

鳥型結核菌竹尾株の磷酸代謝に関する知見補遺 (P³²による実験)

杉林 礼三・茂兼 英寿
伊藤 和彦・田中 伸一

名古屋大学医学部内科第一講座—指導 日比野進教授

緒 言

Streptomycin の in vitro, in vivo における結核菌に対する効力は、はなはだ顕著なものであり、この抗菌作用に関して、その作用点、作用様式の解明に多数の学者が種々の研究を発表している。

すなわち、S.S. Cohen¹⁾らは Streptomycin が in vitro で DNA と不溶性の沈澱を作ることを見出し、生体内における Streptomycin の抗菌力も、菌の DNA と沈澱をおこすことにより招来されると考えた。しかしこの説に対しては、Donovik²⁾らは種々の電解質の Streptomycin の抗菌力に対する影響や、Streptomycin—DNA 沈澱物に対する DNAase の作用、また Streptomycin が DNA を沈澱させる傾向と、菌の発育を阻止する傾向の違い、等より否定している。Streptomycin と核酸との関係については Ryback³⁾らは、Streptomycin は RNA-depolymerase を抑制すると言っている。また Geiger⁴⁾らは大腸菌において Serine の酸化は添加する Catalytic amount の Fumarate の酸化により刺戟されるが Streptomycin はその刺戟を妨げる。おそらく、Serine の酸化に必要な Fumarate の酸化の中間産物の作用を妨げるであろうと言っている。また Umbreit^{5)–9)}らも、大腸菌に対する Streptomycin の作用に関する一連の研究において、有機酸代謝と Streptomycin の関係を追求して、焦性ブドウ酸およびフマル酸の酸化が、これをそれぞれ単独に基質として用いたときは Streptomycin による影響は少ないが、両者ともに用いた場合の酸化に対しては強く阻害することを発見した。これにより Streptomycin は焦性ブドウ酸とオキサロ酢酸の縮合を阻害することにより終末呼吸系を阻害するものであると考えた。これに対し、Barkulis¹⁰⁾は anaerobic な状態では Streptomycin は焦性ブドウ酸の metabolism を阻害すると言っている。わが教室の竹内、山本¹¹⁾らも Streptomycin は鳥型結核菌においては焦性ブドウ酸の利用を抑制し、焦性ブドウ酸を基質とする酸素吸収や、T.T.C.の還元を抑制するが、クエン酸量には何ら変化を与えないし、クエン酸を基質とする呼吸には影響を与えないことを見ている。しかし Umbreit⁹⁾らはさらに研究を続け、Pyruvate→

Acetate+Formate→H₂O+O₂ の反応系に対し、Streptomycin は何ら影響しないことを見出し、さらに Raport and Wagen^{12)–14)}が犬の肝より取り出した。2—phosph—4—hydroxy—4—carboxy—adipic acid が大腸菌では Pyruvate と Oxalacetate あるいは Fumarate を加えることにより生成され、Streptomycin はその生成を著明に阻害すると言っている。また Zeller¹⁵⁾らはデアミン酸化酵素の阻害をいい、奥貫、山村^{16)–17)}らは安息香酸の酸化阻害より、Streptomycin の適応酵素産生の阻害を強調している。教室の石下¹⁸⁾らもニコチン酸を用いて、その適応酵素産生が阻害されることを証明している。

わが教室では数年来 Streptomycin の結核菌に対する作用を、磷酸代謝、有機酸代謝、アミノ酸代謝、含窒素ヘテロ化合物の代謝、等より研究してきた。私は磷酸代謝の面より、Radio-isotope P³² を用いて研究してきたので、その結果を報告する。

生体の物質代謝を Radio-isotope を用いて研究する方法は近時急激に発達し、多数の論文が発表されている。今までの方法では不可能と思われた問題についても種々の輝かしい成果をおさめている。殊に物質代謝を動的に観察しようとするときには、この方法は不可欠のものであり、その応用範囲は極めて広い。しかし一面、Radio-isotope を用いる実験は、それを用いない今までの実験方法をそのまま適用できない点が多く、困難なる問題が種々ある。Radio-isotope を用いるとき、最も注意を要することは、Contamination を如何にして除くかということ、Sampling の条件を同一にするということであろう。また生体内の磷酸化合物を取扱うとき、その生物学的に種々重要な役割をえんずる、高エネルギー磷酸結合は、pH および熱に対して非常に不安定であり、これら種々の点を考慮して、その実験方法には最大の注意を払った。もちろん Radio-isotope の実験方法は未だ確立されたとはいいい難く、われわれの用いた方法もなお不備な点のあることは認めざるをえないが、実験方法は今後なお幾多の研究を要するとして、現在では一応これで満足せざるをえないであろう。

