



Title	結核菌培養濾液タンパク質の分画
Author(s)	小野寺, 昌彦; ONODERA, Masahiko; 黒野, 憲二 他
Description	
Citation	結核の研究, 34, 38-49
Issue Date	1974-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26833
Type	departmental bulletin paper
File Information	34_P38-49.pdf



結核菌培養濾液タンパク質の分画

小野寺昌彦 黒野憲二 塩川洋之

北海道大学結核研究所生化学部

(昭和48年9月25日受付)

結核菌の培養濾液に含まれる化学成分は古くから広汎に研究されているが、特にタンパク質の分離についてはツベルクリン反応との関連において多くの試みがなされてきた¹⁻⁸⁾。現在ツベルクリン反応は単に結核症における診断法としてのみならず、細胞免疫における典型的な遅延型アレルギーとして注目されているが、その抗原として結核菌培養液中の各化学成分の確認、均一性あるいは物理化学的および免疫学的性質等は再検討されねばならない点が多い。われわれはこのような観点から、遅延型アレルギー機作解明の第一段階として、従来からツベルクリン活性と最も関係が深いと考えられている菌培養濾液中のタンパク質の詳細な分画を行なったので報告する。

実験材料および方法

1. 試薬類

アンスロンはキシダ化学(試薬特級)のものを用いた。セファデックス G-200 は pharmlacia 社製のもの、DEAE-セルロースは培養液の最初の分画にはミドリ十字社製、以下の分画には DE-32 (Whatman) を用いた。DEAE-セルロースは 0.5N 水酸化ナトリウム溶液、脱イオン水、0.5N 塩酸溶液、脱イオン水、0.5N 水酸化ナトリウム溶液、脱イオン水の順序で処理し活性化した。このとき最後の洗液が脱イオン水の pH と同じ値を示すまで洗滌した。使用に際しては用いる緩衝液で平衡化した Peterson ら^{9,10)}の方法に準じてクロマトグラフィーを行なった。

2. タンパク質の定量

タンパク質は核酸あるいは糖が混在する場合はトリクロール酢酸を加えて生じた沈澱を水酸化ナトリウム溶液で溶かしたものについて、ウシ血清アルブミン (Armour 社製、3 回再結晶製品) を標準物質として Lowry 法¹¹⁾で定量した。核酸あるいは糖が混在しないかあるいは少ない場合、特にタンパク質を細分画するクロマトグラフィーを行なう場合には、日立製 124 ダブルビーム式分光光度計を用いて 215 nm あるいは 280 nm における紫外部吸収の吸光度を測定してタンパク質のクロマトグラ

フィーのパターンを追跡した。

3. 糖の定量

糖はグルコースを標準物質として Scott ら¹²⁾のアンスロン-硫酸法で定量した。

4. ディスク電気泳動

培養濾液および分画操作によって得られた画分のディスク電気泳動は Ornstein¹³⁾ および Davis¹⁴⁾の方法にしたがい 7.5% ゲル (pH 8.9) 5×70 mm の管を用いて行なった。

5. 結核菌の培養

ヒト型結核菌 H₃₇R_v 株をソートン変法培地 (アスパラギン 4 g/l をグルタミン酸ナトリウム 8 g/l で置きかえたもの、その他の成分はもとのソートン培地と同じである) で 37°C、6~10 週間培養したが、培養液の最終 pH は培養ロット毎にかなりの変動を示した。此の実験では最終 pH が酸性の培養濾液 (10 週間培養、酸性培養濾液と略記) とアルカリ性の培養濾液 (6 週間培養、アルカリ性培養濾液と略記) を出発材料として用いた。

6. モルモットの感作

加熱 H₃₇R_v 死菌をアジュバントとして Arlacel-Dra-keol (1:9) に 10 mg/ml となるようにホモジナイザーで混和懸濁し、体重 500~800 g のモルモットの左右大腿部外側の筋肉内に 0.5 ml ずつ計 1 ml を 1 回注射した。

7. 皮内反応

各段階で得られた画分のタンパク質量が 1 ml あたり 20 μg になるように希釈し、希釈液 0.1 ml を感作したモルモットの腹部皮内に注射し、6, 24, 48 時間後又は 18, 24 時間後の発赤の縦と横の長さを測定し、その平均値を発赤の強さとして示した。

実験結果

I. 濾液タンパク質の分画

方法の項で述べたように、H₃₇R_v 株の 6~10 週間培養液の最終 pH は各ロット毎に大きく異なり且つ培養濾液中のタンパク質量にも著しい差がみられたので、出発材料としては最終 pH がアルカリ性の培養液 (pH 8.4, Jan. 21, '70) と酸性の培養液 (pH 5.45, Oct. 20, '70) をサイ

濾過（東洋濾紙 No. 85 SB, 径 14.5 cm を使用）により菌体成分を除いて得られた濾液を用い、それぞれ別々に分画を行った。分離法としては、分画中にタンパク質の変性を避けるため、温和な分離法であるイオン交換セルロースクロマトグラフィー、ゲル濾過あるいは硫酸アンモニウムによる塩析等を適当な順序に組合わせて用いた。

A) アルカリ性濾液 (Jan. 21, '70) タンパク質の分画

表 1 にこの培養濾液のタンパク質量および紫外外部における吸光度を示した。表にみられるようにトリクロル酢酸 (以下 TCA と略記) で沈澱させて Lowry 法で測定したタンパク質量は 0.586 mg/ml であるが、260 nm および 280 nm における吸光度は高く、特に 260 nm における値が 280 nm における値の約 2 倍近いことは濾液中に多量の核酸および多糖類が存在することを示唆している。

表 1 F1 (アルカリ性培養液) の諸性状と F2 および F4 のタンパク質の回収量

F1	タンパク質濃度	0.586 mg/ml	
	pH	8.4	
	伝導度	460 μC	
	$E_{280}^{1\text{cm}}$	7.0	
	$E_{260}^{1\text{cm}}$	13.7	
	容積 (ml)	タンパク質濃度 (mg/ml)	タンパク質量 (mg)
F1	18000	0.586	10550
F2	3400	2.30	7820
F4	310	17.8	5500

(1) DEAE-セルロースカラムによる糖成分の除去 (操作 1)

