

チフス菌の酵素的性状 (I)

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

松 本 正 義

〔昭和 33 年 10 月 23 日受稿〕

目 次

第 1 編 O_2 消費に於ける金属イオンの促進作用とその添加時期の関係

I 緒 言

II 実験材料及び実験方法

III 実験成績

- 1 O_2 消費に対する Mg^{++} , Fe^{++} の影響
- 2 金属イオンを基質に先立つて添加した場合
- 3 金属イオンに先立つて基質を添加した場合

IV 総括及び考案

V 結 言

第 II 編 O_2 消費に於ける二基質の相互作用とその添加時期の関係

I 緒 言

II 実験材料及び実験方法

III 実験成績

- 1 C 源と C 源の組合せ
- 2 C 源とアミノ酸の組合せ
- 3 アミノ酸とアミノ酸の組合せ

IV 総括及び考案

V 結 言

第 1 編 O_2 消費に於ける金属イオンの促進作用とその添加時期の関係

I 緒 言

2 価の金属イオンが多く、の酵素作用に必要であることは周知の通りであり、pyruvic decarboxylase¹⁾, oxalacetic decarboxylase²⁾, phosphoglucomutase³⁾, phosphoglucokinase⁴⁾, glucokinase⁵⁾, fructokinase⁵⁾, enolase⁶⁾, adenosine kinase⁷⁾ などに於ける Mg^{++} , Mn^{++} の賦活作用, pyrocatecase, cis-aconitase, homogentidicase に対する Fe^{++} の必要性など多くの研究がある。複合酵素系としての細菌の代謝に於ても、 Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} など 2 価金属イオンの酵素反応賦活作用が認められ、特にこれらイオンがグルコースの酸化に於ける焦性ブドウ酸以下の完全酸化促進することが明らかにされている⁸⁾。

一方グルコース、焦性ブドウ酸などを基質とした菌の呼吸は菌体の洗滌回数に応じて低下し、この低下は Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} などの添加により大部分回復され、従つてこの低下は洗滌により菌体内の酵素作用に必要なこれらイオンが菌体外へ離脱する

ためと考えられる。⁹⁾¹⁰⁾

そこで本編に於てはチフス菌を供試菌とし、そのよく洗滌した菌体の各種基質に於ける金属イオンの O_2 消費促進作用と、その添加時期との関係を検討することとした。

II 実験材料及び実験方法

供試細菌: Sal. typhi 57 S の教室保存標準株を普通寒天に $37^{\circ}C$, 18 時間培養して用いた。

菌浮游液の調製: 培地より集めた菌体を M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.2) を以て二回遠沈洗滌した後、緩衝液に浮游させて 30 分間 $37^{\circ}C$ で放置し、遠沈して菌体を再び緩衝液に浮游させたものを生菌浮游液とした。菌量の決定は光電比濁計を用いて濁度を測定し、あらかじめ作成した標準曲線に対比して行つた。

O_2 消費量測定: ワールブルグ検圧計を用い常法¹¹⁾に従つた。

金属イオン: Mg^{++} は硫酸マグネシウム, Fe^{++}

は硫酸第一鉄を用い、蒸留水に溶解し、終末濃度を $10^{-4}M$ となるようにして実験した。

基質：何れも市販品を蒸留水に溶解し、必要により NaOH 又は HCl を以て pH を 7.2 に修正して使用した。

Ⅲ 実験成績

1 O_2 消費に対する Mg^{++} , Fe^{++} の影響

細菌のある種基質に於ける O_2 消費に対し、 Mg^{++} , Fe^{++} など 2 価の金属イオンが促進的に作用することはよく知られているが、以下の実験に先立ち本供試菌に於ては如何であるかを一覧することとした。

O_2 消費量測定は実験方法の項に記した如くワールブルグ検圧計を用い、容器の主室に菌液、一方の側室に Mg^{++} , Fe^{++} 他方の側室に基質を入れ、両側室より金属イオン及び基質を同時に混入した。

第 1 表 O_2 消費に対する Mg^{++} , Fe^{++} , 添加の影響

	O_2 消費 μl		
	30'	60'	120'
基質なし	11	19	23
" $+Mg^{++}$	16	25	28
" $+Fe^{++}$	17	21	28
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	18	27	29
グルコース	37	91	172
" $+Mg^{++}$	47	92	172
" $+Fe^{++}$	44	87	148
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	49	106	187
乳酸	51	129	156
" $+Mg^{++}$	64	126	197
" $+Fe^{++}$	59	120	188
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	68	137	204
焦性ブドウ酸	27	44	82
" $+Mg^{++}$	39	70	135
" $+Fe^{++}$	36	66	120
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	42	79	145
サク酸	25	43	77
" $+Mg^{++}$	29	52	94
" $+Fe^{++}$	31	50	88
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	33	54	99
コハク酸	26	50	84
" $+Mg^{++}$	25	54	89
" $+Fe^{++}$	27	52	86
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	27	54	89

基質はグルコース、乳酸、焦性ブドウ酸、サク酸、コハク酸、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、バリン、ヒスチジンの 10 種を選んで行つた。

結果は C 源については第 1 表、アミノ酸については第 2 表に一括して表示した。

同表に見られる如く、 Mg^{++} , Fe^{++} の促進作用が認められる基質はグルコース、乳酸、焦性ブドウ酸、サク酸であり、他の基質では殆んど促進効果は認められなかった。

Mg^{++} , Fe^{++} はほぼ同様な作用を示し、 Mg^{++} , のみ或は Fe^{++} のみが促進的に働くというような基質はなく、又 Mg^{++} , Fe^{++} を同時に添加した場合も Mg^{++} のみ或は Fe^{++} のみの場合と効果は大差なかった。

第 2 表 O_2 消費に対する Mg^{++} , Fe^{++} 添加の影響

	O_2 消費 μl		
	30'	60'	120'
基質なし	13	21	26
" $+Mg^{++}$	17	24	29
" $+Fe^{++}$	15	23	28
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	19	26	32
アラニン	17	32	60
" $+Mg^{++}$	20	43	71
" $+Fe^{++}$	19	41	78
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	21	44	82
アスパラギン酸	18	31	58
" $+Mg^{++}$	22	33	62
" $+Fe^{++}$	20	32	62
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	24	34	63
グルタミン酸	27	50	97
" $+Mg^{++}$	28	53	102
" $+Fe^{++}$	27	52	100
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	28	53	104
バリン	14	23	29
" $+Mg^{++}$	17	25	34
" $+Fe^{++}$	16	23	33
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	17	26	35
ヒスチジン	15	24	28
" $+Mg^{++}$	18	27	32
" $+Fe^{++}$	17	26	30
" $+Mg^{++}+Fe^{++}$	18	27	33

