小川卵黄培地上に rough および smooth 型コロニー を形成する鼠らい菌中のミコール酸および各 種炭素鎖長をもつ脂肪酸の比較分析

日 下 喬 史

(川崎医科大学・第二生化学教室)

野 間 口 博 子 宮 田 泰 代 森 竜 男

(大阪大学微生物病研究所)

(受付：1986年2月6日)

1970年 Ogawa ら⁽¹⁾ は鼠らい菌ハワイ株を1%小川卵黄培地上に培養させることに成功したが、その後この方法による4~5代までのコロニー外観は通常 rough (R) 型であるのに、9~15代継代させると smooth (S) 型コロニーに変換する例の多いことが知られて来た⁽²⁾。このような R, S 型鼠らい菌間の性状の比較について、Kawaguchi ら⁽²⁾ は S 型菌は R 型菌に比べてマウスに対する病原性がいちじるしく低下していることを観察し、また楠瀬(恵)⁽³⁾ は R 型菌の superoxide dismutase (SOD) 比活性が継代により数十倍上昇することを報告している。したがって、R, S 両型菌の間はかなり生化学的性状の変動が起こると予想されるが、脂質成分の変動については未だ報告がない。我々⁽⁴⁾ は数年来らい菌や鼠らい菌のミコール酸分析の結果をこれらの菌の迅速な同定に利用する方法を開発して来たが、今回この方法の信頼性を確認する目的と共に、両型菌の間での脂肪酸代謝の変動を調べる目的から、両型菌のミコール酸の質的、量的分析と、ミコール酸の前駆体とみなされている炭素(C)数27~56の極長鎖脂肪酸の量的分析などを行い若干の知見を得たので報告する。

研究材料

1%小川卵黄培地⁽¹⁾に5代継代したR型菌と80代継代したS型菌(いずれもハワイ株鼠らい菌)を使用した。

研究方法

各種炭素鎖長脂肪酸とミコール酸の分画：鼠らい菌より各種炭素鎖長脂肪酸およびミコール酸を分離する方法

は前報⁽⁴⁾と同じである。その骨子はR, S両型菌を別々に水で2回洗滌後、凍結乾燥して一定量(10~20mg)を秤量し、これらを出発材料として5% KOH を含む50%エタノール水溶液中で85°C, 4時間鹼化し(この間還流冷却管使用)して総脂肪酸を抽出する。この抽出画分を島津 LC-4A 型高速液体クロマトグラフ (HPLC) 装置に接続したゲルろかカラム (Shimpack, HSG-15) に負荷し、総脂肪酸を分子サイズ別に分画し (Fig. 1) 各画分中の脂肪酸重量を溶媒を完全に留去後秤量する。この際、既知分子量のポリスチレン標準品 (Waters 社) 数種のゲルろかにより溶出量から分子量を求め得る検量線を作成し、これにより未知画分中の分子量を算出した。

ミコール酸分析：Fig. 1 に示される画分①, ②はその分子量範囲(850~1,300)からミコール酸を含む画分と考えられるので、両型菌のこれらの画分を前報⁽⁴⁾のごとくフェナシルエステル化した後、別々にシリカゲル吸着カラム (Waters 社, μ Porasil) —HPLC に負荷すると、画分①からは初めに溶出される(極性のより小さい)大ピークと、これより遅れて溶出され、これの約 $1/10$ サイズの小ピークの2画分に別れる。後述の質量 (MS) 分析によると大ピークは α -ミコール酸^(註1)、小ピークは β -ミコール酸^(註2)であった。画分②を同じ吸着カラムに負荷すると、主ピークは1個でこれは後述の MS

(註1) 分子中にカルボキシル基と β 位炭素の OH 基以外には酸素を含まぬミコール酸群をいう。

(註2) 分子中にメチル分枝基とオキソ基を含むミコール酸群をいう。

Fig. 1 Gel-permeative-HPLC of the total fatty acids in the both bacilli. Experimental conditions are described in text.

