

チフス菌の S-R 変異に関する研究

第 2 篇

チフス S 型, R 型菌に於ける力源代謝について.

岡山大学医学部細菌学教室 (指導: 村上教授)

新 沢 義 憲

〔昭和30年2月15日受稿〕

目 次

第一章 緒 言	第一節 実験材料及び実験方法
第二章 休止菌による glucose 代謝	第二節 実験成績
第一節 実験材料及び実験方法	第四章 総括及び考案
第二節 実験成績	第五章 結 論
第三章 発育時に於ける glucose の利用	参考文献

第一章 緒 言

前報に於て筆者はチフス菌 S, 57 S (S 型) を原株としてこれより分離せる S, 57 R (R 型) の両型菌を使用して, 主として物質代謝の面から, S-R 変異に伴う生物学的性状の差異を知るべく実験を行い, その結果 R 型化する事により好氣的な glucose の代謝様式, 即ち Warburg-Dickens pathway 及び glucose dehydrogenase 系の発達が起るのでは無いかと言う事を各種阻害剤, 其の外的実験に於ける酸素消費量, 及び炭酸ガス発生量の測定値より推定して報告したが, 今回は更にこの点を追究する事により今迄未解とされていた, チフス菌の S-R 変異に伴う物質代謝の変動を明らかにし, この変異型式の本態の一端でも知らんとして実験を行つた結果, 得た所の知見をこゝに報告する次第である.

前報にも述べた如く, S-R 変異は最初 Arkwright. (1920, 1921, 1924), によつて集落の形態, 細菌の形態, 浮游液の自発凝集性, 毒力, 等により認知されたが, 現在では特異的多糖体の問題が重要視されて来た. 即ち White (1929), の報告にもある如く,

S 型菌は表面の特異多糖体により蛋白体が被われている為に, Millon 試薬其の外の蛋白凝集反応に対して陰性であると説明している. 更に III 型の Pneumococcus に存在する多糖体はこれを特異な polysaccharase によつて処理する事により病原性も失われ, 莢膜や, 特異血清中で凝集する性質も失われて R 型化して来る事を, Avery and Dubos (1931), Dubos (1932, 1935, 1939), Sickeler and Shaw (1933, 1934, 1935, 1941) は報告しており, 共に S-R 変異に於ける特異多糖体の重要な役割を述べている. 又 Dubose (1952) は従来変異菌は O 抗原と呼ばれる多糖質, 或は M 蛋白と名付けられる蛋白体の産生能力の消失と言う観点より規定されて来たが, R 型菌はこれを分解利用した為の消失では無いか, 即ち S 型菌はこれ等物質を代謝により分解利用出来ない為の残存ではないかと推定して居る.

又, Pneumococcus に於て型転換物質が III 型の Pneumococcus より Avery, McLeod and McCarty (1944) により純粹に取り出されたが, この型転換物質は desoxyribo 核酸である事を認め, これを莢膜多糖質を有しない II 型の菌に微量混入培養する事によつて III 型の

莖膜菌に変異せしめ変異現象に於ける核酸の重要性について述べている。この事は S 型菌から R 型菌への変異に際して見られる、多糖体の産生機能の消失が、これ等を合成する酵素群の連鎖の一部が失われた為のものか、或は相対的な酵素の量的な相違によるものかは別として、酵素生成を支配するとさえ言はれて居る核酸は更に、細菌に特有な蛋白体の合成にも関与すると言う別な観点からも興味があると考えられる。

尚、Vendrelly (1946) は *E. coli* の S 型菌と R 型菌との ribo 核酸と desoxyribo 核酸の含有量を測定して S 型菌の方が desoxyribo 核酸を多く含むと述べ、又 Cohen (1951) は ribo 核酸は主として oxidative pathway に従つて合成され、triose phosphate から合成される desoxyribo 核酸は主として Embden-Meyerhof pathway に由来すると報告している。

第二章 休止菌による glucose の代謝

第一節 実験材料及び実験方法

供試菌は既に第 1 篇に於て述べた如く、チフス菌 S. 57 S を原株として赤須 (1933) の報告による陳旧培養法に従つて分離した S. 57 R を使用した。常に平板培地上の集落形態、及び Millon 反応、更に液体培地中に於ける発育形式、生理的食塩水中に於ける自発凝集性等によつて S 型菌、又は R 型菌である事を確認しつゝ実験に供した。

供試菌浮游液の調製は、前報同様普通寒天平板培地の 18 ~ 24 時間培養菌を用い M/50 磷酸緩衝液 (0.85% 食塩添加, pH7.2) を使用して 3 回洗滌を行い、濃度はプルフリツヒ比色計により 5mg/cc に常に一定として実験に供した。

