

2種細菌の代謝に於ける相互作用に就て

第 2 編

acetoin の生成に於ける相互作用

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 教授)

岡山大学医学部歯科学教室 (指導: 前今川教授
渡辺教授)

横 原 兼 久

〔昭和32年3月25日受稿〕

目 次

緒 言

第1章 実験材料及び実験方法

第2章 実験成績

第1節 各種基質に於ける acetoin の
生成と pH との関係に就て第2節 基質 glucose に於ける pyru-
vate, acetoin の生成に就て

i) 静止菌

ii) 上清と静止菌

iii) 発育中に於ける菌

第3節 基質 pyruvate に於ける ace-

toin の生成に就て

第4節 基質 glucose に於ける pyru-
vate, acetoin の生成に及ぼ
す阻害剤の影響に就て第5節 基質 pyruvate に於ける pyru-
vate 消費並びに acetoin の
生成に及ぼす阻害剤の影響に
就て

第3章 総括及び考按

結 論

文 献

緒 言

著者は前編に於て、2種細菌の相互作用の一端を代謝の面より追求せんとし、先づ呼吸の測定を行つた所、基質 glucose に於て最も酸素消費が促進されかつ相互作用のある事が解つた。更に RQ の測定を行つた所、大腸菌と白色葡萄球菌、エロゲーネス菌と白色葡萄球菌では RQ の上昇 (協力作用)、大腸菌と黄色葡萄球菌では RQ の低下 (抑制作用)、エロゲーネス菌と黄色葡萄球菌では相互作用のない事が認められたので、同時に acetoin の測定を行つた所 RQ の場合と同様の結果を得た。次で各種阻害剤を用い呼吸に及ぼす影響を調べた所、 NaN_3 に於て最も酸素消費が促進されかつ RQ に於ても相互作用が認められた。そこで著者は本編に於て2種細菌の相互作用を代謝産物である acetoin 生成に就て実験を行つた。翻つて acetoin の生成機

構に関しては古くより知見があり、その研究は主としてYeast 及び Pig heart に就て行われた。Yeast に就ては Neuberger and Hirsch (1921)¹⁾, Neuberger and Ohle (1922)²⁾, Gross and Werkman (1947)³⁾ の報告があり、動物組織に就ては Green et al (1942)⁴⁾, Stotz et al (1944)⁵⁾, Berg and Westerfeld (1944)⁶⁾, 赤堀等 (1951)⁷⁾, 山村等 (1953)⁸⁾ の報告があり、又植物組織では Tomiyasu (1937)⁹⁾, Singer and Pensky (1951)¹⁰⁾ の報告がある。微生物による acetoin の生成に関しては数年前より新しい興味もたれ始め、Rowatt (1951)¹¹⁾, Nossal (1951~1952)¹¹⁾, Moat and Lichstein (1953)¹³⁾, 片桐 (1954)¹⁴⁾ は乳酸菌に就て、Dolin and Gunsalus (1951)¹⁵⁾ は連鎖球菌に就て、Watt and Krampitz (1947)¹⁶⁾ は葡萄球菌に就て、Silverman and Werkman (1941)¹⁷⁾, Juni (1950~1952)¹⁸⁾, Happold

and Spencer (1952)¹⁹⁾, Gale (1953)²⁰⁾ はエロゲーネス菌に就て報告している。

著者は大腸菌, エロゲーネス菌を用い之れに白色葡萄球菌及び黄色葡萄球菌を組合せ, acetoin の生成に於ける相互作用に就て実験を行い興味ある知見を得たので報告する。

第1章 実験材料及び実験方法

供試菌： 教室保存の大腸菌 (communis), 白色葡萄球菌, 黄色葡萄球菌で 37°C, 18時間普通寒天平板培地に培養したものを用いた。即ち静止菌浮遊液としては前回と同様 1/50M 磷酸緩衝液 (0.85% 食塩加, pH 7.2) で2回洗滌し, 同緩衝液に浮遊させ大腸菌及びエロゲーネス菌は全量 10 mg, 白色及び黄色葡萄球菌は全量 30 mg の濃度のものを用いた。菌の発育中に於ける相互作用の検討は合成培地(蒸溜水 1000 cc に Na₂HPO₄ 2.5, KHPO₄ 0.35, NaCl 1.0, MgSO₄ 0.01, FeSO₄ 0.001, glucose 1.0, pepton 1.0 を溶解したもの) を滅菌試験管に 10 cc 宛とり, 之に普通寒天平板培地よりの菌 (18時間培養) を1白金耳宛移植し, 24時間後及び48時間後に遠沈しその上清について行つた。

基質: glucose, pyruvate, lactate, succinate, acetate を用い終濃度 1/300M になる様に蒸溜水に溶し酸性のものは pH の修正を行つた。

阻害剤: NaN₃ 10⁻²M, DNP 10⁻³M になる様蒸溜水に溶解して用いた。以上の実験材料により, Warburg 検圧計を用い開栓のまま温度 37.5°C, pH 7.2, 振盪時間 60~120分, 水平振盪毎分80回の条件下にて反応させ, 直ちに遠沈しその上清に付き glucose²¹⁾, pyruvate²²⁾, acetoin²³⁾ の定量を行つた。なお菌量は常にブルフリッヒ比色計を使用して一定とし毎回の実験に於て菌量による実験誤差を防いだ。

