

## カナマイシンを作用させた結核菌の電子顕微鏡的研究

有路文雄・山口淳二・岡 捨己

東北大学抗酸菌病研究所

発行 昭和45年10月22日

ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF TUBERCLE BACILLI  
TREATED WITH KANAMYCIN\*

Fumio ARIJI, Junji YAMAGUCHI and Sutemi OKA

(Received for publication October 22, 1970)

The earlier biochemical studies on the acting mechanism of kanamycin, one of aminoglycoside antibiotics, have revealed that kanamycin acts on the ribosomes and inhibits the protein synthesis, and also causes a damage of the cell membrane and a decrease of the activities of respiratory enzymes in the bacterial cells. In this study, the fine structures and sites of activities of respiratory enzymes in the tubercle bacilli treated with kanamycin were investigated with electron microscope.

*Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra cultivated in Dubos' medium for 7 days was incubated in the medium containing kanamycin (10 mcg/ml) at 37°C for 24 and 48 hours. Succinic dehydrogenase activity was demonstrated by the method of Sedar and Burde using tetranitro-blue tetrazolium (TNBT) and succinate. Cytochrome oxidase activity was demonstrated by the amine method of Burstone. The specimens were fixed in 1% OsO<sub>4</sub> buffered with acetate-veronal buffer of Michaelis (pH 6.1). The fixed cells were treated in 0.5% uranyl acetate, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Epon 812 according to Luft.

In the tubercle bacilli treated with kanamycin, the cytoplasm appeared to be coarse. The fine granular structures of ribosomes were not obvious. The homogeneous, slightly dense, large granules and the vacuoles were occasionally observed in the cytoplasm. These morphological changes of the cytoplasm may be explained by the degeneration of ribosomes affected by kanamycin and the inhibition of the formation of ribosomes caused by the inhibition of the protein synthesis.

The mesosomes appeared to be poorly organized or to be broken into fragments. Enzyme activities of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase, as evidenced by the deposition of dense reaction products, were located on the mesosomes, but a remarkable decrease of enzyme activities was demonstrated in the kanamycin-treated cells. These cytochemical findings were also found to be consistent with the results of biochemical determinations. Accordingly, in the case of tubercle bacilli, it is reasonable to suppose that the degeneration or the abortive formation of mesosomes occurs under the influence of kanamycin, and that the mesosomes are essential to the activities of respiratory enzymes and the growth of the cells. The elongated membrane structures, occasionally to the proximity of the large dense granules and the vacuoles, were also observed in the cytoplasm. These membrane structures may correlate with the appearance of the large granules and the vacuoles.

\* From the Research Institute for Tuberculosis, Leprosy and Cancer, Tohoku University, Hirose-machi, Sendai 980 Japan.

## I. 緒 言

カナマイシン (KM) は梅沢ら (1957)<sup>1)</sup>により *Str. kanamyceticus* の培養濾液より抽出された広域スペクトラムの抗生物質で、各種の細菌に作用し結核菌に対しても強い抗菌作用を持っている。ストレプトマイシン (SM) 等と同じくアミノ糖類抗生物質で、その作用機序に関しては菌体内にとりこまれた後リボソーム (ribosome) 系における蛋白の合成を阻害するものと考えられている<sup>2)-4)</sup>。また、現在では二次的变化と考えられているが、細胞膜の損傷<sup>5)</sup>や呼吸酵素活性の低下<sup>6)</sup>も SM で古くから知られている事実である。

しかしこれらの薬剤が結核菌に及ぼす影響を形態学の面から追求した研究報告はきわめて少ない。KM の直接の作用効果を菌体の微細構造の面から認識することは困難かもしれないが、KM の作用によつて起こる一連の菌体の変化を超微形態学の面から把握することにより、作用機序の理解を助け、また菌体の微細構造と機能の関連性について理解を深めることが可能ではないかと考え、本研究を試みた。すなわち発育阻止に十分な濃度で KM を作用させた人型結核菌 *H<sub>37</sub>Ra* 株で超薄切片を作製し、微細構造の変化について電子顕微鏡観察を行なった。また超細胞化学的技法を用いてコハク酸脱水素酵素およびチトクローム酸化酵素の活性を検出し、これらの酵素活性とメソゾーム (mesosome) に及ぼす影響を電子顕微鏡下に観察した。コハク酸脱水素酵素の変化についてはさらに whole cell のレベルで、生成された formazan を抽出し、比色法による検討も行なった。

