

細菌のグルコース酸化に対する Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ の影響

第 1 編

静止菌のグルコース酸化に対する影響について

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

北 村 正 彦

[昭和 34 年 5 月 8 日受稿]

目 次

- | | |
|--|---|
| <p>I. 緒 言</p> <p>II. 実験材料及び実験方法</p> <p>III. 実験成績</p> <p>1. Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ の O₂ 消費阻害</p> <p>2. グルコース, 焦性ブドウ酸の酸化に於ける量的関係に対する影響</p> | <p>3. Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ 阻害の Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Mn⁺⁺ による回復の可否</p> <p>4. チオニンによる回復の可否</p> <p>IV. 総括及び考案</p> <p>V. 結 言</p> |
|--|---|

I. 緒 言

Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Mn⁺⁺ などの二価金属イオンが種々の酵素作用を活性化することは古くから知られているが, 酵素化学の進歩とともに他の金属イオン Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ などもある種の酵素活性を促進することが明らかとなつている。例えば arginase¹⁾ は Fe⁺⁺, Mn⁺⁺ の他 Co⁺⁺, Ni⁺⁺ によつて, phosphoglucomutase²⁾ は Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ の他 Co⁺⁺, Ni⁺⁺ によつても活性化され, C. welchii の lecithinase³⁾ は Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ の他 Co⁺⁺, Zn⁺⁺ により, polypeptidase⁴⁾⁵⁾ は Co⁺⁺, Zn⁺⁺ によつて活性化され, enolase⁶⁾ は Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ の他 Zn⁺⁺ によつて, 酵母からの aldolase⁶⁾ は Fe⁺⁺ の他に Co⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺ によつても賦活されることが知られている。然し一方 Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ などは高濃度に於ては Hg⁺⁺, Ag⁺⁺ などの重金属イオンと同様に蛋白を変性せしめることもありうる。

筆者は中等度の濃度 10⁻⁴ M 前後のこれらイオンが, 複合酵素系としての細菌の代謝, 特にグルコースの酸化に対し如何に影響するかを検討し, その作用機序の一端を明らかにした。

本編に於ては *Sh. flexneri* 2a, *St. albus* を供試菌とし, その静止菌の酵素作用に対する Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ の影響を検討した実験成績について記し, 御批判を仰ぐ次第である。

II. 実験材料及び実験方法

供試細菌: *St. flexneri* 2a, *St. albus* の教室保存株。

菌培養法: 普通寒天平板培地を用い, 37°C, 18~20時間培養した。

静止菌浮游液の調製: 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 2 回遠沈洗滌し, 再び同一組成の緩衝液に浮遊せしめた。

菌量は光電比濁計を用いて比濁し, あらかじめ作成した標準曲線と対比して決定した。

O₂ 消費量の測定: ワールブルグ検圧計を用い常法⁷⁾に従つた。

基質, 金属イオン: 何れも市販品を蒸留水を溶解し, 必要により NaOH 又は HCl を以て pH を修正して用いた。

Co⁺⁺ は塩化コバルト, Ni⁺⁺ は硫酸ニッケル, Zn⁺⁺ は硫酸亜鉛を用いた。

グルコースの定量：3,5-ジニトロサルチル酸を用いる比色法⁹⁾によつた。

焦性ブドウ酸の定量：2,4-ジニトロフェニルヒドラゼンを用いる比色法⁹⁾によつた。

乳酸の定量：p-ヒドロキシデフェニルを用いる比色法¹⁰⁾によつた。

醋酸の定量：試料溶液を硫酸々性として水蒸気蒸溜に付し、溜出液を10⁻²M NaOHを以て滴定した。

III. 実験成績

1. Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ の O₂ 消費阻害

供試菌 *Sh. flexneri*, *St. albus* の O₂ 消費に対するこれらイオンの阻害作用を見るため、グルコース及び焦性ブドウ酸を基質とし、Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ を夫々 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M, 10⁻³M, 10⁻²M になるように加えた各場合について O₂ 消費量 (1時間) を測定した。

O₂ 消費量測定はワールブルグ検圧計を用いこれらイオンは容器の主室に菌液と共に入れ、あらかじめよく接触せしめてから15分後に基質を側室より混入した。基質は終濃度 M/100 となるようにし、菌量は *Sh. flexneri* は湿菌量 20 mg/cup, *St. albus* は 60 mg/cup とし、pH 7.2, 37°C で行つた。

普通寒天18時間培養菌を用いた実験では、*Sh. flexneri* については第1表に示した如くであり、グルコースを基質とした場合には阻害剤無添加 (対照) では O₂ 消費 226 μl であるのに対し、Co⁺⁺ 10⁻⁶M 添加では阻害は殆んど認められないが 10⁻⁵M では 147 μl, 10⁻⁴M では 61 μl となつて阻害が現われて来る。Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ では 10⁻⁵M までは著明な阻害は見られないが、10⁻⁴M 以上の濃度では明らかに阻害が認められた。

