

リボ核酸の Streptolysin S 増産効果発現上 必要な cofactor に関する研究

第 2 報

ペプトンよりの cofactor の分離試験

金沢大学医学部薬理学教室 (主任：岡本 肇教授)

正 印 達
西 川 順 子
小 林 孝

(受付：昭和37年7月22日)

現在、リボ核酸 (RNA) による溶連菌の Streptolysin S (以下 St-S と略記す) 増産現象に関する生化学的研究にはもっぱら洗浄溶連菌を、RNA を加えた単純化メジウムに浮遊せしめて St-S の増産をおこさせる静止菌法^{1) 2) 3)} が利用されているのであるが、この静止菌法による実験ではメジウムに補助因子 cofactor としてペプトンあるいは肉汁の少量を加える必要のあることについては、すでに Bernheimer 等⁴⁾ ならびに細谷、江上ら^{5) 6) 7)} によって実証報告されたところである。^{*} そしてこの補助因子の本質問題に関しては、それが autoclaving-resistant であり、100°, 60分の処置によって pH12 で破壊されるが pH1.0 では安定、しかも灰化で無効となるというくらいしかわかっていなかったのであるが、最近清水⁸⁾ は肉汁

を対象としての考査で肉汁中より cofactor 活性を有するポリペプチッド (非透析性) を高純度に分離することに成功した。他方、私たちは同時に市販ペプトン標品を対象としてその cofactor 活性物質の追求実験にとりかかったのであるが、その間、教室の小林⁹⁾ によって RNA のかわりにペプトン (3~5%) を加えた単純化メジウムでも相当高度に St-S 産出がおりうという事実がみいだされるということもあって、ここに問題の複雑化と考査の困難化に当面するにいたった。

しかし種々考査するうちに、まずペプトンにおける cofactor 活性物質と St-S 増産性物質とは透析によって分別され、前者は透析外液に移行し後者は内液^{**)} にとどまることを知り、これを契機に透析外液からの cofactor 活性物

本研究の遂行には日本対ガン協会並びに東京生化学研究所からの助成金に負うところがあったことを記して、感謝の意を表します。

^{*} 別に Bernheimer¹⁾ は RNA のかわりにその RNase-core を用いる静止菌法でマルトースあるいはグルコサミンの微量をもってよくペプトンに代置しうることを証明している。

^{**)} 透析内液における St-S 増産性物質の本質問題についての研究は目下進行中。

質の分離純化の途がひらけてきたわけである。

すなわち, 以下は, 現在までに得られた成績

についての報告である。

I. 実験材料および核酸効果実験法

A. 材料

1) 菌株——教室保存の *Streptococcus hemolyticus*

“S-株”を用いた。

菌浮遊液の調製法: 普通ブイヨン (pH7.6) 100ml に溶連菌を接種し, 37°C 下に18時間培養したものを, 遠心沈殿 (3,500 r. p. m. 15分) し, その沈渣にたいし0.85% NaCl 100ml 宛をもってする洗浄操作を3回ほどこす。最後の沈渣 (生菌体) を磷酸緩衝—リンゲル液 (以下PBRと略記す) に浮遊せしめたものを用意す。

2) ペプトン標品: 市販のミクニ, 啞鈴, 照内および Witte の4種。

3) リボ核酸: 市販の Yeast sodium ribonucleate “Merck” にたいし清水による精製法^{10a, b, c)} (市販 RNA 標品の Ag-複合体 → 脱銀操作 → 精製 RNA 標品) をほどこした高度精製品*) を使用した。この精製RNAの10%水溶液を原液として用意す。

B. Cofactor 活性の証明法

磷酸緩衝—リンゲル液 ($M/15 Na_2 HPO_4$ 7.2ml + $M/15 KH_2 PO_4$ 2.8ml + Ringer 液 40.0ml, pH7.2)

を基礎メジウムとしたいわゆる 静止菌法による St-S 産出実験によつた。すなわち, それぞれ

i) [菌浮遊液 1.0ml + PBR 0.6ml + 10%精製 RNA 液 0.2ml + 10%被検ペプトン画分の水溶液 0.2ml] 混液, および

ii) [菌浮遊液 1.0ml + PBR 0.6ml + 10%精製 RNA 液 0.2ml + 0.85% NaCl 0.2ml] 混液 (対照)