分析によるとジカルボキシミコール酸(註3)であった。以上3種のコール酸は何れもまだ多種分子サイズの混合物であるので、これらを別々に逆相カラム(Nakarai 社, Cosmosil 5-C18)に負荷し HPLC を行って分子サイズ別に分けた。最後にこれらのミコール酸フェナシルエステルを日立 M-80B 型 MS 分析計を用いエレクトロンインパクト(EI)-MS により化学構造を推定し、またシクロプロパン基のような化学基の証明のため Varian 製 XL-200 型核磁気共鳴(NMR)装置を用いプロトン(H^+)-NMR スペクトルを測定した。

放射性さく酸およびリグノセリン酸の各種炭素鎖長脂肪酸へのとりこみ: 水 5 ml 中に $[2-^{14}C]$ Na-アセテート(Amersham 社・54Ci/mol 水溶液) 0.04 μ moles と 150mg 乾燥量の R または S 型菌を含む液を 37°C, 2 時間インキュベイトしたのち、十分量の水で洗い、ついで前述のようにして総脂肪酸を抽出し、一部をカウント測定用に保存し、残りを前述のように各種鎖長脂肪酸に分画

(註3) ω 位にもカルボキシル基をもつミコール酸群で、天然にはある種の高級アルコール(後述)がこの基とエステル結合しているが、鹼化時このアルコールは水解され、ミコール酸画分に抽出されてこない。

Table 1 Content of Various Carbon-length's Fatty Acids in the Both Bacilli

Fract. No.*	Main component	R-bacilli	S-bacilli
⑦	Fatty acid (C 14~18)	4.1%	7.7%
⑥	Fatty acid (C 19~23)	1.2%	1.8%
⑤	Fatty acid (C 24~26)	0.4%	0.3%
④	Fatty acid (C 27~42)	4.0%	2.5%
③	Fatty acid (C 43~56)	4.8%	0.7%
②	Dicarboxymycolates	14.8%	1.4%
①	α -, β -mycolates	10.7%	8.4%
Sum		40.0%	22.8%

* The same as Fig. 1.

し、各画分中のカウントを Packard 製液体シンチレーションカウンタで測定した。また、水 5 ml 中に $[1-^{14}C]$ リグノセリン酸(CEA製・4.7Ci/mol 2%デキストラン浮遊液) 0.1 μ mole と 150mg 乾燥重量の R または S 型菌を含む液を 33°C, 5 時間インキュベイトしたのち、放射性アセテートの場合と同様にして、各種鎖長脂肪酸中にとりこまれた放射能を測定した。

結 果

両型菌の菌体中各種炭素鎖長脂肪酸の含有率: R, S 両型菌の菌体中各種脂肪酸の含有率は Table 1 のとおりで、まず総脂肪酸含有率は R 型の 40% に対し S 型は 22.8% で明らかに低値を示した。その内訳は、*de novo* 脂肪酸合成酵素により生成されと考えられる C 14~26-脂肪酸含有率(画分⑦+⑥+⑤)は R 型の 5.7% に対し S 型は 9.8% で S 型の方がむしろ高値であるのに対し、ミコール酸生合成の前駆体と考えられる C 27~56-脂肪酸含有率(画分④+③)は R 型の 8.8% に対し S 型は 3.2% にすぎず、さらに 3 種のミコール酸合計の含有率(画分②+①)も R 型の 25.5% に対し S 型は 9.8% とはるかに低値であった。

両型菌のミコール酸分析: 両型菌間での各種ミコール酸含有率には上述のように大差があるものの、各種ミ

Fig. 2 α-mycolic acids in *M. lepraemurium*

Peak No.	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
m/z of mass-fragment								
(A)	1,046	1,060	1,074	1,088	1,102	1,116	1,130	1,144
(B)	740	754	768	782	796	810	824	838
(C)	487	487	515	515	543	543	571	571
(D)	307	307	307	307	307	307	307	307
(E)	351	351	351	351	351	351	351	351
number of (CH ₂)								
a	17	18	17	18	17	17	17	18
b	10	10	12	12	14	14	16	16
c	17	17	17	17	17	17	17	17
d	21	21	21	21	21	21	21	21

Fig. 3 β-mycolic acids in *M. lepraemurium*

Peak No.	①	②	③	④
m/z of mass-fragment				
(A)	1,118	1,146	1,174	1,202
(B)	812	840	868	896
(C)	531	559	587	615
(D)	307	307	307	307
(E)	351	351	351	351
number of (CH ₂)				
a	17	17	17	17
b	14	16	18	20
c	17	17	17	17
d	21	21	21	21

コール酸の逆相カラム HPLC や、それに続く MS-分析の結果による質的な比較においては両型菌の間に全く差違が認められなかった。したがって本項には主に R 型菌の分析結果のみを記す。α-, β- およびジカルボキシミコール酸フェナシルエステルの逆相カラムクロマトグラ

