

微生物の代謝に対するストレプトマイシンの作用

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

川 井 潔
松 本 豊 治
本 松 格 史

〔昭和 34 年 12 月 25 日受稿〕

緒 論

微生物に対するストレプトマイシン (以下 SM) の発育阻止作用が、如何なる機転によるものであるかに関しては従来より数多くの報告がある。それは先ず、Fitzgerald & Bernheim の適応酵素の形成阻害説¹⁾、Cohen の Desoxyribo 核酸結合説²⁾、Zeller 一派による Diamine 酸化酵素の阻害説³⁾⁴⁾、と共に、終末呼吸酵素系の阻害説として Geiger 一派に始まり、それを更に発展させて行つた Umbreit et al. ⁵⁾⁶⁾ の研究が有力な学説として挙げられるのであるが、未だ尚確定的な解決を見たとは云いえない段階にある。しかし SM がその発育阻止作用の機序として矢張り何等かの代謝系に対する干渉を惹起するものであると考えるのが現在の趨勢である。

一方 SM は嫌気的条件下よりも、好气的条件下における阻害作用の方がより大きいこともよく知られている。そこで筆者は、赤痢菌駒込 B₁₁₁ (Sh. flexneri 2a) を供試材料として、その SM の代謝系に対する干渉の様相を、主として好气的条件下において追求した。

実験材料及び実験方法

供試菌： 教室保存の赤痢菌駒込 B₁₁₁ (Sh. flexneri 2a) 及びそれを in vitro で SM 増量的継代法により、SM 10,000 γ /cc 耐性を獲得せしめたもの。

細菌浮游液： 普通寒天平板培地 37°C, 18 時間培養のものを集菌し、M/50 phosphate buffer (pH 7.2) にて 2 回遠沈洗滌後、同組成の緩衝液に再浮游させて静止菌浮游液とした。菌量はブルフリッヒ光電比色計により比濁法にて調整した。

呼吸測定： ワールブルグ検圧計を用い、常法に従つた。SM は特別の場合以外は 15 分前主室に添加して前振盪して後、基質を添加した。

基質： すべて M/100 (終濃度)、pH 7.2 に修正して用いた。

発育実験： 合成培地として下記の組成のものを用いた。

Glucose	2.0 g
Glutamate	3.0
K ₂ H ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄	0.1
常水 (再蒸溜水)	100 ml
ニコチンアミド	10 ⁻⁶ M pH 7.2

ピルビン酸の定量： Friedmann-Haugea の方法に従つた。

実験成績

第 1 節 基質呼吸に対する SM の効果

1. 単独基質呼吸に対する SM の効果

基質として、TCA cycle に関連あるものを選んでその基質呼吸に対して SM が阻害作用を示すかどうか調べた。

SM は発育阻止濃度として 20 γ /cc 濃度で十分である故、呼吸阻害実験には 20 γ /cc と、高濃度としては 200 γ /cc を選んだ。SM は 15 分前に主室に添加して preincubate し、菌体内への滲透を十分ならしめるようにした。第 1 表に示す如く、SM は Glucose 基質で全く阻害はなく、寧ろ促進的に作用した。高濃度 (200 γ /cc) に於いても促進的に働いた。比較として耐性株に就いても同じ実験を試みてみたが、耐性株では勿論阻害を受ける事はなかつた。他の pyruvate, succinate, fumarate, malate に対しても呼吸阻害は全くなく、僅かに促進的に働いた。しかし glutamin 酸, asparagin 酸に対しては促進効果は目立たず、阻害も殆んどなかつた。そしてこの事は 60 分~120 分の観察でも変りなかつた。

2. 2 種組み合わせ基質呼吸に対する SM の効果

単独基質呼吸では、SM の阻害効果はみられない

第1表 基質呼吸に対するストレプトマイシンの効果

基質	SM 濃度 7/cc	感受性株	耐性株
glucose	0	170 μ l	158
"	20	179	154
"	200	198	158
pyruvate	0	117	38
"	20	120	39
"	200	126	41
succinate	0	138	91
"	20	144	92
"	200	160	94
fumarate	0	72	67
"	20	73	68
"	200	78	73
malate	0	141	131
"	20	148	133
"	200	159	136
glutamate	0	76	58
"	100	81	56
aspartate	0	113	99
"	100	119	104
fumarate glutamate	0	220	168
"	100	228	167
pyruvate fumarate	0	232	
"	200	239	
glucose glutamate	0	304	
"	200	318	

