

ツベルクリン劃分に関する研究

第1報 加熱により生ずる劃分量の変化について

九州大学医学部細菌学教室(主任 戸田忠雄教授)

大友 信也

(昭和 29 年 6 月 7 日受付)

緒 言

Koch がツベルクリンを創始して以来現在でも、皮内反応及びその他結核の免疫学血清学の領域に於いて用いられている旧ツベルクリン又は精製ツ蛋白質は、通常結核菌培養液を加熱滅菌し、その濾液から作られている。ツの活性が相当耐熱性であつて、このようにして作られたものでも充分な実用的価値をもつているという事は、この方面の研究に大きな便宜を与えているといわねばならぬことであつて、我々はその便宜さに終始馴れてしまつてはならぬと考える。培養液中の種々の菌代謝及び崩壊産物は、100°C 数時間というはげしい処理によつて何れかの部分で自然状態と違つたものになるということは当然予想されるところである。しかしながら現在までツベルクリン成分の加熱による変化を詳しく取扱つた研究は殆んど見当らぬ状態である。

Corper-Cohn¹⁾ は簡単な実験ながら、ツは pH 6.6 以上の加熱では変化しないと云つている。即ち pH 6.0 では加熱により N=12.7~13.1% の蛋白が凝固する。このものの 1 mg の活性は、全ツ蛋白の 0.03 mg に相当する。更にこの熱凝固と pH との関係は、三塩化醋酸沈澱法で、13 mg/dl の蛋白を含むツは熱処理により、pH 5.95 で 9.4 mg, 5.5 で 6.7 mg, 5.0 で 5.4 mg となるが pH 6.6~8.2 では全て 13.0 mg であり、この範囲の pH では熱による可溶性蛋白の損失はみられないと述べている。然し彼等の行つた三塩化醋酸法ではツ中の各成分の変化を詳しく知ることは出来ない。一方 Seibert²⁾ は生の非加熱ツから低温アルコール沈澱法で蛋白 3 種、多糖体 2 種を分離しその性状を明らかにした。尚又彼女は別に³⁾ 蛋白 A は加熱により凝固する。加熱ツから蛋白 A', B' を取つたが、これらは等電点で不溶性であり、恐らく蛋白 A, B の変性したものであろうといつている。

この度私は、加熱ツ濾液からも、非加熱ツ濾液からと全く同じ沈澱性、溶解性の蛋白 3 種、多糖体 2 種を分離し得たので、この両部の劃分をその取量、物理化学、生物学的性状の各面に於いて比較し、加熱による影響を調べんとしてこの実験を行つたのである。本報においては取量の面でこの問題を検討する。

実験材料および方法

材料は人型結核菌青山 B 株ソートン培養液 (8~19 週培養)、及び BCG ソートン培養液 (5~7 週) (何れもソートンはアスパラギンの代りに倍量のグルタミン酸ソーダを使用) を 1 Lot につき数 1 ずつ使用した。これらの同一 Lot を非加熱部と加熱部に分け、後者は 100°C 蒸気で 2 時間加熱した。

両部とも Seibert³⁾ の方法にならい、限外濾過法で濃縮、除塩し、低温において等電点およびアルコール沈澱を行つて劃分した。Seitz 濾過及び全分劃操作はすべて 0~4°C の冷室中で行つた。

限外濾過法：限外濾過は Beckhold⁴⁾ が醋酸コロジウムを用いて以来種々の方法が取られている。Seibert⁵⁾ もニトロセルローズの醋酸溶液を用い、その 9% 溶液で作つた膜が適当であると述べている。私は彼等の用いた醋酸溶液よりも Elford⁶⁾ が使つたエーテル・アルコール溶液の方がより作り易いという点を取つて、乾燥セロイジンを 1 : 1 重量比のエーテル・アルコール混合液で 10% 溶液とし、これで Reichel 型濾過管の外側に膜を張つて使用した。膜の張り方及び濾過操作は大体 Seibert⁵⁾ 及び Heckly-Watson⁷⁾ 等の方法に準じた。この実験で行つた限外濾過による培養濾液の濃縮は $\frac{1}{100}$ 量程度まで行い、その途中蒸留水を度々注加して濃縮液中の、劃分を不確実ならしめる塩類その他の低分子物質を充分濾別した。その為濾過後の濃縮液は大体洗滌に用いた蒸留水の pH に等しくなつている。