第2章 実験成績

1. 各種基質に於ける acetoin の生成と pH との関係に就て

前報により基質 glucose の場合 RQ と acetoin 生成に相関関係のある事が判つたが, acetoin 生成は pH と密接な関係があるので如何なる pH に於て, 又如何なる基質を用いた場合に acetoin の生成が顕著であるか, 又相互作用が見られるかに就て実験を行つた。実験成績は第1表に示す通りである。

第 1 表

①

	glucose								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	5.4	—	5.8	5.6	+	7.2	6.8	+
A	4.5	5.1	—	5.8	5.4	±	7.2	6.3	+
al	4.5	5.2	—	5.8	5.8	+	7.2	7.2	—
C·al	4.5	5.3	—	5.8	5.8	卅	7.2	6.4	卅
A·al	4.5	5.4	—	5.8	5.8	卅	7.2	6.2	卅

	glucose								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	5.8	—	5.8	5.6	+	7.2	6.8	+
A	4.5	5.8	—	5.8	5.4	±	7.2	6.3	+
au	4.5	5.7	卅	5.8	5.8	卅	7.2	6.8	卅
C·au	4.5	5.9	+	5.8	5.4	卅	7.2	6.2	卅
A·au	4.5	5.6	±	5.8	5.4	卅	7.2	5.7	卅

②

	pyruvate								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	5.8	—	5.8	6.2	±	7.2	7.6	—
A	4.5	5.8	—	5.8	6.2	±	7.2	7.6	—
al	4.5	5.5	≡	5.8	6.1	+	7.2	7.1	±
C·al	4.5	6.2	±	5.8	6.5	—	7.2	7.7	—
A·al	4.5	6.4	±	5.8	6.4	—	7.2	7.5	—

	pyruvate								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	5.8	—	5.8	6.4	±	7.2	7.5	—
A	4.5	5.8	—	5.8	6.2	±	7.2	7.6	—
au	4.5	5.4	≡以上	5.8	5.8	≡	7.2	7.6	≡
C·au	4.5	5.8	≡	5.8	6.2	+	7.2	7.5	+
A·au	4.5	5.8	≡	5.8	6.0	≡	7.2	7.5	≡

③

	lactate								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	6.3	±	5.8	6.5	±	7.2	7.6	+
A	4.5	6.4	±	5.8	6.3	±	7.2	7.6	+
al	4.5	5.4	≡	5.8	6.2	≡	7.2	7.4	≡
C·al	4.5	6.4	≡	5.8	6.6	±	7.2	7.7	≡
A·al	4.5	6.6	≡	5.8	6.7	±	7.2	7.7	≡

	lactate								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	5.6	±	5.8	6.5	±	7.2	7.7	+
A	4.5	6.0	±	5.8	6.3	±	7.2	7.7	+
au	4.5	5.4	≡以上	5.8	5.8	≡以上	7.2	7.5	≡以上
C·au	4.5	5.8	≡	5.8	6.3	≡	7.2	7.5	≡
A·au	4.5	5.8	≡	5.8	6.3	≡	7.2	7.5	+

④

	succinate								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	5.8	±	5.8	6.4	—	7.2	7.7	±
A	4.5	5.8	±	5.8	6.3	±	7.2	7.6	±
al	4.5	5.3	±	5.8	5.8	±	7.2	7.5	—
C·al	4.5	6.1	±	5.8	6.3	—	7.2	7.7	—
A·al	4.5	6.2	卅	5.8	6.5	±	7.2	7.7	—

	succinate								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	5.8	+	5.8	6.4	—	7.2	7.7	±
A	4.5	5.8	+	5.8	6.3	±	7.2	7.6	±
au	4.5	5.4	卅	5.8	5.8	—	7.2	7.4	卅
C·au	4.5	5.9	卅	5.8	6.4	±	7.2	7.7	卅
A·au	4.5	6.0	+	5.8	6.4	+	7.2	7.6	卅

⑤

	acetate								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	5.4	—	5.8	6.4	—	7.2	7.7	—
A	4.5	5.4	—	5.8	6.0	—	7.2	7.5	—
al	4.5	5.3	—	5.8	5.7	—	7.2	7.5	—
C·al	4.5	5.7	—	5.8	6.3	—	7.2	7.7	—
A·al	4.5	5.7	—	5.8	6.3	—	7.2	7.7	—

	acetate								
	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.	pH		A. M. C.
	initial	final		initial	final		initial	final	
C	4.5	5.4	—	5.8	6.4	—	7.2	7.7	—
A	4.5	5.4	—	5.8	6.0	—	7.2	7.5	—
au	4.5	5.4	—	5.8	5.8	—	7.2	7.2	—
C·au	4.5	5.5	—	5.8	6.4	—	7.2	7.7	—
A·au	4.5	5.5	—	5.8	6.2	—	7.2	7.7	—

菌液……2.0 ml (C, A 40 mg. al, au 120 mg) 湿菌量
 glucose, pyruvate, lactate, succinate, acetate ……各々 0.25 ml, 終濃度 1/300 M,
 磷酸緩衝液……0.75 ml を加え全量 3.0 ml とする,
 37.5°C, 1hr.