菌液 2.0 cc (湿菌量 10 mg) 基質 0.3 cc (終濃度 10⁻²M) 全量 3.0 cc, $\frac{M}{50}$ 磷酸緩衝液, pH 7.2, 37.5°C, 1 hr

ので、2種の組み合わせ基質に就いて試みた。第1表に示す如く pyruvate (M/100) と fumarate (M/100) の組み合わせ基質での呼吸に於いては、pyruvate に対する fumarate の sparking 効果はみられなかつた。又 SM 200 7/cc の添加でも、この基質組み合わせ呼吸に対する阻害はみられなかつた。fumarate と glutamin 酸、及び glucose と glutamin 酸組み合わせ基質についても同じであつた。そこで、Geiger の実験に倣い、有機酸とアミノ酸の組み合わせを行ない、有機酸 (脂肪酸) として fumarate, アミノ酸として glutamin 酸を選び

fumarate と SM を同時に添加して3時間 preincubate 後 glutamin 酸を添加して、SM の阻害効果の有無を検討したが、殆んど阻害は見られなかつた (第2表)。

第2表 フマル酸前酸化3時間後グルタミン酸添加呼吸に対するストレプトマイシンの効果

時間 (min)	60'	120'	180'	30'	60'	90'	120'
SM							
0 7/ml	112 μ l	114	96	149	276	186	294
200	129	121	106	150	283	179	283

菌液 2.0 cc (湿菌量 10 mg) 基質: フマル酸, グルタミン酸, 0.3 cc (終濃度 10⁻²M) SM: 0.3 cc 全量 3.0 cc, pH 7.2, 37.5°C, 1時間毎区分測定。

表は1時間毎の区分測定を示す。

glucose を前酸化して後、glutamin 酸を添加した場合についても全く同様であり、SM の阻害は起らなかつた。何れも比較として、耐性菌に就いても同様のことを試みたが、勿論耐性菌には、何等阻害効果はなかつた (第3表)。

第3表 グルコース前酸化3時間後グルタミン酸添加呼吸に対するストレプトマイシンの効果

時間 (min)	60'	120'	180'	30'	60'	90'	120'
SM							
0 7/ml	139 μ l	132	132	98	248	131	233
200	162	153	148	106	278	165	288

菌液 2.0 cc (湿菌量 10 mg) 基質: グルコース, グルタミン酸 0.3 cc (終濃度 10⁻²M) SM: 0.3 cc, 全量 3.0 cc, pH 7.2, 37.5°C, 1時間毎区分測定。

以上、静止菌浮游液の基質呼吸については SM が何等阻害効果をもたない事を知つたので SM が発育菌に対しては明らかに発育阻止効果をもつ事より、可及的発育可能の条件に近付けるべくワールブルグ検圧計にて、基質として glucose, glutamate に 10⁻³M Mg⁺⁺ を添加し、此に対する静止菌浮游液の呼吸を測定し、その呼吸を SM が阻害するかどうかを見たところ、第4表 (30分毎の区分測定値を記す) の如く、幾らか阻害効果を認めることができた。対照として耐性株に就いて同じ事を試みたが、それには全く阻害効果は表われなかつた。

第4表 グルコース, グルタミン酸, Mg⁺⁺ 基質系に対するストレプトマイシンの効果

基質	時間(min)	SM					
		15'	30'	45'	60'	75'	90'
glucose	0.7/ml	75 μl	162	84	190	91	186
glutamate Mg ⁺⁺	100	83	166	89	179	65	122

菌液 2.0cc (湿菌量 10mg), 基質: グルコース, グルタミン酸 0.3cc (終濃度 10⁻²M), Mg⁺⁺ は 10⁻³M に M/50 phosphate buffer に含有さす. SM 0.3cc, 全量 3.0cc, pH 7.2, 37.5°C, 30分毎区分測定

第2節 発育菌に対する SM の効果

1. 好氣的条件下での SM の効果

前述の如く, SM が菌の発育を抑える事は明らかな事実であり, 此の発育阻害は代謝面に於ける何等かの干渉を暗示する. その結果として代謝産物の攪乱も期待されてよい.

