

抗酸性菌の物質代謝に関する研究

第 2 編

各種抗酸性菌に於ける酵素の菌体内局在性について

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

林 周 平

〔昭和 34 年 7 月 16 日受稿〕

緒 言

第 1 編では抗酸性菌の grinding cell を超遠心分劃法により supernatant fraction (Sf) と particulate fraction (Pf) に分別し、之等の酵素学的性状を脱水素酵素反応により検討した。このように限定された反応に於てさえ、各種基質に対する酵素活性は Sf と Pf で明かに差のあることが示され、この両分劃の性状差は又菌の種類により相違あることも明確となつた。

これ等の事実よりして各種酵素は細胞内に一様に分布するものではなく、細胞微細構造と密接な関係を保持し、ある程度局在性を有するものと考えられる。この細胞微細構造と酵素の局在性に関連して、細菌細胞に mitochondria が存在するか否かが電子顕微鏡的¹⁻⁴⁾、酵素学的⁵⁾ に重要な問題となりつつある。しかし現在、細菌に mitochondria を確認したという証拠はない。Weibull⁶⁾ は細菌を lysozyme で消化すると球状体の protoplast が得られるが、この protoplast を低張液で処理すると、所謂 burst が起り細胞質内容が流出する。之を遠心沈澱すると不溶性部が回収される。このものが gost であり、細胞質膜に該当することを述べている。更に又 gost の酵素活性は mitochondria と類似していることを認めている。拘る観点から細胞質膜は生理学的に極めて重要部と考えられる。細菌の grinding cell から得られた Pf は、細胞質膜と酵素性状が一致することより、最近超遠心分劃法が酵素局在性究明の最良の手段に採られるに至っている。細菌細胞で此の部門の研究は次第に増加しているが⁷⁻¹⁰⁾、抗酸性菌に関する報告では山村及び協力者¹¹⁻¹²⁾、Millman 等¹³⁾ の優れた記録がある。

著者は第 1 編の脱水素酵素反応を更に拡大し、酸

素消費の面より検討し、Sf 及び Pf の酵素活性を動的に把握出来るよう実験を試みた。

実験材料及び実験方法

供試菌株：第 1 編と同様に H 37 Rv, H 37 Ra, BCG, 鳥型竹尾株, Myc, ATCC. 607, Myc, phlei の 6 株で、培養方法、培養期間も全く同一である。

Sf, Pf の、各基質に対する O₂ の消費の検討は、総て前編で述べた脱水素反応の活性度との比較が最大の目的であるため、之等超遠心分劃物も前編に於けると全く同一の条件で作製された。

O₂ 消費測定法：Warburg 検圧法によつた。即ち副室に 10% KOH 液、0.5ml、主室に 0.02 mol phosphate buffer solution PH 7.0 (以下緩衝液)、0.7 ml、Sf (又は Pf)、2 ml、側室は 0.1 mol 基質、0.3 ml、以上反応系の総量は 3 ml であり、37°C の状態に於て時間的に O₂ 消費を観察した。勿論供試基質も前編と全く同一物である。

実験成績

A) H 37 Rv, H 37 Ra の Sf, Pf の成績
図 1-a, 1-b に示した如く H37Rv, H37 Ra 両株の Sf は基質に対する O₂ 消費の傾向、即ち酵素活性の傾向は大体類似している。lactate, pyruvate は共によく酸化を受けるが特に前者は著明である。次いで malate, fumarate もよく酸化されるが、citrate, acetate, succinate の酸化は極めて微弱であり、endogenous respiration と著差は認められない。只 H 37 Rv と H 37 Ra で異なる点は、後者の Sf が前者のそれよりも各基質に対する活性度が遙かに高い (約 2 倍位) ことである。

次に Sf の O₂ 消費を脱水素反応 (前編) と比較すると、一般に脱水素作用をよく受ける基質は、O₂

消費に於ても之が増加する傾向を示した。しかし脱水素の活性は、O₂ 消費と完全に一致する結果を示しはしなかつた。例えば H 37 Rv-Sf は脱水素反応では pyruvate に最高の活性を示したが O₂ 消費では寧ろ lactate が優位を示し、又 H 37 Ra-Sf は fumarate に対し強力な脱水素能を示したにかかわらず、それより遙かに弱い結果を示した pyruvate が O₂ 消費の結果に於ては fumarate の約 2 倍の消費を示している。

