

## 細菌の glucose 酸化に於ける鉄イオンの作用

## 第 1 編

## 静止菌に対する鉄イオンの作用

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

戸 部 清

〔昭和 33 年 7 月 23 日受稿〕

## 目 次

- |   |  |
|---|--|
| <p>I. 緒 言</p> <p>II. 実験材料及び実験方法</p> <p>III. 実験成績</p> <p>1. 菌の基質酸化に対する <math>Fe^{++}</math>, <math>Fe^{+++}</math>, <math>\alpha\alpha'</math>-dipyridyl の影響</p> | <p>2. 菌の呼吸時に於ける磷代謝に対する <math>Fe^{++}</math>, <math>Fe^{+++}</math>, <math>\alpha\alpha'</math>-dipyridyl の影響</p> <p>3. 菌による <math>Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}</math> の反応</p> <p>IV. 総括及び考案</p> <p>V. 結 言</p> |
|---|--|

## I. 緒 言

細菌の物質代謝がその発育条件に大きく支配されることは言をまたない。当教室では、病原性細菌について発育条件を種々変化せしめ、それにとりなう菌体の酵素的性状の変化を追求しているのであるが、筆者はその一環として  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl を添加して鉄イオンを減じた培地に発育した菌体の糖代謝を検討し、併せて  $Fe$  イオンの作用点をうかがうべく実験を行った。

減鉄培地発育菌の性状に関しては、チフテリー菌<sup>1)</sup>について毒力との関係上多く論じられており、特に興味のあるのはこの菌では培地中の鉄量を減じるに従い、酵素伝達がチトクローム系からフラビン系に転換するという点である。

筆者の実験に於ては、*Sh. flexneri* 2a (駒込BⅢ)、*Staphylococcus albus* の2菌を供試菌として、先ず普通寒天培養の静止菌の代謝に於ける  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  の作用を見、ついでそれらの菌の減鉄培地に培養した菌体が水素伝達系に変換が起るか否か、及び glucose 代謝様式に如何なる変化が起るかについて検討した。

以下その成績を記して御批判を仰ぐ次第である。

## II. 実験材料及び実験方法

供試細菌 *Sh. flexneri* 2a(駒込BⅢ), *Staphy*

*lococcus albus* の教室保存標準株。

菌浮游液の調製・普通寒天培地 37°C, 20時間培養の菌を集菌し、M/50磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.2) を以つて2回遠沈洗滌してから緩衝液に浮游して1時間37°Cに保ち、更に遠沈した菌体を緩衝液に浮游した。菌量決定は光電比色計によつた。

呼吸量の測定・Warburg 検圧計を用い常法<sup>2)</sup>に従つた。なお  $O_2$  発生量の測定は反応終了後3-N  $H_2SO_4$  を注加して発生する  $CO_2$  を測定する方法によつた。

基質,  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl 何れも市販品を用いたが、 $Fe^{++}$  は硫酸第一鉄,  $Fe^{+++}$  は硫酸第二鉄を用いた。

$F^{++}$ の定量: KSCN を用いる比色法<sup>3)</sup>によつた。

$Fe^{+++}$  の定量:  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl を用いる比色法<sup>4)</sup>によつた。

glucose の定量: 3, 5 dinitro salicylic acid による比色法<sup>5)</sup>によつた。

pyruvate の定量: 2, 4 dinitrophenylhydrazine を用いる比色法<sup>6)</sup>によつた。

lactate の定量: 濃硫酸, p-hydroxydiphenyl を用いる比色法<sup>7)</sup>によつた。

acetate の定量: 試料溶液を  $H_2SO_4$  を加えて酸性として水蒸気蒸溜し、溜出液を 0.01-N NaOH

を以つて滴定した。

P<sup>32</sup> を用いる実験<sup>8)</sup>: 菌体中の P<sup>32</sup> の分布を測定する実験では、先づ供試菌体を蒸留水で1回洗滌した後、少量の蒸留水を加えて25回凍結融解して菌体を破壊し、これを Schneider 法に従つて分割した。各分割は硝、硫酸法で湿式灰化して無機磷酸の形に変えて後、マグネシア混液で沈澱させ、これを円形濾過板で均等に沈澱が附着するように注意して濾過し、乾燥後 Geiger 計数管で計測し、2分間のカウント数を以て P<sup>32</sup> 量を表わすこととした。

