

細菌のカタラーゼ活性について

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 村上 栄教授)

秋 _ス 山 健 二

〔昭和35年6月23日受稿〕

目 次

第1編 培養条件とカタラーゼ活性の関係

I. 緒 言

II. 実験材料及び実験方法

III. 実験成績

1. 培地へのグルコース添加の影響
2. 培地への KCN, NaN_3 添加の影響
3. 培地への α, α' -デピリヂル, オキシシ
ン添加の影響

IV. 総括及び考案

V. 結 言

第2編 カタラーゼを失った菌のグルコース,
アラニンの酸化

I. 緒 言

II. 実験材料及び実験方法

III. 実験成績

1. 各菌のカタラーゼ, ペルオキシダーゼ
活性及びグルコース, アラニンの酸化
に於ける量的関係
2. 有及び無カタラーゼ菌体の赤血球に対
する影響

IV. 総括及び考案

V. 結 言

参考文献

第 1 編 培養条件とカタラーゼ活性の関係

I. 緒 言

細菌にはカタラーゼを有するものと、これを欠くものがあり、有するものでも量的に種々の差異があることは周知の通りである。

細菌のみならず種々の生物細胞に於けるカタラーゼの役割は物質酸化によつて生成された H_2O_2 を分解処理するものであるとされている。

肺炎双球菌¹⁾²⁾³⁾, 連鎖球菌⁴⁾などはカタラーゼを欠くため発育途次、或は静止菌でもグルコース分解途次 H_2O_2 を生成蓄積することが知られている。従つてこのような菌ではカタラーゼを有する血液その他を加えて置かねば生成する H_2O_2 のため菌自体が障害され発育は下全となる。

ところが *Sh. dysenteriae* に属する菌ではカタラーゼを欠くに拘わらず、普通寒天などで良好な発育を行い、かつ H_2O_2 の蓄積も認められず、カタラーゼを有する菌と何ら異るところが見られないものもある。

又人に於ても無カタラーゼ症患者が発見され⁵⁾⁶⁾⁷⁾,

カタラーゼの意義乃至は H_2O_2 の生成の有無は簡単には推論し得ない現状となつた。

このような観点より菌のカタラーゼに関しても一考の必要が認められるので本編では *St. flexneri*, *Sal. typhi* を供試菌とし培養条件と菌体カタラーゼ活性との関係について検討した。

II. 実験材料及び実験方法

供試細菌: *Sh. flexneri* 2a, *Sal. typhi* 57 の教室保存の標準株。

何れも S 型と思われるコロニーをとり、ミロン反応、食塩水による自然凝集性など試験して R 型の混入しないよう継代し、純化して使用した。

静止菌浮游液の調製: 培地より集めた菌体を M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.2) を以て 2 回遠沈により洗滌した後、同組成の緩衝液に浮游した。

菌量は光電比濁計で濁度を測定し、あらかじめ作成した標準曲線と対比して決定した。

O_2 消費量の測定: ワールブルグ検圧計を用い

常法⁹⁾に従った。

基質は市販品を蒸留水に溶解し、必要により、NaOH、又は HCl を以て pH を修正して使用した。

カタラーゼ活性の測定⁹⁾： ワールブルグ検圧計を用い、主室に菌液 2.0 cc (湿菌量 1 mg/cup)、磷酸緩衝液 0.7 cc、側室に H₂O₂ (終濃度 M/300) 0.3 cc を入れ、側室の H₂O₂ を主室に混入してから 5 分間に発生する O₂ 消費量を測定してカタラーゼ活性を比較した。

III. 実験成績

1. 培地へのグルコース添加の影響

基礎培地組成

ペプトン	10.0 g
食塩	3.0 g
第一磷酸カリ	0.35 g
第二磷酸ソーダ	2.5 g
硫酸第一鉄	0.001 g
硫酸マグネシウム	0.01 g
水	1.0 l
pH	7.2

上記組成の基礎培地 (グルコース無添加培地) 及びこれにグルコースを 0.5 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 5 g/l となるように夫々加えた培地を作り、50 cc 容コルベンに分注して供試菌を接種し、37°C、20時間培養して10代継代し、1, 2, 5, 10 代目の菌体を夫々集菌し、洗滌後緩衝液に浮遊して静止菌とし、カタラーゼ活性を測定した。

なお各代のカタラーゼ活性の測定では、常に毎回対照として基礎培地に培養した菌体についても同様に操作した。

第1表 培地グルコース量と菌体カタラーゼ活性の関係

培地 C 源	継代	1代	2代	5代	10代
C 源なし		197	185	190	177
グルコース 0.5 g/l		191	170	166	169
" 1 g/l		160	154	150	145
" 2 g/l		118	115	108	117
" 5 g/l		82	64	58	62

カタラーゼ活性を O₂ 発生量 (μl) を指標として比較すると、Sh. flexneri 2a では第1表の如くであり、グルコース 0.5 g/l 添加培地培養菌体では10代まで殆んど対照培地に培養した菌体 (対照菌) と大差は

ないが、1 g/l 添加の場合は僅かながらカタラーゼ活性の低下が見られ、培地中のグルコース濃度が大となるに従い菌体カタラーゼ活性は低下し、5 g/l 添加では著明な低下が認められる。

Sal. typhi 57 では第2表の如くである。やはり

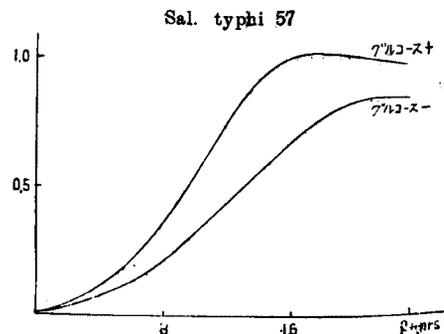
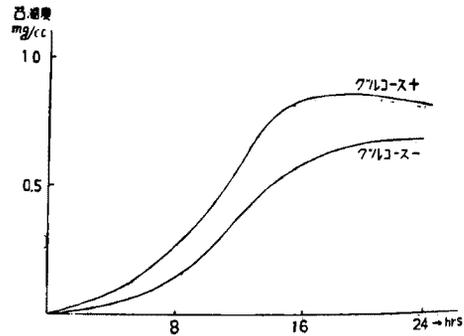
第2表 培地グルコース量と菌体カタラーゼ活性

	1代	2代	5代	10代
C 源なし	218	206	210	187
グルコース 0.5 g/l	212	197	204	195
" 1 g/l	180	174	167	152
" 2 g/l	167	135	148	146
" 5 g/l	154	119	128	102

培地グルコース濃度が大となるに従い菌体カタラーゼ活性が低下し、5 g/l 添加ではかなりの低下が見られるが、Sh. flexneri 2a に比較するとややその低下は少いようである。

以上の通り培地にグルコースを添加することによりカタラーゼ活性が低下するが、グルコースの添加により対照培地とは菌の発育速度が異なり、同じ

第1図 培地へのグルコース添加と菌の発育の関係
Sh. flexneri 2a



時間培養でも両菌の発育に於ける phase が多少とも異なるはずであり、これがカタラーゼ活性の差異を来すのではないとも考えられるので、次に培養時間とカタラーゼ活性との関係を対照培地及びグルコース (5g/l) 添加培地培養菌体について検討した。

前記組成の対照培地及びこれにグルコースを加えた培地の夫々 30 cc を 50 cc 容コルベンに分注して菌を接種し、37°C で静置して培養し、4 時間毎にその一部づつを取り出して濁度を測定して発育曲線を作つたところ、第 1 図の如くであり、*Sh. flexneri* 2a, *Sal. typhi* 57 共に対照培地では 8 時間目頃より log phase となり、20 時間目頃より stationary phase となるのに対し、グルコース添加培地では

log phase, stationarg phase に入るのがやや早く、かつ発育度も対照培地に於けるよりもかなり大である。

そこで次に両培地に菌を接種し、10 時間、16 時間、24 時間、48 時間後に夫々集菌、洗滌しカタラーゼ活性の培養時間的变化を検討した。なおこの実験ではカタラーゼ活性の測定と同時に他の酵素活性を見えるため、グルコール、乳酸、焦性ブドー酸、コハク酸を基質とした O₂ 消費量 (1 時間値 μ l) をも測定して比較することとした。カタラーゼ活性の測定では各菌共湿菌量 1 mg/cup, O₂ 消費では 20 mg/cup とし、基質は何れも M/100 となるようにした。

