

高圧の細菌に及ぼす影響に就いて

第二篇 細菌の酵素作用に及ぼす高圧の影響

指導 村上 栄教授

指導 林 香苗教授

岡山大学医学部細菌学教室

市 橋 大

〔昭和28年12月24日受稿〕

第一章 緒 言

既に第一篇に於て hydrostatic pressure がチフス菌の発育並びに増殖、運動性等諸生活現象に対して著明な阻害を与へる事を立証した。本篇に於ては細菌の生活機能と密接な関連を有する種々の酵素作用に及ぼす高圧の影響に就き実験的研究を行った。

細胞の原形質を分析すれば蛋白質、リポイド、多糖類のやうな高分子化合物を得るが、生きた原形質内では之等の物質は蛋白質同志結合したり、リポプロテイド、ポリサツカロプロテイドなど更に大きい分子を作り互に種々の程度の強さで可変的に結合していると考へられている。而して斯る構造のいろいろの部分に低分子の物質やイオンが結合或は集合しているであろう。亦ポリペプチド鎖自身の形も周囲の影響により変化すると考へられる。酵素はそう云ふ原形質の構成分の一部である。而して細菌の細胞内の酵素も亦例外ではない。此の酵素の作用が種々の物質やイオンの存否、増減、蛋白其の他の物質との結合、吸着、分離などにより影響される事は既に知られている。而して原形質の構造が複雑であればある程、酵素の働きも種々の制約を受けるわけで単離抽出された酵素の作用とは自ら異なる所以である。私は菌体内の斯る複雑な機構の下に於ける酵素作用を観察の対象とし、それが高圧の影響を蒙つて如何なる変化を示し、且それが細菌の生活機能と如何なる有機的関連を有するかを追求せんとして若干の

実験を行った。本篇に於ては特に細菌の呼吸酵素、脱水素酵素及びカタラーゼ作用に就いて検索した。

第二章 細菌呼吸酵素に及ぼす影響

生細胞の酸素呼吸に与かる酵素にはチトクローム及びチトクローム酸化酵素 (Warburg Keilin 系) とその補酵素の外、脱水素酵素並にカタラーゼ等があるが後者は夫々単独に研究する方法があるので後章に譲り茲では主として生細胞の酸素呼吸に於て基質と酸素との最終連鎖としてその主役を演ずると考へられるチトクローム及びチトクローム酸化酵素の作用を観察するに最も適切な方法である Warburg の検圧計を応用して細菌の酸素呼吸が高圧の影響を如何に蒙るかを検討した。

I 実験方法並に基礎実験

供試菌。普通桿菌、球菌、芽胞菌等計15株を用ひ、特定の実験を除き常に普通寒天平板培地に 37°C 18 時間培養した菌を用ひ、食塩磷酸緩衝液にて洗滌後 resting bacteria として実験に供した。緩衝液の組成は $\frac{M}{2}$ NaHPO₄ 8.5c.c., $\frac{M}{2}$ KH₂PO₄ 1.5c.c., 0.9% NaCl 240c.c. とし、pH 7.4 である。

加圧方法。第一篇に於て詳述した。

酸素消費測定。Warburg の検圧計を用ひ、対照菌と加圧菌の酸素消費量を測定した。容器内の各容量は次に示す通りである。

主室 菌液 2c.c. (生鮮重量 4mg)
 側室 A, 基質 0.5c.c. (最終濃度 $\frac{1}{100}$ Mol)
 側室 B, 緩衝液 0.5c.c.
 副室, 10% KOH
 ガス腔, 空気
 測定温度 37.5°C 振動数 112~120回/分
 定法により恒温槽に入れて15分間振盪, 温度と気圧とが平衡を保つてから活栓を閉じ側室 A, B の内容を主室内に混入した時を実験開始時として以後 10 分或は 15 分毎に酵素消費量を目盛で読み特定の場合を除き 180 分続けた。

基礎実験 1. 使用せる油の作用を検討するために油を重層したものとしなないものの酸素消費量を比較したが差異を認めなかつた。実験に際しては念のため対照菌液にも同じ油を同じ時間だけ重層して用ひた。

基礎実験 2. 加圧の際菌浮游液の濃度によつて差異を生ずるか否かに就いて実験を行つた結果 2mg/c.c. 及び 10mg/c.c. の濃度に於て圧を加へた後, 同一濃度にして酸素消費を比較した結果両者の差は誤差範囲を出ない。

即ち hydrostatic pressure であるから濃度差を考慮する要はない。

基礎実験 3. 同一実験に於て 2 本以上のマンメータを一つの材料に用ひたがその平均誤差は 5% 以内に留まつた。

II. 実験成績

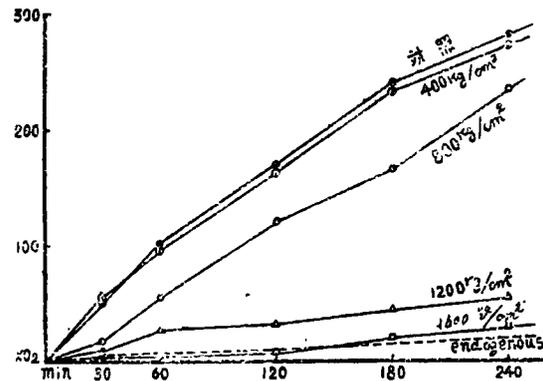
1. 高圧による呼吸阻害度.

