

〔総説〕 松本歯学 4 : 97~111, 1978

## ブドウ球菌の細胞外蛋白質について

藤村 節夫

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

On the Extracellular Proteins from *Staphylococcus aureus*

SETSUO FUJIMURA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. T. Nakamura)

ブドウ球菌の細胞外蛋白質について

微生物が細胞外にオートリシス (自己溶菌) によらず積極的に毒素たんぱくや酵素を分泌することはよく知られていることである。臨床的にはジフテリア菌毒素, 溶連菌で猩紅熱のときに紅斑をおこす発赤毒, 激烈な下痢をおこすコレラ毒素, いずれも中毒のボツリヌス毒素などが有名である。そもそも細胞外たんぱくの研究の動機は病原細菌学の立場からはそれらの細菌の病原性との関連, 病因論, あるいは感染によって生ずる病変とのかわりあい, 免疫などが主で, 生物学的興味からは生化学性状, 生物活性, 分泌の様式を解明しようとする。ここでは主に後者の立場から比較的新しい研究の動向を紹介したい。多くの種類の菌について触れることはできないので筆者も多少携ったことのあるブドウ球菌のヘモリジン, プロテアーゼ, スタフィロキナーゼについて述べたい。文献の紹介は原則として1970年以前のもののはかたんに新しいところを詳しくしたい。

### I. ヘモリジン (溶血毒素)

ヘモリジンには  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  の四種類がある。この分類はレンサ球菌のそれが, 血液寒天平板上で

の溶血環の形態によってなされるのとは違い, もっとも強く溶解する赤血球の動物種によってされる。

ブドウ球菌ヘモリジンの存在は1870年代より知られているが, この毒素はブドウ球菌の細胞外たんぱく質のうちエンテロトキシンとならんでもっとも活発に研究されてきた。活発に研究されるようになったのは一つの医療事故がきっかけになっているといわれる。すなわち, 1928年にオーストラリアの小村 Bundarberg で21名の子供にジフテリアワクチンを接種したところ, そのうち12名がづぎづぎに死亡した。委員会が設けられて原因を調査したところ, ワクチンがブドウ球菌で汚染されていたことが判明した。これ以来ブドウ球菌毒素が注目されるようになった。

#### A: $\alpha$ -ヘモリジン

この毒素は致死毒性, 皮膚壊死毒性, 溶血作用をもつ。Neisser と Levaditi<sup>(8)</sup> は1900年に血液寒天上でブドウ球菌が溶血をおこし, 培養上清に対する抗血清でこの溶血作用は中和されることを報告している。 $\alpha$ -ヘモリジンはウサギ赤血球に対して強く溶血するが, 他の動物のものにはほとんど影響を与えない<sup>(10)</sup>。致死毒性も LD<sub>50</sub> ( $\mu$ g toxin/kg body weight) はウサギ2, ニワトリ60, マウス40, カエル400となっておりウサギに強く作用

(1978年10月24日受理)

する<sup>1)</sup>。

(i)産生

Gladstone<sup>43)</sup>が1938年最初に産生について系統的な研究を開始し、アルギニン、プロリン、グリシン、炭酸ガスがその産生を促進することを合成培地を用いて調べている。近年 Dalen<sup>26)</sup>、<sup>27)</sup>は酵母抽出物中から産生促進物質を探し、それを同定した。それによると、酵母抽出物全体を与えればむしろ産生を阻害するが、60%エタノールで沈殿したものを除いた上清中には産生を促進するものが含まれていて、これをセハデックスG-25、ダウエックスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーで精製した。この物質はニンヒドリン反応陽性でポーリー試薬に赤染するので、アミノ酸のうちイミダゾール基をもつもの、すなわちヒスチジンであると予想された。実際ヒスチジンと共に薄層クロマトグラフィーで展開するとRf値が一致し、合成培地にヒスチジンを加えると産生は4.7倍促進された。さらにヒスチジンよりもグリシルヒスチジン、ヒスチジルグリシン、アラニルヒスチジンのようなヒスチジンのジペプチドが促進効果は強いことを示している<sup>28)</sup>。培地のpHは7.0~8.0のとき産生は最大で、pH 6以下あるいは8.5以上ではほとんど産生はなくなる<sup>11)</sup>。非常に不思議な現象としてペニシリン系の抗生剤が産生を促進する<sup>50)</sup>。これはペニシリンの作用から考えて細胞壁合成の障害と細胞外への分泌との関係であろうと思われるが、理由はまだ解っていない。もし細胞壁合成の障害が原因ならば、なぜ他の毒素、酵素の分泌もpleiotropicに促進されないのかという疑問が残る。

(ii)精製と性状

精製は古くから試みられている。代表的な例はBernheimerとSchwartz<sup>15)</sup>の硫酸画分、カーテン電気泳動、ゾーン電気泳動、超遠心の組合せ、Lominski<sup>67)</sup>の酢酸メタノール沈殿、セハデックスG-75、DEAE-セハデックス、メタノール沈殿、Robinson<sup>93)</sup>の亜鉛沈殿、CM-セルロース、寒天ゲル電気泳動、Coulter<sup>25)</sup>の酢酸メタノール沈殿、酢酸抽出、セハデックスG-100による精製があり、Arbuthnott<sup>2)</sup>はBernheimerとSchwartz<sup>15)</sup>の方法で部分精製後、熱精製、尿素抽出を行っている。これらのデータによれば、すべて $\alpha$ -ヘモリジンは単純たんぱくで分子量は44,000<sup>15)</sup>、29,600

と21,200<sup>25)</sup>と報告されている。特長として精製された $\alpha$ -ヘモリジンは凝集しやすいことで、これは尿素で防ぐことができる。最近エレクトロフォーカシングの開発が行われ、これを使ってWadström,<sup>106)</sup>MöllbyとWadström,<sup>80)</sup>McNivenら<sup>78)</sup>、<sup>4)</sup>によって精製がされた。WadströmのグループはV 8株の培養上清6ℓをエバポレーターで20倍濃縮し、透析後生じた沈殿を除き、上清を尿素を加えた系でエレクトロフォーカシングをおこない、3つのpIの異なる $\alpha$ -ヘモリジン分画を得た。このheterogeneityについてMcNivenらはWood 46株でさらに研究を進めた。培養上清に硫酸を加えて濃縮し、エレクトロフォーカシングで分画して4つの $\alpha$ -ヘモリジンを得た( $\alpha$ A- $\alpha$ D)。それぞれの等電点は $\alpha$ Aが $8.55 \pm 0.12$ 、 $\alpha$ Bが $9.15 \pm 0.07$ 、 $\alpha$ Cが $7.36 \pm 0.03$ 、 $\alpha$ Dが $6.28 \pm 0.11$ であった。量的には $\alpha$ Aが85~95%を占める。 $\alpha$ Aと $\alpha$ BはSDS-ディスク電気泳動でもともに分子量は36,000と170,000の二種類があることが判るが、尿素-ディスク電気泳動ではともに一本のバンドとなる。

$\alpha$ -ヘモリジンの凝集についてはかなり調べられており、Arbuthnottら<sup>2)</sup>は精製した毒素を超遠心で分析すると、その90%は3S( $\alpha_{3s}$ )で10%は凝集した12S( $\alpha_{12s}$ )であった。 $\alpha_{3s}$ は溶血活性をもち分子量は33,000~36,000で<sup>34)</sup>、 $\alpha_{12s}$ は不活性で不溶性であるが、8M尿素水に可溶で尿素処理によって活性が現われる。尿素を透析で除けばまた不活性で不溶性となる<sup>2)</sup>。 $\alpha_{3s}$ から $\alpha_{12s}$ への変換はジグリセリド、レシチン、コレステロール、リゾレシチンのような脂質によっても誘発でき<sup>3)</sup>、凝集(polymerization)は毒素が脂質と疎水結合をするからであるという。

Sixら<sup>97)</sup>はWood 46株培養上清から硫酸画分、セハデックスG-50、G-100、分取りポリアクリル電気泳動で精製し、ディスク電気泳動で2つの泳動度の異なる $\alpha$ -ヘモリジンを得ている(AとB)。SDS-電気泳動ではAとBは泳動度が同じで、分子量27,500を示しゲル内沈降反応で中心に抗 $\alpha$ -ヘモリジン血清をおき、周囲にAとBをおくと沈降線は融合するので免疫学的にも等しい。末端アミノ酸はアミノ基がともにアラニン、カルボキシル基がリジンである。アミノ酸分析値も似たりよったりで、強いといえばアスパラギン酸が

40 と 43, グリシンが 20 と 24, でこれも有意の差かどうか疑わしい. 等電点は A が 7.2, B が 8.4 と測定されている<sup>98)</sup>. 分子内のどこに違いがあって泳動度, 等電点に違いがでてくるのかは不明である.

