

サルモネラ属のリン脂質について

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 俵 寿太郎教授)

赤 塚 和 也
 金 政 泰 弘
 吉 岡 智 子
 俵 寿 太 郎

【昭和45年6月19日受稿】

目 次

I. 緒 言

II. 実験材料及び実験方法

1. 供試菌株
2. 培養方法
3. リピド抽出方法
4. リン脂質の構成成分及び定量法
5. 脂質の脂肪酸組成及び定量法

III. 実験成績

1. 脂質の構成成分の同定
2. 脂質構成成分の定量
3. 脂質の構成脂肪酸組成及び定量

IV. 考 察

V. 結 言

VI. 参考文献

I. 緒 言

細菌脂質の研究は、脂質の分離分析技術の進歩と共に、1955年以後非常に広範に行なわれてきた。細菌の構成脂質は、2・3の例外を除くと、主として複合脂質であるリン脂質よりなると考えられている。すなわちグラム陰性菌では抽出可能な脂質のうち80~90%までがリン脂質であり、グラム陽性菌でも40~70%のリン脂質を含んでいるものが大部分である。細菌リン脂質の構成成分の中には、細菌に特有なものも存在するが、その大半は動植物に普遍的に存在するリン脂質とその骨格を一にするものである。ただその構成脂肪酸においてはかなりの特徴がある。

細菌をグラム陰性菌および陽性菌に大別し、その構成リン脂質の面からみると、グラム陰性菌では、phosphatidyl ethanolamine (PE) が主成分をなし、その他に phosphatidyl glycerol (PG)、少量の Cardiolipin (CL) 等が含まれるが、グラム陽性菌では PE の含有量が非常に少ないか、又は全く見出されていない。そのかわり PG のアミノ酸複合体及び CL などが大量に存在している。

グラム陰性菌の中でもつとも詳細な研究がなされているのは大腸菌であり¹⁾²⁾、著者等³⁾も *E. coli* B におけるリン脂質は大量の PE, PG 更にかんりの

量の CL よりなることを報告した。同じグラム陰性菌であるサルモネラ属については Cmelik^{4)~7)}, Gray⁸⁾, 等が報告している。Cmelik は *Sal. typhi*⁴⁾⁶⁾, *Sal. ballerup*⁵⁾, *Sal. paratyphi C*⁶⁾ 等についてリピド成分を追求しているが、リン脂質の構成成分などの詳細な研究にまで至っていない。しかし Macfarlane⁹⁾ は *Sal. typhimurium* の菌株を使つてかなり詳細な研究をしており、リン脂質は PE, PG よりなることを述べ、PG の大部分は Diphosphatidyl glycerol すなわち CL であることを報告している。更に Ames¹⁰⁾ は同じ *Sal. typhimurium* のリン脂質の培養条件変換時の動静を観察している。

以上のサルモネラ属の各菌は、*Sal. typhi* を除いて、ある動物にはチフス性疾患を誘起するが人にはせいぜい腸炎を誘発するにとどまる。サルモネラ属の A 群, B 群, D 群の代表菌株である *Sal. paratyphi A*, *Sal. paratyphi B*, *Sal. typhi* は人にチフス性疾患をおこす特性を有する菌株であり、抗原構造的には勿論、生物学的性状で鑑別は可能である。このような特殊性をもつ3菌株のリン脂質の組成及び脂肪酸組成について分析を行なうことは意義あると考え、また三菌株間に差異があるかどうかを検討することも考慮に入れて実験を行ない、以下の成績を得た。

II. 実験材料及び実験方法

1. 供試菌株

当教室保存の標準株である *Salmonella typhi* H 901 (Typhi と略), *Salmonella paratyphi A* (Para A と略), *Salmonella paratyphi B* (Para B と略) を供試した。

2. 培養方法

培地は下記の組成を有する半合成培地を用い、モノ培養管で振盪培養を行ない増殖曲線を追いながら late log phase の菌を集め、生理的食塩水で洗滌後実験に供した。

