O 抗原の化学的本態に関する研究

第1報 フェノール水加温抽出法により分離した *Ps. fluorescens* の複合多糖体について

河 西 信 彦

東京大学伝染病研究所第三細菌研究部 (部長 武田徳晴教授)

〔受付: 10月14日 1955年〕

O 抗原の化学的並に生物学的性状については武田教授が最近の総説¹⁾においてその広範な研究成績を詳細に亘つて述べている。特にO抗原の所謂「毒性因子」に就てはこれが抗原能であるとかシュワルツマン反応, 発熱反応, 過血糖, 流産の惹起等々O抗原の主要な生物学的活性と密接な関係にあるいわば中心因子であるので「毒性因子」の代りに「生物学的活性因子」なる名称を提唱しているが末だこの毒性因子の化学的本態は未確定である。

ところで近年 Westphal²⁾らは主として大腸菌から彼等のフェノール水加温抽出法により蛋白性成分を全く含まない発熱物質, Lipopolysaccharide を分離しているが, この物質はO抗原がフェノール水の処理によつて蛋白を離脱した一種の分解産物ともみられるのであつて Westphal はこの多糖体の毒性にはリポイドと多糖体の結合が重要であるという成績を提出している。

著者は Westphal のいう蛋白不含の Lipopolysaccharide が得られるものかどうかを調べる為に *Ps. fluorescens* の菌体からフェノール水で抽出した多糖体を武田らの精製法¹⁾により分離精製してその構成成分の分析を行つたので茲にその成績を報告したい。

実験材料並びに方法

菌体——本実験に用いた *Ps. fluorescens* の菌体は Dole³⁾が作った培地にタンク培養したものである。即ち培地15l に *Ps. fluorescens* のS型菌を接種し37°Cで一晩静置し, 翌朝滅菌ブドウ糖溶液 50g/100 ml を加えて滅菌空気を送りつゝ約8時間培養の後, シャーププレス超遠心機で菌体を集めアセトンで脱水乾燥する。培地15lにつき乾燥菌体として平均40gの収量である。

分析方法——分析用の試料は低温で充分透析の後凍結乾燥したものを更にアブデルハルデン乾燥器にて65°前後で恒量となるまで乾燥して使用した。凍結乾燥したものは通常8~12%の水分を含有する。

電気泳動分析はHT-B型日立セリウス装置を用い

PH7.7, $\mu=0.1$ の磷酸塩緩衝液で行つた。

総窒素量は Micro-Kjeldahl 法⁵⁾により, 有機燐は Allen 法⁶⁾により測定した。還元糖は試料を1n 塩酸と共に硝子管に封じ, 沸騰水中で水解したのち1n 苛性ソーダで微弱酸性にまで(約95%)中和して Somogyi 法の変法⁷⁾で比色定量した。結果はグルコースの値として示した。アミノ糖は4n 塩酸で封管中沸騰水浴で水解したのち Elson & Morgan 法の改良法⁸⁾で測定した。メチルペントースは Dische & Shettles の方法⁹⁾で測定した。また蛋白を Folin Ciocalteu's phenol 反応¹⁰⁾で, 試料を n/10 苛性ソーダ溶液として0.1 ml. Carbonate 試薬2 ml, 1:2 稀釈 Phenol 試薬0.2 ml を使用して測定した。この場合結晶卵白アルブミンを標準品とした。

またリポイド含量は試料を1n 塩酸と共に沸騰水中で3時間加水分解したのちクロロホルム可溶の物質を秤量してリポイド量とした。なお吸収スペクトルは Beckman の Spectrophotometer を用い n/10 苛性ソーダ溶液について測定した。

実験成績

1. 複合多糖体の分離精製

複合多糖体の分離精製法については既に別報¹¹⁾で報告した通りであるがなお要旨を述べたい。

抽出過程は大體 Westphal の方法と同じである。即ち, 乾燥菌体34gを水1190mlに浮かべて65°~68°に加

KASAI, Nobuhiko: Studies on the chemistry of the O antigen. I). On the complex polysaccharide derived from cells of *Ps. fluorescens* by means of phenol-water emulsion method. Institute of Infectious Diseases, University of Tokyo. — Jap. J. of Bact., 11 (3), 251-255, 1956.