何程の圧力を加へる事によつて細菌の呼吸阻害が見られるかといふ点に就いて葡萄糖及びアスパラギン酸を基質として酸素消費量の測定を行ひ, 次の結果を得た。

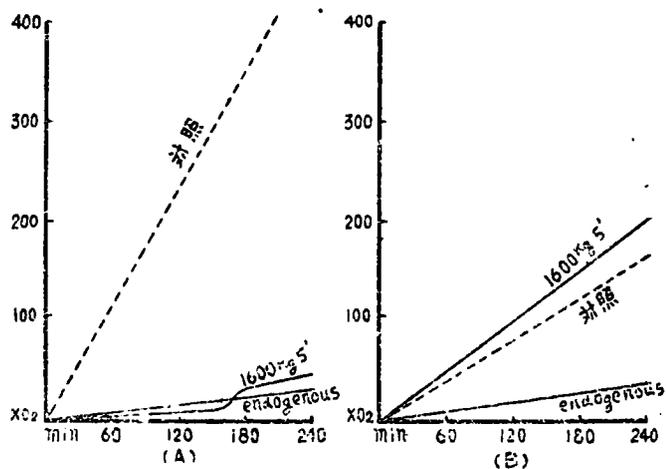
圧の高さ: 加圧時間を 30 分に一定する場合チフス菌では 600 kg/cm² の圧迄は酸素消費量の減少を認めないが 800 kg/cm² に至り相当の減少を認める。1200 kg/cm² になると急激なる減少を呈し, 1400 kg/cm² で殆ど酸

素消費を示さなくなる。(第 1 図)。葡萄状球菌では之に反し, 1600 kg/cm² 迄圧を高めても酸素消費量の減少を示さず却つて若干の増加を認めた。(第 2 図右)

第 1 図 細菌呼吸に及ぼす高圧の影響
 圧の高さとチフス菌の酸素消費量
 チフス菌 4mg (生鮮重量)
 加圧時間 30 分



第 2 図 細菌呼吸に及ぼす高圧の影響
 酸素消費量の比較 加圧 1600 kg/cm²
 A. チフス菌 4mg B. 葡萄球菌 4mg 基質グルコース

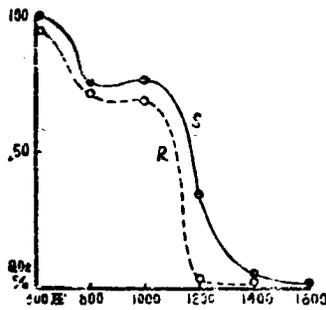
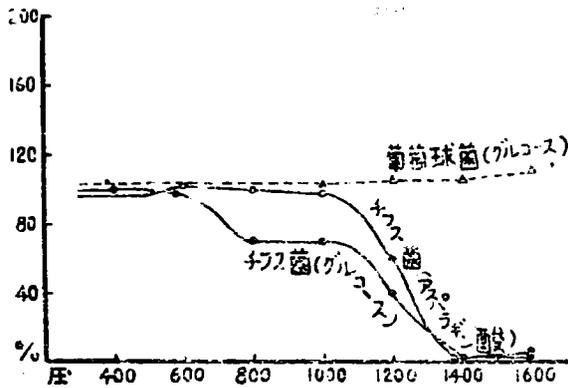


加圧時間: チフス菌では 800 kg/cm² の圧でも 10 分以内の加圧では殆ど影響を認めない。1600 kg/cm² の圧では僅か 1 分間の加圧によつて顕著な抑制を受ける。5 分間の加圧では除圧後初めの 2 時間は酸素の消費は零で, endogenous respiration の値より低いが振盪後 2~3 時間で次第に酸素呼吸を始め内呼吸を超えて酸素消費量を増加するが振盪後 6 時間に至るも対照と同程度迄は増加しない (第 2 図左)

基質の差: 同一実験に於て基質の種類例へば葡萄糖とアスパラギン酸との間に差異を

生ずる事は注目すべき事実である。即ち1200 kg/cm² の加圧では両者は略同様の抑制を受けるが、800kg/cm² の圧では葡萄糖の場合が遙かに抑制度は大である。(第3図)

第3図 細菌呼吸の阻害度 対照の QO₂ を 100 とす 加圧 30 分間



第4図
チフス菌 S 型, R 型
の酸素消費量
基質 $\frac{1}{100}$ M
グルコース

2. 菌種菌株並に菌型による差異.