本節では菌の発育可能な最小の合成培地を作り, 第5表の如く, 此の合成培地に, 20 γ/cc, 200 γ/cc に各々 SM を添加したものと及びN源としての glutamin 酸を除いたものに SM を添加した各々の培地に普通寒天20時間培養の洗滌菌体を浮游して所定の濁液 (0.4) とし, 2~3時間振盪 (37°C) して, その発育量を測定すると共に代謝産物としての

第5表 合成培地振盪培養発育菌と代謝産物

株の種類	測定の対称		菌量濃度 (-log T)	基質 (glucose) 消費 (μM/cc)	pyruvate 蓄積 (μM/cc)
	N源	0時間値 SM濃度			
感受性株	(-)	0.7/ml	0.40 (0.40)	0 (0)	0 (0)
		200	0.38 (0.40)	2.2 (5.0)	0 (0.08)
	(+)	0	0.54 (0.55)	2.6 (5.4)	0 (0.08)
		20	0.42 (0.40)	2.7 (5.5)	0.12 (0.34)
		200	0.41 (0.40)	2.6 (5.7)	0.10 (0.30)
		500	0.40 (0.40)	2.9 (10.0)	0.05 (0.14)
耐性株	(-)	500	0.39 (0.40)	2.0 (10.0)	0.05 (0.12)
		0	0.40 (0.40)	2.6 (10.0)	0.08 (0.11)
	(+)	500	0.40 (0.40)	1.8 (10.0)	0.08 (0.14)
		0	0.40 (0.40)	2.6 (10.0)	0.08 (0.14)

2時間値, () 内は3時間値を表す

pyruvate を分析定量した. 又基質消費として, glucose をも定量した. その結果はN源 (-) の発育不能培地では一静止菌と同じ状態と見てよい. glucose の消費はみられたのであるが, SM (200 γ/cc) 添加による pyruvate の蓄積は殆んど起らなかった. しかしN源 (+) の培地では一発育可能培地であるが—SM (20 γ/cc) の添加で明らかに発育阻害が見られ, 且 pyruvate が蓄積してくるのが認められた. 即ち発育の為に活性化された代謝の回転に於いて, pyruvate の利用が妨げられた事が考えられる. SM の作用が発育合成という賦活的な代謝過程と極めて密接な関係がある事が伺われる.

耐性株ではN源 (+) の場合でも, 発育は見られ

ず, これからも耐性株の栄養要求が感受性株より厳しいことが分つた. 又耐性株では, N源 (+) の場合に SM (500 γ/cc) 添加で, pyruvate の蓄積—僅かではあつたが—は SM 未添加のものと殆んど同量で変りはなかつた.

2. 嫌氣的条件下での SM の効果

上記と全く同様に, N源 (+) と (-) の合成培地を作り, 洗滌菌体を浮游せしめ, 所定の濁度とし, Thunberg 管に菌液を入れ, 第6表に示す如く, SM を各添加し, 真空ポンプにて 10 mmHg 迄減圧した後, 恒温槽内に3時間静置後, その発育濁度, glucose 消費, 及び代謝産物としての pyruvate 蓄積量を測定したが, N源 (+) 或いは (-) の場合,

何れも pyruvate は検出することができなかつた。又 glucose 消費量は SM (200 γ /cc, 500 γ /cc) より何等阻害を受けなかつた。

第6表 合成培地嫌氣的培養発育菌と代謝産物

測定の対称		菌量濃度 ($\cdot \log T$)	基質 (glucose) 消費 (μM /cc)	Pyruvate 蓄積 (μM /cc)	
N 源	0時間値 SM濃度				
感 受 性 株	(-)	07/ml	0.39	2.1	0
		500	0.40	3.0	0
		0	0.40	2.0	0
	(+))	20	0.40	1.9	0
		200	0.39	2.9	0
		500	0.39	3.4	0

3時間値

総括及び考案

前述の如く SM の作用機作に関しては、数多くの報告があり、種々論議されている。そしてこの SM は、明らかに微生物の発育を阻害するものであり、総ての生命現象が酵素化学的レベルで解明されつつある今日、この SM の発育阻害という現象も当然微生物の物質代謝経路に対する何等かの干渉を意味するものとして酵素化学的な解決が見出されなければならない。しかし乍ら微生物の物質代謝系自体も未だその全貌が明らかにされているとは云えない現在、SM の作用機作を端的に把握することは、極めて至難の事と思われるが、その阻害現象と関聯ある生理学的変動を幾分かでも明らかにする事は、やがては作用機作の本質的解明への近道となる。しかして現在迄、これ等については数多くの報告がみられるが、それは菌種菌株により必ずしも一定した成績を得ていない。

一般に抗生物質の作用機作は多面的であるとも考えられて居り Aureomycin, Terramycin に就いては発育阻害濃度の数倍の高濃度では呼吸に対する阻害が表われるという報告がある。

