

## 抗酸性菌の物質代謝に関する研究

## 第 1 編

超遠心分画法により得た磨碎菌体の可溶性分画物と  
不溶性顆粒分画物の脱水素酵素反応の研究

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上 栄教授）

林 周 平

〔昭和 34 年 7 月 16 日受稿〕

## 目 次

## I. 緒 言

## II. 実験材料並びに実験方法

## III. 成 績

- 1) 各種抗酸性菌の Sf, Pf の脱水素反応
- 2) 透析処理せる H37Ra, の Sf が lactate,

malate の脱水素反応に及ぼす Cofactor の影響

## IV 総括及び考案

## V 結 論

## I. 緒 言

結核菌をはじめ抗酸性菌は、他の一般病原細菌に比し生物学的、理化学的性状に於て多くの相違点を示している。このことが抗酸性菌の初期酵素化学的研究に於ける興味の中心であり、又其の研究手段としては菌体自体が供試された<sup>1)</sup>。其の後酵素化学の飛躍的進展に伴い多くの細菌が其の目的、手段に使用され、又抗酸性菌もその中に含まれた。

しかし最近抗酸性菌の毒力（病原性）の問題が大きく台頭し、之に關しての生化学的研究<sup>2-3)</sup>と併行し毒力を中心としての酵素化学の研究が富に增加了。中でも Bloch 等<sup>4-7)</sup>による毒力菌と無毒菌の脱水素酵素反応の研究は注目に値するものがある。しかし之等の研究は總て生菌を用い、臨床的応用に直結するもので基礎学的検討とは異つている。又本邦では鳥型菌を中心として広範に亘る酵素学的研究が山村及び其の協力者<sup>8-10)</sup>によつて報告され多大の成果が得られている。

他方人型或は牛型結核菌は、鳥型及び一般抗酸性菌との間に於て毒力をはじめ、幾多の相違点を示しているに拘わらず、非病原性抗酸性菌を用いて得た成績から人型、牛型毒力菌の性状を推測したものが多いた。

裏に岡<sup>11-12)</sup>は人型、牛型両株の毒力菌と弱毒菌（無毒菌も含む）の生菌、無細胞液につき各種基質添加のもとに脱水素酵素反応を検討し、滝沢<sup>13)</sup>は岡<sup>12)</sup>の抽出した無細胞液を更に超遠心分画法により可溶性上清分画と不溶性顆粒分画に分別し、前者は TCA cycle に關する多くの有機酸を酸化するが、之に反して後者は lactate, succinate のみを特異的に酸化するにすぎないと述べた（供試株は人型毒力株、無毒株である）。山村<sup>14-16)</sup>は鳥型竹尾株より得た該不溶性顆粒分画は malate のみを酸化することを以前に記録している。

以上の諸点より超遠心分画法により得られた酵素活性の分画は同じ抗酸性菌といえども其の種類により確かに相違した性状を示すものと考えられる。しかし之等の諸点につき系統的に検討を行つた報告に接することができないので著者は脱水素酵素反応の觀点より之を検討した。

## II. 実験材料並びに実験方法

供試菌株： 人型毒力株 H 37 Rv (以下 H 37 Rv), 人型無毒株 H 37 Ra (以下 H 37 Ra), BCG, 鳥型竹尾株, Myc. ATCC. 607 (以下 ATCC), Myc. phlei (以下 phlei) の 6 種であり、鳥型竹尾株は国立早島療所より、他の 5 株は予防衛生研究所より分

与されたものである。

培養法： H 37 Rv, H 37 Ra, BCG, 鳥型竹尾株, ATCC は sauton 液体培地に培養し, 前三者は其の16日発育菌を, 後二者は1週間発育菌を供試した. Phlei は sauton 培地上で発育不良のため肉汁ブイヨンに発育せしめ, その5日培養菌を供試した。

