

精製 Streptolysin-S 標品に対する Ribonuclease をもつての分解試験

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本 肇教授)

紺 井 忠 弥

(昭和33年12月9日受付)

On the Digestion Experiment with Ribonuclease of Purified Streptolysin(S) Preparations

TADAYASU KON-I

*Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University
(Director : Prof. Dr. Hajime Okamoto)*

ABSTRACT

The influence of ribonuclease on the partially purified samples of streptolysin-S was studied in an effort to learn something of the purity of the sample and the chemical nature of the toxin.

Throughout the experiments, I-N-F-streptolysin-S-fractions, which were all prepared according to the method described by Shoin, were used. Ribonuclease employed was a purified sample from beef pancreas.

The principal results were as follows :

1) When phosphate-buffered solution (pH 7.6) of I-N-F-streptolysin-S-fraction (I-N-F-St-S) with an addition of ribonuclease was allowed to stand at 23°C for 15 hours, there occurred a $\frac{1}{2}$ decrease in the hemolytic activity.

The same was the case in the control experiment, in which I-N-F-St-S, dissolved simply in phosphate buffer (pH 7.6), was incubated at 23°C for 15 hours.

It may therefore be said that the occurrence of a slight degree of inactivation in this course of the experiments could conceivably be attributed to the experimental conditions, and streptolysin-S itself was not affected, at all, by ribonuclease.

2) On addition of HCl-solution, there occurred only a little precipitation (R) in the ribonuclease digestion solution of I-N-F-St-S, whereas a large amount of flaky precipitation occurred (C) in the I-N-F-St-S solution of the control experiment.

3) The yield of R-precipitate and that of C-precipitate were 72 mg (corresponding to 72% of the quantity of I-N-F-St-S originally used) and 16 mg (16%), respectively, indicating that I-N-F-St-S was contaminated with a large amount of ribonuclease-sensitive RNA, which had been added to the culture broth.

The R-precipitate was tested to exhibit hemolytic activity up to a dilution of 1 : 40 Mill., while the C-precipitate only 1 : 5 Mill. The R-precipitate was therefore 2 times as active as the mother I-N-F-St-S.

It may now be said that, from the ribonuclease-digestion solution of I-N-F-St-S, the activity was carried down almost completely with the HCl-precipitate.

Both R- and C-precipitates gave positive physical and chemical tests for polyribonucleotide, but negative tests for protein.

The ultraviolet absorption curve of R- and C-precipitates was quite similar to that of

yeast ribonucleic acid.

Thus, the significance of the data obtained in the present study lies in the following points :

a) It was calculated that of the I-N-F-St-S, at least, 70 per cent is ribonuclease-sensitive and non-active RNA.

b) A polyribonucleotide of ribonuclease-resistant form seems to be an essential part of streptolysin-S molecule.

c) The treating with ribonuclease would be useful steps in the purification process of streptolysin-S, although a little portion of the toxin may concomitantly undergo loss of activity under the experimental conditions other than the presence of ribonuclease.

緒 言

リボ核酸 (RNA) による溶連菌の溶血毒増産現象が発見¹⁾されたことで、現在我々が Streptolysin-S 並びに RNA の生物学的性状に関して有する知識は著しく豊富^{2), 3), 4)}となつて来たことは周知の如くである。しかし本毒素の本質如何という問題になると、何分 Streptolysin-S は未だ結晶状態で把握されるに至らず、従つて所謂精製 Streptolysin-S 標品を対象として、その化学的並びに物理的性状を精査することによつて間接的に本毒素の化学的構成を推定するより外に方途がないという困難性のために、各研究者の見解は核酸説⁵⁾、蛋白説⁶⁾、或いは核蛋白説^{6), 7)}と分れ、しかもその何れにも否定し難い^{8), 9)}ものがある