培地組成 (培地 1 ℓ 中)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{aq}$13.95 (g)
KH_2PO_4 2.10
NaCl 0.50
CaCl_2 0.0146
MgSO_4 0.22
FeCl_2 0.000024
Poly-peptone 5.0
Yeast extract 1.0
Sod. lactate (50%) 5.0 (ml)

3. リピド抽出方法

リピドの抽出は図-1に示す如く $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (2:1 v/v) で3回抽出を行ない, Folch 法¹¹⁾で精製し総脂質を得た。

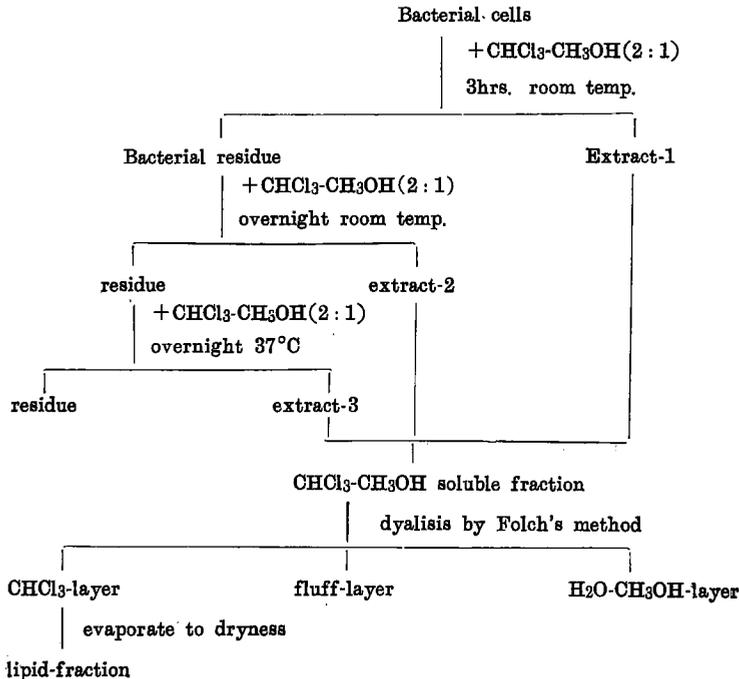
4. リン脂質の構成成分及び定量法

リン脂質の構成成分の検討はシリカゲルG薄層クロマトグラフ法 (TLC) によつた。展開溶媒は $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (70:25:4 v/v) 又は $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-7N-NH}_4\text{OH}$ (65:35:5 v/v) を用い、一次または二次元 TLC を行なつた。同定にはヨウ素蒸気発色、ニンヒドリン発色、Dittmer のリン発色¹²⁾ を行なつた。また各成分の定量は、クロマトプレート上の各スポットをかきとつて、Allen 法の Kates の変法¹³⁾により発色させ 680 m μ で比色定量を行なつた。

5. 脂質の脂肪酸組成及び定量法

総脂質の脂肪酸組成は、 HCl-MeOH 法¹⁴⁾でメチル化し、ガスクロマトグラフ (K53型 日立ガスクロマトグラフ) により観察した。定量はガスクロマトグラフ上の各ピークを三角法で測つて、それぞれの%を求めた。

Figure-1 Preparation of the lipid fraction



III. 実験成績

1. 脂質の構成成分の同定

Typhi, Para A 及び Para B の各菌の総脂質の含有量は、それぞれ乾燥菌量の 11.6%, 12.3%, 11.4% で各菌とも脂質の含有量は似かよつた値を得た。

脂質構成成分の検討は、二次元シリカゲル G-TLC のクロマトプレートの各スポットの発色定性試験、及び各スポット成分の緩和なアルカリ分解 (Dowson 分解法)¹⁵⁾ により得られた脱アシル水溶物のペーパークロマトグラフィにより行なつた。勿論、標準物質及び金政の得ている大腸菌の脂質構成成分と比較

検討して同定を行なつた。

三菌間に成分種類の差異は認められなかつたので Typhi の脂質のみのクロマトグラムを示した。フロントに上つたスポットは中性脂肪であり、その他の極性脂質はすべてリン脂質よりなることが判つた。図-2 で明らかな如く、大量の PE, CL 及びかなりの量の PG 及び微量の phosphatidyl serine (PS), phosphatidic acid (PA) が認められた。その他に minor な成分は全く見られずかなり単純な組成をしていることが判つた。

2. 脂質構成成分の定量

二次元 TLC で展開せられた各スポットを数枚のプレートよりかき取り、Kates の変法で比色定量した結果を表-1 に示す。

Table-1 Phospholipid composition of *Sal. typhi*, *Sal. paratyphi A* and *Sal. paratyphi B*.

