

Sh. flexneri に属する菌の glucose 代謝

第 1 編

普通寒天及び液体培地発育菌の glucose 酸化

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

財団法人共愛会芳野病院

藤 本 剛 平

〔昭和 32 年 9 月 2 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. 各菌の基質酸化能

2. glucose 酸化に対する阻害剤の影響

3. 培養条件と glucose 酸化の関係

IV. 総括及び考案

V. 結 言

I. 緒 言

微生物の糖代謝に関しては近来多くの研究が見られるが、病原菌のそれは比較的少く、限られた範囲に過ぎない。著者は本教室における病原性細菌の系統的な糖代謝研究の一環として、Sh. flexneri に属する菌の glucose 代謝の一端をうかがうべく実験を行った。

細菌の物質代謝はその発育環境に大きく支配され、病的材料より分離直後の菌は継代を重ねるに従い、漸次酵素的性状に変化を来すことは周知のことであるが、本実験に於ては長期間継代を続け、その性状の安定していると思われる教室保存株を用い、その普通寒天培養菌体、並びに僅かに培養条件を変化せしめた菌体につき glucose の代謝様式の検討を行った。以下その成績を記し御批判をこう次第である。

II. 実験材料及び実験方法

供試細菌: Sh. flexneri 1a, 1b, 2a, 3a, 4a, 5 に属する標準株の各教室保存のもの。

菌培養法: 普通寒天培養菌はその 37°C, 18時間培養のものを用い、液体培地による静

置培養菌は、

第二磷酸ソーダ	25.0 gr
第一磷酸カリ	0.35
グルコース	3.6
ペプトン	1.0
硫酸第一鉄	0.001
硫酸マグネシウム	0.01
食塩	1.0
水	1l

pH 7.2

の組成の液体培地 250 ml を 300 ml 容コルベ
ンに入れて滅菌し、同組成の培地に 3 代継代
したものから接種し、37°C 18時間静置した
後遠沈により集菌して用いた。又振盪培養菌
は、同組成の培地 250 ml を 1l 容コルベ
ンに入れて接種、37°C で 10 時間激しく振盪し
て培養、同様操作により 4 代継代した菌体を
集めて用いた。

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)
にて 2 回遠沈洗滌し、再び同組成の緩衝液に
浮游して使用し、菌量決定は光電比濁計によ
った。

呼吸量測定: Warburg 検圧計を用い、常

法¹⁾に従つた。

基質, 阻害剤: 何れも市販品を蒸留水にとかし, HCl, 又は NaOH にて pH を修正して使用した。

glucose 及びその分解産物の定量: glucose は 3,5-dinitrosalicylic acid による比色法²⁾, pyruvate は 2,4-dinitrophenyl hydrazine による比色法³⁾, acetoine は creatine, α -naphthal による比色法⁴⁾, lactate は濃硫酸, p-hydroxydiphenyl による比色法⁵⁾ により定量し, 又 acetate は試料溶液を水蒸気溜に附し, 溜出液を M/100 NaOH で滴定して定量した。

III. 実験成績

1. 各菌の基質酸化能

実験を行うに先立ち, 各供試菌の酵素的性状の概略を知る目的で, 普通寒天18時間培養の各菌体の種々基質に対する酸素消費量を測定したところ第1表に示す通りであつた。即ち, 六炭糖では glucose, fructose は各供試菌によりよく酸化され, mannose は 3a 菌により, galactose は 2a 菌により酸化され難い。又 ribose は 1a 菌が僅かながらその酸化能をもつ以外, 他の菌では極めて微弱であつた。

第1表 *Sh. flexneri* 各菌の基質酸化能 (O₂消費量 μ l, 1 hr値)