### III. 実験成績

#### 1. 菌の基質酸化に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, αα'-dipyridyl の影響

各供試菌の静止菌浮游液に glucose, gluconate, ribose, β-glycerophosphate (glycero-P), pyruvate, lactate, acetate, succinate を夫々基質として添加したときの O<sub>2</sub> 消費量, CO<sub>2</sub> 発生量に対する Fe<sup>++</sup> (10<sup>-4</sup>M), Fe<sup>+++</sup> (10<sup>-4</sup>M), αα'-dipyridyl (10<sup>-3</sup>M) の影響を見た。

第 1 表 呼吸に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> の影響 (B2a・普通寒天18時間培養)

添加物質	—			Fe <sup>++</sup> 10 <sup>-4</sup> M			Fe <sup>+++</sup> 10 <sup>-4</sup> M			αα'-dipyridyl 10 <sup>-3</sup> M		
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ
なし	11	10	/	14	11	/	13	12	/	9	10	/
glucose	129	104.5	0.81	182	167.4	0.92	186	169.3	0.91	73	53.3	0.73
gluconate	12	10	/	13	11	/	12	12	/	10	10	/
ribose	14	11	/	12	10	/	14	13	/	11	10	/
glycero-p	92	75.4	0.82	123	105.8	0.86	114	96.9	0.85	71	50.4	0.71
pyruvate	94	122.6	1.46	136	189.0	1.39	142	201.6	1.42	41	80.4	1.96
lactate	73	62.8	0.86	127	111.8	0.88	116	105.6	0.91	37	20.4	0.55
acetate	12	10	/	11	13	/	13	12	/	10	11	/
succinate	97	98.0	1.01	101	103.0	1.02	105	107.1	1.02	89	89.9	1.01

菌液 (湿菌量 20 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.4 ml 全量 3.0 ml とする  
PH 7.2, 30°C, 1hr

Sh. flexneri 2a (B2a と略) では第1表に示す通り, glucose, glycero-P, pyruvate, lactate を基質とした O<sub>2</sub> 消費は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> 添加により促進され, αα'-dipyridyl によつて阻害されたが, この促進或は阻害は pyruvate に於て最も顕著であつた。又 RQ 値に対する影響を見ると glucose, glycero-P, lactate を基質とした場合には, Fe<sup>++</sup> 又は Fe<sup>+++</sup> の添加により僅かに RQ は増大し,

pyruvate を基質とした場合には減少する傾向が認められ, 又 αα'-dipyridyl の添加によつては逆に glucose, glycero-P, lactate では僅かながら減少し, pyruvate では増大する傾向が見られた。

succinate を基質とした場合にはそれら添加物により呼吸は殆んど影響されず, 又 glucose, ribose, acetate は B2a の普通寒天培養菌体によつては Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> の存否に拘わらず酸化され難かつた。

第 2 表 呼吸に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, αα'-dipyridyl の影響  
(B2a : gluconate 添加培地18時間培養)

	—			Fe <sup>++</sup> 10 <sup>-4</sup> M			Fe <sup>+++</sup> 19 <sup>-4</sup> M			αα'-dipyridyl 10 <sup>-3</sup> M		
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ
gluconate	92	94.8	1.03	118	122.7	1.04	116	120.6	1.04	67	67.7	1.01

菌液 (湿菌量 20 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/1000.3 ml, 全量 3.0 ml とする  
PH 7.2, 37°C, 1hr.

次に gluconate, ribose の酸化に対する影響を見るため, gluconate (0.1 g/100 cc) 或いは ribose

(0.1 g/100 cc) を加えた普通寒天に継代して適応せしめた菌体を用いて O<sub>2</sub> 消費量を測定したところ,

第 3 表 呼吸に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, αα'-dipyridyl の影響  
(B2a: ribose 添加培地18時間培養)

	—			Fe <sup>++</sup> 10 <sup>-4</sup> M			Fe <sup>+++</sup> 10 <sup>-4</sup> M			αα'-dipyridyl 10 <sup>-3</sup> M		
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RO	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ
ribose	63	57.3	0.91	76	69.9	0.92	73	66.4	0.91	47	41.8	0.89

菌液 (湿菌量 20 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。  
PH 7.2, 37°C, 1hr.