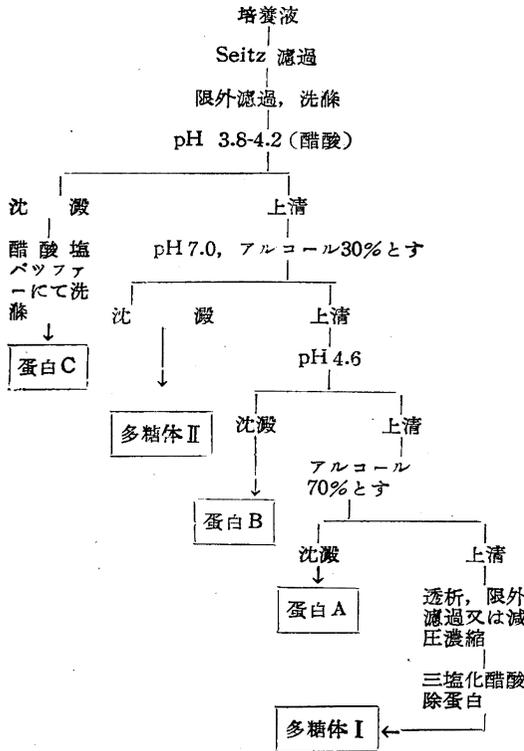
分劃法および劃分：

分劃法の大要は第 1 図に示す通りである。

劃分はすべて数回、溶解、再劃分を行つて、出来るだけ各劃分の混在を防ぐとともに夾雑物を除いて精製し、透析、凍結乾燥を行つて製品化し、その後の実験に供した。取量をみる目的の場合には定量的考慮を払つて操作を行い、最後に秤量用容器中に劃分溶液を入れて凍結乾燥し、この重量を測定した。

この分劃法によると、非加熱濾液からは Seibert のいう蛋白 A, B, C 及び多糖体 I, II がとれるのであるが、加熱濾液からも同じ方法で全く同じ溶解、沈澱性を有する劃分が分離出来る。これらの劃分を、分離方法が

第1図 分割法の大要



同じである点で関連させて、蛋白 hA, hB, hC 及び多糖体 hI, hII と仮称して論を進める。

蛋白C及び hC : 濾液を醋酸で pH 3.8~4.2 にすると生ずる沈澱。これは pH 4.0, $\mu=0.02$ の醋酸・醋酸ソーダ緩衝液で洗滌し、洗液は上清に加える。やや黄褐色、等電点で不溶。Cより hC の方が着色強く、時に汚泥色を呈することがある。BCG の C, hC は人型菌の C, hC より粘稠であるように感じられた。

TABLE 1
Yields of tuberculin fractions isolated from 12-week-old culture filtrate of human tubercle bacilli Aoyama B strain (lot No. 2).

Unheated Seitz-filtrate		Heated filtrate (heated with bacilli)			
Protein A	x 10mg/l* 18	Protein hA	x 10mg/l* 2	Protein hA	x 10mg/l* 1
" B	8	" hB	4	" hB	5
" C	7	" hC	41	" hC	68
Polysac. I	6	Polysac. hI	8	Polysac. hI	5
" II	2	" hII	1	" hII	1
Total	41	Total	56	Total	80

* mg of fraction per liter of culture filtrate.

§ Fractions were isolated from filtrate which was concentrated by combination method of freeze-drying and dialysis, instead of ultrafiltration.

TABLE 2

Yields of tuberculin fractions isolated from 5-week-old culture filtrate* of BCG (lot No. 5).

Unheated filtrate		Heated filtrate	
Protein A	x 10mg/l 2	Protein hA	x 10mg/l 1
" B	1	" hB	2
" C	2	" hC	6
Polysac. II	4	Polysac. hII	6
Total	9	Total	14

* This filtrate seemed to contain some bacilli or bacillary debris as the filtration was done by filter paper. Polysaccharides I and hI were not isolated.

TABLE 3

Yields of tuberculin fractions isolated from 7-week-old culture filtrate* of BCG (lot No. 10).

Unheated filtrate		Heated filtrate	
Protein A	x 10mg/l 2	Protein hA	x 10mg/l 1
" B	1	" hB	2
" C	6	" hC	12
Polysac. I	1	Polysac. hI	1
" II	13	" hII	18
Total	23	Total	34

* This filtrate seemed to contain some bacilli or bacillary debris as the filtration was done by filter paper.

