

## 鳥型結核菌の有機酸代謝

名古屋大学医学部内科第一講座

(指導 日比野進教授)

竹内 浩一・山本 正彦

野村 元旦・田中 伸一

(受付 昭和 30 年 3 月 3 日)

結核治療に化学療法が果たした足跡は、結核統計にあられた最近の諸事実がこれを明示している。

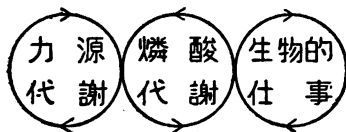
結核が病態生理の上にも病理解剖的にも、また疫学的特異な、多岐に渉る知見を提供していることは言をまない。これ等の諸事実は、その病原菌の特殊性にも直起因する現象と考えられよう。

かく考える時、今後私どもの渴望する化学療法剤は、細菌の有機化学的、生化学的 Characteristics に立し、これから出発した薬剤の探求が行わるべきである。さらに同時に、これが Host に対して取る態度、ま生体が行ういわゆる Defence mechanism との薬剤関連等が綿密に検討されねばなるまい。すなわち結核とこれを宿す生体の dynamic aspect に関する配慮、合理的な将来の化学療法剤には払われなければならないのである。私共はこのような構想の下に研究を行っているが、まず結核菌の諸問題を化学的に取扱つた。

物質代謝の研究は、特に微生物学の領域において 1940 を境として急激な進展をみ、日進月歩という状態である。これは化学の領域における方法論の進歩に負うところが大きかつた。物質代謝の骨格は、これを模式にする下の如くなるよう。

すなわち力源

供給する系、このエネルギーを転換せしめるための磷酸



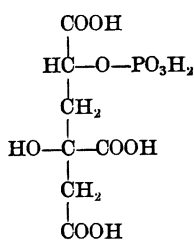
代謝系、それからこれを利用して様々の生物学的な仕事する系の三者に大別出来る。

力源代謝系に関しては、1940 年迄にほぼその解明を見所の解糖酵解の過程に対して、呼吸が負う比重の著大である事が、近々十数年間に次第に明確となつたことは目に値する。

特にこの呼吸が力源給与源として主役を演ずること、かかる力源の転換系たる磷酸代謝と、力源代謝系と共軌軸に係る諸研究において、その重要性が広く認められるに至つたのである。

私は力源給与に主役を演ずる代謝系を、鳥型結核菌を

材料として取上げ、併せて、これと最近重要な化学療法剤の一つである Streptomycin (SM) との関係を研究してみようと企てた。SM の作用機序に関する業績はかなり多いが、その中でも最もまとまつた考え方を提示したのは、Umbreit 一門の研究で、彼等は SM の作用点は焦性ブドウ酸が、Krebs の Tricarboxylic acid cycle



以外の系に入つて代謝される Step を阻害するにあるという考えをのべている。その問題の物質を 2-Phospho-4-carboxy-adipic acid ならんとしたことは、重要な波紋をなげかけた。Umbreit は  $\text{P}^{32}$  を使用してこの主張をさらに支持しようとしているが、TCA Cycle や、Szent-Györgyi の 4-C-dicarboxylic acid cycle に代る新 Cycle を提示するところに迄は進展<sup>24-25)</sup>していないようである。

又この Krebs によつて提唱されたいわゆる Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) に関して、結核菌を材料とする研究を、山村、楠瀬氏等<sup>26)</sup>も取上げ、かかる Cycle は一般に考えられている如く、結核菌においても普遍的な力源給与系であつて、該菌(鳥型)にもあてはまる事を想像している。蓋しその根拠は、結核菌の磨砕、あるいは凍結融解によつてえた。一応無細胞状態の酵素標本により、TCA cycle の各 Member を代謝する酵素の存在を認めたことに基因するものであろう。さらに進んで山村氏等は、コハク酸がリンゴ酸から TCA サイクルを通つて酸化的に生成する以外に、還元的に生成するような経路も存するであろうとのべ、このコハク酸生成系を catalyse する酵素系を Particulate particle として、高速冷凍遠心法で分離している。これが動物細胞における Mitochondria に相当するものであるか否かは研究中の問題であろうが、結核菌体内において、一定のはたらきをもつ Particle があるのである。由来生物学においては、酵素群の存在する事実より、その酵素群の生物学的重要性を云々することが出来ないことは、過去の数多の例証があるのであつて、力源給与系におい

