ストレプトマイシン耐性菌核酸による耐性化に就いて

木 下 嘉 一

東北大学医学部細菌学教室 (主任 黒屋政彦教授)

[受付: 11月22日1954年]

細菌の菌型転換は Griffith¹⁾(1928年)が少量の II 型肺炎双球菌 R 型を III 型菌 S 型の加熱死菌の大量と混じて、マウスの皮下に接種すると、R→S 変異と共に加熱死菌と同型の III 型菌に変異する事を認めた事にはじまる。このことはその後、度々追試され²⁾更に *in vitro* でも起る事が知られた³⁾。Alloway^{4,5)}は R→S 変異に於ける活性物質を若い S 型菌を bile salt で溶し、アルコールを加えて生ずる沈澱の中に見出し、はじめて活性物質を細菌を含みぬ状態で得た。しかし活性物質が高分子の DNA である事を明かにしたのは Avery, McCarty^{6,7)} 等である。彼等は R 型の II 型肺炎双球菌を S 型に転換する活性物質を S 型の III 型菌のみならず II 型及び III 型からも得た。即ちこれ等の菌を Sod. desoxycholate で溶し、Sevag の Chloroform 振盪法によつて蛋白を莢膜多糖体分解酵素によつて莢膜多糖体を、更に Ribonuclease (以下 RN ase) によつて RNA を除去し、CaCl₂ による精製を行い高い純度で活性物質を得て、これを Transforming principle (Tp) と名付けた。このものは水溶性で粘稠透明で、RNA 定性反応陰性であるが、Diphenylamin 反応陽性で紫外線吸収及び元素分析より DNA である事を認めた、更に型転換最少所要量(活性度)は 0.003 r である事を認めた。

その後 Boivin⁸⁾は大腸菌に於て、Alexander & Leidy⁹⁾は Influenza 菌に於て型転換物質を抽出し、又その協力者である Zamenhof¹⁰⁾等は電気泳動法によつて 1%以下の RNA, 0.2%以下の多糖体を含む DNA を精製し、このものゝ 0.01 r で型転換を起し得る事を報告している。

細菌の型転換と薬剤耐性との関係についての最初の報告は Nielsen¹¹⁾で、R 型肺炎双球菌で Sulfapyridin (以下 S-P) に感受性あるものゝ少量を S-P 耐性の S 型の加熱死菌の大量と混じてマウスの皮下に接種すると、体内から S-P 耐性の S 型菌が分離され、又同様の事実は *in vitro* でも認められた。しかしこの 2つの型質の遺伝に於ける関連性については Hotchkiss¹²⁾及び Alexan-

der¹³⁾等によつて明にされた。一方 Penicillin (以下 Pc) 感受性菌と耐性とを同一培地に培養すると、耐性菌の耐性度の低下する事は Voureka¹⁴⁾によつて発見され、本邦でも秋葉教授によつて追試され、DNA 分割にこの活性物質の存在する事を認めた。

私はチフス菌、大腸菌、大原赤痢菌の菌体成分の研究に当り、Sod. desoxycholate 処理及び Chloroform 振盪による除蛋白で核酸を高分子の状態好収量に抽出し又之等の菌の Streptomycin 高度耐性菌株を作り同様に核酸を得て、之等につき化学的及び物理的諸性状を吟味したのち、各種の SM 耐性菌株の核酸を感受性 R 型菌に作用せしめ感受性菌の耐性化及び R→S 型転換に関する実験を行い些か所見を得たのでここに報告する。

実 験

I) 核酸抽出法及び物理的・化学的諸性状

A) 核酸抽出に使用した菌株。1) チフス菌 No. 58 株及びその SM 耐性菌株。耐性菌はチフス菌 No. 58 株を SM 含有培地に次第に SM の濃度を高めつゝ培養し 10 mg/cc SM 耐性としたもので、この菌は 10 数代に汎り普通寒天培地に継代培養してもその耐性度の減弱を来さない。而して原株同様に V 型且つ S 型である。2) 大腸菌—B 株、その SM 耐性菌株及び依存性株、耐性菌はチフス菌のそれと同様にして得られ 10 mg/cc SM 耐性、又依存性株は SM 耐性上昇中に見出したものであり、SM 200 r/cc に於て最もよく発育し、それ以上或は以下の濃度では発育が悪い。3) 大原赤痢菌及びその SM 耐性株、耐性株は前 2 者同様にして得たが 1 mg/cc SM 耐性となつたのみで前者の如き高い耐性は得られなかつた。

B) 核酸抽出法

KINOSHITA Kaichi: SM-Resistance induced by DAN from SM-resistant bacteria. Department of Bacteriology, School of Medicine, Tohoku University, Sendai. — Jap. J. of Bact. 10(5), 463-468, 1955.

