

鳥型結核菌の適応の一特異型式について（続報）

部 勇

国立療養所春霞園一院長 工藤敏夫博士

受付 昭和31年2月29日

第1章 緒 言

須田ら¹⁾は *Pseudomonas* に属する1菌株を用いてトリプトファン代謝酵素系について適応酵素の研究を行い「逐次適応」の現象を見出した。すなわち代謝上位の物質Aに適応させると代謝下位の物質B, C, D, ……に適応しているの、この方法を用いて代謝経路の追跡ができるとのべ、

トリプトファン→キヌレニン→アンスラニール酸→ピロカテキン→

という代謝経路のあることを証明している²⁾。この場合はアンスラニール酸が代謝をうけている。

また Stanier ら³⁾は芳香族有機酸の代謝について研究を行い、同様に適応法による代謝経路の追跡が可能であることを認めている。しかして最近 Stanier らはマンデル酸添加培地に培養した *Pseudomonas fluorescens* の1菌株からの抽出液が、マンデル酸を酸化して安息香酸とすることを報告している^{4)~6)}。

また山村ら⁷⁾は鳥型結核菌を用いて種々の適応型式のあることを報告しているが、そのうち「逐次適応」の方法により、

安息香酸→ピロカテキン→

という代謝経路のあることを明らかにしている。

しかして以上はいずれの場合も、基質が菌によつて代謝をうける場合である。しかるに私は鳥型結核菌（竹尾株）浮游液を用いて実験を行い、マンデル酸に接触せしめた菌がマンデル酸をまったく代謝することができないにもかかわらず安息香酸とその代謝下位のピロカテキンに完全に適応していることを認め、前報告において特異な適応型式であると述べた⁸⁾。

今回私はふたたび同様の方法で実験を行い、アンスラニール酸に接触せしめた菌が、アンスラニール酸をまったく代謝することができないにもかかわらずピロカテキンに完全に適応しており、未処置菌に比して速かにこれを代謝することを認め、前報告と同様な特異な適応型式と思われるので報告する。

第2章 実験方法

実験方法はすべて前報告と同じ。

第3章 実験成績

第1節 適応菌によるピロカテキンの酸化

ピロカテキン適応菌、アンスラニール酸適応菌および対照の普通菌を用いて、基質をピロカテキンとしてワールブルグ氏検圧計により酸素吸収量を測定すると図1に示す通りである。すなわち普通菌は一定の誘導期をもつてピロカテキンを酸化するが、アンスラニール酸適応菌はピロカテキン適応菌と同様に全く誘導期を要しないでピロカテキンを酸化することができる。

第2節 適応菌によるアンスラニール酸の酸化

第1節と同様にピロカテキン適応菌、アンスラニール酸適応菌および普通菌を用いて、アンスラニール酸を基質とした場合には、酸素吸収量の増加は全く認められない。すなわちアンスラニール酸はピロカテキン適応菌、アンスラニール酸適応菌および普通菌のいずれによつても酸化をうけない。

第3節 適応菌による基質の酸化におよぼすストレプトマイシンの影響

第1節の実験において同時にストレプトマイシン（以下STMと略）を添加して、基質の酸化におよぼすSTMの影響を観察すると図1に示す通りである。すなわちSTM 500 γ 添加により普通菌においては著しい阻害をうけるにもかかわらず、アンスラニール酸適応菌においてはピロカテキン適応菌と同様にほとんど阻害をうけないことを認めた。すでに山村らは、STMは菌が安息香酸およびピロカテキンに適応することを阻害するが、適応菌によるそれらの基質の酸化はSTMによつて阻害されないと述べている⁹⁾。上述の成績からアンスラニール酸によるピロカテキンの酸化もSTMによつてほとんど阻害せられず、ピロカテキン適応菌と同様な態度を示すことを認めた。

