

# *Rhodococcus* sp 4306 株のミコール酸分子種の同定と 分類学的意義

## Identification of Mycolic Acid Species and Taxonomical Feature of *Rhodococcus* sp 4306 Strain.

藤原 永年

Nagatoshi Fujiwara

### 1. 緒言

結核菌を始めとする抗酸菌，類縁抗酸菌は細胞表層にミコール酸分子を多量に含み，その炭素鎖長，サブクラス組成は菌種によって異なっていることが特徴である．土壌から分離した *Rhodococcus* sp 4306 未同定株は短鎖のミコール酸を有し，本菌株由来ミコール酸含有糖脂質である cord factor 投与によりマウスにおいて軽度の肺肉芽腫炎症病変を誘導することを既に報告した<sup>1)</sup>．本菌株は16S rDNA のホモロジー検索の結果，1995年に提唱された *Dietzia* 属菌種との間で95%以上の相同性を有することが解った．本報告では，*R. sp* 4306 未同定株よりミコール酸を単離精製し，MALDI/TOF-MSを用いた質量分析によるミコール酸分子種の同定，さらに不飽和ミコール酸の水素添加法を応用した同定を試みた．*Dietzia* 属菌種と炭素鎖長および構成分子種を比較し，分類学的指標としてのミコール酸について検討した．また，*R. sp* 4306 未同定株の生化学的性状や表現型から本菌株の分類学的位置について考察した．

### 2. 実験材料と方法

#### 2.1. 使用菌株および培養

*R. sp* 4306 未同定株に加え，比較対象として *D. maris*, *D. natronolimnaea*, *D. psychrophilocaliphilila*, *R. ruber* の計5菌株を用いた．各菌株はHeart infusion broth (Difco社製) で，30℃，2-3日間振とう培養した．

#### 2.2. ミコール酸画分の抽出・精製

培養後，遠心集菌した菌体を90℃，2時間アルカリ加水分解し (10% KOH, H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH, 1:1, by vol.)，ミコール酸画分を抽出した．塩酸で酸性化した後，水とヘキサンを加えて二層分配し，ヘキサン層に溶出したミコール酸画分を回収して，遠心エバポレーターで濃縮した．ジアゾメタンでメチルエステル誘導体として薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて各種展開溶媒系 (ヘキサン/エーテル, 90:10, by vol. 或いはベンゼン) で3回展開したTLCに20%硫酸を噴霧し，180℃で加熱発色させてミコール酸の存在とサブクラスの分布を確認した．また，ヨウ素蒸気により確認した各ミコール酸スポットをTLCからかき取り，クロロホルムで抽出してミコール酸を精製した．

### 2. 3. MALDI/TOF-MSの測定

2,5-Dihydroxybenzoic acidをマトリックスとして、精製ミコール酸の質量数をMALDI/TOF-MS (Bruker Daltonics社製Ultraflex) により測定した。得られたm/zからミコール酸のサブクラス、炭素鎖長、不飽和度等の構造を解析した。

### 2. 4. 不飽和脂肪酸の解析

不飽和が二重結合によるものかシクロプロパン環によるものかを判別するため、水素ガスを還元剤として用いる還元反応（水素添加）を実施した<sup>2)</sup>。 *R. sp* 4306由来ミコール酸 200 µgを水素添加用インピンジャー 2本にそれぞれ入れて乾固し、メタノールあるいは水酢酸 4 mlを加えて溶解した。触媒として少量の白金を加え、60℃、4時間水素ガスを通気した。反応終了後、水とヘキサンを加え、ヘキサン層からミコール酸を抽出し、遠心エバポレーターで濃縮した。得られたミコール酸を2.3.に示したMALDI/TOF-MSで同様に質量分析し、反応前後の質量数の変化から二重結合とシクロプロパン環の判別を試みた (Fig. 2C)。

### 2. 5. *R. sp* 4306の生化学的性状試験

*R. sp* 4306未同定株と *Dietzia* 属菌種との生化学的性状およびその表現型を比較した。生化学的性状はコリネバクテリウム同定キットであるアピコリネ（日本ビオメリュー社製）とグラム陰性桿菌同定用IDテスト・NF-18（日水製薬製）の試験項目を応用して検討した。また、*Dietzia* 属菌種は弱アルカリ下での増殖を認めるため、増殖の至適pHを検討した。塩酸あるいは水酸化ナトリウムでpH調整したHeart infusion brothで各菌株を30℃、48時間培養し、波長600 nmの濁度を測定して、増殖曲線を作成した。