多糖体II及び hII : 蛋白 C (hC) の残液及びその洗液を中和し、アルコール (エタノール) 30% 濃度とすると生ずる沈澱。白色。溶液は蛋白白色の螢光を発し、これは BCG の II 及び hII の方が人型菌のそれより強い。Lot によりこの割合を欠くことがある。なお他の割

分でもそうであるが、特にこの多糖体IIの分離には低温での操作が必要である。

蛋白B及び hB : 上の残液を pH 4.6 とすると沈澱するもの。白色ないし微黄色。等電点の水では溶解性。

蛋白A及び hA : 上の上清のアルコール濃度を 70% にすると生ずる沈澱。白色。等電点の水には溶解性。

多糖体I及び hI : 以上の残液からアルコールを除き、三塩化醋酸で残余の蛋白を除いたものから得られる。白色。95%以上の濃度のアルコールに不溶。

実験結果

1 実験に使用した人型菌及び BCG 培養液からは表に示すような割合で割合を分

離し得た。菌株によつて幾分の相違のあることは当然考えられるが、非加熱培養液中の蛋白では一般にAが比較的多いことが見られる。人型菌培養液中では培養期間の長くなる程Aの産生が他の蛋白に比していちじるしく増加している。このことは、これら蛋白の培地中への遊離と、結核菌の発育との間の関係を示唆するものであると思われる。又多糖体劃分では、BCGではIIがIより遙かに多く、反対に人型菌ではIがIIより多く、時にはIIを欠くことがあるという違いがあるのも興味あることと思われる。

2 菌体ないし菌屑と共に加熱した場合、(Lot 2,5,10)

劃分の総収量をみると、いずれのLotも加熱部(hと略す)は非加熱部(rと略す)より40%以上多い。この総収量の差は大体に於いて蛋白劃分中にあり、しかもその中のhC量がC量より非常に多いことがこの増加の原因をなしている。同じ蛋白劃分中에서도反対にhA量はA量より著明に少くなっている。hBとBとの量を比べると、人型菌のLot 2ではhBがBより相当少ないが、BCGではこの多寡は一定していない。多糖体量はh部の方がr部よりやや多いことがみられる。

この結果において見られる如く、結核菌培養液を菌体と共に加熱した時の大きな変化は、蛋白hAがr部からのAより著明に少いこと、反対にhCがr部からとられたCよりいちじるしく多いことである。しかもhC-Cの量は、A-hAの量をはるかに超える程大きく、この為h部の劃分総収量の増加をもたらしているのである。

3 Seitz 濾液を加熱した場合 (Lot 15, 16)

この場合の実験では、結果2でみられた菌体の影響を除くためと、出来るだけ加熱時の量的変化を定量的に検討するために次のように行つた。即ち、培養濾液をSeitzで濾過除菌し、限外濾過で濃縮後3分して、r: そのまま

TABLE 4

Yields of tuberculin fractions isolated from 18-week-old culture filtrate* of human tubercle bacilli Aoyama B strain (lot No. 15).

(r) Unheated pH 6.8 Seitz-filtrate				(h ₁) Heated at pH 6.8 Seitz-filtrate				(h ₂) Heated at pH 8.0 Seitz-filtrate			
Protein		x 10mg/l	%	Protein		x 10mg/l	%	Protein		x 10mg/l	%
A		22	33	h ₁ A		15	23	h ₂ A		13	20
"	B	7	11	"	h ₁ B	7	11	"	h ₂ B	6	9
"	C	9	14	"	h ₁ C	18	27	"	h ₂ C	16	23
Polysac.	I	14	21	Polysac.	h ₁ I	17	26	Polysac.	h ₂ I	21	32
"	II	14	21	"	h ₁ II	15	23	"	h ₂ II	17	26
Total		66	100	Total		72	110	Total		72	110

* Culture was filtered with Seitz filter and concentrated by means of ultrafiltration. The concentrated ultrafiltrate was divided in three portions r, h₁ and h₂. Portions of h₁ and h₂ were then heated at different pH.

TABLE 5

Yields of tuberculin fractions isolated from 8-week-old culture filtrate* of human tubercle bacilli Aoyama B strain (lot No. 16).

