

納豆菌細胞壁の生化学的研究

第1報 細胞壁の調製方法と一般的性質

岩原章二郎・松本宗人（農産製造学研究室）

Syōjirō IWAHARA and Muneto MATSUMOTO

Biochemical Studies on the Cell Wall of Nattō Bacteria.

(1) Methods for the Preparation of Cell Wall and Some Properties of the Preparations.

緒 言

近年、細菌細胞壁の分離法が進歩して、その化学的性状に関する研究が急速に発展している^(1,4)。著者らは、納豆菌の細胞壁の化学組成や構造機能などを明らかにし、該菌の特性とみられる粘質物の生産や溶菌現象などの解明に資し、また、該菌の分類学的位置の検討にも資したいと考えて、標題の研究を計画した。

本報には、細胞壁試料の調製法について、アルカリ処理法や音波処理法や両法の併用法を比較検討した結果と、調製試料の化学組成の大略を明らかにした結果を報告する。

音波発生装置を借用させていただいた京大発酵生理学研究室に対し、また、その運用に特に御援助をいただいた同室左右田健次氏に厚く感謝申し上げる。

実験材料および方法

使用菌株： 市販系引納豆より分離した保存菌株を使用した。

培養基： 第1表に示す組成の人工培地を用いた。

第1表 人工培地の組成

MonoNa-Glutamate	1%
Glycerin	2 "
Citric Acid	0.2 "
KH ₂ PO ₄	0.05 "
K ₂ HPO ₄	0.05 "
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.05 "
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1.25mg%
Biotin	0.001 "
Tap Water, pH 7.4 (adjusted with 10% Am. Water)	

培養法： 500ml容イカリガタフラスコに培地100mlずつをいれて殺菌し、数白金耳の大豆汁寒天斜面培養を接種して、37~40°Cで18時間水平往復式の振とう培養を行なった。

菌体の収集： 培養液を遠心分離（12,000 R.P.M., 20分間）して集めた菌体を蒸留水で2回遠沈洗浄し、ついで、50%酒精で数回洗浄後、アセトンを加えガラスフィルターでろ過し、エーテルで数回洗浄脱水して、淡黄褐色の菌体を得た。真空デシケーターに乾燥保存して実験に供した。

細胞壁の調製法： まず、アルカリ処理による方法と音波処理による方法を適用した。ともに、後述するようにわずかに不完全と考えたので、両法の併用による方法をも行なった。

(1) アルカリ処理による法——上述の方法で得た乾燥菌体を10g/100mlの割合に、0.05N-NaOHに懸濁し、37°Cに24時間保温して後遠心分離して不溶区分を集める。この操作を紫外部吸収性物質の溶出しなくなるまで反復して後、不溶区分を50%酒精（0.05N-HCl含有）で数回洗浄し、ガラスフィルター上で無水酒精で2回、アセトンでろ過洗浄後、エーテルで脱水し硫酸デシケーターに乾燥して、白色の細胞壁試料（以下CWAと略記する）を得た。

(2) 音波処理による法——乾燥菌体約2gを50%酒精100mlに懸濁し、Raython音波発生装置により、10KCで20分間処理したものを遠沈して残存不溶固形分を得る。これを0.1M-リン酸塩緩衝液（pH=7.0）で数回洗浄して後、前法と同様に溶剤で洗浄脱水乾燥して白色の細胞壁試料（以下CWBと略記する）を得た。

(3) 音波処理とアルカリ処理とを併用する法——上記の(2)の方法で得た細胞壁試料（CWB）を、さらに(1)の方法で処理して白色の細胞壁試料（以下CWCと略記す

る)を得た。

細胞壁に対する酵素類の作用： リゾチーム、ペプシン、トリプシン (いずれも標品) をそれぞれ 5 microg/ml , 0.05% , 0.05% 濃度で、納豆菌培養液を $1/2$ 濃度で、リン酸塩緩衝液に懸濁したCWA試料に作用させて $615\text{ m}\mu$ における吸収度を追った。

細胞壁の水解： CWA試料 100 mg を 6 N-HCl 20 ml にいれ、沸騰湯浴中に加熱し、不溶物、遊離溶出N、溶出遊離アミノ酸、アミノ糖などの消長を追い、それぞれ試料乾燥重に対する%、試料の全N量に対する%、試料乾燥量に対する遊離 $\text{NH}_2\text{-N}$ 量をグルタミン酸に換算しての%、試料に対するグルコサミンとしての%をもって表わした。

