



Title	結核菌の物質代謝に関する研究：(第3報) Mycobacteriaのアミノ酸代謝について
Author(s)	佐藤, 孝治; SATO, Koji; 澄川, 栄一郎 他
Citation	結核の研究, 11, 35-43
Issue Date	1959-10
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26676">https://hdl.handle.net/2115/26676</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	11_P35-43.pdf



# 結核菌の物質代謝に関する研究

## (第3報) *Mycobacteria* のアミノ酸代謝について

佐藤孝治・澄川栄一郎

(北海道大学結核研究所細菌部 主任 大原 達教授)

(厚生省北海道医務出張所 所長 有末四郎博士)

(昭和 34 年 6 月 15 日受付)

### 緒 言

*Mycobacteria* が炭素源も窒素源もともに比較的簡単な化合物を利用して代謝を営むことは、早くより認められているが、炭素源の代謝過程はかなり明らかにされているにもかかわらず、窒素源の代謝に関しては未知の分野が非常に多い。*Mycobacteria* のアミノ酸の代謝、殊にアミノ酸の呼吸に与える影響を調べた報告は余り多く見当らず、僅に Nakamura<sup>1)</sup>, Cutinelli<sup>2)</sup>, Franke<sup>3)</sup>, 山村<sup>4)</sup> その他若干の報告に接し得るのみであり、又その結果を見ても必ずしも一定した成績は得られていない。

一方、アミノ酸の *Mycobacteria* の発育に及ぼす影響についての研究は呼吸のそれよりも比較的多いが<sup>6)~13)</sup>, その成績についても可成りまちまちの結果が示されている。

このように一致した結果が得られていないのは実験に使用した菌型、菌株、培養条件、及び実験方法の差異等複雑な条件に左右される為であろう。

アミノ酸のうち cysteine はその化学構造上 SH 基を持つ特殊なものなので、当然その代謝に於いて特異なものを用意されるが *Mycobacteria* についての報告は殆んど見当らず、ただ Youmans<sup>10)</sup> が cysteine は H<sub>37</sub>Ra H<sub>37</sub>Rv の成長に対し低い濃度に於いてすでに抑制的であると述べているのみである。

著者は先人の行つた *Mycobacteria* のアミノ酸代謝についての研究を更に推し進めるべく、各種アミノ酸の *Mycobacteria* の呼吸に及ぼす影響を調べ、ついで *l*-cysteine の呼吸、並びに成長に及ぼす影響を主として鳥型竹尾株についてしらべた。

### 実験材料及び実験方法

1) 使用菌株：鳥型菌竹尾株、非病原性抗酸性菌 *M. phlei*, 人型結核菌無毒株 H<sub>37</sub>Ra, 同強毒株 H<sub>37</sub>Rv 及び

BCG の 5 株を使用した。何れも当研究所保存の菌株である。

2) 培地、及び培養法：Sauton 味の素変法培地(味の素 0.8%)を 100 ml 入りの三角コルペンに 40 ml 宛分注し、コッホ滅菌釜に入れて 100°C, 30 分間宛 3 日間、間歇滅菌をなし、37°C にて培養した。培養日数は鳥型竹尾株、及び *M. phlei* は 3 日間、BCG は 8~10 日間、H<sub>37</sub>Ra 株及び H<sub>37</sub>Rv 株は 10~12 日間とした。但し実験 4 に於ては 1.5 日及び 7 日培養の鳥型菌竹尾株を使用した。

3) 菌液調製法：上記培地に発育した菌膜を充分洗い、培地成分を取除いた後、型の如く水晶玉コルペンによる振盪法で磨砕し、蒸溜水を加えて必要な濃度の菌浮游液とした。なお懸濁液中の生菌数を定量培養によつて測定し、これにより実験値を補正した。

4) 酸素消費測定に於ける基質：実験 1 に於いては下記のアミノ酸を基質として使用した。

a) Monoamino-monocarbon 酸：*glycine*, *dl*-*alanine*, *dl*-*serine*, *l*-*cysteine* 塩酸塩、及び *l*-*valine*。

b) Monoamino-dicarbon 酸：*l*-*glutamic acid*, *d*-*glutamic acid*, 及び *l*-*aspartic acid*。

c) Diamino-monocarbon 酸：*l*-*lysine*。

d) Cyclic amino-acid：*dl*- $\beta$ -*phenylalanine*, *l*-*tryptophane*, 及び *l*-*histidine*。

なお実験 2, 4 に於ては *l*-*cysteine* のみを基質として酸素消費を測定した。

*l*-*cysteine* を除き、各基質は NaOH にて中和し pH 7.0 とした。*l*-*cysteine* は塩酸塩として使用する方が化学的に安定である為中和しなかつたが、基質に菌液及び緩衝液を加えた時の pH は 7.0 であつた。又基質として使用する *cysteine* は、実験の都度新しく調製した。

