576, 8, 095 : 578, 088

細菌表面構造の研究

第 3 編

細菌表面構成物質の化学的研究

岡山大学医学部細菌学教室(主任:村上教授)

医学士 田 口 一 美

[昭和40年3月9日受稿]

目 次

- 1. 序言
- 2. 所謂 Antigen Compléte の精製に就て
 - 2. I Gram 陰性菌より Antigen Compléte を 精製する方法
 - 2. II Gram 陽性菌より Atnigen Compléte を 精製する方法
- 3. Ribonuclease の精製並びに物理的, 化学的性 状に就て
- 4. 細菌々体より Ribo-核酸 (R. N. A.) 及び Desoxyribo-核酸 (D. N. A) を精製する方法並び に化学的性状に就て
- 5. 所謂 Antigen compléte を各成分に分離する 方法並びにその物理的及び化学的性状に就て
- 6. 細菌表面物質の糖類成分に就て
 - 6. I 酸水解に依り生ずる還元値の消長に就て
 - 6. Ⅱ 糖類成分の種類に就て

1 序 雪

免疫化学最近の発展の一つの大きな原因をなす細菌成分の研究は先づ特異性多糖類の分離によつて始められた。しかしながら、その特異性多糖類の一つに属する各種病原性細菌の表面構成物質は重要生物学的反応物質或いは Gram 染色反応物質として認められながらも化学的には研究はあまり進んでいない。細菌菌体表面構成物質として重要なものは Polysaccharide-Polypeptide-Lipid-複合体であつてその免疫学的性状¹⁾ 荷電性²⁾ 等より菌体表面を構成する物質である事が同定されている。而も、この物質は菌体表面の物理化学的構造にも重要な関係を有し(第2編)生理化学方面よりも Ribo 核酸類似の反応体として適応酵素産生、菌体外毒素産生にも重要性を保有している(第5編)、此等の研究を通じて私は

- 7. 細菌表面構成物質の分子量測定及び分子形態 に就て
- 8. 細菌表面構成物質の分光化学的研究
 - 8. I Ribo 核酸-Antigen Compléte 複合体の分 光化学的研究
 - 8. II Antigen Compléte 及びその polypeptide の分光化学的研究
- 9. 細菌表面構成物質の有する蛋白質 peptide 結 合部活性化能に就て
 - 9. I Antigen Compléte 及びその成分 polypepetide I及び IIの peptide 結合部の活性度に就て
 - 9. II Antigen Compléte の蛋白質 Peptide 結合部の活性化能に就て
- 10. 結論

Antigen compeéte 及び Ribo 核酸並びに此等と関連して、Desoxyribo 核酸の化学的性状に興味をおぼえ、此等物質の精製方法、分光化学的性状或は他の純化学的研究をなし、以下述べる様な諸知見を得る事が出来た、

2 所謂 Antigen Compléte の精製に就

2 I Gram 陰性菌より Antigen Compléte を 精製する方法

Boivin¹) の方法を基本とせるもので、Gram 陰性菌としては8578型、R型、8588型、R型 863に就いて精製したものであるが、此処には8588型菌の場合を述べる、集落の性状、自然凝集性、重金属反応等によつて充分8型菌である事を確めた8588型菌を少なくとも10代規則正しく37°C 20時間培養を繰り返して使用する、斯かる8588型菌の37°C

20時間培養のものを搔き集め、生理的食塩水に浮遊せしめ、4000r. p. m. 30分遠心沈澱3回洗滌し、培養基等の異物を除去した後、秤量す(25 gr). これにあらかじめ5°Cに冷却せる N/2CCl₃COOH を10倍量(250cc)加へ直ちに氷室に保存する。此の間屢々よく振盪攪拌する。

48時間後氷室より取り出しなるべく速やかに4000 r. p. m 遠心沈澱し, 残渣菌体と抽出上清とに分け, 上清を牛腸膜にて流水に対して透析し、CI の定性 反応を試み、CI の透析された事を確めて後、蒸溜 水にて12時間透析する(計約60時間)該透析内容液 を遠心沈澱し, 沈澱物を除去後 37°C 附近で低温濃 縮しその量を 50cc とす. 之に純 Alcohol 150cc を 攪拌注加し,5時間氷室に静止後,3000r.p.m.20分 遠心沈澱し, 白色沈澱物と上清に分離, 沈澱物を蒸 溜水 40cc に攪拌しながら溶かす. 此れを24時間氷 室に屢々振盪しつつ,保存する.不溶解物を 2000 r.p.m. 5 分遠心沈澱にて分離し、上清に120cc. の 純 Alcohol を加える. 以上の Alcohol 沈澱蒸溜水 溶解の操作を3回繰返して精製し、最後に得る白色 沈澱物を純 Alcohol にて2回, Aceton にて2回, 遠心沈澱洗滌し、直ちに減圧乾燥し白色物質を得る。 菌体 25gr より収量 230mg である. 本物質は本編 の以下述べる様な実験でPolysaccharide-Polypeptide-Lipid の複合体(以下 P.P.L 体と記す) であり, 核酸は含まない事が確められた。

2 II Gram 陽性菌より Antigen Compléte を 精製する方法

Gram 陰性菌と異つて Gram 陽性菌 (Staphyloco ccus aureus 寺島株友び F.D.A株) では Boivin 方 法を基本とした方法で、純粋な P.P.L 体は得られ ない、得られた物質は多少吸湿性のある褐白色物質 であつて、精製途中にも、Gram 陰性菌の場合に見 られなかつた性質として屢々器壁に吸着し, 分子量 も後に述べる様に Gram 陰性菌の倍近い値であり、 Mg の定性反応陽性, 生理化学的性状に於ても Gram 陰性菌よりのものは数 7/10 mg 菌量で強い適応酵 素活性能を有するのに本物質には全然その働きが認 められなかつた. 抑々、Gram 陽性菌ではその菌体 表面に Ribo-核酸-Mg-蛋白質が存するのは Bartholmew. Umbreit (1944) 8 によつて Gram 染色と関 連して明らかにせられた所である。従つて Gram 陽 性菌の菌体表面に存在する Polysaccharide-複合体が Gram 陰性菌の場合と異つた結合状態に於て存在す る事は凝問の余地がなく、両歯に於ける相違は当然 Ribo 核酸と関係がある事が想想され、精製操作に用いられる方法がN/2 CClaCOOH低温抽出である事から、益々その予想を深めたのであつて、両者の相違を分光化学的に検索した結果(8)明らかに Gram 陽性菌では 2600Å に強い吸収を認め Gram 陰性菌よりの Antigen Complète には斯かる吸収を認めなかつた。此等の結果より次に述べるような精製方法で Gram 陽性菌より CClaCOOH 低温抽出で得られる物質が Ribo 核酸-Mg-Polysacchride-Polypeptide-Lipide 複合体(以下 R. P. P. L. 体と記す)である事を確め、同時にこれより Gram 陰性菌より得たものと同じ性状の物質を得る事に成功した。

生体膠質複合系に就いて系統的研究をなしている Prezylecki⁴⁾ によれば生体膠質複合系の結合には共有結合、イオン結合、水素結合、非極性原子因による凝集等があるがそれは適当な方法により判定する事が出来る。例へば非特異性有機溶媒により分割される時は非極性原子因による凝集であり、塩の作用で容易に解離されるものはイオン結合と推定され、それ等の方法の外、pH の変化、容積の変化、電気透析、電気泳動等によつて分割しない場合は共有結合と考へられる。このような原理に従つて Ribo 核酸と Polysaccharide 複合体との結合の種類を確め、その程度をも知る意味を兼ねて系統的に種々の方法を用いて分離を試みたのである。

先づ第一に用いた方法, pH を変化させ沈澱を分 別せんとする試みは不成功に終つた。次に Felton5) が肺炎菌多糖類とその抗体との沈澱物より特異的多 糖類除去に用いた非水溶性多糖類 Ca 塩及び Sr 塩 の方法である. 即ち Gram 陽性菌より 2. I の方法 により得られた物質を極く少量の蒸溜水にCa(OH)2 を少量加へて溶解せしめ、少量の Na2HPO4 を加へ る. 次にCaCl2を30%の割合に溶解した飽和Ca(OH)2 水溶液を PH9.0 になるまで加へ, 1時間室温放置 後遠心沈澱により白色沈澱を分離する.この時得ら れる白色沈澱は Polysaccharide-複合体の Ca 塩であ つて核酸は含まないが、他の分析より予想される Polysaccharide-複合体の約 1/5 量にも満たない程度 の収量しか得られなかつた、次にこの操作の途中で Ca(OH)₂ 飽和水溶液を加える際, 1/5 量の純 Alcohol を加える操作を行つてみたが、矢張り Ribo-核 酸を含まない白色物質が得られ、その収量には殆ど 増加が認められなかつた. 尚, この操作中上清中の 分光化学的検索によれば、2600A の吸光係数は殆ん ど不変であつた. 次に塩類を用いる方法として単に

10%CaCl2 を 1/10 量加へ pH を 8.0 に修正し後純 Alcohol 1/5 量を加へこの操作を繰り返す方法を行ったが、これによつても満足すべき収量がなかつた。因みに pH 8.0 修正を行つたのは所謂 Sevag 法による核蛋白質より核酸を分別する場合に核酸と蛋白質のイオン結合の部分が pH 8.0 に於て容易に分別される事にならたものである。 尚、電気氷動法はその荷電性より成功する可態性が薄いので試みなかった。

以上の結果は Gram 陽性菌の核酸-Polysaccharide 複合体には塩の作用によつて容易に分別される核酸-Polysaccharide の結合がイオン性である部分が極めて少く約1/5量である事を示すものと思はれる. 残部は主として共有結合であり、他の色々の結合をなしているものと想像される.

