

結核菌の物質代謝の研究

第 2 編

遠心操作により得た細胞内各種分割の酵素学的活性の研究

岡山大学医学部微生物学教室 (指对: 村上 栄教授)

滝沢 千之助

〔昭和 33 年 11 月 5 日受稿〕

目 次

- | | |
|--|--|
| 1. 緒 言
2. 実験材料及び実験方法
3. 実験成績
A) R ₁ の酵素学的性状
B) S ₁ の酵素学的性状 | C) S ₂ の酵素学的性状
D) R ₂ の酵素学的性状
4. 総括並びに考案
5. 結 論
6. 文 献 |
|--|--|

1. 緒 言

生物を作り上げている其の内的機構、からくりは、其の生体固有の物質代謝のパターンによつて規定されていることは Barron(1943)¹⁾, Nilsson(1940)²⁾, Gale(1943)³⁾ 等の説明からも充分考え得られる。最近の酵素化学の進歩と、電子顕微鏡の解像力とは歩を一にし、動植物の細胞質構造と其の生理機能の関連が Millerd (1953)⁴⁾, Bensley (1934)⁵⁾ を始め多くの研究者により次第に明確にされてきた。

一方細菌の物質代謝の研究も盛んであるが、其の多くは特定の細菌の、特定の酵素或は酵素系が問題であつたが Mudd(1943)⁶⁾, Dubos(1952)⁷⁾ 等の細菌細胞の構造学的理論が台頭するに及び、細菌を一つの鍵として細胞構造と其の生理機能の研究が盛んになつた。

細菌細胞に顆粒構造の存在することは古くは Koch が *Mycobacteria* で、或は又 *C. diphtheriae* で Babes-Ernst 顆粒が知られているが、物質代謝と重要な関係にある顆粒構造が示されたのは tetrazolium を indicator とし、之が還元されることによつて red formazane を生ずる顆粒が *E. coli*, *S. typhi* に存在するという Bielig, Kausche, Haardick(1949)⁸⁾ の研究に始まつている。しかしてこの顆粒は Mudd(1953)⁹⁾ 等により mitochondria であると考えられるに至つた。しかし一般に細菌体内に動植物細胞に見られる如き mitochondria が存在

するか否かは現在では決定的証拠はないようである。Shinohara (1957)¹⁰⁾, Mudd(1951(1956)¹¹⁾¹²⁾, Toda (1957)¹³⁾ 等は確かに mitochondrial-like の構造を電子顕微鏡で観察しているが、この構造を純粹に集め生理機能を検討することが不可能な限り、動植物細胞の mitochondria と同一視することは至難である。

他方 Sevag(1941)¹⁴⁾, Schachman(1952)¹⁵⁾, Georgi (1951)¹⁶⁾ 等が細菌細胞の磨砕液の遠心分割により得られた不溶性分割顆粒は DNA, RNA の割合、酵素学的活性等の諸点から mitochondria と極めて類似の性状を認めている。mitochondria が生理的機能で大な興味を持たれたのは、この構造が磷酸化電子伝達粒子と電子伝達粒子を保有しているという Green(1957)¹⁷⁾ の記録にあると思われる。

以上のような諸問題から細菌細胞の遠心分割による各分割物質(不溶性顆粒分割と可溶性分割)の酵素学的活性は盛んに追求されるに至つた。結核菌は他の細菌と発育様式、菌体成分がかなり異り、更に光学的にも顆粒構造に富む点から興味もたれ、特に Millman and Youmans (1955)¹⁸⁾, 山村¹⁹⁾, 楠瀬 (1954)²⁰⁾²¹⁾ 等の詳細な研究は極めて参考となり得る。

著者は第 1 編に於て人型毒力結核菌 H 37 Rv 株と同じく無毒株 H 37 Ra の無細胞液 (15000 rpm 上清) の脱水素酵素能を検討し、更にこの機能が透析処理により如何なる影響を受けるやを追究したが、尚物質代謝を動的に把握するため、一応無細胞液に

つき酸素消費の面を測定確立し、更に無細胞液を 40000 rpm で遠心分割し、溶性分割(上清)と不溶性分割顆粒(沈渣)に別し、各々の酵素活性を測定し、第1に結核菌を用いて、諸先輩の報告した生体生理機能の検討と、第2に山村の鳥型結核菌による詳細な記録と対比し、人型結核菌が同一の酵素学的性状を現わすか否かを検討した。

2. 実験材料及び実験方法

供試菌株：人型毒力株 H 37 Rv, 人型無毒株 H 37 Ra, 牛型毒力株, Bovine 263, BCG の各株の中性小川氏鶏卵培地に継代中のものを, sauton 培地に3代以上継代し、実験には sauton 2週間発育菌を撰んだ。

