

## チフス菌のS-R変異に関する究研

## 第 1 篇

## チフスS型, R型菌の呼吸について

岡山大学医学部細菌学教室 (指導・村上教授)

新 沢 義 憲

〔昭和31年2月15日受稿〕

## 目 次

第一章 緒 言	実験材料及び実験方法
第二章 各種基質による呼吸について 実験材料及び実験方法 実験成績	実験成績
第三章 呼吸に及ぼす各種阻害剤の影響 実験材料及び実験方法 実験成績	第五章 培地中の炭素源と呼吸の関係 実験材料及び実験方法 実験成績
第四章 呼吸に及ぼす金属イオンの影響	第六章 総括及び考案
	第七章 結 論
	参考文献

## 第一章 緒 言

細菌変異の著明な形式は、固形培地上での集落の形態の変化であるが、この変異の最も顕著な外面的表現は、Arkwright, (1920, 1921, 1924), により詳細に報告された。即ち、彼は腸内細菌で正常菌から、bouillon 培地に於ける沈澱性、更に自然凝集性、抗元性変異、特に平板培地上で異つた集落形態を示す変異菌を見出し、これに集落の形態から正常菌の smooth type (S型), に対して rough type (R), と名付けて区別した。其の両者間の差異はS型菌では bouillon 培地で混濁平等に発育し、生理的食塩水で自然凝集を起さず、其の集落の形態は滑沢で円形を示し、運動性を有し、毒性を持つ。これに反してR型菌は bouillon 培地では凝集性に沈澱発育をなし、生理的食塩水で自然凝集を起し、又其の集落は表面粗糙、乾燥し、周縁不規則な形態を示して、S型菌に比較して一般に運動性少く、又毒性も欠除する。かゝる変異菌を生ずる現象に対してS-R変異と名付けた。

其の後、Hadley (1927), Finkle (1931), Alloway (1932), Bisset (1938), 佐藤 (1949), 長田 (1949), 等の研究により、集落の形態のみならず、形態的变化、菌体抗元の変異、毒性其の外の生物学的性状にも変化を来す事が認められ、現在では通常、特異的多糖質抗元の喪失と言う観点から規定されている。即ち、White (1929) は Millon 試薬でR型菌は沈澱し強い蛋白凝集反応を呈するが、R型菌では反応は陰性である事からS型菌に於ける特異的多糖質について論じており、其の反応はS型、R型を分類する重要な反応として現在も使用されている。又岡本 (1943) は同様に重金属塩による沈澱性の相異により区別し得る事を報告している。更に山中 (1942) はチフス菌のS-R変異に関する研究として fuch sine, と malachite green を用いた紅緑染色法でS, R 両菌を同一条件で比較染色し鑑別する方法を報告して居る。又赤須 (1933) はチフス菌、パラチフス菌を用いて陳旧培養をもつてするS型菌よりR型菌の分離、及び其の生物学的性状の詳細な報告を行つて居

る。

一方、これ等変異現象の本質に関しては、Tracy (1938) は Lactbacills で S 型から R 型に移行するのは、糖分解性菌が含窒素栄養物の利用能力の増大した糖非分解性菌への変化であると述べている。更に Brawn (1947), は Brucella で R 型菌は陳旧培養による種々の有害条件に適應するものであり、S 型菌はこの還境により淘汰され、R 型菌が出現する、故に S-R 変異は自然的突然変異、又は一連の突然変異の結果として起る現象であり、変異の可逆性は突然変異が可逆的である為で、R 型菌はその競争的優勢の為に安定であると述べている。又山中 (1949) は集落内の分裂増殖に当り、或る還境時期に応じて起る固有の自己触媒性の不斉性合成の結果として起る現象であろうと推定している。

然るに、S-R 変異の本態に関しては未だ解明の段階には到っていない。

筆者は S-R 変異が従来から云われている所の、長期累代移植培養、特異、非特異性血清、化学薬品、細菌の代謝産物、其の外の酵素作用、温度、動物通過、機械的作用、光線等の所謂外因に起因する周囲の生活還境の変化から生ずる変異現象とするならば、細菌の生活態度もそれに応じて当然変化を来すものとして、主として物質代謝の面から考察する事により、複雑多岐なる S-R 変異の一端でも知る目的で実験を行つた所、2, 3の知見を得たので報告する次第である。

## 第二章 各種基質による呼吸について

### 実験材料及び実験方法

1) 供試菌、教室保存のチフス菌 S, 57S を用いた。S 型菌は原株を動物通過する事により得た。R 型菌の分離は原株を 1~2 週間 bouillon 培地に培養した後に、其の一白金耳を普通寒天平板培地に移植して稍々、R 型化した集落を選び再び bouillon 培地に培養する陳旧培養により分離する赤須 (1933) の方法を用いて約 10 代を経て R 型菌 (S, 57R) を得た。これ等の S 型、R 型菌共に集落の形態、

液体培地上での発育性状、生理的食塩水による自然凝集性、Millon 反応、重金属塩法、更に免疫血清反応等により、S 型、又は R 型菌である事を常に確認しつつ普通寒天平板培地に 37°C で 18 時間~24 時間培養した菌を実験に供した。