といった現状である。即ち、本毒素の本質解明には更に解析的考査を進め歩一步と核心にせまることが要求されているわけであるが、私はこの間に処して、精製 Streptolysin-S 標品として I-N-F-Streptolysin-S-Fraction⁸⁾を選び、その Ribonuclease (RNase) に対する態度の方面から考査を進めたところ、精製 Streptolysin-S 標品の純度、本毒素の本質並びに精製法の問題に関連せしめて甚だ興味ある成績を得たので、ここに報告することとする。

因みに Streptolysin-S が RNase の影響を受けないことに対しては既に Bernheimer⁶⁾並びに細谷^{9), 10)}によつて指摘されているところである。

実験方法

1) 精製 Streptolysin-S 標品 :

溶連菌 (S-株) の 1% 酵母核酸加ブイオン培養より正印のアルコール分割法⁸⁾によつて分離精製した I-N-F-Streptolysin-S-Fraction * (以下精製 St-S と略記す) で、試験管内溶血限界濃度が 1 : 10 Mill. のものと 1 : 20 Mill. のものの二標品を供試す。

何れも類白色無晶形粉末で、水に易溶、鉍酸沈澱性、Orcinol- 反応強陽性、Dische- 及び Feulgen- 反応は共に陰性、1% 水溶液では Ninhydrin- 反応は微に陽性である。なおこれ迄も色々と論議^{5), 8)}されたように本標品はその分離過程から考えても、少なくともこれに酵母核酸と St-S の非働化したもの等が混在しているとするのが当然である。

2) Ribonuclease (RNase) :

牛脾臓よりの粗酵素標品 10 mg を蒸溜水 1cc に溶

解したもの (即ち 1% RNase 液) を用意す。

3) 実験術式 :

被検 I-N-F-Streptolysin-S-Fraction 200 mg を M/15 磷酸緩衝液 (pH=7.6) 18cc に溶解したものを 2分した 2本の試験管を用意し、氷冷下で一方には 1% RNase 液 1cc を加え、他方には蒸溜水 1cc を加える。ここに得られた両管即ち、

R-管 : 1% RNase 加 1 : 100 精製 St-S 溶液 10cc 及び

C-管 : 1 : 100 精製 St-S 溶液 10cc (対照) に対し並行的に順次、次の如き処置を行う :

先ず RNase の作用を蒙らない時の溶血力価を測定すべく両管から 0.1cc 宛を分取した後、両管 (内容はそれぞれ 9.9cc となる) を 23°C ** の孵卵器内に納める。23°C 下に静置せしめること 15 時間、第 2 回

* I-N-F-St-S は岡本等の I₃-Fraction^{11), 12)}に該当す。

** RNase 活性の至適温度は大體 60~70°C といわれているが、この温度下では St-S の熱非働化が甚だしいので、23°C を選んだわけである。

目の溶血力測定用として 0.1cc 宛を分取した後、両管（内容はそれぞれ 9.8cc となる）を氷冷せしめて、16% HCl 0.2cc 宛を加う（この時直に白色絮状の沈澱を生起するが混濁度において R 管 < C 管である）。氷冷下に置くこと 5 分——この間に両管を振盪して内容を充分混和せしめて第 3 回目の溶血力測定用として 0.1cc 宛を分取す——両管の内容をそれぞれ遠心（4, 000 r. p. m., 8min. at 0°C）によつて上清液と沈澱に

分離す。

沈澱に対しては 98% 冷アルコール 30cc 宛をもつてする洗滌操作を 2 回施し、更に冷エーテル 30cc による処置を施した後、減圧乾燥器内に納める。かくして得られた微灰白色粉状の二標品について、その収量、溶血力、理・化学的性状の考査を行う。上清液は放棄す。

実験成績

第 I 表及び第 II 表はそれぞれ溶血限界濃度 = 1: 20 Mill. の I-N-F-St-S-Fraction を対象とした場合の実験過程とその間に行われた St-S に対する溶血力試験の成績を示したものである。

