炭疽菌のアミノ酸要求についての研究 (1)

炭疽菌の増殖を支持できるかんたんなアミノ酸組成

及 川 忠

日本医科大学衛生学教室 (主任: 八田教授)

東邦大学医学部細菌学教室 (主任: 桑原教授)

〔受付: 9月27日1956年〕

まえがき

炭疽菌の増殖に必須なアミノ酸についての知見は現在までのところきわめて少ない。すなわち, Gladstone (1939)¹⁾ は 17 種のアミノ酸を含む培地 (発育素なし) に 8 株中 6 株の炭疽菌が増殖可能であること, 一部のアミノ酸相互に拮抗現象が認められることを報じ, また Brewer ら (1946)²⁾ はチアミン及び 19 種のアミノ酸を含む純合成培地に炭疽菌の 2 株が増殖すると報じているが必須アミノ酸についてはアミノ酸相互の連関が複雑であるためはつきりした成績がでないとのべている。

さきに桑原及び川島 (1953)³⁾ 桑原, 川島 及び 及川 (1956)⁴⁾ は, 水解カゼインを主体とする半合成培地で, チアミン及びアリチアミン同族体が炭疽菌の増殖を著しく促進することを報告したが, 更に著者はチアミン加半合成培地のビタミンなしカゼインアミノ酸 (Difco) を純アミノ酸混合物に代えても同様の増殖が得られることを認めたのでこのアミノ酸培地について必須アミノ酸を検討してみた。以上に報告するのはこれまでの実験のあらましである。

II. 実験の方法

a. 使用した菌株: これまで著者らの用いてきた 6 株—盛岡, 堀, 52 系, 1 苗, 東大, 川口—を使用した。川口株をのぞく 5 株はチアミンを発育素として必要とする。1 苗株は弱毒株である。

b. 使用した培地: 実験につかつた標準の合成培地の組成は Table 1 に示す通りである。

NaHCO₃ を 0.05 % に加えると初期増殖は高められるが培養 48 時間以後は全く変りがないので簡便のため使用しなかつた。

c. 抜とり実験の方法: 標準培地の組成アミノ酸を 1 つ

Table 1 Composition of Basic Medium.

KH ₂ PO ₄ 4.5 g,	NaCl 2.0 g,	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 g,
Glucose (anhydrous) 3.6 g,	Thiamine. Cl 5 mg,	
Redistilled water 1000 cc.,	pH 1.0 ± 0.2	
Aspartic acid 0.15 g,	dl-Valine 0.1 g,	
l-Leucine 0.1	dl-Alanine 0.6	
d-Glutamic acid 0.1	l-Isoleucine 0.6	
dl-Phenylalanine 0.5	l-Lysine·HCl 0.6	
Glycocoll 0.3	l-Proline 0.3	
l-Tyrosine 0.3	l-Arginine·HCl 0.3	
l-Histidine·HCl 0.3	l-Cystine 0.05	
dl-Methionine 0.05	l-Tryptophan 0.02	

ずつ欠く培地をつくり, これに菌液を接種, 増殖を肉眼的に観察し, 最も影響の少ないアミノ酸 1 種を除いたものを次の標準組成として再び前と同じ形式で抜とり実験を行なう。この方式をくりかえして 1 種ずつアミノ酸組成の簡易化をはかつた。

各菌株は普通寒天斜面に 35~37°C, 72 時間培養し, 滅菌生理食塩液で菌液をつくり, 47°C に 2 時間保持してきただけ胞子をよりわけた後, 3 cc の培地に大略 10⁵ 個の胞子を接種した。接種した培地は 37°C に 1 週間培養し, 毎日肉眼的ににごりを観察し, 0, 1~3 程度に記録した。増殖は顆粒状または綿状である場合が多く, 比濁または平板計算はかなり困難であつたので, 特別の場合を

OIKAWA Tadashi: Studies on the Amino Acid Nutrition of *Bacillus anthracis* (1) A Simple Amino Acids Medium for the Growth of *B. anthracis* Dep. of Hygiene, Nippon Medical College; Dep. of Bacteriology, School of Medicine, Toho University. — Jap. J. of Bact. 11 (12), 1099—1104, 1957.

