

## 第54回総会特別講演

## 抗酸菌の微細構造

—核と細胞壁を中心に—

福 士 主 計

弘前大学医学部細菌学

受付 昭和54年8月24日

The 54th Annual Meeting Special Lecture

FINE STRUCTURE OF MYCOBACTERIA

—Nucleus and Cell Wall—

Kazue FUKUSHI\*

(Received for publication August 24, 1979)

The ultrastructure of mycobacterial cells including tubercle bacilli has been well studied with fruitful results. We have, however, little knowledge of mycobacterial nuclear chromosome and of localization of mycobacterial antigen. In this review, the results of our electron microscopic observations on the mycobacterial chromosomes and on the visualization of mycobacterial antigen were summarized.

1. Localization of mycobacterial antigen by the use of immunoferritin technique. Highly active IgG was obtained from rabbits immunized with *M. smegmatis* cells. The IgG was conjugated to the ferritin particles by the aid of 0.5% glutaraldehyde. Mycobacterial cells were agglutinated with the immunoferritin molecules and the cell-immunoferritin complexes were fixed, embedded and sectioned. The immunoferritin particles were shown to be combined with the outer layer of cell walls. It was clearly shown in another experiment that the immunoferritin particles were combined with the cell wall components isolated from the sonicated bacterial cells.

2. Ultrastructure of mycobacterial chromosome. Several species of mycobacteria, including *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra and H<sub>37</sub>Rv, BCG, *M. smegmatis*, streptomycin-resistant strain of *M. smegmatis* AC-5 and drugs-resistant strain of human tubercle bacillus, were converted into spheroplasts in a medium containing glycine and lysozyme. The spheroplasts thus prepared were spread on the surface of water according to the "one-step release" procedure introduced by Kleinschmidt. Single DNA fiber of double helix was observed in many preparations.

The length of DNA was 1,100~1,150  $\mu\text{m}$ , and the estimated genome size of *M. smegmatis* was  $2.15\sim 2.25 \times 10^9$  daltons. The replication forms were of *E. coli* type except for some strains of human tubercle bacilli. The polyribosome was observed along the active segment of DNA.

結核菌を含む抗酸菌の菌体構築物については、わが国にすぐれた研究の先達がおられたために、その研究水準

が極めて高く、抗酸菌特有の菌体構造の発見や、広く細菌に存在する菌体構造を抗酸菌において初めて見出した

\* From the Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Aomori Pref. 036 Japan.

業績も多い。抗酸菌において見出された構築物や、それらの生理的意義の解明が、抗酸菌以外の細菌の微細構造の理解にも、大きな寄与をしてきたといつてよい。

その中であつて、未だ充分明らかにされていない構造として核がある。また近年、抗酸菌の特徴的な免疫活性の大部分が、菌体の細胞壁画分に局在することが明らかにされ、癌の免疫療法の有力な手として臨床的に応用されつつある。そのため、細胞壁の抗原性を可視的にすることが形態学の立場から興味を持たれる。

私はここに、過去25年間にわたつてテーマとしてきた抗酸菌の微細構造の研究のあとをふりかえりながら、抗酸菌の細胞壁の抗原性を実際に目で見ることに、核を構成する染色体の微細構造を明らかにすることに中心をおいて述べたい。

### 1. フェリチン抗体法による抗原局在部位の観察

フェリチン抗体法は、抗原抗体反応の場を可視的にする免疫電子顕微鏡法の一つである。*M. smegmatis* の反復注射で得られた免疫家兎血清から DEAE セルロースカラムで IgG を分離精製し、Ouchterlony 寒天ゲル内沈降反応によつてその活性をたしかめたくて、フェリチン（2回結晶、カドミウムフリー、ICN Pharm. Inc., Cleveland, Ohio）と結合させた。フェリチン粒子と抗体との結合剤としてこの実験では 0.5% グルタルアルデヒド（Union Carbide）を用い、よい成績を得た。結合したフェリチン抗体を透析、洗浄、10万×g 2時間 2回沈殿したものを用いた。これと *M. smegmatis* 菌体とを反応させ、凝集反応をみたくて洗浄、固定、超薄切片を作製した。

図1はこのように作られた *M. smegmatis* の菌体の切片像である。フェリチン粒子が細胞壁表面に一列に付着している。いろいろな培養条件で、いろいろな切断方向について観察したが、ほぼ同様の電顕像が得られた。

