

## 細菌のトリプトファン代謝に関する研究

## 第 2 編

## 腸チフス菌のトリプトファン代謝

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

稲 田 実

〔昭和 34 年 4 月 6 日受稿〕

## 目 次

第1章 緒 言	第1節 インドールの発育作用
第2章 窒素要求による分類	第2節 トリプトファンとインドールとの発育作用機序
第3章 窒素要求とトリプトファン要求との関係	第3節 インドール誘導体の発育作用
第1節 アミノ酸単独培地について	第5章 総括及び考按
第2節 窒素源とトリプトファンとの関係	第6章 結 論
第3節 アミノ酸混合培地について	参考文献
第4章 トリプトファンの生合成	

## 第1章 緒 言

腸チフス菌が、その発育に必須のアミノ酸としてトリプトファンを要求することは Koser, Rettger<sup>1)</sup> (1919), Fildes, Gladstone and knight<sup>2)</sup> (1933), Johnson, Rettger<sup>3)</sup> (1942, 1943), 鷹取<sup>4)</sup> (1952) 等の報告せる処であるが、一方 Van Loghem<sup>5)</sup> (1911), Braun and Cahn-Bronner<sup>6)</sup> (1921, 1922), Burrows<sup>7)</sup> (1939) 等は腸チフス菌の或る株は単に NH<sub>3</sub> 塩だけを N 源として発育し得ることを指摘している。

又 Fildes (1933)<sup>2)</sup> 等及び Burrows<sup>7)</sup> はトリプトファン必要株の中には training によつてトリプトファンを必要とせざるに至る菌株の存在することを報告している。

著者は当教室保存の腸チフス菌10株を用いて、腸チフス菌に於けるトリプトファンの意義を検討した。

## 第2章 窒素要求による分類

腸チフス菌は発育にトリプトファンを必要とすると言われているが、その点を中心にして窒素要求の立場から、当教室保存の腸チフス菌10株を分類してみた。

## 実験材料及び実験方法

- 1) 供試菌、当教室保存の腸チフス菌10株を用いた。
- 2) 使用培地、Saunders<sup>8)</sup> 鷹取、<sup>4)</sup> 新井<sup>9)</sup> の培地を参照して次の3種類の培地を作った。

## A 培地

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
NaCl	2.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
NH <sub>4</sub> Cl	0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
グルコース	2.0
水	1000.0

## B 培地

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
NaCl	2.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
グルタミン酸	0.5
シスチン	0.1
グルコース	2.0
水	1000.0

C 培地

B 培地 + トリプトファン 0.02 g

何れの培地も pH 7.2 に修正し, 100°C, 15分, 3 回間歇滅菌して使用した.

3) 接種菌量, 各菌株の普通寒天斜面に 37°C, 18~24時間培養せるものの 1 白金耳を, 滅菌生理的食塩水 10 ml に浮遊させ, その 1 白金耳を夫々上記 A, B, C の各培地 4 ml に接種した.

4) 培養及び継代, 37°C に培養し, 24時間毎に夫々同一組成の培地 4 ml に継代した. 継代には 1 白金耳を以てし, 5 代継代を行つた.

5) 発育度の観察, 24時間毎に発育による混濁を肉眼により観察して+, +, ±, -で表した. 尚 2 本づつ平行して実験を行いその平均値を取つた.

実験成績

表 1 に示す如くで, NH<sub>3</sub> 塩培地には何れの菌株も全く発育しなかつた.

表 1 腸チフス菌株の窒素要求による分類

菌株	培地	A					B					C				
		継代	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV
S 57		-	-	-	-	-	+	+	++	+	+	++	++	++	++	+
S 58		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	+
S 59		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++
S 60		-	-	-	-	-	+	++	++	+	+	++	++	++	++	++
S 61		-	-	-	-	-	+	++	++	+	+	++	++	++	++	++
村上株		-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	++	++	++	++	++
宮本株		-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	++	++	++	++	++
平松株		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+
長尾株		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+
津国株		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	+	+

基礎培地の組成

{	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.14%
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1%
	NaCl	0.2%
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01%
	グルコース	0.2%

A 培地は基礎培地 + NH<sub>3</sub>塩

B 培地は基礎培地 + グルタミン酸 (M/60) + シスチン (M/500)

C 培地は基礎培地 + グルタミン酸 (M/60) + シスチン (M/500) + トリプトファン (10<sup>-4</sup> M)

発育度は肉眼により+, -で表はす

グルタミン酸, シスチン培地には S 57, S 60, S 61 の 3 株のみが良好な発育を示し, 5 代継代可能であつたが, 他の 7 株は全く発育しなかつた.

グルタミン酸, シスチンにトリプトファンが加わ

つた培地にはすべての菌株が初代から旺盛な発育を示した.

これをもつてみるに, 窒素源として無機の窒素では発育のみられる菌株は全く存在せず, S 57, S 60, S 61 の 3 株はアミノ窒素としてグルタミン酸及びシスチンがあれば発育できる菌株であり, 他の 7 株はグルタミン酸及びシスチンだけでは発育はみられず, 之にトリプトファンが加わると始めて旺盛な発育を示した.

