

Cl. perfringens のブドウ糖代謝に関する研究

金沢大学医学部微生物学教室(主任 谷友次教授)

柴 田 道 也

Michiya Shibata

(昭和30年1月31日受附)

緒 言

Cl. perfringens のブドウ糖代謝に関しては、Wolf¹⁾らによつて醗酵による水素ガス発生を認めて以来、幾多の研究があるが、Pappenheimer & Shaskan²⁾ がブドウ糖分解に関して、鉄イオンがガス醗酵に不可欠の要素であり、これを欠く時はガス発生を伴わぬホモ乳酸醗酵を行うことを報告している。Bard & Gumsalus³⁾ もこれを更に追求し、果糖-1, 6-二磷酸をグリセリン・アルデヒド-3-磷酸とデオキシアセトン磷酸に分解する Aldolase が鉄を有する酵素であることを明らかにして、Cl. perfringens における Embden Meyerhof System を経過する糖分解経路の存在を略々確認した。最近に至り平野教授ら^{4) 5)} は偏性嫌気菌である Clostridia の中、

Cl. perfringens, Cl. botulinum を用いて、ワールブルグ検圧計の実験においてブドウ糖を基質として可成りの酸素吸収を見ることを報告された。この事実は発育の場合、酸素が阻害的に作用する、即ち Redoxpotential の低い Medium を好適の発育環境とする Clostridium においては極めて奇異な現象であると同時に又重要な報告であると思う。

著者も Cl. perfringens のブドウ糖分解について、嫌氣的並びに好氣的環境における発生ガス及び吸収ガス量の測定、分解終末産物の定性これに対する α - α' dipyridyl の影響などについて検討し、嫌氣的、好氣的両者の分解過程の異同について考察を行つた。

実験材料並びに実験方法

供試菌液： Cl. perfringens PB₀₄ 株の1%ブドウ糖加肝浸出ブイヨン、18時間嫌氣的培養より遠心集菌し、M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で3回洗滌し、同緩衝液に浮游して、光電管比色計を用いて4mgN/mlの静止菌液とした。菌液は実験の都度新鮮培養菌より作製し、作製後可及的早く使用した。

各種ガス量の測定： ワールブルグ検圧計を用いた。フラスコ内容は、主室に基質1ml, M/5 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5ml, 側室に菌液 0.5ml, 及び必要な場合には 0.03M α - α' dipyridyl 溶液 0.1ml, 副室に20%苛性カリ溶液 0.2ml, 全量 2.5ml となるように主室に蒸溜水を加えた。又ワールブルグの実験と別に、酸素吸収及び炭酸ガス発生比を見るため、200ml フラスコに2本のコック付ガラス管をつけたゴム

栓をし、この中にワールブルグ・フラスコの内容と同じ比になる如く基質、緩衝液、菌液を各々10倍量入れ、37°Cの振盪恒温器中にて振盪し、反応を行わせ、所要時間毎にこれを取り出し、直ちに10%硫酸水を添加して反応を止め、内容ガスを労研式ガス分析器にかけて炭酸ガスの増加量と酸素の減量を測定した。

分解終末産物の定性： ワールブルグ検圧実験後、フラスコ内容液の各種物質の定性を行つた。a) ブドウ糖： ペーパー・クロマトグラフ法による。溶媒はButanol 4容, Ethanol 1容, 水1容, 発色剤はアンモニア硝酸銀液。b) 不揮発性酸類： ペーパー・クロマトグラフ法による。溶媒はButanol 4容, 氷酢酸1容, 水1容, 発色剤は0.04% Brom・Phenol・Blue (B・P・B) アルコール溶液。c) 揮発性酸類： 蒸気蒸

溜を行つた被検液について Reid & Lederer⁶⁾ のペーパ・クロマトグラフ法によつて行つた。溶媒は 1.6N アンモニア水飽和の Butanol を用い、発色剤は 0.04% Methyl-Red アルコール溶液 (原法は Brom・

