ブルセラ属のアミノ酸要求についての研究 (1)

波状熱菌のアミノ酸要求について

横 山 桂 壽

東邦大学医学部細菌学教室 (主任: 桑原教授)

〔受付: 2月29日1956年〕

I. まえがき

ブルセラ属の栄養についての研究は, その歴史もかなり古く, その数もかなり多い。しかし今ではすでに歴史的な意味しかないであろう Zobell and Meyer(1932)¹⁾の研究は別として本格的な栄養の探究は他の菌のそれと同じく1940年を境として胎動を始めたと考えて差支えあるまい。Koser, Breslove and Dorfman (1941)²⁾が17種のアミノ酸を含む純合成培地について, ブルセラの発育素をニコチン酸, チアミン, パントテン酸及びビオチンと決定して以来, Mc Cullough and Dick (1943)³⁾, Gerhardt, Tucker and Wilson (1950)⁴⁾の研究は主として上記の発育素群を含む合成培地における窒素原及び硫黄原の簡易化に向けられ, ウシ流産菌 No. 19株については再びかつて Zobell and Meyer が記載したものに近い培地組成が登場し, Sanders, Higuchi and Brewer (1953)⁵⁾は波状熱菌について6種のアミノ酸を含む合成培地を提供している。

著者はこれまでこれらの純合成培地のブルセラ属に対する増殖支持性を検討した結果, これらの培地は菌株特異性がかなり強く一般に実用化されるには不足であることを知り得たので, 更に広い増殖支持性をもつアミノ酸組成を検討すべく, 3株の波状熱菌を用いてそのアミノ酸要求性をくわしく調べ, Sanders らの報告とは異なる6種のアミノ酸を含む組成を得ることができた。以下に報告するのはその実験経過のあらましである。

II. 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 (東大株, M-2株, M-7株) の3株でM-2, M-7両株は予研倉塚技官から分与をうけたものである。

各菌株は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) を滅菌生理食塩液10ccに浮遊させたものを菌液として用いた。

b) 基礎培地: Koser, Breslove and Dorfman (1941) の用いた培地を次の様に改変して使用した。

各アミノ酸を加えた培地はN/10-NaOHでpHを6.8

KH ₂ PO ₄	1.0 g
NaCl	15.0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.1 g
Fe, Cu, Mn, Ca	Trace
Glucose	3.0 g
Nicotinamide	0.5mg
Thiamin · HCl	0.5mg
Ca-pantothenate	0.5mg
Biotin	0.1γ
Redistilled water	1000cc
Aspartic acid	0.5 g
dl-Alanine	0.5 g
Glycine	0.2 g
l-Lysine	0.2 g
l-Histidine · HCl	0.2 g
l-Tryptophan	0.2 g
l-Cystine	0.15 g
dl-Valine	0.1 g
l-Leucine	0.1 g
l-Arginine · HCl	0.1 g
dl-Methionine	0.1 g
dl-Phenylalanine	0.1 g
l-Proline	0.1 g
l-Tyrosine	0.05 g
dl-Serine	0.015 g
dl-Threonine	0.015 g

(この報告の概要は第10回日本細菌学会関東支部総会シンポジウムの席上で公表した)。

YOKOYAMA Keiju: Studies on the amino acids nutrition of *Brucellae* (1) Amino acids nutrition of *Brucella melitensis*. Dep. of Bact., School of Medicine, Tōhō University — Jap. J. of Bact., 11 (6), 535-538, 1956.

に修正し、3 ccずつウイゲール反応試験管に分注し、121°C、15分間高压滅菌し、これに前記菌液 0.1ccずつを接種するようにした。

c) 抜き取り試験： 以上のアミノ酸の中、1種類ずつを取り除いた培地をつくり、これに菌を培養し、増殖にさして必要でないアミノ酸を除き、残りのアミノ酸について、また1種類ずつアミノ酸を取り除いた培地をつくり、この方法を順次くりかえしていった。対照はその都度使用したアミノ酸全部を加えた培地を用いた。

