百日咳菌の力源代謝

第2報 代謝様式について

阿部貞太郎

(国立予防衛生研究所)

〔受付: 7月30日, 1951年〕

私は第1報に於て, Thunberg の術式に則り, 百日咳菌の脱水素酵素系を系統的に検討した。しかし前報にも述べた如く, この細菌の代謝様式の追跡には, 好気性の状態に於て, 呼吸酵素の測定が最も正しく百日咳菌の力源代謝を理解することになることは論をまたない。

近来, 大腸菌, *Aerobacter aerogenes*, 酵母, Typhus *Rickettsiae*等に於て, 代謝様式が検討され決定されたことは注目に値する。

しかるに一方, 百日咳菌の培養には Bordet-Gengou 培地の如き, 特種の培地を必要とし, 又合成培地には可溶性澱粉又は活性炭末等の特異的物質を不可欠とすることである。これらの物質の培地中での意義もまた, 間接に, B-G-培地上の百日咳菌の代謝様式の検討から割出せる可能性がある。

実 験

Warburg 検圧計により, 酸素酵素及び呼吸商を測定したものであり, 容器の大きさは15~32ccであり, 百日咳菌の B-G-培地 48時間培養生菌を常法により休止菌となし, その濃度は 200bil/cc=0.70mgN/cc 前後のものが用いられた。

主室に, 菌浮游液 1cc, Sørensen の $1/15$ M Phosphat Buffer (PH. 7.2) 1cc., 基質 $1/10$ モル溶液 1cc, 0.01M, ATP(B塩)0.1ccを入れ, 中央室には, 20%KOH:0.2cc又は 10%HCl:0.2cc が夫々用いられた。

1) 糖及び糖アルコール類(第1表参照)

勿論休止菌のみで基質を欠くものを対照にとり, 対照の酸素吸収量を各基質の酸素吸収量より引いた数値より計算したものである。

以上のことから明瞭なる如く, B-G-培地上の百日咳菌は, 糖, 糖アルコール類を力源として利用し得ない。勿論かゝる百日咳菌を含糖培地に継代した後の菌が, 糖を利用する可能性が産生されるか否かは別問題である。

特異な態度を示したものとして, グルコザミンがあるが, 酸素消費量は少量であるが, 毎回対照より多く出たので敢えて記して置いた。アミノ糖の特異性を示す一端ともなるであろう。

第1表 糖及び糖アルコール
菌液 240bil/cc=0.8mgN/cc (小林株1⁹代)

基 質	酸素吸収量 (μ l)		
	15分	30分	QO ₂
サツカロース	0	0	0
ラクトース	0	0	0
トレハロース	0	0	0
グルコース	0	0	0
ガラクトース	0	0	0
ラムノース	0	0	0
イノジット	0	0	0
キシロース	0	0	0
アラビノース	0	0	0
マンニット	0	0	0
ソルビット	0	0	0
ズルシット	0	0	0
イヌリン (1/60M)	0	0	0
ザリシン	0	0	0
グルコザミン (HCl鹽)	4	11	26

2) アミノ酸類(第2表参照)

力源としてアミノ酸を考える場合, 当然酸化的にアミノ基が離脱して Keto 酸となり, 解糖中間代謝に入るものと考えられるが, 又一方チステインの如く, アミノ基 SH 基とが同時に離脱するものもあり, またプロリン, ハイドロキシプロリンの如く酸化的にピロリジン核が開環してグルタミン酸となり, さらに脱アミノして α -ケトグルタル酸になる等, 一樣には論ぜられないが, 実験方法として前述同様の条件で, 中央室に10%HCl 0.2ccを入れて発生する NH₃を捕捉する。

Keto酸の分解阻害剤は入れてないが, アミノ酸の濃度及び測定時間を考慮すると, 酸素吸収量は, 脱アミノ反應の速度, 即ちアミノ酸の利用される尺度を具現してお

ABE, Sadataro: Metabolism of *H. pertusis*. II. Metabolic mode.

National Institute of Health of Japan. Jap. J. Bact., 7(2): 81-94, 1952.

るものと考えられる。

以上の各種アミノ酸の酸素吸収量から、力源として利用される可能性あるアミノ酸はチス테인、リジン、DL-セリン等の特種なアミノ酸を除いて、グルタミン酸、DL-アラニン、アスパラギン酸、L-プロリン、ハイドロオキシプロリン等であると考えられる。

第2表 アミノ酸類

菌液 120bil/cc=0.42mgN/cc (小林株 22代)

基 質	酸素吸収量 (μ l)		
	15分	30分	QO ₂
L(+)-グルタミン酸	39	73	347
D-L-セリン	8	14	67
アスパラギン酸	20	32	152
L-プロリン	19	34	162
ハイドロオキシプロリン	9	19	90
L-ロイシン	4	10	47
D-L-ロイシン	0	0	0
ヒスチジン	0	0	0
グリシン	6	8	38
リジン	10	17	80
アルギニン	9	14	67
フェニル・アラニン	4	8	38
チス테인	63	89	423
アミノ酪酸	0	0	0
β -アラニン	0	0	0
トリプトファン	5	10	47
メチオニン	0	0	0
D-L- α -アラニン	18	27	128
バリン	4	8	38
ノルバリン	17	27	128
タウリン	0	0	0

