576.851.49-095.3

Sh. flexneri に属する菌の glucose 代謝

第 3 編

培地 C 源と glucose 酸化の関係

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. 培地C源と基質酸化能の関係
2. gluconate 及び ribose の酸化に対する DNP 及び arsenite の影響
3. 各培地発育菌の glucose 酸化
IV. 総括及び考案
V. 結言

I. 緒言

第1編に於て Sh. flexneri に属する菌の glucose 代謝に関しての実験を行い，それらの普通寒天培養菌はいずれも glucose を主として Embden—Meyerhof 経路をへて分解し pyruvate に至らしめ，又 glucose を含む液体培地で激しく振盪して培養することにより Embden—Meyerhof 経路以外のもの，恐らくは Warburg —Dickens 経路或は gluconate, 2-ketogluconate（又は 5-ketogluconate）をへる経路による glucose 酸化能を，菌により差異はあるが獲得する．しかし尚 Embden—Myerhof 経路による酸化が多くの割合を占めることを推定した．

第2編に於ては，各普通寒天培養供試菌の静止菌体では gluconate 酸化酵素系は適応的に生成されるものであり，ribose 酸化に関する酵素系は主としていわゆる構成酵素として存在するものであることを推定し，又一部の菌（St. flexneri 1a）では glucose に馴らした静止菌では gluconate 及び ribose 酸化酵素系が発達し，gluconate に馴らしたものは ribose 酸化酵素系の発達が認められるが，他の菌（Sh. flexneri 2a, 3a）ではかかることは見られないことを明らかにした．

本編では，glucose, gluconate, ribose などを夫々C源とせる培地に発育した菌体の glucose 代謝が培地C源の差異に応じて変化するものか否かにつき検討した．

II. 実験材料及び実験方法

供試細菌：Sh. flexneri 1a, 2a, 3a 標準株の教室保存のもの．

菌培養法：

第二燐酸ソーダ	2.5 gr
第一燐酸カリ	0.35
硫酸第一鉄	0.001
硫酸マグネシウム	0.01
食塩	1.0
ペプトン	1.0
寒天	30.0
水	1 l
pH	7.2

上記組成の基礎培地にC源として glucose, gluconate, ribose, pyruvate を夫々 M/50 となる様加えた固形培地を用い，同一組成培地に5代以上継代したものを使用した．培養は

37°C，18時間である．

菌浮游液の調製：前編同様培地より集菌したものをM/50燐酸緩衝液（0.85％NaCl加，pH 7.2）にて2回洗滌後，同一組成の緩衝液に浮游せしめて使用した．

呼吸量測定： Warburg 検圧計を用い，常法に従つた．

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

glucose, pyruvate の定量： 何れも前編同様の比色法によつた．

ribose の定量：orcine による比色法[15]によつた．

Ⅲ. 実験成績

1. 培地C源と基質酸化能の関係

各供試菌の glucose, gluconate, ribose, pyruvate を夫々C源とした培地に発育した菌体の glucose, gluconate, ribose, pyruvate を基質とした O_2 消費を比較した．基質は各々M/100，反応時間は1時間とした．結果は第1表に示す通り，1a では，pyruvate をC源とした培地に発育した菌（「pyruvate 菌」と略，他も同様に略す）は glucose, pyruvate を基質としてよく O_2 消費を示すことは勿論であるが，gluconate, ribose を基質として僅かに O_2 消費が認められるにすぎなかつた．「ribose 菌」では ribose を基質とした O_2 消費は増大していたが，gluconate の験化能は増大していなかつた．「gluconate 菌」では gluconate に極めてよく適応しており，且つ ribose にも僅をながら適応しているのが認められた．「glucose 菌」では gluconate によく適応し，ribose にも僅かながら適応していた．

これに対し 2a, 3a の両菌では 1a とは多少異り，「gluconate 菌」は gluconate の，又「ribose 菌」は ribose の酸化能は増大するが，「glucose 菌」の gluconate, ribose に対する適応，及び「gluconate 菌」の ribose に対する適応は何れも僅かに認められるにすぎなかつた．

第1表 培地のC源と基質酸化能の関係

Sh. flexneri 1a

培地のC源 \ substrate	glucose	gluconate	ribose	pyruvate
glucose	107	41	47	48
gluconate	151	186	58	97
ribose	96	17	68	66
pyruvate	132	18	28	136

Sh. flexneri 2a

培地のC源 \ substrate	glucose	gluconate	ribose	pyruvate
glucose	91	16	23	49
gluconate	163	199	32	83
ribose	108	11	52	56
pyruvate	124	7	10	129

