

抗酸菌のリボゾームに関する研究

第1報 ヒト型結核菌のリボゾームの分離とその性状

江 田 亨

東京大学医学部細菌学教室 (主任 岩田和夫教授)

受付 昭和 43 年 8 月 26 日

STUDIES ON THE RIBOSOME OF MYCOBACTERIA*

I. Isolation and Characterization of the Ribosome of
Mycobacterium tuberculosis H₃₇Ra

Tohru EDA

(Received for publication August 26, 1968)

Studies were carried out on the preparation procedure and characterization of the ribosome from the strain H₃₇Ra of *Mycobacterium tuberculosis*.

The ribosome fraction was obtained as follows ; The strain was cultivated in the synthetic medium containing Tween 80 at 37°C for 14 days and the cells were harvested by centrifugation and washed with and resuspended in the 10⁻²M of tris buffer containing 10⁻²M of MgCl₂ (tris-Mg buffer). The cell-free extract of the washed cells was prepared by passing through the French pressure cell at 400 kg/cm² followed by centrifugation. Particulate fractions were isolated from the cell-free extract by successive ultracentrifugation at 20,000 g for 60 minutes (20 p 60 fraction), and 105,000 g for 120 minutes (105 p 120 fraction). Final supernatant fraction (105 s 120 fraction) was used as a soluble enzyme. Each particulate fraction was resuspended in tris-Mg buffer and analyzed morphologically, physicochemically and biologically. The following results were obtained.

1) The 105 p 120 fraction contained a higher amount of RNA than other fractions did U-V spectrophotometrically and chemically.

2) Analytical ultracentrifugation pattern showed that the 105 p 120 fraction consisted chiefly of 70 S particles with a small amount of 50 S.

3) Electron microscopically the 105 p 120 fraction was proved to be nearly spherical particles, 27~35 mμ in diameter.

4) Furthermore, it was shown that the 105 p 120 fraction could incorporate ¹⁴C-amino acids into its protein fraction in the presence of ATP and its generator, the soluble enzyme and cofactors.

From these results, the 105 p 120 fraction may be considered to be the ribosome fraction of H₃₇Ra.

* From Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

近年生物物理学, 生化学などの急速な進歩に伴い, 生物細胞の蛋白生成に関する研究が高等動物細胞あるいは, 細菌細胞を用いて活発に行なわれ, 分子生物学の発展と相俟つて, その機構の全貌がようやく明らかになりつつある。これらの知見によると, リボゾームは生物細胞における蛋白生成の主要な場として重要な役割を演じているものであるが, 細菌細胞のうち現在までに検討された菌種は, 大腸菌を中心とする若干のものに限られ, 特に大腸菌のそれについては詳細に知られている¹⁾。抗酸菌は大腸菌に比べて種々の点で非常に異なり, 抗酸菌における蛋白生成の研究は興味があり, また応用面よりみても非常に重要であるが, いまだ抗酸菌についての検討はみるべきものがなく, したがってリボゾームに関する知見も乏しく, 2, 3の報告²⁾⁻⁵⁾²¹⁾があるのみでほとんど知られていないと言つてよい。

著者は抗酸菌の蛋白生成について, 特にそのリボゾームを中心として系統的に追究することを企図し, すでに *Mycobacterium* 607 (以下 M. 607)²⁾ および BCG³⁾ よりリボゾームを分離し, その性状を報告してきた。本報告においては, ヒト型結核菌 H₃₇Ra を対象として, そのリボゾームを分離することを試み, その物理化学的, 形態学的性状および生物活性を調べ, 本菌株のリボゾームと考えられる分画を得たので報告する。

材料と方法

1. 菌株と培地

当教室保存のヒト型結核菌 H₃₇Ra 株を Tween 80 加合成培地 (以下 TSM 培地)⁶⁾ に継代したものをを用いた。本菌株は, この培地で均等に発育し, 約 14 日間で最大の発育を示す。

