

緑膿菌産生色素“Pyocyanine”に関する研究

—特に Pyocyanine 生合成に影響する因子について—

岡山大学医学部微生物学教室（主任：村上 栄教授）

（指導：金政泰弘講師）

坂 野 才 蔵

〔昭和40年6月28日受稿〕

内 容 目 次

緒 言

実験材料及び実験方法

実験成績

1. 各種糖類及び中間代謝物の影響
2. 金属イオンの影響
3. N源添加の影響

4. 培養時の好気、嫌気条件の影響

5. 培養時 pH の影響

6. 菌の発育と Pyocyanine 産生との関係

考 按

結 論

文 献

緒 言

緑膿菌の産生する色素については、この菌の発見者である Gessard¹⁾ の研究を嚆矢として幾多の研究がある。特にその色素の一種である Pyocyanine に関しては、Fordes²⁾ が始めて結晶として取り出し、Wrede and Strack³⁾ によつてその構造が決定され、緑膿菌に特異な緑色色素であり、自然界に存在するフェナジン核を有する色素として最初に報告されたものである。

この色素の産生に関しては、栄養要求と増殖との関係において幾多の報告がなされているが、Burton⁴⁾ の研究がもつともまとまつたものとして有名である。彼の報告によると、Pyocyanine 産生に及ぼす環境条件は単一のものではなく、色々の因子を必要とし、特にアミノ酸の面の検討ではアラニンとロイシンが必要であることを述べている。一方 Blackwood や Neish⁶⁾ は ¹⁴C でラベルされた基質を用いて検討し、Glycerol が最もすぐれた Substrate であり、アミノ酸は基質としては大して役立たないと述べている。

著者は緑膿菌による Pyocyanine 産生の場合の環境条件に関して更に検討を進め、多面的な観察により興味ある知見を得たので報告する。

実験材料及び実験方法

供試菌：教室保存の *Pseudomonas aeruginosa* を供試した。普通寒天培地に数代継代して純化を計り、常に普通寒天培地に16～24時間培養した新鮮株を実験に使用した。

使用化学薬品：培地調製用薬品、炭水化物、アミノ酸、EDTA 等はすべて市販品を用いた。

Pyocyanine 産生の判定：特に断わらない限り37°C、24時間培養後、室温に2～3時間放置後肉眼的に観察す。又培地及び菌のすべてをコルペンにとり、クロロホルムで色素抽出を行つて検討した。

実 験 成 績

1. 各種糖類及び中間代謝物の影響

普通寒天培地に *Pseudomonas aeruginosa* を培養した場合には Pyocyanine の産生は殆んど認められない、この培地に各種糖類、Glycerine、 β -glycerophosphate、Pyruvate を各々終濃度 M/10 になる如く添加してその影響を見た。

表1に示す如く他の物質を添加しない普通寒天培地では Glycerine を加へた場合にのみ色素の産生が見られた。尚各々の組合せに MgSO₄ を M/500 添加した場合、Glucose 及び Glycerine 添加例において

色素の産生が見られる。その他の物質添加では Mg イオンの有無にかかわらず色素産生は認められない。

表 1 Pyocyanine 産生に及ぼす各種糖及び中間代謝物の影響

添加物 培地	Glucose	Ribose	Lactose	Maltose	Saccharose	Glycerine	β -Glycero phosphate	Pyruvate
普通寒天培地	—	—	—	—	—	+	—	—
普通寒天培地 + MgSO ₄	+	—	—	—	—	+	—	—

基礎培地：普通寒天培地

添加物：1/10M (終濃度)

MgSO₄：1/500M (終濃度)

Glycerine 添加は Pyocyanine 産生に特に有効であるので、この添加濃度の系列変化を検討した。

1. その結果は M/10 (終濃度) 添加が最も有効であったが、M/20 以上の Glycerine 添加であれば産生は良好である成績を得た。

表 2

Pyocyanine 産生に及ぼす glycerine の濃度影響

Glycerine M (終濃度)	0.1/10	0.25/10	0.5/10	1/10	2/10	4/10
Pyocyanine 産生能	±	+	++	+++	++	++