フは Fig. 2, 3, 4 の左半分に示すとおりで、図中数字を付したピークのみにつき直接導入法により EI-MS 分析を行った。この際、分析の基礎となる各ミコール酸の解裂様式は Fig. 5, 6, 7 のとおりである。このうち、α-ミコール酸の解裂様式 (Fig. 5) は前報⁽⁴⁾ のとおりで

Fig. 6 EI-mass-fragments of β -mycolic acids in *M. lepraemurium* Fig. 7 EI-mass-fragments of dicarboxy-mycolic acids in *M. lepraemurium* Fig. 8 EI-mass-spectrum of α -mycolic acid in *M. lepraemurium*

放射能の合計はR型菌の10,006 dpm に対しS型菌は201,746dpm であり、S型菌にはR型菌より20倍も多くとりこまれていた。但し、各画分へのとりこみ配分率について検討すると、*de novo* 脂肪酸合成酵素によると考えられる画分 (⑦+⑥+⑤) へのとりこみはR型菌の50%に対し、S型菌は72%でS型菌の方が優位を示すも

の、ミコール酸 (画分②+①) へのとりこみはR型の36%に対し、S型は19%でR型菌の方が優位であった。一方リグノセリン酸から各種脂肪酸にとりこまれた放射能の合計はR型菌の72,135dpm に対し、S型菌は、60,979dpm であり、この場合は両型菌の間に有意の差はなかった。各画分へのとりこみ配分率について検討すると、画分⑤と④について両画分への配分率の合計はR型の92%に対しS型は90%と殆んど同じであるものの、R型画分④の27%に対してS型のそれは8%といちじるしい差を示し、R型菌の方がS型菌より C_{24} 附近の脂肪酸から C_{40} 附近の脂肪酸への伸長活性に著差のあることがうかがえる。その他の画分へのとりこみ配分率については両型菌の間に有意差を認めにくい。

考 察

Table 1, 2より両型菌の間に著しい差の認められた項目を総合したものが Table 3である。この Table 中の S/R 比のうち、 $[2-^{14}C]$ アセタートの総脂肪酸へのとりこみ量に関する比 (20.75) は他の値に比べてとび

Fig. 9 EI-mass-spectre of β -mycolic acid in *M. lepraemurium*

Fig. 10 EI-mass-spectre of dicarboxy-mycolic acid in *M. lepraemurium*

Table 2 Fatty Acid-synthesizing Activities *in vivo* in the Both Bacilli

Fr. No.*	Main component	R-bacilli		S-bacilli	
		Incorporat. of $[2-^{14}\text{C}]$ acetate (%)	Incorporat. of $[1-^{14}\text{C}]$ lignocerate (%)	Incorporat. of $[2-^{14}\text{C}]$ acetate (%)	Incorporat. of $[1-^{14}\text{C}]$ lignocerate (%)
⑦	Fatty acid (C14~18)	3,044dpm (30%)	1,139dpm (1.6%)	83,160dpm (41%)	1,787dpm (3%)
⑥	Fatty acid (C19~23)	1,078dpm (11%)	3,750dpm (5.0%)	29,780dpm (15%)	2,974dpm (5%)
⑤	Fatty acid (C24~26)	875dpm (9%)	47,055dpm (65.0%)	32,508dpm (16%)	49,953dpm (82%)
④	Fatty acid (C27~42)	1,253dpm (13%)	19,720dpm (27.0%)	10,854dpm (5%)	5,084dpm (8%)
③	Fatty acid (C43~56)	730dpm (7%)	56dpm (~0%)	6,924dpm (3%)	86dpm (~0%)
②	Dicarboxy-mycolate	1,734dpm (17%)	140dpm (~0%)	8,528dpm (4%)	132dpm (~0%)
①	α -, β -mycolate	1,292dpm (13%)	275dpm (0.4%)	29,992dpm (15%)	963dpm (1.6%)
Sum		10,006dpm (100%)	72,135dpm (100%)	201,746dpm (100%)	60,979dpm (100%)

* The same as Fig. 1.

