



Title	Streptolysin-S の研究 : 静止菌による毒素産生に及ぼすKイオンとpHの影響について
Author(s)	前川, 静枝; MAEKAWA, Shizue
Citation	低温科学. 生物篇, 15, 95-108
Issue Date	1957-11-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17602
Type	departmental bulletin paper
File Information	15_p95-108.pdf



Shizue MAEKAWA 1957 Studies on Streptolysin-S. The Influence of K-Ion and pH on the Formation of Streptolysin by Resting Cells. *Low Temperature Science, Ser. B, 15.* (With English résumé p. 108)

Streptolysin-S の 研 究

静止菌による毒素産生に及ぼす K イオンと pH の影響について*

前 川 静 枝

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 32 年 6 月受理)

ま え が き

細菌の菌体外毒素の産生は、一般にその分裂増殖の過程において代謝産物として分泌されるか、または菌体の崩壊により培地中に溶出されるかの何れかによるものと考えられているが、溶連菌々体を非働性馬血清に浮遊させて振盪することによつて得られる Weld の hemotoxin^{1),2)} は、菌体内にある毒素が血清によつて抽出されてきたものと考えられた。またこれとは別に岡本 (1939 年) 及びその一門の「核酸の溶連菌溶血毒素増産現象」についての興味ある業績³⁾⁻¹³⁾ がもとになつて、細谷、江上ら¹⁴⁾⁻¹⁶⁾ (1948 年) によつて溶連菌々体と核酸溶液を接触させるだけで作り出される強力な溶血毒素が見出され、その生成機構は菌体のもつ酵素が核酸に作用して毒素が合成されるものと考えられた。これらの毒素は何れも Streptolysin-S^{10),20)} に属するものであることが証明されている。この核酸と溶連菌々体によつて産生される Streptolysin-S については、その後、岡本²¹⁾、Bernheimer²⁰⁾ 及びその他の学者によつて追試確認され、更に進んで Bernheimer²²⁾ によつて溶連菌静止菌、核酸、maltose (又は glucosamine)、PO₄, K 及び Mg イオンだけで毒素が産生されることが明らかにされた。

著者はこの毒素の産生機構を考究するために、まずさきの Bernheimer²²⁾ によつて報告された毒素産生の条件を詳細に検討した結果、毒素産生に関与する因子の濃度関係においてより適当な条件を見出すことが出来たと同時に、特に K イオンの毒素産生に及ぼす影響について興味ある知見を得たのでこれらの成績を報告する。

実験材料並びに方法

1) 静止菌： 牛血液斜面寒天に累代培養した A 群溶連菌 S. 8 株を普通ブイヨン (牛心浸出液, polypeptone 1%, NaCl 0.5%) に 36°C 7~8 時間培養し、遠心分離により菌体を集め、磷酸緩衝液加食塩水 (M/30 磷酸緩衝液 + M/12.9 NaCl, pH 7.0) で 2 回洗滌後、同溶液又は pH 7.0 に調製した蒸溜水に浮遊させて用いた。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 387 号

2) リボ核酸 (RNA): Clarke & Schryver 法²⁵⁾ によつて抽出された酵母核酸を 1 N NaOH で 0°C 30 分処理し, その acetone 30% 沈澱を更に RNase で 37°C 4 時間分解して再び acetone 30% で沈澱させた劃分^{24), 25)} (A₃₀ R₃₀) を用い, 磷酸緩衝液加食塩水又は蒸留水で溶解した。

3) 溶血毒素産生の方法: 静止菌浮游液, RNA (A₃₀ R₃₀), maltose, NaH₂PO₄, KCl, MgSO₄·7 H₂O の混合溶液 (pH 7.0 に調製) からなつている毒素産生の反応液を 0.5 ml 宛小試験管に分注し, 37°C 恒温槽中で incubate し, 反応時間 20, 40, 60, 80, 100, 120 分に夫々試験管を取り出し反応を停止させるために直ちに凍結させ, 溶血力価測定の前直前に遠心により菌体を除いた。

4) 溶血毒素力価測定法: 反応上清液は 0.5 ml 宛の倍数稀釈を行い, 等量の 3% 家兎血球浮游液 (生理的食塩水で 3 回洗滌) を加え 37°C 恒温槽で 2 時間反応させた。溶血単位を求めるために, 部分溶血を示す試験管を遠心して 50% 溶血を挟む 2 管の上清を蒸留水で 4 倍に稀釈し, 581 mμ 波長の吸光度を分光光度計 (島津) で測定した。この測定値から 50% 溶血の吸光度を示す反応上清の稀釈倍数をグラフの上で求めて, この数値を溶血単位/0.5 ml とした。

5) pH の測定: pH 測定に供し得る試料が微量であるために, 東洋濾紙 pH 試験紙による測定法を採用した。標準色表との比較操作の条件を揃えるために試料の温度を一定にし一定の蛍光灯の下で 2 種以上の pH 試験紙を用いて比色した。

6) 菌体内の K イオン量の測定: 37°C に一定時間反応させた毒素産生溶液は反応終了後直ちに 8,000 r.p.m. 20 分室温で遠心分離を行い, 上清は溶血単位測定のために凍結保存し, 菌体は -2°C ~ -4°C 低温室内で, もとの反応液の 6 倍量の 0°C の蒸留水 (脱イオン) で 3 回遠心洗滌を行なつた。洗滌菌体は蒸留水でもとの反応時の濃度にもどし, この菌体浮游液について焰光分光光度計 (Lange) を用いて K イオン濃度を測定した。

実 験 成 績

I. 毒素産生条件の検討

1. 菌 体 毒素産生には若い培養の菌体が必要であるという報告^{1), 25)} があるが, 発育期との関係の詳細な研究は行なわれていない。著者は静止菌に用うる菌体の培養時間と毒素産生能力との関係を見るために, 3.5 時間, 8 時間, 16.5 時間培養の菌体から静止菌を作り比濁により菌濃度をほぼ一定にして, 図 1 に記載した反応条件で毒素産生を調べた。結果は, 対数増殖期の初期にあつている 3.5 時間の菌体の毒素産生能は, 対数増殖期の後期である 8 時間及び定常期の終りにあつている 16.5 時間のそれよりも遙かに低いという事実が認められた (図 1)。

次に, 反応時の菌体の濃度と毒素産生との関係をみるために, 同様な条件で反応時菌濃度を次の 3 段階にして実験を行なつた。即ち, (1) ブイヨン培養 30 ml 分の菌体を 3 ml の反応液に浮遊させた場合 (10:1), (2) ブイヨン培養 15 ml 分の菌体を 3 ml 反応液に浮遊させた場合