即ち, S 57, S 60, S 61 の 3 株はトリプトファンがなくても発育し得るが, 他の 7 株, S 58, S 59, 村上, 宮本, 平松, 長尾, 津国株はトリプトファンがなくては発育し得ないと思われる.

当教室の腸チフス菌 10 株の内, 3 株はトリプトファン不要株であり, あとの 7 株はトリプトファン必要株と思われる.

以後, 主としてトリプトファン不要株として S 60 を, トリプトファン必要株として S 58 を選んで実験をおしすすめ, 必要に応じて他の菌株をも用いた.

第 3 章 窒素要求とトリプトファン要求との関係

腸チフス菌の殆んどがトリプトファンを必要としていることが分つたが, そのトリプトファンと窒素要求との関係をみてみた.

第 1 節 アミノ酸単独培地について

多数のアミノ酸単独培地に菌が発育するかどうかみてみた.

実験材料及び実験方法

1) 供試菌, S 58 及び S 60

2) 使用培地, Saunder の培地を参考にして次の基礎培地を作つた.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	1.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
NaCl	2.0
グルコース	2.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1
水	1000.0

上記の基礎培地に次に記すアミノ酸を単独に夫々 0.05% 加えたアミノ酸単独培地を作つた. 但し dl 体は倍量用いた. 尚シスチンは先づ N/10HCl に, チロジンは N/10NaOH に夫々溶かしてから用いた.

dl-アラニン, l-グリシン, l-ヴァリン, l-ロイシン, l-シスチン, dl-メチオニン, l-アスパラギン酸, l-グルタミン酸, dl-リジン, l-アルギニン, l-ヒス

チジン, dl-フェニルアラニン, l-チロシン, l-トリプトファン. これらアミノ酸単独培地は夫々 4 ml づつ試験管に分注, pH 7.2 に修正, 100°C, 15分, 3回間歇滅菌して使用した.

3) 接種菌量, 培養及び継代方法, 発育度の観察は第2章と同じ.

実験成績

表2に示す如くで, S 58 は発育はすべての培地にみられなかつたが, S 60 はグルタミン酸, アスパラギン酸, シスチン培地に良く発育し5代継代可能であつた. 特にグルタミン酸培地には良好な発育を示した.

表2 各種単独アミノ酸の発育に及ぼす影響

菌株	継代	単独アミノ酸培地													
		アラニン	グリシン	β-アラニン	ロイシン	シスチン	メチオニン	アスパラギン酸	グルタミン酸	リジン	アルギニン	ヒスチジン	フェニルアラニン	チロシン	トリプトファン
S 58	I	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 60	I	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	II	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	III	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	IV	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	V	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

基礎培地は表1と同じ  
各種単独アミノ酸培地は基礎培地に各種アミノ酸を0.05%に加えしもの  
発育度は肉眼により+, -で表はす

グリシン, アルギニン, メチオニン培地には初代には発育がみられたが, 2代以後に継代出来なかつた.

ところで両株ともトリプトファン培地には全く発育はみられなかつた. トリプトファン不要株の S 60 はむしろトリプトファン以外のアミノ酸単独培地に良く発育している.

これをみるにトリプトファンは単独では意味が無いことが分る. トリプトファン必要ということは他にN源があつてのことであろう.

そこで, 次にN源とトリプトファンとの関係のみてみた.

第2節 N源とトリプトファンとの関係

N源として無機の NH<sub>3</sub> 塩を選び, 之にトリプトファンが加わつた培地にトリプトファン必要株が発育し得るかどうか調べた.

実験材料及び実験方法

- 1) 供試菌, トリプトファン必要株7株
- 2) 使用培地, 次の NH<sub>3</sub> 塩にトリプトファンの加わつた培地を使用した.

Na <sub>2</sub> HO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
NaCl	2.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0
トリプトファン	0.02
グルコース	2.0
水	1000.0

- 3) 接種菌量, 培養方法, 発育度の観察は第2章と同じで, 但し継代は行わなかつた.

実験成績

7株ともこの培地には全く発育しなかつた. 即ち, トリプトファン必要株は NH<sub>3</sub> 塩とトリプトファンでは発育出来ないことが分る.

第2章の実験成績及びこの実験からトリプトファン必要株としては, N源としてアミノ酸の存在を必要とし, その土台の上にトリプトファン存在の意義があるのであろう.

そこでこんどは多数のアミノ酸混合培地をつくり, アミノ酸の引き抜き実験を行い, どのアミノ酸が必要か調べてみた.

第3節 アミノ酸混合培地について

実験材料及び実験方法

- 1) 供試菌, S 58, S 60
- 2) 使用培地 基礎培地としては, 第3章第1節の場合と同じ組成のものを用いた.

基礎培地に多数のアミノ酸を加えたアミノ酸混合培地を作つた.

用いたアミノ酸は次の通りである.

