

結核菌体におけるいわゆる“tetrazolium還元顆粒”について

金井興美

国立予防衛生研究所結核部（部長 室橋豊穂）

受付 昭和 36 年 6 月 11 日

Muddら¹⁾が、結核菌体内で tetrazolium を還元し、赤色ホルマザンを沈着せしめる細胞顆粒を mitochondria とみなしてから 10 年になるが、この主張には現在なお反論もある。理由として、還元 tetrazolium (ホルマザン) が時間とともに融合して大きな二次的顆粒を作りうることを、また、それは脂質に溶けて移動し、染色結果の判断に誤謬をきたすおそれがあり、さらに、tetrazolium 還元系の電子伝達過程が完全に説明されえなかつたことなどがあげられる。

しかるに、1959 年 Slater²⁾により naphthoquinone 誘導体である vitamin K₃ が tetrazolium の還元に関与することが見出され、1960 年には Kashketら³⁾が抗酸菌の分離顆粒に naphthoquinone が集中していることを報告するなど、この分野における知見が急速に進展している。

既報⁴⁾のごとく、著者は結核生菌より分離した菌体顆粒画分について、免疫学的性質を検討してきたが、この画分は Darterら⁶⁾によつて mitochondria とみなされたものである。しかし、この推察はその画分のもつ酵素活性よりなされたものであり、決定的な証拠に欠けていた。また、顆粒画分の均一性に関しても検討の余地があつた。そこで、著者は顆粒画分による tetrazolium 還元反応についても検討を加えてきたが、反応における基質の効果と阻害剤の影響より考えて、この顆粒画分は少なくとも 2 種類の顆粒よりなるとの結論に達した。本報においては、このような所見のもとに、これまでの tetrazolium 還元顆粒についての文献を批判したい。

実験材料と方法

使用菌株は人型 H37Ra 結核菌であり、Proskauer & Beck 変法合成培地上⁷⁾に 4 週間発育の菌体を使用した。菌体の収獲、破壊およびその細胞分画法はすでに詳述してあるので⁴⁾、ここではその概要を図 2 に示した。tetrazolium 塩還元反応は次の要領で行なつた。

- 1) 菌体あるいはその細胞画分を 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) に 100 mg/ml の濃度に再浮遊する。
- 2) 2・3・5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) を 0.01 M 磷酸緩衝液に 1% に溶解する。
- 3) 基質としては、1/150 M lactate あるいは細胞分

画における最終上清 (S₄₀) を用いた。

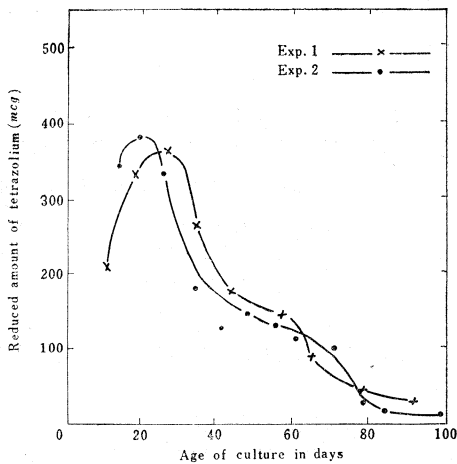
以上 3 成分をそれぞれ 0.5 ml, 0.2 ml, 0.5 ml の量に混合し、37°C に保つて一定時間後に発生したホルマザンの量を測定する。すなわち、20% の三塩化酢酸を加えて反応をとめ、アセトンを一定量注加して赤色沈澱を溶解せしめ、その遠沈上清を Coleman 光電比色計 ($\lambda = 500 m\mu$) で比色定量した。あらかじめ用意した標準グラフより還元された TTC の量を計算した。なお、菌体を tetrazolium で生体染色するさいには、TTC の代りに neotetrazolium を使用し、ホルマザン抽出には酢酸エチルを使用した。このため別個の標準グラフを用意した。