## II. 実験材料および方法

### (i) 使用菌株および KM による処理の方法

Dubos 培地に 7 日間培養した人型結核菌 *H<sub>37</sub>Ra* 株を用い、培養液中に終末濃度が 10 mcg/ml になるように KM (硫酸カナマイシン) を加え、37°C で 24 時間および 48 時間菌を浸漬した。

### (ii) 電子顕微鏡的観察法

上記処理を行なった菌を遠心集菌し、Michaelis の酢酸ペロナル緩衝液 (pH 6.1) で 2 回洗浄、Kellenberger らの方法<sup>7)</sup>に準じて 1% OsO<sub>4</sub> で 4°C で、3 日間固定、その後 0.5% 酢酸ウラニールで 1 時間処理したうえで、エタノール系列で脱水、Epon 812 を主剤とする Luft の方法<sup>8)</sup>で包埋し、Porter-Blum MT-I 型ミクロームで切片を作製して日立 HU-11B 型電子顕微鏡 (加速電圧 75 kV) で観察、撮影を行なった。

### (iii) 呼吸酵素活性の検出法

KM の処理を受けなかつた対照菌および 10 mcg/ml の KM を 48 時間作用させた菌については直接超薄切片の作製を行なったほか、次のごとくコハク酸脱水素酵素

およびチトクローム酸化酵素の細胞化学的処理を行なつたうえで超薄切片を作製し電子顕微鏡による観察を行なった。

### a) コハク酸脱水素酵素活性の細胞化学的検出法

主として Sedar らの方法<sup>9)</sup>に従つた。すなわち 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 2 回洗浄した菌を、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 11.25 ml, 0.8 M コハク酸ソーダ 3.75 ml, 1 mg/ml の割りに蒸留水に溶解した tetranitro-blue tetrazolium (TNBT) 15 ml からなる反応液に 37°C で 20 分間浸漬、反応させた。

### b) チトクローム酸化酵素活性の細胞化学的検出法

Burstone の amine 法<sup>10)</sup>に準じて行なつた。すなわち 0.2 M トリス緩衝液 (pH 8.1) で 2 回洗浄した菌を、*p*-amino-diphenylamine 15 mg, *p*-amino-*p'*-methoxy-diphenylamine 12 mg, 0.2 M トリス緩衝液 (pH 8.1) 15 ml, 蒸留水 35 ml からなる反応液に 37°C で 30 分間浸漬、反応させた。

a) b) の処理を行なつた菌をそれぞれの反応液に用いた緩衝液で 3 回洗浄した後、上記 (ii) の方法に従い固定、包埋した。

細胞化学的方法と平行して、比色法を用いて whole cell のレベルで formazan の生成度を比較検討した。TNBT の formazan は各種の有機溶媒に不溶性で抽出困難なため、TNBT の代りに triphenyltetrazolium chloride (TTC) を用いた。すなわち当量の KM 作用菌および対照菌を TNBT の代りに TTC を含む上記 a) の反応液と同様組成の反応液に 37°C で 20 分間浸漬し、生成された TTC-formazan をそれぞれ *n*-butanol で抽出し、光電比色計 (Hitachi Perkin-Elmer 139) を用い波長 490 mμ で比色した。

## III. 実験成績

KM による処理を受けなかつた結核菌 (対照菌) の微細構造と呼吸酵素の活性部位

図 1 は無処置の人型結核菌 *H<sub>37</sub>Ra* 株の超薄切片像で従来の報告<sup>11)</sup>にみられるものとはほぼ同様の所見を呈している。すなわち最外層の細胞壁に接してその内側に細胞質膜が存在し、菌体内部には微細な線維状構造を示す核が存在していて、その外側をリボソームの微細な顆粒によつて充たされた細胞質がとりまいている。菌体中央において蜂巣状のいわゆるメソゾームと呼ばれる膜構造が細胞質内にみられる。このメソゾームは明らかに細胞質膜と連絡しており、メソゾームと細胞質膜は連続した一つの "unit membrane" から成立つていることを示している。また核との接触も保たれている。