次に3で述べるような方法で 膵臓より 調整 した Ribonuclease を働かしめて、Ribo 核酸を消化せし める方法を試みた、即ち2.1と同滌件の Gram 陽 性菌 (65gr) より同方法にて褐白色物質 (280 mg) を精製しその 100mg を 50cc. IM 醋酸ソーダ水溶 液に溶解し,更にこれに 10 mg の Ribonuclease を 加へ5℃の氷室に数日間壓々振盪攪拌して保存する。 この間,時々,次法に従つて溶解性燐酸を定量しその 平衡に達するまで氷室中に置く. 即ち該液 1cc. に 氷醋酸 10cc. を加えてよく混和し,5分後濾過し,濾 液の所謂溶解性燐を Iversen® の方法により滴定定 量をなす。本方法によると最高の溶解性燐量は該試 料Pの82%に達した。 尚, これより後 pH を7.7に 修正し、40°C に3時間放置後の液を以て Ribonucrease 消化完了液とした。かくして得られた消化液 より Ribonuclease なる蛋白質と Polysaccharide-Complex とに分別するのであるが、Polysaccharide-Complex が Biuret 反応が弱陽性であり、Trypsin で その中の Polypeptide の部分が消化されるという相 当高分子の蛋白質としての性質をもつので、普通最 も簡単で展,用いられる Chloroform-Amylalcohol 除蛋白による Ribonuclease の除去は用いられ難い, 上記消化液 40cc. に純アルコール 120cc. を加えて, 氷室に3時間放置後,遠心沈澱にて白色沈澱部と上 清に分離する.この場合上記のような器壁に吸着す る性質は極く弱くなつている. この白色沈澱物を湿 性乾固のまま秤量し、その10倍量のN/2 CCl₃COOH を加え、24時間氷室に於て抽出する。これを遠心沈 澱し,沈渣をすて上清を流水に対して透析する.以 下 2.1 に於て述べたと同様の方法にて精製を繰り 返して白色物質を得る、収量は出発物質 100 mg に対して 60 mg である。因みに本物質は核酸を含まず、分子量も Gram 陰性菌よりのものとほぼ同程度であり、その他の性状も Gram 陰性菌よりのものと一致し適応酵素活性化能も強力である(後述)。

以上により Gram 陽性菌表面には Gram 陰性菌と同様のPolysaccharide-複合体があるが、これRibo-核酸-Mg と結合状態にあり、その結合状態は一部分イオン結合をなし、他の大部分は共有結合をなしているのではないかと思われる。

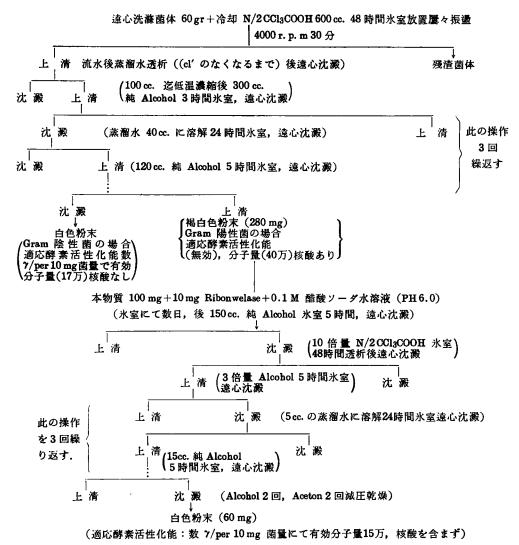
これら Gram 陽陰性菌よりの操作を簡単に表示すると第一表の様になる。

3 Ribonuclease の精製並びに物理的、化 学的性状に就て

Ribonuclease は Gram 陽性菌より Antigen Compléte を精製する事と Desoxyribo 核酸を調製する事を目的として調整したものである。精製の基本として用いたものは Kunitz7 の方法であるが、単に Ribonuclease のみを目標としたため、酸抽出の方法を用いず次法のようにした.

屠殺直後の新鮮な豚膵臓より出来るだけ脂肪組織 等を除去した後重量を測定し(1kg), 磨砕後蒸溜水 を 11. Chloroform 15cc. を加えて室温に屢々振盪 して放置する事12時間後 40°C の恒温槽に48時間放 置すると最上層褐黄色抽出液、中層組織消化片、下 層 Chloroform の如く三層に別れる. これを Buchner の濾斗により吸引濾過し、褐黄色の濾液を煮沸水 100°C に 3 分間煮沸後,再び濾過すると褐黄色の濾 液が得られる.この濾液 1l. に対して硫酸安問 140gr を加えて, 0.8 飽和硫酸安問となし, 冷暗所に48 時間放置すると沈澱が得られる.この上部透明液を 「サイフオン」により除去し、後残部を遠心沈澱に より除去すると約 lgr. の沈澱を得る事が出来る. これを半乾固状態のまま, その 5gr に対し 25cc の 蒸溜水を加えて溶解せしめ, 5N の NaOH を用い て pH4.8 に調整する (標準 pH 液に対して Methyl red を指示薬とする). よく攪拌しながら飽和硫酸 安間液 25cc. を加え濾過する. 清澄な濾液を1N硫 酸を用いて pH 4.2 (Methyl red) に修正し、その 100cc. に対し66cc. 飽和硫酸安問液を攪拌しつつ加 え、冷暗所に48時間放置し、沈澱物を濾別する。以 上の 0.6 飽和硫酸安問液溶解 0.8 飽和硫酸安問沈澱 の操作を更に3回繰り返し、最後の沈澱物約1gr を 蒸溜水 10cc. に溶解せしめ、流水に対して硫酸のな

第一表 細菌より所謂 Antigen Complète を精製する方法

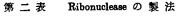


くなるまで常法のように透析し、更に12時間蒸溜水に対して透析する。透析液を遠心沈澱によりその上清のみをとり、5°C に冷却し、その1.1倍量の同じく5°C に冷却した95% Alcohol を使用して沈澱物を3回洗滌する。これを塩化カルシュームによりデシケータ中にて乾燥せしめる。 収量は 0.8gr である操作を簡単に表示すると第2表のようである。

精製した Ribonuclease の物理的及び化学的性状は第3表のようであつて、分子量は約15万である。 尚作用至適温度は 62° C,作用至適 pH は 7.5 である。

4 細菌々体より Ribo-核酸 (R.N.A.) 及び Desoxyribo-核酸 (D.N.A.) を精製する 方法並びに化学的性状に就て

細菌菌体表面物質である Antigen Compléte に強い適応酵素活性化態が存在する事を発見してから、 当然斯かる Polysaccharide-Complex の適応酵素活性化反応体としての意義を R. N. A. 若しくは D. N. A と比較する事によつて知り、更に適応酵素の実態がを比判する事のために R. N. A. 及び D. N. A. を精製する事は是非必要であつた。参考にした文献はSpiegelman¹⁰ Avery. Mc Carty. Mc leord¹¹ 須田⁹



磨粹新鮮豚膵臓 1kg+蒸溜水 1l+Chloroform 15cc. 12時間 室温放置 48時間 40°C 放置 沈渣 滤液 (硫酸安問 0.8 飽和とす 48時間冷暗所) 沈澱 上清 35°C 蒸溜水溶解 pH→4.8 後飽和 硫酸安問 35cc. を加ふ 此の操作4回繰り返す 沈澱 滤液 . 飽和硫安液 45cc. 48時間冷暗所 沈澱 滤液 '1.1倍量 75% Alcohol \ 48時間遠心沈澱 /95% Alchol 上清 沈澱 (2回洗滌 微褐白色粉末 (0.8gr.)

