

細菌のトリプトファン代謝に関する研究

第 1 編

赤痢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 2 章 インドール生成に及ぼす pH の影響
第 3 章 トリプトファンとインドールとの定量的関係
第 4 章 インドール生成に及ぼす金属イオンの影響
第 5 章 インドール生成に及ぼす阻害剤の影響

第 6 章 インドール生成に及ぼす糖類の影響
第 1 節 発育時に及ぼす各種糖類の影響
第 2 節 グルコース培地について
第 3 節 グルコース生育菌について
第 7 章 総括及び考按
第 8 章 結 論
参考文献

第 1 章 緒 言

L-トリプトファンの微生物に於ける分解経路は、大きくは 2 つに分れ、1 つは大腸菌、赤痢菌、コレラ菌に於ける如く、トリプトファンを分解してインドールを生ずる経路であり、他はチフス菌¹⁾、*Neurospora*²⁾ 等に於ける如く、インドール環の酸化的開裂がおこり、フォルミルキヌレニンを経てキヌレニンになり、次いでアントラニール酸、又はキヌレニンに至る道と、キヌレニンは更に 3-オキシキヌレニンとなり之からは 3-オキシアントラニール酸、又はキサントレン酸になる道がある。更に又 3-オキシアントラニール酸からニコチン酸になる道もある。又トリプトファンをエネルギー源とする *Pseudomonas* 属の或る株は、トリプトファンを分解してキヌレニンを経てアントラニール酸にし、更にアントラニール酸をカテコール→シス-シスコン酸→ β -ケトアジピン酸に分解する。

扱、細菌の鑑別に際し生物学的方法として、インドール形成の有無を検することは古くから行われていたが、Hopkins 及び Cole が 1901 年トリプトファンを発見し、次いで 1903 年³⁾ 大腸菌により、トリプトファンからインドールが形成されるのを証明する迄は、インドールの前駆物質は不明であつた。次いで Herzfeld 及び Klinger (1915)⁴⁾、Woods (1935)⁵⁾、

Happold (1935)⁶⁾、日本では古武門下⁷⁾ によりトリプトファンからのインドール形成の研究が行われた。之等は何れも殆んど、大腸菌を用いて行われている。筆者は同じくトリプトファンを分解してインドールを産生する赤痢菌駒込 B III 菌を用いてトリプトファン代謝に関していささか知見を得たので此処に報告する。

第 2 章 インドール生成に及ぼす pH の影響

実験材料及び実験方法

- 1) 供試菌、教室保存の赤痢菌駒込 B III 菌を用いた。
- 2) 細菌浮游液、普通寒天平板培地に 37°C、18~24 時間培養せるものを、pH 7.2 の 0.15 M 磷酸緩衝液にて遠心沈澱洗滌すること 2 回、菌体のインドールを完全に除去したる後、同緩衝液に浮游させ 30 mg/cc の菌浮游液を作つた。菌量は毎常、光電比色計を用いて測定した。
- 3) L-トリプトファン 0.1 mg/cc 溶液、L-トリプトファンを蒸留水にとかして作つた。
- 4) 各 pH 緩衝液、pH 5.0~6.0 にはフタル酸緩衝液、pH 6.0~8.0 には磷酸緩衝液、pH 8.0~10.0 には硼酸緩衝液を用いた。
- 5) インドールの定量、後藤の方法⁸⁾ を基本にし

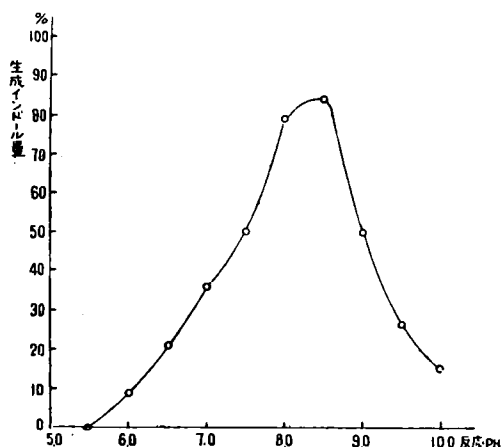
て、試料の倍量の石油エーテルを加えて、インドールを振盪抽出すること2回、石油エーテルを合して Ehrlich の Aldehyd 試薬を正確に加えること 5 cc, 着色した水溶部を光電比色計を用いて緑色のフィルターにより比色定量した。

6) 内容 100 cc の三角コルベンに菌液 1cc, 各 pH 緩衝液 8 cc, L-トリプトファン溶液 1 cc を加え、綿栓を施して 37°C の孵卵器にて24時間放置したる後、その混合液の 1 cc を採取し、インドールの定量を行った。

実験成績

図1に示した如くで、各反応 pH による生成インドール量は百分率で示した。インドール生成は pH 8.0~8.5で最も著明であり、pH 5.5以下ではインドール生成は全く見られなかつた。

図1 反応 pH と生成インドール量との関係



横軸：反応 pH

縦軸：生成インドール量の百分率

第3章 トリプトファンとインドールとの定量的関係

トリプトファンからインドールの生成されるのは分つたが、インドール生成に伴うトリプトファンの消費はどうなっているであろうか。インドールと同時にトリプトファンを定量することにより両者間の関係を見てみた。

実験材料及び実験方法

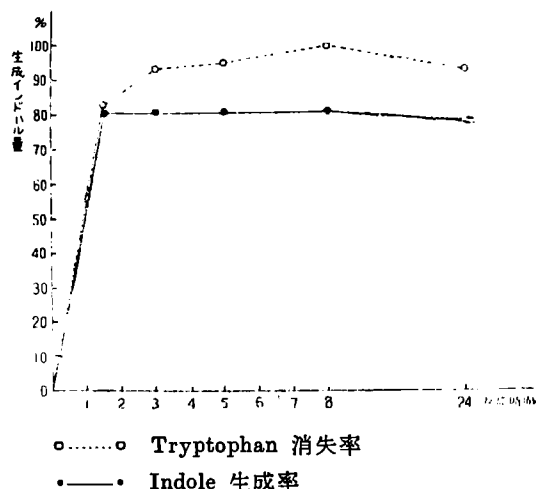
1) 内容 100 cc の三角コルベンに菌液 2 cc (30 mg/cc), pH 8.0 の磷酸緩衝液 17 cc, トリプトファン溶液 1 cc (0.1 mg) を加え 37°C に放置、時間置きに、その混合液の 1 cc を取り出し、インドールを石油エーテルで振盪抽出して、前と同じく定量し、残渣についてトリプトファンの定量を行った。

