志賀赤痢菌から得られた異性ヒト血球抗原性を示すオリゴ糖について

巨 智 部 直 久, 古 川 研

群馬大学医学部法医学教室 (主任: 井関尚栄教授)

Eisler^{1), 2)}は志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*) 免疫ヤギ血清中にヒト血球に対する凝集素が存在することを見出し、志賀赤痢菌とヒト血球との間に共通の抗原物質があるとして異性人血球抗原と名付けた。また、S型の志賀赤痢菌の菌体抗原多糖体にはグルコサミン、ガラクトース、ラムノースおよび少量のグルコースとアルドヘプトースが含まれているが、R型になるとラムノースが欠如することが知られている^{3), 4)}。

Iseki ら⁵⁾ および佐伯⁶⁾ は志賀赤痢菌免疫トリ血清中のヒト血球凝集素とヒトO型血球との凝集反応がD-ガラクトースで阻止され、またその血清中のヒト唾液沈降素とO分泌型唾液との沈降反応がD-ガラクトースとラクトースで阻止されることを見出した。次いで、志賀赤痢菌と共通の抗原性を示す分泌型ヒト胃粘膜の水溶性型物質に *Bacillus cereus* のH分解酵素を作用されると、ウナギ抗H抗体に対する阻止力とともに抗志賀赤痢菌血清に対する阻止力も破壊されることが報告され⁷⁾、その際にウナギ抗体に対するH決定基であるフコースとともにガラクトースをも遊離することが認められた^{8), 9)}。これらのことから、ヒト血液型物質に存在するβ-D-ガラクトシル基が志賀赤痢菌との共通抗原に関連があると予想されるようになった。

今回、我々は志賀赤痢菌のリボ多糖体から異性ヒト血球抗原性を示すオリゴ糖を分離し、その構造を追求し、またその結果から抗志賀赤痢菌血清中の異性抗体の示す特異性に関して考察したので報告する。

材料および方法

1. 菌株: *Shigella dysenteriae* (志賀赤痢菌) のS型株をもちいた。この株は東京都衛生研究所から分与されたものである。

2. リボ多糖体の抽出と純化: 普通寒天平板上に一夜37℃で培養した菌体を集め、エタノール次いでエーテルで洗って乾燥菌体を得た。リボ多糖体は45%フェノール法で抽出し、超遠心分離(105,000×g, 2時間)によって沈降する画分を得た。このものにはいまだか

りの量の核酸が混在していたので、RNaseを加えてRNAを消化した後、再び超遠心分離を繰返した。その結果、260 mμにおける吸収が認められないリボ多糖体標品を得ることができた。

3. オリゴ糖の分離: 0.5%のリボ多糖体の0.1N硫酸溶液を20分間100℃で加熱し、水酸化バリウムで中和後、水解産物を再蒸留水に対して透析した。この透析外液を減圧濃縮して低分子分解物を得た。これをブタノール:ピリジン:水(6/4/3, solvent I)を展開剤としたペーパークロマトグラフィーを行なうとラムノース、ガラクトースおよび少量のグルコースとグルコサミンの他に二糖および三または四糖と考えられるオリゴ糖が検出された。これらのオリゴ糖はsolvent I, 酢酸エチル:ピリジン:酢酸:水(5/5/1/3, solvent II) およびブタノール:酢酸:水(2/1/1, solvent III)を交互にもちいたペーパークロマトグラフィーで分離し、最後に0.1Mホウ酸緩衝液(pH10.0)による濾紙電気泳動(1500 V, 2時間)によって純化した。

またリボ多糖体の水解産物を solvent I で展開したクロマトグラム上で、ガラクトースに相当する位置から溶出したものには、ガラクトースの他にオリゴ糖も含まれており、これは濾紙電気泳動によって分離された。

4. 抗血清: 抗志賀赤痢菌免疫トリ血清をヒト血球凝集素としてもちいた。ヒトO型血球に対する凝集素価は1:1024であった。

5. 加水分解酵素: α-D-ガラクトシダーゼはコーヒー豆から抽出純化し¹¹⁾、β-D-ガラクトシダーゼ活性の認められないものを用いた。β-D-ガラクトシダーゼはエムルシンから Hestrin ら¹²⁾の方法で抽出純化し、α-D-ガラクトシダーゼ活性のないものを用いた。このものにはβ-D-グルコシダーゼとβ-N-Aセチルグルコサミニダーゼ活性が認められた。

