

核酸による溶血性連鎖状球菌の溶血毒 増産現象に関する研究

第16報 高度純化の Ribo-核酸の Streptolysin S
増産効果についての実験

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本肇教授)

山本 泰 伊藤 佐 杉山 篤弘
正印 達 阪東 芳雄

(昭和32年1月4日受付)

Studies on the Phenomenon of High Promotion by Nucleic Acid of
the Production of Streptolysin S of Hemolytic Streptococcus
Part 16. Experiment with Highly Purified Yeast Ribonucleate Preparation
for Streptolysin S Formation Promoting Activity

Yasusi Yamamoto, Tasuku Ito, Tokuhiko Sugiyama,
Susumu Shoin and Yoshio Bando

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

最近当研究所の清水¹⁾は Ag-RNA-Complex を介する核酸の精製法なる研究に従事中、市販酵母核酸標品に対し Sevag の chloroform-gel 法²⁾並びに Ag-RNA-Complex を介する精製法を夫々反覆施行して純度の異なる一連の RNA 標品を調製したが、著者等はこれらの各 RNA 標品について Streptolysin S 増

産効果を比較検討することで、これ迄³⁾核酸による溶血性連鎖状球菌の溶血毒増産現象に関する研究部面*で欠けていた RNA 標品の純度とその Streptolysin S 増産に対する効果性という問題に対する解答が得られるとして本研究に着手した訳である。

予備的事項

先ず清水¹⁾の Ag-RNA-Complex を介する核酸の精製法についての研究成績から本研究に関係ある化学的事項を摘記し、これが生物学的活性の問題に関連して来る点を述べることにする。

即ち第1表は Ag-RNA-Complex を介する核酸標品の精製過程を示したものであつて、本法の原理は核

酸標品に対し一旦これを Ag-RNA-Complex に化せしめた後、アンモニヤールカリ性下で飽和食塩水を加えて H₂S を通ずると、脱銀されて RNA の再生が起ると同時に化生するコロイド状 Ag₂S によつて不純物が吸着除去されるにあるという。

而して第2表は同氏が市販酵母核酸ソーダ“Merck”

* これまでの研究では、たとえば、岡本³⁾、⁴⁾等はずばら市販酵母核酸を、細谷、江上⁵⁾等は市販酵母核酸と自家調製 RNA 標品を、又 Bernheimer⁶⁾等は市販酵母核酸の外に Sevag 法で精製したが純度について明記していない RNA 標品を使用しているといつた具合である。

*を試料として選び、これに対し1)前記 Ag-Complex を介する精製法を1回、2回、3回及び4回と順次適用して、その都度得られた Ag-₁、Ag-₂、Ag-₃ 及び Ag-₄ なる4つの精製 RNA-Na 標品と、2)連続して Sevag 法による Chloroform-amylalcohol 振盪操作を施すこと3回、6回、9回及び12回に及んで得た S-₃、S-₆、S-₉ 及び S-₁₂ の製精 RNA-Na 標品について、夫々の10% ** 水溶液の1滴宛を濾紙上に1列に滴下せしめ、風乾した後、Ninhydrin 反応を試験して得た成績を示したものであつて、今回著者等が行つた Streptolysin S (以下 St-S と略記) 産出実験では本表における全部の標品が供与されたのである。

ところで第2表で只1回の Ag-RNA-Complex を介する精製法を施行するだけで、Sevag 法を連続して9回施行した場合にも匹敵する程に純化された RNA 標品が得られている所見は、精製法の効率という点から極めて重視すべきものであるが、他方 Sevag 法では9回以後及び Ag-RNA-Complex を介する精製法では1回以後、たとえ精製操作を反覆しても、Ninhydrin 反応が完全に消失するに至らず依然として微陽性(±)の状態を保持している所見は、現下核酸の生物学的活性の研究分野で、