焦性ブドウ酸を基質とした場合には、各イオン共に 10⁻⁶M では殆んど影響は見られないが 10⁻⁵M では約50%前後の阻害を示し、10⁻⁴M 以上では阻害は著明となつた。

St. albus については第2表に示す如くであり、グルコースを基質とした場合の各イオンによる阻害が極めて小であることは *Sh. flexneri* と異なる点であり、Co⁺⁺ では 10⁻²M に於ても殆んど影響を及ぼさず、Ni⁺⁺ では 10⁻³M で軽度の阻害を示し、Zn⁺⁺ では 10⁻⁴M 以上の濃度で若干の阻害を示すにすぎなかつた。

焦性ブドウ酸を基質とした場合には、グルコース

第1表 Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ の O₂ 消費阻害
Sh. flexneri

阻害イオン	基質	グルコース	焦性ブドウ酸
—		226	169
Co	10 ⁻⁶ M	217	161
Co	10 ⁻⁵ M	147	76
Co	10 ⁻⁴ M	61	33
Co	10 ⁻³ M	43	32
Co	10 ⁻² M	59	46
Ni	10 ⁻⁶ M	236	134
Ni	10 ⁻⁵ M	221	71
Ni	10 ⁻⁴ M	91	33
Ni	10 ⁻³ M	42	19
Ni	10 ⁻² M	51	36
Zn	10 ⁻⁶ M	223	141
Zn	10 ⁻⁵ M	182	83
Zn	10 ⁻⁴ M	122	47
Zn	10 ⁻³ M	92	26
Zn	10 ⁻² M	36	21

第2表 Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ の O₂ 消費阻害
St. albus

阻害イオン	基質	グルコース	焦性ブドウ酸
—		231	155
Co	10 ⁻⁶ M	229	157
Co	10 ⁻⁵ M	236	159
Co	10 ⁻⁴ M	239	92
Co	10 ⁻³ M	259	63
Co	10 ⁻² M	201	41
Ni	10 ⁻⁶ M	242	158
Ni	10 ⁻⁵ M	246	142
Ni	10 ⁻⁴ M	237	81
Ni	10 ⁻³ M	206	36
Ni	10 ⁻² M	197	33
Zn	10 ⁻⁶ M	216	171
Zn	10 ⁻⁵ M	197	120
Zn	10 ⁻⁴ M	146	74
Zn	10 ⁻³ M	124	50
Zn	10 ⁻² M	107	24

に於けるよりもはるかに阻害は著しく、各イオン共に 10⁻⁴M の濃度で約50%前後の阻害を示し 10⁻³M 以上では著明な阻害が認められた。

以上の如く Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Zn⁺⁺ は菌の O₂ 消費

を阻害するが、グルコースに於けるよりは焦性ブドウ酸で著しく、*St. albus* では焦性ブドウ酸を基質とした場合には阻害が認められるに拘わらず、グルコースでは阻害は殆んど見られなかつた。

Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} は二価金属イオンであるから酵素反応に必要な Fe^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} などの二価金属イオンと拮抗する可能性が推定され、これが阻害機構の一つとなることが想像される。

そこで同じく金属イオンと結合することにより酵素反応を阻害することが知られている阻害剤 KCN, NaN_3 を添加した培地に継代して馴らした菌体を用い、そのグルコース或は焦性ブドウ酸を基質とした O_2 消費に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の影響を普通寒天培養の対照菌と比較した。なお培地に於ける KCN, NaN_3 の濃度は *Sh. flexneri*, *St. albus* 共に 10^{-3} M となるようにし、各培地に夫々5代以上継代して馴らした菌体を用い、夫々 KCN 菌, NaN_3 菌と略称することとした。

結果は *Sh. flexneri* では第3表の如くであり、

第3表 KCN 菌, NaN_3 菌の O_2 消費に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の影響
Sh. flexneri

	対照菌	KCN 菌	NaN_3 菌
グルコース	231	172	186
" + Co 10^{-5} M	146	149	137
" + Co 10^{-4} M	72	107	109
" + Co 10^{-3} M	39	61	52
" + Ni 10^{-5} M	226	183	181
" + Ni 10^{-4} M	83	142	134
" + Ni 10^{-3} M	26	51	69
" + Zn 10^{-5} M	152	141	164
" + Zn 10^{-4} M	106	137	123
" + Zn 10^{-3} M	82	114	91
焦性ブドウ酸	147	59	62
" + Co 10^{-5} M	91	50	52
" + Co 10^{-4} M	56	44	40
" + Co 10^{-3} M	69	38	31
" + Ni 10^{-5} M	87	57	51
" + Ni 10^{-4} M	31	40	42
" + Ni 10^{-3} M	46	32	30
" + Zn 10^{-5} M	117	52	59
" + Zn 10^{-4} M	59	41	40
" + Zn 10^{-3} M	21	28	22