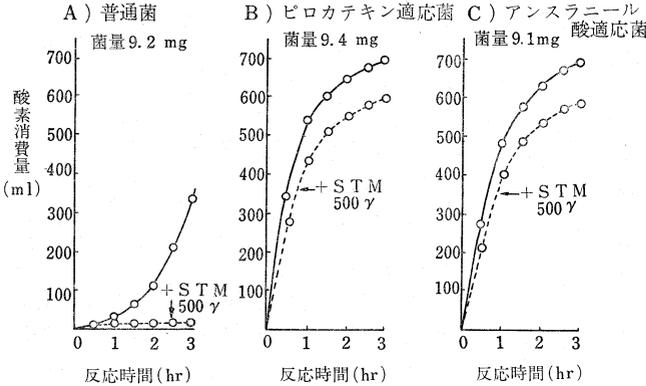
第4節 適応酵素活性化の時間的観察

第1節および第3節の実験にもとづき、ピロカテキン適応とアンスラニール酸適応の場合の適応酵素の活性化について、両者の時間的關係がどのようなかを検討するために次の実験を行つた。

すなわちピロカテキンおよびアンスラニール酸をそれぞれ基質として、適応時間をそれぞれ0分、5分、10分、

図1 ピロカテキンの酸化とストレプトマイシン (STM) の影響

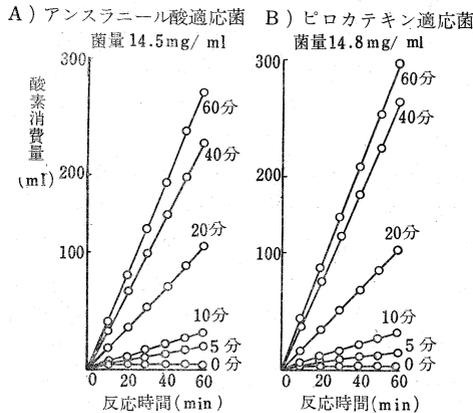
鳥型結核菌(竹尾株)のグリセリン・ブイオン培養第3日目の菌浮游液、基質はいずれもピロカテキンを10μM、菌量は菌浮游液1.0ml中の乾燥菌量(mg)。測定はWarburg検圧計を用いて酸素吸収の増加を測定し、対照の酸素消費量を差引いてある。すなわち容器主室に菌浮游液1.0ml、磷酸緩衝液(pH 7.5, M/10) 0.4mlを入れ、側室に基質液0.1ml(通常、基質濃度は0.1ml中10μMとし、一定時間後主室と混和する)、中央小室に20%苛性加里液0.2mlを入れ、容器中の総液量2.4mlとなるように残余は蒸留水を加えた。温度はすべて37.5°で、容器内容は空気をもつてみた。



20分, 40分, 60分として実験を型のごとくおこない, おのおの適応菌をえる。これらの適応菌浮游液を使用して基質をピロカテキンとし, おのおのにSTM 500γを添加して測定中にピロカテキン適応酵素の産生してくるのを抑制しつつ酸素吸収量を測定すると図2に示す通りである。すなわちピロカテキン適応およびアンスラニール酸適応のいずれの場合もほとんど同様な時間的推移を示しながらピロカテキンに対する適応酵素が活性化してくることが明らかになった。

図2 適応酵素活性化の時間的観察

鳥型菌(竹尾株)のグリセリン寒天培養第4日目の菌。基質はいずれもピロカテキンを10μM。0分において、いずれもSTM 500γ添加。図中～分とあるのは適応時間を示す。



第5節 適応に用いるピロカテキンおよびアンスラニール酸の量的関係

以上のごとくアンスラニール酸適応菌はピロカテキン適応菌と同様にピロカテキンに適応しているが, 適応に用いるアンスラニール酸とピロカテキンの量的関係がど

のようであるかを検討するために次の実験を行つた。すなわち菌浮游液1.0ml に対してピロカテキンおよびアンスラニール酸100, 50, 10, 5, 1, 0.2μMをそれぞれ0.1mlの蒸留水に溶解したものを添加し, 磷酸緩衝液 0.4mlを加えて総量1.5mlとし型のごとく適応せしめ, これらの適応菌によるピロカテキンの酸化について比較観察した。図3は各適応濃度の対数を横軸に, 酸素吸収量を縦軸にとり, その適応濃度と反応初速度(反応開始後30分, 45分, 60分の酸素吸収増加量)との関係を示したものである。これによるとアンスラニール酸適応の場合もピロカテキン適応の場合も約10μM 附近に適応の至適濃度がある。しかし100μM/1.5mlにおいては, アンスラニール酸適応菌ではピロカテキン適応菌に比して反応初速度は増加している。

