細菌と環境との相互作用

第1報 誘導期の大腸菌の発育に及ぼすコバルトイオンの作用

片 山 胖・東 明 一・許 太 陽

小 田 正 夫・伊 藤 誠 一

京都府立医科大学微生物学教室 (指導: 鈴木成美教授)

〔受付: 2月16日・1959年〕

I. 緒 論

細菌の成長に及ぼす金属イオンの作用については, F. Friedlein¹⁾ 等によつて研究されて以来, その重要性が認識されて来た。それは元来, 細菌の合成培地の培地成分の研究を目標とするものであつたが, 最近の酵素化学並びに金属錯化合物の化学の進歩につれて, 微量金属イオンの生物学的作用が再認識されてきた²⁾。又方法論的にも, Polarography を頂点とする電気化学的分析方法の進歩によつて, 微量イオンの定性, 定量が容易となり, その生物学的意義の研究応用にも役立つものであろう。

他方, 単細胞生物の一種としての細菌と, その発育環境との相関関係は細菌の生理学と生態学の重要な一領域であつた。我々がこの細菌と環境との相互作用を重要視するのは, 単に細菌学の体系の確立を望むのみではなしに, これはまた, 実際の医学細菌学の重要な課題の一つであると思ふが故である。このことは, 病原細菌学が元来, 人間ないし動物を発育の場とする細菌の生活様式を対象とするものと考えられ, 病原細菌とその発育環境たる宿主動物との相関々係は, 一つには感染病理及び免疫の問題として, 今一つは, 細菌の変異特に化学療法の発達と共に耐性菌の問題として表現されているものと言えよう。我々がこれらの複雑な問題を, 細菌の側に立つて考える時, 可能な限りの最も単純な System を用いて“細菌とその外的環境”の相互作用の原則的のあり方を問題意識に上せながら, 実験と考察とを加えて行く可きではなからうか。かかる意味で; 微量金属イオンの細菌に対する作用と, 細菌のそれに対する反応という System が我々の検討の対象となつた。

本報においては, 合成培地で増殖可能な E. coli B 株を用い, その発育に及ぼす Mg^{++} イオンの作用と, Co^{++}

イオンの抑制作用とを, 菌の lag phase について定性的, 定量的に検討した。log phase の菌については更に複雑な要因もあるので (3) これを別個に考えたい。

II. 実験方法

イ) 使用菌: E. coli B 株を用いた。

ロ) 培地: Bouillon 及び合成培地 (Simmons 培地) を用いた。その組成は, $(NH_4)_2 HPO_4$ 25g; KH_2PO_4 15g; NaCl, 5.0g; Glucose 3.0g; $MgSO_4$ は濃度を種々変えて実験に供した。

ハ) 細菌の培養及定量法: Bouillon 16時間培養菌を生理食塩水で三回洗滌し, 生食水で10倍に稀釈, pipett で一滴を接種。細菌の培養は, 17mm 径の試験管又はコペンで振盪培養する。菌の定量には, Phenolred を0.0045%に, 更に4-N. HCl を一滴添加し, 日立製分光光度計で590m μ での吸収を測定し turbidimetric に行つた。

ニ) 試薬: 試薬は特級試薬ないし, 2~3回再結晶を繰り返したものを用い, その純度を Polarography によつて検討した。

ホ) ポーラログラフ, 柳本製を用いた。酸素の除去は窒素ガスによる。

ヘ) 細菌の Viable Count: Pour Plate method を用いた。48時間後に, Colony 数を数える。

KATAYAMA Yutaka, HIGASHI Tomokazu, KYO Taiyo, ODA Masao and ITO Seiichi. : Studies on the Interaction between Bacteria and Their Environment I. The Action of Cobaltous Ion upon the Growth of Esch. coli in Lag Phase Kyoto Prefectural University of Medicine, Department of Microbiology (Director: Prof. SUZUKI Shigemi, M. D.) —Jap. J. of Bact. 14(8), 721-724, 1959.

