The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Plakinの作用機作に関する研究
Author(s)	東, 雍
Citation	大阪大学, 1963, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28509
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

【32】

氏　名・(本籍)	東(ひがし)　雍(やすし)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　403　号
学位授与の日付	昭和38年3月25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	Plakin の作用機作に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 天野　恒久　(副査) 教授 須田　正巳　教授 萩原　文二

論文内容の要旨

〔目　的〕

Gruber と二木は兎の血小板抽出液が，B.anthracis に対して殺菌作用を持っていることを報告し，この殺菌因子を plakin (plakoanthrakocidin) と名付けた。plakin の性質及び作用様式については天野らによって報告されてきており，それによると，plakin は B.subtilis，B.megaterium などに対しても殺菌作用があり，これらの菌の glutamate，succinate，malate を基質とする時の酸素呼吸を瞬時に停止させる。同時に菌の permeability barrier も破壊する。そして菌の permeability barrier が cytoplasmic membrane にあることから，plakin は cytoplasmic membrane に作用するのではないかと考え，この考えの正しいことを B.megaterium の protoplast が plakin の作用を受けて lysis を起し ghost になると言う事実から証明している。

著者は精製した plakin を使用して protoplast-lysis の様式をしらべ，plakin による菌の酸素呼吸の停止が何故起るのか，また，plakin が cytoplasmic membrane の何に作用しているのかを知る目的で実験を行なった

〔方法並びに成績〕

1. Plakin の精製：馬及び兎の血小板を M—NaCl に浮游して音波破砕し（Ⅰ），pH2.5 にして沈澱する lipoprotein を除いて中和（Ⅱ）後，硫安40～80%の分画（Ⅲ）を，hydroxylapatite あるいは DEAE—cellulosecolumn でクロマトする（Ⅳ）。Hydroxylapatite column でクロマトしたⅣはⅠに比し蛋白量あたりの活性は約250倍である。

2. protoplast-lysis の様式：B. megaterium の protoplast 浮游液に plakin を加え，10分間隔に反応液を振盪して protoplast の濁度減少を測定すると，plakin が低濃度の場合は lysis の始るまでに lag time がある。そして lysis が始ると，その速度は plakin 濃度に関係なくほぼ一定している。前者を説明

する一つの考え方は，protoplast-lysis が plakin の multiple hit によって起っているのだろうと言うことである。後者では，plakin の作用により生じた protoplast 由来の物質が，lysis そのものに関与していることが想像される。これは lag time 中に取り出した遠沈上清の protoplast-lysis の活性が，lysis の始まる時間が近づくと強くなっていることからも想像される。実際に protoplast 中にこのような物質（lytic factor）の存在することが確められ，精製も可能であった。

これらの実験中に気付いたが，plakin による protoplast-lysis は反応液の上層部に強くあらわれていた。酸素の影響を疑い Thunberg tube を使用し anaerobic の条件で実験を行なうと，反応液全層にわたり平等に lysis がみられ，aerobic のものに比べて lysis 活性が減弱していている。これを CN^-,CO,azide などの呼吸阻害剤を用いて比較したところ，anaerobic の実験と同様の現象がみられた。そして anaerobic の条件に azide を加えても lysis 活性減弱度の相加作用はなかった。したがって protoplast は酸素呼吸をしている状態の方が静止状態よりも plakin 作用を受け易いわけである。このような酸素効果は他の protoplast-lysis を起す酵素 lipase や表面活性剤 desoxycholate などでは，plakin による protoplast-lysis の場合にみられるように著明ではなかった。

3. 末端電子伝達系からみた plakin による B.megaterium の酸素呼吸停止の原因：Plakin を作用させた時に起る succinate を基質にした時の protoplast の酸素消費の停止を，酸素電極で測定すると，protoplast-lysis に並行していることがわかる。ところがこのように protoplast が lysis を起し酸素消費の停止した状態でも，phenazine methosulfate を electrone carrier とすると酸素消費がみとめられるから，succinic dehydrogenase の活性は残っている。また，NADH を基質にすると酸素消費の活性があること及び differential spectrum のデーターから cytochrome が十分にその機能を果し得る状態のままであることもわかる。以上の事実から plakin による菌の酸素呼吸停止は flavoprotein と cytochrome との間が block されている為に起っていると考えられる。