第1表 核酸抽出法
肉汁寒天培地, 37°C, 20hrs培養

表1に示す如く上記の各菌株を馬肉汁寒天培地に大量に培養(37°C 20 hr)集菌し、(但し SM 依存性大腸菌は 200r/cc SM 含有培地使用)Schneider¹⁰⁾に従つて0.01M Sod. Citrate, 1 M NaCl, 0.5% Sod. desoxycholate, pH 7.4~9.0 の液に菌濃度 50mg/cc (W.W.)に浮游し、60°C 30' 加温して溶菌を来さしめた。(Sod. desoxycholate は大腸菌を特に pH 9.0 に於てはよく溶菌し核酸抽出に好都合である。先に Boivin⁸⁾ は Sod desoxycholate による大腸菌の溶菌は不充分であると述べている)これを冷却した後50%にアルコールを加えると何れの場合も粘稠な線維状の沈澱を生ずる、之を硝子棒にからめて集め、1 M NaCl に溶し、更にアルコールで沈澱させ、2回この操作を反復した後 1 M NaCl に溶し

Chloroform 振盪(Octylalcohol 存在下)によつて Gel 層の生じなくなるまで上清を処理し最後の上清にアルコールを加えて析出する線維状の沈澱を再び硝子棒にからめて集め、(図1)蒸溜水に溶し、流水(2日間)、蒸溜水(1日間)に対し透析した後、液体窒素を寒剤として凍結乾燥した。

C) 化学的諸性状

0.1% 溶液は粘性を帯び、何れも Biuret 反応は陰性であり、Diphenylamin 反応、Orcin 反応は強陽性で、Molisch 反応も陽性である。窒素、磷及び DNA, RNA の定量を行つたが次に述べる電気泳動所見と照し合せ

第1図

SM 耐性菌核酸 (大腸菌)
50%Et-OH による繊維状沈澱

之等は DNA, RNA 及び多糖体を含有しているが蛋白は有しないことを知つた。

D) 電気泳動の研究及び紫外線吸収曲線

磷酸緩衝液 (pH 7.8), 資料濃度 0.3~0.5%, 予め比電伝導度を測つた後、泳動を行つたが、耐性菌及び感受性菌核酸は何れも殆んど似た像を示している。即ち—18

第2表 各菌株—核酸の化学的性状

菌 株		培養菌量 (W.W) g	收 量 % (D.W)	定 性 反 応				RNA DNA	N %	P %	N/P
				Molisch	Biuret	Orcin	Dische Diphen- ylamin				
T-58	原 株	10	1.25	+	—	++	++	1.78	7.40	3.53	2.09
	SM 耐	10	1.15	+	—	++	++	1.83	11.40	3.53	3.23
E. coli	原 株	40	1.22	+	—	++	++	2.16	4.27	2.18	1.95
	SM 耐	10	3.10	++	—	++	++	1.66	7.30	3.25	2.24
	SM 依	35	0.90	+	—	+	++	2.73	12.03	3.69	3.26
Ew 33	原 株	100	0.12	±	—	++	++	1.69	10.97	5.95	1.84
	SM 耐	10	0.78	+	—	++	++	1.67	7.03	2.71	2.62

〜 $20 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{volt. sec}$ の易動度を示す核酸に相当する 2 分層と $-0.25 \sim -3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{volt. sec}$ の極めて遅い易動度を有する多糖体の 1 分層とより成っている。而して蛋白に相当する分層は見られない。(図 2) 之等核酸の紫外線吸収は強弱の差はあるが何れも $260 \text{ m}\mu$ に極大, $230 \text{ m}\mu$ 附近に極小を示している。(図 3)

第 2 図 各種 SM 耐性菌核酸の電泳像]

燐酸緩衝液: pH 7.8 $i=0.2$
 溶液: 4°C
 原液原液: 0.3~0.5%

III SM 耐性菌核酸による感受性菌の SM 耐性化に関する実験手技

表 3 に示す如く, 各種 SM 感受性菌の 37°C 24hr 馬肉汁ブイヨン培養を更に 37°C 5hr 培養する。この 5hr 培養菌液の 0.2cc を SM 耐性菌核酸(以下 Tp)を含む 3.8cc のブイヨンに接種し 37°C 2hr 培養する。その 0.5cc を取り生理的食塩水でピペットを取り換えつゝ 10^{-5} , 10^{-6} 及び 10^{-7} の稀釈液を作り, その 1cc を 1.5% 寒天 ($45 \sim 50^\circ\text{C}$ 前後) に混釈し 37°C 24hr 培養し発生する Colony を算える²⁰⁾ (Total cell size)。一方上述の 37°C 2hr 培養菌液 10^{-1} 及び 10^{-2} 稀釈液各 1cc を表示する濃度の SM 含有 1.5% 肉汁寒天 ($45 \sim 50^\circ\text{C}$) に混釈し 37°C 48hr~72hr 培養して発生する Colony を算え

