

原 著

ミコバクテリアにおける薬剤耐性の研究—実験材料と方法

増 田 国 次*・山 田 毅

大阪大学微生物病研究所

(*現所属: 結核予防会大阪府支部)

受付 昭和 51 年 7 月 10 日

STUDIES ON DRUG RESISTANCE IN MYCOBACTERIA

—Materials and Methods—

Kunitsugu MASUDA** and Takeshi YAMADA

(Received for publication July 10, 1976)

The details of the experimental procedures used in the previous report (Kekkaku: 51, 399, 1976) were described about the preparation of the supernatant fractions, the ribosomes and ribosomal subunits, the poly(U)-directed polyphenylalanine synthesis and the binding of ³H-dihydrostreptomycin.

1. ま え が き

前稿¹⁾において、われわれの研究結果を中心に抗酸菌における薬剤耐性の研究成果について総括的に述べた。これらの研究結果は、他の研究者により追試可能でなければならぬと考え、かつまた、各方面への応用を期待する立場から、本稿ではわれわれの実験方法を詳細に述べ、前稿の総説の補足としたい。

2. 使用菌株および培地

Mycobacterium smegmatis ATCC 14468 株および Rabinowitchi 株を使用した。培地は蒸留水 1 l 中に肉エキス(和光純薬工業製) 10g, ポリペプトン(大五栄養化学製) 10g, NaCl 2g, グリセリン 40ml を溶解し, pH を 7.0 に 10% NaOH で調整し, 200ml ずつ振盪培養用フラスコに分注したのち, 加熱滅菌した。

3. リボソームと可溶性画分の分画

M. smegmatis を 37°C にて振盪培養した。O. D. _{590nm} = 1.0~1.5 に達した時点 (exponential phase) で、遠

心 (10,000×g, 15分) により集菌し、菌塊を standard buffer^(注1) (10mM Tris-HCl, pH 7.8, 60 mM NH₄Cl, 6mM 2-mercaptoethanol, 10mM MgCl₂) で 3 回洗い、2 倍量の standard buffer に浮遊させ、音波^(注2) によって菌を破碎した。これを 20,000×g, 20分間遠心して、菌破片を除去し、更に 27,000×g (Sorval SS34 ローター, 15,000rpm), 30分間遠心を 2 回繰り返して、粗抽出液を得た。この粗抽出液を 104,500×g (Beckman Type 40 ローター, または日立 RP 40 ローター, 40,000 rpm) で、2 時間遠心し、リボソームと可溶性画分とに分離した。これらの操作はすべて 4°C で行なつた。

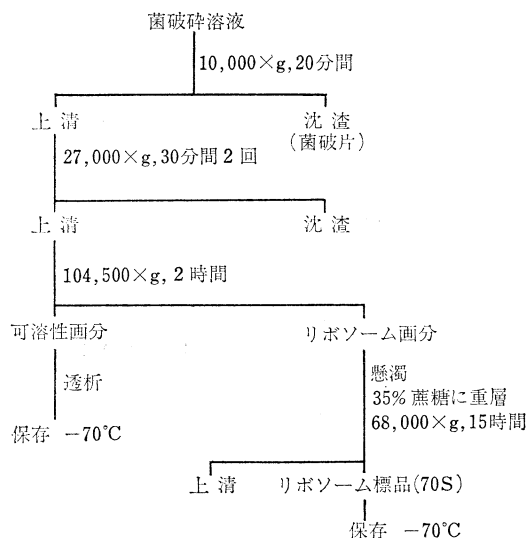
可溶性画分は 600 倍量の standard buffer に対し、24 時間透析したのち、0.5ml ずつ分注し^(注3)、-70°C に保存した。

一方、リボソーム画分は黄褐色を呈した透明な粘稠度の高いもので、少量の standard buffer を加えながら、もみくだくように懸濁した。これを蔗糖 (Sigma 製) を 35% 含む standard buffer 20 ml の上に静かに重層し、68,000×g (Beckman Type 30 ローター, または日立 RP 30 ローター, 20,000 rpm), 15 時間遠心し、リボソーム

** From the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Yamada-kami, Suita, Osaka 565 Japan.

Present address: Antituberculosis Association, Osaka Branch, Yokobori 2-19, Higashi-ku, Osaka 541 Japan.

