

鳥型結核菌の乳酸々化酵素について

(第 2 報)

大阪市立医科大学 刀根山結核研究所(所長 渡辺 三郎博士)

楠瀬 正道・楠瀬 恵美・山村 雄一

(昭和 26 年 10 月 2 日 受付)

緒 言

前報¹⁾において、われわれは(1)鳥型結核菌中に2種の性質を異にする乳酸々化酵素Ⅰ及びⅡが存在し、その一つすなわち酵素Ⅰは水素受容体の介入を要せずして直接酸素分子と反応するが、他の一つすなわち酵素Ⅱはメチレン青の如き水素受容体の添加を必要とする。(2)前者の、酵素Ⅰは青酸、アチドに insensitive、透析に安定、乳酸を醋酸と炭酸ガスとに分解する反応を catalyze する等の性質より、従来よく知られている動物組織、微生物の乳酸々化酵素とは異つた新しい酵素であると報告した。その後、われわれは前者の酵素Ⅰを精製して以上の点を更に明らかにしたので、本報では主としてこの精製酵素Ⅰに関する実験成績を報告する。

実 験 の 部

(1) 実験方法

(i) 酵素の活性並びに乳酸、焦性ぶどう酸及び揮発性酸の定量法はいずれも前報¹⁾と同様である。

(ii) コチマーゼ(D.P.N.)、アデノシン3磷酸(A.T.P.)、リボフラビン磷酸(F.M.N.)及びカタラーゼはそれぞれ Williamson & Green²⁾、Le Page³⁾、Kuhn⁴⁾及び Sumner⁵⁾の方法に従つて分離又は合成した。フラビンアデニンチマクレオチド(F.A.D.)は大阪大学医学部久生生理学教室より譲与されたものである。なお、酵素試料中に含まれる F.A.D. の定量法は後述する。

(2) 酵素の精製法

われわれは、第1表に示す方法で酵素の精製を行った。カオリン、アルミナによる吸着、アセトン、アルコールによる沈澱等はいずれも酵素を非可逆的に不活性化するので使用できない。

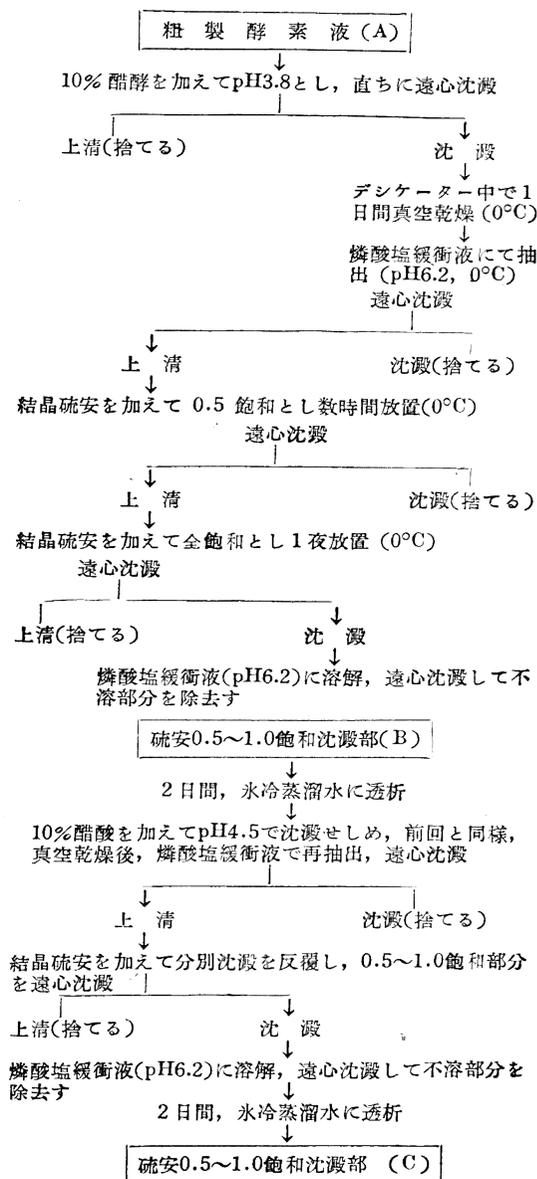
(3) 精製酵素の性質

以上の方法で精製した酵素製品(B)及び(C)による乳酸の酸化はメチレン青の添加により全く促進されない(第2表)。従つて、精製により、混在していた2種の乳酸々化酵素Ⅰ及びⅡが完全に分離され、酵素Ⅰのみ精製されたことが解る。これより本報で本酵素とあるのは酵素Ⅰのみを指すこととする。

さて、まず前報に報告した本酵素の諸性質を精製酵素(B)及び(C)液について確かめた所、いずれの性質についても全く同様の結果を得た。更に新しく得た成績を次に要約する。

