

赤痢菌の代謝に関する研究

第 1 篇

細菌代謝に於ける二価金属イオンの作用点

岡山大学医学部細菌学教室 (指導・村上 栄教授)

松 浦 慶 之

〔昭和 30 年 12 月 10 日受稿〕

目 次

- | | |
|--|--|
| I. 緒 言
II. 実験材料及び実験方法
III. 実験成績
1. 金属イオンの呼吸促進作用
2. 呼吸促進作用に対する α, α' -dipyridyl の影響 | 3. Mg^{++} の呼吸促進作用に対する 2, 4-dinitrophenol の影響
4. 磷酸代謝に及ぼす Mg^{++} の影響
IV. 総括及び考案
V. 結 論 |
|--|--|

I. 緒 言

二価金属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つて, pyruvic decarboxylase¹⁾, oxalacetic decarboxylase²⁾, phosphoglucomutase³⁾, phosphoglucokinase⁴⁾, glucokinase⁵⁾, gluconokinase⁶⁾, fructokinase⁵⁾, enolase⁷⁾, hexokinase⁸⁾, pyruvic phosphophosphatase⁹⁾, myokinase¹⁰⁾, adenosinekinase¹¹⁾, acetylphosphatase¹²⁾, ……に於ける Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++} など金属イオンの賦活作用が証明されており, 又 pyrocatecase, cis-aconitase, homogentidicase はいわゆる二価鉄酵素として Fe^{++} を不可欠因子とすることが認められている。更に又今迄金属イオンとは無関係と考えられていた riboflavine なども生体内に於ては Fe, Cu, Mo その他の金属イオンと錯塩を作り助酵素として働くことが最近では明らかになつた¹³⁾。

その他金属イオンで賦活される酵素には極めて多くのものが知られているが, これらの酵素に於ける酵素蛋白—金属イオン間の結合の強度には種々の差異が認められ, その解離が比較的困難なものや, 透析その他簡単な操

作で容易に解離されるものが見られる。

Milton¹⁴⁾ は兎心筋のミトコンドリアの代謝の研究に於て, 標品を洗滌するとその回数に応じ Mg^{++} の賦活効果が増大することを認め, この理由は洗滌操作によりミトコンドリア内の酵素作用に不可欠な Mg^{++} その他のイオンが除去されるためであるとしている。赤沢¹⁵⁾, 筆者等¹⁶⁾ は或種の細菌に於ても, 菌体の洗滌により, 洗滌回数に応じた呼吸量の低下が見られ, 而もこの低下は Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} など二価金属イオンの添加によつて回復することを認め, これは主として菌体内のこれら金属イオンのうち, 酵素蛋白との結合の弱い部分が細菌膜を通して除去されることによると推定されることを報告した。

前述の如く, 単離酵素に対する金属イオンの作用に関しては広範な研究があるとはいえ, 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, その代謝に於ける金属イオンの作用も又複雑を極め, 且菌種によりこれらイオンの細菌膜透過性に対する差異もあつて, その作用点を正確に捕捉することは容易ではないと予想される。然し金属イオンを可及的に除去した菌体では, 或る特定イオンを添加

することにより代謝様式に何らかのずれを生じることは想像に難くなく、これを利用して細菌代謝に於ける金属イオンの作用点をうかがうことは、代謝に関する研究の一助になるものと考え、かゝる観点からして本研究を行うこととした。

供試菌としては主として *Sh. dysenteriae* 3 を使用したが、この理由は本菌が洗滌操作により比較的容易に金属イオン欠乏状態にすることが可能であり、従つて他菌に比しイオン添加の影響が顕著に現われるためである。その他の菌は比較参照のため必要に応じ使用することとした。

II. 実験材料及び実験方法

供試細菌： 各菌共教室保存の標準株を、普通寒天 37°C 18 時間培養して使用した。

金属イオン： $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を用い蒸留水に溶解して使用した。

基質、阻害剤： 何れも市販品を水にとかし、HCl 或は NaOH で pH を修正して使用した。

呼吸量測定： Warburg 検圧計を用い常法によつた¹⁷⁾。

生菌浮游液 培地より集めた菌体を M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl を含む) で 2 回洗滌後、同一組成の緩衝液に浮游し、37.5°C に 1 時間放置することにより金属イオン欠乏状態としてから遠沈し、再び緩衝液に浮游させたものを生菌浮游液として用いた。菌量決定は光電比濁計によつた。

pyruvate の定量： 2,4-dinitrophenylhydrazine による比色法¹⁸⁾によつた。

acetyl 化 sulfanilamide の定量： 試料を 2 分し、その 1 半はそのまゝ、1 半は 0.2-N となるよう HCl を加え煮沸水中に 60 分放置して加水分解し、その各々につき sulfanilamide の定量を行い、その差より算出した。sulfanilamide の定量は N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine を用いるチアゾ反応¹⁹⁾によつた。

