

各種抗菌性物質耐性菌の研究

第二編

各種抗菌性物質に対する耐性菌及び非耐性菌の 適応酵素系に関する研究

岡山大学医学部細菌学教室（主任 村上教授）

専攻生 金 久 禎 記

〔昭和 28 年 10 月 20 日受稿〕

目 次

第 1 章 序 言	性及び非耐性菌に於ける相違に就いて
第 2 章 実験材料及び実験方法	1. <i>Staphylococcus aureus</i> 寺島株について
1. 各種抗菌性物質に対する各種細菌の耐性獲得実験	2. <i>Salmonella typhi</i> 57 型 S に就いて
2. 細菌表面構成物質の精製方法	第 5 章 Polysaccharide-Polypeptide-Lipide-Complex より分離した Polysaccharide 及び Polypeptide I の適応酵素活性化能の耐性及び非耐性菌に於ける相違に就いて
3. Ribo 核酸の精製方法	第 6 章 Polysaccharide Polypeptide-Lipide-Complex と Ribo 核酸の適応酵素活性化能の相互干渉現象より見たる耐性及び非耐性菌の相違に就いて
4. Polysaccharide-Polypeptide-Lipide-Complex より Polysaccharide 及び Polypeptide I を分離する方法	第 7 章 総括及び考察
5. 適応酵素実験方法	第 8 章 結 論
第 3 章 細菌表面構成物質の適応酵素活性化能の耐性及び非耐性菌に於ける相違に就て	文 献
1. <i>Staphylococcus aureus</i> 寺島株について	
2. <i>Salmonella typhi</i> 57 S 型について	
第 4 章 Ribo 核酸の適応酵素活性化能の耐	

第 1 章 序 言

生細胞内に於ける適応現象の本質は次の 3 の場合¹⁾が考えられる。即ち、

- 1) 微生物の変異に基く mutant strain によつて決定する場合²⁾,
- 2) 微生物の生細胞内に其の基質に特異性を有する酵素系の出現する場合,
- 3) 微生物の培養過程に於て異つた基質相互の影響が細胞酵素系に出現する場合である。そこで本研究で主として問題にするのは 2) の場合であるが、2) 及び 3) の場合は従来から多数の業績があつて (Stephenson³⁾⁴⁾, Spiegelmann⁵⁾, 須田⁶⁾⁷⁾, 田口⁸⁾, Karström

によつて adaptive enzyme として constructive enzyme より区別されたものである。

さて基質との接触により微生物内に適応酵素の発達して来る機序は Stephenson, Gale によつて定性的に研究され、Spiegelmann⁵⁾によつて適応酵素の産生には力源代謝が不可欠であり、従つて生細胞内合成反応の出現と同時に酵素活性化能が出現すると云うことが見出され、この合成反応には Plasmagen と呼ばれる構造未知の担体が必要であることを明かにした。更に須田⁹⁾及び尾田、竹田¹⁰⁾は Spiegelmann の所謂 Plasmagen は Ribo 核

酸であつて、これが生細胞内酵素始原体の相互転化の反応体であることを略々明かにした。

最近に至つて教室の田口¹¹⁾は須田等の Ribo 核酸の反応体としての作用を確認し、更に外界の物質の変化に最も敏感に接する微生物表面構造の主体をなす Polysaccharide-Polypeptide-Lipide 複合体 (以下 P. P. L. 体と称する) にも力源代謝の影響なしに適応酵素反応体としての作用のあることを見出し、更に進んで斯る両反応体は相互に其の作用に於て干渉する所謂適応酵素反応体干渉現象の存在を明かにした。

翻つて余は前報¹²⁾に於て Penicillin 耐性菌に於ては高 energy 磷化合物として蓄積された energy が原株 (非耐性株) よりも大きいと云うことを発表した。恐らく蛋白質合成反応又はその反応体に変化があるものと想像される。又各種抗菌性物質に対する耐性菌では其の解糖作用に於て質的に量的に種々の段階の変化が見られるが、これが当然力源代謝を通じて適応酵素にも変化を及ぼすことは当然であると思われる。

斯くして上述の様な観点から本編では大体次の問題を解決すべく諸実験を行つた。即ち、

- 1) 適応酵素系に変化がある場合、その原因が適応酵素系反応体、蛋白合成反応、力源代謝の何れに原因しているか?
- 2) 力源代謝に質的、量的変化のあることは前報¹²⁾に於て明かにされているが、どの程度生物細胞内合成反応に影響を与えているか?
- 3) 適応酵素系反応体としての Ribo 核酸或は菌体表面構造物質である P. P. L. 体に質的な変化があれば、それより菌体構造論 (田口¹¹⁾) 的にどのような変化が結論出来るか? 而もこれを端的に証明出来るのは各反応体間の干渉現象である。
- 4) この様な問題の解決により前報の解糖作用の energy 論的变化が如何に証明づけられるであろうか?

第2章 実験材料及び実験方法

1. 各種抗菌性物質に対する各種細菌の耐性獲得実験

使用した抗菌性物質は bacteriostatic なものとして Penicillin G (Meiji) 及び bacteriocidal なものとして 4,4',4''-Trimethyl-3,3',3''-Tripropyl-alkyl-8 (2-Methylthiazol)-2,2'-Pentamethinthiazol-dyamin-3,3''-Dijod (以下 2,4-Dimethylthiazol と略称する) 並に両者の中間的な作用を持つものと見られる Methyl-Chitosan-Hydrochorate (Macramin 寺山¹³⁾) である。

使用菌株は *Staphylococcus aureus* 寺島株及び *Salmonella Typhi* 57 S 型であつて、此等菌株の上述各抗菌性物質に対する耐性獲得実験は前報²⁾と同じで、耐性の最後獲得濃度は第1表の通りである。

第一表 各種菌の耐性獲得濃度

菌 種	非耐性濃度	耐 性 濃 度
Penicillin		
S 57. s.	30×10^4	1×10^4
Staphylo. 寺島	25×10^6	12×10^5
2-4-Dimethylthiazol		
S 57. s.	25×10^4	4×10^4
Staphylo. 寺島	1×10^6	12×10^4
Macramin		
S 57. s.	20×10^3	1×10^3
Staphylo. 寺島	30×10^3	2×10^3

2. 細菌表面構成物質の精製方法

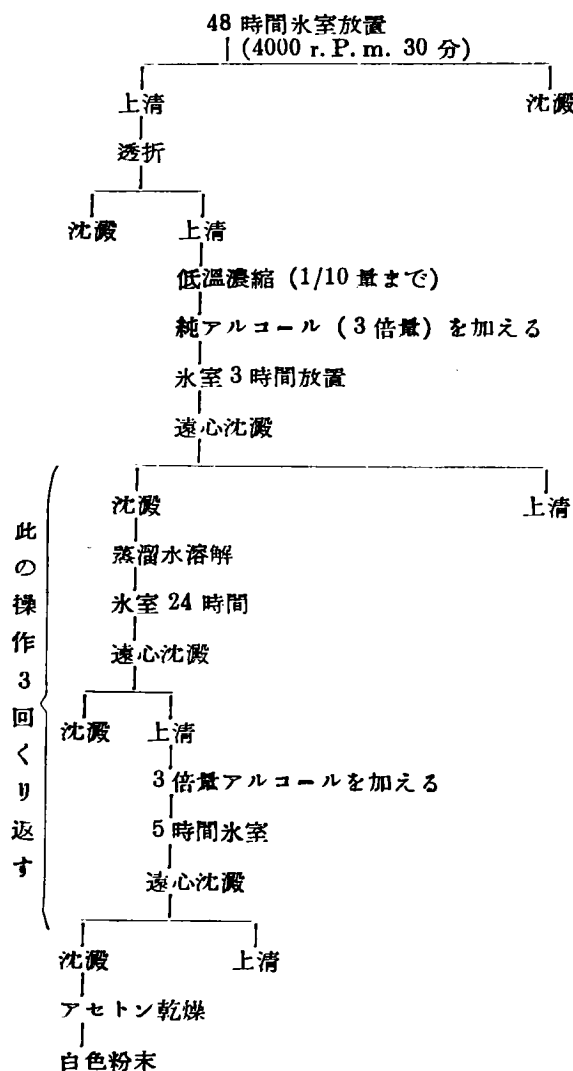
細菌表面構成物質の中で使用したのは Polysaccharide-Polypeptide-Lipide 複合体であつて、その精製方法は田口¹⁴⁾によつた。即ち Gram 陰性菌の場合はあらかじめ 5°C に冷却した N/2CCl₃COOH を菌量の10倍量加えて時々振盪しつつ、48時間氷室に貯蔵し、なるべく速かに 4000 r. p. m. にて遠心分離し、残渣菌体と抽出上清に分け、上清を牛腸膜にて流水に対して Cl⁻ の透析されるまで透析して後、透析内容を遠心沈澱して、上清を 37°C 附近で低温濃縮し、その量を初めの 1/10 量とする。これに 3 倍量の純 Alcohol を攪拌注加し、5 時間、氷室に放置後 3000 r. p. m. 20 分、遠心

沈澱し、白色沈澱物を蒸溜水 40cc 溶解し、24 時間氷室に放置振盪しつつ保存し、不溶解物を遠心沈澱により除去し、これに 3 倍量の純 Alcohol を加える。

以上の操作を数回繰返し、最後の白色沈澱物を純 Alcohol にて 2 回、Aceton にて 2 回洗滌し、直ちに減圧乾燥する。

第二表

菌体表面構成物質精製方法(その一)

