

Mycobacterium および *Nocardia* の DNA 含有量の比較

東村道雄・水野松司

国立療養所中部病院

受付 昭和44年1月21日

DNA CONTENT OF MYCOBACTERIA AND NOCARDIAS*

Michio TSUKAMURA and Shoji MIZUNO

(Received for publication January 21, 1969)

The content of deoxyribonucleic acids (DNA) was compared in various mycobacteria by Tsukamura¹⁾, but, since the data were presented inadequately, it was desired again to estimate the DNA content, applying a more appropriate method, in various mycobacteria and nocardias.

Twelve strains of 7 species of *Mycobacterium* and 12 strains of 5 species of *Nocardia* were used (Table 1 and 2). The strains had been maintained on Ogawa egg medium at -20°C . After subcultureing test strains on Ogawa egg medium at 37°C (*Mycobacterium*) or at 28°C (*Nocardia*), growing organisms were harvested, washed three times in distilled water, and then used for estimation of DNA, ribonucleic acid (RNA) and protein contents. Rapid-growing mycobacteria (Table 3) and nocardias were harvested after incubation for 7 days, slow-growing mycobacteria (Table 3) after incubation for 14 days, and very slowly growing mycobacteria (Table 3) after incubation for 21 days. The organisms were fractionated according to the procedures of Schneider²⁾ or of Ogur-Rosen³⁾. The DNA content was measured by the diphenylamine reaction⁴⁾, the RNA content by the orcinol reaction⁵⁾, and the protein content by the Folin phenol reagent⁶⁾. The estimation was made on three different samples and the results were expressed as μg DNA per mg protein.

Influence of the Fractionation Method on DNA Content Estimation

The DNA content varied depending on the method of fractionation. Some species showed similar values in both methods, while some showed markedly different ones (Tables 1 and 2). It was noticed that the influence of the fractionation method be consistent in species groups (Table 3). It was suggested that the effect of extraction agents on the DNA extraction be correlated with some taxonomic group (Table 3). The difference of the DNA content between the two fractionation methods would have been produced by either the use of hot trichloroacetic acid (Schneider method) or the use of hot perchloric acid (Ogur-Rosen method) for extraction of the DNA. The effect may be essentially related to the cell wall or cell membrane structure of organisms.

RNA content appeared relatively low in the Ogur-Rosen method (Tables 1 and 2).

DNA Content in Various Taxonomic Groups

1. When observed in the values obtained by the Schneider method, the DNA content of mycobacteria were considerably uniform, whereas that of nocardias differed from strain to strain (Tables 1 and 2). Especially the content in *N. polychromogenes* was significantly lower than the others (Table 2).

2. When observed in the values obtained by the Ogur-Rosen method, the DNA content in

*From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Aichi-Ken 474 Japan.

slow-growing mycobacteria was significantly higher than that in rapid-growing mycobacteria. The content in *M. tuberculosis* and *M. bovis* was low. The nocardias were grouped into two subgroups; one showing low values (*M. polychromogenes*, *N. asteroides* and *N. farcinica*) and another showing high values of the DNA content (*N. brasiliensis* and *N. caviae*) (Tab. 1 and 2).

In view of the results obtained, the DNA content estimated using the Ogur-Rosen method seemed to be more related to taxonomic grouping, and it was believed that the comparison of the DNA content between two fractionation methods, Schneider and Ogur-Rosen methods, contributes to the taxonomy of micro-organisms.

Mycobacterium の DNA (deoxyribonucleic acid) 含有量については、かなり多くの報告があるが、分類学的な見地からの検討はまだ行なわれていない¹⁾。前に著者の一人²⁾は *Mycobacterium* の DNA 含有量が ploidy と関係がありはしないかという仮想のもとに、DNA 含有量の測定を行なつたが、はつきりした結論は出せなかつた。この原因としてはいろいろな条件が考えられるが、*Mycobacterium* の DNA 測定法特に抽出法が未完成であること、高等生物のように核当りの DNA 量の測定が不能で菌全体の量しか測定できないこと、菌種によつて DNA 抽出に難易があるかもしれないなどの要素が考えられる。しかもなお、本報で再び *Mycobacterium* および *Nocardia* の DNA 含有量の問題を取りあげたのは、DNA 抽出法および測定法になお問題を残しながらも、ともかく得られた測定結果が *Mycobacterium* および *Nocardia* の群別 (分類学) とかなり密接な関係をもつらしいと思われたからにはかならない。

