

ペーパークロマトグラフィーによる抗酸菌核酸
の塩基組成に関する研究

萩原 義 郷・鹿田 喜代子

久留米大学医学部微生物学教室細菌学講座（指導 中村昌弘教授）

受付 昭和 44 年 7 月 20 日

THE BASE COMPOSITIONS OF DEOXYRIBONUCLEIC
ACID ISOLATED FROM MYCOBACTERIA*

Yoshisato HAGIHARA and Kiyoko SHIKADA

(Received for publication July 20, 1969)

The base compositions of desoxyribonucleic acid (DNA) isolated from 6 strains of Mycobacteria including human type, bovine type, avian type, nonphotochromogen and saprophyte, were studied.

DNAs were extracted from the mycobacterial cells disrupted by means of grinding with sea sands and dryice, in borate buffer containing 1.0M NaCl, and were precipitated by isopropyl alcohol after deproteinization with phenol. DNAs obtained were purified by treatments of trypsin, activated charcoal and ribonuclease. Purified DNAs were hydrolysed with formic acid, and GC contents were estimated by paperchromatography.

The results obtained demonstrated that GC contents of Mycobacteria tested were 65.5 to 68.2%, and that mycobacterial DNAs were GC type. These DNA ratios could not be used for the classification of Mycobacteria, because there were only a slight difference of the ratios among various types of Mycobacteria.

近年、生物の遺伝物質であるデオキシリボ核酸 (DNA) の塩基組成を示す %GC (グアニン+シトシンの量) を微生物の分類に利用しようとする試みが行なわれている¹⁾。すなわち DNA の %GC が微生物の種によって特定の値を示すことを利用しようとするものである。

抗酸菌からの DNA の分離およびその塩基組成については、抗酸菌が一般細菌と比較して材料として取扱いにくい点があるためか、Chargaff ら²⁾⁻⁴⁾ により詳細な報告がなされている他は報告は少なかつた。しかるに最近 Wayne ら⁵⁾ は Marmor ら⁶⁾ によつて開発された方法を用いて多数の抗酸菌の DNA 塩基組成を測定し、その実験結果を報告した。われわれは数種の抗酸菌の菌体を機械的に破壊する従来の方法を用いて DNA を抽出精製し、ペーパークロマトグラフィーによつてその塩基組成

を調べたのでその結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株：供試菌株として教室保存のヒト型結核菌 H₉₇Ra 株、ウシ型結核菌 BCG 株、トリ型結核菌 A-71 株、非定型抗酸菌 nonphotochromogen P-40 株、雑菌性抗酸菌 *Mycobacterium phlei* および *Mycobacterium smegmatis* を用いた。

2. 供試培地：A-71 株および P-40 株の 2 株は小川培地を用いて培養し、その他の菌はすべて Sauton 培地を用いて培養した。

3. DNA の分離法：3 週間から 4 週間培養した菌を集め、生塩水およびアセトンで洗滌した後、10 倍から 20 倍量のエーテルで 1 夜脱脂した。脱脂した菌体に海

* From the Department of Microbiology, Kurume University School of Medicine, Kurume, Fukuoka Pref. 830 Japan.

砂およびドライアイスを加え、乳鉢を用いて摩砕し、1.0 M に NaCl および 100mcg/ml に RNAase を加えた 硼酸バッファー (pH 8.4) を用いて DNA を抽出した。その抽出液に 80% フェノールを等量加えて除蛋白を行なった。除蛋白は変性蛋白の沈殿ができなくなるまで数回行なった。この除蛋白液にイソプロパノールを加えて DNA を析出させて分離した。

