

ストレプトマイシン耐性鳥型結核菌より抽出した核酸の遺伝学のおよび生化学的研究

第 I 報

佐々木 富子

慈恵会医科大学医化学教室 (指導 牧野堅教授)

国立国府台病院

受付 昭和 32 年 4 月 13 日

核酸の遺伝的特性に関連してまず Awery, Macleod, & Carty¹⁾ は肺炎双球菌 S 型菌から抽出した核酸が, R 型菌を特異的に S 型菌に変換する活性を有することを報告した。また薬剤耐性と DNA の遺伝学的関連について Wyss²⁾ はサルファ剤耐性大腸菌から抽出した核蛋白とサルファ剤耐性との関係について報告した。Vourek³⁾ はペニシリン耐性の場合, 感性菌から耐性菌への移動が可能であつたという。さらに Hotchkiss⁴⁾ はペニシリン耐性 S 型肺炎菌から抽出した DNA をもつて, 感性菌を耐性化することに成功した。勝沼および中里⁵⁾ はストレプトマイシン (以下 SM と略) 耐性結核菌から抽出した核蛋白加培地で, 感性結核菌の SM 耐性化に成功したという。SM 耐性に関する DNA についての研究は未だ報告が少なく, 勝沼および中里⁶⁾ は前記核蛋白の活性が DNAase によつて失われることから, この活性の主体が DNA にあることを実証し, 田中, 水野および清水⁷⁾ らは SM 耐性菌には特異的な核酸が増量していることを発見し, その生化学的特性から, これを Bound nucleotide と命名し SM 耐性の主役は, この Bound nucleotide であろうとしている。一方菌体 DNA 中に含まれるプリン塩基とピリミジン塩基との比が, 菌の種族によつて一定であることは多数報告されているが Mycobacterium の核酸については, 僅かに Marshak & Vogel⁸⁾ の報告があるにすぎない。

以上のように薬剤耐性化機構についての DNA の生化学的分析実験は, 僅かに 2, 3 の報告があるのみで, 詳細は未だ不明であるといつてよい。結核菌の SM 耐性獲得に DNA が如何に関与しているかを究明するためにまず, SM 耐性鳥型結核菌から Chargaff & Saidel⁹⁾ 法を多少改変して抽出した核酸と, SM 感性菌から抽出した核酸とを, 生化学的に分析比較してみた。

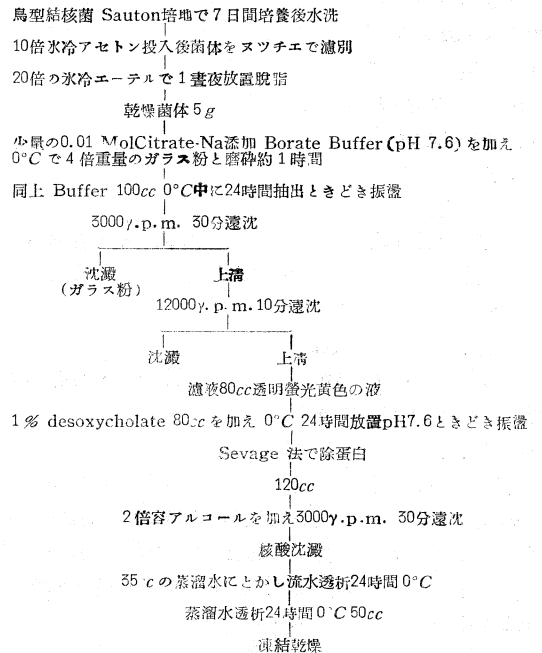
実験方法

使用菌株は鳥型結核菌獣調株を使用し, 耐性菌は前述の同一菌株を SM 中に継代分離培養したもので, SM 濃度 100 γ /cc 以上の耐性菌株を用いた。

核酸抽出法

Chargaff Saidel 法を多少変更して用いた次のようなものであつて, 主な相違点は原法は脱脂後透析精製を加えて粗核蛋白を取り出し, さらに核酸を抽出していることまた除蛋白を丁寧に行つていることおよび核蛋白および核酸を直接蒸留水に溶かさず, 生理的食塩水をもつて一度は溶解させていることである。

表 1 核酸抽出法



〔I〕核酸の生化学的特性

総磷測定法は Fiske & Subbarow¹⁰⁾ 法によつた。DNA 測定法はデフェニルアミン反応¹¹⁾を用いた RNA 測定法は Meibaum 法¹²⁾を用いた。

紫外線吸収波長の測定

Beckmann のスペクトロ・フォトメーターを用いて測定した。以上結果を総合した核酸の性状の生化学的特性は表 2 に示す。

表2 核酸の生化学的分析比較

	耐性菌から抽出した核酸	感性菌から抽出した核酸	文献値 ³⁾ ※
収率%	0.79	0.25	2.7-0.4
総磷%	7.5-7.6	4.22-4.37	6.3
DNA%	6.3-6.25	6.25	
RNA%	2.5	1.2	
吸収波長 λ_{max} <i>mμ</i>	258	258.5	258
吸収波長 λ_{min} <i>mμ</i>	255	255.5	255