6. ガスクロマトグラフィー: 糖誘導体のガスクロマトグラフィーは日立F6Dを用いて行なった。糖ア

ルコールのアセチル化物には 3% ECNSS-M, メチルグリコシドの trimethyl silyl (TMS) 化物には 10% S E-30, メチル化糖には 5% polyneopentyl glycol succinate (NPGS) をそれぞれ充填剤として用いた。

7. 人乳オリゴ糖：人乳のオリゴ糖は初乳から Kobata and Ginsburg の方法¹³⁾ で分離、純化した。夫々のオリゴ糖は Dr. kobata から分与された標準サンプルと比較しながら、Rf 値、構成糖および免疫学的活性をしらべて同定した。

実験結果

1. オリゴ糖の構成：分離されたオリゴ糖のペーパークロマトグラフィーにおける移動度、およびそれぞれの構成糖のモル比を表 1 に示した。構成糖は、オリゴ糖を 1 N 硫酸中で 100℃, 6 時間加水分解したものを solvent I を用いたペーパークロマトグラフィーで検出同定した。またその水解産物を NaBH₄ で還元した後、無水酢酸-ピリジン混液 (1:1) で O-アセチル化したものをガスクロマトグラフィーで分析してモル比を求めた¹⁴⁾。表 1 に掲げたものの他に 2 種のオリゴ糖と考えられる還元性物質も分離されたが、酸加水分解の後、上述の如く構成糖をしらべた結果、アルドヘプトースから成るものと考えられたので以下の実験には供しなかった。また sh-3 と sh-12 は微量であった為、それらの構造分析は酵素処理をするに止めた。

2. オリゴ糖 sh-2 の構造：sh-2 を 2% NaBH₄ で還元した後、1 N 塩酸メタノール中でメタノリシスして生じた産物を Yamakawa ら¹⁵⁾ の方法で TMS 化した。これをガスクロマトグラフィーで分析すると methylgalactoside と galactitol とが等モル存在することがわかったので、sh-2 は Gal-Gal なる二糖類であると考えられた。

表 1 オリゴ糖の移動度と構成糖

オリゴ糖	Rglc 値			構成糖		
	Solvent I	II	III	Rha	Gal	Glc
sh-12	0.23	0.39	0.33	2	2	0
sh-2	0.56	0.59	0.63	0	2	0
sh-3	0.85	0.90	0.91	1	1	(0.3)

非還元性のガラクトースの結合位置は次のようにして決定した。a). アルカリ分解：Barker ら¹⁶⁾ の方法に基づいて sh-2 を 0.04 N Ba(OH)₂ 中で室温 24 時間処理した。この反応液について Warren¹⁷⁾ および Aminoff¹⁸⁾ の方法に従って thiobarbituric acid による saccharinic acid の定量を行なったが、いずれの方法によっても呈色反応は認められなかった。この結果は、sh-2 のアルカリ分解によっては iso- および metasaccharinic acid が生成しないことを示し、1→3 および 1→4 結合は否定された¹⁹⁾。b). IO₄ 酸化：

sh-2 を 0.025 M の NaIO₄ 中で 4℃, 24 時間酸化後、chromotopic acid による formaldehyde の定量を行なったところ、オリゴ糖 1 モル当り 0.8 モルの formaldehyde が生成したことがわかった。また、sh-2 を NaBH₄ で還元した後、同一条件で IO₄ 酸化すると生成した formaldehyde 量は無処理の sh-2 の場合と変りなかった。このことから 1→6 結合は否定され、また C-2 の水酸基が置換されていることが示唆された。c). メチル化糖のガスクロマトグラフィー：Hakomori の方法²⁰⁾ で sh-2 を完全メチル化した後、1 N 塩酸メタノール中で加熱しメチルグリコシドを得た。これをガスクロマトグラフィーで分析したところ、図 1 に示した如く methyl-3, 4, 6-trimethylgalactoside と methyl-2, 3, 4, 6-tetramethylgalactoside とが認められた。以上の結果を総合して sh-2 のガラクトースの結合は 1→2 結合であるとすることができた。

