

發育電位時間曲線によるチフス菌代謝の研究

第 1 編

各基質における電位時間曲線の研究

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 村上 栄教授)

秋 田 和 男

[昭和 32 年 9 月 20 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) 炭水化物を基質にした場合の研究
- 2) アミノ酸を基質にした場合の研究

- 3) 上記の実験における phosphate buffer と数種塩類混和溶液との電位の比較

IV. 総括及び考按

V. 結 論

I. 緒 言

細菌が發育しつつある培地中の不反応性電極電位 (innert electrode potential) は Gillespie¹⁾, Hewitt²⁾⁻¹¹⁾, 並びに Knight¹²⁾⁻¹⁴⁾ 等により古くから研究報告されている。Aubel (1928)¹⁵⁾ は腎、肝並びに筋肉の洗滌した組織で、Canon (1926)¹⁶⁾ は yeast で、又 Yudukin (1935), 福見 (1941)¹⁸⁾¹⁹⁾, 川崎 (1954)²⁰⁾ は *E. coli* の洗滌菌体を使用して研究している。而して今日の見解では、發育電位の下降は細胞による還元成分の産生と、培地中にある O_2 による酸化成分の産生の二つの割合の割合によつて決定されるとされ、前者は培地中の細胞の数量とその代謝活性により、後者は medium の表面の面積、粘度、自己酸化物質の性質、並びにその量によるといわれているが、主に培地中の電位の移動は細胞の代謝に関連する酵素の活性化の表現とみなされ見掛けの酸化還元電位 (apparent oxidation reduction potential) といわれる。

著者はチフス菌を使用し、medium に $1/50$ M phosphate buffer (以後 P. B と略す) (pH 7.2) 液、並びに種々塩類加溶液 (以後 S. S

と略す) (pH 7.2) を使用して炭水化物並びにアミノ酸を基質としてその濃度別の電位の下降を追求し、基質と「電位時間曲線」との関係を検討した。

II. 実験材料及び実験方法

1) 供試細菌並びに使用基質

本実験に使用せる菌株は、当教室保存の *Sal. typhi* 57 S である。供試菌は常に一定材料から調整した普通寒天平板培地に 18 時間培養し、滅菌生理的食塩水にて、3000 r. p. m. 20 分 2 回遠心洗滌を行い培地成分を除去し最後に高速度遠心沈澱 8000 r. p. m. 10 分間した後、化学天秤にて秤量の上所要濃度の菌液を作成した。

使用基質は、glucose, pyruvate, lactate, succinate, acetate, malate 並びに aspartate, glutamate, alanine で、その濃度は 10^{-1} M, 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M とし酸性のものは、 $1/10$ 規定の苛性ソーダにて pH の修正を行った。

電位測定に用いた medium は 0.85% NaCl 加 $1/50$ M P. B (pH 7.2) 及び S. S (pH 7.2) で、その組成は第二リン酸ソーダー 2.5 g, 第一リン酸カリウム 0.35 g, 硫酸アンモニウム

0.5 g, 塩化アンモニウム 0.5 g, 硫酸マグネシウム 0.001 g, 硫酸鉄 0.001 g, 蒸溜水 1000 cc である。

2) 電位測定装置並びに測定方法

著者の使用せる電位測定装置は、当教室山本²¹⁾が、細菌の発育電位時間曲線に及ぼす抗菌物質の影響を研究した際に使用したものを更に改良したもので、従来の白金電極は往々にして不規則な変動を見たので著者は水銀の接触部即ち図1のA点の洗滌時の水滴浸入その他水銀の汚染によるものと考え、水銀を廃止し、白金線と銅線を銀ロウにて接合の上、ガラス管に封じ上部は特製の真鍮製キャップ

図 1.

