UDC 576.852.23.097.2 : 612.396.21.015

191. 赤塚謙一：菌体外毒素の N-グルクロナイド生成に関する研究 その 2^{*1}

ジフテリア毒素におよぼすグルクロン酸の影響

Kenichi Akatsuka : Studies on N-Glucuronide Formation in Bacterial
Exotoxin. (2). Influence of Glucuronic Acid
on Diphtheria Exotoxin *in vitro*.

(Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.^{*2})

Effect of glucuronic acid on the toxicity and antigenity of diphtheria toxin *in vitro* was examined and its reaction mechanism was considered. Toxicity of this toxin weakened or disappeared easily on treatment with glucuronic acid but not its antigenity. Consequently, this change is not accompanied by marked degeneration of the protein and may be termed as the formation of a toxoid. The weakening or loss of toxicity by glucuronic acid treatment is not recovered by dialysis to remove excess glucuronic acid so that the change cannot be considered as the formation of a mere mixture or a salt, the product being a comparatively stable substance. Since the toxicity and antigenity of diphtheria toxin are lost by its treatment with 2,4-dinitrofluorobenzene, free amino acid is thought to take part in the toxicity and antigenity of this toxin. It was found by treatment with dinitrofluorobenzene to form dinitrophenylamino acid that ϵ -position in lysine had a free amino group. Therefore, weakening and disappearance of toxicity of this toxin by treatment with glucuronic acid is thought to be the result of reaction between glucuronic acid and free amino group in the toxin protein molecule, i.e. formation of N-glucuronide. Toxin free of toxicity by treatment with glucuronic acid was found to contain a definite quantity of glucuronic acid which could not be removed by salting out or dialysis.

(Received September 30, 1960)

ジフテリア毒素はホルマリンによつて抗原性を失うことなく容易に無毒化されトキシoidとして広く用いられているが、それ以外に各種のアルデヒド類、アスコルビン酸、ケテン、ペルオキシダーゼなどによつても無毒化されると報告されている¹⁻⁵⁾。

グルクロン酸のジフテリア毒素の毒性におよぼす影響については、すでに田村等⁶⁾が *in vitro* でグルクロン酸によるジフテリア毒素の無毒化を報告しているが、その機序はグルクロン酸の還元作用によるのではないかと推論している。

最近、山県等⁷⁾はグルクロン酸ナトリウムによるジフテリア毒素のトキシoid化を報告しているが、その反応機序については明らかでない。

著者は先に菌体外毒素の一つであるブドウ菌毒素の毒性におよぼすグルクロン酸の影響を検討し、グルクロン酸ナトリウムによつて溶血作用の減弱消失を認め、その機序は毒素蛋白の遊離アミノ基とグルクロン酸のアルデヒド基との化学的反應で、N-グルクロナイド生成に関係があるのではないかと示唆をうけた⁸⁾。そこでジフテリア毒素のグルクロン酸による無毒化(トキシoid化)についても同様の反応(N-グルクロナイド生成)が起こるのではないかと予想し、ジフテリア毒素を用いグルクロン酸ナトリウムによる影響を検索し、その反応機序を検討した。

^{*1} その 1 : 本誌 81, 908(1961).^{*2} Nihonbashi-honcho 3-chome, Chūō-ku, Tokyo.

1) A. M. Pappenheimer, Jr. : J. Biol. Chem. 125, 301(1938).

2) S. Schmidt : Biochem. Z. 256, 158(1932). 3) H. Goldie : Compt. rend. soc. biol. 125, 863(1937).

4) B. Ghash, et al. : Science and Culture 3, 243(1937).

5) K. Anger : J. Exptl. Med. 92, 237(1950).

6) 田村, 他 : 第 5 回グルクロン酸研究会報告集 p. 21(1959) グルクロン酸研究会, 東京.

7) 山県, 他 : 第 4, 5 回グルクロン酸研究会発表 (1958, 1959); 日本小児科学会雑誌 63, 2060(1959).

8) 赤塚, 他 : 第 80 回日本薬学会年会発表 (1960).