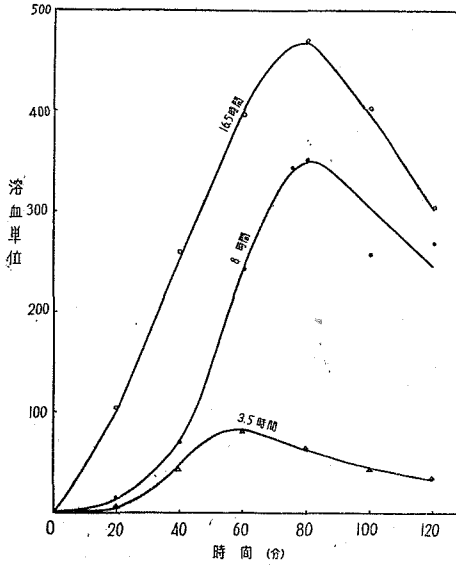


図1. 菌体の発育期と毒素産生能との関係
 培養時間 3.5時間, 8時間, 16.5時間の菌体は3回洗滌後に磷酸緩衝液加食塩水(pH 7.0)を用いて約20 mg/mlに浮遊させたものを菌液とした。
 反応液: 菌液 0.75 ml, RNA (200 μg/ml) 0.15 ml, 0.05 M maltose 0.15 ml, 0.02 M MgSO₄ 0.15 ml, 0.5 M KCl 0.3 ml, (全量 1.5 ml)。

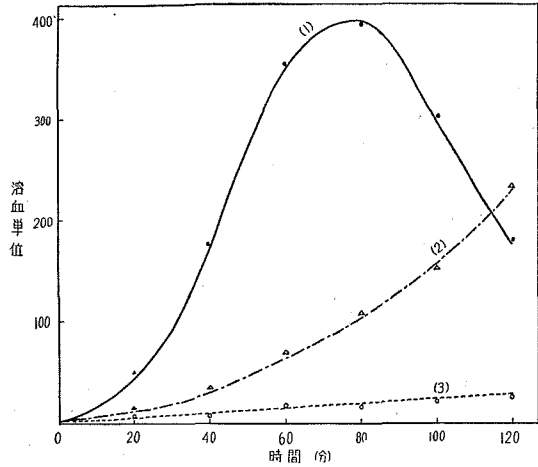


図2. 反応液中の菌濃度と毒素産生との関係
 8時間培養菌体で反応時菌濃度 10:1 (1), 5:1 (2), 2.5:1 (3)。反応液: 図1と同じ。

(5:1), (3) プイヨン培養 7.5 ml 分の菌体を 3 ml 反応液に浮遊させた場合 (2.5:1)。その結果は図2に示す通り, 菌濃度の増加と共に毒素産生の速度が増加するという関係が認められ, この関係は一般の酵素反応にみられる酵素の量と反応生成物の関係と同様である。

2. RNA

RNA と毒素産生との関係を見るために, その濃度を 5 μg/ml, 20 μg/ml,

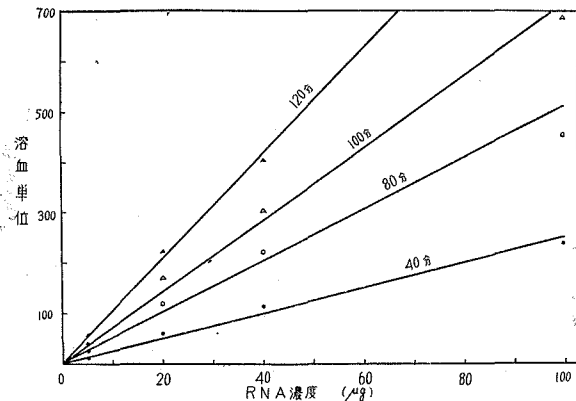


図3. RNA 濃度と産生された毒素単位との関係

反応液: 菌液 (8時間培養, 20:1, 緩衝液) 0.75 ml, RNA (50 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml, 1,000 μg/ml) 0.15 ml, 0.05 M maltose 0.15 ml, 0.02 M MgSO₄ 0.15 ml, 0.5 M KCl 0.3 ml, (全量 1.5 ml)。図中の数値は毒素産生の反応時間を示す。

40 μg/ml, 100 μg/ml の4段階にして図3に記載した条件で毒素産生を調べた。その結果は, RNA 濃度の増加と共に毒素力価が上昇し, その間に直線的な比例関係が成立している。

この関係が一般の酵素反応にみられる基質とその生成物との関係と同様であることから, RNA が毒素生成の基質になっていることがうかがわれる。このような関係はこの毒素産生に関与する他の因子にはみられなかつた。

3. Maltose

毒素産生に maltose が力源として重要な因子であることは Bernheimer も記載している

が、著者の種々な maltose 濃度での毒素産生の実験においてもそのことが確認された。その結果は図4に示す通りであるが、この条件においては、0.005 M 附近に至適濃度があり、これ以上の濃度はむしろ阻害的に作用することがわかった。

4. 無機イオン 静止菌と RNA による毒素産生には上述の maltose の他に PO_4 , K, Mg の各イオンの存在が必要であると Bernheimer によつて報告され、 PO_4 イオンと K イオンを KH_2PO_4 として、Mg イオンは $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ として添加している。しかしながら、これらの各イオンの濃度と毒素産生との関係を検討するためには、 PO_4 イオンと K イオンを別々の塩として与えることがのぞましい。そこで著者は PO_4 は NaH_2PO_4 として K は KCl として与えて、Mg は Bernheimer と同様に $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ として与えた。各イオンの毒素産生のための至適濃度を検討してみると、Mg については図5の結果からわかるように 0.002 M 附近にあり PO_4 については図6に示すように 0.03 M でありこれより濃度を増加することにより

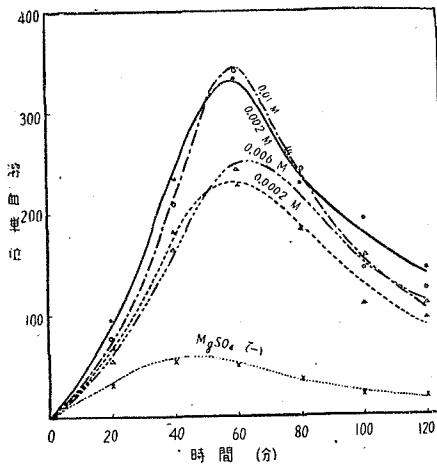


図5. $MgSO_4$ 濃度と毒素産生との関係

反応液：菌液(8時間培養, 20:1, 緩衝液) 0.75 ml, RNA (200 $\mu g/ml$) 0.15 ml, 0.05 M maltose 0.15 ml, $MgSO_4$ (図中に示した濃度の10倍) 0.15 ml, 0.5 M KCl 0.3 ml, (全量 1.5 ml)。

