

原 著

非定型抗酸菌 P 6 (暗発色菌) のミコール酸について

佐 藤 博・荒 井 秀 夫・横 沢 厚 信

本 宮 雅 吉・今 野 淳

東北大学抗酸菌病研究所

矢 野 郁 也

関西医科大学医化学

受付 昭和 48 年 12 月 5 日

MYCOLIC ACID OF SCOTOCHROMOGENIC MYCOBACTERIA, P 6*

Hiroshi SATO, Hideo ARAI, Atsunobu YOKOZAWA,

Masakichi MOTOMIYA, Jun KONNO

and Ikuya YANO

(Received for publication December 5, 1973)

An α -mycolic acid was isolated from P 6, a strain of scotochromogenic mycobacteria, and its chemical structure was established. This acid consisted of 80 carbons and had two of cyclopropane-rings. The entire structure of this α -mycolic acid was found to be similar to those from *M. kansasii* and *M. phlei*.

緒 言

ミコール酸は炭素 2 の位置に側鎖をもち、同じく 3 の位置に水酸基を有する高分子の脂肪酸であり、結核菌体から抽出される毒性物質として知られるコードファクター、アジュバント活性その他の種々の生物活性を有するロウ D の構成成分として重要な役割を果している。ミコール酸はミコバクテリア、コリネバクテリア、ノカルディアから抽出され、これらの菌に特有であると考えられているが、古川、矢野らは質量分析を用いて、*Achromobacter euriidice* にもミコール酸類似の脂酸が存在することを報告している。ミコバクテリアについては現在まで、種々の菌株についてそのミコール酸の構造が明らかにされているが、暗発色菌についてはまだ報告がないので以下の実験を行った。

実 験 方 法

1. 抽出と精製

ソートン培地に 4 週発育の暗発色菌 P 6 を濾過、水洗後、Etémadi¹⁾の方法に従い、5%メタノール性 KOH でレフラックス下に 4 時間加熱し、塩酸を加えて溶液を酸性とした後、エーテルを加えて可溶画分を集め、このエーテル層に 2 倍量のメタノールを加えて 4°C におき生じた沈殿を遠心により集め、上清は濃縮した後再びエーテルに溶かし、2 倍量のメタノールを加え、4°C で生じる沈殿を集めた。集めた沈殿はもう 1 度エーテルに溶かして、2 倍量のメタノールを加えてできた沈殿をメタノールで洗い、これを粗ミコール酸とした。かくして得られた粗ミコール酸はジアゾメタンによりメチルエステルとしたのち、ケイ酸カラムを用いたカラムクロマトグラフィーを行った。溶出ははじめに石油エーテル、ついでベンゼンの含有度をしだいに上げた石油エーテル：ベンゼンの混液で行い、薄層クロマト上、4 つのスポットが認められたが、今回は石油エーテル：ベンゼン (65:35) で溶

* From the Research Institute for Tuberculosis and Leprosy, Tōhoku University, Sendai, Miyagi Pref. 980 Japan.

Table. Column Chromatography of Methylesters of α -mycolic Acid

Fraction	Eluted with 50ml of :	Yields (mg)	Results of TLC
1~34	PE-PE : Bz (75 : 25)	59	
35~42	PE : Bz (70 : 30)	7	
43・44	" (65 : 35)	6	Pré- α
45・46	" (")	13	Pré- α
47~58	" (")	122	α
59~63	" (60 : 40)	12	α
64~73	" (55 : 45)	10	
74~77	" (50 : 50)	4	
78~83	" (")	37	α, α'
84~100	" (")	141	α'
101~111	" (45 : 55)	34	α'
112~116	" (40 : 60)	10	α'
117~123	" (35 : 65)	3	
124~128	" (30 : 70)	19	α', β
129~139	" (")	197	β
140~148	" (20 : 80)	29	β
149~156	" (10 : 90)	13	β
160~165	Bz	2	
166~170	Bz-Ether (50 : 50)	Trace	
Total		708	

PE : Petroleum ether
Bz : Benzene

出された画分を調整用薄層クロマトグラフィーで精製した。薄層クロマトグラフィーの展開溶媒および発色は、Lanéelle²⁾の方法に準じて、*n*-ヘキサン：エーテル(85：15)で3回展開後、ロードミンBで発色させた。かきとつたシリカゲルGからの抽出にはエーテルを用い、ロードミンBはフロリジルを通すことにより除いた。薄層クロマトグラフィーはスポットが単一になるまで繰り返した。

