

岡山醫學會雜誌

第 69 卷 3 号 (737 号)

昭和 32 年 3 月 31 日 発行

576.851.492-095.3

Sh. flexneri に属する菌の amino 酸代謝

第 1 篇

菌の発育と amino 酸代謝能の関係

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上栄教授)

牛 田 誠 之

[昭和 32 年 2 月 8 日受稿]

目 次

I 緒 言

II 実験材料及び実験方法

III 実験成績

1 各菌の発育に及ぼす N 源, S 源,

発育素の影響

2 静止菌による amino 酸の生成

IV 総括及び考案

V 結 論

I 緒 言

赤痢菌の発育条件, 特に発育素 (vitamine 類), 及び amino 酸の要求に就いては古くより多くの研究がなされて来た。それらによると, 赤痢菌は一般的に言つて大腸菌など最も簡単な組成の培地に発育しうる菌と, ブドウ球菌など比較的複雑な培地条件を要求する菌との中間に位するといえる¹⁾⁻⁶⁾。即ち C 源として glucose, N 源として glutamate 又は aspartate, S 源として cysteine 又は methionine を含む培地に発育し, 且つ nicotinamide を必要とするものが多いことが知られている。

これ迄の文献によれば同一菌株を用いた実験でもその成績に多少の相異点が見受けられるが, これは恐らくその菌株の継代の条件的差異に起因することが少なくないと想像される。

筆者は Sh. flexneri に属する菌の数株を供試菌とし, 先づそれらの発育に及ぼす発育素の効果, N 源の影響, S 源としての cysteine, methionine の影響, 及びこれらと各静止菌の amino 酸代謝能の関係を検討し, 次いで各静止菌による cysteine, methionine の分解様式に関する実験結果を記し御批判を仰ぐこととした。

II 実験材料及び実験方法

供試細菌: Sh. flexneri 1a (中村菌), 1b (昭和菌), 2a (駒込 B Ⅲ菌), 2b, 3a (川瀬菌), 4a (西貢菌), 5 (駒込 A 菌) の各教室保存株。

菌発育度の測定: 各培地に於ける菌の発育度を判定するに当つては, 同一組成培地に 2 代継代したものの 2 白金耳を 5.0ml の培

地に接種し、24時間後にその濁度を光電比濁計により測定し、+, ±, -の符号を以て表現することとした。-を以て表わしたものは3代継代の不能のものである。

静止菌浮游液の調製：普通寒天18時間培養の菌体を集菌後 M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加) にて2回洗滌後、同一組成の緩衝液に浮游し 37°C に1時間放置してから遠沈し、菌体を同じ緩衝液に浮游させたものを静止菌浮游液として用いた。菌量決定は光電比濁計にて測定し、標準曲線に対比して決定した。

O₂ 消費量の測定：Warburg 検圧計を用い常法⁷⁾に従った。

amino 酸の分析：amino 酸の定性は paper chromatography⁸⁾によつた。これによる定量は精度が低いため、spot の大きさよりその概略を判定するに止めた。展開剤は n-butanol, acetic acid, water (4:1:2), 或いは水飽和 phenol を適宜用い、発色は ninhydrine 反応に依つた。

III 実験成績

1 各菌の発育に及ぼす N 源, S 源, 発育素の影響。

各供試菌の発育に及ぼす amino 酸その他の影響を検討するため、

glucose	2.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.5 "
KH ₂ PO ₄	0.35 "
NaCl	2.0 "

MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.01 "
FeCl ₂ · 4H ₂ O	0.01 "
water	1.0 l

