百日咳菌毒素に関する研究

第6報 菌体内高分子物質について

黒屋 政彦・天野 保二・大 泉 壮・佐藤 蓉子

黒河内達郎・太 田 玲・伊藤 政志

東北大学医学部細菌学教室

〔受付：11月29日・1960年〕

近時、超遠心法の発達に伴い、各種菌体内高分子物質の研究が報告され、特にRNA蛋白については、Scha-chman¹⁾、Chao^{2,3)}等により、その分離の条件、イオン強度の影響およびその物理的性状などが報告されている。但し、これ等の研究は、主として酵母、大腸菌などの非病原性菌についてであり、又菌体内高分子物質のすべてに涉つたものではない。

吾々は、数年来、百日咳菌々体成分に関する研究をつづけ、特に物理的方法のみによる毒素の単離に努力を傾注して来た結果、ほぼその目的を達したが、本報告では、毒素の単離と同時に得られた他の高分子成分、即ち、第2蛋白（前報のA成分）、DNA蛋白、RNA蛋白、原点物質などの分離法、性状などについて述べる。この方法はやや定性的であり、得られた各成分の純度その他に就いては更に検討を要する。

実験および結果

百日咳I型菌前野株を、炭末加カザミノ酸液体培地に37℃4日間培養後、その菌体を、湿菌200mg/mlとなるよう蒸溜水浮游液とし、10KC音波振盪20分間処理により菌体を破壊し、10,000g30分遠心の上清（出発材

料）を得た。これについて Spinco Model E による沈降分析を行うと、ほぼ5つの高分子成分を認めることが出来る（図1）。これ等5成分の沈降係数は、それぞれ

表1 菌体内高分子物質分画法

図1 出発材料の沈降図

(59,000r.p.m. 8分間隔)

A; 3.5S B; 4.8S C; 14.0S
D; 15.5S E; 27.1S

KUROYA Masahiko, AMANO Yasuji ŌIZUMI Sō, SATŌ Yōko, KUROKŌCHI Tatsuo, ŌTA Rei and ITŌ Masashi: Studies on Pertussal toxin. VI. High Molecular Bacterial Body Substances except Toxin. Department of Bacteriology, School of Medicine, Tohoku University, Sendai.—Jap. J. of Bact., 16(6), 490-496, 1961.

3.5, 4.8, 14.0, 15.5, 27.1Sであり, Sの小さな成分より第2蛋白(前報のA成分), DNA蛋白, 毒素及び分子量を異にする2つのRNA蛋白である。

これ等, 高分子物質の概略の分離法は, 表1の通りであるが, ここでは, 毒素を除き, その他の成分について述べる。

1) 第2蛋白

表1の如く, 出発材料について190,000 g 120分の遠心を行うと, 第2蛋白とDNA蛋白の大部分は上清中にある(図2)。

図2 出発材料 190,000g 120分遠心後の沈降図

この上清を凍結乾燥して少量の水に再溶解し, pH7.1, M/15, phosphate buffer, 3.5mA/cm², 15~20hrs の条件で, 澱粉による Zone electrophoresis (以下 Z.E.P.

図3(A) 190,000g 120分遠心上清の Z.E.P.

(一) 原点

(B) 同上分画 25 の沈降図

(59,000r.p.m., 8分間隔) 3.4S

と略記)を行うと図3Aのような泳動図を示す。

即ち, 蛋白の大部分は, 陽極方向に動いて分画25附近に Peak を作り, 同じく分画5附近にはDNA蛋白の分布を見る。これ等蛋白の分布は, 澱粉面より転写した濾紙を Amidoblack 10B で染色し, さらに各分画より水で溶出した試料については T.C.A. の沈澱及び Diphenylamine 反応により調べた。

核酸については, 溶液の反応の外, 転写濾紙を Fuchsin 染色 (Ziehl の石炭酸 Fuchsin 液で20~30分間染色後 Amidoblack の場合と同様の脱色処理を行う) することによっても, その分布を見ることが可能である。この場合, DNA蛋白及びRNA蛋白の部分がよく染まり他の蛋白は染らない。之は Fuchsin によつて染まるものはDNA又はRNA自身であることを示すものと考えられる。

又, 上記転写濾紙について Gram 染色を行うと, Fuchsin 同様RNA蛋白及びDNA部分がよく染まる。これ等の事実, Gram 染色における陽性は, 菌株のRNAに由来するとした黒屋⁴⁾, Henry⁵⁾, Umbreit^{6,7)}等の報告を支持し, 且つ, DNAも又, Gram 陽性物質であることを提示するもので, 細菌の染色機構の上から注意すべきものと考えられる。

