HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Paper Chromatographyによる結核菌体及びツベルクリン蛋白の構成アミノ酸分析
Author(s)	板倉, 益夫
Citation	結核の研究, 8, 38-43
Issue Date	1958-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26642
Type	departmental bulletin paper
File Information	8_P38-43.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Paper Chromatography による結核菌体及びツベルクリン蛋白の構成アミノ酸分析

板倉益夫
（北海道大学結核研究所細菌部　主任　大原達教授）

（昭和33年1月8日受付）

まえがき

1906年ポーランドの植物学者 M. Tswett によつて創案されたクロマトグラフ吸着法は，1931年 Kuhn がカロチノイドの分離に応用して美事な成果を得て以来急激な発展を見せ，1943年 Gordon, Martin & Synge ら[1)~3)]はアミノ酸をそのままの形で分離する事を企て，吸着柱に相当多量の水を含み得る物質として澱粉，繰維素を試みた結果，濾紙がアミノ酸の分離に対して最適なことを発見した。

Consden, Gordon & Martin[4)] は微量のアミノ酸混合物を濾紙の一端に付着せしめ，乾燥して余分の水分を蒸発せしめた後密閉器内で水と自由に混合しない溶剤を流下せしめると，濾紙上の溶質が2液相間の分配系数の差により分離されるので，適当な方法で各アミノ酸の同定が行われる事を見出した。彼らはこの方法に用いる装置を考案し phenol, collidine 及び n-butanol, benzylalcohol の混合物（1:1）を溶剤として一次元及び二次元法によりアミノ酸分析を行つた。かかる paper partition chromatography が彼等によつて考案発表されて以来装置や操作法にいろいろの改良が加えられてその応用範囲も拡大され，主として有機物の分配，同定に重要な役割を果している。

Paper chromatography がこのように発達したのは，カラム法では同一品質の充塡剤を使用した場合でも，充塡の方法や保持させる固定相の量を常に厳密に一定させることが困難であるに対し，ペーパー法では密閉器内で濾紙に溶剤蒸気を飽和させるので，紙質が同一なら一定条件で固定相の量を濾紙面全体に均等に保持させることが出来ると云う利点を持つためである。従つてペーパー法で得られるクロマトグラムには再現性がある。更に又極く微量の材料で分離の目的が果されると云う利点がある。

アミノ酸の定性分析に関しては Dent[5)]（1948）が60種類以上のアミノ酸及び他のニンヒドリン反応物質について phenol と collidine を溶剤として下降式二次元法によつて詳細な研究を行つている。なお下降法よりも上昇法の方が一定した Rf 値を得易いと云われるが Ma & Fontaine[6)] が考案した上昇法に用いる装置は小型で気密度も良く，一次元法は勿論二次元法にも使用出来て便利である。

Circular paper chromatography は Rutter[7)] により考案され Zimmermann & Nehring[8)], Giri & Rao[9)~11)] らによりその価値が認められた。この方法は horizontal chromatography 又は disc chromatography と呼ばれるように水平に保持した濾紙上で行われる。試料は中心又はその周辺の同心円上に1個又は数個を塗布し，展開溶剤をその中心部へ極めて徐々に与えて混合物を分離するので，数多く切り取つて異つた顕色法を試みることも出来る。又本法は極めて簡単であり Rf 値も大きく，しかも再現性のある成績を出せるのでミクロ分析に適している。

Zimmermann & Nehring[8)] はデシケーターと蓋との間に円形濾紙をはさみその中心部に試料を塗布した後，毛細管からここえ展開溶剤を送る方法（dropping method）を考案した。後に Giri & Rao[9),10),11)] は Rutter の方法を改良し直径18.5～24.0 cm の円形濾紙の中心に0.5 cm のスリットをつくり 0.5×4 cm の濾紙片を挿入して溶剤を展開させる方法を考案し，中心から 4 cm の円周上に等間隔に試料と対照の既知アミノ酸混合液を交互に塗布し n-ブタノール・酢酸・水混合液（4:1:5）で展開した。

Giri[12)] は直径 35 cm の大型濾紙を使用し蛋白の水解物を対照の既知アミノ酸と同時に展開し，溶剤としては n-ブタノール・酢酸・水混合液（4:1:5），ピリジン・水混合液（8:2）などを用いると迅速正確な検出が出来ると述べている。

