認するため、ATLの遺伝子配列から繰返し構造以外の部分であるAM domainのN末端領域およびGL domainのC末端領域のペプチドに対する抗血清を作製し、*S. aureus* FDA209P, RN450およびRUSAL2から抽出したLiCl画分に対するイムノブロットング解析を行なった。FDA209PおよびRN450の結果から(表 I -1), 138kDaおよび115kDaタンパクがAM domainとGL domainの両方を有し、85kDaおよび62kDaタンパクはAM domainを、51kDaタンパクはGL domainを有している可能性が示唆された。一方、RN450から*atl*を不活化した株であるRUSAL2において、すべての抗血清がバンドを認識しなかった所見からも(表 I -1), 138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDaおよび51kDaタンパクは*atl*遺伝子産物であることが示唆された。また、zymogramによる溶菌活性の結果において、138kDaおよび115kDaタンパクが*M. luteus*および*S. aureus*の両方に、85kDaおよび62kDaタンパクが*S. aureus*に、51kDaタンパクが*M. luteus*に溶菌活性を有することから(表 I -1), 138kDaおよび115kDaタンパクはGLおよびAMの両方のdomainを有し、85kDaおよび62kDaタンパクはAM domainを、51kDaタンパクはGL domainを有している可能性が高い。以上のことから、138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDaおよび51kDaタンパクは*atl*遺伝子産物であることが強く示唆された。図 I -10にATLタンパクのプロセシングに対する仮説を示す。

Sugaiらは、3M LiCl処理により菌体表層の自己溶解酵素を効果的に抽出できると報告している⁵⁹⁾。本研究の結果から、3M LiCl処理のみでは菌体表層の自己溶解酵素を完全に抽出できないことを示している。しかし、菌体画分にて全く酵素活性を認めなかったことから、LiCl処理後の4% SDS抽出により、菌体表層に強固に結合した自己溶解酵素も完全に抽出可能であることを示唆している。また、protoplastにおいて138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDaおよび51kDaタンパクを認め、trypsin処理によりこれらのタンパクが完全に消失したことは(図 I -3b), *atl*遺伝子産物が細胞膜の外側に細胞壁

には結合しないまま局在していることを示唆している。また, trypsin処理により, LiCl画分にて atI 遺伝子産物と考えられるバンドがほとんど消失したのに対し, SDS画分に115kDaのバンドを認めたことは(図I-3a), SDS画分は細胞膜あるいはその外側に強固に結合したタンパクであり, LiCl画分は菌体外側に緩やかに結合したタンパクであることを示唆している。

表 I -1 菌体抽出自己溶解酵素の溶菌酵素活性および抗自己溶解酵素血清に対する反応性

	Bacteriolytic activities ^a		Reactivities to anti-autolysin serum ^a			
	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	Anti-GL	Anti-AM	Anti-GL peptide	Anti-AM peptide
138kDa	+	+	+	+	±	+
115kDa	+	+	+	+	±	±
85kDa	-	+	+	+	-	+
62kDa	±	+	+	+	-	+
51kDa	+	-	+	+	+	-

^a: -, No activity; ±, weak activity; +, strong activity.

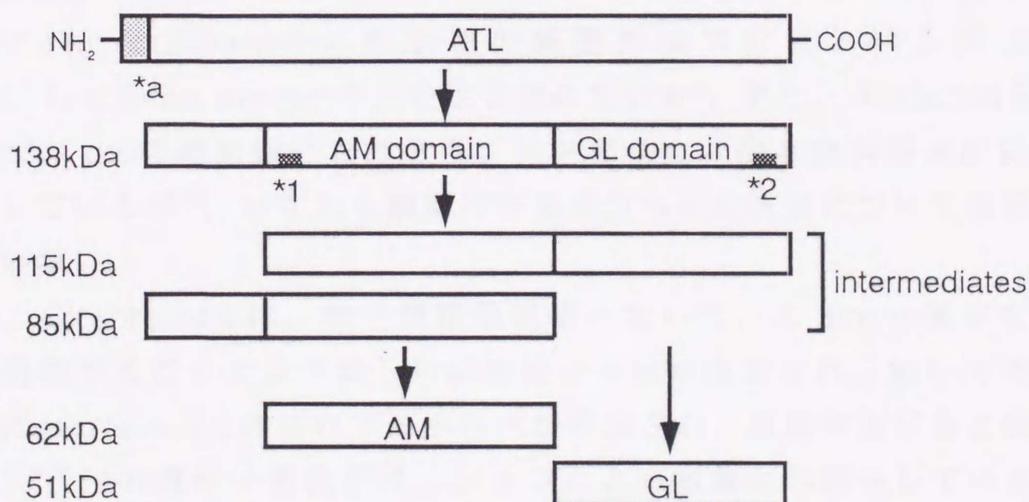


図 I -10 ATLタンパクのプロセッシングに対する仮説

*a, シグナル配列; *1, 抗AMペプチド血清作製に用いたペプチド(CPKIEEDYTSYFPKYAYR); *2, 抗GLペプチド血清作製に用いたペプチド(CGYYDKIGEVGKYFDIP)を示す。

Sugaiらは、自己溶解酵素欠失株は培養すると巨大クラスターを形成し、GLおよびAMはそのクラスターを分散させる活性を有していると報告している^{61,62}。過去にも様々な菌種において、細胞壁分解酵素の欠失と細胞分離との関連性が報告されてきた^{5,7,11,12,14,15,42,52,53,61,76,77}。免疫電子顕微鏡観察において、*atl*遺伝子産物が隔壁形成部位の表面に局在することは、*atl*遺伝子産物が菌体分離に密接に関わっていることを強く示唆している。

以前、Sugaiらは*S. aureus* FDA209P菌体から高浸透圧下でprotoplastを抽出した際、遠心により得られた上清からペプチドグリカン画分を抽出し、その画分にはSDSに安定性の溶菌酵素（自己溶解酵素）が存在しないことを示している⁵⁹。本研究において、protoplast表面に*atl*遺伝子産物の存在を認めたことから、*atl*遺伝子産物は細胞膜あるいは細胞膜から伸びた線維状の菌体成分に結合している可能性が考えられる。また、TEM観察の結果、gold particlesが隔壁形成部位の細胞壁から20-50nm離れた部位に局在していることから、*atl*遺伝子産物は細胞膜から伸びた線維状の菌体成分に結合している可能性が考えられる。その菌体成分として自己溶解酵素の調節因子として報告されている^{13,24,35,64}リポタイコ酸の可能性が考えられるが、生化学的根拠は未だ得られていない。

免疫電子顕微鏡によるペプチドグリカン加水分解酵素の局在性の研究は、過去に数例報告されている。Hobotらは、*Bacillus subtilis* 168の細胞壁における*N*-acetylmuramyl-L-alanine amidaseの局在性を報告し²³、Diazらは、*Streptococcus pneumoniae*の細胞壁の隔壁形成部位における*N*-acetylmuramyl-L-alanine amidaseの局在性を認めている⁹。また、Walderichらは、*Escherichia coli*の細胞壁におけるペプチドグリカン加水分解酵素の局在性を報告しているが⁷⁴、いずれも酵素の特異部位への局在性については明らかにしていない。

一方、Giesbrechtらは、電子顕微鏡観察において、*S. aureus*菌体をペニシリン処理することにより新しい細胞壁の合成が阻害され、続いて周囲の細胞壁にmurosomesと呼ばれる微小の穴が形成され、溶菌が生じると報告している^{17,18,19}。*Atl*遺伝子産物がペニシリンによる溶菌にも関与しているとのOshidaらの報告³⁹からも、*atl*遺伝子産物の局在性とペニシリン誘導型の溶菌との関連性を明らかにすることは重要であると考えられる。

Henzeらは、MRSAからtransposon Tn551挿入により*femA*および*femB*遺伝子を不活化した変異株を分離し、この変異株はβ-ラクタム系抗生物質への感受性が上昇することに加え、不規則な細胞分離および隔壁分離の阻害

を引き起こすこと、さらにペプチドグリカンのglycineペンタペプチドの形成および分解を阻害することなどを報告した²²⁾。このことは、glycylglycine endopeptidaseが細胞分離に関与していることを示唆している。本研究において、*atl*遺伝子産物が隔壁分離完了後の菌体分離に関与していると考えられることから、glycylglycine endopeptidaseが隔壁分離に関与している可能性も考えられる。

本研究の結果から、菌体分離における*atl*遺伝子産物の役割を模式図にまとめた(図 I-11)。Atf遺伝子産物は隔壁形成部位表面の線維状の菌体成分に結合して局在し、菌体分裂後の分離に関与していることが強く示唆された。しかし、*S. aureus*の菌体分離における*atl*遺伝子産物の役割は未だその大部分が明らかではない。Atf遺伝子産物がどのような機序で隔壁形成部位の菌体表面に特異的に局在し、またどのような菌体成分に結合して局在するのか、さらに*atl*遺伝子産物がどのようなメカニズムにより菌体分離を引き起こすのかなどについては今後の課題である。

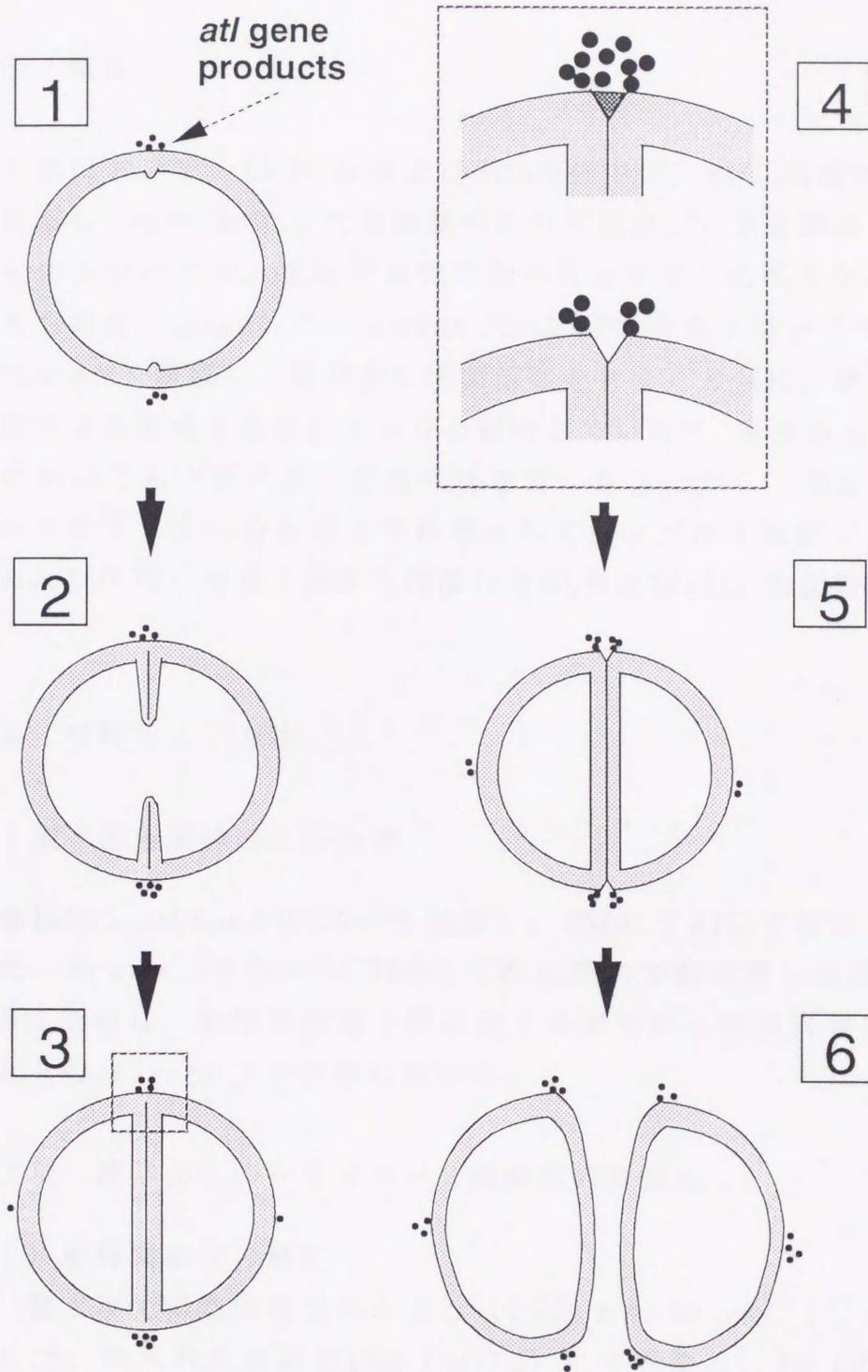


図 I-11 菌体分離における *atf* 遺伝子産物の役割 (仮説)

第2章 菌体からのクラスター分散酵素の精製および性状

第1節 概要

第1章において、LiCl画分およびSDS画分中に、抗GL血清および抗AM血清と反応し、zymogramにて溶菌活性を有するタンパクを認めたことから、これらのタンパクが*atf*遺伝子産物であることをさらに明らかにする必要性が考えられた。Sugaiらは*S. aureus* FDA209Pの培養上清から51kDa GLおよび62kDa AMを精製し、両酵素が溶菌活性を有すると共に、菌体クラスターを分散させる活性をも有していると報告している⁶²⁾。菌体から抽出したLiCl画分においてもクラスター分散活性を有したことから、本研究では、LiCl画分からクラスター分散活性を指標としてタンパクを精製し、その性状の分析および同時に培養上清から精製したGLおよびAMとの比較を行なった。

第2節 材料および方法

第1項 使用菌株および培養

菌株は*S. aureus* FDA209Pを使用し、TSBにて37℃で振とう培養を行なった。*S. aureus*を300mlのTSBにて静止期まで前培養した後、2.7ℓのTSBに接種し、対数増殖期中期に達するまで約4時間培養した。培養は計36ℓ行ない、以下の実験に用いた。

第2項 菌体からのクラスター分散酵素の精製法

1) 粗酵素画分の調製

第1項で得た培養液から遠心(4,500 x g, 30 min, 4℃)により集菌した。得られた菌体をPBS (pH7.0)にて洗浄し、3M LiCl 6~7 mlに懸濁して氷中で15分間放置後、遠心(9,000 x g, 10 min, 4℃)し、その上清を集めた。この操作を2回繰り返す、36ℓの培養液から得られた計165mlを粗酵素画分とした。

2) クロマトグラフィー

各精製段階での酵素活性は、*S. aureus* FDA209Pから分離したクラスター形成変異株Lyt66⁶¹⁾の加熱死菌 10^5 粒子/mlに各酵素画分を37℃にて30分間作用させ、作用後の粒度分布をコールターカウンター、コールターチャネライザー (model ZM, Coulter Electronics Ltd., Luton, England) およびパーソナルコンピューター (PC9801 vm2, NEC, 東京) を用いて測定し、クラスター分散に伴う分離細胞の増加を指標とした。 10^4 粒子/mlの細胞から分離細胞を1000増加させるのに必要な酵素量を1酵素活性単位 (1U) とした。また、高速液体クロマトグラフィーはHLCシステム (HLC-803D, GE-4, UV-8model II, 東曹, 東京) を使用した。