- a) Avery 等が肺炎双球菌で証明した Desoxyribo-核酸をもつて型転換因子 (Type transforming agent) とする研究に対しても、Mirsky⁷⁾,⁸⁾,⁹⁾ 等が指摘しているように型転換が DNA 標品に微量に混在している蛋白質によるものでないかといつて
- b) Frick¹⁰⁾ が DNA には Sevag 法で除去し得ない鞏固結合のアミノ酸があると報じている、
- c) Dounce¹¹⁾, Borsook¹²⁾ 等が蛋白合成と核酸との

関係で RNA には化学的に結合したアミノ酸 (或いは Polypeptide) があり得ることを示している、といった具合に核酸分子における構成成分としての蛋白性物質の存在に関する思潮が漸次抬頭しつつある現状にかんがみて、亦見逃すべからざるものといえよう。しからば Ag-₁→₄、S-₃ 及び ₄ の各標品における Ninhydrin 反応微陽性物質が果して核酸の構成蛋白、混在物の何れであろうか。このことに関して清水¹³⁾ は水解物のペーパー・クロマト実験、Adenine、Adenosine からの Glycine 化生の実験等をも行つて得た成績を綜合考察して、“勿論この成績から直ちに RNA 分子における鞏固結合のアミノ酸の存在を否定し得る訳のものでもなく、又 RNA に果して構成成分としてのアミノ酸があるか否かのつきつめた問題は、現在核酸の化学的並びに遺伝生化学的研究が当面している諸難問題に直接関連して来るという極めて重大なる意義を有するのであるから、早計に論断すべきでなく今後の研究にまつとした方が寧ろ穩当といえよう”と述べ、その所論は甚だ慎重である。けだし RNA といい、DNA といい共に複雑なる高分子化合物である上に未だ何れも結晶化されるに至つておらず、亦これが核酸の真態であるというものが把握されていない現状としては又已むを得ないことであろう。しかし今回実験の性質上、ここに特に注記する必要があることは、現在 Sevag 等の chloroform-gel 法が核酸標品に対する最も効果的な除蛋白法であるとして広く利用されていることから叙上 Ag-₂→₄ 並びに S-₁₂ 標品は少なくとも核酸標品に対する精製技術が現下到達している限りでの最高度の純化状態のものであると断じて一向支障がないということである。

Streptolysin S 増産効果の実験

実験方法

1) 供試 RNA 標品 :

- a) 市販酵母核酸ソーダ “Merck”.
- b) Ag-RNA-Complex を介して精製した Ag-₁、Ag-₂、Ag-₃ 及び Ag-₄ の4精製 RNA-Na 標品.

- c) Sevag 法で精製した S-₃、S-₆、S-₉ 及び S-₁₂ の4精製 RNA-Na 標品.
- 各標品の10%水溶液(ラクムス中性)2ccを調製し、100°C、30'の処置を行つたものを夫々原液として用意。

* 市販酵母核酸標品 (Merck 製, キリンビール会社製, Fisher Scientific Co. 製) は何れも10%水溶液で著明に Ninhydrin 反応陽性である。

** 各標本の10%水溶液状態での Ninhydrin 反応試験では原試料と S-₃ のみが陽性で他はすべて陰性。

2) 培養並びに溶血試験 :

当研究室慣用^{3), 4)}の1%核酸加ブイオン培養法に準じた。即ち先ず普通ブイオン (pH 7.6) 100cc から次の如く〔普通ブイオン 4.5cc + 被検 RNA 標品の10%原液 0.5cc〕なる組成の培養液9本と、〔普通ブイオン 4.5cc + 滅菌食塩水 0.5cc〕の1本を用意する。

- 1) 1%市販酵母核酸加ブイオン (pH 7.6) 5cc
- 2) 1% Ag-1 加ブイオン (pH 7.6) 5cc
- 3) 1% Ag-2 加ブイオン (pH 7.6) 5cc
- 4) 1% Ag-3 加ブイオン (pH 7.6) 5cc