2) 細菌浮游液、普通寒天平板培地に培養した、前記供試菌を集菌し培地成分の混入を除く為に、pH 7.2 の M/50 磷酸緩衝液 (0.85%, 食塩加) で遠心沈澱器により、3 回洗滌して、最後に、同緩衝液を以て、両型菌共に 5mg/cc の休止菌浮游液を調製した。尚、菌量はブルフリッヒ比色計を用いて厳密に測定し毎回の菌量の変動による実験誤差を極力防止した。

3) 基質、基質は総て最終濃度が M/100 となる様に用いた。但し分子量の不明な、glycogen 等は 1mg/cc 溶液として用いた。これ等の基質は再蒸溜水に溶解して pH を 7.0 に修正して使用し、使用薬品は一級品等純粋なものを可及的使用して実験を行つた。

4) 実験方法、呼吸量測定には、Warburg の検圧計を Umbreit (1949), の常法に従つて用いた。容器内容は酸素消費量の測定では、副室に 10% KOH, 0.5cc を入れ、呼吸により生ずる炭酸ガスを呼吸せしめ、菌液は 2.0cc, 基質は 0.5cc, で全量が 3.5cc となる様に補正して実験を行つた。又常に endogenous respiration を対照として測定し、各基質に対する測定値からこれを引いた値を以て酸素消費量の測定値とした。

### 実験成績

S 型、R 型菌の酵素の分布状態を知る為に、以下、糖類、20種、カルボン酸、18種、アミノ酸、20種、計 58種の基質を用いて酸素消費量 ( $XO_2$ ), 炭酸ガス発生量 ( $XCO_2$ ), 及びそれ等から算出される呼吸商 (R. Q), を測定した所、次に述べる如き結果を得たので主として S 型、R 型菌間の差異と言う観点から記述した。

#### I. 糖類を基質とした場合の呼吸

其の酸素消費量は 120 分の測定値で一括し

て、第1表に示した。即ち S 型、R 型菌共に、arabinose, xylose, rhamnose, sucrose, lactose, glycogen, starch, inulin, sorbit, mannit, drucit, inosit, を基質とした場合には酸素消費は認められなかつた。又これ等の基質について実験時間を8時間迄延長して観察したが、全く酸素消費は起らず、所謂適応現象は見られなかつた。この事からチフス菌では S 型、R 型菌共に実験開始頭初より酸素消費を測定し得た、glucose, mannose, galactose, fructose, dextrin, maltose, ribose, glycerin を分解する酵素系が存在する事を知つた。又 S 型菌、或は R 型菌のみに酸素消費が認められる基質は無かつた。

其の酸素消費量を見ると、S 型、R 型菌共に、glucose が最大で maltose, galactose が僅少の差でこれに次ぎ、やゝ低く fructose, mannose, glycerin, dextrin の順となる。

S 型菌と R 型菌の差異に関しては、全体的に見て S 型菌の方が酸素消費量は大であり、glucose に於て其の差が最も著明に見られた。

第1表 糖類基質の酸素消費量 単位：μl.

Substrate	濃度	120分 X O <sub>2</sub>	
		S	R
arabinose	M/100	0	0
xyrose	"	0	0
rhamnose	"	0	0
ribose	"	22	18
glucose	"	262	202
mannose	"	195	163
fructose	"	192	158
galactose	"	226	183
sucrose	"	0	0
lactose	"	0	0
maltose	"	230	192
dextrin	1mg/cc	48	51
glycogen	"	0	0
inulin	"	0	0
starch	"	0	0
sorbit	"	0	0
mannit	"	0	0
durcit	"	0	0
inosit	"	0	0
glycerin	"	132	116

ribose については呼吸量が少いので差異は余り感じられなかつた。

次に、これ等の基質の中より、glucose, galactose, mannose, ribose, の4種類の基質を選び炭酸ガス発生量を測定して、呼吸商を求めた所、第2表に示す如き結果を得た。即ち表に見られる通り、酸素消費量、炭酸ガス発生量共に S 型菌が R 型菌より大きく、呼吸商も同様に S 型菌の方が大きい事を知つた。

第2表 糖類基質の炭酸ガス発生量(XCO<sub>2</sub>), 呼吸商 (R. Q) X O<sub>2</sub>, X CO<sub>2</sub> 単位：μl.

