

抗酸菌のリボゾームに関する研究

第2報 抗酸菌リボゾームの安定性について

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*

II. Stability of the Ribosome of *Mycobacterium tuberculosis*

Tohru EDA

(Received for publication August 26, 1968)

In the preceding paper of this series, it was demonstrated that the ribosome fraction was obtained from the cell-free extract of *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra by means of preparative ultracentrifugation and its characteristics were analyzed morphologically, chemically and biologically.

This paper deals with stability of the ribosome prepared from *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra against various chemical and physical treatments. The results obtained were as follows :

1) By dialyzing against Mg⁺⁺ free tris buffer, the ribosomes containing mainly 70 S particles were dissociated into two components of 50 S and 30 S particles. When Mg⁺⁺ ion was added at concentration of 10⁻² M after dialyzation, two components of 50 S and 30 S particles seemed to be partially associated into 70 S particles reversibly.

2) Digested the protein constituents of the ribosomes by trypsin, the ribosomes changed to be soluble as measured by analytical ultracentrifugation.

3) The ribosome particles disappeared when larger amount of EDTA was added into the ribosome suspension. Furthermore, adding more than 10⁻³ M of EDTA into the ribosome suspension, hyperchromicity and increased absorption of acid soluble fraction of the ribosomes at 260 m μ were observed spectrophotometrically.

4) When the ribosomes were incubated at 37°C and 50°C in tris buffer containing 10⁻² M of Mg⁺⁺, hyperchromicity and increased absorption of the acid soluble fraction of the ribosomes at 260 m μ were observed, whereas no changes were observed by incubating at 15°C spectrophotometrically. This heat-denaturation of the ribosomal RNA could be inhibited by addition of more than 0.1 μ mole/ml of ATP.

From these results, it was indicated that the ribosomal RNase of tubercle bacilli seems to be associated with its ribosomes, and activated by various chemical and physical treatments.

著者は既報^{1)~4)}において *Mycobacterium* 607 (以下 M. 607), BCG およびヒト型結核菌 H₃₇Ra からリボゾームを分離し, その形態学的, 物理化学的性状および生

物活性を明らかにし, 抗酸菌のリボゾームは他の生物細胞一般と本質的に相違はなく, また抗酸菌の種間にも特に著明な差異は認められず, いわゆる細菌型を示すこ

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

とを報告した。

本報告においては、主としてヒト型結核菌を対象として、そのリボゾームの物理化学的処理に対する影響を調べ、安定性の面から抗酸菌リボゾームの性状を検討した。

材料と方法

1. 菌株と培地

当教室保存のヒト型結核菌 $H_{37}Ra$ 株を用いた。使用培地は前報におけると同様に Tween 80 加合成培地 (以下 TSM 培地)³⁾である。

2. リボゾームの調製法

前報¹⁾と同様に超遠心分画法によつた。その概略を述べると、TSM 培地で $37^{\circ}C$ 14 日静置培養菌を $10^{-2} M$ $MgCl_2$ 含有 $10^{-2} M$ tris-HCl buffer, pH 7.3 (以下 tris-Mg buffer) に浮遊し、French pressure cell 通過により菌体を破壊した後、7,000 rpm 20 分遠心により intact cell, cell wall などを除いた上清から更に 20,000 g, 60 分で沈降する分画を除いた上清を更に 105,000 g, 120 分遠心し沈降する分画を得た。本分画は前報⁴⁾で報告したように、形態学的、物理化学的性状および生物活性などからリボゾーム分画と考えられ、以後の実験では本分画をリボゾーム分画として、一定量の tris-Mg buffer に浮遊して使用した。

