

鼠癩系抗酸性菌より分離したる蛋白に就て

前 田 研 究 室

醫學博士 明 石 修 三

伊 丹 二 三 雄

菌體を構成する蛋白は抗體產生其他諸般の免疫學的現象と密接なる關係を有し、近時菌體より種々の條件下に分離せる各種蛋白に就て其抗原性の強弱或は特異性が論究せられてゐる。此點に鑑み菌體蛋白の化學的研究を諸種の觀點より行ひ考察することは興味あることと思ふ。本研究は菌體を種々のアルカリ濃度を異にする抽出劑を以て順次抽出を行ひ抽出分離せる各種フラクチオンの蛋白に就て精製操作を施して後、其化學的性狀を以下述ぶる諸項に亘り検査し蛋白相互の比較研究を試みたるものなり。

實 驗 の 部

I 粗蛋白の分離

脂肪を分離せる鼠癩系抗酸性菌の脱脂菌體（化學講演集第10輯参照）を用ひ先づ之に5倍量の $m/15$ Na_2HPO_4 (PH 8.3) を加へ乳鉢にてよく搗り、ついで $5-8^\circ$ の室温で2日間振盪器上にて振盪後、遠心器に移して遠心分離し、沈澱に尙一回新しき抽出劑を加へて前と同様に處理し、かくして2回に亘つて得たる淡黄綠色の強く溷濁せる浸出液を合し氷冷下に5%醋酸を加へて蛋白を充分に析出せしむ。次に此蛋白を稀アルカリに溶解、再び醋酸添加により沈澱、此操作を數回反復行ひたる後、最後に蛋白液をベルケフェルド濾過管（V又はN）を用ひて濾過し挾雜物を除きて透明となれる濾液に醋酸を加へて析出せしめたる蛋白をAフラクチオンとす。次にAの抽出に依り得た菌體殘渣を全く同一の抽出法により $0.01n$ Na OH (PH約12) にて抽出し、更に其殘渣を $0.1n$ Na OH にて抽出、以下 $0.3n$ Na OH 、 $1n$ Na OH 、 $3n$ Na OH と順次抽出劑のアルカリ濃度を増し、かくして各浸出液より得た蛋白を夫々B, C, D, E, F, とし、最後に残つた抽出殘渣を G とす。各蛋白フラクチオンに就てN及びP含有量の測定を行ひ、又電氣泳動法に依り等電域の値を求め其結果を第1表に表記す。

第 1 表

蛋 白	抽 出 劑	收量(%)	N (%)	P (%)	等 電 域
A	m/15 Na_2HPO_4	0.9	15.2	2.10	3.1 ~ 4.0
B	0.01n Na OH	2.1	15.3	0.68	4.4 ~ 4.7
C	0.1n "	1.0	15.7	0.33	4.4 ~ 4.7
D	0.5n "	0.5	15.1	0.04	4.1 ~ 4.7
E	1 n "	1.5	15.6	0.03	4.1 ~ 4.7
F	3 n "	7.8	14.0	1.54	3.0 ~ 4.4
G	抽 出 殘 渣	25.6	2.3	0.06	—

上表より明かなる如くN値は相互間に殆んど差違を認めず之に反してP値はA最も多く次第に減少して再び最後のFに於て著しく増加す等電域はAとFとに於てやゝ低きも他は殆んど等し、尙收量に就ては全體として著しく低く、たゞFが斷然多いことが注目せらる。收量の多寡に關しては抽出前に菌體の受けたる破壊の狀態、或は又菌體中の脂肪、水、殘存量の如何等菌體自身の狀態により左右せられるものと考へられるが更に收量の低下を來す他の原因は抽出分離及び濾過の困難なる操作に存するのである。然し例へ之等の障礙に基く損失量を充分考慮するとしても、上記の方法に依り得られる蛋白量は一般に少いことが事實のようである。又GフラクチオンはN、P共に少く、從つて蛋白に非ずしてキチン様物質と見做さる。此物質をF蛋白と分離せる時の狀態は宛も水を含みたる寒天様の外觀を呈し、又乾燥粉末は水に浸せば著く膨化し抱水性強きを認む。本物質は菌體の有力なる支柱質と考へられるものであるが、かゝる性質は細菌の水分貯藏ひいては生命維持上何等か意義を有するものゝ如く推察せらる。