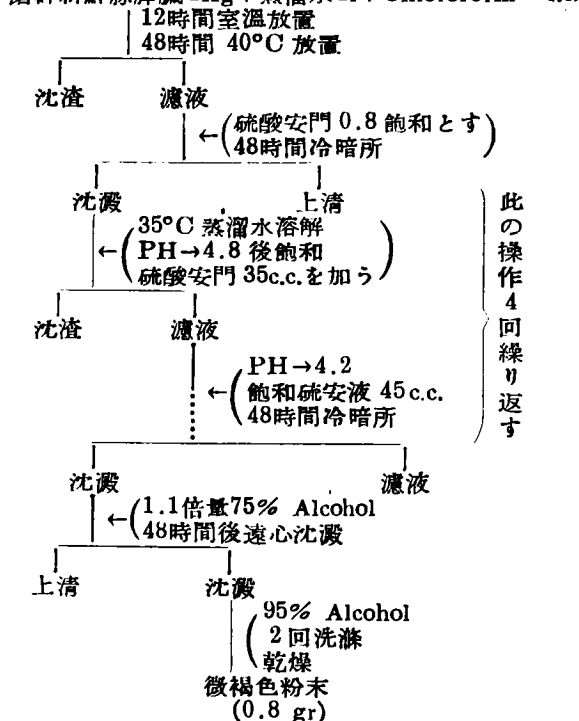
遠心洗滌菌体+10倍量 $N/2$ C Cl_3 $COOH$ 

次に Gram 陽性菌では上述の方法で精製した物質には Ribo 核酸が複合体として含まれているので、Ribonuclease を作用せしめて、Ribo 核酸を分解除去しなければならない(田口⁹⁾)。即ち Gram 陽性菌より上述の方法で得た物質 100mg を 50cc の 0.1M の醋酸ソーダ水溶液に溶解し、更にこれに Kunitz¹⁵⁾ の方

法で得た Ribonuclease 10mg を加え、5°C. の氷室内に数日間屢々振盪し、時々溶解性磷の定量(Iversan¹⁶⁾)をし、その平衡に達した時を以て消化完了とし、これに 40cc の純 Alcohol を加えて沈澱(湿性)の 10 倍量の $N/2$ CCl_3 $COOH$ を加えて抽出、遠心沈澱し、15°C 以下に保つ、上清を流水に対して透析し、以下

第三表 Ribonuclease の製法

磨碎新鮮豚膵臓 1Kg + 蒸溜水 1l + Chloroform 15c.c.



第四表

菌体表面構成物質の精製方法(その二)

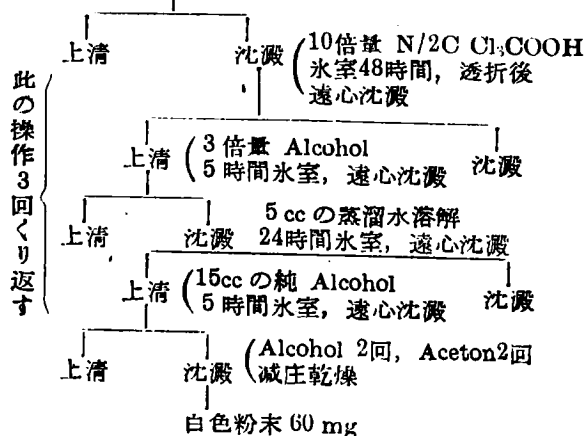
第三表の白色乾燥物質 100mg (gram 陽性菌)

+10mg Ribonuclease + 50cc

0.1M 醋酸ソーダー水溶液 (P. H. 6.0)

氷室にて数日、後 150cc, 純 Alcohol

氷室 5 時間、遠心沈澱



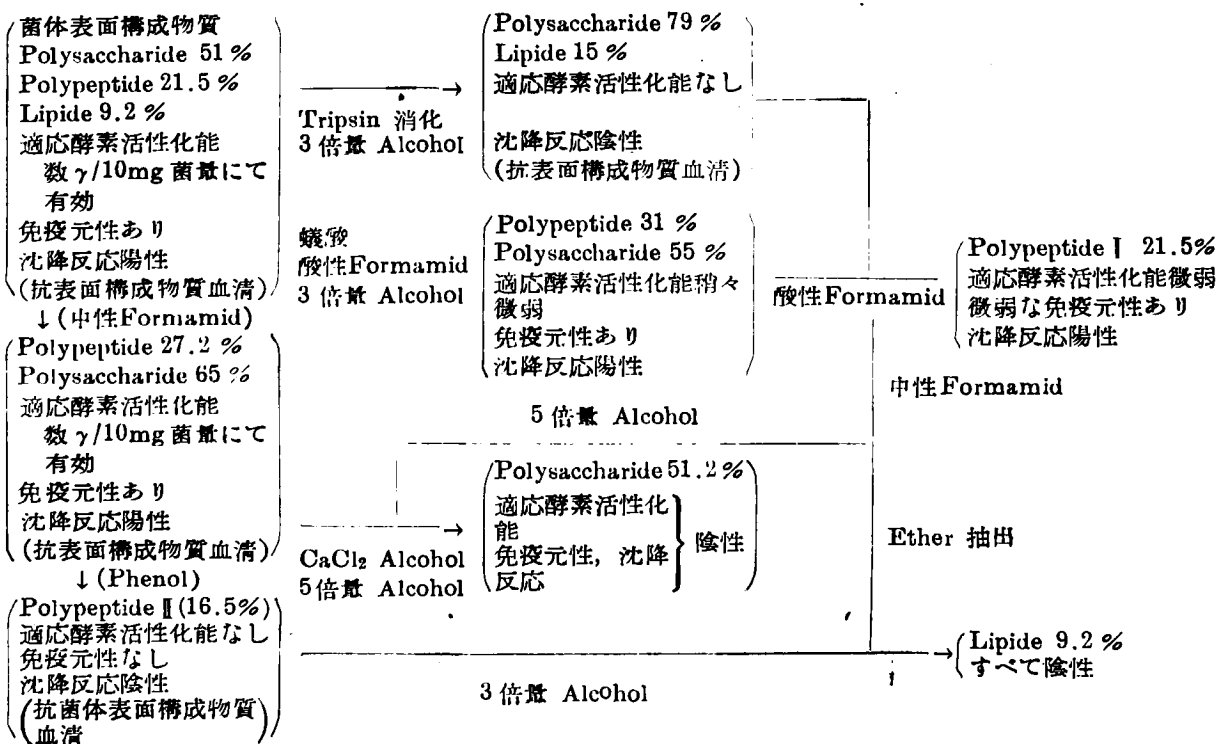
Gram 陰性菌 の場合の Alcohol 沈澱及び蒸溜水溶解を繰返して乾燥せしめる。

3. Ribo 核酸の精製方法

Ribo 核酸の精製には Autolysis に依る菌体破壊—重曹水抽出—Chloroform—Amyl alcohol 除蛋白—精製 (田口¹¹⁾) の方法を使用した。即ち菌体を3回生理的食塩水で洗滌し、菌量と同量の硫酸 Magnesium 食塩水 (即ち N/1000 MgSO_4 及び N/10 NaCl を含む水溶液) を加えて 37°C , 24 時間振盪する。次に同組成の硫酸 Magnesium 食塩水を更に3培量加えて此に重曹を M/10 になる様に加えて 37°C で3時間振盪する。この振盪液を4000 r. p. m. にて1時間乃至2時間遠心沈澱し、菌体残渣と上清とに分離 (以上は無菌的に行う) する。此の褐黄色上清にその $\frac{1}{8}$ 量の Chloroform と $\frac{1}{10}$ 量の Amyl-alcohol を加えて十分に振盪し、2000 r. p. m. 5 分遠心沈澱すると上清は核酸を含む清澄なる褐黄色液、中層は蛋白質ゲル、下層は Chloroform の3層に分離する。最上層は再び同様の方法で除蛋白を繰返す事数回にして中層の蛋白質ゲルの部が認められなくなる。最後に上層の2倍量の純 Alcohol を加え5時間氷室に保存し、生じた白色沈澱物

を遠心沈澱にて分離し、この白色沈澱を適量の蒸溜水に溶解し、氷室に24時間保存し、その際の不溶解物を遠心沈澱にて除去し、その上清の2培量の Alcohol を加える。以上の操作を更に2回繰返えし、最後の白色沈澱物をあらかじめ 5°C に冷却せる10倍量の N/2 CCl_3COOH を加え屢々振盪して、48時間氷室内に保存する。温度を高くとも 10°C に昇らせない様に注意しながら出来るだけ速やかに遠心沈澱し、上清を流水に対して Cl^- のなくなるまで透析する。透析液を遠心沈澱により不溶解物を除去し、これに少量の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 及び Na_2HPO_4 を加える。次に CaCl_2 を30%含む飽和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 液を PH 9.0 になるまで加え、更に $\frac{1}{10}$ 量の Alcohol を注加して氷室に1時間放置後遠心沈澱により白色沈澱物を分離する。この操作を3回繰返し最後の液を中和後透析する。透析内液に2培量の純 Alcohol を加えよく振盪しつゝ、氷室内に5時間保ち生成する白色沈澱物を分離し、少量の水に溶かし氷室に24時間保存後 Alcohol にて2回洗滌し低温減圧乾燥して白色粉末を得る。このものゝ N 対 P の比は 1.68 : 1 であつた。

第 五 表



4. Polysaccharide-Polypeptide-Lipide-複合体より Polysaccharide 及び Polypeptide I を分離する方法

分離した Polysaccharide 及び Polypeptide I は教室田口¹¹⁾の精製したものを使用したため詳細は省略し、唯その概略を表示するに止める。

5. 適応酵素実験方法

培養は耐性菌の場合は普通寒天培地にて耐性獲得濃度の抗菌性物質を含有するものに、非耐性菌はこれを含まないものに 37°C, 20 時間培養後蒸留水にて 2 回洗滌後秤量し、pH 7.4 の M/48 磷酸緩衝生理的食塩水に浮遊させ、基質は主として Anthranil 酸, Pyrocatechine で Warburg 氏検圧法により基質の酸化分解を測定した。基質は主として M/50. Gas 腔は空気、恒温槽は 37°C に保った。

第3章 細菌表面構成物質の適応酵素活性化能の耐性菌及び非耐性菌に於ける相違に就いて

上述の方法で培養した耐性菌及び非耐性菌は *Staphylococcus aureus* 寺島株, *Salmonella typhi* 57 S 型であるが、何れに於ても Anthranil 酸, Pyrocatechine の何れも長時間振盪後に於ても分解しない。然し各菌より単離精製された P. P. L. 体を 5r/10mg 菌量に混ざると Anthranil 酸及び Pyrocatechine 何れも或る一定時間後に急激な酸化分解を始める。此の場合使用する P. P. L. 体は各自己菌種のものでなくてはならないが、耐性菌及び非耐性菌の間には多少相互に活性化させる傾向を認める事が出来る。