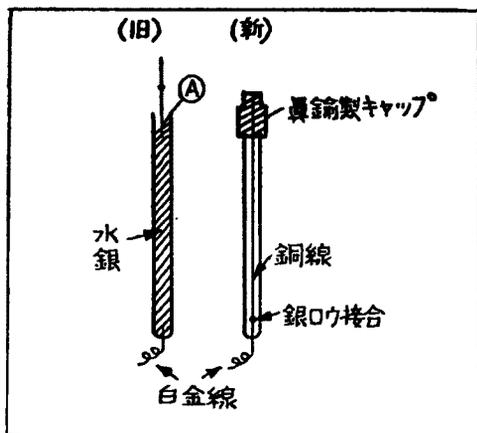
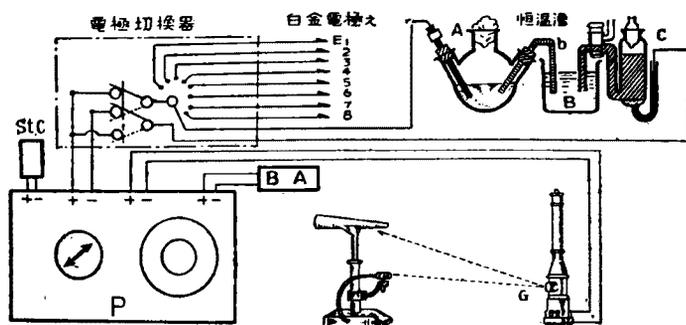


図 2.



- A : 試料器
 B : 飽和塩化カリ溶液
 C : 甘汞電極 (0.2359 V/37.5°C)
 P : 電位差計 (K₂ 型)
 G : Galvanometer (R_s 型, 感度 3.7×10⁻¹⁰A)
 BA : Battery
 St. C : Standard cell

にて封じて使用した。その結果従来の電極を使用した場合に比較して実験の誤差は少くなり、又キャップにしたため電極と potentiometer 間の連絡はクリップを付けたリード線を増し実験操作の迅速化が計られた。

測定操作 2 図に示す如く三つ口コルベン (A) に被検液 30 cc を入れる。一方の小さい口には白金電極 (a) を挿入し被検液の中央位にあるように固定する。白金電極は一昼夜クロム硫酸によく浸し充分に水洗し、70% アルコール溶液内に入れ滅菌し、滅菌蒸溜水でよく水洗したものを用いた。他方の小さい口には塩化カリ寒天橋 (b) をアルコールで滅菌し、滅菌蒸溜水でよく水洗して入れる。塩化カリ寒天橋は 100 cc の蒸溜水に塩化カリ 30 g, 寒天 5 g をよく溶かし、ガラス管内に吸い入れる。塩化カリ寒天橋の他端は飽和塩化カリの溶液槽 (B) に浸す。飽和塩化カリ溶液槽には一方甘汞電極 (C) の脚を入れる。この甘汞泥状物は自製のものを用いた。

この (A) (B) (C) の三者を、恒温槽に入れ 37.5°C に保つて置く。白金電極及び甘汞電極は連結器を径て電位差計に接続した。

III. 実験成績

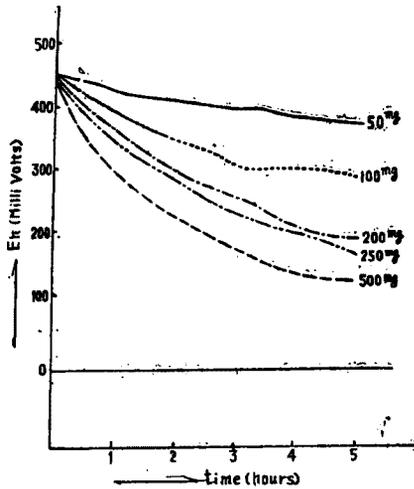
1) 炭水化物を基質にした場合の研究

1/50M P. B (pH 7.2) に種々濃度の *Sal. typhi* 57 S を浮遊せしめ、基質を添加しない場合の電位を時間的に追求するに第 3 図の如き関係となる。

菌量 50 mg, 100 mg, 200 mg, 250 mg, 500 mg 4 時間値で + 400 mV, + 325 mV, + 225 mV, + 200 mV, + 150 mV と菌濃度順に電位の降下を示す。これは菌の自己呼吸による電位の下降と考えられる。

