

原 著

Mycobacteria 細胞壁および細胞膜におけるミコール酸 の生成とその調節

鳥 山 淨 子

新潟大学医学部細菌学教室

受付 昭和 56 年 12 月 3 日

BIOSYNTHESIS AND REGULATION OF CELL WALL MYCOLIC ACID IN MYCOBACTERIA

Seiko TORIYAMA*

(Received for publication December 3, 1981)

Mycolic acids, an α -alkyl β -hydroxy very long chain (C_{20-40}) fatty acids are well known to be the most characteristic cell wall lipid component in Actinomycetales and to contribute to the physiological characteristic of cell walls in acid-fast bacteria. In order to investigate the biosynthetic mechanism and physiological roles of such type of fatty acids, we have developed the powerful analytical method for mycolic acid composition from various species of Mycobacteria and related microorganisms using gas chromatography-mass spectrometry. The results showed, the first, *M. phlei* possessed α -mycolic acids (M_1) ranging from C_{70} to C_{80} (dienoic monocarboxylic acids) and dicarboxy mycolic acids (M_3) ranging from C_{52} to C_{64} (monoenoic dicarboxylic acids) with C_{20} or C_{22} alkyl chain at α position, as major components of both the extractable and cell wall bound lipids. The second, with using this method, the changes in mycolic acid composition upon the growth inhibition by the antituberculous drug, isoniazid (INH), were examined and the synthesis of longer chain mycolic acids in both subclasses were shown to be strongly inhibited with the increase in the concentration of INH. Changes in acid-fastness (the disappearing of acid fastness) or surface structure of the cells were also observed, paralleled with the inhibition of mycolic acid synthesis. The third, the adaptive changes in mycolic acid composition were also demonstrated in response to the shift of growth temperature. Increasing the growth temperature from 20°C to 50°C resulted in an increase in longer chain species of both mycolic acid subclasses with a concomitant decrease in shorter chain homologues. The most abundant species were C_{76} of M_1 and C_{58} of M_3 in the 20°C grown cells, while the 50°C grown cells contained C_{80} in M_1 and C_{62} in M_3 , most abundantly. Mass fragmentographic analysis revealed an increase in total carbon numbers of mycolic acids was caused by the elongation of straight chain alkyl unit, without any change in α -branch. In vitro incorporation studies of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate into long chain fatty acids by the ammonium sulfate precipitated enzyme fraction obtained from sonicated *M. phlei* extracts showed the radioactivity was incorporated actively into wide ranges of long chain even and odd numbered fatty acids ranging from C_{24} to C_{50} , which could be precursors of straight chain alkyl unit of mycolic acids. The ^{14}C incorporation pattern on radio gas chromatogram was profoundly affected by

* From the Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine, Asahimachidori-1, Niigata 951 Japan.

the incubation temperature, the shorter acids were labelled at the lower temperature and the longer acids were labelled at the higher temperature, this indicating the adaptative change in mycolic acid molecule appeared again to occur at the straight alkyl chain, exclusively.

From the results obtained above, it was demonstrated the structure of mycolic acid are not only characteristic in the species of mycobacteria, but also vary by the environmental condition, such as the growth temperature or the presence of antituberculous isoniazid, followed by the changes in the cell wall surface structure.

I. 緒 言

ミコール酸は、結核菌を初めとする *Mycobacteria* および類縁菌である *Nocardia*, *Corynebacteria* などの *Actinomycetales* に属する細菌に特異的に分布する α 分枝, β ハイドロキシン酸である^{1)~4)}。

これらのミコール酸は菌体内では、大部分細胞壁骨格やトレハロズエステル (trehalose dimycolate (TDM) trehalose monomycolate (TMM)) 等の糖脂質にエステル型として存在している。*Mycobacteria* の細胞壁骨格は、他の細菌と異なり約 30 % のミコール酸を含んでおり、これらは arabinogalactan の arabinose の 5 位とエステル結合しており、他の構成成分とともに細胞壁の強固性 rigidity を保ち、抗酸性を初めとする種々の生理的機能と密接に関連していると考えられている。またミコール酸を含む糖脂質の主要な成分として trehalose に 2 分子または 1 分子のミコール酸がエステル結合した TDM, いわゆる Cord factor と TMM が存在しこれらはマウスに対する致死活性を有し、抗腫瘍性やアジュバント活性、肉芽腫形成能などの生物活性を示す。これらの細胞壁の生理的機能や生物活性は、ミコール酸の分子種組成と密接に関連していることが明らかになりつつある^{5)~9)}。

従来、ミコール酸の構造に関する研究は、多数にのぼるが、いずれも subclass 混合物としての解析が大部分でありその熱に対する不安定さからガスクロマトグラフィーによる分析が困難であった。そこで我々は、熱に安定なトリメチルシリル誘導体を調製し、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー分析を行なうことにより、ミコール酸の単一分子種の解析および定量方法を確立した¹⁰⁾。

一方、ミコール酸生合成経路の詳細はいまだに明らかにされていないが、 C_{16} , C_{18} 脂肪酸から malonyl-CoA または -ACP の縮合によつて延長され種々の長鎖脂肪酸が合成され、これにさらに $C_{16} \sim C_{24}$ 脂肪酸が Claisen-type の反応によつて縮合して、還元され、種々のミコール酸が合成されるのではないかと推測されている¹¹⁾¹²⁾。しかし、その詳細は明らかではなく、培養温度による調節や薬剤に対する反応等、その機構に関しては全く知ら

れていない。

抗結核剤 Isoniazid は、その抗菌作用機構については膨大な報告があるが、近年 INH が結核菌に特異的なミコール酸の生合成を阻害することが知られるようになり¹³⁾¹⁴⁾、結核菌に高い特異性を有する抗菌スペクトルと作用機構との関連性が注目されている。我々は *Mycobacterium phlei* を用い、INH 存在下でのミコール酸生合成の変化を検討したところ、ミコール酸含量および分子種組成に顕著な変動が認められた。

また、一般に細菌の細胞膜脂質は温度に対して適応し、膜の fluidity を適当に保つため、膜脂質のアシル基が変動することが知られている^{15)~17)}。しかしミコール酸の分子種組成が培養温度によりどのように変動するかは、全く知られていなかった。そこで *Mycobacteria* 中最も広範囲の温度域で増殖可能な *M. phlei* を用い、培養温度によるミコール酸の変動を検討したところ、温度によつてミコール酸直鎖部分の炭素数が変動することを見出した。

またメロミコール酸に相当すると考えられている長鎖脂肪酸について、硫安分画酵素を用いて検討したところ、放射能の取り込みは反応温度に依存して変化することが明らかになった。

これらの温度および薬剤による分子種組成の変動の結果より、ミコール酸生合成およびその調節機構の一端を解明したので、これらについて報告する。

II. 実験材料および実験方法

1. 実験材料および培養条件

Mycobacterium phlei およびその他の *Mycobacteria* を 1 % glucose, 0.5 % peptone, 0.2 % yeast extract を含む液体培地 (pH 7.0) で振とう培養した。各温度での脂質組成を比較するため、20, 30, 40 および 50°C の各温度で定常期初期まで培養した。また温度をシフトした後短時間での脂質組成の変動を調べるため 20°C で培養した菌体を対数増殖期に 50°C に温度をシフトし、その後 24 時間まで培養し経時の変化を検討した。抗結核剤 Isoniazid (以下 INH と略す) のミコール酸代謝に及ぼす影響を検討するため、対数増殖期初期に INH 0~500 μ g/ml を添加し、その後 3, 6, 9 時間および 72 時間まで培

養した。これらの発育はいずれの場合も 540 nm の吸光度で測定した。

2. 脂質の抽出および分離

菌体を 13,500×g, 20分間 (4℃) 遠心して集菌した後 Folch ら¹⁸⁾の方法に従い、菌体の20倍量のクロロホルム・メタノール (2:1, by vol) を用い脂質を抽出した。クロロホルム・メタノール抽出脂質を extractable lipid (以下 EL と略す) とし、抽出残渣いわゆる細胞壁結合性の脂質を bound lipid (以下 BL と略す) とし、両者に含まれるミコール酸、非極性脂肪酸を分析した。

3. ミコール酸および非極性脂肪酸の分離

EL および BL は、10%水酸化カリウム・メタノールで3時間水解後、6N HCl で酸性とし、総脂肪酸を *n*-ヘキサンで抽出し、さらにこれらをベンゼン・メタノール・硫酸 (10:20:1, by vol) でメチルエステル化した。得られたメチルエステルは、展開剤として *n*-ヘキサン・エチルエーテル (4:1, by vol) を用い、薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略す) によつてミコール酸と非極性脂肪酸に分離した。また別に TLC で各成分を分離し 9M 硫酸を噴霧した後 180℃ で加熱し、出現したスポットを二波長クロマトスキャナー CS-900 (島津) を用いてデンストメトリーで測定し、相対量を求めた。