ジフテリア毒素におよぼすグルクロン酸ナトリウムの影響 ジフテリア粗毒素 (150 Lf/cc, DRM 10^{-8} /cc)^{*3} に等容量の 25%グルクロン酸ナトリウム (以下 GNa と略) ホウ酸緩衝液 (pH 7.2) を混合し, 37° に保温, 1 週間毎に DRM と Lf, Kf を測定し毒性と抗原性の変動を観察した. 別に対照として粗毒素と 0.8%ホルマリン (以下 F と略), ホウ酸緩衝液 (pH 7.2) の等量混合物ならびに粗毒素とホウ酸緩衝液 (pH 7.2) の等量混合物を同様に操作した. GNa 混液は時間の経過と共に液が酸性に傾く傾向があつたので, pH は毎日測定し, ほぼ pH 7.0~7.2 を保つよう必要に応じて *N* 水酸化ナトリウム水溶液で調整した.

DRM は F の場合には 2 週間後に全く消失するが, GNa では 3 週目に消失した. Lf は両者ともやや低下し, Kf は明らかに延長した. 対照では Lf, Kf, DRM に変化が認められない (Table I).

Table I. Influence of Sodium Glucuronate (GNa) on Crude Diphtheria Toxin

Concn. of GNa (%)	Period (week)	1	2	3
12.5	{ DRM/cc.	10^{-5}	10^{-8}	0
	{ Lf/cc.	75	75	60
	{ Kf (min.)	90	255	300
0.4	{ DRM/cc.	10^{-4}	0	0
	{ Lf/cc.	75	60	60
	{ Kf (min.)	90	180	180
Control	{ DRM/cc.	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}
	{ Lf/cc.	75	75	75
	{ Kf (min.)	40	40	40

註 混合直後はいずれも DRM 10^{-8} /cc, 75 Lf/cc, Kf 40 min.

グルクロン酸ナトリウムによる減毒速度と濃度との関係 ジフテリア粗毒素 (150 Lf/cc) に 25% GNa ホウ酸緩衝液 (pH 7.2) 等容量を混合し, それぞれ 0, 12, 22, 31, 37° に保存して前回と同様に操作し, 1, 2, 3 週目に DRM, Lf, Kf を測定した. 37° 処理の場合は DRM が 3 週目に消失しているが, 31, 22 および 12° の場合では DRM は減弱の傾向はあつたが 3 週間の観察ではなお毒性を示し, 処理温度の高いもの程減弱速度は速い傾向にあつた (Table II).

Table II. Influence of Temperature on Detoxication Rate of Diphtheria Toxin by Sodium Glucuronate

Temp (°C)	Period (week)	1	2	3
0	{ DRM/cc.	10^{-8}	10^{-6}	10^{-8}
	{ Lf/cc.	75	75	75
	{ Kf (min.)	40	50	50
12	{ DRM/cc.	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
	{ Lf/cc.	75	75	75
	{ Kf (min.)	40	50	60
22	{ DRM/cc.	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
	{ Lf/cc.	75	75	75
	{ Kf (min.)	50	60	180
31	{ DRM/cc.	10^{-5}	10^{-4}	10^{-2}
	{ Lf/cc.	75	75	75
	{ Kf (min.)	60	90	240
37	{ DRM/cc.	10^{-5}	10^{-8}	0
	{ Lf/cc.	75	75	60
	{ Kf (min.)	90	240	300
Control	{ DRM/cc.	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}
	{ Lf/cc.	75	75	75
	{ Kf (min.)	40	40	40

註 混合直後 DRM 10^{-8} /cc, 75 Lf/cc, Kf 40 min.

ジフテリア毒素におよぼすグルクロン酸アミドその他の薬物の影響 ジフテリア粗毒素を用い 1.2 M GNa あるいはグルクロン酸アミド (以下 Gad と略), ガラクトウロン酸ナトリウム (以下 GalNa と略), グルコン酸

^{*3} DRM (最少発赤量): 家兎背部に毒素希釈液を 0.1 cc ずつ皮内注射し, 48 hr 後に直径 1 cm 以上の発赤を認める最小毒素量 (希釈倍数). Lf: 抗毒素 1 単位に相当する毒素量 (フロクランシオンによつて調べる). フロクランシオン (flocculation, 絮状反応): 標準抗毒素血清 (10 単位/cc) を各段階量とり, 毒素の一定量を加え, 40° に保温するとき絮状沈殿を生ずるが, 抗毒素の単位と毒素の Lf が一致したものが最も早く沈殿を生ずる. Kf: フロクランシオンの際, 絮状沈殿を認めるまでの時間 (分).

