Cl. welchii の焦性葡萄糖代謝について

II 本菌の本酸代謝に及ぼす葡萄糖添加の影響

平野 清壽 義川 英治 今給 黎 茂

鹿児島大学医学部 細菌学教室

〔受付: 7月2日1955年〕

著者らは前報¹⁾において Cl. welchii 等のいわゆる糖分解性の Clostridia (静止菌) は (1) glucose (G) を好氣的にも嫌氣的にも著明に分解するが pyruvate (P) を基質としてはこれをほとんど分解しえないこと及び (2) 好氣的な G 代謝に際しては著明な P 蓄積を来すが嫌氣的な G 代謝では P 蓄積を伴わないことをのべた。かつこれらの点は通常の好気性菌とは異つた Clostridia の一つの特徴とみなしうることにもふれた。

Cl. welchii が基質 P を好氣的に消費しえないことは好氣的な G 代謝に際して著明な P 蓄積を来すことと一致した所見で、本菌の G 代謝は P の段階まで行われて P 以後の代謝が行われなると一応考えることが出来る (その理由のいかんや G 代謝時の P が定量的に蓄積しているか否か、すなわち P の爾後の分解が完全に阻害されているか否かについては後報で改めて検討したい)。しかし本菌が嫌氣的に基質 P を消費せずしてかつ嫌氣的な G 代謝に際して P 蓄積を来さないことは、本菌の G 代謝が G-P 間のある地点で停止しているとは考えにくい。本菌の嫌氣的な G 代謝はたとえそれが静止菌によるものであつても本菌本来の糖代謝に近く、従つて energy 源ないし合成素材源としてこれを利用している訳であるから反応は当然 P 以後の過程に進んでいるであろう (一般に G-P 間の代謝は “previous fermentation” であつて、P 以後の代謝に糖代謝の本来の意義 — energy 源, 合成源としての利用 — があるとされている)。また本菌の G 代謝が via pyruvate でないとも考えにくい。少くとも従来の知見よりすると本菌の嫌氣的な G 代謝 (G 醗酵) は via pyruvate でありかつ代謝が P 以下の過程に及んでいると考えるのが常識的であつて、とすれば G 代謝の中間産物として產生された P は爾後の代謝を受けるが基質として加えられた P は代謝せられないことになる。その理由としては、第一に考えられることは基質 P の不透過性の問題であり、第二には代謝産物としての P と基質 P との

代謝産物としての P と基質 P との代謝上の差異とくに G-P 間の代謝産物が P 代謝に及ぼす影響であろう。

本報では主として第 2 の可能性に關聯して本菌の P 代謝に及ぼす G 添加の影響を検討した結果を報告したいと思う。

実験方法

i) 供試菌及び菌液: 前報と同じく Cl. welchii PB6K で同一方法で菌液を作つた。

ii) 反応系: これも前報と同じく、菌液 (10 mg/ml) 1.0 ml, 磷酸緩衝液 (M/15, PH 7.0) 1.0 ml, 基質 (PM/30, M/25, M/15 等) 0.5 ml, 水又は添加物 0.5 ml よりなる 3.0 ml 系。添加物としては各種濃度の G, 及び G に菌を 37°C に一定時間接触反応させた遠心上清等を用いた。

iii) 好, 嫌氣的操作及び定量: 前報と同一であるが、本報では一部の実験を Warburg 装置によつた。上述の反応系のうち、菌液と緩衝液を Warburg flask 主室、基質 (P) と添加物 (G) はそれぞれ側室 a, b にいれ、副室には好氣的測定 (O₂ 吸収) の場合は KOH, 嫌氣的 (H₂ 発生) には alkali 性 pyrogallol 0.5 ml を濾紙片と共に置いた。型の如く manometer を装着して好氣的には大氣中、嫌氣的には N₂ と置換して適時側室内容を主室に定量的に注加して O₂ 吸収と H₂ 発生を読んだ。一定時間反応後は flask 内容について G, P を定量し、起始時との差をとつて代謝量を算出することは前報と同じである。Warburg の取り扱いの Umbreit の成書²⁾に準拠したが、とくに H₂ 測定の詳細は別報³⁾記載の通りである。また O₂ 吸収, H₂ 発生は endogenous なそれ

HIRANO, Seiju, YOSHIKAWA, Eiji, and IMA-KYUREI Sigeru: On the Pyruvate Metabolism of Cl. welchii. III, Effects of Addition of Glucose. Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, Kagoshima University. — Jap. J. of Bact., 10(12), 1043-1048, 1955.

