

## 細菌無細胞液による物質代謝の研究

## 第 2 篇

## 腸チフス菌の代謝

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

北 中 創

〔昭和 33 年 3 月 31 日受稿〕

## 目 次

第 1 章 緒 言	第 5 節 阻害剤及び抗生物質の影響
第 2 章 実験材料及び実験方法	第 6 節 種々濃度の KCN・メチレン青・チ
第 3 章 実験成績	トクローム C・CuSO <sub>4</sub> ・AgNO <sub>3</sub> の影響
第 1 節 各菌株酵素活性度の比較	第 7 節 代謝産物及び代謝経路
第 2 節 pH の影響	第 4 章 考 按
第 3 節 金属イオンの影響	第 5 章 結 論
第 4 章 透析の影響	

## 第 1 章 緒 言

周囲環境の変化に応じて細菌は生活態度に変化を来すことはよく知られている。この細菌変異の最も著明なものは Arkwright<sup>1)</sup> により述べられた S → R 変異即ち固形培地上での集落形態の変化であつた。

その後多くの研究者<sup>2)-5)</sup> により、その変異は集落形態のみならず、個々の細菌形態の変化・免疫性・病原性及びその他の生物学的性状にも変化を生ずることが認められ、就中最も著しい性状の変化は抗原構造の変化であつて、これは現在 S → R 変異の時には菌体表面の特異的抗原が失われて R 型菌は特異性に乏しい内部抗原のみを有する様になると解釈せられている。然し今日この S → R 変異の本態に関しては尚十分に説明された段階には到っていない。

又現今各種抗生物質が相次いで発見され、夫々の専門分野で広く応用され卓効を奏しているが、反面薬剤耐性の問題<sup>6)-16)</sup> が大きく注目を浴びるに至り、耐性獲得の機序に関する研究は活発に行われ、変異の問題とも関連して幾多の報告が示されている<sup>6)-10)17)-20)</sup>。

細菌が薬剤耐性を獲得する機序として Demerec ら<sup>11)-13)22)-26)</sup> による突然変異選択説と Hinshelwood<sup>13)</sup>、秋葉ら<sup>15)16)27)28)</sup> の適応乃至誘導変異説と

が対立し、未だ論議の域を脱しない感が深い。然し乍ら近時生化学の進歩とともに生化学的諸性質の変化を追求し物質代謝の面から変異並びに耐性獲得の機構を解明しようとする試みが行われている。即ち Lewis<sup>30)</sup>、齊藤<sup>31)</sup> の乳糖分解性菌につき選択説を裏付ける実験、Deskowitz<sup>32)</sup> のネズミチフス菌 S → R 変異についての考察、合成培地を利用する細菌発育素の最近の広汎な研究<sup>6)</sup>、新沢<sup>33)</sup> のチフス菌に於て R 型化することにより好氣的力源代謝系路の発達する報告、切目<sup>34)</sup> のアミノ酸代謝に着目した実験、又 Robinow<sup>35)</sup>、Knaysi<sup>36)</sup> により細菌体に於ける核物質の証明が近時急速に進められるとともに Lederberg and Tatum<sup>37)38)</sup> らによつて大腸菌の種々の栄養素合成能を欠く菌株同志が混合培養されて新しい合成能を有する菌株を生じ、一種の接合“recombination”を証明した注目すべき報告が存在する如く、この方面の進歩は期してまつべきものが多い。この進展は細菌学においても、各々の酵素は単一の遺伝子によつて統御される、即ち一つの遺伝子は一つの酵素を作る型板として作用すると云う“one gene-one enzyme”説があてはめられる傾向にあると云えよう。

一方 Serag ら<sup>39)40)41)</sup> は耐性菌ではアミノ酸転換能力の減退、糖代謝を含めて終末呼吸系が変化し薬

剤の侵襲を防ぐことが耐性成立の主因と考え、Umbreit 一派<sup>42)</sup>は SM による oxalacetate-pyruvate condensation 即ち終末呼吸機構の阻害を主張し、代居<sup>43)</sup>らは耐性菌の脂肪酸代謝・窒素代謝に着目し、Bellamy and Klimek<sup>44)</sup>、Gale and Rodwell<sup>45)</sup>は耐性菌が原株に比し著しく栄養要求度の変異を示すことを報告し、Pondi and Dietz<sup>46)</sup>、Spink and Ferris<sup>47)</sup>、Gilson and Parker<sup>48)</sup>、榊原<sup>49)</sup>らにより耐性菌に薬剤破壊酵素の産生されることも認められている。更に Cohen<sup>50)</sup>は核酸代謝との関係を論じ、最近日比野<sup>51)</sup>もそれをとり上げ菌体 DNA の変動により、SM 感性菌をして SM 存在下でも生育し得ることを報告し、耐性獲得に菌体核酸も干渉することを明らかにした。

この様に各種の菌が変異し又薬剤に対し耐性を獲得すれば、その菌の代謝系に何らかの変化をもたらすであろうと云うことは多言の要がないであろう。

筆者は第 1 篇の基礎実験に基き、氷冷下金剛砂磨砕法により腸チフス菌の S 型株・R 型株・SM 耐性株・CM 耐性株の各細菌無細胞液を抽出し酵素化学的に種々検討を行つたのでその成績を述べる。

## 第 2 章 実験材料及び実験方法

実験材料：供試菌は教室保存の腸チフス菌 S<sub>57</sub> の S 型株・R 型株及び S 型から獲得した SM 耐性株 (200mg/cc) と CM 耐性株 (200 $\gamma$ /cc) である。耐性菌株獲得には現在最も広く用いられる増量的継代法<sup>52)</sup>により SM は 200 mg/cc, CM は 200  $\gamma$ /cc まで耐性を上昇せしめ得た。尚耐性菌の大量培養には夫々の薬剤を耐性度の半量混入した普通寒天を用いた。何れも 37°C, 18 時間普通寒天平板培養菌を第 1 篇で述べた氷冷下金剛砂磨砕法<sup>53)</sup>により各菌の無細胞粗酵素液を作製して実験に供した。

呼吸量測定・Warburg 検圧計を用い Umbreit の常法<sup>54)</sup>に従つて測定した。即ち容器主室には前記無細胞粗酵素液を 2.0 ml と容器全液量が 3.5 ml になる様補足する M/25 磷酸緩衝液 (pH 7.2) の適当量を入れ、副室には 20% KOH 0.5 ml, 側室には M/10 基質 0.3 ml を、又阻害剤・抗生物質・金属イオン等添加物は第 2 側室に入れ、測定温度は 37.5°C, 振盪回数 140 回/分、反応は空気中に行つた。

窒素量測定・Mikrokjeldahl<sup>55)</sup>法によつた。pyruvate の定量・Friedemann and Haugen 法<sup>57)</sup>によつた。

揮発性酸の定量<sup>56)</sup>：試料を H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で酸性とし水

蒸気蒸溜後 1/100N NaOH で滴定した。

## 第 3 章 実験成績

### 第 1 節 各菌株酵素活性度の比較

先づ対称として各菌株の各 Warburg 容器 3 mg の休止菌を用い、炭水化物 5 種類、有機酸 9 種類、アミノ酸 5 種類の計 19 種の基質に対する酸素消費量を測定し第 1 表とした。大体全基質を通じ CM 耐

第 1 表 腸チフス菌 4 菌株休止菌の呼吸  
(O<sub>2</sub>-uptake  $\mu$ l/90min.)

