百日咳菌々体成分の漏出現象に関する研究

山 出 谷 寛

大阪市立大学医学部細菌学教室 (主任：桑島謙夫教授)

[受付： 6月24日・1961年]

緒 言

百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) は、他の細菌に比して発育速度が遅く、菌の収量も少ないことはよく知られている事実である。半合成培地として、始めて成功した Cohen-Wheeler¹⁾ の培地でも澱粉や炭末の添加を必要とする。さらに進んで、桑島ら²⁾ は、陰イオン交換樹脂が澱粉、炭末に代りうることを見出した。

われわれ³⁾ は、さきに、この陰イオン交換樹脂添加半合成培地を用いて、Spermine およびリボ核酸(RNA)が、百日咳菌の発育を促進することを報告した。Spermine, Spermidine などの Polyamine が発育因子となる例は *Haemophilus parainfluenzae*⁴⁻⁶⁾, *Neisseria perflava*⁷⁾, *Lactobacillus casei*⁸⁾ など数種の菌について知られているにすぎない。しかし、Spermine や RNA が、なぜこれらの菌の発育を促進するかは、いまだ明らかでない。

一方、Mager⁹⁾ は、*Neisseria perflava*, *Pasteurella tularensis* で、低張溶液中での 260m μ 吸収物質の漏出が、Polyamine で抑制され、EDTA によつて促進されること、および、漏出により菌の呼吸活性と生菌数が著しく低下することを報告している。さらに、三木¹⁰⁾ は大腸菌、ブドウ球菌で、260m μ 吸収物質の漏出は Gramicidin-J により促進され、漏出物質の大部分は、菌体内酸溶性ヌクレオチドであると報告している。また、Herbst¹¹⁾ は *Haemophilus parainfluenzae* で Spermine などの Polyamine が菌体内 RNA の分解を阻止することを報告している。

これらの事実から、百日咳菌に対する Spermine や、RNA の発育促進効果が、あるいは、この様な 260m μ 吸収物質の漏出現象および菌体内 RNA の分解阻止と関係するのではないかと考え、百日咳菌浮游液で、260m μ 吸収物質の漏出現象について実験を行い、漏出物質は、菌体内酸溶性ヌクレオチド、および RNA 分解産物に由来し、漏出は Polyamine により抑制され、多塩基酸により促進されるという新知見をえたのでここに報告す

る。

実験材料と方法

1.

特記しない限り、百日咳菌 I 相菌 18-323 株を使用した。

2. Amine.

Spermine 4HCl, Spermidine phosphate trihydrate, Cadaverine 2HCl は California Corporation for Biochemical Research の製品を、Putrescine 2HCl は Nutritional Biochemical Corporation の製品を用いた。

3. 菌浮游液の調製

桑島らの考案した、陰イオン交換樹脂添加半合成培地を Roux 瓶に 100ml 宛分注し、15 ポンド、15 分間減菌した後、Bordet-Gengou 培地に 37°C 72 時間培養後の菌浮游液を一定量接種し、37°C 96 時間静置培養した後、各々培養液を、6,000rpm, 15min, 4°C で遠沈集菌し菌体を 0.85% 食塩水で 2 回洗滌した後、適当な条件の緩衝液 (標準条件：0.1M pH 8.0 のトリス塩酸緩衝液で、菌体 (湿重量) 25mg/ml) に浮遊せしめて実験に供した。

4. 260m μ 吸収物質の漏出量の測定

菌浮游液を、各々の項で示した条件で incubate した後、10,000rpm, 30min, 4°C で遠沈し、その上清および遠沈沈渣 (菌体) に終末濃度 6% になる様に水冷過塩素酸を加え、4°C, 1 時間静置した後、不溶物を遠沈または濾過により除いた後、Beckman DU 型分光光度計を用いて 260m μ における吸光度を測定して漏出量とした。

5. 菌体内核酸の抽出および定量

YAMADEYA Yutaka: A Study on Leakage of Cell Components in *Bordetella pertussis*. Department of Bacteriology, Osaka City University Medical School.—Jap. J. of Bact. 16(12), 1058-1067. (1961)

菌体内核酸成分は, Ogor & Rosen¹²⁾ 法に従って抽出し, 各々抽出液について, 260m μ における吸光度を測定すると同時に, RNA 画分は, オルシン塩酸反応¹³⁾

