

Mucor rouxianus の Dimorphism の生理学的研究

I 生長と呼吸

西 上 一 義

Kazuyoshi NISHIGAMI: Physiological Study on Dimorphism of *Mucor rouxianus*.
I. Growth and Respiration.

Abstract.—A physiological study on the dimorphism of *Mucor rouxianus* (Class phycmycetes) was made under both the aerobic and anaerobic conditions. Of the results, the following ones are noteworthy.

1) The growth rate, in shaking culture, arrived to a stational phase after 72 hours; in static culture, however, it was seen after 96 hours. The total growth of cells expressed as dryweight in shaking culture is as three times as the static culture.

2) Glucose is the most essential substrate on respiration of *M. rouxianus*. The optimal concentration is 2×10^{-1} M.

3) Q_{CO_2}/Q_{O_2} value varies by culture condition. The value attains the maximum in nitrogen anaerobic culture.

4) The existence of the TCA cycle was assured in aerobically cultured *M. rouxianus*.

5) Sodium malonate slightly inhibited the oxidation of succinate by this organism.

多くの糸状菌類において、栄養体生長の際に環境条件を変えると、菌体は糸状形に或は酵母形になる (二形性: dimorphism)。菌類の dimorphism は古くより多くの研究者によって知られているが、*Mucor* 属に関しては Berkely (1838), Bail (1857) により初期の研究がなされている。以後分類学或は系統学の方面の研究者によって多数の研究がなされ、近年形態と生理との関連性を解明しようとする生物学上の一般的な動向もあって、この dimorphism の研究はますます活発になっている。その中でも Bartnicki *et al.* 1, 2, 3, 4) (1961, 1962) は特に *M. rouxianus* を用い特に広範囲な研究をしている。Bartnicki によれば *M. rouxianus* は空气中で好氣的に培養すれば通常の糸状を呈し二酸化炭素による嫌氣的条件のもとでは酵母形の生長をする。また酸素の存在は二酸化炭素の酵母形化効果を弱める。また彼等は種々の条件下における形態的变化および菌体成分の分析を比較的にスタティックな観点に立っておこなっている。

この報告においては筆者は生理学的な立場より、*M. rouxianus* の諸性質を調べようとしたものである。

本文に入るに先立ち、論文作成上種々の便宜と助言を賜った鳥取大学医学部及川俊彦教授に



Fig. 1. Normal filamentous cells of *Mucor rouxianus* cultured on slant agar YPG medium.

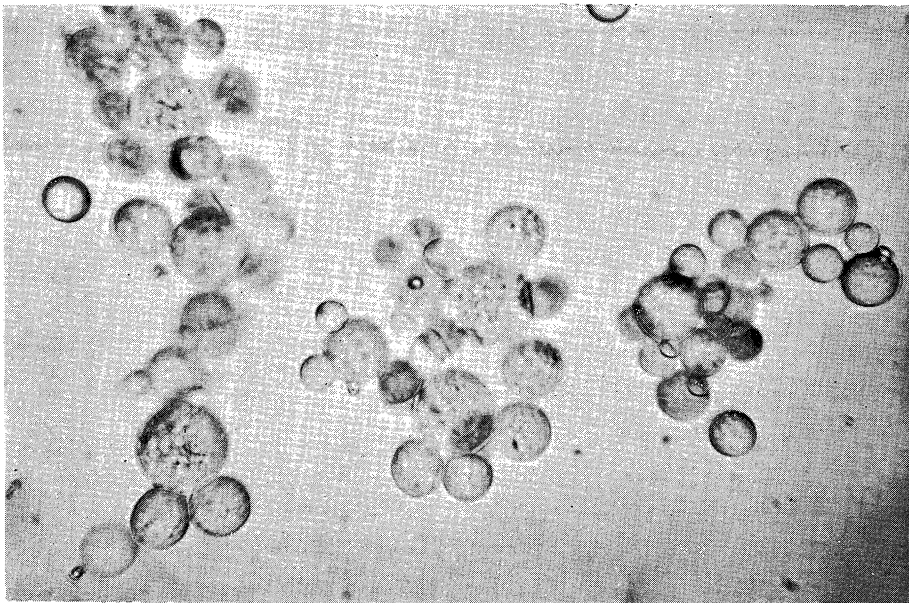


Fig. 2. Yeast form cells of *Mucor rouxianus* anaerobically cultured by CO_2 in liquid YPG medium.