ナトリウムのホウ酸緩衝液 (pH 7.2) で前記と同様に操作し DRM, Lf, Kf を測定した。DRM は GNa, Gad, GalNa などではいずれの場合でも 3 週目に消失したがグルコン酸ナトリウムでは対照と同様に DRM の減少が認められない。Lf はいずれも殆んど変動していない (Table III)。

Table III. Influence of Sodium Glucuronate (GNa) and Other Compounds on the Diphtheria Toxin

Compd.	Concn. (M)	Period (week)	1	2	3
GNa	0.6	{ DRM/cc.	10^{-5}	10^{-3}	0
		{ Lf/cc.	75	75	60
		{ Kf (min.)	90	255	300
Glucuronamide	0.6	{ DRM/cc.	10^{-5}	10^{-3}	0
		{ Lf/cc.	75	50	50
		{ Kf (min.)	180	300	360
Na-galacturonate	0.6	{ DRM/cc.	10^{-5}	10^{-3}	0
		{ Lf/cc.	75	60	50
		{ Kf (min.)	180	300	360
Na-gluconate	0.6	{ DRM/cc.	10^{-8}	10^{-8}	10^{-7}
		{ Lf/cc.	75	60	60
		{ Kf (min.)	40	50	50
Control (toxin)		{ DRM/cc.	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}
		{ Lf/cc.	75	75	75
		{ Kf (min.)	40	40	40

註 混合直後 DRM 10^{-8} /cc, 75 Lf/cc, Kf 40 min.

グルクロン酸ナトリウム処理物の透析 ジフテリア粗毒素 (150 Lf/cc) を前記と同様に 25% GNa 溶液で処理, 37° 3 週間後に DRM/cc が 0 になったものを大量のホウ酸緩衝液 (pH 7.2) を外液に用いてセロファン膜で氷室中 3 日間透析した。GNa 処理物は透析後 Lf はやや減少傾向 (透析前の Lf 総計 10 (cc) $\times$ 70 (Lf) = 700, 透析後の Lf 総計 14 (cc) $\times$ 45 (Lf) = 630) があるが殆んど差なく, また Kf の変動は認めない。DRM は透析によつてその復元は全く認められなかつた (Table IV)。

Table IV. Influence of Dialysis on the Sodium Glucuronate Treated Toxin

		GNa treated toxin	Control
Before treatment	Volume	10	10
	DRM/cc.	0	10^{-8}
	Lf/cc. Kf (min.)	70, 300	75, 40
After treatment	Volume	14	11
	DRM/cc.	0	10^{-7}
	Lf/cc. Kf (min.)	45, 300	60, 40

グルクロン酸ナトリウム処理物の電気泳動 精製毒素 (1000 Lf/mg N, 1000 Lf/cc) を前記と同様に 25% GNa ホウ酸緩衝液で処理後, 中性硫酸アンモニウム 70% 飽和で塩析を行ない, ペロナール緩衝液 (pH 8.6) で 2 日間透析後, Tiselius 電気泳動装置によつて泳動度を測定した。F 処理毒素および毒素を対照とした。GNa 処理毒素では F 処理毒素と同様に対照毒素とは明らかに易動度に差がみられた。

Fig. 6.
Electrophoretic Pattern of Sodium
Glucuronate Treated Toxin,
Formalin Treated Toxin
and Control

60 min. 5 mA, pH 8.6 (veronal buffer),
protein concn. 0.5%

グルクロン酸ナトリウム処理毒素中のグルクロン酸量 精製毒素 (1000 Lf/mg N, 1000 Lf/cc) を前回と同様に GNa 処理し, その 60 cc (400 Lf/cc, DRM 0/cc) を中性硫酸アンモニウム 70% 飽和によつて塩析を繰り返す。

返し, その間に遊離の DNFB を除き, 4 回目ならびに 7 回目の 2 回に Lf 当たりのグルクロン酸量を定量した. 操作は下記のようなのである. グルクロン酸はナフトレゾルシン法で定量し, 4 回塩析物では $0.051 \gamma/\text{Lf}$, 7 回塩析物では $0.045 \gamma/\text{Lf}$ と殆んど差はみられなかつた.