次に菌濃度を 100mg/30cc に一定にして基質濃度変化

図 3

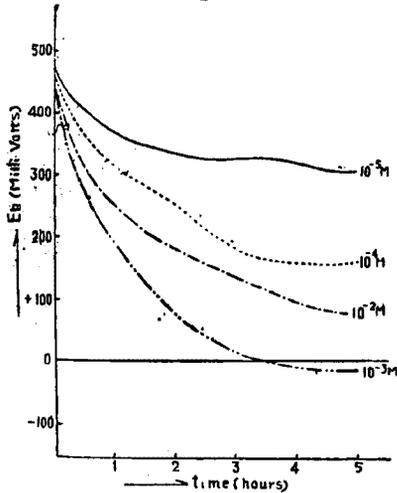


による影響を検討した。

i) glucose を基質にした場合

基質濃度間の電位の下降を測定するに $10^{-3}M$ では最低値 $-10mV$ を示し, $10^{-2}M$, $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ はそれより上位を示し, $+80mV$, $+155mV$, $+305mV$ の4時間値を示した(図4)。

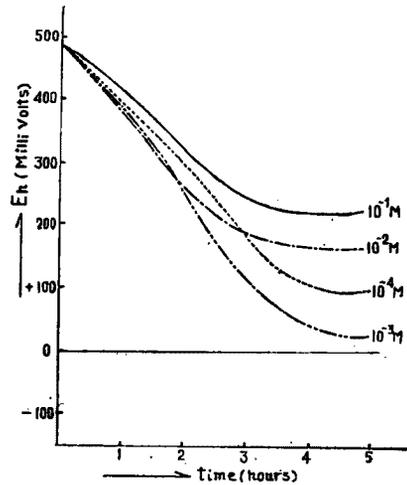
図 4 glucose



ii) pyruvate を基質にした場合

基質濃度 $10^{-3}M$ では最低値 $+25mV$ を示し, $10^{-4}M$, $10^{-2}M$, $10^{-1}M$ はそれより上位を示し $+100mV$, $+175mV$, $+225mV$ の4時間値を示している。この場合、基質の高濃度ではむしろ電位降下は軽度である(図5)。

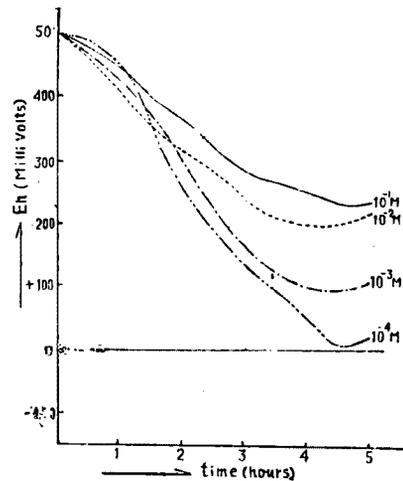
図 5 .pyruvate



iii) lactate を基質にした場合

基質濃度 $10^{-1}M$, $10^{-2}M$, $10^{-3}M$, $10^{-4}M$ における電位降下は著しく4時間値で $+225mV$, $+200mV$, $+100mV$, $+0mV$ を示した。即ち基質濃度の低くなる順に電位は下降している(図6)。

図 6. lactate



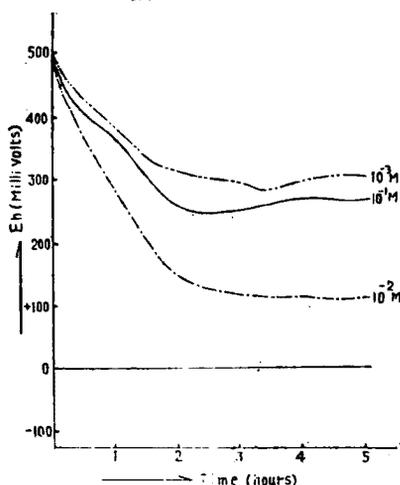
iv) acetate を基質にした場合

凡そ3時間より各濃度とも一定値を示し, $10^{-2}M$, $10^{-3}M$, $10^{-1}M$ で $+100mV$, $+225mV$, $+300mV$ を示し, $10^{-2}M$ の電位降下が著しい(図7)。