第三表 精製 Ribonuclease の物理的及び 化学的性状

全	室 素	Na) :	18.2%		
燐		Pb	痕	跡		
NH3態窒	素 全窒素に対	する%)゚	,	7.28%		
Trypsind	(permg 4	室 素	8.9	5×10-3		
Tryptoph	ane e)			0		
分子量 (のものを 回平均)	1M 硫酸安 使用し,滲	問液中 2% 透圧法 5		00±1800		
分子量(粘度,測	定法	1410	00± 3 000		
酸塩基剂	商定によ	る等電点	: p	pH 7.6		
比	容	積	ŧ [0.73		
	Biuret		陽	性		
蛋白反応	Xanthopr	otein	陽	性		
	Millon		陽	性		
作用	至適	温度	約	62°C		
作 用	至	適 pH	E pH	7.5		

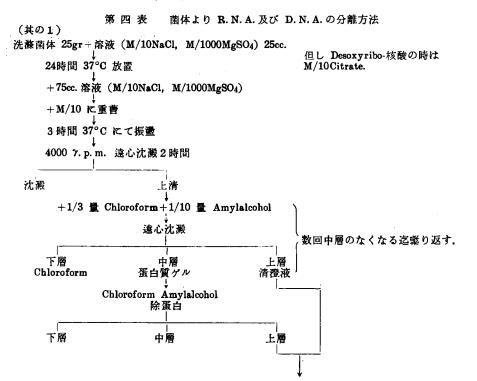
- a) Kjehldahl 法に依る
- b) Iversen 法6) に依る
- c) Formol 滴定法による
- d) 分光化学的定量方法 (Holiday⁸) に依る

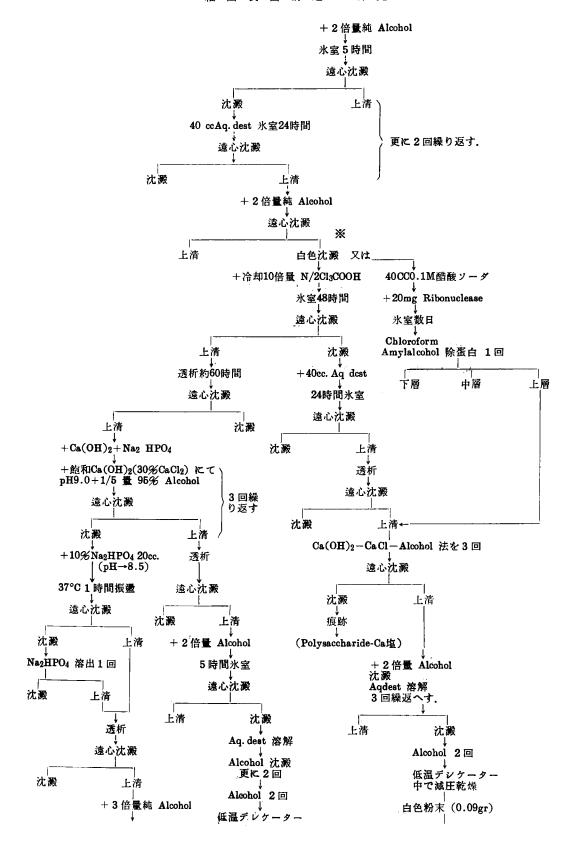
である.

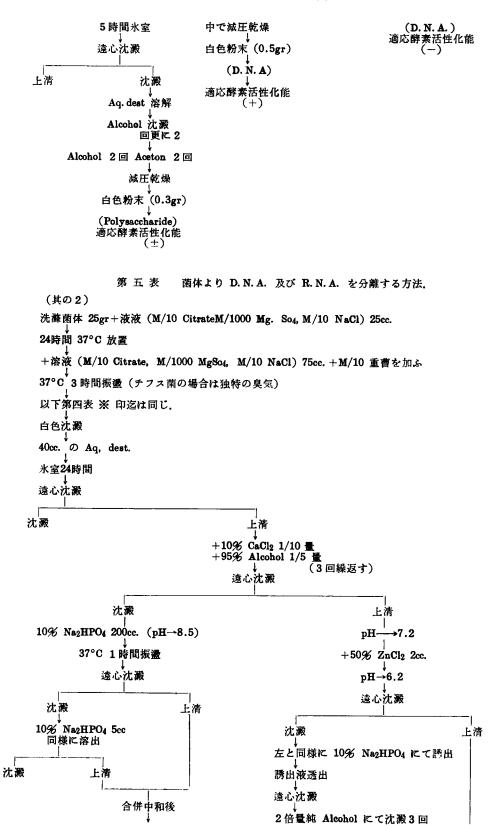
先づ R. N. A. 及び D. N. A. 出来る限り純粋に取 り出すためには菌体を破壊する事が必要である。使 用細菌が Staphylococcus aureus (寺島株) S 57, S 58, S 63であつたため, 凍結融法, 胆汁による方法, Desoxychol 酸による方法は全部不成功であり、その 他に Antiformin を使用して抗元性物質を単離して いる例があるのに鑑み,本法も行つて見たが R.N. A. 又は D. N. A. が破壊される為に不適当であつ た、超音波破壊法は装置の都合上試みる事が出来な かつた. 最後に Autolysis に依る方法を考察し, 可 成り満足すべき結果が得られ、これに Spiegelman の重曹水抽出法を併用して,次法の如く成功した。 先づ R. N. A. の場合より述べると2と同じ条件の 下に培養して来た菌体 25gr を使用し, これを遠心 沈澱により3回生理的食塩水で洗滌する。これと同 量 (25cc.) の硫酸マグネシウム, 食塩水 (即ち M/ 1000 MgSO₄ 及び M/10 Nacl を含む水溶液) を加え, 37°C 24時間屢々振盪しつつ保存する.次に同組織 の硫酸マグネシウム, 食塩水 74cc. を加え, これに 重曹を M/10 になるように加え, 37℃ 3時間振盪 液を 4000 r. p. m にて1時間半乃至2時間遠心沈澱 し菌体残渣と上清とに分離し(以上は無菌的に行う)。 この褐黄色上清にその 1/3 量 Chloroform と 1/10量 Amylalchol を加えて充分振盪して遠心 沈澱(2000 r. p. m. 5 分) すると上層は核酸を含む 清澄 な 褐黄 色液中層は蛋白質ゲル,下層は Chloroform の 3 層 に分ける、この三部を分離し、最上層を同様の方法 にて除蛋白を繰り返す事数回にて中層の蛋白質ゲル の部が認められなくなる。各回の蛋白質ゲルの部を 同様に除蛋白し、これの上層を先の上層と合して、 その2倍量の純 Alcohol 加え 5時間氷室に保存し、 出来た白色沈澱を遠心沈澱にて分離し、この白色沈 澱を 40cc. の水に溶解し、氷室に24時間保存する. 遠心沈澱により不溶解物を除去し、その上清に2倍 量の Alcohol を加える. 以上の操作を更に2回繰返 し、最後の白色沈澱物に 5°C に冷却せる 10倍量の N/2 CCl₃COOHを加え,屋々振盪して48時間氷室に 保存する. 温度を高くとも 10°C 以上には昇らせな いように注意して, 出来るだけ速やかに遠心沈澱し 上清を流水に対して Cl'のなくるなまで透析する。 透析液を遠心沈澱により不溶解物を除いて、不要の Polysaccharide を除去する為に次の方法を行ふ. 即 ち, 透析液に少量の Ca (OH)2 を加え, 更に Na2 HPO4 を加える. 次に CaCl2 を30%に含む飽和 Ca (OH)₂ を PH9.0 になるまで加え更に 1/10 量の95 % Alcohol を加え、氷室に1時間放置し、遠心沈澱 により白色沈澱物を得る、操作を更に3回繰り返し、最後の上清を中和後、透析する。透析内液に2倍量の純 Alcohol を加え、よく振盪して氷室に5時間保存し、白色沈澱物を遠心沈澱により分離し、少量の水に溶かし、氷室24時間後、更に一回 Alcohol 沈澱を繰り返し、最後の白色沈澱物を Alochol で2回洗滌し低温減圧乾燥すると白色粉末を得る。収量は0.5gr であつて、分光写真により2600 A に強い吸収を認め N:P の比は重量で約1.7:1 である。

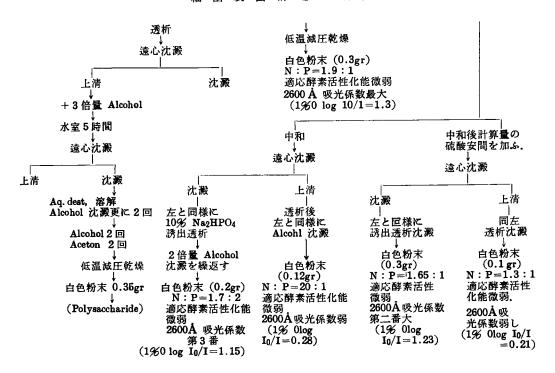
D. N. A. を精製する目的のためには先づ最初の抽出液 MgSO4 の代りに「クエン酸ソーダ」 M/10 のものと使用し、更に M/2 CCl₃COOH 抽出の場合抽出されない部分を蒸溜水に溶かし Alcohol 沈澱に進むか、 N/2 CCl₃COOH の代りに Ribonuclease を 2 のようにして作用せしめ後 Chloroform-Amylalcohol 除蛋白 1 回後、 Ca(OH)₂-CaCl₂-Alcohol 法を繰り返して精製する。 菌体 25gr より収量は 0.1gr であつて、矢張り分光写真により 2600 Å に強い吸収を認めその吸収係数は Ribo 核酸の場合よりも強く N: Pの重量比は約1.63: 1 である。これらの外に ZnCl₂に依る精製をも試み、やや満足すべく而も簡単である事を知つたが、ここには表のみとして省略する。

