

第 57 回 総会 シンポジウム

結 核 菌 研 究 の 進 歩

座 長 徳 永 徹

国立予防衛生研究所結核部

戸 井 田 一 郎

結核予防会結核研究所第一研究部

受付 昭和 57 年 8 月 11 日

The 57 th Annual Meeting Symposium

RECENT ADVANCES IN THE RESEARCH OF TUBERCLE BACILLI

(Received for publication August 11, 1982)

Co-Chairmen: Tohru TOKUNAGA* and Ichiro TOIDA**

Symposists:

1. Fine Structure of Mycobacteria: Kazue FUKUSHI, Department of Bacteriology, Hirosaki University, School of Medicine.
2. Genetics of Mycobacteria: Yasuo MIZUGUCHI, Department of Microbiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health.
3. Newer Approaches for Structure Analysis and Physiology of Mycolic Acids: Ikuya YANO, Department of Bacteriology, Niigata University, School of Medicine.
4. Superoxide Dismutases of Mycobacteria: Masamichi KUSUNOSE, Toneyama Institute for Tuberculosis Research, Osaka City University, Medical School.

This symposium, entitled "Recent Advances in the Research of Tubercle Bacilli", was held to commemorate the Centenary of the discovery of tubercle bacilli by Dr. Robert Koch in 1882.

Since the discovery of tubercle bacilli, enormous amounts of knowledge have been accumulated. Various species of acid fast bacteria other than human and bovine tubercle bacilli (*Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis*), which have been found by Dr. Koch, were isolated from various sources and identified as members of genus *Mycobacterium*, and the relatedness of *Mycobacterium* with *Corynebacterium* and *Nocardia* were also established. The development of highly sophisticated instruments, such as electron microscopy and gas chromatography-mass spectrometer (GC/MS), enabled us to observe the ultrafine structures of tubercle bacilli and to analyze the detailed chemical structures of very complicated mycobacterial constituents. Despite the many difficulties in experimental procedures, the studies on the metabolic activities and genetics of tubercle bacilli have achieved the steady progress.

The Japanese researchers have made great contributions for such advances in the fundamental

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

** From the First Department of Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204 Japan.

researches of tubercle bacilli, as summarized in "50 Years in Tuberculosis Research" which was published to commemorate the Jubilee of the Japanese Society for Tuberculosis.

In this symposium, four symposists presented the most up-to-date results of their brilliant works.

Dr. Kazue Fukushi, Hirosaki University, showed many beautiful electron microscopic photographs of the ultrathin section of whole bacilli, cell wall, cytoplasmic membrane, mesosomes, chromosomes, nucleus, polyphosphate granules and pili of mycobacteria. From these observations, he proposed the schema of the ultrafine structures of mycobacteria.

Dr. Yasuo Mizuguchi, University of Occupational and Environmental Health, developed the method for spheroplast formation and its reversion to bacillary form. Budding and elementary body formation were observed in the reversion process, and also a filamentous or mycelium-like growth accompanying branching and occasional septation were noticed in the regeneration process. These methods to induce spheroplast and to convert them to bacillary form may provide a way for the new manipulation system to study the genetics in *Mycobacteria*.

Dr. Ikuya Yano, Niigata University, reported the results of GC/MS analysis of mycolic acid and their temperature-induced changes in *Mycobacteria* and *Nocardia*. Overcoming the tremendous difficulties to analyse the chemical structures of such high molecular and complicated substances such as mycolic acids, Dr. Yano clarified the composition of molecular species of mycolic acids by the elegant application of gas chromatography-mass spectrometry. He also demonstrated that the mycolic acid composition varied dramatically with the growth temperatures. In *M. phlei*, the longerchain molecular species increased at the higher temperatures and the shorter ones at the lower temperatures, while in *N. asteroides* the less unsaturated species increased at the higher temperatures and the highly unsaturated ones at the lower temperatures.

Dr. Masamichi Kusunose, Osaka City University, purified superoxide dismutase (SOD), which is an enzyme to catalyze the reaction: $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$, from various mycobacterial species. Molecular weight, contents of metal ions and amino acids sequence of SOD from several species of mycobacteria and other bacteria, as well as yeast mitochondria, were compared. Changes of SOD activities of *M. tuberculosis*, *M. lepraemurium* and *M. leprae* according to their growth phase or their physiological environments were followed, and the biological significance of this enzyme, SOD, for the survival of these mycobacteria within the host cells was discussed.

We, co-chairmen and symposists, all expect this symposium would be a milestone to stimulate the interests of many researches for the further studies on tubercle bacilli.

1882年, Robert Koch が結核菌を発見し, その病原的意義を確立してからちょうど100年が経過した。この間に, 結核菌の研究は絶えることなく続けられ, 結核菌についての我々の知識は, Koch の時代とは比較にならぬまでに蓄積されている。Koch による人型および牛型の結核菌の発見に引き続いて, 数多くの類縁の細菌が気づきと発見され, 属としての *Mycobacterium* が確立され, *Mycobacterium* と *Corynebacterium* や *Nocardia* との近縁関係も明らかにされて, 結核菌が細菌分類学の上で占めるべき位置もほぼ定着した。電子顕微鏡や質量スペクトロメーター・ガスクロマトグラフィーのように高度に洗練された器械の開発によつて, Koch の時代には想像もできなかったような形態学的超微細構造や菌体成分の詳細な化学構造の解析が可能となつた。さらに, 発育

の遅さ, 単個菌液の作り難さ, 菌体を破壊することの困難さ, などの実験操作上の制約にもかかわらず, 結核菌代謝および遺伝の研究も着実な発展を遂げてきている。

このような結核菌研究の進歩に, 我が国の研究者は多くの貢献を成し遂げてきており, 結核病学会創立50周年記念として出版された「結核研究の五十年」にも, その一斑を窺うことができる。結核菌発見100周年を記念する第57回結核病学会総会シンポジウムとして, 「結核菌研究の進歩」と題したこのシンポジウムでは, 「形態」について福主主計, 「遺伝」について水口康雄, 「菌体成分」について矢野郁也, 「代謝」について楠瀬正道の, 4名のシンポジストの先生方によつて, 世界に誇りうる我が国の結核菌研究の最尖端の業績が紹介される。

抗結核剤によつて結核が比較的容易に治癒させうる病

気となるにつれて、結核菌の基礎的研究に対する関心が薄れ、たまたま腫瘍の免疫療法への関心の高まりともあいまつて、結核菌をもつばら免疫研究の道具として、あるいは免疫療法剤の一つとして取り扱う傾向が最近強くなつてきている。それはそれで今日的な重要な研究主題ではあるけれども、結核菌を一つの生物種として、また一つの病原菌として眺めたとき、まだまだ解明し尽くされていない医学的課題が残されており、また非常に魅力的な研究対象であることが、あらためて認められるで

あろう。結核菌発見100周年の記念すべき結核病学会総会にあつて企画されたこのシンポジウムを機会に結核菌の基礎的研究への関心が再び高まることを期待したい。

なお、本シンポジウムで発表された矢野郁也先生の業績に対し、日本結核病学会今村賞が授与された。本シンポジウムでの発表が、受賞記念講演を兼ねるものであることを附言する。

1. 抗酸菌の微細構造

弘前大学医学部細菌学講座 福 士 主 計

結核菌の形態学的研究は100年前のロベルト・コッホの発見にさかのぼるが、結核菌の菌体を細胞のレベルで観察できるようになつたのは、電子顕微鏡応用の時代に入つてからの、1950年代以後のことである。結核菌発見100年にあたり、歴史的な見方もいささか加えながら、結核菌をはじめとする抗酸菌の細胞構築について述べる。

1. コッホの初めて見た結核菌

1882年4月10日号の *Berliner Klinische Wochenschrift* に発表された Robert Koch¹⁾ の論文に従つて喀痰中結核菌を染色してみると、ピスマルクブラウンの褐色のバックに、少量の水酸化カリウムを加えたメチレン青で染まつた青い菌体を見ることができる。室温では20~24時間、40℃では30~60分染色が原法である。

この発見のあと間もなく、石炭酸フクシンによる染色法が考案されたので、Ziehl-Neelsen 法によつて代表される、赤く染まつた結核菌のイメージがわれわれに定着するようになった。

2. 電子顕微鏡で見る抗酸菌

電子顕微鏡が微生物の観察に応用されるようになった当初は、抗酸菌の膜面培養菌が好んで用いられた。これまで約30年間の電顕使用における抗酸菌の微細構造研究上の主要な報告を表1に示す。

抗酸菌、*Nocardia*, *Corynebacteria* に特徴的に観察さ

れる電子線不透過性顆粒が武谷ら²⁾によつて研究され、ポリリン酸顆粒であると結論され、Kornberg ら³⁾の報告と対比したうで、エネルギープールの形であろうと推論された。

細菌の超薄切片観察が可能となつて、1957年の篠原ら⁴⁾の細胞質内膜構造の発見も、抗酸菌のみならず、あらゆる細菌細胞の構築研究に大きな貢献をしたといふことができる。

武谷らのミコバクテリオファージの増殖機構の超薄切片による観察⁵⁾、細胞壁の線維構造の発見⁶⁾も画期的な報告であった。

その後、抗酸菌では他の細菌細胞に比して研究の遅れていた分野についても研究が進展し、徳永ら⁸⁾が抗酸菌にも線毛(pili)の存在することを報告し、福士ら⁹⁾¹⁰⁾が核染色体の分離観察を大腸菌などと同様に行ない、水口¹¹⁾はプラスミドの分離を報告した。

3. 細胞壁 (cell wall)

グラム陽性菌に共通な20~30 nmの厚さを有する。その表面に、平行に走る2本の線維構造 paired fibrous structure が武谷ら⁶⁾によつて報告された。分離した cell wall の表面にも同様な構造が観察されるが、ネガティブ染色よりも、シャドウイングの方がこの線維構造の観察に適している。武谷らは種々の有機溶媒処理の成績から、この構造は脂質を主成分とすると報告している⁷⁾。

cell wall に大部分の免疫活性物質が存在することが、最近いっそう明確にされた(東ら¹²⁾)。抗原局在部位を形態学的に確認するために、著者ら⁹⁾¹³⁾はフェリチン抗体法を用いて電顕観察を行なつた。図1は正常の *Mycobacterium smegmatis* の超薄切片像である。図2はこのミコバクテリアにフェリチン抗体法観察を行なつた1例を示す。グルタールアルデヒド法で抗体に結合させたフェリチン粒子が、cell wall 表層に付着し、抗原の局在部位を示している。分離精製した cell wall 画分とフェリ

表1 抗酸菌微細構造研究への貢献

電子線不透過性顆粒の本態	武谷ら	1954
メソゾームの発見	篠原ら	1957
ミコバクテリオファージの増殖機構	武谷ら	1957
細胞壁の線維構造の発見	武谷ら	1961
線毛の発見	徳永ら	1973
核染色体の分離	福士ら	1976
プラスミドの分離	水口ら	1981

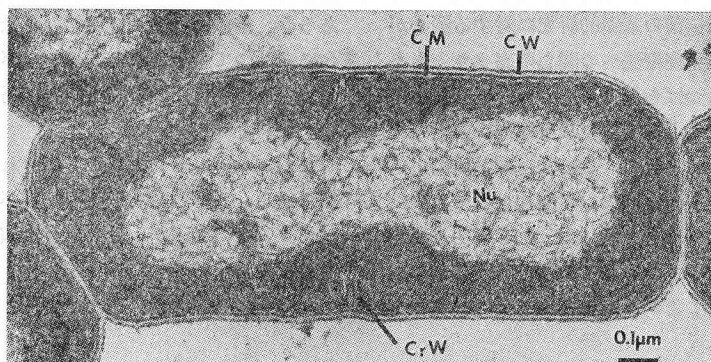


図1 *Mycobacterium smegmatis* の超薄切片像×82,000

CW, cell wall; CM, cytoplasmic membrane; CrW, cross wall; Nu, nucleus.

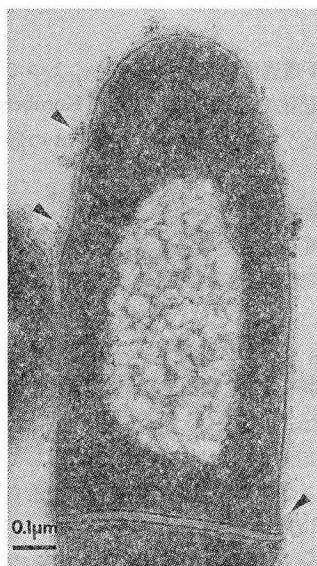


図2 フェリチン抗体の付着した *Mycobacterium smegmatis*. ×84,000
矢印がフェリチン粒子を示す。

チン抗体との反応によつても、その結合の特異性が確認された。

4. 細胞質膜 (cytoplasmic membrane)

cell wall の内側にあつて (図1), 菌体細胞質を包む膜で、極めて生物活性に富み、各種の脱水素酵素、呼吸酵素、透過酵素、細胞壁成分合成酵素などを含有している。

5. メゾソーム (mesosome)

細胞質内に見出される膜構造であつて、抗酸菌で初めて発見された構造である (篠原⁴⁾, Zapf¹⁴⁾)。その後の研究によつて、この構造は細胞質膜と同じ二重膜構造を有しており、細胞質膜の彎入によつて形成されたものであることが明らかにされた。その後多種の細菌細胞にこの構造が見出され、とくにグラム陽性菌においては

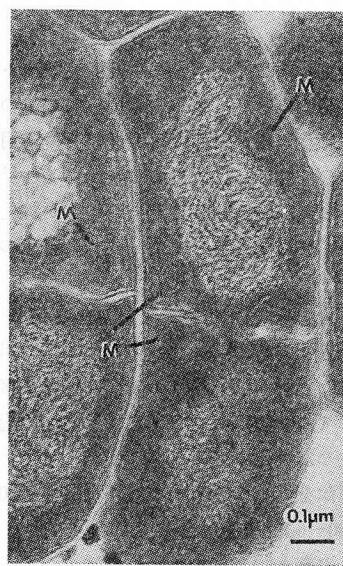


図3 *Mycobacterium smegmatis* の超薄切片像。×82,000
M, mesosomes.