基礎培地：普通寒天培地

2. 金属イオンの影響

Glucose を添加した場合には、あわせて Mg イオンの添加が必要である事を知つたので、M/10 Glucose 添加に対する MgSO₄ 添加量の検討を行い、少くとも

M/1000 以上の添加が必要である。しかし他の金属イオン、例えば Fe イオン又は Mn イオンでは無効であつた。

Glucose を基質に入れた場合には Mg イオンが必要であり、Fe イオンは有効でない事が判つたが、そこで *Pseudomonas aeruginosa* の Glucose, β -Glycerophosphate 及び、Glycerine の酸化能に対するこれら金属イオンの影響を検討した。表 4 に示す如く、Glucose 基質の場合の酸素消費量に対し、Mg イオンは特異的な促進を示し、Fe イオンではむしろ酸素消費量が低下した成績を示した。即ち Glucose が代謝されて、Pyocyanine 産生に必要な基材への変化に Mg イオンが必要である事がうかがえる。尚 β -Glycerophosphate, Glycerine 基質の場合は Mg イオン添加は効果なく、Fe イオン添加が僅かの促進を示した。

表 3 Pyocyanine 産生に及ぼす金属イオンの影響

添加金属イオン終濃度 (Mole)		0	1/2000	1/1000	1/500	1/250
金属化合物	基礎培地					
	普通寒天培地					
MgSO ₄	普通寒天培地	—	—	—	—	—
	普通寒天培地 + Glucose	—	±	+	++	+++
FeCl ₂	普通寒天培地	—	—	—	—	—
	普通寒天培地 + Glucose	—	—	—	—	—
MnCl ₂	普通寒天培地	—	—	—	—	—
	普通寒天培地 + Glucose	—	—	—	—	—

添加 Glucose：1/10 Mole (終濃度)

Ethylendiamine tetraacetate (EDTA) は金属イオンとキレート化合物をつくるが、特に Mg イオンとは同モルで結合して、細菌発育に対して不活性化され

る¹¹⁾。そこで Glycerine 添加ペプトン水及び Glucose 添加ペプトン水に EDTA 液及び MgSO₄ 液の一定量を加へて、Pyocyanine 形成に Mg イオンが必要で

ある事を確かめた。Glycerine 添加普通寒天培地では EDTA 添加量を増すと、Pyocianine 産生は低下して行き、 $1/400\text{M}$ (終濃度) の EDTA 添加で産生は認められなくなる。 $1/500\text{M}$ の Mg イオンを添加したものは、J 度 $1/500\text{M}$ の EDTA 添加でその効果が打消される成績を得た。Glucose 添加培地でも同様の成績を得る事が出来た。即ち $1/500\text{M}$ の Mg イオン添加による効果も同モルの EDTA で相殺される結果を得た。

EDTA の大量を添加すると菌の発育も抑えられる。この発育阻害をさける意味で、大量の磷酸塩の添加実験も行つた。表に示さなかつたが、この場合は発育は全く抑えられなかつたが、大量添加では Mg イオンが結合する為か、Pyocianine 産生が阻止された。

表 5 添加 EDTA と Mg イオンの相互関係

添加 EDTA 終濃度 Mole	0	$1/2000$	$1/1000$	$1/500$	$1/400$	$1/333$	$1/250$
+ Glycerine	+++	++	++	+	—	—	—
+ Glycerine + MgSO_4	+++	+++	+++	+++	++	++	+
+ Glucose	±	—	—	—	—	—	—
+ Glucose + MgSO_4	++	++	+	±	—	—	—

基礎培地：0.3% Peptone 水

添加 glycerine 及び glucose： $1/30\text{M}$ (終濃度)

添加 MgSO_4 ： $1/500\text{M}$ (終濃度)

3. N 源添加の影響

一般の実験には基礎培地に普通寒天培地又はペプトン水を用いたが、N 源の関係を検討する目的で、合成培地を用いて以下の実験を行つた。C 源は Glucose, Glycerine, Lactate と変化せしめ、これに Alanine, Glutamate, Aspartate を添加した。いずれも通常の発育を示すにかかわらず、この実験の範囲内では Pyocianine の産生には Alanine が必須である成績を得た。

