

## コレラ菌のグルコース酸化について

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

森 正 守

〔昭和34年9月14日受稿〕

## 目 次

第1篇 発育菌及び静止菌のグルコース酸化	I. 緒 言
I. 緒 言	II. 実験材料及び実験方法
II. 実験材料及び実験方法	III. 実験成績
III. 実験成績	1. O <sub>2</sub> 消費に対する pH の影響
1. 発育途次のグルコースの分解	2. 酸 (低 pH) による凝集
2. 静止菌のグルコース酸化	3. グルコースを加えて振盪した菌体の O <sub>2</sub> 消費能
IV. 総括及び考案	IV. 総括及び考案
V. 結 言	V. 結 言
第2篇 グルコースを加えて振盪した静止菌の 酵素活性	参考文献

## 第1篇 発育菌及び静止菌のグルコース酸化

## I. 緒 言

生物細胞の糖代謝に関しては極めて多くの研究があり枚挙にいとまがない。又そのグルコース酸化についても古来多くの研究があり、Emden-Meyerhof の経路<sup>1)2)</sup>、Warburg-Dickens の経路<sup>3)~6)</sup>、又は 2-ケトグルコン酸を経る経路<sup>7)~9)</sup> などの詳細な機構が明らかにされている。

微生物のグルコース酸化についても種々研究されて居り、他の生物細胞とはほぼ同様な機構が明らかにされている。

然し病原菌についての研究は比較的少なく、病原性の本態の究明のためには、その酵素的性状の検討は必須であり、筆者は当教室に於ける病原菌の代謝に関する研究の一端としてコレラ菌のグルコース酸化について 2, 3 検討を加えた。

細菌は一般生物細胞と異り、酵素的性状が培養条件に支配されるので、特に培養条件との関係に於いてグルコース酸化を見て行くこととした。

## II. 実験材料及び実験方法

供試菌: コレラ菌の原型菌稻葉株、中間型菌彦

島株、異型菌小川株の教室保存のもの、

菌培養法及び発育度の判定: プイオン、或はプイオンにグルコースを加えた培地をコルベンに分注、接種し 37°C で静置又は振盪して培養した。

発育度は光電比濁計により測定した。

pH の測定: 島津製 pH メーターによつた。

グルコース及びその分解産物の定量: グルコースは 3,5-ジニトロサルチル酸を用いる比色法<sup>10)</sup>、乳酸は p-ヒドロキシフェニルを用いる比色法<sup>11)</sup>、焦性ブドウ酸は 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いる比色法<sup>12)</sup> により、サク酸は試料を水蒸気蒸溜し、溜出液を M/100 NaOH を以て滴定して定量した。

O<sub>2</sub> 消費量の測定: ワールブルグ検圧計を用い常法<sup>13)</sup> に従い、基質はすべて市販品を水にとかし、必要により pH を修正して用いた。

## III. 実験成績

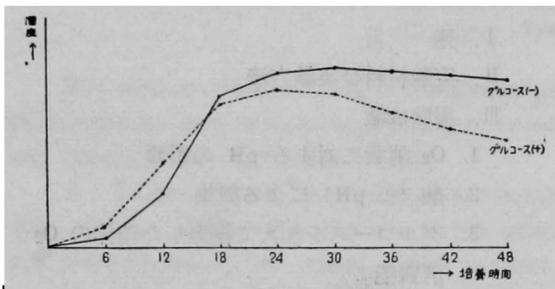
## 1. 発育途次のグルコースの分解

本実験に先立ち菌の発育に対するグルコースの影響を見るため、プイオンを基礎培地とし、これにグルコースを M/100 となる様添加したもの、及び無

添加のもの（対照）を 50 cc 容コルベンに 40 cc ずつ分注し、普通寒天18時間培養菌の生理的食塩水浮游液（10 mg/cc）から一白金耳ずつ接種して 37°C で静置して培養し、6時間毎にその一部をとつて比濁し、發育曲線を作成した。

結果は原型菌の場合を第1図に示した如くであり、

第1図 菌の發育に対するグルコースの影響  
（静置培養）  
（原型菌）



対照培地では培養6時間目頃から發育曲線は立ち上つて log phase に入り、18時間目頃から増殖は衰え、24時間目頃から、いわゆる stationary phase となるものと見做される。

これに対し、グルコース添加培地では發育曲線の立上りは対照培地に於けるよりも早く、6時間目、12時間目頃の菌濁度（發育度）は対照培地よりも大であるが、發育は早く停止し、18時間目頃以後はむしろ發育は不良となり、且つ30時間頃以後菌濁度の減少即ち菌の死滅は対照培地よりも著しい傾向が見られた。

他の菌に於いても図示は省略したが同様の成績であつた。

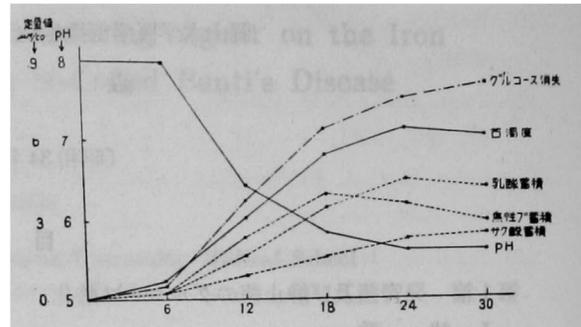
これらはコレラ菌が低 pH に弱く、グルコースの分解による pH 低下のためと推定される。

そこで菌の増殖にともなうグルコース分解並びに pH の変動を見た。即ち前記実験と同様にグルコース M/100 添加ブイオンに菌を接種し 37°C で静置して培養し、6時間毎にその一部を取り出し、グルコース消失量、分解産物としての焦性ブドウ酸、乳酸、サク酸の蓄積量及び pH を測定した。