私の実験は Streptomycin が結核菌の磷酸代謝に及ぼす影響に関する一連の研究の一翼として行つたもので

あり、Radio-isotope の実験により磷酸代謝のすべてを論ずることはできないが、これらの研究の総合は他日二期するとして、ここでは私は Radio-isotope による実験によりえた成績につき説明しようと思う。

実験方法および材料

材料として、鳥型結核菌竹尾株の Sauton の液体培地に4日間培養した菌を用いた。菌はガーゼを3枚重ねて濾過し集菌する。その菌を Potter-Elvehjem 型の Homogenizer で菌の水洗の目的で、均等化ついで遠心の操作を3回行う。菌に附着する培地の成分はこれで充分取り除くことができる(山本¹¹⁾ら。

これを、蒸留水にて菌浮游液を作り、Glycyl-glycine (final Concentration M/10とす) Buffer にて、pH を7.2 に調製し、Streptomycin およびP³²を加え 37°C 水浴中に incubate して各磷酸化合物への P³²の Incorporation を見たのであるが、Streptomycin の作用時間およびP³²を加える時期および作用時間の詳細については、各実験毎に記載する。各磷酸化合物の抽出は、酸溶性劃分については Umbreit¹⁹⁾の方法により、酸不溶性劃分については Schmidt-Thannhauser²⁰⁾の方法に

よつた。

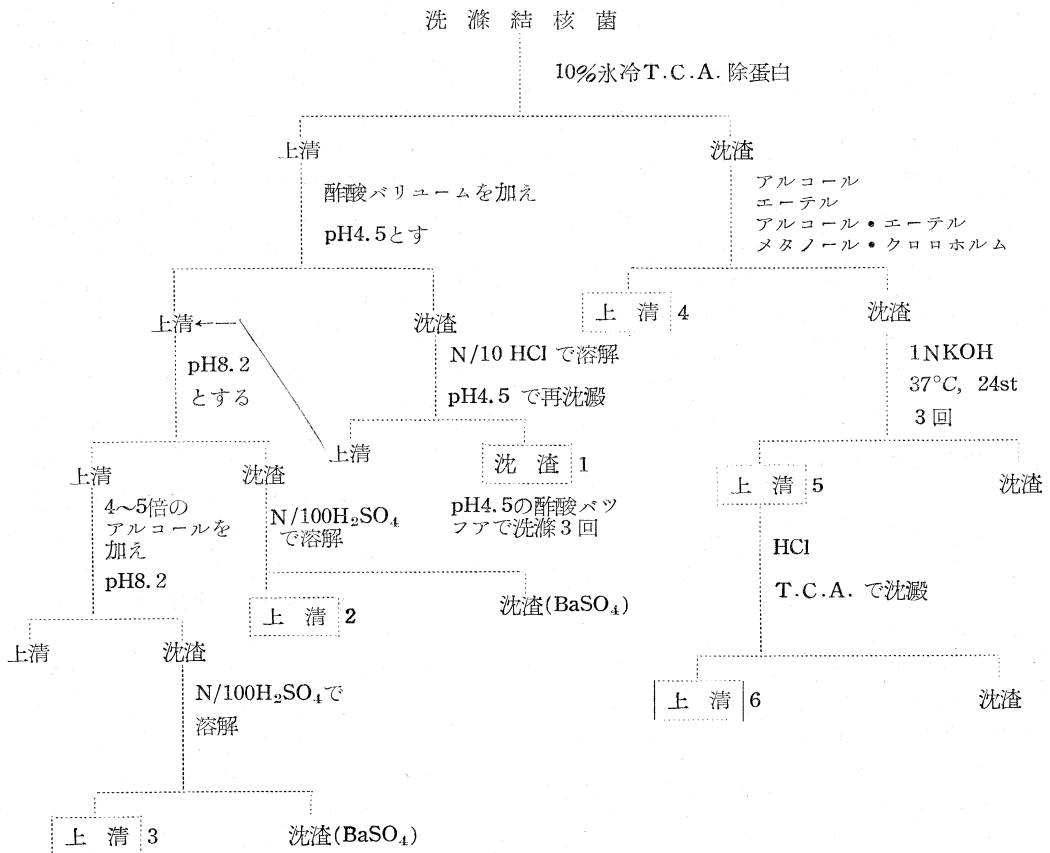
図1はこれをまとめたものであるが、そのおのおのについて詳述すると(図1参照)

A. 酸溶性劃分の抽出

酸溶性劃分の抽出は、まず反応液に final Concentration 10%に、氷冷 Trichloroacetic-acid (以下T.C.A. と略)を加え、反応を止め、氷水中に10分間放置する。この間ときどき強く振盪し、遠沈濾過して、上清を第1回抽出液とする。沈渣を10%氷冷 T.C.A. にて遠沈管内で10分間充分にねる。遠沈濾過して、上清を取る。この方法を3回~4回行い、上清を合して酸溶性劃分とし、各化合物にわけた。