表中 C, A, al, au は夫々大腸菌, エロゲ一ネス菌, 白色葡萄球菌, 黄色葡萄球菌を C·al, C·au, A·al, A·au は夫々両菌を同時に作用させた場合を示すものである (以下同様).

glucose を基質とせる場合, C と al 及び A と al の組合せに於ては, pH 4.5 では各菌単独の場合も両菌を同時に作用させた場合も acetoin 生成は認められなかつた. pH 5.8 及び 7.2 では各菌単独の場合 acetoin 生成は殆んど認められないが, 同時に作用させた場合は acetoin 生成は顕著にして促進的であつた. pH は 5.8 の場合は変化はないが 7.2 の場合は各菌単独の場合よりも低下した. C と au の組合せに於ては pH 4.5 では殆んど acetoin の生成は認めないが, pH 5.8 及び 7.2 では両菌を同時に作用させた場合, acetoin の生成は au 単独の場合より抑制的であり pH も低下の傾向にあつた. pyruvate を基質とした場合, C と al, A と al の組合せに於て acetoin の生成は pH 4.5 では al 単独の場合にのみ認められ, 両菌を同時に作用させた場合は全く認められなかつた. pH 5.8 及び 7.2 では, 単独の場合も同時に作用させた場合も acetoin の生成は認められなかつた. C と au の組合せに於ては各 pH を通じ, au 単独の場合のみ acetoin の生成は顕著であるが, 同時に作用させた場合は抑制的であつた. なお au の acetoin の生成は pH の上昇につれ少々抑制的であつた. lactate を基質とした場合, C と al, A と al の組合せに於て各 pH を通じ, al 単独の場合のみ acetoin の生成は認められ, 両菌を同時に作用させた場合は何れも抑制的傾向を示していた. C と au の組合せに於ては, au 単独では各 pH を通じ acetoin の生成は顕著であるが, 両菌を同時に作用させた場合は acetoin の生成は減少し pH が上昇するに従いこの傾向は著るしい. succinate を基質とした場合, pH 4.5 のみ A と al の組合せに於て各菌単独では acetoin の生成は認められないが, 同時に作用させた場合は促進的であつた. また

C と au の組合せの場合も pH 4.5 に於て促進的傾向を示している. acetate を基質とした場合, 各 pH を通じ何れの場合も acetoin の生成は認められなかつた.

2. 基質 glucose に於ける pyruvate, acetoin の生成に就て

i) 静止菌: 前回の実験により基質 glucose, pH 7.2 の場合, 2 種細菌の相互作用が顕著に認められたので, glucose を基質とし, glucose の消費並に pyruvate, acetoin の生成に就て実験を行つた. その結果は第 2 表に示す通りである.

① C と al の組合せに於ては, 各菌単独の場合より両菌を同時に作用させた場合が, pH は少々低下するも glucose の消費は寧ろ少い. pyruvate の生成は何れの場合も認められず, acetoin の生成は各菌単独の場合認められないが, 両菌を同時に作用させた場合は促進的であつた. ② A と al の組合せに於ては pH, glucose の消費は ① の場合と略々同様な傾向にあるが, pyruvate の生成は A のみ認められ, 両菌を同時に作用させた場合は pyruvate 及び acetoin の生成共に促進的であつた. ③ C と au の組合せに於ては, pH は ① ② の場合と同様低下の傾向を示すが, glucose の消費は ① ② の場合と異り促進され, C 単独では pyruvate 及び acetoin の生成は認められないが, au 単独では何れも顕著であり, 両菌を同時に作用させた場合は pyruvate, acetoin 共殆んど生成されず抑制的であつた.

ii) 上清と静止菌: 前回の実験により, C と al, A と al, C と au を同時に作用させた場合, acetoin の生成に於て相互作用のある事が判つた. この場合, 一方の静止菌の分解産物を他の静止菌が利用し acetoin を生成するものか, 又 2 種の静止菌各々の分解産物の相互作用により acetoin が生成されるものかを追求するために, 前回と同様の条件にて 60 分振盪後 7000 r. p. m. で 10 分間遠沈し, その上清 2 ml に対し他の静止菌 1 cc をを加え, 再び同様な条件で実験を行いその上清に

第 2 表

① glucose					
	pH		glucose-consump (μ M)	pyruvate-produced (μ M)	A. M. C. -produced
	initial	final			
C	7.2	6.8	3.2	0	±
al	7.2	7.2	3.1	0	-
C·al	7.2	6.4	2.8	0	卅

② glucose					
	pH		glucose-consump (μ M)	pyruvate-produced (μ M)	A. M. C. -produced
	initial	final			
A	7.2	6.3	3.3	0.8	+
al	7.2	7.2	3.1	0	-
A·al	7.2	6.2	2.9	1.3	卅

③ glucose					
	pH		glucose-consump (μ M)	pyruvate-produced (μ M)	A. M. C. -produced
	initial	final			
C	7.2	6.8	3.2	0	±
au	7.2	6.8	3.3	1.2	卅
C·au	7.2	6.2	3.3	0.3	+

菌液……………2.0 ml {C, A 40 mg
 (湿菌量) {al, au 120 mg
 glucose……………0.25 ml (終濃度M/300)
 磷酸緩衝液……………0.75 ml を加え全量 3.0 ml とする。
 37.5°C, 1hr.

