



| | |
|------------------|---|
| Title | 細菌毒素の本態に関する生化学的研究 : ゼフテリア毒素の純化とその組成 |
| Author(s) | 伊藤, 時哉; ITO, T. |
| Citation | 獣醫學研究, 1(2), 67-76 |
| Issue Date | 1953-03 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/jjvr.1.2.67 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/11347 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | KJ00000104918.pdf |



細菌毒素の本態に關する生化學的研究

デフテリア毒素の純化とその組成

伊藤時哉

(北海道大學獸醫學部生化學教室)

I. 緒言

Clostridium tetani, *Cl. botulinum*, *Cl. welchii*, *Corynebacterium diphtheriae* 等が宿主の体内や培地中に分泌するいわゆる体外毒素程毒性の劇烈なものは自然界に例がない。純デフテリア毒素に換算して 0.3 γ で体重 10 kg の兒童が死んだ例さえある。¹⁾

これら毒素に關し究明さるべき主要な點は

- 純粹分離とその化學構造の決定
- 毒性、抗原性と構造との關係
- 宿主生体に對する直接の作用
- 產生の條件と機構等であろう。

最近破傷風毒素,²⁾ Botulinus A 毒素^{3,4)} が結晶蛋白として、又 Botulinus B 毒素 (未結晶化) も殆ど純粹な蛋白の形で得られ、それぞれの分子量は約 67,000,²⁾ 900,000,^{3,4)} 60,000⁵⁾ と報告された。デフテリア毒素の純化は、先ず EATON⁶⁾ によつて試みられ、1937 年 PAPPENHEIMER⁷⁾ が純度 95~98% のもの、1950 年 AGNER⁸⁾ が 98~99% のもの、又 1952 年 LEPOW 等⁹⁾ が殆ど純粹と思われるものを報じているが現在尙結晶化には成功していない。

著者は電氣泳動的にも定量的絮狀沈降反應及び寒天ゲル中の抗原抗体反應に於ても純粹な状態に本毒素を分離し同様にして得た toxoid との間に組成の比較を試みた (一部既報)。¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾

II. 材料

a. 現在最も強力な毒素產生株とされている *Corynebacterium diphtheriae* P. W. No. 8 TORONTO 株を牛肉 papain 消化液及び肉汁を主とする培地に¹³⁾ 34°C, 9 日間培養後菌体を除去した粗毒素液

(Lf 90~100 u/cc, 正常モルモットに對して M.L.D 約 0.0001 cc).

b. 同様な粗毒素液に 0.5% の割合に formalin を加えて pH 8.0, 37°C に 1 月間靜置し toxoid 化したもの¹⁴⁾ (Lf 90~100 u/cc 成家兎に對し 2~3 cc で無毒)。

III. 純化

粗毒素液及び toxoid 液それぞれ 1 回量 10 l に細谷¹⁾ に従つて 50 g/dl の ZnCl₂ 液 100 cc を少量づつ滴加しよく振つて重い沈澱を得、翌日蒸水で反復傾しやし遠心して沈澱を集め 40% Na₂HPO₄ を 100 cc. 加え pH 8.0, 37°C で溶かし新に生ずる磷酸亞鉛の沈澱を除き濃赤褐色の上清を流水に對し、72 hrs. 透析し (毒素 toxoid の收量共に殆ど 100% 純度約 35%; Photo. a …… 以上細谷法¹⁾ による) 次にこの液に pH 8.0 の飽和硫安液を加え 1/3 飽和とし生ずる沈澱を除きさらに飽和硫安液を加え (50% 飽和頃から濁り始める) 60% 飽和とし沈澱を集めて水に溶かし、さらに 2 回この鹽析を反復した後毒素液の場合直ちに稀醋酸を滴加して pH 4.1 とし、生ずる沈澱を集め水を加え N/10NaOH で pH 11 とし、不溶部を除きさらにこの操作を 2~3 回反復し pH 4.1 の上清が無色になつたら沈澱を低温で真空乾燥し赤褐色無定形粉末 0.4 g を得た (含水量 17~19%)。

toxoid の場合鹽析後透析して電解質を除いた後 pH 4.6 とし沈澱を集め pH 11 の不溶部を除き、この操作を反復し粉末約 0.35 g を得た。

かくして得た毒素 toxoid 1 g の Lf はそれぞれ約 370,000 u 及び 350,000 u (無水物換算) で收量は約 15% であつた。

IV. 毒 力

a. 純化毒素

0.5 mg を滅菌生理食鹽水 10 cc. に溶かし、その 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002, 0.00002 cc. 相當量を体重 280 g 内外の正常モルモット 1 群 5 頭づつにそれぞれ皮内注射してその生死を調べた。

| 純毒量 (γ) | 生死 | 死亡するまでの日數 |
|---------|----|-----------|
| 10 | 死 | 1 |
| 1 | 死 | 1 |
| 0.1 | 死 | 2 |
| 0.01 | 死 | 2 |
| 0.001 | 生* | |

* 局所に necrosis を生ずる。

b. 純化 toxoid

0.1% 液 1 cc. づつを連続 3 日間 2.5~3.0 kg の正常家兎に皮内注射したが何ら變化なく 3 週間後 1.6 cc. を再注射した處局所にアレルギー的な發赤を認めただけであつた (toxoid 量合計 4.6 mg)。

従來の報告¹⁵⁾に基づけば本純毒のモルモットに對する M. L. D. は 0.027 γ である。

V. 電 氣 泳 動

(a) 細谷法によつて得た濃縮毒素, (b) 純化毒素, (c) 純化 toxoid それぞれ 0.1 g を Tiselius の緩衝液 (0.002 M NaH_2PO_4 & 0.033 M Na_2HPO_4 ; pH 8.0, μ 0.1) に溶かし同緩衝液に對し 72 hrs. 透析後不溶部を除き Tiselius の装置 (長脚セル使用) により 4°C で測定を行つた。(a) は多分菌体蛋白と思われる易動度の高いもの, albumin, alpha-, beta-, 及び gamma-globulin の各峰を示した (Photo. a) のに反して (b) と (c) はそれぞれ單一な峰 (Photo. b & c) を示し、本泳動條件に於ては電氣泳動的に純粹であることを認めた。易動度から定めると beta-globulin に屬する。

