***Bacillus* 属細菌の産生する生理活性物質の研究 (第 4 報¹⁾) *B. subtilis* K
の培養濾液から得られるガマ心臓機能促進成分について²⁾**

青沼 繁, 三村 務, 久岡正史, 大谷正洋, 近藤 覚

大阪大学薬学部³⁾

**Studies on biologically Active Substances formed by *Bacilli*. IV.¹⁾ Toad Heart
Function Promoting Substance from Culture Filtrate of *B. subtilis* K²⁾**

SHIGERU AONUMA, TSUTOMU MIMURA, MASAFUMI HISAOKA,
MASAHIRO OTANI and SATORU KONDO

Faculty of Pharmaceutical Sciences Osaka University³⁾

(Received October 7, 1971)

A substance promoting the function of toad heart was obtained as an isoelectric precipitate by adjusting pH of the culture filtrate of *Bacillus subtilis* K to 3.0. The precipitate was purified by chromatography on DEAE-cellulose column and then gel chromatography on Sephadex G-75. The substance was finally isolated by column chromatography over acid alumina. It seemed to be homogeneous by electrophoresis on polyacrylamide gel disc. This substance was found to be a lipoprotein which was derived from the cytoplasmic membrane fraction of the vegetative cells according to immunological examination. This substance increased the ³²P-uptake into chick myocardium 2 hr after intraperitoneal injection of 0.5 mg/chick.

著者らは *Bacillus* 属細菌の産生する生理活性物質のスクリーニングを行ない, *B. subtilis* が家兎血清カルシウム低下性物質, ガマ心臓機能促進成分, 子宮筋収縮成分などを培養濾液中に産生することを見出し,⁴⁾ とくに *B. subtilis* K の産生する家兎血清カルシウム低下性物質についてはすでに単離し, α 因子と命名, その作用本体がリポ蛋白質であることを明らかにした.^{1,5,6)}

本報文では同じく *B. subtilis* K の産生するガマ心臓機能促進成分の分離精製法とその諸性質について検討を加えた。

実 験 方 法

培養方法 *B. subtilis* K を既報⁴⁾ の半合成液体培地で 37°, 90 時間振盪培養後さらに 15 時間静置, 溶菌させ, その培養濾液を用いた。

カラムクロマトグラフィー DEAE セルロースは常法通り活性化した後, 0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化し, カラムに充填した。同じ緩衝液に溶解した試料を吸着させ, 溶媒の食塩濃度を 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 1.0M と stepwise に上昇させて溶出し, 最後に 0.05M NaOH で溶出した。

Sephadex G-75 によるゲル濾過は溶媒として蒸留水を用いた。

酸性アルミナによるカラムクロマトグラフィーは吸着クロマト用アルミナ (Brockmann) を 0.2N HCl で 2 時間処理後, 蒸留水で pH 5.0—6.0 になるまで洗滌を繰返し,⁷⁾ カラムに充填した。試料の水溶液を流して吸着させた

- 1) 第 3 報: 青沼 繁, 三村 務, 金 在萬, 乾 容子, 薬誌, 92, 542 (1972).
- 2) 青沼 繁, 三村 務, 久岡正史, 金 在萬, 第 18 回日本薬学会近畿支部総会講演 (1968).
- 3) Location: 1-1, Toneyama 6, Toyonaka, Osaka.
- 4) S. Aonuma, T. Mimura, J. Kim, H. Akamatsu, K. Saito, *Agr. Biol. Chem.* (Tokyo), 33, 1377 (1969).
- 5) S. Aonuma, T. Mimura, J. Kim, M. Hisaoka, T. Nakanishi, S. Yamaura, *Agr. Biol. Chem.* (Tokyo), 33, 1381 (1969).
- 6) 青沼 繁, 三村 務, 中西俊秀, 在間由美子, 福田俊一, 「微生物をめぐる分子生物学とその薬学領域における応用面」シンポジウム講演要旨集, p. 65 (1971).
- 7) 青沼 繁, 三村 務, 友永郁子, 薬誌, 82, 434 (1962).