可溶性分割と不溶性顆粒分割の作製法： 上記発育菌を用い滝沢<sup>13)</sup>の法により作製した. 即ち前記発育菌を滅菌濾紙上に集めて, 脱水した湿潤菌 12 g に石英砂を倍量添加し, 乳鉢中にて1時間 (0°C に於て) 強力に磨碎し, 之に 0.02 mol phosphate buffer solution. PH 7.0 (以下緩衝液と略す) を 90 ml 添加し, 充分に攪拌せるものを最初 10000 rpm にて30分間遠心し, 其の上清を 15000 rpm にて30分間遠心, 得られた淡黄透明な上清を再に40000 rpm にて1時間超遠心分割を行い可溶性分割と不溶性顆粒分割に分けた. 可溶性分割物は其のままの状態を Sf と称し, 不溶性顆粒分割物は之に 20 ml の緩衝液に懸濁せしめ Pf とした. 只 phlei の場合のみは湿潤菌 5 g 当り緩衝液 50 ml で処理し, 得られた不溶性顆粒分割には前記同様 20 ml の緩衝液を添加し Pf とした。

Sf 透析処理法： 透析処理に於ける外液は蒸溜水を使用したが, 処理法の詳細については成績の項目で述べる。

Co-factor： 使用したものは CoI, riboflavine, ATP の三者で何れも GBI 社製のものである。

脱水素酵素反応： Thunberg 法 (Mb 脱色法) によつた. 其の技術, 内容の詳細は別項に於て述べる。

### III. 成 績

1) 各種抗酸性菌の Sf, Pf の脱水素反応 Thunberg 管を使し, 其の主室は基質. 0.5 ml, Mb. 0.25 ml, 緩衝液. 0.5 ml, 副室に Sf (或は Pf). 0.5 ml を容れ, 真空ポンプにて水銀柱 2~3 mmHg の状態で5分間排気し, 37°C の恒温槽にて2分間温度平衡を行い, Sf (或は Pf) を主室に流込み, 其の瞬間より Mb の脱色するまでの時間を測定した。

#### A) 人型結核菌の検討

成績の大要は第1表に示した。

即ち H37Rv. Sf は pyruvate が最も短時間で脱色される. lactate は之に次ぐが, 其の他の基質は稍々長時間を要する. H37Ra. Sf では lactate,

第1表 人型菌の Sf, Pf の脱水素能

substrates	strain		H37Rv		H37Ra	
	fraction		Sf	Pf	Sf	Pf
pyruvate		/ "	300	7800	1040	± (12000)
lactate		700	1230	400	—	600
acetate		1800	—	1630	—	—
citrate		2400	—	1700	—	—
succinate		1700	7000	1500	—	4300
malate		1230	—	900	—	—
fumarate		1140	—	540	—	—
control		3300	—	2630	—	—

fumarate が早く, 次いで malate, pyruvate であり, 他のものは之等に比すると活性が稍弱い。

又 H 37 Rv, H 37 Ra の Pf は共に lactate, succinate が基質である場合は脱水素される。又其の能力は H 37 Ra の Pf に於て強く, 又 succinate に対するよりも lactate に対して強い。又 pyruvate に対しては両株の Pf 共に脱水素能は存在すると思われるが, 著明ではなく特に H 37 Ra の Pf に於て弱い結果を得た。

以上の如く人型結核菌の Sf は供試基質の全部を種々の強さで脱水素するが, 又対照に於ても之が起り得る。之に反して Pf は lactate, succinate は完全に脱水素し, 又 pyruvate に対しても微弱ながら能力が存在するものと思われる。又 Pf の対照は全く脱水素が認められない結果を得た。

#### B) BCG の検討

BCG は人型菌に比し, sauton 培地上に於ける発育は不良であり, 其収量も少ない。之より分離した不溶性顆粒分割は人型菌の約 1/4 量に過ぎない。其の色調も人型菌が茶褐色を呈しているのに比し, 淡いクリーム状である。脱水素能は第2表に示した。

第2表 BCG の Sf, Pf による脱水素能

substrates	fractions		Sf	Pf
pyruvate		/ "	3100	—
lactate		3000	—	4800
acetate		2800	—	—
citrate		3500	—	—
succinate		2900	—	6000
malate		2400	—	—
fumarate		1300	—	—
control		4000	—	—

表に示した如く, Sf の各基質に対する脱水素能は極めて微弱である。強いていうならば fumarate に対しては稍々活性が強い。前述の如く人型菌の Sf は pyruvate, lactate 等に対して特に強力な活性を示したが、このような現象は全く観られなかつた。即ち脱色は起り得るが各基質差は殆んで認め難い。

又 Pf は lactate, succinate のみ脱色が起り、又 lactate に対する脱水素能は人型菌の Pf 程強力でないが、succinate に対する活性は人型菌との間に著差を観ない。又人型菌の Pf は僅かながら pyruvate に対する活性が観られたが、BCG では全く認められなかつた。

