

## Streptomycin 耐性菌における RNA 類縁物質について

## (第 2 篇)

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

第 1 篇において、Streptomycin (以下 SM と略) の耐性問題に関連して結核菌に見出される、RNA に類縁性を有する核酸関係物質 (以下「未知物質」と略) について述べたが、今回はさらにその精製等についてイオン交換樹脂をも用いて若干の検討を行った。

## II 実験材料および測定法

第 1 篇において述べた材料・測定法を今回も同様に用いた。今回はさらに下記のものも用いた。

## 1) イオン交換樹脂

それぞれ目的に応じて Dowex-50, Dowex-1, Amberlite IRC-50, Amberlite IR-4B の計 4 種類を使用した。

樹脂<sup>1)</sup> は粒子が大粒の場合は磁製乳鉢でこれを適当にすりつぶし、水中で篩分けて粒子の過大・微細なものを除去して一定の範囲の大きさの粒子を揃えた。(200~400 mesh)

使用前にあらかじめ Soxhlet の抽出器にかけてエーテルで 24 時間清浄化した後 24 時間水洗し、さらにそれぞれの前処理を施した後で使用に供した。

## 2) 総磷の測定

総磷は試料に 10N-硫酸 0.5 ml, 濃硝酸 1 滴を加えて 130~160°C にて灰化し、1~2 滴の 30% 過酸化水素水を滴加して、灰化の終了するとともに水冷、1ml の水を加えて 100°C 10 分間熱した後水冷、Fiske-Subbarow の方法によつて発色させ、Beckman の光電分光光度計にて波長 660 m $\mu$  にて測定した。

## 3) 窒素の測定

窒素は Farnas<sup>2)</sup> の方法によつて定量した。

## III 実験方法および実験成績

## A. バリウム塩→水銀塩

第 1 篇に述べた如く「未知物質」はバリウム塩として沈澱捕捉できるが、バリウム塩法によつてえられた物質は crude であり、これをさらに水銀塩にする精製法について吟味した。

表 1 水銀塩による調製法

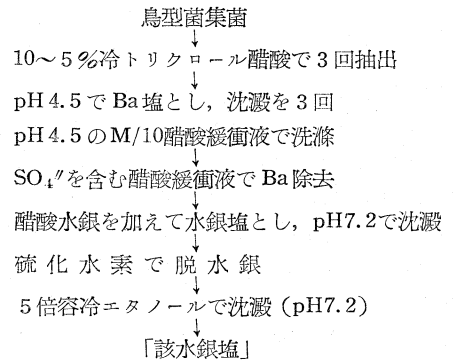


表 1 の如く一旦バリウム塩として捕捉した後、pH 4.5 の 1 M-硫酸を含む醋酸緩衝液で数回すつて除バリウムし、その上清にもはや沈澱の生じなくなるまで醋酸水銀を加えて pH 7.2 において水銀塩として捕捉した後、硫化水素を十分に通じて脱水銀し、冷エタノールにて沈澱させる。(以下この手技で脱水銀してえた沈澱を「該水銀塩」と略)

一応この段階で検討した結果は次の如くである。

## (1) 窒素・磷

「該水銀塩」をアブデルハルデン氏乾燥器で 80°~90°C で乾燥後、窒素・総磷の量を測定した。(表 2)

## (2) 易水解磷

「該水銀塩」の磷酸の存在様相を水解度より検討した。すなわち、乾燥量 10mg を 50ml の 1 N-塩酸に溶解し、2ml 宛試験管に入れ沸騰湯浴で加水分解し時間的關係を見た。(図 1) すなわち、

表 2 「該水銀塩」の窒素・総磷量

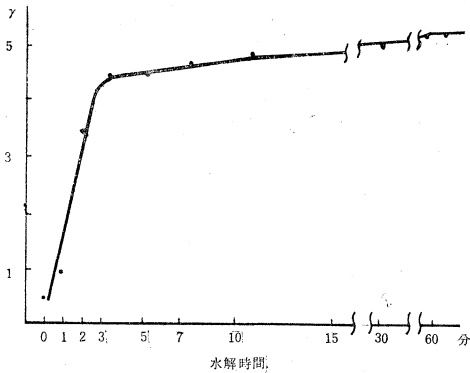
	N	P	N:P
第 1 例	2.0 $\gamma$	6.8 $\gamma$	0.29
第 2 例	1.9 $\gamma$	8.0 $\gamma$	0.24