恒常的な構造であるとみられるに至つた。Fitz-James¹⁵⁾ の命名でメゾソーム mesosome と一般に呼ばれている。図3に *Mycobacterium smegmatis* の切片像を示すが、この菌体ではメゾソームが細胞分裂を開始して発現した隔壁 cross wall の先端部に見出され、しかもその一端は染色体を主体とする核部位とも隣接するので、細胞分裂に際して、隔壁形成だけでなく、染色体 DNA の合成にもメゾソームが積極的な役割を果たしていることを示している。

細菌メゾソームの形態と機能に関する報告は多いが、メゾソームの機能として、表2のようにまとめることができよう。メゾソームを細菌の持つ膜状の“organelle”と考えるのが一般的である (Greenawalt & Whiteside¹⁶⁾) が、一方においてメゾソームを単なる細胞質膜の彎入部として理解しようとする意見もある。

表2 メゾソーム

1. グラム陽性菌には常に存在する
2. 1菌体に少なくとも1個観察される
3. 細胞質膜の嚢入で形成される
4. 隔壁, 核染色体と連絡
5. 細胞壁合成と隔壁形成
6. 呼吸とエネルギー代謝
7. 細胞質膜前駆体の合成
8. 核と細胞分裂の制御

6. 核 (nucleus)

細菌細胞の中央部を占め、超薄切片像では微細な線維様物質の集合体として観察される部分が核であることは、広く認められてきたが、ほとんどの細菌およびウイルスで行なわれるようになった Kleinschmidt 法による染色体の分離観察が、抗酸菌については試みられず、抗酸菌の染色体の直接観察による知見は皆無であった。著者ら⁹⁾¹⁰⁾は *Mycobacterium smegmatis* の染色体分離を試みて成功したので、他の抗酸菌 BCG, ヒト型結核菌 H₃₇Ra, H₃₇Rv, 薬剤耐性結核菌などについても同様な実験を行ない、すべての抗酸菌において染色体の分離観察に成功した。

抗酸菌の染色体観察がこれまで成功しなかつたのは、スフェロプラスト作製が難しかつたことに大きな原因があつた。グリシンとリゾチームを用いる方法が水口・徳永¹⁷⁾によつて確立されて、この障害が取り除かれた。著者らはこの方法で抗酸菌のスフェロプラストを作り、Kleinschmidt 法に従つて染色体を観察した。その要点は次のとおりである。

抗酸菌を Dubos 培地に懸濁培養し、対数増殖期にグリシンを1.5%になるように加えて培養を続け、遠心集菌後にさらにグリシンとリゾチームを含有する生食水に移し、37℃ 18時間インキュベートすると、90%以上の菌体がスフェロプラスト化する。BCG, ヒト型結核菌では、この他にリパーゼを添加するとスフェロプラスト化率が高まる。このようにして得られたスフェロプラスト化抗酸菌を、0.01%チトクロームcを含有する1M酢酸アンモニウム液に懸濁した蒸留水に浮遊、展開し、単分子膜として菌体の染色体をすくい上げ、電子顕微鏡で観察した。

図4は *Mycobacterium smegmatis* の染色体の電顕像である。1個の菌体から連続した1本の染色体が放出され、その線維はダブルストランドであつて、DNA であることが酵素消化法その他によつて確認された。菌体からほぼ完全に放出された DNA の長さを実測すると、*M. smegmatis* については1,100~1,148 μm で、Lang ら¹⁸⁾の分子量計算法を適用すると、 $2.156 \sim 2.25 \times 10^9$ daltons となる。これは光学的方法による抗酸菌染色体の分子量

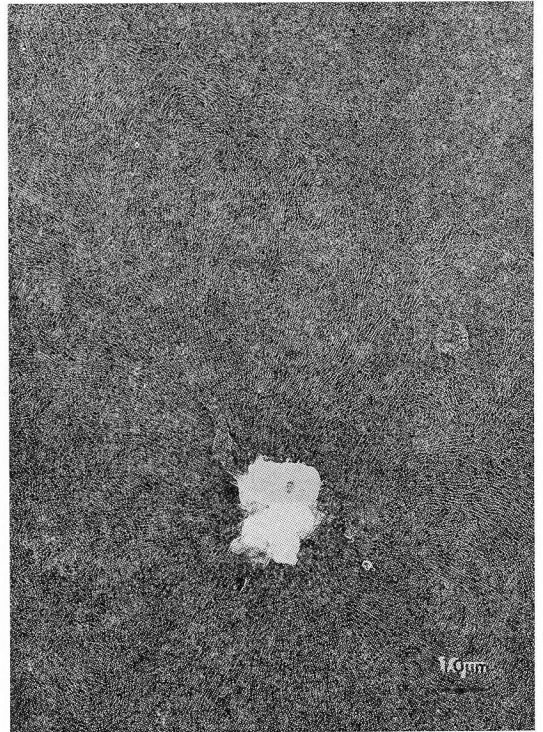


図4 Kleinschmidt 法で撮影した *Mycobacterium smegmatis* の染色体。×10,000

とほぼ一致する。

染色体 DNA の複製(レプリケーション)は閉鎖環状で、いわゆる大腸菌型または Cairns タイプと呼ばれる形式であつた。

ストレプトマイシン耐性の *M. smegmatis* および多剤耐性ヒト型結核菌の細胞から、プラスミド様の小閉鎖環状の DNA を分離観察したが、水口¹⁹⁾が遺伝学的手法を加えて、ミコバクテリアのプラスミドの存在を報告した。

7. ポリフォスフェイト顆粒 (polyphosphate granule); 電子線不透過性顆粒

光学顕微鏡的には塩基性色素でメタクロマジーを示す異染顆粒として認められ、電子顕微鏡では、電子密度の大きい、電子線不透過性の円形顆粒として観察される。これは武谷ら²¹⁾¹⁹⁾の研究によつてポリフォスフェイト顆粒であると報告された。

最近、微小部の元素分析が可能な、分析用電子顕微鏡が開発、応用されるようになったので、著者らは本装置を用いて、抗酸菌の電子線不透過性顆粒を構成する金属元素の分析を行なつた。

Mycobacterium smegmatis を Sauton 液体培地上に膜面培養し、銅製グリッドにのせ、空気乾燥して H-600-KEVEX 7000 分析型電子顕微鏡で撮影記録した。透過型電顕で観察されるミコバクテリアの小コロニーを図5

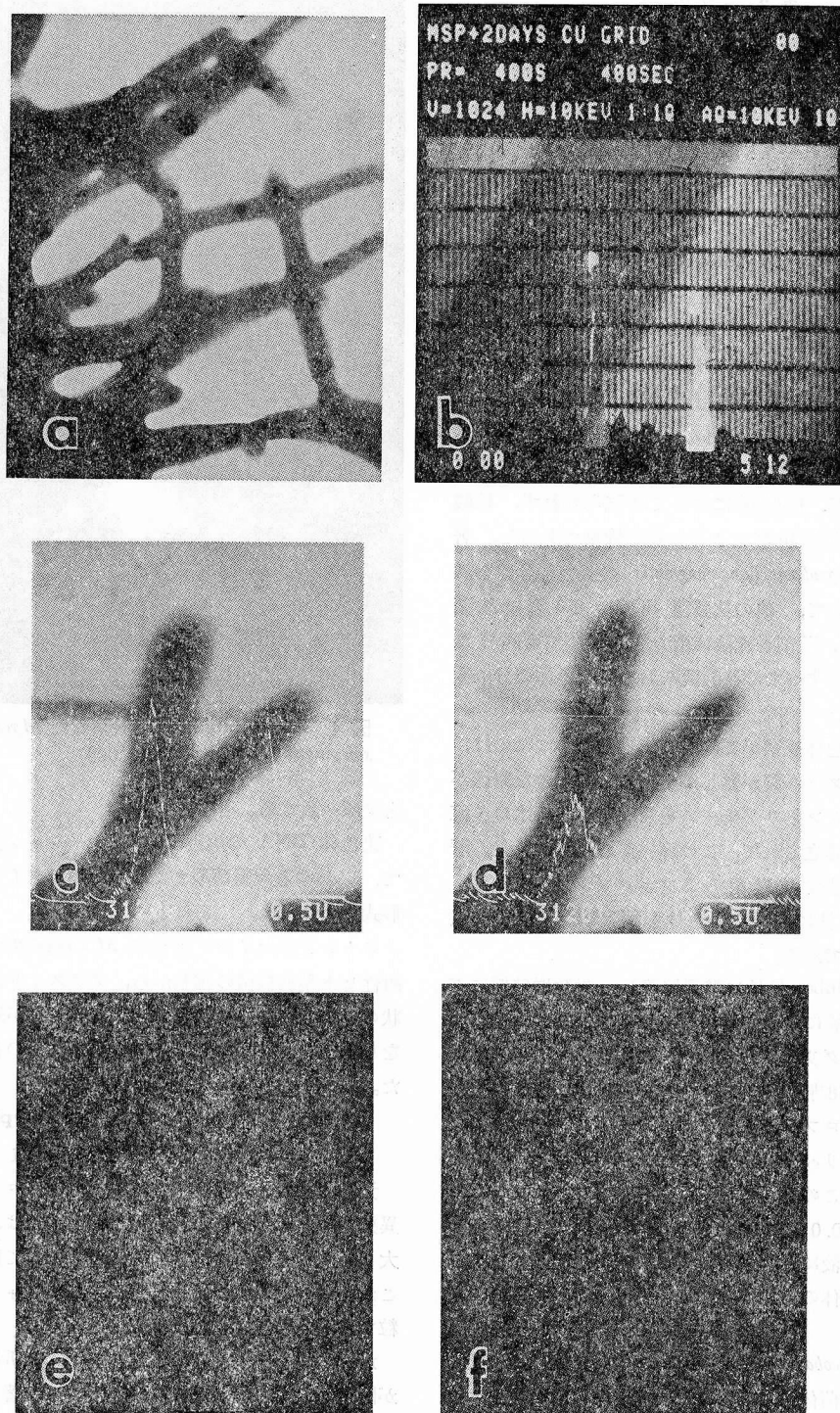


図5 分析電子顕微鏡で記録した *Mycobacterium smegmatis* の電子線不透過性顆粒の元素分析

- a. 菌の小コロニー b. 顆粒部の元素スペクトル c. Pの線分析
d. Kの線分析 e. Pの面分析 f. Kの面分析

aに示す。電子線不透過性顆粒にスポットを当てて得られた分析スペクトルは、図5bに見るように、磷とカリウム元素を主成分とすることを示している。菌体の拡大像をスクリーン上に観察しつつ、数個の菌体内の電子線不透過性顆粒について線分析を行なうと、図5cで磷のX線強度が顆粒部に極めて高いのに比して、カリウムは図5dのように同じ顆粒部でもかなり低いことを示している。さらに走査電子顕微鏡部を用いて、磷とカリウムについての面分析を行なうと、図5eの磷分析では顆粒部分に一致して磷元素が多量で、一方、図5fのカリウム分析では菌体全野にほぼ均等に分布していることが示された。

これらの点分析スペクトル、線分析、面分析を総合してみると、磷とカリウムが *M. smegmatis* の菌体を構成する主要な金属元素であつて、共に菌体内に広く分布するが、とくに顆粒部分には磷が著しく高濃度に含有されていることを示している。この結果は、電子線不透過性顆粒がポリフォスフェイトであることを支持するものであるが、カリウムその他の金属元素の存在も推測され、今後の検討を必要とする。

なお、菌体に広く分布する磷は磷脂質や核酸の存在を示し、カリウムは蛋白合成その他の代謝に必要なイオンの存在を示すものであろう。

8. 線毛 (pili)

菌体表面の性的構造物として、大腸菌の雄性特異線毛 (F pili) が知られ、雄染色体はこの中を通して雌細胞に移行するとされているが、ミコバクテリアでも徳永ら⁸⁾によつて、*M. smegmatis*, H₃₇Ra, BCG で見出されたことと報告された。固型培地上に増殖した菌で、細胞あたり1~2本から多いものでは密生するものまである。しかし性的接合との関連は不明であるとしている。

9. 抗酸菌形態の模型図

以上の知見をまとめると図6のように描くことができる。

個々の菌体微細構造はほぼ明らかにされたと思われるが、それぞれの構造物の有機的な関連がどのようになっているか、またそれぞれの菌体構築物の合成と形態形成がどのように行なわれているかについて、今後研究を進める必要があると思われる。

本研究は下記の方々との共同研究によるものである。
記して感謝する。

山口淳二 (近畿大学医学部)

有路文雄 (東北大学抗酸菌病研究所)

浅野宏司, 佐々木甚一, 大串靖子, 山崎武逸, 小山弘 (弘前大学医学部)

文 献

- 1) Koch, R.: Die Aetiologie der Tuberkulose, Berliner Klinische Wochenschrift, No. 15, April 10, 221, 1882.
- 2) Takeya, K. et al.: Studies on the nature of granules found in acid-fast bacilli, J Electronmicroscopy, 2: 29, 1954.
- 3) Kornberg, A. et al.: Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*, Biochim Biophys Acta, 20: 215, 1956.
- 4) Shinohara, C. et al.: Mitochondria-like structures in ultrathin sections of *Mycobacterium avium*, J Bacteriol, 74: 413, 1957.
- 5) Takeya, K. et al.: Light and electron microscope studies of Mycobacterium—Mycobacteriophage interactions III. Further studies on the ultrathin sections, J Biophys Biochem Cytol, 11: 441, 1961.
- 6) Takeya, K. et al.: Paired fibrous structure in mycobacteria, Biochim Biophys Acta, 30: 197, 1958.
- 7) Takeya, K. et al.: Further studies of the paired fibrous structure of mycobacterial cell wall, J Biophys Biochem Cytol, 9: 496, 1961.
- 8) 徳永 徹・水口康雄: ミコバクテリアの性と遺伝, 結核, 48: 481, 1973.
- 9) 福土主計: 抗酸菌の微細構造——核と細胞壁を中心