次に Pf の O₂ 消費の結果を観察すると図、2-a、2-b の成績が得られる。

脱水素反応に於ては lactate, succinate に対しては勿論活性が示され、更に pyruvate に対しても非常に微弱ながら活性が存在した。

然るに図に示した如く H37Rv, H37Ra 両株の pf は共に lactate, succinate のみを特異的に酸化し、他の基質は全く酸化しない。又 Sf に於ては endogenous respiration を認めたが、Pf では全く或は殆んど之が認められなかつた。

B) BCG の Sf, Pf の場合

前編で記載した如く BCG の sauton 培養菌は人型、鳥型菌等に比し、発育不良で菌の収量は少なく、又同一生菌量より得られた Pf の収量の著しく少ないことより考えて Pf は勿論、Sf も他菌の場合より濃度が低いように思われる。

Sf は脱水素反応に於ても fumarate に或る程度の活性が示された以外は極めて活性が弱く、特に lactate, pyruvate, citrate 等では殆んど活性が認

図 1-a

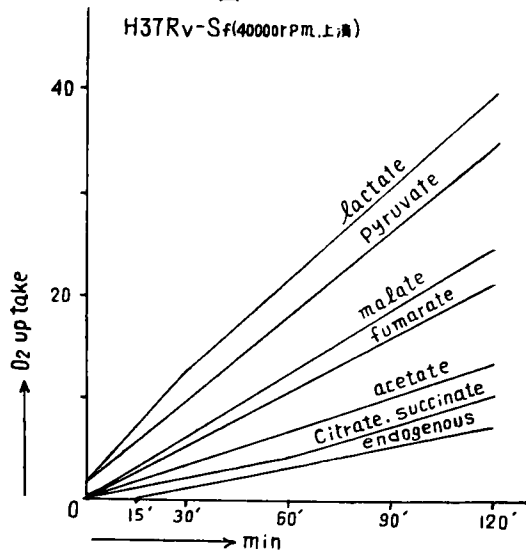


図 1-b

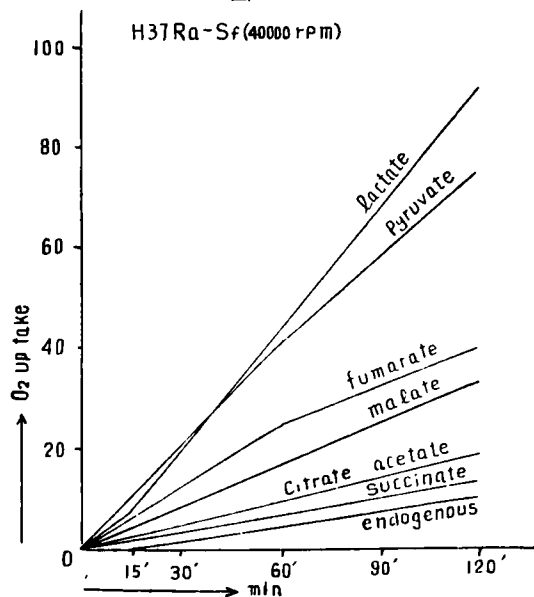


図 2-a

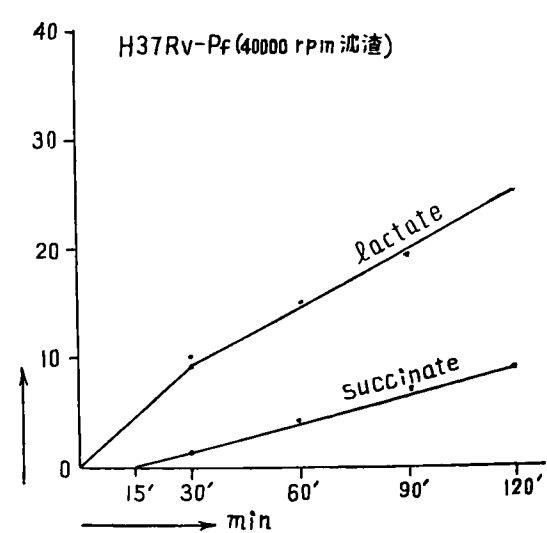
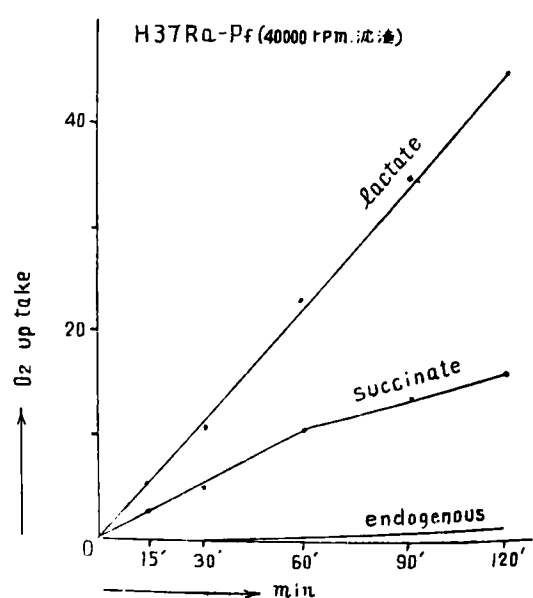