4. Osmotically burst の ghost に対する plakin の作用：上記のように plakin は protoplast に lysis を起させるが，plakin は cytoplasmic (protoplasmic) menbrane 中のなにに作用するのか P^{32} を使用して調べた。P を制限した合成培地に P^{32} を加え，B.megaterium を培養し，その protoplast を osmotically に burst して P^{32}—ghost を得た。P^{32}—ghost に plakin を作用させた後，Schmidt—Tanhäuser の方法で分画して，P^{32} を count したところ，時間的に TCA—soluble の P^{32} は増加し，alcohol 及び alcohol—ether soluble の P^{32} は減少して行く。この事実から pakin が ghost の phospholipid に作用していることが考えられるので，これを確かめるために plakin 作用後の反応液を Gibson らの方法で抽出を行なった。その結果は chloroform 層（phospholipid)の P^{32} の時間的減少と対応して methanol-KCl 層 P^{32} の時間的増加がみられ，上記の推定が確認された。

5. Ghost から抽出した phospholipid に対する plakin の作用：Gibson らの方法で ghost から抽出した phospholipid を蒸溜水中に emulsion にし，これに Tris buffer あるいは borate buffer を加えて plakin を作用させる。作用後の methanol-KCl 層を King 法で total P の定量を行なうと，P^{32}-ghost における実験と同様の結果が得られた。なおこの活性の至適 PH は8.5であった。

〔総　括〕

Plakin は感受性菌の cytoplasmic (protoplasmic) membrane の phospholipid に作用する。そして

plakin 作用を受けた菌の cytoplasmic membrane には， flavoprotein と cytochrome との間に電子伝達の block がおきている。

論文の審査結果の要旨

1907年 Gruber 及び二木によって家兎，馬，ラツテの血小板中に炭疽菌殺菌因子が発見され，後にこれはプラキンと命名された。この物質の本態又は作用機構についてはその後，行なわれていない。教室においては1952年以後，その作用機構の研究を開始し，種々面より，溶菌の機構を追求したが，本物質の精製を行ない得なかった為，本態は依然，不明であった。著者は，まず精製法を確立した。粗抽出液に混在するリポ蛋白に着目し，標品を安定化することに成功し，その後，比活性約250倍に精製するに至り，粗抽出液に混在した細菌のプロトプラストを崩壊すると思われるアルカリフオスフアターゼ，エステラーゼ等は，除去された。

この精製標品を使用して，作用機構を研究し，次の事実を明らかにした。

1）プラキンによる感受性菌のプロトプラストの崩壊の速度論的解析により，1ケのプロトプラストの崩壊には2ケ以上の場所におけるプラキンの作用の必要なこと，つぶれたプロトプラストから他のプロトプラストをつぶす別な物質が放出されて，崩壊は更に拍車をかけられる。

2）溶菌は酸素の存在下で速やかで，嫌気的条件では遅く， HCN.CO.azide を好気的条件下に加えると，嫌気的条件下のものと同様におくれるという，酸素効果を明らかにした。

3）ついで以前から判明していた酸素呼吸の停止を更に解析し，コハク酸脱水素酵素は，つぶれた後でも活性を有すること，該酵素とチトクロームの間が溶菌により恐らく二次的に遮断されるものと考えているが，チトクローム系を電子が流れている時の方がプラキンの溶菌は起り易いとのべている。

4）プロトプラストを低浸透圧でショツクにかけてえた原形質膜を主とするゴーストに対するプラキンの作用を， P^{32} をとり込ませたものでしらべ，燐脂質が分解されることを知り，更にゴーストよりクロロフオルム，メタノールで抽出した燐脂質についても，これを加水分解することを明らかにした。

以上本論文は，従来不明であったプラキンの本態が燐脂質を分解する酵素であることを明らかにしたもので細菌学，免疫学に寄与する所大きいものと確信する。