フェリチン抗体は分子量約60万の巨大分子になっているので、細胞壁は通過できないと考えられ、これが細胞内部にフェリチン粒子のみられない原因という可能性もある。そこで、自己融解菌を観察したが、細胞壁の崩壊、断裂、剝離などが著しいにもかかわらず、細胞内部へのフェリチン付着は認められなかつた。

更に積極的に抗原の局在性を知るために、細胞壁画分とフェリチン抗体との反応を観察した。菌体を音波破壊し、10,000×g 沈渣に細胞壁画分（図2）を得て、この画分とフェリチン抗体との間に沈降反応を行ない、洗浄、固定、包埋、超薄切片を作製した。図3はその沈降反応産物の超薄切片像である。細胞壁にフェリチン粒子の付着がみられる。寒天ゲル内沈降反応の結果からも、抗原局在部位は細胞壁であることが確認された。抗酸菌の細胞壁の生化学的基本構造がミコール酸・アラビノガラク

タン・ムコペプチド複合体であつて、そのうち免疫活性の発現にエッセンシャルな因子は、ムコペプチド部分であることがすでに解明されているが、形態的にもこの事実は裏付けられた。

### 2. 染色体の微細構造

細菌の染色体を菌体の外に取り出して展開し、これを電子顕微鏡で観察する方法は、Kleinschmidt<sup>1)</sup> によつて考案され、微生物だけでなく、各種動物細胞にも応用されているが、抗酸菌ではまだ報告をみない。これは染色体を展開する前段階であるスフェロプラスト作成の技術が、抗酸菌では難しかつたことによる。この抗酸菌のスフェロプラスト化が、水口・徳永<sup>2)</sup> によるグリシン法の開発によつて成功し、私どもの染色体直接観察の道がひらけた。

私どもは、*M. smegmatis*, BCG, ヒト型結核菌 H<sub>37</sub>Ra および H<sub>37</sub>Rv, SM 耐性の *M. smegmatis* AC-5 (庄司宏教授、水口康雄教授より分与された)、および患者から分離された多剤耐性ヒト型結核菌などから染色体を遊出させ、その微細構造を電子顕微鏡で観察した。

これらの菌の Dubos 培地対数増殖期の菌体にグリシン（和光）を 1.5% 添加して培養を続け（菌種に応じて 2 ないし 24 時間）、集菌、生食水に懸濁後、リゾチーム（Sigma）200μg/ml、グリシン 1.5%、2M ショ糖 15% を加え、37°C 18 時間インキュベートして菌体をスフェロプラスト化した。ヒト型結核菌ではリパーゼ 300μg/ml の添加が、スフェロプラスト形成率を高めた。なお、抗酸菌のスフェロプラスト化は、サイクロセリン（Imaeda et al.<sup>3)</sup>）、メチオニン（Yabu et al.<sup>4)</sup>）によつても可能であることを知つた。

こうして得られたスフェロプラストを遠心集菌し、0.01% チトクローム c (Sigma) を含有する 1M 酢酸アンモニウム液に懸濁し、蒸留水面上に滴下して単分子膜を形成させた。展開した核酸を含むチトクローム c 単分子膜をグリッド膜上に載せ、白金または白金パラジウム（時にクロミウム）で回転シャドウイングして電子顕微鏡で観察した。

図4はこの方法で得られた *M. smegmatis* の電顕像である。1個の菌体からほぼ完全に染色体が放出されてひろがり、その線維をほぼ完全に追跡することができる。*M. smegmatis* の染色体 DNA は連続した1本の線維であつて、その線維はダブルストランドであることが、多数の写真から明らかになつた。図5も *M. smegmatis* の1例である。ほぼ完全に破裂し虚脱した1個の菌体から、放射状に染色体 DNA が伸展している。連続性の線維であることが明瞭に観察できる。