Cresol・Purple を用いている) を使用した。又蟻酸は甘黍生成法⁷⁾ を併用した。その他アルコールの検出に Agulhon 氏反応⁷⁾ を用いた。

実験成績

1. 窒素気中 (嫌氣的) におけるブドウ糖その他中間代謝物よりのガス発生

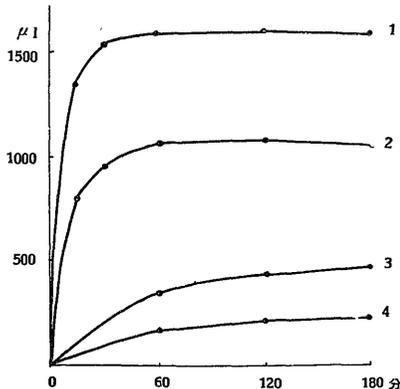
ブドウ糖及び中間代謝物である 焦性ブドウ酸, 乳酸, 酢酸, 蟻酸, グルタミン酸, コハク酸, フマル酸等について, これらを基質としてガス発生を見た。以上の中, ガス発生のあるのはブドウ糖及び焦性ブドウ酸のみで, 他のものでは認められなかつた。

1/50M, 1ml のブドウ糖より H_2 は 900~1120 μ l, CO_2 は 450 μ l 発生し, これは 1M ブドウ糖より H_2 2~2.5M, CO_2 1M に相当する。同量の焦性ブドウ酸よりは H_2 , CO_2 共約 220 μ l 発生し, これは焦性ブドウ酸 1M 当り H_2 , CO_2 各々 0.5M に相当する (第1図, 第1表)。

ブドウ糖よりのガス発生は焦性ブドウ酸に比し遙かに早く, 約30分間で殆んど反応を終える。この反応に対する α - d ipyridyl の影響については著者が前報⁸⁾ に述べた。

第1図 N_2 気中におけるガス発生

1. ブドウ糖よりの総ガス量
2. ブドウ糖よりの水素ガス
3. 焦性ブドウ酸よりの総ガス量
4. 焦性ブドウ酸よりの水素ガス



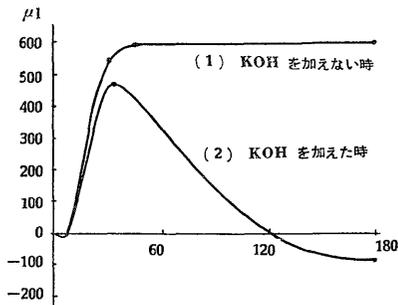
2. 空気中 (好氣的) におけるブドウ糖, その他の中間代謝物よりのガス発生並びに酸素吸収について

前回の実験における ワールブルグ・フラスコ内の Atmosphere を窒素から空気に替えて実験を行つた。好氣的環境においても, ガス圧の変動を認めたのは, 前回と同じくブドウ糖と焦性ブドウ酸のみで他の基質においては全く変化がなかつた。ブドウ糖を基質とした場合には水素ガス及び炭酸ガスの発生と, 同時に起る酸素吸収との複雑な関係が現われる。

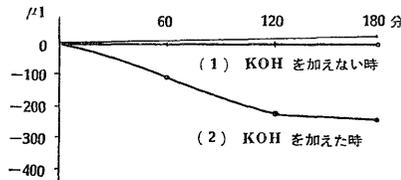
ワールブルグ・マノメータは第2図に示すような曲線を描く, 即ち最初の数分間には極少量のガスの吸収を見る (5~20 μ l, 或いは全く見られないこともある), その後急激にガス発生が起り20~30分に至つて止り, 平衡状態になる。この実験において, 副室に KOH を入れて発生する炭酸ガスを吸収させる時には, カーブ (2) に示す如く, ガス発生は前者に比して稍々少なく, 前者が未だ上昇を続ける途中において下降にうつる。又前者が平衡状態になつた後においても, このガス吸収が経続し 180 分に至る迄この状態が続く。前述した如く, この曲線は三種のガス (H_2 , CO_2 , O_2) の発生, 吸収総合の曲線であるため, この関係を明らかにする目的で, 炭酸ガスと酸素のみの比をガス分析器を用いて測定した。反応時間10分, 30分, 3時間のものを夫々測定した結果どの時間においても炭酸ガスの増量と酸素の減量は等しかつた。