(試料 100  $\gamma$  中の値)

「該水銀塩」もまた多量の易水解磷を有することが判明した。

## (3) 塩基の検出

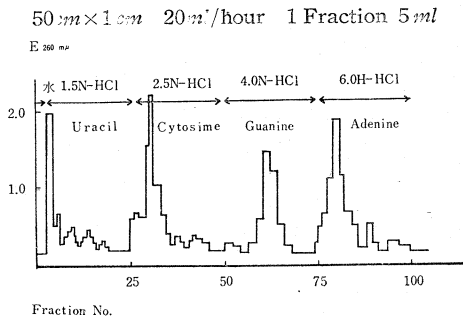
図1 「該水銀塩」の磷水解曲線  
100°C 1N-塩酸で加水分解 100γ  
中の磷



鳥型感性菌にSMを作用させてえた「該水銀塩」を1 N-塩酸10ml とともに封鎖し、Autoclave にて1.5気圧、3時間加水分解した後封を切り、濾過後湯浴にて約5ml に蒸発濃縮し、これに3滴のアンモニア水を加えた後、蒸留水で全量約40ml にしたものを試料とした。

イオン交換樹脂による核酸関係物質の分析は1945年以後において次第に正確に実施しうようになり、Harris<sup>3)</sup>、Elmore<sup>4)</sup>、Cohn<sup>5)</sup>らの努力によつて近年に至つて世の趨勢は広くイオン交換体の使用を見るに至つた。私共は塩基の分離検出をWall<sup>6)</sup>の手技に従つて、陽イオン交換樹脂Dowex-50によるクロマトグラフィーを行つた。樹脂をまずピッカー内で十分に8N-塩酸、水、2N-苛性ソーダ、水の順に数回繰返した後、Resinbedの長さを50cmにしさらに1.5N-塩酸を48時間通して後水洗する。これに試料を流入して樹脂に吸着させた後、約50mlの蒸留水を通した。(図2)

図2 Dowex-50 による塩基のイオン交換樹脂  
クロマトグラフィー



溶出剤は1.5N-塩酸に始まり2.5N-, 4.0N-, 6.0N-と階段的に高め Automatic fraction collector で分取した。図2の如く大きな4つの peak を認め、その4 fraction の紫外外部吸収スペクトルおよびE280/E260比率、その fraction number と純品のそれとの溶出位置を比較するとともに、4 fraction を濃縮後、第1篇の塩

基の検出と同様な方法によつてペーパークロマトグラフィーを行つた。

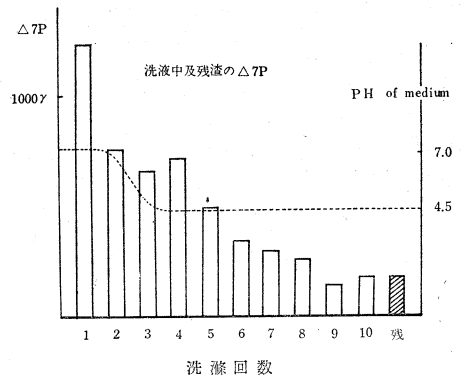
その結果、この場合もRNAの構成塩基たるウラシル、チトシン、グアニン、アデニンを認めた。

B. バリウム塩法の検討

今まで述べた「未知物質」は、これをすべて一旦バリウム塩の形にして捕捉したのであるが、バリウム塩法の手技が果して適当な方法であるか否かを検討するため、1, 2の実験を行つた。

(1) SM感性鳥型菌(湿重量30g)にSMを作用させた後トリクロール醋酸で酸溶性劃分を抽出し、醋酸バリウムおよび苛性ソーダを加えて、pH7.2における不溶性バリウム塩を遠心分離した。これをpH4.5のM/10醋酸緩衝液(少量の醋酸バリウムを含む)で丹念に約15分間攪拌洗滌すること10回、各回とも洗滌用の緩衝液は30ml宛使用した。残つた洗渣には、1M-硫酸を含む醋酸緩衝液(pH4.5)を加えて除バリウムすること3回、各回の上清を一緒にした(計10ml)。