(Kerr & Seraidarin) を, DNA 画分は, デフェニールアミン反応¹⁴⁾ (Dische) を用いて, それぞれを定量した。また, 燐は Allen 法¹⁵⁾ によつて定量した。

6. 菌体外漏出物質および菌体内酸溶性画分中の塩基およびヌクレオチドの分析。

上記のごとくしてえられた菌体外漏出物および菌体内酸溶性画分を, それぞれ KOH で中和した後, 氷室に一夜放置し, 生じた過塩素酸カリの沈澱は遠沈によつてこれを除き, さらに中尾¹⁶⁾ らの方法に従い, 活性炭に吸着させ 0.3% アンモニウム-50%, エタノール湿液で溶離 (この場合紫外外部吸収物質の回収率はつねに 90~95% であった) 脱塩した後, スクレオチドの分析には Potter¹⁷⁾ らの方法に従い Dowex-1 ギ酸型を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行い, 溶出は, ギ酸, ギ酸アンモニウムの Continuous elution system により行つた。次に塩基組成の分析には, 脱塩した溶液に 60% 過塩素酸溶液を加え, 沸騰溶液中で 2 時間加水分解し, この水解物質を Cohn¹⁸⁾ の方法に従い, Dowex-50 (H⁺) 型を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行い, 溶出は 2N 塩酸により行つた。(かような方法でスクレオチドおよび塩基組成の分析を行うと, その 260m μ における吸光度に基づく回収率はつねに 90~95% であった)。溶出液は, 3.0ml 宛採集し, その紫外外部吸収は Beckman DU 型分光光度計を用いて測定した。既知の試料の溶出曲線および文献¹⁷⁾ と比較することにより, おのおのスクレオチドおよび塩基を推定し, おのおのピーク毎の紫外外部吸収曲線により検討し確認した。

7. 蛋白質および糖の定量

蛋白質は Lowry 法¹⁹⁾ によつて定量した。また糖の呈色反応は, Dische の Cysteine-硫酸法²⁰⁾ を用いた。

8. 漏出と呼吸との関係

漏出前および漏出後の菌体について, Warburg 検圧計を用い酸素吸収を測定した。なお, 実験条件は次のごとくである。

Warburg flask 内の組成は, 主室に, 菌浮游液 Cell 15mg/ml. pH 7.4, M/15, Phosphate Buffer または Buffer のみを 2.0ml, 側室に M/10, 基質溶液または蒸留水を 0.2ml, 副室に 20% KOH 0.2ml を入れ, 総量を 2.4ml とした。Gas 腔は空気を満たし, preincubate は 15 分間行つた。酸素吸収量は, 0.2 μ l/60min/30mg で表わした。

9. 漏出と菌発育能力

実験結果の項で記述するごとく, 培養してえられた培養液について, 日立製光電比色計 EPO-B 型を用い 530 m μ における光学的密度 (Optical Density) によつて測定した。

実験結果

1. 漏出現象とその条件

前述のごとく調製した菌浮游液を, 37°C で振盪すると 260m μ に吸収極大をもつ物質が多量に菌体外に漏出する。Fig. 1, Fig. 2, に示す様に, 漏出物質は大部分酸可溶性のオルシン, 塩酸反応陽性の燐酸化合物で 260 m μ に吸収極大をもつことからリボヌクレオチドと思わ

Fig. 1. Absorption curve of leaked material.
(Cell 25mg/ml, pH 8.0, 37°C, 0.1M Tris-HCl-Buffer)

Fig. 2. Leak of 260m μ -absorbing material and effect of spermine.

Fig. 3. Effect of pH.

Fig. 4. Effect of ionic strength.

れる。

漏出は、菌浮游液の組成 (medium) によりかなり変化し、medium の pH を 5.7 以下にすれば漏出は全く起らず、アルカリ側になるにつれて増加し (Fig. 3)、イオン強度 (μ) は 0.1~0.2 が至適である。 (Fig. 4)。低温では漏出はほとんど起らず、56°C 5min, 80°C 5min の加熱によつても著しく減少する (Fig. 5)。このような漏出現象は、4 時間の incubate を通じて徐々に増加し (Fig. 2)、振盪しても、また静置しても漏出量にはほとんど影響がない (Fig. 5)。さらに、漏出量は菌体の湿重量に直線的に比例し (Fig. 6)、37°C 180 分振盪後 100mg の菌体 (湿重量) よりの漏出量は、アデニール酸 300~420 μ g に相当する。

2. 漏出量と菌発育時期との関係

陰イオン交換樹脂添加半合成培地に、百日咳菌を接種し、一定時間後、遠沈により集菌してえられた菌体について、漏出量、菌発育および菌収量の相互関係は、Fig 7.