4. DNA の精製法: 得られた DNA 画分はさらに Marmur 法⁷⁾, 活性炭処理法⁸⁾, Tumita ら⁴⁾ の方法によつて精製された。その大要を述べると、約 10mg/ml になるように DNA を 0.1M 硼酸バッファー (pH 8.4) に溶解し、0.1% にトリプシン (Sigma 製) を加え 37°C 6 時間処理し、NaCl を 1.0M になるように加えたのちクロロフォルム・アミルアルコール (4:1) を加えて除蛋白を行ない、イソプロパノールを用いて DNA を析出させた。これを 10mg/ml に 0.1M 磷酸バッファー (pH 6.5) に溶解し、同じバッファーで洗滌した活性炭を 1/5 量加えて 0°C 1 夜放置し、31,000g 60 分遠心した上清に 1.0M に NaCl を加え、イソプロパノールで DNA を析出させた。この DNA はさらに 10mg/ml に上記磷酸バッファーに溶解し、100mcg/ml に RNAase (Sigma 製) を加えて 30°C 1 夜処理後 1.0M に NaCl を加え、クロロフォルム・アミルアルコールを用いて除蛋白をくり返した後、イソプロパノールにより DNA を析出させ分離した。得られた DNA は 3M 酢酸ソーダに 0.001M に ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を加えた液に溶解し、イソプロパノールを滴下して析出した DNA を分離した後、70% から 90% のエタノールで段階的に洗滌しさらにアセトンで洗滌して乾燥した。

5. ペーパークロマトグラフィーによる塩基組成分析⁹⁾: 精製した 2~4mg の DNA に 2ml の蟻酸を加え加水分解を行ない、減圧下で乾固した後、1N-HCl 0.2ml に溶解した。東洋濾紙 No. 51 にその 10~20 μ をスポットした後、イソプロパノール・塩酸・水 (170:41:40) を溶媒として上昇法により塩基の分離を行なった。分離された塩基は 0.01N-HCl 5ml で溶出し、各塩基に特定の波長で吸光度を測定し、モル比を算出した。

6. DNA の測定¹⁰⁾: ジフェニールアミン法により測定した。

7. RNA の測定: Zamenhof の方法¹¹⁾ を改変した方法を用いた。すなわち DNA を約 500mcg/ml 含有する試料 0.2ml を取り、これに 1ml のオルシノール試薬を加え、10 分間湯浴中で加熱し、冷却した後、3ml の水を加え、660m μ の吸収を測定した。この方法においても 5mcg/ml 以下の RNA を測定しうる。

8. 蛋白の測定: Lowry-Folin 法¹²⁾ により測定した。

9. 糖の測定: アンズロン法¹³⁾ により測定した。

Table 1. Chemical Analysis of DNA Fractions Isolated from Mycobacteria

Strain	DNA	RNA	Protein	Sugar	RNA/DNA
M. tuberculosis H ₃₇ Ra	89.0*	1.0	4.4	2.9	1.1
M. bovis BCG	88.6	1.3	5.5	2.3	1.5
M. avium A-71	90.4	0.9	2.6	1.5	1.0
Nonphotochromogen P-40	89.2	1.0	4.6	1.3	1.1
M. phlei	92.5	1.1	2.3	1.6	1.3
M. smegmatis	86.5	0.9	6.0	4.3	1.0

* %

Table 2. Effect of RNA Concentration in DNA Material on the Values of Purine/Pyrimidine and GC Content

RNA/DNA*	Adenine	Guanine	Cytosine	Thymine	PU/PY	%GC
0	27.8	21.5	20.8	30.1	0.97	42.2
1	28.8	21.4	21.4	28.6	1.00	42.8
3	26.2	23.8	24.2	26.0	0.99	47.8
5	27.9	23.5	23.5	25.1	1.06	47.0
10	29.5	22.8	21.0	26.8	1.09	43.8
0 ¹⁵⁾	28.2	21.5	21.2	27.8	0.99	42.7

* Proportion of RNA contained in DNA material. (%)

DNA: Calf thymus DNA (Sigma)

RNA: Yeast RNA (Sigma)

15) Wyatt, 1951

10. 磷の測定: Fiske-Subbarow 法¹⁴⁾ により測定した。

実験結果

1. DNA の化学分析

精製した DNA の化学分析の結果を表 1 に示す。各試料とも DNA は約 90% であり、その他に蛋白および糖が含まれている。すなわち約 2.6~6.0% の蛋白および約 1.3~4.3% の糖の存在が認められた。RNA は約 1% 前後含有されているが、これは DNA に対しては 1.0~1.5% の含有率である。