図3 バリウム塩法の検討 pH7.2における不溶性バリウム塩をpH4.5の醋酸緩衝液で洗滌



これらの洗液中および残渣中の易水解磷を測定した結果を図3に示した。すなわち、pH4.5の緩衝液で洗滌すると洗滌液は3回目にすでにpH4.5になつたが、「未知物質」はその後も連続的に溶出された。この点から、「未知物質」を醋酸酸性で定量的に沈澱捕捉するには不完全な方法であり、また他の物質の共沈澱による混在が避けられず、従つて「未知物質」をバリウム塩法によつては截然と分割しえないと思われる。

(2) SM耐性鳥型菌(湿重量15g)より冷トリクロール醋酸にてpH4.5における不溶性バリウム塩を調製した後、バリウムを外す条件について検討した。(図4)

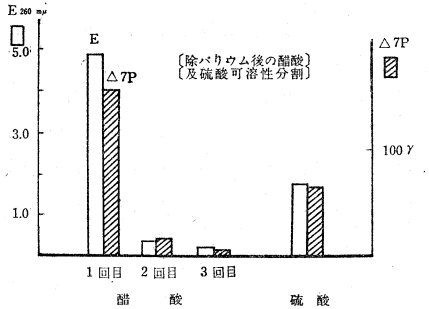
このバリウム塩に1M-硫酸を含む醋酸緩衝液5mlを加えて遠心分離し、洗渣はさらに同様に2回繰返す。各上清の紫外外部吸収および易水解磷の様相をみた。

その残渣には1N-硫酸2mlを加えて残渣中のバリウムを除去し、溶液の紫外外部吸収および易水解磷の有無を

検した。

この実験結果より、除バリウム後醋酸溶性の部分の他に硫酸の如き鉍酸酸性という過激な方法によつて初めて溶性となる部分があり、換言すれば醋酸酸性という穏和な条件では一度バリウム塩にしたものは不可逆的に結合して、除バリウムが完全には行われえないことが明かになった。

図4 バリウム塩法の検討 pH 4.5 における不溶性バリウム塩中の $\Delta 7P$ および $E_{260}$



これらの実験結果より、「未知物質」を一旦バリウム塩にすることはさらに研究をすすめる上に不利な方法であろう。

C. アルコール分割法

「未知物質」を一旦バリウム塩として捕捉することは前述の如く不利であるため、他の手技として溶媒沈澱法を行い、エタノールによる分割法を検討した。該物質は現段階においては未だ正確な物質の把握がなされていないため、不溶性バリウム塩の形成・紫外部の吸収・易水解磷の3つを指標とした。

(1) まずエタノールで分割できるか否かを検討した。すなわち表3の如く鳥型菌の酸溶性部分を抽出後5倍容エタノールを加えて約1時間水冷し、遠心分離して上清と沈澱に分別した後、各より pH 4.5 における不溶性バリウム塩として、沈澱(1), (2)をえた。これを1N-硫酸で除バリウムしてえた結果を表4に示した。

表3 アルコール分割法 上清と沈澱(その1)

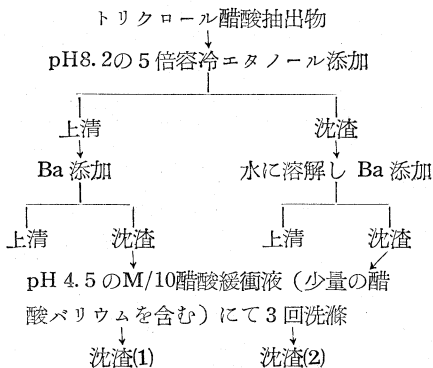


表4 アルコール分割法 上清と沈澱(その2)

		沈 澱 (1)	沈 澱 (2)
易 水 解 磷		痕 跡	39 $\gamma$
E	260 $m\mu$	0.060	1.500
	280 $m\mu$	0.053	1.080

この実験結果から「未知物質」は5倍容エタノールで沈澱部分に捕捉せられ、上清部分にはほとんどないことが明かとなった。

(2) 次に何倍容のエタノールで分割できるかを検討した。(表5)

