

鳥型結核菌の乳酸々化酵素について

第1報 鳥型結核菌より抽出したる一新乳酸々化酵素について

大阪市立医科大学 刀根山結核研究所 (指導 渡辺三郎教授)
 国立療養所 刀根山病院 (院長 渡辺三郎博士)

楠瀬正道・村瀬恵美・山村雄一

(昭和26年4月5日受付)

[本論文の要旨は第一回及び第二回日本結核病学会近畿地方会において発表した]

最近われわれは結核菌の物質代謝について一連の研究を行つているが⁽¹⁾、その実験方法は主として生菌浮游液を酸化酵素系とみなして、これに種々の基質を添加し、検圧的に酸素消費を測定追究することによつて行われた。しかし菌体内の物質代謝の機作をより詳細に把握するためには細胞を用いる実験と共に、一方菌体より強力な酵素系を抽出して問題を単一化することが望まれる。さきに(1949年)われわれは菌体よりはじめて検圧的に定量できる強力な乳酸々化酵素が抽出されることを見出した⁽²⁾。乳酸々化酵素は広く生体内に分布する重要な酵素として、古くから多数の研究が行われており⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾、その酵素的性状も区々である。しかしてわれわれが鳥型結核菌より得た乳酸々化酵素は従来報告された他のいずれの酵素とも異つていると考えられる。

実験の部

酵素の抽出法並びに測定法

鳥型結核菌の竹尾株を使用した。培地の組成はカツラエキス 20g, ペプトン 20g, 食塩 2g, グリセリン 50cc および蒸留水 1l である。通常同時に 300cc 培地10個に、鳥形菌の菌苔数個を植継いで、37°C. 4日間培養後、集菌し菌苔を生理的食塩水でよく洗滌し、プフナー漏斗上に移して、少量のアセトンを繰返し注ぎ吸引し、菌体を乾燥器中に置いて室温で真空乾燥する。3lの培地より約40gの乾燥菌体を得る。40gの乾燥菌を300cc 磷酸塩緩衝液(0.005M. pH 7.5) とともに磨砕し、2日間水室中で自己融解させ、30分間10,000回転で遠心分離して得た黄色上清液を粗製酵素製品とする。残渣は再び磷酸塩緩衝液に懸濁し、自己融解を繰返して抽出する。時に3回目の自己融解抽出液も活性を有することがある。この粗製酵素液は数日間0°Cで活性を保存する。

乳酸の酸化の測定は Warburg 氏検圧計で次の条件

によつて行う。

主 室 酵素抽出液 2.0c.c. 磷酸塩
 緩衝液 (pH6.2, 0.2M 溶液) 0.3c.c.
 側 室 dl 乳酸ソーダ (3M) 0.1c.c.
 中央小室 20% KOH 0.3c.c. 温度 37°C.
 空気中にて測定

揮発性酸の定量は次の如くで行う。3g 無水 $\text{Na}_2\text{S O}_4$ 、及び 1.5c.c. Conc. H_2SO_4 を小さい Kjeldahl のフラスコに入れ、これに三塩化醋酸で除蛋白した後の反応液 1c.c. を加え蒸留水で全容 6c.c. とする。これを40分間水蒸気蒸溜し、後溜液を CO_2 -free の $1/100$ M. NaOH を用いて滴定し、生成揮発性酸量を定量する⁽⁸⁾。焦性ブドウ酸の定量は (Lift-Cook法⁽⁹⁾)によつて行つた。乳酸の定量は硫酸セリウムによる次のような反応の結果生ずる炭酸ガス量を検圧的に測定して行う。 $(\text{H}_3\text{CHOH COOH} + \text{Ce}^{++++} \longrightarrow \text{H}_3\text{CHO} + \text{CO}_2 + \text{Ce}^{+++})$ 但し焦性ブドウ酸も硫酸セリウムにより酸化を受けるのでこの酸が生成物として存在すると考えられる場合には上の方法は適用できないので、次のような方法を考案した。パン酵母 100g をアセトン乾燥粉末となし、これを $1/15$ M. Na_2HPO_4 溶液 200c.c. に懸濁し、37°C で3時間自己融解させて、その上清を遠心分離して集め、これを乳酸脱水素酵素製品とする。被検液を 95°C 5分間加熱し、これと上記酵母乳酸脱水素酵素との混合液を Warburg 氏検圧計容器中に入れ、被検液中の乳酸を酵母の酵素で酸化させ、その酸素消費から乳酸量を定量する。その反応条件は次の如くである。

Warburg氏検圧計

主 室 酵母乳酸脱水素酵素溶液 1.0c.c.
 磷酸塩緩衝液 (pH6.2 0.2M) 0.5c.c.
 加熱試料 1.0c.c.
 側 室 メチレン青 (0.5%) 0.3c.c.
 中央小室 KOH (20%) 0.3c.c.

