

## 細菌の glucose 酸化に於ける鉄イオンの作用

## 第 3 編

## 減鉄培地発育菌の酵素的性状(2)

## staphylococcus albus について

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

|                           |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| I. 緒 言                    | 体の酵素的性状                    |
| II. 実験材料及び実験方法            | 3. gluconate をC源とした培地に発育した |
| III. 実験成績                 | 菌体の酵素的性状                   |
| 1. 各培地に於ける発育曲線, 並びにC源の酸化  | IV. 総括及び考案                 |
| 2. glucose をC源とした培地に発育した菌 | V. 結 言                     |

## I. 緒 言

前編迄の実験により, *Sh. flexneri* 2a, *St. albus* の静止菌では, その glucose 酸化は  $Fe^{++}$  が不足すると pyruvate 以下の完全酸化が不円滑になり, 又 *St. flexneri* 2a では  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl を加えて  $Fe^{++}$  量を減じた培地に発育した菌体の glucose 酸化は,  $Fe^{++}$  を充分含む培地に発育したものに比し pyruvate の完全酸化に関与する酵素活性が低下しているが, チフテリア菌に見られるような<sup>1)</sup> H 伝達系のチトクローム系より, フラビン系への変換は見られず, 更に又 glucose 酸化に於ける glucose  $\rightarrow$  pyruvate 間の経路の変換も認められないことを知った。

本編では *St. albus* 供試菌につき,  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl を添加して  $Fe^{++}$  量を減じた培地に発育した菌体が,  $Fe^{++}$  を充分含む培地に発育した対照菌体に比し, 酵素的性状に於て如何なる変化が見られるかにつき検討することとした。

## II. 実験材料及び実験方法

供試細菌: *St. albus* の教室保存標準株。

菌培養法:

基礎培地組成

|          |        |
|----------|--------|
| 第一磷酸カリ   | 0.35 g |
| 第二磷酸ソーダ  | 2.5    |
| 食塩       | 3.0    |
| 硫酸マグネシウム | 0.01   |
| ペプトン     | 10.0   |
| 酵母エキス    | 0.5    |
| 水        | 1.0 l  |
| pH       | 7.2    |

上の組成の基礎培地にC源として glucose 或は gluconate を 2 g/l となるように加え, 更に  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl (0.05 g/l) を加えたもの, 並びに  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の代りに硫酸第一鉄 (0.001 g/l) を加えたものを培地とし, 夫々に5代以上継代して馴れさせたものから接種し18時間, 37°Cで静置培養した。なお  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl は初代培養は減量して培地に加え, 菌が馴れるにつれて順次濃度を上昇させるようにした。

菌浮游液の調製: 培地より集めた菌体を M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.2) にて2回遠沈洗滌し, 再び同一組成の緩衝液に浮游して使用した。菌量決定は光電比濁計によつた。

呼吸量測定: Warburg 検圧計を用い常法<sup>2)</sup>に従つた。

基質, 阻害剤: 何れも市販品を用い, 蒸留水に

とかし, HCl 又は NaOH にて pH を修正した.

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-hydroxy diphenyl を用いる比色法<sup>7)</sup>によつた.

acetate の定量: 試料溶液を水蒸気蒸溜し溜出液を M/100 NaOH にて滴定した.

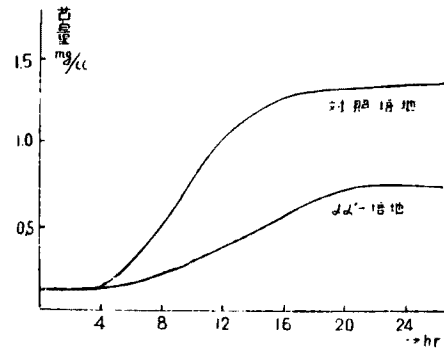
ribose の定量: orcine-HCl 反応によつた.

### III. 実験成績

1. 各培地に於ける発育曲線, 並びに C 源の酸化前記基礎培地に glucose を C 源として加え, 更に  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl を添加したもの ( $\alpha\alpha'$ -培地と略す) 及び  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl を加えないで  $Fe^{++}$  を加えたもの (対照培地) を作り, 夫々の培地に 5 代継代したものから 1 白金つつを接種し, 37°C で培養して発育曲線を記録した. 結果は第 1 図の如くであつて, 対照培地では接種後 4 時間目頃より stationary phase となるるに対し,  $\alpha\alpha'$ -培地では 8 時間目頃より logphase に入り, 16 時間目頃より stationary phase に入る. 最高菌量は対照培地では約 1.5 mg/cc であるのに対し  $\alpha\alpha'$ -培地では約 1.0 mg/cc 程度であつて発育は不良であつた.