Sh. flexneri 3a

培地のC源 \ substrate	glucose	gluconate	ribose	pyruvate
glucose	89	15	17	53
gluconate	142	164	19	134
ribose	91	17	51	78
pyruvate	168	18	18	191

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

2. gluconate 及び ribose の酸化に対する DNP 及び arsenite の影響

先づ「gluconate 菌」による gluconate の酸化に対するこれら阻害剤の影響を検討すると第2表に示す如く，各菌共一般に O_2 消費量は 2×10^{-3}M DNP 添加により $^1/_4$～$^1/_5$ に減少し，10^{-3}M arsenite 添加によつては $^3/_4$ 程度となつた．これに対する pyruvate の蓄積は阻害剤無添加の場合には 1a 菌では 1.6 μM，2a 菌では 0.9 μM，3a 菌では 0.7 μM であるが，添加によつて僅かながら蓄積量は増大し，又 arsenite 添加によつては著明な pyruvate

第2表 各培地発育菌による glucose 酸化の量的関係

Sh. flexneri 1a

		O_2消費μM	CO_2発生μM	RQ	基質消費 μM	pyruvate 生成 μM
glucose 培地	glucose	7.3	3.4	0.46	4.6	5.2
	−+DNP	6.1	2.6	0.42	4.9	8.8
	pyruvate	1.9	3.0	1.49	3.1	—
	−+DNP	0.1	0.2	2.0	0.5	
gluconate 培地	glucose	14.6	11.1	0.76	4.3	0.9
	−+DNP	10.1	4.3	0.43	4.0	6.4
	pyruvate	8.7	13.0	1.50	21.9	—
	−+DNP	0.9	1.3	1.50	1.3	
ribose 培地	glucose	8.6	4.2	0.49	4.8	5.0
	−+DNP	6.7	2.8	0.41	4.4	7.5
	pyruvate	2.7	4.0	1.49	4.9	—
	−+DNP	0.3	0.5	1.67	0.5	

菌液(湿菌量30mg)2.0ml, 基質(30μM)0.3ml, DNP(終濃度10^{-3}M) 0.3ml, 全量3.0mlとする, pH7.2, 37°C, 1hr.

第3表 各培地発育菌による glucose 酸化の量的関係

Sh. flexneri 2a

		O_2消費μM	CO_2発生μM	RQ	基質消費 μM	pyruvate 生成 μM
glucose 培地	glucose	6.8	3.1	0.45	3.8	5.1
	−+DNP	6.3	2.5	0.40	4.7	8.0
	pyruvate	1.5	2.3	1.50	2.3	—
	−+DNP	0.3	0.4	1.33	0.3	
gluconate 培地	glucose	16.6	13.1	0.79	4.2	1.0
	−+DNP	9.4	4.0	0.43	3.9	6.2
	pyruvate	10.7	15.9	1.48	18.1	—
	−+DNP	9.1	13.4	1.48	2.0	
ribose 培地	glucose	8.1	3.6	0.44	4.4	5.0
	−+DNP	7.7	3.2	0.42	4.2	7.4
	Pyruvate	1.7	2.6	1.51	2.0	—
	−+DNP	0.4	0.6	1.50	0.6	

菌液(湿菌量30mg)2.0ml, 基質(30μM)0.3ml, DNP(終濃度10^{-3}M)0.3ml, 全量3.0mlとする, pH7.2, 37°C, 1hr.

蓄積が認められた.

次に ribose をC源として発育した各菌による ribose 酸化に対するこれら阻害剤の影響を検討して第3表の結果が得られた. 即ち各菌共 O_2 消費量は DNP により著明に, arsenite によつて若干抑制される. 而してこれに対する pyruvate 蓄積量を見ると各菌共阻害剤無添加の対照では 1a 菌では 0.9 μM, 2a 菌では 0.7 μM, 3a 菌では 0.8 μM で, 何れも僅かながら pyruvate 蓄積が認められるが, DNP 添加により全く蓄積は認められなくなり, arsenite 添加によつては逆にかなりの蓄積量増大を認めた.

3. 各培地発育菌の glucose 酸化

C源を夫々 glucose, gluconate, ribose とした各培地に発育した菌体により glucose 酸化に対する量的関係と, これに対する DNP (2×10^{-3}M) の影響を検討した. 結果は第4〜第6表の通りである.

