

人型結核菌と牛型結核菌培養濾液における蛋白質の比較

井 上 豊

国立予防衛生研究所結核部（部長 室橋豊穂）

受付 昭和 41 年 12 月 24 日

A COMPARISON OF PROTEINS IN MYCOBACTERIAL CULTURE FILTRATES*

Yutaka INOUE

(Received for publication December 24, 1966)

With the ultimate purpose to find species-specific antigens of mycobacteria, particularly of *M. tuberculosis* and of *M. bovis*, a preliminary experiment was carried out to analyse proteins contained in Sauton culture filtrate. Our question to this problem was raised in such a way, "Are there any proteins different in serological specificity? And, if any, what part is responsible for species-specificity?"

Strains of mycobacteria tested were 3 of *M. tuberculosis* (H37Rv, H37Ra and Aoyama-B), and 3 of *M. bovis* (BCG, Ushi-10 and Ravenel). These strains were grown on Sauton medium at 37°C for 4 to 9.5 weeks. After termination of the cultivation, the bacilli were filtered off through usual absorbent filter paper and then through a Seitz's filter without previous heating of the culture. The filtrate was condensed by ultrafiltration with nitrocellulose membrane, and the condensed material was dialyzed and lyophilized.

The dialyzed material designated as MT (abbreviation of macromolecule of tuberculin) was used for fractionation thereafter.

DEAE cellulose column chromatography

DEAE cellulose (Serva, 0.7 meq/g or 0.76 meq/g) was equilibrated with 0.002 M phosphate buffer (pH 8), or 0.02 M tris-HCl buffer (pH 8). After loading of the sample, and washing with the starting buffer, the convex gradient or the linear gradient was produced to 0.2 M NaCl with the phosphate or tri-HCl buffer (pH 8).

Protein content was determined by modification of Folin's method, and sugar by anthron method.

To check mutual influence of MT components, chromatographic analysis of Aoyama-B and BCG-MT subfractions by ammonium sulfate fractionation was simultaneously carried out.

In *M. tuberculosis*-MT, 5 peaks of protein were recognized (Fig. 4).

1) a large quantity of unabsorbed protein. 2) a sharp peak in the beginning of the gradient: Pt-1 (abbreviation of protein-1 of *M. tuberc.*). 3) a distinguished peak in young culture only, but hardly recognizable at 9.5 weeks: Pt-2. 4) a main peak in all culture age: Pt-3. 5) a peak eluted by 0.5 M NaOH.

In *M. bovis*-MT, 2 or 3 peaks of protein were prominent (Fig. 5).

1) The unabsorbed protein was almost negligible. 2) Most of MT protein was eluted on one peak: Pb-1 (abbreviation of Protein-1 of *M. bovis*). 3) Pb-2 in the shoulder of Pb-1.

* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki-Chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan.

- 4) a peak eluted above 0.1 M NaCl concentration which fluctuated quantitatively in each strain.
- 5) a small peak eluted by 0.5 M NaOH.

In these cases, each main peak was not influenced practically by the coexisting materials, and Pt-1 and Pb-1 were heterogenous by the ammonium sulfate fractionation. Infering from the literatures, Pt-3 peak may correspond to unheated PPDs and contain most of α antigen by Yoneda's designation.

Although the above fractionation was as yet divided phenomenologically, the "prototype" of *M. tuberculosis*, if this term is allowed to use tentatively, seemed to be characterized by the presence of Pt-1~Pt-3 peaks in *M. tuberculosis*. In *M. bovis*, Pb-1 and Pb-2 peaks may be specific, but a more qualitative examination would be needed to confirm this pattern as prototype of *M. bovis*.

