

原 著

ヒト型結核菌 H₃₇Rv 株由来の混晶性タンパク質

田坂博信・松尾吉恭・加藤雅史

広島大学医学部細菌学教室

受付 昭和 51 年 3 月 15 日

MIXED CRYSTAL TUBERCULOPROTEIN FROM H₃₇Rv
STRAIN OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Hiromichi TASAKA*, Yoshiyasu MATSUO and Masafumi KATO

(Received for publication March 15, 1976)

Proteinic substances were separated as needle crystals from unheated culture filtrate of the strain H₃₇Rv of *Mycobacterium tuberculosis* grown in Sauton medium by saturated ammonium sulfate following fractionation with starch block zone electrophoresis.

(1) Crystals of the same appearance were also found in the extract from surface large of the bacilli of *M. tuberculosis* and in culture filtrate of the strain ATCC 14468 of *M. smegmatis*. Proskauer Beck medium could be substituted for Sauton medium and Pevikon used instead of starch for supporting medium of the zone electrophoresis.

(2) The crystals were not separated in a particular fraction with saturated ammonium sulfate, but the concentration at 60% was of the best condition. Crystallization occurred in broad areas ranging from pH 2 to pH 9.

(3) Proteinic crystal was found to consist of pleural proteins and referred to as Mixed Crystal Tuberculoprotein (MCTP). MCTP separated from 0~50% SAS fraction was composed of α , γ and other proteins, and in contrast, that from 50~70% SAS fraction β and other proteins.

(4) A glycoprotein associated with MCTP was detected from culture filtrate of *M. tuberculosis*, and separated by gel filtration using a Sephadex G-100, ion exchange chromatography with a DEAE sephadex A-25 as well as affinity chromatography with the aid of a Con A sepharose. This glycoprotein was assumed to form the nucleus of crystals.

(5) In addition of MCTP, an extracellular protein other than α and β antigens, named γ antigen, was separated and purified from culture filtrate of *M. tuberculosis*. The distribution of γ antigen was examined by the Ouchterlony's method. It was demonstrated in *M. tuberculosis*, including resistant strains against various drugs, and *M. bovis*, but not in *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare-avium* complex, *M. fortuitum*, *M. chelonae* and *M. smegmatis*.

According to, the authors' further investigation, it seems better to replace the term "crystal" with "paracrystals".

* From the Department of Bacteriology, Hiroshima University School of Medicine, 1-Chome Kasumi, Hiroshima 734 Japan.

米田・福井¹²⁾によつて結核菌のタンパク質性抗原 α および β が分離・精製されて以来、この方面の研究は進展せず、わずかに Daniel and Ferguson³⁾ により a_1 および a_2 抗原の分離が報告されているにすぎない。

われわれはヒト型結核菌 $H_{37}Rv$ 株の非加熱培養濾液の35%飽和硫酸 (SAS) で沈殿するタンパク質をデンブンプ分域電気泳動により分画し、分画液に SAS を加えると肉眼的に観察される大きさのタンパク質性の結晶の析出がみられるという思いがけない現象に遭遇した。この結晶は、これを溶解して SAS を加えるのみでは再結晶とはならないが、再びデンブンプ分域電気泳動を行なつて SAS を加えると析出してくることから Seibert の報告した結晶⁴⁾とは異なるものと思われた。種々検討の結果、この結晶はタンパク質性ではあるが、単一なタンパク質によるものではなく、数種のタンパク質によつて構成される混晶であり、しかも糖タンパクがその核になっているらしいという興味深い知見が得られたほか、混晶の構成タンパクとして既知の α, β 以外に γ と名づけるタンパク質をも分離・精製したので以下報告する。

材料ならびに方法

1. 培養濾液の調製: ヒト型結核菌 $H_{37}Rv$ 株 (Trudeau 研—阪大微研から分与された) を Sauton 培液 (1 l の三角フラスコに 200 ml ずつ分注) に 3~4週間, 37°C で浮上培養したのち, glass filter 次いで Millipore filter で濾過した。

2. 培養濾液の塩析濃縮と硫酸分画: 培養濾液に disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) を 2 mM および ethylenediamine-di-o-hydroxyphenylacetic acid (EDDHA) を 0.2 mM になるように添加後, 硫酸を 70%飽和 (472 g/l) になるように加えて氷室内で攪拌し, 析出した沈殿物を遠心分離 (12,000 rpm, 連続遠心) して集め, 1 mM EDTA 含有 0.05 M Trisaminomethane buffer, pH 7.5 (以下 0.05 M TrisCl, pH 7.5) に対して透析, 溶解した。これを 100,000×g, 60分超遠心