結果は第2図に示す如くであり、原型菌では培地グルコースの消失量は大体菌の發育と平行して居り、6時間目頃から急激に増大し、20~24時間目頃から消失速度は衰えた。

pH の低下も亦、菌の發育度、グルコース消失と平行的であり、6時間頃頃から急激に低下し12時間目

第2図 發育途次のグルコースの分解  
（静置培養）  
（原型菌）



には約 pH 6.3、16時間目には pH 5.7、24時間目には pH 5.6 附近となり、以後は殆んど一定値となつた。

分解産物蓄積量も6時間目頃から急激に増大し、焦性ブドウ酸は18時間目頃を頂点として以後かなり急激に減少し、乳酸は24時間目頃を頂点として徐々に減少し、サク酸は6時間目頃から徐々に増大の傾向を辿つた。

他の菌についてもほぼ同様の傾向が認められ、三供試菌につき培養18時間目の定量値を表示すると、第1表の如くである。

第1表 發育途次のグルコース分解に於ける量的関係（静置培養18時間）

菌	グルコース消失 μM/cc	分解産物蓄積 μM/cc		
		焦性ブドウ酸	乳酸	サク酸
原型菌	6.3	3.9	3.4	2.5
中間型菌	7.8	3.7	3.0	2.6
異型菌	6.0	4.8	4.0	2.0

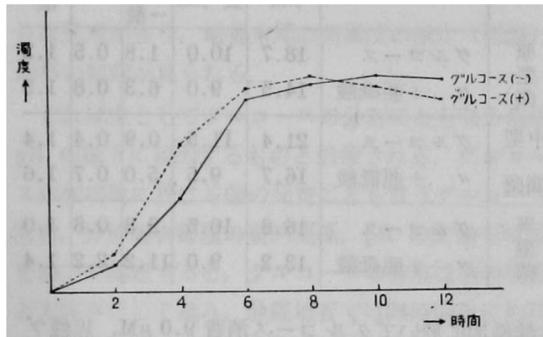
原型菌ではグルコース消失 6.3 μM に対し焦性ブドウ酸、乳酸、サク酸蓄積は夫々 3.9, 3.4, 2.5 μM となり、グルコース 1 M 当りの C<sub>3</sub> 化合物（焦性ブドウ酸、乳酸）蓄積量の合計は 1 M を僅かに上廻り、中間型菌ではグルコース消失 1 M 当りの焦性ブドウ酸、乳酸蓄積量の合計は 1 M に僅かに足りない。

異型ではグルコース消失 6.0 μM に対し焦性ブドウ酸、乳酸、サク酸蓄積は夫々 4.8, 4.0, 2.0 μM となつて、グルコース消失 1 M 当りの焦性ブドウ酸、乳酸蓄積量の合計は 1 M をかなり上廻り 1.5 M 程度であつた。

次に振盪培養した場合について検討する。

前実験と同様ブイオンに M/100 グルコースを加えた培地を 100 cc 容コルペンに 60 cc づつ分注した菌を接種し 37°C で振盪し (1 分間80回の割), 2 時間毎に取出して比濁して発育曲線を作成し, 又グルコース消失量, 焦性ブドー酸, 乳酸, サク酸, などの分解産物蓄積量並びに pH の測定を行った. 発育曲線は原型菌について第 3 図に示す如く, G

第 3 図 菌の発育に対するグルコースの影響 (振盪培養) (原 型 菌)

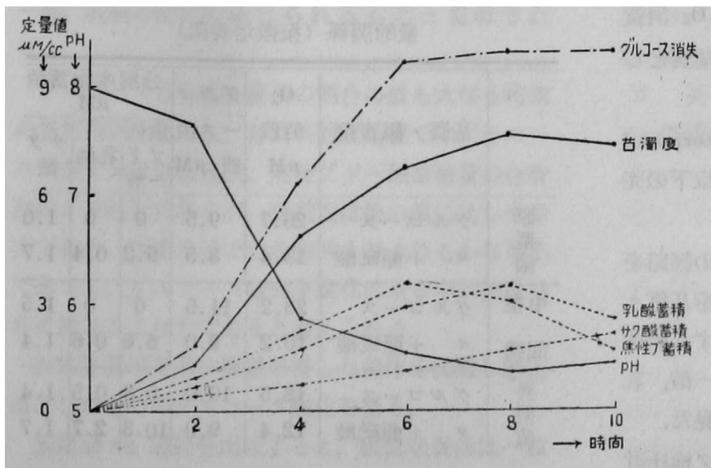


ルコース添加培地, 無添加培地共に静置培養に比し, 増殖は極めて早く 2 時間目頃から曲線は急激に立上り, 6 時間目頃より増殖は緩徐となつて stationary phase に入ると見做された.

而してグルコース添加培地では対照培地に比しやや培養初期の増殖速度は大であるが, 最高発育度は大差なく, 又菌の死滅はやや早いようである.

グルコース分解に於ける量的関係について見ると第 4 図の如くであり, グルコース消失は菌の発育と大体平行し, 2 時間目頃より急激に増大し, 6 時間目頃には培地グルコースは殆んど消失しつくされた.

第 4 図 発育途次のグルコースの分解 (振盪培養) (原 型 菌)



pH 低下もそれと平行的であり 2 時間目頃より急激に低下し 6 時間目には pH 5.5 附近となり, 8 時間頃よりやや上昇する傾向が見られた.

分解産物蓄積は 6 時間目頃迄漸次増大し, それ以後は焦性ブドー酸, 乳酸蓄積は減少する傾向にあり, 8 時間目頃より pH がやや上昇の傾向を示すことと一致している.

他菌でも図表は省略したが類似の傾向であつた.

