

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2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34年11月10日

I 序 言

ミコバクテリアの INH 耐性株ではどのような機構によつてカタラーゼ活性が減弱するのか、このことは菌にとつてどのような意義があるのかを知るためには、INH との関係を一応ぬきにして、ミコバクテリアのカタラーゼ活性がどのような条件で変動するか、カタラーゼの生物学的意義は何かをあらかじめ検討する必要がある。われわれはさきに、菌の発育の過程に伴つてカタラーゼ活性が減弱し、逆に菌体内遊離ポルフィリン含量が高まることを報告した¹⁾。これに対し、培養が古くなれば菌膜中の死菌の割合が増大するから、われわれのように菌膜全体の平均値としてのカタラーゼ活性をみていく場合には、活性値の低下は当然であり、一方ポルフィリン含量は累積値であるから培養の古いほど高くなるのは当然であり、前報にはなんら特別の意味はないという批判が成立する。この批判は液体培養菌膜から菌液を作つて固型培地に接種する場合、培養の古いものほど菌膜単位重量当りの集落形成数が少ないことを根拠にしている。

われわれはこの批判を考慮にいれて、発育の過程に伴う菌のカタラーゼ活性とポルフィリン含量の変動をさらに検討し、次に培地の鉄量がこれらに及ぼす影響を検討したので報告する。

II 材料と方法

菌株は前報の *Mycobacterium avium* AVT 株の INH 感性株と 100 γ/ml INH 耐性株。培養条件は前報と同じ(注:前報 12 頁左欄 15 行目「湿菌量 0.25 mg」は「0.25 g」の誤り)¹⁾。培地は通常処方ソートン液体合成培地およびこれからクエン酸鉄アンモンをぬいたもの、クエン酸鉄アンモンを通常の 5 倍量 (1 l 当り 0.25 g) 加えたものを用い、それぞれ通常培地、鉄欠乏培地、鉄過剰培地とよぶ。鉄欠乏培地は特別の除鉄操作を行なっていないので、クエン酸鉄アンモンに換算して 1~3 γ/ml に鉄を含んでいる。感性株はこれら培地に、耐性株は 100 γ/ml INH を加えた同様の培地に培養した。

ポルフィリン抽出・定量は前報と同じく、神前²⁾、沢田ら³⁾の方法によつた(注:前報 11 頁右欄 8 行目「水 1 ml と氷醋酸 2 ml を加えてよく振盪」のあとに「エーテル 5 ml を加え栓をしてよく振り」を挿入「抽出、濾過、残渣を…」と続く)¹⁾。

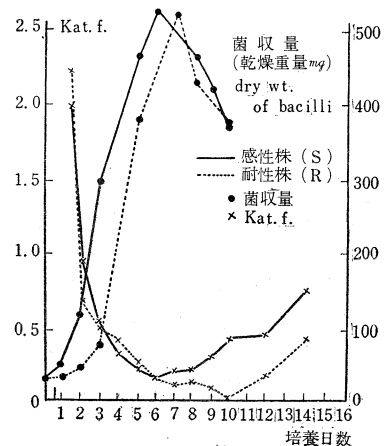
カタラーゼ活性は前報と同じく v. Euler & Josephson⁴⁾の方法に準じて測定した¹⁾。

III 実験結果

1) 菌の増殖とカタラーゼ活性

①通常培地における感性株と耐性株の比較(図 1): 耐性株はやや長い lag phase をもつが、一たん log phase に入れば感性株と同等の発育速度を示し、最大収量(感性株では 6 日、耐性株では 7 日目)もほぼ等しい。最大収量に達したのち両株とも急激に収量が減少していく。カタラーゼ活性は、前報のとおり log phase のごく初期に非常に高い値を示し、はじめ急激について徐々に活性は低下し、感性株では 6 日、耐性株では 10 日目に最低値に達するが、のち再び活性は上昇し 14 日目の実験終了まで上昇を続けた。活性の再上昇は、感性株では菌収量の減少と同時に始まつたが、耐性株ではかなり遅れて始まつた。このこと、活性の最低値が耐性株のほうが低くほとんど 0 になつたことのため、6 日以