VI. 定量的絮狀沈降反應

それぞれ 7.75 mg の純毒 (Lf 2,300 u) 及び toxoid (Lf 2,200 u) を少量の生食に完全に溶かし、これらに高力價デフテリテ免疫馬血清から精製した pseudoglobulin 液 (Lf 3,600 u/cc., 蛋白 72.3 mg/cc. 主に beta₂-globulin からなり全蛋白中 49.8% が抗毒

素である (Photo. d) をそれぞれ豫め Ramon の方法で求めた中和最適量 0.64 cc. (N 7.39 mg) 或は 0.611 cc. (N 7.04 mg) 加え (全体の N 量 8.39 及び 7.94 mg) 40°C に一夜靜置し、特異結合沈澱を完結させ、遠心して集めよく洗滌した後 Kjeldahl 法により N 量を求め各々 4.69 及び 4.49 mg を得、豫め求めた純抗原毒側の N 即ち 3.68 及び 3.52 mg (1 Lf が 0.0016 mg¹⁶⁾) を減じ、純毒素, toxoid 1 Lf の N 量を算出し、何れも 0.00044 mg を得た。これは PAPPENHEIMER,⁷⁾ WADSWORTH 等,¹⁷⁾ PILLEMER 等¹⁸⁾ が高純度のもので得た値とほぼ一致する。

さらに特異結合沈澱を分離した後の上清の N 量を求め各々 3.70 及び 3.45 mg を得た。これは上清に pseudoglobulin 液中の非抗毒素蛋白以外の N 質物が全然來なかつたことを示している。

VII. ゲル中の抗原抗体反應

最近蛋白の純粹性を確める方法としてゲル中の抗原抗体反應を利用することが OUDIN,¹⁹⁾ OUCHTERLONY²⁰⁾ 等により提唱され、その優秀性が MUNOZ & BECKER,²¹⁾ POPE,²²⁾ BOWEN²³⁾ 等により證明されている。著者もこの方法を試みた。

清潔な中驗管に Photo. d の pseudoglobulin 液 5 cc. (Lf 18,000 u) を入れ精製寒天を約 3% 加えて (pH 7.5) 固め、その上に 3% の寒天液 5 cc. を重ねて固め、さらに純毒 40 mg (Lf ca. 15,000 u) を生食 3 cc. に溶かした液を注加し、無菌的に室温に 2~3 週間置いた處、毒素、抗毒素が中段の寒天層に漸次擴散結合し、寫眞の通り均一な白濁相を生じた。細谷法により濃縮した粗毒の場合雜多な異系の生成を見た。

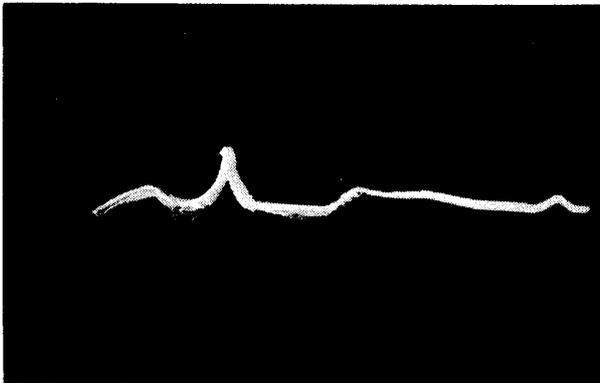
VIII. 純化物と抗毒素の特異結合物の電氣泳動

純毒 toxoid 液に各中和最適量の抗毒素液 (Photo. d) を加え生じた結合沈澱を集め充分洗滌後少量の稀 NaOH に溶かし pH 8.0 の磷酸鹽緩衝液に對し 72hrs. 透析後 (V) と同様に測定し、このものが電氣泳動的に均質なことを知つた。(Photo. e & f)。

さらにこの結合物に市販“pure pepsin”から精製した pepsin を結合蛋白の1%加え pH 4.4, 37°C 16 hrs. 作用させ吸着剤を用いて酵素を除去, 透析後同様に測定し, ここに残存する蛋白の大部分が γ -globulin であり (Photo. g & h) 尙このものにつき Ramon の flocculation test を試みた結果これは大

Photo. a. Electrophoretic pattern of Diphtherial Toxin uncompletely purified according to Hosoya¹⁾

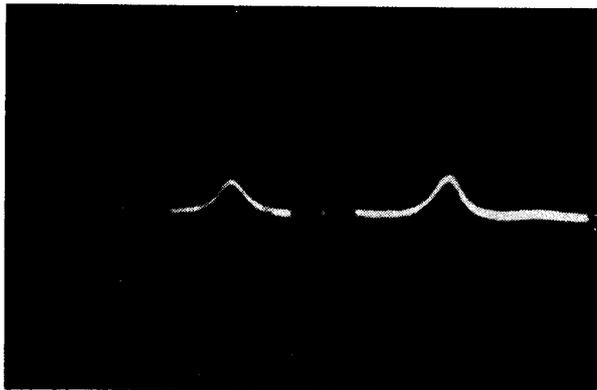
Lf 2,100 u/cc.
Toxic Protein/Total Protein = ca. 0.35
F = 4 Volts/sec. t = 2 hrs.



Ascending pattern

Photo. b. Pure diphtherial Toxin

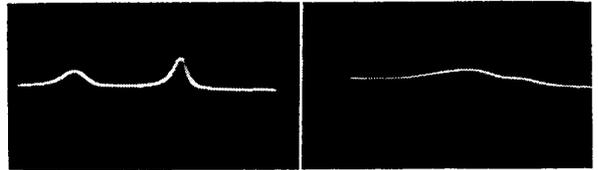
Lf ca. 370,000 u/g
Protein 0.53% in phosphate buffer
F = 4.3 Volts/sec. t = 2 hrs.
 $-u = 2.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Volt}/\text{sec.}$



Ascend. patt. Descend. patt.

