

# 赤痢菌のストレプトマイシン耐性変異と トリプトファン代謝

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

川 井 潔  
西 井 笑 美 子  
高 橋 学  
本 松 格 史

〔昭和 34 年 12 月 25 日受稿〕

## 緒 言

細菌が抗生物質耐性化するとその形態並びに生化学的性状に種々変化を来すことは周知の事実である。中でも Streptomycin (以下 SM) は特異的な存在として、その遺伝子変異効果が種々論議されているが<sup>1)2)3)4)</sup> この変異によつて惹起される微生物の生化学的性状の中、最も興味ある分野は、この代謝機構に関するものである。既に Umbreit<sup>5)</sup>, Sevag<sup>6)</sup> 等は微生物が SM 耐性化することによりその解糖及び終末呼吸系に重要な代謝交換を来すことを報告しているが、これら性状の変化が SM 耐性変異によつて起きた第一次的な主要な変化であるか、或いは第二次的な随伴的な変化であるかは極めて重要な問題である。これらのことについては oxytetracycline 系抗生物質についてなされた小山等<sup>7)</sup> の実験報告もみられるが未だ釈然とした状態とは云えない。しかしこの代謝交換の一端としてアミノ酸代謝系の一環であるトリプトファン代謝も SM 耐性変異という観点から追求されるだけの価値がある。

しかし乍らこの方面に関する研究報告は未だこれを見ない。筆者等は以下の実験で教室保存の赤痢菌駒込 B<sub>III</sub> を使用し in vitro で高度に SM 耐性化し感受性株を対照として生理学的に比較検討した。

## 実験材料及び実験方法

使用菌: 教室保存の赤痢菌駒込 B<sub>III</sub> (SM 感受性株) を SM 増量的継代法により SM (10,000 7/ml) 耐性を獲得せしめ、特殊の場合以外は、SM (5,000 7/ml) 含有普通寒天平板培地に成育せしめたものを SM 耐性株として使用した。

細菌浮游液: 上記の菌を普通寒天平板培地に

37°C, 16~18時間培養後、集菌し、pH 7.2 の M/50 の磷酸緩衝液にて2回遠沈洗滌し同一緩衝液に浮游させた。菌量はプルフリツヒ比色計を用いて厳密に測定し、所定の濁度の浮游液を調整した。

基質及び阻害剤: トリプトファンを再蒸溜水に溶解し、終濃度が M/2,000, M/10,000 となるようにした。阻害剤の pH もすべて7.2に修正した。インドールの定量: 後藤<sup>8)</sup>の方法に倣つた。

## 実験結果

### 第1節 ストレプトマイシン含有培地発育 耐性菌のトリプトファンナーゼ活性

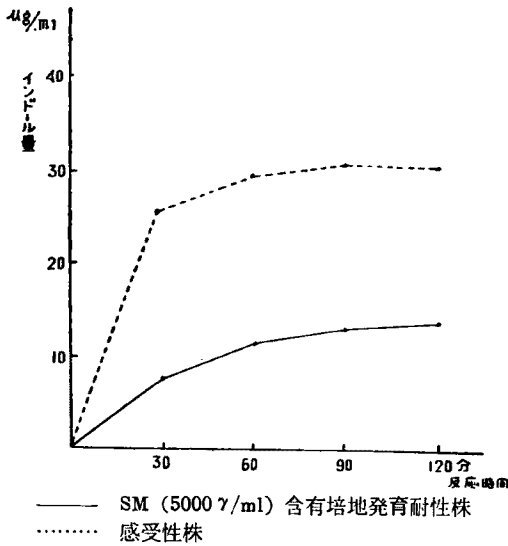
赤痢菌駒込 B<sub>III</sub> はトリプトファンを分解してインドールにする酵素トリプトファンナーゼをもつている。このトリプトファン分解作用が SM 高度耐性化することによつてどうなるかを感受性株を対照として経時的に調べてみた。

トリプトファン濃度 M/2000 で両株の18時間普通寒天培養 (耐性株は SM 添加培地) 菌を静止菌となしインドール産生量を測定した結果は図1の如くである。感受性株のトリプトファン分解は殆んど30分でその頂点に達しその時のインドール産生量は殆んど120分後と変わらない。が一方耐性株のインドール量は60分~90分迄は漸次に増量し、120分後大体その頂点に達したとみえても、その全量は感受性株に比べると約半分であり、最初の頃は更に低い。一般に耐性株の方がトリプトファン分解が非常におくれていると云える。