図1 リボソーム・可溶性画分画法



を洗浄した。得られた沈渣は無色に近い透明なもので、少量の standard buffer に十分懸濁し、 -70°C に保存した(図1参照)。

われわれの経験では、2l の培養から、湿菌量で約 50 g の菌塊を得、およそ 4,000 O.D. $_{260\text{nm}}$ units の 70S リボソーム(注4)が得られた。

(注1) standard buffer 調整法

保存用として濃度が10倍で、 Mg^{++} を含まないものを調整しておく(concentrated solution)。

Conc. sol.

2M tris(hydroxymethyl)aminomethane (和光純薬工業製) pH7.8	75ml
NH_4Cl (和光純薬工業製)	24g
2-mercaptoethanol (和光純薬工業製)	7ml

蒸留水を加えて 1,500ml とする。

10mM Mg^{++} を含む standard buffer

Conc. sol.	50ml
1M MgCl_2 (半井化学薬品製)	5ml

蒸留水を加えて 500ml とする。

0.1mM Mg^{++} を含む standard buffer

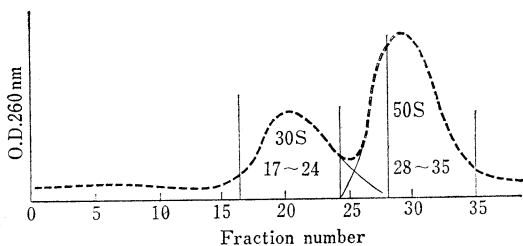
Conc. sol.	50ml
1M MgCl_2	50 μl

蒸留水を加えて 500ml とする。

(注2) 菌破碎法

Sonicator (大岳製作所製) を用いた。音波破碎の場合には温度上昇がみられるので、氷冷しながら、約2分間音波処理した後、温度を測定し、もし温度上昇がみられたら、十分に冷却した後音波処理を行なった。このような操作を数回繰り返す。

図2 リボソーム・サブユニットの分画



Polyphenylalanine 合成系には可溶性画分は大腸菌より分画したものをを用いたが、この場合には *M. smegmatis* に比して破碎しやすいので、菌塊を standard buffer で洗った後、等量の Alumina (500g の alumina を 0.5N HCl 1,000 ml に溶解し、1時間よくかくはんする。その後、1l の蒸留水で3回洗い、十分乾燥させておく) を徐々に加えながら乳鉢で十分に破碎(十分破碎されると粘稠度が増してくる)したのち、2倍量の standard buffer を加えた。

(注3) 分注量は1回の実験に使用するに足りる量であつて、いつたん溶解すると失活しやすい。

(注4) Sは沈降定数, Svedberg 単位で 10^{-13} (cm/sec)/(dyne/g) を示す。細菌から得られるリボソームは70Sで、溶媒の Mg^{++} 濃度を下げると30Sと50Sのサブユニットに可逆的に解離することが知られている。

4. リボソーム・サブユニットの分画

70S リボソームを 0.1mM MgCl_2 を含む standard buffer 9ml に溶解し、10~30%の蔗糖密度勾配(注1)をもつ 50ml 溶液に 3ml ずつ重層し、Spinco SW 25.2 ローター (Beckman) を用い、20,000 rpm, 16時間遠心し、1.2 ml ずつの分画の 260 nm の吸収を測定し、30Sと50Sのサブユニットに分けた。その一例は図2のごとくで、おのおのサブユニットについて再度蔗糖密度勾配遠心を行なうと、他のサブユニットの混入はほとんど認められなかつた。得られた30Sと50Sのサブユニットをおのおの集め、コロジオン・バッグ (Sartorius Membrane Filter G.M.B.H. 製) を用いて、減圧吸引しながら、10mM MgCl_2 を含む standard buffer を加えて、含まれる蔗糖の希釈を行ない、更に濃縮して、 -70°C に保存した。リボソームの濃度は 260 nm 吸収による optical density (O.D. $_{260\text{nm}}$ unit) で表した。

(注1) 蔗糖密度勾配遠心法

0.1mM Mg^{++} を含む standard buffer を用いて、10%と30%の蔗糖溶液を調整し、 4°C に保存しておく。Gradient former (Model 570, Instrumentation Specialties Co., Lincoln, Nebraska) を用いて、10~30%の直線

