

## 細菌無細胞液による物質代謝の研究

## 第 3 篇

## 赤 痢 菌

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 2 章 実験材料及び実験方法

## 第 3 章 実験成績

## 第 1 節 酵素活性能

## 第 2 節 阻害剤及び抗生物質の影響

## 第 3 節 金属イオン及び透析の影響

## 第 4 節 pH の影響及び代謝産物

## 第 5 節 アセトン乾燥菌

## 第 4 章 考 按

## 第 5 章 結 論

## 第 1 章 緒 言

化学療法が Paul Ehrlich (1904) により華々しく治療界に登場するに及んで早くも Frank and Roehl<sup>1)</sup> (1907) がその薬剤に対して強い抵抗性を有する *Trypanosoma* を報告し、その後薬剤の改善とそれらに対する耐性病原体との競争が続けられて来た。そして近時相次ぐ抗生物質のめざましい発見以来各臨床分野に於ける卓効とともに、その薬剤耐性の問題は特に注目を浴びる様になり、これに関する研究も多数に上つている<sup>2)-9)</sup>。

薬剤耐性も安定な遺伝性を持った 1 種の変異であるが、いかなる生物学的性状の変異が耐性成立の基礎となるのであろうか。この点の解明は困難な問題であり、現在の知識も又極めて乏しいが最近の生化学の進歩とともに薬剤耐性の機構を生化学的性状の変化を通じて解明しようとする試みが盛んに行われ、凡そ次の様な報告がなされている。

1) 菌体の薬剤結合性の減弱、即ち耐性菌の細胞膜の透過性が変化している場合 (Fischl<sup>10)</sup>, von Jancso<sup>11)</sup>, 石井<sup>12)</sup>)

2) 薬剤を不活性化する物質の菌体外分泌 (Abraham<sup>13)</sup>, Gilson and Parker<sup>14)</sup>, 桐原<sup>15)</sup>, Merckell<sup>16)</sup>)

3) 耐性菌に於て薬剤との拮抗物質の生産が原株より増加している場合 (Mac Leod<sup>17)</sup>, 山田<sup>18)</sup>)

4) 原株の発育素を耐性菌では必要としなくなる場合 (Sevag<sup>19)</sup>, Bellamy and Klimek<sup>20)</sup>, Gale

and Rodwell<sup>21)</sup>, 桑原<sup>22)</sup>, Sevag and Rosanoff<sup>23)</sup>, English and Mc Coy<sup>24)</sup>, 鶴谷<sup>25)</sup>)

5) 原株と主要な代謝系を異にする場合 (Mac Leod<sup>17)</sup>, 山田<sup>18)</sup>, Sevag<sup>19)</sup>, Rosanoff and Sevag<sup>27)</sup>, Geiger<sup>28)</sup>, Umbreit<sup>29)</sup>)

6) 耐性菌では阻害される酵素系が原株より大量に作られる場合 (Wysa<sup>30)</sup>)

以上の様な事実乃至可能性が考えられるが、この内いずれが菌の耐性獲得の主役を演ずるかは依然わからず、又薬剤の相異、病原体の種類及び菌株によつても著しい差のあることも一層この機作解明を複雑にしている。

筆者も既に第 2 篇に於て腸チフス菌の S 型株・R 型株・SM 耐性株・CM 耐性株、夫々の無細胞粗酵素液を主に用いて、その代謝面から種々考察を加え二三の知見を得たのであるが、今回赤痢菌に就いて第 2 篇同様その無細胞粗酵素液並びにアセトン乾燥菌を用い、赤痢菌の物質代謝を酵素化学的に探究し、併せて薬剤耐性との関連性を窺わんとして本実験を行った。

## 第 2 章 実験材料及び実験方法

教室保存の赤痢菌 Sh. flexneri II の SM 感受性菌及び SM 耐性菌 (200 mg/cc) の 2 種を用う。この何れも 37°C, 18 時間 普通寒天平板培養したものを、前報<sup>31)</sup> 腸チフス菌の場合と同様に氷冷下金剛砂磨砕法<sup>32)</sup> により無細胞粗酵素液を抽出し実験

に供した。尚耐性菌株獲得には広く用いられる増量の継代法<sup>33)</sup>によつた。又耐性菌株培養には上述普通寒天に ca 100mg/cc の SM を混入した。又アセトン乾燥菌も用に臨んで使用したが、その作製は現在の細菌アミノ酸 decarboxylase の知見の大部分をこれを用いて研究した Gale<sup>34)</sup>、<sup>35)</sup>、<sup>36)</sup>の方法によつた。

呼吸量測定・Warburg 検圧計を使用し Umbreit の常法<sup>37)</sup>に従つて酸素消費量並びに炭酸ガス発生量を測定した。

窒素量測定：Mikrokjeldahl 法<sup>38)</sup>、<sup>39)</sup>によつた。

NH<sub>3</sub> の定量：アンモニアを次亜臭素酸塩で窒素ガスに酸化しこれを検圧する方法<sup>40)</sup>、<sup>41)</sup>、<sup>42)</sup>を用いた。

pyruvate の定量：Friedemann and Haugen 法<sup>43)</sup>による。

揮発性酸の検出<sup>44)</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。

paper-chromatography<sup>45)</sup>：pyruvate の同定<sup>42)</sup>、glycine の検出、glycine の分解生成物の同定<sup>42)</sup>等 に本法を用う。濾紙は東洋濾紙 No. 50、展開剤は n-butanol (3%アンモニア水飽和)、n-butanol・etanol・水 (4:1:4) を pyruvate、glycine 分解生成物に、n-butanol・acetic acid・水 (4:1:2) を glycine に用う。発色は前者には飽和 NaOH で、後者は ninhydrine 反応によつた。

### 第3章 実験成績

#### 第1節 酵素活性能

まづ炭水化物5種、有機酸9種、アミノ酸4種につき予め休止菌でその何れに対しても活性を有することを確かめた後、粗酵素液の活性を検したが第1表の如く非耐性・耐性両菌株とも相似た傾向、即ち lactate・succinate・glycine の3種には高度の活性を示し、fumarate・asparate に極く微かの活性が見られた。残りの不活性基質につきその後種々抽出条件を変え、又補酵素・金属イオン等賦活因子を加える等努力を重ねたが遂に活性の出現は認められなかつた。即ちこれらは腸チフス菌の場合と同じく無細胞液抽出の操作により酵素蛋白の変性、不活性を来すか、或はその Co-factor 系の失調又は損失に由来するものと推察し、爾後の実験にはこの顕著な活性の見られた lactate・succinate・glycine の3種を専ら使用し、その性状の解明に努めた。

この3基質の酵素活性能を両菌株につき単位全窒素量即ち 1mg 当りの1時間酸素消費量で比較して

第1表 Sh. flexneri II の酸素消費量  
( $\mu$ l/90 min.)