図 2 は KM による処理を受けなかつた結核菌でコハク酸脱水素酵素活性部位検出の細胞化学的処理を行なつたものの超薄切片像であり、図 3 はチトクローム酸化酵

素活性部位検出の細胞化学的処理を行なったものの超薄切片像である。既報<sup>11)~13)</sup>のごとく、コハク酸脱水素酵素の活性部位を示す TNBT-formazan の aggregate はメソゾームに一致して顕著に観察され、一部細胞質膜にも認められた。またチトクローム酸化酵素の活性部位も前者とはほぼ同様であり、図3にみるごとく反応産物の dense deposit がメソゾームに一致して観察され、一部細胞質膜にも認められた。

#### KM で処理した結核菌の微細構造

図4は 10 mcg/ml の KM で 24 時間処理した人型結核菌 H<sub>37</sub>Ra 株の超薄切片像であり、図5~7は同じ濃度でさらに 48 時間処理した菌の超薄切片像を示している。

10 mcg/ml の濃度で KM を 24 時間作用させた菌では一般にあまり著明な変化はみられなかつたが、ときには図4にみるごとくリボゾームの顆粒構造が消失し、細胞質は一部 homogeneous にみえ、また一部においては coarse にみえ細胞質の欠損がみられた。このような菌においては典型的なメソゾームの構造は少なく、メソゾームの構造は単純で organization の低下が認められた。

KM (10 mcg/ml) を 48 時間作用させた菌の切片像をみると、細胞質は一般に compact でなくなり不規則な粗大顆粒状を呈し、リボゾームの顆粒構造は失われている。またしばしば図5および図6に示すように変性した細胞質の aggregate と思われる大きな dense granule がいくつか観察された。さらに変化の著しい菌体では空胞状に細胞質の大きな欠損がみられた(図7)。KM を 48 時間作用させた菌ではこのように細胞質の変化が顕著であるが、同時にメソゾームの変化も著明になっている。すなわち organize されたメソゾームは少なく、メソゾームの構造は単純で、あるいはまた unit membrane が単層または多層になつて細胞質内に伸長し、しかもしばしば細胞質内に出現した dense granule や空胞の部位に接して伸長している像が観察された(図5~7)。変化の著しい場合は構成単位膜が短棒状に切断され、膜の断片を認めるのみで、かろうじてメソゾームの存在が見分けられる程度に変化している(図6, 7)。しかしいずれの場合も細胞壁、核の構造はよく保たれており、細胞質膜にも認むべき変化はみられなかつた。

#### KM で処理した結核菌における呼吸酵素の活性

図8に示す切片像は 10 mcg/ml の濃度で KM を 48 時間作用させた人型結核菌 H<sub>37</sub>Ra 株でコハク酸脱水素酵素活性の細胞化学的検出を行なったものである。メソゾームの内部の構造は比較的良好に保たれているが、これらを包む共通の外膜に断裂がみられ、メソゾームの構造に一部崩壊、欠損が起こっている。このメソゾームにおいてはごく一部分だけ electron dense であつて、対照菌のメソゾーム(図2)と比較して formazan の沈着の

度合いが著しく低下している。

図9は前者と同様に KM を作用させ、その後チトクローム酸化酵素活性の細胞化学的検出を行なった人型結核菌 H<sub>37</sub>Ra 株の切片像である。メソゾームの内部の構造は一部を除いてほとんど欠損しており、これらを包む共通の外膜には断裂がみられ、その一端が細胞質内に長く伸びている。このように organization の欠損が著明であるが、このメソゾームにおいてはチトクローム酸化酵素の活性を示す反応産物の dense deposit がほとんどみられない。

以上のように超細胞化学的研究によつて、KM で処理された結核菌ではメソゾームの organization の低下ないしは欠損に伴つて、膜系に結合してみられるコハク酸脱水素酵素およびチトクローム酸化酵素活性の著明な低下が電子顕微鏡で明瞭に認められた。これらの実験成績をさらに検討する目的で、生成された formazan を抽出して whole cell での formazan の生成量を比較した。すなわち当量の対照菌および KM 作用菌から得られた TTC-formazan を光電比色計を用い波長 490 m $\mu$  で測定した結果、吸光度はそれぞれ 0.18 : 0.06 であつた。この実験成績からも KM で処理した菌では対照菌と比較して著明に formazan の生成が低下していることが明らかであつた。

