

## A群溶連菌のリン脂質および糖脂質について

金沢大学医学部薬理学教室 (主任 ; 正印 達教授)

木	越	茂
北	島	耕
林		義
西		一
		也

(昭和53年10月27日受付)

A群溶連菌には抗腫瘍作用を示すものがあり、抗腫瘍性溶連菌について多くの研究がなされている<sup>1)2)</sup>。しかしながら、抗腫瘍作用に関連があると考えられる溶連菌の菌体成分についてはほとんど知られていない。他方、細菌のリン脂質あるいは糖脂質の組成が菌の種類によって著しく異なることが報告されており、これらの脂質の組成と細菌の生物学的性状との間には密接な関係のあることが示唆されている<sup>3)4)</sup>。したがって、溶連菌の抗腫瘍作用と菌体脂質の間には何らかの関係があるのではないかと推察される。

A群溶連菌には、ストレプトリジンSおよびOを産生する菌 (Sv菌, Su菌, C203S菌など)、ストレプトリジンSのみを産生する菌 (Blackmore菌) およびストレプトリジンOのみを産生する菌 (C203U菌) の3種類があるが、ストレプトリジンSを産生する菌のみが抗腫瘍作用を示すことが報告されている<sup>5)</sup>。本研究は、溶連菌Suのリン脂質および糖脂質を溶連菌Blackmoreあるいは溶連菌C203Uの脂質と比較しながら、薄層クロマトグラフィーならびにペーパー・クロマトグラフィーで検討したものである。

### 実験材料および方法

#### 1. 溶連菌株

教室保存の3種類のA群溶連菌、Su菌、Blackmore菌およびC203U菌を使用した<sup>5)</sup>。

#### 2. 溶連菌の培養

溶連菌の培養にはWoodらの合成培地<sup>6)</sup>を用いた。合成培地の組成はBacto tryptone 20g, Bacto yeast extract 10g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5g, ブドウ糖 1g, 精製水 1l で、10% NaHCO<sub>3</sub>でpHを7.3に調整したのち、

120°Cで20分間滅菌したものをを用いた。溶連菌の合成培地による培養液200mlを10lの合成培地に接種し、37°Cで12時間培養したのち、低温下で連続遠心 (10,000rpm, 100ml/分)により集菌し、菌体を生理食塩水で2回洗浄した (菌収量は湿重量で20-25g)。

#### 3. 溶連菌脂質の抽出

溶連菌脂質はFolchらの方法<sup>7)</sup>によって抽出した。すなわち、溶連菌20-25gを20倍量のクロロホルム・メタノール (2:1, v/v)で室温で2回抽出したのち、抽出液に1/5量の生理食塩水を加えて混和し、4°Cに放置して混液が二層に分離してから、水溶性物質を含む上層を除去し、脂質を含む下層をロータリー・エバポレーターを用いて窒素気流下に40°Cで濃縮して油状物質 (総脂質) 2~2.5gを得た。得られた総脂質を100mlのクロロホルム・メタノールに溶解し、使用するまで-20°Cに保存した。

#### 4. 薄層クロマトグラフィーによる溶連菌脂質の分離・同定

##### (i) クロマトプレートの作製

クロマトプレートはStahlの方法<sup>8)</sup>によって作製した。すなわち、25gのシリカゲルH (Merck)を70mlの精製水に浮遊させたものをガラス板 (20×20cm)に載せてシリカゲルの薄層 (厚さ: 0.25mm)を作り、一夜乾燥後、薄層を110°Cで30分間加熱して活性化し、放冷後に実験に用いた。

##### (ii) 展開溶媒

溶媒A: クロロホルム・メタノール・水 (65:25:4, v/v)<sup>9)</sup>, 溶媒B: ジイソブチルケトン・酢酸・水 (80:50:10, v/v)<sup>10)</sup>, 溶媒C: 塩化エチレン・メタノール (98:2, v/v)<sup>11)</sup>, 溶媒D: n

Phospholipids and Glycolipids of Group A Hemolytic streptococci. Shigeru Kigoshi, Kousaku Kitajima, Yoshinori Hayashi and Kazuya Nishi. Department of Pharmacology (Director ; Prof. S. Shoin), School of Medicine, Kanazawa University.

-ヘキサノール・エチルエーテル・酢酸 (70 : 30 : 2, v/v)<sup>12)</sup>.

(iii) 発色試薬

(a) ヨード試薬 (2% エタノール溶液, 脂質の検出)<sup>13)</sup>, (b) リンモリブデン酸試薬 (10% エタノール溶液, 脂質の検出)<sup>14)</sup>, (c) ニンヒドリン試薬 (n-ブタノールで飽和した水に 0.2% に溶かしたもの, アミノ基の検出)<sup>15)</sup>, (d) Dragendorff 試薬 (A液: 塩基性硝酸ビスマス 1.7g を 20% 酢酸 100 ml に溶解したもの, B液: ヨウ化カリウムの 40% 水溶液. A液 20 ml, B液 5 ml および水 70 ml を混和して使用. コリンの検出)<sup>9)</sup>, (e) Dittmer-Lester 試薬 (A液: 40.11g の三酸化モリブデンを 25N 硫酸 1l に加熱溶解したもの, B液: 粒末モリブデン 1.78g を A液 500 ml に加熱溶解したもの. A液 1 容, B液 1 容に水 2 容を加える. リン脂質の検出)<sup>9)</sup>, (f) アンスロン試薬 (アンスロン 0.5g とチオ尿素 10g を 66% 硫酸 1l に溶かしたもの, 糖脂質の検出)<sup>17)</sup>, (g) アンチモン試薬 (三塩化アンチモン 25g をクロロホルム 75g に溶解したもの, ステロール類の検出)<sup>18)</sup>, (h) 過塩素酸試薬 (20% 水溶液, ステロール類の検出)<sup>19)</sup>.

