ブルセラ属のアミノ酸要求についての研究

II. 各型ブルセラの増殖を支持できる簡単なアミノ酸組成

横 山 桂 壽

東邦大学医学部細菌学教室 (主任: 桑原教授)

〔受付: 7月24日 1956年〕

私はさきに3株の波状熱菌 (*Br. melitensis* 東大株, M-2株, M-7株) についてアミノ酸要求をくわしく調べた結果, 6種のアミノ酸 (Aspartic acid 0.5mg/cc, Histidine 0.2mg/cc, Cystine 0.15mg/cc, Arginine 0.1mg/cc, Phenylalanine 0.1mg/cc, Serine 0.015mg/cc) を含む純合成培地が, Sanders, Higuchi and Brewer (1953)¹⁾ の提供したアミノ酸培地より増殖支持性が高いことを知ったので, 第1報でこれを報告した。

この組成は前記3株の波状熱菌については Sanders, Higuchi and Brewer (1953) の提示した組成よりもすぐれた増殖支持力を示すが, 他の2型のブルセラでは増殖はるかに低下することがわかったので, 更に上記の組成中のアミノ酸の各々を順次他のもので置換して各株に対する増殖支持力をしらべた結果, 各型のブルセラ属の増殖を比較的平等に高度に支持できるアミノ酸組成を知ることができた。

以下に報告するのはその実験結果のあらましである。

実験方法

a) 使用菌株:

実験に用いたのは教室保存の波状熱菌3株 (東大株, M-2株, M-7株), プタ流産菌 (No. 1330株, S-14株), ウシ流産菌1株 (No. 19株) の6株である。各菌株は1%グリセリン寒天斜面にロウソク培養法で継代保存し, 実験に当つては各株の37°C, 72時間培養から2mg (1白金耳) を生理食塩液10ccに浮遊させたものを菌液として用いた。

b) 基礎培地:

前回同様 Koser, Breslove and Dorfman (1941) の用いた培地を次のように改変して使用した。

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdots 1.0 \text{ g}$

$\text{NaCl} \cdots 15 \text{ g}$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} \cdots 0.1 \text{ g}$

$\text{Fe, Cu, Mn, Ca} \cdots \text{Trace}$

Glucose $\cdots 3.0 \text{ g}$

Nicotin amide $\cdots 0.5 \text{ mg}$

Thiamine $\cdot \text{HCl} \cdots 0.5 \text{ mg}$

Ca-pantothenate $\cdots 0.5 \text{ mg}$

Biotin $\cdots 0.1 \text{ r}$

Redistilled water $\cdots 1000 \text{ cc}$

c) アミノ酸組成の置換:

前回に提示した No. 11 培地のアミノ酸組成は以下の通りである。

<i>l</i> -Aspartic acid	0.5 mg/cc
<i>l</i> -Histidine $\cdot \text{HCl}$	0.2 "
<i>l</i> -Cystine	0.15 "
<i>dl</i> -Arginine $\cdot \text{HCl}$	0.1 "
<i>dl</i> -Phenylalanine	0.1 "
<i>dl</i> -Serine	0.015 "

此の組成のアミノ酸の中 Histidine をのぞいて, 1つずつ適宜の他のアミノ酸で置換していった。

すなわち, *dl*-Serine を *dl*-Threonine 0.015 mg/cc で, *dl*-Phenylalanine を *l*-Tyrosine 0.05 mg/cc で, *l*-Aspartic acid をそれぞれ *d*-Glutamic acid 0.5mg/cc, Glycine 0.2 mg/cc, *dl*-Alanine 0.5 mg/cc, *l*-Leucine 0.1mg/cc, 及び *dl*-Valine 0.1 mg/cc でそれぞれ置換し, 更に Aspartic acid と Cystin を *d*-Glutamic acid と *dl*-Methionine 0.1 mg/cc 及び *d*-Glutamic acid と *dl*-Homocystein 0.15 mg/cc で, Aspartic

YOKOYAMA Keiju: Studies on the Amino Acid Requirement of Brucellae. II. Simple Amino Acid Composition suitable for the Growth of 3 Types of Brucellae. Dept. of Bacteriology, School of Medicine, Toho University. — Jap. J. of Bact., 11 (11), 995-999, 1956.

acid と Arginine を Glutamic acid と *dl*-Ornithine

0.1 mg/cc で置換した組成について検討した。

d) 培養実験

各アミノ酸を加えた培地は N/10 NaOH で pH を 6.8 に修正し、3 cc ずつウィダル反応用小試験管に分注し、121°C、15 分高压滅菌し、これに前記菌液 0.1 cc ずつを接種するようにした。