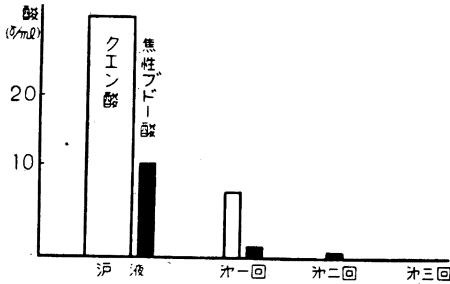
て占める、この酵素群の Biological Significanceは 別個に検討を待つべきものと考えられる。特に無機リン酸の (〜p) への Esterification の如き、いわゆる Energy transferring system との複合酵素系における、上記酵素群の比重を検討し、結核菌における TCA cycle 云々が論じらるべきであろう。私はまず TCA cycle 云々の問題から一旦離れて、有機酸群の全 Pattern を総括的に掴みたいと考え、クロマトグラフィでこれを観察してみた。

実験方法

(a) 結核菌よりの有機酸の抽出法 私どもは実験方法の吟味として、(1) 菌体より培地成分の洗滌除去の条件、(2) 菌体より有機酸群の完全な抽出法、の二点をまず検討した。

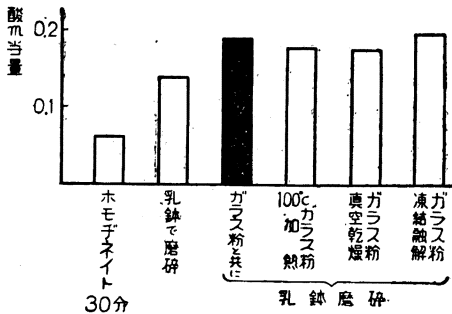
(1) の洗菌については、水で Potter-Elvehjem 型 Homogenizer<sup>9)</sup>を用いて均等化、ついで遠心集菌する。この操作 2 回で培地成分の Contamination なき事が分つた。この間の消息は、第 1 図に明示されている。

第 1 図 洗菌の問題



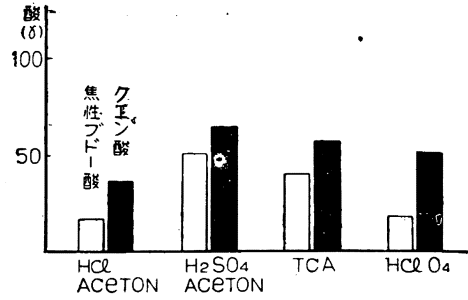
(2) の有機酸の抽出条件については、ガラス粉と乳鉢磨砕の必要が、結核菌を資料とする時重要である事が明らかである。この時の除蛋白方法に関しては H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Aceton ついで Trichloroacetate がよい (第 2, 3, 4, 5 図)。

第 2 図 抽出時の物理的条件

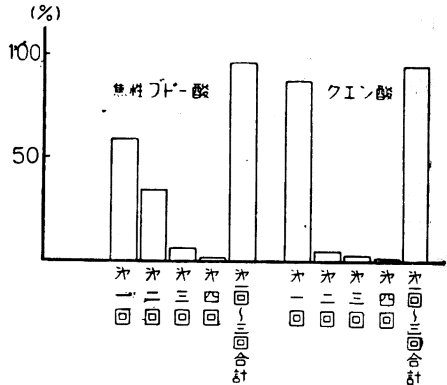


抽出回数は 3 回にて実技上ほぼ完全に近い。これ等の諸予備実験は結核菌に関するほとんど万般の場合に適用すると考えられるが、動物諸臓器や一般微生物の場合に

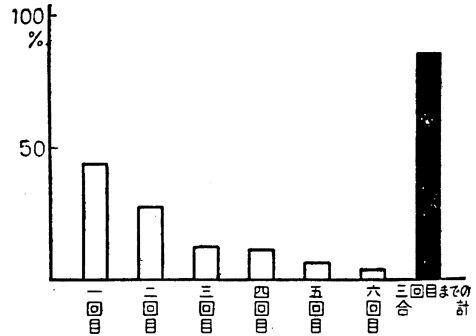
第 3 図 菌体内よりの有機酸抽出条件



第 4 図 有機酸の抽出率



第 5 図 トリクロール酢酸による五炭糖の抽出率



比較して、抽出操作が丹念である必要があることを特筆しておく。

(b) 有機酸代謝の全 Pattern を捉えるべく、私共は Silica gel を固定相に使用する Partition Chromatography 法を用いた<sup>9)-11)</sup>。

