

# 細菌のグルコース酸化に於ける阻害剤としての オーレオマイシンの利用

## 第 2 篇

### オーレオマイシン阻害の機序

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上栄教授）

泉 原 充 衛

〔昭和33年11月17日受稿〕

#### 目 次

I 緒 言	
II 実験材料及び実験方法	
III 実験成績	
1. オーレオマイシン阻害の Fe イオンによる回復	3. オーレオマイシンの阻害のチオニンによる回復の可否
2. KCN, NaN <sub>3</sub> 添加培地に発育した菌体の O <sub>2</sub> 消費に対するオーレオマイシンの影響	4. 菌のカタラーゼ, ペルオキシダーゼ作用に対するオーレオマイシンの影響
	IV 総括及び考案
	V 結 言
	参考文献

#### I. 緒 言

前篇に於ては細菌の C 源酸化特にグルコース, グルコン酸の酸化に於けるオーレオマイシンの阻害剤としての作用を検討し, オーレオマイシン添加によつてグルコースよりの乳酸, 焦性ブドウ酸蓄積及びグルコン酸よりの五炭糖蓄積が増大することを認め, グルコースよりの乳酸蓄積が増大するのはオーレオマイシンより焦性ブドウ酸以下の酸化が不円滑となり, 且つ基質より離脱した H の O<sub>2</sub> への伝達が阻害される結果と推定されることを述べた。

本篇に於ては更に一步を進め, オーレオマイシンによる O<sub>2</sub> 消費, 阻害の Fe イオン, 又はチオニンによる回復の可否, KCN, NaN<sub>3</sub> を加えた培地に馴らした菌体の O<sub>2</sub> 消費に対する AM の阻害効果を見, 又カタラーゼ, ペルオキシダーゼ作用に対する影響を検討した。

#### II. 実験材料及び実験方法

供試細菌 : Sh. flexneri 2a, Sh. flexneri 3a, Staphylococcus aureus, Staphylococcus albus (夫々 B 2a, B 3a, aureus, albus と略す) の教室保存の標準株

生菌浮游液の調製 : 培地より集めた菌体を磷酸緩衝液 (0.8% NaCl 加, pH 7.2) で 2 回遠沈洗滌し, 再び同じ組成の緩衝液に浮游せしめた。菌量は光電比濁計により測定し, あらかじめ作成した標準曲線と対比して決定した。

O<sub>2</sub> 消費量測定 : Warburg 検圧計を用い常法<sup>6)</sup>に従つた。

カタラーゼ活性の測定 : Warburg 検圧計を用い<sup>14)</sup>、試料溶液に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加し発生する O<sub>2</sub> 量を測定してカタラーゼ活性を比較した。

ペルオキシダーゼ活性の測定 : 試料溶液 1 ml に 10% トリジン水醋酸溶液 0.1ml, M/5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1ml を加えて生成する青色発色より比較した<sup>15)</sup>。

グルコース及びその分解産物の定量 : 前篇同様の方法によつた。

#### III. 実験成績

1. オーレオマイシン阻害の Fe イオンによる回復  
AM は Fe<sup>++</sup> 又は Fe<sup>+++</sup> と錯塩を形成するので AM による O<sub>2</sub> 消費の阻害が Fe<sup>++</sup> 又は Fe<sup>+++</sup> により回復される可能性が考えられる。そこでその成否をグルコース, 乳酸, 焦性ブドウ酸, を基質とした場合について検討した。

ワールブルグ検圧計を用い、(1)主室に菌液とAMを入れてあらかじめよく接触せしめ、15分後に側室から基質及び  $Fe^{++}$  (又は  $Fe^{+++}$ ) を混入した場合、(2)主室に菌液と  $Fe^{++}$  (又  $Fe^{+++}$ ) を入れておき、15分後に側室から基質及びAMを混入した場合の二つにつき2時間の  $O_2$  消費量、基質消費量、分解産物蓄積量を対照と比較した。基質は M/100 ( $30\mu M$ /cup), AMは  $10^{-4}M$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  は  $3 \times 10^{-4}M$  となるように加えた。

Sh. flexneri 2a に於てグルコースを基質とした場合の  $Fe^{++}$  の効果については第1表に示した如くであ

第1表 AM 阻害  $Fe^{++}$  のによる回復  
Sh. flexneri 2a

主 室	側 室	$O_2$ 消費 $\mu M$	グルコ ース消 費 $\mu M$	分解産物蓄積 $\mu M$		
				焦性 ブ 酸	乳酸	醋酸
菌 液	グルコース	16.2	9.6	1.2	0.8	0.4
〃	〃 +AM	9.6	8.2	4.7	6.8	1.1
〃 +AM	〃	8.1	7.8	4.1	7.0	1.0
〃 + $Fe^{++}$	〃	19.3	10.4	0.4	0.5	0.4
〃	〃 + $Fe^{++}$	18.2	9.8	0.4	0.6	0.6
〃 + $Fe^{++}$	〃 +AM	12.8	8.6	1.9	2.0	0.9
〃 +AM	〃 + $Fe^{++}$	8.4	7.8	3.2	3.6	1.5

菌液 2.0ml, AM 0.3ml,  $Fe^{++}$  0.3ml, グルコース ( $30\mu M$ ) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2,  $37^\circ C$ , 2hr.