	休止菌 (3 mgw. w.)		無細胞液	
	非耐性株	SM-耐性株	非耐性株	SM-耐性株
glucose	98.3	106.1	5.5	5.9
mannose	96.0	101.3	5.2	6.1
galactose	68.9	73.0	6.1	6.4
maltose	17.8	19.9	2.6	3.3
dextrine	71.9	77.4	3.2	3.4
citrate	12.4	13.0	5.8	5.8
acetate	58.1	59.2	5.8	6.0
lactate	223.2	240.4	229.3	248.2
pyruvate	126.4	139.8	9.1	7.4
succinate	198.7	209.1	175.5	188.6
malonate	11.4	12.6	1.8	2.2
malate	189.6	198.0	4.5	4.8
fumarate	116.8	124.7	11.4	12.6
$\alpha$ -ketoglutarate	34.8	37.0	1.5	1.6
glutamate	33.2	36.1	6.3	7.1
asparate	79.7	90.2	14.1	14.7
glycine	26.3	29.0	43.5	52.1
alanine	45.4	46.8	8.7	8.8
Endog. Resp.	10.0	10.8	8.3	8.5

みた処第2表に示す如く lactate・succinate・glycine の3基質ともに耐性株に酸素消費量の増加が認められ、腸チフス菌の場合をも考慮に入れれば耐性獲得とともに酵素能の量的亢進の傾向が推測される。

第2表 Sh. flexneri II の酵素活性能  
(O<sub>2</sub>-uptake :  $\mu$ l/60 min. /mgN)

	非耐性株	SM-耐性株
lactate	65.0	89.3
succinate	42.4	57.4
glycine	17.6	25.3
Endog. Resp.	3.7	3.8

#### 第2節 阻害剤及び抗生物質の影響

阻害剤の中にはその阻害機作が判明しないものも多いが、種々の阻害剤を使い分けることにより或る基質の分解過程にどの様な酵素系が関与しているか或る程度迄の推測が可能なることは生化学乃至酵素化学の歴史が証明している処である。この種阻害剤には種々のものが用いられ、KCN の如き簡単な物質から Streptomycin, Chloromycetin 等の抗生物質に至る迄この範疇に入れられる。筆者も KCN・NaNO<sub>2</sub>

NaF・CuSO<sub>4</sub>・AgNO<sub>3</sub> 及び SM・CM を用いその両菌株粗酵素液による lactate・succinate・glycine 3 基質に及ぼす影響を比較検討してみたが、SM・CM を除く他の阻害剤に就いては両菌株間に著差なく第3表のたき殆ど同じ態度を示した。

第3表 阻害剤及び抗生物質の影響

	終末濃度	阻 害 率 (%)		
		lactate	succinate	glycine
Sod. cyanide	10 <sup>-3</sup> M	25.5	14.0	+20.1
" "	10 <sup>-2</sup> M	61.4	59.3	0
Sod. azide	10 <sup>-3</sup> M	40.8	69.8	8.7
Sod. fluoride	10 <sup>-2</sup> M	6.7	20.6	6.4
Silver nitrate	10 <sup>-3</sup> M	20.2	21.3	77.1
Cupric sulfate	10 <sup>-3</sup> M	31.0	21.9	83.2
Streptomycin	10 <sup>-3</sup> M	+17.2	+17.5	9.3
" "	10 <sup>-3</sup> M	(0)	(+5.4)	(2.7)
Chloromycetin	10 <sup>-3</sup> M	8.1	6.7	7.3
" "	10 <sup>-3</sup> M	(2.0)	(6.3)	(6.1)

( ) : SM-耐性菌。

含鉄酵素即ちチトクローム系酵素の阻害剤とされるKCK<sup>(46)</sup>・NaN<sub>3</sub><sup>(47)</sup> は lactate・succinate に於て相当の阻害度を示す反面 glycine に対しては殆ど影響が認められない。又 Stumpf and Green<sup>(49)</sup> によりフラビン系酵素の阻害剤<sup>(50)</sup>と目されるCuSO<sub>4</sub>・AgNO<sub>3</sub> は lactate に軽度のそして glycine には高度の阻害を与えている。この両者の阻害傾向のみによる即断は勿論危険であろうが lactate・succinate 殊に前者は腸チフス菌の場合と異り通常広く認められているチトクローム系に属する酸化酵素、glycine も又従来知られるフラビン酵素の1特性を示しているものと見ていゝであろう。尚 NaF は何れに対しても著しい影響を及ぼさなかつた。次に SM は両菌株間に若干の差を示した。即ち非耐性株では lactate・succinate に対し少々促進的に働くのに比し、SM 耐性株では殆ど無影響、又 glycine での僅かな阻害が耐性株では殆ど消失している。然しこの差も僅かであり而も SM が促進的に働いている点耐性の本質には余り関係しない様に見える。一方 CM の影響は両菌株の全基質に就いて僅かの酸化阻害作用が認められるがその阻害力は極めて小さい様であり、少くともこの3基質酸化酵素に CM は直接には殆ど作用しないものの様に推測される。

第3節 金属イオン及び透析の影響

二価金属イオンの酵素能に対する賦活作用<sup>(51)-(56)</sup>

については既に前篇で詳述したが、本菌に就いても 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種を用い各粗酵素に対する作用を検した。その結果 SM 耐性、非耐性両菌株の態度には差が認められず

第4表 金属イオンの影響

(O<sub>2</sub>-uptake : μl/90min.)