Substrate	S			R		
	X O <sub>2</sub>	X CO <sub>2</sub>	R. Q	X O <sub>2</sub>	X CO <sub>2</sub>	R. Q
glucose	262	247	0.94	202	183	0.91
mannose	195	179	0.92	163	145	0.90
galactose	226	216	0.94	183	162	0.90
ribose	22	18	0.81	18	14	0.78

以上の実験成績から、S 型菌と R 型菌の糖類代謝様式に何等かの差異が存在するのでは無いかと言う疑問を持つたので以後の詳細な実験を行つた。尚、両型菌共に endogenous respiration の値は極めて僅かで有意義な測定値は得られなかつた。

## II. Carbon 酸を基質とした場合の呼吸

前記糖類基質と同様の実験を行つた結果は一括して第3表に示した。即ち表中に見られる様に酸素消費を認めた基質は formic acid, acetic acid, pyruvic acid, propionic acid, butyric acid, lactic acid, oxalic acid, succinic acid, fumaric acid, malic acid, α-keto-glutaric acid, tartaric acid, glycerophosphoric acid, gluconic acid, の14種であつた。この場合も所謂適応現象は認められず、又 S 型菌或は R 型菌にのみ酸素消費が見られる基質も存在しなかつた。

これ等基質を大別すると、pyruvic acid, lactic acid が非常に酸素消費量は大きく、formic acid, glycerophosphoric acid, fumaric acid, がこれに次ぎ、他は殆んど同程度の測定値を示した。又其の測定値は S 型菌と R 型菌の間では実験誤差範囲内の差を示すに過ぎ

第3表 Carbon酸基質の酸素消費量単位：μl.

Substrate	濃 度	120分XO <sub>2</sub>	
		S	R
formic acid	M/100	65	64
acetic acid	"	32	38
pyruvic acid	"	152	144
propionic acid	"	36	37
butyric acid	"	32	35
lactic acid	"	170	160
oxalic acid	"	35	35
succinic acid	"	32	30
fumaric acid	"	46	42
malic acid	"	25	26
tartaric acid	"	25	24
malonic acid	"	0	0
α-ketoglutaric acid	"	25	25
citric acid	"	0	0
benzoic acid	"	0	0
anthranilic acid	"	0	0
glycerophosphoric acid	"	24	47
gluconic acid	"	56	48

なかつた。

次に以上の基質の中より、pyruvic acid, succinic acid, fumaric acid, gluconic acid を選んで、炭酸ガス発生量を測定して呼吸商を求めた所、第4表に示す結果を得た。即ち、酸素消費量と同様に炭酸ガス発生量、呼吸商共にS型菌、R型菌の間に特に著しい差異は認められなかつた。

第4表 Carbon 酸基質の炭酸ガス発生量 (XCO<sub>2</sub>), 呼吸商(R. Q)XO<sub>2</sub>. XCO<sub>2</sub>単位：μl.

Substrate	S			R		
	XO <sub>2</sub>	XCO <sub>2</sub>	R. Q	XO <sub>2</sub>	XCO <sub>2</sub>	R. Q
pyruvic acid	152	150	0.99	144	141	0.98
succinic acid	32	16	0.50	30	14	0.49
fumaric acid	46	34	0.74	42	32	0.76
gluconic acid	56	50	0.89	48	40	0.86

Ⅲ. amino 酸を基質とした場合の呼吸

前記糖類, carbon 酸を基質とした場合と同じ実験方法によつて各種 amino 酸を使用して実験を行つた。使用基質のうち、第5表に示す通り、glycocoll, l(+)-α-alanine, l(+)-as-

paragine 酸, l(+)-glutamine 酸, d(+)-glutamine 酸, l(+)-arginine, l(-)-cysteine, l(-)-α-proline の各基質に於いて、S型、R型菌共に酸素消費が見られ、S型、R型菌の間には殆んど記すべき差異の無い事を知つた。又適応現象も実験時間を8時間迄延長して観察したが、両型菌共認められたかつた。

第5表 amino 酸基質の酸素消費量単位：μl.

Substrate	濃 度	120分XO <sub>2</sub>	
		S	R
glycocoll	M/100	48	50
l(+)-α-alanine	"	43	41
l(+)-valine	"	0	0
l(-)-leucine	"	0	0
l(-)-phenylalanine	"	0	0
l(-)-methionine	"	0	0
l(-)-norleucine	"	0	0
l(-)-tyrosine	"	0	0
l(+)-asparagin酸	"	51	53
l(+)-glutamin酸	"	36	32
d(+)-glutamin酸	"	43	48
l(+)-lysine	"	0	0
l(+)-arginine	"	29	33
l(-)-ornithine	"	0	0
l(-)-cystine	"	22	24
l(-)-cysteine	"	0	0
l(-)-tryptophane	"	0	0
l(-)-histidine	"	0	0
l(-)-α-proline	"	62	64
l(-)-oxyproline	"	0	0

第三章 呼吸に及ぼす各種阻害剤の影響

前章に於ける種々の基質を用いた呼吸実験の結果、S型、R型菌の間に特に糖類代謝について何等かの差異が存在するのでは無いかと言う事を推定し得たので、その点を特に追究する目的で glucose, gluconic acid, pyruvic acid を選びこれ等基質の呼吸に対する各種阻害剤の影響を検討して見た。

実験材料及び実験方法

実験材料は前章と同じくS型、R型菌の普通寒天平板培地18時間~24時間培養菌の休止菌浮游液(5mg/cc)を用い、基質には glucose,

gluconic acid, pyruvic acid を共に最終濃度が M/100 となる様に使用した。

酸素消費量, 炭酸ガス発生量は, 前章同様に常法に従って測定した。

使用阻害剤は, KCN $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ M, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ M, NaF  $10^{-2}$ ~ $10^{-3}$ M, 2, 4-dinitrophenol  $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ M, NaN<sub>3</sub>  $10^{-2}$ ~ $10^{-3}$ M, monoiodoacetic acid  $10^{-2}$ ~ $10^{-3}$ M, 計 6 種類を使用した。濃度は基礎実験の結果で適当と思われる前記濃度を使用した。