(1) Silica gel の活性化: Marshal 法<sup>9)</sup>によつた。すなわち水ガラスに濃 HCl をゆるやかに注加して、Silica gel の沈澱を作る。これを HCl につけたまま熟成せしめること 7 日、ついでこれを蒸留水で丹念に、Cl<sup>-</sup>の消失するまで洗滌する (数十回)。これをアルコール、次にエーテルで洗い、Silica gel を乾燥せしめ、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の除湿器内に貯える。

(2) 溶媒: エステル化しないという特性を利用して、tert. Amyl alcohol が常用されているが、高価で不経済

である点を考慮し、Butanol を使用する方法を採用した。Butanol を Phenyl hydrazine 共存下に精溜する。これは全スリ合せの精溜器で行う。酸の blank をなくするため、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 下でこれを再度蒸溜する。接合にゴム、コルク等の使用は避けた。クロロホルムは濃硫酸と分液戸斗で、濃硫酸層が、黒く着色しなくなるまで振盪する。これを Butanol の場合と同様、蒸溜する。展開に使用する溶媒は最初、純クロロホルム、ついで 5%、10%...→と Butanol の含量を増加させ、極性の大な溶媒に漸次移行するような Gradient を作る。クロロホルムはフォスゲンを貯蔵中に副生するから、クロロホルム、ブタノール混液を精製直後に作り、冷暗所へ貯える。展開に使用する溶媒は下の如きものである。

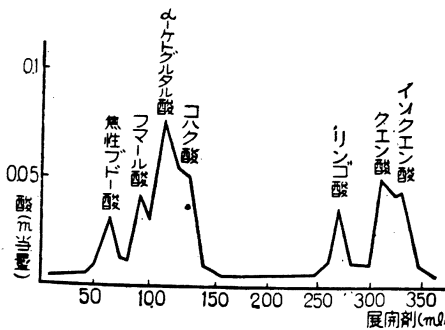
溶媒 ml	Chloroform の %	Butanol の %
50	100	0
"	95	5
"	90	10
"	85	15
"	80	20
"	75	25
"	70	30
"	60	40
"	50	50
"	30	70
"	0	100

(3) 純粋の有機酸についてまず、私の Silica gel 法による回収率は図示の如く、ほぼ満足すべきものと考えられる。また、純粋な有機酸の混液について分離の状況及び回収率を調べてみても、ほぼ、良好と考えられる(第1表、第6図)。

第1表 各種有機酸の回収率 % (各酸 0.2m 当量)

有機酸	実験	1	2	3	平均
焦性ブドウ酸		109.5	100.2		104.8
フマル酸		89.1	98.5		93.8
α-ケトグルタル酸		81.1	100.2	101.3	94.2
コハク酸		93.2	99.2	109.4	100.5
リンゴ酸		95.2	82.3	102.4	93.1
クエン酸		112.3	108.0		110.1
インクエン酸		90.2			90.2

第6図 有機酸純品混合物の分離流出状態



(4) 結核菌の有機酸群の取扱い方: 先に記した如く、洗菌し、Sauton 培地約 10l の 4~5 日培養菌を集め、所定の条件で菌を incubate、硫酸アセトン、トリクロール酢酸液のいずれかで有機酸を抽出する。

(イ) エーテル抽出法: 硫酸アセトンで有機酸を菌体より抽出し、NaOH 又は KOH で中和する。これを減圧濃縮後、エーテル抽出器にかけて全有機酸をエーテル層に抽出する。抽出時間は通常 10~20 時間を要する。抽出が完了したらエーテルを溜去後、なるべく少量の Butanol に取つて、Silica gel 柱にかける。

(ロ) Ba 塩法: トリクロール酢酸で前述の如く有機酸を抽出し、これに 25% 酢酸 Ba 5cc 及び 4~5 容の純アルコールを加える。pH を 8~8.5 とし、氷冷する。氷冷後夜後遠心して、Ba 塩を集める。Ba 塩をなるべく少量の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (N/10) ですり、有機酸を抽出する。BaSO<sub>4</sub> の沈澱を更に 2 回 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (N/10) で丹念に洗つて有機酸を完全に抽出する。抽出液を合一して、中和濃縮後、可及的少量の Butanol で有機酸を 3 回抽出し、Silica gel の Chromatograph Column の上へ置く。

これを Chloroform butanol で展開するのであるが、展開溶媒の組成は上述の如きものである。

酸素吸収は通常の Warburg 型 Microrespirometer で計測した<sup>12)</sup>。

Ketoacids 群は、Friedman 法<sup>13)</sup>で 2-4-dinitrophenyl hydrazine で各々の hydrazone とし、Pyruvic acid のそれを Xylol で、α-Ketoglutaric acid のそれを醋酸エチルでそれぞれ抽出し、これを各々、炭酸ソーダに転溶せしめ、アルカリで発色せしめて、Beckmann の Spectrophotometer で定量する。

