

BCG 再接種モルモットの肺の細胞顆粒分画からの 抗結核菌物質の分離とその性状

II. 表面活性剤による抽出とゲル濾過法による分離

金井 興美・近藤 瑩子

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 44 年 5 月 28 日

SEPARATION AND PROPERTIES OF MYCOBACTERICIDAL COMPONENTS FROM THE LUNG GRANULAR FRACTION OF BCG-REVACCINATED GUINEA PIGS*

II. Preparation by Detergent-extraction and Gel-filtration

Koomi KANAI and Eiko KONDO

(Received for publication May 28, 1969)

A huge-molecular mycobactericidal fraction associated with cathepsin and acid phosphatase activities was separated from detergent-extract of the lung granular fraction of BCG-revaccinated guinea pigs by gel-filtration on Sepharose 2B column (Fig. 1, Fig. 2, Table 1). The mycobactericidal activity was heat-stable at 100°C and pH 5.6 for 10 minutes, but the enzymatic activities were lost. Further fractionation was conducted using organic solvents (Fig. 3, 4), and the mycobactericidal moiety was obtained as 90% acetone-soluble and ether-insoluble components of still high molecular weight. The components were free from the enzymatic activities. Separation of such mycobactericidal components was also successful from the extract prepared by freezing and thawing, but this fraction was negative in cathepsin activity unlike the preparation by the detergent.

A discussion was made that the mycobactericidal principle might exist in the membrane structure associated with lysosomal hydrolases, but as a factor distinct from them.

私達の 前報告¹⁾においては、BCG 再接種を受けたモルモットの肺より、lysosome を含む細胞顆粒分画を分離し、その酸抽出、20% アルコール沈殿物質に殺菌効果を認めた。また一方では、私達はマウスの感染組織(肺、脾)の顆粒分画を Triton X-100 で抽出し、その抽出液をゲル濾過して、acid phosphatase 活性と Cathepsin 活性を伴った大分子の蛋白分画を得、このものの抗菌力についても報告してきた²⁾⁻⁷⁾。そこで以上の経験をふまえて、BCG 再接種モルモットの肺を材料とし

て、Triton X-100 による抽出とゲル濾過法を利用する抗菌因子の分離を試みた。その成績をここに報告する。

実験材料と方法

前報告¹⁾の実験と同一条件の BCG 再接種モルモットを使用した。組織分画法も前報告と変りないが、そこでの経験を考慮して、今回は 3,900 g×20 分の遠沈による沈渣は捨て、その上清の 25,000 g×20 分遠沈沈渣をもつて、対象細胞顆粒分画とした。この分画からの抽出に

* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

Fig. 1. Separation Procedure of Mycobactericidal Components from Lung Granular Fraction of BCG-Revaccinated Guinea Pigs

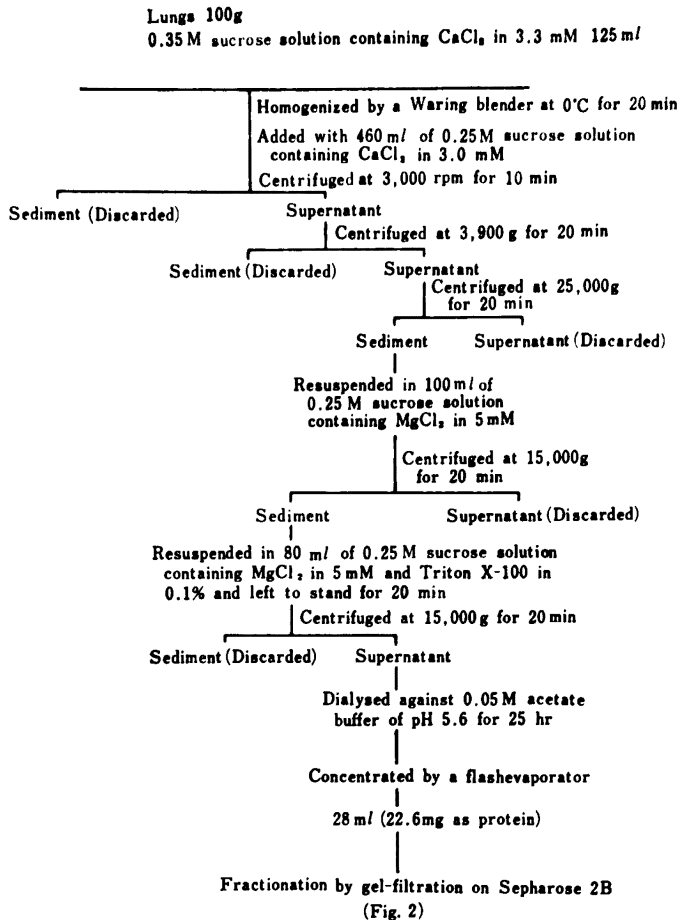
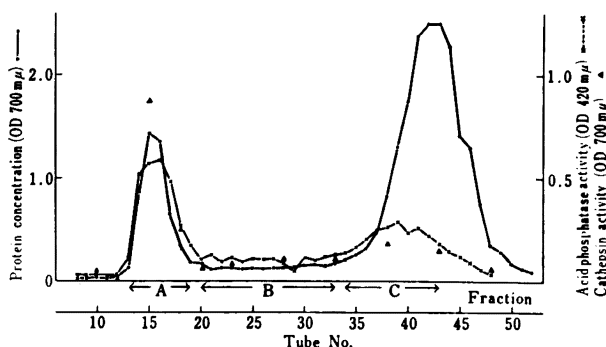