揮発性酸の定量： 試料溶液を H_2SO_4 で酸

性として水蒸気蒸溜し、溜出液を 0.01-N NaOH で滴定した。

P^{32} を用いる実験 菌体中の P^{32} 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²⁰⁾ (第 6 表) に従つて分画した。各分画は硝・硫酸法で湿式灰化²¹⁾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様に注意して濾過し、乾燥後 Geiger 計数管で計測し、2 分間のカウント数を以て P^{32} 量を表わすこととした。

III. 実験成績

1. 金属イオンの呼吸促進作用

二価金属イオンの細菌呼吸促進効果の菌種及び基質による差異を知るための実験として、菌体内保有の金属イオンを出来る限り除いたものを用い、第 1 表に記した 6 種の基質につき、1 時間の O_2 消費量及びこれに対する Mg^{++} の影響をしらべたところ同表に示した結果を得た。即ち各菌共 glucose, pyruvate を基質とした O_2 消費は Mg^{++} により著しく促進され、acetate, lactate ではこれに次ぎ、その他の基質では Mg^{++} の影響は殆んど見られなかつた。ただ特異的なのは、*Sh. dysenteriae* 3 に於て succinate を基質とした場合に Mg^{++} の効果が顕著なことであつた。又菌種別に見ると、チフス菌、ブドウ球菌では一般にイオン効果は少く、*Sh. dysenteriae* 3 に於て最も効果的であつた。

Mg^{++} の O_2 消費促進作用の pH による影響は第 1 図の示す通りであつて、pH 7.0~7.5 に於て最大の促進が見られ、至適 pH の範囲はせまく、その両側では急激に促進作用が低下している。

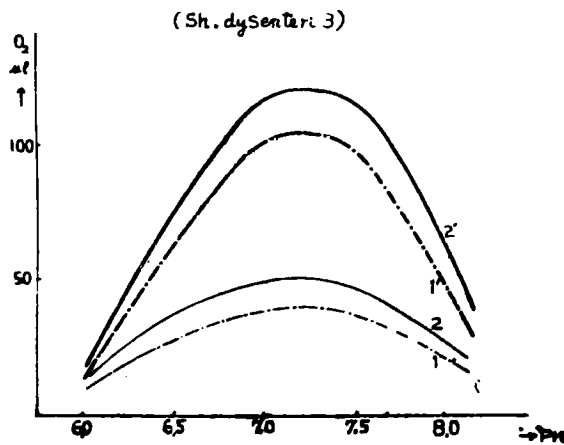
以上の実験は何れも Fe^{++} , Mn^{++} についても試みたが Mg^{++} と同様の成績が得られた。

次に呼吸商 (RQ) に及ぼす Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} の影響を検討すると第 2 表に示す通り、pH 6.2 では O_2 消費、 CO_2 発生共に余り変化

第1表 各菌, 各基質に於ける Mg^{++} の呼吸促進作用 O_2 消費量 μl

	glucose		pyruvate		acetate		lactate		succinate		fumarate		malate	
	— Mg^{++}	+ Mg^{++}	— Mg^{++}	+ Mg^{++}	— Mg^{++}	+ Mg^{++}	— Mg^{++}	+ Mg^{++}	— Mg^{++}	+ Mg^{++}	— Mg^{++}	+ Mg^{++}	— Mg^{++}	+ Mg^{++}
Sh. dysenteri 2 大野菌	91	131	82	121	34	63	95	159	73	79	52	52	58	63
Sh. dysenteri 3	72	181	64	109	19	28	71	124	72	161	45	59	37	39
Sh. flexneri 1 中村菌	76	139	29	57	11	19	36	60	76	81	51	67	82	85
Sh. flexneri 2 駒込 BIII	71	123	79	112	5	5	97	171	56	68	31	38	29	37
Sh. flexneri 3 川瀬菌	78	114	87	122	28	49	75	118	58	63	41	42	45	48
Staphyl. aureus	62	87	49	72	59	76	107	141	51	57	60	64	52	59
Staphyl. albus	48	69	45	61	33	45	70	109	48	51	43	49	61	68
Staphyl. citreus	62	88	61	83	159	181	122	166	111	122	110	103	78	81
Pseud. aeruginosa	72	129	81	138	71	138	101	139	98	111	89	95	73	98
E. coli communis	77	123	84	143	80	117	83	121	107	116	64	71	49	68
E. coli communior	82	146	77	131	83	128	79	118	85	91	49	58	57	76
S. typhi 57 S	71	109	63	94	91	111	96	116	37	39	38	42	39	41
S. typhi 58 S	78	97	61	83	96	106	87	96	41	44	41	42	35	37

菌液 (湿菌量 Staphyl. では 50mg/cup, 他は 10mg/cup) 2.0cc, 基質 (終濃度 $10^{-2}M$) 0.3cc
 Mg^{++} (終濃度 $10^{-4}M$) 0.3cc, 全量 3.0cc とする, pH 7.2, 37.5°C, 1hr.