濾液中に多量存在する多糖類はタンパク質と非特異的な結合を形成しやすく、分画操作を著しく困難にすると予想されるので、DEAE-セルロースカラムによる糖の分離を試みた。図 1 に示すように 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した DEAE-セルロース (ミドリ十字社製) カラムに濾液を通すと糖成分の大部分は吸着されず素通りするが、タンパク質はほとんど吸着され NaCl 濃度の増加とともに溶出されて 0.5M の NaCl 濃度ではすべてのタンパク質が溶出された。以上の予備実験から、実際には濾液 (F1 と略記) 18 l を 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に 2 回以上透析後、上記緩衝液で平衡化した 10×60 cm の DEAE-セルロースカラムに流し、素通りする糖成分をすて、吸着したタンパク質区分を 0.5M NaCl-30 mM リン酸緩衝液で溶出して集め、タンパク質濃度 2.30 mg/ml の液 3400 ml を得た (F2)。この操

作により 10550 mg の F1 から 7820 mg の F2 が回収された。

(2) 硫酸アンモニウムによる濃縮 (操作 2)

3400 ml の F2 に固体硫酸アンモニウムを 90% 飽和

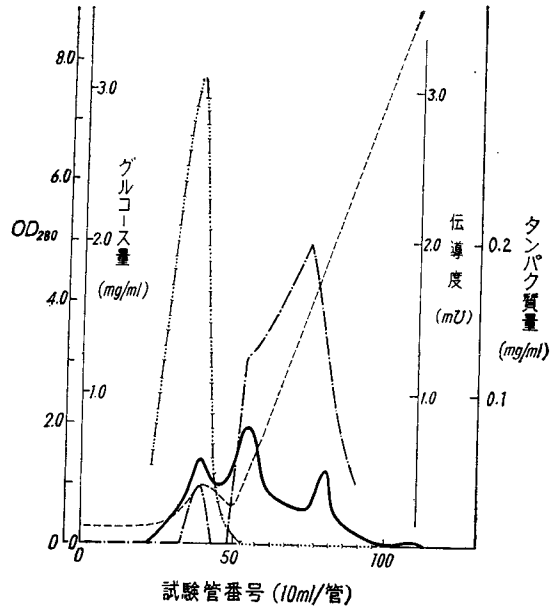


図 1 アルカリ性培養濾液の DEAE-セルロースクロマトグラフィーの溶出パターン
カラム: 2.64×29 cm, 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) NaCl 0→1M
— OD₂₈₀, (---) グルコース, (·····) タンパク質, (-·-·-) NaCl

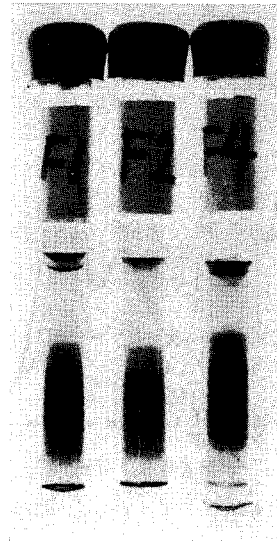


図 2 アルカリ性濾液 (Jan. 21, '70) より得られた F1, F2, F4 のディスク電気泳動像

に達するまで加え、生じた沈澱を冷却遠心機により集めた。沈澱は 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) にとかし (F3)、セロファンチューブに入れて同緩衝液に一夜透析した。透析後生じた不溶物を遠心により除いた液は容積が 310 ml、タンパク質濃度は 17.8 mg/ml で 5500 mg のタンパク質が回収された (F4)。これら 1, 2 の操作により、濾液中のタンパク質の半量が F4 として得られ、タンパク質の濃度は 30 倍に濃縮された。培養濾液中には多数の蛋白質が存在することが予想されるが、実際そのディスク電気泳動パターンには図 2 に示すように多くのバンドが見られた。F1 のパターンにバンドとして見られるすべてのタンパク質が F4 に回収されたかどうかを識別することは困難であったが、後で述べるように F4 画分は 2 μ g のタンパク量で強い皮内反応を示したので、少なくともツベルクリン活性に関連のあるタンパク質の大部分は F4 画分に回収されたものと考えられる。この画分から以下の細かな分画を行なった。

(3) セファデックス G-200 によるゲルクロマトグラフィー (操作 3)

pH 6.5 の 10 mM リン酸緩衝液に平衡化させたセファデックス G-200 カラム (2.64 \times 94 cm) 上で F4 のゲルクロマトグラフィーを行ない、図 3 に見られるように 3 つの主なピーク (F5-1, F5-2, F5-3) が得られた。操作 1. によって除くことのできなかった糖成分は void volume で溶出された F5-1 のみにみられ、他のピークには全く

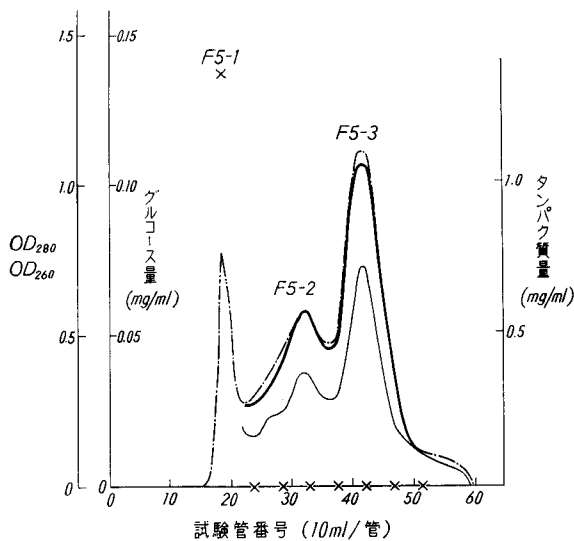


図 3 F4 のセファデックス G-200 による分画
カラム: 2.64 \times 94 cm, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5), — OD₂₈₀, - - - OD₂₆₀, -x-x-x- グルコース, - - - - タンパク質