Sh. flexneri 2a に於ける結果は第 3 表の如くであり、両培地培養菌共に O₂ 消費は培養時間に大き

第 3 表 培養時間と酵素活性の関係
Sh. flexneri 2a

	対 照 培 地				グルコース添加培地			
	10hrs. 培養	20hrs. "	30hrs. "	48hrs. "	10hrs. "	20hrs. "	30hrs. "	48hrs. "
カタラーゼ活性 (O ₂ 発生 μ l)	192	184	205	182	89	80	75	71
O ₂ 消費 (μ l) 基質なし	30	25	14	8	25	22	17	5
" グルコース	327	289	513	86	277	252	115	56
" 乳 酸	362	315	244	175	147	130	90	44
" 焦性ブドー酸	219	182	77	42	71	65	61	40
" コハク酸	195	152	80	41	140	152	76	52

く支配され、培養時間が長くなるにつれて O₂ 消費量は急激に減少するが、カタラーゼ活性は殆んど変化されない。

Sal. typhi 57 に於ても表示は省略したが全く同様である。

従つてグルコース添加培養した菌体が対照菌よりカタラーゼ活性が小であるのは発育に於ける base が対照培地に於けるのと異つているためではないことが認められる。

次にグルコース添加培地では発育途次酸産生のため pH が漸次低下するものであるが、カタラーゼ活性の低下がこの pH 低下に起因するものか否かを見るため、*Sh. flexneri* 2a を用い次の 4 種の培養液で培養した菌体 (20 時間培養) のカタラーゼ活性を比較した。即ち

- (1) 対照培地 (前記基礎培地, 始 pH 7.2) に培養
- (2) 対照培地を pH 6.0 に修正し、これに菌を接種して時々 pH を 6.0 に修正しながら培

養

- (3) グルコース添加基礎培地 (始 pH 7.2) に培養

- (4) 上のグルコース添加培地に菌を接種し、時々 pH を 7.2 に修正しながら培養

以上の各菌体を集め、1 mg/cup の菌量でカタラーゼ活性を測定した。結果は第 4 表の如くであり、対照培地に培養した菌体は培養時の pH 7.2, 6.0 の場合共に著明なカタラーゼ活性を有するのに対し、

第 4 表 培地 pH と菌体カタラーゼ活性の関係

Sh. flexneri 2a

	カタラーゼ活性 O ₂ 発生 μ l
対照培地 (pH 7.2) 培養 菌	192
pH 6.0 対照培地 "	204
グルコース添加培地 "	82
pH 7.2 グルコース添加培地 "	79

グルコース添加培地では pH 7.2 に修正して培養した菌体も、修正しないものも共にカタラーゼ活性は小である。

従つてグルコー添加培地に培養した菌体のカタラーゼ活性の低下は、培地 pH の低下によるものではないことが認められた。

次にグルコースがカタラーゼ作用自体を阻害するか否かを見るため、*Sh. flexneri* 2a 普通寒天培養菌体を用い、静止菌のカタラーゼ作用に対するグルコース添加の影響を見た。即ち 1 mg/cup の菌量を用い、グルコース (M/30) を加えた場合と、加えない場合について H₂O₂ を添加して O₂ 発生量を比較したところ、第 5 表の如くであり、静止菌ではグ

第 5 表 静止菌のカタラーゼ活性に対するグルコースの影響

	カタラーゼ活性 (O ₂ 発生 μl)
添加物なし	197
グルコース M/30 添加	190

ルコースを添加してもカタラーゼ活性は影響されないことが認められた。

次にグルコース以外の C 源、乳酸、焦性ブドー酸、コハク酸を添加した培地に継代し、5 代目の菌体のカタラーゼ活性を比較した。

培地に添加するこれら C 源は何れも M/30 となるようにし、培養時間は 20 時間とした。

結果は第 6 表の如くであり、*Sh. flexneri* 2a、

第 6 表 C 源添加培地に培養した菌のカタラーゼ活性

	<i>Sh. flexneri</i> 2a	<i>Sal typhi</i> 57
C 源 なし	179	212
乳 酸	184	207
焦性ブドー酸	185	211
コハク酸	180	194

Sal. typhi 57 両菌共にこれら C 源を添加した培地に培養した菌体のカタラーゼ活性は何れも対照培地のものと殆んど差異がない。

2. 培地への KCN, NaN₃ 添加の影響

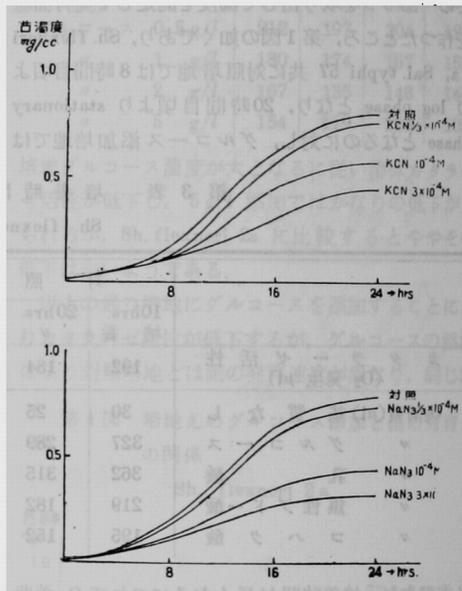
カタラーゼの作用を阻害することが知られている KCN, NaN₃ を添加した培地に供試菌を継代して、5 代目の菌の発育曲線を記録し、同時にその 20 時間培養菌体のカタラーゼ活性及び O₂ 消費量を対照培

地に培養した菌体と比較した。

菌量はカタラーゼ活性の測定では 1 mg/cup, O₂ 消費量の測定では 20 mg/cup とした。

先づ発育曲線を見ると *Sh. flexneri* 2a では第 2 図の如く、KCN, NaN₃ 1/2 × 10⁻⁴M 添加では発育に殆んど影響を与えず、10⁻⁴M では若干発育は阻害され、3 × 10⁻⁴M では著明に阻害される。

第 2 図 培地への KCN, NaN₃ 添加と菌の発育との関係 (*Sh. flexneri* 2a)



Sal. typhi 57 でも第 3 図の如くほぼ同様の傾向が見られる。

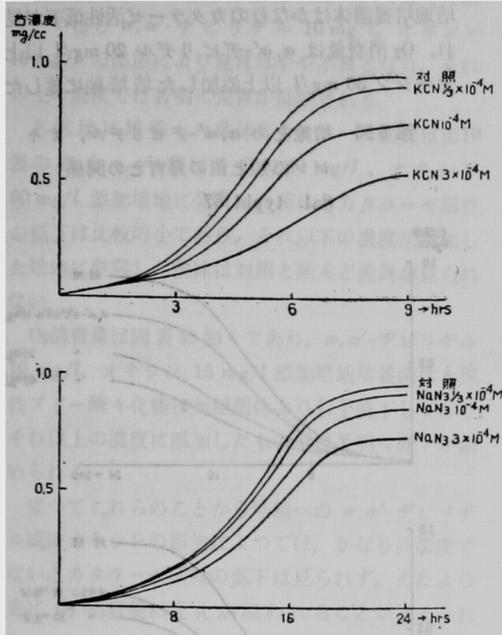
而してこれら各培地に発育した菌体 (20 時間培養) のカタラーゼ活性及び O₂ 消費量を測定したところ第 7 ~ 8 表り吉長であつた。

この実験ではカタラーゼ活性の測定は 1 mg/cup, O₂ 消費量の測定は 20 mg/cup の菌を用い、基質は何れも M/100 となるようにして行つた。

Sh. flexneri 2a では第 7 表の如く、KCN, NaN₃ 1/2 × 10⁻⁴M 添加培地に培養した菌はカタラーゼ活性が著しく低下しており、10⁻⁴M 添加では殆んど失つている。