分析方法： 全Nはケルダール法により、 $\text{NH}_2\text{-N}$ はホルモール滴定法およびフェンスライク法により、アミノ糖はエルソン・モルガン反応により、中性糖はろ紙クロマトグラフ法により、核酸はジフェニールアミン法やオルシンー塩化第二鉄反応で定性し定量はDNA標品 (N.B.C.) を標準として $260\text{ m}\mu$ の吸収度により、菌体量や細胞壁量の濃度は $615\text{ m}\mu$ の吸収度を目安とした。吸収度はすべて日立光電分光光度計により、電子顕微鏡は日立HS-6型を用いた。

実験結果および考察

結果の概要を第2, 3表および第1~5図に示した。

細胞壁試料の収率： 第2表に示すように、培養液1

第2表 乾燥菌体の収量および細胞壁試料の収率 (対乾燥菌体%)

培養液	乾燥菌体収量	細胞壁試料の収率		
		CWA*	CWB*	CWC*
1 l	約5 g	52.3	55.0	51.0

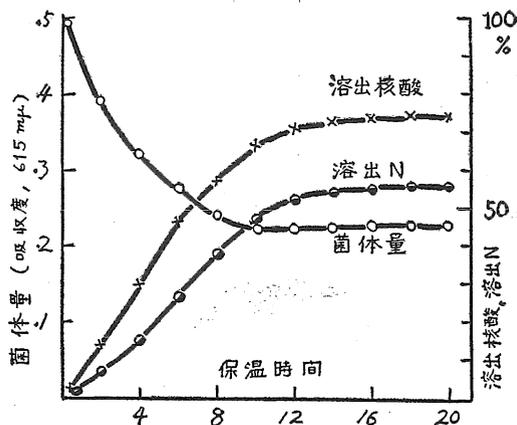
※) 調製法および記号の説明は本文。

lから乾燥菌体約5 gが得られる。細胞壁試料の収率は、3種の調製法による差は小さいが、CWBの収率が最も高くCWAがこれに次いでいる。

アルカリ処理および音波処理の効果： 著者らは既報のように、納豆菌体が希アルカリ処理によってその懸濁液の光学的濃度を著しく低下し細胞内容物を溶出することを知り (実験結果の一例は第1図のようである)、また、相当強いアルカリ (0.5 N 程度) で処理しても細胞

第1図 納豆菌体のアルカリ処理における変化

(菌体 10 g を 0.05 N-NaOH 100 ml に懸濁して 37°C に保温。溶出核酸量は菌体の全核酸に対する%、溶出Nは菌体の全Nに対する%)



壁にはほとんど変化が認められないことを電子顕微鏡で観察したので、細胞壁調製法としてアルカリ処理を適用してみたが、この処理法によってかなりすぐれた試料が得られるようである。すなわち、得られたCWA試料は、既報のように、後述の音波処理による試料に比べると、電子顕微鏡像 (第2図) はやや様相を異にしているが、SALTONらが *E. coli* を 1 N-NaOH で処理して得た細胞壁がかなり分解されているとしているのに比べて、

第2図 電子顕微鏡写真

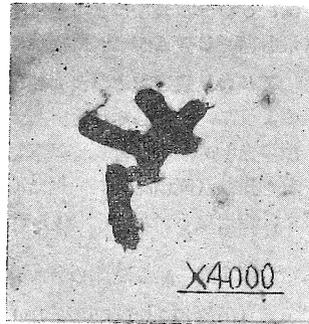
(i)

(ii)

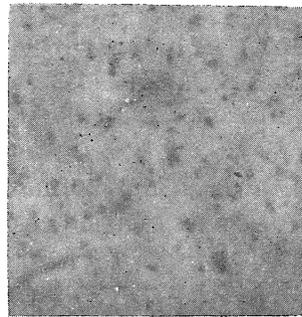
(iii)



(一)



(二)



- (イ): 細胞壁試料 CWA, ×約 4,000
- (ロ): 同 CWB, ×約 5,000
- (ハ): 同 CWC, ×約 5,000
- (ニ): 納豆菌乾燥菌体, ×約 4,000
- (ホ): CWAにリゾチームを作用させたもの, ×約 5,000