v) succinate を基質にした場合

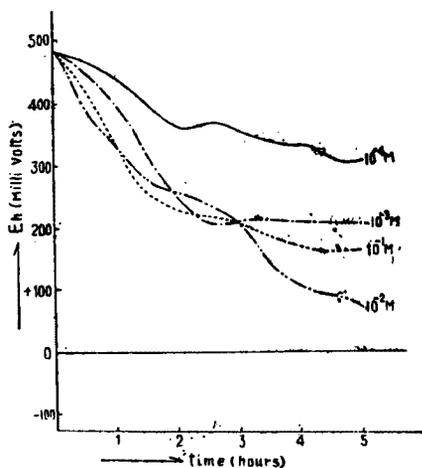
基質濃度 $10^{-4}M$, $10^{-3}M$, $10^{-1}M$, $10^{-2}M$ に

図 7. acetate



おける4時間後の電位は +300 mV, +200 mV, +150 mV, +100 mV を示し 10^{-2} M 濃度で最も低く 10^{-1} M, 10^{-3} M の順に電位の下降が著しい (図 8).

図 8. succinate



vi) malate を基質にした場合

基質濃度 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M とともに +200 mV ~ +300 mV の4時間値を示し, 10^{-3} M 濃度が最も低い電位を示している (図 9).

2) アミノ酸を基質にした場合の研究

i) glutamate を基質にした場合

基質濃度 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, 10^{-1} M で +225 mV, +200 mV, +25 mV, -100 mV

図 9. malate

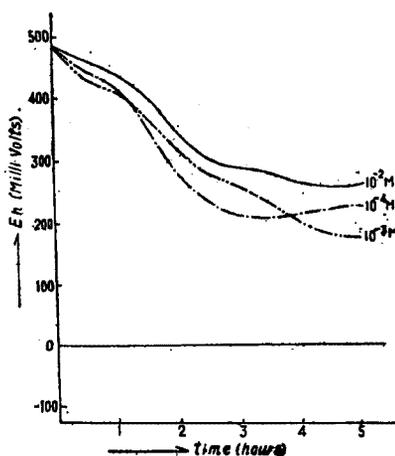
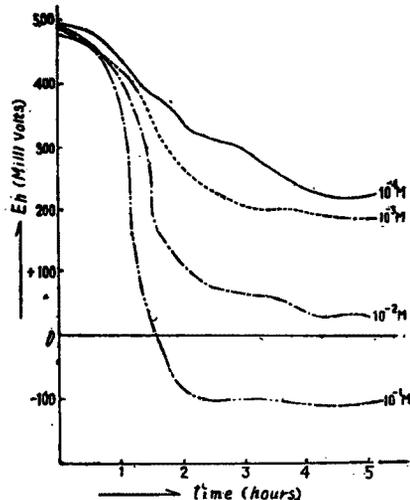


図 10. glutamate



値を示し, 濃度順に下降している (図10).

ii) aspartate を基質にした場合

基質濃度 10^{-1} M, 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M で, 4時間値は +375 mV, +125 mV, +50 mV, -50 mV 値を示し, 濃度の低くなる順に電位の下降が著しい (図11).

iii) alanine を基質にした場合

基質濃度 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M における4時間後の電位は +200 mV ~ +250 mV 値を示し, 濃度別に大差はないが 10^{-4} M が最も低い電位を示している (図12).