実験成績は37°Cに培養し、96時間後と、144時間後に観察し、その最終結果によることにした。

増殖程度は以下のように表記した。

増殖せず 0
 10^7 ヶ/cc以下 1
 $10^7 \sim 10^8$ ヶ/cc 2
 $10^8 \sim 10^9$ ヶ/cc 3

III. 実験結果

抜き取り実験の結果は第1表、第2表、第3表に示す通りである。アミノ酸の必要性の程度は次の様にした。

抜き取った結果の増殖度 アミノ酸の必要度

0 卅
1 卅
2 +
3 -

尚、そのアミノ酸を抜き取った方がかえって増殖が良くなった場合、即ち増殖を阻害している場合は×とした。

IV. 実験の成績

a) アミノ酸組成と抜き取り試験の関係

実験に用いた3株はいずれも16種類のアミノ酸 (Aspartic acid または Glutamic acid を欠いたもの) を含む培地によく増殖するが、すでに Aspartic acid と Glutamic acid を入れかえると、抜とつた場合に増殖に影響するアミノ酸はある程度変るのが認められた (第1～3表)、東大株及びM-7株では No. 3の組成 (Aspartic acid, Alanine, Threonine を欠く) において Histidine 必須、Proline, Tyrosine を含む数種のアミノ酸が重要または有効であるが、更に Lysine を欠いた No. 4組成では Phenylalanine が必須となり、Histidine の重要性は全く消失している。

また No. 5の組成 (Aspartic acid, Alanine, Lysine, Valine, Leucine, Methionine, Threonine を欠く) 及び No. 6の組成 (更に Glycine を欠く) では増殖が

第1表 Br. melitensis (東大) に
 ついての抜き取り実験

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Aspartic acid	/	-	/	/	/	/	/	/	/	/	-	/	/	/	/
Glutamic acid	-	/	++	-	x	x	/	/	/	-	/	/	/	/	/
Alanine	-	-	/	/	/	/	/	/	/	-	/	/	/	/	/
Glycine	-	-	++	?	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Lysine	-	-	/	/	/	/	/	/	/	-	/	/	/	/	/
Histidine	-	-	+++	+	x	++	-	x	/	-	+++	-	-	+	/
Tryptophan	+	+	+	+	x	x	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Cystine	+	+	+	+	+	1	++	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++
Valine	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Leucine	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Arginine	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	++	-	+	/	/
Methionine	+	-	-	/	/	/	/	/	/	-	/	/	/	/	/
Phenylalanine	-	-	+++	+	-	-	/	/	/	-	/	/	/	/	/
Proline	-	-	++	+	-	-	+	/	/	-	+	/	/	/	/
Tyrosine	-	-	++	+	+	-	-	/	/	-	/	/	/	/	/
Serine	-	+	-	+	+	-	-	/	/	-	/	/	/	/	/
Threonine	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Growth in total Contained media	3	3	3	3	1	0	2	2	2	2	3	1	1	1	1

第2表 Br. melitensis M-2 についての
 抜き取り実験

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Aspartic acid	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	/	/
Glutamic acid	-	/	+	-	x	x	/	/	/	-	/	/	/	/	/
Alanine	-	-	/	/	/	/	/	/	/	-	/	/	/	/	/
Glycine	-	-	-	?	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Lysine	-	-	/	/	/	/	/	/	/	-	/	/	/	/	/
Histidine	-	-	-	-	x	+	-	+	/	+	+++	+++	+++	+++	+++
Tryptophan	+	+	-	-	x	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Cystine	+	+	+	+	1	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Valine	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Leucine	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Arginine	-	-	+	-	-	-	-	++	-	+	+	++	+	/	/
Methionine	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Phenylalanine	-	-	+++	-	-	/	/	/	/	+	/	/	/	/	/
Proline	-	-	+	-	-	-	-	/	/	+	++	/	/	/	/
Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-	/	/	+	/	/	/	/	/
Serine	-	-	-	-	-	-	-	/	/	+	/	/	/	/	/
Threonine	-	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Growth in total Contained media	3	3	3	3	1	0	2	2	2	2	3	1	1	1	1

