

## Streptomycin 耐性菌における RNA 類縁物質について

(第 1 編)

黒 沢 武 正・住 田 元 旦  
山 本 正 彦・田 中 伸 一

名古屋大学医学部内科第一講座—指導 日比野進教授

受付 昭和 31 年 2 月 20 日

## I 緒 言

現在までに発見せられた抗結核剤のうち、最も有力なものに数えられる Streptomycin (以下 SM と略) の耐性化は重大な問題であり、臨床的に結核菌の SM 耐性防止方法が種々試みられている。また試験管内においてもこの耐性問題を究明せんとして種々の方面より極めて多数の研究が今までに報告されてきた。

SM の耐性問題の探究は、SM がいかんして細菌の発育を抑制するかということを探明するための根本的な手懸りになるとも考えられ、SM の作用機作を研究する一つの道程としても重視せられるに至つた。

近年の化学における方法論の急速な進歩に伴い、これらの問題を菌の物質代謝の面から論じた興味ある研究報告も多数見られる。

SM の耐性菌出現の Genetics についての研究は、McCarty, Avery<sup>1</sup>らのいわゆる Transforming principle を一部導入して、杉山<sup>2</sup>らが SM なくして、耐性菌より単離した DNA で感性菌を耐性化せしめうること、ならびにこの耐性化には Energy rich phosphate bond の廻転が共転していることを明確にした。

SM の作用機作に関しては、結核研究者はもちろん、多くの微生物学者、生化学者等により広汎に論じられてきている。

SM と核酸との関係については、Donovick<sup>3</sup>, Cohen<sup>4</sup>, Massart<sup>5</sup> はそれぞれ独立に研究して、SM は DNA, RNA と可逆的に複合体を作つて、沈澱するといひ、SM の Diguanid 基が核酸と結合するものと考えた。しかしこの現象が細胞内における SM の作用としていかほど具体性を有するかについては批判しているが、Euler, Jaarma<sup>6</sup> は、SM が菌の発育を抑制しているときに RNA を加えると、この抑制が解かれて菌が増殖してくることを認め、Pandalai<sup>7</sup> もブドウ球菌、大腸菌において、RNA は SM と拮抗すると述べている。また Umbreit 一門は、力源代謝と SM の関係を研究し、SM は焦性ブドウ酸とオキザロ酢酸の縮合を阻害すると考えた<sup>8</sup>。しかし、次でクエン酸の形成は SM で全く影響を受けないことを

認めた<sup>9</sup>。さらに進んで SM の作用点は焦性ブドウ酸が Krebs の Tricarboxylic acid cycle 以外の系に入つて代謝される Step を阻害すると考え、同位元素 P<sup>32</sup> をも使用してこの問題の物質が 2-phospho-4-hydroxy-4-carboxyl-adipic acid であろうと主張している<sup>10</sup>。竹内<sup>11</sup> からも鳥型結核菌竹尾株を用いて焦性ブドウ酸を中心とする研究から、SM は鳥型菌における焦性ブドウ酸の代謝を抑制することを酸素吸収、化学的定量成績、T.T.C. (Triphenyl tetrazolium chloride) の還元値より認めているが、この際クエン酸の代謝は諸種の条件下で SM によつて影響を受けないことを明かにしている。これらの実験より、焦性ブドウ酸を中心とするいわゆる複合酵素系の Unbalance が招来されることはまず間違いなからうと考えられる。

また SM の作用として特筆すべきは、適応酵素産生阻止の事実<sup>12</sup>であり、私共の研究室<sup>13</sup>においても Niacin の酸化分解においてこれと全く軌を一にする成績をえているが、奥貫・堀尾<sup>14</sup>は一旦できた酵素の崩壊転換も SM で阻止される事実より SM は蛋白質の動きを釘づけにするともっている。

私どもはこれらの興味ある先人の業績を通覧し、SM 問題に関連して核酸代謝、磷酸代謝の面より結核菌を若干取扱つてみた。先に私共の研究室では、次のような興味ある現象に逢着した。すなわち通常の SM 感性鳥型結核菌に、試験管内で 500~1,000  $\gamma/ml$  の SM を作用させると、該菌の Alcohol dried powder から過塩素酸で抽出できる、紫外部 260  $m\mu$  に強い吸収をもつ物質の増量を認めるのに対して、SM 耐性菌においては SM の作用の有無にかかわらずその量にほとんど変化のないことをまず認め<sup>15</sup>、さらにこの本態を追求している際、酸溶性割合で pH 4~5 の酸性領域において不溶性バリウム塩を形成すること<sup>15</sup>を認めた。私どもはこの本態 (以下未知物質と略) について物質的に把握せんとして若干の検討を行つた。