第1図 Mg^{++} の O_2 消費促進作用と pH

1: Pyruvate, 1': Pyruvate + Mg^{++} ,
 2: Succinate, 2': Succinate + Mg^{++}

菌液 (湿菌量 10mg) 2.0cc, 基質 (終濃度 $10^{-2}M$) 0.3cc, Mg^{++} (終濃度 $10^{-4}M$) 0.3cc, 全量 3.0cc とする. 1hr., 37.5°C

第2表 呼吸商, 基質消失量に対する金属イオンの影響 (Sh. dysenteri 3)

	pH 6.2				pH 7.2			
	O_2 消費 μM	CO_2 発生 μM	RQ	pyruvate 消失 μM	O_2 消費 μM	CO_2 発生 μM	RQ	pyruvate 消失 μM
pyruvate	2.1	3.2	1.52	4.4	3.4	4.9	1.42	7.2
— + Mg^{++}	2.9	4.3	1.50	6.2	10.6	13.8	1.30	25.4
— + Fe^{++}	2.6	3.9	1.50	5.5	8.4	11.2	1.33	19.4
— + Mn^{++}	2.4	3.6	1.51	5.1	8.0	10.7	1.34	18.6
succinate	2.9	2.0	0.68		4.1	3.0	0.74	
— + Mg^{++}	3.6	2.5	0.69		12.5	10.0	0.80	
— + Fe^{++}	3.2	2.2	0.69		9.0	7.2	0.80	
— + Mn^{++}	3.1	2.1	0.68		8.6	7.8	0.79	

菌液 (湿菌量 15mg) 2.0cc, 基質 ($30\mu M$) 0.3cc, 金属イオン (終濃度 $10^{-4}M$) 0.3cc, 全量 3.0cc とする. 1hr., 37.5°C

をうけず、pH 7.2に於ては何れも著明な促進をうけ、succinateの場合にはRQは幾分増大し、pyruvateでは減少する傾向が認められた。而して基質としてのpyruvateの消失量を同時に測定した結果、これら金属イオン添加によるO₂消費量の増大はpyruvate消失量のそれを上廻っていることを知った。

succinateの定量は精度の高い方法がないため行わなかつたが同様の関係があるものと推測する。

pyruvateをacetyl donorとした生菌による sulfanilamideのacetyl化に対する各イオンの影響は第3表の通りであり、pH 6.2, 7.2の場合共にこれらイオン添加によりacetyl化は著しく低下するのが認められた。

第3表 sulfanilamideのacetyl化に及ぼす金属イオンの影響
(Sh. dysenterii 3)

acetyl donor	sulfanilamideのacetyl化 μM	
	pH 6.2	pH 7.2
pyruvate	6.6	5.1
- +Mg ⁺⁺	2.0	1.1
- +Fe ⁺⁺	2.5	1.3
- +Mn ⁺⁺	2.6	1.4
succinate	3.2	2.1
- +Mg ⁺⁺	1.0	0.8
- +Fe ⁺⁺	1.2	0.6
- +Mn ⁺⁺	1.2	0.9

菌液 (60mg) 2.0cc, acetyl donor (終濃度M/25) 0.3cc sulfanilamide (30μM) 0.3cc, 金属イオン (終濃度10⁻⁴M) 0.3cc 全量 3.0cc とする, 2hr, 37.5°C

次に、菌によるpyruvate或はsuccinateよりの揮発性酸の生成に対するMg⁺⁺, Fe⁺⁺, Mn⁺⁺添加の影響をしらべたところ第4表の結果を得た。即ちpyruvate, succinateよりの揮発性酸の生成はこれらイオンの添加により著しく減少するのが認められた。而してこの生成揮発性酸は沃度・ランタン法²²⁾によるacetateの反応陽性であり、chromotrop酸法²³⁾によるformateの反応は陰性であつた。

第4表 揮発性酸の生成に及ぼす金属イオンの影響
(Sh. dysenterii 3)

基質	揮発性酸生成量 0.01-N NaOH 所要量 (cc)	
	pH 6.2	pH 7.2
pyruvate	1.36	0.96
- +Mg ⁺⁺	0.98	0.14
- +Fe ⁺⁺	1.07	0.24
- +Mn ⁺⁺	1.10	0.28
succinate	1.06	0.80
- +Mg ⁺⁺	0.79	0.11
- +Fe ⁺⁺	0.81	0.19
- +Mn ⁺⁺	0.83	0.21