実験成績

- 1) H37Ra 全菌体による TTC 反応、ことに培養日数による変化

300 ml 容量の三角フラスコに Proskauer & Beck 変法培地を 100 ml 分注し、この培地上で H37Ra 株を 10~14 日間隔で継代保存したが、陳旧培養をも 37°C に放置し、一定時期にこれらの培養より選んだものにつき、その TTC 還元力を上記の方式で測定した。基質を加えずに、endogenous の 2 時間還元量をもつて活性度とした。独立的に 2 回行なつた実験成績を図 1 に示した。各培養菌とも 50 mg を用いたが、TTC 還元量は 3~4 週において最高である。この峰の前後においては傾斜は急で、活性度は急激に弱まる。この傾向は lactate を基質とした Lyon ら⁸⁾の成績でも表現され、また、BCG を使用した著者⁹⁾の以前の成績では峰は 1 週間早く現われているが、BCG と H37Ra の発育速度の差によるものである。この所見より、次の実験を計画した。同一培養群の 3 週および 4 週発育の菌体それぞれ 100 g より、図 2 の方式で顆粒画分 R₄₀ を分離したが、その収量は前者より 3,280 mg、後者より 1,920 mg であつた。すなわち、3 週培養に R₄₀ が多い。次の実験 2) より考えて、この所見は TTC 還元力が菌体顆粒画分の量によつて左右されることを示唆するが、さらに再現性を検討すべきであろう。

- 2) 全菌体、顆粒画分 (R₄₀)、細胞質液 (S₄₀)、および破壊菌体残渣 (R₅) による TTC 反応



Note: Reaction by 50 mg cells in 120 minutes was recorded.

Fig. 1. Age difference of tetrazolium reducing activity of H37Ra cells grown in modified Proskauer & Beck medium.

全菌体および菌体画分 R₅, R₄₀, S₄₀ による TTC 反応を比較した。全菌体と S₄₀ の場合には基質を使用せず緩衝液を用い、R₅ と R₄₀ の場合には緩衝液ある

いは S₄₀ との組合せを検討した。反応は 75 分の間、経時的に追求し、成績を図 3 に示した。この成績は、全菌体による endogenous の TTC 反応が、S₄₀ と R₄₀ との組合せにおいて発現していることを示すものであり、R₄₀, S₄₀ のいずれか一方では反応はきわめて微弱である。また、R₅ と S₄₀ との組合せによつても反応は弱いので、TTC を還元する顆粒画分は破壊菌体より容易に流出するものであろう。なお、R₄₀ は lactate を基質としても TTC を還元するが、S₄₀ と lactate のみの組合せでは TTC は還元されないことも観察された。

3) あらかじめ neotetrazolium で生体染色された菌体からの画分より、ホルマザンの抽出

新鮮収獲菌体を neotetrazolium 0.0225 % 溶液に再浮遊し、37°C で 30 分間放置した。紫色を帯びた菌体を濾紙上に集めて蒸留水で洗滌した。この菌体 70g より型のごとく菌体分画し、R₅, R₁₀, R₁₅, R₄₀ を得た。これらの沈澱の湿潤量を計り、また、そこに含まれるホルマザン量を酢酸エチルで抽出し比色定量した。操作中に反応がすすまぬよう実験は 5°C で行なつた。成績は表 1 に示した。ホルマザン量は予期したごとく R₄₀ に最高であるが、実験 2) と異なり、その分布は R₅ にも、R₁₀, R₁₅ にも比較的ゆきわたつている。

