

Radioisotope P<sup>32</sup> による細菌燐代謝の研究

## 第二編

P<sup>32</sup> 摂取量に及ぼす金属イオン, 抗生物質の影響

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

竹 原 実

〔昭和 33 年 9 月 1 日受稿〕

## 目 次

## I. 緒 言

## II. 実験材料及び実験方法

## III. 実験成績

第1節 Mg<sup>++</sup>Fe<sup>++</sup> 2価金属イオンの影響

## 第2節 Aureomycin, Chloromycetin, Penicillin の影響

## 第3節 Aureomycin 投与時変化の影響

第4節 各燐分割への P<sup>32</sup> incorporation の検討と Aureomycin の各燐分割への影響

## IV. 総括及び考按

## V. 結 論

## 文 献

## I. 緒 言

二価金属イオンである Fe<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> イオンが種々の酵素作用を活性化することは周知の事実であり、単離された酵素系についての賦活作用の機構点は多くの生化学者により究明されている。しかし極めて多くの酵素系が複雑に組合さつた細菌体に於ては、代謝に於ける金属イオンの作用は複雑を極め、従つて色々の角度から作用点を正確に捕捉しようとする努力が払われている<sup>1)2)3)</sup>。

第一編に論じた如く燐代謝は生体内代謝過程に非常に大きな役割を果すものであり、前述の金属イオンの作用点も酸化と共働した oxidative-phosphorylation に関する酵素系に存すること大なりと目されるので、著者は Sal. 57 S, Sal. 57 R, Staph. albus, Staph. aureus に就て各種基質代謝時に於ける燐摂取に及ぼす Fe<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> イオンの影響を追求し金属イオン作用機構研究の一助になさんと試みた。

又抗生物質の細菌に対する作用は多くの研究者により詳細に研究されている。Aureomycin では Loomis<sup>4)</sup> (1950) は燐代謝を阻害すると言つており、Van Metter<sup>5)</sup> は TCA 回路の或る部分を封鎖する作用をもつと言つている。

Chloromycetin では Smith<sup>6)7)</sup> は脂肪酸エステルの代謝を阻害し、Gale<sup>8)</sup> は蛋白合成の阻害をなすと述べている。Penicillin に於ては Vendrely<sup>9)10)</sup> は核酸代謝を阻害し、Mitchell<sup>11)</sup> は ATP 代謝の所を阻害すると述べ、本邦梅沢<sup>12)</sup> 等は Penicillin は増殖期の菌の呼吸は阻害するが休止期の呼吸には効果がないと言つている。かく作用機構に関しては諸説紛々としてゐるが、著者も静菌状態に於ける各基質代謝時に於てこれら抗生物質が細菌代謝の本態の一端を担う燐代謝に如何なる影響を及ぼすかを検討した次第である。

## II. 実験材料及び実験方法

供試細菌: 各菌共教室保存の Sal. 57 S, Sal. 57 R (Sal. 57 S より継代純化を計り常法により常に確認しつつ使用した), Staph. albus, Staph. aureus を使用し普通寒天平板上に 37°C 18時間培養のものを用いた。培養後掻集め生理的食塩水で 4000r. p. m. 20分2回洗滌を行い更に生理的食塩水に浮遊して 37°C 1時間自家呼吸を行わしめ、次に M/50 磷酸緩衝液に浮遊せしめ光電比色計により、Light stopping effect を利用し比色定量を行い 30 mg/ml のものを調整し実験に供した。

基質: 何れも市販品を蒸溜水にとかし HCl 或は

NaOH で pH を 7.2 に修正し終濃度が M/40 になる如く調整した。

金属イオン：  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  を用い蒸溜水に溶解して使用した。

抗生物質：市販の物質を蒸溜水に溶解して使用した。総て終濃度  $10^{-3}$  mol となる如く使用した。

P<sub>32</sub>：使用せる P<sub>32</sub> は米国 Orkridge 研究所より配布せられた正磷酸である。これを生理的食塩水で希釈し NaOH で pH 7.2 に修正したものを実験に供する事とした。

実験方法：小試験管にあらかじめ基質溶液及び金属イオン溶液又は阻害剤溶液を入れ、これらの全量が 1 ml なる如くする。但しこれらの濃度は菌液 3 ml を注加した時の終濃度が規定濃度になる如く調整した。一方菌液は  $1 \mu\text{c}/\text{ml}$  の P<sub>32</sub> を含み、しかも生菌濃度が 30 mg/ml なるよう調整したものを上記小試験管に 3 ml 宛注加し 37°C 1 時間 incubate した。incubate 後直ちに冷却し終濃度 2% になる如く Formalin を入れ固定し 8000 r. p. m. 10 分遠心沈澱を行い菌を集めた。更にこれを冷磷酸緩衝液 (0.9% 食塩加) にて 3 回洗滌を行い、菌体外に附着している P<sub>32</sub> を可及的取り除くよう留意した。かくして得られた菌体をキエルダールコルベンに洗い込み、硫酸法により湿性灰化してマグネシア混液によつて磷マグネシアアンモンの沈澱を作り、第一編で述べた如くガイガーミューラー計数管にて計測を行う。測定結果は使用した菌液中の総カウ

ト数に対する菌体内摂取カウント数の百分比で表わす事とした。

なお 4 節に於て行つた磷分劃は Schneider 法<sup>3)</sup> により 10% 三塩化醋酸を用いて酸溶性磷を分劃し、これを Fiske<sup>4)</sup> が考案した方法で無機磷と有機磷を測定した。

