

乳酸桿菌のアミノ酸要求性に関する研究

第3報 乳酸桿菌のアミノ酸要求性について (付, 全編の総括)

東京歯科大学微生物学教室(主任: 米沢和一教授)

田 中 勝 雄

(昭和31年10月16日受付)

Studies on Amino Acid Requirements of Lactobacilli 3rd Report, On Amino Acid Requirements of Lactobacilli (Appendix : Summary of Three Reports)

Katsuo Tanaka

*Microbiological Department of Tokyo Dental College
(Director : Prof. W. Yonezawa)*

(本報の要旨の一部は昭和31年4月5日, 於, 熊本市, 第29回日本細菌学会総会の席上で発表した.)

I. 緒言と文献概要

一般にビタミン要求性のきびしい菌程アミノ酸要求も強いとされており, なかでも乳酸菌はその要求するアミノ酸の種類が多いこと, 又その要求性が, 特異的でしかも安定なことが知られている. 従つて乳酸桿菌は Bioassay に用いられているばかりでなく, 代謝研究の対象ともなり, そのアミノ酸要求性の^{29), 30), 31)} 検討も数多く報告されているところである.

しかしながら *L. acidophilus* に関しては, 割にその報告は少ない.

Dreizen et al³²⁾ は, 齶食から分離した乳酸桿菌, レンサ球菌 (*Str. salivarius*), 白色ブドウ球菌, ブド

ウ糖発酵性 *Saccharomyces* の各1株についてそのアミノ酸要求性を検討しているが, 単独の抜取り試験でその必要性を判定している.

わたしは, 既に第2報において母子3種来源より得た3株及び齶菌由来の1株 (*O₃*株) の *Lactohacillus acidophilus* のビタミン要求性及び金属イオン要求性, 発育阻害物質等を検討して, その大要を明らかにし, いずれの性状もよく相似していることを記載した. 本報においては供試菌株のアミノ酸要求性について記載する.

II. 実験方法

培地としては, ビタミン要求性の検査に用いた半合成培地中の, Casein hydrolysate を Cystine, Tryptophane を含む19種のアミノ酸に置き変えたものを使用した.

19種アミノ酸は, いずれも東京化成の製品である. DL-Alanine, L-Histidine, DL-Threonine, DL-Valine, DL-Serine 及び Glycine は水に, 又 L-Isoleucine, L-Methionine, DL-Phenylalanine, DL-Try-

ptophane, L-Leucine は温湯に, 又 DL-Aspartic acid, L-Glutamic acid は, 希釈 NaOH で, 又 L-Arginine, L-Lysine は, 0.4 N HCl に, 又 L-Tyrosine L-Cystine は N HCl にそれぞれ溶解して保存液とした.

培地中アミノ酸含量は第13表に示す通りである.

培地 pH その他は, 半合成培地の調製法に準じた, 接種材料, 発育判定等も前報と同様である.

第13表 Composition of Amino acids (per l)

DL-Alanine	400 mg	L-Lysine	200 mg
L-Arginine	100 mg	DL-Methionine	400 mg
L-Aspartic acid	100 mg	DL-Phenylalanine	200 mg
L-Cysteine	400 mg	L-Proline	100 mg
L-Cystine	400 mg	DL-Serine	200 mg
L-Glutamic acid	500 mg	DL-Threonine	200 mg
L-Glycine	100 mg	L-Tyrosine	100 mg
DL-Histidine	200 mg	DL-Tryptophane	200 mg
DL-Isoleucine	500 mg	DL-Valine	500 mg
DL-Leucine	500 mg		