なる内容を有する二本の試験管 (各混液は 2ml 宛で, 精製 RNA あるいはペプトン画分の濃度は 1%) を用意し, ただちに 37°C の水浴中に静置すること二時間, 氷冷してから両者の内容を遠心沈殿 (3,500 r. p. m. 15分) に付し, 両上清液について溶血力の比較試験を行う。

溶血試験は当教室慣用の 1% 洗浄ウサギ赤血球浮遊液を使用しての倍下希釈法によつた。

被検ペプトン画分の cofactor 活性の有無いかんは i) および ii) の両上清液における溶血力の相違で判明するわけであるが, なお, はたしてそれ自体で St-S 増産がおこらないかどうかをたしかめるために [菌浮遊液 1.0ml + PBR 0.8ml + 10%被検物質水溶液 0.2ml] 混液についての実験をもおこなつた。

II. 実験成績

まず, 予備の実験において

1) 市販のペプトン標品それ自体の呈する補助因子活性度では, ミクニ, 啞鈴, 照内および Witte の4者間にはほとんど差異がないこと, しかし

2) アルコールによる活性の沈殿という点では啞鈴 > ミクニ = 照内 = Witte という順序であること

が知られたので, 本研究ではもっぱらペプトン “啞鈴” を原料として進めることとした。まず, 市販ペプトンよりの cofactor 活性部分の精製分離過程を要約すれば表 1 のごとくであ

る。すなわち

1) 5%市販ペプトン水溶液にたいする3倍量のアルコール (98%) による沈殿操作。

2) アルコール沈殿物の水溶液にたいする, 同量宛のアルコール (98%), エーテルおよびアルコール (98%) の順次付加による沈殿物の捕集 [P-I-A 画分: この画分ではなお cofactor 活性物質と St-S 増産的に作用する物質が混在している。]

3) P-I-A 画分の水溶液をセロファン袋におさめたものの蒸留水にたいする透析 (氷冷下, 二昼夜)。cofactor 活性物質は膜透過性であるが, St-S 産生をおこす物質は非透析性で内液に残

*) 市販の RNA 標品は不純ですでに cofactor 活性物質を混有しているので静止菌法による St-S 増産実験で, そのような市販品を用いたのでは St-S の増産 (すなわち核酸効果) がおこるから cofactor 物質の追求には適しない。しかしこの精製 RNA についてはそれ自体の存在下では St-S の産出はきわめて僅微であるが, ペプトンの少量追加ではじめて St-S の高度増産がおこることが予備実験でたしかめられた。

る。透析内液を凍結乾燥に付す [P-DI画分]。

4) 透析外液にたいするアルコール沈殿 [P-DO画分]: この画分は強い cofactor 活性を呈するが, なお不純でそのペーパークロマトグラフィーは数個のニンヒドリン陽性のスポットを与える。]

5) P-DO 画分水溶液の Amberlite IRA-410 (Cl⁻型) を通過せしめたものの凍結乾燥 [P-DO₄₁₀画分]。この行程ではじめてペーパークロマトグラフィーで単一のスポットを与える cofactor 活性画分が得られる。

いま市販ペプトン“啞鈴”を原料として, これに上記分離精製法を適用して得られた P-I-A, P-DI, P-DO および P-DO₄₁₀ の各画分について検討した成績を述べれば:

[A] 各画分の cofactor 活性度の比較実験

すなわち, 表2は各画分を1%に付加して核酸効果発現に対する cofactor 活性を比較した成績であるが, なんら cofactor 画分を加えない [菌浮遊液+精製核酸+PBR+0.85%食塩水]混液(No. 6) ではその遠心上清液の1:8液までしか溶血力を呈していないに対し, ペプトン“啞鈴”(原料)およびそれからの画分 P-I-A, P-DI, P-DO ならびに P-DO₄₁₀ を付加(1%)した各混液ではその上清液のいずれもが溶血力において強大であり, しかも溶血力の順序は P-DO₄₁₀ (No.5, 1:2,048液) > P-DO (No.4, 1:1,024液) = P-I-A (No.2, 1:1,024液) > P-DI (No.3, 1:128液) = Peptone“啞鈴”(No.1, 1:128液) である事を見る。

すなわち, この成績は P-DO₄₁₀ 画分では原料のペプトン“啞鈴”よりも cofactor 活性という点では16倍も濃縮精製されており, その他の画分ではなお精製度において劣っているとい