C 源を glucose の代りに gluconate とした場合にも類似の成績であり,  $\alpha\alpha'$ -培地では発育の遅滞,

第 1 図  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl 添加及び無添加培地に於ける発育曲線 (glucose 加培地)



不良が見られた.

次に glucose 或は gluconate を C 源とした培地に於ける C 源の消失量, pyruvate, acetate, lactate の生成量並びに培地 pH を 24 時間後, 48 時間後に測定したところ第 1 表, 第 2 表の通りであり, glucose を C 源とした場合には, 対照培地に於て培地 pH は 24 時間後に 5.7, 48 時間後に 5.9 となり,  $\alpha\alpha'$ -培地では夫々 5.9, 5.6 であつて両培地間に著差は見られなかつた. 培地 glucose 消失量は  $\alpha\alpha'$ -培地の方が少く, pyruvate, lactate, acetate 蓄積量は  $\alpha\alpha'$ -培地の方がやや大であり, 従つて glucose 消費量に対する pyruvate, lactate, acetate の蓄積量の割合は  $\alpha\alpha'$ -培地の方がかなり大きいと言える.

第 1 表 glucose を C 源とした培地発育菌の glucose 分解

| 培地                 | 定量値    | 始 pH | 終 pH | glucose 消失<br>$\mu\text{M}/\text{cc}$ | pyruvate 生成<br>$\mu\text{M}/\text{cc}$ | lactate 生成<br>$\mu\text{M}/\text{cc}$ | acetate 生成<br>$\mu\text{M}/\text{cc}$ |
|--------------------|--------|------|------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                    |        |      |      |                                       |  |                                       |                                       |
| 対 照                | 24 hr. | 7.2  | 5.7  | 2.7                                   | 0.3                                    | 0.3                                   | 0.2                                   |
|                    | 48 hr. | 7.2  | 5.5  | 6.3                                   | 1.0                                    | 0.6                                   | 0.5                                   |
| $\alpha\alpha'$ 培地 | 24 hr. | 7.2  | 5.9  | 2.0                                   | 0.5                                    | 0.4                                   | 0.3                                   |
|                    | 48 hr. | 7.2  | 5.6  | 4.9                                   | 1.1                                    | 0.8                                   | 0.7                                   |

第 2 表 gluconate を C 源とした培地に発育中

| 培地                 | 時間     | 始 pH | 終 pH | pyruvate 生成<br>$\mu\text{M}/\text{cc}$ | lactate 生成<br>$\mu\text{M}/\text{cc}$ | acetate 生成<br>$\mu\text{M}/\text{cc}$ |
|--------------------|--------|------|------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                    |        |      |      |  |                                       |                                       |
| 対照培地               | 24 hr. | 7.2  | 5.9  | 0.4                                    | 0.2                                   | 0.3                                   |
|                    | 48 hr. | 7.2  | 5.7  | 0.7                                    | 0.6                                   | 0.7                                   |
| $\alpha\alpha'$ 培地 | 24 hr. | 7.2  | 5.7  | 0.5                                    | 0.4                                   | 0.4                                   |
|                    | 48 hr. | 7.2  | 5.4  | 0.9                                    | 0.8                                   | 0.9                                   |

gluconate を C 源とした培地に於ては、精度の高い gluconate の定量法がないため、培地 gluconate の消失量は測定出来なかつたが、pH の変化、分解産物の蓄積量などとして glucose を C 源とした培地の所見と同様の傾向であつた。

2. glucose を C 源とした培地に發育した菌体の酵素的性状

実験方法の項に於て記した通りの glucose を C 源とし、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl を加えた培地に 20 時間培養した菌 ( $\alpha\alpha'$ -菌と略す) 及び  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl の代りに  $Fe^{++}$  を加えた培地に培養した菌 (対照菌) の静止菌株の各種基質酸化能、及び glucose の酸化様式を検討した。