ヨード試薬および Dittmer-Lester 試薬をクロマトプレートに噴霧した場合はそのまま発色させ, その他の試薬を噴霧した場合はプレートを 110°C で加熱して発色させた.

(iv) 溶連菌脂質の分離および検出

溶連菌脂質の分離は二次元薄層クロマトグラフィーでおこなった. すなわち, クロマトプレートの一隅 (両端から 2.5cm) に 30~40mg の脂質をマイクロピペットで点状にスポットし, あらかじめ展開溶媒 A200 ml を入れて槽内を溶媒蒸気で飽和させた展開槽内にクロマトプレートを置いた. 溶媒先端が脂質塗布点から 15cm 上昇してからクロマトプレートを展開槽より取り出し, ドライヤーで 15~20 分間乾燥させた. つぎに, プレートを 90 度回転させて, 溶媒 B200 ml を入れた別の展開槽内に置いた. 2 回目の展開が終わってから, クロマトプレートを充分に乾燥させ, 噴霧試薬を用いて脂質を検出した.

なお, クロマトプレートから回収した一部の脂質について, 溶媒 C および D を用いる二次元薄層クロマトグラフィーによって脂質の種類を調べた. この際, 標準物質としてコレステロール (Merck) およびコレステロール・パルミテート (Sigma) を用いた.

アミノ基を含む脂質, リン脂質および糖脂質を一枚のプレート上に検出するために, はじめにヨード試薬を噴霧して脂質のスポットの位置を確認したのち, ニ

ンヒドリン試薬でアミノ基の有無を調べ, Dittmer-Lester 試薬でリンの存在を確認, さいごにアンスロン試薬で糖を検出した. また, アミノ基を含む脂質, コリンを含む脂質およびステロール類を一枚のプレートで検出するために, ヨード試薬で脂質を検出したのち, ニンヒドリン試薬, Draogendorff 試薬, 過塩素酸試薬を順次を使用して脂質の種類を調べた.

4. 脂質水解産物のペーパー・クロマトグラフィー

二次元法で分離された脂質画分をクロマトプレートより回収してペーパー・クロマトグラフィーに用いた. すなわち, 溶連菌の総脂質 70~80mg をクロマトプレート (厚さ: 0.5mm) にスポットし, 溶媒 A および B を用いて二次元法で展開したのち, ヨード試薬でスポットの位置を確めて脂質を含むシリカゲルをプレートから採取し, クロロホルム・メタノール (2 : 1, v/v) で脂質を抽出した.

(i) リン脂質

クロマトプレートから回収したリン脂質の各画分を Benson-Maruo の方法<sup>20)</sup>で脱アシル化した. リン脂質のメタノール溶液 (脂質量: 10~15mg) 5 ml と 0.1N KOH メタノール液 5 ml を混和して 37°C に 15 分間置いたのち, 氷冷し, Dowex 50 (H<sup>+</sup>型) を加えて中和した. ついで, ガラス線維をつめた濾斗で樹脂を除去してから, 適量のクロロホルムおよび水を加えてクロロホルム・メタノール・水の組成比が 4 : 2 : 1 (v/v) になるようにして混和した. 混液が二層に分離してから, 水溶性物質を含む上層を採り, 上層液について, Dawson の方法<sup>21)</sup>によって二次元ペーパー・クロマトグラフィーをおこなった. すなわち, 濾紙 (東洋濾紙 No.50, 40 × 40cm) の一隅 (両縁より 5cm) にリン脂質の脱アシル化物をスポットし, はじめに水飽和ブタノール・酢酸・エタノール (100 : 10 : 12, v/v)<sup>21)</sup> を用いて上昇法で 16 時間展開したのち, 濾紙をドライヤーで充分に乾燥してから濾紙を 90 度回転させ, メタノール・ギ酸・水 (80 : 13 : 7, v/v)<sup>21)</sup> を用いて上昇法で 4 時間展開した. 展開の終わった濾紙を乾燥したのち, 濾紙上のリン酸化合物を Hanes-Isherwood の試薬 (5N 塩酸 20 ml, 72% 過塩素酸 40 ml と 5% モリブデン酸水溶液 130 ml を混和したもの)<sup>22)</sup> で検出して, リン酸化合物の Rf 値を求めた. なお, 標準物質としてホスファチジル-L-セリン (Nb Co.) およびホスファチジルエタノールアミン (Nb Co.) の脱アシル化物を用いた.