謹しんで感謝の意を表す。なお本実験は上田育子氏* の共力のもとにおこなわれたものであることを特に附記しておく。

材 料 お よ び 方 法

材 料

実験に用いた *Mucor rouxianus* IAM 6130は、東京大学応用微生物研究所から恵送を受けた。

培 養 基

stock culture は馬鈴薯培養基, preculture には合成培地 (Y P G 培地) を使用した。その組成は次のとおりである。

酵母エキス	3 g
ペプトン	10g
グルコース	20g
蒸 溜 水	1000 ml
pH	4.5
培養温度	30°C

振盪培養は、300 ml エルレンマイヤーフラスコ中に培養液 50 ml を入れ、reciprocating shakerを用いた。

二酸化炭素による嫌気培養は Fig. 3 の如き装置を用いて発生させた二酸化炭素を培養フラスコ内に置換しておこなった。

試料作成

生長した菌は遠心分離機を用い蒸溜水で3回洗う。その後1時間振盪して、ホモジナイザーで懸濁液を作り試料とする。

呼吸および発酵の測定方法

呼吸・発酵の測定および呼吸阻害実験はすべて 30°C でおこなった。呼吸阻害剤としては、弗化ソーダ、マロン酸、シアン化カリウムを用いた。シアン化カリウムは苛性ソーダに吸収されて阻害度が減少するので、30分間測定後すばやく添加し、続けて測定をする。

脱水素酵素実験

脱水素酵素の実験には、ツンベルグ管を使用し、その内容液は次の組成にした。

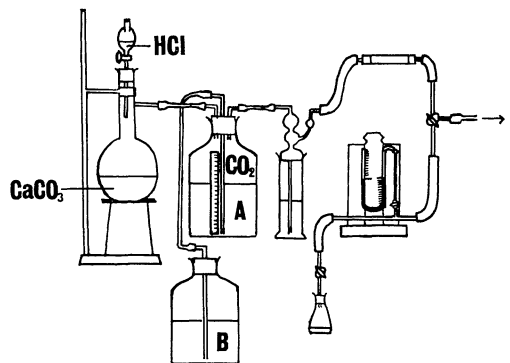


Fig. 3. Ventilation apparatus for anaerobic culture.

* 鳥取大学医学部第2生理学教室

主 室	{	水素供与体溶液	1.0 ml
		緩衝液 ($6.7 \times 10^{-2} M$ 酸性フタル酸緩衝液)	
		pH 4.5	0.4 ml
		メチレン青溶液 ($1 \times 10^{-4} M$)	0.1 ml
側 室 菌懸濁液			
反応温度		30°C	

実 験 結 果

I 菌体増殖曲線

液体培養において好氣的に振盪した時と、空気のもとで静置した場合の菌体の増殖度をまず調べた(Fig. 4)。振盪培養では24~60時間が対数増殖期にあたるが、静置培養では48~84時

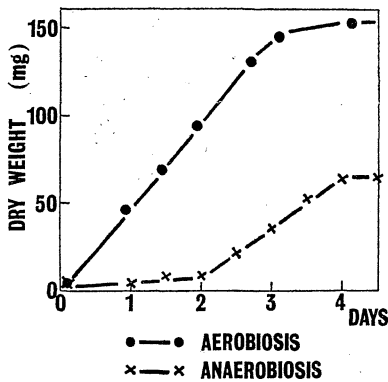


Fig. 4. Growth curve of *M. rouxianus* incubated under aerobic and anaerobic condition.

間が対数期であった。増殖量に関しては振盪培養と静置培養の比は約3:1という値を得た。

以上の結果から実験試料の培養は振盪培養では48時間、静置培養では72時間おこなった。

II 種々の糖の酸化能

グルコース酸化の際の最適濃度をしらべた(Fig. 5)。最終濃度 $4 \times 10^{-1} M$, $3 \times 10^{-1} M$,

$2 \times 10^{-1} M$, $1 \times 10^{-1} M$ のグルコースを呼吸基質として与えた場合の酸化能に関しては、 $2 \times 10^{-1} M$ が最適濃度である事がわかった。他の糖(フラクトース, サッカロース, ガラクトース, グリセリン等)を基質にした時にも最適濃度は $2 \times 10^{-1} M$ であった。