Sf, Pf の各対照の結果は人型菌と同様に、前者は脱色が起り得るが、後者は全くそれが認められない。

### C) 鳥型菌の検討

鳥型菌の場合 Sf をそのまま脱水素反応に使用すると、対照の Mb 還元速度が極めて早く、添加基質の効果判定が困難のため、緩衝液にて Sf を更に 5 倍稀釀したものと供試した。結果は第 3 表のとおりである。

第 3 表 鳥型竹尾株の Sf, Pf の脱水素能

substrates	fractions	Sf	Pf
pyruvate		' "	
lactate		17 00	—
acetate		10 00	12 30
citrate		30 30	—
succinate		32 00	—
malate		20 00	5 30
fumarate		22 00	2 00
control		16 00	4 00
		30 00	—

即ち Sf は或る基質に対し特に脱水素能が強いという特性は余り見当らないが、中でも lactate は割合高く、次いで fumarate, pyruvate の順である。其の他の基質も脱水素は観られるが著明ではない。特に acetate, citrate 等は対照と殆んど差を観ない。

次いで Pf の結果は前述の人型菌、BCG に比較し何れとも異つた興味ある性状を示した。即ち Pf は lactate, succinate, malate, fumarate の 4 種の基質に対し活性を示し、其の脱水素能は malate, fumarate, succinate, lactate の順であり、何れも

強度のものである。

即ち鳥型菌の両分割がそれぞれ所有する脱水素能は人型菌、BCG 等と比較し大きく差のあることを示したものと思う。

### D) Myc, ATCC 607 の検討

ATCC も鳥型菌と同様に Sf をそのままの濃度で用いると対照の Mb 脱色が短時間内に起り、判定を困難にならしめるので 7 倍に稀釀して用いた。其の結果は第 4 表に示した。

第 4 表 Myc, ATCC 607 の Sf, Pf の脱水素能

substrates	fractions	Sf	Pf
pyruvate		' "	9 30
lactate		8 30	18 00
acetate		11 00	65 00
citrate		13 00	—
succinate		9 00	3 30
malate		11 00	50
fumarate		8 30	1 00
control		11 30	75 00

注、Sf…7 倍に稀釀せる溶液である。

表の如く Sf は 7 倍稀釀液を用いても対照の Mb 還元速度は早く、各種基質添加時の還元速度も、対照速度と著差が観られなかつた。即ち Sf 自体に水素給与体となりうる物質が高度に含まれているものと考えられる。

次いで Pf の脱水素能を検討すると citrate 以外の基質は総て脱水素が観られたが、特に malate, fumarate, succinate 次いで lactate が短時間で Mb 脱色が起り、この性状は鳥型菌と極めて類似しているが、活性度は之より更に強力に思われた。又 Pf の対照も前記の供試株と異り長時間の観察で脱色が認められた。

### E) Myc, phlei の場合

結果の大要は第 5 表に示した如く Sf に於ては供試基質の総てに於て、又対照に於ても Mb の還元が観察された。しかし pyruvate, acetate に於ては対照よりも脱色に長時間を要し、基質に対する特異的な脱水素能は観られなかつた。fumarate, malate に対しては比較的強い脱水素能が認められ、之に次いで lactate, succinate, citrate の順であつた。

次に Pf の性状を観ると、lactate, succinate,

malate 三者のみを脱水素する。しかし其の脱水素能は強力なものではない。この性状は前述までの供試株の何れの Pf の酵素性状とも異つたものである。

第5表 Myc. phlei の Sf. Pf の脱水素能

substrates	fractions	Sf	Pf
pyruvate		32.00	—
lactate		13.30	38.00
acetate		37.00	—
citrate		20.00	—
succinate		15.00	70.00
malate		9.30	70.00
fumarate		7.00	—
control		33.00	—
		"/"	"/"

II) 透析処理せる H37Ra の Sf が lactate, malate の脱水素反応に及ぼす Co-factor の影響

Rohner 等<sup>17)</sup>により結核菌はかなり多くの riboflavin を有していることが知られた。菌体抽出液及び之の透析外液が螢光黄微色を呈すること、又銀による阻害が認められることから、脂肪酸脱水素酵素系には riboflavin が関与することを山村<sup>18)</sup>は述べている。

