

原 著

結核菌由来糖タンパク質のリソゾーム 酵素に対する阻害作用

田坂博信・加藤雅史
清谷克寛・松尾吉恭

広島大学医学部細菌学教室

受付 昭和 53 年 9 月 21 日

INHIBITORY EFFECT OF TUBERCULOGLYCOPROTEIN ON LYSOSOMAL ENZYME ACTIVITY

Hiomichi TASAKA*, Masafumi KATO, Katsuhiko KIYOTANI
and Yoshiyasu MATSUO

(Received for publication September 21, 1978)

Mixed paracrystal tuberculoprotein-glycoprotein (MCTP-GP) isolated from unheated culture filtrate of the strain H₃₇Rv of *Mycobacterium tuberculosis* was shown to noncompetitively inhibit the *in vitro* activity of lysosomal enzymes such as acid phosphatase, N-acetyl- β -glucosaminidase, N-acetyl- β -galactosaminidase, β -glucuronidase, β -galactosidase and α -glucosidase. The inhibitory activity was the highest against acid phosphatase, the lowest against α -glucosidase and moderate against the other four enzymes. The inhibition was optimal at pH 5.0 to 5.5.

ヒト型結核菌 H₃₇Rv 株の非加熱培養濾液をデンブロン分域電気泳動により分画し、分画液に SAS を加えるとタンパク質性の針状結晶様混合物の析出する現象を観察した。この針状結晶様析出物は、培養液中のタンパク質性物質と veronal buffer ならびに SAS との相互作用の結果、析出してくるのであるが、培養液中に含まれている糖タンパク質 (mixed paracrystal tuberculoprotein-glycoprotein, MCTP-GP) は、針状結晶様析出物の形成を促進する作用のあることを、前報¹⁾において報告した。

結核菌と感染宿主との相互作用について Kanai²⁾, Kanai ら³⁾ は、感染した結核菌は生体内でリソゾームとの相互作用の結果、菌体表面に宿主由来の acid phosphatase およびその他のリソゾーム由来の構造物を保持

していることを示している。そこで私たちは、結核病巢内で、菌体外に分泌された、または細胞壁中の MCTP-GP が、どのような生物学的反応に関与するかを明らかにする目的で、リソゾーム酵素と MCTP-GP の相互作用について *in vitro* で検討したところ、MCTP-GP は acid phosphatase など数種の酸性加水分解酵素の活性を非競合的に阻害するという興味深い生物学的活性を見出したので報告する。

材料ならびに方法

1. 結核菌由来糖タンパク質 (MCTP-GP) の分離：ヒト型結核菌 H₃₇Rv 株の非加熱培養濾液から前報¹⁾の通りに行なった。
2. リソゾーム酵素の調製：モルモット (体重約 400

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

g) の腹腔に 12% カゼイン-生理食塩水, pH7.4 (12ml/kg) を注入し, 18時間後に Hanks 液にて腹腔に滲出した好中球を採取した。採取した好中球は 2~3 回 Hanks 液または生理食塩水で洗浄し, 最後に 0.1% Triton X-100 を加え, Vorex Homogenizer により好中球のホモジネートを作製し, リソゾーム酵素液とした。

3. 供試基質: 4-methylumbelliferyl (4-MU) phosphate, 4-MU-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside, 4-MU-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranoside, 4-MU- β -D-glucuronide, 4-MU- β -D-galactopyranoside および 4-mU- α -D-glucopyranoside (Koch-Light Laboratories, England) をそれぞれ dry methoxyethanol に 10mM になるように溶解したものを stock solution とし, 用に臨み希釈して用いた。

4. 酵素活性の測定: 酸性加水分解酵素活性の測定は 4-methylumbelliferone を用いた蛍光比色法による Mead ら⁴⁾⁵⁾ の方法に従った。各基質の stock solution を 0.2% Triton X-100 含有 0.1M acetate buffer に基質が 0.2mM になるように調製し, この 0.2mM の基質液の 0.1ml と好中球のホモジネート 0.1ml を混合し, 37°C で 20分間 incubate した後, 5mM EDTA 含有 50mM glycine buffer, pH 10.4 で反応を停止させ, 基質より遊離した 4-MU を E₃₆₅F_{460nm} で蛍光比色計 (日立製, 分光蛍光光度計 204) で測定し, 酵素活性は n mole/min/ml であらわした。