	lactate	succinate	glycine
無添加	243.2	157.0	39.6
Fe <sup>++</sup>	267.0	179.3	45.6
Mg <sup>++</sup>	261.3	166.2	45.5
Mn <sup>++</sup>	256.3	169.8	73.8

何れも Endog. Resp. で修正した値。

第4表に記す如く3金属イオンともに呼吸促進作用を示し、lactate・succinate に就いては腸チフス菌の場合同様 Fe<sup>++</sup> の促進作用最も強く、lactate では Fe<sup>++</sup>・Mg<sup>++</sup>・Mn<sup>++</sup> の順であつたが腸チフス菌よりは賦活力が弱い様である。又 glycine に於ても3金属イオンの呼吸促進作用が認められるが特に Mn<sup>++</sup> が86%の高促進率を示すことは注目される。

次に本粗酵素液を0°C で1昼夜蒸溜水に対して透析を行いその安定度を検してみたが、耐性・非耐性両菌の差はこゝでも認められず、第5表に示す如く lactate・succinate は約25%の活性度低下を来し、これら酸化酵素蛋白の安定性又は補欠因子群との結合が弱くなつている様である。これらに金属イオン、透析外液等を添加することによりその復活を期待し

第5表 透析の影響 (O<sub>2</sub>-uptake : μl/90 min.)

	lactate	succinate	glycine
非透析	235.5	149.5	35.5
透析	176.7	109.8	32.2
+透析外液	174.9	109.9	35.1
+Fe <sup>++</sup>	194.3	120.7	36.0
+Mg <sup>++</sup>	177.1	110.0	33.8
+Mn <sup>++</sup>	175.9	114.6	70.6

たが Fe<sup>++</sup> により約15%の失活度の所迄復活し得た以外にはそれらの効果は極めて薄い様である。然し glycine の場合殆どその失活が表われず、而も先に注目した Mn<sup>++</sup> により本実験の場合にも約2倍の活性度上昇を見たことはいよいよ Mn<sup>++</sup> 対 glycine 酸化酵素の密接な関連性が窺われる。

第4節 pH の影響及び代謝産物

M/25 磷酸緩衝液を用い pH を 4.5~8.3 に変え、

粗酵素液の lactate・succinate・glycine 3 基質に対する酸素消費量への影響とともに、その代謝経路推定の一助として炭酸ガス発生量を検し、又 glycine については NH<sub>3</sub> 生成量を同時に計測し第 6 表に示したが耐性・非耐性両菌株とも略々相似た成績を得た。即ち lactate・succinate・glycine 3 基質とも

第 6 表 pH の影響 (120分値)

	pH	O <sub>2</sub> -uptake		NH <sub>3</sub>
		CO <sub>2</sub> -output		
lactate	4.5	270.4 μl	0 μl	μl
	7.2	309.5	0	
	8.3	280.0	0	
succinate	4.5	141.3	0	
	7.2	175.5	0	
	8.3	171.7	0	
glycine	4.5	27.6	14.3	0
	7.2	117.0	0	31.6
	8.3	104.5	0	50.7

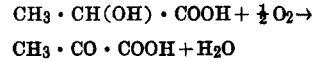
に opt. pH は 7.2 前後にあるが、酸性に傾くと succinate 酸化は相当低下するがアルカリ側には比較的影響されない様であり lactate は酸・アルカリ両側ともに僅かの活性低下しか見られず相当広い活性 pH 域を持つもの様である。又 glycine に関しては酸性側で著明に酸素消費が減る一方炭酸ガス発生傾向が認められ、アルカリ側では pH 7.2 の場合と大差なく而も NH<sub>3</sub> 生成量が中性の場合に比し増加していることは Gale らにより広汎に研究されている<sup>57)・62)</sup> 一般アミノ酸の分解過程が培地 pH 又周囲環境により異なる如く、即ち中性又はアルカリ性培地で細胞が生長の場合には脱アミノが起り、酸性の環境では脱炭酸によりアミノ酸分解が起るのに稍々似た傾向を示しているものと推察した。然しこれのみを以て既に知られている lysine・arginine・ornithine・glutamic acid・histidine・tyrosine 6 アミノ酸脱炭酸機能と同一に論ずるのは早計であろうが、かく pH の差により酸化的脱アミノと脱炭酸の両作用の濃淡が認められていることは興味のある問題と考える。尚 succinate・lactate の両者ともこの pH 域にては CO<sub>2</sub> 発生は認められなかつた。

次に終末濃度 M/1000 の lactate・glycine につき約 210 分~240 分酸素消費の認められなくなる迄振盪測定後、除蛋白しその上清を前者では Friedemann-Haugen 法により定量し、それが pyruvate であることの同定並に後者の生成物の同定を第 2 章で述べ

た如く paperchromatography により行つた。その結果第 7 表に示す如く lactate は非耐性・耐性両菌

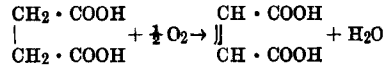
第 7 表 代謝産物及び代謝経路

(1) lactate :

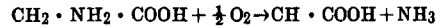


	O <sub>2</sub> -uptake (μl)		pyruvate (mg)	
	理論値	実験値	理論値	実験値
非耐性株	336	336	4.4	4.2
SM 耐性株	336	309	4.4	4.1

(2) succinate :



(3) glycine :



	O <sub>2</sub> -uptake (μl)		NH <sub>3</sub> (μl)	
	理論値	実験値	理論値	実験値
非耐性株	336	258	672	98.4
SM 耐性株	336	244	672	90.6

株とも酸素消費量、pyruvate 生成量ともに (1) 式の理論値に殆ど一致し化学量論的に完全に分解してしまうことを知り、又 Edson<sup>63)</sup>・山村<sup>50)</sup> らの発見せる酢酸に向う乳酸々化酵素も存在することが知られているので、この上清につき酢酸の検出にも努めたが認められず結局 (1) 式に従い本粗酵素液により lactate から pyruvate への one-step のみの代謝が行われることを確認した。

succinate に就いては確実な定量法もなく施行し得なかつたが恐らく一般 succinate 酸化酵素の如く fumarate へ酸化反応が進んでいるものと思う。