### III. 実験成績

#### 第 1 節 $\text{Mg}^{++}$ ・ $\text{Fe}^{++}$ 2 価金属イオンの影響

著者は第一編に於て Sal. 57 S, Sal. 57 R, Staph. albus 及び Staph. aureus の 4 菌種に就て各種基質添加時に於ける P<sub>32</sub> 摂取量を比較検討したが、これら P<sub>32</sub> 摂取量が  $\text{Mg}^{++}$  イオン,  $\text{Fe}^{++}$  イオン添加によつて如何なる影響を受けるかを「なし (0~5°C)」、「なし (37°C)」, ブドウ糖, 焦性ブドウ酸,  $\beta$ -グリセロ磷酸, クエン酸,  $\alpha$ -ケトグルタル酸, コハク酸, グルタミン酸, アスパラギン酸の場合につき実験を行つた。

第 1 表より第 4 表に示す如く添加金属イオン濃度は終濃度にて  $\text{Mg}^{++}$  イオンは  $10^{-2}$ ~ $10^{-4}$  mol,  $\text{Fe}^{++}$  イオンは  $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$  mol の場合に就て実験を行つた。Sal. 57 S に対する  $\text{Mg}^{++}$  イオンの影響は何れの基質に於ても P<sub>32</sub> 摂取量の増加を来すが、就中ブドウ糖, コハク酸, グルタミン酸を基質とせる場合は著明な増加を来した。 $\text{Fe}^{++}$  イオンの影響は  $\text{Mg}^{++}$  イオンの場合と大体同じ傾向を示すが、 $\text{Mg}^{++}$  イオンよりやや劣るようである。但しクエ

表 1 P<sub>32</sub> 摂取量に及ぼす金属イオンの影響 (Sal. 57S)

金属イオン 基 質	対 照	$\text{Mg}^{++}$			$\text{Fe}^{++}$		
		$10^{-2}$ mol	$10^{-3}$ mol	$10^{-4}$ mol	$10^{-4}$ mol	$10^{-5}$ mol	$10^{-6}$ mol
なし (0~5°C)	0.50	0.46	0.52	0.52	0.54	0.46	0.48
なし (37°)	0.56	0.70	0.82	0.64	0.78	0.70	0.66
ブドウ糖	1.40	1.75	1.56	1.36	1.58	1.48	1.44
焦性ブドウ酸	0.98	1.10	1.06	1.06	1.16	1.08	1.08
$\beta$ -グリセロ磷酸	0.74	0.78	0.78	0.74	0.78	0.78	0.74
クエン酸	0.50	0.56	0.54	0.54	0.64	0.60	0.66
$\alpha$ -ケトグルタル酸	0.52	0.72	0.68	0.56	0.62	0.58	0.58
コハク酸	0.50	0.80	0.64	0.72	0.66	0.60	0.56
グルタミン酸	0.78	1.0	0.90	0.76	0.90	0.82	0.76
アスパラギン酸	0.50	0.54	0.54	0.50	0.48	0.56	0.55

菌量：湿菌量にて 90mg

基質：1/40mol(終濃度)

Incubate : 1 hr.

表 2 P<sup>32</sup> 摂取量に及ぼす金属イオンの影響  
(Sal. 57R)

金属イオン 基 質	対 照	Mg <sup>++</sup>			Fe <sup>++</sup>		
		10 <sup>-2</sup> mol	10 <sup>-3</sup> mol	10 <sup>-4</sup> mol	10 <sup>-4</sup> mol	10 <sup>-5</sup> mol	10 <sup>-6</sup> mol
なし (0~5°C)	0.40	0.46	0.42	0.39	0.44	0.39	0.44
なし (37°C)	0.62	0.68	0.67	0.66	0.66	0.62	0.62
ブ ド ウ 糖	1.56	1.80	1.52	1.58	1.62	1.54	1.53
焦 性 ブドウ酸	0.72	0.74	0.84	0.78	0.80	0.76	0.81
β-グリセロ 磷酸	0.70	0.76	0.72	0.74	0.80	0.75	0.84
ク エ ン 酸	0.46	0.50	0.42	0.46	0.50	0.47	0.44
α-ケトグルタル酸	0.54	0.64	0.58	0.64	0.75	0.56	0.64
コ ハ ク 酸	1.0	1.10	1.06	1.04	1.12	1.06	1.03
グ ル タ ミ ン 酸	0.64	0.80	0.78	0.77	0.76	0.72	0.78
ア ス パ ラ ギ ン 酸	0.62	0.68	0.66	0.62	0.68	0.64	0.58

菌量：湿菌量にて 90mg

基質：1/40mol (終濃度)

Incubate: 1hr.