	PA	PS	PG	CL	PE
<i>Sal. typhi</i> H 901	3.1	0.7	5.6	12.4	78.2
<i>Sal. paratyphi A</i>	1.5	2.5	6.0	12.9	77.1
<i>Sal. paratyphi B</i>	2.8	0.3	11.0	10.3	75.6

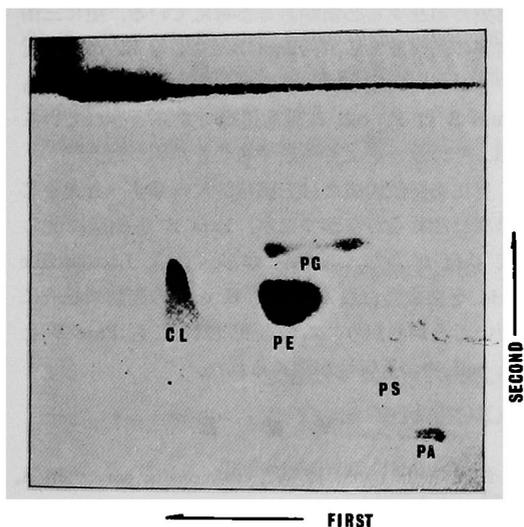


Figure-2 Two-dimensional thin-layer chromatogram of total phospholipid from *Salmonella typhi* H 901.

Solvent system : first development, CHCl₃-MeOH-H₂O (70/25/4, v/v); second development, CHCl₃-MeOH-7N·NH₄OH (65/35/5, v/v). Spots were revealed by charring after spraying with Dittmer reagent.

PA, Phosphatidic acid; PS, Phosphatidyl serine; PE, Phosphatidyl ethanolamine; PG, Phosphatidyl glycerol; CL, Cardiolipin.

結果はリン定量による成績で、約10%近く存在する中性脂質を除外した総リン脂質中の各成分の%である。三菌種とも75~78%の PE を含有し、リン脂質の大部分は PE であることが分る。PG は Typhi, Para A では数%であるが、Para B では11%存在する。CL は何れの菌種でも10%以上存在する結果を得た。その他 PA・PS の少量を認めたが、何れの菌種の場合も極微量であるので菌相互での有意の差は考えられなかつた。

3. 脂質の構成脂肪酸組成及び定量

GLC による脂肪酸組成の分析結果は表-2 に示す如くであつた。三菌株とも大量を占める脂肪酸としては C₁₆, C_{18:1}, C_{18:1} であり、これ以外に C₁₄, C_{17-Δ}, C₁₈, C_{14-OH}, C₂₂ 及び未知の脂肪酸が僅かに認められた。しかし C_{19-Δ} すなわち Lactobacillic acid は Para B に痕跡程度に認められたのみで他

Table-2 Fatty acid composition of *Sal. typhi*, *Sal. paratyphi A*, *Sal. paratyphi B* and *E. coli*.

Fatty acid	14:0	16:0	16:1	17-Δ	18:0	18:1	Unknown	19-Δ	14-OH	22:0
<i>Sal. typhi</i> H 901	5.2	38.4	24.3	1.7	—	17.3	2.9	—	4.0	5.2
<i>Sal. paratyphi A</i>	5.0	34.1	24.1	2.1	1.5	17.6	5.0	—	5.3	5.3
<i>Sal. paratyphi B</i>	3.0	32.7	19.2	1.9	0.5	25.7	3.5	0.3	4.3	3.5
<i>E. coli</i> B	2.5	38.6	13.8	3.0	2.0	27.9	4.6	3.0	4.6	—