(r) Unheated pH 7.0 Seitz-filtrate				(h ₁) Heated at pH 7.0 Seitz-filtrate				(h ₂) Heated at pH 9.0 Seitz-filtrate			
Protein		x 10mg/l	%	Protein		x 10mg/l	%	Protein		x 10mg/l	%
A		8	18	h ₁ A		3	7	h ₂ A		5	12
"	B	7	16	"	h ₁ B	2	5	"	h ₂ B	3	7
"	C	12	28	"	h ₁ C	20	46	"	h ₂ C	24	56
Polysac.	I	14	33	Polysac.	h ₁ I	16	37	Polysac.	h ₂ I	13	30
TCA ppt		2	5	TCA ppt		2	5	TCA ppt		2	5
Total		43	100	Total		43	100	Total		47	110

* Culture was filtered with Seitz filter and concentrated by means of ultrafiltration. The concentrated ultrafiltrate was divided in three portions r, h₁ and h₂. Portions of h₁ and h₂ were then heated at different pH.

! Trichloroacetic acid precipitate.

Polysaccharides II and hII were not isolated.

非加熱, h₁: そのまま加熱, h₂: pH 8~9 として加熱を行い劃分した。この考慮により Seitz 濾過時の吸着による劃分損失の差, および異つた限外濾過器によつて起る膜通過の劃分損失量の差が, r, h 間に現れるのを除外した。勿論最後の透析, 凍結乾燥は同一条件で行つた。

この実験での総収量の変動は両 Lot とも約 10% 程度の増加が h 部にみられたが、このような劃分実験ではこの程度の量の変動は誤差の範囲にあると考えられるものであつて、総収量は両部とも殆んど変わらないと認めてよい。両部からの劃分量を比べると、この際も hC > C 及び hA, hB < A, B という結果は両 Lot ともみられ、結果 1. と同傾向であつた。しかし、この度の成績では、これ等 3 蛋白劃分量の多寡にある種の関係が見出さ

れた。即ち、10%程度の誤差を考慮に入れてみると、Lot 15では、 $(A+B)-(h_1A+h_1B)=44\%-34\%=10\%$ と、 $h_1C-C=27\%-14\%=13\%$ とが一致する。Lot 16でも同様に、 $34\%-12\%=22\%$ と、 $45\%-28\%=18\%$ とが大体相当していて、これらから

$$(A+B)-(hA+hB) \approx hC-C$$

という関係が見出された。但し(A+B)量としては上のような関係にあるが、BとhBとの間だけでは差の殆んど認められない場合もあつた(Lot 15)。

多糖体量は主としてIの量に変化がみられ、大体においてhIの方がr部からのI量より多かつた。

アルカリ性での加熱処理(h₂)の結果では、Lot 15では加熱による量的変動の増強が明らかに認められたが、

Lot 16では一概にそうとも云い得ない成績である。このことに関しては、処理の影響以外になお、培養期間の問題その他の因子が介在しているのではないと思われる。

考 按

蛋白質の変性過程については諸説があるが、Bull⁸⁾は、球状の一般自然蛋白は変性によつて、結合鎖の破壊が生じ非対称分子になると云つてゐる。又Haurowitz⁹⁾は、蛋白の熱変性は、Peptide鎖のsalt bridgeが切り離される。この切れたpeptideは新しく出来た分子内及び分子間のsalt bridgeによつて再配列を作る、と述べてゐる。又Mc Carter, Watson¹⁰⁾は加熱培養濾液中の、pH 4~5で沈澱するツ蛋白はその上清中のものより分子量が大きく(36,800と13,600)、しかも長くなつた変性分子(a/bが40.0と11.8)であると報告している。このことはHaurowitzのいうpeptide鎖の分子間再配列説から説明出来るのであるが、一方Seibertはこれに対し、生の蛋白Aの分子量が32,000である点からみて、Watsonのいう変性長大蛋白はPolymerizeしたものであらうといつてゐる。

この度の実験成績によると、出来るだけ定量的な考慮を払つたLotでは、熱処理によつて劃分総量は殆んど変わらないが、r、h部を比較すると蛋白A、B量よりhA、hB量が少く、反対にCよりhC量が多く、しかもこの二つの場合の差がほぼ等しいという結果が得られた。即ち $(A+B)-(hA+hB) \approx hC-C$ という相関が見出された。しかしてこのことから推察すると、ツベルクリン蛋白の熱変性には、 $A \rightarrow hA+hB+hC$ 、 $B \rightarrow hB+hC$ 及び $C \rightarrow hC$ という変化が起り得ることが考えられるのであつて、更にその中でも、 $A \rightarrow hA$ 、 $B \rightarrow hB$ 、 $C \rightarrow hC$ の如く同性質の溶解性(沈澱性)をもつたままの変化と、 $A \rightarrow hB$ 、 hC 又は $B \rightarrow hC$ の如く違つた溶解性をもつようになる変化とが考えられるのである。但しBとhB量との間には差の明らかでない場合もあつたが、このことは見掛け上の変化の平衡状態か、或いは $A \rightarrow$

hB 、 $B \rightarrow hC$ が起り難いかの何れかであると思われるが今のところ不明であり、この点についてはA、B及びCを別々に加熱処理して夫々を劃分することにより大体の見当はつくものと考へている。