各培地はそれぞれ 37°C に培養し、96 時間で増殖度観察を判定した。増殖及びアミノ酸の必要程度は前回同様次の様に規定した。増殖度は、

増殖せず……0

10⁷/cc 以下……1

10⁷~10⁸/cc……2

10⁸~10⁹/cc……3

アミノ酸必要度は、そのアミノ酸を抜き取っても増殖に全くあるいはほとんど影響のない場合を (一) 抜き取った時、全く増殖しなくなる場合を (卅) とし、その中間に (卅), (+), (±), をそれぞれを区別した。

実験成績

a) アミノ酸組成の置換と増殖支持力との関係：

No. 11 組成の Serine を Threonine で置換したもの (No. 16) は、3 株の波状熱菌及びブタ流産菌 No. 1330 株については良好な増殖支持力を示したが、ブタ流産菌 No. 19 株については不良であった。No. 11 組成の Phenylalanine を Tyrosine に置換した No. 17 組成は No. 16 組成に比較して、ブタ流産菌 S-14 株、ウシ流産菌 No. 19 株の増殖は良好だったが、波状熱菌 M-7 株については、No. 16 組成より増殖程度が悪かった。No. 11 組成の Aspartic acid を Glutamic acid に代えた No. 18 組成では波状熱菌、ブタ流産菌、ウシ流産菌の各共株に良好な増殖支持力を示した。No. 11 組成の Aspartic acid を Glycine に代えた No. 19 組成、Alanine に代えた No. 20 組成、Leucine に代えた No. 21 組成、及び Valine に代えた No. 22 組成は No. 18 組成に比較して増殖支持力がかなり劣っていた。(第 1, 2 参照) 従って以上 7 種類のアミノ酸組成の中 No. 18 組成は、

表 1 波状熱菌の各種アミノ酸組成におけるアミノ酸必要性と増殖度

Strains No. of Amino Acids Composition Amno Acids	Br. melitensis 東大										Br. melitensis M- 2										Br. melitensis M- 7												
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			
Glutamic acid			±					0	±	+				+				0	±					+				0	±	+			
Aspartic acid	±	+									+	+										±	±										
Glycine				±										±										±									
Alanine					±									±										±									
Histidine	±	±	±	±	±	±	±	0	±	±	+	+	±	+	+	+	+	0	±	±	+	+	±	+	±	+	+	+	0	±	±		
Cystine	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Valine						±											+											±					
Leucine					±										±										±								
Arginine	±	+	±	+	±	+	±	0	±		±	+	±	+	+	+	+	+	0	±		+	+	±	+	±	±	+	0	±			
Methionine							0											0										0					
Phenylalanine	±		±	±	±	±	±	0	±	±	±		±	±	±	±	±	0	±	±	±	+		±	+	±	±	±	0	±	±		
Ornithine										±													±							±			
Homocysteine								+											+									+					
Tyrosine		+										+											±										
Serine		+	±	+	±	+	±	0	±	±	±	±	±	+	+	+	+	0	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±	0	±	-		
Threonine	±										±											±											
Growth in total Contained media	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3				2			1	0	3					3	2	3	2	2	2	2	0	3	3

(註) 増殖：0……No Growth 1……~10⁷/cc 2……10⁷~10⁸/cc 3……10⁸~10⁹/cc

アミノ酸必要性：(卅)……essential

(-)……indifferent for growth

表 2 流産菌の各種アミノ酸組成におけるアミノ酸必要性と増殖度

Amino Acids	Strains No. of Amino Acids Composition	Br. Suis. No. 1330										Br. Suis S-14										Br. Abortus Bang No. 19									
		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Glutamic acid				+						0 ± ±			± ±						0 ± ±	+							0 ± ±	+			
Aspartic acid		+	+									± ±										± ±									
Glycine					±									±										+							
Alanine						±									+										±						
Histidine		+	+	+	± ±	± ±	± ±	0	± ±	± ±	+	+	+	± ±	+	0	± ±	0	± ±	+	+	± ±	+	+	+	± ±	0	± ±	0	± ±	+
Cystine		± ±	± ±	± ±	± ±	± ±	± ±				+	± ±	± ±	± ±	± ±	0	± ±	± ±			+	± ±	± ±	± ±	± ±	± ±	0	± ±			+
Valine								±										±										±			
Leucine						±										0										0					
Arginine		+	+	+	± ±	± ±	± ±	0	± ±	± ±	+	± ±	± ±	± ±	+	0	± ±	0	± ±		± ±	± ±	+	+	± ±	0	± ±	0	± ±		
Methionine								0										0										0			
Phenylalanine		+		+	+	+	+	±	0	± ±	± ±	+		± ±	± ±	+	0	± ±	0	± ±	+	± ±		+	± ±	+	+	0	± ±	0	± ±
Ornithine											± ±										+										± ±
Homocysteine										± ±									± ±										± ±		
Tyrosine			+									± ±											± ±								
Serine			+	± ±	+	± ±	± ±	0	± ±	± ±		± ±	± ±	± ±	+	0	± ±	± ±	0	± ±	+		± ±	± ±	± ±	± ±	0	± ±	± ±	0	± ±
Threonine		+										± ±										± ±									
Growth intotal		3	3	3	3	2	3	3	0	3	3	1	2	3	2	2	0	2	0	3	3	1	2	3	2	1	0	2	0	3	3
Contained media																															