細菌の菌種, 菌株並に菌型の高圧に対する抵抗力の差異が有るか否かを検する為に第1表に見られる如き各種の菌を選び実験に供した. 1600kg/cm² 30分の加圧によつて蒙る呼吸の阻害度即ち酸素消費量の減少の率を比較すれば表の如くなる. 数字は QO₂ (cmm) 即ち菌 1mg が 60 分間に消費する酸素の量を示す 之によるとチフス菌大腸菌は阻害度最も大で 100%, 次でパラチフス A 菌赤痢菌が 70~80% の阻害を受け, パラチフス B 菌, 肺炎桿菌等は比較的抵抗が強い. 葡萄状球菌と肺炎双球菌は全く抑制されず, 却つて促進される傾向を示し, 馬鈴薯菌(有芽胞)は促進が著明である. 菌株の間ではチフス菌の 57 株及 58 株の間に差を認めないが大腸菌では coli communis が 100% 阻害されるに対し, coli communior は僅かに 16% しか阻害されない. 葡萄球菌でも寺島株と F, D, A 株の間に差を認める事が出来る. S 型菌と R 型菌の間では R 型の方が抵抗は弱く, S 型は 1400kg/cm² 30 分で酸素消費が停止するが R 型はそれより低く 1200kg/cm² 30 分で殆ど停止する。(第4図)

第1表 高压の各種細菌に対する呼吸阻害度
(数字は QO₂(cmm) を示す) 1600kg/cm² 30分

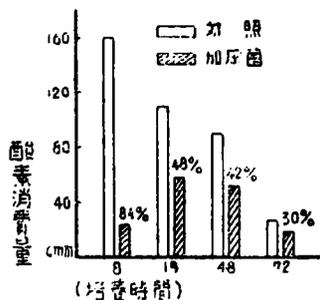
菌種 (株)	基質 グルコース			基質 アスパラギン酸		
	対照	被圧	阻害度	対照	被圧	阻害度
S. typhi (57S)	116.0	0	100%	67.0	0	100%
S. typhi (57R)	110.0	0	100.0	83.0	0	100.0
S. typhi (58S)	108.0	0	100.0	59.0	0	100.0
S. paratyphi (A)	115.0	34.4	70.2	41.0	21.0	48.8
S. paratyphi (B)	135.5	96.0	29.3	122.5	73.5	40.0
B. coli (communis)	137.0	0	100.0	67.0	0	100.0
B. coli (communior)	131.0	109.5	16.5	208.0	130.5	37.0
B. Pyocyaneus (教)	18.0	0	100.0	221.0	0	100.0
B. Pyocyaneus (分)	35.0	0	100.0	138.0	0	100.0
B. Dysenteriae (駒BⅢ)	70.0	14.0	81.0			
B. Pneumoniae F.	41.0	36.0	12.0	39.5	34.0	13.0
B. Mesentericus	13.0	28.5	(-120.0)	25.5	32.5	(-27.0)
Pneumococcus I	28.0	28.0	0			
Staphylococcus aureus (寺島)	65.5	71.5	(-9.0)	35.0	36.0	(-1.0)
Staphylococcus aureus (F. D. A)	21.1	29.6	(-24.8)			

馬鈴薯菌が加圧により酸素消費量の増加を示す点は特に留意すべきで、芽胞を有する菌は圧に対して抵抗性を有する許りでなく、その新陳代謝を却つて高める場合があると考へられる。

3. 菌齢による差異

細菌呼吸の高圧による阻害或は抑制が細菌の培養時間即ち菌齢によつて異なる事は対数増殖期にある幼若菌は種々の生活機能が充進状態にあると考へられる事からも予測される所である。一般に酸素消費量は培養時間の短いもの程多い。而して16時間乃至24時間の培養のものは略一定の酸素消費を示し、48時間になると相当減少を示す。普通寒天平板培地に夫々8時間、18時間、48時間及び72時間培養した菌に就いて400kg/cm²乃至1200kg/cm²の圧を5分及び30分間加圧した後酸素消費量を測定した。比較のため、各培養時間の対照のQ_{O₂}を1とし、酸素消費量の減少を百分比で示すと、800kg/cm²の圧迄は著明な差異を認めないが1200kg/cm²の圧では加圧5分にして幼若菌は著明な呼吸の抑制を示す。即ち培養8時間の菌は培養18時間の成熟菌に比べ短時間内の加圧で影響を蒙り易い。之に対し培養時間の長いもの程影響は少なく、72時間培養のものは800kg/cm²30分の加圧でも殆ど酸素消費の減少を示さない。(第5図)

第5図
菌齢との関係
(チフス菌)
数字は加圧による呼吸阻害率を示す



4. 水素イオン濃度及び滲透圧との関係、加圧の際の条件として菌浮游液の種類によつても差異を生ずる事は前篇に於て予測して置いた。菌浮游液の性状として特に取上げる必要のあるのは水素イオン濃度及び滲透圧との関係である。