### 第2節 ストレプトマイシン非含有培地に 継代せるストレプトマイシン耐性 菌のトリプトファンナーゼ活性

この節以外の実験では耐性株は総て SM 含有培

図1 SM含有培地発育耐性株と感受性株のトリプトファンナーゼ活性



菌液 2.0 ml (湿菌量 10 mg), トリプトファン (終濃度 M/2000) 0.3 ml, pH 7.2, M/50 磷酸緩衝液 0.7 ml, 全量 3.0 ml とす, 37.5°C

地に発育せしめて耐性株の厳重な selection を行なったが SM 非含有培地継代後の耐性株ではどうか。SM 非含有培地に20代継代後でも、耐性度は尚高く保持されているに拘らず、そのトリプトファンナーゼ活性は表1の如く充分回復している。そこで、SM 非含有培地1代経過のものについて調べたが、これでも既にトリプトファンナーゼ活性は殆んど回復している。このことはトリプトファンナーゼ活性の消長が SM 耐性化と直接密接な関係をもたないことを示す重要な知見と云わなければならない。

第1表 SM 非含有培地発育耐性株と感受性株のトリプトファンナーゼ活性 (インドール産生量)の時間的比較

株の種類	インドール生成量 (μg/ml)			
	30'	60'	90'	120'
耐性株	9.3	12.4	14.5	16.5
感受性株	10.1	14.6	15.0	16.8

菌液 2.0 ml (湿菌量 10 mg), トリプトファン溶液 (終濃度 M/2000) 0.3 ml, pH 7.2, M/50 磷酸緩衝液 0.7 cc, 全量 3.0 ml, 37.5°C

第3節 インドール産生に対する金属イオン及び V. B<sub>6</sub> の影響

両株のトリプトファンナーゼ作用がどのようなもの

であるかを更に検討する為にインドール産生量を指標として以下の如き実験を行なった。

トリプトファン濃度を M/10,000 とし、二価金属 ion として Mg<sup>++</sup> は MgSO<sub>4</sub>, Fe<sup>++</sup> は FeSO<sub>4</sub>, Mn<sup>++</sup> は MnCl<sub>2</sub>, Cu<sup>++</sup> は CuSO<sub>4</sub> を使用した。二価金属 ion が解糖系及び終末呼吸系に対し重要な役割を果していることは茲に改めて述べる迄もなく、その諸種細菌の呼吸に対する影響については赤沢<sup>9)</sup>、松浦<sup>10)</sup> の報告にみられる。これら二価金属 ion 及びビタミンとして B<sub>6</sub> の影響を見た結果は表2の如くである。トリプトファン分解に対しては各々 10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-4</sup>M 濃度において、殊に 10<sup>-3</sup>M で二価金属 ion では何れも却つて阻害が見られる。Cu<sup>++</sup> が最も強度であり、耐性株、感受性株共に全くインドールの産生がみられぬ。次いで Fe<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> の順に阻害が少なくなっている。次に V. B<sub>6</sub> はトリプトファンナーゼの補酵素と考えられているが、表にもみられるように両株共明らかに V. B<sub>6</sub> (1 mg/cc) によりインドール産生が促進されている。

第2表 トリプトファン分解 (インドール産生) に対する金属イオン及びビタミンの影響

株の種類 金属イオン及び ビタミン(M)		インドール生成量 (μg/ml)	
		耐性株	感受性株
0		5.0	14.4
Mg <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	4.2	15.0
	10 <sup>-4</sup>	4.6	14.6
Fe <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	3.0	12.4
	10 <sup>-4</sup>	2.0	14.2
Mn <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	4.3	14.9
	10 <sup>-4</sup>	4.4	14.6
Cu <sup>++</sup>	10 <sup>-3</sup>	0	0
	10 <sup>-4</sup>	0	0
B <sub>6</sub>	1 mg/ml	11.0	16.6
	25 γ/ml	4.6	15.0