菌液(湿菌量100mg) 25.0cc, 基質(終濃度M/500) 2.5cc, 金属イオン(終濃度10⁻⁴M) 2.5cc, 全量 30.0cc とする, 2hr., 37.5°C

2. 金属イオンの呼吸促進作用に対する α, α'-dipyridyl の影響

以上の各実験に於てはMg⁺⁺, Fe⁺⁺, Mn⁺⁺は類似の効果を示しているが、果してこれらイオンがお互に他の作用を完全に代行しうるものか否かを知るため、各イオンの呼吸促進作用に対するα, α'-dipyridylの阻害効果をしらべた。添加金属イオンはすべて10⁻⁴M, α, α'-dipyridylは10⁻³Mを用い、阻害剤は基質及び金属イオンに先立つて菌に加え、菌体内への浸入を充分ならしめるよう注意した。結果は第5表に示す通りでこれを要約すると、(1) これらイオンにより呼吸促進を受けない基質(Sh. flexnerii 3に於けるsuccinate)ではイオンの有無に拘らず、この濃度のα, α'-dipyridylの影響を受けない。(2) 呼吸促進を受ける基質でも、イオン無添加の場合の(金属イオン欠乏菌体の)呼吸はこの阻害剤による影響が殆んど認められない。(3) Fe⁺⁺の効果は完全に、Mn⁺⁺では一部この阻害剤により打消される。然しMg⁺⁺の作用は全く影響されない。これらの事実よりFe⁺⁺及びMn⁺⁺の作用はMg⁺⁺によつて代行されるものと推定される。

第5表 金属イオンの O₂ 消費促進作用に及ぼす α, α'-dipyridyl の影響

		—	Mg ⁺⁺	Fe ⁺⁺	Mn ⁺⁺
Sh. dysenterii 3	pyruvate	59μl	151	127	103
	—	51	150	50	76
	+ α, α'-dipyridyl	68	178	164	117
	—	58	170	60	82
Sh. flexneri 3	pyruvate	80	141	124	111
	—	71	138	70	89
	succinate	65	75	68	68
	+ α, α'-dipyridyl	51	60	50	50

菌液2.0cc (湿菌量10mg), 基質 (終濃度10⁻²M) 0.3cc, 金属イオン (終濃度10⁻⁴M) 0.3cc, α, α'-dipyridyl (終濃度10⁻³M) 0.3cc 全量 3.0cc とする. 1hr., 37.5°C pH7.2

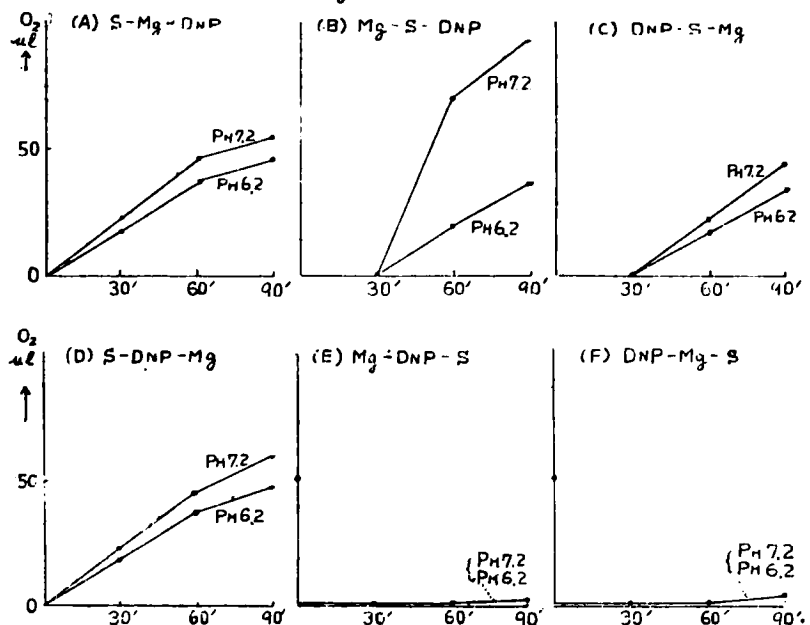
3. Mg⁺⁺ の呼吸促進作用に対する 2,4-dinitrophenol の影響

Mg⁺⁺ による呼吸促進作用の性状を検討するため, oxidative phosphorylation を阻害する²⁴⁾ 2,4-dinitrophenol (DNP) の影響を検討した. 一般に菌に基質及び Mg⁺⁺ を与える