最後に glycine に就いては (3) 式の酸素消費量は理論値の約 1/2 となり、而も paperchromatography で glycine の既に消失してつたこと並に分解産物として glyoxylic acid の生成されたことを確認し、又理論値には及ばなかつたが NH<sub>3</sub> の可成の発生も認められることより、Ratner 及び Green<sup>64)</sup> が豚の腎臓中に発見したものや、Janke<sup>65)</sup> により僅かに数種の細菌 (Ps. fluorescens, Bac. mycoides, Bac. vulgare, Bac. coli) で認められたものと同様本菌粗酵素によつても glycine は (3) 式に従い、酸化的脱アミノ反応を受けることが推測さ

れる。

#### 第5節 アセトン乾燥菌

以上述べた如く本赤痢菌 *Sh. flexneri* II の金剛砂磨砕法による無細胞抽出液中に *glycine oxidase* の存在することは明らかで、前篇腸チフス菌の場合には見られなかつたことで、この点に着目し Gale らがアミノ酸脱炭酸酵素抽出に用いたのを始め他の種々酵素抽出にも広く利用されるアセトン乾燥法により、他のアミノ酸に対する酸化能並びに菌体表面構造等を探してみた。尚非耐性菌のみを使用した。

まづアミノ酸12種その他の基質6種につきその酸素消費量を休止菌 (5mg w. w.) 及びアセトン乾燥菌 (10mg d. w.) とで測定し第8表とした。これに

第8表 *Sh. flexneri* II のアセトン乾燥菌の呼吸 ( $O_2$ -uptake:  $\mu$ l/60 min.)

	休 止 菌 (5 mgw. w.)	アセトン乾燥菌 (10 mgd. w.)
glucose	91.4	0
pyruvate	115.2	0
lactate	182.5	65.3
succinate	138.0	52.5
fumarate	87.9	0
malonate	10.8	0
glutamate	23.7	0
asparate	59.5	5.2
glycine	27.4	27.1
alanine	43.2	0
cystine	11.9	0
valine	5.5	0
leucine	4.1	0
isoleucine	5.0	0
phenylalanine	8.9	0
arginine	8.6	0
histidine	4.6	0
tyrosine	4.2	0
Endog. Resp.	9.2	3.3

よると7種のアミノ酸は休止菌にても既に酸化は認められぬが、アミノ酸の菌体内透入速度は細菌により又基質により可成の差がある様であり見掛けの酸素消費量のみでその酸化能の真の大きさの決定は早計であり、アセトン乾燥菌に就いても検したがこれら7種のアミノ酸のみならず、*glycine* 以外のアミノ酸には *asparate* に極めて僅かの酸素消費が見られたに過ぎず、操作中に補欠作用族の欠損も考えられるので金属イオン・Yeast-extracts (10%, 1時

間煮出) を添加する等努力を重ねたが矢張磨砕法同様 *lactate*・*succinate*・*glycine* の3基質以外には酸化能が認められず、酵素蛋白の絶対量の不足も考えられ、抽出法の改善、補欠作用族の解明等とともに将来の研究に待たなければならない結果であつた。

次によく知られた *succinate* に対する *malonate* の阻害が腸チフス菌の場合休止菌では見られず無細胞状態にして始めて表われることを知り前篇に於てその細胞膜透過性との関係を論じたが本菌に就いても此の問題を追究してみた。まづ休止菌を用い *succinate* 酸化に対する *malonate* の態度を見たが第9表の如く全然阻害作用は表われなかつたが磨砕法による無細胞液では明らかに阻害が認められ本菌に於ても細胞膜透過性が *succinate* に対する *malonate* 阻害作用に何らかの影響を与えているこ

第9表 コハク酸々化に及ぼすマロン酸の影響

	休 止 菌	無細胞液	アセトン乾燥菌
<i>succinate</i>	198.7 $\mu$ l	175.5 $\mu$ l	52.5 $\mu$ l
+10 <sup>-3</sup> M. malon.	197.0	17.7	4.3

とが推測され、更に菌体の表面構造を変性せしめたアセトン乾燥菌に於ても本阻害が立派に証明されることより、既に発表されている奥貫<sup>66)</sup> らの大腸菌・鳥型結核菌、Gerhaardt ら<sup>67)</sup> の *Achromobacter* sp. (UH3) と並んで前篇の腸チフス菌 *S<sub>87</sub>*, そしてこの赤痢菌 *Sh. flexneri* II の *succinate* 酸化酵素系に対する *malonate* 阻害が細胞膜透過性に由来してその様相が変る事実を知り得た。

#### 第4章 考 按

以上述べた如く第2篇腸チフス菌について今回は赤痢菌 *Sh. flexneri* II を用いて金剛砂磨砕法による無細胞抽出液を主に使用し同菌の SM 耐性株と非耐性株の酵素学的性状を種々検討した。

両菌株とも無細胞抽出液中には *lactate*・*succinate*・*glycine* 3酸化酵素を含有して居り、この酵素能を現在最も信用のおけるとされる<sup>68)</sup> 単位全窒素量当りの酸素消費量の1時間値で両菌株につき比較したが(第2表)、3基質とも耐性株に酸素消費量増加が認められた。耐性菌の呼吸量に関しては比較的報告も少く、少々増加<sup>18)</sup> 或は減少<sup>27)69)70)</sup> となす説、基質により増加又は減少する報告<sup>15)20)21)</sup> 等実験者により一致した成績は得られて居ず、筆者の腸チフス菌の場合<sup>31)</sup> も CM 耐性株では増加し、SM 耐性

株では原株よりわずかに酵素能低下が認められ、結局薬剤・菌種・基質の相異によりその態度も異なる様で抽出し得なかつた基質に関しては速断出来ないが、少なくともこの3基質の酸化酵素能はSM耐性株では増加して居る事実より、未だ明確な耐性機構の知られていない今日これら耐性菌性状の断面が数多く集積されて行き、それらを通覧することにより一貫した耐性解析の律序解明に近づく上にこれら

事実の意義を見出したい。尚両菌株間の3酸化酵素の質的差は阻害剤・抗生物質・金属イオン・透析・pH等による影響並びに代謝産物を通じての観察では有意の顕著な差は認められず、酵素自体の質的变化はなく飽く迄も耐性ととも量的变化として表われるものと推測した。