この報告のあらましは第 29 回日本細菌学会総会「生理化学」シンポジウムで公表した。

Table 2a Elimination Tests of Amino Acids (Morioka)

Amino Acid \ Elimination test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aspartic	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Isoleucine	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Glycocoll	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Proline	—	—	—	—	+	++	++	++	++	++	++
Histidine	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
Cystine	+	—	—	+	+	+	+	±	—	—	
Tryptophan	—	+	—	—	—	—	—	—	—		
Tyrosine	—	—	—	—	—	—	—	—			
Methionine	—	—	—	—	—	—	—				
Phenylalanine	++	+	—	—	—	—					
Arginine	—	—	—	—	—						
Lysine	—	—	—	—							
Leucine	+	—	—								
Glutamic	+	—									
Alanine	×										

++: essential for growth   ++: necessary for growth   +: helpful
 —: indifferent   ×: toxic for growth

Table 2b Elimination Tests of Amino Acids (Hori, Kawaguchi, 1-Byō)

Amino Acid \ Elimination test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aspartic	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+
Valine	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Isoleucine	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Glycocoll	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Proline	—	++	—	—	—	++	++	++	++	++	++
Histidine	—	+	—	—	+	—	—	—	+	++	++
Cystine	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	
Tryptophan	—	+	+	—	—	—	—	—	—		
Tyrosine	—	++	—	—	—	—	—	—			
Methionine	+	+	—	—	—	—	—				
Phenylalanine	—	—	+	—	—	—					
Arginine	+	++	—	—	—						
Lysine	—	+	—	—							
Leucine	×	—	—								
Glutamic	×	—									
Alanine	×										

除き肉眼的観察を主体とした。

III. 実験の成績

a. アミノ酸の抜とり実験：アミノ酸の抜とり簡易化実験は Table 2 a~c に示す通りである。

表に示すように堀, 川口, 1 苗の 3 株は大体同程度,

52系株と東大株が大体同様, 盛岡株のみは他の 2 群と別の態度を示した。

盛岡株：実験を通じてほとんど常に必須のアミノ酸は Glycocoll, *dl*-Valine 及び *l*-Isoleucine の 3 種で他のアミノ酸は組成の変動に応じてかなり重要性の変化がみられた, すなわち 16 種または 15 種のアミノ酸組成では重

Table 2c Elimination Tests of Amino Acids (52-Kei, Tōdai)

Elimination test Amino acid	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aspartic	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
Isoleucine	×	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Glycocoll	++	+	+	+	++	++	+	+	+	++	++
Proline	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+
Histidine	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Cystine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tryptophan	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Tyrosine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Methionine	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phenylalanine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginine	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lysine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Leucine	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutamic	×	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Alanine	×	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

要あるいは有効であった。Phenylalanine, Leucine, Tryptophan Cystine はかえって組成の簡易化に伴って重要性を失った。No-11組成 (Aspartic acid, Valine, Isoleucine, Glycocoll, Proline, Histidine) からはどのアミノ酸を除いてもかなり増殖は減じ、これ以上の簡易化は不可能であった。

堀, 川口, 1 菌株: この 3 株の盛岡株と異なる点は Valine が必須ではなくて有効程度の重要性しか示していないことである。Glycocoll, Isoleucine はアミノ酸組成にかかわらず大体において必須であった。

52系, 東大株: この 2 株は上記 4 株に比しはるかにアミノ酸要求がゆるやかで, NO. 11-組成でも必須のアミノ酸は 1 種もなく, Glycocoll と Isoleucine がある程度重要であるに止まり, Glycocoll 以外のアミノ酸を更に減らすことが可能であった。