Fig. 5. Effect of heating.

Fig. 6. Leak in relation to cell amount.

Fig. 7. Culture and leak.

に示す様に、湿菌単位重量あたりの漏出量は、対数増殖期の菌でもつとも著しく、それ以後、定常期に入ると共に、急激に減少する。

3. 漏出に影響を与える物質。

Pasteurella tularensis では, Spermine が菌体内 260 μ 吸収物質の漏出を阻止することが知られている。したがって, 桑島らの百日咳菌に対する Spermine の発育促進効果が, あるいはこの様な漏出現象に関係あるのではないかと考え, 漏出に影響を与える物質を調べた所, Fig. 8. に示す結果をえた。すなわち $10^{-2}M$ の Spermine は, 上記漏出を著明に抑制する。Spermine 以外でも, Spermidine, Protamine などの Polyamine は漏出を抑制するが Putrescine, Cadaverine などの Diamine では抑制作用は著しく弱く, Arginine, Lysine は抑制作用はない。これに対し, 蔞酸, マロン酸, コハク酸, 酒石酸およびクエン酸などの多塩基酸は漏出を著明に促進するが, 醋酸, グルタミン酸, およびアスパラギン酸には促進作用がない。その他, 無機の酸である磷酸, 砒酸では漏出を促進するが, 硼酸, 亜砒酸では影響がない。すなわち, 上記漏出は, Polyamine で抑制され, 多塩基酸で促進されるという著しい特徴がある。

次に, 金属イオンについてみると, Ca^{++} は著明に漏出を阻止するが, Mg^{++} , Ba^{++} , Nr^{++} , K^{+} などの金属イオンではほとんど影響がない。

さらに, 培地成分であるカザミノ酸 10mg/ml を加えても, またグルコースを加えても影響がない。

ペニシリン, ストレプトマイシン, クロラムフェニコ

Fig. 8. Inhibition and Stimulation.

ールは, 漏出にはほとんど影響がないが, 大腸菌, ブドウ球菌で漏出促進することが知られている Gramicidin-J は, 百日咳菌の場合にも $10^{-3}M$ の低濃度で著明な促進効果が見られた。次に, キレート作用をもつ EDTA, クエン酸は漏出を著明に促進する。しかし, $10^{-2}M$ の EDTA に種々の濃度の $CaCl_2$ を加えると Ca の濃度に応じて EDTA の効果が打ち消されることから EDTA の効果はキレート作用によるものと考えられる (Fig. 9)。しかし, EDTA で漏出を促進した場合のみ, Fig. 10. に示す様に, 短波長に吸収をもつ物質が多量に漏出することは, 注目すべきことであり, 後に述べる形態学的観察の結果と共に一部の菌体に破壊がともなっているものと思われる。

4. 漏出と呼吸活性との関係

260 μ 吸収物質が菌体から漏出することにより, 菌

Fig. 9. Effects of Polyamine, EDTA and Gramicidin-J.

Fig. 10. Effect of EDTA.

の呼吸にどのような影響を与えるかを調べた。漏出前と漏出後の菌を用い、コハク酸、グルタミン酸を基質として Warburg 検圧計を用い、酸素吸収を測定した。Fig. 11 に示すごとく、漏出後の菌体でも漏出前の菌体と比較して、酸素吸収には著明な変化がみとめられない。また、Spermine, Spermidine 10^{-2} M の濃度では、百日咳菌の内部呼吸にも、グルタミン酸、コハク酸を基質とする呼吸にも、ほとんど影響を与えなかった。

また、漏出が菌の呼吸と関係あるかどうかを調べた所 ツンベルグ管を用いて嫌氣的に incubate しても、 10^{-2} M KCN を加えても、漏出量は対照のそれと著明な差がなかった。これらのことから、漏出現象が、菌の呼吸作用とは直接には関係がないものと思われる。

5. 漏出物質と核酸代謝

漏出する $260\text{m}\mu$ 吸収物質が菌体のどの成分から由来するかを調べた。実験方法の項で記述した方法で、おのこの条件で incubate した後の菌体内に残存する核酸成分を Ogur & Rosen 法で抽出して測定した。TABLE. 1. に示すごとく、トリス緩衝液で漏出させた場合には、