グルコースを基質とした場合には、阻害イオン無添加では対照菌 231 μl , KCN 菌 172 μl , NaN_3 菌 186 μl の O_2 消費を示すのに対し、 Co^{++} 10^{-5} M 添加に於ては夫々 146 μl , 149 μl , 137 μl となり、又 Co^{++} 10^{-4} M 添加に於ては夫々 72 μl , 107 μl , 109 μl となつて KCN 菌, NaN_3 菌に於ける Co^{++} の阻害効果は対照菌に比し著しく小であつた。

Ni^{++} , Zn^{++} の影響についても同様であり、KCN 菌, NaN_3 菌に於けるこれらイオンの阻害度は対照菌に比し著しく小であつた。

焦性ブドウ酸を基質とした場合にもまた同様の傾向が見られ、阻害イオン無添加の O_2 消費は対照菌 147 μl , KCN 菌 59 μl , NaN_3 菌 62 μl であり KCN 菌, NaN_3 菌では対照菌に比し小であるが、 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} による阻害度は対照菌の方がはるかに大であつた。

St. albus では第4表の如くであり、グルコースを基質とした場合には前述の通り対照菌に於ては Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の阻害作用は殆んど見られず、

第4表 KCN 菌, NaN_3 菌の O_2 消費に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の影響
St. albus

	対照菌	KCN 菌	NaN_3 菌
グルコース	221	183	191
" + Co 10^{-5} M	217	192	194
" + Co 10^{-4} M	206	190	187
" + Co 10^{-3} M	192	187	188
" + Ni 10^{-5} M	234	194	199
" + Ni 10^{-4} M	229	186	207
" + Ni 10^{-3} M	217	180	194
" + Zn 10^{-5} M	219	189	206
" + Zn 10^{-4} M	197	194	198
" + Zn 10^{-3} M	162	178	190
焦性ブドウ酸	162	97	106
" + Co 10^{-5} M	167	104	117
" + Co 10^{-4} M	101	103	114
" + Co 10^{-3} M	56	87	97
" + Ni 10^{-5} M	158	112	119
" + Ni 10^{-4} M	92	107	112
" + Ni 10^{-3} M	39	98	96
" + Zn 10^{-5} M	141	114	109
" + Zn 10^{-4} M	82	107	114
" + Zn 10^{-3} M	41	81	80

KCN 菌, NaN_3 菌に於てもまたこれらイオンによる阻害は認められなかつたが, 焦性ブドウ酸を基質とした場合には阻害イオン無添加では対照菌 $162 \mu\text{l}$, KCN 菌 $97 \mu\text{l}$, NaN_3 菌 $106 \mu\text{l}$ の O_2 消費であるのに対し, Co^{++} 10^{-3} M 添加では夫々 $56 \mu\text{l}$, $87 \mu\text{l}$, $97 \mu\text{l}$ となつて, KCN 菌, NaN_3 菌では Co^{++} による阻害は極めて小であり, 又 Ni^{++} , Zn^{++} に於ても Co^{++} と全く同様の傾向であつた。

2. グルコース, 焦性ブドウ酸の酸化に於ける量的関係に対する影響

Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} のグルコース, 焦性ブドウ酸を基質とした O_2 消費, 基質消費, 分解産物蓄積に対する影響を検討した。即ち静止菌浮游液に基質を加え, 更に各イオンを添加した場合, 及び無添加の場合(対照)につき2時間振盪して O_2 消費量を測定し, 又遠沈上清についてグルコースを基質とした場合にはその消費量, 焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸蓄積量を, 又焦性ブドウ酸を基質とした場合にはその消費量, 乳酸, 醋酸蓄積量を夫々定量した。

結果は *Sh. flexneri* については第5表に示した如

第5表 グルコース酸化に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の影響

<i>Sh. flexneri</i>						
基質・ 阻害イオン	定量値 μM	O_2 消費	グルコ ース消 費	焦性ブ ドウ酸 蓄積	乳酸 蓄積	醋酸 蓄積
グルコース		19.7	16.1	1.2	0.4	1.1
" +Co 10^{-5} M		10.9	9.6	3.1	0.4	1.2
" +Co 10^{-4} M		5.7	6.6	4.2	0.3	1.9
" +Co 10^{-3} M		2.9	3.0	2.1	0.3	0.9
" +Ni 10^{-5} M		19.6	9.2	1.6	0.8	1.9
" +Ni 10^{-4} M		10.3	6.4	2.9	1.3	2.1
" +Ni 10^{-3} M		1.1	2.4	1.3	0.9	0.8
" +Zn 10^{-5} M		15.2	5.1	0.7	0.5	1.5
" +Zn 10^{-4} M		9.3	6.2	2.7	0.6	2.3
" +Zn 10^{-3} M		4.2	4.5	1.1	0.6	1.8