に際し, それらを添加する順序により Mg⁺⁺ の呼吸促進効果に差異の見られることは赤沢も報告している通りであつて, Mg⁺⁺ は基質と同時に或は基質に先立つて加えないと効果を現わさない. 而してこれと同様に DNP の阻害効果にも, 基質, Mg⁺⁺, DNP の三者を菌に加える順序によりかなりの差異が見られる. そこで特にこの点に留意して第2図に示す実験を行つた. 即ち菌に基質 (succinate), Mg⁺⁺, DNP を種々の順序で30分置きに逐次添加し, この間10

分毎に O₂ 消費量を測定して (A)~(F) のグラフを得た. この実験に於て基質として succinate を用いた理由は, pyruvate 或は glucose ではその酸化に種々の cofactor を必要とし複雑であるに対し, succinate では少くともその酸化の初期段階は比較的複雑でないと思像されるためである. 又 DNP は pH7.2 では 10⁻⁴M, pH6.2 では 10⁻⁵M を用いた. 本実験の結果を要約すると, (1) 最初に DNP, 次に succinate を加えても, この濃度の DNP では O₂ 消費の阻害は認められない. 最後に Mg⁺⁺ を加えても何等影響を及ぼさない (C 図). (2) 最初に Mg⁺⁺, 次に succinate, 最後に DNP を加えると Mg⁺⁺ により促進された O₂ 消費は DNP により打消される (B 図). (3) 最初 Mg⁺⁺—DNP, 或は DNP—Mg⁺⁺ の順に加えて置くと最後に succinate を加えても O₂ 消費は見られず, Mg⁺⁺ が DNP の阻害効果を助長することが示されている. pH6.2 に於ては Mg⁺⁺ の呼吸促進作用は殆んど現われないに拘らず, やはり同様の現象が認められる (E, F 図). (4) この様な Mg⁺⁺ · DNP 間の呼吸阻害に於ける協力的作用は succinate

第2図 O₂ 消費に対する Mg⁺⁺, 2,4-dinitrophenol の影響 (Sh. dysenterii 3)



S: 基質 succinate, DNP: 2,4-dinitrophenol
 菌液 (湿菌量 10mg) 2.0cc, 基質 (終濃度 10⁻²M) 0.3cc, Mg⁺⁺ (終濃度 10⁻³M) 0.3cc, DNP 0.3cc, 全量 3.0cc とする, 37.5°C, DNP 濃度: 10⁻⁴M (pH 7.2), 10⁻⁵M (pH 6.2).

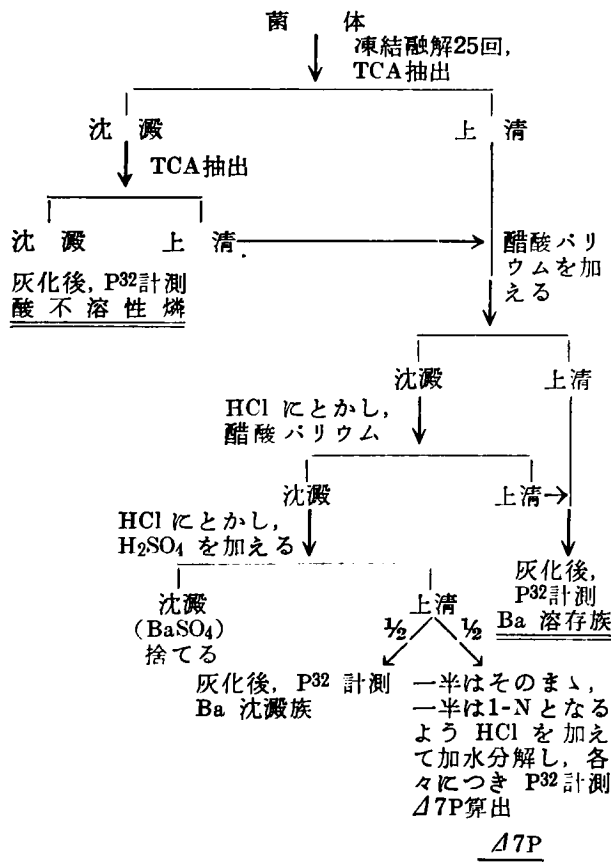
—Mg⁺⁺—DNP, 或は succinate—DNP—Mg⁺⁺ の順に添加した場合に於てもうかがわれ、Mg⁺⁺ が存在しないと DNP の阻害は認められないに拘らず、Mg⁺⁺ が加わることにより阻害が現われて来る。