図 2-b



め難い位であつた。この傾向は O₂ 消費に於いても同様に現われ、図、3-a に示した如き結果が得られた。

即ち fumarate, malate に対し僅かに O₂ 消費が観られたが、其の他の基質は endogenous respiration と何等変る点はない。この事実は人型菌と著しく相違している。

又 Pf は脱水素反応で lactate, succinate のみに反応が現われたが、O₂ 消費に於ても同様に lactate succinate に限り活性が存在した。しかし之等の基質に対しても活性度は著しく低く、図、3-b に示す様な結果を得た。

兎角、BCG 自体が活性が弱いのか、sauton 培養という環境が不適当なのか、酵素的活性は他菌に比し著しく低いように思われる。

図 3-a

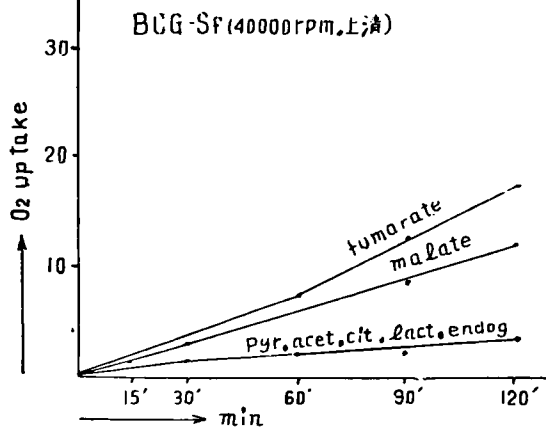
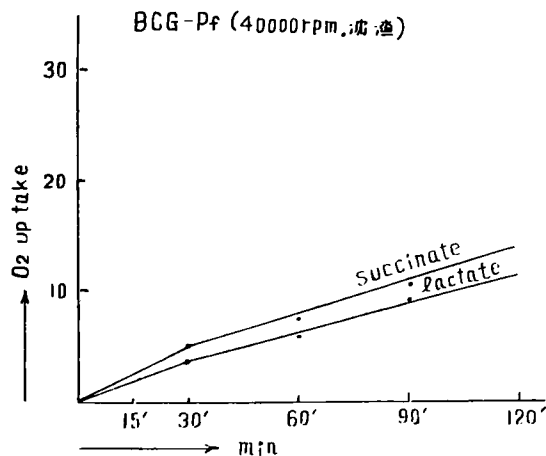


