

A群溶連菌の脂質に関する研究-1-溶連菌の脂質組成

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8894

A群溶連菌の脂質に関する研究

〔I〕溶連菌の脂質組成

金沢大学医学部薬理学教室 (主任: 正印 達教授)

北 島 耕 作

(昭和56年1月26日受付)

Key words Hemolytic streptococci, lipid composition, fatty acid pattern, phospholipids, glycolipids.

A群溶連菌に抗腫瘍作用のあることが見いだされてから、抗腫瘍性溶連菌について多くの研究が行なわれた¹⁾²⁾。このうち、A群溶連菌にはストレプトリジンSおよびストレプトリジンOを産生する菌、ストレプトリジンSのみを産生する菌およびストレプトリジンOのみを産生する菌の3種類が知られているが、ストレプトリジンSを産生する溶連菌のみが抗腫瘍作用を示し、その他の溶連菌や緑色連鎖球菌には抗腫瘍作用が認められないと報告されている¹⁾³⁾。一方、細菌のリン脂質と糖脂質の組成は菌の種類によって著しく異なり、これらの脂質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指摘されている⁴⁾⁷⁾。このことから、連鎖球菌の抗腫瘍作用とリン脂質および糖脂質の組成の関係について考査を行うため、まず生物学的性状の異なる連鎖球菌4株について、脂質組成に関する実験を行なった。

本論文では抗腫瘍性でストレプトリジンS(SLS)産生能を有する溶連菌Su菌とBlackmore菌およびストレプトリジンO(SLO)産生能を有し抗腫瘍性のないC203U菌並びにストレプトリジン産生能を欠き抗腫瘍性のない緑色連鎖球菌を用いて、リン脂質、糖脂質および中性脂質の組成ならびにこれら脂質の脂肪酸構成について定性定量実験を行なった。

材料および方法

1. 連鎖球菌

教室保存のA群溶連菌Su株(3型, SLSおよびSLO産生株, 以下Su菌と略記), Blackmore株(11型, SLS産生株, 以下Blackmore菌と略記), C203U株(C203S菌の変異種, SLO産生株, 以下C203U菌と略記)および緑色連鎖球菌90を使用した⁸⁾。

2. 連鎖球菌の培養

連鎖球菌の培養にはWoodらの合成培地⁹⁾を使用した。合成培地の組成はBacto tryptone 20g, Bacto yeast extract 10g, KH_2PO_4 5g, ブドウ糖 1g, 精製水 1lで、10% NaHCO_3 でpHを7.3に調製したのち、120℃で20分間滅菌したものをを用いた。連鎖球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℃で12時間培養したのち、低温下で連続遠心(10,000rpm, 100ml/分)して集菌し、菌体を生理食塩水で2回洗浄した。

3. 連鎖球菌脂質の抽出

連鎖球菌の脂質はFolchらの方法¹⁰⁾によって抽出した。すなわち、およそ20gの連鎖球菌を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℃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℃で濃縮して油状物質(総脂質)を得た。この総脂質(収量: 200-250mg/20g)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℃に保存した。

Studies on the Lipids of Group A Hemolytic Streptococci. [I] Lipid Composition of Hemolytic Streptococci. Kousaku Kitajima, Department of Pharmacology (Director: Prof. S. Shoin), School of Medicine, Kanazawa University.

4. 連鎖球菌脂質の薄層クロマトグラフィー

1). クロマトプレートの作製

クロマトプレートは Stahl の方法¹⁹⁾によって作製した。すなわち、25g のシリカゲル H (Merck) を 70 ml の精製水に浮遊させたものをガラス板 (20 × 20 cm) に載せてシリカゲルの薄層 (厚さ: 0.25 mm, 0.5 mm および 1.0 mm の 3 種類) を作り、一夜室温で乾燥後、薄層を 110 °C で 30 分間加熱して活性化し、放冷後、実験に用いた。なお、厚さ 0.5 mm および 1.0 mm の薄層は分離した脂質を回収するのに用いた。

2). 展開溶媒

展開溶媒液として次の 5 種類を用いた。すなわち、溶媒 A: クロロホルム・メタノール・水 (65:25:4, V/V)¹¹⁾; 溶媒 B: ジソブチルケトン・酢酸・水 (80:50:10, V/V)¹²⁾; 溶媒 C: クロロホルム・アセトン・メタノール・酢酸・水 (65:35:11:4:1.5, V/V)¹³⁾; 溶媒 D: 塩化エチレン・メタノール (98:2, V/V)¹⁴⁾; 溶媒 E: ヘキサン・エチルエーテル・酢酸 (70:30:2, V/V)¹⁵⁾ を用意した。

3). 発色試薬

展開分離された分画の検出のため、次の 7 種類の発色試薬を用いた。

(1) ヨード試薬 (2% エタノール溶液、脂質の検出)¹⁶⁾、(2) リンモリブデン酸試薬 (10% エタノール溶液、脂質の検出)¹⁶⁾、(3) 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: 粉末モリブデン 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)¹⁷⁾、(4) 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。糖脂質およびステロール類の検出)¹⁸⁾、(5) 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)¹⁶⁾、(6) 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)¹⁶⁾ (7) 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)¹⁶⁾。

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で発色させ、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。

4). 連鎖球菌脂質の分離および検出

二次元薄層クロマトグラフィーで連鎖球菌脂質の成分を調べた。¹⁹⁾ 厚さ 0.25 mm のクロマトプレートの一

隅 (両端から 2.5 cm) に 15 - 20 mg の総脂質をマイクロピペットで点状にスポットしたのち、溶媒 A で 15 cm 展開した。展開後、クロマトプレートを 90 度回転させてから、溶媒 B で 15 cm 展開した。溶媒を除いてから、ヨード試薬をプレートに噴霧してスポットの位置を確認したのち、その他の試薬を噴霧して脂質の種類を調べた¹⁹⁾。

展開溶媒 A および B を用いる二次元薄層クロマトグラフィーによって連鎖球菌のリン脂質と糖脂質は個々の成分に分離されたが、中性脂質の分離が不十分であったので、展開溶媒 D および E を用いる二次元薄層クロマトグラフィーで連鎖球菌の中性脂質の種類を調べた²⁰⁾。なお、中性脂質の成分を同定するためにコレステロール (Merck)、コレステロール・パルミテート (Sigma)、パルミチン酸、モノパルミチン、ジパルミチン、トリパルミチン (PL - Biochemicals) などを標準物質として用いた。

5). 連鎖球菌脂質の分取薄層クロマトグラフィー

連鎖球菌のリン脂質、糖脂質の加水分解産物をペーパー・クロマトグラフィーで調べたり、各脂質の脂肪酸構成をガスクロマトグラフィーで調べるために、総脂質の各成分を一次元薄層クロマトグラフィーで分離・精製した¹⁹⁾。

厚さ 0.5 mm または 1 mm の薄層 (20 × 20 cm) の一端から 2.5 cm の所に総脂質 100 mg または 200 mg を線状にスポットし、展開溶媒 A を用いて 17 cm 展開し、クロマトプレートを十分に乾燥したのち、ヨード試薬を噴霧してスポットの位置を確かめた。ついで、脂質を含むシリカゲルをプレートからかきとり、クロロホルム・メタノール (2:1, V/V) で脂質を抽出した。リン脂質については同様な操作を 2 - 3 回繰り返した。また、展開溶媒 A を用いる一次元薄層クロマトグラフィーで分離した糖脂質について、さらに展開溶媒 C を用いる一次元薄層クロマトグラフィーを 2 - 3 回繰り返した。

中性脂質は展開溶媒 E を用いる一次元薄層クロマトグラフィーで分離したのち、展開溶媒 D または E を用いる一次元薄層クロマトグラフィーによって各脂質画分を精製した。なお、一次元薄層クロマトグラフィーで分離したリン脂質または糖脂質は、展開溶媒 A および B を用いる二次元薄層クロマトグラフィーによって、また、中性脂質の成分は展開溶媒 D および E を用いる二次元薄層クロマトグラフィーによって、それぞれの脂質画分が単一であるか否かを調べた。

5). ペーパー・クロマトグラフィーによる脂質水分解産物の同定

一次元薄層クロマトグラフィーにより分離したリン脂質および糖脂質を同定するため、それぞれの脂質の水解産物についてペーパー・クロマトグラフィーを行なった¹⁹⁾。

1). リン脂質

リン脂質の各画分を0.1NKOHで37℃、15分間処理して脱アシル化し²¹⁾、脱アシル化物を二次元ペーパー・クロマトグラフィーで調べた²²⁾²³⁾。濾紙(東洋濾紙 No. 50, 40 × 40 cm)の一端(両縁より5 cm)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)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十分に乾燥させてから、濾紙を90度回転させ、メタノール・ギ酸・水(80:13:7, V/V)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)²⁴⁾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。