非極性脂肪酸メチルエステルは、さらに硝酸銀薄層クロマトグラフィー (以下 AgNO₃-TLC と略す) により、展開剤としてベンゼン・*n*-ヘキサン (4:1, by vol) を用いて不飽和度の異なる subclass すなわち飽和、モノエンおよびジエン画分に分離した。

4. ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーによる分析

ミコール酸メチルエステルは Bistrimethyl silyltrifluoroacetamide (BSTFA) により TMS 誘導体としガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (以下 GC-MS と略す) により分析した。GC-MS 分析は日立 M-60 を用い、ガラスカラム 50 cm×3 mm, 2% OV-1 Chromosorb W. 注入温度 395℃, カラム温度 310℃ または 340℃, molecular separator 330℃, イオン源 220℃, イオン化電圧 60 μA, electron energy 20eV, accelerating voltage 3.2 kV で行なつた。

5. Growing cell による 2-¹⁴C 酢酸の取り込みと放射能の測定

M. phlei を 35℃ で培養し、その対数増殖期初期に 2-¹⁴C 酢酸を培地に加え温度を 20℃ に shift down した場合、50℃ に shift up した場合および 35℃ のままの場合のそれぞれについて、5, 10, 15, 20, 30 および 60 分間インキュベートした後、クロロホルム・メタノール (2:1, by vol) によつて反応を止め EL および BL を抽出し、水解後脂肪酸メチルエステルの TLC を行なつた。おのおののスポットの放射能は薄層クロマト用スキャナ

ー (日本無線) を用いて測定し、またおのおのの相対量は、二波長クロマトスキャナーを用いたデンストメトリーで測定した。各スポットの放射能ピーク面積/各スポットのデンストメトリーの面積を specific activity とした。

6. 酵素液の調製方法および脂肪酸合成の測定

M. phlei 対数増殖期菌体を 5 倍量の 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT) に懸濁し、超音波 (Branson sonifier) 処理を 1'30"×15 回行ない、100,000×g, 30分間遠心沈殿を行ないさらにその上清より硫酸アンモニウム 40~75% 飽和画分を得、これを酵素液として使用した。

脂肪酸合成活性の測定は、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5), 5 mM 塩化マグネシウム, 10 mM 炭酸水素カリウム, 3 mM ATP, 0.3 mM NADPH, 0.3 mM NADH, 8.3 μM 1-¹⁴C 酢酸および酵素液を含めて全容 1 ml とし、25, 37, 45 および 55℃ で各 60 分間反応を行ない、20%水酸化カリウム、メタノール溶液で反応を止め、アルカリ水解後、濃塩酸で酸性にし *n*-ヘキサン 8 ml で脂肪酸を抽出した。この一部をとり、取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンタで測定した。

7. ラベルされた脂肪酸の薄層クロマトスキャナーおよび radio GLC による分析

ラベルされた脂肪酸をメチルエステル化後 TLC を行ない薄層クロマトスキャナー (日本無線) でミコール酸各 subclass および 非極性酸、その他の極性酸中の放射能の分布を調べた。

非極性脂肪酸に相当する放射能スポットを薄層から回収し radio GLC により C₁₆₋₅₀ 各脂肪酸中に取り込まれた放射能の分布を調べた。

radio GLC は島津 GC-6A を用い、ガラスカラム 1.5 m×3 mm, 2% OV-1 Chromosorb W. を用い、カラム温度 160~330℃, 3℃/min の昇温で行ない、キャリアガスとしてヘリウムガスを用いた。また放射能の検出は、GLC と連結した Packard gas proportional counter で行なつた。

III. 実験結果

1. ミコール酸の分析

1-1. ミコール酸の TLC による分離

Mycobacteria の菌体より抽出した脂肪酸のメチルエステルをシリカゲルの TLC を用いて展開すると、非極性酸と極性酸メチルエステルが明瞭に分離する (Fig. 1)。極性脂肪酸はいくつかの subclass 成分に分かれ、それぞれ α-ミコール酸 (M₁, M_{1'})、ケトミコール酸 (M₂)、ジカルボンミコール酸 (M₃) に相当する¹⁹⁾。

1-2. ミコール酸分子種の GC-MS による分析

前項で分離したミコール酸のうち *M. phlei* のミコール酸の主要 subclass 成分を TMS 誘導体としたのち、

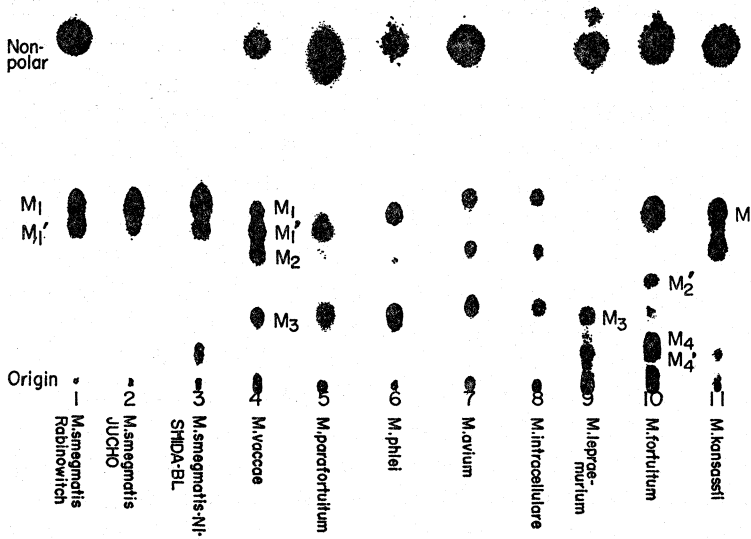


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of mycolic acid methyl ester subclasses in various Mycobacteria.

M_1 : α -mycolic acid, M_1' : shorter-chain α -mycolic acid, M_2 : keto mycolic acid, M_3 : dicarboxy mycolic acid, M_4 , M_4' : unknown.

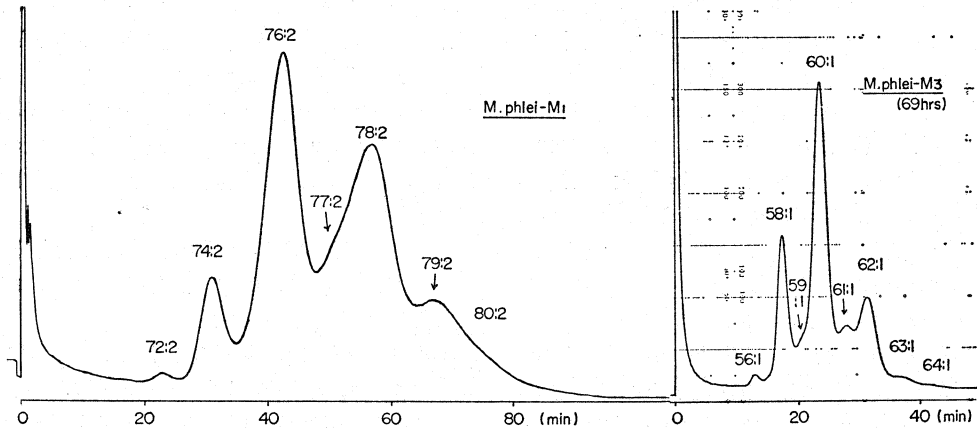


Fig. 2. Gas chromatograms of TMS-methyl mycolate from *M. phlei* (M_1 , M_3).

GLC で分析したところ Fig. 2 に示すように M_1 , M_3 とも GC 上 5~7 つのピークに分離したので各ピークについて質量分析により、その構造を解析した。

M_1 は炭素数 70~80 α ミコール酸の homologue である。 M_1 の主要な 3 つの分子種、 C_{74} , C_{76} および C_{78} のマススペクトルを Fig. 3 に示した。各分子種の総炭素数および二重結合数は分子イオン $[M]^+$, $[M-15]^+$, $[M-29]^+$, $[M-31]^+$, $[M-32]^+$ イオンおよび $[M-90]^+$ イオンから同定され、また直鎖部分は、 C_{2-3} 開裂によるフラグメントイオン $[A]^+$ および $[A-90]^+$ イオンから、一方分枝構造は C_{3-4} 開裂によるイオン $[B]^+$ および $[B-29]^+$ 等より明瞭に同定された。その結果 $C_{74:2}$ ミコール酸は $C_{52:2}$ 直鎖部分および $C_{22:0}$ α unit から構成されるか、または $C_{50:2}$ 直鎖部分および $C_{24:0}$ α unit から

構成されることが明らかになった。同様にして $C_{76:2}$ は $C_{52:2}$ 直鎖部分と $C_{24:0}$ α unit, $C_{78:2}$ は $C_{54:2}$ と $C_{24:0}$ から構成されていることが示された。