而して O₂ 消費を見ると、1/2 × 10⁻⁴M 或は 10⁻⁴M KCN, NaN₃ 添加培地に培養した菌体では、対照培地に培養したものと各基質に於ける O₂ 消費量は殆んど差異がなく、3 × 10⁻⁴M KCN 或は NaN₃ を添加したものは一般に各基質共 O₂ 消費量が小であるが、特に焦性ブドー酸を基質とした場合の O₂ 消費

第3図 培地への KCN, NaN₃ 添加と菌の
発育度の関係 (Sal. typhi 57)



が小である。

Sal. typhi 57 でも第8表の如く、これと同様の傾向であり、以上のことから $3 \times 10^{-4}M$ 或はそれ以下

上の KCN, 又は NaN_3 を添加した培地に発育したものは発育度も著しく不良であり、カタラーゼ活性も欠いているが、それと同時に O_2 消費より見た酵素的性状も対照菌と若干相違しているのに対し、 $KCN, NaN_2 \frac{1}{3} \times 10^{-4}M \sim 10^{-4}M$ 添加培地では発育度は余り不良ではなく、 O_2 消費量も対照菌と大差なく、ただカタラーゼ活性を欠くのみである。

3. 培地への α, α' -チピリデル, オキシシン添加の影響

α, α' -チピリデル或はオキシシンは Fe イオンと醋塩を作ることが知られているので、これ等を加えて微量の Fe イオンを除去した培地に継代した菌体のカタラーゼ活性を対照培地に培養したものと比較した。

前記基礎培地の硫酸第一鉄の代りに α, α' -チピリデル (10, 20, 40 mg/l) 或はオキシシン (15, 30, 60 mg/l) を添加した培地を作り、これらに供試菌を継代して、5代目の菌の発育曲線を作成し、同時にその20時間培養の菌体を集めてカタラーゼ活性並びにグルコース、乳酸、焦性ブドウ酸、コハク酸を基質とした O_2 消費量を測定して比較した。

発育曲線は Sh. flexneri 2a に於ては第4図の如くであり、 α, α' -チピリデル 10 mg/l, 又はオキシ

第7表 KCN, NaN₃ 添加培地に培養した菌の酵素活性
Sh. flexneri 2a

培地への添加物	対照 (添加物なし)	KCN			NaN ₃		
		$1/3 \times 10^{-4}M$	$10^{-4}M$	$3 \times 10^{-4}M$	$1/3 \times 10^{-4}M$	$10^{-4}M$	$3 \times 10^{-4}M$
カタラーゼ活性 (O_2 発生 μl)	192	25	6	4	16	5	5
O_2 消費(μl) 基質なし	24	28	23	20	31	24	17
" グルコース	275	267	246	213	292	273	207
" 乳酸	325	336	320	265	338	317	254
" 焦性ブドウ酸	173	192	164	87	180	147	107

第8表 KCN, NaN₃ を添加した培地に培養した菌の酵素活性
Sal. typhi 57

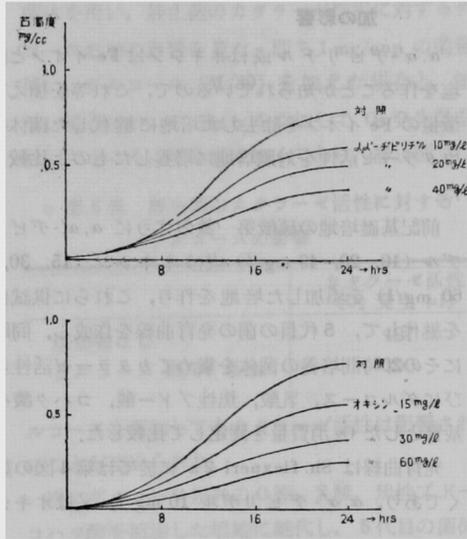
培地への添加物	対照 (添加物なし)	KCN			NaN ₃		
		$1/3 \times 10^{-4}M$	$10^{-4}M$	$3 \times 10^{-4}M$	$1/3 \times 10^{-4}M$	$10^{-4}M$	$3 \times 10^{-4}M$
カタラーゼ活性 (O_2 発生 μl)	247	8	31	21	29	20	9
O_2 消費(μl) 基質なし	32	35	28	27	40	37	30
" グルコース	302	347	268	204	276	228	179
" 乳酸	326	305	287	182	307	256	205
" 焦性ブドウ酸	214	226	184	110	240	217	107

ン 15 mg/l 添加で発育はかなり不良となり、それ以上の濃度では著明に抑制される。

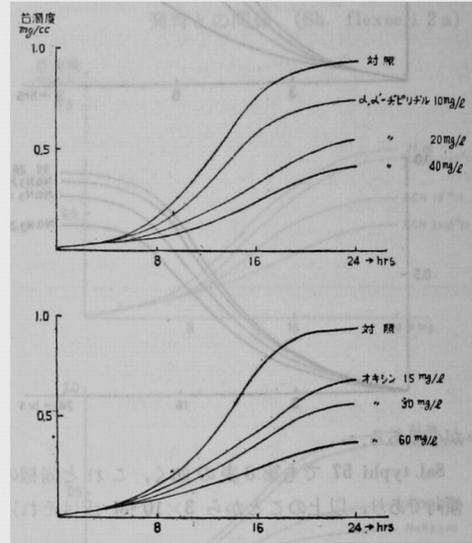
又各培地発育菌のカタラーゼ活性、O₂消費量は第9表の如くであり、 α, α' -チピリヂル 10 mg, 20 mg/l, オキシシン 15 mg, 30 mg/l 添加培地培養

菌体はカタラーゼ活性は対照菌と余り大差なく、 α, α' -チピリヂル 40 mg/l, オキシシン 60 mg/l 添加培地培養菌体はかなりのカタラーゼ活性低下が見られ、O₂消費量は α, α' -チピリヂル 20 mg/l 以上、オキシシン 30 mg/l 以上添加した培地に養した菌

第4図 培地えの α, α' -チピリヂル, オキシシン添加と菌の発育との関係
Sh. flexneri 2a



第5図 培地えの α, α' -チピリヂル, オキシシン添加と菌の発育との関係
Sal. typhi 57



第9表 α, α' -チピリヂル, オキシシンを添加した培地に培養した菌の酵素活性
Sh. flexneri 2a

培地えの添加物	対 照 (添加物なし)	α, α' -チピリヂル			オ キ シ ン		
		10 mg/l	20 mg/l	40 mg/l	15 mg/l	30 mg/l	60 mg/l
カタラーゼ活性 (O ₂ 発生 μ l)	220	217	192	87	256	240	216
O ₂ 消費(μ l) 基質なし	32	30	28	20	29	30	19
〃 グルコース	265	242	220	196	252	217	208
〃 乳 酸	307	260	192	152	276	226	174
〃 焦性ブドー酸	212	196	127	77	188	154	82

第10表 α, α' -チピリヂル, オキシシンを添加した培地に培養した菌の酵素活性
Sal. typhi 57

培地えの添加物	対 照 (添加物なし)	α, α' -チピリヂル			オ キ シ ン		
		10 mg/l	20 mg/l	40 mg/l	15 mg/l	30 mg/l	60 mg/l
カタラーゼ活性 (O ₂ 発生 μ l)	262	252	260	249	280	251	237
O ₂ 消費(μ l) 基質なし	40	37	30	27	37	29	31
〃 グルコース	319	285	266	247	261	240	216
〃 乳 酸	330	342	277	216	307	238	182
〃 焦性ブドー酸	278	207	167	92	247	181	89

体では一般に对照菌に比し小であり、特に焦性ブドウ酸を基質とした O_2 消費は著しく小である。

Sal. typhi 57 では発育曲線は第5図の如くであり、やはり α, α' -デピリヂル 10 mg/l, オキシシン 15 mg/l の添加により発育はやや不良となり、それ以上の濃度では著明に発育が抑制される。

各培地に培養した菌体のカタラーゼ活性は第10表の如く α, α' -デピリヂル 40 mg/l, オキシシン 60 mg/l 添加培地に発育した菌体もカタラーゼ活性の低下は比較的小であり、それ以下の濃度に添加した培地に発育した菌体は对照と殆んど差異が見られない。