後 0.05M NaH_2PO_4 , 0.1M Na_2HPO_4 を順次 stepwise に流して溶出した。

化学組成の分析 蛋白質, 糖質, 脂質, の定量はそれぞれ前報¹⁾の方法で, 核酸は紫外線吸収 (UV) スペクトルから Warburg Christian の式で⁸⁾算出した。

分子量の測定 分子量の測定は Sephadex G-75 のカラムを用いるゲルクロマトグラフィー⁹⁾で行なった。

ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動 前報¹⁾の方法で行なった。pH 8.3 のグリシン緩衝液中, 4.5 mA, 100 V で 3 時間通電した。蛋白質の染色にはアミドブラック 10B, 脂質の染色にはスダンブラック B を用いた。

N 末端および C 末端アミノ酸の分析 N 末端アミノ酸残基の分析は DNP 法により行ない薄層クロマトグラフィーにより標準 DNP 化アミノ酸と比較同定した。また C 末端アミノ酸はヒドラジン分解法¹⁰⁾により検出した。

脂質, 蛋白質部分の分離 Shore らの方法¹¹⁾により検体の水溶液にエーテル・エタノール混液 (3:1 v/v) を加え, 振盪, 脂質を数回抽出し, 水層はそのまま凍結乾燥して蛋白部分, 有機溶媒層は濃縮乾固して脂質分画とした。

生物活性の検定 ガマ剔出心臓灌流試験は八木-Straub 法¹²⁾により検定した。なおその他の生物活性についてはいずれも既報^{1,4,5)}の方法により測定した。

ヒヨコ心筋への ^{32}P のとり込み 孵化後 2 日目の雄性ヒヨコを 4 羽 1 群とし, 4.5 μCi の $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ を含む生理食塩水 0.5 ml を腹腔内投与し, 検体投与群にはさらに各用量の検体を含む生理食塩水を腹腔内に投与して各時間毎に断頭, 瀉血死させ, その心筋中へとり込まれた ^{32}P の放射能を湿性灰化後 GM 計数管で測定した。なお specific activity は心筋を湿性灰化後総燐量を測定し, cpm/ μgP として表現した。¹³⁾

増殖型菌体から細胞下画分の調製 *B. subtilis* K の増殖型菌体を Weible らの方法¹⁴⁾でリゾチーム処理し, それぞれ cell wall 画分, cytoplasm 画分, ghost 画分を得た。

抗血清調整とゲル内沈降反応 すべて前報¹⁾の方法にしたがって行なった。

結 果

B. subtilis K の培養濾液からガマ心臓機能促進作物物質の単離

培養濾液中に含まれている心臓機能促進成分を Fig. 1 に示す方法で精製を行なった。まず培養濾液を 1.0N HCl で pH 3.0 に調整し, 生じる等電点沈殿を Fraction I として得, 等電点精製を 3 回くり返した後 DEAE

Fig. 1. Isolation of Toad Heart Function Promoting Substance from Culture Filtrate of *Bacillus subtilis* K

8) "Methods in Enzymology" vol. III, ed. by S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, 1957, p. 451.

9) 青沼 繁, 浜 堯夫, 真弓忠範, 田中慶一, ホルモンと臨床, **15**, 81 (1968).

10) 青沼 繁, 江川 宏, 松浦恒雄, 真弓忠範, 末吉美保子, 薬誌, **86**, 923 (1966).

11) V. Shore, B. Shore, *Biochemistry*, **6**, 1962 (1967).

12) 青沼 繁, 浜 堯夫, 薬学研究, **30**, 323 (1958).

13) 青沼 繁, 浜 堯夫, 薬誌, **79**, 1436 (1959).

14) C. Weible, L. Bergström, *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 340 (1958).

Fig. 2. Fractionation of Fraction I on a DEAE-Cellulose Column

1500 mg of Fr-I were applied to a column (3.0×13.0 cm) of DEAE-cellulose equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 7.0). The adsorbents were eluted stepwise with same buffer containing 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 and 1.0 M NaCl, successively and with 0.05M NaOH.

Fig. 4. Fractionation of Fraction III on Acid Alumina Column

80 mg of Fr-III were applied on a column of acid alumina treated with 0.2N HCl. The adsorbents were eluted with 0.05M NaH_2PO_4 and 0.1M Na_2HPO_4 .

二本のバンドを示すので、さらに有効成分を単離するため、酸性アルミナによるカラムクロマトグラフィーを行なったところ Fig. 4 に示すように 0.05M NaH_2PO_4 と 0.1M Na_2HPO_4 溶液でそれぞれ溶出してくる二成分に分離された。活性は 0.1M Na_2HPO_4 溶出分画 Fraction IV に認められるのでこれを 48 時間蒸留水に対して透析後凍結乾燥し、ガマ心臓機能促進作用物質 (toad heart function promoting substance: THPS) とした。収量は培養液 24 liter から 40 mg であった。

この THPS は Fig. 5 から明らかなようにポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動で蛋白質の染色と脂質染色で一致する単一のバンドを示した。

各精製段階における化学組成の比較

化学組成の分析結果を Table I に示したが、これから明らかなように Fraction I から精製が進むに従って蛋

Fig. 3. Gel Filtration of Fraction II on a Sephadex G-75 Column

500 mg of Fr-II dissolved in H_2O were applied on a column (2.0×70.0 cm) of Sephadex G-75.