第2表の如く gluconate を基質とした O<sub>2</sub> 消費は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> の添加により僅かに促進され αα'-dipyridyl によつては僅かに阻害されたが RQ は殆んど影響されなかつた。ribose 酸化に於ては第3

表の如く、やはり Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> の添加によつて阻害されるが RQ は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> 添加により増大し、αα'-dipyridyl により減少する傾向が僅かに見られるにすぎなかつた。

第 4 表 呼吸に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> の影響 (St. albus 普通寒天18時間培養)

添加物質	0			Fe <sup>++</sup> 10 <sup>-4</sup> M			Fe <sup>+++</sup> 10 <sup>-4</sup> M			αα'-dipyridyl 10 <sup>-3</sup> M		
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ
なし	34	31.6	0.93	49	46.1	0.94	42	39.5	0.94	30	27.3	0.91
glucose	161	146.5	0.91	239	219.9	0.62	249	229.1	0.92	92	81	0.88
gluconate	36	/	/	51	/	/	47	/	/	39	/	/
ribose	39	/	/	50	/	/	43	/	/	32	/	/
glycero-p	87	98.3	1.13	117	140.4	1.20	111	131	1.18	61	62.8	1.03
pyruvate	175	241.5	1.38	29	295.4	1.29	216	285.1	1.32	121	170.6	1.41
lactate	166	164.3	0.99	196	227.4	1.16	187	215.1	1.15	89	77.3	0.87
acetate	72	67	0.93	97	89.2	0.92	102	93.8	0.92	61	56.7	0.93
succinate	96	93.1	0.97	107	103.8	0.97	105	101.9	0.97	87	84.39	0.97

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。  
PH 7.2, 37°C, 1hr.

albus に於ては第4表に示す如く、B2a に於ける成績と同様、glucose, glycero-P, pyruvate, lactate を基質とした O<sub>2</sub> 消費は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> により促進され、αα'-dipyridyl により阻害されるが、pyruvate に於て最も大であつた。然し一般に B2a に於ける程著者ではないようであつた。又 RQ 値のこれら添加物による変動も B2a に於ける程著しくなかつた。この実験に用いた普通寒天培養菌体は

Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> の存否に拘わらず gluconate, ribose を酸化し難かつたので、gluconate を添加した普通寒天に継代して適応せしめた菌体を用い gluconate 酸化に対するこれら添加物の影響を見たところ第5表の如く、O<sub>2</sub> 消費量は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> により僅かに増大し、αα'-dipyridyl により若干減少する程度であり、RQ に対しても有意の差異は生じなかつた。

第 5 表 呼吸に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, αα'-dipyridyl の影響  
(St. albut gluconate 添加培地18時間培養)

	—			Fe <sup>++</sup> 10 <sup>-4</sup> M			Fe <sup>+++</sup> 10 <sup>-4</sup> M			αα'-dipyridyl 10 <sup>-3</sup> M		
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	RQ
gluconate	99	103	1.04	119	125.0	1.05	128	134.4	1.05	72	74.9	1.04

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。  
PH 7.2, 37°C, 1hr.

なお glucose に於ては ribose を添加した培地に継代しても ribose 酸化能はあまり増大しなかつたので ribose 酸化に対する影響は検討することが出来なかつた。次に B<sub>2a</sub> につき, glucose, gluconate, ribose, pyruvate 酸化に於ける O<sub>2</sub> 消費, 基質消費, pyruvate, lactate, acetate 生成の量的関係に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, αα'-dipyridyl の影響を見た。glucose, pyruvate については第 6 表に示したごとく, Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> 添加によつて glucose 酸化に於ける O<sub>2</sub> 消費, glucose 消費は増大するが, pyruvate, acetate の生成量は減少し, lactate の生成量は大した変動を見なかつた。αα'-dipyridyl 添加によつてはこれとは全く逆で, O<sub>2</sub> 消費, glucose 消費は阻害され, pyruvate, acetate の生成の増大が認められた。又 pyruvate を基質とした場合も同様であり, O<sub>2</sub> 消費, pyruvate 消費は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> 添加により増大し, acetate 生成は減少した。αα'-dipyridyl 添加によつては O<sub>2</sub> 消費, pyru-

vate 消費は著しく減少し, acetate 生成の割合は増大された。gluconate (第 7 表), ribose (第 8 表) を基質とした場合も glucose の場合と同様の傾向であつたが, glucose に於けるほど影響が顕著でなかつた。albus について見ると, glucose, pyruvate を基質とした場合には第 9 表の如く, B<sub>2a</sub> に見られたほど Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, αα'-dipyridyl の影響は著明ではないが, やはり B<sub>2a</sub> 同様 glucose, pyruvate を基質とした O<sub>2</sub> 消費, 基質消費は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> により僅かながら促進され, αα'-dipyridyl によつて阻害された。glucose よりの pyruvate 生成は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> の添加, 無添加に拘わらず認められなかつたが, αα'-dipyridyl 添加によつては僅かながら pyruvate が蓄積された。gluconate を加えた普通寒天に発育した gluconate 適応菌体を用い, gluconate の酸化に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, αα'-dipyridyl の影響を見ると第 10 表の如く, O<sub>2</sub> 消費は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> により僅かながら促進され, αα'-