の組成の基礎培地 (pH7.0) に N 源として NH₄Cl, glutamate, 又は aspartate (各 M/50), S 源として Na₂SO₄, cysteine, 又は methionine (各 M/500) を種々の組合せて加え、更に nicotinamide (10⁻⁶M) 添加、及び無添加の場合につき各菌の発育状況を測定した。結果は第1~第3表の通りであつた。即ち、各菌共 N 源として NH₄⁺, S 源として SO₄⁻ の培地には nicotinamide の存在に於ても発育不能であつた。各菌につき N 源としての glutamate, 及び aspartate, S 源としての cysteine, 及び methionine の適否, nicotinamide の要否を要約すると第4表の通りであり、nicotinamide の要否が培地の amino 酸組成と関聯のある場合が 1a, 3a 菌に於て見受けられた。

次に多くの赤痢菌にとつて重要な発育素である nicotinamide, 及び amino 酸代謝に重要な関聯をもつ VB₆ の供試菌に対する効果を発育曲線より検討した。即ち

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.5 g
KH ₂ PO ₄	0.35 "
NaCl	2.0 "
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.01 "
FeCl ₂ · 4H ₂ O	0.01 "
glucose	2.0 "
Na-glutamate	1.0 "
cysteine	0.2 "
methionine	0.2 "

第1表 培地成分と発育度 (1)

		培地 (N 源, S 源, nicotinamide)					
		NH ₄ ⁺ SO ₄ ⁻	NH ₄ ⁺ SO ₄ ⁻ nicotinamide	NH ₄ ⁻ cysteine	NH ₄ ⁺ cysteine nicotinamide	NH ₄ ⁺ methionine	NH ₄ ⁺ methionine nicotinamide
菌 株	Sh. flexneri 1a	-	-	-	±	-	±
	" 1b	-	-	-	±	-	±
	" 2a	-	-	-	±	-	-
	" 2b	-	-	-	-	-	-
	" 3a	-	-	-	-	-	±
	" 4a	-	-	±	±	+	+
	" 5	-	-	-	-	-	±

第2表 培地成分と発育度 (2)

		培地 (N源, S源, nicotinamide)					
		aspartate SO ₄ ²⁻	aspartate SO ₄ ²⁻ nicotinamide	aspartate cysteine	aspartate cysteine nicotinamide	aspartate methionine	aspartate methionine nicotinamide
菌 株	Sh. flexneri 1 a	-	±	-	+	-	+
	" 1 b	-	-	-	+	-	+
	" 2 a	-	-	-	+	-	+
	" 2 b	-	-	-	+	-	+
	" 3 a	-	-	-	±	-	+
	" 4 a	±	±	+	+	+	+
	" 5	-	-	-	+	-	+

第3表 培地成分と発育度 (3)

		培地 (N源, S源, nicotinamide)					
		glutamate SO ₄ ²⁻	glutamate SO ₄ ²⁻ nicotinamide	glutamate cysteine	glutamate cysteine nicotinamide	glutamate methionine	glutamate methionine nicotinamide
菌 株	Sh. flexneri 1 a	-	±	-	+	+	+
	" 1 b	-	-	-	+	-	+
	" 2 a	-	-	-	+	-	±
	" 2 b	-	-	-	+	-	+
	" 3 a	-	-	-	+	+	+
	" 4 a	±	+	+	+	+	+
	" 5	-	-	-	+	-	+

第 4 表

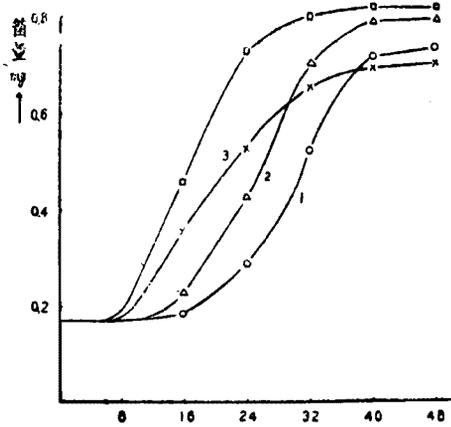
	N源として最適の amino 酸	S源として最適の amino 酸	nicotinamide の要否
Sh. flexneri 1 a	aspartate	methionine	methionine・glutamate の場合、不要、その他の場合、要
" 1 b	aspartate, glutamate	cysteine	要
" 2 a	aspartate	cysteine	要
" 2 b	glutamate	methionine, cysteine	要
" 3 a	glutamate	methionine	methionine・glutamate の場合、不要、その他の場合、要
" 4 a	aspartate, glutamate	methionine	不要
" 5	glutamate	cysteine, methionine	要