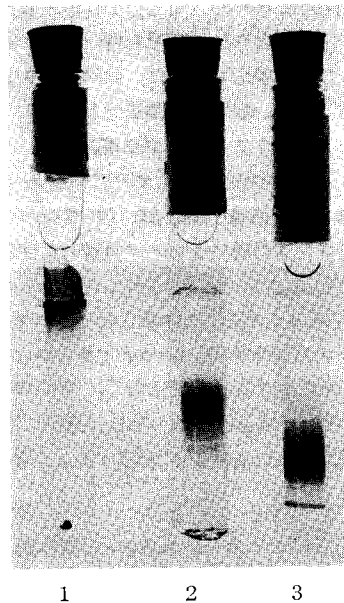


図 4 F4 のセファデックス画分の
ディスク電気泳動像
1. F5-1, 2. F5-2, 3. F5-3

検出されない。F5-2 と F5-3 では 280 nm と 260 nm における吸光度の比が 1.6 を示すので、これらのピークに混在する核酸の量はほとんどないかあるいはあっても非常に少ないものと考えられる。F5-2, F5-3 の E_{280}^{260nm} の値はいずれも約 10 であった。したがって以下の分画操作においては 280 nm の吸光度を測定してタンパク質量の定量を行なった。

F5-1, F5-2, F5-3 のディスク電気泳動のパターンを図 4 に示したが、図に見られるように、セファデックス G-200 カラムから遅れて溶出する画分ほど即ち分子量の小さいものほど泳動距離が長い。このことはこれらのタンパク質の泳動距離は主としてタンパク質の分子量の大きさに関係していることを示している。

(4) F5-2 の細分画 (操作 4)

上に得られた F5-2 は操作 3. と同じ条件下でセファデックス G-200 上で再クロマトグラフィーを行なった後に、固体硫酸アンモニウムを 90% 飽和に達するまで加え、生じた沈澱を 90% 飽和硫酸アンモニウム液で十分洗滌した。沈澱を遠心により集め、予め 90% 飽和硫酸アンモニウムで十分洗って平衡化したセライト (セライト 535) カラム (2 \times 5 cm) に乗せてセライトカラム上端の表面にタンパク質の層をつくらせた。さらにクロマトグラフィー中に沈澱タンパク質の拡散を防ぐために少量のセライトを乗せて層をつくった。次に 400 ml の水

を極限緩衝液槽に400 mlの90% 飽和硫酸アンモニウム水溶液 (pH 6.6) を混合槽に入れ、硫酸アンモニウム濃

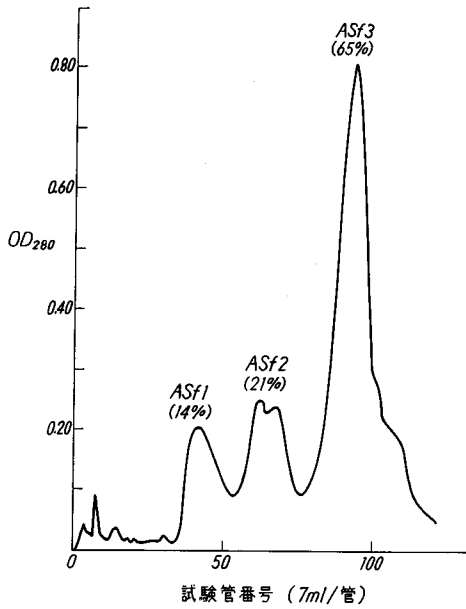


図5 F5-2の硫酸アンモニウム溶解度差クロマトグラフィーによる分画

カラム: 2×5 cm, pH 6.6 (NH₄)₂SO₄, 90→0% 飽和

度が直線的傾斜で減少する溶離液をカラムへ入れてクロマトグラフィーを行なった。その溶出パターンを図5に示すが、3つのピーク (ASf1, ASf2, ASf3) が得られた。これらのピークのうち、ASf1はディスク電気泳動

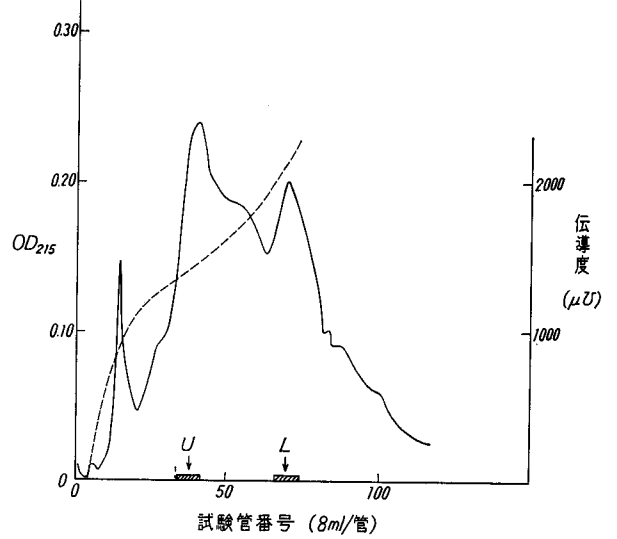


図7 ASf2のDEAE-セルロースによる分画

カラム: 0.9×30 cm, 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) NaCl 0.1→0.5 M, — OD₂₁₅, - - - NaCl

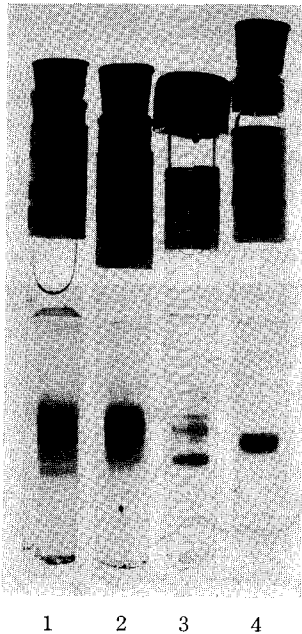


図6 F5-2の硫酸アンモニウム溶解度差クロマトグラフィーで得られた画分のディスク電気泳動像

1. F5-2, 2. ASf3, 3. ASf2, 4. ASf1

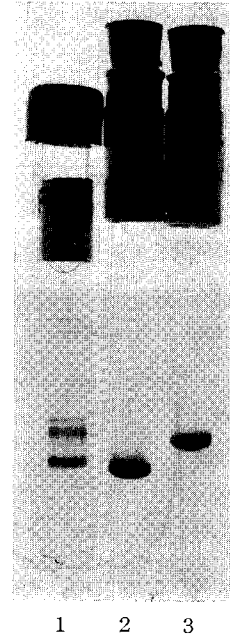


図8 ASf2のDEAE-セルロース・クロマトグラフィー画分のディスク電気泳動像

1. ASf-2, 2. L-フラクション, 3. U-フラクション

パターン (図6) に見られるように、単一なバンドを示した。ASf2を30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で十分透析後、同緩衝液に平衡化した DEAE-セルロース (ミドリ十字社製) カラムで NaCl 濃度を上昇させてクロマトグラフィーを行なった。その溶出パターンを図7に示すが、2つの主なピーク (U, L) が得られ、それらをそれぞれ上と同じ条件で再クロマトグラフィーを行なって得た画分は図8に見られるようにディスク電気泳動でいずれも単一なバンドを示した。