以上の如く Mg⁺⁺ の呼吸促進作用は DNP を適当な順序に加えることにより打消され、燐酸代謝の関与が予想される。

4. 燐酸代謝に及ぼす Mg⁺⁺ の影響

Mg⁺⁺ の呼吸促進作用に燐酸代謝が関与するという想定のもとに、これを確かめるため P³² を用い菌の呼吸時に於ける燐酸代謝に及ぼす Mg⁺⁺ の影響をしらべた。即ち P³²O₄ を含む燐酸緩衝液に菌を浮遊させ、succinate 或は pyruvate を基質として加えて 37.5°C, 1 時間 incubate した後、菌体内に摂取された P³² の分布状態と、これに及ぼす Mg⁺⁺ の影響を見た。分画は第 6 表に従って行い、各分画に入つて来る P³² の量を 2 分間のカウント数として表わすと第 7 表に示す結果となつた。

第 6 表 燐酸化合物の分画 (Schneider 法)



即ち Mg⁺⁺ 添加により Δ7P, Ba 溶存族 (6 炭糖, 3 炭糖, 焦性ブドウ酸その他の燐酸化合物) に incorporate される P³² は著しく増大し、酸不溶性燐 (脂質燐, 蛋白燐, 核酸燐など) についても多少の増大が見られる。而して Δ7P に incorporate される P³² の Mg⁺⁺ による増大は第 2 表に見られる呼吸促進をはるかに上廻っており、Mg⁺⁺ が ATP などの高エネルギー燐酸化合物の関与する燐酸代謝を促進することを示している。

第 7 表 呼吸時の燐酸代謝に及ぼす Mg⁺⁺ の影響 (Sh. dysenterii 3)

	P ³² incorporate (2分間のcount数)		
	Δ7P	Ba 溶存族	酸不溶性燐
基質なし	674	1824	743
pyruvate	989	2977	1021
+ Mg ⁺⁺	2350	5469	1798
succinate	801	2398	998
+ Mg ⁺⁺	2394	5871	1657

菌液 (湿菌量210mg) 7.0cc, 基質 (終濃度M/50) 1.0cc, Mg⁺⁺ (終濃度10⁻⁴M) 1.0cc, M/50燐酸緩衝液 (P³²10μc を含む) 1.0cc 全量10.0cc とする, pH7.2, 37.5°C, incubation 1hr.

IV. 総括及び考案

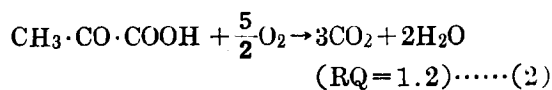
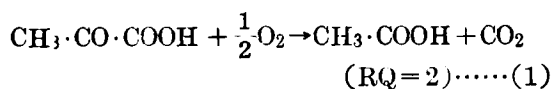
細菌体を培地より集菌後、緩衝液で洗滌することにより或る種の酵素系の機能が衰弱し、ために呼吸量の低下が現われるが、Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Mn⁺⁺ など二価金属イオンを改めて添加すると回復する。これは赤沢が報告している如く、主として洗滌操作により菌体内の酵素作用に必要なこれら金属イオンが菌体外に失われることによると考えてさしつかえないと思われる。

洗滌による金属イオンの損失は菌種により難易の差異が見られ(第 1 表), Sh. dysenterii 3 は容易に金属イオン欠乏状態になりうるが、チフス菌, ブドウ球菌では一般になり難く、これは金属イオンの細菌膜透過性の差異によるものと推察する。チフス菌, ブドウ球菌な

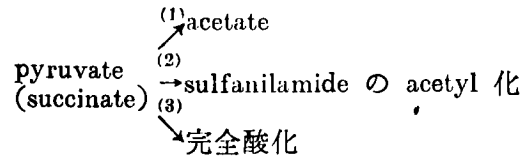
どに於ても洗滌後数時間緩衝液に浮遊して放置すると、金属イオン欠乏状態になりイオン添加の効果が顕著になる。但しこの場合には、同時に酵素自体の衰弱も亦まぬがれぬようである。

二価金属イオンによる呼吸促進効果は基質によつても又差異が見られ、各菌共一般に glucose, pyruvate に於て著しく、lactate, acetate ではこれに次ぎ、succinate, fumarate, malate では殆んど認められない。従つて pyruvate, 及びこれと代謝経路に於て密接な関連のある基質でイオン効果が顕著であると言ひ得る。然し *Sh. dysenterii* 3 に於ては succinate を基質とした際にも著明な効果が認められ、これは succinate 酸化に関与する酵素系に於ける他菌との若干の差異を暗示するものと推察する。

呼吸商 (RQ) に対する金属イオン添加の影響を見るに (第2表), pyruvate を基質とした場合の RQ は Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} の添加により多少減少し、又イオン添加による O_2 消費量の増大は基質 pyruvate の消失量のそれを上廻つており、更に又揮発性酸 (主として醋酸) の生成はイオン添加により減少する。これらのことから考察するに金属イオン欠乏菌に於ては (1) の反応の比重