5) 酸素消費量の測定：Warburg 旧法によつた。実験 1, 及び 2 においては主室に 1 ml の菌液と、同じく 1

ml の 1/15 M Soerensen 磷酸緩衝液 (実験 1 においては pH 7.0, 実験 2 においては pH 6.0, 7.0, 8.0 を使用), 副室に 0.3 ml の 10% NaOH, 側室に 0.2 ml の基質を入れた。なお主室に加えた菌液の濃度は, 鳥型菌及び *M. phlei* は 20 mg/ml, 他の 3 菌株は 50 mg/ml (何れも wet weight) とし, 側室に入れた基質の濃度は *l*-cysteine, *l*-aspartic acid, *l*-tryptophane 及び *l*-histidine の 3 者は終末濃度が 0.0025 M, 他のアミノ酸は 0.01 M となるようにした。実験 4 においては, 主室に 100 mg/ml の菌液 0.2 ml, 及びソートン味の素変法培地 (味の素 0.8%) 或はその 2 日又は 7 日鳥型菌培養濾液を夫々 1.8 ml 宛入れた。

酸素消費量測定の際は何れも各基質は 20 分間平衡の後これを主室に加え, 酸素消費量はその 90 分間値を記録した。

6) 脱水素酵素活性の測定: 反応測定には Thunberg 管を用い, その主室には 0.5 ml の菌液 (*M. phlei* は 25 mg/ml, 鳥型竹尾は 50 mg/ml, 他の 3 菌株は 100 mg/ml) と 0.5 ml の 1/10 M 磷酸緩衝液, 副室には 0.2 ml の 1/500 M 2-6-dichlor phenol-indophenol 溶液を入れ, 更に基質として 0.0005 M *l*-cysteine 0.5 ml と, 阻害剤として 1/50 M KCN 0.3 ml とを加え, 蒸溜水で全量を 2.0 ml とした。

測定は 37°C の恒温槽に 15 分間平衡にした後, 色素液が脱色するに要する時間 (分) を測り, それを還元時間とした。

7) *l*-cysteine の鳥型竹尾株の発育に及ぼす影響の測定: Souton 培地より味の素を除いたものを基礎培地とし, これにそれぞれ *l*-cysteine, 味の素, *l*-cysteine + 味の素を加えた群を作つた。*l*-cysteine の濃度は 0.0025 M, 0.00025 M, 0.000025 M, 及び 0.0000025 M, の 4 種とし, 味の素は 0.4% の割に加えた。何れも 100 cc 三角コルペンに 40 cc, 試験管に 5 cc 宛分注し, 滅菌はザイツ濾過管で行つた。

菌液の接種は, 三角コルペンの培地 (各濃度の *l*-cysteine ごとに 3 本宛用意) には per ml 10 mg の菌液を 0.1 ml, 試験管には各濃度の試験管 3 本を一組とし, これに per ml 1mg, 10<sup>-1</sup>mg, 10<sup>-2</sup>mg, 10<sup>-3</sup>mg, 10<sup>-4</sup>mg, 10<sup>-5</sup>mg の濃度の稀釈菌液を夫々 0.1 ml 宛接種し, 37°C で培養した。三角コルペンに発育せる菌膜は培養 7 日間でその菌の乾燥重量を測定し, 試験管に接種せるものは Youmans<sup>10)</sup>, 新明<sup>11)</sup>等の行つた small inoculum technique により generation time を測定した。実験 1, 2, 4 の成績はすべて 3 回繰り返した実験結果の平均である。

## 実験成績

実験 1. 各種アミノ酸の *Mycobacteria* の呼吸に及ぼす影響

*M. phlei*, 鳥型竹尾株, BCG, H<sub>37</sub>Ra 及び H<sub>37</sub>Rv 株の呼吸に及ぼすアミノ酸の影響を Warburg 検圧計によつて調べた結果は表 1 に示した通りである (酸素消費量

表 1 *Mycobacteria* の呼吸に及ぼすアミノ酸の影響

基 質	<i>M. phlei</i>		鳥型菌竹尾株		BCG		H <sub>37</sub> Ra 株		H <sub>37</sub> Rv 株	
	酸素消費 ( $\mu$ l/1.5hr)	内呼吸に 対する増 加率 (%)	酸素消費	内呼吸に 対する増 加率 (%)	酸素消費	内呼吸に 対する増 加率 (%)	酸素消費	内呼吸に 対する増 加率 (%)	酸素消費	内呼吸に 対する増 加率 (%)
glycine	399.5	27.6	407.7	88.1	69.2	15.2	33.7	10.8	47.4	10.3
<i>dl</i> - $\alpha$ -alanine	373.8	61.5	274.3	62.5	62.8	4.4	32.2	5.9	38.0	-11.7
<i>dl</i> -serine	232.3	0.5	230.8	6.4	60.5	0.7	32.0	5.2	47.0	9.3
* <i>l</i> -cysteine	502.5	117.1	455.8	110.2	125.6	108.7	53.3	74.7	66.9	55.9
<i>dl</i> -valine	224.8	-2.9	273.5	26.1	66.3	10.3	30.2	0	47.1	9.6
<i>l</i> -glutamic acid	411.3	77.7	337.6	55.7	68.3	13.6	48.0	57.4	56.3	30.3
* <i>l</i> -aspartic acid	390.3	68.6	259.5	20.1	66.4	10.5	28.1	-7.5	42.8	0
<i>l</i> -lysine	284.8	23.0	262.8	21.5	59.8	-0.5	31.3	2.9	46.4	7.0
<i>dl</i> - $\beta$ -phenylalanine	242.5	4.8	207.3	-4.4	61.1	1.7	30.8	1.3	43.3	0
* <i>l</i> -tryptophan	259.8	12.2	227.5	4.9	61.4	2.1	29.6	-2.6	43.0	0
* <i>l</i> -histidine	290.5	25.0	255.7	17.9	63.4	5.5	34.5	13.4	46.8	8.9
内 呼 吸	231.5		216.8		60.1		30.4		43.0	