## 3. 結果

2.2.の操作で得られたTLCのパターンをFig.1に示した。移動度 (Rf値) が0.45付近にミコール酸のスポットが1箇所のみ確認された。Rf値から、これらのスポットはα-ミコール酸と考えられた。*R. sp* 4306, *D. natronolimnaea*, *D. maris*, *D. psychrhalcaliphilila*は同程度のRf値 (0.42) を示したが、*R. ruber*のRf値 (0.48) は他の4株に比べ高かった。

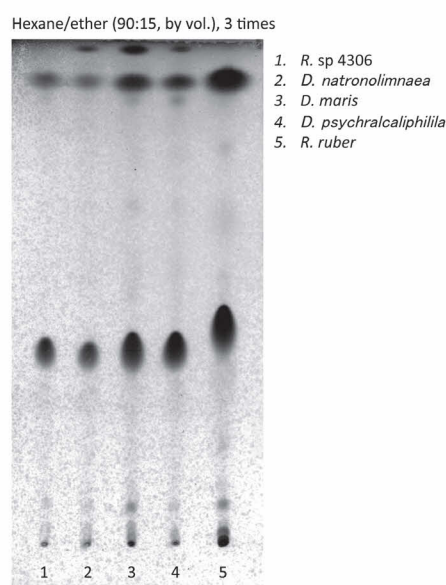


Fig. 1. TLC pattern of mycolic acids methyl esters derived from *Rhodococcus* and *Dietzia* spp. Developing solvent; *n*-hexane/ether (90:15, by vol.), 3 times.

次に、2.3.の操作に従い精製ミコール酸をMALDI/TOF-MS解析した結果をFig.2Aに示した。*R. sp 4306*, *D. natronolimnaea*, *D. maris*, *D. psychrhalcaliphilila*のミコール酸分子はm/z 587が一番高いピークとして検出された。推定構造式と比較してみると質量数587はC36:1の $\alpha$ -ミコール酸メチルエステルにナトリウムが付加した構造の質量数と一致した。さらにミコール酸分子種のピークは14或いは28マス間隔で分布し、m/z 561, C34:0; m/z 573, C35:1; m/z 575, C35:0; m/z 585, C36:2; m/z 589, C36:0; m/z 599, C37:2; m/z 601, C37:1; m/z 603, C37:0; m/z 613, C38:2; m/z 615, C38:1; m/z 617, C38:0と同定した。これら4菌種のミコール酸分子種はC36:1を中心にC34-C38に分布しており完全に一致していた。また、*R. sp 4306*は他の3菌種に比べ、C36:2の不飽和ミコール酸のピークが高かった。同様に*R. ruber*についてミコール酸分子種を解析した結果、C42:1-C46:1に分布しており、*R. sp 4306*及び*Dietzia*属菌種と異なっていた。次に*R. sp 4306*に存在した不飽和ミコール酸が二重結合によるものか、或いはシクロプロパン環によるものかを検討するため、白金を触媒として水素添加を実施した。Fig.2Bに示したようにメタノール或いは氷酢酸存在下でミコール酸を水素添加すると反応産物は共に質量数が2或いは4マス増加した飽和ミコール酸のみのピークが検出された。二重結合はメタノール下の弱反応で水素添加されるが、シクロプロパン環は氷酢酸下の強反応の時のみ水素添加されることから、本ミコール酸の不飽和はすべて二重結合に起因することが明らかとなった。