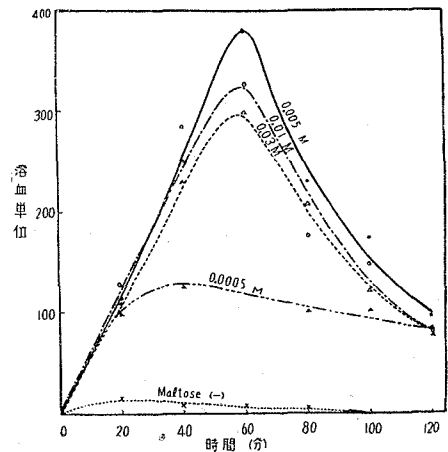


図4. Maltose 濃度と毒素産生との関係

反応液：菌液(8時間培養, 20:1, 緩衝液) 0.75 ml, RNA (200 $\mu g/ml$) 0.15 ml, maltose (図中に示した濃度の10倍) 0.15 ml, 0.02 M $MgSO_4$ 0.15 ml, 0.5 M KCl 0.3 ml, (全量 1.5 ml)。

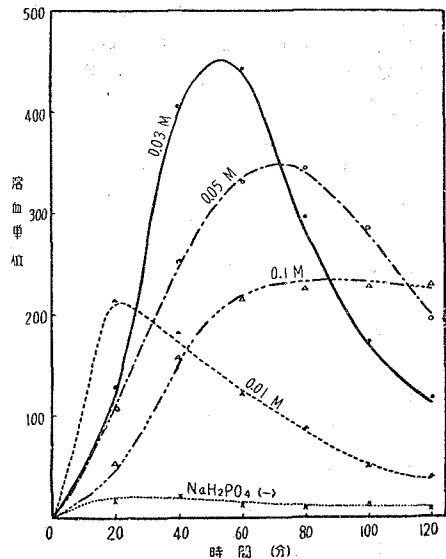


図6. NaH_2PO_4 濃度と毒素産生との関係

反応液：菌液(8時間培養, 50:1, 蒸溜水) 0.6 ml, RNA (200 $\mu g/ml$) 0.3 ml, 0.05 M maltose 0.3 ml, 0.01 M $MgSO_4$ 0.6 ml, NaH_2PO_4 (図中に示した濃度の10倍) 0.3 ml, 0.3 M KCl 0.3 ml, 蒸溜水 0.6 ml, (全量 3.0 ml)。10% NaOH で pH 7.0 に調製。

顯著に毒素産生の阻害があらわれて来る。ところがKの有効濃度は前2者に比して遙かに高いことは図7の結果からうかがわれ0.1~0.4Mで最高の溶血毒素を産生している。

このように毒素産生に対する夫々のイオンの至適な濃度は著しく異なつてゐることから、 PO_4 イオンとKイオンを1つの塩の形で添加することは不適當と思われる。Kイオンは他のイオンより著しく高い濃度を必要とすることは、その毒素産生に關与する意義が他のイオンと異なつてゐることを暗示している。

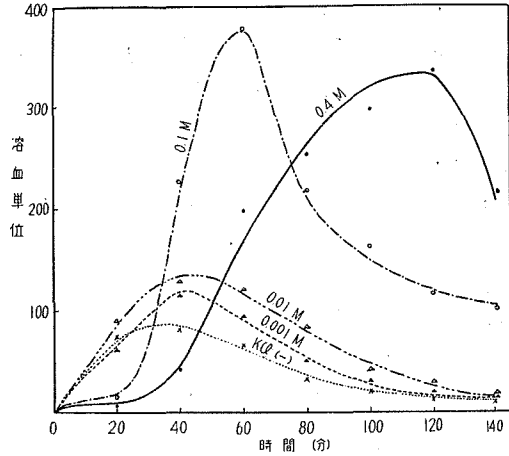


図7 KCl濃度と毒素産生との関係

反応液：菌液(8時間培養, 20:1, 緩衝液) 0.75 ml, RNA (200 μ g/ml) 0.15 ml, 0.05 M maltose 0.15 ml, 0.02 M $MgSO_4$ 0.15 ml, KCl (図中に示した濃度の5倍) 0.3 ml, (全量 1.5 ml)。

小括並びに考按

以上の実験結果から、静止菌とRNAによる毒素産生のためには、maltose, と PO_4 , K, Mgの各イオンが必要であることが追試確認され、更に夫々の有効濃度が明らかにされた。しかしながら、この条件は静止菌による毒素産生のために必要にして且つ充分なものではないことが想像される。例えば、著者の他の実験から菌体の洗滌回数を更に重ねることは毒素産生能を低下させ、また、短時間反応させて未だ充分に毒素産生の活性を保持していると思われる菌体を、新しいメヂウムに移すことによりその毒素産生能が著しく低下するという事実もあるので、以上の因子の他に未だ解明されていない微量の因子が、毒素産生に關与していると考えらるべきであろう。

II. 毒素産生に及ぼすKイオンとpHの影響

1. 毒素産生におけるKイオンの必須性について

この毒素産生におけるKClの効果はKCl以外のKalium塩によつて示されるかどうか、またKイオン以外の1価の陽イオンである NH_4 又はNaの塩化物によつても示され得るかどうかを検討した。その結果は表1に示す通りで、Kを含む塩類の場合には著明な毒素産生が

表1 K-塩, NH_4 -塩, Na-塩の毒素産生効果の比較

塩類	KCl	KBr	KNO_3	KH_2PO_4	NH_4Cl	NaCl	(-)
反応時濃度(M)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	-
溶血毒素單位/0.5ml	320	402	308	51.4	16	35	29

反応液：菌液(7時間培養, 50:1, 蒸溜水) 0.6 ml, RNA (200 μ g/ml) 0.3 ml, 0.05 M maltose 0.3 ml, 0.01 M $MgSO_4$ 0.6 ml, 0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml, KCl, KBr, KNO_3 , KH_2PO_4 , NH_4Cl , NaCl 又は蒸溜水(表中に示した濃度の5倍) 0.6 ml, 蒸溜水 0.3 ml, (全量 3.0 ml) 10% NaOH で pH 7.0 に調製。