以下各過程のデータに対し順を追つて批判的に検討を加えることとする。

(I) 先ず氷冷下で 1: 100 精製 St-S 9cc (pH=7.6) に対し 1% RNase 液 1cc を加えた直後の R₁-液では溶血限界濃度 = 1: 20 Mill. の力価であり、この R₁-液を 23°C 下に 15 時間静置した R₂-液ではその溶血力が 1/2 に低下（即ち 1: 10 Mill.）していることが看取されるが、この過程における力価の半減はアルカリ性 (pH=7.6) 及び温熱下 (23°C) の非働化に関係して起つたもので、St-S 自体に対する RNase の影響によるものでないことは、対照の 1: 100 精製 St-S 液 (pH=7.6) 即ち C₂-液においても C₁-液に対して、同じく力価の半減 (1: 10 Mill.) が起つていることに徴しても明白である。

又、R₂-並びに C₂-液に対しそれぞれ HCl が加えられた R₃-並びに C₃-液にあつては、その何れもが溶血限界濃度 = 1: 5~10 Mill. であることから、この場合の溶血力の低下は HCl による St-S の非働化に帰すべきであつて、この間に St-S 自体が RNase によつて有害な影響を蒙つたと考えられる余地はないわけである。

以上は R₁→R₃ 及び C₁→C₃ 迄の過程に対して単に溶血力の方面からのみの考察を加えたのであるが、以下はその内容的方面についての考察である。

先ず R₁→R₃ 迄の過程、及び C₁→C₃ 迄の過程に関しては次のように考えられよう：

(a) 当初 I-N-F-St-S に含まれていた St-S は少なくともその半量が非働化されており、そしてこれには両過程を通じて共通の条件、即ちアルカリ、温度、

HCl が原因となつておるが、RNase は全く関与していない。

(b) R₃-液と C₃-液とでは、その溶血力試験の成績が同一 (1: 5~10 Mill.) であることから、それぞれ (9.9cc) に活性状態で存在する St-S の絶対量は同等である。

(c) R₁→R₃ 迄の過程で HCl 可溶性となつた物質がある。そしてこれは St-S とは無関係で、元来 I-N-F-St-S に混在していた RNA の RNase による解体産物、即ち mononucleotides、であると考えられる。

(d) ところで、一般に RNA 標品にあつてはこれに RNase-sensitive のもの以外になお RNase-resistant のものが含まれているとされており^{13), 14), 15), 16), 17)}

又、既に註記したように I-N-F-St-S には RNA の外に非働化された St-S も混在しているだろうことも否定出来ないところであるから、今これらの事情をも考慮に入れて R₃-並びに C₃-液の内容を推定すると
R₃-液：活性 St-S, 非働化 St-S, Mononucleotides
(及びなお残存している RNase-sensitive RNA),
RNase-resistant RNA, RNase

C₃-液 (対照)：活性 St-S, 非働化 St-S, RNase-sensitive RNA, RNase-resistant RNA

の如くなる。そしてこの両液に対し HCl 沈澱による分離操作が加えられるならば、少なくとも R₃-液からは Mononucleotides が除去された劃分が収得されるべきである。

かく観じ来つて、R₃-液から HCl 沈澱によつて分離された R₄-Fraction, 及び C₃-液から HCl 沈澱によつて分離された C₄-Fraction とについての比較溶血試験の成績に及ぶと、そこには大いに趣の異つたものがあることに留意されよう。

即ち、R₄-Fraction は溶血限界濃度 = 1: 20~40 Mill. で、その溶血発揮力において C₄-Fraction (1:

5~10 Mill.) に 4~8 倍しているという所見は

1) $R_1 \rightarrow R_3$ 液の過程では $C_1 \rightarrow C_3$ 液の過程とは異つた異変が招来されている。そして

2) これには R-系と C-系の両実験間における相違条件として唯一のものである RNase の存・否が関連している

ことを示唆している点で甚だ重要視すべきものといえよう。

(II) 次にいよいよ R_4 -Fraction と C_4 -Fraction とに関してであるが、今第Ⅲ表から看取される成績、即ち溶血力において R_4 -Fraction (1: 20~40 Mill.) は C_4 -Fraction (1: 5~10 Mill.) に 4~8 倍し、その代り収量において前者 (16 mg) は後者 (72 mg) の $\frac{1}{4}$ 程度であり、しかも両者は何れも Polyribonucleotides として鑑識されたという関係から推察し得るところを述べれば次の如くである：