1) 酸性 (pH4.5) にてバリウム塩をつくる劃分
T.C.A. 抽出液に、少しく過剰の25%酢酸バリウムを加える。この場合は、沈澱が少量なるため、Carrier として、極く少量の第一磷酸ソーダを加え、氷冷中にて NaOH で pH4.5 にし、15分間放置する。この間しばしば、管壁をガラス棒でこすり沈澱を促進させた。これを遠沈し、沈渣を N/10 HCl で溶解し、再び pH 4.5 として再沈澱させる。上清は前の上清に加えて、次の劃分とする。沈渣は少量の酢酸バリウムを含む pH 4.5の

図 1 結核菌より各磷酸化合物の抽出



酢酸 Buffer にて5回洗滌する。これにより Contaminate している無機 P³² はほとんど除くことができる。この物質は種々特異な性質を有しているが、その詳細については他の機会に述べることにして、本論文ではふれない。

2) 酸溶性バリウム不溶性劃分

1) の上清をさらに NaOH で pH 8.2~8.3 とする。これは B.T.B. でアルカリ性、Phenolphthalein で僅かに紅色を呈する点をとつた。ここにできたバリウム塩を遠沈して集め、上清は次の劃分とし、沈渣は N/100 の H₂SO₄ でバリウムを BaSO₄ として除き、この上清に、BaSO₄ を N/100 H₂SO₄ で3回洗滌して、その上清を加えたものを、この劃分として、次の如き方法でそれぞれの P³² をはかつた。

この劃分への Contaminate した無機 P³² を除くのに Magnesium mixture を加えアルカリ性で Magnesium ammonium phosphate として、沈澱さす方法と、Ennor²¹⁾ らのモリブデン酸アンモンを加え、酸性にてイソブタノールで抽出する方法を行つた。これらの方法について考えて見ると、

Magnesium mixture は型の如くつくり、検液を 4 N-NaOH を注意深く滴下しながら Phenolphthalein でアルカリ性とし、さらにアンモニヤ水を 1cc 加えて pH を 10 位にする。Magnesium mixture を加え Carrier として極少量の第一磷酸ソーダを加え、氷冷中に数時間放置する。この間ときどき管壁をガラス棒でこすり、沈澱を促した。

沈澱した Magnesium ammonium phosphate を遠沈し、上清を濾過して除くのであるが、この方法ではたとえ氷冷中とはいえ、pH 10 のアルカリ性で数時間 (Ennor らは 18~24 時間) 放置するので易水解磷が崩壊する恐れがあり、またこの方法による沈澱には無機磷ばかりでなくある程度の有機磷を含み、また無機磷の沈澱も完全でない⁹⁾、²¹⁾ 私は Ennor らのイソブタノールによる抽出法を用いた。

イソブタノール法は溶液を final Concentration 1 N の HCl、または H₂SO₄ 酸性にし、モリブデン酸アンモンを加え、イソブタノールで抽出するのであるが、無機磷はほとんど全部イソブタノール層に移行するし、有機磷には全く影響がない²¹⁾。このことは予備実験からも証明することができた。

また同様の実験を、HCl と H₂SO₄ についてそれぞれ 1 N の場合と、2 N の場合を行い、対照として酸を全く加えないものを行つた。イソブタノール抽出は 3 回行い、それを合せて cpm を測つた。しかして HCl と H₂SO₄ ではほとんど差がなく、1 N と 2 N でも全く差がないことが判つた。私は 1 N・HCl を主として用いた。

この方法を用いる場合注意を要することは、イソブタノールは少量ながら水に溶解し、その度合は HCl の濃度により異なるので、HCl の濃度は実験中一定にしなければならない。また私は水を飽和せしめたイソブタノールを用いた。

3) バリウム溶性アルコール不溶性劃分

2) の上清に 4~5 倍のエタノールを加え NaOH で pH 8.2~8.3 とし氷冷中に 15 分間放置後、遠沈し沈渣の Ba 塩をこの劃分とする。沈渣は pH 8.2~8.3 のエタノールで 3 回洗滌する。

B. 酸不溶性劃分

4) リポイド劃分

10% cold T.C.A. で除蛋白した沈渣を、数倍のエタノール、エーテル、エタノール・エーテル (3:1) 数分 40°C 加熱、メタノール・クロロホルム (1:1) で 90°C、30 分加熱し、それぞれ遠沈濾過して上清を集め、これをリポイド劃分とする。

この劃分の無機磷の除去には、まず溶媒を蒸発させて除き、エーテルに溶解し、第一磷酸ソーダの飽和溶液にて数回洗滌した。この方法ですると無機磷は相当程度除かれるが、水層は黄褐色に着色し、その cpm も相当高く出るので、有機磷も水層に含まれてくるのではないかと考えられる。リポイド劃分の無機磷の除去はこのように不完全であるが、他の完全な方法が見つからないので、一応この方法を用いた。リポイド劃分の Contamination の除去にはなお研究を要する点が多いと思われる。

