

ブドウ球菌のグルタミン酸呼吸に対する 諸種阻害剤及び抗生物質の作用

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上栄教授)

矢 部 芳 郎

秋 田 和 男

秋 田 悦 示

[昭和32年9月12日受稿]

緒 言

グルタミン酸がブドウ球菌の生理乃至代謝面に於て、極めて重要な役割を果す事が報告されている¹⁾²⁾。このグルタミン酸を基質とした場合のブドウ球菌の呼吸に対する諸種阻害剤及び抗生物質の作用をしらべ、これ等の物質の作用機序と同時にブドウ球菌細胞の生理的機構の一端を窺つた。

実験方法及び材料

使用菌: 教室保存のブドウ球菌 *Staphylococcus citreus* 及び *aureus* (寺島)。

菌調製方法: 前記ブドウ球菌を普通寒天平板上に37°C, 18時間培養後, 採取し, M/50

磷酸緩衝液で2回洗滌し, 蒸留水に浮遊した。菌量は島津光電比濁法により調製した。

呼吸測定方法: ワールブルグ検圧計を用い, 37.5°Cに於て常法に従つて測定を行つた。

実験結果

第一節 生菌の呼吸に対する諸種阻害剤の作用

1. チオニンの作用. 酸化還元反応酵素系に於てメチレンブルー若しくはチオニンが電子運搬系の代りに屢々使用される事は衆知の事実である。然るに, チオニンを生菌に添加した場合, 表1にみる如く, チオニンは菌の呼吸を阻害した。

表 1 ブドウ球菌の呼吸とチオニン

	Staph. citreus				Staph. aureus (寺島)			
	酸素消費量			チオニン	酸素消費量			チオニン
	全量 μ l	補正值 μ l	阻害率%	着色度	全量 μ l	補正值 μ l	阻害率%	着色度
—	11				10			
+チオニン	7			卅	7			卅
グルタミン酸	64	53			159	149		
グルタミン酸+チオニン	26	19	64	±	17	10	93	卅
グルコース	35	24			102	92		
グルコース+チオニン	22	15	38	±	50	43	53	±

容器内容: 生菌浮游液1cc (湿菌量10~20mg), 0.2M磷酸緩衝液1cc (Staph. citreusではpH7.0, aureusではpH6.2), 0.1Mグルタミン酸0.3cc, 1/1000チオニン0.3cc, 水を加えて全量3.0ccとする。気相: 空気, 37.5°C, 60分。

又チオニンを添加して呼吸を行わせた後遠沈して得た菌は紫色に染つており、呼吸阻害の強いもの程より強く染つていた。その阻害作用は、グルタミン酸を基質とした場合に、より強く、又、Staph. aureus (寺島) に対して、Staph. citreus に対するよりも強かつた。尚 Staph. aureus に於てはグルタミン酸呼吸の*

*至適 pHは6.2に存在するため⁹⁾、実験はすべて pH 6.2 に於て行つた。

2. シヤンカリの作用。シヤンカリは呼吸酵素系の中、チトクロム系を阻害する事はよく知られている。ブドウ球菌に於ても、シヤンは強く呼吸を阻害した(表2)。

表 2 ブドウ球菌の呼吸に対する KCN 及びチオニンの作用

	酸 素 消 費 量 μl					
	Staph. citreus			Staph. aureus (寺島)		
	全 量	補 正 値	阻害率%	全 量	補 正 値	阻害率%
—	50			16		
— + KCN	19			14		
— + KCN+チオニン	61			13		
グルタミン酸	172	122	0	228	212	0
グルタミン酸+KCN	21	2	98	23	9	96
グルタミン酸+KCN+チオニン	64	3	98	22	9	96

容器内容： 10^{-2}M KCN 0.3cc を追加した以外は表1のものと同様。実験条件：表1のものと同様。

然しその阻害作用はチオニン添加により恢復されなかつた。

3. 窒化ソーダの作用。窒化ソーダも強く呼吸を阻害した(表3)。Staph. citreus

表 3 ブドウ球菌の呼吸に対する Na_2N_3 及びチオニン

	酸 素 消 費 量 μl					
	Staph. citreus			Staph. aureus (寺島)		
	全 量	補 正 値	阻害率%	全 量	補 正 値	阻害率%
—	50			21		
— + Na_2N_3	46			12		
— + Na_2N_3 +チオニン	51			11		
グルタミン酸+	172	122	0	170	149	0
グルタミン酸+ Na_2N_3	46	0	100	21	9	94
グルタミン酸+ Na_2N_3 +チオニン	73	22	82	20	9	94