実験成績

各阻害剤の S 型, R 型菌の各基質に対する影響を実験時間 120 分の酸素消費量の測定値より求めた, 阻害度 (%), により第 6 表に一括表示した。表に示す通り基質又は, 阻害剤により S 型, R 型菌の間には相当著明な差異を有する事を知った。

先ず, KCN について観察すると, 基質 glucose では, S 型菌の阻害が 93 %を示すのに対して R 型菌では 63%と数字の示す如く, S 型菌の方が強く阻害される事を知った。gluconic acid の基質でもこれと同様の傾向が見られたが, 基質 glucose の場合よりその差は遙かに少かつた。pyruvic acid では殆んど実験誤差範囲内で同程度の阻害効果を示した。尚共に阻害度は濃度に比例していた。

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を使用した場合は, 基質 glucose では, S 型, 83%, R 型 76%と KCN よりはその差異は少いがやはり S 型菌の方が強く阻害を受けた。gluconic acid を基質とせる時は差は更に小さいが, やはり S 型菌の方が強く阻害を受ける事を知った。pyruvic acid では全く阻害度は同じであつた。

NaF, については, glucose を基質とせる時は前二者に比較して其の阻害度は非常に低いがこの場合も同様に S 型菌の方がやゝ強く阻害される事を知った。gluconic acid では殆んど同程度の阻害を示し, pyruvic acid では全く阻害効果は認められなかつた。

NaN<sub>3</sub> を用いた実験では, 高濃度では, 大体 KCN, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> と同一傾向を示し, glucose, gluconic acid では S 型菌の方がやゝ強く阻害された。pyruvic acid ではその阻害度は同じであつた。

2, 4-dinitrophenol は高濃度で弱い阻害効果が見られたが, この場合特に S 型, R 型菌の間の差異は感じられなかつた。又低濃度に於ては NaF と同様阻害効果は認められなかつた。monoiodoacetic acid では, 各基質共に阻害は非常に強く見られ, 基質 glucose で僅かに S 型菌が強く阻害されたが, 他の基質では差異は殆ど認められなかつた。

第 6 表 酸素消費に及ぼす各種阻害剤の影響

阻 害 剤 濃 度		KCN		As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		NaF		NaN <sub>3</sub>		2, 4-D. N. P.		monoiodoacetic acid	
		10 <sup>-3</sup> M, 10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-2</sup> M, 10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-2</sup> M, 10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-2</sup> M, 10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-3</sup> M, 10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-2</sup> M, 10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-2</sup> M, 10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-2</sup> M, 10 <sup>-3</sup> M				
glucose	S	93	30	83	62	23	0	50	6	11	0	95	90
	R	63	21	76	54	19	0	38	4	9	0	86	68
gluconic acid	S	98	35	85	41	18	0	43	9	9	0	93	87
	R	81	47	82	35	17	0	31	7	9	0	89	82
pyruvic acid	S	89	76	71	64	0	0	51	13	7	0	94	83
	R	87	69	72	62	0	0	53	12	8	0	92	85

表中数字は対称に対する阻害%で示す。

次に以上の実験成績で, 特に興味を感じた。glucose と pyruvic acid について KCN  $10^{-3}$ M, NaN<sub>3</sub>  $10^{-2}$ M を用いて炭酸ガス発生量に対す

る阻害効果を検した所, 第 7 表に示す様な結果を得た。即ち glucose を基質とせる然炭ガス発生は KCN を添加した場合 S 型, R 型菌

共に酸素の消費量と殆ど同程度の阻害を受ける為に、呼吸商の値はほぼ阻害剤を使用しない場合に等しい事を知った。然し  $\text{NaN}_3$  を用いた実験では、S型菌では KCN 同様に酸素消費量と同程度の阻害が認められたが、R型菌に於ては酸素消費量が受ける以上に炭酸

ガス発生に強い阻害が認められたので呼吸商も著しく差異が見られた。基質 pyruvic acid ではこの様な事は見られず、S型、R型菌共に KCN,  $\text{NaN}_3$  により酸素消費量と同程度に、阻害を受け、特に S型、R型菌の間に著しい差異は見られなかつた。

第7表 炭酸ガス発生量 ( $\text{XCO}_2$ ), 呼吸商 (R. Q.) に及ぼす阻害剤の影響

基 質	阻害剤	$\text{XO}_2$			$\text{XCO}_2$			R. Q.		
		O	KCN	$\text{NaN}_3$	O	KCN	$\text{NaN}_3$	O	KCN	$\text{NaN}_3$
glucose	S	400	31	205	376	38	186	0.94	0.92	0.93
	R	362	130	224	328	117	152	0.91	0.90	0.79
pyruvic acid	S	120	28	61	118	26	58	0.99	0.94	0.97
	R	110	26	53	113	24	51	0.99	0.95	0.98