次に各酸化酵素の性状を若干検してみたがその結果の概略を第10表に示した。lactateに就いては從

第10表 Sh. flexneri II より抽出の粗酵素性状

	lactate	succinate	glycine
抽出方法	磨 碎 法	磨 碎 法	磨 碎 法
加温(50°C, 10分)	安 定	安 定	不 安 定
透 析	- 25%	- 25%	±
opt pH	7.2	7.2	7.2
金属イオン	Fe <sup>++</sup> >Mg <sup>++</sup> >Mn <sup>++</sup>	Fe <sup>++</sup> >Mn <sup>++</sup> >Mg <sup>++</sup>	Mn <sup>++</sup> >Fe <sup>++</sup> ≥Mg
KCN・NaN <sub>3</sub>	阻 害	阻 害	±
NaF	±	±	±
AgNO <sub>3</sub> ・CuSO <sub>4</sub>	- 20%	- 20%	- 80%
SM	+ 17%	+ 17%	±
CM	±	±	±
チトクローム C	+ 30%	+ 24%	±
イースト抽出液	±	±	+ 22%
代謝産物	pyruvate	(fumarate)	glyoxylic acid
10,000 r. p. m.	100	100	100
15,000 r. p. m.	61.4	50.3	78.0
20,000 r. p. m.	38.0	34.3	48.2
40,000 r. p. m.	4.8	7.6	24.1

来から広く動植物界で知られた<sup>71)-79)</sup>チトクローム系を通り pyruvate に向う酸化酵素に対し、最近 Edson<sup>63)</sup>・山村<sup>60)</sup>らが鳥型結核菌でフラビン系を通り pyruvate 又は acetate に向う新酸化酵素を発見して注目を浴びているが、筆者も先に腸チフス菌 S<sub>57</sub> に於て全くチトクローム系には不関性を示しむしろフラビン系に由来すると思われる諸性状を備えた新乳酸々化酵素を發表<sup>31)</sup>したが、本菌にては Warburg<sup>47)</sup>、Warburg 及び Negelein<sup>48)</sup>等によりチトクローム系含鉄酵素の阻害剤として知られた KCN、同じく Clifton らの云う oxidative phosphorylation の阻害剤<sup>80)81)</sup>であるとともに含鉄酵素をも特異的に阻害<sup>46)</sup>すると云われる NaN<sub>3</sub>を用いた場合矢張相当の阻害を受けるに反し腸チフス菌では著しい阻害の見られたフラビン系酵素毒とされる AgNO<sub>3</sub>・CuSO<sub>4</sub><sup>49)50)</sup>で余り影響を受けず、代謝産物としては pyruvate を而も完全に化学量

論的に一致した実験値で生成し酸素消費量も又これに伴う成績を得た点腸チフス菌の場合と異りチトクローム系通過の一般に存在する乳酸々化酵素類の酵素を本菌は有するものと思われ、フラビン系に促進的に働くことされる Yeast-extracts により全く影響されず、cytochrome C による促進効果、耐熱性等それを裏書きする事象の認められるとともに益々その推定を深くした。尚透析によつて約25%の活性低下を見たことは賦活因子群との結合状態が腸チフス菌とは異り稍々疎なるためか、又抽出操作により失活を来し易い酵素蛋白の脆弱性に基くものか詳かでないが透析外液・金属イオン就中 Fe<sup>++</sup> で約10%の活性回復しか得られぬ点よりこれら両因子の夫々に起因するためと考えるが、これらは矢張各菌固有の酵索性状なのであろう。又 SM・CM 両抗生物質の影響は CM には見られなかつたが SM に約17%の促進作用が認められ、SM 耐性菌株には全然

影響の見られなかつた点より, Umbreit<sup>29,32)</sup> らの云う T. C. A. cycle 上への SM 作用の何らかの陰影を暗示しているのかも知れないが, これのみを以つては遺憾乍ら何れとも論断出来なかつた。尚アセトン処理によつても lactate に強い酸化能を有するアセトン乾燥菌が得られ, これに就いての性質も無細胞粗酵素液同様追究したが山村<sup>50)</sup> の鳥型結核菌の場合の如き異つた抽出法により性状の異つた乳酸々化酵素は得られず全く無細胞抽出液中に含まれる粗酵素と同質の乳酸々化酵素であると思われる。

TCA cycle のメンバーとして重視されている succinate 酸化酵素系は succinate を脱水素して fumarate にする脱水素酵素と, 脱離した水素を酸化する酸化系とより成り広く動植物界に見出されているが, いづれの場合もこの脱水素酵素系と酸化酵素系とが緊密に結合しているのみならず, その結合物が更に細胞の不溶性構成成分と結合しているので抽出純化の困難なもので現在でも succinate 酸化酵素系として抽出し実験に供されている。細菌に就いては比較的大腸菌に就き研究<sup>83)</sup> が進められて居り, 菌塊を磨砕又は超音波により菌細胞を破壊後遠心沈澱しその沈澱部分より succinate 酸化酵素系が得られて居り, その上清部分には極めて僅かしか含有されていないとされているが, 筆者の場合は専らこの上清中より而も相当高活性の succinate 酸化酵素が得られた。これは抽出に常用している遠心沈澱回転数 (10,000 rpm) を更に増すに従い各上清の酵素活性度は漸次低下し 20,000 rpm で約50%の活性度となり, 40,000rpm では殆ど痕跡的となつて了うこと (第10表) より, 常用回転数の上清中には破壊菌体顆粒の大部分が尚残存し, それと結合した succinate 酸化酵素系が作用を発揮しているものと考えられる。

succinate 酸化酵素系からチトクローム系への反応形式に関しては未詳の処も多く近年 Keilin and Hartree<sup>84)</sup>, Slater<sup>85)</sup>, Neufeld ら<sup>86)</sup>により研究が進められて居るが, チトクローム系を通ることは略々確実で本菌 succinate 酸化酵素系に於ても阻害実験, Yeast-extracts により促進されず, cytochrome C により促進される等の点よりその酸化過程に於てチトクローム系と極めて密接な関連性を有するものと推測される。酵素作用上に於ける金属イオンの持つ意義<sup>51)-56)</sup> の重大さに関しても, 前篇で述べたが, 本粗酵素系に於ても二価金属イオン就中 Fe<sup>++</sup> に顕著な賦活作用の認められる事実はいよいよこの推測