Fig. 5. Polyacrylamide Gel disc electrophoresis of Fraction IV (THPS).

condition; 4.5 mA, 100 V for 3 hr
upper; amidoblack 10 B stain
lower; sudanblack B stain

セルロースカラムクロマトグラフィーにける。食塩濃度を 0.1M から 1.0M まで stepwise に上昇させながら溶出させ、最後に 0.05M NaOH で溶出すると Fig. 2 のような溶出曲線が得られる。各分画を生物検定したところ心臓機能促進活性は 0.05M NaOH 溶出分画に最も強く見出されたので以下この分画を Fraction II として精製をすすめた。Fraction II を Sephadex G-75 でゲル濾過すると Fig. 3 に示すように明らかに二成分に分離された心臓機能促進活性は後から溶出してくる低分子分画 Fraction III に認められた。この分画はポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動でまだ

TABLE I. Chemical Composition and UV_{max} of each Fraction

	Protein (%)	Lipid (%)	Carbohydrate (%)	UV _{max} (mμ)
Fraction I	75.3	20.1	3.3	260
Fraction II	71.0	20.3	2.1	261
Fraction III	65.5	27.0	2.0	274
Fraction IV (THPS)	60.2	27.8	0.4	274

白質含量と糖質含量が減少し、脂質含量が増加してくる。また紫外吸収極大値も 260 mμ から 274 mμ へ移行し、THPS では核酸はほとんど完全に除かれている。また THPS の由来とも関連してアミノ糖の定性反応を行なったが陰性であった。以上の結果から THPS は化学的にはリポ蛋白質であると考えられる。

THPS の生物活性

Fraction I および THPS の八木-Straub 法によるガマ別出心臓機能促進効果を Fig. 6 に示した。THPS は 100 μg/ml の灌流濃度で収縮位心搏振幅の増大を来たすが洗滌操作によってその作用は速やかに消失する。これに対して出発原料である Fraction I では活性は約 1/2 であり、THPS の活性は明らかに上昇している。

また同じ菌株 *B. subtilis* K の産生する家兎血清カルシウム低下作用物質とはゲルクロマトグラフィー (Fig. 3) の段階で完全に分離されている⁵⁾ ため THPS にはカルシウム低下活性は認められず、さらに Mg⁺⁺ の存在下にも 12.5 μg/ml の終濃度で全く溶血活性が認められなかった。⁶⁾ 毒性は 10 mg/100 g ラットの用量で全く認められなかった。

THPS の化学的性質

THPS のアミノ酸組成については THPS を常法通り酸分解 (6N HCl で封管中, 100°, 18 および 24 時間分解)、アルカリ分解 (6N Ba(OH)₂ で 100°, 10 および 18 時間分解) を行ない、両加水分解物についてアミノ酸自動分析計 (日立製 KLA3 型) で分析した結果、Table II に示すように 15 種類のアミノ酸が検出された。含硫アミノ酸が極めて少なくシスチン、システインを全く含んでいない。

N 末端アミノ酸としてロイシンのみが検出され、C 末端アミノ酸はグルタミン酸であった。

THPS の構成蛋白部分および脂質部分の性質

実験方法で述べた方法で THPS から脂質部分を抽出分離し、薄層クロマトグラフィーにかけたところ Fig. 7 に示したように各展開溶媒系において 3 つのスポットが検出された。

さらに THPS の生物活性発現にいずれの部分が必要であるのかを明らかにするため蛋白部分と脂質部分についてそれぞれ心臓機能促進活性を検討したところ Fig. 8 に示したように脂質部分は 500 μg/ml の灌流濃度で収縮位心幅の一時減少後増加が認められるが蛋白部分にはほとんど活性が残っていない。したがって THPS の活性

Fig. 6. Toad Heart Promoting Activity of Fraction I and Fraction IV (THPS)

TABLE II. Amino Acid Composition of THPS

Amino acid	Molecular proportions	Amino acid	Molecular proportions
Asp	10.1	Met	1.0
Thr	10.1	Ile	2.6
Ser	3.8	Leu	8.6
Glu	9.6	Tyr	4.2
Pro	3.3	Phe	2.5
Gly	4.5	Lys	2.1
Ala	4.2	Trp	12.0
Val	3.3

Fig. 7. Thin-Layer Chromatogram of Lipid Moiety of Fraction IV (THPS)

solvent systems:

1 : chloroform: methanol: H_2O (65:25:4)

2 : petroleum ether: ether: acetic acid (80:3:1)

3 : petroleum ether: ether: acetic acid (90:10:1)

The spots were detected by heating for 30 min at 110° after spraying of 50% H_2SO_4 .