4. 培養時の好気、嫌気条件の影響

次に Pyocianine 産生に及ぼす好氣的、嫌氣的条件の影響を観察した。表 7 は Glucose 添加培地の場合で、好気条件ではいずれの培地条件でも菌発育は著明であるが、Mg イオンを加えた場合のみ Pyocianine 産生が見られる事は既述の如くである。しかし嫌気状態では、何れの培地条件でもかなりの発育は認められるが、Mg イオン添加の場合にも Pyocianine

表 4 酸素消費量に及ぼす Mg イオン Fe イオン添加の影響

基質 金属イオン	—	Glucose	β -Glycero phosphate	Glycerine
—	23	139	42	52
MgSO_4	19	226	38	59
Fe cl_2	32	65	55	68

普通寒天培地に 37°C 15 時間培養せる菌を生理食塩水にて、3 回洗滌したものを供試。

菌量：5mg/cup

基質： $\text{M}/100$ (終濃度)

酸素消費量： 37°C (1 時間値)

金属イオン： $\text{M}/100$ (終濃度)

表 6 Pyocianine 産生能に及ぼす N 源の影響

C 源	N 源	発育度	Pyocianine 産生度
Glucose + Alanine		++	++
" + Glutamate		++	—
" + Aspartate		++	—
Glycerine + Alanine		++	++
" + Glutamate		++	—
" + Aspartate		++	—
Lactate + Alanine		++	++
" + Glutamate		++	—
" + Aspartate		++	—

基礎培地：Phosphate $\text{M}/2000$, MgSO_4 $\text{M}/500$

NaCl 0.85% (終濃度)

添加 C 源： $1/30\text{M}$ (終濃度)

添加 N 源： $1/30\text{M}$ (終濃度)

産生はない。

次に表 8 の Glycerine 添加培地においては、好気的
条件ならば菌発育、Pyocianine 産生共に著明な
のに対し、嫌気条件では発育は良好であるにもかかわ

らず、Pyocianine 産生は認められない。

表 7, 表 8 何れの培地条件でも嫌気状態では pH
がやや低い傾向が見られるが、何れにしても Pyo-
cianine 産生に好気的条件が必要である事が判つた。

表 7 Pyocianine 産生に及ぼす好気嫌気状態の影響 (I)

—Glucose 添加培地—

基礎培地		1% Peptone 水	1% Peptone 水 + 2% Glucose	1% Peptone 水 + 2% Glucose + Mg
培養条件				
好 気 的 培 養	発 育 度	++	++	++
	Pyo. 産生度	—	±	++
	終 pH	8.6	8.0	7.8
嫌 気 的 培 養	発 育 度	+	+	+
	Pyo. 産生度	—	—	—
	終 pH	7.2	7.0	6.8

添加 $MgSO_4$: $1/500$ M (終濃度)

好気的培養: 液体培地表面を可及的広くするため、300ml コルベンに 50ml の液体培地を入れ
培養した。

嫌気的培養: 100ml コルベンに 50ml の液体培地を入れデシケーター中で排気、窒素注入を 3
回繰り返して嫌気条件を保った。

表 8 Pyocianine 産生に及ぼす好気嫌気状態の影響 (II)

—Glycerine 添加培地—

基礎培地		1% Peptone 水	1% Peptone 水 + 1% Glycerine	1% Peptone 水 + 1% Glycerine + Mg
培養条件				
好 気 的 培 養	発 育 度	++	++	++
	Pyo. 産生度	—	++	++
	終 pH	8.6	8.2	7.9
嫌 気 的 培 養	発 育 度	+	+	+
	Pyo. 産生度	—	—	—
	終 pH	7.2	7.0	7.0

添加 $MgSO_4$: $1/500$ M (終濃度)

好気的培養: 表 7 に同じ

嫌気的培養: 表 7 に同じ

5. 培養時 pH の影響

次に培養時の pH の変化による Pyocianine 産生
の変化を追及した。Pseudomonas aeruginosa は酸性
下では発育が悪く、中性附近か若しくはそれ以上の
pH でよく発育する。表 9 は Glucose 加 Peptone 水
で起始 pH を 4, 5, 6, 7 にして培養を行い菌発育
と Pyocianine 産生能を見た。起始 pH が 6, 7 で
ないと Pyocianine 産生はなく、又発育は認められ
ない。これは発育をとまなわない場合は、色素産生