(a) R_4 -Fraction と C_4 -Fraction との収量差 (即ち 72 mg - 16 mg = 56 mg) は C_4 -Fraction に含有される RNase-sensitive polynucleotide 量に該当する。従つて C_4 -Fraction ではその $\frac{3}{4}$ 程度が RNase-sensitive RNA で、残りの $\frac{1}{4}$ は活性 St-S, 非働化 St-S, RNase-resistant RNA よりなると見られる。

而して C_3 -液と C_4 -Fraction とが溶血成績において同様 (1: 5~10 Mill.) であることは C_3 -液における内容 (活性 St-S, 非働化 St-S, RNase-sensitive RNA, RNase-resistant RNA) がそのままの比率関係で HCl 沈澱したものが C_4 -Fraction であることを教示しており、かくて更にさかのぼつて原料 I-N-F-St-S でも亦、その $\frac{3}{4}$ 相当量迄が RNase-sensitive RNA であつたと推算され得るわけである。

(b) R_3 -液の内容から HCl 沈澱によつて Mononucleotides が殆んど除去されたものが R_4 -Fraction であり、これは活性 St-S, 非働化 St-S, RNase-resistant RNA [及び微量の Mononucleotides, 残存している RNase-sensitive RNA 及び RNase] からなると考えられる。而して C_4 -Fraction と R_4 -Fraction との溶血力比が 1: 4~8 であることから R_4 は C_4 よりも単に溶血力という点から見れば、4~8 倍も高い精度の St-S 標品であるといひ得る。

(c) I-N-F-St-S に対する RNase 処置液から HCl 沈澱によつて分離された R_4 -Fraction は、その溶血力において原料 I-N-F-St-S よりも勝つているのであるが、もし $R_1 \rightarrow R_4$ の過程でアルカリ、温熱並びに HCl による St-S の非働化が起らなかつたならば、

R_4 -Fraction の溶血力は更に強力であるべき筈である。

(d) かく論じ来つて、 R_4 -Fraction が依然として Polyribonucleotide としての理・化学的性状を示しており、しかも原試料の I-N-F-St-S と異り、蛋白反応が陰性であるという成績に着目するならば、ここに自ら St-S 分子では少なくとも Ribonuclease-resistant polyribonucleotide が重要な構成部をなしているものであろうとの考えが起つて来るところである。

以上は溶血限界濃度 = 1: 20 Mill. の I-N-F-St-S 標品について行つた RNase 処置実験の成績であるが、同様関係の成績は又溶血限界濃度 = 1: 10 Mill. の I-N-F-St-S 標品を対象とした RNase をもつてする消化実験においても得られた。

とにかく、今回実験の成績は I-N-F-St-S は少なくとも St-S と RNA との混合物である。そして RNase によつて RNA の方は純酵素的反応で解体されたが、St-S の方は分解されずに残つた、とはいへこの間に St-S の方では実験過程における純理・化学的影響のために失活したものがあつたとして理解し得るところであらう。

ところで、今ひるがえつて蛋白質といひ核酸といつても、その何れもが複雑を極めた構成質であり、これが研究部面ではその本質の問題に対しては極めて慎重控え目な態度をとる必要があることに想到するならば、今回実験の意義は Streptolysin-S 問題に対しその分離・精製の度を更に進め得べき新方途を見出した点と、Streptolysin-S と RNase-resistant-polyribonucleotide との間には本毒素の本質問題に関連して切り離して考え得ないものがあるというデータを提供した点に求むべきであつて、これだけの成績からはもとより、一方的に本毒素の構成に蛋白性部分がないという可能性を完全に否定すべきでないといつた方が寧ろ穩当であらうか。