第 6 表 glucose, pyruvate の酸化に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, αα'-dipyridyl の影響  
Sh. flexneri 2a (普通寒天培養菌)

	O <sub>2</sub> 消費 μM	基質消費 μM	pyruvate 生成 μM	lactate 生成 μM	acetate 生成 μM
glucose	6.1	1.9	0.8	0.4	0.3
+ Fe <sup>++</sup>	9.0	2.4	0.2	0.4	0.2
+ Fe <sup>+++</sup>	8.8	2.3	0.2	0.4	0.2
+ αα'-dipyrid.	3.4	1.2	1.5	0.3	0.5
pyruvate	4.7	4.5	—	0.7	1.2
+ Fe <sup>++</sup>	6.9	5.5	—	0.8	0.8
+ Fe <sup>+++</sup>	6.7	5.2	—	0.6	0.8
+ αα'-dipyrid.	2.6	3.0	—	0.6	1.4

菌液 (湿菌量 20 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, 添加物 0.3 ml 全量 3.0 ml とする。  
PH 7.2, 37°C, 1hr., Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>: 10<sup>-4</sup>M, αα'-dipyridyl 10<sup>-3</sup>M

表 7 表 gluconate 酸化に対する Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>, αα'-dipyridyl の影響  
Sh. flexneri 2a (gluconate 培地培養菌)

	O <sub>2</sub> 消費 μM	pyruvate 生成 μM	lactate 生成 μM	acetate 生成 μM
gluconate	5.4	0	0.7	1.0
+ Fe <sup>++</sup>	6.0	0	0.9	0.8
+ Fe <sup>+++</sup>	5.8	0	0.9	0.8
+ αα'-dipyrid.	4.7	0.9	0.8	1.4

菌液 (湿菌量 20 mg) 2.0 ml, 基液 (湿菌量 20 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, 添加物 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。

PH 7.2, 37°C, 1hr.

Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>: 10<sup>-4</sup>M, αα'-dipyridyl: 10<sup>-3</sup>M

第 8 表 ribose の酸化に対する  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響  
Sh. flexneri 2a (ribose 培地培養菌)

	O <sub>2</sub> 消費	基質消費 $\mu M$	pyruvate 生成 $\mu M$	lactate 生成 $\mu M$	acetate 生成 $\mu M$
ribose	3.0	1.6	0	0.2	0.3
+ $Fe^{++}$	3.4	1.8	0	0.2	0.2
+ $Fe^{+++}$	3.3	1.7	0	0.2	0.2
+ $\alpha\alpha'$ -dipyrid.	2.4	1.3	0.3	0.4	0.4

菌液 (湿菌量 20 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, 添加物 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。  
PH 7.2, 37°C, 1hr.  
 $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ : 10<sup>-4</sup>M,  $\alpha\alpha'$ -pyridyl: 10<sup>-3</sup>M

第 9 表 glucose. pyruvate の酸化に対する  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響  
St. albus (普通寒天培養菌)

	O <sub>2</sub> 消費 $\mu M$	基質消費 $\mu M$	pyruvate 生成 $\mu M$	lactate 生成 $\mu M$	acetate 生成 $\mu M$
glucose	8.1	2.9	0	0.9	0.5
+ $Fe^{++}$	9.8	3.2	0	0.6	0.3
+ $Fe^{+++}$	9.6	3.1	0	0.6	0.3
+ $\alpha\alpha'$ -dipyrid.	6.2	2.1	0.8	0.8	0.9
pyruvate	7.6	7.3	—	1.2	1.9
+ $Fe^{++}$	9.4	8.6	—	1.0	1.2
+ $Fe^{+++}$	9.2	8.6	—	7.8	1.4
+ $\alpha\alpha'$ -dipyrid	5.4	5.0	—	1.0	2.1

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100), 添加物 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。  
pH 7.2, 37°C, 1hr.  
 $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ : 10<sup>-4</sup>M,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl: 10<sup>-3</sup>M