一方、 M_3 は炭素数 54~64 のジカルボンミコール酸に相当し、その主要な 3 つの分子種のマススペクトルを Fig. 4 に示した。 M_1 の場合と同様にして、総炭素数、二重結合数、直鎖部分、側鎖部分が同定された。 M_1 の場合と異なる点は、フラグメントイオン $[A]^+$ にもう一つのカルボキシメチルエステルが含まれることであり、このことから M_3 はジカルボンミコール酸であると同定された。その結果 $C_{56:1}$ ジカルボンミコール酸は $C_{34:1}$ 直鎖および $C_{22:0}$ α unit, $C_{58:1}$ は $C_{36:1}$ または $C_{34:1}$ 直鎖および $C_{22:0}$ または $C_{24:0}$ α unit, $C_{60:1}$ は $C_{36:1}$ 直鎖および $C_{24:0}$ α unit より構成されることが明らかになった。

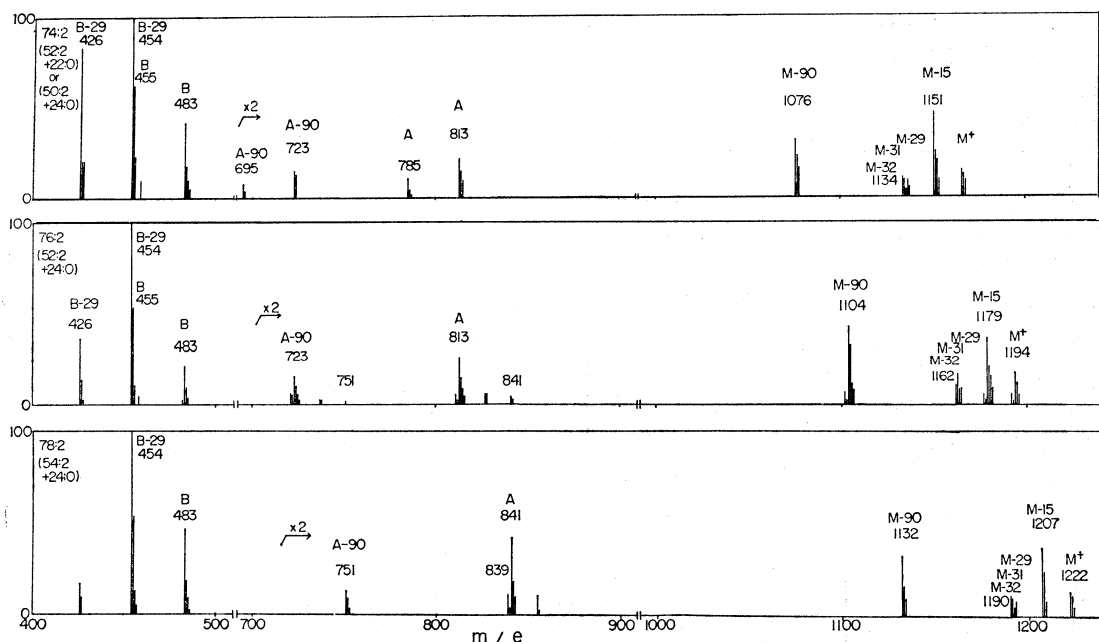


Fig. 3. Mass spectra of TMS-derivatives of α -mycolic acid methyl esters (C_{74} , C_{76} and C_{78} : M_1).

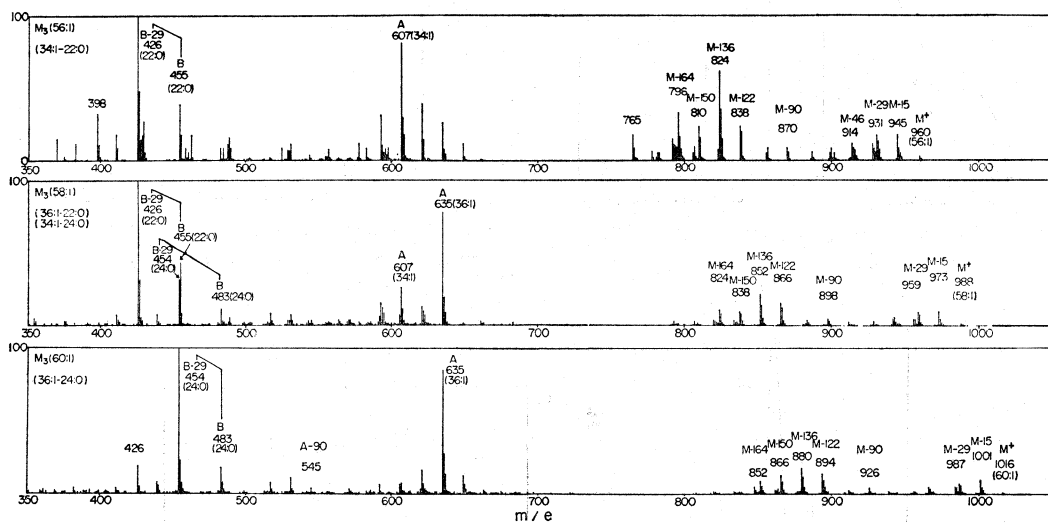


Fig. 4. Mass spectra of TMS-derivatives of dicarboxy mycolic acid methyl esters (C_{56} , C_{58} and C_{60} : M_3).

2. INH の影響

2-1. INH の増殖への影響

M. phlei の培地中に INH 0~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えて、その増殖速度を調べると Fig. 5 に示すように、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で顕著な発育阻害が認められた。これに対応する培地 200 ml 当りの菌体重量は INH 濃度が高くなるほど減少し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でコントロールの 1/10 に減少した。

2-2. INH のミコール酸含量および分子種組成に及ぼす影響

前項の各 INH 濃度で72時間培養した packed cell 当りの脂肪酸量を EL および BL について定量した結果をFig. 6 に示した。EL, BL とも共通して脂肪酸量は減少したが、BL の脂肪酸量の方が著しく減少した。さらに BL のミコール酸分子種組成の変動を検索したところ INH により分子種組成は著しく変動した。ジカルボンミコール酸は C_{60} が主成分であるが、INH 濃度を高めると長鎖の分子種 (C_{62} , 64) ほどその含量が減少し、これと相対的に短鎖の分子種が増加した。このように INH 存在下の培養では、長鎖ミコール酸の絶対量が減少する

傾向が認められた (Fig. 7)。このような傾向は INH 添加後短時間の観察 (約 3~4 時間) でも認められた。

3. 培養温度の影響

3-1. 培養温度の増殖への影響

M. phlei は *Mycobacteria* の中では、極めて広範囲の温度域で発育可能な菌である。Fig. 8 に示すように、その至適発育温度は40℃付近であり20℃では増殖は阻害されるが、50℃の高温でも良好な発育が認められる。

3-2. 培養温度のミコール酸合成への影響

各培養温度の定常期菌体より得られた EL のミコール酸と非極性酸の相対的な割合は温度により著しく異なり、高温になるほどミコール酸の割合が増加する傾向が認められた (Fig. 9)。一方 BL の総脂質量は packed cell 1g 当り 10~15mg であり、このうちミコール酸は 85~90% を占めている。これらの BL の総脂質量すな

わちミコール酸含量は温度によつてあまり影響をうけなかった。

次に EL および BL のミコール酸分子種組成の温度による変動を GC-MS 分析により検討した。培養温度 20, 30, 40 および 50℃ の菌体の EL および BL の M_1 (α ミコール酸) の分子種組成の変動を Fig. 10 に示した。EL および BL のいずれにも共通して培養温度によりミコール酸分子種組成に著しい変動が認められ、温度が高くなると長鎖の分子種、特に C_{80} 分子種が著しく増加し、これと相対的に短鎖の $C_{74,76}$ 分子種が減少した。同

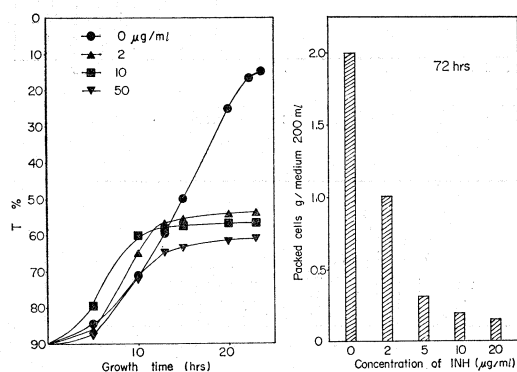


Fig. 5. Growth inhibition of *M. phlei* by various concentration of INH.

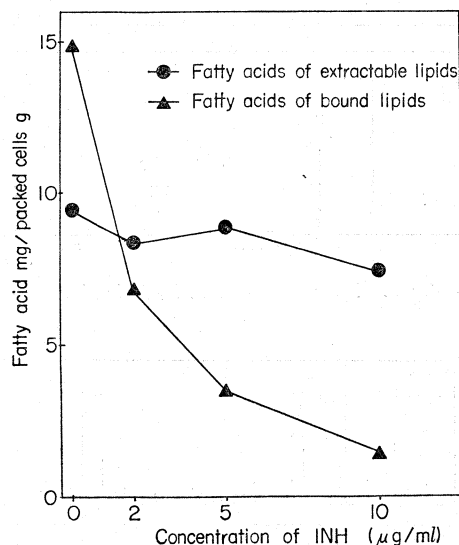


Fig. 6. Effect of different concentrations of INH on the amount of fatty acids in *M. phlei*.