以上の操作を表示すると次のようになる(第4表 及び第5表)。









以上得られた D.N.A. 及び R.N.A. の物理的及び化学的性状を一括すると第六表の様になる。

第 六 表 D.N.A. 及び R.N.A. の物理的及び化学的性状

			D. N. A.	R. N. A.	D. N. A.	R. N. A.	
全 窒 燐	素	N P	10.2% 16.6%	6.7 % 11.49%	11.5 % 18.45%	6.95% 11.9 %	
分子量(渗	透圧法 5 回	平均)	305000 ±1500	250000 ±1000	321000 ±1800	280000 ±1500	
分子量(粘	度法10回	平均)	300000 ±3000	248000 ±4000	318000 ±2700	270500 ±3800	
酸塩基滴定	による等	電点	Ca 4.20	Ca 4.2	Ca 4.2	Ca 4.3	
比	容	積	0.702	0.712	0.705	0.705	
Feulgen	反	応	陽性	陰 性	陽性	陰 性	
Pentose	反	応	陰 性	陽性	陰 性	陽性	
	Biuret		陰 性	陰 性	陰 性	陰 性	
蛋白質反応	Xanthop	rotein	陰 性	陰 性	陰 性	陰 性	
	Millon		陰 性	陰 性	陰 性	陰 性	
2600 Å 吸	光 係	数	1.23	0.82	1.31	0.91	
菌		種	Staphylo	aureus	S 57 S 型		

5 所謂 Atntigen Compléte を各成分に 分離する方法並びにその物理的及び化 学的性状に就て

ここに記載する実験は、所謂 Antigen Compléte を各構成分に分離し、それが Polysaccharide、Polpeptide 及び Lipid より成る事を明らかにし、特に生物学的性状の1つの特性である適応酵素活性化反応体としての能力或いは免疫元性が何の程度の簡単な物質まで保持されるかを明らかにした実験として興味があるものと思われる。参考にしたのは Morgan 及び Partridge^[2] が赤痢菌の体内毒素の精製に使用した方法である。

精製された Antigen Compéte を中性 Formamid 中に溶解し、5時間室温に放置する。しかる後、こ れに充分量の Ether を加えて充分振盪し、分液「ロ ート」に依り Ether を除く、これの操作を3回繰 り返して, Ether 可溶性の Lipid を除き Ether よ りは別に減圧濃縮を繰り返して Lipid を精製する. 残部を分画(1)とし、これに蟻酸を加え所謂蟻酸々 性 Formamyd とし、これを室温放置 5 時間後(不 完全解離) 10% CaCl₂1/10量 95% Alcohol 1/5量を 加え、氷室静置 5 時間後、生ずる白色沈澱を遠心沈 澱により集め、残部を分画(Ⅱ)とし、この白色沈澱 を10% Na₂HPO₄ 水溶液により誘出を2回試み,誘 出液を初め流水、次いで再溜水を使用して透析し、 後5倍量純 Alcohol による沈澱、蒸溜水溶解により 精製,最後の白色沈澱を純 Alcohol 2 回, Aceton 2 回洗滌し,減圧濃縮により乾燥,白色粉末を得る. 分画(Ⅱ)は一部分は直ちに透析後3量倍 Alcohol 沈 澱法に依り乾燥粉末とし分画(Ⅱ)の残部は更に酸酸 性 Formamid により充分時間を分けて、CaCl2 Alcohol 後若しくは燐タングステン酸20%に加えた濾液 を透析した液が Fehling 液を還元しなくなるまで放 置する. 即ち, 完全解離完了後, 10% Cacle 1/10量 95% Alcohol 1/5 量により Polysaccharide を Ca 塩 として沈澱せしめ、以下 Na2HPO 誘出 Alcohol 沈 澱,蒸溜水溶解,透析により Polysaecharide 濃縮 により Formamid を除き数回後減圧乾燥せしめる. 即ち Polypeptide で Biuret 反応微弱陽性, Millon 反応陽性である.次に同様にして作つた分画(Ⅱ) より Trypsin 消化法により Polysaccharide を得る 事が出来る. 即ち分画(II)の白色粉末を 0.1NH4 OH-NH4Cl 水溶液に溶かし、10 mg 精製 Trypsin 及び少量の Tymol を加えて、37°C 1 時間後 Chlo-

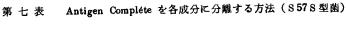
roform-Amylalcohol 除蛋白 2 回後これを流水後,蒸 溜水に対して透析する. これに純 Alcohol 5倍量を 加え、氷室5時間後、沈澱を分離し、蒸溜水溶解を 3回繰り返し、最後の白色沈澱物を常法のように Alcohol, Aceton 洗滌により乾燥粉末 Polysaccharide を得る。次に Antigen Conpléte より同様に Trypsin 消化法により分画(皿), 即ち Polysaccharide-Lipid 複合体を得る。この分画(Ⅲ)より中性 Formamid 法 に依り、同様にして Polsaccharide 及び Lipid を得 る事が出来る. 次に Autigen Compléte より Phenol の中に溶解する事によつて Polypeptide と Pôlysaccharide に分離する事を試みた. 即ち Antigen Compléte O Polysaccharide-Polypeptide-Complex & 50% Phenol に溶かしてれを室温 24 時間後, これを透析 すると初め蛋白濁を呈していたのが澄明液となる. この透析液に CaCl2. Alcohol 法で Polysaccharide を除去し、後再びこれを透析し、減圧濃縮によつて Polypeptide を得る. Formamid 法によつて得られ た Polypeptide を Polypeptide I として, この Phenol よりのものを Polypeptide Ⅱ とする. 最後に Poly-peptide Iは透析性であるといはれるが12)内外 液のN測定により透析しないという結果を得た事を 附記する.

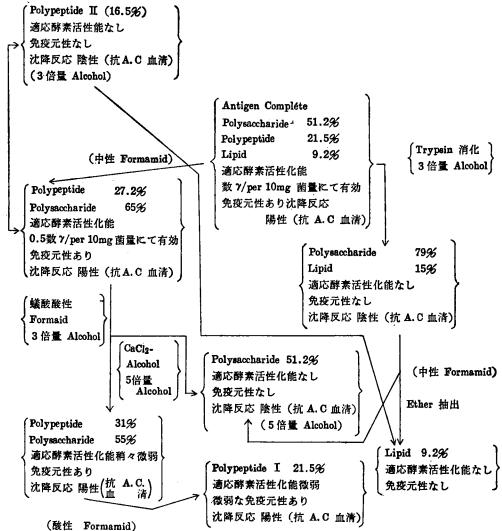
以上の分別過程を簡単に略記すると第7表の様になる。

この成績を見ると、適応酵素活性化反応体としての性状と免疫元性或ひは抗 Antigen Compléte 血清との沈澱性とが殆ど全く一致している。而も、Antigen Compléte より Lipid を除いたものの方がAntigen Compléte より適応酵素活性化能が強く、この事を(第4編)で述べる活性 SH 基との関係があり興味深い(第5編参照)。

更にこれらの操作を S 57 S 型菌の外に S 58 S 型菌, Staphyloccus aureus 寺島株及び Staphylococcus aureus F. A. D. 株に就ても行ひ, その他に種々の定性反応定量反応を行つた成績は第8表のようである

第8表の成績により各菌種間に於ける化学的性状を比較してみると、Gram 陰性、陽性菌で著るしく異る点は Gram 陰性菌と較べて Gram 陽性菌ではPolysaccharide 部分が少く、Polypeptide Iが多く、又 Lipid が多い事である。又 Polysacharide ではN及びPが比較的多く、その Polypeptid I は分子量が大きく、Tyrosin. Tryptophane 及び Histidinが少い、Lipid では不飽和酸が陽性菌に多く、これは





従来 Gram 陽性菌表面に不飽和酸が多いという報告はと一致するものである。陽性菌間では F.A.D 株の方が寺島株よりも Polysaccharide 少く, Polypeptide Iが多い外は差異がなく, 又陰性菌間では差異がない。Polytaccharide I及びIIを見ると分子量は Polypeptide IIがやや小さくNはIIの方がやや多い事が解る。

6 細菌表面物質の糖類成分に就て

6,1 酸水解に依り生ずる還元値の消長に就て

久志本¹⁶⁾氏が澱粉に就て行つたと同様の方法で細 菌表面構成物質多糖類の還元値の酸水解による消長 とその理想的酸水解は如何になさるべきかを知る目的で、本実験を行つたのである。使用酸としては主として硫酸を、また塩酸をも使用し、酸水解温度は 100° C、還元値の測定はMicro-Berstrand 法 $^{(7)}$ に依った。試料は8.588型菌の表面物質である。

(1) 酸濃度と還元値の消長

1.5cc. の 4mg/cc 試料液とそれに各濃度の酸1.5 cc. とを試験管に分注し、振盪混和後 100°C の 温浴中に浸し、夫々一定の水解時間 (5,10,15,30,60及び120分)後、冷却 NaOH にて中円後、Micro-Berstrand 法に依り還元値を測定する。成績は第9表の通りである。この表に依つて判定される事を完全酸