なお全アミノ酸添加組成で, Alanine はすべての菌株に対し, Glutamic acid 及び Leucine は一部の菌株に対し増殖阻止的に作用した。

b. No-11組成の各アミノ酸の最適濃度: 上記の実験から 6 菌株のすべての増殖を支持できるアミノ酸組成は No. 11-組成であることがわかったので, 各成分アミノ酸 (Aspartic acid, Valine, Isoleucine, Glycocoll, Proline, Histidine) の有効濃度をそれぞれ階段希釈法によってしらべてみた。その成績は Table 3 に示してある。

Table 3. Optimun Concentration of Each Amino Acid in the No. 11. Composition

Amino Acid	Concentration (γ/cc)
Aspartic acid	200~ 500
Valine	200~ 400
Isoleucine	500~1000
Glycocoll	500~1000
Proline	100~ 250
Histidin	200~ 500

c. No. 11-組成のアミノ酸の置換: 上記の実験で得られた No. 11 の組成は, アミノ酸抜りの順序によって規正されたともみられるので, 他の近縁のアミノ酸がこの組成の各因子を代用できるかどうかを各種のアミノ酸につき種々の量で試験してみた。その成績は Table 4. に概括してある。試験した範囲では *l*-Asparagine が *l*-Aspartic acid と同量でこれと同等以上の増殖を示した他は, No. 11-組成の成分アミノ酸に代用できるものはなかった。

また *l*-Isoleucine に対して *dl*-Isoleucine は全く代用能力を欠くことが知られた。

試験した 6 株のうち 52系, 東大の 2 株はアミノ酸要求がゆるやかで, Aspartic acid→Asparagine, Glutamic acid; Isoleucine→Leucine; Glycocoll→Alanine, Leucine; Histidine→Arginine の代用が可能であった。

Table 4. Substitution of Amino Acid in the No. 11 Composition

No. 11-Composition	Replaceable (Same growth as) (No. 11-Composition)	Replaceable (Less growth than) (No. 11-Composition)	Not replaceable
<i>l</i> -Aspartic acid	Asparagine		Glutamic acid Glutamine Alanine Leucine
<i>dl</i> -Valine		* Leucine	Arginine Methionine Lysine
<i>l</i> -Isoleucine		* Leucine	Alanine Methionine Arginine
Glycocoll	* Alanine * Leucine		Phenylalanine
<i>l</i> -Proline		* Lysine	Arginine Glutamic acid
<i>l</i> -Histidine	* Arginine		Alanine Leucine Methionine Lysine

* Replaceable only in the case of Tōdai and 52-Kei strain

d. Valine と Isoleucine の拮抗：上記の実験で盛岡株は No. 11 組成から Valine と Isoleucine のいずれか 1 つを除くと増殖が全く起らない。しかし Valine と Isoleucine を同時に除くとかなり良好な増殖が認められ、両者の間に一定の拮抗関係が認められた、両者の量的関係にはあまりはつきりした限界は認められなかったが、Valine 1 モル：Isoleucine 2～5 モルで最も拮抗が明かであった。(Table 5)。

この組成の Valine は *l*-型でも *dl*-型でも拮抗に変りはないが、Isoleucine は *l*-型に限り拮抗及び増殖促進性を示すが、*dl*-型はいずれの能力をも欠くことが知られた。また *l*-Leucine 及び *dl*-Leucine は Valine, Isoleucine のいずれとも拮抗せずむしろ増殖に有害であった。