り、AM、 $Fe^{++}$ 無添加の対照では  $O_2$  消費量、16.2  $\mu M$ , グルコース消費量 9.6  $\mu M$ , 焦性ブドウ酸、乳酸、醋酸蓄積は各々 1.2, 0.8, 0.4  $\mu M$ , であるのに対し、AMを基質と共に添加した場合には各々 9.6  $\mu M$ , 8.2  $\mu M$ , 4.7  $\mu M$ , 6.8  $\mu M$ , 1.1  $\mu M$ , でありAMを基質に先立つて添加すると夫々 8.1  $\mu M$ , 7.8  $\mu M$ , 4.1  $\mu M$ , 7.0  $\mu M$ , 1.0  $\mu M$  となり、AM添加では  $O_2$  消費、グルコース消費共に阻害されるが、 $O_2$  消費に対する阻害度よりもグルコース消費に対する阻害度の方が少であり、又分解産物の蓄積はAM添加より増大した。而してAMを基質に先立つて菌と接触せしめて置く方がAMの作用は大であつた。

又  $Fe^{++}$  添加によつては  $O_2$  消費、グルコース消費共に促進されるが  $O_2$  消費の促進度はグルコース消費の促進度より大であり、又分解産物蓄積は  $Fe^{++}$  添加により減少した。 $Fe^{++}$  の効果も  $Fe^{++}$  を基質に先立つて菌に接触せしめて置いた方が大であつた。

而してAM及び  $Fe^{++}$  を添加するのに、 $Fe^{++}$  を先

に加えて置きAMを後から基質と共に添加した場合には  $O_2$  消費 12.9  $\mu M$ , グルコース消費 8.6  $\mu M$ , 焦性ブドウ酸、乳酸、醋酸蓄積は夫々 1.9, 2.0, 0.9  $\mu M$  であり、又AMを先に、 $Fe^{++}$  を後から基質と共に加えた場合には夫々 8.4  $\mu M$ , 7.8  $\mu M$ , 3.2  $\mu M$ , 3.6  $\mu M$ , 1.5  $\mu M$ , となり、 $Fe^{++}$  をAMに先立つて添加して置くとAMの阻害はかなり回復されるが、 $Fe^{++}$  をAMの後から加えた場合には  $Fe^{++}$  の回復効果は小であつた。

$Fe^{++}$  による回復も第2表の如く  $Fe^{++}$  と同様であ

第2表 AM 阻害の  $Fe^{++}$  による回復  
Sh. flexneri 2a

主 室	側 室	$O_2$ 消費 $\mu M$	グルコ ース消 費 $\mu M$	分解産物蓄積 $\mu M$		
				焦性 ブ 酸	乳酸	醋酸
菌 液	グルコース	16.2	9.6	1.2	0.8	0.4
〃	〃 +AM	9.6	8.2	4.7	6.8	1.1
〃 +AM	〃	8.1	7.8	4.1	7.0	1.0
〃 + $Fe^{+++}$	〃	18.1	9.9	0.5	0.6	0.4
〃	〃 + $Fe^{+++}$	17.6	9.7	0.4	0.5	0.4
〃 + $Fe^{+++}$	〃 +AM	13.2	8.6	1.8	1.9	0.8
〃 +AM	〃 + $Fe^{+++}$	9.7	7.9	3.1	4.6	1.2

菌液 2.0ml, AM 0.3ml,  $Fe^{+++}$  0.3ml, グルコース ( $30\mu M$ ) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2,  $37^\circ C$ , 2hr.

り、 $Fe^{+++}$  をAMに先立つて加えるとかかなりの回復が認められるが、 $Fe^{+++}$  をAMの後から加えると効果は小であつた。

乳酸を基質とした場合の  $Fe^{++}$  の作用は第3表に、 $Fe^{+++}$  の作用は第4表に見られる如く、AM、 $Fe^{++}$ ,

第3表 AM 阻害の  $Fe^{++}$  による回復  
Sh. flexneri 2a

主 室	側 室	$O_2$ 消費 $\mu M$	乳酸消 費 $\mu M$	焦性ブ 酸蓄積 $\mu M$	醋酸蓄 積 $\mu M$
〃	〃 +AM	5.7	8.4	4.8	2.3
〃 +AM	〃	4.8	7.4	3.7	2.0
〃 + $Fe^{++}$	〃	14.7	16.1	1.0	1.3
〃	〃 + $Fe^{++}$	14.3	15.7	1.3	1.4
〃 + $Fe^{++}$	〃 +AM	9.6	12.3	2.5	1.5
〃 +AM	〃 + $Fe^{++}$	8.1	9.6	2.9	1.8

菌液 2.0ml, AM  $Fe^{++}$  0.3ml, 乳酸 ( $30\mu M$ ) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2,  $37^\circ C$ , 2hr.