最も完全に近い状態で放出された染色体 DNA の長さを印画紙上で実測すると、1,100~1,150μm で、推定分

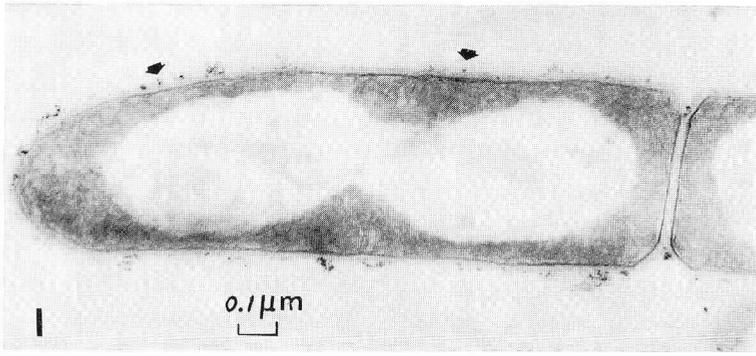


図1 フェリチン抗体法による *M. smegmatis* の切片像。矢印はフェリチン抗体の付着を示す。

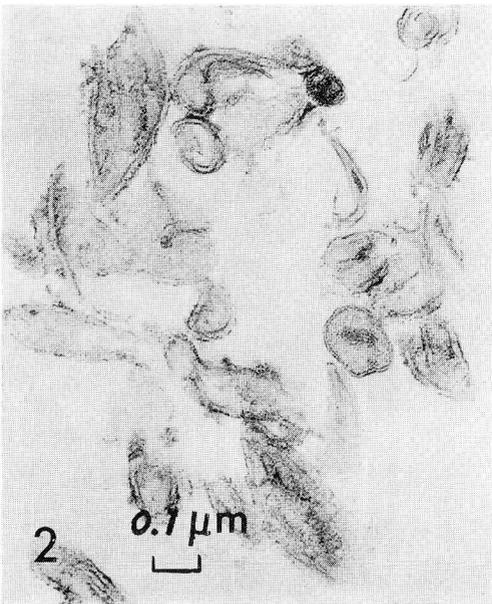


図2 *M. smegmatis* の細胞壁画分の切片像。

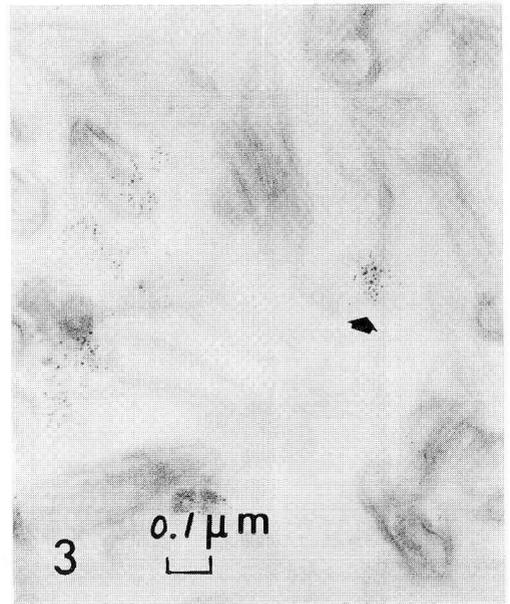


図3 フェリチン抗体法による *M. smegmatis* の細胞壁画分の切片像。矢印はフェリチン抗体の付着を示す。

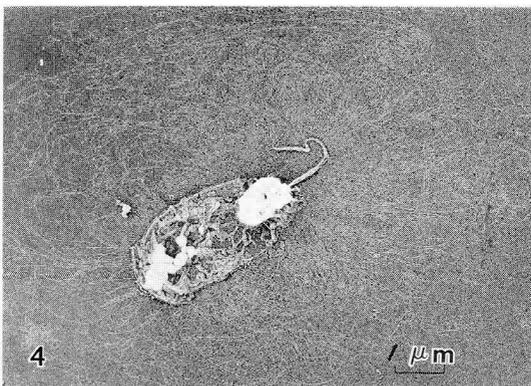


図4 *M. smegmatis* の染色体。回転シャドウイング。

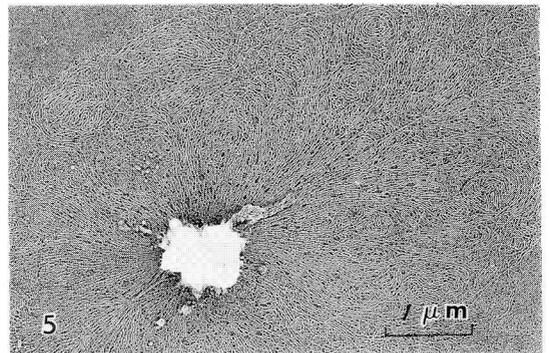


図5 *M. smegmatis* の染色体。回転シャドウイング。

子量は  $2.15 \sim 2.25 \times 10^9$  daltons である。

BCG, ヒト型結核菌 H<sub>37</sub>Ra, 同 H<sub>37</sub>Rv, SM 耐性 *M. smegmatis* AC-5, 患者分離の多剤耐性ヒト型結核菌などについても同様な観察を行なった。いずれも染色体 DNA の基本的形態は同様であつたが、ヒト型結核菌ではグリシンの効果が著明でなく、リパーゼの添加が必要であつた。