また、リン脂質画分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〕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〕を展開溶媒とする二次元ペーパー・クロマトグラフィーも行なった²⁵⁾。

さらに、リン脂質の各画分を0.1N塩酸で100℃、40分間処理し²⁶⁾、得られた水解産物を脱アシル化物と同様にペーパー・クロマトグラフィーで調べた。

2). 糖脂質

糖脂質をリン脂質と同様に0.1NKOH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²⁶⁾²⁷⁾。展開溶媒には(1)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〕²⁴⁾、(2)ブタノール・ピリジン・水(6:4:3, V/V)〔下降法, 13時間展開〕²⁸⁾、(3)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〕²⁹⁾および(4)酢酸エチル・ピリジン・酢酸・水(5:5:1:3, V/V)〔下降法, 12時間展開〕³⁰⁾の4種類を用いた。濾紙(東洋濾紙 No. 50, 20 × 40 cm)の一端から5 cmの所に糖脂質の脱アシル化物およびグルコース(標準物質)を線状(長さ:2 cm)にスポットし、それぞれの溶媒液を用いて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1 mlにアセトン200 ml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)³¹⁾で検出してスポットのRf値を求めた。

また、糖脂質の各画分を0.1N塩酸で100℃、40分間処理して得られた部分水解産物について、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行なった²⁶⁾²⁷⁾。さらに、糖脂質の各画分を3N塩酸で100℃、90分間処理し、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)または酢酸エチル・ピリジン・水(12:5:4, V/V)を展開溶媒として下降法により展開した²⁷⁾³²⁾。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0.91 mlとフタル酸1.66 gを水飽和ブタノール100 mlに溶解したもの)³³⁾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2 gとアニリン2 mlをアセトン100 mlに溶解したもの)³⁴⁾を用いた。

6. 連鎖球菌脂質の定量

連鎖球菌のリン脂質、糖脂質および中性脂質の各成分の量をAmentaの方法³⁵⁾によって測定した。

1). リン脂質および糖脂質

展開溶媒AおよびBを用いる二次元薄層クロマトグラフィーで連鎖球菌の総脂質を個々の成分に分離し、ヨード試薬でスポットの位置を確認したのち、クロマトプレートに100℃に30分間置いた。放冷後、クロマトプレートより脂質を含むシリカゲルをかきとって試験管に移し、重クロム酸試薬(2.5gの重クロム酸カリウムを1 lの36N硫酸に溶解したもの)2-3 mlを加えて100℃で45分間加熱した。放冷後、15分間遠心(2000-3000rpm)し、その上清0.5 mlに水20 mlを混和したのち、350nmで吸光度を測定し次式によって脂質量を算出した。また脂質を含まないシリカゲルをプレートよりかきとって同様の操作を行ない盲検とした。

$$\frac{\text{シリカゲル盲検値} - \text{被験物測定値}}{\text{シリカゲル盲検値} - \text{標準脂質測定値}} \times \mu\text{g 標準脂質} = \mu\text{g 被験脂質}$$

標準脂質にはホスファチジルコリン(50 mg/dl, Merck)を用いた。

2). 中性脂質

展開溶媒DおよびEを用いる二次元薄層クロマト

グラフィーで連鎖球菌の中性脂質を個々の成分に分離したのち、脂質を含むシリカゲルをかきとって、リン脂質または糖脂質の場合と同様に重クロム酸試薬を用いて比色法で脂質量を測定した。また、標準物質としてコレステロール (50 mg/dl, Merck) およびパルミチン酸 (50 mg/dl, PL - Biochemicals) を用いた。

7. 連鎖球菌脂質の構成々分の定量

1). リンの定量

Kingの方法³⁶⁾によって脂質のリン量を測定した。すなわち、連鎖球菌の総脂質 (1 - 2 mg) に60%過塩素酸を加えて直火で加熱し、黒い浮遊物が完全になくなるまで続けたのち、試料中のリンをFiske - Subbarow試薬 (1 - amino - 2 - naphthol - sulfonic acid 0.25g を、15%NaHSO₃ 100 mlにとかし、つづいて、Na₂SO₃ 0.5gを溶解したもの)³⁷⁾で発色させ、830nmで比色して脂質のリン量を求めた。標準物質として、リン標準液 (1 mg/ml, 第一化学) を用いた。

2). 糖の定量

アンスロン・硫酸法³⁸⁾で脂質の糖量を測定した。連鎖球菌の総脂質 (1 - 2 mg) にアンスロン試薬 (試薬の項に記載) を加えて100℃で15分間加熱したのち、生じた青緑の発色液を625nmで比色して脂質の糖量を求めた。標準物質としてグルコース (20 mg/dl, 和光) を用い、脂質の糖量をグルコース量で表わした。

8. ガスクロマトグラフィーによる脂質の構成脂肪酸の分析

一次元薄層クロマトグラフィーで分離された連鎖球菌のリン脂質、糖脂質または中性脂質の各成分脂質を硫酸メタノールでメチル化したのち、それぞれの脂質の脂肪酸構成をガスクロマトグラフィーで調べた³⁹⁾。

1). 脂肪酸のメチル化⁴⁰⁾

5 - 10 mgの脂質に5%硫酸メタノール 2 mlを加えて65 - 70℃の水浴中に15時間置いたのち、水 5 mlとヘキサン 2 mlを加えて混和し、二層に分離してからヘキサン層をとり、窒素ガスの下で減圧濃縮した。残渣を少量のクロロホルムで溶解し、シクロヘキサン・クロロホルム (1:1, V/V)⁴⁰⁾を展開溶媒とする一次元薄層クロマトグラフィーによって脂肪酸メチルエステルを分離したのち、クロマトプレートより脂肪酸メチルエステルを含むシリカゲルをかきとり、ヘキサンで脂質を抽出してガスクロマトグラフィーに用いた。

2). 装置および測定条件

ガスクロマトグラフは水素炎イオン化検出器付きの日立モデル 063 を使用した。カラムは長さ 200 cm、内径 3 mm のガラス管で、60 - 80 メッシュの

Chromosorb W (AW - DMCS) に NPGS を 20% にコーティングしたものを充填した。カラムの温度は 210℃で、試料気化室の温度は 230℃、検出器の温度は 280℃であった。キャリアガスとして用いた窒素ガスの流量は 20 ml / 分であり、ガスクロマトグラフの検出感度はレンジが 10、アッテネーションが 16 であった。

3). 脂肪酸の定性および定量

ガスクロマトグラムから連鎖球菌脂質の構成脂肪酸を同定するため、それぞれの脂肪酸メチルエステルの相対保持時間を、ガスクロ用の Analytical reference standard kits [Methyl ester kit ES - 9 (Even carbon, saturated), Methyl ester kit EU - 11 (Even carbon, unsaturated) および Methyl ester Kit OS - 8 (Odd carbon, saturated) - ガスクロ工業] を用いて比較した。

また、構成脂肪酸の含量は全ピーク面積の合計を 100 として百分率 (%) で表わした。すなわち、ピーク面積 (半値幅×ピーク高) をそれぞれの脂肪酸について求めたのち、全ピーク面積を算出して 100 とした⁴¹⁾。

9. 糖脂質の構成糖のガスクロマトグラフィーによる分析

連鎖球菌の糖脂質を塩酸メタノールで処理したのち、トリメチルシリル化合物に導いてガスクロマトグラフィーで調べた⁴²⁾。

1). 糖のトリメチルシリル (TMS) 化法⁴³⁾

5 - 10 mgの糖脂質を5%塩酸メタノール 1 mlと共に封管して100℃で5時間加熱したのち、Amberlite IR - 4B (メタノールで洗浄したもの) 1 mlを加えて塩酸を除き、溶媒を100℃で蒸発させた。残渣に1 mlのピリジン、0.2 mlのヘキサメチルジシラザンおよび0.1 mlのトリメチルクロロシランを加えて60 - 70℃に30分間置いたのち、等量のクロロホルムと水 (6 ml宛) を加えて混和し、二層に分離してから下層をとって減圧蒸留した。この残渣を少量のクロロホルムに溶解してガスクロマトグラフィーに用いた。

2). 装置および測定条件

日立モデル 063 ガスクロマトグラフ (水素炎イオン化検出器付き) を使用した。カラムの長さ 200 cm、内径 3 mm で 60 - 80 メッシュの Chromosorb W (AW - DMCS) に SE - 30 を 3% にコーティングしたものを充填した。

カラムの温度は 190℃で、試料気化室の温度は 300℃、検出器の温度は 320℃であった。キャリアガスとして用いた窒素ガスの流量は 30 ml / 分であり、ガスクロマトグラフの検出感度はレンジが 10、アッテネーシ

Table 1. Amounts of total lipids and contents of phosphorus or carbohydrates in total lipids of streptococci*.