みられるが、 NH_4Cl 、 NaCl の場合にはこれらの塩類を加えなかつた対照例と殆んど変りない低い値を示した。この成績は KCl の効果はその K イオンに起因するもので、他の陽イオンによつておきかえられないことを示している。この表において KH_2PO_4 の場合の溶血力価が他の K 塩に比して著しく低いのは、この濃度では PO_4 の毒素産生の阻害によるものであることは先にあげた実験結果から明らかである。

2. 有効な K 濃度においてみられる毒素産生の抑制現象について

毒素産生の経過を時間的に観察すると図 8 (1) に示すように、反応の初期にみられる毒素産生の極めて悪い時期と、

これに続いてくる急激な毒素産生の時期と、その後の急激な毒素単位の低下の時期の 3 つに分けられる。これを仮りに抑制期、産生期及び減退期となづけた。しかしながら KCl 濃度を 0.03M

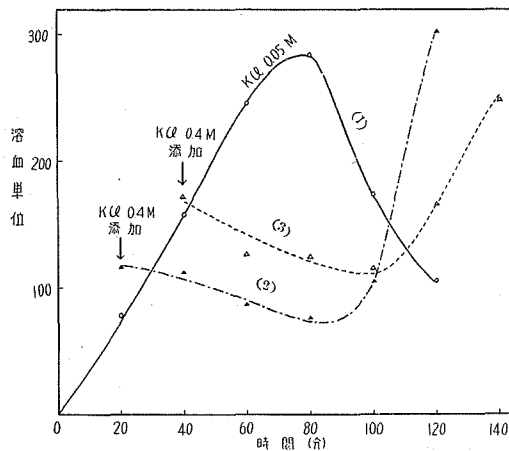


図 9. 毒素産生過程に及ぼす KCl 濃度の影響 (2)

曲線 (1) 反応液：菌液 (図 8 と同じ) 0.6 ml 、 RNA ($400\text{ }\mu\text{g/ml}$) 0.3 ml 、 0.05 M maltose 0.3 ml 、 0.01 M MgSO_4 0.6 ml 、 0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml 、 0.5 M KCl 0.3 ml 、蒸溜水 0.6 ml 、(全量 3.0 ml)。10% NaOH で pH 7.0 に調製。

曲線 (2) (3) 反応液：上述の反応液から蒸溜水を除いて 20 分、40 分毒素産生反応後に 2 M KCl 0.6 ml 加え再び pH 7.0 に調製。

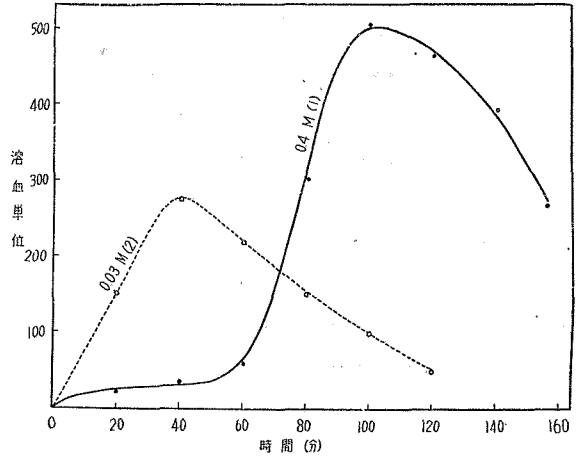


図 8. 毒素産生過程に及ぼす KCl 濃度の影響 (1)

反応液：菌液 (7 時間培養、50 : 1、蒸溜水) 0.6 ml 、 RNA ($250\text{ }\mu\text{g/ml}$) 0.3 ml 、 0.05 M maltose 0.3 ml 、 0.01 M MgSO_4 0.6 ml 、 0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml 、 0.3 M KCl 0.3 ml 、蒸溜水 0.6 ml 、(全量 3.0 ml)。10% NaOH で pH 7.0 に調製。

迄下げた場合は図 8 (2) のように、抑制期があらわれないで直ちに産生期に入り充分な毒素単位に達しないで減退期に移行する。この抑制期のみられない毒素産生の反応の途中で、 KCl 濃度を増加させると図 9 に示すように、 KCl 添加の直後から抑制期があらわれて、その後再び産生期に移行することが観察された。このことから、抑制期は KCl 濃度に関連してあらわれる現象であることがわかる。

この抑制期の発現は KCl に特異的なものであるかを検討するために、 KCl と同じ濃度 (0.4 M) の KBr 、 KNO_3 、 NH_4Cl 、 NaCl を用いて毒素産生の経過を観察した。後 2 者のように K イオンを含まぬ塩類を用いるときは、産生に必須な K イオンを KCl の形で抑制期のあらわれない濃度 (0.03 M) だけ加えて実験を行なつた。その結果は図 10、11 に示す通りで何れの場合も抑制現象があらわれるが、

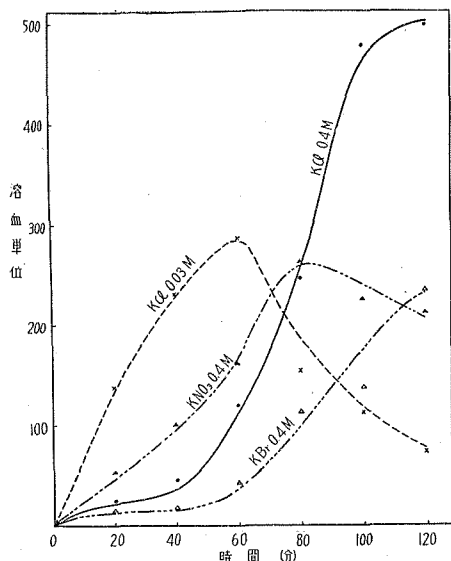


図 10. 種々なる K-塩 (0.4 M) を用いたときの毒素産生経過の比較

反応液: 菌液 (7時間培養, 50:1, 蒸溜水) 0.6 ml, RNA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.3 ml, 0.05 M maltose 0.3 ml, 0.01 M MgSO_4 0.6 ml, 0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml, 0.15 M, 2 M KCl (又は 2 M KBr, KNO_3) 0.6 ml, 蒸溜水 0.3 ml, (全量 3.0 ml)。10% NaOH で pH 7.0 に調製。