水素イオン濃度：チフス菌の生理的食塩水浮游菌液を一規定のHCl及びNaOHで種々pHを異にしたものを作り対照と被圧菌に分けて、加圧後遠心沈澱によつて対照と同時に洗滌し、再びpH7.4の緩衝液に浮游せしめて基質葡萄糖により酸素消費量を測定した。単にpHの異なる液に浸すだけでは洗滌して観察すれば著明な変化は受けないと云つてよい。例へばpH4.5の液に30分間浸しても僅かに10~20%の酸素消費の減少を示す過ぎない。

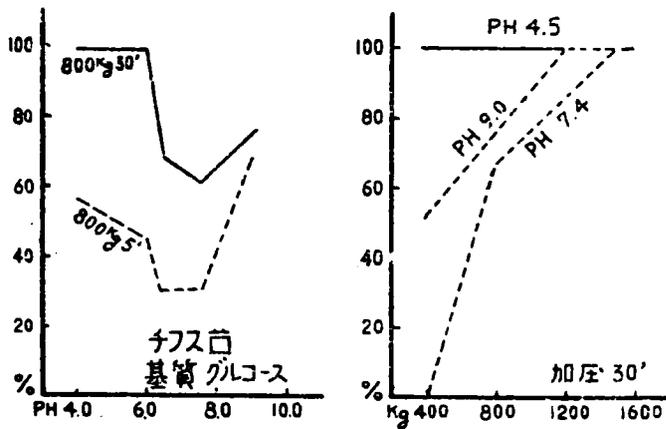
対照のQ_{O₂}を標準とし高圧による呼吸阻害の程度を百分比で表はすと第6図の如くなる。即ち(1)pHが酸性側にある場合高圧による呼吸の抑制は大である。400kg/cm²5分の加圧で30%、30分の加圧で100%の阻害を示している。(2)pHがアルカリ側にある場合、阻害はpH7.4の場合に比して大差を認めない。又酸性側では加圧時間が長い程阻害されるがアルカリ側では5分と30分の加圧の場合差を認め難い。

滲透圧：菌浮游液のpHを7.4に一定し、食塩水濃度を0~5%迄変えて前述の如く、対照と加圧菌液を作り滲透圧の差による変化を追求した結果第7図の如き成績を示した。尚食塩水濃度を変えるだけでは30分以内ならば洗滌して生理的食塩水に再浮游せしめれば、そのQ_{O₂}には殆ど影響しない。表示してあるのは対照のQ_{O₂}を標準とした場合の阻害度を百分比で比較したものである。(1)低張液即ち滲透圧小なる場合には加圧による阻害度は大である。蒸溜水の場合が最も大で400kg/cm²30分で相当の酸素消費抑制を示している。(2)等張液(0.85%NaCl)並に高張液の場合には阻害度は比較的小であり、食塩濃度5%の場合には0.85%の場合より更に阻害は小となる。即ち高張液になる程高圧に対し保護的に作用する事が考へられる。

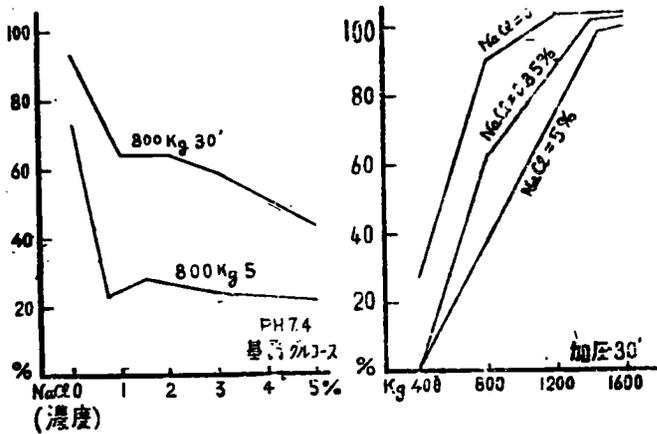
5. 酵素の遊離及び恢復に就いて。

高圧が菌体に加へられ次で急に除かれた時、菌体内部にある酵素その他の物質が菌体外に遊離するか否か又斯る操作を加へた後に振盪

第6図 細菌呼吸に及ぼす高圧の影響(2)
高圧とpHの関係(呼吸阻害率)



第7図 細菌呼吸に及ぼす高圧の影響(3)
滲透圧と高圧の関係(呼吸阻害率)