実験方法は酸素消費量には Warburg 検圧計を使用し、その手技は Umbreit (1949) の方法に従つて、検圧計の読みから測定値 (μ l) を求めた。

各基質、並びに分解生成物の定量的検索と

は、同一組成の検圧計内容を実験時間 240 分後に取り出し、遠沈操作により菌体を除いた上清をもつて供試材料とした。glucose の定量には Somogyi-Shaffner-Hartman 法を用いた。pyruvic acid の定量は、2,4-dinitrophenylhydrazin を使用する、Friedman-Haugen の方法に従つて行つた。又 lactic acid の定量は hydroxybiphenyl 法により定量を行つた。

尚、分解生成物の捕捉の目的で完全分解を阻害させる為には主として KCN 10^{-3} M を使用した。好氣的条件下での実験には検圧計のガス腔を空気とし、逆に嫌氣的条件は Umbreit の方法に従つてガス腔を窒素ガスで実験を行つた。反応生成物の検出には、Stokes and Campbell (1951) の方法に従つて paper chromatography を使用した。即ち容器内容を実験時間終了後適当量取り出し前記同様除菌した上清を供試材料とした。展開剤の組成は 45% methanol, 45% ethanol, 10% 水、を使用し、発色には 0.1N AgNO_3 を 5N NH_4OH に溶解したものを吹霧して使用した。使用濾紙は東洋濾紙の No. 50 を用いた。

第二節 実験成績

(1) glucose の消費量と酸素消費量

glucose の消費量と酸素消費量の関係を同一反応系の容器内容で追究した所、第 1 表に示すが如き結果を得た。表中に示す数字は両消費量共 240 分の実験時間に於ける検圧計の測定値及び、Somogyi-Shaffner-Hartman 法による glucose の定量から算出した消費 μ M で示した。即ち、好氣的条件に於ては前篇にも報告した如く酸素消費量の比較実験では S 型菌の方が R 型菌のそれよりやゝ大きい事を知つたが、今回の実験に於てもその傾向は認められ、S 型菌は 240 分で 47.5 μ M 消費するのに対して R 型菌は 42.5 μ M であつた。然るに、glucose の消費量は同一実験時間に於て S 型菌は 13.5 μ M であるのに比して R 型菌は 10.1 μ M であり、この結果から、S 型菌では glucose 1 μ M の消費に対して 3.5 μ M の酸素を必要とするが、R 型菌では 4.2 μ M

の酸素を消費する事になり、この事実から、見掛けの酸素消費量は S 型菌の方が大であるが実際の glucose 1 μM 当りの酸素消費量は R 型菌の方が大きい事を知った。

又、嫌氣的条件下に於ては、glucose の消費量は S 型菌が 7.3 μM , R 型菌が 5.8 μM と S 型菌が遙かに大きい事を知った。

第 1 表 glucose の消費量と酸素消費量

菌型	条件		
	測定対象	好気性条件	嫌気性条件
S 型菌	酸素消費量	47.5 μM	/
	glucose 消費量	13.5 μM	7.2 μM
R 型菌	酸素消費量	42.5 μM	/
	glucose 消費量	10.1 μM	5.8 μM

反応系：菌液 2.0cc (10mg/cup), glucose (30 μM /cup), 全量 3.0cc.

反応 pH: 7.2 好気性・ガス腔空気, 嫌気性
ガス腔窒素ガス, 反応温度: 37.5°C

反応時間: 240分, glucose 定量: Somogyi-Shaffner-Hartman 法.

(2). glucose の消費量と pyruvic acid の生成量 glucose の消費量を測定した実験に於て同一供試材料を以て pyruvic acid の生成量を測定し、更に同一反応系に KCN 10⁻³M を添加して完全分解を阻止して pyruvic acid を捕捉定量した実験に於て第 2 表に示す如き結果を得た。

即ち、表に見られる通り、S 型菌に於ては glucose 13.5 μM の消費に対して 1.5 μM の pyruvic acid が生成され、R 型菌では glucose 10.1 μM の消費に対して pyruvic acid 1.1 μM が生成され、S 型菌と R 型菌の間に特に差異は感じられなかつた。この数値は完全分解の可能な条件下に於ける中間代謝産物である pyruvic acid の生成量であるが、これに対して、pyruvic acid が蓄積されると仮定して、完全分解を阻害する為に cytochrome 系の酵素阻害剤である KCN 10⁻³M を添加した実験に於ては、S 型菌では glucose 10.2 μM 消費に対して 8.4 μM の pyruvic acid が蓄積される。これに反して、R 型菌では 9.8 μM の

glucose から 3.9 μM の pyruvic acid が蓄積される事を知った。これ等から逆算すれば S 型菌に於ては pyruvic acid 1 μM の生成に対して 1.2 μM の glucose が消費された事になり、R 型菌では 2.5 μM が消費された事になる。即ち、pyruvic acid 1 μM 当りの glucose の消費量は S 型菌と R 型菌では約 2 倍の差異を示す事を知った。