焦性ブドウ酸ソーダを基質とした場合は第3図に示す如く, ガス圧は KOH を入れないものにおいては殆んど変化なく, KOH を添加し

第2図 空気中におけるブドウ糖代謝のガス圧カーブ



第3図 空気中における焦性ブドウ酸ソーダ代謝のガス圧カーブ



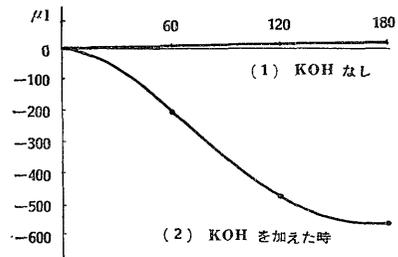
たものではガス吸収を認めた。このことは焦性ブドウ酸ソーダをも酸化し、この際の酸素吸収量と、炭酸ガス発生量が等モルであることを示す。以上の成績より各ガス量の値は第1表に示す如く、ブドウ糖 1M より H₂ 1.5M, CO₂ 1.6M 発生し、O₂ 1.6M の吸収を見る。焦性ブドウ酸ソーダ 1M よりは H₂ の発生なく CO₂ 0.5M の発生と O₂ 0.5M の吸収を見る。

3. 空気中におけるブドウ糖、焦性ブドウ酸酸化に及ぼす α - α' dipyridyl の影響

実験2と同条件で、側室内に α - α' dipyridyl の 0.03M 溶液 0.1ml を添加して、ガス圧の変化を検討した。第4図に示す如く、この場合には水素ガスの発生は全く認められず、KOH を添加しないものでは殆んどガス圧の変化を見なかつた。発生炭酸ガスを吸収したものでは約 600 μ l の酸素吸収を認めた。即ち α - α' dipyridyl の添加は水素発生を伴わぬ酸化の反応を起すものと思われる。

焦性ブドウ酸ソーダを基質とした場合には、ブドウ糖の場合と稍異なり、酸素吸収は可成

第4図 空気中ブドウ糖に dipyridyl を添加した時のガス圧カーブ



阻害され、 α - α' dipyridyl 非添加時に比し 1/5~1/6 量になる。

以上の成績を第1表に纏めた。

第1表 ガス量測定値

基質	ガス Medium 添加物	H ₂	CO ₂	O ₂
ブドウ糖	窒素	2-2.5	1	—
	窒素 dipyridyl	0	0	—
	空気	1.5	1.6	1.6
	空気 dipyridyl	0	1	1
焦性ブドウ酸ソーダ	窒素	0.5	0.5	—
	窒素 dipyridyl	0.2	0.2	—
	空気	0	0.5	0.5
	空気 dipyridyl	0	0.1-0.2	0.1-0.2

註：基質各々 1M に対する H₂, CO₂ の発生モル及び O₂ 吸収モル。

4. 反応終末産物の定性

以上の実験において、ワールブルグ・フラスコ中に残溜するブドウ糖、分解終末産物の定性をペーパー・クロマトグラフによつて行つた。基質にブドウ糖を用いた場合の残溜ブドウ糖の定性試験では、嫌氣的条件において、 α - α' dipyridyl 非添加では完全に消失して認められない。 α - α' dipyridyl 添加のものでは、著明なブドウ糖の Spot を認め、対照のものと同様の大きさであつた。好氣的条件においては、 α - α' dipyridyl 添加、非添加何れにおいてもこれを認めることがなかつた。