5. リソゾーム酵素活性阻害作用の測定: 前記の「酵素活性の測定」と同様の手順で行なう, すなわち基質液の 0.1ml に MCTP-GP 液 0.05ml および好中球のホモジネート 0.05ml を混合し, その酵素活性を測定し, これを MCTP-GP(+)activity とし, MCTP-GP 液の代わりに MCTP-GP 液を溶解している buffer 0.05ml を加えたものの活性を control activity とし, 下の式によつて阻害率を算出した。

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{control act.} - \text{MCTP-GP}(+) \text{act.}}{\text{control act.}} \times 100$$

成 績

1. β -glucuronidase に対する MCTP-GP の阻害活性: β -glucuronidase に対する MCTP-GP の阻害活性を pH3.5 から 6.0 までの pH 域において測定した結果は, 表 1 および図 1 に示したように測定した pH 域のいずれにおいても阻害活性が認められたが, 特に pH5.0 以上においては 90% 以上の阻害活性が認められた。

2. Acid phosphatase および NAc- β -glucosaminidase に対する MCTP-GP の dose response: MCTP-GP の量を 125 μ g/ml から 2 倍希釈の系列において pH 5.5 における阻害活性を測定したところ図 2 に示すよう

Table 1. Influence of pH on the Effect of MCTP-GP on β -glucuronidase Activity

pH	β -glucuronidase activity		% Inhibition
	MCTP-GP* (125 μ g/ml)	Control*	
3.5	18.7	29.0	35.7
4.0	13.4	27.3	50.7
4.5	6.8	20.3	66.3
5.0	0.73	12.5	94.1
5.5	0.31	6.5	97.6
6.0	0.08	3.8	97.9

* : n mole/min/mg

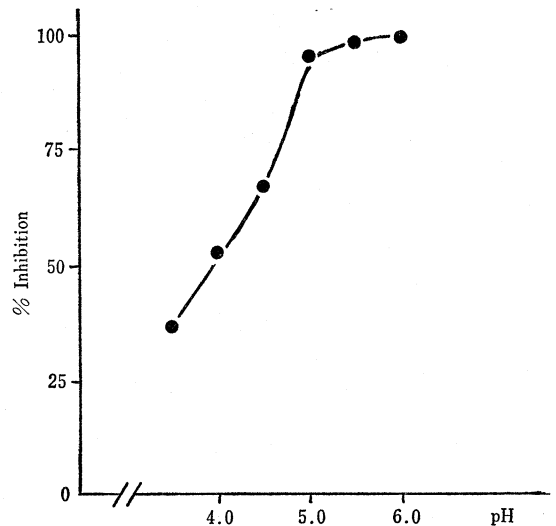


Fig. 1. Per cent inhibition of MCTP-GP on β -glucuronidase activity at various pH

に MCTP-GP の 50% inhibition は NAc- β -glucosaminidase に対しては約 50 μ g/ml であつたが, acid phosphatase に対しては約 20 μ g/ml であり, acid phosphatase に対し, より強い阻害活性が認められた。

3. pH4.0 および 5.5 における各種リソゾーム酵素に対する MCTP-GP の阻害活性: 一括して表 2 に示した。供試したいずれの酵素に対しても程度の差は認められるが, 阻害活性のあることが認められた。

4. リソゾーム酵素に対する MCTP-GP の阻害機構: NAc- β -glucosaminidase に対する阻害機構について検討した。4-MU-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside の 0.02 から 0.20mM までの間で, MCTP-GP 添加群と非添加群それぞれの NAc- β -glucosaminidase 活性を表 3 に示した。図 3 は表 3 の double reciprocal plot で MCTP-GP 添加群, 非添加群いずれも 1/s 軸上 -5.0/mM で交わり noncompetitive pattern を示した。

