

原 著

Mycobacterium, *Rhodococcus* および *Nocardia* による
2,6-Diamino (G-³H) Pimelic Acid Dihydrochloride 取り込みの差異

東 村 道 雄・水 野 松 司・村 田 浩

国立療養所中部病院

受付 昭和 54 年 10 月 24 日

DIFFERENCE OF UPTAKE OF 2,6-DIAMINO (G-³H) PIMELIC ACID
DIHYDROCHLORIDE AMONG *MYCOBACTERIUM*, *RHODOCOCCUS*,
AND *NOCARDIA*

Michio TSUKAMURA*, Shoji MIZUNO and Hiroshi MURATA

(Received for publication October 24, 1979)

Diaminopimelic acid (DPA) is a component of cell wall of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia*. A comparative study of the uptake of radioactive DPA has revealed that these three genera have different patterns of the uptake of this compound.

Test organisms were cultivated on Ogawa egg medium at 37°C for 5 days. The bacteria grown were harvested and washed three times with a 0.9% NaCl solution. The bacteria were weighed aseptically, and 100 mg, wet weight, of bacteria were suspended in 4.0 ml of a M/15 phosphate buffer solution (pH 7.1) containing sodium acetate (2.5 µg/ml) and 2,6-diamino (G-³H) pimelic acid dihydrochloride (25 µCi/ml). The radioactive DPA (³H-DPA) was a product of the Radiochemical Center, Amersham, England (specific activity, 2.6 Ci/m mol; batch 40). The reaction mixture was incubated at 37°C for 24 hours. The mixture was centrifuged, and supernatant was discarded. The bacteria were washed three times with 5 ml of distilled water, and fractionated according to the procedure of Schneider (J. Biol. Chem. 161:293, 1945).

The bacteria were first extracted twice with 2 ml of a 10% trichloroacetic acid (TCA) solution (Fraction I), and twice with 2 ml of ethanol and then once with 3 ml of a boiling ethanol-diethyl ether (1:1) mixture for 5 minutes (Fraction II), and extracted twice with 2 ml of 5% TCA solution at 90°C for 15 minutes (Fraction III). The residue was dissolved in 2 ml of a 1% NaOH solution by heating at 100°C for 5 minutes (Fraction IV).

A 0.5 ml sample of each fraction was added to 5 ml (Fractions I to III) or 10 ml (Fraction IV) of a scintillator solvent, and the radioactivity was estimated by a liquid scintillation counter (Aloka LSC 651, Nihon Musen Co., Tokyo). The scintillator solvent used was composed of the following: Toluene, 1,000 ml; 2,5-diphenyloxazole, 4 g; 1,4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene, 100 mg (TDP-1-SL). The radioactivity was expressed as disintegrations per minute (dpm). Total radioactivity in a whole fraction was calculated by multiplying the radioactivity estimated by the volume.

The radioactivity from ³H-DPA was incorporated first principally into the Fraction II, which contains lipids, and then moved to the Fraction IV, which contains proteins (Table 1). In this study, the radioactivity in various organisms were compared at a stage, at which the majority of the radio-

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

activity was present in the Fraction II (Table 2).

Comparisons of the radioactivity in Fraction II of various organisms are shown in Table 3. Rapidly growing mycobacteria showed a large amount of the incorporation (60,650 to 1,217,900 dpm), whereas rhodococci and nocardiae showed a small amount of it (2,648 to 44,570). An intermediate between rapidly and slowly growing mycobacteria, *M. flavescens*, showed a radioactivity of in between these above two groups. It is considered that the uptake of the ^3H -DPA is influenced by the growth rate, as DPA is a cell wall component. Comparison of the uptake would be meaningful, only when test organisms have the same growth rate. Rapidly growing mycobacteria, rhodococci, and nocardiae grow abundantly after incubation for 3 days, and are considered to have almost the same growth rate. Difference of the uptake of ^3H -DPA between the rapidly growing mycobacteria, and the rhodococci and nocardiae would be considered as some difference of cell wall formation of these organisms.

In summary, rapidly growing mycobacteria took up more amounts of 2,6-diamino (G- ^3H) pimelic acid dihydrochloride than did rhodococci and nocardiae. No marked difference was observed between the latter two.