(註) 増殖: 0No. Growth 1 $\sim 10^7$ /cc 2 $10^7 \sim 10^8$ /cc 3 $10^8 \sim 10^9$ /cc

アミノ酸必要性: (±)essential

(—)indifferent for growth

各型のブルセラの増殖を支持するに最も良好な組成と認められた。

Glutamic acid	0.5mg/cc
Histidine	0.2 "
Cystin	0.15 "
Arginine	0.1 "
Phenylalanine	0.1 "
Serine	0.015 "

f) 培地の硫黄原について:

上記の No. 18 組成でも他の組成同様 Cystine は増殖に必須であつたが、この Cystine を Methionine に代えた No. 23 組成では各型各株共に増殖は認められなかつた。Cystine を Homocysteine に代えた No. 24 組成では No. 18 組成と略々同様な結果を示した。

そこで更に他の硫黄原が利用されるかどうかをしるために基礎培地中の $MgSO_4$ を $MgCl_2$ に代えて Cystine を Na_2S , $Na_2S_2O_3$, Na_2SO_3 にそれぞれ代えて見た所、置換できることを知つたので、0.15 mg/cc から培数稀釈して最小増殖支持量をしらべて見た所第 3 表

第 3 各硫黄原の最小有効濃度 (mg/cc)

	Br. melitensis			Br. suis		Br. abort
	東大	M-2	M-7	No. 1330	S-14	No. 19
Cystine	0.0094	0.0094	0.037	0.0094	0.0094	0.037
Methionine	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
Homocysteine	0.0094	0.075	0.15	0.15	0.15	(0.15)
Na_2S	0.075	0.037	(0.15)	(0.15)	(0.15)	0.075
$Na_2S_2O_3$	0.15	0.0094	0.037	0.075	(0.15)	0.075
Na_2SO_3	(0.15)	0.15	0.15	0.15	0.0094	0.037

(註) 各硫黄原とも 0.15 mg/cc より倍数稀釈し、増殖度 10^8 /cc 以上を示す最小量を記載。

(—) は全く増殖を認めなかつたもの、

(0.15) は 0.15 mg/cc で増殖度 10^8 /cc 以下を示したものの、

に示す通りになつた。最小増殖支持量は各型各株によつてかなり違つた数字を示し、Cystin は 0.037 mg/cc で

表 4 純合成培地における各菌株の増殖

Strains Mediums	Br. melitensis			Br. suis		Br. abort
	東 大	M—2	M—7	No. 1330	S—14	No. 19
Sanders (1953)	5.28×10^8	6.05×10^8	1.31×10^8	2.16×10^6	6.05×10^8	1.29×10^8
No. 11—medium	1.5×10^9	6.6×10^9	1.01×10^{10}	4.3×10^9	2.4×10^7	2.1×10^7
No. 18—medium	1.8×10^9	2.7×10^9	1.8×10^{10}	4.2×10^9	4.8×10^9	9×10^9

(註) 数字は 37°C, 72 時間培養後の培地 1 cc 当りの生菌数を示す。生菌数測定は平板混釈法による。

各型各株共に平等に増殖度 3 を示したが、他の硫黄原では、0.15 mg/cc で、Homocysteine はウシ流産菌 No. 19 株、Na₂S は波状熱菌 M—7 株、ブタ流産菌 No. 1330 株、S—14 株、Na₂S₂O₃ はブタ流産菌 S—14 株、Na₂SO₃ は波状熱菌東大株がそれぞれ増殖度 2 以下であった。

c) その他の成分の変換：

No. 18 組成の Arginine を Ornithine に代えると (No. 25 組成)、Cystine を除いても波状熱菌の 3 株、ブタ流産菌 No. 1330 株では増殖度 1 を示し、ブタ流産菌 S—14 株、ウシ流産菌 No. 19 株では増殖度 2 を示した。

また No. 18 組成に、ビタミン B₆ 複合体 0.5 mg/l 加えてみたが、加えない場合に比べアミノ酸必要性の差異は認められなかった。

a) No. 18 組成、No. 11 組成及び Sanders (1953) 培地の比較：

実験成績は第 4 表に示す通りである。

Sanders (1953) 培地ではブタ流産菌 No. 1330 株の増殖が悪く、No. 11 組成では、ブタ流産菌 S—14 株と、ウシ流産菌 No. 19 株の増殖が悪かったが、No. 18 組成では各型各株共、略同じく極めて良好な増殖を示した。