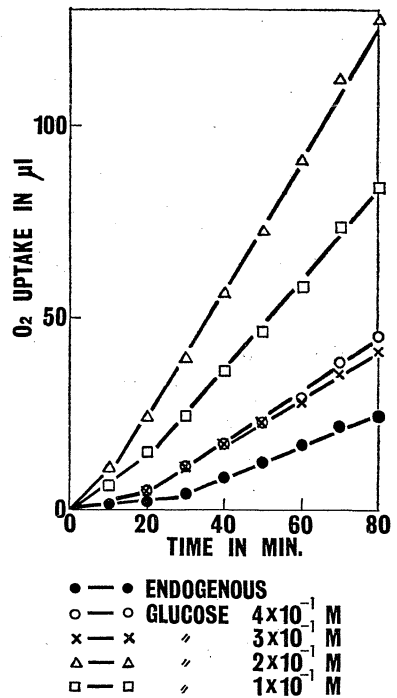


Fig. 5. The effect of substrates for respiration of *M. rouxianus*.

次にこれらの糖の酸化速度を比べてみた (Fig. 6)。グルコース、フラクトースおよびサッカロースはともによく利用されてほとんど差がない。ガラクトースおよびグリセリンもよく酸化されるが前三者より、かなり速度は小さい。

III Q_{CO_2}/Q_{O_2} 値測定

Q_{CO_2}/Q_{O_2} 値測定の結果、各基質により、また培養条件により、種々の異った値が得られた (Table 1)。嫌氣的に培養したものは当然 Q_{CO_2}/Q_{O_2} 値は高くなっているが、同じ嫌気条件でも窒素処理は二酸化炭素処理より高い値を示している。また嫌気条件では、サッカロースにおける場合よりグルコースの方が大きな Q_{CO_2}/Q_{O_2} 値を示した。

IV ツンベルグ管使用による脱水素酵素実験

M. rouxianus においては、自家呼吸量が高く添加呼吸の活性が明確に得られない場合がある。従ってワールブルグ検圧法による測定のかたわら、ツンベルグ管法による脱水素酵素実験も行った。振盪培養により好氣的条件下で生育した菌

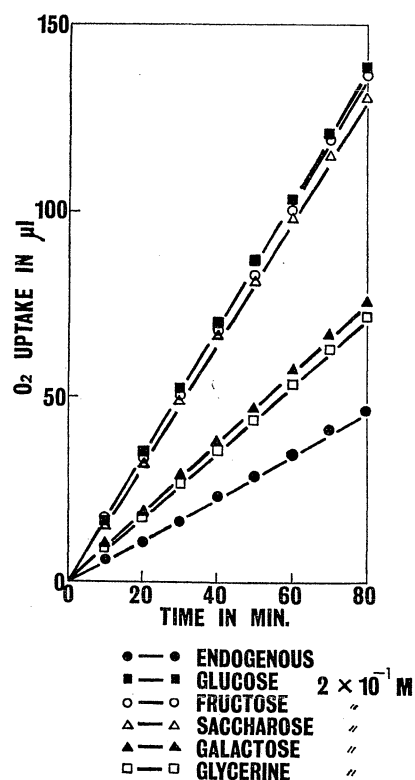


Fig. 6. Respiratory activity of *M. rouxianus* on various concentration of glucose.

Table 1. Q_{CO_2}/Q_{O_2} value by *M. rouxianus* cultivated under aerobic and anaerobic condition

substrate	glucose	saccharose	glycerine	galactose
enviromental condition				
air	1.1	1.1	—	0.94
N ₂	11.7	4.9	—	1.6
CO ₂	4.6	2.8	1.5	—

体のメチレン青還元脱色時間は、コハク酸を水素供与体とした時、最も短かった (Table 2)。TCAサイクルの中間物質が明瞭に酸化されている点よりTCAサイクルの存在が確認された。

V 呼吸阻害実験

TCAサイクル中のクエン酸、コハク酸、 α -ケトグルタル酸、フマル酸、リンゴ酸を呼吸基質として Q_{O_2} を測定した結果、 α -ケトグルタル酸、クエン酸は自家呼吸量と比較して、顕著な添加呼吸を示さなかった。他の三者の中でコハク酸を基質とした場合が最大呼吸量を示した。よってコハク酸を基質として呼吸阻害実験をおこなった。