図 3-b

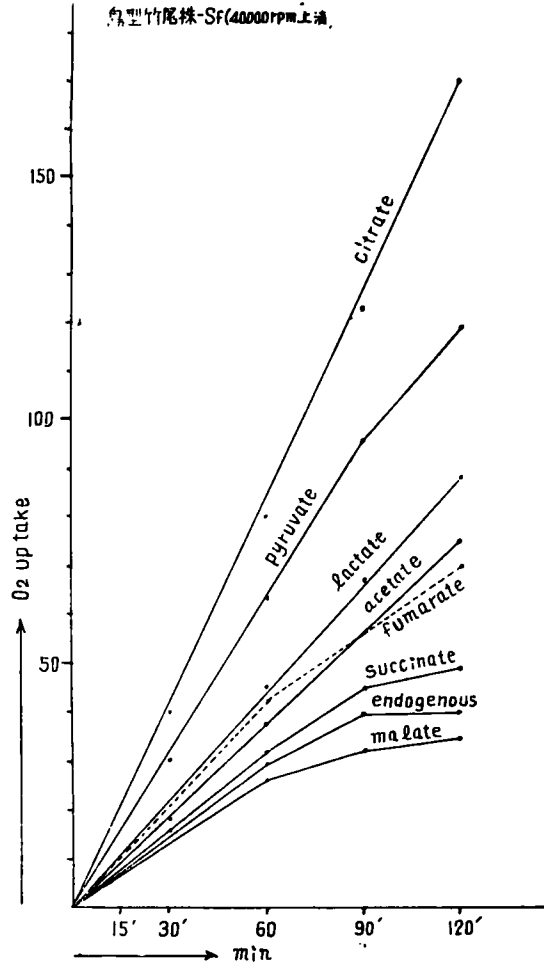


C) 鳥型竹尾株の Sf, Pf の場合

脱水素反応に於ては Sf は5倍に稀釈せるものを実験に用いたが、O₂ 消費の測定に於ては稀釈せず

に供試した。Sf の O₂ の消費の結果は図、4-a に示した。

図 4-a



図に示した如く、鳥型菌による基質酸化の性状は、他の供試株に比し極めて特徴的である。

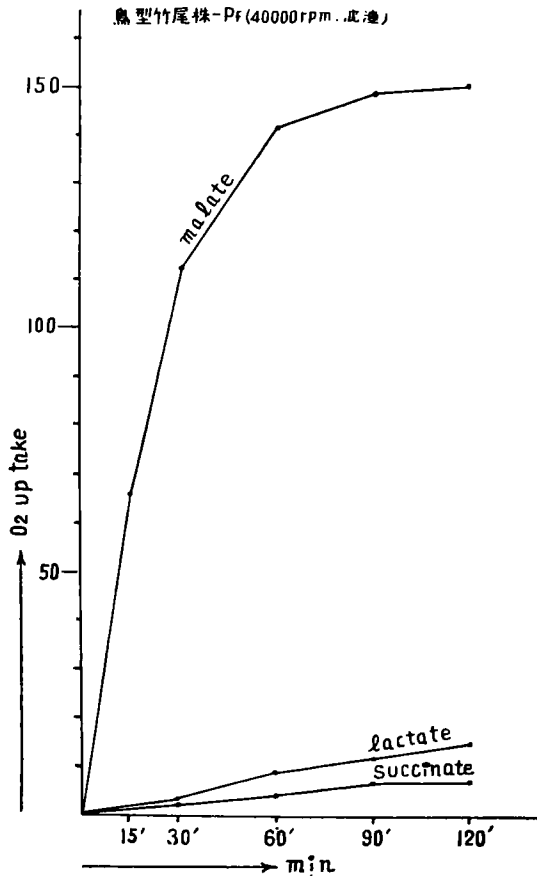
citrate を基質とした場合、鳥型菌程 O₂ 消費が増加した例は他の供試株では観られなかつた。即ち H 37 Rv, H 37 Ra, BCG 等に於ては citrate の効果は殆んど認められなかつたが、鳥型菌の Sf は供試基質中、最も O₂ 消費が高く endogenous respiration の4倍以上である。しかも興味あることに脱水素反応に於て citrate は供試基質中、最も活性が低い成績を示していることである。

又脱水素反応では lactate, fumarate, pyruvate の順に高い効能を示したが、O₂ 消費測定の結果は citrate に次いで pyruvate, lactate, acetate, fumarate の順で、各々 endogenous respiration の 3, 2.2, 1.9, 1.7 倍の O₂ 消費の増加を観た。acetate の酸化も、他の供試菌株では観察出来ない

効果を示しているに拘わらず、脱水素能に於ては citrate と同様に活性が著しく弱い。又 O_2 消費に及ぼす malate の効果は全く認められず endogenous respiration 以下であり、succinate の効果も極めて微弱である。

次に Pf の結果であるが、これも極めて特徴的であり興味ある性状を示した。其の成績は図、4-b に示した。

図 4-b



即ち malate は反応の開始と共に驚異的 O_2 消費の増加が起り、開始後30分頃より其の消費増加率は次第に弱まる傾向が現われるが消費の最高は2時間頃のように思われる。即ち malate の酸化酵素型は Sf には存在せず、専ら Pf に局在するものと考えられる。

又 lactate, succinate もこの Pf により僅かに O_2 の消費が観られたが、malate に対する活性に比すると全く問題にならなかつた。

以上の如く malate に対し著しい活性を示した Pf も、脱水素反応に於ては malate 以外に、fumarate, succinate に対しても強度の脱水素能を示