を深くした。この酸化作用には一般に助酵素は不要とされ本実験に於ても見掛け上直接基質に働きかける様だが将来更に純化が進められるなら既知の助酵素以外の要因を要求するものであるかも知れぬ。尚この代謝産物は確認出来なかつたのであく迄推定の域を出ないが一般 succinate 酸化酵素同様恐らく fumarate へ向うものと思う。

以上の諸性状に加えて特に注意をひいたのは malonate 阻害の態度であつた。凡そ malonate は succinate と同族列に位し succinate 酸化酵素には強い親和力を示し所謂基質酵素結合物を作ることにより succinate 酸化を阻害するのであり, 厳密には本酵素にのみ特異的とは云い難い (oxalacetate decarboxylase も阻害される)<sup>87,88)</sup> が多くの場合この阻害があれば succinate 酸化酵素系が関係しているとみなされている。然し乍ら先に腸チフス菌 S57 で見られたと同様, 本菌に於ても休止菌酸化の場合には全然この阻害が認められず (第9表) 無細胞抽出液にして始めてこの阻害が表われたことより菌体細胞膜の透過性を無視することは出来ず, 菌体細胞膜を変性せしめる手段としてアセトン乾燥菌を作り, これにて実験を行つた処矢張 malonate 阻害を証明し得た。奥貫らは大腸菌<sup>66)</sup> に於て同様の事実を認め又鳥型結核菌<sup>66)</sup>, Achromobacter sp. (UH3)<sup>67)</sup> に就いての報告もあるが前者は原形質膜の malonate 非透過性に原因を求め, 後二者は Pseudomonas aeruginosa<sup>89)</sup>, Pseudomonas fluorescens<sup>90)</sup>, 鯉<sup>91)</sup> で認められた malonate decarboxylase と類似の malonate 分解酵素に起因すると述べている。翻つて筆者の場合は malonate 添加によつても脱炭酸は見られず, 又 malonate decarboxylase が SM により阻害を受けることより, SM を添加した実験に於ても別に成績は変わらず而もアセトン処理により菌体表面構造を変え, 透過性を高めた状態にても典型的 malonate 阻害が認められること等より, malonate 分解酵素の完全な否定も出来ぬが本菌にあつては矢張 succinate 酸化酵素系の存在する場迄 malonate は細胞膜透過性の制約を受けて到達出来ぬとする考えの方が可能性が強い様に思える。

最後に glycine 酸化酵素系に就いてであるが, 古くは Dakin<sup>92)</sup>, Bach<sup>93)</sup> により glycine から NH<sub>3</sub>·glyoxylic acid・尿素等々の分解が発表され, 近年 Isotope の導入により Olsen ら<sup>94)</sup> は C<sup>13</sup> を用い, 又 Ratner ら<sup>95)</sup> は N<sup>15</sup> を用いての研究によりこの代謝分解過程も大分明らかになつてゐる。細菌に

については Janke<sup>65)</sup> らは *Ps. fluorescens*, *Bac. mycoides*, *Bac. coli*, *Bac. vulgare* につき本酸化酵素を發表しているが、幸い赤痢菌 *Sh. flexneri* II に於ても glycine 酸化酵素を粗酵素液として抽出し得たので、その性状を検討してみたのであるが lactate・succinate の場合と異り KCN・NaN<sub>3</sub> 等チトクローム系阻害剤、又 NaF によつても全く阻害を受けないことは Ratner, Nocito 及び Green<sup>64)</sup> らにより1944年豚の腎臓より抽出された酵素と同じ様である。反之フラビン系阻害剤と目される AgNO<sub>3</sub>・CuSO<sub>4</sub> に対しては高度の阻害を受け、又 Yeast-extracts の促進効果よりみて Ratner の酵素同様フラビン系酵素に属するものと思われ、助酵素も又従つて彼の云う如く FAD であろうと思われる。透析によつても比較的安定であり且つ金属イオン就中 Mn<sup>++</sup> による顕著な賦活作用が認められたことは機作は未詳乍ら興味のある事象であると思う。

pH の活性域は lactate・succinate に比し、比較的狭小の様で opt. pH は7.2前後にあり、Ratner の云う如く酸性に傾くと極度に酸化能の低下を来し約 1/4~1/5 となつたが脱炭酸の傾向が認められ、又アルカリ側では脱アミノ機能が旺盛に見られた。Gale ら<sup>57)-62)</sup> はアミノ酸代謝にて中性又はアルカリ性環境では脱アミノ機能亢進し、酸性条件では脱炭酸が起ると述べている。

代謝産物は化学量論的理論値には粗酵素なるためか完全に一致しなかつたが、細菌<sup>65)</sup> (*Ps. fluorescens*・*Bac. mycoides*・*Bac. vulgare*・*Bac. coli*) や動物組織<sup>64)</sup> の glycine 酸化酵素同様本酵素により glycine が酸化的脱アミノ作用を受け NH<sub>3</sub> 並びに glyoxylic acid が生成されることを認めた。

以上の如く赤痢菌 *Sh. flexneri* II より抽出し得た3酸化酵素の耐性との関係に触れつゝ各酵素の性状に検討を加え、細菌の種類によつては菌体内への基質の透入速度に差がありそれが限定要因となる時見かけの酸素消費量のみでその細菌の酸化能の真の大きさを決定出来ないのので菌体表面の状態を変化させ基質の透入を容易にするためアセトン乾燥菌を用

いてアミノ酸を中心に未抽出酵素の検出に努めたが、遺憾乍らこれら基質に就いては所期の酸化能が得られなかつた。

## 第5章 結 論

前篇腸チフス菌について今回は赤痢菌 *Sh. flexneri* II を用いて、金剛砂磨砕法による無細胞抽出液及びアセトン乾燥菌を主に使用し、その SM 耐性株と非耐性株とを代謝的変異の面から眺め、酵素学的性状に種々検討を加え下記知見を得た。