Salting Out of Sodium Glucuronate (GNa) Treated Toxin and
Quantitative Measurement of Glucuronic Acid

ジフテリア毒素におよぼす 2,4-ジニトロフロロベンゼンの影響 精製毒素 (1000 Lf/mg N, 125 Lf/cc, DRM $10^{-7}/\text{cc}$) を NaHCO_3 アルカリ性とし 2,4-dinitrofluorobenzene (以下 DNFB と略) 処理し, ついで Lf, DRM を測定した. また上記精製毒素を GNa あるいは F 処理 (前回と同様の操作により) し, いずれも 100 Lf/cc, DRM 0/cc となつたものを同様に DNFB 処理した. Table V のように DNFB 処理によつて毒素は Lf, DRM を, GNa および F 処理毒素は Lf を消失した (Table V).

Table V. Influence of 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) on Diphtheria Toxin and Sodium Glucuronate (GNa) or Formalin (F) Treated Toxin

Toxin	Control		DNFB treated	
	DRM/cc.	Lf/cc.	DRM/cc.	Lf/cc.
Toxin	10^{-7}	125	0	0
GNa treated toxin	0	100	0	0
F treated toxin	0	100	0	0

ジフテリア毒素の遊離アミノ基 精製毒素 (1800 Lf/mg N, 4000 Lf/cc) を Sanger 法によつて DNFB 処理した。その酸塩水解物 PPC をタルクカラムに注ぎ、吸着された黄色物質を塩酸エタノール混液で抽出した。減圧濃縮で残留した黄色油状物は塩酸酸性でエーテルに不溶であつた。そこでこのものは DNP-リシンあるいは DNP-アルギニンではなからうかと推定した。なおこれは浮紙クロマトゲラフィー (PPC) で R_f 0.47 (前記と同様に操作) に黄色スポットを示した。(対照に用いた 2,4-ジニトロフェノールは R_f 0.30 で塩酸噴霧で褪色)。また坂口反応は陰性 (DNP-アルギニンは陽性) であつた。つぎにニンヒドリン反応は陽性で、亜硝酸処理によつて塩酸酸性でエーテルを黄染し (水層無色)、 NaHCO_3 水溶液に転溶することから遊離アミノ基の存在を予測した。そこで前記黄色油状物をさらに DNFB 処理したところ、エーテルに溶け、PPC で R_f 0.05 (1.5 M リン酸緩衝液で展開) に黄色スポットを示した。なお、別に製した di-DNP-リシンは R_f 0.05, また水飽和ブタノール展開では両者とも R_f 0.71 であつた。すなわち、本毒素蛋白における遊離アミノ基は構成アミノ酸のリシン ϵ 位アミノ基であると考えられた。

考察および結論

ジフテリア毒素はその本体が単純蛋白体で、その構成アミノ酸組成としてチロシン (9.5%), リシン (5.3%), アルギニン (3.8%), ヒスチジン (2.4%), トリプトファン (1.4%) などが知られている。本毒素はホルマリンによりトキシド化されるが、その機序については毒素蛋白末端アミノ基の一部がホルミル化されるためと考えられている⁹⁾。なお、ホルマリンによるトキシド化に際しては、そのホルミル化は毒素蛋白構成アミノ酸のうちのリシンの ϵ -アミノ基に起こると推定されている¹⁾。GNa による減毒化についても上述の関係が推定されるわけで、毒素蛋白遊離アミノ基に反応することは予想できる。