くであり, グルコースを基質とした場合, 対照では O_2 消費 $19.7 \mu\text{M}$, グルコース消費 $16.1 \mu\text{M}$, 焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸蓄積は夫々 1.2 , 0.4 , $1.1 \mu\text{M}$ であるのに対し, Co^{++} 10^{-5} M 添加では夫々 10.9 , 9.6 , 3.1 , 0.4 , $1.2 \mu\text{M}$ となり O_2 消費, グルコース消費は共に Co^{++} 添加により減少するが, O_2 消費に対するグルコース消費の割合はむしろ大となり, 又分解産物としての焦性ブドウ酸の蓄積は増大した。

第6表 焦性ブドウ酸化に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の影響
Sh. flexneri

基質・ 阻害イオン	定量値 μM	O_2 消費	焦性ブ ドウ酸 消費	乳酸 蓄積	醋酸 蓄積
焦性ブドウ酸		9.1	17.2	0.2	0.7
" +Co 10^{-5} M		4.9	9.1	0.4	1.1
" +Co 10^{-4} M		2.7	5.0	0.5	1.4
" +Co 10^{-3} M		2.0	3.8	0.3	0.6
" +Ni 10^{-5} M		8.9	17.0	0.6	1.3
" +Ni 10^{-4} M		3.2	5.8	0.8	1.2
" +Ni 10^{-3} M		1.1	1.9	0.5	0.8
" +Zn 10^{-5} M		5.1	9.3	0.9	1.2
" +Zn 10^{-4} M		4.4	7.1	0.9	1.0
" +Zn 10^{-3} M		3.8	6.5	0.8	0.9

Co^{++} 10^{-4} M 及び 10^{-3} M 添加に於ても同様の傾向であり, Co^{++} 濃度が大になるにつれて O_2 消費, グルコース消費に対する阻害は当然大となるが, O_2 消費に対するグルコース消費の割合は増大し, 又分解産物特に焦性ブドウ酸蓄積の割合も大となつた。

Ni^{++} , Zn^{++} 添加に於ても上述の Co^{++} 添加に於けると類似の傾向が見られた。

焦性ブドウ酸を基質とした場合には第6表の如くであり, イオン無添加(対照)では O_2 消費, 焦性ブドウ酸消費, 乳酸, 醋酸蓄積は夫々 9.1 , 17.2 , 0.2 , $0.7 \mu\text{M}$ であるのに対し, Co^{++} 10^{-5} M 添加では夫々 4.9 , 9.1 , 0.4 , $1.1 \mu\text{M}$ となり, Ni^{++} 10^{-5} M 添加では夫々 8.9 , 17.0 , 0.6 , $1.3 \mu\text{M}$, Zn^{++} 10^{-5} M 添加では夫々 5.1 , 9.3 , 0.9 , $1.2 \mu\text{M}$ となつて, イオン添加により一般に O_2 消費, 基質消費共に阻害され, 又乳酸, 醋酸蓄積の割合は僅かに増大する傾向が見られるにすぎなかつた。

St. albus では第7, 8表に示す如くであり, グルコースを基質とした場合には前記 *Sh. flexneri* とは異り, Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 添加の影響は O_2 消費, グルコース消費に対して殆んど見られず, 又分解産物蓄積も著しい増大は見られなかつた。

焦性ブドウ酸を基質とした場合には, 各イオン共 10^{-3} ~ 10^{-4} M でかなりの O_2 消費阻害が見られ, 焦性ブドウ酸消費の阻害も大体 O_2 消費に対する阻害と平行していたが, 分解産物蓄積の割合は余り影響されず, 醋酸蓄積の割合がやや増大するにすぎなかつた。

第7表 グルコース酸化に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の影響

St. albus						
基質・ 阻害イオン	定量値 μM	O_2 消費	グルコ ース消 量	焦性ブ ド一酸 蓄積	乳酸 蓄積	醋酸 蓄積
グルコース		14.2	5.6	0	0.2	0.6
" +Co 10 ⁻⁵ M		14.4	5.9	0	0.2	0.6
" +Co 10 ⁻⁴ M		14.1	5.8	0	0.2	0.6
" +Co 10 ⁻³ M		14.1	5.8	0	0.2	0.6
" +Ni 10 ⁻⁵ M		14.4	5.9	0	0.2	0.7
" +Ni 10 ⁻⁴ M		14.1	5.7	0	0.3	0.8
" +Ni 10 ⁻³ M		1.3	5.3	0	0.2	0.8
" +Zn 10 ⁻⁵ M		14.1	5.7	0.3	0.2	0.5
" +Zn 10 ⁻⁴ M		13.1	5.3	0.5	0.3	0.6
" +Zn 10 ⁻³ M		6.9	4.1	0.6	0.1	0.8