第 3 表に示した各種基質 (各終濃度 M/100) に於ける  $O_2$  消費量 (1 時間値) を比較すると同表に見られる如く、対照菌では glucose, glycerol-P, pyruvate, lactate, succinate を基質として著明に  $O_2$  消費が見られるのに対し、 $\alpha\alpha'$ -菌では glucose を基質とした場合の  $O_2$  消費量はむしろ対照菌よりは大であるが、pyruvate, lactate, acetate, succi-

第 3 表 glucose 培地 ( $\alpha\alpha'$ -dipyridyl 添加、及び無添加) 培養菌体の各基質酸化能 ( $O_2 \mu l$ )

|            | 対 照 菌 | $\alpha\alpha'$ 菌 |
|------------|-------|-------------------|
| なし         | 37    | 49                |
| glucose    | 192   | 263               |
| gluconate  | 47    | 51                |
| ribose     | 44    | 53                |
| glycerol-P | 91    | 72                |
| pyruvate   | 96    | 52                |
| lactate    | 120   | 59                |
| acetate    | 69    | 56                |
| succinate  | 122   | 53                |

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, 1 hr.

ate を基質とした  $O_2$  消費は対照菌に比し著しく小であつた。

次に  $\alpha\alpha'$ -菌、及び対照菌の glucose 酸化様式を比較するため、第 4 表の如く、glucose を基質とし

第 4 表 glucose 培地發育菌の glucose 酸化

| 菌                 | 基質, 阻害剤          | 定 量 値               |                      |      |                   |                         |
|-------------------|------------------|---------------------|----------------------|------|-------------------|-------------------------|
|                   |                  | $O_2$ 消費<br>$\mu M$ | $CO_2$ 発生<br>$\mu M$ | RQ   | 基質, 消費<br>$\mu M$ | pyruvate 生 成<br>$\mu M$ |
| 対 照               | glucose          | 11.2                | 7.7                  | 0.69 | 3.8               | 0.8                     |
|                   | — + DNP          | 9.8                 | 6.5                  | 0.66 | 3.0               | 1.9                     |
|                   | — + monoiodoacet | 3.9                 | 2.7                  | 0.69 | 0.9               | 0.2                     |
|                   | — + KCN          | 6.1                 | 4.1                  | 0.68 | 2.0               | 0.45                    |
|                   | — + arsenite     | 6.3                 | 4.1                  | 0.65 | 2.6               | 3.2                     |
|                   | pyruvate         | 5.8                 | 8.1                  | 1.39 | 6.2               | —                       |
|                   | — + DNP          | 0.7                 | 1.0                  | 1.47 | 0.9               | —                       |
|                   | — + monoiodoacet | 1.4                 | 2.0                  | 1.40 | 1.5               | —                       |
|                   | — + KCN          | 1.3                 | 1.8                  | 1.42 | 1.5               | —                       |
|                   | — + arsenite     | 0.6                 | 0.9                  | 1.48 | 0.7               | —                       |
| $\alpha\alpha'$ 菌 | glucose          | 12.4                | 6.4                  | 0.52 | 4.3               | 2.6                     |
|                   | — + DNP          | 3.3                 | 1.7                  | 0.52 | 1.0               | 0                       |
|                   | — + monoiodoacet | 4.4                 | 2.2                  | 0.51 | 2.2               | 0.3                     |
|                   | — + KCN          | 4.0                 | 2.0                  | 0.50 | 1.4               | 0.5                     |
|                   | — + arsenite     | 6.4                 | 3.1                  | 0.49 | 2.0               | 0.9                     |
|                   | pyruvate         | 1.4                 | 2.0                  | 1.42 | 1.6               | —                       |
|                   | — + DNP          | 0.5                 | 7.2                  | 1.43 | 0.6               | —                       |
|                   | — + monoiodoacet | 0.9                 | 1.3                  | 1.42 | 1.0               | —                       |
|                   | — + KCN          | 0.8                 | 1.1                  | 1.43 | 1.0               | —                       |
|                   | — + arsenite     | 0.4                 | 5.7                  | 1.43 | 0.5               | —                       |

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質, 阻害剤各 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。pH 7.2, 37°C, 1 hr.  
glucose, pyruvate :  $10^{-2}M$ , DNP :  $10^{-3}M$ , monoiodoacetate :  $1/3 \times 10^{-3}M$ , KCN :  $3 \times 10^{-3}M$ , arsenite  $10^{-3}M$ .