第4表 AM 阻害の Fe<sup>+++</sup> による回復  
Sh. flexneri 2a

主室	側室	O <sub>2</sub> 消費 μM	乳酸消費 μM	焦性ブドウ酸蓄積 μM	醋酸蓄積 μM
菌液	乳酸	12.6	15.6	2.4	1.9
"	" +AM	5.7	8.4	4.8	2.3
" +AM	"	4.8	7.8	3.7	2.0
" +Fe <sup>+++</sup>	"	15.9	17.0	1.1	1.4
"	" +Fe <sup>+++</sup>	15.4	16.8	1.4	1.4
" +Fe <sup>+++</sup>	" +AM	10.2	12.7	2.8	1.7
" +AM	" +Fe <sup>+++</sup>	7.8	8.9	3.0	1.6

菌液 2.0ml, AM 0.3ml, Fe<sup>+++</sup> 0.3ml, 乳酸(30μM) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2 37°C, 2hr.

又は Fe<sup>+++</sup>無添加ではO<sub>2</sub>消費 12.6μM 乳酸消費 15.6 μM, 焦性ブドウ酸蓄積 2.4μM, 醋酸蓄積 1.9μM, であり, AM添加によつてはO<sub>2</sub>消費乳酸消費共に消費され, 焦性ブドウ酸, 醋酸蓄積は共に増大し, 且つ AMを基質に先立つて加える方がその効果は大であつた。

又 Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup>添加によつてはO<sub>2</sub>消費, 乳酸消費共に増大し, 焦性ブドウ酸, 醋酸蓄積は減少した。

而して Fe<sup>++</sup>, 又はFe<sup>+++</sup> をAMに先立つて加えると, AMの阻害はかなり回復された。

焦性ブドウ酸を基質とした場合は第5表, 第6表, に示した如く, やはりAM阻害は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> の添加により回復され, 且つAMに先立つてFe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> を加えて置く方が回復効果は大であつた。

St. aureus に於ても第7表~第12表に示す如く, 上記と全く同様の成績であり, グルコースを基質とした場合にはAM添加により O<sub>2</sub>消費グルコース消費は減少し, 焦性ブドウ酸, 乳酸, 醋酸など分解産物の蓄積

第5表 AM 阻害の Fe<sup>++</sup> による回復  
Sh. flexneri 2a

主室	側室	O <sub>2</sub> 消費 μM	焦性ブドウ酸消費 μM	乳酸蓄積 μM	醋酸蓄積 μM
菌液	焦性ブドウ酸	9.7	16.4	1.4	1.4
"	" +AM	4.9	10.6	2.6	1.9
" +AM	"	4.0	9.2	2.8	2.1
" +Fe <sup>++</sup>	"	13.6	19.7	0.9	1.3
"	" +Fe <sup>++</sup>	12.9	18.6	1.0	1.4
" +Fe <sup>++</sup>	" +AM	8.7	13.2	1.6	1.7
" +AM	" +Fe <sup>++</sup>	7.0	12.0	2.4	1.9

菌液 2.0ml, AM 0.3ml, Fe<sup>++</sup> 0.3ml, 焦性ブドウ酸 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2, 37°C 2hr.

第6表 AM 阻害の Fe<sup>+++</sup> による回復  
Sh. flexneri 2a

主室	側室	O <sub>2</sub> 消費 μM	焦性ブドウ酸消費 μM	乳酸蓄積 μM	醋酸蓄積 μM
菌液	焦性ブドウ酸	9.7	16.4	1.4	1.4
"	" +AM	4.9	10.6	2.6	1.9
" +AM	"	4.0	9.2	2.8	2.1
" +Fe <sup>+++</sup>	"	13.4	18.1	1.2	1.4
"	" +Fe <sup>+++</sup>	11.7	17.3	1.5	1.4
" +Fe <sup>+++</sup>	" +AM	7.8	14.6	1.9	1.6
" +AM	" +Fe <sup>+++</sup>	7.0	11.2	2.2	1.5

菌液 2.0ml, AM 0.3ml, Fe<sup>+++</sup> 0.3ml, 焦性ブドウ酸 (30μM) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2, 37°C, 2hr.

第7表 AM 阻害の Fe<sup>++</sup> による回復  
St. aureus

主室	側室	O <sub>2</sub> 消費 μM	グルコース消費 μM	分解産物蓄積 μM		
				焦性ブドウ酸	乳酸	醋酸
菌液	グルコース	15.0	9.7	1.2	0.6	0.8
"	" +AM	8.8	7.8	1.6	3.9	1.6
" +AM	"	7.1	6.4	1.4	4.2	1.5
" +Fe <sup>++</sup>	"	17.1	10.0	0.7	0.4	0.5
"	" +Fe <sup>++</sup>	16.8	9.8	0.7	0.3	0.6
" +Fe <sup>++</sup>	" +AM	11.7	8.6	1.2	2.0	1.1
" +AM	" +Fe <sup>++</sup>	9.8	7.1	1.3	2.8	1.3

菌液 2.0ml, AM 0.3ml, Fe<sup>++</sup> 0.3ml, グルコース (30μM) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2, 37°C, 2hr.