3) 上記と同様の実験における, P.B (pH 7.2) と S.S (pH 7.2) との電位の比較

図 11. aspartate

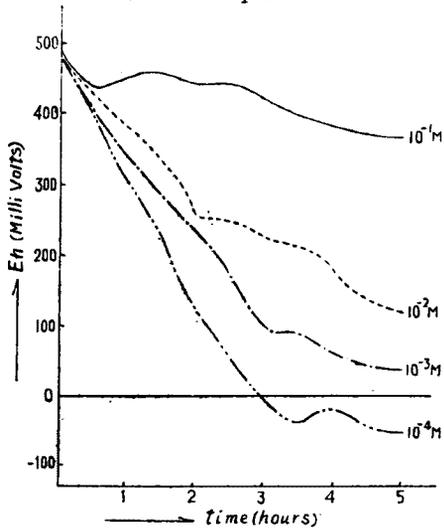


図 13. glucose $10^{-2}M$

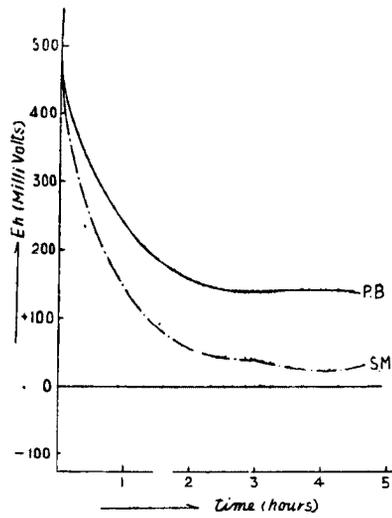


図 12. alanine

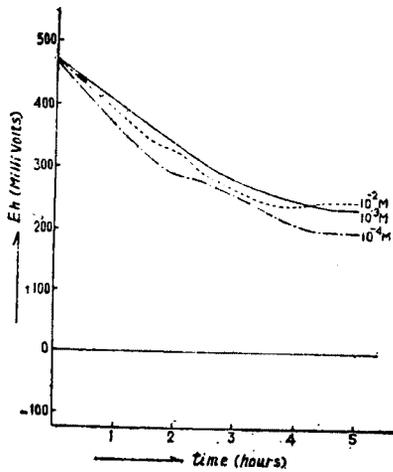


図 14. pyruvate $10^{-3}M$

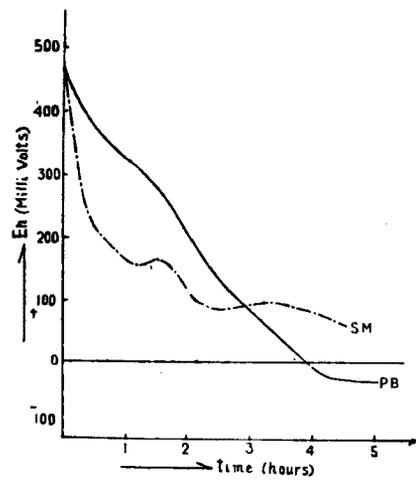
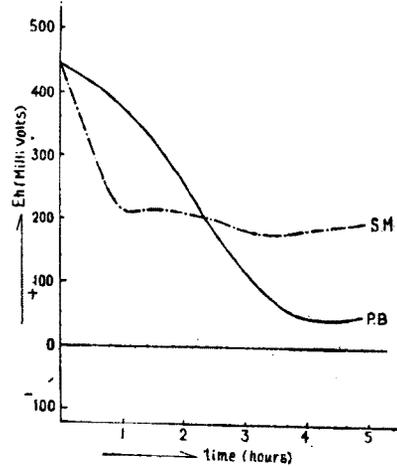


図 15. lactate $10^{-3}M$

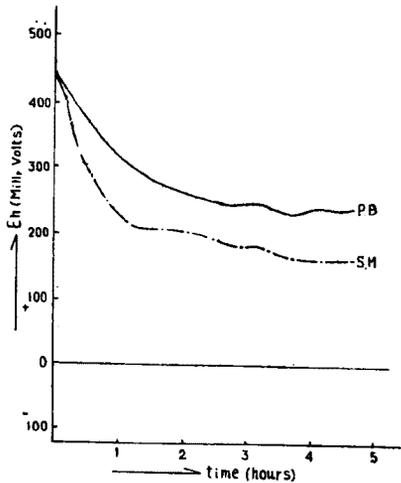


- i) glucose $10^{-2}M$ 濃度の場合
 始めより S.S の方が電位の下降は著明である。4 時間値は P.B で +150 mV, S.S で +25 mV を示した (図 13)。
- ii) pyruvate $10^{-3}M$ 濃度の場合
 2 時間半における電位は S.S の方が低い。4 時間値では、P.B の方がより低下している。4 時間値 S.S で +75 mV, P.B で -25 mV である (図 14)。
- iii) lactate $10^{-3}M$ 濃度の場合
 2 時間値では S.S の方が低い。爾後 P.B の方がより下降している。4 時間値 P.B +50 mV, S.S +175 mV である (図 15)。

iv) acetate $10^{-3}M$ 濃度の場合

始めより S.S. の方が下降が著しい. 4時間値 P.B で +225 mV, S.S で +175 mV を示した (図16).