III. 結

本研究では市販のペプトン標品から RNA の St-S 増産効果発現に対する cofactor 活性を呈する物質の精製法が攻究せられた。その結果,

a) Cofactor 活性物質がアルコール沈殿性であり, しかももっぱら透析外液に収集される,

b) この透析外液の Amberite IRA-410

えよう。

ちなみに表3提示の成績から P-DO₄₁₀ 画分の cofactor としての影響がその濃度に関係していることが知られよう。

[B] 各画分についての精製 RNA を加えないメジウムにおける比較実験

表4は原料のペプトン“啞鈴”とそれから得られた P-I-A, P-DI および P-DO₄₁₀ の各画分について, それ自体に St-S 増産能がないかどうかを検した成績である。すなわち, 本表では特に P-DO₄₁₀ 画分自体にはほとんど全く St-S 増産能がない (No.4) に対し, 透析前の P-I-A 画分によって St-S の増生が起こっているという所見に注目すべきであろう。

[C] 各画分についての化学的方面からの考查

表5は上記の cofactor 活性度試験 (表2) および St-S 増産能試験 (表4) の成績とともに, ペプトン“啞鈴”(原料)とそれから得られた P-I-A, P-DO, P-DO₄₁₀ および P-DI (非透析画分) のそれぞれについて化学的定性反応 (Ninhydrin, Biuret, Orcinol および Dische) ならびにペーパークロマトグラフィー, および紫外線吸収曲線を調べて得られた成績を一括展示したものである。

以上は現在までのペプトン中における cofactor 活性物質に関する考查で得られた成績であるが, いまこれらの諸成績を総合考察する事で「P-DO₄₁₀画分は cofactor 活性を有する高度に純化された状態の polypeptide 性物質よりなる*)」と断じてまず間違いないといえようか。

語

(Cl⁻) 通過で cofactor 活性物質を高度純化の状態 で取得しうる,

c) この cofactor 活性物質はおそらく polypeptide であろう

という結論が得られた。

*) アミノ酸類には cofactor 活性がない。11)12)

文

- 1) Bernheimer, A. W. and Rodbart, M. : J. Exp. Med., 88, 149, 1948.
- 2) Hosoya, S., Hayashi, T., Homma, Y., Egami, F. and Yagi, Y. : Japan. J. Exp. Med., 20, 27, 1949.
- 3) Ito, R., Okami, J. and Yoshimura, M. : Japan. Med. J., 1, 253, 1948.
- 4) Bernheimer, A. W. : J. Exp. Med., 90, 373, 1949.
- 5) 細谷省吾, 林奮義, 本間遜, 江上不二夫, 下村道夫, 八木康夫: 基礎と臨床, 3, 120, 1949.
- 6) Egami, F., Shimomura, M., Yagi, Y., Hayashi, T., Mase, T. and Hosoya, S. : J.

献

- Exp. Med., 20, 527, 1950.
- 7) 岡本肇: 細胞化学シンポジウム, 3, 145, 1954; 金大結研年報, 19(下), 165, 1962.
 - 8) 清水隆作: 薬学雑誌, 80, 941, 1960.
 - 9) 小林孝: 詳細は近く発表の予定.
 - 10) 清水隆作: a) 薬学雑誌, 76, 158, 1956.
b) 同誌, 77, 561, 1957.
c) 同誌, 77, 676, 1957.
 - 11) Younathan, E. S. and Barklis, S.S. : J. Bact., 74, 151, 1957.
 - 12) 清水隆作, 林鋭雄, 越村三郎: 日本薬学会北陸支部第13回例会講演 (金沢).

Table 1.

