Streptococcus faecalis におけるピルビン酸酸化と

それに関連する代謝に関する研究 (第 3 報)

脂質欠乏培地における菌の増殖に及ぼす培養条件の影響

上原悌次郎, 山崎哲雄, 山岡邦雄, 福井三郎

(京都大学工学部工業化学教室)

昭和 43 年 8 月 31 日 受 理

Studies on Pyruvate Oxidation and Related Metabolism in *Streptococcus faecalis*

Part III. Effects of Cultural Conditions on Growth in a Lipid-deficient Medium

By Teijiro KAMIHARA, Akio YAMAZAKI, Kunio YAMAOKA and Saburo FUKUI

Laboratory of Industrial Biochemistry, Department of Industrial Chemistry,
Faculty of Engineering, Kyoto University

Streptococcus faecalis 10 C1 was found to be unable to grow in a lipid-deficient medium when glucose was sterilized separately from the other components of the medium. On the other hand, a sufficient growth of the organism occurred not only by autoclaving glucose in the medium, but also by adding autoclaved mixtures of glucose and phosphate or alkali to the glucose-omitted medium. The growth-promoting effect of the glucose-phosphate mixture was enhanced by heating the mixture together with an appropriate amino acid, such as glycine or cystine.

Lipoate, acetate or oleate was found to substitute for active substance(s) (tentatively named as "autoclave factor") which may be produced by autoclaving glucose under the conditions described above. This fact indicates that pyruvate oxidation may be essential for the growth in the medium lacking in lipid substances, their precursors, or "autoclave factor".

Moreover, under a strictly anaerobic condition (in deaerated medium), the organism was able to grow without the supplementation, indicating that low levels of redox potential of the medium may be required for the growth. Catalase, ascorbic acid or FeSO_4 was also found to permit the organism to grow in the absence of "autoclave factor". This fact would be consistent with this assumption.

These results suggest that the effect of "autoclave factor" would be ascribed to the promotion of acetyl-CoA formation from pyruvate by providing more anaerobic conditions.

(Received August 31, 1968)

Streptococcus faecalis 10 C1 は脂質*または酢酸のよう
なその前駆体のみを欠き, 他の栄養源は充分に含む合
成培地では, エネルギー源であるグルコースを他の培地

成分とともに加熱殺菌した場合には増殖できるが, プロ
ピオン酸を加えると増殖が阻害され, そこにリボ酸, 酢
酸あるいはオレイン酸のような高級脂肪酸またはレシチ
ンを添加すると回復される^(1,2). 著者らはこのプロピオ
ン酸による増殖阻害はピルビン酸酸化の阻害に基づくも
のであること, およびピルビン酸の酸化生成物は脂質合

* 以下, 脂質欠乏培地というのは酢酸などのいわゆる
脂質前駆体を含めて脂質一般を欠く培地という意味
である.

成に利用されることを明らかにした^(2,3)。

その後、同じ脂質欠乏培地でグルコースを他の成分と別個に加熱殺菌して冷却後、無菌的に両者を混合した場合には、プロピオン酸を加えなくてもまったく増殖できないことを見出した⁽⁴⁾。このことはグルコースと培地成分との反応によって生じた物質 (autoclave factor と仮称する) がなんらかの作用で脂質合成を促進する可能性を示しており、興味深い事実と思われる。そこで、“autoclave factor” の生理作用を知るための 1 つの手段として、これを含まない脂質欠乏培地において、*S. faecalis* 10 C 1 の増殖を促進する種々の培養条件を検討したところ、リボ酸、酢酸およびオレイン酸、ならびにカタラーゼ、アスコルビン酸あるいは FeSO_4 が有効であることを見出すとともに、これらの物質を加えなくても培地を脱気するだけで本菌は増殖しうることを知った。これらの事実は、“autoclave factor” がおそらく培地に還元的雰囲気をもたらすことによってビルビン酸の酸化を促進し、その結果、脂質合成が進み増殖可能となることを示唆している。本報ではこれらの実験結果を、“autoclave factor” の生成条件について若干検討して得た結果とあわせて報告する。

