細菌の栄養に関する研究 (第2報)

志賀赤痢菌の栄養について

水野傳一・小坂璋吾

(國立豫防衛生研究所化學部)

〔受付: 1月13日, 1950年〕

從來知られている志賀赤痢菌の完全合成培地は窒素の要求が甚だ複雑とされ⁽⁵⁾, かつニコチン酸アミドの要求度についても論議が多い。^(5, 11, 12) われわれはかねてから細菌の栄養上における進化(あるいは逆進化)の過程をしらべたいと考えているが, その意味において志賀赤痢菌の窒素源を検討し, これに伴うニコチン酸アミドの意義をしらべた結果二三の知見を得たのでここに報告する。

用いた株は豫研第二細菌部保管の志賀赤痢菌花房株であるが, 実験の順序は次のとおりである。第一に Dorfman et al.⁽⁷⁾ の合成培地にできるだけ近いものに志賀菌を生育せしめそれより順次アミノ酸を引き抜いてその範囲をせばめ, 必須のアミノ酸を追究しこれがグルタミン酸であることを決定した。次にこのグルタミン酸の至適濃度をしらべ, さらにニコチン酸アミドの要不要を生長曲線を追つて検討した。この際ニコチン酸アミドがない場合にも生育するので, 種々の濃度にニコチン酸アミドを加えた培地の培養後のニコチン酸アミド作用を示す物質を定量してみた。

實 験

菌株とその保持 豫研第二細菌部大村桂子嬢の御好意により使用に臨んで菌株の御分與をいただいた。この點厚く感謝の意を表す。使用した菌株は志賀赤痢菌花房株と大原菌渡枝株とであるが菌型については完全にS型のみを鈎菌したものではない。

うえた菌量と生長度の観察 斜面寒天 24 時間培養の菌を一白金耳(約 1.5mg) でいつも同一白金耳を用いた。)をかきとり生理食鹽水 10cc にうかべ3回食鹽水であらい, 菌量の多い場合はこのままを 0.3cc, 菌量の少ない時はこれを 100 倍にうすめたもの 0.3cc を 6.7cc の培地に加えた。生長度の観察は濁度を Coleman の Electrophotometer によつて, 附屬試験管を用いて観察し, 吸光係数の數値そのままをもつて表示した。一つの數値は2本以上の平均値である。

薬品の純度 とくに斷りない限り薬品は3回以上再結晶したものをを用いた。メチオニン, バリン, ニコチン

酸アミドはわれわれが合成したもので, プロリン, シスチン, トリプトファン, ヒスチジン, アルギニンは市販のものそのままを用いた。

(I) アミノ酸の種類決定

Dorfman et al.⁽⁷⁾ の示す赤痢菌の合成培地のアミノ酸のうち手に入りうるだけのアミノ酸を用いて次の培地をつくつた。

KH ₂ PO ₄	0.5g dl-バリン	0.05g
MgSO ₄	0.05g トロイシン	0.05g
l-グルタミン酸	0.3g dl-フェニールアラニン	0.05g
α-アラニン	0.3g l-シスチン	0.05g
グリシン	0.1g l-プロリン	0.05g
l-トリプトファン	0.1g dl-メチオニン	0.05g
l-ヒスチジン	0.1g l-アルギニン	0.05g
l-チロジン	0.05g	

500cc 蒸留水にとかし pH6.8~7.0, ぶどう糖 0.2%, ニコチン酸アミドを $5 \times 10^{-5}M$ となる如く加えて全量を 6.7cc とする。100°30分 3 回滅菌。前述の接種菌量の少ない方をうえ 37°24~48 時間培養, 裸眼で濁りを認める程度の發育で白金耳をもつて継代 5 代以上を経たものを生長陽性とするという手續を経てアミノ酸を順次引きぬいた。

第1表に示す如くグルタミン酸が最小要求のアミノ酸であることが決定された。この際アミノ酸の種類を減ずる際の培地の總窒素の減量は残つたアミノ酸の増量で補つた。第1表には量的にでないが, メチオニンは生長促進の作用が著しいことを認めた。

そこでグルタミン酸はいかなる濃度において志賀菌に至適であるかを決定するために3代にわたつてグル

本論文の要旨は昭和 24 年 10 月 27 日傳研豫研學術集會の席上講演發表した。

Denichi MIZUNO and Shogo KOSAKA: Studies on the nutritional requirements of Bacteria. II On the nutrition of Shiga dysentery bacilli. Japan. J. Bact., 5(2): 53-57, 1950. (The National Institute of Health of Japan, Tokyo).