Table 2. Inhibitory Activity of MCTP-GP on Lysosomal Enzyme Activity

Enzymes	Inhibitory activity				Optimal pH*
	pH 4.0		pH 5.5		
	MCTP-GP ($\mu\text{g/ml}$)				
	62.5	125	62.5	125	
Acid phosphatase	16.3		100	100	5.5
NAc- β -glucosaminidase			68.0	87.0	5.5
NAc- β -galactosaminidase	5.1		87.3		5.5
β -glucuronidase		50.7	85.6	97.6	3.0
β -galactosidase	12.9		86.8		3.0
α -glucosidase	13.6		32.0		6.0

* Optimal pH of each lysosomal enzyme in casein-induced guinea-pig peritoneal polymorphonuclear leukocyte homogenate

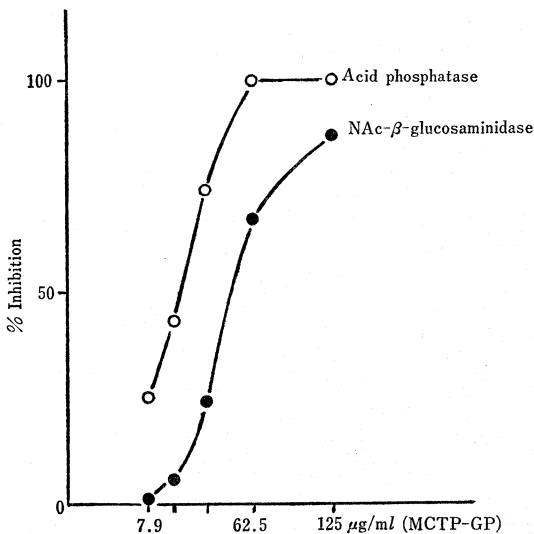


Fig. 2. Dose response of MCTP-GP on acid phosphatase and NAc- β -glucosaminidase activity at pH 5.5

Table 3. Kinetics of MCTP-GP Inhibition on NAc- β -glucosaminidase Activity

S (mM)*	v (n mole/min/mg)**		
	Control	MCTP-GP (31.3 $\mu\text{g/ml}$)	MCTP-GP (62.5 $\mu\text{g/ml}$)
0.020	0.4350	0.3168	0.2057
0.026	0.5296	0.3972	0.2648
0.032	0.6099	0.4870	0.3097
0.040	0.7589	0.5721	0.3901
0.060	0.9929	0.7754	0.5035
0.120	1.742	1.398	0.8345
0.200	2.463	1.749	1.140

* S : 4-MU-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside

** v : NAc- β -glucosaminidase activity

考 案

結核菌に限らず細胞内寄生性細菌のいずれからもリゾゾーム酵素に対する阻害物質が産生されているという報告には、未だ接していない。われわれが結核菌の培養液中から得た MCTP-GP はリゾゾーム酵素活性を阻害することが示された。この物質は菌体表面にも見出すことができる²⁾。この MCTP-GP のリゾゾーム酵素に対する非競合阻害活性は *in vitro* の現象として観察されたにすぎないから、これが感染宿主内でも同様の活性を示し、結核菌の病原性発現に積極的役割りを果たしているか否かは、今後の検討に待たねばならない。もつとも、個々の酵素の至適 pH は必ずしも同じではない(表 2 参照)にもかかわらず MCTP-GP の阻害活性はいずれの酵素に対しても pH 5.0~5.5 の間において強く発揮されている。Phagolysosome 内の pH について Sprick⁶⁾ は、*Mycobacterium tuberculosis* および *M. smegmatis* の菌体表面を標示色素で染色して、マウスあるいはモルモットの単球および好中球に貪食させると、貪食された

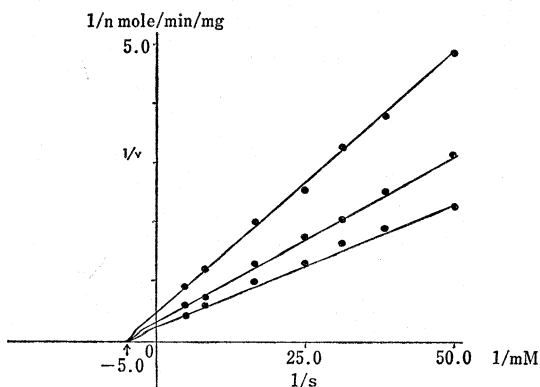


Fig. 3. Kinetics of MCTP-GP inhibition on NAc- β -glucosaminidase activity(double reciprocal plot)