2. 分析方法

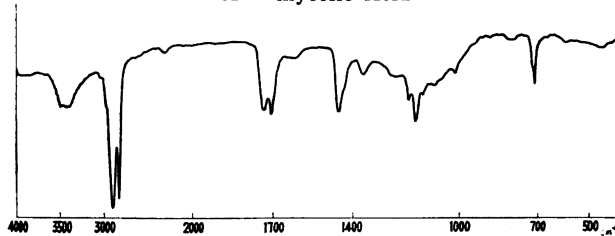
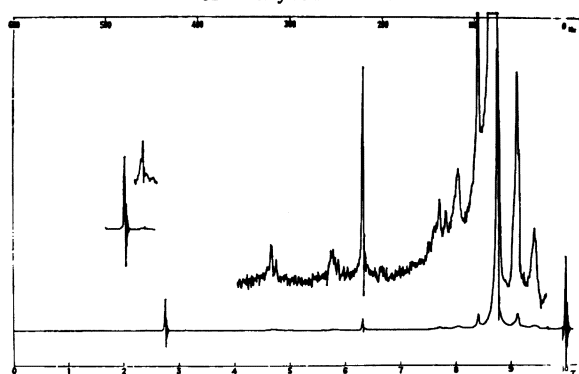
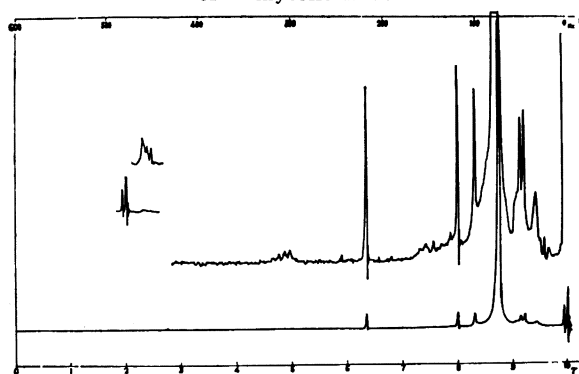
赤外吸収スペクトラムにはミコール酸メチルエステルをKBrディスクとして用いた。

核磁気共鳴スペクトルの測定は日立-パーキンエルマー R 20 型装置を使用し、CDCl₃ 溶液中に溶解した物質を、テトラメチルシランを内部標準として行つた。アセチル化にはピリジンと無水酢酸を用い、赤外吸収スペクトル上、遊離水酸基の吸収が認められないことを確認した。

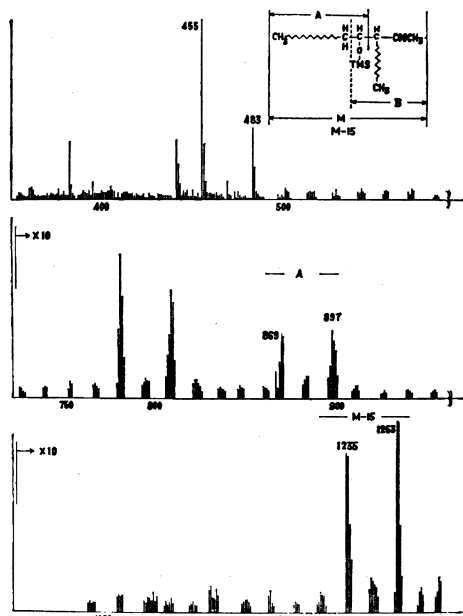
質量分析は島津-LKB 9000 を用い、電圧は 22.5 eV とした。TMS には bis-trimethylsilylacetamide を用いた。