電顕像や分析結果から判断して、認めべき損傷は受けていないものとみられ、これは、使用したアルカリの濃度や菌種の相違によるものと考えられる。したがって、アルカリ処理法は納豆菌の細胞壁分離法として十分適用しうるものと認められるが、電顕像において細胞内容物がわずかに残存することが観察されるので、完全な方法とはいえないようである。

音波処理によって得たCWB試料は、電顕像にみるように、菌体が破壊され、内容物もほとんど完全に除去されているようであるが、分析結果は少量の核酸の残存を示しているため、菌体内内容物の溶出除去が完全でない。したがって、音波処理法は細胞壁分離に適用しうるものと認められるが、完全な方法というわけには行かない。

第3表 細胞壁試料の化学的性状

試料	CWA	CWB	CWC
定性反応	いずれも、ニンヒドリン反応陽性、エルソン・モルガン氏反応強陽性、アダムキーピッツ氏反応微弱陽性、ザントプロテイン反応微弱陽性。		
溶解性	いずれも、水、希酸、希アルカリ、有機溶剤類に不溶、強酸、強アルカリにわずかに溶ける。		
核酸反応	微弱陽性	弱陽性	微弱陽性
全N	10.05	11.50	10.00
NH ₂ -N ^{※1} ※2	5.50	5.85	5.55
全アミノ糖 ^{※1} ※3	15.55	14.31	15.65
糖	ブドウ糖(こん跡)	同左	同左
核 酸	こん跡	2.35	こん跡

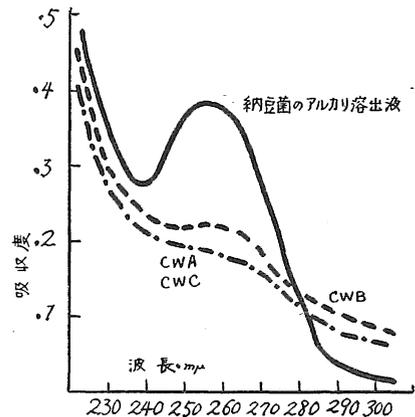
数値は、いずれも乾燥細胞壁試料に対する%。

※1: 塩酸(6N), 100°C, 15時間水解物について、※2: グルタミン酸-Nとして、※3: グルコサミンとして。

上述の両法を併用して得たCWC試料は、電顕像においても分析結果によっても内容物が完全に溶脱除去されていて、この併用法が、納豆菌の細胞壁分離法として確実なすぐれた方法であることを示している。

細胞壁の化学的性状: 上記の方法で得た細胞壁試料の2~3の化学的性質を比較すると、第3表および第3図に示すように、CWBがやや核酸を含有している

第3図 納豆菌のアルカリ溶出液と細胞壁試料との紫外吸収スペクトル

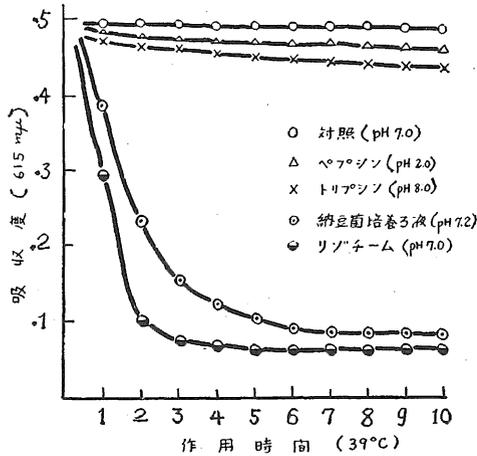


が、概して試料の間には著しい差異を認めない。したがって、細胞壁試料は、調製方法によってそれぞれ多少の相違はあるが、いずれも酸やアルカリにはほとんど不溶であり、50%程度のアミノ酸類と10~15%程度のアミノ糖を含有している一種のムコポリペプチドであると考えられる。

細胞壁に対する酵素類の作用: CWA試料に対し

て、リゾチーム、ペプシン、トリプシン、納豆菌の培養液などを作用させた結果は第4図に示す通りで、細胞壁はペプシンやトリプシンのような Endopeptidase に