1) 金剛砂磨砕法により *Sh. flexneri* II の乳酸・コハク酸・グリシン各酸化酵素を含有する無細胞液を抽出し得た。又アセトン乾燥菌にてもこの3酸化酵素が得られ、この両酸化酵素の性状は全く同一のものであつた。

2) *Sh. flexneri* II の SM 耐性株、非耐性株間にこれら3酸化酵素の性状の差は認められなかつたが全窒素量1mg 当りの酵素活性度は耐性株に強く量的に酵素の差を認めた。

3) 本菌の乳酸・コハク酸々化酵素は従来知られた動植物組織、細菌類のそれとよく似た性状を持つことを確認した。

4) グリシン酸化酵素は動物組織・数種の細菌でしか抽出に成功していないが、本菌で抽出し得たものはこれらと略々似た性状即ちチトクローム系阻害剤では全く阻害を受けず、比較的狭小な pH 活性域を有し、酸化的脱アミノによりグリシンからグリオキシン酸を生成するフラビン酵素なることを証明した。

5) コハク酸に対するマロン酸阻害が休止菌では全く認められず、アセトン乾燥菌・無細胞液に於て完全に起ることより細胞膜透過性に起因する可能性を確実にした。

本論文の要旨は第66回岡山医学会総会にて発表した。

閣筆するに当り御指導御校閲を賜つた村上教授に深甚の謝意を表するとともに、種々御便宜御厚意に預つた教室員各位に心から御礼申し上げる次第であります。

## 参 考 文 献

- 1) Frank and Roel Ber. Klin. Wschr., 44, 233 (1907)
- 2) Demerec, M. Proc. Nat. Acad. Sci., 31, 15 (1945)
- 3) Newcombe, H. B. and Hawirko, R.: J. Bact., 57, 565 (1949)
- 4) Klein, M. and Schon, S. E.: J. Bact., 63, 399 (1953)



- 5) 牛場：日本細菌学会雑誌，9，349 (1954)
- 6) Hinshelwood：The chem. kinetics of the bacterial cell, Oxford (1946)
- 7) 秋葉：医学のあゆみ，13，250 (1952)
- 8) Linz, R.: Ann. Inst. Past., 78, 105 (1950)
- 9) Dubos, R. J.: Bacterial Cell, Harvard Univ. Press (1945)
- 10) V. Fischl and L. Fischl: Z. Imm. forsch., 83, 324 (1934)
- 11) N. H. von Jancso: Z. Imm. forsch., 88, 275 (1936)
- 12) 石井：日本細菌学会雑誌，5，259 (1950)，7，103 (1952)
- 13) Abraham, E. et al.: Nature, 146, 837(1940)
- 14) Gilson, S. C. and Parker, R. F.: J. Bact., 55, 801 (1948)
- 15) 神原：Acta Scholae Med. Univ. in Kioto, 28, 144 (1951)
- 16) Merkel, J. R. and Steers, E.: J. Bact., 66, 389 (1953)
- 17) MacLeod: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41, 215 (1939)
- 18) 山田：日新医学，38，35 (1951)
- 19) Sevag, M. G.: J. Bact., 47, 450, 48, 615 (1944), Advance in Enz. 6, 39 (1946)
- 20) Bellamy, W. D. and Klimek, J. W.: J. Bact., 55, 147 (1948)
- 21) Gale, E. F. and Rodwell, A. W.: J. Bact., 55, 161 (1948)
- 22) 桑原：衛生試験所報告，71，97 (1953)
- 23) Sevag, M. G. and Rosanoff, E. I.: J. Bact., 63, 243 (1952)
- 24) English, A. R. and McCoy, E.: J. Bact., 62, 19 (1951)
- 25) 桑原：日新医学，39，486 (1952)
- 26) 鶴谷：日本医科大学雑誌，19，1161 (1952)
- 27) Rosanoff, E. I. and Sevag, M. G.: Antibiot. Chemoth., 3, 495 (1953)
- 28) Geiger, W. B.: Arch. Bioch., 15, 227(1947)
- 29) Umbreit, W. W.: J. Biol. Chem., 177, 703 (1949)
- 30) Wyss, O. and Schaiberger, G. E.: J. Bact., 66, 49 (1953)
- 31) 北中：第9回日本細菌学会中四国支部総会にて発表 (1956)
- 32) 北中：第60回岡山医学会総会にて発表 (1955)
- 33) 小酒井：細菌の薬剤耐性，医学書院，P.26 (1955)
- 34) Gale, E. F.: Adv. in Enzym., 6, 1 (1946)
- 35) Gale, E. F.: Eiweiss Forschung, 4, 145 (1948)
- 36) 江上他：標準生化学実験法，文江堂，P.355 (1953)
- 37) Umbreit, W. W.: Manometric Techniques and Tissue Metabolism (1949)
- 38) Kjeldahl, J.: Zs. f. analyt. Chem., 22, 336 (1883)
- 39) 藤井：生化学実験法 (定量篇) P.80.
- 40) 佐竹：化学の領域，南江堂，20号，P.46 (1955)
- 41) 藤田：医学生物学研究領域に於ける検圧法とその影響，岩波書店 (1949)
- 42) Treadwell and Hall: Analytical Chemistry, II, 747 (1935)
- 43) Friedemann, T. E. and Haugen, G. E.: J. Biol. Chem., 144, 67(1942), 147, 415 (1943)
- 44) Quastel, J. H. and Webley, D. M.: Biochem. J., 35, 192 (1941)
- 45) 佐竹：クロマトグラフ，共立社.
- 46) Keilin, D.: Proc. Roy. Soc., London, B. 121, 165 (1936)
- 47) Warburg, O.: Biochem. Z., 177, 471 (1926)
- 48) Warburg, O. and Negelein, E.: Biochem. Z., 262, 237 (1933)
- 49) Stumpf, P. K. and Green, D. E.: J. Bioi. Chem., 153, 387 (1944)
- 50) 山村：生化学，25，321 (1953)
- 51) Cori, G. T., Colowick, S. P. and Cori, C. F.: J. Biol. Chem., 123, 375 (1938)
- 52) Warburg, O. and Christian, W.: Biochem. Z., 310, 384 (1942)
- 53) Meyerhof, O. and Lohmann, K.: Biochem. Z., 271, 89 (1934)
- 54) Boyer, P. D. et al.: J. Biol. Chem., 149, 529 (1943)
- 55) Kalnitsky, G. and Werkman, C. H.: Arch. Biochem., 2, 113 (1943), 4, 25 (1943)
- 56) E. Racker: Advances in Enzymology, 15, 141 (1954)
- 57) Eggerth, A. H.: J. Bact., 37, 205 (1939)
- 58) Gale, E. F.: Biochem. J., 34, 392 (1940)