Watanabe と Kato<sup>110)</sup> は同様に Wood 46 株を用いてゲル濾過, ゴーン電気泳動, CM-セハデックスで精製し単一の標品を得ている. 分子量は  $36,000 \pm 2,000$  であるが, Wadström,<sup>106)</sup> McNiven<sup>78)</sup> らのような等電点の heterogeneity がみられず, pH 7.98  $\pm$  0.05 だけにみられた.

最新の報告であり, ガラスビーズでのクロマトグラフィーを使った文献も注目される. Cassidy ら<sup>17), 18)</sup> は, 培養上清を pH 6.8 にしてから 0.05 M リン酸バッファー (pH 6.8) で平衡してあるガラスビーズカラムにのせ, リン酸バッファーの濃度勾配で溶出する. 溶出した  $\alpha$ -ヘモリジン分画を DEAE-セハデックスで更に精製するとディスク電気泳動で単一のバンドの  $\alpha$ -ヘモリジンを得る.

$\alpha$ -ヘモリジンのアミノ酸組成については 4 つほど報告がある<sup>15), 25), 98), 110)</sup> がどれも値はよく合致しており, 特長的なのは, シスチンが含まれず, したがって S-S 結合はない. リジン, アスパラギン酸, スレオニン, セリン, グルタミン酸, グリシンが多く, ヒスチジン, アルギニン, トリプトファンの塩基性アミノ酸は少ない.

### (iii) 作用機構

溶血反応が,  $\alpha$ -ヘモリジンに特定の酵素活性があつてそれによつておこるといふ証明はまだないようである. 1930 年代に Forssman<sup>35)</sup> はこの反応が酵素反応の様式に従うとしたが, Levine<sup>64)</sup> は, 毒素と赤血球の反応はストイキオメトリックであつて酵素反応ではないとした. この点は近年, 溶血反応を経時的に観察するとシグモイドカーブとなり毒素濃度の低いところでは反応速度は毒素濃度に比例することが解つた<sup>66)</sup>. Cooper ら<sup>22)</sup> も同様シグモイドカーブを得ており, 始めに prelytic phase があり続いて直線的に溶血が進み, その後反応は次第に停止する. prelytic phase は 25°C ~ 46°C の間では温度を上げるにしたがい短くなる. また, 抗血清を反応開始後 2 分以内に加えると以後の溶血はおこらず, 3 ~ 5 分後に加えれば prelytic phase は対照と同じ時間になる<sup>23)</sup>. また

反応系に蔗糖を加えると反応は一時的に抑えられ, ポリエチレングリコールでは完全に阻害される. 一度血球に結合した  $\alpha$ -ヘモリジンは他の血球に再び結合することはない.

$\alpha$ -ヘモリジンで赤血球を処理するとヘモグロビン放出が検出される前に 50% ~ 75% の血球中の  $K^+$  が急激に放出されてしまう. 抗血清を反応初期に加えればヘモグロビンはもちろん  $K^+$  の放出もなくなるが, 蔗糖, ポリエチレングリコール存在では  $K^+$  放出は正常になされる<sup>24)</sup>. 溶血の様式は以上のように決して一元的におこらず複雑な機構がありそうである. Doery ら<sup>30)</sup> は  $\alpha$ -ヘモリジン産生株 (他の種類のヘモリジンを産生しない株) の培養上清から硫酸塩析で  $\alpha$ -ヘモリジンを得てその酵素活性を調べたところイノシトールホスホリパーゼ活性を検出した.  $\alpha$ -ヘモリジンをウサギの血管内に注射したところ血中のコレステロールエステラーゼ活性が著明に減少し (約 1/4 になる) ホスホリパーゼ, リパーゼ活性は変化しなかったという実験もある<sup>30)</sup> が, その意味するところは不明である.

Wiseman のグループは,  $\alpha$ -ヘモリジンは不活性の形で分泌され<sup>119)</sup> (プロトキシン) 赤血球中のたんぱく分解酵素によつて活性化され溶血活性をもつようになるという説<sup>120)</sup> をだしている. そして溶血の動物種による強さの違いは, 赤血球の化学構成によるのではなく, 活性化するたんぱく分解酵素の多様性によるものだと考えている. 活性化はトリプシンによつても可能であるので, プロトキシンをトリプシン (実際にはカルボキシメチルセルロースに吸着させたものを使い, あとで  $\alpha$ -ヘモリジンから分離できるようにしてある) で 37°C で 30 秒処理しセルロースを除き, p-トルエンスルホンル-L-アルギニンメチルエステル (TAME) を基質にしてエステラーゼ活性を調べると明らかにその活性が生ずると同時に溶血活性も生ずる. N 末端アミノ酸を調べるとプロトキシンはヒスチジンであるが活性型はイソロイシンかロイシンのどちらかであった<sup>121)</sup>. これはいわゆる Zymogen の活性化機構と同様にプロトキシンの N 末端側のペプチドがたんぱく分解酵素によつてとりのぞかれ活性化されるのとよく似ている.

### (iV) 細胞, 膜, その他に対する作用

$\alpha$ -ヘモリジンの細胞毒性について 1960 年代に

なって多く報告されるようになった<sup>5)41)42)49)53)57)58)79)87)91)103)</sup>。使用する細胞もヒト、ウサギ、マウスなどで primary cell を使ったもの、line cell を使ったものなどまちまちであり毒素の精製度、投与量、培養法なども統一されていないが、少くも共通しているのは細胞膜に傷害を与えることである。Artenstein ら<sup>5)</sup>はウサギ腎細胞、エールリッヒ腹水ガン細胞に  $\alpha$ -ヘモリジンを与えて細胞培養すると細胞質の滲出がみられ、この中にはヘルペスシンプレックスウイルスや、前もって放射性のメチオニン標識したたんぱく質も含まれることを示した。これも細胞膜の傷害によるものと思われ、KB 細胞に subtoxic な量で与えた実験<sup>58)</sup>では細胞の溶解にスクレアーゼの共同作用がみられた。Galantani の報告<sup>42)</sup>では細胞内の ATP 量の増加がみられ、ぶどう糖の消費と乳酸産生の減少がみられるという。これは細胞膜傷害の二次的効果と思われる。

Wadström のグループは細胞に対する影響の研究を進めて次のような結果を得ている。細胞としてヒト胎児肺繊維芽細胞（ディプロイド）を用い、予めトリチウム-ウリジンでラベルし、これに毒素を与えてメヂウムに放出される放射能をもって細胞の膜傷害の指標とした<sup>104)</sup>。それによると、 $\alpha$ -ヘモリジンはほとんど影響を与えないという。長い時間処理すると細胞が膨潤する。もっとも影響の大きいのは  $\alpha$ -ヘモリジンで作用させる温度に依存しない。ただし  $\alpha$ -ヘモリジンも KB 細胞に対しては傷害を与えることを確認している。この傷害は抗  $\alpha$ -ヘモリジン血清で中和される<sup>109)</sup>。ウサギに sublethal な量を注射すれば、マスト細胞からヒスタミンが放出されるらしいという報告<sup>101)</sup>もある。

Novak ら<sup>88)</sup>は粗標品の  $\alpha$ -ヘモリジンはラット肝ミトコンドリアでの ADP の酸化的リン酸化を抑制しエネルギー産生の過程にも影響をおよぼすと述べている。

#### B: $\beta$ -ヘモリジン

Glenny と Stevens<sup>45)</sup>は1935年、 $\alpha$ -ヘモリジンとは中和に要する抗血清の量の違い、hot-cold 溶血（後述）をするなどの点で異なる溶血毒素をみつけ  $\beta$ -ヘモリジンとした。Bryce と Rountree<sup>16)</sup>は1936年に  $\beta$ -ヘモリジンは動物から直接分離した菌株によって多く産生され、ヒツジ赤血球を

よく溶血することを報告した。 $\beta$ -ヘモリジンは  $\alpha$ -ヘモリジンとならんで非常によく研究されている。

#### (i) 産生

$\beta$ -ヘモリジンは種々のメヂウムで簡単に産生させることができる。Chesbro ら<sup>19)</sup>は培養液の透析外液で  $\beta$ -ヘモリジンの産生を見、L-アルギニンが産生を促進することを報告し、Wiseman<sup>114)</sup>は Gladstone の基礎培地<sup>43)</sup>を用いて L-アルギニン、グリシン、L-プロリンが産生に必須であることをみつけている。Sharma と Haque<sup>96)</sup>は L-プロリン、グリシン、L-アルギニン、L-シスチン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、ニコチンアミド、チアミン、グルコース、クエン酸、りん酸塩、硫酸、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  を含む合成培地を作り、空気中では L-スレオニン、L-チロシン、イノシトール、葉酸、リボフラビン、ピリドキサル塩酸、コリン、パントテン酸が促進作用をもち、炭酸ガス下では L-プロリン、L-グルタミン、L-シスチンが必須であった。