Hemolytic streptococci	Yields of coccal cells from 10 l culture (g wet cells)	Amounts of total lipids and contents of phosphorus or carbohydrates in total lipids (mg/10 g wet cells)**		
		Total lipids	Phosphorus***	Carbohydrates****
Strain Su	30.5 ± 1.8	113.2 ± 9.5	0.86 ± 0.05	12.53 ± 0.73
Strain Blackmore	26.3 ± 1.0	88.3 ± 4.5	0.55 ± 0.00	12.50 ± 0.28
Strain C203U	25.4 ± 2.0	104.9 ± 7.7	0.83 ± 0.04	13.20 ± 0.14
A viridans strain	16.7 ± 1.8	43.7 ± 0.5	1.00 ± 0.05	2.39 ± 0.02

*Streptococci were grown in Wood and Gunsalus medium at 37°C for 12 hr, and the total lipids of coccal cells were extracted with chloroform-methanol (2:1, v/v) at room temperature.

**Each value represents mean ± S.E. of 4 experiments.

***Phosphorus contents of total lipids were determined by the method of King³⁶.

****Carbohydrates of total lipids were examined by the anthrone method³⁸, using glucose as a standard substance. Values are given as glucose contents.

オンが 32 であった。

3). 糖の定性

ガスクロマトグラムから連鎖球菌脂質の構成糖を同定するために、トリメチルシリル化糖の相対保持時間とガスクロマトグラム上のパターンについて標準物質〔TMS D - Galactose と TMS α - D - Glucose (ガスクロ工業)〕を用いて比較した。

成 績

1. 連鎖球菌のリン脂質と糖脂質

溶連菌の総脂質量は菌体 10g (湿重量) について 90 - 110 mg で, Su 菌, Blackmore 菌及び C203U 菌の間には著しい差異が認められなかった (表 1)。また, 溶連菌脂質の糖の含量もほぼ同じで菌体 10g について 13 mg であった。しかし, Su 菌および C203U 菌の脂質のリン含量が 0.85 mg 前後であったのに対し, Blackmore 菌のリン量は 0.55 mg で他の溶連菌よりも少なかった。他方, 緑色連鎖球菌の総脂質は 44 mg /10g と溶連菌の 1/2 であり, リン含量は 1 mg, 糖含量は 2.4 mg と溶連菌にくらべて, かなり異なっていた。以上の如くリン脂質あるいは糖脂質の含量は連鎖球菌によって異なっていた。ついで, 連鎖球菌のリン脂質および糖脂質の種類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によって調べて, 次の如き成績を得た。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・

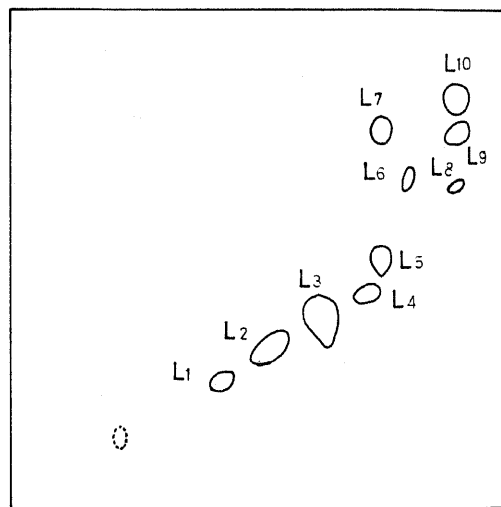


Fig. 1. A two-dimensional thin-layer chromatogram of total lipids from a hemolytic streptococcus, strain Su. The total lipids were developed in chloroform-methanol-water (solvent A; 65:25:4, by vol.) in the x-direction and then in diisobutylketone-acetic acid-water (solvent B; 80:50:10, by vol.) in the y-direction. Spots were detected with iodine, followed by staining with phosphomolybdate. Numbers refer to those in Table 2.

Table 2. 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	
L 1	0.27	0.17	+	+	+	+	-	-	-	Glycophospholipids
L 2	0.43	0.28	+	+	+	-	-	-	-	Phospholipids
L 3	0.56	0.34	+	+	-	+	-	-	-	Glycolipids
L 4	0.67	0.41	+	+	+	-	-	-	-	Phospholipids
L 5	0.73	0.48	+	+	-	+	-	-	-	Glycolipids
L 6	0.79	0.72	+	+	+	-	-	-	-	Phospholipids
L 7	0.62	0.87	+	+	-	-	-	-	-	Neutral lipids
L 8	0.87	0.80	+	+	-	+	-	-	+	Neutral lipids
L 9	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; Dittmer-Lester reagent (R3) for phospholipids; anthrone reagent (R4) for glycolipids and sterols; ninhydrin reagent (R5) for amino group; Dragendorff reagent (R6) for choline; antimony (R7) for sterols.

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 10 個のスポット (L₁ - L₁₀) に分離された (図 1). これらの 10 個のスポットの各種検出試薬に対する反応結果(表 2) から, 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 は糖とリンを含む脂質と同定された. また, Blackmore 菌および C203U 菌の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に類似しており, リン脂質や糖脂質の種類が同じであった. しかし, 緑色連鎖球菌の総脂質は上記展開溶媒によって 11 個のスポットに分離され, Su 菌の場合とは異なって, 上記の糖脂質以外にアンスロン試薬に陽性反応を呈するスポットが見いだされた (図 2 - GL₁).

二次元薄層クロマトグラフィーによって分離されたこれらのリン脂質または糖脂質の個々の脂質成分を同定するために, 各成分の脱アシル化物および水解産物について行なったペーパー・クロマトグラフィーの成績は表 3 に示す如くであった¹⁰⁾. すなわち, リン脂質 L₂, L₄ および L₆ はそれぞれの脱アシル化物および水解産物から, ホスファチジルグリセロール, ジホスフ

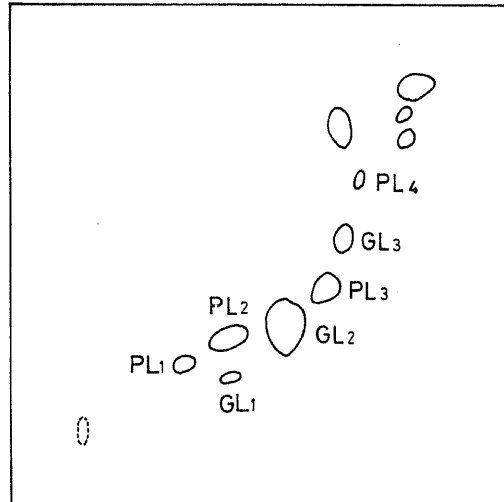


Fig. 2. A two-dimensional thin-layer chromatogram of total lipids from a hemolytic streptococcus, a viridans strain. The total lipids were developed with two different solvent systems as described in Fig. 1, and spots were detected with iodine and phosphomolybdate. PL, phospholipids; GL, glycolipids.

Table 3. Deacylated products and hydrolysates of phospholipids and glycolipids of streptococci

Spot number	Deacylated products and hydrolysates*	Identified as
L1	Diglucoyl glycerophosphoryl glycerol, glycerophosphoryl glycerol, glycerophosphate, glycerol and glucose	Diglucoyl phosphatidyl glycerols
L2	Glycerophosphoryl glycerol, glycerophosphate and glycerol	Phosphatidyl glycerols
L3	Diglucoyl glycerol, monoglucoyl glycerol, glycerol and glucose	Diglucoyl diglycerides
L4	1, 3 diglycerophosphoryl glycerol, glycerophosphoryl glycerol, glycerophosphate and glycerol	Diphosphatidyl glycerols
L5	Monoglucoyl glycerol, glycerol and glucose	Monoglucoyl diglycerides
L6	Glycerophosphate and glycerol	Phosphatidic acids

*Streptococcal phospholipids and glycolipids were deacylated with 0.1 N KOH or hydrolysed with 0.1 N HCl and 3 N HCl, and the deacylated products and hydrolysates were examined by paper chromatography one-dimensionally or two-dimensionally with various solvent systems. Carbohydrates of streptococcal glycolipids were also examined by gas-liquid chromatography after hydrolysis with methanolic HCl.