5) DNA, RNA の抽出

これは Schmidt-Thannhauser 法に従つた。

4) の沈渣をエーテルでよく洗い、完全に乾燥せしめ、1 N, KOH で 37°C の孵卵器中で 24 時間抽出、上清を遠沈濾過する。抽出は 3 回行つた。これを総核酸劃分とする。

これに HCl, T.C.A. を加え沈澱を生成せしめ、遠沈濾過して、上清を RNA 劃分とした。

総核酸劃分、RNA 劃分はそれぞれ、モリブデン酸アンモン、イソブタノールで無機磷を除いた。この場合イソブタノール層と水層との境界に粘着性の沈澱物が生じ、それをいずれの層に属さすかに困難を生じたが、この実験では水層の側に入れた。

DNA は総核酸劃分の成績より RNA 劃分の成績を引いた値をもつてした。

以上で各劃分の抽出を終え、それぞれの 7 分水解磷、60 分水解磷、総磷の cpm を測つた。

酸溶性バリウム不溶性劃分およびバリウム溶性アルコール不溶性劃分では 7 分水解磷、60 分水解磷を測つたが、その方法は次の如くである。

両者ともに N/100 H₂SO₄ で溶解し、バリウムは

BaSO₄として沈澱さす。BaSO₄はN/100 H₂SO₄でよく洗滌し、その上清も加えて final Concentration 1 N・HClとして7分間、100°Cの水浴中で加熱、ただちに水で冷却して、モリブデン酸アンモンを加え、イソブタノールで3回抽出する。

残った水層を100°C、60分間水浴中で加熱し同様にイソブタノールで抽出する。

リポイド割分、総核酸割分、RNA割分はエールダールのフラスコ（われわれは大量の材料を処理するため、容量150 cc、長さ30 cm大のフラスコを作った）うちにてH₂SO₄で灰化する。灰化後H₂SO₄はfinal Concentration 1 Nに稀釈するが、この場合の燐はピロ燐酸の形になっており、イソブタノールに移行しないので、稀釈したら数分間沸騰させて、オルトの燐酸にすることが必要である。これをイソブタノール法で同様に抽出する。

そのおのおのをガイガー・ミュラーの計測器でcpmを測つた。また実験の第2として、今度は核酸(DNA, RNA)へのP³²のIncorporationをSpecific activityより見たが、この場合は前の実験と同様にして、酸不溶性割分より、総核酸割分とRNA割分とを抽出し、それぞれをH₂SO₄で灰化し、それを水にて、H₂SO₄が1 Nになる如く稀釈し、その1ccをとつてcpmを、1ccをとつて燐の量を測定した。この場合前の実験と異なる点は、灰化する前にイソブタノール法でそれぞれの無機燐を除かなかつたことである。これによりRNAというのはその部に蛋白燐を含むことになるが、核酸割分より無機燐を除くことは、前にも述べた如く、イソブタノール法では、例えばイソブタノール層と水層との間に沈澱物が生じ、それをいずれの層に入れるのがよいか不明であったし、またその沈澱のために両層を明確に分離することが困難である等のことと、蛋白Pは少ないことまた酸溶性割分やリポイド割分の抽出の操作により、無機燐はほとんど抽出できていると考えたからである。燐の定量はFiske-Subbarowの法を用いた。

実験成績

I. 鳥型結核菌竹尾株の各燐酸化合物へのRadioisotope P³²のIncorporationに対するStreptomycinの影響

表1 反応系

	対 照	S M	K F	K F + S M
菌 液	40cc	40cc	40cc	40cc
SM(50 mg/cc)	0	5cc	0	5cc
K F (M/4)	0	0	5cc	5cc
水	10cc	5cc	5cc	0

表1の如き反応系を用いた。菌液は Glycyl-Glycin-

buffer でpH7.2に調製し、また final Concentration M/10になる如く、GlucoseとGlycerinを加えた。Streptomycinはfinal Concentration 1,000γ/cc、Potassium fluorideはM/50になるようにした。各Lotはそれぞれ2本ずつ使い、結果はその平均値をとつた。菌量は実験により差はできたが、各Lotあて15~20g (wet weight)である。

この反応液を37°Cの恒温槽中で、2時間30分振盪後各LotにP³²(NaH₂PO₄の形)をおのおのに約0.25 mcずつ加える。さらに30分振盪して反応を中止する。また別の実験ではStreptomycinとP³²を同時に加え3時間作用させて反応を中止する。反応の中止にはfinal Concentration 10%にT.C.A.を加える。