アラニン, グリシン, ゼリン, ロイシン, チロジン, グルタミン酸, アスパラギン酸, アルギニン, メチオニン, シスチン, ヒスチジン, トリプトファンの計12種類である.

アミノ酸は夫々 10<sup>-3</sup>Mol 濃度に加え, 全部のアミノ酸を加えた培地を M1 とする.

培地 M1 からアミノ酸を夫々一つ宛引抜いた培地を作つた.

何れの培地も pH 7.2 に修正して使用した。

3) 接種菌量, 培養及び継代方法は第2章と同じであるが, 発育度の観察には肉眼によらず光電比色計によつて発育による混濁度をしらべ, 最高の発育を100とし, これに対する比率をもつて表した。

実験成績

表3に示す如くで, S58はトリプトファンを欠くと全く発育がみとめられず, 次いでシスチンを欠くと発育が非常に悪くなり, アスパラギン酸を欠くと発育が大分劣る。

表 3 アミノ酸引きぬき試験の発育に及ぼす影響

菌 株	培地名	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13
		培地組成	1	ニラ	リン	ス 酸	リン	ロシ	リン	チスチ	ル 酸	アルギ	メチオ	チスチ
S	継 代	M	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1
		I	68	59	73	28	73	83	66	57	67	60	59	11
II	53	57	51	41	62	66	62	53	62	54	60	19	0	
III	68	68	71	41	76	62	59	57	64	51	70	5	0	
IV	62	53	66	53	81	81	73	68	62	52	63	3	0	
V	62	62	73	51	62	66	62	63	62	60	58	3	0	
S	I	100	81	86	39	81	86	78	94	75	81	80	30	80
II	69	64	76	47	81	73	83	76	70	63	70	26	61	
III	86	88	78	57	94	81	105	81	81	72	90	17	78	
IV	91	76	64	51	83	81	81	71	87	61	82	8	70	
V	80	78	83	57	86	83	100	71	86	70	84	4	75	

M 1 培地の組成は次の通り  
基礎培地 (表1と同じ)

アラニン	10 <sup>-3</sup> M
グリシン	"
アスパラギン酸	"
ゼリン	"
チロシン	"
ロイシン	"
ヒスチジン	"
グルタミン酸	"
アルギニン	"
メチオニン	"
シスチン	"
トリプトファン	"

数字は発育度を示す。発育による混濁を光電比色計で求め最高の発育を100とし, 他をこれに対する比率をもつて表した。

之に反して S60 はトリプトファンを欠いても培地 M1 と同程度に発育し, むしろシスチンを欠くと発育が非常に劣り, 次いでアスパラギン酸を欠くと発育が大分劣る。

これにより S58 はトリプトファンを必要としていること, S60 はトリプトファンを全く必要としないことが確定された訳である。

シスチンに次いでアスパラギン酸が発育に重大な影響をもっていることは両者の菌株に共通であつた。

尚, S源としてシスチンを必要としており, シスチンさえあれば, メチオニンは無くても差支えないことが分つた。

他のアミノ酸は発育に殆んど影響はない様に見える。

トリプトファン必要株である S58 が, トリプトファンを含む多数のアミノ酸培地には良く発育することが出来るのに, 唯トリプトファンを欠くと全く発育がみられないことは, トリプトファンの合成が出来ないものと思われる。それに反してトリプトフ

ファンがなくても発育する S60 の場合には, トリプトファンを合成しているものと思われる。

第4章 トリプトファンの生合成

では, トリプトファンは如何にして合成されるであらうか。先づトリプトファンの前駆物質として考えられるものはインドールならびにインドール誘導体であらう。

そこで, 先づトリプトファン必要株のインドールによる発育効果をみてみた。

第1節 インドールの発育作用

実験材料及び実験方法

- 1) 供試菌, トリプトファン必要株 7 株
- 2) 使用培地

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
NaCl	2.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
アスパラギン酸	2.2

シスチン	0.48
グルコース	2.0
水	1000.0

上記の基礎培地はトリプトファン又はインドールを夫々  $10^{-3}M$  濃度に加えたトリプトファン培地及びインドール培地を作った。

何れも pH 7.2 に修正して使用した。

3) 接種菌量, 培養方法, 発育度の観察は第2章と同じであるが, 継代は行わず培養24時間後に判定した。

**実験成績**

表4に示した通りであり, 全株ともトリプトファン培地, インドール培地に同程度の良い発育を示した。

表4 トリプトファン必要株のインドールによる発育効果

菌株	培地	インドール培地	トリプトファン培地
S	58	+	+
S	59	+	+
村上株		+	+
宮本株		+	+
平松株		+	+
長尾株		+	+
津国株		+	+

**基礎培地の組成**

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.14%
$KH_2PO_4$	0.1%
NaCl	0.2%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01%
グルコース	0.2%
アスパラギン酸	M/60
シスチン	M/500

インドール培地は基礎培地+インドール $10^{-3}M$   
 トリプトファン培地は基礎培地+トリプトファン  $10^{-3}M$   
 発育度は培養24時間後に肉眼により判定し, +で表はす。

