

Sh. sonnei S 型, R 型 菌 の 酵 素 的 性 状

第 2 編

静 止 菌 に つ い て

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

浜 野 充 生

〔昭和 33 年 5 月 8 日受稿〕

目 次

I 緒 言	2 O ₂ 消費に対する Mg ⁺⁺ , Fe ⁺⁺ の影響
II 実験材料及び実験方法	3 グルコース酸化に対する阻害剤の影響
III 実験成績	IV 総括及び考按
1 S 型菌, R 型菌の基質酸化能	V 結 言

I 緒 言

前編に於ては大腸菌 S 型及び R 型の発育に於ける N 源, C 源, ビタミン類の要求を比較し又, 好氣的, 半嫌氣的培養に於ける発育度, C 源の消費, 分解生成物の蓄積などを検討して, S 型, R 型の供試菌はニコチンアミドを添加すれば, グルコースを C 源としアスパラギン酸, グルタミン酸, アラニン, グリシンなどのアミノ酸を各単独に N 源としてよく発育し, 特にアスパラギン酸は良好な N 源となり, 又 C 源としてグルコースの代りにグルコン酸, 乳酸, 焦性ブドウ酸, コハク酸でもよく発育し得る. 栄養要求に於て S 型 R 型間に有無の差は認められない. 然し一般に好氣的培養では R 型菌の方が S 型菌よりは発育は良好であり, 嫌氣的培養では S 型の方が良好な発育を示し, 且つ, 培地中のグルコース消費量に対する, 焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸の生成量は S 型菌に於ける方が大であり, S 型菌は R 型菌に比しやや嫌氣性に傾いて居ると考えられることを述べた.

本編に於ては好氣的, 並びに半嫌氣的培養の静止菌体の C 源酸化を S 型菌, R 型菌について比較しながら検討することとした.

II 実験材料及び実験方法

供試菌 前編同様教室保存の Sh. sonnei 菌 (岡山株) S 型, R 型を用いた. 尚 S 型菌は動物通過等により可及的に純化し寒天平板上の最も S 型の集落を

示すものから釣菌して用いた. 一方 R 型は分離後 R → R と釣菌として継代した純化 R 菌を用いた.

培養法:

(イ) 普通寒天培養菌は 37°C 18 時間培養のものをを用いた.

(ロ) 液体培養では

第一磷酸カリ	0.35 g
第二磷酸ソーダ	25 g
食 塩	3.0 g
硫酸第一鉄	0.091 g
硫酸マグネシウム	0.01 g
ペプトン	10.0 g
グルコース	20.0 g
水	1.0 l
pH	7.2

上の組成の液体培地を用い振盪培養では, 大きなコルベんに少量の培養を入れ空気との接触をよく振盪しながら 37°C 5 時間培養し, 静置培養ではコルベンの上部迄培地を入れ, 流動パラフィン重層培地では, 更にその上に減菌流動パラフィンを約 3 cm の層となる様に浮かせて, 37°C に 20 時間静置して培養した.

菌浮游液 各培地培養菌を集菌し, 培地成分混入を除くため M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で 2 回遠沈洗滌後, 同緩衝液に浮游せしめて, 体止菌浮游液を調製した. 菌濃度は光電比濁計によつた.

基質, 阻害剤 市販品を適當濃度に蒸留水にと

かし必要によつては NaOH 又は HCl を以つて pH を修正して用いた。

呼吸量測定：ワールブルグ検圧計を用い常法¹⁹⁾に従つた。

グルコースの定量：3.5-チニトロサルチル酸を用いる比色法によつた。

焦性ブドウ酸の定量：2.4-チニトロ、フェニール、ヒトラジンをを用いる比色法によつた。

乳酸の定量：濃硫酸、P-ヒドロキシチフェニルにより発色して、比色した。

醋酸の定量：試料溶液を硫酸を加えて酸性とし水蒸気蒸溜し、溜出液を M/100 NaOH を以つて滴定した。

Ⅲ 実験成績

1. S型菌, R型菌の基質酸化

能先づ普通寒天18時間培養のS型, 及びR型の各菌体を用い, グルコース, グルコン酸, リボース, 焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸, コハク酸, フマル酸を夫々基質とした O₂ 消費量(1時間値)を測定したところ, 第1表に示す如くであつた。両菌共グル

第1表 普通寒天平板地培培養菌のC源酸化

基 質	S	R
グルコース	141	104
グルコン酸	31	28
リボース	54	51
焦性ブドウ酸	90	145
乳 酸	132	160
醋 酸	43	47
コハク酸	64	99
フマル酸	52	67
な し	29	32