この事は所謂、Embden-Meyerhof pathway に従つて分解される場合は 1 M の glucose から 2 M の pyruvic acid が生成され、又 Warburg-Dickens pathway による分解ならば、glucose 1 M から、pyruvic acid 1 M が生成される理論値と併せ考えれば非常に興味ある事実である。更に前篇に於て述べた如く酸素消費量の glucose 基質の場合は KCN によりその呼吸は S 型菌の方が強く、阻害される事を知つたが、この実験に於ける glucose の消費量の阻害も S 型菌の方が大であつた。

第 2 表 glucose の消費量と pyruvic acid の生成量

菌型	測定対象	阻害剤	
		ナ	シ KCN10 ⁻⁴ M
S 型菌	glucose 消費量	13.5 μM	10.2 μM
	pyruvic acid 生成量	1.5 μM	8.4 μM
R 型菌	glucose 消費量	10.1 μM	9.8 μM
	pyruvic acid 生成量	1.1 μM	3.8 μM

反応系：菌液 2.0cc (10mg/cup), glucose (30 μM /cup), 全量 3.0cc 反応 pH 7.2, 反応温度: 37.5°C 反応時間: 240分, ガス腔: 空気, glucose 定量: Somogyi-Shaffner-Hartman 法, pyruvic acid 定量: Friedman-Haugen 法.

(3). glucose の消費量と lactic acid の生成量、前記 (2) の実験と同一反応系、同一実験方法で生成した lactic acid の定量を測定した結果第 3 表に示す如き結果を得た。

lactic acid の定量には hydroxybiphenyl 法によつた。即ち好氣的な glucose の分解に於ては S 型菌は glucose 13.5 μM の消費につき、lactic acid 4.4 μM 生成されるのに対して、R 型菌では glucose 10.1 μM から lactic acid

3.3 μ M が生成された。その結果から分る様に glucose 1 μ M の消費により生成された、lactic acid の量には、S 型、R 型菌の間に著明な差異の認められない事を知った。

第 3 表 glucose 消費量と lactic acid の生成量

	glucose 消費量	lactic acid 生成量
S 型菌	13.5 μ M	4.4 μ M
R 型菌	10.1 μ M	3.3 μ M

反応系：菌液 2.0cc (10mg/cup), glucose 0.5 (30 μ M/cup), 全量 3.0cc 反応 pH: 7.2, 反応温度: 37.5°C 反応時間: 240分, ガス腔: 空気, glucose 定量: Somogyi-Shaffner-Hartman 法, lactic acid 定量: hydroxybiphenyl 法。

(4). pyruvic acid の消費量と酸素消費量。

pyruvic acid を基質とせる場合の酸素消費量を測定し、同一反応系の実験に於ける基質 pyruvic acid の消費量を測定した所、第 4 表に示す如き結果を得た。表中の数字は検圧計の測定により得た酸素消費 μ M. 及び Friedman-Haugen 法による pyruvic acid 消費 μ M で示した。即ち前篇にも述べた如く pyruvic acid を基質とした場合の酸素消費量は両型菌共ほぼ同一測定値を示したが、今回の実験に於ても両型菌共誤差範囲内で等しい結果を得た。又、これに対する pyruvic acid 自体の消費量も S 型菌が 4.8 μ M, R 型菌 4.6 μ M で殆んど等しい結果を得た。尚これ等の数値は pyruvic acid の完全酸化に要する理論値にほぼ等しい事を知った。

第 4 表 pyruvic acid の消費量と酸素消費量

	pyruvic acid 消費量	酸素消費量
S 型菌	4.8 μ M	11.0 μ M
R 型菌	4.6 μ M	10.8 μ M

反応系：菌液 2.0cc (10mg/cup), pyruvic acid (30 μ M/cup), 全量 3.0cc 反応 pH: 7.2, 反応温度: 37.5°C 反応時間: 240分, ガス腔: 空気, pyruvic acid 定量: Friedman-Haugen 法。

(5). glucose の分解生成物の検出

KCN 10⁻³M を添加して完全分解を阻害させた反応系に於て、glucose を基質として 240 分振盪させた後、内容を取らし徐菌した上清を供試材料として、paper chromatography により反応生成物を検索した所、第 5 表に示す如き結果を得た。

即ち M/50 の glucose を基質とせる場合、S 型菌ではその濾紙の上に AgNO₃ にて発色する、spot はその RF 値から、推察して RF 0.60 の glucose の残余 spot と、0.70 に現れる、pyruvic acid が明確に検出され、R 型菌に於ては S 型菌と同じく明瞭な glucose と pyruvic acid の spot と更に、0.30 の低い部分に gluconic acid と思われる稀薄な spot を検出した。