#### IV. 考 察

SM や KM などのアミノ糖類抗生物質が細菌の蛋白合成系に及ぼす影響については miscoding の現象<sup>14)15)</sup>がよく知られている。すなわちリボゾームの 30S 部分とくに 23S core 蛋白に作用し<sup>16)~20)</sup>, aminoacyl-tRNA とリボゾーム(30S 部分)の結合を阻害し<sup>21)~23)</sup>, codon-anticodon の interaction が阻害されて miscoding が起こり、菌体内に異常蛋白が蓄積するものと考えられている。一方、近年 Luzzatto ら<sup>24)25)</sup>は殺菌効果を示すに十分な濃度で大腸菌に SM を作用させると、polyribosome や 50S および 30S のリボゾームは消失し、70S の不可逆的な monosome (str-monomer) がつくられることを明らかにし、SM で ribosome cycle が阻止され蛋白合成が初期段階で阻害される可能性が示された。

KM を作用させた結核菌の微細構造で特徴的なことは細胞質の変化である。リボゾームの顆粒構造は失われ、細胞質は一部 homogeneous にみえ、あるいは coarse となり細胞質の崩壊、欠損がみられる。このような細胞質の変化は KM の作用によつて起こる直接的なリボゾームの変性、崩壊、あるいはまた蛋白合成の阻害からリボゾームの生成が阻害されるためではないかと考えられる。

メソゾームもまた著明な影響を受け、organization の

低下ないしは欠損がみられ、機能の面では少なくとも呼吸酵素活性の低下が明らかである。しかし結核菌の膜系には呼吸酵素のほか、ATPアーゼや酸性フォスファターゼの活性も検出され<sup>11)13)</sup>、そのほかメソゾームについては細胞壁の合成<sup>26)~28)</sup>あるいは核酸代謝への関与<sup>29)~31)</sup>等多様な機能が考えられており、ここに得られたメソゾームの変化を明確に意味付けすることは困難である。蛋白合成の阻害作用によつてメソゾームの構造蛋白および酵素蛋白に合成阻害が起こっているのかもしれない。また蛋白合成に膜が関与している可能性<sup>32)33)</sup>についても考慮しておく必要があるかもしれない。しかしメソゾームの変化はKMだけでなく他の抗結核剤の作用によつてもみられる現象<sup>34)~36)</sup>で、KMにのみ特異的なものとは言いがたいようである。一般に菌体の増殖が阻止されるような代謝異常に伴つてメソゾームの生成が阻害され、あるいは変性が起こるのではなからうか。いずれにせよメソゾームのdisorganizationに伴い膜系に結合した呼吸酵素の活性が著明に低下していることはこれらの酵素活性が膜系のorganizationと密接な関連を有することを示しており、メソゾームが菌体生理のうえで非常に重要な要素であることを示唆しているものと思われる。

またしばしば細胞質の変性、欠損部位に接して膜系が層状に伸長している像が観察されたが、この現象はメソゾームの単なる形成不全や変性とは異なり、膜系の多様な機能の一面を示しているように思われる。すなわち異常代謝産物あるいは変性物質の出現に対応してなんらかの反応を示しているようであり、一つの適応の現象とも考えられる。

## V. 結 語

アミノ糖類抗生物質で蛋白合成阻害剤の一つであるKMを作用させ、発育阻止の状態におかれた結核菌で微細構造の変化と呼吸酵素活性の変化について電子顕微鏡観察を行なつた。

KM作用菌においてはリボゾームの顆粒構造は消失し、細胞質の変性、欠損がみられた。同時にメソゾームのdisorganizationと呼吸酵素の活性の低下が観察された。細胞質の変化についてはKMの作用による直接的なリボゾームの変性、崩壊と蛋白合成の阻害によるリボゾームの生成阻害が考えられた。メソゾームと呼吸酵素の活性の変化については必ずしも明確な理解は得られなかつたが、蛋白合成の阻害により菌の発育が阻止された状態ではメソゾームに形成不全あるいは変性の起こることが明らかであり、さらに膜系に結合した呼吸酵素の活性がメソゾームのorganizationと密接な関係にあつて、菌体生理のうえでメソゾームの果たす役割りがきわめて大きいことが示唆された。また膜系が菌の異常状態に対応して適応を示しているような所見も得られた。

以上のようにKMを作用させた結核菌で得られた超微形態学的知見は従来の生化学的知見とよく一致しており、さらに膜系の機能を理解するうえでもいくつかの貴重な知見が得られた。