さらに, 上記試料および標準物質の脱アシル化物について, フェノール・水 (100 : 30, v/v) [上昇法, 16 時間展開]<sup>23)</sup> およびブタノール・プロピオン酸・水

(142 : 71 : 100, v/v) [上昇法, 14時間展開]<sup>23)</sup>を展開溶媒とする二次元ペーパー・クロマトグラフィーをおこなった。

#### (ii) 糖脂質

薄層クロマトグラフィーで回収した糖脂質の各画分をリン脂質と同様に0.1N KOHメタノール液で脱アシル化し, 得られた脱アシル化物を一次元ペーパー・クロマトグラフィーで調べた。展開溶媒には(a)プロパノール・アンモニア(比重: 0.90)・水(6 : 3 : 1, v/v) [下降法, 20時間展開]<sup>22)</sup>, (b)ブタノール・ピリジン・水(6 : 4 : 3, v/v) [下降法, 13時間展開]<sup>24)</sup>, (c)ブタノール・プロピオン酸・水(142 : 71 : 100, v/v) [下降法, 14時間展開]<sup>25)</sup>および(d)エチル酢酸・ピリジン・酢酸・水(5 : 5 : 1, 3, v/v) [下降法, 12時間展開]<sup>26)</sup>の4種類が用いられた。濾紙(東洋濾紙No.50, 20 × 40cm)の一端から5cmの所に糖脂質の脱アシル化物およびブドウ糖(標準物質)を線状(長さ: 2cm)にスポットし, 下降法で一定時間展開したのち, 濾紙をドライヤーで十分に乾燥させ, 濾紙上のスポットを硝酸銀試薬(A液: 飽和硝酸銀水溶液1mlにアセトン200mlを加えて生じた沈澱を少量の水を加えて溶解したもの, B液: 0.5N NaOHメタノール液, C液: 5%チオ硫酸ナトリウム溶液, 濾紙をA液, B液およびC液で順次処理する)<sup>27)</sup>で検出し, スポットのRf値を求めた。

また, 糖脂質の各画分を0.1N塩酸で100°C・40分間処理して得られた部分水解産物<sup>28)</sup>について, 上記の展開溶媒による一次元ペーパー・クロマトグラフィーをおこなった。さらに, 糖脂質の各画分を3N塩酸で100°C・90分間処理し<sup>29)</sup>, 得られた糖脂質の完全水解産物を濾紙にスポットし, ブタノール・酢酸・水(6 : 4 : 3, v/v)<sup>28)</sup>またはエチル酢酸・ピリジン・水(12 : 5 : 4, v/v)<sup>28)</sup>を展開溶媒として下降法により展開した。糖脂質の完全水解産物の検出には, アニリン水素フタレート試薬(アニリン0.91mlとフタル酸1.66gを水飽和ブタノール100mlに溶解したもの)<sup>29)</sup>またはジフェニルアミン・アニリン試薬(ジフェニルアミン2gとアニリン2mlをアセトン100mlに溶解し, 80%リン酸溶液10mlを混和したもの)<sup>30)</sup>を用いた。

### 実験成績

#### 1. Su菌脂質の薄層クロマトグラフィー

クロロホルム・メタノール・水(65 : 25 : 4, v/v)およびジイソブチルケトン・酢酸・水(80 : 50 : 10, v/v)を展開溶媒とする二次元薄層クロマ

トグラフィーによって, Su菌の総脂質は11個のスポットに分離されたが, 原点のスポットを除いた残りの10個のスポット(L1-L10)はいずれもヨード試薬やリンモリブデン酸試薬などの脂質用試薬に対して陽性反応を示した(図1)。表1はこれら10個のスポットの各種検出試薬に対する反応結果を示したもので, スポットL1, L2, L4およびL6はDittmer-Lester試薬に対し陽性反応を示し, スポットL1, L3およびL5はアンスロン試薬に陽性反応を示したが, これらのスポットはいずれもニンヒドリン試薬およびDragendorff試薬に対し陰性反応を示した。したがって, スポットL2, L4およびL6はリン脂質であり, スポットL3とL5は糖脂質であり, スポットL1はリンと糖を含む脂質であると考えられた。また, スポットL8とL10はアンスロン試薬に対し陽性反応を示したが, アンチモン試薬や過塩素酸試薬などのステロール用試薬に対しても陽性反応を示したので, ステロール類であると考えられた。以上のごとく, Su菌の総脂質に3種類のリン脂質, 2種類の糖脂質およびリンと糖を含む脂質が見いだされたので, それぞれの脂質成分を同定するために, 各画分の脱アシル化物および水解産物についてペーパー・クロマトグラフィーをお

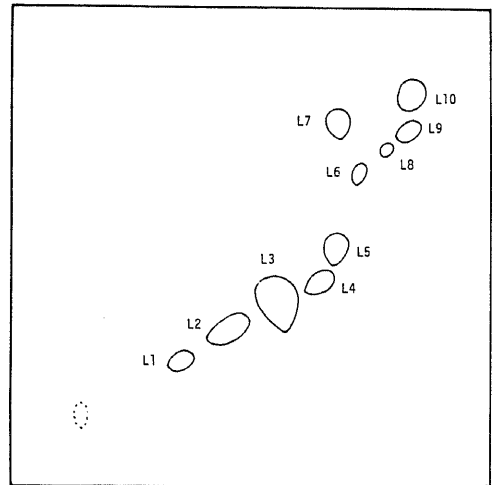


Fig. 1. A two-dimensional thin-layer chromatogram of total lipids from a hemolytic streptococcus, Su. The chromatogram was developed in chloroform-methanol-water (solvent A, 65:25:4, by vol.) in the x-direction and then in diisobutylketone-acetic acid-water (solvent B, 80:50:10, by vol.) in the y-direction. spots were detected by iodine, followed by staining with phosphomolybdate. Numbers refer to those in Table 1.