O_2 消費量は同表の如くであり、 α, α' -デピリヂル 10 mg/l, オキシシン 15 mg/l 添加培地培養菌体も焦性ブドウ酸々化能は对照菌体より若干低下しており、それ以上の濃度に添加したものでは著明な低下が認められる。

従つてこれらのことから培地への α, α' -デピリヂル或はオキシシンの添加によつては、かなり高濃度でないとカタラーゼ活性の低下は見られず、それより先に O_2 消費能に変化が現われることが認められる。

而して Sal. typhi 57 は Sh. flexneri 2a よりも更にカタラーゼ活性の低下は困難である。

IV. 総括及び考案

菌の酵素的性状は培養条件に支配されるところが大きい。本編に於ては Sh. flexneri 2a, Sal. typhi 57 を供試菌としてそのカタラーゼ活性に対する培地条件を検討した。

グルコースその他のC源を添加した培地(ブイオン)に培養した菌体のカタラーゼ活性を見ると、焦性ブドウ酸、乳酸、コハク酸を添加した培地の場合は对照培地(C源無添加のブイオン)に培養したものとカタラーゼ活性は殆んど差異は見られないが、グルコース添加培地培養菌体ではカタラーゼ活性が減弱する傾向が見られる。

而して培地中のグルコース濃度の大な程カタラーゼ活性の減弱は大となり、グルコース 5g/l の添加では著明な減弱が認められる。

このようなカタラーゼ活性の低下は、培地にグルコースを添加することによる菌の発育の相違、即ち発育に於ける phase が異なることによるものではなく、グルコース添加により発育途次培地 pH が低下することによるものでもなく、又グルコースがカタ

ラーゼ作用そのものを阻害するものでもないことは上記各実験から明らかであり、グルコース添加培地に於て菌がエネルギー源として主としてグルコースを利用することによると見做される。即ちグルコース添加培地に培養した菌の酵素的性状を見ると、焦性ブドウ酸の酸化能が著しく低下しており、この菌のエネルギー獲得は主としてグルコース→焦性ブドウ酸の間の酸化反応で行われ、 O_2 消費が活発でないと思像される。

従つて物質代謝に於ける H_2O_2 産生は对照培地のものに比し小であり、菌体はカタラーゼ活性を余り必要としないため、漸次活性低下が起るのではないかと想像される。

次にカタラーゼの阻害剤として知られている KCN, NaN_3 を添加した培地に培養した菌体について見る。

これら阻害剤の培地への添加濃度を種々かえて、菌のカタラーゼ活性及び O_2 消費量を比較すると、両供試菌とも KCN, NaN_3 濃度が $3 \times 10^{-4}M$ 以上の場合には菌体はカタラーゼ活性を欠くと同時に、 O_2 消費量も对照培地のものと相異しており、焦性ブドウ酸を基質とした O_2 消費が著しく小であるが、 $\frac{1}{3} \times 10^{-4}M \sim 10^{-4}M$ では発育も余り影響されず、 O_2 消費量も殆んど変化なく、ただカタラーゼ活性のみを失っている。

このような菌体の酵素的性状については後編に於て 2, 3 検討する予定である。

次に Fe イオンと銻塩を作ることによりこれを除去することが知られている α, α' -デピリヂル及びオキシシンを添加した培地に培養した菌体について見る。

これらの 10~15 mg/l の添加で両供試菌とも発育は若干抑制され、それ以上の濃度では著明に抑制される。

而して 20 mg/l の α, α' -デピリヂン、又は 30 mg/l のオキシシンを添加した培地に発育した菌体では一般に O_2 消費は小であり、特に焦性ブドウ酸を基質とした O_2 消費が小であるが、カタラーゼ活性の低下は余り著しくなく、40~60 mg/l の添加では O_2 消費能は著しく低下し、Sh. flexneri 2a では同時にカタラーゼ活性の低下が認められるが、Sal. typhi 57 ではカタラーゼ活性の低下はそれほど著しくない。

このように Sh. flexneri 2a では阻害剤の添加濃度を大にするとカタラーゼ活性の低下が見られるが、他の酵素活性もこれにとまつて変化することはま

ぬがれられず、これは α, α' -チピリヂル、オキシンは Fe イオンを除去することによりカタラーゼの合成を阻害するため、カタラーゼ合成を阻害するより前に Fe イオンを必要とする他の酵素の作用を阻害し、従つて発育その他の新陳代謝が阻害されることによると考えられる。

V. 結 言

Sh. flexneri 2a, Sal. typhi 57 を供試菌とし、菌体カタラーゼ活性に対する培地添加物の影響を検討して次の成績を得た。

1. 培地への乳酸、焦性ブドウ酸、コハク酸等の添加はカタラーゼ活性に殆んど影響を及ぼさないが、グルコース添加によつてはカタラーゼ活性は低下する。

2. KCN, NaN_3 ($\frac{1}{8} \times 10^{-4}\text{M} \sim 10^{-4}\text{M}$) 添加ではカタラーゼ活性は著明に低下するが、他の酵素活性は殆んど変化しない。

3. α, α' チピリヂル、オキシリン (40~60 mg/l) 添加では焦性ブドウ酸々化能は著しく低下し、Sh. flexneri 2a の場合のみは同時にカタラーゼ活性も低下する。

第 2 編 カタラーゼを失つた菌のグルコース、アラニンの酸化

I. 結 言

グルコース、アラニンその他の物質の酸化系の酵素反応に於ては H_2O_2 が生成し、カタラーゼが存在しないと生成した焦性ブドウ酸は H_2O_2 により自動的に酸化されることは周知の通りである。

細菌でも肺炎双球菌、連鎖球菌などではカタラーゼを欠き、静止菌に於てもグルコースの酸化途次生成する H_2O_2 のため、一方に於て生成した焦性ブドウ酸は逐次酸化されて行く。又この際カタラーゼを欠く赤血球を加えて置くとヘモグロビンが酸化されてメトヘモグロビンとなる。

ところが Sh. dysenteriae に属するある菌ではカタラーゼを欠くに拘わらず、焦性ブドウ酸、メトヘモグロビンの酸化は認められず¹⁰⁾、 H_2O_2 の生成はないと考えざるを得ない。

本編では Sh. flexneri 2a の KCN, NaN_3 を添加した培地に培養したカタラーゼ活性を失わしめた菌体及びカタラーゼを有する原株につき、Sh. dysenteriae 4, D. pneumoniae II と比較しながら、グルコース、アラニンの酸化に於ける量的関係、ヘモグロビンに対する影響などを検討した。

II. 実験材料及び実験方法

供試菌： Sh. flexneri 2a, Sh. dysenteriae 4, D. pneumoniae II 型の教室保存株。

静止生菌浮游液の調製： 培地より集めた菌体を磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.2) を以て 2 回遠沈洗滌した後、同緩衝液に浮游した。

菌量は光電比濁計で濁度を測定し、あらかじめ作成した標準曲線と対比して決定した。

凍結乾燥菌の調製： 培地より集めた菌体を 2 回遠沈洗滌後、少量の蒸留水を加え、東京応用物理研究所製 RL-1000 型凍結乾燥機により乾燥した。

使用に当つては乾燥重量を測定し、緩衝液に浮游した。

O_2 消費量の測定： ワールブルグ検圧計を用い常法に従つた。

カタラーゼ活性の測定： 前編同様ワールブルグ検圧計を用い、菌液に H_2O_2 を加えて 5 分間に発生する O_2 量を測定し比較した。

ペルオキシダーゼ活性の測定： Main & Shinn¹¹⁾ の H_2O_2 定量法を逆に応用し、菌液 1.0 cc (湿菌量 10 mg, 乾燥菌の場合は乾燥重量 2.5 mg) に o-トリヂン氷醋酸溶液 0.25 cc (o-トリヂンが 10^{-2}M となるようにする)、 H_2O_2 0.25 cc (10^{-3}M となるように) を混じ室温に放置し、10 分の青色発色により比較、+、- 等の符号を以てペルオキシダーゼ活性を示した。

