 原 著

Newman D₂C ブドウ球菌からの clumping factor の純化

林 滋* 山田 兼雄**

Purification of clumping factor from Newman D₂C staphylococcus

Shigeru HAYASHI* and Kaneo YAMADA**

Key words : staphylococcus aureus, clumping factor, fibrinogen, fibrinogen-sepharose, purification

Newman D₂C staphylococci have been clinically used for detecting FDP or soluble fibrin monomer complexes as staphylococcal clumping test. In this preliminary report we extracted clumping factor, which was existed in the surface of the cell wall of staphylococcus aureus (Newman D₂C, a bound coagulase positive, free coagulase negative, clumping factor positive and variant of strain D₂C), by alkali treatment and purified it by gel filtration (Sephadex G-100) and fibrinogen-Sepharose chromatography. The extracted solution of staphylococci by 0.05N NaOH was gel filtrated on Sephadex G-100. Clumping factor positive fraction of Sephadex G-100 was passed through fibrinogen-Sepharose affinity chromatography. The adsorbed substance was eluted by a linear pH gradient with 0.05M Tris, H₃PO₄, pH 9.5. Clumping factor positive fraction (purified CF) eluted by pH gradient was applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and appeared as a single band with or without reduction by DTT. Purified CF was gel filtrated using Sephadex G-200 before and after SDS-treatment. The molecular weight of CF was 12,000 (after SDS-treatment) and 270,000 (before SDS-treatment).

It can be concluded from these results that clumping factor was consisted of 21—24 subunits, which were single chain and 12,000 of molecular weight, and was 270,000 of molecular weight.

 緒 言

Newman D₂C ブドウ球菌は, staphylococcal clumping test (SCT) として, FDP や SFMC

の測定に応用されている¹⁾. この菌の表面には, フィブリノゲンの A α 鎖, B β 鎖と結合し得る clumping factor (CF) が存在していることが見出されている²⁾. しかしブ菌とフィブリ

* 荻窪病院内科 (〒167 東京都杉並区今川3—1—24), Internal Medical, Ogikubo Hospital, Tokyo, Japan.

** 聖マリアンナ医科大学小児科, Department of Pediatrics, St. Marianna Medical School, Kanagawa, Japan.

ノゲンの結合機序に関しては、フィブリノゲンの側からの説明は、ある程度なされているが、ブ菌の側からの説明は十分ではない。とくに CF の性状については、ほとんど説明されていない。著者らは、ブ菌より CF を抽出、純化し、その性状を明らかにし、CF とフィブリノゲンとの結合に関しても一部明らかとなったので、ここに報告する。

I. 材料ならびに方法

1) ブドウ球菌³⁾: Newman D₂C, bound coagulase (+), free coagulase (-), clumping factor (+) の staphylococcus aureus を使用。

2) clumping 活性: フィブリノゲンを coating した赤血球 (帝国臓器) を用いて、凝集法により測定した。活性は検体の希釈倍数で表現した。

3) coagulase 活性: ウサギ血漿 (栄研化学) を用いて測定した。

4) fibrinogen-Sepharose affinity chromatography: Heene and Matthias⁴⁾ の方法を改変して作製した。吸着した蛋白は、pH elution により溶出させた。

5) ゲル濾過: Sephadex G-100 (1.5×90 cm), Sephadex G-200 (1.5×90cm), 0.05M Tris H₃PO₄, pH 7.6 のバッファーを用いて、ゲル濾過を行った。

6) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE): Weber and Osborn⁵⁾ の方法によった。還元系 (DTT), 非還元系で行ない、染色はクマシーブルーと PAS 染色を行った。

7) 分子量測定: SDS-PAGE および Sephadex G-200 で行った。マーカーとして、fibrinogen (Kabi 社を使用し、既報の方法³⁾で純化したもの), 他は、Schwarz Mann 社製の γ -globulin (160,000), ovalbumin (45,000), chymotrypsinogen (25,000), cytochrome C (12,400) を使用した。

II. 成績

1) CF の抽出: ブ菌 (2.5g) を 0.05N NaOH 液に混じ、37°C, 2 時間インキュベートする。遠沈後 (3,000rpm 20分, 14,000rpm 20分)

Fig. 1 Purification of clumping factor by Sephadex G-100 and fibrinogen-Sepharose chromatography.

の上清 (CF 上清) を出発材料とした。NaOH 液で水解後のブ菌は、clumping 活性を認めなかった。また、上清の coagulase 活性も陰性であった。

2) CF の純化: CF 上清をポリエチレングリコールで濃縮後、0.05M Tris, H₃PO₄, pH 7.6 (buffer A) で透析し、Sephadex G-100 でゲル濾過を行った。clumping 活性は、No. 15, 16, 17, 48 で陽性であった (図 1)。次いで No. 15~17 の分画を、fibrinogen-Sepharose に通し、buffer A で洗滌し、0.05M Tris, H₃PO₄, pH 9.5 (buffer B) で溶出させた。SDS-PAGE による検討では、Sephadex G-100 の分画 (No. 16) は、やや幅の広いバンドと小さなバンドが認められ (図 2-2), fibrinogen-Sepharose 溶出分画 (No. 49) では、単一バンドであり (図 2-3), DTT による還元系でも、単一バンドであった (図 2-4)。このバンドは、PAS 染色では染まらなかった。

3) CF の分子量: 純化した CF (fibrinogen-Sepharose の溶出分画) を、Sephadex G-200 でゲル濾過し (図 3), 一方 fibrinogen, γ -globulin

Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of NaOH extracted solution (1), fraction No. 16 of Sephadex G-100 (2), fraction No. 49 of fibrinogen-Sepharose (3) and fraction No. 49 after DTT reduction (4).