方 法

使用した菌株は、genus *Mycobacterium* 7 菌種 12 株と genus *Nocardia* 5 菌種 12 株、計 24 株である。これらの菌株はいずれも 1% 小川培地によく発育するので、1% 小川培地に培養後 -20°C に保存された。検査に際しては、菌を 1% 小川培地に培養し、発育した菌を蒸留水で 3 回洗滌し、Schneider 法³⁾または Ogur-Rosen 法⁴⁾で分画した。分画後、Schneider 法の核酸画分、蛋白画分、Ogur-Rosen 法の DNA 画分、RNA 画分、蛋白画分について、DNA 量は diphenylamine 反応⁴⁾により、RNA (ribonucleic acid) 量は orcinol 反応⁵⁾により、蛋白量は Folin phenol 試薬⁶⁾により、それぞれ比色定量した。測定は別々の標本について 3 回測定し、得られた測定値の平均値と標準偏差を表に示した。DNA 量は $\mu\text{g DNA/mg protein}$ として示した。なお、3 回の測定は別の標本で行なわれているが、Schneider 法の測定と Ogur-Rosen 法の測定は同一標本について、一対の実験として行なわれた。

測定材料を得るのに 1% 小川培地を用いた理由は、い

ずれの被検株も好適な発育を示すためである。培養温度は *Mycobacterium* は 37°C、*Nocardia* は 28°C とした。菌をとるための培養期間は十分な発育が得られ、かつなお陳旧化しない時期 (可及的対数期後半に相当する時期を期待した) を選んだ。すなわち、*Nocardia* および *M. phlei* および *M. smegmatis* では 7 日、*M. kansasii*、*M. avium* および *M. scrofulaceum* では 14 日、*M. tuberculosis* および *M. bovis* では 21 日とした。

後述するごとく *Mycobacterium* および *Nocardia* の核酸抽出法としていかなる方法が適切かという問題は困難な問題を含んでいる。しかし、このような問題にとり組むこと自体が本報の目的ではないので、以下に使用した方法をやや詳細に記述して参考に供する。

前処置。1% 小川培地に発育した菌を白金耳でとつて、パラフィン紙にのせて秤量する。Schneider 法および Ogur-Rosen 法の測定用としてのおおの湿菌量 200~400mg (平均 300mg) の菌をとり、ガラス製遠心管に入れて、蒸留水 4ml を加えてガラス棒で菌塊を壊しながらかきまぜ 3,000 r. p. m. 10 分遠心する。上清を捨てて再び蒸留水を加え、これを 3 回繰り返して最後に沈渣をとる。

なお、*Nocardia* では培地材料を被検材料にもちこまぬため、発育した菌の上部をとるにとどめる。1% 小川培地は 1 標本の測定用として 20 本用意した。

Schneider 法

(1) 沈渣に 5°C に冷した 10% TCA (三塩化酢酸) 4ml を加え、ガラス棒で混和しながら 10 分抽出し、3,000 r. p. m. 10 分遠心して上清をとる (混和、遠心の方法は以下すべて同じ)。これを 2 回繰り返して、上清 2 回分を合して「冷 TCA 可溶画分」とする。

(2) 沈渣に純 ethanol 4ml を加え 10 分間 2 回抽出する。更に ethanol-ether (1:1) 混液 4ml を加え 3 分間煮沸 2 回抽出する。以上の抽出画分を合して「脂質画分」とする。

(3) 5% TCA 4ml を加え、80°C 15 分抽出を 2 回繰り返す。2 回分の抽出液を合して「核酸画分」とする。

(4) 以上の抽出残渣に2% NaOH 4mlを加え、100°Cに5~10分加熱し、残渣を溶解させて、「蛋白画分」とする。

以上の画分の中で、核酸画分をDNAおよびRNAの比色定量に、蛋白画分を蛋白の比色定量に用いる。標準曲線に入らない時は、抽出液を適宜希釈し、後で希釈倍数を乗じて補正する。

Ogur-Rosen 法

(1) 5% 氷冷過塩素酸 4ml で5分抽出を2回繰り返す。2回の抽出液を合して「冷過塩素酸可溶画分」とする。

(2) ethanol-ether (1:1) 混液 4mlを加え3分間煮沸抽出2回を繰り返す。更に95% ethanol 4mlで10分間抽出3回を繰り返す。以上の抽出液を合して「脂質画分」とする。

(3) 5% 氷冷過塩素酸 4ml で5分間抽出2回。この画分は棄却する。

(4) 10% 過塩素酸 4mlを加え氷室(5°C)で18時間抽出する。更に10% 氷冷過塩素酸を加えて10分抽出する。以上の抽出液を合して「RNA画分」とする。