上記の泳動で, 蛋白濃度の最も高い分画25について沈降分析を行なうと図3Bの如くなり, 従来, ムチン様物質(前報のA成分)と称して来たものと同一の Pattern を示す。

この分画は, biuret 反応, direct chromogen test が陽性, Molisch 反応微陽性, Orcinol 反応, Diphenylamine 反応は陰性である。

この部分を Pool して一部を凍結乾燥し2%水溶液として再び沈降分析を行うと, 少量の毒素の混入を認めたので, 上記 Pool した試料について再び190,000 g 120分の遠心を行つて混入毒素を沈澱として除去し, その上清を約 1/100 M Phosphate buffer の存在のもとに凍結乾燥して白色の粉末を得た。このものの Tiselius 型電気泳動及び超遠心による沈降分析は図4の通りであつて, 未だ充分とは云えないがほぼ単一の像を示し, その沈降速度より明らかに毒素と異なる蛋白質であることを知る。

この物質は, 窒素量12.4% (Microkjeldahl 法)であるが糖類をほとんど含まない。

毒性はマウスに対し, 腹腔内注射で LD₅₀=18.66 mg/kg(毒素はLD₅₀=0.58mg/kg)で著しく低く, 又, 家兎皮内反応において直径10mmの出血斑を示すに 0.018 mg を要した(毒素の場合 0.007~0.00045 mg)。

この毒性は、本物質本来のものか
 あるいは微量の毒素の混入によるもの
 かを知るために別に精製した第2蛋白
 について、190,000 g 120 分の遠
 心を繰り返しつつ、その毒性の変化
 を検定すると、マウスにおけるLD₅₀
 は 5.3mg/kg から第1回遠心により
 8.1 mg/kg となり、更に第2回遠心
 により 9.3mg/kg に低下し、又家兎
 皮内の出血斑、直径10mmを示すに
 要すると推定される量は、0.006 mg
 から0.014 mg, 更に0.03mg となつ
 た。即ち遠心により毒素が除かれ出
 血反応は低下してゆくが、マウス致
 死毒は必ずしも平行して低下しな
 い。

この結果は、本物質の示す出血毒
 の大部分は混入 Gundel 毒素による
 ものであることを証明しているが、
 尚、本物質自体のマウス致死毒性を
 否定するには至っていない。このマ
 ウス致死毒性が皮内注射の場合、発
 赤腫脹を示すものであるか否かは今
 後の問題としたい。

又、このものの溶液と、20倍稀釈
 抗菌家兎血清（凝集価 20,000 倍）
 との間に沈降反応を行うと、0.015
 mg/ml まで陽性を示し（毒素の場
 合0.0036mg まで陽性）、毒素に比し
 抗原性が低い。この傾向は、本物質
 を抗原として家兎を免疫した時にも見られる。即ち、総
 量 5 mg を 2 週間にわたって免疫して得た20倍稀釈家兎
 血清は、0.46mg/mlの抗原に対し、微弱な沈降反応を示
 すに過ぎない。又、この血清の凝集価は最高 128倍にす
 ぎなかつた。従つて第2蛋白はその沈降速度やN量等か
 ら見て、分子量の比較的小さい蛋白質と思われ、従つて
 その in vitro 又は vivo の免疫原としての作用も小さい
 ものと考えて居る。ただし、この成績は更に精細な実験
 を行わなければ断定は困難である。

2) DNA蛋白

毒素及び第2蛋白分離の過程における Z.E.P. は、そ
 のままDNA蛋白を単離する方法である。即ち、Z.E.P.
 後、Diphenylamine 反応陽性部分を Pool して沈降分析
 を行うと単一の Peak を示す（図5）。

図 4 第2蛋白の物理的性状

沈 降 図

試料濃度 2%, pH 7.1_{M/15} phosphate buffer
 (59,000r.p.m., 8 分間隔)

電 気 泳 動 図

試料濃度 0.8%
 phosphate buffer
 イオン強度=0.16
 8 mA
 15~16°C

図 5 DNA 蛋白沈降図

(59,000r.p.m.) (8 分間隔) 5.3 S

本分画は、蛋白とDNAの反応のみ陽性であり、Z.E.
 P. よりの溶出による 磷酸塩の存在下に凍結乾燥した際
 には、ほぼ乾燥前と同様にとけるが、透析後の凍結乾燥
 においては、水への溶け方が、著しく悪くなる。

又、図7に示す如く別記の条件では、抗菌家兎血清と
 の間に沈降反応を示さない。

尚, このものを分析して, それがDNA蛋白であることの証明をする予定である。

3) RNA蛋白

毒素を分離するための190,000 g 120分遠心沈澱物について Z.E.P. を行くと, 毒素, 第2蛋白と, DNA蛋白との中間部に比較的広く Orcinol 反応強陽性と Amido black 染色とを示す RNA蛋白の分布を見る(図6A)。

図6(A) 190,000g 120分遠心沈澱物の Z. E. P.

