

# 安定同位元素 $^{18}\text{O}_2$ を用いた極性ミコール酸生合成の研究

Biosynthetic studies using  $^{18}\text{O}_2$  of polar mycolic acids in *Mycobacteria*

水野 浄子

## 1. はじめに

酸素は我々人間が生きていく為に無くてはならない物質である。人間だけでなく他の多くの生物も酸素なしに生きていくことはできない。人間は呼吸することによって生きていく。酸素を吸い炭酸ガスを出すということ、即ち、生物の細胞の中では、酸化がおこなわれ、エネルギーを生みだしている。我々が毎日食べている糖質や脂肪とかが体の中で非常にゆっくりと酸化されている。このとき、酸素は何をしているかという、1つは水素の受容体となっている。例えば、ブドウ糖や脂肪酸のようなものから水素が引きぬかれ、その水素が1原子又は1分子の酸素と反応し、水又は過酸化水素に還元される。又生体内の酸化現象の中で酸素が導入される場合もある。この場合、分子状の酸素が入るのではなく、即ち、空気中の酸素ガスが入るのではなく、水の酸素が入っていく。

この他に、生体内では種々の反応がおこなわれているが、分子状の酸素が直接、物質の中にとりこまれる反応が認められる。これらの反応は、生体内では生理的に重要な反応である。必須栄養物質の代謝、アミノ酸、糖、脂肪酸の合成及び分解、ステロイドホルモン、胆汁酸の合成、ビタミンの合成及び分解、色素の合成及び分解、体外から摂取した薬物及び毒物の解毒、ばあいによっては解毒ではなく毒性をますときもある。このように種々の反応で分子状酸素が直接、物質にとりこまれるが、このような反応は、酸素添加現象とよばれ、これらの反応に関与する酵素は酸素添加酵素とよばれている。酸素添加現象は、人間の体内だけでなく、微生物の重要な構成成分の生合成でも認められるので、本報では、細菌中での酸素添加現象について検討した。

## 2. ミコール酸

結核菌を中心とする *Mycobacterium* 属 (及びその近縁の) 細菌の最も大きな特徴は、"抗酸性" を有することであるが、この性質は、細胞壁の化学構造、特にその中に多量に存在する脂質成分であるミコール酸にもとづくものと考えられている。ミコール酸は Order. Actinomycetales に属する細菌細胞壁に存在する超高級分枝脂肪酸で炭素数20~90までの広範囲におよぶ $\alpha$ -分枝、 $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸である。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ースエステル (Trehalose dimycolate, trehalose monomycolate) 等の糖脂質にエステル型として存在している。細胞壁骨格では、ミコール酸は 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、抗酸性をはじ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抗酸菌細胞壁骨格 (CWS) や種々の糖脂質 (トレハロースやグルコースのエステル) が免疫反応を調節するアジュバント物質として利用されたり、マクロファージを活性化して肉芽腫を形成したり、又非特異的な感染防禦能や抗腫瘍性を示すことも明らかになりつつある。

一方、ミコール酸の構造は、菌種により著しく異なり、炭素数、二重結合数はもとより、シクロプロパン環やメチル側鎖、メトキシ基を有するもの、ジカルボンミコール酸など極性の異なるものが種々知られている。また、これらのミコール酸生合成の詳細はいまだに明らかにされていないが、C<sub>16</sub>、C<sub>18</sub>脂肪酸からmalonyl-CoAまたは、-ACPの結合によっ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<sub>16</sub>~C<sub>24</sub>脂肪酸が、Claisen type反応によって縮合され、還元され、この間に種々の官能基が導入されるのではないかと推測されている。

### 3. 極性ミコール酸の生合成

結核菌やライ菌などMycobacterium属に属する細菌は、極めて好気性の強い細菌であり、脂質代謝の面で分子状酸素を利用する多くの反応が知られている。それらのうちには、細胞壁のペプチドグリカンのN-アセチルムラミン酸のN-グリコリル化があり、この反応には酸素添加酵素が関与していることが古くから知られている。また好氣的な不飽和化、即ち $\Delta^9$ -desaturation及びミコール酸生合成に関係の深いと思われる $\Delta^5$ -desaturationにも、分子状酸素が関与すると考えられている。

Mycobacteriaの細胞壁の主要成分として含まれるミコール酸においては、極性度の最も低い $\alpha$ -ミコール酸以外に、多数の極性の異なるsubclassの存在が知られている。<sup>2-6)</sup>これらのうち極性度の最も高いジヒドロキシミコール酸及びエステルミコール酸の生合成については、従来、前述の酸素添加酵素の関与が予想され大変興味をもたれていた。即ちジヒドロキシミコール酸の $\omega$ -19位の水酸基の生成機構については、分子状酸素のとりこみによりエポキシミコール酸が生成され、これが開裂して生成されると考えられている。またエステルミコール酸は、ケトミコール酸にBaeyer-Villiger型酸化反応により分子状酸素が直接導入され生成され、さらに実験操作上アルカリ水解によりジカルボンミコール酸と2級アルコールとなり検出されると考えられているが、<sup>7)</sup>これらは推測のみでまったく実証されていなかった。そこで我々は、これらの生成機構を明らかにする為、安定同位元素<sup>18</sup>O<sub>2</sub>気流中で、各種Mycobacteriumの菌液を短時間incubateし、GS/MSを用いて分離した各分子種について<sup>18</sup>Oのとりこみを検索した。さらにこれらの極性ミコール酸の生合成の調節、即ち培養温度による変動についても考察を加えた。<sup>8-9)</sup>