2) トリプトファンの定量は川俣の方法⁹⁾によつた。

実験成績

図2に示した如くで、インドールは90分後には早くも最高値に達し、理論値の81%を示し、以後8時間に至るも変わらず、24時間後には少しく減少した。

図2 インドール生成とトリプトファン消失との関係



トリプトファンは90分後には83%消費され、3時間後には94%と殆んど完全に分解され、8時間後には100%の消失を見る。図からも分るように、トリプトファン消失率とインドール生成率は、ほぼ相等しく、トリプトファンが完全に分解してインドールになつたことが分る。又、トリプトファンより中間物質を経ずして、直接にインドールになつたことが思われる。

第4章 インドール生成に及ぼす金属イオンの影響

実験材料及び実験方法

各種2価金属イオンの影響を見るために Hg^{++} には $Hg(C_2H_3O_2)_2$ を Cu^{++} には $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ を、 Mg^{++} には $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を、 Fe^{++} には $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ を、 Co^{++} には $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ を、 Ni^{++} には $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ を、 Mn^{++} には $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ を、 Zn^{++} には $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ を濃度はすべて $10^{-2}M \sim 10^{-6}M$ を用いた。

内容 100 cc の三角コルベンに菌液 1cc, pH 8.0 の磷酸緩衝液 6 cc, 金属イオン溶液 2 cc, トリプトファン溶液 1 cc (0.1 mg) を加え、綿栓を施し 37°C, 5時間放置後、その混合液の 1 cc を取り、イ

ンドールの定量を行つた。

実験成績

表1に示す如くで、各種二価金属イオンのインドール生成に及ぼす影響を、阻害率で表した。

表1 インドール生成に及ぼす各種二価金属イオンの影響

金属イオン 濃度(終末)	Hg ⁺⁺	Cu ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Co ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Fe ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Mn ⁺⁺
10 ⁻² M	100	99	92	94	62	68	57	41
10 ⁻³	100	97	89	84	59	52	16	28
10 ⁻⁴	100	97	85	67	49	21	13	21
10 ⁻⁵	100	36	85	67	14	16	11	11
10 ⁻⁶	99.8	10	14	23	12	0	11	0

表中数字は阻害率を表す。阻害なきものを0%とする。各種金属イオン濃度はモル濃度(終末)を示す。

Hg⁺⁺ は最も著しい阻害作用を示し、10⁻⁵M で100%阻害を示した。

Ni⁺⁺ は Hg⁺⁺ に次いで強い阻害を示し、10⁻⁵M で85%であった。

Cu⁺⁺ も強い阻害を示し 10⁻⁴M で97%であった。

Co⁺⁺ も強い阻害を示し 10⁻³M で84%であり 10⁻⁴M では67%と、中等度以上の阻害を示した。

Zn⁺⁺ と Fe⁺⁺ とは中等度の阻害を示し、10⁻³M で50%台であった。

Mg⁺⁺ と Mn⁺⁺ とは中等度以下の阻害を示し、10⁻³M~10⁻⁴M で Mg⁺⁺ は10%台、Mn⁺⁺ は20%台であった。

第5章 インドール生成に及ぼす阻害剤の影響

実験材料及び実験方法

用いた各種阻害剤は KCN, ヒドロオキシルアミン, NaN₃, モノヨード醋酸, 8-Hydroxyquinoline, 亜硫酸ソーダ, 硫酸ソーダ, NaF である。

前章と同じで、金属イオン溶液の代わりに各種阻害剤溶液 2cc を用いた。尚、阻害剤の濃度は 2×10⁻²M~2×10⁻⁵M を用いた。

実験成績

表2に示した如くで、各種阻害剤のインドール生成に及ぼす影響を、阻害率で表した。

KCN は最も著しい阻害を示し、2×10⁻³M で100%、2×10⁻⁴Mで99%を示した。

表2 インドール生成に及ぼす各種阻害剤の影響

阻害剤 濃度(終末)	KCN	NaN ₃	モノヨード醋酸	NaF	ヒドロオキシルアミン	8-Hydroxyquinoline	亜硫酸ソーダ	硫酸ソーダ
2×10 ⁻² M	100	93	77	4	99	83	95	26
2×10 ⁻³	100	18	57	0	99	40	84	26
2×10 ⁻⁴	99	14	18	0	59	23	48	24
2×10 ⁻⁵	51	14	18	0	21	15	26	24

表中数字は阻害率を表す。阻害なきものを0%とする。各種阻害剤の濃度はモル濃度(終末)を示す。

KCN に次いで、ヒドロオキシルアミンが強い阻害を示し、2×10⁻³M で99%を示した。

NaN₃ は 2×10⁻²M では93%と強い阻害を示したが、2×10⁻³M 以下では弱い阻害しか示さなかつた。

モノヨード醋酸及び 8-Hydroxyquinoline は 2×10⁻³M で中等度の阻害を示した。

亜硫酸ソーダは 2×10⁻²M~2×10⁻³M で可なり強い阻害を示した。

硫酸ソーダは 2×10⁻²M 以下の何れの濃度でも同程度の弱い阻害を示した。

NaF は殆んど全く阻害は見られなかつた。

第6章 インドール生成に及ぼす糖類の影響

第1節 発育時に及ぼす各種糖類の影響

培地にグルコースがあると、インドール生成が抑制されることは、古くから Fischer¹⁰⁾ によつて知られた。

筆者は、赤痢菌の発育時に於けるインドール生成に及ぼす各種糖類の影響を見てみた。

実験材料及び実験方法

1) トリプトファン培地(トリプトファンを 0.1%含む)として、次の組成のものを作つた。

Na ₂ HPO ₄	1.4
KH ₂ PO ₄	1.0

NaCl	2.0
MgSO ₄	0.1
アスパラギン酸	2.2
グルタミン酸ソーダ	2.5
メチオニン	0.29
トリプトファン	1.0
ニコチン酸アミド	0.001
蒸留水	1000.0