A. Streptomycin 感性菌の場合

1) Streptomycinを2時間30分作用後、P³²を加えさらに30分作用させた場合

表2に、その成績をまとめたが、各化合物について説明すると次の如くである。

表2 SM感性菌の各燐酸化合物へのP³²のIncorporation (cpm) SM 2時間30分作用後P³²を加え30分間作用

	対照	SM	K F	K F + S M
Ba 不 溶 性△7—P	280	850	4028	580
” △60—P	270	870	221	6251
アルコール不溶性△7—P	5130	1321	1291	1008
” △60—P	880	588	538	540
リポイド—P	740	1551	5800	6538
R N A — P	850	148	88	57
総 核 酸 — P			92	205

i) 酸溶性バリウム不溶性割分

a) 7分水解燐

Streptomycinを作用させると、対照に比較し約3倍にP³²のIncorporationが増加する。同時に行つた実験では、高エネルギー燐酸結合に対するAT Paseによるleakを防止するというPotassium fluorideを使用させたときにはこの割分へのP³²のIncorporationは非常に増大し、StreptomycinとPotassium fluorideを同時に作用せしめてもその傾向は変わらない。

b) 60分水解燐

この割分においても、Streptomycinを作用させると、対照に比較して3倍の増加が見られる。Potassium fluorideの添加では対照とほとんど差がなく、StreptomycinとFluorideを同時に作用させたものでは、FluorideはむしろStreptomycinによる増加を抑制する傾向が見られる。

ii) バリウム溶性アルコール不溶性割分

a) 7分水解燐

この劃分ではバリウム不溶性劃分とは反対に Streptomycin を作用させることにより、対照に比較して約 $\frac{1}{2}$ に減少している。Potassium fluoride 添加でも $\frac{1}{2}$ に減少し、Fluoride と Streptomycin とを同時に作用させても、僅かに減少の傾向が強くなるのみである。

b) 60分水解燐

この劃分では、Streptomycin, Potassium fluoride, Streptomycin + Potassium fluoride の3者ともに、対照と比較してほとんど差が無く、幾分減少の傾向が見られる。3者の間には全く差が見られない。

iii) リポイド劃分

この劃分では総燐への Incorporation を測つたが、Streptomycin を作用せしめることにより、対照に比較して約2倍の増加が見られる。Potassium fluoride および同時に Streptomycin を作用させたものでは、ともに対照に比較して非常な増加が見られる。

iv) R N A

この劃分も総燐への Incorporation を見たが、Streptomycin を作用させると、対照に比して実に $\frac{1}{2}$ に減少する。このことは他の劃分に比較して、全く著明な現象であり注意すべきことと思われる。Potassium fluoride, およびそれと同時に Streptomycin を作用させたときにも減少は著しい。

2) Streptomycin と P³² を同時に加え、3時間作用させた場合

これは表3に示す如くである。

表3 SM感性菌の各燐化合物への P³² の Incorporation (cpm) SMと P³² を同時に加え3時間作用

	対照	SM	K F	K F + SM
Ba 不溶性 Δ 7-P	31500	30000	3000	3500
〃 Δ 60-P	100000	130000	321000	345000
アルコール不溶性 Δ 7-P	2300	2400	8840	8800
〃 Δ 60-P	4600	5600	20000	22000
リポイド-P	50000	102000	23100	20800
R N A-P	105000	98000	21000	29000
総核酸-P	183000	173000	37000	36000

i) 酸溶性バリウム不溶性劃分

a) 7分水解燐

Streptomycin を作用させても、対照に比し全く差がない。Potassium fluoride 添加では、非常に減少し約 $\frac{1}{6}$ である。この傾向は同時に Str-

ptomycin を作用させても、変らない。

b) 60分水解燐

これも Streptomycin の影響は少ない。Potassium fluoride 添加、および同時に Streptomycin を作用させたときはともに3倍程の増加を見る。

ii) バリウム溶性アルコール不溶性劃分

a) 7分水解燐

この劃分も Streptomycin を作用させても、対照に比して全く変化無い。Potassium fluoride および同時に Streptomycin を作用させると対照に比較して著明な増加が見られるが、両者の間には差がない。

b) 60分水解燐

この劃分でも Streptomycin を作用させると、対照に比較し僅かな増加が見られるが、ほとんど差が無いといつてよいほどである。Potassium fluoride 添加、および同時に Streptomycin を作用させると、約4倍にも増加するが、両者の間に差は見られない。

iii) リポイド劃分

この劃分では総燐への Incorporation を見たが Streptomycin を作用させることにより約2倍の増加が見られる。この実験で両者の間に差が見られたのは、この劃分のみである。Potassium fluoride 添加では対照に比し、 $\frac{1}{2}$ に減少しており、同時に Streptomycin を作用させてもその傾向は変らない。

iv) R N A

この劃分でも総燐についてであるが、Streptomycin を作用させても、対照とほとんど変化なく、僅かに減少の傾向が見られるのみである。表5の場合には実に $\frac{1}{2}$ に減少しており、他の劃分についてもいえることであるが、Streptomycin を作用させる時間およびそれと P³² を加える時間の関係について考えると興味深い。Potassium fluoride 添加では著明に減少する。同時に Streptomycin を作用させても減少は著明であるが、Fluoride 単独に比較して僅かにその傾向が少ない。

v) 総核酸

この劃分も総燐を見たのであるが、Streptomycin の影響は全く見られない。Potassium fluoride 添加は著明な減少を見、これは Streptomycin を同時に作用させても変化がない。