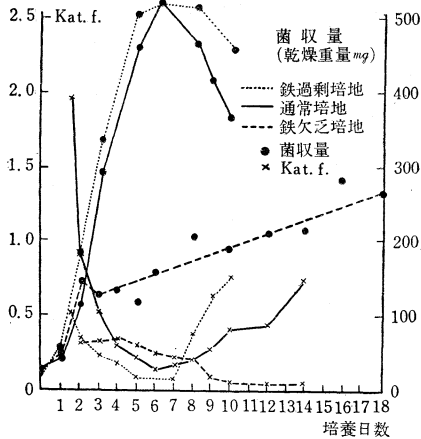
図 1 通常培地



前では両株のカタラーゼ活性に差がなかったが7日以後では耐性株の活性は感性株よりもはるかに低くなった。

⑨培地の鉄含量が感性株に及ぼす影響(図2)：通常培地と比較して鉄過剰培地での増殖はやや早く、4日目ではほぼ最大収量に達し、4~6日はほぼ同様の収量を示したのち収量減少が始まる。菌膜は厚く粗で、培養が古くなると黄褐色の部分と濃褐色~錆色の部分とが混じり、動揺によって沈みやすい。一方鉄欠乏培地では最初2日間は通常培地と同様の経過をとるが、3日目に一たん菌量が少し減り(このことは実験ごとに毎回みられた)、そのち通常培地よりずっと低い速度で対数的に増殖を続け、観察うちきりの18日目にやつと他の場合の最大収量の約半分に達し、なおlog phaseを続けていた。菌体は白~紅色で繊細な感じで、菌膜は非常に薄く稠密で、菌膜の一部を白金耳でひつかけると全体と一緒に持ち上がるくらいであった。

図2 感性株



カタラーゼ活性についてみると、鉄過剰培地では通常培地と同様の傾向を示したが、通常培地のような培養のごく初期の非常に高い活性はみられず、培養前半では通常培地よりも低い活性であった。活性再上昇は同様に6日以後にみられ、鉄過剰培地ではこの上昇が非常に著明で8日以後は通常培地をはるかに凌駕する活性を示した。一方、鉄欠乏培地ではやや様相を異にし、2日以後わずかず活性が高まって4日目にあまり明らかではない1つの山を作り、再び徐々に活性は低下して実験終了の14日まで低い活性のまま続いた。

⑩培地の鉄含量が耐性株に及ぼす影響(図3)：耐性株のカタラーゼ活性は、鉄過剰培地では、培養のごく初期の著しく高い活性を示さない点は感性株と同様であった。活性再上昇は感性株に比較して遅れて始まり、あまり著明でなく、そのため発育のずれを考慮にいれれば培養前半では両株の活性にほとんど差はなかったが、培養

後半では耐性株の活性は感性株よりもかなり低くなった(図4)。一方鉄欠乏培地では、培養初期に高い活性を示さずに途中で一たん山を作り、再び活性が低下し実験終了まで再上昇しないという全体的な経過は、感性株と同じであったが、5日目の山は感性株の4日目の山よりもはるかに著明なものであった(図5)。

図3 耐性株

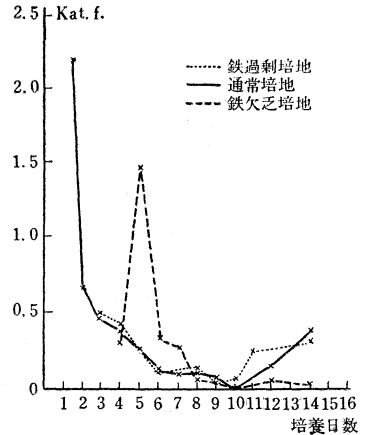
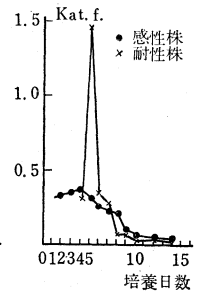
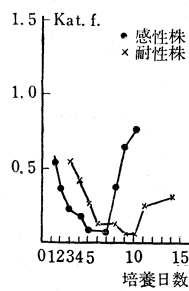