次に、糖を加えたトリプトファン培地として、上記のトリプトファン培地（以後T培地と略す）に、グルコース、ガラクトース、マンニット、キシロース、ラクトース、サッカロース、ソルビット、グリコーゲンを夫々1%に加えた培地を作つた。

このT培地及び糖を加えたT培地は何れもpH7.2に修正し、100°C、30分、3回滅菌して使用した。

2) 駒込BⅢ菌の普通寒天斜面に18~24時間培養せるものの一白金耳をかきとり、これを1ccの滅菌生理的食塩水に浮遊させ、その二白金耳を、上記T培地及び糖を加えたT培地の各々20ccに接種し、37°C、24時間培養した後、各々の培地から1ccを取り出し、インドールの定量を行つた。

実験成績

表3に示した如くて、発育時、培地にグルコース、ガラクトース、マンニットが存在すると、インドール生成は著しく抑制されて、インドール生成量は、糖の存在しない場合に比べて、グルコース、ガラクトースの場合は約1/10であり、マンニットの場合は前二者より幾分抑制は弱くて、約2/10である。

之に反して、他の糖類の存在は、何等インドール生成に影響を与えなかつた。

表3 発育時、インドール生成に及ぼす各種糖類の影響

培 地	生 成 インドール量(μg)	終 末 pH
トリプトファン培地	35	7.8
グルコース + "	3.5	4.7
ガラクトース + "	4.8	5.2
マンニット + "	7.0	5.4
キシロース + "	33	7.5
ラクトース + "	35	7.6
サッカロース + "	33	7.5
ソルビット + "	35	7.5
グリコーゲン + "	33	7.6

何れの培地も初発 pH 7.2とす

培地 pH の変化をみると、培養前の pH 7.2 に比べて、培養後は、インドール生成の抑制が著しかったグルコース、ガラクトース、マンニットの場合は、pH は 4.7~5.4 となり、ずつと酸性側に下つている。これは之等の糖が利用されて、その結果培地が酸性側に傾いたものと思われる。

之に反して、糖の存在しない場合は、pH は 7.8 と一番よく上り、インドール生成に影響のなかつた糖類の場合は、pH は 7.5~7.6 と少し上つている。このことからインドール生成には培地の pH がアルカリ側の方がよいことがうかがえる。

第2節 グルコース培地について

前節の実験から、発育時にグルコース、ガラクトース、マンニットが存在すると、インドール生成を著しく抑制し、尚培地 pH が酸性側に下ることが分つたが、此等糖類と培地 pH の変化及びインドール生成との関係はどうかであるか、此の場合、グルコースを選んで、そのことを調べてみた

実験材料及び実験方法

1) T培地（前節と同じ）及びグルコースを 0.2%に加えたT培地を用いた。何れも pH 8.0 に修正した。

2) 上記培地の各々 30 cc に前節の時と同じ菌量を接種して、37°C で培養、24時間置きに各々の培地から無菌的に夫々 1 cc ずつを採取し、インドールの定量を行うと同時に、グルコースを加えたT培地からの 1 cc についてはグルコースの検出も行つた。

尚、グルコースを加えたT培地は、グルコースが利用されて培地 pH が酸性に下るため、時々アルカリを加えて、培地の pH を8.0に修正した。

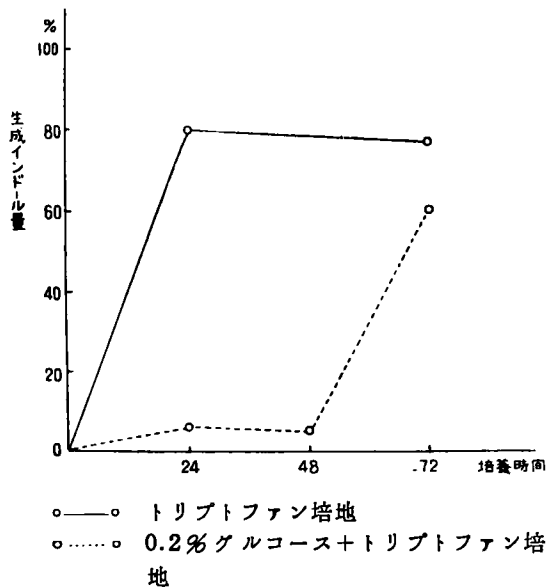
3) グルコースの検出には、3-5-ジニトロサリチル酸を用いる Sumner の法¹⁾によつた。

実験成績

図3に示した如くて、T培地では24時間後、インドールは早くも80%生成され、以後72時間では少しく減少して77%であつた。之に反して、グルコースが加わつたT培地では24時間後、インドール生成は僅か6%にすぎず、48時間経つても尚5%で、同時にグルコースの検出を行つたが、グルコースは存在していた。処が、72時間ではインドールは急に60%生成され、この時、培地にグルコースは全く見出だされなかつた。

T培地では著明なインドール生成が始めから見られたのに、グルコースが加わつたT培地では、グル

図3 発育時、インドール生成に及ぼすグルコースの影響



コースが利用されてその結果、酸性側 (pH 4.7~5.0) に低下した培地 pH を時々8.0に修正したにも拘らず、インドール生成は僅かしか認められず、培地のグルコースが全く消費され尽して後、始めて著明なインドール生成が始まることが分つた。