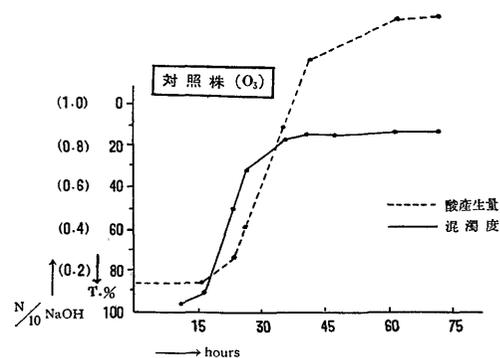
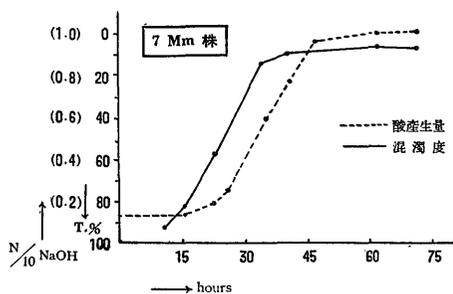
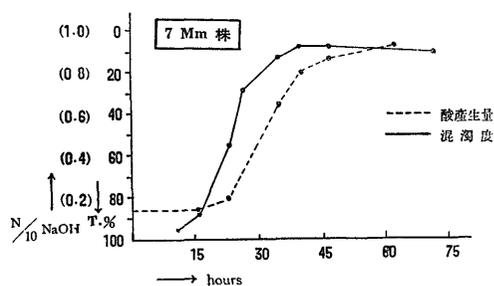
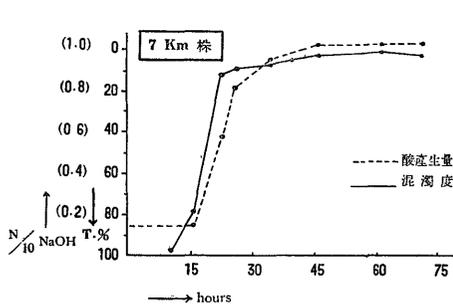
III. 実験成績

1. 必須アミノ酸

予備実験として本培地が供試菌の発育に適するか否かを検討した。即ち、完全合成培地での発育曲線を画

いてみた。その成績を第1図に示したが、いずれの菌株も本培地中でよく増殖した。

1 図 Acid Production and Turbidity.



次にアミノ酸1種ずつを抜取つた培地での発育状態を検し、第14表の如き成績を得た。

この成績から必要性を判定すると、第15表の如くなる。

菌株別に見ると、共通して必須としているものは、Arginine, Glutamic acid, Histidine, Leucine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophane, Tyrosine, Valine であり、7 Ms 株はその他 Alanine 及び Serine

第14表 Effect of deletion of Amino Acids

Strain	Complete medium	DL-Ala.	L-Arg.	L-Asp.	L-Cyst.	L-Cystine	L-Glu.	L-Gly.	DL-His.	DL-Ileu.
7 Ms	32.0	100	84.5	34.6	28.6	19.4	98.5	10.0	77.5	22.6
7 Mm	23.5	100	100	73.0	13.5	12.0	100	19.6	100	22.5
7 Km	17.4	71.5	90.2	70.2	14.0	15.5	100	25.5	100	33.8
O ₃	32.7	75.0	89.5	37.5	46.8	31.2	100	33.8	67.5	39.5

Strain	DL-Leu.	L-Iys.	DL-Met.	PL-Phe.	DL-Pro.	DL-Ser.	DL-Thr.	DL-Try.	L-Tyr.	DL-Val.
7 Ms	80.0	26.4	36.7	86.4	20.5	84.0	100	100	89.7	95.0
7 Mm	71.0	12.5	100	100	10.0	26.0	86.8	100	100	100
7 Km	85.5	13.8	100	100	14.2	33.0	97.2	100	89.0	92.0
O ₃	79.4	24.8	44.6	90.0	26.5	85.5	91.5	100	89.0	92.0

(注) 数値は Transmission % を示す。

第15表 Amino Acid Requirements of Test Organisms

Strain	DL-Ala.	L-Arg.	L-Asp.	L-Cyst.	L-Cystine	L-Glu.	L-Gly.	DL-His.	DL-Isoleu.	DL-Leu.
7 Ms	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
7 Mm	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
7 Km	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
(O ₃)	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+

Strain	L-Iys.	DL-Met.	DL-Phe.	DL-Pro.	DL-Ser.	DL-Thr.	DL-Try.	L-Tyr.	DL-Val.
7 Ms	-	-	+	-	+	+	+	+	+
7 Mm	-	+	+	-	-	+	+	+	+
7 Km	-	+	+	-	-	+	+	+	+
(O ₃)	-	-	+	-	+	+	+	+	+

を、7 Mm 株、7 Km 株はともに Alanine, Aspartic acid, Methionine を必須としている。O₃ 株は Serine, を必要としており、必須のもののみから見ると、7 Km 株 (新産児口腔由来)、7 Mm 株 (母体口腔由来) は全く一致している。