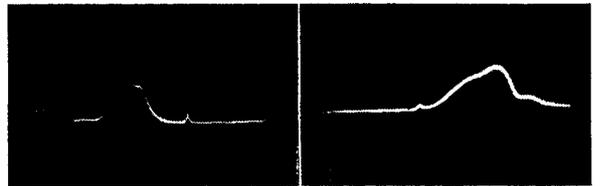
部分が分割細小抗毒素 (1 Lf が 0.0009~0.0012 mg. N) であり, 毒素, toxoid は pepsin により分解され盡されていることを知つた。これは本毒素が protease により容易に破壊されるとの報告²⁴⁾及びこのような際細小抗毒素 (M. W. 98,000~113,000, 易動度から判断すると γ -globulin) を生ずるとの報

Photo. c. Pure diphtherial Toxoid
Lf ca. 350,000 u/g
Protein 0.75% in phosphate buffer
F = 4.5 Volts/sec. t = 3 hrs.
 $-u = 3.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Volt}/\text{sec.}$



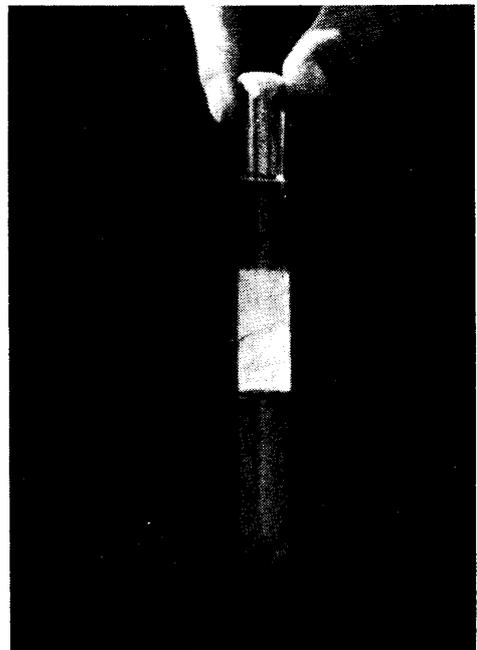
Ascend. patt. Descend. patt.

Photo. d. Purified pseudoglobulin from hyper-immunized diphtherial equine serum



Ascend. patt. Descend. patt.

Pure diphtherial Toxin-Antitoxin Flocculation in Agar Gel



告²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾に一致する。

IX. 純化物の紫外線吸収

純毒 toxoid を pH 9.0 の生食に N 1 mg/cc. の濃度に溶かし, Hilger の装置により各 2 cc. の紫外線部吸収スペクトルを撮影し, 吸収曲線を得た (Fig. 1)。

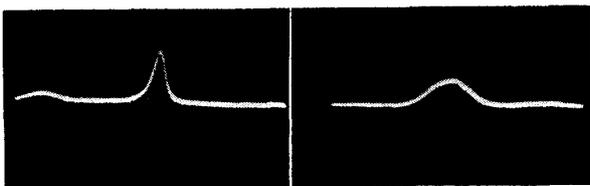
兩者共蛋白分子中の tyrosine-, phenylalanine-, tryptophane- 残基の二重結合に起因する波長 2,800 Å 附近に於ける吸収の極大を認めたが、兩者間に量的な差異は殆ど認められなかつた。

X. 純化物の性状

| | 毒素 | toxoid |
|----------------------|--------|--------|
| 失活温度 (pH 7.5 に於ける) C | 55~57° | 55~57° |
| 凝固温度 (") C | 58~60° | 58~60° |
| 等電點 | pH 4.1 | pH 4.6 |

Photo. e. Diphtherial Toxin-Antitoxin Flockes dissolved with NaOH at pH 12.

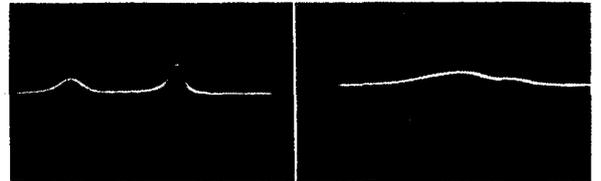
Protein 1.36% in phosphate buffer (pH 8.0, $\mu=0.1$)
 F = 4.3 Volts/sec. t = hrs.
 -u = $40 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{Volt}/\text{sec}.$



Ascend. patt. Descend. patt.

Photo. f. Diphtherial Toxoid-Antitoxin Flockes dissolved with NaOH at pH 12

Protein 0.76% in phosphate buffer (as above)
 F = 4.4 Volts/sec. t = 3 hrs.
 -u = $3.7 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{Volt}/\text{sec}.$



Ascend. patt. Descend. patt.

Photo. g. Diphtherial Toxin-Antitoxin Flockes digested with pepsin.

Protein 0.58% in phosphate buffer (pH 8.0, $\mu=0.1$)
 F = 4.1 Volts/sec. t = 11,700 sec.
 -u = $1.2 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{Volt}/\text{sec}.$

and

= 4.2 × "



Ascend. patt. Descend. patt.

Fig. 1. Ultra-violet ray absorption curves of pure diphtherial Toxin and Toxoid.

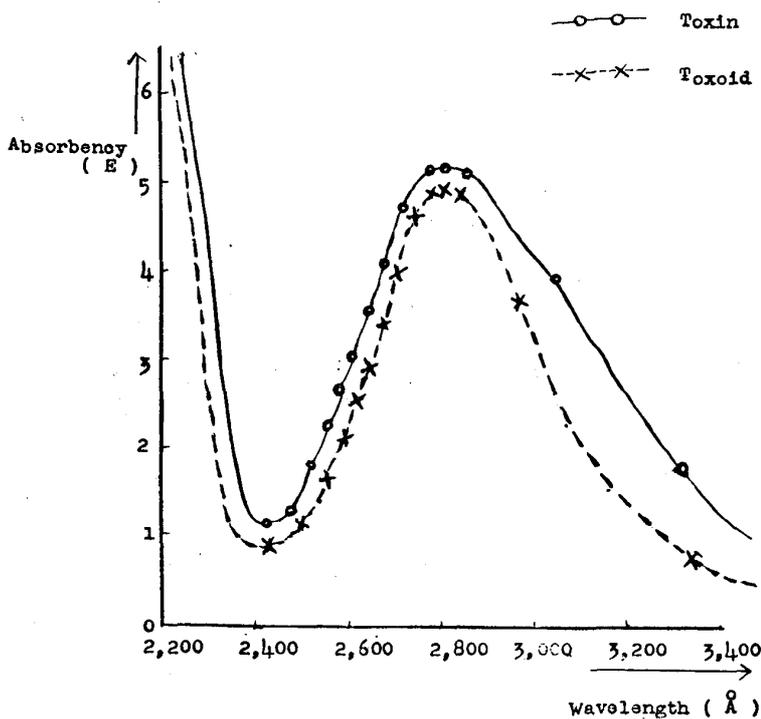
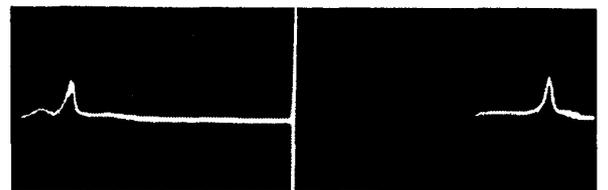


Photo. h. Diphtherial Toxoid-Antitoxin Flockes digested with pepsin.