第 10 表 gluconate 酸化に対する  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響  
St. albus (gluconate 培地培養菌)

	O <sub>2</sub> 消費 $\mu M$	pyruvate 生成 $\mu M$	lactate 生成 $\mu M$	acetate 生成 $\mu M$
gluconate	4.1	0	0.5	0.7
+ $Fe^{++}$	5.0	0	0.3	0.6
+ $Fe^{+++}$	4.8	0	0.3	0.5
+ $\alpha\alpha'$ -dipyrid.	3.8	0.7	0.3	0.8

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, 添加物 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。  
pH 7.2, 37°C, 1hr.  
 $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ : 10<sup>-4</sup>M,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl: 10<sup>-3</sup>M

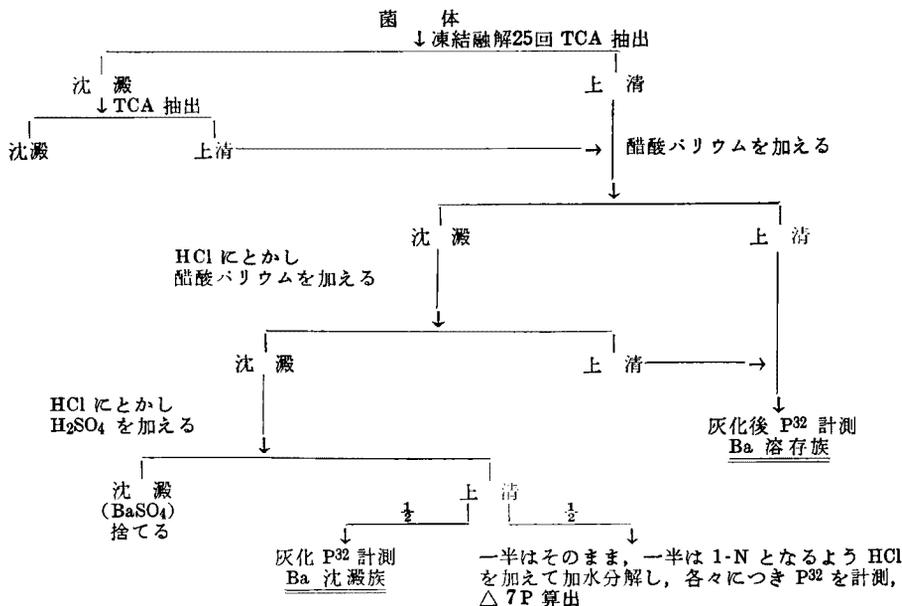
dipyridyl により阻害された。而して pyruvate 生成は,  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  の添加及び無添加の場合は共に認められないが,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl 添加によつては僅かながら pyruvate 生成が認められた。

2. 菌の呼吸時に於ける磷代謝に対する  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響

$Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  の作用の一端をうかがうため, P<sup>32</sup> を用い glucose, pyruvate を基質とした呼吸時

の磷代謝に及ぼす  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  及び  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響を検討した。即ち  $P^{32}O_4$ ... を含む磷酸緩衝液に菌を浮遊せしめ、glucose 或は pyruvate を基質として加えて  $37^\circ C$  に1時間振盪した後、菌体内に摂取された  $P^{32}$  の分布状態、及びこれに対する  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響を *B2a*, *albus* について見た。分画は第11表に従って行い、

各分画に入つて来る  $P^{32}$  を2分間のカウント数として表わすと第12表、第13表に示す結果となつた。 $Fe^{++}$  及び  $Fe^{+++}$  は  $\Delta 7P$  (高エネルギー磷酸化合物) 及び Ba 溶存族 (6炭糖, 3炭糖, 焦性ブドウ酸その他の磷酸化合物) に incorporate される  $P^{32}$  量を著しく増大せしめ、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl は逆にこれ等を減少せしめた。而して  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  に

第11表 磷化合物の分画 (Schneider 法<sup>6)</sup>)第12表 呼吸時の磷代謝に及ぼす  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響

Sh. fleyneri 2a

	$P^{32}$ incorporation (2分間の count 数)		
	$\Delta 7P$	Ba 溶存族	酸不溶性磷
基質なし	796	1937	715
glucose	1198	3766	1434
+ $Fe^{++}$	1974	4943	1825
+ $Fe^{+++}$	2031	4711	1803
+ $\alpha\alpha'$ -dipyr.	1083	2367	1025
pyruvate	1067	3451	1322
+ $Fe^{++}$	2135	4826	1737
+ $Fe^{+++}$	1792	4939	1626
+ $\alpha\alpha'$ -dipyr.	980	2406	1143