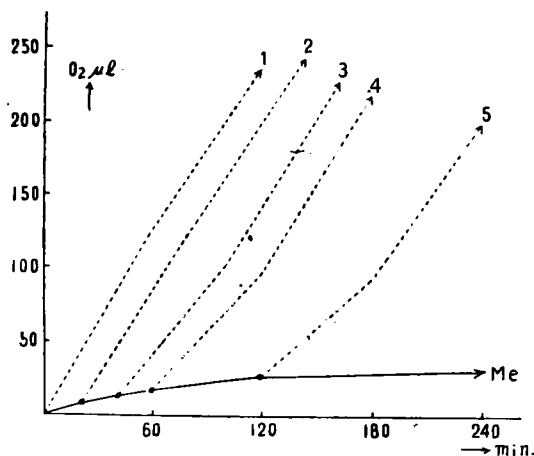
2 金属イオンを基質に先立つて添加した場合
金属イオン (Me と略す) の O_2 消費促進作用が

その添加時期に如何に影響するかを検討するため、
先ず Me を基質に先立つて加えておき、20分後、
40分後、60分後、120分後に基質添加した場合の O_2
消費量を測定した。対照として基質を Me と同時
に添加したものについても行った。

Me は Mg^{++} 及び Fe^{++} (終濃度各 $10^{-4}M$) を混
合して用い、基質は前の実験で Me による O_2 消
費促進の認められたグルコース、乳酸、焦性ブドー
酸、サク酸、並びに O_2 消費促進の認められなかつ
たコハク酸及び各アミノ酸について行った。

グルコースを基質とした場合は第3表に示した。

第3表 O_2 消費に対する基質添加時期の影響



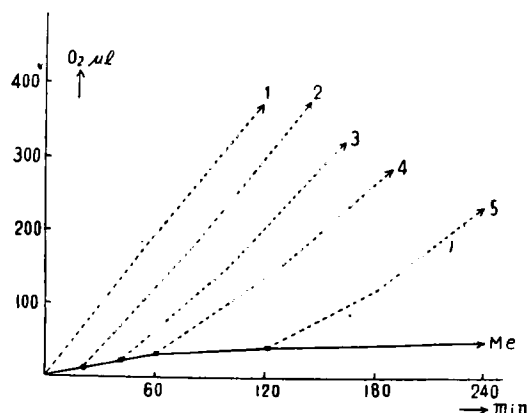
同表の実線は Me のみの O_2 消費曲線、点線 1
は基質を Me と同時に添加した場合、2 は基質を
Me の20分後、3 は40分後、5 は120分後に添加し
た O_2 消費曲線である。

同表に見られる如く、Me を添加し基質を加えな
い O_2 消費 (endogenous) は60分で $18 \mu l$ 、120分
で $27 \mu l$ 、以後の O_2 消費は極めて僅かであり、最
初から Me 及びグルコースを添加した場合には60
分で $127 \mu l$ 、120分で $236 \mu l$ でわずかに下向きに湾
曲しているが、Me 添加20分後にグルコースを加え
たものでは殆んど直線的であり、40分後に添加する
と60分で $82 \mu l$ 、120分で $232 \mu l$ 、となり曲線は上向
きに湾曲した。

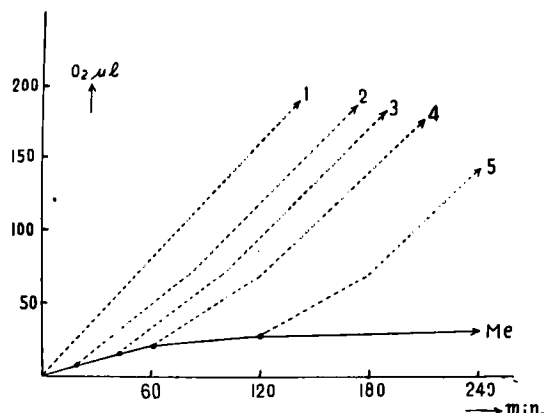
更に60分後、120分後にグルコースを加えると最
初の60分間の O_2 消費は少いが、以後増大し、曲線
は立上り上向きの湾曲を示す傾向が大となった。

基質を乳酸、焦性ブドー酸、サク酸とした場合
にも夫々第4、5、6表の如く、前述のグルコースに於
けると同様の傾向であり、 O_2 消費曲線は最初から
Me と共に基質を加えた場合には直線的、内至は下に
湾曲するが、基質を Me 添加20分後、40分後、120

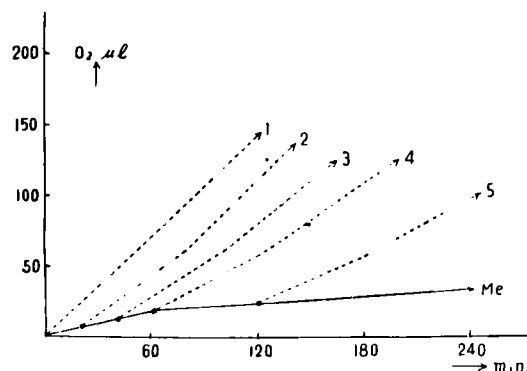
第4表 O_2 消費に対する基質添加時期の影響



第5表 O_2 消費に対する基質添加時期の影響
焦性ブドー酸



第6表 O_2 消費に対する基質添加時期の影響
サク酸

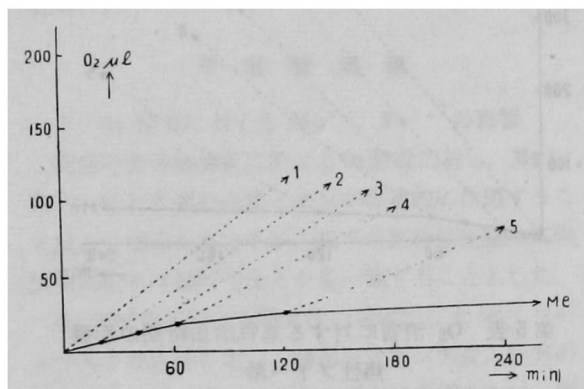


分後に加えると、添加時期がおくれるにつれて最初
の O_2 消費は少いが、反応時間と共に O_2 消費は増
大し曲線は上に湾曲する傾向が大となった。

コハク酸を基質とした場合には第7表に示す如く、
コハク酸添加時期がおくれるにつれて O_2 消費は低
下し、これは酵素活性の低下に原因すると思われる
が、上述の各基質に於て見られたような曲線の立上