密度勾配を作製する。作製後は4℃に保存し、当日中に使用した。遠心後は Density Gradient Fractionator (Model 640, ISCO 製) にて分注しながら, Ultraviolet Analyzer (Model UA-2) で自動的に 260 nm の吸収を測定した。

5. Core particles と split proteins の分画と再構成

Traub ら²⁾ の原著に一部変更を加えて実験を行なった。

1) 分画法

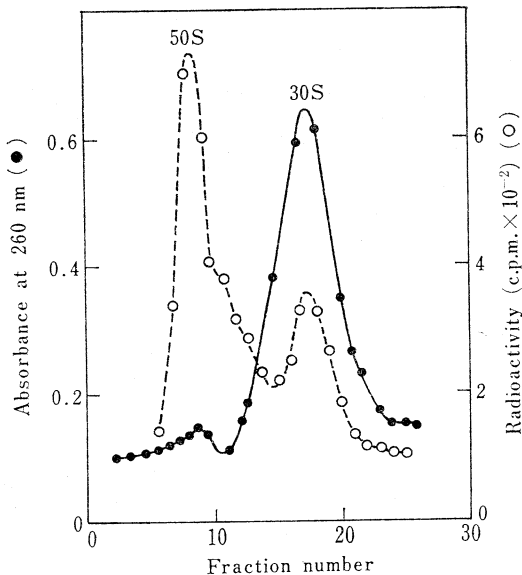
遠心用チューブ (Cellulose Nitrate Tube, Beckman, size, 1/2" dia. × 2") 中に次のものを含む。

2M Tris-HCl, pH 7.6	30μl
1M MgCl ₂	0.18ml
30 S サブユニット ^(注1)	2.25ml
CsCl (半井化学薬品製)	3.7 g

蒸留水を加えて 4.5ml とする。

これを SW 50L ローター (Beckman) を用い7℃で 39,000 rpm, 40時間遠心し, チューブの底に穴をあけ, 2滴ずつ分画した。各分画の一定少量を蒸留水に加えて, 260 nm の吸収を測定し, 吸収を示すピークを集めて保存した (Core particles)。一方, split proteins は遠心チューブの壁に付着して残るので, これを 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 30mM MgCl₂, 6mM 2-mercaptoethanol, 1M LiCl を含む溶液に溶解し保存した。

図 3 Core particles と split proteins とによる再構成 30S リボソーム・サブユニット



再構成させた 30S サブユニットと ¹⁴C ラベルしたリボソームを 2 × 10⁻⁴M MgCl₂ を含む standard buffer で希釈して蔗糖密度勾配遠心を行ない, O.D. 260nm (●) と放射能 (○) とを測定した。

2) 再構成法

得られた core particles と split proteins の各分画を混合し^(注1), 0.2M LiCl を含む standard buffer に20時間透析した。この結果, 図3に示すように, 30S サブユニットが再構成された。

(注1) 感受性株および耐性株 (30S サブユニットに耐性が局在) の30S サブユニットを 200~300 O.D. units 用い, 上記分画法によつて, core particles と split proteins とに分画した上で, それぞれを互いに交換して混合する。

6. Polyphenylalanine 合成系

Nirenberg³⁾ の原著に一部変更を加えて実験を行なった。

1) Mixture I の調整法

2M Tris-HCl, pH 7.8	10.0ml
2M NH ₄ Cl	5.0ml
6.66 × 10 ⁻² M adenosine triphosphate	3.0ml
2.0 × 10 ⁻³ M guanosine triphosphate	3.0ml
蒸留水	2.0ml

調整後, 5ml ずつに分注し, -20℃に保存した。

2) Mixture II の調整法

Mixture I	250μl
2-mercaptoethanol	1μl
7.5 × 10 ⁻² M phosphoenolpyruvate monopotassium salt (Sigma 製) ^(注1)	250μl
Phosphoenolpyruvate kinase (Sigma 製)	4μl
¹⁴ C-phenylalanine ^(注2)	25μl
蒸留水	275μl

次に示すように Mixture II は実験反応液 100μl 中に 30μl を含むので, 実験数に合わせてその都度調製する。

3) Polyphenylalanine 合成実験系

反応小試験管 (反応液 100μl) 中に次のものを含む。

Mixture II	30μl
Polyuridylic acid ^(注3)	10μl
0.1M MgCl ₂	5 または 10μl ^(注4)
リボソーム ^(注5)	3 O.D.
Transfer ribonucleic acid ^(注6)	5μl
大腸菌可溶性画分 ^(注7)	10μl
5mM spermine ^(注8)	5μl
抗生物質 ^(注9)	5 または 10μl
蒸留水を加えて 100μl とする。	