図4 鉄過剰培地

図5 鉄欠乏培地



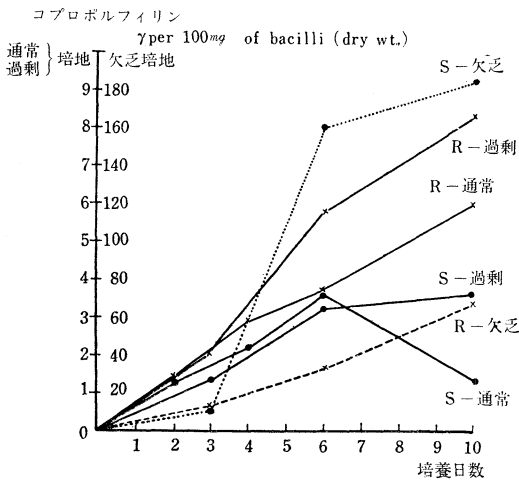
2) 菌体内遊離ポリフェリリン含量(表1, 図6)：鉄欠乏培地における感性株の異常に高いポリフェリリン含量が目される。この菌では培地や菌体がしばしば深紅色に染まっていた。他の場合では6~7日まではほぼ直線的にポリフェリリン量が増大しているのに対し、この場合には3~6日の間に飛躍的な増量がみられる。耐性株も鉄欠乏培地では高いポリフェリリン含量を示したが、この場合は感性株のような飛躍的な増量はなくほぼ直線的に増加しており、したがって培養3~4日以後では感性株よりもずっと低い含量になった。また耐性株ではいずれも実験終了の10日までほぼ直線的な増量が続けたのに対し、感性株では鉄過剰培地では6日以後ほぼ現状維持、通常培地ではかえって著しい減量を示した。さらに感性株では7日までは通常培地と鉄過剰培地との間に差はないが、耐性株では鉄過剰培地のほうが常に高いポリフェリリン含量を示した。すべての場合を通じ、検出されたのはコプロポリフェリリンのみであった。

表 1 培地鉄量とポルフィリン量

菌株	培養日数	2	3	4	6	10
	培地					
感性株	鉄欠乏培地		11.8		162.2	184.9
	通常培地	1.3		2.2	3.6	1.3
	鉄過剰培地		1.4		3.2	3.7
耐性株	鉄欠乏培地		12.9		32.7	67.3
	通常培地	1.5		2.9	3.7	6.0
	鉄過剰培地		2.1		5.8	8.3

コプロポルフィリン γ per 100mg 菌重量(乾燥重量)

図 6 ポルフィリン量の変動



IV 考 案

1) 菌の増殖とカタラーゼ活性：菌の増殖曲線とカタラーゼ活性の変動曲線とを比較すると、一般的な傾向として、菌が lag phase から log phase に移り活発な増殖を開始する時期にはカタラーゼ活性は高く、増殖が軌道に乗った log phase では活性は低く、自己融解が始まりその産物を基質としての増殖が始まると再びカタラーゼ活性は高くなる。このような幾つかの菌発育の phase, すなわち菌の増殖型式の変化は、菌が基質の質的量的の変動やその他の環境条件の変動に対応して代謝型式を変えたことの反映と考えられるが、カタラーゼ活性の変動もまたこのような基本的な代謝型式の変化の二次的な反映と考えることができよう。たとえば、千谷らの *Pseudomonas* についての業績から類推して⁵⁾, log phase にはもつとも効率のよいチトクロム系が主動していると考えれば、盛んな増殖の割合には生体内の過酸化水素生産は少なく、適応的にカタラーゼ活性は低下するだろうし、チトクロム系形成以前の培養初期やチトクロム系が系としての乱れをみせる培養後期には、自己酸化のフラビン酵素系の役割が相対的に増大して過酸化水素

生産が増え、適応的にカタラーゼ活性も高まるのであろう。また序言で述べた批判に対しては、培養がさらに古くなつた時期にカタラーゼ活性が再上昇するという実験結果によつて答えられる。固型培地での集落形成能力を菌の生死と結びつけることがむしろ問題で、このような集落形成能力もまた基本的な代謝型式の一現象にすぎないのであろう。

さらにカタラーゼ活性は培養の過程でこのように大きく変動するので、たとえば「鳥型菌 AVT 株のカタラーゼ活性」として一定の値を示すことは無意味に近く、2つの異なる菌株あるいは同一菌株で培養条件の異なる場合のカタラーゼ活性の比較は、この変動を十分に考慮して行なわねばならない。

2) 培地の鉄量とカタラーゼ活性：鉄はカタラーゼの構成要素であり、培地の鉄量がカタラーゼ活性に影響すること自体はむしろ当然である。しかしその影響の仕方は、鉄欠乏培地のように鉄量が菌増殖の limiting factor になっていると思われる場合でさえも、鉄が少ないだけ活性も低いというような単純なものではない。鉄はチトクロム系にも、二価鉄酵素アコナーゼを通じて TCA サイクルにも⁶⁾, 金属フラビン酵素を通じてフラビン関与の酸化還元系にも⁷⁾, 関連している。したがつて鉄の多少は、一方ではこれら基本的な代謝系のバランスに影響して^{8) 9) 1)} で述べたように間接的にカタラーゼ活性をコントロールし、他方ではカタラーゼ自体の構成材料の多少として直接的にその活性を左右し、あわせて複雑な影響を及ぼすのであろう。INH とカタラーゼとの関係についても、直接的な相互作用¹⁰⁾ のほかに、基本的な代謝系が INH によつて乱されることに由来する間接的な影響をも考慮しなければならないだろう。