がないと断定すべきかどうかは後述の検討にゆだね
なければならない。

次に起始 pH を 7.6 と一定して培養中の pH の変
化の影響をみた。実験の詳細は表 10 に示す如く、
Glucose 加 Peptone 水の Peptone 量を 0.2% と低濃
度とし、添加 Glucose の量を $1/20$, $1/10$, $1/7.5$, $1/5$
M [終濃度] と変化せしめて培養を行った。

一般に Peptone の濃度を下げ、Glucose 量を増す
と pH は強く低下する。又その下降の状態は図 1 に

表9 Glycerine 添加 Peptone 水で起始 pH 変化による Pyocyanine 産生

起始 pH	発 育 度	終 pH	Pyocyanine 産 生 能
4	—	4	—
5	—	5	—
6	+	8.0	+
7	++	8.0	++

培地成分 Peptone 1%
Glycerine $1/10$ M (終濃度)

表10 Pyocyanine 産生に及ぼす Glucose 添加量増加による培養 pH 変動の影響

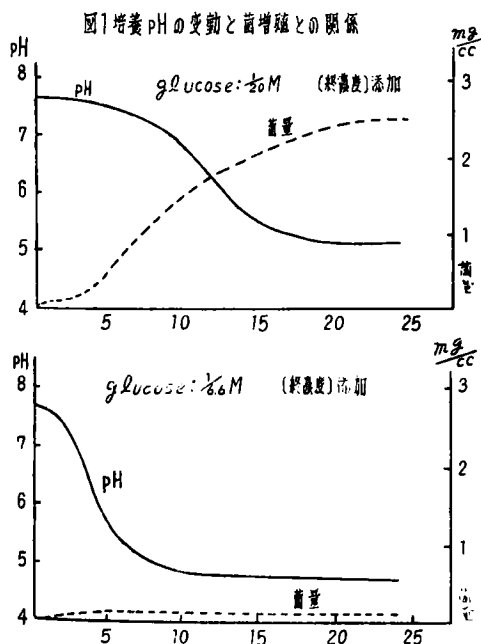
glucose 添加量 (終濃度 Mole)	終 PH	Pyocyanine 産生
$1/20$	5.0	+
$1/10$	4.6	—
$1/7.5$	4.5	—
$1/5$	4.4	—

基礎培地: Peptone 0.2% (終濃度)

$MgSO_4$ $M/500$ (終濃度)

起始 pH: 7.6

終 pH が4.8であるため、培養直後には青色を呈せず、よって NaOH で pH 10.0 に修正後緑色を呈した。



培地: 0.2% Peptone 水, $MgSO_4 M/500$ (終濃度)
この培地に図中記述の如く glucose を添加した。
pH は日立 pH メーターにて、菌量は光電比濁法により測定した。

示す如くで ($M/20$ Glucose 及び $M/6.6$ Glucose 添加の場合を代表として示す), $M/20$ Glucose 添加の場合は、培養 10 時間後より徐々に pH は下がり始め、終 pH は 5.0 附近に達し、その間に菌発育も著明に認められるが、 $M/6.6$ 添加の場合は pH は急激に下降して発育も殆んど認められない。

Pyocyanine は pH が酸性のままであれば緑色を示さない。これは Pyocyanine は pH の変化で色調を異にする為であり、著者が抽出精製した Pyocyanine の各種 pH における色調は表11の如くである。した

表11 pH 変動による Pyocyanine の色

pH	色
0.60	赤
3.05	赤
5.05	紫
5.20	紫
6.10	青
7.30	青
9.60	青

がつて判定時 pH が6.0以下の時は pH を中性以上に上げて検討する必要がある。表11の成績はこの方法で検討し、 $1/20$ M Glucose 添加の場合のみに Pyocyanine 産生が見られた。

6. 菌の発育と Pyocyanine 産生との関係

好、嫌気培養の実験及び pH の変動による実験の成績から、菌の発育という点が色素産生に影響を与えるかどうかと云う事が問題になった。そこで起始接種菌量を変えて正常菌が存在するにも拘らず、人為的に菌増殖の有無を生ぜしめ、菌の発育と Pyocyanine 産生との相関関係を見た、表12に示す如く、元来色素産生に良好な $1/10$ M glycerine 添加 Peptone