#### (1) 安定同位元素<sup>18</sup>O<sub>2</sub>をトレーサーとして用いたとりこみ実験方法

##### a. 実験材料及びincubationの方法

*Mycobacterium fortuitum* ATCC及び*Mycobacterium phlei* ATCCを1%glucose, 0.5

%peptone, 0.2%yeast extractを含む液体培地 (PH7.0) で $30^\circ\text{C}$ 又は $40^\circ\text{C}$ で振とう培養する。対数増殖期中期 (3~4日間) に集菌し、テフロン密栓付三角フラスコ中で新たに調製したPGY培地中にsuspend (菌体100mg/ml) し、充分大気を除去した後、 $^{18}\text{O}_2$  (99%) 気流を導入する。さらに $\text{N}_2$ ガスを導入して20% $^{18}\text{O}_2$ となる様に調節した後、 $30^\circ\text{C}$ 又は $40^\circ\text{C}$ で1~24時間振とうして $^{18}\text{O}_2$ の菌体へのとりこみを調べた。また各温度での $^{18}\text{O}_2$ のとりこみ率を比較する為、 $35^\circ\text{C}$ から $20^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$ へshiftし、1~6時間の短時間incubationを行なった。

b. ミコール酸及び2級アルコールの分離

反応終了後、ただちに10%KOHで3時間水解し、酸性化後脂肪酸を抽出、メチルエステル化したのち、Silicagel TLC(展開溶媒: n-ヘキサン・エチルエーテル, (4:1, by vol)) でミコール酸subclass及び2級アルコールを分離した。また各種脂質画分中の $^{18}\text{O}$ のとりこみを比較する為に、反応終了後、ただちに反応液の5倍容のクロロホルム・メタノール (2:1, by vol) を加え脂質を抽出した。クロロホルム・メタノール抽出脂質をextractable lipid (EL) とし、抽出残査いわゆる細胞壁結合性の脂質をbound lipid (BL) とし、両者に含まれるミコール酸subclass及び2級アルコールを分析した。

c. 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及び2級アルコールはBis(trimethyl silyl)trifluoroacetamide (BSTFA):ピリジン (2:1, by vol) 中でTMS化し、GS/MS (日立-M80B, 日立-M60) に導入して、ミコール酸各分子種を分離したのち、各成分の質量分析を行なった。また各特定マスイオンをモニターしてmassfragmentographyを行なった。

GC/MS条件:ガラスカラム50cm×3mm,2%OV-1ChromosorbW, 注入温度 $395^\circ\text{C}$ , カラム温度 $310^\circ\text{C}$ 又は $340^\circ\text{C}$ , molecular separator $330^\circ\text{C}$ , イオン源 $220^\circ\text{C}$ , イオン化電圧 $60\mu\text{A}$ , electron energy 20eV, accelerating voltage 3.2KV.

(2) 薄層クロマトグラフィーによる脂質の分離

*M.fortuitum* 及び*M.phlei*の脂肪酸メチルエステルを展開溶媒n-ヘキサン・エチルエーテル (4:1,by vol) で展開したパターンで、ミコール酸に相当するスポットが5~6つ認められる。極性の高いsubclassとして、 $M_4$ :ジハイドロキシミコール酸,  $M_3$ :ジカルボンミコール酸及び2級アルコールが検出された。(Fig. 1.)

(3) GC/MS分析による安定同位元素 $^{18}\text{O}$ のとりこみ検出

a. *M.fortuitum*のジヒドロキシミコール酸への $^{18}\text{O}$ のとりこみ

*M.fortuitum*や*M.chitae*等非発色性迅速発育性抗酸菌には、多量のエポキシ及びジヒドロキシミコール酸が存在するが、*M.fortuitum*では $C_{76}$ を中心に $C_{72}$ から $C_{80}$ に及ぶジヒドロキシ酸分子種が存在する (Fig. 2.)。これらのジヒドロキシミコール酸メチルエステルのDiTMS誘導体のマススペクトルでは、分子イオン ( $M^+$ ) は極めて弱く、一般に検出不可能である