## II 実験材料および測定法

## 1) 結核菌

① SM感性菌

SMに接触させたことのない鳥型結核菌竹尾株またはBCG (SM 0.5 $\gamma$ /mlにて発育阻止されるもの)

② SM耐性菌

上記SM感性鳥型結核菌竹尾株またはBCGをSM含有 Sauton 培地に継代培養することにより、SM 1,000  $\gamma$ /ml 以上の耐性菌を試験管内で調製し、しかる後SMを含有しない培地に数代培養したもの。使用前SM 1,000  $\gamma$ /ml 以上に耐性であることを確認した後使用に供した。

③ 培養方法

培地は Sauton 合成液体培地を用い、37°Cにて孵卵器で培養した。

培養期間は、竹尾株の場合は4日間、BCGは10日間である。

2) SM

SMは硫酸塩のものを用いた。

3) Tiselius の電気泳動

日立-HT-B型 Tiselius 電気泳動装置を用いた。

4) 紫外部の吸収測定

溶液の場合は、Beckman の光電分光光度計により、それぞれの波長において吸光係数を求めた。

濾紙上では、低圧水銀燈 (マツダ空気殺菌灯GL15: 2537 Å, 100V, 15W) により科研の紫外線フィルターを用いて暗黒色のスポットとして検出した。

5) 五炭糖の測定

Mejbaum<sup>16)</sup>のオルシン-塩酸反応によつて発色させ、Beckman の光電分光光度計を用い、波長 660 $m\mu$ にて測定した。

6) DNAの定性

Dische<sup>17)</sup>のチフェニールアミン反応を用いた。

7) 磷の測定

易水解磷は、試料を1N-塩酸または1N-硫酸にて沸騰湯浴中で7分間加水分解した後、Fiske-Subbarow<sup>18)</sup>の方法によつて発色させ、波長 660 $m\mu$ にて測定した。

なお濾紙上の場合、Hanes-Isherwood<sup>19)</sup>の方法に従い、Hanes-Isherwood の試薬 (60%過クロール酸 5ml, 4%モリブデン酸アンモン 25ml, 1N-塩酸 10ml, 水 60ml) を噴霧し、紫外線照射 5分後アンモニア蒸気にあて、緑青色のスポットとして検出した。この方法によれば、無機磷のみならず易水解の有機磷も検出可能である。

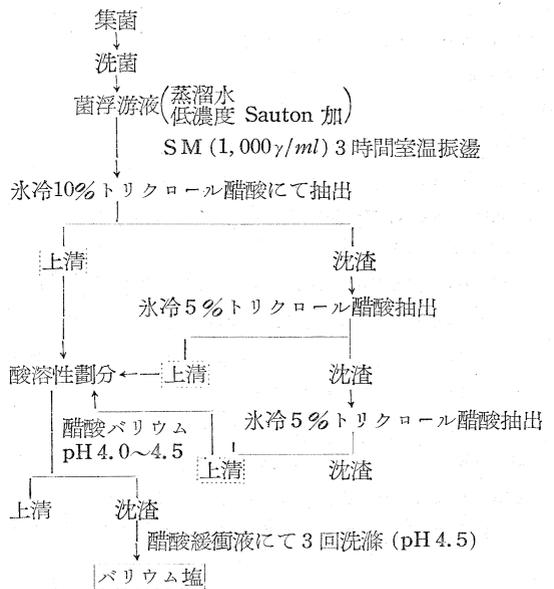
III 実験方法および実験成績

表1に示した如く、Sauton 培地に培養した結核菌を集菌し、次いで蒸溜水にて数回菌体を洗滌した後、これを Potter-Elvehjem 型 Homogenizer<sup>20)</sup> で水で均等化、次いで遠心集菌する。この操作を2回繰返して用供する。これで培地成分は除去できる<sup>13)</sup>。湿重量50gの菌に約 200ml の割合で稀釈 Sauton 培地 (蒸溜水 9 :