筆者も先づその生理学的究明の端緒として呼吸系に対する阻害より検討していつた。

赤痢菌駒込 BIII に就いて glucose 及びその中間代謝物及びアミノ酸 (glutamin 酸, asparagin 酸) 基質呼吸に対する SM の効果をみたが、200 γ /cc

という高濃度に於いても単独基質の場合は全く阻害はみられなかつた。Benham⁹⁾ も Eberthella typhosa で SM はその内部呼吸を促進すると報じて居り、Henry et al.¹⁰⁾ も Staph. aureus の多数の酵素活性 (glucose, fructose, ethanol, pyruvate, ascorbin 酸, adenyil 酸のソーダ塩, glutamin 酸, D-ribose, α -glycero 磷酸, glyceraldehyde, dehydroxyacetone, glycerate, glyoxal) が SM によつて阻害されないと云い、Geiger¹¹⁾ は、E. coli に就いて、その糖類及びその中間代謝物 (lactate, glycerol, succinate, malate, fumarate, oxaloacetate, pyruvate) の酸化割合が、SM によつて影響を受けなかつたと報じている。Frederick, Bernheim & R. J. Fitzgerald¹²⁾ も Mycob. tuberculosis No. 607 の normal strain の pyruvate の酸化 (O_2 -uptake) が SM によつて影響を受けないと報じている。然し又一方 Geiger¹¹⁾ は適当な条件の下では、E. coli のアミノ酸代謝が SM で阻害され Bernheim u. Fitzgerald¹³⁾ は Mycob. tuberculosis 607 の normal strain の benzoic acid の酸化が 10 γ /cc の SM で阻害されると云い Henry et al.¹⁰⁾ は Staph. aureus の glycerol, acetate の酸化が同じく SM で阻害される。Krampitz, Green, and Werkmann¹⁴⁾ は SM が ribonucleinate 酸化を阻害すると報告して居る。

此のように SM の阻害は基質により、又菌種により区々で必ずしも一定して居らないが、大体に於いて呼吸に対しては阻害効果の表われない場合が多く、筆者の場合も 200 γ /cc という高濃度でも全く阻害が見られなかつた。これは Aureomycin, Terramycin が 200 γ /cc の濃度で各種基質呼吸に強い阻害を表わすようになるのと比べて SM の作用の差異を伺わず興味ある事実と思われる。そこで、次に pyruvate, と fumarate の二種基質の組み合わせで、その呼吸に対する SM の効果を見たが、pyruvate に対する fumarate の sparking 効果はなく、SM の阻害も表われなかつた。Geiger¹¹⁾ によると、E. coli の asparagin 酸呼吸は 8 γ /cc の SM によつて阻害を受けると云い、又 fumarate の前酸化後、serine, leucine, glutamin 酸の添加による呼吸増加は SM によつて阻害を受けると報告しているが、筆者の場合は fumarate 前酸化を行なうことによつて、3時間後の glutamin 酸添加による増加した呼吸は SM (200 γ /cc) によつて殆んど阻害されなかつた。又筆者の成績¹⁵⁾ では E. coli の asparagin 酸, glutamin 酸各々単独基質での呼吸は SM (100 γ /cc) によつ

て阻害を受けている故、このような菌種菌株による差異は更に今後の検討に待たねばならないと考える。

glucose と glutamin 酸、及び fumarate と glutamin 酸の組み合わせ基質に対する SM の呼吸阻害も明らかでない。そこで glucose と glutamate 2種基質組み合わせに更に Mg^{++} を $10^{-3}M$ 添加した系の呼吸に対する SM の阻害を見た所、60分～120分で阻害効果が表われた。これは菌体浮游液が、燐酸緩衝液である上に、glucose, glutamate, Mg^{++} の組み合わせでは殆んど駒込 B_{III} の最少合成培地の組成に等しい故、細菌体は発育状態としての代謝の回転を始め、静止菌の時より単位当りの活性が高くなり、発育時の代謝状態に近似する為、発育合成過程或いはこれと密接に関連した代謝過程を阻害すると考えられる SM が、結果として呼吸に対する阻害を表わすに到つたものと考えられる事ができる。比較としての耐性株で、阻害が全然起つていない事実は、これを更に裏付ける。