第1表 各種濃度の glucose (G) 添加がCl.welchiiの嫌気的な pyruvate (P) 消費に及ぼす影響

反応系に添加された (0.5 ml)		P	M/30	M/30	M/30	M/30	M/30	M/30
		G	H ₂ O	M/240	M/120	M/60	M/30	M/15
実験 I	0 時間 の	P	53	53	53	53	53	53
		G	0	10	21	45	97	173
	反応 2 時間 の 消費 量	-P	-4	-9	-14	-22	-25	-20
		-G	—	-10	-21	-45	-97	-97
II	0 時間 の	P	53		53	53	53	53
		G	0		26	47	91	186
	反応 2 時間 の 消費 量	-P	-3		-15	-22	-26	-22
		-G	—		-26	-47	-91	-117

備考 1) P, G 及びその消費量 (-P, -G) は mg/dl

第2表 菌の好, 嫌気的な G 代謝濾液が嫌気的な P 代謝に及ぼす影響

反応濾液 作製時の 反応系の	G 量		M/15, 0.5 ml					
	環 境		好 気 的			嫌 気 的		
	反 応 時 間		1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
濾液を添加 した新しい 反応系にお ける	0 時間の	G	12	0	0	4	0	0
		P	86	99	99	51	51	51
	2 時間の 消費 量	-G	-12	—	—	-4	—	—
		-P	-18	-4	-4	-6	-3	-1

備考 第1表に同じ。

を控除して基質によるガス代謝量とした。

実験成績

I. 各種濃度の G 添加が Cl. welchii の嫌気的な P 消費に及ぼす影響

前述の反応系で基質として P (M/30, 0.5 ml), 添加物として M/240~M/15 の G ないし H₂O の 0.5 ml を加えて, 嫌気的に 2 時間反応させた時の G 及び P の消費は第1表に示す通りである。表には実験を 2 回反復した所見を示してあるが,

(i) G を加えない反応系では 4~3 mg/ml の P が減少(消費)するにすぎないが(mg/ml は著者らの測定単位で, これに 3/100 をかけたものが 3 ml 系における P 消費量になるが簡略のため mg/dl で比較する), G が同時に存在すると P 消費が増加する。

(ii) G の存在による P 消費の促進増加は G M/30 までは G の濃度(量)に比例し, G の M/15 以上ではかえつ

て減少する。すなわち P と同モルの G の存在で P 消費の促進が最も著しい。

II. 菌の好, 嫌気的な G 代謝濾液が嫌気的な P 消費に及ぼす影響

実験方法の項でのべた反応系で基質として G (M/15 の 0.5 ml) を加えたものを好, 嫌気的に一定時間 (1~3 時間) 保つたのちに (すなわち G に菌を作用させて), その遠心上清 (30000 r.p.m., 30') を分離する。新しく P (M/30, 0.5 ml) を基質とした反応系を作つてこの遠心上清の 0.5 ml を添加物として加え, 嫌気的に 2 時間反応させた時の P 消費は第2表に示す通りである。

(i) G との反応 1 時間の上清では好気的には 12 mg/dl, 嫌気的には 4 mg/dl の G が残存し反応 2 時間以上の上清では G が残存しない。P 消費の促進は好, 嫌気的上清とも G が残存する場合に限つて認められる。

(ii) また表は省略するが嫌気的に G を菌と 30 分~3

第3表 G と P の共存による H₂ 発生及び P 消費の促進 (G, P 添加の時間的關係)

フラスコ 番号	基 質 添 加	実 験 回 数 測 定 値	I	II	III	IV
1	G (M/100) — 0' — H ₂ O	+ H ₂	205	235	223	230
		- P	—	—	—	—
2	P (M/25) — 0' — H ₂ O	+ H ₂	3	13	6	6
		- P	4	5	4	3
3	G (M/100) — 0' — P (M/25)	+ H ₂	268	271	237	307
		- P	13	11	12	16
4	G (M/100) — 30' — P (M/25)	+ H ₂	253	285	257	229
		- P	8	11	7	8
5	G (M/100) — 120' — P (M/25)	+ H ₂				228
		- P				3
6	P (M/25) — 33' — G (M/100)	+ H ₂	281	275	273	
		- P	11	12	16	
7	P (M/15) — 30' — G (M/100)	+ H ₂	191	229	225	
		- P	16	19	12	

+H₂ は H₂ 発生量 (μl), -P は P 消費量 (mg/dl).