Table 2. Methylene blue reduction time by *M. rouxianus* in Thunberg tube

		endogenous	glucose	ethanol	lactate	citrate	α -keto-glutarate	succinate	fumarate	malate
		ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml
main chamber	substrate (1M)	—	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	M/15 buffer PH4.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	1×10^{-4} M Methylene blue	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	distilled mater	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—
side arm	suspension	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Methylene blue reduction time		23'	10'	2'11"	2'22"	15'	12'	2'	15'	20'

1) マロン酸ソーダによる阻害

マロン酸ソーダの阻害度が50%になるためのK値 (=コハク酸濃度/マロン酸濃度)を知るために、マロン酸濃度(最終濃度) $1 \text{ M} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ の範囲で実験をおこなった (Fig. 7)。

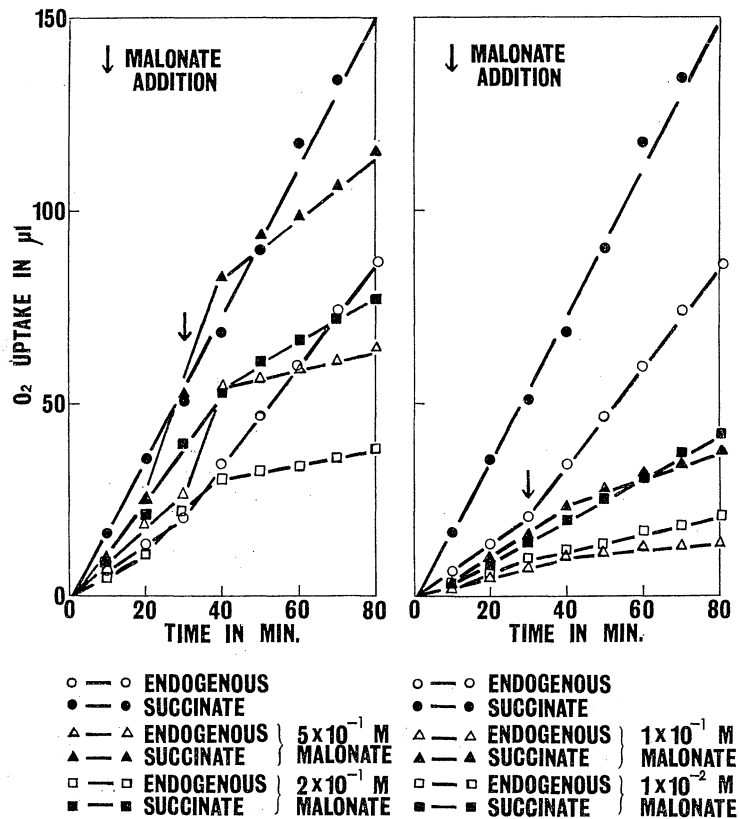


Fig. 7. The effect of sodium malonate on oxygen uptake by *M. rouxianus*.

これらの結果より、好氣的条件で培養した *M. rouxianus* においては、コハク酸酸化がマロン酸で阻害される事がわかり、TCAサイクルの存在も明確である。この際のKの値は比較的に小さく2であった (Table 3)。

Table 3. The degree of inhibition for sodium succinate catabolism by sodium malonate

Malonate (Mol)	5×10^{-1}	2×10^{-1}	1×10^{-1}	1×10^{-2}	1×10^{-3}
substrate					
endogenous	20.3	14.2	14.6	0	0
sodium succinate	82.5	58.0	47.0	19.5	0

Table 4. The degree of inhibition for sodium succinate catabolism by potassium cyanide

potassium cyanide (Mol)	5×10^{-4}	3×10^{-4}	2.5×10^{-4}	1.7×10^{-4}	1.4×10^{-4}	1.25×10^{-4}	1×10^{-4}
substrate							
endogenous	100	85.0	80.5	83.3	21.9	15.0	0
sodium succinate	100	94.2	100	90.7	41.3	53.0	0