これをもつて見るに、グルコースによるインドール生成の抑制は、全くはグルコースが利用されてその結果培地 pH が酸性側に低下した為ではないと思われる。

第3節 グルコース生育菌について

今度は、発育時に於けるグルコースの影響をみたが、しからばグルコース培地に育つた菌は、グルコースを含まない培地の菌に比べて、インドール生成はどのようであろうか。

実験材料及び実験方法

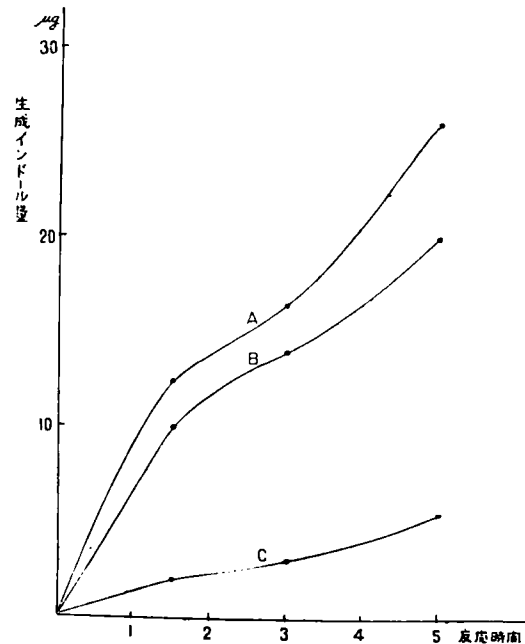
- 次の3通りの培地を作つた。
 - T培地 (第1節と同じ) pH 7.2 に修正せるもの。
 - T培地 pH 5.0 に修正せるもの。
 - 0.2%グルコース + T培地 pH 7.2 に修正せるもの。
- 普通寒天平板上に 37°C, 18~24 時間培養した駒込BⅢ菌を、上記培地の各々 100 cc に1白金耳接種し、37°C, 20時間培養後、その培養菌を夫々集めて、pH 7.2 の磷酸緩衝液にて2回洗滌、菌体のインドールを完全に除去した後、再び同緩衝液に浮遊、30 mg/cc の静止菌浮遊液を作つた。

3) 菌液 1 cc, トリプトファン溶液 1 cc (1.0 mg), pH 7.2 の磷酸緩衝液 8 cc を加え、37°C の孵卵器に放置、90分、3時間、5時間後に夫々の混合液から 1 cc ずつ採取し、インドールの定量を行つた。

実験成績

図4に示した如くで、図の曲線A, B, C, は夫々A, B, C 培地に育つた菌の経過時間によるインドール生成量を表わしている。

図4 発育時のグルコースの存在が菌のトリプトファンナーゼ活性に及ぼす影響



曲線Aはグルコースを含まないトリプトファン培地 (初発 pH 7.2) に生育した菌の活性を、曲線Bは同じ培地 (但し初発 pH 5.0) に生育した菌の活性を、曲線Cはグルコースを 0.2% 含んだトリプトファン培地に生育した菌の活性を夫々示す。

A培地の菌は、5時間後 26 μg, B培地の菌は、A培地の菌より幾分少ないが、しかし 20 μg のインドール生成をみた。

之に反してC培地の菌は5時間に至るも 5.5 μg しか生成しない。

5時間後のインドール生成量を比較すると、B培地の菌は、発育時の pH を5.0と下げたにも拘らず、A培地の菌にくらべて、約80%もあり、他方、C培地の菌は、約20%しかない。

これをもつてみるに、グルコース生育菌のインドール生成が、著しく低下しているのは、全くは、培地のグルコースが利用されてその結果、培地の pH が酸性側に下つた為ではないという事が分つた。

グルコースを含んだ培地に育つた菌は、グルコースを含まない培地に育つた菌に比べて、インドール生成が著しく減弱していると思われる。

第7章 総括及び考按

大腸菌、コレラ菌、赤痢菌等は、トリプトファンよりインドールを生成するが、その経路として、古くはトリプトファン→インドール焦性葡萄糖→インドール醋酸→スカトール→インドールと言う段階的生成が信じられていた。

しかし、Frierber (1922)¹²⁾ は生育試験でインドールカルボン酸、一チカルボン酸、一アルデヒド、一醋酸、一焦性葡萄糖、一エチルアミン、スカトールからは、いずれもインドールを生成しないことを認めた。

齊藤 (1931)¹³⁾ は生育試験で大腸菌が dl-インドール乳酸及びインドール焦性葡萄糖から、他の窒素源の存在の下にインドールを生ずることを明かにした。

間島 (1936)¹⁴⁾ は静止大腸菌が、dl-インドール乳酸、右旋性インドール乳酸、インドール焦性葡萄糖からはインドールを生じ、左旋性インドール乳酸、インドールアクリル酸からは全くインドールを生ぜずと報告した。

藤川 (1938)¹⁵⁾ は l-Abrin (N-メチルトリプトファン) からのインドール生成を認めた。

大島¹⁶⁾ はトリプトファン誘導体である d-Tryptophan, Acetyltryptophan, Benzoyltryptophan, Tryptophanhydantoin, Tryptophanmetyler, Tryptophanuraminosäure, Tryptophansäure amid 等に静止大腸菌を作用させたが、Tryptophanmetyler 及び Tryptophansäure amid からのみインドールを生じ、他からは全く生じないのを認めた。

市原¹⁷⁾ は之等齊藤、間島、藤川、大島の得た結果から栄養上無効のものからは全くインドールを生ぜず、栄養上トリプトファンの代りをして有効な物質のみからインドールの生ずるを見た。そして栄養上トリプトファンの代りをして有効であるということは、それらの物質が細胞内でトリプトファンに容易に移行することを示すものであるから、結局インドールはトリプトファンのみから生じて、他のものからは生じないとした。即ち、インドールはトリプトファンから直接に生じて、中間の物質を経ないと主張した。