基 質	S 型	R 型	SM 耐性	CM 耐性
glucose	139.0	96.4	131.0	155.0
mannose	132.0	72.6	128.0	139.0
galactose	61.1	44.3	59.8	63.8
maltose	14.6	12.6	16.6	19.8
dextrine	46.2	43.1	59.3	67.3
acetate	36.2	20.2	34.8	40.1
actate	113.0	102.4	105.0	117.0
pyruvate	75.1	72.9	67.7	85.2
succinate	20.4	19.0	20.8	22.4
fumarate	16.8	15.7	15.4	17.4
malate	12.9	11.1	13.6	13.9
malonate	3.3	2.8	3.2	3.5
citrate	5.8	4.7	8.9	9.2
$\alpha$ -ketoglutarate	5.5	5.3	6.6	7.0
glutamate	26.3	24.4	27.2	30.8
asparate	28.2	25.2	29.5	32.1
glycine	14.3	12.9	14.8	16.3
alanine	8.7	7.6	9.1	8.5
proline	10.3	9.1	10.9	11.1
Endog. Resp.	8.0	8.2	8.4	8.4

性株の酸素消費量を最高に、S 型と SM 耐性株が続き、そして R 型株の酸素消費量は最も少い傾向が認められた。

次に 4 菌株の無細胞粗酵素液を用い、上述基質に対する酵素活性度を検してみたが、第 1 篇に於て S 型が示した如く lactate・succinate・fumarate の 3 種だけに 4 菌株とも活性が見られたので lactate・succinate 2 基質に対する 4 菌株粗酵素液の酵素活性度を単位窒素量当りの酸素消費量により比較してみた。それには常に一定含有窒素量の粗酵素液が得られる様に窒素量と酵素活性度との比例し得る限界を調べ、lactate 0.7~1.6 mg/cc, succinate 0.4~2.5 mg/cc なることを確かめ、各無細胞液調製毎に成るべく窒素量 1 mg/cc になる様予めしらべおいた

窒素量と280 m $\mu$  吸光度<sup>59)</sup>との関係表により M/25 磷酸緩衝液 (pH 7.2) にて補正をなし、第2表に

第2表 腸チフス菌無細胞液の酵素活性度  
(O<sub>2</sub>-uptake  $\mu$ l/mgN/hr.)

	lactate	succinate
S 型 株	108.8	51.7
R 型 株	137.0	60.7
S M 耐性 株	95.4	48.0
C M 耐性 株	113.1	52.3

示す如く窒素量 1 mg 当りの酸素消費量を各菌株間で比較してみた。その結果休止菌の活性度とは異り succinate・lactate ともに R 型株を最高に、CM 耐性株・S 型株と続くが大差なく、SM 耐性株が最低に位していることが判つた。勿論これのみを以て4菌株間の全酵素の量的質的の差を云々するのは早計であるが、少くとも本 succinate・lactate の酸化酵素に関しては4菌株間に活性度の量的差が認められた。

第2節 PH の影響

M/25 磷酸緩衝液を用い、pH を 4.5~8.3 に変え、その影響を調べた。第3表の如く succinate・fum-

第3表 腸チフス菌4菌株の呼吸に及ぼす pH の影響  
(O<sub>2</sub>-uptake  $\mu$ l/60min.)

	pH	S 型	R 型	SM 耐性	CM 耐性
lactate	4.5	227.9	280.9	234.0	260.2
	7.2	227.6	279.4	239.1	260.8
	8.3	229.5	283.2	238.0	258.9
succinate	4.5	97.9	101.6	99.4	103.0
	7.2	111.3	134.7	120.0	127.8
	8.3	92.0	112.4	100.3	115.6
fumarate	4.5	18.1	20.6	17.7	19.8
	7.2	20.4	25.8	20.7	23.9
	8.3	18.3	21.4	18.2	20.6

すべて endog. resp. の修正をした値。

arate に於ては opt. pH 7.2 辺に存する様で4菌株間に差異は認められなかつた。lactate に於てはこの範囲では著しい差は認められないが、強いて opt. pH を云うならば非耐性菌では 8.3 辺り、耐性菌では 7.2 辺りとなつていた。

第3節 金属イオンの影響

二価金属イオンが基質と酵素蛋白の結合を強め、

種々の酵素能を活性化することはよく知られているが、本腸チフス菌粗酵素液についてもこの金属イオンの影響をしらべてみた。二価金属イオンは FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O の3種を夫々終末濃度 10<sup>-3</sup>M になる様蒸溜水に溶解して使用する。その結果は第4表の如く3金属イオンとも呼吸促進

第4表 金属イオンの影響  
(O<sub>2</sub>-uptake  $\mu$ l/60min.)

	S 型	R 型	SM 耐性	CM 耐性
lactate	210.0	195.0	214.8	225.3
+ Fe <sup>++</sup>	267.0	238.0	265.7	274.2
+ Mg <sup>++</sup>	220.5	209.2	228.7	246.8
+ Mn <sup>++</sup>	214.0	204.3	220.0	231.3
succinate	149.0	101.0	146.9	156.0
+ Fe <sup>++</sup>	196.9	134.0	189.8	200.9
+ Mg <sup>++</sup>	157.0	111.0	154.1	168.8
+ Mn <sup>++</sup>	164.3	116.0	161.9	175.7
fumarate	21.3	14.5	20.8	24.3
+ Fe <sup>++</sup>	26.3	20.2	26.6	30.2
+ Mg <sup>++</sup>	23.0	15.6	23.2	26.0
+ Mn <sup>++</sup>	24.1	16.8	24.3	27.8

すべて endog. resp. の修正をした値。

作用を示すが、Fe は lactate・succinate・fumarate 3 基質を通じこの促進効果最も大きく、lactate では Mg, Mn の順にその効果弱くなり、又 succinate・fumarate では逆に Mn, Mg の順になつている。然し変異株・耐性株に於て原株 (S 型) とこの金属イオンの影響に関しては格別有意の差は認められなかつた。

第4節 透析の影響

粗酵素液を透析膜に入れ 4°C 以下で一昼夜蒸溜水に対し透析したが第5表に示す如く、lactate は4菌株を通じこの透析により殆ど活性の低下が認められなかつたが、succinate に於ては 40%~50% の活性低下が認められ、耐性株に稍々この程度が大きい様であつた。又 fumarate では4菌株とも殆ど 60%前後の失活を見た。これに対し透析外液・Fe・Mg・Mn を加えることよりその活性低下の回復を期したが、その何れによつても完全な復活は得られず、たゞ Fe に軽度の、Mn・Mg の順に微かの効果が見られ、透析外液には全く効果が認められなかつた。

第5表 透析の影響

(O<sub>2</sub>-uptake  $\mu$ l/90min.)