クエン酸は Natelson 法<sup>14)</sup>で測定した。Pentabrom-aceton に化せしめたものを、石油エーテルで抽出、これをチオ尿素で発色せしめることにより特異的にクエン酸の微量定量が可能である。

揮発性の有機酸は Maclendon 法<sup>15)</sup>で水蒸気蒸溜に付し、定量した。

有機酸の Chromatography は、Methyl ester に化せしめたものを、水飽和ブタノールで展開、これに NH<sub>2</sub>OH をふきかけて各々有機酸の Hydroxamate にして FeCl<sub>3</sub> で発色せしめた<sup>16)</sup>。

リンゴ酸の同定は、試料を少量の Ba-acetate, 4~5 容のアルコール添加、pH 8.5, 0°C, 数時間放置にてリンゴ酸を Ba 塩として捕取。これを SO<sub>4</sub>'' で除 Ba 後、硫酸、Hydroxamic acid 反応により、螢光物質に化せしめて確認した<sup>17)</sup>。

それ以外、有機酸の同定確認は顕微融点測定機でその融点測定により施行した<sup>18)</sup>。

Streptomycin は硫酸塩を使用した。

除蛋白用 Aceton<sup>19)</sup>は、KMnO<sub>4</sub> 被酸化物を除去後、

精溜して用に供する。これにて 5 ml/l の硫酸 Aceton, 塩酸 Aceton を調製して使用した。

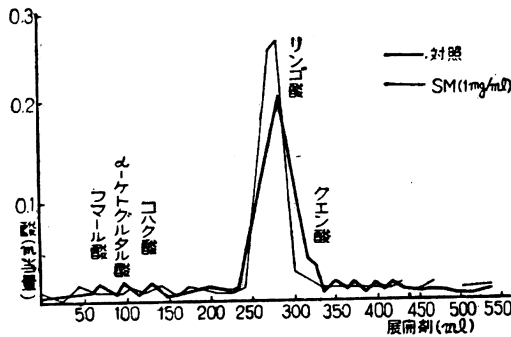
Cocarboxylase は, Viscontini, Karrer の法<sup>20)</sup>により合成した。Monophosphate, Disphosphate, Triphosphate の分割はアルコール・アセトン混液による方法は不完全で, Resin, IRC-50 によるがよい。

実験成績

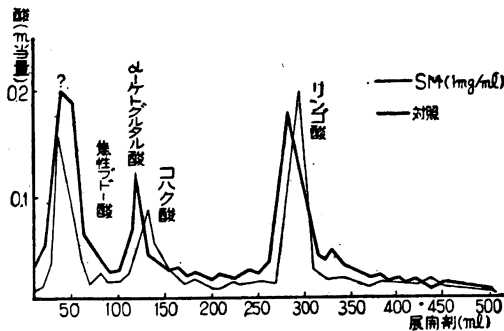
鳥型結核菌の Trichloracetate 抽出物を, 0°C で, 数 ml の Ba Acetate 及び 4 倍量のアルコールを添加, pH 8.5, 30 分放置で, 有機酸を Ba 塩として沈澱せしめ, 該塩を SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> で除 Ba 後上述の Silica gel Chromatography で展開した (第 7 図)。

SM と 2 時間接触せしめた菌のそれを, 同時に附記しであるが, リンゴ酸の大きな Peak が目立つ。

第 7 図 Ba-塩法による有機酸のシリカゲルクロマトグラフ



第 8 図 エーテル抽出法による有機酸のシリカゲルクロマトグラフ



結核菌の硫酸 Aceton 抽出物を濃縮後, エーテル抽出器にかけて, 有機酸群を抽出し, 同様 Silica gel Chromatography でひらいたのが第 8 図であるが, 同様リンゴ酸の大きな Peak が目立つ。共に SM は大きな影響を与えぬ事が第 7, 8 両図から分る。更にこの際 α-ケトグルタル酸, 焦性ブドウ酸, クエン酸については各々別に化学的定量を行ったが, SM はやはり著変を与えぬ事が分つた (第 2 表)。なおこの結核菌がリンゴ酸脱羧を行う事は興味を唆る事実である。

第 2 表 SM による有機酸の消長 (SM 1000 r/ml 有機酸量 (r)/菌乾燥 g)

実験		1	2	3	4	5
α-ケトグルタル酸	対照	135	170	105	120	195
	SM	151	175	105	100	160
焦性ブドウ酸	対照	100	100	110	150	130
	SM	96	96	112	144	152
クエン酸	対照	222	196	222	192	204
	SM	222	196	222	192	240