B. Streptomycin 耐性菌の場合

1) Streptomycin を、2時間30分作用後 P³² を加えさらに30分間作用した場合

これは表4に示す如くである。

表4 SM耐性菌の各磷酸化合物へのP³²の Incorporation (cpm) SM 2時間 30分作用後P³²を加え30分間作用

	対照	SM	K F	K F + SM
Ba 不溶性△7-P	235	228	2280	2051
" △60-P	950	850	2461	2352
アルコール不溶性△7-P	1150	1140	1391	1128
" △60-P	1048	581	270	232
リポイド — P	715	704	1028	1125
R N A — P	1450	1580	145	150

i) 酸溶性バリウム不溶性劃分

a) 7分水解磷

Streptomycin を作用させても対照に比較して全く変化が見られない。Potassium fluoride を添加すると約10倍にも増加する。同時に Streptomycin を作用させても、その影響は全くない。

b) 60分水解磷

この場合も、Streptomycin を作用させたものと対照とは全く差がない。Potassium fluoride 添加では2.5倍の増加を見、このときも同時に Streptomycin を作用させても変化が見られない。

ii) バリウム溶性アルコール不溶性劃分

a) 7分水解磷

この劃分でも Streptomycin の影響は全く見られない。Potassium fluoride および同時に Streptomycin を作用させても対照に比較して全く変化がない。

b) 60分水解磷

この劃分では耐性菌を使用した場合に Streptomycin の影響が見られる唯一のもので、対照に比較して約1/2に減少している。Potassium fluoride では著明に減少し約1/4になっている。同時に Streptomycin を作用させてもこの傾向は変わらない。

iii) リポイド劃分

総磷についてであるが、Streptomycin の影響は全く見られない。Potassium fluoride を加えると僅かに増加し、同時に Streptomycin を加えたときも同様である。

iv) R N A

総磷についてであるが、Streptomycin 感性菌では対照に比較して殆にも減少したが、耐性菌では Streptomycin を作用させても全く差が認められない。このことを私は非常に重要視しているが、次の実験において特に核酸のみをとり挙げて

Specific activity を見た。Potassium fluoride および同時に Streptomycin を作用させるとともに、%にも減少する。両者の間に差は認められない。

2) Streptomycin と P³²を同時に加え、3時間作用させた場合

これは表5に示す如くである。

表5 SM耐性菌の各磷酸化合物へのP³²の Incorporation (cpm) SM と P³²を同時に加え3時間作用

	対照	SM	K F	K F + SM
Ba 不溶性△7-P	1420	1210	2260	1800
" △60-P	2120	1550	1750	1750
アルコール不溶性△7-P	4220	3200	4330	4020
" △60-P	3310	2750	5230	4360
リポイド — P	762	725	110	115
R N A — P	323	302	105	112
総核酸 — P	1220	1450	310	350

i) 酸溶性バリウム不溶性劃分

a) 7分水解磷

Streptomycin の影響は全く見られない。

Potassium fluoride 添加、および同時に Streptomycin を作用させたものでも僅かに増加が見られる。

b) 60分水解磷

Streptomycin を作用させると僅かな減少が見られる。Potassium fluoride 添加、および同時に、Streptomycin を作用させたものとはほとんど影響が見られない。

ii) バリウム溶性アルコール不溶性劃分

a) 7分水解磷

Streptomycin を作用させると、対照に比較して僅かに減少し、Potassium fluoride 添加、および同時に Streptomycin を作用させたものはほとんど影響がない。

b) 60分水解磷

Streptomycin を作用させると、僅かに減少し、Potassium fluoride 添加、および同時に Streptomycin を加えたものでは僅かに増加する。

iii) リポイド劃分

Streptomycin を作用させてもほとんど変化なく、Potassium fluoride 添加、および同時に Streptomycin を作用させたものでは著明に減少する。

iv) R N A劃分

Streptomycin では全く影響がなく、Potassium fluoride 添加および同時に Streptomycin を作用させると約1/2に減少する。

v) 総核酸劃分

これはRNA劃分と全く同様の傾向をとる。

鳥型結核菌竹尾株の核酸へのP³²の Incorporation に対する Streptomycin の影響 (Specific activity)