	S型	R型	SM 耐性	CM 耐性
lactate 非透析 透析 +透析外液 +Fe <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup> +Mn <sup>++</sup>	219.0	243.0	187.9	225.9
	199.0	197.2	172.0	207.9
	203.7	197.8	180.6	208.0
	215.2	228.6	184.2	218.0
	200.9	198.2	179.1	211.6
	199.7	195.6	177.0	208.2
	succinate 非透析 透析 +透析外液 +Fe <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup> +Mn <sup>++</sup>	119.0	125.5	84.7
61.3		68.6	47.5	81.3
61.7		69.8	49.8	84.2
72.6		88.2	65.4	102.4
64.6		72.1	53.0	88.0
70.6		80.6	59.4	93.1
fumarate 非透析 透析 +透析外液 +Fe <sup>++</sup> +Mg <sup>++</sup> +Mn <sup>++</sup>		21.4	24.6	17.4
	8.3	9.2	7.1	8.0
	8.4	9.4	7.6	8.4
	11.2	13.8	10.7	12.0
	10.0	10.6	8.8	10.2
	10.9	12.0	9.0	11.4

夫々の endog. resp. の修正をした値。

## 第5節 阻害剤及び抗生物質の影響

特定の代謝系に働く阻害剤を種々用いて代謝の解析、又逆に利用して薬剤作用機序の解明のために阻害剤を用いての代謝実験は盛んに行われているが、筆者も KCN・NaN<sub>3</sub>・NaF・malonate 及び SM・CM を用い、その4菌株代謝に及ぼす影響を検してみた。終末濃度は NaF のみ 10<sup>-2</sup>M、他はすべて 10<sup>-3</sup>M にした。第6表は休止菌につき、第7表は無細胞液についての結果であるが、先づ lactate に就いて4菌株とも休止菌では KCN、無細胞液は malonate で阻害される以外は大した

第6表 阻害剤及び抗生物質の影響

(I: 休止菌)

(O<sub>2</sub>-uptake  $\mu$ l/60min.)

	S型	R型	SM 耐性	CM 耐性
lactate +SM +CM +NaN <sub>3</sub> +NaF +KCN +malon.	155.3	127.9	111.9	134.8
	137.5	118.3	109.0	126.4
	134.4	108.7	108.2	130.7
	126.0	73.9	100.9	114.8
	138.6	113.1	105.1	119.0
	50.8	47.7	41.9	48.2
	145.9	124.0	110.4	138.8

succinate +SM +CM +NaN <sub>3</sub> +NaF +KCN +malon.	26.7	21.6	24.1	30.6
	30.5	25.9	24.3	30.7
	16.0	13.9	14.1	16.3
	5.3	3.7	4.8	5.1
	25.9	19.3	26.4	31.8
	27.4	20.8	23.8	31.1
	29.3	23.4	33.6	38.5
fumarate +SM +CM +NaN <sub>3</sub> +NaF +KCN +malon.	11.2	10.8	11.0	13.3
	13.0	13.9	13.0	15.7
	11.7	9.7	9.7	10.4
	3.1	3.4	3.5	5.0
	8.4	9.8	11.3	12.3
	11.5	10.9	10.8	14.0
	17.8	16.4	18.9	18.4

第7表 阻害剤及び抗生物質の影響

(II: 無細胞液)

(O<sub>2</sub>-uptake  $\mu$ l/90min.)

	S型	R型	SM 耐性	CM 耐性
lactate +SM +CM +NaN <sub>3</sub> +NaF +KCN +malon.	263.0	276.0	238.8	266.3
	264.5	278.1	239.7	267.0
	260.2	272.5	235.1	270.6
	238.1	243.1	223.0	240.8
	209.0	248.0	217.0	262.1
	243.1	251.0	218.1	260.8
	149.3	146.6	136.3	133.9
succinate +SM +CM +NaN <sub>3</sub> +NaF +KCN +malon.	165.2	173.2	110.2	169.0
	190.7	193.6	108.9	175.8
	140.9	156.4	105.0	170.2
	53.1	76.6	27.0	36.1
	115.0	158.4	100.4	145.6
	154.0	160.0	108.7	164.0
	18.3	11.8	19.8	28.1
fumarate +SM +CM +NaN <sub>3</sub> +NaF +KCN +malon.	32.6	48.9	33.8	46.2
	36.1	55.7	38.1	50.4
	29.8	50.2	32.6	44.3
	25.5	39.5	25.5	37.2
	28.7	45.0	31.1	42.6
	31.2	49.7	32.9	47.1
	26.9	41.2	26.2	38.5

影響を受けない様である。KCN 阻害が無細胞液に認められない点より、休止菌では酵素学的阻害の意味よりもむしろ菌全体に coated 的に働き基質の菌体膜内即ち酵素作用点までの進入を阻止するためではなかろうか。又 malonate の阻害はコハク酸々化酵素系を混入した粗酵素なるためか、或は

TCA-cycle 上の各酸化酵素への阻害も云々されている現状より lactate に対しても阻害効果を示すのかも知れないが断定は困難である。SM・CM の作用は微かで耐性菌・非耐性菌の間にも特別の著しい差は認められなかつた。

次に succinate に就いては SM は非耐性菌には呼吸促進的に働き、CM は非耐性菌及び SM 耐性菌には阻害に傾いている様である。KCN 阻害は余り著しくないが NaNO<sub>3</sub> の阻害が休止菌・無細胞液を通じて認められ、チトクローム系の関与が推測される。NaF の影響は著明なものはない。然し注目を引くのは malonate の阻害態度である。即ち休止菌では全くこの阻害が見られぬにも拘らず、一旦無細胞状となると4菌株を通じ共に著しい阻害効果の認められたことで、これにも原形質膜の透過性が大いに起因しているものと思われる。

一方 fumarate に対しては休止菌に於ては NaNO<sub>3</sub> が相当阻害的に働くが無細胞液では大した作用も呈していない。これも乳酸に対する KCN の場合同様菌体表面に対する coated 作用と考えられる。その他の薬剤作用並びに4菌株間の態度の相異等も顕著なものは見られなかつた。

尚無細胞の形で抽出は不可能であつたが糖・有機酸・アミノ酸の中主なもの7種類につき耐性株・非耐性株の休止菌に於ける SM・CM の態度を見たが第8表の如く glucose には両者ともに余り影響が見られなかつた。即ち解糖過程への SM・CM の作

第8表 腸チフス菌休止菌の呼吸に及ぼす  
抗生物質の影響  
(O<sub>2</sub>-uptake μl/60min)