(一) 原点

(B) 同上 RNA 蛋白分画沈降図

(59,000r.p.m. 8分間隔)

1: 14.6 S 2: 24.0 S

この部分は Fuchsin 染色でも明らかにその存在を示し Amido black 10B で淡染する。但し, 陽極方向への先進部分には, 時に Amido black 染色性を伴わずに, Orcinol のみ陽性の部分も認められる(蛋白と離れた RNA ?)。

この RNA 蛋白分画を溶出した試料の沈降分析は, 図6Bの如く, 著しく Peak が低い, 14.6 S 及び 24.0 S の2成分を認め, しかもこの2成分は, 図1に示した D.E. の Peak に相当すると思われる。

この2成分は, 湿菌 200mg/ml より抽出した出発材料の沈降分析からは見ることが出来るが, それよりも菌濃度の低い (100 mg/ml) 時には沈降分析的に証明することは困難となる。

又, Z.E.P. においても, 100mg/ml の菌濃度より得た出発材料をそのまま試料とした時には, RNA 蛋白の分布を明確に見ることは困難であるが, この試料を 190,000 g 120 分の遠心により濃縮した時始めてその所在を示すことが出来る。この事は RNA が操作途中においても急速に崩壊しつつあることを考えさせる。この分画も, DNA 蛋白同様抗菌家兎血清との間に何らの反応

を示さない。RNA 蛋白の純化にはなお遠いが, この部分が RNA 蛋白に相当することは確実である。

4) 凝集原

出発材料の Z.E.P. を行い, その 1 cm 毎の各分画の溶出液 (4 ml) の水で溶出し, 1.7% 食塩水で 2 倍稀釈した) について抗菌家兎血清との間に沈降反応を行うと原点 (Frac. 30) 及び毒素の Peak に相当する部分 (Frac. 25) に最高値を示す (図7)。

図7 出発材料 Z.E.P. 各分画の沈降反応

そこで, Frac. 30 及び 25 の各々をもつて抗菌免疫血清を吸収し, その吸収血清について夫々の抗原で沈降反応を行い, 同時に菌凝集価を測定すると表2の如き成績を示す。

即ち, Frac. 25 及び 30 の抽出液の窒素量を同じく 0.048 mg/ml に調製し, 夫々の 1 容を 20 倍稀釈抗菌血清の 2 容に混和して 37°C 2 時間放置し, 生じた沈降物を除いて再び抗原を加え, ほぼ沈降の生じなくなるまでこれを繰り返した (原血清 1 ml 当り抗原窒素 4.2mg を要した。)

この吸収血清の最終稀釈は 90 倍である。

表2に示す如く, この吸収血清と吸収に用いた抗原との沈降反応は, ほとんど陰性であるが, 吸収に用いた抗原と沈降反応に用いた抗原とが異なる場合は, 対照の価とほぼ等しい価を示した。

このことから, 原点物質 (Frac. 30 Cell wall を含む) と Frac. 25 の物質 (毒素) とは免疫学的に異なることが考えられる。一方, 菌凝集価は Frac. 30 で吸収した血清においてのみ, 原凝集価 11,520 倍から 720 倍に低下したが, Frac. 25 (毒素) で吸収した時は凝集価が低下しない。このことも, Frac. 25 と原点物質が異なる証拠となるばかりでなく, この条件で泳動した場合は凝集素吸収能は主として原点にのみ存在することを示している。

原点分画抽出液は, 常に混濁し, 泡を生じ易い。biuret 反応, Molisch 反応ともに陽性, T.C.A. でよく沈澱を生ずる。direct chromogen test では青色を呈し, 核酸反

第2表 Frac. 25 および Frac. 30 の血清学的区別

吸 収 原	血清希釈	×90	×180	×360	×720	×1440	×2880	×5760	×11520
	抗原								
対 照 (未 吸 収)	Frac. 30	++	++	++	+	+	±	—	—
	Frac. 25	++	++	++	+	—	—	—	—
Frac. 30 0.048 mgN/ml	Frac. 30	+	±	—	—	—	—	—	—
	Frac. 25	+	+	+	+	—	—	—	—
Frac. 25 0.048 mgN/ml	Frac. 30	+	+	+	+	±	—	—	—
	Frac. 25	+	±	—	—	—	—	—	—