著者は H37Ra の Sf が lactate, malate に対し強い脱水素能のあることを前述のとおり観察した。そこで之の Sf を透析処理し、其の内液につき lactate, malate の脱水素能を検討した。Co-factor としては CoI, riboflavin, ATP を用い、其の濃度は CoI は 1ml 毎 120, riboflavin, ATP は各々 100 $\gamma$  のものを調製した。

透析処理法は Sf を内液とし、蒸溜水を外液として 2~3°C の氷室内で 1 週間透析を実施した。外液は前 2 日間は 1 日 2 回、以後は 1 日 1 回更新した。

#### A) lactate を基質とした場合

反応の組合せ並びに結果は第 6 表に示した。

第 6 表 H37Ra. Sf の透析内液の乳酸脱水素反応に及ぼす諸因子の影響

No.	内液 ml	緩衝液 ml	Mb ml	lactate ml	CoI ml	riboflavin ml	ATP ml	脱色時間
1	0.5	1.1	0.25	0.5				"/"
2	0.5	0.8	0.25	0.5	0.3			25.30
3	0.5	0.8	0.25	0.5		0.3		17.00
4	0.5	0.8	0.25	0.5			0.3	17.20
5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.3	0.3		26.30
6	0.5	0.5	0.25	0.5	0.3		0.3	18.30
7	0.5	0.5	0.25	0.5		0.3	0.3	19.00
8	0.5	1.1	0.25	0.5				19.00

緩衝液 : 0.02 mol phosphate buffer solution pH 7.0, Mb : 0.0002 mol lactate, 0.1 mol CoI : 120 $\gamma$  per ml, riboflavin : 100 $\gamma$  per ml ATP 100 $\gamma$  per ml \* : lactate の代りに蒸溜水 0.5 ml

即ち Sf の透析内液と lactate は各々 0.5 ml, Mb は 0.25 ml とし、之に上記 Co-factor を種々に組合せ反応全量が 2.35 ml になるように緩衝液で補正した。勿論表中の No. 1 は Co-factor の対照（何れの Co-factor も含まない）であり、No. 8 は基質の対照（lactate の代りに蒸溜水 0.5 ml を添加したもの）である。

結果は表中に観られる如く lactate さえ存在すれば Co-factor を添加しなくても No. 2 の如く CoI を添加すると Mb の脱色時間は著明に短縮される。しかし No. 3 の如く riboflavin を添加した場合も全く No. 2 と同一の結果が得られた。又 ATP を添加した場合（No. 4）は No. 1 即ち対照と脱色時

間に於て著差が認められない。

又著効を示した CoI と riboflavin を同時に添加しても（No. 5），単一添加の場合と何等反応速度に変りは認められない。勿論 CoI と ATP（No. 6）或は riboflavin と ATP（No. 7）のような組合せも相助的効果は認められなかつた。

以上の結果で No. 1 の組合せに於て脱色が観られたことは、この内液中に透析処理に対して安定な、しかも補酵素として CoI を必要としない系がある如く思われる。このことは楠瀬、山村等<sup>18)19)</sup>が鳥型竹尾株より二種の乳酸脱水素酵素系を記載していることからも充分考えられる。

故に著者が検討した乳酸脱水素酵素反応は実際に

は CoI を反応に必要とするものであるけれども、反応系自体には二種の乳酸々化酵素系が不完全に存在したことは事実と思う。riboflavine は CoI と同等の効果を見掛上は示したが、何れの系に作用するかについては精製された段階に於て検討しない限り断言は許されない。

#### B) malate を基質とした場合

malic dehydrogenase の Co-factor として CoI が必要であることは以前より周知の事実である。山村等<sup>14-16)</sup>は鳥型竹尾株の場合、其の Pf のみが特異的に malate を酸化することを観察しているし、著者も鳥型竹尾株の Pf は malate に対し極めて強力な脱水素能を有しているが、Sf は全く微弱であることを前項で述べた。この事実は一面に於ては鳥

型菌の場合、CoI が Pf に所有されていることを思われる。

然るに人型結核菌では Pf は全く malate に対して脱水素能を有せず、其の活性は Sf に存在することも前述したとおりである。

これ等の事実は少くとも、ある意味に於て菌体内における酵素の局在を現わす証拠であり、其の局在性の相違は細菌の種類によることを示している。Widman<sup>21)</sup>、Millman<sup>22)</sup>は局在性の相違は細菌分化の程度によることを報告している。