3. リボゾームに及ぼす透析の影響

リボゾームの Mg イオン依存性を検討するため透析処理を行なつた。 $H_{37}Ra$ のリボゾーム浮遊液を $4^{\circ}C$ で $MgCl_2$ を含有していない tris buffer で 24 時間透析した。更に透析後、 $MgCl_2$ を終末濃度が $0.01 M$ および $0.001 M$ になるように加え、 $4^{\circ}C$ に 2 時間放置した。上記のような種々処理を行なつたリボゾーム浮遊液について、分析超遠心パターンを測定して、その物理的变化を観察した。

4. リボゾームに及ぼす EDTA 添加の影響

リボゾームに対する EDTA の金属イオンとくに Mg イオンのキレート作用がどのような影響をもたらすかについて検討した。 $H_{37}Ra$ のリボゾーム浮遊液に EDTA が終末濃度 $1 mg/ml$ になるように加え、 $4^{\circ}C$ 2 時間放置後、その物理的变化を分析超遠心パターンにより測定した。次にリボゾーム浮遊液に EDTA を終末濃度が 10^{-4} から 10^{-1} になるように加え、 $4^{\circ}C$ に 2 時間放置後、その $0.1 ml$ をとり、再留水で $5 ml$ に希釈し、直ちに分光光度計で $260 m\mu$ の吸光度を測定すると同時に、別の $0.1 ml$ に氷冷 7% PCA $5 ml$ を加え、 $4^{\circ}C$ に一夜放置後遠心し、その上清について $260 m\mu$ の吸光度を測定し、上記処理前と比較することにより、EDTA 添加による化学的变化を検討した。

5. リボゾームに及ぼす加温の影響

リボゾームの温度に対する安定性を検討した。 $H_{37}Ra$ のリボゾーム浮遊液を $15^{\circ}C$, $37^{\circ}C$ および $50^{\circ}C$ の恒温槽に放置し、経時的にその $0.1 ml$ を取り出し、 $5 ml$ の再留水に希釈して、直ちに $260 m\mu$ の吸光度を測定すると同時に、別の $0.1 ml$ を氷冷 7% PCA $5 ml$ に加え、 $4^{\circ}C$ に一夜放置後遠心し、その上清について $260 m\mu$ の吸光度を測定することにより、上記熱処理に対する化学的变化を検討した。

6. リボゾームの熱変性に及ぼす ATP の影響

$H_{37}Ra$ のリボゾーム浮遊液に ATP を終末濃度が $0.001 \sim 0.1 \mu mole/ml$ になるように加え、 $37^{\circ}C$ で 4 時間保温後、その $0.1 ml$ をとり $5 ml$ の再留水で希釈し、直ちに $260 m\mu$ の吸光度を測定すると同時に、別の $0.1 ml$ を氷冷 7% PCA $5 ml$ に加え、 $4^{\circ}C$ に一夜放置後遠心し、その上清について $260 m\mu$ の吸光度を測定することにより、リボゾームの温度による変化に対する ATP の保護作用を検討した。

7. リボゾームに及ぼすトリプシン処理の影響

$H_{37}Ra$ のリボゾーム浮遊液にトリプシン ($2,200,000$ HuM/g) を終末濃度が $1 mg/ml$ になるように加え、 $37^{\circ}C$ で 2 時間保温後、その物理的变化を分析超遠心パターンにより測定した。

実験成績

1. リボゾームに及ぼす透析の影響

$H_{37}Ra$ のリボゾームを Mg 不含有 tris buffer で $4^{\circ}C$, 24 時間透析し、更に透析後 $MgCl_2$ を 10^{-2} および $10^{-3} M$ の濃度に加えたときの分析超遠心パターンを Fig. 1 に示した。 $H_{37}Ra$ のリボゾームは本来 $69.3 S$ 粒子を主成分とし、少量の $50.5 S$ 粒子を含む 2 粒子成分よりなつてゐるが、24 時間の透析により $69.3 S$ 粒子は著明に減少してほとんど消失し、 $50.5 S$ 粒子の増加が顕著となり、更に新たな $30.6 S$ 粒子の出現が認められた。透析後 $MgCl_2$ を $10^{-3} M$ の濃度に加えると、 $69.3 S$ は再び増加するが、 $50.5 S$ および $30.6 S$ 両粒子がなお優位を占めている。 $MgCl_2$ の濃度を上げて、 $10^{-2} M$ に加えると $69.3 S$ 粒子は更に増加し、 $50.5 S$ および $30.6 S$ 両粒子は相対的に減少したが、なお消失するまでに至らなかつた。