対し, pyruvate, acetoin の定量を行つた。
 実験成績は第3表の通りである。

第 3 表

① glucose			
		pyruvate- produced (μ M)	acetoin- produced
対 照	C·al	0	卅
上清一静止菌	C-al	0	+
	al-C	0	卅

② glucose			
		pyruvate- produced (μ M)	acetoin- produced
対 照	A·al	1.3	卅
上清一静止菌	A-al	1.4	卅
	al-A	0.2	+

③ glucose			
		pyruvate- produced (μ M)	acetoin- produced
対 照	C·au	0.3	+
上清一静止菌	C-au	0.3	±
	au-C	0.2	-

菌液……………2.0 ml {C, A 40mg
 (湿菌量) {al, au 120mg
 glucose……………0.25ml (終濃度 M/300)
 磷酸緩衝液 0.75ml を加え全量 3.0ml とする。
 37.5°C, 1hr. 振盪後其遠沈上清に更に静止菌を加
 え 37.5°C, 1hr. 作用さす。pH 7.2

① C と al の組合せに於て, pyruvate は
 対照の場合も上清に静止菌を作用させた場合
 も認められず, acetoin は C の上清に al を作
 用させた場合は生成されないが, al の上清
 に C を作用させた場合は対照の場合と同様頭

著であつた。

② Aとalの組合せに於て pyruvate の生成は、先づAの上清に対しalを作用させた場合は対照と略々同様最も顕著であるが、alの上清に対しAを作用させた場合は認められなかつた。

acetoin の生成は、Aの上清に対しalを作用させた場合は対照と同様顕著であるが、alの上清に対しAを作用させた場合は acetoin の生成は殆んど認められなかつた。③ Cとauの組合せに於ては pyruvate の生成は何れも僅かに認められ、acetoin の生成は対照の場合と同様殆んど認めなかつた。

iii) 発育中に於ける菌：発育中に於ける菌を用いた場合、静止菌と比較し pyruvate, acetoin の生成に於て如何なる相異があるものか窺うために、実験を行つた。実験成績は第4表の通りである。

pH は静止菌の場合に比較し全般的に低下の傾向を示し、C、Aは培養時間が24時間から48時間になると稍々上昇するも、al、auは殆んど変動が認められなかつた。pyruvate の生成は静止菌の場合と同様の傾向を示すも、Aは静止菌の場合と異り pyruvate の生成は認められず al は僅かながら生成を認めた。acetoinの生成はCとalの組合せに於て両菌を同時に24時間並びに48時間培養した場合は、静止菌の場合と同様相互作用が認められかつ促進的であり、更にalを24時間培養後遠沈しその上清に対しCを加え更に24時間培養した場合は、両菌を同時に培養した場合と同様促進的傾向を示した。Aとalの組合せに於ては静止菌の場合と異りA単独の acetoin の生成は顕著にして、何れの場合もA単独に於けると同様の結果を示し相互作用は認められなかつた。Cとauの組合せに於て両菌を同時に培養した場合は静止菌の場合と同様抑制的傾向を示し、auの24時間培養後その遠沈上清にCを加え更に24時間培養した場合は、両菌を同時に培養した場合と同様の傾向を示し抑制的であつた。

第 4 表

		pH	pyruvate (μM)	acetoin
24	C	5.4	0	++
	al	6.6	0.8	+
	C-al	5.6	0	+++
48	C	5.6	0.2	++
	al	6.6	0.9	+
	C-al	6.0	0	+++
	C-al	6.0	0.1	++
	al-C	5.8	0.1	+++

		pH	pyruvate (μM)	acetoin
24	A	6.0	0	++++以上
	al	6.0	0.7	+
	A-al	5.8	1.3	++++以上
48	A	6.6	0	++++以上
	al	6.2	0.9	+
	A-al	6.0	0	++++以上
	A-al	6.0	0	++++以上
	al-A	5.8	0	++++以上

		pH	pyruvate (μM)	acetoin
24	C	5.4	0	++
	au	5.4	2.5	+++
	C-au	5.9	0	+
48	C	6.2	0.2	++
	au	5.4	3.3	++++以上
	C-au	6.1	0	++
	C-au	6.0	0	++
	au-C	5.4	0.8	+

合成培地 $\left\{ \begin{array}{ll} \text{Na}_2\text{HPO}_4 & 2.50 \\ \text{KH}_2\text{PO}_4 & 0.35 \\ \text{Na Cl} & 1.00 \\ \text{MgSO}_4 & 0.01 \end{array} \right. \left. \begin{array}{ll} \text{FeSO}_4 & 0.001 \\ \text{glucose} & 1.00 \\ \text{pepton} & 1.00 \end{array} \right\}$ を
 蒸留水 1000cc に溶解したものを滅菌試験管に 10cc 宛とり、之に普通寒天平板培地よりの菌 (18時間培養) を 1 白金耳宛移植し、夫々 24 時間及び 48 時間培養後遠沈しその上清に就いて行つた。
 pH 7.2