ァチジグリセロールおよびホスファチジン酸であると同定され、脂質 L₁ はジグルコシルホスファチジグリセロールであると同定された。また、糖脂質 L₃ と L₅ はそれぞれの脱アシル化物および水解産物から、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。さらに、緑色連鎖球菌にのみ見いだされた糖脂質は、その脱アシル化物および水解産物からトリグルコシルジグリセライドであると考えられた²⁷⁾⁴⁴⁾。なお、糖脂質の構成糖をガスクロマトグラフィーで調べた成績から、いずれの連鎖球菌の糖脂質もグルコースのみを含むことが明らかとなった(図3)。

連鎖球菌のリン脂質および糖脂質の種類が薄層クロマトグラフィーとペーパー・クロマトグラフィーによって同定されたので、個々の脂質の含量を Amenta の方法で調べた。成績は表4の如くであった。

Su 菌、C203U 菌および緑色連鎖球菌では菌体 10g のリン脂質量が 20 mg 以上であったのに対し、Blackmore 菌のリン脂質量は 14 mg で他の連鎖球菌よりも少なかった。また、溶連菌の糖脂質量は菌体 10g について 50 - 63 mg であったが、緑色連鎖球菌の糖脂質量は 10 mg に過ぎず、溶連菌の糖脂質量の 1/5 以下で

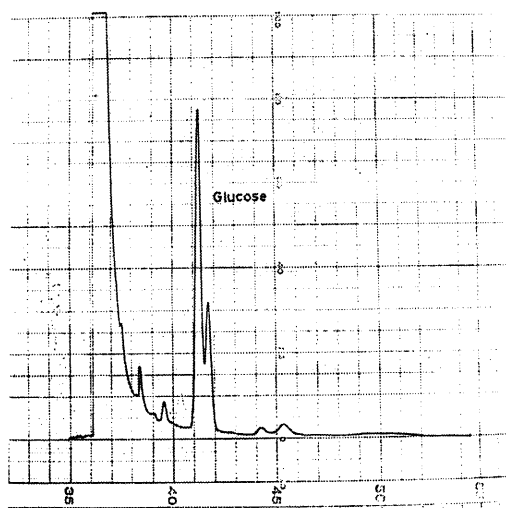


Fig. 3. A gas-liquid chromatogram of TMSi methyl glycosides from diglucoyl diglycerides of a hemolytic streptococcus, strain Su.

あった。すなわち、Su 菌と C203U 菌はリン脂質および糖脂質の含量が類似していたが、Blackmore 菌は他の溶連菌とリン脂質量が異なっており、緑色連鎖球菌

Table 4. Contents of phospholipids and glycolipids of hemolytic streptococci*

Lipid classes	Lipid contents of hemolytic streptococci (mg/10 g wet cells)**			
	Strain Su	Strain Blackmore	Strain C203U	A viridans strain
Total lipids	113.2 ± 9.5	88.3 ± 4.5	104.9 ± 7.7	43.7 ± 0.5
Phospholipids				
Phosphatidyl glycerols	5.2 ± 0.3	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Diphosphatidyl glycerols	13.8 ± 0.9	10.8 ± 0.1	16.9 ± 0.7	22.2 ± 0.9
Diglucoacyl phosphatidyl glycerols	2.4 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Glycolipids				
Monoglucoacyl diglycerides	28.0 ± 3.2	10.0 ± 0.8	5.6 ± 0.4	1.2 ± 0.1
Diglucoacyl diglycerides	35.1 ± 3.0	43.8 ± 2.1	48.7 ± 1.8	8.7 ± 0.3
Neutral lipids	28.6 ± 1.4	20.8 ± 1.2	35.5 ± 8.0	8.6 ± 2.6

*Contents of phospholipids and glycolipids of streptococci were determined by the method of Amenta³⁵⁾.

**Each value represents mean ± S.E. of 4 experiments.

***Contents of phosphatidic acids in 10 g of streptococcal cells were less than 1 mg.

の糖脂質量は溶連菌の糖脂質量と異なっていた。

他方、個々のリン脂質の各成分あるいは糖脂質の各成分も連鎖球菌ごとに異なっていた。Su 菌ではホスファチジルグリセロールとモノグルコシルジグリセライドの量が多く、他の連鎖球菌の両脂質の含量が菌体 10g に対し 1.2 - 2.0 mg と 10 mg 以下であったのにくらべ、Su 菌では 5.2 mg と 28.0 mg であった。また、緑色連鎖球菌ではモノグルコシルジグリセライドおよびジグルコシルジグリセライドの量が 1.2 mg / 10g および 8.7 mg / 10g と、溶連菌の糖脂質量の 1/4 以下であった。さらに、モノグルコシルジグリセライドの含量が溶連菌ごとに異なっており (28 mg / 10g, 10 mg / 10g および 6 mg / 10g)、リン脂質または糖脂質の組成が連鎖球菌の種類によって著しく異なっていた。また、表 4 の成績は Su 菌や Blackmore 菌ではジホスファチジルグリセロール、モノグルコシルジグリセライドおよびジグルコシルジグリセライドが主要な脂質成分であり、C203U 菌や緑色連鎖球菌ではジホスファチジルグリセロールとジグルコシルジグリセライドが主要な脂質であることを示している。

2. 連鎖球菌の中性脂質

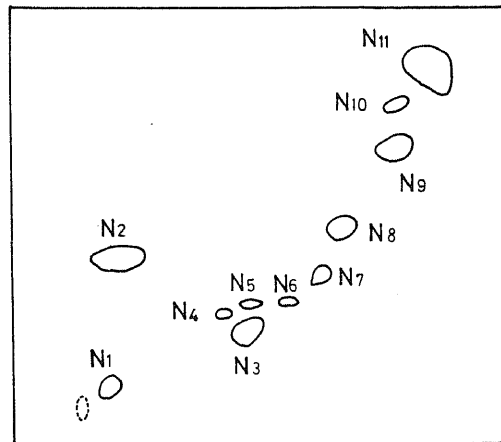


Fig. 4. A two-dimensional thin-layer chromatogram of neutral lipids from a hemolytic streptococcus, strain Su. The neutral lipids were developed in ethylene chloride-methanol (solvent D; 98:2, by vol.) in the x-direction and then in hexane-ethyl ether-acetic acid (solvent E; 70:30:2, by vol.) in the y-direction. Spots were detected with iodine and phosphomolybdate. Numbers refer to those in Table 5.

Table 5. Chromatographic characteristics of neutral lipids of a hemolytic streptococcus, Su*

Spot number	Average Rf values in		Color reaction by spray reagents**					Possible identification***
	Solvent D	Solvent E	R1	R2	R3	R4	R5	
N 1	0.07	0.07	+	+	-	-	-	Monoglycerides
N 2	0.10	0.40	+	+	-	-	-	Free fatty acids
N 3	0.39	0.24	+	+	-	-	-	
N 4	0.34	0.27	+	+	-	+	+	Sterols
N 5	0.41	0.30	+	+	-	-	-	1, 3 diglycerides
N 6	0.52	0.29	+	+	-	-	-	1, 2 diglycerides
N 7	0.53	0.41	+	+	-	-	-	
N 8	0.71	0.54	+	+	-	-	-	Fatty acid methyl esters
N 9	0.86	0.70	+	+	-	-	-	Triglycerides
N10	0.88	0.84	+	+	-	+	+	Sterol esters
N11	0.93	0.94	+	+	-	-	-	Hydrocarbons

*Total lipids of a hemolytic streptococcus, Su, were chromatographed two-dimensionally on a silica gel H plate with ethylene chloride-methanol (solvent D, 98:2, by vol.) and n-hexane-diethyl ether-acetic acid (solvent E, 70:30:2, by vol.) and the spots were detected with various spray reagents.

**Spray reagents: iodine (R1) and phosphomolybdate (R2) for lipids; Dittmer-Lester reagent (R3) for phospholipids; anthrone reagent (R4) for glycolipids and sterols; antimony (R5) for sterols.