Woods (1935)⁵⁾ は静止大腸菌が、インドール乳

酸、一プロピオン酸、一アクリル酸、一醋酸、一カルボン酸、一アルデヒドからはインドールを生ぜず、唯インドール焦性葡萄糖のみからは、他の窒素源の存在のもとに10%のインドールが生じたのを認めた。そしてこれはトリプトファンに移つたものであるとなした。

Happold 及び Hoyle (1935)⁶⁾ は大腸菌の死菌製品で始めてトリプトファンからインドール形成を証明し、そしてこの酵素系に“トリプトファンナーゼ”なる名を与えた。そしてこの死菌で Woods と同様の結果を得た。

Baker 及び Happold (1940)¹⁸⁾ は、これら先人の成績及び自己の成績から17種のインドール誘導体中死菌によりインドールの生ずるのはトリプトファン以外にはなかつたので、氏等は側鎖は 3C で NH₂ 及び COOH が完全でなくてはインドールは形成されない。つまりトリプトファンのみから出来る故に、市原と同じくインドールはトリプトファンから直接に生ずると唱えた。

さて、トリプトファンからインドールは直接に生ずることは分つたが、トリプトファンからのインドール生成の pH による影響はどうであろうか。

Happold 及び Hoyle (1935)⁶⁾ は大腸菌の死菌製品では至適 pH は 8.5 であるといい、大島 (1940)¹⁵⁾ は静止大腸菌では pH 8.0~9.0 の間に於て、インドール生成は最も著明であり、Happold 及び Hoyle の成績と一致したと述べている。

後に Gale 及び Epps (1942)¹⁹⁾ は至適 pH が少し高すぎるとして、静止大腸菌では pH 7.5 であるといい、尚 Dawes 及び Happold (1948)¹⁹⁾ は大腸菌の無細胞酵素液で至適 pH は Gale 及び Epps に一致して pH 7.5 であるという。

筆者の場合、静止赤痢菌ではインドール生成は pH 8.0~8.5 の間で最も著明であつた。

次にトリプトファンとインドールとの定量的関係では Herzfeld 及び Klinger (1915)⁴⁾ は、生育試験で生成するインドールと消失するトリプトファンとの間に化学量的関係の存在することを明かにした。

Woods (1935)⁵⁾ はトリプトファンは静止大腸菌により完全にインドールに変化せられること、しかもインドールの生成速度はトリプトファンの消失速度と一致することを示した。さらに又トリプトファンからインドールの生成せらるるに当り、1分子のインドール生成に対し、5原子の酸素を要するのを見て、次の式を立てた。

トリプトファン+5O→インドール+3CO₂+NH₃+H₂O

間島 (1936)¹³⁾ は静止大腸菌でトリプトファンからのインドール生成は24~30時間の間に最高に達し、その値は理論値の82~88%を示し、その値を補正すればほぼ理論値になるとして、トリプトファンは完全にインドールに変化せられると述べている。

藤川 (1938)¹⁴⁾ はトリプトファンは静止大腸菌により50分後には最高値である86%迄分解せられてインドールとなるも、その後は20時間後に於ても分解量は増加せずと述べている。

筆者は静止赤痢菌によるトリプトファンからのインドール生成に於て、インドールとトリプトファンを同時に定量することにより次の事を知つた。即ちインドール生成は90分後には最高値に達し理論値の81%を示し、以後8時間に至るも変らなかつた。一方トリプトファンは90分後83%消費され、8時間後には100%と全く消失していた。

これから分るように、静止赤痢菌に於ても大腸菌と同じく、トリプトファンは完全にインドールに変化せられること、インドール生成率とトリプトファン消失率は、ほぼ一致することを見出した。尚、トリプトファンから中間物質を経ずして、直接インドールになることが思われる。

次にトリプトファンからのインドール生成に及ぼす金属イオンの影響であるが、静止赤痢菌ではHg⁺⁺ は最も強い阻害を示し、次いでNi⁺⁺, Cu⁺⁺, Co⁺⁺も強い阻害を、Zn⁺⁺, Fe⁺⁺ は中等度の阻害を、Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ は中等度以下の弱い阻害を夫々示した。

Dawes 及び Hapold (1949)²⁰⁾ は静止大腸菌ではHg⁺⁺ は10⁻⁴Mで100%, 10⁻⁵Mで95%, Cu⁺⁺ は10⁻²Mで92%阻害し、Fe⁺⁺ は10⁻²Mで23%しか阻害しないと述べている。

筆者の場合、静止赤痢菌であるが、Dawes と同様にHg⁺⁺, Cu⁺⁺ は強い阻害を示したが、Fe⁺⁺ はやや異なり10⁻²Mで65%とかなりの阻害を示した。

次にトリプトファンからのインドール生成に及ぼす阻害剤の影響であるが、静止赤痢菌ではKCN は最も強い阻害を示し、之に次いでヒドロオキシルアミン、亜硫酸ソーダが強い阻害を、8-Hydroxyquinoline, モノヨード醋酸が中等度以上の阻害を、NaN₃, 硫酸ソーダは弱い阻害を夫々示した。

NaF は殆んど全く阻害は見られなかつた。

Evans 及び Hapold (1942)²¹⁾ は静止大腸菌では、モノヨード醋酸は3×10⁻²Mで、NaF は2×10⁻²Mで何れも阻害しないと云う。

筆者の場合、静止赤痢菌であるが、Evans と同様にNaF は阻害は見られなかつたが、モノヨード醋酸は2×10⁻²Mで77%の阻害を示し、いささか異なる結果を得た。

Dawes 及び Hapold (1949)²⁰⁾ は静止大腸菌でKCN は2×10⁻³Mで100%, 4×10⁻⁴Mで80%と最も強い阻害を示し、これはKCN がトリプトファンナーゼの補酵素であるピリドキサル磷酸(後述)とシアンヒドリンを形成するためだろうと云う。