Fujimura ら<sup>36)</sup>は細胞外たんぱくの産生とファージによる溶原化との関係を調べているうちに、マイトマイシン C を対数増殖前期に培養に加えると、本来産生が非常に高いものがほとんど産生しなくなったり、産生がほとんどないものが高単位の  $\beta$ -ヘモリジンを産生するようになる現象をみつけた。この現象の考えられる説明はスタフィロキナーゼの項で扱うことにする。

#### (ii) 精製と性状

精製の報告は1960年以後の代表的なものをあげる。Jackson<sup>55)</sup>はハートインフュージョン培地で培養し亜鉛沈殿、アルコール沈殿、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーで50~60%の回収率で255倍精製。Chesbro ら<sup>19)</sup>はセルロースホスフェートに吸着させバッファー濃度の勾配で150倍精製した。この標品には3%の核酸が含まれ、免疫学的にも2種の抗原が含まれるという。Doery ら<sup>30)</sup>は硫酸沈殿とハイドロキシアパタイトで精製、Chesbro ら<sup>19)</sup>と同様免疫反応で2種の抗原を含む。Maheswaran ら<sup>69)</sup>は42°Cで48時間培養の上清を硫酸分画、セハデックス G-100、DEAE, CM で精製したものは、4°Cで3日間は安

定であると報告した。Gow と Robinson<sup>46)</sup>は硫酸分画, セハデックスG-100, CM, DEAE, 濃度勾配電気泳動で精製し, 免疫電気泳動でバンドは一本を示し, 超遠心像も単一ピークで沈降定数は1.7sであった。4°Cでは安定であるが, 100°Cでは10分で失活する。

Haque と Baldwin<sup>52)</sup>はアセトン沈殿と DEAE で免疫電気泳動で単一の標品を得ている。

Wadström と Möllby<sup>107)</sup>は, カゼインの加水分解物, 酵母抽出物, ぶどう糖の入った培地で大量の  $\beta$ -ヘモリジンを含む上清を出発材料として, CM, エレクトロフォーカシング, ビオゲル P-10 を用いて比活性を 40,000 倍上げ, 免疫拡散, ディスク電気泳動でホモジナスな標品を得た。等電点は 9.4 で分子量は 38,000。不安定な物質で精製標品は 4°C で half-life は 12~24 時間, -20°C でも 24~48 時間で貯蔵するには凍結乾燥以外にはないという。精製標品を pH 8~10 の間でエレクトロフォーカシングすると僅ながらヘテロジェニティがあり pH 8.8, 9.4, 9.8 にピークを示す。もちろん 9.4 がメインのピークである。 $\beta$ -ヘモリジンの性状で重要なものに "hot-cold lysis" なるものがある。これは赤血球サスペンションと  $\beta$ -ヘモリジンを 37°C でインキュベートしただけでは溶血は観察されず, 一度 4°C に冷却してはじめて溶血するのでこの名前がある。血液寒天上で集落の周囲の溶血を調べるときも集落形成のあと平板を冷やさないと溶血環は現われない。この hot-cold lysis の現象はまだ説明がついていない。

$\beta$ -ヘモリジンはヒツジ赤血球にもっとも強く作用するが, ヒツジに対してが 2048 溶血単位/ml とすれば, ウシ 512, ヒト 256, ネコとウサギが 64 という報告<sup>115)</sup>, あるいは, ヒツジを  $10^9$  溶血単位/ml とすると, ウシ  $10^8$ , ヤギ  $10^5$ , ウサギ  $10^2$ , ヒトとネコ  $10^1$  という報告<sup>108)</sup>がある。溶血におよぼすカチオンの影響も甚大で, Wiseman によれば,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  がもっとも促進し,  $\text{Mn}^{2+}$  がこれに続き,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  は阻害する。Robinson ら<sup>92)</sup>によれば,  $\text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ , Haque と Baldwin<sup>51)</sup>によれば  $\text{Mg}^{2+}$  と  $\text{Fe}^{2+}$  が促進,  $\text{Ca}^{2+}$  が阻害となっている。

#### iii) 作用機構

$\beta$ -ヘモリジンのもつ酵素活性についてはかなり確実な結果がでている。Maheswaran と

Lindorfer<sup>70)</sup>は,  $\beta$ -ヘモリジンはヒツジ赤血球に作用させると水溶性の有機りんを生ずること, スフィンゴミエリンを分解し, この反応は  $\text{Mg}^{2+}$  で促進することを観察し,  $\beta$ -ヘモリジンの本体はスフィンゴミエリナーゼであってこれが赤血球膜のスフィンゴミエリンを溶解して溶血をおこすのだらうと考えた。このことは他の研究者によっても追試されている<sup>30)117)</sup>。Wadström と Möllby<sup>108)</sup>は, 高度に精製した  $\beta$ -ヘモリジン<sup>107)</sup>とスフィンゴミエリンとを  $\text{Mg}^{2+}$  存在下でインキュベートしてからクロロホルム-メタノールでホスホリピドを抽出し, 薄層クロマトグラフィーで分離すると N-アシルスフィンゴシンのスポットが現われるようになるので,  $\beta$ -ヘモリジンの本体はスフィンゴミエリナーゼであるとした。この標品はホスハチジルコリン, ホスハチジルエタノールアミン, ホスハチジルセリンを分解しない<sup>82)</sup>。スフィンゴミエリンに対する作用は次のように考えられる。

スフィンゴミエリン+水  $\rightarrow$  N-アシルスフィンゴシン+ホスホリコリン。なお Wiseman と Caird<sup>117)</sup>によれば種々の動物の赤血球中のスフィンゴミエリン含量の全ホスホリピドに対する割合はヒツジ 50.5%, ウシ 45%, ヒト 21.6%, ウサギ 19.7%, ヤギ 38%となっている。

#### 組織培養細胞などに対する影響

粗  $\beta$ -ヘモリジン標品は KB 細胞に対して強い細胞毒性を示し  $\alpha$ -ヘモリジンと異なり細胞の酵素活性の変化をきたすという<sup>59)</sup>。高度に精製された標品による細胞毒性は Wiseman<sup>116)</sup>によって確認され, ヒト羊膜, サル腎, KB 細胞に変性をきたすことを報告した。また, あわせて細胞のスフィンゴミエリン含量が  $\beta$ -ヘモリジン処理によって細胞中の全ホスホリピドに対して 17%から 3.5%へ減少することも確認した。Wadström と Möllby<sup>108)</sup>は, ウサギ, モルモット, マウスに対して 10~100  $\mu\text{g}$  投与すれば致死的で, ニワトリ胎児は 0.25~10  $\mu\text{g}$  で死亡する。この致死作用は抗  $\beta$ -ヘモリジン血清で抑制される。一方ヒトトロンボサイト,  $\alpha$ -グラニュールも速やかに溶解されるが, ヒト白血球, 細菌のプロトプラストは影響を受けない。これらの感受性の差も細胞のホスホリピドの構成に由来していると考えられる。事実, 白血球膜のスフィンゴミエリン含量は少ない<sup>111)</sup>。最近 Low ら<sup>68)</sup>は  $\beta$ -ヘモリジンをヒトとウシの

赤血球と反応させ、そのゴーストをフリーズエッチさせ電子顕微鏡で観察し、おそらくスフィンゴミエリンの分解物 ( $N$ -アシルスフィンゴシン) と思われる particle-free の物質が二重膜の疎水性部分に集積していることを示した。またこのことはスフィンゴミエリンが二重膜の外側に多く偏在していることを示唆している。1970年代にはホスホリパーゼ (細胞由来、蛇毒由来など) の溶血性、膜に対する作用、リビドに対する影響が続々と報告されている<sup>20) 21) 44) 47) 63) 77) 85) 89) 94) 122)</sup>が、ここでは直接関係しないので詳述はさける。

### C: $\gamma$ -ヘモリジン

$\gamma$ -ヘモリジンの存在はすでに1938年 Smith と Price<sup>100)</sup> によって報告され、ウサギ、ヒツジ、ヒトの赤血球を溶解する。この観察は後に Marks<sup>75)</sup> によっても確認された。

粗  $\alpha$ -ヘモリジンの抗血清で  $\gamma$ -ヘモリジンは中和されるが、精製のすずんだ  $\alpha$ -ヘモリジンの抗血清では中和されないで  $\alpha$ -ヘモリジンとは異なる物質で、以前は  $\delta$ -ヘモリジンのコンタミネーションであるといわれたこともあったが、現在では独立のヘモリジンであることが一般に認められている。文献は  $\alpha$ -、 $\beta$ -ヘモリジンと比べて少なく、 $\alpha$ -、 $\beta$ -ヘモリジンの如く研究がされつくしたという感じはない。