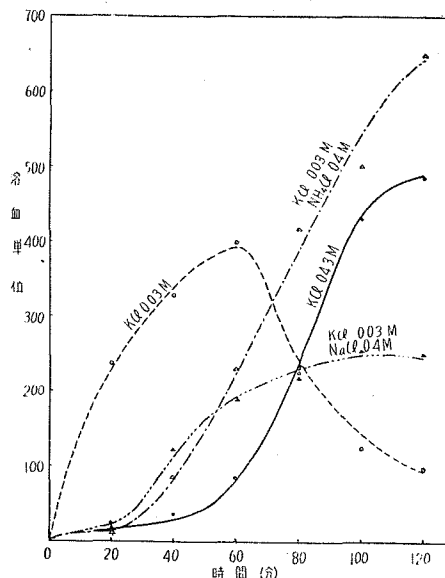


図 11. KCl, NH_4Cl , NaCl (0.4 M) を用いたときの毒素産生経過の比較

反応液: 菌液 (図 10 と同じ) 0.6 ml, RNA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.3 ml, 0.05 M maltose 0.3 ml, 0.01 M MgSO_4 0.6 ml, 0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml, 0.3 M KCl 0.3 ml, 蒸溜水 (又は 2 M KCl, NH_4Cl , NaCl) 0.6 ml, (全量 3.0 ml)。10% NaOH で pH 7.0 に調製。

KBr, KNO_3 , NaCl では夫々 Br, NO_3 , Na の産生期における毒素産生の阻害があらわれて、最高毒素単位は KCl のときの単位まで達しなかつた。たゞ NH_4Cl の場合のみは KCl の場合と全く同様な毒素産生曲線をえがき毒素単位はむしろ KCl の場合を上廻る。

以上の結果から、この KCl による抑制期の発現は、その K イオンによるものであるが、 NH_4Cl 又は NaCl の場合にもあらわれるということから、この現象は K イオンに特異的な現象ではないことがわかつた。

3. 毒素産生経過に及ぼす pH の影響について

著者は実験の目的から先に述べたような非緩衝溶液を反応液として用いているために、反応過程に maltose の代謝産物によつて次第に酸度が増強し、pH は 7.0 から徐々に酸性側に移行する (この代表的な例を図 12 に掲げた)。そこで反応経過中の pH の変化と毒素産生との関係

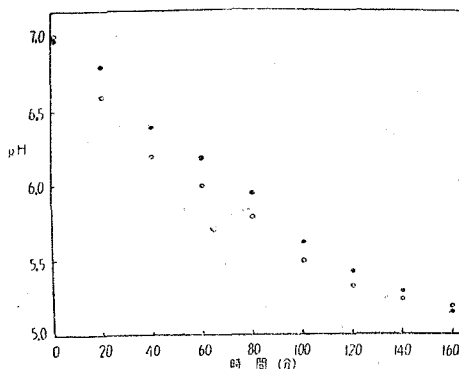


図 12. 毒素産生経過中の pH の変化
反応液: 図 8 (KCl 0.4 M) と同じ。

を詳細に検討するために、次のように条件を変えて実験を行なった。

(1) 予め菌体と maltose を一定時間反応させておいて、一定の pH に達した時に RNA を加えて毒素産生を行なわせてみた。その結果は図 13 に示すように、Preincubation したものは抑制期が短縮又は消失し、毒素産生曲線の山が左方に移行することがわかった。

(2) 菌濃度を増加して maltose の分解を促進させた場合の毒素産生の様相は、図 14 に示すように、抑制期は著明に短縮され早く産生期があらわれ早く減退期に移行することがわかった。

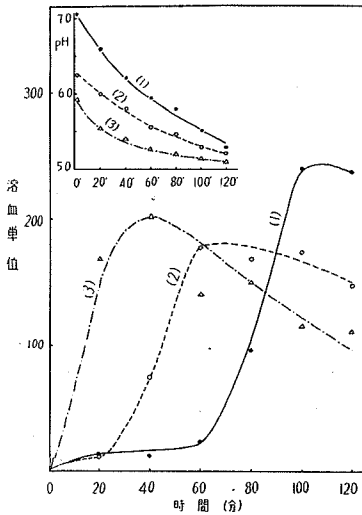


図 13. Preincubation による毒素産生経過及び pH の変化

曲線 (1) 反応液：菌液 (7 時間培養, 50 : 1, 蒸留水) 0.6 ml, RNA (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.3 ml, 0.05 M maltose 0.3 ml, 0.01 M MgSO_4 0.6 ml, 0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml, 2 M KCl 0.6 ml, 蒸留水 0.3 ml, (全量 3.0 ml)。10% NaOH で pH 7.0 に調製。

曲線 (2), (3) 上述の反応液から RNA を除て 40 分 (2), 80 分 (3) Preincubation 後に RNA 添加。

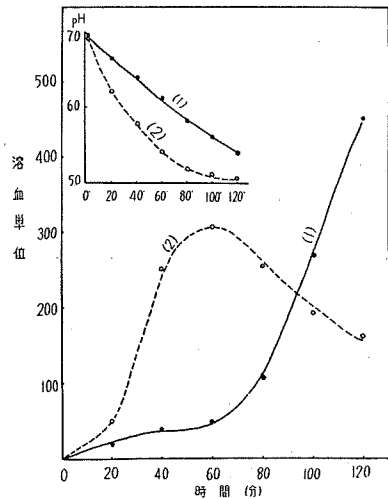


図 14. 菌濃度増加による毒素産生経過及び pH の変化

曲線 (1) 反応液：菌液 (7 時間培養, 50 : 1, 蒸留水) 0.6 ml, RNA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.3 ml, 0.05 M maltose 0.3 ml, 0.01 M MgSO_4 0.6 ml, 0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml, 2 M KCl 0.6 ml, 蒸留水 0.3 ml, (全量 3.0 ml)。10% NaOH で pH 7.0 に調製。

曲線 (2) 反応液：菌液 (7 時間培養, 200 : 1, 蒸留水) 0.6 ml 他は上述と同じ。

(3) 反応開始時の pH を 5.4, 5.9, 7.0, 7.8, 8.8 に夫々修正しておいて毒素産生の反応を行なわせてみた結果は、図 15 に示す通り、標準の条件 (pH 7.0) より酸性側 (pH 5.9) で反応を開始させた場合は産生期が早くあらわれて且つ早く減退期に移行し、アルカリ側 (pH 7.8) で反応を開始させた場合は、これと反対に抑制期が延長し産生期のあらわれるのが遅れることがわかった。しかして pH 5.4 又は 8.8 から反応を開始させた場合は菌体の活性が全く阻害されるために、pH の変動も殆んどなく毒素産生も少なかった。

以上の実験成績を通覧すると、何れの場合も抑制期から産生期に移行する点は pH 6.0~5.8 にあり、産生期から減退期に移行する点は pH 5.5~5.4 にあるということから、毒素産生の各