た O<sub>2</sub> 消費, 基質消費, pyruvate 生成の量的関係と, これに対する 2, 4-dinitrophenol (DNP 10<sup>-3</sup>M), monoiodo, acetate (1/3 × 10<sup>-3</sup>M), KCN (1/2 × 10<sup>-2</sup>M), arsenite (10<sup>-3</sup>M) の影響を検討した. 対照菌では阻害剤無添加 (対照) の場合, 3.8 μM の glucose 消費に対し 11.2 μM の O<sub>2</sub> 消費, 0.8 μM の pyruvate 蓄積が認められ, αα'-菌では 4.3 μM の glucose 消費に対し 12.4 μM の O<sub>2</sub> 消費, 2.6 μM の pyruvate 蓄積が見られるが, DNP 添加によつては, αα'-菌では対照菌に比し O<sub>2</sub> 消費, glucose 消費の阻害率が大きく, かつ pyruvate 蓄積は対照菌では増大するのに対し, αα'-菌では減少するという差異が認められた. monoiodo acetate, KCN の影響は両菌間に著明な差異は見られなかった. 又 arsenite では O<sub>2</sub> 消費, glucose 消費の阻害率は両菌間に大差はないが対照菌では glucose 1M 当り 1M 以上の pyruvate が蓄積するのにに対し, αα'-菌では pyruvate 蓄積量の割合はこれよりは小であつた. なお同時に行つた pyruvate を基質とした場合については各阻害剤の影響は両菌間に差異は認められず, これら阻害剤によつて何れも pyruvate 酸化は著明に抑制された.

### 3. gluconate を C 源とした培地に発育した菌の酵素的性状

次に gluconate を C 源とした αα'-培地及び対照培地に発育した菌体の基質酸化能, 及び glucose, gluconate 酸化様式を比較した.

先づ第 5 表に示した各基質に於ける O<sub>2</sub> 消費量を

第 5 表 gluconate 培地 (αα'-dipyridyl 添加, 及び無添加) 培養菌体の各基質酸化能

|           | 対 照 菌 | αα' 菌 |
|-----------|-------|-------|
| なし        | 25    | 29    |
| glucose   | 112   | 156   |
| gluconate | 62    | 129   |
| ribose    | 27    | 34    |
| glycero-P | 81    | 51    |
| pyruvate  | 83    | 42    |
| lactate   | 106   | 53    |
| acetate   | 53    | 30    |
| succinate | 94    | 53    |

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, 1 hr.

測定したところ, 同表に見られる如く, 対照菌は glucose, pyruvate, lactate, succinate を基質とした O<sub>2</sub> 消費量が大きく, 又 gluconate にはやや適応しているのが認められる程度であつたが, これに対し αα'-菌では glucose 消費量は対照菌よりはむしろ大きく, gluconate への適応は対照菌に於けるより著しく大であるが, pyruvate, lactate, acetate, succinate を基質とした O<sub>2</sub> 消費は対照菌よりは著しく小であつた.

gluconate 酸化能は *St. albus* に於ては発育に於ける phase に支配され, logphase にある菌は gluconate を基質とした O<sub>2</sub> 消費が大きく培養時間が長くなり, stationary phase に入ると酸化能が低下すると考えられる<sup>12)</sup>.

そこで上述の αα'-菌が対照菌に比し gluconate 酸化能が大きくであるという成績がこのような発育に於ける phase によるか否かを検討するために, αα'-菌及び対照菌の 12 時間, 24 時間, 48 時間培養のものをを用いて夫々の gluconate を基質とした O<sub>2</sub> 消費量を測定した. 結果は第 6 表の通り, 何れの培養時間

第 6 表 gluconate 培地発育菌の gluconate を基質とした O<sub>2</sub> 消費量

|       |           | 12 hr. | 24 hr. | 48 hr. |
|-------|-----------|--------|--------|--------|
| 対照菌   | 基質なし      | 32     | 21     | 16     |
|       | gluconate | 81     | 59     | 47     |
| αα' 菌 | 基質なし      | 42     | 26     | 19     |
|       | gluconate | 149    | 112    | 76     |

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

のものも αα'-菌の方が gluconate 酸化能が大きく, かつ 12 時間培養の対照菌よりも 24 時間培養の αα'-菌の方が大であつて, 菌体の発育に於ける phase のみの影響ではないと推定された.