	1a	1b	2a	3a	4a	5
glucose	146	153	213	233	79	177
fructose	181	81	171	181	80	161
mannose	92	77	98	15	71	150
galactose	78	66	28	161	66	76
gluconate	9	7	9	10	8	9
ribose	18	8	7	8	7	7
arabinose	7	7	8	7	7	8
xylose	9	8	8	8	8	7
pyruvate	76	97	68	201	89	89
acetate	24	20	7	77	23	31
succinate	96	51	91	44	51	56
malate	89	44	76	49	39	69
基質なし	7	8	7	7	6	7

菌液 (湿菌量 20 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 10⁻²M) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする, pH 7.2, 37°C, 1 hr.

pyruvate 酸化能は各菌共に大であり, succinate, malate も又然りであるが, 3a 菌以外の菌では acetate 酸化能は一般に微弱であつた。

次に, これ等供試菌のうち 1a, 2a, 3a の3菌を選び, その普通寒天培養菌を用いて, glucose, gluconate, ribose を基質とした O₂消費量, 基質消費量及び pyruvate, lactate, acetoine 生成量間の量的関係を検討した。

但し gluconate の定量は精度の高い方法が無いため行わなかつた。結果は第2表に示す如くであり glucose を基質とした場合の O₂消費量は 1a で 16.8 μ M, 2a で 19.2 μ M, 3a で 17.5 μ M であり, これに対する glucose 消費量は夫々 4.0, 4.9, 4.4 μ M であつて, glucose 1 M 当りの O₂消費量は, 約 4 M となつた。而して, glucose 1 M 当り 1/4 ~ 1/5 M の pyruvate, 1/4 ~ 1/5 M の acetate, 1/3 ~ 1/4 M の lactate の蓄積を認め, acetoine の生成は僅かであつた。

他の基質 gluconate, ribose では前述の如く, 各菌とも O₂消費は全く認められないか, 極めて僅少であり, 且つ基質の消失, 分解産物の生成も認められなかつた。

2. glucose 酸化に対する阻害剤の影響

上の実験により, これ等供試菌は glucose

第2表 各菌の glucose, gluconate, ribose の酸化と生成物の

	基 質	O ₂ 消費 μ M	基質消費 μ M	pyruvate 生成 μ M	lactate 生成 μ M	acetate 生成 μ M	acetoine 生成
1a	glucose	16.8	4.0	1.0	1.2	0.9	±
	gluconate	0.3	/	0	0	0	—
	ribose	0.3	0~0.1	0	0	0	—
2a	glucose	19.2	4.9	1.1	1.5	1.0	±
	gluconate	0.1	/	0	0	0	—
	ribose	0.1	0~0.1	0	0	0	—
3a	glucose	17.5	4.4	1.0	1.2	0.9	±
	gluconate	0.2	/	0	0	0	—
	ribose	0.2	0~0.1	0	0	0	—

菌液 (湿菌量 30 mg) 2.0 ml, 基質 (30 μ M) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする pH 7.2, 37°C, 1 hr.

を酸化して pyruvate に至ると考えられる。そこで次に, glucose より pyruvate に至るに主として如何なる経路をたどるものかをうかがうため 2, 3 阻害剤の存在下に於ける glucose 酸化を量的に検討したところ下記成績が得られた。

1 a 菌 (第 3 表) では, 阻害剤無添加の場合 (対照) glucose 4.7 μM の消費に対し O_2 17.4 μM を消費し, 1.3 μM の pyruvate を蓄積するに対し, 2, 4-dinitrophenol (DNP, 10^{-3}M) 添加に於ては, 3.1 μM の glucose 消費に対し 9.3 μM の O_2 を消費し, O_2 消費に対する glucose 消費の割合は対照に比し大となり, 且つこの阻害剤の存在下では消費 glucose 1 M に対し 1 M をはるかに上廻る pyruvate の蓄積が見られる。