この第 7, 8 図において縦軸は, 酸度の Mol 当量, 横軸は溶媒の流出量である。流す液の最初は, 純粋の Chloroform を, ついで 50 ml 毎に Butanol 含量を 5%, 10%, 20%…… と次第に高め, 溶媒の Polarity を高めて行く。流出液の 10 ml ずつを Automatic fraction collector で分取してその酸度を滴定で測定すると同時に, その Fraction number と, 純品のその比較よりそれぞれの有機酸を同定したものである。

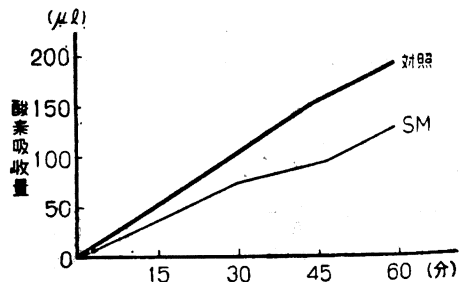
リンゴ酸の Peak については上述した H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>・NH<sub>2</sub>OH 蛍光反応の外, N を含まぬこと, Ninhydrin 反応 (-) その他より同定した。

次に私は, 糖質代謝の十字路に立つ焦性ブドウ酸の動きと, SM の関連を 2, 3 研究してみた。結核菌の懸濁液を, Cocarboxylase, Mg<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 等の共存下に, 焦性ブドウ酸を基質として, Warburg の Microrespirometer で酸素吸収を計測すると, SM はこれを抑制する (第 3 表, 第 9 図)。

第 3 表 焦性ブドウ酸酸化の反応系

鳥型竹尾菌ガラス粉抽出液	1 ml
焦性ブドウ酸ソーダ	100 μM
コカルボキシラーゼ	100 r
MnCl <sub>2</sub>	1 × 10 <sup>3</sup> M (終濃度)
メチレン青	500 r
pH 6.0 磷酸緩衝液	M/20 (終濃度)
全量	2.4 ml

第 9 図 SM による焦性ブドウ酸酸化の影響



これは焦性ブドウ酸の菌による利用が低下している為であることが, 該酸を Friedman 氏法で実際に計測して明確となつた (第 4 表)。然しこの際クエン酸の量には変化ない事が Natelson 法で定量して明示された (第 4 表)。

第4表 SMの焦性ブドウ酸代謝に与える影響

竹尾鳥型4日菌	5000 mg (乾燥量)
焦性ブドウ酸ソーダ	2000 μM
コカルボキシラーゼ	1000 r
MnSO <sub>4</sub>	1×10 <sup>-3</sup> M (終末濃度)
pH 6.0 磷酸緩衝液	M/50 (終末濃度)
全量 50 ml	3時間 37°C

	焦性ブドウ酸消費 (MM)	菌体内焦性ブドウ酸(γ)		クエン酸(γ)	
		菌体内	菌体外	菌体内	菌体外
SM (1000 r/ml)	510	40		16	360
対 照	620	23		16	340

焦性ブドウ酸の酸化分解をSMが抑制するにも拘わらず、クエン酸量の影響を与えぬ事は、奇異な現象でこの顛末を解決する事が必要になる。クエン酸代謝にSMが著変を与えぬ事は、クエン酸を基質とした時の酸素吸収、またその際の諸有機酸の定量成績から明らかとなつた(第5, 6, 7表, 第10図)。反応系は第5表の如きものを採用した。

第5表 クエン酸酸化の反応系

鳥型竹尾菌ガラス粉抽出液	1 ml
クエン酸ソーダ	50 μM
メチレン青	500 r
MgCl <sub>2</sub>	1×10 <sup>-3</sup> M (終末濃度)
pH 7.2 磷酸緩衝液	M/20 (終末濃度)
全量	2.4 ml

第6表 SMのクエン酸代謝に与える影響

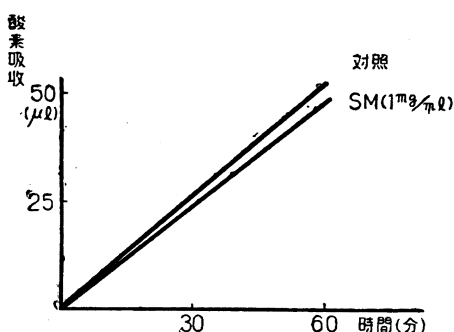
竹尾鳥型4日菌	1.5 g (乾燥量)
pH 7.2 磷酸緩衝液	M/50
クエン酸ソーダ	2500 μM
MgCl <sub>2</sub>	1×10 <sup>-3</sup> M
37°C	3時間 50 ml