漏出した量だけ菌体内の酸溶性画分および RNA 画分が減少しているのに対し、Spermine 10^{-2} M を加え漏出を 60% 抑制した場合には、菌体内 RNA 画分の減少もそれに応じて抑制されていた。同様にクエン酸 10^{-2} M で漏出を 100% 促進させた場合にも、菌体内 RNA 画分の減少は、それに応じて促進されている。しかし、菌体内 DNA 画分は、どちらの場合も全く変化を示していない。また、いずれの場合にも、菌体内核酸成分と菌体外に漏出した量との総和は、ほぼ一定値を示した。これらの結果から漏出する $260\text{m}\mu$ 吸収物質は菌体内酸溶性ヌクレオチドおよび RNA の分解産物に由来するものと考えられる。

Table. 1. Origin of leaked material.

		Lea- ked	Intracellular*			Σ
			acid soluble	RNA	DNA	
Control	0 ^{min}	0.475	0.410	3.430	2.900	7.215
	180	1.615	0.360	2.300	2.850	7.125
Spermine 10 ⁻² M	0	0.488	0.310	3.450	2.900	7.148
	180	0.932	0.310	3.100	2.850	7.195
Citric acid 10 ⁻² M	0	0.500	0.330	3.430	2.960	7.220
	180	2.282	0.280	1.693	2.910	7.165

* Extracted by Ogur-Rosen Method.

O. D. $260\text{m}\mu/100\text{mg}$ Cell, 37°C , pH 8.1.
(wet weight)

6. 漏出にともなう菌体形態の変化

菌体成分の漏出が溶菌のために起るものではないことは、デフェニールアミン反応陽性物質や蛋白質がほとんど漏出しないことから推察されるが、菌体の電子顕微鏡像についても漏出後の菌体を対照のそれと比較してみても、特に認められる形態的な変化のないことから裏書きされる。〔菌体浮游液の一滴を支持膜に滴下、 37°C で乾燥させ、日本電子工学社製、JEM-3x 型を用いて観察した。直接倍率 $5800\times$ 〕Spermine の存在下で漏出を抑制した場合にも菌の形態に変化がみとめられなかった。しかし、EDTA を加え漏出を促進した場合のみ、溶菌といえる程顕著ではないが、明らかに一部菌体に破壊像が認められる。(Fig. 12)

また、漏出物の Dische 反応²⁰⁾の吸収スペクトル (Fig. 13) を見ると、対照では、 $390\text{m}\mu$ 付近のペントースの吸収だけで、菌体成分であるデオキシペントース ($375\text{m}\mu$)、ヘキソース ($410\text{m}\mu$) の吸収は認められないのに対し、EDTA を用いた場合には、デオキシペントース・ヘキソースの吸収が認められる。この点からも、ある程

Fig. 12. Electromicrography of leaked cells.

1. 0min Buffer 2. 180min Buffer 3. 180 min Spermine 4. 180min EDTA

度菌体の破壊が起つていることが示唆される。

7. 漏出と菌発育能力との関係

百日咳菌は、種々の環境に対し低抗力の弱いことはよく知られている。菌体成分の漏出が菌の発育能力にどのような影響を与えるかを調べた。容量100mlの三角コルベンに培地10mlを分注し滅菌後、特に上記の操作を無菌的に行つてえた漏出前および漏出後の菌浮游液を一定量接種し、37°C 72時間静置培養した後、菌発育を、日立製光電比色計を用い、530m μ における光学的密度から測定した。TABLE 2. に示したごとく、菌の発育能力については、菌体成分の漏出により著明な変化を受けた

とは考え難い。

8. 漏出物質の同定

以上の実験結果から、漏出する260m μ 吸収物質は、酸溶性、オルシン塩酸反応陽性の磷酸化合物で、比較的低分子のヌクレオチドであると予想されるので、実験方法の項で記述したごとく、菌浮游液を37°C 180分振盪後、漏出したものおよび菌体内の酸可溶性画分を活性炭で脱塩し、イオン交換クロマトグラフィーを行つた。先ず、塩基組成をDowex-50 H⁺型を用いて分析すると、漏出物にも、菌体内にもウラシル、シトシン、グアニン、アデニンの4つの成分をみとめるが、漏出物には比較的

Table. 2. Growth.