りは殆んど認められず、Me 添加の影響は少ないものと思われた。

第7表 O₂ 消費に対する基質添加時期の影響
コハク酸

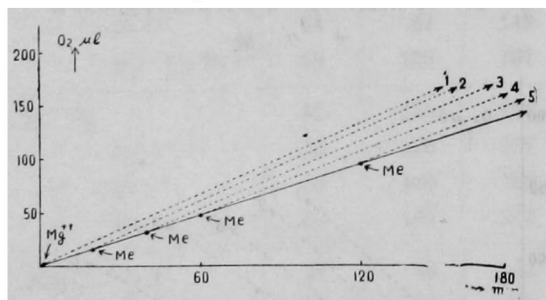


アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、バリン、ヒスチジン、を基質とした場合にもコハク酸に於けると同様の傾向であつた。

3 金属イオンに先立つて基質を添加した場合
次に基質を先に加えておき、20分後、40分後、60分後、120分後に Me を夫々添加した場合の O₂ 消費量を比較した。

グルコースを基質とした場合には第8表の如くであり、同表の実線は Me 無添加（基質のみ）の O₂

第8表 O₂ 消費に対する Me 添加時期の影響
グルコース



消費曲線であり、点線1～5は夫々基質と同時に Me を添加したもの、20分後、40分後、60分後、120分後に Me を添加したもの、O₂ 消費曲線である。

同表に見られる如く、Me は最初から基質と同時に添加した場合が最も促進効果が大であり、20分後、40分後、60分後、となるにつれて Me 作用は減弱し、120分後に添加した場合には殆んど促進作用を示さなくなつた。

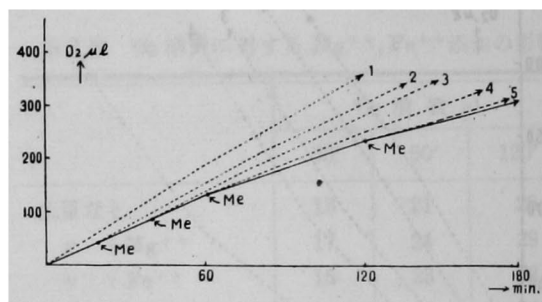
乳酸を基質とした場合（第9表）、焦性ブドウ酸、（第10表）、サク酸（第11表）の場合に於ても同様の

傾向であり、Me 添加の時期がおくれるにつれてその促進作用は減弱した。

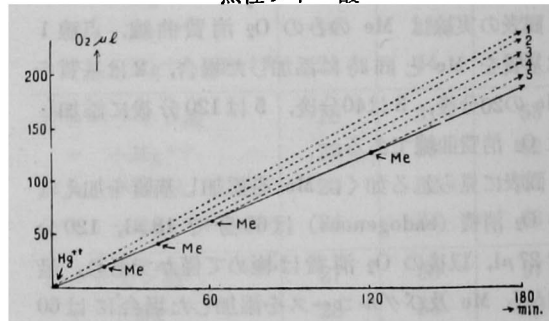
コハク酸を基質とした場合（第12表）には基質と同時に Me を添加しても O₂ 消費促進は殆んど認められず、基質添加20分後、40分後、60分後、120分後に Me を添加した場合も何れも O₂ 消費を促進しなかつた。

アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、バリン、ヒスチジン、を基質とした場合にも（表示は省略）コハク酸に於けると同様 Me 添加の時期に拘らず O₂ 消費促進は認められなかつた。

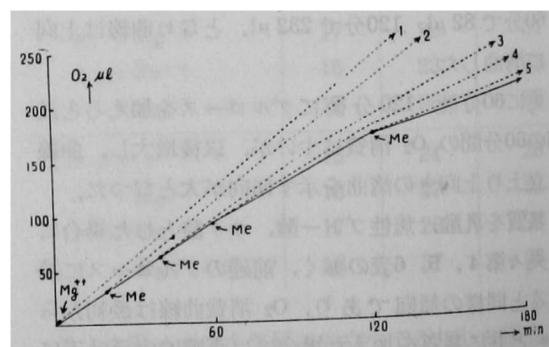
第9表 O₂ 消費に対する Me 添加時期の影響
乳 酸



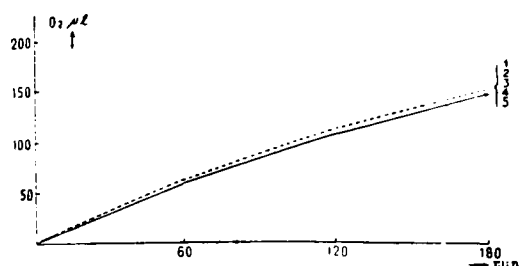
第10表 O₂ 消費に対する Me 添加時期の影響
焦性ブドウ酸



第11表 O₂ 消費に対する Me 添加時期の影響
サ ク 酸



第12表 O_2 消費に対する Me 添加時期の影響
コハク酸



VI 総括及び考案

二価の金属イオンの O_2 消費促進作用は基質により異なり、供試菌に於てはグルコース、乳酸、焦性ブドー酸を基質とした場合が最大であり、サク酸がこれに次ぎ、他の基質に於ては殆んどその作用は見られない。

このような促進作用は Mg^{++} でも Fe^{++} でも同様に現われ、且つこの両者を同時に加えても Mg^{++} のみ、或は Fe^{++} のみの効果と大差がない。そこで本実験に於ては Mg^{++} と Fe^{++} (共に 10^{-4} M) を同時に加えて用い、それら金属イオン (Me と略す) の O_2 消費促進作用と、その添加時期の関係を検討して次の結果が得られた。

基質に先立つて Me を加えた場合について見ると、グルコース、乳酸、焦性ブドー酸の各基質に於て共に基質添加が Me 添加の 20 分後、40 分後、60 分後、120 分後となるにつれて、反応開始 30~60 分頃迄の O_2 の消費は、対照 (Me と基質とを同時に添加したもの) よりも弱く、その後の O_2 消費は漸

次増大し、 O_2 消費曲線は立ち上りを示す傾向が大となる (第 3~6 表)

これは Me 添加後、基質添加迄の振盪期間中に菌体内保有の基質となりうる物質の酸化 (endogenous respiration) に向つて酵素の配列が行われて居り、これが新たに添加した基質の酸化に向けられるのに時間がかかるためと想像される。

次に基質を Me の前に添加した場合には、Me 添加の時期がおくれるにつれてその O_2 消費促進作用はおとろえ、基質添加の 120 分後に Me を加えたのでは殆んどその作用は認められない。