(1) TSK gel Phenyl Toyopearl 650M 疎水クロマトグラフィー

粗酵素画分を0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) に対して透析し、同緩衝液で十分平衡化したTSK gel Phenyl Toyopearl 650M (1.8 x 150 mm; 東曹, 東京) カラムにアプライした。同緩衝液で十分洗浄後、0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて溶出した。溶出した活性画分を0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) に対して透析した。

(2) TSK gel HA1000 ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー

(1) で透析した活性画分を0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化したTSK gel HA1000 (7.5 x 75 mm; 東曹, 東京) カラムにかけ、同緩衝液で十分洗浄後、30分で0.1Mから0.5Mのリン酸緩衝液 (pH 6.8) になるようリニアグラジェントで溶出した。溶出した活性画分に最終的に2.5MになるようNaClを添加した後、0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) に対して透析した。

(3) TSK gel Phenyl 5PW 疎水クロマトグラフィー

(2) で透析した活性画分を0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) で平衡化したTSK gel Phenyl 5PW (7.5 x 75 mm; 東曹, 東京) カラムにアプライし、同緩衝液で十分洗浄後、30分で0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) から0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) になるようリニアグラジェントで溶出した。溶出した活性画分は2つの画分からなり、前の画分をpeak1, 後の画分をpeak2とした。Peak1およびpeak2の各々に対し、再度最終的に2.5MになるようNaClを添加した後、各画分を0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) に対して透析した。

(4) TSK gel Phenyl 5PW 疎水クロマトグラフィー

(3) で得られたpeak1およびpeak2を(3)と同様の条件で再クロマトグラフィーし、得られた溶出画分を0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に対して透析した。

(5) TSK gel Blue 5PW アフィニティクロマトグラフィー

(4) で得られた活性画分を0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化したTSK gel Blue 5PW (7.5 x 75 mm; 東曹, 東京) カラムにアプライした。同緩衝液で十分洗浄後, 30分で0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) から0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) になるようリニアグラジェントで溶出し, 得られた活性画分を最終精製標品とした。

第3項 培養上清からのクラスター分散酵素の精製法

培養上清からのGLおよびAMの精製は, Sugaiらの方法⁶²⁾に準じて行なった。

1) 培養上清の調製

第2項で得られた培養上清に0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて平衡化したTSK gel Blue Toyopearl 650ML (東曹, 東京) を加えて攪拌後, 4℃にて一夜放置した。

2) クロマトグラフィー

以下の各精製段階での酵素活性の測定は, 菌体からの精製過程と同様にクラスター分散活性を指標として行なった。10⁴ 粒子/mlの細胞から分離細胞を1000増加させるのに必要な酵素量を1酵素活性単位 (1U) とした。

(1) TSK gel Blue Toyopearl 650ML アフィニティクロマトグラフィー

4℃にて一夜放置した培養上清から沈澱したゲルを集め, カラム (1.8 x 150 mm) にアプライし, 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて十分洗浄後, 0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) にて溶出した。溶出した活性画分を溶出に用いた緩衝液に対して透析した。

(2) TSK gel Phenyl 5PW 疎水クロマトグラフィー

(1) で溶出, 透析した活性画分を0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) で平衡化したTSK gel Phenyl 5PW (7.5 x 75 mm; 東曹, 東京) カラムにアプライし, 同緩衝液で十分洗浄後, 30分で

0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) から0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.8) になるようリニアグラジェントで溶出した。溶出した活性画分は2つの画分からなり、前の画分をpeak1、後の画分をpeak2とした。Peak1に最終的に2.5MになるようNaClを添加した後、0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) に対して透析した。また、peak2を0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に対して透析した。

(3) TSK gel Phenyl 5PW 疎水クロマトグラフィー

(2) で得られたpeak1を(2)と同様の条件で再クロマトグラフィーし、得られた溶出画分を0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) に対して透析した。

(4) TSK gel Blue 5PW アフィニティクロマトグラフィー

(2) で得られたpeak2および(3) で得られた活性画分を0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化したTSK gel Blue 5PW (7.5 x 75 mm; 東曹, 東京) カラムにアプライした。同緩衝液で十分洗浄後、30分で0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) から0.1M リン酸緩衝液 + 2.5M NaCl (pH6.8) になるようリニアグラジェントで溶出し、得られた活性画分を最終精製標品とした。

第4項 SDS-PAGEおよびWestern blottingによる自己溶解酵素の検出法

得られた精製酵素に対し、10%ポリアクリルアミドゲルを用い、第1章、第2節、第4項の方法により自己溶解酵素の検出を行なった。

第5項 菌体および培養上清からの精製酵素の性状比較

1) クラスター分散活性の分析

S. aureus FDA209Pから分離したクラスター形成変異株Lyt66の加熱死菌 10^5 粒子/mlに第2項および第3項にて精製した酵素を37℃にて30分間作用させ、作用後の粒度分布をコールターカウンター、コールターチャネライザーおよびパーソナルコンピューターを用いて測定した。 10^4 粒子/mlの細胞から分離細胞を1000増加させるのに必要な酵素量を1酵素活性単位(1U)とした。

(1) クラスター分散活性に及ぼすpHの影響

酵素活性測定系における0.1M リン酸緩衝液のpHを4から8の範囲で変化させて測定した。

(2) クラスター分散活性に及ぼすNaCl濃度の影響

酵素活性測定系におけるNaClの濃度を12.5から200mM（2倍希釈系列）の範囲で変化させて測定した。

(3) クラスター分散活性に及ぼすCibacron BlueおよびEDTAの影響

酵素活性測定系において25 μ M Cibacron Blue F3G-A（Fluka AG, Chemische Fabrik, Buchs, Switzerland）あるいは3.125mM EDTA（nacalai tesque, 京都）を添加し、それぞれの分散活性を測定した。

2) 溶菌活性の分析

*M. luteus*あるいは*S. aureus*加熱死菌を0.5mg/mlになるように50mMリン酸緩衝液（pH6.8）1mlに懸濁し、各精製酵素250ng/mlを添加後、37℃にて振とうし、波長660nmでの濁度を分光光度計により経時的に測定した。

第3節 結果

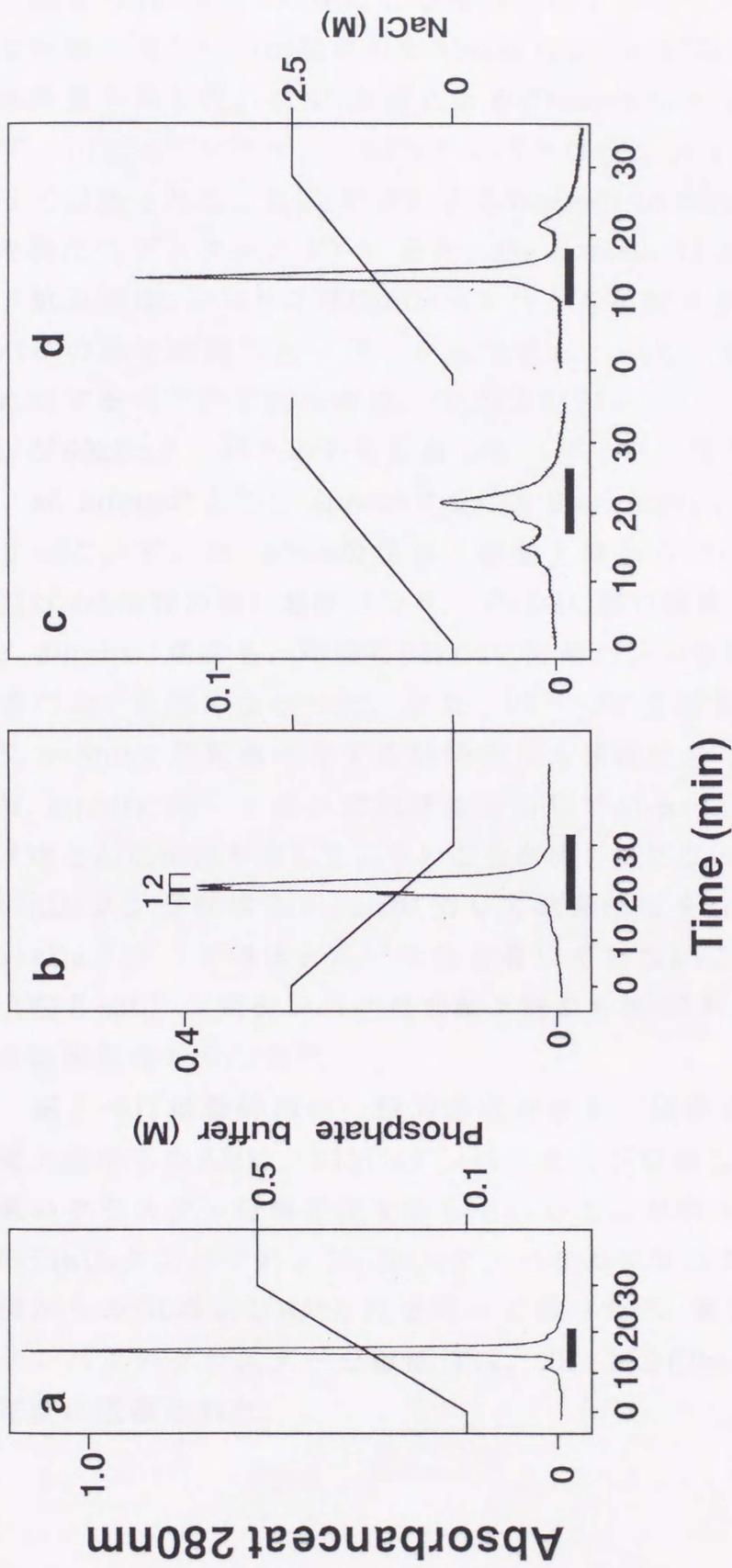
第1項 菌体および培養上清からのクラスター分散酵素の精製

クラスター形成株Lyt66の加熱死菌に対して菌体から抽出したLiCl画分を作用させ、コールターカウンターシステムを用いてクラスター分散活性を検討したところ、活性を認めたことから、LiCl画分よりクラスター分散活性を指標としてタンパクを精製した。菌体からの精製のカラムクロマトグラムを図II-1に示す。精製第1段階として、LiCl画分を0.1Mリン酸緩衝液+2.5M NaCl (pH6.8) に透析し、TSK gel Phenyl Toyopearl 650Mにアプライしたところ、LiCl画分のほとんどの活性画分はカラムに結合した。精製第2段階のTSK gel HA1000 ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーにおいても同様に、ほとんどの活性画分はカラムに結合し、単一のpeakとして溶出された(図II-1a)。精製第3段階のTSK gel Phenyl 5PW クロマトグラフィーにてpeak1とpeak2を分離した(図II-1b)。各々のpeakは最終的にTSK gel Blue 5PW クロマトグラフィーにより単一のpeakとして溶出された(図II-1c,d)。表II-1に各精製段階での結果のまとめを示す。

表II-1 菌体からのクラスター分散酵素の精製の要約

Fraction	Protein (μg)	Cluster-dispersing activity	
		SP act ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	U ^a
Crude	12144	6.79	82458
Phenyl 650M	2180	4.59	10006
HA1000	2264	8.83	19991
Phenyl 5PW (peak1)	127.2	15.72	2000
Phenyl 5PW (peak1)	291	31.25	9094
Blue 5PW (peak1)	18.4	5.43	99.9
Phenyl 5PW (peak2)	64.0	17.18	1100
Phenyl 5PW (peak2)	159.6	18.80	3000
Blue 5PW (peak2)	22.4	125.0	2800

^a: 1単位(U)は基質である 10^5 粒子/mlの細胞クラスターに作用させたときに、 10^4 個の分離細胞が生じる酵素量とした。



図II-1 菌体からの精製過程での高速液体クロマトグラム

- (a) TSK gel HA1000
- (b) TSK gel Phenyl 5PW
- (c) TSK gel Blue 5PW (peak1)
- (d) TSK gel Blue 5PW (peak2)

1, peak1; 2, peak2
 ■ はクラスタ一分散活性存在部分を示す。

第2項 精製酵素の性状比較

図II-2aにSDS-PAGEによる銀染色のタンパクパターンを示す。Peak1は培養上清からの精製された51kDa GL, peak2は62kDa AMと同一の電気泳動度を示した。抗AM血清によるWestern blottingの結果を図II-2bに示す。51kDaタンパク, 62kDaタンパクはGL, AMと同様に抗AM血清によって認識された。抗GL血清によるWestern blottingにおいても同様の結果を得た(データ示さず)。また, GL domainのC末端領域に対するペプチド抗血清は, AMおよび62kDaタンパクを認識せず, GLおよび51kDaタンパクのみを認識した(データ示さず)。一方, AM domainのN末端領域に対するペプチド抗血清は, GLおよび51kDaタンパクを認識せず, AMおよび62kDaタンパクのみを認識した(データ示さず)。

*M. luteus*および*S. aureus*ゲルによるzymogramの結果を図II-2cおよびII-dに示す。*M. luteus*の場合, 培養上清からのGLおよびAMと同様に, 51kDaに活性の強い溶菌バンド, 62kDaに弱い溶菌バンドを認めた。一方, *S. aureus*の場合も, 同様に62kDaに溶菌バンドを認めたが, 51kDaには溶菌バンドを認めなかった。また, 図II-3に各精製酵素の*M. luteus*および*S. aureus*加熱死菌に対する経時的な溶菌活性を示す。51kDaタンパクは*M. luteus*に対して高い溶菌活性を有しているのに対し, 62kDaタンパクはほとんど活性を有していないことが明らかになった(図II-3a)。一方, 62kDaタンパクは*S. aureus*に対して溶菌活性を有しているのに対し, 51kDaタンパクはほとんど活性を有していないことが明らかになった(図II-3b)。両タンパクは培養上清からのGLおよびAMとそれぞれ同一の溶菌活性を示した²⁹⁾。

表II-2に精製酵素の一般的性状を示す。菌体62kDaタンパクおよび培養上清からのAMは, 51kDaタンパクおよび培養上清からのGLに比較して高いクラスター分散活性を有していることが明らかとなった。菌体からの51kDaタンパクおよび62kDaタンパクのクラスター分散活性は, 培養上清からのGLおよびAMとほぼ同一であった²⁹⁾。また, 51kDaおよび62kDaタンパクのクラスター分散活性は, 25 μ MのCibacron Blue F3G-Aにより完全に阻害された。