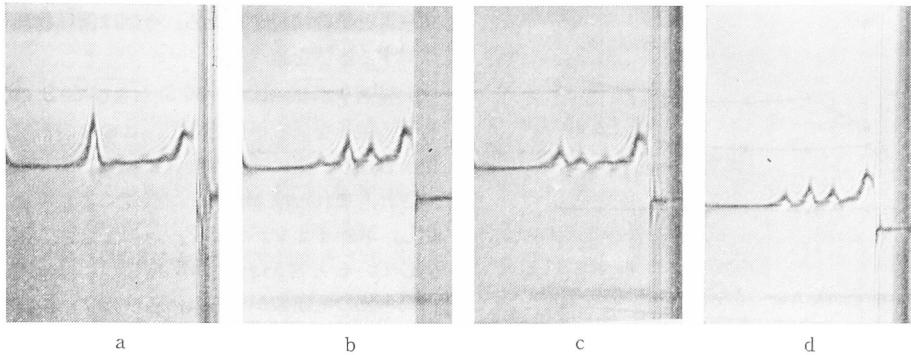
2. リボゾームに及ぼす EDTA 添加の影響

$H_{37}Ra$ のリボゾームに EDTA を添加した後の分析超遠心パターンを Fig. 2 に示したが、 $69.3 S$ および $50.5 S$ などの粒子成分は消失し、 $10 S$ 以下のいわゆる可溶性物質のみが認められた。

次に $H_{37}Ra$ のリボゾームに種々の濃度の EDTA を添加し、その化学的变化を $260 m\mu$ の吸収測定で検討した結果を Fig. 3 に示した。

図にみられるように、 $10^{-3} M$ 以上の濃度で著明な吸

Fig. 1. Influence of Mg⁺⁺ Concentration on the Ribosome Particles Prepared from H₃₇Ra—Change of the Ultracentrifugation Pattern



a : Non-treated
 b : Dialyzed against Mg-free tris-buffer.
 c : 10⁻² M of MgCl₂ was added after dialyztion.
 d : 10⁻³ M of MgCl₂ was added after dialyztion.
 All samples were centrifuged at 42,000 rpm for 12 minutes.

取増加がみられ、また酸可溶性分画において軽度の吸収増加が認められた。

3. リボゾームに及ぼす加温の影響

H₃₇Ra のリボゾームを 15°C、37°C および 50°C に保温し、経時的に 260 mμ の吸収を測定した結果を Fig. 4 に示した。図にみられるように 15°C 保温では 6 時間まで吸収の変化が認められなかつたが、37°C および 50°C の保温では、1 時間後から 260 mμ の吸収増大が認められ、その程度は 50°C 保温がより著明であつた。また酸可溶性分画の 260 mμ の吸収増加も 37°C および 50°C 保温において 1 時間後から認められ、後者がより著明であつたが、15°C 保温では吸収の変化は認められなかつた。