第八表 各種細菌 Antigen Compléte の 化学的性状

	loce	phy- ccus ceus 島株	loce	phy- occus D. A. 株	S 5型	57 S 菌	S.5 型	58 S 萬
Polysac- charide	45.	5%	39.	1%	51.	2%	54.	3%
N	4.	5%	2.	.8%	0.	8%	0.	99%
P	6.	9%	3.	1%	0.	5%	0.	41%
Fehling	陽	性	陽	性	陽	性	陽	性
Buérut	陰	性	陰	性	陰	性	陰	性
Polypeptid I	28.	1%	33.	1%	21.	5%	19.	8%
N	15.	8%	14.	2%	13.	5%	12.	8%
P	痕	跡	痕	跡	0.	2%	0.	1%
Buiret 反応	陽	性	陽	性	陽	性	陽	性
Milon 反応	陽	性	陽	性	陽	性	陽	性
Xantho- protein反応	陽	性	陽	性	陽	性	陽	性
坂口反応	陽	性	陽	性	陽	性	陽	性
Tyrosin	1.	58 <i>%</i>	1.	78%	8.	48%	6.	93%
Tryphan	0.	71%	0.	73%	1.	76%	2.	01%
Histidin	0.	1%	痕	跡	2.	1%	2.	3%
分 子 量	32	000	35	000	37	400	37	6 00
Polypeptid II	23.	5%	27.	8%	16.	5%	12.	5%
N	18.	9%	17.	3%	15.	3%	14.	9%
P	/	/	,	/	痕	跡	痕	跡
分 子 量 c)	32	000	32	800	35	000	36	000
Lipid	15.	9%	17.	2%	9.	2%	11.	5%
P	4.	2%	4.	7%	2.	12%	3.	18%
不飽和 脂肪酸 ^{d)}	21.	5%	2.	48%	/	/	/	/

a) Holiday⁸⁾ の分光化学的定量方法で次式に依る M=1.0 E305-0.092 E280 M₂=6.21 E280-0.288 E305

- b) Jopes¹³⁾ の方法による
- c) 粘度測定法に依る
- d) 三浦14)の方法に依る

第九表 細菌表面構成物質 Antigen Compléte の酸水解 (S 58 S 型)

項目	水解時間 (分)	5	10	15	30	60	120
1N-H ₂ SO ₄	glucose		12. 9	17.5	26. 3	37.5	40. 6
1N-Hcl	としての 還元力	15. 3	28.0	35.0	40.5	42.0	42.5
$2N-H_2SO_4$	25/11/3	19. 3	21.3	26.4	40.2	41.0	41. 5
$3N-H_2SO_4$	}	23.0	31.5	37.2	41.0	42 . 0	41.8
$4N-H_2SO_4$		33. 1	37.5	39.7	42.5	41. 0	40.3
$5N-H_2SO_4$		41.5	43.8	43. 5	44.0	40. 5	40.2

水解水解に依り生ずる還元値は42.5%であつて,理想酸水解用酸濃度はこの場合 $2~N\sim~3~N~H_2SO_4$ であると思われ $5~N~H_2SO_4$ では既に分解糖還元糖の分解が起るものと思はれる.

(2) 各種細菌 Antigen Compléte の酸水解還元値 8588型菌の外,8578型菌,Staphylococcus aureus 寺島株及び Staphylococcus aureus F. A. D. 株 の P. P. L. 体の 2N-H₂SO₄ を用いた酸水解2時間 後の glucose としての還元値は次の様である。即5 8588型菌は42.5% 8578 型菌は40.3%寺島株30.8 % F. A. D. 株27.5%である。

6,2 糖類成分の種類に就て

酸性溶液に於ける単糖及び Uron 酸の呈色反応,即ちこれの Furfurol 誘導体がぞれぞれ Phenol 誘導体と有色化合物を作り,糖類の種類に依つてその色彩及び吸収帯の位置を18)異にする事を利用し,各種細菌の P.P.L. 体の成分を分光化学的に検索した。尚2,3の結晶法をも試みた。試料はすべて2N-H₂SO₄.2時間加水分解物である。

(1) 糖類に共通の反応 (α-naphthol 反応)¹⁹⁾

Molisch-Udransky 法を用いたものでは 8578 型 菌, 8588 型菌, Staphyloccus aureus 寺島株, Staphylococcus aureus F.A.D. 株の P.P.L. 体は, 何れも Ketose. Ardose 反応共陽性であるが前2者 は Ketose 反応が弱い.

(2) Pentose の呈色反応

Pentose の反応として用いたのは Resorcin 反応 (Rosenthaler²⁰⁾) 及び Anilin 反応 (Schiff 法²¹) である。Resorcin 反応は常法の如く行つたものであつて、12% HCl 溜出液 10cc. に濃塩酸 (35%) 10 cc. を加えこれに少量の Resorin を加え沸盪浴中に数分間加熱すると色素沈澱 (紫色) を生ずる。これを濾別,水洗した後,氷醋酸に溶かし,その上澄液の吸収分光写真を撮影する。S 57 S 型菌,S 58 S 型菌の場合には 6340Å 5870Å 5020Å に明瞭な吸収を認めるが,Staphylococcus の P.P.L. 体では Arabionose が存在するものと思はれる¹⁸⁾ Anilin 反応も S 57 S 型,S 58 S 型の場合のみ赤色反応を与え,5200Å に吸収を認める事が出来た。

(3) Methyl pentose の反応18)

塩酸応 (Widste-Toleus 法) 及び Aceton 反応 (Rosenthaler 法20)) を試みた. 塩酸反応は Methyl pentose に特異の反応であるといわれ, S 57, S 58 S 型菌のみに陽性であり Aceton 反応も同様である.

(4) Ketose の呈色反応²²⁾

この内行つたのは Pinoff の試験法で、試料を Alcohol- H_2SO_4 液 (濃硫酸 75cc. と 96%アルコール 20cc.) 10cc. に加え、 100° C に加熱すると Ketose があれば 2、3 分以内に濃紫色となる。この反応は Staphylococcus よりの P.P.L. 体の方が強い結果を得た。

(5) a-Xylose の定性23)

試料 0.03gr と蒸溜水 1cc. と炭酸ガドミューム 0.1gr と臭素水 $2\sim3$ 滴を小試験管に容れ静かに温 浴中に温め,コルク栓をして24時間放置した後最小蒸発皿に移して臭素を蒸発せしめ,濾過後蒸溜水にて洗滌,洗滌液と濾液を蒸発範固,これに95% Alcohol 1cc. を加え室温に放置 $3\sim4$ 時間後結晶を検鏡する. α -Xylose があれば特有のボート状 Cadmium Xylonohromide の結果を生ずる、本定性反応により対照とした Xylose 結晶と一致する結晶は何れのP. P. L. 体にも認められなかつた、

(6) α-Glucose 及び α-Glucuron の酸の定性23)

試料 0.5gr を小さい磁性皿に入れ, これに2.5cc. 硝酸 (比重1.14) を加え化合物を絶えず攪拌しながら,沸煮温浴で濃縮する. これに 10 cc. の蒸溜水を加え,約 1cc. になる迄蒸発せしめ,これに 2cc. の蒸溜水を加へ炭酸加里 (粉末)をリトマス試験紙に対して Alkali 性に液がなるまで加へ,次いで醋酸で酸性として24時間放置後,結晶の有無を確め,若し出来ていなければ,更に除々に濃縮する.ここに見られる針状結晶は酸性砂糖酸加里の結晶である. 試料少量につき融点は確め得なかつた. この方法により何れの菌の P.P.L. 体にも本結晶を認める事が出来た.

(7) Galactose の定性

(6) の場合に針状結晶の外に粘度酸の棒状結晶を 各々の P.P.L. 体に於ても認める事が出来た.

第10表の結果を見ると Ketose と Ardose の含量では Staphylococcus の方が Ketose に富む事が想像され、又 Pentose 及び Methyl pentose は Staphlococcus の P. P. L. 体には欠如するもののようである。

7 細菌表面構成物質の分子量測定及び分子 形態に就て

既に第2編に於て gram 陽性菌の R.P.P.L. 複合体, P.P.L. 体及び gram 陰性菌の P.P.L. 体に

第十表 各種細菌の Antigen Compléte の 糖類成分

								_		_	_
		A. 0)) 種類	Sta-	ylo	Sta- ph		s	57S	S	58S
項目		_	<u></u>	寺島			株	西	菌	型	菌
a-Napht	thol	Ke	tose	陽	性	陽	性	弱	陽性	弱	陽性
5	反応	Ar	lose	陽	性	陽	性	陽	性	陽	性
pentose	Resc (A	rcin rabcı	反応 iose)	陰	性	陰	性	陽	性	陽	性
роможе		lin rabir	反応 iose)	陰	性	陰	性	陽	性	陽	性
Methyl	He	反	応	陰	性	陰	性	陽	性	陽	性
pentose	Ace	ton [灵応	陰	性	陰	性	陽	性	陽	性
Ketose (pinoff 反応)					姓	強陽	性	陽	性	陽	性
α-Xylose					し	な	L.	な	L	な	l
æ-glucose 又は æ-glucuron 酸					b	あ	ŋ	あ	ŋ	あ	ŋ
galrctose					ŋ	あ	り	あ	ŋ	あ	ŋ

就て、その誘電スペクトルよりその軸化を計算しgram 陽性菌では P.P.L. 体が R.P.P.L. 体の倍近い軸化を有する等の結論を得る事が出来た、本項では更に Polysaccharide 部及び Polypeptide 部をも合せてこれ等の渗透圧測定、粘度測定等より得られた結果を綜合して論ずる事にする。

先づ渗透圧測定法は Weber 及び Stover²⁴⁾型の 装置を自作し、半透膜は Collodion であつて、溶媒 は Polysaccharide は PH 3.2、polypeptide は pH 5.6、Antitigen Compléte は PH3.6~40. Ribo 核酸 Antigen Conpléte は pH3.1 の M/5 Na₂HPO₄-M/10 拘縁酸緩衝液を使用し、外挿法により、次式を使用 して分子量を求めた。

$$\mathtt{M} = \mathtt{RT}/\underset{e \to 0}{\underset{lim}{\lim}} \quad \frac{\mathtt{P}}{\mathtt{C}} \cdots \cdots \cdots \cdots \cdots (1)$$

但しPは渣透圧, Cは溶液 11 の溶媒の gr 数である.