表12 起始菌量と Pyocyanine 産生の関係

起始菌量	菌増加度	終 pH	Pyocyanine 産 生 度
2 mg/ml	—	8.0	—
0.4	+	8.2	++
0.08	+	8.4	++
0.016	++	8.4	+
0.003	++	8.2	±

培地: Peptone 0.3% Glycerine $1/10$ M pH 7.6

Incubation: 37°C. 15hrs

水で終 pH は中性以上であつても、起始菌量 2mg/ml で、その後の菌増加が認められない様な場合では、Pyocianine 産生は認められない。起始菌量 0.4mg/ml 0.016mg/ml の時は菌増加も著明であり、色素産生も良好である。しかし起始菌量 0.003mg/ml の時は発育良好であるが、15時間培養で最終菌量が他にくらべて、さして多くならないので、Pyocianine 産生もやや劣る結果を得た。

静止菌であつても Pyocianine を産生するとすれば、大量接種のもの程大量の Pyocianine 産生があつてよい筈であるが、仮定に反した結果を得た。即ち Pyocianine 産生は必ず菌発育を必要とする事が予想された。

考 按

緑膿菌は 1882 年 Gessard¹⁾ によつて緑色をした膿から初めて分離された。この時以来この菌が緑色色素を作ることは明らから各種の研究がなされて来た。該菌の産生する色素は 2 種あり、その 1 つは青緑色の Pyocianine であり、他は黄色の螢光を発する Fluorescin である。

前者の Pyocianine はフェナジン誘導体であつてその生理学的意義や合成に必要な条件等については序論において述べた如く幾多の研究がなされている。一般的に言つて、この色素産生にはアミノ酸に加えて、Magnesium, Sulfur Source が必要であると言われる。Burton⁴⁾⁶⁾ は特にアミノ酸として Alanine, Leucine を強調し、Blackwood⁶⁾ 等は Glycerine が必要であるとして、アミノ酸は軽視している。その後の研究の進展にともない、Frank⁷⁾ 等は Alanine と、そして Glycerine が Jointsubstrate として必要であるとのべている。又 Kurachi⁸⁾ は Anthranilic acid が、Millican⁹⁾ は Anthranilic acid の前駆体である Shikimic acid が Pyocianine 合成に関与することを報告している。

著者は Pyocianine 生合成を細菌生理学の面から、各種条件、要因について検討を加えた。著者の得た成績でも、Glycerine が存在すれば色素産生が行われる事は明らからであるが、これに代るものとして Glucose + Mg イオンがあげられる。即ち Glucose + Mg イオンは Glycerine と全く同様の態度を示す。Blackwood⁶⁾ は ¹⁴C でラベルした Glycerine は Pyocianine に Incorporate する事をのべている。したがつて Glucose は Mg イオンを Cofactor として、Glycerine へ Convert し、Pyocianine 合成にあづか

るものと考えられる。Mg イオンは Dihydroxy acetone phosphate → Glycerine 系にも必要であると同時に、Embden-Myerhoff 系にも必要であるのであるが、この場合前者は基材生成に、後者は TCA cycle 入つてから Energy を得る事に必要であるのか、又両者に存する DPNH Linkage に関与するものかは断定出来ないが、充分その両者の可能性が考えられる。緑膿菌の Glucose 酸化が Mg イオン添加で強く促進される事実からも、これ等代謝系を円滑に促進している事が窺われる。

N 源に関しては広範な実験は行わなかつたが、他の条件が満足させられても Alanine は基材として必ず要求されることは Burton⁶⁾ の報告と一致した。

pH の影響として pH 6.0 以下の強い酸性下、又は培養中速かに酸性に傾く場合には、Pyocianine の産性は認められなかつた。pH 6.0 以下にした場合には、菌の発育も認められないので、すべての代謝系が停止していると考えられる。Glucose の大量添加を行つて、Incubate 中に pH が速かに下る状態の場合、発育曲線の上昇も殆んど認められず、Pyocianine の産生も認められない。ここで当然考えられる事は、Pyocianine 産生は菌増加に何等かの関係があるという事である。著者はこれを確かめる為に、起始菌量 20mg/ml という高濃度で、その他の因子はすべて満足せしめて培養を行つた。