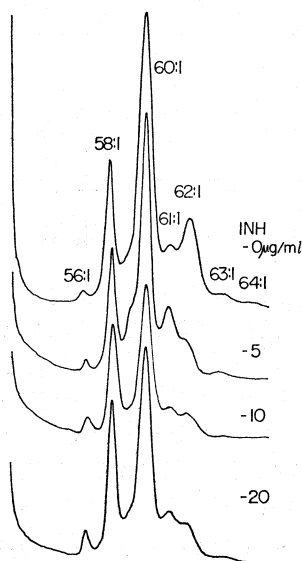
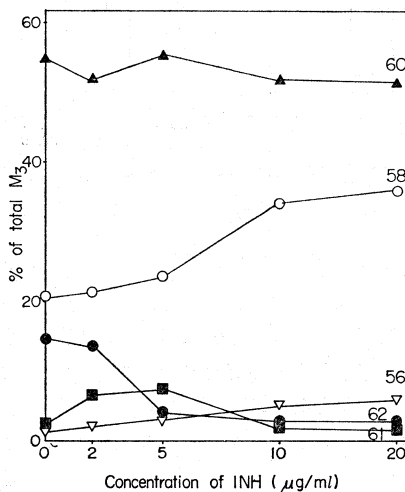


Fig. 7. Changes in mycolic acid-molecular species composition by different concentrations of INH.



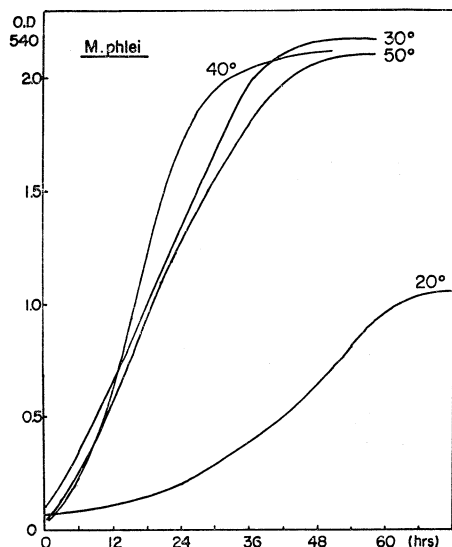


Fig. 8. Growth curve of *M. phlei* at various temperatures.

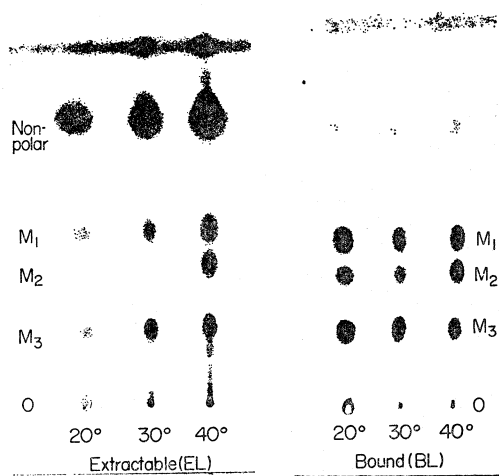


Fig. 9. Thin-layer chromatograms of mycolic acid methyl esters in *M. phlei* grown at various temperatures. Total fatty acid methyl esters were obtained from cells grown at 20, 30 or 40°C.

様の傾向が M_3 (ジカルボンミコール酸) でも認められた (Fig. 11)。すなわち培養温度が低い場合には、短鎖の $C_{58,60}$ が主成分であるが温度が高くなるほど、短鎖の分子種は減少しこれと相対的に長鎖の C_{62}, C_{64} 分子種が主成分となつた。

これらの培養温度による変動が温度をシフトした後どのような時間的経過を経てみられるかを検討するため、温度を20°Cから50°Cに shift up して経時的に分子種組成の変動を調べた。その結果、温度 shift up 後すでに数時間以内に変動が認められ shift up 後5時間で長鎖の C_{62}, C_{64} 分子種が増加し、短鎖の C_{56}, C_{58} 分子種の減少

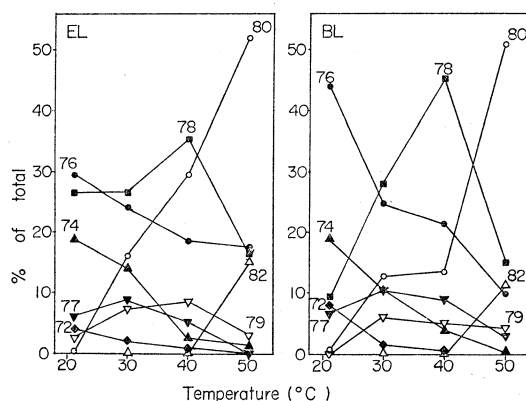


Fig. 10. Changes in the molecular species composition of α -mycolic acids in extractable (EL) and cell wall bound (BL) lipids according to growth temperature. Values are relative percentages of mycolic acids.

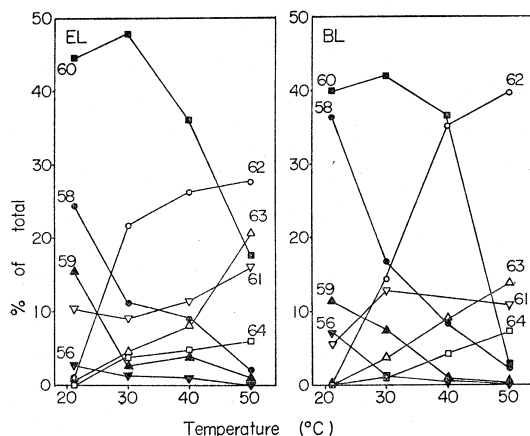


Fig. 11. Changes in the molecular species composition of dicarboxy mycolic acids in extractable (EL) and cell wall bound (BL) lipids according to growth temperature. Values are relative percentages of mycolic acids.

が認められた。また24時間経過すると主成分が短鎖の分子種より長鎖の分子種にほぼ入れ変わった (Fig. 12)。

さらにこれらの温度によるミコール酸分子種組成の変動がミコール酸分子のどの部分、すなわち直鎖または α 側鎖に由来するかを検討するため、ミコール酸メチルエステル TMS 誘導体のマスフラグメントグラフィーを行なった。Fig. 13 に 20, 30°Cおよび50°Cの M_3 の直鎖部分に相当するフラグメントイオン $[A]^+$ および α 側鎖に相当するフラグメントイオン $[B]^+$ $[B-29]^+$ のマスフラグメントグラムを示した。 α 側鎖の $C_{22:0}$, $C_{24:0}$ に相当するフラグメントイオン $[B]^+$, $[B-29]^+$ は温度によりほとんど影響をうけず、ほぼ一定であつた。一方直鎖の $C_{32:1}$, $C_{34:1}$, $C_{36:1}$ および $C_{38:1}$ に相当するフラグメント

になり、その後減少していく傾向が認められた。これに代わって BL のミコール酸へは遅れて放射能が取り込まれた。これらの BL への取り込みは温度により著しい影響をうけ、35℃では10分より、50℃では5～10分後より増加しはじめたが20℃では30分後においてもわずかな取り込みしか認められなかつた。この結果、初めに EL のミコール酸に放射能が取り込まれ、これがさらに BL に移行することが示唆された。またこの移行は温度によって影響をうけ、温度が高いほど移行が速やかで、細胞壁のミコール酸の生合成が活発に行なわれていることが明らかになった。

4. C₃₀₋₅₀ 長鎖脂肪酸の酵素的生合成

4-1. 硫酸画分酵素による 1-¹⁴C 酢酸の長鎖脂肪酸への取り込みに及ぼす反応温度の影響

Fig. 15 に示すように 1-¹⁴C 酢酸の長鎖脂肪酸への取り込み活性は20℃から55℃と比較的広い温度域に認めら

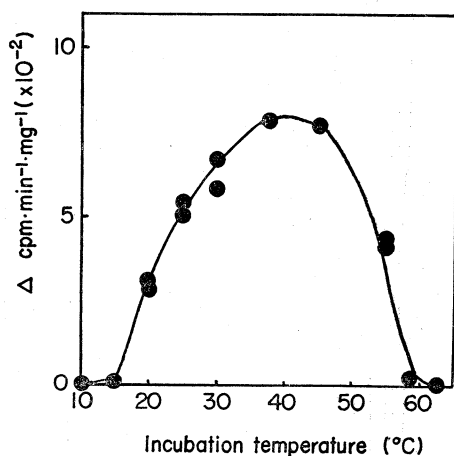


Fig. 15. Effect of incubation temperature on the enzymatic incorporation of 1-¹⁴C-acetate into fatty acids in *M. phlei*.