表5 アルコール分割法 沈澱部分(その1)

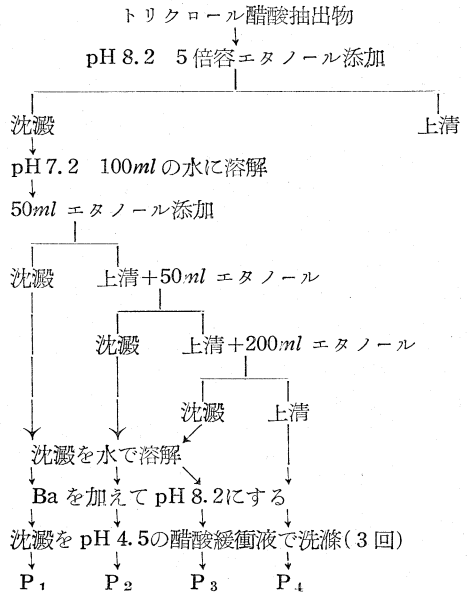


表6 アルコール分割法 沈澱部分(その2)

Fraction No.	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
エタノール添加率	1/2	1	3	
易 水 解 磷 $\gamma$	75	75	29	5
E	280 $m\mu$	1.55	1.30	0.85
	260 $m\mu$	2.65	2.65	1.55

すなわち、上記と同様の手技にてエタノールにて沈澱する部分をえた後、エタノールの添加率によつて P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> に分け、さらに3倍容エタノールでなお沈澱しないものはバリウムを加えて沈澱させて P<sub>4</sub> とした。これらを硫酸で除バリウムしてえられた結果を表6である。

以上の実験結果より、「未知物質」を易水解磷を指標として検討するに3倍容のエタノール添加により97%以上沈澱し、4~5倍容のエタノールによつて十分に沈澱することが判明した。

D. イオン交換樹脂による研究

Nucleotide の性質は相互に極めて類似しているために古典的な分別沈澱法によつて相互に分離することは極めて困難である。

イオン交換樹脂を用いて Nucleotide を分離することは、近年 Cohn<sup>8)</sup> その他の人々によつて著しく発展してきた。私共は上記諸々の実験を行う一方、イオン交換樹脂を用いて、Potter<sup>9)</sup>らが行つた動物組織の酸溶性劃分の Nuucleotide の分離方法に従つて、以下述べる諸実験を行った。樹脂は次の3種を使用した。

- 強塩基性陰イオン交換樹脂 Dowex-1
- 弱 " 陰 " " Amberlite IR-4B
- 強酸性陽 " " Amberlite IRC-50

樹脂はそれぞれあらかじめ活性化した後使用した。

(1) Dowex-1 による「該水銀塩」の実験

「該水銀塩」160mg を10ml の水に溶解し(透明)、Dowex-1 (formic form) に吸着し、その結果を表7に示した。紫外部吸収を指標にして検討するに、その約7%はほとんど吸着されずに水洗の際に洗い去られ、残りの大部分(%)は吸着強いために溶出されない。「未知物質」はPotter らの実験した Mononucleotide の条件では溶出しえない遥かに吸着度の強いものと考えられる。

表7 Dowex-1 による「該水銀塩」のイオン交換樹脂クロマトグラフィー

10cm×1cm, 0.6ml/min 各 Fraction 50ml

試料	水洗 20ml	水	蟻酸				4N-蟻酸+蟻酸ソーダ			
			0.5N	1N	2N	4N	0.2M	0.5M	1M	1M
E260 $\mu$	50.0	16.0	0	0	0	0	0	0	0	0

(2) IR-4Bによるバリウム塩の実験

Dowex-1 では吸着されたまま溶出しえないという前回の実験結果から、Dowex-1 より吸着度の少ないIR-4Bを用い、かつ6N-塩酸に食塩飽和という極めて過激な方法を試みた。(図5)