Table 1. Chromatographic characteristics of lipid fractions of a hemolytic streptococcus, Su\*

Spot number	Average Rf values in		Color reaction by spray reagents**								Lipid classes
	Solvent A	Solvent B	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	
L1	0.27	0.17	+	+	-	-	+	+	-	-	Unknown
L2	0.43	0.28	+	+	-	-	+	-	-	-	Phospholipids
L3	0.56	0.34	+	+	-	-	-	+	-	-	Glycolipids
L4	0.67	0.41	+	+	-	-	+	-	-	-	Phospholipids
L5	0.73	0.48	+	+	-	-	-	+	-	-	Glycolipids
L6	0.79	0.72	+	+	-	-	+	-	-	-	Phospholipids
L7	0.62	0.87	+	+	-	-	-	-	-	-	Neutral lipids
L8	0.87	0.80	+	+	-	-	-	+	+	+	Neutral lipids
L9	0.93	0.85	+	+	-	-	-	-	-	-	Neutral lipids
L10	0.94	0.93	+	+	-	-	-	+	+	+	Neutral lipids

\* Total lipids of a hemolytic streptococcus, Su, were chromatographed two-dimensionally on a silica gel H plate using chloroform-methanol-water (solvent A, 65:25:4, by vol.) and diisobutylketone-acetic acid-water (solvent B, 80:50:10, by vol.), and the spots were detected with various spray reagents.

\*\* Spray reagents: iodine (R1) and phosphomolybdate (R2) for lipids; ninhydrin (R3) for amino group; Dragendorff reagent (R4) for choline; Dittmer-Lester reagent (R5) for phospholipids; anthrone (R6) for glycolipids and sterols; antimony (R7) and perchloride (R8) for sterols.

Table 2. Rf values of deacylated products of streptococcal phospholipids\*

Number of phospholipids	Rf values of deacylated products in		Identified as
	Solvent I	Solvent II	
L2	0.84 (0.51)**	0.53	Glycerophosphoryl glycerol***
L4	0.29 (0.30)	0.56 (0.59)	1,3-diglycerophosphoryl glycerol
L6	0.34 (0.33)	0.76 (0.74)	Glycerophosphate
	0.31 (0.31)	0.45 (0.50)	L- $\alpha$ -glycerophosphoryl serine (GPS)
	0.44 (0.47)	0.62 (0.63)	L- $\alpha$ -glycerophosphoryl ethanolamine (GPE)

\* Deacylated products of streptococcal phospholipids were two-dimensionally chromatographed on a paper (Toyo Roshi No. 50) using phenol saturated water-acetic acid-ethanol (solvent I, 100:10:12, by vol.) and methanol-formic acid-water (solvent II, 80:13:7, by vol.), and the spots were detected with Hanes-Isherwood reagent.

\*\* Rf values of phosphate esters in solvent I and II were reported by Dawson<sup>21</sup>.

\*\*\* Rf values of deacylated product from phospholipid L2 on a paper with phenol-water (100:30, v/v) and butanol-propionic acid-water (142:71:100, by vol.) were 0.42 and 0.19, and Rf values of glycerophosphoryl glycerol in the same solvent systems were 0.40 and 0.17<sup>23</sup>.

こなった。

## 2. リン脂質の同定

3種類のリン脂質(L2, L4およびL6)の脱アシル化物の二次元ペーパー・クロマトグラム(図2)でのRf値とホスファチジル-L-セリンおよびホスファチジルエタノールアミンの脱アシル化物のRf値ならびにDawson<sup>21)</sup>の報告したリン酸化合物のRf値との比較によって、リン脂質L2, L4およびL6の脱アシル化物はそれぞれグリセロホスホリルグリセロール, 1, 3ジグリセロホスホリルグリセロールおよびグリセロホスフェートであると同定された(表2)。したがって、Su菌の3種類のリン脂質L2, L4およびL6はそれぞれホスファチジルグリセロール, ジホスファチジルグリセロールおよびホスファチジン酸であると考えられた。

## 3. 糖脂質の同定

Su菌の2種類の糖脂質(L3とL5)の脱アシル化物

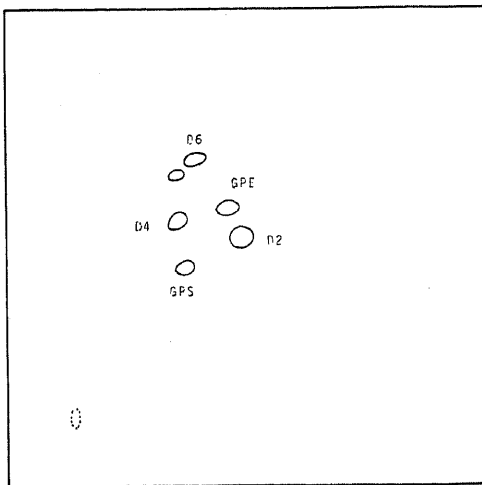


Fig. 2. A two-dimensional paper chromatogram of deacylated products from streptococcal phospholipids. The chromatogram was developed in phenol saturated water-acetic acid-ethanol (solvent I, 100:10:12, by vol.) in the *x*-direction and then in methanol-formic acid-water (solvent II, 80:13:7, by vol.) in the *y*-direction. Spots were detected by Hanes-Isherwood reagent. Spots D2, D4 and D6 represent the deacylated products of phospholipid L2, L4 and L6, respectively. L- $\alpha$ -glycerophosphoryl serine (GPS) and L- $\alpha$ -glycerophosphoryl ethanolamine (GPE) were the deacylated products of phosphatidyl serine and phosphatidyl ethanolamine, respectively.