菌液 2.0 ml (湿菌量 10 mg), トリプトファン (終濃度 10<sup>-4</sup>M) 0.3 ml, 金属イオン及びビタミン 0.3 ml, pH 7.2, 全量 3.0 ml, 1 hr. 37.5°C

第4節 インドール産生に対する数種阻害剤及び抗生物質の影響

表3の如くトリプトファンナーゼに対して阻害剤

第3表 トリプトファン分解(インドール産生)に対する阻害剤及び抗生物質の影響

阻害剤及び抗生物質(M)		株の種類		インドール生成量( $\mu\text{g/ml}$ )	
		耐性株	感受性株	耐性株	感受性株
0				5.0	14.4
NaN <sub>3</sub>	10 <sup>-3</sup>			5.4	14.6
	10 <sup>-4</sup>			4.8	14.6
Arsenite	10 <sup>-3</sup>			4.0	14.6
	10 <sup>-4</sup>			4.1	14.6
2,4-DNP	10 <sup>-3</sup>			7.0	15.0
	10 <sup>-4</sup>			7.0	15.0
SM	10 <sup>-3</sup>			4.8	14.6
	10 <sup>-4</sup>			4.8	14.2
AM	10 <sup>-3</sup>			0	8.8
	10 <sup>-4</sup>			3.8	14.6
CM	10 <sup>-3</sup>			3.0	11.2
	10 <sup>-4</sup>			4.8	14.6

菌液 2.0 ml (湿菌量 10 mg), トリプトファン(終濃度 10<sup>-4</sup>M) 0.3 ml, 阻害剤及び抗生物質 0.3 ml, pH 7.2, 全量 3.0 ml, 37.5°C, 1 hr.

NaN<sub>3</sub>, Arsenite, 2,4-Dinitrophenol がどのように作用するかを見たが, この場合 NaN<sub>3</sub> は影響なく亜硫酸ソーダは該菌の呼吸は強く阻害するに拘らずトリプトファンナーゼ作用に対しては殆んど影響を示さなかつた. 2,4-Dinitrophenol は促進的に働いた.

次に抗生物質の影響を見たが Aureomycin は 10<sup>-3</sup>M の濃度においてインドール産生を強く阻害した. Chloromycetin は 10<sup>-3</sup>M において軽度な阻害がみられた. しかし Streptomycin は 10<sup>-3</sup>M でも全く阻害が見られなかつた.

### 総括及び考案

細菌が SM 耐性化することによつて, そのアミノ酸分解系がどのように変わるだろうかということは当然考えられる事である. そこで筆者はトリプトファンを分解してインドールとする赤痢菌駒込 B11 を使用してそのトリプトファンナーゼ活性を耐性株と感受性株について比較検討した.

インドールは Happold & Hoyle<sup>11)</sup>, Berker & Happold<sup>12)</sup>, 市原<sup>13)</sup> 等が述べているようにトリプ

トファンから直接に生ずるものと考えられる故, 筆者はトリプトファンを基質としてその分解能力(トリプトファンナーゼ活性)をインドール産生を指標にして測定した. その結果 SM 含有培地(5,000 $\gamma$ /cc)発育耐性株はその活性がずつと低下している. 即ち SM 耐性化することによりトリプトファンナーゼ活性が落ちてくるのが推定されるが, 次に耐性株を SM 非含有培地に 20代継代した株に就いて調べた結果はそのトリプトファン分解→インドール産生は減弱してはなくて, 殆んど元通りに回復している. 併し耐性度は 10,000 $\gamma$ /ml に保持されている. そこで SM (-) 培地一代継代した株に就いて同じくそのインドール産生量を測定したが矢張りそのトリプトファンナーゼ活性は感受性株に近い迄に回復している. そこでトリプトファンを分解してインドールにするトリプトファンナーゼの活性は SM 耐性化と相伴つて消長するのではなくこれは耐性化とは直接関係のない独立した酵素系で, 耐性株にもトリプトファンナーゼは存在する筈のものであるが SM (+) 培地に成育することによつてそのトリプトファンナーゼの適応的な産生が SM のために抑制されるのであると考えられる. SM が適応酵素の形成を阻害することは既に Spiegelman<sup>14)</sup>, 須田<sup>15)</sup> 等が報告している所である.