II 蛋白の精製

上記各種粗蛋白の中代表的なものを選び精製を行つた。即ち抽出條件の最も懸隔り、且つP含有量の最も多きA、F、兩蛋白、及び其中間に位しP含有量の最も少きD蛋白が夫である。精製法は¹⁾Sevagが糖蛋白、核蛋白より蛋白を分離する爲めに考案したるクロ、ホルム振盪法に倣つた。先づ蛋白を約50倍量の0.05n Na OHに溶解し、50~55°の水浴中に1時間熱し少量の不溶性物質を遠心除去し、次に醋酸を加へ、液のPHを5.6（中性と等電點との中間PH）となし、分液漏斗に移し $\frac{1}{4}$ 容積のクロ、ホルムと $\frac{1}{16}$ 容積のアミールアルコールとを加へ15~30分間振盪す。この時析出せし下層のクロ、ホルム蛋白ゲルを上層の水溶液と分離しクロ、ホルム蛋白ゲルは之にアルコールを加へ解膠し再び醋酸を加へて析出せしむ。かくして得た蛋白に就て更に兩3回同様のクロ、ホルム處理を反復施行す。最後に電解質を除くため透析装置に移して透析

精製す。

Ⅲ 精製蛋白の検索

a) 一般的性状

何れも微黄色の粉末にして殊に弱アルカリの存在に於て水に容易に溶解す。但し F 蛋白のみは例外にして粗製時にはアルカリ易溶なりしも精製後は溶解性著しく低下す。何れの蛋白液も熱凝固性を示さざるも醋酸を加ふれば蛋白析出し。又アルコールにより全く沈澱す。何れも硫酸により容易に鹽析され $\frac{1}{2}$ 飽和 (14%) にて殆んど大部分析出し。續く $\frac{1}{2}$ 飽和及び全飽和にて析出する部分は極微量に過ぎず。硫化鉛反應は殆んず認めず従つてチスチン存するも微量なるべし。

次に N 及び P を定量し精製前後の値を比較し又蛋白の恆在性挟雜物質たるグルコサミン量を測定せり。其結果を第 2 表に掲ぐ。

第 2 表

蛋 白	N (%)	P (%)	グルコサミン(%)
A	15.3	0.21	0.12
D	15.5	0.03	0.17
F	14.5	0.07	0.21
G	—	—	2.05

上表に依れば N は精製前後の値に差違を認めざるも P は A と F に於て著しく減少す。此 A 蛋白の P が核酸に由來するものなることは蛋白精製時にクロ、ホルム蛋白ゲルと分別せる水層より得たるフラクチオンに於て證明さる。即ち該フラクチオンはペントーゼ反應を強く呈し。又水解後アンモニヤ性銀液の添加によりプリン銀を析出す。尙 F の P に就ては核酸を證明せず。他の形態の P と思はるゝが詳細は不明である。

グルコサミンの定量は Jvar Nilsson²⁾ 法により施行す各蛋白に於て何れも少量のグルコサミンを含有す。抽出殘渣 G に就ても亦蛋白と同一測定條件にて行ひたるが其グルコサミン量は蛋白に比して遙かに多く更に水解時間を長くすれば値を増加すべし。

グルコサミンの定量

約 0.1g 蛋白を 5cc n-HCl と共に 3 時間沸騰水 浴中に浸し。ついで遠心分離により不溶分と分ち沈澱を n-HCl で洗滌し水解液及び洗液を合し 4n Na OH で嚴密に中和後全液量を 10cc とす。此液 2cc (0.1—0.3mg グルコサミン) を有栓試験管にとり之に 2cc Acetylacetone を加へ 95° 水浴中に 20 分間保ち。ついで水冷後 2cc Aldehyd 試薬を加へ 30 分放置後 30 分以内に Leifo 光

度計により Filter 530を用ひ測定す。

b) 2.3 特種アミノ酸の含有量

チロヂン及びトリプトファンを Folin-Marenzi ³⁾ 法により、アルギニンを Jorpes-Thoren ⁴⁾ 法により夫々定量せり。其結果を纏めて第3表に掲ぐ。