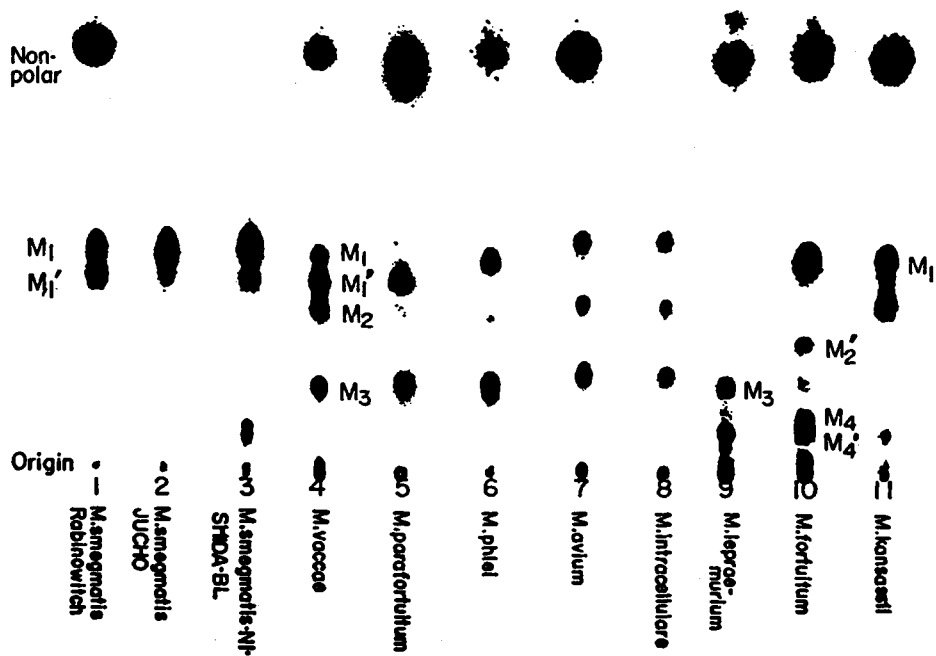


Fig. 1

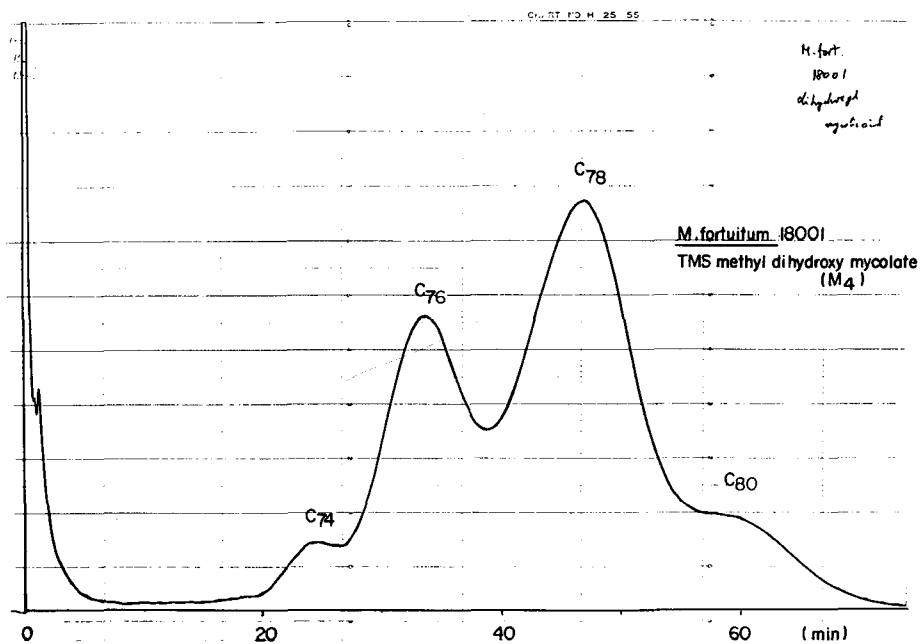


Fig. 2

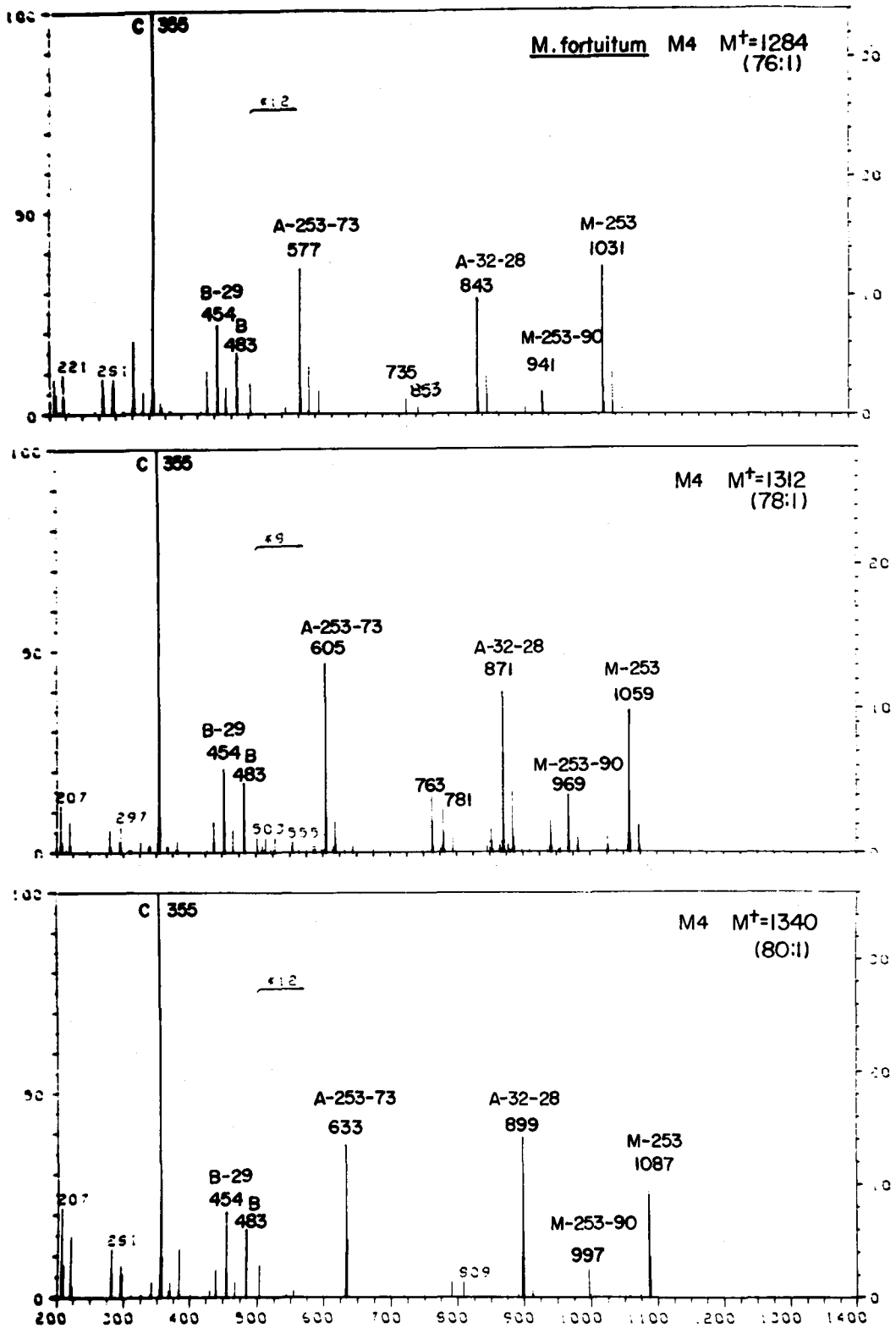


Fig. 3

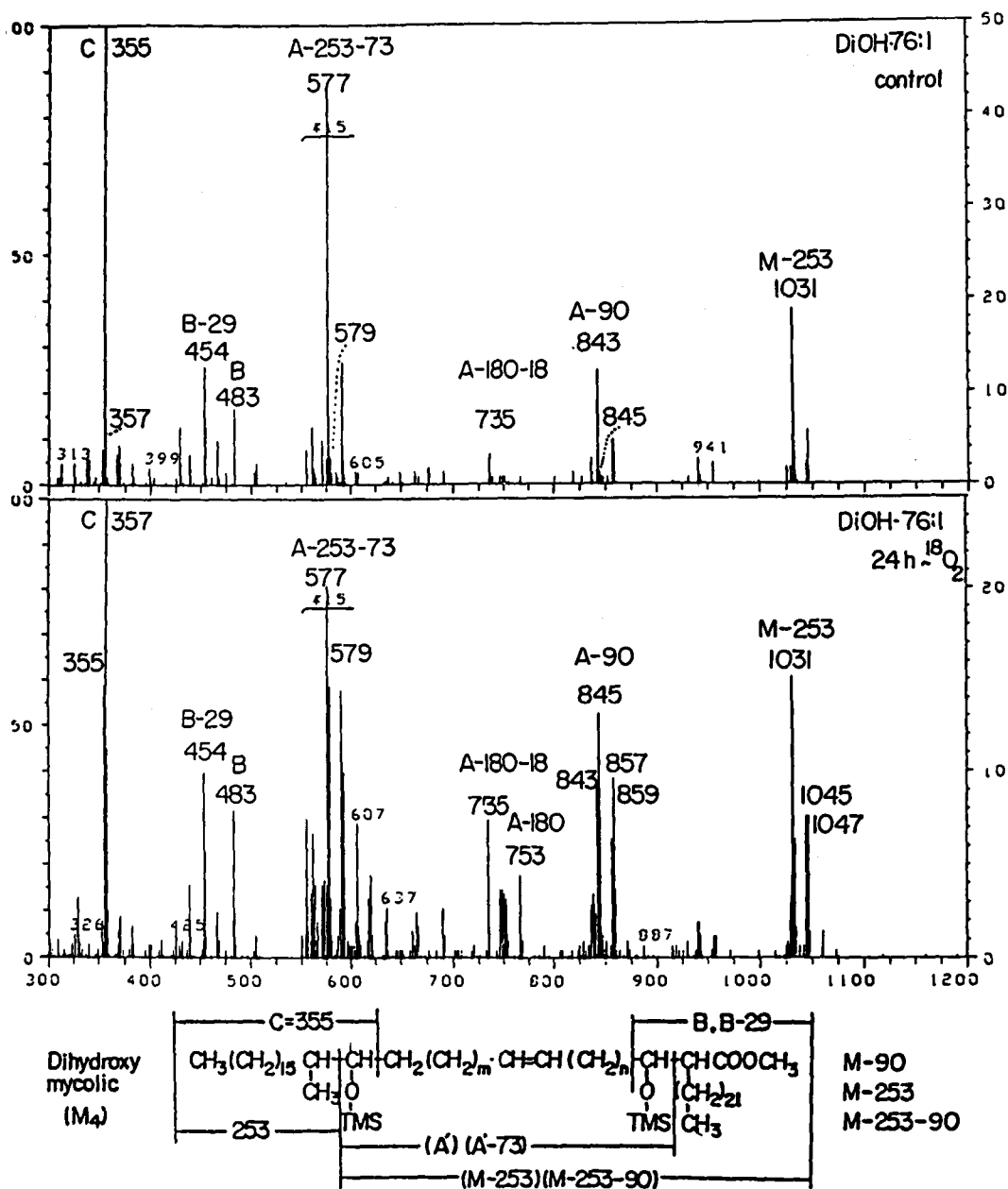


Fig. 4

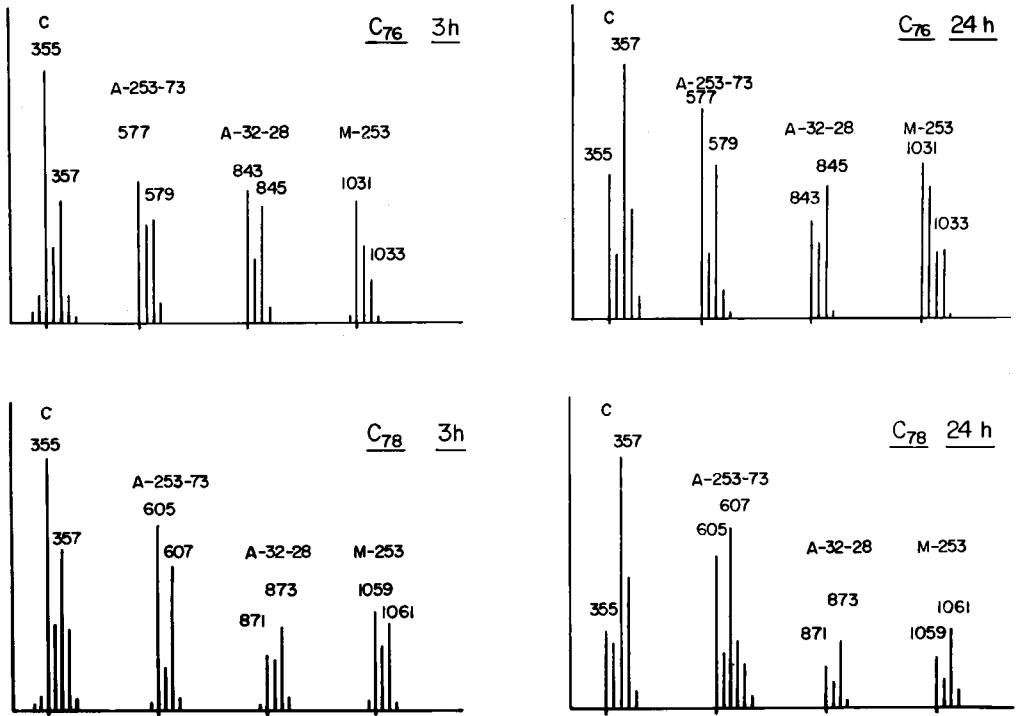


Fig. 5

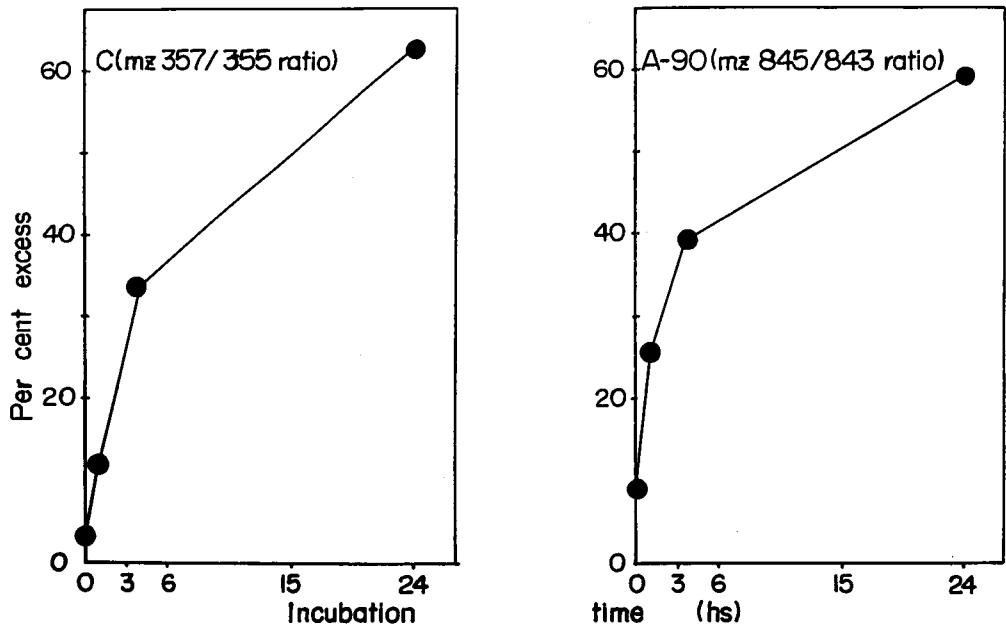


Fig. 6

が、 $\omega$ 側及びカルボキシル側の各OH基の両側で開裂して生ずるイオン (M-253, M-253-90, A-90, A-253-73, B, B-29及びC=355又は327)が顕著に検出され、これらから総炭素数、二重結合数、 $\alpha$ -unit, 直鎖部分の構造、 $\omega$ 側水酸基の位置等は容易に解析できる (Fig. 3, Fig. 4.)。 <sup>18</sup>O<sub>2</sub>気流中で24時間incubateして得られたC<sub>76</sub>ミコール酸の場合、 $\omega$ 側のOH基を含むフラグメントイオン (C, A-253-73, A-90等) に+2マスのシフトが顕著に認められ、これに対して、C・3位のOH基に由来するイオン (B, B-29等) には全く+2マスのシフトが認められないことから、 $\omega$ 側のOH基に<sup>18</sup>Oが特異的にとりこまれていることが明らかとなった (Fig. 4)。