

Title	ジフテリア毒素産生機構に関する研究 : ジフテリア 菌体内抗毒素結合物質について
Author(s)	松田, 守弘
Citation	大阪大学, 1963, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28611
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、〈a href="https://www.library.osaka- u.ac.jp/thesis/#closed">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

--- [3] --

 氏名・(本籍)
 松 田 守 弘

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 50

50
 <

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 第 439 号

学位授与の日付 昭和38年7月25日

学位授与の要件 医学研究科生理系

学位規則第5条第1項該当

学位論文題目 ジフテリア毒素産生機構に関する研究;ジフテリア菌体内

抗毒素結合物質について

(主 査) (副 査)

論文審査委員 教授 米田 正彦 教授 天野 恒久 教授 堀 三津夫

論文内容の要旨

(目 的)

ジフテリヤ毒素(以下ジ毒素と略称す)は、大部分が菌体外培養濾液中に見出され、菌体内には極く僅かしか認められない。従って毒素産生に関する従来のすべての研究が、毒素の菌体外遊出のみを、その対象としてとりあげていたために、菌体内に於ける毒素蛋白の生成部位或はその生成過程などは全く明らかにされておらず、毒素生合成機構の全貌はなお未解明のまま残されている。本研究の目的は、この未解明の問題に免疫化学的 approach を試み、毒素の菌体外産生に伴っておこる菌体内の特異的な変化、特に毒素蛋白或はそれと免疫化学的に関連ある物質の形成様式および、その局在性を明らかにすることによりジ毒素蛋白産生機構を解明するための新しい手掛りを得ることにある。

(実験方法)

有毒株 P. W. No. 8, C4(β), C7(β) 及び無毒株 C4, C7 の Mg 含有 Tris 緩衝液洗滌菌体の機械的破砕物を遠沈分画して菌体画分;Fraction/5000 $-14500(5000\times g\ 20$ 分間と 14,500×g 30分間での遠沈画分) Sup/14500(14,500×g 30分間遠沈上清)Fraction/14500-100000(14,500×g 30分間と 100,000×g 120分間との遠沈画分)更に後者から"membrane fraction"(14,500×g 30分間-100,000×g 10分間画分)及び"ribosomes"(100,000×g 10分間-100,000×g 120分間の遠沈を繰返して精製)を調製した。 菌体画分標品の抗毒素結合能は,blending 法,定量吸収試験及び Ouchterlony・の寒天ゲル内沈降法により検討した。試料画分量は乾量測定で,また蛋白量,RNA量は,失々 Lowry,Dische らの方法により測定した。

(実験成績)

1) 毒素を産生しつつあるジ菌 (FeP菌) 無細胞抽出液の抗毒素結合現象: FeP 菌 14,500×g 遠沈上清は、予めそれに既知量のジ毒素を加えたときにのみ (所謂 blendig 法)、抗毒素との間に明瞭な沈降反

応を起し、しかもその時の抗毒素結合量が、加えた毒素量をはるかに上廻ることを見出した。この標品の $100,000\times g$ 2 時間上清(少量の可溶性毒素が存在)或は過剰鉄の存在によって毒素産生を阻止されたジ菌 (Fes 菌) では、このような現象は全く認められない。

- 2) 種々の菌体画分の抗毒素結合能: FeD 菌及び FeS 菌の各種菌体画分中, FeD 菌の画分(細胞壁標品を除く)のみが結合能を示し、その活性は特定画分(Fraction/14500-100000)に集約している。
- 3) 抗毒素結合の特異性:毒素を産生していない Fes 菌及び無毒菌 (C4, C7) の画分には結合能はない。更に Fep Fraction/14500-100000 を各種血清で前処理した場合, この結合能はジ抗毒素血清で処理した場合にのみ消失し, その他の血清による前処理の影響を全くうけない。 また一たん結合した抗毒素の大部分は, 反覆洗滌によって除去されない。
- 4) Fep Fraction/14500-100000 における抗毒素結合物質の存在とその特性:充分洗滌したこの画分の家兎免疫血清中には、 ジ毒素に対する特異沈降抗体及び中和抗体 (0.5~5.0単位/ml) が生ずる。 この画分は、ジ抗毒素で中和される定型的ジ毒性を示すが、その毒性は、 この画分の抗毒素結合能から計算した通常の毒素の毒性の約10-3程度に過ぎない。種々の対照実験を行なった結果、以上の特異免疫原性及び毒性が、混入し得る微量の遊離毒素によるものではないことを明らかにした。 この画分を音波処理することにより抗毒素結合物質を溶出することに成功したが、寒天ゲル内沈降解析の結果、 この物質には、ジ毒素蛋白の抗原特異性と部分的に共通するもの (毒素蛋白の C. R. M.)) の存在することを証明した。
- 5) 抗毒素結合物質の局在一菌体構造との関連性: 抗毒素結合能をもつ Fraction/14500-100000 の画 分は, "membrane fraction" (蛋白69.1%, RNA 16.4%) と75S, 57S, 38S の沈降定数をもつ "ribosomes" (蛋白47.9%, RNA 52.1%) とから構成され, この両構成とも抗毒素を特異的に結合する。
- 6) 抗毒素結合物質の形成と毒素産生能との関連性:非溶原性一無毒株の C4, C7 菌の菌体画分には抗毒素結合能は全く認められないが、これらの菌に β ファージを感染させて得た溶原性の C4(β), C7(β) 菌は、ジ毒素産生能を獲得すると共に、その菌体画分に結合能を生ずる。