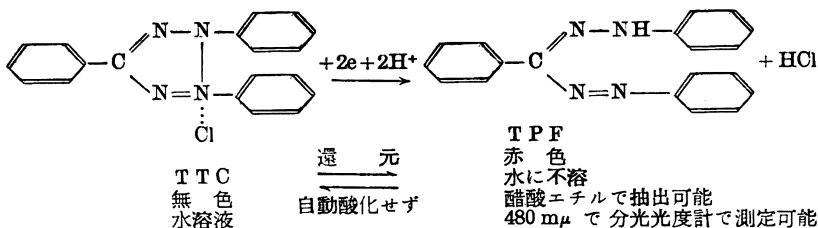
	クエン酸消費 (μM)	菌体内クエン酸 (γ)	焦性ブドウ酸 (γ)		α-ケトグルタル酸 (γ)	
			菌体内	菌体外	菌体内	菌体外
SM (1000 r/ml)	680	98	78	268	216	402
対 照	680	88	81	274	185	385

これらの消息を明らかにする為再度研究方法を変えてこれを取扱つてみた。焦性ブドウ酸の結核菌による利用のSMによる影響をTTC(2・3・4 triphenyl tetrazolium chloride)で研究してみた。TTC⇌TPFの反応は第11図に略記せる如くで、TPFがAutoxidationしない事がかかる実験に従来賞用されたメチレン・ブルーにない美点である。焦性ブドウ酸を水素供与体としてTTCのTPFへの還元状況を検討してみると第12図

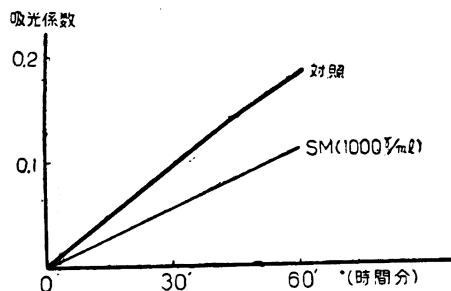
第10図 SMのクエン酸酸化に与える影響



第11図 TTC (2・3・5 トリフェニールテトラゾリウムクロライド)



第12図 TPFの生成量



第7表 SMのクエン酸合成に与える影響

鳥型竹尾4日菌	500 mg (乾燥菌量)
コカルボキシラーゼ	1000 r
MnSO <sub>4</sub>	1×10 <sup>-3</sup> M
pH 7.3 磷酸緩衝液	M/50 (終末濃度)
焦性ブドウ酸ソーダ	1000 μM
リンゴ酸	1000 μM
37°C	3時間 全量 50 ml

	焦性ブドウ酸消費量 (μM)	菌体内焦性ブドウ酸(γ)	クエン酸(γ)	
			菌体内	菌体外
SM (1000 r/ml)	538	64	96	820
対 照	672	53	92	800

の如く、SMがこれを抑制する事が判明し、先述せる酸素吸収や、焦性ブドウ酸の実測成績からの観察と軌を一にする結果がここでもまた得られた。焦性ブドウ酸の生体内運命として当然想起されるのはクエン酸であるが、この問題を更に第7表に示すような反応系で検討してみた。すなわちOxalacetate前駆物たり得るリンゴ酸を