第 5 表 glucose の分解生成物の検出 RF 値

S 型菌	R 型菌	対 称 実 験
0.70	0.70	0.70—pyruvic acid
0.60	0.60	0.60—glucose
/	0.30	0.30—gluconic acid

- 1) 反応系：菌液 2.0cc (10mg/cup), glucose 0.5cc (M/50), KCN 0.5cc (10⁻³M), 全量 3.0cc
- 2) 供試材料：上記反応内容 240 分後、上清。
- 3) 条件：反応 pH 7.2, 反応温度 37.5°C, 反応時間 240 分, ガス腔：空気。
- 4) paper chromatography
展開剤：45% methanol
45% ethanol
10% water
発色剤：0.1N AgNO₃, 5N NH₄OH 溶液。

(6). gluconic acid の分解生成物の検出次に第 6 表に示した如く、gluconic acid を基質とした実験を前記 (5) と同一実験方法で行つて見た。この場合は S 型菌は gluconic acid の残余 spot とその僅か上に不明の spot の極めて稀薄なのを検出した。R 型菌では同様 gluconic acid の 0.30 の spot と pyruvic acid の 0.70 の spot が比較的明確に検出され、S 型菌に見られた不明の spot (RF 0.40) がこの場合も更に稀薄な状態で同じ位置に認められた。

第6表 gluconic acid の分解生成物の検出 R F 値

S 型菌	R 型菌	対 称 実 験
/	0.70	0.70—pyruvic acid
0.40	0.40	?
0.30	0.30	0.30—gluconic acid

- 1) 反応系：菌液2.0cc (10mg/cup), gluconic acid 0.5(M/50), KCN 0.5cc (10⁻³M), 全量3.0cc
- 2) 供試材料：上記反応内容240分後, 上清.
- 3) 条件：反応pH7.2, 反応温度37.5°C, 反応時間240分, ガス腔：空気.
- 4) paper chromatography
展開剤：45% methanol
45% ethanol
10% water
発色剤：0.1N AgNO₃, 5N NH₄OH 溶液.

第三章 発育時に於ける glucose の利用

第一節 実験材料及び実験方法

実験供試菌は前章同様, S, 57S, S, 57R の両型菌を使用した. 発育測定に使用せる合成培地の組成は次の通りである.

glucose	2.0
tryptophan	0.2
asparagin 酸	3.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.1
KH ₂ PO ₄	1.0
Na ₂ HPO ₄	1.4
NaCl	2.0

水 1,000cc

以上の組成の pH7.2 の合成培地に両型菌を移植したものを, 好気性培養に於てはそれぞれ4本の大型滅菌試験管に等量に分注して一定間隔で振盪しながら, 37°C の孵卵器中で培養した. 嫌気性培養に於ては両型菌を各々4本づゝの滅菌 Thunberg 管に等量に分注し, ロータリーポンプを用いて排気した後, 窒素ガスを充填し更に嫌気培養器中に入れて, 再び排気し窒素ガスを充填する操作を数回くり返した後そのまゝ 37°C の孵卵器中に入れ

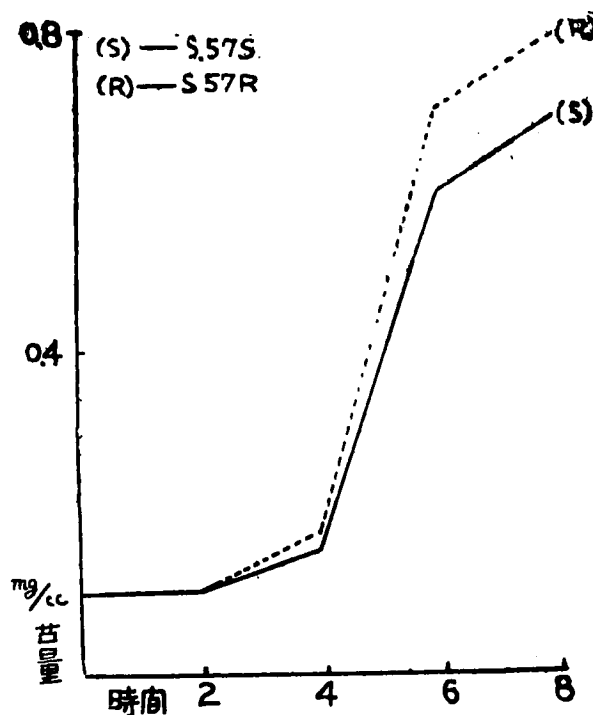
て嫌気培養とした. この際培地中に溶解せる, 酸素に対しては何等処置を取らなかつた為, 完全な嫌気条件とは云えないと思われる.