測定値は抽出の度毎に多少各含有量の変動が見られたので上記のような測定値に巾ができた。なお引用文献は Chargaff が 1949 に鳥型結核菌について行ったものをとつた。

〔II〕 核酸の生物学的検定

実験方法

① 感受性菌

勝沼信彦氏より分与された SM 感性鳥型結核菌調株を用い、実験に際しその都度 SM 濃度 0.02 γ /cc において耐性のないことを確めた菌株を用いた。

② 核酸抽出 SM 耐性結核菌

上記同一菌株を SM 中に継代分離培養したもので、SM 濃度 100 γ /cc 以上の耐性菌株を用い、実験に際しその都度 SM 濃度 100 γ /cc 以上の耐性のあることを確めた。

③ 培地

Sauton 無蛋白培地を用いた。

④ 核酸抽出法

前述した。

⑤ 休止菌

7日間培養菌を 0°C に冷却しつつ等調磷酸緩衝液 pH 7.4 で洗滌、5回、0°C、24時間放置後さらに1回洗った菌を使用する。

⑥ 感作用 DNA 溶液調製

DNA を 100 γ /cc の割合に pH 7.4 の等調磷酸緩衝液に溶解後 Sitz 氏細菌濾過器を通す。

⑦ 感作法

上記 DNA 溶液に休止菌を Potter's homogenizer で homogenate したものを一定濃度に Buffer で稀釈し上清を Mc Faland No. 1 の比濁度にしたものを同一容ずつ入れる。37°C、24時間感作後 Buffer で DNA を洗滌除去する。

⑧ 実施法

上記感作菌と休止菌を別々に Sauton 培地に 7日間培養し、そのおのおのを homogenate しその上清を各一白金耳ずつ菌量テストにより大体 4,000個の菌数を表3のような SM 加培地に接種し、菌の増殖が見られる SM 最高濃度を比較することによつて、両者における SM 耐性発現率を比較した。実験成績は表3に見られる。感作した場合は SM 0.062 γ /cc 含有培地では、ことに著明な菌の増殖が見られた。

表3の1 耐性菌から抽出した核酸の遺伝作用

時 間	36					48					60				
試験管番号	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
DNA カンサ菌 SM 0.031 γ /cc	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
休止菌	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
DNA カンサ菌 SM 0.062 γ /cc	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±
休止菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA カンサ菌 SM 0.125 γ /cc	-	-	-	-	-	±	+	+	-	-	±	+	+	-	-
休止菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

卍 試験管全面に広がり壁に生え上つたもの 卍 全面に生えたもの
+ 一部分生えたもの ± かすかに生えたもの

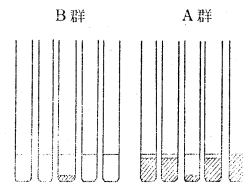
表3の2

時 間	72					82					130				
試験管番号	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
DNA カンサ菌 SM 0.031 γ /cc	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
休止菌	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
DNA カンサ菌 SM 0.062 γ /cc	+	+	+	+	+	卍	+	+	+	+	卍	+	+	卍	卍
休止菌	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
DNA カンサ菌 SM 0.125 γ /cc	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	卍	-
休止菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

卍 試験管全面に広がり壁に生え上つたもの 卍 全面に生えたもの
+ 一部分生えたもの ± かすかに生えたもの

表3中※の部分を図1に示す。

図1 DNA カンサ菌群が SM 耐性培地において休止菌群より増殖しているところ



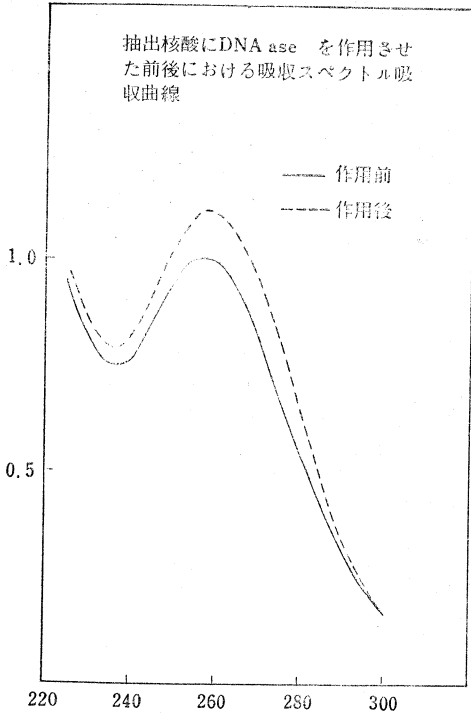
図中B群は休止菌で試験管5本中1本生えている。A群はDNA感作菌群で5本とも生えている。感作菌の方が遙かによく増殖する。この活性は凍結乾燥下に約2週間の活性を有するが、凍結乾燥を行わず直ちに活性を調べたものは SM 0.25 γ /cc まで上昇した。

DNAase 処理による影響

抽出核酸に Kunitz の方法で DNAase を作用させた。作用方法 0.05M MgSO₄ 10cc に 1.0M 醋酸塩緩衝液 pH 5.0 10cc を加え蒸溜水で 100cc とした Buffer を調製する。凍結乾燥した核酸を DNA 100 γ /cc の割合に蒸溜水に溶かす。Kunitz の DNAase を 100 γ とり 2cc の Buffer