#### (i) 産生

このヘモリジンの産生株として Smith<sup>99)</sup> の発見した Smith 5R というのがよく使われるが、特に産生条件について詳しく調べたという文献はないようであるが、培養器にさざみを入れて通気をよくしたり、直接送る空気量を多くしたりすると産生は悪くなるという<sup>81)</sup>。Fackrell と Wiseman<sup>32)</sup> は産生について調べたような結果を得ている。寒天培地を滅菌セロハンでカバーし、その上に菌を接種し 37°C、24時間、10% (v/v) 炭酸ガス中で培養後、集菌してサスペンションとし上清中のヘモリジンを調べると、ドルマン-ウイelson寒天、グラットストーン-ハイニンゲン寒天でよく産生することが解る。産生のタイムコースは特異で24時間までは直線的に進むが、それ以後は活性がなくなり(失活してゆく)、72時間ではほとんど活性がなくなる。菌体内の  $\gamma$ -ヘモリジンを調べても同様のカーブを描くがピークは多少前へず

れる。至適 pH は 7.0 付近で 6.0 以下、8.0 以上では産生は悪くなる。温度は 37°C が至適、炭酸ガス濃度は 10% がよい。

#### (ii) 精製と性状

Guyonett ら<sup>48)</sup> はハイドロキシアパタイトで2つのコンポネントを得た。この2つのヘモリジンは溶血作用において共同作用がある。Möllby と Wadström<sup>81)</sup> は Smith 5R の培養上清を DEAE-セハデックスに pH 8.5 で吸着を試みると、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\delta$ -ヘモリジンは吸着しないが、 $\gamma$ -ヘモリジンは吸着させることができるので、これを利用して  $\gamma$ -ヘモリジンを 0.2 M トリス緩衝液 (pH 8.5) - 0.2 M 食塩で溶出させ、画分をさらにエレクトロフォーカシングで分離すると pH 9.5 のところに  $\gamma$ -ヘモリジンの大きなピークが得られ、pI 8.5 のところに小さなピークを得る。pI 9.5 のものを種々の動物の赤血球に作用させると、ウサギ、ヒト、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ニワトリ、ウマに対してそれぞれ 10 溶血単位/ml、240、640、2560、2560、640、<10、20 であった。その後彼らはブレインハートインフュージョン培地で多量に産生させることに成功し、培養上清を人工腎臓で透析し濃縮後 pH 6.5 で CM-セハデックスに吸着させ pH 9.0 で溶出、硫酸 67% で塩析し、エレクトロフォーカシングで部分精製 (ディスク電気泳動で5本のバンドがでるといふ) した。標品は  $\alpha$ -ヘモリジンを含まずマウス、ウサギに致死毒性がある。特長的な性状として寒天、ヘパリン、デキストラン硫酸のような多糖によって活性が阻害される<sup>83)</sup>。Fackrell と Wiseman<sup>32)</sup> はウルトラフィルトレーション、セハデックス G-75、硫酸分画で 2,700 倍精製しディスク電気泳動、免疫電気泳動で単一のバンドを示す標品を得た。現在のところ彼らの標品が最も純度が高いと思われる。この標品で性状を調べ<sup>33)</sup> 次のような事が解った。分子量は 45,000、pI は 6.0、抗原的に  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\delta$ -ヘモリジンと交叉せず、アミノ酸組成ではアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシンが多くメチオニンが極端に少なく、シスチンは含まれない。溶血スペクトラムは、ウサギ、ヒツジ、モルモット、ラット、イヌの順に強い。EDTA による阻害がみられ、 $10^{-4}$ M で約半分、 $10^{-3}$ M で完全に阻害される。この阻害は EDTA を透析で除けば活性は回復するので可逆的である。Taylor と

Bernheimer<sup>102)</sup>は2つのコンポネントの  $\gamma$ -ヘモリジン I, IIを得、それぞれの分子量は29,000と26,000、等電点はpI 9.8と9.9、両者ともプロナーゼ、ズブスチリンによって失活し、種々のリポド(ホスハチジルセリン、ホスハチジルイノシトール、ホスハチジルグリセロール、スフィンゴミエリンなど)が溶血活性を抑制することを報告している。

#### iii)作用機構

作用機構に関する知見は貧弱で Fackrell と Wiseman<sup>33)</sup>の報告以外みあたらない。それによるとまずヒト赤血球から僅か窒素を放出し、*Clostridium perfringens* のホスホリパーゼCと同等の酸可溶性のりんを放出することから、 $\gamma$ -ヘモリジンにもホスホリパーゼ活性がありそうであるが、スフィンゴミエリンを分解しないので  $\beta$ -ヘモリジンとは異なり、ホスハチジルエタノールアミン、ホスハチジルコリンにも変化を与えない。また Wiseman らの  $\alpha$ -ヘモリジンの活性化機構<sup>120)</sup>(プロトキシン)もない。

#### D: $\delta$ -ヘモリジン

$\beta$ -ヘモリジンの発見後20年経って William と Harper<sup>113)</sup>は1947年に抗  $\alpha$ -,  $\beta$ -ヘモリジン血清を含むヒツジ赤血球寒天上で抗血清で障害されない溶血がおこることをみつけ、 $\delta$ -ヘモリジンと呼んだ。 $\delta$ -ヘモリジンは溶血スペクトラムが広く、ウサギ、ヒツジ、ヒト、サル、ウマ、ラット、マウス、モルモット赤血球に作用する。Marks と Vaughan<sup>74)75)</sup>は1950年に  $\delta$ -ヘモリジンの存在を再確認し、ヒト、ヒツジ赤血球に作用させたとき  $\beta$ -ヘモリジンとの共同作用があることをあわせて報告した。

#### (i)産生

産生条件についてももっとも詳しく調べたのは Murphy と Haque<sup>84)</sup>である。寒天平板上に滅菌セロハン紙をカバーし、その上に菌を増殖させて  $\delta$ -ヘモリジンを産生させた場合、空気中の炭酸ガス濃度は10%が最適で、pH は6.0~8.0の間で大した差はない。添加する糖の効果をグルコースとラフィノースで調べたところ、前者は産生を下げ、後者は影響がなかった。培養の至適温度は35℃~41℃でpHとともにstrictではない。市販の培地ではブレインハートリバーが最もよく、ブレインハートインフュージョン、ユーゴン寒天が続く。

Yoshida<sup>123)</sup>はCCY培地(カゼイン分解物と酵母抽出物を主成分とする)の透析外液を用い、37℃で回転培養するとlag phaseなしに産生が始まり18h~24hで終了するという。

#### (ii)精製と性状

Yoshida<sup>123)</sup>は硫酸分画、アルコール抽出、クロホルム抽出、メタノール抽出、CM-セルロース、カルシウムホスヘートゲル、TEAE-セルロースで結晶化している。沈降定数は6.1Sで、アミノ酸組成ではアスパラギン酸、イソロイシン、フェニルアラニン、リジンが多く、リジン以外の塩基性アミノ酸は極端に少ない。プロリン、チロニン含量も少なく、シスチンは調べていない。分子量は74,000で標品にはなおRNaseと $\beta$ -ヘモリジンのコンタミネーションがある。Kregerら<sup>61)</sup>はWood 46株( $\alpha$ -ヘモリジンの高産生株)の変異株で $\alpha$ -ヘモリジンを野性株の5%しか産しない株を用い、6ℓの培養上清を出発材料とし $\delta$ -ヘモリジンをハイドロキシアパタイトに吸着させ、pH 7.4のリン酸バッファーで溶出させ $\delta$ -ヘモリジン画分を透析すると不溶性と可溶性のものに分かれる。この段階で画分はホスホリパーゼを含まない。可溶性のものをさらにセハデックスG-150、ビオゲルA-5Mの分子篩にかけると二峰性の活性のピークを示し主成分は分子量が150,000~200,000であった。このヘテロジェニティは超遠心法でも確認され11.9Sと4.9Sに分かれ等電点もpH 9.5と5.0の二つに分かれる。アミノ酸組成で特長的なのはイソロイシン、ロイシン、バリンの非極性のものが全体の31%を占めプロリンはない。

Maheswaran と Lindorfer<sup>71)</sup>の成績によれば、pI は3.32, 3.75, 8.45でKreger<sup>61)</sup>のとはかなりずれている。Kantorら<sup>56)</sup>はKreger<sup>61)</sup>の株を用い、培養上清をアルミナゲルを通過させるだけの一段階の精製でディスク電気泳動で単一のバンドを示し回収率も93%と高率である。分子量は103,000であるが非イオン性の界面活性剤で処理すると21,000のサブユニットになる。SDSやグアニジン処理で10,000以下のペプチドに解離してしまう。熱に対しては安定で80℃、15分で活性に影響はなく、90℃で50%失活する。作用する赤血球のスペクトルは広いがヒトに最も強く、hot-cold lysisはない。アミノ酸組成ではヒスチジン、アル