表 3 P<sup>32</sup> 摂取量に及ぼす金属イオンの影響  
(Staph. albus)

金属イオン 基 質	対 照	Mg <sup>++</sup>			Fe <sup>++</sup>		
		10 <sup>-2</sup> mol	10 <sup>-3</sup> mol	10 <sup>-4</sup> mol	10 <sup>-4</sup> mol	10 <sup>-5</sup> mol	10 <sup>-6</sup> mol
なし (0~5°C)	0.16	0.18	0.16	0.17	0.22	0.18	0.20
なし (37°C)	0.19	0.22	0.20	0.18	0.44	0.22	0.23
ブ ド ウ 糖	0.75	0.86	0.84	0.66	1.20	0.83	0.76
焦 性 ブドウ酸	0.29	0.24	0.22	0.26	0.52	0.38	0.31
β-グリセロ 磷酸	0.35	0.62	0.54	0.42	0.74	0.43	0.36
ク エ ン 酸	0.16	0.18	0.15	0.19	0.25	0.32	0.26
α-ケトグルタル酸	0.20	0.18	0.16	0.19	0.19	0.56	0.41
コ ハ ク 酸	0.21	0.24	0.22	0.21	0.48	0.24	0.22
グ ル タ ミ ン 酸	0.30	0.26	0.27	0.28	0.52	0.32	0.28
ア ス パ ラ ギ ン 酸	0.31	0.37	0.42	0.38	0.36	0.35	0.34

菌量：湿菌量にて 90mg

基質：1/40mol (終濃度)

Incubate: 1 hr.

ン酸の場合には Mg<sup>++</sup> イオンより大きい影響をもつ事がわかつた。又「なし (37°C)」に於ても両金属イオンとも効果があつたが、自家呼吸にも影響を示すためであろうと考える。

Sal. 57R に於ては Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup> イオン共に Sal. 57S と大体似た傾向が認められたが、一般に効果が少なく、Mg<sup>++</sup> イオンの場合はブドウ糖、グルタミン酸を基質とした時及び Fe<sup>++</sup> イオンの場合はα-ケトグルタル酸を基質とした時影響が見ら

れた程度にとどまつた。

Staph. albus に於ては前二者とやや趣を異にし、Fe<sup>++</sup> イオンが非常に大きく影響する事が分つた。特にブドウ糖を基質にした時 Fe<sup>++</sup> イオンで P<sup>32</sup> 摂取量は1.6倍、焦性ブドウ酸では1.8倍、β-グリセロ磷酸で2.1倍、α-ケトグルタル酸で1.8倍、コハク酸で2.2倍、グルタミン酸で1.7倍と著明な増加が見られた。これに反し Mg<sup>++</sup> イオンによる影響は少くブドウ糖、β-グリセロ磷酸を基質とした場合

表 4 P<sup>32</sup> 摂取量に及ぼす金属イオンの影響  
(Staph. aureus)

金属イオン 基 質	対 照	Mg <sup>++</sup>			Fe <sup>++</sup>		
		10 <sup>-2</sup> mol	10 <sup>-3</sup> ml	10 <sup>-4</sup> mol	10 <sup>-4</sup> mol	10 <sup>-5</sup> mol	10 <sup>-6</sup> mol
なし (0~5°C)	0.20	0.22	0.22	0.20	0.20	0.18	0.22
なし (37°C)	1.06	1.20	1.16	1.18	1.16	1.13	1.12
ブドウ糖	1.46	1.70	1.65	1.54	1.80	1.70	1.65
焦性ブドウ酸	1.40	1.65	1.56	1.50	1.80	1.51	1.44
β-グリセロリン酸	0.54	0.52	0.54	0.60	0.58	0.60	0.60
クエン酸	1.32	1.44	1.22	1.38	1.32	1.40	1.62
α-ケトグルタル酸	1.36	1.50	1.44	1.42	1.52	1.44	1.48
コハク酸	1.40	1.60	1.62	1.56	1.54	1.50	1.44
グルタミン酸	1.32	1.29	1.28	1.32	1.66	1.46	1.38
アスパラギン酸	1.26	1.42	1.36	1.32	1.40	1.34	1.36

菌量：湿菌量にて 90mg

基質：1/40mol (終濃度)

Incubate 1 hr.

にやや増加を来すのみで他は殆んど影響が見られなかつた。

Staph. aureus に於ては Mg<sup>++</sup> イオン, Fe<sup>++</sup> イオン共に影響は少く, Mg<sup>++</sup> イオンの場合, ブドウ糖, 焦性ブドウ酸, コハク酸を基質とした時影響がやや大きく, Fe<sup>++</sup> イオンの場合に於ては, ブドウ糖, 焦性ブドウ酸, グルタミン酸を基質とした時摂取量の増加が見られこれらの場合は何れも Mg<sup>++</sup> の時に比して大であつた。

## 第2節 Aureomycin, Chloromycetin, Penicillin の影響

抗生物質中 Aureomycin, Chloromycetin, Penicillin の3種を撰び夫々の菌について「なし (0~5°C)」, 「なし (37°C)」, ブドウ糖, 焦性ブドウ酸, β-グリセロリン酸, クエン酸, α-ケトグルタル酸, コハク酸, フマル酸, リンゴ酸, グルタミン酸, アスパラギン酸の場合につき夫々の実験を行った。結果は表5~8に示す。

全般的に Aureomycin 添加による P<sup>32</sup> 摂取量の低下は著明で, Sal. 57 S ではブドウ糖では47%, 焦性ブドウ酸では60%, グルタミン酸で68%に低下を示した。同じく Sal. 57 R にもブドウ糖で40%, 焦性ブドウ酸で78%, β-グリセロリン酸で70%, α-ケトグルタル酸で70%, コハク酸で50%, グルタミン酸で68%に低下した。