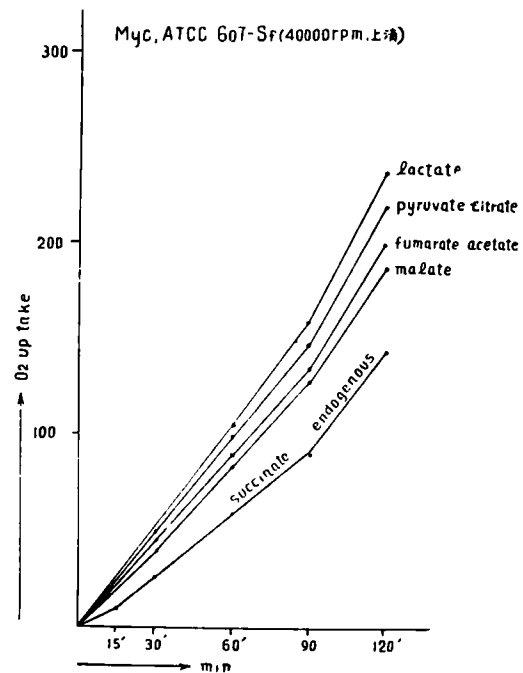
し、又 lactate に於ても之が認められた。この事実から鳥型菌に於ては特に脱水素能と O_2 消費の関係は完全な一致が観られない。

D) Myc, ATCC. 607 の Sf, Pf の場合

Myc, ATCC. 607 の Sf は脱水素反応に於て高稀釈(7倍)のものを供試したに拘わらず、無基質対照の反応速度が著しく速かであり、そのため各基質による有効速度というべきものは判定に困難であつた。強いて効果を求めるならば lactate, fumarate 次いで pyruvate 等が少々対照より反応速度が速く、acetate, malate は対照と同程度、citrate は寧ろ遅れている。

O_2 消費の検討に際しては原液の状態を用いた。其の結果は図、5-a に示した。

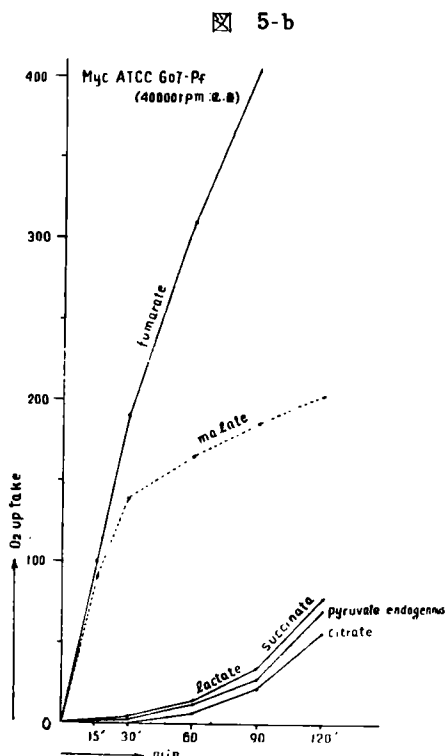
図 5-a



即ち Sf の特徴は endogenous respiration にあり、供試株中最高の O_2 消費を示している。このことは脱水素反応の結果と極めてよく一致する。lactate は endogenous respiration の 1.6, Pyruvate, citrate は 1.5, fumarate, acetate, malate は 1.3 倍の O_2 消費を示した。脱水素反応で全く有効な反応速度が認められなかつた citrate, acetate 等が pyruvate 或は fumarate と同程度の O_2 消費を示したことは幾らか興味がある。

Pf は脱水素反応で malate, fumarate で著しく速かな反応速度を示し、又 succinate も著効が認め

られ、lactate に於ても有効反応速度が観察された。これらの反応を示した Pf による O₂ 消費の検討の結果は図、5-b に示した。



Myc. ATCC, 607-Pf の O₂ 消費に於ける特異性状は fumarate の著明な酸化にある。即ち供試菌株の Pf 中、fumarate を酸化するのは之のみであり、しかも endogenous respiration の13倍に及ぶ O₂ 消費を記録した (90分の観察)。又 malate の酸化も鳥型竹尾株の Pf と同様著明であり、特に30分頃まで酸化力は急速に増大し、それ以後弛かな増加を示し、2時間目の観察点では endogenous respiration の約3倍の O₂ 消費が観られた。