又 RQ は DNP 添加により著明に低下することを認めた。

arsenite (10^{-3}M) も同様に RQ を低下せしめ, 且つ glucose 1 M 当り 1 M 以上の pyruvate の蓄積を来した。

第 3 表 glucose の酸化に対する阻害剤の影響 Sh. flexneri 1 a

	O_2 消費 μM	CO_2 発生 μM	RQ	基質消費 μM	Pyruvate 生成 μM
glucose	17.4	13.6	0.78	4.7	1.3
—+ DNP	9.3	4.0	0.43	3.8	6.1
—+ arsenite	6.7	3.4	0.51	2.9	4.8
—+ monoiodoacet.	3.6	2.8	0.78	1.7	0.2
—+ NaN_3	18.3	14.1	0.77	5.0	4.9
pyruvate	9.1	12.9	1.42	17.4	/
—+ DNP	0.7	1.0	1.43	1.5	/
—+ arsenite	0.9	1.3	1.44	1.5	/
—+ monoiodoacet.	4.6	6.0	1.31	9.0	/
—+ NaN_3	2.3	3.2	1.40	4.0	/

菌液 (湿菌量 30 mg) 2.0 ml, 基質 (30 μM) 0.3 ml, 阻害剤 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする pH 7.2, 37°C, 1 hr.

DNP : 10^{-3}M , arsenite : 10^{-3}M , monoiodoacetate : $\frac{1}{2} \times 10^{-3}\text{M}$, NaN_3 : 10^{-2}M

monoiodoacetate ($\frac{1}{2} \times 10^{-3}\text{M}$) では, RQ 値には殆んど変化ないが O_2 消費, glucose 消

第 4 表 glucose の酸化に対する阻害剤の影響 Sh. flexneri 2 a

	O_2 消費 μM	CO_2 発生 μM	RQ	基質消費 μM	Pyruvate 生成 μM
glucose	16.1	12.2	0.76	4.9	1.4
—+ DNP	8.7	4.3	0.49	2.7	3.0
—+ arsenite	7.1	3.8	0.53	2.5	4.0
—+ monoiodoacet.	2.2	1.7	0.77	1.4	0.3
—+ NaN_3	16.2	12.3	0.76	4.6	4.0
pyruvate	10.9	15.4	1.41	20.4	/
—+ DNP	1.0	1.4	1.40	1.6	/
—+ arsenite	1.2	1.7	1.41	1.9	/
—+ monoiodoacet.	5.1	7.1	1.40	9.9	/
—+ NaN_3	2.5	3.6	1.43	4.8	/

菌液 (湿菌量 30 mg) 2.0 ml, 基質 (30 μM) 0.3 ml, 阻害剤 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする pH 7.2, 37°C, 1 hr.

DNP : 10^{-3}M , arsenite : 10^{-3}M , monoiodoacetate : $\frac{1}{2} \times 10^{-3}\text{M}$, NaN_3 : 10^{-2}M

第 5 表 glucose の酸化に対する阻害剤の影響 Sh. flexneri 3 a

	O_2 消費 μM	CO_2 発生 μM	RQ	基質消費 μM	Pyruvate 生成 μM
glucose	16.6	13.0	0.78	4.3	0.7
—+ DNP	6.8	2.9	0.42	2.8	4.7
—+ arsenite	5.9	2.7	0.46	2.0	3.1
—+ monoiodoacet.	3.9	3.0	0.78	1.7	0.1
—+ NaN_3	13.6	10.5	0.77	4.2	3.3
pyruvate	15.1	22.2	1.47	27.9	/
—+ DNP	1.8	2.6	1.46	3.5	/
—+ arsenite	1.6	2.4	1.48	3.0	/
—+ monoiodoacet.	7.9	11.4	1.45	14.4	/
—+ NaN_3	5.9	8.7	1.47	9.7	/

菌液 (湿菌量 30 mg) 2.0 ml, 基質 (30 μM) 0.3 ml, 阻害剤 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする pH 7.2, 37°C, 1 hr.