Staph. albus ではブドウ糖で33%, β-グリセロリン酸で55%, α-ケトグルタル酸で40%に低下し, 他

表 5 P<sup>32</sup> 摂取量に及ぼす各種抗生物質の影響 (Sal. 57S)

基 質	対照	オーレオマイシン	クロロマイセリン	ペニシリン
なし (0~5°C)	0.50	0.50	0.56	0.52
なし (37°C)	0.56	0.49	0.56	0.62
ブドウ糖	1.40	0.65	1.30	1.44
焦性ブドウ酸	0.98	0.60	0.95	0.94
β-グリセロリン酸	0.74	0.68	0.84	0.74
クエン酸	0.50	0.46	0.48	0.48
α-ケトグルタル酸	0.52	0.40	0.62	0.68
コハク酸	0.50	0.54	0.68	0.58
フマル酸	0.58	0.46	0.54	0.62
リンゴ酸	0.52	0.48	0.62	0.58
グルタミン酸	0.78	0.53	0.73	0.88
アスパラギン酸	0.50	0.46	0.60	0.56

菌量・湿菌量にて 90mg

基質：1/40mol (終濃度)

抗生物質：10<sup>-3</sup>mol (終濃度)

は殆んど阻害が見られなかつた。

Staph. aureus に於ては総ての基質に於て高度の阻害を来し, 「なし (37°C)」で30%, ブドウ糖で16%, 焦性ブドウ酸で51%, クエン酸で20%, α-ケトグルタル酸で27%, コハク酸で33%, フマル酸で50%, グルタミン酸で47%, アスパラギン酸で49%と他菌に比し高度の阻害が認められた。

次に Chloromycetin による影響であるが, 総て

表 6 P<sup>32</sup> 摂取量に及ぼす各種抗生物質の影響 (Sal. 57R)

基質	対照	オーレオマイシン	クロロマイセチン	ペニシリン
なし (0~5°C)	0.40	0.47	0.46	0.48
なし (37°C)	0.62	0.44	0.58	0.56
ブドウ糖	1.56	0.62	1.54	1.58
焦性ブドウ酸	0.72	0.56	0.84	0.72
β-グリセロ磷酸	0.70	0.50	0.70	0.84
クエン酸	0.46	0.44	0.56	0.52
α-ケトグルタル酸	0.54	0.38	0.48	0.64
コハク酸	1.0	0.50	0.76	0.92
フマル酸	0.72	0.64	0.68	0.82
リンゴ酸	0.66	0.62	0.64	0.60
グルタミン酸	0.64	0.42	0.62	0.56
アスパラギン酸	0.62	0.70	0.64	0.66

菌量：湿菌量にて 80mg  
 基質：1/40mol (終濃度)  
 抗生物質：10<sup>-3</sup>mol (終濃度)

表 7 P<sup>32</sup> 摂取量に及ぼす各種抗生物質の影響 (Staph. albus)

基質	対照	オーレオマイシン	クロロマイセチン	ペニシリン
なし (0~5°C)	0.16	0.16	0.14	0.18
なし (37°C)	0.19	0.18	0.17	0.17
ブドウ糖	0.75	0.35	0.64	0.70
焦性ブドウ酸	0.29	0.27	0.29	0.26
β-グリセロ磷酸	0.35	0.19	0.34	0.33
クエン酸	0.16	0.15	0.12	0.16
α-ケトグルタル酸	0.20	0.08	0.12	0.22
コハク酸	0.21	0.16	0.21	0.18
フマル酸	0.22	0.20	0.23	0.25
リンゴ酸	0.19	0.19	0.26	0.20
グルタミン酸	0.30	0.24	0.29	0.26
アスパラギン酸	0.31	0.18	0.28	0.34

菌量：湿菌量にて 90mg  
 基質：1/40mol (終濃度)  
 抗生物質：10<sup>-3</sup>mol (終濃度)

の菌で有意の減少は見られず、むしろ上昇する結果を得たものもある。Sal. 57 S に於て、β-グリセロ磷酸、コハク酸、アスパラギン酸を基質とした場合、Staph. aureus に於て焦性ブドウ酸、リンゴ酸を基質とした場合には上昇を来し、阻害を見たものは僅かに Staph. aureus に於てグルタミン酸を基質とした場合のみである。

表 8 P<sup>32</sup> 摂取量に及ぼす各種抗生物質の影響 (Staph. aureus)

基質	対照	オーレオマイシン	クロロマイセチン	ペニシリン
なし (0~5°C)	0.20	0.16	0.20	0.18
なし (37°C)	1.06	0.32	1.0	1.04
ブドウ糖	1.46	0.24	1.24	1.36
焦性ブドウ酸	1.40	0.72	1.46	1.42
β-グリセロ磷酸	0.54	0.38	0.52	0.46
クエン酸	1.32	0.24	1.12	1.20
α-ケトグルタル酸	1.36	0.34	1.20	1.12
コハク酸	1.40	0.46	1.24	1.36
フマル酸	1.38	0.66	1.34	1.36
リンゴ酸	0.86	0.56	1.0	1.24
グルタミン酸	1.32	0.62	0.82	1.22
アスパラギン酸	1.26	0.62	1.18	1.34