3. オリゴ糖の酵素分解：sh-2 に対して β-ガラクトシダーゼと α-ガラクトシダーゼを個々に作用させると、前者によって水解が起り単糖のガラクトースが生じた。このことから sh-2 の非還元性ガラクトースは β-結合していると考えられた。また sh-3 と sh-12 にも β-ガラクトシダーゼは作用してそれぞれガラクトースとラムノース、ガラクトースと新たなオリゴ糖を生じた。

4. オリゴ糖の免疫学的活性：既知の単糖とオリゴ糖および分離されたオリゴ糖による免疫学的活性は、抗志賀赤痢菌血清とヒト O 型血球との凝集反応阻止試験でしらべた。その結果は表 2 に示した如くである。sh-12 と sh-2 とはそれぞれ乳糖にくらべて 10 倍、4 倍の阻止活性を示しているの、これらは志賀赤痢菌の異性ヒト血球抗原物質の特異性決定部分に由来したものであるのではないかと考えられる。

志賀赤痢菌から得られた異性ヒト血球抗原性を示すオリゴ糖について

図1 メチル化オリゴ糖のメタノリシス産物のガスクロマトグラフィー

- A 2'-フコシルラクトース
B sh-2
C ラクト-N-テトラオース

分析条件：5% NPGS のステンレスカラム，2 M. 温度プログラム：150℃～200℃，5℃/min キャリヤーガス：N₂ 10 kg/cm².

同定されたピーク：

- a, b : methyl-2,3,4,6-tetramethylgalactoside
c : methyl-2,3,6-trimethylglucoside
d : methyl-2,4,6-trimethylgalactoside
e : methyl-3,4,6-trimethylgalactoside と methyl-2,4,6-trimethylgalactoside の合成ピーク
f : methyl-3,4,6-trimethylgalactoside

表2 単糖およびオリゴ糖の凝集
阻止活性 ($\mu\text{g}/1.0\text{ml}$)

糖 類	阻止に必要な最少濃度
sh-12	313
sh-2	625
(人乳オリゴ糖)	
lacto- <i>N</i> -fucopentaose I	313
2'-fucosyllactose	625
lacto- <i>N</i> -tetraose	3215
(既知単, 二糖)	
lactose	3215
melibiose	6250
galactose	6250
fucose	25000
glucose	50000

考 察

抗志賀赤痢菌トリ血清中のヒト血球抗体とヒトO型血球との凝集反応がD-ガラクトースで阻止されることから、志賀赤痢菌のヒト血球抗原物質の決定群にガラクトースが存在することは早くから予想されていた。そしてこの抗体に対してH活性を示す血液型物質ではガラクトシル基が重要な役割を担っていると考えられた。ヒト血液型物質のH決定群の構造は

D-GlcNAc-または

D-GlcNAc-とされている²¹⁾。従って、ヒト血液型

物質の糖鎖構造で志賀赤痢菌のヒト血球抗原物質と共通の抗原性を示す部分は、*N*-アセチルグルコサミンに結合した β -ガラクトシル基ではないかと予想されていた²²⁾。しかし最近、ヒト血液型物質からフコースを含みH活性のあるオリゴ糖を分離し、これを *Bacillus fulminans* から得られた α -(1 $\rightarrow$ 2)-フコシダーゼで処理してフコースを失ったオリゴ糖を回収し、その免疫学的活性をしらべたところウナギ抗H抗体に対する阻止力を失うとともに、抗志賀赤痢菌血清中のヒト血球抗体に対する阻止力も減弱していることが認められた²³⁾。またヒト血液型物質と共通の糖鎖構造をもった lacto-*N*-tetraose (β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-D- β -Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc)

の阻止活性が単糖のD-ガラクトースや二糖類のラクトースと同程度しかないことが知られてきた。(表2参照)。そこでヒト血液型物質を構成する β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-または β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-の構造は、志賀赤痢菌のヒト血球抗原決定群の構造を直接には反映していないのではないかという疑問が生じてきた。