容器内容： 10^{-1}M Na_2N_3 0.3cc を追加した以外は表1のものと同様。実験条件：表1のものと同様。

に於てはその阻害はチオニン添加によりやや恢復するようであつたが、Staph. aureus (寺島) に於ては全く恢復しなかつた。

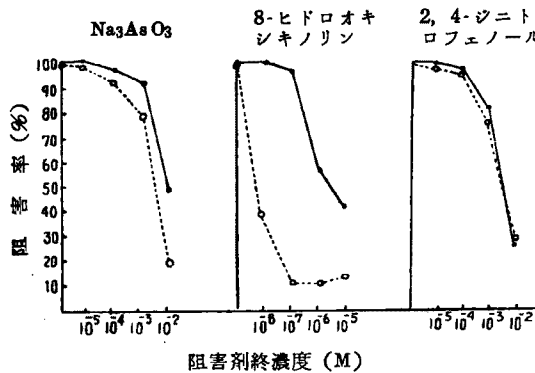
4. その他の阻害剤の作用(図1)。亜硫酸ソーダは $10^{-2}\sim 10^{-3}\text{M}$ の濃度に於て強くグルタミン酸呼吸を阻害した。8-ヒドロキシキノリンは $10^{-5}\sim 10^{-6}\text{M}$ の低濃度に於て強く呼吸を阻害したが、その作用は Staph. aureus

(寺島) に対してより強く認められた。2, 4-ジニトロフェノールも $10^{-2}\sim 10^{-3}\text{M}$ に於て強く呼吸を阻害した。

第二節 生菌の呼吸に対する諸種抗生物質の作用

図2に見る如く、諸種抗生物質中オーロマイシン($10^{-3}\sim 10^{-4}\text{M}$)が最も強い呼吸阻

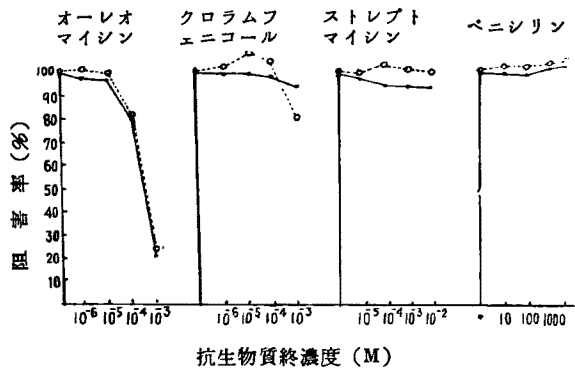
図1 ブドウ球菌の呼吸に対する諸種阻害剤の作用



容器内容及び実験条件：表2のものと同様

●—●staph. citreus, ○- - -○staph. aureus (寺島)

図2 ブドウ球菌の呼吸に対する諸種抗生物質の作用



容器内容及び実験条件：表2のものと同様

●—●staph. citreus, ○- - -○staph. aureus (寺島)

害作用を示した。クロラムフェニコール ($10^{-3}M$) は極く軽度呼吸を阻害したが、ペニシリン及びストレプトマイシンは認めるべき呼吸阻害作用を示さなかつた。

第三節 無細胞抽出液によるグルタミン酸酸化に対する諸種阻害剤及び抗生物質の作用

1. 無細胞抽出液の調製法。ブドウ球菌の $37^{\circ}C$, 18時間培養したものを採取し, $0\sim3^{\circ}C$ に於て約1時間石英砂と磨砕し, 湿菌量 300 mg に対し 1 cc の割合で $M/50$ 磷酸緩衝液を加え, $0^{\circ}C$ に於て, 14,500G, 40分間遠沈し, この上清を無細胞抽出液として使用した²⁾。

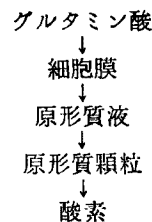
2. 諸種阻害剤及び抗生物質の作用(表4)。

生菌に対して強い呼吸阻害作用を示したものの中, チオニン亜砒酸ソーダ及び8-ヒドロキシキノリンは無細胞抽出液のグルタミン酸呼吸に対しては全く阻害作用を示さなかつた。又チトクロム系に作用すると考えられるところの阻害剤の中, シヤンカリ及び窒化ソーダの作用はチオニンの添加により, よく恢復された。然しオクタノールによる阻害はチオニン添加により余り恢復されなかつた。