の一次元ペーパー・クロマトグラムでのRf値と石塚ら<sup>31)</sup>の報告した糖脂質脱アシル化物のRf値との比較によって、糖脂質L3とL5の脱アシル化物はそれぞれジグルコシルグリセロールおよびモノグルコシルグリセロールであると同定された(表3)。他方、糖脂質L3の0.1N塩酸による部分水解産物からジグルコシルグリセロール, モノグルコシルグリセロールおよびブドウ糖が得られ、糖脂質L5の0.1N塩酸による部分水解産物からモノグルコシルグリセロールおよびブドウ糖が得られた(図3)。また、糖脂質L3およびL5の3N塩酸による完全水解産物からブドウ糖とグリセリンが得られた。したがって、Su菌の2種類の糖脂質L3とL5はそれぞれジグルコシルグリセライドおよびモノグルコシルグリセライドであると推定された。

## 4. リンと糖を含む脂質

Su菌のリンと糖を含む脂質L1の水酸化カリウムおよび塩酸による水解産物のペーパー・クロマトグラムから、脂質L1の脱アシル化物のRf値が石塚ら<sup>31)</sup>の報告したジグルコシルグリセロホスホリルグリセロールのRf値に一致しており(表3)、部分水解産物にグリセロホスホリルグリセロール, グリセロホスフェ

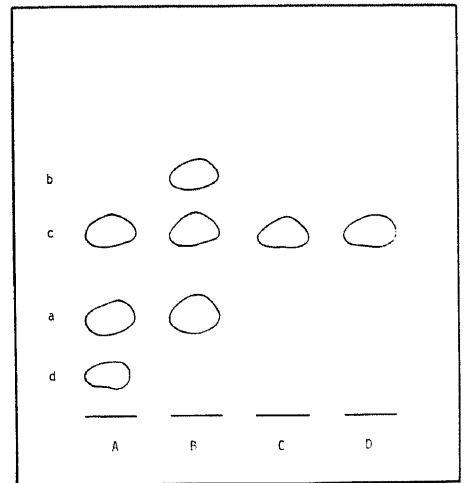


Fig. 3. An one-dimensional paper chromatogram of deacylated products (A), partial hydrolysates (B) and total hydrolysates (C) of glycolipid L5. The chromatogram was developed with butanopyridine-water (solvent V, 6:4:3, by vol.) in descending method, and spots were detected by silver nitrate. Diglucoyl glycerol (a), monoglucoyl glycerol (b), glucose (c) and monoacylate (d) were obtained from glycolipid L5. Glucose (D) was used as a standard.

Table 3. Rf values of deacylated products of streptococcal glycolipids\*

Number of glyco-lipids	Rf values of deacylated products in				Identified as
	Sojvent III	Solvet IV	Solvent V	Solvent VI	
L1	0.41 (0.42)**	0.07 (0.06)	0.05 (0.03)	0.30 (0.28)	Diglucosyl glycerophosphoryl glycerol
L3	0.53 (0.53)	0.21 (0.02)	0.20 (0.20)	0.46 (0.48)	Diglucosyl glycerol
L5	0.63 (0.63)	0.30 (0.31)	0.36 (0.36)	0.58 (0.56)	Monoglucosyl glycerol
	0.56	0.19	0.36 (0.36)	0.48 (0.48)	Glucose***

\* Deacylated products of streptococcal glycolipids were chromatographed one-dimensionally on a paper (Toyo Roshi No. 50) using the following solvent systems and detected with silver nitrate: propanol-ammonia (specific gravity: 0.90)-water (solvent III, 16 : 3 : 1, by vol.); butanol-propionic acid-water (solvent IV, 142: 71: 100, by vol.); butanol-pyridine-water (solvent V, 6: 4: 3, by vol.); ethyl acetic acid-pyridine-acetic acid-water (solvent VI, 5: 5: 1: 3, by vol.).

\*\* Rf values of deacylated products of glycolipids were reported by Ishizuka and Yamakawa<sup>31)</sup>.

\*\*\* This substance was used as a standard.

Table 4. Chromatographic characteristics of neutral lipids of a hemolytic streptococcus, Su\*

Spot number	Average Rf values in		Detection by spray reagents**					Possible identification
	Solvent C	Solvent D	R1	R2	R6	R7	R8	
L8a	0.39	0.24	+	+	-	-	-	Unknown
L8b	0.34	0.27	+	+	+	+	+	Sterols***
L8c	0.41	0.30	+	+	-	-	-	1, 3-diglycerides
L8d	0.52	0.28	+	+	-	-	-	1, 2-diglycerides
L10a	0.86	0.70	+	+	-	-	-	Triglycerides
L10b	0.88	0.84	+	+	+	+	+	Sterol esters***
L10c	0.93	0.94	+	+	-	-	-	Hydrocarbons

\* Two lipid fractions (L8 and L10) from a hemolytic streptococcus, Su, were chromatographed two-dimensionally on a silica gel H plate with ethylene chloride-methanol (solvent C, 98: 2, v/v) and n-hexane-diethyl ether-acetic acid (solvent D, 70: 30: 2, by vol.), and detected with various spray reagents.