又、NaN₃ が10⁻²Mで50%, 10⁻³Mで7%阻害がみられることから、トリプトファンナーゼ酵素系に鉄又は他の金属の関与を思わせると言つている。

筆者の場合、静止赤痢菌であるが、KCN は最も強い阻害を示し、その作用機点は、Dawes 及び Hapold の言うが如き為と思われる。

金属結合試薬である8-Hydroxyquinoline 及びNaN₃ による阻害が見られることは、Dawes 及び Hapold の言う如く、トリプトファンナーゼ系に金属の関与を思わしめる。

又、SH 阻害剤であるモノヨード醋酸、Hg⁺⁺, Cu⁺⁺ による阻害がみられることは、酵素系にSH基の存在を思わしめる。

次にトリプトファンからのインドール生成に及ぼす糖類の影響については、先づ発育時に及ぼす各種糖類の影響をしてみるに、培地にグルコース、ガラクトース、マンニットが存在すると、糖の存在しない場合に比べて著しくインドール生成が抑制された。之に反して他の糖類、キシロース、ラクトース、サッカロース、ソルビット、グリコーゲンの存在は何らインドール生成に影響を与えなかつた。

又、培地pHの変化をみるに、培養前、いずれの培地もpH 7.2にしてあつたものがグルコース、ガラクトース、マンニットが加わつた培地では培養後はpH 4.7~5.2となり、ずつと酸性側に下つている。これは之等の糖が利用されてその結果、培地のpHが酸性側に下つたものと思われる。

之に反して、糖の存在しない培地はpH 7.8となり、グルコース、ガラクトース、マンニット以外の糖類の加わつた培地ではpH 7.5~7.6となり、いずれも培養後の培地pHはむしろ上つている。

即ち、グルコース、ガラクトース、マンニット以外の糖類は利用されないものと思われる。又、イン

ドール生成には培地の pH がよりアルカリ性側の方がよいことが分る。

これをもつてみるに、利用され得る糖が存在するとインドール生成は著しく抑制され、尚且つ、培地 pH が酸性側に低下することが判明した。

では、なぜ発育時に糖が利用されるとインドール生成を著しく抑制するのであろうか。

この点に関して、Happold 及び Hoyle (1936)²²⁾ は、大腸菌の培養で、グルコースが存在するとインドール生成は僅かしか認められず、グルコースがすっかり利用され尽した後に、始めて著明なインドール生成が始まることを見出した。この間、グルコースが利用される結果、酸性に低下した培地を時々 pH 8.0 に修正したにも拘らず、インドールの著明な生成はみられなかつたので、グルコースのインドール抑制作用は、全くはグルコースが利用された結果、培地 pH が酸性に低下した為ではないとした。

筆者は赤痢菌の発育時、培地にグルコースが存在するとインドール生成は僅かしか認められず、グルコースがすっかり利用され尽した後、始めて著明なインドール生成を認めた。この間、グルコースが利用された結果酸性に低下した培地を pH 8.0 に時々修正したにも拘らず、グルコースの存在する間は著明なインドール生成を認める事は出来なかつた。

赤痢菌に於ても、Happold 及び Hoyle と同じく、グルコースによるインドール生成の抑制作用は、全くは、グルコースが利用されてその結果培地 pH が酸性に低下した為ではないことが分つた。

ではグルコース培地に生育した菌は、グルコースを含まない培地に生育した菌に比べてインドール生成即ちトリプトファナーゼの酵素活性はどうであるうか。

筆者は赤痢菌で、培養前、培地 pH を 5.0 にしたグルコースを含まない培地に生育した菌は、培養前、培地 pH を 7.2 にした同じ培地に生育した菌に比べて、トリプトファナーゼ活性は約 20% しか減少していないのに、グルコースを含んだ培地に生育した菌は約 80% も減少している。

このことから、グルコースによるインドール生成の抑制は、全くはグルコースが利用されてその結果培地 pH が酸性側に低下した為ではないことが分る。

又、グルコース培地に生育した菌のトリプトファナーゼ活性が著しく減少していることが分つた。

Happold 及び Hoyle (1936)²²⁾ は、普通寒天か

らのクロロフォルム死滅菌は 5.0 mg のトリプトファンから 0.6 mg のインドールを生成したのに、グルコース寒天からの夫れは、全くインドールを生成しなかつたので、グルコースの存在では恐らくトリプトファナーゼの形成が不可能であろうとなした。

Dawes 及び Happold (1949)¹⁹⁾ は大腸菌の無細胞酵素液の実験で、グルコース生育菌から得られた透析液は、トリプトファナーゼ酵素液の Apoenzyme を活性化するのに、グルコース生育菌の蛋白部は活性化しないのを見て、グルコース生育菌は coenzyme は充分持っているのに、Apoenzyme の形成が出来ないとなした。Boyd 及び Lichstein (1955)²³⁾ は、グルコース生育菌に、ビタミンを含まないカゼインの酸加水分解物又はアミノ酸の混合物を加えることにより、グルコース生育菌のトリプトファナーゼ活性は充分恢復したのに、ビタミン、ミネラルなどの cofactor を加えても、活性が恢復しないのを見て、グルコース生育菌は、トリプトファナーゼの Apoenzyme の形成が出来ないとなした。

そして、グルコースが利用される結果トリプトファナーゼの酵素合成に必要な窒素源が不足しているため、酵素合成能力は持っているが、トリプトファナーゼ酵素の形成が阻止されるのだと言っている。