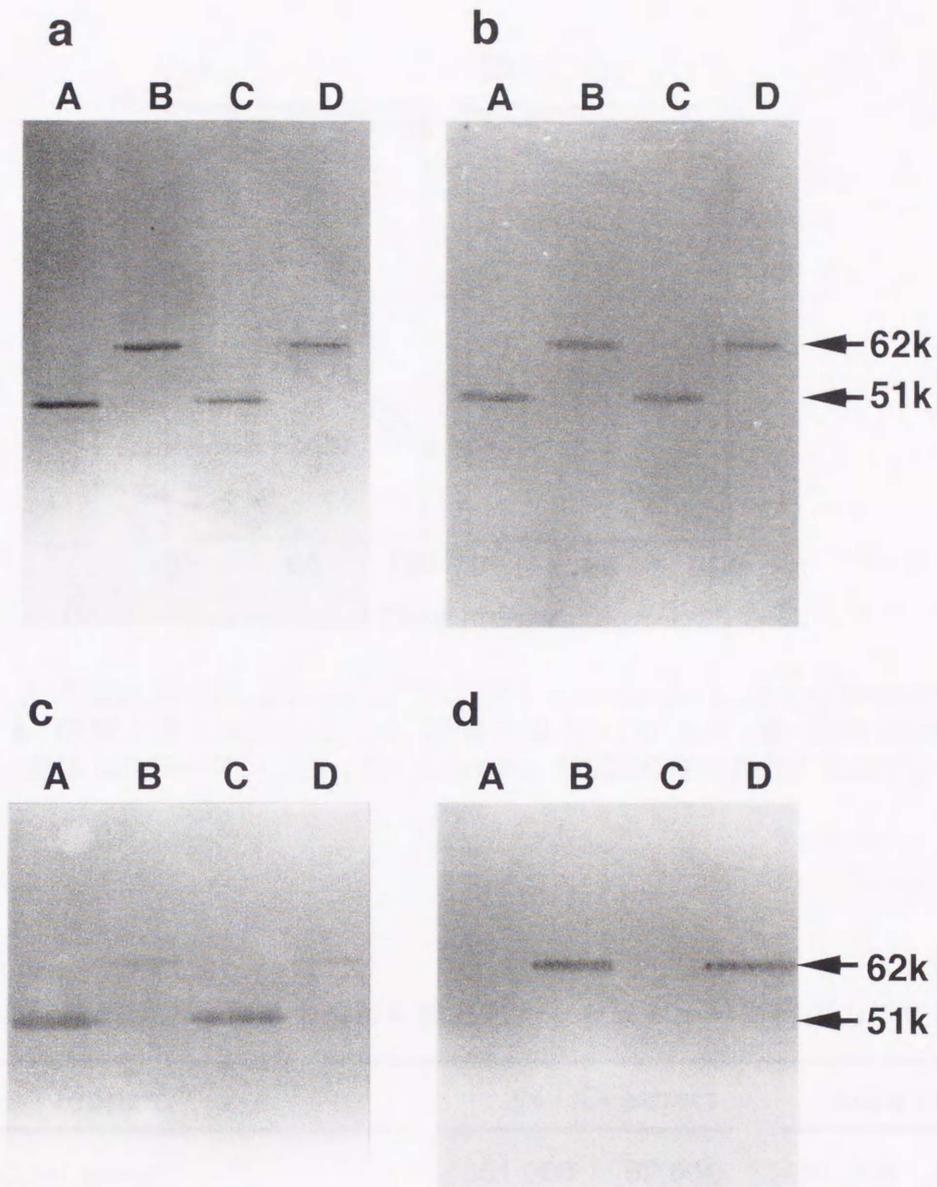


図 II -2 菌体から精製したクラスター分散活性酵素の SDS-PAGE 後の銀染色, イムノブロッティングおよび zymogram による解析
 (a) SDS-PAGE 後の銀染色
 (b) 抗 AM 血清によるイムノブロッティング
 (c) *M. luteus* 菌体を封入したゲルによる zymogram
 (d) *S. aureus* 菌体を封入したゲルによる zymogram
 レーン: A, 菌体から精製した peak1 (150ng protein); B, 菌体から精製した peak2 (150ng protein); C, 培養上清から精製した GL (150ng protein); D, 培養上清から精製した AM (150ng protein)
 右側矢印は検出されたバンドの分子量 (Da) を示す。

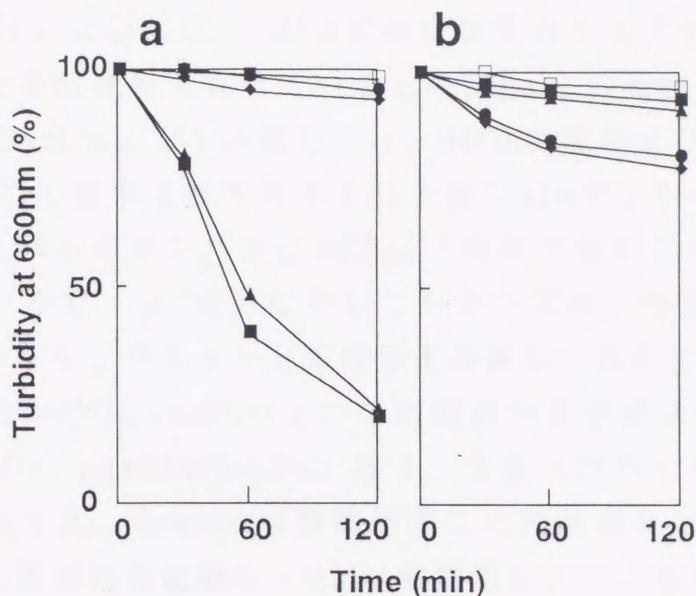


図 II -3 各精製酵素の*M. luteus* (a) および*S. aureus* (b) に対する溶菌活性
 ▲, 培養上清 51kDa GL ; ◆, 培養上清 62kDa AM ; ■, 菌体 51kDa タンパク ; ●, 菌体 62kDa タンパク ; □, Control (精製酵素非添加) を示す。

表 II -2 菌体および培養上清から精製したクラスター分散酵素の性状の比較

Property	3M LiCl extract		Supernatant	
• Molecular weight	51,000	62,000	51,000	62,000
• Separation activity to <i>S. aureus</i>				
Lyt66 (U/ μ g)	5.43	125.0	7.65	151.5
• pH optima	7.0	7.0	7.0	7.0
• Ionic optima (NaCl conc., mM)	100	100	100	100
• Stimulation (+) or Inhibition (-) of separation activity:				
25 μ M Cibacron blue F3G-A	-100%	-100%	-100%	-100%
3.125mM EDTA	-80%	-100%	-100%	-100%

第4節 考察

51kDa GLおよび62kDa AMは溶菌活性を有すると共に、菌体クラスターを分散させる活性をも有しているとのSugaiらの報告がある⁶²⁾。第1章において、LiCl画分およびSDS画分中に、抗GL血清および抗AM血清と反応し、zymogramにて溶菌活性を有する分子量51kDaおよび62kDaのタンパクを認めしたが、これらのタンパクが*at*遺伝子産物であることを明らかにする必要がある。一方で、LiCl画分においてもクラスター分散活性を有したことから、同画分よりクラスター分散酵素を精製し、性状分析を行なった。

分離したpeak1とpeak2の2つの活性画分を最終精製した結果、peak1が分子量51kDa、peak2が62kDaであり、培養上清から精製したGLおよびAMと同一であった。Sugaiらは酵素処理した細胞壁を分析した結果、GLは細胞壁の還元基末端を遊離し、AMは細胞壁のアミノ基を遊離すると報告している^{57,62)}。精製した51kDaおよび62kDaタンパクは、抗血清との反応性、溶菌活性およびクラスター分散活性において、各々GLおよびAMの性状とほぼ同一であったことから、菌体から精製した51kDaタンパクはGL、62kDaタンパクはAMであることが強く示唆された。

Lyt66加熱死菌に対するクラスター分散活性において、62kDaタンパクおよびAMは、51kDaタンパクおよびGLに比較して高い活性を有していることが明らかとなった。両酵素のペプチドグリカンに対する作用部位が異なっていることから、グリカン鎖を切断するより架橋構造を切断する方が菌体分離に関してより効率が良いあるいは細胞壁の娘細胞へと分離する部位がAMに対してより感受性が高い等の可能性が考えられる。

第1章の生化学的検索において、LiCl画分およびSDS画分には138kDa、115kDaおよび85kDaタンパクに加えて51kDaおよび62kDaタンパクが存在し、免疫電子顕微鏡的検索において、菌体表層の隔壁形成部位に*at*遺伝子産物が局在すると示唆されたことから、菌体表層に局在するGLおよびAMは菌体分離に深く関与していると考えられる。

第3章 自己溶解酵素ATLのプロセシングに及ぼすCibacron Blue F3G-Aの影響

第1節 概要

Oshidaらは、自己溶解酵素遺伝子 *atl* に対する open reading frame が 3768bp であり、1256個のアミノ酸によりコードされた分子量 137,381Da のタンパク (ATL) を構成していると報告している⁴⁰⁾。第1章および第2章の結果から、黄色ブドウ球菌は前駆体として 138kDa のタンパクを産生し、膜表面あるいは外側において、115kDa および 85kDa 等の中間体を経て、51kDa GL および 62kDa AM にプロセシングを受けた後、培養上清中に放出される可能性を示唆した。

アフィニティクロマトグラフィに対するリガンドとして用いられるトリアジン系色素 Cibacron Blue F3G-A (CB)^{4,55)} は、*in vivo* で菌体分離を阻害し、巨大クラスターを形成することが知られている^{58,60)}。第2章の結果からも、*atl* 遺伝子産物が *in vivo* で菌体分離に関与していると考えられることから、本研究では、まず ATL のプロセシングに及ぼす CB の影響を検討した。

また、CB を添加して培養した菌より 138kDa および 115kDa タンパクを精製した後、両タンパクの N 末端アミノ酸配列を決定し、ATL との相同性についても検討した。

第2節 材料および方法

第1項 Cibacron Blue F3G-A (CB) によるクラスター分離活性阻害

2mM から 2 μ M (2 倍希釈系列) の CB を添加した Mueller-Hinton 培地 (BBL, Becton Dickinson and Co., Cockeysville, MD, USA) 100 μ l 中に *S. aureus* FDA209P を 10⁵ cells 接種し、12時間静置培養した後、位相差顕微鏡および透過型電子顕微鏡にてクラスターの形成を観察した。

第2項 培養条件および自己溶解酵素画分の調製

1) ATLのプロセッシングに及ぼすCB濃度の影響

0, 15, 30, 60, 120あるいは240 μ MのCBを添加したMueller-Hinton培地中に, *S. aureus* FDA209Pを 10^6 cells/ml接種し, 37°Cにて12時間静置培養した後, 以下の方法で自己溶解酵素画分を調製した。

2) ATLのプロセッシングに及ぼす時間の影響

60 μ M CB添加あるいは非添加のMueller-Hinton培地中に, *S. aureus* FDA209Pを 10^6 cells/ml接種し, 37°Cにて1, 3, 6あるいは12時間静置培養した後, 以下の方法で自己溶解酵素画分を調製した。

3) 自己溶解酵素画分の調製

1) あるいは2) の条件で培養した培養液から, 3つの画分を以下の方法で調製した。

培養上清画分(上清画分) : 培養液を遠心(9,000 x g, 10 min, 4°C)後, 得られた培養上清を80%飽和硫酸アンモニウムにて濃縮し, 0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)に透析したものをを用いた。

菌体LiCl抽出画分(LiCl画分) : 培養液から集菌した菌体に対し, 第1章, 第2節, 第2項に述べた方法で画分を調製した。

菌体SDS抽出画分(SDS画分) : LiCl抽出後の菌体に対し, 同様に第1章, 第2節, 第2項に述べた方法で画分を調製した。

第3項 SDS-PAGEおよびWestern blottingによる*atl*遺伝子産物の検出法

得られた各画分に対し, 7.5%ポリアクリルアミドゲルを用い, 第1章, 第2節, 第4項の方法により自己溶解酵素の検出を行なった。

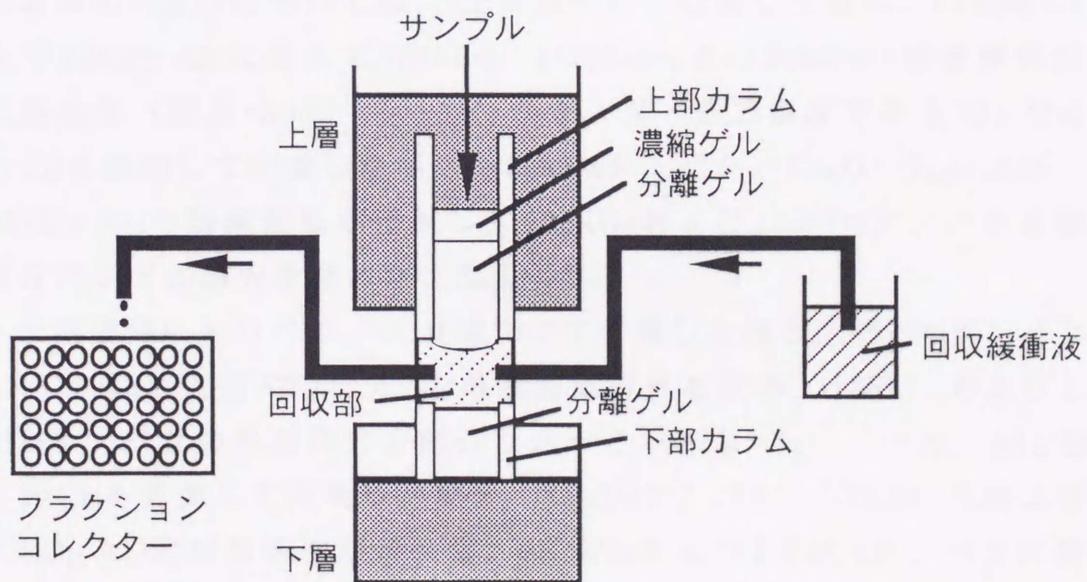
第4項 138kDaおよび115kDaタンパクの精製法

第2項にて抽出したSDS画分を7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたバイオフィレーシスⅢシステム(AE-6700, ATTO, 東京)(図Ⅲ-1)に展開し, タンパクの分取を行なった。得られたタンパクに対し, SDS-PAGE銀染色像, zymogramによる溶菌酵素活性およびWestern blottingによる抗GLあるいは抗AM血清との反応性から138kDaタンパクおよび115kDaタンパクを確認した。また, 両タンパクの一般的性状として, 第2章, 第2節, 第5項の方法で巨大クラスター形成変異株Lyt66に対する各