- 59) Gale, E. F.: *Bact. Rev.*, **4**, 135 (1940)
- 60) Gale, E. F. and Epps, H. M. R.: *Biochem. J.*, **36**, 600 (1942)
- 61) Gale, E. F.: *Bact. Rev.*, **7**, 139 (1943)
- 62) Gale, E. F.: *Biochem. J.*, **39**, 46 (1945)
- 63) Edson, N. L.: *Biochem. J.*, **41**, 145 (1947)
- 64) S. Ratner, V. Nocito and D. E. Green: *J. Biol. Chem.*, **152**, 119 (1944)
- 65) Janke, A. and Tayenthal, W.: *Biochem. Z.*, **289**, 76 (1937)
- 66) 奥貫: 化学の領域, 南江堂, 20号, 267 (1955)
- 67) Gerhardt, P. et al.: *J. Bact.*, **65**, 581 (1953)
- 68) 萩原, 奥貫: 化学の領域, 南江堂, 20号, 159 (1955)
- 69) 中塚, 荒谷: *J. Antibiot.*, **4**, 141 (1950)
- 70) 中沢他2名: *J. Antibiot.*, **5**, 580 (1952)
- 71) Stephenson, M.: *Biochem. J.*, **22**, 605 (1928)
- 72) Still, I. L.: *Biochem. J.*, **35**, 380 (1941)
- 73) Barron, E. S. G.: *J. Biol. Chem.*, **100**, 155 (1933)
- 74) Hahn, A. and Fischbach, E.: *Z. Biol.*, **94**, 58 (1933)
- 75) Adler, E. and Michaelis, M.: *Z. physiol. Chem.*, **235**, 154 (1935)
- 76) Green, D. E.: *Biochem. J.* **30**, 1489 (1936)
- 77) Bach, S. J. and Dixon, M.: *Nature*, **149**, 48 (1942)
- 78) Claggett, C. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, **178**, 977 (1949)
- 79) Kaufman, S. I. et al.: *J. Biol. Chem.*, **192**, 301 (1951)
- 80) Clifton, C. E.: *Adv. in Enzym.*, **6**, 269 (1946)
- 81) Mickelson, M. N.: *J. Bact.*, **59**, 659 (1950)
- 82) Oginsky, E. L., Smith, P. H. and Umbreit, W. W.: *J. Bact.*, **58**, 747 (1949)
- 83) 奥貫: 標準生化学実験法, 文江堂, P.395 (1953)
- 84) Keilin, D. and Hartree, E. F.: *Biochem. J.* **41**, 503 (1947)
- 85) Slater, E. C.: *Biochem. J.*, **45**, 15 (1949)
- 86) Neufeld, H. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **210**, 851, 861, 869 (1954)
- 87) Pardee, A. B. and Potter, V. R.: *J. Biol. Chem.*, **178**, 241 (1949)
- 88) Plaut, G. W. E. and Lardy, H. A.: *J. Biol. Chem.*, **180**, 13 (1949)
- 89) C. T. Gray: *J. Bact.*, **63**, 813 (1952)
- 90) 山田, 鈴木: 日本農芸化学会雑誌, **25**, 290 (1951)
- 91) Wolfe, I. B., Ivler, D. and Rittenberg, S. C.: *J. Biol. Chem.*, **208**, 885 (1954)
- 92) Dakin, H. D.: *oxidations and reductions in the animal body*, London (1922)
- 93) Bach, S. I.: *Biochem. J.*, **33**, 90 (1939)
- 94) Olsen, N. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **148**, 611 (1943)
- 95) Ratner, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **134**, 665 (1940)

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

Report 3. On *Bacillus Dysenteriae*

By

Hajimu Kitanaka

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

Following up the previous experiments, with the use of extracts and acetone powder prepared from several strains of *B. dysenteriae* such as SM-resistant strain and SM-susceptible strain of *Sh. flexneri* II, this study has been conducted in order to consider some aspects of their metabolism. The results are as follows:

1. It has been possible to obtain cell-free extracts from *Sh. flexneri* II by grinding with emery powder, the extracts containing oxidases of lactate, succinate, and glycine; and also the same three oxidases have been obtained from the acetone-powder prepared from *Sh. flexneri* II. Moreover, the characteristics of those oxidases obtained by the above two methods are exactly the same.

2. No marked difference can be observed in the properties of these three oxidases contained in extract from SM-resistant strain or in those from SM-susceptible strain, of *Sh. flexneri* II, but there is a quantitative difference in oxygen uptake: namely, in SM-resistant strain oxygen uptake on three substrates per hour per mg of N is greater than the same in the case of SM-susceptible strain.

3. It has been confirmed that the properties of three oxidases of this bacillus, namely, oxidases of lactate, succinate, and glycine, are quite similar to the properties of those oxidases found in animals, plants, and bacteria.

4. Glycine oxidase has been extractable only from animal tissues and from a few kinds of bacteria, and the one that has been extracted from this bacillus possesses somewhat similar properties as those of animal tissues and other bacteria in that it is not affected by inhibitory agents of the cytochrome system and possesses a relatively narrow pH range of activity. It has been proven that glycine oxidase prepared from *Sh. flexneri* II is a flavoprotein which produces glyoxylic acid and  $\text{NH}_3$  by oxidative deamination of glycine.

5. Inhibitory action of malonate can not at all be seen on succinoxidase in resting cells of *Sh. flexneri* II, while this inhibitory action is observable in the case of the acetone powder and cell-free extracts of *Sh. flexneri* II. This phenomena seem to be possibly brought about by permeability of the cell membrane.

---