する場合酵素の振出が容易になるかといふ疑点、更には加圧によつて蒙つた傷害から菌が恢復するか否かを酵素作用の面から観察し得るかといふ諸点を本章で取上げて見たい。

酵素の遊離：充分洗滌したチフス菌の磷酸緩衝液 10mg/cc 濃度の菌液を作り之に 1600kg/cm² 30 分の加圧を行ひ、10000 r. p. m 10 分の遠心沈澱で完全に菌を沈澱させ上清を取つて葡萄糖を基質として酸素の消費を測定した結果、2 時間の振盪で僅かに 3 cmm 程度で、之は対照と同様の値である。次に同様に処理した菌液を約 3 時間 37°C の恒温槽中で振盪した後遠沈して得た上清によつて酸素消費量を検すると、加圧菌に於て対照よりも特に酸素消費が増加する事実は認め難い。従つて加圧により酵素が遊離し又は遊離し易くなるといふ事は考へられない。

酵素作用の恢復：既に前篇固有運動の観察の項で一部の菌に加圧によつて停止していた運動性を恢復する現象を認めて詳述した。呼吸に於ても斯る恢復の現象を認め得るかどうかと云ふ問題であるが、前掲の第 2 図左に於て見られる様に、1600kg/cm² 5 分の加圧の場合チフス菌では酸素消費は初め内呼吸よりも少ないが、2 乃至 3 時間の振盪で次第に消費量は増加する。この現象は 1200kg/cm² 5 分では更に著明である。注意すべき事は加圧時間が長いと此の現象は認めないか又は見別け難い。従つて加圧時間の短かい時のみ呼吸の恢復といふ現象を観察する事が出来る。

III 小 括

以上の実験を要約すれば次の如くである。

(1) 細菌の呼吸は高圧によつて抑制乃至阻害を受け或は反対に促進される場合もある。

(2) 普通桿菌の大部分は 800kg/cm²

以上 1600kg/cm²迄 30 分間の加圧で大なり小なり抑制を受ける。之に反し球菌は 1600 kg/cm² の圧では抑制を認めず却つて促進される傾向を有し、芽胞を有する馬鈴薯菌では促進傾向は著明である。

(3) 同一菌種でも株又は型によつて圧に対する抵抗性を異にする。

(4) 菌齡の若いもの程呼吸阻害度は大である。

(5) 加圧時の pH 及び滲透圧によつても異なり、アルカリ側よりは酸性側、又高張液よりは低張液中に於て加圧の作用は大である。

(6) 加圧によつて菌体酵素が遊離し又は振盪によつて遊離し易くなる事はない。

(7) 短時間の加圧の場合には除圧後時間の経過と共に呼吸を恢復する現象を認めた。

第三章 脱水素酵素作用に及ぼす影響

前章に於て細菌の呼吸酵素 (Warburg-Keilin 系) の作用が高圧によつて抑制乃至影響を蒙る事実を種々の実験によつて確めたのであるが、生体の呼吸に参与する重要なもう一つの酵素系である脱水素酵素も亦影響を受けるであろう事は推測に難くない。而して脱水素酵素作用は Thunberg 法によつて他の呼吸酵素を除外して観察し得る利点がある。この方法では脱水素酵素はその特異基質により還元され、且適当に酵化還元電位を有する可逆的酸化還元色素で再び酸化される。茲ではメチレン青が還元されてメチレン白になる時間 (褪色時間) を測定する事によつて酵素作用を観察した。

I 実験方法

供試菌としてチフス菌 (S57 S) 及び葡萄

球菌 (寺島株) を用ひ各々18時間培養のものを生理的食塩水で2回遠沈洗滌し、可及的被酸化物を除く目的で60分間通気を行つた後2mg/ccの浮游液とした。基質は1/10 Mol濃度として用ひ、Sørensenにより1/15 Mol 磷酸緩衝液のpH 7.2を用ひて反応を緩衝した。H型Thunberg管の主脚に菌液1.0c.c., 緩衝液1.0c.c., 副脚に基質1.0c.c.及びMerck製メチレン青溶液1/5000 Molを0.5c.c.入れ、対照と加圧菌を一本づゝ計2本を気密に連結し同時に吸引ポンプで7mmHgとなる迄吸引し(5分間)、次で38°C恒温槽内に2分間放置後主脚及び副脚を混合してより完全脱色迄の時間を測定した。

II 実験成績

(1) 第2表に示した如く、チフス菌では各基質を通じて400kg/cm²5分加圧により明らかにメチレン青脱色時間の延長を認める。圧

第2表 高圧の脱水素酵素作用に及ぼす影響 (メチレン青還元時間)

チ フ ス 菌	Donater	30'		5'				対 照
		1600kg		1600kg	1200kg	800 kg	400 kg	
	Glucose	120' 脱色せず		41' 00"	24' 00"	12' 00"	13' 30"	7' 30"
	Aspartic acid	"		54' 00"	26' 30"	14' 30"	12' 00"	9' 00"
	Lactic acid	"		38' 00"	31' 00"	12' 30"	9' 30"	7' 00"
	Formic acid	"		64' 00"	37' 30"	32' 00"	13' 00"	12' 30"