して不溶物を除き, 上清を希釈後, 必要に応じ 35%, 50%および70% SAS に分画を行なつた。

3. デンブンプ分域電気泳動法⁵⁾: 幅 3 または 10 cm, 高さ 1.5 cm, 長さ 31 cm のデンブンプブロックの陰極側より 10 cm の個所に 1.0 cm 幅に材料を充填し, 2mA/cm² で 16~18 時間氷室内で 0.05 M Veronal buffer, pH 8.6 を緩衝液として電気泳動を行なつた。泳動後, デンブンプブロックを幅 1.0 cm ずつに切り出して, 太目の試験管に入れ, 4 または 10 ml の 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.6 を加えてよく攪拌後放置し, 各試験管の上澄液の一部はタンパク量の測定 (Lowry らの方法⁶⁾) にあて, 2つの大きいピークには SAS (pH 7.5) を加えて氷室内に放置した。

4. γ 抗原の分離・精製: 35% SAS 分画をデンブンプ分域電気泳動し, 易動度のおそい分画中に析出した結晶をガーゼで濾過して除いた残りの沈殿しているタンパク質を出発材料とし, Sephadex G-200 (カラム: 直径 2.64 cm, 長さ 100 cm; 緩衝液: 0.05 M TrisCl, pH 7.5) でゲル濾過, 次いで DEAE cellulose (カラム: 直径 1.5 cm, 長さ 30 cm; 緩衝液: 0.5 mM EDTA 含有 0.02 M Trisaminomethane buffer, pH 8.0 (以下 0.02 M TrisCl, pH 8.0) に食塩濃度を 0 から 0.2 M に直線的に増加させる) によるイオン交換クロマトグラフィーを行ない, 得られたタンパク質を γ 抗原と名づけた。その抗原性および純度の検討は Ouchterlony 法⁷⁾,

Fig. 1. The Fractionation Procedure Employed for Crystallization from Mycobacterial Culture Filtrates

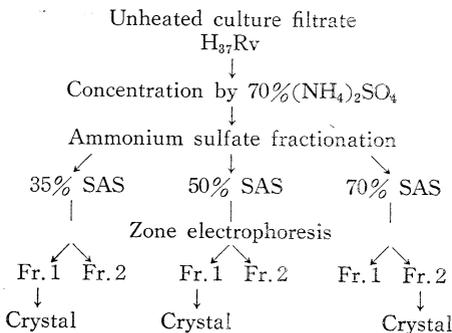
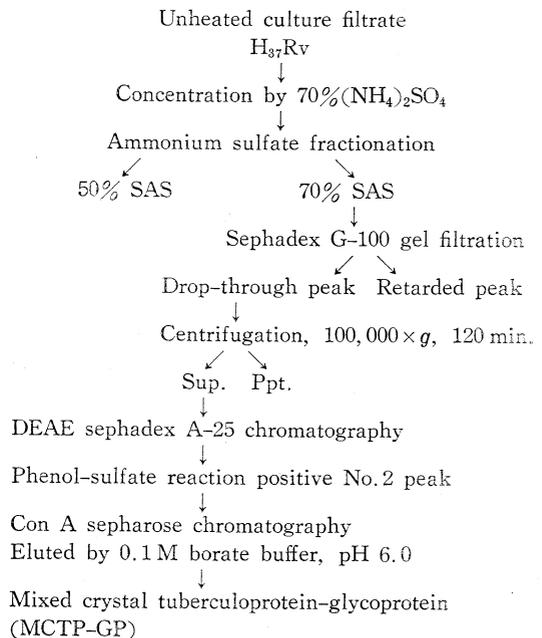


Fig. 2. The Fractionation Procedure used for Isolation of Mixed Crystal Tuberculo-protein-Glycoprotein from Mycobacterial Culture Filtrates