第6節 適応に用いるアンスラニール酸の検討

以上の実験においては再結晶をくりかえしてえたアンスラニール酸を使用したのであるが, あるいはこのアンスラニール酸の中に僅かに他の適応可能な代謝物質が混在して、それに菌が処置の間に適応して、前述のごとくピロカテキン適応菌の場合と同様の成績をえたのではないかという恐れがあり, これを検討するために次の実験を行つた。すなわち図4A)のごとく菌を適応せしめる場合と同様に型のごとくアンスラニール酸と菌浮游液とを3時間振盪して, その操作中に僅かに混在する恐れのある基質を酸化消費せしめ, このようにしてえた菌浮游液を遠心沈澱(10,000γ/m, 30分)して上清をえる。この上清をもはや他の適応可能な基質を含まぬアンスラニール酸液と見なして, これに別に新しく調製した普通菌液を適応せしめる。このようにしてえた菌をアンスラニール酸適応菌とし, ピロカテキンを基質としてその酸素吸収量を測定したが, 前述の成績となら異なる点認めず, このようにしてえたアンスラニール酸適応菌は図4B)のごとく, ピロカテキン適応菌と同様に誘導期なしに直ちにピロカテキンを酸化し, STMによつてはほとんど阻害をうけないうすなわち前節までの実験成績は, アンスラニール酸中に他の適応可能な代謝物質が混在したためによるものではないことを確かめることができた。

第7節 吸収スペクトルによる基質の変化の観察

以上は適応菌による酸素の消費量を観察したのであるが, 次にベックマンのスペクトロフォトメーターDU型を用い紫外部の吸収スペクトルを測定して基質の変化を追跡した。

[第1項] アンスラニール酸の吸収スペクトル

ピロカテキン適応菌, アンスラニール酸適応菌および普通菌(1.0ml中の乾燥菌量いずれも約120mg)を用いて,

図3 適応に用いるピロカテキとアンスラニール酸の量的関係

鳥型菌(竹尾株)のグリセリン・ブイオン培養第4日目の菌浮游液。使用乾燥菌量は下表のごとし。数字の単位は mg/ml。ただし、Kは対照の普通菌。

〔適応濃度〕 μM / 1.5 ml		100	50	10	5	1	0.2	K
log〔適応濃度〕 μM		2	1.7	1.0	0.7	0	-0.7	
乾燥菌量	アンスラニール酸適応	10.2	10.8	10.0	9.8	10.0	9.5	9.1
	ピロカテキ適応	9.8	9.2	10.5	9.9	10.6	9.9	10.1

図5 アンスラニール酸の吸収スペクトル

鳥型結核菌(竹尾株)のグリセリン・ブイオン培養第4日目。菌量 128.5mg/ml として、アンスラニール酸と接触。

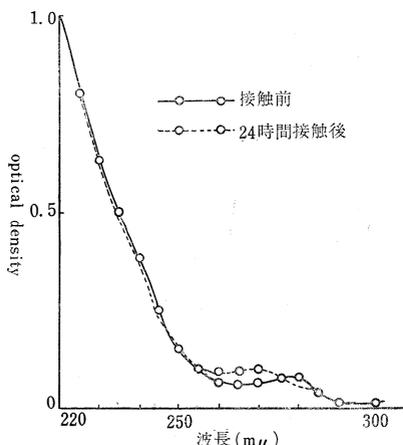
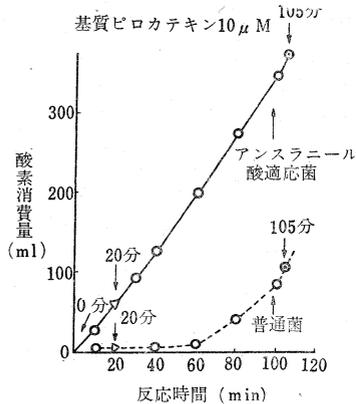