温度 37°C. 空気中にて測定

乳酸量はこの酵母酵素製品により消費された酸素量の2倍に相当する。

チトクロームC並びにチトクローム酸化酵素製品はいずれも Keilin and Hartree⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ 法に従つて得た。

実験結果

(1) 基質特異性

この酵素抽出液は直接酸素分子によつて乳酸を酸化する(第一表)。リンゴ酸, 酒石酸, 焦性ブドウ酸, 醋酸, 琥珀酸, 酪酸, グルタル酸, グルタミン酸, コハク酸, α-グリセロリン酸, アラニン, チロジン, システイン, グリセリン, 酒精, およびブドウ糖は酸化されない。

(2) メチレン青の影響

終末濃度 $1/500M$ の割合にメチレン青を添加すると, 乳酸の酸化は 30~50% 増加する。次にこの酵素液を 53°C 15分間加熱すると活性は全く消失し, これにメチレン青を加えると, 酵素活性の回復をみると, その回復の程度は加熱前の液がメチレン青で活性化されたのと同程度である(第一表)。

第一表 メチレン青の影響

各 Warburg 氏容器中に磷酸塩溶液 (pH6.2, 0.2M) 0.2c.c. 乳酸ソーダ (1M) 0.1cc を添加

原酵素溶液	加熱	酵素液	メチレン青	60分の酸素消費量
			0.5%	C.M.M.
2.0	c.c.	—	c.c.	100
2.0	—	—	0.2	212
—	2.0	—	—	3
—	2.0	—	0.2	125

この事実から, この酵素抽出液は異つた2種の乳酸々化酵素を含んでおり, 一は熱に不安定 (53°C 15分加熱で完全に破壊) で, 他よりメチレン青の添加を要せず直接酸素分子と反応しうるものであり, 他は熱に比較的安定 (53°C 15分加熱に安定) で, 酸素分子との反応にはメチレン青の如き水素受容体を必要とするものであると考えられる。

菌の生育並びに抽出条件によつては, 前者の酵素のみを含む抽出液の調製も可能であり, 本報では前者の酵素(直接酸素分子と反応し水素受容体の添加不要)の性状について以下に報告する。これより酵素と記すのは前者のみを指す。

(3) 酵素の一般的性状

(a) Michaelis 恒数は約 $5 \times 10^{-2} M$ である。この値は他の酵素のそれより大きい値である(第二表)。

第二表 種々の酵素の Michaelis 恒数

酵 素	Michaelis 恒 数	文 献
本酵素	$5 \times 10^{-2} M/l$	(17)
α-オキシ酸酸化酵素	2.4×10^{-3}	
変形菌の L-アミノ酸酸化酵素	6×10^{-3}	Stump, P.K., and Green D.E., : J.B.C. 155,387 (1944)
大腸菌の焦性ブドウ酸酸化酵素	1.2×10^{-1}	Still, J.L., B.J. 35, 380 (1941)
α-グリセロリン酸脱水素酵素	5.1×10^{-3}	Cori, G.T., et al J.B.C.173.605(1948)

(b) 至適 pH は約 6.0 である。

(c) 賦活エネルギーは約 12,845 cal/mol である。

(第三表より計算)

第三表 温度の影響

温 度	速度恒数 k	log k
27°C	103 CMM	1.70
32°	134	1.82
37°	203	2.00

k は 1 時間の乳酸々化による酸素消費量である。

この値は淋菌の乳酸々化酵素について測定した 14,902 cal/mol⁽⁶⁾ なる値と略々等しい。

(d) 阻害剤の影響 第四表に種々の阻害剤の影響を示す。青酸, アジド, およびトロポロンに insensitive な点は, この酵素系中に重金属の欠如を示している。また焦性ブドウ酸によつて阻害されない点は他の乳酸々化酵素と異つている。