ギニン、プロリン、チロシン、シスチンを含まない事が特長的である。

#### 作用機構と毒性

Wiseman と Caird<sup>118)</sup> は  $\delta$ -ヘモリジンは赤血球に対して酵素的に作用すると主張した。すなわち、赤血球より有機リンを放出しホスハチジルイノシトール、ホスハチジルセリン、ホスハチジルコリンを加水分解するので赤血球より放出された有機りんはホスホリビドの酵素的分解の産物であろうと考えた。しかしその後の詳細な実験はされていない。

$\delta$ -ヘモリジンは培養細胞、白血球、細菌のプロトプラスト、スフェロプラスト、リソゾームにも作用をおよぼすといわれている。動物に対する LD<sub>50</sub> は Kreger<sup>61)</sup> によればマウス 2 mg, モルモット 7.17 mg であるという。

## II. プロテアーゼ

プロテアーゼ(たんぱく分解酵素)は多くの微生物が産生する。中でも枯草菌のズブスチリジンや放線菌の一種によるプロナーゼは実験室でも日常的に使われる。ブドウ球菌のプロテアーゼはそれほどよく知られてはいないが、最近重要な知見が得られているので紹介する。

#### (i)産生について

プロテアーゼ研究にはよく V 8 という株が使われる。Arvidson ら<sup>9) 12)</sup> も V 8 株を用いカゼインの加水分解物と酵母抽出物を主成分とする培地(CCY 培地)で産生機序を調べた。産生は約 2 時間の lag phase を経て始まり対数増殖期中期には終了してしまうので産生は約 3 時間しか続かない。その後 3 時間ばかりは急激に培養液中のプロテアーゼは失活してゆくと 8 時間以後の失活はゆるやかである。培地から酵母抽出物を除いた培地(CC 培地)では産生は極めて貧弱で僅か 13% に減ってしまう。そこで既知の物質で酵母抽出物に代わりうるものを探したところ、Ca<sup>2+</sup> 2.5 mM を CC 培地に加えるとかなり産生は回復するのが解った。Ca<sup>2+</sup> の効果はプロテアーゼ産生が Ca<sup>2+</sup> の存在によって増強されたのかまたは異種のプロテアーゼが新たに産生されるようになったのかを調べるため CCY 培地でプロテアーゼを産生させ EDTA をいろいろの濃度で加えてから酵素活性を調べると 0.8 mM EDTA で 50% 阻害される

が、それ以上の濃度の EDTA ではもはや阻害は進まないで CCY 培地で作られるプロテアーゼには EDTA に感受性のもの (EDTA-S) と耐性のもの (EDTA-R) があるらしいことが解った。そして CC 培地で産生されるプロテアーゼは EDTA-R で CC 培地 + Ca<sup>2+</sup> でできるのは EDTA-S であった。すなわち、みかけ上 Ca<sup>2+</sup> が EDTA-S の産生を促進するが実際には Ca<sup>2+</sup> が EDTA-S の産生を誘導するのではなく、Ca<sup>2+</sup> の存在が EDTA-S のプロテアーゼの安定性に必須なのである。

#### (ii)精製と性状

前出<sup>12)</sup> の EDTA-R プロテアーゼを Arvidson ら<sup>13)</sup> は V 8 株培養上清をイソエレクトロフォーカシングでプロテアーゼを分離すると、pI が 4.0 (プロテアーゼ I) と 9.4 (プロテアーゼ II) の 2 つがあることが解った。それぞれをイオン交換樹脂への negative adsorption, イソエレクトロフォーカシング, ゲル濾過で精製し、ゲル内沈降反応とともに単一の物質を得た。I と II を比較すると、I は分子量は 21,000 で DFP で 10% 失活、いろいろの 2 価金属イオンで活性を失わず、エステラーゼ活性を持たない。II は分子量 12,500 で DFP で 30% 失活、Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> で失活しエステラーゼ活性をもつ。一方、EDTA-S のものを Arvidson ら<sup>6) 8)</sup> は CC 培地 + Ca<sup>2+</sup> で作りセハデックス G-200 を 2 回通過させて精製しプロテアーゼ III とした。分子量は約 28,000 でゲル内沈降反応でプロテアーゼ I と II と融合しない。酵素活性は Ca<sup>2+</sup> で 2 倍、Zn<sup>2+</sup> で 1.6 倍、Mg<sup>2+</sup> で 1.74 倍上昇する。1 mM EDTA で 99% 失活しこれは非可逆的である。DFP で活性に影響はない。III はすなわちメタロ酵素であろうが酵素分子にカルシウムが含まれているという成績は得られていない。

プロテアーゼ I, II, III のカゼインを基質としたときの Km 値はそれぞれ 0.59%, 0.19%, 0.29% である<sup>7)</sup> ので II がカゼインに対してもっとも親和性が高く I がもっとも低いということになる。Arvidson らの一連の仕事<sup>6) 7) 8) 9) 12) 13)</sup> より以前に V 8 株を用いて精製と酵素学的検討がなされている。すなわち、Drapeau ら<sup>31)</sup> は 5 ℓ の培養上清に 3 kg の硫酸を加えて塩析し、沈殿を 2 mM 塩化カルシウムを含むトリスバッファー (pH 7.5, 10



mM) に溶解しアセトン沈殿, DEAE—セルロース, 分取りポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い単一なプロテアーゼを得た. 分子量は SDS—ポリアクリルアミド電気泳動で 11,400, 超遠心で 12,000, 沈降定数は 2.9 S である. アミノ酸組成ではシスチンを含まない. 酵素活性は pH 3.5~9.5 まで陽性で至適 pH は 4.0 と 7.8 の 2 つにある. 0.1 mM DFP で失活するのでセリンプロテアーゼということになる.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , EDTA は 1 mM—10 mM で影響をおよぼさない. Arvidson らの結果と矛盾が多いが Arvidson らはこれについて言及していない.

精製されたプロテアーゼでアミノ酸配列既知のインスリン, RNase, リゾチームなどを加水分解させ, 生じたペプチドのアミノ末端基, アミノ酸組成を調べるとどこで加水分解されたのかが解る. この方法で 2 つの至適 pH 4.0, 7.8 いずれにおいてもグルタモイルボンドが加水分解されることが解った<sup>54)</sup>. 一般に細菌のプロテアーゼは, ランダムに加水分解するが, ブドウ球菌のは非常に特異性が高いので実験室でのよい道具の一つとなるらう.

### III. スタフィロキナーゼ

いわゆる繊維素溶解現象はプラスミンによっておこるのであるが, プラスミン(一種のプロテアーゼ)の前駆体である不活性型のプラスミノーゲンを活性化してプラスミンに変えるキナーゼは細菌, 尿, 組織に由来する. 細菌ではレンサ球菌とブドウ球菌によって産生され前者のストレプトキナーゼはヒトプラスミノーゲンに強く作用するので臨床的にも使用され, かつ, プラスミノーゲンの活性化機序の解明に多大の貢献をしている. それに対してブドウ球菌のスタフィロキナーゼはヒトにあまり作用しないことからそれほど注目される事もなく現在でも, 世界でも数箇所研究室で扱われているにすぎない. Lewis と Ferguson<sup>65)</sup> はスタフィロキナーゼはイソプラスミノーゲンをもっとも強く活性化し, 活性化は pH や温度に依存することを報告したのが実質的なスタフィロキナーゼ研究の始まりといってもよい.

