191. 荒井岩夫：チフス菌の発育素に関する研究（第4報）¹⁾

インドールの発育素としての作用機序補遺

Iwao Arai: Growth Factor for *B. Typhosus*. IV.

Mechanism of Growth Promoting Action of Indole.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Tokyo*)

L-Tryptophane を発育素として要求する一群のチフス菌に対して、indole が顕著な発育促進効果を示し而も indole を添加した合成培地に培養して得たチフス菌四方株（以下四方株と略記する）の菌体に *p*-dimethylaminobenzaldehyde 及び濃塩酸を作用せしめると紫色を呈する事実を認めたので、著者は indole から tryptophane が合成されるであろうことを推定し、これを第3報¹⁾で報告した。

Burrows²⁾ はチフス菌増殖時の同菌の tryptophane 要求度の差異により、これ等の細菌を次の3群に分類した。(1) アムモニアを唯一の窒素源として発育し得る菌株、(2) 元來 tryptophane の共存を必要とするが馴致培養によりアムモニアのみで発育し得るに至る菌株、(3) tryptophane の存在を絶対に必要とする菌株。

Fildes, Gradston, Knight³⁾ 等は上記分類中(2)に相当する菌株について tryptophane 不含の合成培地に馴致培養して得た菌体中に tryptophane が生成していることを、Hopkins-Kohle 試薬による呈色反応を用いて証明した。又 Burrows²⁾ は(1)に相当する菌株を少量の tryptophane を添加した合成培地に培養し、時間的に tryptophane 量の消長を追跡することにより最初添加した量より増加する傾向を認め、この菌株は自ら tryptophane を合成し得る能力があることを指摘した。

著者は第2報⁴⁾で indole- β -acetic acid, skatole, indole- α -carboxylic acid 或は若干の pyrrole 誘導体が微弱乍ら四方株の発育を促進する事実を指摘したが、これ等 indole 化合物中 skatole, indole- α -carboxylic acid 等が *p*-dimethylaminobenzaldehyde と鉍酸により紫色乃至緑色系統の色調を呈し、tryptophane について認められる色調と極めて近似している為、indole 添加培地に培養した四方株菌体が上記試薬により紫色を呈することを以て直ちに tryptophane が合成されたものと判断することは早計に失するものと考えた。又秋葉、鷹取⁵⁾等は多くのチフス菌中 tryptophane 或は indole を不要とし asparagine 及び cystine のみを窒素源として発育し得る数菌株を分離しているので、これ等のうち任意の1株 Watson 株につき tryptophane 或は indole 不含の合成培地に培養して得た菌体に *p*-dimethylaminobenzaldehyde 及び鉍酸を作用せしめた処、緑色を呈する

事実を認めたが、遊離 tryptophane 或は casein を以てする藍紫色の色調とは少々異り判定に困難を感じた。

Spies, Chamber⁶⁾等は遊離或は結合 tryptophane の *p*-dimethylaminobenzaldehyde 及び鉍酸による呈色液の吸収スペクトルが波長 425 m μ 及び 590 m μ に吸収の極大が存在し、就中 590 m μ の極大吸収帯の特異的な点を指摘した。著者はこの報文に基き、遊離 tryptophane 及び casein について同一条件で追試した処、第1図の様に何れも 420 m μ 附近及び 600 m μ 附近に吸収の極大の存在することを確認した。依つて、四方株を *L*-tryptophane 及び indole を夫々発育素として添加した合成培地に培養して得た菌体及び Watson 株を asparagine 及び cystine のみを窒

Fig. 1

* Bunkyo-ku, Tokyo.

1) 荒井：本誌 70, 326 (1950).

2) Burrows: J. Infectious Diseases, 64, 145 (1939); ibid. 65, 134 (1939).

3) Fildes, Gradston, Knight: Brit. J. Exptl. Path. 14, 189 (1933).

4) 荒井：本誌 70, 319 (1950).

5) 秋葉、鷹取：未発表。

6) Spies, Chamber: Anal. Chem. 21, 1249 (1949).

Fig. 2

有することが明かである。著者は本研究でチフス菌中 tryptophane に対する要求度を異にする菌株群中より夫々任意に上記2株を選定したが、これ等の菌株が何れも一致して tryptophane 以外の添加物より自ら tryptophane を合成し、これを夫々の細胞質構成成分として保有していることは興味ある事実である。

本研究は落合教授及び秋葉教授の御指導によるもので深甚なる謝意を表明すると共に、吸収スペクトル測定に当り便宜を與えられた徳川生物学研究所柴田氏並びに測定を担当された串田氏及び菌体試料の一部を提供された東京大学微生物学教室鷹取氏に謝意を表す。又本研究の費用の一部は文部省科学研究費の支出を仰いだので併せて感謝する。

実 験 の 部

菌体試料の採取 (1) 四方株 (tryptophane を発育素とした場合) 普通寒天培地上に 24 時間培養した菌体 1 白金耳量を下記処方 of 合成液体培地 500 cc に移植し、3 日間培養後 100°, 30 分間加熱滅菌し、遠心分離器で菌体を集め蒸留水で数回浮遊遠沈の操作を反覆して附着せる培地成分を洗滌し去つた後、更に脱水の目的で 95% 酒精で 1 回洗滌し真空デシケーター中で乾燥する。(合成培地処方) Na₂HPO₄·12H₂O 1.4 g, KH₂PO₄ 1.0 g, NaCl 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, asparagine 3.0 g, cystine 0.1 g, glucose 3.0 g, H₂O 1000.0 cc, (以上を (A) 成分と仮称する) + tryptophane 0.0204 g, (10⁻⁴ mol/l) (pH 7.2)。