第四表 阻害剤の影響

阻害剤	添加終末濃度	阻害%	阻害剤	添加終末濃度	阻害%
青酸ソーダ	$4 \times 10^{-3} M$	0	焦性ブドウ酸	$4 \times 10^{-2} M$	0
ナトリウムアザド	4×10^{-3}	0	ヨード醋酸	8×10^{-3}	0
トロポロン	7×10^{-4}	0	弗化ソーダ	8×10^{-3}	0
硝酸銀	3.3×10^{-4}	100	マロン酸	5×10^{-3}	0
硫酸銅	3.3×10^{-4}	100	亜硫酸	2.5×10^{-3}	0

(e) 透析の影響 蒸留水に対して 0°C, 48時間透析することにより活性は殆ど減少しない。この事実は容易に解離しうる助酵素の欠如を示している。

(f) チトクロームCおよびチトクローム酸化酵素系の影響 本酵素液にチトクロームCおよびチトクローム酸化酵素を添加したところ, 全く影響をみとめることができなかった(第五表 1~4.7)。

また本酵素液中のチトクロームC乃至チトクローム酸化酵素の活性をヒドロキノンの酸化によつて検したがその存在はみとめられなかつた(第五表 5~7)。

第五表 チトクロームCおよびチトクローム酸化酵素の影響並びに酵素液によるヒドロキノン₂の酸化

各 Warburg 容器中に磷酸塩溶液 (pH6.2, 0.2M) 0.2c.c., 酵素液2.0c.c. を添加

容器番号	乳 3 M	ヒドロキノン 1/50M	チトクロームC	チトクローム酸化酵素	60分の酸素消費量 [△]
1	0.1 c.c.	— c.c.	0.4 c.c.	0.8 c.c.	295 ^{CMM}
2	0.1	—	0.4	—	305
3	0.1	—	—	0.8	320
4	0.1	—	—	—	306
5	—	0.5	0.4	—	0
6	—	0.5	—	—	0
7	—	0.5	0.4	0.8	98 [*]

△ 各基質の酸素消費量よりそれぞれの対照の酸素消費量を減じた値である。

* 酵素液を添加していない。

〔4〕 反応の機作

Warburg 氏容器中で数時間反応後、反応液を除蛋白した上清について焦性ブドウ酸の定量を試みたがその生成をみとめることは不成功に終わった。又 Warburg-Yabusoe⁽¹²⁾ の方法によつて呼吸商の測定を行うと酸素消費量と略々等モルの炭酸ガスの発生をみとめた。さらに、酵母の乳酸脱水素酵素を用いて反応後の内液中の残存乳酸量を定量すると、乳酸1モルに対して等モルの酸素消費が起ることが明らかになった。

その成績は第六表に示す。

第六表 反応物質の定量

実験 No	乳酸消費量 μM	酸素消費量 μM	揮発性酸生成量 μM	炭酸ガス生成量 μM
1	17.6	17.6	12.8	/
2	/	71.2	68.8	74.0

第七表 種々の乳酸 α 化酵素の性質の比較表

所 在	酵素分子との反応		コチマセの必要	反応生成物	基質特異性
	直接	メチレン青の必要			
鳥型結核菌	+	-	-	醋酸	
動物組織 ⁽³⁾	-	+	+	焦性ブドウ酸	
酵 母 ⁽⁴⁾	-	+	+	同 上	
大腸菌 ⁽⁵⁾	-	+	-	同 上	
淋 菌 ⁽⁶⁾	-	+	-	同 上	
ハツカネズミの腎臓 ⁽¹⁶⁾	+	-	-	同 上	α-アミノ酸
緑葉植物 ⁽¹⁷⁾	+	-	-	同 上	アリコニール酸

従つて生成揮発性酸を醋酸と仮定すると次式〔1〕がこの酵素により catalyze されると考えられる。 $CH_3CH(OH)COOH + O_2 \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + H_2O \dots [1]$

考 按

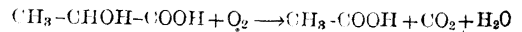
以上の実験結果からこの酵素の本態は不明であるが、酸素分子と直接反応し、メチレン青やチトクロームC系の添加を必要としない点で、従来よく知られた動物組織 (Meyerhoff)⁽³⁾ 酵母 (Pernheim⁽⁴⁾, 奥貫⁽¹³⁾ Dixon⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ et al) および細菌 (Stephenson⁽⁵⁾, Barron⁽⁶⁾) の乳酸脱水素酵素とは明らかに構造を異にしている。