Protein 0.63% in phosphate buffer (as above)

F = 4.2 Volts/sec. t = 9,000 sec.
 -u = $1.5 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{Volt}/\text{sec}.$



Ascend. patt. Descend. patt.

XI. 純化物の組成 (無水物) %

| | 毒素 | Toxoid |
|-----------------|---------|---------|
| Total N | 15.6 | 16.3 |
| Amino N | 0.897 | 0.29 |
| Amino N/Total N | 5.75 | 1.80 |
| Sulphur | 1.4 | 1.2 |
| Phosphorus | ca. 0.1 | ca. 0.1 |
| Reducing Sugar | 0.266 | 0.19 |

| | 毒素 | Toxoid |
|--------------------|----------|-----------|
| Fat & Fatty Acids | 4.55 | 2.95 |
| Ash | 0.1 | 0.06 |
| Iron* | ca. 0.01 | ca. 0.005 |
| R.N.A. or D.N.A.** | — | — |
| Porphyrin § | — | — |

* KCNS を用いる微量比色法による。

** Bracht の pyronine, methylgreen 染色による。

§ 醋酸々性でエーテル抽出後比色法による。

XII. 純毒の N 分布

純毒無水物 0.2 g (N 0.0312 g) に 36% HCl 2 cc. を加えて 16 hrs. 煮沸して完全に加水分解した後、減壓で濃縮し Van Slyke 法によつて定量した。

| | % |
|------------------|------|
| Humin-N | 2.3 |
| Amide-N | 5.7 |
| Arginine-N | 4.7 |
| Cystine-N | 2.9 |
| Histidine-N | 2.2 |
| Lysine-N | 6.7 |
| Monoamino-N | 53.0 |
| Mono-non-amino-N | 6.3 |
| Total | 83.8 |

XIIV. 純化物の蛋白呈色反應

| | 毒素 | Toxoid |
|--------------------|-----|--------|
| Biuret reaction | +++ | +++ |
| Xanthoprotein " | +++ | +++ |
| MILLON's " | +++ | — |
| ADAMKIEWICZ's " | ++ | ++ |
| NEUBAUER-RHODE's " | ++ | ++ |
| LIEBERMANN's " | ++ | ++ |
| SAKAGUCHI's " | +++ | +++ |
| PAULI's " | +++ | +++ |
| Sulphur " | +++ | +++ |
| Na-nitroprusside " | — | — |
| p-Chinone " | ++ | ++ |
| Ninhydrine " | +++ | +++ |
| MOLISCH's " | +++ | +++ |
| NESSLER's " | + | + |

構成アミノ酸の paper chromatography では見出されない tryptophane が両者に認められ、純化毒素に明瞭な tyrosine が toxoid には見られない。

XIV. 純化物の HCl 加水分解液の paper chromatography

純度 90~95% の毒素及び formalin-toxoid の HCl 加水分解液の paper chromatography に関しては不完全ながら WOIWOD²⁹⁾ 等の報告がある。

著者は植竹、佐々木と共に純毒, toxoid の加水分解液について二次元 chromatography を反復した。

加水分解: (a) 純毒 15 mg に 1 N. HCl 20 倍量を加え 20 hrs. 煮沸して全毒素 N の 33% がアミノ酸になるまで分解し, (b) 純毒 15mg に 6 N. HCl 20 倍量を加え 72 hrs. 煮沸して完全にアミノ酸にまで分解し, (c) 純 toxoid 15 mg に 1 N. HCl 20 倍量を加え 20 hrs. 煮沸して完全に加水分解し, それぞれについて東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) を用い n-butanol : CH₃CO OH : H₂O = 9 : 1 : 7 及び phenol : H₂O = 4 : 1 を溶媒として上昇法によつて 23°C で 24 hrs. 及び 40 hrs. 二次元の展開を行い ninhydrine 溶液を吹きつけて発色させた。

(a) では tyrosine, lysine, proline, cystine, aspartic acid, leucine, phenylalanine 等の spots だけが認められた。

(b) では明かに異なる 20 種のアミノ酸の spots を認め (Fig. 2), (c) では tyrosine だけが全然認められなかつた。又 (b) よりも arginine, proline, cystine 等のそれが微量のようであり (Fig. 3), それ以外には両者間に何ら差異を認めることが出来なかつた。

XV. 考 察

以上の結果から本プレパレートは現在の蛋白質化学, 免疫学に於て純粹な蛋白質と判断される。これらの性質は他の研究者が種々の菌株, 培地, 精製法によつて得た精製毒素, toxoid のそれによく一致することから本毒素は限定された唯一種類の蛋白質であると考えられる。

