



Title	Bacillus属細菌の産出する生理活性物質の研究
Author(s)	金, 在萬
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30223
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

【2】

氏名・(本籍)	きむ 金	じえ 在	まん 萬
学位の種類	薬	学	博 士
学位記番号	第	2081	号
学位授与の日付	昭和45年6月5日		
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	Bacillus属細菌の産生する生理活性物質の研究		
論文審査委員	(主査) 教授	青沼	繁
	(副査) 教授	上原喜八郎	教授 岩田平太郎 教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

〔緒 論〕

動植物は古くから天然医薬学の資源として利用されて来たが、微生物が医薬品の資源として利用されはじめたのはこれらよりはるかに後のことで、第二次大戦以後ペニシリンの実用化によりはじまるといえる。それ以来今日まで微生物は医薬品の生産手段として主に、(1)抗生物質、(2)酵素製剤、(3)細菌毒素を利用した生物学的製剤、などの生産に利用されているが特に抗生物質領域での開発は著しく微生物産生医薬品の大部分を占めている。

しかしながら今日まで微生物産生物質について動物に対する生理活性を検討した報告はきわめて少なく、微生物産生生理活性物質の開発はほとんどなされていない。このような状況の中で著者は生理化学の立場から従来の抗生物質や細菌毒素とは異なる新しい微生物産生生理活性物質の開発を旨として本研究をはじめた。まず微生物産生生理活性物質が得られるかどうか、その可能性を検討するため実験材料として9種の非病原性Bacillus属細菌を選び、その培養濾液の各分画について生理活性をしらべた所、数種の生理活性を認めた。

次いで、さらにその可能性を具体化するため特に活性物質の産生が著明にみられるBacillus subtilis Kの培養濾液より家兔血清カルシウム低下性物質の精製をこころみ、活性を有する作用本体としてリポ蛋白質を精製単離し、その化学的、生理化学的性質を種々検討し、微生物産生生理活性物質を実体としてとらえることが出来た。

〔本 論〕

生理活性スクリーニング

9種のBacillus属細菌を半合成液体培地で振とう培養後その培養濾液をpH2~3に調整した時生じて来る沈殿をFraction I、沈殿を生じない培養濾液および沈殿を分離した上澄を減圧濃縮後6倍量のアセ

トン中に注ぎ、生じて来る沈殿を Fraction II として得、その生理活性を検討した。生理活性はラット子宮収縮効力、家兎血清カルシウム値の変動、ガマ心臓機能促進効力および家兎循環白血球数の変動について検討した。その結果、数種の菌株の Fraction I と II に種々の生理活性が認められたが中でも *B. subtilis* K および *B. natto* No. 8 に強い家兎血清カルシウム低下効力を、*B. subtilis* K と *B. megaterium* K M に強い子宮収縮効力を認めた。

B. subtilis K の培養濾液より家兎血清カルシウム低下性物質の精製単離

次に *B. subtilis* K の産生する家兎血清カルシウム低下性物質の精製単離をこころみた。

すなわち *B. subtilis* K を半合成液体培地で90時間振とう培養し、その培養濾液を pH 2~3 に調整して生じて来る沈殿を Fraction I として得、Fig. 1 の方法で精製した。すなわち Fraction I を等電点精製した後、Fraction I に含まれている核酸を除去するためリボヌクレアーゼを目的として部分精製した Takadiastase で酸素分解後セファデックス G-75 によるゲル濾過、等電点分画を行なった後 DEAE-cellulose カラムで精製を行ない有効分画として fr-VI を得る。

Fraction I (yield : 3.1g from the culture filtrate 24 liters)

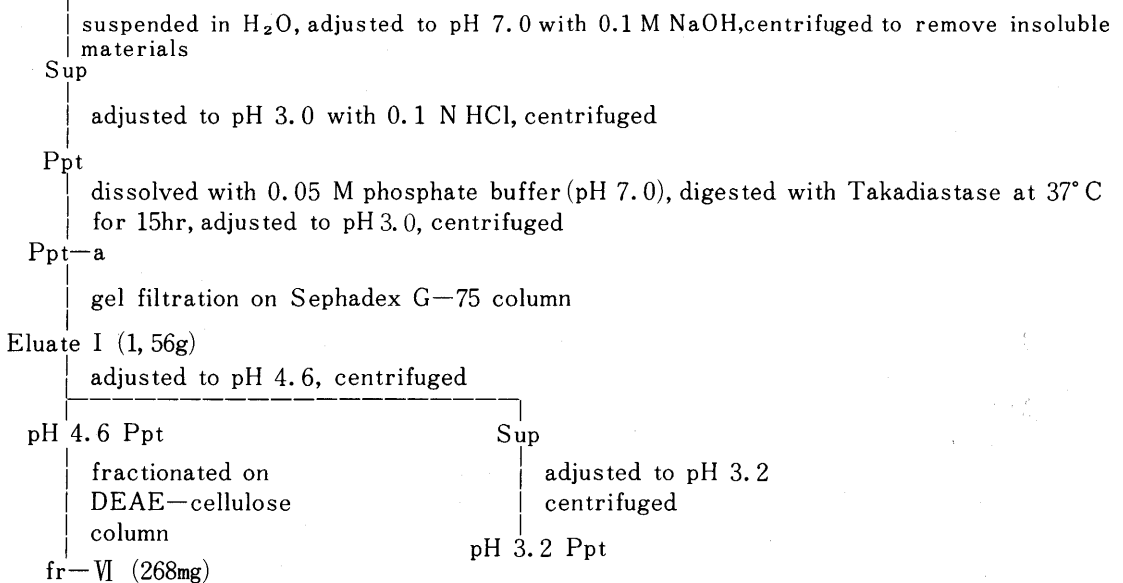


FIG. 1. Fractionation of the Rabbit Serum Ca-decreasing Substance from the Culture Filtrate of *B. subtilis* K.