しかし最近ハツカネズミの腎臓よりα-アミノ酸 α 化酵素 (Blanchard et al⁽¹⁶⁾) および緑葉植物から α-オキシ酸 α 化酵素 (Clagetti⁽¹⁷⁾) が発見され、これらはいずれも乳酸を直接酸素分子により酸化するもので、この点本酵素はむしろこれらの新しい二つの酵素に類似しているが、乳酸以外の基質特異性、反応生成物およびその他の点で同一であるとはできない。第七表に乳酸の酸化を catalyze する既知の酵素と本酵素との性質の比較を示す。

従つて本酵素は、従来報告された乳酸 α 化酵素とは明らかに異つた新しい酵素であると考えられる。しかしこの実験に使用した酵素製品は不純であるため上述のことを断定することはできない。

総 括

鳥型結核菌より乳酸 α 化酵素を抽出し、その一般的性質並びに作用機作につき実験を試み、その成績を報告した。この酵素は (1) 直接酸素分子と反応し、メチレン青及びチトクロームC系の添加が不要である。(2) 青酸及びアザドに insensitive である。(3) 容易に透析しうるような助酵素を欠如している。(4) 異常に高い値の Michaelis 恒数等の性質を有し、かつ、(5) 次式を catalyze して他の乳酸脱水素酵素のように焦性ブドウ酸を生成するとは考えられない。



以上の諸点より本酵素はおそらく新しい酵素であると思像される。

終りに、御指導と御校閲を賜つた恩師渡辺三郎教授ならびに大阪大学理学部、赤堀四郎教授に深謝の意を表す。

文 献

1. 山 村：酵素化学の進歩第2輯 (1950)
2. 楠瀬, 村瀬, 山村：第一回日本結核病学会近畿地方会(1949)

3. Meyerhoff, O., : Arch. ges. Physiol., 175 ; 20 (1919)
4. Bernheim, F., : Biochem. J., 22 ; 1178 (1928)
5. Stephenson, M., : Biochem. J., 22 ; , 605 (1928)
6. Barron. E. S. G., and Hasting S. A. B., : J. Biol. Chem., 100 ; 155 (1933)
7. Green, D. E., and Brousteaux, J., : Biochem. J., 30 ; 1489 (1936)
8. Quastel, J. H., and Webley D. M., : Biochem. J., 35 ; 192 (1941)
9. Clift, F. P., and Cook, R.P., : Biochem. J., 26 ; 1788 (1932)
10. Keilin, D., and Hartree, E.F., : Proc. Roy. Soc (London) B ; 122. 298 (1937)
11. Keilin. D., and Hartree, E. F., : Proc. Roy. Soc. (London) B 125 ; 171 (1938)
12. Warburg. O., and Yabusoe, : Biochem. Z, 146 ; 380 (1924)
13. Okunuki. K., : Acta. Phitochim., 11 ; 65 (1939~40)
14. Dixon, M., and Zerfas. L. G., : Nature., 143 ; 557 (1939)
15. Bach. S. J., Dixon, M., and Zerfas, L. G., : Nature., 149 ; 48 (1942)
16. Blanchard, M., Green, D. E., Nocito, V., and Ratuer, S., : J. Biol. Chem ; 155, 421 (1944) ; Ibid. 161:588 (1945)
17. Clagett. C. O., Tolbert, N. E., and Burris, R. H., : J. Biol. Chem ; 178, 977 (1949)

◇ 結核予防会

出版案内

東京都千代田区神田三崎町一ノ二
(振替東京三三三〇〇)

結核文献の抄録速報

主幹 隈部 英雄

隈部 英雄 編

結核 集団検診の実際

B5判 340頁 950円(〒共)

集検を全国的に統一しようとして関係各機関と連携の上編まれた権威書、集検の指針として結核の管理に欠くべからざる良書、凡そ結核に関係ある医師、技術者、保健婦などの必携の書であると、各方面より推奨の声が多く寄せられている。

☆

日本における

結核の実際

B5判 240頁 350円(〒共)

蔓延の状況、損害、施設の現状、療養の実際、社会の認識、結核対策等を新資料に基いて述べた結核白書であり、結核調査、統計の決定版である。

発刊以来一ケ年を経、抄録する文献の数も国内一三八誌、外国二三誌の多きに上り、いよゝその内容を充実して参りました。各関係者の研究面に此の上ない参考書であると存じます、部数が限られておりますので一日も早くお申し込み下さい。

B5判 約80頁

1部 150円

6ヶ月 900円

(〒共)