

ミコバクテリア INH 耐性変異株の 菌体内ポルフィリンとカタラーゼ活性 (第1報)

戸井田 一郎・齋藤 千代

結核予防会結核研究所 (所長 隈部英雄)

受 付 昭和35年9月29日

I 研究目的

結核菌の INH 耐性変異株は、特異な栄養要求、カタラーゼ活性の減弱、毒力の減弱などの点で、INH 感受性原株と異なることが知られている。これらの諸性質のうち、とくにカタラーゼ活性の減弱という現象は、もつとも基本的なものとみなされており、他の現象はカタラーゼ活性の減弱にもとづいて説明されている。(たとえば、特異な栄養要求はカタラーゼ活性減弱によるもので、発育因子となるものはいずれも、カタラーゼ活性をもつ物質であるという主張。毒力の減弱は、病巣に蓄積する過酸化水素によつてカタラーゼをもたぬ耐性株は死滅し、そのために一たん成立した病巣が退行することによるという主張。) それにもかかわらず、INH 耐性とカタラーゼ活性との関係について、たちいつた研究はほとんど行われていず、わずかに INH 耐性株のポルフィリン生合成能について論じた Fisher^{1) 2)}、勝沼^{3) 4)}、正田⁵⁾、堀⁶⁾の業績が目につくのみである。われわれは一方では INH の作用機作、INH 耐性化の機作、他方ではカタラーゼの生体における意義、ポルフィリン生合成の経路などの諸問題を追究する一つの足場として、ミコバクテリアの INH 耐性株をとりあげ、そのポルフィリン、ポルフィリン酵素およびこれらと関連の深い代謝系について、一連の研究を計画した。ここでは、耐性株の菌体内ポルフィリン量とカタラーゼ活性との関連について報告する。

II 材料と方法

菌株および培養方法: Mycobacterium 607 は東大農学部応用微生物研究所より、Mycobacterium avium AVT は都立家畜衛生試験所より分与をうけ、ともに当所細菌学研究科において 1% 小川培地に継代保存されたもの。培養は Sauton 合成液体培地に 38°C、静置表面培養を行つた。使用にさきだつて同培地に数代継代し、実験結果に述べるような安定した発育を示すようになったものを用いた。耐性株としては、INH 100 γ /ml 添加 Sauton 合成液体培地に継代して、この培地に実験結果に述べるような安定した、かつ INH 非添加同培

地における感性原株に匹敵する発育を示すようになったものを用いた。培養は INH 100 γ /ml 添加 Sauton 合成液体培地に 38°C、静置表面培養を行つた。

ポルフィリンの抽出および定量: 菌体からのポルフィリン抽出は神前法⁷⁾に、ポルフィリン体の分別定量は沢田らの方法⁸⁾に準じて行つた。すなわち、菌体約 1 g (湿菌量) をとり、40 g/dl KOH 0.5 ml を加え、100°C 水浴中で 120 分間加熱、水冷後、水 1 ml と氷醋酸 2 ml を加えてよく振盪抽出、濾過、残渣を醋酸エーテル (氷醋酸 8 : エチルエーテル 100 V/V) でよく洗つて濾液と洗液とを合し、十分量の水で 4 回洗つたのち、5.0 g/dl HCl 1.0 ml ずつで 5 回抽出、HCl 層を合し、60 g/dl NaOH 1.0 ml で中和、放冷後、氷醋酸 1 ml とエチルエーテル 5 ml を加えて振盪、エーテル層をとつて水で 4 回洗つたのち、0.5 g/dl HCl で抽出、抽出液がもはや赤色蛍光を示さなくなるまで十分抽出する (普通 4~5 回で十分)。HCl 層を合し、コプロポルフィリン定量に用いる。0.5 g/dl HCl で抽出した残液を、5.0 g/dl HCl で同様に十分抽出、この部分を合してプロトポルフィリン定量に用いる。定量は Beckmann 分光光度計 (日立製 EPU 2 型) を用い、コプロポルフィリンでは 402 m μ 、プロトポルフィリンでは 406 m μ の吸光度を測定した。標準曲線は Grinstein 法⁹⁾によりヘモグロビンより調製したプロトポルフィリン結晶によつて作つたものを、両者ともに利用した。