交差免疫電気泳動法⁹⁾および SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁹⁾で行なつた。

5. 混晶性糖タンパクの分離・精製: 50~70% SAS 分画を出発材料とし, Sephadex G-100 (カラム: 直径 5 cm, 長さ 100 cm; 緩衝液: 0.05 M TrisCl, pH 7.5) でゲル濾過し, 100,000×g, 120分超遠心で lipopolysaccharide を除き, 次いで DEAE sephadex A-25 (カラム: 直径 1.9 cm, 長さ 45 cm; 緩衝液: 0.02 M TrisCl, pH 8.0 に食塩濃度を 0 から 0.5 M に直線的に増加させる) によるイオン交換クロマトグラフィーを行なつた。各分画液について 280 nm の吸収およびフェノール・硫酸法¹⁰⁾によつて中性糖の定量を行なつた。更に精製のため, Con A sepharose (カラム: 直径 1.9 cm, 長さ 20 cm) による吸着クロマトグラフィーを行ない 0.1 M borate buffer, pH 6.0 で糖タンパクを溶出した。

成 績

1. 結晶の析出: ヒト型結核菌 H₃₇Rv 株の非加熱培

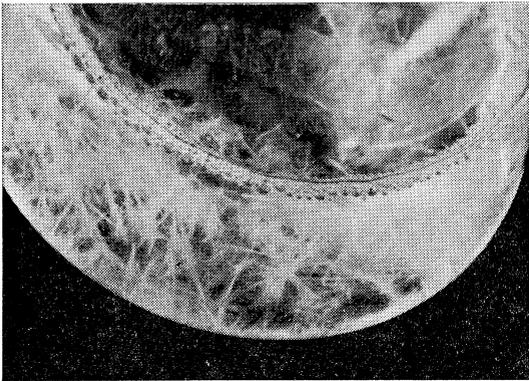


Photo. 1. Mixed crystal tuberculoprotein from 35% SAS fraction.

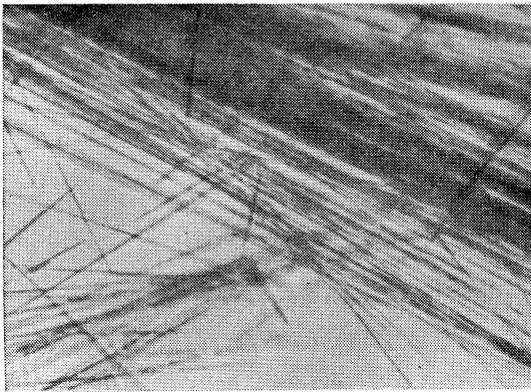


Photo. 2. Mixed crystal tuberculoprotein from 35% SAS fraction (magnification, ×240).

養濾液からの 35% SAS 分画・デンブン分域電気泳動による分画溶液に SAS を加えて析出してきた針状結晶は写真 1, 2 に示す通りである。

この結晶は, はじめの SAS 分画を 35~50% および 50~70% としても同様な操作ののちに析出することがわかつた。

また, 結核菌菌体 (湿菌 200 g) に 1,500 ml の 0.05 M TrisCl, pH 7.5 を加え, スターラー上で 72 時間攪拌して得られた菌体表層抽出液, ならびにスメグマ菌 ATCC 14468 株の Sauton 培養濾液からも同様の結晶の析出が認められた。

更に Sauton 培液の代わりに Proskauer Beck 培液 (Difco) を用いても, また電気泳動の支持体をデンブンの代わりに Pevikon としても同様の結晶の析出が認められた。

2. 結晶析出に及ぼす SAS 濃度と pH の影響: (1) SAS 濃度—50, 55, 60, 65 および 70% 飽和になるように SAS を加えて検討した結果, 60% SAS の場合に最もよく結晶の析出がみられた。(2) pH—デンブン分域電気泳動後, 抽出されたタンパク質分画液の pH は 8.0~8.3 であつたが, それを塩酸および苛性ソーダで pH

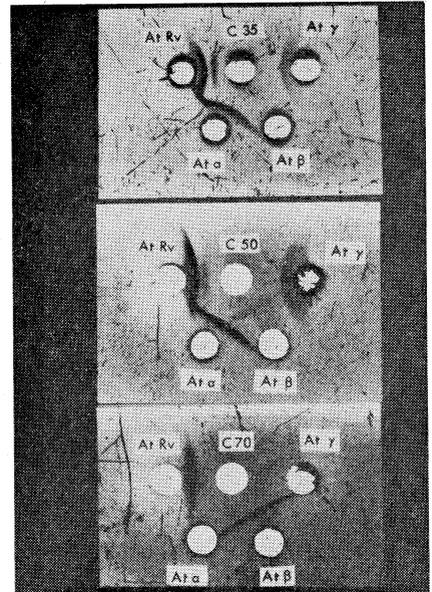


Photo. 3. Double-diffusion analysis in agar gel. The three center wells labelled C35, C50 and C70 contained MCTP from 0~35% SAS, 35~50% SAS and 50~70% SAS fraction, respectively. The peripheral well labelled AtRv contained rabbit polyvalent anti-H₃₇Rv anti-serum. The peripheral wells labelled At α , At β and At γ contained rabbit anti- α , β and γ anti-serum, respectively.