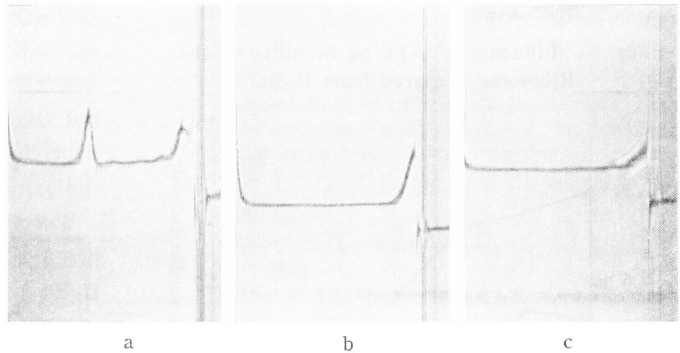
4. リボゾームの温度変性に及ぼす ATP の影響

前述のように H₃₇Ra のリボゾームは、37°C 以上の保温により 260 mμ 吸収物質の増加が認められたが、この熱変性に及ぼす ATP の保護作用を調べた結果、Fig. 5 に示したように、37°C、4 時間保温後の 260 mμ の吸収増加は、ATP の 0.1 μmole/ml の存在により抑制されることが認められた。

5. リボゾームに対するトリプシン処理の影響

H₃₇Ra のリボゾームにトリプシンを加え、37°C、2 時間保温後、その物理的变化を分析超遠心パターンで検すると、Fig. 2 に示したように、37°C、2 時間保温のみではほとんど変化が認められなかつたにも拘らず、トリプ

Fig. 2. Influence of Trypsin and EDTA on the Ribosome Particles Prepared from H₃₇Ra—Change of the Ultracentrifugation Pattern



a : Incubated at 37°C for 2 hours
 b : Incubated with 1 mg/ml of trypsin at 37°C for 2 hours
 c : Kept with 1 mg/ml of EDTA at 4°C for 2 hours
 All samples were centrifuged at 42,000 rpm for 12 minutes.

Fig. 3. Influence of EDTA on Stability of the Ribosome Prepared from H₃₇Ra

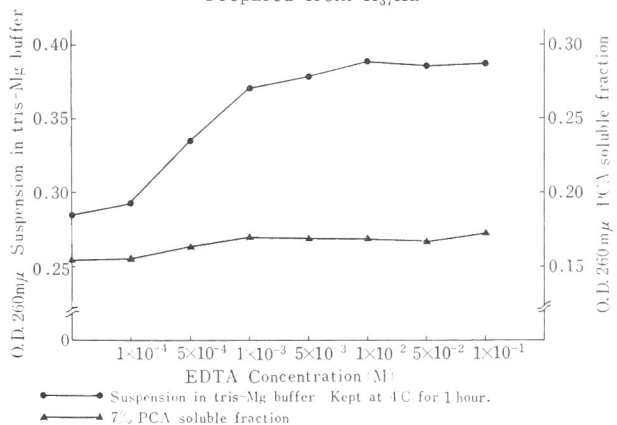


Fig. 4. Influence of Temperature on Stability of the Ribosome Prepared from $H_{37}Ra$

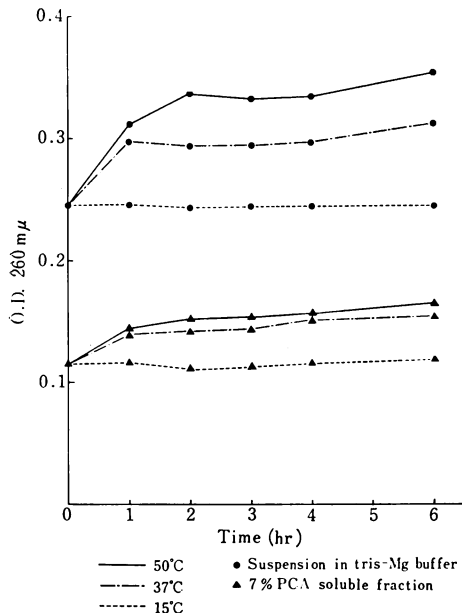
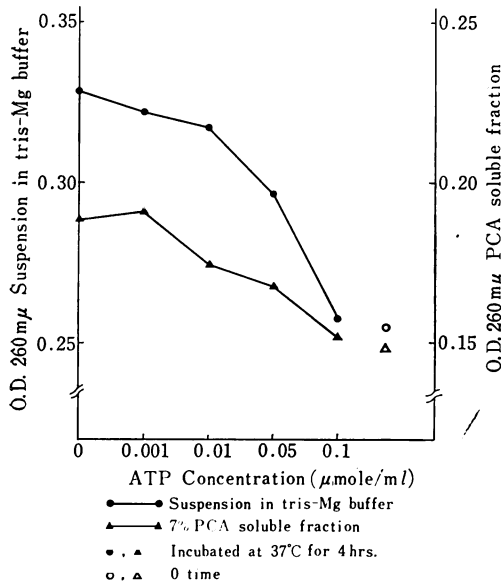