water 1.0 l

の組成の培地(pH7.0)に菌を接種し、時間を追って発育度を測定してnicotinamide(10⁻⁶M)、VB₆(10mg/l)添加の影響を見た結果第1図、第2図に示す通り、4aなどの如くnicotinamideを必要とせざる菌では、nicotinamideは発育曲線にさしたる影響を与えず、VB₆添加によつては発育の最高に達する時間が著しく短縮

されたが、最高の発育度に於ける菌量には殆んど差異が見られなかつた。これに対しnicotinamideを必要とする1b、2a、2bなどの菌ではnicotinamideが発育を支持することは当然であり、又VB₆は発育を支持しないが、VB₆、nicotinamide両者の添加に於てはnicotinamideのみの場合に比し発育の最高に達する時間の短縮が認められた。

第1図 菌の発育に対する発育素の影響 (1) (Sh. flexneri 4a)



→ incubation (hr)

- 1 : vitamine 無添加, 2 : nicotinamide,
3 : VB₆ 4 : nicotinamide + VB₆

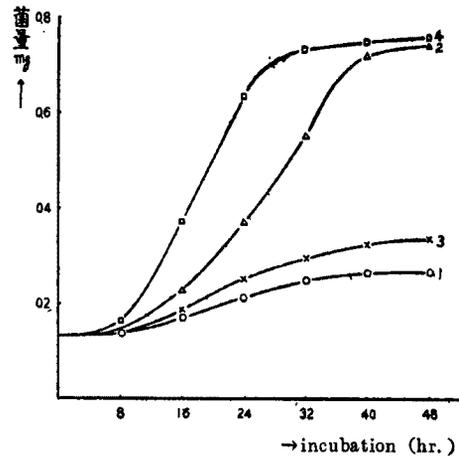
medium :	{	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.25 g
		KH ₂ PO ₄	0.035g
		NaCl	0.2 g
		glucose	0.2 g
		Na-aspartate	0.1 g
		Na-glutamate	0.1 g
		cysteine	0.02 g
		FeCl ₂ · 4H ₂ O	0.001g
		MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.01 g
		water	100 ml
	pH	7.0	

2 静止菌による amino 酸の生成

上述の実験から、菌種により発育に於ける N 源、S 源としての amino 酸の適否、及び nicotinamide の要否に差異のあることを知つた。そこで各静止菌による glutamate, aspartate の分解、並びに他の amino 酸の生成能について検討することにした。

先づ各菌につき、これら amino 酸を基質とした O₂ 消費、及びこれらの amino 酸自身の消失を、amino 酸単独添加の場合及び glucose, cysteine, 或は methionine と同時に添加した場合について測定した。結果は第 5 表に示した通りであり、一般に glutamate, aspartate を単独で添加した場合に比し glucose を同時に加えた場合には呼吸量が増大され、

第2図 菌の発育に対する発育素の影響 (2) (Sh. flexneri 1a)



→ incubation (hr.)

- 1 : vitamine 無添加, 2 : nicotinamide,
3 : VB₆ 4 : nicotinamide + VB₆

medium :	{	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.25 g
		KH ₂ PO ₄	0.035g
		NaCl	0.2 g
		glucose	0.2 g
		Na-aspartate	0.1 g
		pH	7.2,
		Na-glutamate	0.1 g
		cysteine	0.02 g
		FeCl ₂ · 4H ₂ O	0.001g
		MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.01 g
	water	100ml,	
	pH	7.0	

cysteine 又は methionine の添加により更に増大される傾向にあつた。而して glutamate, aspartate のうち各菌の発育に於いて N 源としてより適当なものの方がその静止菌により、よりよく分解される結果が得られた。又 cysteine, methionine の呼吸促進作用も発育に於てより適当な S 源となりうるものの方が大であつた。