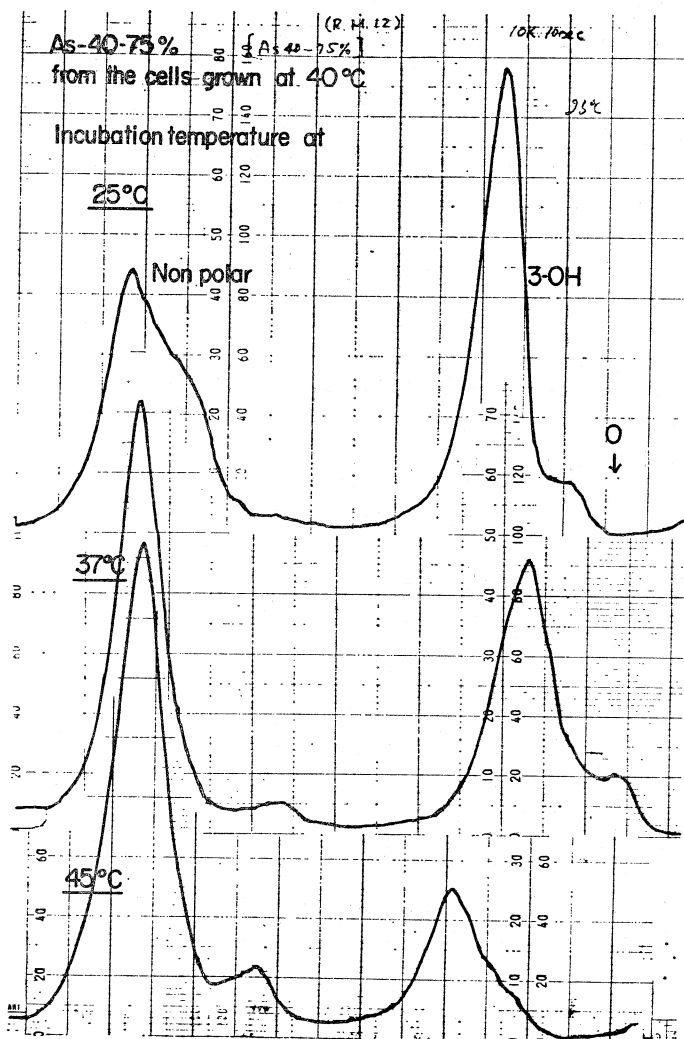


Fig. 16. Radio thin-layer chromatograms of enzymatic product after incubation of 1-¹⁴C-acetate with crude ammonium sulfate fraction of *M. phlei*.

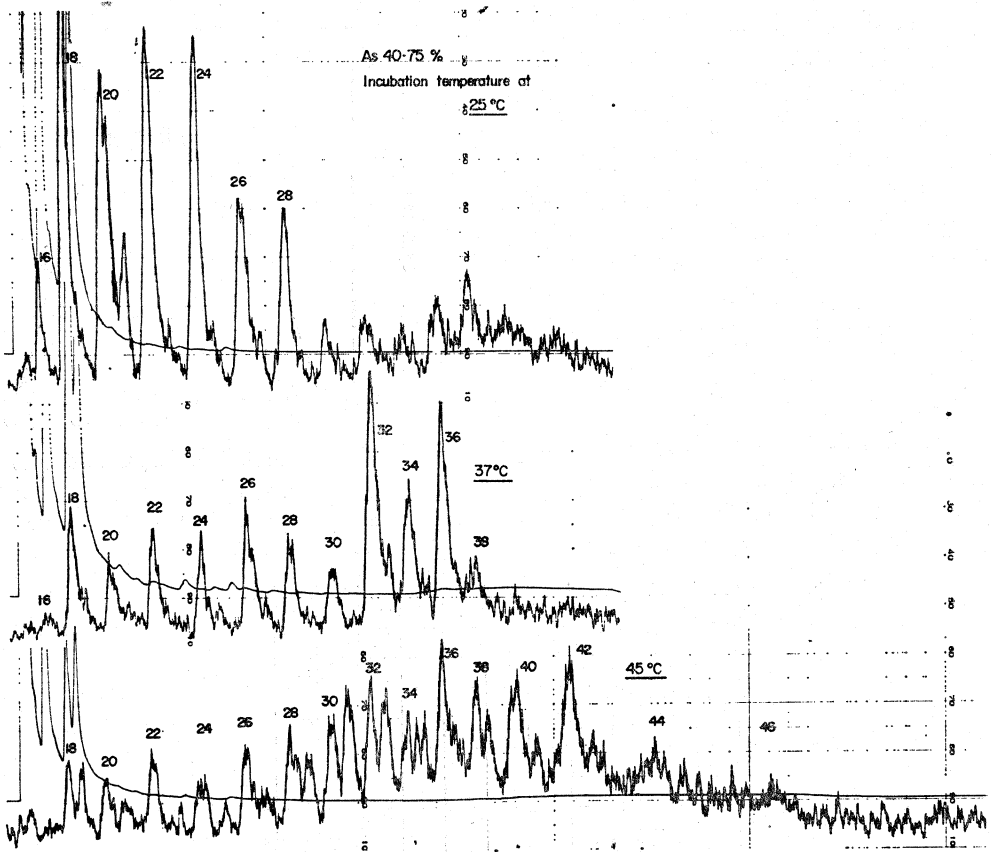


Fig. 17. Radio gas chromatograms of ^{14}C -labelled fatty acid methyl esters synthesized enzymatically at 25, 37 or 45°C in *M. phlei*.

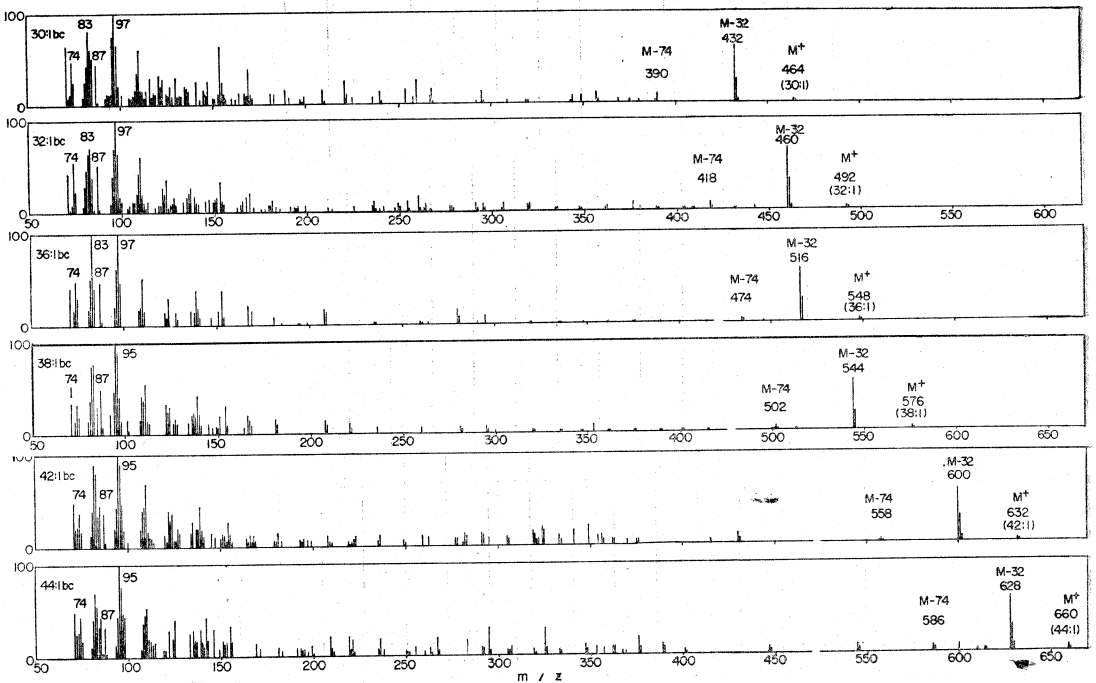


Fig. 18. Mass spectra of very long chain, non-polar fatty acid methyl ester from *M. phlei*.