Sauton 1) を加え、SMを 1,000 $\gamma$ /ml の割合に加えて (対照にはSMを加えず) pH 7.2 で室温にて3時間振盪する。

上記の操作をした後 Umbreit<sup>21)</sup> に従つて酸溶性劃分をうる。すなわち、氷冷下で集菌菌塊を乳鉢に入れ、あらかじめ氷冷した10%トリクロール醋酸で15分間精力的に菌を磨碎して抽出を行い、遠心後上清をとり、さらにこの沈渣を氷冷トリクロール醋酸で2回抽出し、終末濃度10~5%とする。この際結核菌の特殊な構造上、精力的かつ丹念に抽出することが特に必要であり、そして丹念に3回行えば抽出は一応満足できる<sup>13)</sup>。遠心してえた上清は集めて濾過した後に、これに25%醋酸バリウムを加えて、Methyl orange および Brom cresol green にて pH 4.0~4.5 に修正し、醋酸バリウムの量が沈澱を生ぜしめるのに不足していないことを確めた後約1時間氷冷し、遠心してえた沈澱を pH 4.5 のM/10醋酸緩衝液 (少量の醋酸バリウムを含む) で3回洗滌する。

表1 バリウム塩による調製法



この手技で「未知物質」を含む、酸溶性劃分で pH 4~5 における不溶性バリウム塩をえる。

表2 SM添加による「未知物質」の量的変化  
SMを添加せぬ場合を1.0とする

	SM 感性 菌		SM 耐 性 菌	
	E <sub>260</sub>	△7P	E <sub>260</sub>	△7P
第 1 例	1.3	1.2	0.8	0.8
第 2 例	1.5	2.1	1.1	1.3
第 3 例	2.0	2.4	0.9	0.8

SM 1,000 $\gamma$ /ml 3時間

(1) SM感性菌・耐性菌(鳥型)の両者を、SMを作用させた場合と作用させない場合にえられたものについて実験を行った。

1M-硫酸を含む醋酸緩衝液(pH 4.5)で除バリウムした後、紫外吸収および易水解磷を指標として比較し(表2)、感性菌にSMを作用させるときは常に増量する結果をえた。

(2) 過塩素酸を用いても抽出可能である。この際は氷冷過塩素酸の、初めは0.6N、後の2回は0.2Nにて抽出し、その手技はトリクロール醋酸の場合と同様である。

なおBCGの場合も同様に抽出できた。

### (3) 塩基

これらの物質が260 $\mu$ に吸収のあることより塩基の存在を想像した。塩基検出のための加水分解法としては、プリンを破壊せずにピリミジンを十分加水分解するために Marshak and Vogel<sup>22</sup>に従つて、

- 1) 1N-塩酸 120°C 2時間
- 2) 7N-過塩素酸 100°C 1時間

の2つの条件を試みた。加水分解物は東洋濾紙 No. 3を用いてペーパークロマトグラフィーを行った。溶媒としては、

- 1) n-ブタノール-水 (14:86 容量%)<sup>23)</sup>
- 2) n-ブタノール-醋酸-水 (4:1:2 容量%)<sup>24)</sup>

の2方法を試み、1)の場合はあらかじめアンモニア気流中で中和の後に行つた。

塩基を低圧水銀燈により科研のフィルターを用いて黒色のスポットとして検出した。なおグアニンについては、紫色の特有の蛍光を参考とした。

その結果、おのおのアデニン、グアニン、チトシン、ウラシルと思われるスポットをえた。

### (4) 糖

Mejbaum のオルシン-塩酸反応、Dische のデフェニールアミン反応を施行した。

オルシン-塩酸反応陽性、デフェニールアミン反応陰性で、恐らく糖として五炭糖を有することと思われる。

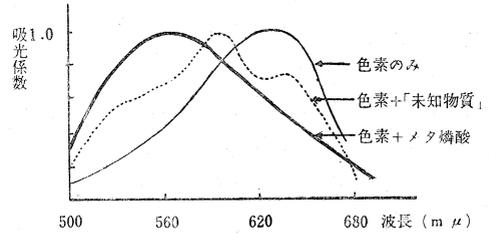
### (5) 磷 酸

この物質には多くの易水解磷がありまた pH 4.5において不溶性バリウム塩を形成する点より、すでに Katzman<sup>25)</sup>らが Yeast において Polyphosphate を見出しているように、メタ磷酸・ピロ磷酸等の存在を疑い、1, 2の実験<sup>26)~28)</sup>を行った。すなわちメタ磷酸の特別の性質である蛋白凝固・メタクロマジー等を試みた。