ASf3はF5-2の65%を占める画分で、放置すると沈

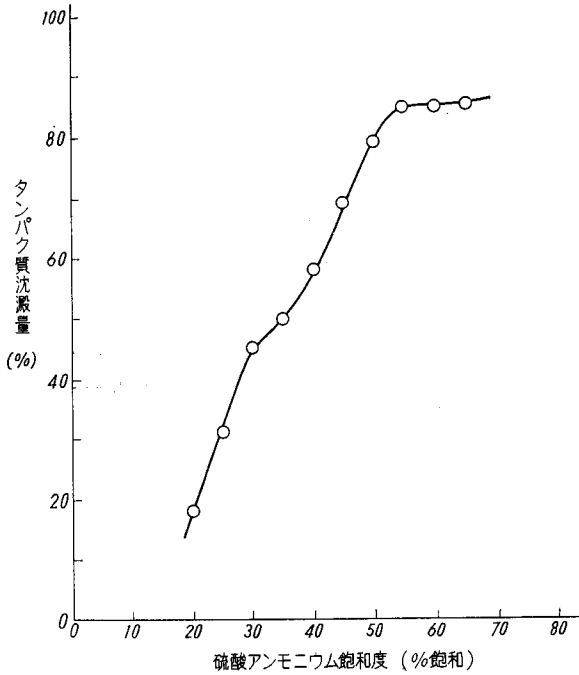


図9 F5-3の硫酸アンモニウムによる塩析曲線

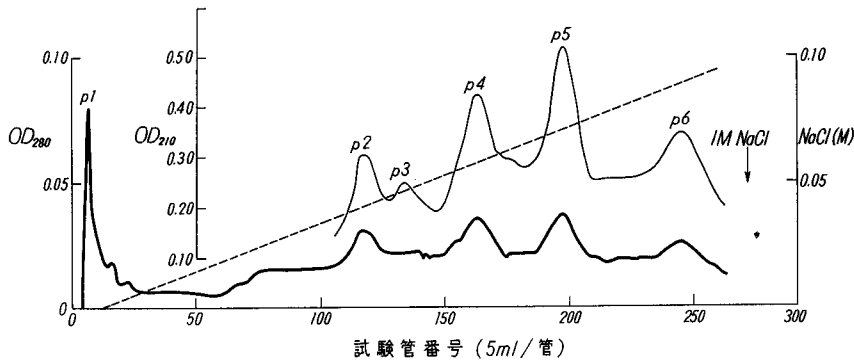


図11 F5-3 (硫酸アンモニウム 35~60% 飽和沈澱部分) の DE-32 による分画
 カラム: 0.9×39 cm, 30 mM リン酸緩衝液, NaCl 0~0.15 M,
 — OD₂₈₀, — OD₂₁₀, - - - NaCl

澱を作りやすく不安定であった。又 pH を 4.5 に下げると大部分 (約 85%) が沈澱した。このような点から考えて、此のタンパク質は Seibert²⁾ の得た C-タンパク質と似ているように思われる。

(5) F5-3の細分画 (操作5)

F4の約50%を占めるF5-3の細分画を行なうために、F5-3について硫酸アンモニウムの飽和度を変えた場合のタンパク質の沈澱の量を調べた。その結果を図

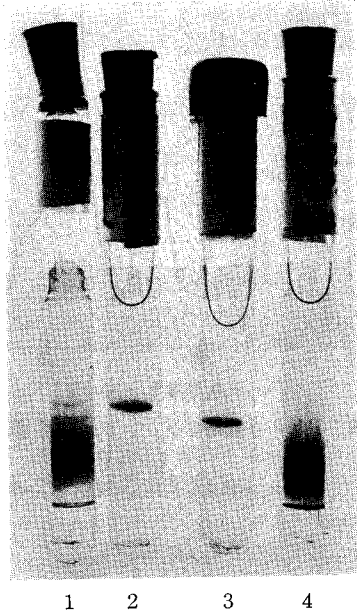


図10 F5-3 (硫酸アンモニウム 0~35% 飽和沈澱部分) の DE-32 カラムクロマトグラフィー画分のディスク電気泳動像

1. F5-3 (0~35% 飽和沈澱部分)
2. フラクシオン-1, 3. フラクシオン-2
4. 1 M NaCl 溶出画分

9に示す。タンパク質の沈澱量はその増加量が飽和度約30%および60%の点において減少しているので、35%飽和で沈澱する画分と35~60%飽和の間で沈澱する画分とに分画した。35%飽和で沈澱する画分を30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した DE-32 カラム上でクロマトグラフィーを行なった。図には示さないが同上緩衝液による one step elution で添加した試料の4.5%に相当する量が2つのピークとして分離しディスク電気泳動に均一なバンドを示した (図10)。残りの部分は NaCl 濃度の直線勾配溶出でよく分離せず1 M NaCl でまとめて溶出したが、そのディスク電気泳動パターンはいくつかのタンパク質の混在を示す幅広いバンドを示した。

35~60% 飽和で沈澱する画分は30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で透析後、同緩衝液で平衡化した DE-32 カラムで NaCl の濃度を0~0.15 M に直線的勾配で増加させる溶離液でクロマトグラフィーを行なうと、図11に示すように6つの主なピークが得られた (p1, p2, p3, p4, p5, p6)。これらの画分のディスク電気泳動パターンを図12に示すが、カラムに吸着されないピーク p1 は単一のバンドを示したが他のピークはいずれも隣接するピークの混在を示す2本のバンドがみられ、分画がまだ不十分であったことを示した。表2に操作(1)~(5)までの分