グルコースの定量： 3,5-ジニトロサルチル酸を用いる比色法¹²⁾ によつた。

乳酸の定量： p-ヒドロキシシフェニルを用いる比色法¹³⁾ によつた。

焦性ブドウ酸の定量： 2,4-ジニトロフェニルヒドラゼンを用いる比色法¹⁴⁾ によつた。

サク酸の定量： 試料溶液を水蒸気蒸溜し、溜出液を 0.01 N NaOH を以て滴定した。

H_2O_2 の定量： Main & Shinn¹¹⁾ の方法によつた。即ち試料 1.0 cc に 10% o-トリヂン氷醋酸溶液 2 滴及びじやがいもよりのペルオキシダーゼ抽出液 6 滴を加え、10 分後の青色発色を比色し、 H_2O_2 標準曲線と対比して定量した。

ヘモグロビン、メトヘモグロビンの吸収曲線の記録：ベックマン自記式分光光度計によつた。

Ⅲ. 実験成績

1. 各菌のカタラーゼ、ペルオキシダーゼ活性及びグルコース、アラニンの酸化に於ける量的関係

一般に細菌の生菌体ではグルコース、アラニンなどは酸化されて焦性ブドウ酸となり、生成した焦性ブドウ酸は更に酸化されて漸次消失して行く場合が多く、*Sh. flexneri* 2a, *Sh. dysenteriae* 4 の供試菌でもそれが見られるが、凍結乾燥した菌体を用いると、焦性ブドウ酸以下の酸化能は著しく低下しており、グルコース、アラニンの酸化は焦性ブドウ酸で殆んど停止し、焦性ブドウ酸の蓄積が見られる¹⁰⁾。

従つてグルコース、アラニンの酸化に於ける量的関係を検討する実験では凍結乾燥菌体を用いるのが便利の場合があり、本実験に於ても主として凍結乾燥菌体を用いることとした。

先づ以下の実験に用いる供試菌 *Sh. flexneri* 2a の普通寒天に培養した菌体及び KCN, NaN₃ を加えた普通寒天に培養した菌体並びに *Sh. dysenteriae* 4, *D. pneumoniae* II の普通寒天に培養した菌体及びそれら各菌の凍結乾燥したもののカタラーゼ活性、ペルオキシダーゼ活性を比較した。

カタラーゼ活性の測定はワールブルグ検圧計を用い、生菌では湿菌量 1mg/cup, 乾燥菌では乾燥菌量 0.25 mg/cup とし、H₂O₂ を加えてから 5 分間に発生する O₂ 量を以て比較した。

結果は第11表の如くであり、*Sh. flexneri* 2a では

第11表 各培地に培養した生菌、凍結乾燥菌のカタラーゼ活性

菌	培 養	カタラーゼ活性 (O ₂ 発生 μl)	
		生 菌	乾燥菌
<i>Sh. flexneri</i> 2a	普通寒天	205	186
	KCN 添加 普通寒天	27	24
	NaN ₃ 添加 普通寒天	11	20
<i>Sh. dysenteriae</i> 4	普通寒天	6	5
	KCN 添加 普通寒天	2	2
	NaN ₃ 添加 普通寒天	3	2
<i>D. pneumoniae</i> II	家兔血液加 普通寒天	7	7

普通寒天培養菌体は生菌、乾燥菌共著明なカタラーゼ活性を有し、凍結乾燥してもカタラーゼ活性の低下は殆んど認められず、KCN, NaN₃ 添加培地に發育したものはカタラーゼ活性を殆んど失つている。又 *Sh. dysenteriae* 4, *D. pneumoniae* は何れもカタラーゼ活性を殆んど全く欠いている。

ペルオキシダーゼ活性を H₂O₂, o-トリデン添加による青色発色より比較すると第12表の如くであり、

第12表 各培地に培養した生菌、凍結乾燥菌のカタラーゼ活性

菌	培 地	ペルオキシダーゼ活性 (青色発色)	
		生 菌	乾燥菌
<i>Sh. flexneri</i> 2a	普通寒天	±	±
	KCN 添加 普通寒天	—	—
	NaN ₃ 添加 普通寒天	—	—
<i>Sh. dysenteriae</i> 4	普通寒天	++	++
	KCN 添加 普通寒天	—	—
	NaN ₃ 添加 普通寒天	—	—
<i>D. pneumoniae</i> II	家兔血液加 普通寒天	±	±

Sh. flexneri 2a, *D. pneumoniae* II は普通寒天培養のものも生菌、乾燥菌共ペルオキシダーゼ活性は極めて微弱であり、*Sh. dysenteriae* 4 は普通寒天培養菌体ではかなり著明なペルオキシダーゼ活性を示すが、KCN, NaN₃ 添加培地に培養したものは殆んどこれを失つている。

次に *Sh. flexneri* 2a 普通寒天培養菌体を用い、そのカタラーゼ活性に対する KCN, NaN₃ の影響を濃度別に見、更にグルコース、アラニンを基質とした O₂ 消費 (1時間値) に対する影響をも見て比較した。

カタラーゼ活性の測定では生菌は湿菌量 1mg/cup, 乾燥菌は 0.25 mg/cup とし、O₂ 消費測定では生菌は湿菌量 20 mg/cup, 乾燥菌は 40 mg/cup とし、KCN, NaN₃ は各々 10⁻⁴M, 10⁻³M, 基質濃度は 10⁻²M となるようにした。

結果は第13表の如くであり、カタラーゼ作用は生菌、乾燥菌共に 10⁻³M の KCN, NaN₃ では勿論、10⁻⁴M の KCN, NaN₃ によつて著明に抑制されるが、これに対しグルコース或はアラニンを基質とした O₂ 消費は 10⁻³M の KCN, NaN₃ ではかなり抑

第13表 静止生菌、凍結乾燥菌のカタラーゼ活性、O₂消費に対する KCN, NaN₃の影響 (Sh. flexneri 2a)

A カタラーゼ活性

	カタラーゼ活性 (O ₂ 発生 μl)	
	生 菌	乾 燥 菌
阻害剤なし	197	175
KCN 10 ⁻⁴ M	26	17
" 10 ⁻³ M	9	17
NaN ₃ 10 ⁻⁴ M	17	15
" 10 ⁻³ M	5	6

B O₂消費

	O ₂ 消費 μl	
	生 菌	乾 燥 菌
グルコース	286	245
" + KCN 10 ⁻⁴ M	298	256
" + " 10 ⁻³ M	60	31
" + NaN ₃ 10 ⁻⁴ M	287	240
" + " 10 ⁻³ M	196	185
アラニン	222	217
" + KCN 10 ⁻⁴ M	235	242
" + " 10 ⁻³ M	52	37
" + NaN ₃ 10 ⁻⁴ M	230	205
" + " 10 ⁻³ M	97	75

制されるが 10⁻⁴M の KCN, NaN₃ では殆んど影響されず、むしろ若干の促進が見られる。

又 Sh. dysenteriae 4 の普通寒天培養菌体を用い、そのペルオキシダーゼ活性及びグルコース、アラニンを基質とした O₂消費に対する KCN, NaN₃の影響を見ると第14表の如くであり、生菌、乾燥菌共にペルオキシダーゼ作用は 10⁻⁴M の KCN, NaN₃ によつて著明に抑制されるが、グルコース、アラニンを基質とした O₂消費はこの濃度 (10⁻⁴M) の KCN, NaN₃ によつては全く阻害されない。

以上の如く KCN, NaN₃ は 10⁻⁴M ではカタラーゼ作用を著明に抑制するが、O₂消費には殆んど影響を及ぼさないことが認められたので、普通寒天培養 Sh. flexneri 2a の凍結乾燥菌体 (カタラーゼ有) を用い、グルコース、アラニンの酸化に於ける

第14表 静止生菌、凍結乾燥菌のペルオキシダーゼ活性、O₂消費に対する KCN, NaN₃の影響 (Sh. dysenteriae 4)

A ペルオキシダーゼ活性

	ペルオキシダーゼ活性 (青色発色)	
	生 菌	乾 燥 菌
阻害剤なし	+	+
KCN 10 ⁻⁴ M	±	±
" 10 ⁻³ M	-	-
NaN ₃ 10 ⁻⁴ M	±	-
" 10 ⁻³ M	-	-