次に各静止菌浮游液に glutamate, 又は aspartate を単独で、及び glucose, cysteine, methionine などと共に添加し 37°C, 2 時間振盪した後の medium 中の新生 amino 酸を paper chromatography により検索した結果を 1a, 2a, 2b, 3a, につき第 6 表~第 9 表に示し、他は省略したが、各菌共一般に amino 酸

第5表 静止菌による aspartate, glutamate の分解

	O ₂ 消費量 μl							aspartate 又は glutamate の消失						
	1 a	1 b	2 a	2 b	3 a	4 a	5	1 a	1 b	2 a	2 b	3 a	4 a	5
glutamate	44	57	37	63	53	74	44	±	±	±	±	±	±	±
" + glucose	146	141	141	269	194	254	199	+	+	+	+	+	+	+
" + " + cysteine	156	219	281	296	209	296	360	+	+	+	+	+	+	+
" + " + methionine	292	176	196	329	321	374	329	+	+	+	+	+	+	+
aspartate	92	29	71	31	34	56	36	±	±	±	±	±	±	±
" + glucose	296	107	276	103	106	263	144	+	+	+	+	+	+	+
" + " + cysteine	327	323	365	186	131	283	261	+	+	+	+	+	+	+
" + " + methionine	397	190	316	199	211	340	209	+	+	+	+	+	+	+
cysteine	11	26	42	24	3	20	17							
" + glucose	142	126	192	156	81	126	121							
methionine	28	5	7	33	21	28	14							
" + glucose	196	87	138	148	107	181	133							
glucose	127	72	117	86	61	108	93							

菌液 2.0 ml (湿菌量15mg)
 glucose 0.25ml (終濃度10⁻²μ)
 amino 酸 各 0.25ml (終濃度10⁻²μ) 全量 3.0ml, pH 7.0, 37°C, 2hr.

第6表 静止菌による amino 酸の生成 (1) (Sh. flexneri 1a)

	生成 amino 酸					
	aspartate	glutamate	alanine	β-alanine	valine	leucine
glucose + alanine	-	-	/	-	-	-
" + aspartate	/	±	±	-	-	-
" + glutamate	±	/	-	-	-	-
" + cysteine	-	-	-	-	-	-
" + methionine	-	±	±	-	-	-
" + aspartate + cysteine	/	±	-	-	-	-
" + " + methionine	/	+	+	±	+	±
" + glutamate + cysteine	±	/	-	-	-	-
" + " + methionine	+	/	±	+	-	-

菌液.....2.0 ml (湿菌量15mg)
 glucose.....0.25ml (終濃度10⁻²μ)
 amino 酸...各 0.25ml (終濃度10⁻²μ), 全量 3.0ml, pH 7.0, 37°C, 2hr.

単独で添加した場合には新生 amino 酸量は僅少であるが, glucose の添加により生成も大となり, 種類も増大する. この傾向は cysteine 或は methionine の添加により更に促進された. 新生 amino 酸の生成はその菌の発育にとって最も適当な N 源, S 源となりうる amino 酸の場合に最も顕著であるようであつた. 而して菌により新生 amino 酸の種類は異なるが, 一般に glutamate, aspartate, alanine

の生成される例が多く, この他, 添加基質により β-alanine, valine, leucine などの生成する場合も認められ, 2b 菌に於て glutamate より valine を大量に生成する点の特徴的であつた. 尚生成 amino 酸のうち, 菌体内に保存されるものと, 菌体外に出るもの即ち反応液中にあるものとで種類に相異があるか否かを見るため, 菌体を洗滌後磨碎して比較したが amino 酸の種類に相異は認められな

第7表 静止菌による amino 酸の生成 (2) (Sh. flexneri 2a)