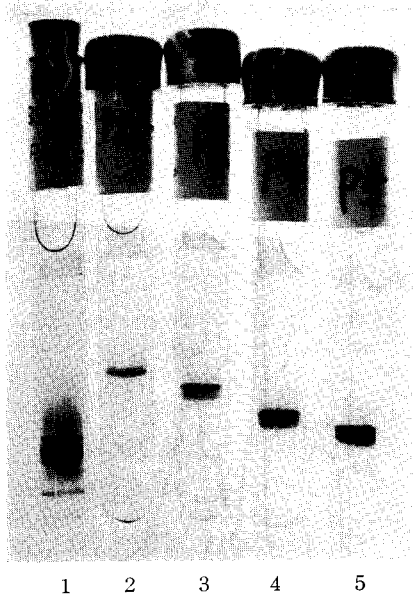


図12 F5-3 (硫酸アンモニウム 35~60% 飽和沈澱画分) の DE-32 カラムクロマト画分のディスク電気泳動像
 1. F5-3 (35~60% 飽和沈澱画分), 2. p-1, 3. p-2, 4. p-4, 5. p-5

表2 各画分 (アルカリ性培養液) のタンパク質の回収量

F1	10 g			
F4	6 g			
F5-1	1.2 g	ASf1	150 mg	
F5-2	1.1 g		ASf2	230 mg
			ASf3	720 mg
F5-3	3.0 g	FrI	39 mg	
	0~35%		FrII	29 mg
			1.42 g	
	35~60%	p1	40 mg	
			p2	95 mg
			p3	49 mg
			p4	105 mg
			p5	110 mg
			p6	75 mg
	>60%		0.24 g	

画によって得られた各画分のタンパク質量をまとめて示した。

B) 酸性濾液 (Oct. 20, '70) タンパク質の分画

この濾液に含まれるタンパク質成分もアルカリ性培養液とほぼ同様の方法で分画することが可能であった。ただ濾液 F1 の pH が低くかつ電導度も高いので (表3)、このままの状態では、濾液中の大部分のタンパク質は DEAE-セルロースに吸着されなかった。しかし 20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) に透析した濾液中のタンパク質はほとんど同上緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースカラムに吸着され、糖とタンパク質画分を分離することができた (図13)。DEAE-セルロースから 0.5 M NaCl で溶出されたタンパク画分をアルカリ性濾液の場合と同様に処理して 90% 飽和硫酸アンモニウム沈澱で濃縮し透

表3 F1 (酸性培養液) の諸性状と F2 および F4 のタンパク質の回収量

F1	タンパク質濃度	0.178 mg/ml	
	pH	5.45	
	伝導度	600 $\mu\Omega$	
	E ₂₈₀ ^{cm}	10.4	
	E ₂₆₀ ^{cm}	22.4	
	容積 (ml)	タンパク質量 (mg)	
	濃度 (mg/ml)	タンパク質量 (mg)	
F1	950	0.178	170
F1 (透析後)	950	0.150	140
F2	100	1.15	115
F4	11	9.0	99

析してF4を得た。アルカリ性濾液とくらべ、酸性濾液にはタンパク質量も1ml当り約1/3程度で、図14のディスク電気泳動パターンから示されるように、タンパク質の成分の種類も少なくなっている。F4のセフアデックスG-200上のゲルクロマトグラフィーによっては、図15に示すように3つのピークが得られた。図から明らかなようにF5-2画分がアルカリ性濾液のそれにくらべて非常に少ない。これはアルカリ性濾液のF5-2の65%を

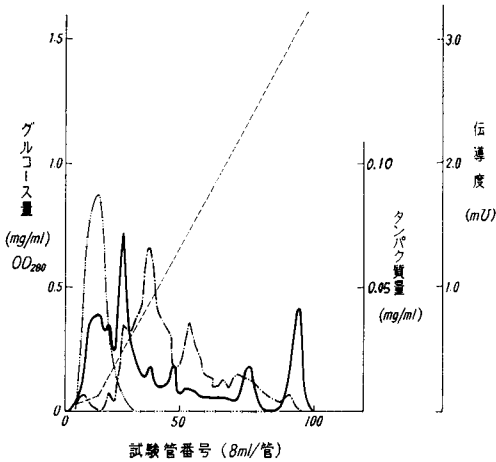


図13 酸性培養濾液のDEAE-セルロースクロマトグラフィーの溶出パターン

カラム: 1.5×30 cm, 20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) NaCl 0→0.5 M, — OD₂₈₀, グルコース, - - - - - タンパク質, NaCl

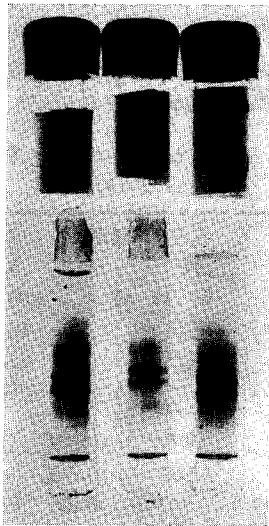


図14 酸性濾液 (Oct. 20, '70) より得られたF-1, F-2, F4のディスク電気泳動像

占めるASf3が酸性で沈殿することから考えて、酸性濾液の場合F5-2の一部が培養中に沈殿してしまい、その結果としてF5-2画分が少ない可能性も考えられる。F5-2画分を更に操作A.(4)と同様に硫酸アンモニウムの濃度を直線的勾配で減少させた溶離液を用いたクロマ

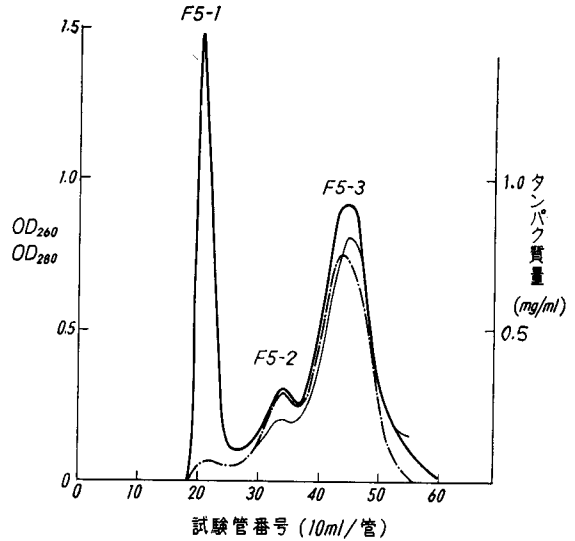


図15 F4のセフアデックスG-200による分画
カラム: 2.6×94 cm, 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5), — OD₂₈₀, - - - - - OD₂₆₀, タンパク質