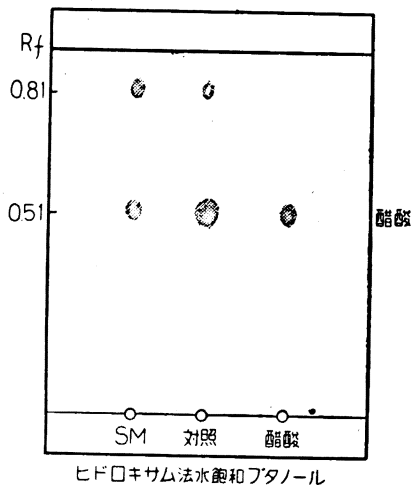
共存させて、焦性ブドー酸の運命を検討してみた(第7表)。

これにより先に記した如く、焦性ブドー酸の消費が、SMにより抑制される事は確認されたが、クエン酸量はこの際もやはり変化がない。

かくの如き実験成績を総合すると、結核菌の焦性ブドー酸の運命が、一旦クエン酸に入ってから代謝されるものなるや否や若干疑わざるを得ない。

先の有機酸の Silica gel Chromatography の項で、詳細にふれなかつたが、エーテル抽出法で施行した第8図の成績において、左端の Peak は目下検討中で、酢酸が有力視されている。私共はこれに関連して、結核菌の除蛋白液につき、これを水蒸気蒸溜に付して、揮発性の有機酸を捕捉し、定量してみた。その結果、SMはこれの量を減少せしめる事が判つたが、これをアルカリで中和後濃縮して、Methylester 化後、Paperpartition Chromatography で水飽和ブタノールを用いて展開し、これにつき、NH<sub>2</sub>OH で有機酸の Hydroxamate とし FeCl<sub>3</sub> で発色せしめると、Rf 0.81, 0.51 の2個所に Spot をみとめた。Rf 0.81 のものは未だ同定出来ない(第13図)。

第13図 有機酸(揮発性)のクロマトグラフ



そして添加側と、対照と比較して大差をみとめない。

Rf 0.51 のものは酢酸であり、SM 添加側の Spot の著しく小さい事が認められる。これ等の成績を総合すると Ether 抽出法、Silica gel Chromatography の実験の左端 Peak が、SM で低い事より酢酸がやはり考えられ、揮発性有機酸の中、SM で減少するのは酢酸である事が分る。

## 考 案

かかる諸成績を多角的に検討してみると、鳥型結核菌竹尾株は、リンゴ酸醗酵を行う。最近山村等は、結核菌

の Granule を、高等動物について Mitochondria 調製法にならつて、冷凍高速度遠心機によりとり、この呼吸酵素群を精査した<sup>22)</sup>。それによれば、私共と同じ、竹尾鳥型結核菌からとつた Granule がリンゴ酸メ化を旺盛に行う事を発見した。これは私共の有機酸群の Migration Pattern で、リンゴ酸の著大な Peak をみた事実と考え合せて興味ある問題である。

なお SM 問題に関連しては、特に焦性ブドー酸の代謝の面から、若干興味ある知見を得た。すなわち、焦性ブドー酸の結核菌による利用は、SM でかなりの抑制をみるが、その運命として、クエン酸の面を観察すると、SM は認むべき影響を与えない。焦性ブドー酸の上記現象は、酸素吸収、TTC の還元、化学的定量の三者から確認されているから、まず確定的と考えられる。クエン酸の方も、焦性ブドー酸を基質とした時、及び(焦性ブドー酸+リンゴ酸)を基質とした時のクエン酸の定量値、またクエン酸を基質とした時の酸素吸収や、クエン酸の消失状況により、SM がこれに影響を与えぬ事はまず動かし難い。かく考え来ると、焦性ブドー酸は Umbreit 等の主張する如く、TCA cycle 以外の系に入つて代謝されて行くものの如き印象を与えるのである。

私共は別に SM の作用機作に関してかなり広汎にその侵襲点を探索し、次のような成績を得ている<sup>23)</sup>。SM 感性菌は SM に遭遇すると、大炭糖の利用にも、無機磷酸の Adenyl 酸系への固定にも SM で変化をうけぬが、この Transphosphorylation system が強く被毒をうける。特にこの時 RNA の荒廃の著しい事を発見した。この事実を、P<sup>32</sup> を Tracer として証明した。

晩近の細胞化学の進歩<sup>24)25)</sup>は、TCA cycle を触媒する酵素群や Oxidative phosphorylation 等々の所謂複合酵素系 (Multienzyme system) は細胞顆粒に集中して存在しており、これはかかる諸酵素蛋白の他、Lipoid RNA が重要な構成因子であると考えられている<sup>26)27)</sup>。かかる生化学者として分劃遠心法で得た顆粒が、古くより形態学的に取り扱われて来た Mitochondria と同一物でないかと考えられるに至つており、生物学の一つの大きな動向である「形態と機能の統一」が、一部、生化学の領域で推進されつつある事は興味深い。

さてこのような生化学の最近の知見を導入して、私共の実験を再度考え直してみよう。SM は磷酸代謝特に RNA を極度の擾乱状態に陥れる事が分つている。これに対して、力源代謝系に関しては、焦性ブドー酸の利用を若干抑制する事実以外、SM はみるべき影響を与えぬ事に大勢は帰結した。要之、SM の侵襲点の核心は、磷酸代謝、特に RNA の障害にあり、私共の手によつて、抽出確認された一新 RNA 類縁物質は、その具体的裏付とならう。換言すれば、Mitochondria の如き細胞顆粒の支柱物質 RNA の荒廃が、間接に複合酵素系の Un-

balance を招来するであろう事は容易に諒解しうる所である。焦性ブドウ酸について私共の観察した事実は、かかる範疇の一例証と考えられないであろうか。

かく考えると、RNA と蛋白の合成転換の密接な関連に関する最近の考えより、SM の Bacteriostatic な作用も鮮かに諒解出来る。適応酵素産生阻止の現象、酵素の崩壊転換の SM による釘づけ現象等にも、総て一応矛盾なく理解出来るであろう。