菌液 (湿菌量 210 mg) 7.0 ml, 基質 (終濃度 M/50) 1.0 ml,  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  (終濃度  $10^{-4}M$ ) 1.0 ml,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl (終濃度  $10^{-3}M$ ) 1.0 ml, M/50 磷酸緩衝液 ( $P^{32}$   $10\mu c$  を含む) 1.0 ml, 全量 10.0 ml とする

pH 7.2,  $37^\circ C$ , 1hr. incubation.

第 13 表 呼吸時の磷代謝に及ぼす  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響  
St. albus

	P <sup>32</sup> incorporate (2 分間の count 数)		
	$\Delta 7 P$	Ba 溶 存 族	酸 不 溶 性 磷
基 質 な し	1016	2137	1412
glucose	1937	3245	2031
+ $Fe^{++}$	2471	4711	2643
+ $Fe^{+++}$	2460	4926	2430
+ $\alpha\alpha'$ -dipyr.	1036	2931	1866
pyruvate	1783	3068	2131
+ $Fe^{++}$	2460	4778	2598
+ $Fe^{+++}$	2350	4471	2461
+ $\alpha\alpha'$ -dipyr.	1413	2764	1776

菌液 (湿菌量 210 mg) 7.0 ml, 基質 (終濃度 M/50) 1.0 ml,  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  (終濃度  $10^{-4}M$ ) 1.0 ml  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl (終濃度  $10^{-3}M$ ) 1.0 ml, M/50 磷酸緩衝液 ( $P^{32}$   $10\mu C$  を含む) 1.0 ml, 10.0 ml とする pH 7.2, 37°C, 1hr, incubation.

よる  $\Delta 7P$  への  $P^{32}$  の incorporation の増大は, これ等イオンの呼吸促進率を上廻っており,  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  が共に ATP などの高エネルギー磷酸化合物の関与する磷酸代謝を促進することが推定された。

### 3. 菌による $Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}$ の反応

以上の如く, 菌による glucose, pyruvate などの酸化を  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  が促進することを知ったが, これらのイオン自身は変化を受けるものか否かを検討した。

先づ B<sub>2a</sub> につき第 14 表に示した如く, 菌浮游液に M/100 glucose, pyruvate, lactate, succinate

を夫々基質として加え, 更に  $Fe^{++}$  を  $1\mu M/cc$  と なるように添加して, 好氣的及び嫌氣的に振盪した。これら反応液は試験管に入れ, 好氣的の場合はそのまま, 嫌氣的の場合は上部にパラフィンを重ねて振盪した。1 時間後に遠沈上清につき  $Fe^{++}$ , pyruvate, lactate の定量を行つたところ同表の結果が得られた。

即ち  $Fe^{+++}$  は glucose, pyruvate, lactate の酸化にともない  $Fe^{++}$  に還元され, succinate の場合はそれほど著明でなく, かつ一般に好氣的の場合は嫌氣的の場合よりこの傾向が著しいことを知つた。

第 14 表 菌による  $Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}$  反応 (1)

Sh. flexneri 2a

	好 気 的			嫌 気 的		
	$Fe^{++}$ 定量 値 $\mu M/cc$	pyruvate 生 成	lactate 生 成	$Fe^{++}$ 定量 値 $\mu M/cc$	pyruvate 生 成	lactate 生 成
— + — + $Fe^{+++}$	0	/	/	0	/	/
菌 + — + $Fe^{+++}$	0.001	—	±	0	—	+
菌 + glucose + $Fe^{+++}$	0.02	±	卅	0.003	+	卅
菌 + pyruvate + $Fe^{+++}$	0.02	/	卅	0.003	/	卅
菌 + lactate + $Fe^{+++}$	0.02	卅	/	0.003	+	/
菌 + succinate + $Fe^{+++}$	0.003	—	±	0.0005	—	±

菌液 (湿菌量 20mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml,  $Fe^{+++}$  (終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。

pH 7.2, 37°C, 1hr.