次に αα'-菌及び対照菌の glucose 酸化を検討するため, glucose を基質とした O<sub>2</sub> 消費, glucose 消費, pyruvate 蓄積の量的関係とこれに対する 2, 3 阻害剤の影響を比較した. 結果は第 7 表の通りであつて, O<sub>2</sub> 消費量, glucose 消費量に対する DNP の阻害率は αα'-菌の方が大きく, かつ pyruvate 蓄積量は対照菌では増大するのに対し, αα'-菌では著しく阻害され, 又 monoiodo acetate, KCN の影響は両菌間に著差は見られず, arsenite 添加に

第 7 表 gluconate 培地発育菌の glucose 酸化

| 菌                 | 定量値<br>基質, 阻害剤 | O <sub>2</sub> 消費 | CO <sub>2</sub> 発生 | RQ   | glucose 消費    | pyruvate 生成   |
|-------------------|----------------|-------------------|--------------------|------|---------------|---------------|
|                   |                | $\mu\text{M}$     | $\mu\text{M}$      |      | $\mu\text{M}$ | $\mu\text{M}$ |
| 対照菌               | glucose        | 10.6              | 7.2                | 0.68 | 3.6           | 0.4           |
|                   | + DNP          | 9.2               | 6.1                | 0.66 | 3.2           | 1.2           |
|                   | + moniodoacet  | 3.3               | 2.3                | 0.69 | 1.2           | 0             |
|                   | + KCN          | 5.7               | 3.9                | 0.68 | 2.0           | 0.4           |
|                   | + arsenite     | 5.2               | 3.4                | 0.66 | 1.8           | 2.3           |
| $\alpha\alpha'$ 菌 | glucose        | 12.6              | 7.7                | 0.61 | 4.3           | 2.4           |
|                   | + DNP          | 7.9               | 4.7                | 0.59 | 3.5           | 0.4           |
|                   | + moniodoacet  | 4.1               | 2.5                | 0.61 | 1.4           | 0.6           |
|                   | + KCN          | 6.7               | 4.0                | 0.60 | 2.1           | 0.6           |
|                   | + arsenite     | 8.9               | 5.2                | 0.58 | 3.8           | 2.4           |

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

DNP :  $10^{-3}\text{M}$ , moniodoacetate  $1/3 \times 10^{-3}\text{M}$ , KCN :  $3 \times 10^{-3}\text{M}$ , arsenite :  $10^{-3}\text{M}$ .

よつては、対照菌では glucose 1M より、1M 以上の pyruvate が蓄積するのに対し、対照菌では glucose 消費量に対する pyruvate 蓄積量の割合は対照菌よりは小であつた。

このように、これら阻害剤の影響は前述の glucose を C 源とした培地に於ける所見と全く同様で

あつた。

次に両菌の gluconate 酸化を比較するため、gluconate を基質とした O<sub>2</sub> 消費量, pyruvate の蓄積量, 及びこれに対する阻害剤の影響を検討した。結果は第 8 表に示した如く阻害剤無添加の場合、対照菌では gluconate より pyruvate 生成は見ら

第 8 表 gluconate 発育菌の gluconate 分解に対する阻害剤の影響

| 菌                 | 定量値<br>基質, 阻害剤  | O <sub>2</sub> 消費 | CO <sub>2</sub> 発生 | RQ   | pyruvate 生成   |
|-------------------|-----------------|-------------------|--------------------|------|---------------|
|                   |                 | $\mu\text{M}$     | $\mu\text{M}$      |      | $\mu\text{M}$ |
| 対照菌               | gluconate       | 4.1               | 4.2                | 1.02 | 0             |
|                   | - + DNP         | 1.6               | 1.6                | 1.01 | 0             |
|                   | - + moniodoacet | 2.0               | 2.0                | 1.02 | 0             |
|                   | - + KCN         | 2.0               | 2.0                | 1.01 | 0.3           |
|                   | - + arsenite    | 2.4               | 2.4                | 1.00 | 1.9           |
| $\alpha\alpha'$ 菌 | gluconate       | 8.9               | 8.6                | 0.97 | 2.4           |
|                   | - + DNP         | 2.1               | 2.0                | 0.96 | 0             |
|                   | - + moniodoacet | 4.3               | 4.2                | 0.97 | 0.7           |
|                   | - + KCN         | 4.1               | 3.9                | 0.96 | 0.8           |
|                   | - + arsenite    | 5.2               | 4.9                | 0.95 | 3.1           |

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

DNP :  $10^{-3}\text{M}$ , moniodoacetate :  $1/3 \times 10^{-3}\text{M}$ , KCN :  $3 \times 10^{-3}\text{M}$ , arsenite  $10^{-3}\text{M}$ .