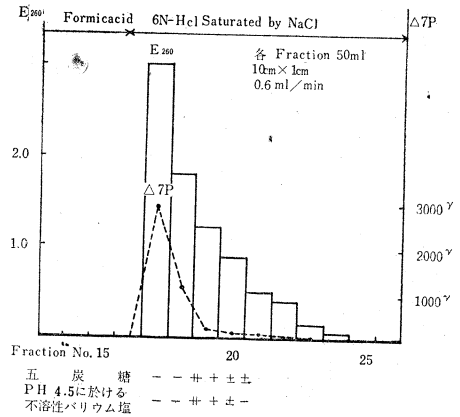
耐性鳥型菌(湿重量40g)より抽出した不溶性バリウム塩を、硫酸で除バリウムした後アンモニア水にてpH9.0に補正、全量の水で約300mlに稀釈したものを試料とした。

この実験においては陰イオン(Cl)の強度を極度に高めたため、図5の如く不溶性バリウム塩の形成・紫外部吸収・五炭糖・易水解磷の4指標を具備した物質を劃分した。

(3) 3種交換樹脂の併用実験

イオン交換樹脂クロマトグラフィーにおいて吸着剤と溶出剤を適当に選択することは最も重要でありかつ最も困難な点であり、ことに未知の物質の際は基礎的検討を必要とする。私共は樹脂の適当な選択を目的として

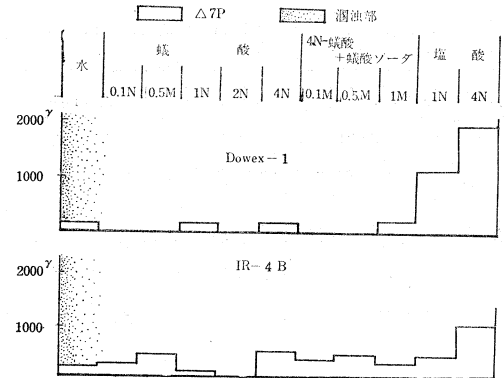
図5 IR-4Bによるバリウム塩のクロマトグラフィー pH4.5における不溶性バリウム塩をIR-4B(formic form)に吸着させ、4N-蟻酸150ml、さらに6N塩酸に食塩を飽和させたものを150ml流す。



Dowex-1, IR-4B, IRC-50の3者を比較検討した。試料としては耐性鳥型菌(湿重量150g)より抽出したエタノール分劃物を水で溶解した全量25ml(pH9.0)とし、3樹脂に7ml宛吸着させた。(試料は白濁をきたしたが遠心分離不能であつた)

この結果IRC-50においては試料は少量の水で大部分が直ちに樹脂から溶出され、「未知物質」は酸性樹脂には吸着し難いことを認めた。

図6 トリクロール酢酸抽出4倍容エタノール沈澱部分のクロマトグラフィー 各 Fraction 50ml 10cm×1cm 0.6ml/min formic form



塩基性二樹脂 Dowex-1, IR-4Bにおいてはイオン強度を高めるために溶出剤の最後に塩酸(1N次いで4N)を用いて溶出を試みた(図6)。試料の濁濁部分はいずれも最初の水にて溶出されるが、これは易水解磷の少ない点より「未知物質」とは異なるものと考えられる。

「未知物質」が易水解磷を多量にもつことはすでに述べ来たが、Dowex-1においては最後の「塩酸」の位置

に、また I R-4B においては多くの Fraction に散在して溶出された。この点から、イオン交換樹脂によつて分離精製しうる可能性を有すると考えられる。

(4) 過塩素酸抽出物の I R-4B における実験  
耐性鳥型菌 (湿重量 80 g) より過塩素酸によつて pH

4.5 における不溶性バリウム塩を調製し、硫酸で除バリウム後アンモニア水を加え、水で約 300 ml (pH 8.0) にして試料とした。(表 8)

溶出剤は 4N-蟻酸 150 ml 用いた後、表の如く食塩の濃度を段階的に高めて最後は飽和に達せしめた。

表 8 過塩素酸抽出物のクロマトグラフィー  
I R-4B 10cm×1cm (formic form) 0.6ml/min 1 fraction 10ml

溶 媒	N/10 HCl			N/10 HCl +N/10 NaCl			N/10 HCl +1N NaCl			N/10 HCl +飽和 NaCl			
	1	4	7	1	4	7	1	4	7	1	4	7	
Fraction No.													
紫外部吸収 260 $\mu$	2.0	0.1	0.05	0.09	0.4	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	1.4	0.7	
pH 4.5 にて 不溶性バリウム塩 易 水 解 燐								+	+	+			
								+	+				