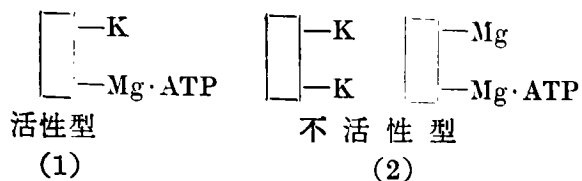
が重く、金属イオン添加により (2) の反応、即ち完全酸化に傾むくものと思われる。*Sh. dysenterii* 3 に於ては succinate を基質とした場合、イオン添加により RQ はわずかながら増大し、又反応生成物としての揮発性酸の減少も認められ、pyruvate の場合同様完全酸化の方向に傾くものと推察される。このことは、pyruvate 或は succinate を acetyl donor とした生菌による sulfanilamide の acetyl 化が金属イオン添加により減少することからも確認される。即ち金属イオン添加により (3) の反応が促進される結果、(1)(2) の反応が抑制さ



れるものと解釈される。但し *Sh. dysenterii* 3 に於ける succinate 基質の場合に関しては、金属イオンによる呼吸促進が fumarate, malate の場合に比し著明に現われることからして、succinate の酸化に於ける金属イオンの作用は、この酸化を完全酸化に近づけることの他に、succinate \rightarrow fumarate の反応自体をも促進するものと推定される。

Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} は何れも多くの実験に於て類似の効果を示すのが認められるが、 α, α' -dipyridyl の阻害実験 (第4表) より見るに、 Fe^{++} の作用は Mg^{++} によつては代行しうるが、 Mn^{++} では完全には代り得ないと推定され、従つてこれらイオンの作用点は一箇所ではなく、その一部分は Fe^{++} , Mn^{++} でも有効であるが、 Mg^{++} 以外のものでは代行し得ない部位もあるものと推測される。

次に Mg^{++} を代表として金属イオンの呼吸促進作用に対する 2,4-dinitrophenol (DNP) の影響につき検討を加える。菌に基質, Mg^{++} , DNP の三者を添加するに際しては、それらの添加順序により Mg^{++} 及び DNP の効果に差異が認められ (第2図), DNP—基質— Mg^{++} , Mg^{++} —基質—DNP, 基質—DNP— Mg^{++} , 基質— Mg^{++} —DNP の順序に添加した場合には、DNP の阻害効果は全く認められないか、或は著明でない。而るに基質に先立つて Mg^{++} , DNP を添加することにより DNP の呼吸阻害効果は最高度に発揮され、呼吸は完全に停止する。即ち Mg^{++} は DNP の阻害作用に対し協力的に働くものと解される。Hers²⁵⁾ は肝 fructokinase に関する報告に於て、この酵素は K^+ , Mg^{++} を必要とし、酵素蛋白に対する K^+ , Mg^{++} , ATP の結合状態が (1) の場合にのみ活性を示し、(2) の状態では不活性であり、従つて K^+ , Mg^{++} , ATP が一定の割合で酵素に加えられた時に最高の活性を示すと解釈している。



この考案を引用すれば、上述の如く、菌に基質、 Mg^{++} 、DNPを添加する順序により、DNPの効果に差異の生ずることは、酵素に対し Mg^{++} 、基質、DNP（或はATPも関与するかも知れない）などが結合する際、一定の順序、及び結合部位があつて、これをそれらのものが奪い合う結果と推測される。何れにせよ Mg^{++} の呼吸促進作用がDNPで阻害される性質のものであることは確かである。DNPは周知の通り oxidative phosphorylation に対する阻害剤であり、従つて Mg^{++} の作用点も酸化と共軛した磷酸代謝に関する酵素系と目される。これを更に確認するため、 P^{32} を含む磷酸緩衝液に菌体を浮遊し、基質として pyruvate 或は succinate を添加して incubate し、摂取 P^{32} の菌体内に於ける分布及びこれに対する Mg^{++} 添加の影響を検討した結果（第7表）、 Mg^{++} 添加により、ATP 即ちATPその他の高エネルギー磷酸化合物、並びに Ba 溶存族即ち六炭糖、三炭糖、pyruvate などの磷酸化合物に incorporate する P^{32} の著明な増大が認められ、 Mg^{++} が ATP などの関与する磷酸代謝を活性化することが明らかとなつた。

これらのことを総合するに Mg^{++} 、 Fe^{++} 、 Mn^{++} などの二価金属イオンの細菌代謝に於ける作用点は酸化と共軛する磷酸代謝であつ

て、呼吸促進作用も亦これに帰すことが出来ると推定される。事実、磷酸代謝に関する多くの酵素が Mg^{++} 、 Mn^{++} など二価金属イオンで活性化されることは広く知られているところである。ただ Fe^{++} による活性化は余り知られておらず、 Mg^{++} 、 Mn^{++} と同様の作用をもつものか否かは疑問の残る点であつて今後の研究に待たねばならない。