その後, 2, 4, 6, 8 の各培養時間に於て, 好, 嫌気培養の両型菌の試料を1本づゝ取り出し, 先ず光電比色計により標準曲線に対比して, 其の濁度から菌量を求め, 更に遠沈操作によつて上清を採取して, その0.5cc 中に含有される glucose 量を Somogyi-Shaffner-Hartman 法によつて定量した.

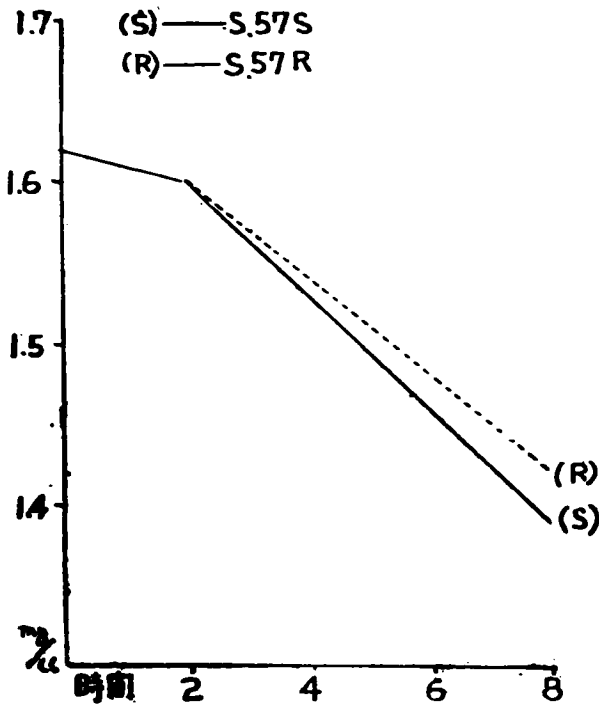
第二節 実験成績

(1). 好気性培養に於ける発育と glucose 消費量との関係, 好氣的培養に於ける, 両型菌の発育曲線及び培地中の glucose の消費曲線は第7, 8表に表示した. 表に示す如く, 両型菌の発育は, 4時間迄は殆んど変わらないが, 培養時間4時間過ぎから, S型菌に対してR型菌の方が, その発育は良好であつた. 又同時に各培養時間に於ける培地を供試材料として其の上清0.5cc 中に含まれる glucose 量を定量した結果は表に示す如く, やはり4時間目迄は著明な差異は認められなかつたが, 4時間後に於て, R型菌はS型菌に比較して消費量の相当の増加を示した. 即ち菌の発育