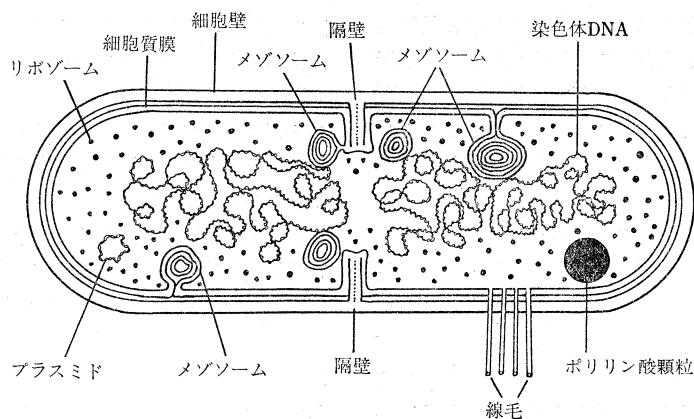


図6 抗酸菌の微細構造の模型図

- に——, 結核, 54: 523, 1979.
- 10) 富士主計・佐々木甚一: ミコバクテリアの染色体, 東北のコロニー, No. 22, 10, 1979.
 - 11) 水口康雄: 抗酸菌のプラスミド, 日細菌誌, 36: 56, 1981.
 - 12) Azuma, I. et al.: Adjuvant activity of mycobacterial cell walls, Japan J Microbiol, 15: 193, 1971.
 - 13) 富士主計他: フェリチン抗体法によるミコバクテリアの抗原局在部位の電子顕微鏡的観察, 弘前医学, 32: 139, 1980.
 - 14) Zapf, K.: Über die Feinstruktur des Cytoplasmas in Ultradünnschnitten von Mycobacterium tuberculosis (BCG), Naturwiss, 44: 448, 1957.
 - 15) Fitz James, P. C.: Participation of the cytoplasmic membrane in the growth and spore formation of bacilli, J Biophys Biochem Cytol, 8: 507, 1960.
 - 16) Greenawalt, J. W. and Whiteside, T. L.: Mesosomes: membranous bacterial organelles, Bacteriological Reviews, 39: 405, 1975.
 - 17) 水口康雄・徳永 徹: ミコバクテリアのスフェロプラスト 1. グリシンとリゾチームによるスフェロプラストの形成, 医学と生物学, 76: 301, 1968.
 - 18) Lang, D. et al.: Electron microscopy of size and shape of viral DNA in solutions of different ionic strengths, J Mol Biol, 23: 163, 1967.
 - 19) Takeya, K. et al.: Electron microscopic studies on intracellular structures of *Mycobacterium tuberculosis*, Ann Rep Jap Soc Tuberc, 4: 1, 1959.

2. 抗酸菌の遺伝とその周辺

産業医科大学微生物学教室 水 口 康 雄

共同研究者: 有働武三 谷口初美 福長将仁 小川みどり

抗酸菌における遺伝学の研究のレベルは, その対象となる菌そのものが種々の理由から材料として好適でないこともあつて研究人口が少なく, 最先端の研究が華々しく繰り広げられている大腸菌などに比べると, 病原細菌学的には非常に重要な地位を占めているにもかかわらず, 必ずしも満足すべき状態には達していない。特にこの属のなかでも最も重要な結核菌に関しては殆んど何もわかっていないと言つても言い過ぎではないといった現状にある。

しかしながら抗酸菌のもつ他の細菌にはみられない種々の特異的な性状もすべては染色体上の遺伝子の発現の結果もたらされた表現型にはかならないことを考えると, 病原性, 薬剤耐性, 更には各種の生物活性などの特異的な性状を遺伝学的な立場から明らかにしていくことは, 抗酸菌を理解するうえで非常に重要であることは言うまでもない。我々はこのような立場からこれまでも抗酸菌の遺伝学の研究を進めてきた^{1)~3)}が, 本シンポジウムにおいては, この数年間我々の教室で進めてきた抗酸菌のプラスミドの研究と, 最近新しく開発された遺伝子伝達の方法である細胞融合法を抗酸菌に応用する際に必要なプロセスであるプロトプラストの形成およびプロトプラストから桿状菌体への復帰について得られた結果を紹介したい。

1. 抗酸菌のプラスミドについて

これまでに多くの細菌について毒素産生性, 定着性, 侵襲性などの病原性に関与する性状や薬剤耐性などの医学的に重要な性状を決定する遺伝子がプラスミド上に存在することが報告されている。我々は抗酸菌にもプラスミドが存在するか否か, もし存在するとすればそれはいかなる機能を担っているであろうかということに興味をも

ち, *M. smegmatis*, *M. vaccae*, *M. intracellulare* の3つの種に属する菌についてプラスミドの分離を試みるのと同時にバクテリオシン産生性, 接合能, 薬剤感受性, 色素産生能などプラスミドに支配されている可能性が高いと思われる性状との関連性を検討した。

プラスミドの分離には菌を温和な条件で溶菌させ, 細胞内に存在する DNA に障害を与えないように抽出を行う必要がある。我々是对数増殖期のマイコバクテリアに 1.5% のグリシンを加えて培養すると細胞壁合成が抑制され, その結果菌がリゾチームに感受性になるという事実⁴⁾を応用し, *M. smegmatis* の場合には約 2 時間, *M. intracellulare* の場合には約 24 ないし 48 時間グリシン処理を行なったあと集菌してリゾチーム処理を行ない, 溶菌後 5 モルの食塩を加えて核 DNA を除き, 上清中のプラスミドをそのまま, もしくはセシウムクロライド・エチジウムブロマイド密度勾配遠心によつて精製したのちアガロースゲル電気泳動にかけて解析した。また, 一方で電子顕微鏡によつてもプラスミド DNA の存在を確認するとともにその分子量の測定を行なった。

図 1 に *M. smegmatis* R 32 株, P 53 株, R 17 株のプラスミド DNA の電気泳動によるパターンを示した。R 32 株には 5 本(または 6 本), R 53 株には 5 本の, R 17 株には 4 本のバンドが認められる。同じプラスミド DNA でもその分子形態(プラスミド DNA がただ環状になっている場合, OC 型, それが更に捻れた形をしている場合, CCC 型)が異なるとゲルの上では異なつた泳動距離を示すので, 図 1 からは直ちに何種類のプラスミドが, それぞれの菌体内に存在するかは結論されないが, 対照として用いた大腸菌のプラスミド DNA, Col E1 (4.2 Md), PBR 322 (2.6 Md) の泳動度とを比較することによつて

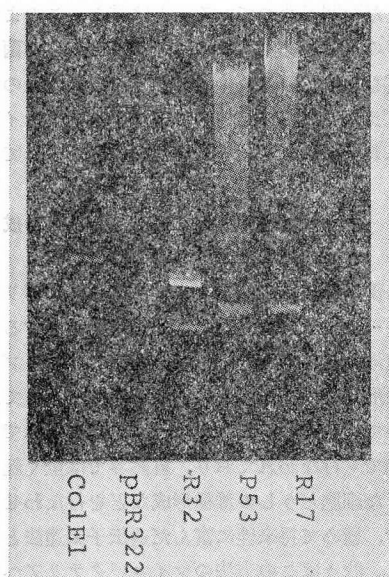


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA molecules isolated from *M. smegmatis* strains R32, P53 and R17. The position of Col EI (4.2Md) and PBR 322 (2.6Md) are also given.

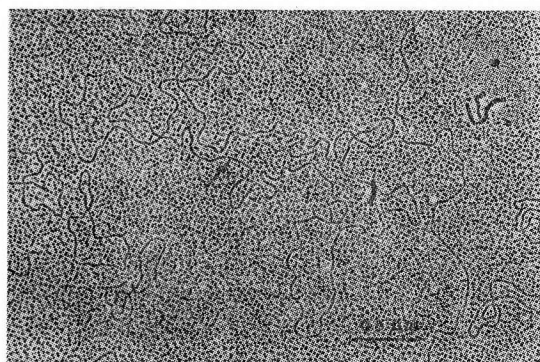


Fig. 2. Electron micrograph of plasmid DNAs of *M. smegmatis* strain P53. Arrow indicates plasmid with molecular weight 28 Md.

M. smegmatis には比較的小さい分子量をもつプラスミドが存在することが明らかとなった。一方、電子顕微鏡を用いて R 32 株にみられるプラスミドの長さを測定したところ、2.3 Md, 2.5 Md, 3.4 Md, 3.9 Md, 4.0 Md の5種類の分子量の異なるプラスミドが見出された。同じく P 53 株には 2.5 Md と 2.9 Md の小さいプラスミドの他に図2に示すように 28 Md の大きさをもつものが存在していた。これらのプラスミドがいかなる機能をもっているか、*M. smegmatis* の場合には接合能およびバクテリオシン産生能との関係について調べてみたが、現在必ずしも結論を出せるまでの結果は得られていない。ただ P 53 に見出された 28 Md の大きさのプラスミ

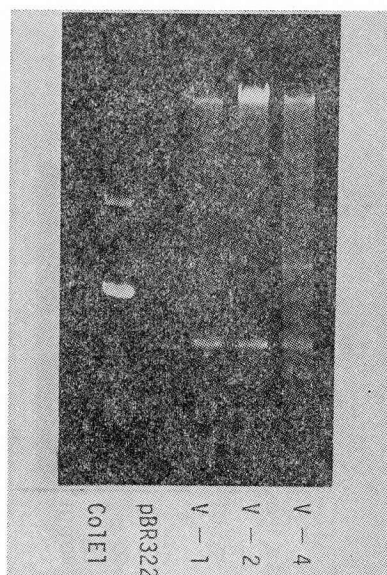


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from *M. vaccae*. V1, photochromogenic smooth colony forming wild type; V2, photochromogenic rough colony forming variant; V4, nonphotochromogenic smooth colony forming variant.

ドはその大きさからみて接合に関与している可能性があるのではないかと考えている。

次に *M. vaccae* についてプラスミドの解析を行なった。この菌は smooth な集落を形成する発育の早いミコプラズマであるが、光発色性を有しかつバクテリオシンも産生する。この菌を植え継いでいくとしばしば rough 型の集落を形成する変異株や光発色性を失った変異型が出現するので、これらの性状のいずれかはプラスミド上にその遺伝子が存在する可能性が高いものと思われた。そこで親株 V-1 から得られた rough 型の variant である V-2 株と、光発色性を失った V-4 株についてプラスミドの検討を行なった。なお、バクテリオシン産生性を失った菌は分離されなかった。結果を図3に示したが、V-2 株は V-1 株と同じプラスミドのパターンを示したのに対し V-4 株では2種類のプラスミドのうち分子量の小さい方が欠損しているのが認められ、この失われたプラスミドが光発色性に何らかの役割を演じている可能性が高いものと思われる。

M. intracellulare は我が国における非定型抗酸菌症の原因の約90%を占める菌であるが、各種の抗結核剤に対して強い抵抗性を示すことでも有名な菌である。この菌はアルブミンの入った寒天培地上で集落形成を行なわせると、平らでかつ透明なコロニー (Tr) を作るが、そのなかから低頻度にはあるが不透明で盛り上がったコロ

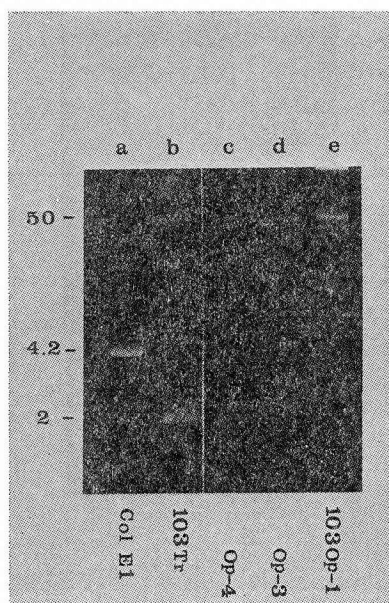


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from *M. intracellulare* strain 103. Tr, transparent colony forming wild type; Op, opaque colony forming variants. The position of Col E1 (4.2 Md, OC and CCC form) is also given.