第 3 図 各種耐性菌核酸の紫外線吸収曲線

第 3 表 Tp による SM 耐性化の実験手技

Borth-Culture 37°C, 24 hrs.				
0.2cc+1.8cc broth				
37°C, 5 hrs				
0.2cc				
broth : 3.6cc		broth : 3.6cc		
Saline : 0.2cc		Tp 溶液 200r/cc : 0.2 cc		
37°C, 2 hrs.				
10 ⁻⁵ : 0.5cc	10 ⁻² : 1cc	10 ⁻² : 1cc	10 ⁻¹ : 1cc	10 ¹⁻ : 1cc
10 ⁻⁶ : "	10 ⁻¹ : "	10 ⁻¹ : "	原液 : "	原液 : "
10 ⁻⁷ : "				
↓	↓	↓	↓	↓
SM(-) Agar		SM(+)	Agar	
チフス菌 0	100r	200r	300r	500r
大腸菌 0	10r	20r	30r	50r
大原菌 0	15r	20r	30r	50r
Total cell size		The sizes of spontaneous or induced SM resistant cells		

る。以上の操作は Alexander & Leidy¹³⁾ の手技に倣つ

第4表 6S 及び R₂ の SM 耐性 T-58 核酸による耐性化

	37°C, 2 hrs. 培養 (Total cell size)	寒 天 の S M 含 有 量							
		100r		200r		300r		500r	
		発 生 集 数	耐 性 菌 率	発 生 集 数	耐 性 菌 率	発 生 集 数	耐 性 菌 率	発 生 集 数	耐 性 菌 率
6 S	Tp 作用 3.58×10 ⁷ /cc	無数		無数		25000	$\frac{1}{1.43 \times 10^3}$	2900	$\frac{1}{1.23 \times 10^5}$
	対照 3.56×10 ⁷ /cc	4200	$\frac{1}{8.47 \times 10^3}$	201	$\frac{1}{1.77 \times 10^5}$	80	$\frac{1}{4.45 \times 10^5}$	31	$\frac{1}{1.14 \times 10^6}$
R ₂	Tp 作用 7×10 ⁷ /cc	無数		無数		50000	$\frac{1}{1.4 \times 10^3}$	1340	$\frac{1}{5.22 \times 10^4}$
	対照 7.9×10 ⁷ /cc	20480	$\frac{1}{3.88 \times 10^3}$	1920	$\frac{1}{4.11 \times 10^4}$	642	$\frac{1}{1.23 \times 10^5}$	238	$\frac{1}{3.31 \times 10^5}$

第5表 Tp に対する DNase 及び RNase の作用

Tp: 400r/cc (in 0.05 M Borate Buffer)	
1 cc + DNase Crystal 500r/cc : 1 cc	1 cc + RNase 500r/cc : 1 cc
0.05M Borate Buffer 0.01M MnCl ₂ に対し透析	0.2M Borate Buffer に対し透析
26°C, 40hrs.	26°C, 40hrs.
更に Aq. dest に対し透析	6 hrs.

Nuclease 作用後の定性及紫外線吸収

	Dische-R.	Orcin-R.
DNase 作用後	—	++
RNase 作用後	++	++
作用 前	++	++

たものである。各 SM 濃度に於ける菌数を分子とし Total cell size を分母とした数はその SM 濃度に於ける耐性菌自然出現率であり、而して之と Tp を作用させた場合の率とを比較するときは耐性化が行われた程度を示す事になる。

III 実験成績

A) チフス菌は No. 58 株をはじめ 27 株、大腸菌は B 株以下 21 株、大原赤痢菌は 45 株について上の実験を試みたが対照に比し全く有意の差を見なかつた。しかしチフス菌 6S 及び R₂ の 2 株は表 4 に示す如く、耐性菌の自然発生率との間に 10²~10³ の比を以て SM 耐性化するのを見た。尙この 2 株は何れも R 型であるが耐性化に伴い S 型に転換し、而もこの 2 つの型質の変換は常に互に相伴っているのを認めた。(この点については後報に詳述する)