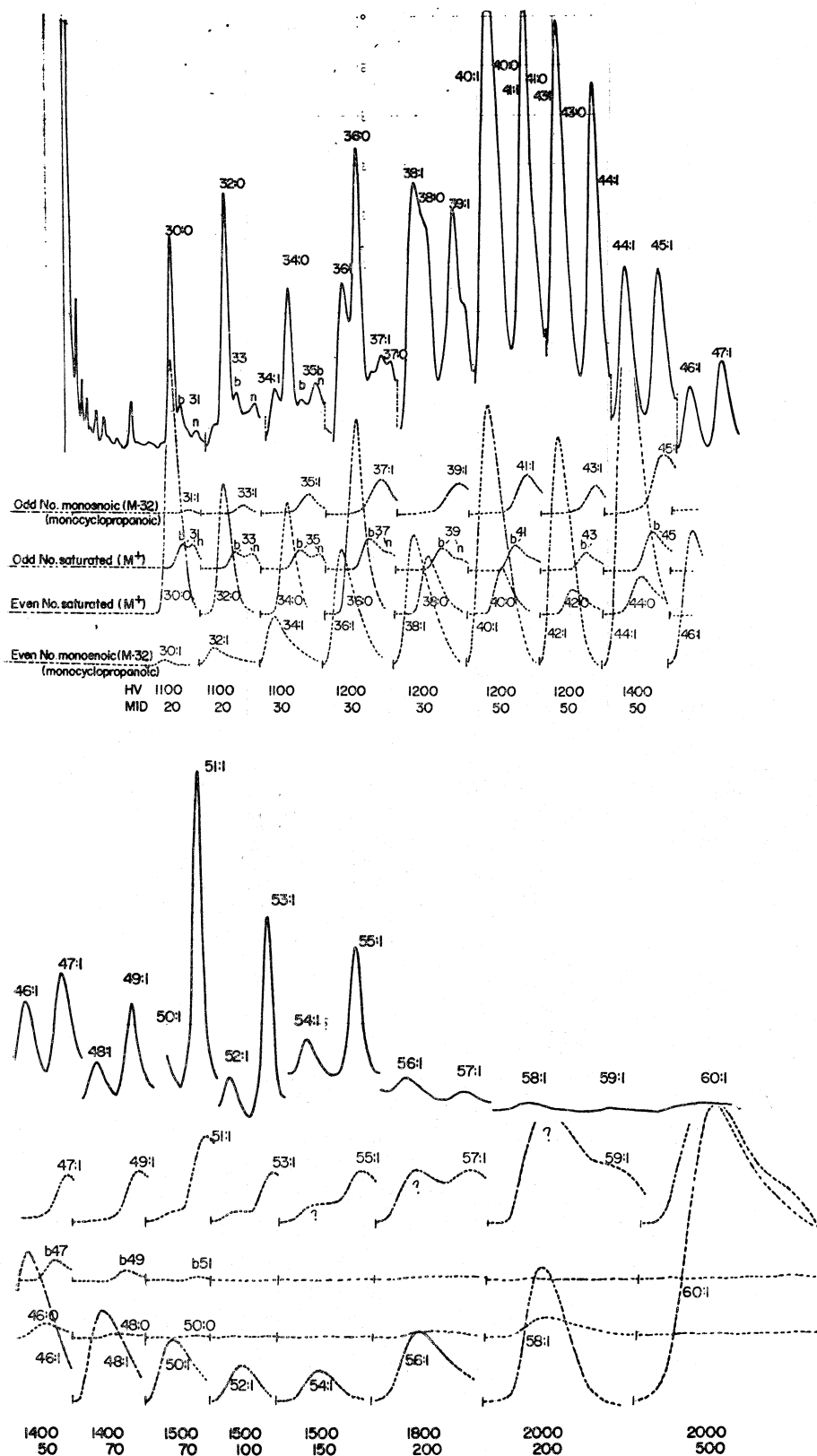


Fig. 19. Mass fragmentograms of very long chain (C_{18-60}) fatty acid methyl esters from *M. phlei*.

Table 1. Molecular Ions of C₃₀₋₅₀ Very Long Chain Fatty Acid Methyl Esters in *M. phlei*

Carbon numbers	Saturated	Monoenoic (Monocyclopropanoic)	Dienoic (Dicyclopropanoic)
30	466	464	462
31	480	478	476
32	494	492	490
33	508	506	504
34	522	520	518
35	536	534	532
36	550	548	546
37	564	562	560
38	578	576	574
39	592	590	588
40	606	604	602
41	620	618	616
42	634	632	630
43	648	646	644
44	662	660	658
45	676	674	672
46	690	688	686
47	704	702	700
48	718	716	714
49	732	730	828
50	746	744	742

れ、その至適温度は40℃付近であつた。またこの活性の認められる温度域は *M. phlei* の発育温度域ともよく一致していた。

4-2. TLC による極性酸・非極性酸の分離と ¹⁴C 放射能の分布

硫安分画酵素により合成された ¹⁴C 脂肪酸メチルエステルを TLC で分離すると放射能ピークは主として二つ認められ、それぞれ非極性脂肪酸、3-hydroxy 脂肪酸メチルエステルの R_f 値と一致した (Fig. 16)。これらの相対比は反応温度によつて影響をうけ、温度が高くなるほど非極性脂肪酸への取り込みが高くなつた。なお、この反応条件下ではミコール酸への取り込みはほとんど認められなかつた。

非極性脂肪酸に相当する放射能ピークを薄層より回収し、さらに AgNO₃-TLC により不飽和度の違いによる subclass (飽和、モノエンおよびジエン画分) に分画すると放射能の90%以上は飽和画分に認められた。

4-3. GLC による各炭素数の脂肪酸の分離と ¹⁴C 放射能の分布

前項の飽和画分を薄層より回収し radio GLC 分析を行なつたところ、放射能は C₁₈~C₅₀ の極めて多数の長鎖脂肪酸に取り込まれていることが明らかになつた (Fig. 17)。しかも、これらの放射能の分布は反応温度により

著しく異なり、反応温度25℃では取り込みは C₂₈ あたりにとどまるが、反応温度37℃とすると C₄₀ あたりにまで放射能が認められ、さらに温度が高くなると、より長鎖の脂肪酸への放射能の取り込みが認められた。また反応温度が高いほど、また長鎖の脂肪酸になるほど、放射能ピークが多数に分離し、直鎖脂肪酸のみならず、分枝酸、シクロプロパン酸等に取り込まれていることが示唆された。

4-4. マスフラグメントグラフィーによる C₃₀~C₅₀ 長鎖脂肪酸の同定

これらの放射能ピークをさらに詳細に同定するため、菌体より長鎖脂肪酸を抽出し、その飽和酸画分について GC-MS 分析を行なつた。その結果、*M. phlei* の非極性酸中には、C₁₆₋₂₀ 前後の脂肪酸以外に、C₃₀₋₅₀ またはそれよりさらに長鎖の脂肪酸がかなりの量存在し、これらは GLC の保持時間から直鎖偶数酸のほか奇数酸、分枝酸を含むことが明らかになつた。しかも炭素数が増加するに従つて、飽和直鎖脂肪酸に一致しないピークが多数前後して出現したので、それぞれの炭素数のピークについてマスフラグメントグラフィーによる同定を行なつた。すなわち偶数飽和、奇数飽和、奇数モノ不飽和および偶数モノ不飽和の各脂肪酸に相当する分子イオン [M]⁺ または [M-32]⁺ イオンをモニターすることにより (Table 1)

これらすべての成分を独立に検出した (Fig. 18, 19)。その結果、直鎖偶数および奇数酸は、 C_{30-40} 程度にとどまり C_{25-30} にはモノメチル分枝酸が存在し、さらに長鎖になると偶数および奇数モノ不飽和酸、すなわちシクロプロパン酸およびモノメチルモノシクロプロパン酸が圧倒的に多くなることが明らかになった。これらの C_{40-50} 長鎖脂肪酸の構造は本菌のミコール酸の直鎖部分に一致し ^{14}C 放射能は短鎖側では偶数直鎖飽和酸へ、長鎖側ではこのような分枝酸およびシクロプロパン酸へも取り込まれることから、本菌のミコール酸の直鎖部分 (メロミコール酸) に相当する長鎖脂肪酸がこの酵素系で合成されたことが示唆された。以上のことから、*M. phlei* におけるミコール酸生合成においては、温度が極めて重要で細胞壁ミコール酸の鎖長を調節していることが明らかとなった。

IV. 考 察

Eukaryotic, および prokaryotic cell の膜脂質は環境温度に対応して適当な膜の fluidity を調節するために構造が変動することが知られている。一般にグラム陰性菌では、低温環境でリン脂質中の飽和およびシクロプロパン酸に対する不飽和脂肪酸量が増加する¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。対照的にグラム陽性菌または不飽和脂肪酸を含まない細菌の場合には、膜の機能の調節は脂肪酸の acyl 基の側鎖構造か、または鎖長を変化させることにより行なわれる¹⁹⁾。Mycobacteria およびその類縁菌では、細胞壁および膜の脂質組成が極端に複雑であり、直鎖および側鎖脂肪酸をもつ特徴的な種々のリン脂質およびミコール酸を含む glycolipid、ミコール酸の結合した cell wall skeleton 等から成っている。Mycobacteria のミコール酸は extractable または cell wall bound lipid 中では総脂肪酸に対してそれぞれ20~30%または80~90%を占め²⁰⁾、生理的に重要な役割を果たしていると考えられているが、環境温度の変化によりどのような影響をうけるかは全く知られていなかった。

一方、各種抗酸菌は感染宿主によつてその至適発育温度が異なり、人型結核菌では37℃、鳥型結核菌はこれより高く37~45℃で良好な発育が認められ、変温動物に寄生性のある抗酸菌 *M. fortuitum* および *M. chelonae* はこれよりはるかに低い至適発育温度をもっている。特に人型結核菌は37℃から急激に低温環境に移すと菌が死滅しいわゆる“Cold shock”といわれる現象が認められ、このときミコール酸生合成が停止することが報告されている²¹⁾。これらの菌のミコール酸は、人型菌では C_{80-86} 、鳥型菌 C_{80-90} 、*M. fortuitum* C_{70-78} 、*M. chelonae* C_{72-78} とその炭素数はその菌の至適発育温度に依存して異なり、至適発育温度域が高くなるほど、鎖長が長くなる傾向が認められている²²⁾²⁵⁾。したがってミコール酸の分子種