温し、同容量、同温度の90%フェノールを撈拌しつゝ加える。フェノール添加後更に25分間加温抽出して5°前後に冷却し、5°~10°で遠心して水層、菌体残渣、フェノール層の三つの部分にわけける。菌体残渣はもう一度はじめの約半量の水に浮かべ65°~68°に約10分間加温抽出して冷却遠心し、上清を前の水層に合する。

水層は更に20,000 r.p.m. 30分遠心し、殆んど透明の上清を流水で三日間透析の後減圧濃縮して約200mlとする(Fraction 10), この濃縮液190mlに20(w/v)%チヒドロストレプトマイシン水溶液を撈拌しつゝもはや上清がDische's Diphenylamine 反応¹²⁾ 陰性となる迄加える(約7ml 使用), 一夜氷室に放置したのち遠心して核酸とストマイの複合体を分離する。上清を弱アルカリ性にしてセロファン膜で充分透析したのち稀醋酸でPH5.0とし、Sevagの除蛋白操作をもはや蛋白ゲル層が殆んど生じなくなる迄繰返す。上清を透析して凍結乾燥したのちPH7.7, $\mu=0.1$ のPhosphate Bufferに2%濃度にとかし、アルコールで分割沈澱を行つて65~68%の沈澱をとる。多糖体分割(Fraction 10C) 1.2gを得る。

なおストマイのNucleateは1mol食塩水にとかし、はじめ1mol食塩水に次いで水に順次透析を繰返して凍結乾燥すれば核酸分割(Fraction 10NA) 2.4gを得る。

またフェノール層からはWestphalの方法に従つて蛋白分割(Fraction 10P) 2.6gを分離した。

2. 精製多糖体分割の性状

各分割の電気泳動分析の結果は第1図に示した通りである。即ち多糖体と核酸の混合物(Fraction 10)からストマイで核酸(Fraction 10NA)を分離して精製した多糖体分割(Fraction 10C)はこの条件のものではほぼ均質とみることが出来る。なお核酸分割に就てみると核酸が示す尖鋭なBoundaryのほかにそれよりはMobilityの遅いDiffuseな成分をやゝ多量に、また多糖体分割のMobilityに相当する小さなBoundaryが認められる。

さて、多糖体分割は類白色の粉末で水にとけて僅かにOpalescentを呈する。1%水溶液はBiuret反応陰性であるがMolisch反応強陽性を示す。デソキシリボ核酸に対するDische's Diphenylamine 反応, Dische's Cystein. H_2SO_4 ¹³⁾ 反応は共に陰性であり、第2図に示した通り紫外部における吸収スペクトルでも260 m μ 附近に核酸特有の吸収は全く認められない。

本多糖体分割は第1表に示した如くN3.4%, P1.6%を含有し、Folinのフェノール反応陽性でポリペプチ

第1図 各分割の電気泳動図

第2図 各分割の紫外外部吸収スペクトル

ツド様物質4.4%を含有する。還元糖及びアミノ糖は第3図にも示したように各々27%, 14%が最高値となっており、またメチルペントースはラムノースとして11%を含有する。ウロン酸に対するDische's Carbazole 反応¹⁴⁾は陰性である。本分割はまたリポイド9%を含有しており灰分含量は5.6%である。

なお本多糖体分割と比較するために Ps. fluorescens

第1表 各分割の一般性状

性状	分割	多糖体分割 Fraction 10C	Ps. fraction	核酸分割 Fraction 10NA	蛋白分割 Fraction 10P
Molisch	反応	++	++	+	—
Biuret	反応	—	+	+	++
Dische's diphenylamine	反応	—	—	++	—
Dische's cystein-H ₂ SO ₄ 反応(DNA)		—	—	++	—
Orcin-HCl	反応	±	±	++	—
総窒素 (%)		3.4	4.8	14.3	14.7
総磷 (%)		1.6	1.8	5.6	<0.1
蛋白質 (%)		4.4	14.8	13.0	>90
還元糖 (%)		27.0	24.0		
アミノ糖 (%)		14.1	12.2		
ラムノース (%)		11.0	9.3		
総リポイド (%)		9	12		
灰分 (%)		5.6	7.8		
沈降反応(菌体免疫血清)		4×10 ⁵	4×10 ⁵	1×10 ⁴	5×10 ⁴
毒性 mld (マウス)		0.4~0.5mg	0.5mg	> 3 mg	> 3 mg