にとかす。Buffer 3 cc + DNA液 0.5 cc + DNAase 0.5 cc, 対象として Buffer 3.5 cc + DNAase 0.5 cc を作り両者を 30°C, 1 時間作用させた。以上の方法による酵素の作用前後の吸収スペクトル変化を見た。

図 2



DNAの非活性化¹³⁾を確認した後次の実験を行った。
非活性化DNA感作菌の生物学的検定

DNA感作菌に上記DNAaseを作用させた非活性化菌群と、DNA感作菌群と菌増殖上の差異を見るとすでにSM低濃度で前者は菌の増殖を見ずSM 0.062γ/cc培地ではDNA感作菌群のみ増殖を見た。

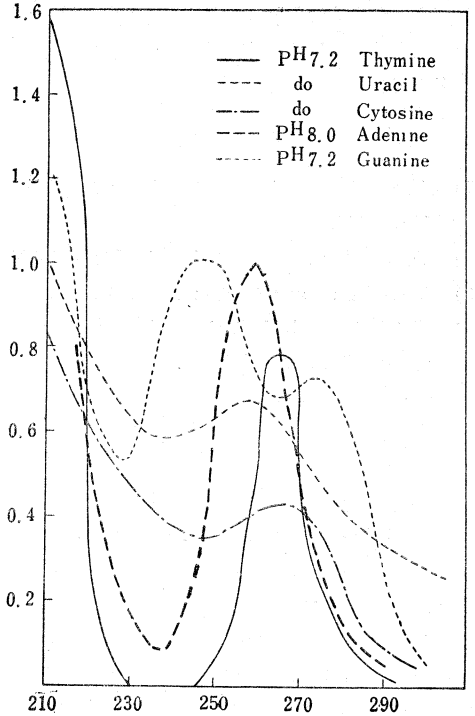
分析実験

抽出核酸を Alfred & Marshak & Henry Vogel¹⁴⁾の法に従い、70% Perchloric Acid で 100°C, 1 時間、加水分解し、Isopropanol-HCl 溶媒で、ペーパークロマトグラフに展開し、紫外線吸収スペクトル特性を検したところ図3に示す吸収曲線を得た。なお種々のpHにおいて測定したが便宜上一括して表に示す。また表4に

表 4 抽出核酸の Rf 値と各 Sample Rf 値の比較

Sample	抽出核酸
Thymine 0.83	0.88
Uracil 0.75	0.75
Cytosine 0.65	0.61
Adenine 0.53	0.53
Guanine 0.24	0.35

図 3



示す Rf 値および紫外線吸収スペクトル特性より見てそれぞれ Thymine, Uracil, Cytosine, Adenine, Guanine を同定しえた。各 Base の mol 比を、耐性菌から抽出した核酸 (R 核酸) と、感性菌から抽出した核酸 (S 核酸) とを比較してみたところ表5のような結果を得た。

表 5 Adenine を 1 とした場合の各 Base 比

	R	S	H ₃₇ Rv	H ₃₇ Ra
G	2.1	1.18	1.86	2.01
C	1.2	1.24	1.92	1.86
T	0.22	0.44	0.55	0.62
U	0.51	0.15	0.31	0.33

H₃₇Rv, H₃₇Ra は文献値¹⁴⁾である

結 論

SM耐性鳥型結核菌から抽出したDNAが感性菌を耐性化することを認めた。

DNAaseの作用を受けたDNAはその作用が消失することを認めた。

R核酸とS核酸のBase比の差異はほとんど認められなかった。

抽出DNAは割に安定で凍結乾燥したものはかなり長時間の(約2週間)活性を保持した。

なお本研究を終始御指導下さった慈恵医科大学医化学

牧野堅教授ならびに菌株の分与等種々の御便宜を与えられた国立刀根山病院山村雄一博士、名古屋医科大学学生化学勝沼信彦博士、国立国府台病院大島英義博士に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Avery, Macleod & Carty : J. Exptl. Med., 79 : 137, 1944.
- 2) Wyss : Ann. N.Y. Acad. Sci., 53 : 183, 1950.
- 3) Voureka : Lancet, 254 : 62, 1948.
- 4) Hotchkiss : Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 16 : 457, 1951.
- 5) 勝沼・中里 : 名古屋医学, 67 : 144, 1953.
- 6) 勝沼・中里 : 結核, 28, 10号, 1954.
- 7) 水野・田中・清水 : 結核, 28, 10号, 1954.
- 8) Marshak & Vogel : J. Biol. Chem., 189 : 597, 1951.
- 9) Chargaff & Saidel : J. Biol. Chem., 177 : 417, 1949.
- 10) Fiske & Subbarow : J. Biol. Chem., 175 : 854, 1955.
- 11) Dische : Mikrochemie., 2 : 26, 1930.
- 12) Mojbaum : Z. Physiol. Chem., 258 : 117, 1939.
- 13) Kunitz : J.G. Physiol., 33 : 349, 1950.