1) *Staphylococcus aureus* 寺島株について

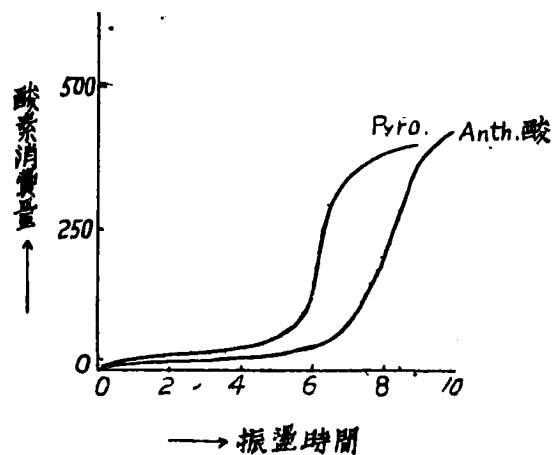
先づ Penicillin 耐性の寺島株について見ると耐性菌及び非耐性菌に就ては各自己よりの P. P. L. 体を作用せしめた場合、第1、第2図の様に適応酵素活性化の準備期には余り長短がないにもかかわらず、以後非耐性菌の場合は急激に酸化分酸曲線が上昇するに反して、耐性菌の場合は少々緩徐に上昇し、次いで前者よりも急激に上昇する二期を認める事が出来る様に思われる。

第1図 非耐性菌にその自己 P. P. L. 体を加えた場合の適応現象

菌 ; *Staphylo.* 寺島非耐性菌

基質 ; Anth. 酸及び Pyrocatechine

活性化物質 ; Penicillin 非耐性菌の P. P. L. 体

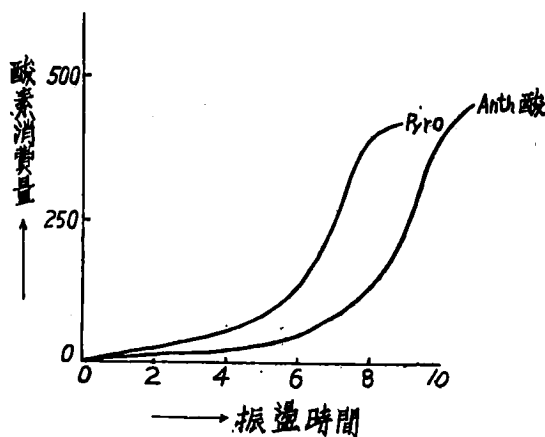


第2図 Penicillin 耐性菌にその自己 P. P. L. 体を加えた場合

菌 ; *Staphylo.* 寺島 Penicillin 耐性菌

基質 ; Anth. 酸及び Pyrocatechine

活性化物質 ; Penicillin 耐性菌の P. P. L. 体

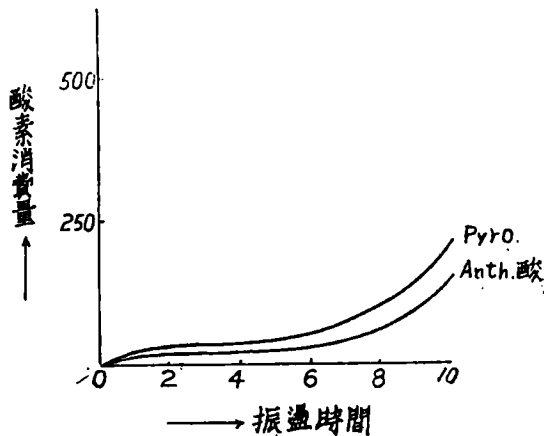


次に Penicillin 耐性寺島株の P. P. L. 体を非耐性菌にと云う様に相互に働かせて見ると明かに両者の間に差が見出される。即ち相互に余り活性度を増さないのであつて、Penicillin 耐性菌の P. P. L. 体を非耐性菌に作用せしめた場合 9 時間で微弱な酸化的適応を示し、(第3図)、反対の場合は更に微弱な活性化能を示すに過ぎない (第4図)。

次に 2-4-Dimethylthiazol の場合に就いて見ると、此の場合は非耐性菌 *Staphylococcus aureus* 寺島株が既に 6 時間で適応するに反して、耐性菌の P. P. L. 体を耐性菌に使

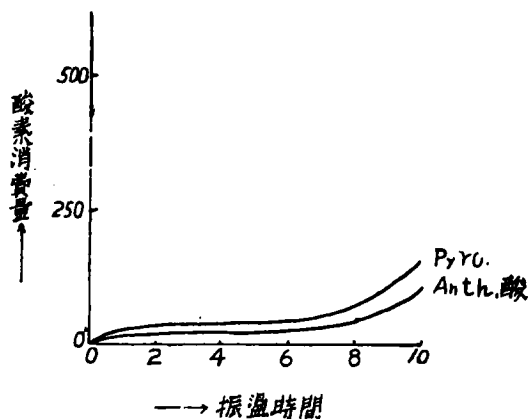
第3図 非耐性菌に Penicillin 耐性菌の P.P.L. 体を加えた場合の適応現象

菌 ; Staphylo. 寺島非耐性菌
基質 ; Anth. 酸及び Pyrocathichine
活性化物質 ; Penicillin 耐性 Staphylo 寺島の P.P.L. 体



第4図 Penicillin 耐性菌に非耐性菌の P.P.L. 体を加えた場合の適応現象

菌 ; Penicillin 耐性 Staphylo. 寺島
基質 ; Anth. 酸及び Pyrocathichine
活性化物質 ; 非耐性 Staphylo. 寺島の P.P.L. 体

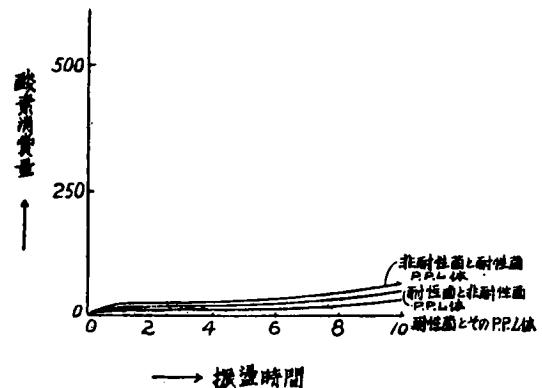


用した時は10時間でも殆んど酸化を示さない(第5図). 交叉的に作用せしめた場合に於ても同様であつて, 耐性菌自体及びその P.P.L. 体には殆んど適応能力, 又は活性化能力が缺如している様に思われる.

更に Macramin 耐性菌の場合を検討すると, その結果は Penicillin 耐性菌の場合と異り, Penicillin 耐性菌 Staphylococcus に見られた様な二相変化はなく, Macramin 耐性菌の P.P.L. 体を Macramin 耐性菌に作用させた場合も(第6図) 非耐性菌の P.P.L. 体を非耐性菌に作用せしめた場合, 交叉的に作用せ

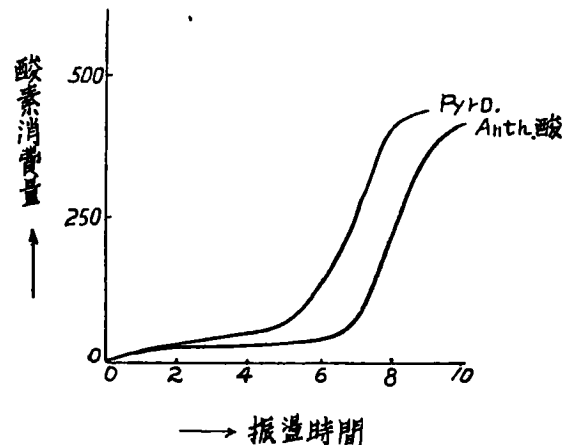
第5図 2,4-Dimethylthiazol 耐性菌の P.P.L. 体の適応活性化能 (Staphylo. 寺島)

基質 ; Anth. 酸



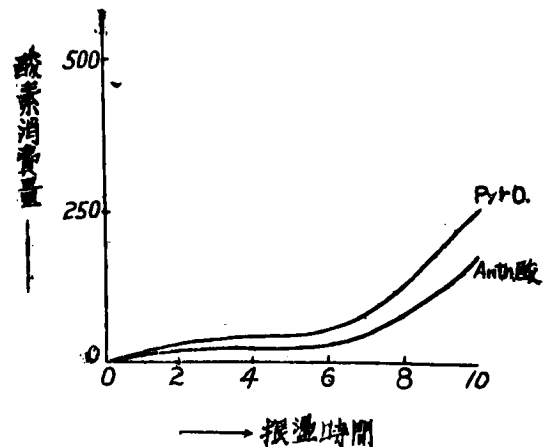
第6図 Macramin 耐性菌にその P.P.L. 体を加えた時の適応現象 (Staphylo. 寺島)

菌 ; Macramin 耐性 Staphylo. 寺島
基質 ; Anth. 酸及び Pyrocathichine
活性化物質 ; Macramin 耐性菌の P.P.L. 体



第7図 非耐性菌に Macramin 耐性菌の P.P.L. 体を加えた時の適応現象

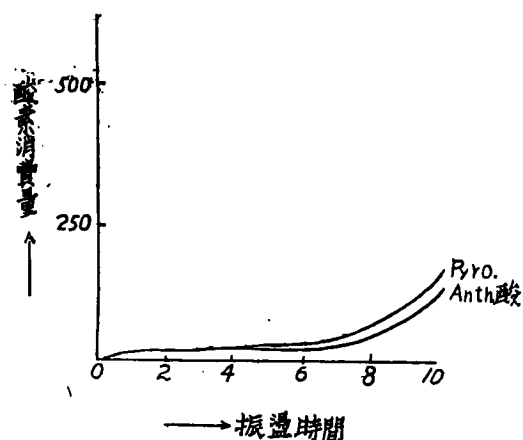
菌 ; Staphylo. 寺島の非耐性菌
基質 ; Anth. 酸及び Pyrocathichine
活性化物質 ; Macramin 耐性 Staphylo. 寺島の P.P.L. 体