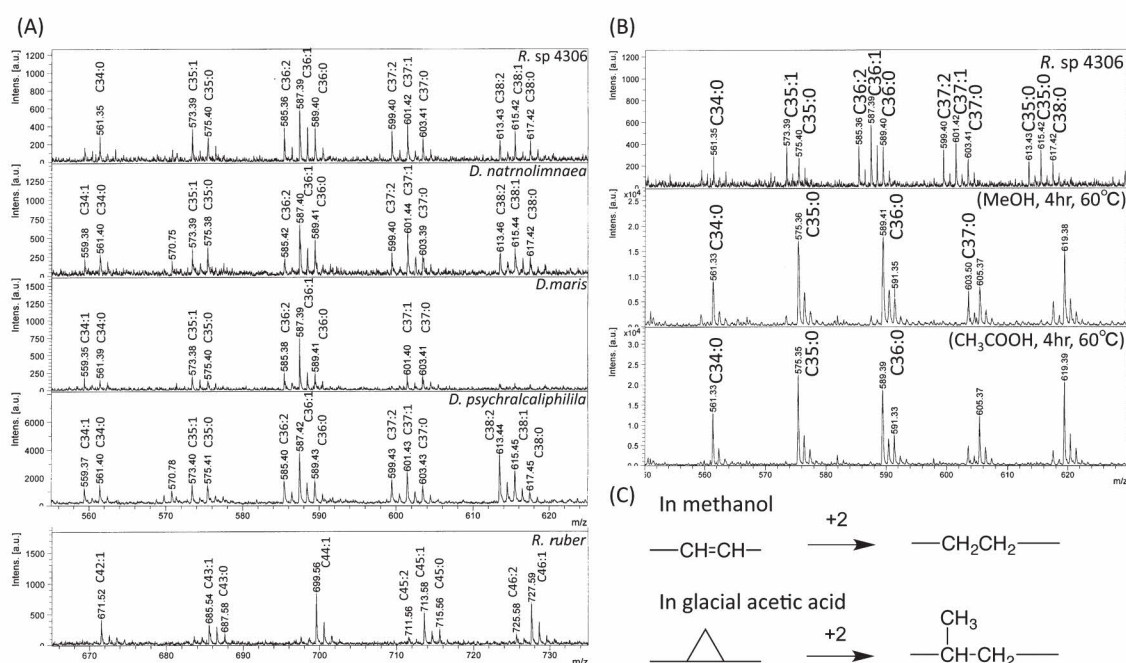


Fig. 2. MALDI/TOF-MS spectra of mycolic acids methyl esters derived from *Rhodococcus* and *Dietzia* spp. (A), increase of mass number by hydrogenation (B), and the scheme of hydrogenation (C).

さらに*R. sp 4306*の表現型および生化学的性状試験の結果を*Dietzia*属菌種および*R. ruber*と比較してTable 1にまとめた。*R. sp 4306*はグラム陽性の短桿菌であり、今回調べた33項目のうち、*D. natronolimnaea*とは1項目（クエン酸の資化性）、*D. maris*とは3項目（オキシダーゼ産生、ピロリドニルアリルアミダーゼ活性および $\alpha$ -グルコシダーゼ活性）、*D. psychrhalcaliphilila*とは3項目（ピロリドニルアリルアミダーゼ活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性およびクエン酸資化性）、*R. ruber*とは4項目（硝酸塩還元、ピロリドニルアリルアミダーゼ活性、アルカリフォスファターゼ活性およびクエン酸資化性）について性質が異なっていた。



Table 1 Phenotypic characteristics of *R. sp 4306*, *Dietzia* species, and *R. ruber*.

	<i>R. sp 4306</i>	<i>D. natronolimnaea</i>	<i>D. maris</i>	<i>D. psychrocaliphila</i>	<i>R. ruber</i>
Cell morphology	Short rod	Short rod			
Colony pigmentation	red	red			
Gram reaction	+	+			
Oxidase test	—	—	—	—	—
Catalase test	+	+	+	+	+
Hydrolysis of gelatin	—	—	—	—	—
Indole production	—	—	—	—	—
Reduction of nitrate	—	—	—	—	+
Enzymatic activity					
Pyrazinamidase	—	—	—	—	—
Pyrrolidonyl arylamidase	+	+	—	—	—
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	—
$\beta$ -Glucuronidase	—	—	—	—	—
$\beta$ -Galactosidase	—	—	—	—	—
$\alpha$ -Glucosidase	+	+	—	—	+
N-Acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	—	—	—	—	—
$\beta$ -Glucosidase (Esculin)	—	—	—	—	—
Urease	—	—	—	—	—
Utilization of substrate					
Glucose	—	—	—	—	—
D-Ribose	—	—	—	—	—
D-Xylose	—	—	—	—	—
D-Mannitol	—	—	—	—	—
Maltose	—	—	—	—	—
Lactose	—	—	—	—	—
Saccharose	—	—	—	—	—
Glycogen	—	—	—	—	—
Fructose	+	+	+	+	+
Maltose	—	—	—	—	—
Galactose	—	—	—	—	—
Citrate	—	+	—	+	+
2-Nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranoside	—	—	—	—	—
L-Lysine	—	—	—	—	—
L-Arginine	—	—	—	—	—
L-Ornithine	—	—	—	—	—

また、*R. sp 4306*の増殖至適pHを検討した結果をFig.3に示した。pH 7.0-10.0の広範囲で同程度に増殖し、増殖曲線は*D. natronolimnaea*と類似していた。また、*R. ruber*は酸性側（pH 5.0）で増殖することが他の4菌種と異なっていた。

#### 4. 考察

ミコール酸の構造解析は、各種誘導体を液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーと質量分析を組み合わせで分析し、そのフラグメントイオンのパターンとTLCの結果から総合的に解析される。今回は、MALDI/TOF-MSを用いて質量数を分析し、TLCの結果とあわせてミコール酸の同定を試みた。解析の結果、*R. sp 4306*のミコール酸組成は不飽和ミコール酸C36:1を中心としたC34-38に分子種が分布した $\alpha$ -ミコール酸と同定した。類縁抗酸菌に特徴的なミコール酸は同一属内においても菌種により炭素鎖長が非常に異なっており、*Rhodococcus*属の菌種間でもC30からC60程度まで偏在している。ミコール酸の存在は属を規定する重要な表現型で