次に SM を培地に添加してトリプトファンナーゼ活性を減弱せしめた耐性株を用い感受性株と並行的にトリプトファン分解に対する二価金属 ion (Mg<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>) 及び V. B<sub>6</sub>, 阻害剤 (NaN<sub>3</sub>, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2,4-Dinitrophenol), 抗生物質 (Aureomycin, Chloromycetin, Streptomycin) の促進或いは抑制の影響を静止菌について比較検討してみたが, TCA cycle 及び解糖系の促進効果著明な二価金属イオンもトリプトファンナーゼに対しては阻害を来し, Cu<sup>++</sup> が最も著明で Fe<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> の順に弱くなる. この点は興味ある問題だと思われる. V. B<sub>6</sub> は耐性株においても著明な促進効果があり, 耐性株の SM (+) 培地成育菌はトリプトファンナーゼ形成は阻害されているとはいえ, 完全ではなく尚幾分その活性が残っており, それは V. B<sub>6</sub> によつて促進可能な性質のものである. それは酵素の部分的形成不全であるかと考えられる. グルコースが培地に存在する時にも同じようにトリプトファンナーゼの活性が低下するが, Boyd & Lichstein<sup>16)</sup> によるとグルコース生育菌のトリプトファンナーゼ活性はビタミンを含有しないカゼイン酸

加水分解物或いはアミノ酸混合物を加えることにより回復しうが、ビタミン、ミネラル等 Cofactor を添加したのでは充分回復出来ないという結果より、該酵素の Apoenzyme 部の形成不全によるのであると結論している。筆者等の場合は上記の結果からは Apoenzyme は形成されているが、Cofactor が充分存在していないのではないかと推定される訳であるが、この点については更に詳細な今後の実験に俟たねばならないと考える。

2,4-Dinitrophenol の促進効果も可成り見られた。酸化的脱炭酸の阻害剤と見做される亜硫酸ソーダはこのトリプトファン分解に対して殆んど影響がみられない。窒化ソーダも殆んど影響が見られぬ。

抗生物質の中 SM は  $10^{-3}M$  という高濃度でも静止菌のトリプトファン分解には殆んど阻害効果がない、即ち SM は酵素反応そのものを阻害するのではなく、その酵素の形成を阻害するものであることがわかる。この事よりトリプトファン分解は既に菌体の中にあつたものであつて基質と接触することによつて適応的に静止菌の中に形成されてくるものではないことが分る。このトリプトファン分解は発育中に形成されるのであつて、さればこそ、耐性菌は SM (+) 培地に発育した時にはその活性が弱く、SM (-) 培地成育のものに活性が高く現われたのである。且その SM 添加培養の耐性菌のインドル時間曲線においてもその適応的立上りはみられず 90分経過後既に頂点に達したと思われるに拘らずインドルの絶対量は感受性株より低かつた。Aureomycin は酸化的磷酸化を阻害<sup>(7)(18)</sup>するといわれているが  $10^{-3}M$  の濃度においては呼吸をも阻害することが AJL<sup>(9)</sup>等によつて報告されておりこのトリプトファン分解に対しても当該濃度で阻害作用が顕著である。Chloromycetin は  $10^{-3}M$  の濃度において軽度の阻害がみられた。

一般に抗生物質の作用は複雑であると考えられており、Aureomycin はその低濃度においては発育阻害がみられるが呼吸阻害はなく 200  $\gamma$ /ml という(約  $10^{-3}M$ ) 高濃度ではじめて呼吸阻害即ちチトクローム系への阻害を起すに至る。トリプトファン

の場合もこのような高濃度で始めて阻害されるようになるのであろうと考えられる。Chloromycetin についても同様のことが思われる。

以上トリプトファン分解は耐性菌の発育時には SM が存在する事により速かに減弱する。しかるに菌の生存は尚変化を受けないことよりこの酵素は非常に labile な存在であり、この菌の生活現象にさして必須のものでないことが想像される。そしてこれは適応的酵素というべきものではあるがその形成には発育を必要とし静止菌の状態に簡単に基質と接触するだけでは赤痢菌の場合、その産生が困難であると思われる。