本実験で得た成績を基にして、各菌株について、培地のアミノ酸組成はいずれも必須のもののみとし、ビタミン組成は発育促進性を含んだ、発育を支持する組成としたところの培地 (A 培地と略す) に各菌株を接種したところ、いずれの菌株も発育して来なかった。

2. 発育促進性アミノ酸

上記実験で、必須アミノ酸組成のみでは供試菌の発育を支持出来ないことがわかったので、A 培地に不必要なアミノ酸を1種づつ添加したものを調製し、この

培地での菌の発育を検した。その結果、7 Ms 株及び O₃ 株は、いずれのアミノ酸を加えても発育は見られなかったが、7 Mm 株は、Cysteine を、7 Km 株は Cysteine 或いは、Cystine を添加すると十分に発育して来ることがわかった (第16表)。

第16表 発育促進性アミノ酸 (Km 株)

Amino acid	Growth (Transmission %)
Cysteine	41.0
Cystine	42.5
Control	46.0

そこで、さらに 7 Mm、7 Ms、O₃ の3株について不必要なアミノ酸2種づつを須次組合せて、A 培地に

添加して各菌株の発育を検した。

その結果 7 Ms 株は第17表に示すような組合せによつて菌の発育が見られた。即ち最もよい発育を示したのは Cysteine と Lysine を添加した場合である。

7 Mm 株の場合は第18表に示すような組合せで菌は増殖して来るが、いずれも Cysteine 単独を添加した場合に劣る。

O₃ 株の場合は、第19表に示した。

第17表 発育促進性アミノ酸 (Ms 株)

Amino acid	Growth (Transmission %)
Cysteine + Lysin	36.2
Glycin + Methionine	72.5
Lysine + Methionine	80.0
Asparatic acid + Cystine	45.5
Control	

第18表 発育促進性アミノ酸 (Mm 株)

Amino acid	Growth (Transmission %)
Cysteine	26.5
Cystine + Glycin	74.5
Cystine + Lysin	47.0
Cystine + Isoleucine	53.5
Cystine + Proline	38.5
Cystine + Serine	40.0
Control	28.0

第19表 発育促進性アミノ酸 (O₃ 株)

Amino acid	Growth (Transmission %)
Aspartic acid + Cysteine	64.0
Cysteine + Isoleucine	50.0
Control	32.0

3. アミノ酸とビタミンの関係

つきにA培地に不必要ビタミンを1種づつ、さらに2種ずつの組合せを加えたものでの発育を検したところ、7 Ms 株、7 Km 株、7 Mm 株では、いずれの場合も発育しなかつた。

O₃ 株の場合は、PABA 及び Pyridoxine を加えた場合のみ中等度の発育が見られたが、それぞれ単独添加の場合は勿論発育して来なかつた (第20表)。

第20表 ビタミンとアミノ酸の関係 (O₃ 株)

Amino acid	Growth (Transmission %)
Pyridoxine + PABA	67.5
Control	38.0

さて、すべてのビタミンの存在下での必須アミノ酸の種類について、Dreizen らは Glutamic acid, Valine, Cystine, Methionine, Phenylalanine, Serine を挙げており、Leucine, Isoleucine, Arginine, Tyrosine, Proline, Tryptophane, Alanine, Threonine の順に必要なアミノ酸を抜取つた際の酸産生量には各種の段階があることを示した。

わたしの成績では、各アミノ酸抜取り成績は比較的判然としていた。

必須アミノ酸を菌株別、即ち来源別に見ると、7 Ms 株、即ち母体腔由来株は、7 Mm 株 (母体口腔由来)、7 Km 株 (新産児口腔由来) より1種少ない。

発育促進性アミノ酸の成績を見ると、いずれも、含有アミノ酸が組合せ中に含まれていることがうかがえる。Dreizen らは、Cystine, Methionine が必須であるとしているが、単一に抜取つた場合は、他の含有アミノ酸の一種は培地組成中にあるわけであつて、氏の菌株では三者が互いに代用し合つているものとも考えられる。いずれにしても、乳酸桿菌の発育には含有アミノ酸は必要とことが考えられる。