このような<sup>18</sup>Oのジヒドロキシミコール酸へのとりこみはC<sub>72-80</sub>分子種中のいずれにおいても観察されるが、C<sub>76</sub>及びC<sub>78</sub>へのとりこみが最も顕著であった (Fig. 5)。C及びC+2, A-90及びA-90+2の比率を経時的に測定してみると、24時間のincubationにより最高60atom percent以上のとりこみが認められており (Fig. 6), このことからジヒドロキシミコール酸は生合成のいずれかの段階で分子状酸素 (O<sub>2</sub>) を利用して活発に合成されることが明らかとなった。

#### b. *M.phlei*のエステルミコール酸への<sup>18</sup>Oのとりこみ

前述のように、エステルミコール酸はケトミコール酸を前駆体としてBaeyer-Villiger型酸化反応により分子状酸素の直接導入により合成され、これらが水解されて2級アルコールとジカルボンミコール酸として検出される (Fig. 7)。 *M.phlei*菌液を<sup>18</sup>O<sub>2</sub>気流中でincubateすると、<sup>18</sup>OはC<sub>18</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub> 2級アルコールにとりこまれるが、これらのアルコールのマススペクトルでは [M-15] イオンが明瞭に検出される (Fig. 8)。 <sup>18</sup>O<sub>2</sub>中でincubateした場合、いずれの炭素数の2級アルコールでも ([M-15]+2)イオンにenrichmentが認められる (Fig. 9)。