ポルフィリンのペーパークロマトグラフィーによる同定: さきの抽出操作のさいの 2 回目のエーテル層 (2 回目の水洗後の) について 5.0 g/dl HCl 抽出-中和-醋酸酸性エーテル抽出-水洗をさらに 2 回くりかえし、最後のエーテル層を減圧濃縮したものを試料とし、沢田らの方法⁸⁾に基いて、溶媒クロロホルム : 30% 醋酸 : 水 = 1 : 5 : 1、暗室中室温で上昇法によりペーパークロマトグラフィーを行い、紫外線で蛍光を発するスポットを検出した。

カタラーゼ活性測定法: von Euler & Josephson の方法¹⁰⁾に準じて行つた。すなわち、50 ml の M/15 磷酸緩衝液 pH 7.8 中の 0.01 N H₂O₂ を入れたコルベ

ンを氷中に深く挿入して冷却しておき、菌液 1.0 ml を加えて混和、ただちに反応液 5.0 ml をとり、あらかじめ 20 % (W/V) H_2SO_4 5 ml をいれておいたフラスコ中にふきこむと同時にストップウォッチをおし、90秒後、180 秒後にそれぞれ反応液 5.0 ml をとって同様に H_2SO_4 で反応を停止する。0.005 N-K MnO_4 にて滴定。それぞれの滴定値 (ml) a_0 , $a_{1.5}$, $a_{3.0}$ および反応液 51 ml 中の乾燥物重量 (g) W より、次式によつて Kat. f. を計算する。すなわち、

$$k_{1.5} = \frac{\log a_0 - \log a_{1.5}}{1.5}$$

$$k_{3.0} = \frac{\log a_0 - \log a_{3.0}}{3.0}$$

$$\text{Kat. f.} = \frac{2k_{3.0} - k_{1.5}}{W}$$

III 実験結果

1) 菌の発育状況：100 ml の三角コルベンに 40 ml の Sauton 液体合成培地をいれ、一白金耳の菌膜 (湿菌量約 0.25 mg) をうえついで場合、M. 607, M. A V T とともに、感性株では 1.5~2 日で、耐性株は 2~3 日で液面の $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{3}{4}$ にわたつてごく薄い菌膜をつくり、ついでそれぞれ 3~4 日、4~5 日で液面一杯に十分に発育した菌膜をつくり、7 日では菌膜は厚く皺がよつて盛上り、以後は菌収量、菌膜の状態はほぼこの状態を継続する。これらの状態を培養初期、中期、後期と表現することにする。

2) 菌体内ポルフィリンの性質：0.5 g/dl HCl 抽出物の吸収曲線の一部 (日立製 EPU 2 型 Beckmann 分光光度計による) を図 1, 2 に示す。M. 607, M.

図 1 M.607 0.5 g/dl HCl 抽出物の吸収曲線
(ブランク 0.5 g/dl HCl)

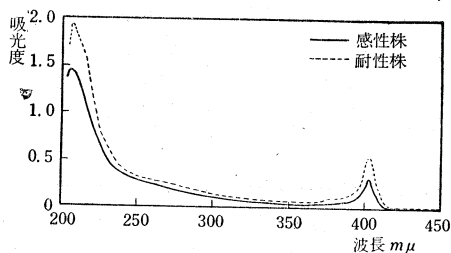
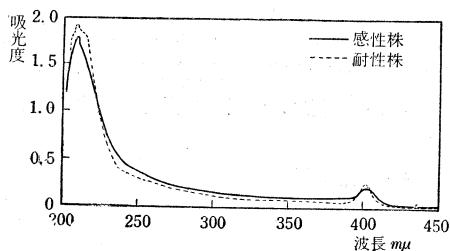


図 2 M.A V T 0.5 g/dl HCl 抽出物の吸収曲線
(ブランク 0.5 g/dl HCl)