ここに観察したダブルストランドの線維はその超微形態よりみて、染色体 DNA に間違いないと考えられるが、抗酸菌では初めての構造観察なので、その本体を確認しようとしてみた。展開した染色体をグリッド膜にのせたまま、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  の DNase I (Sigma) で処理すると、1 分間ではほぼ完全に線維構造が消失したが、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  の RNase (Behringer) では全く変化しなかつた。この実験によつてこれまで観察した線維構造が DNA であることを確認した。

私どもの観察した抗酸菌の DNA の複製様式は閉鎖環状で、いわゆる大腸菌型であつたが、ヒト型結核菌では Y 型、四岐型または八岐型の fork が多数観察された。これらはローリングサークル型というべきで、細菌にはまれである。マメヤトウモロコシなど、ある種の植物細胞のクロロプラスト DNA は、大腸菌型とローリングサークル型中間体の両方を含有することが報告<sup>5)</sup> されているので、ある種の抗酸菌は、このような植物型の複製様式を有することも考えられる。

ポリペプチドの一次構造を直接決定している構造遺伝子の遺伝子座を、直接電子顕微鏡でとらえることは、大腸菌で Miller ら<sup>6)</sup> によつて報告されているが、私どもの観察で、*M. smegmatis* でも活性 DNA 線維にそつてポリリボソームが付着した像がみられた。それぞれのポリリボソームは数個ないし十数個のリボソームと mRNA とから成つていた。

細菌の染色体外遺伝子としてのプラスミッドが、薬剤耐性伝達性をになつていることが広く知られるようになり、結核病学においても、耐性菌感染とその治療のう

で、抗酸菌にはたしてプラスミッドが存在するかどうか、関心の持たれる課題である。私どもは SM 耐性の *M. smegmatis* AC-5 および肺結核患者の喀痰から分離した多剤耐性ヒト型結核菌から、プラスミッドの分離を試みた。ラウリル硫酸ソーダと高濃度の塩化ナトリウムを用いる方法<sup>7)</sup> で分離してみると、両種の耐性菌からそれぞれ、小さな閉鎖環状の DNA が、かなり多数観察された。形態学上、従来報告された細菌プラスミッドと一致する所見であるが、耐性遺伝子をになつたプラスミッドであるかどうか、今後の遺伝学的な検討にまたなければならぬ。

## む す び

抗酸菌を免疫電子顕微鏡法の手技で観察し、その抗原局在部位が細菌細胞壁にあることを確認した。また抗酸菌の染色体の微細構造を初めて明らかにした。これらの知見が、抗酸菌病の免疫学や遺伝学を理解するうえで、橋渡しの役割を果たすことができれば幸いである。

終わりに、私どもの研究を特別講演として発表する機会を与えて頂きました島村喜久治会長ならびに会員の皆様に厚く感謝致します。また終始はげましを頂きました東北大学海老名敏明名誉教授、岡捨己名誉教授に深く感謝致します。この研究は弘前大学医学部細菌学教室員諸君との協同研究であります。感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Kleinschmidt, A.K. and Zahn, R.K.: Z. Naturforsch., 146 : 770, 1959.
- 2) 水口康雄・徳永徹: 医学と生物学, 76 : 301, 1968.
- 3) Imaeda, T. et al.: Tubercle, 49 : 385, 1968.
- 4) Yabu, K. and Takahashi, S.: J. Bacteriol., 129 : 1628, 1977.
- 5) Kolodner, R.D. and Tewari, K.K.: Nature, 256 : 708, 1975.
- 6) Miller, O.L. et al.: Science, 169 : 392, 1970.
- 7) Guerry, P. et al.: J. Bacteriol., 116 : 1064, 1973.