3. 基質 pyruvate に於ける acetoin の生成に就て

糖代謝に於ける代謝経路は主として pyruvate を通り、acetoin は pyruvate 2 mole

が脱炭酸と縮合とを同時に受けて生成される事は諸学者の認める所であるので、基質に pyruvate を用いた時の acetoin の生成に就て実験を行った。その成績は第5表に示す通りである。

第5表

① pyruvate				
	pH		pyruvate-consump (μ M)	acetoin-produced
	initial	final		
C	7.2	7.6	3.3	—
al	7.2	7.1	3.0	±
C·al	7.2	7.7	3.3	—

② pyruvate				
	pH		pyruvate-consump (μ M)	acetoin-produced
	initial	final		
A	7.2	7.6	1.7	—
al	7.2	7.1	3.0	±
A·al	7.2	7.5	3.3	—

③ pyruvate				
	pH		pyruvate-consump (μ M)	acetoin-produced
	initial	final		
C	7.2	7.6	3.3	—
au	7.2	7.6	2.0	卅
C·au	7.2	7.5	3.3	±

菌液…………… 2.0 ml {C, A 40mg
(湿菌量) (al, au 120mg)
pyruvate………… 0.25ml 終濃度 M/300
磷酸緩衝液 0.75ml を加え全量を 3.0ml とする。
37.5°C, 1hr.

① C と al の組合せに於て、pH は C 及び両菌を同時に作用させた場合 (C·al) 共に基質 glucose の場合に比較し上昇の傾向を示した。pyruvate は殆んど消費されており、acetoin の生成は全く認められなかつた。② A と al の組合せに於て、pH は ① と同様の傾向を示し、pyruvate の消費は A が最も少く、両菌を同時に作用させた場合 (A·al) の約 $1/2$ であつた。acetoin の生成は、① の場合と同様全く認められなかつた。③ C と au の組合せに於て、pH は両菌を同時に作用させた場合 (C·au) は ①② の場合と同様上昇の傾向を示し、又 au も al に

比較し上昇していた。pyruvate の消費は au のみ少々抑制的であるが、C 及び両菌を同時に作用させた場合 (C·au) は何れも全く消費されていた。acetoin の生成は、au のみ顕著で両菌を同時に作用させた場合 (C·au) は全く認められなかつた。

4. 基質 glucose に於ける pyruvate, acetoin 生成に及ぼす阻害剤の影響に就て

基質 glucose に於て 2 種細菌の相互作用により acetoin が生成される場合、次の 3 つの場合が考えられる。即ち第 1 の場合は静止菌を仮りに A 菌、B 菌とすれば、A 菌又は B 菌により glucose が分解され、その分解産物を B 菌又は A 菌が利用し acetoin を生成する場合、第 2 の場合は A、B 両菌により夫々分解された分解産物を、A 菌或は B 菌単独で利用し acetoin が生成される場合、第 3 の場合は A 菌及び B 菌により夫々分解された生成物を A、B 両菌の相互作用により利用され、acetoin が生成される場合とが考えられる。今或る阻害剤で代謝経路の特定の部位を阻害した場合その代謝経路は抑制されるか或は他に逸れる筈である。そこで阻害剤として DNP (10^{-3} M)、 NaN_3 (10^{-2} M) を用い基質 glucose に於ける pyruvate 及び acetoin の生成に就て実験を行つて見た。その成績は第 6 表に示す通りである。表中 D, N は夫々 DNP, NaN_3 の

第6表

① glucose		
	pyruvate-produced (μ M)	acetoin-produced
C — al	0	
Cd — al	0.9	+
C — alD	0	—
CN — al	2.5	—
C — alN	0	±
al — C	0	±
alD — C	0.8	卅
al — Cd	0.9	—
alN — C	0.7	—
al — CN	2.3	—

② glucose

	pyruvate-produced (μ M)	acetoin-produced
A — al	1.5	卅
AD — al	2.6	±
A — alD	0	—
AN — al	2.7	+
A — alN	0	+
al — A	0.2	+
alD — A	3.0	—
al — AD	3.0	—
alN — A	2.8	±
al — AN	2.8	±

③ glucose

	pyruvate-produced (μ M)	acetoin-produced
C — au	0.3	+
CD — au	1.9	±
C — auD	0	±
CN — au	2.1	±
C — auN	0.3	±
au — C	0.2	—
auD — C	0.1	—
au — CD	0.3	—
auN — C	0	—
au — CN	0.4	±

菌液………2.0 ml {C, A 40mg
(混菌量) {al, au 120mg
glucose ……0.25ml 終濃度 M/300
磷酸緩衝液 0.75ml を加え全量 3.0ml とする。
37.5°C, 1hr. 振盪後遠沈しその上清に更に静止
菌を加え同様の条件で作用さす。

略号で、例えば CD—al は最初に基質と共に大腸菌と阻害剤を加え、一定時間反応させた後その遠沈上清に対し白色葡萄球菌を作用させた事を示す。

① C と al の組合せに於て、C を基質 glucose に一定時間作用させその遠沈上清に対し al を作用させた場合、即ち C と al を対照とし阻害剤 DNP 及び NaN_3 を最初に用いた場合は、pyruvate の生成は夫々認められるが阻害剤を最後に用いた場合は対照と