2. RNA の塩基組成分析に及ぼす混在 RNA の影響

今回の実験条件において RNA の混在が DNA の塩基組成に及ぼす影響を調べるため、コウシ胸腺 DNA (Sigma 製) およびイースト RNA (Sigma 製) を用いて実験を行なった。DNA 量に対して RNA を 0, 1, 3, 5, 10% に加えた試料を作製し、これらを同一条件により蟻酸分解した後、ペーパークロマトグラフィーにより塩基の分離を行ない、%GC を測定した。表 2 はその結果である。DNA のみの場合および RNA が 1% 存在する場合においては、構成塩基のモル比および %GC は文献値¹⁵⁾ にほぼ一致する。しかし RNA が 3% 以上存在する場合には、これらの値は文献値に比較して大きな差

Table 3. Rf Value of DNA Base of Mycobacteria in Paperchromatogram

Base	Strain	M. tuberculosis			Nonphotochromogen P-40	M. phlei	M. smegmatis
		Hominis H ₃₇ Ra	Bovis BCG	Avium A-71			
Guanine		0.21	0.25	0.27	0.25	0.26	0.20
Adenine		0.31	0.34	0.37	0.35	0.36	0.30
Cytosine		0.43	0.48	0.49	0.46	0.45	0.42
Thymine		0.71	0.70	0.74	0.71	0.70	0.73

Solvent: iso-propanol: HCl: water = 170:41:40

Table 4. Base Composition of DNA Isolated from Mycobacteria

Strain	Adenine	Guanine	Cytosine	Thymine	PU/PY	%GC
M. tuberculosis H ₃₇ Ra	17.4	33.5	32.6	16.3	1.04	66.1
M. bovis BCG	17.4	31.8	35.0	15.8	0.97	66.8
M. avium A-71	16.4	34.2	34.0	15.6	1.02	68.2
Nonphotochromogen P-40	17.3	32.4	33.1	17.2	0.99	65.5
M. phlei	17.1	32.9	33.1	16.9	1.00	66.0
M. smegmatis	18.1	31.0	34.6	16.3	0.97	65.6

異を示した。すなわち、この実験から RNA は約 1% の存在では構成塩基のモル比および %GC の測定にそう大きな影響を与えないと思われる。これより、今回の実験に用いられた抗酸菌 6 株の DNA は十分使用できるものと考えられる。

3. 塩基組成分析

各抗酸菌より分離した DNA を蟻酸分解し、ペーパークロマトグラフィーにより各塩基の分離を行なった。各試料ともウラシルのスポットは認められなかつた。

表 3 に各試料の構成塩基の Rf 値を示す。表 4 は 6 株の抗酸菌から得られた DNA の塩基組成分析をまとめたものである。これらの DNA の %GC はそれぞれ H₃₇Ra 66.1%, BCG 66.8%, A-71 68.2%, P-40 65.5% で M. phlei 66.0% および M. smegmatis 65.5% であつた。この結果から抗酸菌の DNA は GC タイプのものであることが確認された。実験に使用した菌株数が少ないので各種抗酸菌間における %GC の差を断定することはできないが、大差はないと思われる。

考 察

抗酸菌から機械的に菌体を破壊して DNA を分離する実験については Chargaff らにより詳細な報告がなされている^{2)~4)}。彼らの報告によるとかなり純度の高い RNA free の DNA を得ている。われわれは機械的方法を用いて菌体を破壊し、実験方法の項で述べたような方法で DNA を分離精製した。得られた DNA は約 1% の RNA を含有するものであつたが、表 2 に示したように RNA 含量が DNA 量に対して約 1% であれば測定された塩基組成は、ほぼ正確な値を示すものと思われるので、今回の実験において得られた値は信頼できるものと思われる。