$\text{XO}_2$ ,  $\text{XCO}_2$  単位:  $\mu\text{l}$ . KCN  $10^{-3}\text{M}$ ,  $\text{NaN}_3$   $10^{-2}\text{M}$

#### 第四章 呼吸に及ぼす金属イオンの影響

##### 実験材料及び実験方法

使用菌は前章迄と同じであり、使用基質は、glucose, pyruvic acid, gluconic acid, ribose, succinic acid, fumaric acid を用いた。

実験方法は同じく Warburg の検圧計を常法に従つて使用し、各金属イオンの影響を検討した。金属イオンはあらかじめ、主室で菌液に混入して置き、120分後の酸素消費量から、その影響を知った。

使用金属イオンは、赤沢 (1955) の一連の実験報告の中より特に興味のある、 $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  を用いた。 $\text{Fe}^{++}$  は  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , と  $\text{Mg}^{++}$  は  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を濃度を共に  $10^{-3}\text{M}$  ~  $10^{-6}\text{M}$  の各濃度にて使用した。

##### 実験成績

$\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  の各基質に対する影響は第8表に一括して表示した。表に示す如く、 $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  共に基質を glucose, pyruvic acid とせる場合のみ S型菌に対して高濃度に於て促進的效果を示し、R型菌では、わずかに促進が認められたが、誤差範囲内での促進程度であつた。

其の外の基質に於ては、S型、R型菌共に全く影響は見られなかつた。

同様の実験を炭酸ガス発生に対しても行つて見たが、結果は酸素消費に対すると同程度の促進が同じく glucose, pyruvic acid を基質とせる S型菌に見られたが、其の外の基質では全く影響は認められなかつた。

#### 第五章 培地中の炭素源と呼吸の関係

培地中の炭素源を色々に変えた培地に発育した菌について酵素の活性状態を知る事から其の菌の物質代謝の様相を推察する目的で以下の実験を行つた。

##### 実験材料及び実験方法

前章迄と同様にして得た S型、R型各菌を 0.5% peptone 培地に炭素源として 0.5% の割合に glucose, ribose, gluconic acid, をそれぞれ添加した、pH 7.2 の半合成培地に、10代継代培養した後に同一培地での 18~24 時間培養菌を遠心沈澱器で集菌し前章迄と同様な操作にて休止菌浮游液 (5mg/cc) を調製して、実験に供した。尚 0.5% peptone 培地には両型菌共に僅かに発育し得るのみであり、各基質を添加すると、発育は極めて旺盛にな

第 8 表 各種基質の酸素消費量に及ぼす金属イオンの影響

イオン 基質	対照	Fe <sup>++</sup>				Mg <sup>++</sup>				
		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup> M	
glucose	S	270	348	345	290	272	319	313	286	274
	R	210	219	219	210	210	214	214	214	209
pyruvic acid	S	158	198	196	172	160	178	173	158	158
	R	153	157	155	153	153	159	159	154	154
gluconic acid	S	60	63	60	60	60	63	61	61	58
	R	42	45	45	43	41	42	42	40	40
ribose	S	25	27	27	25	25	26	25	25	24
	R	22	23	22	22	21	23	23	21	21
succinic acid	S	35	37	37	35	35	36	37	35	35
	R	33	35	34	33	33	35	35	33	33
fumaric acid	S	49	51	50	50	48	53	51	50	49
	R	48	48	48	47	47	51	51	50	48

単位：μl

る事を準備実験に於て知つた。又同時に 1.0% peptone 培地での継代培養菌を対照として、同一実験に使用した。実験方法はこの場合も同じく、Warburg 検圧計を常法に従つて用いた。

各培地に発育した菌の glucose, ribose, gluconic acid, pyruvic acid, の各 M/100 を基質とした時の酸素消費量を測定し、同時にこれ等に対する KCN 10<sup>-3</sup>M, NaN<sub>3</sub> 10<sup>-2</sup>M の阻害剤の影響を検した。

実験成績

各培地に於ける酸素消費量を 120 分の実験測定値で一括して第 9 表に示した。表に示す如く、対照菌 1.0% peptone 培地発育菌の実験成績は前章迄に記した普通寒天平板培地の発育菌に比較してやゝ酸素消費量は少いが傾向は大体同一であつた。培地中に glucose を添加した発育菌に於て特に目立つのは基質を glucose とした場合の酸素消費量が増大する

第 9 表 培地中添加炭素源と酸素消費量 単位：μl

培地 基質	peptone	pep. + glucose	pep. + ribose	pep. + gluconic acid	
glucose	S	203	243	198	213
	R	150	220	142	172
pyruvic acid	S	75	95	73	81
	R	70	92	70	74
ribose	S	42	43	74	40
	R	41	40	73	41
gluconic acid	S	50	56	48	73
	R	43	50	42	58

培地・対照 1.0% peptone 0.5% peptone + 0.5% glucose, ribose, or gluconic acid 各 10 代培養 120 分 X O<sub>2</sub>