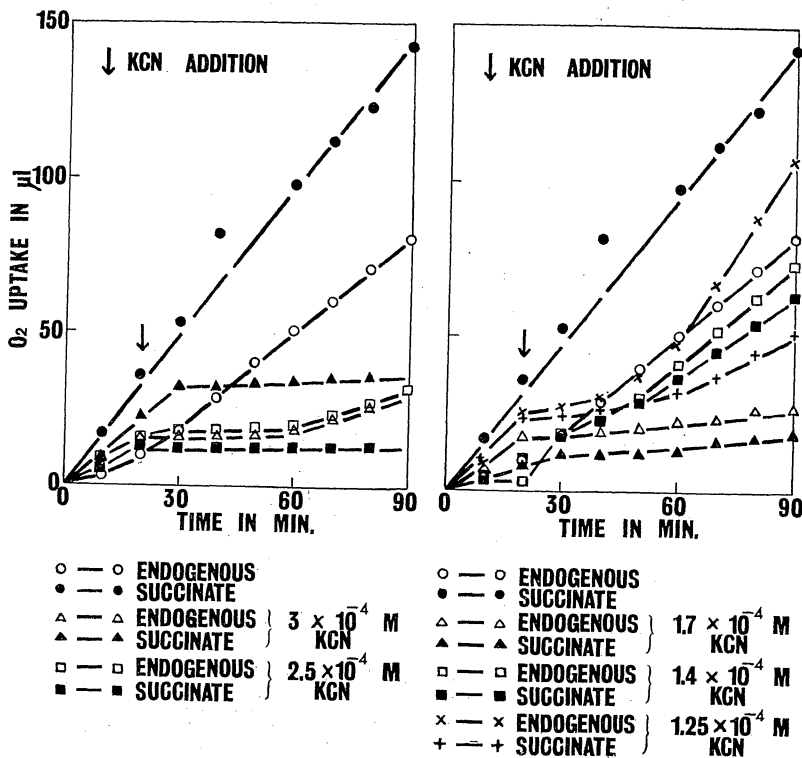


Fig. 8. The effect of potassium cyanide on oxygen uptake by *M. rouxianus*.

2) シアン化カリウムによる阻害

シアン化カリウムによる呼吸阻害の影響を調べるために、まずシアン化カリウムの最終濃度 $1 \times 10^{-2}M \sim 1 \times 10^{-4}M$ の範囲でおこなった (Table 4, Fig. 8)。シアン化カリウムは $1.7 \times 10^{-4}M$ の低濃度においても十分に阻害を与えている。

3) 弗化ソーダによる阻害

基質をグルコースとして使用して、 $5 \times 10^{-1}M \sim 1 \times 10^{-2}M$ 弗化ソーダで阻害濃度の限界を確かめたい (Table 5, Fig. 9) この場合は青酸カリの場合と異なり、添加呼吸より自家呼吸の方に大きな阻害を与えた。

Table 5. The degree of inhibition for sodium succinate catabolism by sodium fluoride

sodium fluoride (Mol)	2×10^{-1}	1.5×10^{-1}	1×10^{-1}	5×10^{-2}	1.25×10^{-2}	1×10^{-2}
substrate	%	%	%	%	%	%
endogenous	82.5	62.5	24.9	11.2	5.0	0
glucose	47.9	35.0	20.5	0	0	0