時間反応させた上清添加の場合には、G との反応 30 分～60 分の上清には 18～3 mg/dl の G が残存し、このような上清添加の場合に限って P 消費の促進が認められ、反応 90 分の上清添加では G が残存しないと共に P 消費の促進をみない。

III. G と P の共存による H₂ 発生量、及び G 添加の時間的關係と P 消費促進との関係について

実験方法の項にのべた Warburg flask による嫌気的な方法で、側室 a に P M/25 ないし H₂O の 0.5ml, 側室 b に G M/100 ないし H₂O の 0.5 ml をいれて、(1) G 単独 (側室 a は H₂O, b は G で同時注加), (2) P 単独 (a は P, b は H₂O で同時注加), (3) G, P 同時添加, (4) G 添加後 30 分に P, (5) G 添加後 120 分に P, (6) P 添加後 30 分に G を添加した場合; 及び側室 a に P M/15 の 0.5 ml, 側室 b に G M/100 をいれて、(7) P 添加後 30 分に G を添加した場合における H₂ 発生を測定すると共に 90～120 分後 (最初の G 又は P 添加後の時間、ただし 5 のみは 3 時間) に flask 内容の G, P を定量してその消費を算出した結果は第 3 表に示す通りである。表には実験を 4 回反復した結果が示され、H₂ 発

生量はその最大値 (H₂ 発生は第 1 図に示す通り基質添加後約 30 分で maximum に達しその後若干の減少をみるがその maximum 値) がしるされている。なお添加された G はすべての系で消費し尽されていたので表には記載を省略した。

(i) まず P 消費からのべると、P 消費は 3, 4, 6, 7 において対照 (P 単独, 2) よりもあきらかに促進せられ、促進の度合は 7 > 3 = 6 > 4 の順に著しい。すなわち P と G を同時或は P 添加後に G を加えた方が G 添加後に P を加えた場合よりも P 消費の促進が著しく、また P M/25 よりも M/15 で P 消費量は大きい。

また 5 すなわち G 添加後 2 時間ではもはや P 消費の促進がみられない (4 すなわち 30 分では上述の通りかなり促進せられる)。

(ii) 次に H₂ 発生についてのべると、P 単独では H₂ 発生は零、G 単独では 205～235 μl であるが 3, 4, 6 の G, P 共存系では一般に (1, 2 の例外を除き) 270～300 μl で G 単独の場合よりも H₂ 発生量が多い。

(iii) G, P の共存による H₂ 発生の増加は 6 では認められるが 7 では認められない。すなわち同じく P 添加後

30分にG添加であるがP M/25では認められ、P M/15では(Pが多くなると)かえつて認められない。i)のべた通りP消費の促進はむしろ後者で著しいのであつて、Pの高濃度ではP消費の促進とH₂発生の増加が平行しないことになる。

IV. G, P の共存による O₂ 吸収について

III と全く同一の実験を、たゞし好氣的な atmosphere で行つた結果は第1図に示す通りである。すなわち Warburg flask による好氣的な方法で側室 a, b に P M/50, G M/100 (ないし H₂O) の 0.5 ml をいれて、(1) G 単独, (2) P 単独, 及び (3) G と P の同時添加による O₂ 吸収を測定すると共に反応 2 時間後の flask 内容の G, P 代謝量を測定算出した。

第1図 Cl. welchii の G, P 各単独及び G+P を基質とした H₂ 発生と O₂ 吸収

備考 1) — H₂ 発生, O₂ 吸収

2) 括弧内の数字は G (glucose), P (pyruvate) の 0 時間値と反応時間値 (mg/dl)

(i) P 単独ではP消費もこれに伴う O₂ 吸収も全くみられない。

(ii) G 単独では 23mg/dl の G 消費に際して 20mg/dl の P 蓄積を伴つて 105 μl の O₂ を吸収する(この所見は従来報告しているところと変りがない)。