そこで人型 H 37 Ra の Sf を前述と全く同一の方法により透析処理を実施し、其の内液が malate に対して如何なる反応を示すかを検討した。其の結果は第 7 表に示した。

第 7 表 H37Ra. Sf の透析内液の malate の脱水素に及ぼす諸因子の影響

No.	内液 ml	緩衝液 ml	Mb ml	malate ml	CoI ml	riboflavine ml	ATP ml	脱色時間
1	0.5	1.1	0.25	0.5				—
2	0.5	0.8	0.25	0.5	0.3			95 00
3	0.5	0.8	0.25	0.5		0.3		—
4	0.5	0.8	0.25	0.5			0.3	—
5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.3	0.3		43 00
6	0.5	0.5	0.25	0.5	0.3		0.3	91 00
7	0.5	0.5	0.25	0.5		0.3	0.3	—
8	0.5	1.1	0.25	0.5(水)*				—

malate : 0.1mol, 其の他の内容は第 6 表と同一。

実験方法は lactate を基質として検討した場合と全く同様である。

表中に於ける No. 1 は Co-factor に対する対照であり、又 No. 8 は基質に対する対照である。即ち Co-factor を全く添加しない場合は、例え malate が存在しても Mb の脱色は全く認められない。然るに No. 2 の如く CoI が反応系に加わると漸く脱色が起り得る。しかしそれには長時間を要した。又 No. 3 の如く riboflavine のみを反応系に添加しても、或は No. 4 の如く ATP のみを添加しても、其の様な場合は全く脱色は認められなかつた。No. 5 は CoI と riboflavine の両者を系中に添加した場合であるが、CoI のみを添加せる場合の約 1/2 に Mb 脱色時間は短縮された。又 No. 6 は CoI と ATP の両者を添加したものであるが、この場合は CoI の効果のみ現われ、ATP は何等相助的効果を発揮するものではなかつた。又 riboflavine と ATP の両者を添加したものは全く脱色は認められなかつ

た。

以上の結果を総合すると malate の脱水素には CoI は絶対必要な Co-factor であることに異論はない。しかし CoI のみでは其の活性は極めて弱く、之に riboflavine が添加されると活性は著しく高められる。しか riboflavine 自体では malate に対し活性は示されない。

#### IV. 総括及び考按

最近酵素化学の目覚しい進展は、其の終局の目的である生合成の道を強く現わすに至つた。Green 等<sup>20)</sup>の主張は明かに細胞内に於ける酵素の局在性を代表するものと考えられる。かつて単純な意味で酵素標品として用いられた細菌細胞も其の目的が大きく異り、現在では細菌細胞の構造と、其の生理的意義が酵素化学により検討を受ける段階に至つた。病原微生物の限界に於てもこの方向は次第に高まりつつある。即ち免疫抗体は抗原的（殆んどの場合蛋

白が関与する)作用を受けた宿主の生体反応の現われであり、之に關しては Haurowitz 等<sup>23-25</sup>の詳細な酵素学的基礎的研究がある。又 Youmans 等<sup>30</sup>は H 37 Ra の不溶性顆粒分離による感染防禦能を検討し優れた結果を得ている。最近、村上及び其の一門<sup>26-29</sup>は人型結核菌、チフス菌の超遠心、酵素活性分離による感染防禦の詳細な検討を報告している。

かくの如く菌体の酵素活性分離が、免疫、感染防禦能と関係がある限り、之等抗原物質の酵素学的研究は極めて重要である。そこで著者は岡<sup>11-12</sup>、滝沢<sup>13</sup>の一連の研究を更に抗酸性菌に拡大し、之等の菌体内の可溶性上清分離と不溶性顆粒分離の酵素学的検討を意図し、本編に於ては特にその脱水素酵素反応を実施追求した。其の成績の大要を総括すると下記の如くである。

1. 人型結核菌： H 37 Rv の Sf は供試基質の総て Mb の脱色が観られるが特に pyruvate に対して強く、次いで lactate であり、 fumarate, malate に対しても中等度の活性を示した。H 37 Ra の Sf は lactate, fumarate に対して高い活性を示し、次いで malate, pyruvate であつた。