\* 印は 0.0025 M, その他は 0.01 M で測定す。菌量はすべて 50 mg (wet weight). 生菌数は鳥型菌竹尾株, *M. phlei* は 10<sup>-6</sup>mg 46.3 その他の 3 菌株は 10<sup>-5</sup>mg 92 である。

は何れも ml/1.5 hr./50 mg, bacterial wet weight であらわしてある)。何れの菌株についても、*l*-cysteine, *l*-glutamic acid は比較的高い呼吸促進を示して居り、殊に *l*-cysteine において著明であつた。Glycine, *dl*-*d*-alanine, *l*-aspartic acid, *l*-lysine は *M. phlei* 及び鳥型竹尾株により、又 *dl*-valine, *l*-histidine は *M. phlei* によりかなりよく酸化されているが、他の菌株では殆ど或いは僅かしか酸化されず、*dl*-serine, *dl*- $\beta$ -phenylalanine, 及び tryptophane は何れの菌株にも殆んど影響を及ぼさなかつた。この実験において、基質として使用したアミノ酸全体を通じて、酸素消費量は *M. phlei* が最も高く、鳥型竹尾株, BCG, H<sub>37</sub>Ra, H<sub>37</sub>Rv の順に低くなつて居るが、傾向としては5菌株共よく似て居り、著しい差異は認められない。またアミノ酸の4つの群の間にも特別な差異は認められなかつた。

**実験 2. *l*-cysteine の酸化及び脱水素反応。**

5株の *Mycobacteria* の pH 6.0, pH 7.0, 及び pH 8.0 に於ける *l*-cysteine 酸化, 及び KCN 阻害を图示すれば図 1~5 の如くなる。

図の如く5株の *Mycobacteria* の内呼吸は pH 7.0 において必ずしも最高値を示さないが、*l*-cysteine 利用の至適 pH は、共通的に 7.0 附近にあるようである。又