(iii) G と P の共存系では O₂ 吸収は G 単独の場合と変りがなく、また 42 mg/dl の P を蓄積する。これは始めに加えられた P 量 (21) と G 代謝で蓄積する P 量 (20) の和にほぼ等しい。

すなわち好氣的には嫌氣的に認められたような G, P

の共存による代謝 (P 消費, O₂ 吸収) の促進が認められない。

実験は前実験と同様数回 (かつ G, P の種々の時間的な関係のもとに) 反復したが、いずれも陽性の結果を認めない。

総 括

以上の所見よりして; (1) Cl. welchii の基質P代謝は、少くとも嫌氣的にはGの共存によつて明かに促進せられる。かつてこの場合、(2) P代謝量は添加G量に比例し、G, P 同モルで最も促進が著しく (I の所見), (3) G そのものないし少くともG代謝の初期の代謝中間物の存在が促進に必要でGの代謝終末産物 (好、嫌氣的いずれの産物でも) では促進がみられない (II 及び III の所見)。また (4) G 添加によるP代謝の促進に伴つて水素ガス発生の増加がみられ、その増加量は通常 8~16mg/dl の添加Pの消費に対して 34~77 μl, 個々の場合について計算すると P 1 モルあたり 0.4~0.9 モルに相当している (III の所見)。

しかし (5) 本菌のP代謝は好氣的にはGの共存によつて全く影響せられない。などのことが明かとせられた。

考 察

1) Glucose の添加によつてとくに菌の pyruvate その他の糖代謝中間物の代謝が促進せられるという報告は数種の菌について認められている⁴⁻⁹⁾。しかしその機転については明かでなく、また Clostridia における類似の報告には接しないようである。著者の場合、共存する G は比較的大量を必要とするのであつて、一部の報告^{4,9)}におけるような微量の G による catalytic なものではない。また別報で詳しくのべる予定であるが、thioglycollate やその他の還元剤の添加によつてはP代謝は促進せられないのであるから一部の報告¹⁰⁾におけるように G の還元力によるものとも考えにくい。

2) その機転としては、本菌では基質として加えられたP単独を消費しないことが併せて考慮される必要があろうが、第1に本菌々体がPに対して非透過性であつてGの存在によつてPを透過 (従つて代謝消費) するにいたるということが考えられる。例えば malonate や citrate 等が細菌々膜を通りにくいことはすでにしばしば論議されているところであるし、また Umbreit¹¹⁾ は E. coli が α-Ketoglutarate や propionate に対して inert なのもやはり透過性の関係であらうとしている (従つてPにおいてもその可能性があろう)。他方Gのような energy 源の存在によつて菌の一定の物質に対する透過性が変化

することは、例えば Gale ら¹²⁾が *Streptoc. fecalis* のグルタミン酸摂取についてのべているところである。しかしこのような考えにたつと、本菌のP代謝が好氣的にはG添加によつて促進せられないことは本菌の好氣的なG代謝は energy 効率が悪い(従つてPに対する透過性をかえない)ということになる。このことは本菌の好氣的なG代謝が前報にのべた通りP以下に及びにくいことと対照して energy の遊離が不十分なことと一応一致するものであるが、Nisman ら¹³⁾が *Cl. sporogenes* の好氣的なアミノ酸酸化が energy の発生を伴うとのべている点とはある程度異つてくる訳である。

次にその機転として考えられる第2の可能性は(かつて著者らがより一層可能性が強いものと考えているのは)本菌のP代謝が G-P 間の代謝によつて spark されるという考えである。例えば著者らは G-P 間で離脱される水素原子(2H)が好、嫌氣的な環境のいかんによつていかに処理されるかということに関して種々の実験を行っているが、もしこの 2H がPに受容されることによつてP代謝が進行する(少なくとも spark される)とすればP単独ではPの代謝が行われずしてGの添加によつて始めてPが代謝せられるという上述の所見が説明可能である。また本菌が好氣的なG代謝に際してP蓄積を来すことや好氣的にGを添加してもP代謝が促進せられないことは好氣的には G-P 間の 2H に対して空中酸素が compete してこれを受容することにその理由を求めることが出来る(別報¹⁴⁾する通りその O₂ 吸収はGあたり1モルでこのような考えと量的に一致する)。

本報の所見が上記のような機転によるものであるか否か、またそのいずれによるかについてはさらに今後の検討を必要とするものであり、また次報以下で逐次あきらかにしたいと思うが、本報ではこのような考え方について一応のべておくにとどめたい。