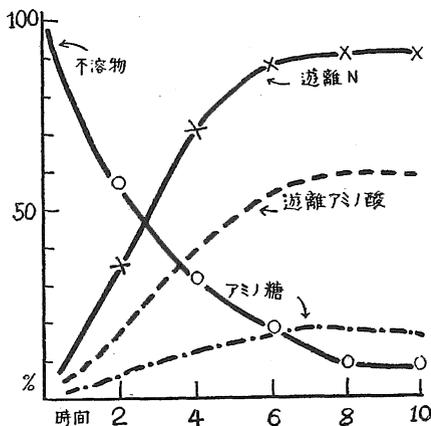
第4図 細胞壁試料 (CWA) に対する
酵素類の作用



対しては強い抵抗性を持っていることが認められ、これは現在までに知られている他の細菌類の細胞壁の態度と一致している。これに対して、リゾチームを作用させると急速に溶解し、納豆菌の培養液によっても溶解する。この結果から、納豆菌の培養液にリゾチーム様酵素が存在することが考えられるが、リゾチームに対する態度もまた、他の細菌類の細胞壁の性質と一致する。アミノ糖を含有していることやリゾチームによって強く作用されることから考えて、納豆菌の細胞壁は他のグラム陽性細菌の細胞壁とほぼ同類の化学構造を有しているものと推察される。

細胞壁に対する酸の作用： 第5図にみるように、C

第5図 細胞壁試料 (CWA) の加水分解



WA試料を6N-HCl中で100°Cに加熱した場合、遊離N量や遊離アミノ酸やアミノ糖などの溶出量の増加もまた不溶物の減少も、約6~8時間後に平衡に達しており、なお数%の不溶物を残存している。

摘 要

アルカリ処理法や音波処理法や両法の併用法によって納豆菌の細胞壁試料を調製し、調製試料を電子顕微鏡による観察や分析によって比較した。

アルカリ処理によって得られた試料は、核酸をほとんど全く含有していないが、電子顕微鏡で観察すると内容物がわずかに残存しているようであり、音波処理によって得られた試料には電子顕微鏡的には内容物がほとんど残留していないようであるが、分析結果では少量の核酸が残存していた。両者の併用法によって得た試料には電顕的にも内容物の残存が認められず、分析結果でも核酸がほとんど存在していなかった。したがって、いずれの方法によって得られる試料も細胞壁試料として十分実験材料に供しようが、併用法が、納豆菌の細胞壁調製法として確実ですぐれていることを知った。

納豆菌の細胞壁は、ペプシンやトリプシンに作用されず、リゾチームによって強く作用され、約50%程度のアミノ酸と約10~15%のアミノ糖を含有しており、これらの点を考えると、このものは、他のグラム陽性菌の細胞壁の性状にほぼ一致し、一種の複合蛋白質と推論される。

文 献

- 金子太吉：農化 35：A53-62, 1961
- 松本宗人・岩原章二郎：納豆菌の溶菌現象 (I) 溶菌条件, 日本農芸化学会関西支部例会, 第177回講演会, 1961
- 同上・同上：同上 (II) 溶菌酵素, 同上, 同上, 1961
- 尾辻 望：蛋白質核酸酵素 5(6)：332-339, 1960
- SALOTN, M.R. J. and HORNE, R.W.: Biochim. Biophys. Acta 7, 19, 177-197, 1951
- SALTON, M.R. J.: Ibid. 8: 510, 1952

Summary

The paper showed three methods (alkali, sonic and sonic-alkali treatment) for the preparation of the cell wall of natto bacteria and some chemical properties of the preparations.

1) The preparation obtained by alkali treatment contained no nucleic acid, while some impurities remained were observed with electronmicroscope.

2) The preparation obtained by sonic treatment contained a few per cent of nucleic acids.

3) Both nucleic acid and impurities observable with electronmicroscope were not detected in the preparation obtained by sonic-alkali combined treatment, which was concluded to be an excellent method of preparing the cell wall of the organism.

4) Preparations obtained by any methods above mentioned contained about 50 per cent of amino acids and about 15 per cent of amino sugars.

5) Preparations were attacked by lysozyme and lysozyme like enzymes of natto bacteria but not attacked by pepsin and trypsin.

6) The cell wall of natto bacteria was considered as a polypeptide, containing some amino sugars, similar to those of the other strains of gram positive bacteria.