基質 10⁻³M, 37°C, 1 hr., pH 7.2

コン酸, 醋酸は酸化し難く, リボース酸化能も共に小であり, グルコースはS型の方がやゝ酸化能が大であるが, 焦性ブドウ酸ではR型の方が大であり, 乳酸, コハク酸, フマル酸に於ても同様の傾向が認められた。これは注目すべき事であると考え, グルコースを含む液体培地を用い, 振盪培養, 静置培養, 流動パラフィン重曹培養した菌体の O₂ 消費量をS型, R型につき比較した。結果は第2~第4表に示す通りであり, 振盪培養では他の培養法のものに比し一般に O₂ 消費は大であり, グルコースはS型の

第2表 液体培地培養菌のC源酸化振盪培養菌

基 質	S	R
グルコース	209	180
グルコン酸	65	60
リボース	57	50
焦性ブドウ酸	142	160
乳 酸	129	142
醋 酸	52	54
コハク酸	71	88
フマル酸	63	72
な し	34	40

基質 10⁻²M, 37°C, 1 hr., pH 7.2

第3表 液体培地培養菌のC源酸化静置培養菌

基 質	S	R
ブドウ糖	120	91
グルコン酸	32	27
リボース	44	42
焦性ブドウ酸	40	78
乳 酸	32	52
醋 酸	20	27
コハク酸	24	39
フマル酸	26	31
な し	19	24

基質 10⁻²M, 37°C, 1 hr., pH 7.2

第4表 液体培地培養菌のC源酸化
流動パラフィン重曹培養菌

基 質	S	R
ブドウ糖	82	70
グルコン酸	27	24
リボース	18	16
焦性ブドウ酸	32	40
乳 酸	21	29
醋 酸	20	24
コハク酸	20	29
フマル酸	24	36
な し	14	15

基質 10⁻²M, 37°C, 1 hr., pH 7.2

209 μ l に対でR型では180 μ l, 焦性ブドウ酸ではS型142 μ l, R型では160 μ l でS型, R型間に大差は認められない。ところが静置培養に於ては, グルコースを基質とした場合S型は120 μ l, R型は91 μ l でむしろS型の方が大であるが, 焦性ブドウ酸では, S型は40 μ l, R型は78 μ l でR型の方が著しく O₂

消費量が大であり, 又乳酸, コハク酸などでも僅かながら R型の方が O_2 消費が大なる傾向が見られた。

流動パラフィン重層培養では S型, R型共に一般に O_2 消費は各培養法のものゝ中最も小であり, グルコース, 焦性ブドウ酸, 乳酸などを基質とした場

合の O_2 消費量は S型, R型間に大差がなかった。

次に各培養法による培養菌体のグルコース酸化に於ける O_2 消費, グルコース消費, 並びに焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸生成の量的関係を S型, R型につき比較すると第5表の通りである。

第 5 表

型	培 養 条 件	O_2 消費 μM	グルコース 消 費 μM	焦性ブドウ 酸 生 成 $M\mu$	乳酸生成 μM	醋酸生成 μM
S	振 盪	9.8	5.4	0.9	0.6	0.9
	静 置	7.8	4.3	2.2	1.4	1.1
	パ ラ フ ィ ン	4.8	3.4	2.7	2.1	1.7
R	振 盪	8.9	4.9	0.3	0.2	0.7
	静 置	5.9	3.9	1.6	0.8	1.0
	パ ラ フ ィ ン	4.0	2.7	1.8	1.1	1.4

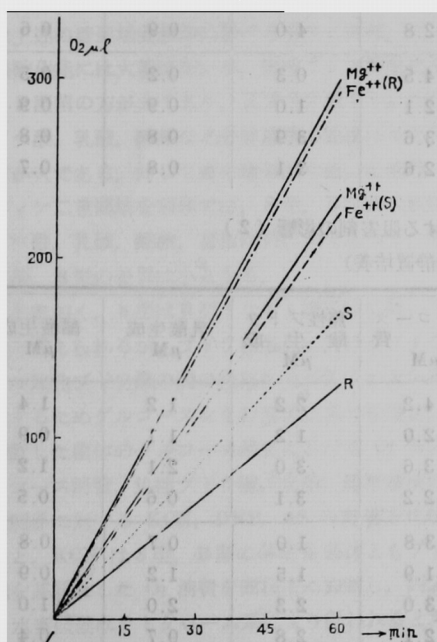
即ち, 振盪培養のものは S型, R型共にグルコース酸化にともなう焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸の生成量は他の培養法のものに比し小であり, 特に R型では小であつた。

