

原 著

Acetate-1-¹⁴C とりこみ後の薄層クロマトグラ
フィーによる *Mycobacterium* と *Rhodococcus*
(*Gordona*) および *Nocardia* との区別

東 村 道 雄・水 野 松 司

国立療養所中部病院

受付 昭和 53 年 8 月 31 日

DIFFERENTIATION AMONG *MYCOBACTERIUM*, *RHODOCOCCUS*
(*GORDONA*) AND *NOCARDIA* BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY
AFTER INCUBATION WITH ACETATE-1-¹⁴C

Michio TSUKAMURA* and Shoji MIZUNO

(Received for publication August 31, 1978)

Introduction

As an aid to differentiate among *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (*Gordona*) and *Nocardia*, several studies have been made on the composition of lipids and mycolic or nocardomycolic acids (Alshamaony et al., 1976; Alshamaony et al., 1976; Azuma et al., 1974; Cummins, 1962; Goodfellow et al., 1976; Kanetsuna & Bartoli, 1972; Lanéelle et al., 1969; Lechevalier et al., 1971; Mordarska & Mordarski, 1972; Minnikin & Goodfellow, 1976; Minnikin et al., 1977; Tsukamura & Mizuno, 1978). In the present study, we have observed the pattern of incorporation of acetate-1-¹⁴C into diethyl ether-ethanol-soluble fraction of mycobacteria, rhodococci (formerly, gordonae) and nocardiae, expecting that the differences among lipid metabolisms of these microorganisms may be found. It was revealed that thin-layer chromatography of the fraction after incubation with acetate-1-¹⁴C was useful for the differentiation among these organisms.

Materials and Methods

The strains used are shown in Table. The test organism was cultivated in Ogawa egg medium slants at 37°C (for nocardiae, 28°C) for 5 days. The organisms grown were harvested and washed three times in saline (0.9% (w/v) NaCl solution). The organisms were weighed and suspended at a concentration of 25 mg (moist weight) per ml in 4.0 ml of a M/15 phosphate buffer solution (pH 7.1) containing 5 μ Ci sodium acetate-1-¹⁴C per ml. The suspension was incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, the cells were collected by centrifugation, washed twice in ice-cold water, and extracted twice with 2.0 ml of an ice-cold 10% (w/v) trichloroacetic acid solution. The cells were then extracted twice with 3.0 ml a diethyl ether-ethanol mixture (1 : 1 in volume) each for 10 minutes. The diethyl ether-ethanol extracts were combined and concentrated until a volume of 0.1 ml under reduced pressure. The concentrate was subjected to thin-layer chromatography (Silica Gel H, 0.25 mm thick), using a solvent system, *n*-propanol-*n*-butanol-water-ammonia (57+20+20+3 in volumes). Radioactive spots

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

in thin-layer chromatograms were scanned by an automatic scanning apparatus (Nihon Musen Company, Tokyo) (Running speed, 300 mm/hour; recording speed, 150 mm/hour; slit, 30×6 mm; time constant, 1,000 counts per minute/30 seconds).

The method of thin-layer chromatography was similar to the method used previously for the experiments with ^{35}S -methionine (Tsukamura & Mizuno, 1975). Sodium acetate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ used was a product of the Daiichi Pure Chemicals Company, Tokyo (specific activity, 54.9 mCi/mmole).

Results and Discussion

Except three strains of *M. aurum*, all strains of mycobacteria tested showed two distinct spots at Rf values 0.00 and 1.00 (Fig. 1). The strains of *M. aurum* showed only a small spot at the Rf value 0.00 (Fig. 1, C).

In contrast to these, all strains of *Rhodococcus* (formerly, *Gordona*) and *Nocardia* showed only one distinct spot at Rf value 1.00 (Fig. 2). Only one strain (23004) of *N. asteroides* showed a small spot at the Rf value 0.00 and all other strains lacked this spot (Fig. 2).

In addition to this difference, one or two small spots were observed at Rf values 0.53 to 0.72. The strains of *Rhodococcus* and *Nocardia* showed a small spot at Rf values 0.69 to 0.72, whereas the strains of *Mycobacterium* showed one or two spots at Rf values 0.53 to 0.66. The strains (15001 and 15011) of *M. aurum* showed another spot at Rf value 0.21 (Fig. 1-C).

In conclusion, *Mycobacterium* could be differentiated from *Rhodococcus* and *Nocardia* by the presence or absence of the spot at Rf value 0.00 in thin-layer chromatography of diethyl ether-ethanol-soluble fraction.