第3図 各分割の還元糖とアミノ糖

から通常の稀醋酸抽出法で分離した複合多糖体 (Ps. fraction と記す) の性状を第1表及び第2, 3図に併せて示しておいた。

即ち Ps. fraction はN4.8 %, P1.8 %であり, 蛋白性成分 14.8 %で前述の多糖体分割に比較して約10% 蛋白を多く含んでいる。

また Dische's Diphenylamine 反応, Cystein-H₂SO₄,

反応は陰性で, 吸収スペクトルも第2図に示したように各波長の吸収係数が若干大きくなっているほかは Fraction 10C とほぼ同様の吸収曲線を示している。一方還元糖, アミノ糖及びラムノース含量は夫々24, 12, 9 % となっており, Fraction 10C に比較して2~3 %宛少くなっている。なお結合リポイドの含量は12%である。

以上の成績から明かなように Fraction 10C は Ps. fraction にくらべて蛋白性成分の含量が約1/3に減じている点が大きな相違点である。

なお, 多糖体分割 Fraction 10C の生物学的性状に就ては既に詳しく述べてある¹¹⁾ のでここには省略したいがマウスに対する最小致死量は0.4 ~0.5 mgであり, 菌体免疫血清との沈降反応は40万倍迄陽性である。

なお前述の核酸分割, 蛋白分割の性状も, 一括して第1表に示しておいたが, 核酸分割はデソキシリボ核酸, リボ核酸のほかに約18%の蛋白を含んでおり, 一方蛋白分割には核酸が殆んど含まれていない。

3. 多糖体分割のリポイドの分解

近年 Morgan¹⁵⁾ らは志賀赤痢菌のO抗原, Polysaccharide-Protein-Phospholipid Complex を Miles & Pirie¹⁶⁾ の方法で処理して Phospholipid を除いた残りの Polysaccharide-Protein Complex が強い毒性と抗原能をもっていることを述べているので, 著者はこの Miles & Pirie の方法で前述の多糖体分割に含まれるリポイドが除去出来るものであるかどうかを調べた。

即ち Fraction 10C の 500 mg を 50ml の水にどかし,

0° に冷却する。これに予め-10° に冷却した0.5 %塩酸含有アルコール・エーテル(1:1)混液の10倍量を攪拌して加える。生じた沈澱は4° で遠心して集め再び0~2° に保ちつゝ水にとかして更に2回同じ操作を繰返す。最後の沈澱は水にとかして中和しセロファン膜で透析したのち凍結乾燥する。白色粉末、420 mgを得る。本分劃はN3.5 %, P1.6 % 結合リポイド4 %であつて Fraction 10CにくらべてN, P含量に差異はないがリポイドが5 %程度少くなつてゐる。しかし、マウスに対する毒性は0.5 mgで3匹中2匹を、0.6 mgで3匹中3匹を斃死せしめる結果となつており著しい毒性の低下は認められない。

総括並びに考察

O抗原に対するフェノールの作用を系統的に調べたのは Morgan¹⁷⁾ である。即ち 彼等は志賀赤痢菌のO抗原に90%フェノール水を室温で作用することが所謂 Simple Protein と Undegraded Polysaccharide に分解するということを述べている。

Westphal らは Morgan らの仕事を基礎として直接菌体に対するフェノール水の作用を詳しく検討した。特に大腸菌の菌体に就て約50%濃度のフェノール水を用いて低温で抽出すると所謂 Glycoproteid が得られるが65° 程度に加温抽出を行うと蛋白性成分を全く欠いた多糖体分劃が得られる。この多糖体分劃はリポイドと多糖体の結合体で強い毒性と発熱性を保持している。

