特異なる変異形式を取る大腸菌のムタビール型 変異菌について (第2報)

Org, M, TS, TR の菌体成分の分析

吉 田 昌 男

岩手医大細菌学教室 (主任 田沢芳三郎教授)

〔受付：6月28日・1958年〕

緒 言

第1報¹⁾で私のM型菌が Massini 型、並びに村瀬型とは全く相異した菌である事を記載し、特にその性状の内 S—R の変異が最も特徴的な性状の一つとして詳細に論述された。然しその実験は所謂狭義の細菌学的技術に依つて進められたのみである。細菌の S—R 変異が本質的には単一の因子即ち菌体の化学的組成に依つて支配されて居る事は近代の細菌化学が明瞭に実証して居る。

茲において私の実験でもその一つの主題たる S—R 変異の裏付けとして各変異菌の化学的分析が必然的に必要とせられる。第2報は斯かる目的で各変異菌の蛋白成分、多糖質成分の分析および核酸成分等の分析結果を検討した研究である。

蛋白及び多糖質成分の定量

由来 S → R の変異は S 型菌の持つ特異的多糖質の減少がその根本的原因とされて居る。私の M 型菌変異系統において Org.—S 型、M—R 型、TS—SR 型、TR—R 型、TSS—S 型 (TSS は第3報参照。TS より更に変異して Org と全く区別不能となつた菌株) である事が各種の実験による性状比較において明瞭である。故にそれ等の蛋白質多糖質成分においても夫々の相違が認められる事が当然推察される。此等の吟味の為本実験が行われた。

実験方法

黒屋教授の方法即ち蛋白成分 (PE) を比濁で、多糖質成分 (CF) を Carbasol 反応の比色で比較定量する方法を基礎として極く若干の操作を私の実験に便利な様に変更して行つた。

表1の如く予備実験で各変異菌の水分量に大差のない

事が認められたので湿潤菌量を基準として実験を進めた。可及的同一条件に培養した各菌株の20時間培養菌 60.0mg を 6 cc の蒸留水に浮遊 100°C 1 時間沸水中で加熱後5000回転30分遠心、上清を分離した。即ち菌体成分の抽出は中性加熱法である。上記上清 2.0cc を等量の蒸

表 1 湿潤菌量の水分

CD 4 Org			
	実験 1	実験 2	実験 3
湿潤菌量	0.7000	0.7000	0.7000
乾燥菌量	0.1570	0.1564	0.1572
水分	0.5430	0.5436	0.5428

CD 4 M			
	実験 1	実験 2	実験 3
湿潤菌量	0.7000	0.7000	0.7000
乾燥菌量	0.1518	0.1513	0.1522
水分	0.5482	0.5497	0.5478

説明 乾燥菌量は湿潤菌を 110°C 2.5 時間
加熱後秤量したものである

溜水で稀釈後 0.1%トリクロール醋酸 (以後 T.C.A. と略記する) を加え (全実験を通じ等量用いた) pH=3.6 ~ 3.8 となし、その濁濁度を同一操作で T.C.A. の代りに蒸留水を等量加えたものを Blance として光電比色計で比濁し (Filter=460) PF 価を得た。PF を測定した溶液を 5000 回転 30 分遠心しその上清 1.0cc に濃硫酸 (鹿

YOSHIDA Masao: Study on the E. coli mutable type variant which shows the characteristic form of variation (Part II) Department of Bacteriology, Iwate Medical Collage—Jap. J. of Bact., 13 (12), 1098-1100, 1958.