ビタミンの代償性については、Möller³³⁾、Snell³⁴⁾らの記載があり、宮沢³⁵⁾は、最近 Lactobacillus fermenti 36について、PABA 或いは、葉酸が、V・B₂の存在しない場合には V・B₂の代用或いは合成を行い、V・B₂の存在する場合には、Alanine, Aspartic acid, Proline の代謝に関係があるらしいことを報告した。

アミノ酸とビタミンとの相互関係は、わたしの3菌株では見られなかつたが、O₃ 株においてはアミノ酸の場合は Aspartic acid + Cysteine 或いは Cysteine + Isoleucine を添加すると発育が見られ、不必要ビタミンの場合は、Pyridoxine + PABA で発育して来ることがわかつた。

もちろん、発育の程度はいずれの場合もあまりよくないが、両者の間に代謝面で何らかの関係があるように考えられる。

IV. 小 括

供試乳酸桿菌4株のアミノ酸要求性を検し、その成績を小括すれば、

1. 全菌株共通して必須なものは、Alanine, Arginine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophane, Tyrosine, Valine であり、母体腔由来株及び O₃ 株は、その他 Serine を、母体口腔由来株及び新産児口腔由来株は共通のアミノ酸の他に Aspartic acid 及び Methionine を必須とすることを知った。即ち、来源別には、母体腔由来株は、他の母体及び新産児口腔由

来株よりも1種少なかった。又母体口腔腔由来株及び新産児口腔由来株は全くその種類が合致していた。

2. 発育促進性アミノ酸として、含硫アミノ酸のうちの1種ないし2種は、各菌株の発育を支持することを知った。

3. 母体腔由来株、母体口腔由来株、新産児口腔由来株の発育に対しては、アミノ酸とビタミンとの間に相互関係は見られなかった。

〔付〕全編の総括

口腔、腸管、腔等の常在菌である乳酸桿菌は、酸産生によつて腸管或いは腔内での常在価値が或る程度解釈されているが、口腔内乳酸桿菌は、一部の人を除いては齲食起因菌と目されており、全く対照的な位置にある。従つてこれら諸体腔における乳酸桿菌の相互関係が多くの研究者によつて論議されて来たことは当然のことと考えられる。教室の小埴は、さきに11組母子4種来源（母体産道、母体口腔、新産児口腔、新産児腸管）より分離した乳酸桿菌を検討して乳酸桿菌の母子間移行は部分的であることを主張した。

わたしは、小埴の分離菌同定についてさらに産生乳酸の旋光性の検査を行い L. acidophilus 3株、同類似菌1株、L. plantarum 類似菌3株は、それぞれ同名の菌種であることを確認した。

そしてその内の1組（母体産道、母体口腔、新産児口腔由来）の Lactobacillus acidophilus 3株及び齲食由来の Lactobacillus acidophilus O₃ 株の4株について、ビタミン、金属イオン及びアミノ酸の要求性を詳細に検討してその大要を明らかにし得た。即ち、各菌株の発育を支持する合成培地中のビタミン組成は、産道由来株、母体口腔由来株、新産児口腔由来株は全

く一致していた。又全菌株共 Mn イオンに対する態度も同様であつた。

ついで必須アミノ酸の種類は殆んど共通しており、発育を促進するアミノ酸にはいずれも含硫アミノ酸が含まれていることも明らかにすることが出来た。

齲食由来の O₃ 株は、供試菌株中ただ1株の右旋性乳酸産生菌であつたが、ビタミン要求性の強い点が他の菌株と異つている。

Lactobacillus acidophilus の栄養要求の側から見ると、今日まで報告されていた二、三のものと比較して供試菌株中の3株は、ある程度共通の様相を呈していることもわかつた。

以上の結論として、わたしは、母子間での乳酸桿菌の移行を証明し得る希有な例を提示した一方、菌株特性が強いとされている乳酸桿菌の栄養要求に一定の共通点を実証したもので、この事実は学界に寄与する所大と信ずる。

稿を終るに当り本研究に対して終始懇篤な御指導を賜り、御核閲をいただいた米沢和一教授に鳴謝すると共に御協力を惜しまれなかつた高添一郎・関山幹雄・竹内太刀夫の諸氏をはじめ教室員一同に深謝する。