結核菌培養濾液を用いて、種特異性を決定しようとする試みは古くより行なわれてきた。しかし「ナイアシン」テストのような化学的同定法の成功に反し、血清学的方法は病勢診断に力がおかれ、菌の同定に関しては糖に genus 特異性のあること¹⁾が推測されている程度である。

最近米田²⁾が人型結核菌 H37Rv の非加熱培養濾液から、 α と β の2つの蛋白抗原を単離し血清学的分類を試みているが、その点で注目し値する。特異性抗原を取り出すことは、菌の同定に役立つのみならず、免疫機構を明らかにするうえでも重要な問題であると思われる。

本実験においては特異的な人型結核菌と牛型結核菌の抗原を得る前段階として、培養濾液の蛋白分画に相違がみられるか、みられるとすればどの点であるかを、DEAE cellulose column chromatography の溶出曲線のパターンの比較により検討したので、その成績を報告する。

実験材料および方法

1) 使用菌株：実験に用いた菌株は下記の計6株である。

- | | |
|---------------------------|--------------------|
| 1. <i>M. tuberculosis</i> | 2. <i>M. bovis</i> |
| ① H37Rv | ① BCG |
| ② H37Ra | ② Ravenel |
| ③ Aoyama B | ③ Ushi 10 |

2) 培養条件

1% 小川培地上の上記保存菌株をそれぞれ「ソートン」培地に2継代し、その菌膜をいずれも大量(5~10 l)の「ソートン」培地に接種した。37°C で4~9.5 週培養した後、培養液を下記の方法に従って処理した。

3) 試料の作製

1. MT 分画

上記培養液を非加熱のまま、いつたん濾紙で濾過し、さらに東洋濾紙 No. 85 を付けた「ザイツ」型濾過器を用いて濾過した。ついでこの濾液を3°Cのもとにニトロ

セルローゼ膜により限外濃縮を行なった。容量が1/20以下になったときにセロファンチューブを用い、蒸留水あるいは0.002~0.02 M 磷酸緩衝液(pH 8)に対して、0°C で1~2 日間透析を行なった。このように透析により低分子部分を除いた培養濾液を MT (macromolecule of tuberculin) と名づける。

2. MT 硫安分画 1 (MT-1)

MT 溶液に等量の飽和硫安溶液(pH 7)を加えて、一晚放置後遠心し、得られた沈渣を上記と同様に透析した。

3. MT 硫安分画 2 (MT-2)

MT-1 を遠心沈殿して得た上清に、飽和量になるように固体硫安を加え、遠心後沈渣を同じく透析した。これを MT-2 とする。

4. MT 硫安分画 3 (MT-3)

MT-2 を遠心沈殿して得た上清を、濃縮、透析した。これを MT-3 とする。

5. MT 硫安分画 (2+3), (MT(2+3))

MT-1 を遠心分離したさいの上清をさらに分画することなく、透析し得られた分画を MT(2+3) と名づけ

Fig. 1. Preparation of MT and MT-Subfraction

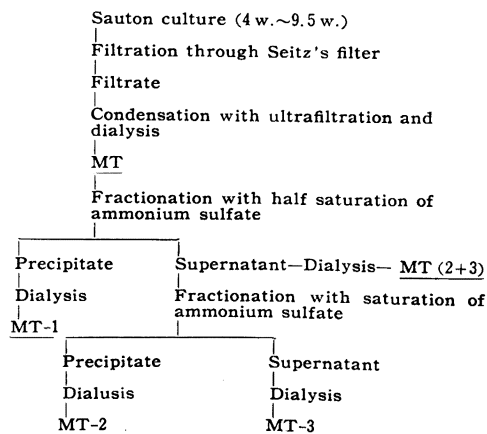
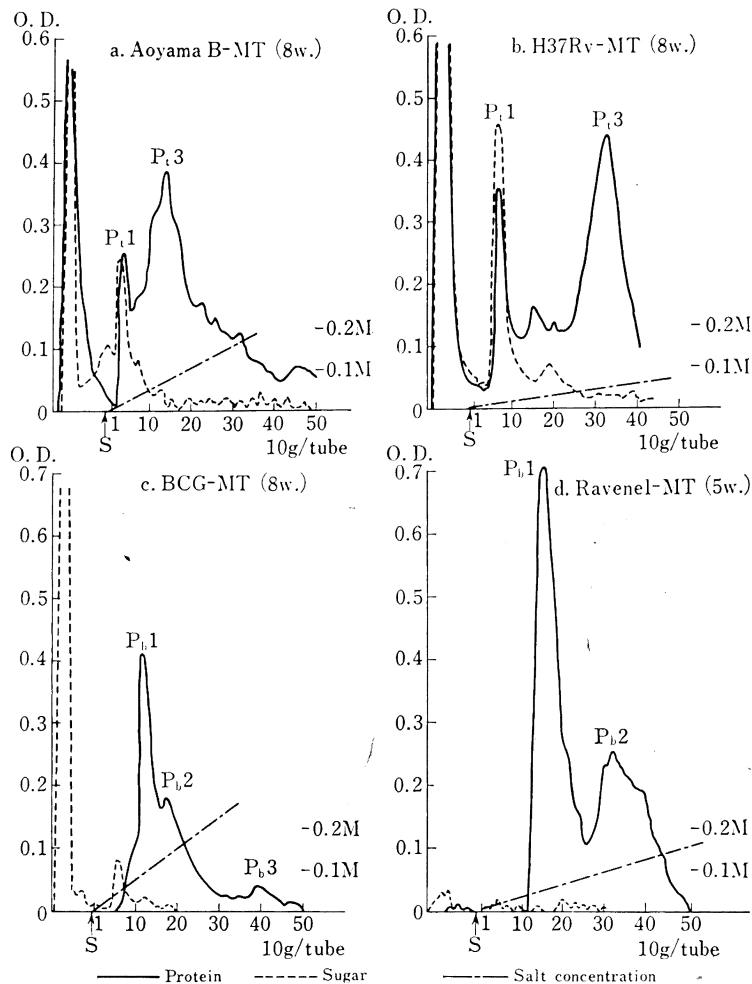