第3表 *Br. melitensis* M-7 についての

抜き取り実験

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Aspartic acid	/	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Glutamic acid	-	/	+	-	×	×	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Alanine	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Glycine	-	-	+	-	?	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Lysine	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Histidine	-	-	///	-	×	+	+	-	/	/	///	///	///	///	///
Tryptophan	-	+	+	-	×	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Cystine	-	+	+	+	1	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
Valine	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Leucine	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Arginine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	///	+	/	/
Metionine	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Phenylalanine	-	-	-	///	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/
Proline	-	-	+	-	-	-	-	+	/	/	-	///	/	/	/
Tyrosine	-	-	+	-	-	-	-	-	/	/	-	/	/	/	/
Serine	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Threonine	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Growth in total Contained media	3	3	3	3	1	0	2	2	2	3	3	1	1	1	1

きわめて低下するが, No. 5 において Glutamic acid を No. 6 において Glutamic acid, Histidine, Tryptophan のいずれか 1 種を除くと良好な増殖が起ることが認められた。

No. 11 の組成 (Aspartic acid, Histidine, Cystine, Arginine, Phenylalanine, Serine) 以下では Cystine は完全に必須になり, この組成では他のアミノ酸抜き取りの影響は比較的よわいが, 更に 1 種以上のアミノ酸を除くと増殖は著明に低下する。しかし Histidine と Cystine だけでよわくはあるが 3 株とも確実に増殖するのが認められた。

b) No. 11 組成と Sanders 培地の比較

上記の実験から No. 11 のアミノ酸組成は波状熱菌の増殖に適当な最も簡易な組成と考えられたので, この組成の各アミノ酸についてそれぞれ増殖に適当な最小濃度をしらべた結果次のアミノ酸組成が決定した。

Aspartic acid	0.5 mg/cc
Cystine	0.15
Arginine	0.1
Histidine	0.2
Phenylalanine	0.1
Serine	0.015

この組成を Sanders 培地のそれと比較してみると, 相互に共通しているのは Cystine と Arginine だけで, 他はすべて異つたアミノ酸が含まれている。

著者の実験培地と Sanders らの培地における実験株の増殖度を比較してみると, 東大株ではあまり差がないが M-2, M-7 両株では No. 11 培地ではほとんど東大株と差のない増殖が得られているのに, Sanders 培地ではかなり増殖度が東大株より低いことが注目された (第4表)

第4表 No. 11 組成の増殖支持力

培地 菌株	Sanders, Higuchi & Brewer (1953)	No. 11 組成
東大	1.6×10^8	3.2×10^8
M-2	9.5×10^7	4.2×10^8
M-7	5.9×10^7	2.14×10^8

(註) 数字は各培地 37°C, 4 日培養の 1 cc 当りの生菌数を示す。

No. 11 培地はそれ自身はもちろん, これに 2% に寒天を加えた固形培地においても——増殖は更にいくらか低下するが——10代継代が可能であり集落型の変化も起らなかった。

c) 他の硫黄原の利用

組成中の Cystine は当然菌体の S 原として利用されていることが想像されるので, 培地中の $MgSO_4$ を $MgCl_2$ に変え他の硫黄化合物の代用能力を試験してみた。成績は第5表に示す通りで Homocystine, Na_2S , $Na_2S_2O_3$, Na_2SO_3 はいずれも程度の差はあるが, Cystine を代用できることが知られた。

第5表 硫黄化合物の増殖支持能力

	最小増殖支持濃度 (mg/cc)
Cystine	0.15
Homocystine	0.06
Na_2S	0.125
$Na_2S_2O_3$	0.015
Na_2SO_3	1.0

V. 考 察

細菌のアミノ酸要求をしらべる方法はいろいろ考えられるが, その中心になるものはもちろん純合成培地におけるアミノ酸抜き取り実験であろう⁶⁾。この方法は Filanders, Mueller, Koser らのはじめたもので, 純合成培地の組成アミノ酸の 1 種を欠く培地をつくりその培地で