事であるがこの状態は、R型菌の方がやゝ増加率は大きであつた。pyruvic acid, gluconic acidを基質とした場合は、glucoseと同様促進されたがS型、R型菌共其の増加は同程度であつた。ribose 基質では対照と殆ど変わらない結果を得た。

ribose を培地に添加した培地の発育菌では基質を ribose とした場合、S型R型菌共に同程度の増加を見る以外に特に変動は認められなかつた。

gluconic acid 添加培地発育菌では glucose, pyruvic acid に目立つた変化なく、gluconic acid を基質とした場合では、両型菌共に酸素消費量の増加を見たが、その割合はやゝS型菌の方が大きであつた。又 ribose に於ても変化は認められなかつた。

次に以上の実験成績から特に興味のある部分を更に追究する目的で阻害剤 KCN $10^{-3}M$ , NaN $3$   $10^{-2}M$ , を用いその阻害効果を検討してみた。実験成績は第10表に示した。この場合も120分の酸素消費量から各基質に対する阻害剤の影響を検索した。又対照は同様に1.0

% peptone 培養菌を用いたが阻害剤に対する態度は普通寒天平板培地培養菌に類似していた。

先ずglucose添加培地発育菌についてglucoseを基質とせる時は対照の阻害程度に比較してKCN, NaN $3$  共にR型菌は阻害が少かつた。

この事は glucose の添加により増加した呼吸量はS型菌に於ては対照と同程度迄に阻害されるのに比して、R型菌では増加呼吸量は阻害され難い事を知つた。基質 pyruvic acid では阻害は対照と殆んど等しかつた。gluconic acid を基質とせる場合は対照に比してS型、R型菌同程度の呼吸量の増加を見たが、この増加呼吸量は両型菌共に阻害剤により同じ様に阻害される事を知つた。

gluconic acid 添加培地発育菌では、基質が glucose, pyruvic acid, では対照と殆ど変わらなかつた。又 gluconic acid を基質とせる時は対照に比較してS型菌がやゝ大きい呼吸量の増加を認めたが、この増加呼吸量は KCN, NaN $3$  により同程度の阻害を受けた。この場合両型菌の間に特に差異は認められなかつた。

第10表 各培地発育菌の酸素消費に及ぼす阻害剤の影響

基 質	培 地 阻 害 剤	1.0% peptone			0.5% pep. + 0.5% glucose			0.5% pep. + 0.5% gluconic acid		
		O	KCN	NaN $3$	O	KCN	NaN $3$	O	KCN	NaN $3$
glucose	S	203	34	154	243	36	150	213	36	153
	R	150	40	132	220	82	148	172	44	138
pyruvic acid	S	75	13	33	95	14	34	81	11	31
	R	70	12	32	92	12	33	74	12	29
gluconic acid	S	50	9	36	56	10	30	73	12	37
	R	43	8	30	50	10	32	58	8	32

KCN  $10^{-3}M$ , NaN $3$   $10^{-2}M$ , 120分XO $2$ , 単位:  $\mu l$

第6章 総括及び考按

以上の実験成績を総括してこれに考案を加えるに、既に第2章に於て述べた如くチフス菌 S57S (S型) を原株としてこれより派生分離せる S57R (R型) の両型菌を使用した実験に於て、使用基質中で一方のみに酸素消費が見られ、他方に見られないと言う様な基

質は認められなかつた。この事からS型菌が、R型化する事により或る特定の酵素系が全く失われる、又は新生する事の無い事を知つた。

又 glucose を始め hexose の多くに酸素消費量、炭酸ガス発生量に差異の存在する事を知つた。ちなみに glucose の代謝に関しては、(1), Meyerhof, Warburg, Needham, Parnas, Cori, Lohmann 等により詳細に研究されて衆



知の Embden-Meyerhof pathway, (2), Dickens (1938, 1950), Cohen, et al. (1950), Scott and Cohen (1951), Horecker and Smyrniotis (1950) により報告されておる。Warburg-Dickens pathway (3), Lookwood, et al. (1941), Bentley and Neuberger (1949), Entner and Staniner (1951), Stokes and Campbell (1951), により研究された glucose から直接 gluconic acid を生成する glucose dehydrogenase 系と以上の 3つの主要な経路が想像され得る。この場合、真野 (1953) の報告にもある様にチフス菌の S 型, R 型両型菌の間には菌体の表面構造, 荷電状態, 菌膜の透過性等に相異がある為に, 酸素消費量, 炭酸ガス発生量の絶対量の相異のみにて代謝様式の断定は勿論, 推定も早計であるが, 第 3 章に於て述べた如く酵素阻害剤を使用せる実験に於て, Warburg (1926), Warburg and Negelein (1933), Davies (1933), Mickelson (1950) 等により cytochrome 系の含鉄酵素を特異的に阻害すると称せられる KCN を用いた実験で glucose を基質した時では S 型菌の酸素消費量の方が遙かに強力な阻害を受けるのに反して, 基質 pyruvic acid の場合は両型菌の呼吸阻害程度に差異の認められない事実は, 何等かの差異を生ずる機構の相異は glucose の分解過程に於て pyruvic acid に到る迄に存在するのではないかと想像された。