この点を明らかにする目的で、志賀赤痢菌の抗原多糖体から抗原活性を有するオリゴ糖を分離し、その構造を明らかにすることが試みられた。今回の実験で得られたオリゴ糖のうち、sh-2の構造はアルカリ分解、過沃素酸化、メチル化糖のガスクロマトグラフィーおよび酵素処理の結果から β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Galと考えられる。この糖の阻止活性はD-ガラクトースやラクトースにくらべて表2に示した如く(625 $\mu\text{g}/\text{ml}$)4~5倍であることから、ヒト血球と共通の抗原性を示すもののうち重要なものと考えて差支えないと思われる。ヒトA、およびB型物質の決定群から得られる二糖類の抗Aおよび抗B抗体に対する凝集阻止活性が、それぞれ625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ²⁴⁾、1,250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ²⁵⁾であることから支持されよう。またsh-12はガラクトースとラムノースのそれぞれ2分子から成る四糖類と考えられる。この糖はsh-2にくらべて2倍強い阻止活性を示しているので、やはり抗原決定群に由来したものであって、 β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Gal-(Rha, Rha)なる構造のものと推定される。

ヒトH決定群に存在する α -L-フコシル基は6-デオキシガラクトースのL型異性体であり、立体配置は β -D-ガラクトシル基に一致する。 α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Galと β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Galの立体模型を組んでみると、いずれの場合にも置換基のC-2のOH基と還元基のC-3のOH基とが近接する状態にあることが認められた。抗志賀赤痢菌血清中のヒト血球抗体の特異性がこのことに直接関係しているとは断定し難いが、ピラノース環のC-2に置換したガラクトピラノースに対する特異性が高いことは容易に考えられる。この抗体が α -1 $\rightarrow$ 4結合したフコースを持ち、Le^a活性を示すオリゴ糖とは反応しない²³⁾こと、また表2に示した如く、lacto-*N*-fucopentaose I (α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc)が高い阻止活性を示すのに対して末端のフコシル基を失った lacto-*N*-tetraose ではその活性が

1/10 に低下することからみても、ガラクトースの異性体であるフコースが α -(1→2)結合することによって抗原活性が強められると考えて良いと思われる。

要 約

S型志賀赤痢菌のリボ多糖体を弱酸水解し、その水解産物からヒト血球抗原性のあるオリゴ糖を分離した。オリゴ糖sh-2はガラクトースの二糖類で、アルカリ分解、過沃素酸々化、メチル化およびグリコシダーゼ処理の結果からその構造は β -D-Gal-(1→2)-D-Galと推定された。またsh-12はガラクトースとラムノースの2分子ずつから成る四糖類と考えられ、その高いヒト血球抗原性と酵素処理の結果から β -D-Gal-(1→2)-D-Gal-(Rha, Rha)と推定された。以上の結果およびヒト初乳のオリゴ糖による凝集阻止試験の結果にもとづいて、抗志賀赤痢菌血清中のヒト血球抗体の示す特異性について考察を試みた。