図6 ピロカテキンの酸化

鳥型菌(竹尾株)のグリセリン・ブイオン培養第4日目。乾燥菌量は普通菌 11.2mg/ml、アンスラニール酸適応菌 11.8mg/ml。酸素吸収は Warburg 検圧計により、ピロカテキ 10 μM を添加した場合の酸素吸収の増加を測定。



普通菌によるピロカテキンの酸化において、図6のごとくまず酸素吸収量を測定して反応開始後0分、20分、105分で適応菌と普通菌との間に著しい差のあることを確認した後、硫酸を添加して反応を停止せしめ、上清についてピロカテキンの吸収スペクトルを追跡すると図7に示すごとく、適応菌と普通菌の場合における吸収スペクトルの変化は著しい差異を示し、普通菌の場合に比し適応菌の場合は速かにピロカテキンの特異的吸収スペクトルが消失する。すなわち20分では両者の間に著しい差は認められないが、105分では著しい optical density の差を示し、適応菌の場合は普通菌よりもピロカテキンの分解の度が大きいことを認める。そうしてその分解速度はアンスラニール酸適応菌の場合とピロカテキ適応菌の場合とほとんど差を認め

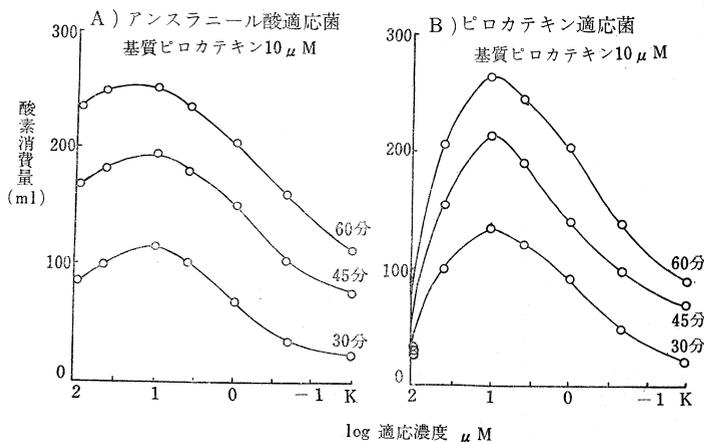
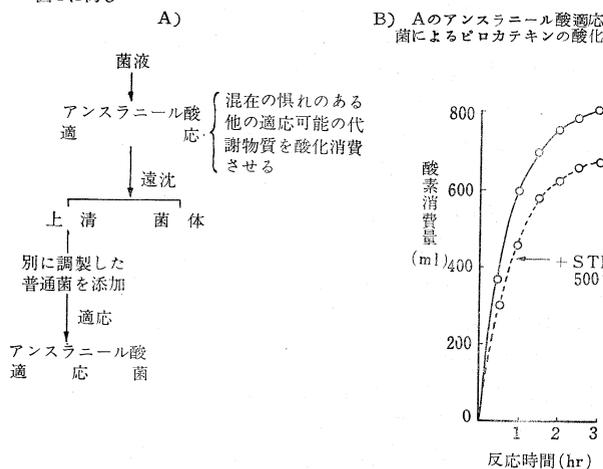