組成が Mycobacteria の発育可能な温度を決める一つの要因であることも示唆される。

しかしながら、実際にミコール酸組成が培養温度によりどのように変動するかは全く知られていなかった。*M. phlei* は Mycobacteria のうちでは極めて広範囲の温度に適応する菌であるので、我々はこれを実験材料として用いミコール酸の温度による変動を調べた。*M. phlei* のミコール酸は、 α ミコール酸以外にジカルボンミコール酸が含まれる点が特徴的である²³⁾。ジカルボンミコール酸は、*M. avium* 等の slow growing group のほか、種々の rapid growing mycobacteria に分布し、抗酸菌の分類学的位置づけと密接な関連性があることを我々は報告した²⁴⁾²⁵⁾。Etémadi らはこれらジカルボンミコール酸は、Baeyer Villiger 反応の生化学的アナログとしてケトミコール酸の酸化によつてエステルミコール酸が形成され、それから生成されると推測している²³⁾。我々の結果では、エステルミコール酸の加水により多分形成されるであろう octadecanol-2 と eicosanol-2 の割合は、温度変化に応じて変動し、ジカルボンミコール酸の分子種組成の変化と並行した²⁶⁾。*M. phlei* の α ミコール酸およびジカルボンミコール酸の含量は温度により著しい影響をうけ、高温培養ほど、菌体のミコール酸含量が増加すること、またミコール酸の分子種組成も温度により影響をうけ、高温ほど長鎖の分子種が増加することを見出した。好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* では温度により、イソおよびアンテイソ分枝酸の比率が変化するのみならず脂肪酸の鎖長が変化することが知られている¹⁹⁾。*M. phlei* のミコール酸についても同様の傾向が認められるが、その炭素数の変動の幅は大きく20℃から50℃の範囲で平均炭素数3~4個の変動が認められ、絶対量としても、高温ほど長鎖分子種の含量が多くなった。また分子種組成の変動は、温度の shift up に対して極めて鋭敏に反応し3~5時間の短時間で分子種の変動が認められた。これらのことからミコール酸が、Mycobacteria の主要構成脂質として、細胞壁や細胞膜の温度適応の少なくとも一端を担っていることが明らかになった。

抗結核剤 Isoniazid はその作用機作に興味がもたれ種々の研究が行なわれてきた。INH はその化学構造がピリドキサルリン酸に類似しているのをこれを補酵素とする種々の酵素系、特にアミノ酸代謝に関連する酵素系に対する阻害作用が注目されたが²⁷⁾、抗菌作用に必要な濃度よりかなり高い濃度でしか阻害が認められず、真の作用機作とは考えられていない。近年、Takayama らは ^{14}C 酢酸を用いた cell での実験から、結核菌のミコール酸生合成が INH によつて阻害され²⁸⁾、cell-free 系においてもミコール酸の直鎖部分 (メロミコール酸) に相当すると考えられる C_{30-60} 直鎖脂肪酸の合成が低濃度 INH 添加で抑制され、特に C_{28} 以上の elongation が阻

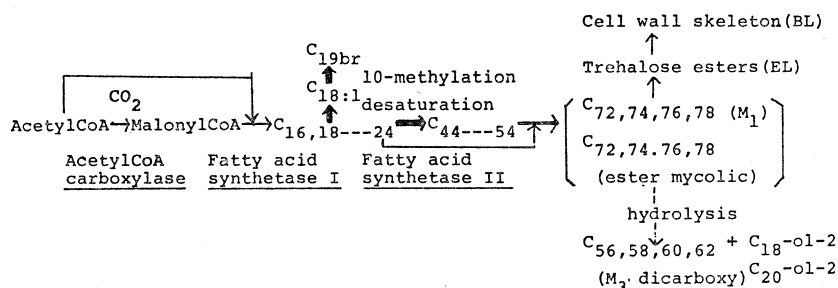
害されていることを明らかにした²⁹⁾。我々は *M. phlei* においては cell 当りのミコール酸の含量が、INH 濃度に比例して著明に減少するのみならず、ミコール酸の分子種組成も変動し INH 濃度が高くなると長鎖のミコール酸が減少することを見出した。これらの INH によるミコール酸の炭素数の変動は、*M. smegmatis* の場合にも認められ、マスフラグメントグラフィーの結果より、直鎖部分の変動(短縮)に由来することが明らかになった(unpublished)。また、これに関連して INH の抗菌スペクトルは特異性が高く、結核菌に対しては強い抗菌力をもっているが、他の細菌に対しては抗菌力が低いことが知られている。*Nocardia rubra* および *Corynebacterium xerosis* は *Mycobacteria* の類縁菌でありミコール酸が存在するが、これらのミコール酸の炭素数は *Mycobacteria* と比べて短く *N. rubra* C₃₆₋₅₀、で *C. xerosis* で C₂₆₋₃₆ である。これらの菌の増殖に対する INH の影響を調べてみると、*N. rubra* では INH 2 µg/ml 以上で顕著な発育阻害が認められたが、*C. xerosis* には全く阻害が認められなかった。また INH 阻害の認められる *Nocardia* では INH によるミコール酸分子種の変化が認められ、比較的長鎖のミコール酸 C_{42,44,46} が減少し、一方阻害のかからない *Corynebacteria* では全く分子種組成の変化は認められなかった³⁰⁾。したがって、以上の結果から INH の主(一次)作用点については、メロミコール酸に相当する長鎖脂肪酸合成系のいずれかの段階で比較的長鎖、特に C₂₄ 以上の chain の合成(延長反応)を阻害することが示唆される。このように温度および INH の影響によるミコール酸組成の変化は一見類似しており、温度が低いほど、また高濃度の INH 添加時ほど、ミコール酸含量が減少するのみならず長鎖の脂肪酸が減少し、これらの調節段階や作用点の詳細な解析が今後必要とされる。

このようにミコール酸は cell wall, cell membrane の脂質の主要構成成分であるため、これらの脂質成分の変動が細胞壁の表面構造にどのような影響を及ぼしているかを知ることは興味がある。そこで *M. phlei* 20°C, 50°C 培養菌、INH 非添加時の菌体、INH 添加時の菌体を走査電顕により菌体表面の観察を行なった。*Mycobacteria* の細胞壁表面の微細構造は極めて特徴的であり表面に約 80 Å の幅をもつ多数の線維構造を有しており、この構造は脂質を主体とするものと考えられている。50°C および INH 非添加の control では、*M. phlei* は長い桿菌で表面には多数の線維構造(fibrous structure)が認められるが、20°C および INH 阻害菌ではいずれも菌全体が丸みをおび表面が平滑になつていた³⁰⁾。このようにミコール酸の分子種組成の変動に並行して菌体の表層構造に変化が認められ、細胞壁の疎水的な性質が明らかに変化していることが示唆された。

これらのミコール酸の酵素的生合成機構については、

いまだに明らかではないが、INH や温度による分子種組成の変化の詳細な機構を明らかにするためには、生合成機構の解明を行なう必要があると思われる。Proméらは *Corynebacterium diphtheriae* の粗酵素液を用い C_{16:0} パルミチン酸が2分子縮合し、炭素数の非常に短い、いわゆるコリネミコール酸を合成した³¹⁾³²⁾。これらの研究より Etémadi らは *Mycobacteria* のミコール酸では、C₁₆, C₁₈ の脂肪酸が n 個の酢酸と縮合してできたミコール酸の母体(C₅₀₋₆₀ メロミコール酸)に C₁₆~C₂₄ の脂肪酸が縮合して分岐部を形成し、ミコール酸が生合成されると考えている³³⁾。Bloch らはこれらのメロミコール酸に相当する長鎖脂肪酸の合成について報告し、*Mycobacteria* は、二つの fatty acyl 基の生合成 system を有し、一つは synthetase I であり C₁₆~C₂₄ の合成に寄与しており、また synthetase II は C₃₀ までの鎖長の elongation を行ない³⁴⁾³⁵⁾、両者は反応温度が高くなると平均炭素数が増加することを報告しているが、その解析は C₃₀ までにとどまっている。これらのメロミコール酸に相当する長鎖脂肪酸の合成については Takayama らが *M. tuberculosis* H₃₇Ra を用い粗酵素系で malonyl-CoA の取り込みを行ない C₅₀ まで放射能の取り込みを認めている²⁹⁾。我々の行なつた *M. phlei* の硫安分画酵素標品による 1-¹⁴C 酢酸の長鎖脂肪酸への取り込み実験の結果では、生成物に二相性が認められ C₁₈₋₂₈ までと C₂₈ 以上 C₅₀₋₆₀ までの二つの system が考えられる。おそらく C₂₈ 以上の脂肪酸合成は elongation により行なわれていると考えられるが、この段階は反応温度に対して極めて鋭敏に反応して、長鎖脂肪酸の鎖長の調節が行なわれ、この結果、ミコール酸の分子種の構造が決定されることが示唆される。

このようにして合成されたミコール酸が菌体内で細胞質から細胞壁へどのように transfer されるかについても全く知られていなかった。Takayama らは、whole cell で酢酸を取り込ませ INH で菌の増殖を阻害すると、初めに EL の TMM への取り込みが阻害されるのに対して、非極性脂肪酸への取り込みは阻害されないことを認めている³⁶⁾。我々は *M. phlei* の対数増殖期の菌体に INH を添加したときの短時間の変化を EL, BL に分けて調べたところ、EL のミコール酸分子種の変動が3時間よりまず認められ、さらに数時間後に BL の分子種が変化することを認めている。また *M. phlei* の whole cell と 2-¹⁴C 酢酸を incubate すると放射能は初め EL (おそらく TMM, TDM と考えられる)に取り込まれ、さらにおくれて cell wall bound ミコール酸に取り込まれるという結果を得ている。低温では特に cell wall への取り込みが阻害された。このことから *Mycobacteria* のミコール酸はおそらく細胞膜または細胞質内で合成され、合成されたミコール酸は、何らかの形で細胞壁に transfer



Scheme. 1. Proposed pathway and regulation for fatty acid and mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium phlei*.