静置培養のものでは, 他の培養のものに比しグルコースよりの分解産物の蓄積は大であり, S型, R型間の差異は静置培養のものに於ける程大ではなかつた。

2. O_2 消費に対する Mg^{++} , Fe^{++} の影響

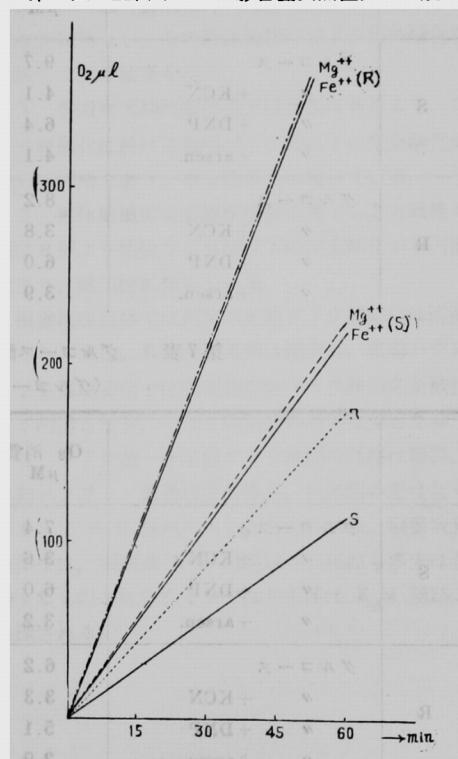
各培養法による供試 S型, R型静止菌の基質酸化

第1図 金属イオンの影響基質グルコース



能を知つたので, 普通寒天培養菌体を用い, グルコース, 焦性ブドウ酸を基質とした O_2 消費に対する Mg^{++} , Fe^{++} の影響を検討した。グルコースを基質とした場合は第1図に示す如く, これらイオン無添加に於ける O_2 消費量は S型よりは R型の方がむしろ小であるが, Mg^{++} 或は Fe^{++} の添加により

第2図 金属イオンの影響基質無性ブドウ酸



著しく促進され、R型はS型より O_2 消費は大となった。

又焦性ブドウ酸を基質とした場合に於ても Mg^{++} , Fe^{++} は O_2 消費を増大するが、その促進率はR型に於ける方が大であつた。

而して全く同じ実験をグルコースを含む液体培地を用いて振盪培養したもの、及び静置培養したものについても行つたが、何れも普通寒天培養菌体を用いた上記実験結果と同傾向の成績が得られた。

3. グルコース酸化に対する阻害剤の影響

以上の諸実験よりS型はR型に比し焦性ブドウ酸酸化能が小であり、グルコース酸化に於ける焦性ブドウ酸以下の完全酸化が不円滑で、分解産物としての焦性ブドウ酸、乳酸、醋酸の蓄積が大である傾向が認められることを知つた。そこで次にグルコース→焦性ブドウ酸の間の経路に差があるものか否かを見るため、グルコース酸化に対する KCN, 2,4-ジニトロフェノール(DNP), 亜硫酸ソーダ(prsen)

の影響を振盪培養、静置培養のS型、R型菌につき検討した。

振盪培養菌では第6表に示した如く、各阻害剤の O_2 消費、グルコース消費に対する影響はS型、R型間に殆んど差異はなく、又 DNP, arsen 添加によつては各菌共グルコースより大量の焦性ブドウ酸、かなりの乳酸を生成しグルコース1Mより生成する焦性ブドウ酸と乳酸量の合計は1Mをはるかに上廻ることを知つた。

静置培養菌については第7表に示した如く、やはり各阻害剤の効果はS型、R型間に有意の差はなく、又前述の如く静置培養菌は振盪培養菌に比し一般に阻害剤無添加の対照に於てもグルコースよりの焦性ブドウ酸その他の蓄積が大であり、特にS型はR型よりも更に大であるが、DNP, arsen 添加によつては両菌共これら分解産物の蓄積は更に増大し、グルコース1Mより生成蓄積する焦性ブドウ酸、乳酸量の合計は両菌共2M近くとなつた。而して DNP 添

第6表 グルコース酸化に対する阻害剤の影響(1)
(グルコース加培地振盪培養)