かくの如くペーパー法は有機物の分析に便利なこと

から動植物成分の研究にも拡く使用され，結核菌体蛋白及びツベルクリン蛋白の構成アミノ酸分析に関しても山村，清水[13] 佐藤，阿部[14] 川瀬[15] Rao & Wadhani[16] その他多数の報告がある。

然しその成績は必ずしも一定したものではなく結核菌体及びツベルクリン蛋白の構成アミノ酸はその研究者により多少異るものがある。これについて Rao & Wadhani は彼等の成績から菌体蛋白の構成アミノ酸は質的には固定しているが，量的には培養日数や培地の N 源の性質等によつて変動すると述べている。著者は先人の成績を確めること及び脱脂菌体についてアルカリ抽出の影響並びに抽出されたアミノ酸と蛋白と，菌体及びツベルクリン蛋白との関係を検討する目的で Paper chromatography を行つたのでその成績をここに報告する。

実 験 材 料

1) 試料。作り方の大要は第1表の如くである。

（i） 結核菌体水解物：ソートン培地に8週間培養した人型結核菌青山B株を，蒸留水で充分洗滌した後これにエーテルアルコール等量混合液を加えて2日間放置，エーテルアルコールを取変えて同じ操作を2回繰返えし，得たる乾燥脱脂菌体 1g につき濃塩酸 7cc，蟻酸 7cc，水 6cc を加えて 24時間加熱加水分解する。これを熱いうちに濾過し，濾液を減圧で乾涸して塩酸を除き更に水 10cc を加えて溶解，活性炭により加熱脱色し，吸引濾過して得た濾液をクロマトグラフィーに用いた。

（ii） ツベルクリン蛋白水解物：上記培養濾液に三塩化醋酸を加えて蛋白を沈澱せしめ沈澱部をエーテルで充分洗滌した後上記と同様にして加水分解した。

（iii） 結核菌体アルカリ抽出蛋白水解物：エーテルアルコール脱脂菌体に約 20 倍量の 0.01N NaOH を加え約6ケ月間 37°C の孵卵器に放置後，これをザイツ滅菌濾過管で濾過し，得られた濾液に三塩化醋酸を沈澱が生じなくなるまで加えて1晩氷室に放置し遠沈により沈澱と上清に分つ。この沈澱部をエーテルアルコールで充分洗滌し（i）と同様に加水分解した。

（iv） 結核菌体アルアリ抽出液A：上記上清を減圧濃縮したもの。

（v） アルカリ抽出物 B：（iii）のアルカリ抽出液から菌体を除いた濾液をそのまま HCl で中性とし，加熱して蛋白を凝固させた後濾過，濾液を遠沈して得た上清を減圧濃縮した。

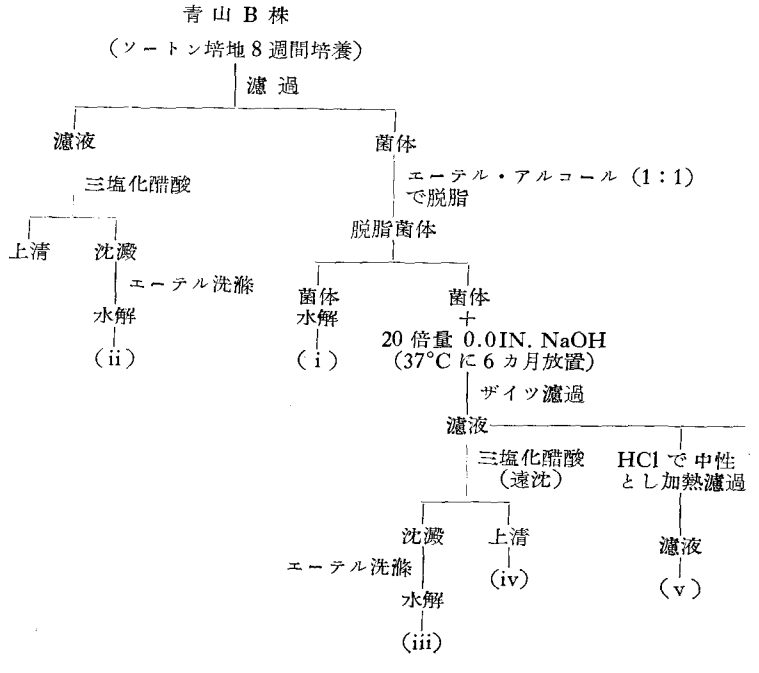
2) 既知アミノ酸溶液：略 0.01M 溶液として使用した。

3) 濾紙：東洋濾紙 No. 50 40×40 cm

4) 装置：Ma, Fontaine らの考案したものと同形で 40 cm の濾紙が入る大きさのものを用いた。

5) 展開溶剤。溶剤は市販品を再蒸留し，phenol は bp 86°C/11 mm, collidine は 165°C～170°C, n-butanol は 117°C, 酢酸は 118°C, pyridine は 115～