の菌株には認められなかつた。三菌株間の差異としては有意なものは認められず、強いてあげれば Para B において C_{16:1} が少なく、これに返して C_{18:1} がやや多い結果を得た。

IV. 考 察

本研究において、サルモネラ属の中の A 群、B 群、D 群の代表的菌種である Para A、Para B 及び Typhi を用いたのは、人にチフス性疾患をおこす菌のリピド成分が、他の腸内細菌と如何に異なるかを追求するにある。他の腸内細菌は腸内にとどまるのに反して、上記3菌は腸管壁を通過して菌血症をおこす特徴がある。

所でサルモネラ属中でリピド成分が最もよく研究されているのは *Sal. typhimurium* で、このものはネズミにチフス疾患をおこす菌である。古くは Macfarlane⁹⁾ の研究があり、リピドの約90%がリン脂質であり、その中の大部分(84%)が PE で、残りの殆んどは CL であることを報告している。又 Ames¹⁰⁾ は非常に詳細な研究の結果、リピドは乾燥菌量の6.3%を占め、このうち10.4%が中性脂質であり、89.6%がリン脂質であると述べている。又このリン脂質のうち75%が PE、18%が PG、4.5%が CL であると述べている。著者等は同じく *Sal. typhimurium* (Typhimurium と略) で実験を行ない、PE が75.5%、CL が7.5%、PL が9.5%という結果を得ている。

サルモネラ以外の腸内細菌の中では大腸菌についての研究が最も多く見られる。Law¹⁾、Kanfer & Kennedy²⁾、Kanemasa³⁾ 等の報告があるが、本研究における実験方法は Kanemasa³⁾ の大腸菌脂質における研究と全く同一であるので、Kanemasa が大腸菌について得た結果と比較考察するのが最も妥当と考える。Kanemasa の報告によれば³⁾、*E. coli* B は乾燥菌量の8.6%のリピドを含み、この大部分(96%)がリン脂質であり、リン脂質の68.1%が PE、18.5%が PG、4.9%が CL、2.0%の PS 及び PA よりなつている。更に *E. coli* では Unknown のリン脂質が4%あることが認められている¹⁶⁾。従つて本研究で得られた実験結果を Typhimurium と *E. coli* のリピド組成と比較考察することにした。

リン脂質の構成成分の種類は三菌種とも *E. coli* 及び Typhimurium と殆んど異なる所はなく、ただ *E. coli* で minor な成分として認められる Unknown の物質(山上等¹⁶⁾)は Bisphosphatidic acid と想定し

ている)が三菌種に認められなかつた。各構成成分の組成から比較検討すると、酸性リン脂質である PG と CL の量において見るべき差異がある。三菌種及び *E. coli*、Typhimurium とも PG+CL の総和は18~21%の範囲内に存しているが、三菌種においては CL の量が他に比して多く、PG の量が少ないという点は注目すべきである。とくに *E. coli* の有する CL の量に対して、三菌種では2倍以上の CL を含有する。Typhimurium に比べても CL の量は多いことが認められる。この事実を直ちに人のチフス性疾患を起す特性と結びつけることは出来ないが、腸管壁を通過する性質と直接又は間接に関連性があるのではないかとの想定がなされ得る。この点は更に追及する必要があると考えている。更に三菌種間の差異であるが、Para B が最も *E. coli* に近いリン脂質組成を有していた。生物学的性状からも Para B は *E. coli* に最も近縁であるとされているが、その点ともよく一致することが判つた。

更に脂肪酸組成では三菌種間に特筆すべき大きな差異は認められなかつたが、Para B が他菌に比して C_{16:1} が少なく、C_{18:1} が多く、又 Lactobacillic acid を微量含む点において *E. coli* の脂肪酸組成に近いことがわかり、この点においても Para B と *E. coli* 内の近縁性が認められた。

V. 結 言

Salmonella typhi H 901, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella paratyphi* B の三菌種を供試菌として、脂質を抽出しその定性と定量及び脂肪酸の定性と定量を行ない、その結果を *E. coli* B 及び *Salmonella typhimurium* と比較検討を行なつた。