た。即ち, インドールはトリプトファンに劣らぬ発育効果を有することが分つた。当教室のトリプトファン必要株は全部トリプトファンがなくてもインドールがあれば良く発育することが分つたので, 更に詳しくトリプトファンとインドールとの発育作用を比較してみた。

**第2節 トリプトファンとインドールとの発育作用機序**

**実験材料及び実験方法**

- 1) 供試菌 S58, S59
- 2) 使用培地, 第1節と同じ基礎培地にトリプトファン及びインドールを夫々  $10^{-3}M \sim 10^{-8}M$  濃度に加えた培地を作った。
- 3) 接種菌量, 培養方法, 発育度の観察は第3章第3節と同じであるが, 継代は行わず培養24時間後に判定した。

**実験成績**

表5に示した如くで, トリプトファン及びインドールは共に両株に於て  $10^{-3}M$  から  $10^{-6}M$  濃度までは一様に旺盛な発育効果を示し,  $10^{-7}M$  からは急に大分低下した発育効果を表わしたが, 同じ濃度に於ては同程度の発育効果を示した。

かくの如く, トリプトファンとインドールが全く同程度の発育作用を有することは, トリプトファンがインドールから合成されるものであることを推測させる。

**第3節 インドール誘導体の発育作用**

インドールの発育作用は分つたが, では尚トリプトファンの前階物質と考えられるインドール誘導体の発育効果はどうであろうか。

インドール誘導体としてインドール醋酸及びスカトールを用いて, インドール及びトリプトファンの発育作用と比較してみた。

表5 トリプトファンとインドールとの発育作用の比較

菌株	検体	検体添加量						
		10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-8</sup> M	0
S 58	インドール	93	96	90	84	26	26	0
	トリプトファン	100	93	87	83	26	18	0
S 59	インドール	87	100	96	80	12	3	0
	トリプトファン	90	100	90	77	9	3	0

基礎培地の組成は表4と同じ。  
 数字は発育度を示す。

発育度は培養24時間後に判定し, 判定方法は表3と同じ。

## 実験材料及び実験方法

1) 供試菌, S 58, S 59  
 2) 使用培地, 第1節と同じ基礎培地を用い, 之にトリプトファン, インドール, インドール醋酸カリ, スカトールを夫々  $10^{-2}M \sim 10^{-6}M$  濃度に加えた培地を作つた。

何れも pH 7.2 に修正して用いた。

3) 接種菌量, 培養方法, 及び発育度の観察は第2章と同じであるが, 但し継代は行わず培養24時間後及び48時間後に判定した。

## 実験成績

表6に示した如くで, 両株ともトリプトファン培地に於ては  $10^{-2}M \sim 10^{-6}M$  の濃度に於て, インドール培地に於ては  $10^{-3} \sim 10^{-6}M$  の濃度に於て一様に旺盛な発育を示した。

表6 インドール誘導体の発育作用

菌株	検体	培養時間	検体添加量					0
			$10^{-2}M$	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$	
S 58	トリプトファン	24	+	+	+	+	+	-
		48	+	+	+	+	+	-
	インドール	24	-	+	+	+	+	-
		48	-	+	+	+	+	-
	インドール醋酸カリ	24	-	-	+	-	-	-
		48	-	-	+	-	-	-
スカトール	24	-	+	+	-	-	-	
	48	-	+	+	-	-	-	
S 59	トリプトファン	24	+	+	+	+	+	-
		48	+	+	+	+	+	-
	インドール	24	-	+	+	+	+	-
		48	-	+	+	+	+	-
	インドール醋酸カリ	24	-	-	+	-	-	-
		48	-	-	+	-	-	-
スカトール	24	-	+	+	-	-	-	
	48	-	+	+	-	-	-	

基礎培地は表4と同じ。

発育度は培養24時間後及び48時間後に肉眼より判定し, +, - で表はす。

又, 両株ともインドール醋酸カリ培地に於ては  $10^{-4}M$  濃度に於てのみ, スカトール培地に於ては  $10^{-3}M$  及び  $10^{-4}M$  濃度に於てのみ良好な発育を示し, 他の濃度に於ては全く発育はみられなかつた。

これによつてみるに, 之等インドール誘導体の発

育効果はトリプトファン及びインドールに, はるかに及ばないことが分つた。

即ちトリプトファンの発育作用はインドールそのものに直結されていると信ぜられる。

## 第5章 総括及び考按

一般に腸チフス菌にとつてトリプトファンは必要であると云われているが, このトリプトファン必要というのは如何なる意義かをしらべてみた。

Van Loghem (1911)<sup>5)</sup> は大腸菌は勿論であるが, 腸チフス菌11株の内3株がアンモニウム塩培地に生育したので, それまで Fischer<sup>10)</sup> がN源に対する要求で大腸菌と腸チフス菌とを区別していたのは正しくないといふ述べた。

