



Title	界面活性剤と細胞壁溶解酵素との併用によるA群化膿レンサ球菌M蛋白質の分離
Author(s)	難波, 和之
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32251
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)	難 波 和 之
学 位 の 種 類	歯 学 博 士
学 位 記 番 号	第 4 4 4 8 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 12 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	界面活性剤と細胞壁溶解酵素との併用による A 群化膿レンサ球菌 M 蛋白質の分離
論文審査委員	(主査) 教 授 作 田 正 義 (副査) 教 授 小 谷 尚 三 教 授 鈴木不二男 助教授 下 野 勉 講 師 村 山 洋 二

論 文 内 容 の 要 旨

きわめて多彩な化膿疾患を惹起するばかりでなく、リウマチ熱や急性糸球体腎炎等の非化膿性続発症を誘発する *Streptococcus pyogenes* (A 群化膿レンサ球菌) の最も重要なビルレンス因子は、菌体表層に局在し、抗食菌作用を示す M 蛋白質である。見方を変えれば型特異の感染防御抗原であるこの M 蛋白質の化学的、生物学的あるいは免疫学的特性、ならびにこれら特性の相互の関係や、菌体表層における存在の様態については、現在なお不明の部分が多い。これは、M 蛋白質をその諸特性を大きく損うことなく、効率よく分離、精製するすぐれた方法が未だに確立されていないことによる。

この研究では、M 蛋白質をできるだけ本来の特性を損うことなく分離することを目標に、先ず菌体をガラスビーズと磨砕して得た破壊菌液から分離した粗細胞壁画分を、通常行なわれるプロテアーゼ処理によってではなく、界面活性剤で処理して精製し、次にこの精製細胞壁にプロテアーゼを含まないエンド-N-アセチルムラミダーゼ (M-1 酵素) を作用させ、得られた純化細胞壁の溶解物より M 蛋白質を分離することをこころみた。得られた結果は、次のように要約される。

1. *S. pyogenes* の 6 型菌 (S 43/100 株) および 12 型菌 (T 12/43/2 株) の Todd-Hewitt プロス培養菌を Braun のセル ホモジナイザーで破壊し、破壊菌液を分画遠心して粗細胞壁を得た。この標品を 1% Triton X-100, ついで 0.2% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) により、室温で比較的短時間、抽出処理した。このようにして得た Triton 単独、および Triton ついで SDS (Triton/SDS) 処理細胞壁標品について、アミノ酸・アミノ糖分析を行なったところ、プロテアーゼ消化による通常の方法で純化した細胞壁では微量にしか検出されないペプチドグリカン構成アミノ酸 (アラニン, グルタミン酸およびリジン) 以外のアミノ酸が、前者では相当量、後者にも無視できない量で存在することが

認められた。すなわち Triton について SDS による処理では除去できない、恐らくはペプチドグリカンに化学結合した蛋白質成分が、供試 *S. pyogenes* の細胞壁に存在することが示唆された。

2. Triton/SDS 処理細胞壁に、ペプチドグリカンのグリカン部を加水分解する *Streptomyces globisporus* が作るエンド-N-アセチルムラミダーゼ (M-1 酵素, 大日本製薬総合研, 横川, 河田博士より恵与された) を作用させた。得られた溶解物には、間接殺菌テストにより、同型の抗 *S. pyogenes* 加熱死菌家兔免疫血清のオプソニン作用を中和する抗オプソニン因子の存在が確認された。ちなみに Triton/SDS 処理細胞壁の M-1 酵素による溶解物は、同型の抗 *S. pyogenes* 免疫血清との寒天ゲル内沈降反応において 4—5 本の沈降線を与え、うち 2 本は、6 型菌および 12 型菌の Lancefield 法による塩酸抽出物が示す沈降線のうち 2 本と融合するのが観察された。またこれらの沈降線を与える抗原は、いずれも、トリプシン処理により抗原性を失った。

3. Triton/SDS 処理細胞壁の酵素溶解物中の抗オプソニン活性抗原は、硫酸塩析により 50—80% 飽和画分に濃縮された。この画分を CM-32 カラムにかけ、先ず 0.01 M 磷酸塩緩衝液 (pH 4.5) についてこの緩衝液に 1 M 食塩を加えたもの、最後に 1 M 磷酸塩緩衝液 (pH 8.0) により段階的溶出を行なった。溶出各フラクションを、OD₂₇₈ を指標としてプールして得た 3 つ (6 型菌) および 5 つ (12 型菌) のピーク画分のうち、1 M 食塩加 0.01 M 磷酸塩緩衝液で溶出される画分 (CM-II) に、明確な抗オプソニン活性が認められた。この CM-II 画分を、DE-32 カラムを用い、食塩の直線濃度勾配法により溶出を行なって分画したところ、6 型および 12 型のいずれについても、得られた 4 つのピーク画分のうちの 2 画分が抗オプソニン作用を示すことがわかった。

4. 6 型菌および 12 型菌の Triton/SDS 処理細胞壁の M-1 酵素による溶解物および溶解物より分離した CM-II 画分は、いずれも同型の *S. pyogenes* 免疫血清のオプソニン作用を中和するが、M 型を異にする *S. pyogenes* に対する免疫血清のオプソニン作用は中和せず、すなわち M 血清型を反映する型特異性を示した。また寒天ゲル内沈降反応においても、6 型菌および 12 型菌の CM-II 画分が対応する抗 M 蛋白質血清との間で生じる沈降線は、互いに交叉し、両画分に共通する抗原性物質は認められなかった。

5. 6 型菌および 12 型菌の粗細胞壁の Triton あるいは Triton/SDS による抽出画分は、同型の抗 *S. pyogenes* 血清との寒天ゲル内沈降反応において、それぞれ 2 本ずつの沈降線を与えた。しかしこれらの沈降線を与える抗原はトリプシンによっては破壊されず、かつこれらの沈降線は、明確に抗オプソニン活性を有する Triton/SDS 処理細胞壁の M-1 酵素溶解物の示す沈降線とは融合しなかった。すなわち粗細胞壁画分の Triton あるいは / および SDS 抽出物には、少なくとも沈降反応によって検知できる M 蛋白質は存在しないことが示された。

論文の審査結果の要旨

この研究は、医学細菌学上最も重要な菌種の一つである *Streptococcus pyogenes* の細胞表層に局

在する抗食作用性のピルレンス因子であり、かつ型特異の防御抗原であるM蛋白質の新しい調製法に関するものである。すなわちこの研究の結果、プロテアーゼ消化を行うことなく、界面活性剤処理により精製した細胞壁に、プロテアーゼを含まないエンド-N-アセチルムラミダーゼ（M—1酵素）を作用させ、結合の相手であるペプチドグリカンを解体させることにより、M蛋白質を可溶化するという独自の新しい方法が確立された。

この方法は、*S. pyogenes*に限らず、適当な調製法がないために研究が遅れている他の細菌種の細胞壁に固有な蛋白質成分についても、これらをその本来の化学的ないしは生物学的特性を大きく損うことなく、分離することを可能にすると考えられる。

したがって、難波和之君の業績は、基礎および応用の両面からみて価値の高いものであり、学位請求に値する優れた研究と認める。