Fig. 2. Elution Diagram of *M. tuberculosis* and *M. bovis*-MT on DEAE Cellulose

る。

以上の試料調製過程を Fig. 1 に示した。

4) 分析法

1. DEAE cellulose column chromatography

DEAE セルローゼ (Serva, 0.7 meq/g あるいは 0.76 meq/g) 5 g を 0.002 M 磷酸緩衝液 (pH 8) で平衡化した後、内径 16 mm のカラムに詰め、0.002 M 磷酸緩衝液 (pH 8) 800 ml を低緩衝液とし、0.5 M NaCl 加磷酸緩衝液 (pH 7.5) を高緩衝液として、convex 型の溶出を行なった。実験によつては 0.2 M NaCl 加磷酸緩衝液 (pH 7.5) を高緩衝液とした。また後には 1% グリセリンを含む 0.02 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8) とこれに 0.2 M NaCl を加えた 2 緩衝液を用いて直線溶出を行なった。いずれの場合も、最後の難溶部は 0.5 M NaOH を用いて溶出させた。

2. 定量法

蛋白質の定量は Folin-Ciocalteu 変法³⁾ により、牛血清アルブミン (Armour 製) を標準物質として行なった。糖はグルコースを標準物質として Anthron 法⁴⁾ により、Coleman-junior 型分光器を用いて測定した。