著者はジフテリア毒素におよぼす GNa の影響を観察し、ジフテリア毒素は GNa によつて明らかに減毒あるいは無毒化され、この反応にはある程度の濃度 (10%以上) が必要なことを明らかにした。また Gad, GalNa, グルコン酸ナトリウムによる影響についても検討したが、Gad, GalNa は GNa と同様に減毒作用が明らかに認められたが、グルコン酸ナトリウムでは減弱作用はみとめられなかつた。したがつてグルクロン酸によるジフテリア毒素の減毒にはその構造中アルデヒド基の存在が関係しているのではないかと推測された。さらに GNa で処理した毒素について、透析によつて毒性が復元するか否かを調べたが、毒性の増強や復元はみられなかつたので、この反応は単なる塩形成や混合によるものではなく、また可逆的なものではないことを認めた。なお電気泳動によつて GNa 処理毒素は原毒素と物理的な性状を異にする点も知ることができた。そして、硫酸アンモニウムによる塩析によつて遊離グルクロン酸を除去した後、Lf 当たりのグルクロン酸を定量し、一定量のグルクロン酸が存在していることを明らかにした。

ホルマリントキシドではホルマリンの濃度を高くして毒素分子中の遊離アミノ基のすべてをホルミル化すると毒性だけでなく抗原性も失われるという。精製毒素を DNFB で処理し、Lf および DRM への影響を調べたところ、毒性、抗原性のいずれも消失し、DNFB が遊離アミノ基のすべてに対しても反応したと推定できる。また GNa およびホルマリン処理毒素についても同様の処理を行なつたが抗原性の消失が認められた。すなわち、毒素分子中の遊離アミノ基が毒性、抗原性に関与するものと考えられる。

なお、本反応に関与する遊離アミノ基であるが、DNFB 処理により DNP アミノ酸とし、構成アミノ酸のリシンの ϵ 位が遊離アミノ基として存在していることを認めた。

著者は以上の考察を経てつぎのような結論を得ることができた。

1) ジフテリア毒素は GNa により減毒あるいは無毒化される。2) GNa のアルデヒド基が毒素の減毒あるいは無毒化に関与している。3) GNa はジフテリア毒素分子中の遊離アミノ基と反応し、N-グルコナイドを生成し、それが減毒あるいは無毒化に関与するものと推定される。また、これに関係する毒素分子中の遊離アミノ基は構成アミノ酸であるリシンの ϵ -アミノ基にあると考えられる。

実験の部

ジフテリア毒素¹⁰⁾ 国立予防衛生研究所血清部より粗毒素の分与を受けた。精製毒素は常法により $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

9) G. Raman : Compt. rend. 179, 485(1924).

10) 伝染病研究所学友会編：“細菌学実習提要,” 317(1959) 丸善。

塩析法で精製し、マイクロゲルダール法により N 量を測定した。

ジフテリア毒素希釈液 セーレンゼンのホウ酸緩衝液 (pH 7.6) 1000 cc, 生理食塩水 3000 cc, 10% ゲラチン水溶液 8 cc, 1% チメロサル 40 cc を混合。

試 薬 グルクロン酸ナトリウム ($C_6H_9O_7Na \cdot H_2O$), グルクロン酸アミド ($C_6H_{11}O_6N$) は自家製品, その他は市販品 (化学用一級) を使用した。

Lf および Kf の測定法 常法にしたがった¹¹⁾。(間接法)

DRM の測定法 家兎を用い常法にしたがった¹²⁾。

透 析 毒素あるいは GNa 処理毒素のそれぞれ 10 cc をセロファン膜 (東洋汙紙 KK 製, No. 60) に入れ, 中性ホウ酸緩衝液 (pH 7.2) を透析外液とした。外液は 1 回 500 cc づつ, 1 日 3 回交換した。

GNa 処理毒素のグルクロン酸定量法 精製毒素 (1000 Lf/mg N, 125 Lf/cc) を前回と同様に 25% GNa で処理し, その 60 cc (400 Lf/cc, DRM 0/cc) を ($(NH_4)_2SO_4$ 70% 飽和) によつて塩析を繰り返した。すなわち, ($(NH_4)_2SO_4$ 70% 飽和 GNa 処理毒素を氷室中に 2 hr 放置し, 遠心沈殿物 (3000 rpm, 15 min) を, さらに飽和 ($(NH_4)_2SO_4$ 溶液に浮遊させ, 1 hr 氷室に放置後, 再び遠心沈殿 (3000 rpm, 15 min), 沈殿をリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解する操作を繰り返した。なお, グルクロン酸の定量はナフトレゾルシン法¹³⁾によつた。