これをさらに定量的に検討する為、massfragmentographyを行なった。即ち (M-15), [(M-15)+1], [(M-15)+2] 及び [(M-15)+3] イオンを別々にモニタークロマトグラムをえがかせ、この結果からとりこまれた<sup>18</sup>Oを定量する (Fig.10)。

まずエステルミコール酸生合成と脂質画分の関連性を明らかにする為、<sup>18</sup>O<sub>2</sub>中でincubateした後、EL及びBLに分画し、とりこみ率を比較したところ、いずれの画分でもC<sub>18</sub>に最も速やかにとりこみが認められた。またいずれの炭素数へのとりこみも常にELのミコール酸が先行し、これに遅れてcell wall bound lipidにとりこみが認められた (Fig.11)。このようにELからBLへとりこみが移行する傾向が認められ、エステルミコール酸はcytoplasmで合成されcell wallへtransferされるのではないかと考えられる。

次に培養温度による変動を検討したところ、低温ではとりこみ率は低く、高温では全体にとりこみ率が増加した。特に高温では長鎖のC<sub>22</sub>docosan-2へのとりこみが著しく増加した。低温ではELのC<sub>18</sub>octadecan-2にのみとりこみが認められた (Fig.12)。このことから温度によりエステルミコール酸の鎖長が調節されていることが明らかとなった。これらの結果、エステルミコール酸の生合成は、温度依存性が高く、培養温度の変化によりその炭素数が変動し、特にcell wallの生合成が調節され、その含量及び組成が変動し環境に適応しているこ