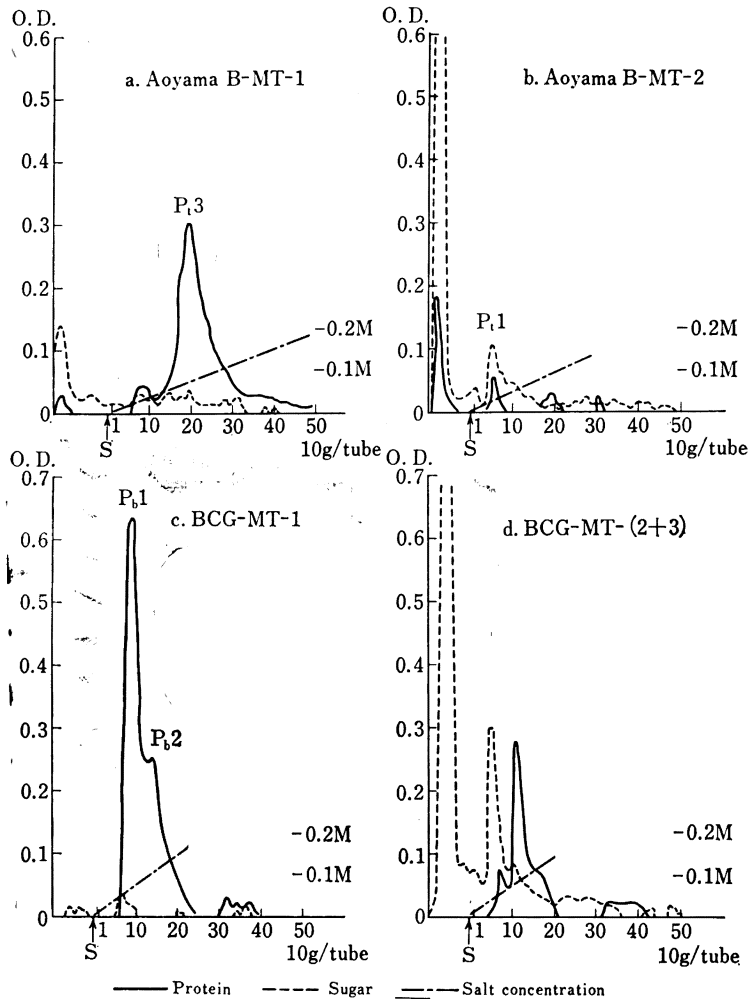
成 績

MT は培養濾液の高分子部分を取り出したものであるから、蛋白、糖、脂質等の混合物であるが、以下には MT 中の蛋白についてのみ述べる。

1) 人型結核菌の MT 蛋白

人型結核菌青山 B 株の MT 蛋白は Fig. 2 a に示したごとく、大量の蛋白質がそのまま素通りし、DEAE cellulose に吸着されないことを示している (S の左の部分)。また cellulose に吸着された蛋白の大部分は 0.2 M 以下の NaCl 濃度で溶出されるが、一部は温和な操作で溶出されなかつた。この溶出曲線から青山 B 株の MT

Fig. 3. Elution Diagram of MT Subfraction by Ammonium Sulfate (*M. tuberculosis* and *M. bovis*)



蛋白はだいたい次のような構成からなることが考えられる。

1. cellulose に吸着されず素通りして出てくる部分
2. 糖の直後に低塩類濃度で溶出される鋭い峰：Pt 1 (Protein 1 of *M. tuberc.* の略)
3. 溶出部の主部を占める部分：Pt 3
4. 0.5 M NaOH で溶出される難溶出部 (図示していない)

の4分画に分かれる。人型結核菌 H37Rv の MT 蛋白 (Fig. 2 b) においてもこの型はほぼ同じで、前述の Fig. 2 a が convex 型溶出によつたのに対し、Fig. 2 b は濃度勾配をゆるやかにし直線型溶出によつているが、主峰に当たる Pt 3 がさらにはつきり現われているように思われる。以上の成績から人型結核菌より得た MT の蛋白溶出部には、少なくとも2つの明瞭な分画 Pt 1 と Pt 3 が存在すると結論できよう。

2) 牛型結核菌の MT 蛋白

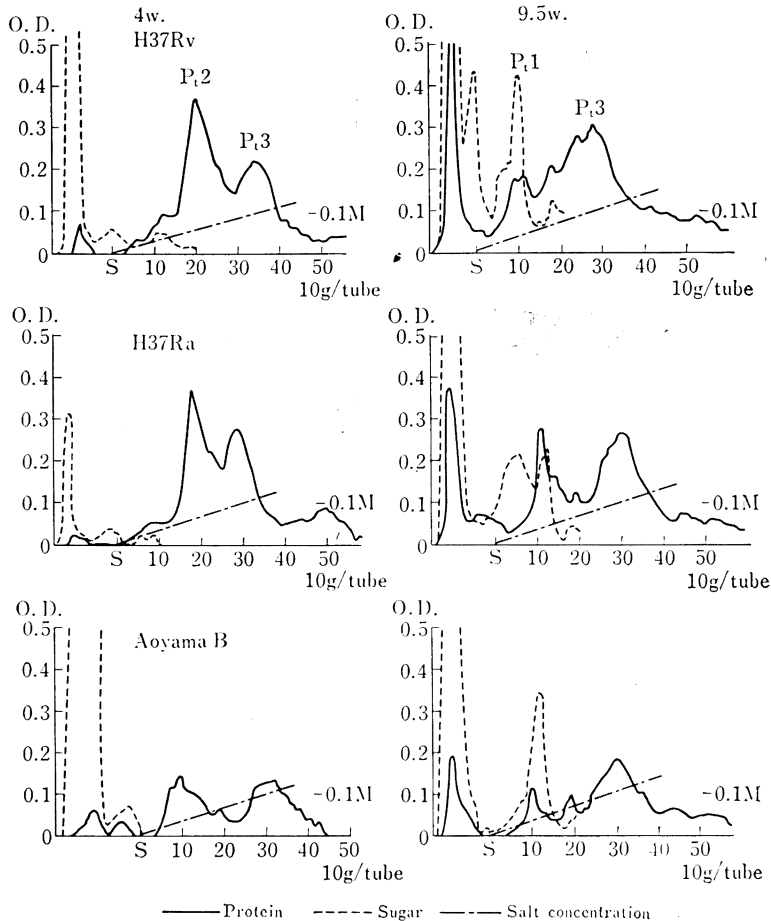
牛型結核菌 BCG の MT 蛋白 (Fig. 2 c) では、人型結核菌の場合に比較して、かなり簡単な溶出曲線が得られ、次のような構成を示している。すなわち、