Inoculate	Growth. O. D. 530m μ .	
	漏 出 前	漏 出 後
5×10^8 /ml	0.457	0.540
10^8	0.450	0.508
5×10^7	0.253	0.175
10^7	0.122	0.045
5×10^6	0.046	0.044
10^6	0.045	0.047
5×10^5	—	0.044

Fig. 13. Dische's Reaction (cystein-sulfuric acid Reaction).

グアニンが少ない (Fig. 14). 次に, Dowex-1 ギ酸型を用いヌクレチドの分析を行うと CMP, AMP の2つのピークを示す (Fig. 15), さらに, 酸可溶性ヌクレオチドの組成を詳しく調べると, 菌体抽出物には CMP, AMP の他に数個のピークを認めるのに対し, 漏出物には CMP, AMP のピークの他におそらく DPN と思われるピークを示す (Fig. 16). 他のピークはいまだ分離同定されていないが, 菌体内のヌクレオチドが無選択的に漏出するのではなく, 比較的, CMP, AMP が漏出されやすいものと考えられる。

考 察

Mager⁹⁾は, *Neisseria perflava*, *Pasteurella tularensis* で, 低張溶液中で 260m μ 吸収物質が菌体外に漏出し, Spermine などの Polyamine がこの漏出を抑制し, EDTA が漏出を促進することを見出した。三木¹⁰⁾は, 大

Fig. 14. Base composition. Dowex-50 H⁺ form, 0.8×13 cm 2N-HCl 0.6ml/min.

Fig. 15. Nucleotides analysis. Dowex-1 formate-form, 0.8×23 cm HCOOH, continuous elution System 9ml/hr.

Fig. 16. Nucleotides analysis. Dowex-1 Formate-form, 0.8×12 cm HCOOH, HCOONH₄, continuous elution System 9 ml/hr.

腸菌, ブドウ球菌を用い, $260m\mu$ 吸収物質の漏出について実験を行い, 漏出は低温で, しかも短時間内に非常に急速に行われ, 漏出物は生活に必須と考えられる酸溶性ヌクレオチドの大半を含むと報告している。さらに, 樋口²¹⁾らは, ビール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用い, 酵母細胞より, ヌクレオチドの分泌は, 発育に好適な環境条件や蒸留水での incubate では余り著明でないのに対し, EDTA の様なキレート剤が分泌を促進することを報告している。

さきに, われわれは, Spermine や RNA が百日咳菌の発育を促進することを報告したが, なぜ Spermine が発育を促進するかは現在までの所明らかでない。しかし漏出物質が, 大部分酸溶性ヌクレオチドで, Spermine がその漏出を抑制することから, 両者の間に何らかの関係があるように思われる。

菌体成分の漏出機序について, 三木¹⁰⁾は, (+) に荷電する Gramicidin-J が (-) に荷電する菌体²²⁾に静電的に吸引吸着し, 菌体の膜透過性に重大な影響を与える結果, 酸可溶性, ヌクレオチドに代表される菌体成分の遊離漏出を促進せしめること, Few²³⁾²⁴⁾は, Polymyxin を用いた実験で, 細胞膜付近の脂質含量の多い層²⁵⁾に選択的に吸着²⁶⁾されることにより, 菌の滲透圧平衡が破れ菌体成分の漏出をきたすという推論を加えた。いずれの場合も, 菌体表面に作用し, 細胞膜の滲透圧平衡を破るためと考えている。この推論に従えば, (+) に荷電すると考えられる Spermine の作用も Gramicidin-J の場合と同様に, 細胞膜に吸着し, 逆に滲透圧に対する抵抗を増大するため漏出を抑制すると考えることができる。しかし, 漏出現象を細胞膜の滲透圧に対する抵抗力の変化だけでは説明できないいくつかの問題がある。

われわれは, はじめ, 百日咳菌の呼吸基質となりうるコハク酸が漏出を促進するのに対し, 百日咳菌が利用することができないグルコースでは影響がないことから, 漏出が菌の呼吸作用と関係あるのではないかと考えた。しかし, 嫌気的にあるいは KCN を加えて incubate しても, 好気的に行つた対照と比べて著明な変化を認めないことから漏出が菌の呼吸とは直接的には関係がないものと考えられる。そこで, コハク酸と類似の化学構造を有する多塩基酸を加えて漏出量を測定したところ, 呼吸基質となりうるかどうかにかかわらず, 蔞酸, マロン酸, コハク酸, 酒石酸, クエン酸は漏出を著明に促進するが, 一塩基酸である醋酸や, モノアミノ・ジカルボン酸であるグルタミン酸では影響がない。これに対し, Spermine, Spermidine などの Polyamine や塩基性蛋白