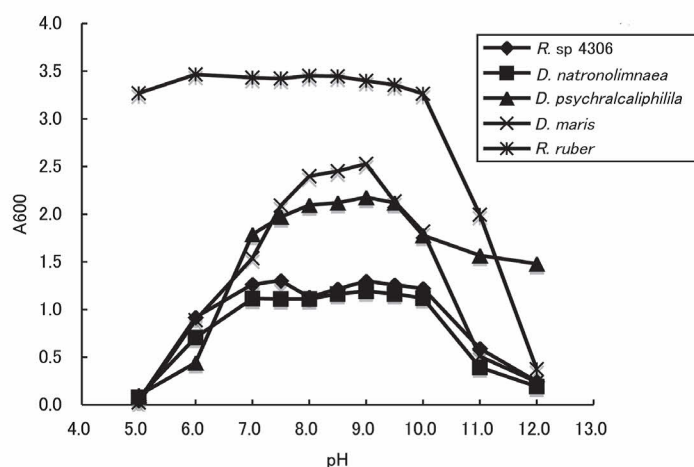


Fig. 3. The optimal pH of bacterial growth in HI broth (48 hrs).

あり、ミコール酸分子種の系統的解析（炭素鎖長やサブクラス）が分類学的指標として種同定に有用であると考え、今回解析した全ての*Dietzia*属菌種のミコール酸分子種が同一であったことは、*Dietzia*属の表現型として重要な意味を持つものと考えられた<sup>4)</sup>。R. sp 4306株が*Dietzia*属菌種のミコール酸組成と完全に一致したことは、分類学的に*Dietzia*属の近縁菌であることを強く示唆する結果であった。

さらに、*Mycobacterium tuberculosis*にはC80前後の $\alpha$ -ミコール酸が存在し、シクロプロパン環を2個もつことが報告されている<sup>3)</sup>。シクロプロパン環の同定はFig.2Cに示した反応から、氷酢酸下での強反応水素添加が有効である<sup>2)</sup>。今回のR. sp 4306株の不飽和ミコール酸は水素添加の結果から、二重結合をもつことが明らかとなった。ミコール酸の生合成を考えると、伸長した脂肪酸の一部が還元され二重結合となり、さらにシクロプロパン環合成酵素によってシクロプロパン環をもつミコール酸が合成されるため、二重結合はシクロプロパン環合成の中間体と考えられた<sup>5)</sup>。従って、短鎖の二重結合ミコール酸を主とする*Rhodococcus*属や*Dietzia*属菌は、既に*Mycobacterium*属菌でクローニングされているシクロプロパン環合成酵素を欠損していることが示唆された。

R. sp 4306の生化学的性状を*Dietzia*属菌種と比較した結果、検査した33項目のうち反応性が異なるのは1-3項目のみであり、生化学的性状も*Dietzia*属に非常に近いことが解った。また、コリネバクテリアの同定キットであるアピコリネの11種類の試験項目の判定表から、R. sp 4306は*Rhodococcus* spp.という結果になったが、注釈として*Gordona/Dietzia/Nocardia*の可能性があり、追加試験のフルクトース資化試験が陽性の場合には*Dietzia* spp.と表記されていた。実際フルクトース資化性は陽性であった。また、*Dietzia*属菌種は主にアルカリ性の湖沼（soda lake）から分離されることが多く、至適増殖pHが弱アルカリ性であり、今回のR. sp 4306至適pHの検討結果とも一致した。

以上より、ミコール酸分子種、サブクラスの組成は*Dietzia*属菌種の分類学的指標として重要な表現型であり、R. sp 4306未同定株は16S rDNAの相同性に加え、ミコール酸分子種の分布、生化学的性状及びその表現型から現在の*Rhodococcus*属から*Dietzia*属に移すことが適当である。

## 5. 参考文献

- 1) Ueda, S., Fujiwara, N., Naka, T., Sakaguchi, I., Ozeki, Y., Yano, I., Kasama, T. & Kobayashi, K. (2001) *Microb. Pathog.* 30, 91-99.
- 2) Kanemasa, Y., Nagamachi, E., & Shibuya, S. (1991) *Microbiol. Immunol.* 35, 77-81.
- 3) Gao, L.Y., Laval, F., Lawson, E.H., Groger, R.K., Woodruff, A., Morisaki, J.H., Cox, J.S., Daffe, M., Brown, E.J. (2003) *Mol. Microbiol.* 49,1547-1563.
- 4) Teramoto, K., Tamaru, T., Hanada, S., Sato, T., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Sato, H. (2013) *J. Antibiot.* 1-5.
- 5) Takayama, K., Wang, C., Besra, G.S. (2005) *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 81-101.