***Rf values of streptococcal lipids were compared with Rf values of standard substances.

Table 6. Contents of neutral lipids of hemolytic streptococci*

Lipid fractions	Lipid contents of hemolytic streptococci (mg/10 g wet cells)**			
	Strain Su	Strain Blackmore	Strain C203U	A viridans strain
Total lipids	113.2 ± 9.5	88.3 ± 4.5	104.9 ± 7.7	43.7 ± 0.5
Neutral lipids				
Monoglycerides	2.7 ± 0.2	1.3 ± 0.0	2.2 ± 0.0	0.8 ± 0.1
Diglycerides	14.4 ± 0.6	10.1 ± 0.4	13.5 ± 1.1	4.2 ± 0.6
Triglycerides	2.2 ± 0.2	2.9 ± 0.2	6.8 ± 0.2	0.9 ± 0.3
Free fatty acids	3.6 ± 0.1	3.8 ± 0.3	6.4 ± 0.7	1.5 ± 2.6
Other components	5.7 ± 0.3	2.7 ± 0.3	6.6 ± 0.5	1.4 ± 0.7

*Contents of neutral lipids of streptococci were examined by the method of Amenta.

**Each value represents mean ± S.E. of 4 experiments.

塩化エチレン・メタノール(98:2,V/V)およびヘキサン・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フィーによって連鎖球菌の中性脂質は11個のスポット(N₁ - N₁₁)に分離された(図4)。これらのスポットのうち、N₄とN₁₀はアンスロン試薬およびアンチモン試薬に対して陽性反応を示し、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パルミテートのRf値と同じであった(表5)。また、スポットN₁,N₂,N₅,N₆,N₈およびN₉はそれぞれのRf値と標準物質のRf値との比較によって、モノグリセリド、遊離脂肪酸、1,3ジグリセリド、1,2ジグリセリド、脂肪酸のメチルエステルおよびトリグリセリドと同定された。表6は連鎖球菌の主な中性脂質の含量を示したもので、溶連菌の中性脂質は菌体10gに対し21 - 36mgであったが、緑色連鎖球菌の中性脂質は9mgにすぎず、溶連菌の中性脂質の1/2以下であった。他方、個々の中性脂質も連鎖球菌ごとに異なっており、モノグリセリドの含量は、C203U菌およびSu菌では2.2mg/10gと2.7mg/10gであった

が、他の連鎖球菌では1.3mg/10g以下であった。また、ジグリセリドの含量は、溶連菌では10 - 14mg/10gであったが、緑色連鎖球菌では4mg/10gに過ぎなかった。さらに、トリグリセリドおよび遊離脂肪酸の含量は、C203U菌では他の連鎖球菌にくらべて多く、それぞれ6mg/10g以上含まれていたが、Su菌およびBlackmore菌の遊離脂肪酸の含量は3.6mg/10gと3.8mg/10gであった。以上の如く中性脂質の組成が連鎖球菌の種類によって異なる成績を得たが、連鎖球菌の主要な中性脂質はジグリセリドおよび遊離脂肪酸であった。

3. 連鎖球菌脂質の脂肪酸構成

リン脂質、糖脂質および中性脂質の脂肪酸構成についての実験成績は次の如くであった(表7)。すなわち、Su菌のジホスファチジルグリセロールおよび糖脂質(モノグルコシルジグリセライドとジグルコシルジグリセライド)ではC_{18:0}の飽和脂肪酸が最も多く構成脂肪酸の60%以上を占めており、次に多いのはC_{18:0}の飽和脂肪酸で、両飽和脂肪酸が構成脂肪酸の90%に達し

Table 7. Fatty acid composition of phospholipids and glycolipids of streptococci*

Hemolytic streptococci	Lipid classes**	Fatty acid composition of lipids (%)***									
		C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2
Strain Su	PG	-	1.5	7.5	-	48.5	12.6	-	8.4	21.0	-
	DPG	-	tr.	8.2	-	76.7	-	-	15.1	-	-
	MGD	tr.	tr.	3.4	-	62.1	2.7	tr.	23.2	8.2	-
	DGD	tr.	tr.	1.0	-	66.7	1.4	1.0	23.2	6.8	-
Strain Blackmore	PG	-	-	tr.	-	85.3	-	-	14.7	-	-
	DPG	-	tr.	8.3	-	69.3	9.6	-	5.6	7.1	-
	MGD	-	tr.	2.0	tr.	59.1	11.8	tr.	6.3	20.8	tr.
	DGD	-	2.1	3.3	-	29.4	-	1.4	7.4	56.5	tr.
Strain C203U	PG	-	tr.	2.8	-	42.7	4.5	tr.	31.5	15.2	3.4
	DPG	-	tr.	2.3	-	35.2	14.0	-	9.3	39.2	-
	MGD	-	tr.	tr.	-	28.0	8.2	-	13.1	50.7	tr.
	DGD	tr.	tr.	tr.	-	19.9	13.3	-	5.4	59.8	1.8
A viridans strain	PG	-	tr.	12.9	tr.	41.6	7.3	-	2.6	35.6	-
	DPG	16.5	tr.	10.6	tr.	45.3	5.3	-	5.7	16.5	-
	MGD	tr.	1.6	8.3	1.3	26.5	10.0	-	1.5	50.3	-
	DGD	tr.	tr.	5.2	tr.	43.3	10.4	-	3.5	37.8	-

*Phospholipids and glycolipids of streptococci were treated with methanolic H₂SO₄ for 15 hr at 65-70°C. After treatment, fatty acid methyl esters were separated from other substances by thin-layer chromatography using cyclohexane-chloroform (1:1, by vol.), and used for gas-liquid chromatography.

**PG, phosphatidyl glycerols; DPG, diphosphatidyl glycerols; MGD, monoglucosyl diglycerides; DGD, diglucosyl diglycerides.

***tr.: trace amounts (less than 1%).

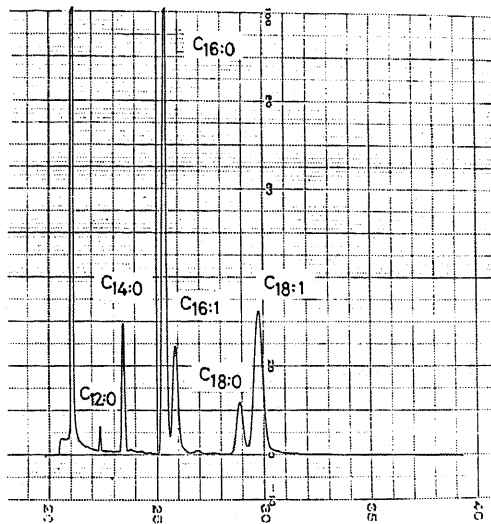


Fig. 5. A gas-liquid chromatogram of fatty acid methyl esters from phosphatidyl glycerols of a hemolytic streptococcus, strain Su.

ていた。しかし、Su菌のホスファチジルグリセロールではC_{16:0}の飽和脂肪酸以外にC_{16:1}とC_{18:1}の不飽和脂肪酸が多く、両不飽和脂肪酸が構成脂肪酸の34%に達していた(図5)。Blackmore菌でも、C_{16:0}の飽和脂肪酸がリン脂質およびモノグルコシルジグリセライドの構成脂肪酸の60%以上を占めていたが、ジグルコシルジグリセライドではC_{18:1}の不飽和脂肪酸が著しく多く構成脂肪酸の57%に達しており、C_{16:0}の飽和脂肪酸はC_{18:1}の不飽和脂肪酸の半分にすぎなかった。なお、モノグルコシルジグリセライドには、C_{16:1}、C_{18:1}などの不飽和脂肪酸が比較的多く含まれていた。しかしながら、C203U菌のリン脂質および糖脂質の脂肪酸構成はSu菌やBlackmore菌の脂肪酸構成とはかなり異なり、C203U菌の糖脂質ではC_{18:1}の不飽和脂肪酸が多く、構成脂肪酸の50%以上を占め、ついでC_{16:0}の飽和脂肪酸が多く両脂肪酸が構成脂肪酸の80%に達していた。また、C203U菌のホスファチジルグリセロールではC_{16:0}とC_{18:0}の飽和脂肪酸が多く(42%と32%)、ジホスファチジルグリセロールではC_{18:1}の不飽和脂肪酸が39%、C_{16:0}の飽和脂肪酸が35%であった。

他方、緑色連鎖球菌ではそれぞれの脂質ごとに脂肪酸構成が異なっていた。ホスファチジルグリセロールではC_{16:0}の飽和脂肪酸とC_{18:1}の不飽和脂肪酸が多く、それぞれ構成脂肪酸の42%と36%を占めており、C_{14:0}の飽和脂肪酸も13%と比較的多く含まれていた。糖脂