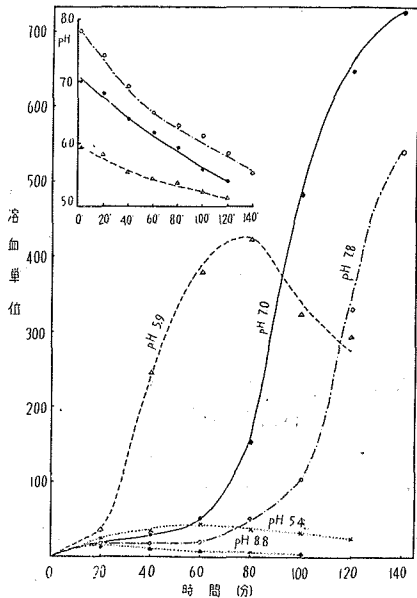


図 15. 反応開始時の pH の相違による毒素産生経過の比較

反応液：菌液（7 時間培養，50：1，蒸留水）0.6 ml，RNA（250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）0.3 ml，0.05 M maltose 0.3 ml，0.01 M MgSO_4 0.6 ml，0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml，2 M KCl 0.6 ml，蒸留水 0.3 ml，（全量 3.0 ml）。10% NaOH で pH 5.4，5.9，7.0，7.8，8.8 に調製。

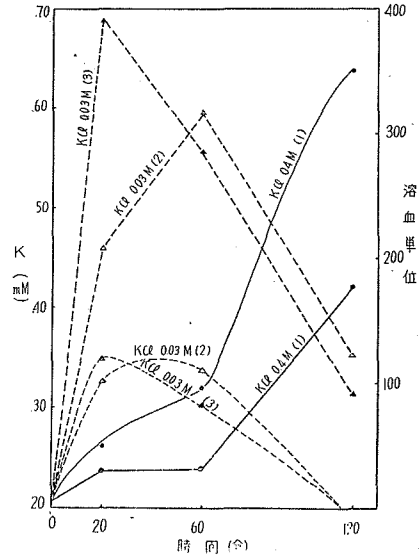


図 16. 毒素産生経過中（KCl 0.4，0.03 M）の菌体内 K 量の変動

曲線 (1) 反応液：菌液（7 時間培養，50：1，蒸留水）0.6 ml，RNA（250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）0.3 ml，0.05 M maltose 0.3 ml，0.01 M MgSO_4 0.6 ml，0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml，2 M KCl 0.6 ml，蒸留水 0.3 ml（全量 3.0 ml）。10% NaOH で pH 7.0 に調製。曲線 (2)，(3) 反応液：0.15 M KCl 0.6 ml，他は上述と同じ。図中の曲線は溶血毒素単位，直線は菌体内 K 量。

phase の発現は反応経過中の pH の変化に関係あることが明らかである。この条件における毒素産生の至適 pH は 6.0~5.8 の非常に狭い範囲にあるように見えるがこの pH よりアルカリ側においては抑制現象によつて毒素の産生がみられないのであつて，抑制現象のない KCl 濃度の低い条件においてはこれより中性に近い pH でも毒素産生がみられることから，真の毒素産生の至適 pH はもつと広い範囲にあることは明らかである。

4. 毒素産生経過中における菌体内 K イオン量について

毒素産生過程における K イオンの影響を考察するの一つの手がかりとして，反応経過中の菌体内 K イオン量を測定してみた。

その結果はメヂウム中の KCl 濃度を変えた実験において KCl 0.4 M の条件では図 16 (1)，17 (1)，18 に示すように，菌体内の K イオン量は，抑制期には徐々に増加し産生期に移行するとその増加の速度が増し減退期にはその量が減少することが認められる。KCl 0.03 M の条件では図 16 (2)，(3) に示すように，反応初期から著しい速度で菌体内 K イオンが増加し，その量は 0.4 M の条件の時よりも遙かに高い値に達し，減退期に移行すれば再び急速に減少するという興味ある結果が得られた。次に反応開始時のメヂウムの pH を変えた実験において pH 6.0 で

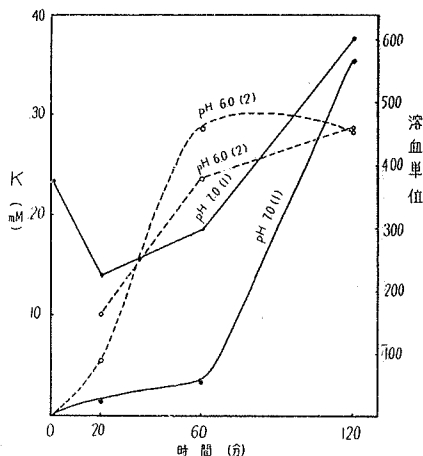


図 17. 毒素産生経過中(反応開始時の pH 6.0, 7.0)の菌体内 K 量の変動

反応液: 菌液(図 16 と同じ) 0.6 ml, RNA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.3 ml, 0.5 M maltose 0.3 ml, 0.01 M MgSO_4 0.6 ml, 0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml, 2 M KCl 0.6 ml, 蒸溜水 0.3 ml, (全量 3.0 ml)。10% NaOH で pH 6.0, 7.0 に調整。図中の曲線は溶血毒素単位, 直線は菌体内 K 量。

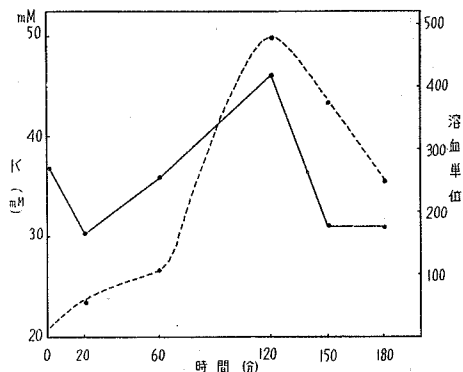


図 18. 毒素産生経過中 (KCl 0.4 M) の菌体内 K 量の変動

反応液: 菌液(図 16 と同じ) 0.6 ml, RNA (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.3 ml, 0.05 M maltose 0.3 ml, 0.01 M MgSO_4 0.6 ml, 0.3 M NaH_2PO_4 0.3 ml, 2 M KCl 0.6 ml, 蒸溜水 0.3 ml (全量 3.0 ml)。10% NaOH で pH 7.0 に調整。

毒素産生を開始させた場合には, 毒素産生曲線において産生期が早くあらわれると共に菌体内 K イオン量の増加も, pH 7.0 で反応を開始させた時の産生期にみられる菌体内 K イオン量の増加と同じような速度で初めから現われるということがわかった。