2. リボゾームの分離法

既報²⁾³⁾ とほぼ同様に超遠心分画法によつた。すなわち TSM 培地に 14 日 37°C 静置培養後遠心により集菌し, 10⁻² M MgCl₂ 含有 10⁻² M tris-HCl buffer, pH 7.3 (以下 tris-Mg buffer) でよく洗浄し, 得られた菌体を tris-Mg buffer に再浮遊し, French pressure cell で 400 kg/cm² 1 回通過させることにより菌体を破壊した。菌体破壊液を 7,000 rpm, 30 分遠心して intact cell, cell wall などを除いたのち, その上清について更に 20,000 g, 60 分で沈降する分画 (20 p 60 分画), その上清を 105,000 g, 120 分で沈降する分画 (105 p 120 分画) およびその上清 (105 s 120 分画) とに分けた。このようにして得られた沈降分画は, それぞれ一定量の tris-Mg buffer に再浮遊して以後の実験に使用した。なお以上の諸操作はすべて 4°C 以下で行なつた。

3. 105 p 120 分画の形態学的検討

105 p 120 分画の形態学的所見を電子顕微鏡像により観察した。105 p 120 分画を適当に希釈したのちその 1

滴をコロジオン膜をはつたメッシュにのせ, クロミウムでシャドウイングを行ない, 電顕写真を撮り形態観察を行なうと同時に, リボゾーム粒子 100 コにつきその大きさを計測し, その分布を調べた。

4. 各分画の物理化学的性状の検討

各分画の蛋白量は Lowry 法⁷⁾ により, RNA 含量は Orcinol 反応⁸⁾ により測定した。また各分画の紫外外部吸収パターンを観察し, 核酸含量を比較するため, 各分画を蛋白量が 50 mcg/ml になるように希釈し, 分光光度計でその紫外外部吸収曲線を測定した。次に 105 p 120 および 105 s 120 各分画の物理学的性状を検討するため Spinco E 型分析用超遠心機を用いて, 各分画の小粒子の沈降恒数を測定した。

5. 105 p 120 分画による ¹⁴C-アミノ酸の取り込み実験

既報³⁾ と同様な反応系を用い, 同様な方法で行なつた。その概略を述べると, 完全反応系は, 基礎反応液として tris buffer に casamino acid, Mg. acetate および MnCl₂ を溶解したもの, ATP とその再生系として ATP, creatine phosphate, creatine kinase の系を用い, cofactor として GTP と GSH, リボゾーム分画として 105 p 120 分画, 可溶性酵素分画として 105 s 120 分画を使用し, この反応系に ¹⁴C-algar protein acid hydrolysate を加え, 37°C で 2 時間反応後 Schmidt-Thannhauser 法⁹⁾ により酸可溶性分画, 脂質, 核酸などを除き蛋白分画を得, 蛋白分画中への ¹⁴C-アミノ酸の取り込みを gas flow counter で測定し, 蛋白量 mg 当りの cpm で表現した。なお完全反応系より ATP とその再生系, cofactor および可溶性酵素分画などを除いて, ¹⁴C-アミノ酸の取り込みに及ぼすそれぞれの影響についても同時に検討した。

実験成績

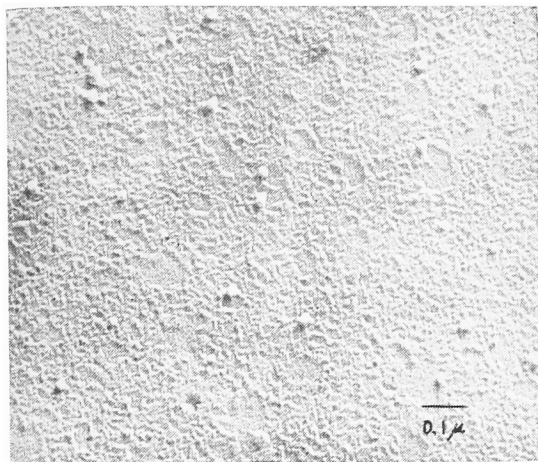
1. 105 p 120 分画の電子顕微鏡像

105 p 120 分画の形態学的所見を電顕像により観察した結果は, Fig. 1 に示すように比較的均一な球状の粒子で, その大きさは Fig. 2 に示すように 23~40 mμ の間に分布し, 特に 27~35 mμ の粒子が大部分を占めていた。