チロヂン及びトリプトファンの定量

約 0.1g 蛋白をパイレックス製試験管にとり 20% NaOH 2cc を加へ空氣冷却管を附して煮沸水浴中に18時間浸す。熱水解液に 7n H₂ SO₄ 3cc を加へ、次に 25cc メスコルベンに移し、0.2—0.5g Kaolin を加へて濾過す。濾液 20cc を 50cc 遠心カップに移し 4cc の 15% Hg₂ SO₄ 液を滴々加へてよく混和す。3時間放置後沈澱を遠心分離す。チロヂン含有の上清液は之を 100cc メスコルベンに入れチロヂンの定量に當て一方トリプトファン Hg₂ SO₄ の沈澱は 1.5% Hg₂ SO₄ 10cc を以て洗滌、10分間放置後遠心分離し、洗液は再び上記チロヂン液に合し、沈澱は尙1回同様に洗滌を反復し、かくして得た沈澱についてトリプトファンの定量を行ふ。

チロヂンの測定 前記チロヂン含有の 100cc メスコルベンに 7n H₂ SO₄ 6cc を加へコルベンを5分間沸騰水浴中に浸して後、水流下で冷却し之に 1cc 2% Na NO₂ 液を加へよく混和し、2分後水を以て劃線迄充す。30分以内に光度計にて Filter 495 を用ひ、吸光度を測定し、既知吸光度曲線により濃度を求む。

トリプトファンの測定

遠心カップ中のトリプトファン沈澱に n HCl 10cc を加へ沸騰水浴中に30分間浸して溶解せしめ、少量の不溶物は顧慮する所なく 100cc メスコルベンに濾過す。濾液に水を加へて約 60cc となし、次に飽和炭酸ソーダ液 25cc、Folin-Denis 氏 Phenol 試薬 5cc とを加へ30分放置後2—3cc 5% Na CN 液を加へ水を以て劃線まで充す。光度計に使用の Filter は620にして、吸光度曲線はトリプトファン濃度 0.5—3.0mg%の範囲内で使用可能である。

アルギニンの定量

約 0.1g 蛋白に2% 10HCl 10cc を加へ18時間煮沸水解後 Na OH にて中和全液を 100cc とす。其一定量 (0.04—0.08mg アルギニンに相當) を試験管にとり水を加へて液量を 5.0cc とす。氷中に浸して冷却後 1cc の 10% Na OH 液と 1cc の新製の 0.02 % α Naphthol 液とを加へよく混和し再び氷中に貯ふ、約 1 時間後冷時に 0.2cc Hypobromit 液を加へ (反應溫度約 4°) 手早く一様に振盪し、15秒後 1cc 40% 氷冷尿素液を加へ混和し直ちに光度計に移し 5分以内に Filter 495 を用ひて測定す。吸光度曲線の使用範圍は 0.8—1.6mg% アルギニンを最適とす。

第 3 表

アミノ酸	A	D	F
トリプトファン (%)	0.87	0.91	1.31
チロジン (%)	3.12	1.98	2.11
アルギニン (%)	7.82	6.84	6.15

定量の結果は上表より明かなる如くトリプトファン含有量は各蛋白何れも其値僅少ならず、殊に F に最も多し。チロジンは可成り含まるゝもトリプトファンとの含有比例を求むれば一般蛋白に比し少き傾向あるやに見受けらる。アルギニンの含量は中等量にして蛋白相互の間に懸隔を示さず。