そしてこの際、アミノ酸の内でも、グルタミン酸とゼリンが酵素合成に必要なものであるのを見ている。

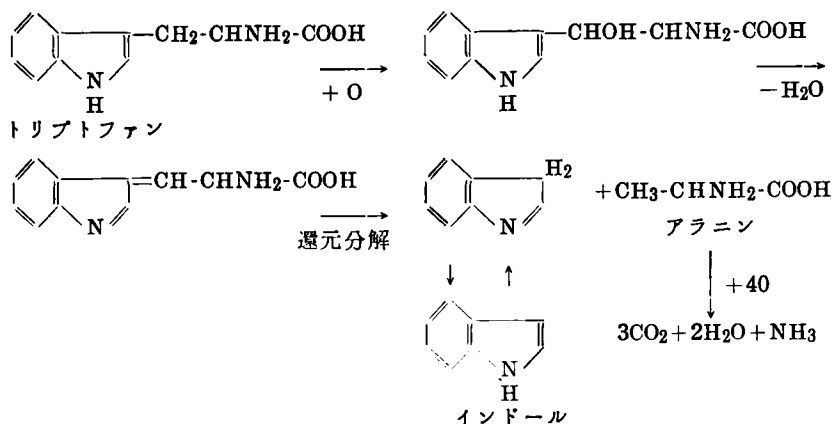
Apotryptophanase 形成に及ぼすグルコースの影響について、培地にグルコースが存在すると菌の増殖が良いので菌体の蛋白合成に必要なアミノ酸の要求が増す為、トリプトファンの分解よりもトリプトファンの合成を必要とするからだろうと想像している。

さて、次にトリプトファンが分解されて、インドールと共に他方に何が生ずるかが問題になるであろう。誰しもアラニンかゼリンを考えるのが当然である。

Baker 及び Happold (1940)¹⁸⁾ は Woods が酵素 5 原子を要することを見た事実から、これを配分し次の経過に従い、還元的切断によつて 1 原子酸素を用いてインドールと共にアラニンが生ずると仮定した。

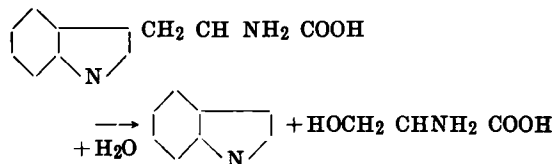
しかし後述する如く、精製されたトリプトファナーゼ酵素ではインドール生成は酸素の消費がなくて行われるのであるから、氏等の仮説は訂正されねばならない。

krebs, Hafez 及び Eggleston (1942)²⁴⁾ は 0-



Aminophenylaldehyd は有力なインドル形成の中間物であるとなした。トリプトファンは酸化されて本物質となり、次いでひとりでに環状になつてインドルに移るといふのである。しかし Baker 等 (1946)²⁵⁾ は O-Aminophenylaldehyd は18時間に22%インドルとなるが、トリプトファンは2時間以内に90%インドルとなり、且つ Dimedon を加えると前者からのインドル形成は完全に抑制されるが、トリプトファンからの抑制されないとして Krebs 等の説に反対した。

Tatum 及び Bonner (1944)²⁶⁾ は Neurospora の変株に於て、インドルとゼリンからトリプトファンが合成されるのを見、大腸菌によつては逆にトリプトファンから加水分解的にインドルとゼリンを生ずると唱へ次の式を立てた。



Dawes, Dawson 及び Happold (1947)²⁷⁾ は紙片吸着法を用いて、Mepacrine の存在の下にインドル形成と同時にアラニンを証明したが、ゼリンは証明し得なかつた。

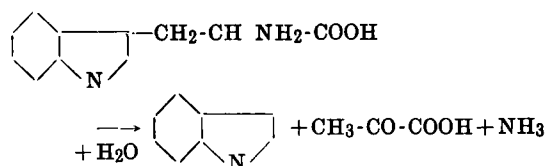
Mepacrine の影響で、静止大腸菌は初めの60分間に酸素を消費しないのに、インドルは少いが形成される。この時アラニンが認められたのである。これにより Happold 等は還元分解でインドルが生ずるといふ自説を固持している。

Woods, Gunsalus 及び Umbreit (1947)²⁸⁾ は大腸菌のアセトン死菌から精製したトリプトファンナーゼを用いて、トリプトファンから酸素を消費することなくインドル、焦性葡萄糖及びアンモニアが各

々1モルづつ形成されるのを見た。

そしてその過程の補酵素がピリドキサル磷酸であることを明かにした。

全体の反応は次の式で示される。



この精製酵素はアラニン又はゼリンを脱アミノして焦性葡萄糖とアンモニアに分解しないので、氏等はアラニンもゼリンもインドル形成の中間代謝物ではないとなした。

アラニンもゼリンも出来ずにトリプトファンからインドル、焦性葡萄糖及びアンモニアが生じたとすると、トリプトファンは先づインドル- α -アミノアクリル酸となり、次いでインドルと α -アミノアクリル酸に分解し、後者はひとりでに焦性葡萄糖とアンモニアとなつたことが思われる。

そうすると、前記 Dawes 等が Mepacrine の存在下にアラニンを証明したことは、 α -アミノアクリル酸が還元されるか、又は焦性葡萄糖が先づアンモニアを得てイミノ酸となり、次いで還元されてアラニンが出来たと考えられる。

先に Woods が静止大腸菌で、トリプトファンからのインドル形成に5原子の酸素を要するのを見たが、これはインドル形成以後の焦性葡萄糖の酸化に関与するものと思われる。

以上、赤痢菌の静止菌を用いて得られた結果について、従来から一番広く研究されている大腸菌の成績から比較検討して総括及び考按を加えたが、尚、詳しいことは更に赤痢菌の無細胞酵素液による実験に待たねばならない。

結 論

筆者は教室保存の赤痢菌駒込BⅢ菌を用い、次の如き結果を得た。

1) 本菌によるトリプトファンからのインドール生成は pH 8.0~8.5 の間で最も著明である。

2) 本菌によりトリプトファンは完全にインドールに変化せられる。且つ、トリプトファン消失率とインドール生成率は略一致する。

3) 二価金属イオンでは、 Hg^{++} 、 Ni^{++} 、 Cu^{++} 、 Co^{++} が本菌のインドール生成を強く阻害する。殊に Hg^{++} の作用は著明である。