Mycobacterium, *Rhodococcus* (*Gordona*) および *Nocardia* の脂質構成または mycolic ないし nocardomycolic acids の組成の差によつて、これらの属の区別をしようという試みは、かなり多くの研究者達によつて行なわれてきた¹¹⁻¹²⁾。本報では、一つの新しい試みとして、菌を acetate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ と incubate した後、エチルエーテル・エタノール可溶分を抽出し、薄層クロマト (thin-layer chromatography) にかけたところ、*Mycobacterium* と、*Rhodococcus* および *Nocardia* は異なる放射性物質分布のパターンを示した。したがつて、両者の acetate 代謝の差が存在すること、およびこれによつて上述の菌を区別しうる事が示唆されたので報告する。

実験材料および方法

使用した菌株は表に示した。被検株は 1% 小川培地に 37°C (ただし nocardiae は 28°C) に 5 日間培養した後、生理食塩水 (0.9% NaCl 液) で 3 回洗浄した後、ガラス玉コルベン内で 5 分間振盪して均一化し、4.0 ml の sodium acetate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ (5 $\mu\text{Ci/ml}$) を含む M/15 phosphate buffer (pH 7.1) に 25 mg/ml (湿菌量) の割合に浮遊させた。

この菌液を 37°C 24 時間 incubate した後、500G (3,000 rpm) で 15 分間遠心して菌を集めた。この菌を氷冷蒸留水で 2 回洗浄した後、菌を 2.0 ml の水冷した 10% 三塩化

酢酸で 2 回抽出して、脂質、蛋白画分などに入っていない低分子性の acetate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ 由来化合物を除去した。次に、菌体を 3.0 ml のエチルエーテル・エタノール (1:1) 混合液で 10 分ずつ 2 回抽出した。抽出液を合して、減圧濃縮して 0.1 ml とし、これを薄層クロマトにかけた。

薄層クロマトは既報の方法¹³⁾に準じて施行した。すなわち Silica Gel H nach Stahl (メルク製, Merck, Darmstadt, 西ドイツ) を用いて、厚さ 0.25 mm, 広さ 20×20 cm の薄層を作り、*n*-propanol-*n*-butanol-water-ammonia (57+20+20+3 容) の溶媒で上昇法により展開した。薄層クロマト上の放射性物質は、日本無線製薄層クロマトスキャンナーによつて記録した。記録条件は次の通りである。running speed 300 mm/hour, recording speed 150 mm/hour, slit 30×6 mm, time constant 1,000 counts per minute/30 seconds.

使用した sodium acetate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ は第一化学製で、比放射能は 54.9 mCi/mmole であった。

実験結果および考察

Mycobacterium は *M. aurum* の 3 株を例外として、被検株全部が、Rf 値 0.00 と 1.00 の 2 カ所に判然とした放射性 spots を示した (図 1)。前者は恐らく重合した高分子化合物に属し、後者は恐らく脂質であろうと推定されるが、実態は不明である。*M. aurum* の 3 株では、

Table. List of Strains Used in the Present Study

Species	Strain No.	Received as:	Source
<i>Mycobacterium phlei</i>	14001	SN101	R. Bönicke
	14002	SN102	R. Bönicke
	14022	ATCC19249	ATCC
<i>Mycobacterium aurum</i>	15001	NCTC10439	NCTC
	15006	ATCC23366	ATCC
	15011	NCTC10438	NCTC
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	17001	SN1	R. Bönicke
	17002	SN2	R. Bönicke
	17027	ATCC14468	ATCC
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	18109	ATCC6842	ATCC
	18110	ATCC14467	ATCC
	18112	ATCC6841	ATCC
<i>Mycobacterium chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	19001	SN281	R. Bönicke
	19002	SN282	R. Bönicke
	19009	ATCC19235	ATCC
<i>Mycobacterium chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	22012	ATCC19977	ATCC
	22014	ATCC23007	ATCC
	22015	ATCC23016	ATCC
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	40001	ATCC13808	ATCC
	40017	ATCC4273	ATCC
	40019	ATCC14341	ATCC
<i>Rhodococcus bronchialis</i>	50003	ATCC25592	ATCC
	50011		M. Tsukamura
	50019		M. Tsukamura
<i>Rhodococcus sputi</i>	55017	ATCC29627	ATCC
	55003	E 6581	M. Tsukamura
	55006	E 7026	M. Tsukamura
<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>	60003	ATCC25593	ATCC
	60005	E 3609	M. Tsukamura
	60016	ATCC14343	ATCC
	65001	ATCC271	ATCC
	65002	ATCC4004	ATCC
<i>Rhodococcus terrae</i>	70001	E 3603	M. Tsukamura
	70002	E 3604	M. Tsukamura
	70006	ATCC25594	ATCC
<i>Rhodococcus aurantiacus</i>	80001	ATCC25938	ATCC
	80002	E 3477	M. Tsukamura
	80004	E 4465	M. Tsukamura
<i>Rhodococcus lentifragmentus</i> (<i>Nocardia rubra</i>)	23002	M-1	I. Uesaka
	23024	M-192	I. Uesaka
	23140	M-20	I. Uesaka
<i>Nocardia asteroides</i>	23004	M-72	I. Uesaka
	23007	M-94	I. Uesaka
	23094	R-399	R. E. Gordon
<i>Nocardia brasiliensis</i>	23012	M-145	I. Uesaka
	23013	M-146	I. Uesaka
	23014	M-172	I. Uesaka
<i>Nocardia farcinica</i>	23025	C-407	I. Uesaka
	23134	M-300	I. Uesaka
	23135	M-324	I. Uesaka