第8表 焦性ブド一酸酸化に対する Co^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} の影響

St. albus					
基質・ 阻害イオン	定量値 μM	O_2 消費	焦性ブ ド一酸 消費	乳酸 蓄積	醋酸 蓄積
焦性ブド一酸		8.1	14.6	0.3	0.7
" +Co 10 ⁻⁵ M		8.0	14.8	0.9	1.5
" +Co 10 ⁻⁴ M		7.8	11.3	0.8	1.9
" +Co 10 ⁻³ M		7.1	9.8	0.7	1.8
" +Ni 10 ⁻⁵ M		7.9	13.2	0.7	1.6
" +Ni 10 ⁻⁴ M		4.4	7.8	0.9	1.3
" +Ni 10 ⁻³ M		2.1	3.4	0.6	0.7
" +Zn 10 ⁻⁵ M		7.8	13.0	0.5	1.1
" +Zn 10 ⁻⁴ M		4.1	7.1	0.6	1.3
" +Zn 10 ⁻³ M		3.6	5.2	0.4	0.6

つた。

以上の各実験により両菌に於て Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} は主として焦性ブド一酸の酸化を阻害するものと考えられた。

3. Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害の Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} による回復の可否

以上の如く *Sh. flexneri*, *St. albus* 両菌共にグルコース, 焦性ブド一酸を基質とした O_2 消費が Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} により程度の差はあるが阻害され, かつこの阻害は主として焦性ブド一酸の完全酸化の段階であろうと推定された。一方この段階は Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} など二価の金属イオンを必要とす

ると考えられるので¹⁴⁾, Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} は Mg^{++} , Fe^{++} 或は Mn^{++} と拮抗するのではないかと推定される。

そこでこれ等イオンの阻害が Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} で回復されるか否かを検討した。

即ち基質をグルコース, 焦性ブド一酸とし第9~17表の如く, ① ワールブルグ検圧計の容器の主室に菌液と阻害剤イオンを入れ15分間よく接触せしめた後, 側室から Mg^{++} その他のイオンと基質を混入した場合, ② 主室に菌液と Mg^{++} などのイオンを入れ15分後に側室から阻害イオン及び基質を混入した場合につき O_2 消費量を比較した。又夫々の対照についても同様に行つた。なお *St. albus* ではグルコースを基質とした場合には阻害イオンの作用が著しくないでこれは省略し, 焦性ブド一酸を基質とした場合のみ行つた。

基質は何れも終濃度 M/100, Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} は終濃度 10⁻⁴M, Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} は終濃度 3×10⁻⁴M として行つた。

先ず *Sh. flexneri* でグルコースを基質とした場合の Mg^{++} による回復の可否を見ると第9表の通りであり阻害イオン無添加の対照では O_2 消費量 217 μl

第9表 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害の Mg^{++} による回復の可否

Sh. flexneri		
主室	側室	O_2 消費量
菌	グルコース	217
菌	" + Mg	251
菌 + Mg	"	267
菌 + Co	"	48
菌	" + Co	61
菌 + Co	" + Mg	159
菌 + Mg	" + Co	173
菌 + Ni	"	63
菌	" + Ni	79
菌 + Ni	" + Mg	149
菌 + Mg	" + Ni	181
菌 + Zn	"	77
菌	" + Zn	98
菌 + Zn	" + Mg	151
菌 + Mg	" + Zn	183

であり、菌液と共に Co^{++} を主室に入れて前以つて接種せしめ、後から基質グルコースを添加した O_2 消費量は $48 \mu\text{l}$ 、基質と共に Co^{++} を加えたものは $61 \mu\text{l}$ であり、基質に先立つて Co^{++} を加えた方が阻害度は大であつた。

而して Co^{++} を先に菌に接触せしめておき、後から基質及び Mg^{++} を添加した O_2 消費は $159 \mu\text{l}$ 、先に Mg^{++} を加えて接触せしめ、後から基質及び Co^{++} を加えると $173 \mu\text{l}$ となり、何れの場合にも Mg^{++} により Co^{++} 阻害はかなり回復されるが、あらかじめ Mg^{++} を菌と接触しておき後から Co^{++} を加えた場合の方が回復度が大きであつた。

同様に Ni^{++} 、 Zn^{++} による O_2 消費阻害も Mg^{++} によりかなりの程度まで回復され、而も Mg^{++} を先に加えて置く方が回復効果は大であつて、このことから Co^{++} 、 Ni^{++} 、 Zn^{++} の阻害は Mg^{++} その他の酵素作用に必要な金属イオンが酵素と結合するのを拮抗的に妨害することによるものと推定された。

次にやわりグルコースを基質とした場合について Fe^{++} による回復の可否を見ると、第10表に示す如く、 Fe^{++} による回復は Mg^{++} に比しはるかに弱く又 Mn^{++} によつては第11表に示す如く、やはり回復は困難であつた。