		生成 amino 酸					
		aspartate	glutamate	alanine	β -alanine	valine	leucine
添 加 基 質	glucose + alanine	±	-	/	-	-	-
	" + aspartate	/	+	±	-	-	-
	" + glutamate	±	/	-	-	-	-
	" + cysteine	-	±	-	-	-	-
	" + methionine	-	-	-	-	-	-
	" + aspartate + cysteine	/	+	+	±	±	-
	" + " + methionine	/	+	±	±	-	-
	" + glutamate + cysteine + methionine	+	/	±	±	-	-

第8表 静止菌による amino 酸の生成 (3) (Sh. flexneri 2b)

		生成 amino 酸					
		aspartate	glutamate	alanine	β -alanine	valine	leucine
添 加 基 質	glucose + alanine	-	-	/	-	-	-
	" + aspartate	/	-	+	-	-	-
	" + glutamate	±	/	-	-	+	-
	" + cysteine	±	-	±	-	-	-
	" + methionine	-	-	±	-	-	-
	" + aspartate + cysteine	/	+	±	-	-	-
	" + " + methionine	/	+	±	-	±	-
	" + glutamate + cysteine + methionine	-	/	±	±	+	-

第9表 静止菌による amino 酸の生成 (4) (Sh. flexneri 3a)

		生成 amino 酸					
		aspartate	glutamate	alanine	β -alanine	valine	leucine
添 加 基 質	glucose + alanine	±	-	/	-	-	-
	" + aspartate	/	±	-	-	-	-
	" + glutamate	+	/	-	±	-	-
	" + cysteine	-	-	-	-	-	-
	" + methionine	±	-	-	-	-	-
	" + aspartate + cysteine	/	+	-	-	-	-
	" + " + methionine	/	+	+	±	-	-
	" + glutamate + cysteine + methionine	+	/	+	±	-	±

かつた。

尚、以上の如き静止菌による amino 酸生成に対する nicotinamide, VB₆ の影響をも同時に検討したところ、VB₆ は amino 酸生成を常に促進するが、生成 amino 酸の種類には変化

を与えず、又 nicotinamide は amino 酸生成には無影響であつた。

IV 総括及び考案

Sh. flexneri に属する供試菌は一般に發育

に N 源として glutamate, 又は aspartate, S 源として cysteine 又は methionine を必要とし, nicotinamide は多くの場合必要であるが, 然し 4a 菌では NH_4^+ を N 源として発育が可能であり, 且 nicotinamide はどの培地でも決定的な影響を与えず, 又 1b, 3a 菌では nicotinamide の要否はその培地中の amino 酸組成に依存し, N 源が glutamate の場合, S 源が cysteine ではその必要性が認められるが, methionine では不要である. このことは cysteine より, methionine 又は他の S 化合物の合成に何らかの形で nicotinamide が不可欠であるか, 或は nicotinamide 自身の合成に methionine が関与するのか, 何れかによるのではないかと推定され興味ある点であるが, その詳細は明らかにし得なかつた.

次に各静止菌による amino 酸の生成能を見るに, 菌浮游液に aspartate, glutamate, alanine などの amino 酸を単独で添加した場合には, 他種 amino 酸生成は殆んど認められず, 又添加 amino 酸の消失も僅かであるが, glucose との共存に於ては amino 酸自身の分解も促進され, 且つ反応液中に他種 amino 酸の生成が見られる. この生成 amino 酸は aspartate, glutamate, alanine の場合が多いが, 菌株によりその割合は種々異つている. 尚 2b 菌に於て, glutamate, glucose の共存下に valine が大量に生成されることは特異的であり, この菌の amino 酸代謝が他菌に比し相異点をもつことがうかがわれる.