	S 型	SM耐性	CM耐性
glucose	95.7	92.7	138.0
+SM	87.9	83.4	124.0
+CM	94.1	100.0	147.0
pyruvate	65.1	74.1	52.2
+SM	69.0	74.5	52.6
+CM	45.5	55.4	49.0
acetate	37.2	26.4	62.9
+SM	36.8	28.8	63.6
+CM	50.1	35.3	99.7
malate	9.1	10.5	12.1
+SM	10.6	13.0	17.6
+CM	5.7	5.5	6.1

glutamate	27.2	27.6	39.3
+SM	6.5	27.3	40.5
+CM	25.8	20.3	17.6
asparat	26.6	24.3	46.1
+SM	25.5	23.8	44.7
+CM	13.3	10.9	14.4
glycine	19.4	19.1	27.2
+SM	20.8	21.4	27.7
+CM	21.1	21.3	25.8

用は余り考えられないのではなからうか。又 Umbreit ら<sup>4)</sup> の云う TCA cycle 就中 pyruvate に対する影響を見たが CM が非耐性菌に稍々阻害的に働く以外には見るべきものがなかつた。然し acetate に対する CM の態度、asparate に対する CM の態度等極めて興味ある問題を含んでいる様であるが将来に待ちたい。

第6節 種々濃度の KCN・メチレン青・チトクローム C・CuSO<sub>4</sub>・AgNO<sub>3</sub> の影響

以上の実験で腸チフス菌の4菌株より金剛砂磨砕法にて抽出し得る lactate・succinate・fumarate の3酸化酵素の性状を追究してきたが、更に4菌株ともに特異的と思われる乳酸々化酵素を中心に第9表に

第9表 種々濃度の KCN・メチレン青・チトクローム C・CuSO<sub>4</sub>・AgNO<sub>3</sub>・Yeast-extracts の影響  
(O<sub>2</sub>-uptake μl/60min.)

添加物	基質	lactate	succinate	fumarate
		98.2	58.1	10.9
KCN	10-2M	90.6	22.6	0
	10-3M	95.2	45.6	8.9
メチレン青	10-4M	96.1	48.5	11.2
	10-5M	94.2	52.8	
	10-6M		55.9	
チトクローム C		97.8	60.7	13.4
CuSO <sub>4</sub>	10-3M	11.9	21.6	7.7
	10-4M	62.4	40.3	10.4
AgNO <sub>3</sub>	10-3M	3.4	21.9	7.2
	10-4M	44.6	42.1	9.6
Yeast-extracts		121.0	63.2	9.8

すべて endog. resp. の修正をしたもの。

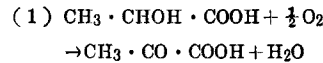
示す如く、チトクローム系の阻害剤 KCN<sup>60)</sup>、フラビン系酵素の阻害剤 CuSO<sub>4</sub> · AgNO<sub>3</sub><sup>65)</sup>、又フラビン系に促進的に働くと考えられる Yeast-extracts (10%, 100°C 1時間煮沸)、そしてチトクローム C 標品並びにメチレン青の影響をしらべてみた。この結果乳酸酸化酵素は 10<sup>-3</sup>M 更に 10<sup>-2</sup>M の KCN, そして 10<sup>-3</sup>M の NaN<sub>3</sub> によつても阻害を受けず、水素受容体の添加 (メチレン青) を必要とせず直接的に酸素と反応し、チトクローム C を添加しても無影響であり、動植物界で広く一般に知られている如くチトクローム系を通つて乳酸の酸化が行われないのではなからうか。而も AgNO<sub>3</sub> · CuSO<sub>4</sub> により強く阻害され、Yeast-extracts の促進効果等より Edson<sup>64)</sup>、山村ら<sup>65)</sup> が鳥型結核菌に於て新乳酸々化酵素として発表しているものに近いフラビン系通過の酵素と考えるべきかと思う。次にコハク酸々化酵素は第 7 表で見られる NaN<sub>3</sub> の阻害とともに KCN にても相当に阻害されるが、CuSO<sub>4</sub> · AgNO<sub>3</sub> によつては lactate の場合程の阻害を受けず、Yeast-extracts によつても影響されない点より、広く動植物界に見られるものと同じくチトクローム系を通る酵素と思われる。尚チトクローム C の促進効果が薄かつたのは恐らく粗酵素なる故既に十二分のチトクロームと conjugate の状態で存するためであらうと思われる。尚フマル酸についてもコハク酸々化酵素系と共存の粗酵素液であるためかも知れぬが、表によれば明らかにチトクローム系を通つて行く形のものとして推測される。

#### 第 7 節 代謝産物及び代謝系路

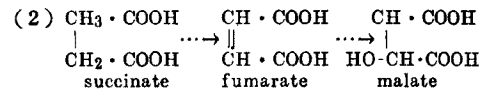
終末濃度 M/1000 乳酸を Warburg 検圧計により酸素消費の見られぬ処まで振盪測定し (240分)、除蛋白後その上清につき Friedemann and Haugen 法<sup>57)</sup> により定量し、同時にその 2-4-dinitrophenylhydrazine を paperchromatography<sup>66)</sup> により同定したが第 10 表に示す如く広く動植物界に見られる乳酸々化酵素同様、分解生成物は焦性ブドウ酸であり而も 4 菌株ともに化学量論的に殆ど完全に分解してしまい、それ以後の分解酵素は本粗酵素液中に活性状では存在しないことを確認した。又 Edson<sup>64)</sup> · 山村ら<sup>65)</sup> の云う酢酸の分解も一応疑い Quastel and Webley 法<sup>58)</sup> に従いその検出にも努めたが見出し得なかつた。尚 CO<sub>2</sub> の発生は見られず (1) 式に従い乳酸は本酵素により完全に焦性ブドウ酸へと分解することを確認した。

succinate · fumarate の二者からの生成物の確認

第 10 表 代謝産物及び代謝経路



	lactate	O <sub>2</sub> 消費量 (μl)		pyruvate
		理論	実測	
S 型	140γ	336	306	120γ ± 5γ
R 型	140γ	336	301	115γ ± 5γ
SM 耐性	140γ	336	309	120γ ± 5γ
CM 耐性	140γ	336	312	125γ ± 5γ



は残念乍ら出来なかつたが、コハク酸々化酵素系は脱水素酵素と酸化系とより成り、而もその両者は緊密に結合して居り、更に細胞の不溶性構成々分と結合して居るので抽出・純化は極めて困難で、コハク酸々化酵素系として研究されている現状であり<sup>67)</sup>、本菌の粗酵素液の性状より考え、筋肉内に心筋の Green-brei 等に存するものと同一の代謝、即ち第 10 表 (2) 式に従い恐らく反応は進行するのであらうと推察した。

#### 第 4 章 考 按

以上の実験成績を総括するに第 1 篇基礎実験の成績に従い金剛砂磨砕法により腸チフス菌の S 型株 · R 型株 · SM 耐性株 · CM 耐性株の各無細胞抽出液中に lactate · succinate · fumarate の各酸化酵素が含有されていることを確認し、この粗酵素液を通じて 4 菌株間の差異並びに各酸化酵素の性状を検討した。