は大部分脂質に依存していると考えられるが, THPS に比較するとかなり効力が低下しているので蛋白部分も完全な効力発現に必要であると思われる。

THPS およびその蛋白部分の分子量

THPS およびその構成蛋白部分を分子量既知の標準物質とともに Sephadex G-75 によるゲルクロマトグラフィーにかけると Fig. 9 のような相関関係が得られ, THPS の分子量は約 65000, その蛋白部分は約 46000 と算定された。したがって両者の差が 3 種の脂質よりなると考えられる。

ヒヨコ心筋への ^{32}P の取込みにおよぼす THPS の影響

生体内における心臓機能の変化がヒヨコ心筋への ^{32}P の摂取量と密接な相関があることから, 著者らは心臓機能促進および抑制因子の生物検定にこの方法を利用し, 牛心筋より得た心臓機能抑制成分の投与で ^{32}P のヒヨコ心筋への取り込みが定量的に減少し, 促進成分では逆に増加することを報告している。¹³⁻¹⁵⁾ そこで THPS に関してもそのヒヨコ心筋への ^{32}P 取り込みに対する影響を検討した。まず用量に対する反応をしらべたところ Table III に示したように 0.5 mg/chick 投与群が分布率, 比活性ともに ^{32}P の取り込みを増加していた。そこで次に用

Fig. 8. Effect of each Moiety from Fraction IV (THPS) on Toad Heart

Fig. 9. Gel Chromatography of Fraction IV (THPS), its Protein Moiety and Some Compounds of known Molecular Weight on a Sephadex G-75 Column

TABLE III. ^{32}P -incorporation into Chick Myocardium at 2 hr after Administration of Fraction IV (THPS)

Dose (mg)	Percentage incorporation ^{a)}	Specific activity ^{b)}
0 (control)	1.112 $\pm$ 0.037 ^{c)}	8.9 $\pm$ 0.8 ^{c)}
0.5	1.456 $\pm$ 0.047	12.0 $\pm$ 0.7
5.0	1.258 $\pm$ 0.125	8.8 $\pm$ 0.8
10.0	1.059 $\pm$ 0.137	8.6 $\pm$ 1.0

a) % of ^{32}P incorporated b) cpm/ μ g of P c) mean $\pm$ standard error ($n=4$)

15) T. Hama, *Endocrinol. Japon.*, 7, 57 (1960).

TABLE IV. Time Course of ^{32}P -incorporation into Chick Myocardium after Administration of Fraction IV (THPS)

Time after administration (hr)	Dose (mg)	Percentage incorporation ^{a)}		Specific activity ^{b)}	
		control	sample	control	sample
0.5	0.5	0.863 $\pm$ 0.229 ^{c)}	1.215 $\pm$ 0.122 ^{c)}	7.2 $\pm$ 1.9 ^{c)}	7.9 $\pm$ 0.5 ^{c)}
2.0	0.5	1.236 $\pm$ 0.121	1.483 $\pm$ 0.100	8.8 $\pm$ 0.6	13.2 $\pm$ 0.8
3.0	0.5	1.113 $\pm$ 0.117	0.809 $\pm$ 0.225	8.8 $\pm$ 0.8	6.2 $\pm$ 1.6

a) % of ^{32}P incorporated b) cpm/ μg of P c) mean $\pm$ standard error (n=4)

量を 0.5 mg/chick とし、経時変化を検討したところ Table IV から明らかなように 0.5 時間から 2 時間まで ^{32}P のヒヨコ心筋への分布率は増加しているが 3 時間後にはこの作用は消失し、対照群よりもむしろ低い値を示している。

THPS の増殖型菌体からの由来

THPS および *B. subtilis* K 菌体からの Cell wall, Cytoplasm, Ghost 画分に対応する抗血清を作成し、ゲル内沈降反応により THPS の菌体からの由来をしらべた結果、Ghost (細胞膜) 成分に由来することが明らかになった。他の画分とはいずれも反応しなかった。