人間等がデフテリアにかかつた際, 体に猛威を振うのは生きている菌自体ではなく, 菌が分泌

Fig. 2. Chromatogram of pure diphtherial toxin-HCl-hydrolysate

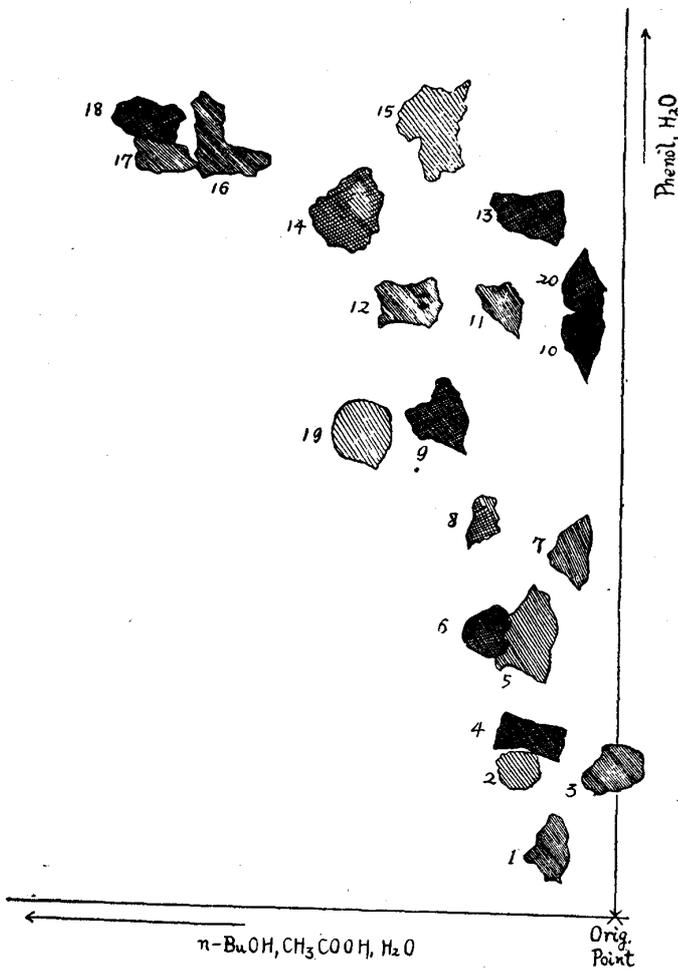
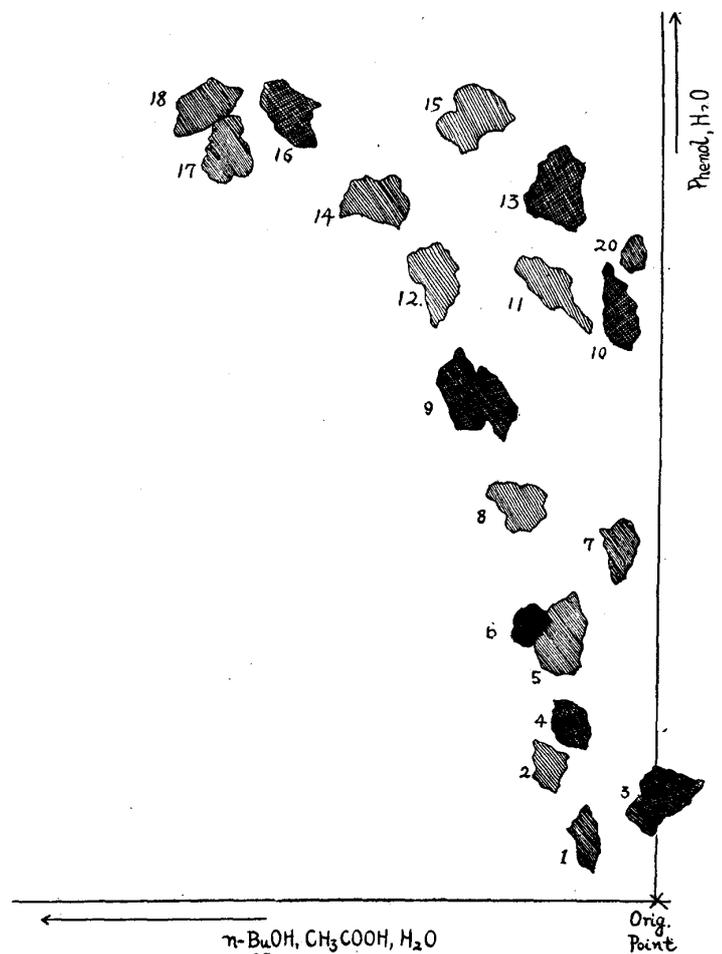


Fig. 3. Chromatogram of pure diphtherial toxoid-HCl-hydrolysate



Amino acids in Figure 2 and 3.

| | | | | | |
|-----|---------------|-----|------------|-----|--|
| No. | Amino acid | No. | Amino acid | No. | Amino acid |
| 1 | Aspartic acid | 2 | Cystine | 3 | α - ϵ -Diaminopimelic acid |
| 4 | Glutamic acid | 5 | Serine | 6 | Glycine |
| 7 | Lysine | 8 | Threonine | 9 | Alanine |
| 10 | Histidine | 11 | Oxyproline | 12 | Aminobutyric acid (α or γ) |
| 13 | Methionine | 14 | Valine | 15 | Proline |
| 16 | Phenylalanine | 17 | Leucine | 18 | Isoleucine |
| 19 | Tyrosine | 20 | Arginine | | |

する毒素であること及び toxoid はほぼ同じ抗原性を有しながら猛毒性のないことは周知の通りである (無論全然無毒とは云えないが)。

生物學的にはこのように實に明白な差異のある毒素、toxoid が共に“生きている”菌体を離れた“物質”蛋白質であるからにはその猛毒性のよつて來たる本体兩者間の本質的な相違は“物質の世界”即ち物理、化學的に究明出来る筈である。

本毒素の分子量は約 75,000 と報告されてい

る。²⁶⁾ 純 toxoid 1 Lf の N 量が毒素のそれと變らぬこと¹⁸⁾ toxoid 化に際して分子の重合も解離も見られぬこと¹⁸⁾ 等から toxoid の分子量もやはり同程度のものと考えられる。

toxoid の等電點はやや高い pH にあり且つ毒素よりも沈澱し難いことは toxoid 化に際し毒素分子表面の酸性原子團や疎水性原子團に變化が起つたことを示している。

PILLEMER 等¹⁸⁾ も報じている通り toxoid に於

ては全 N の占める % が高い。これは無 N 質構成分の減少離脱によるものと考えられる。

PAPPENHEIMER³⁰⁾ も報じている通り、toxoid 化に際してアミノ N の約 $\frac{1}{3}$ への減少を認めた。これは毒素分子表面の遊離アミノ基が毒性と密接な関係を有すると云う一般の見解を裏書する。