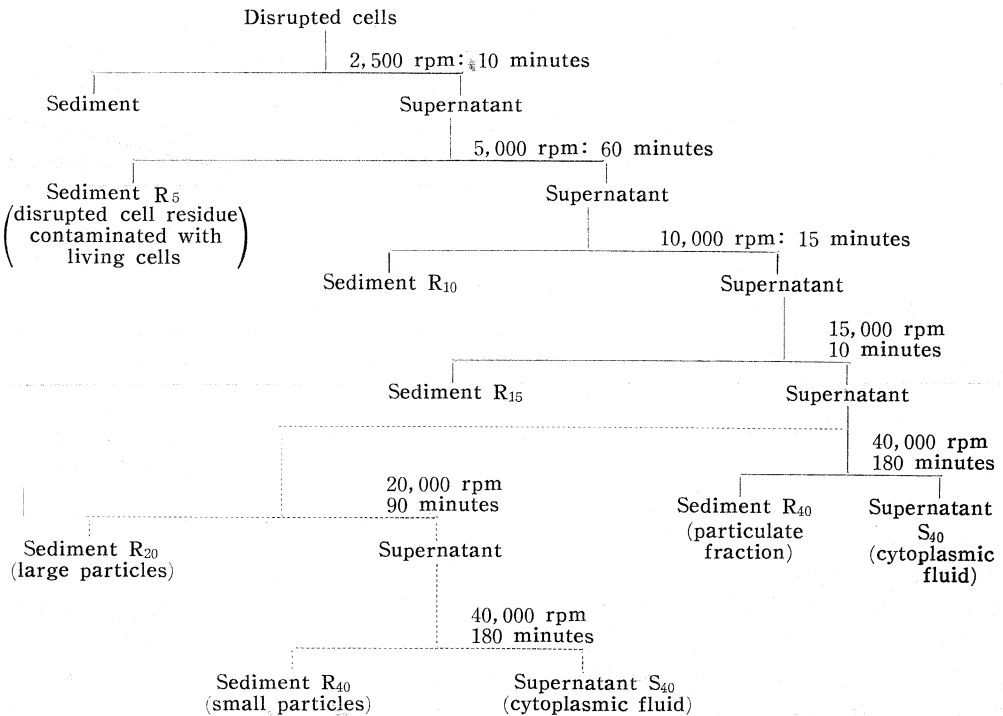
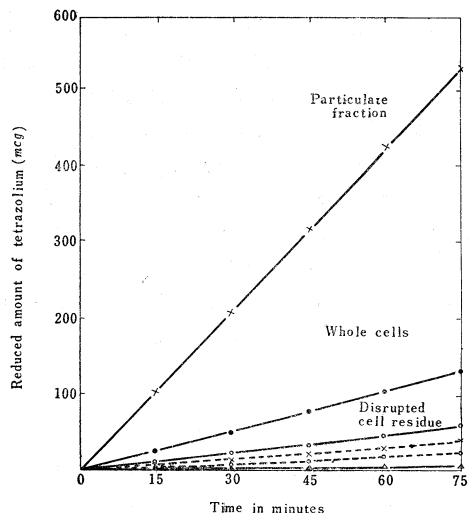


Fig. 2. Procedure for mechanical fractionation of living H37Ra cells.



Note: • Whole cells
 △ Supernatant S₄₀ (cytoplasmic fluid)
 × Particulate fraction R₄₀
 in the presence of phosphate buffer
 — in the presence of S₄₀
 ○ Disrupted cell residue R₅
 in the presence of phosphate buffer
 — in the presence of S₄₀
 Each material was used in the amount of 50 mg but 0.5 ml of supernatant fluid.

Fig. 3. Tetrazolium reducing activity of H37Ra cells and of cellular components obtained from mechanically disrupt cell extract.

(mcgホルマザン/mg sediment) 値が R₄₀ では 3.4 でこれは図 3 における R₄₀, S₄₀ 組合せ 30 分値の 4.3 にもつとも近く、他方、R₅, R₁₀, R₁₅ では 1.6, 1.7, 1.8 と接近している。また、S₄₀ は全く赤紫色を呈せず、その表層の fatty layer のみが薄い紫色を呈した。これらの所見は、R₅, R₁₀, R₁₅ が染色された R₄₀ に汚染されていることを意味し、また、ホルマザンが脂溶性であるため、リポドに溶けて位置を移動したともみられる。実験 2) と 3) よりして、菌体における tetrazolium 還元反応は、主として R₄₀ と S₄₀ との組合せで発生するが、適当な時間で観察すれば、生体染色部位は顆粒画分にある。