又 H 37 Rv, H 37 Ra の両者の Pf は共に lactate, succinate, pyruvate の 3 者のみしか脱水素しなかつた。pyruvate に対する活性は両者とも極めて微弱であり、又 lactate, succinate に対する活性は H 37 Ra の Pf が遙かに強い結果を示した。又両株とも Sf は対照で脱色が観られるが Pf では認められない。

2. BCG： BCG の Sf は供試基質総てに対して脱水素能は弱い。ある程度の高い活性を示したのは fumarate のみであつた。この点人型菌と可成異った性状を示している。又 Pf は lactate, succinate の両者のみ脱水素が認められ他の基質は全く陰性である。

3. 鳥型菌： 各基質に対する Sf の脱水素能は、対照と比較して余り強力なものではないが、 lactate, fumarate, pyruvate は中等度の活性を示している。しかし Pf の脱水素能は前記人型菌、 BCG に比して著しく性状を異にしている。即ち malate, fumarate, succinate, lactate の 4 者に活性を示し、其の内 malate に最も強い活性があり、人型菌、 BCG で高い活性を示した lactate は最も弱い結果を得た。

4. Myc. ATCC. 607： 本菌の Sf は相当高度

に稀釈されても対照の Mb 脱色速度が早いため、各基質に対する検討は非常に不明確である。又 Pf は citrate を除き総ての供試基質で脱色が認められ、特に malate, fumarate に対しては非常に高く次いで succinate に対して高い活性を示し、 lactate に中等度の活性を示したが、 pyruvate, acetate に対するそれは弱いものである。又本菌の Pf のみが対照で脱色が認められた。

5. Myc. phlei. Sf は fumarate, malate に対し幾分高く、次いで lactate に対し活性が存在するが、 pyruvate, acetate は対照と何等差を認めることが出来ない。Pf は lactate, succinate, malate の 3 者に於てのみ脱色が観られるが succinate, malate に対しては弱い。

完全細胞で其の細胞内の詳細の酵素性状を把握することは困難であるが、上記の如く分離せるものにつき其の性状を検討すると、同じ抗酸性菌のグループにあり乍ら、各分離の酵素分布、活性の強弱には有意の差が認められる。

6. 透析処理した Sf の性状： H 37 Ra の Sf の透析内液に lactate を加え、この反応系に Co-factor 添加しなくとも脱色が観られることは内液中に透析に安定な乳酸化酵素系の存在を思わしめる。しかし反応系中に CoI を添加すると脱色は更に短時間で起り得る。しかも之の反応は CoI を riboflavin で代用出来ることが判明した。結核菌の乳酸化酵素は二種存在することが知られているが、著者の実験段階で riboflavin の作用機序を断言することは出来ない。又内液は CoI の存在なしでは malate を脱水素することは不能である。又 CoI の存在する反応系に riboflavin を添加すると、 CoI のみによる脱色よりも著しく時間が短縮される。しかし riboflavin 単独では何等脱色能力を保有しない。即ち riboflavin は CoI に対し相助作用を与える物質と考えられる。

#### V. 結 論

人型結核菌、 H 37 Rv, H 37 Ra, と次いで BCG、 鳥型竹尾株、 Myc. ATCC. 607, Myc. phlei の 6 種の sauton 培養菌 (Myc. phlei はブイヨン培養) を超遠心分離法により可溶性分離と不溶性顆粒分離に別し、之等の酵素学的性状を追求し、更に H 37 Ra の可溶性分離を透析処理し、其の内液につき lactate, malate の脱水素能を Co-factor の存在のもとに検討し下記の結論を得た。検討方法は総て

Mb 脱色法を用いた。

- 可溶性分割と不溶性顆粒分割は明かに異つた酵素性状を有する
- 可溶性分割の各基質に対する特異的活性及び活性の強弱は菌の種類により異なる。このことは不溶性顆粒分割でもいえる。
- H 37 Ra の可溶性分割の透析内液に CoI を添加すると lactate に対する脱水素能は高められ、又 riboflavine は CoI の代用となる。
- 同じ透析内液に CoI と riboflavine の両者を添加すると、CoI のみによる場合よりも malate