考 察

著者らは *B. subtilis* K の産生する生理活性物質としてすでに家兎血清カルシウム低下性物質を単離し、その化学的本体が分子量約 115000 のリポ蛋白質であることを報告し、 α 因子と命名した。そしてこの α 因子の産生菌体における生理的意義を検討中に α 因子には細胞膜溶解活性があり、その活性本体が Mg^{++} の存在下でカルシウム低下因子と解離することを見出し、surfactin¹⁶⁾ であることを明らかにした。⁶⁾ さらにこれらの生理活性物質とは別に同じ *B. subtilis* K の培養液からガマ心臓機能促進成分、⁴⁾ ラット胃酸分泌促進および抑制成分¹⁷⁾ が得られることを報告している。

この報文ではガマ心臓機能促進成分についてその精製、単離方法とその性質について述べた。出発原料は上記の諸生理活性物質と同じく培養液から pH 3.0 で等電点沈殿する Fraction I であるが THPS はカルシウム低下性物質とは Sephadex G-75 によるゲルクロマトグラフィーにおける挙動が異なり、分子量も 65000 とかなり小さく、また THPS にはカルシウム低下活性および溶血活性が認められないので明らかに異なる物質と考えられる。一方、胃酸分泌促進および抑制成分とは DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンが異なり、これらの成分はいずれも 0.6M NaCl 以前の段階で溶出される。¹⁷⁾ しかし胃酸分泌に作用するこれらの成分はいずれも未だ単離されていないので化学的本体の比較はできない。

THPS と α 因子は分子量の差はあるがアミノ酸組成も類似しており、いずれもリポ蛋白質でありその菌体からの由来の検討の結果膜成分である可能性がある⁶⁾ が、最も大きな相違点は α 因子の場合、その生物活性が蛋白部分に THPS の場合は脂質部分に依存している¹⁾ ことである。THPS に関してのみ考えればその構成脂質の分析が完全ではないのでその作用本体が三種の脂質のいずれかは明らかではないが、蛋白部分を除くと活性の低下がみられることは有機溶媒による抽出操作で、蛋白部分に変性が起こっている可能性も考えなければならないが、脱脂後も水溶性であったので、むしろ親水性の蛋白質が複合体として脂質の可溶化、膜に対する親和性を助けていることも考えなくてはなるまい。

THPS の均質性に関してはディスク電気泳動以外に超遠心分析 (60340 rpm, 120 分) も行なったが脂質含量が高いためか全く沈降しなかった。

ヒヨコ的心筋への ^{32}P の取り込みに関する実験から心臓機能促進効果とその分布率の増加の間に相関性が認め

16) A. Kakinuma, M. Hori, H. Sugino, I. Yoshida, M. Isono, G. Tamura, K. Arima, *Agr. Biol. Chem.* (Tokyo), 33, 1523 (1969).

17) 青沼 繁, 三村 務, 大西礼子, 近藤 覚, 第 21 回日本薬学会近畿支部総会講演 (1971).

られ *in vitro* における THPS の効果が *in vivo* での ^{32}P の取り込みにおいても認められた。さらにその作用機作として心筋中の磷代謝が密接にからんでいることが示唆されよう。今後、作用本体の化学的解明、作用機作などについて検討をすすめたいと考えている。

最後に、微生物の産生するような薬理活性物質の医薬品開発資源としての可能性について近年数多くの報告¹⁸⁾があり、期待される分野と考える。

結 論

1) *Bacillus subtilis* K の培養液から pH 3.0 での等電点沈殿を原料とし、DEAE セルロース, Sephadex G-75, 酸性アルミナによるカラムクロマトグラフィーなどの操作によりガンマ心臓機能促進作用物質 (toad heart function promoting substance: THPS) を単離した。

2) この THPS はゲル濾過法による分子量が約 65000 のリポ蛋白質で 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の灌流濃度で八木-Straub 法によるガンマ剔出心臓標本の収縮位心博振幅の著明な増加作用を有している。

3) THPS の蛋白部分は分子量が約 46000 で 15 種のアミノ酸よりなり、N末端アミノ酸はロイシン、C末端アミノ酸はグルタミン酸である。

4) THPS の生物活性は主として脂質部分に依存するが、蛋白部分を除去すると活性の低下が認められる。

5) THPS は免疫学的に産生菌体の細胞膜に由来する成分である。

6) THPS をヒヨコに投与するとその ^{32}P の心筋への取り込みを促進する。

18) 三村 務, “微生物薬品化学, 医薬品開発基礎講座 4 巻,” 地人書館編, 1971, p. 332.