3) 培地の鉄量と菌体内遊離ポルフィリン含量：鉄欠乏培地で遊離ポルフィリンが蓄積するというわれわれの成績は、*Micrococcus lysodeikticus*¹¹⁾, *Corynebact. diphtheriae*¹²⁾ などについての成績と一致し、鳥型菌竹尾株¹³⁾ についての成績と一致しない。チフテリア菌では、毒素生産と関連して培地の鉄とポルフィリンの関係について多くの研究があり、鉄の欠乏がチトクロム形成を不可能にし遊離の形のポルフィリンが蓄積するとされている^{12) 14)}。鉄欠乏培地の感性株で 3~6 日の間に飛躍的にポルフィリンが蓄積したことは、菌生育の一定の時期にチトクロムが形成されるという千谷らの業績で説明できる⁵⁾。通常培地の感性株で 7 日以後カタラーゼ活性の再上昇とともにポルフィリンが減少したことは、蓄積したコプロポルフィリンの再動員によるカタラーゼ生産を想像させるが、コプロポルフィリンはヘム合成経路からはずれた by-product と考えられており¹⁵⁾, さらに検討を要する¹¹⁾。カタラーゼ活性とポルフィリン含量の間には一定の関係は認められなかつた。

4) 感性株と耐性株との差異：両株の差異を現象的に拾いあげてみると、鉄欠乏培地におけるポルフィリン含量は耐性株のほうがはるかに低い。とくに耐性株では感性株にみるような飛躍的な増加はみられない。鉄欠乏培地でみられるカタラーゼ活性の山は、耐性株のほうが感性株よりもはるかに著明である。⊖通常培地、鉄過剰培地におけるカタラーゼ活性の再上昇は、耐性株では感性株よりもかなり遅れて始まり、したがってこれ以後耐性株の活性は感性株よりも低くなる。⊕感性株のポルフィリン含量は通常培地と鉄過剰培地とで差がないが、耐性株では鉄過剰培地で高い含量を示す。——これらの現象的な差が、INHの抗菌作用やINH耐性とどのような本質的な関連をもつかについては現在何もいうことはできない。1) 2) でもふれたように、基本的な代謝系とINHとの関係を明らかにすることによってこれら現象の意味づけがはじめて可能になると、われわれは考えている。

V 結 論

- 1) 鳥型菌の培養の過程に伴うカタラーゼ活性とポルフィリン含量との変動を検討した。
- 2) 培地の鉄量は、菌のカタラーゼ活性に複雑に影響する。
- 3) 培地の鉄を制限すると、菌体内遊離コプロポルフィリンの著明な蓄積をみる。

湯沢・隈部先生の御校閲を感謝いたします。

文 献

- 1) 戸井田一郎・斎藤千代：結核，34：11，昭34.
- 2) 神前武和：最新医学，2：513，昭22.
- 3) 沢田藤一郎・柴田雄蔵・梶原保：日本医事新報，1699：10，昭31.
- 4) von Euler, H. & Josephson, K. : Ber. 56 : 1749, 1923.
- 5) 千谷晃一・水上茂樹・三井宏美：酵素化学シンポジウム，13：173，昭33.
- 6) 酵素研究法，第2巻，316，朝倉書店，昭31.
- 7) 八木国夫：フラビンの生化学，194，共立出版，昭32.
- 8) 八木国夫・三橋進・小島保彦：酵素化学シンポジウム，9：59，昭29.
- 9) Lenhoff, H.M., Nicholas, D.J. & Kaplan, N.D. : J.B.C., 220 : 983, 1956.
- 10) 岡捨己・庄司真：抗菌誌，13：151，昭33.
- 11) Townsley, P.M. & Neilands, J.B. : J.B.C., 224 : 695, 1957.
- 12) Pappenheimer, A.M. Jr. : J.B.C., 167 : 251, 851, 1957.
- 13) 山田善朗・畠山英夫・早野和夫：結核，33：718，昭33.
- 14) 八木国夫・三橋進・小島保彦：生化学，25：442，昭29.
- 15) 浦田郡平・渡辺愛子・木村秀子：生化学，30：365，昭33.