一方、合成培地に於ける好氣的振盪培養に SM を添加した場合、N源 (glutamin 酸) が存在する際—即ち発育可能状態の時—は SM が存在するものでは菌量は殖える事なく静止菌と外見的には等しい状態と見てよいが、pyruvate がそれぞれ蓄積して来た。然し glucose 消費量は SM で影響を受けず殆んど同じであつた。所で N源 (glutamin 酸) を除いた培地のもの即ち静止菌状態の場合は SM にて pyruvate の蓄積は見られなかつた。この事実は、発育によつて高まる代謝過程の一部が SM によつて阻害される結果、glucose の主要中間代謝物たる pyruvate 利用が十分行われ難い為、その蓄積を起すに到つたものと考えられる事ができる。対照として行なつた耐性株では此の培地では N源があつても発育増殖は起り得ず、栄養要求が耐性株より厳しいことを同させた。

そして又 SM 添加をしても、感受性株の場合と異なり、pyruvate の蓄積増大は起らなかつた。

又嫌氣的培養をも試みたが N源 (-) 即ち静止菌の状態の場合は勿論、N源 (+) 即ち発育可能状態の場合も pyruvate 蓄積は、SM 添加でも起らなかつた。

以上の事実より、SM の阻害は、発育合成過程と密接な関係があり、それは合成過程と couple した aerobic な pyruvate の代謝に、より深い関聯があることを思わせる。

結 論

赤痢菌駒込 B_{III} に付いて、SM の阻害機構を追求して下記の結果を得た。

1. SM は 200 γ /cc という高濃度でも尚 pyruvate, succinate, fumarate, malate, glutamin 酸を基質とした呼吸を阻害しない。

glucose 基質での呼吸は SM により促進される傾向が大である。

2. fumarate を基質として SM と共に preincubation を行なわせた後 glutamin 酸を添加した際の増加せる呼吸は SM により殆ど阻害されない。

3. glucose と glutamin 酸基質に $Mg^{++} 10^{-3}M$ を添加した際の呼吸は SM による阻害効果が認められる。

4. 合成培地の好氣的振盪培養に於ける SM の発育阻止の結果は、代謝産物として pyruvate の蓄積増大を来す。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導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) Fitzgerald, R. J., Bernheim, F., and Fitzgerald, D. B.: J. Biol. chem., 175, 195, 1948.
- 2) Cohen, S. S.: J. Biol. chem., 166, 393, 1946.
- 3) Owen, C. A., Jr., Karlson, A. G., and Zeller, E. A., J. Bact., 62, 53, 1951.
- 4) Zeller, E. A., Owen, C. A., Jr., and Karlson, A. G.: J. Biol. chem., 188, 623, 1951.
- 5) Umbreit, W. W.: J. Biol. chem., 177, 703, 1949.
- 6) Oginsky, E. L., Smith, P. H., and Umbreit, W. W.: J. Bact., 58, 747, 1946.
- 7) Umbreit, W. W., Smith, P. H., and Oginsky, E. L.: J. Bact. 61, 595, 1951.
- 8) Friedmann, T. E., and Haugen, G. E.: J. Biol. chem., 147, 415, 1943.
- 9) Ross, S. Benham: Science, 105, 69, 1947.
- 10) Henry, J., Henry, R. J., Housewright, R. D., and Benham, S.: J. Bact., 56, 527, 1948.

- 11) Geiger, W. B.: Arch. Biochem., **15**, 227, 1947. 105, 417, 1947.
12) Bernheim, F., and Fitzgerald, R. J.: Science, **105**, 435, 1947. 14) Krampitz, L. O., Green, M. N., and Werkman, C. H.: J. Bact. **53**, 378, 1947.
13) Bernheim, F., and Fitzgerald, R. J.: Science, 15) 川井: 印刷中.

Studies on the Effect of Streptomycin on the Metabolic Activities of Bacteria.

By

Kiyoshi Kawai
Toyozumi Matsumoto.
Kakushi Honmatsu

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

This experiment was attempted to investigate the inhibitory action of streptomycin. The organism used is *Shigella flexneri* 2a.

The results are as follows:

- 1) Even under a level of 200 γ /ml streptomycin, it cannot inhibit the oxidation of pyruvate, succinate, fumarate, malate, glutamate, and aspartate by whole cell suspensions.
 - 2) When glutamate is added to a cell suspension that has previously been permitted to oxidize fumarate, an immediate increase in oxygen consumption is observed. This increase is scarcely prevented by streptomycin.
 - 3) The oxidation of a mixture of glucose, glutamate, and 10^{-3} M Mg^{++} by a cell suspension is prevented by streptomycin level of 200 γ /ml.
 - 4) Streptomycin prevents especially aerobic growth of this organism in the synthetic medium and results in an increased accumulation of pyruvate as a metabolic product.
-