第 15 表 菌による  $Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}$  反応 (2)

Sh. flexneri 2a

	好 気 的			嫌 気 的		
	Fe <sup>+++</sup> 定量値 μM/cc	pyruvate 生 成	lactate 生 成	Fe <sup>+++</sup> 定量値 μM/cc	pyruvate 生 成	lactate 生 成
— + — + Fe <sup>++</sup>	0.02	/	/	0.006	/	/
菌 + — + Fe <sup>++</sup>	0.007	—	±	0.003	—	±
菌 + glucose + Fe <sup>++</sup>	0.001	±	++	0.001	+	++
菌 + pyruvate + Fe <sup>++</sup>	0.001	/	+	0	/	++
菌 + lactate + Fe <sup>++</sup>	0.001	++	/	0.0005	+	/
菌 + succinate + Fe <sup>++</sup>	0.005	—	±	0.002	—	±

菌液 (湿菌量 20 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, Fe<sup>++</sup> (終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする.

pH 7.2, 37°C, 1hr.

第 16 表 菌による  $Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}$  反応 (3)

St. albus

	好 気 的			嫌 気 的		
	Fe <sup>+++</sup> 定量値 μM/cc	pyruvate 生 成	lactate 生 成	Fe <sup>+++</sup> 定量値 μM/cc	pyruvate 生 成	lactate 生 成
— + — + Fe <sup>+++</sup>	0	/	/	0	/	/
菌 + — + Fe <sup>+++</sup>	0.001	—	±	0	—	±
菌 + glucose + Fe <sup>+++</sup>	0.01	—	±	0.002	±	+
菌 + pyruvate + Fe <sup>+++</sup>	0.01	/	+	0.001	/	+
菌 + lactate + Fe <sup>+++</sup>	0.01	++	/	0.001	+	/
菌 + succinate + Fe <sup>+++</sup>	0.001	—	±	0	—	—

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, Fe<sup>+++</sup> (終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする.

pH 7.2, 37°C, 1hr.

第 17 表 菌による  $Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++}$  反応 (4)

St. albus

	好 気 的			嫌 気 的		
	Fe <sup>+++</sup> 定量値 μM/cc	pyruvate 生 成	lactate 生 成	Fe <sup>+++</sup> 生 成 μM/cc	pyruvate 生 成	lactate 生 成
— + — + Fe <sup>++</sup>	0.02	/	/	0.006	/	/
菌 + — + Fe <sup>++</sup>	0.01	—	±	0.004	—	±
菌 + glucose + Fe <sup>++</sup>	0.001	—	±	0.001	±	+
菌 + pyruvate + Fe <sup>++</sup>	0.001	/	+	0.0005	/	+
菌 + lactate + Fe <sup>++</sup>	0.001	++	/	0.001	+	/
菌 + succinate + Fe <sup>++</sup>	0.01	—	±	0.004	—	—

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (各終濃度 M/100) 0.3 ml, Fe<sup>++</sup> (終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする.

pH 7.2, 37°C, 1hr.

次に  $Fe^{+++}$  の代りに  $Fe^{++}$  を加えて同様の実験を行った結果は第15表の通りであつて、 $Fe^{++}$  は勿論菌、基質の無添加の場合にも、好氣的条件に於ては自動的に  $Fe^{+++}$  に酸化される傾向があるが、菌による glucose, pyruvate, lactate の酸化の途次に於ては  $Fe^{+++}$  への酸化はむしろ抑制される。このように菌によるこれら基質の酸化に當つては  $Fe^{+++} \rightarrow Fe^{++}$  の反応が起り、 $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$  の反応は起りにくいものと考えられた。

*albus* を供試菌とした場合にも第16表、第17表に示す如く *B2a* の場合と全く同様の傾向であつた。

#### IV. 総括及び考案

細菌体を緩衝液で充分洗滌すると菌体内の遊離金属イオンの一部が除去される結果、代謝用式に変化を来すことが推定されている<sup>8)</sup>。本編では *Sh. flexneri* 2a (*B2a*), *St. albus* を供試菌とし、充分洗滌した菌体を用いて、基質酸化に於ける  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  の作用を検討した。

先づ普通寒天培養菌の各種基質に於ける  $O_2$  消費量、 $CO_2$  発生量に対する  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  及び  $Fe^{++}$  と特異的に錯塩を形成する  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響を見ると、 $O_2$  消費が  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  により最も促進され、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl により最も阻害される基質は両菌共 glucose 及び pyruvate であり、lactate がこれに次ぎ、succinate では殆んど影響されない。又 *B2a* に於ける gluconate, ribose は  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  の存在の有無に拘わらず酸化され難い。而して glucose を基質とした呼吸高 (RQ) は  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  により増大し、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl により減少する傾向が見られ、pyruvate ではこの逆に  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  により減少、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl により増大される。このことより glucose 或は pyruvate は  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  添加により完全酸化に近づくものと予想される。