の脱水素能は高められる。しかし riboflavine は CoI の代用にはならなかつた。

稿を終るに臨み終始御懇意なる御指導と御校閲を賜つた恩師、村上栄教授に深甚の謝意を表します。又本研究に対し御協力を戴いた岡博士に感謝の意を表します。

## 文 献

- 川畠：福岡医誌, 27, 833, 1934.
- Dubos, R. J.: Am. Rev. Tuberc., 60, 385, 1949.
- Dubos, R. J. and Middlebrook, G.: Am. Rev. Tuberc., 58, 698, 1948.
- Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 61, 270, 1950.
- Desbordes, J., Fournier, E.: Am. Rev. Tuberc., 66, 382, 1952.
- Patnode, R. A., Wrinkly, C. K. and Beasley, C.: Am. Rev. Tuberc., 69, 599, 1954.
- Wilson, F. J., Kalish, C. and Fish, C. H.: Am. Rev. Tuberc., 65, 187, 1952.
- 山村、今津：医療, 3, 9, 15, 昭和24.
- 山村：酵素化学の進歩, 2, 269, 1950.
- 大林、続木、古屋：医学と生物学, 10, 6, 311, 昭和22.
- 岡：岡山医学会誌, 69, 5, 1229, 昭和32.
- 岡：岡山医学会誌, 69, 5, 1239, 昭和32.
- 滝沢：日本細菌学会、中四国支部会演説要旨。光市。昭和32。
- 楠瀬、永井、山村他：酵素化学シンポジウム, 10, 114, 1954)
- Yamamura, Y., Kusunose, M., Nagai, S., et al.: Med. J. Osaka. Univ., 6, 489, 1955.
- 山村：結核菌の生化学, 共立出版, 132, 昭和30.
- Rohner, and Roulet.: Biochem. Z., 300, 148, 1939.
- 楠瀬、楠瀬、山村：結核, 27, 72, 243, 1952.
- Yamamura, Kusunose and Kusunose.: J. Biochem., 39, 227, 1952.: Nature., 170, 207, 1952.
- Green, D. E.: 生化学, 29, 2, 65, 1957.
- Widman, C., King, T. E. and Cheldelin, V. H.: J. Bact., 71, 737, 1956.
- Millman, I., Darter, R. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 91, 271, 1956.
- Haurowitz, F.: Biol. Revs., 27, 247, 1952.
- Haurowitz, F.: J. Immunol., 43, 331, 1942.
- Haurowitz, F.: 化学の領域, 10, 7, 27, 1956.
- 村上、岡、松浦、吉岡：日本細菌学会中四国支部会演説要旨, 昭和33年11月, 下関市.
- 村上、吉岡、松浦、岡：日本細菌学会中四国支部会演説要旨, 昭和33年11月, 下関市.
- 村上、吉岡、岡、松浦：日本細菌学会中四国支部会演説要旨, 昭和33年11月, 下関市.
- 村上、松浦、岡、吉岡：日本細菌学会中四国支部会演説要旨, 昭和33年11月, 下関市.
- Youmans, G. P., Millman, I., Youmans, A. S.: J. Bact., 70, 5, 557, 1955.
- 岡：岡山医学会誌, 69, 5, 昭和32年.

## Studies on the Metabolism of Acid-Fast Bacilli

Part I Dehydrogenase Activities on the Soluble and Particulate  
Fractions Separated by Ultracentrifuge

By

Shuhei HAYASHI

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

In order to study the enzymatic properties of human type tubercle bacilli, H37 Rv, H37 Ra and BCG, and avian type bacilli, Takeo's strain, Myc. ATCC 607 and Myc. phlei, the author prepared the soluble fraction and particulate fraction of these cells by means of ultracentrifuge from the ground cells that were cultured in Sauton's media. Using the fractions thus obtained, the author observed enzyme activities of these fractions. And then, the author picked out the soluble fraction of H37 Ra; dialyzed it and studied the dehydrogenase activity of the dialyzed soluble fraction for lactate and malate with the addition of Co-factor by means of Thunberg's methylene blue reduction method. The following results were obtained.

- 1) It was observed that the enzyme activities of two fractions, soluble and particulate, were distinctly different in any organisms.
- 2) It could be confirmed that the specific enzyme activity of each fraction for the substrates and the intensities of that activities were varied as the strains.
- 3) The dehydrogenase activity of the dialyzed soluble fraction of H37 Ra for lactate was raised by the addition of CoI. And riboflavin could substitute for CoI.
- 4) The more increased dehydrogenase activity for malate was observed by the simultaneous addition of CoI and riboflavin to the dialyzed soluble fraction of H37 Ra compared with the single addition of CoI to that fraction. However riboflavin failed to replace the role of CoI.