A V T とともに、感性・耐性にかかわらず同様に、207 ~ 209 mμ の端在性のピーク、402 mμ に鋭いピーク、500 mμ 付近、550 mμ 付近および 595 mμ 付近に不明瞭なピークを示した。5.0 g/dl HCl 抽出物は端在性のピークのほかには、顕著なピークを示さなかつた。P P C では各菌株を通じて Rf ≒ 0.38 の spot 以外には明白な spot はみられなかつた。以上、抽出法、塩酸に対する態度、吸収曲線、P P C および赤色蛍光による検出結果よりミコバクテリアの菌体内ポルフィリンはコプロポルフィリン体であると考えられる。

3) 菌体内ポルフィリンの定量：培養初期、中期、後期における各菌株のコプロポルフィリン量を表 1 に示す。

表 1 培養時期とコプロポルフィリン含量
(乾燥菌体 100 mg あたりコプロポルフィリン γ)

菌株	培養時期	初期	中期	後期
	菌型			
M 607	感性株	4.0	4.5	6.3
	耐性株	5.5	6.9	11.1
M. A V T	感性株	1.3	3.1	4.4
	耐性株	1.7	2.9	4.9

注：乾燥菌重量は約80°Cで重量が一定になるまで乾燥した場合の重量

M. 607, M. A V T とともに、また感性株、耐性株とともに、乾燥菌量あたりのコプロポルフィリン量は、培養日数に対し、ほぼ直線的に増大している (図 5, 6)。感性株と耐性株とを比較すると、M. A V T では両者の間に差はなく、M. 607 では耐性株の方が感性株よりコプロポルフィリン含量は大であり、この差は培養が古くなるにつれてますます著明になっている。

4) カタラーゼ活性：カタラーゼ活性と培養日数との関係を図 3, 4 に示す。この場合の Kat. f. は菌膜全体の

図 3 M. 607 のカタラーゼ活性

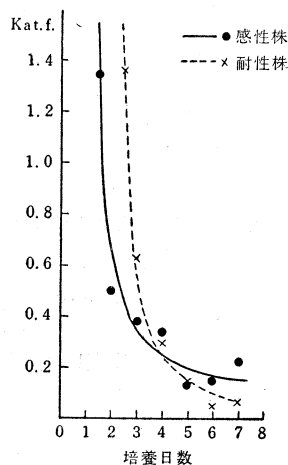
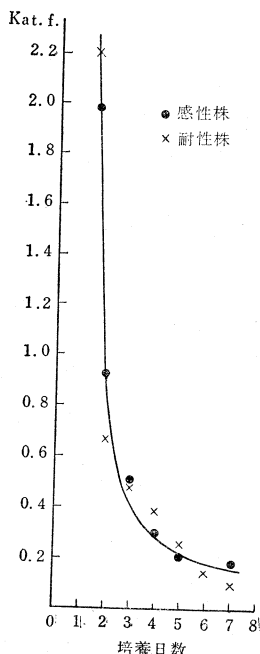


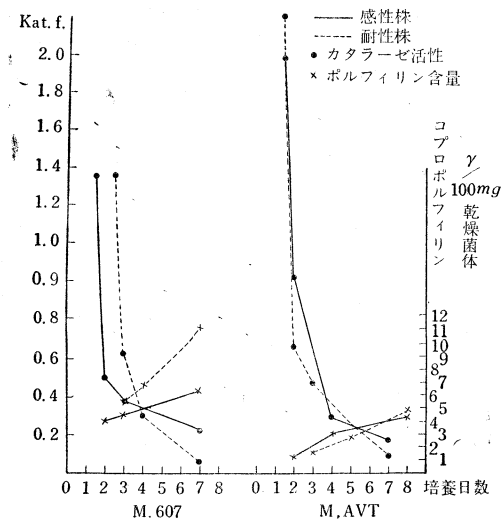
図4 M. AVT のカタラーゼ活性



平均値としてのカタラーゼ活性の表現であるが、Kat. f. は培養が古くなるにつれ、図のようにはじめは急激に、のちに徐々に減少して一定値に近づいてゆく。このような関係はすべての菌株にみられたが、M. AVT では各期を通じて Kat. f. の値は、感性感株と耐性感株の間にほとんど差を認めないのに対し、M. 607 では耐性感株の発育の遅れによる約 1 日のずれを考慮にいれて比較すると、培養中期以後とくに培養後期では耐性感株の Kat. f. は感性感株のそれよりも明らかに低い値を示している。