各遠心分割物質の作製法：上記各発育株の洗滌菌塊を乳鉢中に収め、石英砂と共に低温下(-3~4°C)で1時間強力に磨砕し、元の湿潤菌 13 g : 0.02 M phosphate buffer pH 7.0, 100 ml の割合に混合、充分攪拌せるものを、4000 rpm にて40分間遠心沈澱し、其の上清を 15000 rpm にて40分間遠心し得られた沈澱を R₁, 上清を S₁ とした。S₁ を更に 40000 rpm (144000×G) にて1時間遠心分割した其の上清(可溶性部)を S₂, 沈澱した不溶性分割顆粒部を R₂ とした。

以上の分割操作は総て低温下に於て処理した。R₁ は生菌細胞を証明し得られるが、S₁, S₂, R₂ は全く無細胞状態である。勿論各分割とも、それ自体は抗酸性は認められない。

S₁, S₂ はそのままのものを実験に使用したが、R₁, R₂ は元の湿潤菌量 13 g に対し、0.02 M phosphate buffer. pH 7.0 を 20 ml 添加、懸濁したものをを使用した。

検討法：R₁ は H 37 Rv, H 37 Ra の2株のものにつき脱水素酵素能、酸素消費量を測定し、S₁ は供試全株のものにつき酸素消費を、S₂, R₂ は H 37 Rv, H 37 Ra のものにつき、脱水素酵素能並びに酸素消費を測定した。

特に本編に於ては S₁ の酵素学的諸性状が、S₂, R₂ に於て如何に分別され得るやを検討することを主眼とした。

3. 実験成績

A) R₁ の酵素学的性状

a) 脱水素酵素反応

前記のとおり、R₁ は H 37 Rv と H 37 Ra による

ものを使用し、生菌細胞は染色並びに培養に於て証明された。勿論其の数は極めて少ないのでその酵素的活性は問題にはならない。

方法は Thunberg の methylen blau (以下 Mb とす) 法によつた。

Thunberg 管の内容は 0.02 M phosphate buffer pH 7.0, 0.5 ml, 0.0002 M Mb. 0.25 ml, substrate 0.5 ml, R₁, 0.5 ml である。反応進行中の温度は 37°C であり、substrates としては pyruvic, lactic, acetic, citric, succinic, malic, fumaric acids である。これ等の substrates は何れも 0.1 M のものであり、NaOH 液にて pH 7.0 に補正後使用した。実験成績は第1表に示した。

第1表 R₁ の脱水素酵素反応

substrates		reduction times	
		H ₃₇ Rv-R ₁	H ₃₇ Ra-R ₁
pyruvic	acid	3' 00"	7' 30"
lactic	acid	—	—
acetic	acid	—	—
citric	acid	—	—
succinic	acid	72' 00"	±
malic	acid	—	—
fumaric	acid	—	—
control	(water)	—	—

表に見る如く pyruvic, succinic acids 以外の基質に於ては殆んど Mb の脱色は認め難い。pyruvic acid のみは迅速に酸化されるが、succinic acid に対する作用は極めて微弱である。即ち R₁ の脱水素能は pyruvic acid 以外は殆んど認め難く、又この成績より察するに、R₁ に存在する生菌数は其の分割物質(R₁)の酵素反応に影響を及ぼす程多数でないことを示すものと考えられる。

b) R₁ の酸素消費の測定

方法は Warburg の検圧計により、容器内容は R₁, 2 ml, 0.02 M phosphate buffer pH 7.0. 0.7 ml, 0.1 M substrate, 0.3 ml, 20% KOH. 0.5 ml である。測定は内容混合時より 15, 30, 60, 90, 120分と計5回である。供試基質は前記同様7種類であり、結果は図1, 図2に示した。

図に示した如く H 37 Rv, H 37 Ra 共に其の R₁ の酸素消費は、各供試基質に於て多少認めることは可能であるが、但し問題にならない程僅微である。恐らくは、この僅かな活性度は S₁ に移るべきもの

図1 H 37 Rv, の R₁,

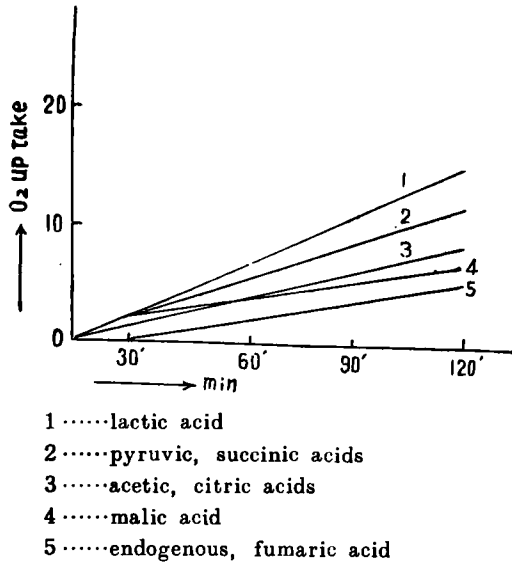
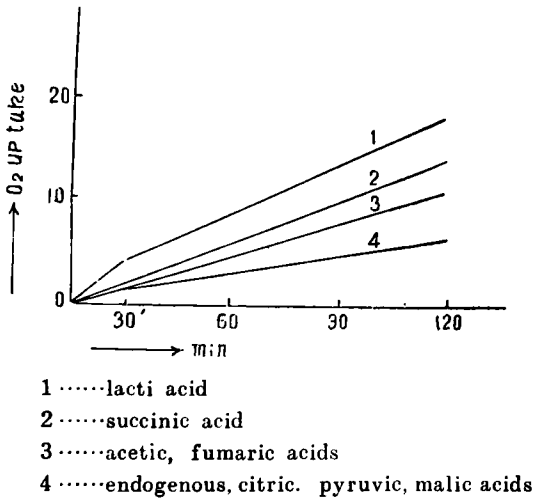