第10表 Co^{++} 、 Ni^{++} 、 Zn^{++} 阻害の Fe^{++} による回復の可否

Sh. flexneri

主 室	側 室	O_2 消費量
菌	グルコース	209
菌 + Fe	" + Fe	242
菌	"	250
菌 + Co	"	62
菌	" + Co	71
菌 + Co	" + Fe	73
菌 + Fe	" + Co	98
菌 + Ni	"	56
菌	" + Ni	73
菌 + Ni	" + Fe	67
菌 + Fe	" + Ni	101
菌 + Zn	"	77
菌	" + Zn	89
菌 + Zn	" + Fe	88
菌 + Fe	" + Zn	112

第11表 Co^{++} 、 Ni^{++} 、 Zn^{++} 阻害の Mn^{++} による回復の可否

Sh. flexneri

主 室	側 室	O_2 消費量
菌	グルコース	212
菌	" + Mn	232
菌 + Mn	"	239
菌 + Co	"	51
菌	" + Co	69
菌 + Co	" + Mn	78
菌 + Mn	" + Co	86
菌 + Ni	"	59
菌	" + Ni	81
菌 + Ni	" + Mn	72
菌 + Mn	" + Ni	90
菌 + Zn	"	81
菌	" + Zn	97
菌 + Zn	" + Mn	93
菌 + Mn	" + Zn	110

焦性ブドウ酸を基質とした場合にも同様の傾向が認められ、第12表の如く Co^{++} 、 Ni^{++} 、 Zn^{++} によ

第12表 Co^{++} 、 Ni^{++} 、 Zn^{++} 阻害の Mg^{++} による回復の可否

Sh. flexneri

主 室	側 室	O_2 消費量
菌	焦性ブドウ酸	188
菌	" + Mg	229
菌 + Mg	"	247
菌 + Co	"	51
菌	" + Co	69
菌 + Co	" + Mg	183
菌 + Mg	" + Co	196
菌 + Ni	"	33
菌	" + Ni	57
菌 + Ni	" + Mg	162
菌 + Mg	" + Ni	186
菌 + Zn	"	55
菌	" + Zn	67
菌 + Zn	" + Mg	172
菌 + Mg	" + Zn	198

る O_2 消費阻害は何れも Mg^{++} により回復され、特に阻害イオンの添加に先立つて Mg^{++} を加えて置くと阻害効果は殆んど認められなくなった。

ところがこれに対し Fe^{++} , Mn^{++} による回復は第13, 14表に見られる如く困難であつた。

これはおそらく酵素との結合力(親和性)が Mg^{++} , Mn^{++} の方が弱いためではないかと考えられる。

次に *St. albus* に於て焦性ブドウ酸を基質とした場合について見ると、やはり Mg^{++} によつては第15表の如くかなりの回復が認められ、又 Fe^{++} (第16表), Mn^{++} (第17表) による回復は Mg^{++} ほど著しくなかつた。

4. チオニンによる回復の可否

以上の如く Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} が Mg^{++} , Fe^{++} 或は Mn^{++} と拮抗するとすれば、鉄を含んだ酵素、特に呼吸酵素系にこれらの阻害イオンが作用する可能性も考えられる。

そこでこれを検討する一助として酸化還元色素チオニンによる Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害の回復の可否を見た。即ちワールブルグ検圧計の主室にチオニンを菌と共に入れ15分後に側室より基質及び阻害イオンを混入し1時間の O_2 消費量を測定した。チ

第13表 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害の Fe^{++} による回復の可否

Sh. flexneri		
主室	側室	O_2 消費量
菌	焦性ブドウ酸	193
菌	" + Fe	241
菌 + Fe	"	256
菌 + Co	"	41
菌	" + Co	55
菌 + Co	" + Fe	59
菌 + Fe	" + Co	68
菌 + Ni	"	32
菌	" + Ni	59
菌 + Ni	" + Fe	49
菌 + Fe	" + Ni	66
菌 + Zn	"	50
菌	" + Zn	66
菌 + Zn	" + Fe	61
菌 + Fe	" + Zn	83

第14表 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害の Mn^{++} による回復の可否

Sh. flexneri		
主室	側室	O_2 消費量
菌	焦性ブドウ酸	171
菌	" + Mn	203
菌 + Mn	"	212
菌 + Co	"	47
菌	" + Co	56
菌 + Co	" + Mn	53
菌 + Mn	" + Co	59
菌 + Ni	"	36
菌	" + Ni	49
菌 + Ni	" + Mn	42
菌 + Mn	" + Ni	61
菌 + Zn	"	51
菌	" + Zn	72
菌 + Zn	" + Mn	63
菌 + Mn	" + Zn	86

第15表 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害の Mg^{++} による回復の可否

St. albus		
主室	側室	O_2 消費量
菌	焦性ブドウ酸	173
"	" + Mg	201
" + Mg	"	223
" + Co	"	99
"	" + Co	112
" + Co	" + Mg	162
" + Mg	" + Co	181
" + Ni	"	83
"	" + Ni	91
" + Ni	" + Mg	151
" + Mg	" + Ni	176
" + Zn	"	82
"	" + Zn	102
" + Zn	" + Mg	159
" + Mg	" + Zn	167