### 結 論

1. SM 耐性株は SM 含有培地発育時にはトリプトファン分解活性が低い。
2. 耐性株は SM 非含有培地に継代することによりトリプトファン分解活性は回復するが耐性度は尚維持されている。SM 非含有培地一代通過でもその活性は充分回復し得る。
3. 耐性株、感受性株共そのトリプトファン分解活性は二価金属イオン  $Mg^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Mn^{++}$  により阻害される。 $Cu^{++}$  の阻害はこの中で最も著しい。V. B<sub>6</sub>, 2,4-Dinitrophenol は促進作用がある。窒化ソーダ、亜硫酸ソーダによる阻害は全くない。
4. オーレオマイシン、クロロマイセチン、ストレプトマイシンの中オーレオマイシンは両株の静止菌のトリプトファン分解作用を最も強く阻害し、クロロマイセチンも幾分阻害効果をもつが、ストレプトマイシンは全く影響がない。
5. 以上トリプトファン分解は細菌(駒込 BIII)の SM 耐性変異とは本質的に密接な関係がないと推定される。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上教授に深甚なる謝意を表し、併せて御協力下さつた教室員各位に感謝致します。

### 参 考 文 献

- 1) 秋葉：医学のあゆみ，13, 250, 1952.
- 2) 牛場，渡辺：日本細菌学雑誌，9, 349, 1954.
- 3) Newcombe, H. B. and Mc Gregor, J.: J. Bact., 62, 539, 1951.
- 4) Demerec: Genetics, 36, 585, 1951.
- 5) P. H. Smith, E. L. Oginsky, W. W. Umbreit: J. Bact., 58, 761, 1949.
- 6) Rosanoff, E. I. and Sevag, M. G.: Antibiot.

- and Chemoth. 3 (5), 495, 1953.
- 7) 小山：日本細菌学雑誌, 10, 515, 1955.
- 8) 後藤：大阪医学会雑誌, 37, 2413, 1948.
- 9) 赤沢：岡山医学会雑誌, 66, 1009, 1954.
- 10) 松浦：岡山医学会雑誌, 68, 153, 1956.
- 11) Happold, F. C. and Hoyle L. : Biochem. J., 29, 1918, 1935.
- 12) Barker, J. W. and Happold, F. C. : Biochem. J., 34, 657, 1940.
- 13) 市原：化学の研究, 1, 1, 1948.
- 14) Spiegelman : Cold. Spring. Harbor. Symp., 11, 256, 1946.
- 15) 須田：酵素化学シンポジウム, 4, 11, 1950.
- 16) Boyd, W. L. and Lichstein, H. C. : J. Bact., 69, 584, 1955.
- 17) Loomis, W. F. : Science, 111, 474, 1950.
- 18) 三浦：Antibiotics and chemotherapy, 2, 152, 1952.
- 19) AjL, S. J. : Bact. Rev., 17, 32, 1953.

---

## A Comparative Study on the Tryptophan Metabolism of Streptomycin-sensitive and Streptomycin-resistant *Shigella flexneri*

By

Kiyoshi Kawai,  
Manabu Takahashi,  
Kakushi Honmatu,  
Emiko Nishii

Department of Microbiology, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Dr. Sakae Murakami)

There has been very little experimental work on the tryptophan metabolism of streptomycin-resistant bacteria. The authors performed this experiment in order to find out the differences of the tryptophan metabolism between streptomycin-sensitive and streptomycin-resistant *Shigella flexneri* 2a. The results were as follows:

1. When streptomycin-resistant strains were grown in the streptomycin-containing medium, they have quantitatively lower tryptophanase activity than streptomycin-sensitive strains.

2. Streptomycin-resistant strains restores tryptophanase activity when streptomycin is absent in the growth medium, but they are resistant to streptomycin (10,000  $\gamma$ /ml).

3. Tryptophanase activity of both strains is inhibited slightly by divalent metal ions such as Mg, Fe, and Mn, but the inhibitive action of Cu is very remarkable. Sodium azide and arsenite have no effect.

Vitamin B<sub>6</sub> and 2,4-dinitrophenol accerelates indole production from tryptophan by this organism.

4. Of the the various antibiotics aureomycin inhibits most markedly tryptophanase activity and chloromycetin does slightly, but streptomycin has no influence.

5. Tryptophanase is an adaptive enzyme, and considered to have essentially no relation to streptomycin-resistant mutation.

---