Fig. 5. Influence of ATP on Stability of the Ribosome Prepared from $H_{37}Ra$



シン添加により粒子成分は全く消失し、10S以下の可溶性物質のみとなった。

以上の諸実験は、BCGより分離したリボゾームについても同様に行なつたが、ほぼ同一な成績が得られたので省略する。

考 察

細菌細胞のリボゾームについての諸性状は大腸菌について特に知られており^{6)~8)}、抗酸菌についてのそれ

は知られるところが少ない。著者は抗酸菌のリボゾームの性状についてより詳細に検討し、大腸菌その他のリボゾームと比較検討するため、今回は諸種物理化学的処理に対する影響を調べた。

大腸菌リボゾームは、30Sおよび50Sの沈降恒数を有する粒子を構成単位として、この2者が重合して70S粒子となり、更に70S粒子2コにより100S粒子が構成され、これらはMgイオン濃度により可逆的に解離重合し、Mgイオンがリボゾームの安定性に重要な役割を演じていると言われ、Hallら⁹⁾、Huxley¹⁰⁾らにより各構成単位の電顕像が得られ、各リボゾーム構成単位の解離重合を形態学的に裏づけている。これらリボゾームの構成単位は透析などの処理によりMgイオン濃度を变化させることにより明らかにすることができる。

著者は $H_{37}Ra$ より調製したリボゾームを透析しMgイオンを除くと、70S粒子は50Sと30Sの2粒子に解離し、更にMgイオン添加により、一部の50Sおよび30S粒子は可逆的に70S粒子に重合することを認め、抗酸菌リボゾームにおいても大腸菌のそれと同様な構成成分よりなり、しかもこれらはMgイオンにより可逆的に解離重合し、Mgイオンがリボゾームの安定性に重要な意義を有することが明らかとなつた。この際260mμの吸収の変化を調べたところ、これら処理によりhyperchromicityが認められ、一部核酸成分の変化がうかがわれた。

リボゾームは一般的に約50%当りの蛋白質および核酸成分よりなり⁶⁾⁷⁾、抗酸菌についても例外ではない¹⁾²⁾⁴⁾。 $H_{37}Ra$ のリボゾームをトリプシンで処理すると粒子成分の消失を来し可溶性化する。すなわちトリプシンによりリボゾーム蛋白が分解されるとリボゾームは変性し、核酸成分も変性すると考えられる。事実別の実験により、トリプシン処理後260mμの吸収変化を調べたところ、hyperchromicityおよび酸可溶性分画の吸収増加が認められ、核酸成分の変性ないし分解が推察されている。

大腸菌リボゾームにはRNaseが結合し、リボゾームに結合している限り不活性であるが、一度遊離すると、たとえば加温、EDTA処理あるいはMgイオンの除去などの処理を行なうと、結合RNaseは活性化され、リボゾームRNAを変性させることが知られ^{11)~13)}、また酵母リボゾーム¹⁴⁾についても同様なことが報告され、リボゾームの安定性の上に重視されている。著者は $H_{37}Ra$ のリボゾームを37°C、50°C加温およびEDTA $10^{-3}M$ 以上の添加などの処理を行なつたところ、hyperchromicityおよび酸可溶性分画の260mμにおける吸収増加を認めた。更に大量のEDTAを添加したところ粒子成分の消失を来した。これらの事実は大腸菌において認められているリボゾームRNaseの活性化にみられる変化と同様であり、抗酸菌リボゾームにおいてもこの例