図2 H 37 Ra の R₁



が菌体残渣と共に或る程度 R₁ に移行したものとされる。

即ち R₁ の主体は元來 cell wall であり, 余り活性を保有しているものとは考えられない。このことは Oginsky and Umbreit (1954)²²⁾ の記載からも充分推測出来る。

B) S₁ の酵素学的性状

S₁ の脱水素酵素能については第1編に於て詳述したので, 特に S₁ の酸素消費について述べる。

測定は R₁ に於けると全く同一方法である。H 37 Rv. S₁ は図3に, H 37 Ra. S₁ は図4に, Bovine 263. S₁ は図5, 又 BCG. S₁ は図6に示した。

即ち H 37 Rv. S₁ は lactic acid を基質とした場合, 約6.3倍, pyruvic acid で4倍, fumaric, malic acids で各々3.3倍, succinic acid で約2倍,

acetic acid で約1.5倍と対照(endogenous respiratoin) よりも酸素消費は増加している。

H 37 Ra. S₁ は lactic acid の場合に4.4倍, pyruvic acid で1.6倍, fumaric acid で2.3倍, malic acid で2倍, succinic acid で約1.3倍と酸素消費は増加している。

H 37 Rv, H 37 Ra の各々の S₁ で異なる点は, pyruvic acid の場合であり, H 37 Rv の S₁ は H 37 Ra

図3 H 37 Rv

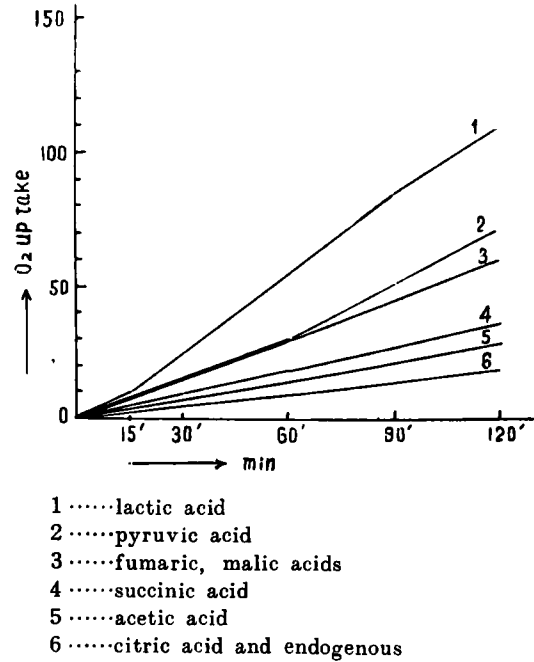


図4 H 37 Ra

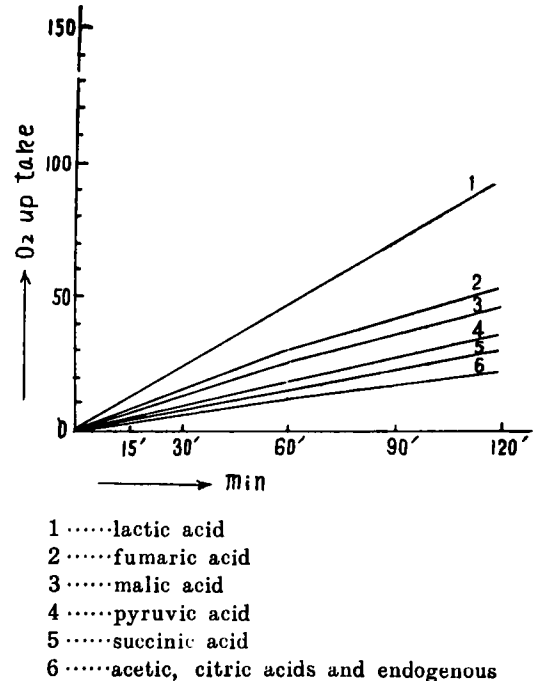


図5 Bovine. 263

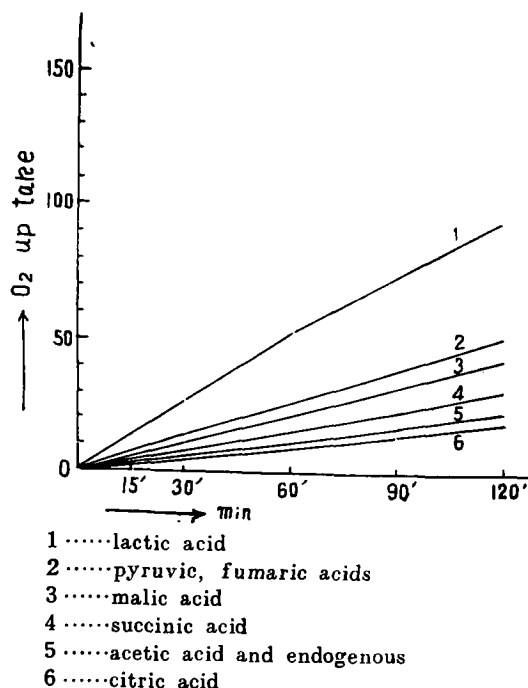
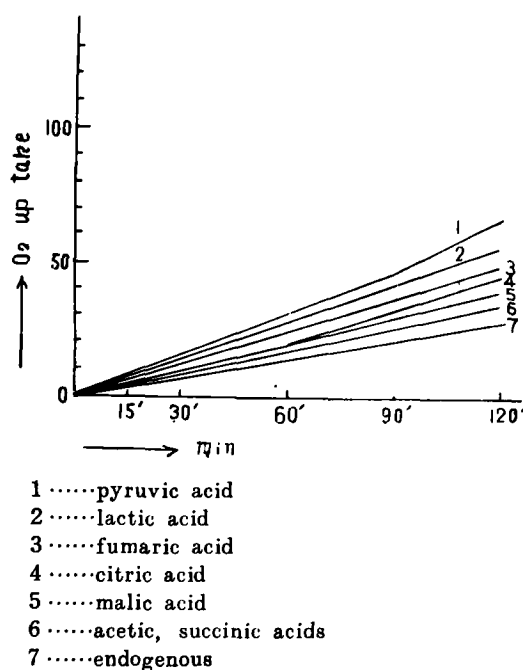


図6 BCG



の S_1 に比較し, pyruvic acid を基質とした場合, 酸素消費は遙かに増加する結果を示した.