Fig. 2. Fractionation of Detergent-Extracted Lysosomal Components of BCG-Revaccinated Guinea Pig Lungs by Gel-Filtration on Sepharose 2B Column (2×37 cm)



当たつては、Triton X-100 による方法と、それに対する一つの対照として、音波処理、凍結融解による場合をも検討した。ゲル濾過による分画法は、Sephadex 2B

あるいは Sephadex G-150 のカラムを使用した。殺菌効力試験は前報告¹⁾の通りである。蛋白量の測定は Folin 法²⁾による OD 700 mμ, あるいはチロジン推定量に換算した。酸性 phosphatase 活性の測定も前報告¹⁾の通りであり、遊離した p-nitrophenol による OD 420 mμ をもって表現した。Cathepsin 活性の測定は、10 mg/ml の変性ヘモグロビン溶液 (pH 3.19) の 0.4 ml に、溶出液 0.2 ml を加え、40°C, 90 分間放置後、5% 三塩酢酸 0.6 ml を加えて反応を停止し、その遠沈上清 0.5 ml をとって、Folin 法で蛋白分解物の量 (OD 700 mμ) を測定した。

成 績

1) Sepharose 2B によるゲル濾過: BCG 再接種モルモット 12 匹より得た 100 g の肺より、Fig. 1 に示した方法によつて得た顆粒画分抽出液を、Sephadex 2B の 2.0×37 cm のカラムにかけ、0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) を用いてゲル濾過した。1 時間 20 ml の流速で溶出し、溶出液は 5 ml ずつ採取した。それらの蛋白量 (Folin 法による OD 700 mμ), 酸性 phosphatase 活性および Cathepsin 活性を測定して、Fig. 2 に図示した溶出 diagram を得た。最初の蛋白ピークと、それに続く低い水平な蛋白曲線は、2 種の水分解素活性とよく連関しているが、第 2 の蛋白ピークにおいては、そのような平行関係はみられず、酵素の存在はその蛋白部分のごく一部をなすとみられる。これら 3 つの溶出部分は、それぞれ図に示したように Fraction A, B, C とし、それらの溶出液をブールした。A と B とは乳白色を帯び、その分子量の巨大さを考えれば、これらは Triton X-100 によつて解体した膜構造の一部であり、水分解素はそこに付着した形で存在するであろうことが推定される。