(5) 10% 過塩素酸 4mlを加えて80°Cで30分間抽出2回。2回分の抽出液を合して「DNA」画分とする。

Table 1. DNA Content of Various Species of the Genus *Mycobacterium* Determined by Schneider Method and Ogur-Rosen Method

Species	Schneider		Ogur-Rosen	
	$\mu\text{gDNA}/\text{mg protein}$	Ratio RNA/DNA	$\mu\text{gDNA}/\text{mg protein}$	Ratio RNA/DNA
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Ra	109.5 ± 5.4	3.80	97.2 ± 4.3	0.79
<i>M. bovis</i> BCG	131.8 ± 6.9	2.70	81.9 ± 10.3	0.98
<i>M. kansasii</i> Forbes-84	90.4 ± 11.6	3.52	152.0 ± 21.8	0.63
<i>M. kansasii</i> Bostrum D-35	91.4 ± 17.2	3.34	135.0 ± 27.3	0.76
<i>M. avium</i> A-71	79.6 ± 15.3	2.09	154.7 ± 10.4	0.64
<i>M. avium</i> 3717	94.2 ± 11.2	2.99	106.7 ± 16.3	1.32
<i>M. scrofulaceum</i> P-5	115.7 ± 5.4	2.55	176.5 ± 14.3	0.62
<i>M. scrofulaceum</i> P-6	111.4 ± 11.2	2.21	177.3 ± 41.4	0.74
<i>M. phlei</i> SN 101	97.0 ± 3.3	2.76	70.2 ± 12.6	0.72
<i>M. phlei</i> SN 102	124.6 ± 13.0	2.43	75.3 ± 4.4	0.55
<i>M. smegmatis</i> SN 1	106.7 ± 14.2	2.63	87.4 ± 11.6	0.57
<i>M. smegmatis</i> Jucho	98.2 ± 7.3	2.85	79.2 ± 14.5	0.67

The DNA content is a mean of three determinations on different samples and its standard deviation.

Table 2. DNA Content of Various Species of the Genus *Nocardia* Determined by Schneider Method and Ogur-Rosen Method

Species	Schneider		Ogur-Rosen	
	$\mu\text{gDNA}/\text{mg protein}$	Ratio RNA/DNA	$\mu\text{gDNA}/\text{mg protein}$	Ratio RNA/DNA
<i>N. polychromogenes</i> M-1	47.8 ± 13.1	5.22	35.7 ± 5.8	1.18
<i>N. polychromogenes</i> M-6	53.8 ± 10.8	6.27	50.7 ± 5.5	1.51
<i>N. asteroides</i> R#399	91.4 ± 8.2	3.83	74.0 ± 12.2	0.84
<i>N. asteroides</i> R#443(1)	108.0 ± 14.1	2.40	64.7 ± 10.5	0.62
<i>N. farcinica</i> W-3409B	75.4 ± 4.7	3.22	55.4 ± 3.6	1.14
<i>N. farcinica</i> R#3318	103.5 ± 14.2	2.21	67.6 ± 3.7	0.70
<i>N. brasiliensis</i> M-145	139.4 ± 15.9	3.28	183.2 ± 7.1	0.64
<i>N. brasiliensis</i> M-146	64.4 ± 9.0	3.95	58.0 ± 6.4	1.65
<i>N. brasiliensis</i> R#405	187.4 ± 4.2	2.23	251.5 ± 13.0	0.46
<i>N. brasiliensis</i> R#887	125.6 ± 18.2	4.88	133.2 ± 5.1	1.11
<i>N. caviae</i> R#1291	129.9 ± 14.9	2.96	176.3 ± 13.1	0.72
<i>N. caviae</i> R#1315	90.4 ± 12.0	4.57	97.4 ± 20.6	0.82

The DNA content shown in table is a mean of three determinations on three different samples and its standard deviation. Strains with letter M were received from Dr. I. Uesaka, Kyoto University, which had been the collection of Dr. N.M. McClung, University of South Florida. Strains with letters R and W were received from Dr. Ruth E. Gordon, Rutgers University. Strains shown as *N. farcinica* were received as *N. asteroides*, but were identified as *N. farcinica* in this laboratory.