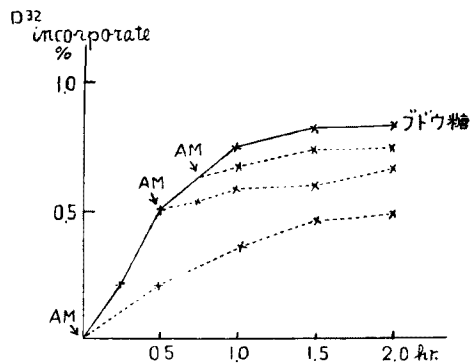
菌量 湿菌量にて 90mg  
 基質：1/40mol (終濃度)  
 抗生物質：10<sup>-3</sup>mol (終濃度)

Penicillin に於ても Chloromycetin の時と同じく有意の減少は認められず、Sal. 57 S に於てグルタミン酸を基質とした場合、Staph. aureus に於てリンゴ酸、グルタミン酸を基質とした場合には逆に上昇を示している。

第3節 Aureomycin 投与時変化の影響

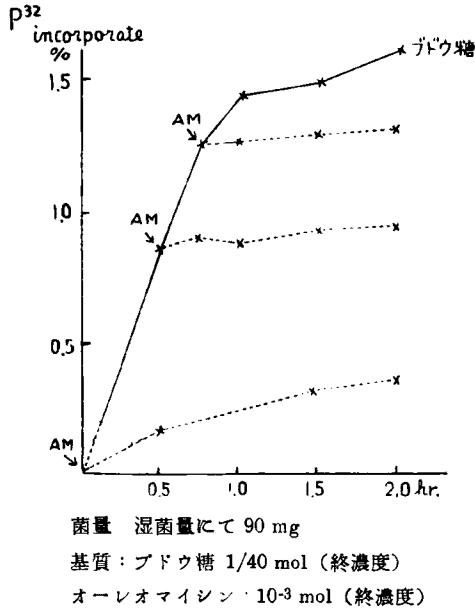
前節に述べた如く抗生物質中 Aureomycin の阻害作用が最強であつたため、ブドウ糖を基質とし incubate 後、0, 0.5, 0.75 時間に Aureomycin の所

図 1 Aureomycin 途中投与による P<sup>32</sup> 摂取量の変化 (Staph. albus)



菌量：湿菌量にて 90 mg  
 基質：ブドウ糖 1/40 mol (終濃度)  
 オーレオマイシン：10<sup>-3</sup>mol (終濃度)

図2 Aureomycin 途中投与による P<sup>32</sup> 摂取量の変化 (Staph. aureus)



定量を投入しその後の P<sup>32</sup> 摂取量の時間的推移を追求した。

Aureomycin の阻害度がよく表われた Staph. albus, Staph. aureus の 2 種について行つたが、結

果は図 1, 図 2 に示す如くである。投与後は対照に比して摂取量増加が抑制され水平線に近い曲線を得た。然し Aureomycin 投与後 P<sup>32</sup> 摂取量が減少するような結果は得られなかつた。

#### 第 4 節 各磷分劃への P<sup>32</sup> incorporation の検討と Aureomycin の各磷分劃への影響

以上述べた実験は 4 種菌の種々条件下に於ける総磷としての摂取量の比較実験を行つたわけである。総磷としては無機磷, 有機磷すべてを含むわけであるから総体的な事の窺えるわけである。よつて著者は Sal. 57 S と Staph. aureus について「なし (0~5°C)」, 「なし (37°C)」, ブドウ糖, グルタミン酸の場合の各種磷分劃に於ける代謝様相の一端を窺わんとした。更に「なし (37°C)」, ブドウ糖の場合に Aureomycin を添加し各磷分劃への影響を追求した。前述の如く Schneider の方法<sup>13)</sup> により無機磷, 酸性有機磷及び磷脂質以下 (これは磷脂質, 核酸磷, 蛋白磷を含む) に分劃し, 結果は表 9, 10, 図 3, 4 に示す如くで、総て 2 分間計数値の 3 回平均を以つて表した。

Sal. 57 S について「なし (0~5°C)」の場合は 86% が無機磷を占め他は実験操作上の誤差範囲と認められる程度であつた。「なし (37°C)」の場合は約 50%

表 9 各分劃への P<sup>32</sup> incorporation と Aureomycin の影響 (Sal. 57S)

		なし (0~5°C)	なし (37°C)	ブドウ糖	グルタミン酸	なし + Aureomycin	ブドウ糖 + Aureomycin
酸性磷	無機磷	732	620	833	802	701	762
	有機磷	172	332	2159	853	213	1013
磷脂質以下		46	262	566	661	69	88
総 P count		950	1254	3558	2316	983	1863

分劃は Schneider 法に依る

表 10 各分劃への P<sup>32</sup> incorporation と Aureomycin の影響 (Staph. aureus)

		なし (0~5°C)	なし (37°C)	ブドウ糖	グルタミン酸	なし + Aureomycin	ブドウ糖 + Aureomycin
酸性磷	無機磷	455	968	1015	956	743	722
	有機磷	59	2125	2387	1950	156	432
磷脂質以下		15	233	282	253	80	95
総 P count		529	3326	3684	3159	979	1249

分劃は Schneider 法に依る

図3 (Sal. 57 S)