4) 阻害剤では、KCN が本菌のインドール生成を最も強く阻害する。

5) 菌発育時、培地にグルコース、ガラクトース、マンニットが存在すると、インドール生成を著しく抑制する。

之に反して、キシロース、ラクトース、サッカロ

ース、ソルビット、グリコーゲンの存在は何らインドール生成に影響を与えない。

6) 菌発育時、培地にグルコースがあると、インドール生成は僅かしか認められず、グルコースがすっかり消費され尽くして後、始めて著明なインドール生成が始まる。

グルコースによる抑制作用は、全くはグルコースが本菌により利用される結果、培地が酸性側に下つた為ではない。

7) グルコースを含んだ培地に生育した菌はトリプトファナーゼ活性が著しく減少している。

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の謝意を表し、併せて御協力下さつた中桐、瀬尾両嬢に感謝する次第であります。

参 考 文 献

- 1) 頼尊他：大阪医学会雑誌，39，789，昭和15年。
- 2) Mehler, A. H. · A symposium on Amino Acid Metabolism, Johns Hopkins Prss, 882, 1955.
- 3) Hopkins, F. G., and Cole, S. W. J. *physiol.*, 29, 451, 1903.
- 4) Herzfeld, E., and Klinger, R. *Zentr. Bakt. Parasitenk. Abt. I Orig.*, 76, 1, 1915.
- 5) Woods, D. D. · *Biochem. J.*, 29, 649, 1935.
- 6) Happold, F. C., and Hoyle, L. · *Biochem. J.*, 29, 1918, 1935.
- 7) 市原：生化学，21，65，1949.
- 8) 後藤：大阪医学会雑誌，37，2413，昭和13年。
- 9) 川俣：大阪大学医学雑誌，5，393，昭和28年。
- 10) Fischer, A., *Biochem. J.*, 70, 105, 1915.
- 11) Sumner, J. B. *J. Biol. Chem.* 65, 393, 1925.
- 12) Frieber, W. *Zent. Bakt. Parasitenk. Abt. I Orig.*, 87, 254, 1922.
- 13) 齊藤：大阪医学会雑誌，30，1729，昭和6年。
- 14) 間島：大阪医学会雑誌，35，441，昭和11年。
- 15) 藤川：大阪医学会雑誌，37，1675，昭和13年。
- 16) 大島：大阪医学会雑誌，39，1523，昭和15年。
- 17) 市原·新医化学提綱，第一版，110，1937.
- 18) Baker, J. W., and Happold, F. C. *Biochem. J.*, 34, 657, 1940.
- 19) Gale, E. F., and Epps, H. M. R. *Biochem. J.*, 36, 600, 1942.
- 20) Dawes, E. A., and Happold, F. C. · *Biochem. J.*, 44, 349, 1949.
- 21) Evans, W. C., Handley, W. R. C., and Happold, F. C. · *Biochem. J.*, 36, 311, 1942.
- 22) Happold, F. C., and Hoyle, L. · *Brit. J. Exptl. Path.*, 17, 136, 1936.
- 23) Boyd W. L., and Lichstein, H. C. · *J. Bacteriol.*, 69, 584, 1955.
- 24) Krebs, H. A., Hafez, M. M., and Eggleston, L. V. *Biochem. J.*, 36, 306, 1942.
- 25) Baker J. W., Happold, F. C., and Walker, N. · *Biochem. J.*, 40, 420, 1946.
- 26) Tatum, E. L., and Bonner. D. · *Proc. Natl. Acad. Sci. u. S.*, 30, 30, 1944.
- 27) Dawes, E. A., Dawson, J., and Happold, F. C. · *Biochem. J.*, 41, 426, 1947.
- 28) Woods, W. A., Gunsalus, I. C., and Umbreit, W. W. *J. Biol. Chem.*, 170, 313, 1947.
- 29) Happold, F. C. · *Advances in Enzymology.* 10, 51, 1950.
- 30) Gale, E. F. · 細菌の化学的活性，本田書店，61，1953.
- 31) Stephenson, M. · 細菌の代謝，丸善株式会社，130，1948.

32) 市原：生物化学ハンドブック，技報堂，425，
昭和28年.

33) 市原他 酵素化学シンポジウム，219，第12集，
1957.

Studies on the Tryptophan Metabolism of Bacteria

I. Tryptophan Metabolism of *B. dysenteriae*

By

Minoru Inada

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

It is well known that *B. coli*, *B. dysenteriae* and *B. cholera* etc., so called indole positive Bacillen produce indole from tryptophan.

There are many reports of *B. coli* but only a few reports of *B. dysenteriae*. Then the author performed experiments with sh. flexneri 2a belonging to *B. dysenteriae* in order to study the Mechanism of indole production from tryptophan on *B. dysenteriae*.

The results were as follows:

1) Indole production from tryptophan by this organism is the most remarkable between PH 8.0 and 8.5.

2) Tryptophan is completely converted into indole by this organism and the rate of indole production is almost equal to the rate at which the tryptophan disappears.

3) Of the various divalent metal ions tested, Hg^{++} , Ni^{++} , Co^{++} and Cu^{++} inhibit strongly indole production by this organism and the most remarkable is the inhibitive action of Hg^{++} .

4) Of the various inhibitors tested, KCN inhibits indole production most markedly.

5) When glucose, galactose or mannit are present in the growth medium, indole production is inhibited markedly. In contrast, xylose, lactose, saccharose, sorbit, and glycogen were without influence upon indole production.

6) When the glucose is present in the growth medium, small amount of indole was produced and no appreciable indole production commenced until all the glucose was completely utilized. The inhibitory effect of glucose is not entirely due to the development of the acid side in culture resulting from the utilization of the glucose by this organism.

7) Tryptophanase activity is markedly reduced when bacterial cells are harvested from a medium containing glucose.
