

氏 名 伊 藤 政 志

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 3 7 年 3 月 2 3 日

学 位 授 与 の 根 拠 法 規 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 の 名 称 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
内 科 学 系

学 位 論 文 題 目 放 線 菌 の 産 生 す る 蛋 白 分 解 酵 素 に つ い て
第 I 報 : 細 胞 毒 と し て 得 ら れ た 5 種
標 本 の 精 製 と そ の 生 物 学 的 諸 性 状 に
つ い て
第 II 報 : 放 射 菌 プ ロ テ ア ー ゼ の 分 布 に つ い て

指 導 教 官 東 北 大 学 教 授 中 村 隆

論 文 審 査 委 員 東 北 大 学 教 授 中 村 隆

東 北 大 学 教 授 石 田 名 香 雄

東 北 大 学 教 授 古 賀 良 彦

伊藤政志提出論文内容要旨

我々は制癌物質を見出す目的で多くの放線菌培養濾液を HeLa 細胞を用いてスクリーニングし、Cytotoxic effect (CTE) を有する濾液が可成多く、その内相当数が非透析性である事を知つた。夫等高分子と考えられる因子の中で CTE と菌株の分類学上の位置の異なるもの 5 つを選んで CTE を指標にして精製を試みた。結果として得られた精製物にはエールリツヒ腹水癌に対する制癌効果は見出し得なかつたが、注射マウスの腹水中に多数の赤血球が出現し、又此等物質をモルモット皮内に注射すると著明な出血壊死の起る事を知つた。精製はエタノール沈降法や分画電気泳動法 (ZEP) に従つたが、得られた物質は全てトリクロール酢酸で沈澱し、紫外部で 280m μ に吸収を示し、超遠心分析法では略々単一で S_{20} は 3.7 から 0.8 迄にわたり、PH 7.1 の磷酸緩衝液を用いた ZEP 上では陰極に移動する物 4 つと陰極に向う物一つとに大別された。此等精製物の HeLa 細胞に対する CTE も、モルモット皮内注射による出血壊死も共に物質投与後短時間の内に起る事、壊死部の組織所見が精製コラゲナーゼのそれに類似する事、又此等物質が PH 2 加熱で速にその生物学的活性を失う事等から此等が酵素である事が示唆された。そこで著者が新たに考案したゼラチン及びカゼインを基質とする寒天パルプ法によるプロテアーゼ測定法を用い測定した所、此等細胞毒はプロテアーゼである事が分つた。続いて此の寒天パルプ法を用い 250 種の放線菌濾液に就て調べた所、約半数の菌株がプロテアーゼを産生している事を認めた。之等の内プロテアーゼ活性の強い物に就いては濾紙電気泳動、ペーパークロマトを試み若干の分類をした。

実 験 成 績

(I) こゝでは HeLa 細胞に CTE を示す 5 種標本の内 408 物質の精製に就て述べる。2% 澱粉を含むキナコ培地で、本放線菌を振盪培養すると 96 時間 (PH 7.0) で HeLa CTE は最高に達する。此を $1/20$ 迄濃縮し 9 倍量のエタノールを加え沈澱を一旦凍結乾燥し粗物質とする。粗物質に就て、PH 7.1 磷酸緩衝液で洗滌した澱粉を支持体として、4°C、 $3mA/cm^2$ 、15 時間の ZEP を試みた。20 番に原点をとると陰極側の 22 番に HeLa CTE のピークが現れモルモット皮内出血壊死因子及び Folin 反応のピークと一致した。此分画を更に硫酸沈降すると紫外部に 280m μ の特異吸収が現れ、超遠心分析上単一で S_{20} は 3.4 であつた。他の 4 種類の物質の内、408 物質と同種の *St. diastatochromogenes* からとれた因子