DNP : 10^{-3}M , arsenite : 10^{-3}M , monoiodoacetate : $\frac{1}{2} \times 10^{-3}\text{M}$, NaN_3 : 10^{-2}M

費共に抑制され、且つ pyruvate 蓄積は殆んど認められなかつた。NaN₃(10⁻²)では、RQ値は殆んど変化しないが、O₂消費、glucose消費は共に僅かに促進され、又 pyruvate 蓄積も対照に比し増大するのを認めた。又同時に pyruvate を基質とした場合についてもこれ等阻害剤の影響を調べたが、同表の示す如く、DNP, arsenite は O₂消費並びに pyruvate の消費を著明に抑制し、NaN₃ は抑制作用これに次ぎ、monoiodoacetate では約 50% の抑制作用が見られるにすぎなかつた。他の菌 2 a, 3 a に於ても 1 a に於けると同様の傾向が見られ、以上の成績よりするに DNP, arsenite は各菌の glucose の酸化を pyruvate の段階で殆んど完全に停止せしめるものと推定された。

3. 培養条件と glucose 酸化の関係

次に培養条件の変化により、glucose 分解経路の変換が起りうるかを調べるため、glucose を含む液体培地を用い、実験方法の項で述べた如くして静置培養したもの（「静置」と略す）と振盪培養したもの（「振盪」と略す）につき、その glucose 酸化の量的

関係を比較検討した。先づ各培養菌につき glucose, gluconate, ribose 及び pyruvate を基質とせる O₂消費量を見るに、第 6 表の如く、各菌共、「振盪」は「静置」に比し各基質に対する O₂消費量が大であるが、特に gluconate, ribose の酸化能が 1 a 菌に於て著明に、又 2 a, 3 a 菌に於ても僅かながら大となつたことは注目すべきことであつた。

第 6 表 静置及び振盪培養菌の基質酸化能 O₂消費量 μ l

菌 培養	Sh. flexneri 1 a		Sh. flexneri 2 a		Sh. flexneri 3 a	
	静置	振盪	静置	振盪	静置	振盪
glucose	106	159	117	176	82	121
gluconate	18	77	20	47	19	48
ribose	17	49	14	27	20	25
pyruvate	49	77	39	89	59	87
基質なし	15	17	12	14	17	16

菌液（湿菌量 20 mg）2.0 ml, 基質 (10⁻²M) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする, pH 7.2, 37°C, 1 hr.

次に各菌の各培養菌体による glucose の酸化の量的関係及びこれに対する DNP の影響を見ると第 7 表に示す如き結果が得られた。

第 7 表 静置及び振盪培養菌の glucose 酸化

	静 置 培 養					振 盪 培 養					
	O ₂ 消費 μ M	CO ₂ 発生 μ M	RQ	基質消費 μ M	pyruvate 生成 μ M	O ₂ 消費 μ M	CO ₂ 発生 μ M	RQ	基質消費 μ M	pyruvate 生成 μ M	
1a	glucose	9.8	4.8	0.49	6.8	6.0	12.6	8.5	0.68	6.5	2.1
	-+DNP	8.2	3.4	0.42	6.2	10.6	8.0	4.0	0.50	4.0	5.0
	pyruvate	1.9	2.8	1.47	2.4	/	3.5	5.1	1.46	4.7	/
2a	+DNP	0.3	0.4	1.33	0.2		0.4	0.6	1.5	0.3	
	glucose	10.1	5.4	0.53	7.7	7.3	14.1	9.3	0.66	6.8	2.9
	DNP	8.9	4.1	0.46	7.4	13.6	11.9	5.8	0.49	6.7	9.6
3a	pyruvate	1.3	1.9	1.46	2.0	/	3.8	5.5	1.44	4.2	/
	+DNP	0.4	0.6	1.50	0.2		0.5	0.7	1.44	0.3	
	glucose	8.1	3.9	0.48	6.9	3.7	11.8	7.9	0.67	6.0	2.2
	-+DNP	8.0	3.4	0.42	7.1	12.7	8.9	4.2	0.47	4.8	7.3
	pyruvate	1.4	2.0	1.46	2.1	/	3.0	4.4	1.46	4.7	/
	-+DNP	0.3	0.4	1.33	0.2		0.4	0.6	1.44	0.2	

菌液（湿菌量 30 mg）2.0 ml, 基質 (30 μ M) 0.3 ml, DNP (10⁻³M) 0.3 ml, 全量 3.0 cc とする, pH 7.2, 37°C, 1 hr.