4) HgCl₂ による TTC 反応の阻害

菌の TTC 反応は NaN₃ によつて全く阻害されないが、HgCl₂, CuSO₄ によつて阻害されることが知られているので、次の要領で R₄₀ の TTC 還元力に及ぼす HgCl₂ の阻害力を検討した。菌体分画の過程において、S₁₅ が得られたさい、これを 2 分あるいは 3 分し、1 つは対照とし、他には HgCl₂ を 0.005, 0.01, あるいは 0.05 終末%に加え、氷室に一晩放置した。翌朝、40,000 rpm 3 時間でそれぞれより R₄₀ を収穫し、これらを用いて TTC 反応を行なつた。lactate あるいは対照よりの S₄₀ を基質として用いた。4 回行なつた実験成績は表 2 に示した。HgCl₂ による反応阻害は

Table 1

Recovery of Formazan (reduced tetrazolium) from Vially-stained H37Ra Living Cells with Neotetrazolium

Cellular fraction (sediment)	Yield of sediment (mg in moist weight)	Reduced amount of tetrazolium in mcg	Ratio mcg formazan	
			mg sediment	
R ₅	8,400	13,300	1.6	
R ₁₀	1,300	2,160	1.7	
R ₁₅	1,240	2,240	1.8	
R ₄₀	3,520	11,800	3.4	
S ₄₀	Not stained except for the superficial fatty layer which stained light purple			

S₄₀ を基質とした場合にきわめて強く、lactate の場合に弱いことが注目される。

5) R₂₀ と R₄₀ による TTC 反応の比較

S₁₅ より直接得られる R₄₀ は一般に半透明で着色の強い上層と、不透明で着色の弱い下層よりなるが、S₁₅ より 20,000 rpm 90 分で下層を大体分離できる。そこで、S₂₀ よりさらに R₄₀ と S₄₀ とを分離し、R₂₀ と R₄₀ の TTC 反応を比較した。この場合も、基質として lactate あるいは S₄₀ を用いた。3 回の実験成績を表 3 に示した。R₂₀ は S₄₀ を基質とした場合に TTC をよく還元し、R₄₀ は逆に lactate を基質とした場合

に TTC 還元量が多かつた。この現象は実験 4) とともに TTC 還元顆粒の不均一性を示している。

考 察

上述のごとく、H37Ra 菌体内で TTC を還元する構造は“顆粒画分”であるといえるが、活性顆粒には少なくとも 2 種類ある。S₄₀ を基質とする場合、R₂₀ は R₄₀ よりも活性が強く、乳酸を基質とする場合、R₄₀ は R₂₀ よりも還元量が多い。また、S₄₀ を基質とする反応は、乳酸を基質とするそれよりも HgCl₂ 阻害に敏感である。他方、R₂₀ は着色の少ない不透明な沈澱として

Table 2
Effect of HgCl₂ Treatment on the Tetrazolium Reducing Activity of Particulate Fraction in the Presence of S₄₀ (cytoplasmic fluid) or Lactate as Substrate

Exp. No.	Reaction time in minutes	Treatment with HgCl ₂ of below-indicated concent. (final %)	Reduced amount of TTC (mcg) in the presence of	
			Cytoplasmic fluid (S ₄₀)	Lactate
1	90	0	310	370
		0.05	12	210
2	90	0	280	84
		0.01	45	76
3	90	0	600	360
		0.01	290	320
		0.05	90	160
4	45	0	290	210
		0.005	50	143
		0.01	18	116

Note: Endogenous reaction was practically null in each case.

Table 3
Comparison of Tetrazolium-reducing Activity of Two Kinds of Particulate Fraction, R₂₀ and R₄₀, of H37Ra Cells

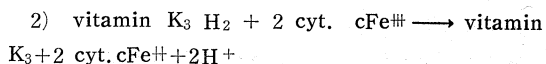
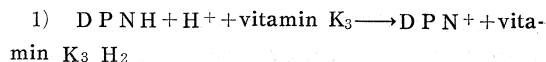
Exp. No.	Reaction time in minutes	Reduced amount of tetrazolium (mcg) by					
		R ₄₀ in the presence of			R ₂₀ in the presence of		
		Phosphate buffer	S ₄₀	Lactate	Phosphate buffer	S ₄₀	Lactate
1	90	16	32	250	8	350	240
2	75	35	120	280	5	380	96
3	90	8	380	600	4	240	59

Note: S₄₀ is the final supernatant (soluble cytoplasmic fraction). Combination of S₄₀ and tetrazolium produced negligible reaction.