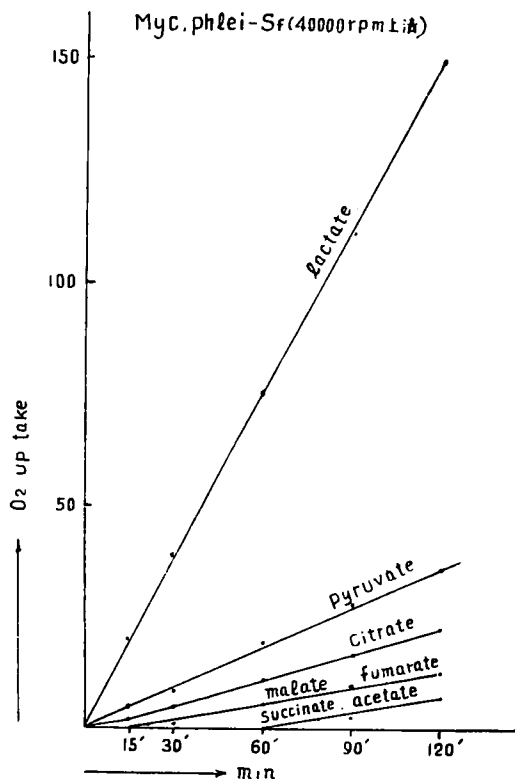
前述した如く lactate, 特に succinate は強力な脱水素能が認められたにも拘わらず、O₂ 消費は endogenous respiration と著差が観られなかつた。

E) Myc. phlei の Sf, Pf の場合

Myc. phlei の Sf は lactate を基質とせる場合、その脱水素能は fumarate, malate より弱いに拘わらず O₂ 消費は図、6-a に示した如く著明な増加を観た。逆に fumarate, malate は O₂ 消費に於ては極めて低い値を示した。又 pyruvate は脱水素反応に於ては、対照と殆んど差が認められない状態であつたのに、或る程度の O₂ 消費が示された。

しかし何れの基質も lactate の場合に比較すれば問題にならない程 O₂ 消費は微量である。例えば

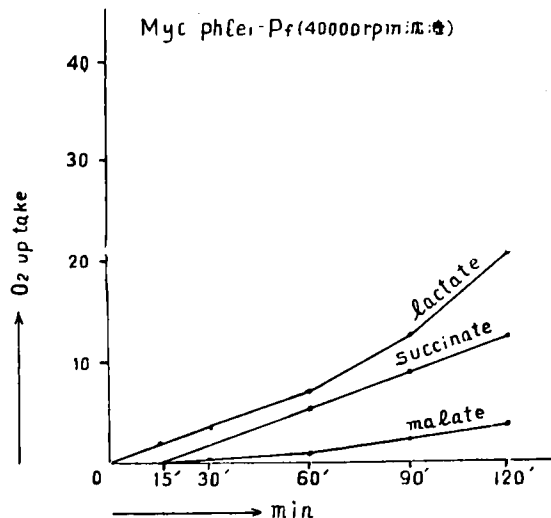
図 6-a



lactate に次ぐ O₂ 消費を示した pyruvate でさえ lactate の僅か 1/4 の消費にすぎない結果を示している。

Pf は脱水素の項で述べた如く lactate, succinate, malate の 三者のみ脱水素され得るが、その能力は微弱であつた。この結果は O₂ 消費の成績にも同様 に現われ、この三者のみが特異的に酸化された。しかし O₂ 消費量は図、6-b に示す如く、何れも著明なものではない。

図 6-b



総括及び考按

最近電子顕微鏡は微生物細胞を構成する多くの構造組織を明かにすることに役立つ。かつて細菌細胞の構成を度外視して得られた酵素標品による生化学的研究は次第に、この細胞微細構造の酵素学的生理機能の研究に重心が移りつつある。確かにこのことは生命現象の解析に有利な手段であるからである。

Georgi^{10,14)} は *B. stenothermophilus* の超遠心分離顆粒が malic dehydrogenase を多量に含み又 cytochrome oxidase と cytochrome C が緊密に結合していることを認めている。又 Mudd¹⁵⁾ は tetrazolium 還元顆粒を mitochondria ときめつけたが、Weibull¹⁶⁾ が指摘しているように、これのみで mitochondria を決定することは認認の可能性がある。結核菌についてこのような種類の研究は極めて少なく、僅かに *Myc. avium* で山村等^{11,16)} が、又 *Myc. tuberculosis var. hominis* (H37Ra) で Millman 等¹³⁾ の報告が見られるにすぎない。