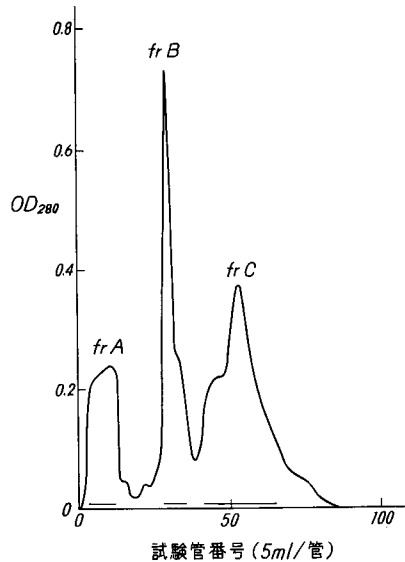


図16 F5-2の硫酸アンモニウム溶解度差クロマトグラフィーによる分画
カラム: 0.9×39 cm, pH 7.0, (NH₄)₂SO₄, 90→0% 飽和

トグラフィーにより3つの主な画分を得た(図16)。このうち frA は 260 nm に吸収極大を有し、そのディスク電気泳動ゲルはアミドブラックで染色されなかったので、核酸であると考えられる。frB はディスク電気泳動的に単一であった(図17)。frC を 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に平衡化した DE-32 カラムでクロマトグラフィーを行なった結果、図18に見られるように幾つかのピークが得られたが、この中で C-pII のみがディスク電気泳動的に単一であった(図19)。

次に F5-3 を予め 20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) で平

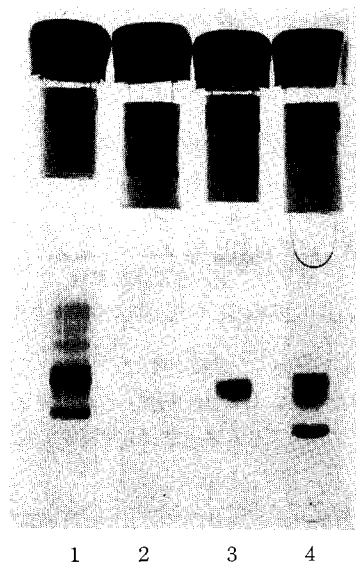


図17 F5-2の硫酸アンモニウム溶解度差クロマトグラフィー画分のディスク電気泳動像
1. F5-2, 2. frA, 3. frB, 4. frC

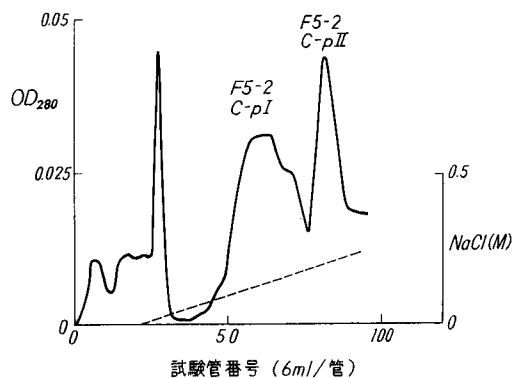


図18 frCのDE-32による分画

カラム: 0.9×35 cm, 30mM リン酸緩衝液 (pH 6.5), NaCl 0→0.5 M, — OD₂₈₀, ---- NaCl

衡化した DE-32 カラム (0.9×30 cm) で NaCl の直線濃度勾配溶離によるクロマトグラフィーを行なった結果、図20にみられるように4つのピークが得られた。ピーク pIII は電気泳動的に単一であった(図21)。更にピーク pIV を 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した DE-32 カラム (0.9×42 cm) で同じ緩衝液による one



図19 frCのDE-32クロマトグラフィー画分のディスク電気泳動像
1. frC, 2. C-pI, 3. C-pII

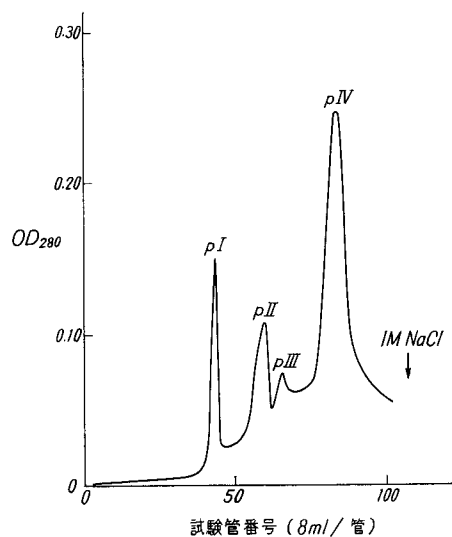


図20 F5-3のDE-32による分画

カラム: 0.9×30 cm, 20mM トリス緩衝液 (pH 8.0), NaCl 0→0.15 M

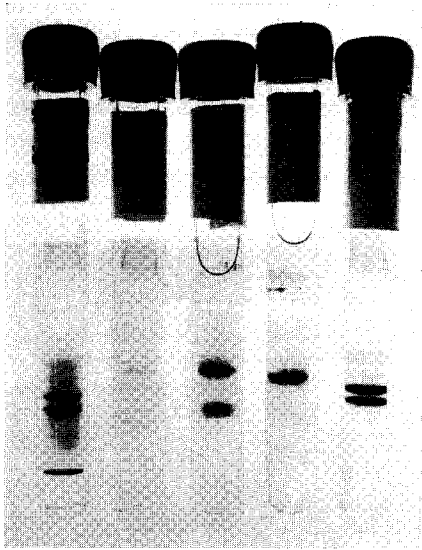


図21 F5-3のDE-32クロマトグラフィー画分のディスク電気泳動像
1. F5-3, 2. pI, 3. pII, 4. pIII, 5. pIV

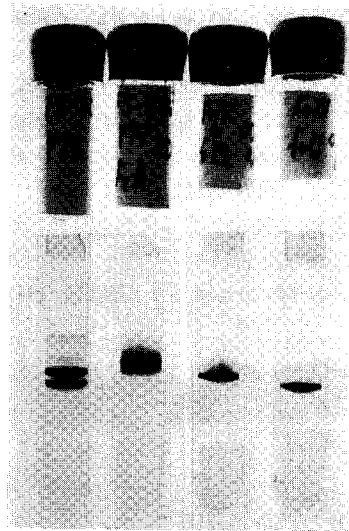


図23 pIVのDE-32クロマトグラフィー画分のディスク電気泳動像
1. pIV, 2. frA, 3. frB, 4. frC.