\*\* Spray reagents: iodine (R1) and phosphomolybdate (R2) for lipids; anthrone (R6) for carbohydrates and sterols; antimony (R7) and perchloride (R8) for sterols.

\*\*\* Rf values of cholesterol and cholesterol palmitate in solvent C and D were found to be 0.34 and 0.24 or 0.87 and 0.84, respectively.

ト、ブドウ糖などが含まれていることが見いだされた。したがって、Su菌の脂質L1はジグルコシルホスファチジルグリセロールであると考えられた。

5. その他の脂質の同定

Su菌の脂質L8とL10はアンスロン試薬のみでなくアンチモン試薬や過塩素酸試薬などのステロール用試薬に対しても陽性反応を示したので、糖を含む脂質

であるか否かを調べた。塩化エチレン・メタノール(98 : 2, v/v)およびn-ヘキサン・エチルエーテル・酢酸(70 : 30 : 2, v/v)を展開溶媒とする二次元薄層クロマトグラムで、脂質L8は4個のスポットに分離し、脂質L10は3個のスポットに分離した(図4)。これらのスポットのうち、L8bとL10bはアンチモン試薬および過塩素酸試薬に対し陽性反応を

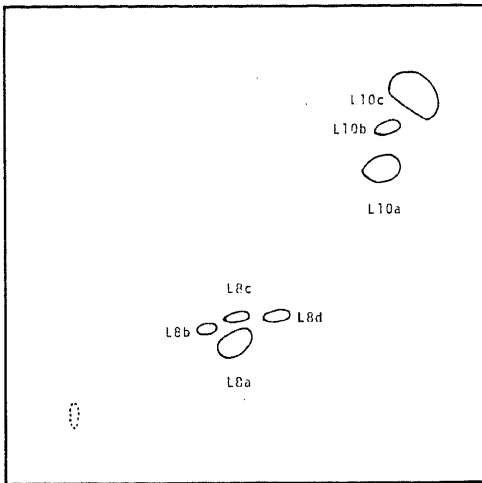


Fig. 4. A two-dimensional thin-layer chromatogram of two lipid fractions (L8 and L10) from a hemolytic streptococcus, Su. The chromatogram was developed in ethylene chloride-methanol (solvent C, 98:2, v/v) in the  $x$ -direction and then in  $n$ -hexane-diethyl ether-acetic acid (solvent D, 70:30:2, by vol.) in the  $y$ -direction. Spots were detected by iodine, followed by staining with phosphomolybdate. Numbers refer to those in Table 4.

示し、それぞれの Rf 値がコレステロールおよびコレステロールバルミテートの Rf 値と同一であった (表 4)。また、クロマトプレートから回収した脂質 L8b と L10b は、Liebermann-Burchard 反応(ステロール類に特異的な呈色反応)<sup>32)</sup>が陽性であり、ジギトニンと不溶性沈澱<sup>33)</sup>を作った。したがって、脂質 L8b と L10b はステロールおよびステロールエステルであると同定された。すなわち、脂質 L8 と L10 はステロールまたはステロールエステルと他の中性脂質の混合物で糖脂質ではないと考えられた。

#### 6. Blackmore 菌および C203U 菌のリン脂質と糖脂質

Blackmore 菌および C203U 菌のリン脂質と糖脂質を Su 菌の場合と同様に薄層クロマトグラフィーおよびペーパー・クロマトグラフィーで調べた (表 5)。クロロホルム・メタノール・水 (65:25:4, v/v) およびジイソブチルケトン・酢酸・水 (80:50:10, v/v) を展開溶媒とする Blackmore 菌総脂質の二次元薄層クロマトグラムは Su 菌総脂質のクロマトグラムと同一であり、ペーパー・クロマトグラフィーで調べた Blackmore 菌のリン脂質および糖脂質は Su

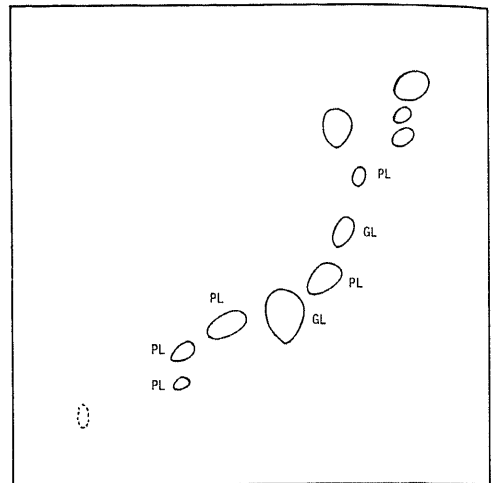


Fig. 5. A two-dimensional thin-layer chromatogram of total lipids from a hemolytic streptococcus, C203U. The chromatogram was developed in chloroform-methanol-water (solvent A, 65:25:4, by vol.) in the  $x$ -direction and then in diisobutylketone-acetic acid-water (solvent B, 80:50:10, by vol.) in the  $y$ -direction. Spots were detected by iodine, followed by staining with phosphomolybdate. The total lipids were separated into 11 components, 5 of which were phospholipids (PL) and 2 components were glycolipids (GL).