III. 実験結果

(1) Mg^{2+} の濃度と大腸菌の増殖

Simmons 合成培地に Mg^{2+} イオン($MgCl_2$)を各種濃度に添加し、増殖曲線を描いたものが第1図である。菌の

第1図 Mg^{2+} イオンの大腸菌増殖に及ぼす作用

註: Mg^{2+} -free 合成培地に Mg^{2+} を $10^{-5} \sim 10^{-6} M$ に添加し、それぞれの培地で大腸菌の増殖曲線を描く。0 は Mg^{2+} を含まないもの。横軸に時間、縦軸に分光光度計で $590m\mu$ での吸収を plot する。数字は添加した Mg^{2+} の濃度を示す。

増殖と Mg^{2+} の濃度との関係は、図2の通りである。 $10^{-5} Mol$ より高濃度では、増殖に大きな差は見られない。このことから以後は、特に指定する他は、 $2 \times 10^{-5} Mol$ の濃度に Mg^{2+} を含む合成地を用いて実験を行うことにした。また、大体、48時間以内に最大増殖量に達するので、多くの場合、48時間の発育量を比較した。また、F. Friedlein¹⁾の言う通り、 Mg^{2+} を含まない培地で継代する時は3代ないし4代で発育が阻止される。(Mg-Starvation)。

(2) Mn^{2+} の影響

Mn^{2+} ($MnCl_2$) を Simmons 合成培地 (Mg^{2+} なし) に各種濃度に添加し、48時間の大腸菌の増殖を第2図に示す。図に示す通り、軽い増殖促進作用が見られる。

(3) Co^{2+} イオンの影響

塩化コバルト ($CoCl_2$) を合成培地に加え、大腸菌の増殖に及ぼす経時的影響を検討したものが第3図である。

Co^{2+} の濃度と菌増殖量を plot すれば第4図の如くなる。図に示すように、大腸菌増殖の lagtime が Co^{2+} によって延長させられる事、また、 Co^{2+} の濃度 $10^{-5} Mol$ 以上では大腸菌の発育は完全に抑制される。

(4) Cu^{2+} 及 Ni^{2+} イオンの作用

Cu^{2+} 及 Ni^{2+} を Lag phase の菌に働かす時、 Co^{2+} と同じように、 $10^{-5} Mol$ 以上の濃度ではそれぞれ大腸菌の

第2図 Mg^{2+} , Mn^{2+} 及び Co^{2+} の大腸菌増殖への影響

註: 合成培地での大腸菌の増殖に及ぼす Mg^{2+} , Mn^{2+} 及び Co^{2+} の影響を Mg^{2+} -free の培地に Mg^{2+} , Mn^{2+} を $10^{-6} \sim 10^{-3} M$ に加え、 Co^{2+} は Mg^{2+} を $2 \times 10^{-5} M$ に含む培地に加えて、大腸菌の48時間の増殖量を、分光光度計 $590m\mu$ での Absorbancy で比較した。

第3図 大腸菌の増殖に及ぼす Co^{2+} イオンの影響

註: Mg^{2+} を $2 \times 10^{-5} M$ に含む合成培地に Co^{2+} を $5 \times 10^{-6} M$ に加え、大腸菌の増殖曲線をかかせた。

発育を完全に阻止する。

(5) Co^{2+} と Mg^{2+} との相関関係

Mg^{2+} の濃度を変え、更に Co^{2+} の濃度をも種々に変えて、合成培地における48時間の大腸菌増殖量を Mg^{2+} 濃度の函数として表示すれば第4図に示す通りである。これによつて判る通り、両イオンの間には或程度の拮抗作用があり、 Mg^{2+} を含まぬ培地では、 $Co^{2+} 10^{-4}$, $10^{-7} Mol$ の濃度でも大腸菌の発育を阻止する。また、 Mg^{2+} の濃度を上げる時には、 Co^{2+} の増殖阻止が或程度抑えられる。この事は、 Co^{2+} の抗菌作用が Mg^{2+} との Competition にあることを示唆するものである。

(6) Bouillon 中での Co^{2+} の作用

Bouillon を Medium として、 Co^{2+} を各種濃度 ($10^{-3} Mol \sim 10^{-7} Mol$) に加えて、増殖曲線を描くときは、合成培地で見られた大腸菌の増殖阻止は見られなくなる。