「未知物質」は N/10-塩酸+1N-食塩の位置に溶出されたと考えられる。

イオン交換樹脂を使用したこれらの実験は基礎的な予備実験にすぎないが、「未知物質」が非常に酸性度強く一旦樹脂に吸着すると容易に溶出されないことを示し、Potter らが Mononucleotide を分離した手技は「未知物質」には適当でないと思われる。食塩飽和の 6 N-塩酸を溶出剤として用いる如き過激な操作は避けて、可及的穏和な手技で分離精製することに意を用いねばなるまい。しかし、これら樹脂による一連の実験から、一応この段階において「未知物質」が Mononucleotide よりは複雑な構造を有する物質であると推察される。

#### IV 総括および考案

以上の如く「未知物質」をバリウム塩→水銀塩にしてその精製を検討したが、他方「未知物質」をバリウム塩にして沈澱捕捉した際、pH 4.5 の醋酸緩衝液で頻回に洗滌すると、連続的に溶出され定量的に沈澱せしめることの困難なことおよび ATP の如き Mononucleotide と截然と分割することの至難なことを思わせる結果をえた。さらに一旦バリウム塩にすると、醋酸酸性という穏和な条件にては不可逆的に不溶性部分を生じ、硫酸の如き過激な方法によつて初めて溶性にしうる等の如き、「未知物質」をバリウムにて分割することが不適当かと考えられる結果をえた。

核酸の沈澱法<sup>10)</sup>としては、核酸の性質を利用し、あるいはまた核酸自身の変化を避けるために従来より、酸・バリウムの他に銅・鉛・ランタム等の金属塩にする方法、或種の色素・SM・硫酸マグネシウム・アルコール等々による諸家の幾多の手技が見られる。私共は「未知物質」に対する諸操作において可及的に激しい操作を避けるべくこれらのうちエタノールによる溶媒沈澱法について検討したのである。そしてその結果、「未知物質」

が既知核酸と同様にエタノールで沈澱し、しかも 4~5 倍容のエタノールで十分であることが判明した。

しかし、私共の若干低重合と思われる核酸類縁物質を、これら古典的な分別沈澱法によつて精製することは極めて難事であると言わねばなるまい。現在有力な手技の 1 つとして挙げられるイオン交換樹脂を使用して研究をすすめた結果、「未知物質」は酸性交換樹脂には吸着し難く、逆に塩基性交換樹脂には強く吸着して容易に溶離しない。Nucleotide を、交換樹脂を用いて蟻酸によつて分離溶出する手技は最近しばしば使用されているが、この物質は蟻酸のみでは溶出され難い。Cohn<sup>8)</sup>らは Mononucleotide の分離において、pH 5 以上ではいずれの Nucleotide も強い陰イオンとして存在するので陰イオン交換樹脂に吸着させ、pH を段階的に低下させて分離溶出が可能であると述べているが、「未知物質」が酸性樹脂に吸着し難く塩基性樹脂に強く吸着し、しかも Potter らの方法で溶出不能なことは、かれらが分離溶出に成功した Nucleotide よりは若干複雑な構造・性格を想起せしむるものであつて、私共が「Oligonucleotide」の如きを考えていることに対する一応の裏付けとなる。しかし他方、Woolley<sup>11)</sup>らの実験の示す如く、比較的重合度の高い物質でも早く溶出するものもあり、これのみから直ちに重合度を推定するのは早計であり、慎重な検討を要することと思われるが、以上行つた一連の諸実験結果を総合するとき、「未知物質」を単一の物質としての物質的な正確な把握には至らずまたこれら核酸構成物質・アミノ酸等が結合していることを確定した実験結果はえていないが、ただ雑然と混在していると考えるよりは、RNA よりは低重合の Nucleotide で、これに Polypeptide の結合したものを推定するのが、この段階においてはより適当であろう。さらにこれが I R-4B または Dowex-1 を用いて Cl の強度を極度に高めて溶出させうる結果をえたが、かかる過激な方法は避くべきで