各菌の培養 6 時間目のグルコース分解の量的関係を表示すると第 2 表の如くであり, 原型菌ではグル

第 2 表 発育途次のグルコース分解に於ける量的関係 (振盪培養 4 時間)

菌	グルコース消失 $\mu\text{M}/\text{cc}$	分解産物蓄積 $\mu\text{M}/\text{cc}$		
		焦性ブドー酸	乳酸	サク酸
原型菌	6.4	2.2	1.7	0.9
中間型菌	6.7	2.8	1.4	1.0
異型菌	6.2	3.0	2.1	1.2

コース消失  $6.4 \mu\text{M}$  に対し, 焦性ブドー酸, 乳酸, サク酸蓄積は夫々 2.2, 1.7,  $0.9 \mu\text{M}$  でグルコース消失 1 M 当りの焦性ブドー酸, 乳酸蓄積量は 1 M にはるかに及ばず, 中間型菌でも同様であり, 静置培養では分解産物蓄積の割合の比較的大な異型菌でも, グルコース消失 1 M 当りの焦性ブドー酸, 乳酸蓄積量の合計は 1 M に及ばなかつた.

## 2. 静止菌のグルコース酸化

次に静置培養及び振盪培養した菌を集菌洗滌後, 静止菌として, それらのグルコース酸化について 2, 3 検討を加えた.

コレラ菌はグルコース加培地に発育した菌は酵素活性が著しく低下するので, 培地はブイオンとしてグルコースを加えないで用い, 静置培養は 18 時間, 振盪培養は 6 時間 37°C で培養した菌体を使用した.

尚コレラ菌は endogenous respiration が高く実験に不便であるため, 集菌, 洗滌後緩衝液に浮遊して 0.5 時間 37°C で振盪して消耗し endogenous respiration を低下せしめて用いることとした.

先づグルコース, グルコン酸, リボース, 乳酸, 焦性ブドー酸, サク酸を基質 (M/100) とした  $\text{O}_2$  消費量 (1 時間値) を比較すると第 3 ~ 第 5 表の如く

第3表 静置及び振盪培養菌の O<sub>2</sub> 消費  
原型菌 O<sub>2</sub> 消費  $\mu$ l, 1hr.

	静置培養菌	振盪培養菌
—	68	40
グルコース	163	187
グルコン酸	80	158
リボース	85	68
乳酸	185	204
焦性ブドウ酸	118	195
サク酸	142	211

第4表 静置及び振盪培養菌の O<sub>2</sub> 消費  
中間型菌 O<sub>2</sub> 消費  $\mu$ l, 1hr.

	静置培養菌	振盪培養菌
—	79	67
グルコース	177	185
グルコン酸	92	134
リボース	90	77
乳酸	250	294
焦性ブドウ酸	118	223
サク酸	138	178

第5表 静置及び振盪培養菌の O<sub>2</sub> 消費  
異型菌 O<sub>2</sub> 消費  $\mu$ l, 1hr.

	静置培養菌	振盪培養菌
—	48	40
グルコース	157	183
グルコン酸	50	105
リボース	67	66
乳酸	172	227
焦性ブドウ酸	87	190
サク酸	90	168

であり、各菌共に振盪培養した菌は一般に O<sub>2</sub> 消費が大であり、特に焦性ブドウ酸、サク酸を基質とした O<sub>2</sub> 消費が大となつていた。

従つて振盪培養では末端物質の酸化 (terminal respiration) が活発であり、焦性ブドウ酸以下の完全酸化が円滑であると推定される。

次に各菌のグルコース→焦性ブドウ酸間の経路を比較するため、静止菌浮游液にグルコースを基質として加え、更に焦性ブドウ酸の酸化を阻害する亜硫酸を添加してグルコース消費量、焦性ブドウ酸、乳酸、サク酸などの分解産物蓄積量の関係を見た。

亜硫酸は 10<sup>-3</sup> M となるようワールブルグ検圧計

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分後に測室よりグルコース (M/100) を混入して1時間振盪した。

尚菌量は前実験の2倍即ち 80 mg/cup とした。静置培養では第6表の如くであり、原型菌では亜

第6表 静止菌のグルコース酸化に於ける量的関係 (静置培養菌)

菌	基質・阻害剤	O <sub>2</sub> 消費 $\mu$ M	グルコース消費 $\mu$ M	分解産物蓄積 $\mu$ M		
				焦性ブドウ酸	乳酸	サク酸
原型菌	グルコース	18.7	10.0	1.8	0.5	1.2
	" + 亜硫酸	14.5	9.0	6.3	0.8	1.5
中間菌	グルコース	21.4	11.5	0.9	0.4	1.4
	" + 亜硫酸	16.7	9.5	5.0	0.7	1.6
異型菌	グルコース	16.8	10.5	3.8	0.8	1.0
	" + 亜硫酸	13.2	9.0	11.2	2.2	1.4

硫酸添加に於いてグルコース消費 9.0  $\mu$ M、焦性ブドウ酸、乳酸、サク酸蓄積量は夫々 6.3, 0.8, 1.5  $\mu$ M でありグルコース消費 1 M 当り、焦性ブドウ酸、乳酸蓄積量の合計は、1 M にはるかに及ばず、中間型菌でも同様であるが、異型菌ではグルコース消費 9.0  $\mu$ M、焦性ブドウ酸、乳酸、サク酸蓄積は夫々 11.2, 2.2, 1.4  $\mu$ M となり、グルコース 1 M 当り焦性ブドウ酸、乳酸蓄積量の合計は 1 M をかなり上廻つた。

振盪培養菌では第7表の如く原型菌、中間型菌、では亜硫酸添加では、グルコース消費 1 M 当りの焦性ブドウ酸、乳酸蓄積はやはり 1 M に及ばず、異型菌ではグルコース 1 M よりの焦性ブドウ酸、乳酸蓄

第7表 静止菌のグルコース酸化に於ける量的関係 (振盪培養菌)