(37°C, 3 時間判定)

Frac. 25 および Frac. 30 の凝集素吸収試験

吸 収 原	血清希釈	×90	×180	×360	×720	×1440	×2880	×5760	×11520
対 照		+++	++	++	++	++	+	+	+
Frac. 30 0.048 mgN/ml		++	++	+	+	—	—	—	—
Frac. 25 0.048 mgN/ml		++	++	++	++	++	+	+	+

(37°C, 3 時間判定)

応は陰性である。

Pool した原点分画抽出液を 9,000 g 50 分遠心して上清と沈澱とに分ち、この各々について凝集素吸収試験を行うと、沈澱の方に強い吸収能を認めた。又、上清に 5 % T.C.A. を加えれば沈澱を生じこの沈澱を分ち、更にその上清に 7 倍量 acetone を加えれば、再び沈澱を生ずる。

ここに得られた T.C.A. 沈澱は Biuret 反応陽性、Molisch 反応微弱、抗菌血清とはわずかに反応し菌体蛋白であることは明らかであり、更に acetone 沈澱は Molisch 反応のみ陽性で沈降反応は認めないが、多糖体であろうと思われる。

原点抽出液の 9,000 g 50 分の遠心沈澱物は灰白色を呈

し、水を加えると混濁した浮游液となる。このものは水不溶性成分であり、電子顕微鏡により、形態的には破碎した細胞膜と考えられる (図 8)。即ち 原点には少量の菌体蛋白と多糖体とが残存するが、その大部分は破碎した菌膜と考えられる。

考 察

1) 第2蛋白

従来、百日咳菌々体成分研究において、ムチン様物質なる名称が Pillemer⁷⁾等によつて用いられ、その後、広く慣用されている。これは菌体成分を分画した際、還元物質を多く含んだ粘液性の蛋白分画を得ることから、これを糖蛋白体と看做して、この名称を用いたものと考えられる (氷室等⁸⁾の実験によると、ムチン様物質の収量は、凍結融解抽出物の 50% を占め、この物質は 29.8% の還元物質を含む)。

吾々も、本研究の初期において、出発材料の沈降図に見られる A 成分 (図 1) をムチン様物質に擬したことがある。その理由は、主として含有量の大きなこと (沈降図よりの概算では抽出物の 50% に近い) に基いたものであつたが、その後、研究の進むに従い実験成績に述べた如く、A 成分の窒素量は、12.3% であるが、還元物質を殆んど含まず、ムチン様物質と考えることは誤りであると考えられる。但し、この所見は培養の方法又は継代数などによつても異なることがあるかも知れない。

又、direct chromogen test において、反応の初期に淡

図 8 原点分画電子顕微鏡像

(×25,000 P_T-P_A Shadowing)

紅色を呈し, Sialic acid の反応⁹⁾と誤認しやすいが, この紅色は, 反応の進むにつれて青色に変わり, Sialic acid とは異なっている。この direct chromogen test で青色を呈することは, tryptophan 及び tryptophan 含有物にも見られ, 糖蛋白体であることの証拠にはなりがたい。以上の成績から, 本物質も毒素以外の蛋白成分との意味から第2蛋白と称することとした。

この第2蛋白のマウス毒性は, 実験にも述べた如く $LD_{50}=18.66\text{mg/kg}$, 径10mm の家兎皮内反応を起すに0.018 mg を要するが, このマウス毒性がこの物質固有の毒性か, 或いは, 沈降分析では検出不可能な微量の出血壊死毒の混入によるものかは不明であるが, 現在, 得られている成績では, 190,000 g 120 分の遠心をくり返すことによりこのものの出血毒性は低下するのに反し, マウス致死毒性は, ある程度以下には低下しない点から見て, 十分, 第2蛋白自体のマウス致死毒性を予想することが出来るが, このものはその遠心速度から見て出血壊死毒 (Gundel 毒素) とは全く別のものであろう。又今のところ, このものの抗原性は低く分子量も小さいものとする。

Z.E.P., 沈降分析等において, この物質と類似の態度を示すものは, E. coli, S. enteritidis 等の音波抽出物中にも見出され, direct chromogen test においても同様に青色を呈する。このことは, 分子量の類似する物質が細菌体構成蛋白として広く存在することを想像せしめる。

2) DNA蛋白及びRNA蛋白

従来, 毒素或いは凝集原の分離に際し, 核酸が混入して, しばしばその成績を混乱せしめたが, Z.E.P.による分画法では, これらが相互に混入することなく極めて確実に各成分を分離することが出来る。