B) Tp に対する DNase 及び RNase の作用。

使用した SM 耐性チフス菌核酸は DNA, RNA 及び多糖体を含んでいる。このうち変異に与るものを吟味するため、Tp に対し DNase 及び RNase を作用させた後、その活性を検した。Nuclease による消化は主として Zamenhof⁽¹³⁾ 法に従つた。表 5 に示す如く Tp を Borate Buffer にとかし DNase 又は RNase を加え Borate Buffer に対し透析しつゝ 26°C~28°C で 40 hr 作用させたのち、定性反応及び紫外線吸収を検した結果 DNase による消化では Dische 反応及び溶液の粘性の消失を認め、RNase 消化後は定性反応及び粘性に就ては消化前と大差なく、紫外線吸収は何れの場合も減弱を認めた。一方 RNase 消化後は 6S, R₂ の耐性化に何等の影響もなく消化前と同様であり、DNase では何等の溶性を示さず対照と同様であり、耐性化に与る物質の破壊が著明であるのを見た。(表 6)

C) 異種 SM 耐性菌核酸(大腸菌及び大原赤痢菌)のチフス菌 6S 及び R₂ に対する作用

上述の如くチフス菌 6S 及び R₂ は同種である SM 耐性チフス菌核酸によつて耐性化を来すが、之等は異種で

第6表 Nuclease 作用後に於ける Tp の作用

		37°C, 2 hrs. 菌数 (Total cell size)	SM濃度							
			100r		200r		300r		500r	
			発生集 落 数	変異菌 出現率	発生集 落 数	変異菌 出現率	発生集 落 数	変異菌 出現率	発生集 落 数	変異菌 出現率
6 S	対 照	3. 6×10 ⁷ /cc	3200	$\frac{1}{1.13 \times 10^4}$	140	$\frac{1}{2.57 \times 10^5}$	20	$\frac{1}{1. 8 \times 10^6}$	16	$\frac{1}{2.25 \times 10^6}$
	Tp (消化前)	3.86× "	無 数		無 数		1640	$\frac{1}{2.35 \times 10^4}$	1882	$\frac{1}{2.05 \times 10^4}$
	RNase 消化後	2. 8× "	無 数		無 数		14000	$\frac{1}{2.00 \times 10^3}$	1817	$\frac{1}{1.59 \times 10^4}$
	DNase "	2.86× "	1950	$\frac{1}{2.49 \times 10^4}$	160	$\frac{1}{3.03 \times 10^5}$	40	$\frac{1}{1.21 \times 10^6}$	45	$\frac{1}{1.08 \times 10^6}$
R ₂	対 照	7.78× "	60500	$\frac{1}{7.29 \times 10^3}$	3680	$\frac{1}{2.11 \times 10^4}$	1880	$\frac{1}{4.13 \times 10^4}$	225	$\frac{1}{3.45 \times 10^5}$
	Tp (消化前)	6.42× "	無 数		無 数		14580	$\frac{1}{4.43 \times 10^3}$	1126	$\frac{1}{5.70 \times 10^4}$
	RNase 消化後	7.20× "	無 数		無 数		無 数		1596	$\frac{1}{4.35 \times 10^4}$
	DNase "	6.36× "	22000	$\frac{1}{2.89 \times 10^3}$	4400	$\frac{1}{1.44 \times 10^4}$	1750	$\frac{1}{3.63 \times 10^4}$	392	$\frac{1}{1.69 \times 10^5}$

ある大腸菌及び大原赤痢菌の SM 耐性菌核酸によって耐性化を来すか否かを検した。実験手技は上述と同様であつたが、この実験の条件では対照と全く同様であり耐性化を示さぬ。

考 案

肺炎双球菌の菌型転換に関する研究は Griffith の発見以来 Avery 等によつて化学的に生物学的に完成された観がある。而して多くの他の研究者によつて大腸菌、インフルエンザ菌、百日咳菌等の菌型転換に関する研究が行われ略々同様の結果が見られた。細菌が Pc, SM などの抗生物質に対して耐性を獲得する現象は遺伝的な変異株の出現のためであるとされている。而して薬剤耐性と菌型転換とは菌の有する 2 型質であつて、これが DNA に密接な関連を有すると思われる。この点に関し Longvard-Nielsen¹¹⁾が行つた R→S 変異と S-P 耐性獲得との関係についての研究はこの問題に対して解明を与えるものと思う。しかし本報告でも述べた様に大腸菌の 21 株、大原赤痢菌の 45 株及びチフス菌の 25 株はこゝに行つた方法では全く変異を来さず R₂ と 6S の 2 株のみが SM 耐性チフス菌核酸によつて耐性化を来しただけである。即ち Tp による型転換はかなり複雑な条件の下で成立すると思われ、Austrian¹²⁾はその綜説の中で(1)細