あり、らさに適当な樹脂・溶出剤を選択し、あるいは交換樹脂以外の方法を吟味すべきであろう。

ひるがえつてSMは磷酸代謝特にRNAを極度の擾乱状態に陥れることが判明している。同位元素 $P^{32}$ をtracerとして核酸の代謝についてSMの影響を見た実験<sup>12)</sup>において、SM感性菌にSMを作用させるとRNAへの $P^{32}$ のIncorporationは著減する事実を認め、RNAが廻転停止の状態にあり荒廃に陥っていることが目立つ。私共の取扱つた物質がRNA系の核酸類縁物質であろうことを種々述べ来たが、感性菌にSMを作用させたときに増量してくることは、このRNAの代謝荒廃に関連あるものと見られ、誠に興味深い。

最近の細胞化学の知見によれば、力源供与系に主役を演ずる呼吸、またこれと共軌的に起る磷酸代謝の諸酵素系等は、細胞顆粒にRNAを支柱として集中し、数多の酵素群がいわゆる複合酵素系を形成し、効律よい動的Metabolic mosaicを形成していると考えられている<sup>13)~15)</sup>。SMによる上述の如き代謝障害は、当然この複合酵素系のunbalanceを招来せずにはおかないであろう。SMによつて磷酸転移反応系の不均衡をきたし、RNAやLipoidの代謝の乱れを惹起することは、当然力源代謝・窒素代謝の複合酵素系の2次的攪乱を招かすにはおかないであろう。またRNAが蛋白質の合成ないしは転換に大きな役割を演じていることは種々論じられている事実で、SMが菌の発育を阻止し、また適応酵素の産生・転換の阻止等のこれらの諸現象に対して、私共の観察した事実は軌を一にしていると考えられないであろうか。

## V 結 語

SMの耐性問題に関連して結核菌中に見出された、RNAに類縁性を有する物質と思われるものにつき、その精製等についてイオン交換樹脂をも用いて検討した。

1) 同物質をバリウム塩→水銀塩にしても、なおアデニン・グアニン・チトシン・ウラシルの4塩基および易水解性を有していた。

2) 一度バリウム塩にすると、pH 4.5になつても連続的に溶出され、また除バリウムするのに硫酸を用いる

如き過激な方法を要することを認めた。

3) アルコール分割により、4倍容のアルコールにて十分に洗滌することを認めた。

4) イオン交換樹脂クロマトグラフィーにて検討し、酸性樹脂には吸着し難く、塩基性樹脂には強く吸着されて、イオン強度を極度に高めて初めて溶出することを認めた。

5) 同物質に関連して、SMはRNAを中心とする磷酸代謝に擾乱を来すとす、私共のSMの作用機作説を論じた。

## 文 献

- 1) 本田・垣花・吉野：イオン交換樹脂(広川書店、東京)、1955。
- 2) Parnas, J.K. : Zs. f. analyt. Chem., 114, 261, 1938.
- 3) Harris, R.J.C. et al. : Nature, 161, 931, 1948.
- 4) Elmore, D.T. : Nature, 161, 931, 1948.
- 5) Cohn, W.E. : Science, 109, 377, 1949.
- 6) Wall, J. S. : Analyt. Chem., 25, 950, 1953.
- 7) Fletcher, W. et al. : J. Chem. Soc., 72, 1944.
- 8) Cohn, W.E. : J. Am. Chem. Soc., 72, 1471, 1950.
- 9) Potter, V.R., R.B. Hurlbert, H. Schmitz, A. F. Brumm : J. Biol. Chem., 209, 23, 1954.
- 10) 渡辺 格・鈴木學之：核酸及核蛋白質(共立出版)上巻, 1953.
- 11) Woolley, D.W. et al. : J. Biol. Chem., 197, 521, 1952.
- 12) 日比野進：第29回日本結核病学会総会特別講演, 1954.
- 13) Schneider, W.C., A. Claude, G.H. Hogeboom : J. Biol. Chem., 172, 619, 1948.
- 14) Lehninger, A.L., E.P. Kennedy : J. Biol. Chem., 173, 753, 1948.
- 15) Dounce, A.L., G.T. Beyer : J. Biol. Chem., 174, 159, 1948.