第7表 好気性培養に於ける発育曲線



第8表 好気性培養に於ける培地の Glucose 消費曲線

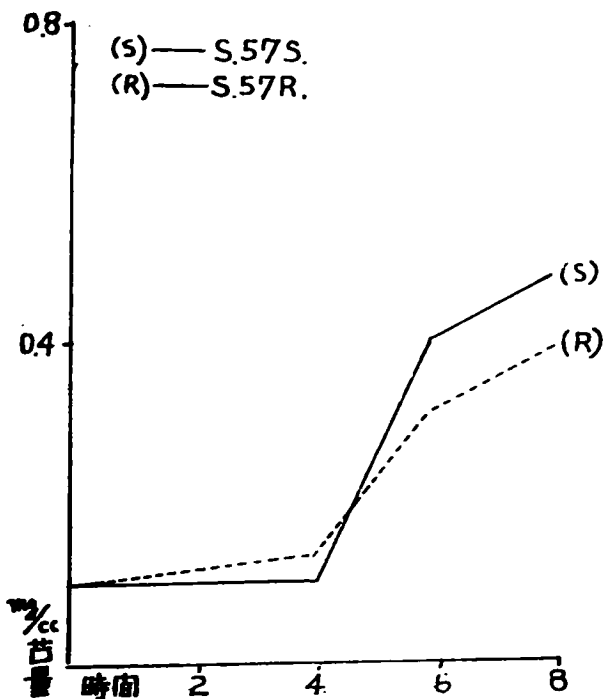


の大きいR型菌が发育の少いS型菌に比して发育の関係とは逆に glucose の消費量の小さい事を知った。

(2). 嫌気性培養に於ける菌の发育と glucose の消費量の関係

同様の実験を嫌気性培養に於て行つた所、

第9表 嫌気性培養に於ける发育曲線

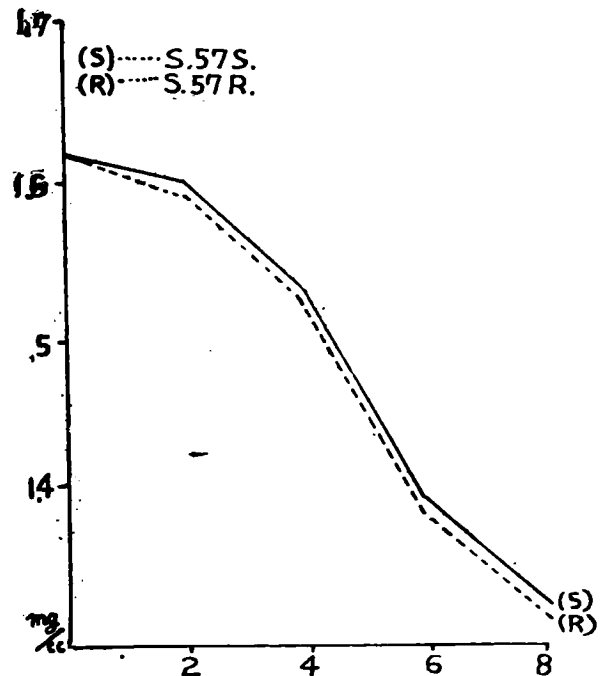


第9, 10表に示す如き実験結果を得た。

即ち发育は一般に好气的培養の時より、不良であつたが、その事は、S型菌よりも、R型菌に著明に見られた。培養時間4時間迄は、殆ど両型菌共に发育が認められなかつたが、4時間以後、S型菌は急激な増殖を示したのに比較してR型菌はその曲線の示す如く極めて、发育状態は悪い事を知つた。この事は好気性培養の場合とは全く逆の関係を示し、S型菌は好気性培養より、嫌気性培養の发育がわずかに不良であるに過ぎなかつたが、R型菌では嫌気性培養に於ては好気性培養の約1/2以下の发育しか示さなかつた。この事は、換言すればR型菌は好気性培養条件の方が、发育に適しておりS型菌の发育には、好、嫌気性の問題はR型菌程強い影響を示さない事を知つた。

更に各培養時間に於ける、培地中の glucose 量を測定した所、S型、R型菌共に、平行した曲線を示し、両型菌の間に特に差異は認められなかつたが、わずかにR型菌の方が、消費量が大きい傾向を見た。又好気性より一般に大量の glucose を必要とする事を知つた。

第10表 嫌気性培養に於ける培地の glucose 消費曲線



第四章 総括及び考案

筆者は既に第1篇に於て、S型菌とR型菌の呼吸に関する比較実験を行い、その中で cytochrome, 及び cytochrome oxidase 等含鉄酵素系の阻害剤である KCN 及び glucose の分解過程で oxidative phosphorylation の阻害 (Slater (1950), Pickett and Clifton (1941)), diphosphoglyceric acid dehydrogenase を阻害する事により glucose の分解の阻止 (Spigleman (1948)), 更に cytochrome 系の阻害, (Keilin (1936)), 等で知られている NaN_3 を用いた実験で, glucose を基質とせる場合, 酸素消費量は KCN, NaN_3 共に S型菌の方を強く阻害する, 又 R型菌に於ては NaN_3 では, KCN に比較してやゝ阻害度の高い事, 更に炭酸ガス発生は KCN によつては, 酸素消費量同様 S型菌の方が, 強く阻害されるが, NaN_3 では, R型菌では酸素の消費に対する阻害以上に炭酸ガス発生を阻害する事が見られた. 又 pyruvic acid を基質とせる実験に於ては, S型菌, R型菌共に差異の認められない事から両型菌の代謝機構の相異は glucose の分解過程で pyruvic acid に到る迄に存在すると想像し, その差異は前記, 阻害剤を用いた成績等から, R型菌には従来から言われている, Embden-Meyerhof pathway 以外に KCN, NaN_3 によつて酸素消費を阻害され難い系, 即ち cytochrome 系を含まず, phosphorylation の関与しない酸素消費を伴う系と, 更にその炭酸ガス発生機構が, 酸素消費よりも強く NaN_3 に阻害を受ける事等から, phosphorylation の関与する炭酸ガスの発生を伴う系を併せ有して居る事を推定して, 前者を glucose dehydrogenase 系, 後者を Warburg-Dickens pathway と推定した. 又 S型菌に於ては主として Embden-Meyerhof pathway に依存した分解経路を取り, その酸素消費, 炭酸ガス発生は T. C. A. cycle に由来するものとして報告したが, 今回の実験に於てこれ等の推定を裏書きする様な結果を得た.