S の % は蛇毒、さそりの毒素等と異なつて特に多くはなく然も $S-S \rightleftharpoons SH$ 系が毒性に關係しているとは思われない。

P は僅か破傷風³¹⁾ や Botulinus A 毒素³²⁾ に大体一致し本毒素も同様核蛋白ではないと思われぬ。

脂質は Lauric acid と capric acid が主のようである(未確認)純化物をテール・アルコールで脱脂すると抗原性が減弱することからこれら脂質は單なる夾雜物とは考えられない。

0.1% の無機成分中その約 10% の Fe を見出した。培地の Fe 量と本毒素の產生、porphyrin の消長、さらに菌の増殖との間に密な關係のあることは周知の通りで PAPPENHEIMER 等³³⁾ は本毒素が本菌々体の porphyrin-Fe-蛋白恐らく Fe を含有する重要な呼吸酵素の蛋白部分であり、さらにその porphyrin-Fe-蛋白は cytochrome b であると主張している。これには異説³⁴⁾ もあるが、兎に角純化物に Fe を見出したことは本問題究明に一步接近したものである。尙高純度毒素中の Fe については、既に PAPPENHEIMER 等が見ていることを最近 MEYERHOFF³⁵⁾ が著者に傳えているが、勿論均質は純化物についてはない。

MILLON の反應により純毒に明瞭な tyrosine が toxoid に見られないことは toxoid 化により毒素分子中の tyrosine 殘基の OH 基も變化を受けていることを示し、紫外線吸収スペクトル分析の結果は二重結合が變化を受けていないことを示す。

WOIWOD 等²⁹⁾ は構成アミノ酸として各 13 及び 11 種を検出したが、著者等は各 20 及び 19 種を検出し、尙最近 WORK³⁶⁾ がデフテリア菌、各種結核菌に見出した α - ϵ -diaminopimelic acid らしいものを認めた。

さらに最も注目すべきは毒素の方が加水分解され難く、然も最初の段階に限定された種類のア

ミノ酸だけば遊離して來ること及び WOIWOD 等²⁹⁾ の報ずる通り toxoid が tyrosine を缺く事である。

現在までに結晶性体外毒素の構成アミノ酸として BÜHLER 等³²⁾ が Botulinus A 毒素に 18 種合計 115.73% を、DUNN 等³¹⁾ が破傷風毒素に 13 種(合計 79.06%) を報じている。それらの特徴は普通の蛋白とは逆に leucine より isoleucine, glutamic acid より aspartic acid (或いは asparagine) の % が高いことだけで特に毒性原子團と云うようなものは見られぬ。

高純度デフテリア毒素についてはさきに PAPPENHEIMER^{7,30)} が全 N 16.0% 及び lysine 5.3, histidine 2.4, arginine 3.8, tyrosine 9.5, tryptophane 1.4 合計 22.4% と云う不完全な報告をしているに過ぎぬ。

實に物凄い毒性を備え、然も極めて壊れ易い本毒素の現わが猛毒性の本体を分子の如何なる構造に求めたらよいのであろうか? そこに何ら特別の補缺簇を見出し得ない。BÜHLER 等³²⁾ は有毒蛋白のあり得る異常性として

1. 分子の極性の異常
2. アミノ酸の構成, 配列, 或いは分子全体の立体幾何學的配位の異常
3. 異常 peptide 結合の存在
4. 現在の分析の精度では發見不能の微量異常, 毒性原子團の存在
5. 異常に大い分子量(例えば Botulinus A 毒素)等をあげている。

毒素, toxoid 間の差異は分子全体にわたるものでないばかりか、構造の差にした處で極く僅か(1個の活性基について數 Å 程度)と思われる。

PAPPENHEIMER¹⁵⁾ が得た摩擦比 ($f/f_0 = 1.22$) からも毒素分子表面に特に凸凹があるとは思われぬ。

毒素は pH 7.5~9.5 で最も安定であるが 3~4 附近, 11 附近では短日中に、2 以下, 12 以上では急激に破壊され又熱, 光線, 酸素, 振盪, protease 等に對しても弱く formalin の他 iod, diazo 化合物, H_2O_2 , HNO_2 , ascorbic acid その他により容易に毒性を失う。

AGNER⁸⁾は或る未知の透過性物質(粗毒液, pepton, その他に存す)の存在で peroxidase と H_2O_2 により又著者等³⁷⁾は tyrosinase により toxoid 化が起ることを認めている。これは分子表面の tyrosine 残基中の活性 H 原子も毒性に關係することを示す。

FRENCH 等³⁸⁾その他によれば toxoid 化に於けるような條件の下では一般に蛋白と formalin との間の反應には複雑な二次反應を伴うものである。

PAPPENHEIMER³⁰⁾は精製毒に ketene を通すと容易に toxoid 化(acetylation)が起り遊離 NH_2 基が半減することを認め、これは lysine 残基の $\epsilon-NH_2$ 基との反應によるものと解し、更に tyrosine 残基の OH 基も acetyl 化され抗毒素との結合能を失うと述べ lysine の $\epsilon-NH_2$ 基と毒性の主役としているが著者の成績では tyrosine 残基が主役と判断される。

BROWN³⁹⁾によれば tyrosine に formalin を作用させると加水分解に安定で遊離の NH_2 基を缺き ninhydrine 反應陰性の物質が形成される。

tyrosine 自体明かに無毒で毒素分子ではこれが異常な状態に存在するものと解する他はない。

WOIWOD 等²⁹⁾は tyrosine の NH_2 基が peptide 結合以外の何か formalin に作用し易い形に存すると云う。

兎に角 tyrosine や特定残基の一部が分子表面かその附近に不安定な状態で存することが判る。これは terminal group の測定で明かになる。

NEURATH⁴⁰⁾等に従つて分子を細長い棒状廻轉楕圓体とした PAPPENHEIMER 等²⁹⁾の測定によると $a = 34 \text{ \AA}$, $b = 152 \text{ \AA}$ となる。

分子中アミノ酸(残基)の平均 M. W. を 120 とすると分子は約 600 個のアミノ酸から成ることになり、表面に 130 個並び得る筈である。tyrosine 残基が最も活性な異常な形として Fig. 4 乃至 5 のように存在すると假定すると tyrosine (9.5%)⁷⁾³⁰⁾の分子数は約 40 個で表面の約 30% を占め、これに基づく遊離 NH_2-N は分子全 N の 4.7% になる。實測値は毒素 toxoid 各 5.75, 1.80% (PAPPENHEIMER によれば 6.1, 1.9%) で toxoid 化に際し tyrosine の遊離 NH_2 基がなくなるとすると分子全 N