しめた場合に於ては Penicillin 耐性菌の時よりも稍々に強い活性化能を示す (第7及び第8図)。

第8図 Macramin 耐性菌に非耐性菌の P. P. L. 体を加えた時の適応現象

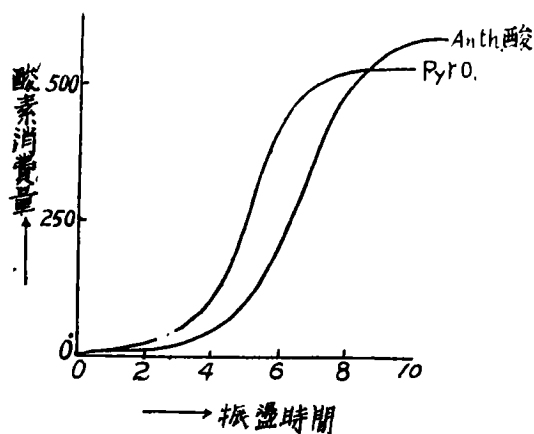
菌 ; Macramin 耐性 Staphylo. 寺島
基質 ; Anth. 酸及び Pyrocatechine
活性化物質 ; 非耐性 Staphylo. 寺島の P. P. L. 体



2) *Salmonella Typhi* 57 S 型に就いて同様の実験結果を述べると非耐性菌の P. P. L. 体を非耐性菌に, Penicillin 耐性菌の P. P. L. 体を耐性菌に作用させた場合は *Staphylococcus aureus* 寺島株の場合と同様に適応酵素の準備期には両者殆ど差なく, 又以後の酸化曲線も耐性菌の場合二相性変化を示している (第9図及び第10図)。その程度は *Staphylococcus aureus* の場合より著るしい。

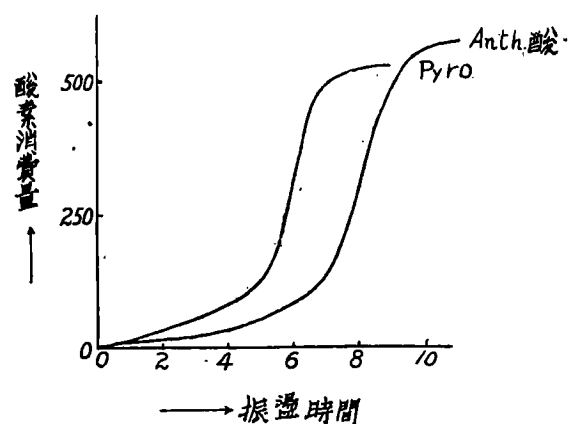
第9図 非耐性菌にその自己 P. P. L. 体を加えた場合の適応現象

菌 ; S. 57, S
基質 ; Anth. 酸及び Pyrocatechine
活性化物質 ; S. 57, S P. P. L. 体



第10図 Penicillin 耐性菌にその自己 P. P. L. 体を加えた場合の適応現象

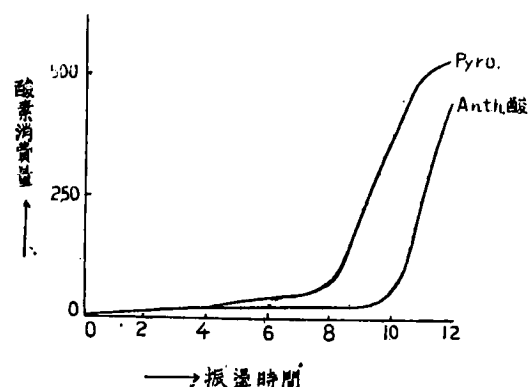
菌 ; Penicillin 耐性 S. 57, S
基質 ; Anth. 酸及び Pyrocatechine
活性化物質 ; Penicillin耐性 S. 57, S の P. P. L. 体



次に L. P. P. 体を相互に働かせた場合, 耐性菌の P. P. L. 体を非耐性菌に働かせると, 9 時間で微弱に活性化し, 爾後12時間で酸化は著しくなるが, 其の曲線は非耐性菌の P. P. L. 体を作用させた場合と同様な傾向を示している (第11図)。反対に非耐性菌の P. P. L. 体を耐性菌に作用させた時には10時間を経るも酸化は起らないで, 12時間にして漸く認められる程度である (12図)。

第11図 非耐性菌に Penicillin 耐性菌の P. P. L. 体を加えた場合の適応現象

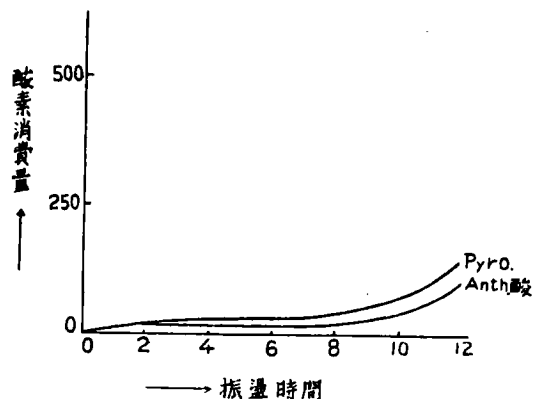
菌 ; S. 57, S
基質 ; Anth. 酸及び Pyrocatechine
活性化物質 ; Penicillin耐性 S. 57, S の P. P. L. 体



2,4-Dimethylthiazol に就いて見ると耐性菌の P. P. L. 体を耐性菌に, 非耐性菌の P. P. L. 体を耐性菌に作用させた場合何れに於ても著明な適応現象は認められなかつた。

第12図 Penicillin 耐性菌に非耐性菌の P.P.L. 体を加えた場合の適応現象

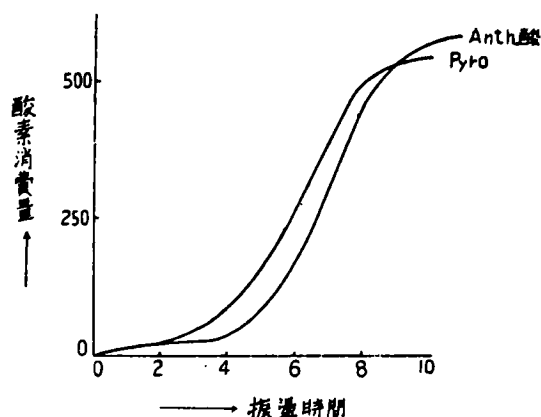
菌 ; Penicillin 耐性 S. 57, S
 質基 ; Anth. 酸及び Pyrocathachine
 活性化物質 ; 非耐性 S. 57, S の P.P.L. 体



次に Macramin に就いて見ると各自の P.P.L. 体を作用せしめた時には、耐性菌では 4.5 時間で著明に（第13図）非耐性菌では 3.4 時間で著明なる適応現象が現れて両者の間には著しい差異はなく、又耐性菌の場合二

第13図 Macramin 耐性菌にその自己 P.P.L. 体を加えた場合の適応現象

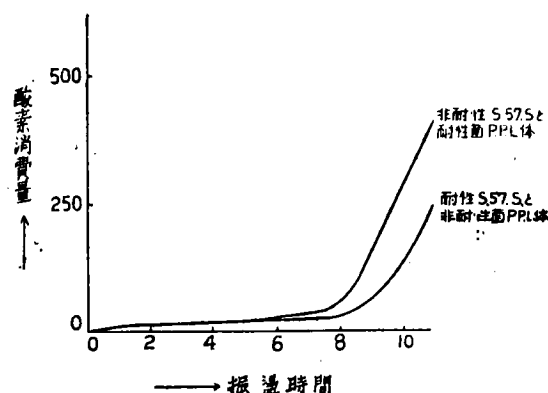
菌 ; Macramin 耐性 S. 57, S
 基質 ; Anth. 酸及び Pyrocathachine.
 活性化物質 ; Macramin 耐性 S. 57, S の P.P.L. 体



相性酸化曲線を示さないのは *Staphylococcus aureus* の場合と同様である。交叉的に作用させた場合でも *Salmonella Typhi* 57 S 型の Penicillin 耐性の場合より著明に現はれて、耐性菌 P.P.L. 体を非耐性菌に作用せしめた時は 8 時間で、反対の場合には 9 時間で適応現象が出現する（第 14 図）。

第14図 Macramin 耐性菌、非耐性菌の P.P.L. 体の相互作用

基質 ; Anth. 酸



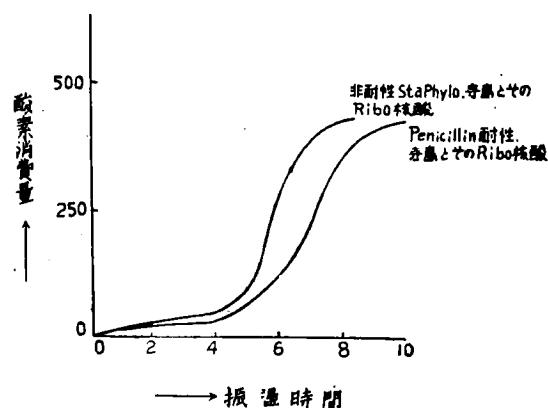
第 4 章 Ribo 核酸の適応酵素活性化能の耐性及び非耐性菌に於ける相違に就いて

Ribo 核酸が強力な適応酵素活性化能を有する事は須田⁹⁾、田口¹⁰⁾によつて報告された所であり、P.P.L. 体の活性化能とは其の機序も異っている事は明かにされている。

1) *Staphylococcus aureus* 寺島株に就いて、自己の Ribo 核酸に力源代謝源として M/10000 の割に Glucose を加えると非耐性菌の場合既に 4 時間半で著明な酸化的適応現象が見られる（15図）。Penicillin 耐性菌の場合には明かにその間の準備期間が長くなり、5 時間で始り、僅かに緩い上昇を示す。P.P.L. 体を活性化物質とした場合の様な二相性変化を示さない（第 15 図）。