Bail¹⁰⁾ の“生物学的空間”の概念から言へば、いかに栄養条件が揃つていても、ある一定限度以上には菌は増殖しないといわれ、これを M-concentration という。0.4mg/ml 以下の起始菌濃度では Incubate により発育は認められ、又色素産生も高度に認められる。しかし 2mg/ml では、その後の菌の増加が認められず、色素産生も認められない。若し静止状態でも充分な素材が揃えば色素産生が認められるとするならば、多量の菌が存在している故、色素産生があつても良い筈である。しかし結果は色素産生が認められず、色素産生には菌発育が必要であると考えられる。又その他の実験において、菌の増加量と Pyocianine 産生の両者を観察した成績で、菌増殖の認められない時は色素産生は無いという事が云える。

結 論

Pseudomonas aeruginosa の産生するフェナジン色素である Pyocianine の生合成に及ぼす理学的因子について検討し、次の結果を得た。

1. Pyocianine の産生には Glycerine が必要であ

るが Glucose+Mg イオンによつても置き換えられる。

2. N 源としては Alanine, Glutamate, Aspartate を検討の対照とした範囲では, Alanine のみが有効である。

3. 発育時の気相条件では, 好気条件の時にのみ産生せられ, 嫌気条件では如何に培地条件が満足されても, Pyocyanine の産生が見られなかつた。

4. 発育時の pH の問題では, pH 6.0 以下の酸

性では発育も悪く, Pyocyanine の産生が認められない。又起始 pH が中性附近にあつても, 急激に pH が下る条件では産生されない。

5. Pyocyanine 産生には菌の発育が必須であつて, 完全な静菌状態では産生が認められない。

稿を終るに際し御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師村上教授並びに金政博士に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Gessard, C. R. Acad. Sci., 94, 53, 1882.
- 2) Fordes, M. J. Acad. Sci., 51, 215, 326, 1860.
- 3) Wrede, F and Strack, E: Zphisiol Chem., Hoppe-Seyleis. 181, 58, 1926.
- 4) Burton, M. O., Eagles, B. A., and Campbell. J. J. R.: Canad. J. Research. 26, 15, 1948.
- 5) Burton, M. O. Campbell. J. J. R. and Eagles. B. A.: Canad. J. Reseach. 26, 15, 1948.
- 6) Blackwood, A. C. and Neish, A. C.; Canad. J. Microbiol., 3, 165, 1957.
- 7) Frank, L. H and De Moss, R. D.: J. Bact., 77, 776, 1959.
- 8) Kurachi, M.: Bull. Inst. Chem. Research, Kyoto Univ., 37, 85, 1959.
- 9) Millican., R. C.: Bioch. Biophys. Acta. 57, 407, 1962
- 10) Bail, O.: Z Immun. Forsh, 60. 1. 1929.
- 11) 荃田芳明: 岡山医学会雑誌.

Studies on the Physiological Factors Participating on the Biosynthesis of Pyocyanine by *Pseudomonas aeruginosa*

By

Saizo Sakano

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

Pseudomonas aeruginosa produces the two pigments, namely Pyocyanine and Fluorescein. The Pyocyanine is bluish green pigment and is derivative of phenazine pigment.

In this paper, the physiological factors that give influences on the biosynthesis of Pyocyanine by *Pseudomonas aeruginosa* in culture will be presented.

1. *Pseudomonas aeruginosa* required glycerine as a nitrogene source for the biosynthesis of Pyocyanine. In a case that glucose was used as carbon source, the addition of magnesium ion was essential.

2. Within alanine, glutamate and aspartate on which the author examined, only alanine was of effective as nitrogen source for the Pyocyanine synthesis.

3. The following results have been investigated by the studies on the atmospheric condition. *Pseudomonas aeruginosa* produced the pigment at a aerobic condition in the chemically satisfactory culture media, but could not produce at anaerobic condition in any culture media.

4. In the acidic media below pH 6.0, the growing of bacteria was very slight and the Pyocyanine could not be produced. Moreover, the pigment did not be synthesized when the pH was descended rapidly, even if the startiag pH of the medium was neutral or slight basic.

5. The growing of the bacteria is indispensable for the synthesis of Pyocyanine, then the resting cells could not synthesize the pigment.