この fr-VI はかなり精製されているがアクリルアミドゲルディスク電気泳動で未だ単一でなく発熱性を有するのでさらにその精製をこころみた。その結果近年 Sweden の O. Vesterberg らにより開発された両性電解質、carrier ampholyte を用いる電気泳動的等電点分画法によって fr-VI を 2 成分に分離し得、発熱性のない有効物質を α 因子として単離することが出来た。

有効物質、 α 因子の化学的性質

α 因子はアクリルアミドゲルディスク電気泳動で単一のバンドを示し、その化学組成は蛋白質 62.2%、脂質 33.6%、糖質 1.2%、窒素 9.8%、リン 0.7% で蛋白質と脂質を主成分とするリポ蛋白質で、セファデックス G-100 カラムによるゲル濾過法でその分子量は 115,000 と算定した。またそのアミノ酸組成が

ら α 因子はS-S結合を有せずN末端アミノ酸はDNP法によりロイシンのみ検出された。しかし有機溶媒で脱脂した蛋白部分、 α -Protein moietyではロイシンの他に新たにアラニンとゼリンがN末端アミノ酸として検出された。C末端側アミノ酸はカルボキシペプチダーゼAによる分解物の分析からアラニル-ロイシル-ゼリンであることを認めた。なお脱脂後の α -Protein moietyでもこの結果は変わらなかった。

有効物質、 α 因子の生理化学的性質

α 因子は0.5mg/kg静脈内投与により6～7時間後に家兔血清カルシウムを投与直前値の9.7%低下させるが α 因子の血清カルシウム低下作用機序を解明する一端として、まず放射性ヨウ素でラベルした ^{131}I - α 因子を用いてその家兔体内分布を検討し、さらに生体カルシウム代謝と関係の深い生理化学的性質について二三検討を加えた。

1. Greenwood-Hunterらの方法によりヨウ素化した ^{131}I - α 因子を3匹一群の雄家兔に $2.36 \times 10^8 \text{ cpm} / 4 \text{ mg}$ 耳静脈内投与後30分と3時間における各臓器への放射活性の分布をしらべた結果、甲状腺、脾臓、肝臓に多くの放射活性が分布し、甲状腺、下垂体、耳下腺、顎下腺など血清カルシウム代謝と関係の深い臓器において放射活性のretention timeが長いことを認めた。

2. 血清無機リンは血清カルシウムレベルと密接に関係することが知られているが、 α 因子により投与後4時間で増加の傾向を示した。また骨カルシウム代謝と関係の深い血清アルカリフォスファターゼ活性について検討したが α 因子による影響はみられなかった。

3. 血中クエン酸は血清カルシウム調節の主役をなす副甲状腺により変化し、組織細胞においてはカルシウムは多くクエン酸などの有機酸塩として存在する。またS. Natelsonらにより発見された豚下垂体由来の血清カルシウム低下作用物質が家兔において血中クエン酸を増加させるという。そこで α 因子の血中クエン酸におよぼす影響をしらべた所、 α 因子投与後2時間で血中クエン酸は著明に増加した。

4. α 因子の腎機能に対する作用、また血清カルシウム低下が結果的に尿中カルシウムにどのような変動をもたらすか、を検討するため α 因子投与後24時間尿中排泄カルシウム量を測定した。その結果、総排泄カルシウム量は α 因子により抑制されることを認めた。

α 因子の菌体からの由来

免疫学的に α 因子の菌体からの由来を明らかにするためB. subtilis Kの増殖型菌体をリゾチーム処理し、C. Weibleの方法によりcell wall, cytoplasmおよびghostの各subcellular fractionを調整し、各fractionの家兔抗血清と α 因子とのゲル内沈降反応を行なった。その結果 α 因子はcytoplasm fractionの抗血清との沈降帯をつくり α 因子は増殖型菌体のcytoplasmに由来することを明らかにした。また各subcellular fractionについて血清カルシウム低下効力をしらべた結果cytoplasm fractionにのみその活性が認められ、生理活性の点からも α 因子がcytoplasmに由来することを裏付けた。

〔結 論〕

1. 9種のBacillus属細菌の培養濾液について生理活性スクリーニングを行ない家兔血清カルシウム低下性物質、ラット子宮収縮物質、ガマ心臓機能促進性物質などが得られることを認めた。

2. Bacillus subtilis Kより家兔血清カルシウム低下性物質を精製単離した。

3. 本物質は分子量115,000で蛋白質62.2%、脂質33.6%からなるリポ蛋白質でN末端アミノ酸はロイシ

ン、C末端アミノ酸はゼリンである。

4. 本物質は0.5mg / kg耳静脈内投与後6～7時間で家兔血清カルシウム値を9.7%低下させる。また投与後2時間で血中クエン酸を著明に増加させる。

5. 本物質は免疫学的に*B. subtilis* Kの増殖型菌体のcytoplasmに由来することを明らかにした。

論文の審査結果の要旨

Bacillus 属細菌の培養濾液より、家兔血清Ca低下性物質、ラット子宮収縮物質、ガンマ心臓機能促進性物質などをそれぞれ精製単離した。特に*Bacillus subtilis* Kより低下性物質を単一に取り出し、化学構造、生理化学的性質に検討を加えた。よって本論文が、薬学博士としての価値があるものと認める。