2:4-ジニトロフェノール及びオーレオマイシンは生菌に対すると同様無細胞抽出液の呼吸をも阻害した。これら無細胞抽出液に関して得られた結果は, Staph. citreus 及び aureus (寺島) の両者に於てほぼ同様であつた。

総括及び考按

グルタミン酸を基質とした場合のブドウ球菌の呼吸は, 矢部²⁾ が報告している様に, 所謂呼吸と云う現象として最も典型的な機序乃至機構によつて行われる。今これを模式的に表示すれば



の如くなる。

前記諸種阻害剤及び抗生物質の呼吸に対する作用について, この模式に従つて考按を試みたい。

チオニン, 亜砒酸ソーダ及び 8- ヒドロオ

表 4 Staphylococcus citreus 無細胞抽出液によるグルタミン酸々化に
対する諸種阻害剤及び抗生物質の作用

阻 害 剤	阻害剤濃度	酸 素 消 費 量 μ l			阻害率%	チオニン による恢 復率 %
		全 量	自己呼吸	補 正 量		
		66	17	49	0	
KCN	10 ⁻³ M	17	10	7	86	
KCN+チオニン		68	22	46	6	80
NaN ₃	10 ⁻² M	23	18	5	90	
NaN ₃ +チオニン		58	17	41	16	74
オクタノール	飽和	21	17	4	92	
オクタノール+チオニン		53	30	23	53	39
NaAsO ₂	10 ⁻² M	78	30	48	2	
2,4-ジニトロフェノール	10 ⁻³ M	35	9	26	47	
8-ヒドロオキシキノリン	10 ⁻⁴ M	66	17	49	0	
オーレオマイシン	2×10 ⁻³ M	27	11	16	67	
ストレプトマイシン	10 ⁻² M	68	19	49	0	
ペニシリン	4000単位/cc	65	17	48	2	

容器内容：無細胞抽出液 1cc (蛋白窒素量 3~4 mg), 0.2M 磷酸緩衝液 (pH7.0) 1cc, 0.25M
グルタミン酸 0.6cc, 1/1000チオニン 0.3cc, 水を加えて全量3.0ccとする。気相：空気, 37.5°C,
120分。

キシキノリンは生菌の呼吸を強く阻害したが、抽出液の呼吸を全く阻害しなかつた。Gale⁴⁾はグルタミン酸の Staph. aureus 内への透過は所謂 Energy-linked であり、そこに Mn⁺⁺ 或は Mg⁺⁺ が関与し、この機構を 8-ヒドロオキシキノリンは阻害するのでであると報告している。亜硫酸ソーダについてはその機序は不明であるが、これもグルタミン酸の細胞膜透過を阻害するものであると考えられる。又チオニンを生菌に添加した場合菌の呼吸は阻害され、菌はチオニンに染つていたが、その着色は呼吸阻害の強いものに於て一般的に著しいのが認められた。一方チオニンは無細胞抽出液のグルタミン酸呼吸を全く阻害しなかつた。従つてチオニンが細胞膜に吸着される事により細胞膜の状態が変り、基質の透過が阻害されるものと考えられる。又チオニンの生菌の呼吸に対する阻害作用はグルタミン酸を基質とした場合、グルコースを基質とした場合よりも強かつた。この事により、グルタミン酸とグルコースの細胞膜透過機序が異なるこ

とが考えられる。

更に又、これらグルタミン酸の細胞膜透過を阻害すると考えられるところのチオニン、亜硫酸ソーダ及び 8-ヒドロオキシキノリンの何れによつても、Staph. aureus (寺島) が Staph. citreus よりもより強く阻害された。この事より、グルタミン酸の透過機序、従つて細胞膜の状態乃至機構は、同じブドウ球菌でも、これら両菌でかなり異なる事が推測される。

シヤンカリ及び窒化ソーダの呼吸阻害作用は無細胞抽出液に於ては、チオニンの添加により充分恢復された。従つてこれらのものゝ阻害作用は、原形質顆粒に存在するところのチトクロム系に対して行われるものと考えられる。一方オクタノールの阻害作用はチオニンにより余り恢復されなかつた。即ち従来報告されている様に、シヤン及びアジドとオクタノールでは同じチトクロム系に於てもその阻害部位が異なることが考えられる⁵⁾⁶⁾。