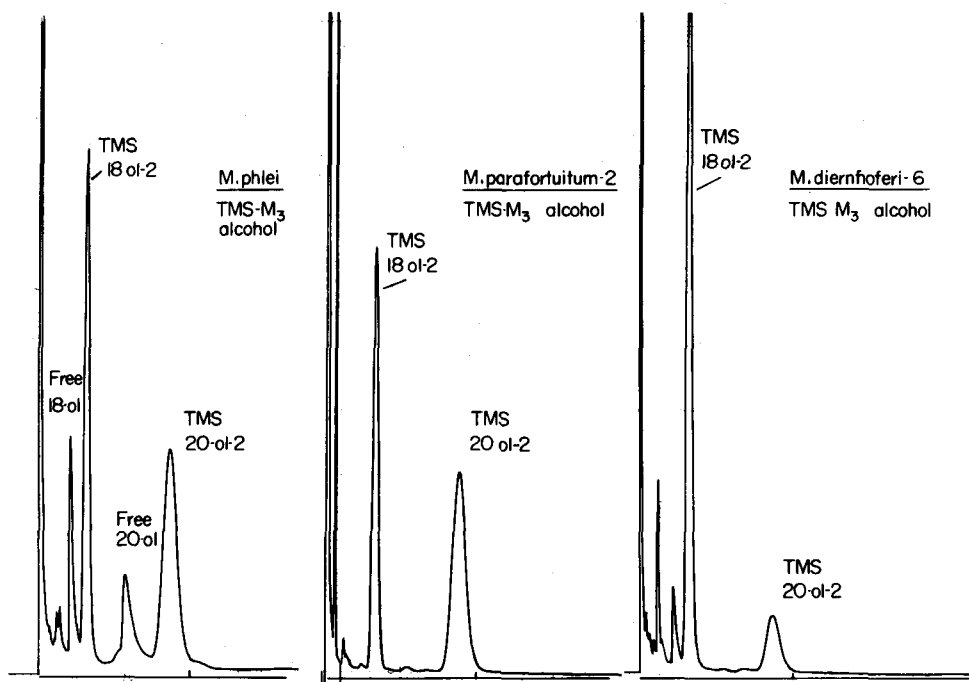


Fig. 7

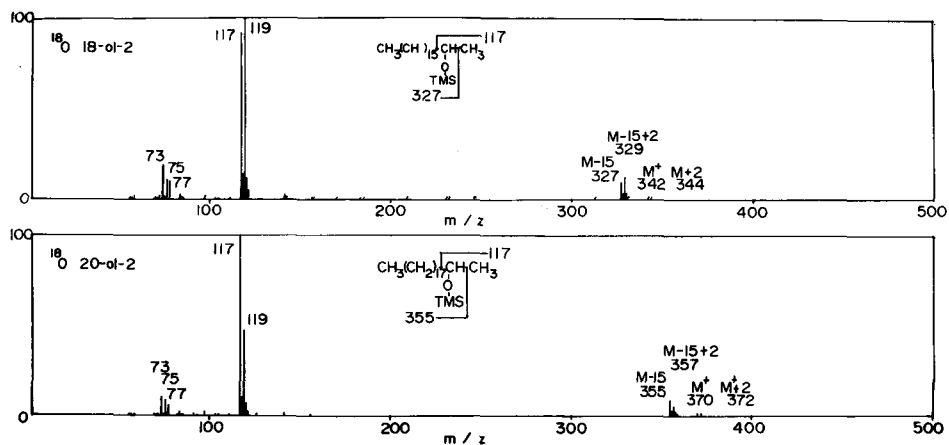


Fig. 8

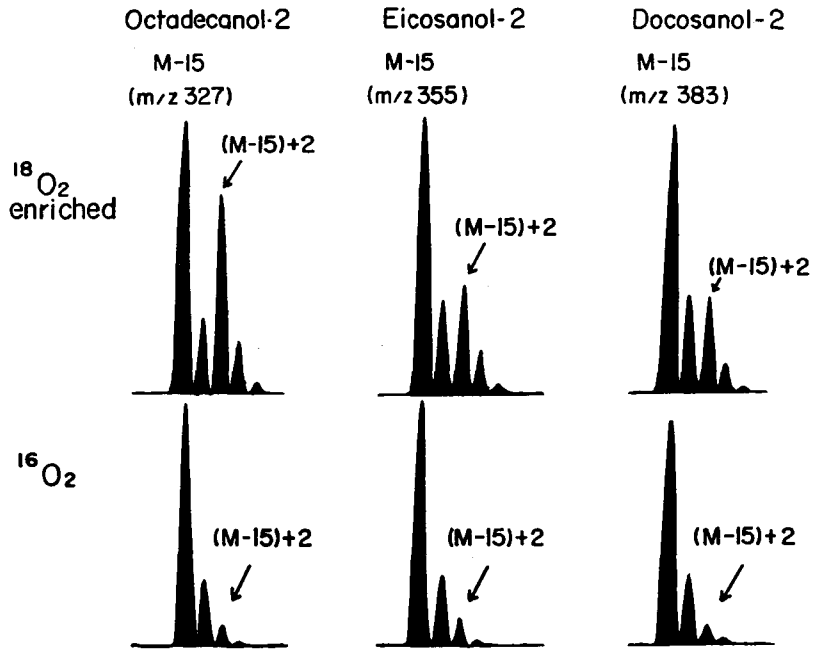


Fig. 9

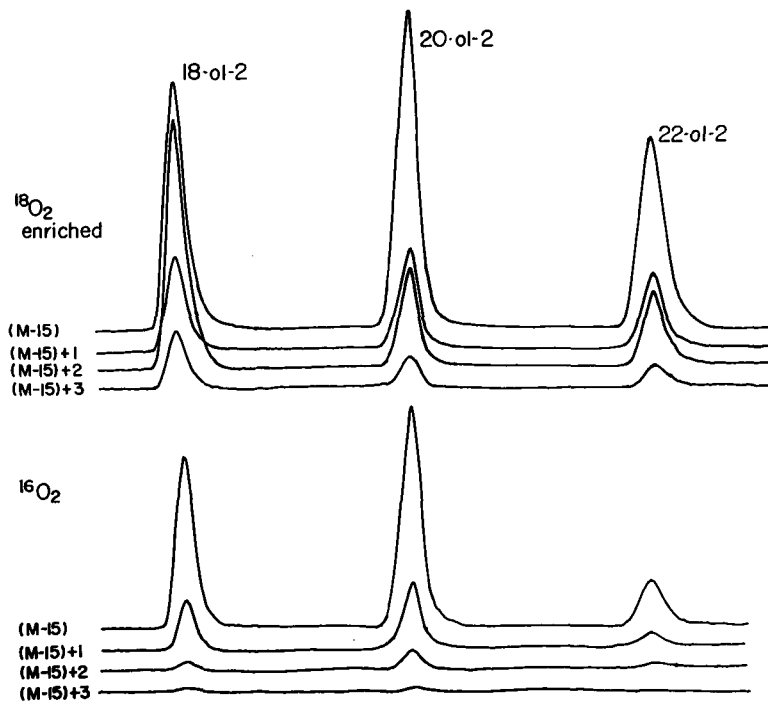