ニーを作る変異株 (OP) を分離することが知られている。この OP 株は薬剤感受性が上昇しているのみならず動物に対する病原性も低下しているといわれているので、我々はこの Tr→OP への変化にプラスミドが関与している可能性について検討を行なった。患者由来の *M. intracellulare* 103 Tr より OP 変異株を数株分離し、それらの菌のプラスミド保有状況を調べたところ、図4に示すように親株の Tr には約 50 Md の比較的大きなプラスミドと 2 Md の小さなプラスミドが認められたのに反し、OP 株はいずれも 50 Md のプラスミドのみを有し小さいプラスミドを欠いていた。このことは Tr→OP への変化にプラスミドが関与している可能性が極めて高いことを意味しているが、これらの OP 株はいずれも多くの抗結核剤に対し、感受性が上昇していることと考えると、おそらくこの 2 Md のプラスミドは細胞壁もしくは細胞膜の何らかの構成成分の遺伝子を有しており、このプラスミドがなくなることによって細胞壁の構造に変化が生じ、集落形態の変化、薬剤通過性の変化をもたらしたものであろうと考えられる。

以上、3 種の菌についてプラスミドの存在が明らかにされたが、ミコバクテリアからのプラスミド DNA の検出は必ずしも容易でなく、現在の技術ではこれらの菌に存在するすべてのプラスミドを検出したか否かにつ

いてはまだ疑問が残っている。とは言え、このようなプラスミドのうちのあるものについてはこれらの菌に何らかの性質を与えている可能性が強く示唆されたので、今後更にプラスミドの検出技術に改良を加え、マイコバクテリアにおけるプラスミドの意義を明らかにしていきたい。

2. *M. smegmatis* のプロトプラスト形成とその桿状菌体への復帰について

異なる菌株から作成したプロトプラストをポリエチレングリコールで融合させたあと、細胞壁を有するもとの菌体へ復帰させるという細胞融合法や、プロトプラストを用いた形質転換法が新しい遺伝子伝達法として最近注目を引いている⁵⁾。この方法はバクテリアのみでなく動植物細胞でも行なわれており、自然界では全く起こりえないような細胞どうしの雑種形成などを行なわせることが可能で、極めて将来性に富んだ遺伝子伝達法と考えられている。我々はこの方法のマイコバクテリアへの応用の可能性を探るため、*M. smegmatis* からプロトプラストの形成と、得られたプロトプラストから桿状菌体への復帰の条件について検討を行なった。

まずプロトプラストの形成であるが、上記の目的のためにはできるだけ安定なプロトプラストを高率に含む浮遊液を実験に必要な充分な量作成する必要がある。そこで種々の条件について検討した結果、以下のような方法により、ほぼ上記条件を満足するプロトプラスト（もしくはスフェロプラスト）浮遊液を作成できることが明らかとなった。まず Tween 80 加トリプトソイブイオンで *M. smegmatis* を振とう培養し、対数増殖期中期でグリシンを 0.75~2%（その至適濃度は菌株によつて異なり、例えば P 53 株では 1%）に加え、そのまま 1 夜培養を続ける。このとき大部分の菌には菌体の一部が膨隆しているのが認められる。翌朝遠心により菌を集め、蔗糖 0.5 M を含む buffer で洗った後、スフェロプラスト化培地（培地中に蔗糖 0.5 M、リゾチーム 50~100 µg/ml、および前培養と同じ濃度にグリシンを加えたもの）に移し更に軽く振とうしながら 15~20 時間培養を続けると、90% あるいはそれ以上の菌が細胞壁のゴーストを脱ぎ捨てるような形をとりながら球状化するが認められる。この時点で残存する桿菌およびゴーストを除くため綿を詰めたカラムで濾過し、更に遠心洗滌によりグリシン、リゾチームを除いてやる。

図5に示したのはこのようにして得られた P 53 株の細胞壁欠損細胞である。電子顕微鏡による観察（図5b）において細胞壁と思われる構造は殆んどみられないので、おそらくプロトプラストといつてよいものと考えられる。

次に、プロトプラストから桿菌体への復帰について、その条件の検討と共に経過を形態学的に追跡した。復帰

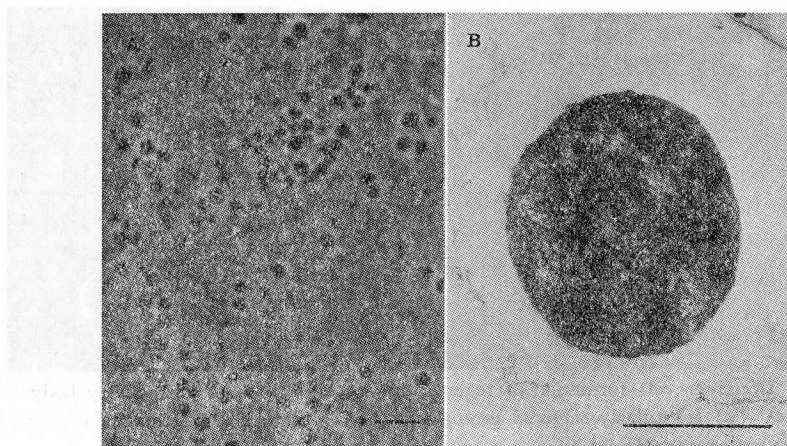


Fig. 5. Cell wall deficient form of *Mycobacterium smegmatis* strain P53. (A) Purified suspension of cell wall deficient forms (bar represents $5\mu\text{m}$). (B) Ultrathin section of a protoplast (bar represents $0.05\mu\text{m}$).

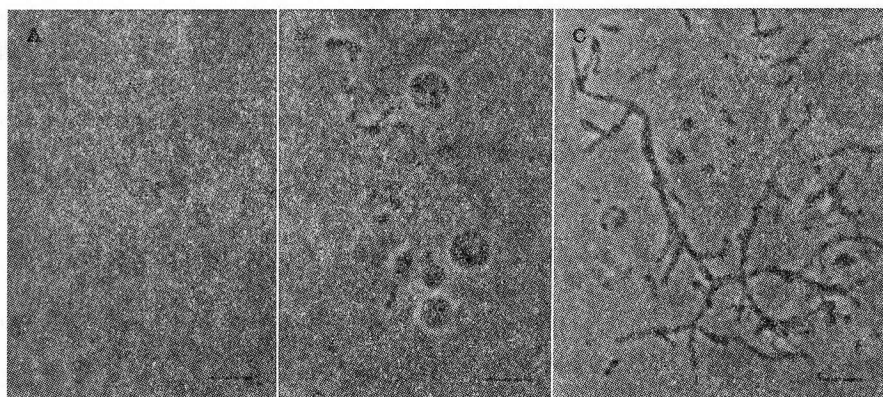


Fig. 6. Phase contrast micrographs of regenerating mycobacterial protoplasts. (A) after 2 days, (B) after 4 days, and (C) after 7 days incubation in regeneration medium (bar represents $5\mu\text{m}$).

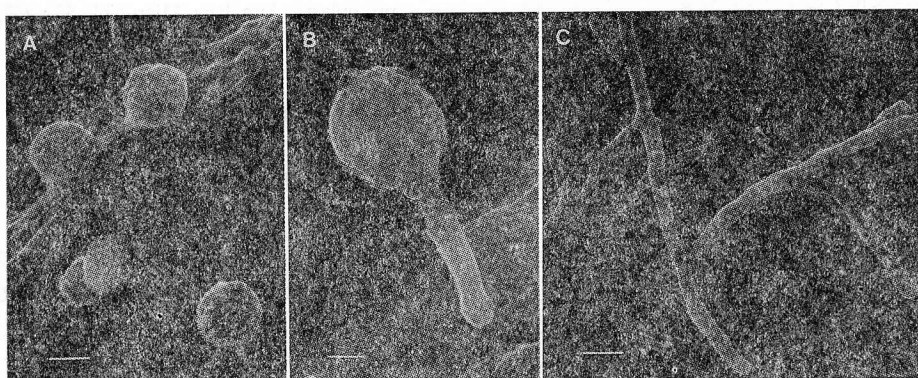


Fig. 7. Scanning electron micrographs of regenerating protoplasts of *M. smegmatis*. (A) 20 hr after incubation (bar represents $1\mu\text{m}$). (B) 3 days after incubation (bar represents $0.5\mu\text{m}$). (C) 7 days after incubation (bar represents $2\mu\text{m}$).

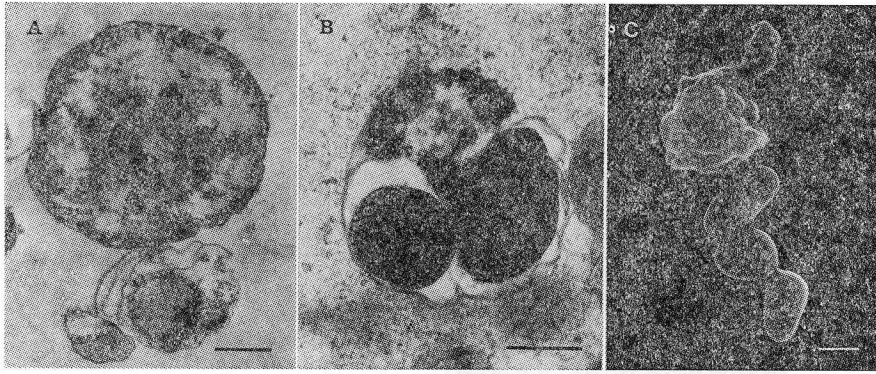


Fig. 8. Daughter cell formation of regenerating protoplasts. (A) Elementary body formation. (B) Irregularly septated protoplast. (C) A protoplast releasing daughter cells (bar represents 0.5 μm).

培地には一定量の Ca^{++} と Mg^{++} が必要とされており、事実ミコバクテリアにおいても最少培地をベースとした場合には蔗糖とともにこの両者を 20 mM および 50 mM 程度に加える必要があつたが、栄養豊富な培地では必ずしも必要ではなかつた。プロトプラストから桿菌体への復帰率は培地の種類や実験ごとによる変動がありその幅は 0.1~10% くらいであつた。

復帰の経過を図 6~8 に示したが、桿菌への復帰には 2 通りの方式があることが明らかとなつた。その第 1 は図 6 および図 7 に示したようにプロトプラストから出芽が生じ、芽の部分が次第に伸長して菌糸状に発育し、やがてこの菌糸に断裂が起こつて、もとの桿状菌体にもどる場合である。この菌糸状の菌体にはあちこちに分岐が生じ (Fig. 6c, Fig. 7c), 隔壁の形成は非常に少ない (写真省略)。このような菌糸状発育は通常の菌を培養したものからは決してみられないもので、復帰途上の菌がなぜこのような発育をするかは不明であるが、この状態の菌は抗酸性が認められないか極めて弱いのでは何らかの細胞壁成分に変化が起こっているものと考えられる。第 2 の方式は図 8 に示すように膨大したプロトプラスト内

に娘細胞が生じ、これが殻を破つて外に飛び出してくる場合である。

以上の 2 つの方式が実際の程度に培地上で起こっているかはまだ必ずしも明らかになつていないが、ミコバクテリアにおけるプロトプラスト形成と桿菌体への復帰方法が確立されたと考えてよいものと思われるので今後この方法を用いて遺伝的な研究を行なつていく予定である。

文 献

- 1) 徳永 徹・水口康雄: ミコバクテリアの性と遺伝, 結核, 48: 481, 1973.
- 2) 水口康雄・徳永 徹: ミコバクテリアの遺伝, 日本細菌学雑誌, 30: 297, 1975.
- 3) 水口康雄・山田 毅: 抗酸菌における交叉耐性, 結核, 53: 243, 1978.
- 4) Mizuguchi, Y. and Tokunaga, T.: Method for isolation of deoxyribonucleic acid from mycobacteria, J Bacteriol, 104: 1020, 1970.
- 5) Hopwood, D.A.: Genetic studies with bacterial protoplasts, Ann Rev Microbiol, 35: 237, 1981.

3. ミコール酸の構造解析と生理

新潟大学医学部細菌学教室

矢 野 郁 也

結核菌を中心とする *Mycobacteria* (およびその近縁細菌) の最も大きな特徴は、“抗酸性”を有することであるが、その発現には細胞壁の化学構造が大きく関与しているものと考えられている。ミコール酸は Order *Actinomycetales* に属する細菌細胞壁に存在する超高級分枝脂肪酸で、炭素数 20 から 90 までの広範囲にわたる α 分枝, β ヒドロキシ脂肪酸であり (図 1), これらの細菌細胞壁の疎水性を保つうえで必須の成分である。この

ような脂肪酸はそのアルキル鎖が天然の生体膜脂質成分中では著しく長いために、構造面でも機能面でも極めてユニークな成分と考えられ、その構造解析については約 40 年も前から活発な研究がすすめられてきた^{1)~5)}。しかしながら、このような脂肪酸は熱に対する不安定さからガスクロマトグラフィー (GC) による分析が困難で単一成分の解析は行なわれていなかった。一方、ミコール酸の構造は、菌種によつて著しく異なり (図 2), 炭素数,

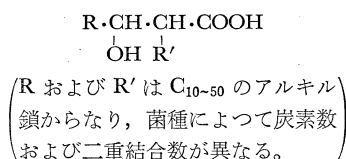


図1 ミコール酸の基本構造

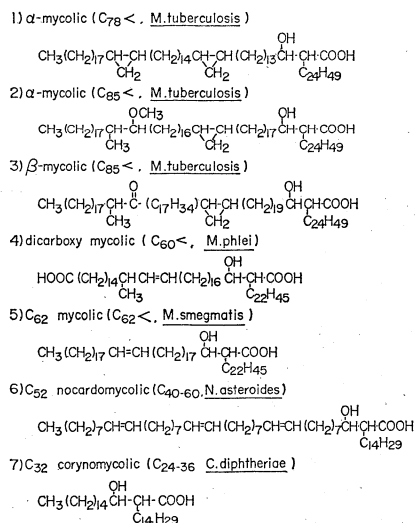


図2 種々の抗酸菌および類縁細菌から得られるミコール酸の構造

二重結合数はもとより、シクロプロパン環やメチル側鎖、メトキシ基を有するもの、ジカルボン酸ミコール酸など極性の異なるものが種々知られており、“分子種”レベルでは著しく多彩な成分を含んでいる。分類学的にはミコール酸の存在が“属”の定義に必須であり、またその構造が“種”により異なることから、菌種の同定にも極めて重要な項目とされている⁶⁾⁷⁾。我々は、ミコール酸研究のための新しい方法論を確立し、これを用いて化学分類学や生理学的研究に役立てる目的で、ガスクロマト質量分析計による単一分子種の分析法について研究を行なつてきた。