		O_2 消費 μM	グルコース 消 μM	焦性ブドウ 酸 生 成 μM	乳酸生成 μM	醋酸生成 μM
S	グルコース	9.7	5.1	0.7	0.5	0.7
	" + KCN	4.1	2.3	1.2	1.1	0.9
	" + DNP	6.4	3.9	4.2	1.0	1.2
	" + arsen.	4.1	2.8	4.0	0.9	0.6
R	グルコース	8.2	4.5	0.3	0.2	0.5
	" + KCN	3.8	2.1	1.0	0.9	0.9
	" + DNP	6.0	3.6	3.9	0.8	0.8
	" + arsen.	3.9	2.6	3.1	0.8	0.7

第7表 グルコース酸化に対する阻害剤の影響(2)
(グルコース加培地静置培養)

		O_2 消費 μM	グルコース 消 μM	焦性ブドウ 酸 生 成 μM	乳酸生成 μM	醋酸生成 μM
S	グルコース	7.4	4.2	2.2	1.2	1.4
	" + KCN	3.6	2.0	1.2	1.1	0.9
	" + DNP	6.0	3.6	3.0	2.1	1.2
	" + arsen.	3.2	2.2	3.1	0.6	0.5
R	グルコース	6.2	3.8	1.0	0.7	0.8
	" + KCN	3.3	1.9	1.5	1.2	0.9
	" + DNP	5.1	3.0	2.3	2.0	1.0
	" + arsen.	2.9	2.1	2.8	0.7	0.4

加に於ては静置培養菌はS型, R型共振培養菌に比しグルコースよりの焦性ブドウ酸蓄積は減少し乳酸蓄積が増大する傾向が見られた。

IV 総括及び考按

Sh. sonnei S型, R型のC源酸化を比較検討するため, 先づ普通寒天18時間培養の静止菌体の数種基質に対するO₂消費量を見ると(第1表), ブドウ糖等数種酸化能は, S型, R型間に殆んど差異はないが, 或いはS型の方がむしろ大であるのに対し, 焦性ブドウ酸酸化能はR型の方がはるかに大であり, 乳酸, コハク酸に於けり僅かながらこの傾向が認められる。又ブドウ糖, 焦性ブドウ酸を基質としたO₂消費に対するMg⁺⁺, Fe⁺⁺など二価金属イオンの促進作用はR型に於て著しく(第2表) Mg⁺⁺, Fe⁺⁺は焦性ブドウ酸の完全酸化を円滑にすると考えられることから²³⁾, R型ではブドウ糖酸化に於ける焦性ブドウ酸以下の完全酸化の機構がS型よりは発達しているものと推定される。

液体培地を用い, 振盪培養したもの, 静置培養したもの, 流動パラフィンを重ねて嫌氣的に培養したものについて, ブドウ糖, 焦性ブドウ酸酸化能を比較すると(第3表), 振盪培養菌体では焦性ブドウ酸の酸化能が, S型, R型菌とも大であり, 且つブドウ糖よりの焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸蓄積量は両者共小であり, 両者間に有意の差異は見られず, 振盪培養よりは, やゝ嫌氣的に傾いた静置培養菌体では上述の普通培養菌体に於ける所見と同様, ブドウ糖酸化能には大差はないが, 焦性ブドウ酸酸化能は, R型菌の方が大であり, 又ブドウ糖よりの焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸など分解産物の蓄積はS型菌の方が大である。而して更に嫌氣的に傾いた流動パラフィン二重層培養菌体では, S型, R型共に焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸, 蓄積は共に大であつて, 再びS型, R型の差異は小となる。

以上の如く, S型はR型よりやゝ嫌氣性に傾いていると考えられるが, ブドウ糖酸化に於けるブドウ糖→焦性ブドウ酸の間の径路に差があるか否かを検討するためグルコースを含む液体培地で振盪並びに静置した菌体のグルコース酸化に於けるO₂消費, グルコース消費, 焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸蓄積の量的関係に対するKCN, DNP, ASの影響を比較すると, KCNはS型, R型の各培養菌体ともブドウ糖を基質としたO₂消費を同程度に抑制し, 両菌共, 水素伝達はテトクローム系により行われると考

えられる。又静置, 及び振盪培養のS型, R型菌共にDNP, arsen添加に於てグルコース1Mより生成蓄積する焦性ブドウ酸, 乳酸量の合計は1M以上となり特に静置培養菌では2M近くとなり, 振盪, 静置両培養法によるS型, R型菌共グルコースを主としてEmbden-Meyerhof径路をへて分解するものと推定される。