不揮発性酸類の定性では著明なものは認めら

れなかつたが、ブドウ糖を好氣的、 α - α' dipyridyl 添加分解時に乳酸の Spot を認めることがあつた。又この時焦性ブドウ酸の根跡を認めることもあつた。

揮発性酸類については、ブドウ糖を嫌氣的分解時に酪酸、酢酸を認め、これに α - α' dipyridyl を添加した時には解糖が行われなため、酸類を認めなかつた。好氣的分解に際しては、酢酸のみを、これに α - α' dipyridyl を加えたものでも同様酢酸のみを認めた。

焦性ブドウ酸分解産物としては、嫌氣的、好氣的何れの場合においても酢酸の出現が著明であつた。

以上の成績は第 2 表に示す如くである。

第 2 表 終末産物の定性

基質	ガス Medium 添加物	ブドウ糖	蟻酸	酢酸	酪酸	焦性ブドウ酸	乳酸	アルコール
ブドウ糖	窒素	—	—	+	+	—	—	—
	窒素 dipyridyl	+	—	—	—	—	—	—
	空気が	—	—	+	—	—	—	—
	空気が dipyridyl	—	—	±	—	±	—	±
焦性ブドウ糖	窒素	—	—	+	—	—	—	—
	空気が	—	—	+	—	—	—	—

総括並びに考按

Cl. perfringens PB₆₄ 株の静止菌を用い、嫌氣的、好氣的両状態におけるガス発生並びに吸収、代謝産物に関する検討を行つた。嫌氣的条件下ではブドウ糖 1M に対し水素ガス 2~2.5 M, 炭酸ガス 1M の発生を伴い、分解産物として酢酸、酪酸を形成する。即ちブドウ糖は Embden Meyerhof の経路を通つて焦性ブドウ酸となり、これが更に $\text{CH}_3\text{COCO}(\text{OH}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CO}(\text{OH}) + \text{CO}_2 + \text{H}_2$ の形式にて酢酸を形成し、又一方活性酢酸が還元されて酪酸を形成するという経路をとるのであろう。この酪酸形成の強弱又は hydrogenlyase の不安定性の故に還元 Coenzyme より発生する水素ガス量に変動が見られるのであろうと思われる。この代謝経路が α - α' dipyridyl によつて阻害されることは Bard & Gunsalus の Aldolase の報告によつて明らかであるが、著者も又この事実を認め、この場合にはブドウ糖は全く変化を受けずに Medium 内に残溜しているのを認めた。

好氣的条件下、即ち Redox-Potential の高い空気中においても亦、Cl. perfringens によつてブドウ糖は分解される。この場合、水素ガス、炭酸ガスの放出されることは窒素気中における現象と同じであるが、同時に又酸素を吸収す

る。その割合はブドウ糖 1M に対し、水素ガス 1.5M, 炭酸ガス 1.6M, 酸素 1.6M である。又この場合水素ガスの産生は極めて短時間の間に起り、炭酸ガスの発生と酸素の吸収は同時に起り、而も 2—3 時間の間、徐々に起るのを認めた。終末産物としては酢酸のみであつて、前者において多量に認められた酪酸を全く認めなかつた。焦性ブドウ酸ソーダを基質としても亦酸素吸収が認められ、基質 1M に対し 0.5M の酸素吸収があつた。

Cl. perfringens は Cytochrome 系の酵素を全く保有していない菌であるが故に、酸素吸収は焦性ブドウ酸以下の過程において、Krebs Cycle 或いは Szent Györgyi Cycle を経過することは考えられない。故にこの酸素消費は焦性ブドウ酸脱水素酵素が作用し、直接酸化の反応 ($\text{CH}_3\text{COCO}(\text{OH}) + \text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CO}(\text{OH}) + \text{CO}_2$) が行われているものと考えられる。又一方水素ガス発生は窒素気中の場合に比し約 1M 少ないが、これは Diplococcus pneumoniae⁹⁾, Streptococcus faecalis^{10) 11)} などに見られる如き H_2O_2 の形成、次いでこの H_2O_2 と Pyruvate との間に起る Holleman 反応が行われているのではないかとの予想を抱かせる。