Koser, Rettger<sup>1)</sup> (1919) は腸チフス菌はアンモニウム塩培地又はアミノ酸単独培地には発育せず, トリプトファンを含むアミノ酸混合培地には発育したと述べている。

Braun 及び Cahn-Bronner<sup>6)</sup> (1921, 1922) は腸チフス菌62株の内, 18株がアンモニウム塩を唯一のN源として発育したが, 他の44株は  $NH_3$  塩又は一群のアミノ酸をN源としても発育せず, トリプトファンが加わると始めて発育が得られたと報告している。

Fildes, Gladstone 及び Knight<sup>2)</sup> (1933) は腸チフス菌4株がトリプトファンを含む14のアミノ酸を含む培地には発育するが, トリプトファンを欠くと発育がみられないと云つてゐる。

Burrows<sup>7)</sup> (1939) は腸チフス菌を栄養的の見地から, a)  $NH_3$  塩を唯一のN源として発育し得るもの, b) トリプトファンを必要とするもトリプトファン無しに発育し得るように trainig し得るもの, c) trainig し得ないものの3種に分つことが出来ると述べている。

Johnson, Rettger<sup>8)</sup> (1943) はチフス菌5株を用いて, 16のアミノ酸を含む培地からアミノ酸引抜き実験を行い, トリプトファンを欠いた場合のみ全く発育がみられないことから, チフス菌にとつてトリプトファンは必須アミノ酸たるべきことを述べた。

鷹取<sup>4)</sup> (1952) は141株の腸チフス菌を用いて, 腸チフス菌を栄養要求の立場から次の4群即ち, A群, トリプトファン必要株, B群, インドール必要株, C群アミノ酸必要株, D群  $NH_3$  塩必要株, に型別し得ることを指摘した。尚 141株の内, A群に属するものは3株, B群に属するものは119株, C

群に属するものは19株であり、D群に属するものは無かったが、C群の中からD群に相当する変異株をつくり出すことが出来たといっている。

筆者は窒素要求の立場から次のものを夫々含む3種の培地、a)  $\text{NH}_3$  塩培地、b) グルタミン酸+シスチン培地、c) グルタミン酸+シスチン+トリプトファン培地、を用いて教室保存のチフス菌10株を分類した。結果は何れの株も  $\text{NH}_3$  塩培地には発育はみられず、10株の内、3株はN源としてグルタミン酸及びシスチンがあれば発育し、他の7株はそれ丈では発育せずグルタミン酸及びシスチンにトリプトファンが加わると始めて発育した。

即ち、10株の内、S57, S60, S61の3株は発育にトリプトファンを必要とせず、他のS58, S59, 村上, 官本, 平松, 長尾, 津国の7株はトリプトファンを必要としている様に思われることが分つた。

つまり、7株はトリプトファン必要株であり、他の3株はトリプトファン不要株ということになる。

これでチフス菌の殆んどどの株がトリプトファンを必要としている様に思われることが分つたので、次に更にトリプトファン必要ということとN要求との関係を見てみた。

先づ、14のアミノ酸を用いて、各々のアミノ酸単独培地に菌が発育するかどうか見てみたが、トリプトファン必要株S58はどのアミノ酸培地にも発育はみられなかつた。他方トリプトファン不要株S60はグルタミン酸、アスパラギン酸、シスチン培地に良く発育した。特にグルタミン酸培地には良好な発育がみられた。

ところで、S58, S60の両株ともトリプトファン単独培地には全く発育はみられなかつた。トリプトファン不要株のS60はむしろトリプトファン以外のアミノ酸単独培地に良く発育している。

このこと及び前述の分類の場合にトリプトファン必要株はグルタミン酸及びシスチン丈では発育はみられず、トリプトファンが加わると始めて発育がみられた事から、トリプトファンは単独では意味がなく、トリプトファン必要ということは他にN源が存在してのことであることが分つた。

そこで次にN源とトリプトファンとの関係をみてみた。

先づN源として  $\text{NH}_3$  塩を用い、之にトリプトファンが加わつた培地にトリプトファン必要株が発育し得るかどうかが調べてみたが、トリプトファン必要株7株とも全く発育し得なかつた。即ちトリプト

ファン必要株は  $\text{NH}_3$  塩とトリプトファンでは発育出来ないことが分つた。

このこと及び前述の分類の場合にトリプトファン必要株はグルタミン酸及びシスチンにトリプトファンが加わると始めて発育がみられた事から、トリプトファン必要株としてはN源として他にアミノ酸の存在を必要とし、その土台の上に更にトリプトファンを必要としているものと思われる。

そこでこんどは多数のアミノ酸混合培地をつくり、一つ一つアミノ酸の引き抜き実験を行い、どのアミノ酸が必要か調べてみた。

トリプトファン必要株S58はトリプトファンを欠いた場合にのみ全く発育はみられなかつた。次いでシスチンを欠くと発育は非常に悪くなり、アスパラギン酸を欠くと発育は大分劣つていた。