(総括)

ジ菌菌体の詳細な免疫化学的研究により、毒素を産生しつつあるジ菌体には、遊離毒素とは別に、抗毒素を特異的に結合する物質が形成され、しかもこの物質が菌体構造画分特に、 リボソームに密接に関連して局在するという新しい事実を見出すことができた。またこの物質の形成が、 β フアージによる毒素産生能の獲得と密接不可分の関係にあることを、初めて立証するとともに、 この抗毒素結合物質の部分的溶出 に成功して、その他の化学的性状について極めて興味ある所見を得た。

論文の審査結果の要旨

ジフテリヤ毒素(以下ジ毒素と略す)は、大部分が菌体外培養濾液中に見出され、 菌体内には極く僅かしか認められない。従って毒素産生に関する従来の研究が、毒素の菌体外遊出のみを、 専らその対象としてとりあげていたために、毒素生合成機構の全貌は、現在なお未解明のまま残されている。 著者は、この問題に免疫化学的 approach を試み、毒素の菌体外産生に伴っておこる菌体内の特異的な変化を解明するための新しい手掛りを得ようと試み毒素を産生しつつあるジ菌(FeP 菌)無細胞抽出液の抗毒素結合現象

を見出し,次の諸事実を明らかにした。

- 1) FeP 菌及び FeS 菌 (過剰鉄の存在によって毒素産生を阻止されたジ菌) の各種菌体画分中 FeP 菌 の画分 (細胞壁標品を除く) のみが結合能を示し、その活性は特定画分 (Fraction/14500-100000) に集 約している。
- 2) Fes 菌及び無毒菌 (C4, C7) の画分には結合能はない。FeD 菌画分を各種血清で前処理した場合, この結合能は、ジ抗毒素で処理した場合にのみ消失し、その他の血清による前処理の影響を全くうけない。 また一たん結合した抗毒素の大部分は、反覆洗滌によって除去されない。
- 3) 洗滌した FeP 画分 Fractiou/14500-100000 の家兎免疫血清中にはジ毒素に対する特異的沈降抗体及び中和抗体が生ずる。この画分は定型的ジ毒性を示すが、その毒性は非常に少い。 種々の対照実験の結果,以上の特異免疫原性及び毒性が、混入し得る微量の遊離毒素によるものではないことを明かにした。この画分を音波処理することにより溶出した抗毒素結合物質中には、毒素蛋白の抗原特異性と部分的に共通するものが存在する。
- 4) 抗毒素結合性画分 Fraction/14500-100000 は "membrane fraction" (蛋白69.1%, RNA 16.4%) と, 75S, 57S, 38S の沈降定数をもつ "ribosomes" (蛋白47.9%, RNA 52.1%) とから構成され, この両構成分とも抗毒素を特異的に結合する。
- 5) 無毒株 C4, C7 菌の菌体画分には抗毒素結合能は全く認められないが、 これらの菌に β ファージ を感染させて得た溶原性の $C4(\beta)$, $C7(\beta)$ 菌は、ジ毒素産生能を生ずる。

以上の結果からみて、毒素を産生しつつあるジ菌体には、遊離毒素とは別に抗毒素を特異的に結合する物質が形成され、しかもこの物質が菌体構造画分特にリボソーム画分に局在することを明かにした。 またこの物質形成が β ファージによる毒素産生能の獲得と密接不可分の関係にあることを立証し、更にこの抗毒素結合物質の部分的溶出に成功して、毒素蛋白と抗原特異性を部分的に共通する事実を見出し、 それが毒素の nascent 蛋白である可能性を示した。以上の著者の成果は、ジ毒素産生機構の研究に新しい知見を加えたものと認められる。