2. 各分画の紫外外部吸収パターンおよび RNA, 蛋白含量

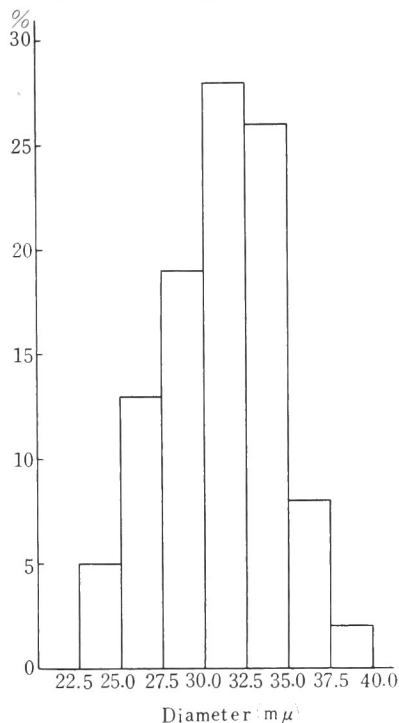
20 p 60, 105 p 120 および 105 s 120 の各分画を, おのおの 50 μg/ml の蛋白量を有する溶液として紫外外部吸収パターンを測定した結果を Fig. 3 に示した。図にみられるように, 105 p 120 および 105 s 120 の両分画は 260 mμ に最大吸収を示す吸収曲線が得られたが, 特に前者ではそのピークが高く, 高い核酸含量の存在が示された。これに反して 20 p 60 分画は 260 mμ に吸収

Fig. 1. Electron Micrograph of 105 p 120 Fraction Prepared from H₃₇Ra



Shadowed with chromium

Fig. 2. Distribution of the Ribosome Particles Prepared from H₃₇Ra in Diameter

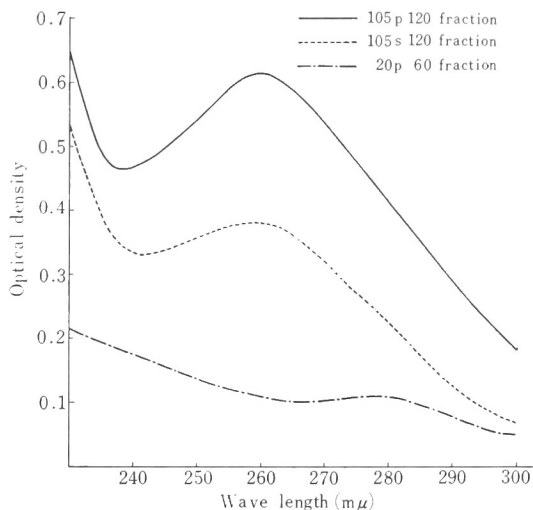


が認められず、この分画に核酸がほとんど含まれていないことが示唆された。更に 105 p 120 分画の蛋白量および RNA 含量を化学的に定量すると、その蛋白:RNA は 51.7:48.3 であり、この分画に RNA が多量に存在することが認められた。

3. 105 p 120 および 105 s 120 分画の分析超遠心パターン

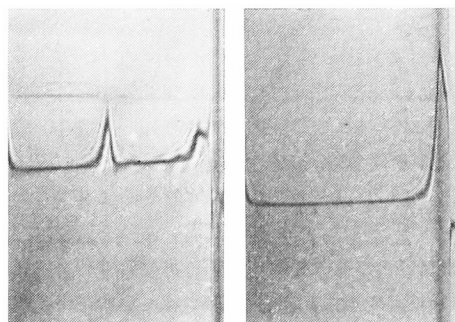
105 p 120 および 105 s 120 両分画の物理的性状を分

Fig. 3. Ultra-Violet Absorption Patterns of 105 p 120, 105 s 120 and 20 p 60 Fractions Prepared from H₃₇Ra



All samples contain 50 mcg/ml of protein.

Fig. 4. Ultracentrifugation Patterns of 105 p 120 and 105 s 120 Fractions Prepared from H₃₇Ra



105 p 120 105 s 120
Centrifuged at 42,000 rpm for 12 minutes in 10⁻² M of tris buffer containing 10⁻² M of MgCl₂ (pH 7.4)

析超遠心パターンにより観察した結果を Fig. 4 に示した。105 p 120 分画では 69.3 S および 50.5 S の 2 粒子群よりなり、そのうち 69.3 S 粒子が大部分を占めていた。

105 s 120 分画では粒子成分は認められず、10 S 以下のいわゆる可溶性物質のパターンのみしか認められなかった。

4. 105 p 120 分画の蛋白分画中への ¹⁴C-アミノ酸の取り込み

上記のように 105 p 120 分画は、その形態学的、物理化学的性状からリボソーム分画と考えられたので、本分画の生物学的活性を ¹⁴C-アミノ酸の取り込み実験により検討することにした。その結果は Table 1 に示すように、完全反応系では 1,024 cpm となり、アミノ酸の