第8表 AM 阻害の Fe<sup>+++</sup> による回復  
St. aureus

主室	側室	O <sub>2</sub> 消費 μM	グルコース消費 μM	分解産物蓄積 μM		
				焦性ブドウ酸	乳酸	醋酸
菌液	グルコース	15.0	9.7	1.2	0.6	0.8
"	" +AM	8.8	7.8	1.6	3.9	1.6
" +AM	"	7.1	6.4	1.4	4.2	1.5
" +Fe <sup>+++</sup>	"	17.6	10.2	0.8	0.4	0.6
"	" +Fe <sup>+++</sup>	17.0	9.9	0.7	0.4	0.8
" +Fe <sup>+++</sup>	" +AM	12.6	8.4	1.1	1.9	1.2
" +AM	" +Fe <sup>+++</sup>	8.6	6.9	1.0	2.3	1.1

菌液 2.0ml, AM 0.3ml, Fe<sup>+++</sup> 0.3ml, グルコース (30μM) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2, 37°C, 2hr.

第9表 AM 阻害の Fe<sup>++</sup> による回復  
St. aureus

主 室	側 室	O <sub>2</sub> 消費 μM	乳酸消費 μM	焦性ブ 蓄積 μM	醋酸蓄 積 μM
菌 液	乳 酸	13.4	16.6	3.0	2.0
"	" +AM	7.1	10.2	6.7	2.1
" +AM	"	6.4	9.8	6.8	1.9
" +Fe <sup>++</sup>	"	16.8	18.8	2.0	1.5
"	" +Fe <sup>++</sup>	16.3	17.9	1.9	1.6
" +Fe <sup>++</sup>	" +AM	11.1	14.0	3.9	1.9
" +AM	" +Fe <sup>++</sup>	9.2	11.9	4.9	2.0

菌液 2.0ml, AM 0.3ml, Fe<sup>++</sup> 0.3ml, 乳酸(30μM) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2, 37°C, 2hr.

第10表 AM 阻害の Fe<sup>+++</sup> による回復  
St. aureus

主 室	側 室	O <sub>2</sub> 消費 μM	乳酸消費 μM	焦性ブ 蓄積 μM	醋酸蓄 積 μM
菌 液	乳 酸	13.4	16.6	3.0	2.0
"	" +AM	7.1	10.2	6.7	2.1
" +AM	"	6.4	9.8	6.8	1.9
" +Fe <sup>+++</sup>	"	16.0	17.9	1.6	1.3
"	" +Fe <sup>+++</sup>	15.4	16.6	1.7	1.4
" +Fe <sup>+++</sup>	" +AM	12.1	14.8	3.4	1.8
" +AM	" +Fe <sup>+++</sup>	8.9	11.4	3.9	2.0

菌液 2.0ml, AM 0.3ml, Fe<sup>+++</sup> 0.3ml, 乳酸(30μM) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2, 37°C, 2hr.

第11表 AM 阻害の Fe<sup>++</sup> による回復  
St. aureus

主 室	側 室	O <sub>2</sub> 消費 μM	焦性ブ 消費 μM	乳酸蓄 積 μM	醋酸蓄 積 μM
菌 液	焦 性 ブ	8.6	15.2	2.1	1.9
"	" +AM	4.7	9.4	2.0	1.4
" +AM	"	3.8	7.1	2.1	2.0
" +Fe <sup>++</sup>	"	10.8	18.2	0.9	1.4
"	" +Fe <sup>++</sup>	9.8	16.9	1.1	1.4
" +Fe <sup>++</sup>	" +AM	8.1	15.2	1.7	1.6
" +AM	" +Fe <sup>++</sup>	5.0	10.1	1.8	1.5

菌液 2.0ml, AM 0.3ml, Fe<sup>++</sup> 0.3ml, 焦性ブドウ酸(30μM) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2, 37°C, 2hr.

第12表 AM 阻害の Fe<sup>+++</sup> による回復  
St aureus

主 室	側 室	O <sub>2</sub> 消費 μM	焦性ブ 消費 μM	乳酸蓄 積 μM	醋酸蓄 積 μM
菌 液	焦 性 ブ	8.6	15.2	2.1	1.9
"	" +AM	4.7	9.4	2.0	1.4
" +AM	"	3.8	7.1	2.1	2.0
" +Fe <sup>+++</sup>	"	10.2	17.8	0.8	1.5
"	" +Fe <sup>+++</sup>	9.7	16.6	1.3	1.2
" +Fe <sup>+++</sup>	" +AM	7.6	14.6	1.6	1.4
" +AM	" +Fe <sup>+++</sup>	4.9	10.2	1.9	1.6

菌液 2.0ml, AM 0.3ml, Fe<sup>+++</sup> 0.3ml, 焦性ブドウ酸(30μM) 0.3ml, 全量 3.0ml とする。pH 7.2, 37°C, 2hr.