図4 アンスラニール酸の検討

鳥型菌(竹尾株)のグリセリン・ブイオン培養第4日目の菌浮游液()における乾燥菌量 9.2mg/ml、基質はピロカテキ 10 μM 。その他の実験方法は図1に同じ



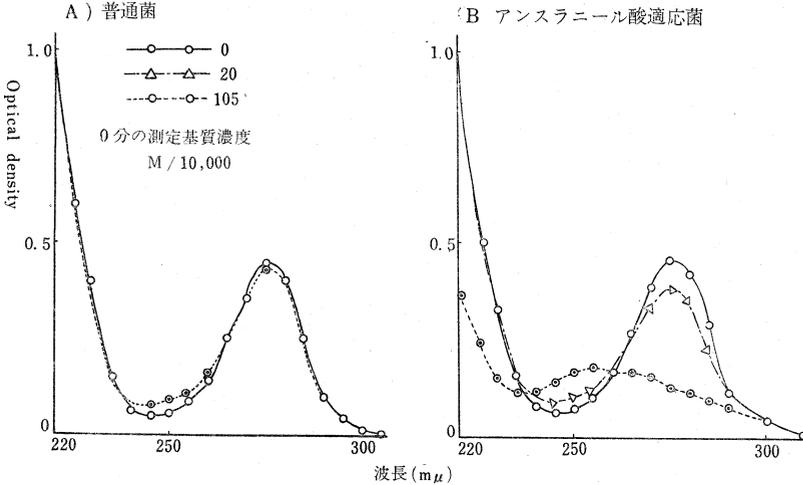
アンスラニール酸を基質とした場合のアンスラニール酸の吸収スペクトルを接触前および24時間接触後において比較測定すると、図5に示すごとくなんらの変化を認めなかつた。すなわちアンスラニール酸自身はこれらの菌液のいずれによつても代謝をうけないことを認めた。

〔第2項〕ピロカテキンの吸収スペクトル

ピロカテキ適応菌、アンスラニール酸適応菌および

図7 ピロカテキンの吸収スペクトル

ピロカテキンの吸収スペクトルは Beckman's Spectrophotometer DU型を用いて、波長220~300 μ mの紫外部において optical density を測定した。一定時間後に硫酸を用いて反応を停止せしめ、遠沈によって上清をとり、添加ピロカテキンの量が M/10,000 となるごとく希釈して、10mm の直径の容器中で吸収スペクトルを測定した。



ない。しかし図7B)に示すごとくピロカテキンの特異的な吸収スペクトルのピークが時間の経過とともに左方にずれ、250 μ m 付近では0分に比して20分、105分の optical density が大きい。これはベンゾール核開裂による分解産生物質の吸収スペクトルが関与しているためと考えられる。

第8節 培地および菌株の検討

前節までの実験成績が培地の変化によりいかなる影響をうけるかを検討するために、グリセリン寒天、グリセリン・ブイヨンおよびキルヒナー氏無蛋白培地よりえた菌について、同様の方法によりそれぞれ比較実験を行つたが、いずれも同様の曲線を描き、これらの培地の変化によつて差を認めなかつた。

また菌株の変化によりいかなる成績を示すかを検討するために、鳥型結核菌のかわりにチモテー菌を使用したのが同様の成績を得た。

考案

須田, Stanier らは「逐次適応」の現象を報告して、これにより代謝経路の追跡ができることを述べている。

しかし須田らは Pseudomonas に属する土壌菌を用いて「逐次適応法」によりトリプトファンの代謝経路の中に、

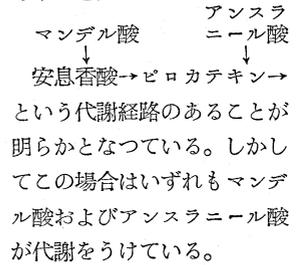
アンスラニール酸→ピロカテキン→
という経路があることを証明し、この現象を利用してすでにピロカテキンの単離精製に成功している^{2,10)~12)}。

また Stanier らはマンデル酸添加培地に培養した Pseudomonas fluorescens の1菌株からの抽出液がマンデル酸を酸化して安息香酸とすることを報告している。

また山村らは鳥型結核菌(竹尾株)浮游液を用いて、

安息香酸→ピロカテキン→
という代謝経路のあることを明らかにしている。

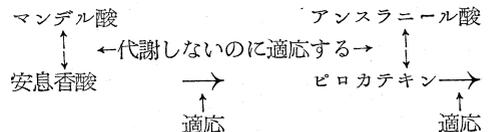
すなわち、これらをまとめあげると、



しかるに前報告で私は、鳥型結核菌(竹尾株)浮游液を用いる実験において、マンデル酸に接触せしめた菌はマンデル酸自身を代謝しないにもかかわらず、安息香酸とその

代謝下位のピロカテキンに完全に適応していると述べた。

しかしふたたび私は同様の実験を行つたが、上述の成績のごとく、鳥型菌によりアンスラニール酸は酸化分解されず、またベックマンのスペクトロフォトメーターによる吸収帯の変化から考えてもアンスラニール酸は代謝をうけているとは思われぬ。したがつて須田, Stanier らの使用した菌とは性状を異にしていると考えられる。そしてそれにもかかわらず、アンスラニール酸に接触せしめた菌はピロカテキン適応菌と同程度にピロカテキンに適応している。すなわち前報告と今回の成績をまとめると、



