



Title	炭疽菌脱英膜因子の酵素学的研究
Author(s)	内海, 爽
Citation	大阪大学, 1961, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28432
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	内 海 爽 うつ み さやか
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 229 号
学位授与の日付	昭 和 36 年 10 月 4 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	炭疽菌脱莢膜因子の酵素学的研究
論文審査委員	(主 査) (副 査) 教 授 天 野 恒 久 教 授 須 田 正 巳 教 授 川 俣 順 一

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

動物の炭疽に対する自然免疫に重要な役割を果すと思われる脱莢膜現象に就いて、教室の鳥居は抵抗性動物であるイヌの血清及び肝臓抽出液に脱莢膜因子 (DCA) の存在を証明し、同時にL-グルタミン酸の γ -ペプチッド結合を分解する γ -グルタミラーゼをも発見し、莢膜ポリグルタミン酸 (GPP) にL-グルタミン酸を多量に含むメガテリウムの脱莢膜は此の酵素により説明出来た。然し、D-グルタミン酸のみより成ると思われる炭疽菌莢膜 GPP は分解されず、従って炭疽菌の脱莢膜の機作はこれまで依然不明であった。

著者はイヌ肝臓抽出液より両者を分割精製することにより、その異同を明らかにしようと試みた。

実験方法及成績

a) DCA 活性測定法

炭疽菌の強毒株の加熱標準菌液一定量を単位時間内で完全に脱莢膜するに要する限界濃度の活性により測定する方法 (顕微鏡的単位) と、適当な条件下で、脱莢膜の結果遊離して来る GPP 量を、抗メガテリウム GPP 血清との定量沈降反応によって測定する方法 (血清学的単位) の二方法を考案して用いた。

b) pH-活性曲線

DCA の pH-活性曲線を上の二方法によりしらべた結果、メガテリウムに対する脱莢膜活性のそれ、及び γ -グルタミラーゼのそれと全く一致し、至適 pH は4であった。

c) 諸性質

加熱に対し又 pH 3.5以下8.0に於いて不安定であるが、pH4 近辺では加熱に対してもかなり安定である。水に高い溶解性を示し蒸溜水透析に耐える。電気泳動による等電点は7.0—7.1に存在する。これ等の諸性質は γ -グルタミラーゼ活性に就いても全く一致し、共にCdイオンにより活性化され、他の金属イオンによる影響も全く一致していた。

d) 分割精製

粗抽出液：イヌ肝臓切片を醋酸食塩水中で凍結融解して抽出，中和遠沈過して最後に 34800g 45分遠心分離し上清をとる。

step 1：上の上清を硫酸50—100%飽和沈澱し，pH6.6，0.01M 磷酸緩衝液に溶解，水に透析後沈澱を除去。殆んどの活性が回収され， γ -グルタミラーゼ，DCA 共に約3倍純化された。

step 2：0.1M クエン酸を加えて pH4.0—4.1とし，蛋白濃度約1%の状態で56°C 5分処理，中和後沈澱を除去。両活性共 step 1より80%回収され，共に最初より約10倍純化された

step 3：硫酸62.5—75%飽和沈澱を蒸溜水に溶解透析する。両活性共に step 2から約70%回収され，90倍純化された。

step 4：カーボワックス6000溶液に透析濃縮（蛋白濃度約1～2%）して，0.075-0.1M 磷酸緩衝液 pH7.2 の状態でベントナイトを加え（ベントナイトmg/蛋白mg=0.5）陰性吸着する。step 3の約90%が両活性共に回収され，共に140倍純化された。

step 5：上の上清を 0.05M磷酸ソーダ濃度 pH 6.20 に合わせ，磷酸カルシウム・ゲルを加え（ゲル乾燥量mg/蛋白mg=1.0—1.5）吸着せしめ，磷酸ソーダ緩衝液0.05M：pH6.5, 7.0, 7.5, 0.075M, pH 7.2, 0.1M; pH7.2 で夫々洗滌後，0.6M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$, pH7.2 で溶出，蒸溜水に透析する。両活性共 step 4より約50%回収され，粗抽出液より780倍純化せる標品を得た。（ γ -グルタミラーゼ活性：390単位/mg; DCA：600 顕微鏡単位/mg）。