実験において述べた如く, ここに得られたDNA蛋白, RNA蛋白は, 沈降分析ではともにほぼ単一であると考えられるが, そのことの化学的証明は未だ行っていない。ただ, 物理的に見ると, DNA蛋白は菌体を破壊する際の音波振盪により, その長い線維状の形態が切れ切れとなるためか, 凍結融解や Mickle 装置による場合に比し, その遠心像が著しく異なっていることが認められる。

又, RNA蛋白は, 沈降速度を異にする2つ又は3つの巨大分子の状態にあるが, Z.E.P. 終了後, 氷室内に数日間保存するのみで容易に低分子化し, 沈降分析による Peak は消失する。このことは, 一般に知られている RNA蛋白の性状と一致する。

Schachman 等^{1,2)}は微量の MgSO_4 , CaCl_2 等の存在の下に, 低分子化されたRNA蛋白を再結合させる試みを報告しているが, 百日咳菌においても追試する価値があるものと考ええる。

Parfentjev 等^{10,11)}はマウス, モルモット等に対する百日咳菌による過敏症の実験において, 菌体成分中特に核蛋白分画が, Shocking fraction として作用すると報告し, その抗原性についても述べているが, 彼等の用いた核蛋白は, その抽出法からも推察される如く, 多量の単純蛋白を混入しているものと考えられ, 従って, その成績についても問題が残る。

吾々の行った実験では, 核蛋白部分に免疫学的意義を見出すことは出来なかつた。

3) 凝集原

図7に示した如く, 出発材料の Z.E.P. による分画において抗菌血清との間に沈降反応を示すのは, 毒素, 第2蛋白及び原点部分のみであり, 更に原点分画は, 凝集素吸収能をも有する。すでに述べた如く, 原点分画は, 常に混濁して居りこの混濁の本態は細胞膜破片と考えられ, 凝集素吸収能は, この部分に強い。Cumius¹²⁾によれば, ジフテリア菌の凝集原は細胞膜にあると報告されているが, 一般に, 凝集原が, 菌体表面にあることは推察出来ることであり, 百日咳菌においても, 細胞膜と緊密な関係にあるものとも考えられる。

この考え方は, Guérault¹³⁾等が凝集原は, 菌体表在成分であろうと推論したこととも一致する。

然るに, 音波振盪, 磨砕洗滌等を繰り返しつつ, Victoria blue 染色を指標として細胞膜の精製を進めると, その凝集素吸収能は次第に低下し, ついには全く失われる (未発表)。

この事実は, Smolens¹⁴⁾等の凝集原抽出法と共に, 一見前述の推察を否定するが如くに見られるが, 必ずしも矛盾とのみは言えず, 細胞膜の定義の問題と共に将来解明されるべき課題と考えられる。

結 論

毒素を分離する時と全く同様の方法を用いて, 第2蛋白, DNA蛋白, RNA蛋白, 原点物質等を分離した。このうち, 原点物質は, 不純なる細胞膜であり, 凝集原としての作用を有し, 第2蛋白は低い抗原性を有するがDNA蛋白, RNA蛋白は, 共に, 生物学的の意味以外に, 免疫学的には意義が低いものと考えられる。

文 献

- 1) Schachman, H. K. 外: Arch. Biochem. Bioph., **38**, 245, 1952.
- 2) Chao, Fu Chuan, 外: Arch. Biochem. Bioph., **61**, 220, 1956.
- 3) Chao, Fu Chuan 外: Arch. Biochem. Bioph., **70**, 426, 1957.
- 4) 黒屋: 伝研集談会報告, 昭和19年(1944) 9 月.
- 5) Henry. H. : Nature, **151**, 671, 1943.
- 6) Umbreit, W. W. 外: J. Bact., **47**, 415, 1944
- 7) Umbreit, W. W. 外: J. Bact., **48**, 567, 1944.
- 8) Pillemer, L. 外: Science, **108**, 311, 1948.
- 9) 氷室・外: 日細誌, **10**, 987, 1955.
- 10) Werner, I. 外: Acta, Soc. Med. Upsal., L VII, 230, 1952.
- 11) Parfentjev, I. A. 外: J. Bac., **53**, 603, 1947.
- 12) Parfentjev, I. A. 外; J. Bact., **53**, 613, 1947.
- 13) Cumius, C. S. 外: Britsch J. Exp. Path., **35**, 166, 1954.
- 14) Gúerault, A. 外: Nature, **181**, (462), 122, 1958.
- 15) Smolens, J. 外: J. Imm., **47**, 155, 1943.