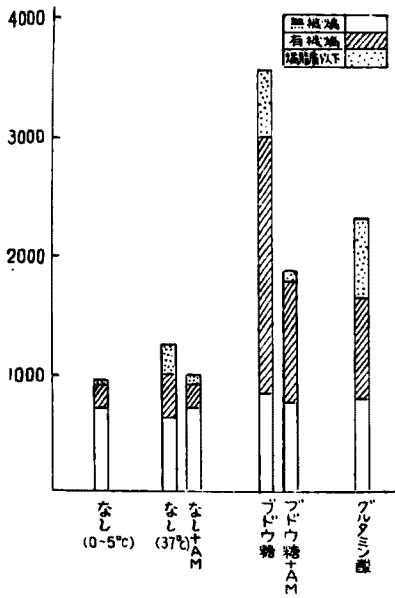
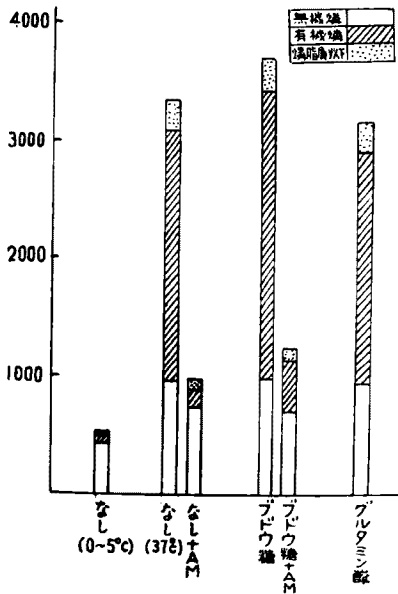


図4 (Staph. aureus)



が無機磷, 酸溶性有機磷は約25%を占め, かなりのP<sup>32</sup>のincorporateが見られた。

かかる基質無添加の場合にAureomycinを添加しその分割への影響を見るに総磷としては前述の如く低下を来しているが, 無機磷のみについて見るといささかも低下しておらず, むしろ増加している傾向が見られ酸溶性有機磷及び磷脂質以下は極度に減

少している。

ブドウ糖を基質とした場合は総磷中酸溶性有機磷が65%と言う量を占めており, 磷脂質以下もやや増加している。これにAureomycinを添加すると無機磷の減少は極微で酸溶性有機磷及び磷脂質以下が非常に減少している。

グルタミン酸を基質とした場合は前述の如く総磷はブドウ糖の場合に於ける程多くはないが他に比し磷脂質以下が多いのは特色である。

次にStaph. aureusに於ける実験結果を示す。「なし(0~5°C)」に於ける分割値を見るに殆んどが無機磷で有機磷, 磷脂質以下は極微である。「なし(37°C)」にては前者に比し総磷値は勿論上昇しているが酸溶性有機磷が甚しく増加している。この場合にAureomycinを添加すれば, この酸溶性有機磷が激減した結果を得た。

ブドウ糖を基質にした場合は「なし(37°C)」の場合に比し著しい変化なく, 全体としてやや増加している結果となつた。この場合にAureomycinを添加すると, やはり酸溶性有機磷が著しく減少している。グルタミン酸を基質とした場合は酸溶性有機磷はやや多いが「なし(37°C)」, ブドウ糖の場合より少い値を得, 磷脂質以下は「なし(37°C)」, ブドウ糖を基質とした場合と変わらない結果を得た。

#### IV. 総括及び考按

菌体を培養後生理的食塩水とか緩衝液にて洗滌すると, 或種の酵素系が活性度を失い, ワールブルグ検圧計による呼吸量の測定では低下を示す。これにMg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>等の2価金属イオンを添加すれば活性度が回復するが, これは洗滌操作により酵素作用に必要な金属イオンが菌体外に失われる事によると赤沢<sup>15)</sup>, 松浦<sup>16)</sup>等が報告している。種々の酵素系について2価金属イオンの必要な事はStumpf, Plant, Paladini, Cohen, Warburg<sup>17)18)</sup>等によつて純粋酵素標品に就いても多くの実験的研究がなされている。

赤沢によるとSal. 57 S, Sal. 57 R, Staph. albus, Staph. aureus等は洗滌による金属イオンの消失が一般に起り難いと述べているが, 著者の実験に於ても, 大量の生理的食塩水で2回洗滌を行い更に37°C 1時間の自家呼吸を行わしめているため, 菌体内の金属イオンは幾分減少し欠乏状態になつているものと考えられる。よつて2価金属イオンを添加すれば, 酵素系の活性度は促進され, 菌体は複合酵

素の Beutel であるため殆どどの基質で  $P^{32}$  摂取量は増加する結果が得られた。しかし 2 価金属による作用は添加基質によつて夫々差異が認められる。即ち各菌共一般にブドウ糖を基質とした時には著明であり、これはワールブルグ検圧計による呼吸量の測定に於ても大体平行した結果が得られている。その他の基質では各菌種によつて各々異つた結果が得られた。何れにしても 2 価金属イオンの作用点は Oxidative Phosphorylation に関する酵素系にあると目されるため、磷酸の移動は著明に増加するものと考えられる。 $Mg^{++}$  イオンと  $Fe^{++}$  イオンとの間に於ける差異としては、全般的に見て Sal. 57 S 及び Sal. 57 R に於いては、 $Mg^{++}$  イオンがより強く促進作用を示し、Staph. albus 及び Staph. aureus では  $Fe^{++}$  イオンの方が強い促進作用を示した。これは代謝系の差異も存するであろうが、グラム陽性菌では菌体内 Mg 含量が多く、しかも菌体の蛋白乃至は有機構造と強固な結合をもつているために洗滌等の操作により  $Mg^{++}$  の消失が起り難いものと考えられる。金属イオンの濃度であるが、 $Mg^{++}$  イオンでは終濃度が  $10^{-2} \sim 10^{-4}$  mol の実験を行つたが、 $10^{-2}$  mol が促進作用は最強であり、 $Fe^{++}$  では  $10^{-4} \sim 10^{-6}$  mol を行い  $10^{-4}$  mol が最強であつた。何れもこれ以上の濃度では沈澱を生ずるため、実験を取止めたが、これらの結果は赤沢<sup>15)</sup>、秋田<sup>17)</sup>等の呼吸量測定からの金属イオンの影響と大体一致するものであつた。