同様生成を認めなかつた。acetoin の生成は何れの場合も対照と同様殆んど認められなかつた。al の上清に C を作用させた場合 (al—C) を対照とした場合は、pyruvate の生成は対照では認められなかつたに反し何れの場合も認められ、阻害剤を最後に加えた場合が少々促進的であつた。acetoin 生成は対照では顕著に認められるが阻害剤を用いた場合は何れも認められなかつた。② A と al の組合せに於て A の上清に対し al を作用させた場合 (A—al) を対照とした時は、pyruvate の生成は阻害剤を最初に用いた場合は顕著で対照よりは少々促進され、阻害剤を最後に用いた場合は全く生成されなかつた。acetoin の生成は対照では顕著であるに拘わらず認められなかつた。al の上清に対し A を作用させた場合 (al—A) を対照とした時は、pyruvate の生成は阻害剤を最初に用いた場合も促進され、acetoin の生成は対照と同様認められなかつた。③ C と au の組合せに於て C の上清に対し au を作用させた場合 (C—au) を対照とした時は pyruvate の生成は、① ② と同様阻害剤を最初に用いた場合促進され最後に用いた場合は殆んど生成されなかつた。acetoin の生成は阻害剤を用いた場合は何れも抑制され認められなかつた。次に au の上清に対し C を作用させた場合 (au—C) を対照とした時は、pyruvate の生成は ① と同様阻害剤を最後に用いた場合が少々促進された。acetoin の生成は対照と同様全く認められなかつた。

5. 基質 pyruvate に於ける pyruvate 消費並に acetoin の生成に及ぼす阻害剤の影響に就て

第3節に於て述べた様な見解のもとに基質に pyruvate を用いたが、acetoin の生成は予期に反し認められなかつた。而して pyruvate の消費された事により他の径路によつたものと考えられるので、阻害剤 DNP, NaN_3 を用い実験を行つた。その成績は第7表に示す通りである。

第 7 表

① pyruvate

	pyruvate-consump (μ M)	acetoin-produced
C — al	3.3	—
CD — al	0.8	—
C — alD	3.3	—
CN — al	3.0	—
C — alN	3.3	—
al — C	3.3	—
alD — C	1.2	—
al — CD	3.1	—
alN — C	3.2	—
al — CN	3.2	—

② pyruvate

	pyruvate-consump (μ M)	acetoin-produced
A — al	3.3	—
AD — al	0.5	—
A — alD	0.8	—
AN — al	0.8	—
A — alN	3.0	—
al — A	3.3	—
alD — A	0.4	—
al — AD	3.2	—
alN — A	0.3	—
al — AN	3.2	—

③ pyruvate

	pyruvate-consump (μ M)	acetoin-produced
C — au	3.3	±
CD — au	0.9	—
C — auD	3.2	—
CN — au	1.1	—
C — auN	3.2	—
au — C	3.3	—
auD — C	2.0	—
au — CD	2.7	—
auN — C	1.9	—
au — CN	2.9	±

菌液……………2.0 ml {C, A 40mg
(湿菌量) {al, au 120mg
pyruvate…0.25 ml 終濃度 1/300M
磷酸緩衝液 0.75 ml を加え全量 3.0 ml とする。
37.5°C, 1 hr. 振盪後遠沈しその上清に更に静止
菌を加え同様の条件で作用さす。

① C と al の組合せに於て、C の上清に
対し al を作用させた場合 (C—al) を対照
とした時、pyruvate の消費は阻害剤 DNP
を C と共に最初に用いた場合最も抑制され、
他の場合は略々対照と同様であつた。逆に al
の上清に對し C を作用させた場合 (al—C)
を対照とした時は、同じく DNP を al と共
に最初に用いた場合が最も抑制され他の場合
は略々対照と同様であつた。

acetoin の生成は何れの場合も全く認めら
れなかつた。② A と al の組合せに於て、
pyruvate の消費は A の上清に對し al を作
用させた場合 (A—al) を対照とした時は、
① と同様阻害剤を最初に用いた方が抑制さ
れる傾向にあり、al の上清に對し A を作用
させた場合 (al—A) も同様の結果を得た。
acetoin 生成は何れの場合も認められなかつ
た。③ C と au の組合せに於て C の上清に
對し au を作用させた場合 (C—au) を対照
とした時は、① ② と同様阻害剤を最初に用
いた場合、pyruvate の消費は抑制的傾向を
示し、au の上清に對し C を作用させた (au
—C) 場合を対照とした時も、① ② と同様
阻害剤を最初に用いた場合抑制的であつた。
acetoin の生成は何れの場合も認められなかつ
た。