1. 大きな主峰：Pb 1 (Protein 1 of *M. bovis*)
2. Pb 1 の右裾の副峰：Pb 2
3. 0.2 M NaCl 濃度より高濃度部で溶出される小さな峰

が認められる。非吸着部と難溶出部 (図示していない) は人型菌の場合に比べて非常に少ないのが特徴である。

牛型結核菌 Ravenel の MT 蛋白 (Fig. 1 d) の溶出曲線は、上に示した BCG の型に似ているが、溶出塩類濃度勾配をゆるやかにしたゆえもあつて、副峰 Pb 2 は BCG Pb 2 に比べてよりはつきりした分画として認められる。

3) MT 蛋白の硫安分画について

Fig. 4. Elution Diagram of Age Variation of *M. tuberculosis*-MT

MT 蛋白の硫酸分画による溶出曲線の変化を検討するために、人型菌青山B株 MT と牛型菌 BCG MT の2つを選んだ。

Fig. 3a は青山B株 MT の硫酸半飽和沈殿物の溶出曲線を表わしている。これと MT 蛋白の溶出曲線 (Fig. 2a) と比較してみると、硫酸沈殿蛋白の大部分は Pt3 であることが分かる。Fig. 3b は同じく、青山B株 MT の 50~100% 飽和硫酸沈殿物の曲線を示しているが、上記 Pt1 はこの分画にあると思われる。しかし図示しなかったが、硫酸全飽和上清にも同じく Pt1 に相当する分画が現われているので、Pt1 は硫酸塩析ではかなり heterogeneous ではないかと思われる。なお今回の報告には実験成績を示さなかったが、Pt1 分画には Ouchterlony 法では、生菌感作血清に対してほとんど沈降反応原性が認められないので、他の分画とはその意味でも区別できる。

BCG MT の硫酸半飽和沈殿物およびその上清の溶出曲線を、Fig. 3c と Fig. 3d にそれぞれ示したが、この場合各峰が heterogeneous な蛋白よりなっているこ