菌	基質・阻害剤	O <sub>2</sub> 消費 $\mu$ M	グルコース消費 $\mu$ M	分解産物蓄積 $\mu$ M		
				焦性ブドウ酸	乳酸	サク酸
原型菌	グルコース	20.7	9.5	0	0	1.0
	" + 亜硫酸	13.4	8.5	5.2	0.4	1.7
中間菌	グルコース	23.2	11.5	0	0	1.5
	" + 亜硫酸	10.2	9.0	5.6	0.6	1.4
異型菌	グルコース	18.5	10.0	0.8	0.5	1.4
	" + 亜硫酸	12.4	9.0	10.3	2.7	1.7

積量の和は1 M以上となつて静置培養菌の所見と大差なかつた。

#### IV. 総括及び考案

コレラ菌原型、中間型、異型の3菌を供試菌としてグルコースの酸化を検討した。

先づ菌の発育に対するグルコースの影響について見ると、一般細菌ではグルコース添加により発育が著しく促進されるのが常であるが、コレラ菌では影響は少なく、培養初期ではグルコース添加により発育はやや促進されるが、後期ではむしろ対照培地よりは発育が劣り、培養末期の菌濁度の減少(死滅)が早い傾向が見られる。

これは主としてグルコースの分解にともなう培地 pH の低下に起因するものと想像される。グルコース添加培地に於ける菌の発育にともなうグルコース消費、分解産物蓄積の量的関係、pH の変動を時間を追つて測定すると、グルコースの分解は菌の増殖と大体平行して進み、静置培養では24時間後に約75%、振盪培養では6~8時間後に殆んど100%の消失が認められ、培地 pH もグルコースの分解にともなつて低下し、静置培養では18~24時間後、振盪培養では6~8時間後には pH 5.5 附近迄低下するが、それ以後はやや上昇する傾向が見られる。

又分解産物としての焦性ブドウ酸の蓄積は静置培養では6~18時間、振盪培養では2~6時間の間で急激に増大し、それ以後はむしろ減少し、乳酸蓄積はややおくれて最大値に達し、それ以後はやはり漸次減少する。サク酸蓄積は培養時間と共に漸次増大する傾向が見られる。

従つてグルコースは log phase に於いて急激に分解されて主として焦性ブドウ酸、乳酸となり、それ以後はグルコース分解はやや衰えるが、焦性ブドウ酸、乳酸の酸化は続けられるものと見做される。

グルコース分解産物蓄積の割合の最も大なる時期の量的関係を見ると、各菌共静置培養ではグルコース消費1 Mに対し乳酸、焦性ブドウ酸蓄積量の合計は約1 M附近であるが、異型菌は他の菌に比しやや大であり、振盪培養では各菌共1 Mよりもかなり小であつて、グルコースは完全酸化に至る率が静置培養に於けるより大であると考えられる。

次に静置培養及び振盪培養した菌体を洗滌し静止菌としたもののグルコース酸化を見る。

基質別 O<sub>2</sub> 消費を比較すると、振盪培養菌は一般

に O<sub>2</sub> 消費量が大きであり、特に乳酸、焦性ブドウ酸、サク酸などいわゆる末端物質の完全酸化が円滑である傾向がうかがわれる。

各菌のグルコース酸化に於ける量的関係を見ると、静置培養菌は振盪培養菌に比しグルコース消費量に対する焦性ブドウ酸蓄積の割合がやや大であるが、亜硫酸添加に於いては共にかなりの焦性ブドウ酸を蓄積し、原型菌、中間型菌ではグルコース消費1 Mに対し、焦性ブドウ酸、乳酸蓄積の合計は1 Mに足らず、異型菌では1 M以上となる。

従つて異型菌は他の2菌とはグルコース→焦性ブドウ酸間の経路がやや異なるのではないかと考えられ、又静置培養菌、振盪培養菌間には、焦性ブドウ酸以下の完全酸化が振盪培養菌の方がやや円滑であるという以外にはグルコース→焦性ブドウ酸間の経路には大差ないようである。

#### V. 結 言

コレラ菌原型菌(稲葉株)、中間型菌(彦島株)、異型菌(小川株)を供試菌として、発育途次のグルコースの分解、及び静止菌のグルコース酸化に於ける量的関係を検討して次の結果を得た。

1. ペプトンを主体とした液体培地にグルコースを加えると、菌の発育は培養初期にはやや良好となるが、培養時間と共に発育が不良となり、死滅も早くなる。これはグルコースの分解にともなう pH 低下によると考えられる。

2. グルコースの分解産物としては焦性ブドウ酸、乳酸が多く、静置培養では振盪培養に於けるよりはるかに多い。

3. 静止菌に於いても、振盪培養菌は静置培養のものに比し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が円滑であると見なされるが、グルコース→焦性ブドウ酸間の経路には差がないものと考えられる。

4. 異型菌は他の2菌に比しグルコース→焦性ブドウ酸間の経路が異なるのではないかと推定される。

## 第 2 篇 グルコースを加えて振盪した静止菌の酵素活性

## I. 緒 言

コレラ菌は発育に於いて高 pH を好み、酸性側で弱いとされている。

一方静止菌浮游液にグルコースを加えて振盪すると、グルコースの分解にともなう酸産生のため pH が低下し、特に酵素に接近した部分では著しい低下が起るものと想像され、この低下は菌体酵素活性に何らかの影響を与えるものではないかと考えられる。

事実菌液にグルコースを加えて振盪した後遠沈、洗滌した菌体の酵素活性は著しく減弱している。

そこで本篇ではグルコースを基質とした  $O_2$  消費に対する pH の影響、菌液にグルコースを加えて振盪した場合の pH の変動及びこれにともなう酵素活性の変化などについて検討した。