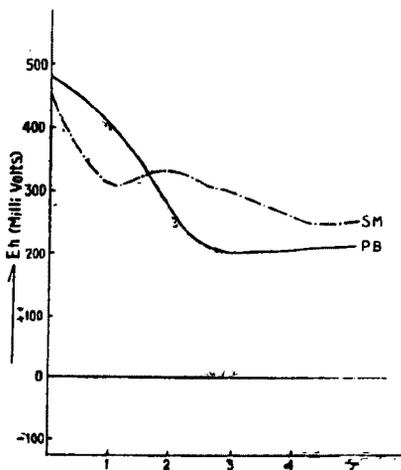
図 16. acetate $10^{-3}M$



v) succinate $10^{-3}M$ 濃度の場合

S.S. の方が1時間半値を見ると低い, 爾後 P.B. の方がより低下し, 4時間値 P.B で +200 mV, S.M で +250 mV を示した (図 17).

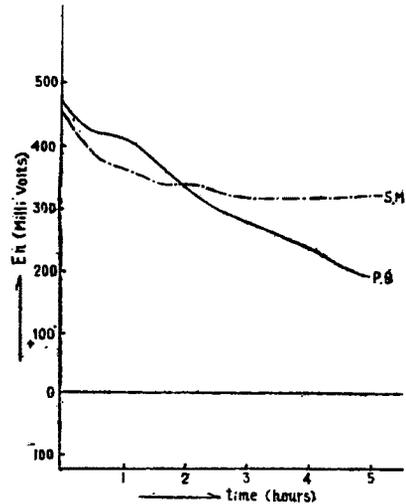
図 17. succinate $10^{-3}M$



vi) malate $10^{-3}M$ 濃度の場合

2時間値は S.S. の方が低い, 爾後は P.B. の方が低い. 4時間値 P.B で +225 mV,

図 18. malate $10^{-3}M$

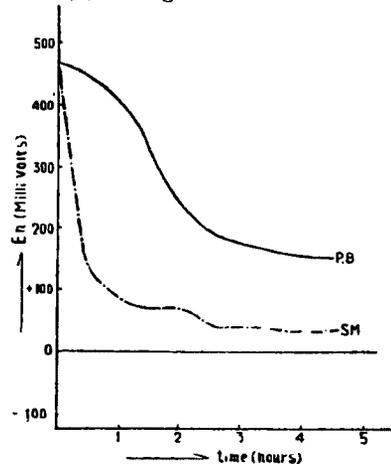


S.S. で +300 mV を示した (図18).

vii) glutamate $10^{-3}M$ 濃度の場合

始めより S.S. の方が電位下降が著しい. 4時間値 P.B で +150 mV, S.S で +25 mV を示した (図19).

図 19. glutamate $10^{-3}M$



viii) aspartate $10^{-3}M$ 濃度の場合

P.B. の方が下降が著しい. 4時間値 P.B で +300 mV, S.S で +50 mV を示した (図20).

ix) alanine $10^{-4}M$ 濃度の場合

P.B. も S.S. も大差はない. 4時間値 P.B で +250 mV, S.S で +260 mV を示した (図21).