に對して約 4% の NH_2-N を失うことになり toxoid 化の實測値によく一致する。

岡⁴¹⁾はこのように特殊な形の残基が幾つか組になつて動物組織の必要缺くべからざる活性物質、(例えば心

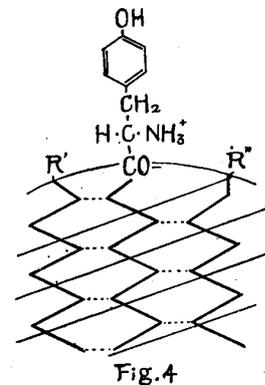


Fig. 4

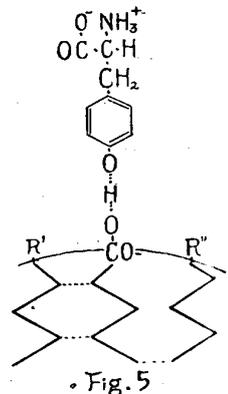
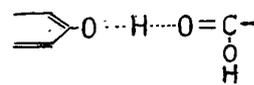


Fig. 5

臓の cytochrome 系³³⁾の母体に堅く結合してしまひその生成を阻止するのではないだろうかと云う。

tyrosine が本毒素の毒性に密接な關係を有することを米田⁴²⁾が簡単な合成培地に於ける毒素産生能の研究からも明かにしている。何れにせよ tyrosine 残基が特殊の活性な状態に存し、然も分子全体との密接な相互關係に基づいて強烈な毒性の主役を擔うに至るものと推察される。

tyrosine が下圖の如く水素結合を形成することに關しては GRAMMER 等⁴³⁾の報告がある。



尙全般にわたつて細

谷⁴⁴⁾ LANDSTEINER,⁴⁵⁾ 江上,⁴⁶⁾ 八木,⁴⁷⁾ 曾良,⁴⁸⁾ STEPHENSON,⁴⁹⁾ HAUROWITZ,⁵⁰⁾ MARRACK,⁵¹⁾ VAN HEYNINGEN,⁵²⁾ GRABAR,⁵³⁾ MAYER,⁶⁵⁾ CHANCE & SMITH⁵⁵⁾ 細谷⁵⁶⁾等の著を參考にした。

XVI. 總 括

Corynebacterium diphtheriae P. W. No. 8 TORONTO 株の培養濾液から毒素並びに toxoid をほぼ純粹の形に得てその性狀組成を比較し、次の點を明白にした。

1. 本毒素は微量の Fe を含む beta-globulin である。
2. 毒素と toxoid の組成上の著しい相異は、tyrosine 残基の有無、 NH_2-N 量、及び等電點の差にある。
3. 毒素の組成アミノ酸として 21 種存在する。

御指導御校閲を賜つた傳研安東，學習院大學岡，本學平戸教授，御示唆を賜つた傳研細谷研究室，阪大赤堀，奥貫，名大江上，本學中村，小幡，山田教授，材料を賜つた北海道製薬並河博士，實驗に協力された札幌醫大植竹教授，辻見，佐々木學士，本學遠藤助教授，中島學士，當研究室次田學士，森恭子，田中榮子嬢にそれぞれ謝意を表す。