ここで特に核酸のみを取り上げ、それへの P³² の Incorporation を Specific activity より見たのは、前の実験で、Streptomycin が核酸、特に RNA に対する P³² の Incorporation を著明に抑制することに興味深く考えたからである。

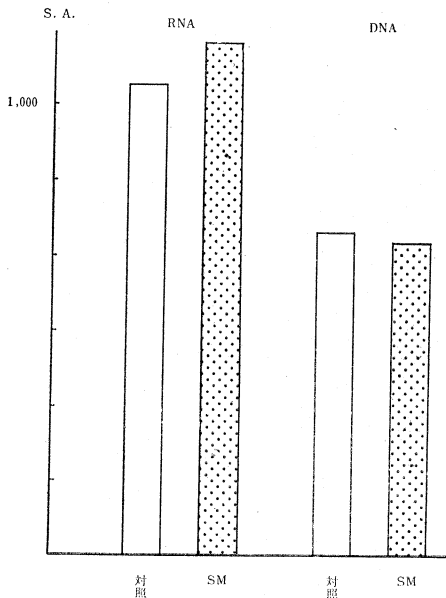
Specific activity は、cpm/磷酸量 (γ) であらわした。

A. Streptomycin 感性菌の場合

1) Streptomycin 2時間30分作用後 P³² を加えさらに30分間作用させた場合

図2に示す如く、この場合は RNA において Streptomycin を作用させると、Specific activity は、対照に比較して約1/2となる。DNAについては Streptomycin の影響はほとんど見られない。

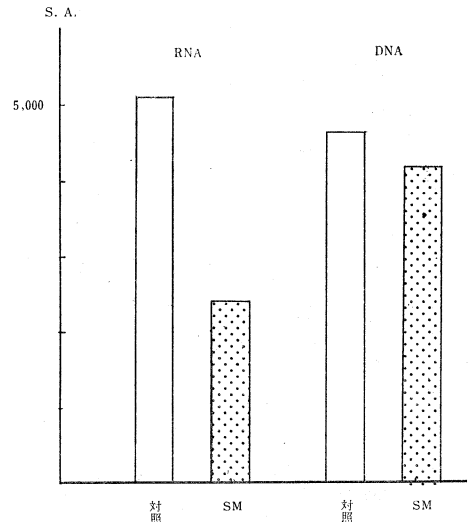
図2 核酸への P³² の Incorporation (Specific activity) SM感性菌に SM 2時間30分作用後 P³² を加え30分間作用



2) Streptomycin を12時間作用させた後 P³² を加えさらに2時間作用させた場合

図3の如く、この場合にも、RNAの Specific activity は Streptomycin を作用させると、対照に比較して約1/2に減少する。DNAは Streptomycin による影響は見られないが、1) に比較して著明なことは、Streptomycin を12時間作用させると、DNAの Specific

図3 核酸への P³² の Incorporation (Specific activity) SM感性菌に SM12時間作用後 P³² を加え2時間作用



activity に比し、RNAのそれは著明に増加していることである。

B. Streptomycin 耐性菌の場合

1) Streptomycin を2時間30分作用させ後 P³² を加えさらに30分間作用させた場合

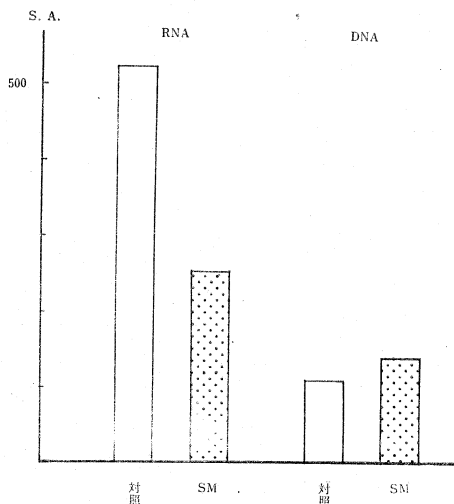
図4の如く、この場合は RNA、DNAともにその Specific activity は Streptomycin を作用させることにより何らの変化を受けていない。

考案および結論

私は Streptomycin が結核菌に対する作用のうち磷酸化合物に対する影響を研究し、特に Radio isotope P³²を用いて実験した。Radio isotope を用いる実験で特に注意を要する Contamination と Sampling に関して、Ennor 21) らによる、モリブデン酸アンモンとイソブタノールを用いる方法を用いて、それによる有利な点について考察した。またそれとともに不安定なる磷酸結合を操作する際に特に注意を要する点について述べた。

実験の結果については、Streptomycin 感性菌において、各劃分に著明なる影響を受け、特にRNA磷では Streptomycin を作用させると実に巧に減少することが目に付く。Umbreit 9) らは同じく P³²を用いた実験で、大腸菌の酸溶性劃分の Specific activity を見ているが、かれらの New Compound で Streptomycin により著明に減少している他はほとんど Streptomycin の影響を認めていない。また日比野、小倉22) らは鳥型結核菌の各磷酸化合物を定量し、Streptomycin を作用させたものと、対照とを比較しているが、感性菌においても R