積は増大し、又 Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> 添加によつては逆に O<sub>2</sub> 消費, グルコース消費は増大し、分解産物蓄積は減少する。而して AM の阻害作用は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> を添加する事により回復するがこれらイオンを AM に先立つて加えて置いた方が回復効果は大であった。

乳酸, 焦性ブドウ酸を基質とした場合にも、やはり AM 阻害は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> により回復された。従つて、AM は酵素作用に必要な Fe<sup>++</sup>, 或は Fe<sup>+++</sup> などの金属イオンと結合することにより酵素反応を阻害するのではないかと考えられた。

2. KCN, NaN<sub>3</sub> 添加培地に発育した菌体の O<sub>2</sub> 消費に対するオーレオマイシンの影響

KCN は Fe イオン錯塩を形成することによりカタラーゼ, ペルオキシダーゼ, チトクロム系呼吸酵素の作用を不活化し、又 cofactor として Fe イオンを必要とする酵素反応を阻害することが知られており、NaN<sub>3</sub> も Fe, Mg, をその他金属イオンと結合することにより、これらイオンの関与する酵素反応を阻害し、又 KCN と同様カタラーゼ, ペルオキシダーゼなど含鉄酵素を不活化すると考えられている。

一方 AM も上述の如く Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> などの金属イオンと錯塩を形成する事が知られている。

そこで KCN, NaN<sub>3</sub> を加えた培地に継代して馴らした菌体では O<sub>2</sub> 消費に対する AM の影響が対照培地に発育した菌体と異なるか否かを検討することとした。

KCN 添加培地は普通寒天に KCN を *Sh. flexneri* 2a では 10<sup>-8</sup>M, *St. aureus* では 3 × 10<sup>-8</sup>M となるように加え、NaN<sub>3</sub> 添加培地は普通寒天に *Sh. flexneri* 2a では 3 × 10<sup>-8</sup>M, *St. aureus* では 10<sup>-8</sup>M となる様に加えたものを用い、これらの各培地に両菌を 5 代以上継代して馴らした 18 時間培養菌体を集菌後、洗滌して静

止菌浮遊液とし実験に供した。(各々 KCN 菌,  $\text{NaN}_3$  と略すこととする)。対照菌は普通寒天 18 時間培養したものをを用いた。

基質はグルコース, 乳酸, 焦性ブドウ酸, (夫々  $10^{-2}\text{M}$ ) の 3 種とし, 各菌のこれらを基質とした  $\text{O}_2$  消費に対する AM ( $3 \times 10^{-4}\text{M}$ ) の影響を比較し, 又参考のため同時に, KCN,  $\text{NaN}_3$  の影響をも併せて検討した。

Sh. flexneri 2a に於てグルコースを基質とした場合には第 13 表の如くであり対照菌では阻害剤無添加では  $212\mu\text{l}$ , KCN 添加では  $61\mu\text{l}$ ,  $\text{NaN}_3$  添加では  $161\mu\text{l}$ , AM 添加では  $84\mu\text{l}$  となつたのに対し, KCN 菌では阻害剤無添加で  $241\mu\text{l}$ , KCN 添加で  $174\mu\text{l}$ ,  $\text{NaN}_3$  添加で  $211\mu\text{l}$ , AM 添加で  $162\mu\text{l}$  となつて対照菌に比較し KCN は勿論,  $\text{NaN}_3$ , AM によつても阻害され難かつた。

$\text{NaN}_3$  菌でも同様,  $\text{NaN}_3$  は勿論, KCN, AM による阻害は小であつた。

乳酸を基質とした場合は第 14 表に見られる如く,

第 13 表 KCN,  $\text{NaN}_3$  添加培地培養菌の  $\text{O}_2$  消費に対する AM の影響

Sh. flexneri 2a		$\text{O}_2$ 消費 $\mu\text{l}$		
	対照菌	KCN 菌	$\text{NaN}_3$ 菌	
グルコース	213	241	239	
〃 + KCN	61	174	161	
〃 + $\text{NaN}_3$	161	211	204	
〃 + AM	84	162	147	

菌液(湿菌量 20mg) 2.0ml, グルコース(終濃度 M/100) 0.3ml, 阻害剤 0.3ml, 全量 3.0ml とする, pH 7.2, 37°C, 1hr.

KCN :  $10^{-3}\text{M}$ ,  $\text{NaN}_3$  :  $10^{-2}\text{M}$ , AM :  $3 \times 10^{-4}\text{M}$

第 14 表 KCN,  $\text{NaN}_3$  添加培地培養菌の  $\text{O}_2$  消費に対する AM の影響

Sh. flexneri 2a		$\text{O}_2$ 消費 $\mu\text{l}$		
	対照菌	KCN 菌	$\text{NaN}_3$ 菌	
乳 酸	197	104	117	
〃 + KCN	62	84	92	
〃 + $\text{NaN}_3$	146	98	96	
〃 + AM	68	81	77	

菌液(湿菌量 20mg) 2.0ml, 乳酸(終濃度 M/100) 0.3ml, 阻害剤 0.3ml, 全量 3.0ml とする, pH 7.2, 37°C, 1hr.

KCN :  $10^{-3}\text{M}$ ,  $\text{NaN}_3$  :  $10^{-2}\text{M}$ , AM :  $3 \times 10^{-4}\text{M}$

KCN 菌,  $\text{NaN}_3$  菌では一般に  $\text{O}_2$  消費量は対照菌に比し小であるが, KCN,  $\text{NaN}_3$ , AM による阻害度は小であつた。

焦性ブドウ酸を基質とした場合にも第 15 表の如く上記第 14 表に見られたと同様, KCN  $\text{NaN}_3$  菌は AM

第 15 表 KCN,  $\text{NaN}_3$  添加培地培養菌の  $\text{O}_2$  消費に対する AM の影響

Sh. flexneri 2a			
	対照菌	KCN 菌	$\text{NaN}_3$ 菌
焦性ブドウ酸	146	83	94
〃 + KCN	52	74	61
〃 + $\text{NaN}_3$	97	68	78
〃 + AM	42	61	58

菌液(湿菌量 20mg) 2.0ml, 焦性ブドウ酸(終濃度 M/100) 0.3ml, 阻害剤 0.3ml, 全量 3.0ml とする, pH 7.2, 37°C, 1hr.