- 5) 1% Ag-4 加ブイオン (pH 7.6) 5cc

- 6) 1% S-3 加ブイオン (pH 7.6) 5cc

- 7) 1% S-6 加ブイオン (pH 7.6) 5cc

- 8) 1% S-9 加ブイオン (pH 7.6) 5cc

- 9) 1% S-12 加ブイオン (pH 7.6) 5cc

- 10) ブイオン (pH 7.6) 5cc

次いで各管に対し一斉に溶連菌 (S-株) の24時間ブイオン培養液の1滴宛を接種した後、37°C の孵卵器に納める。培養30時間の後、遠心沈澱によつて各培養液の上清液を得。かくて10種の遠心上清液について同時に型の如く^{3), 4)} 倍下稀釈法による溶血試験を行う。

実 験 成 績

第3表に示したように Ag-1, Ag-2, Ag-3, Ag-4 及び S-3, S-6, S-9, S-12 の各精製 RNA 標品並びに原試料たる市販酵母核酸標品は何れも St-S 増産に対する効果性においては同様であつて、その間に何ら差異するところがないという成績が得られた。就中、注目すべきは最高限度純化の Ag-3→4 及び S-12 の各 RNA 標品が何れも依然として強力な St-S 増産効果を呈していることであつて、これは St-S 増産効果が Ribo-核酸標品に随伴して来ている微量物質によるものでないかという疑問を解消し、これが Ribo-核酸自

体の特性であることを肯定せしめるに足るものといえよう。即ち今回実験の意義は先に伊藤¹³⁾, Bernheimer¹⁴⁾ の水解物についての考查成績から間接的に“酵母核酸標品の存在下で起る溶連菌溶血毒素 S の増産現象は該核酸自体の性能の顕現に外ならない、即ち換言すれば特定の Polynucleotide 構成を有する核酸自体にこそ St-S 増産効果を呈する性能が潜在している”と推断されたことに対し、更に直接、Ribo-核酸標品の純化という方面からの考証を齎らした点にあるといえよう。

結 語

市販酵母核酸標品に対し Sevag の chloroform-gel 精製法或いは清水の Ag-RNA-Complex を介する精製法を繰り返して行つても Streptolysin S 増産効果

には認むべき何らの異変 (増強或いは減弱) も招来されず、両法によつて夫々最高限度迄純化された Ribo-核酸標品は依然強力効果性であることが実証された。

文 献

- 1) 清水 : 薬学雑誌, 1957年登載の予定, (薬学雑誌, 76, 158, 1956 を参照のこと).
- 2) Sevag, M. G., Lackman, D. B. and Smolens, J. : J. Biol. Chem., 124, 425, 1938.
- 3) 岡本 : 細胞化学シンポジウム, 3, 145, 1954.
- 4) Okamoto, H. : Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 12, 167, 1940.
- 5) 細谷, 林, 森, 江上, 鈴木 : 基礎と臨床, 1, 205, 1948.
- 6) Bernheimer, A. W. and Rodbert, M. : J. Exp. Med., 88, 149, 1948.
- 7) Mirsky, A. E. : Nucleic Acids and Nucleoproteins in

Symposia on Quantitative Biology (Cold Spring Harbor Symposia), Vol. II, 16, 1947.

8) Mirsky, A. E. & Pollister, A. W. : J. Gen. Physiol., 30, 117, 1946.

9) Chargaff, E. & Davidson, J. N. : The Nucleic Acids. Chemistry and Biology, Vol. I, II, 1955.