第15図 Ribo 核酸の適応酵素活性化能の Penicillin 耐性、非耐性菌に於ける差異

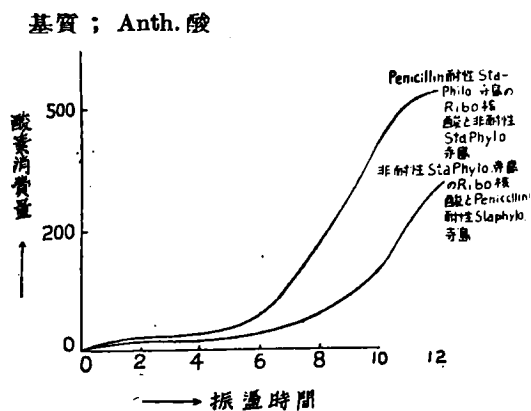
基質 ; Anth. 酸



此の場合；力源代謝を除いて、Ribo 核酸のみを作用せしめると非耐性菌では7時間、耐性菌も同様7時間で適応を示し、両者に殆んど差異がない。

次に Ribo 核酸を交互に作用させた場合、耐性菌の Ribo 核酸で非耐性菌は6時間で、非耐性菌の Ribo 核酸で耐性菌は7時間で適応し、而も緩い上昇を示す（第16図）。

第16図 Ribo 核酸の適応酵素活性化能の Penicillin 耐性、非耐性菌に於ける相互作用



2-4-Dimethylthiazol 耐性菌に就いては、耐性菌の Ribo 核酸で耐性菌及び非耐性菌は10時間後も適応せず、殆ど適応能力又は適応酵素活性化能を示さない。又非耐性菌の Ribo 核酸に耐性菌を遠応せしめた時も同様である。

Macramin 耐性菌に就いては、耐性菌の Ribo 核酸で非耐性菌を適応せしめた場合は、非耐性菌の Ribo 核酸で適応せしめた場合と殆ど差を見出さない。耐性菌の Ribo 核酸で耐性菌を適応せしめる時は耐性菌の P. P. L. 体で適応せしめた時よりも準備期が長く 7.5 時間で始まり、以後は一般に緩い上昇を示す（第17図）。

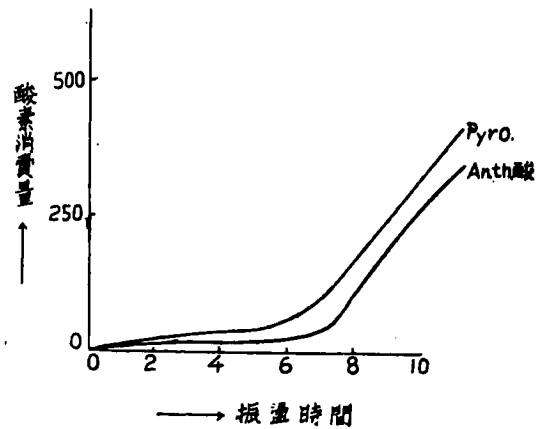
又非耐性菌の Ribo 核酸で耐性菌を適応せしめると、前と同様に7時間附近より適応する。力源代謝の影響も非耐性菌と Macramin 耐性菌とでは殆んど差がない。

2) Salmonella Typhi 57 S 型に就て（第18図）。

次に Salmonella Typhi 57 S 型に就いて述べると一般に Staphylococcus aureus 寺島株の

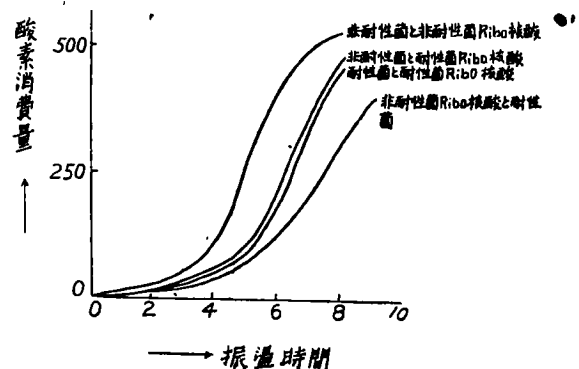
第17図 Macramin 耐性菌にその自己 Ribo 核酸を加えた場合の適応現象

菌；Macramin 耐性 Staphylo. 寺島
基質；Anth. 酸及び Pyrocathchine
活性化物質；Macramin 耐性 Staphylo. 寺島の Ribo 核酸



第18図 Penicillin 耐性菌及び非耐性菌と其等の Ribo 核酸の相互作用 (S. 57, S)

基質；Anth. 酸



場合よりも耐性、非耐性菌の間の変化が少い様であつて、Penicillin 耐性菌の Ribo 核酸と微量 Glucose で耐性菌或は非耐性菌を適応させた場合、その準備期は両者共に4時間で、非耐性菌の場合の3.5時間より少々遅れている。非耐性菌の Ribo 核酸で耐性菌は準備期4時間で而もゆるやかに上昇するが前者よりも少々急である。

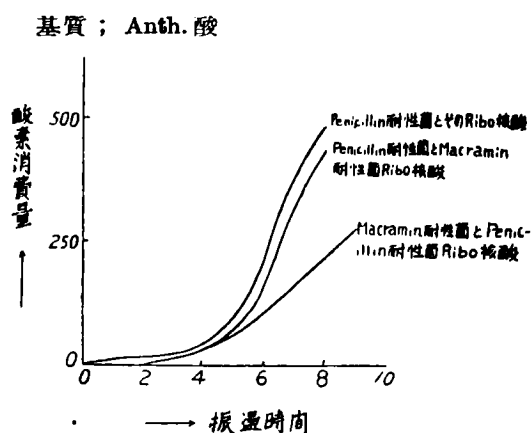
2-4-Dimethylthiazol 耐性菌の Ribo 核酸を耐性菌に或は非耐性菌に作用せしめると10時間後も殆ど適応しない。又耐性菌の Ribo 核酸を非耐性菌に作用させても同様である。Macramin 耐性菌の Ribo 核酸を以て耐性菌或は非耐性菌を適応させると前者では著明に準備期が延び、4時間20分で始まるが、後者

は非耐性菌の Ribo 核酸で適応せしめた時と殆ど差が認められず、又上昇度は両者の間に差が無い。

又 Macramin 耐性菌の Ribo 核酸を非耐性菌に作用させると非耐性の Ribo 核酸を作用させた場合と殆ど差が認められない。以上の三種の抗菌性物質に依る耐性菌の Ribo 核酸適応に対する力源代謝の影響は *Staphylococcus aureus* 寺島株の場合と殆ど同様な結果を示すものである。

次に Macramin 耐性菌の Ribo 核酸を Penicillin 耐性菌に作用せしめると Penicillin 耐性菌の Ribo 核酸を作用させた時の 4 時間に略々一致しているし、Penicillin 耐性菌の Ribo 核酸を Macramin 耐性菌に作用させると Macramin 耐性菌の Ribo 核酸を作用させた時よりも酸化作用の上昇がゆるやかなる曲線を描く (第 19 図)。

● 第19図 Penicillin 耐性, Macramin 耐性菌の Ribo 核酸の相互作用 (S. 57, S)



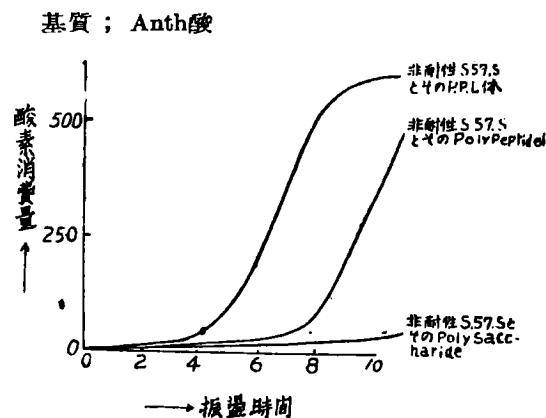
第5章 Polysaccharide - Polypeptide-Lipide 複合体より分離した Polysaccharide 及び Polypeptide I の適応酵素活性化能の耐性及び非耐性菌に於ける相違に就いて

此の実験は *Salmonella Typhi* 57 S 型の Polypeptide-Polysaccharide-Lipide 複合体についてのみ行つた。

非耐性菌の場合、自己の P. P. L. 体は 4 時間、更に Polypeptide I は 8 時間で適応せしめるが、Polysaccharide には殆ど作用がない

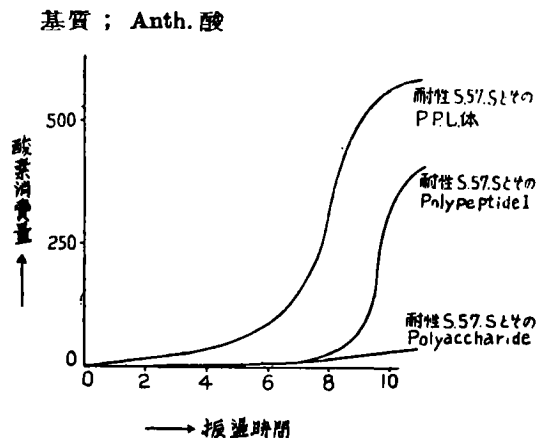
(第 20 図)。

第20図 非耐性 S. 57 S に対するその P. P. L. 体及びその構成成分の適応酵素活性化能



Penicillin 耐性菌では自己の P. P. L. 体で準備期 5 時間、Polypeptide I では 8 時間 45 分であり、Polysaccharide では殆んど適応しない (第 21 図)。