総括及び考案

前編と同様、大腸菌 (C)、エロゲーネス菌
(A)、白色葡萄球菌 (al)、黄色葡萄球菌 (au)
の各組合せにより如何なる基質を用いた場合
acetoin の生成に於ける相互作用が顕著であ
るか知るために、glucose, pyruvate, lactate,
succinate, acetate の各種基質を用い実験を
行つた所、前述の成績の示す通り基質 glucose
のみに相互作用が認められた。即ち C と al,
A と al の組合せに於て各菌単独の場合は

acetoin の生成は殆んど見られないのに反し、両菌を同時に作用させた場合には pH 5.8~7.2 に於て著明な acetoin の生成が認められ、又 C と au では pH 7.2 の場合のみ acetoin の生成に於ける相互作用が見られたがその作用は抑制的であつた。なお A と au の組合せでは相互作用は全く認められなかつた。翻つて acetoin の生成機序を考察するに、Nossal は pyruvate に glucose の或る一定量を添加する事により acetoin の生成が促進されたと述べている。又赤堀は牛肝より得た酵素を用い pyruvate より acetoin の生成される事を認め、この反応は ATP, V. B₁, Mg²⁺, glucose 等を添加する事により促進される事を報告している。山村も同様豚心より得た酵素を用い pyruvate よりの acetoin の生成が Mn²⁺, cocarboxylase で促進されると報告している。而して Juni (1950), Nossal (1951), Rowatt (1951), Dolin and Gunsalus (1951), Watt and Werkman (1953)²⁴, Moat and Lichstein (1953), Gale (1953) 等は 2 mole の pyruvate が脱炭酸と縮合と同時に受けて 1 mole の acetoin と 2 mole の CO₂ を生成するものであろうと述べている。一方菌による glucose よりの acetoin の生成は、pyruvate を経て行われるとすれば基質 glucose の場合よりも寧ろ基質 pyruvate の場合の方が、acetoin の生成に顕著である筈である。然るに事實は前記実験の示す如く基質として pyruvate を用いた場合には、au のみに僅かながら acetoin の生成が認められ、他の菌では各菌単独の場合も両菌を同時に作用させた場合も認められなかつた。この事より本反応は pyruvate 2 分子の存在のみで行われる様な簡単なものでなく、恐らく反応の促進されるために関与する色々な因子が存在する事が想像される。平野²⁵は glucose—pyruvate 間の代謝産物が pyruvate 代謝に影響を与えるものではないかと報告しており、著者もこの見解を支持するものである。次に 2 種細菌の各組合せのうちで、acetoin の生成に於て促進或は抑制作用の見られる場合に就きその機序

を考察するに、今一方の菌を glucose 基質に一定時間作用させ、その遠沈上清に対し他方の菌を作用させた実験成績 (第 3 表) が示す通り、C と al の組合せでは al の上清に対し C を作用させた場合並びに、A と al の組合せでは A の上清に対し al を作用させた場合とも、2 種静止菌を同時に加えた場合と同様 acetoin の生成に於て促進的であつた。而して C と au では、au の上清に C を作用させた場合は静止菌の場合と同様 acetoin の生成は抑制的であつた。従つて acetoin の生成に於て促進的であつた C と al の組合せでは、恐らく al により生成された glucose 分解産物を C が利用し acetoin が生成されるのではないかと考えられる。更に阻害剤 DNP, NaN₃ を用い C の作用を抑制した所、acetoin の生成は全くみられずこの様な機序を確認する事が出来た。一方 A と al の組合せに於ける促進作用は、al を基質 pyruvate に作用させた場合、pH を低下させる事により acetoin の生成が認められた事実 (第 1 表) より、恐らく A のため glucose の分解により生成された pyruvate その他の酸が蓄積する結果、pH が低下し al の acetoin 生成能が賦活された結果と解釈される。次に acetoin に於て抑制的であつた C と au の組合せでは、au を単独で基質 glucose に作用させた場合には acetoin の生成が顕著である事から C と au を同時に加えた場合には、恐らく au により生成された acetoin が C より更に消費されるものと考えられる。なおこの事を確認するため、C の acetoin 分解能を阻止する阻害剤を添加する事により、C と au との組合せによる acetoin 生成抑制作用を打消し得ると考えられるので、DNP, NaN₃ を用い実験 (第 6 表) を行つた所 acetoin の分解は阻止されずこの試みは不成功であつた。

結 論

前編に於て、RQ と acetoin の生成とは平行して行われる事が解つたので、RQ に於て相互作用の認められた大腸菌と白色葡萄球菌、

エロゲーネス菌と白色葡萄球菌及び大腸菌と黄色葡萄球菌の3組を用い、acetoinの生成に於ける相互作用の機序を追究するため実験を行った所次に示す様な結論を得た。

1) 基質 glucose に於て acetoin の生成に於ける相互作用が認められ至適 pH は 5.8 ~ 7.2 と推定された。

2) 発育中の菌を用いた場合は acetoin の生成に於て静止菌の場合と略々同様の結果を得たが、エロゲーネス菌では特に顕著であつた。

3) 基質 pyruvate に於て acetoin の生成が殆んど認められなかつた事実により acetoin の生成は、色々な因子が関与する複雑な反応である事が想像された。

4) acetoin の生成に於て促進的であつた大腸菌と白色葡萄球菌では、al の glucose 分解産物を大腸菌が利用して acetoin の生成

が行われたものと考えられ、エロゲーネス菌と白色葡萄球菌では、エロゲーネス菌のため glucose の分解により生じた pyruvate 及びその他の酸が蓄積し pH が低下するため、その結果白色葡萄球菌の acetoin 生成能が賦活され、acetoin が生成されたものとする事が出来た。抑制的であつた大腸菌と黄色葡萄球菌では、黄色葡萄球菌のため基質 glucose の分解により生成された acetoin が、大腸菌のため消費されるものではないかと考えられる。