次に粘度測定よりの物理恒数は次の方法で得られたものである。粘度測定には Oswald の粘度計を使用し、恒数 km の測定には次の Staudinger の式を使用した。 恒数 km の算出はその妥当性より Polysacchride のみに就いて行つた。

$$\frac{yspc}{c} = \frac{y/y_0 - 1}{c} = km. M \cdots (2)$$

但し,分子量をM,比例恒数をkm. 1l 中の溶質の瓦数をCとする。

次に Polypeptide, P.P.L. 体, R.P.P.L. 体複

合体に就いては Polson²⁵⁾ の実験式を使用してその 軸比を求めた、即ち

$$y/yo-1=4.0G+0.098G(\frac{b}{a})^2$$
(3)

但しGは単位体積中の溶質容積 b/a は廻転楕円 体の短軸対長軸の比である。

以上の方法に依つて得られた各物理恒数の結果は第11表のようになる。先づ Polysaccharide に就いて見ると粘度測定より算出された km 恒数は Cellulose-澱粉よりも非常に小さく本 Polysaccharide分子が非常に分枝したものと考えられる。分子量はGram 陽性菌よりのものは Gram 陰性菌よりのものに較べて小さく,これと同様に km 恒数も Gram 陽性菌よりのものの方が小さい。次に Polypeptide Iではその軸比を見ると大体1:3前後であつて普

通のものとあまり異なつていないが、Polypeptide II は1:8以上であつて、同じ Polypeptide であるが Polypeptide II は変性蛋白の場合に非常よく似ている。この点に関しては Polarogram に依る研究と一緒に後程詳論する(第4編)、P.P.L. 体及び R.P.P.L. 体では分子量が後者が2倍以上、軸比は後者が半分位という値が得られ、透電スペクトルによる値と粘度による値は極めてよく一致している. P.P.L. 体は gram 陰性菌のよりのものの方が軸比が大きい。これらの結果より非常に長い絲状分子と思われる。Polysaccharide が Polypeptide Iと結合する(而も大体1分子と考えられる)ことによつてその結合物 P.P.L. 体が比較的短い分子として存在するという結論を得る事が出来るが、この構成に関しては不明といわねばならぬ。

第十一表 細菌表面構成物質の物理的恒数

細	菌	租	į	類	Staphyloccus aureus 寺 島 株							
項目				物質種類	Polysaccharide	Palypeptide	Polypeptide II	P. P. L. 体	R. P. P. L. 体			
分子	量		秀日	E測定)	120,000	32, 000	3, 100	151,000	403, 000			
透電ス~	: 7	INK	£	る軸比・	/	/	/	1:21	1:9.5			
粘度测	定	にょ	る	軸比	/	1:3	1:8.2	1:20.5	1:87			
粘度測知	έĸ	よる	kr	n. 恒数	0.38	/	/	/	/			
細	菌	租		類		Staphyloco	œus F.A.D. 株					
項目				物質種類	Polysaccharide	Polypeptide I	Poly peptide II	P.P.L. 体	R. P. P. L. 体			
分子	量	(参)	秀E	王測定)	105,000	35, 000	32, 800	152,000	398,000			
透電ス・	・ク	INK	. L	る軸比	/	/	/	1:23	1:11			
粘度测	定	にょ	る	軸比	/	1:3.2	/	1:218	1:11.4			
粘度測定	包化	よる	kr	n 恒数	0.35	/	/	/				
細	菌	租	i.	類		S 57 S	型 菌					
項目				物質種類	Polysaccharide	Polypeptide I	Polypeptide II	P. P. L. 体				
分子	量	(参)	秀 E	E 測定)	139,000	32,000	328,000	175,000	1			
透電ス・	・ク	トルK	Ŀ	る軸比	/	/	/	1:28	/			
粘度测	定	にょ	る	軸比	/	1:3.5		1:30.2	/			
粘度測定	せん	よる	k	nu 恒数	0.43	/	/	/	/			
細	菌	租	Ē.	———— 類		S 58 S	型菌					
項目				物質種類	Polysaccharide	Polypeptide I	Polypeptide II	P. P. L. 体				
分子	量	(渗	透上	王測定)	137, 000	37, 600	36,000	180,000	/			
透電ス・	・ク	1 NK	ĿŁ	る軸比	/	/	/	1:27	/			
粘度測	定	にょ	る	軸比	/	1:2.9	/	1:27.8	/			
粘度測定	包化	よる	kı	m. 恒数	0.41	/	/	/	/			

8 細菌表面構成物質の分光化学的研究

本測定に使用した分光器は島津製作所製 QM60 型 水晶分光写真器である。

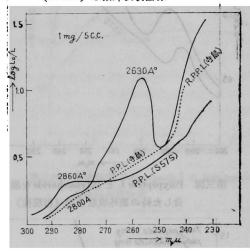
8 1 Ribo 核酸-Antigen Compléte 複合体の 分光化学的研究

Gram 陽性菌の P.P.L. 体は Ribo 核酸が分子結 合をなして複合体として存する事を見出し得た最初 の根拠はその分光化学的研究である。抑々核酸の紫 外吸収曲線に就ては Marshleuski. Heyroth 及び Loofbourow26) Casperson27)等多くあるが, Casperson の 結果を見て見ると Thymo 燐酸ソーダ, 酵母核酸及 び肺臓 Pentose-polynucleotide 共に極めて強い紫外 吸収性を示し、何れも 2800Å 附近より以上に於て 吸収を増加し、2600A 附近に於て最大値をとり、 これより以下に於て次第に減少し, 2280A附近より 再び増加する事を示している。次に P.P.L. 体中に は Polypeptide が存在するから、蛋白質の紫外吸収 曲線にも注意する必要がある。 これに関しても Dheré28) Ley & Arends29) Baker & Davidson30) Casperson27) Haliday8). 近藤及び秦31) 等多くの研究があ る。これらの結果を見ると、核酸はその Purin 及 びPyrimidine基に基く所の著るしい特殊吸収性を示 し、蛋白質もその含有する Amino 酸の種類により 可成り著るしい特殊吸収を示すものであるが、そ の程度は遙かに後者が低い, 殊に蛋白質にては著明 吸収を起す Amino 酸は多くとも 5~7%にすぎず, 核酸では Purin 及び Pyrimidine 基は35~40 %で あるから, その差は著しい訳である.

Casperson の結果をみると、2600Å に於て10%核 酸はその紫外線の90%、1%核酸に於ても19%を吸 収し, これに対して Albumin は 25% 溶液が 1% 核 酸と同程度の吸収である。 さて gram 陽性菌より得 られた R.P.P.L. 複合体と gram 陰性菌より同様 の方法で得られた P.P.L. 体との紫外線吸収曲線は 第1図のようになる. R. P. P. L. 体は同濃度のgram 陰性菌の P.P.L. 体の比較して極めて著るしい吸 光系数を有し,而もその曲線は従来核酸系の吸収曲 線といはれるものと殆どよく一致している. 即ち, 2630Aに極めて高い一つの吸収の山を示し2800Aに もこれよりも著るしく低い他の吸収の山が存在して いる. これに反して同濃度の P.P.L. 体は 2806A に極めて低い吸収極大を示している. R.P.P.L. 複 合体に Ribonuclease を働せて得られた gram 陽性菌 の P.P.L. 体では吸収度は著しく低くなつて居り,

第一図 Ribo 核酸-Mg-Polypeptide-Polysaccharide
-Lipid 複合体
(R. P. P. L.), Polysaccharide-Polypeptide
-Lipid 複合体

(P. P. L) の紫外吸収曲線

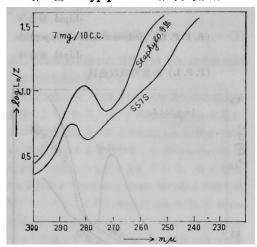


2800Aに1つの極大を示すのみとなり、その程度もはは gram 陰性菌の P.P.L. 体に一致している事が解る。次にこれら両菌の P.P.L. 体は何れも普通の蛋白質に見られるような特殊吸収でなく、3800~2860Aに於ける山よりも紫外部に何等の極小点を示していない。これらの結果より gram、陰性菌のP.P.L. 体と同様の方法で gram 陽性菌より得られる物質は核酸を含み、その核酸は Ribonuclease で特異的に分解されることより Ribo 核酸がある事が結論出来る。尚 P.P.L. 体の吸収曲線は次に述べる Polypeptide の吸収曲線と著しい関係がある。