菌のリン脂質および糖脂質と同じであった。すなわち、Blackmore 菌の総脂質には、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸およびジグルコシルホスファチジルグリセロールの 4 種類のリン脂質とジグルコシルジグリセライドおよびモノグルコシルジグリセライドの 2 種類の糖脂質が見いだされた。

他方、二次元薄層クロマトグラフィーによって C203U 菌の総脂質から 5 種類のリン脂質と 2 種類の糖脂質が得られ (図 5)、ペーパー・クロマトグラフィーによって 4 種類のリン脂質と糖脂質が Su 菌のリン脂質および糖脂質と同じであることが示された。また、C203U 菌のもう 1 個のリン脂質は、ニンヒドリン試薬に陽性反応を示し、その水解産物からグリセロホスホリルグリセロール、グリセロホスフェート、アミノ酸などが得られたので、ホスファチジルグリセロールにアミノ酸が結合したものであると考えられた<sup>34)~36)</sup>。したがって、C203U 菌はアミノ酸の結合したホスファチジルグリセロールを含有する点で Su 菌または Blackmore 菌とは異なっていた。

Table 5. Phospholipids and glycolipids of three strains of hemolytic streptococci

Strains of streptococci	Phospholipids*					Glycolipids*	
	PA	PG	DPG	Glu-PG	Amino-PG	Glu-DG	Glu-Glu-DG
Su	+	+	+	+	-	+	+
Blackmore	+	+	+	+	-	+	+
C203U	+	+	+	+	+	+	+

\* Phospholipids and glycolipids found in the streptococci are as follows: phosphatidic acid (PA); phosphatidyl glycerol (PG); diphosphatidyl glycerol (DPG); diglucosyl phosphatidyl glycerol (Glu-PG); phosphatidyl glycerol containing amino acid (Amino-PG); monoglucosyl diglyceride (Glu-DG); diglucosyl diglyceride (Glu-Glu-DG).

## 考 按

薄層クロマトグラフィーおよびペーパー・クロマトグラフィーによって、A群溶連菌 Su の総脂質には4種類のリン脂質と2種類の糖脂質が含まれていることが示され、リン脂質はジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸およびジグルコシルホスファチジルグリセロールであり、糖脂質はジグルコシルジグリセライドおよびモノグルコシルジグリセライドであると同定された。また、A群溶連菌 Blackmore の総脂質にも、溶連菌 Su と同様に、4種類のリン脂質と2種類の糖脂質が含まれていることが示された。しかしながら、A群溶連菌 C203U の総脂質には上記の脂質以外にアミノ酸の結合したホスファチジルグリセロールが見いだされた。これらの成績は、A群溶連菌 Su と Blackmore とはリン脂質および糖脂質の構成が同じであるが、A群溶連菌 C203U のリン脂質構成が溶連菌 Su または Blackmore とは異なることを示している。

ストレプトリジン S を産生する A 群溶連菌 (Su 菌、Blackmore 菌など) は抗腫瘍作用を示すが、ストレプトリジン S を産生しない A 群溶連菌 (C203U 菌) またはレンサ球菌 (*St. faecalis* など) は抗腫瘍作用を示さないことが報告されている<sup>1)</sup>。*St. faecalis* の糖脂質構成は溶連菌 Su や Blackmore などとは異なっており、トリグルコシルジグリセライド、ホスファチジルグルコシルジグリセライドなどの糖脂質が *St. faecalis* に見いだされている<sup>37)</sup>。したがって、抗腫瘍性溶連菌と抗腫瘍作用を示さない溶連菌またはレンサ球菌とでは、リン脂質あるいは糖脂質の構成が異なるのではないかと推察される。

## 結 論

3種類のA群溶連菌、Su菌、Blackmore菌およびC203U菌のリン脂質と糖脂質を薄層クロマトグラフィーおよびペーパー・クロマトグラフィーで調べて以下の成績を得た。

1. Su菌およびBlackmore菌の総脂質には4種類のリン脂質と2種類の糖脂質が含まれていた。
2. 両溶連菌のリン脂質はジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸およびジグルコシルホスファチジルグリセロールであり、糖脂質はジグルコシルジグリセライドおよびモノグルコシルジグリセライドであると同定された。
3. C203U菌の総脂質には上記のリン脂質以外にアミノ酸の結合したホスファチジルグリセロールが含まれていた。

稿を終るにぞみ、御校閲を賜わった正印達教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R. : Japan. J. Microbiol., 11, 323 (1967).
- 2) Okamoto, H. : Mechanisms in Bacterial Toxinology (ed. by A. W. Bernheimer), p. 238, John Wiley & Sons Inc., New York, 1976.
- 3) Kates, M. : Adv. Lipid Res., 2, 17 (1964).
- 4) Ikawa, M. : Bacteriol. Rev., 31, 54 (1967).
- 5) 越村三郎・西田信義・坂東 勲・正印 達・南幹雄・角野光司 : 金大結研年報, 23, 61 (1965).
- 6) Wood, A. J. & Gunsalus, I. C. : J. Bacteriol., 44, 333 (1942).
- 7) Folch, J., Lees, M. & Sloan Stanley, G. H. : J.