5) カタラーゼ活性とボルフィリン含量との関係：図 5 にまとめて図示した。培養日数の経過とともに、菌膜全

図5 カタラーゼ活性とコプロボルフィリン量との関連



体の平均的なカタラーゼ活性が減弱していくのに対し、逆にボルフィリン含量は増大していく。この傾向はどの菌株にもみられた。M. AVT では Kat. f. の減少、ボルフィリン含量の増大とともに、感性感株、耐性感株の間に差を認めないのに対し、M. 607 では培養の経過とともに耐性感株のカタラーゼ活性は感性感株のそれよりも低下し、同時にボルフィリン含量は感性感株をはるかに凌駕するのが注目される。

IV 考 案

1) INH 耐性感株のボルフィリン生成能：Fisher¹⁾
2) は INH 耐性感株はボルフィリン生成能を失つたために発育因子としてヘミンを要求するとし、勝沼ら³⁾ 4)、正田⁵⁾ は鳥型菌 INH 耐性感株ではコプロボルフィリンが消失し、またこのものを培地に加えると INH 耐性感株には変化なくカタラーゼ活性が回復するとしている。しかし堀⁶⁾ は鳥型菌でも培養条件によつては感性感株と耐性感株の間にボルフィリン生成能に差がないことをみている。われわれの培養条件や発育状態にとくに留意して行つた実験では M. AVT では培養の各期を通じて感性感株、耐性感株間にボルフィリン含量の差はなく、M. 607 ではかえつて耐性感株の方に多くのボルフィリンが含まれていた。以上の各報告間に認められる不一致は用いられた菌株、培養条件、発育状態などのちがひによるものであると考えられるが、いずれにせよボルフィリン生成能の欠如という性質が INH 耐性感株の特異的、普遍的な性質であるということはいえないであろう。

2) INH 耐性とカタラーゼ活性：INH 耐性感株がカタラーゼ活性を失うことについては多くの報告があるが、ミコバクテリアのすべての菌株の、すべての INH 耐性感株がカタラーゼ活性を失うというのではない。たとえば Bönicke¹¹⁾ は牛型、人型結核菌、彼のいわゆる echte Tuberkelbazillen は INH 高度耐性感化により必ずカタラーゼ活性を失うが、鳥型菌その他いわゆる atypische Tuberkelbazillen は 100 γ/ml INH 耐性感株でもカタラーゼ活性に変化がないと述べている。われわれの実験では M. AVT では感性感株、耐性感株の間にカタラーゼ活性の差はなく、M. 607 では培養中期以後、とくに後期では耐性感株のカタラーゼ活性は明らかに減弱していた。しかし全く消失はしなかつた。Bönicke のように echte Tuberkelbazillen と atypische Tuberkelbazillen との間に、INH に対する態度に本質的な差があるかどうかについては、われわれは人型菌、牛型菌について同様の実験を行つて検討中である。なお、発育の時期によつて菌膜全体の平均としてのカタラーゼ活性が変化する点については、われわれは発育の過程における菌膜全体としての、より一次的な代謝状態の変化が二次的にカタラーゼ活性の減弱として表現されるのだろう

と解釈している。INH 耐性株のカタラーゼ活性減弱についても同様の解釈が成立つのではないだろうか。われわれはこの点について INH 耐性株の H_2O_2 分解機構と同時に H_2O_2 産生機構の検討を計画している。

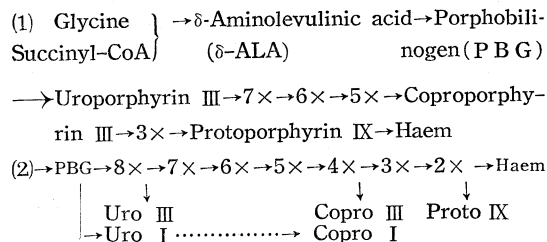
3) ポルフィリン含量とカタラーゼ活性との関連：われわれの実験では培養が古くなるにつれてカタラーゼ活性が低下し、これに対しコプロポルフィリン量はかえって増加している。カタラーゼは作用基としてプロトポルフィリンの鉄誘導体であるプロトヘムをもつ酵素であるから、ここにみられるポルフィリン量とカタラーゼ活性との逆相関については次の3通りの仮説が考えられる。すなわち、