このように, 毒素産生曲線と菌体内 K イオン量の変動の曲線とはほぼ平行的な関係にあることは興味ある事実であるが, 毒素産生の強さと菌体内 K イオン量の間には直接の関係がみられないことは, 先に述べたように, メジウム中の K イオン濃度の低い毒素産生の不十分な条件の方が, 反つて濃度の高い充分な毒素産生の条件よりも菌体内の K イオン量は遙かに高い値にまで達することからも明らかである。

図 17, 18 において反応時間 0 分の菌体内 K イオン量が 20 分の時より高い値を示しているのは, この実験例においては反応開始前のメジウムの温度を 0°C に保っていたので低温による吸着のための増加であると考えられ, 図 16 の場合には反応前のメジウムの温度を低温に保たなかつたのでこの現象はみられなかつたと考えるべきであろう。

総括並びに考按

溶連菌静止菌と RNA による Streptolysin-S 産生に関与する必要な因子については, すでに Bernheimer によつて検討され, 力源として maltose (又は glucosamine) が必要である他に PO_4 , K, Mg なる無機イオンが欠くべからざるものであることが報告されているので, 著者はその報告にもとづいて更にこれらの各因子の適当な濃度関係について検討した結果, 先に述べ

たように一層高い毒素を産生する条件を見出し得たが、この条件における毒素産生の過程には抑制期、産生期、減退期の明らかに区別できる3つの phase が存在することがわかった。

第1の抑制期は実験の示す通り、メヂウム中のKイオンの高い濃度において現われるものでありその濃度が低いときにはみられないから、Kイオン濃度に関連する現象であることは明らかである。しかしながら、毒素産生経過中の菌体内のKイオン量を測定した成績からみて、産生期に移行するまでにKイオンが菌体内に移動してメヂウム中の濃度が著しく減少したとは思われないので、この現象はメヂウム中のKイオン濃度だけではなく実験の示す通りメヂウムのpHによつて左右される因子と関連しておこる現象と考えなければならないが、その因子については未だ究明されていない。

第2の産生期に移行すると、さきの抑制現象は全くとれて毒素産生の速度は急激に増し、抑制期のないKCl濃度の低い条件にみられる産生速度よりむしろ速い速度で毒素単位が上昇し、且つ達する最高毒素単位も必ず上廻っている。このことから、抑制期が適応酵素生成の際の初期のlag phaseの意義のように次の段階の毒素産生期の反応に必要な現象であるようにも考えられるが、このphaseを短縮又は消失させるような条件を与えても産生期の毒素産生の速度及び達する最高値に大きな差異はみられなかつたので、直接毒素産生の反応に必要なphaseではないと考えられる。そこで、KCl濃度の高い条件においては抑制期と無関係に高い毒素産生がみられる原因を考えると、KCl濃度の低い毒素産生の不十分な条件に NH_4Cl を高濃度(0.4M)に加えるとKCl高濃度(0.4M)の条件にみられるような高い毒素産生があることから、この効果は、Bernheimerの報告²⁶⁾にあるKイオンや NH_4 イオンによるStreptolysin-Sの熱安定化の現象で説明することが出来よう。

第3の減退期の発現は、メヂウム中のこの毒素産生に関与する各因子がこの時期になると欠乏して来ることによつてあらわれるのではなくメヂウムのpHが5.5~5.4に達して菌体の活性が阻害されることによつて生ずる現象であつて、このメヂウムでは毒素を安定に保つには不十分であるから毒素産生が停止すると、作られた毒素が破壊されるという現象が大きくあらわれ毒素単位は次第に低下する。著者の用いた条件は非緩衝溶液で反応を行なわせているためにpHの変化がはげしくあらわれて、産生期から減退期への移行が急激であるのは当然である。

毒素産生経過中の菌体内のKイオン量を測定した結果、毒素産生曲線とほぼ平行関係を示すという興味ある事実があるが、メヂウムからRNAを除いて毒素産生を行なわせない場合の菌体内のKイオン量の変動はRNAを加えて毒素産生を行なわせた場合と同様な様相を示すことから、菌体とメヂウム間のKイオンの移動は毒素産生に直接結びついた現象ではなく単に菌体の活性と平行してあらわれる現象と考えられる。また、メヂウム中のKイオン濃度の高い時の菌体内へのKイオンの移動が濃度が低い時よりも反つて少ないということは、このKイオンの移動は単なる物理的なものではなく、もつと生物学的な要素を含んでいることを示している。

む す び

1. 溶連菌静止菌と RNA による溶血毒素産生の Bernheimer の条件を追試確認し、この毒素産生に必要な因子の夫々有効濃度について検討を加えた。

2. 有効な K 濃度を用いた条件においては、この毒素産生の経過は抑制期、産生期、減退期の明らかに区別出来る 3 つの phase を含んでいることがわかった。

3. 種々の実験結果から、メヂウム中の K イオン濃度と pH がこれらの phase に影響を与える主なる因子であり、しかも両者の影響には相互に関連があることがわかった。

4. 菌体内の K イオン量の変動の曲線と毒素産生曲線とはほぼ平行的な関係にあるが、菌体の K イオン量そのものと毒素単位との間には一定の関係はなく、また RNA を除いた反応系においても同じような変動を示すので、菌体とメヂウム間の K イオンの移動と毒素産生とは直接の関係はないものと考えられる。

5. メヂウム中の K イオンは、毒素合成の反応に関与する必須な因子としての役割と産生された Streptolysin-S を熱に対して安定化する役割との 2 つがあり、前者としての K イオンは PO_4 イオン、Mg イオンと同様に微量でその効果を示すが後者としての K イオンは高濃度において始めてその効果があらわれる。著者の条件においてみられる毒素産生の増強の効果は主に後者によるものと考えられる。

稿を終るに臨み種々御教示を賜った名大理学部江上教授、御校閲を賜った根井教授並びに終始御懇篤なる御指導を戴いた林助教授に厚く御礼申上げ、また焰分光光度計の使用に関して御配慮を戴いた青木教授並びに核酸試料を御分与下さいました名大理学部田中理学士に感謝いたします。