即ち, 第二章に於て述べた如く, paper chromatography を用いた実験に於て KCN $10^{-3}M$ を添加してその完全分解を阻止させた実験材料を用いた場合, 基質 glucose から S型菌では pyruvic acid のみを生成するのに対して R型菌ではそれ以外に gluconic acid も同時に検出された. この gluconic acid の生成に関しては, gluconokinase の作用は不可逆反応と想像されるから, 6-phosphogluconic acid から合成されると解するよりも, Barker, et al. (1939), Eichel, et al. (1949). Bentley (1949) 等により報告されている, glucose dehydrogenase によつて gluconolactone を經由して生成されると解する方が順当であろう, 又 Keilin and Hartree (1948) はこの glucose dehydrogenase は flavin 系酵素であると報告して居る事から KCN の添加によつて阻害され難い事も想像出来る. 又 Auel (1950) は脱水素された水素は此の系に於ては, かなり自由に acceptor として分子酸素を利用出来ると報告しているので, glucose より脱水素されて gluconic acid を生成する反応が検圧計の上で酸素消費量として現れる事は当然予期出来る. この事は前記第1篇に於ける筆者の R型菌に glucose dehydrogenase 系が存在すると言う相像を裏書きする結果であつた.

更に gluconic acid を基質とした時では, S型菌では分解生成物と思われる不明の spot を認め, R型菌もこれと同一 RF に極めて稀薄な spot として同一物質が検出され, これ等の量的な差異を示したが, 又 R型菌に於ては pyruvic acid が明確に検出された. この不明の spot に関しては, Stubbs and Lockwood (1940), Lockwood, et al. (1941), Entner and Stainer (1951), Katznel son, et al. (1953). 増尾 (1953) 等により pseudomonas, acetobacter 等で証明した gluconic acid を 2-keto, 或は 5-ketogluconic acid に分解する事, 又は更に α -ketoglutaric acid を T. C. A. cycle を通じて生成し完全分解の経路を通ると言われ, 又 gluconic acid の酸化の初期には 2-ketogluconic acid が蓄積さ

れると報告しているが、筆者の実験に於て見られた spot も 2-ketogluconic acid ではなからうかと、Stokes and Campbell (1951) の報告にもある RF 値等から考えて想像したが、この点に関しては、未だに疑問とする点も存在するので次の機会に更に追究して見たいと思つている。然し、この実験に於て R 型菌のみに pyruvic acid を検出した事は興味ある事実である。

更に、第二章に述べた如く、好氣的分解で S 型菌、R 型菌の酸素消費量と glucose 消費量の関係では、完全酸化せる場合は、 $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O$ の式から考えられる如く 1 Mol の glucose を分解するのに 6 Mol の酸素が必要であるが筆者の実験に於ては、S 型菌では $1\mu M$ 当り、 $3.5\mu M$ の酸素を、又 R 型菌では $4.2\mu M$ と S 型菌に比較して R 型菌は遙かに大量の酸素を消費した。この事は R 型菌に於ては、glucose 分解過程が酸素を多く必要とするか、或は S 型菌に於ては完全分解されず何等かの中間代謝産物として蓄積せるかの、いずれかであろうと想像した。この R 型菌に存在する glucose の好氣的な分解経路に関しては、更に第 2 章に述べた glucose 消費に伴う pyruvic acid の生成に関する実験に於て、同じく KCN を添加して完全酸化を阻害して pyruvic acid の蓄積を測定した所、S 型菌に於ては pyruvic acid $1\mu M$ 当り glucose $1.2\mu M$ 、R 型菌では $2.5\mu M$ 消費されて、R は S に比し約 2 倍の glucose の消費を知つた。この事は Embden-Meyerhof pathway に従つて分解されるよりも Warburg-Dickens pathway に従つて分解されると云う考え方によく符合し、又 KCN の阻害度等から考えて分解された glucose は総て pyruvic acid として蓄積されないとしても、R 型菌に於ける前記 paper chromatography により gluconic acid から pyruvic acid を生成し、その間に検圧計による呼吸実験から炭酸ガスの発生が見られる事、及びそれは phosphorylation の阻害剤である NaN_3 に阻害され易い事等を併せ考えれば、R 型菌に於ける好氣

的な Warburg-Dickens pathway が存在する事を示すものと信ずる。更に pyruvic acid の消費量と酸素消費量を測定した実験に於て、その測定値は両型菌の間に著しい差異の認められない事から、pyruvic acid 以下の分解には著明な相異の存在しない事を知つた。

次に第 3 章の実験に見られる如く、S 型菌と R 型菌の発育と培地中の glucose の消費量を測定した実験に於て、好氣性条件では、R 型菌が S 型菌に比して glucose の消費が少いにもかかわらず、発育が良好であつた。この事は換言すれば、S 型菌は R 型菌より多量の glucose を消費しながら発育は緩慢であつた。又嫌氣性条件では発育は S 型菌に比して R 型菌は非常に悪く、glucose の消費量もむしろ、R 型菌の方が多量に必要とする事を認めた。此の事から考えても R 型菌の力源代謝には遊離酸素が必要である事が判る。