(indole を発育素とせる場合) 普通寒天培地上に 24 時間培養した菌体を下記処方 of 合成培地に 2 代継代培養した後その 1 白金耳量を Roux のコルベンに調製した同一処方の培地上に移植し、4 日間培養して得た菌体を撹取り湿菌のまま 100°, 30 分間加熱滅菌する。これを蒸留水中に浮遊し遠沈する操作を数回反覆し水溶性附着物を洗滌し去り、更に 95% 酒精・エーテル (1:1) 混合物で同様の操作を 3 回反覆して附着せる indole を洗い去つた後、真空デシケーター中で乾燥する。(培地処方) (A) 成分 + indole 0.0117 g (10⁻⁴ mol/l), 寒天 30.0 g, (pH 7.2)。

素源とせる indole 化合物不含の合成培地に培養して得た菌体について、夫々上記同様の呈色反應を行い各々の吸収スペクトル曲線を追跡した処、第2図に示す様に何れも 400 mμ 附近及び 600 mμ 附近に吸収の極大が存在することを確認した。就中 600 mμ 附近の極大吸収帯は遊離 tryptophane 及び casein について認めたものと全く一致し、供試菌体の構成因子として tryptophane が存在することは疑なき事実と云うことが出来る。ここに使用した菌体は従来よりの個有の tryptophane による影響を避ける為、indole を発育素として培養すべき四方株は予め tryptophane 不含の合成培地に於て indole を発育素として 2 代継代培養した後、大量の同一培地に移植して得た菌体を試料とし、又 Watson 株は asparagine 及び cystine のみを窒素源とした indole 化合物不含の合成培地に 10 代継代培養した後同一組成の大量の培地に移植して得た菌体を試料とした。

尚、indole について上記と同一条件で呈色反應を行つたが、黄褐色を呈し、又試料無添加の *p*-dimethylaminobenzaldehyde のみの場合には微黄色を呈し、夫々の吸収スペクトル曲線は第2図に示した形をとり、菌体について認めた曲線とは本質的に異なることは明かである。

上記の諸事実を要約するに、四方株は indole から tryptophane を合成する能力を有し、又 Watson 株は直鎖アミノ酸から tryptophane を合成する能力を

(2) Watson 株 上記 (A) 成分のみよりなる合成液体培地に普通寒天培地上 24 時間培養の菌体を移植し 24 時間培養後更に同一合成培地で 10 代継代培養したものを多量の同一処方合成培地に 4 日間培養して得た菌体を湿菌のまま、100°, 30 分間加熱滅菌する。然る後大量の蒸留水を用いて浮遊、遠沈の操作を反覆し、更に 95% 酒精で 1 回洗滌後真空デシケーター中に乾燥する。

菌体中 tryptophane の呈色反応 精密に秤取した菌体試料 (20~40 mg) に *p*-dimethylaminobenzaldehyde 30 mg を結晶のまま加え 19 n H₂SO₄ 10 cc を注加する。よく振盪混合し、85° 水浴中 15 分間加熱すれば徐々に紫~緑色を呈するが、冷水で急冷後 0.045% NaNO₂ 溶液 0.1 cc を注加すると瞬時に色調が濃くなる。可検試料の秤取量及び夫々の色調は次の通りである。

試 料	秤取量	色 調
四方株菌体 (indole を発育素とせる場合)	20 mg	藍紫色
四方株菌体 (tryptophane を発育素とせる場合)	20 mg	汚紫色
Watson 株菌体 (発育素無添加の場合)	39 mg	緑色
casein	20 mg	藍色
遊離 tryptophane	1 mg	濃藍色
indole	1 mg	黄褐色

東京大学医学部薬学科

Summary

By the measurement of absorption spectrum of the colored solution obtained by the application of *p*-dimethylaminobenzaldehyde reagent to bacterial cells, it was determined that tryptophane is synthesized in the bacterial cells of *Bacillus typhosus* cultivated either on synthetic medium containing indole or in asparagine-cystine medium.

(Received November 6, 1950)

192. 荒井岩夫：チフス菌の発育素に関する研究（第5報）

トリプトファンの発育素としての作用機序 その2

(附) 数種の Indole 誘導体のチフス菌発育素に対する拮抗性について

Iwao Arai: Growth Factor for *B. Typhosus*. V. Mechanism of Growth Promoting Action of Tryptophane. (2). With Additional Observations on the Inhibition of Growth of *B. Typhosus* by Several Indole Derivatives.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Tokyo.)

先に indole 及びその誘導体 11 種のチフス菌四方株（以下四方株と略称する）の発育に及ぼす効果を吟味し、tryptophane, indole の外に indole- β -acetic acid, skatole, indole- α -carboxylic acid が微弱乍ら発育促進性をもつことを報告¹⁾した。これ等の内、indole は菌体増殖に際し tryptophane の前駆物質として意義を有することは前報²⁾³⁾で実証した処であり、又 indole- α -carboxylic acid も炭酸を離脱し易い性質から考え二次的に生成した indole の影響が想像されるが、indole- β -acetic acid 及び skatole の示す発育支持能の機作については上述の如き経路を遮断することは困難であつて、細菌の増殖に際し細胞質の外に介在して何等かの触媒的役割を演ずべき可能性も考えられる。

今回著者は tryptophane の carboxyl 基と amino 基とを夫々部分的に閉塞又は脱去した数種の物質及び tryptophane の indole 核中 pyrrole 部と benzene 部に夫々置換基を導入した 2 種の物質の四方株の発育に及

1) 荒井：本誌 70, 29 (1950)。

2) 荒井：本誌 70, 36 (1950)。

3) 荒井：本誌 71, 671 (1951)。