葡 萄 球 菌	Donater	30'		5'				対 照
		1600kg	400kg	1600kg	1200kg	800kg	400kg	
	Glucose	24' 00"	15' 00"	18' 30"	21' 00"	20' 00"	19' 00"	19' 30"
	Maltose	30' 00"	11' 00"	11' 30"	10' 00"	12' 00"	11' 00"	11' 30"
	Lactic acid	17' 00"	9' 00"	8' 30"	7' 30"	8' 00"	7' 30"	8' 00"
	Formic acid	38' 00"	9' 30"	7' 30"	8' 30"	7' 00"	9' 00"	9' 30"

が高くなると更に著明に延長する。1600 kg/cm² 30分の加圧では120分後でも完全には脱色しない。

(2) 短時間の加圧又は比較的低い圧の場合には脱色の開始迄が遅延するが、開始より完了迄の時間は対照と殆ど変らない。之はメチレン青の段階的稀釈液を対照にとり比較する事によつて確め得た。

(3) 葡萄状球菌では1600kg/cm² 30分加圧

の場合のみ脱色時間の延長を認めるが5分の加圧では変化ないか又は僅かに促進される場合があり、基質によつて多少の差異を認めた。例へば乳酸は促進傾向が明らかであるが、他の基質は不定である。

III 小 括

以上の実験を要約すると、(1) H型Thunberg管を用ひ対照と加圧菌液の二本を連結し、同

時に吸引して真空状態を等しくする事によつて実験誤差を僅微のものとする事が出来た。
 (2) 脱水素酵素作用の抑制乃至阻害は 400 kg/cm^2 5分の加圧より認める事が出来た。之は前章呼吸の場合に比し、相当の差異があるが、酵素の抵抗性といふよりはむしろ実験方法の差に基くと解する方が妥当であろう。此の点に就いては更に後章で述べる事にする。
 (3) 葡萄球菌は低い圧又は短時間の加圧ではむしろ促進の傾向を認めるが 1600 kg/cm^2 30分の加圧になると脱水素酵素作用は抑制を受ける。

第四章 カタラーゼ作用に及ぼす影響

好気性生物に於ては分子状酸素を水素受容体として働く脱水素酵素の作用により過酸化水素が生成されるが、カタラーゼの生理的意義はこの H_2O_2 を分解し酵素と水になす事にあると考へられていたが、Keilin等の研究によるとカタラーゼは脱水素酵素の作用により生じた H_2O_2 に働き、恰もペルオキシダーゼの如く、他の物質の酸化を促進する作用を有する事が判つた。即ちカタラーゼも又生体酸化に一役をかつているのである。従つて細菌酵素作用の一つとしてカタラーゼ作用に及ぼす高压の影響を追求する事によつて本篇に於て企図する所を更に補足したい。細菌カタラーゼの研究は外国の文献を待つまでもなく、本邦に於て多数の業績が残されているので其等を参考にしつゝ、細菌カタラーゼの外家兎赤血球カタラーゼ及び牛肝抽出カタラーゼの作用を比較しながら高压の作用を検討した。

I 実験方法

カタラーゼ作用測定：藤田秋治氏の方法に従ひ、細菌カタラーゼが過酸化水素水を分解して発生する酸素量を Warburg の検圧法により測定した。容器内各容量は次の通りである。

- 主室 酵素液 1.0cc (菌, 家兎血球抽出カタラーゼ) 及び緩衝液 1.5cc
- 副室 10% KOH 0.5cc
- 側室 再溜過酸化水素水 0.06M 0.5cc

緩衝液組成

0.154 M	NaCl	950cc
0.154 M	NaH_2PO_4	7.5cc
0.11 M	Na_2HPO_4	42.5cc
0.154 M	NaHCO_3	2.0cc

測定温度は 37.5°C 振盪回数 120/分 測定時間は30分間である。

家兎赤血球浮游液：家兎心血 5cc を採取し、生理的食塩水で3回遠沈洗滌し、沈澱の最上層の白色不透明の薄層(白血球)をピペットにより除去し赤血球のみを得て適宜稀釈する。

抽出精製カタラーゼ：牛肝臓を磨碎した後水を加へて攪拌振盪し麻袋を用ひて搾り、汁液を濾過した後にアルコールによつて除蛋白を施し、更にアルコール、及びクロロホルムを加へて残存せる蛋白質とヘモグロビンを除去す。斯くして得た粗製カタラーゼ液より中性磷酸カルシウムによつて吸着物を除き次で1%の Na_2HPO_4 水溶液に入れて溶離した液を低温にして透析し精製カタラーゼ液を作る。