文 献

- 1) Eisler, M.: Ueber ein gemeinsames Antigen in den Zellen des Menschen und in Shigabazillen. Z. f. Immunitätf., 67(1/2): 38-48, 1930.
- 2) Eisler, M.: Weitere Untersuchungen über das Menschenblutantigen in Shigabakterien und sein Verhältnis zu deren Forssman-Antigen. Z. f. Immunitätf., 70(1/2): 48-57, 1931.
- 3) Davies, D.A.L., Morgan, W.T.J. and Record, B.R.: Studies in immunochemistry. 15. The specific polysaccharide of the dominant 'O' somatic antigen of *Shigella dysenteriae*. Biochem. J., 60(2): 290-303, 1955.
- 4) Davies, D.A.L.: Isolation of a "Rough" somatic antigen from *Shigella dysenteriae*. Biochim. Biophys. Acta, 26(1): 151-158, 1957.
- 5) Iseki, S., Saeki, N. and Furukawa, K.: Immunochemical studies on bacterial blood group substances. I. Absorption of the blood group specific antibodies in bacterial antisera by simple sugars. Japan. J. Microbiol., 3(4): 455-459, 1959.
- 6) 佐伯直道: 細菌の血液型物質の免疫化学的研究. 北関東医学, 9(5): 952-972, 1959.
- 7) 古川研, 茂木治, 井関尚栄: 型物質分解酵素の研究, 13報, 新しいO(H)物質分解酵素の血清学的作用. 医学と生物学, 57(5): 184-188, 1960.
- 8) 山本茂, 古川研: 型物質分解酵素の研究. 14報. *Bac. cereus* の出すO(H)物質分解酵素の化学的作用. 医学と生物学, 62(3): 53-58, 1962.
- 9) 山本茂, 古川研: O(H)物質分解酵素の化学的作用について, 北関東医学, 12(1): 60-67, 1962.
- 10) Westphal, O., Lüderitz, O. und Bister, F.: Über die extraktion von Bakterien mit phenol / Wasser. Z. Naturforschg., 76: 148-155, 1952.
- 11) Courtois, J.E. and Petek, F.: Methods in Enzymology, Vol. VIII. Academic Press, 1966, p565-571.
- 12) Hestrin, S., Feingold, D.S. and Schramm, M.: Methods in Enzymology, Vol. I. Academic press, 1955, p231-240.
- 13) Kobata, A. and Ginsburg, V.: Oligosaccharides of human milk. I. Isolation and characterization. Arch. Biochem. Biophys., 130(1-2): 509-513, 1969.
- 14) Kim, J.H., Shome, B., Liao, J-H. and Pierce, J.G.: Analysis of neutral sugars by gas-liquid chromatography of alditol acetates: Application to thyrotropic hormone and other glycoproteins. Anal. Biochem., 20(2): 258-274, 1967.
- 15) Yamakawa, T., Ueta, N. and Ishizuka, I.: Notes on the gas-chromatography of trimethylsilylated monosaccharides. Japan. J. Expt. Med., 34: 231-240, 1964.
- 16) Barker, S.A., Law, A.R., Somers, P.J. and Stacey, M.: Linkage analysis of carbohydrates by using saccharinic acid formation. Carbohydr. Res., 3(4): 435-444, 1967.
- 17) Warren, L.: The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem., 234(8): 1971-1974, 1959.
- 18) Aminoff, D.: Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem. J., 31: 384-391, 1961.
- 19) Whistler, R.L. and BeMiller, J.N.: Alkaline degradation of polysaccharides. Adv. Carbo-

- hyd. Chem., 13 : 289-329, 1958.
- 20) Hakomori, S.: A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethylsulfoxide. J. Biochem., 55(2): 205-207, 1964.
- 21) Rege, V.P., Painter, T.J., Watkins, W.M. and Morgan, W.T.J. : Isolation of serologically active fucose-containing oligosaccharides from human blood-group H substance. Nature, 203-(4943): 360-363, 1964.
- 22) 井関尚栄： 血液型の転換に関する研究. 人類遺伝学雑誌, 73(2) : 85-99, 1968.
- 23) 山本治子： トリエチルアミン処理によって得られた水溶性型物質の少糖類に対する分解酵素の作用について. 北関東医学, 19(6) : 575-600, 1969.
- 24) Morgan, W.T.J.: Ciba foundation symposium on the chemistry and biology of mucopolysaccharides. J.&A. Churchill, 1958, p200-215.
- 25) Watkins, W.M., and Morgan, W.T.J. : Further observations on the inhibition of blood-group specific serological reactions by simple sugars of known structure. Vox Sang., 7(2): 129-150, 1962.

OLIGOSACCHARIDES SHOWING HETEROPHILE HUMAN RED
CELL ANTIGENICITY OBTAINED FROM *SHIGELLA DYSENTERIAE*

NAOHISA KOCHIBE and KEN FURUKAWA

Department of Legal Medicine
School of Medicine
Gunma University
Maebashi, Gunma, Japan
(Director: Prof. Shoei Iseki)

Oligosaccharides showing heterophile red cell antigenicity were isolated from the partial hydrolysate of purified lipopolysaccharide of S-form *Shigella dysenteriae*. An oligosaccharide sh-2 was disaccharide composed of galactose. The results of alkaline degradation, periodate oxidation, gaschromatographic analysis of permethylated substance and enzymatic treatment indicated that the structure of sh-2 was probably β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Gal. Another oligosaccharide sh-12 was a tetrasaccharide containing galactose and rhamnose in a molar ratio of 1:1. The probable structure of sh-12 was β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Gal-(Rha,Rha) from the results of enzymatic degradation and its high immunological activity.

The structural relationship between human blood group substance and the heterophile antigen of *Shigella dysenteriae* was discussed on the immunological specificity of human red cell antibody present in anti- *Shigella dysenteriae* immune chicken serum.