R. Bönicke, Forschungsinstitut Borstel, 2061 Borstel, West Germany; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, U.S.A.; National Collection of Type Cultures (NCTC), London, England; I. Uesaka, Kyoto University, Kyoto, Japan (These strains belonged originally to the collection of N.M. McClung, University of South Florida, Tampa, Florida, U.S.A.); R.E. Gordon, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, U.S.A.

この Rf 値0.00(原点)の spot が著しく小さかつた (図1のC参照)。

Mycobacterium が Rf 値0.00と1.00に2つの明瞭な spots を示すのに対して, *Rhodococcus* と *Nocardia* の被検株は全部が, Rf 値1.00に1つだけの明瞭な放射性

spot を示した。すなわち Rf 値0.00 (原点) の spot を示さなかつた。唯一の例外は *N. asteroides* 23004 株で、この株は Rf 値0.00に小さい spot を示した(図2のC)。

以上の他に、次のような差がみられた。

Mycobacterium では、時により Rf 値0.53~0.66の

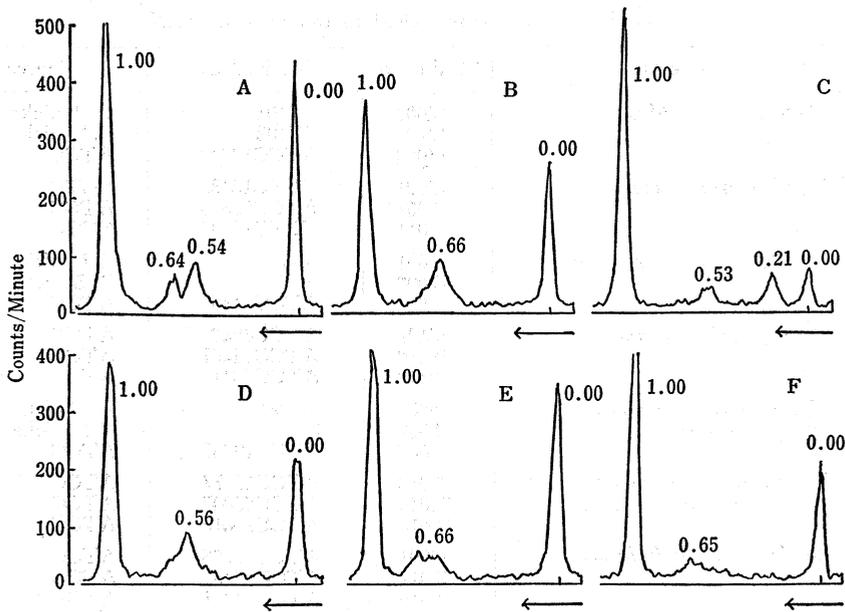


Fig. 1. Radioactive spots in thin-layer chromatograms of diethyl ether-ethanol-soluble fraction of mycobacteria after incubation with acetate- 1-C^{14} . A. *M. chelonae* subsp. *chelonae* 19001, B. *M. smegmatis* 17001, C. *M. aurum* 15011, D. *M. phlei* 14002, E. *M. chelonae* subsp. *abscessus* 22014, F. *M. fortuitum* 18110.