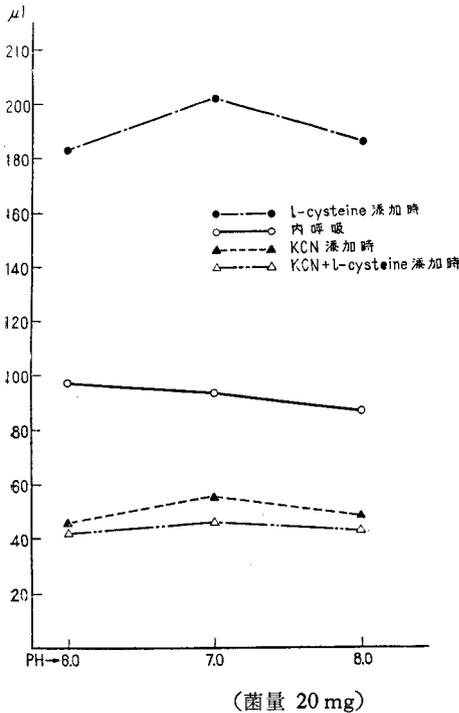


図 1 *M. phlei* の各 pH に於ける酸素消費量

KCN 添加によつて *l*-cysteine の酸化は殆んど完全に阻害された。

次に各菌株の *l*-cysteine を基質とした場合の脱水素酵素の活性度及びその KCN による阻害を測定した。そ

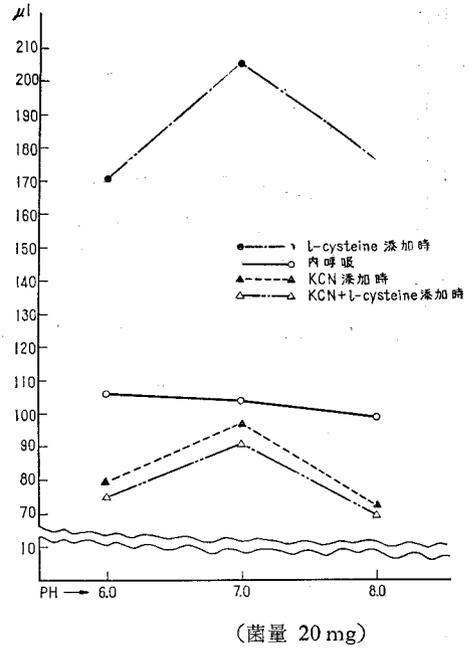


図 2 鳥型菌竹尾株の各 pH に於ける酸素消費量

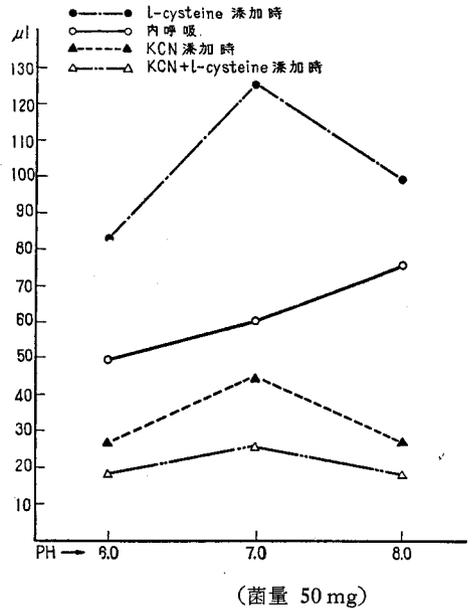
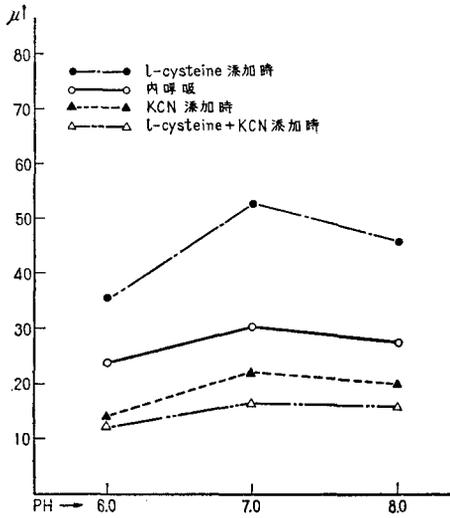
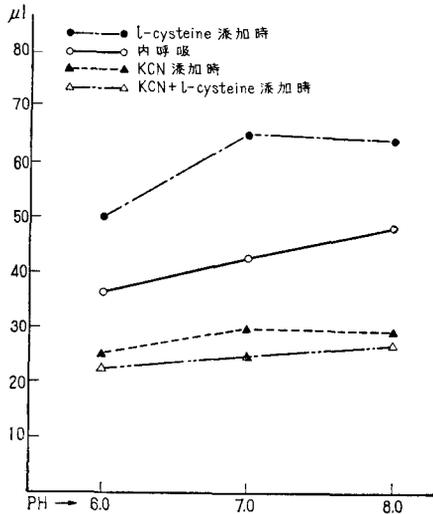


図 3 BCG の各 pH に於ける酸素消費量



(菌量 50 mg)

図 4 H<sub>37</sub>Ra 株の各 pH に於ける酸素消費量



(菌量 50 mg)

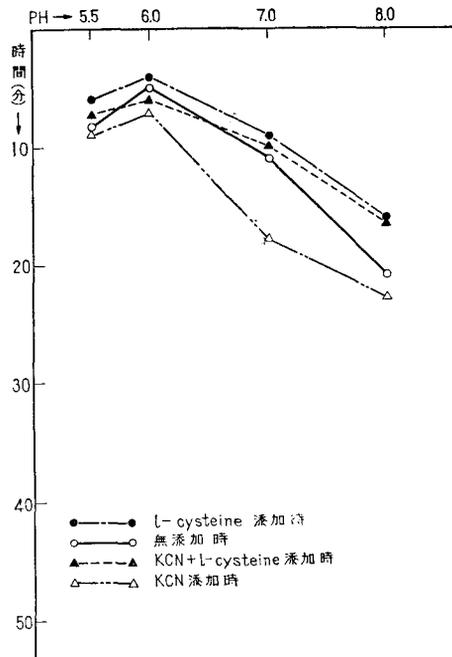
図 5 H<sub>37</sub>Rv 株の各 pH に於ける酸素消費量

の結果は図 6~10 の如くである。

図 6~10 からわかる如く 5 菌株共脱水素酵素の至適 pH は 6.0 附近にあり、それより 5.5, 7.8 と遠ざかるにつれ、脱色時間が長くなる。

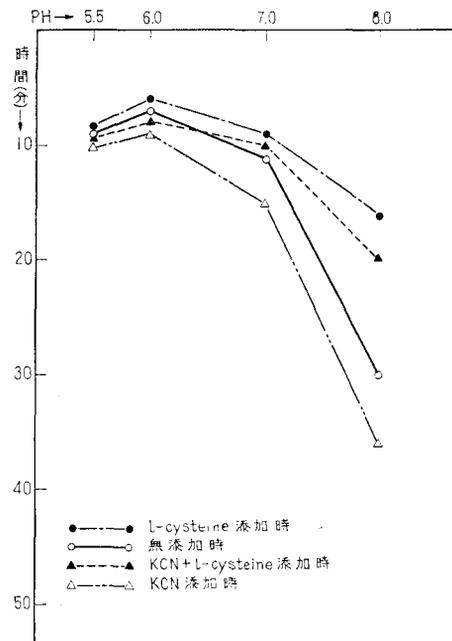
而して L-cysteine の促進効果は M. phlei, 鳥型竹尾株よりも BCG, H<sub>37</sub>Ra 株, H<sub>37</sub>Rv 株において著しく、しかも酸化の場合と異なつて KCN によつてあまり阻害されないようである。

たとえば H<sub>37</sub>Rv 株の pH 6.0 における脱色時間は無



(菌量 12.5 mg)

図 6 M. phlei の各 pH に於ける脱水素酵素活性



(菌量 25 mg)