B O₂消費

	O ₂ 消費 μl	
	生 菌	乾 燥 菌
グルコース	279	262
" + KCN 10 ⁻⁴ M	292	277
" + " 10 ⁻³ M	59	50
" + NaN ₃ 10 ⁻⁴ M	287	275
" + " 10 ⁻³ M	112	107
アラニン	198	212
" + KCN 10 ⁻⁴ M	209	223
" + " 10 ⁻³ M	45	40
" + NaN ₃ 10 ⁻⁴ M	220	230
" + " 10 ⁻³ M	57	48

量的関係と、これに対する 10⁻⁴M KCN, NaN₃の影響を検討した。即ちこれら阻害剤はワールブルグ検圧計容器の主宰に菌液 (乾燥菌量 40 mg/cup) と共に入れ、あらかじめよく接触せしめてから15分後に側室より基質を M/100 となるよう加え、1時間振盪して O₂消費量を測定した後、遠沈上清について基質消費量、H₂O₂生成量、分解産物としての乳酸、焦性ブドウ酸、サク酸生成量を夫々測定した。

グルコースを基質とした場合には第15表の結果であり、O₂消費、グルコース消費は阻害剤無添加の対照と KCN, NaN₃添加の場合とで大差なく、又 H₂O₂生成は何れの場合にも認められないが、対照では焦性ブドウ酸生成が著しく大であるのに対し、KCN, NaN₃添加により小となり、代りにサク酸の

第 15 表 グルコース酸化に於ける量的関係に対する KCN, NaN₃ の影響
Sh. flexneri 2a 凍結乾燥菌

基質・阻害剤	定量値 $\mu\text{M}/3\text{cc}$	O ₂ 消費	グルコース消費	H ₂ O ₂ 生成	乳酸生成	焦性ブ生成	サク酸生成
グルコース		11.8	14.0	0	1.0	16.5	2.0
〃 + KCN 10 ⁻⁴ M		12.6	14.0	0	3.5	3.0	7.0
〃 + NaN ₃ 10 ⁻⁴ M		12.5	13.5	0	0.5	3.5	11.5

生成が大となる。

アラニンを基質とした場合は第16表の如くであり、O₂ 消費は KCN, NaN₃ 添加により殆んど影響されず、アラニン消費量の測定は精度の高い定量法がないため行わなかつたが、クロマトグラフィーに於ける spot の大きさより判定すると、アラニン消費量

は KCN, NaN₃ 添加に於ても対照と大差ないものと推定され、又 H₂O₂ は何れの場合にも蓄積されないが、焦性ブドー酸生成は対照では著しく大であるのに対し、KCN, NaN₃ 添加に於ては小となり、代りにサク酸の生成が著明に大となることが認められた。

第 16 表 アラニン酸化に於ける量的関係に対する KCN, NaN₃ の影響
Sh. flexneri 2a 凍結乾燥菌

基質・阻害剤	定量値 $\mu\text{M}/3\text{cc}$	O ₂ 消費	H ₂ O ₂ 生成	乳酸生成	焦性ブ生成	サク酸生成
アラニン		9.2	0	1.0	10.0	1.5
+ KCN 10 ⁻⁴ M		9.7	0	1.5	2.0	3.5
+ NaN ₃ 10 ⁻⁴ M		9.0	0	0.5	2.0	8.0

次に Sh. flexneri 2a, Sh. dysenteriae 4 の普通寒天培養菌及び KCN, NaN₃ 添加培地培養菌、並びに D. pneumoniae II 家兎血液加普通寒天培養菌の各凍結乾燥菌体を用い、グルコース、アラニンの酸化に於ける量的関係を比較した。

菌量その他はすべて上記実験と同様にして行つた。結果はグルコースを基質とした場合は第17表に一括して示した如くであり、Sh. flexneri 2a では普通寒天培養菌はグルコースよりの焦性ブドー酸生成が著しく大であるのに対し、KCN 或は NaN₃ 添加

培地に培養した菌では焦性ブドー酸生成は小であり、サク酸生成が大となつている。H₂O₂ 生成は各菌体共認められない。

Sh. dysenteriae 4 では普通寒天培養菌はやはりグルコースよりの焦性ブドー酸生成量が著しく大であり、かつ KCN 或は NaN₃ 添加培地に培養した菌でもかなりその生成が大であり、普通寒天培養のものより僅かに小であるにすぎず、サク酸生成量も著明な差異はなく、前述の Sh. flexneri 2a の場合とはこの点が異つている。H₂O₂ 生成はやはり各菌体

第 17 表 各培地に培養した菌のグルコース酸化
凍結乾燥菌

菌種	培地	カタラーゼ活性	O ₂ 消費	グルコース消費	H ₂ O ₂ 生成	乳酸生成	焦性ブ生成	サク酸生成
Sh. flexneri 2a	普通寒天培地	卅	12.4	14.0	0	1.5	15.0	1.5
	KCN 添加 〃	±~	11.7	13.5	0	3.0	3.5	5.5
	NaN ₃ 添加 〃	±~	10.6	13.5	0	0	3.0	10.0
Sh. dysenteriae 4	普通寒天培地	+	10.9	12.5	0	0.5	12.0	2.0
	KCN 添加 〃	-	11.3	13.0	0	2.0	10.5	4.0
	NaN ₃ 添加 〃	-	10.5	12.0	0	0	10.5	5.5
D. pneumoniae II	普通寒天	-	9.7	11.5	2.0	0	2.0	10.5

共全く認められない。

D. pneumoniae II の血液寒天培養菌では、 H_2O_2 の生成が明らかに認められ、グルコースよりの焦性ブドウ酸蓄積は小であり、かつサク酸の生成が大である。

アラニンを基質とした場合にも第18表の如く、グルコースの場合と同様であつて、*Sh. flexneri* 2a では普通寒天培養のものは焦性ブドウ酸生成が大であるが、KCN, $NaNO_3$ 添加培地培養のものは小であり、代りにサク酸生成が大となつている。

第 18 表 各培地に培養した菌のアラニン酸化
凍 結 乾 燥 菌

		カタラーゼ 活 性	O_2 消費	H_2O_2 生成	乳酸生成	焦 性 ブ 生 成	サ ク 酸 生 成
<i>Sh. flexneri</i> 2a	普通寒天培地	+++	8.5	0	1.0	9.5	1.0
	KCN 添加 "	—	7.5	0	2.0	2.5	2.5
	$NaNO_3$ 添加 "	—	8.0	0	0.5	1.5	7.0
<i>Sh. dysenteriae</i> 4	普通寒天培地	—	7.0	0	0.5	8.0	2.0
	KCN 添加 "	—	7.5	0	1.0	5.0	3.5
	$NaNO_3$ 添加 "	—	7.0	0	0	5.5	3.5
<i>D. pneumoniae</i> II	普通寒天培地	—	1.5	0.5	1.0	0.5	0.5

又 *Sh. dysenteriae* 4 では焦性ブドウ酸、サク酸生成量は普通寒天培養菌、KCN, $NaNO_3$ 添加培地培養菌間に *Sh. flexneri* 2a に於ける程の大差は認められない。

D. pneumoniae II ではアラニン酸化能は極めて小であるため、その量的関係は明らかにしえなかつた。

以上のことから *Sh. flexneri* 2a で KCN, $NaNO_3$ 添加培地に培養してカタラーゼを失わせた菌、或は普通寒天培養の菌（カタラーゼを有す）でも反応時 KCN, $NaNO_3$ を加えてカタラーゼ活性を抑制して置くとグルコース、アラニンの酸化に於て生成した焦性ブドウ酸は同時に生成する H_2O_2 によつて自動的に酸化されてサク酸となることがうかがわれ、*D. pneumoniae* II では血液加普通寒天培養菌もカタラーゼを有せず、かつグルコース酸化途次著明な H_2O_2 を生成するので、生成した焦性ブドウ酸は直ちに酸化されてサク酸になるが、*Sh. dysenteriae* 4 では普通寒天培養菌、KCN, $NaNO_3$ 添加培地培養菌は共にカタラーゼを有しないに拘わらず、グルコース、アラニンの酸化に於て著量の焦性ブドウ酸の生成が認められ、*Sh. flexneri* 2 の KCN, $NaNO_3$ 添加培地培養菌、或は *D. pneumoniae* II とは異つていることがうかがわれる。