2.0~9.0に補正して検討した結果、最適 pH は7.5~8.0であった。ただし、より酸性またはアルカリ性 pH 域でも時間は延長するが結晶の析出が認められた。

3. 結晶を構成するタンパク質: 電気泳動によつて再結晶された結晶について、抗 α および抗 β 血清 (阪大微研, 米田正彦教授のご好意により分与をうけた), 抗 γ 血清 (後述) ならびに抗 $H_{37}Rv$ 血清とゲル内沈降反応を行なつた結果、写真3に示すように35%および50% SAS 分画よりの結晶には α および γ 抗原が認められたが、70% SAS 分画よりの結晶には β 抗原のみが認められた。

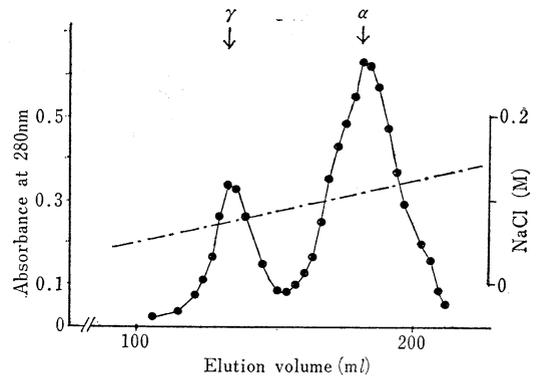
SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動したゲルを Coomassie blue および PAS 染色すると Coomassie blue 染色では0~50% SAS および50~70% SAS 分画からのそれぞれに数本のバンドが検出された。その中に同一移動度を示すバンドは認められなかつた。他方 PAS 染色では両ゲルの上方の同部位にバンドが認められた。

4. γ 抗原の分離・精製: 培養濾液の0~35% SAS 分画をデンプン分画電気泳動し、析出した結晶を除いた残りの沈殿物を溶解後、Sephadex G-200 でゲル濾過して、最後に流出する大きなピークについて、更に DEAE cellulose カラムでイオン交換クロマトグラフィーを行なうと図3に示したような明瞭な2つのピークが得られた。第2のピークに含まれるタンパク質は抗 α 血清とゲル内沈降反応で沈降線を生ずるのに対して、第1ピークのそれは抗 α 血清とは沈降線を生じないが、抗 $H_{37}Rv$ 血清とは1本の沈降線を生じた。このタンパク質は抗 β 血清とゲル内沈降反応を行なつてもそれに対して沈降線を作らないことを確かめた上、再度同じ条件で DEAE cellulose によるイオン交換クロマトグラフィーを行なつた。得られたタンパク質は抗 $H_{37}Rv$ 血清との交差免疫電気泳動により1本の沈降線が生ずること、また SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動でも1本のバンドしか認められなかつたことから、これは既知の α および β 抗原とは異なる精製タンパク質と考えられたので、これを γ 抗原と命名した。

γ 抗原でウサギを免疫して、得られた抗 γ 血清は α および β 抗原に対してゲル内沈降反応で沈降線は生じない (写真4参照) が、 $H_{37}Rv$ 抗原と交差免疫電気泳動を行なうと1本の沈降線のみが描かれることを確認した。

γ 抗原の分子量は30,000~70,000の間で α 抗原のそれよりもやや大きく、硫酸分画では30%から45%の SAS の間に沈殿し、電気移動度は α 抗原よりも少なく、100°C、30分の加熱で抗原性を失う。ゲル内沈降反応で検討した限りでは各種薬剤耐性結核菌 (国立療養所広島病院, 望月孝二副院長のご好意により分与を受けた) およびウシ型菌には γ 抗原の存在が認められたが、*Mycobacterium*

Fig. 3. Elution Profile of γ Antigen Using DEAE Cellulose Column Chromatography



Note: Solide line showing the optical density at 280 nm, dashed line indicating NaCl gradient.