ぬけて高い。これは、アセテートが菌体内にとりこまれる、いわゆる細胞壁と細胞膜間の輸送の段階において、両型菌の間の活性に著しい差があるためか、または著者の一人、日下がすでに報告⁽⁶⁾したようにR型菌^(註4)ではアセチル-CoA カルボキシラーゼ活性が微弱のためにとりこまれたアセテートより生成されるマロニル-CoA が微量で、したがって *de novo* 脂肪酸合成系も脂肪酸伸長系もいちじるしく抑制されるための何れかと考

えられるが、詳細は今後の検討を要する。この値以外の S/R 比においては、C₁₄₋₂₆-脂肪酸の含有率比 (1.72) と $[2-^{14}\text{C}]$ アセテートの C₁₄₋₂₆-脂肪酸へのとりこみ率比 (1.44) のみが1より有意に高い値であり、その他は $[1-^{14}\text{C}]$ リグノセリン酸の総脂肪酸へのとりこみ比 (0.85) を除き1より有意に低い値である。ところが今

(註4) 文献(6)で報告した培養鼠らい菌はすべて R 型菌であったとひるがえって考えられる。

Table 3 Comparison of Fatty Acid Content and Fatty Acid-Synthesizing Activity between the Both Bacilli

item	R-bacilli	S-bacilli	S/R ratio
Total fatty acids content	40.0%	22.8%	0.57
C ₁₄₋₂₆ -fatty acids content	5.7%	9.8%	1.72
C ₂₇₋₅₆ -fatty acids content	8.8%	3.2%	0.36
Total mycolates content	25.5%	9.8%	0.38
Incorporated Amount of [2- ¹⁴ C] acetate in total fatty acids*	0.08nmol	1.66nmol	20.75
Incorporat. rate of [2- ¹⁴ C] acetate in C ₁₄₋₂₆ -fatty acids	50.0%	72.0%	1.44
Incorporat. rate of [2- ¹⁴ C] acetate in total mycolates	30.0%	19.0%	0.63
Incorporated amount of [1- ¹⁴ C] lignocerate in total fatty acids*	7.20nmol	6.10nmol	0.85
Elongation rate from [1- ¹⁴ C] lignocerate	27.0%	8.0%	0.29

* The amounts (nmoles) were calculated from dpm using specific radioactivity of [2-¹⁴C] acetate or [1-¹⁴C] lignocerate (see text).

までの抗酸菌の脂肪酸合成に関する知見^(7,8)から鼠らい菌においても C₁₄₋₂₆-脂肪酸の合成は *de novo* 脂肪酸合成酵素系により触媒されるが、それより長炭素鎖の脂肪酸やミコール酸の合成は極長鎖脂肪酸伸長系や極長鎖脂肪酸不飽和化系などこれとは別の酵素系により触媒されると考えられる。したがって、*de novo* 脂肪酸合成酵素については S 型菌の方が R 型菌よりもより活性であるが、それより長鎖長の脂肪酸やミコール酸の合成については S 型菌は R 型菌より活性が低いと考えるならば、Table 3 の S/R 比の生じる理由がほぼ説明出来ると思われる。但し、[1-¹⁴C] リグノセリン酸からミコール酸への放射能のとりこみが両型菌ともに低い結果 (Table 2) に関しては、菌体内にとりこまれたリグノセリン酸やこれより伸長する脂肪酸の一部が β 酸化をうけた場合すべて 1 位炭素の放射能がアセテートとして不可逆的に失われるためにミコール酸の前駆体と考えられる C₂₇₋₅₆-脂肪酸の比放射能 (Ci/mole) の急速な低下を来すためと考えれば説明がつくのではなからうか。

上述のような S 型菌に予想される変動すなわち *de novo* 脂肪酸合成素活性の上昇とリグノセリン酸からの脂肪酸伸長酵素活性の低下が正しいならば、このような変動は結核菌 H₃₇ Ra 株にイソニコチン酸ヒドラチド

(INH) を適量作用させた時ときわめて類似した現象⁽⁸⁾である。すなわち、この場合も INH 投与により C₁₄₋₂₆-脂肪酸含有量は若干増すのに対しミコール酸含有量はいちじるしく減少し、発育も阻害される。なお、鼠らい菌のマウスに対する病原性の主因がそのコードファクター⁽⁹⁾にありと考えるならば、S 型菌の病原性が R 型菌より減少⁽²⁾している原因をミコール酸生成能の低下によるコードファクターの減少によって一部説明が可能になるかもしれない。

最後に実験結果にも述べたように、S 型菌のミコール酸は化学構造上 R 型菌のそれと全く差のないことが確認されたが、このことはミコール酸分析による抗酸菌種の同定方法の信頼度を再確認したものと云えよう。

結 論

1%卵黄含有の小川固形培地に 5 代継代し、rough 型コロニーを形成するハワイ株鼠らい菌 (R 型菌) と、これを 80 代継代し smooth 型コロニーを形成するにいたった菌 (S 型菌) について構成脂肪酸組成と *in vivo* での脂肪酸合成活性を比較したところ以下の結果を得た。