第 1 表 試 料 の 作 り 方



116°C, benzylalcohol は 205°C の点を取り下記の組成のものを使用した。

（i） phenol: 水飽和 phenol

（ii） collidine: 水飽和 collidine

（iii） butanol: 水飽和 butanol

（iv） benzyl alcohol: 水飽和 benzyl alcohol

（v） bu-ac: 酢酸・n-ブタノール・水混合液（1:4:5）を分液濾斗に入れてブタノール層を取り，4～5日放置したものを使用した。

（vi） bu-py: ピリジン・n-ブタノール・水混合液（3:4:7）を使用。

6） 粉霧発色試薬: ニンヒドリンを 0.2% の割に含水ブタノールに溶解したものを用いた。

実験方法

1 次元法は 40×40 cm の濾紙の 1 片から 6 cm の処に既知アミノ酸及び試料を約 0.002 cc 宛 2 cm の間隔で塗布し，これをうず巻状の支柱に巻き込んで装置内に入れ密閉して溶剤を上昇させ，装置には濾紙を入れる前日，溶剤を約 2 cm の高さまで入れて 20°C の恒温器内に納め，溶剤蒸気を装置内に充満させて置いた。

溶剤により展開時間は異るが 17 乃至 24 時間の間に溶剤前線を試料塗布点から約 27～30 cm 迄上昇させた。この濾紙を装置から取出して室温乾燥後，ニンヒドリン溶液を粉霧して室温で乾燥発色せしめ Rf 値を測定，更に加熱して新しい発色の出現を調べた。

2 次元法は相交る 2 辺から夫々 6 cm の処に直線を引きその交点に試料を直径約 0.5 cm 位に塗布し，1 次元法と同様にして最初 phenol で展開，室温乾燥後，collidine で直角方向に再展開した。乾燥発色は 1 次元法と同じである。

その他 1 次 phenol，2 次 bu-ac，1 次 bu-ac，2 次 phenol，及び 1 次 phenol，2 次 bu-py 展開の各組合せで実験を行つた。

円形クロマトグラフィーは中心から半径 2 cm の円周上に試料と既知アミノ酸を交互に 4～12 個塗布した。濾紙の中心には 0.5 cm のスリットを作つて 0.5×5 cm の濾紙片を挿入し，デシケーターと蓋との間に濾紙を水平に置いた。デシケーターの内には溶剤を満したシャーレを溶液面から濾紙までの距離が 2 cm になるように台上に置きスリットをこのシャーレ内に入れて展開した。

このデシケーターも前日から 20°C の恒温器内に置き装置内を展開剤の蒸気で満すために底部にも溶剤を入れたシャーレを置いた。展開時間は約 17 時間から 30 時間までの間で溶剤前線が直径 35 cm 以上になるまで行つた。

別に試料を濾紙の中心に 1 個塗布して同様に展開した。

以上によつて検出された Rf 値と発色を既知アミノ酸のそれと比較同定した。

実験成績

対照とした既知アミノ酸の 1 次元法による Rf 値は第 2 表に示す如くである。

同じアミノ酸の円形クロマトグラフィーによる Rf 値は上昇法のそれよりも稍大であつた。（表は省略）

なお，東洋濾紙 No. 50 を用いて実験を行つた場合，溶剤前線及びその近くに黄褐色の着色物が出来，特にこれは phenol を溶剤とした場合に著しく，Rf 値が 0.8 位になると乱れて測定出来なくなるのでこれを除く目的で蒸溜水を入れた装置に濾紙を入れ 1 次元法と同じように濾紙上端まで蒸溜水を上昇せしめた後乾燥して実験に使用した。この操作によつて phenol でも全てのアミノ酸の Rf 値が測定出来るようになり，しかも再現性も良くなつた。又他の溶剤で起る teiling もこれによつて少くなつた。

各試料のアミノ酸分析は上昇次元法によつて充分行い得る。この場合の溶剤は phenol, collidine の組合せが最もよい分離を示した。但し collidine にはその製品によつて Rf 値の異るものがある為，同一製品で実験を行わなければならないと云う不便があり，又 collidine は Rf 値が低いので 30 cm 以上溶剤を上昇させなければならない欠点のある事は止むを得ない。