好氣的条件下において、 α - α' dipyridyl を添加しても、嫌氣的条件下におけるような解糖阻止の現象は見られず、ブドウ糖は完全に分解されて全く残存しなかつた。この時水素ガスの発生は全くなく、酸素吸収と、炭酸発生のみが起り、酢酸が反応産物として検出される他、焦性ブドウ酸及びアルコールの少量が認められた。嫌氣的条件下では Embden-Meyerhof 経路を通じて焦性ブドウ酸に至ることは略々明瞭であるが、好氣的条件下においても、この経路の存在は否定できない (Bard らは好氣的では Aldolase の鉄が2価から3価に酸化されて、このため

Aldolase が不活化され、好氣的な場における Clostridia の発育不能の原因の一つではないかと予想しているが)。しかし著者の実験の成績の如く、好氣的な場で α - α' dipyridyl がブドウ糖分解に何ら阻止効果を与えないこと、即ち Aldolase が不活化され乍ら糖分解が進むということから見るに、Cl. perfringens が単に Embden-Meyerhof 型式のみの分解を行うものでなく、別な分解経路が当然予想される。この経路としては、酸素吸収と炭酸放出とが交互に繰返されて酸化をうける Warburg-Dickens の経路が存在するのではないかと思われる。

結 論

Cl. perfringens PB₆₄ 株の静止菌を用い、ブドウ糖代謝について検討し、次の結果を得た。

1. 嫌氣的代謝においては、ブドウ糖 1M より水素ガス 2~2.5M, 炭酸 1M 発生, 酢酸, 酪酸形成を見た。
2. 好氣的代謝においては、ブドウ糖 1M より、水素ガス 1.5M, 炭酸 1.6M 発生, 酸素 1.6M 吸収, 酢酸のみの形成を見た。
3. 焦性ブドウ酸ソーダ 1M より、嫌氣的では水素ガス, 炭酸共に 0.5M 発生, 好氣的では炭酸 0.5M 発生, 酸素 0.5M 吸収, 何れも酢酸のみの形成を認めた。
4. ブドウ糖分解に際し、 α - α' dipyridyl の添

加により嫌氣的では反応が阻止されるに反し、好氣的では水素の発生なく、且つ 1M の酸素吸収, 炭酸発生を伴い、ブドウ糖は完全に分解されていることを認めた。

5. 好氣的、且つ α - α' dipyridyl 添加時にはブドウ糖は Embden-Meyerhof 経路以外の代謝経路により分解されるものの如くである。

(本論文の要旨は第27回日本細菌学会において発表した)。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜つた谷教授に深く感謝の意を表します。又御教示を載いた西田助教授、田上学兄に感謝致します。

文 献

- 1) Wolf, C. G. L. : J. of Path. Bact., 22, 207 (1918).
- 2) Pappenheimer, A. M. and Shaskan, E. : J. of Biol. Chem., 155, 265 (1944).
- 3) Bard, B. C. and Gunsalus, I. C. : J. Bacter., 59, 387 (1950).
- 4) 平野清寿他 : 日本細菌学雑誌, 9, (4), 265 (1954).
- 5) 大迫英彦 : 医学研究, 24, (1), 187 (1954).
- 6) Reid, R. L. and

- Lederer, M. : Biochem. J. 50, 60 (1951).
- 7) 宮路憲二 : 応用細菌学, 136, 126, (岩波書店) 昭和13年.
- 8) 柴田道也 : 十全医学会雑誌, 57, 836 (1955).
- 9) Sevag, M. G. : Bioch. Zeitschr. 267, 211, (1933).
- 10) Seeley, H. W. and Vandemark, P. J. : J. Bacter., 61, 27 (1951).
- 11) Seeley, H. W. and Rio-Estrada, C. : J. Bacter., 62, 649, (1951).