本論文の要旨は1956年6月第470回岡山医学会並びに第5回日本口腔科学会中国四国地方会に於て報告した。

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、今川教授、渡辺教授並びに多大の御助言を戴いた微生物学教室松浦先生に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Neuberg, C. & Hirsch, J.: 1921. *Biochem. Z.*, **115**, 282.
- 2) Neuberg, C. & Ohle, H.: 1922. *Biochem. Z.*, **127**, 327; **128**, 610.
- 3) Gross, N. H. & Werkman, C. H.: 1947. *Arch. Biochem.*, **15**, 125.
- 4) Green, et al.: 1942. *J. Biol. Chem.*, **145**, 69.
- 5) Stotz, et al.: 1944. *J. Biol. Chem.*, **152**, 41.
- 6) Berg, R. L. & Westerfeld, W. W.: 1944. *J. Biol. Chem.*, **152**, 113.
- 7) 赤堀等: 1951. *ビタミン*, **4**, 387.
- 8) 山村等: 1953. *酵素化学シンポジウム*, **8**, 101; 1954. *酵素化学シンポジウム*, **9**, 57; 1953. *ビタミン*, **6**, 483; **6**, 839.
- 9) Tomiyasu, Y.: 1937. *Enzymologia*, **3**, 263.
- 10) Singer, T. P. & Pensky, J.: 1951. *Arch. Biochem.*, **31**, 457.
- 11) Rowatt, E.: 1951. *Biochem. J.*, **49**, 453.
- 12) Nossal, P. M.: 1951. *Biochem. J.* **49**, XI V; **50**, 591.
- 13) Moat, A. G. & Lichstein, H. C.: 1953. *J. Bact.*, **66**, 324.
- 14) 片桐: 1954. *生化学雑誌*, **25**, 457.
- 15) Dolin, M. I. & Gunsalus, I. C.: 1951. *J. Bact.*, **62**, 199.
- 16) Watt, D. & Krampitz, L. O.: 1947. *Federation, proc.*, **6**, 301.
- 17) Silverman, M. & Werkman, C. H.: 1941. *J. Biol. Chem.*, **138**, 35.
- 18) Juni, E.: 1950. *Federation, proc.*, **9**, 396, 1952. *J. Biol. Chem.*, **195**, 715.
- 19) Happold, F. C. & Spencer, C. P.: 1952. *Biochem. et Biophys. Acta.*, **8**, 543.
- 20) Gale, E. F.: 1953. *The chemical activities of bacteria*, 3rd edition.
- 21) 江上等: 1953. *標準生化学*, **18**.
- 22) Friedmann, T. E. & Haugen, G. E.: 1943. *J. Biol. Chem.*, **147**, 415.
- 23) Westerfeld, W. W.: 1945. *J. Biol. Chem.*, **161**, 495.
- 24) Watt, D. & Werkman, C. H.: 1951. *Arch. Biochem. Biophys.*, **31**, 383.
- 25) 平野等: 1955. *日本細菌学雑誌*, **10**(12), 1043.

Studies on the Interaction in the Metabolism of
Two Species of Bacteria

Part Two: Interaction in the production of acetoin

By

Kanehisa Yokohara

Dept. of Bacteriology (Director: Prof. S. Murakami)

Dept. of Dental Surgery (Director: Prof. Y. Imagawa
Y. Watanabe)

Okayama University Medical School

As reported in the previous paper, it has been demonstrated that the acceleration of O_2 -consumption is greatest in the case of the substrate glucose, while the interaction likewise seems to occur in the case of RQ. Moreover, since it being evident that the RQ value parallels with the production of acetoin, the present experiment has been conducted in order to trace the mechanism involved in the production of pyruvate and acetoin.

Bacteria used: *E. coli communis*, *A. aerogenes*, *Staphylococcus albus*, and *Staphylococcus aureus*.

Substrates: glucose, pyruvate, lactate, succinate, and acetate.

Inhibiting agents: DNP and NaN_3 .

1. In the case of the substrate glucose, an interaction has been found to be involved in the production of acetoin, and its adequate pH seems to be 5.8—7.2.

2. The acetoin production in the case with the use of the bacteria in the process of growth, has been nearly the same as that in the case with resting cells; and that with *A. aerogenes* especially pronounced.

3. In the case of the substrate pyruvate, hardly no acetoin production can be recognized.

4. In the case of the combination of *E. coli* with *Staph. albus*, which is cooperative in the acetoin production, it seems that acetoin is produced by *E. coli* utilizing of the decomposition products of glucose produced by *albus*. As for the combination of *A. aerogenes* with *Staph. albus*, it appears to be possible to assume that in the decomposition of glucose by *A. aerogenes*, the accumulation of pyruvate and other acids results in the lowering of pH so that acetoin production capacity of *Staph. albus* is activated. On the other hand, in the inhibitory combination of *E. coli* with *Staph. aureus*, it appears that *E. coli* might consume acetoin produced in the decomposition of glucose by *Staph. aureus*.