れず、 $\alpha\alpha'$  菌では O<sub>2</sub> 消費 8.9  $\mu\text{M}$  に対し pyruvate 生成は 2.4  $\mu\text{M}$  で、前述の glucose を基質とした場合よりはるかに少い。而して DNP 添加に於ては両菌共 pyruvate 生成は皆無となり、

moniodo acetate, KCN の影響も両菌間に有意の差異は見られなかつた。又 arsenite 添加に於ける O<sub>2</sub> 消費と pyruvate 生成の割合も両菌間に著差は認められなかつた。

## IV. 総括及び考案

供試菌 *St. albus* の教室保存株は glucose 酸化経路が培養条件により比較的変りやすいと考えられる<sup>11)</sup>が、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl を加えて  $Fe^{++}$  量を減じた培地に発育した菌体 ( $\alpha\alpha'$ -菌) が、 $Fe^{++}$  を充分含む培地に発育したもの (対照菌) と酵素的性状に於て如何に変化しているかについて行つた以上の実験成績に検討を加えた。

glucose 或は gluconate を C 源として  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl 添加培地 ( $\alpha\alpha'$ -培地) 及び含  $Fe^{++}$  培地 (対照培地) に於ける発育曲線を見ると、C 源が何れの場合にも  $\alpha\alpha'$ -培地では対照培地に比し発育は不良であり、発育のおくれが見られる。然し実験に用いた 20 時間培養菌は、何れも stationary phase の菌体と考えてきつかえないと思われる。

さて glucose 或は gluconate を C 源とした  $\alpha\alpha'$ -培地及び対照培地に菌を培養し培地 pH の変化、培地 C 源の消失量、pyruvate, lactate, acetate の生成量を比較すると、 $\alpha\alpha'$ -培地では、対照菌に比し pH の変化には著差は見られないが、培地 C 源の消失に対する pyruvate, lactate, acetate の蓄積量は著しく大であり、従つて  $\alpha\alpha'$ -培地では C 源酸化に於ける pyruvate 以下の酸化が不完全となるものと推定される。

そこで glucose 又は gluconate を C 源とした培地に発育した菌体の各種基質酸化能を比較すると、 $\alpha\alpha'$ -菌では pyruvate, lactate, acetate, succinate など末端物質の酸化能が弱く、*Sh. flexneri* 2a と同様 TcA cycle による pyruvate の完全酸化に関与する酵素系が衰弱していることがうかがわれる。

このように pyruvate 以下の酸化能は変化していることが認められるが glucose  $\rightarrow$  pyruvate 間の酸化経路には差異を生じているものか否かを見るため、glucose を C 源とした培地に発育した菌体の glucose 酸化に対する 2, 3 阻害剤の影響を検討すると、対照菌では glucose を基質とした  $O_2$  消費、glucose 消費 DNP により余り影響されず、かつ pyruvate 蓄積量は DNP により増大するのに対し、 $\alpha\alpha'$ -菌では glucose を基質とした  $O_2$  消費、glucose 消費は DNP によりかなり抑制され、かつ pyruvate 蓄積は DNP 添加により著明に減少する。又 arsenite 添加によつては、対照菌では glucose 1M の消費当り 1M 以上の pyruvate を蓄積するのにに対し、 $\alpha\alpha'$ -菌では pyruvate 蓄積量の割合は対照菌に於け

るより少い。

このような  $\alpha\alpha'$ -菌と対照菌との差異は gluconate を C 源とした培地に於ける  $\alpha\alpha'$ -菌と対照菌とに於いても見られ、培地 C 源が glucose の場合にも gluconate の場合にも共に  $\alpha\alpha'$ -菌が対照菌とは glucose 酸化経路に於ける glucose  $\rightarrow$  pyruvate 間に差異を生じていることを示すものと考えられる。武田<sup>11)</sup>は *St. albus* の glucose 酸化に対する DNP の影響の差異よりその酸化様式が、菌体の発育に於ける phase により異り、培養時間の短いもの、即ち logphase にある菌体では glucose より pyruvate 生成は DNP により増大し、培養時間が長いもの、即ち stationary phase にある菌体では DNP より逆に減少することを見ている。然しながら、上述の  $\alpha\alpha'$ -菌と対照菌との差異はこのような phase の相異に帰することは出来ない。即ち  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl 添加培地に於ては発育が対照培地に於けるより遅れるのであるから、この  $\alpha\alpha'$ -菌と対照菌の差異は発育に於ける phase の相異によるのではなくして培地  $Fe^{++}$  量の不足そのものに由米すると考えられる。