KCN :  $10^{-3}\text{M}$ ,  $\text{NaN}_3$  :  $10^{-2}\text{M}$ , AM :  $3 \times 10^{-4}\text{M}$

第 16 表 KCN,  $\text{NaN}_3$  添加培地培養菌の  $\text{O}_2$  消費に対する AM の影響

St. aureus		$\text{O}_2$ 消費 $\mu\text{l}$		
	対照菌	KCN 菌	$\text{NaN}_3$ 菌	
グルコース	269	276	281	
〃 + KCN	217	292	266	
〃 + $\text{NaN}_3$	106	211	244	
〃 + AM	97	196	212	

菌液(湿菌量 60mg) 2.0ml, グルコース(終濃度 M/100) 0.3ml, 阻害剤 0.3ml 全量 3.0ml とする, pH 7.2, 37°C, 1hr.

KCN :  $10^{-3}\text{M}$ ,  $\text{NaN}_3$  :  $10^{-2}\text{M}$ , AN :  $3 \times 10^{-4}\text{M}$

第 17 表 KCN,  $\text{NaN}_3$ , 添加培地培養菌の  $\text{O}_2$  消費に対する AM の影響

St. aureus		$\text{O}_2$ 消費 $\mu\text{l}$		
	対照菌	KCN 菌	$\text{NaN}_3$ 菌	
乳 酸	207	164	126	
〃 + KCN	182	177	104	
〃 + $\text{NaN}_3$	87	128	106	
〃 + AM	76	88	97	

菌液(湿菌量 60mg) 2.0ml, 乳酸(終濃度 M/100) 0.3ml, 阻害剤 0.3ml, 全量 3.0ml とする, pH 7.2, 37°C, 1hr.

KCN :  $10^{-2}\text{M}$ ,  $\text{NaN}_3$  :  $10^{-3}\text{M}$ , AM :  $3 \times 10^{-3}\text{M}$

第18表 KCN, NaN<sub>3</sub> 添加培地培養菌のO<sub>2</sub>消費  
に対する AM の影響  
St. aureus

	対 照 菌	KCN 菌	NaN <sub>3</sub> 菌
焦性ブドウ酸	159	97	84
〃 +KCN	114	99	79
〃 +NaN <sub>3</sub>	61	67	80
〃 +AM	67	68	72

菌液 (湿菌量 60mg) 2.0ml, 焦性ブドウ酸 (終濃度 M/100) 0.3ml, 阻害剤0.3ml 全量 3.0ml とする, pH 7.2, 37°C, 1hr.

KCN : 10<sup>-2</sup>M, NaN<sub>3</sub> : 10<sup>-3</sup>M, AM : 3 × 10<sup>-4</sup>M

により阻害され難かつた。

St. aureus でも Sh. flexneri に於けると同様, 第16~第18表の如く, グルコース, 乳酸, 焦性ブドウ酸, を基質とした場合共に, KCN 菌, NaN<sub>3</sub> 菌は対照菌に比し AM 阻害が小であつた。

従つて AM は KCN, NaN<sub>3</sub> とほぼ同じ点に作用するものと考えられた。

### 3. オーレオマイシンの阻害のチオニンによる回復可否

上述の如く AM の阻害作用の一つは Fe<sup>++</sup>, 又は Fe<sup>+++</sup> と結合することにより, 焦性ブドウ酸の完全酸化を阻害することであろうと考えられるが, 又一方前篇に於て述べた如く AM は菌のグルコース酸化に於て O<sub>2</sub> 消費を抑制し, 同時に分解産物として乳酸の生成をも増大することから, AM は基質より離脱した H を O<sub>2</sub> に伝達するのを阻害するとも考えられる。

そこで次に AM の O<sub>2</sub> 消費阻害が酸化還元色素チオニン (Thio と略す) 添加によつて回復されるか否かをグルコース, 乳酸, 焦性ブドウ酸を基質とした場合について検討した。

即ちワールブルグ検圧計の主室に菌液及び Thio (終濃度 10000 倍) を入れ, 15 分後に側室より基質 (10<sup>-2</sup>M) 及び AM (10<sup>-4</sup>M) を混入して O<sub>2</sub> 消費量を測定し, Thio, AM 無添加の対照と比較した。

結果は Sh. flexneri 2a では第19表の如くであり, グルコースを基質とした場合には, Thio, AM 無添加では 212μl であり, AM 添加では 161μl, Thio 添加では 174μl, と何れもやや阻害されて居り, AM, Thio 添加では 146μl と阻害は更に大となつて AM の阻害を Thio が回復するという事は認められなかつた。