①コプロポルフィリンがカタラーゼ合成経路上の正常の前駆物質であることを前提にして、培養が古くなると鉄の欠乏、apocatalase 部分の生成低下、この蛋白部分の他の方面への利用、ヘム部分と蛋白部分の結合機構の障害などがおこり、このために正常に進んできたカタラーゼ合成機構がコプロポルフィリンよりは先に進まず、正常に合成されてきたコプロポルフィリンが利用されずに遊離の形で菌体内に蓄積するという仮説。

②コプロポルフィリンは正常の前駆物質ではなく by-product であり、培養が古くなると正常のポルフィリンカタラーゼ合成機構に①で述べたような障害ないし低下がおこり、side reaction が活発になつてコプロポルフィリンがつくられるという仮説。

③コプロポルフィリンはやはり正常の前駆物質ではなく、カタラーゼの崩壊の結果生じる end-product であり、培養が古くなるとカタラーゼの生産は衰え、逆に崩壊が促進されてコプロポルフィリンが増加するという仮説。近時、Falk, Dressel が、ポルフィリン生合成経路として、従来の(1)にかわる(2)の経路を提案しており、この説によるとウロ-、コプロ-、プロト-ポルフィリンはいずれも正常の合成経路の上にはなく、by-product として扱われている^{12) 13)}。この説はわれわれの仮説②③を支える一つの根拠と考えられる。

以上の3通りの仮説については今後検討を続けたい。



V 結 論

Mycobacterium 607, Mycobacterium AVT の INH 感性原株と 100 γ/ml INH 耐性変異株のカタ

ラーゼ活性と菌体内ポルフィリンについて検討した。その結果、

1) 各菌株とも菌膜全体の平均としてのカタラーゼ活性は培養日数とともに低下する。

2) 各菌株とも菌体内ポルフィリンはコプロポルフィリン体である。培養日数とともにコプロポルフィリン含量は増大する。

3) M. AVT ではカタラーゼ活性、ポルフィリン含量ともに感性株、耐性株の間に明らかな差はない。

4) M. 607 では培養中期以後では耐性株のカタラーゼ活性は感性株のそれよりも減弱し、ポルフィリン含量では逆に耐性株が感性株をはるかに凌駕する。

5) 以上の事実に基づいて培養過程におけるカタラーゼ活性の変動の原因、および菌体内コプロポルフィリンのカタラーゼ生合成における意義について若干の考案を行った。

最後にいろいろと助言を与えて下さった大沢義信、原稿をみて下さった湯沢健児、岩崎龍郎の諸先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Fisher, M.W. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 467, 1954.
- 2) Fisher, M.W. : Amer. Rev. Tuberc., 69 : 797, 1954.
- 3) 後藤幹彦・勝沼信彦・正田享：結核, 32 (増刊号) : 105, 昭32.
- 4) 勝沼信彦：文部省科学研究費総合研究班「耐性」研究班, 昭和32年第2回班会議.
- 5) 正田享：ビタミン, 13 : 331, 昭32.
- 6) 堀三津夫：第33回日本結核病学会総会特別講演.
- 7) 神前武和：最新医学, 2 : 513, 昭22.
- 8) 沢田藤一郎・柴田雄蔵・梶原保：日本医事新報, -1699, 10, 昭31.
- 9) Grinstein, M. : J.B.C., 167 : 515, 1947.
- 10) von Euler, H., & Josephson, K. : Ber., 56 : 1749, 1923.
- 11) Bönicke, R. : Tuberkuloseforschungsinstitut Borstel ; Jahresbericht, 1957 : 58.
- 12) Dressel, E.I.B. : Porphyrin Biosynthesis and Metabolism, 1955.
- 13) Dressel, E.I.B., & Falk, J.E. : Biochem. J., 56 : 156, 1954.
 ibid, 63 : 73, 1956.
 ibid, 63 : 80, 1956.
 ibid, 63 : 87, 1956.
 ibid, 63 : 338, 1956.