なお Bernheimer¹⁸⁾ 及び細谷¹⁹⁾ によつて、RNA に対し RNase を作用せしめた溶液から分離した RNase-resistant polynucleotide (即ち Bernheimer 等の所謂 AF) が溶連菌の St-S 産出を増強せしめる効果において原核酸に優越しているものがあることが実証されており、又他方杉山¹⁹⁾ によつて、熱非働化 St-S は酵母核酸よりも St-S 増産効果において勝つていると報告されていることは、何れも今回実験の成果に照応するものとして、ここに注記に値するものがあるといえようか。

総括並びに結論

既述の諸事項に基き今回実験の成果を要約せば次の如くである。

(1) 従来 I-N-F-Streptolysin-S-Fraction には Streptolysin-S 以外にお RNA も含まれているだろうと推想されながらも、これに対する明確な実証が齎されていない。ところが I-N-F-Streptolysin-S-Fraction が RNase によつて内容的に果して如何なる異変を来すかについて詳細に追究され、その結果としてここに初めて RNA の混在することが証明され、しかもその含量は 4% にも及ぶと推算されるに至つた。

(2) I-N-F-Streptolysin-S-Fraction に対し RNase を磷酸緩衝液 (pH=7.6) 中で 23°C 下、15 時間作用せしめた後、HCl 沈澱の操作を加えるという方式で、

a) 混在する RNase-sensitive RNA は HCl 非沈澱性の解重合体 (Mononucleotides) に分解されるが、Streptolysin-S の方は RNase の影響を全く蒙ることがない。

b) 而して遠心分離によつて RNA の解重合体 (Mononucleotides) は上清液に残存するに対し Streptolysin-S の方は HCl 沈澱性の RNase-resistant Fraction の方へ収集される。

ことが明示された。

(3) これ迄の Streptolysin-S の核酸説では、本毒素は本質的に Polynucleotide 構成の核酸属であろう位にしか考え得られないという状態であつたが、上述の RNase-resistant Fraction の理・化学的性状についての検討で、本劃分は Polyribonucleotide 性で、蛋白反応陰性であるという成績が得られ、ここに Streptolysin-S 分子では少なくとも RNase-resistant polyribonucleotide が重要な構成部をなしているだろうという一歩進んだところ迄論考し得るに至つた。

(4) I-N-F-Streptolysin-S-Fraction に対する RNase 処置は混在する RNase-sensitive RNA を除去する上に有要なる手段である。しかしこの場合 Streptolysin-S はたとえ RNase には全く影響されなくとも、実験条件 (pH, 温度, HCl 処置) の関係で本毒素の方を終始安全に保持するというが如きことは期待出来ず、或る程度 Streptolysin-S に失活するものがあることは免れない。