第 1 表 志賀赤痢菌合成培地のアミノ酸引きぬき試験経過

組 成 培 地 番 號	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉	M ₁₀
K H ₂ P O ₄	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
・ M g S O ₄	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
l-グ ル タ ミ ン 酸	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○
l-ト リ プ ト フ ェ ン	○	○	○	○	○	○	○	×	○	×
dl-メ チ オ ニ ン	○	○	○	○	○	×	×	○	○	×
dl-ロ イ シ ン	○	○	○	×	×	×	×	×	×	×
l-シ ス チ ン	○	○	○	○	×	×	×	×	×	×
dl-ア ラ ニ ン	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×
dl-チ ロ ジ ン	○	○	×	×	×	×	×	×	×	×
グ リ シ ン	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
l-ヒ ス チ ジ ン	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
dl-バ リ ン	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
dl-フェニールアラニン	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
l-プ ロ リ ン	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
l-ア ル ギ ニ ン	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
ニコチン酸アミド 10 ⁻⁵ M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
判 定 率	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

第 1 圖 繼代とグルタミン酸至適濃度

○ × はそれぞれその物質の存否を示す。

※ 5 代以上繼代可能なものを + とする。

タミン酸の濃度と生長度との關係を追究した。その結果は第 1 圖に示すとおり、初代にあつては 5g/l に至適濃度があることがわかつた。よつて 5g/l のグルタミン酸の加わつた培地に志賀菌をうえつぎし 25 代に至つたが、ためし凝集反應の程度においては菌の變異はみとめられなかつた。また第 1 圖に示される如くニコチン酸アミドの存否は餘り關係がないようであつた。

以上のような結果から結論されることは、志賀赤痢菌（花房株）は最小要求の窒素源としてグルタミン酸を必要とすること、その至適濃度は初代においては 5g/l (1/30M) であること、生長自身はニコチン酸アミドの存否には關係ないこと等である。

(Ⅱ) ニコチン酸アミドの役割について

前項のとおり、ニコチン酸アミドは志賀赤痢菌に必要でないことがわかつたので次のような實驗を試みた。

* アミノ酸の組名せと減菌温度とについては注意してニコチン酸アミドが生成されていないようにした。(1-4)

KH ₂ PO ₄	0.4g	400cc蒸留水
MgSO ₄	0.04g	pH6.8~7.0
l-アスパラギン酸	0.5g	100°30分3回滅菌*
l-グルタミン酸	0.5g	(本培地は赤痢菌全般に
dl-メチオニン	0.025g	比較的好適なる事は第3
ぶどう糖	1.0g	報に示す通りである。)

これにニコチン酸アミドを 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M となる如く加えて 6.7cc 宛分注, 菌量 0.3cc を加えて全量 7.0cc となるようにした。前述の如く接種菌量は少ないものと多いものと2種類であつたが, 兩者とりまぜて4回行つた。生長度の観察は時間を追つて行い, 48 時間に至つた。結果の1例は第2圖の通りである。この場合は接種菌量は少ない方である。数値の差はあるが4回の實驗は全く同様の結果を示している。

第2圖 志賀赤痢菌の生長曲線
とニコチン酸アミド

以上から結論されることは, 志賀赤痢菌はニコチン酸アミドを必要とせずに生育するけれども, 約 24 時間のおくれがあること ((5) 参照) 及びニコチン酸アミドを 10^{-8} M を加えた場合には生長曲線は複雑で4~5

回の生長休止期が 48 時間のうちに示されていること等である。

(Ⅲ) 培養後の培地中のニコチン酸アミド類似物質の定量

前項のとうり志賀菌にはニコチン酸アミドは生長促進に働くのみである。ニコチン酸アミドがいわゆる“Essential Metabolite”^(7,8) であるか, 純粹の“Growth Factor”であるかをきめるには培養後の培地中にこれを定量することによつて確かめられる。ただし培養後には恐らく原形と異り例えばコチマーゼのような形となつていであろう。