1a 菌 (第2表) に於いては DNP 無添加の対照では glucose 1M 当りの O_2 消費量は

第4表 各培地発育菌による glucose 酸化の量的関係

Sh. flexneri 3a

		O_2消費μM	CO_2発生μM	RQ	基質消費 μM	pyruvate 生成 μM
glucose 培地	glucose	7.0	3.1	0.45	4.9	5.0
	−+DNP	6.8	2.9	0.42	5.2	9.3
	pyruvate	1.8	2.7	1.50	2.7	—
	−+DNP	0.3	0.5	1.66	0.5	
gluconate 培地	glucose	15.0	11.5	0.77	4.2	0.8
	−+DNP	10.2	5.0	0.49	5.0	8.4
	pyruvate	9.7	14.5	1.49	15.7	—
	−+DNP	1.1	1.7	1.50	1.8	
ribose 培地	glucose	8.9	4.4	0.49	4.5	5.0
	−+DNP	7.0	3.2	0.45	5.1	8.2
	pyruvate	2.4	3.5	1.47	4.0	—
	−+DNP	0.3	0.4	1:33	0.5	

菌液(湿菌量30mg)2.0ml, 基質 (30μM) 0.3ml, DNP (終濃度10^{-3}M) 0.3ml, 全量3.0mlとする, pH7.2, 37°C, 1hr.

第5表 gluconate 培地発育菌による glucose, gluconate の酸化

Sh. flexneri 1a

	O_2消費μM	CO_2発生μM	RQ	pyruvate 生成 μM
gluconate	18.2	18.8	1.03	0
—+DNP	8.2	7.5	0.92	0.2
—+arsenite	5.3	5.2	0.98	2.1
glucose	16.0	13.2	0.83	0.4
—+DNP	10.3	5.4	0.52	9.6
—+arsenite	8.1	5.7	0.71	6.9

Sh. flexneri 2a

	O_2消費μM	CO_2発生μM	RQ	pyruvate 生成 μM
gluconate	16.1	17.8	1.10	0
—+DNP	7.4	8.4	1.13	0.1
—+arsenite	4.2	4.3	1.02	1.1
glucose	14.6	11.6	0.79	1.0
—+DNP	10.5	5.0	0.48	8.0
—+arsenite	7.1	4.2	0.60	5.3

Sh. flexneri 3a

	O_2消費μM	CO_2発生μM	RQ	pyruvate 生成 μM
gluconate	17.3	21.0	1.21	0
—+DNP	8.9	9.9	1.11	0
—+arsenite	5.9	5.7	0.98	1.8
glucose	15.6	12.6	0.81	0.7
—+DNP	9.1	4.5	0.50	8.3
—+arsenite	7.3	3.7	0.51	4.3

菌液（湿菌量30mg）2.0ml，基質（終濃度10^{-2}M）0.3ml，阻害剤（終濃度10^{-3}M）0.3ml，全量3.0mlとする，pH7.2，37°C，1hr.

「glucose 菌」で約 1.6 M，gluconate 培地菌で 3.4 M，ribose 培地菌では 1.8 M であつた．而して「glucose 菌」及び「ribose 菌」は何れも pyruvate 酸化能が微弱となつていた．又 RQ は「glucose 菌」0.46，「ribose菌」0.49 で何れも小さく，「gluconate 菌」ではこれら

第6表 ribose 培地発育菌による ribose の酸化

Sh. flexneri 1a

	O_2消費μM	CO_2発生μM	RQ	ribose 消費 μM	pyruvate 生成 μM
ribose	8.9	8.1	0.91	7.4	0.9
—+DNP	1.0	0.8	0.8	0.8	0
—+arsenite	4.3	4.4	1.02	3.6	1.9

Sh. flexneri 2a

	O_2消費μM	CO_2発生μM	RQ	ribose 消費 μM	pyruvate 生成 μM
ribose	9.7	9.0	0.93	8.8	0.8
—+DNP	1.4	1.2	0.86	1.0	0
—+arsenite	7.6	6.6	0.97	6.0	3.2

Sh. flexneri 3a

	O_2消費μM	CO_2発生μM	RQ	ribose 消費 μM	pyruvate 生成 μM
ribose	7.7	6.8	0.88	6.8	1.0
—+DNP	1.2	1.0	0.84	1.0	0
—+arsenite	4.0	3.5	0.88	3.3	1.8

菌液（湿菌量30mg）2.0ml，ribose（30μM）0.3ml，阻害剤（終濃度10^{-3}M）0.3ml，全量3.0mlとする，pH7.2，37°C，1hr.