2, 4-ジニトロフェノール及びオーレオマイシンは糖代謝に対する阻害剤として知られ

ているが、ブドウ球菌に於てもその生菌及び無細胞抽出液の両者の呼吸を阻害した。従つてこれらのものは呼吸に關聯した燐代謝即ち酸化的燐酸化の機序を阻害するものと考えられる。以上を要約すれば次の様になる。

チオニン、亜硫酸ソーダ及び8-ヒドロオキシキノリンはグルタミン酸の細胞膜透過機序を阻害し、それ以外のものはチトクロム系乃至呼吸に關聯した燐代謝という原形質内の眞の呼吸機序を阻害すると考えられる。

無細胞抽出液でみられた現象がその儘生菌内に於ても行われていると考えるのは必ずしも正しくはない。従つて前記の様に、はつきりとその呼吸阻害作用の機序をわかりきることには多少とも危険性がある。然し細菌の示す種々の生理現象の解明のために阻害剤を使用するに當つて、一応その阻害剤の作用機序を前記のようにすつきりとした形に於て理解しておくことは細菌生理の研究上、殊に細胞膜の状態乃至その透過機序を研究し、理解する上に非常に重要なのではないかと考えられる。

結 論

1. チオニン、亜硫酸ソーダ及び8-ヒドロオ

文

- 1) 秋田：岡山医学会雑誌，69，549，1957.
- 2) Yabe, Y.: Japn. J. Microbiol. 印刷中.
- 3) 秋田，矢部：日本細菌学雑誌，11，172，1956.
- 4) Gale, E. F.: Biochem. J., 48, 286, 1951.

キシノリンはブドウ球菌生菌のグルタミン酸呼吸を著しく阻害したが、無細胞抽出液のものは全く阻害しなかつた。又これらのものは *Staphylococcus aureus* (寺島) の呼吸を *Staphylococcus citreus* のものよりも、より強く阻害した。

2. 生菌に於ては、シヤンカリ及び窒化ソーダによる呼吸阻害はチオニン添加により恢復されなかつたが、無細胞抽出液に於てはチオニンによりよく恢復された。

3. 無細胞抽出液に於ては、オクタノールによる呼吸阻害はチオニン添加により余り恢復されなかつた。

4. 2, 4-ジニトロフェノールは生菌及び無細胞抽出液の両者のグルタミン酸呼吸を阻害した。

5. 諸種抗生物質中、オーレオマイシンのみがグルタミン酸呼吸を強く阻害した。

終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上栄教授に深甚の謝意を表し、併せて御協力下さつた元井氏に心より感謝致します。

献

- 5) Keilin, D., Hartree, E. F.: Proc. roy. Soc., 127, 167, 1939.
- 6) Stephenson, M.: Bacterial Metabolism, 3rd Ed., 21, 1949.

Action of Various Inhibitors and Antibiotics on Glutamate-Respiration of Staphylococcus

By

Yoshiro Yabe
Kazuo Akita
Yoshimi Akita

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Professor Dr. Sakae Murakami)

The author studied the action of various inhibitors and antibiotics on the glutamate-respiration of staphylococci under the consideration of physiological structure of the cell. *Staphylococcus citreus* and *aureus* (Terashima) were used as the test organisms, and L-glutamic acid as the substrate. The results were as follows :

1) Thionine, sodium arsenite and 8-hydroxyquinoline inhibited the respiration of intact cells of staphylococci markedly, but did not inhibit that of cell-free extracts. The inhibitive action of these three sorts of inhibitors was stronger on *Staph. aureus* (Terashima) than on *Staph. citreus*.

2) In intact cells, the inhibition of respiration by potassium cyanide and sodium azide was not restored by addition of thionine. In cell-free extracts, however, the inhibition by these two sorts of inhibitors was well restored by thionine.

3) By addition of thionine, the inhibition of the respiration of cell-free extracts by octanole was not so well restored as that by cyanide or azide.

4) 2,4-Dinitrophenol inhibited the glutamate-respiration of both of the intact cells and cell-free extracts.

5) Of all the antibiotics tested, aureomycin was the only one which noticeably inhibited the glutamate-respiration of staphylococci.