またペーパークロマトグラフィーによる分離においてもウラシルのスポットは認められなかつた。

6 株の抗酸菌から分離した DNA は表 4 に示すように GC タイプであり、各菌株ともよく類似した値を示すものであつた。%GC についていえばトリ型菌の 68.2% を除けば他はすべて 65~67% であつた。これらの値は BCG 菌について Tumita ら⁴⁾、Spirin ら¹⁶⁾ によつてまた M. phlei について Belozersky ら¹⁷⁾ によつて著された値にほぼ一致するものである。使用した抗酸菌がヒト型、ウシ型、トリ型、非定型、雑菌性とそれぞれ型の異なる株であつたにもかかわらず、その %GC がよく似た値を示したことは、使用菌株数が少なく、確実なことはいえないとしても、各種抗酸菌の分類にこれらの結果を利用することは困難と思われる。この分類の問題については molecular hybridization の実験に待つべきであらう。

近年 Marmur ら⁸⁾ により DNA の denaturation temperature から %GC を測定する方法が開発されて以来、種々の微生物について %GC が測定され、これらの結果は微生物の分類に応用されるようになった¹⁾。抗酸菌については、最近 Wayne ら⁹⁾ が酵素的方法を用いて DNA を分離し、Marmur らの方法で %GC を測定している。彼らは 30 株の各種抗酸菌について、実験を行ない、その %GC は 64~70% であることを報告した。この値は全く方法の異なるわれわれの実験結果とほぼ一致している。

結 論

機械的に菌体を破壊する方法を用いて 6 株の抗酸菌から DNA を抽出し、ペーパークロマトグラフィーにより

GC content の測定を行ない次の結果を得た。すなわちそれぞれの %GC はヒト型菌 H₃₇Ra 66.1%, ウシ型菌 BCG 66.8%, トリ型菌 A 71 68.2%, nonphotochromogen P-40 65.5%, 雑菌性抗酸菌 M. phlei 66.0% および M. smegmatis 65.5% であった。この結果から次の結論を得る。

- 1) 抗酸菌の DNA は GC type を示す。
- 2) 抗酸菌の型による %GC の差はごくわずかなものであり、これによつて抗酸菌を分類することは困難であると思われる。

稿を終るにあたり、懇切なご指導、ご鞭撻をいただき、ご校閲を賜つた中村教授に深く感謝致します。また種々ご教示をいただいた九州大学医学部細菌学教室武谷教授、久留米大学医学部医化学教室松本助教授に深謝致します。

文 献

- 1) Hill, L. R.: *J. gen. Microbiol.*, 44 : 419, 1966.
- 2) Chargaff, E., and Sidel, H. F.: *J. Biol. Chem.*, 177 : 417, 1949.
- 3) Vischer, E., Zamenhof, S., and Chargaff, E.: *J. gen. Microbiol.*, 177 : 429, 1949.
- 4) Tumita, T., and Chargaff, E.: *Biochem. Biophys. Acta*, 29 : 568, 1958.
- 5) Wayne, L. G., and Gross, W. M.: *J. Bacteriol.*, 96 : 1915, 1968.
- 6) Marmur, J., and Doty, P.: *J. Mol. Biol.*, 5 : 109, 1962.
- 7) Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3 : 208, 1961.
- 8) 齊藤日向: 蛋白質核酸酵素, 11 : 446, 昭 41.
- 9) 竹村彰祐・三浦隆一郎: 蛋白質核酸酵素, 11 : 516, 昭 41.
- 10) Dische, Z.: *The Nucleic Acids*, 1 : 287, Academic Press N. Y. 1955.
- 11) Zamenhof, S.: *Methods in Enzymology* (ed. Colowick, S. P., and Kaplan, N. O.) III : 696, Academic Press, N. Y., 1957.
- 12) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193 : 265, 1951.
- 13) Yemm, E. W., and Willis, A. J.: *Biochem. J.*, 57 : 508, 1954.
- 14) Fiske, C. H., and Subbarow, Y.: *J. Biol. Chem.*, 66 : 375, 1925.
- 15) Wyatt, G. R.: *Biochem. J.*, 48 : 584, 1951.
- 16) Spirin, A. S., Belosersky, A. N., Shugaeva, N. V., and Vanushin, B. F.: *Biokhimiya*, 22 : 744, 1957.
- 17) Belosersky, A. N., and Spirin, A. S.: *The Nucleic Acids*, ed. Chargaff, E., and Davidson, J. N., 3 : 147, Academic Press, N. Y. 1960.