図 7 鳥型竹尾株の各 pH に於ける脱水素酵素活性

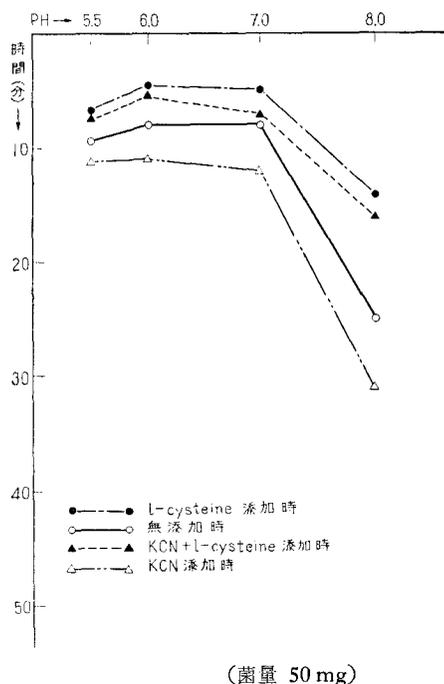


図 8 BCG の各 pH に於ける脱水素酵素活性

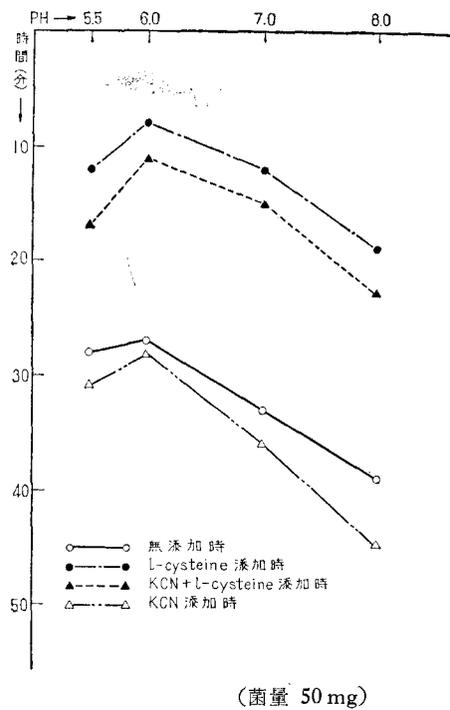


図 10 H<sub>37</sub>Rv 株の各 pH に於ける脱水素酵素活性

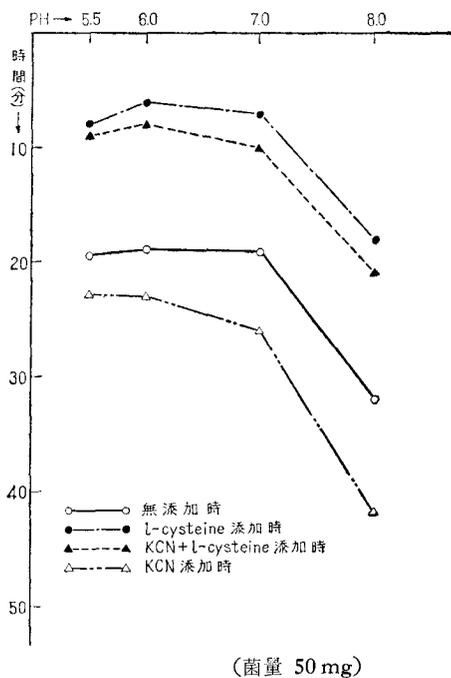


図 9 H<sub>37</sub>Ra 株の各 pH に於ける脱水素酵素活性

添加時には 27 分であるが、*l*-cysteine を添加するときには 8 分と著しく短縮する。併し KCN による阻害は *l*-cysteine に KCN を加えても 3 分間延長するだけである。これらの傾向は何れの pH についても同様に認められた。

実験 3. 鳥型竹尾株の発育に及ぼす *l*-cysteine の影響

Sauton 味の素変法培地 (味の素 0.4%) と、それより味の素を除いた培地における *l*-cysteine のいろいろな濃度についての鳥型竹尾株の発育効果を generation time 及び菌の乾燥重量によって表わしたものが表 2 である。数値は 3 本のコルベン、或は 3 本の試験管の結果を平均したものである。

Sauton 味の素変法培地における鳥型竹尾株の generation time, 及びその 7 日培養の菌の乾燥重量は、夫々 3.6 時間、147 mg であるが、これに *l*-cysteine を加えた場合はその濃度が高くなるにつれ、generation time は長くなり、菌乾燥重量は減少する。*l*-cysteine の 0.0025 M. の濃度においては 10<sup>-3</sup>mg 接種培地までが一週間後にかろうじて肉眼的な菌の発育を示したに過ぎず、菌の乾燥重量も僅か 12 mg であるに過ぎない。即ち *l*-cysteine は明らかに菌の発育に対し抑制的である。

鳥型竹尾株がアミノ酸を除いた Sauton 基礎培地にお

表 2. 鳥型菌竹尾株の発育に及ぼす *l*-cysteine の影響

測定値	<i>l</i> -cysteine 濃度		0.0025 M		0.00025 M		0.000025 M		0.0000025 M		O M	
	味の素 添加の有無		有	無	有	無	有	無	有	無	有	無
Generation time (時間)	10 <sup>-3</sup>	12 <sup>-2</sup>	4.8	9.0	3.8	7.2	3.6	6.0	3.6	7.2	3.6	7.2
菌乾燥重量 (mg)	12	5	63	10	98	13	134	20	147	147	14	14

註 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> は接種菌量夫々 10<sup>-3</sup>mg, 10<sup>-2</sup>mg 培地まで肉眼的発育を認めた事を示す。