DNFB 処理法 精製毒素¹⁰⁾ (1000 Lf/mg N, 125 Lf/cc, DRM 10^{-7} /cc) 20 cc に DNFB 0.1 cc, $NaHCO_3$ 0.1 g を加え, 40° で 2 hr 徐々に攪拌後, 遠心沈殿 (2000 rpm, 5 min), 油状に析出する未反応の DNFB を除去後, グリシン 0.1 g を添加, 37° に 2 hr 放置, 残存する微量の DNFB を除去して Lf, DRM を測定した。また, 上記毒素液の GNa, F 処理物も同様に操作した。

ジフテリア毒素分子中の遊離アミノ基の決定 精製毒素 (1800 Lf/mg N, 4000 Lf/cc) を用い, Sanger¹³⁾ の方法によつてつぎのように行なつた。毒素 5 cc に 5% DNFB-EtOH 溶液 10 cc, $NaHCO_3$ 0.5 g を加え, 室温で 2 hr 振盪後, 減圧下で EtOH 留去, 蒸留水 10 cc を加える。遠心沈殿 (3000 rpm, 5 min) で沈殿を上清と分離し, 蒸留水 10 cc づつで 2 回洗浄, EtOH 10 cc と混じ, 汙取, さらに EtOH 30 cc で洗浄した。ついで, HCl 酸性とし, 遠心沈殿後, 蒸留水, EtOH で前回と同様に洗浄した。これを定沸点 HCl 5 cc と混じ煮沸, 約 8 hr 加熱後黄色透明な内容を PPC (展開溶媒 1.5 M リン酸緩衝液, 東洋汙紙 No. 50), Rf 0.47 のスポットを認めた。さらに加熱を続け計 10 hr 後, 再び PPC, Rf 0.47 (上記と同様操作)。ついで, この黄色溶液をタルク 5 g で作つたカラム (径 1 cm) に注ぎ, N HCl 20 cc で洗浄, 吸着されている黄色物を N HCl-EtOH (1:5) 混液 10 cc で抽出した。抽出物を減圧濃縮, 残存する黄色物を Et_2O と振盪したが, Et_2O 層に黄色物は移行しない。また, N HCl-EtOH (1:5) に可溶である。PPC, Rf 0.47 (上記と同様に操作), 汙紙上の黄色スポットは 5% HCl 噴霧で消失しない。ニンヒドリン陽性, 坂口反応陽性。上記黄色油状物は HCl 酸性で $NaNO_2$ の処理によつてエーテルに移行するようになり, これは, $NaHCO_3$ 水溶液に転溶した。油状物の一部をとり $NaHCO_3$ 水溶液 5 cc に溶解, DNFB-EtOH 溶液で前記と同様に操作。DNFB を除去するため EtOH 10 cc で 2 回洗浄後, HCl 酸性とし, Et_2O 5 cc と振盪すると, 黄色物は Et_2O に移行した。 Et_2O 留去後 PPC, Rf 0.05 (展開溶媒 1.5 M リン酸緩衝液, 東洋汙紙 No. 50)。なお, リシンより Sanger 法¹³⁾ で調製した di-DNP-リシンは Rf 0.05 (前記と同様に操作)。また, 水飽和 BuOH で展開した結果, Rf 0.71 (東洋汙紙 No. 50) で di-DNP-リシン Rf 0.71 に一致した。

終りに本研究に当たつて終始御懇篤な御指導を賜つた東京大学 石館守三教授に衷心より感謝し, 合わせて種々御激励と御助言を頂いた故 山県 汎博士, またジフテリア毒素ならびに標準抗毒素血清を御配慮願つた国立予防衛生研究所血清部長 村田良介博士に感謝いたします。なお本研究に種々御協力を頂いた東京医科歯科大学 塩野哲博士, 中外製薬株式会社 龍居五郎博士, 松本仁氏に深く感謝します。その他本研究について特別の御便宜を賜つた中外製薬株式会社に厚く御礼申し上げます。

中外製薬株式会社

11) 伝染病研究所学友会編: “細菌学実習提要,” 248(1959) 丸善。

12) 伝染病研究所学友会編: “細菌学実習提要,” 316(1959) 丸善。

13) F. Sanger: Biochem. J. **39**, 507(1945); **42**, 287(1948); **45**, 563(1949)。