次に抗生物質の影響であるが、Aureomycin を添加すると絶ての菌に於て非常に強い阻害を受けている。各菌種共添加基質によつて Aureomycin の阻害率は各々異つているが、ブドウ糖基質の場合を初めとして「なし ( $0 \sim 5^{\circ}C$ )」に比して  $P^{32}$  の incorporation が著明に増大している基質に於て特に阻害は著明で、Aureomycin 添加によつて「なし ( $0 \sim 5^{\circ}C$ )」の場合の値に近く減少して行く、つまり純物理的な Passive diffusion による値に近づくのである。かく考えると今まで行つた実験中  $P^{32}$  incorporation が「なし ( $0 \sim 5^{\circ}C$ )」と余り変らないような基質の場合は殆どが純物理的な Passive diffusion によるもので、かかる場合は磷の要求が関与しない代謝が行われているものと考えられる訳である。ちなみに「なし ( $0 \sim 5^{\circ}C$ )」に対する Aureomycin の影響は全く無く、磷の透過性にはなんらの障害も与えない。又 Aureomycin の投与時を変化せしめて Staph. albus, Staph. aureus につ

いてブドウ糖基質の場合の  $P^{32}$  摂取量を時間的に追求しているが、投与後は水平線に近い漸増線を通り、これは純物理的な侵入のみが存続するものと考えるのが妥当であろう。Aureomycin の作用機序に関しては Loomis を初めとして多数の発表がなされているがこれらは後述する。

Chloromycetin によつては殆どの場合阻害作用は見られなかつた。Chloromycetin の作用機序に関しては Smith<sup>67)</sup> 等が脂肪酸エステルの分解即ちエステラーゼの作用を阻止すると述べ、細菌の呼吸、解糖過程の磷酸基転移、蛋白の分解には何の阻害作用も与えないのであるが、著者の得た総磷の面からもその事が予想され得る。次に Penicillin によつては著者の実験ではグラム陽性菌も陰性菌も共に磷摂取の阻害は見られず、むしろ昂進する場合を見出した。

Penicillin の作用機序に関しては諸説紛々としてゐるが Macheboeuf<sup>18)</sup> 等は Clostridium を用いて、ATP-ase を阻害する事を明かにし、Krampitz, Werkman<sup>19)</sup>, Mitchell<sup>11)</sup> 等は Staphylococcus でヌクレオチッド即ち核蛋白の異化作用を阻害すると述べている。又 Gale<sup>70)</sup> は Penicillin を作用せしめた Staphylococcus はグルタミン酸を同化出来ぬが、内呼吸、ブドウ糖酸化及び醗酵には変化を与えないと言う。著者の実験で何等の阻害を見出し得ず、Staphylococcus ではグルタミン酸基質の場合にはやや阻害される傾向を見せているが、これらは以上の説と大体合致するものと考えてよからう。

以上はすべて総磷値についての観察であつたが、これを Schneider 法によつて分割した結果について検討を加えて見る。

総磷	{	酸溶性磷	{	無機磷	第 1 分割
		有機磷		第 2 分割	
	{	脂質磷	}	第 3 分割	
核 酸 磷		(脂質磷			
蛋白磷		以下)			

Sal. 57 S, Staph. aureus 共に総磷値ではかなりの差異を見出すが、これらの差異は殆んど無機磷以外のものによるもので、物理的な Passive diffusion による無機磷値には著差が存しない事が分つた。内呼吸を行わしめた場合でも、特に Staph. aureus では enzymatic な磷の動きが存する事が窺える。ブドウ糖の添加を行えば Embden-myerhof 系又は Warburg-Dickens 系を経て完全酸化の方向へ代謝系が進み Oxidative Phosphorylation による磷の



必要性が高まり、特に酸可溶性有機磷が増大するものと考えられ、著者の実験に於てもそれに合致する結果が得られた。グルタミン酸を添加した場合も脱アミノ後 TCA cycle による完全酸化が行われ、ために磷の移動をとめない、かなり増加する結果が得られる。磷脂質以下への incorporation は何れの場合も酸溶性有機磷に比して余り増大しないが、これは緩衝液浮游の静菌状態であるため、菌体形成の方向へは余り進まないためと考える。