(5) 要するに本研究によつて Streptolysin-S の精製分離並びにその本質に関する研究に新方途が拓けて来たわけである。

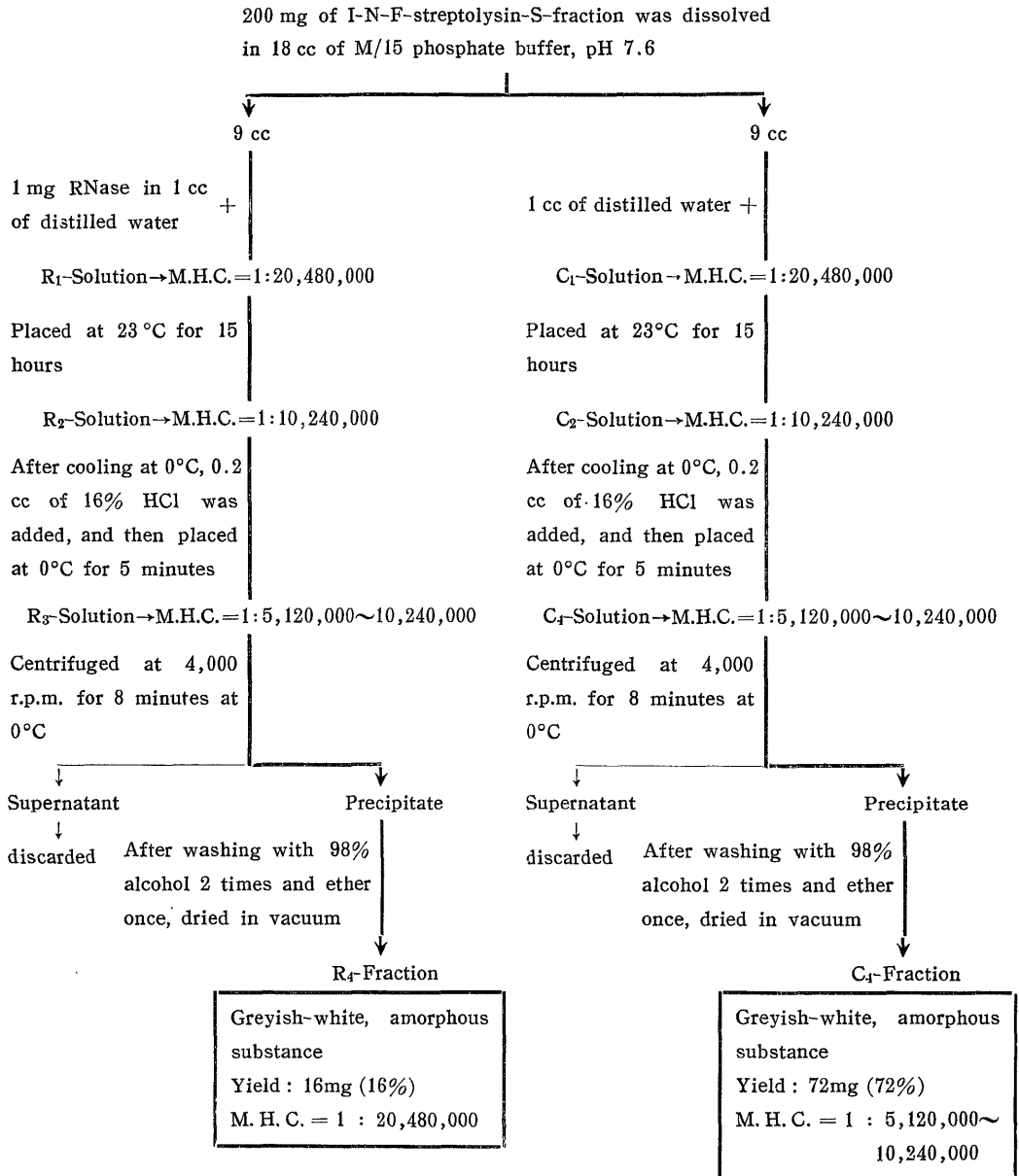
文

- 1) Okamoto, H. : Japan. J. Med. Sc., IV. Pharmacol., 12, 167, 1940.
- 2) 岡本 肇 : 核酸効果とこれに基く Streptolysin-S 研究の展開, 細胞化学シンポジウム, 3, 145, 1945.
- 3) McCarty, M. : Streptococcal Infections, Columbia University Press, 1953.
- 4) Okamoto, H., Koshimura, S., Hirata, R., Murasawa, K., Bando, Y. and Shimizu, R. : Z. f. Krebsforsch., 62, 408, 1958.
- 5) 岡本・松田・京田 : 日本薬物学雑誌, 33, 370, 1941.
- 6) Bernheimer, A. W. : J. Exp. Med., 90, 373, 1949.
- 7) 細谷・林・本間・江上・八木・鈴木 : 基礎と臨床, 1, 211, 1943.
- 8) Shoin, S. : Japan. J. Exp. Med., 24, 13, 1954.
- 9) 細谷・林・本間・江上・下村・八木 : 基礎と臨床, 3, 120, 1949.
- 10) Hosoya, S., Hayashi, T., Homma, Y., Egami, F., Shimomura, M.