Table 3. Effect of Fractionation Method on the DNA Content in Various Species of the Genus *Mycobacterium* and the Genus *Nocardia*

Relationship between the DNA content obtained by the Schneider method and the DNA content obtained by the Ogur-Rosen method	Genus or group	Species
Schneider > Ogur-Rosen	Very slowly growing mycobacteria	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i>
Schneider < Ogur-Rosen	Slowly growing mycobacteria	<i>M. kansasii</i> <i>M. avium</i> <i>M. scrofulaceum</i>
Schneider > Ogur-Rosen	Rapidly growing mycobacteria	<i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i>
Schneider \geq Ogur-Rosen	<i>Nocardia</i>	<i>N. polychromogenes</i>
Schneider > Ogur-Rosen	<i>Nocardia</i>	<i>N. asteroides</i> <i>N. farcinica</i>
Schneider \leq Ogur-Rosen	<i>Nocardia</i>	<i>N. brasiliensis</i> <i>N. caviae</i>

(6) 残渣に 2% NaOH 4 ml を加えて煮沸 5~10 分で溶解し、「蛋白画分」とする。

(Ogur-Rosen 法の原法では、脂質画分の抽出に chloroform 抽出の過程がある。しかし *Mycobacterium* では、chloroform 抽出を行なうと菌体が管底に付着して以後の操作が著しく困難となる。このため、chloroform 抽出過程を省略して Schneider と類似の脂質抽出法を採用した)。

結果および考察

DNA 量測定値と分画法の関係

得られた成績は表 1 および表 2 に一括して示した。まず注目されるのは、DNA 量測定値 ($\mu\text{gDNA}/\text{mg protein}$) が分画法に Schneider 法を用いるか Ogur-Rosen 法を用いるかによって著しく異なり、しかも菌種または菌群によって一定の傾向がみられたことである (表 3)。

Mycobacterium。まず *Mycobacterium* についてみるのに、被検 *Mycobacterium* は DNA 測定値に及ぼす分画法の影響で 3 群に分かつことができる (表 1 および表 3)。

M. tuberculosis および *M. bovis* では Schneider 法の測定値が Ogur-Rosen 法の測定値よりも大きい (*M. bovis* BCG では t-test で有意差 ($P < 5\%$) が認められる。以下、有意差の検定は t-test により、危険率 5% 以下で有意差を示す)。

次の群は、*M. kansasii*, *M. avium*, *M. scrofulaceum* で、この群では Schneider の測定値の方が Ogur-Rosen 法の測定値よりも小さい。しかも、被検株 6 株中、*M. avium* 3717 を例外として 5 株に有意差が認められる。

第 3 群は、発育の速い抗酸菌すなわち *M. phlei* と *M. smegmatis* で、前者とは逆に Schneider 法の値の方が Ogur-Rosen 法の値よりも大きい。被検 4 株中 *M.*

smegmatis Jucho を例外として 3 株に有意差が認められる。

以上の比較で有意差の認められなかつたのは 3 株だけであるが、これらも有意差がなかつたとはいえ、同じ傾向を示している。

Nocardia。 *Nocardia* でも分画法の DNA 抽出量に及ぼす影響は菌種によって一定の傾向がみられた (表 2 および表 3)。

N. polychromogenes (2 株) では Schneider 法の測定値の方が Ogur-Rosen 法の測定値よりも大きい値を示したが有意差ではない。

N. asteroides および *N. farcinica* では、Schneider 法の測定値の方が Ogur-Rosen 法の測定値より大きい (被検 4 株ともに有意差を示す)。

N. brasiliensis および *N. caviae* では逆に Ogur-Rosen 法の測定値の方が Schneider 法の測定値よりも大きいまたは大差がない (被検 6 株中 *N. brasiliensis* M-145, R#405 および *N. caviae* R#1291 では有意差を示して Ogur-Rosen 法の測定値の方が大きい、他の株では有意差はみられなかつた)。

DNA の測定値が Schneider 法と Ogur-Rosen 法とで異なる原因は、おそらく前者では三塩化酢酸、後者では過塩素酸が使用されるためと思われる。この 2 つの方法で DNA の抽出比が異なる原因は、菌種によって細胞壁または細胞膜の構造が異なるため、あるいは菌種によって DNA と蛋白との結合状態が異なるためなどの可能性が考えられる。

RNA 含有量は両者の測定法により著明な差がみられ、Schneider 法の方が Ogur-Rosen 法よりも高い値を与える。これは Schneider 法では RNA の抽出が熱三塩化酢酸抽出で行なわれるのに対して、Ogur-Rosen 法では冷過塩素酸 18 時間処理によるためと思われる。しか

し両者の得失を論じることは本報の目的ではないので結果を記録するとどめる(表1および表2参照)。

DNA 量測定のカテゴリ学に対する害与

上述のごとく、DNA 含有量測定値は Schneider 法による場合と Ogur-Rosen 法による場合とで異なるので、両者別々に考える必要がある。

Schneider 法による測定値についてみると、*Mycobacterium* の DNA 含有量は比較的好く似ており菌種差が少ないことが注目される。被検 12 株(7 菌種)で、*M. bovis* BCG と *M. avium* A-71 の 2 株が例外的に他のあるものに対して有意差を示す他は、互いに有意差がない。(2 株が例外になった原因は危険率 5% の方に入った実験誤差とも考えられるが、我々の用いる方法自体が、核内 DNA も細胞質内 DNA も「一緒くた」にした測定法なので、ここに例外をあまり深く詮索しても意味がないと思われる)