Bovine 263 の S_1 は lactic acid で 5.2 倍, pyruvic acid, fumaric acid の各々で約 3 倍, malic acid で 2.3 倍, succinic acid で 1.7 倍と対照より酸素消費は増加している.

BCG の S_1 に於ては pyruvic acid で 2.3 倍,

lactic acid で 2 倍, fumaric acid で 1.7 倍, citric acid で 1.6 倍と対照より酸素消費は増加した, malic, acetic, succinic acids の各々も僅かではあるが効果は認められる.

即ち BCG の S_1 は, Bovine 263 の S_1 に比較し全般的に活性は低く, 特に lactic acid を基質とした場合は遙かに Bovine 263 の S_1 より低いことが判明した.

以上毒力株, 弱毒株, 計 4 株の S_1 につき TCA cycle に密接な関係のある有機酸を基質とし酸素消費を測定したが, 特に pyruvic acid, lactic acid の各々に於ては, 毒力或は菌株間に有意の差が認められた. 何れの株の S_1 も succinic, acetic, citric acids の利用度は低いが, BCG の S_1 のみは比較的 citric acid を利用することが可能であった.

以上の結果は岡 (1957)²³ の報告の追試を主体としたが再現性のあることが確認出来た.

C) S_2 の酵素学的性状

a) 脱水素酵素反応

曩に岡 (1956)²⁴ は S_1 の脱水素酵素能について報告しているが, 著者は S_2 の之の活性を追求することによ, S_1 の活性を更に進んだ段階から検討し得るものと考えた.

供試した S_2 は H 37 Rv と H 37 Ra の 2 株よりのものである. 遠心 (40000 rpm) 終了時 S_2 の上層部にクリーム状の脂質層が出来るが, 之は完全に除去した.

S_2 は半透明, 黄白色を呈し勿論非抗酸性であり細胞を含んでいない.

実験方法は R_1 と同一で Thunberg の Mb 法を採用した. 其の結果は第 2 表に示した.