質にはC_{16:0}の飽和脂肪酸およびC_{16:1}とC_{18:1}の不飽和脂肪酸が多く、モノグルコシルジグリセライドではそれぞれ構成脂肪酸の27%、10%および50%を占めており、ジグルコシルジグリセライドでは構成脂肪酸の43%、10%および38%を占めていた。しかし緑色連鎖球菌のジホスファチジルグリセロールには、C_{10:0}の飽和脂肪酸が多く含まれていた。すなわち、ジホスファチジルグリセロールの主要な構成脂肪酸はC_{10:0}(17%)、C_{14:0}(10%)、C_{16:0}(45%)およびC_{18:1}(17%)であった。表8はリン脂質および糖脂質の脂肪酸構成を飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸にわけて比較表示したもので、Su菌のジホスファチジルグリセロールおよび糖脂質では飽和脂肪酸が不飽和脂肪酸よりも多く8倍以上であった。C203U菌のリン脂質や糖脂質では不飽和脂肪酸が飽和脂肪酸よりも多い傾向にあり、ジグルコシルジグリセライドに結合した不飽和脂肪酸の量は飽和脂肪酸の3倍以上になっていた。Blackmore菌や緑色連鎖球菌のジホスファチジルグリセロールでは、飽和脂肪酸が不飽和脂肪酸よりも3-5倍多かったが、糖脂質では両脂肪酸の量に著しい差異が認められなかった⁴⁵⁾⁻⁴⁷⁾。

表9は中性脂質の脂肪酸構成の成績を示したもので、Su菌の遊離脂肪酸、モノグリセリドおよびトリグリセリドではC_{16:0}の飽和脂肪酸が最も多く、構成脂肪酸の40%を占めており、次に多いのはC_{18:0}の飽和脂肪酸で両飽和脂肪酸が構成脂肪酸の70%に達していた。また、1,2ジグリセリドではC_{18:1}の不飽和脂肪酸が最も多く構成脂肪酸の43%を占めており、C_{18:1}の不飽和脂肪酸を合すると構成脂肪酸の52%が不飽和脂肪酸であった。しかし、1,3ジグリセリドではC_{10:0}の飽和脂肪酸が最も多く構成脂肪酸の72%を占め、1,2ジグリセリドの脂肪酸量と著しく異なっていた。Blackmore菌のトリグリセリドとステロールエステルでは、C_{16:0}の飽和脂肪酸が最も多く構成脂肪酸の50%を占め、C_{18:0}の飽和脂肪酸を合すると、両飽和脂肪酸で構成脂肪酸の60%に達していた。また、遊離脂肪酸、1,2ジグリセリドおよび1,3ジグリセリドにはC_{16:1}とC_{18:1}の不飽和脂肪酸が多く含まれ、両不飽和脂肪酸で構成脂肪酸の30%以上に達していた。Su菌の1,2ジグリセリドと1,3ジグリセリドでは構成脂肪酸量が異なっていたが、Blackmore菌ではC_{18:1}の不飽和脂肪酸が両脂質とも、C_{18:0}の飽和脂肪酸量の3倍含まれており構成脂肪酸量は類似していた。C203U菌の遊離脂肪酸、モノグリセリドおよび1,3ジグリセリドではC_{18:0}の飽和脂肪酸が最も多く、次に多いのがC_{16:0}の飽和脂肪酸で両飽和脂肪酸が構成脂肪酸の80%を占めていた。また、

トリグリセリドとステロールエステルではSu菌やBlackmore菌と同様にC_{16:0}の飽和脂肪酸が最も多く、C_{18:0}の飽和脂肪酸を合せると両飽和脂肪酸が構成脂肪酸の86%に達していた。また、1,2ジグリセリドではC_{18:1}の不飽和脂肪酸を多く含んでいたが(C_{18:0}の3倍量)、遊離脂肪酸では他の溶連菌にくらべて不飽和脂肪酸が著しく少なく1/5以下であった。他方、緑色連鎖球菌の遊離脂肪酸ではC_{16:0}の飽和脂肪酸が最も多く、C_{18:0}の飽和脂肪酸を合せると両飽和脂肪酸で構成脂肪酸の89%に達しており、不飽和脂肪酸量はSu菌やBlackmore菌にくらべて少なかった。また、1,2ジグリセリドとモノグリセリドではC_{18:1}の不飽和脂肪酸が多く含まれ構成脂肪酸の20%を越えていた。特に1,2ジグリセリドではC_{18:1}の不飽和脂肪酸がC_{18:0}の飽和脂肪酸の10倍に達していた。以上のことから、不飽

和脂肪酸(C_{14:1}, C_{16:1}, C_{18:1}およびC_{18:2})が最も多く含まれるのはBlackmore菌の中性脂質(含有量:33%)で最も少なかったのは、C203U菌の中性脂質(含有量:14%)であった。

考 察

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菌、Blackmore菌およびC203U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ることが明らかにされ、リン脂質はホスファチジン酸、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、糖脂質はモノグルコシルジグリセライドとジグルコシルジグリセライドであると同定された²⁷⁾⁴⁾⁴⁸⁻⁵¹⁾。しかし、緑

Table 8. Saturated and unsaturated fatty acids in phospholipids and glycolipids of hemolytic streptococci

Hemolytic streptococci	Lipid components*	Relative amounts of lipids**		Unsaturated acids / Saturated acids
		Saturated fatty acids	Unsaturated fatty acids	
Strain Su	PG	3.4	1.8	0.11
	DPG	13.8	0.0	
	MGD	24.8	3.1	
	DGD	32.2	2.9	
	(total)	74.3	7.8	
Strain Blackmore	PG	1.7	0.0	0.82
	DPG	9.0	1.8	
	MGD	6.7	3.3	
	DGD	19.1	24.7	
	(total)	36.5	29.8	
Strain C203U	PG	1.5	0.5	2.05
	DPG	7.9	9.0	
	MGD	2.3	3.3	
	DGD	12.3	36.5	
	(total)	24.0	49.3	
A viridans strain	PG	0.7	0.5	0.49
	DPG	12.5	3.5	
	MGD	0.5	0.7	
	DGD	4.5	4.2	
	(total)	18.2	8.9	

*PG, phosphatidyl glycerols; DPG, diphosphatidyl glycerols; MGD, monoglucosyl diglycerides; DGD, diglucosyl diglycerides.

**Relative amounts of saturated or unsaturated fatty acids were calculated as follows:

Relative amounts of lipids=

$$\frac{\text{Contents of lipid components (mg)} \times \text{fatty acid composition (\%)}}{100}$$

色連鎖球菌の総脂質には上記の糖脂質以外にトリグルコシルジグリセライドが含まれていた²⁷⁾³²⁾³⁴⁾。また、溶連菌の総脂質には、モノグリセリド、ジグリセリド、遊離脂肪酸、脂肪酸のメチルエステル、ステロールなどの中性脂質が含まれており、緑色連鎖球菌の中性脂質と類似していた。

実験に用いられた3種類の溶連菌の脂質の構成は、リン脂質、糖脂質および中性脂質とも共通しており、緑色連鎖球菌においても同様であったが、これら各脂質の構成成分の含量は表10にみられる如くそれぞれ異なっていた。しかし、一般に溶連菌では、糖脂質のジグルコシルジグリセライドが多く、緑色連鎖球菌では、リン脂質のジホスファチジルグリセロールが多か

ったが、糖脂質は溶連菌にくらべて少なかった。

またリン脂質、糖脂質および中性脂質の構成脂肪酸のガスクロマトグラフィーによる分析実験から、Su菌のリン脂質や糖脂質には飽和脂肪酸が多いこと、C203U菌のリン脂質および糖脂質には不飽和脂肪酸が多いこと、さらにBlackmore菌の脂質の構成脂肪酸はSu菌やC203U菌と異なることなどの成績が得られた。

一方、A群溶連菌に属するSu菌、Blackmore菌およびC203U菌はストレプトリジン産生能が異なることが報告されている³⁾。すなわち、Su菌はストレプトリジンSおよびOを産生するが、Blackmore菌はストレプトリジンSのみを産生し、C203U菌はスト