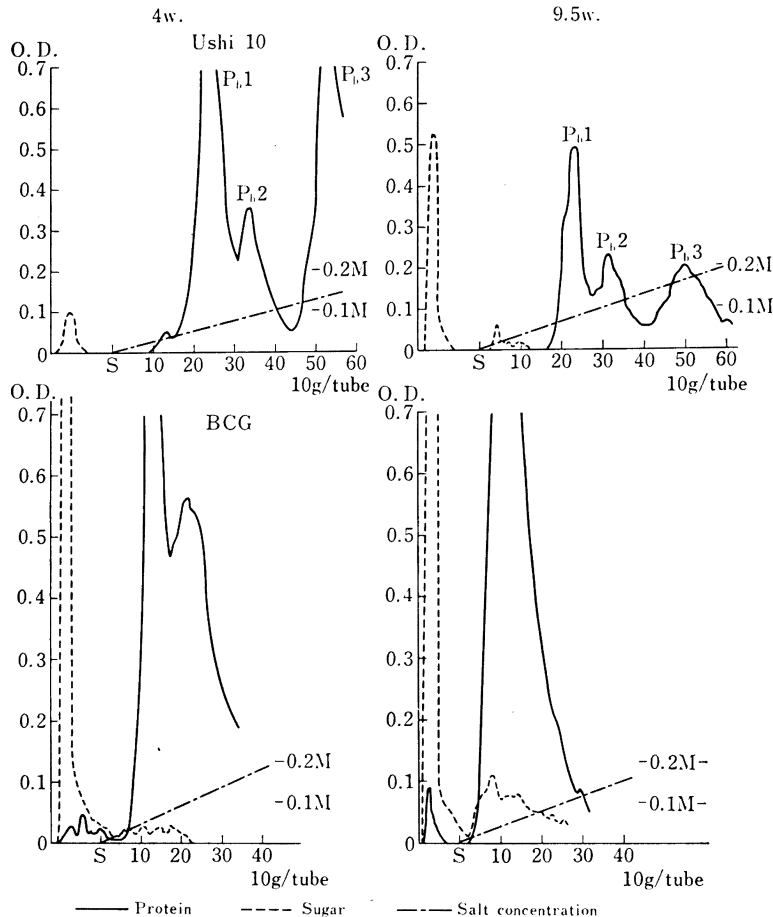
とを示すに止まった。

4) 培養期間による MT 蛋白の変化と菌型に特有なパターンの存在

上述のごとく人型結核菌と牛型結核菌の MT 蛋白には、各菌型内の比較をした場合には、おのおのの菌型に特有の分画群すなわち各型の prototype とも称すべき分画が存在するのではないかと予想し、Pt1, Pt3 および Pb1, Pb2 に注目しながら次の実験に移った。

人型菌3株 (H37Rv, H37Ra と青山B株) と牛型菌1株 (Ushi 10 株) につき、培養条件と時期をそろえて「ソートン」培養を行ない、4 週および 9.5 週にそれぞれ分けて収穫した。グリセリン加 Tris-HCl 緩衝液を使つた以外は、前実験と条件はほぼ同じである。成績を Fig. 4 と Fig. 5 に示した。

人型菌 4 週培養においては Pt1 と思われるものは非常に少なく、その右に若い培養においてのみ大きく認められる新しい分画が見つかった、これを Pt2 と名づける。9.5 週培養においては、Pt1 と Pt3 は明瞭に認められるが、Pt2 に相当する分画をはつきり示すことはで

Fig. 5. Elution Diagram of Age Variation of *M. bovis*-MT

きなかつた。以上をまとめると、培養期間により各分画に大小はあるが、Pt 1~Pt 3 が存在するという点は人型菌の prototype といえるのではなかろうか。

牛型菌においては別の機会に行なわれた BCG-MT 蛋白の溶出曲線 (Fig. 5-BCG) をも参考にした。非吸着性蛋白がほとんどない点と、大きな Pb 1 の次に小さな Pb 2 がくる点は各株に共通のパターンと推定してもよいと思われるが、これをただちに prototype とすることは、現象論的に決めた type とはいえ、各峰の対応関係に関する定性的な成績を待つてからにしたい。このさい Ushi 10 と BCG の Fig. 1-C を比べることにより、Pb 3 ともいべき峰の存在が確かめられた。

考 察

成績に述べたごとく、培養濾液の macromolecule の蛋白を全体として比較できるように、クロマトグラフィの溶出曲線として表わし、現象論的に人型菌と牛型菌とを比較しようと試みた。培養濾液の分画は今後細分化の傾向に向かうと思われるが、著者のとつた方法は、pro-

otype を示しうる点に意義があると思われる。この場合精製物を比較するのと違って、粗製物質を用いたので、共存物質が溶出曲線に与える影響を心配したが、硫安分画のパターンを考え合わせると、主な分画に関するかぎり大きな変化はなかつた。

次に培養期間を異にする MT 蛋白については、各時期により構成成分の変動が著明に現われている。Pt 1 は 4 週培養ではほとんど認められず、9.5 週培養では鋭い峰として現われている。この分画は精製操作により増減する点とほぼ沈降反応原性のない点とから、artefact の感を強くするが、米田らも H37Rv 培養濾液から著者と異なる方法によつて、Pt 1 と似た性質を持った蛋白分画 mtp-2 を得ているので、培養期間が延びるとともに分解して現われてくる蛋白質群かもしれない。Pt 2 は培養初期に多く、後に減することから考えて、菌の不安定な物質代謝産物の感を強くする。Pt 3 は常に存在し、後期に多く、硫安半飽和で沈殿する部分の大部を占めるので、ほぼ非加熱 PPDs に相当し、またこの峰の左肩を中心し沈降反応原性があることを認めているが、上記成績に