3) 合成培地の所見(第3表, 第4表参照)

百日咳菌の合成培地は Hornibrook 及び傳研一研今村氏の報告もあるが、私もまた時を同じくして実験を行つて居つた。この問題は、活性炭素の意義及びアミノ基轉移酵素と関連して、興味ある結果を得て居る。

基礎培地は、Hornibrook, Sophia 等の培地と同様のものである。

NaCl 2.5g CuSO₄5H₂O 0.05%sol 1cc
 KH₂PO₄ 0.5g Cystein 1%sol 2.5cc
 MgCl₂6H₂O 0.4g Niacin 10⁻³mol
 CaCl₂ 1%sol. 1cc 活性炭末(市販品) 0.5g/l
 FeSO₄7H₂O 0.5%sol. 2cc. 蒸留水 1.1

以上の培地に、L(+)-グルタミン酸、アスパラギン酸、

DL-アラニン、L-プロリン、ハイドロオキシプロリン、 α -ケトグルタル酸+NH₄Cl 等を、7g/lの濃度に入れ、B₆ (Pyridoxine) 10⁻³mol. の濃度に入れたものと、入れぬものを作り、PH 7.2に修正、小試験管に2cc分注して、15ポンド20分間高圧滅菌する。B-G-培地 48時間培養菌(島田株20代)の濃厚浮游菌液を1白金耳接種、7日間観察し5代に渉つて植えつく。

第3表より、B₆は発育促進的に働くが、不可欠ではない。 α -ケトグルタル酸+NH₄Cl+B₆でもよいが非常に発育が悪い。

力源としてアミノ酸が利用される途は、この合成培地の実験から、 α -ケトグルタル酸又はオキサール醋酸を通つて、DL-アラニンから入る焦性葡萄糖では代用できない。

また硫黄代謝に於ては、上記小試験管は2cc入りのグルタミン酸培地に、チス테인を除き各種硫黄化合物で代用してみる。この成績もまた今村氏の結果とほぼ同一であり、チス테인、メチオニン、グルタチオン等では優劣をつけ難いが、強いて云えばグルタチオンが最適の如き感がある。

第3表 力源としてのアミノ酸発育度(肉眼的)

1) L(+)-グル タミン酸	B ₆ -	++	4) アスバラ ギン酸	B ₆ -	+	+
	B ₆ +	+++		B ₆ +	+	++
2) L-プロリン	B ₆ -	+	5) α -ケトグ ルタル酸 +NH ₄ Cl	B ₆ -	+	-
	B ₆ +	++		B ₆ +	+	(*)
3) ハイドロ オキシプ ロリン	B ₆ -	+	6) D-L-アラ ニン	B ₆ -	-	-
	B ₆ +	++		B ₆ +	+	-

(*) 非常に発育が悪い。

第4表 硫黄源の変化

十一は肉眼的発育度。皆田株21代 5代培養

	¹ / ₁₀₀ ¹ / ₁₀₀₀			¹ / ₁₀₀ ¹ / ₁₀₀₀	
	M/1	M/1		M/1	M/1
1) Uptein	++	+++	7) K ₂ SO ₄	-	-
2) メチオニン	++	+++	8) タウリン	-	-
3) グルタチオン	+++	+++	9) ハイポ	+	++
4) チオグリコ ール酸	+	++	10) Na ₂ S	++	+++
5) チオウレア	-	-	11) Na ₂ SO ₃ 7H ₂ O	-	-
6) K ₂ S ₂ O ₈	-	-			

4) 糖中間代謝産物(第5, 6, 7表参照)

前記同様な実験で酸素吸収量を測定し、また炭酸ガスの測定は 10% HCl 0.2cc 入れて測定した値と、酸素吸収量とを比較して間接的に測定したものである。

また大腸菌の代謝様式には既に S.J. Ajl氏の報告があ

るが、この大腸菌と比較する意味で、同様酸素吸収量を測定し、比較検討することにした。基質が α -ケトグルタル酸の場合には、無論、マロン酸阻害による数値の方が正しいのであるが(第5表)、大腸菌との比較の場合に於ては阻害剤のない場合を用いた。

百日咳菌は、大腸菌に比較して、すべての中間代謝酵素系が Q_{O_2} により判ずると弱体であるということが判る。特に解糖中間代謝中重要である林檎酸に於て著明である。このことは、活性炭末及び血球の培地中での意義に関係して居るのであるが、第3報に於て再びとり上げる。一方、合成培地の所見から、力源の導入はオキザール醋酸又は α -ケトグルタル酸の経路であるから、この代謝もまた高等動物で証明された Krebs の citric acid cycleが考えられる。

第5表 糖中間代謝産物
220bil/cc=0.77mgN/cc (皆田株 23 代)