第16表 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害の Fe^{++} による回復の可否

St. albus		
主 室	側 室	O ₂ 消費量
菌	焦性ブドウ酸	166
"	" + Fe	247
" + Fe	"	264
" + Co	"	87
"	" + Co	109
" + Co	" + Fe	126
" + Fe	" + Co	156
" + Ni	"	79
"	" + Ni	96
" + Ni	" + Fe	113
" + Fe	" + Ni	159
" + Zn	"	81
"	" + Zn	96
" + Zn	" + Fe	107
" + Fe	" + Zn	131

第17表 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害の Mn^{++} による回復の可否

St. albus		
主 室	側 室	O ₂ 消費量
菌	焦性ブドウ酸	171
"	" + Mn	293
" + Mn	"	316
" + Co	"	78
"	" + Co	93
" + Co	" + Mn	113
" + Mn	" + Co	136
" + Ni	"	73
"	" + Ni	87
" + Ni	" + Mn	117
" + Mn	" + Ni	122
" + Zn	"	84
"	" + Zn	97
" + Zn	" + Mn	116
" + Mn	" + Zn	133

オニンは終濃度 10,000 倍希釈, Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} は夫々 10^{-4} M となるようにして行つた。

Sh. flexneri については第18表に示す如くであり、グルコースのみの O₂ 消費 207 μ l に比し基質とチオニン添加の O₂ 消費は 137 μ l となり、この菌ではチオニンは阻害的に働く作用を示し、 Co^{++} 添加では 54 μ l, チオニン + Co^{++} 添加では 51 μ l となつてチオニンによる回復は全く認められなかつた。

第18表 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害のチオニンによる回復の可否

Sh. flexneri	
基質・阻害イオン	O ₂ 消費量 μ l
グルコース	207
+ Co	54
+ Ni	93
+ Zn	103
+ チオニン	137
+ チオニン + Co	51
+ チオニン + Ni	74
+ チオニン + Zn	87
焦性ブドウ酸	171
+ Co	48
+ Ni	46
+ Zn	64
+ チオニン	106
+ チオニン + Co	47
+ チオニン + Ni	41
+ チオニン + Zn	58

同様に Ni^{++} , Zn^{++} による阻害もチオニンによつて回復されず、焦性ブドウ酸を基質とした場合にも Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} による O₂ 消費阻害はチオニンによつて回復されなかつた。

St. albus に於てはグルコースを基質とした O₂ 消費は前述の如く Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} によつて阻害され難いので、焦性ブドウ酸を基質とした場合のみ実験したのであるが、結果は第19表の如くであり、対照の O₂ 消費は 163 μ l であるのに対しチオニン添加では 217 μ l となつて、この菌ではチオニンにより O₂ 消費は増大されるが、 Co^{++} 添加では 96 μ l, チオニン + Co^{++} 添加では 117 μ l となり、 Co^{++} による阻害はチオニンにより回復されるとはいい難い。同様に Ni^{++} , Zn^{++} の阻害もチオニンによつては回復されなかつた。

第19表 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} 阻害のチオニン
による回復の可否
St. albus

基質・阻害イオン	O_2 消費量 μl
焦性ブドウ酸	163
+ Co	96
+ Ni	102
+ Zn	81
+ チオニン	217
+ チオニン + Co	117
+ チオニン + Ni	105
+ チオニン + Zn	118

IV. 総括及び考按

Sh. flexneri, *St. albus* の静止菌のグルコース及び焦性ブドウ酸の酸化に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の作用を検討した上記実験成績に考案を加える。

これらのイオンのグルコース、焦性ブドウ酸を基質とした O_2 消費に対する影響を見ると、*Sh. flexneri* ではイオンの種類により多少の差異はあるが何れも 10^{-4} M に於てかなりの阻害を示し、特に焦性ブドウ酸を基質とした場合が阻害度が大きい。

St. albus では一般に *Sh. flexneri* よりも阻害され難く、特にグルコースを基質とした場合の阻害度は極めて小であるが、焦性ブドウ酸を基質とした場合には各イオン共に 10^{-4} M で約50%前後の阻害を示し、このような両菌間の差異は、これらイオンの菌体表面透過性の相違もあるが、一つにはグルコース酸化経路の相違によるものと考えられる。即ち *Sh. flexneri* ではグルコースは主として Embden-Meyerhof 経路により分解されるため¹¹⁾、 O_2 消費は主として焦性ブドウ酸以下の段階で行われるのに対し、*St. albus* ではグルコースは主に Warburg-Dickens 経路又はグルコース→グルコン酸→2-ケトグルコン酸 (又は 5-ケトグルコン酸)→の経路により分解され¹²⁾、 O_2 消費の行われる段階が *Sh. flexneri* とは異なることによるのではないかと考えられる。