## II. 実験材料及び実験方法

供試菌： コレラ菌原型菌稻葉株、中間型菌彦島株、異型菌小川株の教室保存のもの。

静止菌浮游液の調製： 前篇同様集菌洗滌した菌体を磷酸緩衝液 (pH 7.0, 0.85% NaCl 加) に浮游した。

$O_2$  消費量の測定： ワールブルグ検圧計を用い常法に従った。

基質は何れも市販品を水にとかし、pH を修正して使用した。

pH の測定： pH メーターによつた。

## III. 実験成績

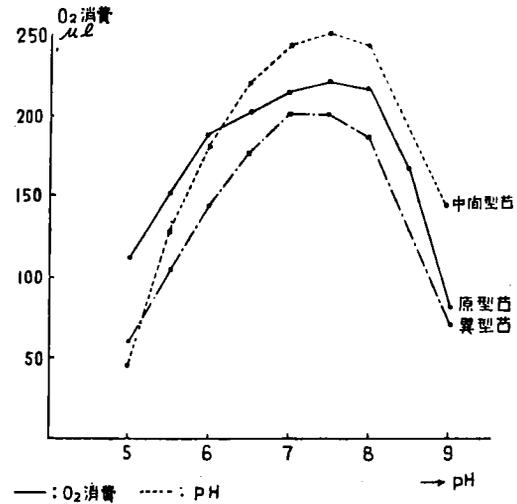
1.  $O_2$  消費に対する pH の影響

コレラ菌はグルコースを基質として著明な  $O_2$  消費を示すが、その  $O_2$  消費に対する反応媒質の pH の影響を見た。

$O_2$  消費量測定はワールブルグ検圧計を用い、菌量は各菌共湿菌量 40 mg/cup とし、37°C で1時間測定した。グルコースは M/100 となるようにした。

結果は第 5 図に示す如く、各菌共に  $O_2$  消費の最大の pH は 7~8 附近にあり、その両側では急激に  $O_2$  消費は低下している。

而して原型菌は酸性側に於ける  $O_2$  消費の低下は比較的ゆるやかであり、次いで異型菌で、中間型菌

第 5 図  $O_2$  消費と pH の関係  
基質グルコース

は最も低下が著しく、至適 pH 範囲がせまいようであつた。

又中間型菌は pH 5.5~5.0 で酸凝集し、他菌も pH 5.0 以下になると凝集する傾向が見られた。

## 2. 酸 (低 pH) による凝集性

そこで菌浮游液の pH を順次低下せしめた場合の凝集の有無を見た。即ち種々の pH の緩衝液を中試験管に 1cc ずつとり、これに 1mg/cc の菌液 (蒸留水浮游液) を 1cc ずつ混和し、よく振盪後 10 分間放置後凝集の有無を agglutinoscope によつて観察した (+, -等の符号を以て表示した)。

第 8 表に示した如く、原型菌は pH 4.5 で僅か

第 8 表 各菌の酸凝集性

	原 型	中 間 型	異 型
9.0	-	-	-
8.5	-	-	-
8.0	-	-	-
7.5	-	-	-
7.0	-	-	-
6.5	-	-	-
6.0	-	-	-
5.5	-	±	-
5.0	-	+	±
4.5	±	+	±
4.0	+	+	+

に凝集が見られ、4.0では明らかに凝集し、中間型菌ではpH 5.5で僅かに、それ以下で明らかに、異型菌ではpH 5.0~4.5で僅かに以下明らかに凝集が認められた。

以上の如くコレラ菌は一般に酸による凝集性が大きく、特に中間型は著しかった。

3. グルコースを加えて振盪した菌体のO<sub>2</sub>消費能。

一般に菌浮游液にグルコースを加えて振盪すると媒質のpHは漸次低下する。

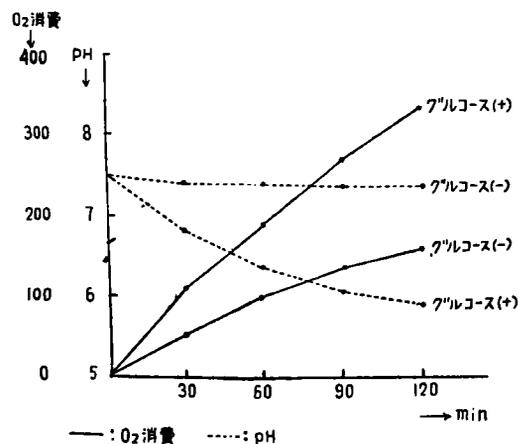
従つて酸に比較的弱いコレラ菌ではこのpH低下の影響が他の菌よりも著しいのではないかと思われる。

先づ各供試菌について、グルコースの酸化にともなうpHの変動を見た。

菌液(湿菌量40mg)2.0cc, グルコース(M/100となるように)0.3cc, 緩衝液0.7ccをワールブルグ検圧計容器に入れて37°Cで振盪し、30分毎に2時間迄O<sub>2</sub>消費量、及びpHを測定した。従つて各4本のマンオメーターを用い、30分毎にその1本づつをとつて測定に供した。又菌は培地より集菌、洗滌直後のものを用い、起始pH 7.5とした。

原型菌では第6図の如くであり、グルコースを基

第6図 グルコース酸化にともなうpHの変動 (原型菌)

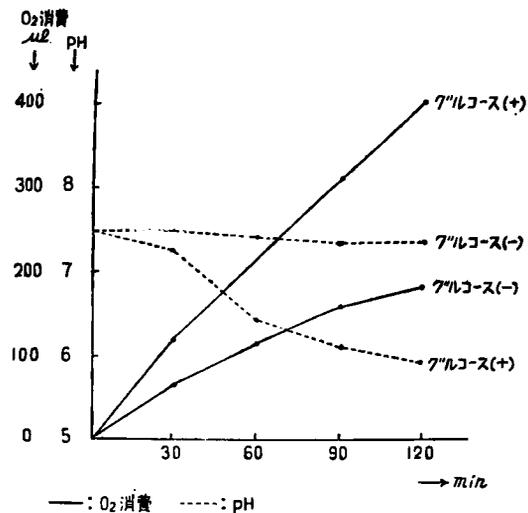


質とした場合はpHは漸次低下し、30分後にはpH 6.8, 60分後には6.3, 90分後には6.1となり、それ以後は低下がやや緩徐となつて120分後には5.9となつた。