実 験 法

1. 使用菌株 : *S. faecalis* 10 C 1

2. 培養法 : *S. faecalis* 10 C 1 によるリボ酸定量法⁽¹⁾の基本培地からプロピオン酸およびグルコースを除き、適当量の各種添加物を加え、120°C で 10 分間加熱殺菌し、冷却後あらかじめ別に殺菌したグルコース溶液を終濃度 0.5% になるように無菌的に加えた。前培養にはグルコースとともに加熱殺菌した培地 5 ml を用い、37°C で約 20~24 時間培養し、増殖が定常状態にある菌を生理食塩水で稀釈し、上記の“autoclave factor” を含まない本培養培地 5 ml に乾燥重量で約 0.5 μg 接種し、培地に酸素が飽和されるように充分試験管を振ったのち、37°C で 12~16 時間培養した。添加物のうち、カタラーゼ、アスコルビン酸、 FeSO_4 はその適当濃度の水溶液を無菌濾過して加えた。オレイン酸は 2% エタノールに溶かし、終濃度 7.1 mM になるように添加した。嫌氣的に培養する場合には、ツンベルク管に培地を入れ、接種後脱気してそのまま培養した。増殖度は濁度法により、570 m μ における吸光度であらわした。

3. 試薬 : カタラーゼ (牛肝, Sigma Chem. Co.) をはじめ、すべて市販の標品を使用した。

結 果

1. “Autoclave factor” の効果

基本培地のグルコース濃度は 0.5% であり、これを他の培地成分とともに 120°C で 10 分間加熱殺菌した場合には、菌の成育は 37°C、12 時間の培養ですでにほぼ最高増殖度 (570 m μ における濁度 0.7 程度) に達した。一方、0.5% のグルコースを培地成分とは別に殺菌して冷却後混合した培地を用いた場合には増殖はまったく認められなかった。このことは、グルコースを他の培地成分と加熱することによって増殖に有効な物質が生成する可能性を示している。一方、これに関連して Lankford らはグルコースと磷酸の加熱生成物が *Lactobacillus fermenti* や *Bacillus* 属の細菌の増殖開始に必要な lag time を短縮する効果を有することを見出し、広汎な研究を行なった⁽⁵⁻⁸⁾。グルコースと磷酸の加熱生成物が増殖促進効果を示すことは *Streptococcus salivarius* や同じく *lactis* についても知られており^(9,10)、この場合にはグルコースをアルカリと加熱したものも有効であると報告されている。グルコースをアルカリで処理するといわゆるレダクトンを生じ、種々の生物学的活性を呈することが知られている⁽¹¹⁾。また、還元糖とアミノ酸との反応、すなわち古くから Maillard 反応⁽¹²⁾として知られる反応においてもレダクトンの生成が指摘されている⁽¹¹⁾。これらの事実から、グルコースと磷酸、アミノ酸またはアルカリとの加熱混合液の脂質欠乏培地における *S. faecalis* 10 C 1 の増殖に及ぼす効果を調べた。Table I にみられるように、グルコース・磷酸カリ混合液 (モル比 1 : 0.5 ; グルコース 5% ; pH 6.5) を 120°C で 30 分間加熱してグルコースとして 0.5% に相当する量を培地 (冷時無菌的に加えたグルコース 0.5% を含有 ; “autoclave factor 欠如”) に添加すると、明らかに増殖効果が認められた。グルコースと磷酸カリを加熱する際にシスチンまたはグリシンをグルコースに対してモル比で 3×10^{-3} の割合で加えるとグルコースと磷酸のみの場合よりも高い活性を示した。シスチンの量を増すと活性も増加した。しかし、グルコースとアミノ酸のみの反応液は無効であった。また、グルコースに対する磷酸の量の比を高めるとアミノ酸を加えなくても、その加熱混合液は高い増殖活性を示し、グルコース : 磷酸 = 1 : 2.5 では培養 13 時間ではほぼ最高増殖度に達した。グルコースと磷酸を別個に加熱して添加した場合にはどのような割合でも増殖効果はみられなかった。一方、グルコースを KOH