Procedure for isolation and purification of cofactor from peptone

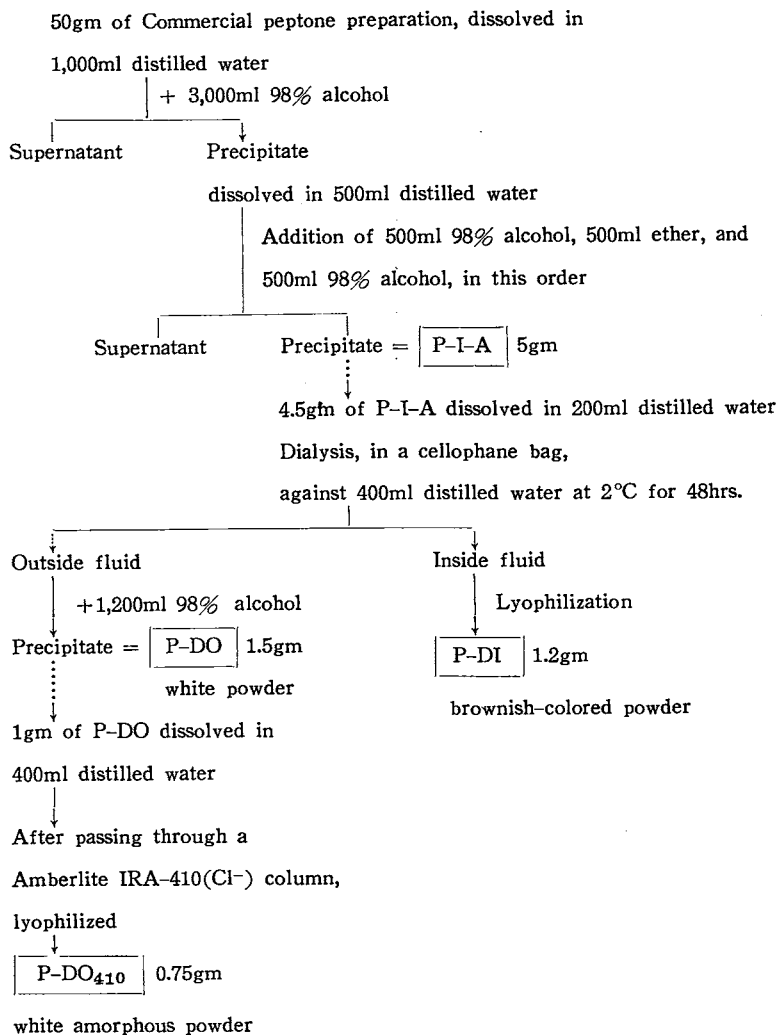


Table 2.

Comparative experiment on the cofactor activity of fractions, P-I-A, P-DI, P-DO and P-DO₄₁₀, for Streptolysin S inducing effect of RNA

| Test-tube No. | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
|--|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Mixture in resting cell system | Washed Streptococcus suspension (ml) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| | Phosphate-buffered Ringer solution (ml) | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | |
| | 10% Purified yeast ribonucleate solution (ml) | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | |
| | 10% Solution of | peptone "Arei" (ml) | 0.2 | . | . | . | . | . |
| | | P-I-A (ml) | . | 0.2 | . | . | . | . |
| | | P-DI (ml) | . | . | 0.2 | . | . | . |
| | | P-DO (ml) | . | . | . | 0.2 | . | . |
| | | PDO ₄₁₀ (ml) | . | . | . | . | 0.2 | . |
| 0.85% NaCl solution (ml) | . | . | . | . | . | 0.2 | | |
| Further treatment of mixture | | Each mixture was placed at 37°C for 2hrs., and then centrifuged ↓ Supernatant ↓ Titration for hemolytic activity* | | | | | | |
| Result of hemolysis test (Reading taken after 2hrs. at 37°C) | | | | | | | | |
| Dilution of supernatant | 1 : | 2 | ### | ### | ### | ### | ### | ## |
| | 1 : | 4 | ### | ### | ### | ### | ### | ++ |
| | 1 : | 8 | ### | ### | ### | ### | ### | + |
| | 1 : | 16 | ### | ### | ### | ### | ### | - |
| | 1 : | 32 | ## | ### | ## | ### | ### | - |
| | 1 : | 64 | ++ | ### | ++ | ### | ### | - |
| | 1 : | 128 | + | ### | + | ### | ### | - |
| | 1 : | 256 | - | ## | - | ## | ### | - |
| | 1 : | 512 | - | ++ | - | ++ | ## | - |
| | 1 : | 1,024 | - | + | - | + | ++ | - |
| | 1 : | 2,048 | - | - | - | - | + | - |
| 1 : | 4,096 | - | - | - | - | - | - | |

* 1ml of 1% washed rabbit's red cell suspension was added to 1ml of each diluted supernatant.
 ### = complete hemolysis ; ##, ++, +, ± = partial hemolysis ; - = no hemolysis