トリプトファン不要株S60ではトリプトファンを欠いても発育は少しも影響されず、むしろシスチンを欠くと発育が非常に劣り、次いでアスパラギン酸を欠くと発育が大分劣つた。

両株とも他のアミノ酸は欠いても発育に殆んど影響はみられなかつた。

両株ともS源としてシスチンを必要としており、シスチンさえあればメチオニンはなくてもよいことが分つた。

又、シスチン及びアスパラギン酸が発育に重大な影響をもっていることは両株に共通であつた。

このアミノ酸引き抜き実験でトリプトファン必要株はトリプトファンを絶対に必要としていることが確定された訳である。

Fildes等<sup>2)</sup>(1933)はチフス菌の栄養要求に於て14のアミノ酸を用いてアミノ酸引き抜き実験を行い、トリプトファンを欠いた場合にのみ発育は全く見られず、次いでシスチンが発育に重大な影響をもっており、他のアミノ酸による僅かの影響はtrainingによつて打勝たれたと報告している。

筆者の場合、アスパラギン酸がやや重大な影響を持つていたが、この点はFildesの成績と異なる。

シスチンがチフス菌の発育に重大な影響を及ぼすことは新井<sup>9)</sup>(1950)も認めており、トリプトファンは、たとえ充分なるN源と共存するとシスチンの一定量が共存せざる場合には発育効果を現わさないと報告している。

トリプトファン必要株にとつてトリプトファンは絶対に必要な事は分つたが、ではトリプトファンの発育に及ぼす作用機序はどのようであろうか。

Burrows<sup>7)</sup> (1939) はトリプトファンはチフス菌の発育に促進的効果を及ぼすとして、トリプトファンの役割について“trigger action”なる表現を用いている。

新井<sup>9)</sup> (1950) はチフス菌の或菌株に対してトリプトファンが顕著な発育促進作用を有し、而もペプトンの如き複合せる組成を有する蛋白分解産物中に於てひとりトリプトファンのみが卓越せる発育効果を有する事実を見、尚トリプトファンが $10^{-8}M$ 程度の微量にて充分発育効果を發揮しうる点より考え、本物質は菌体の発育過程に於けるN源たるの意義よりむしろ触媒的意義を有する如く思われると述べている。

筆者もトリプトファン必要株 S 58, S 59 に於てトリプトファンが $10^{-8}M$ 濃度でも発育効果を有するのを見ることが出来た。

先にアミノ酸引き抜き実験に於てトリプトファン必要株 S58 がトリプトファンを含む多数のアミノ酸培地に於ては旺盛な発育を示すのに、トリプトファンを欠いた場合にのみ全く発育が見られないこと、並びに上述のトリプトファンが $10^{-8}M$ という微量でも発育効果を有することから、トリプトファンはトリプトファンを必要とするチフス菌にとつて“発育因子”にあたるものと解せられる。

先のアミノ酸引き抜き実験に於てトリプトファンを欠くと全く発育の出来ない S58 の場合はトリプトファンの合成が出来ないものと思われる。それに反してトリプトファンがなくても発育できる S60 の場合にはトリプトファンを合成しているものと思われる。

では、トリプトファンは如何にして合成されるであろうか。先づトリプトファンの前階物質として考えられるものはインドールならびにインドール誘導体であろう。

Fildes<sup>11)</sup> (1940) はトリプトファンを必要とするチフス菌につき、インドール及びスカトール、インドールアルデヒド、-醋酸、-カルボキシル酸、-プロピオン酸、-アクリル酸、-焦性葡萄糖、-エチラミンの8種のインドール誘導体による発育効果を見たが、インドールのみが高い活性を有することを認め、チフス菌に於てトリプトファンはインドール或はこれと同様な他の未知の物質より合成されるのであろうとして、その合成過程を次の式で示した。

$NH_3$  塩又はアミノ酸→インドール→トリプトフ

ァン

Wooley 及び Sebrell<sup>12)</sup> (1945) はチフス菌 T-63株に対するインドール、dl-トリプトファン、インドールアルデヒド、-ヒダントイン、-チオヒダントイン、-醋酸、-プロピオン酸、-n 酢酸の発育作用を見たが、インドールは dl-トリプトファンの3~4倍の強い発育効果を有し、インドール醋酸が微弱乍ら発育効果を有することを報告している。

鷹取<sup>4)</sup> (1951) はトリプトファン必要株の内、119株はインドールでよく発育するが、残りの3株はインドールでは発育せず、どうしてもトリプトファンを必要としたといつている。