(7) 細菌の Viability に及ぼす Co^{2+} の影響

第4図 Mg^{++} と Co^{++} との拮抗

註: Co^{++} を各濃度に含む培地に Mg^{++} を $10^{-7} \sim 10^{-2}$ Mに加え, 48時間の増殖量を比較した。
横軸に, Mg^{++} の濃度を $-10gM$ で, 縦軸に細菌の増殖量を Adsorbancy で plot する。
A: $Co^{++} O$, B: $10^{-7} M$, C: $10^{-6} M$, D: $10^{-5} M$ に Co^{++} を含む。

第5図 Co^{++} に対する大腸菌の生存曲線

註: Bouillon 及び合成培地菌を3回洗滌後, 合成培地に再浮遊し, Co^{++} を 10^{-3} , $10^{-4} M$ に加え, Survival を経時的に見る。
B-4 B-3 は, Bouillon 培養菌を $Co^{++}: 10^{-4}$, $10^{-3} M$ 培地に, S-4 S-3 は, 合成培地培養菌を $Co^{++}: 10^{-4}$, $10^{-3} M$ 培地に浮遊したもの。
横軸に時間, 縦軸に Survival rate をとる。

Bouillon 及び合成培地18時間培養菌を3回生食水で洗滌, $10^4/ml$ 程度の濃度に合成培地に浮遊せしめ, Co^{++} を $10^{-3} M$, $10^{-4} M$, $10^{-5} M$, に加えて, 3, 6, 12, 24時間と経時的に Viable Count を行い, 原菌数に対する比率 (N/N_0) を測り第5図に図示した。

実験の結果, Bouillon 培養菌では, $Co^{++} 10^{-3} M$, 24時間

作用で約 $1/10$, $10^{-4} M$ で $1/2$ に減少する。 $10^{-5} M$ では, 殺菌的効果はなく, 極く微量の増減を見せる。然るに, 合成培地培養菌では, $Co^{++} 10^{-3} M$ で24時間後に, $1/100$, $10^{-4} M$ では約 $1/100$ と, 顕著な殺菌効果を示す。

IV. 考 察

我々は, Co^{++} イオンが大腸菌の増殖を $10^{-5} Mol$ 以上の濃度において, 完全に阻止することを見た。この際に注意すべき事は, $10^{-5} Mol$ 以下の低濃度においては, 増殖を阻止しないばかりでなく, $10^{-6} Mol$ 程度において, Co^{++} を全然加えない時の増殖以上の菌増殖を示す場合がある事である。この現象は, Co^{++} のみでなく, Penicillin による増殖阻止帯の近縁に増殖促進帯として見られるのと現象的に同一と考えられるが, Co^{++} の菌発育阻止濃度限界の濃度の大腸菌の解糖, 核酸合成, 細胞分裂等に及ぼす微量の濃度差の影響は今後の検討を要するが, 興味ある問題である。また, 細菌の増殖曲線を描く場合, Co^{++} の濃度変化と, 細菌の lagtime の長さについては, 実験の Series によつて少からざる差が見られる。特に, $10^{-5} Mol$ の最低阻止量附近の濃度において, 同一培養菌を, 同一濃度の Co^{++} を含む合成培地に培養した場合, 多くの試験系列において, 完全に同一の成績が見られるとは限らないが, 特に興味をひくのは, 同一条件の各培養瓶を比較する時, 完全に阻止される瓶と, 全然阻止されない瓶との2種類が見られることのあることである。このことは一つの接種菌群の中に 7×10^{-6} の barrier を破れる菌一コロニーの存在する群と存在しない群に基づくのか, ないしは population としての適応に未知の factor が存するのか, 今後の検討にまちたい。たゞ, Co^{++} 濃度の微量の差で, 増殖の完全阻止と無効という決定的な差を見せることは, Co^{++} と Mg^{++} との Competition の量的関係によるもので, 環境条件の微妙な差の持つ生物学的意味の重要性を意味するものと考えられる。