にもれるものではないことが示され、またリボゾーム調製上あるいはリボゾーム系による諸実験において考慮すべき点と思われる。

酵母リボゾームにおいては、加温によりリボゾーム RNase 活性化に基因するリボゾームの不安定化が ATP により抑制されることが知られているが¹⁴⁾、著者はこの点についても H₃₇Ra のリボゾームについて検討したところ、ATP の添加により安定化されることを確認した。

以上のように大腸菌その他のリボゾームにおいてすでに確認されている諸種物理化学的処理に対する安定性について、抗酸菌リボゾームについてもほぼ同様な成績が得られ、著者がすでに報告した抗酸菌リボゾームの物理化学的、形態学的諸性状および生物活性などについて考慮するとき、抗酸菌リボゾームは他の生物細胞において認められるリボゾームと本質的に変りではなく、抗酸菌においてもその蛋白合成機構も含めて、生物細胞一般に認められている生命現象の本質から離れたものではないことが確認された。なお以上の諸点については、BCG より得られたリボゾームについてもほぼ同様な成績が得られている。

結 論

ヒト型結核菌 H₃₇Ra から得られたリボゾームについて、透析、加温、EDTA およびトリプシン添加などの処理を加え、これら処理のリボゾームに及ぼす影響を物理化学的に調べた結果、次の成績を得た。

1. リボゾームの Mg イオン依存性を検討するため透析を行なったところ、70 S 粒子は 50 S および 30 S 粒子に解離し、再び Mg イオンを添加することにより一部は 70 S 粒子に可逆的に重合した。
2. リボゾームをトリプシンで処理すると、粒子成分は消失し、可溶化した。
3. リボゾームに EDTA を加えると粒子成分は消失し、また 10^{-3} M 以上の濃度で hyperchromicity および酸可溶性分画の 260 m μ における吸収増大が認められ

た。

4. リボゾームを 37°C および 50°C で加温すると、1 時間後に hyperchromicity および酸可溶性分画の 260 m μ における吸収増大が認められ、この変化は 50°C 保温でより著明であつたが、15°C 保温では変化が認められなかつた。これらリボゾームの熱変性は ATP を 0.1 μ mole/ml に加えることにより阻害された。

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。

終りに臨み、懇切なご指導、ご校閲を賜つた主任岩田和夫教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 江田亨：日本細菌学雑誌，19：201，昭 39.
- 2) 江田亨：日本細菌学雑誌，19：411，昭 39.
- 3) 江田亨：日本細菌学雑誌，19：437，昭 39.
- 4) 江田亨：結核，43：419，昭 43.
- 5) 江田亨：結核，38：37，昭 38.
- 6) Tissières, A. and Watson, J. D. : Nature, 182 : 778, 1958.
- 7) Tissières, A. et al. : J. Mol. Biol., 1 : 221, 1959.
- 8) Roberts, R. B. et al. : In "Molecular Genetics. Part I." Edited by Taylor, J. H., p. 291~352, Acad. Press, New York, 1963.
- 9) Hall, C. E. and Slayter, H. S. : J. Mol. Biol., 1 : 329, 1959.
- 10) Huxley, H. E. and Zubay, G. : J. Mol. Biol., 2 : 10, 1960.
- 11) Elson, D. Biochim. Biophys. Acta, 27 : 216, 1958.
- 12) Elson, D. : Biochim. Biophys. Acta, 36 : 372, 1959.
- 13) Spahr, P. F. and Hollingworth, B. R. : J. Biol. Chem., 236 : 823, 1961.
- 14) Otaka, Y. and Uchida, K. : Biochim. Biophys. Acta, 76 : 94, 1963.