即ち, チフス菌が glucose を Embden-Meyerhof pathway に従つて分解し, 成川 (1952) の報告にもある様に Krebs の T. C. A. cycle を経て Warburg-Keillin 系に連結する力源代謝系を有すると言われているが, 筆者の実験に於ては更に R 型菌にはこの系以外に pyruvic acid に到る迄に KCN に阻害され難い酸素消費を伴う系で  $\text{NaN}_3$  により, 酸素消費より強力に炭酸ガス発生を阻害される代謝様式を併せ有するのではないかと実験成績より想像された。

更に各種阻害剤の作用機点に関しては種々の報告がなされている。Cross, et al. (1949), Kennedy and Lehninger (1951) は 2, 4-dinitro-

phenol,  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{AsO}_3$  等は oxidation と phosphorylation を分離する事によつて阻害効果を呈すると述べ, Pickett and Clifton (1941) は  $\text{NaN}_3$  は glucose の分解で phosphorylation を伴う反応を阻害すると報告し, 更に Slater (1950) は 2, 4-dinitrophenol,  $\text{NaN}_3$  は oxidative phosphorylation を阻害すると報告している。

NaF に関しては, Meyerhof and Lohmann (1934), Endo (1938) は enolase を特異的に阻害すると報告し, 同じく NaF, iodoacetic acid が glucose の酸化を阻害するのは phosphorylation を阻害する為であると Mickelson (1950) は述べており, 更に彼は glucose の oxidative pathway は NaF, iodoacetic acid に阻害されると報じている。Stockes and Campbell (1951) の報告によると glucose から gluconic acid を生成し更に 2 Keto, 又は 5 Keto gluconic acid を生成し分解の進む系は phosphorylation の関与なしに進み, NaF, iodoacetic acid で阻害されないと述べている。

これ等の事から考えると第 6, 7 表に示した実験成績から, R 型に於て KCN に阻害され難い酸素消費と phosphorylation に対する阻害剤により炭酸ガス発生が強く阻害される系は phosphorylation を含む Warburg-Dickens pathway と phosphorylation を含まない glucose dehydrogenase 系では無いかと推定した。

即ち, KCN に見られた両型菌の阻害度の差と他の phosphorylation を阻害する阻害剤を使用した時の阻害度の差からもこの事が推定出来るのではないかと思われる。

又 pyruvic acid を基質とした総ての実験成績で両型菌に差異の認められなかつた事は pyruvic acid 以下の代謝様式に根本的な相違の存在しない事を推定した。

又 2, 4-dinitrophenol では Peiss and Field (1948) は低い濃度では酸素消費を促進させると述べ, Clifton (1946) は適当濃度では酸化に関係なく合成機構を阻害すると報告しているが, 筆者の実験に於ては阻害効果は殆

ど認められず、両型菌の間に差異は認められなかつた。

金属イオンの影響に関しては赤沢 (1954) の報告にもある様に、この場合 S 型菌で金属イオンによる呼吸促進作用に差異の見られることは、両型菌間の代謝機構に於ける何らかの差異を暗示するものと考えられる。又、Stephenson and Gale (1937) は培地中に glucose を添加する事により、構成酵素である glucozymase の増加を報告しており、Cohen and Raff (1951) は gluconic acid, ribose, 其の他の適応酵素より代謝機構を明らかにしているが、第 9, 10 表の実験成績から、glucose を培地に添加する事により S 型は KCN, NaN<sub>3</sub> に阻害され易い Embden-Meyerhof pathway の適応的增加を見て、R 型に於ける増加量は KCN, NaN<sub>3</sub> に阻害され難い事から、Warburg-Dickens pathway 及び glucose dehydrogenase の二者による適応的增加ではないかと推定され、前記の想定を裏書きする様な結果を得たが、今回行つた如き簡単なる実験ではこれらの予想を断定する事は不可能であり想像の域

を出ないがこの点の究明に関しては事後の実験に期したいと考えている。

## 第七章 結 論

(1) 本実験は S 型菌と R 型菌の代謝機構の相違を追究する事によつて、S—R 変異の本質を究明せんとする目的で行つた。

(2) 各種基質を使用した酸素消費、及び炭酸ガス発生量の測定実験に於て、一方にのみそれ等が見られる基質の存在しない事から両者の酵素的差異は比較的量的な差異にある様に思われた。

(3) 普通寒天平板培地培養菌、及び培地中に glucose 其の外を添加した半合成培地培養菌の呼吸並びに阻害実験から、Embden-Meyerhof pathway 以外に R 型菌では、Warburg-Dickens pathway 及び glucose dehydrogenase 系に比較的依存した代謝様式を取るのではないかと思われた。

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の謝意を表し、併せて御協力下さつた西谷嬢に感謝する次第であります。