と *St. lavendule* に属する 2 菌株から得られた因子は、ZEP で塩基性の性質を示し又同様の生物学的活性を示すが、*St. cellulosa* に属する一つの菌株から得た因子は、酸性物質であつた。408 粗物質を家兎に 3 日間隔で 5 回にわたり静注する事により抗体価 4 倍の免疫血清が得られたが、この免疫血清を用い、Ouchterlony 法で 5 精製物の抗原分析を行うと前述の 4 つには交叉する線を認めたが、*St. Cellulosa* のそれだけは交叉しなかつた。408 免疫血清で抗原稀釈による中和試験を試みた所、抗原 $1 \text{ } \mu\text{g}$ 迄生物学的活性は中和された。ZEP で精製された分画の凍結乾燥物を最小 $1 \text{ } \mu\text{g} / 0.2 \text{ ml}$ モルモツト皮内に注射すると 1 ~ 2 時間で著明な出血壊死が認められ、組織所見では中心の壊死部に膠原繊維の変性が著るしい。猶 $1 \sim 10 \text{ } \mu\text{g}$ の範囲で注射量の対数と壊死部直径の間には直線の関係が成立する。HeLa 細胞に対しては 408 粗物質では 250 γ 、硫酸沈降と ZEP を併用した物では 60 γ 迄 CTE を示す。細胞は細長化と細胞質の顆粒変化が目立ち、物質を加えてから 2 ~ 3 時間という短時間に出現し直ちに膜様脱落が起る。之等生物学的活性因子は易熱性で 100 $^{\circ}\text{C}$ 3 分で完全にこわれ、56 $^{\circ}\text{C}$ でも PH 2 では破壊が著るしい。(II) プロテアーゼの力価測定は、著者の考案によるもので、緩衝液を入れた 3%ゼラチン、或はカゼイン溶液に 1.5%寒天を混ぜ寒天平板を作り、拡散法で行つた。37 $^{\circ}\text{C}$ 12 時間パルプ片に浸ませた酵素液を上記基準に作用させた後、現像はゼラチン板上に飽和硫酸を重畳して行つた。Casein-Folin法の 1 単位が寒天平板法の 2 単位に相当し、酵素濃度の対数とパルプ周囲に現れた透明帯の直径との間には直線的な関係が示された。そこで次に 408 物質を此の酵素活性を指標に精製を進める事にした。結晶化には到らなかつたが、途中の精製段階でも Duolite C-10 使用のクロマトでも HeLa に対する CTE 因子と酵素活性とは全く同一の態度を取る事が判明した。更に両活性とも微量の Ca^{++} により著明に保護される事が分つた。放線菌 250 種の培養濾液に就て、この方法を用いて酵素活性を調べた所、半数以上の菌株がプロテアーゼを産生していた。参考に用いた標本 NBO トリプシン (1-300)、ペルナーゼ、プロナーゼ、コラゲナーゼ、及び 408 物質はいづれもカゼインよりもゼラチンにより強い活性を示したが、放線菌の中には少数ではあるが、カゼインのみに活性を示す特異なプロテアーゼが見出された。250 種の内 100 種に就て更に HeLa CTE を調べた所、プロテアーゼ活性を示す大部分が HeLa にも該 CTE を示した。プロテアーゼ活性の強いもの 40 種に就て、PH 7.1 の磷酸緩衝液で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、 0.45 mA/cm 17 分間通電の濾紙電気泳動を試みた所、陰極に向うものが 60%認められた。同様の 50 種に就て $\text{M}/20$ 磷酸緩衝液とメタノール (65:35) に少量の塩を加えた溶媒でペーパークロマトを試み参考酵素と対比させて三つの型に分類した。

考察並びに結論

非病原性として知られる好気性放線菌の培養濾液中には可成広く HeLa に対し細胞変性効果を示す高分子を含み、しかも菌体外毒素としての性質を示す。5種の菌株の産生する物質を精製したがいずれも HeLa に対し膜様剝離を示し、モルモット皮内注射で出血壊死を短時間内に起す。 S_{20} は 0.8~3.7 で 280m μ に極大吸収を示し、Folin 反応陽性で、エタノール、硫酸で沈澱する。PH 7.1 の ZEP では菌株に応じ陽極に向うものと陰極に泳動するものがある。新たに考案した寒天パルプ法によりプロテアーゼ検定を行つた所、之等菌体外毒素はプロテアーゼであり、微量の Ca^{++} により保護された。土壌より得られる放線菌の半数は此種のプロテアーゼを産生し、その60%はPH 7.1の濾紙電気泳動で塩基性の性質を示す。ペーパークロマト的には三つの型に分けられる。猶之等プロテアーゼは今後放線菌の分類学に利用され、更に抗寄生虫剤として利用される可能性を含んでいる。

審 査 結 果 の 要 旨

著者は制癌物質を探索する目的で各種放線菌濾液の HeLa 細胞に対する細胞変性効果を追求中、多くの放線菌が HeLa の細胞脱落を示す因子を産生している事を見出し、かつそれらの因子が何れも非透析性である事を明かにしたのち、代表的な 5 物質について主として分域電気泳動法により精製を試みたところ、何れも超遠心の場で単一な物質として得られ、 S_{20} は 0.8 より 5.7 に及んでいる。内 4 種類は塩基性物質、他のひとつは酸性物質で、その本態は Protease である事が Gelatin 及 Casein を基質として明かにしている。なおこれら物質は何れもモルモット皮内に注射すると著明な出血壊死を惹起し、菌体外毒素の性質を有する。即ち免疫原として抗体を産生するので、寒天ゲル内沈降反応を用いこれら protease の抗原分析を行つたところ、分類学的に同種の放線菌の産生する protease は血清学的に同一であるが、異種のものとは交叉しない事を明かにし、放線菌分類学に応用し得る新手段であることを示唆している。

その他著者は簡易にこれら濾液中に含まれる protease を証明する pulp disc diffusion assay を考案し、これら protease のペーパークロマトを行う事により protease の分類も行つている。

protease の工業的、医薬的利用の注目されている今日、この基礎的な実験結果の利用度は高いものと考えられる。