1) 蛋白凝固: 同物質の水溶液は卵アルブミンを強く凝固せしめた。

2) メタクロマジー: 図1に示す如く、Toluidine blue の特有の波長が同物質を加えると短波長に移動することは明かであり、大量のメタ磷酸を加えた場合によく似た様相を示している。(図1)

図1 「未知物質」のメタクロマジー



以上により少なくとも一部メタ磷酸が存在すると思われる。

### (6) アミノ酸

(3)に記した加水分解物がニンヒドリン反応陽性であつたためアミノ酸の存在を疑い、Vickery and White<sup>29)</sup>に従い6N-塩酸で12時間100°加熱加水分解した後、その水解物について東洋濾紙 No. 131を用いて次の3種の条件<sup>24)</sup>でペーパークロマトグラフィーを行った。

- 1) 水飽和フェノール
- 2) ブタノール-醋酸 (4:1)
- 3) ルチヂン-コルデン (1:1)

その結果、

- 1) SM感性鳥型菌にSMを作用させたもの
- 2) SM耐性鳥型菌
- 3) SM感性BCGにSMを作用させたもの
- 4) SM耐性BCG

の4種とも、おのおのアスパラギン酸、グルタミン酸および1~2種の不明の同一アミノ酸を認めた。

### (7) 濾紙電気泳動<sup>30)</sup>

「未知物質」に含まれているいろいろの成分例えば塩基・五炭糖・磷酸・アミノ酸等が、結合して単一の物質となつているものかあるいはただ単に雑然たる混合物にすぎないかを知る1つの方法として、濾紙通電クロマトグラフィーを試みた。またこの物質は種々の性質より当然高分子と思われるので通常の濾紙クロマトグラフィーでは動き難いと考えられ、また若し単一の物質であるならば、できれば泳動値・分子量等の物理学的恒数を算出するための1つの条件としても濾紙電気泳動を用いることが有利であると考えた。

濾紙の選定: 濾紙としては東洋濾紙 No. 3, No. 50が考えられる。No. 50は均質であるが Nucleotide を紫外線ランプで見ることおよびペーパー上で磷の反応を行うことを考えて、紫外線の吸収少なく無機物の少ない No. 3を用いた。なお No. 3にも多少無機磷の反応があるのでN/100-塩酸で数回、次に水で数回洗い、無機磷を除いて使用に供した。

緩衝液の選定: 緩衝液も通常用いられるペロナール-ペロナールソーダ緩衝液、磷酸緩衝液はそれぞれ紫外線吸収、磷反応を呈して不適当のため、中性では硼砂-硼酸緩衝液、酸性ではクエン酸-塩酸緩衝液を用いた。

緩衝液の濃度：高いときは通電量多く泳動は速かであるが加熱され、低いときは発熱は少ないが泳動が遅いので大体 M/20~M/100 を使用した。

泳動装置としては懸垂法を使用した。

電圧は 300volt/40cm 位、電流は 1mA/4cm~0.5mA/4 cm 位を使用し、泳動時間は10時間内外行つた。

展開を終つた濾紙は、低圧水銀燈に科研のフィルターを使用して塩基の存在を黒色のスポットとして検出した後に、濾紙を縦に3分して五炭糖・磷・アミノ酸の反応を行つた。

五炭糖は、濾紙上より 0.5N アンモニアにて溶出したものにつき、オルシナー塩酸反応を行つた。磷の反応は Hanes-Isherwood の方法によつた。アミノ酸の反応には、ニンヒドリン反応を用い濾紙上で行う方法と、濾紙より 0.1N-塩酸で溶出したものを塩酸で加水分解して 1% ニンヒドリン水溶液を加えて加熱する 2つの方法によつた。

その結果、pH 8.2 の硼砂-硼酸緩衝液で行つた実験では、紫外線吸収・五炭糖・有機磷・ニンヒドリン反応陽性の部分は一致して、恰かも結合している如き結果をえた。pH 4.5 のクエン酸-塩酸緩衝液を使用した際も、紫外線吸収・ニンヒドリン反応は一致した場合が多かつたが、必ずしも一定の成績をえなかつた。

#### (8) Tiselius の電気泳動

次に Tiselius の電気泳動装置によつても同様に実験を試みた。

pH 8.0M/20 磷酸緩衝液に対して24時間透析したものにつき、8mA, 87Volt, 20分間、2cm 泳動を行わせて、大体において単一な peak をえた。