上述の如き aspartate, glutamate, alanine などと glucose の共存に於ける amino 酸生成は一般に cysteine 又は methionine の添加により更に促進され, 且つ生成 amino 酸の種類も増加する. 而してこの含硫 amino 酸の効果は, 各菌の発育に及ぼすこれら amino 酸の S 源としての適否と大体平行して居り, cysteine が S 源として適する菌に於ては, amino 酸生成にも効果的であり, methionine

が適する菌に於ては, amino 酸生成に methionine の方がより貢献すると見做しうる. このことは cysteine 又は methionine の添加が菌の環境を発育しうる条件に接近せしめるため, amino 酸代謝の活潑化が起ることに依ると考えられる. 然し nicotinamide は, 発育にそれを必要とする菌に於ても, 本実験の範囲内では amino 酸生成に影響を及ぼさなかつた.

V 結 論

Sh. flexneri 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a, 5 の各教室保存株を供試菌として, 発育に及ぼす N 源としての aspartate, glutamate, S 源としての cysteine, methionine の影響を検討し, 更にそれら静止菌による amino 酸の生成能を比較して次の結果を得た.

1 これらの菌は一般に N 源として aspartate, 又は glutamate, S 源として cysteine 又は methionine を必要とし, 且つ nicotinamide を要求するものが多い. 然し 4a 菌のみは NH_4^+ を N 源となし得, 且つ nicotinamide は発育に於ける不可欠因子ではなく, 又 1a, 3a 菌では glutamate-cysteine 培地の場合は nicotinamide を必要とするが, glutamate-methionine 培地では不要である.

2 aspartate, glutamate, alanine などを単独で静止菌に与えても他種 amino 酸の生成は僅かであるが, glucose と共に添加すると amino 酸生成量は著明に増大する. この際の生成 amino 酸は aspartate, glutamate, alanine の場合が多く, 2b 菌に於ては特異的に valine の生成が顕著である. この amino 酸生成能は cysteine 又は methionine を追加することにより更に促進され, 且つ各菌に於て S 源として発育に適当なものの方が促進効果はより大である.

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) Koser, S. A., Dorfman, A., and Saunders,

F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 38, 311

- (1938)
- 2) Koser, S. A., and Saunders, F.: *Bact. Rev.*, **2**, 99 (1938)
- 3) Dorfman, A., Koser, S. A., Reames, H. R., Swingle, K. F., and Saunder, F.: *J. Inf. Dis.*, **55**, 163 (1939)
- 4) 鶴岡正夫: *医学と生物学*, **10**, 292 (1947)
- 5) 福見秀雄, 大村桂子, 砂川澄子: *医学と生物学*, **12**, 412 (1948)
- 6) Mizuno, D., and Kosaka, S.: *Japan. Med. J.*, **3**, 99 (1950)
- 7) Umbreit, W. W. et al.: *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, (1949)
- 8) 佐竹一夫: *クロマトグラフ*, 共立社, 91 (1952)

Amino Acid Metabolism of *Sh. flexneri*

I. Relation between Growth and Amino-acid Metabolism

By

Seishi Ushida

Department of Bacteriology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. S. Murakami)

This experiment was conducted to examine the effect of aspartate and glutamate as N source and cysteine and methionine as S source for the growth of some strains belonging to *Sh. flexneri*, and the ability of amino acids syntheses by the resting cells of each strain. Thus the following results were obtained.

1. These organisms generally need aspartate or glutamate as N source and cysteine or methionine as S source, and many of them require nicotinamide. It is interesting that in each strain belonging to *Sh. flexneri* 1a, 3a, when growth medium is glutamate-cysteine system the organisms require nicotinamide, but when glutamate-methionine system, they do not require it.

2. If each of amino acids, such as aspartate, glutamate, alanine, is added to resting cells suspension independently, the formation of the other kinds of amino acids is little, but if each of them is added with glucose, the formation is great. At this time formed amino acids are mostly aspartate, glutamate and alanine, but to form valine from glutamate and glucose with a strain in *Sh. flex.* 2b is peculiar. The above mentioned synthetic reaction of amino acids is remarkably accelerated by the addition of cysteine and methionine.