而して, DNP添加に於けるグルコース酸化の振盪培養菌と静置培養菌間の差異は, 振盪培養菌ではグルコースよりの焦性ブドウ酸蓄積が大で乳酸蓄積が比較的小であるのに対し, 静置培養菌では焦性ブドウ酸蓄積量はやゝ減少し, その代り乳酸蓄積量が増大する点である。平野氏²⁴⁾はDNPはEmbden-Meyerhof径路によるグルコースの解糖に於て離脱したHを焦性ブドウ酸によつて乳酸とする反応は阻害しないことを述べているが, このことからするに静置培養菌は振盪培養菌に比し当然のことながらグルコースの分解に於て乳酸を生成する系が発達していることが推定される。

然しながら以上の如くS型, R型菌間にグルコース→焦性ブドウ酸間の径路に差異は認められない。

V 結 言

Sh. sonnei (高山株), S型, R型の教室保存の株を供試菌とし, その静止菌体のブドウ酸の酸化を比較して次の結果を得た。

1. 普通寒天18時間培養ではS型はR型より, ブドウ糖酸化に於ける焦性ブドウ酸以下の完全酸化が幾分不円滑であり, やゝ嫌氣性に傾いている。

2. 液体培地による静置培養菌体でも上と同様S型はR型より焦性ブドウ酸以下の完全酸化が不円滑であり, 嫌氣性に傾いている。

振盪培養菌体では両菌共焦性ブドウ酸酸化は活潑となり, S型, R型間の差異は縮少し, 流動パラフィン重層培養菌では両菌共焦性ブドウ酸の完全酸化は不円滑となり, やはり両菌間の差異は少となる。

3. ブドウ糖→焦性ブドウ酸間の径路は静置, 流動パラフィン重層培養菌体共, 両菌間の差はなく主としてE-M径路によると考えられる。振盪培養菌体では, 両菌共E-M径路以外の径路も多少は発達するものと見られるがやはり主体はE-M径路と見做される。

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謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) Arkwright, T. A.: J. Path. and Bact., **23**, 358 (1920)
- 2) Arkwright, T. A.: J. Path. and Bact., **24**, 36 (1921)
- 3) Arkwright, T. A.: Brit. J. Exp. Path., **5**, 23 (1924)
- 4) Hadley, P.: J. Inf. Dis. **40**, 1 (1927)
- 5) Finkle, P.: J. Exp. Med., **53**, 661 (1931)
- 6) Alloway, J. L.: J. Exp. Med., **55**, 91 (1932)
- 7) Bisset, K. A.: J. Path. and Bact., **47**, 223 (1938)
- 8) 佐藤: 日本細菌学雑誌, **4**, 97 (1949)
- 9) 長田: 日本細菌学雑誌, **4**, 3, 139 (1949)
- 10) White, P. B.: J. Path. and Bact., **32**, 85 (1929)
- 11) 岡本: 日新医学, **32**, 895 (1943)
- 12) 山中: 最近の細菌学及び免疫学, **86**,
- 13) 山中: 医学通信, **149** (1949)
- 14) Tracy J. Bact., **36**, 467 (1938)
- 15) Brawn: Bact. Rev., **11**, 75 (1947)
- 16) 小林: 岡山医学雑誌.
- 17) 岡
- 18) 水野: 日本細菌学雑誌.
- 19) Umbreit, W. W. et al.: Manometric Techniques, (1949)
- 20) 標準生化学実験 **18**.
- 21) 標準生化学実験: **36**.
- 22) 標準生化学実験: **35**.
- 23) 松浦: 岡山医学会雑誌, **68**, 153 (1956)
- 24) 平野: 第29回日本細菌学会総会 (熊本) (1956)

Enzymatic Properties of *Sh. Sonnei*, S Type and R Type

Part 2. Resting Cells

By

Mitsuo Hamano

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

With the use of the standard strains, namely, S type and R type of *Sh. sonnei* stocked in our laboratory as test bacteria, the author made comparative study on modes of the oxidation of glucose and pyruvate by these bacteria in resting form and obtained the following results.

1. In the case where these bacteria are cultured in the plain agar medium for 18 hours, the complete oxidation of glucose below pyruvate in the case of S type seems to be less smoothly carried out than in the case of R type, and it tends to be more or less anaerobic.

2. Even in the case of still standing culture in fluid medium (bouillon) the complete oxidation below pyruvate in the case of S type likewise is less smoothly carried out than in the case of R type.

3. As for the pathway between glucose to pyruvate in any method of culture, there is no difference between S type and R type; and it seems that the pathway from glucose to pyruvate is mainly through Embden-Meyerhof pathway.