に比し大で 0.76 であつた．

これに対し DNP 添加の場合を見ると，pyruvate の酸化は DNP により殆んど完全に抑制され，又 glucose を基質とせる場合，「glucose 菌」及び「ribose 菌」では O_2 消費，基質消費，RQ 値の DNP による影響は「gluconate 菌」に比し少く「gluconate 菌」では O_2 消費はかなり抑制され，RQ も低下するに拘わらず，glucose 消費量に対する影響は比較的僅かであつた．而して何れの培地に発育した菌体に於いても glucose よりの pyruvate の蓄積は DNP 添加により増大し，glucose 消費 1 M に対し「glucose 菌」では約 1.8 M，「gluconate 菌」では 1.6 M，「ribose 菌」では 1.7 M の pyruvate 蓄積が認められ

た.

以上は 1a 菌についての成績であるが, 2a, 3a 菌に於いてもこれと同様の関係が見られ, 各菌間に有意の差異は認められなかつた.

IV. 総括及び考按

Sh. flexneri に属する菌の静止菌体による glucose の分解様式が, 発育培地 C 源の差異により変化するものか否かを検討する目的で, Sh. flexneri 1a, 2a, 3a の 3 菌を選んで行つた上記実験成績に考案を加える.

これら供試菌はペプトンを N 源とし, glucose, gluconate, ribose, pyruvate を C 源とした培地によく発育し, 各培地 C 源によく適応する. 而して, pyruvate 培地発育菌は各菌共 gluconate, ribose の酸化能が微弱であり, ribose 培地発育菌は gluconate を殆んど酸化しない.

gluconate 培地発育菌は gluconate をよく酸化することは勿論であるが, 2a, 3a では ribose 酸化能を欠ぎ, 1a では僅かながら ribose 酸化能を獲得している. かくの如く 2a, 3a に於てそれらの gluconate 培地発育菌が gluconate には全く適応しているにも拘わらず, ribose に適応していないことは, それらの菌による gluconate 酸化が ribose を通らないで他の経路, 例えば 2-ketogluconate 或は 5-ketogluconate をへる分解経路 [15)16)17)] を通るのではないかと想像される. 然し 1a に於ては gluconate の適応菌は ribose にも或程度適応しており, この菌の gluconate 酸化に ribose をへる経路が少くとも一部には存在するものと考えられる.

更に glucose を C 源とした培地に発育した菌体について見ると 1a 菌では僅かながら gluconate, ribose に適応しており, この菌の glucose 酸化に gluconate, ribose をへる経路も存在する可能性が推定される. これに対し 2a, 3a 菌では gluconate, ribose に対する適応は全く認められず, これらの菌では glucose の酸化が gluconate, ribose を通りにくいものと考えられる.

さて, 各培地発育菌の glucose 酸化経路につき更に検討するに, 各供試菌とも glucose 培地, ribose 培地に発育せる菌体は pyruvate の酸化能が微弱であるため, glucose 1M に対し 1M 以上の pyruvate 蓄積が認められ, 且つ glucose 1M 当りの O_2 消費は各菌共 1.6～1.8 M の範囲であり, RQ 値は 0.45 附近となつて比較的小さい. 更に DNP 添加に於ては O_2 消費は殆んど影響されないが, RQ 値は低下し, pyruvate 蓄積は glucose 1M 当り 2M 近くに及ぶ.

又 gluconate 培地発育菌では, pyruvate 酸化能が大であるため, pyruvate 蓄積量は少く, 又 glucose 1M 当りの O_2 消費は 4M 近くなり, RQ も他の培地のものに比し大であるが, DNP 添加に於ては pyruvate 以下の酸化が阻止される結果 O_2 消費はかなり抑制される. 然し glucose の消費に対する DNP の阻害は小さく, RQ 値は低下し, 又 pyruvate の蓄積は glucose 1M 当り 2M 近くに及ぶ. これらのことより, gluconate 培地発育菌に於ても亦 glucose 酸化は主として Embden—Meyerhof 経路によるものと想像される. このことは次のことより更に確認された.

gluconate 培地発育菌を用い, gluconate 酸化に対する DNP の影響を検討し, glucose 酸化に対するそれと比較すると, 各菌共 glucose 基質の場合には (第 4～第 6 表) 前述の如く DNP 添加により pyruvate の大量の蓄積が見られたのであるが, gluconate 基質の場合は (第 5 表) DNP 添加により O_2 消費は著明に抑制され且つ pyruvate の蓄積も減少する. 更に ribose 培地発育菌を用い ribose の酸化に対する DNP の影響を見ると (第 3 表), この阻害剤により ribose の酸化は著明に阻害され, pyruvate の蓄積も全く認められなくなる. これらの事実からして, 各培養菌による glucose 酸化は gluconate, ribose をへないで, 即ち 主として Embden—Meyerhof 経路により pyruvate に至るものと推定される.