これは次の事実により更に確かめられた。即ち glucose 酸化に於ける量的関係に対する添加物の影響を見ると、両菌共 glucose 消費量に対する pyruvate, lactate, acetate の蓄積量は、 $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  添加により減少し、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl により増大する。又 pyruvate を基質とした場合には  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  により pyruvate 消費量に対する acetate 蓄積量が増大し、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl により減少する。従つて  $Fe^{++}$  或は  $Fe^{+++}$  の欠乏時には主として pyruvate の段階で停とんするものと考えられる。而して

gluconate, ribose に適應せしめた菌体を用いた実験により、これらの基質の酸化に於ても、やはり  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  は pyruvate 以下の完全酸化を促進するものと推定される。

更に glucose 又は pyruvate を基質とした呼吸時に於ける燐代謝が  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl により如何に影響されるかを  $P^{32}$  を用いて見た実験よりするに、 $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  は共に菌の glucose 或は pyruvate の酸化にともなう、ATP などの高エネルギー燐酸化合物の関与する反応を促進することにより pyruvate 以下の完全酸化を促進するものと推定される。

このように本実験の範囲内に於ては  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  は同様の作用を示すものであるが、これは  $Fe^{++}$  又は  $Fe^{+++}$  は何れも効果があるが、或は作用をもつのは、その一方であり、他方は一旦それに變化した後に効果を發揮するかを以下検討する。

菌浮遊液に glucose, pyruvate, lactate, succinate を夫々基質として加え、更に  $Fe^{+++}$  を添加して好氣的及び嫌氣的に振盪した後、遠沈上清の  $Fe^{++}$  を定量するに、両菌共 glucose, pyruvate, lactate を基質とした場合には著量の  $Fe^{++}$  の生成が認められる。これに対し  $Fe^{+++}$  の代りに  $Fe^{++}$  を添加して上清中の  $Fe^{+++}$  を定量しても、 $Fe^{++}$  の生成は全く認められず、而も基質無添加の場合対照は空气中の  $O_2$  によりかなりの量の  $Fe^{++}$  が自動的に酸化されて  $Fe^{+++}$  を生成するが、glucose, pyruvate, lactate を加えて置くと  $Fe^{+++}$  の生成は殆んど認められない。

即ち、 $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++} \rightarrow Fe^{++}$  の反応が活発であることが分る。而してこれは嫌氣的に於けるよりも好氣的に於ける方がはるかに著しい。

これらのことより pyruvate を完全酸化に導く作用をもつものは  $Fe^{++}$  であり、 $Fe^{+++}$  は菌の基質酸化に於て  $Fe^{++}$  に還元されてから効果を發揮するのではないかと推定される。

#### V. 結 言

*Sh. flexneri* 2a, *St. albus* の教室保存標準株を供試菌とし、各基質酸化、特に glucose 酸化に於ける  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の影響を検討して次の結果を得た。

1.  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  は glucose 酸化に於ける pyruvate 以下の完全酸化を促進し、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl は阻害する。2.  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  の作用点の一つは

高エネルギーの燐酸化合物の関与する酵素反応である (参考文献は第3編の末尾に記載)  
と思われる。

3.  $Fe^{+++}$  は菌の基質酸化途次に於て  $Fe^{++}$  に還元されて後作用するのではないかと推定される。

---

## The Action of Iron Ions on Glucose Oxidation of Bacteria Part 1. The Action of Iron Ions on the Resting Cells

By

Kiyoshi TOBE

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

Using the standard strains such as *Sh. flexneri* 2a and *St. albus*, that are stocked in our laboratory, the author studied the influences of  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ , and  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl on the oxidation of various substrates, especially that of glucose, and obtained the following results:

1.  $Fe^{++}$  and  $Fe^{+++}$  promotes the complete oxidation of pyruvate in the course of the glucose oxidation, whereas  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl acts as to inhibit the oxidation.
  2. One of the actions of  $Fe^{++}$  and  $Fe^{+++}$  seems to be the enzymatic reaction involved in high energy phosphate compounds.
  3. It appears that first  $Fe^{+++}$  is reduced to  $Fe^{++}$  in the process of the substrate oxidation by bacteria and then it begins to act.
-