しかして之等の研究を総合し、言いうることは、一般に不溶性顆粒分離は特異的に cytochrome system が存在することと、TCA cycle に関与する総ての酵素を含むものではなく、寧ろこれは僅か一部しか存在しない。そして可溶性上清分離との協力作用により細胞自体の TCA cycle 及び終末呼吸酵素系を完全なものにしている如く思われる。即ち超遠心分離物質は単なる細胞破片や抽出物ではなく細胞の生理機能の単位ではなからうか。

最近、教室の岡¹⁷⁾、滝沢¹⁸⁾ は結核菌の物質代謝に関する仕事を系統的に進めてきたが、著者は同じ抗酸菌といえども種々性状を異にしている限り、上述せる如く不溶性顆粒分離と可溶性分離の酵素学的活性の様相が異なるのではなからうか、即ち細胞構成物と酵素は密接な関係を保ちながら、各菌種特有の局在性を示すものと推考した。この観点に立脚し本編に於ては特に、Warburg 検圧計による O₂ 消費の面より各種抗酸性菌につき検討を加えた。

超遠心分離物の製法は第1編で詳述した。そして調製された分離物の一部を第1編の脱水素酵素反応に使用し、残部は本編の実験に供試し、又基質、緩衝液も同時作製のものを両実験に用い、なるべく条件を同一にした関係上、本実験成績は脱水素酵素反応の結果と完全に比較検討が出来るものと思う。

以下供試各株につき総括すると下記の如くである。

H 37 Rv, H 37 Ra.; 両株の Sf の酵素学的性状は大體類似しており、共に lactate, pyruvate をよく酸化し、次いで malate, fumarate が中等度の酸化を受ける。しかし其の他の供試基質の酸化は著明でない。活性度は一般に H37Ra-Sf が高く、例えば lactate は endogenous respiration の9倍、pyruvate : 7.5倍、fumarate : 4倍、malate : 3倍の O₂ の消費増加を認めたが、H 37 Rv-Sf は lactate : 5.3倍、pyruvate : 4.5倍、malate : 3.3倍、fumarate : 3倍の O₂ 消費であつた。

次に両株の Pf の性状を観ると、何れの Pf も lactate, succinate のみを特異的に酸化し、他の基質は酸化しなかつた。この性状は滝沢¹⁸⁾ の成績とよく一致した。

BCG.; BCG の Sf は脱水素反応に於ける活性も著しく低い結果を得たが、O₂ 消費に於ても著明な酸化を受ける基質は認められなかつた。ただ活性は低いながらも Pf は人型菌同様に lactate, succinate を特異的に酸化するように思われた。

鳥型竹尾株.; 之の Sf は極めて特徴ある性状を示した。即ち citrate を基質とした場合、脱水素反応では見るべき効果がなかつたに拘わらず、O₂ 消費では著しい増加を示した。又 malate の酸化酵素系は、この分離には全く存在しないような結果を得た。

Pf は脱水素反応では malate, fumarate, succinate, lactate に活性を示したが、O₂ 消費に於ては malate のみが特異的に、しかも高度に酸化された。この事実は山村の実験の如く malate の完全な酸化酵素系は Pf にのみ局在するものと考えられる。

Myc. ATCC. 607.; この株の Sf の特徴は endogenous respiration が極めて高いことであり、これは脱水素反応に於ても観察された。

又これの Pf は fumarate, malate を特異的に酸化した。特に fumarate の酸化は強力であつた。

Myc. phlei.; Sf により lactate は著明な酸化を受けるが、其の他の基質では O₂ 消費の増加は余り著しいものが認められなかつた。又 Pf は lactate, succinate, malate の三者を特異的に酸化した。供試各株の Pf により特異的に酸化される基質を総括列記すると第1表の如くである。

著者は第1編で各株の Sf, Pf の脱水素能を検討したが、この結果は必ずしも Warburg 法による O₂ 消費の成績とは一致しなかつた。勿論前者は脱水素

第1表 Pf により特異的酸化を受ける
基質

供 試 株	Pf により特異的に酸化される基質
H37Rv	lactate, succinate
H37Ra	" "
BCG	" "
鳥型竹尾株	malate
Myc, ATCC. 607	fumarate, malate
Myc, phlei	lactate, succinate, malate