質である Protamine は漏出を抑制し, また Putrescine, Cadaverine などの Diamine も Polyamine よりはその効果は著しく弱い抑制作用を示すのに対し Arginine, Lysine には抑制作用が見られない。すなわち, 漏出は Polyamine で抑制され, 多塩基酸で促進されるという著しい特徴がある。これらの物質をその化学構造上から見ると, 漏出を抑制するためには, 両端に遊離のアミノ基を有する Polyamine が必要で, 逆に漏出を促進するためには両端に遊離のカルボシル基を有する多塩基酸が必要である様に思われ, その一端が, カルボシル基, あるいはアミノ基でカバーされるとその作用を失う (Fig. 17)。

Fig. 17. A hypothetical schema for inhibitive and stimulative effects.

また, その効果の強弱は, Diamine が弱く, Polyamine が強いことから, 分子量の大小と関係がある様に思われる。この様に, 漏出に影響を与える物質には, その作用機序は明らかでないが, 化学構造上一定の規則性が存在することは非常に興味ある事実である。

次に, Lamanna²⁷⁾は Mg^{2+} が腭結晶リボヌクレアーゼ (RNase) の活性を著しく阻害し, NaCl のような塩類が, この酵素を活性化することを報告している。樋口²¹⁾らは, EDTA, クエン酸などが細胞内 Mg^{2+} の Chelating agent として作用し, この Mg^{2+} と結合するため, Mg^{2+} により inactive な状態にあつた RNase が活性化され細胞内 RNA の分解をうながし, これが細胞外に漏出すると考えている。事実 $10^{-2}M$ の EDTA に種々の濃度の CaCl_2 を加えることにより Ca^{2+} の濃度に応じて, EDTA の効果が打ち消されることから, EDTA の効果はキレート作用によるものであると考えられる。

一方, Mager⁹⁾は *Pasteurella tularensis* を用いての実験で, 菌体成分の漏出は, 溶菌のためであると報告して

いる。しかし、百日咳菌では、EDTA で漏出を促進²⁸⁾した場合のみ、一部菌体の形態に変化をみとめ、漏出物質にも菌体成分であるデオキシペントース、ヘプトースをみとめることから、一部溶菌が起つたものと考えられるが、多塩基酸で漏出を促進した場合や、逆に Polyamine で漏出を抑制した場合にも菌の形態に変化をみとめず、漏出物質にも、菌体成分であるデオキシペントース、ヘプトースをみとめず、蛋白質も非常に少ないことから、EDTA の場合を除いては、漏出は溶菌のため起るのではないと考えられる。

次に、Herbst¹¹⁾は、Haemophilus parainfluenzae を用い、Spermine が菌体内 RNA の分解を阻止することを報告した。われわれは、百日咳菌を用いて、漏出物質が菌体内酸溶性ヌクレオチドおよび RNA の分解産物に由来し、漏出を抑制する Spermine が菌体内 RNA の分解を抑制し、逆に漏出を促進するクエン酸が菌体内 RNA の分解を促進することを見出した。いずれの場合も、菌体内 DNA は、全く変化を受けていない。

以上の実験結果だけでは、百日咳菌に対する Spermine や RNA の発育促進作用について十分な説明ができないし、菌体成分の漏出現象についても従来報告されている細胞膜の透過性の変化、RN-ase の活性化および溶菌現象だけでも説明できない複雑な問題が残されている。

しかし、いずれの場合も、漏出物質は大部分、酸溶性ヌクレオチドで、菌体内ヌクレオチドが無選択的に漏出するのではなく、CMP, AMP, DPN が多量に漏出しているが、この点については、さらに今後の検討が必要である。

結 論

百日咳を用い、菌体成分の漏出現象について実験を行い、以下のごとき結論をえた。

1. 百日咳菌を有機酸緩衝液中で incubate すると菌体外に紫外部吸収物質が多量に漏出することがみとめられた。

2. 漏出物質は、大部分、酸可溶性のオルシン、塩酸反応陽性の磷酸化合物で、260m μ に吸収極大をもつヌクレオチドで、これら漏出は、Spermine, Spermidine などの Polyamine で抑制され、蔞酸、マロン酸、コハク酸、酒石酸、およびクエン酸などの多塩基酸により促進される。すなわち、漏出を抑制するためには、両端に遊離のアミノ基が必要で、漏出を促進するためには、両端に遊離のカルボシル基が必要である。しかし、その一端