示したごとく収量が多い点と、溶出塩類濃度の点とから考えて、米田らの α 抗原にかなり近似していると思われる。

次にこれらの試料の低塩類濃度で溶出される部分は、牛型菌ではMT蛋白の80%以上に達するが、人型菌では試料の作製方法にずいぶん影響され、4週培養では70~80%、9.5週培養では50%くらいであつた。これらの原因として実験操作中の変性を考えたほうがよい例にしばしば出会つた。

さて mycobacteria 培養濾液を DEAE cellulose によつて分画している研究には、Rhodes, J.M.⁶⁾、奥山ら⁹⁾、米田²⁾ および Kniker, W.T. ら⁷⁾ の報告がある。前3者、とくに米田はこの方法を蛋白精製に適用して、非常に純度の高い物質を取り出しているが、培養濾液中の蛋白全般に関してはとくに触れていない。これに反し Kniker らは、長期培養濾液の macromolecule 全体の溶出曲線を求め、その比較を数菌株で行なっている。この場合試料作製の過程が著者の方法とかなり違つているので、得られた結果を厳密に比較することは難しいが、かれらの成績では、人型菌 H37Rv 株の培養濾液において、溶出曲線の大部分にわたつて、280 m μ /260 m μ の比が1より小になつており、また高塩類濃度で溶出される部分が非常に多いとされている。これらは同じく macromolecule を対象としながらも、著者の成績と著しく違つている点である。本成績で述べた人型菌青山 B 株の Pt 3 の 280 m μ /260 m μ 比は 1.5 をこえている。用いた DEAE cellulose が異なるので、交換能の差が溶出曲線に当然影響していると考えられるが、上記の差はこれを上回ると思われる。また粗試料を吸収スペクトルの O.D. のみによつて示しているのも、どのように意義づけているのか理解しがたい。

さて以上述べたごとく、培養濾液の macromolecule を DEAE cellulose column によつて分別し、その溶出曲線を描くことにより、人型菌と牛型菌の MT 蛋白の溶出パターンに著しい相違を認めた。使用した菌株が少

数に止まるが、人型菌では各株に共通した特異的なパターンを得ることができた。このパターンを人型菌全体に普遍化することは、ある種の危険を伴うが、これらの分画に着目して菌型特異性物質の精製を試みることは興味のあることと思われる。

結 論

1) *M. tuberculosis* と *M. bovis* の培養濾液蛋白を比較した場合に種特異性が認められる。人型菌3株では Pt 1~Pt 3 の3つの分画が共通に認められたのに対して、牛型菌では Pb 1~Pb 2 の2つの分画が特有に認められたが、Pb 3 に相当する分画は各株間に大きな違いがある。

2) おおのこの分画の量的関係は培養時期によつて変動し、人型菌では Pt 1 は古い培養で、Pt 2 は若い培養時期にのみ明瞭に認められる。Pt 3 は全培養期間を通して認められる。牛型菌では培養時期による変動を系統づけえなかつた。

3) Pt 3 はほぼ非加熱 PPDs に相当し、また米田らの α 抗原が大部分を占めると思われる。

室橋部長のご校閲ならびに本研究部、佐藤、金井、小関の諸氏のご援助に感謝する。

文 献

- 1) Tennent, D.M., and Watson, D.W.: J. Immunol., 45: 179, 1942.
- 2) 米田正彦: 結核, 38: 287, 1963.
- 3) Lowry, O.H. et al.: J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
- 4) Roe, J.H.: J. Biol. Chem., 212: 335, 1955.
- 5) Rhodes, J.M.: Int. Arch. Allerg., 19: 257, 1961.
- 6) 奥山春枝 他: 結核の研究, 第15集: 46, 1961.
- 7) Kniker, W.T. et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 89: 29, 1964.