Phenol, bu-ac, の組合せも悪くはないが，どちらも酸性溶剤であるから Rf 値が似ているために分離し難いものもあつた。

又 phenol, bu-py の組合せでは分離は良いが spot が広り易かつた。然し溶剤に phenol, bu-ac, 又は bu-py を用いた場合は円形クロマトグラフィーで 35cm 以上に展開すればこれのみで殆ど全てのアミノ酸を各試料から分離検出することが出来た。

第 1 図は 1 例として結核菌脱脂菌体の塩酸加水分解物〔試料（i）〕の phenol, collidine による上昇式次元展開によつて得られたクロマトグラムを示したものである。図に見られるように 16 種類のアミノ酸即ち alamine, leucine, serine, cystine, glutamic acid, tyrosine, lysine, phenylanine, arginine histidine, threonine, valine, aspartic acid, methionine, glycine 及び proline が検出された。

以下試料（ii）より（v）まではクロマトグラムを

第 2 表　各種溶剤によるアミノ酸の Rf 値

アミノ酸＼溶剤	Phenol	Collidine	n-Butanol	BuAc	BuPy	Benzyl alcohol
dl-α-alanine	0.55	0.12	0.06	0.30	0.51	0.02
β-alanine	——	0.08	0.02	0.28	0.51	0.15
L-(−)-leucine	0,84	0.34	0.30	0.62	0.72	0.19
dl-iso-leucine	0.85	0.32	0.28	0.60	0.70	0.18
dl-serine	0.36	0.09	0.03	0.17	0.47	0.01
L-(−)-cystine	0.29	0.03	0.01	0.07	——	0.00
L-(+)-glutamic acid	0.28	0.06	0.01	0.21	0.54	0.00
L-(−)tyrosine	0.62	0.41	0.13	0.40	0.68	0.12
L-(+)-lysine monohydro chloride	0.45	0.03	0.01	0.10	——	0.00
dl-β-phenyl alanine	0.87	0.39	0.31	0.56	0.75	0.36
L-arginine hydrochloride	0.60	0.04	0.01	0.13	0.18	0.01
L-histidine	0.70	0.09	0.04	0.13	0.50	0.02
dl-threonine	0.50	0.12	0.04	0.23	0.52	0.02
dl-valine	0.76	0.23	0.17	0.47	0.64	0.11
L-aspartic acid	0.17	0.05	0.00	0.13	0.49	0.00
asparagine	0.17	0.05	——	0.13	——	——
dl-methionine	0.81	0.32	0.18	0.45	0.68	0.18
L-(−)-tryptophane	0.75	0.40	0.26	0.43	——	——
cysteine	0.31	——	0.00	0.06	0.42	0.00
L-proline	0.91	0.17	0.07	0.32	0.58	0.12
glycine	0.40	0.06	0.03	0.16	0.50	0.02

省略しそのアミノ酸構成を一括して第3表に示した。表のごとく菌体，菌体アルカリ抽出蛋白においては 16 種類，ツベルクリン蛋白では tyrosine を除く 15 種類，アルカリ抽出液では菌体で検出される 16 種類の他に tryptophane をも証明することが出来た。

アルカリ抽出液は三塩化酢酸で蛋白を除去したもの〔試料 (iv)〕も，加熱濃縮したもの〔試料 (v)〕も Rf 値に一部差はあるがアミノ酸構成は定性的には同じであつた。