以上のバリウム塩における諸実験結果から、「未知物質」中には crude なバリウム塩の状態においてはあがあるが、RNA の構成塩基たる 4つの塩基、五炭糖、磷酸（そのうちの一部はメタ磷酸と思われる）、アミノ酸を有していることが想像される。しかもこれらが結合していることを思わせる成績が多かつた。そして氷冷トリクロール醋酸で抽出可能な点より、RNA ほど高分子ではないように推定されるから、一応これが RNA に類縁性を有する核酸関係物質で Oligonucleo-polypeptide ともいふべき状態で存在するものであらうと考える。

#### IV 総括および考察

以上の実験により、SM の耐性問題に関連して結核菌中に見出された私どもの「未知物質」が、恐らく RNA に類縁性を有する核酸関係物質で、その化学的本態が Oligonucleo-polypeptide であらうという一応の見解に達したのである。しかし、この物質の純粋な分離およびさらに進んで物質的な確実な把握までには到らなかつた。

まずこれらの研究を行うに当つては、生物の物質代謝

が動的なものである以上、結核菌の発育条件・発育時期を可及的一定にする必要がある。私どもは結核菌を Sauton 合成培地に数代継代培養したものを培地の pH、培養温度に注意しつつ、培養期間はすべて一定期間のものを使用に供した。

次にいわゆる酸溶性劃分を抽出するには、結核菌体が特種な脂質に被覆されていて抵抗が強いために、高等動物組織や一般微生物を材料とするときに比して容易でないため、磁製乳鉢で強力かつ精力的に菌体を磨砕して抽出操作が不十分に終らぬように留意した。また核酸は、トリクロール醋酸・過塩素酸にて冷時には不溶であるが熱すれば可溶性となる<sup>31)</sup>ため低温操作が肝要であり、これらの点に注意を払つた。

さて SM の耐性問題、SM の侵襲点に関連して見出されたこの「未知物質」の、物質的な把握、さらに SM 感性耐性両菌における SM を作用させた場合と作用させない場合の態度、菌の age、これらの諸々の場合においてこれらが全く同一物質なりや否や等々、さまざまの Metabolic state についての定量的な解決が当然望まれるが、またこれは容易な命題ではない。私共が想像している "Oligonucleotide" の研究は少なく、RNA, DNA を酵素の力を借りて Oligonucleotide<sup>32,32)</sup> を調製した報告があるが、Woolley<sup>34)</sup>らにより最近漸く Yeast を使用してこれを分析的に純粋に分離すべく努力されているが、結核菌についての報告は未だ見ない。

pH 4.5 において沈澱させた酸溶性物質は無論このままでは crude であらう。しかし一応この段階において紫外線吸収および易水分解を指標としてこれが SM 感性・耐性菌の両者において SM の作用の有無にかかわらず常在することを認めた。そしてこれが感性菌において SM を作用させることにより常に増量することを認めている。しかし定量的な厳密な比較は、「未知物質」の本態が明らかになつたときに初めて可能であらう。

私どもはさらに進んで crude なバリウム塩の状態ではあるが、塩基としては RNA の構成塩基であるアデニン、グアニン、チトシン、ウラシル、糖としては五炭糖、磷酸（そのうちの一部はメタ磷酸と思われる）、2~3 のアミノ酸が「未知物質」に存在することを思わせる結果をえたので、これらが結合して単一物質の状態にあるのか、単に雑然たる混合物にすぎぬかを濾紙電気泳動にて実験した結果は、pH 8.2 においては諸反応の陽性部分が一致して恰かも結合せる如き結果をえたが私どもの物質中に含まれているアミノ酸がアスパラギン酸、グルタミン酸の如き酸性アミノ酸であり、また Smith<sup>35)</sup> が述べている如く、中性→アルカリ性では種々の核酸関係物はほとんど同じ易動度で陽極に動くことより、これのみで単一とはいえない。従つてさらに pH 4.5 における実験を行つたが、この場合も一致せる場合が多かつたが必

ずしも一定の成績をえなかつた。次に Tiselius の電気泳動の結果は単一の peak をえているが、透析中に一部の成分を失つた恐れがあり、あるいは pH がアルカリ側のために先に述べた危険があるために、単一物質と断定はでき難い。