反応小試験管はすべて水中に置き, 上記成分を規定量混合の上 (一例を表1に示す), 37℃で45分間反応させたのち, 10%トリクロル酢酸 (TCA) (和光純薬工業製) 1ml を加えて反応を停止させ, 更に80℃で20分間加熱した。その結果生じた TCA 不溶性物質を, Whatman glass

表 1 Polyphenylalanine 合成実験プロトコールの一例*

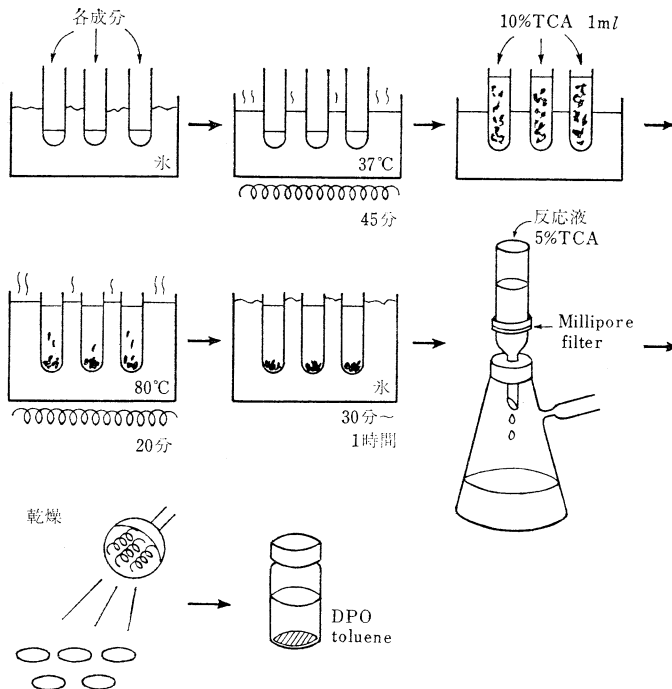
Tube No.	Mix II	Poly(U)	5mM Spermine	0.1M MgCl ₂	30 S	50 S	tRNA	Sup.***	VM	D. W.
1	30	0	5	10	S** 10	R** 10	5	10	0	20
2	30	10	5	10	10	10	5	10	0	10
3	30	10	5	10	10	10	5	10	10	0
4	30	0	5	10	R 10	S 10	5	10	0	20
5	30	10	5	10	10	10	5	10	0	10
6	30	10	5	10	10	10	5	10	10	0

* 数字の単位は μl で各チューブ合計 $100\mu\text{l}$ となる。

** S: 感受性株由来 R: 耐性株由来

*** 大腸菌可溶性画分

図 4 Polyphenylalanine 合成実験法



filter disc (GF/C) 上に集め、5% TCA で十分洗った後、フィルターを乾燥させ、放射能を液体シンチレーション・カウンターで測定した (図 4 参照。表 2 に実験成績の一例を示した)。

(注 1) Phosphoenolpyruvate monopotassium salt (PEP) の量を変えて反応させた結果を図 5 A に示した。

(注 2) ¹⁴C-phenylalanine 調整法

第一化学薬品より specific activity 322mCi/mM, 0.1 mCi 包装の製品を購入した。

¹⁴C-phenylalanine 500 μl

$4 \times 10^{-2}\text{M}$ ¹²C-phenylalanine 117 μl

蒸留水

1,383 μl

を混合することにより、 $100\mu\text{Ci}/5\mu\text{mole}/2\text{ml}$ の調整ができる。

(注 3) Polyuridylic acid (poly U) (Sigma 製)

10mg/ml の溶液として、 -20°C に保存しておく。

(注 4) Mg^{++} 濃度は 70 S リボソームを用いた場合と、30 S と 50 S サブユニットによる再構成リボソームを用いた場合とでは異なる⁴⁾。すなわち図 5 B に示すように、それぞれ 8mM, 15mM で最高の合成能を示す。実験系では 5mM, 10mM 相当量であるが、他の成分にも、 Mg^{++} が含まれている。