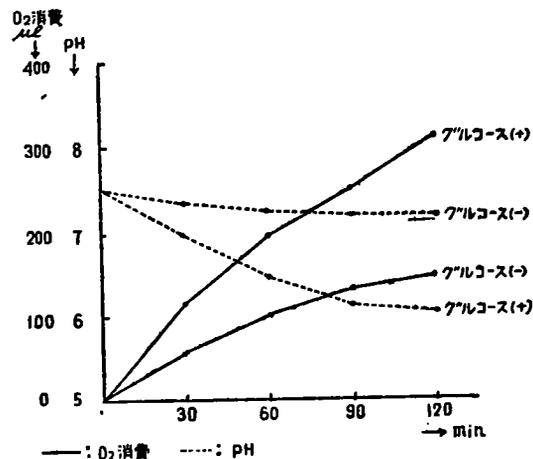
グルコース無添加(対照)の場合はpH低下は極めて微弱であつた。

他の菌でも第7, 8図の通り同様の傾向で60分pH 6.5附近, 120分pH 6.0附近迄低下した。

第7図 グルコース酸化にともなうpHの変動 (中間型菌)



第8図 グルコース酸化にともなうpHの変動 (異型菌)



このようにグルコースを加えて振盪するとpHは低下するが、この低下が菌の酵素活性に如何に影響するかを見た。

上記実験と割合を同じに、即ち菌液(湿菌量240mg)12.0cc, グルコース(M/100となるように)1.8cc, 緩衝液4.2ccを50ccコルベンに入れて1時間振盪した後、遠沈し緩衝液で1回洗滌してから、緩衝液に再浮游し、ワールブルグ検圧計容器に40mg/cupの菌量となるように入れて、グルコース、乳酸、焦性ブドウ酸、コハク酸を基質としたO<sub>2</sub>消費(1時間値)を測定した。尚対照菌としてグルコースの代りに水を加えて1時間振盪した後、全く同様に処理したものをを用いた。

結果は第9表に示す如くであり、各菌共グルコー

第9表 グルコース加振盪後の菌の O<sub>2</sub> 消費

	原型菌		中間型菌		異型菌	
	対照菌	グルコース加振盪菌	対照菌	グルコース加振盪菌	対照菌	グルコース加振盪菌
なし	54	26	67	20	48	32
グルコース	172	72	184	42	167	67
乳酸	116	54	162	31	130	45
焦性ブドウ酸	97	36	117	28	88	40
コハク酸	105	53	147	34	115	56

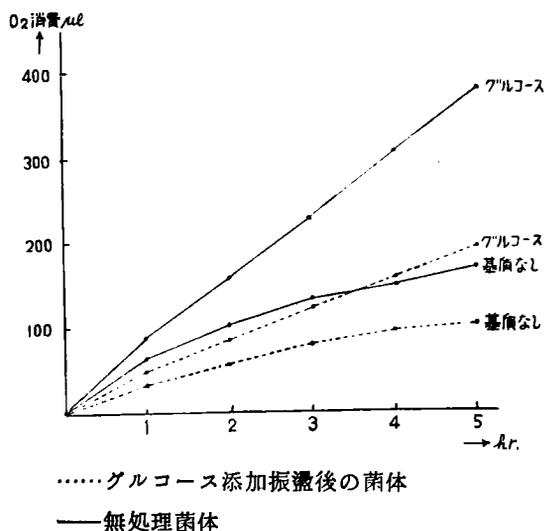
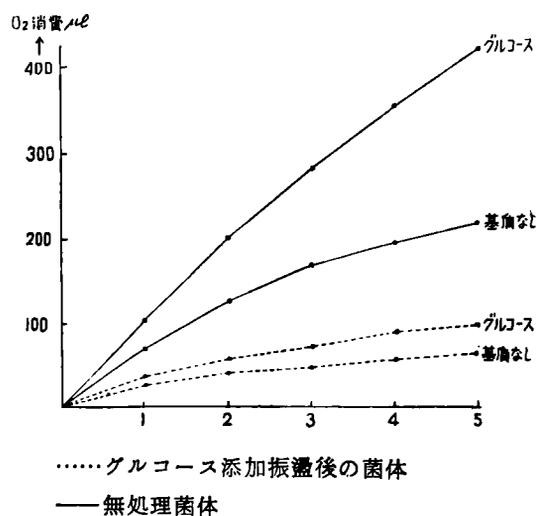
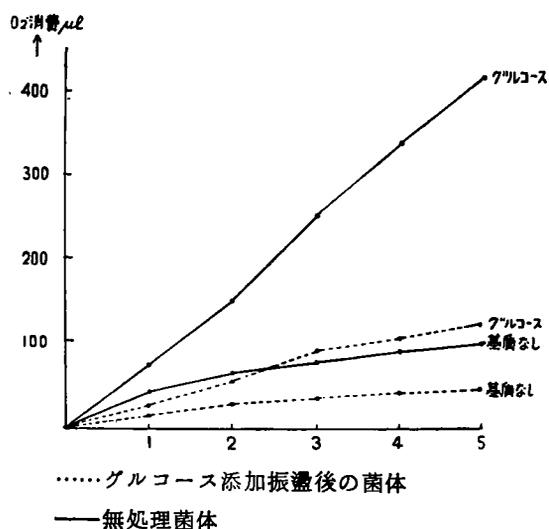
スを加えて振盪した後の菌体は酵素活性が著しく低下して居り、各基質共 O<sub>2</sub> 消費は極めて微弱であった。

特に中間型菌はこの傾向が大であり、次いで異型菌、原型菌の順であった。

この順序は pH の低下に対する抵抗性の弱い順序と一致して居り、上記酵素活性の低下がグルコースを加えて振盪した際の pH の低下に関係があるのではないかと想像される。