次に感性菌・耐性菌に、SM を作用させたものと作用させないもの、鳥型菌・BCG からえられたものの異同であるが、私どもの実験結果からはこれらの構成成分に確然たる相違のある data はえられていない。恐らくこれらは同一物質であろうが、その結論は今後に残された問題である。

## V 結 語

SM の耐性問題に関連して結核菌中に見出された、酸性で pH 4.5 において不溶性バリウム塩を形成する割合にあつて、SM の作用によつて増量する物質について研究した。

1) RNA の構成塩基たるアデニン・グアニン・チトシン・ウラシル、五炭糖、2~3 のニンヒドリン陽性物質および多量の易水解磷を検出した。

2) 濾紙電気泳動・Tiselius の電気泳動からは、上記の成分が混在するのではなく、恰かも結合している如き結果をえた。

3) 同物質は、RNA に類縁性を有する核酸関係物質で、恐らく Oligonucleo-polypeptide ともいうべき状態で存在するものであろう。

## 文 献

- 1) Avery, O. T., C. H. McLeod, M. McCarty : J. Exp. Med., 79, 137, 1944.
- 2) 杉山正雄他 : 結核, 29 : 445, 1954.
- 3) Donovan, R., P. Banales, F. Pansy : J. Bact., 56, 125, 1947.
- 4) Cohen, S.S. : J. Biol. Chem., 168, 511, 1947.
- 5) Massart, L., G. Peters, V. Houcke : Experimentia, 3, 289, 1947.
- 6) Euler, H. V., M. Jaarma : Arkiv. Kemi. Mineral. Geol., 25 A, 1, 1947.
- 7) Pandalai, M. G., K. M. Pandalai : J. Sci. Ind. Research, 8 B, 57, 1949.
- 8) Umbreit, W. W. et al. : J. Biol. Chem., 177, 704, 1949.
- 9) Umbreit, W. W. et al. : J. Bact., 58, 76, 1949.
- 10) Umbreit, W. W. et al. : ibid. 66, 74, 1953.
- 11) 竹内浩一他 : 結核, 30 : 503, 1955.
- 12) 山村雄一 : 酵素化学の進歩 (共立社, 東京) II
- 13) 日比野 進 : 第29回日本結核病学会総会特別講演, 1954.
- 14) 奥貫一男・堀尾武一 : 第26回日本生化学会総会抄録輯, 23, 1954.
- 15) 水野厚生他 : 第28回日本結核病学会総会演説特集号, 1953.
- 16) Mejbbaum, W. : Z. physiol. Chem., 258, 117, 1939.
- 17) Dische, Z. : Mikrochemie, 2, 26, 1930.
- 18) Fiske & Subbarow : J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
- 19) Hanes, C. S., F. A. Isherwood : Nature, 164, 1107, 1949.
- 20) Potter, V. R., C. C. Elvehjem : J. Biol. Chem., 114, 495, 1936.
- 21) Umbreit, W. W. et al. : Manometric technique (mineapolis), 1949.
- 22) Marshak, A., H. J. Vogel : J. Biol. Chem., 189, 597, 1951.
- 23) Markham and Smith : Biochem. J., 45, 294, 1949.
- 24) 佐竹一夫 : ペーパークロマトグラフ, 1951.
- 25) Katchman, B. J., W. O. Fetty : J. Bact., 69, 607, 1955.
- 26) Wiame, J. M. : Biochem. Biophys. Acta, 1, 234, 1947.
- 27) Schmidt, G., L. Hecht, S. J. Thannhauser : J. Biol. Chem., 166, 775, 1946.
- 28) Juni, E., M. D. Kamen, J. M. Reiner, S. Spiegelman : Arch. Biochem., 18, 387, 1948.
- 29) Vickery, H. B., A. White : J. Biol. Chem., 99, 701, 1933.
- 30) Grassman, W., K. Hannig, M. Knedel : Dtsch. med. Wschr., 76, 333, 1951.
- 31) Schneider, W. C. : J. Biol. Chem., 161, 293, 1945.
- 32) Carter, C. E. : J. Am. Chem. Soc., 72, 2604, 1950.
- 33) Gordon, A. H. et al. : Biochem. J., 48, 569, 1951.
- 34) Woolley, D. W. et al. : J. Biol. Chem., 197, 521, 1952.
- 35) Smith, J. D. : The Nucleic Acids, Chemistry and Biology (Chargaff, E., J. N. Davidson), 267, 1955.