E. 簡易な純アミノ酸培地の組成とこの培地における菌の増殖：以上の実験の他、培養中の pH の移動を考慮して 6 種のアミノ酸を含む培地構成を Table 6 の通りに定めた。

この培地では 3 cc 培地 10⁴ 箇の胞子をうえた場合 6 株

とも培養 18 時間頃から肉眼的ににごりがわかるようになり、48 時間から 60 時間の間に最大増殖に達する。52 系、東大両株ははじめ均等ににごりが現われ、後に顆粒状沈澱をつくるが、他の 4 株でははじめから顆粒状または綿状の沈澱をつくる。この増殖状態は 5 代まで継代しても変らない。接種胞子量が 10³ のオーダーになると増殖経過が 1～2 日おくれ、10² のオーダーではほとんど増殖が起らない。この培地に 2% に寒天末を加えて固形培地にすると表面増殖は更におくれ、4 日目にならないと集落形成が認められなかった。

IV. 考 察

はじめ Gladstone (1939) は 17 種のアミノ酸を含む純合成培地で拔とり実験を行ない、単独アミノ酸拔とりでは Valine と Leucine を抜つた場合に増殖の減少が最も著しく、次で、Glycine, Cystine, Isoleucine, Tryptophan の抜とりがいずれも増殖に影響するとのべている。

著者の実験では 16 種のアミノ酸を含む培地では Glyci-

Table 5. Valine-Isoleucine Antagonism in the No. 11-Composition

Added Levels of Amino Acid		Growth after 2 days culture*
<i>dl</i> -Valine	<i>l</i> -Isoleucine	
0	0	2~3°
M/500	0	0
"	M/5,000	0
"	M/1,000	0~1
"	M/500	2
"	M/200	3
"	M/100	3
"	M/50	2
M/5,000	0	0
"	M/5,000	2~3
"	M/2,000	3
"	M/1,000	2
M/50,000	0	2
0	M/500	0
0	M/5,000	0
0	M/50,000	0~1
0	M/100,000	2

* Employed culture: Morioka strain.

° 0: No. visible growth, 1: Scanty growth 2: Moderate growth, 3: Good growth.

Table 6. Composition of Simple Amino Acids Medium

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	5.5g	KH ₂ PO ₄	1.3g
NaCl	2.5g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1g
Glucose (anhydrous)	3.6g	Thiamine Cl	5.0mg
<i>l</i> -Aspartic acid	0.25g	<i>dl</i> -Valine	0.2g
<i>l</i> -Isoleucine	1.0g	Glycocoll	1.0g
<i>l</i> -Proline	0.2g	<i>l</i> -Histidine HCl	0.5g
Redistilled Water 1000cc., pH 7.0±0.2			

ne が 5 株に必須, 1 株に重要であり, Valine 及び Isoleucine がそれぞれ 2 株に必須, 3 株にそれぞれ重要であつた点では上記の研究と似た傾向を示したが, Leucine は加えらるとかえって有害に作用したものが 3 株, やゝ増殖に有効なもの 3 株, Cystine と Tryptophan は全く増殖に影響のない点が異つていた。

これまでに横山⁹⁾が報告しているように, アミノ酸抜とり試験の成績はそのアミノ酸組成においてのみ適用され得るもので, アミノ酸組成の変化に伴つてアミノ酸必要性も当然動揺し得るものと考えられる。たとえば堀株の場合 Proline についてみると, 16 種のアミノ酸組成で

は抜とつても全く増殖に影響がないが, Alanine を含まない 15 種のアミノ酸組成ではかなり増殖に影響をあたえ, 更にこれから Glutamic acid を除いた 14 種アミノ酸組成では再び全く増殖に無関係となる。同様の現象は他のほとんどすべてのアミノ酸に認められた。このようにアミノ酸組成に左右される抜とり試験成績は, 成分アミノ酸の中に相互に転換の可能なアミノ酸群が存すること, 複雑なアミノ酸拮抗のためと推定される。実験を通じて 6 株中 5 株に対しすべてのアミノ酸組成において必須であつたのは Glycocoll だけで, 次で Isoleucine もほとんどの場合必須であつた。この両種のアミノ酸はいわば『絶対必須』ともいふべきもので, 他のすべてのアミノ酸からの転換が可能であると考えられる。合成増地の成分アミノ酸を 1 種ずつ減らしかなり増殖可能な最もかんたんな組成として No. 11 組成 (Aspartic acid, Valine, Isoleucine, Glycocoll, Proline, Histidine) が得られた。この組成では, Aspartic acid を Asparagin に変えらると一層よい増殖が得られた他は, いずれのアミノ酸も他の類似のアミノ酸で代用することはできなかった。たゞ 52 系株, 東大株の 2 株はアミノ酸必要がゆるやかで Glycocoll が重要である他は Valine→Leucine, Proline→Lysine, Histidine→Arginine の転換が可能であつた。