われわれが用いた定量法は Isbell et al⁽¹⁰⁾ の方法によつたものである。すなわち本法は赤痢菌 Sonne 型の一菌株によりアンモニア窒素を基培地に用いて生長の濁度を標準ニコチン酸アミド濁度と比濁し定量するものである。この方法はニコチン酸アミドと同様に働くものは非特異的にでる。われわれは本報告第3報に示すように大原菌(渡枝株)がこの定量に使用できることを知つたので, この菌を用いた。培地は志賀菌の生長曲線観察に用いたと同じもの, うえる菌量は志賀菌接種時の菌量の少ない場合と同一である。生長の観察は 24 時間以内に行つた。検液は同一濃度につき3~5本ずつ, 定量の範囲は 10^{-8} ~ 10^{-7} M のニコチン酸アミド量の附近となるように適當にうすめて行つた。標準直線は毎回とつた。

ところでニコチン酸アミドの定量に赤痢菌を用いることには, なお非特異反應の検討を要する。Dorfman et al^(6,16) は高壓滅菌したコチマーゼとニコチン酸アミドとでは後者の方が赤痢, プロテウス兩菌共に有効に働くとしているが, かれらは同一モルにおいて比較していない。そこでわれわれはニコチン酸アミドの定量に先立つて高壓滅菌したコチマーゼとニコチン酸アミドとを同一モル数において比較してみた。菌は定量に用いる大原菌(渡枝株)である。われわれが用いたコチマーゼは Williamson & Green⁽¹⁷⁾ の方法でわれわれがビール酵母からつくつたもので, 有機燐の定量によつて純度 40 % と決定したものである。従つてモ

第2表 ニコチン酸アミドと高壓滅菌コチマーゼとの比較

濃 度	0.25 × 10 ⁻⁷ M	0.5 × 10 ⁻⁷ M	0.75 × 10 ⁻⁷ M	1.0 × 10 ⁻⁷ M	2.5 × 10 ⁻⁷ M	0
ニコチン酸アミド	0.014	0.024	0.050	0.056	0.214	0
高壓滅菌コチマーゼ	0.012	0.027	0.045	0.050	0.212	0

示された数値は本文中にある吸光係数で生長度と直線関係にある。

ル数は純度 40 % として逆算した。結果の 1 例は次のとおりである。

第 2 表のとおり同一モル数においてはニコチン酸アミドと加熱滅菌したコチマーゼとは同値であるという結果を示している。従つて志賀菌培養後の培地の中にコチマーゼができていても、これを加熱滅菌することによつてニコチン酸アミドと同一モル数として換算されうるわけである。われわれは培養後の培地中のニコチン酸アミドを定量するときに培養後 100°30 分滅菌したが、この加熱は菌體に含有されているコチマーゼを抽出しつくすと同時にこれをニコチン酸アミド様物質に變えるに充分な條件である。^(13,14) したがつてわれわれは志賀培養後 100°30 分滅菌し、遠心上清をとり標準直線にはずれぬように適當にうすめ定量を行つ

た場合には恐らくこの前後の二つの代謝——アミノ窒素のもとアミノ窒素+發育素——を同一生長期に交互に繰り返しているのではないかと思わせる結果が出ている。

培養後に培地中に甚だ多量にニコチン酸アミド様物質が合成されているのは、ニコチン酸アミドが生長促進にのみ働いている證明であると同時に、これがいわゆる“Essential Metabolite”⁽¹⁵⁾ となつていゝことをも證明することとなるであらう。

概 括

志賀赤痢菌（花房株）の窒素の最小要求はグルタミン酸でその至適濃度は 5g/l (1/30M) であることを決定した。この際ニコチン酸アミドは生長促進に働くのみであることを生長曲線によつて示した。また培養後