これはやはり菌体酵素系が Me 不在の基質酸化様式に適応し、それに向つて配列されているため Me 添加の効果が現われにくいということが一因と思われる。

V 結 言

Mg^{++} , Fe^{++} の各種基質に於ける O_2 消費促進作用と、これに対する金属イオン (Me) の添加時期の関係を検討し次の結果を得た。

1. Mg^{++} , Fe^{++} により O_2 消費を促進される基質はグルコース、乳酸、焦性ブドー酸、サク酸である。
2. Me を基質に先立つて添加した場合には基質添加が 20 分後、40 分後、60 分後、120 分後となるにつれ O_2 消費曲線は上に湾曲する。
3. 基質を Me に先立つて添加した場合には Me 添加がおくれるにつれて O_2 消費促進効果は減弱する。

第 2 篇 O_2 消費に於ける二基質の相互作用とその添加時期の関係

I 緒 言

細菌に 2 種の基質を同時に添加するとそれらの間の相互作用により、各単独に添加した場合は代謝様式に変化を来す例が種々見受けられる。

Bernheim¹²⁾ は *Pneumococcus* の焦性ブドー酸を基質とした呼吸に於て或種アミノ酸を同時に添加すると O_2 消費は促進され、焦性ブドー酸の消費もこれに平行して増大するが、アミノ酸側の変化は認められないことからこれは単なる触媒として作用するものと推定しているが、その詳細は不明であると

している。

Tonhazy も Pelczar¹³⁾ は *N. gonorrhoeae* に於てグルタミン酸と焦性ブドー酸を同時に添加することにより O_2 消費の促進を認め、これを DPN を介した共軛反応に帰して居り、又グルタミン酸とフマル酸との間の呼吸促進反応をグルタミン酸⇌アスパラギン酸のトランスアミネーションの存在に帰している。

又或種細菌では¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ クエン酸は単独で添加しても分解されないが、グルコースと共に添加すると分解され得ることが知られている。

本篇に於ては O_2 消費量より見た 2 種基質の相互作用とこれに対する各基質の添加順序及び添加時期の関係を検討した。

II 実験材料及び実験方法

供試細菌: sal. typhi 57 S の教室保存標準株を普通寒天に $37^\circ C$, 18 時間培養して使用した。

菌浮游液の調製: 前篇と同様培地より集めた菌体を M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.2) を以て二回遠沈洗滌後, 緩衝液に浮游して 30 分間, $37^\circ C$ 放置, 遠沈後菌体を再び緩衝液に浮游して生菌浮游液とした。菌量は光電比濁計により決定した。

O_2 消費量測定: ワールブルグ検圧計によつた。

III 実験成績

グルコース, 乳酸, 焦性ブドウ酸, 醋酸, クエン酸, コハク酸, フマル酸, リンゴ酸, の C 源, 及びアラニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, ヒスチジン, バリンのアミノ酸の種々の組合せの 2 基質 (終濃度何れも $10^{-2} M$) を共に添加した場合の O_2 消費が各基質単独の場合と如何に変化するか, 又それらの添加時期によりどう変るかを比較検討した。

第13表 O_2 消費に対する二基質の相互作用
クエン酸—グルコース

	2 時間 O_2 消費 μl
クエン酸	0
グルコース	134
〃 + クエン酸	207

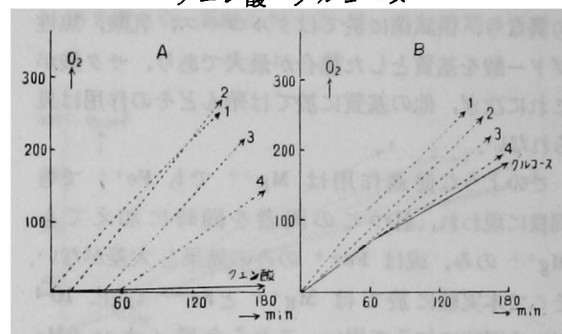
a. クエン酸—グルコース

クエン酸とグルコースを同時に添加した場合, 及び各単独添加の場合の O_2 消費量 (2 時間値) を測定したところ第13表の如く, クエン酸単独では全く O_2 消費は認められず (endogenous と同じ), グルコースでは $134 \mu l$ であるが, グルコース+クエン酸では $207 \mu l$ と著しく O_2 消費が増大した。そこでこの 2 基質の組合せに於て一方の基質を先に菌に加え, 他方を 20 分づゝづらして後から加えた場合の O_2 消費量を測定した。結果は第14表の如くであり, 同表の実線は一方の基質のみの O_2 消費曲線, 点線 1 は最初から二基質を同時に加えたもの (対照), 2 は一方の基質を加えてから 20 分後に他基質を添加したもの, 3 は 40 分後, 4 は 60 分後に添加した O_2 消費曲線である。

クエン酸を先に加え, 後にグルコースを加えた場合は同表 A の如く最初から二基質同時に添加しても O_2 消費はかなり増大されるが, 20 分後にグルコースを添加した場合には増大が更に著しく, 49 分後ではこれに比しやゝ増大率は減少し, 60 分後では更に減少した。

グルコースを先に加えクエン酸を後から添加した場合, 同表 B の如くであり, 二基質同時に添加した場合が O_2 消費増大は最大であり 20 分後, 40 分後, 60 分後になるに従い増大率は減少した。

第14表 O_2 消費に対する基質添加時期の影響
クエン酸—グルコース



b. クエン酸—乳酸

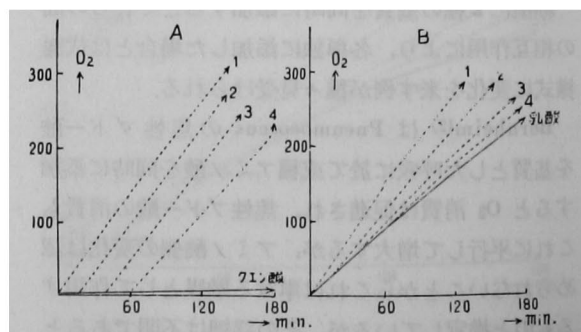
クエン酸, 乳酸を同時に添加した O_2 消費量 (2 時間値) は第15表の如く乳酸単独の場合に比しクエン酸添加によりやはり促進された。

次に一方の基質を先に加え, 時間をづらして他方を添加した場合の O_2 消費を比較すると第16表の如

第15表 O_2 消費に対する二基質の相互作用
クエン酸—乳酸

	2 時間 O_2 消費 μl
クエン酸	0
乳 酸	157
〃 + クエン酸	224

第16表 O_2 消費に対する基質添加時期の影響
クエン酸—乳酸



くであり、クエン酸を先に加えた場合（同表A）では乳酸の添加が20分後、40分後、60分後になるにつれて僅かずつ O_2 消費促進率は増大するが、それ程著しくなく、乳酸を先に加えた場合には、同表Bの如くクエン酸の添加がおくれるにつれて O_2 消費増大率は減少した。