考 察

私が前にのべた 6 種のアミノ酸組成と Sanders ら (1953) の培地組成との差は前者が Aspartic acid, Histidine, Phenylalanine, Serine を含むのに対し、後者は Alanine, Glutamic acid, Lysine 及び Methionine を含む点にあり、共通の因子は Arginine と Cystine だけである。しかしウシ、及びブタ流産菌は全アミノ酸の抜とり実験の場合にも、常に Glutamic acid を必須または重要とし従って No. 11 組成では波状熱菌以外の菌型は当然はえにくいことが推定された。もちろんたとえば流産菌 No. 19 株が Gerhardt ら (1948, 1950) の L-Asparagine 培地に増殖可能であることは私

も追試確認したが、その増殖度は速度も量もきわめて小さく全く実用的とは思われなかった。

しかし一方 Glutamic acid は多種アミノ酸を含む培地及び、株によつては Sanders らの培地においてさえも増殖阻止的に作用し除いた方が増殖がよくる例が認められたので、これを培地に加えることは他のアミノ酸組成にかなりの改変を与えるであろうことが推定されたのであるが、私の No. 11 組成の場合は他のアミノ酸成分の質的及び量的重要性に全く何らの変化をも与えることなく Aspartic acid と置換することができた。No. 18 組成は液体培地としては少くとも私の用いた 6 種に対しては他のどの組成よりも非撰択的に良好な増殖を示している。

Rode ら (1951)³⁾ は McCullough & Dick の培地—ブドウ糖を炭素原とする—の窒素原を Asparagine にすると Methionine Cystathionine は増殖を支持できないが、Glutamic acid を N—原にすると Cystine, Methionine, S, S²⁻, S₂O₃²⁻ はいずれも増殖を支持できるとのべ、また Lankford ら (1952) によると Asparagine lactate 培地では Cystine, Methionine, Cystathionine はいずれも S 原になり得るが、ブドウ糖の場合は Cystine が必須となるのとべている。しかし私の組成では Aspartic acid, Glutamic acid のいずれが存在しても Cystine は必須で Homocysteine, SO₃²⁻, S₂O₃²⁻ S²⁻ はこれに代用し得るが、Methionine は代用できなかった。従つてこの組成の場合 Methionine → Cystine の変換は不可能と考えられる。

No. 18 組成では Arginine を Ornithine に変えると、Cystine の必要性が減じ Cystine を欠いても中等度に近い増殖が認められることがわかった。球菌群の一部には Arginine dihydrolase (Hills)⁴⁾ なる酵素があつて Arginine から Ornithine を産生することが知られているが、プルセラの場合どんな機構で Ornithine が Cystine 合成に関連するかは興味深い問題であろう。

水野ら (1952)⁵⁾ がブドウ球菌について実験したよう

に **Transamination** に関連するビタミン **B₆-Complex** を培地に加えることによりアミノ酸必要性が変わるかどうかしらべたが, この場合には **No. 11** でも **No. 18** でも必要性の変化は認められなかった。

結 び

1. **Glutamic acid, Histidine, Cystine, Arginine, Phenylalanine, Serine** の6種のアミノ酸を含む合成培地は, 波状熱菌, プタ流産菌及びウシ流産菌に対して, **Sanders** 培地, **No. 11** 培地よりもすぐれた増殖支持力を示した。

2. 此の組成の **Cystine** は **Homocysteine, S²⁻, S₂O₃²⁻, SO₃²⁻** によつて代用することできるが, **Methionine** によつては代用できなかった。しかし **Arginine** を **Ornithine** に変えると **Cystine** の必要性の減弱が認められた。

3. ビタミン **B₆ Complex** によるアミノ酸必要性の変化はこの組成では認められなかった。

終りに臨み, 御懇篤な御指導と御校閲を賜つた桑原教授に心から感謝致します。

(此の論文の一部は第29回日本細菌学会総会において報告した⁴⁾)

(この研究の一部は文部省科学研究費による, こゝに記して感謝の意を表する—桑原。)

文 献

- 1) Sanders T. H., Higuchi, K., and Brewer, C. R., : J. Bact., **66**, 294-299, 1953.
- 2) 横山, 桑原: 第10回日本細菌学会関東支部総会, 1955.
- 3) Rode, L. J., Lankford, C. E., and Shuhardt, V. T.: J. Bact. **62**, 571-582, 1951.
- 4) 桑原, 横山: 第29回日本細菌学会総会 (1956).
- 5) Hills, G. M., : Biochem. J. **34**, 1057-1068, 1940.
- 6) 水野, 小坂: 日本細菌学雑誌 **7**, 229-233, 1952.