第 1 表
精 製 法

鳥型結核菌(竹尾株)をグリセリン肉汁培地に培養(37°C, 5日間), 集菌, 法離後, 菌体をそのまま1日間凍結, 後 37°C で融解, 磷酸塩緩衝液(pH7.5)と共に磨砕, 再び凍結, 融解を反覆し, 更に1日間氷室に放置, 後遠心沈澱(10,000r.p.m.)して得た上清液を粗製酵素液(A)とする。



(i) D.P.N. 及び A.F.P. 等の添加により全く影響を受けない。

(ii) 磷酸塩緩衝液の代りにヴェロナール緩衝液を用いて酵素を抽出し、無機磷酸の影響を調べたが第3表の如く全く影響をみとめなかつた。

第 2 表

粗製(A)及び精製(B)酵素の乳酸々化に及ぼすメチレン青の影響

酵 素 製 品	酵 素 吸 取 量 /60分	
	—	M/100メチレン青 0.5cc 添加
(A)	190 μ l	283 μ l
(B)	144	133

第 3 表

無 機 磷 酸 塩 の 影 響

緩 衝 液 (pH7.0 M/5)	酵 素 吸 取 量		
	30 分	60 分	150 分
ヴェロナール- HCl 0.3cc	28 μ l	54 μ l	130 μ l
Na ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ 0.3cc	32	59	135

各ワールブルグ氏容器 : ヴェロナール緩衝液-抽出
酵素液 2.0cc; 3M 乳酸ソーダ 0.2cc ;
その他 H₂O 含有

(4) 助 酵 素 に つ い て

本酵素は $\frac{M}{10000}$ の硝酸銀及び $\frac{M}{3000}$ の硫酸銅溶液(終末濃度)で完全に阻害されるからフラビン酵素を予想せしめた。そこで酵素の蛋白部分より助酵素部分を分離する目的で Warburg & Christian⁶⁾ の方法に従つて酸性硫酸沈澱法及びその他の沈澱・吸着・加熱・透析等種種の方法を組合せて行つたが、殆んどすべての場合に酵素の非可逆的不活性化を招いて成功しなかつた。しかし数例において、F.A.D. の添加によつて乳酸の酸化が若干促進される結果を得た(第4表)。但し、その結果は一定でなくて再現性に富んでおらず、又 F.M.N. の添加は影響を受けない。

第 4 表 F.A.D. 及び F.M.N. の 影 響

使用 酵 素 試 料	添 加	酵 素 吸 取 量	
		9 0 分	180 分
(B)* 液→数時間氷 冷蒸留水に透 析した液	—	123 μ l	247 μ l
	F.M.N. 100 γ	129	285
	F.A.D. 20 γ	181	347
(B)* 液→アセトン にて沈澱せし め真空乾燥後 再抽出した液	—	68	168
	F.A.D. 20 γ	96	249

* (B) 液は(第1表)参照

次に酵素試料を 85°C, 15 分加熱した後遠心沈澱を行つてその上清液をとり、これに Warburg & Christian⁶⁾の方法に従つて豚の腎臓より分離精製した d-アミノ酸化酵素の蛋白部分並びに基質として dl-アラニンを加えてその酵素作用を調べ、所謂アラニン試験を行つた。第5表には、3日間透析した(遊離の F.A.D. を除去するため) (B) 液について行つたアラニン試験の実験例を示す。

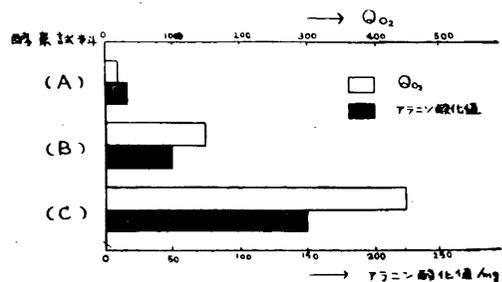
第 5 表 (B) 液のアラニン試験

d-アミノ酸々化酵素 (B-Protein)	0.4 ^{cc}	0.4 ^{cc}	0.4 ^{cc}
4% dl-アラニン	0.2	0.2	0.2
M/10 ヒロ磷酸塩 (pH8.3)	1.5	1.5	1.5
100 γ /cc F.A.D.	0.05 (5 γ)	—	—
加熱 (B) 酵素液	—	2.0	—
酵素吸取量 (μ l/30分)	178	60	2

第5表から、精製酵素 (B) 中にかなりの量(約 1~2 γ /cc) の F.A.D. が含まれていることを知つた。

次に本酵素の精製度と、酵素中に含まれている F.A.D. 量との関係を知りたいと考え、酵素試料(A), (B), (C)について乳酸々化の QO₂ と各試料毎 mg 中のアラニン試験による相対的 F.A.D. 含量(試料 1mg に対するアラニン酸化値)とを測定したところ第1図に示す成績を得た。