Table 1. Incorporation of ^{14}C -Amino Acids into the Protein Fraction of the Ribosome Isolated from H_{37}Ra

Reaction system	Incorporation of ^{14}C -amino acids into the protein fraction. cpm/mg protein
Complete system	1,024
—ATP and generating system	316
—ATP and generating system, GTP and GSH	235
—105 s 120 fraction	182

Complete system

Basal fluid: tris-HCl buffer, casamino acids, Mg. acetate, MnCl_2

ATP and generating system: ATP, creatine phosphate, creatine kinase

Cofactor: GTP, GSH

Ribosome fraction: 105 p 120 fraction

Soluble enzyme: 105 s 120 fraction

取り込みが認められ、完全反応系から ATP とその再生系および GTP, GSH などを除いた反応系では、それぞれ 316, 235 cpm となり、約 1/3 あるいは 1/4 に取り込みは減少した。また可溶性酵素分画である 105 s 120 分画を完全反応系より除くと 182 cpm となり約 1/5 に取り込みは減少した。

考 察

著者はヒト型結核菌 H_{37}Ra の TSM 培地 14 日培養菌を French pressure cell で破壊し、超遠心分画法により 105,000 g, 120 分で沈降する分画 (105 p 120 分画) を得た。本分画は紫外線吸収パターンにより 260 $\text{m}\mu$ に高いピークを有し、この分画に高い核酸含量の存在が示唆された。また化学的に定量すると RNA および蛋白質の含量はそれぞれ約 50% であった。各種高等生物細胞あるいは細菌細胞のリボゾームは、その RNA 含量に多少の差異はあるにしても、いずれも 50~60% といわれ^{10)~12)}、著者がすでに分離した M. 607 および BCG のリボゾームにおいても約 50~60% であり²⁾³⁾、今回分離した H_{37}Ra においてもほぼ同様な成績が得られた。分析超遠心パターンをみると、70 S および 50 S の 2 粒子群からなり、このうち 70 S 粒子が主で、50 S 粒子はごく少量が認められるにすぎず、また今回も 100 S 粒子は認められなかつた。萩原⁵⁾は H_{37}Ra および Jucho 株のリボゾームについて、100 S 粒子が見出されなかつたと報告しているが、著者の分離した M. 607 のリボゾームでは少量ながら 100 S 粒子が認められ²⁾、BCG³⁾ および H_{37}Ra で認められなかつたのは、これら菌種のリボゾームに 100 S 粒子が存在しないのではなく、おそらくリボゾーム調製法に基因するものと考えられ⁵⁾¹³⁾¹⁴⁾、おおむね大腸菌にみられるリボゾーム¹¹⁾と同様なパターンを示すようである。

リボゾームの大きさは細胞の種類により多少の相違があり、大腸菌では 20 $\text{m}\mu$ ¹⁵⁾¹⁶⁾、Candida albicans では 50~70 $\text{m}\mu$ ¹²⁾、ラットの肝細胞では 24 $\text{m}\mu$ ¹⁷⁾と言われているが、著者の分離した BCG では 30~40 $\text{m}\mu$ ³⁾であり、 H_{37}Ra では 22~40 $\text{m}\mu$ と大きな幅があり、そのうち 27~35 $\text{m}\mu$ が大部分を占め、抗酸菌リボゾームは大腸菌と Candida のほぼ中間位の大きさを有するようである。

以上のような物理化学的、形態学的性状から、本分画が H_{37}Ra のリボゾームと考えられたので、その生物活性を ^{14}C -アミノ酸の取り込み実験により検討した。本分画は可溶性酵素分画、ATP とその再生系、GTP, GSH などの添加により、その蛋白分画中に ^{14}C -アミノ酸の取り込み能を有することが認められた。

これら完全反応系より ATP とその再生系を除くと取り込みは 1/3 に減少し、また可溶性酵素分画を除くと約 1/5 に減少した。

以上の諸成績は、先に著者の分離した M. 607 および BCG における成績²⁾³⁾ とほぼ一致し、また萩原⁵⁾の分離した H_{37}Ra および Jucho 株のリボゾームとほぼ同様な成績であり、抗酸菌の種間に共通した一般的な性状と考えられよう。