図 20. aspartate $10^{-3}M$

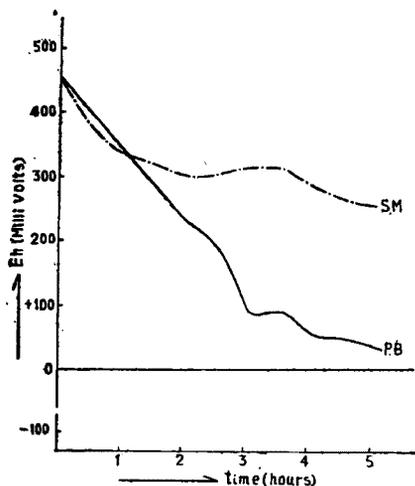
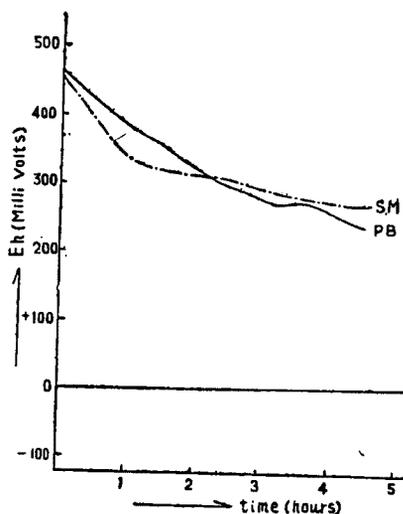


図 21. alanine $10^{-4}M$



IV. 総括及び考按

以上著者は *Sal. typhi* 57 S を供試し medium に $1/50M$ P. B (pH 7.2) 及び S. S (pH 7.2) を用いて、基質 glucose, pyruvate, lactate, acetate, succinate, malate, glutamate, aspartate, alanine の $10^{-1}M$, $10^{-2}M$, $10^{-3}M$, $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ 濃度に添加し、 $37.5^{\circ}C$ で時間を追って電位を測定した。

1) 基質濃度と電位の関係をみると、glucose, pyruvate, malate では基質濃度何れも $10^{-3}M$ における電位が最も低い電位を示し、

それより濃厚なものも薄いものもより高い値を示している。即ち是等の基質では一定菌量における最低電位を示す濃度は凡そ $10^{-3}M$ であると考えられる。acetate, succinate では同様の関係が $10^{-2}M$ 濃度で成立している、lactate, aspartate では基質濃度が $10^{-1}M \sim 10^{-4}M$ の範囲においては薄いもの程、より低い電位を示し、glutamate では全く逆の関係が認められた。alanine では基質濃度と電位の間の一一定の関係は認められなかつた。

2) 基質と最低電位との関係をみると glutamate, aspartate, glucose では最低電位は夫々 $-100 mV$, $-50 mV$, $-30 mV$ で使用基質の中で最も低い電位を示している。之に次いで pyruvate, lactate, succinate で $0 \sim +100 mV$, acetate, malate $+100 mV \sim +200 mV$, alanine $+200 \sim +300 mV$ の順である。

一定基質とそれに対する単離された簡単な酵素系の活性化の場合における電位は一定していることは考えられるが、白金電極によつてその電位を測定する際には、基質濃度、酵素濃度によつて種々の電位値が得られる。従つて休止細菌の場合には、細菌体は極めて複雑な酵素を蔵する酵素 Beutel であると考えられるから一定基質の酸化の場合に於ても実際には複雑な酵素系の活動が存在するものと推測され、体内の状態即ち発育の phase によつて多少の電位の差が見られるであろうし、又電位測定時の medium 中に浮遊せしめた菌の濃度によつて種々な電位値が得られることも当然のことである。

従つて以上の実験で得られた電位は、著者の実験条件に於ける値であることは云うまでもない。

3) $1/50M$ P. B (pH 7.2) と S. S (pH 7.2) に於ける電位測定値を比較してみると、glucose, acetate, glutamate では P. B に比し S. S の方がより低電位を示し、その差は 4 時間後の値では夫々 $+100 mV$, $+80 mV$, $+140 mV$ である。pyruvate, lactate, succinate, malate, aspartate, alanine では S. S に比

し P. B の方がより低電位を示し、その差は夫々 +100 mV, +170 mV, +40 mV, +80 mV, +220 mV, +25 mV である。

V. 結 論

1) *Sal. typhi* 57 S 一定菌量における最低電位を示す濃度は、glucose, pyruvate, malate では 10^{-3} M, acetate, succinate では 10^{-2} M であつた。