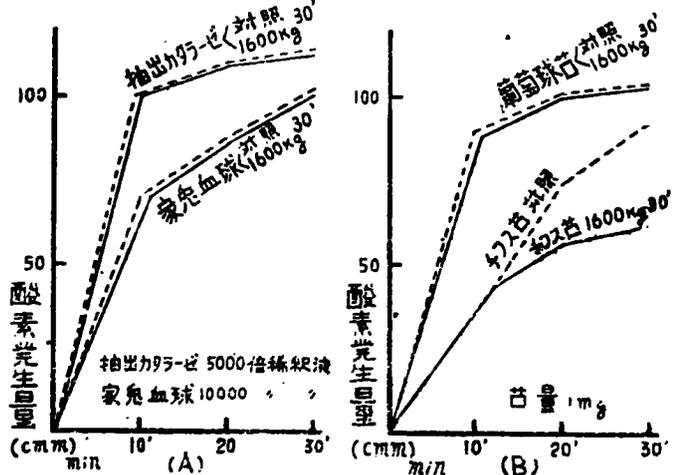
II 実験成績

1. 細菌カタラーゼ

チフス菌では 1600 kg/cm^2 30分の加圧により対照に比べて約30%の酸素発生量の減少を認めた。(第8図) 併し 1200 kg/cm^2 以下の

第8図 カタラーゼ作用に及ぼす高压の影響
 酸素発生量の比較

- A. 牛肝抽出カタラーゼ及家兎赤血球カタラーゼ
- B. 細菌カタラーゼ



圧では殆ど影響を認めない。他の桿菌でも同様の結果を示したが、葡萄球菌では 1600 kg/cm^2 30 分の加圧によつてカタラーゼ作用に全く影響しない。

2. 家兎赤血球カタラーゼ

1600 kg/cm^2 30 分の加圧によつても血球カタラーゼによる酸素発生量は対照と全く変わらない。(第 8 図)。

3. 牛肝抽出カタラーゼ

1600 kg/cm^2 30 分の加圧によつて何等の変化を認めなかつた。(第 8 図)

III 小 括

以上を要約すると Warburg 検圧法によつて細菌、家兎赤血球並に抽出精製カタラーゼの作用に及ぼす高圧の影響を検討した結果、細菌カタラーゼのうちチフス菌等一部桿菌のカタラーゼ作用が抑制又は阻害されるのを認めた以外には、球菌、家兎赤血球、並に牛肝抽出カタラーゼのいづれも全く影響を蒙らないことを確めた。之によりカタラーゼ作用が細菌の形状や細胞膜の透過性又は菌の生活機能の障碍の程度と密接な関連を有する事を予測し得る。又単離された酵素そのものは此の程度の圧では変化を受けないと考へられる。

第五章 考 按

酵素作用に対する高圧の影響に就いては生理学の領域に於て若干の研究が為されている外、細菌学領域では文献的に極めて僅かの報告があるのみである。即ち E. Büchner は 1897 に酵母に圧を加へてチマーゼを分離しているが H. Büchner は之を一般細菌に応用して失敗している。Certes (1889) は $300 \sim 500$ 気圧の下では細菌の腐敗作用及び酵母の醗酵作用のいづれも阻害しないと報告した。Chlopin 及び Tamman (1904) によれば 3000 kg/cm^2 の圧を 96 時間に互り加圧する事によつて酵母の醗酵作用を阻害する事を報じている。更に近年に至り米国の Johnson 一派の発光菌に関する一連の研究によつて海底に棲む或種の菌の Metabolism が相当の圧力に抵抗

を有するのみでなく、適度の圧の場合には却つて促進される傾向のある事を発見している。其の外、Johnson, Kautsmann, Genser 等 (1948) による invertase, Fraser, Johnson (1951) によるトリブシンの作用に及ぼす高圧の影響に就いての研究があるが之等は細菌学領域を逸脱するので茲には述べない。本篇に於て述べた細菌の呼吸酵素、脱水素酵素、カタラーゼ作用等に就いて高圧の作用を研究した文献は私の調べた範囲では見当らない。以下実験成績に関して考察を加へたい。

チフス菌は 800 kg/cm^2 30 分の加圧より呼吸の阻害が現はれるが之は比濁法によつてチフス菌増殖曲線の lag phase の延長を認めるのと軌を一にしている。亦運動を示す菌が減るのも此の程度の加圧からである。即ち此の程度の加圧により運動を停止し、呼吸を阻害され且、増殖を遅延させられる一部の菌が存在する事を示している。呼吸の抑制乃至阻害は圧の高い程、又加圧時間の長い程大となる。又基質によつても同一実験に於て酸素消費量の消長に差異を生ずる事は興味ある点である。Johnson 等は高圧の作用として蛋白の変性特に分子の容積の変化を強調している。即ち高圧により蛋白分子は球状の配列から線状の配列に変えられ、分子全体の容積が変化すると述べている。斯る変化が基質との接触を容易に或は困難にし、従つて酵素作用に影響を及ぼすものと考へられる。基質によつて多少の差があるのは、例へば、葡萄糖とアスパラギン酸とではその分子量が異なる上、構造を異にしているから酵素との接触に於ても差異を生じてよいわけである。球菌に於て概ね高圧の作用が少ないか又は促進的に働き、桿菌に於て阻害的に働くのは形態上の差異に基くと考へられるが、同一の菌種でも株を異にし、又は型を異にすると抵抗性が変るのは恐らく菌体表面構造上の差異によるものと考へられる。芽胞を有する菌が高圧に対し極めて強い抵抗を示す事は前篇に於ても述べたが、呼吸に於ては 1600 kg/cm^2 程度の圧では却つて促進的に作用するのは、その細胞膜に対し