Table 3.
Test for cofactor activity of P-DO₄₁₀ in relation to its cocentration

| Test-tube No. | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
|--|--|--|-----|-----|-----|-----|
| Mixture in resting cell system | Washed streptococcus suspension (ml) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| | Phosphate-buffered Ringer solution pH 7.2 (ml) | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | |
| | 10% Purified yeast ribonucleate solution (ml) | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | |
| | P-DO ₄₁₀ | 10% solution (ml) | • | 0.2 | • | • |
| | | 2% solution (ml) | • | • | 0.2 | • |
| | | 1% solution (ml) | • | • | • | 0.2 |
| | 0.85% NaCl solution (ml) | | 0.2 | • | • | • |
| Further treatment of mixture | | Each mixture was placed at 37°C for 2hrs., and then centrifuged ↓ Supernatant ↓ Titration for hemolytic activity | | | | |
| Result of hemolysis test (Reading taken after 2hrs. at 37°C) | | | | | | |
| Dilution of supernatant | 1 : | 2 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| | 1 : | 4 | ++ | +++ | +++ | +++ |
| | 1 : | 8 | + | +++ | +++ | +++ |
| | 1 : | 16 | - | +++ | ++ | ++ |
| | 1 : | 32 | - | +++ | ++ | - |
| | 1 : | 64 | - | +++ | + | - |
| | 1 : | 128 | - | +++ | - | - |
| | 1 : | 256 | - | ++ | - | - |
| | 1 : | 512 | - | ++ | - | - |
| | 1 : | 1,024 | - | ++ | - | - |
| | 1 : | 2,048 | - | + | - | - |
| | 1 : | 4,096 | - | - | - | - |

Table 4.
Influence of P-I-A, P-DI and P-DO₄₁₀ on the
Streptolysin S formation of
Streptococcus hemolyticus

| Test-tube No. | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
|--|--|--|-----|-----|-----|-----|---|
| Mixture in resting cell system | Washed streptococcus suspension (ml) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| | Phosphate-buffered Ringer solution pH 7.2 (ml) | 1.0 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | |
| | 10% Solution of | peptone "Arei" (ml) | • | 0.2 | • | • | • |
| | | P-I-A (ml) | • | • | 0.2 | • | • |
| | | P-DI (ml) | • | • | • | 0.2 | • |
| P-DO ₄₁₀ (ml) | | • | • | • | • | 0.2 | |
| Further treatment of mixture | | Each mixture was placed at 37°C for 2hrs., and then centrifuged ↓ Supernatant ↓ Titration for hemolytic activity | | | | | |
| Result of hemolysis test (Reading taken after 2hrs. at 37°C) | | | | | | | |
| Dilution of supernatant | 1 : | 2 | ± | ++ | +++ | +++ | ± |
| | 1 : | 4 | - | ++ | +++ | +++ | - |
| | 1 : | 8 | - | + | +++ | +++ | - |
| | 1 : | 16 | - | - | ++ | ++ | - |
| | 1 : | 32 | - | - | ++ | ++ | - |
| | 1 : | 64 | - | - | + | + | - |
| | 1 : | 128 | - | - | ± | ± | - |
| | 1 : | 256 | - | - | - | - | - |
| | 1 : | 512 | - | - | - | - | - |

Table 5.

Comparative illustration of biological, chemical and physical properties of samples, peptone, P-I-A, P-DI, P-DO and P-DO₄₁₀

| Sample | | Peptone "Arei" (original) | P-I-A | P-DI | P-DO | P-DO ₄₁₀ |
|-----------------|--|---------------------------|-------|------|-------|---------------------|
| Properties | | | | | | |
| Biological test | Streptolysin S inducing activity (cf. Table 4) | + | ++ | ++ | - | - |
| | Cofactor activity for RNA in inducing streptolysin S (cf. Table 2) | + | +++ | +? | +++ | ++++ |
| Chemical test | Ninhydrin | +++ | ++++ | +++ | +++ | +++ |
| | Biuret | +++ | . | +++ | ++ | ++ |
| | Molisch | ++ | . | +++ | - | - |
| | Orcinol | +? | . | +? | - | - |
| | Dische | ? | . | ? | - | - |
| Physical test | Number of ninhydrin-positive spots in paper chromatography** | 10 ~ 11 | 5 | 6 | 3 ~ 4 | 1 (or 2) |
| | Nucleic acid-like UV absorption spectrum | - | - | - | - | - |

* Positive tests are graded arbitrarily as follows : + + + +, + + +, + +, +, and - represents negative test.

** A mixture of n-butanol-acetic acid-water (4 : 1 : 2) ; ascending, at 18°C for 15hrs.