先に新沢<sup>33)</sup> は S<sub>57</sub> の S 型が R 型に変異することに於て特に R 型にのみ発見される酵素は無かつたと述べているが、筆者も休止菌を用いて炭水化物 5 種、有機酸 9 種、アミノ酸 5 種の計 19 種の基質に対する酸素消費実験に於て (第 1 表) 特に変異株 · 耐性株に独特の酸化酵素の出現、又欠如等の現象は見られず、強いて云うならば全基質の呼吸能が R 型株に於ては新沢の云う如く低下し、SM 耐性株は S 型株と大同小異、そして CM 耐性株に軽度増進の傾向が見られることである。

山田<sup>68)</sup> はサルファ剤耐性大腸菌を用い糖及び有機酸を基質とした酸素呼吸量を原株と比較し多くの基質に於て耐性株は呼吸が増加するのを認め、Bellamy and Klimek<sup>44)</sup>、Gale and Rodwell<sup>46)</sup> は黄色ブドウ球菌 Pe 耐性株に於てアミノ酸々化能を

Warburg 法でしらべ glycine・serine・proline 及び glutamate では耐性株がおそく, arginine 及び lysine では耐性株が反つて早いことを述べている. Rosanoff and Sevag<sup>41)</sup> は大腸菌 SM 耐性株を用い glucose・pyruvate の酸化能が低下し, 乳酸生成量が増加し glucose→pyruvate→lactate 以後の代謝経路が欠落したこと及び pyruvate 代謝が酵素的に変化し SM の侵襲を回避するものと説明している. 又中塚・荒谷<sup>69)</sup> の報告では黄色ブドウ球菌・ネズミチフス菌・大腸菌の CM 耐性株はいずれも原性より発育がおそくなり, 酸素消費も減少する. 以上各薬剤につき耐性菌の酸素消費に共通した特異的変異は認められず, この呼吸能と耐性との関連性については仲々複雑な問題が介在している様で一貫した律序が認められていない.

次に4菌株無細胞液中に含有される lactate・succinate 各酸化酵素能を比較してみた. 酵素能の比較にはいろいろ<sup>70)</sup> の法があるが単位全窒素量又は蛋白窒素量当りの酵素活性度の比較が現在の処最も信がおける様で筆者もこれに従い窒素量1mg 当り1時間の酸素消費量を比較してみたが, lactate・succinate とともにR型株を最高に, CM 耐性株・S型株これに次ぎ, SM 耐性株の酵素能が最も低いことがわかつた(第2表). 注目すべきは休止菌に於ては両基質ともに最低の酵素活性能を示したR型株が無細胞状になると最高の能力を示すことである. これに就いて簡単に推定を下すことは困難だが真野<sup>71)</sup> が S<sub>57</sub> の S型・R型両型菌間に表面構造・荷電状態・菌膜の透過性等の差を認めている如く, これら特に細菌々体膜の透過性が大きな因子となつていのではないだろうか. 然し兎に角無細胞の状態で同一単位当りの lactate・succinate 各酸化酵素能は R型>CM 耐性>S型>SM 耐性の順であり, 各菌株内の含有酵素の量的差を示すものであらうと思う.

二価金属イオンが基質と酵素蛋白との間に介在し両者の結合を密ならしめることにより, 種々の酵素作用を活性化することはよく知られたことで, 例えば phosphoglucomutase<sup>72)</sup>, aldolase<sup>73)</sup>, enolase<sup>74)</sup>, pyruvic phosphophosphatase<sup>75)</sup>, pyruvic decarboxylase<sup>76)</sup>, oxalacetic decarboxylase<sup>77)</sup> 等に於て Mg<sup>++</sup>・Mn<sup>++</sup>・Fe<sup>++</sup>・Co<sup>++</sup>・Cu<sup>++</sup> など金属イオンの賦活作用が認められて居る. 然しその賦活効果は一つ一つの酵素蛋白によつても差のあることで, 極めて多くの酵素系が混在している細菌体の代謝に及ぼす金属イオンの作用と云う問題は菌膜の透過性

も関連しなかなかに複雑な様相を呈し, その事象の解釈も容易でない. 赤沢<sup>78)</sup>, 松浦<sup>79)</sup>, 新沢<sup>83)</sup> からも腸チフス菌・赤痢菌等を用い金属イオンと酵素蛋白との結合状態, 金属イオンの代謝上に於ける作用点, S-R変異に於ける金属イオンの作用態度より夫々の代謝変異を推定する等の報告をしているが, 筆者も比較的単一酵素化した粗酵素液を使用することにより二価金属イオンの影響を変異株・耐性株の代謝面で試みてみたが(第4表), Fe・Mg・Mn 3イオンともに呼吸を促進させる能力を持ち, 就中 Fe は lactate・succinate・fumarate 3基質を通じてこの促進力最も大きく, lactateにあつてはMgこれに次ぎMnの促進効果は極めて微弱となつている. 反之 succinate・fumarate の場合はいずれも Mn の賦活作用が Mg のそれを凌駕している. この Mn・Mg の呼吸促進効果が lactate の場合と succinate・fumarate の場合と異なる点 lactate 酸化に関する酵素系と後者の酵素系との間に若干の差異の存在を暗示している様である. 然しこれら金属イオンにより受ける影響で4菌株間には格別有意の差を見出し得なかつた.

酵素標品を純化精製する上に透析がよく用いられ, 又酵素によつては透析により活性度が低下し, 種々活性因子を加えることにより, その酵素と補助的活性因子との関連性並びにその結合状態・作用点等の解析に利用されているが, 本実験標品に於ても透析を行い, 4菌株を通じて lactate では透析により殆んど活性の低下を示さず(第5表), 本菌の乳酸々化酵素は透析に対しては比較的安定なることを知り得た. 然し他の二者殊に fumarate に於ては透析操作により殆ど60%前後の失活を見, succinate についても40%~50%の活性低下を認めた. この復活の目的で透析外液・Fe<sup>++</sup>・Mg<sup>++</sup>・Mn<sup>++</sup>を加えてみたがその何れによつても完全な復活は得られず, たゞ Fe に軽度の次いで Mn・Mg に微かの効果が見られ, 透析外液によつては回復の見られぬ点よりこれら酵素の賦活因子は透析により酵素蛋白より容易に離脱し, 一たん酵素蛋白より脱すると極めて不安定となり速かに非可逆的に不活性化するか, 又は再び酵素蛋白と結合して賦活作用を発揮するには互に共働的に密接な関連性を持つた因子群としての形成が必要なのであらう.