CD 4

図 1 PF CF 値

C3 4

印) 2.0cc 加え冷却後 1% Carbasol-alkohol 溶液 0.1 cc を加え 100cc 10 分加熱発色した紫赤色を比色に供した。又 Blance として菌抽出液の代りに蒸留水を加え同様処置したものを用いた。斯くして Filter=530 を使用して得た値を CF とした。

実験成績 図 1 の如く PF は CD 4 では M, TR, Org, TS, TSS の順に, C34 では TR, M, Org, TS の順に多く一般に $R > S$ である。又 CF は CD 4 では TS, TSS, Org, TR, M の順に C34 では Org, TS, TR, M の順に多く一般に $S > R$ である。又 PF, CF 総合しての比較では, CD 4 Org は同 TS, 同 TSS よりむしろ S 型菌としての性状弱く, C34 では Org と TS との S 型程度の判別が困難である。CD 4 M は同 TR より R 型性状強く C34 M と C34 TR とは区別不可である。

核酸及び関連物質の定量

近時, 核酸の重要性が各方面で認識されその研究も目ざましい発展を遂げて居る。細菌学の領域においてもその定量的方面は Boivin, Vendrely¹⁾, Leonardi²⁾, Stephenson³⁾, 佐藤⁴⁾, 南本⁵⁾ 等により報告され又 Transformation 等の対照として等々数多くの業績が発表され

て居る。而して Stephenson, 南本等は核酸特に R.N.A. は $R > S$ であると記載して居る。茲において私は PF, FC の成績に更に追加する意味において各変異菌の D. N.A., R.N.A. およびその精製途中の関連物質たる酸可溶性磷, 磷脂質を定量的に分析した。

実験方法

Schmidt & Thannhauser 法⁶⁾ の黒屋教授変法を用いた。10~15 g の湿潤菌量を冷水で 1 回洗滌後 7% 冷 T.C.A. を約 20 倍量に加え時々冷却しつつ 15 分間振盪後遠心し上清を分離する。かかる操作を 3 回繰返えした後沈澱を 1 回冷水で洗滌した。而して以上の上清は総て回収し酸可溶性物質として分析に供した。上記沈澱を 40 倍のエーテル・エタノール (1:1) で 3 回洗滌抽出 pH=7.0 なる事を確め次に 40 倍量のエーテル・エタノール (3:1) を加え 5 分間加熱後遠心し 20 倍量のエーテルで洗滌。次に 40 倍量のクロロホルム・エタノール (1:1) を加え還流装置で 30 分間煮沸冷後遠心し沈澱を又 20 倍のエーテルで洗滌した。以上酸可溶性物質を分離後の今迄の上清は磷脂質として回収分析に供した。斯くして得た沈澱は白色粉末として乾燥され秤量され一部で N 量が測定された。即ち脱脂乾燥菌体である。この乾燥菌体を 1 N KOH 液に約 1% の割に浮游し, 37°C に時々振盪しながら 30~40 時間放置後遠心して上清を分離した (尚この際の微量の沈澱には分析の結果 P は認められなかつた) この上清を塩酸で pH=1.4 に生じた沈澱と上清を分離した。而して沈澱を pH=1.4 の塩酸で洗滌し洗液は上記上清部分に追加した。又沈澱は 20 倍量のアルコール・エーテル (1:1) で 1 回洗滌乾燥後 D.N.A. 分割として分析に供した。上記上清は一部で総磷を測定し又一部で Delory の無機磷を計り総磷から Delory の磷を差引き R.N.A. 磷を算出した。以上の各分割の分析値は表 2 に示す如くである。尚全実験において磷の定量は Hiske-Subbarow 氏法を用い窒素量は Microkjeldahl 法を用いた。又上記 pH=1.4 の沈澱は D.N.A. で上清には主として R.N.A. が含まれる事は表 3 の定性反応が示す如くである。

実験成績

表 2 の如く酸可溶性磷同窒素, 磷脂質, 同窒素および D.N.A. には各菌株間に有意の差を認められないが R. N.A. においては M, TR の R 型菌が多く逆に S 型菌においては少ない成績を得た。この R.N.A. の定量値は定性反応としての Orcin 反応においても呈色の強弱に依つて明瞭に認め得られた。此等の成績は Stephenson および南本等の報告と大体において一致する成績を示す