2) アセトンならびにエーテルによる Fraction A と B の分画: Fr A 15 ml にアセトン 135 ml を加えて、アセトン

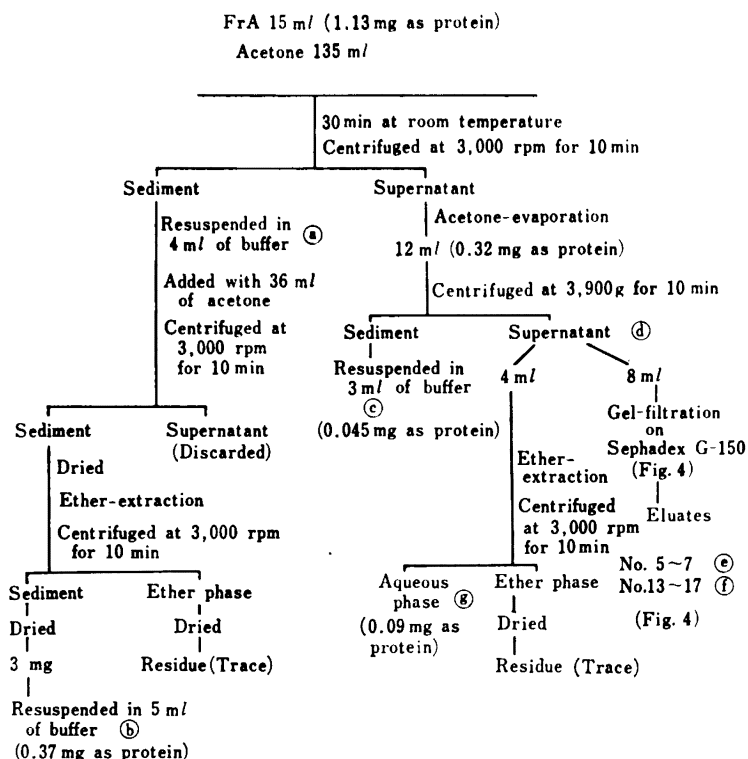
の終末濃度を 90% にした。室温に 30 分放置後、3,000 rpm, 10 分遠沈して上清と沈殿とを得た。上清から減圧濃縮によつてアセトンを除き、3,000 rpm 10 分で遠沈

して更に上清と沈渣に分けた。この上清のうち 4 ml はエーテルによる抽出操作を受け、また残り 8 ml は 4 ml

ずつ2回に分けて Sephadex G-150 の 1.0×26 cm のカラムにかけ、1時間 20 ml の流速で 0.05 M 酢酸緩衝液

(pH 5.6) を流してゲル濾過した。溶出液は 4 ml ずつ採取した。その蛋白量による溶出 diagram が Fig. 4 である。一方アセトン処理による沈殿は、一度 90% アセトンで洗滌し、乾涸してからエーテル抽出を行なった。Fr B は単に 90% アセトンによる可溶部分と不溶部分とに分けた。以上のごとくして得られた各資料は、それぞれそのままの形で、あるいは酢酸緩衝液に再浮遊し、Folin 値をきめてから殺菌力試験に供した。成績は Table 1 に示した。要約すれば、殺菌効果は Fr A と B とにあり、しかも 90% アセトン可溶部分に移り、これを Sephadex G-150 のカラムにかけると、分子量の高い方の蛋白に強い活性がみられた。これの殺菌力はエーテル抽出を受けたのちも不変であつた。また、これらの製品はすべて 100°C 5 分加熱後に使用したことを、そし

Fig. 3. Further Fractionation of FrA (Fig. 2) by Acetone and Ethyl Ether



Buffer: 0.05 M acetate buffer of pH 5.6

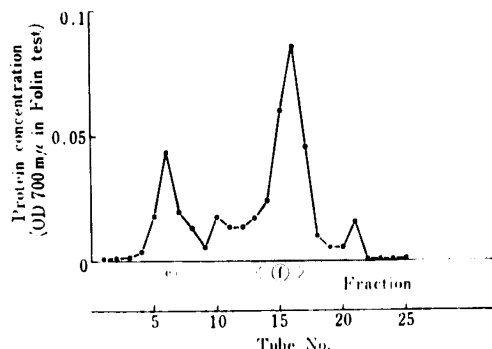
Table 1. Mycobactericidal Activity of Various Subfractions Derived from Detergent-Extracted Lysosomal Components of BCG-Revaccinated Guinea Pig Lungs