抗生物質の作用機転については第1章で述べた如く未だ十分解明されたとは云えずその生化学面よりの説明として, Streptomycin は塩基性で核酸と容易に結合する処から Cohen<sup>80)</sup> は核蛋白との関係を

論じ、Alexander and Leidey<sup>60)</sup> は SM 耐性インフルエンザ菌から抽出した核酸により SM 感性インフルエンザ菌を SM 耐性化する事に成功し、日比野<sup>61)</sup> は鳥型結核菌につき、木下<sup>61)</sup> は腸チフス菌について同様の報告をなし、木村<sup>29)</sup> は SM 耐性 S 型腸チフス菌の核酸によつて感性 R 型菌を耐性化すると同時に S 型への型転換もなし得たと述べ、又 Umbreit<sup>42)</sup> 一派は SM の oxalacetate-pyruvate condensation 即ち終末呼吸機構の阻害を主張している。Chloromycetin については構造上 Phenylalanine に類似することよりその代謝並びに Esterase に作用するのではないかと考えられている<sup>82)</sup> が、筆者もこれら抗生物質を酵素阻害剤とともに腸チフス菌の 4 菌株に作用させてみた。

その結果は前章に記す如く(第 6 表・第 7 表)阻害剤程の影響は見られなかつたが SM は呼吸阻害剤と云うよりも無影響か、むしろ呼吸促進的に働き、succinate に於て耐性株(SM・CM とも)に非耐性株での促進効果が見られなかつた以外 4 菌株を通じて特異の差は見出し得なかつた。又 CM は概ね阻害傾向を示し、SM 同様この阻害様相も菌株により特に相異すると云つたものはなかつたが、たゞ休止菌にては 4 菌株殆ど同程度の阻害を受ける succinate に於て無細胞になると阻害度は著しく軽度となり、而も耐性株(特に CM 耐性株)にその傾向が強く認められたことは、勿論この一事のみで推察するのは早計であるが、細菌表面構造・細菌細胞膜の透過性等の問題との関連性も考えられる。尚粗酵素液としての抽出は不可能であつたが糖・有機酸・アミノ酸の主なもの 7 種類の休止菌を用いての実験に於て(第 8 表) SM・CM ともに glucose に対しては耐性・非耐性ともに影響少く、解糖過程への両作用は弱いのではないかと想像される。又 Umbreit<sup>42)</sup> の云う pyruvate に関しては CM が SM 耐性株及び非耐性株に稍々阻害的に働く以外 SM は全く無影響であつた。然しこゝで注目を引いたのは acetate への促進、aspartate への抑制と云う呼吸に対する CM の態度で今後の研究に待ちたい。

一方阻害剤を用いて生物の複雑な代謝過程を分析的に解明しようとする試みは可成多く、KCN・Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>・NaF・2,4-dinitrophenol・monoiod 酢酸・As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 等が酵素毒としてもつとも屢々用いられるが、これらが果してどの代謝過程をどの程度特異的に阻害するものであるかは必ずしもまだ十分でないが、Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub> は Pickett and Clifton<sup>83)</sup> が phosphorylation

の阻害を、Clifton<sup>84)</sup> は assimilation の障喝を述べ、Keilin<sup>62)</sup> は cytochrome, cytochrome oxidase 等含鉄酵素を阻害すると報告している。又 KCN も Warburg and Negelein 等により含鉄酵素を特異的に阻害することが知られている。NaF に就いては Meyerhof and Lohman<sup>74)</sup> は enolase の阻害を、Mickelson<sup>85)</sup> は oxidative phosphorylation の阻害に言及している。これらと共に筆者の用いた malonate のコハク酸々化の阻害作用についても、Quastel and Wheatly<sup>86)</sup>, Randles and Birkeland<sup>87)</sup> によりよく知られて居り、Pandee and Potter<sup>88)</sup>, Plaut and Lardy<sup>89)</sup>, Evans et al. ら<sup>90)</sup> は succinoxidase の阻害は勿論、oxalacetate の脱炭酸及び酸化への阻害についても述べ、更に  $\alpha$ -ketoglutarate 酸化への阻害を Stumpf et al.<sup>91)</sup> が発表している。

これら阻害剤に対する実験でも(第 6 表・第 7 表) 4 菌株の間で特に顕著な差は認められず各酸化酵素別に大体共通の態度を示している。即ち lactate に就いては休止菌では可成りの障喝を見た KCN も無細胞液では、同じくチトクローム系の阻害剤 Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub> とともに殆ど無影響と云う極めて興味ある知見を得た。この点 Edson<sup>64)</sup> が Mycobacterium phlei より抽出し、又山村ら<sup>65)</sup> も発表するチトクローム系不関性の乳酸々化酵素に酷似している。尚休止菌に於ける KCN の態度は酵素に対する阻害と云うより、基質の酵素作用点迄の到達を阻止する細菌細胞膜の透過性へ働く菌体 coated 的なものと考えられる。又 malonate によつても可成りの影響を受けていることは、本無細胞液が粗酵素にして、コハク酸々化酵素系の混在のためか、或は succinate のみならず oxalacetate,  $\alpha$ -ketoglutarate 始め T.C.A. cycle 上の各酸化への影響も云々されていること<sup>88)-91)</sup> より、lactate に対しても特異的に阻害効果を示すのかも知れないが本段階での推定は困難であつた。

次に succinate に対しては KCN は余り反応を示さなかつたが、Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub> に著しい阻害作用の見られたことはチトクローム系と密接な関連性を有する本酸化酵素系としては当然の帰結であろう。然し本実験に於て特に注目を引いたのは malonate の阻害態度である。即ち前述の如くよく知られた malonate の succinate への拮抗阻害が本菌の休止菌では全然認められないにも拘らず、無細胞状になるや明らかに認められることである。これと同様の事象を奥貫<sup>92)</sup>・Gerhardt<sup>93)</sup> らが鳥型結核菌・Achromobacter



sp. (UH<sub>3</sub>) に就いて観察し原形質膜の透過性に原因を求めているが、その可能性が本菌の場合も十分考えられ酵素能が透過性に起因してその発現様相を種々変じ、改めて細菌細胞膜の存在を認識した。

本菌乳酸 $\alpha$ 化酵素の特異性的一端については既に KCN $\cdot$ NaN<sub>3</sub> 等チトクローム系阻害剤の不関性で示したが、チトクロームCによつてもその酸化能は促進されず(第9表)、更に Stumpf and Green<sup>63)</sup> らによりフラビン系酵素阻害剤とされる CuSO<sub>4</sub> $\cdot$ AgNO<sub>3</sub> に著しい反応を示し、フラビン系に促進的に働くと考えられる Yeast-extracts にも強く影響される点、従来から Stephenson<sup>94)</sup>、Still<sup>95)</sup>、

Barron<sup>96)</sup>、Hahn and Fischbach<sup>97)</sup>、Adler and Michaelis<sup>98)</sup>、Green<sup>99)</sup>、Bach and Dixon<sup>100)</sup>、Claggett<sup>101)</sup>、Kaufman<sup>102)</sup>、らにより明らかにされている大腸菌、淋菌、パン酵母、麦酒酵母、豚心筋、高等植物、微類等広く一般に存在する普通のチトクローム系乳酸 $\alpha$ 化酵素とは大いに趣を異にし、むしろ Edson<sup>64)</sup>、山村ら<sup>65)</sup> が鳥型結核菌で発見したフラビン系の新乳酸 $\alpha$ 化酵素に近いものであり、而も代謝経路は Edson $\cdot$ 山村らが酢酸に向うに反し、本菌のは(10表)従来のもと同じく pyruvate に向う全く特異な新乳酸 $\alpha$ 化酵素を本菌は有するものと推定した。尚助酵素に就いては必要とするも