	酸素吸収量 (μ l)		
	15分	30分	Q_{O_2}
コハク酸	62	115	298
フマル酸	16	32	83
林檎酸	9	16	41
焦性葡萄糖	8	14	36
α -ケトグルタル酸	23	44	127
オキザール醋酸	2	4	10
クエン酸	17	29	75
蔞酸	0	0	0
マロン酸	0	0	0
醋酸	3	6	16
酒石酸	0	0	0
グリセリン	2	3	7
蟻酸	0	0	0

370bil/cc=1.28mgN/cc (皆田株 24 代)

α -ケトグルタル酸+KOH	15分 39	30分 75
同 +HCl	11	22
同+マロン酸 0.1cc+KOH	34	69

$X_{O_2}=69$

$X_{CO_2}=49$

R.Q.=49/69=0.71

220bil/cc=0.77mgN/cc (皆田株 24 代)

オキザール醋酸+KOH	15分 +2	30分 +4
同 +HCl	0	0

$X_{O_2}=4$

$X_{CO_2}=4$

R.Q.=4/4=1

第6表 (大腸菌) 普通寒天 48 時間培養菌
(0.45mgN/cc)

基 質	酸素吸収量		
	15分	30分	Q_{O_2}
コハク酸	200	363	1637
フマル酸	104	184	814
リンゴ酸	86	161	717
オキザール醋酸	22	42	186
クエン酸	25	45	200
α -ケトグルタル酸	99	190	844
焦性葡萄糖	279	525	2335
醋酸	158	280	1244
蟻酸	308	574	2553

第7表 百日咳菌の力源代謝様式

討 論

Ail氏が AS_2O_3 による阻害実験、及び Acetat 培地に發育した大腸菌の適應酵素の解析から、グルコース分析時の CO_2 発生は、 C_7 Cycle からの CO_2 発生でなく、 C_4 Cycle 及び Acetat. Format からの CO_2 発生であることを論拠として C_7 Cycle が大腸菌の力源代謝機序ということを決定したのである。

酸素消費量及び呼吸商の測定のみでは代謝様式を決定し難いが、第3報に於て述べる可溶性澱粉又は活性炭末の培地發育の百日咳菌の分析から、比較検討する機会をもつであろう。一方、適應現象から B-G-培地について考えてみると、百日咳菌は分離当初より B-G-培地に継代され、分離当初の性質を比較的長期間にわたり持続することができる。即ち百日咳菌には、理想に近い培地は B-G-培地より他にないのである。即ち B-G-培地上の百日咳菌は、病原菌として寄生しつつある百日咳菌それ自体に非常に Analog なものであると考えられる。

この菌が大腸菌に比して比較的活性な場所は、クエン酸及び α -ケトグルタル酸である。一方、不活化なる場所は、焦性葡萄糖、醋酸及び蟻酸であり特に目立つ所は、

類を利用し得ない所であり、別の定義で興味ある所は、
フマル酸→林檎酸→オキザール醋酸の個所であるが、
このことは第3報に於て論ずる。

また合成培地の所見から、普通の力源は糖類→Triose-
phosphat→ 焦性葡萄糖の経路からであるのに、この細
菌はオキザール醋酸かケトグルタル酸である。

力源を利用してCO₂発生には C₄Cycle だけではα-ケ
トグルタル酸及びクエン酸の活性を説明し難く、二つ
のケト酸を利用することができるのであるから、B-G-培
地上の百日咳菌は C₄Cycleを通るものとした方が適当で
ある。

また第3報に於て述べるが、百日咳菌は絶対好気性細
菌であるという論拠もあるので、解糖中の水素受容者は
常に酸素なることも論をまたない。第7表に於て以上の
関係を図示しておく。また、蟻酸脱水酵素の欠乏は非常
に興味があり、B-G-培地中の血球の関係もまた考えられ
るが、こゝでは、醋酸の二分子縮合からコハク酸になる
経路の存在可能性があることを記しておく。

結 論

Warburg検圧計により各種基質の酸素消費量及び呼吸

商の測定、合成培地の所見から、B-G-培地上の百日咳菌
の力源代謝は、Krebsの C₄Cycleであることを示した。

最後に、御指導を賜わりし予研第二細菌部々長福見秀
雄博士に感謝すると共に、この実験中終始御鞭撻、御便
宜を受けた、傳研一研曾良氏、四研野島氏及び傳研化学
部山川氏、爲政氏及び予研化学部畏友水野傳一氏の御好
意に対しては、衷心より感謝する。

文 献

- 1) J.B.Sumer et al: chemistry and methods of enzymes (1947).
- 2) H.A. Lardy: Respiratory enzymes, p. 201-225.
- 3) V. V. Umbreit et al: Manometric Technique and tissue Metabolism (1949).
- 4) S. J. Aji: Acetic acid oxidation by *Escherichia* and *aerobacter aerogenes*. J. Bact Vol. 59, 1950. P. 499-507.
- 5) M. R. Bovarnick et al: Respiration of Typhus Rickettsiae. J. Exp. Med. Vol. 88, (1949).
- 6) E. C. Foulkes: The occurrence of the tricarboxylic acid cycle in Yeast. Biochem J. Vol. 48, P. 378-383.
- 7) 今村晋: 百日咳菌液体培養の研究. 医学通信. 第6年. 第238号.