菌体表面の pH は 4.7~5.5 であつたと報告している。また Jensen ら⁷⁾ も phagolysosome 内の pH は、細胞によつてかなりの違いがあるが、pH3~5 の間にあると述べている。われわれが今回検討した MCTP-GP の阻害活性の至適 pH が phagolysosome 内の pH とほぼ同じ域値にあるということは極めて興味深く示唆に富んでいるといえよう。

病原細菌ではないが、放線菌の培養液より梅沢らによつて分離されたリソゾーム酵素の阻害物質として、ペプスタチン⁸⁾⁹⁾ はカテプシン D を、ならびにイソフラボンラムノシド¹⁰⁾ は中性、酸性 β -ガラクトシダーゼをそれぞれ阻害することが報告されている。更に Avila ら¹¹⁾ は、生体内物質のヘパリン、コンドロイチン硫酸およびヒアルロン酸などのガラクトサミノグリカン類に阻害活性が認められると報告している。

結核病巣に特有な乾酪化の成立原因として戸井田¹²⁾は、「結核菌の場合には、lysosome 膜の活性化ないし脆弱化をひき起こさないで、lysosome 内に存在し、増殖しようするような、いわば一種の平和的共存の状態が、細胞の破壊、消化、吸収を伴わない凝固壊死という“おだやかな死”を来す理由であろうと考えられる」と述べているが、MCTP-GP のリソゾーム酵素阻害作用とマクロファージの“おだやかな死”との関連を検討するのも興味あることのように思われる。

結 語

結核菌の培養液中から、または菌体表層から分離した糖タンパク質は、acid phosphatase, N-acetyl- β -glucosaminidase, N-acetyl- β -galactosaminidase, β -glucuronidase, β -galactosidase および α -glucosidase などのリソゾーム酵素の活性を非競合的に阻害するという興味深い生物学的活性を示すことを *in vitro* で明らかにした。

今後は、阻害活性を指標として培養液中より阻害物質の分離・精製を行ない、阻害スペクトラムの検討ならびに *in vivo* における活性を明らかにしていきたい。

本研究にあつて、リソゾーム酵素活性の測定について御指導ならびに便宜をはかつて頂いた本学薬学科石橋貞彦教授ならびに高野達哉助教授（現帝京大学薬学部教授）に深謝します。

本論文の要旨は第51回日本結核病学会総会および第50回日本細菌学会総会において報告した。

文 献

- 1) 田坂博信・松尾吉恭・加藤雅史：結核，51：117，1976.
- 2) Kanai, K.: Jap. J. Med. Sci. Biol., 20 : 73, 1967.
- 3) Kanai, K. and Kondo, E.: Jap. J. Med. Sci. Biol., 23 : 303, 1970.
- 4) Mead, J. R., Smith, J. N. and Williams, R. T.: Biochem. J., 61 : 569, 1955.
- 5) 高野達哉：蛋白質核酸酵素，別冊，生体膜実験法上，p. 220, 1974.
- 6) Sprick, M. G.: Am. Rev. Tuberc., 74 : 552, 1956.
- 7) Jensen, M. S. and Bainon, D. F.: J. Cell Biol., 56 : 379, 1973.
- 8) Aoyagi, T., Kunimoto, S., Morishima, H., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: J. Antibiot., 24 : 687, 1971.
- 9) Aoyagi, T., Morishima, H., Nishizawa, R., Kunimoto, S., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: J. Antibiot., 25 : 689, 1972.
- 10) Aoyagi, T., Hazato, T., Kumagai, M., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: J. Antibiot., 28 : 1006, 1975.
- 11) Avila, J. L. and Convit, J.: Biochem. J., 152 : 57, 1975.
- 12) 戸井田一郎：結核・呼吸器抄録，22 : 307, 1971.