精製タンパクのクラスター分離活性および*S. aureus*ならびに*M. luteus*加熱死菌に対する各精製タンパクの溶菌活性も検討した。

第5項 自己溶解酵素のN末端アミノ酸分析法

第4項の結果において精製した138kDaおよび115kDaタンパクを、7.5%分離ゲルを用いたSDS-PAGEに展開し、Towbinらの方法⁶⁹⁾に従い、PVDF膜（Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA）に10℃で65分間、電氣的に転写した³³⁾。PVDF膜上のタンパクをクーマシー染色して138kDaタンパクおよび115kDaタンパクのバンドを切り出し、ペプチドシーケンサー（PSQ2システム、島津製作所、東京）にてN末端アミノ酸配列を決定した。



図III-1 バイオフォーシスⅢシステムの基本構成の模式図

第3節 結果

第1項 Cibacron Blue F3G-A (CB) によるクラスター分離活性阻害

S. aureus FDA209PはCB存在下であっても、非存在下と同様の増殖速度を示し、30 μ M以上のCB濃度にて菌体分離がほとんど阻害され、巨大なクラスター形成を認めた(図III-2)。

第2項 自己溶解酵素ATLのプロセシングに及ぼすCBの影響

自己溶解酵素ATLのプロセシングに及ぼすCBの影響をzymogramおよびWestern blottingにより検討した結果を以下に示す。

1) ATLのプロセシングに及ぼすCB濃度の影響

抽出した上清画分、LiCl画分およびSDS画分に対するzymogramの結果を図III-3に、Western blottingの結果を図III-4に示す。

*M. luteus*および*S. aureus*ゲルによるzymogramの結果から、LiCl画分およびSDS画分においては、CB非添加にて培養した場合、51kDa GLおよび62kDa AMに加えて138kDa、115kDaおよび85kDaに溶菌酵素活性を認めた(図III-3b,c)。一方、クラスター形成濃度である30 μ M以上のCBを添加して培養した場合、85kDaタンパク、51kDa GLおよび62kDa AMの酵素活性が消失し、138kDaおよび115kDaタンパクの酵素活性バンドの増大を認めた(図III-3b,c)。

上清画分においては、CB非添加にて培養した場合、85kDaタンパク、51kDa GLおよび62kDa AMの溶菌酵素活性を認め、138kDaおよび115kDaタンパクの酵素活性を認めなかった(図III-3a)。一方、30 μ M以上のCBを添加して培養した場合、85kDaタンパク、51kDa GLおよび62kDa AMの酵素活性が消失し、138kDaおよび115kDaタンパクの酵素活性を認めた(図III-3a)。

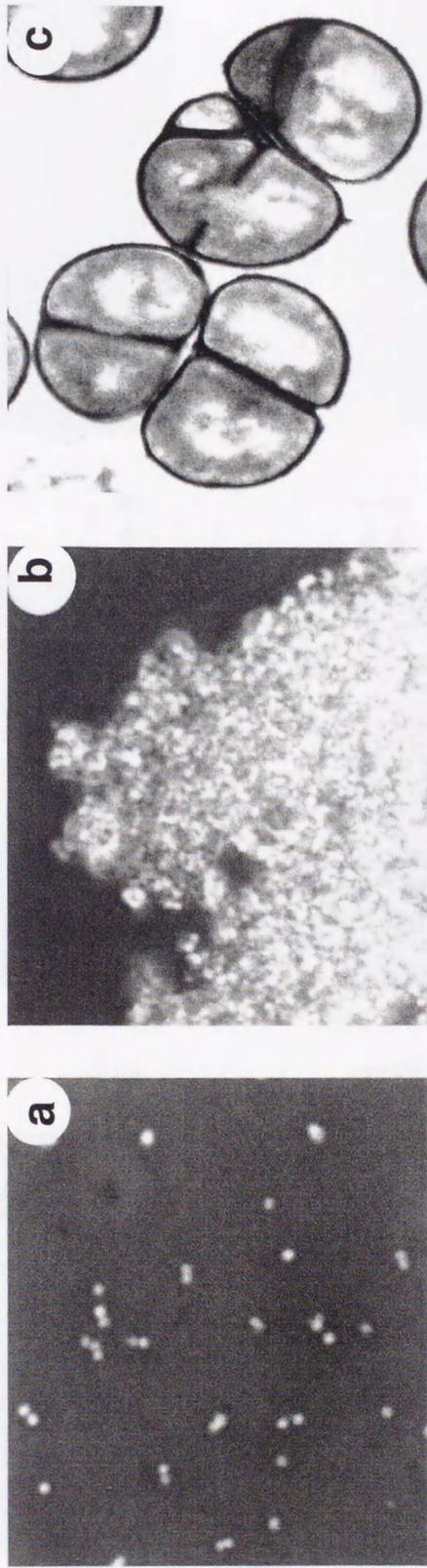
Western blottingにおいても、zymogramにて酵素活性を有したバンドはすべて抗GL、AM血清によって認識され、zymogramと同様の結果であった(図III-4)。

2) ATLのプロセッシングに及ぼす時間の影響

抽出した上清画分，LiCl画分およびSDS画分に対するzymogramの結果を図Ⅲ-5に，Western blottingの結果を図Ⅲ-6に示す。

Zymogram，Western blottingおよびSDS-PAGE後の銀染色の結果から，LiCl画分およびSDS画分においては，CB非添加にて培養した場合，培養約1時間後より138kDaタンパク，3時間後より115kDaタンパクを認めたのに加え，3時間後より85kDaタンパクおよび51kDa GLを，6時間後より62kDa AMを認めた。一方，60 μ M CBを添加して培養した場合，培養約1時間後より138kDaタンパク，3時間後より115kDaタンパクを認めたが，85kDaタンパク，51kDa GLおよび62kDa AMを認めなかった（図Ⅲ-5b,c，Ⅲ-6b,c）。

上清画分においては，CB非添加にて培養した場合，培養約6時間後より85kDaタンパクおよび51kDa GLを認め，12時間後より62kDa AMを認めたが，138kDaおよび115kDaタンパクを認めなかった。一方，60 μ M CBを添加して培養した場合は，培養約3時間後より138kDaおよび115kDaタンパクを認めたが，85kDaタンパク，51kDa GLおよび62kDa AMを認めなかった（図Ⅲ-5a，Ⅲ-6a）。

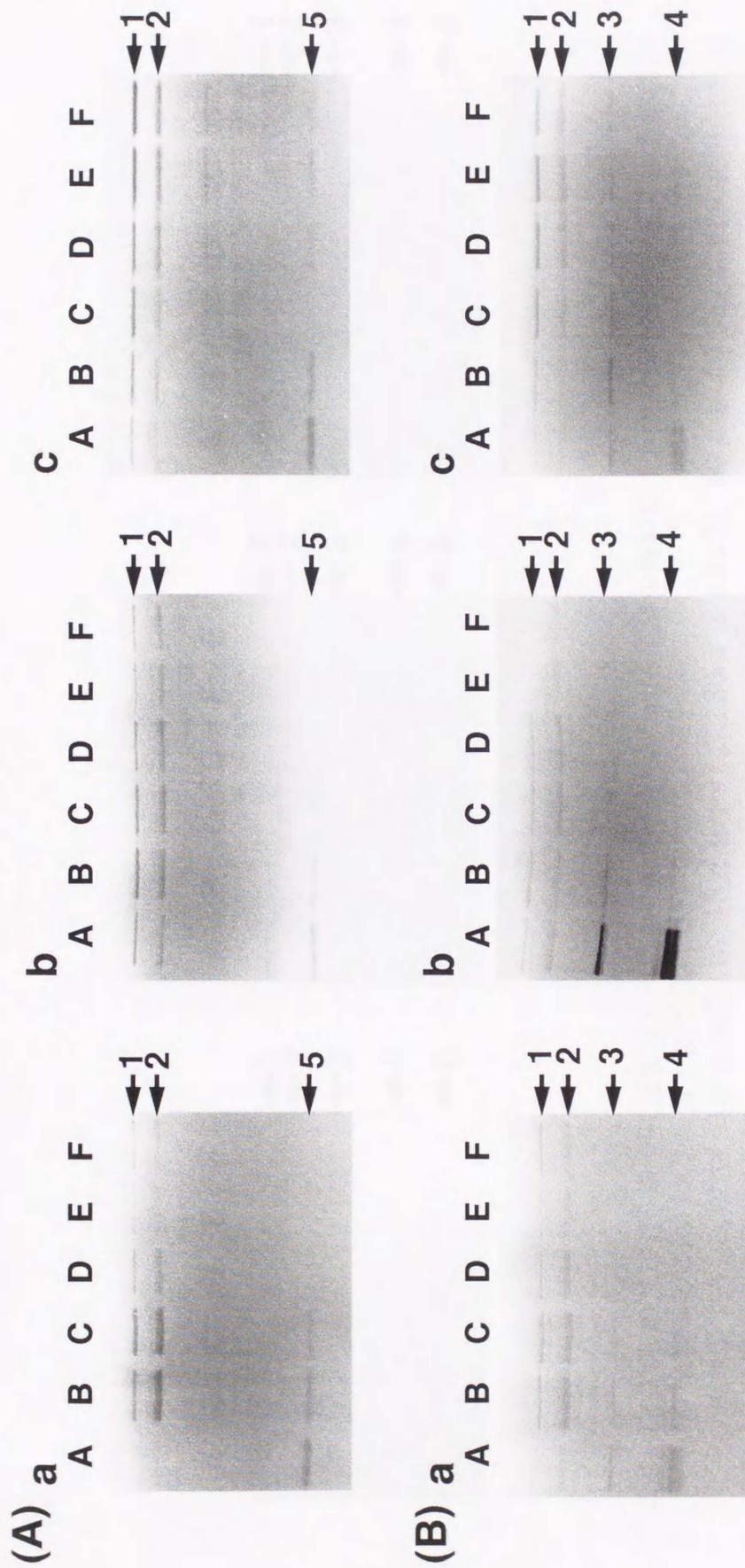


図Ⅲ-2 Cibacron Blue F3G-A (CB) 存在下培養による *S. aureus* FDA209P の巨大クラスタ形成
(参考文献 58 改変)

(a) CB 非存在下培養における位相差顕微鏡像 (直接倍率 X2500)

(b) CB 存在下培養における位相差顕微鏡像 (直接倍率 X2500)

(c) CB 存在下培養における透過型電子顕微鏡像 (直接倍率 X32000)



図III -3 ATLのプロセシングに及ぼすCB濃度の影響 (zymogram による解析)

(A) *M. luteus* 菌体を封入したゲルによる zymogram

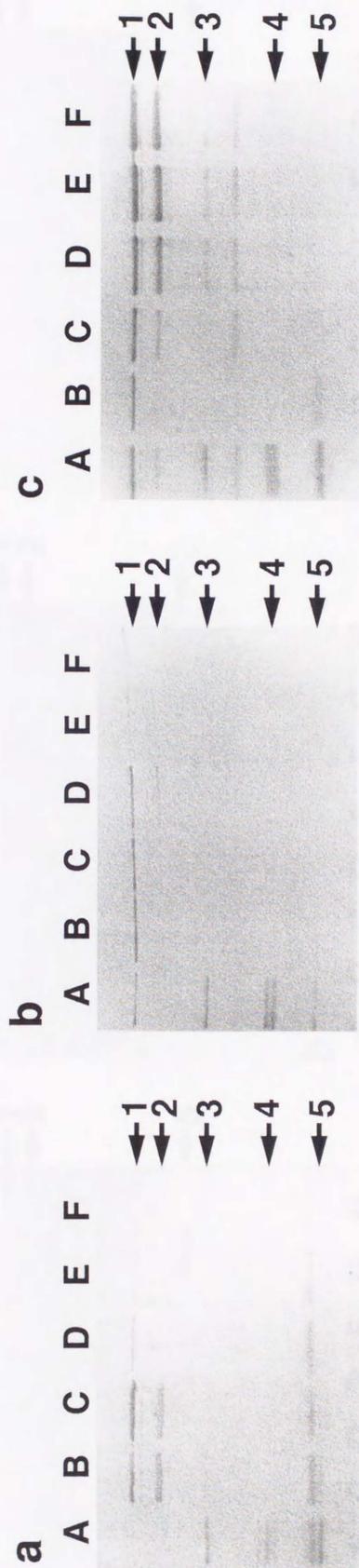
(B) *S. aureus* 菌体を封入したゲルによる zymogram

(a) 上清画分; (b) LiCl 画分; (c) SDS 画分

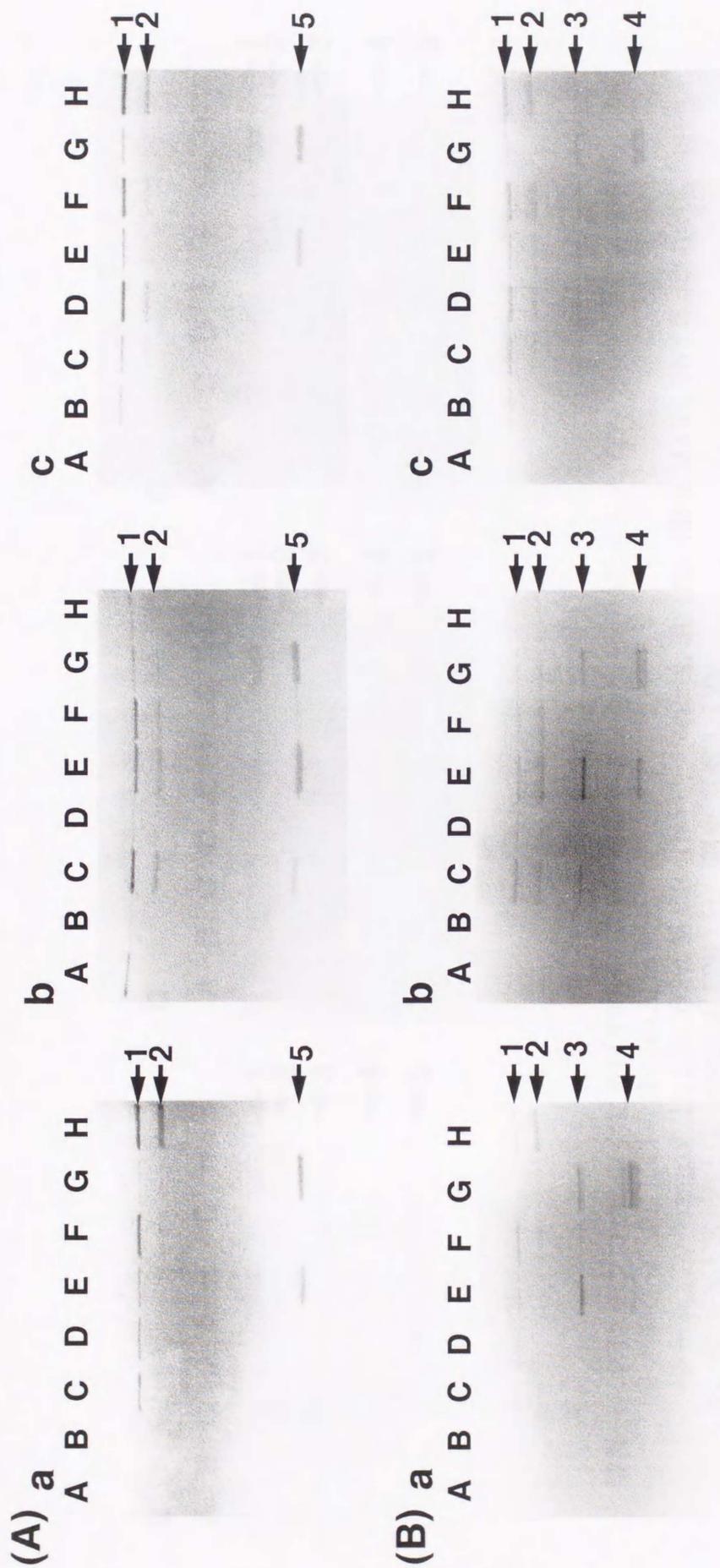
レーン: A, control (0 μg/ml); B, 15 μg/ml; C, 30 μg/ml; D, 60 μg/ml; E, 120 μg/ml; F, 240 μg/ml