一方AとhA、BとhB等の如く、溶解性において等しいものが、その他の性状でも又等しいか否かは、この実験では何ら明らかにし得ない。hAはAの中でその溶解性が変る程変性を受けなかつた部分であると想像されるのであるが、この点については統報の化学分析、及び目下実験中の電気泳動度の測定等によつて明かにする積りである。

蛋白A、Bの分子量はそれぞれ32,000、16,000とされているが、Cについてはまだ報告されていない。しかしながら第1表において、凍結乾燥で濃縮した部からのhCに比し、限外濾過を行つた部からのhCが、それのみ極めて少いこと(1/2以下)がみられる。このことは、蛋白hCの分子量が他のものにくらべて小さいという事を暗示していると考えられる。この事はなお今後分子量測定を行つて確める積りであるが、始めに述べた蛋白変性に関する諸説及び、この実験結果から考察すると、ツ中の蛋白は熱処理によつてPeptide鎖の破壊による低分子化が起るのではないかと想像されるのである。

多糖体劃分量において、多糖体IよりhIが多いことがみられたが、これは多糖体複合蛋白である蛋白A、Bが変性する際に、その中から多糖体が遊離したためによるのであらうと考へる。このことは第2報においても検討する積りである。

他方、培養液を加熱する際、菌体又は菌屑が存在する時は、hCがCより極めて多く取出された。このhC-Cの差は、一部はA、BからのhCによるのではあるが、大部分は、劃分総収量の増加から考へて菌体から抽出された可溶性蛋白によるものであると認められる。即ち加熱処理によつて菌体よりhCの溶解性をもつた蛋白が多量抽出されることが知られたわけである。この菌体蛋白の抽出については後に報を更めて詳述する予定である。

結 語

人型結核菌青山B株、BCG両培養濾液を、Seibertの低温アルコール沈澱法で劃分した。非加熱濾液からの劃分はSeibertの云う蛋白A、B及びC、多糖体I及びIIであるが、加熱部からの劃分は、蛋白hA、hB及びhC、多糖体hI及びhIIと仮称する。

1) 種々培養期間における培養液から分離したこれら劃分の収量を示した。

2) 非加熱培養濾液からと、加熱培養濾液から同条件下で各劃分を分離し、この収量を或程度定量的に比較検討して、ツ劃分に対する加熱の影響を調べた。

蛋白割合においては、hA はAより甚しく少なく、hB はBよりやや少なかつたり又は殆んど差の見られぬこともあつたが、hCはCより非常に多く、 $(A+B)-(hA+hB) \approx hC-C$ の関係が認められた。

多糖体量は主として hI がIより多くみられた。

以上の結果から、ツ中の蛋白は加熱処理により $A \rightarrow hA + hB + hC$, $B \rightarrow hB + hC$ という変性を起すものと考えられた。

3) 加熱の際、培養液中に菌体が存在する時は、菌体中の蛋白が熱抽出され、これの大部分は蛋白 hC の形で分離され得ることを認めた。

(本研究は文部省科学研究費の援助を受けて行つた。)

実験に対して終始懇切なる御指導御鞭撻を賜つた戸田忠雄教授、武谷健二助教授に深く感謝する次第である。

文 献

1) Corper, H.J. and Cohn, M.L.: Am. J. Cl.

Path., 20, 603, 1950.

2) Seibert, F.B.: Chem. Rev., 34, 107, 1944.

3) Seibert, F.B.: Am. Rev. Tuberc., 59, 86, 1949.

4) Beckhold, H. and Silbereisen, K.: Biochem. Zeits., 199, 1, 1928.

5) Seibert, F.B.: J. Biol. Chem., 78, 345, 1928.

6) Elford, W.J.: Handbuch d. Virusforschung I. Häfte, 132-139, 1938.

7) Heckly, R.J. and Watson, D.W.: Am. Rev. Tuberc., 63, 718, 1951.

8) Bull, H.B.: Advances in Enzymology, 1-42, 1941.

9) Haurowitz, F.: Chemistry and Biology of Proteins, 125-147, 1950.

10) Mc Carter, J.R. and Watson, D.W.: J. Immunol., 43, 85, 1942.