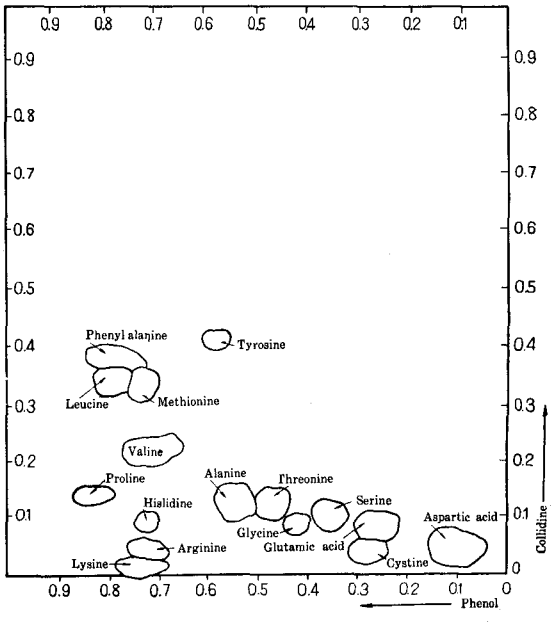
考　　察

結核菌の菌体蛋白構成アミノ酸については前述の如く多くの研究があるがそのうち著者の成績と若干異るものを挙げて見ると山村らは taurine を証明したが methionine を証明せず，佐藤らは tryptophane, glucosamine を，Rao らは tryptophane, iso-leucine を証明している。著者は上述の如く methionine, の証明は出来たが，taurine, tryptophone, glucosamine, iso-leucine 等の証明は出来なかつた。この内 iso-lencine についてはその存在を認め得るようにも思われるが，iso-leucine と leucine の Rf 値が似ているために分離がし難く，その為判明とその存在を確認する事は出来なかつた。又 tryptophane の存在については Rao らがその証明のために水酸化バリウムで加水分解しているに反し，著者は塩酸で加水分解を行つたのみであるから水解中に tryptophane が分解して証明されなくなつたのかも知れない。この推察は菌体のアルカリ抽出液に tryptophane の証明されることから見てもある程度正

第 3 表　各試料のアミノ酸構成

試料 / アミノ酸	(i) 結核菌体蛋白	(ii) ツベルクリン蛋白	(iii) 結核菌体アルカリ抽出蛋白	(iv) 結核菌体アルカリ抽出液 A	(v) 結核菌体アルカリ抽出液 B
alanine	+	+	+	+	+
leucine	+	+	+	+	+
serine	+	+	+	+	+
cystine	+	+	+	+	+
glutamic acid	+	+	+	+	+
tyrosine	+	−	+	+	+
lysine	+	+	+	+	+
phenyl alanine	+	+	+	+	+
arginine	+	+	+	+	+
histidine	+	+	+	+	+
threonine	+	+	+	+	+
valine	+	+	+	+	+
aspartic acid	+	+	+	+	+
methionine	+	+	+	+	+
glycine	+	+	+	+	+
tryptophane	−	−	−	+	+
proline	+	+	+	+	+

第 1 図　結核菌菌体加水分解物の上昇式二次元法による Chromatogram. 一次 phenol, 二次 collidine, 21°C, 溶剤前線：phenol＝27cm, collidine＝31cm, 試料塗布点：右下端 0 の位置



しいものと思われる。一方ツベルクリン蛋白についての先人の成績を見るに山村らは tyrosine, cystine, histidine を，佐藤らは phenyl alanine を証明出来ないと述べているが，著者の実験では tyrosine の証明が出来なかつたほかはすべて証明することが出来た。尚 tyrosine が証明出来なかつたのは tyrosine の濃度が菌体のそれよりも低いためではないかとも考えられる。何となれば tyrosine の検出には比較的多量を要ししかも発色が黄色乃至褐色なため少量の場合検出が困難だからである。

菌体のアルカリ抽出蛋白の構成アミノ酸は菌体水解物のそれと質的には同じであるがこれを酵素学的に若干眺めて見よう。

Corper, Sweang[17] その他多くの学者の述べている如く人型並びに牛型結核菌は自己融解酵素を持つて居る。Baisden, Yegian[18] によると Autolyse はエーテルアルコールで生菌を処理すると増強すると云う。また

Wong[19] は結核菌はアルカリ性 (pH 8.0) にした方が対照 (pH 5.8) よりも tuberculin が 2 倍以上得られたと述べ，Wong, Duyang[20] は合成培地に $H_{37}Rv$ を植え 4 週後濾過し，濾液を取除き菌体を 2 分し，一方に

0.05 N NaOH 150 cc を他方には滅菌水 150 cc を加えて毎日フラスコを振盪したが，結核菌の Autolyse は NaOH の方では 3 日目に現われ 14 日目には殆ど intact な cell は見られなかつたに反し，滅菌水の方は Autolyse がおきなかつたと述べている。