という関係が成り立つ。すなわち従来の逐次適応の型式では代謝をうけるはずのアンスラニール酸が、前報告におけるマンデル酸と同様に自らは代謝をうけないにもかかわらず適応酵素の活性化に関与するという点が特異的である。

最近 Monod ら¹³⁾は大腸菌の1菌株が代謝されない melibiose と接触せしめられることによつて β -galactosidase を産生してくることを報告しており、私の観察した現象と相似している。

総括および結論

鳥型結核菌(竹尾株)浮游液を用いる実験において、

1) アンスラニール酸自身は普通菌および適応菌のいずれによつても酸化せられないが、アンスラニール酸適

応菌はピロカテキンに適応しており、全く誘導期を要しないのでピロカテキンを酸化することができる。

2) アンスラニール酸適応菌によるピロカテキンの酸化はSTMによつて著明な阻害をうけない。

3) アンスラニール酸適応とピロカテキン適応の場合の適応酵素系活性化の時間的推移は、両者の間にほとんど差を認めない。

4) アンスラニール酸適応とピロカテキン適応の場合、ほとんど同程度の至適濃度を示した。

5) ベックマンのスペクトロフォトメーターにより紫外部において基質の変化を追求すると、アンスラニール酸は普通菌および適応菌いずれの場合も、菌液との接触前および24時間接触後とにおいて変化を認めなかつた。また適応菌においてはピロカテキンの速かな分解が見られ、かつアンスラニール酸適応菌とピロカテキン適応菌との間に基質分解速度の差を認めなかつた。

6) 以上の現象はグリセリン寒天、グリセリン・ピジョンおよびキルヒナー氏無蛋白培地などの異なる培地に培養してえた鳥型菌において同様に観察することができる。またチモテ菌においても同様の成績をえた。

7) 前報告に続いて上述の成績から、代謝をうけない一定の物質と接触させることによつて、ある物質に適応してくるということは、従来から明らかにせられている適応の型式から考えて特異な適応の型式であると思われる。

終りにのぞみ、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わ

つた渡辺三郎教授ならびに山村雄一助教授に深甚の謝意を捧げる。また常に種々の御指導と御鞭撻を賜わつた恩師春霞園院長工藤敏夫博士に衷心より感謝する。また常に不変の御友情を頂いた刀根山結核研究所員各位と春霞園医局員各位ならびに終始御協力を頂いた当園協田政美技官に感謝する。

文 献

- 1) 須田：酵素化学シンポジウム，第1集，73，1949.
- 2) 須田：酵素化学シンポジウム，第4集，11，1950.
- 3) Stanier : J. Bact., 55, 477, 1948.
- 4) Gunsalus, I.C., Gunsalus, C.F. and Stanier, R.Y. : J. Bact., 66, 538, 1953.
- 5) Stanier, R.Y., Gunsalus, I.C. and Gunsalus, C.F. : J. Bact., 66, 543, 1953.
- 6) Gunsalus, C.F., Stanier, R.Y. and Gunsalus, I.C. : J. Bact., 66, 548, 1953.
- 7) 山村・笹川：酵素化学シンポジウム，第5集，60，1950.
- 8) 薮：結核，28，342，1953.
- 9) 山村・笹川・安立：医療，3(8)，17，1949.
- 10) 直野・須田：標準生化学実験，434，1953.
- 11) 須田・竹田：標準生化学実験，352，1953.
- 12) 須田他：酵素化学シンポジウム，第7集，81，1952.
- 13) Monod and Cohn : Adv. Enzymology, 13, 67, 1952.