右側矢印は検出された溶菌バンド

1, 138kDa; 2, 115kDa; 3, 85kDa; 4, 62kDa; 5, 51kDa を示す。



図III-4 ATLのプロセシングに及ぼすCB濃度の影響(抗GL, AM血清を用いたイムノブロットイングによる解析)
 (a) 上清画分; (b) LiCl画分; (c) SDS画分
 レーン: A, control (0 μ g/ml); B, 15 μ g/ml; C, 30 μ g/ml; D, 60 μ g/ml; E, 120 μ g/ml;
 F, 240 μ g/ml
 右側矢印は検出されたバンド: 1, 138kDa; 2, 115kDa; 3, 85kDa; 4, 62kDa; 5, 51kDaを示す。



図III-5 ATLのプロセシグに及ぼす時間の影響 (zymogram による解析)

(A) *M. luteus* 菌体を封入したゲルによる zymogram

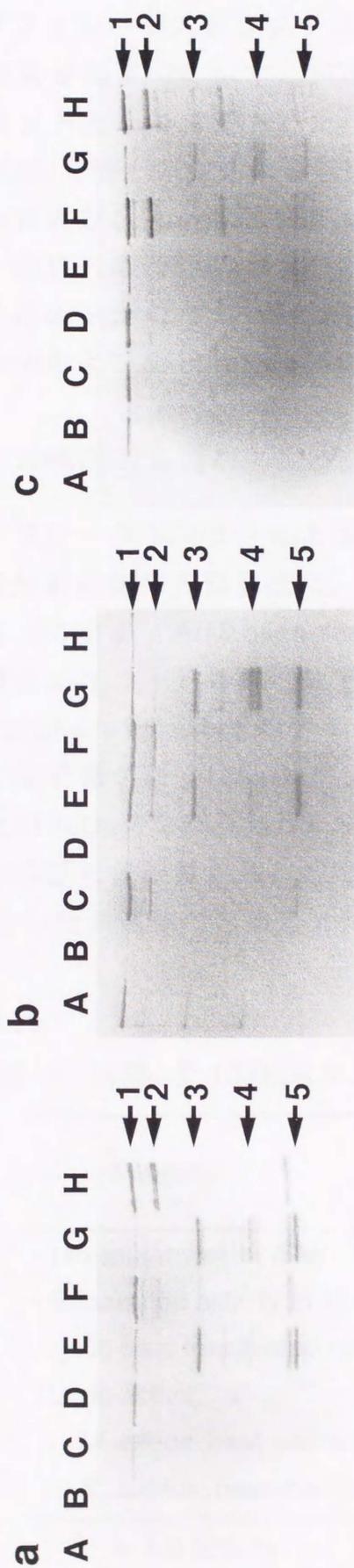
(B) *S. aureus* 菌体を封入したゲルによる zymogram

(a) 上清画分 ; (b) LiCl 画分 ; (c) SDS 画分

レーン : A, control, 1h ; B, 60 μM CB, 1h ; C, control, 3h ; D, 60 μM CB, 3h ; E, control, 6h ;

F, 60 μM CB, 6h ; G, control, 12h ; H, 60 μM CB, 12h

右側矢印は検出された溶菌バンド : 1, 138kDa ; 2, 115kDa ; 3, 85kDa ; 4, 62kDa ; 5, 51kDa を示す。



図III-6 ATLのプロセシングに及ぼす時間の影響 (抗GL, AM血清を用いたイムノブロッティングによる解析)
 (a) 上清画分; (b) LiCl画分; (c) SDS画分
 レーン: A, control, 1h; B, 60 μ M CB, 1h; C, control, 3h; D, 60 μ M CB, 3h; E, control, 6h;
 F, 60 μ M CB, 6h; G, control, 12h; H, 60 μ M CB, 12h
 右側矢印は検出されたバンド: 1, 138kDa; 2, 115kDa; 3, 85kDa; 4, 62kDa; 5, 51kDaを示す。

第3項 138kDaおよび115kDaタンパクの精製

バイオフィレーシスⅢシステムによる138kDaおよび115kDaタンパクの精製の結果を図Ⅲ-7に示す。SDS-PAGE銀染色において、両タンパクは単一のバンドとして精製された(図Ⅲ-7a)。また、両タンパクは抗GLおよび抗AM血清との反応性を認め(図Ⅲ-7b)、zymogramの結果からも*M. luteus*および*S. aureus*に対する溶菌酵素活性が認められた(データ示さず)。表Ⅲ-1に138kDaおよび115kDaタンパクの一般的性状を示す。両タンパクは*in vitro*にて*S. aureus*菌体に対するクラスター分離活性ならびに*M. luteus*および*S. aureus*菌体に対する溶菌活性を認めなかった。

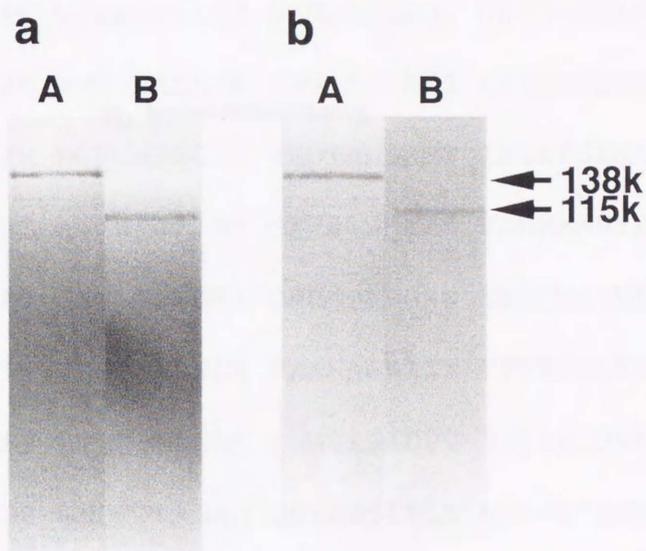
第4項 138kDaおよび115kDaタンパクのN末端アミノ酸分析

ペプチドシーケンサーによる138kDaおよび115kDaタンパクのN末端アミノ酸分析の結果を図Ⅲ-8に、Oshidaらが発表したATLのアミノ酸配列を図Ⅲ-9に示す。AtIのopen reading frameは3768bpであり、1256個のアミノ酸によりコードされた分子量137,381Daのタンパクを構成している⁴⁰⁾。138kDaタンパクのN末端アミノ酸配列とATLのアミノ酸配列との比較ならびに分子量から、138kDaタンパクはシグナル配列切断後のATLであり、また115kDaタンパクのN末端アミノ酸配列とATLのアミノ酸配列との比較ならびに分子量から、115kDaタンパクは62kDa AMおよび51kDa GLの結合した前駆体であることが強く示唆された。

表Ⅲ-1 精製した138kDaタンパクおよび115kDaタンパクの性状

Property	<i>atl</i> gene products	
	138kDa	115kDa
• Molecular weight (Da)	138,000	115,000
• Separation activity to <i>S. aureus</i>		
Lyt66 heat inactivated cells	— ^a	—
• Lytic activity to:		
<i>M. luteus</i> heat inactivated cells	—	—
<i>S. aureus</i> heat inactivated cells	—	—

^a: —, No activity



図Ⅲ-7 菌体から精製した 138kDa タンパクおよび 115kDa タンパクの SDS-PAGE 後の銀染色およびイムノブロッティングによる解析
 (a) SDS-PAGE 後の銀染色
 (b) 抗 GL および AM 血清によるイムノブロッティング
 レーン : A, 精製 138kDa タンパク (150ng protein) ; B, 精製 115kDa タンパク (150ng protein)
 右側矢印は検出されたバンドの分子量 (Da) を示す。

138kDa タンパク

Ala-Glu-Thr-Thr-Gln-Asp-Glx-Thr-X-Asn

115kDa タンパク

Ala-X-Ala-Gln-Pro-Arg-Ser-Val-Ala-Ala

図Ⅲ-8 138kDa タンパクおよび 115kDa タンパク N 末端アミノ酸配列

第4節 考察

各抽出画分に対するCBの影響を表Ⅲ-2にまとめた。Zymogram, Western blottingおよびSDS-PAGE後の銀染色の結果から, CB非添加にて培養した場合, LiCl画分およびSDS画分においては, 51kDa GLおよび62kDa AMと共に138kDa, 115kDaおよび85kDaタンパクを認めたのに対し, 上清画分においては, 138kDaおよび115kDaタンパクを認めず, 85kDaタンパク, 51kDa GLおよび62kDa AMを認めた。第1章および第2章の結果からも, ATLは138kDaタンパクとして産生された後, LiCl画分あるいはSDS画分において115kDaおよび85kDaタンパク等の中間体を経て51kDa GLおよび62kDa AMにプロセッシングを受けると考えられる。しかし, 上清画分に85kDaタンパク, 51kDa GLおよび62kDa AMの活性のみを認めたことから, 培養上清中には, プロセッシングを受けた成熟型の51kDa GL, 62kDa AMあるいは85kDaタンパクの形でのみ放出されるものと考えられる。

一方, クラスタ形成濃度である30 μ M以上のCBを添加した場合, LiCl画分およびSDS画分において85kDaタンパク, 51kDa GLおよび62kDa AMが消失し, 138kDaおよび115kDaタンパクの増大を認めたことから, CBは138kDaおよび115kDaタンパクの51kDa GLおよび62kDa AMへのプロセッシングを阻害している可能性が強い。また, 上清画分において, CBにより85kDaタンパク, 51kDa GLおよび62kDa AMが消失し, 138kDaおよび115kDaタンパクを認めたことから, 培養上清中に138kDaおよび115kDaタンパクの形で放出されるものと考えられる。しかし, CB濃度の増加に伴って, SDS画分における138kDaおよび115kDaタンパクの活性およびタンパク量が増加し, 逆に上清画分における活性およびタンパク量が減少したことは, CBの濃度が高くなるにつれて, 培養上清への*atl*遺伝子産物の放出が阻害され, SDS画分への蓄積が促進されていると思われる。

Oshidaらは, スルヒドリルプロテアーゼ阻害剤*p*-hydroxymercuribenzoic acid存在下にて培養した*S. aureus* RN450の4% SDS抽出画分において, 51kDa GLおよび62kDa AMに相当する溶菌バンドが, *M. luteus*および*S. aureus*ゲルを用いたzymogramにおいて減弱し, 対照的に約150kDaのサイズを有する溶菌バンドが増強したと報告している⁴⁰⁾。このことは, 産生された前駆体タンパクがプロテアーゼによってプロセッシングを受け, 51kDa GLおよび62kDa AMになることを示唆している。

30 μ M以上のCB濃度におけるATLのプロセッシング阻害に加え、精製した138kDaおよび115kDaタンパクがクラスター分散活性を有していなかったことは、成熟型のGLおよびAMが菌体分離に関与していることを強く示唆している。

CBによるATLのプロセッシング阻害のメカニズムとして、少なくとも2つの可能性が考えられる。1つはCBがATLのプロセッシングを受ける部位に直接結合することにより、プロセッシングを引き起こす酵素の作用を阻害する可能性、もう1つはCBがATLに直接作用するのではなく、プロセッシングを引き起こす酵素（processing enzyme）の酵素活性を阻害する可能性である。GLおよびAMがCibacron Blue F3G-Aをリガンドとしたゲルに特異的に結合したこと⁵⁷⁾から、それぞれがCBと結合するドメインを有すると考えられるが、プロセッシングを受ける前の138kDaおよび115kDaタンパクがCBと結合するかどうかについては今後の課題である。

本研究において、138kDaおよび115kDaタンパクは、バイオフォーシスⅢシステムにより各々単一のバンドとして精製された。SDS画分におけるCB濃度に比例した138kDaおよび115kDaタンパクの蓄積は、両タンパクのより効率の良い精製を可能にした。*M. luteus*および*S. aureus*ゲルによるzymogramにおいて、138kDaおよび115kDaタンパクは溶菌活性を有していた。しかし、*M. luteus*あるいは*S. aureus*菌体に対する溶菌活性において、138kDaおよび115kDaタンパクは成熟型のGLあるいはAMに比較して極めて低かった。また、両タンパクはクラスター分散活性を有していなかったことから、成熟型の酵素の形で強い溶菌活性およびクラスター分散活性を有することが示唆された。

138kDaおよび115kDaタンパクのN末端アミノ酸配列の結果、138kDaタンパクはシグナル配列切断後のATL、115kDaタンパクは62kDa AMおよび51kDa GLの結合した前駆体であることが明らかとなった。

以上の結果から、*atl*の遺伝子産物ATLはシグナル配列切断後、138kDaタンパクとして産生された後、プロセッシングを受け、115kDaおよび85kDaタンパク等の中間体を経て51kDa GLおよび62kDa AMとなり、培養上清中に放出される可能性が示唆された。一方、CBはプロセッシングを阻害することにより、85kDaタンパク、51kDa GLおよび62kDa AMが産生されず、138kDaあるいは115kDaタンパクとして培養上清中に放出されると考えられた。

表Ⅲ-2 ATLのプロセシングに及ぼすCBの影響(各抽出画分の*atl*産物における溶菌酵素活性および抗自己溶解酵素血清に対する反応性^{a)})

	CB 非処理			CB 処理		
	上清 画分	LiCl 画分	SDS 画分	上清 画分	LiCl 画分	SDS 画分
138kDa	—	+	+	+	+	+
115kDa	—	+	+	+	+	+
85kDa	+	+	+	—	—	±
62kDa	+	+	+	—	—	—
51kDa	+	+	+	—	—	—

^{a)} : —, No activity; ±, weak activity; +, strong activity.