以上述べたようにヒト型結核菌 H_{37}Ra においても、M. 607 および BCG におけると同様に、105,000 g, 120 分で沈降する分画がリボゾームと考えられ、他の高等動物細胞あるいは細菌細胞と基本的には同様な一般性状を有することを確認した。

次に本分画の免疫学的活性であるが、Kanai ら¹⁸⁾、Youmans ら¹⁹⁾²⁰⁾は H_{37}Ra からリボゾーム様分画を得、本分画の免疫学的活性を検討して、感染防御抗原となりうることを報告しているが、著者の分離したリボゾームについては、この点今後の検討に待ちたい。

結 論

ヒト型結核菌 H_{37}Ra のリボゾームを分離し、その物理化学的、形態学的および生物学的諸性状を検討した。

H_{37}Ra の Tween 合成培地 14 日培養菌を French pressure cell で破壊し、intact cell, cell wall などを除いた上清について、20,000 g, 60 分で沈降する分画、その上清を 105,000 g, 120 分で沈降する分画 (105 p 120 分画) およびその上清に分けた。

1. 105 p 120 分画の紫外線吸収パターンは 260 $\text{m}\mu$ に最大吸収を有し、しかも他の分画に比べてそのピークは高く、高い核酸含量の存在が示され、また本分画の RNA 含量は約 50% であった。

2. 105 p 120 分画の分析超遠心パターンは、70 S 粒子を主とし、少量の 50 S 粒子を有する 2 粒子群よりなっていた。

3. 105 p 120 分画の電子顕微鏡像による形態学的所

見は、大きさ 23~40 m μ の球状粒子で、このうち 27~35 m μ の粒子が大部分を占めていた。

4. 105 p 120 分画は ATP とその再生系、可溶性酵素分画、GTP および GSH などの添加により、その蛋白分画中に ¹⁴C-アミノ酸の取り込み能を有することを認めた。

以上の成績より 105 p 120 分画は H₃₇Ra のリボゾームとみなされる。

本論文の要旨は、昭和40年4月第40回日本結核病学会総会（仙台）において発表した。

終りに懇切なご指導、ご校閲を賜わった主任岩田和夫教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Roberts, R. B. et al. : In "Molecular Genetics. Part I" Edited by Taylor, J. H., p. 291, Acad. Press, New York, 1963.
- 2) 江田亨 : 日本細菌学雑誌, 19 : 201, 昭 39.
- 3) 江田亨 : 日本細菌学雑誌, 19 : 411, 昭 39.
- 4) 江田亨 : 日本細菌学雑誌, 19 : 437, 昭 39.
- 5) 萩原義郷 : 福岡医学雑誌, 55 : 201, 昭 39.
- 6) 江田亨 : 結核, 38 : 37, 昭 38.
- 7) Lowry, O. H. et al. : J. Biol. Chem., 193 : 265, 1951.
- 8) Schneider, W. C. : In "Methods in Enzymology" Vol. III. p. 680~684, Acad. Press, New York, 1957.
- 9) Schmidt, G. and Thannhauser, S. J. : J. Biol. Chem., 161 : 83, 1945.
- 10) Tissières, A. and Watson, J. D. : Nature, 182 : 778, 1958.
- 11) Tissières, A. et al. : J. Mol. Biol., 1 : 221, 1959.
- 12) 岩田和夫・横田健 : 医学と生物学, 64 : 154, 昭 37.
- 13) Bowen, T. J. et al. : Biochem. J., 72 : 419, 1959.
- 14) Bowen, T. J. et al. : Nature, 189 : 638, 1961.
- 15) Hall, C. E. and Slayter, H. S. : J. Mol. Biol., 1 : 329, 1959.
- 16) Huxley, H. E. and Zubay, G. : J. Mol. Biol., 2 : 10, 1960.
- 17) Littlefield, J. W. et al. : J. Biol. Chem., 217 : 111, 1955.
- 18) Kanai, K. and Youmans, G. P. : J. Bact., 80 : 607, 1960.
- 19) Youmans, A. S. and Youmans, G. P. : J. Bact., 88 : 1030, 1964.
- 20) Youmans, A. S. and Youmans, G. P. : J. Bact., 89 : 1291, 1965.
- 21) Trnka, L. et al. : J. Bact., 95 : 310, 1968.