以上を考慮して著者の実験を眺めて見るとアルカリ抽出液中の蛋白は菌体から単に抽出されたものばかりでなく，エーテルアルコールによつては酵素は破壊されないから当然 Autolyse が起つているものと考えられるので，Autolyse による菌体破壊に抽出が加わつたものと考えてよい。又実際に抽出後の作成途中で菌体の破壊状態を顕微鏡で観察したが，中性抽出では見られない程早期（数日）に破壊が起つていたことも Autolyse の旺盛な事を示すものである。従つてアルカリ抽出液のアミノ酸構成分塩酸加水分解と質的に同じであつたにしても量的には可なり相違するものがある事は容易に想像される。然し Rao らの云うごとく，培養日数，培地中の N 源等によつて菌体蛋白自体の構成アミノ酸も量的に変動するものであるから量的な比較と云う事は非常に難しい。ここに述べたペーパークロマトグラフィーに他の生化学的な方法を併用する事によつて，結核菌の菌体構成分は更にはつきりして行くものと考える。

結　　論

ソートン培地に 6 週間培養した人型結核菌青山 B 株のエーテルアルコール（1：1）脱脂菌体及びツベルクリンの塩酸加水分解物並びにアルカリ処理菌体蛋白の構成アミノ酸を paper chromatography によつて分析検出し，次の結果を得た。

結核菌体蛋白の構成アミノ酸として serine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, valine, leucine, phenyl alanine, threonine, proline, cystine, histidine, arginine, lysine, methionine 及び tyrosine の 16 種類を検出し得た。

ツベルクリン蛋白については tyrosine を除く 15 種類，菌体のアルカリ抽出液では前記の 16 種類の他に tryptophane を証明出来た。

tryptophane は塩酸加水分解中に分解されるためにアルカリ抽出液以外では証明出来なかつたものと考える。

尚各試料とも iso-leucine が存在するようにも思われたが leucine と明らかに区別することが困難であつたのでこれを除外した。

稿を終るに当り御指導並びに御校閲を賜わつた大原教授に感謝致します。

文　　献

1. Gordon, A. H., Martin, A. J. P. and Synge, R. L. M.: Biochem. J., 37, 79, 1943.
2. Gordon, A. H., Martin, A. J. P. and Synge, R. L. M.: Ibid., 37, 86, 1943.
3. Gordon, A. H., Martin, A. J. P. and Synge, R. L. M.: Ibid., 37, 92, 1943.
4. Consden, R., Gordon, A. H. and Martin, A. J. P.: Biochem. J., 38, 224, 1944.
5. Dent, E.C.: Biochem. J., 43, 169, 1948.
6. Ma, R. A. and Fontaine, T. D.: Science, 110, 232, 1949.
7. Rutter, L.: Nature, 161, 435, 1948.
8. Zimmerman, G. und Nehring, K.: Angew. Chem., 63, 556, 1951.
9. Giri, K. V. and Rao, N. A. N.: Nature, 169, 923, 1952.
10. Giri, K. V. and Rao, N. A. N.: Chemical Abstract, 46, 9019, 1952.
11. Giri, K. V. and Rao, N. A. N.: J. Inst. Sci., 34, 95, 1952.
12. Giri, K. V.: Nature, 171, 1159, 1953.
13. 山村雄一・清水 豊：医療，4 (1)，13，1950.
14. 佐藤正二郎・阿部政次：抗酸菌病研究雑誌，8 (1)，28，1952.
15. 川瀬好生：医療，増刊号，103 頁，1956.
16. Rao, N. A. N. and Wadhani, T. K.: J. Bact., 72 (1), 12, 1956.
17. Corper, H. J. and Sweang. H. C.: J. Bact., 3, 129, 1918.
18. Baisden, L. and Yegian, D.: J. Bact., 45, 163, 1943.
19. Wong, S. C.: J. Bact., 33, 451, 1937.
20. Wong, S. C. and Duyang, G.: Proc. Soc. Exp. Biol.& Med., 45, 845, 1940.
21. 山根 績・森川盛雄・木村卓夫：日本細菌学雑誌，5，190，1950.
22. 梅村清彦：現代医学，2 (1)，39，1951.
23. 石井清英：長崎医学会雑誌，29 (3)，218，1954.
24. 曾我美勝・田代 裕・広田猛夫：日本生理学雑誌，16 (5)，228，1954.
25. 片山富男・田中伸一：結核，29 (11)，427，1954.
26. 佐竹一夫：クロマトグラフィー（共立出版株式会社）1953.
27. 桑田 智：クロマトグラフィー（広川書店），1954.
28. 桑田 智：続クロマトグラフィー（広川書店），1955.
29. Cramer, F.: Paper Chromatography (London Macmillan), 1955.
30. 山村雄一：結核菌の生化学（共立出版株式会社），64，1955.