gluconate を C 源とした培地に於ては *Sh. flexneri* 2a と同様、 $\alpha\alpha'$ -菌は対照菌に比し gluconate への適応は著しいが、gluconate 酸化に於ては pyruvate 以下の酸化が不完全であるということ以外、阻害剤の影響を見た実験からは gluconate  $\rightarrow$  pyruvate 間の酸化経路の変換は認められなかつた。

又 KCN による阻害剤実験の結果 C 源代謝に於ける H 伝達がチトクローム系よりフラビン系へ変換しているということも認められなかつた。

## V. 結 言

*St. albus* の教室保存標準株を供試菌とし、培地 C 源を glucose 又は gluconate とし、 $\alpha\alpha'$ -dipyridyl を添加して  $Fe^{++}$  量を減じた培地及び  $Fe^{++}$  を充分含有する培地に静置培養 (18 時間) した菌体の酵素的性状を検討して次の結果を得た。

1. 培地 C 源の如何に拘わらず減鉄培地発育菌では glucose 酸化に於ける pyruvate 以下の完全酸化に関与する酵素活性が低下する。
2. glucose を C 源とした、減鉄培地発育菌では glucose  $\rightarrow$  pyruvate 間の経路は含鉄培地のそれとは別のものが発達している。
3. gluconate を C 源とした培地の場合、減鉄培地発育菌と含鉄培地発育菌間に gluconate 酸化の

差異は見られない。

4. 減鉄培地発育菌に於て、H伝達系のチトクローム系よりフラビン系への変換は起らないものと思われる。

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なる謝意を表します。

#### 参 考 文 献

- |  |  |
|--|--|
| 1) 八木国夫, 三橋 進, 小島保彦: 酵素化学シンポジウム, <b>9</b> , 59, (1954)   | 7) 標準生化学実験, 文江堂: 35, (1953)                      |
| 2) Umbreit, W. W., et al.: Manometric Techniques, (1949) | 8) 標準生化学実験, 文江堂: 136, (1953)                     |
| 3) 化学実験学, 第1部, 分析化学II, 河出書房, 460, (1943).                | 9) 松浦慶之・岡山医学会雑誌, <b>68</b> 巻, 1~4号, 153, (1956)  |
| 4) Feigl, F., et al.: Z. anal. chem., <b>90</b> , 199.   | 10) 標準生化学実験, 文江堂: (1953)                         |
| 5) 標準生化学実験, 文江堂・18, (1953)                               | 11) 藤本剛平: 岡山医学会雑誌, <b>69</b> 巻, 9号, 2455, (1957) |
| 6) 標準生化学実験, 文江堂: 36, (1953)                              | 12) 武田正孝: 岡山医学会雑誌,                               |

## The Action of Iron Ions in Glucose Oxidation of Bacteria

### Part 3. Enzymatic Properties of Bacteria Cultured in the Medium with Reduced Iron Content (2) *Staphylococcus albus*

By

Kiyoshi TOBE

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

Using *St. albus*, the standard strain stocked in our laboratory, as the test bacteria, by studying the metabolic reactions of the bacteria, cultured both in the medium reduced of its  $Fe^{++}$  content by addition of  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl and in the medium with sufficient  $Fe^{++}$ , the author obtained the following results:

1. Irrespective of what the C-source may be, in the case of *St. albus* cultured in the medium with reduced  $Fe^{++}$  by addition of  $\alpha\alpha'$ -dipyridyl the enzymatic activity involved in the complete oxidation of those below pyruvate in the process of glucose oxidation is lowered.

2. In the medium with glucose as its C-source with reduced  $Fe^{++}$  there is developed a pathway different from that in the case of the medium containing sufficient  $Fe^{++}$  in the course of the oxidation pathway from glucose to pyruvate.

3. In the medium with gluconate as its C-source there can be recognized no difference in the gluconate oxidation whether cultured in the medium with reduced  $Fe^{++}$  or in the medium containing sufficient  $Fe^{++}$ .