- Biol. Chem., 226, 497 (1957).
- 8) 原 昭二 : 薄層クロマトグラフィー (石川・原・古谷・中沢編), 改訂3版, 13頁, 南山堂, 昭和43年.
- 9) Wagner, H., Horhammer, C. & Wolf, P. : Biochem. Z., 334, 175 (1961).
- 10) Marinetti, G. V., Erbrand, J. & Kochen, J. : Federation proc., 16, 837 (1952).
- 11) Jatzkewitz, H. & Mehl, E. : Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 320, 251 (1960).
- 12) Colp, T. W., Tucker, P. W., Raltiff, R. & Hall, F. F. : Biochim. Biophys. Acta, 218, 259 (1970).
- 13) Mangold, H. K. & Kammereck, R. : J. Am. Oil Chemists' Soc., 39, 201 (1962).
- 14) Kaufmann, H. P., Makes, Z. & Diecke, F. : Fette Seifen Anstrichmittel, 63, 235 (1961).
- 15) Skipiski, V. P., Peterson, R. F. & Barclay, H. : J. Lipid Res., 3, 467 (1962).
- 16) Dittmer, J. C. & Lester, R. L. : J. Lipid Res., 5, 126 (1964).
- 17) Roe, J. H. : J. Biol. Chem., 212, 335 (1955).
- 18) Weicker, H. : Klin. Wochschr., 37, 763 (1959).
- 19) Lepage, M. : J. Chromatogr., 13, 99 (1964).
- 20) Benson, A. A. & Maruo, B. : Biochim. Biophys. Acta, 27, 189 (1958).
- 21) Dawson, R. M. C. : Biochem. J., 75, 45 (1960).
- 22) Hanes, C. S. & Isherwood, F. A. : Nature, 164, 1107 (1949).
- 23) Benson, A. A. & Strickland, E. H. : Biochim. Biophys. Acta, 41, 328 (1960).
- 24) Jeans, A., Wise, C. S. & Dimler, R. J. : Analyt. Chem., 23, 415 (1951).
- 25) Benson, A. A., Bassham, J. A., Calmin, M., Goodale, T. C., Hass, V. A. & Stepka, W. : J. Amer. Chem. Soc., 72, 1710 (1950).
- 26) Fisher, F. G. & Nebel, H. G. : Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 302, 10 (1955).
- 27) Trevelyan, W. E., Procter, D. P. & Harrison, J. S. : Nature, 166, 444 (1950).
- 28) Brundish, D. E., Shaw, N. & Baddily, J. : Biochem. J., 25, 21c (1965).
- 29) Partige, S. M. : Nature, 164, 443 (1949).
- 30) Bailey, R. W. & Bourne, E. J. : J. Chromatogr., 4, 206 (1960).
- 31) Ishizuka, I. & Yamakawa, T. : J. Biochem., 64, 13 (1968).
- 32) Burchard, H. : Chem. Zentr., 61, 25 (1890).
- 33) Windaus, A. : Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 65, 110 (1910).
- 34) Vorbeck, M. L. & Marinetti, G. V. : Biochemistry, 4, 296 (1965).
- 35) Santos Mota, J. M., Kamp, J. A. F., Verheij, H. M. & Deenen, L. L. : J. Bacteriol., 104, 611 (1970).
- 36) Kocun, F. J. : Biochim. Biophys. Acta, 202, 277 (1970).
- 37) Fischer, W. : Biochim. Biophys. Acta, 306, 353 (1973).

### A b s t r a c t

Hemolytic streptococci capable of forming streptolysin S, such as Su, Blackmore and others, have been reported to be cytotoxic to the tumor cells, but the streptococcus without the formation of streptolysin S (C203U) was shown to be inert upon the tumor cells. In this study, the phospholipids and glycolipids of three strains of hemolytic streptococci, Su, Blackmore and C203U, were examined by thin-layer and paper chromatography to compare the constitution of these lipids among three streptococci.

Streptococcal cells were cultured in 10 l of Wood and Gunsalus medium at 37°C for 12 hours, and the total lipids were extracted from the cells according to the method of Folch et al (yields of total lipids : 2-2.5g/10 l). The total lipids were chromatographed two-dimensionally on a silica gel H plate (0.25mm thick, 20 × 20cm) using chloroform-methanol-water (65 : 25 : 4, by vol.) and diisobutyl ketone-acetic acid-water (80 : 50 :

10, by vol.), and the spots on the plate were detected with various spray reagents. The total lipids of Su were separated into 10 components, 4 of which were phospholipids and 2 components were glycolipids, and there was no lipid component containing amino group.

The lipid components found in the total lipids of Blackmore were similar to those of Su. On the other hand, a phospholipid containing amino group was found in the total lipids of C203U, from which 5 phospholipids and 2 glycolipids were obtained.

To identify these phospholipids and glycolipids, each component obtained by preparative thin-layer chromatography was deacylated with 0.1 N KOH, and the deacylated products were chromatographed on a paper (Toyo Roshi No. 50) one-dimensionally or two-dimensionally with different solvent systems. In addition, the glycolipids were hydrolysed with 0.1 N HCl or 3 N HCl, and the hydrolysates were examined by paper chromatography. The phospholipids of two strains of the streptococci, Su and Blackmore, were identified as diphosphatidyl glycerol, phosphatidyl glycerol, phosphatidic acid and diglucosyl phosphatidyl glycerol, and the glycolipids of these streptococci as diglucosyl diglyceride and monoglucosyl diglyceride, respectively. The phospholipids and glycolipids of C203U were similar to those of Su, except the phospholipid containing amino group. This phospholipid was identified as phosphatidyl glycerol containing amino acid.

These results indicate that the constitution of phospholipid and glycolipid in two strains of hemolytic streptococci, Su and Blackmore, is the same, but that the constitution of phospholipid of C203U differs from that of Su or Blackmore.

---