以上の成績から、S 型菌が R 型化する事により好氣的分解経路が発達すると言う事が明らかにされたと思う。

第五章 結 論

- (1). チフス菌 57S と、これから解離した 57R との両型菌を使用して S—R 変異に伴う生物学的変化を知る目的で実験を行つた。
- (2). S 型菌に於て、KCN $10^{-3}M$ を添加して完全分解を阻害させた時の paper chromatography による実験で glucose の分解生成物として pyruvic acid のみを検出し、蓄積 pyruvic acid 量は R 型菌の 2 倍量を示した。
- (3). R 型菌に於て、KCN $10^{-3}M$ を添加して完全分解を阻害させた時の paper chromatography による実験で glucose の分解生成物として pyruvic acid と gluconic acid を検出し、更に gluconic acid から pyruvic acid を検出した。又蓄積 pyruvic acid 量は S 型菌の $1/2$ 量であつた。
- (4). 以上の事から S 型菌の代謝は主として Embden-Meyerhof pathway に従い、R 型菌はこの外に glucose dehydrogenase 系及び、Warburg-Dickens pathway が存在する事を

知った。

(5) S型菌が、R型化する事により、前記好氣的な力源代謝経路の発達が起る事を知った。

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. Bact. **23**, 358 (1920) J. Path. Bact. **24**, 36 (1921) Brit. J. Exp. Path. **5**, 23 (1924)
- 2) White, P. B. : J. Path. Bact. **32**, 85 (1929)
- 3) Avery, O. T., and Dubos, R. J. . J. Exp. Med. **54**, 73 (1931)
- 4) Dubos, R. J. : J. Exp. Med. **55**, 377 (1932) J. Exp. Med. **62**, 259 (1935) 細菌細胞, 岩波書店 (1952)
- 5) Sickles, G. M. and Shaw, M. : J. Inf. Dis. **53**, 38 (1933) J. Bact. **28**, 415 (1934) J. Bact. **42**, 133 (1941)
- 6) Avery, O. T. MacLeod, C. M. and McCarty. : J. Exp. Med. **79**, 137 (1944)
- 7) Cohen, S. S. : Nature. **168**, 746 (1951)
- 8) 赤須 : 衛生学伝染病学雑誌, **29**, 327 (1933)
- 9) Umbreit, W. W., Burris, R. T., and Stanfer, J. P. : Manometric techniques and tissue metabolism (1949)
- 10) 江上外 : 標準生化学実験, 文江堂.
- 11) 齊藤正行著 : 光電比色計による臨床検査, 南山堂.
- 12) Stokes, F. N. and Campbell, J. J. R. . Arch. Biochem. **30**, 121 (1951)
- 13) Slater, E. C. : Nature. **166**, 982 (1950)
- 14) Pickett, M. J. and Clifton, C. E. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **46**, 433, (1941)
- 15) Spiegelman, S. : Arch. Biochem. **18**, 409 (1948)
- 16) Keilin, D. : Proc. Roy. Soc. London B. **121**, 165 (1936)
- 17) Keilin, D. and Hartree, E. F. : Biochem. J. (London) **42**, 221 (1948)
- 18) Lockwood, L. B. Tabenkin, B. and Ward, G. E. : J. Bact. **42**, 51 (1941)
- 19) Entner, N. and Stanier, R. Y. J. Bact. **62**, 181 (1951)
- 20) Katznelson, H. Tanenbaum, S. W. and Tatum, E. L. : J. Biol. Chem. **204**, 43 (1953)
- 21) 増尾外 : 酵素化学シンポジウム, 8集, 105 (1953)

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

Research Relative to S-R Variation of Bacteria

Report II. Energy Metabolism 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, which is a form of bacterial variation. Organisms used were same as Report 1—*S. typhi* 57—S and its isolated 57—R. Experimental method was the measurement of O₂ uptake and CO₂ evaluation by use of Warburg manometer, and at the same time detection of production by quantitative and paper chromatography of the various substrates.

The results were as follows;

1. In type-S bacterium mainly glucose was analyzed by Embden-Meyerhof pathway. The amount of production of pyruvic acid from glucose under the system in which complete analysis was inhibited with addition of KCN, was twice that of R-type bacterium.

2. Under the same experiment of type-S bacterium, the production of glucose was detected by paper chromatography to be pyruvic acid only.

3. In type-R bacterium, mainly glucose was analyzed by Warburg-Dickens pathway. The amount of production of pyruvic acid from glucose under the system in which complete analysis was inhibited with addition of KCN, was one-half that of S-type bacterium.

4. Under the same experiment of type-R bacterium, the production of glucose was detected by paper chromatography to be, in addition to pyruvic acid, gluconic acid which is believed to be the result of glucose dehydrogenase system. Also, pyruvic acid was found in the production of gluconic acid.

From the above experiment it was found that if S-type bacterium changes to R-type, Warburg-Dickens pathway and glucose dehydrogenase system will develop.