て或種の変化を与へ、それが酵素作用を旺にするものと考へる事が出来るが詳細は尚不明である。

加圧時の Medium の pH 及び滲透圧が圧による菌の傷害に影響を及ぼす因子となる事実も呼吸の測定によつて確認された。即ち、pH ではアルカリ側に於て、亦滲透圧では高張液に於て夫々酸性側及び低張液に於けるよりも圧に対する抵抗が強い。従つて相当深い海底にも菌が棲息し得るのも斯る点より首肯される。

次に本実験に於て使用した程度の hydrostatic pressure では酵素が直接菌体外に圧出されたり、又は振盪によつて振出し易くなるといふ事実は認められないが之は菌体が完全に破壊される程には甚大な変化を蒙らないと解して良いと思ふ。

呼吸に於ても恢復の現象を一部に認めたが之は圧の高さと加圧の時間に略比例し、固有運動に於て観察された運動麻痺と相通ずるものがあり麻痺が酵素作用にも及ぶ事を推測させる。

Claude, Zobell 等は高圧が酸化還元電位にも変化を及ぼす可能性を予測しているが、Thunberg 法によるメチレン青還元時間の測定による脱水素酵素反応の実験に於て、加圧によりチフス菌の色素還元時間の遅延を認めた事は之を裏書するものである。400kg/cm² 5分の加圧で既に色素還元時間の遅延する点は呼吸酵素の場合よりも遙かに低い圧で早くも影響を蒙るかの如くであるが、注意すべき事は脱色開始迄が遅れるのみで脱色開始より完了迄の時間は対照と変らない事である。之は基質と酵素との接触が円滑に行はれず酵素が基質によつて充分飽和される迄に時間を要するのではなからうか。而して酵素作用が一旦始まると反応は遅滞なく進むものと考へられる。基質と酵素の接触が円滑充分でないといふ事は菌体表面構造の変化乃至は蛋白質の Denaturation の可能性を考へさせるものである。脱水素酵素と呼吸酵素の作用に高圧の影響の差異がある様に見えるのは前者が実験

操作容易なために後者よりも加圧後比較的短時間内に反応を調べる事が出来るために低い圧によつて軽度の傷害を蒙つた菌を恢復する前に観察し得るからであろう。従つて呼吸に於ても 400 kg/cm² 程度の圧によつて実験方法上証明し得ないが恐らく多少の影響を受けるものと考へる事が出来る。

カタラーゼ作用に関する実験も同様に菌体表面に於ける或種の変化を予想させる。何故ならば単離した牛肝抽出カタラーゼの作用が何等の変化も蒙らないのに、菌のカタラーゼ作用は可成り低減している。之は酵素としてのカタラーゼの加圧による破壊では無く、菌の表面構造の変化によつてカタラーゼと過酸化水素の接触が悪くなつた事、或はカタラーゼの作用を充分に働かせない何等かの変化が菌体に生じたと解する事が可能である。

第六章 結 論

細菌の酵素作用に及ぼす高圧の影響を夫々呼吸酵素、脱水素酵素及びカタラーゼ作用に就いて追求し次の結果を得た。

1) 細菌の呼吸は、普通桿菌の大部分のものは 800kg/cm² 以上 1600kg/cm² 迄の圧で 30 分の加圧により完全に或は一部阻害を蒙る。之に反し球菌は何等の抑制を認めず却つて多少の促進を見る。芽胞菌は促進傾向著明である。又菌株、菌型及び菌齢によつても抵抗を異にする外、加圧時の Medium の pH 及び滲透圧等の因子も無視出来ない。一部に呼吸の恢復を認めたが、加圧によつて特に酵素が遊離し易くなる様な現象は認められない。

2) 脱水素酵素作用はチフス菌では 400 kg/cm² 5分の加圧により著明な影響を蒙る。即ち色素還元時間の遅延を認める。葡萄球菌では 1600kg/cm² 30分の加圧により始めて遅延を認めるが低い圧では遅延を認めないか又は促進的である。

3) カタラーゼ作用では桿菌は 1600kg/cm² 30分の加圧で酸素発生量の減少を示すが之は呼吸の場合よりも高い圧でなければ認められない。球菌、家兎赤血球、及び牛肝抽出精製

カタラーゼでは此の程度の圧では影響を認めない。

要するに酵素作用の阻害は恐らく、酵素と基質の接触が円滑に行はれないためで之は細

菌の細胞膜の透過性の異常、或は表面構造の変化が主なる原因であると考えられる。此の点に就いては第三篇に於て明らかにしたい。