第 2 表 S_2 の脱水素酵素反応

substrates	reduction times	
	H37Rv- S_2	H37Ra- S_2
pyruvic acid	2' 30"	13' 00"
lactic acid	7' 20"	5' 30"
acetic acid	16' 30"	17' 00"
citric acid	22' 40"	15' 30"
succinic acid	16' 00"	15' 00"
malic acid	12' 00"	10' 30"
fumaric acid	13' 40"	6' 00"
control (water)	31' 00"	28' 00"

H 37 Rv の S₂ の脱水素酵素能は pyruvic acid を基質とした場合最も強く、対照の12.5倍、之に次いで lactic acid の 4.3 倍, malic acid の 2.6 倍, fumaric, succinic acids で各々2.2~2 倍, 次いで acetic, citric acids であるが、最後の2者に対しては活性は極めて低い。

H 37 Ra の S₂ の活性は lactic acid で 5 倍, succinic, malic acids で各々 1.9~2.7 倍で H 37 Rv の S₂ と比較し活て自体に著差は見られないが, pyruvic acid に対しては著しく其の活性は低下し, 対照の 2.1 倍にすぎない。然るに fumaric acid では 4.6 倍で H 37 Rv の S₂ より活性は可成り高い。この pyruvic, fumaric acids に対する S₂ の態度は H 37 Rv, H 37 Ra の各々の S₁ の酸素消費と同一の傾向を示している。

b) S₂ の酸素消費の測定

S₂ に各種基質を添加し酸素消費の面より酵素活性を検討することは、同一の試験に於ける S₁ の結果との比較に於て価値を生ずるものと思われる。又 S₂ に於ける前述の脱水素酵素反応と同一の傾向に現われるか否かも問題の点である。

R₁, S₁ の酸素消費測定と全く同一の方法に依つた。H 37 Rv の S₂ の結果は図7に H 37 Ra の S₂ は図8に示した。

H 37 Rv の S₂ により最もよく酸化を受けるのは lactic acid で対照 (endogenous respiration) の 5

図7 H 37 Rv-S₂

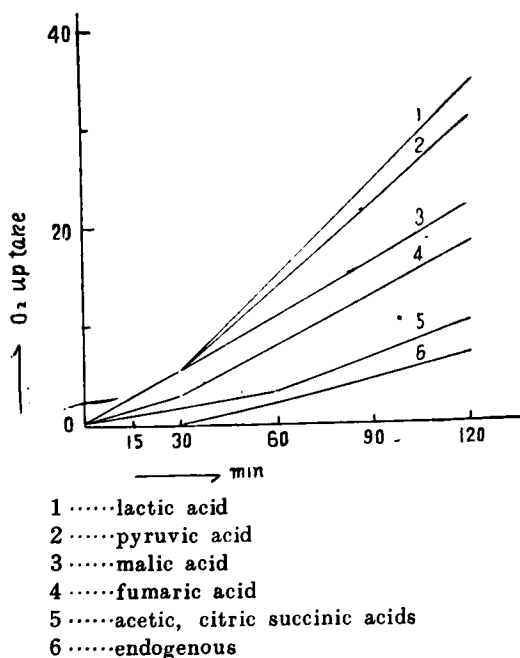
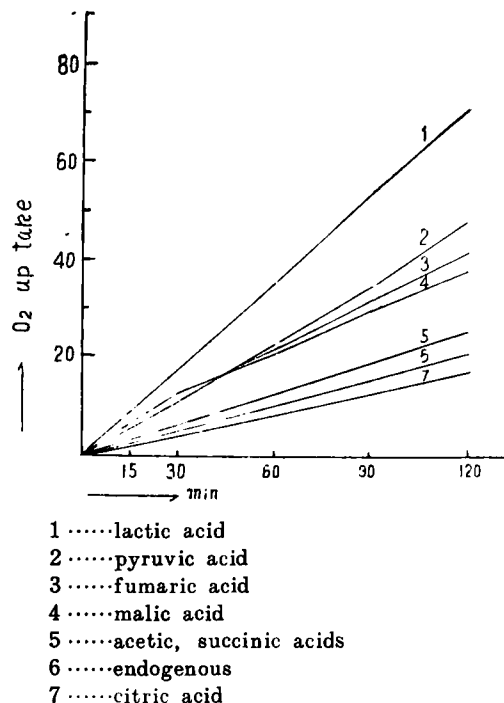


図8 H 37 Ra-S₂



倍, pyruvic acid の 4.5 倍, malic acid の 3.2 倍, fumaric acid の 2.9 倍, succinic, acetic, citric acids で各々1.5倍の結果を得た。この対照に対する各基質添加時の活性度は確かに S₁ と同一の傾向を示している。

しかし S₁ と大きく異なる点は全体の活性が低下していることである。即ち S₁ の対照の酸素消費は S₂ の対照の約2.4倍も高い。各基質添加時に於ても S₁ の酸素消費は S₂ の 3~2 倍高いことが判明した。

次いで H 37 Ra の S₂ の結果を観ると lactic acid を添加した場合は、対照の 4 倍, pyruvic acid で約 3 倍, fumaric acid で 2.3 倍, malic acid で 2 倍, succinic, acetic acids で各々 2 倍の酸素消費を示した。この対照に対する基質添加時の活性度は大体 S₁ の場合と類似しているが、只一つ pyruvic acid の場合のみは対照に対する活性度が S₁ の場合よりも著しく高いことである。