Table I. Effects of Autoclaved Mixtures of Glucose-potassium Phosphate and Autoclaved Alkaline Solution of Glucose on Growth of *S. faecalis* 10 C 1 in a Lipid-deficient Medium*¹

Additions* ²	Growth* ³ (O. D. at 570 m μ)
None	0.02
Glucose-potassium phosphate (G-P) (1 : 0.5)	0.37
G-P-cystine (1 : 0.5 : 3×10^{-3})	0.52
G-P-cystine (1 : 0.5 : 15×10^{-3})	0.60
G-P-glycine (1 : 0.5 : 3×10^{-3})	0.48
G-P (1 : 1.25)	0.55
G-P (1 : 2.5)	0.68
G-cystine (1 : 3×10^{-3})	0.02
G-glycine (1 : 3×10^{-3})	0.01
G-KOH (pH 12)	0.32
G-HCl (pH 2)	0.00

*¹ A semi-synthetic medium for the bioassay of lipoic acid (Kamihara, 1961⁽¹⁾) was used, except that sodium propionate was omitted and glucose was added aseptically.

*² Mixtures of glucose, potassium phosphate and/or amino acids were autoclaved at 120°C for 30 min. The concentration of glucose in each mixture was 5%. Molar ratios of potassium phosphate and/or amino acids to glucose are shown in parentheses. A half ml each of the resultant solutions was added at pH 6.8 to 4.5 ml of the basal medium mentioned above*¹.

*³ The growth was measured after the incubation at 37°C for 13 hr.

または NaOH とともに pH 12 で加熱し、グルコースとして 0.5% 相当量を培地に加えると、グルコース：磷酸 = 1 : 0.5 の加熱混合液にはほぼ匹敵する増殖効果を示した。グルコースを塩酸性で処理しても無効であった。

2. リポ酸の効果

前にも報告したように⁽²⁾, *S. faecalis* 10 C 1 は“autoclave factor”を含む脂質欠乏培地でプロピオン酸を加えると脂質合成に必要なビルビン酸酸化が阻害され、そのために増殖不能となるが、リポ酸を加えるとビルビン酸酸化が促進されて増殖が回復される。autoclave factor”がなければプロピオン酸を加えなくても増殖できないが、この際、ビルビン酸酸化が促進されれば増殖可能となるかどうかは、“autoclave factor”の作用を知る上できわめて興味ある問題である。そこで、ビルビン酸酸化に特異的に作用すると考えられるリポ酸を“autoclave factor”を含まない培地に加えてその効果を調べたところ、Fig. 1 に示すように、その量に応じて増殖が

Fig. 1. Effect of Lipoic Acid on Growth of *S. faecalis* 10 C 1 in a Lipid-deficient Medium not Containing “Autoclave factor”.

Conditions are the same as in Table I. Incubation was made at 37°C for 12 hr.

Fig. 2. Effect of Acetate on Growth.

Conditions are the same as in Table I.

認められた。すなわち、培養 12 時間で DL-リポ酸 0.033 μ M というきわめて低い濃度で最大増殖度の 1/2 の生育を示し、0.10 μ M ではほぼ最大増殖度に達した。

3. 酢酸の効果

2. の実験結果で、“autoclave factor”が存在しなくてもビルビン酸酸化が進めば本菌は増殖できる可能性が強くなったので、ビルビン酸の酸化生成物である酢酸の添

加効果を調べた。その結果, 培養 12 時間で約 0.1 mM の酢酸ソーダにより 1/2 の増殖度が得られ, 0.2 mM で最大に達した (Fig. 2)。

4. オレイン酸の効果

前報⁽²⁾に示したように, “autoclave factor” を含む脂質欠乏培地で, プロピオン酸により増殖を阻害した場合, オレイン酸などの高級脂肪酸やレシチンがリボ酸や酢酸の代替作用を示した。そこで, “autoclave factor” を含まない培地におけるオレイン酸の効果を調べたところ, 酢酸の場合にくらべると増殖開始に必要な時間は長かったが, 23 時間で 570 mμ における吸光度が 0.42 に相当する増殖が認められた。なお, この際, 溶媒として用いたエタノールは終濃度 43.4 mM であり, この濃度のエタノールは接種量が高いと増殖効果を示す⁽⁴⁾が, 本実験に用いた接種量では影響はみられなかった。