Table 9. Fatty acid composition of neutral lipids of streptococci*

Hemolytic streptococci	Lipid classes**	Fatty acid composition of neutral lipids (%)***									
		C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2
Strain Su	FA	tr.	2.6	7.0	-	51.0	4.8	2.6	21.3	10.5	tr.
	MG	tr.	-	1.6	-	44.7	tr.	-	44.7	8.0	-
	1, 2-DG	8.8	1.4	2.3	tr.	25.7	9.0	-	9.3	42.5	-
	1, 3-DG	71.9	tr.	tr.	-	14.4	tr.	-	5.6	6.3	-
	TG	tr.	-	6.3	-	44.3	-	-	34.2	14.9	-
	SE	-	-	7.3	-	31.7	4.3	-	30.6	21.9	3.0
Strain Blackmore	FA	tr.	tr.	4.5	-	41.5	12.6	tr.	16.9	18.9	3.2
	MG	tr.	tr.	3.0	-	28.7	6.4	tr.	31.5	20.9	5.5
	1, 2-DG	tr.	2.4	7.3	-	44.2	16.1	tr.	6.4	22.9	tr.
	1, 3-DG	tr.	tr.	3.8	-	37.5	13.3	-	11.7	32.5	1.0
	TG	tr.	1.2	9.5	-	52.5	10.9	1.4	10.4	10.8	tr.
	SE	tr.	tr.	7.5	1.3	58.5	6.8	tr.	16.6	6.3	-
Strain C203U	FA	tr.	tr.	3.0	-	40.8	tr.	1.7	51.0	3.0	tr.
	MG	tr.	tr.	3.2	-	39.2	tr.	-	46.3	10.7	-
	1, 2-DG	tr.	tr.	3.2	-	30.5	8.0	tr.	16.4	40.0	1.1
	1, 3-DG	tr.	tr.	2.7	-	34.7	2.3	tr.	41.8	15.6	1.6
	TG	tr.	tr.	6.7	-	45.5	tr.	1.3	44.4	tr.	tr.
	SE	tr.	tr.	13.4	-	54.3	tr.	-	31.8	tr.	-
A viridans strain	FA	tr.	tr.	-	tr.	76.7	4.8	-	12.4	5.5	-
	MG	tr.	tr.	4.3	1.4	33.1	4.3	-	29.3	20.6	6.2
	1, 2-DG	-	tr.	23.1	tr.	41.2	6.3	-	2.2	22.0	-
	1, 3-DG	-	tr.	10.2	tr.	66.9	3.8	-	9.3	7.6	-
	TG	-	tr.	12.5	2.1	55.1	10.0	-	15.4	4.1	-
	SE	tr.	2.7	12.8	1.2	47.6	7.7	-	21.4	6.0	tr.

*Neutral lipids of streptococci were treated with methanolic H₂SO₄ for 15 hr at 65-70°C. After treatment, fatty acid methyl esters were separated from other components by thin-layer chromatography using petroleum ether-ethyl ether-acetic acid (90:10:1, by vol.), and used for gas-liquid chromatography.

**FA, free fatty acids; MG, monoglycerides; 1, 2-DG, 1, 2-diglycerides; 1, 3-DG, 1, 3-diglycerides; TG, triglycerides, SE, sterol esters.

***tr.: trace amounts (less than 1%).

プトリジン O のみを産生する。また、Su 菌と Blackmore 菌は抗腫瘍作用を示すが、C203U 菌は抗腫瘍作用を示さない。他方、緑色連鎖球菌はストレプトリジン S および O を産生せず、抗腫瘍作用を示さないなど¹²⁾、これら 4 種類の連鎖球菌はそれぞれ生物学的性状が異なっている。

本研究では 4 種類の連鎖球菌、すなわち、溶連菌 Su、溶連菌 Blackmore、溶連菌 C203U および緑色連鎖球菌の間にはリン脂質、糖脂質または中性脂質の組成あるいは脂肪酸構成に違いがあることを実証したのであるが、これらはそれぞれの連鎖球菌の生物学的性状の違いに関係があるものと考えられ、さらによくわしい研究が必要である^{4)~7)}。

結 論

3 種類の A 群溶連菌 (Su 菌、Blackmore 菌および C203U 菌) ならびに緑色連鎖球菌のリン脂質、糖脂質および中性脂質の組成と脂質の脂肪酸構成を調べて以下の成績を得た。

1. Su 菌および Blackmore 菌の主要な脂質成分

は、ジグルコシルジグリセライド、モノグルコシルジグリセライドおよびジホスファチジルグリセロールであった。しかし、糖脂質の構成成分は Su 菌と Blackmore 菌とでは著しく異なっていた。

2. C203U 菌ではジグルコシルジグリセライドとジホスファチジルグリセロールが主要な成分であった。

3. 緑色連鎖球菌にはジホスファチジルグリセロールが著しく多く含まれており、糖脂質の含量はリン脂質量に比較して少なかった。

4. Su 菌のリン脂質や糖脂質の構成脂肪酸には飽和脂肪酸が多かったが、C203U 菌の脂質の構成脂肪酸には不飽和脂肪酸が多かった。また、4 種類の連鎖球菌のリン脂質、糖脂質および中性脂質の脂肪酸構成はそれぞれの菌によって著しく異なっていた。

稿を終るにのぞみ、御指導御校閲を賜った正印達教授ならびに本研究に対し直接の御指導を賜りました木越茂助教授に深く感謝の意を表します。

Table 10. Lipid composition of hemolytic streptococci

Lipid components	Lipid composition of hemolytic streptococci (%)			
	Strain Su	Strain Blackmore	Strain C203U	A viridans strain
Total lipids	100.0	100.0	100.0	100.0
Phospholipids				
Phosphatidyl glycerols	4.6	1.9	1.9	2.8
Diphosphatidyl glycerols	12.2	12.3	16.1	50.9
Diglucoyl phosphatidyl glycerols	2.1	1.4	1.6	3.8
Glycolipids				
Monoglucoyl diglycerides	24.7	11.3	5.3	2.7
Diglucoyl diglycerides	31.0	49.6	46.5	20.0
Neutral lipids				
Monoglycerides	2.3	1.5	2.0	1.8
Diglycerides	12.7	11.4	12.9	9.5
Triglycerides	1.9	3.3	6.5	1.9
Free fatty acids	3.2	4.3	6.1	3.3

文 献

- 1) **Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.** : Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. *Jpn. J. Microbiol.*, **11**, 323 - 336 (1967).
- 2) **Okamoto, H.** : Antitumor activity of streptolysin S-forming streptococci, p 238 - 258. *In* A. W. Bernheimer (ed.), Mechanisms in bacterial toxinology, 1st ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 1976.
- 3) 越村三郎, 西田信義, 坂東勲, 正印達, 南幹雄, 角野光司 : 制癌に関する実験的研究. 第26報 Streptolysin Oのみの産生能を有する溶連菌の無効性について. 金大結研年報, **23**, 61 - 66 (1965).
- 4) **Kates, M.** : Bacterial lipids. *Adv. Lipid Res.*, **2**, 17 - 90 (1964).
- 5) **Ikawa, M.** : Bacterial phospholipids and natural relationship. *Bacteriol. Rev.*, **31**, 54 - 64 (1967).
- 6) **Dunnick, J. K. & O'Leary, W. M.** : Correlation of bacterial lipid composition with antibiotic resistance. *J. Bacteriol.*, **101**, 892 - 900 (1970).
- 7) **Shaw, N.** : Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, **17**, 63 - 100 (1974).
- 8) **Wood, A. J. & Gunsalus, I. C.** : The production of active resting cells of streptococci. *J. Bacteriol.*, **44**, 333 - 341 (1942).
- 9) **Folch, J., Lees, M. & Sloan Stanley, G. H.** : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 - 509 (1957).
- 10) 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 - 74頁. 東京, 南山堂, 1968.
- 11) **Wagner, H., Horhammer, C. & Wolf, P.** : Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. *Biochem. Z.*, **334**, 175 - 184 (1961).
- 12) **Marinetti, G. V., Erbrand, J. & Kochen, J.** : Quantitative chromatography of phosphatides. *Federation Proc.*, **16**, 837 - 844 (1957).
- 13) **Neskovic, N., Sarlieve, L., Nussbaum, J. L., Kostic, D. & Mandel, P.** : Quantitative thin-layer chromatography of glycolipids in animal tissues. *Clin. Chim. Acta*, **38**, 147 - 153 (1972).
- 14) **Jatzkewitz, H. & Mehl, E.** : Zur Dünnschicht - chromatographie der Gehirn - Lipoide, ihrer Um - und Abbauprodukte. *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **320**, 251 - 257 (1960).
- 15) **Colp, T. W., Tucker, P. W., Raltiff, C. R. & Hall, F. F.** : Chromatographic analysis of ocular lipids. 1. Bovine and human iris tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, **218**, 259 - 268 (1970).
- 16) 野田万次郎 : 脂質1(舟橋・原・山川編), 第1版, 503 - 553頁, 東京, 共立出版, 1970.
- 17) **Dittmer, J. C. & Lester, R. L.** : A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.*, **5**, 126 - 127 (1964).
- 18) **Roe, J. H.** : The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **212**, 335 - 343 (1955).
- 19) 木越茂・北島耕作・林義則・西一也 : A群溶連菌のリン脂質および糖脂質について. 十全医会誌, **87**, 664 - 673 (1978).
- 20) **Kigoshi, S.** : Chromatographic characterization of antitumor lipids from a group A *Streptococcus*. *Experientia*, **29**, 375 - 377 (1973).
- 21) **Benson, A. A. & Maruo, B.** : Plant phospholipids. 1. Identification of the phosphatidyl glycerols. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 189 - 195 (1958).
- 22) **Dawson, R. M. C.** : A hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological samples. *Biochem. J.*, **75**, 45 - 53 (1960).
- 23) **Dawson, R. M. C., Hemington, N. & Davenport, J. B.** : Improvements in the method of determining individual phospholipids in a complex mixture by successive chemical hydrolysis. *Biochem. J.*, **84**, 497 - 501 (1962).
- 24) **Hanes, C. S. & Isherwood, F. A.** : Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature*, **164**, 1107 - 1112 (1949).
- 25) **Benson, A. A. & Strickland, E. H.** : Plant phospholipids. III. Identification of diphosphatidyl glycerol. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 328 - 333 (1960).