又 H 37 Rv の S₁, S₂ の関係と異なる点は H 37 Ra の S₂ は、この S₁ の場合と比較し、実際の酸素消費に余り差が認められない。即ち 40000 rpm の遠心処理により H 37 Rv の S₂ の酸素消費は著しく低下するが、H 37 Ra の S₂ は余り影響を受けた如く思われない。

次いで H 37 Rv, H 37 Ra 各々の S₂ の脱水素酵素反応と酸素消費との関係を観ると大体に於て結果

は一致するが、H 37 Rv の S₂ で pyruvic, succinic acids を各々基質とした場合のみは2者の関係が一致していない。

D) R₂ の酸素学的性状

R₂ は S₁ の 40000 rpm 遠心処理により得られた不溶性顆粒分劃であり、電子顕微鏡像では大体50~100 m μ の大きさのものである。この顆粒分劃は赤味を帯びた Youmans(1955)²⁵⁾の述べた red fraction と一致するものである。之の phosphate buffer 懸濁液は不透明で乳白色を呈している。Schaman(1952)²⁶⁾は P. fluorescens, E. coli, R. rubrum で 160,000 g で遠心して得られた顆粒分劃には多量の RNA が存在し、上清には DNA が移行していることを述べているが、著者が用いた結核菌の R₂ は僅かに RNA が存在するのみで、これに反し S₂ は両者を高濃度に含んでいた。

かくの如き性状を有する R₂ が細菌細胞の何れの部分に位置するかは現在明かでないが著者は物質代謝の面より検討を加えた。

a) R₂ の脱水素酵素反応

方法は R₁ の場合と同様に Thunberg の Mb 法によつた。其の結果は第3表に示した。

第3表 R₂ の脱水素酵素反応

substrates	reduction times	
	H37Rv-R ₂	H37Ra-R ₂
pyruvic acid	—	—
lactic acid	8' 30"	4' 30"
acetic acid	—	—
citric acid	—	—
succinic acid	75' 00"	45' 00"
malic acid	—	—
fumaric acid	—	—
control (water)	—	—

即ち H 37 Rv, H 37 Ra 両株ともに、其の S₁, S₂ に於ては供試基質の種類により脱水素の速度に長短はあるが殆んどの基質が利用され得る結果を得た。又 S₁, S₂ に於ては、無基質の対照も Mb の脱色が認められた。然るに S₁ から更に遠心分劃された R₂ は、S₁、或は S₂ とは全く脱水素の様相が異つてゐる。

第3表に示した如く lactic, succinic acids を各々基質として添加した場合に限り Mb の脱色が見られ、其の他の供試基質並びに対照に於ては Mb の脱

色は全く認められない。

又 lactic acid が基質の場合は H 37 Rv, H 37 Ra 両者の R₂ 共に基質の酸化は極めて速かであるが、succinic acid の酸化には両株の R₂ 共に長時間を要した。

以上の結果から R₂ に於ける脱水素酵素系は極めて限局された基質に限るものと思われる。

b) R₂ の酸素消費の測定

R₂ の脱水素酵素能については前述の如くであるが、この顆粒分劃が酸素消費に於て如何なる性状を現わすかは最も興味がある。山村並びに其の協同研究者(1954)²⁷⁾は鳥型菌竹尾株の 38000 rpm の遠心で沈澱する particulate particle は動物細胞に於ける mitochondria と極めて類似の性状を有し、l-malic acid のみを特異的に酸化し得ることを発見している。

然るに H 37 Rv, H 37 Ra の R₂ による酸素消費の結果は山村等の記録とは大部異つた性状を示した。即ち図9, 図10に示した如く、両株の R₂ 共にそれ自体では malic acid を酸化することは出来ない。

図9 H 37 Rv-R₂

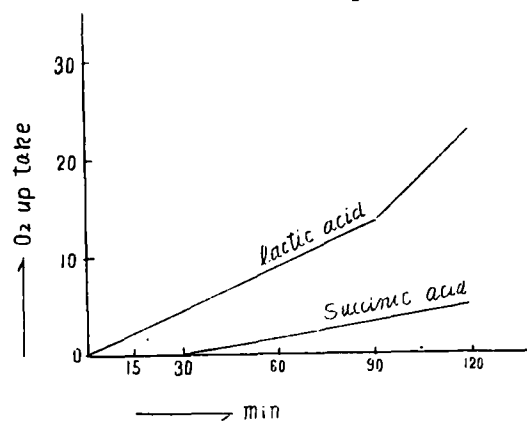
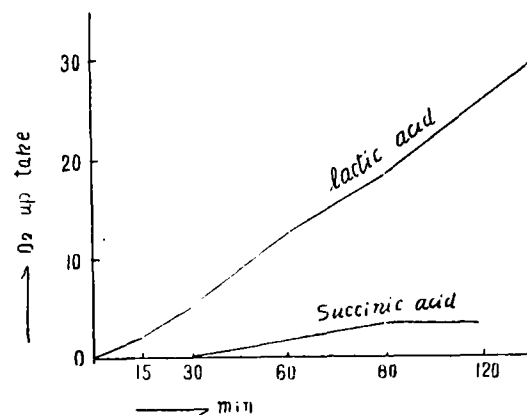