## 参 考 文 献

- 1) Arkwright, T. A.: J. Path. and Bact. **23**, 358 (1920)
- Arkwright, T. A., J. Path. and Bact. **24**, 36 (1921)
- Arkwright, T. A.: Brit. J. Exp. Path. **5**, 23 (1924)
- 2) Hadley, P.: J. Inf. Dis. **40**, 1 (1927)
- 3) Finkle, P.: J. Exp. Med. **53**, 661 (1931)
- 4) Alloway, J. L.: J. Exp. Med. **55**, 91 (1932)
- 5) Bisset, K. A.: J. Path. and Bact. **47**, 223 (1938)
- 6) 佐藤 日本細菌学雑誌, **4**, 97 (1949)
- 7) 長田 日本細菌学雑誌, **4**, 3, 139 (1949)
- 8) White P. B.: J. Path. and Bact. **32**, 85 (1929)
- 9) 岡本: 日新医学, **32**, 895 (1943)
- 10) 山中著: 最近の細菌学及び免疫学, P. 86.
- 11) 山中: 医学通信, **149** (1949)
- 12) 赤須: 衛生学伝染病学雑誌, **29**, 327 (1933)
- 13) Tracy J. Bact. **36**, 467 (1938)
- 14) Brawn Bact. Rev. **11**, 75 (1947)
- 15) Umbreit, W. W. et al.: Manometric techniques and tissue metabolism (1949)
- 16) Dickens, F.: Bioch. J. (London) **32**, 1626 (1938)
- 17) Dickens, F. and Glock, G. E.: Nature. **166**, 33 (1950)
- 18) Cohen, S. S. and Scott, D. B. M.: Science. **111**, 543 (1950)
- 19) Horecker, B. L. and Smyrniotis, P. Z.: Arch. Bioch. **29**, 232 (1950)
- 20) Scott, D. B. M. and Cohen, S. S.: J. Biol. Chem. **188**, 509 (1951)
- 21) Lookwood, L. B. Tabenkin B. and Ward, G. E.: J. Bact. **42**, 51 (1941)
- 22) Entner, N. and Stanier, R. Y.: J. Bact. **62**, 181 (1951)
- 23) Stokes, F. N. and Campbell, J. J. R.: Arch. Bioch. **30**, 121 (1951)
- 24) Bentley, R. and Neuberger, A.: Bioch. J.

- (London) 45, 584 (1949)
- 25) 真野：岡山医学雑誌, 65, 11, 1835 (1953)
- 26) Warburg, O.: Biochem. Z. 177, 471 (1926)
- 27) Warburg, O. and Negelein, E.: Biochem. Z. 262, 237 (1933)
- 28) Davies, R.: Biochem. Z. 265, 90, 267, 357 (1933)
- 29) Mickelson, M.N.: J. Bact. 59, 659 (1950)
- 30) 成川：仁泉医学雑誌, 3, 4, 164 (1952)
- 31) Cross, R. J., Taggart, T. V., Covo, G. A. and Green, D. E.: J. Biol. Chem. 177, 655 (1949)
- 32) Kennedy, E. P. and Lehninger, A. L.: J. Biol. Chem. 190, 361 (1951)
- 33) Pickett, M. J. and Clifton, C. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 46, 443 (1941)
- 34) Slater, E. C.: Nature. 166, 982 (1950)
- 35) Meyerhof, O. and Lohmann K.: Biochem. Z. 271, 89 (1934)
- 36) Endo, S.: Biochem. Z. 296, 56 (1938)
- 37) Peiss, C. N. and Field, J.: J. Biol. Chem. 175, 49 (1948)
- 38) Clifton, C. E.: adv. in Enzy. 6, 269 (1946)
- 39) 赤沢：岡山医学雑誌, 66, 5, 1009 (1954)
- 40) Stephenson, M. and Gale, E. F.: Biochem. J. 31, 1311 (1937)
- 41) Cohen, S. S. and Raff, R.: J. Biol. Chem. 188, 501 (1951)

---

Department of Bacteriology, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Dr. S. Murakami)

### Research Relative to S-R Variation of Bacteria

#### Report I. Respiration of S-type and R-type *S. typhi*

By

Yoshinori Shinzawa

This experiment was conducted with the object of finding out the instinct of smooth-rough type variation, a form of bacterial variation. A comparison was made using organisms *S. typhi* 57-S, and 57-R which was isolated from it. The method of experiment was mainly with Warburg manometer to measure O<sub>2</sub> uptake and CO<sub>2</sub> evaluation when various substrates were used with bacteria developed on agar platte medium and semi-synthetic medium. Furthermore, the influence of inhibitor on them was examined to arrive at the difference of metabolism of the both types from the experimental results.

The results were as follows:

1. The difference of metabolism of S-type and R-type bacteria is an analysis of glucose which was found to be active until it became pyruvic acid.
  2. S-type bacterium analyzes mainly by glucose and Embden-Meyerhof pathway.
  3. R-type bacterium, in addition to glucose analysis and Embden-Meyerhof pathway, analyzes by glucose dehydrogenase system and Warburg-Dickens pathway.
  4. It is concluded from the foregoing that if S-type bacterium changes to R-type bacterium, aerobic metabolism system will develop.
-