次にグルコース又は焦性ブドウ酸を基質とした際の量的関係に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の影響を見ると、*Sh. flexneri* ではこれらイオン添加により O_2 消費、グルコース消費は共に阻害されるが、 O_2 消費に対するグルコース消費の割合は増大し、又分解

産物特に焦性ブドウ酸蓄積の割合が大となつてグルコース酸化は焦性ブドウ酸の段階で阻止されることがうかがわれる。

St. albus では前述の如くグルコース酸化に対する影響は少く、分解産物蓄積の割合も余り変化しない。

又焦性ブドウ酸を基質とした場合には、*Sh. flexneri*, *St. albus* 両菌共にこれらイオンによる O_2 消費はグルコースの場合よりは大きく、かつ基質焦性ブドウ酸自体の消費も大体 O_2 消費と平行して阻害され、分解産物蓄積も著しい増大は示さず、焦性ブドウ酸を基質としたものはこれらイオンにより主として反応の初期段階から阻止されるものと推定される。

これら阻害イオンの作用点を推定するに、菌による焦性ブドウ酸を基質とした場合には Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} などの二価金属イオンを必要とするので¹³⁾¹⁴⁾、これら必要イオンと Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} が拮抗するのではないかと予想される。

これを確かめるため、先づ金属イオンと結合することにより酵素反応を抑制することが知られている阻害剤 KCN, NaN_3 を含む培地に馴らした菌体に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の影響を見ると、これらの菌の呼吸は対照の菌に比しこれら阻害イオンにより阻害され難い。

又 Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} による阻害の Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} 及び酸化還元色素チオニンによる回復の可否を見ると、 Fe^{++} , Mn^{++} によつては回復されないが、 Mg^{++} によつては回復され、チオニンによつては回復されない。

チオニンは酸化還元色素としてH伝達を行いうるが、これにより回復されないことから Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} がH伝達を行うチトクローム系の呼吸酵素を阻害するのではなく、 Mg^{++} により回復されることからしておそらく酵素作用に必要な遊離の状態の Mg^{++} その他のイオンと酵素とのゆるやかな結合を拮抗的に阻害するのではないかと推定される。

ただ Mg^{++} によつては回復可能であるに拘わらず Fe^{++} , Mn^{++} により回復されない点に疑問が残るが、これは酵素とこれらイオン及び阻害イオンの間の結合力の強弱に起因するのではないかと想像される。

V. 結 言

Sh. flexneri, *St. albus* 両菌を供試菌とし、普通

寒天20時間培養の静止菌の O_2 消費及びグルコース、焦性ブドウ酸の酸化に対する Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の阻害作用、並びにこれらイオンの阻害の Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} , チオニンによる回復の可否を検討して次の結果を得た。

1. *Sh. flexneri* ではイオンの種類により多少の差異はあるが何れも $10^{-4} M$ に於てかなりの O_2 消費阻害を示し、特に焦性ブドウ酸を基質とした場合が阻害度が大きい。

2. *St. albus* ではグルコースを基質とした場合の阻害は極めて小であるが、焦性ブドウ酸ではかなりの阻害が認められる。

これは両菌間のこれらイオンの菌膜透過性の差異

にもよるが、一つにはグルコース酸化経路の差異にもよると考えられる。

3. Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} の阻害はグルコース酸化に於ける焦性ブドウ酸 \rightarrow 化の段階と考えられ、酵素反応に必要な Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} などのイオンとこれら阻害イオンが拮抗することによると考えられる。

(文献は第2編の末尾に記載)

The Effects of Co^{++} , Ni^{++} and Mn^{++} on the Oxydation of Glucose by Bacteria

Part I. The effects on the oxydation by resting cells

By

Masahiko KITAMURA

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

Using the strains of *Sh. flexneri* and *Staphy. albus* as the test organism, the author studied the O_2 uptake of the resting cells cultured on nutrient agar media for 20 hours, the inhibition caused by Co^{++} , Ni^{++} or Zn^{++} on oxydation of glucose or pyruvate in the organisms and the recovering effect of Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} or thionine against the inhibition. The following results were obtained.

1) The O_2 uptake of *Sh. flexneri* was, of course varying in degree, considerably suppressed at the concentration of $10^{-4} M$ of metal ions, Co^{++} , Ni^{++} or Zn^{++} , regardless the sort of metal. Especially it was serious in the case of oxydation of pyruvate.

2) Concerning *Staphy. albus*, it was observed only slight inhibition of glucose, but serious inhibition was found in the case of pyruvate. Hence the difference on the inhibition, presumably, regarded to be based on different pathway of glucose metabolism besides the difference in the permeability of the surface of bacteria for ions.

3) It could be postulated that the inhibition of Co^{++} , Ni^{++} or Zn^{++} on oxydation of glucose were based on a block of the step on the oxydation of pyruvate, since these metal ions could compete with Ni^{++} , Fe^{++} or Mn^{++} that were necessary for such enzyme action.