図10 H 37 Ra-R₂



人型菌の R₂ が酸化し得る基質は lactic, succinic acids のみであり、しかも其の酸化は強力なものではない、特に succinic acid の酸化は全く微弱であり、成績自体に幾分疑問を持たざるを得ないが、前述の脱水素酵素能の検討に於ても Mb の脱色を見ている限り著者はこの結果を認めたい。

以上の結果から R₂ には lactic acid, succinic acid の酸化酵素は特異的に証明され得るが、其の他の酸化酵素は S₂ に存在するものと思われる。

4. 総括並びに考案

最近、細胞内構造と酵素学的性状を明確にすることが重要な課題となつた。このことは力源代謝に関係ある酵素系が明確化されるに従ひ、各酵素系が如何なる構造に組織化され、合成引いては生命現象につながるかという生化学的終局の問題を含んでいるからに他ならないと思う。この課題の解決の鍵として動物細胞の mitochondria が注目されるに至り、次いで細菌細胞に於ても Bielg(1952)²⁸, Bringmann (1953)²⁹, Preuner (1951)³⁰ 等は mitochondria を思わしめる報告を出している。Georgi(1951)¹⁶ は *B. stenothermophilus* から得た顆粒分割は malic dehydrogenase を多量に含み、又この分割に cytochrome oxidase と cytochrome c の存在を確認しているし、山村(1954)¹⁹ も鳥型結核菌でこれと類似した結果を報告している。

細菌細胞に於て動物細胞に観られる如き、mitochondria が存在するか否かの確証は未だ明かでないが、上記の如き特異的酵素活性を示す顆粒分割が第1に細菌生細胞の何れの部分に位置を占めるか…極言すれば細胞質内のものか、或は細胞表面構造のものか、第2にこの顆粒分割の酵素活性が真実であるか否か、即ち顆粒分割の抽出に当り其の操作が不適当のため当然あるべき酵素活性が溶出し、上清部(S₂)に移行してはいないかという大きな疑問が残っているが、之等を決定する証拠も現在存在していない。

著者は曩に岡(1957)²³ が報告した結核菌無細胞液の酵素学的活性に基き、更に無細胞液を遠心分割することにより活性に如何なる影響があるかを追究し、更に其の結果を緒言で論及した如く諸種細菌で検討を加えられた先人の結果、或は鳥型結核菌で報告された山村(1955)の結果と比較検討した。供試株の各無細胞液(15000 rpm 遠心の上清)を S₁, S₂, R₂ に分割し、又 S₁ 作製の際沈澱したものを R₁

(15000 rpm 遠心による沈澱)とし、この4分割につき脱水素能並びに酸素消費を測定した。

以上の各分割の各々について総括する。

R₁……内容は殆んど cell wall に相当する部分であると思われる。しかも R₁ は生菌細胞も証明され得る分割であり、酵素学的活性は低い乍らも存在している。cell wall 自体が著明な活性物質とは思われないので、この活性の主体は恐らくは S₁ に移るべきものが cell wall に附着して沈澱した為と思われる。

S₁……分割中最も活性が高く殆んど供試基質が種々の程度に利用され得るが、H 37 Rv では lactic, pyruvic acids の2者が、H 37 Ra では lactic acid が特によく酸化され、pyruvic acid は H 37 Rv に比較すると低い。malic, fumaric acids も両株共によく利用するが、株間の差は少い。

Bovine 263 は lactic, pyruvic, fumaric acids の順によく酸化するが、BCG は pyruvic, lactic, fumaric acids の順であり、又 BCG は他の株と異り citric acid を割合よく酸化する。

即ち S₁ は諸基質を酸化するが株差により、各基質の酸化度を異にしている。

S₂……この分割は S₁ と極めてよく似た性状を示しているが、H 37 Rv の S₂ は其の酸化の程度が S₁ に比較し著しく低下していることが異点である。然るに H 37 Ra の S₁ と S₂ の間には著差が観られなかつた。

R₂……これは S₁ より得られた不溶性顆粒分割であり、動物細胞の mitochondria とよく対比される部分である。人型結核菌の R₂ は lactic, succinic acids を特異的に酸化し、鳥型菌の R₂ が malic acid をよく酸化するのと全く性状を異にしている。この相違は細菌の種類により異なる細胞分化の程度が影響するものと思われる。