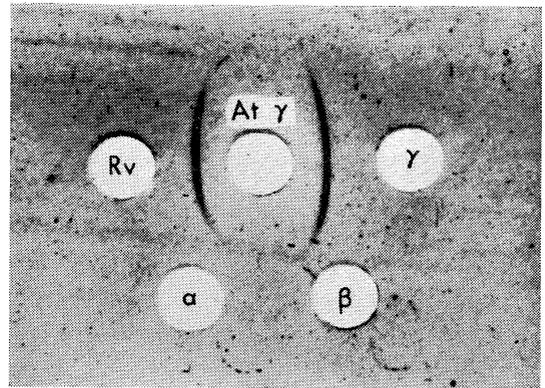
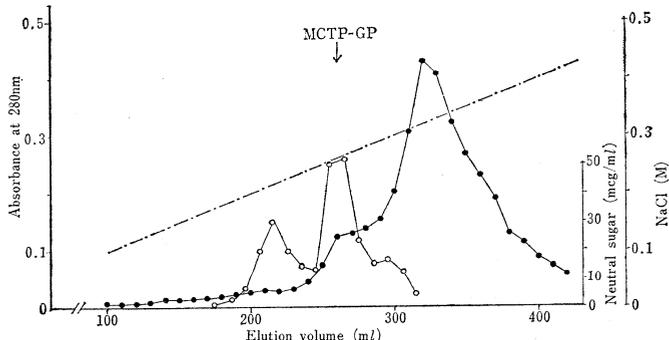


Photo. 4. Double-diffusion study in agar gel. The center well labelled At γ contained rabbit anti-serum. The peripheral well labelled Rv contained crude $H_{37}Rv$ antigen. The three peripheral wells labelled α , β and γ contained α , β and γ antigen, respectively.

bacterium kansasii, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare-avium* complex, *M. fortuitum*, *M. chelonae* および *M. smegmatis* にはその存在が認められなかつた。

5. 混晶の核になる物質の分離・精製: 前出のように針状結晶として析出する混晶性タンパク質は、SAS 濃度を種々に変えても得られるため硫酸沈殿でうまく分画されず、また広い pH 域で析出がみられる。ところが SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動すると 50% SAS および 70% SAS 分画のいずれの混晶からのゲルにも PAS 染色で赤染されるバンドが検出された。そこで混晶形成に糖タンパクが関与しているのではないかと考え、培養濾液の 50~70% SAS 分画を Sephadex G-100 によりゲル濾過を行なうとピーク 1 とピーク 2 の大きい 2 つの分画が得られた。これらをそれぞれデンプン

Fig. 4. Elution Profile of Mixed Crystal Tuberculo-protein-Glycoprotein Employing DEAE Sephadex A-25 Column Chromatography



Note: Solid circles show the optical density at 280 nm, open circles the neutral sugar content, and dashed line the NaCl gradient.

分域電気泳動で検討すると素通りしたピーク1の、その中に混晶性タンパク質が存在した。そこでこのピークを100,000×g, 120分超遠心し、lipopolysaccharideを除いた後の上清液を、DEAE sephadex A-25でイオン交換クロマトグラフィーを行なうと図4に示したように中性糖の2つのピークならびに1つのタンパクのピークの3分画が得られた。更にそれぞれのピークをデンブン分域電気泳動で検討した結果、混晶性糖タンパクは中性糖の第2のピークに相当することが確かめられたので、これについて Con A sepharose で吸着クロマトグラフィーを行ない、0.1 M borate buffer, pH 6.0で溶出することにより精製された混晶性糖タンパク分画を得ることができた。

β 抗原に分離した混晶性糖タンパクを混合してデンブン分域電気泳動して検討した結果、 β 抗原のみでは結晶の析出が認められなかつたのに対し、糖タンパクとともに電気泳動した方には結晶の析出がみられた。

考 案

結核菌の培養濾液中または菌体表層抽出液から、電気泳動を経由することによつて、タンパク質性の結晶が析出するという、これまでに報告されたことのない特異な現象を観察した。

このタンパク質性の結晶を解析したところ、それは複数のタンパク質を構成成分とし糖タンパクと密接に関連する混晶 (mixed crystal tuberculoprotein, MCTP) であることが明らかにされた。

電気泳動によつてのみ混晶が析出することの機作は明らかでないが、0~50% SAS 分画からの混晶は α および γ 抗原などを構成タンパクとし、他方50~70% SAS 分画からのそれは β 抗原その他のタンパク質を構成タンパクとして析出してくることから、電気泳動によつて糖タンパクが活性化されて周囲に存在するタンパク質群