No. 11 組成についても盛岡株では Valine, Isoleucine のいずれを除いても増殖は全く起らなくなるが, Valine と Isoleucine を同時に除くと中等度の増殖が起り, 両者の間に明かに増殖拮抗が認められた。Valine 及び Isoleucine 単独の増殖阻止濃度は Gladstone の実験におけるよりもかなり高く, Valine では M/50,000 Isoleucine では M/100,000 の附近にあることが知られた。また Gladstone の実験と異なる点として, Valine, Leucine 及び Isoleucine の三角拮抗関係は全く認められず, *dl*-Isoleucine には増殖支持力も拮抗作用も欠けていることが注目された。Bonner (1946)¹⁰⁾が, *Neurospora* 変異株において, Valine と Isoleucine の増殖拮抗を認め, その原因が前駆体であるケト酸蓄積によるアミノ酸産生阻害であることを解明していることから見て, この拮抗関係はおそらく他の菌種にも認め得るものと推定され, Leucine の介入は菌株特異性と考えらるべきものであろう。また両者の拮抗は他のアミノ酸の存在とは関係なく, 16 種アミノ酸組成の場合も同様に発現した。著者の実験した 6 株のうち拮抗関係の著明なものは, 盛岡株だけで他の 5 株でははつきりした関係をつかめなかつた。

V. 結 論

著者は6株の炭疽菌のアミノ酸必要性を検討し次の結論を得た。

1. 各アミノ酸の重要性は組成によって変動したが、Glycocoll, *l*-Isoleucine 及び Valine は大部分の株についてすべての組成を通じ必須または重要であった。

2. 抜とり試験により、6株の増殖を中等度以上に支持できる最もかんたんなアミノ酸組成は、Glycocoll, Valine, Isoleucine, Aspartic acid, Proline, Histidine であることがわかった。

3. 6株中1株には他のアミノ酸組成と関係なく、明かに Valine と Isoleucine の増殖拮抗が認められた。Valine は *l*-型でも *dl*-型でも効果は同じであるが、Isoleucine は *l*-型にかぎり増殖効果と拮抗を示し、*dl*-型はいずれの作用をも欠いていた。

4. Leucine は Valine と Isoleucine の拮抗には無関係であった。

終りに御指導をいただいた日本医大八田教授、御厚情を賜った東邦大学桑原教授に深甚の謝意を表します。

この研究の一部は文部省科学研究費によつた(桑原)。

文 献

- 1) Gladstone, G. P.: Brit. J. Exp. Path., **20**: 189-200, 1939.
- 2) Brewer, C. R., McCullough, W. G., Mills, R. C., Roessler, W. G., Herbst, E. J. and Howe, A. F.: Arch. Biochem., **10** (1): 65-75, 1946.
- 3) Kuwahara, S. and Kawashima, M.: Tokyo J. Med. Sciences, **61** (5-6): 299-304, 1953.
- 4) Kuwahara, S., Kawashima, M. and Oikawa, T.: Tokyo J. Med. Sciences, **64** (1): 15-19, 1956.
- 5) 横山: 日本細菌学雑誌, **11** (6): 535-538, 1956.
- 6) Bonner, D.: J. Biol. Chem **166**: 545-554, 1946.
- 7) 桑原, 及川: 第29回日本細菌学会総会生理化学シンポジウム.