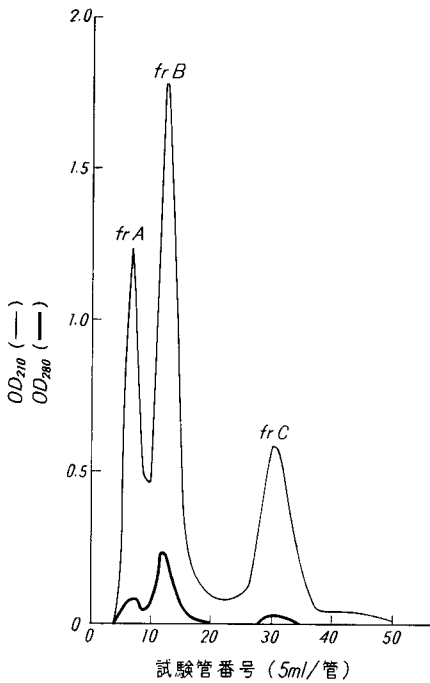


図22 F5-3 (pIV) のDE-32による分画
カラム: 0.9×42cm, 30mM リン酸緩衝液 (pH 6.5),
One-Step elution, — OD₂₈₀, — OD₂₁₀

step elution を行なった結果, 図22に示すように3つのピークを得た (frA, frB, frC) が, これらディスク電気泳動パターンはいずれも単一なバンドを示した (図23)。

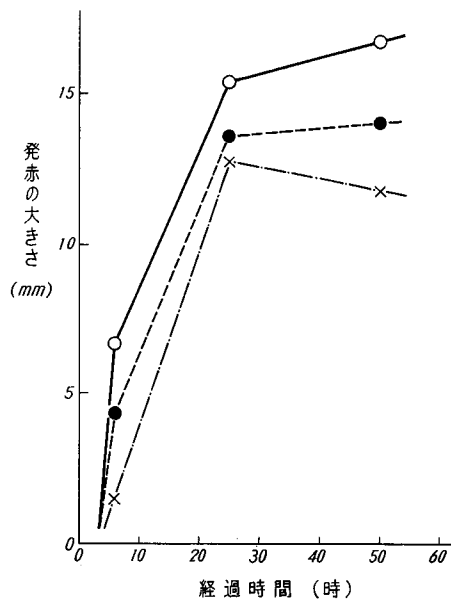


図24 F4, F5-2およびF5-3画分の皮内反応の時間経過
○-○-○- F4, ●-●-●- F5-2, -x-x-x- F5-3

II. 皮内反応

上に述べた分画操作により得られた画分のうちいくつかのものについて皮内反応の予備的実験を行なった。図24にはアルカリ性培養濾液から得られたF4, F5-2, F5-3についての皮内反応の経時変化の一例を示した。6時間ではF4, F5-2, F5-3いずれも反応は弱いですが、時間の経過と共に強くなりF5-3は24時間後においてF4, F5-2は48時間後において最強の値を示した。F4, F5-2は72時間後においてもいづれもまだかなりの強さの反応を示したが、F5-3では72時間後反応は大きく減弱した。こ

のようにこれらのタンパク質画分はいずれも H₃₇R_v 死菌感作モルモットに対して典型的な遅延型のツベルクリン反応を示した。

図25には9匹の感作モルモットに対してアルカリ性培養濾液から分画されたF4, F5-1, F5-2, F5-3の24時間後におけるツベルクリン活性の強さを棒グラフで示した。4画分はいずれも活性の強さにおいては大差はないが、F5-2がやや強い反応を示し、F5-3については、個体によっては陰性を示すものもみられた。

酸性培養濾液から得られたF4, F5-2, F5-3のツベル

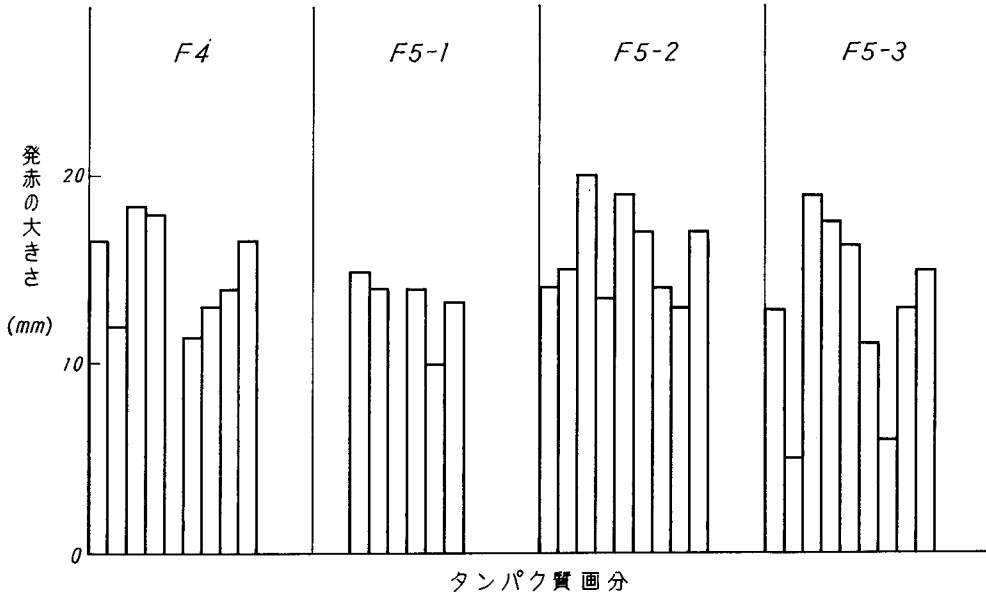


図25 F4, F5-1, F5-2およびF5-3の皮内反応の比較

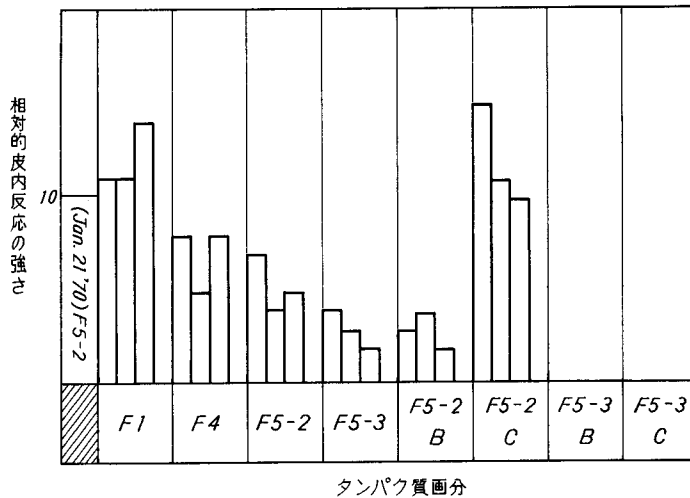


図26 F1, F4, F5-2, F5-3の皮内反応の比較

クリン活性は図 26 に見られるように、アルカリ性培養液から得られたそれぞれに対応する画分の活性にくらべかなり弱かった。しかし、F5-2 から得た F5-2-frC の画分は F5-2 よりも強い活性を示した。ディスク電気泳動で単一なバンドを示した F5-3frB と F5-3-frC 画分はいずれも発赤が観察されなかった。