かかる分割を行う方法にて Aureomycin の作用を見る事は Aureomycin の作用機序を解明する一助になると考え、「なし (37°C)」, ブドウ糖基質の場合にのみついて実験を行った。Loomis<sup>4)</sup> はミトコンドリアの酵素系を用いて 2,4-ジニトロフェノールと同様呼吸にともなう磷酸基の移動を阻害すると報告した。三浦<sup>2)</sup> 等は P<sup>32</sup> 含有合成培地に Staph. aureus を培養して、Aureomycin を添加した場合は核酸磷の分割に入つて行かない事を証明している。更に三浦<sup>2)</sup> 等は Phosphate buffer 浮游の静菌状態でも実験を行い Oxidative Phosphorylation が阻害され ATP 分割への incorporate が激減する事も報告している。著者の実験に於ても Aureomycin による磷摂取の阻害は殆んどが酸溶性有機磷に対してであり、磷脂質以下も僅かの影響を受けるが、無機磷に対しては影響は見出せず、三浦等の報告を裏書きする結果が得られた。

## 文

- 1) Utter, M. F. and Werkman, C. E. : J. Biol. Chem., 167, 817, 1947.
- 2) Stumpf, P. K., K. Zamdnaya and D. E. Green : J. Biol. Chem., 167, 817, 1947.
- 3) Plant, G. W. E., and Lardy, H. A. : J. Biol. Chem., 180, 13, 1949.
- 4) Loomis, W. F. : Science, 111, 474, 1950.
- 5) Van Metter, J. C. and Oleson, J. J. : Science., 113, 273, 1951.
- 6) Smith, G. N., and Worrel, C. S. : Federation Proc., 8, 253, 1949.
- 7) Smith, G. N. and Worrel, C. S. : J. Bact., 58, 803, 1949.
- 8) Gale, E. F. and Paine, T. F. : Biochem. J., 48, 298, 1951.
- 9) Tulasne, R., Vendrely, R. and Minck, R. C. R. Soc. Biol., 142, 237, 1948.

## V. 結 論

著者は教室保存の Sal. 57 S, Sal. 57 R, Staph. aureus, Staph. albus を用いて P<sup>32</sup> を Tracer として用い磷摂取に及ぼす 2 価金属イオン及び抗生物質の影響を検討した。

1) Mg<sup>++</sup> イオン, Fe<sup>++</sup> イオン共に磷摂取量を増強せしめ、Oxidative Phosphorylation に関するものと思われる。但し Sal. 57 S 及び Sal. 57 R では Mg<sup>++</sup> イオンの方が効果大であり、Staph. aureus 及び Staph. albus では Fe<sup>++</sup> イオンの方が効果大であつた。

2) Aureomycin は細菌の磷摂取を強く阻害するが、Chloromycetin 及び Penicillin は影響を及ぼさなかつた。

3) 磷分割を行った結果呼吸時に於て菌体内に摂取される P<sup>32</sup> の大部分は酸溶性有機磷に incorporate される。

4) 各磷分割に incorporate される P<sup>32</sup> に及ぼす Aureomycin の影響は、酸溶性有機磷への incorporate を強く阻害し、それ以外のものに及ぼす影響は見出し得なかつた。

稿を終るに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた村上栄教授に対し又御支援を戴いた金政講師に衷心より謝意を表す次第であります。

## 献

- 10) Vendrely, R., Tulasne, R. and Minck, R., : C. R. Soc. Biol. 142, 239, 1948.
- 11) Mitchell, P. D., : Nature, 164, 259, 1949.
- 12) 梅沢, 西川 : Penicillin, 1, 640, 1949.
- 13) 標準生化学実験 : 136, 1953.
- 14) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. : J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
- 15) 赤沢 : 岡山医学会雑誌, 66, 1009, 1954.
- 16) 松浦 : 岡山医学会雑誌, 68, 159, 1956.
- 17) 秋田 : 岡山医学会雑誌, 69, 549, 1957.
- 18) Gros, F. and Macheboeuf, M. Ann. Inst. Pasteur, 74, 368, 1948.
- 19) Krampitz L. O. and Werkmann, C. H. : Arch. Biol. Chem., 12, 57, 1947.
- 20) Gale, E. F. and Rodwell, A. W. : J. Bact., 55, 161, 1948.
- 21) 三浦 : 化学の領域, 8, 21, 1952.
- 22) 三浦 : 第31回日本細菌学会特別講演.

## Studies on Phosphorus Metabolism of Bacteria by Radioactive $P^{32}$

### Part 2 The effect of metal-ions and antibiotics on the $P^{32}$ incorporation.

By

Minoru Takehara

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

Using Radioactive  $P^{32}$  as a Tracer, the author studied the effect of bivalent metal-ions and antibiotics on the phosphorus intake of *Salmonella 57S*, *Salmonella 57R*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus albus* of the departmental stock. And the following results were obtained.

1). It was observed that  $Mg^{++}$  and  $Fe^{++}$  ions tend to increase the phosphorus intake of these organisms. Therefore these ions should have relation to oxidative phosphorylation. However, it was noticed that  $Mg^{++}$  ion had more powerful effect on *Salmonella 57S*, and *Salmonella 57R*, contrarily  $Fe^{++}$  ion had that on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus*.

2). Although aureomycin showed inhibitory effect on the phosphorus intake of the organisms, chloromycetin and penicillin did not show the effect.

3). From the result of phosphorus fractionation, the greater part of  $P^{32}$  deposit in the cells took in the respiratory state was incorporated in the acid-soluble organic phosphorus fraction.

4). Concerning about the effect of aureomycin on the  $P^{32}$  incorporation in each fractions, it was found strong inhibitory effect of aureomycin on the incorporation of  $P^{32}$  in the acid-soluble organic phosphorus fraction.

But the effect on the incorporation in other fractions could not be observed.

---