ミコール酸構造の解析法

ミコール酸の構造解析の研究は、既に長年多数の研究者達によつて行なわれてきたことは先述したが、一般にはケイ酸カラムクロマトグラフィーを中心とした分離法、元素分析や質量分析、赤外吸収スペクトルや NMR スペクトルが有用な手段として用いられてきた。なかでも最も有力な分析法は質量分析で、ミコール酸の炭素数や二重結合数、直鎖部分や α 側鎖の構造、カルボニル基、メトキシ基の同定には必須の方法と考えられてきた。問題点は、ミコール酸が構造上、高温に極めて不安定なことであり、250~300°C では C₂ と C₃ 位 ($\alpha\beta$) 間で容易に炭素炭素の結合が開裂(熱分解)してしまうことである。

Mycobacterial cells

(glucose-yeast extract-peptone)
 hydrolysis (10% KOH methanol for 3 hrs)
 extraction of fatty acid
 methanolysis (benzene-methanol-H₂SO₄
 10:20:1, v/v/v)

Fatty acid methyl esters

separation by TLC (hexane-ether 4:1, v/v)
 mycolic acid ester
 trimethylsilylation (BSTFA-pyridine 1:1, v/v)

GC-MS analysis of TMS-methylmycolate

(2% OV-1 at 340°C)

Hitachi RMU 6 MG (Ryhaage-type separator)

ionization current	60 μ A
electron energy	20 eV
accelerating voltage	3.2 KV

図3 ミコール酸の GC/MS 分析法の概略

したがつて、従来は“pyrolysis product”すなわちメロミコール (直鎖部分由来のアルデヒド) と α 側鎖に由来するメチルエステルを分析して構造解析がなされており、その方法を発展させて pyrolysis gas chromatography が行なわれてきた⁸⁾。けれどもこの方法では、intact なミコール酸の解析が不可能であり、各分子種の定量は極めて困難である。そこで我々は、ミコール酸の分子種をできるだけ元の構造のまま、簡便に、定量性よく分析したいと考えて、ミコール酸メチルエステルの trimethylsilyl (TMS) 誘導体を調製し、これを最近発展してきた新しい分析法であるガスクロマト質量分析計 (GC/MS) によつて解析しようとした。その方法の概略を図3に示すが、この方法は TMS 化が定量的に行なえることと、TMS メチルエステルは高温でも安定で、調製法が簡便なこと等から多数の試料の分析にも適しており、マススペクトル中のフラグメントイオンの情報量や内容も適度であると考えられ、C₆₀-80 程度のミコール酸までは、極めてよい再現性が得られている (方法の詳細は文献を参照されたい⁹⁾⁻¹²⁾)。最近では、silica gel 薄層クロマト、不飽和度を異にする同族体の分離に有用な硝酸銀薄層クロマトグラフィーおよび GC/MS 法を組み合わせ、単一なミコール酸分子種を分離することが可能となつている。また、これらのほか米国のグループ (Takayama ら¹³⁾ および Gray ら¹⁴⁾) は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてミコール酸分子種を分離し、定量を行なっているが、GC/MS 法と異なり、各分子種の質量分析は、直接導入法によらなければならない点が難点で改良の余地があるように思われる。

を示し、時にはこれらが殆んど重なりあつた状態を示し ($M_1 + M_1'$), 菌種によっては極めて複雑なパターンを示す。このことは *Mycobacteria* では *Nocardia* や *Corynebacteria* と比べて明らかにミコール酸の subclass 組成に差があることを示しており、菌種によつて特徴をもつことを示唆している。このようなミコール酸メチルエステルを TLC プレートから回収して TMS 化を行ない GC/MS を用いて分析すると、まず *Corynebacteria* では C_{32} を中心として、*Rhodococcus* では C_{30-50} 前後の、また *Nocardia* では C_{40-60} 前後の、そして *Mycobacteria* では C_{60-80} 前後の主として偶数ミコール酸に相当する多数のピークが検出される (図5および図6)。これら

のミコール酸メチルエステル TMS 誘導体のうち *N. polychromogenes* の $C_{58,60,62,64}$, ミコール酸の誘導体のマススペクトルを図7に示す。その結果、ミコール酸メチルエステル TMS 誘導体のマススペクトルは、図8に示すような解裂機構により多数のフラグメントイオンを形成し、分子イオン (M^+), ($M-15$) $^+$, ($M-90$) $^+$ イオン等により、ミコール酸の総炭素数および二重結合数が決定された。これに対してフラグメントイオン(A)または(A-90)イオンも一般に顕著に検出されるが、これらは直鎖部分(すなわちメロミコラル)の構造を示しており、一方、フラグメントイオン(B)または(B-29)イオンは α 側鎖の解析に有用であつた。*M. phlei* から得られ

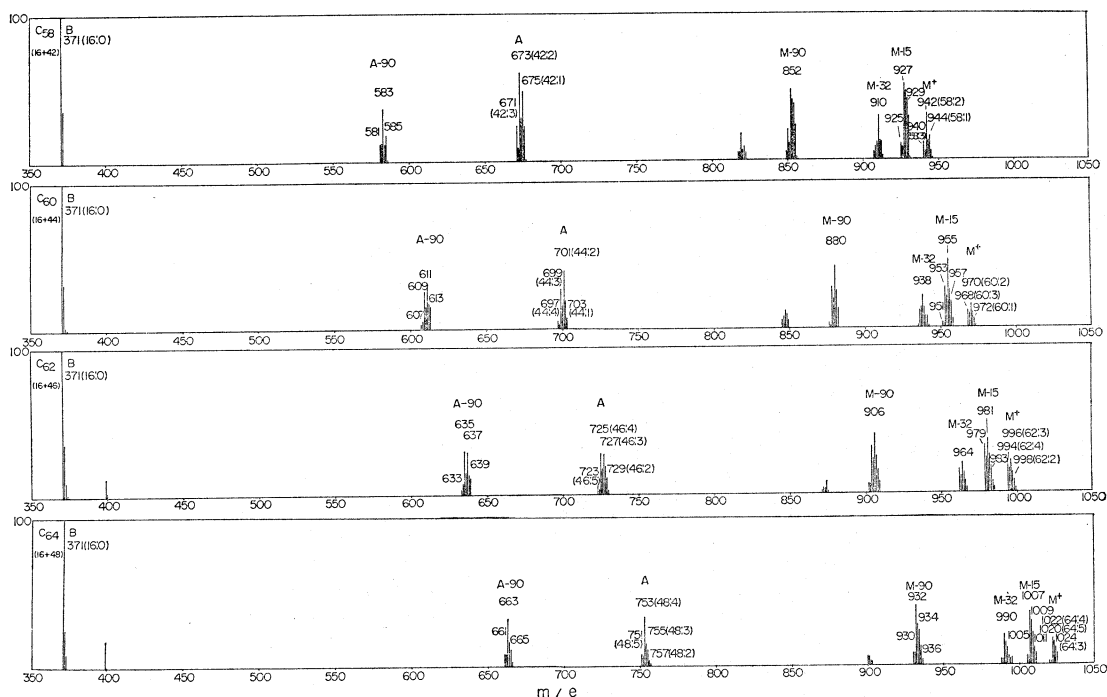


図7 *N. polychromogenes* の $C_{58, 60, 62, 64}$, ミコール酸メチルエステル TMS 誘導体のマススペクトル

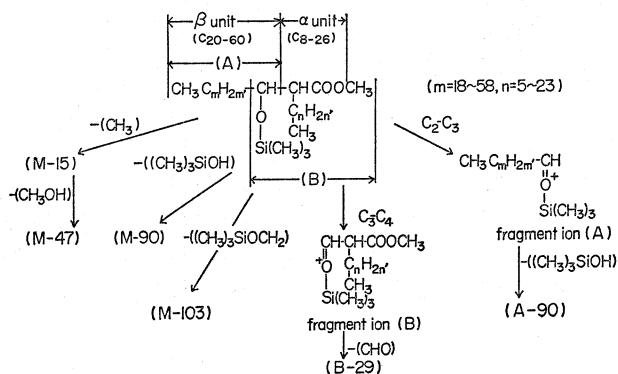


図8 EI マススペクトルにおける TMS ミコール酸メチルエステルのフラグメントイオン生成機構

る C₇₂₋₈₀ の α-ミコール酸 (M₁) の分析結果を表 1 に示す。この結果, *M. phlei* の C₇₂₋₈₀ α-ミコール酸は, 直鎖部分が C₅₀₋₅₅ までの diene 構造 (またはシクロプロパン環を含む) を有しており, 主として偶数酸から成る

が, 一部奇数酸も含んでいること, α 位のアルキル側鎖は C₂₀ または C₂₂ であること等が明らかになった¹⁵⁾。これに対して *N. polychromogenes* のミコール酸は, 炭素数 C₅₆ から C₆₆ に至る偶数酸からなるが, その不飽和度

表 1 *M. phlei* α-ミコール酸 (M₁) メチルエステル TMS 誘導体の GC/MS よる分析

Peak	[M] ⁺	[M-15] ⁺	[M-90] ⁺	[A] ⁺	[A-90] ⁺	[B] ⁺	[B-29]	β unit	α unit
C _{72:2}	1138	1123	1048	785	695	455	426	C _{50:2}	C _{22:0}
C _{74:2}	1166	1151	1076	813	723	455	426	C _{52:2}	C _{22:0}
				785	695	483	454	C _{50:2}	C _{24:0}
C _{76:2}	1194	1179	1104	813	723	483	454	C _{52:2}	C _{24:0}
				841	751	455	426	C _{54:2}	C _{22:0}
C _{77:2}	1208	1193	1118	855	765	455	426	C _{55:2}	C _{22:0}
C _{78:2}	1222	1207	1132	841	751	483	454	C _{54:2}	C _{24:0}
C _{79:2}	1236	1221	1146	855	765	483	454	C _{55:2}	C _{24:0}
C _{80:2}	1250	1235	1160	869	779	483	454	C _{56:2}	C _{24:0}

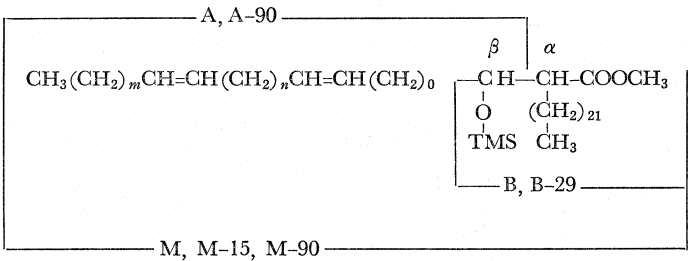


表 2 *N. polychromogenes* ミコール酸メチルエステル TMS 誘導体の GC/MS 分析

Peak	M ⁺	M-15	M-90	Components	Carbon No. & double bond No.	Flagment A	Flagment B	Branch structure
P ₅₆	916	901	826	C ₆₀ H ₁₂₀ O ₃ Si	C _{56:1}	647(: 1)	371(: 0)	m=38 : 1 n=13 : 0
	914	899	824	C ₆₀ H ₁₁₈ O ₃ Si	C _{56:2}	645(: 2)		38 : 2
P ₅₈	944	929	854	C ₆₂ H ₁₂₄ O ₃ Si	C _{58:1}	675(: 1)	371(: 0)	m=40 : 1 n=13 : 0
	942	927	852	C ₆₂ H ₁₂₂ O ₃ Si	C _{58:2}	673(: 2)		40 : 2
	940	925	850	C ₆₂ H ₁₂₀ O ₃ Si	C _{58:3}	671(: 3)		40 : 3
P ₆₀	972	957	882	C ₆₄ H ₁₂₈ O ₃ Si	C _{60:1}	703(: 1)	371(: 0)	m=42 : 1 n=13 : 0
	970	955	880	C ₆₄ H ₁₂₆ O ₃ Si	C _{60:2}	701(: 2)		42 : 2
	968	953	878	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₃ Si	C _{60:3}	699(: 3)		42 : 3
	966	951	876	C ₆₄ H ₁₂₂ O ₃ Si	C _{60:4}	697(: 4)		42 : 4
P ₆₂	998	983	908	C ₆₆ H ₁₃₀ O ₃ Si	C _{62:2}	729(: 2)	371(: 0)	m=44 : 2 n=13 : 0
	996	981	906	C ₆₆ H ₁₂₈ O ₃ Si	C _{62:3}	727(: 3)		44 : 3
	994	979	904	C ₆₆ H ₁₂₆ O ₃ Si	C _{62:4}	725(: 4)		44 : 4
P ₆₄	1026	1011	936	C ₆₈ H ₁₃₂ O ₃ Si	C _{64:2}	757(: 2)	371(: 0)	m=46 : 2 n=13 : 0
	1024	1009	934	C ₆₈ H ₁₃₀ O ₃ Si	C _{64:3}	755(: 3)		46 : 3
	1022	1007	932	C ₆₈ H ₁₂₈ O ₃ Si	C _{64:4}	753(: 4)		46 : 3
	1020	1005	930	C ₆₈ H ₁₂₆ O ₃ Si	C _{64:5}	751(: 5)		46 : 5
P ₆₆	1052	1037	962	C ₇₀ H ₁₃₄ O ₃ Si	C _{66:3}	783(: 3)	371(: 0)	m=48 : 3 n=13 : 0
	1050	1035	960	C ₇₀ H ₁₃₂ O ₃ Si	C _{66:4}	781(: 4)	369(: 1)	48 : 4 14 : 1
	1048	1033	958	C ₇₀ H ₁₃₀ O ₃ Si	C _{66:5}	779(: 5)		48 : 5

(二重結合数)は *Mycobacteria* と比べて著しく高く、最高 hexaene までを含んでおり、またその二重結合はミコール酸の直鎖部分に存在することが明らかとなつた(表2)¹²⁾。このことは、*Mycobacteria* のミコール酸が最高 diene までにとどまることと比べて、物理化学的性質が著しくことなることを意味しており、両者の細胞壁の性状の違いを反映しているものと考えられる。