これに対して、*Nocardia* では菌株差が目立ち、特に *N. polychromogenes* 2 株の DNA 量が少ないのが注目される。この両株の DNA 量は *N. brasiliensis* M-146 以外のすべての *Nocardia* の DNA 量に対して有意差を示している。

Ogur-Rosen 法の測定値でみると、*Mycobacterium* の DNA 含有量は、発育速度による群別と一致して差があるように思われる。

発育の最も遅い *M. tuberculosis* および *M. bovis* とは一群をなして DNA 含有量が比較的小で、発育速度の中等度の *M. kansasii*, *M. avium* および *M. scrofulaceum* の含有量は高く、発育の速い *M. phlei* および *M. smegmatis* の含有量は低い(表1)。第2の群の6株の DNA 含有量は、第1群および第3群に対して有意差を示して大である(ただし *M. avium* 3717 と *M. tuberculosis* H₃₇Ra の間だけは例外で有意差ではない)。

一方、*Nocardia* では、*N. brasiliensis* M-146 だけを例外として2群に分かたれ、第1群の *N. polychromogenes*, *N. asteroides* および *N. farcinica* では DNA 含有量が比較的低く、第2群の *N. brasiliensis* および *N. caviae* では比較的高い(表2)。

以上の結果からみると、DNA の測定法自体に問題が残っているが、Schneider 法よりも Ogur-Rosen 法の測定値の方が、菌のカテゴリ学に一定の関係を示し、役に立ちそうに思われる。また DNA の測定値自体の他に、分画法の DNA 測定値に与える影響も注目すべき現象のように思われる。なぜならば、分画法の DNA 測定値に与える影響が、菌種によつて一定しているらしく思われるからである。このような現象は、菌種によつて細胞壁また

は細胞膜の構造が異なるとか、DNA と蛋白との結合状態とが異なるとかの原因のために、三塩化酢酸または過塩素酸処理によつて受ける影響が菌種によつて異なるために起こるのかもしれない。

結 論

1 DNA 抽出のための細胞分画法として、Schneider 法(DNA 抽出に三塩化酢酸使用)を用いるか、または Ogur-Rosen 法(DNA 抽出に過塩素酸使用)を用いるかによつて、DNA 測定値が異なる。この分画法の影響は、菌種によつて一定しているらしく思われる。*M. tuberculosis* および *M. bovis* では Schneider 法で DNA 測定値が大となり、*M. kansasii*, *M. avium* および *M. scrofulaceum* では Ogur-Rosen 法で大となる。*M. phlei* および *M. smegmatis* では Schneider 法で大となる。*Nocardia* では *N. asteroides* および *N. farcinica* では Schneider 法で測定値が大となり、*N. brasiliensis* および *N. caviae* では逆に Ogur-Rosen 法で測定値が大となるかまたは大差を示さなかつた。

2. Schneider 法の DNA 測定値は、*Mycobacterium* では菌種、菌株による差が少なく、互いに近似の値を示したが、*Nocardia* では菌株差が大であつた。特に *N. polychromogenes* の DNA 含有量が低い値を示した。

3. Ogur-Rosen 法の DNA 値は、*Mycobacterium* では、発育の速い *M. phlei* および *M. smegmatis* で低く、発育の遅い *M. kansasii*, *M. avium* および *M. scrofulaceum* で高く、発育の非常に遅い *M. tuberculosis* および *M. bovis* で低かつた。一方、*Nocardia* は DNA 含有量により2群に大別され、*N. asteroides*, *N. farcinica* および *N. polychromogenes* は低い値を、*N. brasiliensis* および *N. caviae* は高い値を示した。Ogur-Rosen 法で得られた DNA 値の方が菌のカテゴリ学と関係がありそうに思われた。

文 献

- 1) Tsukamura, M.: Jap. J. Microbiol., 5: 255, 1961.
- 2) Schneider, W.C.: J. Biol. Chem., 161: 293, 1945.
- 3) Ogur, M. & Rosen, G.: Arch. Biochem., 25: 262, 1950.
- 4) Dische, Z.: Mikrochemie, 8: 4, 1930.
- 5) Kerr, S.E. & Seraidarian, K.: J. Biol. Chem., 159: 211, 1945.
- 6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.H., Farr, A.L. & Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.