著者はこの Westphal らの方法に従つて Ps. fluorescus から多糖体成分を抽出し、ストレプトマイシンを用いる簡易精製法により電気泳動学的にほぼ均質の多糖体を分離精製し得たので主としてその化学的性質を調べた。その結果、本分劃はポリペプチッド様物質を約4 %, リポイド9 %を含有する一種の複合多糖体であることがわかつた。これは従来われわれの研究室で行つてゐる稀醋酸抽出法により分離した蛋白15 %, リポイド12 %を含有する所謂 Lipocarbohydrate-Protein Complex から70%以上の蛋白が離脱分解した形を示すものであるが、なお多糖体の部分には4 %程度のポリペプチッド様成分が残存しており Westphal のいうようにペプチッドやアミノ酸を全く欠いた Lipopolysaccharide は得られなかつた。

ところでこのようにフェノール水は蛋白部分に対して強い分解能を示すものと思われるが既に述べた実験成績から明かな如くリポイドに対する分解作用は殆んどみられないのであつてこのことはリポイド結合がフェノール水の加温処理に強い抵抗を示すものである。

一方 Morgan らは志賀赤痢菌のO抗原から Miles & Pirie の塩酸性アルコール・エーテルによる脱脂法で結合リポイドを除去している。而して、残りの Polysaccharide-Protein Complex はなお強い毒性と抗原能をもつてゐることを述べている。

著者はフェノール水で抽出した複合多糖体から Miles & Pirie 法でリポイド成分が完全に除去出来るものかどうかを調べたが、約9 %のリポイドの中5 %程度が除去されるが残りのリポイド部分はこの方法では分解が困難である。しかも、この処理で毒性に著しい変化が認められない結果となつてゐる。

結 論

1. Ps. fluorescus の菌体からフェノール水で加温抽出して有毒性多糖体分劃を分離精製した。

2. 本多糖体分劃はポリペプチッド様物質約4 %, リポイド約9 %を含む一種の複合多糖体である。

3. 本複合多糖体は通常の方法で分離した Ps. fraction, Lipocarbohydrate-Protein Complex の蛋白部分が大半離脱した形と一致する。

4. この Lipocarbohydrate のリポイド部分は、塩酸アルコール・エーテル抽出により完全に多糖体から分離することは困難である。

終りに臨み終始御懇篤な御指導、御鞭撻を戴いた武田教授並びに親しく御校閲を賜つた伊藤教授に深甚の謝意を表します。また本実験に御協力をいただいた研究室の各位に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 武田：日本細菌学雑誌。8 (特), 441, 1953.
- 2) 武田, 細菌毒素シンポジウム。第1輯。
- 3) Westphal, O., Lüderitz, O. & Bister, F.: Z. Naturforschg., 7b, 148, 1952; Westphal, O., Lüderitz, O., Eichenberger, E. & Keiderling, W.: Z. Naturforschg., 7b, 536, 1952; Lüderitz, O. & Westphal, O.: Z. Naturforschg., 7b, 548, 1952.
- 4) Dole, V. P.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 63, 122, 1946.
- 5) Kabat, E. A. & Meyer, M. M.: Experimental Immunochimistry, 282.
- 6) Allen, R. J. L.: Biochem. J., 34, 858, 1940.
- 7) Nelson, N.: J. Biol. Chem., 153, 375, 1944.
- 8) Palmer, J. W., Smythe, E. M. & Meyer, K.: J. Biol. Chem., 119, 491, 1937.
- 9) Dische, Z. & Shettles, L. B.: J. Biol. Chem., 175, 595, 1948.

- 10) Lowry, O. H., et al. : J. Biol. Chem., 193, 265, 1951; Kunkel H. G. & Tiselius, A. : J. Gen. Physiol., 35, 89, 1951.
- 11) Takeda, Y. and Kasai, N. : Japan. J. Exp. Med., 印刷中.
- 12) Dische, Z. : Mikrochemie, 8, 4, 1930.
- 13) Stumpf, P. K. : J. Biol. Chem., 169, 367, 1947.
- 14) Dische, Z. : J. Biol. Chem., 167, 189, 1947.
- 15) Davies, D. A. L., Morgan, W. T. J. & Moismann, W. : Biochem. J., 56, 572, 1954.
- 16) Miles, A. A. & Pirie, N. W. : Brit. J. Exp. Path., 20, 83, 1939.
- 17) Morgan, W. T. J. & Partridge, S. M. : Biochem. J., 35, 1140, 1941.