(注 5) リボソームは各小試験管に 70 S は 3 O. D. units,

30Sは1 O. D. unit, 50Sは2 O. D. units 加える。リボソーム調整時に濃縮または希釈を適宜に行なつて、5 μ l または 10 μ l 加えるとよいように調整しておく

表 2 Polyphenylalanine 合成に及ぼす VM の影響

50S	30S	VM (μ g/ml)	vic A*		vic B*	
			c. p. m.	%	c. p. m.	%
S**	S	0	3,616	100	1,466	100
S	S	0.5	1,346	37	145	10
S	S	1	519	14		
R**	R	0	5,422	100	3,064	100
R	R	0.5	5,273	97	2,661	87
R	R	1	4,948	91		
R	S	0	4,261	100	1,850	100
R	S	0.5	4,421	103	278	14
R	S	1	4,144	97		
S	R	0	3,825	100	1,956	100
S	R	0.5	548	14	1,532	78
S	R	1	488	13		

* *M. smegmatis* のクロモソーム上の locus 名で、その変異をもつ mutant を示す。

** S: 感受性株由来

R: 耐性株 (vic A または vic B) 由来

便利である。

(注6) Transfer ribonucleic acid (tRNA) (Miles 製)

10mg/ml の溶液として、-20°C に保存する。tRNA の必要量は図5Cに示すように、50 μ g で最高の合成能を示した⁴⁾。

(注7) 大腸菌可溶性画分

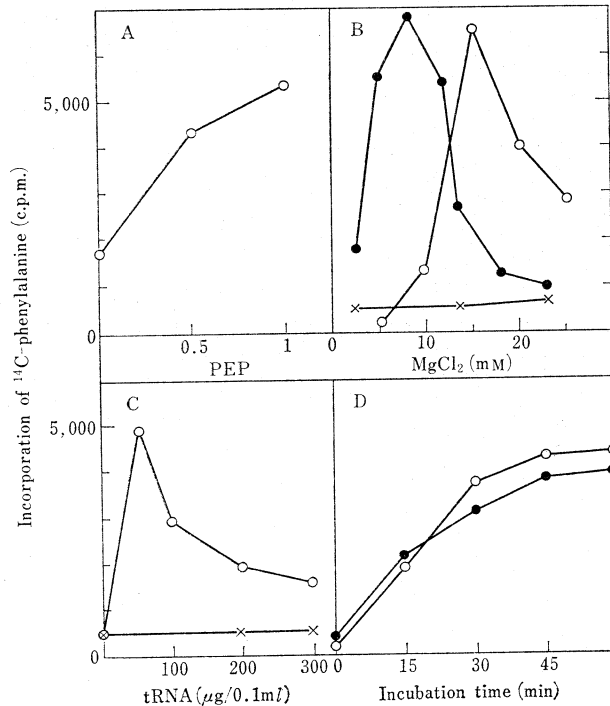
260nm の吸収値が25になるように調整して実験に供した。図5Dに示すように、*M. smegmatis* のリボソームに *M. smegmatis* の、または大腸菌の可溶性画分を用いても、同程度の合成能を示した⁴⁾。

(注8) Spermine, spermidine, putrescine などの polyamine を上記実験系に加えることによつて、低濃度 Mg⁺⁺ で最高の合成能があり、しかも ¹⁴C-phenylalanine の取り込みはより多くなる⁵⁾。

70S リボソームの場合は polyamine を加える順序は実験結果に影響を与えないが、サブユニットの再構成リボソームの場合は、最後に加える必要がある。

(注9) 抗生物質はあらかじめ 10 μ g/ml, 100 μ g/ml などの溶液を調整しておき、反応系に 5 μ l または 10 μ l 加えることによつて、最終濃度を 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g などとすることができる。

図 5 Polyphenylalanine 合成系における各種実験条件



- A. Phosphoenolpyruvate monopotassium salt (PEP) の量。実験に供した量を1としてあらわした。
- B. MgCl₂ 濃度。● 70S リボソーム。○ 30S と 50S サブユニットの再構成リボソーム。× 70S リボソームで poly U を含まない。
- C. tRNA 量。○ poly U を含む。× poly U を含まない。
- D. リボソームと可溶性画分。○ 両方ともに *M. smegmatis* 由来。● *M. smegmatis* リボソームと大腸菌可溶性画分。