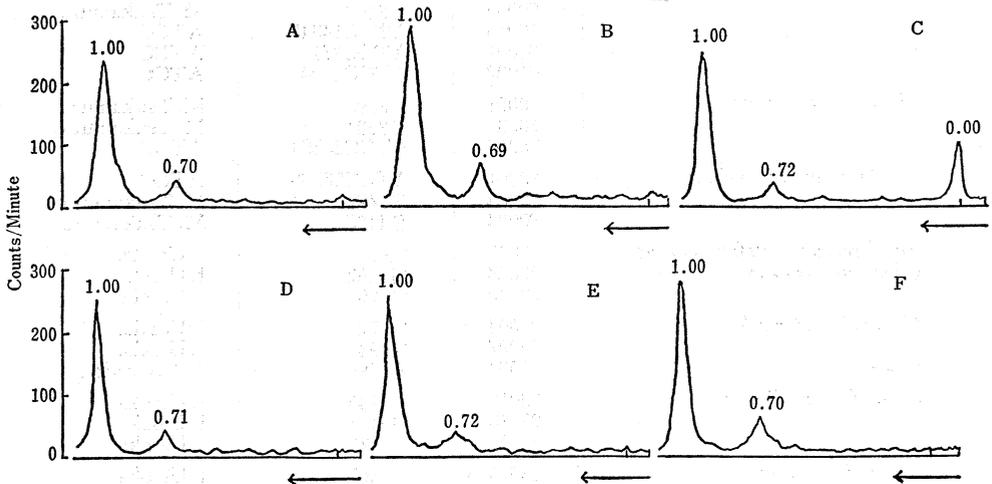


Fig. 2. Radioactive spots in thin-layer chromatograms of diethyl ether-ethanol-soluble fractions of nocardiae and rhodococci after incubation with acetate- 1-C^{14} .

A. *N. brasiliensis* 23013, B. *N. farcinica* 23135, C. *N. asteroides* 23004, D. *R. bronchialis* 50011, E. *R. rhodochrous* 40017, F. *R. terrae* 70001.

間に、1, 2の小さい放射性 spot がみられた。特に *M. aurum* では、他の株にみられない Rf 値 0.21 の部分に小さい spot を示した (図1のC)。

これに対し、*Rhodococcus* および *Nocardia* では、Rf 値 0.69~0.72の部分に小さい spot を示すことがあつた。

以上のごとく、*Mycobacterium* と *Rhodococcus* および *Nocardia* の間には、acetate 代謝の定性的または定

量的な差異があることが示唆されたが、これ以上の分析は、筆者らの能力の限界外となるので、上記の事実の記載にとどめる。もし、この現象を更に研究していただける方があれば幸いである。

結 論

Sodium acetate- 1-C^{14} と菌とを incubate した後、

エチルエーテル・エタノール可溶分を抽出して薄層クロマトを行なつたところ、*Mycobacterium* は Rf 値 1.00 と 0.00 の 2 カ所に明瞭な放射性 spots を示したが、*Rhodococcus* と *Nocardia* は Rf 値 1.00 の場所だけに放射性 spot を示した。

文 献

- 1) Alshamaony, L., Goodfellow, M. and Minnikin, D. E.: J. Gen. Microbiol., 92 : 188, 1976.
- 2) Alshamaony, L., Goodfellow, M., Minnikin, D. E. and Mordarska, H.: J. Gen. Microbiol., 92 : 183, 1976.
- 3) Azuma, L., Ohuchida, A., Taniyama, T., Yamamura, Y., Shoji, K., Hori, M., Tanaka, Y. and Ribi, E.: Biken J., 17 : 1, 1974.
- 4) Cummins, C. S.: J. Gen. Microbiol., 28 : 35, 1962.
- 5) Goodfellow, M., Collins, M. D. and Minnikin, D. E.: J. Gen. Microbiol., 96 : 351, 1976.
- 6) Kanetsuna, F. and Bartoli, A.: J. Gen. Microbiol., 70 : 209, 1972.
- 7) Lanéelle, M. A., Asselineau, J. and Castelnuovo, G.: Ann. Inst. Pasteur, 108 : 69, 1969.
- 8) Lechevalier, M. P., Horan, A. C. and Lechevalier, H.: J. Bacteriol., 105 : 313, 1971.
- 9) Mordarska, H. and Mordarski, M.: J. Gen. Microbiol., 71 : 77, 1972.
- 10) Minnikin, D. E. and Goodfellow, M.: The Biology of the Nocardiae (edited by Goodfellow, M., Brownell, G. H. and Serrano, J. A.), Academic Press, London, p. 160, 1976.
- 11) Minnikin, D. E., Patel, P. V., Alshamaony, L. and Goodfellow, M.: Int. J. Syst. Bact., 27 : 104, 1977.
- 12) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: J. Gen. Microbiol., 105 : 159, 1978.
- 13) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Int. J. Syst. Bact., 25 : 271, 1975.