2) lactate, aspartate では、基質濃度が 10^{-4} M \sim 10^{-4} M において薄いもの程より低い電位を示すが、glutamate では逆であり、alanine では、その間に一定の関係を認めなかつた。

3) 著者の測定値では、最低電位は glutamate, aspartate, glucose では 0V 以下、pyruvate, lactate, succinate では、0V \sim +100 mV,

acetate, malate では +100 mV \sim +200 mV, alanine では +200 mV \sim +300 mV であつた。

4) P. B と S. S の電位比較では、P. B に比し S. S の方がより低電位を示すのは、基質 glucose, acetate, glutamate で、その逆は pyruvate, lactate, succinate, malate, aspartate, alanine であつた。

5) 以上、基質の種類、濃度又は作用 medium の種類を変えることによつて、チフス菌による電位の下降を厳密に測定した結果、発育電位時間曲線の検索に資する所の多い成績を得た。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を頂いた、恩師村上教授に深甚の謝意を表し、併せて種々御協力をして下さつた、金政、寺坂、矢部の諸先生並びに小野、青山の両氏に厚く御礼申上ます。

文 献

- 1) Gillepsie, R. W. H.: *Soil. Sci.*, **9**, 199, 1920.
- 2) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **24**, 512, 1930.
- 3) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **24**, 676, 1930.
- 4) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **24**, 669, 1930.
- 5) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **25**, 169, 1931.
- 6) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **25**, 858, 1931.
- 7) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **24**, 1551, 1930.
- 8) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **25**, 1445, 1931.
- 9) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **25**, 1452, 1931.
- 10) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **25**, 1641, 1931.
- 11) Hewitt, L. F.: *Bioch. Jour.*, **25**, 2068, 1931.
- 12) Knight, B. C. J. G.: *Bioch. Jour.*, **24**, 1066, 1930.
- 13) Knight, B. C. J. G.: *Bioch. Jour.*, **24**, 1075, 1930.
- 14) Knight, B. C. J. G.: *Bioch. Jour.*, **24**, 1496, 1930.
- 15) Aibel, E., Egami, F. (1935, 2) *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 684.
- 16) Canon, R. K., Cohen, B. and Clark, W. M.: *U. S. P. H. Rep., Suppl.*, **55**, 1926.
- 17) Yudukin, J.: *Bioch. Jour.*, **29**, 1130 (1935)
- 18) 福見秀雄: 昭和15年5月, *実験医学雑誌*, **24**, 5, 734.
- 19) 福見秀雄: 昭和16年4月, *実験医学雑誌*, **25**, 4, 515.
- 20) 川崎浩: *十全会雑誌*, **57**, 515 (1935)

Oxidation-Reduction Potential in Relation to Growth of *Salmonella typhi*

I :

Oxidation-Reduction Potential in Various Substrates

By

Kazuo Akita

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

In order to study some metabolic aspects of *Salmonella typhi*, the author measured the inert electrode potential of the culture media at 37.5 C with the lapse of time. M/50 phosphate buffer and salt solution were used as the fundamental culture media; glucose, pyruvate, lactate, succinate, malate, glutamate, aspartate and alanine as the substrates; *Salmonella typhi* 57 S as the test organism. The results were as follows:

1) The most remarkable fall of potential was observed in the media of 10^{-3} M glucose, pyruvate and malate, and in 10^{-2} M acetate and succinate

2) In the media of lactate or aspartate of the concentration from 10^{-1} to 10^{-4} M, the potential fell with the decrease of concentration of substrate, while, in that of glutamate, the reverse interrelation was observed. In the media of alanine, no definite interrelation was observed.

3) The lowest potential was below 0 V in the media of glutamate, aspartate and glucose; 0 ~ +100 mV in those of pyruvate, lactate and succinate; +100 ~ +200 mV in those of acetate; +200 ~ +300 mV in that of alanine.

4) When glucose, acetate and glutamate were used as the substrates, the fall of potential was less in phosphate buffer than in salt solution, while, when pyruvate, lactate, succinate, malate, aspartate and alanine were used, the fall of potential was less in salt solution than in phosphate buffer.