Sample			Mycobactericidal activity* (Viable counts per mg bacilli)	
Sephadex 2B fraction (Fig. 2)	Acetone-ether fraction (Fig. 3) (Fig. 4)	Folin value (OD700mμ)	Exp. I	Exp. II
A		0.043	19×10 ⁸	
90% Acetone	Insoluble (a)	0.13	53×10 ⁸	
	Ether-extracted residue (b)	0.37		3×10 ⁸
	Soluble-Acetone evaporation {	Sediment (c)	18×10 ⁸	
		Supernatant (d)	5×10 ⁸	
		Sephadex G-150 No. 5~7 (e)	10×10 ⁸	
		Eluates No. 13~17 (f)	86×10 ⁸	
		Ether-treated (g)	<1×10 ³ (5×10 ⁴)**	
B		0.091	14×10 ⁸	
90% Acetone	Insoluble	0.57	48×10 ⁸	
	Soluble-Acetone evaporation	0.254	<1×10 ³	
C		0.18	20×10 ⁸	
Control buffer (0.05 M acetate buffer pH 5.6)		0	19×10 ⁸	2×10 ⁸

* H₃₇Rv suspension of 0.1 mg bacilli per ml were exposed to each sample of indicated Folin value at 37°C for 4 hours.

** Exposure at 4°C

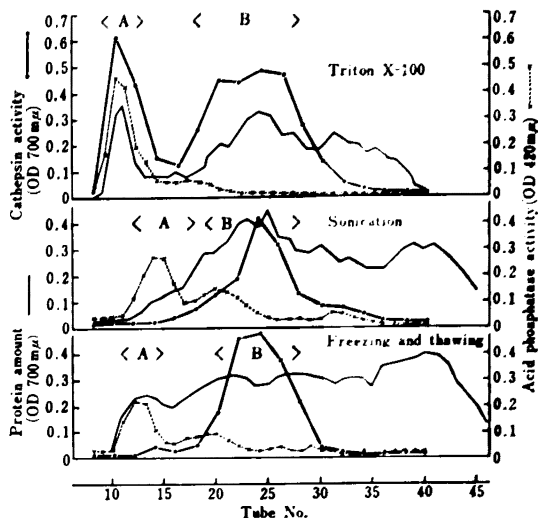
Fig. 4. Gel-Filtration on Sephadex G-150 (1×26 cm) of Acetone-Extracted Moiety of FrA ((d) in Fig. 3)



て、有機溶媒による処置によつて、Fr A, B のもつ 2 つの酵素活性はほとんど消失したことが注目された。

3) 機械的方法による抗菌物質の抽出: BCG 再接種モルモットの肺 110 g より Fig. 1 の方法で得た洗滌細胞顆粒分画を 3 等分し、その 1 つは前回のごとく Triton X-100 によつて抽出し、他の 1 つは $MgCl_2$ を 5 mM に含む 0.25 M 蔗糖溶液 40 ml にうかべて音波処理し (20 キロサイクル, 300 mA, 85 V に調整した音波発生装置で 10 分処置)、最後の 1 つは Tween 80 を 0.1% に含む同蔗糖溶液 40 ml にうかべて凍結融解を 10 回行なつた。それぞれ 25,000 g×20 分の遠沈後、得られた上清を濃縮して Sephadex G-150 のカラム (34×2.5 cm) にかき、0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を流して溶出液を 5 ml ずつ採取した。蛋白量と酵素活性を型のごとく測定して、Fig. 5 に示す Diagram を得た。Triton X-100 抽出製品は、最上段のごとく 2 つの酵素活性を伴つた第 1 の蛋白ピークがみられ、これは一度下降してから次に第 2 の Cathepsin の大きな山とほぼ位置を同じくする第 2 の蛋白ピークに続き、最後に酵素活性の蛋白部分が続いた。Sephadex 2B による分画のパターン (Fig. 2) でみられた Fraction A, B は、この Sephadex G-150 の場合は合併して第 1 の蛋白ピーク (Fraction A) を形成していると考えられるが、音波処理の製品においては、酸性 phosphatase の山のみ存在して、この部分に蛋白峯がみられなかつた。おそらく音波によつて解体した膜の部分構造が再凝集し、遠沈操作によつて除かれていた可能性も推定され、この点を考慮して表面活性剤 Tween-80 (lysosome を破壊しない) を媒質に加えた凍結融解の場合は、酸性 phosphatase のみを伴つた第 1 の蛋白ピークは存在した。そして、この山は一度顕著に下がることなく、そのまま高く水平な蛋白曲線となつた。しかし、ここに Cathepsin 活性のないことは Triton X-100 抽出の場合と大変異なる。一方、第 2 の Cathepsin 活性の山は、いずれの抽出標本においても存在した。図