乳酸, 焦性ブドウ酸を基質とした場合にもグルコー

スを基質とした場合と同様の傾向であり, 又 St. aureus では第20表の如く, AM による阻害の Thio による回復は認められなかつた。

第19表 AM 阻害のチオニンによる回復の可否  
Sh. flexneri 2a

基質・AM, thionine	O <sub>2</sub> 消費 (μl)
グルコース	212
〃 +AM	161
〃 +Thio	174
〃 +AM+Thio	146
乳 酸	142
〃 +AM	89
〃 +Thio	106
〃 +AM+Thio	78
焦性ブドウ酸	137
〃 +AM	69
〃 +Thio	97
〃 +AM+Thio	60

菌液 2.0ml, AM (終濃度 10<sup>-4</sup>M), Thio (終濃度 10000 倍) 0.3ml, 基質 (終濃度 10<sup>-2</sup>M), pH 7.2, 37°C, 1hr.

第20表 AM 阻害のチオニンによる回復の可否  
St. aureus

基質・AM, thionine	O <sub>2</sub> 消費 (μl)
グルコース	217
〃 +AM	147
〃 +Thio	169
〃 +AM+Thio	130
乳 酸	138
〃 +AM	71
〃 +Thio	89
〃 +AM+Thio	66
焦性ブドウ酸	117
〃 +AM	58
〃 +Thio	79
〃 +AM+Thio	50

菌液 2.0ml, AM (終濃度 10<sup>-4</sup>M), Thio (終濃度 10000 倍), 0.3ml, 基質 (終濃度 10<sup>-2</sup>M), 0.3ml, 全量 3.0ml とする, pH 7.2, 37°C, 1hr.

5. 菌のカタラーゼ, ペルオキシダーゼ作用に対するオーレオマイシンの影響。

前述の如く AM は Fe<sup>++</sup>, Fe<sup>+++</sup> と錯塩を作り, 又

AMの阻害が  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ により一部回復されることなどから、含鉄酵素の  $Fe$  と AM が結合する可能性が考えられる。

そこで含鉄酵素として、カタラーゼ、ペルオキシダーゼを選び、その作用に対するAMの影響を見た。

カタラーゼに対する影響は、菌液にAMを  $10^{-4}M$ ,  $3 \times 10^{-4}M$ ,  $10^{-8}M$ となるに加え、15分後に  $H_2O_2$  を  $200/M$  となる様に添加し、10分間の  $O_2$  発生量をAM無添加の対照と比較することにより調べた。

結果は第21表の如くであり、*Sh. flexneri* 2a ではAM無添加の対照では  $O_2$  発生量  $184\mu l$  であり、AM  $10^{-4}M$ ,  $3 \times 10^{-4}M$ ,  $10^{-8}M$  添加では各々  $197\mu l$ ,  $194\mu l$ ,  $190\mu l$  となりAMによる阻害は全く認められず、又 *St. aureus* に於ても同様の結果であった。

第21表 菌のカタラーゼ活性に対するAMの影響  
 $O_2$  発生量  $\mu l$

	<i>Sh. flexneri</i> 2a	<i>St. aureus</i>
—	184	226
AM $10^{-4}M$	197	241
AM $3 \times 10^{-4}M$	199	246
AM $10^{-8}M$	190	231

菌液 2.0ml, AM 0.3ml,  $H_2O_2$  (終濃度M/200) 0.3ml, 全量 3.0mlとする, pH 7.2,  $37^\circ C$ , 10min.

ペルオキシダーゼ作用に対する影響は第22表の如くであり、AM添加及び無添加に於て菌液に0-トリジン、及び  $H_2O_2$  を添加して発生する青色より比較するに、両菌のペルオキシダーゼ作用に対しAMの影響は全く認められなかつた。

第22表 菌のペルオキシダーゼ活性に対するAMの影響

	<i>Sh. flexneri</i> 2a	<i>St. aureus</i>
—	+++	++
AM $10^{-4}M$	+++	++
AM $3 \times 10^{-4}M$	+++	++
AM $10^{-8}M$	+++	++

菌液 1.0ml, 10%トリジン氷醋酸溶液 0.1ml, M/5  $H_2O_2$  0.1ml,  $37^\circ C$ , 10min.

#### IV. 総括及び考按

AMは  $Fe$  その他の金属イオンと錯塩を形成しその抗菌作用はこれらイオンの存在により低下することが知られている。

而して前篇に述べた如くAMはグルコース酸化に於て焦性ブドウ酸以下の酸化を阻害し又、一方細菌によるグルコース、焦性ブドウ酸などの酸化には  $Fe^{++}$ ,  $Mg^{++}$  などの金属イオンを必要とし、これらイオンを除去するとグルコース酸化に於て焦性ブドウ酸以下の酸化が不円滑となると考えられる。従つてAMの阻害は  $Fe^{++}$  又は  $Fe^{+++}$  添加により回復される可能性が考えられる。

そこでこれを確かめるため、グルコース、乳酸、焦性ブドウ酸を夫々基質として、菌にあらかじめAMを加えて接触して置いて後に基質及び  $Fe^{++}$  (又は  $Fe^{+++}$ ) を加えた場合、及びAMを添加した場合につき  $O_2$  消費、基質消費、分解産物蓄積の状況を対照と比較したところ、菌にあらかじめAMを接触して置いたのでは  $Fe^{++}$  (又は  $Fe^{+++}$ ) により回復されないが、 $Fe^{++}$  (又は  $Fe^{+++}$ ) を先に加えて置くとかなりの程度に回復されることが認められた。