新井<sup>9)</sup> (1950) はチフス菌が発育時トリプトファンを分解してキヌレニン次いでアントラニール酸を生成するという大谷、及び本田<sup>13)</sup>の報告に鑑み、チフス菌の発育途上に於ける之等トリプトファン分解産物が二次的に発育促進作用を有するに非ざるやと考え、キヌレニン、アントラニール酸の発育効果を見たが全く陰性であつたので、トリプトファンの発育作用としてインドール核の重要性を想像し、インドール及びインドール誘導体9種の発育効果を見たが、トリプトファン及びインドールは $10^{-2}\%$ ~ $10^{-6}\%$ の濃度に於て略々同程度の顕著なる発育効果を有し、其の他ではインドール醋酸、及びスカトールのみが $10^{-2}\%$ の濃度に於て微弱な発育効果を示したと報告している。そして Fildes<sup>11)</sup> (1940)、Woley 及び Sebrell<sup>12)</sup> (1945) の前記の成績及び自己の成績から総合して、インドール誘導体がチフス菌に対し発育支持能を示す為には、i), インドール核の $\alpha$ 位が空位なること。ii), インドール核の $\beta$ 位が空位なるか或は $\beta$ 位置換基が特異的構造を有すべきこと。の諸条件を具備すること必要なりと述べている。

筆者はトリプトファン必要株7株のインドールによる発育効果を見たが、何れの株もインドールでトリプトファンに劣らぬ発育を示した。鷹取の如くインドールでは発育せず、どうしてもトリプトファンを必要とする株はなかつた。

インドールがトリプトファンに劣らぬ発育を示すことから更に詳しく両者の発育効果を比較してみた処、トリプトファン、インドール共に $10^{-3}$ ~ $10^{-8}M$ 濃度に於て略々同程度の発育効果を示した。

トリプトファンとインドールの発育効果の比較では筆者の場合は新井と同じであり、Fildes がインドールがトリプトファンと同じ発育を示すには約10倍の濃度を要すると云い、又 Wooley がインドール



はトリプトファンの約3~4倍の強い発育効果を有すると云つたのといささか異なる。

次にインドール誘導体としてインドール醋酸及びスカトールを用いて発育効果をみてみたが、トリプトファン及びインドールが  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$ M 濃度に於て旺盛な発育効果を示すのに、インドール醋酸は  $10^{-4}$ M 濃度に於てのみ、スカトールは  $10^{-3}$ M 及び  $10^{-4}$ M 濃度に於てのみ良好な発育効果を示したに過ぎなかつた。

Wooley 等はチフス菌に対してインドール醋酸が微弱な発育効果を有するのを見、新井はインドール醋酸及びスカトールが 10-2% 濃度に於て発育効果を有するのを見たが、筆者も同様にインドール醋酸及びスカトールがチフス菌に対して発育作用を有するのを見ることが出来た。

インドールがトリプトファンと略同程度の発育効果を有すること及びインドール誘導体の発育効果は、インドールに遙かに及ばないことから、トリプトファンの発育作用はインドールの発育作用に直結されており、トリプトファンがインドールから合成されるものであることを推測させる。

Fildes<sup>2)</sup> (1933) 等は元来トリプトファンを必要とするが training によつて  $\text{NH}_3$  塩を唯一の N 源として発育し得る菌株をトリプトファンを含んでいない  $\text{NH}_3$  塩培地に培養して、その菌体内にトリプトファンが合成されていることを証明した。

Burrows<sup>7)</sup> (1939) は  $\text{NH}_3$  塩を N 源として発育し得るチフス菌株が、少量のトリプトファンを添加した  $\text{NH}_3$  塩培地に於て菌体増殖後、検出されたトリプトファン量が最初の添加量より増加していることからこの菌株はトリプトファンを合成する能力ありとした。

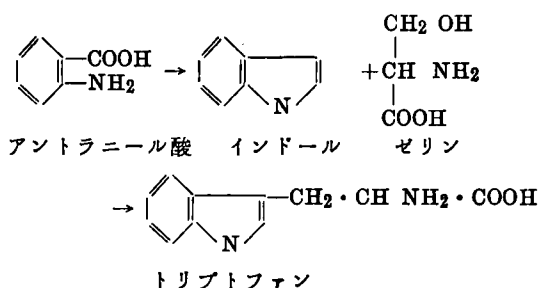
鷹取<sup>4)</sup> (1952) はトリプトファン及びインドール不要で直鎖アミノ酸を必要とする菌株をグルタミン酸、アスパラギン、及びシスチンを含む培地に培養して又、 $\text{NH}_3$  塩にて発育し得るように training された菌株を  $\text{NH}_3$  塩培地に培養して夫々の菌体内にトリプトファンが合成されていることを微生物学測定法によつて証明した。

新井<sup>14)</sup> (1951) は発育にトリプトファンは不要であるがインドールは必要とする菌株をインドールを含む培地に培養して、又、アスパラギン及びシスチンを N 源として発育し得る Watson 株をアスパラギン及びシスチンを含む培地に培養して夫々の菌体がトリプトファンを合成していることを Ehrlich

のアルデヒド試薬を用いて吸収スペクトルにより証明した。

扱、チフス菌に於てトリプトファンはインドールから合成せられる事は分つたが、では次にインドールは何から合成せられるであろうか。又、トリプトファンは如何にしてインドールから合成せられるであろうかが問題となる。

この点に関して、Neurospora の生化学的ミュータント<sup>15)</sup> ではトリプトファンの生合成は次式の如くアントラニール酸からインドールが合成され、次いでインドールとゼリンとが縮合されてトリプトファンが合成せられることが分つている。