第4章 自己溶解酵素ATLのプロセッシング

第1節 概要

第3章において、CBによりATLのプロセッシングが阻害され、138kDaはシグナル配列切断後のATLおよび115kDaタンパクは62kDa AMおよび51kDa GLの結合した前駆体であることが明らかとなった。そこで、ATLのプロセッシング機序を明らかにするため、以下の実験を試みた。まず、138kDaタンパクに対するウサギ抗血清を作製した。*in vivo*において、菌体において産生されるタンパクを放射性同位元素である $[^{35}\text{S}]$ -methionineによりラベルしてpulse-chase 実験を行なった後、抗ATL血清を用いた免疫沈降法によりATLのプロセッシングを検討した。また、*S. aureus* FDA209Pから分離した自己溶解酵素欠失株Lyt66からprocessing enzyme画分として様々な粗酵素を調製し、*in vitro*におけるATLのプロセッシングについても検討した。

第2節 材料および方法

第1項 抗ATLウサギ血清の作製

前項にて精製した138kDaタンパクをRibi adjuvant system (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO, USA) (50 μg of protein per ml) によりエマルジョン化し、日本白色ウサギ (体重 2 kg) の皮内、皮下および筋肉に注射した。28日後、同様な投与を再び行なった。56日後、138kDaタンパク 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を静脈内投与し、その5日後に抗血清を採取した。

第2項 免疫沈降法による *at* 遺伝子産物の検出法

1) $[^{35}\text{S}]$ -methionineによる pulse-chase 実験

S. aureus FDA209Pをmid log phaseまでメチオニン非添加の完全合成培地²⁸⁾にて培養し、 $[^{35}\text{S}]$ -methionine (10mCi/ml) (Amersham, Buckinghamshire, UK) を最終濃度100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ になるように加え、37 $^{\circ}\text{C}$ にてpulse labelした。10分後、非ラベル体のmethionineを十分量加え

ることで菌体へのラベル体の取込みを停止させた。以後、37℃で培養を行ない、0、1、3および6時間後、各々培養液5 mlを分取した。

2) 自己溶解酵素画分の調製

得られた培養液から2つの画分を以下の方法で調製した。

菌体LiCl抽出画分 (LiCl画分) : 残りの培養液5mlに対し、最終濃度5%になるように100%トリクロロ酢酸を加えて菌の代謝を停止した後、遠心(9,000 x g, 10 min, 4℃)した。得られた菌体をアセトンおよび10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) にて洗浄し、湿菌体1gにつき0.6mlの3M LiClに懸濁、氷温中で15分放置後、遠心(12,000 x g, 5 min, 4℃)して得られた上清をLiCl画分とした。

菌体SDS抽出画分 (SDS画分) : LiCl抽出後の菌体を10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) にて洗浄し、LiCl抽出と同量の1% SDSに懸濁、100℃にて1分間煮沸した後、遠心(12,000 x g, 5 min, 4℃)して得られた上清をSDS画分とした。

3) 抗ATL血清による免疫沈降反応

得られたSDS画分に対して用いた免疫沈降法は、Andersonらの方法²⁾およびSchneewindらの方法⁴⁸⁾に準じて行なった。SDS画分各100 μlに対し、10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) 900 μlを加えて10倍に希釈した後、1次抗体として抗ATL血清10 μlを添加し、室温にて30分間放置した。次いで、2次抗体としてProtein A Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) 30 μlを添加し、室温にて30分間放置した。遠心(12,000 x g, 5 min, 4℃)後、10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) にて洗浄し、SDS sample bufferにて可溶化したものを以後の実験に用いた。

4) SDS-PAGEによるatf遺伝子産物の検出

2)、3)にて調製したLiCl画分およびSDS画分に対し、7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行なった。クーマシー染色後、ゲルを乾燥し、Fuji medical X-ray film (Fuji Film Co. Ltd., Tokyo)を用いて-80℃でオートラジオグラフィーを行なった。

5) 自己溶解酵素ATLのプロセッシングに及ぼすCBの影響

60 μM CB存在下のメチオニン非添加完全合成培地にて*S. aureus* FDA209Pを培養した後、1)から4)と同様の方法にて自己溶解酵素の検出を行ない、プロセッシングに及ぼすCBの影響を検討した。

6) 画像解析プログラムを用いた放射活性の比較

オートラジオグラフィーによるX線フィルム上のタンパクバンドを

客観的に定量化するため、パーソナルコンピュータ（Macintosh Quadra 650, Apple, USA）、スキャナー（Epson, GT-8000）および画像解析プログラムNIH Imageを用いて各バンドの放射活性を間接的に定量化した。

第3項 Processing enzyme画分の調製法

Processing enzyme画分は、*S. aureus* FDA209Pから分離した自己溶解酵素欠失株Lyt66を用いて調製した。TSBにて対数増殖期後期まで菌を培養し、遠心（9,000 x g, 10 min, 4℃）した。得られた培養上清に対し、80%飽和硫酸アンモニウムにて濃縮し、0.1Mリン酸緩衝液（pH6.8）に透析したものを上清画分として用いた。一方、菌体はPBS（pH7.0）にて2回洗浄した後、湿菌体1gにつき0.6mlの2% Triton X-100（Sigma chemical Co., Ltd., St. Louis, MO, USA）、1% SDS、1.5% *1-O-n-octyl-β-D*-glucopyranoside（nacalai tesque, 京都）あるいは1% Deoxycholic acid（nacalai tesque, 京都）に懸濁した。室温中で30分放置後、遠心（12,000 x g, 5 min, 4℃）して得られた上清をTriton画分、SDS画分、オクチル画分あるいはコール酸画分として用いた。また、PBS（pH7.0）にて洗浄した菌体に対して、湿菌体1gにつき0.6mlの3M LiClに懸濁し、氷温中で15分放置後、遠心（12,000 x g, 5 min, 4℃）して得られた上清をLiCl画分として用いた。

第4項 *in vitro*におけるATLのプロセッシング解析法

第3章、第2節、第4項にて精製した138kDaタンパク100ngに対し、各々のprocessing enzyme画分5μgを加え、37℃にて1時間反応させた後、*M. luteus*および*S. aureus*ゲルによるzymogramにより*in vitro*におけるATLのプロセッシングの検討を行なった。

第3節 結果

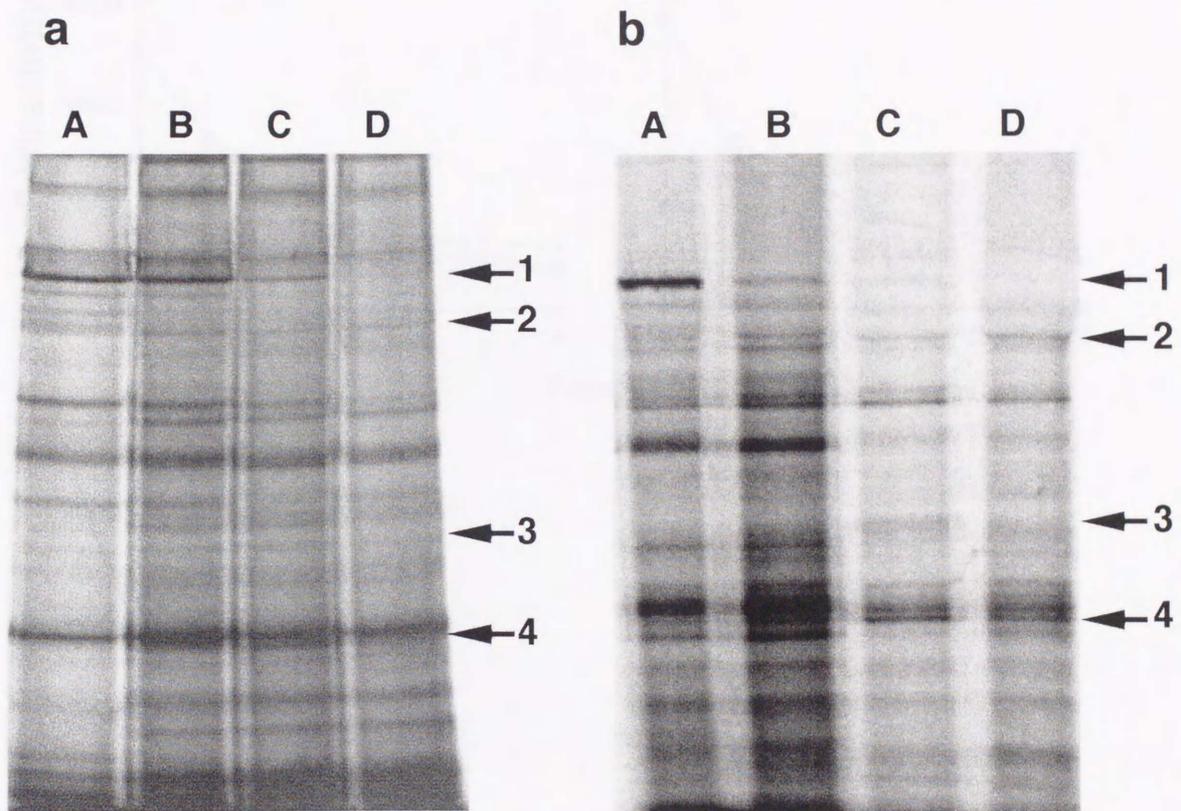
第1項 免疫沈降法によるATLのプロセッシング

LiCl画分およびSDS画分のオートラジオグラフィーの結果を図IV-1に示す。LiCl画分において、138kDaタンパクは0時間にて多く認められ、時間経過とともに減少を認めた。一方、115kDaタンパクは時間経過による変化をほとんど認めなかった。51kDa GLおよび62kDa AMは、0時間では全く認められないが、1時間後より出現し、次第に増加した後、再び6時間後から減少を認めた(図IV-1a)。LiCl画分に比較してSDS画分は、0時間にて138kDaタンパクが多く認められ、1時間後にほとんど消失した。一方、115kDaタンパクは時間経過による変化をほとんど認めなかった。51kDa GLおよび62kDa AMは0時間では全く認められないが、1時間後より出現した(図IV-1b)。このことから、SDS画分はLiCl画分との間に時間的な差をほとんど認めなかった。一方、上清画分では138kDaおよび115kDaタンパクを認めなかったのに対し、3時間後より51kDa GLおよび62kDa AMが出現し、時間とともに増大を認めた(データ示さず)。

また、オートラジオグラフィーの結果から、各タンパクバンドの放射活性を定量化したグラフを図IV-2に示す。60 μ M CB存在下での培養では、LiCl画分、SDS画分共にコントロールに比較して、138kDaタンパクおよび115kDaタンパクの大幅な増大を認めたのに対し、51kDa GLおよび62kDa AMを全く認めなかった(図IV-2b, 2d)。

第2項 *in vitro*におけるATLのプロセッシングの検討

ZymogramによるATLのプロセッシングの結果を図IV-3に示す。精製した138kDaタンパクのみを37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした場合、138kDaに単一の溶菌バンドを認めた。一方、138kDaタンパクにTriton画分を作用させると138kDaの溶菌バンドは消失し、*M. luteus*の場合、115kDaと51kDaに溶菌バンドの出現を認め(図IV-3a)、*S. aureus*の場合、115kDaと62kDaに溶菌バンドの出現を認めた(図IV-3b)。同様に抗GL血清あるいは抗AM血清によるWestern blottingにおいても138kDaタンパクの消失に伴って115kDaタンパク、62kDa AMおよび51kDa GLの出現を認めた(データ示さず)。しかし、上清画分、LiCl画分、SDS画分、オクチル画分およびコール酸画分において、138kDaタンパクのプロセッシングは認められなかった(データ示さず)。



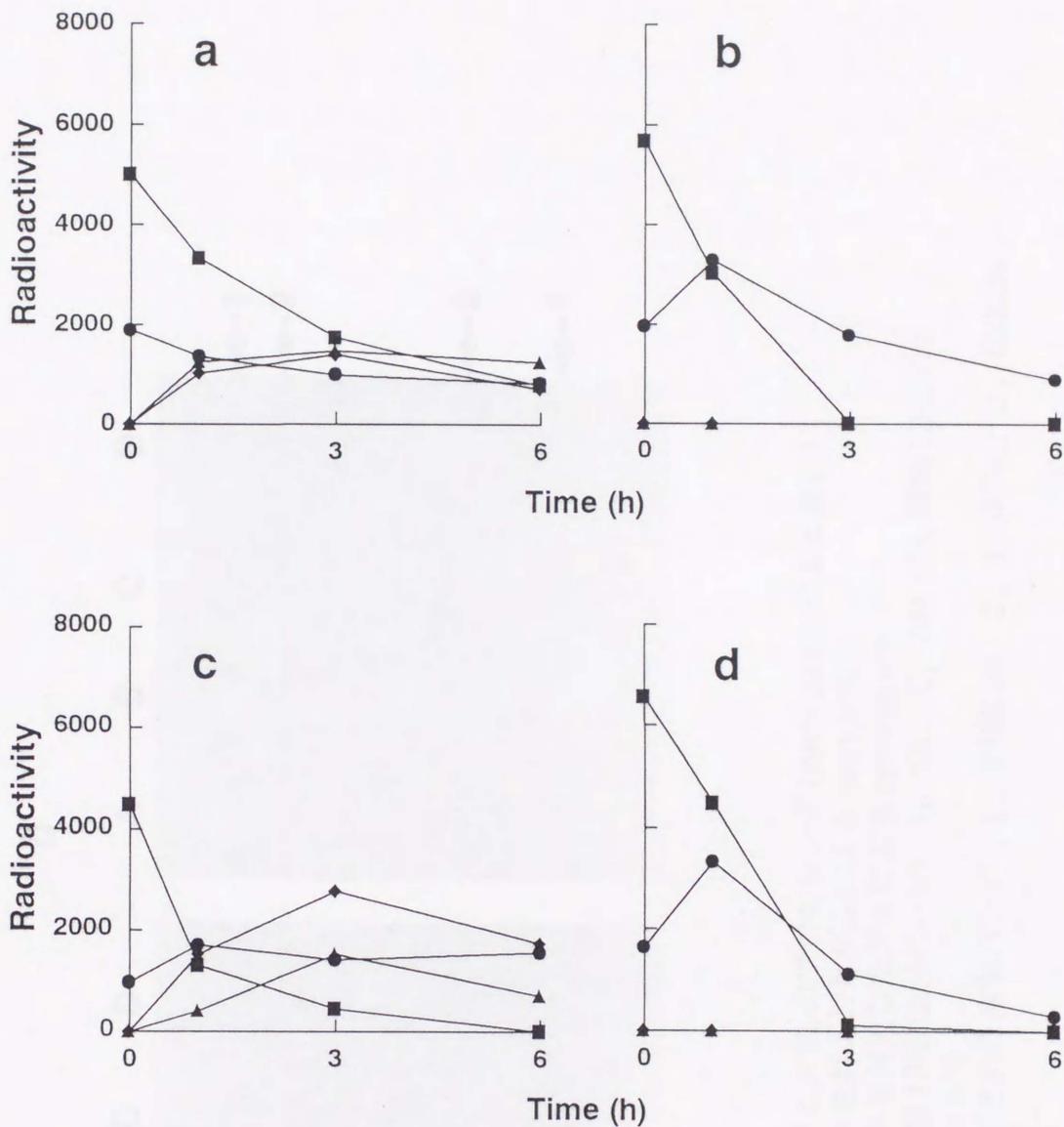
図IV-1 菌体から抽出した自己溶解酵素画分におけるATLのプロセッシング(免疫沈降法による解析)