step 5を繰り返しても殆んど純度は向上せずむしろ活性損失が大きいのでこれ以上分割は進めなかったが，各分割に於ける両活性の完全な併行関係及び最終段階での純化の程度より，両者が異なるものとは考え難い。

e) クロマトグラフィー

Hydroxyl apatite のコラム・クロマトグラフィーを行った。磷酸ソーダ緩衝液の段階濃度溶出法により step 5 劃分は猶20%前後の不純物が認められたが， γ -グルタミラーゼと DCA は常に0.4M 劃分に均一な山として現れ，再クロマトにより単一の均質なパターンが得られた。

f) 炭疽菌莢膜 GPP の分解

精製せる劃分はメガテリウム GPP よりは弱いが，炭疽菌の *in vitro* の莢膜 GPP 及び *in vivo* の細胞外 GPP のいずれをも分解することが粘度測定で明らかとなった。

g) 基質特異性

γ -L-グルタミルL-グルタミン酸を最も特異的に分解し，これより弱いが γ -D-グルタミルL-グルタミン酸， γ -L-グルタミルL-アミノ酸をも分解した。

総 括

イヌ肝臓抽出液より炭疽菌脱莢膜因子を精製し更にクロマトグラフィーによって，これが本質的に γ -グルタミラーゼと同一であることが明らかになった。炭疽菌 GPP 中に僅かであるがL-グルタミン酸が存在し，これを分解することによって脱莢膜が起る可能性が立証された。同時に莢膜内の他の成分若くは莢

膜と細胞壁結合部に何等かの基質構造が存在するかも知れない。

論文の審査結果の要旨

動物の炭疽に対する自然免疫に重要な役割を果たす脱莢膜現象に就いて教室の鳥居は炭疽抵抗動物であるイヌの臓器抽出液より脱莢膜因子を証明したが、未だその本態に就いては全く未解決であった。著者はこの問題に就いて研究し、イヌの肝臓抽出液よりこの因子を高度に精製することによってその本態を明らかにし、炭疽菌脱莢膜現象を酵素レベルで解明した。

グルタミン酸の γ -ペプチド結合を分解する酵素所謂 γ -グルタミラーゼをイヌの肝臓の酸性抽出液より次の5段階で精製した。(1)硫酸50—100%飽和画分、(2) pH 4.0に於ける56°C 加熱処理、(3) 硫酸62.5—75%飽和画分、(4) ベンナイトによる陰性吸着、(5) 磷酸カルシウムゲル吸脱着。以上の分画法により酵素活性は780倍純化され、この間脱莢膜活性も全く併行して精製された。又、ハイドロオキシルアパタイトによるクロマトグラフィーによっても両活性が同一であることが証明された。

一方、精製せる γ -グルタミラーゼは炭疽菌莢膜より分離精製せるポリグルタミン酸を分解する事が明らかにされた。

γ -グルタミラーゼは、至適 pH 4 に於いて炭疽菌及びメガテリウムを脱莢膜し、夫々の莢膜ポリグルタミン酸を分解し、 γ -L-Glu-L-Glu を最も特異的に分解するが、同時に Cbz- γ -L-Glu-L-Glu-Bz をも分解し、これが endopeptidase としても働くこと、並びに γ -L-Glu-L- アミノ酸、 γ -D-Glu-L-Glu をも分解する事が分った。

従って炭疽菌莢膜ポリグルタミン酸中に僅かに存在する L-グルタミン酸が γ -ペプチド鎖に連っている事によって、 γ -グルタミラーゼによって分解され、これによって脱莢膜されるものと考えられる。

以上、本研究は従来不明であった炭疽菌脱莢膜現象の機作を解明し、先に教室の豊田が明らかにしたことであるが感受性動物の白血球には犬の白血球 $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{50}$ 位しか γ -グルタミラーゼが含まれていない事実を考えて炭疽に対する自然免疫の一つのメカニズムを酵素学的に明らかにした。 γ -グルタミラーゼは亦、生体内でグルタチオンや葉酸の代謝に関与していると考えられ、その精製は生物学的にも意義を有するものである。