得られ、R₄₀は橙黄色あるいは赤褐色の半透明沈澱である。HgCl₂による反応阻害は、この反応系におけるSH化合物、ascorbic acidの関与を示唆する。これまで、TTC反応に関与する物質として glutathione, cysteine, ascorbic acid があげられたが¹⁰⁾これらはpH9.0以上のアルカリ側においてTTCを還元し、はたして細胞内においてTTCを還元しうるかという点では疑問があつた。しかし、この疑問は、最近Slater一派¹¹⁾の研究によつて解明され、pH7.4においても、cysteineあるいはascorbic acidよりvitamin K₃を経てTTCに水素の伝達される系が見出された。したがつて、この反応系はHgCl₂に敏感に阻害される。

また、乳酸を基質とする場合は、抗酸菌には2種類の乳酸酸化酵素のあることを考慮すべきである¹²⁾。一つはFADを助酵素として酸素と直接反応する真の酸化酵素であり、他は、DPNを助酵素とし、cytochrome系を経て酸素に水素を移す脱水素酵素である。Myco-bacterium phleiを用いたWeber & Brodie¹³⁾の報

告においては、cytochrome Cの還元は次の系路によつてゐる。



Slater²⁾の研究からみれば、この反応系において、TTCはcytochrome Cに変わつて還元されるものであり、また上述の1)は、フラボプロテインによつて申介されるというから、一般に、フラボプロテイン→vitamin K₃→TTCという系が考えられ、これが乳酸を基質とするTTC反応であろう。したがつてHgCl₂阻害が少ないと考えられる。

そこで問題は、R₂₀にHgCl₂感性のTTC反応が強く、R₄₀にはHgCl₂に感受性少なく乳酸酸化を伴うTTC反応が強い意味である。結核菌のbiochemical cytologyの現段階では完全な説明は不可能であるが、他の一般細菌、細胞における知見より考えてみよう。近

年、細菌の protoplast を用いる実験方法が進歩し、shokate として細胞膜 (plasmic membrane) が純粹に得られ、乳酸酸化酵素はチトクローム系とともに、この plasmic membrane に付随して得られるようになった^{14) 15)}。結核菌においても、この membrane の存在は Knaysi¹⁶⁾ 以来認められているが、この構造は細胞内部に陥入分派しているといわれる。最近の Mudd¹⁷⁾ の見解は、この菌体構造物と菌体ミトコンドリアとが、機能的に一つの協働体であることを主張する。われわれの R₄₀ が、このような構造物に由来する可能性は十分ありうる。

他方、細菌核構造における水素伝達系に関しては知見がないので、一般生体細胞における Stern & Timonen¹⁸⁾ の報告を引用しよう。すなわち、核においては還元 DPN は発生するが、フラボプロテイン、チトクローム系は存在せず、glutathione と ascorbic acid が見出された。植物では、これまでも DPN (TPN) → glutathione → ascorbic acid → 酸素の順に電子が伝達される系が知られているので¹⁹⁾ これにさらに vitamin K₃ が追加されれば、TTC の還元が核において発現してもよきそうである。抗酸性菌竹尾株を用いた山村¹²⁾ の報告にては、RNA-P/DNA-P が R₁₂ では 3.14, R₃₈ では 7.21 であり、大顆粒のほうに核成分が多いともいえるが、DNA の大部分が可溶成分に移るので、決定的な根拠とはならない。tetrazolium による生体染色顆粒を mitochondria とする主張は、Mudd¹⁾ をはじめとして少なくないが^{20) 21)}、Knaysi²²⁾ はそれを核であると認めた。吉川²³⁾ は大腸菌 K12 株の recombination の実態を tetrazolium で生体染色した F⁺ を用いて研究し、bridge 形成後に赤色顆粒が F⁻ に移動するのを顕微鏡映画にとらえた。この所見は、赤色顆粒が核であることを示唆する。他方、phage 感染によつて核融解を起こした菌体にも、TTC 還元顆粒がみられるとの報告²⁴⁾ もあり、染色顆粒を核か mitochondria か的一方には決めがたい。