考 察

現在まで結核菌培養濾液からタンパク質、特にツベルクリン活性タンパク質の分離についての報告は非常に多いが、培養濾液中に含まれるタンパク質を系統的に分画した報告はそれほど多くはない。Seibert²⁾は培養濾液から A-, B- および C-protein の 3 種類のタンパク質を分離しそのツベルクリン活性、物理化学的性質を詳細に調べている。Yoneda^{5,1)}は分域電気泳動法、カラムクロマトグラフィー、塩析を用いて培養濾液より 7 種のタンパク質を分離して抗原性を調べた。Affronti¹⁵⁾は、ポリアクリルアミドの電気泳動法により培養濾液のタンパク質および多糖質の分析を行ない、Kinker および LaBorde⁷⁾は結核菌培養濾液から DEAE-セルロースクロマトグラフィーにより約 20 種の抗原を分画し、その免疫学的性質について報告しているが、彼らの得た画分の化学的純度について言及していない。最近 Castelnovo¹⁶⁾は M. phlei 菌体の X-プレス破砕物抽出液からイオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー等によってタンパク質の分画を行なっている。しかしながら、これら分離されたタンパク質はそれぞれ各研究者独自の方法で分離されており、各タンパク質間の対応および異同の識別は困難である。

われわれは結核菌 H₃₇Rv の無蛋白培地から DEAE-セルロースクロマトグラフィー、セファデックス G-200 によるゲルクロマトグラフィー、硫酸アンモニウムによる塩析等の操作により、アルカリ性培養濾液からは少なくとも 14 種類のタンパク質を、酸性培養濾液からは少なくとも 12 種類のタンパク質を分離し、前者においては 6 種類の後者においては 5 種類のタンパク質がディスク電気泳動的に均一であった。培養濾液中には多数のタンパク質が存在することはそのディスク電気泳動パターンからも明らかで、それらのすべてタンパク質が分画分離されたかどうかを判断するのは困難であるが、各分画段階における画分のディスク電気泳動および最終段階における各タンパク質の総和量の収量が比較的よい（アルカリ性濾液ではタンパク質の収量は約 60% に達している）ことから考えて、濾液中にあった大部分のタンパク質が回収されたものと考えられる。したがって此の報告

に述べた分画操作は今後濾液からタンパク質を分画したりあるいは分離する場合に一つの参考例となるものと考えられる。

われわれの得た各画分の生物活性、特にツベルクリン活性については予備的実験しか行なっていないが、Sephadex 分画画分に皮内反応が陽性であることおよび水野¹⁷⁾によれば F5-1 と F5-3 が正常モルモットの脾臓細胞に対して blastogenic 活性があることは Sultzer¹⁸⁾の報告と共に興味のあることで将来詳細に研究を行なう予定である。

結 論

結核菌 H₃₇Rv 株のソートン変法培地 37°C, 6~10 週間培養濾液から DEAE-セルロースクロマトグラフィー、セファデックス G-200 によるゲルクロマトグラフィーおよび硫酸アンモニウムによる塩析等の操作により、アルカリ性培養液からは少なくとも 14 種類のタンパク質を酸性培養液からは少なくとも 12 種類のタンパク質を分離した。前者のうち 6 種類のタンパク質が、後者においては 5 種類のタンパク質がディスク電気泳動的に均一であった。

謝 辞

此の研究を行なうにあたり、結核菌の培養を行なっていただいた北海道大学結核研究所予防部門山本健一博士に深謝する。

参 考 文 献

- 1) E. B. Bevilacqua and J. R. McCarter: J. Exp. Med., **87**, 229 (1948).
- 2) F. B. Seibert: Amer. Rev. Tuberc., **59**, 86 (1949).
- 3) M. A. Jones, A. B. Larsen, T. H. Vardaman and L. A. Baisden: Amer. Rev. Tuberc., **68**, 425 (1953).
- 4) M. A. Jones, A. B. Larsen, T. H. Vardaman and L. A. Baisden: Amer. Rev. Tuberc., **68**, 439 (1953).
- 5) M. Yoneda and Y. Fukui: Biken's J., **4**, 25 (1961).
- 6) Y. Fukui and M. Yoneda: Biken's J., **4**, 187 (1961).
- 7) W. T. Kinker and J. B. LaBorde: Amer. Rev. Resp. Dis., **89**, 29 (1964).
- 8) S. D. Chaparas and H. Bear: Amer. Rev. Resp. Dis., **89**, 41 (1964).
- 9) E. A. Peterson and H. A. Sorber: Methods in Enzymology, **5**, 3 (1962).

- 10) E. A. Peteron: Cellulosic Ion Exchangers in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (1970). North-Holl and Publishig Co., Amsterdam-London.
- 11) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, N. J. Forr and R. T. Randall: J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- 12) T. A. Scott and E. H. Melvin: Anal. Chem., **25**, 1656 (1953).
- 13) L. Ornstein: Ann. New York Acad. Sci., **121**, 321 (1964).
- 14) B. J. Davis: Ann. New York Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
- 15) L. F. Affronti, R. C. Parlett and R. A. Cornesky: Amer. Rev. Resp. Dis., **91**, 1 (1965).
- 16) G. Castelnuovo, S. Yamanaka, M. Zoppis and E. Dotti: Tubercle, **50**, 194 (1969).
- 17) 水野佑亮: 私信.
- 18) B. M. Sultzer and B. S. Nilsson: Nature, New Biology, **240**, 198 (1972).