扱、チフス菌に於て、トリプトファンの生合成が Neurospora の場合の如く行われるかどうかについては次の機会に譲りたい。

## 第6章 結 論

筆者は教室保存の腸チフス菌10株を用いて次の如き結果を得た。

1) 10株の内、7株は発育にトリプトファンを必要とし残りの3株は必要としない。

2) トリプトファン必要株 S58 はどのアミノ酸をも単独に N 源として利用し得ないが、トリプトファン不要株 S60 はグルタミン酸、シスチン、アスパラギン酸を単独に N 源として利用する。特にグルタミン酸をよく利用する。

3) S58 はトリプトファンを欠くと全く発育はみられず、シスチンを欠くと発育が非常に劣り、次いでアスパラギン酸を欠くと発育が大分劣る。これに反して S60 はトリプトファンを欠いても発育は少しも影響されず、むしろシスチンを欠くと発育が非常に劣り、次いでアスパラギン酸を欠くと発育が大分劣る。

4) トリプトファンは  $10^{-8}$ M 濃度でも発育効果を有する。このこと及び上述のトリプトファンを欠くと全く発育のみられないことから、トリプトファンはトリプトファン必要株にとつて“発育因子”に

あたると思われる。

5) インドールはトリプトファンと略同程度の発育効果を有する。

6) インドール醋酸, スカトールは幾分発育効果を有するが, インドールに比べるとずっと弱い。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師村上教授に深甚の謝意を表し, 併せて御協力下さった中桐, 瀬尾両嬢に感謝する次第であります。

#### 参 考 文 献

- 1) Koser, Rettger : J. Infect. Dis., **24**, 301, 1919.
- 2) Fildes, Gladstone, Knight : Brit. J. Exptl. Path., **14**, 189, 1933.
- 3) Johnson, Rettger : J. Bact., **43**, 103, 1942 ; **45**, 127, 1943.
- 4) 鷹取 : 日本細菌学雑誌, **7**巻, 3号, 245, 1952.
- 5) Van. Loghem : Zent. Bact. Parasitenk. I. Orig., **57**, 385, 1911.
- 6) Braun, Cahn-Bronner : Zent. Bact. Parasitenk. I. Orig., **86**, 196, 1921. ; Biochem Z., **131**, 226, 272, 1922.
- 7) Burrows : J. Infect. Dis., **64**, 145, 1939.
- 8) Saunders, Finkle : J. Am. Chem. Soc. **59**, 170, 1937.
- 9) 新井 : 薬学雑誌, **70**巻, 6号, 311, 1950.
- 10) Fischer, A. : Vorlesungen über Bakterien. **2**. Aufl. Jena. **97**, 1903.
- 11) P. Fildes : Brit. J. Exptl. path., **21**, 315, 1940.
- 12) Wooley, Sebrell . J. Biol. Chem., **157**, 141, 1945.
- 13) 大谷, 本田 : 大阪医学会雑誌, **37**, 1, 昭和13年.
- 14) 新井 : 薬学雑誌, **71**巻, 691, 1951.
- 15) Yanofsky, C. : A symposium on Amino Acid Metabolism, Johns Hopkins Press, 930, 1955.
- 16) 水野, 小坂 : 日本細菌学雑誌, **5**, 53, 59, 1950, **7**, 227, 229, 1952.
- 17) Gale, E. F. : 細菌の化学的活性, 本田書店, 91, 1953.
- 18) Oginsky, Umbreit : 細菌生理学入門, 丸善株式会社, 63, 1953.
- 19) Lamanna, Mallette : 基礎細菌学, 丸善株式会社, 336, 1953.

## Studies on the Tryptophan Metabolism of Bacteria

II. Tryptophan metabolism of *B. typhosus*.

By

Minoru Inada

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

It is well known that tryptophan is necessary for the growth of *B. typhosus*.

The author analyzed this requirement of tryptophan from the point of view of the nutritive requirement of *B. typhosus*. The results were as follows:

- 1) Of ten strains, seven strains require tryptophan for growth, three strains do not.
  - 2) S-58 which requires tryptophan utilizes no amino acid singly as N source and S-60 which does not require tryptophan utilizes singly glutamic acid, cystine and aspartic acid. Glutamic acid is especially utilized by S-60.
  - 3) S-58 does not grow in the absence of tryptophan and grows scarcely in the absence of cystine and grows a little in the absence of aspartic acid. On the contrary S-60 grows in the presence or absence of tryptophan and grows scarcely in the absence of cystine and grows a little in the absence of aspartic acid.
  - 4) Tryptophan has the effect on growth at  $10^{-8}$  Mol. From this and the fact that above mentioned the strain which requires tryptophan could not grow in the absence of tryptophan tryptophan is found to be "growth factor" for the strain.
  - 5) Indole is found to be approximately equally effective as tryptophan.
  - 6) Indole acetic acid and skatole is more weak effective compared with indole.
-