2. 有及び無カタラーゼ菌体の赤血球に対する影響

カタラーゼを有する赤血球及びこれを欠く赤血球に対する有カタラーゼ菌体並びに無カタラーゼ菌体の代謝時の作用を以下に検討した。

有カタラーゼ血液としては家兎血液、無カタラーゼ血液としては無カタラーゼ症患者血液を脱線維して用いた。

先づ普通寒天にこれら血液を2%となるように加えた培地及びこれに更に KCN 又は $NaNO_3$ を $10^{-4}M$ となるように加えた培地を作り、各培地に *Sh. flexneri* 2a (有カタラーゼ)、*Sh. dysenteriae* 4 (無カタラーゼ)、*D. pneumoniae* II (無カタラーゼ) を夫々コロニーの現われるように接種し、 $37^\circ C$ 、24時間培養し、メトヘモグロビン (MetHb と略す) 環及び脱色環の生成状況を観察した。

有カタラーゼ血液加培地に於ける成績は第19表の如くであり、阻害剤無添加の培地では *D. pneumoniae* II に於て MetHb 環、脱色環の生成が見られるのみで、他の菌では認められず、KCN, $NaNO_3$ 添加培地では *D. pneumoniae* II の他 *Sh. flexneri* 2a でもかなり明瞭に認められるが、*Sh. dysenteriae* 4 ではこれらの環の出現は僅かである。

無カタラーゼ血液添加培地では第20表の如くであり、阻害剤無添加の培地では *D. pneumoniae* II は著明に MetHb 環、脱色環を生成し、他の菌では生成せず、KCN, $NaNO_3$ 添加培地では有カタラーゼ血液加培地に於けるとほぼ同様で *D. pneumoniae* II では著明な、又 *Sh. flexneri* 2a でもかなりの MetHb 環、或は脱色環を生成し、*Sh. dysenteriae* 4 では比較的僅かである。

次に *Sh. flexneri* 2a の普通寒天培養菌 (有カタラーゼ)、KCN 或は $NaNO_3$ ($10^{-4}M$) 添加普通寒天

第 19 表 有カタラーゼ血液加培地に於けるメトヘモグロビン生成及びこれに対する KCN, NaN₃ の影響

培地	Sh. flexneri 2a		Sh. dysenteriae		D. pneumoniae II	
	Met Hb 環	脱色環	Met Hb 環	脱色環	Met Hb 環	脱色環
血液加普通寒天	—	—	—	—	±	±
“ +KCN	++	+	±	—	++	+++
“ +NaN ₃	++	+	±	—	++	+++

KCN, NaN₃ : 10-4M

第 20 表 無カタラーゼ血液加培地に於けるメトヘモグロビン生成及びこれに対する KCN, NaN₃ の影響

培地	Sh. flexneri 2a		Sh. dysenteriae 4		D. pneumoniae II	
	Met Hb 環	脱色環	Met Hb 環	脱色環	Met Hb 環	脱色環
血液加普通寒天	±	±	±	±	++	++
“ +KCN	++	+	±	±	++	+++
“ +NaN ₃	++	+	±	±	++	+++

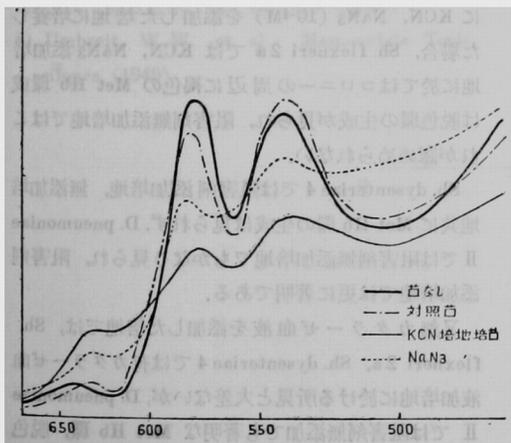
KCN, NaN₃ : 10-4M

培養菌（無カタラーゼ）を用い、その静止生菌によるグルコース、アラニンの酸化途次に於ける無カタラーゼ赤血球に対する影響を見た。即ち各培地に20時間培養した菌体を洗滌して静止菌とし

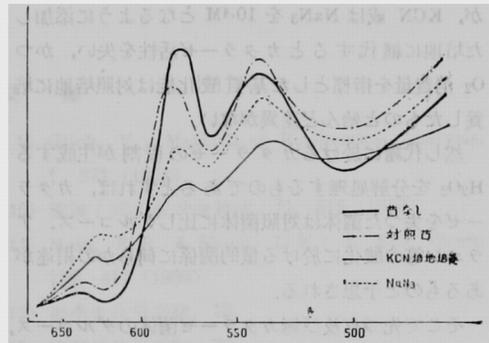
- 菌液（湿菌量 20 mg）……………1.0 cc
- 基質（M/100 となるように）……0.5 cc
- 無カタラーゼ赤血球浮游液（100倍稀釈となるように）……0.5 cc

を中試験管に入れて1時間振盪した後、1,000r. p. m., 5分間遠沈し、沈渣（赤血球を含む）に蒸留水を加

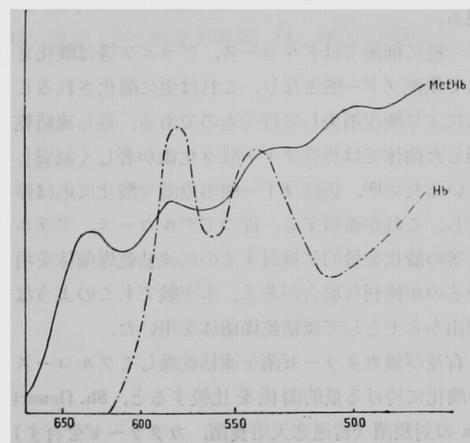
第 6 図 各培地培養菌のグルコース酸化途次に於ける Hb の変化（反応後の吸収曲線）



第 7 図 各培地培養菌のアラニン酸化途次に於ける Hb の変化（反応後の吸収曲線）



第 8 図 Hb, MetHb の標準吸収曲線



えて溶血せしめた後、更に 5,000 r. p. m., 10 分間遠沈して菌体その他を除き、上清を蒸留水で適當濃度に稀釈して分光光度計を用いて吸収曲線を記録した。

なお比較のため菌無添加の場合についても同様に操作した。

グルコースを基質とした場合には第 6 図の如き吸収曲線がえられ、標準曲線 (第 9 図) と対比して検討すると、菌無添加では Hb の吸収曲線と殆んど一致しており、対照培地培養菌に於ても Hb の吸収曲線に近いが、KCN 或は NaN_3 を添加した培地に培養した菌体では Hb の吸収曲線とは異なり、Met Hb の曲線に近いものがえられる。

アラニンを基質とした場合にも第 8 図の如く同様であり、カタラーゼを有する対照菌体では Hb は殆んど変化をうけないが、カタラーゼを欠く KCN, NaN_3 添加培地培養菌体では Hb は酸化されて Met Hb になることが推定される。

IV. 総括及び考案

Sh. flexneri 2a はカタラーゼを有する菌であるが、KCN 或は NaN_3 を 10^{-4}M となるように添加した培地に継代するとカタラーゼ活性を失い、かつ O_2 消費量を指標とした基質酸化能は対照培地に培養したものと殆んど差異がない。

然し代謝に於けるカタラーゼの役割が生成する H_2O_2 を分解処理するものであるとすれば、カタラーゼを失った菌体は対照菌体に比しグルコース、アラニン等の酸化に於ける量的関係に何らかの相違があるものと予想される。

そこで先づ有及び無カタラーゼ菌体のグルコース、アラニンの酸化に於ける量的関係を詳細に検討して見る。

一般に細菌ではグルコース、アラニン等は酸化されて焦性ブドウ酸となり、これは更に酸化されることにより漸次消失して行くものである。然し凍結乾燥した菌体では焦性ブドウ酸々化能が著しく減弱しているため¹⁵⁾、焦性ブドウ酸の段階で酸化反応は停止し、これが蓄積する。従つてグルコース、アラニン等の酸化を量的に検討するのに凍結乾燥菌体を用いるのが便利な場合がある。本実験でもこのような理由から主として凍結乾燥菌体を用いた。