5. 結 論

著者は H 37 Rv, H 37 Ra, Bovine 263, BCG の4株を供試し、sauton 2週間発育菌を石英砂と共に磨碎し R₁, S₁, S₂, R₂ の4種に遠心分割し、酵素学的性状を検討し、下記の結論を得た。

1. R₁ の酵素学的活性は低い。
2. S₁ は4分割中最も活性が高く、又各基質に対する活性度は菌株間に或る程度差が認められる。
3. S₂ は S₁ の酵素学的性状に類似しているが、活性度が全般的に低下している。

4. R₂ はlactic acid, succinic acid を特異的に酸化し、他の基質は全く酸化しない。但し succinic acid の酸化は極めて微弱である。

稿を終る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ます。

文 献

- 1) Barron, E. S. G. *Advances in Enzymology*, **3**, 148, 1943.
- 2) Nilsson, R., and Alm, F. *Bioch. Z.*, **304**, 285, 1940.
- 3) Gale, E. F. *Bact. Rv.*, **7**, 139, 1943.
- 4) Millerd, A. and Bonner, L. *J. Histochem. Cytochem.*, **1**, 254, 1953.
- 5) Bensley, R. R. et al. *Anat. Rec.*, **60**, 449, 1934.
- 6) Mudd, S., Heinmets, F., et al. *J. Bact.*, **46**, 205, 1943.
- 7) Dubos, R. J. *Bacterial cell*, 川喜田愛郎訳, 岩波書店.
- 8) Bielig, H.-J., et al. *Z. Naturforsch.*, **4b**, 80, 1949.
- 9) Mudd, S., Winterscheid, L. C. *Expth. cell Reseach*, **5**, 251, 1953.
- 10) Shinohara, C., et al. *J. Bact.*, **74**, 413, 1957.
- 11) Mudd, S., et al. *J. Bact.*, **62**, 459, 1951.
- 12) Mudd, S., et al. *J. Bact.*, **72**, 767, 1956.
- 13) Toda, T., et al. *J. Bact.*, **73**, 442, 1957.
- 14) Serag, M. G., Smolens, J., et al. *J. Biol. chem.*, **139**, 925, 1941.
- 15) Schachman, H. K., Pardee, A. B., and Stanier, R. Y. *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**, 245, 1952.
- 16) Georgi, C. E., et al. *proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **76**, 598, 1951.
- 17) Green, D. E. *生化学*, **29**, **2**, 1, 1957.
- 18) Millman, I., Youmans, G. P. *J. Bact.*, **69**, 320, 1955.
- 19) 山村: 結核菌の生化学.
- 20) 楠瀬, 永井, 山村他: 酵素化学シンポジウム, **10**, 114, 1954.
- 21) 楠瀬, 永井, 山村他: 酵素化学シンポジウム, **12**, 115.
- 22) Oginsky, E. W. & Umbreit, W. W. *An introduction to bacterial physiology*, 1954.
- 23) 岡: 岡山医学会雑誌.
- 24) 岡: 日本細菌学会, 中四国支部総会, 1956.
- 25) Youmans, G. P. Millman, I., and Youmans, A. S. *J. Bact.*, **70**, 557, 1955.
- 26) Schachman, H. K., Pardee, A. B., Stanier, R. Y. *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**, 245, 1952.
- 27) 楠瀬, 永井, 楠瀬, 山村他: 酵素化学シンポジウム, **10**, 114, 1954.
- 28) Bielig, H.-J., Kausche, G. A., Haardick, H. *Naturwissenschaften*, **39**, 354, 1952.
- 29) Bringmann, G. *Zentr. Bakt. parasitenk., Abt. 1. Orig.*, **159**, 424, 1953.
- 30) Preuner, R., Prittitz, V., Gaffron, J. *Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. 1. Orig.*, **157**, 244, 1951.

Studies on the Metabolic Aspects of Mycobacterium tuberculosis

II: Enzyme Activities of Various Centrifugation
Fractions of the Cell-Free Extract

By

Sennosuke TAKIZAWA

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

In the 1st part, the dehydrogenase activities of the cell-free extract of Mycobacterium tuberculosis was discussed. In the present part, the author studied the enzyme activities of various centrifugation fractions of the cell-free extract by means of oxygen consumption. The cell-free extract was divided into 4 fractions, R₁, S₁, R₂ and S₂, by centrifugation. H37Rv, H37Ra, bovine 263 and BCG cultured on Sauton's media for 2 weeks were used in this study. The results are summarized as follows:

- 1) R₁ has little enzyme activities.
 - 2) S₁ has generally the highest enzyme activities of all the 4 fractions, though some variation existed among 4 strains.
 - 3) The enzyme activities of S₂ are similar to those of S₁, though the activities are generally somewhat low.
 - 4) R₂ oxidized lactate and succinate of all the substrates tested, though the activity to succinate was very low.
-