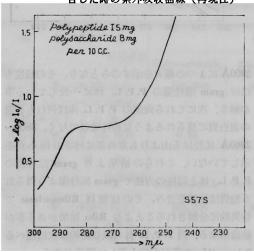
- 8 Ⅱ - Antigen Compléte 並びにその polypeptide の分光化学的研究

Antigen Compléte (P.P.L体) 自体の紫外吸収曲線は上述のようにその特殊吸収を欠いでいるように思はれる。しかるにこの P.P.L. 体の示す 2800~2860Å に於ける山はその Polypeptide にもとづくものである。即ち、P.P.L. 体より得られた Polypeptide Iの紫外吸収曲線は第2図のようになる。これと P.P.L. 体 (第1図) と比較すると 2800~2860Å の吸収の山は、これより Polysaccharide 及び Lipid をとる事によつて殆どその位置を変化せずに特殊吸収の極大となつている事が解る。逆に Polypeptide Iと Polysaccharide を一緒に溶解せしめて12時間後に分光写真をとると明らかに再現性を

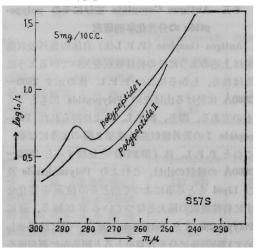
第二図 Polypeptide I の紫外吸収曲線



第三図 Polypeptide I と Polysaccharide を混合した時の紫外吸収曲線(再現性)



第四図 Polypeptide I 及びII の紫外吸収曲線

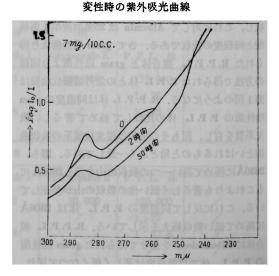


有てしいる (第三図). 次に同じ P.P.L. 体より得 た Polypeptide(II) の紫外曲線は第4図のようで あつて極大及び極小吸収の波長はわずかに変化し ているが、その吸収系数は相当変化している。 と の Polypetide I及びIIの吸収曲線の相違が如何な る機転によるものであるかを知るため、Polypeptide I及びⅡを 0.2 NNaOH に溶解し, 2時間後, 50 時間後紫外吸収曲線を撮影して Polypeptide I及び Ⅱの NaOH 変性の態度を検索した。結果は第5図 のように Polypeptite Iは NaOH 変性によつて著 しく影響を受け、Polypeptide II に近くなる事を示 している。この事は前7で述べた分子軸比と著るし い関係があり Polypeptide II は Polypeptide I の変 性型であるといえるといえる. 次に Polypeptide II は Polypeptide I と同様に Polysaccnaride を混ず る事により再現性があるか否かを知るため、両者を 同時に溶解して12時間後撮影するも、peptide I+ polysaccharide の時のような再現性はなく殆ど polypeptide Ⅱ 自体と相違しない (第6図). 最後に各 菌種間の polypeptide Iはその極大吸収波長が多少 相違しているが、Polypeptide II では大体殆ど一致 している。これは複合蛋白質の変性の問題と軌を1 にしているものと思われる.

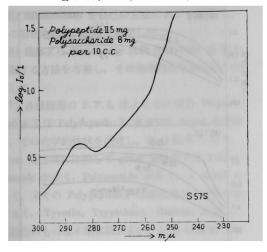
9 細菌表面構成物質の有する蛋白 Peptide 結合部活性化能に就て

9 I Antigen Compléte 及びその成分 Polypetide I, II の Peptide 結合部の活性度に就て 蛋白質の Peptide 結合部の活性化の直接の証明法

第五図 S57Sの Polypeptide Iの NaOH



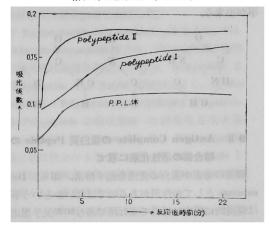
第六図 Polpeptide ILと Polysaccharide を混合した時の紫外吸収曲線(非再現)



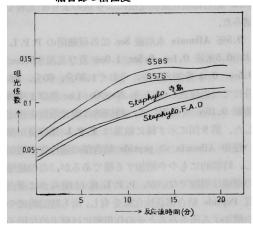
は荒谷32)の炭酸ソーダを用いた Biuret 反応の出現 曲線と Pulfrich の Step-photometer で測定する方 法を用いた。即ち、検液 3 cc. に1% Na₂CO₃1cc. を加え, 更に1%硫酸銅 0.15 cc. を入れ, S57 の Filter を用いて反応後、時間を追つてその吸光系数 を決定した。先づ、P.P.L. 体及びその成分 Polypeptide I並びに Polypeptide IIの Polypeptide 結合 部の活性度を比較するために P.P.L. 体 1.4%, Polypeptide I及びIIは0.2%のものを使用して実験 した、結果は第7図のようである。この結果より見 ると Polypeptide IIはIよりも著しく反応出現時間 が促進し吸光系数も大きく明らかに Peptide 結合部 が活性化している事が解る。即ち変性蛋白と未変性 蛋白の場合に似ている. 次に1.4% P.P.L. 体では Polypeptide I よりも吸光系数低く, 出現時間は反 対に速くなる. P.P.L. 体に含まれる Polypeptide が約30%前後であるから、0.2% Polypeptide では 1.4% P.P.L. 体中に含まれる Polypeptide の濃度 よりも稀薄であるから1.4% P.P.L. 体の吸光系数 が低いのは濃度によるものと考えられず, P. P. L. 体中にある Polypeptide 結合部の相違によるもの, 即ち Polypeptide に Polysaccharide 結合部の相違に よるもの, 即ち Polypeptide に Polysaccharide が 結合しているため、Biuret 反応の反応すべき Peptide 結合部の反応性が阻害されているものと思われる。 使用したのは8578型菌よりのものである。

次に各種細菌の Polypeptide I に就てその0.2% 検液を用いて同様の実験を試みた、その結果第8図 に見られる様に Staphylococus aureus 寺島株と F.

第七図 細菌表面構成物値の Polypeptide 結合部の活性度(S57Ś)



第八図 各種細菌 Polypeptide I の Polypeptide 結合部の活性度



A.D. 株では殆ど一致し、S57S型菌及びS58型菌 でも殆ど一致しているが、ここに使用した gram 陰 性菌, 陽性菌間では相当異つている. 即ち, 他の物 理的並びに化学的性状では可成り似た性質のある両 菌種の Polypeptide Iがその Polypeptide 部分の活 性度では相当異なり、gram陽性菌よりのものの方が いちじるしく小さい、この理由は色々と考えられる が各種蛋白質間の Peptide 部分の活性度の相違に対 しての荒谷氏320の仮説に従うと次のように考えられ る. 寺島教授等33) によると, 球状蛋白質の Peptide 鎖には次のようなB型部とE型部がある。E型では Peptide 結合部分がむき出しになつているに反し, B型では Peptide 結合の CO と他のそれの NH の 間に水素結合があつて互に閉鎖しているためにB型 は E 型のものより活性度がある筈である. 従つて, この説に従つて上の場合を説明すると gram 陽性菌 の Polypeptide I の方が B 型の構造に富み, gram 陰性菌の Polypeptide I には B 型構造が多いといふ事が出来る。

9 II Antigen Compléte の蛋白質 Peptide の 結合部の活性化能に就て

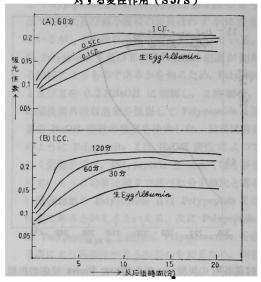
細菌の毒素が蛋白の変性を起す酵素,即ち,Denaturase としての作用があるのではないかという事は仮説的に従来いはれて来た所であり340%の又予想出来る所である.其処で,細菌表面構成物質 P.P.L.体にそのような作用があるか否かを知るため,Peptide 結合部活性度測定法により次のような実験を試みた.