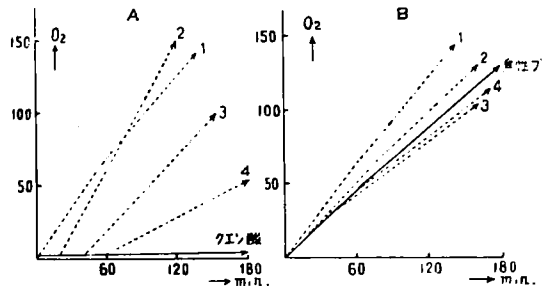
c. クエン酸—焦性ブドウ酸

この組合せの二基質も同時に添加すると、第17表の如く焦性ブドウ酸のみでは $89 \mu l$ 、クエン酸と同時に添加すると $156 \mu l$ となつて著明な O_2 消費促進が見られた。

第17表 O_2 消費に対する二基質の相互作用
クエン酸—焦性ブドウ酸

	2 時間 O_2 消費 μl
クエン酸	0
焦性ブドウ酸	89
" + クエン酸	156

第18表 O_2 消費に対する基質添加時期の影響
クエン酸—焦性ブドウ酸



而して時間をずらして一方の基質を添加した場合は第18表の如くであり、クエン酸を先に加えた場合には（同表A）、クエン酸、焦性ブドウ酸を同時に添加するよりも20分後に焦性ブドウ酸を添加した方が O_2 消費はより著しく増大され、40分後では両基質同時添加（曲線1）とほぼ同程度となり60分後では増大作用は減弱しつ。焦性ブドウ酸を先に、後からクエン酸を添加した場合は同表Bに示す通り、クエン酸添加が20分後のものが O_2 消費が最大であり、40分後、60分後添加に於ては焦性ブドウ酸単独の場合（クエン酸を添加しない場合）より O_2 消費は減少した。

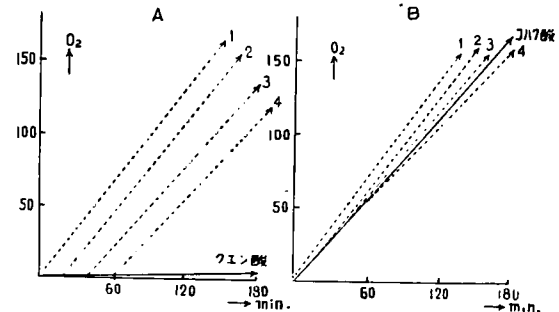
d. クエン酸—コハク酸

コハク酸とクエン酸を同時に添加した場合にも第19表の如く比較的軽度ながら O_2 消費は促進された。

第19表 O_2 消費に対する二基質の相互作用
クエン酸—コハク酸

	2 時間 O_2 消費 μl
クエン酸	0
コハク酸	62
" + クエン酸	97

第20表 O_2 消費に対する基質添加時期の影響
クエン酸—コハク酸



クエン酸を先に加え後からコハク酸を添加した場合には第20表Aの如く促進効果はコハク酸添加時期に余り関係しないがコハク酸を先に添加しクエン酸を後から添加した場合にはクエン酸添加の時期が遅れる程 O_2 消費促進効果は減弱し、且つコハク酸添加60分後にクエン酸を加えるとコハク酸のみの場合よりむしろ O_2 消費は減少した。

e. クエン酸—フマル酸

クエン酸とフマル酸の組合せでは第21表の如くフマル酸のみでは $42 \mu l$ 、クエン酸と同時に添加しても $53 \mu l$ で O_2 消費は殆んど促進されず、図示は省略したがフマル酸、或はクエン酸を時間をずらして添加しても O_2 消費の促進も、減少も認められなかつた。

第21表 O_2 消費に対する二基質の相互作用
クエン酸—フマル酸

	2 時間 O_2 消費 μl
クエン酸	0
フマル酸	42
" + クエン酸	53

f. クエン酸—リンゴ酸

この組合せの二基質も同時に添加すると第22表の如く O_2 消費の促進作用は見られなかつた。又時間をずらして一方の基質を添加しても何ら見るべき変化はなかつた。

第22表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用
クエン酸—リンゴ酸

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
クエン酸	0
リンゴ酸	47
" + クエン酸	48

g. 焦性ブドウ酸—乳酸

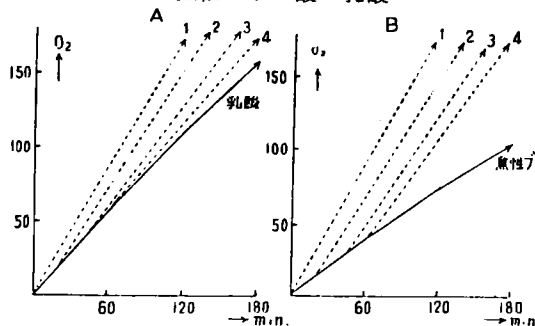
この組合せでは第23表の如く焦性ブドウ酸では 86 μ l, 乳酸では 154 μ l, 両者を同時に添加すると 227 μ l で両者の和よりもやや低かった。

而して一方を時間をおくらして添加しれ場合には, 第24表の如くであり, 何れの基質を先に加えても他方の基質の添加時期がおくれるにつれて O₂ 消費は低下した。

第23表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用
焦性ブドウ酸—乳酸

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
焦性ブドウ酸	71
乳 酸	112
" + 焦性ブドウ酸	179

第24表 O₂ 消費に対する基質添加時期の影響
焦性ブドウ酸—乳酸



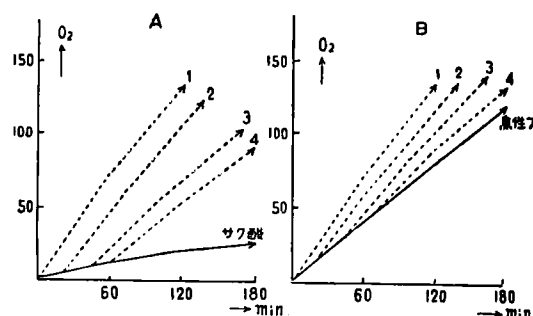
h. 焦性ブドウ酸—醋酸

この二基質の組合せの O₂ 消費量は第25表の如くであり, 焦性ブドウ酸単独では 92 μ l, 醋酸のみでは 51 μ l, 両者を同時に加えると 184 μ l となつて両者の O₂ 消費量の和よりは更に大となつた。

第25表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用
焦性ブドウ酸—サク酸

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
焦性ブドウ酸	92
サ ク 酸	51
" + 焦性ブドウ酸	184