献

- and Yagi, Y. : Japan. J. Exp. Med., 20, 27, 1949.
- 11) Okamoto, H., Miura, K., Ito, R. und Kyoda, S. : Japan. J. Med. Sc., IV. Pharmacol., 13, 23, 1940.
- 12) Okamoto, H., Kyoda, S., und Ito, R. : ibid, 14, 99, 1941.
- 13) Kunitz, M. : J. Gen. Physiol., 24, 15, 1941.
- 14) Gulland, J. M., Barker, G. R. and Jordan, D. O. : Ann. Rev. Biochem., 14, 175, 1945.
- 15) Loring, H. S., Carpenter, F. H. and Roll, P. M. : J. Biol. Chem., 169, 601, 1947.
- 16) Chargaff, E. and Davidson, J. N. : The nucleic acids, vol. 1. New York, Academic Press, 1955.
- 17) 江上不二夫編 : 核酸及び核蛋白質, 上巻.
- 18) Bernheimer, A. W. and Rodbart, M. : J. Exp. Med., 88, 149, 1948.
- 19) 杉山篤弘 : 金大結研年報, 14 (中), 271, 1956.

Table I
Experiment for Separating Ribonuclease-resistant Fraction from
Ribonuclease-digested Solution of Purified Streptolysin-S Preparation



Remarks : In the hemolysis test experiment with R₁-, R₂- and R₃-Solutions, as well as C₁-, C₂- and C₃-solutions, 0.1cc was removed from each of the solutions.
M.H.C.= Minimum hemolytic concentration, as judged on a weight basis of the I-N-F-streptolysin-S-fraction.

Table II
Showing the Result of Hemolysis Test Experiment
with the Samples signified in Table I

Sample	Dilution of I-N-F-streptolysin-S fraction													
	20,000 1 : 1	40,000 1 : 1	80,000 1 : 1	160,000 1 : 1	320,000 1 : 1	640,000 1 : 1	1,280,000 1 : 1	2,560,000 1 : 1	5,120,000 1 : 1	10,240,000 1 : 1	20,480,000 1 : 1	40,960,000 1 : 1	81,920,000 1 : 1	
Solution	R ₁	###	###	###	###	###	###	###	###	##	+	-	-	
	C ₁	###	###	###	###	###	###	###	###	##	+	-	-	
	R ₂	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	-	
	C ₂	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	-	-	
	R ₃	###	###	###	###	###	###	###	++	+	±	-	-	
	C ₃	###	###	###	###	###	###	###	++	+	±	-	-	
Frac-tion	R ₄	###	###	###	###	###	###	###	###	##	++	+	±	
	C ₄	###	###	###	###	###	###	###	++	+	±	-	-	

Remarks : ### indicates complete hemolysis; ##, ++, +, ± indicate partial hemolysis; - indicates no hemolysis.

第Ⅲ表 R₄及び C₄-Fraction の収量, 溶血力, 理・化学的性状の比較

Fraction	R ₄	C ₄	(I-N-F-St-S)
収 量	16mg	72mg	(100mg)
溶 血 限 界 濃 度	1:20,480,000~40,960,000	1:5,120,000~10,240,000	(1:20,480,000)
理・化学的性状	何れも遊離状態の Polyribonucleotide として鑑別された, 即ち		
	形 状	微灰白色無晶形粉末	微灰白色無晶形粉末
	溶 解 性	アルコール, エーテルに不溶于水に不溶であるが Na ₂ CO ₃ による中和で容易に溶解	アルコール, エーテルに不溶于水に易溶
	Orcinol 反応	##	##
	Feulgen 反応	-	-
	Dische 反応	-	-
	Ninhydrin 反応 (1%水溶液における)	-	±
Tetrabromophenolphthalein ethyl ester による蛋白検出反応 (1%水溶液における)	-	-	
紫外線吸収スペクトル	酵母核酸曹達のそれと同様 (図1参照のこと)		