いても或程度の発育を示すことは注目に値いすること  
で、その generation time は 7.2 時間、乾燥重量は 14  
mg を示した。而してこの脱アミノ酸培地に *l*-cysteine  
を 0.0000025 M の濃度に加えた場合は generation time  
6.0 時間、菌乾燥重量 20 mg と少々菌発育に対し効果  
的成績がみられた。然し *l*-cysteine 濃度が 0.00025  
M より次第に高くなるにつれ、その generation time,  
及び菌乾燥重量は、夫々 7.2 時間、13 mg; 9.0 時間  
10 mg と次第に菌の発育は悪くなり、*l*-cysteine 0.0025  
M の場合に至つては、10<sup>-2</sup>mg 以上の菌接種培地におい  
て僅に菌の発育が認められたのみで、菌の乾燥量も 5 mg  
と極めて少量であつた。即ち *l*-cysteine は 0.0000025  
M の濃度において極く僅か菌の発育を支持するだけで、  
それ以上の濃度では常に菌発育に対し抑制的に働いた。

#### 実験 4. Sauton 培地及び Sauton 培養濾液内発育鳥 型菌の酸素消費に対する *l*-cysteine 添加の影響

菌は培地成分を利用し、呼吸を行いつつ生育をとげる  
が、培地に *l*-cysteine を添加することにより菌の酸素  
消費は如何なる影響を受けるかを 1.5 日間及び 7 日間培  
養の竹尾株について調べた。

表 3. 幼若鳥型菌竹尾株 (1.5 日培養菌) のソート  
ン濾液及び *l*-cysteine による酸素消費

Substrate	pH	7.0	7.6	8.2
		<i>l</i> -cysteine	246.6 (1.9)	277.4 (2.2)
ソートン 培地	菌不接種 培地	336.6 (2.6)		
	菌 2 日培 養濾液		373.5 (2.9)	
	菌 7 日培 養濾液			357.7 (3.1)
ソートン培地 + <i>l</i> -cysteine	菌不接種 培地	435.3 (3.3)		
	菌 2 日培 養濾液		390.1 (3.1)	
	菌 7 日培 養濾液			407.5 (3.5)
基質なし (内呼吸)		131.5	125.3	114.9

註 1. 菌量 20 mg(wet weight), 観察時間 90 分  
2. 括弧内の数値は内呼吸を 1 とした場合の比率

表 4. 陳旧鳥型菌竹尾株 (7 日培養) のソート  
ン濾液及び *l*-cysteine による酸素消費

Substrate	pH	7.0	7.6	2.2
		<i>l</i> -cysteine	51.1 (2.2)	48.2 (2.4)
ソートン 培地	菌不接種 培地	23.4 (1.0)		
	菌 2 日培 養濾液		25.2 (1.3)	
	菌 7 日培 養濾液			24.5 (1.5)
ソートン培地 + <i>l</i> -cysteine	菌不接種 培地	64.2 (2.8)		
	菌 2 日培 養濾液		50.6 (2.5)	
	菌 7 日培 養濾液			39.7 (2.4)
基質なし (内呼吸)		23.2	20.3	16.4

註 表 3 に同じ

先ず、菌を植えない Sauton 味の素変法培地 (味の素  
0.8%) 並びに 2 日間及び 7 日間竹尾株を培養した  
Sauton 濾液をそれぞれ基質として該菌 (幼若菌及び陳  
旧菌) に加えた時の酸素消費を調べ、更にそれらに  
*l*-cysteine を 0.0025 M の割に加えた時の影響をしらべ  
た。対照として培地の代りには夫々に該当する pH の磷  
酸緩衝液、*l*-cysteine の代りにはそれと同量の蒸留水  
を用いた。

その結果は表 3, 表 4 に表示した。即ち 1.5 日培養の  
若い菌は *l*-cysteine 及び培地成分を酸素消費の面でよく  
利用する。特に菌培養期間の長い培地成分をよりよく  
利用する。このことは 7 日培養の鳥型竹尾株においても  
同様であつたが、その利用度は 1.5 日培養の若い菌より  
も低かつた。しかし *l*-cysteine 添加に伴う酸素消費の  
増加率は 7 日培養菌の方が大であつた。

#### 総括並びに考按

Nakamura<sup>1)</sup> は 5 種のアミノ酸について人型結核菌の  
呼吸に及ぼす影響を Warburg 法により調べ、glutamate  
が酸素吸収を非常に促進し、glycine,  $\alpha$ -alanine, taurine  
がこれに次ぎ aspartic acid は全然影響を与えぬことを

観察した。Cutinell<sup>2)</sup> も glycine, *l*-aspartic acid について Nakamura と同様な結果を得、又 histidine は影響を与えぬことを明らかにしている。Franke<sup>3)</sup>等は鳥型菌について調べ glutamic acid がその酸素消費を増加させる外、他のアミノ酸は殆んど影響を与えぬとしている。又山村<sup>4)</sup>は人型、牛型結核菌及び BCG 浮游液は glycine alanine, glutamic acid, aspartic acid 及び asparagine 等を酸化する事ができるが、他のアミノ酸の大部分を酸化できぬと発表している。

表 5 Mycobacteria の呼吸に及ぼすアミノ酸の影響

基 質	菌 株	鳥型 (竹)	M.phlei	BCG	H <sub>37</sub> Ra	H <sub>37</sub> Rv
glycine		卅	卅	+	+	+
<i>dl</i> - $\alpha$ -alanine		卅	卅	±	±	-
<i>dl</i> -serine		±	±	±	±	±
<i>l</i> -cysteine		卅	卅	卅	卅	卅
<i>dl</i> -valine		卅	±	+	±	±
<i>l</i> -glutamine 酸		卅	卅	+	卅	卅
<i>l</i> -asparagine 酸		卅	卅	+	±	±
<i>l</i> -lysine		卅	卅	±	±	±
<i>dl</i> - $\beta$ -phenylalanine		±	±	±	±	±
<i>l</i> -tryptophan		±	+	±	±	±
<i>l</i> -histidine		+	卅	±	+	±