を同一条件でゲル透過し、 V_e を算出し、分子量を求めた。CF の分子量は、27万であった。一方、SDS-PAGE より求めた分子量 (ovalbumin, chymotrypsinogen, cytochrome c を分子量既知蛋白質として泳動した) は、12,000であった。さらに、純化した CF を、SDS で処理し、Sephadex G-200 でゲル透過したところ、高分子、低分子域の2か所にピークと活性が認められ(図3)、分子量は、それぞれ、27万、12,000であった。

4) CF の性状: CF の紫外吸収曲線は、205, 255nm に極大吸収を示す2峰性であり、 A_{280}/A_{260} は0.53であった。CFは、熱安定性(56%, 15分でも clumping 活性を認める)、アルカリ安定性(0.05N NaOH 液中でも活性有)を示し、coagulase 活性は認めなかった。

III. 考 案

ブ菌の膜上に存在する CF を、アルカリ処理により溶出させ、これを fibrinogen との結合性を利用した affinity chromatography で純化した。アルカリ処理の過程で、小分子 (clumping

Fig. 3 Gel filtration of purified clumping factor on Sephadex G-200. Upper panel shows gel filtration profile of purified clumping factor and lower panel shows that of SDS treated purified clumping factor.

活性陽性, PAS 陽性) のフラグメントが遊離されたが、このフラグメントの性状については、まだ十分検討していない。これまでの実験結果より、CF の分子構造を考えると、CF は、PAS 陰性、分子量 12,000 で単鎖の subunit が21~24と結合して、約27万の分子量の物質と推測され、フィブリノゲンとの結合性は、各 subunit に認められる。しかしブ菌の膜上に存在している時は、上記の PAS 陽性フラグメントが、分子量27万の CF と結合していると考えられている。各 subunit 同士の結合は強く、アルカリ処理によっても離開せず、SDS 処理で離開した。また、SDS 処理後の subunit にも、clumping 活性が認められ、活性部位はかなり安定な構造であろうと推測された。最後に、今回純化した CF が、蛋白質であるか、他の物質(核酸など)との複合体であるかは、今後の検討に待ちたい。

文 献

- 1) Hawiger, J., Niewiarowski, S., Gurewich, V. and Thomas, D. P.: Measurement of

- fibrinogen and fibrin degradation products in serum by staphylococcal clumping test. J. Lab. Clin. Med., 75; 993~1008, 1970.
- 2) Hawiger, J., Hammond, D. K. and Timmons, S.: Human fibrinogen possesses binding site for staphylococci on A α and B β polypeptide chains. Nature, 258; 643~645, 1975.
- 3) Hayashi, S.: Studies on the significance of serum soluble fibrin in nephritis, with special reference to the technique of staphylococcal clumping. Acta Haem. Jap., 42; 53~64, 1979.
- 4) Heene, D.L. and Matthias, F.R.: Adsorption of fibrinogen derivatives on insolubilized fibrinogen and fibrinmonomer. Thrombos. Res., 2; 137~154, 1973.
- 5) Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244; 4406~4412, 1969.

●わが国唯一のビタミンB₁₂研究の完全な集大成!

ビタミンB₁₂ —基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人 専門医24氏分担執筆

A 5 判 367頁 図157 表73 定価7,800円(千200円)

ビタミンB₁₂は最も新しく発見されたものであるが、その構造の特異性や作用の独自性から、その研究の進歩は著しいものがある。最近では、その同族体の臨床応用が広がってきたものの、生化学、酵素学などの基盤にたった合理的な使用法はまだほど遠い所にある。本書はわが国でのB₁₂研究を現時点で集大成し、関係各方面の研究者に便ならしめた。

●内容: 第1章 ビタミンB₁₂研究の進歩と問題点, 第2章 ビタミンB₁₂の吸収, 第3章 ビタミンB₁₂の腸管吸収機構, 第4章 Whole body counterのビタミンB₁₂吸収試験ならびにB₁₂代謝への応用, 第5章 悪性貧血と胃の自己免疫, 第6章 悪性貧血の成因に関する自己免疫的考察, 第7章 ビタミンB₁₂の生体内転換利用, 第8章 ビタミンB₁₂結合蛋白, 第9章 Acid-resistant binding capacityと“granulocyte related” binding proteinについて, 第10章 トランスコバリンII欠乏症, 第11章 ビタミンB₁₂のradioassay, 第12章 ビタミンB₁₂と葉酸代謝, 第13章 ビタミンB₁₂と中毒, 第14章 巨赤芽球性貧血, 第15章 尿中メチルマロン酸排泄とビタミンB₁₂代謝, 第16章 高ビタミンB₁₂血症, 第17章 ビタミンB₁₂代謝と神経系, 第18章 ビタミンB₁₂と神経疾患。

●101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768