第21図 Penicillin 耐性 S. 57, S に対するその P. P. L. 体及びその構成物質の適応酵素活性化能

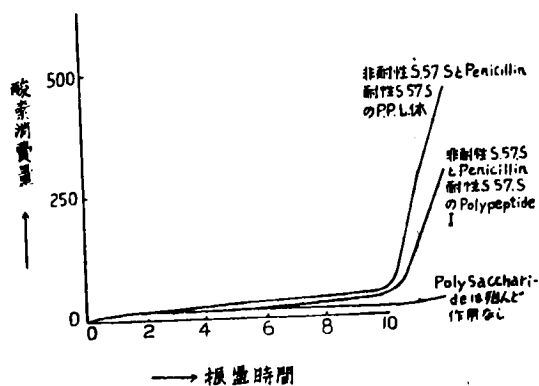


Penicillin 耐性菌の P. P. L. 体を非耐性菌に作用せしめると 10 時間で適応し、Polypeptide I では 12 時間で、非耐性菌の Polypeptide I を作用せしめる時と殆ど差のない適応を示す (22 図)。Polysaccharide では殆んど作用がない。

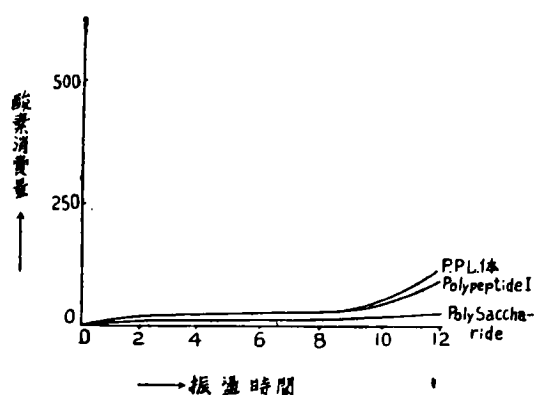
非耐性菌の P. P. L. 体を Penicillin 耐性菌に作用せしめると 12 時間で僅かであり、Polypeptide I でも略々同様である (第 23 図)

次に Macramin 耐性菌 P. P. L. 体を Macra-

第22図 非耐性 S. 57, S. 菌に対する Penicillin 耐性 S. 57, S. 菌の P. P. L. 体及びその構成物質の適応酵素活性化能
基質 ; Anth. 酸



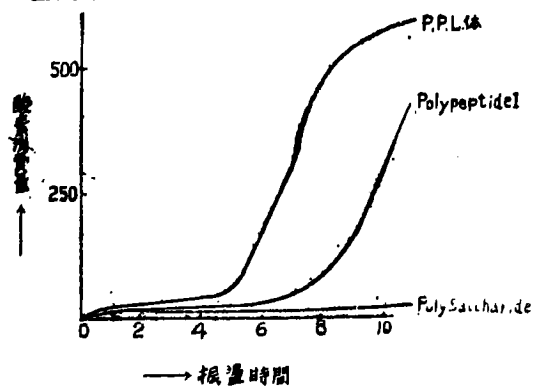
第23図 Penicillin 耐性 S. 57, S. 菌に対する非耐性 S. 57, S. 菌の P. P. L. 体及びその構成物質の適応酵素活性化能
基質 ; Anth. 酸



min 耐性菌に作用せしめると 5 時間で著明に表れるが, Polypeptide I では 8 時間で活性化する. 又 Polysaccharide では適応現象は認められない (24図).

第24図 Macramin 耐性 S. 57, S. 菌に対するその P. P. L. 体及びその構成物質の適応酵素活性化能

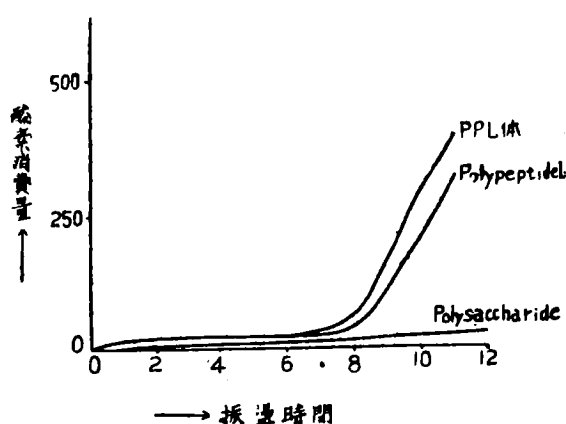
基質 ; Anth. 酸



Macramin 耐性菌の P. P. L. 体を非耐性菌に作用せしめると 8 時間で僅かに適応するが, Polypeptide I では 8 時間 30 分で適応を示す (25 図).

第25図 非耐性 S. 57, S. 菌に対する Macramin 耐性 S. 57, S. 菌の P. P. L. 体及びその構成物質の適応酵素活性化能

基質 ; Anth. 酸

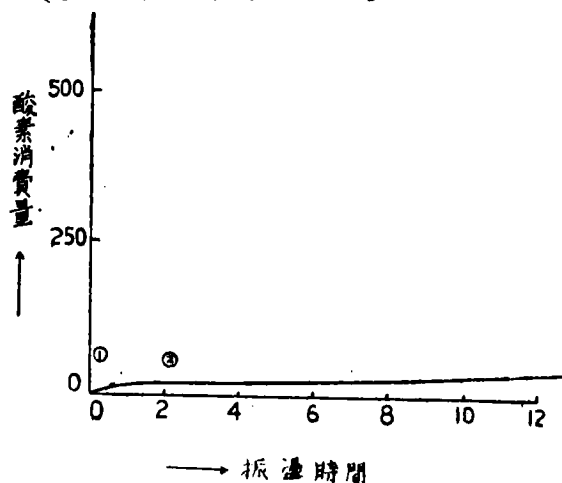


第6章 Polysaccharide-Polypeptide-Lipide-複合体と Ribo 核酸の適応酵素活性化能相互干渉現象より見た耐性及び非耐性菌の相違に就いて

非耐性菌では第26図に示した様に, 例えば P. P. L. 体を適応酵素活性化能が認められな

第26図 非耐性 S. 57, S. 型菌に於ける Ribo 核酸と P. P. L. 体の相互干渉現象

- ① 干渉性反応体 : P. P. L. 体
- ② 被干渉性反応体 : Ribo 核酸



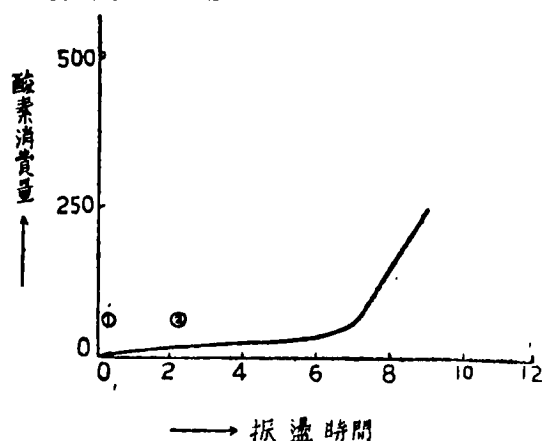
い程度に微量加えて基質と共に振盪し, 2 時間後, Ribo 核酸を適応酵素を活性化せしめる程度の量と M/10000 glucose を以て振盪する

と適応酵素は活性化して来ない。此の場合 P. P. L. 体は干渉性適応酵素反応体であり、Ribo 核酸は被干渉性反応体であつて、更に反応体を反対にした時も同様の干渉現象を認める。この干渉現象には被干渉性反応体を入れる時間が一定時間以内でないと干渉現象を示さないが、以下の実験に於ては簡易化のため2時間に一定した。

非耐性菌を使用して、耐性菌の P. P. L. 体を干渉性反応体として、使用すると Penicillin 耐性菌の時は6時間で、即ち Ribo 核酸を入れて4時間にして適応し余り干渉しない(第27図)。

第27図 非耐性菌 S. 57, S に対するその Ribo 核酸の適応酵素活性化に対する Penicillin 耐性菌の P. P. L. 体の干渉作用

- ① 干渉性反応体 ; Penicillin 耐性 S. 57, S 菌の P. P. L. 体
② 被干渉性反応体 ; 非耐性 S. 57, S 菌の Ribo 核酸
基質 ; Anth. 酸



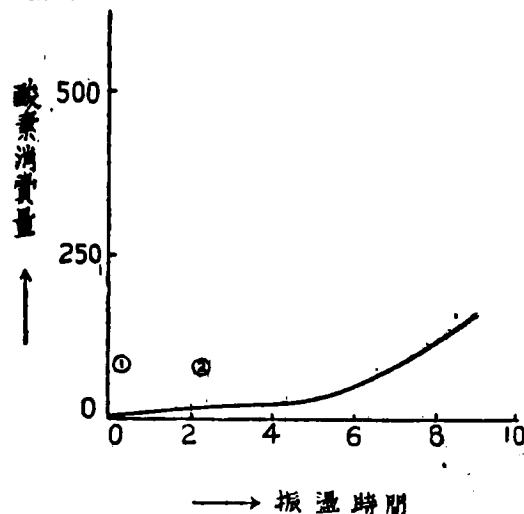
又 Macramin 耐性菌の P. P. L. 体も殆ど干渉せず6時間後即ち Ribo 核酸混入後4時間で適応する(第28図)。

次に耐性菌の Ribo 核酸を干渉性反応体とし、非耐性菌の P. P. L. 体を被干渉反応体として、適応せしめると Penicillin 耐性菌では7時間後に適応し(29図)。Macramin 耐性菌では9時間を経るも適応せず、完全に干渉する(第30図)。

次に耐性菌を使用して同様の実験を行うと非耐性菌の P. P. L. 体を干渉性反応体として、耐性菌の Ribo 核酸を被干渉性反応体として

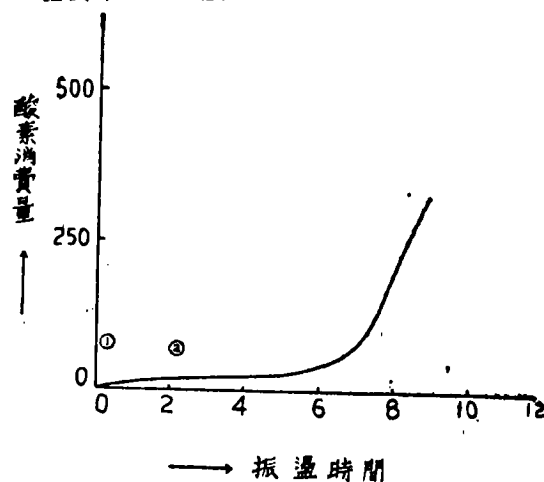
第28図 非耐性 S. 57, S 菌に対する Ribo 核酸の適応酵素活性化に対する Macramin 耐性菌の P. P. L. 体の干渉作用