卅 は酸素消費増加率が 100% 以上  
 卅 〃 〃 50~99%  
 卅 〃 〃 20~49%  
 + 〃 〃 10~19%  
 ± 〃 〃 -9~0~9%  
 - 〃 〃 -10% 以下

著者の今回行つた実験成績を纏めてみると表 5 の如くなる。

表の如く、M. phlei 及び鳥型菌竹尾株は他の 3 菌株に比し呼吸に利用するアミノ酸の種類も多く、利用の程度もまた大きい。但し各アミノ酸による Mycobacteria の呼吸の増加には、量的な差は勿論あるが、質的に菌型、乃至毒性を鑑別しうる程の結果は得られていない。

それよりも目立つことは、5 菌株を通じて、*l*-cysteine 及び *l*-glutamic acid を基質にした場合の呼吸の促進が著しいことである。

一般によく酸化されるアミノ酸は菌の成長にもよく利用されることが知られており、例えば山村<sup>5)</sup>は、酸化を

受けるアミノ酸は glutamate, asparaginate 等いずれも無蛋白培地の窒素源として好適なものばかりであると述べている。Glutamic acid が Mycobacteria の好適な窒素源であることは異論のないところであり、菌の呼吸を増強させることもうなずけるが、*l*-cysteine が Mycobacteria の酸素消費を促進させることは、特異な発見といわなければならない。そこで著者は *l*-cysteine の酸化の状態を更によく知るために実験 2、及び 3 を行つた。

実験 2 において、Mycobacteria 5 菌株の *l*-cysteine による酸素消費の消長をしらべたが、各菌株の呼吸の *l*-cysteine による増加の至適 pH は大体 7 附近にある事と、KCN 添加により *l*-cysteine の酸素消費量は内呼吸に比し著しく減ずることを知つた。然し阻害剤として KCN のみしか用いず、且 intact cell だけによるこの実験から直ちに cysteine に対する酵素系等を推測することは差し控えるべきであろう。

次に著者は、*l*-cysteine 添加時、*l*-cysteine+KCN 添加時、及び KCN 単独添加時における脱水素酵素活性を各 pH においてしらべ endogeneous control と比較してみた。この実験から、一般に菌の脱水素酵素活性は M. phlei、鳥型菌竹尾の 2 株において強く、H<sub>37</sub>Ra 及び H<sub>37</sub>Rv 株においては比較的弱いこと、及び BCG は大体両者の中間に位置する事を知つた。ここに興味深いことは、*l*-cysteine による脱色促進効果が H<sub>37</sub>Rv 及び H<sub>37</sub>Ra の人型 2 菌株において特に著しかつたこと、並びに酸素消費の場合と異なり KCN による阻害がすべての菌株を通じ少なかつたことである。

然し cysteine を添加した場合の酵素活性については、これが cysteine のみを利用する脱水素酵素によるものか、或は菌体内に存在する他の基質にも働く脱水素酵素作用であるかを考えねばならないし、又 KCN の阻害についても、intact cell を使用したのみの現在の実験条件からは遽にその機序を推測することは不可能である。

さて次に著者は *l*-cysteine の鳥型菌竹尾株の発育に及ぼす効果をしらべた。

Youmans<sup>10)</sup> は *l*-cysteine の人型結核菌の発育に対する影響をしらべ、この物質は低い濃度においてすでに菌の発育に対し抑制的であると述べているが、酸素吸収量を増加させるアミノ酸は総て菌の発育に対して好適な窒素源になり得ると云う従来の成績からみて、*l*-cysteine は特異な例外と云わざるを得ない。なお cysteine は化学的に不安定なアミノ酸で、熱やアリカリによつて比較的容易に変化する。Youmans は cysteine を含む培地を 15 ポンドの圧で 20 分間加熱滅菌しているが、かかる不安定性よりみて彼の cysteine に対する取扱いは適

当でないと考えられる。よつて著者は培地の滅菌に当つて熱を加えず、ザイツの滅菌濾過管を使用した。

著者は、Sauton 味の素変法培地及びこれより味の素を除いた培地について、色々な濃度の *l*-cysteine はすべて鳥型竹尾株の発育に対し抑制的に働くことを見出した。(但し味の素を除いた培地において *l*-cysteine の濃度が 0.0000025 M の場合は極く僅か菌の発育を支持する結果を得た)。

山村<sup>4)</sup>は一般的に菌の酸素吸収に影響を与える種々なる物質を2つに大別して居る。即ち第1は基質となつて菌体内に存在する酵素系により実際に酸化分解をうけるもので、もちろんかかる物質は添加によつて酸素吸収を増大せしめる。第2の物質は安息香酸やサリチル酸のように自からは代謝をうけないで、しかも酸素吸収を変化せしめるものである。著者の今回の実験から cysteine が上記2つのいずれに属するかを決めるには慎重を要するが、Keillin<sup>19)</sup> は cysteine と細胞内 oxidase 及び cytochrome c との関係を観察し、cysteine は特殊な dehydrogenase なしに oxidase と cytochrome c によつて容易に酸化されることを報告している。