第11表 乳酸 $\alpha$ 化酵素の性状

	腸チフス菌 S <sub>57</sub>		鳥型結核菌(山村)		
	I	II	I	II	
抽出法	金剛砂磨砕法	凍結融解法	凍結融解法	アセトン乾燥自己融解法	
50°C, 10分加熱	安定	不活性	不活性	安定	
透析	安定	安定	安定	不安定	
酢酸(pH 3.8)沈澱	安定	安定	安定	不活性化	
酵素分子の反応	直接的	直接的	直接的	水素受容体必要	
メチレン青の促進作用	なし	なし	なし	あり	
チトクロームCの促進作用	なし	なし	なし	あり	
助酵素	(フラビン系)	F	A	D	D P N
反応生成物	焦性ブドウ酸	酢酸	酢酸	焦性ブドウ酸	
酵素の性状	新しい酵素	新しい酵素	新しい酵素	動物組織の酵素に類似	

の<sup>96)99)102)95)</sup>、又不要並びに酵素蛋白と強固に結合状のもの<sup>95)-97)100)101)84)</sup>と生体種別により異り未だ十分解明されて居らず、筆者も又詳細な解析を行ひ得ず、従つて断定は危険であるが、Edson の云う「凍析・加温・酢酸沈澱を行ひ活性低下を見ない点より助酵素不要、或は non dissociable」に従うならば、恐らく後者に属しもし助酵素の分離可能となればフラビン系に属するものであろうと推察する。然し兎に角将来の研究を待つ次第である。

第5章 結 論

腸チフス菌 S<sub>57</sub> の S 型株、R 型株、SM 耐性株、CM 耐性株の主に無細胞抽出液を用い、各代謝的性状の変化を検討し下記知見を得た。

- 1) 金剛砂磨砕法により S<sub>57</sub> 4 菌株の乳酸 $\cdot$ コハク酸 $\cdot$ フマル酸各酸化酵素を含有する無細胞液を抽出し得た。
- 2) S<sub>57</sub> 4 菌株の乳酸 $\cdot$ コハク酸 $\cdot$ フマル酸各

酸化酵素の性状の著差は認められなかつたが、無細胞液全窒素量 1 mg 定りの酵素活性度は R 型株>CM 耐性株>S 型株>SM 耐性株の如く量的の差を認めた。

3) S<sub>57</sub> 4 菌株ともにその無細胞液中に含有する乳酸 $\alpha$ 化酵素は従来知られた動物組織 $\cdot$ 酵母 $\cdot$ 諸種細菌等のそれとは全く異つた性状を持つ新しいものである事を知つた。

4) 阻害剤、殊にマロン酸阻害実験に於て、休止菌と無細胞液との間で著しい反応態度の差を示し、これらが細菌細胞膜の透過性に起因する可能性を認めた。

本論文の要旨は1956年11月、第9回日本細菌学会中四国支部総会に於て発表。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上教授に深甚の謝意を表し、併せて種々御協力下さつた教職員各位に感謝する次第である。

## 参 考 文 献

- 1) Arkwright, T. A.: *J. Path. Bact.*, **23**, 358 (1920), **24**, 36 (1921) *J. Exp. Path.*, **5**, 23 (1924)
- 2) Hadley, P.: *J. inf. Dis.*, **40**, 1 (1927), **60**, 129 (1937)
- 3) White, P. B.: *J. Path. Bact.*, **32**, 85 (1929)
- 4) Luria, S. E.: *Bact. Rev.*, **11**, 1 (1947)
- 5) Braun, W.: *Bact. Rev.*, **11**, 75 (1947)
- 6) Dubos, R. J.: *Bacterial Cell*, Harvered, Univ. Press (1945)
- 7) Austrian, R.: *Bact. Rev.*, **16**, 31 (1953)
- 8) Wyss, O. et al.: *Bact. Rev.*, **17**, 17 (1953)
- 9) Abraham, E. P.: *Adaptation in microorg.*, Cambridge, 201 (1953)
- 10) Andrieu, G. et al.: *Rev. immunol.*, **17**, 173 (1953)
- 11) Demerec, M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **31**, 15 (1945)
- 12) Chabbert, Y.: *Press. Med.*, **60**, 1683 (1952)
- 13) Levaditi, C. and Henry, Evans, J.: *Rev. immunol.*, **17**, 1 (1953)
- 14) Hinshelwood, C.: *The chem. kinetics of the bacterial cell*, Oxford (1946)
- 15) 秋葉: *医学のあゆみ*, **13**, 250 (1952)
- 16) Linz, R.: *Ann. Inst. Past.*, **78**, 105 (1950)
- 17) Mitchison, D. A.: *Adapt. in microorg.*, Cambridge, 253 (1953)
- 18) Barber, M.: *Adapt. in microorg.*, Cambridge, 235 (1953)
- 19) Cavalli, L. L. and Maccacaro, G. A.: *Nature*, **166**, 991 (1950)
- 20) 渡辺: *日本細菌学雑誌*, **10**, 231 (1955)
- 21) 金井: *日本細菌学雑誌*, **10**, 177 (1955)
- 22) Klein, M. and Kimmelman, L. J.: *J. Bact.*, **52**, 471 (1946)
- 23) Klein, M. and Schon, S. E.: *J. Bact.*, **65**, 454 (1953)
- 24) Newcombe, H. B. and Hawirko, R.: *J. Bact.*, **57**, 565 (1949)
- 25) Lederberg, J. and Lederberg, E. M.: *J. Bact.*, **63**, 399 (1952)
- 26) 牛場: *日本細菌学雑誌*, **9**, 349 (1954)
- 27) 秋葉: *細菌学の領域* (医学書院), 204 (1953)
- 28) 横田: *日本細菌学雑誌*, **10**, 261, 317, 419, 651 (1955)
- 29) 木村: *日本細菌学雑誌*, **11**, 199 (1956)
- 30) Lewis, I. M.: *J. Bact.*, **28**, 619 (1934)
- 31) 齊藤: *日本細菌学雑誌*, **3**, 24 (1948)
- 32) Deskowitz, M. W.: *J. Bact.*, **33**, 349 (1937)
- 33) 新沢: *岡山医学会雑誌*, **68**, 370, 381 (1956)
- 34) 切目: *仁泉医学雑誌*, **3**, 89 (1951)
- 35) Robinow, C. F.: *J. Hyg.*, **43**, 413 (1944)
- 36) Knaysi, G.: *J. Bact.*, **35**, 539 (1947)
- 37) Tatum, E. L. and Lederberg, J.: *J. Bact.*, **53**, 673 (1947)
- 38) Lederberg, J. and Tatum, E. L.: *Nature*, **158**, 558 (1946)
- 39) Steers, E. and Sevag, M. G.: *Archiv. Biochem.*, **24**, 129 (1949)
- 40) Sevag, M. G. and Steers, E.: *Archiv. Biochem.*, **24**, 144 (1949), **25**, 185 (1950)
- 41) Rosanoff, E. I. and Sevag, M. G.: *Antibiot. Chemoth.*, **3**, 495 (1953)
- 42) Oginsky, E. L. and Umbreit, W. W.: *J. Bact.*, **58**, 747 (1949), **59**, 29 (1950), **61**, 595 (1951), **66**, 74 (1953)
- 43) 代居: *日本細菌学雑誌*, **6**, 473 (1951)
- 44) Bellamy, W. D. and Klimek, J. W.: *J. Bact.*, **55**, 153 (1948)
- 45) Gale, E. F. and Rodwell, A. W.: *J. Bact.*, **55**, 161 (1948)
- 46) Pondi, A. and Dietz, C. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**, 843 (1943)
- 47) Spink, W. W.: *J. Lab. Clin. Med.*, **37**, 1 (1951)
- 48) Gilson, S. C. and Parker, R. F.: *J. Bact.*, **55**, 801 (1948)
- 49) 榊原: *Acta Scholae Med. Univ. in Kioto.*, **28**, 144 (1951)
- 50) Cohen, S. S.: *J. Biol. Chem.*, **168**, 511 (1947)
- 51) 日比野: *結核第29回総会号* (1954)
- 52) 小酒井: *細菌の薬剤耐性* (医学書院), 26 (1955)
- 53) 北中: *第60回岡山医学会総会にて発表* (1955)
- 54) Umbreit, W. W. et al.: *Manometric Techniques and Tissue Metabolism* (1949)
- 55) Kjeldahl, J.: *Zs. f. analyt. Chemie*, **22**, 336 (1883)