Fig.10

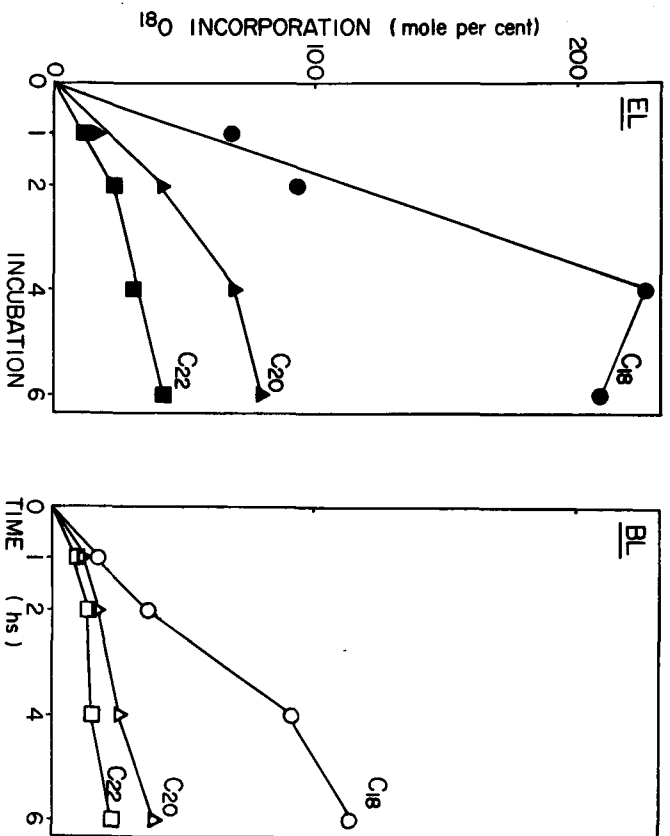


Fig.11

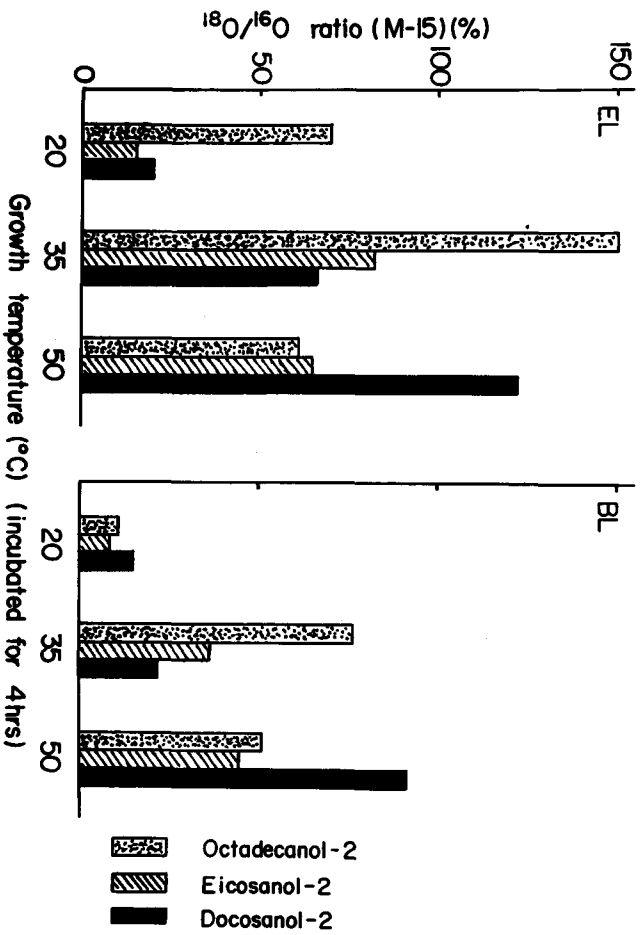
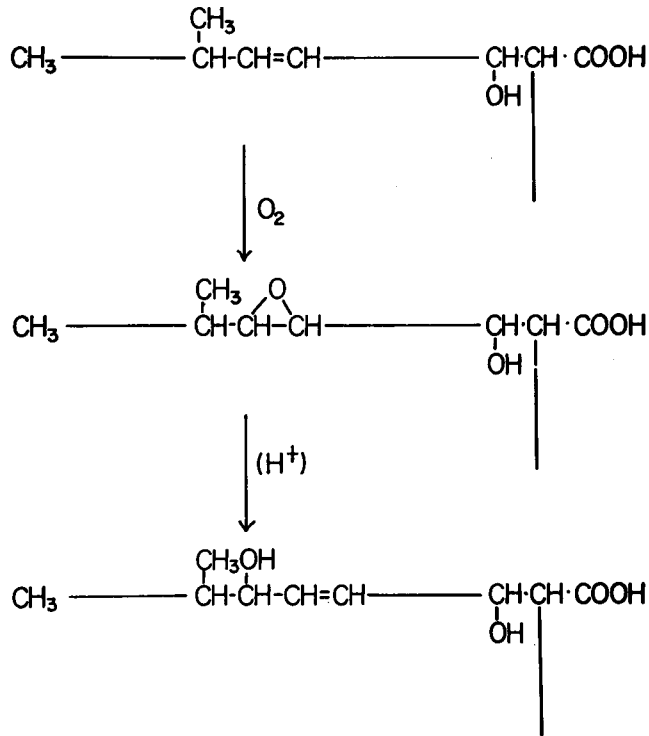
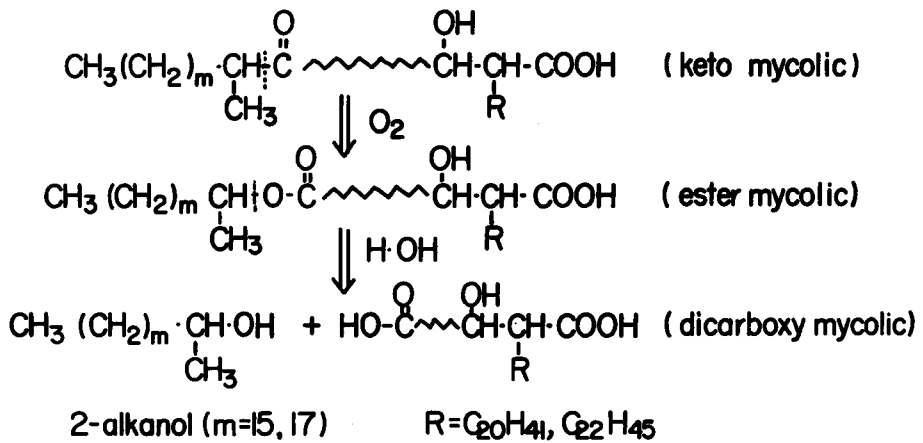