## 文 献

- 1) Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, R., Osato, Y., Nitta, K. and Takeuchi, T.: *J. Antibiotics*, 10A: 181, 1957.
- 2) Weisblum, B. and Davies, J.: *Bacteriol. Rev.*, 32: 493, 1968.
- 3) Schlessinger, D.: *Bacteriol. Rev.*, 33: 445, 1969.
- 4) 田中信男: *日本細菌学雑誌*, 24: 169, 昭44.
- 5) Anand, N. and Davis, B. D.: *Nature*, 185: 22, 1960.
- 6) Hancock, R.: *J. Gen. Microbiol.*, 25: 429, 1961.
- 7) Kellenberger, E., Ryter, A. and Séchaud, J.: *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 4: 671, 1958.
- 8) Luft, J. H.: *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 9: 409, 1961.
- 9) Sedar, A. W. and Burde, R. M.: *J. Cell Biol.*, 27: 53, 1965.
- 10) Burstone, M. D.: *Enzyme Histochemistry and its Application in the Study of Neoplasm*, Academic Press Inc., New York, 1962.
- 11) Arijji, F., Yamaguchi, J., Fukushi, K. and Oka, S.: *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.-C*, 15: 88, 1968.
- 12) Yamaguchi, J., Arijji, F. and Fukushi, K.: *Electron Microscopy, Vol. II.* edited by Uyeda, Maruzen Co. Ltd., Tokyo, 1966, p. 249.
- 13) 山口淳二・有路文雄・福士主計・岡捨己: *J. Electron Microscopy*, 15: 262, 1966.
- 14) Davies, J., Gilbert, W. and Gorini, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 51: 883, 1964.
- 15) Davies, J., Gorini, L. and Davis, B. D.: *Mol. Pharmacol.*, 1: 93, 1965.
- 16) Davies, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 51: 659, 1964.
- 17) Cox, E. C., White, J. R. and Flasks, J. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 51: 703, 1964.
- 18) Staehelin, T. and Maselson, M.: *J. Mol. Biol.*, 19: 207, 1966.
- 19) Traub, P., Hosokawa, K. and Nomura, M.: *J. Mol. Biol.*, 19: 211, 1966.
- 20) Masukawa, H., Tanaka, N. and Umezawa, H.: *J. Antibiotics*, 21: 517, 1968.
- 21) Pestka, S., Marschall, R. and Nirenberg, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 53: 639, 1965.
- 22) Kaji, H. and Kaji, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 54: 213, 1965.
- 23) Kaji, H., Suzuka, I. and Kaji, A.: *J. Biol. Chem.*, 241: 1251, 1966.
- 24) Luzzatto, L., Apirion, D. and Schlessinger,

- D.: Proc. Natl. Acad. Sci., 60: 873, 1968.
- 25) Luzzatto, L., Apirion, D. and Schlessinger, D.: J. Mol. Biol., 42: 315, 1969.
- 26) Fitz-James, P. C.: J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 8: 507, 1960.
- 27) Van Iterson, W.: J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 9: 183, 1961.
- 28) Higgins, M. L. and Schockman, G. D.: J. Bacteriol., 101: 643, 1970.
- 29) Fitz-James, P. C.: Bacteriol. Rev., 29: 293, 1965.
- 30) Wolstenholme, D. R., Vermeulen, C. A. and Venema, G.: J. Bacteriol., 92: 1111, 1966.
- 31) Ryter, A.: Bacteriol. Rev., 32: 39, 1968.
- 32) Schlessinger, D., Marchesi, V. T. and Kwan, B. C. K.: J. Bacteriol., 90: 456, 1965.
- 33) Moore, L. D., Kocun, F. J. and Umbreit, W. W.: Science, 154: 1350, 1966.
- 34) Arijji, F. and Yamaguchi, J.: J. Electron Microscopy, 18: 228, 1969.
- 35) 山口淳二・有路文雄・真所弘一・岡捨己: 結核, 44: 449, 昭 44.
- 36) 山口淳二・有路文雄・真所弘一・岡捨己: 医学のあゆみ, 72: 69, 昭 45.