文 献

- 1) 谷友次：医学微生物学第4版，南山堂（昭29）。
- 2) 岡本俊次郎：十全医学会雑誌，40：822（昭27）。
- 3) 中田尚：金沢大学結核研究所年報，第8年下巻，130（昭25）。
- 4) 長谷川慶藏：歯科学報，40：407（昭10）。
- 5) 長谷川慶藏：歯科学報，42：643，742，812，883（昭11）；43：18（昭12）。
- 6) Bunting，

- R. W., and Palmerlee, F., : J. A. D. A., 12 : 381 (1925).
- 7) Morishita, T., : J. Bact., 18 : 186 (1929).
- 8) 春木保彦：口腔衛生学会雑誌，1：85（昭28）。
- 9) 小埴寛：十全医学会雑誌，58：65（昭31）。
- 10) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 6th Ed. (1948).
- 11) 白土寿一

他：第6回日本歯科医学会総会口演（昭30）。

12) 成沢亀一郎：日本産婦人科学会雑誌，7：191（昭30）。

13) 日本分析化学会：機器による化学分析，丸善版（昭29）。

14) 江上不二夫他編：標準生化学実験，第1版，文光堂版（昭28）。

15) Snell, E. E., and Strong, F. M., : *Enzymologia*, 6 : 186 (1939).

16) Landy M, and Dickens, D. M., : *J. Lab. and Clinical Med.*, 27 : 1086 (1942).

17) Hill, T. J., and Kniesner, A. H., : *N. Y. J. of Dent.*, 11 : 319 (1941).

18) Hill, T. J., and Kniesner, A. H., : *J. D. Res.*, 21 : 467 (1942).

19) Weisberger, D., and Johnson, F. G., : *J. Dent. Res.*, 25 : 25 (1946).

20) Peterson, W. H., and Peterson, M. S., : *医学のあゆみ*, 2 : 377 (1946).

21) Dreizen, S., and Spies, T. D., : *J. Dent. Res.*, 32 : 65 (1953).

22) 中村・秋葉編：細菌学，総論，106，南山堂（昭29）。

23) Charney, J., Fisher W. P. : *J. Bact.*, 62 : 145 (1951); *Science*, 114 : 687 (1951).

24) MacLeod, Robert A., and Snell, E. E., : *J. Biol. Chem.*, 170 : 351 (1947).

25) Carlson, W.

W., Farina, L. L., and Whiteside-Carlson, V. : *J. Dent. Res.*, 31 : 634 (1952).

26) 青柳高明・水野伝一：第29回日本細菌学会総会口演（昭31）。

27) 池田正・白土寿一：歯科学雑誌，7：463（昭25）。

28) 帆足望：公衆衛生，12（4），（昭27）；13（1），（2）（昭28）。

29) Costilow, R. N., Fabiau, F. W., : *Food Res.*, 19 : 269 (1945).

30) Cimino, S., Previtiera, G. : *Boll. soc. ital. biol. sper.* 27 : 491 (1951); *C. A.* 48 : 227 (1954) (ビタミン，7：5より引用)。

31) Peters, V. J., Snell, E. E., : *J. Bact.*, 67 : 69 (1954).

32) Dreizen, S., Mosny, J. J., Gilley, E. J., and Spies, T. D., : *J. Dent. Res.*, 33 : 339 (1954).

33) Möller : *Z. physiol. Chem.*, 260 : 246 (1939).

34) Snell et al : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 27 : 1 (1941).

35) 宮沢滋：バイオアッセイ集談会誌，創刊号，31（1954）。

36) 田村学造・石川不二夫：分析化学，2：273（昭28）。

37) 赤堀四郎・水島三一郎編：蛋白質化学，1，共立出版（昭29）。

38) Stephenson, M., 原著田中正三・鈴木達雄共訳：細菌の代謝，丸善（昭30）。

正 誤 表

田 中 勝 雄：乳酸桿菌のアミノ酸要求性に関する研究（第1～3報）

十全医学会雑誌 第58巻10号960～976頁

頁	行	誤	正
961	左 下より13行	breves	brevis
961	” 3行	brivis	brevis
961	右 上より24行	Heterofemementation	Heterofermentation
968	左 上より7行	Primidine	Pyrimidine
972	1図左下のグラフ中で	7 Mm株	7 Ms株
974	第17表2行目	+ Lysin	+ Lysine
974	第17表6行目	Control が空欄	33.5 を入れる
974	第13表3行目	+ Glycin	+ Glycine
974	” 4行目	+ Lysin	+ Lysine