第26表 O₂ 消費に対する基質添加時期の影響
サク酸—焦性ブドウ酸



次に一方の基質を時間をずらして添加した場合は第26表の如く, 醋酸を先に加え焦性ブドウ酸を後から添加した場合 (同表A), 及び焦性ブドウ酸を先に加え後から醋酸を添加せしめた場合 (同表B), 共に添加時期がおくれるにつれて O₂ 消費増大率は低下し, 最初から両基質を同時に添加した場合が増大は最も顕著であつた。

第27表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用
焦性ブドウ酸—コハク酸

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
焦性ブドウ酸	72
コハク酸	51
" + 焦性ブドウ酸	103

i. 焦性ブドウ酸—フマル酸

焦性ブドウ酸, フマル酸の組合せでは第28表の通りであり, 焦性ブドウ酸で 89 μ l, フマル酸では 37 μ l, 二基質同時添加では 121 μ l となり両基質に於ける O₂ 消費の和よりも小であつた。

第28表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用
焦性ブドウ酸—フマル酸

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
焦性ブドウ酸	89
フマル酸	37
" + 焦性ブドウ酸	121

k. 焦性ブドウ酸—リンゴ酸

この組合せでは第29表の如く, 焦性ブドウ酸単独では 102 μ l, リンゴ酸では 34 μ l であり, 両者同時添加では 81 μ l となり, 焦性ブドウ酸単独の場合よりむしろ減少した。

次にこの二基質の一方を時間をずらして添加した場合については第30表の如く, リンゴ酸を先に添加

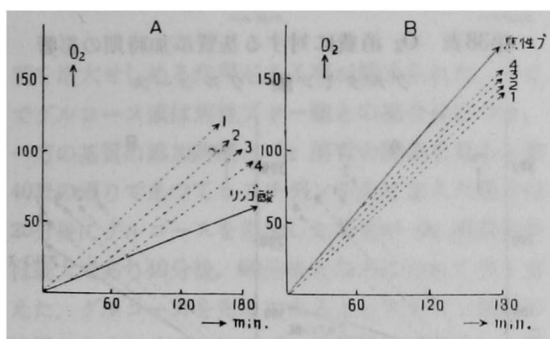
第29表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

焦性ブドウ酸—リンゴ酸

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
焦性ブドウ酸	102
リンゴ酸	34
“ + 焦性ブドウ酸	81

第30表 O₂ 消費に対する基質添加時期の影響

リンゴ酸—焦性ブドウ酸



した場合には同表Aの通り、焦性ブドウ酸を同時に添加しても O₂ 消費に大差は見られず、又焦性ブドウ酸を先に加え、リンゴ酸を後から加えた場合にも同表Bの通り添加時期に拘らず O₂ 消費に大差は認められず O₂ 消費曲線 1, 2, 3, 4, は大体平行しており、且つ何れも焦性ブドウ酸単独添加の O₂ 消費よりは小であつた。

k. コハク酸—フマル酸

1. コハク酸—リンゴ酸

コハク酸に対するフマル酸或はリンゴ酸の組合せでは第31表、32表の如く二基質を同時に添加した場合の O₂ 消費は両基質単独の場合の合計よりやゝ小

第31表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

コハク酸—フマル酸

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
コハク酸	57
フマル酸	43
“ + コハク酸	72

第32表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

コハク酸—リンゴ酸

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
コハク酸	62
リンゴ酸	39
“ + コハク酸	86

であつた。

2. C源とアミノ酸の組合せ

a. アラニンとの組合せ

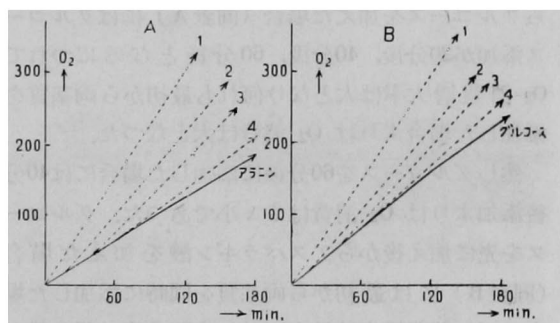
C源はグルコース、焦性ブドウ酸、コハク酸、を選びこれらとアラニンとの組合せの二基質を同時に菌に添加した場合の O₂ 消費を見ると第33表の如く、アラニンとグルコース、或はアラニンと焦性ブドウ酸を同時に添加すると O₂ 消費は著しく増大され、両者の和よりは、はるかに大となつた。然しアラニンとコハク酸ではこの様な増大現象は見られなかつた。そこでアラニンとグルコースの組合せに於て一方を時間をずらして添加した場合について見ると第34表の如く、アラニンを先に加え後からグルコース

第33表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
グルコース	119
焦性ブドウ酸	76
コハク酸	57
アラニン	81
“ + グルコース	320
“ + 焦性ブドウ酸	217
“ + コハク酸	136

第34表 O₂ 消費に対する基質添加時期の影響

アラニン—グルコース



を添加した場合（同表A）、グルコースを先に加え後からアラニンを添加した場合（同表B）共に後から加える基質の添加時期のおくれる程 O₂ 消費増大率は減少し、最初から二基質を同時に添加した場合が最も増大率が大きであつた。

焦性ブドウ酸とアラニンの組合せに於ても図示は省略したが、同様の傾向であつた。

b. アスパラギン酸とC源の組合せ

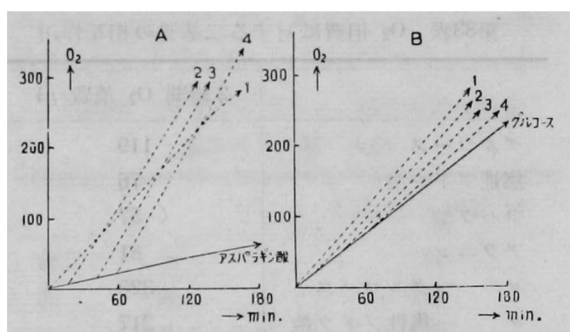
アスパラギン酸との組合せでは第35表の如くアスパラギン酸とグルコース、アスパラギン酸と焦性ブドウ酸を同時に添加すると各単独添加の場合に比し

O₂ 消費は増大された。

第35表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
グルコース	126
焦性ブドウ酸	89
コハク酸	51
アスパラギン酸	102
" + グルコース	297
" + 焦性ブドウ酸	286
" + コハク酸	134

第36表 O₂ 消費に対する基質添加時期の影響
アスパラギン酸—グルコース



アスパラギン酸とグルコースの組合せにつき一方の基質を時間をずらして加えた場合を見ると第36表の通りでありすアスパラギン酸を先に添加して後からグルコースを加えた場合（同表A）にはグルコース添加が20分後、40分後、60分後となるにつれてO₂ 消費増大率は大きくなり何れも最初から両基質を添加した場合よりはO₂ 消費は大きくなった。