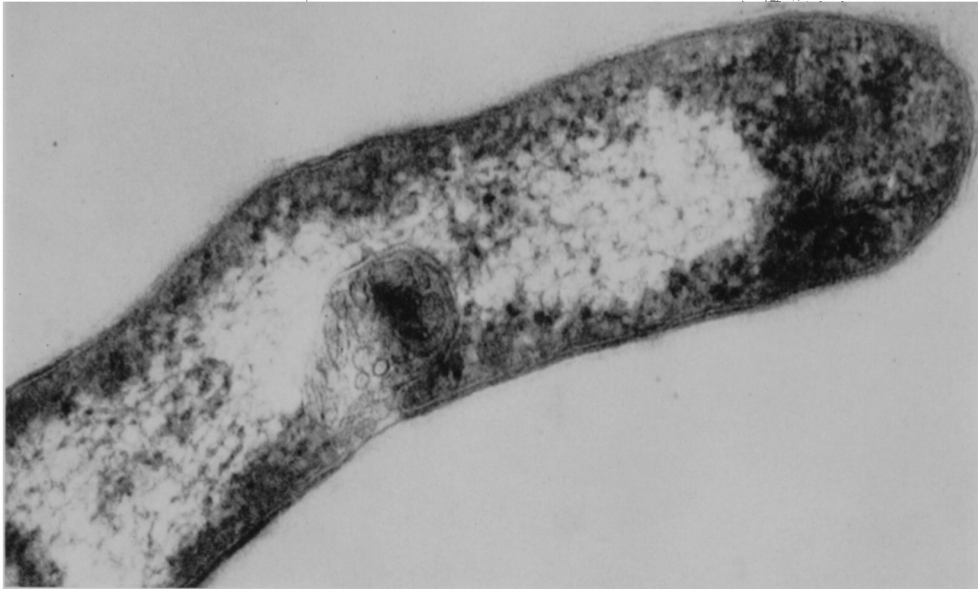


Fig. 1. Section of untreated *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra. The cytoplasm is filled with fine granules of ribosomes. A vesicular mesosome with surrounding membrane which is continuous with the cytoplasmic membrane is seen in the central portion of the cell. ×95,000



Fig. 2. *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra incubated in a medium containing TNBT and succinate. The formazan of TNBT, indicating the activity of succinic dehydrogenase, is localized on the mesosome. ×120,000



Fig. 3. *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra incubated in a medium containing *p*-amino-diphenylamine and *p*-amino-*p*'-methoxy-diphenylamine. Dense deposits of final product, indicating the activity of cytochrome oxidase, are localized on the mesosome. ×90,000



Fig. 4. *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra treated with kanamycin (10 mcg/ml) for 24 hours. The cytoplasm appears to be coarse and partially to be homogeneous. The mesosomes are poorly organized.  $\times 92,000$



Fig. 5. *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra treated with kanamycin (10 mcg/ml) for 48 hours. The cytoplasm appears to be coarse. The homogeneous, slightly dense, large granules are seen in the cytoplasm. The disorganization of mesosomes and the elongation of the membrane, as lamellae, to the proximity of the dense granules are also observed.  $\times 100,000$

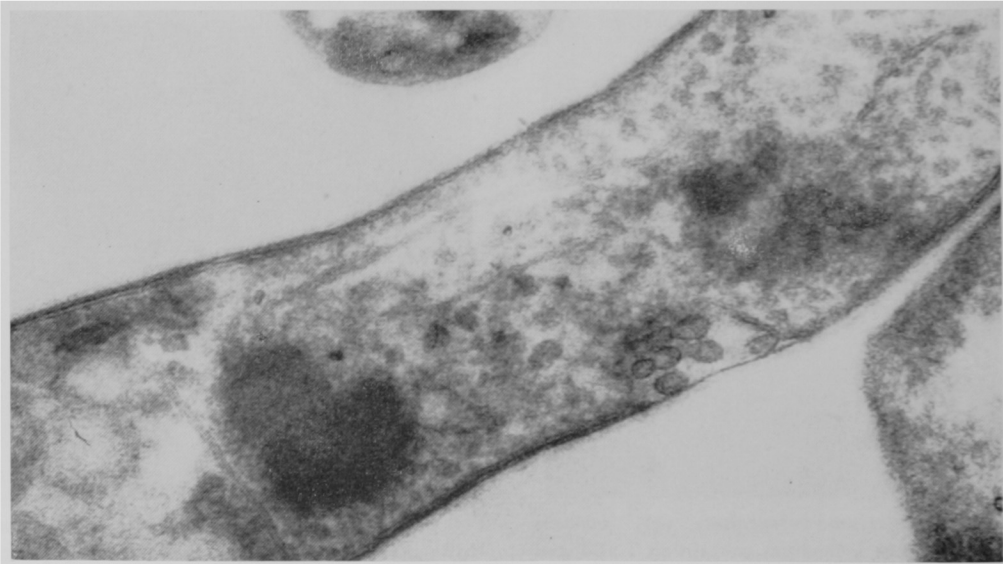


Fig. 6. *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra treated with kanamycin (10 mcg/ml) for 48 hours. The cytoplasm appears to be coarse. The large dense granules are seen in the cytoplasm. The mesosomes appear to be broken into fragments, and to be elongated to the proximity of the dense granules.  $\times 92,000$