即ち「静置」は「振盪」に比し各菌共一般に glucose を基質とした O_2 消費量は少ないが、 O_2 消費量に対する基質消費量の割合は「静置」の方が大であり、例えば 1a 菌に於て、「静置」は $7.9 \mu M$ の O_2 消費に対し glucose 消費は $6.8 \mu M$ であるが、「振盪」では $12.6 \mu M$ の O_2 消費に対する glucose 消費は $6.5 \mu M$ である。RQ は「静置」の 0.49 に対し、「振盪」では 0.68 となり「静置」に比し大なる RQ 値が得られた。又 pyruvate 酸化能は何れの培養菌でも、普通寒天培養のものに比し微弱となつてゐるため、glucose 消費量に対する pyruvate 蓄積量の割合も何れの培養菌も普通寒天培養のものに比し大であり、「静置」は「振盪」に比しこの傾向が更に著明であつた。

次に阻害剤 DNP の影響について見ると、各菌共 glucose 基質に於て、「振盪」では「静置」に比し O_2 消費の DNP による抑制が顕著であり、glucose 消費量も亦多少より強く抑制される成績が得られたが、特に 1a の「振盪」では glucose 酸化に対する DNP の阻害作用が他菌に比し大であり、その glucose 酸化の過程に DNP により阻害される様な経路の関与が他菌に比し大なることが認められた。

IV. 総括及び考案

Sh. flexneri に属する各菌は一般に glucose をよく酸化分解して pyruvate に至らしめ、更にその一部を完全酸化し、一部は lactate, 或は acetate にすると考えられる。

さて、2, 3 の供試菌につき、glucose \rightarrow pyruvate の代謝が如何なる経路によるかを検討すると、先ず普通寒天培養菌の O_2 消費量を見るに (第 1 表) 各菌共 ribose その他の 5 炭糖及び gluconate を基質とせる O_2 消費が極めて小さく、このことはこれ等の菌による glucose 酸化に於て Warburg—Dickens 経路⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ の関与を欠くことを暗示するものと考えられる。

次に 1a, 2a, 3a 各菌の glucose 酸化に於

ける量的関係と、これに対する数種阻害剤の影響を見るに (第 3, 4, 5 表), monoiodoacetate, NaN_3 を用いた阻害実験によつては glucose 分解経路の推定に対する手掛りを得ることは出来なかつたが, DNP, arsenite を用いた実験によつては、普通寒天培養のこれら供試菌が主として Embden—Meyerhof 経路¹¹⁾¹²⁾ により glucose を分解することがほぼ推定される。即ち各菌共阻害剤無添加 (対照) では, glucose 1 M に対する O_2 消費は 4 M 程度であり, RQ は 0.76~0.78 であるのに対し $10^{-3}M$ DNP を添加することにより glucose 1 M に対する O_2 消費は 2.5~3.2 M となり, glucose 消費量に対する O_2 消費量の割合は対照に比し低下する。DNP は pyruvate 以下の酸化を殆んど完全に抑制することが認められるので (同表), DNP 存在下の O_2 消費は主として glucose \rightarrow pyruvate の間のものみに由来すると一応考えることとする。而して pyruvate の蓄積は DNP 添加により著しく増大し, glucose 1 M より 2 M 近くの pyruvate が蓄積し, 且つ RQ も DNP 添加により著明に低下するのが認められる。又 $10^{-3}M$ arsenite による阻害実験に於ても同様な傾向が見られ、これらのことからして供試菌による glucose の分解は主として Embden—Meyerhof 経路により行なわれるとすることが妥当と考えられる。