然しグルコースを60分後に添加した場合には40分後添加よりはO₂ 消費はやゝ小であつた。グルコースを先に加え後からアスパラギン酸を加えた場合（同表B）には最初から両基質を同時に添加した場合がO₂ 消費増大は最大であり、20分後、40分後、60分後となるにつれて増大率は減少した。

焦性ブドウ酸との組合せについても図示は省略したが同様の傾向が認められた。

c. グルタミン酸とC源の組合せ

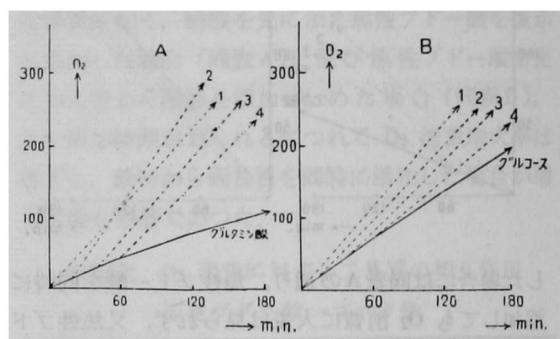
グルタミン酸との組合せについては第37表の通り、グルコース、或は焦性ブドウ酸と同時に添加するとO₂ 消費量は両者の和よりはやゝ大となつたが、コハク酸との組合せではこのような結果は得られなかつた。

グルコースとの組合せに於けるO₂ 消費と添加時期との関係を見ると第38表の通り、グルタミン酸を

第37表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
グルコース	136
焦性ブドウ酸	63
コハク酸	54
グルタミン酸	84
" + グルコース	224
" + 焦性ブドウ酸	207
" + コハク酸	124

第38表 O₂ 消費に対する基質添加時期の影響
グルタミン酸—グルコース



初めに加え後からグルコースを添加した場合には前述のアスパラギン酸との組合せにおいて見られると同様に初めからグルタミン酸、グルコースを同時に添加した方がO₂ 消費はより著しく増大した。

又グルコースを先に加えた場合にも最初からグルコースと同時にグルタミン酸を添加したものの方が大であり、20分後、40分後、60分後となるにつれてO₂ 消費増大率は減少した。

焦性ブドウ酸との組合せに於ても同様の傾向が認められた。

d. ヒスチジンとC源との組合せ

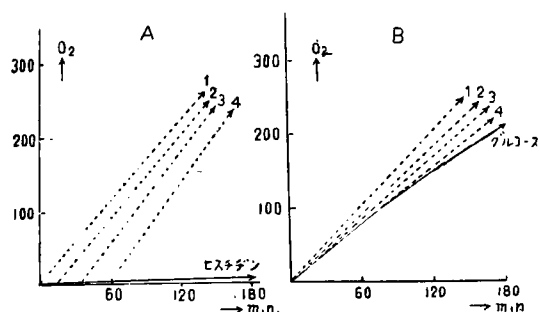
ヒスチジンとC源との組合せでは第36表の如くであり、ヒスチジンは単独ではO₂ 消費を示さないが、グルコース、焦性ブドウ酸と共に添加するとO₂ 消

第39表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
グルコース	124
焦性ブドウ酸	57
コハク酸	42
ヒスチジン	4
" + グルコース	162
" + 焦性ブドウ酸	89
" + コハク酸	49

第40表 O₂ 消費に対する基質添加時期の影響

ヒスチジン—グルコース



費を増大せしめる作用がある事が認められた。そこでグルコース或は焦性ブドウ酸との組合せにつき、一方の基質の添加時期と O₂ 消費の関係をみると第40表の通りであつてヒスチジンを先に加えた場合は20分後にグルコースを添加した場合が O₂ 消費効果は最大であり40分後、60分後となるにつれてやゝ衰えた。グルコースを先に加えるとヒスチジン添加の時期のおくれるにつれて O₂ 消費増大は減少し、最初からヒスチジン、グルコースを同時に添加した O₂ 消費は最大であつた。

e. バリンとC源の組合せ

バリンとC源との組合せでは第41表の如くであり何れのC源と同時にバリンを添加するも O₂ 消費促進現象は認められなかつた。

第41表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
グルコース	137
焦性ブドウ酸	63
コハク酸	52
バリン	7
" + グルコース	142
" + 焦性ブドウ酸	76
" + コハク酸	50

3. アミノ酸とアミノ酸の組合せ

5種のアミノ酸のうち2種の各組合せにつき O₂ 消費量を比較すると第42, 43, 44, 45表の如くアラニン—アスパラギン酸、アラニン—ヒスチジン、アラニン—バリン、アスパラギン酸—グルタミン酸、アスパラギン酸—ヒスチジン、アスパラギン酸—バリン、グルタミン酸—ヒスチジン、グルタミン酸—バリンの各組合せでは何れも二基質添加に於ける O₂ 消費量は両基質単独の場合の O₂ 消費の中間の値を示し、異常に O₂ 消費を増大し、或は減少する

事は見られなかつた。

第42表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
アラニン	56
アスパラギン酸	106
グルタミン酸	143
アラニン+アスパラギン酸	136
" + グルタミン酸	259
アスパラギン酸+グルタミン酸	197

第43表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
アラニン	76
ヒスチジン	5
バリン	9
アラニン+ヒスチジン	82
" + バリン	81
ヒスチジン+バリン	10

第44表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
アスパラギン酸	87
ヒスチジン	7
バリン	9
アスパラギン酸+ヒスチジン	89
" + バリン	90

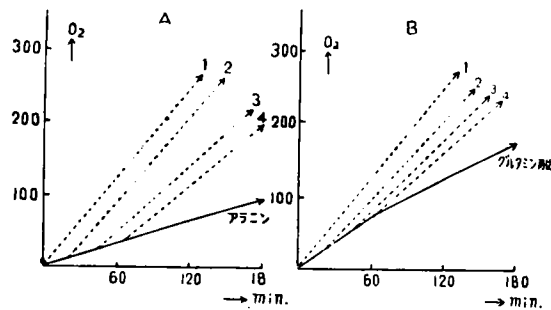
第45表 O₂ 消費に対する二基質の相互作用

	2 時間 O ₂ 消費 μ l
グルタミン酸	137
ヒスチジン	7
バリン	6
グルタミン酸+ヒスチジン	141
" + バリン	140

然しアラニンとグルタミン酸との組合せでは(第44表)アラニン 56 μ l, グルタミン酸 143 μ l, 両者同時添加のそれは 259 μ l と著しく O₂ 消費が増大した。そこでアラニンとグルタミン酸の組合せにつき、一方の基質の添加時期をずらして O₂ 消費を見ると第46表の如くであり、アラニンを先に添加した場合(同表A)に他の基質を最初から添加したものが O₂ 消費増大は最大であり、20分後、40分後、60分後となるにつれて O₂ 消費は低下した。