(1) リン脂質の成分は三菌種において全く同様の成分であつて、*E. coli* 及び *Salmonella typhimurium* と比べてみた場合もほぼ同一組成であり、ただサルモネラには認められない Unknown の物質が *E. coli* には認められた。

(2) リン脂質の成分組成では、三菌種は *E. coli* に比べて cardiolipin の含有量が多く10~13%を含み、phosphatidyl glycerol はこれに反して数~11%を含有するのみであつた。

(3) 三菌株間の間では *Salmonella paratyphi* B は Cardiolipin が最も少なく、phosphatidyl glycerol が最も多くて、*E. coli* のリン脂質組成に最も近い傾向を示した。

(4) 脂質構成脂肪酸は C₁₆、C_{16:1}、C_{18:1} が主要

脂肪酸であり, *E. coli* のそれと大差はなかつた。特に *Salmonella paratyphi B* は *E. coli* に近い脂肪酸組成を示すことがわかつた。

(本研究の要旨は昭和43年11月, 第21回日本細菌学会中国四国支部総会にて発表した。)

VI. 参 考 文 献

- 1) Law J. A. : *Bacteriol. Proc.*, 1961, 929.
- 2) Kanfer J. N. & E. P. Kennedy : *J. Biol. Chem.*, 238, 1963, 2919.
- 3) Kanemasa Y., Y. Akamatsu & S. Nojima : *Biochem. Biophys. Acta*, 144, 1967, 382.
- 4) Cmelik S. : *Z. Physiol. Chem.* 290, 1952, 146.
- 5) Cmelik S. : *Z. Physiol. Chem.* 293, 1953, 222.
- 6) Cmelik S. : *Z. Physiol. Chem.* 296, 1954, 67.
- 7) Cmelik S. : *Z. Physiol. Chem.* 299, 1955, 227.
- 8) Gray G. M. : *Biochem. Biophys. Acta*, 65, 1962, 135.
- 9) Macfarlane M. G. : *Biochem. J.*, 82, 1962A, 40.
- 10) Ames G. F. : *J. of Bact.*, 95, 1968, 833.
- 11) Folch J. M. Lees & G. H. Sloane Stanley : *J. Biol. Chem.*, 266, 1951, 497.
- 12) Dittmer J. G. & R. L. Lester : *J. Lipid Res.*, 5, 1964, 126.
- 13) Kates M., A. C. Allison & A. T. James, : *Biochem. Biophys. Acta*, 48, 1961, 571.
- 14) Stoffel W., F. Chu & E. H. Athens, Jr : *Anal. Chem.*, 31, 1959, 307.
- 15) Dowson R. M. C. : *Biochem. J.* 75, 1960, 45.
- 16) Yamagami A., T. Yoshioka & Y. Kanemasa : *Jap. J. of Microbiology* (in press)

Phospholipids of Salmonella Group

By

Kazuya AKATSUKA, Yasuhiro KANEMASA,
Tieko YOSHIOKA and Jutaro TAWARA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director : Prof. Jutaro TAWARA)

Sal. typhi, *Sal. paratyphi A* and *Sal. paratyphi B* which are the representative strains of group D, A and B of *Salmonella* group respectively, have special characteristics of inducing typhoid fever in man. Their complex antigenic structures and biochemical characters are already well known.

The authors studied the difference, if any, in the lipid components among these strains, while comparing with the lipid components of other *Enterobacteria*.

1. The major components of phospholipid were found to be identical in all the three strains. Moreover, these were almost the same in *E. coli* and *Sal. typhimurium*, with an exception of a minor unknown component in *E. coli*.

2. Considering the composition of individual components, three strains contained a considerable amount of cardiolipin (10—13% of total phospholipid). On the other hand, they contained phosphatidyl glycerol in several to 10%.

3. Among the three strains, *Sal. paratyphi B* tended to show the quantities of cardiolipin and phosphatidyl glycerol very similar to those in *E. coli B*.

4. The fatty acid composition of total lipids in these three strains did not differ so appreciably from that of *E. coli*. Main components of the fatty acid were palmitic, palmitoleic and oleic acids.