然らば cysteine の強い酸化は如何にして起るのであろうか？ 単に酵素系の activator として作用して居るのか、或は代謝系、殊に energy 利用の代謝系を攪乱しているのであらうか？

そこで、*l*-cysteine が Mycobacteria の呼吸をよく促進させるにもかかわらず、菌の成長抑制が見られる原因の一端を知りたいと思つて実験4を行つたが未だ決定的な事は分らない。

ただこの実験からみると、Sauton 培地に *l*-cysteine を加えたときの Mycobacteria の酸素消費は、phosphate buffer 中に *l*-cysteine を入れた場合とはかなり異なるようであり、殊に若い菌で培地の pH が弱アルカリ側では cysteine 利用が少ない傾向にあるようであつた。Mycobacteria が cysteine 酸化の能力を有しながら、cysteine 添加培地において発育出来ないのは、菌のごく若い時期に何等かの障害があるのではなからうかとも考えられるが、詳細は今後の研究に譲り度い。

## 結 論

鳥型菌竹尾株, *M. phlei*, BCG, 人型結核菌強毒株 H<sub>37</sub>Rv 並びに同無毒株 H<sub>37</sub>Ra の5株について、その呼吸に及ぼす12種のアミノ酸の影響、特に各菌株の酸素消費量、脱水素酵素活性に及ぼす *l*-cysteine の影響と、これらが KCN によつて阻害される状況とを調べた。また鳥型菌竹尾株について、その発育に及ぼす *l*-cysteine

の影響を調べ、更に、Sauton 培地又は菌を培養した Sauton 濾液を *l*-cysteine と共に基質として加えた際の酸素消費の消長についても検索した。得たる成績は次の如くである。

1) 鳥型菌竹尾株及び *M. phlei* は酸素消費の面において他の3菌株よりも多くの種類のアミノ酸を活潑に利用する。

2) *L*-cysteine はすべての菌株に対して酸素吸収を著しく促進せしめた。この際の至適 pH は 7.0 附近にある。又 *L*-cysteine による酸素消費の促進は KCN 添加によつて著しく阻害される。

3) *L*-glutamic acid は各菌株の酸素消費に対して *l*-cysteine に次ぐ影響を与えた。

4) Glycine, *dl*- $\alpha$ -alanine, *l*-aspartic acid, lysine は *M. phlei* 及び鳥型菌竹尾株により、*dl*-valine, *l*-histidine は *M. phlei* によりそれぞれかなり良く酸化されるが、他の菌株によつては殆んど又は僅かしか酸化されない。

5) *Dl*-serine, *dl*- $\beta$ -phenylalanine 及び tryptophane は5菌株を通じ全く利用されなかつた。

6) 基質を加えない場合の脱水素酵素活性は、*M. phlei* 及び鳥型菌竹尾株が最も強く、BCG がこれに次ぎ、H<sub>37</sub>Rv 及び H<sub>37</sub>Ra 株はこれらより遙かに弱い。然し基質として *l*-cysteine を加えた場合における酵素活性の促進は、H<sub>37</sub>Rv 株及び H<sub>37</sub>Ra 株において特に著しかつた。

7) *L*-cysteine は鳥型菌竹尾株の発育に対して常に抑制的な効果を示した(但し Sauton 脱アミノ酸培地に *l*-cysteine を 0.0000025 M の極めて微量を加えた時のみは、ごく僅かに菌の発育を支持した)。かくの如く *l*-cysteine が菌の呼吸を促進せしめるにも拘わらず発育に対し抑制的であることは興味ある事実と考えられる。

8) Sauton 培地に *l*-cysteine を加えた時の Mycobacteria の酸素消費は、phosphate buffer 中に *l*-cysteine を入れた場合のそれとは可なり異なるようであり、殊に若い菌で培地の pH がアルカリ側にあるような場合には *l*-cysteine 菌の酸素消費はによつてさほど著明に促進されなかつた。

## 参 考 文 献

- 1) Nakamura, T.: Tōhoku, J. Exptl. Med.; 34, 231, 1938.
- 2) Cutinelli, C.: Boll. ist. sieroterap. milan., 19, 141, 1940.
- 3) Franke and Schillinder: Biochem. Z. 316, 313, 1944.

- 4) 山村雄一：結核，27, 450, 1952.
- 5) 山村雄一：結核菌の生化学，100, 1955.
- 6) Proskauer, B., and Beck, M.: Z. Hyg. Infektionskrankh., 18, 128, 1894.
- 7) Armand-Delille, P., Mayer, A., Schaefer, G., and Terroine, E.: Compt. rend. soc. biol., 74, 272, 1913.
- 8) Long, E.R.: Am. Rev. Tuberc., 5, 857, 1922.
- 9) Crimm, P.D., and Martos, V.F.: Am. Rev. Tuberc., 49, 94, 1944.
- 10) Youmans, A.S., and Youmans, G.P.: J. Bact., 67, 734, 1954.
- 11) Marshak, A.: J. Bact., 61, 1, 1951.
- 12) 片山富男, 田中伸一：結核，29, 427, 1954.
- 13) Holmgren, N.B., Millman, I., and Youmans, G.P.: J. Bact., 68, 405, 1954.
- 14) 新明美仁他：結核の研究，第3集，50, 1955.
- 15) Keillin, D.: Proc. Roy. Soc. London, 106B, 418, 1930.