結 果

ケイ酸カラムを用いたクロマトグラフィーの結果は表のごとくで、石油エーテル中のベンゼンの濃度を上げる

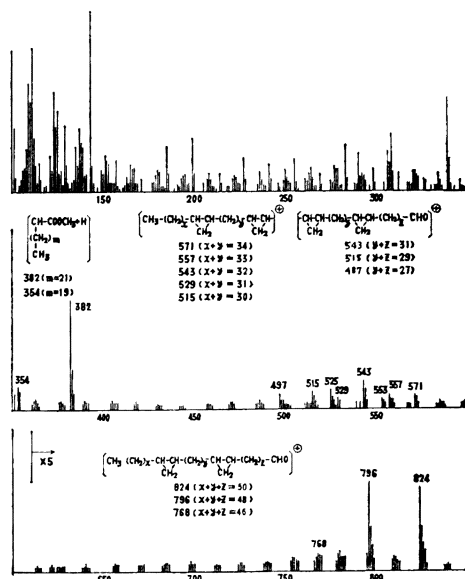
Fig. 1. Infra-red Spectrum of Methylester of α -mycolic AcidFig. 2. NMR Spectrum of Methylester of α -mycolic AcidFig. 3. Spectrum of Acetylated Methylester of α -mycolic Acid

に従つて薄層クロマト上認められる4つの画分が溶出された。今回の実験で分析に用いた α ミコール酸メチルエステルは全体の35%を占め、白色粉末で、融点は44~46°Cであつた。元素分析の結果は、C₈₁H₁₅₈O₃にはほぼ一致した。赤外吸収スペクトル(図1)では遊離水酸基に由来する吸収のほか、3060, 1030 cm⁻¹にサイクロプロパン環を示す吸収が認められ、核磁気共鳴スペクトル(図2)上、9.42 τ , 10.3 τ にシグナルがあり、サイクロプロパン環の存在が示唆され、6.4 τ にみられる、メチルエステルのメチルプロトンに由来するシグナルの面積と比較することによりサイクロプロパン環は2つ存在することが推測された。二重結合を示すシグナルは認められなかつた。図3はアセチル化されたメチルエステルの核磁気共鳴スペクトルである。遊離の水酸基のアセチル

Fig. 4. Mass Spectrum of Trimethylsilyl Derivatives of Methyleneester of α -mycolic Acid

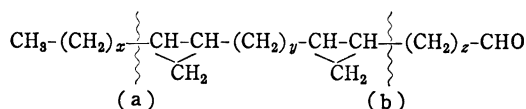
化により、8.0 τ に新しいシグナルが出現しており、これは前述の6.4 τ のシグナルとその面積を比較することにより、アセチル化をうける水酸基は1つであることがわかる。

図4, 5に質量分析の結果を示した。炭素2と3の間の開裂を防ぎ、分子イオンピークを捕える目的で、遊離水酸基をトリメチルシリル (TMS) 化した場合のスペクトルが図4で、 $m/e=1235$, 1263 にピークがあり、これはM-15に相当する。したがってミコール酸メチルエステルは、もともと $C_{81}H_{168}O_9$ および $C_{83}H_{182}O_9$ であると考えられる。また $m/e=382$ に大きなピークが認められ、これは炭素2と3の間の開裂とそれに伴う分子の再配列によつて生じた $C_{28}H_{47}COOCH_3$ と考えると、骨格部には二重結合2つかサイクロプロパン環2つが存在すると考えられるが、赤外吸収、核磁気共鳴スペクトルを参考にして、サイクロプロパン環2つが存在すると考えられる。次に骨格部にあるサイクロプロパン環の位置を知るために、TMS化をしないメチルエステルそのままのマススペクトル(図5)をみると、炭素2と3の間の開裂によつて生じるエステルのピークが $m/e=382$ と356に認められ、これらのピークは $C_{28}H_{47}COOCH_3$, $C_{22}H_{45}COOCH_3$ に由来すると考えられる。アルデヒド部分に由来するピークとして $m/e=768$, 796 と824に大きなピークがみられ、これらはそれぞれ $C_{55}H_{106}O$, $C_{56}H_{108}O$ および $C_{57}H_{110}O$ であることが示唆される。アルデヒドから H_2O がとれたM-18も弱いながら認められる。 $m/e=515$, 543 , 571 に認めら

Fig. 5. Mass Spectrum of Methyleneester of α -mycolic Acid

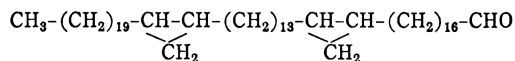
れる一連のピークは $C_{36}H_{67}O+C_{37}H_{71}$, $C_{38}H_{71}O+C_{39}H_{75}$ および $C_{40}H_{75}O+C_{41}H_{79}$ に由来するものと考えられる。