- ① 干渉性反応体 ; Macramin 耐性 S. 57, S 菌の P. P. L. 体
② 被干渉性反応体 ; 非耐性 S. 57, S 菌の Ribo 核酸
基質 ; Anth. 酸



第29図 非耐性 S. 57, S 菌に対するその P. P. L. 体の適応酵素活性化に対する Penicillin 耐性菌の Ribo 核酸の干渉作用

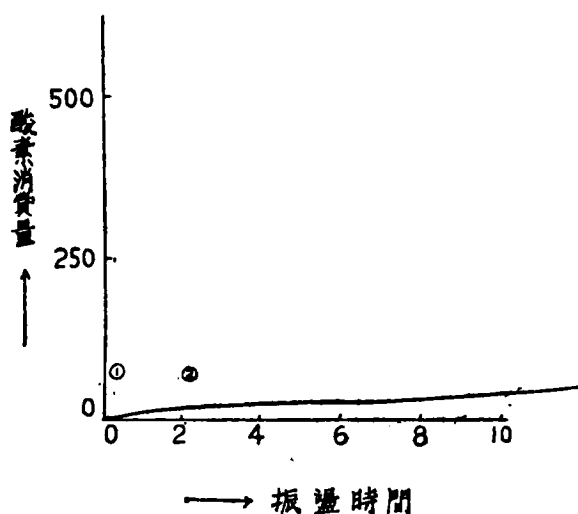
- ① 干渉性反応体 ; Penicillin 耐性 S. 57, S 菌の Ribo 核酸
② 被干渉性反応体 ; 非耐性 S. 57, S 菌の P. P. L. 体
基質 ; Anth. 酸



適応せしめると Penicillin 耐性菌は9時間(31図)。Macramin 耐性菌では6時間で適応し(32図), Penicillin 耐性菌の場合稍々干渉を示すが, Macramin 耐性菌の場合は殆ど干渉しない。更に非耐性菌の Ribo 核酸を干渉性反応体とし、耐性菌の P. P. L. 体を被干渉性

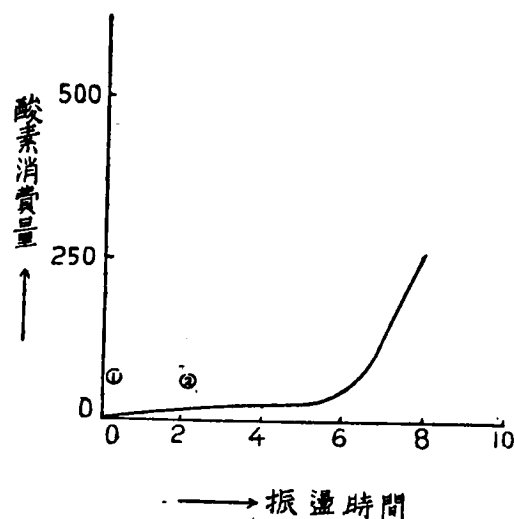
第30図 非耐性 S. 57, S 菌に対するその P.P.L. 体の適応酵素活性化に対する Macramin 耐性菌の Ribo 核酸の干渉作用

- ① 干渉性反応体 ; Macramin 耐性 S. 57, 菌の Ribo 核酸
 ② 被干渉性反応体 ; 非耐性 S. 57, S 菌の P. P. L. 体
 基質 ; Anth. 酸



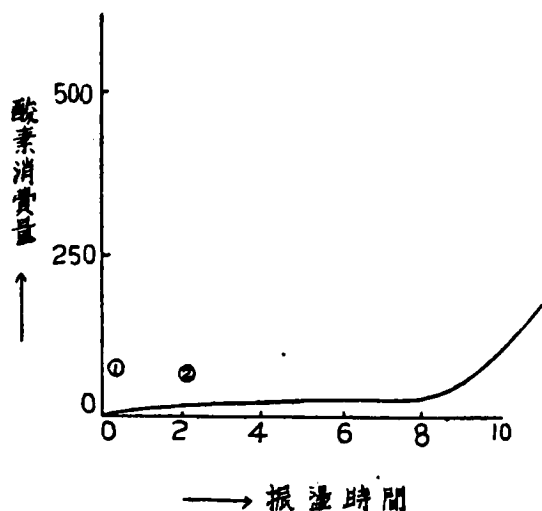
第32図 Macramin 耐性 S. 57, S 菌に対するその Ribo 核酸の適応酵素活性化に対する非耐性菌の P.P.L. 体の干渉作用

- ① 干渉性反応体 ; 非耐性 S. 57, S 菌の P. P. L. 体
 ② 被干渉性反応体 ; 非耐性 Macramin 耐性 S. 57, S 菌の Ribo 核酸
 基質 ; Anth. 酸



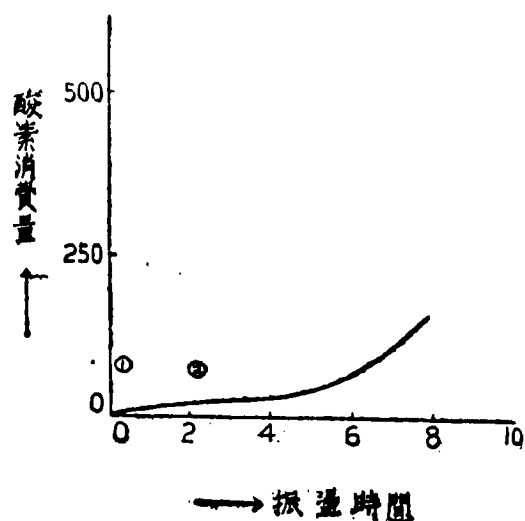
第31図 Penicillin 耐性 S. 57, S 菌に対するその Ribo 核酸の適応酵素活性化に対する非耐性菌の P. P. L. 体の干渉作用

- ① 干渉性反応体 ; 非耐性 S. 57, S 菌の P. P. L. 体
 ② 被干渉性反応体 ; Penicillin 耐性 S. 57, S 菌の Ribo 核酸
 基質 ; Anth. 酸



第33図 Penicillin 耐性 S. 57, S 菌に対するその P. P. L. 体の適応酵素活性化に対する非耐性 S. 57, S 菌の Ribo 核酸の干渉作用

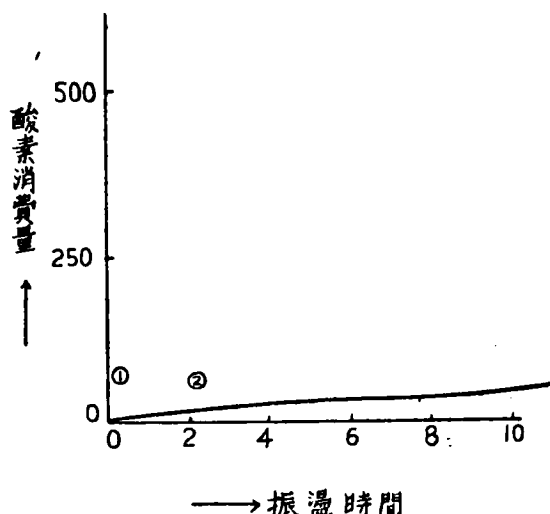
- ① 干渉性反応体 ; Penicillin 耐性 S. 57, S 菌の Ribo 核酸
 ② 被干渉性反応体 ; Penicillin 耐性 S. 57, S 菌の P. P. L. 体
 基質 ; Anth. 酸



反応体として実験すると Penicillin 耐性菌では7時間で殆ど干渉せず (33図). Macramin 耐性菌では完全に干渉して適応現象を示さない (第34図).

第34図 Macramin 耐性 S. 57, S 菌に対する
その P.P.L. 体の適応酵素活性化に
対する非耐性 S. 57, S 菌の Ribo 核
酸の干渉作用

- ① 干渉性反応体；非耐性 S. 57, S 菌の Ribo 核酸
② 被干渉性反応体；Macramin 耐性 S. 57, S 菌の P. P. L. 体
基質；Anth. 酸



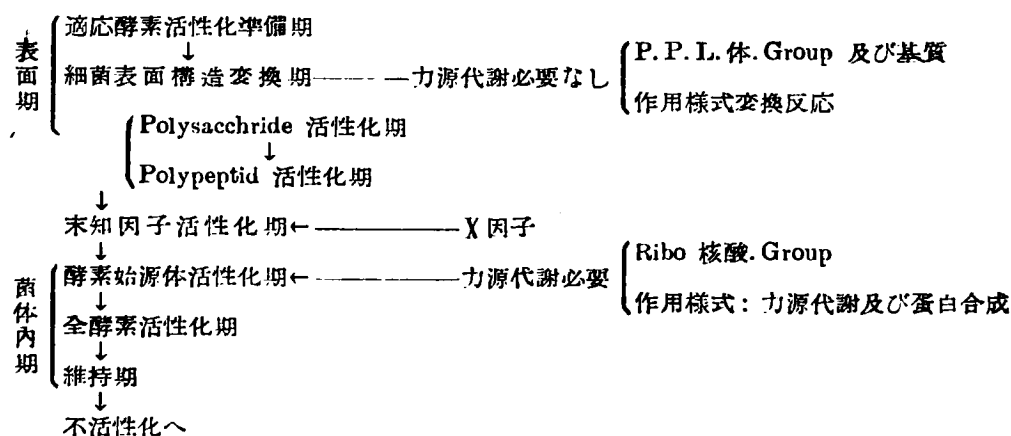
第7章 総括及び考察

序言に述べた様に本実験の目標とした所の
四点を順序に従つて論議すると次の様である。
先づ適応酵素産生過程は現在次の様に考える
のが適当とされている。即ち教室の田口⁹⁾に
よれば、次の如く分析される。