菌の細胞学的素質(2)型転換物質の性質(3)型転換に必要な環境等の諸条件を挙げている。本報告に於けるチフス菌 6S, R₂ は他のチフス菌と異り Tp による変異が可能であり且つ R 型であつた、しかし他のチフス菌株及び No. 58 株を同株免疫血清によつて処置して得た R 型は Tp による変異を来さないし、又大腸菌の R 型及び大原赤痢菌の R 型は同種の Tp によつても又異種の Tp によつても変異を来さない。SM 耐性菌核酸は何れも DNase, RNA 及び多糖体を含んだものとして抽出されたが、チフス菌 6S, R₂ の 2 株を耐性化せしめる物質は DNase で全く不活化されるが、RNase では何等の影響を被らない。この事は従来の報告と一致する。6S, R₂ は異種である大腸菌及び大原赤痢菌の核酸では変異を来さない事は異種の核酸では型の転換が不可能である様にも思われる。しかしこれに対する反対の事実も記載されて居り変異を起すに必要な条件のすべてが解明されて居らない現在に於ては断言することは出来ない。

結 論

1) チフス菌 No. 58 株、大腸菌-B 株及び大原赤痢菌の原株及びそれ等の SM 耐性菌株並びに SM 依存性大腸菌から、Sod, desoxycholate 処理及び Chloroform 振盪による除蛋白によつて高分子の状態で核酸を抽出し

た。

2) 之等核酸の化学的, 物理的諸性状の研究によればこのものは DNA, RNA を主体とし少量の多糖体を含
有し, 蛋白を有しない。

3) SM 耐性菌核酸をそれぞれの感受性菌に作用させ
たが, 大腸菌 21 株, 大原赤痢菌 45 株及びチフス菌 25 株
に於ては, 本実験手技に於ては SM 耐性化を来す事が
出来なかつた。しかしチフス菌 6 S, R₂ の 2 株は SM 耐
性チフス菌核酸の作用により自然発生率に比し $10^2 \sim 10^3$
倍の開きを以て耐性化を来す事が出来た。

4) 耐性化に与える活性物質は DNase によつて破壊
され, RNase によつて何等の影響を被らない事を知つ
た。

(本報告の要旨は第 27 回日本細菌学会昭和 29 年 4 月 5
日発表した)

擱筆に臨み, 御指導を賜つた恩師, 黒屋教授に深甚
の謝意を表する。

参考文献

- 1) Griffith, F.: J. Hyg. **27**, 113-159, 1928.
- 2) Reiman, H. A.: J. Exp. Med. **49**, 237-2, 47, 1929.
- 3) Dawson, M. H.: J. Exp. Med. **51**, 123-147, 1930.
- 4) Alloway, J. L.: J. Exp. Med. **55**, 91-99, 1932.
- 5) Alloway, J. L.: J. Exp. Med. **57**, 26-52, 78, 1933.
- 6) McCarty, M. and Avery, O. T.: J. Exp. Med. **83**, 89-96, 1946.
- 7) McCarty, M. and Avery, O. T.: J. Exp. Med. **83**, 97-103, 1946.
- 8) Boivin, A.: Cold Spring Harbar Symposia on Quantitative Biology **12**, 7-17, 1947.
- 9) Alexander, H. E. and Leidy, G.: J. Exp. Med. **93**, 345-359, 1951.
- 10) Zamenhof, S., et al.: Arch. Biochem. **40**, 50-54, 1952.
- 11) Langvad-Nielsen, A.: Acta. Path. Microbiol. Scand. **21**, 362-369, 1944.
- 12) Hotchkiss, R. D.: Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol., **16**, 457, 1951.
- 13) Alexander, H. E. and Leidy, G.: J. Exp. Med. **91**, 17-31, 1953.
- 14) Voureka, A.: Lancet, **1**, 674, 1948.
- 15) 秋葉, 石井: 医学と生物学, **24**, 55, 1952.
- 16) Schneider, M. D.: J. Bact., **63**, 495, 1951.
- 17) Hisashi Sato: Tohoku. J. Exp. Med. **55**, 53-55, 1951.
- 18) Chargaff, E. and Zamenhof, S.: J. Biol. Chem. **173**, 327, 1948.
- 19) Austrian, R.: Bacteriological Reviv, **16**, 31-50, 1952.
- 20) 大西正男, 加藤貞治: 日本細菌学雑誌, **5**, 23-3235, 1950.