3) 次に H₂ 発生にふれると、一般に細菌におけるGよりの H₂ 発生はP以下の過程にあると考えられている。例えば *Clostridia* においても Koepsell & Johnson¹⁵⁾は *Cl. butylicum* で $P \rightarrow \text{acetate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2$ すなわち P 1 モルあたり 1 モルの H₂ 発生を、Woods & Clifton¹⁶⁾は *Cl. tetanomorphum* で $3P \rightarrow \text{acetate} + \text{butyrate} + 3\text{CO}_2 + \text{H}_2$ すなわち P 1 モルより $\frac{1}{3}$ モルの H₂ 発生をのべている。しかし本報の所見による本菌の G (M/100 の 0.5 ml, 5 μ M) よりの H₂ 発生は 200~230 μ l (約 10 μ M) であつて G 1 モルあたりほぼ 2 モルに近い。従つて H₂ 発生のすべてがP以下の過程にあるとすれば、上記の Koepsell らの反応によるとしても、

Gは定量的に2モルのPを生じ、かつ生じたPのすべてが phosphoroclastic に P 1 モルにより 1 モルの H₂ を発生するとしなければならないが、このようなことは考えにくい。第1に本菌のG醱酵産物のすべてが acetate のみであるとは考えにくいし、またそうだとすると G-P 間で離脱した 2H が処理されえない(換言すると他に充分の H-acceptor が添加されなければG代謝が進みえない)。従つてGよりの H₂ 発生の少くとも一部は G-P 間の代謝に基因すると考えざるをえないようである。

つぎに G, P の共存によつて H₂ 発生が増加するが、これはいずれにせよPの代謝に基くものであろう。もしこれが添加されたPに由来するとすれば、P消費1モルあたり 0.4~0.9 モルの比較的に大量の H₂ 発生がみられる訳であり、また同時に、P代謝のすべてが前項(第2の可能性)にのべたような 2H の受容を伴つて行われるともいえない訳で、Pによる 2H の受容がP代謝の必須条件であるとしてもそれは代謝を spark するものであつて爾後の代謝は H₂ として 2H を離脱するものを含むことになる。しかし H₂ の増加分が添加されたPに由来するか否かは問題で、G代謝における G-P 間の 2H が添加されたPに受容されるために(H-acceptor としてPを加えた形になる)、一方においては添加されたPの消費(乳酸等への還元)がみられると共に他方ではGの中間産物であるPは 2H を離脱するような反応へ進みやすくなつて H₂ 産生がますということも考えられる(むしろこのような考えが前項にのべた第2の機転と矛盾するところが少いようである)。

結 論

総括の項を参照されたい。

主要文献

- 1) 平野清寿, 義川英治: 日本細菌学雑誌, 10(11), 965, 1955.
- 2) Umbreit, W. W., Burris, R. H., and Stauffer, J. F.: *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Pub. Co., Minneapolis, 1951, 8, 43.
- 3) 平野清寿: 医学と生物学, 33, 73, 昭 29.
- 4) Schultz, A. S. et al: J. Am. Chem. Soc., 62, 2271, 1940.
- 5) Stone, R. W. et al: Iowa State Coll. J. Sci., 14, 253, 1940.
- 6) Slade, H. D. and Werkman, C. H.: J. Bact., 40, 158, 1940.
- 7) Heitzman, P. and Grelet, N.: Comp. rend. Acad. Sci., 216, 694, 1943.
- 8) Rewett, E.: Biochem. J., 49, 453, 1951.

- 9) Nossal, P. M.: Biochem. J., 49, 407, 1951.
- 10) Trudinger, P. A.: Aust. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 29, 117, 1951 (以上の 4-10 は Biological Abstracts より)
- 11) Umbreit, W. W.: J. B. C., 177, 703, 1949.
- 12) Gale, E. F.: Bull. of the Johns Hopkins Hospital, 83, 119, 1948.
- 13) Nisman, B.: Bact Rev., 18, 16, 1954.
- 14) 平野清寿: 近く発表.
- 15) Koepsell, H. J. and Johnson, M. J.: J.B.C., 145, 379, 1942.
- 16) Woods, D. D. & Clifton, C. E.: Biochem. J., 32, 345, 1938.