Mg^{++} を欠く培地においても, 実験方法の項で述べた標準の方法で Bouillon 培養菌を接種すれば増殖し得るが Mg^{++} を含まない培地で継代を繰り返すと増殖しえなくなる。が F. Friedlein¹⁾ の示す通り, Mg^{++} -Starvation の際には, 先の Co^{++} 添加の場合とは異り, 大腸菌の増殖は継代毎に著明に増殖抑制を見せるが, その現れ方は量的な差であり, Mg^{++} の拮抗金属イオン Co^{++} による Mg^{++} 作用阻止に見られる増殖, 非増殖の著明な質的差異とは表現形態が大きく異なることに注意する必要がある。 Co^{++} と Mg^{++} との相互作用については更に Co^{++} 耐性菌を分離し, これを用いての実験によつて, その生物

学的な意味が追求され得よう。Fe²⁺, Cu²⁺等の作用も、これらを含め培地で継代して始めてその作用が認識せられてくるが、別に述べるように⁴⁾、これら金属イオンと高い Stability Constant をもつて結合する Chelating agent に加えることによつてもこれらの意味が追求されえよう。微量金属イオンの作用機構は、これら金属の isotope を用いての菌体的透過の実験を行い⁵⁾、その際に更に考察を加えよう。

Boillon 中では Co²⁺ の増殖抑制効果が見られないのは、Boillon 中のアミノ酸などと、安定な Chelating 化合物を作ることによるものと思われ、別に述べたい⁶⁾。

V. 結 論

E. coli B株を用い、合成培地における金属イオンの本菌の発育への、定性的定量的影響を検討した。

1) 大腸菌の増殖に対する Mg²⁺ の作用は、著明な促進作用をもつが、10⁻⁶Mol 以上においては、濃度増加によつても作用の増加は見られない、10⁻⁷ ないし 10⁻⁸Mol の段階においては、濃度の増加と共に増殖促進作用は著しく高まる。Mg²⁺ を含まない培地においても細菌は増殖しうるが、Mg²⁺-free の培地に継代する時は、増殖の阻害が現れるようになる。

2) 合成培地に Co²⁺ を加え大腸菌の増殖に対する作用を検する時、10⁻⁶Mol 以上の濃度において増殖を完全に抑制する。なお、この場合、発育阻止限界量以上では時に、増殖促進作用を示すことがある。Ni²⁺, Cu²⁺も10⁻⁶Mol 以上の濃度において、菌の増殖を抑制する。

3) Co²⁺ の増殖阻止作用は、Mg²⁺ を高濃度に加えて行く時、或る程度除去される。従つて、Co²⁺ の抗菌作用は細菌に必要な Mg²⁺ との Competition に基くものと思われる。

4) Bouillon 中においては、Co²⁺ の抗菌作用は現れない。

5) Co²⁺ は、Bouillon培養菌を合成培地に移植したときは、10⁻³, 10⁻⁴M, で軽い殺菌作用を示すが、合成培地培養菌に対しては、10⁻³M, 10⁻⁴ Co²⁺ 濃度、24時間作用で、それぞれ、約 1/1000, 1/100 にまで生菌数が減少する程殺菌作用が顕著である。

終りに臨み、恩師鈴木成美教授の御指導に厚く感謝の意を捧げる。併せて、大阪府立大学工学部応用化学教室分析化学部武者宗一郎教授の御助言に深甚なる謝意を表す。

文 献

- 1) Friedlein, F.: Biochem. Z. 194, 273-291, 1928. Der quantitative Verwendungsstoffwechsel des Paratyphus-B-Bazillus, des Bacterium coli und des B. pyocyaneus.
- 2) Williams, R. J. P.: Biol. Revs. Camb. Phil. Soc. 28, 381-415, 1953. Metal Ions in Biological System.
- 3) Baskett, A. C.: Proc. roy Soc. B. 139, 251-262, 1952. The Resistance of Bac. lactis aerogenes to Proflavine. II. The direct Induction of Adaptation.
- 4) 片山胖・他: 細菌と環境との相互作用, 第2報, 誘導期の大腸菌の発育に及ぼす EDTA 及び O-Phenanthroline の作用.
- 5) 鈴木成美・片山胖・今村昭: Co²⁺ 耐性及び感受性大腸菌細胞の Co²⁺ イオン透過性について, 第十回日本細菌学会関西支部会発表, 日本細菌学雑誌, 13, 449, 1958.
- 6) 片山胖・他: 第3報, 金属イオンの実験条件の検討.