0.5% Albumie 水溶液 3cc. に各種細菌の P.P.L. 体の0.5%液 0.1cc. 0.5cc. 1.0cc. 及び蒸溜水0.9cc. 0.5cc. 0.cc を加えて後、それぞれ30分、60分、120分にて反応液として L % Na₂CO₃ 1 cc 及び1%燐酸銅 0.15cc を使用して、時間的に吸光系数を測定した。第9図に示す様に結果は P.P.L 体の量が多い程卵 Albumin の peptide 結合部の活性度が増加し、時間的にもやや増加する様であるが、この結果の機構は明瞭でないが、P.P.L 体は明らかに蛋白質 Peptide 結合部活性化能を有し、而も時間的にやや増加する所をみるとその作用能には酵素的な因子が相当あるものと思われる。

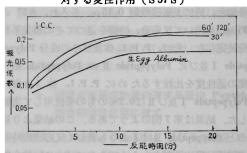
次に Polypeptide Iの0.5%液を同様な条件で働かせてみると第10図の様にやはり活性化能を有しているが、この場合時間的な増加は殆どなく、30分、60分、120分の曲線が一致してしまい、酵素的な因子が認められない。次に Polysaccharide にはこの様な現象は全然認められなかつた。

以上の知見は次の2点で極めて重要であると思われる。第1にこの様な P.P.L 体 の蛋白質 peptidc 結合部活性化能が免疫元性と一致している点である。これを pauling が抗体の生成機構の証明として試験 管内で抗体を作り得たという報告36)と関連して考えてみると、実に興味が深いものと考えられる。P.P.L体のこの性質が適応酵素活性化反応体としての性質と一致している点である。即ち、適応酵素活性化反応体として蛋白質 peptide 結合部活性化能が重

第九図 P.P.L.体の Egg Albumin に 対する変性作用(S57S)



第十図 Polypeptide Iの Egg Albumin に 対する変性作用 (S57S)



要な位置を占めるものと思われる。

10 結 論

以上の実験を要約してみると次の様な結論を得る 事ができる。

- 1) Gram 陰性菌よりは CCl₃COOH 低温抽出法に よつて純粋の Antigen Compléte (Polysaccharide-Polypeptide-Lipid 複合体) を得ることができる。
- 2) Gram 陽性菌では CClaCOOH 低温抽出法で純粋の P. PL 体は得る事ができず得られるのは Ribo 核酸-Mg-Dolysaccharide-Polypeptide-Lipid 複合体である.
- 3) Gram 陽性菌よりの Ribo 核酸-Mg-Polysaccharide-Polypeptide-Lipid 複合体の Ribo 核酸 Mg はイオン性結合部 1/5, 残部は主として共有結合の形で残余の複合体と結合しているものと考えられる.
 - 4) Ribo核酸-Mg-Polysaccharidé-Polypeptide-Lipid

複合体より純粋の P.P.L 体を得る方法を考案した。

- 5) Ribonuclesse を自己の方法によつて精製し、 その物理的化学的性状を測定した。
- 6) 菌体より Desoxyribo 核酸及び Ribo 核酸を精製する方法を考案し、その物理的化学的性状を測定した。
- 7) 各種細菌の P.P.L 体よりその成分 Polysaccharide 及び Polydeptide I, II並びに Lipid を分離し、その化学的性状を測定し、次の結果を得た. Gram 陰性菌に比較して gram 陽性菌では Polysaccharide が少く、Polypeptide が多く、又 Lipid も多く、又その Polypeptide I は陽性菌の方が分子量大きく、Tyrosin、Tryptohane、Histidin が少い、又陽性のものは不飽和酸が多い。何れの菌種でもPolypeptide I より Polypeptide II の方が分子量小さくNに富む、又これ等物質の有する適応酵素活性化能と免疫元性とが一致する。
 - 8) 糖類成分中特異な点として次の結果を得た。

Gram 陽性菌には Pentose 及び Methylpentose がないが Gram 陰性菌には存し、Ketose は両種菌にあるが Gram 陽性菌に多い。両種菌に Xylose はない

9) 各種細菌の P.P.L 体及びその成分の分子量, 軸比, Km 恒数等を測定し, その分子形態について 論じた. 特に重要な事として一般に Polypeptide I よりも Polypeptide II は著しい軸比を有する点と P.P.L 体は Gram 陰性菌の方が大きい軸比を有す

献

文

- Boivin, Mescrbena et mesrobena; C, R. Soc.
 Biol., 114; (1933). 307 Raistrick and Topley;
 Brit. J. of EXp. Med., 15, (1934) 113.
- 村上 栄, 間野忠衛, 第23回日本細菌学会総会 (1950)
- Bartholomew, J. W. & Umbreit, W. W.; J. of Bact., 48, (1944)
- Prezylecki, V. W.; Kolloid Zeits., 83, (1937)
 51.
- Felton, α. D.; J. of Im munol., 22 (1932)
- 6) Iversen; Biochem. Z., 104 (1920) 22.
- Kunitz, M.; J. of Gener. physiol., 24 (1940)
 15.

る点を見出した.

- 10) Ribo核酸-Mg-Polysaccharide-Polypeptide-Lipid 複合体の紫外吸収曲線を測定した。
- 11) Polysaccharide-Polypeptide-Lipid 複合体、Polysaccharide-Polypeptide-複合体、Polypeptide I 及び II の紫外吸収曲線を測定した結果、Polypeptide II は Polypeptide I の NaOH 変性型に近く、又 Polypeptide I + Polysaccharide の混和物は Polysaccharide-Polypeptide の吸収曲線への再現性を有するが、これに反して Polypeptide II + Polysaccharide の混合物にはかかる事がない事、又 Polypeptide I は各菌種間で吸収曲線が相違するが Polypeptide II では異らない事を見出した。
- 12) P.P.L 体に含まれる時の Polypeptide と分離した Polypeptide I 及び II ではその Peptide 結合 部活性度が異り、この順に大きい事を見出した。
- 13) P.P.L 体の蛋白質 peptide 結合部活性化能を 見出した。

終りに臨み,ご指導とご校閲をいただいた村上教 授に深基の謝意を表す。尚,分光器の使用を許され た本学精神科林教授及び photometer を御借与下さ つた本学法医教室遠藤教授业びに実験の補助を願つ た奥野孝世助手に感謝する。

本研究は文部省科学研究費の補助の下に行なった 事を併記する。

概要は第3回日本細菌学会中四国地方支部会総会 にて発表した。

- 8) Holiday; Biochem. J., 30 (1936) 1795.
- 9) 須田正己; 自然, 5. (1950) 18.
- Spiegelman; J. of Gener. physice., 31 (1947)
 27.
- Avery, Mc Carty, Mc Leord; J. Exp. Med.,
 79, (1944) 137. Bac. Rev., 10 (1946) 63; J.
 Exp. Med., 83, (1941) 89, 97.
- 12) Morgan & partrige; Biochem, J, 35, (1941) 1140.
- 13) Jorpes, E; ibid, 26, (1932) 1509.
- 14) Miura; J. of Biochem., 29, (1939) 467.
- 15) 林清五郎; 薬学, 4, (1950) 60.
- 16) 久志本常高; 生化学, 21, (1949) 86.
- 17) Klein, G.; "Hanbuch der pflanzenanalyse", II.

- Spezielle Analyse, 1, (1932) 786.
- 18) 野副; 日化, 57, (1936) 798. 813.
- Klein. G.; "Handbuch der pflanzenanalyse",
 II. Spezielle Analyse, 1, (1932) 775.
- Rosenthaler, L.; Z. Anal. Chem., 48, (1909)
 169.
- Klein, G.; "Handbuch der pflanzenan*lyse",
 II. Spezielle Analyse, 1, (1932) 807.
- 22) Klein, G.; ibid, 814.
- 23) 荒木長次; 化学実験学 II, II, (1942), 190—193.
- 24) Weber, H. A. & Stöver, R,; Biochem. Z., 259, (1933) 277.
- 25) Polson, A. G.; Nature, 137, (1936) 740.
- 26) Heyroth, F. & J. Loofbourow; J. A. C. S., 53, (1931) 3411.

- Caspesson, R.; Skandinav. Arch. f. physiol. Supplement, No. 8, 73, (1936)
- 28) Dhéré, Ch.; Recherches spectrographiques, Fribourg, (1909)
- Loy, H. and B. Arends; Dtsch. chem. Ges.,
 B, (1928) 212
- Baker, T. & L. Davidson; Nature, 116. (1925)
 172.
- 31) 近藤金助,秦 茂之; 日農化会誌,18,(1941) I.
- 32) 荒谷真平, 生化学, 21, (1949) I.
- 33) 島内, 水島三一郎; 科学, 17, (1947) 24, 52.
- 34) 守山; 科学, 11, (1941) 402.
- 34) 守山; 医学と生物学, 10, (1947) 163
- Pauling, Chambell; J. Exp. Med., 76, (1942)
 211.

Studies on surface structures of the bacterial cell

Report 111. Chemical studies on surface substances of the bacterial cell.

Kazumi Taguchi, M. D.

Department of Bacteriogy, Okayama University Medical School

Surface substances of the bacterial cell which would have biological and immunological activities were studied with aid of purification process, chemical analysis, spectrochemical procedures, viscosimetory, dielectric spectrometory, osmotic manometory and other physicochemical procedures.

Purified substance from Gram positive bacterial cell by trichlor-acetic acid method was determined to be the mixture of ribonucleic acid-Mg and polysaccharde-polypeptide-lipid. Mixture was consisted of ion-binding in one-fifth and its molecular weight was ca. 400,000 with axis ratio of 1:2. By acting with ribonuclease this mixture was purified into polysaccharide-polypeptide-lipid compound which, to date, had been difficult to purify from Gram positive bacterial cell.

Purified polysaccharide-polypeptide-lipid compound from Gram negative bacterial cell using trichlor-acetic acid method was also studies revealing molecular weight of ca. 150,000 and twice longer axis ratio than ribonucleic acid mixture. Thus, it was considered that parallel coexistence of two molecules of ribonucleic acid-Mg and one molecule of polysaccharide polypeptide-lipid compound was clarified.

Polysacchardie-polypeptide-lipid compound was further purified into polysaccharide-polypeptide 1 (PP 1), polysaccharide-polypeptide 11 (PP 11) and lipid. From measuring molecular weight, km constant, axis ratio etc, it was found that PP 1 had more elongated molecular form than PP 11 and that relationship between Pl' 1 and PP 11 was identical with that between non-denaturated protein and denaturated protein.