第 3 表 志賀菌培養後の培地中におけるニコチン酸アミド様物質の定量結果

菌量	はじめのニコチン酸量	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	0
	培養時間				
多	24 h	1.2 × 10 ⁻⁶ M	5.0 × 10 ⁻⁷ M	3.0 × 10 ⁻⁷ M	1.6 × 10 ⁻⁷ M
	48	1.6 × 10 ⁻⁶	7.0 × 10 ⁻⁷	4.0 × 10 ⁻⁷	8.0 × 10 ⁻⁷
少	24	4.0 × 10 ⁻⁷	1.2 × 10 ⁻⁷	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸
	48	1.0 × 10 ⁻⁶	5.0 × 10 ⁻⁷	6.2 × 10 ⁻⁷	5.0 × 10 ⁻⁷
	86	1.2 × 10 ⁻⁶	8.0 × 10 ⁻⁷	6.2 × 10 ⁻⁷	6.6 × 10 ⁻⁷

たのである。すなわち以上のような非特異反應に對する検討を加えて定量を行つたわけである。

代表的 2 例を示すと第 3 表のとおりであるが、ニコチン酸アミドを全く加えなかつた培地においてもニコチン酸アミドと同作用の物質が 10⁻⁷M 程度できていることが明らかである。

考 察

志賀赤痢菌（花房株）がグルタミン酸を必須の窒素源とすることは Gale⁽⁹⁾ 一派のグラム陽性菌のグルタミン酸の代謝の研究と對比してグラム陰性菌の代謝に何か手がかりを與えるものではないかと考える。またグルタミン酸の至適濃度が 5g/l (1/30M) であることは、ジフテリア菌のグルタミン酸の要求にこれと同一濃度が示されている點⁽¹⁵⁾ と對比して見る必要がある。

ニコチン酸アミドはこの場合發育素として作用せず生長促進物質としてのみ作用する。そこで志賀赤痢菌はアミノ窒素を要求する菌群とこれに發育素を加えて始めて發育する菌群との轉移點に當る菌と考えたい。またはこの場合 10⁻⁸M 程度のニコチン酸アミドを加え

のニコチン酸アミド様物質を定量してこれが“Essential Metabolite”であることを決定した。なおこれらの結果について二三の論議を行つた。

終りに激勵御鞭達を賜つた傳染病研究所秋谷教授、浮田助教授、松本助教授、豫防衛生研究所福見博士に厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) Bovarnick, M. R.: J. Biol. Ch., **148**, 151-161 (1943)
- 2) Idem.: Ibid., **149**, 301-302 (1943)
- 3) Idem.: Ibid., **151**, 467-475 (1943)
- 4) Idem.: Ibid., **153**, 1-3 (1944)
- 5) Dorfman, A., Kosor, S. A., Reamer, H. R., Swingle, K. F., and Saunders, J. Inf. Dis., **65**, 163-182 (1939)
- 6) Dorfman, A., Koser, S. A., Horwitt, M. K., Barkman, S., and Saunders, F.: Proc. Soc. exp. Biol. & Med., **43**, 434-438 (1940)
- 7) Fildes, P.: Lancet (i) 955-957 (1940)

- 8) Fildes, P., Woods, D. D., McIlwain, H.,
Work, T. S., Rydon, H. N., Rose, F. L.,
Walker, J., Albert, A., & Stacey, M.:
Nature, **163**, 356 (1948)
- 9) Gale, E. F.: *Bull. Johns Hop. Hosp.*, **83**,
119-175 (1948)
- 10) Isbell, H., Wooley, J. G., Butler, R. E.,
and Sebrell, W. H.: *J. Biol. Ch.*, **139**, 499
-510 (1941)
- 11) Kligler, I. J. and Grossowicz, N.: *J. Bact.*,
38, 309-320 (1939)
- 12) Idem: *Ibid.*, **42**, 173-192 (1941)
- 13) McIlwain, H. and Hughes, D. E.: *Bioc.*
J., **43**, 60-70 (1948)
- 14) McIlwain, H., Stanley, D. A. and Hughes,
D. E.: *Bioc. J.*, **44**, 153-158 (1949)
- 15) Mueller, J. H.: *J. Bact.*, **32**, 207-210 (1936)
- 16) Saunders, F., Dorfman, A., and Koser, S.
A.: *J. Biol. Ch.*, **138**, 67-82 (1941)
- 17) Williamson, S. and Green, D. E.: *J. Biol.*
Ch., **135**, 345-346 (1940)