次に glucose を加えた液体培地を用い、静置培養したもの (「静置」) と振盪培養したもの (「振盪」) につき glucose の酸化様式を比較するに、「静置」では gluconate, ribose の酸化能を欠くのに対し、振盪培養することにより、各菌共これら基質の酸化能を多少とも獲得し、特に 1a 菌に於てこの傾向が顕著である。而して静置に比し glucose 消費量に対する O_2 消費量の割合は大であり、従つて「振盪」では glucose 分解に Embden—Meyerhof 経路の他、Warburg—Dickens 経路も関与すると予想されるが、このことは DNP による阻害実験により更に確かめられた。即ち、DNP は Embden—Meyerhof 経路を阻害

しないと考えられるが¹³⁾、「振盪」は「静置」に比し glucose を基質とした O₂ 消費、及び基質自体の消費が DNP により、より強く阻害されることからして、振盪培養することにより Embden—Meyerhof 以外の経路、恐らくは Warburg—Dickens 経路が僅かながら現われて来るものと考えられる。然しながら「振盪」に於ても DNP 存在下の glucose 酸化では 1 M の glucose より 1 M 以上の pyruvate の生成が見られることからして、glucose 酸化に Embden—Meyerhof 経路も関与し、むしろその主流はこの経路ではないかと推定される。

V. 結 言

Sh. flexneri 1 a, 1 b, 2 a, 3 a, 4 a, 5 の各菌を供試菌として、普通寒天に発育した菌体、glucose, pepton を含む液体培地を用い静置培養した菌体、及び振盪培養した菌体に

つき glucose の酸化様式につき検討し次の結果を得た。

1. これら各菌により、glucose はよく酸化されて pyruvate に至り、更に一部は acetate となり、一部は完全酸化される。

2. DNP, arsenite などの阻害剤による実験の結果、各菌の普通寒天培養菌体は glucose を主として Embden—Meyerhof 経路により分解する。

3. glucose を含む液体培地で静置培養した菌体は glucose をやはり Embden—Meyerhof 経路より分解すると考えられる。

4. glucose を含む液体培地で振盪培養を重ねた菌では他の経路、恐らくは Warburg—Dickens 経路、或は gluconate, α -ketogluconate (又は 5-ketogluconate) をへる経路も発達してくると考えられるが、主流はやはり Embden—Meyerhof 経路と推定される。

(参考文献は第 3 編の末尾に記載)

Glucose Metabolism of Bacteria Belonging to *Sh. flexneri*

Part 1.

The Glucose Oxidation of the Bacteria Growing on Agar and Fluid Media

By

Gohei Fujimoto

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

With the use of the bacteria of standard strain such as *Sh. flexneri* 1 a, 1 a, 2 a, 3 a, 4 a and 5. a series of experiments were conducted in order to study the modos of glucose oxidation of each of these bacteria growing on plain agar and still-standing or shaking fluid medium containing glucose and pepton. The results are presented in the following.

1. Each of these bacteria oxidize glucose converting into pyruvate, and a portion of glucose is converted to lactate or acetate and still other portion of it is completely oxidized.

2. In inhibitory experiments using DNP and arsenite, it has been found that each of these bacteria growing on the plain agar medium oxidizes glucose primarily by the Embden—Meyerhof pathway.

3. Those bacteria grown on the fluid medium containing glucose likewise oxidize glucose by the Embden—Meyerhof pathway in the case of still-standing culture, whereas in the case of shaking culture they seem to convert glucose by other pathway too, most likely by the Warburg—Dickens pathway or even the pathway, gluconate, 2-keto gluconate or 5-ketogluconate can be thought to develop.