5. 嫌気培養およびカタラーゼの添加効果

以上の実験結果から, “autoclave factor” を含む培地でプロピオン酸を加えて増殖を阻害したときと同様,

Fig. 3. Effect of Deaeration of the Medium on Growth.

- A: Static culture (glucose was autoclaved with the other components of the medium)
 B: Deaerated culture (glucose was autoclaved separately)
 C: Static culture (glucose was autoclaved separately)

Conditions are the same as in Table I, except that deaerated incubation was made in a Thunberg tube.

“autoclave factor”が存在しないときにも, リボ酸, 酢酸および高級脂肪酸が増殖を促進することが明らかとなった。一方, 著者らは “autoclave factor” による増殖が溶存酸素の量によって著しく影響を受け, 脱気した培地で, 増殖がもっとも良好であることを見出した⁽¹³⁾。そこで, “autoclave factor” 欠乏培地においても培地を脱気した場合の菌の成育を調べたところ Fig. 3 に示すように, 増殖開始に必要な時間はやや長かったが, その増殖速度においても, 最高増殖度においても “autoclave factor” 共存時にはほぼ等しい結果が得られた。

S. faecalis 10 C 1 は NADH オキシダーゼ活性が強く, 酸素が存在すると H_2O_2 を生じる⁽¹⁴⁾。本菌はカタラーゼをもたないとされているが, 酸素により NADH ペルオキシダーゼが誘導生成されるので, 静置培養*でも増殖できるが, 好気培養の場合の方が増殖度が高いといわれている⁽¹⁵⁾。これらの結果は, 磷酸カリを含む培地をグルコースとともに加熱殺菌した培地, すなわち “autoclave factor” を含む培地で得られたものであるが, “autoclave factor” を含まない本報の培地条件では脱気した場合は増殖できるが, 溶存酸素の存在する静置培養ではまったく成育できないのは, “autoclave factor” 欠乏の場合には H_2O_2 の影響をより強く受ける可能性を示している。そこで, 培地にカタラーゼを終濃度 100 μg/ml になるように添加したが, 培養 13 時間で 570 mμ における濁度が 0.65 に達し, 嫌気培養の場合と同様の増殖効果が認められた。

6. アスコルビン酸および $FeSO_4$ の効果

本菌が “autoclave factor” を含まない培地で嫌気条件では増殖できるということは, “autoclave factor” は培地を還元的雰囲気につづることによって増殖を可能ならしめると考えることができる。前述のように, グルコースの加熱分解によってレダクトン類が生成することが知られており, *Bacillus globigii*⁽⁷⁾ や *Micrococcus glutamicus*⁽¹⁶⁾ における “autoclave factor” の増殖効果はアスコルビン酸で代替されるといわれている。一方, これらの微生物の場合は, いずれも各種キレート剤が有効であり, とくに *M. glutamicus* の場合, 鉄化合物の大量添加で増殖促進効果を示すことから, 菌の増殖にとって真に必要なのは鉄であって, “autoclave factor” は一種の

* この文献⁽¹⁵⁾の著者 Dolin は嫌気培養とよんでいるが, 単なる “deep culture” であり, 本報の著者らのいう静置培養と同じ条件である。

Fig. 4. Effects of L-Ascorbic Acid and FeSO_4 on Growth.

Condition are the same as in Table I, except that L-ascorbic acid or FeSO_4 was added aseptically by filtration.

Table II. Cultural Conditions under which *S. faecalis* 10 C1 is able to grow in a Lipid-deficient Medium not Containing "autoclave factor".