#### (i) 産生

産生機序で最も注目すべき点は, テンペレートファージによる溶原化とスタフィロキナーゼ (以下キ

ナーゼと略す) 産生との関連である. Winkler ら<sup>112)</sup> はキナーゼ非産生でかつ  $\beta$ —ヘモリジン産生株が溶原化するとキナーゼ産生,  $\beta$ —ヘモリジン非産生に変換してしまうことを発見した. これはダブルコンバージョンと呼ばれるものである. Mason と Allen<sup>76)</sup> もこの観察を追試するとともにキナーゼ産生,  $\beta$ —ヘモリジン産生を変換させるファージの遺伝子は異なる座に分布するらしいことを報告した. Fujimura ら<sup>36), 38)</sup> は, 10 のキナーゼ産生株についてマイトマイシン C でプロファージを誘発すると菌は溶解してゆくが, その後の培養でキナーゼ産生がコントロールよりも増加するものと減少するものに分かれ, 増加は約 2 倍である. このことはキナーゼ産生株のうちあるものはその遺伝子がプロファージにあって (ブドウ球菌はほとんどすべての株がプロファージによって溶原化している). これが誘発されると合成される子孫ファージの数の遺伝子数が増え産生も増加することを示唆する. 一方, 誘発によって産生が減少するものは, キナーゼの座は菌の染色体にあり誘発されると菌の遺伝子の発現がとまるので産生も抑制されるものと考えられる. なお誘発による  $\beta$ —ヘモリジン産生の増加にドラマチックであり, 70 倍にも達するものがある. キナーゼ産生がマイトマイシン C で増加するものと  $\beta$ —ヘモリジンが増加するものとは必ずしも一致しない. また,  $\alpha$ —ヘモリジンとヌクレアーゼ産生は誘発により一般に抑制される. マイトマイシン C の効果は抗ガン剤ブレオマイシンでも可能で誘発のメカニズムとキナーゼ産生との関係も論じられている<sup>37)</sup>. ブドウ球菌の遺伝学的解析がほとんどされていない現今, これ以上は産生のメカニズムを探れないのは残念である. 産生に対する生理的条件では炭素源として乳酸やピルビン酸が非常に有効で培地の pH もきびしく 7.5 前後がよい. 6 以下ではほとんど産生はない. (藤村, 未発表). キナーゼ産生株のうち Fujimura らが検索した限りでは PS 47 という株が非常に高単位の産生を示し, これを 33 °C で乳酸を加えた自然培地で培養し培養上清中のキナーゼを時間を追ってセハデックス G—75 で溶出量を調べると培養初期では分子量が約 15,000 である (Type A) が, 15 時間ほど培養したものは分子量が約 320,000 (Type B) になる<sup>39) 40)</sup>. この Type A から Type B への変換は通常の培養温度の 37

°Cでは決しておこらず、また培地に乳酸を加えないとおこらない。このことから予想できるように変換は Type A の重合によっておこるのではなく、仮定上の物質 (Complex Forming Substance という) が産生されてそこにキナーゼ分子がいくつも結合して変換がおこる。33°C、乳酸といった条件も Complex Forming Substance の産生に必要なのである。事実 Type A も Type B もキナーゼ部分について調べたところ等電点はともに 5.6 と 6.0 にあり各 Type を抗原として得た抗血清をクロスして使うと抗血清による活性阻害は同程度におこる。Complex Forming Substance はたんぱく質であることがわかったが、キナーゼとの結合は高濃度の塩や界面活性剤ではずれる。また結合はキナーゼに特異的ではなく  $\beta$ -ヘモリジンやチトクロム C とも可能でチトクロム C との結合はキナーゼとよりは強く、かつ結合するサイトは共通である。

#### (ii) 精製と性状

Satoh<sup>95)</sup> は全培養液に塩化亜鉛 (1%) を加え菌体および培養液中のたんぱくを沈殿させ、沈渣よりりん酸ナトリウムでたんぱくを抽出しアセトンおよび硫酸で分画し、DEAE-, CM-セルロースで精製し比活性を約 90 倍あげた。収量は 14% で標品は免疫学的にまだ単一といえず抗血清との間に複数の沈降線がみられる。分子量は 18,500 で熱に対して安定である。Lack と Glanville<sup>62)</sup> は硫酸分画, CM-セルロース, アルコール沈殿で 106 倍精製し収量は 18% であった。標品はコアグラゼ, ロイコジジン,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -ヘモリジンを含まず分子量は 22,500 であった。Vesterberg と Vesterberg<sup>105)</sup> は培養上清を 1% グリシン液で透析し、イソエレクトロフォーカシングで分けたところ pH 5.8, 6.2, 6.8 に分布しヘテロジナスであることを示した。各コンポネントの間には金属イオン, EDTA, システインによる活性への影響の違いはなく、至適 pH もすべて共通であった。Arvidson ら<sup>10)</sup> によれば培養上清を人工腎臓で透析し pH 5 で DEAE-セルロースで negative adsorption を行い非吸着部分をイソエレクトロフォーカシングで 2,000 倍精製した標品は分子量が 16,000—22,000 で等電点は pH 5.6, 6.0, 6.55, 6.7 にあり、やはりヘテロジナスである。

#### (iii) プラスミノノーゲンの活性化機構

活性化機構についての知見は貧弱でそれもストレプトキナーゼの活性化機構と比較するのが多い。Davidson<sup>29)</sup> は活性化中にキナーゼは消費されず酵素的に作用するとした。Kowalska-Loth と Zakrzewski<sup>60)</sup> は CM-セハデックスとイソエレクトロフォーカシングで精製したものを使って活性化機構を調べた。プラスミノノーゲンはヒト由来のものである。まずプラスミン生成のタイムコースを調べると、キナーゼ量が少なければ lag 期が長くなり、多ければ短くなる。そしていずれの場合もシグモイドカーブとなる。一定量のプラスミノノーゲンにプラスミンを加えて反応を始めると、lag 期はなくなってゆくの、反応初期にキナーゼはプラスミノノーゲンにではなくプラスミンとかわり合いを持つのではないかと考えられる。

NPGB (P-nitrophenyl-P'-guanidinobenzoate) という合成基質で生成したプラスミンのアクティブサイトを定量する実験では、キナーゼ濃度がプラスミン生成の制限因子でこれは明らかにキナーゼが活性化中に消費されることを示すのでストイキオメトリックである。このことからキナーゼはプラスミノノーゲンに酵素的に作用するのではなくプラスミノノーゲンを修飾する物質であると言える。またキナーゼとプラスミノノーゲンはモル比で 1:1 で結合することが飽和曲線から類推される。

Makino ら<sup>72)</sup> および Makino<sup>73)</sup> はイヌのプラスミノノーゲンを精製しこれに高度に精製したスタフィロキナーゼを作用させて、キナーゼの変化を追跡したところ、精製キナーゼは pI 5.7, 6.1, 6.7 の 3 つのコンポネントを含むが、反応が進むうちに、pI 6.7 と 6.1 のものは、pI 5.7 に変化してゆくことが観察されこれは、生成したプラスミンの蛋白分解作用によるものと考えた。(培養から 3 つのコンポネントが得られるというのは、培養中に、post-translational modification をやはり蛋白分解酵素の作用で受けると考える)。この点はトリプシンを作用することによっても確認された。

付記。本総説中で筆者の報告は、札幌医科大学微生物学教室に在籍中、林 喬義教授、牧野利一助教授の指導下で行われたものである。

## 引用文献

- 1) Arbuthnott, J. P. (1964) Ph. D. Thesis in Glasgow University.
- 2) Arbuthnott, J. P., Freer, J. H., and Bernheimer A. W. (1967) Physical states of staphylococcal alpha-toxin. *J. Bacteriol.* 94 : 1170-1177.
- 3) Arbuthnott, J. P., Freer, J. H., and Billcliffe, B. (1973) Lipid induced polymerization of staphylococcal alpha-toxin. *J. Gen. Microbiol.* 75 : 309-319.
- 4) Arbuthnott, J. P., Freer, J. H. and McNiven, A. C. (1973) Physical properties of staphylococcal alpha-toxin and aspect of alpha-toxin membrane interactions. in "Staphylococci and Staphylococcal Infections" 2nd International Symposium. Academic Press. New York pp. 285-297.
- 5) Altenstein, M. S., Madoff, M. A. and Weinstein, L. (1963) Studies on the biologic activity of purified staphylococcal alpha-toxin. *Yale J. Biol. Med.* 35 : 373-389.
- 6) Arvidson, S. (1973) Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus* II. Isolation and characterization of an EDTA-sensitive protease. *Biochim. Biophys. Acta*, 302 : 149-157.
- 7) Arvidson, S. (1973) Hydrolysis of casein by three extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B.* 81 : 538-544.
- 8) Arvidson, S. (1973) The role of calcium for stability of an extracellular proteolytic enzyme from *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B.* 81 : 545-551.
- 9) Arvidson, S. (1973) The formation of calcium-dependent extracellular proteolytic enzyme from *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B.* 81 : 552-558.
- 10) Arvidson, S., Eriksson, R., Holme, T., Möllby, R., Wadström, T. and Vesterberg, O. (1973) Production, purification and partial characterization of staphylokinase. in "Staphylococci and Staphylococcal Infections" 2nd International Symposium. Academic Press. New York. pp. 406-412.
- 11) Arvidson, S. and Holme, T. (1971) Influence of pH on the formation of extracellular proteins by *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B.* 79 : 406-413.
- 12) Arvidson, S., Holme, T. and Lindholm, B. (1972) The formation of extracellular proteolytic enzymes by *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B.* 80 : 835-844.
- 13) Arvidson, S., Holme, T. and Lindholm, B. (1973) Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. I. Purification and characterization of one neutral and one alkaline protease. *Biochim. Biophys. Acta*, 302 : 135-148.
- 14) Bernheimer, A. W. (1968) Cytolytic toxins of bacterial origin. The nature and properties of cytolytic proteins. *Science* 159 : 847-851.
- 15) Bernheimer, A. W. and Schwartz, L. L. (1963) Isolation and composition of staphylococcal alpha-toxin. *J. Gen. Microbiol.* 30 : 455-468.
- 16) Bryce, L. M. and Rountree, P. M. (1936) The production of beta-toxin of Staphylococci. *J. Pathol. Bacteriol.* 43 : 173-189.
- 17) Cassidy, P. and Harshman, S. (1976) Purification of staphylococcal alpha-toxin by adsorption chromatography on glass. *Infect. Immun.* 13 : 982-986.
- 18) Cassidy, P. and Harshman, S. Binding studies and properties of I-labelled staphylococcal alpha-toxin. in "Staphylococci and Staphylococcal Infections" 3rd International Symposium. Academic Press. New York. (in press)
- 19) Chesbro, W. R., Heydrick, F. P., Martineau, R. and Perkins, G. (1965) Purification of staphylococcal beta-hemolysin and its action on staphylococcal and streptococcal cell walls. *J. Bacteriol.* 89 : 378-389.
- 20) Coleman, R., Finean, J. B., Knutton, S. and Limbrick, A. R. (1970) Structural study in the modification of erythrocyte ghosts by phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta*, 219 : 81-92.
- 21) Colley, C. M., Zwaal, R. F., Roelofsen, B. and Van Deenen, L. L. M. (1973) Lytic and non-lytic degradation of phospholipids in mammalian erythrocytes by pure phospholipases. *Biochim. Biophys. Acta*, 307 : 74-82.
- 22) Cooper, L. Z., Madoff, N. A. and Weinstein, L. (1964) Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal alpha-toxin. I. Kinetics of the lytic reaction. *J. Bacteriol.* 87 : 127-135.
- 23) Cooper, L. Z., Madoff, N. A. and Weinstein, L. (1964) Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal alpha-toxin. II. Effects of inhibitors on the hemolytic sequence. *J. Bacteriol.* 87 : 136-144.