第46表 O_2 消費に対する基質添加時期の影響

アラニン—グルタミン酸



IV 総括及び考案

菌に二種の基質を同時に添加した場合の相互作用を O_2 消費量より見るに、(1)二基質を同時に添加した O_2 消費量が各基質単独のものゝ和より大となる場合（促進作用）、(2)大体和に等しい場合、(3)和よりも小である場合、(4)一方の基質に於ける O_2 消費量よりむしろ小となる場合（阻害作用）に大別する。

これらのうち促進作用、及び阻害作用を示す組合せにつき、 O_2 消費に対するそれら二基質の添加時期の影響を検討する。

クエン酸—グルコース、（又は焦性ブドー酸）、アスパラギン酸—グルコース（又は焦性ブドー酸）、グルタミン酸—グルコース（又は焦性ブドー酸）、ヒスチジン—グルコース（又は焦性ブドー酸）の各組合せに於てはグルコース（又は焦性ブドー酸）を先に加えると他方の基質の添加がおくれる程 O_2 消費促進作用は減弱し、これはグルコース（又は焦性ブドー酸）の添加により菌の酵素はそれら独自の酸化に向つて配列され、後から他の基質を加えても相互作用に参与する余地がなくなるためと考えられる。

ところがクエン酸（又はアスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン）を先に加えると、グルコース（又は焦性ブドー酸）は同時に添加するよりもむしろ20～60分後に添加した方が O_2 消費促進効果は大となり、これはグルコース（又は焦性ブドー酸）の酸化（酸素との結びつき）が他方の基質に優先するため、他方の基質を先に加えて置くと相互作用に関

与し易いためと想像される。

クエン酸—乳酸、クエン酸—コハク酸に於ても乳酸、コハク酸を先に加えると促進効果は減弱するが、これも同様の理由によると思われる。

サク酸—焦性ブドー酸、アラニン—グルコース、アラニン—グルタミン酸の各組合せでは、何れを先に加えても他方の基質の添加時期がおくれる程 O_2 消費促進効果は減弱し、両者を同時に加えた場合が最大である。これは一方を先に加えるとその基質独自の酸化に対して酵素が配列され、他方を後からおくれて添加しても相互作用を生ぜしめる効果が減少するものと考えられる。

リンゴ酸—焦性ブドー酸の組合せでは両者を同時に添加すると焦性ブドー酸のみの場合より O_2 消費は低下し、又何れの基質の添加時期をずらしても常にこの傾向が認められる。

その阻害機構の詳細は不明であるが、それらの酸化の何れかの段階に於てお互に拮抗的に働く部位が存在することがうかがわれる。

V 結 言

菌の O_2 消費に於ける種々の組合せの二基質の相互作用と各基質の添加時期の関係を検討し次の結果を得た。

1. 二基質を同時に添加した O_2 消費量が各単独の O_2 消費量の和より大となる場合（促進）、大体和に等しい場合、和より小である場合、一方の基質単独の O_2 消費量より小となる場合（阻害）がある。

2. O_2 消費促進的に働く二基の添加時期と促進効果の関係をみると、一方の基質を加えた後から他方を添加した方が促進効果が大となる場合と、逆に小となる場合があり、これは菌による各基質の酸化（酵素との結合）に順位が存在するためと考えられる。

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甚なる謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Stumpf, P. K., Zurudnaya, K., and Green, D. E. : J. Biol. Chem. 167, 817 (1947)
- 2) Plant, G. W. E., and Lardy, H. A. : 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) Warburg, O., and Christian, W. : Biochem. Z., 310, 384 (1942)
- 7) Caputto, R. : J. Biol. Chem., 189, 801 (1951)
- 8) 松浦 : 岡山医学会雑誌, 68巻, 1~4号, 153 (昭和31年)
- 9) 松浦, 赤沢 : 日本細菌学会中四国支部会 (昭和28年)
- 10) 赤沢 : 岡山医学会雑誌, 66巻, 5号, 1009 (昭和29年)
- 11) Umbreit, W.W., et al : Manometric Techniques, (1951)
- 12) Bernheim, F., and Bernheim, M. L. C. : J. Bact, 46, 225 (1943)
- 13) Tonhazy, N. E., and Pelczar, M. J. : J. Bact., 65, 368 (1952)
- 14) Lominisky, J., et al. : Nature, 160, 573 (1947)
- 15) Vanghn, R. H., et al. : J. Bact., 60, 119 (1950)
- 16) Lara, F. J. S., and Stokes, J. L. : J. Bact, 63, 415 (1952)
- 17) 松浦 : 岡山医学会雑誌, 68巻, 1~4号, 173 (昭和31年)

Enzymatic Properties of *Sal. typhi* (II)

Part 1. The Relationship between the Accelerative Action of Metal Ions and the Time of Addition in Oxygen-Uptake by Resting Cells

By

Masayoshi MATSUMOTO

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

In the investigation of the relationship between the accelerative action of Mg^{++} and Fe^{++} on the O_2 -uptake of *Sal. typhi* and the time when such metal ions are added, the author obtained the following results:

1. The substrates that accelerate the oxygen consumption of cells in the presence of Mg^{++} or Fe^{++} are glucose, lactate, pyruvate, and acetate.
2. When metal ion is added prior to a substrate and the substrate is added 20 minutes, 40 minutes, 60 minutes or 120 minutes later, the O_2 -uptake curve makes an upward curvature along with the lapse of time.
3. In the case where a substrate is added before metal ion, the accelerative action on O_2 uptake is weakened in proportion to the length of delay in the metal ion addition.

Part 2. The Relationship of the Mutual Actions of Two Substrates with the Time of Addition in Oxygen Consumption

By

Masayoshi MATSUMOTO

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

By studying the relationship of the mutual actions of two substrates variously coupled from several substances with the time of adding such a combination of substrates in O₂-consumption of *Sal. typhi*, the author obtained the following results:

1. It has been found that there are three sets of cases; namely when two substrates are added simultaneously, the amount of O₂-uptake is greater than the total O₂-uptake of two individual substrates (acceleration); O₂-uptake is about the same as the total of two substrates measured separately; and the amount of O₂-uptake becomes less than the O₂-uptake of single one of the two substrates (inhibition).

2. Looking over the relationship of the adding time of two substrates as to accelerate O₂-uptake and the accelerative effect, there are two different sets; namely, the one where one substrate is added later than the other, the accelerative effect is greater; and on the contrary the other where such an effect is diminished.

This phenomenon seems to be due to the gradings in the oxidation (combining with oxygen) of each substrate by cells.