図4 核酸への P^{32} の Incorporation
(Specific activity) SM耐性菌
にSM2時間30分作用後 P^{32} を
加え30分間作用



NAが Streptomycin により幾分増加している他はあまり著明な変化を認めていない。このことより考えると Streptomycin の作用を考えると、静的な考察ではその変化を見出すことは困難であり、私が行つた如く、磷酸の移動というが如き動的な観察が必要と思われる。

また同じ感性菌を用いた実験でも、 P^{32} を Streptomycin と同時に作用させたときには、始め Streptomycin を作用させた後に P^{32} を加えたものに比較して、Streptomycin の影響は明かでない。このことは P^{32} の各磷酸化合物への Incorporation は速かであり、また Streptomycin が菌に作用し、ある程度の影響を与えるにはかなりの時間を要することが想像されて興味あることと思われる。

耐性菌に対する実験では感性菌に見られたような Streptomycin による影響はほとんど見られず、これによつても感性菌の実験にあらわれた Streptomycin による変化は、Streptomycin に特異な作用と思われる。

核酸における P^{32} の Specific activity に対する Streptomycin の影響においても RNA に対しては著明なる影響を有し、耐性菌ではこれらのことは見られない。また DNA では感性菌、耐性菌ともに影響は見られなかつた。

このことは柴谷²³⁾らの、成長時のマウスの肝における磷の Turnover rate が RNA で著明であり、DNA ではほとんど見られないこと、また Hokin²⁴⁾らの鳩の脛に刺戟を与え、その酵素の分泌を促すと、RNA 割分への P^{32} の Incorporation が著明に増加するが、この物質は Schmidt-Thannhauser 法では RNA 割分にある

が、実は Lipoid 様物質であるという実験もあり、なお今後の研究を要する点も多々あるが、DNA に変化がないことと比較して、Streptomycin が RNA の代謝に対して著しい変化を与えることは、Streptomycin の作用機序に対し興味ある事実と思われる。

文 献

- 1) Cohen, S.S. : J. Biol. Chem. 168, 511, 1947.
- 2) Donovick, R., A.P. Bayan, P. Canales et F. Pansy : J. Bact., 56, 125~137, 1948.
- 3) Ryback, B., F. Gros : Chem. Abst., 43, 2668i.
- 4) Geiger, W.B. : Arch. Biochem., 15, 227, 1947.
- 5) Umbreit, W.W. : J. Biol. Chem., 177, 703~714, 1949.
- 6) Smith, P.H., Oginsky, E.L., and Umbreit, W.W. : J. Bact., 58, 761~767, 1949.
- 7) Umbreit, W.W., and Tonkazy, N.E. : J. Bact., 58, 769~776, 1949.
- 8) Umbreit, W.W., Smith, P.H., and Oginsky, E.L. : J. Bact., 61, 595~604, 1951.
- 9) Umbreit, W.W. : J. Bact., 66, 74~81, 1953.
- 10) Burkulis, I.L. : J. Bact. 61, 375, 1951.
- 11) 竹内浩一・山本正彦・野村元且・田中伸一 : 結核, 30 : No.9, 503~509, 1955.
- 12) Rapoport, S., and Nelson, N. : J. Biol. Chem., 161, 421~427, 1945.
- 13) Rapoport, S., and Wagner, R. H. : J. Biol. Chem., 167, 621~622, 1947.
- 14) Rapoport, S., and Wagner, R. H. : Nature, 168, 295~296, 1951.
- 15) Zeller, E.A., C.A. Owen, Karlson : J. Biol. Chem., 188, 623, 1951.
- 16) 奥貫一男・堀尾武一 : 第 26 回日本生化学会総会抄録輯, 23, 1954.
- 17) 山村雄一 : 結核菌の物質代謝, 第 27 回日本結核病学会特別講演集, 1952.
- 18) 石下泰堂 : 未発表.
- 19) Umbreit, W.W., R.H. Burris, and J.F. Stauffer : Manometric Techniques and Tissue Metabolism, 1951.
- 20) Schmidt and Thannhauser : J. Biol. Chem., 161, 83, 1945.
- 21) Ennor, A.H. and H. Rosenberg : Biochem. J., 50, 524~530, 1952.
- 22) 日比野 進 : 結核菌の化学, 結核, 29 : 第29回日本結核病学会特別講演特別号, 1949.
- 23) Fujisawa, Y., and Sibatani, A. : Experimentia, 10, 178, 1954.

- 24) Hokin, L.E. and Mabel. R. : Bioph. Bioch
Act., 11, 591, 1953.