ところが、培地より集菌、洗滌直後の菌液（無処理菌）につきグルコースを加え長時間に亘つて O<sub>2</sub> 消費量を測定し、グルコース処理菌（グルコースを加え1時間振盪した後の菌体）のそれと比較したところ第9～11図の如くであった。尚この実験では菌量 20 mg/cup とし、グルコースは M/100、起始 pH 7.5 とした。

図の通り、グルコース処理菌では長時間の測定に於いても O<sub>2</sub> 消費の回復は見られず、これに対し

第9図 グルコース加振盪菌の O<sub>2</sub> 消費 (原型)第10図 グルコース加振盪菌の O<sub>2</sub> 消費 (中間型)第11図 グルコース加振盪菌の O<sub>2</sub> 消費 (異型)

無処理菌ではグルコースを基質とした O<sub>2</sub> 消費は長時間に亘つて減弱を認めなかつた。

そこで次の3通りの方法で処理した各菌体を用い、グルコースを基質とした O<sub>2</sub> 消費を比較した。

(1) 菌液（湿菌量 40 mg）2.0 cc にグルコースを M/100 となるように加え全量を 3.0 cc とし、37°C で1時間振盪した後、緩衝液で洗滌し、緩衝液に再浮游。

(2) 上と同様グルコースを加えて1時間振盪した後、グルコース（M/100）を加えた緩衝液で洗滌し、同じくグルコース加緩衝液に再浮游。

(3) 菌液にグルコースの代わりに水を加えて1時間振盪した後、緩衝液で洗滌し、緩衝液に再浮游（対

照菌体)

以上の各菌浮游液をワールブルグ検圧計容器に入れ (40 mg/cup), グルコースを M/100 となるよう加えて O<sub>2</sub> 消費を測定した.

尚この実験ではグルコース加緩衝液で洗滌, 再浮游する操作があるので他の基質についての O<sub>2</sub> 消費量測定は行えなかつた.

結果は第10表の通りであり, 各菌共グルコースを

第10表 グルコース加振盪菌の処理方法と O<sub>2</sub> 消費量の関係 O<sub>2</sub> 消費  $\mu$ l, 1hr.

振盪		グルコース加振盪	グルコース加振盪	添加物なしで振盪
洗滌		緩衝液で洗	グルコース加緩衝液で洗滌	緩衝液で洗
浮游		緩衝液に浮	グルコース加緩衝液に浮游	緩衝液に浮
菌・基質				
原型菌	—	23	/	42
	グルコース	77	156	187
中間菌	—	20	/	63
	グルコース	41	186	211
異型菌	—	28	/	55
	グルコース	55	162	172

加えて振盪, 緩衝液で洗滌, 再浮游した菌体の O<sub>2</sub> 消費は著しく低下しているが, グルコース加緩衝液で洗滌, 再浮游した菌体では O<sub>2</sub> 消費の低下は比較的少なく, 殆んど対照菌体に近い O<sub>2</sub> 消費を示した. 特に中間型菌ではグルコース加緩衝液を以て洗滌, 浮游せしめることにより O<sub>2</sub> 消費能低下を防止する効果は顕著に認められた.

第11表 乳酸加振盪菌の処理方法と O<sub>2</sub> 消費量の関係 O<sub>2</sub> 消費  $\mu$ l, 1hr.

振盪		乳酸加振盪	乳酸加振盪	添加物なしで振盪
洗滌		緩衝液で洗	乳酸加緩衝液で洗	緩衝液で洗
浮游		緩衝液に浮	乳酸加緩衝液に浮	緩衝液に浮
菌・基質				
原型菌	—	32	/	45
	乳酸	124	187	192
中間菌	—	57	/	60
	乳酸	147	220	226
異型菌	—	45	/	47
	乳酸	109	163	174

第12表 焦性ブドウ酸加振盪菌の処理方法と O<sub>2</sub> 消費量の関係 O<sub>2</sub> 消費  $\mu$ l, 1hr.

振盪		焦性ブドウ酸加振盪	焦性ブドウ酸加振盪	添加物なしで振盪
洗滌		緩衝液で洗	焦性ブドウ酸加緩衝液で洗	緩衝液で洗
浮游		緩衝液に浮	焦性ブドウ酸加緩衝液に浮	緩衝液に浮
菌・基質				
原型菌	—	37	/	50
	焦性ブドウ酸	105	160	167
中間菌	—	60	/	66
	焦性ブドウ酸	124	156	175
異型菌	—	51	/	48
	焦性ブドウ酸	107	132	148

次に比較のためグルコースの代りに乳酸, 或は焦性ブドウ酸を以て全く同様に処理した各菌体の夫々乳酸, 焦性ブドウ酸を基質とした O<sub>2</sub> 消費を見た.

結果は第11, 12表の如くであり, 乳酸或は焦性ブドウ酸を加えて振盪した後, 緩衝液で洗滌, 浮游したものは前述のグルコースの場合程ではないが, やはりやや O<sub>2</sub> 消費が低下して居る.

これに対し乳酸或は焦性ブドウ酸を加えた緩衝液を以て洗滌, 浮游した菌体は対照菌と殆んど同等の O<sub>2</sub> 消費を認めた.

IV. 総括及び考案

コレラ菌は酸に対して比較的抵抗性が弱いとされている.

その一つとして低 pH に於ける凝集性を見ると, 中間型菌は5.5~5.0, 原型菌, 異型菌では5.0~4.5以下の pH になると凝集するのが認められる.

一方一般に菌液にグルコースを加えて振盪するとグルコースの分解にともない pH が低下するものであり, 供試菌に於いても菌液にグルコースを加えて振盪すると反応起始 pH 7.5 のものが, 1時間で6.5附近に, 2時間で6.0附近迄 pH が低下した.

而してこの pH は反応媒質の pH 値であつて, 菌体酵素の周辺の実際の pH は更に低いものと想像される. 酸に弱いコレラ菌ではこの pH 低下が菌の酵素系に与える影響は他菌に比し特に著しいのではないかと考えられる.