V. 結 論

Mg^{++} 、 Fe^{++} 、 Mn^{++} など二価金属イオンの細菌代謝に於ける作用点を知る目的で、赤痢菌、チフス菌、ブドー球菌、大腸菌、緑膿菌を供試菌とし、菌体を緩衝液で洗滌することにより金属イオン欠乏菌として用い、種々の実験を行つて次のことが明らかにされた。

(1) 各菌共金属イオンにより呼吸促進をうける基質は glucose, pyruvate であり、Sh. dysenteriae 3 に於ては更に succinate の場合にも著明な呼吸促進をうける。

(2) 金属イオンの作用は基質の酸化を完全酸化に近づけるものと考えられ、更に Sh. dysenteriae 3 に於ける succinate 基質の場合には、succinate \rightarrow fumarate の反応も亦促進するものと推定される。

(3) 金属イオンの作用点は酸化と共軛した磷酸代謝であると推察する。

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の謝意を表し、併せて放射性同位元素に関し御指導、御協力下さつた金政氏に感謝する次第であります。

参 考 文 献

- 1) Stumpf, P. K., K. Zarudnaya, and D. E. Green. J. Biol. Chem., 167, 817, 1947.
- 2) Plaut, G. W. E., and H. A. Lardy. J. Biol. Chem., 180, 13, 1949.
- 3) Najjar, V. A.: J. Biol. Chem., 175, 281, 1948.
- 4) Paladini, A. C., et al.: Arch. Biochem., 23, 55, 1949.
- 5) Phosphorus Metabolism 1, 480.
- 6) Cohen, S. S. J. Biol. Chem., 189, 617, 1951.
- 7) Warburg, O., and W. Christian: Biochem. Z., 310, 384, 1942.
- 8) Lutwark-Mann, C., and T. Mann: Biochem. Z., 281, 140, 1935.
- 9) Lohmann, K., and O. Meyerhof: Biochem. Z., 273, 60, 1934.
- Boyer, P. D., and et al.: J. Biol. Chem., 149, 529, 1943.
- 10) Kalcher, H. M.: J. Biol. Chem., 149, 127

- 1943.
- 11) Caputto, R.: J. Biol. Chem., 189, 801, 1951.
- 12) Kuplan, Nathan, O., and F. Lipmann: J. Biol. Chem., 176, 459, 1948.
- 13) Mackler, B., H. R. Mahler, and D. E. Green J. Biol. Chem., 210, 149, 165, 176, 1955.
- 14) Milton, H., P. M. Fuld, and E. S. Perling. Proc. Soc. Exp. Med., 79, 349.
- 15) 赤沢: 岡山医学会雑誌, 66巻, 5号, 1009, 66巻, 6号, 1, 1954,
- 16) 松浦, 赤沢. 日本細菌学会中・四国支部会, 1953.
- 17) Umbreit, W. W., et al.: Manometric Techniques and Tissue Metabolism. 1949.
- 18) 標準生化学実験法, 文江堂, 36.
- 19) 齊藤: 光電比色計による臨床化学検査. 南山堂, 253.
- 20) 標準生化学実験法, 文江堂, 136.
- 21) 菊池他・最新医学, 6巻, 9号, 822, 1951.
- 22) Feigl, F.: Qualitative Analyse Mit Hilfe von Tupfelreaktionen, 432.
- 23) Feigl, F.: Qualitative Analyse Mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, 431.
- 24) Tepley, L. J.: Arch. Biochem., 24, 383, 1949.

Department of Bacteriology, Okayama University Medical School
(Director . Prof. Dr. S. Murakami)

Studies on the metabolism of *B. dysenteriae*

Report 1: The point of action of metal ions on bacterial metabolism.

By

Yoshiyuki Matsuura

Washing of organisms by phosphate buffer results in the decrease of their respiration, and the addition of divalent metal ions such as Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} restores the decrease.

This study is performed to determine the mechanism of action of such metal ions by observing the influence of these ions on the metabolism of metal ion deficient organisms; some strains of *Sh. flexneri*, *Sh. dysenteriae*, *S. typhi*, *Staphyl. albus*, *Staphyl. aureus*, *Staphyl. citreus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

(1) The respiration in which glucose or pyruvate are substrates can be accelerated by metal ions and moreover in the case of *Sh. dysenteriae* 3, succinate is the substrate in which respiration is accelerated too.

(2) The action of metal ions seemed to cause the reaction to perfect oxidation and in the case of *Sh. dysenteriae* 3 succinate \rightarrow fumarate reaction is accelerated too.

(3) It is concluded that metal ions act on enzyme system concerning phosphorus metabolism coupled with oxidation and this action results in the acceleration of respiration.