Fig.12

とが明らかになった。



Scheme. 1



Scheme. 2

#### 4. おわりに

*Mycobacteria*は本来極めて好氣的な細菌であり、酸素を利用する反応系が発達分化しているが、<sup>18</sup>O<sub>2</sub>トレーサー実験により、ミコール酸生合成にも直接分子状酸素を利用する反応系が証明された点、非常に興味深い。またこれらの分子状酸素の関与する反応も含めてミコール酸の生合成に関しては、酵素系での研究は行なわれておらず、さらに酵素系での研究が必要と思われる。

また、これらの極性ミコール酸が、細胞壁の構成成分として、どのような物理化学的役割をはたしているのか、細胞壁の生理的機能とどのような関連をもっているのかも興味深い問題である。

#### Reference

- 1) 早石修 (1984) : 酸素と生命. 東京大学出版会, 東京.
- 2) Kaneda, K., S. Mizuno, S. Inaizumi and I. Yano(1985): GC/MS analysis of polar mycolic acids from *Mycobacteria* 医用マス研究会講演集10:101-104
- 3) Lévy-Frèbault, V., M.Daffé, K. S. Goh, M. A. Lanéelle, C.Asselineau and H. L. David(1983): Identification of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. J. Clinical Microbiology, 17:744-752
- 4) Daffé, M., M. A. Lanéelle, G. Puzo and C. Asselineau(1981): Acide mycolique epoxydique: Un nouveau type ó acide mycolique  
Tetrahedron Letters, 22(45):4515-4516
- 5) Minnikin. D., S. M. Minnikin and M. Goodfellow(1982):The oxygenated mycolic acids of *Mycobacterium fortuitum*, *M.francinogenes* and *M. senegalense*. Biochimica et Biophysica Acta, 712:612-620.
- 6) Yano, I., S. Toriyama, M. masui, M. Kusunose, E. Kusunose and N. Akimori(1978): Gas chromatographic and mass spectrometric analysis of C<sub>50-60</sub> mono-and di-carboxy mycolic acids in *Mycobacteria*. 医用マス研究会講演集 3:169-172
- 7) Markovits, J., F. Pinte and A-H. Etémadi(1966); Sur la structure des acides mycoliques dicarboxyliques insaturés isolés de *Mycobacterium phlei*. C R Acad Sci [C] (paris), 263:960-962.
- 8) Mizuno, S., K. Kaneda and I.Yano(1985): Incorporation of <sup>18</sup>O into the w-19 hydroxy group of dihydroxy mycolic acid in *Mycobacterium fortuitum*. 医用マス研究会講演集, 10:173-176
- 9) Mizuno, S., K. Kaneda and I. Yano(1986): Biosynthetic studies using <sup>18</sup>O of ester mycolic acids and its regulation by growth temperature in *Mycobacterium phlei*. 医用マス研究会講演集,

11:129-132

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

M<sub>1</sub>:  $\alpha$ -mycolic acid, M<sub>2</sub>: keto mycolic acid, M<sub>3</sub>: dicarboxy mycolic acid and secondary alcohol, M<sub>4</sub>, M<sub>4</sub><sup>'</sup>: dihydroxy mycolic acid

Fig.2. Gas chromatograms of TMS methyl dihydroxy mycolate(M<sub>4</sub>) from *M. fortuitum*

Fig.3. Mass spectra of TMS methyl dihydroxy mycolate(M<sub>4</sub>) from *M. fortuitum*

Fig.4. Mass spectra of <sup>18</sup>O-enriched and control TMS methyl dihydroxy mycolate(C<sub>76:1</sub>, M<sub>4</sub>) from *M. fortuitum*

*M. fortuitum* was incubated in the <sup>18</sup>O<sub>2</sub> atmosphere for 24h at 30°C.

Fig.5. Partial mass spectra of <sup>18</sup>O-enriched fragment ions in C<sub>76</sub> and C<sub>78</sub> dihydroxy mycolate from *M. fortuitum*

Fig.6. Time course for incorporation of <sup>18</sup>O<sub>2</sub> into  $\omega$ -19(or  $\omega$ -21) hydroxy group in C<sub>76</sub> dihydroxy mycolate from *M. fortuitum*

Fig.7. Gas chromatogram of TMS secondary alcohols from *M. phlei*, *M. parafortuitum* and *M. diernhoferi*

Fig.8. Mass spectra of <sup>18</sup>O-enriched TMS octadecanol-2 and TMS eicosanol-2 from *M. phlei*

Fig.9. Partial mass spectra of secondary alcohols obtained from the cells incubated in <sup>16</sup>O<sub>2</sub> or <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-enriched atmosphere

Fig.10. Mass fragmentograms of TMS-secondary alcohols monitoring shifted mass ions (M-15) by <sup>18</sup>O enrichment

Fig.11. Time course for incorporation of <sup>18</sup>O into secondary alcohol from *M. phlei*

EL: extractable lipid, BL: cell wall bound lipid.

Fig.12. Incorporation of <sup>18</sup>O into secondary alcohols at various incubation temperature from *M. phlei*

*M. phlei* was incubated in the <sup>18</sup>O<sub>2</sub> atmosphere for 4h after shifting up to 50°C or down to 20°C from 35°C.

Scheme 1. Proposed pathway for biosynthesis of dihydroxy mycolic acid in Mycobacteria.

Scheme 2. Proposed pathway for biosynthesis of dicarboxy mycolic acids and 2-alkanols via ester mycolic acids in Mycobacteria