実際に菌液にグルコースを加えて1時間振盪した後, 緩衝液で洗滌した菌体の各種基質に於ける O<sub>2</sub> 消費能は著しく低下して居り, 而もこの低下は中間

型に於いて最も顕著であり、次いで異型菌、原型菌の順であつて、この順序は酸凝集の起り易い順序と一致している。

ところが培地より集菌洗滌直後の菌にグルコースを加えて振盪し、長時間に亘つて  $O_2$  消費量を測定して行くと、上述の如く pH はかなり低下している筈であるのに、 $O_2$  消費は4~5時間に至つても減弱しない。

従つて酵素と基質とが結合している場合には pH が低下しても余り影響はうけず、洗滌して一度基質を取り除くと不活し易い（不安定）ものと見做される。

このことはグルコースを加えて振盪した菌体を緩衝液で洗滌する代りにグルコース加緩衝液で洗滌すると酵素活性の低下が殆んど現われないことから確かめられる。

更に比較のためグルコースの代りに乳酸或は焦性ブドウ酸を加えて振盪した後、緩衝液で洗滌した菌について見ると、この場合にはグルコースの場合と異り pH の低下は殆んどないに拘らず、やはりやや活性が低下して居り、乳酸或は焦性ブドウ酸を加えた緩衝液で洗滌すると低下は防止し得る。

従つて pH は低下しなくても一旦酵素と結合し反応をいとないだ後、基質を取り除くと、次に同じ基質を加えても活性は若干衰えて居り、pH が低下して居ればこの低下が更に著しいと考えられる。

グルコースの場合にはこの二つの原因が重複して酵素活性の低下が顕著となるものと推定される。

## V. 結 言

コレラ菌原型菌（稻葉株）、中間型菌（彦島株）、異型菌（小川株）を供試菌とし、静止菌浮游液にグルコースを添加して振盪した後の菌体の酵素活性を  $O_2$  消費量を指標として検討して次の結果を得た。

1. グルコースを加えて振盪した後、一旦洗滌し、再び緩衝液に浮游した菌体は  $O_2$  消費量が著しく小さい。これはグルコースの分解により pH が低下し、菌体酵素の不活化を来したためと推定される。

2. グルコースを加えたまま長時間振盪しても酵素活性の低下は見られず、又この菌をグルコース加緩衝液で洗滌すると殆んど低下を来さない。従つて酵素がグルコースなどの基質と結合して居る間は pH が低下しても比較的安定であり、一旦基質を取り除くと不活化し易いものと考えられる。

終りに臨み、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) Roster, J. W.: *Bact. Rev.*, 11, 167 (1947).
- 2) Gunsalus, I. C., Horecker, B. L. & Wood, W. A.: *Bact. Rev.*, 19, 89 (1955).
- 3) Dickens, F.: *Biochem. J.*, 32, 1626 (1938).
- 4) Dickens, F. & Glock, G. E.: *Nature*, 166, 33 (1950).
- 5) Scott, D. B. M. & Cohen, S. S.: *J. Biol. Chem.*, 188, 509 (1951).
- 6) Horecher, B. L. & Smygrnotis, P. Z.: *Arch. Biochem.*, 29, 232 (1950).
- 7) Entner, N. & Stanier, R. Y.: *J. Bact.*, 62, 181 (1951).
- 8) 増尾他・酵素化学シンポジウム, 8集, 105 (1953).
- 9) Stokes, F. N. & Campbell, J. J.: *Arch. Biochem.*, 30, 121 (1951).
- 10) 標準生化学実験: 18
- 11) 標準生化学実験: 36
- 12) 標準生化学実験: 35
- 13) Umbreit et al.: *Manometric Techniques*
- 14) 戸田・戸田細菌学

## Oxidation of Glucose by *Vibrio Cholera*

By

Masamori MORI

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

### Part I. Oxidation of Glucose by Growing and Resting Cells

Using the 3 strains of *Vibrio cholera*, original strain (INABA's strain), intermediate variant strain (HIKOZIMA's strain) and variant strain (OGAWA's strain), the author carried out the study on the oxidation of glucose by growing cells and stoichiometry of the glucose oxidation by the resting cells. The following results were obtained.

1) By an addition of glucose to the liquid media of which main constituent was peptone, a fair acceleration of cell growth was observed at the early stage of culture. But the growth tended to decrease and the cells became to die fairly early stage with time of culture. This was supposedly due to the decrease of pH of media resulting from oxidation of glucose.

2) On the growing cells pyruvate and lactate were accumulated in fairly large amount as metabolite of glucose. A large amount of accumulated metabolite was also found on organism cultured by shaking.

3) Further oxidation of glucose beyond pyruvate was carried out more smoothly on the resting cells of shaking cultured organism than on the resting cells of still-standing cultured organism. And there was no difference on the oxidation pathway of glucose on resting cells by either cultures, shaking or still-standing.

4) The oxidation pathway of glucose up to pyruvate was supposedly somewhat different on the variant strain compared with other 2 strains.

### Part II Enzyme Activity of Resting Cells Shaken with Glucose

Using the 3 strains of *vibrio cholera* as in the previous paper, part I, the author studied the enzyme activity of resting cells that were previously shaken with addition of glucose into its cell suspension. The enzyme activity was evaluated by measurement of O<sub>2</sub> uptake with conventional Wardurg technique. The following results were obtained.

1) It was found a marked decrease of O<sub>2</sub> uptake on the resting cells, which were previously shaken with addition of glucose, washed and resuspended into buffer solution. This fact supposed to be due to the inactivation of enzyme system of the cells resulting from decrease of pH by glucose oxidation.

2) A prolonged shaking of the cells with glucose did not render an inactivation of enzyme system at all. Also no inactivation was found on the cell shaken as above and washed with glucose added buffer. Hence, it could be postulated that the enzyme activity was kept fairly stable even in a low pH solution so far as the enzyme was present with substrate like glucose, and that the activity tended to be lost as substrate was taken off.

---