ミコール酸分子種組成の定量と化学分類学への応用

ミコール酸は、前述したように Order Actinomycetales に属する細菌の特徴的な成分であり、現在までに *Mycobacteria*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordona*, *Bacterionema*, *Corynebacteria* および *Brevibacterium* にその存在が知られている。炭素数は一般に *Corynebacteria* のミコール酸が最も短く、 C_{20-38} で偶数酸から成るのに対して、*Bacterionema* では偶数奇数多数の分子種から成る。また *Nocardia* では C_{52} が中心で tetraene までの二重結合同族体が含まれるが、*Rhodococcus* の各菌種は構成幅が極めて大きく、 C_{30-34} (monoene まで)、 C_{40-46} (diene まで)、 C_{50-58} (tetraene まで) および C_{64-68} 前後のもの(penta-および hexaene まで)等、極めて多彩である。これに対して、*Mycobacteria* のミコール酸は一般に炭素数が多く、subclass 組成も複雑で、菌種により著しく変化に富み、直鎖モノカルボン酸(α -ミコール酸)をはじめ種

々のメチル側鎖やシクロプロパン環をもつもの、メトキシ酸およびジカルボン酸等極性の異なる同族体から成る。ミコール酸の TLC および GC/MS による subclass ならびに分子種組成の分析結果から、*M. tuberculosis* complex は互いに極めて類似したパターンを示し、*M. intracellulare-avium-scrofulaceum* complex とは明確な差が認められること、また迅速発育菌群中でも *M. phlei* のような発色菌群と、*M. smegmatis* のような非発色菌群との間にはジカルボンミコール酸(エステルミコール酸由来のものと考えられる)の有無によつて大きな差があること¹⁶⁾、さらにこれらの菌種同士も分子種組成に明らかな差があることが見出された。その結果、従来位置づけの不明確であつた菌群(*M. parafortuitum* と *M. diernhoferi* の差、*M. chelonae* と *M. fortuitum* の差、*Rhodococcus* の不均一性や *Gordona aurantiaca* の位置づけ等)の分類学的グループ分けが可能となつた。図9に *Nocardia* および *Rhodococcus* ミコール酸の分子種組成と平均炭素数を、また図10には *Mycobacteria* の α -ミコール酸(M_1+M_1')の分子種組成を示す¹⁷⁾。

ミコール酸組成の変動と細胞壁合成の温度による調節

Mycobacteria やその近縁細菌は一般に、宿主寄生性のものと土壌や水中に棲息するものの両者を含むが、前者の場合、その環境特に発育温度は宿主依存性のものが

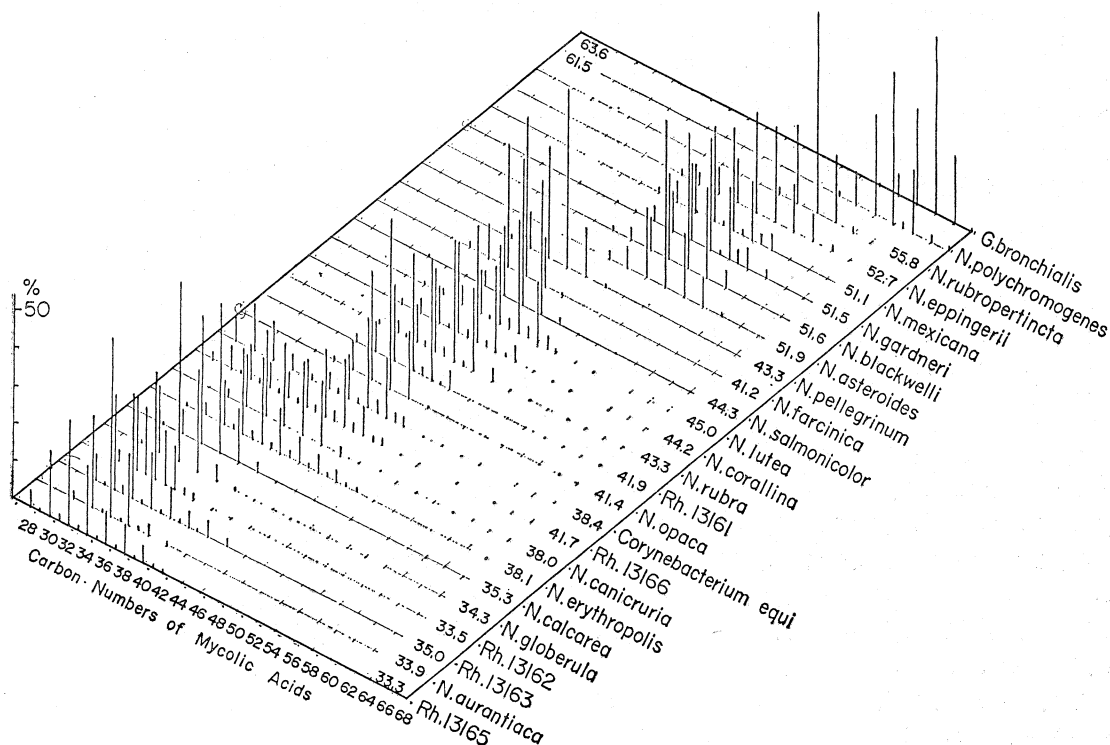


図9 *Nocardia* および *Rhodococcus* のミコール酸分子種の分布

Molecular Species Composition of " α " Mycolic Acids ($M_1 + M_1'$) in Mycobacteria
(Runyon-IV, Rapid Growers)

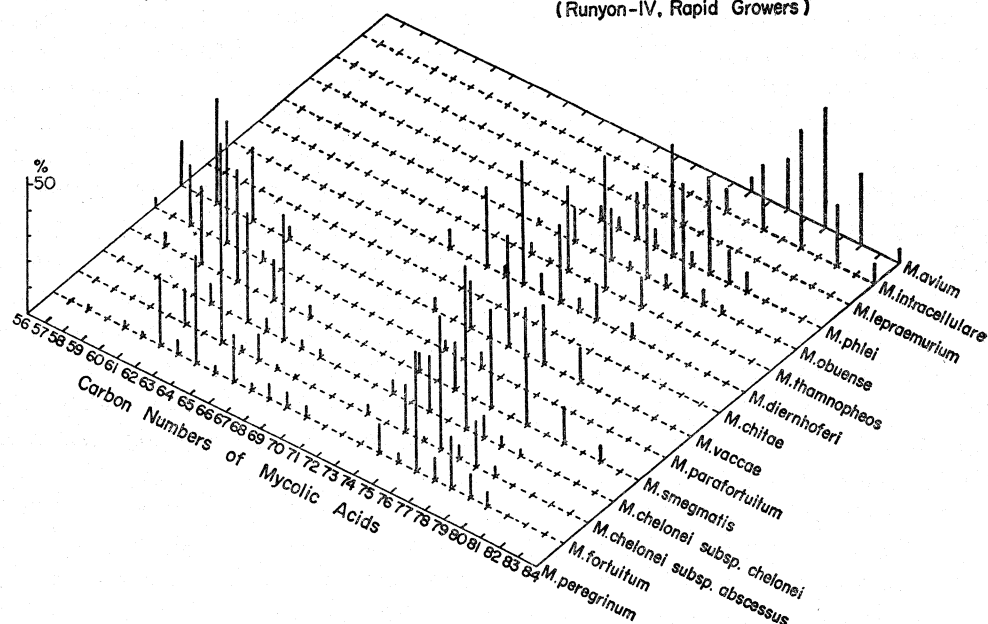


図10 Mycobacteria (Runyon IV 群, Rapid growers) の α ミコール酸 ($M_1 + M_1'$) 分子種の分布

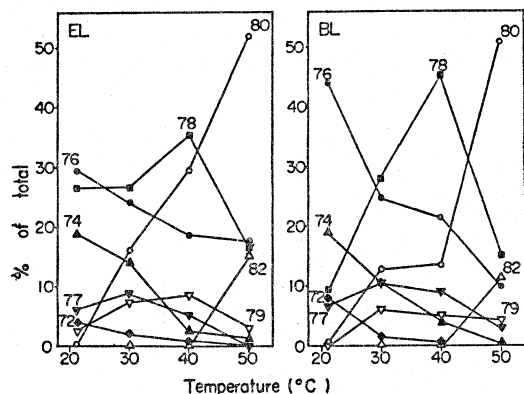


図11 *M. phlei* の α -ミコール酸分子種組成の温度による変化。EL: chloroform-methanol 抽出脂質の α -ミコール酸, BL: 細胞壁結合脂質の α -ミコール酸。

多く、人型結核菌は急速に冷却することにより“cold shock”を起こし、鳥型菌は高温側に、また変温動物寄生性の *M. chelonae* や *M. fortuitum* は低温側に至適発育温度を有している。これに対して *M. phlei* をはじめとする saprophytic な菌群は広範囲の温度領域に適応し、細胞壁の温度適応機構の解析には好都合な材料である。最近著者らは、ミコール酸の構造が、培養条件殊に温度を変化させた場合に著しく変動することを見出した^{15)18)~20)}。この現象は、抗酸菌細胞壁の温度適応現象の一つと考えられ、Mycobacteria の場合には主

して炭素鎖長が変化し、Mycobacteria 中最も発育温度領域の広い *M. phlei* の場合、20°C と 50°C の間で α -ミコール酸の炭素鎖長の差は C_4 にも達する(図11)。これに対して *Nocardia* では、培養温度変化に際して不飽和度が変化し、低温培養時には、高度不飽和酸が、高温培養時には飽和酸が増加する。図12に *N. asteroides* の低温および高温培養時のミコール酸組成をマスフラグメントグラフィーにより解析して得た結果を示す。これらのミコール構造の変動はいずれも生理的には明らかに適応性の変化であり、このことはまた ESR を用いた実験でも証明された。また、これらの適応性変化は、いずれの菌の場合でも温度シフト後比較的短時間(1世代時間内)で認められ(図13)、抗酸菌細胞壁ではその機能を維持するためにミコール酸組成が活発に変動して環境に適応していることが明らかとなった。

安定同位元素を用いたミコール酸生成の研究

ミコール酸生成の研究は、従来、方法論的な困難さのために、とくに分子種レベルでの検討はほとんど行なわれていなかった。著者らは、種々の ^{14}C 放射性同位元素ラベル前駆体のみならず、 ^{18}O や ^{13}C 等安定同位元素ラベル前駆体の取り込み実験を行ない、GC/MS を用いて取り込まれた同位元素を定量する方法を検討した結果、これらは、放射性同位元素と同等またはさらに詳細な情報を与えることが明らかとなった。その結果、*M. phlei* をはじめとする発色菌群および MAIS-complex に広く分布するエステルミコール酸は、Baeyer-Villiger 型酸化

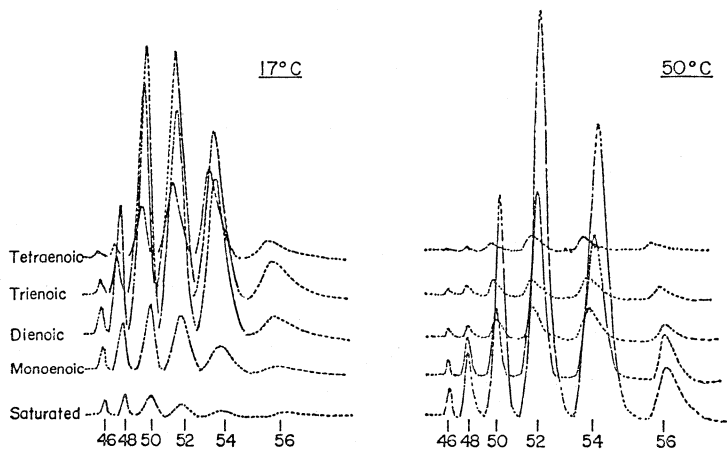


図12 *N. asteroides* のミコール酸 TMS メチルエステルのマスフラグメントグラム。高温菌 (50°C) では飽和ミコール酸が、低温菌 (17°C) ではジェンおよびトリエンミコール酸が多量を占める。

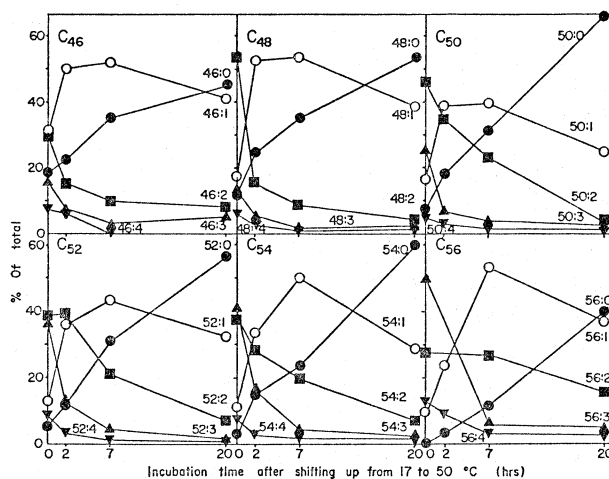


図13 *N. asteroides* の温度シフト後のミコール酸組成の変化。対数増殖期まで 17°C で培養後、50°C に shift up し、経時的にミコール酸組成をしらべた結果を示す。