表3 ^3H -dihydrostreptomycin のリボソームへの結合

Strain	^3H -dihydrostreptomycin bound	
	c. p. m.	%
<i>M. smegmatis</i> (parent)	7,143	100
VM-resistant E (SM low resistant)	4,073	57
VM-resistant M (SM high resistant)	522	7
VM-resistant A (SM high resistant)	501	7
VM-resistant O-1 (SM high resistant)	862	12

7. ジヒドロストレプトマイシンのリボソームへの結合実験

寺岡ら⁶⁾ および Chang ら⁷⁾ の方法に一部変更を加えて実験を行なった⁸⁾⁹⁾。

1) 結合能実験

反応小試験管(反応液 100 μl)中に次のものを含む。

Mixture ^(注1)	20 μl
^3H -dihydrostreptomycin ^(注2)	30 μl
リボソーム ^(注3)	3 O. D.

蒸留水を加えて 100 μl とした。

反応小試験管はすべて水中におき、上記成分を規定量混合の上、37°Cで10分間反応させたのち、氷冷した。これに緩衝液(50mM Tris-HCl, pH 7.8, 70mM KCl, 5mM MgCl₂) 2ml を加え、直ちに、Millipore Filter (孔径, 0.45 μm) 上にそそぎ、更に緩衝液 20ml で十分洗い、Filter を乾燥させたのち、液体シンチレーション・カウンターで放射能を測定した。

2) 抗生物質の影響実験

反応は次の2段階に分けて行なった。

a) 第1段階: 上記結合能実験と同様であるが、反応小試験管ごとの誤差をなくすために、20本相当分の反応を、同一試験管内で行なった。

Mixture	320 μl
^3H -dihydrostreptomycin	600 μl
リボソーム(親株由来)	60 O. D.

蒸留水を加えて 1.6ml とする。

反応小試験管を37°Cに10分間置き、リボソームに ^3H -dihydrostreptomycin を結合させた。

b) 第2段階: 上記反応液を水中におき、80 μl ずつに分注した。

反応液(第1段階)	80 μl
Mixture	8 μl
抗生物質 ^(注4)	5 または 10 μl
蒸留水を加えて 120 μl とした。	

これを37°Cで10分間さらに反応させたのち、緩衝液を 2ml 加え、直ちに結合能実験と同様に filtration を行ない、放射能を測定した。

(注1) Mixture の調整法

2M Tris-HCl (pH 7.8)	1.25ml
1M MgCl ₂	0.25ml
1M KCl	3.50ml

蒸留水を 5.0ml 加えて 10ml とする。

これを 20 μl 加えると反応液中では最終濃度が 50 mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 70mM KCl となる。

(注2) ^3H -dihydrostreptomycin の調整法

Dihydrostreptomycin- ^3H sesquisulphate を Radiochemical Centre より購入した。Specific activity 3.0 Ci/m mol, 2.1mCi/mg の包装であった。

^3H -dihydrostreptomycin	40 μl
cold dihydrostreptomycin (1mg/ml)	80 μl
蒸留水	880 μl

(注3) 3 O. D. が 5 μl または 10 μl 相当になるようあらかじめ調整しておく。親株とバイオマイシン耐性株での結合能実験結果の一例を表3に示した。

(注4) 抗生物質はあらかじめ 1mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml などの濃度の溶液として調整しておき、5~10 μl を加えた。

文 献

- 1) 山田毅・増田国次: 結核, 51: 399, 1976.
- 2) Traub, P. and Nomura, M.: J. Mol. Biol., 34: 575, 1968.
- 3) Nirenberg, M. W.: Methods in enzymology, vol. 6, Academic Press Inc., New York, p.17, 1964.
- 4) Yamada, T., Kawaguchi, K., Masuda, K., Shoji, K. and Hori, M.: Am. Rev. Resp. Dis., 106: 769, 1972.
- 5) Lee, K. J., Yamada, T. and Masuda, K.: Biken J., 19: 71, 1976.
- 6) Teraoka, H. and Tanaka, K.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 46: 93, 1972.
- 7) Chang, F. N. and Flaks, J. G.: Antimicrob. Ag. Chemother., 2: 294, 1972.
- 8) Masuda, K., Yamada, T. and Hori, M.: Biken J., 17: 33, 1974.
- 9) Masuda, K. and Yamada, T.: Biochim. Biophys. Acta, 435: 333, 1976.