Fig. 5. Fractionation by Gel-Filtration on Sephadex G-150 Column (34×2.5 cm) of Soluble Lysosomal Components Obtained from the Granular Fraction of BCG-Revaccinated Guinea Pig Lungs by Various Extraction Methods



中に示したように、A, B なる部分をそれぞれの抽出標本についてプールし、それらの殺菌力について検査した。その結果、殺菌力は Triton X-100 抽出品では A 分画のみに存在し、音波処理の場合はいずれにもなく、凍結融解抽出品の場合は A, B いずれにも検出された。

考 察

前報告¹⁾では lysosome を含む細胞顆粒分画の酸抽出物より、20%アルコール沈殿物として酸性 phosphatase 活性や Cathepsin 活性をもたない抗菌物質を分離したが、本報告では、その Triton X-100 抽出物をゲル濾過して、それらの酵素活性を伴つた巨大分子の分画として抗菌物質を得た。この物質は熱に安定であり、酸性環境でのみ殺菌活性がある。また 90% アセトン可溶の部分に活性が移り、その活性はエーテル処置後も不変である点で、2つの方法による抽出物は共通点があり、分離方法の違いにも拘らず、両者が同一殺菌因子をその中に保有している可能性は極めて強い。また Triton X-100 抽出・ゲル濾過法による分離物質が、脂質を含む膜構造の部分であることは、この表面活性剤のもつ性格と、これまでの報告⁹⁾¹⁰⁾から推定される。この点は今後脂質の分析と電顕像等から裏づけてゆきたい。また抗菌因子が膜構造をなす脂質あるいは蛋白であるか、それとも膜に付着してはいるが、そこから生理的に遊離しうる水解酵素とは別種の蛋白であるかという問題がある。マウスの脾における私達の経験¹¹⁾は後者の可能性を支持しているの

また細胞顆粒画分からの抽出に当たつて、Triton X-100 による抽出物は、収量（蛋白量として）が 6.2mg であり、音波、凍結融解による収量 12.4mg, 12.0mg の半量であつたが、蛋白当りの酸性 phosphatase の活性は逆に後者の 2~3 倍強く、lysosome を対象として考えると、Triton X-100 による抽出法は一番優れており、しかもゲル濾過によつてその抗菌力は巨大な分子分画に集中する点が、抗菌性物質精製の第1段階として便利である。しかし凍結融解による抽出物からも抗菌物質がとれるという事実は、Triton X-100 に特有な抗菌物質でないことを支持している。

今後の問題点として、抗菌因子の精製、性状、殺菌作用の機序および in vivo での菌との交渉等が考えられるが、出発材料として、全肺の代りに肺胞内の macrophage を用いることが望ましいであろう。

本研究実施に当たつては、日米医学協力計画結核専門部会からの研究費に負うところが大きい。記して謝意を表す。また本論文の要旨は第 44 回日本結核病学会で報

告した。

文 献

- 1) 金井興美・近藤瑩子：結核，44：211，昭 44.
- 2) Kanai, K. : Japan. J. Med. Sci. Biol., 20 : 73, 1967.
- 3) Kanai, K. : Japan. J. Med. Sci. Biol., 20 : 401, 1967.
- 4) Kanai, K. : Ann. New York Acad. Sci., 154 : Art 1, 177, 1968.
- 5) Kanai, K. : Japan. J. Med. Sci. Biol., 21 : 103, 1968.
- 6) Kanai, K. and Kondo, E. : Japan. J. Med. Sci. Biol., 21 : 405, 1968.
- 7) Kanai, K. and Kondo, E. : Japan. J. Med. Sci. Biol., 21 : 415, 1968.
- 8) Lowry, O.H. et al. : J. Biol. Chem., 193 : 265, 1951.
- 9) Verity, M.A., Caper, R. and Brown, W.J. : Biochem. J., 109 : 149, 1968.
- 10) Axline, S.G. : J. Exptl. Med., 128 : 1031, 1968.
- 11) Kanai, K. and Kondo, E. : Japan. J. Med. Sci. Biol., 投稿予定.