

Streptolysin-S に対する諸種酵素の影響性について

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本 肇教授)

紺 井 忠 弥

小 寺 一 英

西 部 行 雄

(昭和33年12月9日受付)

Effect of Various Enzymes on Streptolysin-S

TADAYASU KON-I

KAZUhide KODERA

YUKIO NISHIBE

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

ABSTRACT

Some data concerning the influence of enzymes on streptolysin-S were presented by Bernheimer in 1949, and by Egami et al. in 1949.

The purpose of the present study was to extend our knowledge in this line of the problem. The data obtained in our study may be summarized as follows :

1) None of the following enzymes, under the experimental conditions employed, was found to be effective in causing a significant degree of inactivation of streptolysin-S : trypsin, pepsin, lipase, varidase, ribonuclease and hyaluronidase.

2) Streptolysin-S was inactivated by α -amylase. Inactivation of the toxin by snake venom occurred only when serum was present. Papain was effective in causing the inactivation of the toxin in the presence of cysteine.

As in the cases of experiments made by previous investigators above-mentioned, the results of this paper were also very disappointing in that they failed to provide convincing evidence as to the chemical nature of streptolysin-S.

緒 言

Streptolysin-S に対する酵素の影響関係如何に関し
ては、これ迄 Bernheimer¹⁾による Ribonuclease,
Desoxyribonuclease, Lysozyme, Hyaluronidase,
Nucleophosphatase, Trypsin, Chymotrypsin, Papain,
Cathepsin 及び Ficin をもつての実験と、細谷等²⁾
³⁾による Ribonuclease, Nucleophosphatase 及び

Chymotrypsin をもつての考査との二つの報告がある
のみである。即ち本研究は、Streptolysin-S ではその
本質或いは帰属が未だに明確を欠いている現状^{4), 5)}
であることに鑑み、本毒素の諸種酵素に対する態度に
ついての知見を更に拡大追補するの目的をもつて行わ
れたものである。

実 験 方 法

1) 精製 Streptolysin-S :
溶連菌 (S-株) の 1%酵母核酸加ブイオン30時間培

養液より正印⁶⁾の記載によつて分離精製した I-N-F-
Streptolysin-S-Fraction (溶血限界濃度 = 1 : 25,600,

000) を使用する。その (以下単に St-S と略記す) 蒸溜水による 1:400 並びに 1:1,000 液を原液とす。

2) 供試酵素:

- a) Pepsin (和光純薬工業)
- b) Trypsin (Grüble)
- c) Papain (Merck)
- d) α -Amylase (石津製薬)
- e) Lipase (石津製薬)
- f) Ribonuclease (ミノファーゲン製薬)
- g) Hyaluronidase (塩野義)
- h) Varidase (Lederle-武田)
- i) 台湾ハブ毒 (塩野義研究所田中兼太郎博士より分譲されたもの)

の9種 (Varidase は Streptokinase と Desoxyribonuclease よりなるといわれるので都合10種) を使用する。この内、今回新たにその St-S に対する影響性が考査されたものは Pepsin, α -Amylase, Lipase, Streptokinase, 台湾ハブ毒 (以下これを Snake-venom と略記) の5種である。なお Papain については Cysteine の存・否, 及び Snake-venom については血清の存・否の両条件下での考査が行われた。

3) 実験術式:

酵素作用のメヂウムとしては, Snake-venom における実験には 0.85% NaCl 溶液を, その他の酵素に

おいてはそれぞれ至適した pH の緩衝液を選んだ (第 I 及び第 II 表参照)。而して incubation の条件は Snake-venom では 37°C 下で1時間, その他の酵素ではすべて 23°C 下で1時間とした。

例えば Trypsin の場合について述べれば, それぞれ

- a) [1:1,000 St-S 液 1cc+1:9,000 Trypsin in M/15 phosphate buffer (pH=8.0) 9cc]
- b) [1:1,000 St-S 液 1cc+M/15 phosphate buffer (pH=8.0) 9cc] (即ち対照)

なる内容を有する2本の試験管を用意し, 両者を同時に 23°C の浴槽中に1時間静置せしめる。次いで10分間氷冷せしめてから両液について溶血力の比較試験を行うといった具合である。なお Papain のみは難溶性であったので乳鉢中で微粉化し当該緩衝液に懸濁せしめたものを酵素液とした。

4) 溶血力試験:

従来当教室で慣用している方法に準ずる。即ち被検液の 0.85% 食塩水による2倍宛の倍下稀釈液各 1cc に対し1%家兎赤血球浮遊液 (脱線維血液を3回食塩水で洗滌したもの) 1cc 宛を加え, よく振盪した後 37°C の孵卵器中に納める。而して2時間後に一旦成績を読み, 更に22時間氷室に静置せしめたものについて再び溶血の有無・強弱を確かめる。

実験成績

第 I 表は台湾ハブ毒の St-S に対する影響性についての実験成績であるが, ここではまず第4管目の (St-S+Snake-venom+血清) にあつては St-S の溶血力が $\frac{1}{2}$ 程度に減弱していることが注目されよう。而して第3管目の (St-S+Snake-venom) では, 対照たる第1管目の (St-Sのみ) 及び第2管目の (St-S+血清) に対比して殆んど溶血力の低下が起つていないことに徴して, 上述第4管目における溶血力の低下は正に Snake-venom の特異的酵素的作用性に基いて St-S の非働化 (即ち分子の破壊) が起つたことの顕現であると断じ得よう。

次に第 II 表は Trypsin, Pepsin, α -Amylase, Lipase, Varidase, Ribonuclease 及び Hyaluronidase における実験成績を総括して展示したものである。

即ち以上の成績に基いて各酵素をそれぞれ St-S に対し破壊的であると判ぜられたものと然らざるものとに分別すると次の如くである。

破壊的	非破壊的 (無影響のもの)
Snake-venom	Trypsin, Varidase
Papain (+Cysteine)	Pepsin, Ribonuclease
α -Amylase	Lipase, Hyaluronidase
	Papain (Cysteine を含まず)

ところで, 先に細谷^{2), 3)} 並びに Bernheimer¹⁾ によつて行われた St-S に対する酵素の影響性の実験に徴しても, 蛋白質或いは核酸の何れをもつて Streptolysin-S の本質とすべきか判じ兼ねるような成績が得られているのであるが, 然らば今回実験の成績はこれを St-S の本質或いは活性基の問題に関連せしめて果してどうであろうか。

このことに関しては, 第 III 表提示のように例え細谷, Bernheimer 等の成績を参考にしたとしても,

i) α -Amylase をもつての実験で, その作用濃度に比例して St-S の非働化が招来されていることは糖質が St-S 構成の上に関与しているのではないかを思わし

めるものがある。

ii) St-S が Papain (Cysteine 加) 並びに Chymotrypsin で影響されることは、本毒素の本質が蛋白性でないかを思わしめるも、Trypsin 及び Pepsin が無影響であることに対する説明に困難性がある。

iii) St-S が Snake-venom (即ち Diphosphoesterase) 並びに Nucleophosphatase によつて影響(細谷)される点は Polynucleotide 性を示唆しているよ

うでもあるが、他方には Ribonuclease は全く無影響性である。

など、その間に甚だ明確を欠くものがあり、本毒素は或いは蛋白(乃至は Polypeptide)・核酸・糖質の三成分(或いはそれ以上)を含む極めて複雑な構成体であるかも知れないという新たな推論さえも可能であるといった具合である。

結 語

1) Streptolysin-S に対し Snake-venom (血清存在下で), Papain (Cysteine 存在下で) 及び α -Amylase は非働化的に影響する。

2) Trypsin, Pepsin, Lipase, Varidase, Ribonuclease 及び Hyaluronidase は何れも Streptolysin-S に対しては全く無影響である。

文 献

- 1) Bernheimer, A. W. : J. Exp. Med., 90, 373, 1949. 2) 細谷・林・本間・江上・下村・八木 : 基礎と臨床, 3, 120, 1949.
3) Hosoya, S., Hayashi, T., Homma, Y., Egami, F., Shimomura, M. and Yagi, Y. : Japan. J. Exp. Med., 20, 27, 1949. 4)

献

- 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. 5) McCarty, M. : Streptococcal Infections, Columbia University Press, 1953.
6) Shoin, S. : Japan. J. Exp. Med., 24, 13, 1954.