有及び無カタラーゼ菌を凍結乾燥してグルコースの酸化に於ける量的関係を比較すると、*Sh. flexneri* 2a の対照菌 (普通寒天培養菌、カタラーゼを有す)

では焦性ブドウ酸蓄積が極めて大であるのに対し、KCN 或は NaN_3 添加培地培養菌 (無カタラーゼ) ではグルコース消費量は対照菌と大差ないに拘わらず、焦性ブドウ酸蓄積量は極めて小である。

アラニンを基質とした場合にも同様であり対照菌では焦性ブドウ酸蓄積が大なのに対し、カタラーゼを欠く KCN, NaN_3 添加培地培養菌では焦性ブドウ酸蓄積が小である。

又対照菌でも KCN, NaN_3 (10^{-4}M 程度) 添加に於てはグルコース、アラニンよりの焦性ブドウ酸の蓄積は阻害剤無添加に於けるより極めて小である。

これはカタラーゼを欠く菌体又は対照菌体でも KCN, NaN_3 を添加してカタラーゼ活性を抑制するとグルコース、アラニンの酸化途次生成する H_2O_2 の処理が困難となり生成した焦性ブドウ酸が H_2O_2 により酸化消滅するためと見做される。

Sh. dysenteriae 4 では対照菌体 (普通寒天培養) もカタラーゼを欠くがグルコース、アラニンより著量の焦性ブドウ酸を生成蓄積し、KCN, NaN_3 添加培地培養菌体でもその蓄積が大であり、もともと H_2O_2 産生は *Sh. flexneri* 2a に比し極めて小であると考えられ、物質代謝 (酸化) 機構がやや異つていると推定される。

又 *D. pneumoniae* II では対照菌体もカタラーゼを欠き、グルコースよりの (アラニンは殆んど酸化しない) 焦性ブドウ酸蓄積は小であり、 H_2O_2 の産生も明らかに認められる。

次に有及び無カタラーゼ菌の発育途次、並びに静止菌のグルコース、アラニン酸化途次に於ける有及び無カタラーゼ赤血球、特に血赤素 (Hb) に対する影響を検討する。

先づ有カタラーゼ血液を加えた普通寒天及びこれに KCN, NaN_3 (10^{-4}M) を添加した培地に培養した場合、*Sh. flexneri* 2a では KCN, NaN_3 添加培地に於てはコロニーの周辺に褐色の Met Hb 環或は脱色環の生成が見られ、阻害剤無添加培地ではこれが認められない。

Sh. dysenteriae 4 では阻害剤添加培地、無添加培地共に Met Hb 環の生成は見られず、*D. pneumoniae* II では阻害剤無添加培地でもかなり見られ、阻害剤添加培地では更に著明である。

又無カタラーゼ血液を添加した培地では、*Sh. flexneri* 2a, *Sh. dysenteriae* 4 では有カタラーゼ血液加培地に於ける所見と大差ないが、*D. pneumoniae* II では阻害剤無添加でも著明な Met Hb 環、脱色

環が出現する。

これらのことからカタラーゼを有する *Sh. flexneri* 2a は H_2O_2 を生成するがカタラーゼにより処理され Hb の酸化は殆んど起らず、KCN, NaN_3 を加えてカタラーゼ作用を抑制すると Hb は酸化されて Met Hb となり、更に酸化されると無色の物質となると見做され、これに対し *Sh. dysenteriae* 4 ではカタラーゼを有しないが、阻害剤添加、無添加に拘わらず Hb の酸化は殆んど起らず、 H_2O_2 の産生は無いか、極めて小であると考えられる。

次に *Sh. flexneri* 2a の対照培地培養菌（有力カタラーゼ）、KCN, NaN_3 添加培地培養菌（無カタラーゼ）を凍結乾燥し、グルコース、アラニンの酸化途次に於ける無カタラーゼ赤血球（特に Hb）に対する影響を比較すると対照培地培養菌では Hb の酸化は殆んど見られないが、KCN, NaN_3 添加培地培養菌では Hb は酸化されて Met Hb を生成することが認められ、 H_2O_2 は産生されることが推定される。

V. 結 言

Sh. flexneri 2a, *Sh. dysenteriae* 4, *D. pneumoniae* II を供試菌とし、有及び無カタラーゼ菌体の酵素的

性状、特にグルコース、アラニンの酸化に於ける量的関係を比較し、有及び無カタラーゼ赤血球、特にヘモグロビン (Hb) に対する影響を検討して次の成績をえた。

1. *Sh. flexneri* 2a では KCN, NaN_3 添加普通寒天培養菌体はカタラーゼを欠くため、グルコース、アラニン酸化途次 H_2O_2 の処理が不能であり、生成した焦性ブドウ酸が H_2O_2 により酸化される。¹¹ 又赤血球を添加して置くと Hb は酸化されて Met Hb となる。

2. *Sh. dysenteriae* 4 はカタラーゼを有せず、何れの培地に培養した菌体も H_2O_2 の生成はないか、極めて少い。

3. *D. pneumoniae* II はカタラーゼを欠き、かつ H_2O_2 の生成は極めて大である。

参 考 文 献

- 1) 藤田) 児玉: 日細菌学雑誌, 462, 555 (1934).
- 2) Sevag, M. G.: Biochem. Z., 267, 211 (1932).
- 3) Bernheim, F. & Bernheim, M. L. C.: J. Bact. 46, 225 (1941).
- 4) 河田: 岡山医学会雑誌, 70, 905 (1958).
- 5) 高原, 宮本: 耳鼻咽喉科, 21, 53 (1946).
- 6) 高原: 岡山医学会雑誌, 63, 1 (1951).
- 7) 上代: 総合医学, 12, 12, 915 (1955).
- 8) Umbreit, W. W. et al.: Manometric Techniques (1949).
- 9) Glick, V.: Methods of Biochemical Analysis, 1, 371 (1954).
- 10) 難波: 岡山医学会雑誌, 71, 815 (1959).
- 11) Main, E. R. & Shinn, L. E.: J. Biol. Chem, 128, 417 (1939).
- 12) 標準生化学実験, 18.
- 13) 標準生化学実験, 35.
- 14) 標準生化学実験, 36.
- 15) 渡辺: 岡山医学会雑誌, 71, 4471 (1959).

Studies on the Catalase Activity of Bacteria

By

Kenji AKIYAMA

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

Part I Effect of Added Substance to the Media on Catalase Activity

Using *Sh. flexneri* 2a and *Sal. typhi* 57 as test organism, the author studied the effect on catalase activity of bacteria by adding a certain kind of substance into culturing media. The following results were obtained.

- 1) The catalase activity was not influenced by the addition of lactate, pyruvate or succinate into media, but was decreased by addition of glucose.
- 2) A marked decrease in the catalase activity was observed by addition of KCN or NaN_3 , in dilution of $1/3 \times 10^{-4} \text{M}$; whereas no change in other enzyme activity was observed by the addition of these substance.
- 3) The addition of α , α' -dipyridyl or oxine, in dilutions of 20—30 mg/L, showed marked decrease in oxidative ability of bacteria of pyruvate, and the decrease in catalase activity was simultaneously observed only in *Sh. flexneri*.

Part II Oxidation of glucose and alanine by catalase deficient bacteria

Using *Sh. flexneri* 2a, *Sh. dysenteriae* 4 and *D. pneumoniae* II, the author studied the enzymatic properties of the catalase active and inactive bacterial cells mentioned above by means of volumetric studies of glucose and alanine oxidation and also studied the effect of these cells on normal or acatalasemic erythrocytes, especially on hemoglobin of the erythrocytes. The following results were obtained.

- 1) As the cells of *Sh. flexneri* 2a grown on KCN or NaN_3 added nutrient agar media was lacking catalase activity, the organism could not decompose H_2O_2 produced through the course of glucose or alanine metabolism. So formed pyruvate by the metabolism was oxidized by H_2O_2 inversely. And hemoglobin was oxidized to methemoglobin, when erythrocytes were added to the reaction media.
 - 2) *Sh. dysenteriae* 4 is failing catalase and the production of H_2O_2 was not detected at all or only scantily on the cells grown on any kind of media.
 - 3) *D. pneumoniae* II is also failing catalase, but the production of H_2O_2 was remarkably high.
-