されるのではないかと考えられる。

以上の結果から予想される ミコール酸合成の pathway を示すと Scheme I のようになる。 C_{16} ~ C_{24} 程度の脂肪酸が合成され、さらに C_{24} 以上の長鎖脂肪酸が elongation されて、 C_{44} ~ C_{54} 程度の脂肪酸となり、ミコール酸の直鎖部分が合成され、次に C_{24} 脂肪酸との縮合により C_{74} , C_{76} , C_{78} 程度の α ミコール酸が合成されるものと考えられる。これに対して、ジカルボンミコール酸は、ケトミコール酸からエステルミコール酸が合成され、これが水解されて生成したものと考えられるが、これらの詳細な機構については、なお将来検討を要する。このように、ミコール酸合成反応の各段階には、種々の調節因子(遺伝的ならびに環境的な)が存在し、in vitro および in vivo で作用していることが考えられるが、今後、詳細に解析したいと考えている。またこのようにして生成したミコール酸のトレハロース脂質 (TMM および TDM) への取り込みや細胞壁への transfer についてもその詳細は明らかでないが、抗酸菌細胞壁合成の調節因子解明には、極めて重要な段階であると考えられる。

稿を終わるにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜った大阪市立大学医学部細菌学教室増井正幹教授、新潟大学医学部細菌学教室矢野郁也教授、大阪市立大学刀根山結核研究所楠瀬正道教授、楠瀬恵美先生、帝塚山短期大学富安郁子助教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Asselineau, J.: The bacterial lipids. Hermann, Paris, p. 122, 1966.
- 2) Etémadi, 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, 1: 294, 1967.
- 4) Goren, M.B.: Mycobacterial lipids: Selected topics, Bacteriol Rev, 36: 33, 1972.
- 5) Murohashi, T. et al.: The role of lipids in acid-fastness of Mycobacteria, Amer Rev Resp Dis, 99: 794, 1969.
- 6) Ribí, E. et al.: Efficacy of mycobacterial cell walls as a vaccine against airborne tuberculosis in the Rhesus monkey, J Infect Dis, 123: 527, 1971.
- 7) Bekierkunst, A. et al.: Immunotherapy of cancer with nonliving BCG and fractions derived from Mycobacteria: Role of cord factor (Trehalose-6,6'-dimycolate) in Tumor Regression, Infect Immun, 10: 1044, 1974.
- 8) Kato, M.: Site of action of the cord factor of *Corynebacterium diphtheriae* in mitochondria, J Bacteriol, 107: 745, 1971.
- 9) Kato, M. et al.: Chemical structure and biochemical activity of cord factor analogs. A comparative study of esters of methyl glucoside and non-hydroxylated fatty acids, Eur J Biochem, 87: 497, 1978.
- 10) Toriyama, S. et al.: Separation of C_{50} - C_{60} and C_{70} - C_{80} mycolic acid molecular species and their changes by growth temperatures in *Mycobacterium phlei*, FEBS lett, 95: 115, 1978.
- 11) Krembel, J. and Etémadi, A.H.: Sur la biogenèse des "acides mycoliques en C_{60} " isolés de *Mycobacterium smegmatis*, Bull Soc Chim Biol, 48: 67, 1966.
- 12) Etémadi, A.H. and Pinte, F.: Sur une nouvelle voie métabolique des acides palmitique et stéarique mise en évidence chez *M. smegmatis*, C R Acad Sci [D] (Paris), 262: 1151, 1966.
- 13) Takayama, K. et al.: Effect of isoniazid on the *in vivo* mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*, Antimicrob Agents Chemother, 2: 29, 1972.
- 14) Takayama, K. et al.: Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*, J Lipids Res, 16: 308, 1975.
- 15) Cronan, J.E., Jr. and Gelman, E.P.: Physical properties of membrane lipids: Biological relevance and regulation, Bacteriol Rev, 39: 232, 1975.
- 16) Cronan, J.E., Jr. and Vagelos, P.R.: Metabolism and fraction of the membrane phospholipids of *Escherichia coli*, Biochim Biophys Acta, 265: 25, 1972.
- 17) Sinensky, M.: Homeoviscous adaption—a homeostatic process that regulates the viscosity of the

- membrane lipids in *Escherichia coli*, Proc Natl Acad Sci USA, 71: 522, 1974.
- 18) Folch, J. et al.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, J Biol Chem, 226: 497, 1959.
- 19) 大島美恵子他: 好熱菌細胞膜の分析と性質, 蛋白質・核酸・酵素, 20: 168, 1975.
- 20) Azuma, I. et al.: Fractionation of mycobacterial cell wall, J. Bacteriol, 96: 1885, 1968.
- 21) Takayama, K. et al.: Effect of low temperature on growth, viability, and synthesis of mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H₃₇Ra, Amer Rev Respir Dis, 118: 113, 1978.
- 22) 矢野郁也・鳥山浄子: Mycobacteria とその類縁抗酸菌ミコール酸 (C₆₀₋₈₀ 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.
- 23) Markovits, J. et al.: Sur la structure des acides mycoliques dicarboxyliques insaturés isolés de *Mycobacterium phlei*, C R Acad Sci [C] (Paris), 263: 960, 1966.
- 24) 矢野郁也他: Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of C₅₀₋₆₀ mono- and di-carboxy mycolic acids in Mycobacteria, 医用マス研究会講演集, 3: 169, 1978.
- 25) 矢野郁也他: α -ミコール酸分子種による Rapid-grower 抗酸菌の分類, 日本細菌学雑誌, 34: 172, 1979.
- 26) Toriyama, S. et al.: Regulation of cell wall mycolic acid biosynthesis in acid-fast bacteria, J Biochem, 88: 211, 1980.
- 27) Yoneda, M. and Asano, N.: Competitive action of isonicotinic acid hydrazide and pyridoxal in the amino acid decarboxylation of *Escherichia coli*, Science, 117: 277, 1953.
- 28) Davidson, L.A. and Takayama, K.: Isoniazid inhibition of the synthesis of monounsaturated long-chain fatty acids in *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra, Antimicrob Agents Chemother, 16: 104, 1979.
- 29) Takayama, K. et al.: Studies of the effects of isoniazid on the biosynthesis of non-mycolic C₃₀₋₅₆ fatty acids by *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra, Proceeding for US-Japan cooperative medical science. Fifteen joint meeting tuberculosis panel, p. 71, 1980.
- 30) 鳥山浄子他: 抗結核剤 INH によるミコール酸生合成阻害と分子種組成の変動, 日本細菌学雑誌, 33: 313, 1978.
- 31) Walker, R.W. et al.: Biosynthesis of mycolic acids. Formation of a C₃₂ β -keto ester from palmitic acid in a cell-free system of *Corynebacterium diphtheriae*, Biochim Biophys Acta, 326: 52, 1973.
- 32) Promé, J.C. et al.: Condensation de deux molécules d'acide palmitique chez *Corynebacterium diphtheriae*: formation d'un β -céto-ester de tréhalose, C R Acad Sci [C] (Paris), 278: 1065, 1974.
- 33) Etémadi, A.H.: Correlations structurales et biogénétiques des acides mycoliques en rapport avec la phylogénèse de quelques genres d'actinomyce-tales, Bull Soc Chim Biol, 49: 695, 1967.
- 34) Odriozola, J.M. and Bloch, K.: Effects of phosphatidylcholine liposomes on the fatty acid synthetase complex from *Mycobacterium smegmatis*, Biochim Biophys Acta, 488: 198, 1977.
- 35) Odriozola, J.M. et al.: Fatty acid synthetase activity in *Mycobacterium smegmatis*, Biochim Biophys Acta, 488: 207, 1977.
- 36) Takayama, K. and Armstrong, E.L.: Metabolic role of free mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*, J Bacteriol, 130: 569, 1977.