の増殖を完全培地のそれと比較して増殖が陰性になった時はそのアミノ酸は必須、増殖が極めて低下した時は重要というような推定を行ない。必須—重要なる現象を菌のそのアミノ酸合成能の完全または部分的欠除として説明している。

しかし Gladstone (1939)⁷⁾ が炭疽菌について Valine, Leucine 及び Isoleucine の3者の間の拮抗関係を報告して以来、多くの研究者が一定の条件下におけるアミノ酸の増殖阻止現象について報告しており、Bonner (1946)⁸⁾ は *Neurospora* から得られた、Valine と Isoleucine を同時に要求する変異株を検討し、蓄積した Ketoisoleucine が Ketovaline→Valine の変化を阻害するためであることを立証した。この1例から考えてもアミノ酸合成能はあるアミノ酸単独とし考えるべきものではなく、常に共存する他のアミノ酸の種類に左右さるべき事を考慮に入れなくてはならないはずである。

著者はこのような考えから多種アミノ酸培地について抜取り試験を行い、増殖に影響のないアミノ酸を順次取除き組成の簡易化をはかってみた。当然想像されたように組成アミノ酸の変化に応じ、必須あるいは重要なアミノ酸もある程度変るのが認められた。特に増殖にかなりな関係をもつ Histidine, Glutamic acid が組成に応じてかえつて有害に作用したことは注目に価する。

著者は上にのべたアミノ酸減少方式によつて Sanders らとは異なる6種アミノ酸組成を得た。しかしこの組成アミノ酸はおそらくある程度の改変が可能なるべく更に他の型、あるいは他の多数株について検討が必要であろう。

Rode ら (1951)⁹⁾ はブタ流産菌について S 原を検討し Cystine が最も有効であるが、Methionine, S^{--} , $S_2O_3^{--}$ をある程度利用し、 SO_3^{--} , SO_4^{--} を利用できないことを報告した。著者の実験では S^{--} , $S_2O_3^{--}$ が利用される他、 SO_3^{--} もある程度利用されたことが異っていた。Rode らの実験では Glutamic acid が N—原である時は Methionine を利用し、Asparagine が N—原の場合は Methionine を利用できないというが著者の実験では Glutamic acid が N—原であつても、

Aspartic acid が N—原であつても共に Methionine は利用されなかつた。

VI. 結 び

著者は3株の波状熱菌のアミノ酸要求性を検出し次の結論を得た。

1. 抜とり試験によるアミノ酸の重要性は組成アミノ酸の種によつてかなり変動することが知られた。

2. アミノ酸種を次第にへらし、Aspartic acid, Cystine, Arginine, Histidine, Phenylalanine, Serine の6種のアミノ酸組成を得た。この組成は波状熱菌に対して Sanders 培地よりもすぐれた増殖支持力を示した。

3. Cystine は S^{--} , $S_2O_3^{--}$, SO_3^{--} によつて代用することができた。

4. 著者の6種アミノ酸組成は波状熱菌の増殖を10代にわたつて変りなく支持できた。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜つた桑原章吾教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) Zobel, C. E., and Meyer, K. F.: J. Inf. Dis. 51: 344-360, 361-381, 1932.
- 2) Koser, S. A., Breslove, B. B., and Dorfman, A.: J. Inf. Dis. 69: 114-124, 1941.
- 3) McCullough, N. B., and Dick, L. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 52: 310-311, 1943.
- 4) Gerhardt, P., Tucker, L. A., and Wilson, J. B.: J. Bact. 59: 777-782, 1950.
- 5) Sanders, T. H., Higuchi, K., and Brewer, C. R.: J. Bact., 66: 294-299, 1953.
- 6) 中村, 秋葉: 細菌学総論, (南山堂) 第1版: 103頁.
- 7) Gladstone, G. P.: Brit. J. Exp. Path. 20: 189-200, 1939.
- 8) Bonner, D.: J. Biol. Chem. 166: 545-554, 1946.
- 9) Rode, L. J., Lankford, C. E., and Shuhardt, V. T.: J. Bact. 62: 571-582, 1951.
- 10) 横山, 桑原: 第10回日本細菌学会関東支部総会 1955.