表 2 核酸及び関連物質の分析価

	Org	M	TS	TR	TSS	備 考
酸 可 溶 性 燐	0.2210	0.2128	0.2218	0.2136	0.2198	湿菌量に 対する%
同 室 素	0.2329	0.2358	0.2461	0.2419	0.2332	"
燐 脂 質 燐	0.0892	0.0911	0.0908	0.0891	0.0917	"
同 室 素	0.0346	0.0358	0.0331	0.0371	0.0338	"
脱 脂 乾 燥 菌 量	12.517	15.734	17.593	18.402	17.864	"
乾 燥 菌 室 素	11.9862	11.3421	12.0323	11.7644	11.9768	乾菌量に 対する%
同 蛋 白 量	74.9138	70.881	75.2019	73.5175	74.855	"
N-KOH 可 溶 総 燐	0.5391	0.5540	0.5293	0.5638	0.5383	"
D.N.A. 燐	0.1383	0.1371	0.1390	0.1350	0.1376	"
D.N.A.	1.3968	1.3847	1.4039	1.3635	1.3898	"
pH=1.4の上清の総燐	0.4004	0.4159	0.3898	0.4280	0.3996	"
同 無 機 燐	0.0075	0.0079	0.0076	0.0079	0.0075	"
R.N.A. の 燐	0.3929	0.4080	0.3922	0.4201	0.3921	"
R. N. A.	4.1647	4.3248	4.1573	4.4530	4.1542	"

表 3 D.N.A. R.N.A. 各分割の定性反応

菌 株	Org		M		TS		TR		TSS	
	p.p.t.	sup.	p.p.t.	sup.	p.p.t.	sup.	p.p.t.	sup.	p.p.t.	sup.
pH=1.4の p. p. t. 及び sup										
Orcin R.	—	+	—	++	—	+	—	++	—	+
Diphenylamin R.	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
Cystein-H ₂ SO ₄ R.	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—

ものである。

総括並びに考察

以上の成績を総括するに私のM型菌変異系統のS—R変異が狭義の細菌学的技術に依るだけでなく菌体成分の分析においても明瞭に証明された。即ち私のS—R変異が単に生化学的および血清学的なものではなく菌体の化学的組成の変化も伴つておる根本的な定型的変異である事が実証された訳である。但し本論の成績を通覧するにS又はRの程度は所謂S—R反応又は血清学的性状等の表現する成績とは必ずしも一致しない如くである。特にTSが他の方法ではSR型と認定されて居るに反し菌体成分に依つてはS型のOrgおよびTSSとの区別が困難であつた如きはその例である。核酸およびその関連物質においてはR.N.A.の量がS—Rの関係を明瞭にした以外S—Rの差に認むべき成績は得られなかつた。然し核酸特にD.N.A.が遺伝現象との関係において強く注目されて居る現在変異乃至遺伝現象を対照とした私の実験において此等の分析を試みた事は決して意義のないものでないと思ふ。又関連物質特に酸可溶性燐はその

中に代謝の中核たるA.T.P.を含む事より而して細菌の此等物質の分析報告が少ない点等より考えれば直接本文に関係ないとしてもその実験の重要性を信ずるものである。

最後に本論文の実験中御指導戴いた田沢教授、園田、近藤両助教授に深甚の感謝の意を表し又特に本第2報の実験に御懇篤な御指導、御援助戴いた東北大黒屋教授に深甚なる感謝の意を表します。尚又本学生化学教室小原教授の御厚意に対して厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Boivin, A.: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biol. 12, 7, 1947.
- 2) Leonardii, M. G.: Compt. rend Acad. Sci. 229, 393, 1949.
- 3) Stephenson, M.: "Bacterial Metabolism" Longmans, London 1950.
- 4) Sato Hisashi: The Tohoku J. exp. med. 55 (1), 53, 1951.
- 5) 南本: 日本細菌学雑誌, 8(特), 525, 1953.
- 6) Schmidt, G.: J. Biol Chem 161, 83, 1945.
- 7) 吉田: 日本細菌学雑誌, 13(11), 1958 の予定.