又前報によれば、Penicillin 耐性菌では
Cytochrome C oxydase 活性度、解糖作用及び
高 energy 燐化能は共に亢進し、特に解糖作
用は著しく、又燐化合物としての Pool され
た energy は大きい。2-4-Dimethylthiazol 耐
性菌では Cytochrome C oxydase 活性度及び高
energy 燐化能は共に其の機能を低下し、これ
に対して解糖作用は著明に亢進している。更
に Macramin 耐性菌では前二者に於ける様な
著しい変化は見出せない。

扱て、先づ力源代謝を中心に適応酵素に於
ける耐性菌及び非耐性菌の相違を考察するに
Ribo 核酸の作用様式は力源代謝と蛋白合成

適応酵素活性化方向定期



共軛反応であり、此の反応を介して酵素始源
体を活性化せしめるにあるから、力源代謝を
考察するに最も都合のよいのは Ribo 核酸の
作用に対する力源代謝の影響を検討するにあ
る。

即ち上述の様に *Staphylococcus aureus* 寺島
株或は *Salmonella typhi* 57 S 型菌の何れに於
いても Penicillin 耐性菌の Ribo 核酸による
適応酵素活性化能に対して力源代謝が非耐性
菌の場合ほど著明には作用しない。この事は

適応酵素始源体が活性化する。即ち蛋白合成
が行われるためには一定の力源は必要である
に違いなく、この力源が何れより由来するか
は前報によつて明かにせられた如く不断の解
糖作用により、即ち高 energy 燐化合物を介
して行われる energy pool の傾向があるから
に外ならないと考えられる。此の事は後で述
べる様に Penicillin 耐性菌の代謝経路を知る
に重要な点であると云はねばならない。

次に Macramin 耐性菌ではこの様な力源代

謝の影響が殆んど非耐性菌の場合と変わらない。これに就いても後述する様に Ribo 核酸による共軛反応そのものに重要な変化がない事を示すものである。2-4-Dimethylthiazol 耐性菌では適応酵素そのものゝ産生能が殆んど欠如しているので、明瞭な考察は困難であるが、先報の様に解糖作用そのものは増強しているにもかゝらず、Pooled energy が少いことゝ、適応酵素産生能の欠如とは此の間の事情を暗示するものと考えられる。

次に蛋白合成反応を案ずるに Penicillin 耐性菌で特に著明な P. P. L. 体を適応酵素活性化物質として使用した時に見られる二相性変化の示すように蛋白合成は恐らく著明な変化はないと考えるのが妥当と思はれる。何故ならばこの二相性変化の後段に示す酸化曲線の急昇は蛋白合成の順調なことを示すに外ならないからである。従つて前報に於いて Penicillin の作用が特定の酸素にあるかの問題は解決されるのであつて、少くとも此の酵素に関する限り特定の酵素に作用するものではないと思はれる。

以上で力源代謝及び蛋白合成反応の問題を終つて、この共軛反応の直接の担体である P. P. L. 体、Ribo 核酸そのものゝ変化を考察する。自己の P. P. L. 複合体を非耐性菌及び耐性菌に作用せしめた場合、各々特有の変化を示すが、此は単に適応能力の差異を示すに過ぎず、此の点より見ると明かに 2-4-Dimethylthiazol 耐性菌は劣り、Penicillin 及び Macramin 耐性菌は之に次ぐものであると云える。

更に相互に作用せしめた場合、何れの耐性菌でも明かに P. P. L. 複合体の構造変化、従つて菌体表面構造の変化を来す事を示している。何となれば若し変化がないとすれば、耐性菌のそれを非耐性菌に作用せしめた場合に、非耐性菌のそれを作用せしめた場合と殆ど同様の適応現象を示さねばならないからである。

この変化の程度は 2-4-Dimethylthiazol の耐性菌の順序である。次に P. P. L. 複合体の何れの構造に変化があるかを知る目的で行はれた本複合体より分離された Polysaccharide-

Polypeptide 複合体及び Polypeptide I に依る実験結果より次の様な考察を得ることが出来る。即ち田口¹⁹⁾が明かにした様に、非耐性菌では Polysaccharide-Polypeptide 複合体は原複合体よりも更に強い活性化能を、Polypeptide I は微弱な活性化能を有し、Polysaccharide は活性化能を缺如している。耐性菌の場合は相互作用実験によつて Penicillin, Macramin 耐性菌何れに於いても Polysaccharide-Polypeptide 複合体の変化は著明であるが、Polypeptide I の変化はない。

此の事実は Polypeptide 部の構造は耐性菌でも殆んど変化なく、Polysaccharide 部或は之と前者との結合部に变化のある事を示すものであろう。Polysaccharide 部変化がある事は他の実験によつても明かにさせられている(金久¹⁷⁾)。

適応酵素の菌体内活性化期に於ける反応体とも云うべき Ribo 核酸ではその変化が最も著しいのは Penicillin 耐性菌であり、Macramin 耐性菌では殆ど無変化である。即ち Penicillin 耐性菌の Ribo 核酸を非耐性菌及び耐性菌の相互に作用せしめた時、明かに適応が遅れるが、Macramin 耐性菌の Ribo 核酸では殆ど差異を認めない。此の様に Penicillin 耐性菌では Ribo 核酸が変化するが、その変化が Ribo 核酸の如何なる構造変化であり、其の意義が如何なるものであるかは今後の研究に俟たねばならない。

以上の適応酵素反応体の示す耐性菌に於ける変化を更に明瞭に示すのは P. P. L. 複合体及び Ribo 核酸の両反応体の示す相互干渉作用である。此の干渉現象が起るのは非耐性菌の場合は各自己菌株のものゝ間で、而もその菌株についてである(田口¹⁹⁾)。

耐性菌の場合、若しその P. P. L. 複合体或は Ribo 核酸が無変化であれば原株である非耐性菌の Ribo 核酸及び P. P. L. 複合体の間に干渉しなければならない。然るに Penicillin 耐性菌では何れを干渉性或は被干渉性反応体としても殆ど原株の反応体との間に干渉しないのは明かに P. P. L. 複合体及び Ribo 核酸

に変化がある事を示している。又 Macramin 耐性菌では Ribo 核酸のみ干渉し Ribo 核酸は殆ど無変化である事を示し、上述の結果と全く一致していると言える。

以上述べた所と前報に於いて述べた所とを総括してみると Penicillin 耐性菌では生菌の energy 論的に最も重要な三つの cycles 即ち electron transportation cycle, energy metabolism 及び high energy phosphorylation cycle 及び此等の Cycles を総括する反応系であると云われている Ribo 核酸に重大な変化があり、これ等の変化は energy 論的には全く性格の異つた菌即ち耐性菌を生ずる形式を暗示するものと云える。

又一方菌体表面構造論的にみると耐性過程では一般に先づ菌体表面構造特に Polysaccharide の部の構造に変化が起ることは明らかであり、或種の抗菌性物質 Macramin では表面構造のみの変化で既に耐性を獲得し得る事があると考えられる。

第8章 結 論

1) Penicillin 耐性菌に於ては Ribo 核酸による適応酵素活性化能に対して力源代謝が非耐性菌程著明に作用しない。

2) Macramin 耐性菌ではこの関係が殆んど非耐性菌と変らない。

3) 2-4-Dimethylthiazol 耐性菌には殆ど適応酵素産生作用がない。従つて力源代謝は明瞭でない。

4) Penicillin 耐性菌でその P. P. L. 体を適応酵素活性化物質として使用すると著明な二相性反応を示すが、このことは蛋白合成に変化のないことを示すものである。

5) 適応酵素産生能力より見ると Penicillin \geq Macramin $>$ 2-4-Dimethylthiazol 耐性菌の順になる。

6) P. P. L. 体は非耐性菌に較べて何れの耐性菌でも変化して居り、その変化の強さは 2-4-Dimethylthiazol $>$ Macramin $>$ Penicillin 耐性菌の順であり、その構成物の内で主として変化するのは Polysaccharide であり、Polypeptide は不変である。

7) 耐性菌では Ribo 核酸も変化しその強さは 2-4-Dimethylthiazol 耐性菌が最も大きく、Penicillin 耐性菌がこれに次ぎ、Macramin 耐性菌は殆ど変化しない。

8) 以上の事は更に干渉現象を利用して確かめることが出来た。即ち Penicillin 耐性菌では Ribo 核酸、P. P. L. 体を干渉性或は被干渉性反応体として使用しても非耐性菌との間に干渉を示さないのは P. P. L. 体、Ribo 核酸何れとも変化していることを示し、Macramin 耐性菌では Ribo 核酸のみ干渉し P. P. L. 体は干渉しないから、Ribo 核酸は不変であるが、P. P. L. 体は変化していることを示すものである。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた村上教授並びに田口博士に深甚の謝意を表明するものである。

文

- 1) 須田正己, 早石修, 尾田義治 ; 酵素化学シンポジウム, 第一集, 73 (1949)
- 2) Lewis ; J. Bact., 28, 619 (1934)
- 3) Stephenson, Yudkin ; Biochem. J., 30, 506 (1936)
- 4) Stephenson, Yudkin, Cole ; Biochem. J., 31, 1311 (1937)
- 5) Spiegelmann ; J. Gener. Physiol., 31, 27 (1947)
- 6) 須田正己 ; 自然, Vol. 5, No. 6, 32 (1950)
- 7) 須田正己 ; 自然, Vol. 5, No. 7, 18 (1950)
- 8) 田口一美 ; 第三回日本細菌学会中, 四国支部

献

- 総会 (1949)
- 9) 須田正己 ; 酵素化学シンポジウム, 第3集, 52 (1950)
- 10) 尾田義治, 竹田義郎 ; 生化学, 22, 256 (1950)
- 11) 田口一美 ; 第462回岡山医学会例会 (1949)
- 12) 金久禎記 ; Acta. Medicinæ Okayama, Vol. 8, 99 (1952)
- 13) 寺山広 ; 化学の研究 (生化学) I, 75 (1948)
- 14) 田口一美 ; 第61回岡山医学会総会 (1949)
- 15) Kunitz ; J. Gener. Physiol., 2415 (1940)
- 16) Versen ; Biochem. Z., 104, 22 (1920)
- 17) 金久禎記 ; 岡山医学会雑誌, 63年, 236 (1951)