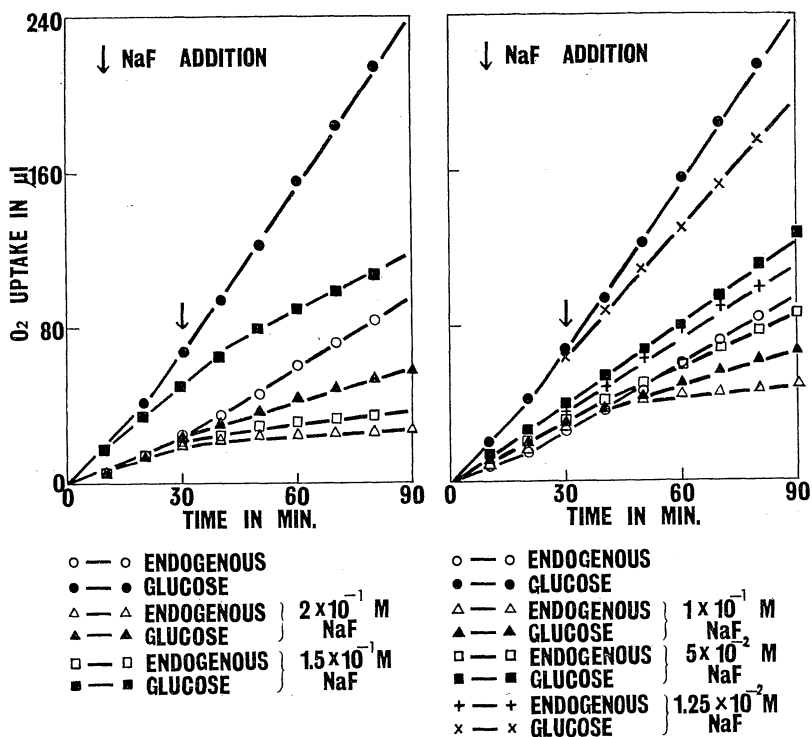


Fig. 9. The effect of sodium fluoride on oxygen uptake by *M. rouxianus*.

論 議

本実験の最初の部分は Bartnicki-Garcia 等の実験の追試の意味を含んでいる。その結果は彼等の報告のとうり、二酸化炭素の条件下の培養では酵母形を生じ、窒素の条件下では糸状形を生じた。

M. rouxianus は他の一般の大型細胞の生物と同様に非常に大きな自家呼吸量を持っている。これに対して30°C, 5時間の starvation を行なったがほとんど低下の効果はなかった。従がって、種々の呼吸基質の添加効果をマンメトリックに測定するにはやや困難な性質を持つ実験材料である。マロン酸阻害実験において、マロン酸添加後、10分間はかえって呼吸量は増加し、その後阻害が現われた。これはマロン酸阻害剤の場合にのみ見られる現象であったが、その原因は不明である。またマロン酸阻害実験においてK値を求めてみた。一般に筋肉では10、酵母では60という値が報告されている。しかし本実験においては $K=2$ という値を得た。この事は *M. rouxianus* においてマロン酸阻害があまり sensitive ではないという一つの証明になる。弗化ソーダの阻害は本菌においても認められ、ピルビン酸フォスホキナーゼの存在が証明された。しかし一方自家呼吸に対する阻害度もかなり大であった。シアン化カリウム阻害は、コハク酸を基質として検圧した時、明らかに阻害が起り、完全阻害を起すのに必要な濃度は $1.7 \times 10^{-4}M$ であった。これらの事から、好氣的に培養した糸状の *M. rouxianus* ではTCAサイクルを経る呼吸系が存在する事が考えられる。呼吸阻害効果に関しては、コハク酸を呼吸基質とした時にのみ現われ、他のグルコース、乳酸、アルコール、 α -ケトグルタル酸、フマル酸、リンゴ酸等を基質にした時には見られなかった。また好氣的培養をした菌において阻害度が大きかったが、これは Bartnicki-Garcia 等の糸状形、酵母形両者に等しく作用するという説と少し異なる結果となった。

結 論

糸状菌 *Mucor rouxianus* について若干の生理学的研究を行なった。

1. 振盪培養では定常期に達するに72時間を要したが、静置培養では96時間を要した。増殖量の比は、振盪培養/静置培養 = 3 : 1 という値を得た。
2. 呼吸基質としてはグルコースが最も良く、その最適濃度は $2 \times 10^{-1}M$ であった。
3. Q_{CO_2}/Q_{O_2} 値は培養条件によって異り、窒素中で培養した時が最大となり、次に二酸化炭素、空気の順であった。
4. グルコースの代謝過程に関しては、好氣的に培養した菌体でTCAサイクルの存在が認められた。
5. 阻害剤としてのマロン酸ソーダは本菌に対して比較的阻害度が低い。

参 考 文 献

- 1). BARTNICKI-GARCIA, S., and NICKERSON, W. J. 1961. *J. Bacteriol.* **82** : 142-148.
- 2). _____ , and _____ 1962. *Ibid.* **84** : 829-840.
- 3). _____ , and _____ 1962. *Ibid.* **84** : 841-858.
- 4). _____ , and _____ 1962. *Biochem. et Biophys. Acta* **58** : 102-119.
- 5). KELLENBERGER, E., RYTER, A., and SÉCHAUD, J. 1958. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4** : 671-686.

[MANUSCRIPT RECEIVED SEPTEMBER 6, 1965]