以上第 1, 第 2, 第 3 編の実験結果を総合するに, Sh. flexneri に属する菌の glucose

酸化は，glucose を含む液体培地を用いはげしく振盪して培養した場合には僅かながら Embden—Meyerhof 経路以外のもの，恐らくは Warburg—Dickens 経路の発達が推定され，この傾向は 1a 菌で最も大であるが，然しなお glucose 酸化の主流は E-M 経路と考えられる．又液体培地静置培養，或は固形培地培養を行つた菌体は培地のC源に関係なく，主として E-M 経路により glucose を酸化して pyruvate に至らしめると考えられる．而して静止菌に於ては，洗滌した菌体を glucose を加えて2～3時間振盪することにより W-D 経路がかなり発達して来るものと推定される．

V. 結　　言

Sh. flexneri 1a, 2a, 3a の各菌を供試菌として，培地C源の差異により glucose 酸化様式に変化を来すものか否かを明らかにする目的で，pepton をN源とし，glucose, gluconate, ribose を夫々C源とした固形培地に発育した菌体の glucose 酸化を検討し，次述の結果を得た．

1. 各供試菌共，glucose 培地発育菌体は glucose をよく酸化するが，gluconate, ribose は酸化し得ない．gluconate 培地発育菌体は glucose の他，gluconate をもよく酸化するが，ribose は殆んど酸化しないか，僅かである．ribose 培地発育菌体は glucose の他，ribose をよく酸化するが，gluconate は酸化し難い．

2. 以上の如く，各培地に発育した菌体は gluconate, ribose の酸化能に著明な差異が認められるが，DNP を阻害剤として用いた実験結果により，これら各培地発育菌体は何れも glucose を主として Embden—Meyerhof 経路により酸化するものと推定される．

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するものであります．

参 考 文 献

1) Umbreit, W. W. et al. (1949): Manometric Techniques and Tissue Metabolism.
2) 標準生化学実験 (1953): 18.
3) 標準生化学実験 (1953): 36.
4) Westerfeld, W. W. (1945) · J. Biol. Chem., 161, 495.
5) 標準生化学実験 (1953): 35.
6) Dickens, F. (1938): Biochem. J., 32, 1626.
7) Dickens, F. and Glock, G. E. (1950): Nature, 166, 33.
8) Cohen, S. S. and Scott, D. B. M. (1950): 111, 543.
9) Scott, D. B. M. and Cohen, S. S. (1951) · J. Biol. Chem., 188, 509.
10) Horecker, B. L. and Smyrniotis, P. Z. (1950): Arch. Biochem. 29, 232.
11) Roster, J. W. (1947): Bact. Rev., 11, 167.
12) Gunsalus, I. C., Horecker, B. L. and Wood, W. A. (1955): Bact. Rev. 19, 89.
13) 平野清寿 (1956): 第29回日本細菌学会総会(熊本) 講演.
14) 順田正己 (1950): 酵素化学シンポジウム, 4集, 19.
15) Entner, N. and Stanier, R. Y. (1951): J. Bact. 62, 181.
16) 増尾外 (1953): 酵素化学シンポジウム, 8集, 105.
17) Stokes, F. N. and Campbell, J. J. R. (1951) Arch. Biochem. 30, 121.

Glucose Metabolism of Bacteria Belonging to *Sh. flexneri*

Part 3.

Relationship Between Carbon Source of Medium and Oxidation of Glucose

By

Gohei Fujimoto

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

In the study of the modos of glucose oxidation using Sh. flexneri 1 a, 2 a, or 3 a as the test bacteria, and glucose, gluconate, or ribose as the carbon source of the medium, the following results were obtained.

1. Every one of these bacteria cultured in the glucose medium can oxidize glucose well, but can not oxidize gluconate nor ribose. Those bacteria growing on the gluconate medium can oxidize glucose and gluconate well, but hardly ribose. The bacteria growing in the ribose medium can oxidize glucose and ribose well but not gluconate.

2. From the results obtained in the experiment using DNP as an inhibitory agent, it is assumed that glucose is mainly oxidized by way of the Embden-Meyerhof pathway by the bacteria grown on each of these culture media.