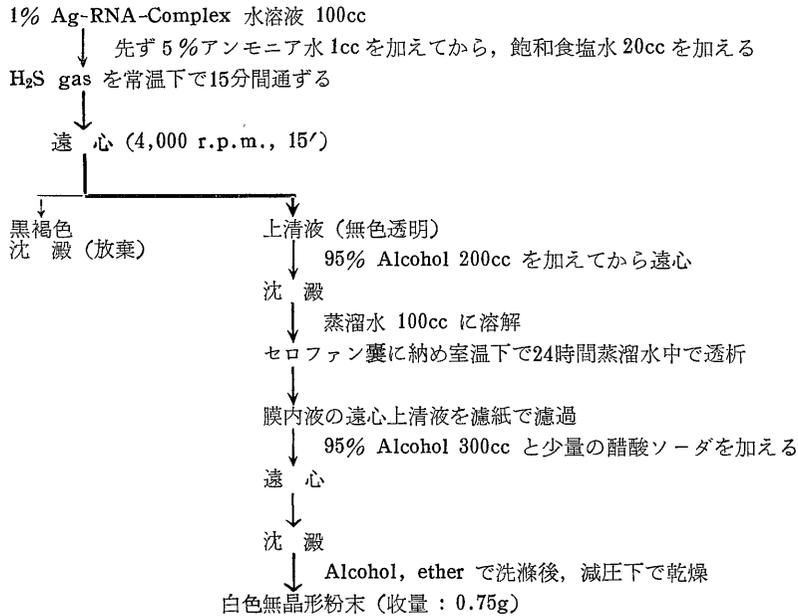
10) Frick, G. : Bioch. Biophys. Acta, 13, 41, 1954.

11) Dounce, A. L. : Enzymologia, 15, 251, 1952; Dounce, A. L., Kay, E. R. M. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83, 321, 1953; Potter,

J. L., Dounce, A. L. : J. Am. Chem. Soc., 78, 3078, 1956. 12) Borsook, H. : The biosynthesis of peptides and proteins. 3 éme congrés international de biochimie, Rapports,

Bruxelles, 54, 1955. 13) Ito, R. : Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 13, 85 *, 1940.

第1表 Ag-RNA-Complex を介する RNA 標品の精製過程



第2表 Sevag 法によつて精製した RNA 標品と Ag-RNA-Complex を介して精製した RNA 標品とについての Ninhydrin 反応比較試験

Sevag 法による精製実験		Ag-RNA-Complex を介する精製実験	
標品 (略記号)	Ninhydrin 反応	Ninhydrin 反応	標品 (略記号)
酵母核酸ソーダ “メルク”	卅	卅	酵母核酸ソーダ “メルク”
3 回施して得た標品 (S-3)	卍	±	1 回で得た標品 (Ag-1)
6 回施して得た標品 (S-6)	+	±	2 回で得た標品 (Ag-2)
9 回施して得た標品 (S-9)	±	±	3 回で得た標品 (Ag-3)
12 回施して得た標品 (S-12)	±	±	4 回で得た標品 (Ag-4)

酵母核酸ソーダ “メルク” に対し Sevag の chloroform-amylalcohol 振盪操作を

酵母核酸ソーダ “メルク” に介し Ag-RNA-Complex を介する精製を施すこと

* 各標品の10%水溶液の1滴宛を濾紙上に、1列に滴下せしめ、風乾の後、Ninhydrin 反応を試験した。而して酵母核酸ソーダ “メルク” における Ninhydrin 反応陽性度を便宜上卅で示した。

第3表 各 RNA 標品についての St-S 増産効果の比較実験
(溶血試験 : 37°C, 2 時間目の判読成績)

培養液の種類	上清液の希釈倍数										
	200 1:1	400 1:1	800 1:1	1,600 1:1	3,200 1:1	6,400 1:1	12,800 1:1	25,600 1:1	51,200 1:1	102,400 1:1	204,800 1:1
1% 酵母核酸“メルク”加ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1% Ag-1 加ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1% Ag-2 加ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1% Ag-3 加ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1% Ag-4 加ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1% S-3 加ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1% S-6 加ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1% S-9 加ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
1% S-12 加ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
上清液の希釈倍数	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128				
培養液											
普通ブイオン培養	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

卍=完全溶血 ; 卍, 卍, 卍=不完全溶血 ; 卍=非溶血.