- 24) Cooper, L. Z., Madoff, N. A. and Weinstein, L. (1964) Hemolysis of rabbit erythrocytes by purified staphylococcal alpha-toxin. III. Potassium release. *J. Bacteriol.* 87: 145-149.
- 25) Coulter, J. R. (1966) Production, purification and composition of staphylococcal alpha-toxin. *J. Bacteriol.* 92: 1655-1662.
- 26) Dalen, A. B. (1973) Production of staphylococcal alpha-toxin in defined medium and identification of stimulating factor from yeast extract. *J. Gen. Microbiol.* 74: 53-60.
- 27) Dalen, A. B. (1973) The induction of staphylococcal alpha-toxin by histidine. *J. Gen. Microbiol.* 74: 61-69.
- 28) Dalen, A. B. (1973) The influence of pH and histidine dipeptides on the production of alpha-toxin. *J. Gen. Microbiol.* 79: 265-274.
- 29) Davidson, F. M. (1960) The activation of plasminogen by staphylokinase: Comparison with streptokinase. *Biochem. J.* 76: 56-61.
- 30) Doery, H. M., Magnusson, B. J., Gulasekharan, J. and Peason, J. E. (1965) The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins. *J. Gen. Microbiol.* 40: 283-296.
- 31) Drapeau, G. R. Boily, Y. B. and Houmard, J. (1972) Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 247: 6720-6726.
- 32) Fackrell, H. B. and Wiseman, G. M. (1976) Production and purification of the gamma haemolysin of *Staphylococcus aureus* "Smith 5R". *J. Gen. Microbiol.* 92: 1-10.
- 33) Fackrell, H. B. and Wiseman, G. M. (1976) Properties of the gamma hemolysin of *Staphylococcus aureus* "Smith 5R". *J. Gen. Microbiol.* 92: 11-24.
- 34) Forlani, L., Bernheimer, A. W. and Chiancone, E. (1971) Ultracentrifugal analysis of staphylococcal alpha-toxin. *J. Bacteriol.* 106: 138-142.
- 35) Forssman, J. (1939) Studies on staphylococci XIV. The fixation of staphylolysin by blood corpuscles and hemolytic action of staphylolysin. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 16: 335-345.
- 36) Fujimura, S., Makino, T. and Hayashi, T. (1970) Effect of mitomycin C on the production of staphylokinase, nuclease and hemolysin by *Staphylococcus aureus*. *Japan. J. Bacteriol.* 25: 316-320. (in Japanese).
- 37) Fujimura, S., Makino, T. and Hayashi, T. (1972) The effect of Bleomycin on prophage induction and staphylokinase production. *Japan. J. Exp. Med.* 42: 75-80.
- 38) Fujimura, S., Makino, T. and Hayashi, T. (1972) Stimulation of staphylokinase production by mitomycin C. *Naturwissenschaften*, 57: 374-395.
- 39) Fujimura, S. (1973) Existence of two kinds of staphylokinase in the culture supernatant of *Staphylococcus aureus* Ps 47. (1973) D. Sc. Thesis in Hokkaido University.
- 40) Fujimura, S., Makino, T. and Hayashi, T. T. A. (1974) Occurrence of complex form of staphylokinase in the course of cultivation of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 28: 5-10.
- 41) Gabliski, J. and Solotorovski, M. (1962) Cell culture reactivity to diphtheria, *Staphylococcus* and tetanus toxins. *J. Immunol.* 88: 505-512.
- 42) Galantani, B., Paradisi, F., Mancini, A. and Giusti, G. (1968) An early effect of *Staphylococcus* alpha-toxin on cells growing in culture: ATP labels in normal and intoxicated cells. *Pathol. Microbiol.* 32: 277-284.
- 43) Gladstone, G. P. (1936) Production of staphylococcal alpha-hemolysin in a chemically defined medium. *Brit. J. Exptl. Pathol.* 19: 208-226.
- 44) Glaser, M., m Simpkins, H., Singer, S. J., Sheetz, M. and Chan, S. I. (1970) On the interactions of lipids and proteins in the red blood cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65: 721-725.
- 45) Glenny, A. T. and Stevens, M. F. (1935) *Staphylococcus* toxins and antitoxins. *J. Pathol. Bacteriol.* 40: 201-210.
- 46) Gow, J. A. and Robinson, J. (1969) Properties of purified staphylococcal beta-hemolysin. *J. Bacteriol.* 97: 1026-1032.
- 47) Gul, S. and Smith, A. D. (1972) Hemolysis of washed human red cells by the combined action of *Naja naja* phospholipase A<sub>2</sub> and albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* 288: 237-240.
- 48) Guyonett, F., Plommet M. and Boullanne, C. (1968) Purification de l'hémolysine gamma de *Staphylococcus aureus*. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 267: 1180-1182.
- 49) Hallander, H. O. and Bengtsson, S. (1967) Studies on the cell toxicity and species specificity of purified staphylococcal toxins. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B.* 70: 107-119.
- 50) Hallander, H. O., Laurell, G. and Löfstrom, G. (1968) Stimulation of staphylococcal hemolysin