本研究の一部は文部省及び北海道廳科學研究補助費によつた併せて謝意を表す。

文 献

- 1) 細谷省吾：デフテリアの豫防 (1947).
- 2) PILLEMER, L. et al.: *Science*, **103**, 615 (1946); *J. Exp. Med.*, **88**, 205 (1948).
- 3) LAMANNA, C. et al.: *Science*, **103**, 615 (1946); *J. Bact.*, **52**, 1 (1946).
- 4) ABRAMS, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **164**, 63 (1946).
- 5) LAMANNA, C. & GLASSMANN, H. N.: *J. Bact.*, **54**, 575 (1949).
- 6) EATON, M. D.: *J. Bact.*, **31**, 347, 367 (1936); **34**, 139 (1937).
- 7) PAPPENHEIMER, A. M. Jr.: *J. Biol. Chem.*, **120**, 543 (1937).
- 8) AGNER, K.: *J. Imm.*, **92**, 337 (1950).
- 9) LEPOW, I. H. & PILLEMER, L.: *J. Imm.*, **69**, 1 (1952).
- 10) 伊藤時哉：醫學と生物學，**20**, 228 (1951).
- 11) 伊藤時哉：同誌，**22**, 124 (1952).
- 12) 伊藤，植竹，佐々木，遠藤，中島：第34回日本獸醫學會講演 (1952).
- 13) 次田敏雄，齋藤：醫學と生物學，**20**, 147 (1951).
- 14) 細谷省吾，宮田：*Compt. rend. Soc. d. biol.*, **99**, 1297 (1928); 實驗醫學誌，**14**, 833 (1930).
- 15) PAPPENHEIMER, A. M. Jr.: *J. Bact.*, **43**, 273 (1942).
- 16) SMITH, F. C. & MARRACK, J. R.: *Brit. J. Exp. Path.*, **11**, 494 (1930); PAPPENHEIMER, A. M. Jr. & ROBINSON, E. S.: *J. Imm.*, **32**, 291 (1937); ANDO, K. et al.: *ibid.*, **34**, 295 (1938); 伊藤時哉，次田：醫學と生物學，**20**, 73 (1951).
- 17) WADSWORTH, A. B. & WHEELER, M. W.: *J. Inf. Dis.*, **73**, 95 (1943).
- 18) PILLEMER, L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **170**, 571 (1947).
- 19) OUDIN, J.: *Compt. rend. Acad. d. Sc.*, **222**, 115 (1946); etc.
- 20) OUCHTERLONY, Ö.: *Acta. path. & microbiol. Scand.* **25**, 186 (1948); etc.
- 21) MUNOZ, J. & BECKER, E. L.: *J. Imm.*, **65**, 47 (1950); **67**, 501 (1951).
- 22) POPE, C. G. STEVENS, M. F. et al.: *Brit. J. Exp. Path.*, **32**, 246 (1951).
- 23) BOWEN, H. E.: *J. Imm.*, **68**, 429 (1952).
- 24) MAVER, E. M.: *J. Inf. Dis.*, **49**, 1 (1931).
- 25) POPE, C. G. & HEALEY, M.: *Brit. J. Exp. Path.*, **20**, 213 (1939); POPE, C. G. & STEVENS, M. F.: *ibid.*, **32**, 314 (1951).
- 26) PAPPENHEIMER, A. M. Jr. et al.: *J. Exp. Med.*, **71**, 247 (1940); PETERMANN, M. L. PAPPENHEIMER, A. M. Jr.: *J. Physiol. Chem.*, **45**, 1 (1941).
- 27) NORTHROP, J. H.: *J. Gen. Physiol.*, **25**, 465 (1942); ROTHEN, A.: *ibid.*, **25**, 487 (1942).
- 28) KATSURA, T.: *Jap. J. Exp. Med.*, **20**, 413 (1950).
- 29) WOJWOD, A. J. & LINGGOOD, E. V.: *Nature*, **163**, 218 (1949).
- 30) PAPPENHEIMER, A. M. Jr.: *J. Biol. Chem.*, **125**, 201 (1938).
- 31) DUNN, M. S. et al.: *Arch. Biochem.*, **22**, 374 (1949).
- 32) BÜHLER, H. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **169**, 295 (1947).
- 33) PAPPENHEIMER, A. M. Jr.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 251 (1947); PAPPENHEIMER, A. M. Jr. & HENDEE, E. D.: *ibid.*, **171**, 701 (1947); **180**, 597 (1949); PAPPENHEIMER, A. M. Jr. *Adv. in Protein Chem.*, **4**, 123 (1948); PAPPENHEIMER, A. M. Jr. & WILLIAMS, C. M.: *J. Gen. Physiol.*, **35**, 727 (1952).
- 34) 西田尚紀：日新醫學，**39**, 352 (1952).
- 35) MEYERHOFF, H. A.: *Private Commun.*, May, **27**, (1952).
- 36) WORK, E.: *Biochem. Biophys. Acta*, **3**, 400 (1950); **5**, 204 (1950); *Biochem. J.*, **49**, (1951); DEWAY, D. L. & WORK, E.: *Nature*, **169**, 533 (1952).
- 37) 伊藤時哉，植竹，佐々木：第5回日本細菌學會北海道支部會講演，1652.
- 38) FRENCH, D. et al.: *Adv. in Protein Chem.*, **2**, 277 (1947); etc.
- 39) BROWN, A. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1011 (1946).
- 40) NEURATH, H.: *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 1841 (1939); POLSON A.: *Kolloid Z.*, **88**, 51 (1939); PAULING, L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2643 (1940).
- 41) 岡小天：私信，Aug. (1952); 談話，Sep. **18** (1952).
- 42) YONEDA, M.: *Nature* **168**, 879 (1951); 科學，**21**, 642 (1951).
- 43) GRAMMER, J. L. & NEUBERGER, A.: *Biochem. J.*, **37**, 302 (1943).
- 44) 細谷省吾：科學園，**2**, 19 (1947).
- 45) LANDSTEINER, K.: *The Specificity of Serological Reactions*, (1949).
- 46) 江上不二夫：*Protein*, **1**, No. **2**, 1 (1950); 免疫化學 (1951).
- 47) 八木康夫：有毒性蛋白質 (1951).
- 48) 曾良忠雄：生物科學 **3**, 15 (1951).
- 49) STEPHENSON, M.: *Bacterial Metabolism*, (1949).
- 50) HAUROWITZ, F.: *Chemistry and Biology of Proteins*, (1950).
- 51) MARRACK, J. R.: *The Enzymes, Chemistry and Mechanism of Action*, 1343 (1950).
- 52) VAN HEYNINGEN, W. E.: *Bacterial Toxins*, (1950).
- 53) GRABAR, P.: *Ann. Rev. of Biochem.*, **19**, 453 (1950).
- 54) MAYER, M. M.: *ibid.*, **20**, 415 (1951).
- 55) CHANCE, B. & SMITH, L.: *ibid.*, **21**, 687 (1952).
- 56) 細谷省吾，曾良：生物化學ハンドブック，559 (1953).

BIOCHEMICAL STUDIES ON THE BACTERIAL TOXINS.

I. ON THE PURIFICATION AND NATURE OF
DIPHTHERIAL TOXIN.

T. ITÔ

(From the Laboratory of Veterinary Chemistry, Faculty of Veterinary
Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.)

Although many reports have described highly purified diphtherial toxin, there is no information about the immunologically and electrophoretically homogeneous preparations.

We have obtained the culture filtrates (Lf 90~100 u/cc), consisting of beef extract and beef digested with papain, inoculated with *Corynebacterium diphtheriae* Park Williams No. 8 TORONTO. And have obtained 0.4 g of protein from each 10 litre of the filtrates, by repeated fractionating precipitation with between 50~60% saturation of ammonium sulfate, further precipitation with acetic acid at pH 4.1, resolution with weak alkali at pH 11, dialyzing against distilled water, and finally drying in cold vacuum.

The preparation, a light brownish powder, contains approximately 370,000 Lf units per g, and 0.00044 mg nitrogen per Lf. And 0.001 γ < M. L. D. < 0.01 γ (for guinea pigs) was found.

It behaves as a single protein in the Tiselius's electrophoresis cell and RAMON's quantitative flocculation test and antigen-antibody reaction in agar-gel.

Chemical analyses of the preparation showed that it is an iron-containing beta-globulin.

The pure toxin and formalin-toxoid were compared with by protein color reactions, ultraviolet ray absorption test, and two dimensional paper chromatography with hydrochloric acid hydrolysates.

Tryptophane, aspartic acid, cystine, α - ϵ -diaminipimelic acid glutamic acid, serine, glycine, lysine, threonine, alanine, histidine, oxyproline, α or γ -aminobutyric acid, methionine, valine, proline, phenylalanine, leucine, isoleucine, tyrosine, and arginine were found in the pure toxin.

The essential difference between the toxin and formalin-toxoid was found on the presence or absence of tyrosine residues in the molecules.

Some possible structure concerning the molecules of the toxin and toxoid was suggested.