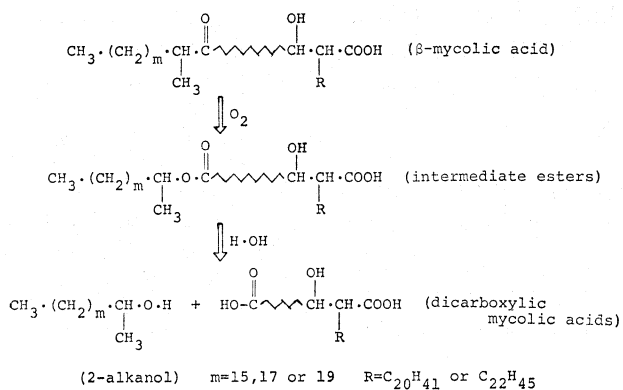


図14 *M. phlei* におけるエステルミコール酸，ジカルボキシミコール酸および2級アルコールの合成機構

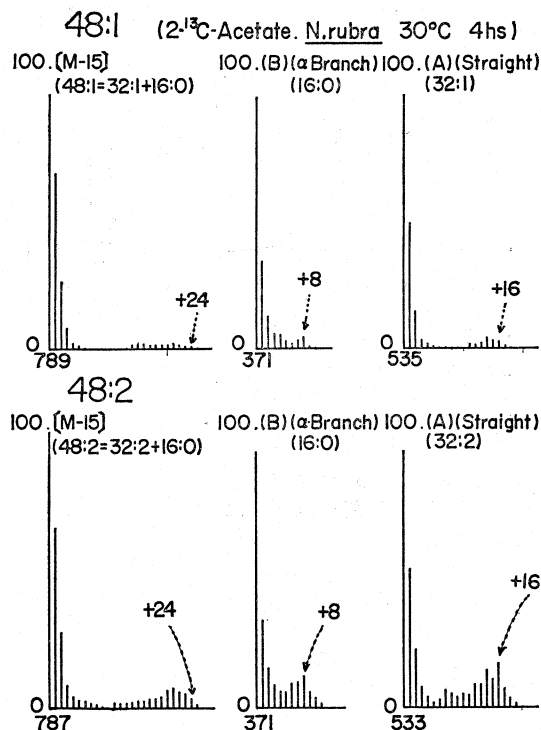


図15 *N. rubra* 休止菌による 2- ^{13}C -酢酸のミコール酸直鎖および α 側鎖への取り込み。C₄₈ モノエンおよびジエンミコール酸への ^{13}C の取り込みを示す。いずれも (M-15) イオンは +24 マスのシフトを、直鎖部分に由来するフラグメントイオン (A) は +16 マスの、 α 側鎖に由来するフラグメントイオン (B) は、+8 マスのシフトを示す。

反応により、分子状酸素 ($^{18}\text{O}_2$) が直接、ケトミコール酸に取り込まれて生成すること (図14)²¹⁾、また、*N. rubra* のミコール酸合成は C₂→C_{14,16} までの脂肪酸が速やかに合成されるほか、C_{14,16} から C_{30,36} までの脂肪酸直鎖の伸長反応により中間体 (メロミコール酸) が合成され、前者との縮合、還元により C₄₀₋₅₀ ミコール酸が生成することも明らかとなつた (図15)²²⁾。これらの結果から、ミコール酸合成の遺伝的および環境条件による調節機構が、各種中間体合成の段階に存在することが示唆されるが、今後詳細な検討を行ないたい。

本研究の推進にあたって、(元)新潟大学医学部細菌学教室鳥山(水野)浄子博士および帝塚山短期大学富安郁子助教授の多大な御協力を得た。また、本研究の初期の段階から大阪市立大学医学部刀根山結核研究所楠瀬正道教授の有益な御助言を頂いた。併せて深く感謝の意を表する。

文 献

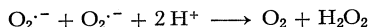
- 1) Asselineau, J.: The Bacterial Lipids (Hermann, Paris). 1966.
- 2) Etemadi, A. H. et al.: Identification d'homologues supérieurs des acides corynomycolique et corynomycolénique dans les lipides de *Corynebacterium* 506, Bull Soc Chim Biol, 47 : 631, 1965.
- 3) Lederer, E.: Glycolipids of mycobacteria and related microorganisms, Chem Phys Lipids, 7 : 294, 1967.
- 4) Bordet, C. and Michel, G.: Structure et biogenèse des lipides a haut poids moléculaire de *Nocardia asteroides*, Bull Soc Chim Biol, 51 : 527, 1969.
- 5) Clermonte, R. and Lederer, E.: Sur la structure chimique des acides phleimycoliques dicarboxyliques, C R Hebd Seanc Acad Sci, Paris 242 : 2600, 1956.
- 6) Rogosa, M. et al.: Coryneform group of bacteria, Bergey's Man, Determin Bacteriol, 8 : 599, 1974. (ed, Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.)
- 7) Runyon, E. H. et al.: Mycobacteriaceae, Bergey's Man, Determin Bacteriol, 8 : 681, 1974. (ed, Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.)
- 8) Etémadi, A. H.: The use of pyrolysis gas chromatography and mass spectroscopy in the study of the structure of mycolic acids, J Gas Chromatogr, 5 : 447, 1967.
- 9) Yano, I. et al.: Structural analysis of molecular species of nocardiomycolic acids from *Nocardia erythropolis* by the combined system of gas chromatography and mass spectrometry, FEBS Lett, 21 : 215, 1972.
- 10) Yano, I. and Saito, K.: Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of molecular species of corynomycolic acids from *Corynebacterium ulcerans*, FEBS Lett, 23 : 352, 1972.
- 11) Yano, I. et al.: GC-MS による *Nocardia* および類縁抗酸性細菌のミコール酸分子種の分析と Chemical taxonomy; Proc 2nd Meet Japan Soc Med Mass Spectrom Abst, 35 : 1977.
- 12) Yano, I. et al.: Separation and analysis of molecular species of mycolic acids in *Nocardia* and related taxa by gas chromatography-mass spectrometry, Biomed Mass Spectrom, 5 : 14, 1978.
- 13) Qureshi, N. et al.: Characterization of the purified components of a new-homologous series of α -mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra, J Biol Chem, 253 : 5411, 1978.
- 14) Steck, P. A. et al.: Mycolic acids. A reinvestigation J Biol Chem, 253 : 5625, 1978.
- 15) Toriyama, S. et al.: Separation of C₅₀₋₆₀ and C₇₀₋₈₀ mycolic acid molecular species and their changes by growth temperatures in *Mycobacterium phlei*, FEBS Lett, 95 : 111, 1978.
- 16) Yano, I. et al.: Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of C₅₀₋₆₀ mono- and dicarboxy mycolic acids in mycobacteria, Proc 3rd Meet Japan Soc Med Mass Spectrom Abst, 169,

- 1978.
- 17) 矢野郁也・鳥山浄子: Mycobacteria とその類縁抗酸菌ミコール酸 (C_{60-80} 超高級脂肪酸) のガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー, 質量分析, 27: 69, 1979.
 - 18) Toriyama, S. et al.: Regulation of cell wall mycolic acid biosynthesis in acid-fast bacteria. I. Temperature-induced changes in mycolic acid molecular species and related compounds in *Mycobacterium phlei*, J Biochem, 88: 211, 1980.
 - 19) Tomiyasu, I. et al.: Changes in molecular species composition of nocardomycolic acids in *Nocardia rubra* by the growth temperature, Chem Phys Lipids, 28: 41, 1981.
 - 20) Tomiyasu, I.: Mycolic acid composition and thermally adaptative changes in *Nocardia asteroides*, J Bacteriol 151: 828, 1982.
 - 21) Toriyama, S. et al.: Incorporation of ^{18}O into long-chain, secondary alcohols derived from ester mycolic acids in *Mycobacterium phlei*, Biochim Biophys Acta, 712: 427, 1982.
 - 22) Tomiyasu, I. et al.: Studies on biosynthesis of mycolic acids using stable isotopes I. Incorporation of $2-^{13}C$ -acetate and 2H_2O into mycolic acids by the resting cell suspension of *N. rubra*, Proc 6th Meet Japan Soc Med Mass Spectrom Abst, 71, 1981.

4. 抗酸菌のスーパーオキシド・ジスムターゼ

大阪市立大学医学部刀根山結核研究所 楠 瀬 正 道

スーパーオキシド・ジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) は次の反応を触媒する酵素である¹⁾。



本酵素は1969年, Fridovich によつて赤血球中に初めて見出された。基質のスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) は細胞の内外で酸素分子から一電子還元により生じるフリーラジカルで, Fridovich らにより生物に有害な活性酸素と考えられた²⁾。彼らは SOD の役割は $O_2^{\cdot-}$ を迅速に除去して細胞をその害から防御するものと報告した。この SOD の発見が突破口となり, 生体と活性酸素の関係についての研究がにわかに活発化し, 過去約10年間に毎年多数の研究が発表されている³⁻⁴⁾。最近の研究では, 生物に直接有害な作用を発揮するのは $O_2^{\cdot-}$ 自身よりも, $O_2^{\cdot-}$ から二次的につくられるヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) や一重項酸素 (1O_2) であるといわれているが, SOD の重要性に変わりはない。われわれは結核菌が好気性細菌で, 肺のような酸素分圧の高い (当然 $O_2^{\cdot-}$ 濃度は高い) 環境下で増殖することから, 酸素毒性防御機構の一として SOD が発達していると予想した。さらに白血球やマクロファージが $O_2^{\cdot-}$ を発生して殺菌作用に関与することが明らかとなつてきた^{3,4)}。これらの知見からも, 結核菌をはじめとする病原性抗酸菌の宿主細胞内増殖によつて活性酸素の代謝は極めて重要と考えられる。抗酸菌のカタラーゼやペルオキシダーゼの報告は古くから数多いが, SOD に関する研究は全くみられない。そこでわれわれは種々の抗酸菌の SOD について実験を行ない, 以下の成績を得た。

I. 抗酸菌 SOD の性質

われわれは種々の抗酸菌から SOD を均一にまで精製し (Fig. 1), その性状について研究した⁵⁾⁻⁹⁾。SOD は生物中に広く分布するが, 細菌には鉄を含む酵素 (Fe-SOD) とマンガンを含む酵素 (Mn-SOD) が知られてい

る¹⁰⁾。結核菌 H₃₇Ra および H₃₇Rv より分離した SOD は分子量が約8万の4量体で, 4原子の鉄が結合し, 水溶液は黄色を呈している⁵⁾。一方, 他の細菌の Fe-SOD はいずれも分子量約4万の2量体で, 1~1.8 原子の鉄を含んでいる。即ち結核菌の SOD は大変ユニークな存在であつたが, 1981年, 2種の archaeobacteria (好熱好酸菌¹⁰⁾とメタン産生菌¹¹⁾) からも4量体の Fe-SOD が分離された。これらの菌は真正細菌とは全く異なり, 真核生物に類似した生化学的性質も具え, 第3の生物系統に属すると考えられているものである。次に結核菌以外の抗酸菌 (類縁菌も含めて) の SOD はいずれもマンガンを含み, ピンク色を呈している。分子量は菌種により異

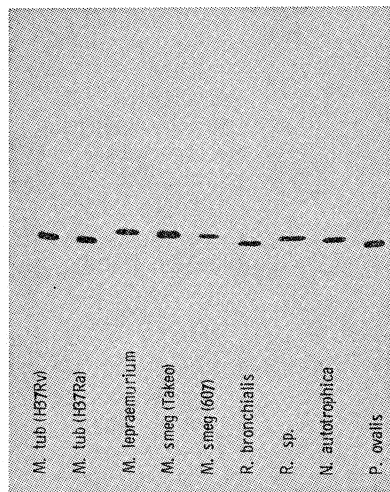


Fig. 1. Slab gel electrophoresis of SODs from various species of mycobacteria and other bacteria.

R. sp. received as "*Nocardia asteroides*", but very similar to *Rhodococcus blackwellii*. P. ovalis, *Pseudomonas ovalis*.

なり、鼠らい菌⁶⁾, *M. smegmatis*⁷⁾, *M. phlei*⁸⁾の各酵素はそれぞれ2, 3, 4量体で、類縁菌の *Rhodococcus*⁷⁾の酵素も4量体である。一方、他の細菌の Mn-SOD は、前述の Fe-SOD と同様に、大部分が2量体である。ところが、抗酸菌のSOD はマンガンの他に少量の鉄も酵素に結合していることが明らかとなった。*M. smegmatis* のSODでは1.7原子のマンガンの他に、約1原子の鉄が含まれている。このようなマンガンと鉄の両金属を含むSODの存在は、抗酸菌や^{6)~8)} *Rhodococcus*⁹⁾に特異的である。

つぎに結核菌⁵⁾, *M. smegmatis*⁷⁾, 鼠らい菌 (*M. lepraemurium*⁶⁾) および *R. bronchialis*⁹⁾ 各SODについてEdman分解法によりN末端アミノ酸配列の決定を36段まで行なつた (Fig. 2)¹²⁾。各SODは互いに極めて類似したアミノ酸配列を示す。例えば結核菌と *M. smegmatis* の両酵素は10番目のアミノ酸がそれぞれトリプトファンとチロジンで、他は全く同じ配列である。Fig. 3に抗

酸菌および他の細菌や下等藻類等のSODのN末端アミノ酸配列の相同性%を示す。これより抗酸菌のSODの構造は、一般細菌よりもミトコンドリアのSODに類似するという注目すべき結果が得られた。抗酸菌と酵母ミトコンドリアSODの相同性が約65%に対し、抗酸菌と一般細菌(10菌種)、ならびに酵母ミトコンドリアと一般細菌の酵素の相同性はそれぞれ約40%および47%である。なお真核生物の細胞質に存在する銅を含むSOD (Cu-SOD)は細菌やミトコンドリアのSODとは共通した構造を全く有しない。以上の成績はミトコンドリアの細菌共生起源説を支持するのみならず、抗酸菌が進化の面で一般細菌よりもミトコンドリアと近い関係にあるという可能性を示唆するものである。

II. 抗酸菌のSOD活性の変動

つぎにわれわれは種々の抗酸菌のSOD活性について検討した結果、育成環境に応じて著しく変動することを見出した。

	I	10
<i>M. tuberculosis</i>	Ala-Glu-Tyr-Thr-Leu-Pro-Asp-Leu	Asp-Trp-Asp-Tyr-Gly-Ala-Leu-Glu-Pro-His
<i>M. smegmatis</i>	Ala-Glu-Tyr-Thr-Leu-Pro-Asp-Leu	Asp-Tyr-Asp-Tyr-Gly-Ala-Leu-Glu-Pro-His
<i>M. lepraemurium</i>	Ala-Glu-Tyr-Thr-Leu-Pro-Asp-Leu	Asp-Trp-Asp-Tyr-Glu-Ala-Leu-Glu-Pro-His
<i>R. bronchialis</i>	Ala-Glu-Tyr-Thr-Leu-Pro-Asp-Leu	Pro-Tyr-Asp-Tyr-Gly-Ala-Leu-Glu-Pro-His
	20	30
<i>M. tuberculosis</i>	Leu-Ser-Gly-Gln-Leu-Asn-Glu-Leu-His-His-Ser-Lys-His-His-Ala-Thr-Tyr-Val	
<i>M. smegmatis</i>	Leu-Ser-Gly-Gln-Leu-Asn-Glu-Leu-His-His-Ser-Lys-His-His-Ala-Thr-Tyr-Val	
<i>M. lepraemurium</i>	Ile-Ser-Gly-Gln-Ile-Asn-Glu-Ile-His-His-()-Lys-His-His-Ala-Thr-Tyr-Val	
<i>R. bronchialis</i>	Ile-Ser-Gly-Lys-Ile-Phe-Glu-Leu-His-His-Asp-Lys-()-His-Ala-Thr-Tyr-Val	

Fig. 2. The N-terminal sequence of SODs from mycobacteria and related bacteria.