Diamino-pimelic acid (DPA) は、*Mycobacterium*, *Rhodococcus* および *Nocardia* の細胞壁 (cell wall) の構成成分の一つとして知られている^{1)~6)}。我々はこの3つの属による DPA 取り込みの差を観察したので報告する。

実験材料および方法

被検株は表3に示してある。菌株は小川培地に37°C 5日間培養し、生理食塩水で3回洗浄した後、使用した。湿菌量 100 mg を無菌的に計り、次の反応液に浮遊させ

た。反応液は、sodium acetate (2.5 $\mu\text{g/ml}$) および 2,6-diamino [G- ^3H] pimelic acid dihydrochloride (^3H -DPA) (25 $\mu\text{Ci/ml}$) を含有する M/15 phosphate buffer solution (pH 7.1) 4.0 ml である。 ^3H -DPA は The Radiochemical Center, Amersham, England 製で、比放射能は 2.6 Ci/m mol のものである。反応液を 37°C 24時間、静置培養した後、遠心して菌を集め、蒸留水で3回洗浄した後、Schneider 法⁷⁾ で分画した。

分画は次のごとく行なつた。まず菌を 10% trichloro-

Table 1. Time Course of Uptake of 2,6-diamino (G- ^3H) Pimelic Acid Dihydrochloride into Various Fractions of *Mycobacterium smegmatis* Strain 17032

Time in hours	Distribution of radioactivity (%)				Total radioactivity (dpm)
	I	Fraction II	III	IV	
24	0.8	92.4	0.4	6.4	11,050,480.
48	0.3	46.4	3.7	49.6	23,262,462.

Table 2. Distribution of Radioactivity from 2,6-diamino (G- ^3H) Pimelic Acid Dihydrochloride in Various Fractions of Rapidly Growing Mycobacteria, Rhodococci, and Nocardiae after Incubation for 24 Hours

Species	Strain	Distribution of radioactivity (%)				Total radioactivity (dpm)
		I	Fraction II	III	IV	
<i>M. chitae</i>	31004	0.6	95.6	1.7	2.1	13,774,592.
<i>M. smegmatis</i>	17032	0.8	92.4	0.4	6.4	11,050,480.
<i>M. phlei</i>	14025	0.4	95.8	0.4	3.3	11,783,720.
<i>R. bronchialis</i>	50003	4.7	90.1	1.8	3.3	74,416.
<i>R. aurantiacus</i>	80001	2.0	91.8	2.1	4.1	210,114.
<i>N. asteroides</i>	23094	3.8	82.4	8.4	5.3	98,284.
<i>N. brasiliensis</i>	23083	2.0	92.0	2.6	3.4	131,310.
<i>N. farcinica</i>	23040	2.9	91.4	1.9	3.7	187,540.

Table 3. Uptake of 2,6-diamino (G-³H) Pimelic Acid Dihydrochloride into Fraction II of *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia*

Species	Strain number	Source	Radioactivity in a 0.5 ml sample of Fraction II (dpm)
<i>Mycobacterium flavescens</i>	33001	ATCC 14474*	38, 140.
	33021	ATCC 23008	24, 017.
	33022	ATCC 23009	46, 128.
<i>Mycobacterium chitae</i>	31002	ATCC 19627*	995, 931.
	31003	ATCC 19628	1, 217, 911.
	31004	ATCC 19629	940, 844.
<i>Mycobacterium chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	22011	ATCC 14472*	95, 329.
	22012	ATCC 19977	106, 512.
	22019	ATCC 23045	60, 650.
<i>Mycobacterium chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	19009	ATCC 19235	123, 121.
	19040	ATCC 23000	174, 559.
	19043	ATCC 23030	115, 396.
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	18008	ATCC 6841*	161, 366.
	18109	ATCC 6842	195, 630.
	18110	ATCC 14467	695, 920.
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	17027	ATCC 14468*	136, 111.
	17031	ATCC 13011	139, 820.
	17032	ATCC 23019	729, 420.
<i>Mycobacterium phlei</i>	14022	ATCC 19249	228, 179.
	14024	ATCC 23042	221, 580.
	14025	ATCC 11758	806, 620.
<i>Mycobacterium aurum</i>	15001	NCTC 10439	825, 406.
	15006	ATCC 23366*	146, 141.
	15061	ATCC 25792	144, 233.
<i>Rhodococcus bronchialis</i>	50003	ATCC 25592*	14, 790.
	50006	E 3413, M. Tsukamura	19, 960.
	50019	E 3926, M. Tsukamura	29, 220.
<i>Rhodococcus terrae</i>	70001	E 3603, M. Tsukamura	10, 070.
	70002	E 3604, M. Tsukamura	14, 530.
	70006	ATCC 25594*	11, 838.
<i>Rhodococcus lentifragmentus</i> (or <i>Nocardia rubra</i>)	23139	N 19, M. Ridell	25, 208.
	23140	N 20, M. Ridell	5, 434.
	23141	N 21, M. Ridell	4, 668.
<i>Rhodococcus rhodochromus</i>	40001	ATCC 13808*	12, 074.
	40017	ATCC 4273	5, 100.
	40019	ATCC 14341	2, 648.
<i>Rhodococcus aurantiacus</i>	80001	ATCC 25938*	13, 779.
	80003	E 4409, M. Tsukamura	17, 620.
	80004	E 4465, M. Tsukamura	26, 220.
<i>Nocardia asteroides</i>	23004	M 72, N. M. McClung	15, 030.
	23006	M 93, N. M. McClung	44, 570.
	23094	R 399, R. E. Gordon	15, 788.
<i>Nocardia farcinica</i>	23025	M 407, N. M. McClung	6, 340.
	23040	M 111, N. M. McClung	12, 250.
	23087	ATCC 23826	13, 733.
<i>Nocardia brasiliensis</i>	23012	M 145, N. M. McClung	23, 050.
	23013	M 146, N. M. McClung	12, 500.
	23083	M 199, N. M. McClung	18, 915.
<i>Nocardia caviae</i>	23113	R 617, R. E. Gordon	18, 915.
	23114	R 1291, R. E. Gordon	25, 197.
	23115	R 1315, R. E. Gordon	18, 472.