第 1 図 QO₂ と F.A.D. 含量 (/mg) との関係



以上の如く酵素の精製に伴つて QO₂ と F.A.D. 含量は共に増加しており両者の間に一定の平行関係がみとめられる。この成績からおそらく F.A.D. が本酵素の助酵素であろうと想像される。

(5) 過酸化水素の生成について

一般にフラビン酵素は酸素分子と反応して過酸化水素を生成することが知られているので、われわれはこれについて実験したが以下に示す如く過酸化水素の生成を証明することはできなかつた。

(i) 精製酵素中にもなお不純物としてカタラーゼを含んでいるが、靑酸又はアゼドを加えてこの作用を阻害しても乳酸々化の速度、R.O. 等は全く影響を受けない。

(ii) coupled oxidation' を行わせるために、アルコールを添加しても酸素吸収量に全く影響を与えない。

(iii) ペルオキシダーゼ作用をブルプロカリン試験によつて調べたがみとめることはできない。

(iv) 過酸化水素又は牛肝臓より得た精製カタラーゼを添加しても乳酸々化に無影響である。

本酵素の特性及び考察

前報¹⁾及び本報における成績を綜括すると本酵素の特性は

(i) 水素受容体の添加を要せずして直接酸素分子と反応する。

(ii) 異常に高い Michaelis 恒数を有する。

第 6 表 種々の乳酸々化酵素の比較

所 在	酸 素 分 子 反 応		助 酵 素	生 成 物	乳 酸 以 外 の 基 質 特 異 性	文 献
	直 接	水 素 受 容 体 の 介 入				
動 物 組 織	-	+	D.P.N.	魚性ぶどう酸		Meyerhoff 7)
酵 母	-	+	不 要	同 上		Bernheim 8)
大 腸 菌	-	+	不 要	同 上		Stephenson 9)
麻 菌	-	+	不 要	同 上		Barron 10)
二十日ネズミの腎臓	+	-	F.M.N.	同 上	l-アミノ酸 高級オキシ酸	Blanchard 11)
豚腎臓及び結核菌	+	-	?	同 上		Zeller 12)
緑葉植物	+	-	?	同 上		Clagett 13)
Micobacterium phoelei	+	-	F.A.D.	醋 酸		Edson 14)
本 酵 素	+	-	(F.A.D.)	醋 酸		

以上の特性及び比較表より、本酵素は明らかに 7)~13) の酵素とは異つた乳酸々化酵素であつて Edson¹⁴⁾ の酵素と類似したものと思われる。

結 論

われわれは鳥型結核菌より抽出した粗製酵素液を醋酸及び硫酸分別沈澱を反覆して精製し、

- 1) 2種の乳酸々化酵素中、一酵素のみを分離精製した。
- 2) その助酵素部分はおそらく F.A.D. であろうと想像される。
- 3) 本酵素は既知の乳酸々化酵素とは異つた種々の特性を有している。

〔本論文の要旨は第 2 回日本結核病学会近畿地方会、第 25 回日本生化学会総会、第 4 回酵素化学シンポジウムにおいて発表した。〕

稿を終るに臨み、恩師渡辺三郎教授並びに阪大理学部赤堀四郎教授に厚く感謝する。

文 献

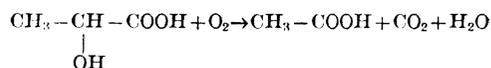
- 1) 楠瀬・村瀬・山村：日本結核病学会第 2 回近畿地方会(1950)発表，結核，第 27 卷，72 頁，1952。
- 2) Williamson and Green：J. Biol. Chem., 135,

(iii) 透析等により容易に解離しうる助酵素を有しない。

(iv) 青酸，アゼドに insensitive であるが微量の硝酸銀及び硫酸銅によつて完全に阻害される。

(v) F.A.D. を助酵素とし，蛋白部分と固く結合しているものと想像される。

(vi) 次の反応式を catalyze すると考えられる。



次に現在までに報告された乳酸々化酵素の比較表を示す。

(1940) 345.

- 3) Le Page：Manometric Techniques and Tissue Metabolism (1949) 204.
- 4) Kuhn and Rudy：Ber., 68, (1935) 383.
- 5) Sumner and Dounce：J. Biol. Chem., 127, (1939) 439.
- 6) Warburg and Christian：Biochem. Z., 298, (1938) 150.
- 7) Meyerhoff：Arch. ges. Physiol. (Pflügers) 175 (1919) 20.
- 8) Bernheim：Biochem. J., 22, (1928) 1178.
- 9) Stephenson：Biochem. J., 22, (1928) 605.
- 10) Barron and Hastings：J. Biol. Chem., 100, (1933) 155.
- 11) Blanchard, Green, Nocito and Ratner：J. Biol. Chem., 161, (1945) 583.
- 12) Zeller and Maritz：Helv. Physiol. Acta., 3, (1945) C19.
- 13) Clagett, Tolbert and Burris：J. Biol. Chem. 178, (1949) 977.
- 14) Edson：Biochem. J., 41, (1947) 145.