c) 蛋白窒素の分布状態

精製蛋白の窒素形態に就て検査し第 4 表に示すが如き成績を得たり。測定法は Narayana の⁵⁾ ミクロ法に大體準據せり。以下方法の大略を記す。

蛋白約 0.1—0.15g に 2% HCl 10cc を加へ還流冷却器を附して沸騰水浴中に 40 時間加熱す。水解液中の不溶物を濾別し、其沈澱に就てキエルダール法により N を求め鹽酸不溶 N とす。濾液は減壓蒸溜器に移して數回蒸溜を反復し、可及的に HCl を除き、コルベンの内容をメスコルペンに移して水を加へて液量を 50cc とす。此液 20cc 宛 2 回に分けて NaOH を加へて弱アルカリ性となし減壓通氣してアムモニヤを $\frac{n}{100}$ HCl に受けて逆滴定により定量す。一方に於てコルベンの内容液中に析出せる微量のフミンの沈澱を濾別し、沈澱に就て鹽酸可溶中フミン N を定量す。2 回分のフミンの濾液を合し減壓濃縮後約 5cc となし濃鹽酸 1cc を加へ高壓釜中で 130° 30 分間加熱し、冷却後 25% 隣タングステン酸液 3cc を加へ析出せし沈澱を一度加温溶解せしめ次に 36 時間冷蔵庫に保存後遠心分離し沈澱を氷冷稀鹽酸 (1 : 10) 3cc を以て 3 回反復洗滌す。濾液並に洗液は合して全容を 50cc とす。之について總 N 及びアミノ N を求め、一方沈澱は $\frac{n}{2}$ NaOH に溶解し液の PH を 7.2 となし水を加へて 25cc とす之に就て總 N 及びアミノ N を求め更に比色法によりアルギニンを定量す。アルギニン量よりアルギニン N を求め其 $\frac{3}{4}$ を鹽基フラクシオンの非アミノ N より減じたるものをヒスチデンの非アミノ N とし之よりヒスチデン N を算出す。尚リジン N は本蛋白中のチスチンを無視して求めアルギニン N とヒスチデン N を總鹽基 N より控除したるものを之に當てたり。

第 4 表を一覽すれば先づ鹽酸不溶 N が、A を除く他の蛋白ことに F に於て著しく多きことが注目さる。鹽酸可溶中フミンは何れに於ても大差なきもアムモニヤ N は D に最も多く或はグルタミン酸がこの蛋白に最も豊富なるやも知れずと想像さる。鹽基性アミノ N は三蛋白とも總 N の

第 4 表

窒素の形態	A	D	F
鹽 酸 不 溶 N	0.63	2.35	4.81
鹽酸可溶中フミン N	0.82	0.79	0.53
ア ム モ ニ ャ N	4.28	8.64	5.24
鹽 基 態 N	26.76	25.89	25.93
{ ア ミ ノ N	11.57	9.09	10.04
{ 非 ア ミ ノ N	15.19	16.80	15.89
{ アルギニン N	16.41	14.12	13.12
{ ヒスチジン N	4.33	9.36	9.07
{ リ ジ ン N	6.02	2.41	3.73
モ ノ ア ミ ノ 態 N	67.25	65.82	62.03
{ ア ミ ノ N	57.80	60.21	52.44
{ 非 ア ミ ノ N	9.45	5.61	9.59
蛋 白 總 窒 素	99.74	103.49	98.54

(數字は總 N に対しての%を示す)

約 $\frac{1}{4}$ を占め、其中アルギニンN最も多く、D, F, 兩蛋白に於てはアルギニンについてヒスチジン多くリジンは著しく少くA蛋白にあつては反對にリジン多くヒスチジン少し、モノアミノNに關しては其非アミノNが概して豊富にして、殊にA, F, に蛋白に多量存することが注目せられる。

結 論

以上の諸成を綜合吟味して結論を求めるならば次の如く述べる事が出来るであらう。

菌體を種々のアルカリ濃度を異にする抽出剤を用ひて分離せし蛋白は其一般的性状、或は又二三特種アミノ酸含有量及び空素分析状態等より見たる化學的成分に關しては多少量的差違は認めらるゝも著しき格段的區別は認め難し。

終に臨み服部報公會より本研究に對し多大なる獎學資金の援助を受けたることを附記し、厚く謝意を表す。

文 獻

- 1) M. G. Sevag, D. B. Lackman & J. Smolens : J. Biol. Chem., **124**, 425, (1938).
- 2) I. Nilsson : Biochem. Z., **285**, 386, (1936).
- 3) O. Folin & D. Marenzi : J. Biol. Chem., **83**, 89 (1929).
- 4) E. Jorpes : Biochem. J., **26**, 1504, (1932).
- 5) N. Narayana & M. Srenivasa : Biochem. J., **22**, (2), 1135, (1928).