(a) LiCl画分

(b) SDS画分

レーン:A, 0h ; B, 1h ; C, 3h ; D, 6h

右側矢印は検出されたタンパクバンド: 1, 138kDa ; 2, 115kDa ; 3, 62kDa ; 4, 51kDaを示す。



図IV-2 ATLのプロセッシングに及ぼすCBの影響(免疫沈降法による解析)

(a) CB非処理(control), LiCl画分

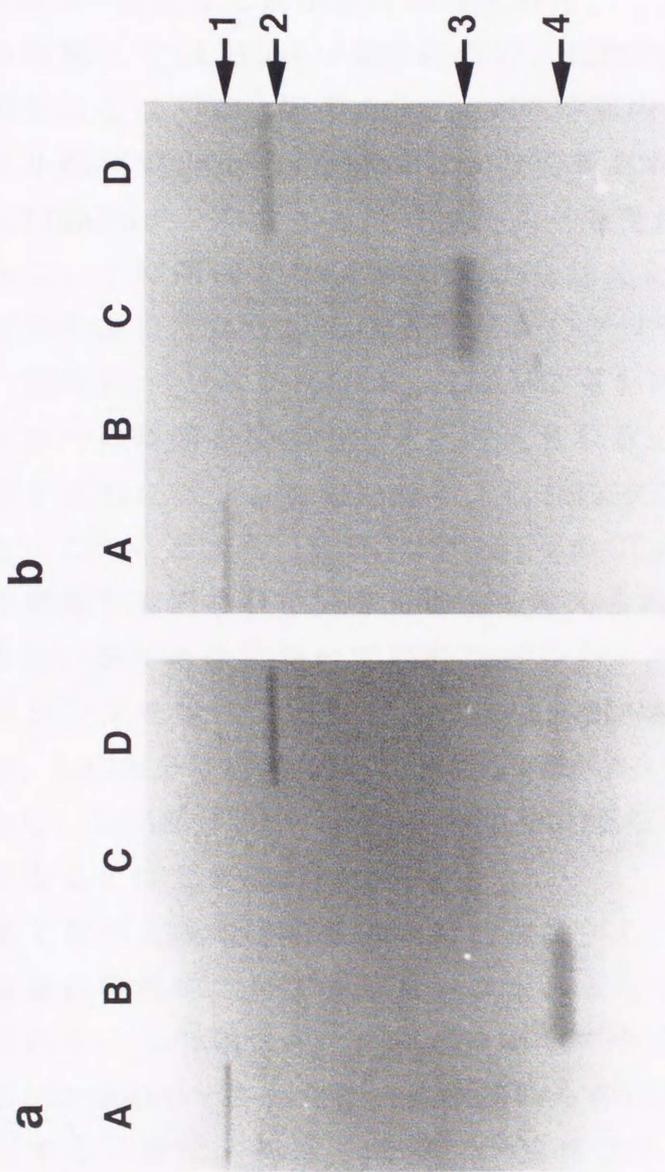
(b) 60 μ M CB処理, LiCl画分

(c) CB非処理(control), SDS画分

(d) 60 μ M CB処理, SDS画分

グラフは, 検出された各タンパクバンドの放射活性を定量化して示したものである。

■, 138kDa タンパク ; ●, 115kDa タンパク ; ▲, 62kDa AM ; ◆, 51kDa GLを示す。



図IV-3 *in vitro*におけるATLのプロセシング (zymogram による解析)

(a) *M. luteus*菌体を封入したゲルによる zymogram

(b) *S. aureus*菌体を封入したゲルによる zymogram

レーン: A, 精製 138kDa タンパク; B, GL; C, AM; D, 精製 138kDa
タンパク + Triton 画分

右側矢印は検出された溶菌バンド: 1, 138kDa; 2, 115kDa; 3, 62kDa;
4, 51kDa を示す。

第4節 考察

第1章から第3章にわたって行なった実験の結果、菌体抽出物中に認められた138kDa、115kDa、62kDaおよび51kDaタンパクは*atf*遺伝子産物であることが明らかとなった。さらに本章において、*in vivo*におけるATLのプロセッシングによる時間的変化を明らかにするため、菌体に対するpulse-chase実験を行なった結果、ATLは138kDaタンパクとして産生された後、プロセッシングを受け、115kDaタンパク等の中間体を経て51kDa GLおよび62kDa AMとなることが強く示唆された。

0時間にてGLおよびAMを認めず、138kDaおよび115kDaタンパクのみを認めたことは、10分間のpulse labelの時間内において、産生されたATLのシグナル配列がsignal peptidaseにより切断されるとともに、138kDaタンパクから115kDaタンパクへのプロセッシングも受けていることを示唆している。さらに、1時間後よりGLおよびAMを認めたことから、138kDaタンパクとして産生されてから115kDaタンパクにプロセッシングを受ける時間に比較して、115kDaタンパクがGLおよびAMに完全にプロセッシングを受けるには極めて多くの時間を要するものと考えられる。一方、138kDaタンパクが時間経過とともに減少したのに対し、115kDaタンパクに大きな変化を認めなかった。このことから、115kDaタンパクのGLおよびAMへのプロセッシングは、菌体表面で調節されている可能性も考えられる。

また、SDS画分において138kDaタンパクが大量に蓄積し、また早期にプロセッシングを受けて消失することは、SDS画分に前駆体タンパクが多く局在し、LiCl画分に成熟型のGLおよびAMが多く局在することを示唆している。しかし、LiCl画分とSDS画分における*atf*遺伝子産物の局在性の違いを明らかにすることはできなかった。

第1章の免疫電子顕微鏡観察の結果から、*atf*遺伝子産物が隔壁形成部位の表面に特異的に局在するメカニズムとして少なくとも2つの可能性が考えられた。1つは、ATLタンパクとして合成され、細胞分裂部位の細胞膜上にtranslocationされた後、細胞膜から伸びた線維状の菌体成分に結合して局在する可能性、もう1つは、一度培地中に放出された後、再びligand-receptor結合を介して菌体成分に結合する可能性である。しかし、pulse-chase実験において、ATLは菌体表層にてプロセッシングを受け、成熟型のGLおよびAMになる可能性が示唆されたことから、前者である可能性が高い。

一方、60 μ M CB存在下での培養では、LiCl画分、SDS画分共に51kDa GLおよび62kDa AMを全く認めず、138kDaタンパクおよび115kDaタンパクの大幅な増大を認めた。このことはCBがATLのプロセッシングを阻害し、GLおよびAMの産生を妨げていることに加えて、138kDaタンパクおよび115kDaタンパクのLiCl画分およびSDS画分への蓄積を促進しているものと考えられる。

SDS画分に対して用いた免疫沈降法により、autoradiography上に認められたバンドが *atl* 遺伝子産物である可能性をより高めた。しかし、autoradiographyによる感度の良好性に加えて、*atl* 遺伝子産物以外のタンパクとprotein A-sepharoseあるいは抗ATL血清との非特異的結合も多く認められたことから、*atl* 遺伝子産物のみを特異的に検出することはできなかった。

*In vitro*において、ATLのプロセッシングはTriton画分においてのみ認められたことから、Triton画分中にprocessing enzymeが存在し、自己の産生したプロテアーゼによってプロセッシングが生じていることを示唆している。一方、LiCl画分、SDS画分、オクチル画分およびコール酸画分において、138kDaタンパクのプロセッシングが認められなかった要因として、Triton X-100にのみprocessing enzymeが特異的に抽出される可能性あるいは*in vitro*ではTriton X-100存在下でのみprocessing enzymeが作用する可能性などが考えられる。また、上清画分においてもプロセッシングが起こらなかったことから、processing enzymeは培養上清中に放出されず、菌体内に存在するタンパクの可能性が考えられる。しかし、138kDaタンパクから115kDaタンパクへのプロセッシングあるいは115kDaタンパクから51kDa GLおよび62kDa AMへのプロセッシングが同一のprocessing enzymeにより起こっているかについては現在まだ明らかではない。Processing enzymeの精製および作用部位に関しては今後の課題である。

最近、*Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*が2種のペプチドグリカン加水分解酵素（150kDa GLと59kDa endopeptidase）を分泌し、両酵素ともSH基を活性中心にもつプロテアーゼによってプロセッシングを受け、活性化されることが報告されている³⁷⁾。また、*S. aureus*が産生するlipaseは、82kDaのprolipaseとして産生され、metallo-cysteine proteaseによってプロセッシングを受け、45kDaの成熟型lipaseになるとの報告もある⁴⁶⁾。ATLも同様なプロテアーゼによって分解を受け、GLとAMを生成している可能性も考えられる。

以上の結果から、*in vivo*において *atl*の遺伝子産物ATLはシグナル配列切断後、138kDaタンパクとして産生された後プロセッシングを受け、115kDaおよび85kDaタンパク等の中間体を経て51kDa GLおよび62kDa AMとなり、培養上清中に放出されることが強く示唆された。一方、CBはプロセッシングを阻害することにより、85kDaタンパク、51kDa GLおよび62kDa AMの産生を妨げていることが示唆された。一方、*in vitro*においてもATLはプロセッシングを受け、51kDa GLおよび62kDa AMとなることも明らかとなった。

総括

1. 菌体表面における *atl* 遺伝子産物の局在性に対し, *M. luteus* および *S. aureus* ゲルによる zymogram ならびに GL および AM に対するペプチド抗血清を用いた Western blotting の結果から, LiCl 画分および SDS 画分にほとんどの *atl* 遺伝子産物が局在し, *atl* 遺伝子産物として 138kDa, 115kDa, 85kDa, 62kDa および 51kDa タンパクの可能性が示唆された。

2. 免疫電子顕微鏡観察の結果から, 細胞表層の *atl* 遺伝子産物は, 隔壁形成部位および次期隔壁形成部位の細胞膜から伸びた線維状の菌体成分に結合して局在し, 菌体分離に深く関与していることが示唆された。

3. 菌体から精製したクラスター分散酵素は, 分子量が 51kDa および 62kDa であり, 抗血清との反応性, 溶菌活性およびクラスター分散活性において, 各々 GL および AM の性状とほぼ同一であったことから, 51kDa タンパクは GL, 62kDa タンパクは AM であることが強く示唆された。

4. クラスター形成濃度である 30 μ M 以上の CB を添加して培養した場合, すべての画分において 51kDa GL および 62kDa AM 活性が消失し, 138kDa および 115kDa タンパクの酵素活性が増大したことから, CB は ATL のプロセッシングを阻害する可能性が考えられた。

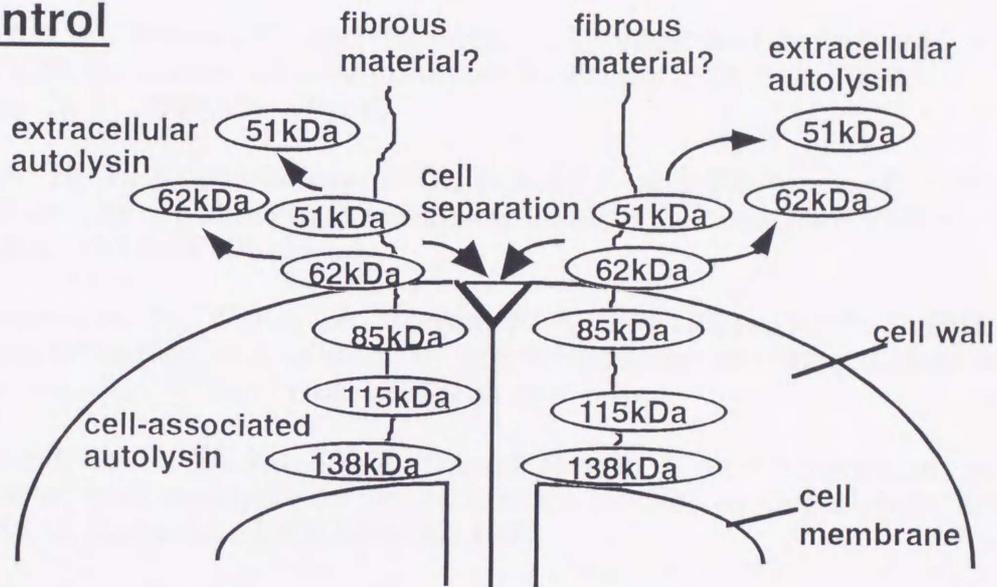
5. 精製した 138kDa および 115kDa タンパクの N 末端アミノ酸配列を決定した結果, 138kDa タンパクはシグナル配列切断後の ATL, 115kDa タンパクは 62kDa AM および 51kDa GL の結合した前駆体であることが明らかとなった。

6. *S. aureus* FDA209P 菌体を [³⁵S]-methionine にて標識し, pulse-chase 実験を行なった結果, *in vivo* において ATL は 138kDa タンパクとして産生された後, 115kDa タンパク等の中間体を経て, 51kDa GL および 62kDa AM となることが強く示唆された。

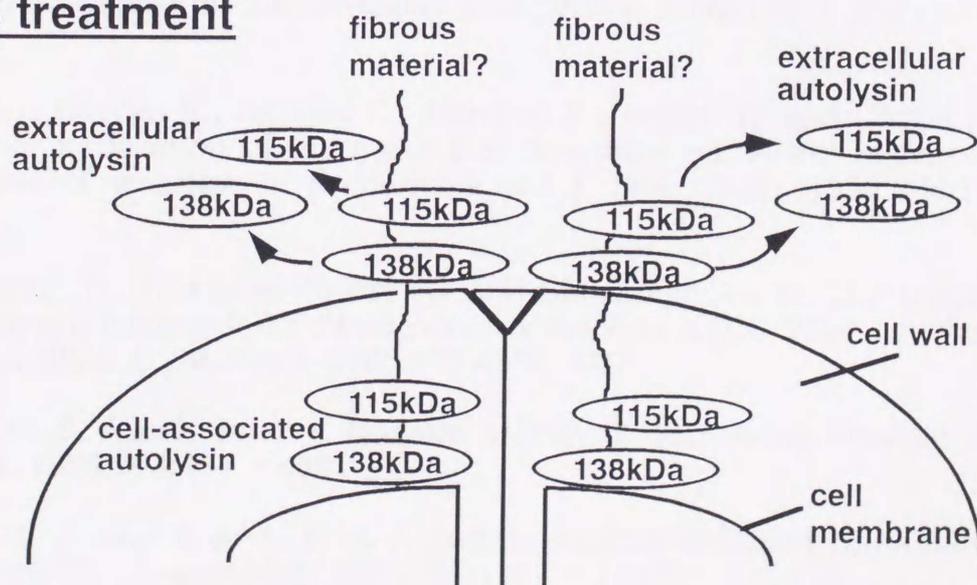
7. 精製した 138kDa タンパクを *S. aureus* FDA209P から分離した自己溶解酵素欠失株 Lyt66 の Triton 画分と作用させると, 115kDa タンパク, 62kDa AM および 51kDa GL が生じたことから, *in vitro* において, ATL はプロセッシングを受け, 51kDa GL および 62kDa AM となることが明らかとなった。