Organisms	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 <i>M. tuberculosis</i>																			
2 <i>M. smegmatis</i>	97																		
3 <i>M. lepraemurium</i>	89	86																	
4 <i>R. bronchialis</i>	80	83	82																
5 Yeast mitochondria	66	62	68	62															
6 Chicken liver "	61	64	61	75	67														
7 Human liver "	59	62	57	68	61	89													
8 <i>E. coli</i> (Mn)	58	61	63	60	45	57	55												
9 <i>Bacillus</i>	47	50	54	54	38	61	55	67											
10 <i>Thermus</i>	46	49	56	50	35	57	52	54	68										
11 <i>Rhodopseudomonas</i>	38	41	39	44	31	43	34	48	48	40									
12 <i>Photobacterium</i>	44	44	49	49	41	54	45	51	64	51	46								
13 <i>Pseudomonas</i>	47	50	51	57	38	54	45	53	64	49	62	74							
14 <i>Chlorobium</i>	45	49	50	50	39	56	54	51	54	47	44	65	61						
15 <i>Spirulina</i>	43	43	44	44	31	43	38	44	50	44	52	59	51	51					
16 <i>E. coli</i> (Fe)	38	41	43	48	43	59	50	55	62	52	72	72	75	52					
17 <i>Chromatium</i>	41	44	45	50	45	59	50	50	60	52	42	68	61	64	50	79			
18 <i>Desulphovibrio</i>	33	37	37	52	37	52	46	46	50	43	54	57	59	46	67	56			
19 <i>Plectonema</i>	36	36	36	45	38	48	38	48	48	39	48	42	48	62	52	48	45		

Fig. 3. Percentage similarity matrix for various SODs.

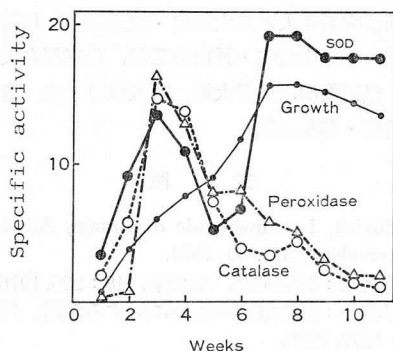


Fig. 4. Changes in SOD, catalase and peroxidase activities of the crude extracts from *M. tuberculosis* H₃₇Ra during growth.

1) 結核菌の SOD 活性

結核菌 H₃₇Ra はソートン培地に培養、一定時間後に菌体を超音波で破碎、抽出液の SOD や他の酵素活性を測定した (Fig. 4)¹³⁾。SOD, カタラーゼ, ペルオキシダーゼ各活性は培養時間と共に増加し、培養 3 週目にピークに達し、以後急激に減少した。ところが SOD 活性のみは再び上昇し、第 7 週で第 2 のピークに達した。さらに菌の膜画分の O₂⁻ 生成活性も第 3 週でピークに達した。おそらくこの時期では菌体内の O₂⁻ と H₂O₂ の濃度は最高になり、それに対応して SOD やカタラーゼの活性が増加したものと推定される。しかし SOD 活性の第 2 のピークについては、その理由は全く不明である。一方、イソクエン酸脱水素酵素、乳酸酸化酵素、プロテアーゼ、NADH-チトクローム c 還元酵素の活性は培養時期で殆ど差は認められなかった。以上の成績は結核菌が環境の変化に対応して SOD やカタラーゼ活性を変動させる調節機構を具えており、結核菌における活性酸素代謝の重要性を示唆するものである。

2) 鼠らい菌の SOD 活性

1% 小川卵黄培地に約 2 カ月間培養した鼠らい菌ハワイ株の超音波破碎抽出液の SOD 活性は 100~200 単位/mg タンパク質で、この価は今までに報告されたいずれの生物の SOD 活性と比べても桁外れに高い⁶⁾。本抽出液からわずか 18 倍の精製で純粋の SOD が分離されるので、抽出液の全タンパク質の 5~6% (1/18) が SOD と推定できる。この性質はハワイ株以外の鼠らい菌 8 株についても同様である (Fig. 5)。したがって SOD 含量に関しては鼠らい菌は全生物中最高である。つぎに鼠らい菌が増殖したマウスの皮下結節から菌を分離し、SOD 活性を測定したところ、比活性はわずか 1~1.5 単位/mg タンパク質であつた。しかしながら培養鼠らい菌から精製した SOD をウサギに注射して得られた鼠らい菌 SOD 抗体を使用して、定量沈降反応により測定すると、SOD

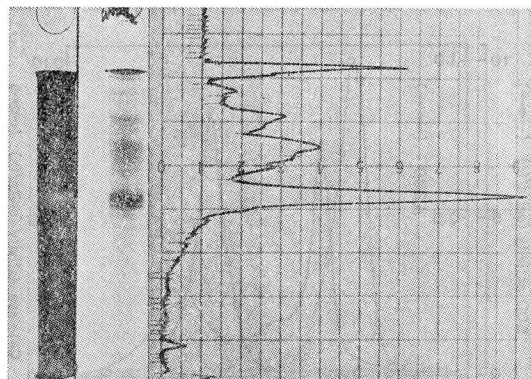


Fig. 5. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the crude extracts from *M. lepraemurium*. Left, stained for SOD activity. Right, stained for protein; the protein pattern was scanned at 620 nm.

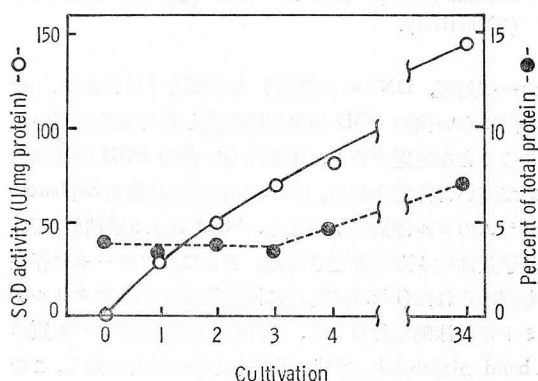


Fig. 6. Effect of successive cultivation on SOD content in *M. lepraemurium*. ○, SOD activity; ●, SOD content determined by quantitative precipitin reaction with the anti-SOD antibody.

含量は 4% であつた。この細胞内増殖菌を小川卵黄培地に培養し、4 代まで植えついでおのの菌の SOD 含量を測定した (Fig. 6)。SOD 活性は代を重ねるに従って増加するが、免疫学的手法で測定した SOD 含量は殆ど変化しなかった。後者はおそらく SOD の inactive form によるもので、培養菌の細胞内で active form に変換するものと考えられる。

3) らい菌の SOD 活性

らい菌 (*M. leprae*) が感染増殖したアルマジロの肝臓 (WHO より分与) から Draper 法によつてらい菌を分離、菌体を超音波で破碎して得られた抽出液の SOD 活性は 18~30 単位/mg タンパク質であつた¹⁴⁾。この価は鼠らい菌以外の菌と比べると低いものではない。しかもアルマジロの肝臓は長時間保存されたものであり、また組織かららい菌分離の際に長時間かつ複雑な操作 (コラゲ

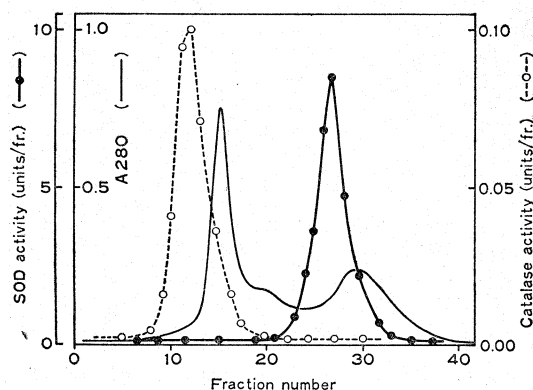


Fig. 7. Gel filtration of the cell-free extracts of *M. leprae* on a Sepharose 6B column (1×75 cm). The elution rate was 9 ml/h. Fractions of 1.5 ml each were collected, and assayed for protein at 280 nm (—), and for SOD (●) and catalase (○) activity.

ナーゼ処理, DNase 処理等)を必要とするために, その間にらい菌の SOD が著明に失活した可能性が高い。このことを考慮すると, 本来のらい菌の SOD 活性は極めて高いと推定される。このらい菌の抽出液を Sepharose カラムのゲル濾過にかけると, SOD は 7.5 倍精製され, 分子量は約 4 万と推定された。さらにカタラーゼの存在も認められた (Fig. 7)¹⁵⁾。次に同抽出液のポリアクリルアミド電気泳動を行なうと, 数種の主要なタンパク質の band が認められ, SOD 活性はその一つと一致し, この band は鼠らい菌 SOD 抗体を加えると免疫沈降物として沈殿した¹⁴⁾。今までのらい菌の酵素については diphenol oxidase 活性に関する研究のみであり¹⁶⁾, しかもその酵素の本体は全く不明である。したがって, SOD とカタラーゼはらい菌に存在する酵素として明白に証明された最初の酵素である。らい菌の一般の代謝活性は極端に低いと考えられるなかで, SOD 活性が著しく高いことは, らい菌においても活性酸素の代謝の重要性を示唆するものである。

以上, 結核菌と共に最も代表的な細胞内寄生性抗酸菌である鼠らい菌とらい菌についても SOD 活性に関する実験成績を示した。抗酸菌は環境に対する抵抗性が強く, 多くの菌種が宿主細胞内で増殖するが, それには酸素毒性に対する防御機構として SOD が大きく与っていると考えられる。

(共同研究者: 大阪市大結研・楠瀬恵美, 川崎医大・市原宏介, 刀根山病院・野田庸二郎, 東京都立大理・奥山典生, 磯辺俊明, 武野大策, 阪大微研・森 竜男, 京大皮膚特研・和泉真蔵)

文 献

- 1) Fridovich, I.: Superoxide dismutase, *Advances in Enzymology*, 14: 35, 1974.
- 2) 浅田浩二: 酸素毒性, *生化学*, 48: 226, 1976.
- 3) 浅田浩二: 活性酸素の生物に対する作用, *代謝*, 15: 1277, 1978.
- 4) 大柳善彦: スーパーオキシドと医学, 共立出版, 1981.
- 5) Kusunose, E. et al.: Superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J Biochem*, 80: 1343, 1976.
- 6) Ichihara, I. et al.: Superoxide dismutase from *Mycobacterium lepraemurium*, *J Biochem*, 81: 1427, 1977.
- 7) Kusunose, M. et al.: Superoxide dismutase from *Mycobacterium* species, strain Takeo, *Arch Microbiol*, 108: 67, 1976.
- 8) Chikata, E. et al.: Purification of superoxide dismutases from *Mycobacterium phlei*, *Osaka City Med J*, 21: 127, 1975.
- 9) Ichihara, K. et al.: A manganese and iron-containing superoxide dismutase from *Rhodococcus bronchialis*, *J Gen Appl Microbiol*, 26: 387, 1980.
- 10) Searcy, K. B. and Searcy, D. G.: Superoxide dismutase from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*, *Biochim Biophys Acta*, 670: 39, 1981.
- 11) Kirby, T. W. et al.: Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*, *Arch Biochem Biophys*, 210: 140, 1981.
- 12) Muno, D. et al.: The N-terminal sequences of superoxide dismutases from the four mycobacterial species, *Biochem Internatl*, 2: 33, 1981.
- 13) 楠瀬正道他: 結核菌の superoxide dismutase の精製と性状, 51: 229, 1976.
- 14) Kusunose, E. et al.: Occurrence of superoxide dismutase in *Mycobacterium leprae* grown on armadillo liver, *J Gen Appl Microbiol*, 26: 369, 1980.
- 15) Kusunose, E. et al.: Superoxide dismutase in cell-free extracts from *Mycobacterium leprae* grown on armadillo liver, *FEMS Microbiol Letters*, 10: 49, 1981.
- 16) Prabhakaran, K. et al.: Use of 3,4-dihydroxyphenylalanine oxidation in the identification of *Mycobacterium leprae*, *J Bacteriol*, 92: 1267, 1966.