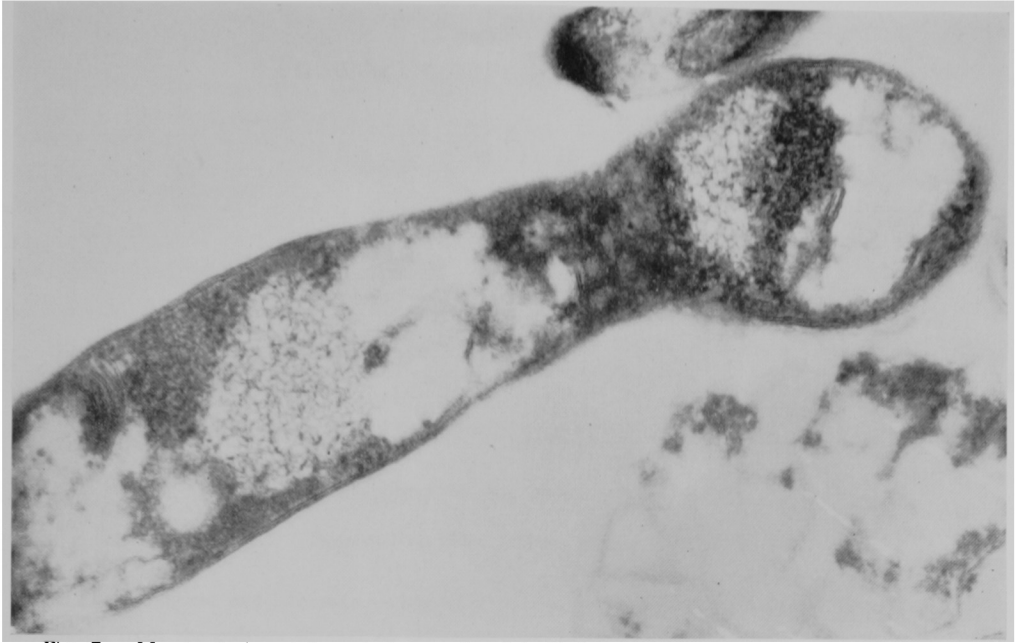


Fig. 7. *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra treated with kanamycin (10 mcg/ml) for 48 hours. The vacuoles and the elongated membrane structures are seen in the cytoplasm. The membrane structures appear to be related with the vacuoles. ×53,000

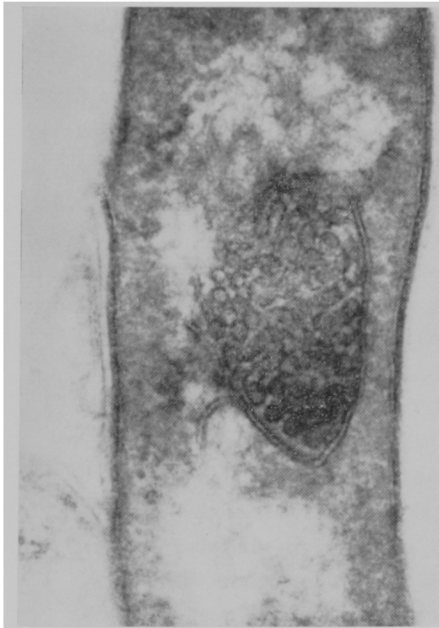


Fig. 8. *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra treated with kanamycin (10 mcg/ml) for 48 hours and incubated in a medium for the demonstration of the activity of succinic dehydrogenase as described in the explanation of Fig. 2. The mesosome appears to be disrupted. The deposits of TNBT-formazan are not obvious except on a portion of the mesosome. ×96,000



Fig. 9. *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H<sub>37</sub>Ra treated with kanamycin (10 mcg/ml) for 48 hours and incubated in a medium for the demonstration of the activity of cytochrome oxidase as described in the explanation of Fig. 3. The mesosome appears to be highly disrupted. The deposits of reaction product are scarcely observed. ×91,000