アルデヒド部分の構造を次のように考えると、

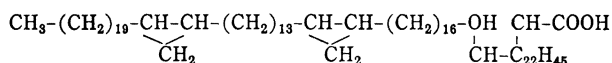


(a) および (b) のところで開裂が生じたと考えられ、(a) による開裂で $C_{36}H_{67}O$, $C_{38}H_{71}O$, $C_{40}H_{75}O$ が生じ、(b) による開裂で $C_{37}H_{71}$, $C_{39}H_{75}$, $C_{41}H_{79}$ が生じることになる。このアルデヒド部分のスペクトルで $m/e=796$, $m/e=543$, 571 を主ピークと考えると、 $x+y+z=48$, $x+y=32$, $y+z=29$ となり、これらの式から $x=19$, $y=13$, $z=16$ となる。

開裂により生じたエステルのピークが単一ではないことからわかるように、アルデヒド部分の長さも単一でなく同族体と考えられるが、最も重要なアルデヒドは、



と考えられ、以上のべた分析結果から、P6の α ミコール酸の構造は



を主とする同族体であると考えられる。

考 案

Anderson⁹⁾が1938年にミコール酸を抽出してから、種々の抗酸菌のミコール酸の構造について多くの論文が

発表されている⁴⁾⁵⁾。なかでも Etémadi の系統的な研究が高く評価されている。薄層クロマトグラフィーと核磁気共鳴、質量分析を中心とする機器分析の発達、純粋な物質の抽出と正確な構造の決定のうえに大きな役割を果たしている。滴定によつていた分子量の測定がマススペクトルの応用により正確さが著しく向上し、コリネバクテリア、ノカルディアを含む抗酸性菌特有と考えられていたミコール酸が、*Achromobacter euridice* にも存在することが明らかにされた⁶⁾。

結核菌のミコール酸については、人型菌では炭素2の位置の側鎖は $C_{24}H_{49}$ であることが知られ、それ以外では $C_{22}H_{45}$ であると報告されている。P6 の場合も $C_{22}H_{45}$ であつた。

菌体またはロウCをケン化しエーテル可溶画分からメタノール沈殿によって得られる粗ミコール酸は、メチルエステルとして薄層クロマトグラフィーを行うと4つのスポットが認められ、Etémadi⁷⁾ はこれらを pré- α 、 α 、 α' および β と名付けている。このうち pré- α はどの菌株についても収量は微量で、分析はあまり行われていないが、Etémadi⁸⁾ は Test 株の pré- α が α ミコール酸の立体異性体であることを認めている。今回の実験では pré- α は収量が少なく、分析できなかつた。薄層クロマトグラム上、時々 α' と β のスポットの上に接して小さなスポットが認められることがあつたが、おのおの α' 、 β の異性体である可能性もあるが検討を加えていない。

P6 の α ミコール酸に類似のものは *M. kansasii*⁹⁾、*M. phlei*¹⁰⁾ にも報告されており、暗発色菌 P6 の分類上の位置から言つてもこれらの菌株に近いことがうかがわれる。

(本論文の要旨は仏文にて、Tohoku J. Exp. Med. に掲載される予定である)

文 献

- 1) Etémadi, A. H., Gasche, J. and Sifferlen, J.: Bull. Soc. Chim. Biol., 47 : 631, 1965.
- 2) Lanéelle, G.: C. R. hébd. Séanc. Acad. Sci. (Paris) 257 : 781, 1963.
- 3) Stodola, F. H., Lesuk, A. and Anderson, J.: J. Biol. Chem., 126 : 505, 1938.
- 4) Asselineau, J.: The bacterial lipids, Hermann, Paris, p. 122, 1966.
- 5) Lederer, E.: Chem. Phys. Lipids, 1 : 295, 1967.
- 6) 古川佳也・野田庸二郎・楠瀬正道・矢野郁也: 第29回実験結核研究会総会, 1972年10月(大阪).
- 7) Etémadi, A. H.: Bull. Soc. Bot., 47, 1965.
- 8) Etémadi, A. H.: Chem. Phys. Lipids, 1 : 165, 1967.
- 9) Etémadi, A. H., Miquel, A. M. and Lederer, E.: Bull. Soc. Chim., 3247, 1964.
- 10) Lamonica, G. Etémadi, A. H.: C. R. Acad. Soc. (Paris), 264 : 1711, 1967.