の段階のみの検討であり、後者は多くの因子を含む動的検討法であるから常に一致するものとは考えられない。

又各株の Sf, Pf に存在する酵素活性の種類又強度は、それぞれ株を異にすることにより性状も差が現われている。著者は抗酸性菌の各株につき之等の検討を行い以上の知見を得た。

結 論

人型結核菌, H 37 Rv, H 37 Ra, BCG, 鳥型竹尾株, Myc, ATCC. 607 の sauton 培養菌及び Mc, phlei の glycerin buillon 培養菌を石英砂で磨砕し、超遠心分割法により不溶性顆粒分割と可溶性分割を得た。各株の之等両分割物の酵素学的性状を Warburg 検圧法により検討し下記の結論を得た。

1. 人型結核菌の可溶性分割は lactate を始め多くの基質を酸化し得るが、不溶性顆粒分割は lactate, succinate のみを特異的に酸化し他の基質を酸化しない。このことは BCG の不溶性顆粒分割についても言う。

2. 鳥型竹尾株の malate の酸化酵素系は完全に不溶性顆粒分割のみに存在する。

3. Myc, ATCC. 607 の可溶性分割は強力な endogenous respiration を保有している。又不溶性顆粒力割は fumarate, malate を特異的に酸化し得る。

4. Myc, phlei の可溶性分割は lactate 以外は其の酸化力が余り強力でない。又不溶性顆粒分割は lactate, succinate, malate の三者のみ酸化し得るが、その程度は余り強力ではない。

稿を終る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ます。又本研究に対し御助言と御協力を戴いた岡博士に感謝の意を表します。

文 献

- Mudd, S. et al.: J. Bact., **62**, 459, 1951.
- Mudd, S. et al.: J. Bact., **72**, 767, 1956.
- Toda, T. et al.: J. Bact.: **73**, 442, 1957.
- Shinohara, C.: J. Bact., **74**, 413, 1957.
- Green, D. E.: 生化学, **29**, 2, 65, 1957.
- Weibull, C.: J. Bact., **66**, 137, 1953.
- Gunsalus, I. G., Gunsalus, C. F. and Stanier, R. Y.: J. Bact., **66**, 538, 543, 548, 1953.
- Widmer, C., King, T. E. and Cheldelin, V. H.: J. Bact., **71**, 737, 1956.
- Alexander, M., Wilson, P. W.: J. Bact., **71**, 252, 1956.
- Georgi, C. E., et al.: J. Bact., **70**, 716, 1955.
- 楠瀬, 永井他: 酵素化学シンポジウム, **10**.114, 1954.
- Kusunose, M., Nagai, S.: J. Bact., **72**, 754, 1956.
- Millman, I., Darter, R. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **91**, 271, 1956.
- Georgi, C. E. et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **76**, 598, 1951.
- Mudd, S.; Ann. Rev. Microbiol., **8**, 1, 1954.
- Yamamura, Y. et al.: M. J. Osaka Univ. **6**, 489, 1955.
- 岡: 岡山医学会誌, **69**, 5, 昭和32.
- 滝沢: 日本細菌学会, 中四国支部会演説要旨, 光市, 昭和32.

Studies on the Metabolism of Acid-Fast Bacilli

Part II The Localization of Enzyme Activity in the Cells of Acid-fast Bacilli.

By

Shuhei HAYASHI

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

Using the same procedure and organisms as in the Part I, the author prepared the soluble fraction and the particulate fraction, and carried out further enzymatic study of these fractions by means of Warburg's manometer technique. The following results were obtained.

1) The soluble fraction of H37 Rv and H37 Ra could oxidize lactate and other substrates fairly successfully; but on the other hand, the particulate fractions of that could oxidize lactate and succinate specifically and failed to oxidize the other substrates. And this fact was also noticed in the case of the particulate fraction of BCG.

2) In the case of Takeo's strain one of the avian type bacilli, the enzyme system that oxidize malate was found merely in the particulate fraction.

3) It could be observed that the soluble fraction of Myc. ATCC 607 showed intense endogenous respiration, and the particulate fraction of the organism could oxidize fumarate and malate specifically.

4) The soluble fraction of Myc. phlei could oxidize lactate successfully, but oxidize the other substrates not so satisfactorily. And in the case of the particulate fraction, it could oxidize any of lactate, succinate or malate, but, in a small extent.