文 献

- 1) Weld, J. T. 1934 The toxic properties of serum extracts of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, **59**, 83.
- 2) Weld, J. T. 1953 Further studies with toxic serum extracts of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, **61**, 473.
- 3) Okamoto, H. 1939 Über die hochgradige Steigerung des Hämolyisinbildungsvermögens des Streptococcus haemolyticus durch Nucleinsäure (1). *Japan. J. Med. Sci.*, IV. Pharmacol., **12**, 167.
- 4) 伊藤 亮 1940 核酸体に因る溶血性連鎖球菌の溶血毒増産現象に関する研究 (2). *日本薬学雑誌*, **28**, 41.
- 5) Okamoto, H., K. Miura, R. Ito und S. Kyoda 1940 Über die hochgradige Steigerung des Hämotoxinbildungsvermögens des Streptococcus haemolyticus durch Nucleinsäure (3). *Japan. J. Med. Sci.*, IV. Pharmacol., **13**, 23.
- 6) Ito, R. 1940 Über die hochgradige Steigerung des Hämotoxinbildungsvermögens des Streptococcus haemolyticus durch Nucleinsäure (4). *Japan. J. Med. Sci.*, IV. Pharmacol., **13**, 35.
- 7) Ito, R. 1940 Über die hochgradige Steigerung des Hämolyisinbildungsvermögens des Streptococcus haemolyticus durch Nucleinsäure (5). *Japan. J. Med. Sci.*, IV. Pharmacol., **13**, 87.

- 8) 伊藤 亮 1940 核酸に因る溶血性連鎖状球菌の溶血毒増産現象に関する研究 (6). 日本薬物学雑誌, **30**, 124.
- 9) Okamoto, H., S. Kyoda und R. Ito 1941 Über die hochgradige Steigerung des Hämolyisinbildungsvermögens des Streptococcus haemolyticus durch Nucleinsäure (7). Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., **14**, 99.
- 10) 京田 進 1941 核酸に因る溶血性連鎖状球菌の溶血毒増産現象に関する研究 (8). 日本薬物学雑誌, **31**, 171.
- 11) 岡本 肇・松田研斎・京田 進 1941 核酸に因る溶血性連鎖状球菌の溶血毒増産現象に関する研究 (9). 日本薬物学雑誌, **33**, 370.
- 12) 松田研斎 1942 核酸に因る溶血性連鎖状球菌の溶血毒増産現象に関する研究 (10). 日本薬物学雑誌, **36**, 171.
- 13) Matsuda, K. 1944 Über die hochgradige Steigerung des Hämolyisinbildungsvermögens des Streptococcus haemolyticus durch Nucleinsäure (11). Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., **16**, 116.
- 14) 細谷省吾・林 喬義・森 禮子・江上不二夫・鈴木安綱 1948 溶血性連鎖状球菌溶血毒素の研究 (1). 基礎と臨床, **1**, 205.
- 15) 細谷省吾・林 喬義・本間 遜・江上不二夫・八木康夫・鈴木安綱 1948 溶血性連鎖状球菌溶血毒素の研究 (2). 基礎と臨床, **1**, 211.
- 16) Hosoya, S., T. Hayashi, Y. Mori, F. Egami, M. Shimomura, Y. Yagi and Y. Suzuki 1949 Studies on the hemolysin of hemolytic streptococci (1). Japan. J. Exp. Med., **20**, 25.
- 17) Hosoya, S., T. Hayashi, Y. Homma, F. Egami, M. Shimomura and Y. Yagi 1949 Studies on the hemolysin of hemolytic streptococci (2). Japan. J. Exp. Med., **20**, 27.
- 18) Egami, F., M. Shimomura, Y. Yagi, T. Hayashi, T. Mase and S. Hosoya 1950 Studies on the hemolysin of hemolytic streptococci. Japan. J. Exp. Med., **20**, 527.
- 19) Todd, E. W. 1938 The differentiation of two distinct serological varieties of streptolysin, streptolysin O and S. J. Path. Bact., **47**, 423.
- 20) Bernheimer, A. W. and M. Rodbart 1948 The effect of nucleic acids and of carbohydrates on the formation of streptolysin. J. Exp. Med., **88**, 149.
- 21) Ito, R., T. Okami and M. Yoshimura 1948 Studies on the effect of nucleic acid upon the synthesis of oxygen-stable streptolysin by certain strains of Streptococcus pyogenes. Japan. Med. J., **1**, 253.
- 22) Bernheimer, A. W. 1949 Formation of bacterial toxin (streptolysin S) by resting cells. J. Exp. Med., **90**, 373.
- 23) Clarke, G. and S. B. Schryver 1917 The preparation of plant nucleic acids. Biochem. J., **11**, 319.
- 24) Tanaka, K., S. Maekawa, T. Hayashi and Y. Kuroiwa 1956 Biochemical studies on streptolysin S (1). J. Biochem., **43**, 827.
- 25) Tanaka, K., S. Maekawa and T. Hayashi 1956 Biochemical studies on streptolysin S (2). J. Biochem., **43**, 833.
- 26) Bernheimer, A. W. 1950 Stabilization of streptolysin S by potassium ions. J. Exp. Med., **92**, 129.

Résumé

Bernheimer's results that the resting streptococcal cells could produce the streptolysin-S by incubating them with RNA solution in the presence of maltose, KH_2PO_4 and MgSO_4 were confirmed. On close examination it was found that the optimum concentration of K-ion for the streptolysin-S formation was much higher than that of PO_4 -ion, which led to the improvement of the streptolysin-S-forming system by the use of the mixture of KCl and NaH_2PO_4 in substitution for KH_2PO_4 .

The process of streptolysin formation occurring in the modified system with higher concentration of KCl proved to consist of three distinguishable phases: initial inhibiting phase, producing phase, and reducing phase. The manifestation and duration of these phases were influenced by the concentration of K-ion and the pH of the reaction medium, the influences exerted by these being dependent on each other.

An interesting fact was observed that the curve of the fluctuation of K-ion concentration in the streptococcal cells, plotted against the reaction time, came out almost parallel to the curve of the streptolysin-S formation. But the result that the behavior of fluctuation of K-ion concentration in the cells in the reaction system excluding RNA, in which no streptolysin-S was formed, was not far different from that in the complete, streptolysin-forming reaction system and that the hemolytic unit of streptolysin formed was not directly proportional to the quantity of K-ions in the cells led to the conception that the streptolysin formation of the resting streptococcal cells in the reaction system is not directly related to the transport of K-ions to those cells.

It was further found that K-ions in this reaction system play the double parts of an indispensable participator in the course of synthesis of streptolysin-S, and of a stabilizer of streptolysin formed. The K-ions showed their stabilizing effect only at higher concentrations. It is, therefore, to be supposed that the formation of higher titer of streptolysin-S in the modified system is mainly caused by the stabilizing effect of K-ions.