- 26) Brundish, D. E., Shaw, N. & Baddiley, J. : The occurrence of glycolipids in gram - positive bacteria. *Biochem. J.*, **95**, 21c-22c (1965).
- 27) Ishizuka, I. & Yamakawa, T. : Glycosyl diglycerides from *Streptococcus hemolyticus* strain D 58. *J. Biochem.*, **64**, 13-23 (1968).
- 28) Jeans, A., Wise, C. S. & Dimler, R. J. : Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates. *Analyt. Chem.*, **23**, 415-420 (1951).
- 29) Benson, A. A., Bassham, J. A., Calvin, M., Goodale, T. C., Hass, V. & Stepka, W. : The path of carbon in photosynthesis. V. Paper chromatography and radioautography of the products. *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 1710-1718 (1950).
- 30) Fischer, F. G. & Nebel, H. J. : Nachweis und Bestimmung von Glucosamin und Galactosamin auf Papierchromatogrammen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **302**, 10-19 (1955).
- 31) Trevelyan, W. E., Procter, D. P. & Harrison, J. S. : Detection of Sugars on paper chromatogram. *Nature*, **166**, 444-445 (1950).
- 32) Fischer, W. & Seyferth, W. : 1-(O- α -D-Glukopyranosyl - (1-2) - α -D-glukopyranosyl) - glycerin aus den Glykolipiden von *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus lactis*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **349**, 1662-1672 (1968).
- 33) Partige, S. M. : Aniline hydrogen phthalate as a spray reagent for chromatography of sugars. *Nature*, **164**, 443 (1949).
- 34) Bailey, R. W. & Bourne, E. J. : Colour reactions given by sugars and diphenylamine - aniline spray reagents on paper chromatograms. *J. Chromatogr.*, **4**, 206-213 (1960).
- 35) Amenta, J. S. : A rapid chemical method for quantitation of lipids separated by thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.*, **5**, 270-272 (1964).
- 36) King, E. J. : The colorimetric determination of phosphorus. *Biochem. J.*, **16**, 292-297 (1932).
- 37) Fiske, C. H. & Subbarow, Y. : The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400 (1925).
- 38) 牧田章: 生物化学実験法 VII - 脂質実験法 - (別冊, 蛋白質核酸酵素) 108-109頁, 東京, 共立出版, 1967.
- 39) 舟阪渡・池川信夫: 最新ガスクロマトグラフィー = 基礎と応用 = II・応用編, 647-667頁, 東京, 広川書店, 1970.
- 40) Christophe, A. & Matthijs, F. : New method for the determination of the fatty acid pattern of serum lipid classes. *Clin. Chim. Acta*, **16**, 39-43 (1967).
- 41) 舟阪渡・池川信夫: 最新ガスクロマトグラフィー = 基礎と応用 = I・基礎編, 307-314頁, 東京, 広川書店, 1970.
- 42) 舟阪渡・池川信夫: 最新ガスクロマトグラフィー = 基礎と応用 = II・応用編, 682-696頁, 東京, 広川書店, 1970.
- 43) 安藤鋭郎・寺山宏・西沢一俊・山川民夫編: 生化学研究法 I - 脂質・糖質 -, 228-232頁, 東京, 朝倉書店, 1968.
- 44) Brundish, D. E., Shaw, N. & Baddiley, J. : The structure and possible function of the glycolipids from *Streptococcus lactis* 13. *Biochem. J.*, **105**, 885-889 (1967).
- 45) Montgomeri, J. Z., Kalmanson, G. M. & Guze, L. B. : Fatty acid composition of L-form of *Streptococcus faecalis* cultured at different osmolarities. *J. Bacteriol.*, **115**, 73-75 (1973).
- 46) Lambert, M. A. & Moss, C. W. : Cellular fatty acid composition of *Streptococcus mutans* and related streptococci. *J. Dent. Res.*, **55**, A96-102 (1976).
- 47) Fischer, W. : The polar lipids of group B *Streptococci*. II. Composition and positional distribution of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 89-104 (1977).
- 48) Cohen, M. & Panos, C. : Membrane lipid composition of *Streptococcus pyogenes* and derived L form. *Biochemistry*, **5**, 2385-2392 (1966).
- 49) Santos Mota, J. M., Kamp, J. A. F., Verheij, H. M. & Deenen, L. L. : Phospholipids of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*, **104**, 611-619 (1970).
- 50) Montgomeri, J. Z., Kaplan, D., Schotz, M. & Guze, L. B. : Effect of serum on phospholipids of *Streptococcus faecalis*. *Infect. Immunity*, **14**,

951-954 (1976).

51) Fischer, W. : The polar lipids of group B *Streptococci*. I. Glucosylated diphosphatidyl

glycerol, a normal glycopospholipid. *Biochim. Biophys. Acta*, 487, 74-88 (1977).

Studies on the Lipids of Group A Hemolytic Streptococci. (I) Lipid Composition of Hemolytic Streptococci Kousaku Kitajima, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. J. Med. Soc.*, **90**, 196–213 (1981).

Key words: Hemolytic streptococci, lipid composition, fatty acid pattern, phospholipids, glycolipids

Abstract

Lipid composition of four hemolytic streptococci (strain Su, strain Blackmore, strain C203U and a viridans strain) was examined by thin-layer, paper and gas-liquid chromatography.

Streptococcal cells were cultured in 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 from 10 g of wet cells: about 45 mg for a viridans strain and 100 mg for other strains).

By two-dimensional thin-layer chromatography, the total lipids of three strains of hemolytic streptococci (Su, Blackmore and C203U) were separated into 10 components, 4 of which were phospholipids and 2 components were glycolipids. However, 3 glycolipids were found in the total lipids from the cells of a viridans strain. On the other hand, free fatty acids, glycerides and sterols were found in the total lipids of the streptococci examined. According to the paper chromatography of water-soluble deacylated products and hydrolysates of each component, the phospholipids of three streptococci (strain Su, Blackmore and C203U) were identified as diphosphatidyl glycerols, phosphatidyl glycerols, phosphatidic acids and diglucosyl phosphatidyl glycerols, and the glycolipids of these streptococci as diglucosyl diglycerides and monoglucosyl diglycerides, respectively. The phospholipids and glycolipids from the cells of a viridans strain were similar to those from the other streptococci, except a glycolipid identified as triglucosyl diglycerides.

The quantities of phospholipids and glycolipids, however, markedly differed with the streptococci examined. Two hemolytic streptococci, strain Blackmore and C203U, contained a large amount of diglucosyl diglycerides (about 50% of total lipids), and the contents of diglucosyl diglycerides and monoglucosyl diglycerides in the cells of Su strain were about 30% and 25%. In contrast, the glycolipid contents in the cells of a viridans strain were about 20%. Diphosphatidyl glycerols were a main component in the cells of a viridans strain (about 50%), whereas the amounts of this phospholipids in the other streptococci were 12-16%.

In addition, a significant difference was found in the fatty acid pattern of phospholipids and glycolipids among four hemolytic streptococci. The ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids in these lipids was 0.11 for Su strain, 0.82 for Blackmore strain, 2.05 for C203U strain and 0.49 for a viridans strain, respectively. Fatty acid pattern of neutral lipids of hemolytic streptococci was similar to those of phospholipids or glycolipids.

These results indicate that a marked difference is found in the quantities of phospholipids and glycolipids or in the fatty acid pattern of these lipids among four hemolytic streptococci.