(1) Addition of autoclaved glucose-phosphate mixtures
(2) Addition of autoclaved alkaline solutions of glucose
(3) Addition of lipoate
(4) Addition of acetate
(5) Addition of oleate
(6) Addition of catalase
(7) Addition of L-ascorbic acid
(8) Addition of FeSO_4
(9) Deaeration of the medium

キレート剤として鉄を利用しやすくして増殖効果をあらわすと考えられている⁽¹⁷⁾。これらの事実に基づき, "autoclave factor" を含まず, 溶存酸素を含んだ脂質欠乏培地における *S. faecalis* 10 C1 の増殖に及ぼすアスコルビン酸および FeSO_4 の効果を調べた。その結果, ともに増殖効果を示し, アスコルビン酸は約 2.8 mM, FeSO_4 は 1.0 mM で, いずれもほぼ最高増殖度を与えた (Fig. 4)。

以上の実験により得られた "autoclave factor" 欠乏培地における *S. faecalis* 10 C1 の増殖をもたらす種々の要因をまとめて Table II に示す。

考 察

培地にエネルギー源として加える糖と他の培地成分と

を同時に加熱殺菌することによって微生物の増殖が促進される現象については, 従来から数多く報告されているが, 代表的なものとしては先にあげた Lankford らの乳酸菌や *Bacillus* 属細菌についての一連の研究⁽⁶⁻⁸⁾や *M. glutamicus* などの微生物の増殖に及ぼす効果についての Nakayama らの報告^(16,17), さらに *Lactobacillus bifidus* の増殖効果に関して Furukawa らの研究⁽¹⁸⁾がある。そのうち, 有効物質の精製単離が試みられたものもあるが^(8,18), 本体が明らかにされたものはない。ただ既知の物質を用いてその代替作用がかなり詳細に研究されており, 先にあげた *M. glutamicus* の場合のように, "autoclave factor" の本体とその作用について比較的明確な仮説が立てられている例もある。しかしその作用の実体はまだほとんど解明されていないといつてよい。

一方, *S. faecalis* 10 C1 の場合, 前報までのプロピオン酸培地においては脂質の合成がこの菌にとって必須の条件であったが, それにくらべて, 本報における培地条件の相違は, プロピオン酸を添加せず, "autoclave factor" が生じないようにグルコースを他の培地成分と別個に殺菌して, 冷却してから無菌的に混合した点に過ぎず, したがって脂質合成が菌の成育にとって必要とされる点については, まったく同じであるといつてよい。"autoclave factor" のかわりに, リボ酸, 酢酸あるいはオレイン酸が有効であったことは, "autoclave factor" が脂質合成になんらかの役割を果していることを意味している。脂質の合成経路として, アミノ酸から脂肪酸への転換などの特殊な場合を除いて, ビルビン酸の酸化によって生じたアセチル CoA からの合成を考える場合, "autoclave factor" はその第 1 段階であるビルビン酸の酸化を促進した可能性が強い。なぜならば, アセチル CoA 以降の段階で "autoclave factor" が必要であるならば, それを含まない場合, 酢酸を加えても脂質合成は進まず, したがって増殖し得ないと考えられるからである。最近, グルコースとグリシンとの Maillard 反応生成物が酵母のビルビン酸の脱炭酸や酸化を促進するという報告⁽¹⁹⁾もあり, 本菌の場合もビルビン酸酸化系に及ぼす "autoclave factor" の影響を検討する必要がある。

つぎに, "autoclave factor" の効果がほぼ完全に近い嫌気条件でおきかえられるという事実は, カタラーゼやアスコルビン酸の効果と考え合せて, "autoclave factor" が培地を還元的雰囲気におくことによって増殖効果をあらわしたものと考えてよいと思われる。この作用と, ビ

ルビン酸酸化促進という効果との関係はきわめて興味ある問題を含んでいる。

一方, 大量の FeSO_4 の添加が増殖をもたらしたという事実については, キレート剤の効果を調べていないので, *M. glutamicus* の場合と同じような推論はできない。アスコルビン酸とはほぼ同濃度を要したことから, FeSO_4 は還元剤として有効であるとも考えられるが, さらに検討を要する問題である。