Table I
Effect of Snake-Venom on Streptolysin-S

Test-tube No.		1	2	3	4
A mixture of	1 : 400 streptolysin-S (I-N-F-fraction) solution	2 cc	2 cc	2 cc	2 cc
	0.85% NaCl solution	3 cc	2 cc	1 cc	.
	1 : 2 rabbit's serum	.	1 cc	.	1 cc
	1 : 200 snake-venom solution	.	.	2 cc	2 cc
Further treatment of each mixture		The content of each test-tube, after standing at 37°C for 1 hour, was titrated for hemolytic activity ↓			
Result of hemolysis test					
Dilution of streptolysin-S	1 : 50,000	###	###	###	###
	1 : 100,000	###	###	###	###
	1 : 200,000	###	###	###	##
	1 : 400,000	###	###	###	++
	1 : 800,000	###	###	###	+
	1 : 1,600,000	###	###	###	-
	1 : 3,200,000	###	###	##	-
	1 : 6,400,000	##	##	++	-
	1 : 12,800,000	++	++	+	-
	1 : 25,600,000	+	+	±	-
	1 : 51,200,000	-	-	-	-
Control		-	-	-	-
Minimum hemolytic concentration		1 : 25,600,000	1 : 25,600,000	1 : 12,800,000 ~25,600,000	1 : 800,000

Remarks : Streptolysin-S (I-N-F-fraction), rabbit's serum and snake-venom were all diluted with 0.85% NaCl solution. 1 cc of 1% rabbit's red cell suspension was added to 1 cc of each of the diluted mixture. The tubes were then incubated at 37°C for 2 hours. Reading was taken after standing for 22 hours in an ice-box.
= Complete hemolysis; ##, ++, +, ± = Partial hemolysis; - = No hemolysis.

Table II
Showing the Summarized Data concerned with the Influence
of Various Enzymes on Streptolysin-S

Exp. group	Tube No.	9 cc of each of the solutions stated below was added to 1 cc of 1 : 1,000 streptolysin-S	Minimum * hemolytic concentration	Grade of reduction in hemolytic activity
I	1	M/15 phosphate buffer, pH 8.0	1 : 25,600,000	1
	2	1 : 9,000 trypsin in M/15 phosphate buffer, pH 8.0	1 : 25,600,000	1
II	1	Glycin-HCl buffer, pH 2.0	1 : 12,800,000	1/2
	2	1 : 9,000 pepsin in glycin-HCl buffer, pH 8.0	1 : 12,800,000	1/2
III	1	M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 25,600,000	1
	2	1 : 9,000 papain in M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 25,600,000	1
	3	1 : 900 cysteine in M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 25,600,000	1
	4	1 : 900,000 papain in M/15 phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 : 90,000 cysteine	1 : 6,400,000	1/4
	5	1 : 90,000 papain in M/15 phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 : 9,000 cysteine	1 : 1,600,000	1/16
	6	1 : 9,000 papain in M/15 phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 : 900 cysteine	1 : 400,000	1/64
IV	1	M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 25,600,000	1
	2	1 : 900,000 α -amylase in M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 12,800,000	1/2
	3	1 : 90,000 α -amylase in M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 6,400,000	1/4
	4	1 : 9,000 α -amylase in M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 3,200,000	1/8
V	1	M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 25,600,000	1
	2	1 : 9,000 lipase in M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 25,600,000	1
VI	1	M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 25,600,000	1
	2	1 : 9,000 varidase in M/15 phosphate buffer, pH 7.0	1 : 25,600,000	1
VII	1	M/15 phosphate buffer, pH 7.6	1 : 25,600,000	1
	2	1 : 9,000 ribonuclease in M/15 phosphate buffer, pH 7.6	1 : 25,600,000	1
VIII	1	M/20 acetate buffer, pH 5.2	1 : 25,600,000	1
	2	1 : 9,000 hyaluronidase in M/20 acetate buffer, pH 5.2	1 : 25,600,000	1

* The content of each test-tube, after standing at 23°C for 1 hour, was titrated for hemolytic activity.

Table III
Effect of Various Enzymes on Streptolysin-S

Author Enzymes	Hosoya et al.	Bernheimer	Kon-i et al.
Pepsin	•	•	0
Trypsin	•	0	0
Chymotrypsin	↓	↓	•
Papain	•	0	0
Papain+Cysteine	•	↓	↓
Cathepsin	•	↓	•
Ficin	•	↓	•
α-Amylase	•	•	↓
Lipase	•	•	0
Ribonuclease	0	0	0
Desoxyribonuclease	•	0	•
Varidase (Desoxyribonuclease + Streptokinase)	•	•	0
Lysozyme	•	0	•
Hyaluronidase	•	0	0
Nucleophosphatase	↓	0	•
Snake-venom	•	•	↓

↓ = Inactivation

0 = No inactivation

• = Not examined