がカルボシル基、あるいは、アミノ基でカバーされると、その作用を失うことがみとめられた。

3. 漏出物質は、菌体内酸溶性ヌクレオチドおよび RNA 分解産物に由来する。

4. 菌体内成分の漏出は、百日咳菌の場合溶菌のために起るものとは考え難い。

5. 菌体成分の漏出により、菌の呼吸活性および発育能力に著しい影響を与えなかった。

6. 漏出物質は、菌体内ヌクレオチドプールから無選択的に漏出するのではなく、比較的 CMP, AMP が漏出し易い。

本論文の要旨は、昭和 36 年 4 月、第 34 回日本細菌学会総会において発表した。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導、御校閲を賜った恩師桑島教授、丹羽講師に深甚の謝意を表すとともに、本研究の当初から有益なる御助言を賜った増井助教授、川崎博士に深謝する。また、本研究の遂行にあたり絶大なる御援助を惜まれなかった、電子顕微鏡研究室、藤原助教授、岩本勉氏ならびに教室員各位にも深謝する。

文 献

- 1) Cohen, S. M. and Wheeler, H. W.: Am. J. Pub. Health., **36**, 371, 1946.
- 2) Kuwajima, Y., Matsui, T. and Asano, A.: Yokohama Med. Bull., **6**, 375, 1955.
- 3) 梅林義彦・山出谷寛・丹羽 允・桑島謙夫: 第33回日本細菌学会総会発表, 1960.
- 4) Herbst, E. J. and Snell, E. E.: J. Biol. Chem., **176**, 989, 1948.
- 5) Herbst, E. J. and Snell, E. E.: J. Biol. Chem., **181**, 47, 1949.
- 6) Herbst, E. J., Blinos, E. B. and Amundsen, L. H.: J. Biol. Chem., **241**, 175, 1955.
- 7) Martin, W. H., Pelczar, M. J. and Hansen, P. A.: Science, **116**, 483, 1952.
- 8) Kihara, H. and Snell, E.: Proc. Nat. Acad. Sci.: **43**, 867, 1957.
- 9) Mager, J.: Biochim. Biophys. Acta; **36**, 529, 1959.
- 10) 三木吉春: 阪市大医誌, **9**, 4005, 1960.
- 11) Herbst, E. J. and Doctor B. P.: J. Biol. Chem., **234**, 1498, 1959.
- 12) Ogur, M. and Rosen, G.: Arch. Biochem. Biophys., **25**, 262, 1950.
- 13) Kerr, S. E. and Seraidarian, K. J.: J. Biol. Chem., **159**, 221, 1945.

- 14) Dische Z. ; Mikrochemie, **8**, 4, 1930.
- 15) Allen, R. J. L. : Biochem. J., **34**, 858, 1940.
- 16) 中尾 真・吉川春寿 : 磷酸代謝シンポジウム, **2**, 13, 1958.
- 17) Hurbst, R. B. and Potter, V. R. : J. Biol. Chem., **222**, 453, 1956.
- 18) Cohn, W. E. : Science, **109**, 377, 1949.
- 19) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Forr, A. L. and Randall, R. T. : J. Biol. Chem., **193**, 265, 1951.
- 20) Dische, Z. : J. Biol. Chem., **181**, 379, 1949.
- 21) 樋口昌考・植村定次郎 : 日本農化学会誌, **33**, 304, 1959.
- 22) Stearn, A. E. and Stearn, E. W. : Protoplasma, **12**, 435, 1953.
- 23) Few, A. V. and Schulman, J. H. : J. Gen. Microbiol., **9**, 454, 1953.
- 24) Few, J. H. and Schulman, J. H. : Nature, **171**, 644, 1953.
- 25) Salton, M. R. J. : Biochim. Biophys. Acta, **10**, 512, 1953.
- 26) Razin, S. and Rozanski, R. : Arch. Biochem. Biophys., **81**, 36, 1959.
- 27) Lamanna, C. and Malette, M. : Ibid **24**, 451, 1949.
- 28) Repaske, R. : Biochim. Biophys. Acta, **22**, 189, 1956.