このことからAMの阻害作用の一つは酵素作用に必要な  $Fe^{++}$  その他の金属イオンと結合することにより、酸化反応を阻害すると考えられる。

これを更に確かめるため  $Fe^{++}$ ,  $Mg^{++}$  などのイオンと結合して阻害作用を示すことが知られている。阻害剤 KCN 或は  $NaN_3$  を添加した培地に継代して馴らした菌体を用い、その  $O_2$  消費に対するAMの阻害度を対照菌と比較したところ KCN 添加培地発育菌の  $O_2$  消費は KCN は勿論  $NaN_3$ , AM によつても阻害され難く、又  $NaN_3$  添加培地発育菌では  $NaN_3$  は勿論 KCN, AM によつても阻害され難く、従つてAMの阻害機構の少くとも一部は KCN,  $NaN_3$  と共通した点があると考えられ、これは恐らく前述の如き  $Fe^{++}$  その他の金属と結合することにより酵素反応を阻害するという点と推定される。

次に前篇で述べた如く菌のグルコース酸化に対しAMを添加すると乳酸蓄積が増大し嫌氣的解糖と類似の所見となり、これは一つには恐らく基質より離脱したHが  $O_2$  に伝達されるのをAMが阻害すると考えられた。

もしH伝達系が阻害されるならば酸化還元色素チオニンによつて回復される可能性も考えられるがチオニンによる回復を見た実験では否定的であつた。

又前述の如くAMが  $Fe$  と錯塩を作ることから含鉄酵素を阻害することも考えられるが、含鉄酵素の例としてカタラーゼ、ペルオキシダーゼをとつて見ると、それらの酵素活性はAMによつて全く影響されなかつた。

このようにAMがH伝達系,特に含鉄酵素系を阻害するという証明は行えなかつたが,尙前篇のその可能性は存在するものと想像される。

### V. 結 言

*Sh. flexneri* 2a, *St. aureus* を供試菌とし, AMのC源酸化に対する阻害機構を追求し次の結果を得た。

1. グルコース, 乳酸, 焦性ブドウ酸々々のAMによる阻害は  $Fe^{++}$  (又は  $Fe^{+++}$ ) をAMに先立つて菌に接触せしめて置くとかなり回復される。

2. KCN 又は  $NaN_3$  を添加した培地に継代して

馴らした菌体の  $O_2$ 消費はAMにより阻害され難い。

これらのことからAMの阻害機構の一つは酵素作用に必要な  $Fe^{++}$  その他の金属イオンと結合することにより酵素反応を不円滑とするものと考えられる。

3. AM阻害は酸化還元色素チオニンにより回復されず, 又含鉄酵素カタラーゼ, ペルオキシダーゼの活性はAMにより影響されない。

終り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ます。

### 参 考 文 献

- 1) Loomis, W. F. : science, III, 474, 1950.
2. 三浦: 化学の領域, 6巻, 8号, 21, 1952.
3. 安井: 岡山医学会雑誌, 69巻10号, 2485, 1957.
- 4) Van Metter, J.C. & Dleson, J. J. : science, 113, 273, 1951.
- 5) Karps, A & Synder, T. C. : Soc. EXP. Biol, 79, 216, 1952.
- 6) Umbreit et al : Manometric Techniques 1951.
- 7) 標準生化学実験, 18,
- 8) 標準生化学実験, 36.
- 9) 標準生化学実験, 35.
- 10) 標準生化学実験.
- 11) 藤本: 岡山医学会雑誌, 69巻9号, 2469, 1957.
- 12) 武田: 岡山医学会雑誌, 70巻10号, 3591, 1958.
- 13) 泉原: 岡山医学会雑誌,
- 14) Glick, V. : Methods of Biochemical Analysis, 1, 373, 1954.
- 15) Main, E. R. & shinn, L. E. : J. Biol. chem, 128, 417, 1939.



## The Utilization of Aureomycin as the Inhibitor in the Study of Bacterial Glucose oxidation.

### Part 2. Mechanism of Aureomycin inhibition

Mitsue IZUMIHARA

Department of Microbiology Okayama University Medical school

(Director: S. Murakami)

Using the standard straine of *Sh. flexneri* 2a and *St. aureus*, the mechanism of AM inhibition on the c-source oxidation of bacteria are studied and the following results ore obtained.

1. AM inhibition of glucose, lactate or pyruvate oxidation can be restored by addition of  $Fe^{++}$  or  $Fe^{+++}$ , especialy in th case where  $Fe^{++}$  or  $Fe^{+++}$  added to cells before addition of AM.
2. AM does not inhibit so markedly the oxygen uptake of the cells grown on the medium added KCN or  $NaN_3$  and adapted to these inhibitors.

From these results, it seems that AM inhibits the enzymatic retions by catching  $Fe^{++}$  the other metal ions necessary to the enzyme actviities.

3. AM inhibition can not be restored by thionine, and AM does not inhibit catalase and peroxidase reaction.
-