緒言で述べたごとく、ホルマザンが脂溶性であることは、この反応による細胞化学的所見の解釈を制限するが、本実験でも、tetrazolium で生体染色したのち分画すると、ホルマザンは顆粒画分以外にも分散分布している。結核菌はリピドに富むので、顆粒画分で発生したホルマザンが脂質に溶けて移動したものと考えられる。

最後に、naphthoquinone について結核菌の立場から論じよう。1933年 Anderson & Newman²⁵⁾ によつて結核菌体より phthiocol なる一種の naphthoquinone が発見され、菌の呼吸に関与すると考えられた。その後、Francis²⁶⁾ は抗酸菌より vitamin K₃ 類似物質を分離し、phthiocol が菌体内でより複雑な構造として存在することを示唆したが、Noll²⁷⁾ は 1,4 naphtho-

quinone の polyisoprenoid 誘導体として分離した。また、Kashket³⁾ により、naphthoquinone が抗酸菌の顆粒画分に主在することが証明され、TTC 反応の酵素学的基礎が菌体構造のレベルで論ぜられる段階にきている。

総括

結核菌体を機械的に分画し、各分画の tetrazolium 還元能を検討した。また、この色素で生体染色した菌体を分画し、菌体内に反応陽性顆粒画分のあることを認めた。しかし、HgCl₂ による反応阻害、基質の影響より還元顆粒には少なくとも 2 種類あることが示唆された。この反応系におけるキノン化合物の関与、抗酸菌顆粒画分にナフトキノンが主在することを示す報告を中心に論考した。

室橋部長の御校閲に感謝します。

文 献

- Mudd, S. et al. : J. Bact., 62 : 459, 1951.
- Slater, T.F. : Nature, 183 : 50, 1959.
- Kashket, E. R. & Brodie, A. F. : Biochim. Biophys. Acta, 40 : 550, 1960.
- Kanai, K. & Youmans, G.P. : J. Bact., 80 : 607, 1960.
- Kanai, K. et al. : J. Bact., 80 : 615, 1960.
- Darter, R. W. & Millman, I. : Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 95 : 440, 1957.
- Youmans, G.P. & Karlson, A.G. : Am. Rev. Tuberc., 55 : 529, 1947.
- Lyon, R. H. et al. : Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 99 : 79, 1958.
- Kanai, K. & Yanagisawa, K. : Jap. J. Med. Sci. & Biol., 7 : 249, 1954.
- Mattson, A. M. et al. : Science, 106 : 294, 1947.
- Slater, T.F. & Planterose, D.N. : Biochem. J., 74 : 591, 1960.
- 山村雄一 : 結核菌の生化学, 共立出版, 東京, 昭30.
- Weber, M. M. & Brodie, A. F. : Biochim. Biophys. Acta, 25 : 447, 1957.
- Storck, R.L. & Wacksman, J.T. : Biochem. J., 66 : 19, 1957.
- Mudd, S. et al. : Bact. Proc., 59th Gen. Meeting, 1959.
- Knaysi, G. : J. Infectious Diseases, 45 : 13, 1929.
- Mudd, S. et al. : Nature, 189 : 79, 1961.