* Type strain

acetic acid (TCA) 液 2 ml で 2 回抽出し、これを「TCA 可溶画分」とした。次いで ethanol 2 ml で 10 分ずつ 2 回抽出し、更に diethyl ether-ethanol (1:1) 混液 3 ml で沸騰させつつ 5 分抽出し、先の ethanol 抽出分と合して、「脂質画分」とした。次に菌を 5% TCA 液 2 ml で 90°C 15 分ずつ 2 回抽出し、これを「核酸画分」とした。最後に、菌を 1% NaOH 液 2 ml に加えて 100°C 5 分加熱し、溶解し、「蛋白画分」とした。以下、以上の 4 画分をおのおの I, II, III, IV 画分と呼ぶ。

各画分の 0.5 ml をとつて、scintillator 5 ml (ただし IV 画分の場合は 10 ml) に加え、その放射能を、日本無線製 liquid scintillation counter で測定し、“disintegrations per minute” (dpm) をあらわした。使用した scintillatore の成分は、次の通りである。Toluene 1,000 ml, 2,5-diphenyloxazole 4.0 g, 1,4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene 100 mg.

実験結果および考察

M. smegmatis No. 17032 株を例として、各画分における放射能の配分をみると、表 1 のごとくで、24 時間後には、その 92% までが第 II 画分に集まった。しかし、この配分は時間によつて異なり、48 時間後には第 IV 画分に 50%、第 II 画分には 46% が見出された。³H-DPA が細胞壁の構成成分であるところから期待されたように、第 I 画分および第 III 画分 (おのおの TCA 可溶画分および核酸画分) にはほとんど入つてこなかつた。

次に、菌種または属によつて、³H-DPA の各画物への入り方の差があるかどうかをみてみると、表 2 の通りで、³H-DPA と 24 時間 incubate した場合は、どの菌属、菌種でも、放射能の大部分は第 II 画分にみられた (表 2)。

以上の観察から、³H-DPA と菌とを 24 時間 incubate した場合は、第 II 画分の取り込み量を比較すべきであるとわかつたので、表 3 にこれを比較してみた。

なお DPA は、細胞壁の構成の材料となるゆえ、発育の遅い菌では、当然、取り込みが遅く、発育の速い菌で

は速いと考えられる。したがつて発育速度がほぼ同じ菌同志の比較をしないと意味がないと思われる。この点、表 3 に示した菌は、*M. flavescens* を除いて、37°C 3 日で小川培地によく発育し、発育速度は互いにほぼ類似している。ただ *M. flavescens* のみは、小川培地で豊富な発育を示すのに 5 日間位かかり、他より発育が遅い。

表 3 の結果をみると、迅速発育性抗酸菌における第 II 画分への ³H-DPA 取り込み量は、60,650~1,217,911 dpm であるのに対し、*Rhodococcus* および *Nocardia* では、これが 2,648~44,570 dpm である。すなわち抗酸菌では、*Rhodococcus* および *Nocardia* に比して、³H-DPA の取り込み量 (取り込み速度) が著しく多い。なお発育の遅い *M. flavescens* では、この値は約 24,000~46,000 dpm で、他の抗酸菌 (迅速発育性抗酸菌) よりも、取り込みが少なかつた。

結 論

遅速発育性抗酸菌、*Rhodococcus* および *Nocardia* の 2,6-diamino (G-³H) pimelic acid dihydrochloride 取り込み量 (37°C 24 時間後) を比較すると、抗酸菌では取り込みが他の 2 者より大であつた。後の 2 者、すなわち *Rhodococcus* および *Nocardia* の間には、差は認められなかつた。

文 献

- 1) Becker, B.M., Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A.: Appl. Microbiol., 13 : 236, 1965.
- 2) Ellwood, D.C. and Tempest, D.W.: Adv. Microb. Physiol., 7 : 83, 1972 (Academic Press, London & New York).
- 3) Ghuyssen, J.M.: Bacteriol. Reviews, 32 : 425, 1968.
- 4) Perkins, H.R.: Bacteriol. Reviews, 27 : 18, 1963.
- 5) Reaveley, D.A. and Burge, R.E.: Adv. Microb. Physiol., 7 : 1, 1972 (Academic Press, London & New York).
- 6) Yamaguchi, T.: J. Bacteriol. 89 : 444, 1965.
- 7) Schneider, W.C.: J. Biol. Chem., 161 : 293, 1945.