と干渉し、これが核となつて混晶を析出するのではないかと推定される。糖タンパクのこのような作用が電気泳動法以外の条件によつても起こりうるのか、また混晶として析出してこない他のタンパク質には何らの干渉も及ぼしていないのか、どんな種類のタンパク質と干渉するのか、干渉をうけたタンパク質は混晶という形而下の現象以外にどのような影響をうけるのか、などの興味深い問題点が指摘されよう。前述のように混晶性糖タンパク (MCTP-glycoprotein, MCTP-GP) を単離する方法を見出すことができたので、向後その生物活性をはじめ物理的ならびに化学的性状について検討を行なう予定である。

混晶を構成しているタンパク質の検討中、米田・福井¹²⁾によつて分離された α および β 抗原とは異なるタンパク質、 γ 抗原を分離した。 γ 抗原は硫安分画、分子量および電気易動度では α 抗原と近似の性質を示すが、結核菌以外の抗酸菌における分布は α 抗原とは異なり、むしろ β 抗原に近似するパターンを示した¹¹⁾。これと Daniel and Ferguson³⁾ の a_1 および a_2 抗原との異同性については比較検討することができなかつたが、 a_1 および a_2 抗原は比較的電気易動度の大きいことから、 γ 抗原とは異なるものと思われる。

結 語

ヒト型結核菌 H_37Rv 株の Sauton 培養の非加熱培養濾液中から、デンブン分域電気泳動後、分画液に飽和硫安液を加えるとタンパク質性の針状結晶が析出する現象を観察した。このタンパク質性の結晶は

(1) 培養液中のみでなく菌体表層抽出液にも見出された。Proskauer Beck 培液で培養しても、電気泳動の支持体を Pevikon に代えても同様の結晶の析出がみられた。また、*Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468 株の培養濾液中にも肉眼的には全く同様の針状結晶が検

出された。

(2) 結晶性タンパクは硫安分画法によつては分別することができないが、結晶析出のための最適飽和硫安濃度は60%であつた。また pH 2 から 9 まで広範囲な pH 域にわたつて析出がみられた。

(3) タンパク質性の結晶は単一なタンパク質による結晶ではなく 0~50% SAS 分画からの結晶は α および γ 抗原などを構成タンパクとし、50~70% SAS 分画からの結晶は β 抗原その他を構成タンパクとする混晶であつた。

(4) 培養濾液中より分離・精製された糖タンパクが混晶形式の核であろうと考えられた。

なお、結核菌の菌体外タンパクとして既知の α および β 抗原とは異なる γ 抗原を分離・精製した。

本研究にあつて貴重な試料の分与ならびに示唆を与えて下さつた米田正彦教授、堀三津夫教授および平井俊博博士（大阪大学微生物病研究所）に深謝します。

主要文献

- 1) Fukui, Y. and Yoneda, M.: *Biken J.*, 4: 87, 1961.
- 2) 米田正彦: *結核*, 38: 287, 1963.
- 3) Daniel, T.M. and Ferguson, L.E.: *Infect. Immunity*, 1: 164, 1970.
- 4) Seibert, F.B.: *Amer. Rev. Tuberc.*, 44: 1, 1941.

- 5) Yoneda, M. and Fukui, Y.: *Biken J.*, 4: 25, 1961.
- 6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- 7) 福井良雄: 蛋白質核酸酵素, 別冊生体膜実験法下, p. 57, 1974.
- 8) 松橋直・臼井美津子・成田秀雄: *化学と生物*, 9: 251, 1971.
- 9) 林健志・大場義樹: 蛋白質核酸酵素, 17: 304, 1972.
- 10) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: *Ann. Chem.*, 28: 350, 1956.
- 11) Yoneda, M., Fukui, Y. and Yamanouchi, T.: *Biken J.*, 8: 201, 1965.

〔付記〕

結核菌由来のタンパク質性結晶の再結晶を、種々の割合の Phosphate buffer-Veronal buffer について検討した結果、Veronal buffer を 50% 以上に含む混液に飽和硫安液を加えることによつて、針状結晶様物質の析出することが見出された。したがつて、従来観察してきた針状結晶はタンパク質と Veronal の混合物と思われ、これに結晶という表現を用いるのは適切とはいえないので、本文中の結晶 (crystal) は結晶様 (paracrystals) および混晶 (mixed crystal) は混晶様 (mixed paracrystals) と改めたい。