- 56) 藤井：生化学実験法（定量篇），P. 80.
- 57) Friedemann, T. E. and Haugen, G. E.: *J. Biol. Chem.*, **144**, 67 (1942), **147**, 415 (1943)
- 58) Quastel, J. H. and Webley, D. M.: *Biochem. J.*, **35**, 192 (1941)
- 59) M. Kunitz: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947)
- 60) Warburg, O.: *Biochem. Z.*, **177**, 471 (1926)
- 61) Warburg, O. and Negelein, E.: *Biochem. Z.*, **262**, 237 (1933)
- 62) D. Keilin. *Proc. Roy. Soc., London, B.* **121**, 165 (1936)
- 63) Stumpf, P. K. and Green, D. E.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 387 (1944)
- 64) Edson, N. L.: *Biochem. J.*, **41**, 145 (1947)
- 65) 山村：生化学, **25**, 321 (1953)
- 66) Cavallini, Frontali and Toschi: *Nature*, **163**, 568 (1948)
- 67) 江上他：標準生化学実験法, 文江堂, 395(1953)
- 68) 山田：日新医学, **38**, 35 (1951)
- 69) 中塚, 荒谷: *J. Antibiot.*, **4**, 141 (1950)
- 70) 萩原, 奥谷: 化学の領域, 南江堂, **20**, 159 (1955)
- 71) 真野: 岡山医学会雑誌, **65**, 1835 (1953)
- 72) Cori, G. T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **123**, 375 (1938)
- 73) Warburg, O. and Christian, W.: *Biochem. Z.*, **310**, 384 (1942)
- 74) Meyerhof, O. and Lohmann, K.: *Biochem. Z.*, **271**, 89 (1934)
- 75) Boyer, P. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, **149**, 529 (1943)
- 76) Kalnitsky, G. and Werkman, C. H.: *Arch. Biochem.*, **2**, 113 (1943)
- 77) Kalnitsky, G. and Werkman, C. H.: *Arch. Biochem.*, **4**, 25 (1943)
- 78) 赤沢: 岡山医学会雑誌, **66**, 1009 (1954)
- 79) 松浦: 岡山医学会雑誌, **68**, 153 (1956)
- 80) Alexander, H. E. and Leidy, G.: *J. Exp. Med.*, **97**, 467 (1953)
- 81) 木下: 日本細菌学雑誌, **10**, 463 (1955)
- 82) Smith, G. H. et al.: *J. Bact.*, **58**, 803 (1949)
- 83) Pickett, M. J. and Clifton, C. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **46**, 443 (1941)
- 84) Clifton, C. E.: *Advances in Enzym.*, **6**, 269 (1946)
- 85) Mickelson, M. N.: *J. Bact.*, **59**, 659 (1950)
- 86) Quastel, J. H. and Wheatley, A. H. M.: *Biochem. J.*, **25**, 117 (1931)
- 87) Randles, C. I. and Birkeland, J. M.: *J. Bact.*, **54**, 275 (1947)
- 88) Pardee, A. B. and Potter, V. R.: *J. Biol. Chem.*, **178**, 241 (1949)
- 89) Plaut, G. W. E. and Lardy, H. A.: *J. Biol. Chem.*, **180**, 13 (1949)
- 90) Evans, E. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **147**, 771 (1943)
- 91) Stumpf, P. K., Zarudnaya, K. and Green, D. E.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 817 (1947)
- 92) 奥貫: 化学の領域, **20**, 267 (1955)
- 93) P. Gerhardt et al.: *J. Bact.*, **65**, 581 (1953)
- 94) Stephenson, M.: *Biochem. J.*, **22**, 605 (1928)
- 95) Still, I. L.: *Biochem. J.*, **35**, 380 (1941)
- 96) Barron, E. S. G.: *J. Biol. Chem.*, **100**, 155 (1933)
- 97) Hahn, A. and Fischbach, E.: *Z. Biol.*, **94**, 58 (1933)
- 98) Adler, E. and Michaelis, M.: *Z. physiol. Chem.*, **235**, 154 (1935)
- 99) Green, D. E.: *Biochem. J.*, **30**, 1489 (1936)
- 100) Bach, S. J. and Dixon, M.: *Nature*, **149**, 48 (1942)
- 101) Clagett, C. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, **178**, 977 (1949)
- 102) Kaufman, S. I. et al.: *J. Biol. Chem.*, **192**, 301 (1951)

## Studies on the Metabolism of Bacteria by Cell-free Extract

## Report 2. On Bacillus Typhosa

By

Hajimu Kitanaka

Department of Microbiology Okayama University Medical School  
(Director : Prof. Sakae Murakami)

Using cell-free extracts prepared from such strains of *B. typhosa* as S-type strain, R-type strain, SM-resistant strain and CM-resistant strain, of S<sub>57</sub>, this experiment has been performed to determine enzymological properties of these extracts. The following are the results.

1. *Cell-free extracts prepared from these four strains of S<sub>57</sub> by grinding with emery powder* : These extracts prove to have respiratory activity on lactate, succinate, and fumarate.

2. Although four strains of S<sub>57</sub> do not show any marked difference in their respiratory activity on such oxidases as lactate, succinate, and fumarate, oxygen uptake per hour per mg of N in cell-free extract of R-type strain is greatest, followed by that of CM-resistant strain, S-type strain, and SM-resistant strain in the order mentioned.

3. Lactic oxidase contained in all these four extracts of S<sub>57</sub> has been verified to be an entirely different oxidase from that found in animal tissues, yeasts, and other bacteria.

4. The action of inhibitory agents, especially that of malonate, on resting bacteria differs markedly from the same on cellfree extracts ; and it is indicated that this phenomenon is possibly caused by permeability of cell membrane of bacteria.

---