今後は, グルコースを磷酸またはアルカリと加熱した場合の有効物質の単離, 精製を進め, 並行してキレート剤をはじめ種々の既知物質の効果を調べる一方, 還元剤や FeSO_4 の効果とビルビン酸酸化との関係を研究して, “autoclave factor” の生理作用を明らかにしてゆきたいと考えている。

要 約

S. faecalis 10C1 は脂質のみを欠く合成培地においてグルコースを他の培地成分と別個に加熱殺菌して, 冷却後無菌的に加えた場合には増殖できないが, グルコースをとともに加熱したときには増殖可能となることを見出した。グルコースと培地成分との反応によって生成すると思われる増殖促進因子 (autoclave factor と仮称) について, その生成条件を検討したところ, グルコースと磷酸カリを中性で加熱した場合, グルコースに対する磷酸カリの濃度比に応じて活性が増加し, その比が 1:2.5 のとき, グルコースを培地ととともに加熱したときと同様の増殖効果が認められた。その比が低い場合にも, シスチン, グリシンのようなアミノ酸を添加して加熱すると活性が高まったが, グルコースとアミノ酸だけを加熱したのでは無効であった。磷酸カリを加えなくても, グルコースをアルカリ性で加熱すると有効因子が生成した。一方, “autoclave factor” を含まない培地でリボ酸, 酢酸またはオレイン酸を加えると顕著な増殖が認められた。また, これらの物質を加えなくても培地の溶存酸素を除去することによって増殖することが明らかとなり,

さらにカタラーゼ, アスコルビン酸および比較的大量の FeSO_4 が有効であった。

これらの事実は, “autoclave factor” が培地に還元的雰囲気を与えることによってビルビン酸から脂質の合成, とりわけ, その第 1 段階であるビルビン酸の酸化を促進する可能性を示唆している。

- (1) 上原悌次郎: ビタミン, **22**, 298 (1960).
- (2) 上原悌次郎, 山岡邦雄, 福井三郎: 農化, **42**, 222 (1968).
- (3) 上原悌次郎, 藪下尚夫, 福井三郎: 農化, **42**, 146 (1968).
- (4) 上原悌次郎, 佐甲 安, 福井三郎: 第 243 回日本農芸化学会関西支部講演会 (1968).
- (5) H. H. Ramsey and C. E. Lankford: *J. Bacteriol.*, **72**, 511 (1956).
- (6) T. P. Sergeant, C. E. Lankford and R. W. Traxler: *J. Bacteriol.*, **74**, 728 (1957).
- (7) C. E. Lankford, T. Y. Kustoff and T. P. Sergeant: *J. Bacteriol.*, **74**, 737 (1957).
- (8) R. W. Traxler, C. E. Lankford and W. Shive: *Appl. Microbiol.*, **10**, 99 (1962).
- (9) K. L. Smiley, C. F. Niven and J. M. Sherman: *J. Bacteriol.*, **45**, 445 (1943).
- (10) C. F. Niven: *J. Bacteriol.*, **47**, 343 (1944).
- (11) H. von Euler, 野村男次, 足立 達, 山藤一雄: レダクトン化学の基礎とビタミン C の生化学的成果, 内田老鶴圃 (東京), (1960).
- (12) L. C. Maillard: *Compt. rend.*, **154**, 66 (1912).
- (13) 上原悌次郎, 古川修弘, 山岡邦雄, 福井三郎: 未発表.
- (14) M. I. Dolin: *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 483 (1953).
- (15) M. I. Dolin: *ibid.*, **55**, 415 (1955).
- (16) K. Nakayama, Z. Sato and S. Kinoshita: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 143 (1964).
- (17) K. Nakayama, Z. Sato, H. Tanaka and S. Kinoshita: *ibid.*, **10**, 181 (1964).
- (18) H. Furukawa, H. Matsuo, T. Deguchi, A. Shiga and H. Samejima: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 617 (1968).
- (19) M. Jemmali: *Compt. rend.*, **264**, 2672 (1967).