S 型菌は R 型菌に比べて、*de novo* 脂肪酸合成酵素により触媒されると考えられる C₁₄₋₂₆-脂肪酸の生成能

は上昇している反面、ミコール酸の前駆体と考えられる C₂₇₋₅₈-脂肪酸やミコール酸の生成能は低下していると思われる結果が得られた。

上述のようなS型菌のいちじらしい脂肪酸代謝活性の変動にもかかわらず、菌体内ミコール酸の化学構造上には全く変化なく、両型菌とも cis- シクロプロパン基を2個含む α -ミコール酸と cis- シクロプロパン基、分枝状メチル基およびオキシ基を各1個含む β -ミコール酸および cis- シクロプロパン基1個、カルボキシル基2個含むジカルボキシミコール酸（天然には ω -カルボキシル基に高級アルコールがエステル結合する）の3種を含むことを HPLC, MS 分析, H⁺-NMR 分析により明らかにした。これにより、ミコール酸分析による抗酸菌種の同定法の信頼性が再確認出来た。

文 献

- 1) Ogawa, T. & Motomura, K.: Studies on murine leprosy bacillus. I. Attempts to cultivate *in vitro* the Hawaiian strain of *Mycobacterium lepraemurium*. Kitasato Arch. Exp. Med., **43**, 21-36, (1970).
- 2) Kawaguchi, Y., Matsuoka, M. & Kawatsu, K.: Pathogenicity of cultivated murine leprosy bacilli in mice. 2. The pathogenicity of bacilli from smooth colonies. Japan. J. Exp. Med., **48**, 211-217, (1978).
- 3) 楠瀬恵美: ミコバクテリアの superoxide dismutase に関する研究, 大阪市立大・医学部・学位請求論文, 31頁 (1983).
- 4) Kusaka, T. et al.: Isolation and identification of mycolic acids in *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium*. Int. J. Lepr., **49**, 406-416, (1981).
- 5) Larsson, L., Draper, P. & Portaels, F.: Use of gas chromatography to differentiate *Mycobacterium leprae* from cultivable armadillo-derived mycobacteria, *M. avium/intracellulare* and *M. lepraemurium* by analysis of secondary alcohols. Int. J. Lepr., **53**, 441-446, (1985).
- 6) Kusaka, T.: Fatty acid synthesizing enzyme activity of cultivated *Mycobacterium lepraemurium*. Int. J. Lepr., **45**, 132-138, (1977).
- 7) Bloch, K.: Control mechanisms for fatty acid synthesis in *Mycobacterium smegmatis*, Advances in Enzymology, **45**, 1-84, (1977).
- 8) Takayama, K. et al.: Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Lipid Res., **16**, 308-317, (1975).
- 9) Goren, M. B., Brokl, O. & Roller, P.: Cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) of *in vivo*-derived *Mycobacterium lepraemurium*. Biochim. Biophys. Acta, **574**, 70-78, (1979),

**Analysis of Mycolic Acids and Various Carbon-Chain-Length's Fatty Acids
in *Mycobacterium lepraemurium* Originated from Rough and
Smooth Colonies Grown on Ogawa's Yolk Media**

TAKASHI KUSAKA

(Dept. Biochem. Kawasaki Medical School)

HIROKO NOMAGUCHI, YASUYO MIYATA and TATSUO MORI

(Research Institute for Microbial Diseases, Univ. of Osaka)

Analysis of constitutive fatty acids and assays *in vivo* of fatty acid-synthesizing activity were carried out in respect of two kinds of *Mycobacterium lepraemurium*, one originated from the rough colonies (5th generation, R-bacilli) and the other from the smooth colonies (80th generation, S-bacilli), both were grown on Ogawa's yolk media.

It was concluded that S-bacilli seemed to have C_{14~26}-fatty-acid-synthesizing ability more active than R-bacilli, while the former seemed to have C_{27~58}-fatty acid- and mycolic acid-synthesizing abilities less active than the latter.

In spite of a less content of mycolates in the S-bacilli than the R-bacilli, no qualitative difference in mycolates-structure was observed. Using HPLC, Mass-spectrometry as well as H⁺-NMR-analysis, both bacilli have α -mycolates (containing two cyclopropane-rings), β -mycolates (containing each one of cyclopropane-ring, methy-branch and oxo-group) and dicarboxylic mycolates (containing one cyclopropane-ring). The reliability on chemical identification of mycobacterial species using mycolate-analysis was, therefore, ascertained furthermore.