- 18) Stern, H. & Timonen, S. : J. Gen. Physiol., 38 : 41, 1954.
- 19) Fruton, J. S. & Simmonds, S. : General Biochemistry, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, p 368, 1958.
- 20) Gonse, P.H. & Yotsuyanagi, Y. : Exptl. Cell Research, 8 : 500, 1955.
- 21) Preuner, R. et al. : Naturwiss., 39:128, 1952.
- 22) Knaysi, G. : J. Bact., 74 : 12, 1957.
- 23) 吉川秀男 : 日本細菌学雑誌, 13 : 587, 昭33.
- 24) Bielig, H. J. et al. : Zs. f. Naturforschung, 46 : 80, 1949.
- 25) Anderson, R. J. & Newmann, M.S. : J. Biol. Chem., 101 : 499, 773, 1933; 103 : 197, 1933.
- 26) Francis, J. et al. : Nature, 163 : 365, 1949.
- 27) Noll, H. : J. Biol. Chem., 232 : 919, 1958.

"Tetrazolium Reducing Granules" in Tubercle Bacilli. *Koomi KANAI* (Department of Tuberculosis, National Institute of Health of Japan. Directed by T. MUROHASHI)

It has been known that there exist intracellular granules in tubercle bacilli which reduce tetrazolium salt and are stained with red formazan (reduced tetrazolium). The present author conducted the following experiments to examine the nature of these granules.

1) Tests of 2·3·5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) reducing activity by whole living cells, particularly the change of activity due to age of culture. Relation between the yield of particulate fraction from living cells and the age of culture. (Fig. 1)

2) Mechanical fractionation of whole living cells into particulate fraction, soluble fraction (cytoplasmic fluid), and disrupted cell residue. TTC reducing activity of these fractions in comparison with the original cells. (Fig. 3)

3) Inhibition by HgCl₂ of TTC reducing activity of particulate fraction in the presence of soluble fraction or lactate as substrates. (Table 2)

4) Further fractionation of the particulate fraction into two subfractions; large particle fraction and small particle fraction. TTC reducing activity of each fraction was examined in the presence of soluble fraction and of lactate. (Table 3)

5) Mechanical fractionation of vitally-stained cells with neotetrazolium to examine the intracellular distribution of reduced tetrazolium. (Table 1)

* * * * *

From the results in Experiment 1, it was seen that TTC reducing activity of whole living cells

was the highest in the culture age of around 3 to 4 weeks. The activity was much lower in the younger and older cultures making a rather steep activity curve due to age of culture. The yield of particulate fraction was greater from 3 week cultures than from 4 week cultures.

From the result in Experiment 2, it was clarified that TTC reducing reaction in whole cells is caused by the activity of the combination between particulate fraction and soluble fraction. The activity of one of them alone was extremely low. When lactate was used as substrate, particulate fraction was active in reducing TTC, but soluble fraction was not.

The result of Experiment 3 indicated that HgCl₂ strongly inhibits the TTC reducing reaction by particulate fraction when soluble fraction is used as substrate, but not so much when lactate is substrate.

The result of Experiment 4 indicated that the large particle fraction is much more active in reducing TTC in the presence of soluble fraction as substrate than in the presence of lactate. On the contrary, the small particle fraction is much more active in the reaction in the presence of lactate than in the presence of soluble fraction. This observation, together with that in Experiment 3, suggests the heterogeneity of particulate fraction in regard to TTC reducing activity.

The result in Experiment 5 indicated that the site that is most strongly stained by reduced tetrazolium is the particulate fraction. When the reaction is stopped in a defined time, the soluble fraction is not stained at all. This observation, together with that in Experiment 2, shows that tetrazolium reducing sites are intra-

cellular organization of the cell.

* * * * *

In 1959, Slater found that vitamin K₃, a naphthoquinone derivative, can reduce tetrazolium directly. The next year, Kashket and Brodie reported that naphthoquinone is principally located in particulate fraction in acid-fast bacteria. In tubercle bacilli, naphthoquinone has been known for many years in the name of

phthiocol, which was recently isolated by Noll in the form of polyisoprenoid of 1, 4 naphthoquinone.

The observations reported in this paper were discussed referring to those recent publications cited above. The previous reports on tetrazolium reducing granules were criticized especially from the heterogeneity of particulate fraction in regard to TTC reducing activity.