以上から、*atl*の遺伝子産物ATLはシグナル配列切断後、138kDaタンパクとして分泌された後、隔壁形成部位および次期隔壁形成部位の細胞膜から伸びた線維状の菌体成分に結合して局在し、そこで115kDaタンパク、85kDaタンパク等の中間体を経た後、成熟型の51kDa GLおよび62kDa AMとなり、菌体分離に関与することが示唆された（図C）。

Control



CB treatment



図C *atl*遺伝子産物の菌体表面における局在性およびプロセッシング（仮説）

参考文献

1. Actor, P., Daneo-Moore, L., Higgins, M. L., Salton, M. R. J. and Shockman, G. D. Antibiotic inhibition of bacterial surface assembly and function. Washington D. C.: American Society for Microbiology, 1988:181 - 257.
2. Anderson, D. J. and Blobel, G. Immunoprecipitation of proteins from cell-free translations. *Methods Enzymol.* 1983;96:111-120.
3. Biavasco, F., Pruzzo, C. and Thomas, C. Cloning and expression of the *Staphylococcus aureus* glucosaminidase in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1988;49:137-142.
4. Bohme, H.-J., Kopperschlager, G., Schulz, J. and Hofmann, E. Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron blue F3G-A. *J. Chromatog.* 1972;69:209-214.
5. Chatterjee, A. N., Wong, W., Young, F. E. and Gilpin, R. W. Isolation and characterization of a mutant of *Staphylococcus aureus* deficient in autolytic activity. *J. Bacteriol.* 1976;125:961 - 967.
6. Cleveland, R. F., Wicken, A. J., Daneo-Moore, L. and Shockman, G. D. Inhibition of wall autolysis in *Streptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipids. *J. Bacteriol.* 1976;126:192-197.
7. Cornett, J. B., Redman, B. E. and Shockman, G. D. Autolytic defective mutant of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 1978;133:631 - 640.
8. Coyette, J. and Shockman, G. D. Some properties of autolytic N-acetylmuraminidase of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* 1973;114:34-41.
9. Diaz, E., Garcia, E., Ascaso, C., Mendez, E., Lopez, R. and Garcia, J. L. Subcellular localization of the major pneumococcal autolysin: a peculiar mechanism of secretion in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1989;264:1238 - 1244.
10. Dolinger, D. L., Daneo-Moore, L. and Shockman, G. D. The second peptidoglycan hydrolase of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 covalently binds penicillin. *J. Bacteriol.* 1989;171:4355-4361.
11. Fan, D. P. Autolysin(s) of *Bacillus subtilis* as dechaining enzyme. *J. Bacteriol.* 1970;103:494 - 499.
12. Fein, J. D. and Rogers, H. J. Autolytic enzyme-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 1976;127:1427 - 1442.
13. Fischer, W. Lipoteichoic acids and lipoglycans. 1994:199 - 215. In Ghuyssen, J.-M. and Hakenbeck, R. (eds.), *Bacterial cell Wall*. Elsevier Science B. V., Amsterdam.

14. Forsberg, C. and Rogers, H. J. Autolytic enzymes in growth of bacteria. *Nature* (London) 1971;229:272 - 273.
15. Forsberg, C. W. and Rogers, H. J. Characterization of *Bacillus licheniformis* 6346 mutants which have altered lytic activities. *J. Bacteriol.* 1974;118:358 - 368.
16. Ghuysen, J.-M., Tipper, D. J. and Strominger, J. L. Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods Enzymol.* 1966;8:685 - 699.
17. Giesbrecht, P., Labischinski, H. and Wecke, J. A special morphogenetic defect and the subsequent activity of "murosomes" as the very reason for penicillin-induced bacteriolysis. *Arch. Microbiol.* 1985;141:315 - 324.
18. Giesbrecht, P., Kersten, T. and Wecke, J. Fan-shaped ejections of regularly arranged murosomes involved in penicillin-induced death of staphylococci. *J. Bacteriol.* 1992;174:2241 - 2252.
19. Giesbrecht, P., Kersten, T., Madela, K., Grob, H., Blümel, P. and Wecke, J. Penicillin-induced bacteriolysis of staphylococci as a post-mortem consequence of murosomes-mediated killing via wall perforation and attempts to imitate this perforation process without applying antibiotics. 1993:393 - 407. In De Pedro, M. A., Höltje, J. V., Löffelhardt, W. (eds.), *Bacterial growth and lysis: metabolism and structure of the bacterial sacculus*. Plenum Press, N. Y.
20. Gilpin, R. W., Narrod, S., Wong, W., Young, F. E. and Chatterjee, A. N. Autolysis in *Staphylococcus aureus* : Preferential release of old cell wall. *J. Bacteriol.* 1974;119:672-676.
21. Hawiger, J. Purification and properties of lysozyme produced by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 1968;95:376-384.
22. Henze, U., Sidow, T., Wecke, J., Labischinski, H. and Berger-Bächi, B. Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 1993;175:1612-1620.
23. Hobot, J. A. and Rogers, H. J. Intracellular location of the autolytic *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase in *Bacillus subtilis* 168 and in an autolysis-deficient mutant by immunoelectron microscopy. *J. Bacteriol.* 1991;173:961 - 967.
24. Höltje, J. and Tomasz, A. Lipoteichoic acid : A specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1975;72:1690-1694.
25. Höltje, J. and Tuomanen, E. I. The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.* 1991;137:441 - 454.
26. Huff, E. and Silverman, C. S. Lysis of *Staphylococcus aureus* cell walls by a soluble *Staphylococcal* enzyme. *J. Bacteriol.* 1968;95:99-106.

27. Huff, E., Silverman, C. S., Adams, N. J. and Awkard, W. S. Extracellular cell wall lytic enzyme from *Staphylococcus aureus* : Purification and partial characterization. J. Bacteriol. 1970;103:761-769.
28. Hussain, M., Hastings, J. G. M. and White, P. J. A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. J. Med. Microbiol. 1991;34:143-147.
29. 小松澤均. 黄色ブドウ球菌の溶菌酵素. Thesis 1992.
30. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 1970;227:680-685.
31. Leclerc, D. and Asselin, A. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Can. J. Microbiol. 1989 ;35:749-753.
32. Lominiski, I., Cameron, J. and Willie, G. Chaining and unchaining *Streptococcus faecalis*-a hypothesis of the mechanism of bacterial cell separation. Nature 1958;181:1477.
33. Matsudaira, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem. 1987;262:10035-10038.
34. Mauck, J., Chan, L. and Glaser, L. Turnover of the cell wall of Gram positive bacteria. J. Biol. Chem. 1971;246:1820-1827.
35. Meyer, P. D. and Wouters, J. T. M. Lipoteichoic acid from *Bacillus subtilis* subsp. *niger* WM : Isolation and effects on cell wall autolysis and turnover. J. Bacteriol. 1987;169:973-980.
36. Mitchell, P. and Moyle, J. Autolytic release and osmotic properties of "protoplast" from *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 1957;16:184-194.
37. Neumann, V. C., Heath, H. E., LeBlanc, P. A. and Sloan, G. L. Extracellular proteolytic activation of bacteriolytic peptidoglycan hydrolases of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. FEMS Microbiol. Lett. 1993;110:205-212.
38. 野上龍造. ペニシリンによって誘発される黄色ブドウ球菌の溶菌機序. 広大歯誌 1983;15:259-271.
39. Oshida, T. and Tomasz, A. Isolation and characterization of a Tn551-autolysis mutant of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 1992;174:4952 - 4959.
40. Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y.-M., Suginaka, H. and Tomasz, A. A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo- β -N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 1995;92:285 - 289.

41. Perkins, H. R. The bacterial autolysin. 1980:437 - 456. In Rogers, H. J., Perkins, H. R., Ward, J. B. (eds.), Microbial cell walls and membranes. Chapman & Hall, London.
42. Pooley, H. M., Shockman, J. D., Higgins, M. L. and Porres-Juan, J. Some properties of two autolytic- defective mutants of *Streptococcus faecalis* ATCC9790. J. Bacteriol. 1972;109:423 - 431.
43. Richmond, M. H. Lytic enzyme of *Staphylococcus aureus*. Biochim. Biophys. Act. 1959;31:564-565.
44. Rogers, H. J. Killing of Staphylococci by penicillins. Nature 1967;213: 31-33.
45. Rogers, H. J., Taylor, C., Rayter, S. and Ward, J. B. Purification and properties of autolytic endo- β -N-acetylglucosaminidase and the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Bacillus subtilis* strain 168. J. Gen. Microbiol. 1984;130:2395-2402.
46. Rolof, J. and Normark, S. In vivo processing of *Staphylococcus aureus* lipase. J. Bacteriol. 1992;174:1844-1847.
47. Roth, J., Bendayan, M. and Orci, L. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A - gold complex. J. Histochem. Cytochem. 1978;26:1074-1081.
48. Schneewind, O., Model, P. and Fischetti, V. A. Sorting of protein A to the Staphylococcal cell wall. Cell 1992;70:267-281.
49. Schwarz, U., Asmus, A. and Frank, H. Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 1969;41:419-429.
50. Shockman, G. D. and Cheney, M. C. Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis* : V. Nature of the autolysin-cell wall complex and its relationship to properties of the autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 1969;98:1199-1207.
51. Shockman, G. D. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 1983;37:501 - 527.
52. Shockman, G. D. and Höltje, J. V. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. 1994:131 - 166. In Ghuysen, J. M., Hakenbeck, R. (eds.), Bacterial cell wall. Elsevier Science B. V., Amsterdam.
53. Shungu, D. L., Cornett, J. B. and Shockman, G. D. Morphological and physiological study of autolytic-defective mutants of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 1979;138:598 - 608.
54. Singer, H. J., Wise, J., E. M. and Park, J. T. Properties and purification of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from *Staphylococcus aureus* H. J. Bacteriol. 1972;112:932-939.

55. Small, D. A. P., Lowe, C. R., Atkinson, T. and Bruton, C. J. Affinity labelling of enzymes with triazine dyes : Isolation of a peptide in the catalytic domain of horse-liver alcohol dehydrogenase using Procion Blue MX-R as a structural probe. *Eur. J. Biochem.* 1982;128:119-123.
56. Strominger, J. L. and Ghuysen, J.-M. Mechanisms of enzymatic bacteriolysis : Cell walls of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or specific peptidases. *Science* 1967;156:213-221.
57. Sugai, M., Koike, H., Hong, Y.-M., Miyake, Y., Nogami, R. and Suginaka, H. Purification of a 51 kDa endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989;61:267 - 272.
58. Sugai, M., Ooku, K., Takata, T., Miyake, Y. and Suginaka, H. A triazine dye, cibacron blue 3G-A induces *Staphylococcus aureus* to form giant clusters. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990;67:175 - 178.
59. Sugai, M., Akiyama, T., Komatsuzawa, H., Miyake, Y. and Suginaka, H. Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable *Staphylococcus aureus* bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 1990;172:6494 - 6498.
60. Sugai, M., Akiyama, T., Komatsuzawa, H., Miyake, Y. and Suginaka, H. Cibacron blue 3G-A inhibits cell separation of gram-positive bacteria. *Arch. Microbiol.* 1991;155:199-201.
61. Sugai, M., Komatsuzawa, H., Ooku-Inomata, K., Miyake, Y., Ishida, E. and Suginaka, H. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* mutants which form altered cell cluster. *Microbiol. Immunol.* 1994;38:995 - 999.
62. Sugai, M., Komatsuzawa, H., Akiyama, T., Hong, Y.-M., Oshida, T., Miyake, Y., Yamaguchi, T., et al. Identification of endo- β -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase as cluster-dispersing enzymes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 1995;177:1491 - 1496.
63. Suginaka, H., Kashiba, S. and Amano, T. Purification and properties of a staphylo-lytic factor produced by a strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Biken. J.* 1967;10:109-120.
64. Suginaka, H., Shimatani, M., Ohno, Y. and Yano, I. Effects of bacterial lipids and lipoteichoic acid on extracellular autolysin activity from *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1979;5:1582-1584.
65. Takabe, I., Singer, H. J., Wise, J., E. M. and Park, J. T. *Staphylococcus aureus* H autolytic activity : General properties. *J. Bacteriol.* 1970;102:14-19.
66. Thompson, J. S. Role of autolytic enzymes in growth of bacteria. *J. Theoret. Biol.* 1971;33:63-75.

67. Tipper, D. J. Mechanism of autolysis of isolated cell walls of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 1969;97:837-847.
68. Tomasz, A. and Waks, S. Mechanism of action of penicillin : Triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 1975;72:4162-4166.
69. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 1979;76:4350-4354.
70. Valisena, S., Varaldo, P. E. and Satta, G. Purification and characterization of three separate bacteriolytic enzymes excreted by *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus saprophyticus*. J. Bacteriol. 1982;151:636-647.
71. Wadström, T. and Hisatsune, K. Bacteriolytic enzymes from *Staphylococcus aureus* : Purification of an endo- β -N-acetylglucosaminidase. Biochem. J. 1970;120:725-734.
72. Wadström, T. Bacteriolytic enzymes from *Staphylococcus aureus* : Properties of the endo- β -N-acetylglucosaminidase. Biochem. J. 1970;120:745-752.
73. Wadström, T. and Hisatsune, K. Bacteriolytic enzymes from *Staphylococcus aureus* : Specificity of action of endo- β -N-acetylglucosaminidase. Biochem. J. 1970;120:735-744.
74. Walderich, B. and Höltje, J.-V. Subcellular distribution of the soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1991;173:5668 - 5676.
75. Wang, X., Wilkinson, B. J. and Jayaswal, R. K. Sequence analysis of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. Gene 1991;102:105-109.
76. Ward, J. B. and Williamson, R. Bacterial autolysins: specificity and function. 1984:159 - 166. In Nombela, C. (ed.), Microbial cell wall synthesis and autolysis. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
77. Wolf-watz, H. and Normark, S. Evidence for a role of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase in septum separation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1976;128:580 - 586.
78. Wong, W., Chatterjee, A. N. and Young, F. E. Regulation of bacterial cell walls : Correlation between autolytic activity and cell wall turnover in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 1978;134:555-561.
79. Yem, D. W. and Wu, H. C. Purification and properties of β -N-acetylglucosaminidase from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1976;125:324-331.