- production by low concentration of penicillin. *Acta Pathol. Microbiol. Scand Section B.* 72: 586—600.
- 51) Haque, R-Ul. and Baldwin, J. N. (1964) Purification and properties of staphylococcal beta-hemolysin. I. Production of beta-hemolysin. *J. Bacteriol.* 88: 1304—1309.
  - 52) Haque, R-Ul. and Balwin, J. N. (1969) Purification and properties of staphylococcal beta-hemolysin. II. Purification of beta-hemolysin. *J. Bacteriol.* 100: 751—759.
  - 53) Hoorn, B. and Löfkvist, T. (1965) The effect of staphylococcal alphatoxin and preparations of staphylococcal antigens on ciliated respiratory epithelium. A study in organ culture. *Acta Otolaryng.* 60: 452—460.
  - 54) Houmard, J. and Drapeau, G. R. (1972) Staphylococcal protease: A proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 3506—3509.
  - 55) Jackson, A. W. (1963) Purification of staphylococcal beta-toxin. *Can. J. Biochem.* 41: 755—761.
  - 56) Kantor, S. K., Temple, B. and Shaw, W. V. (1972) Staphylococcal delta hemolysin: Purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 151: 142—156.
  - 57) Kienitz, M. and Schmelter, G. (1964) Untersuchung über den Einfluss von Staphylokokkentoxinen auf Affennieren-Zellkulturen. *Z. Bakteriol. Parasiten Krankenh. Abt. I. Orig.* 193: 447—453.
  - 58) Korbecki, M. and Jeljaszewicz, J. (1964) Action of staphylococcal alpha-hemolysin on KB cells. *Z. Bakteriol. Parasiten Krankh. Abt. I. Orig.* 192: 430—433.
  - 59) Korbecki, M. and Jeljaszewicz, J. (1965) Action of staphylococcal toxins in cell cultures. *J. Infect. Dis.* 115: 205—213.
  - 60) Kowalska-Loth, B. and Zakrzewski, K. (1975) The activation by staphylokinase of human plasminogen. *Acta Biochimica Polonica* 22: 327—339.
  - 61) Kreger, A. S., Kim, A. -S., Zaboretzky, F. and Bernheimer, A. W. (1971) Purification and properties of staphylococcal delta-hemolysin. *Infect. Immun.* 3: 449—465.
  - 62) Lack, C. H. and Glanville, K. L. A. (1970) Staphylokinase. in "Methods in Enzymology" XIX Academic Press. New York. pp. 706—714.
  - 63) Lankisch, P. -G. and Vögt, W. (1972) Direct haemolytic activity of phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta* 270: 241—247.
  - 64) Levine, B. S. (1938) Studies of staphylococcal toxin. The toxin-red cell reaction. *J. Immunol.* 35: 131—139.
  - 65) Lewis, H. J. and Ferguson, J. H. (1951) A proteolytic enzyme system of blood. III. Activation of dog serum profibrinolysin by staphylokinase. *Am. J. Physiol.* 166: 594—602.
  - 66) Lominski, I. and Arbuthnott, J. P. (1962) Some characteristics of staphylococcal alpha-hemolysin. *J. Pathol. Bacteriol.* 83: 515—520.
  - 67) Lominski, I., Arbuthnott, J. P. and Spence, J. B. (1963) Purification of staphylococcal alphatoxin. *J. Pathol. Bacteriol.* 86: 258—262.
  - 68) Low, D. K., Freer, J. H., Arbuthnott, J. P., Möllby, R. and Wadström, T. (1975) Consequence of sphingomyelin degradation in erythrocyte ghost membranes by staphylococcal beta-toxin (sphingomyelinase C). *Toxicon* 12: 279—285.
  - 69) Maheswaran, S. K., Smith, K. L. and Lindorfer, R. K. (1967) Staphylococcal beta-hemolysin. I. Purification of beta-hemolysin. *J. Bacteriol.* 94: 300—305.
  - 70) Maheswaran, S. K., and Lindorfer, R. K. (1967) Staphylococcal beta-hemolysin. II. Phospholipase C activity of purified beta-hemolysin. *J. Bacteriol.* 94: 1313—1319.
  - 71) Maheswaran, S. K., and Lindorfer, R. K. (1970) Purification and partial characterization of staphylococcal delta-hemolysin. *Bacteriol. Proc.* p78.
  - 72) Makino, T., Fujimura, S. and Hayashi, T. T. A. (1976) Studies on staphylokinase. *Z. Bakteriol. Parasiten Krankenh. I. Orig. Supplement* 5: 539—547.
  - 73) Makino, T. (1978) Proteolytic modification of staphylokinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 522: 267—269.
  - 74) Marks, J. and Vaughan, A. C. T. (1950) Staphylococcal delta-hemolysin. *J. Pathol. Bacteriol.* 62: 597—615.
  - 75) Marks, J. (1951) The standardization of staphylococcal alpha-antitoxin, with special reference to anomalous hemolysins including delta-hemolysin. *J. Hyg.* 49: 52—66.
  - 76) Mason, R. E. and Allen, W. E. (1975) Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with lysogenic conversion to loss of beta-hemolysin production. *Can. J. Microbiol.* 21: 1113—1116.
  - 77) Mavis, R. D., Bell, R. M. and Vagelos, P. R.

- (1972) Effect of phospholipase C hydrolysis of membrane phospholipids on membrane enzymes. *J. Biol. Chem.* **247**: 2835-2841.
- 78) McNiven, A. C., Owen, P. and Arbuthnott, J. P. (1972) Multiple forms of staphylococcal alpha-toxin. *J. Med. Microbiol.* **5**: 113-122.
- 79) Mesrobian, I., Georesco, M., Ieremia, T., Mitrica, M., Draghici, D. and Mateesco, M. (1960) Action des toxines microbiennes sur les cultures des tissus. I. Action de l'alpha-toxine staphylococcique sur les cultures tissu embryonnaire human. *Arch. Roumanes Pathol. Exptl. Microbiol.* **19**: 161-171.
- 80) Möllby, R. and Wadström, T. (1960) Studies on haemolysin from *Staphylococcus aureus* by the method of isoelectric focusing. in "Protides of the biological fluids". (17th Colloq.) Pergamon Press, London. pp. 465-469.
- 81) Möllby, R. and Wadström, T. (1971) Separation of gamma hemolysin from *Staphylococcus aureus* Smith 5R. *Infect. Immun.* **3**: 633-635.
- 82) Möllby, R. (1973) Purification of two bacterial phospholipase C and some effects on cell membrane. Ph.D Thesis in Karolinska Institutet.
- 83) Möllby, R. and Wadström, T. (1973) Purification of staphylococcal beta-, gamma- and delta-hemolysins. in "Staphylococci and Staphylococcal Infections" 2nd International Symposium. Academic Press. New York. pp. 298-313.
- 84) Murphy R. A. and Haque, R. -U1. (1967) Purification of staphylococcal delta-hemolysin. I. Production of delta-hemolysin. *J. Bacteriol.* **94**: 1327-1333.
- 85) Nannigan, N., Tijssen, F. C. and Op Den Kamp, J. A. F. (1973) Electron microscopy of *Bacillus subtilis* protoplast membrane after treatment with phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta*, **298**: 184-194.
- 86) Neisser, M. and Levaditi, C. (1900) Action de la toxine staphylococcique sur le rein. *Compt. rend. 13 Cong. Int. Med.* pp. 475-479.
- 87) Nogrady, G. and Burton, A. L. (1961) L'effect de la toxine staphylococcique alpha sur les cellules d'embryon de poulet en cultures de tissue. *Pathol. Biol.* **9**: 831-833.
- 88) Novak, E., Seifert, J., Buchar, E. and Raskova, H. (1971) Effect of staphylococcal alpha-toxin on the phosphorylation of ADP by rat liver mitochondria II. Effect of staphylococcal alpha-toxine upon electron transport. *Toxicon*, **9**: 361-366.
- 89) Op Den Kamp, J. A. F., Kauerz, M. Th. and Van Deenen, L. L. M. (1972) Action of phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipase C on *Bacillus subtilis* protoplasts. *J. Bacteriol.* **112**: 1090-1098.
- 90) Pateleski, J., Szulc, S., Pniewska, B., Przetakiewicz, Z. and Jelszewicz, J. (1973) Effect of staphylococcal alpha-toxin on lipolytic enzyme activities of the arterial wall. in "Staphylococci and Staphylococcal Infections" 2nd International Symposium. Academic Press. New York. pp. 352-354.
- 91) Penso, D. and Vicari, G. (1957) Studio dei fenomeni immunizari per mezzo delle colture tissute. III. Sull'azione citopatogena della tossina stafilococcica. *Rend. Inst. Super Sanita.* **20**: 1109-1112.
- 92) Robinson, J., Thatcher, F. S. and Gagnon, J. (1958) Studies with staphylococcal toxins. IV. The purification and metallic requirements of specific hemolysins. *Can. J. Microbiol.* **4**: 345-361.
- 93) Robinson, J. and Thatcher, F. S. (1963) Studies with staphylococcal toxins VII. Separation of proteolytic enzyme from alpha-hemolysin. *Can. J. Microbiol.* **9**: 697-702.
- 94) Roelofsen, B., Zwaal, R. F. A., Comfurius, P., Woodward, C. B. and Van Deenen, L. L. M. (1972) Action of pure phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipase C on human erythrocytes cell ghosts. *Biochim. Biophys. Acta.* **241**: 925-929.
- 95) Satoh, Y. (1969) On the purification of staphylokinase. *Sapporo Med. J.* **35**: 67-77 (in Japanese).
- 96) Sharma, B. S. and Haque, R. -U1. (1973) A chemically defined medium for production of staphylococcal beta-hemolysin. *Can. J. Microbiol.* **19**: 1319-1323.
- 97) Six, H. R. and Harshman, S. (1973) Purification and properties of two forms of staphylococcal alpha-toxin. *Biochemistry* **12**: 2672-2677.
- 98) Six, H. R. and Harshman, S. (1973) Physical and chemical studies on staphylococcal alpha-toxin A and B. *Biochemistry*, **12**: 2677-2683.
- 99) Smith, D. D. (1956) Alpha- and gamma-lysin production by variants of *Staphylococcus aureus*. *Nature*, **178**: 1060-1061.
- 100) Smith, M. L. and Price, S. A. (1938) *Staphylococcus* gamma-hemolysin. *J. Pathol. Bacteriol.* **47**: 379-393.
- 101) Szmigielski, S., Kwarecki, K., Jeljaszewicz, J.