### 総 括

1) 鳥型結核菌々体内有機酸群を定量的に抽出する条件を吟味した。

2) Silica gel を固定的に使用する Partition Chromatography で、TCA cycle に現れる有機酸群の分割を、まず純品で検討し、Rf 値を決定した。

3) 鳥型結核菌について該方法を適用し、リンゴ酸酐酵を行う事を確認した。同時に若干酢酸の貯留の存在を認めた。それ以外の有機酸含量は極めて低い。

4) SM は有機酸群の Migration pattern に認むべき変動を与えない。

5) SM は焦性ブドウ酸の代謝を抑制する事を、酸素吸収、化学的定量成績、及び Triphenyl tetrazorium chloride の還元値より確定した。

6) 5)の事実にも拘わらず、クエン酸の代謝は諸種の条件下において、SM で影響を蒙らない。かかる実験事実より焦性ブドウ酸が、鳥型結核菌にては TCA cycle 以外の経路で代謝して行く可能性も考え得よう。

7) SM を作用せしめた菌体内には、酢酸が減少している事を水蒸気蒸溜法、及び Paperpartition Chromatography により確定した。

3) SM は RNA を中心とする 隣酸代謝に侵襲の中心があるとする、私共の SM の作用機序説を述べ、本研究において詳述した有機酸代謝と、SM の関連を、私共の機作論より研究した。

### 文 献

- 1) Sumner, Mybäck: The Enzymes, Chem. and Mech. of Action. Vol. 1, Vol. 2. (1950, 1951).
- 2) Umbreit, W. W., E. L. Ogirsky, P. H. Smith: J. Bac., 58, 76. (1949).
- 3) Umbreit et al.: *ibid.*, 58, 769. (1949).
- 4) Umbreit et al.: *ibid.*, 66, 74. (1953).

- 5) Umbreit et al.: J. Biol. Chem., 177, 704. (1949).
- 6) 山村雄一: 結核, XXVII, 第27回日本結核病学会総会特別講演.
- 7) 山村雄一・楠瀬正道・楠瀬恵美: 結核, XXVIII, 34. (1953).
- 8) Potter, V. R., and C. C. Elvehjem: J. Biol. Chem. 114, 495. (1936).
- 9) Marshall, L. M., J. M. Orten, and A. H. Smith: *ibid.*, 179, 1127. (1949).
- 10) Frohman, C. E., J. M. Orten, and A. H. Smith: *ibid.*, 193, 277. (1951).
- 11) Marvell, C. S., and R. D. Rands: J. Am. Chem. Soc. 72, 2642. (1950).
- 12) Umbreit, W. W. et al.: Manometric Techniques and Tissue Met. (1949).
- 13) Friedman, T. E., and G. E. Haugen: J. Biol. Chem. 147, 415. (1943).
- 14) Natelson, S., J. B. Pincus, and J. K. Lugovoy: *ibid.*, 175, 745. (1948).
- 15) J. F. Maclendon: *ibid.*, 154, 357. (1944).
- 16) Fink, K., and R. M. Fink: Proc. Soc. Exp. Med., 70, 654. (1949).
- 17) Hummel, J. P.: J. Biol. Chem. 180, 1225. (1949).
- 18) 化学実験学 (基本操作篇) (河出書房)
- 19) 桑田 智: 溶剤
- 20) Viscontini, Bonetti, Ebnöthe, Karrer: Helv. Chem. Act., 34, 1385. (1951).
- 21) 標準生化学実験法 (文光堂版) (1953).
- 22) 山村雄一他9名: 第29回日本結核病学会総会演説.
- 23) 日比野進: 結核 (特別号), XXIX, 第29回日本結核病学会総会特別講演.
- 24) Schneider, W. C., A. Claude, and G. H. Hogeboom: J. Biol. Chem., 172, 451, 619. (1948).
- 25) Lehninger, A. L., and E. P. Kennedy: *ibid.*, 173, 753. (1948).
- 26) Green, D. E., W. F. Loomis, and V. Auerbach.: *ibid.*, 172, 389. (1948).
- 27) Edsall, J. T.: Enzymes and Enzyme Systems. (1951).