

結核菌のトリカルボン酸サイクルに関する研究

(第 1 報)

大阪市立医科大学 刀根山結核研究所

(所長 渡辺三郎教授)

楠瀬正道・楠瀬恵美

(昭和 27 年 6 月 21 日受付)

(本論文の要旨は第 4 回日本結核病学会近畿地方学会及び第 4 回日本生化学会総会において発表した)

トリカルボン酸サイクル (TCA サイクル) が動物組織の終末呼吸系に重要な役割を演じていることは殆んど確定的である。しかるに細菌に関しては, *Azotobacter agilis*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Aerobacter aerogenes*, 大腸菌等の多くの菌種について, 報告¹⁾が行われているにも拘らず TCA サイクルの存在を確証する決定的な事実をあげた例は殆んどない。われわれは結核菌が極めて好気的な細菌である点から TCA サイクルの存在を予想し菌体よりこのサイクルに関する諸酵素の抽出を試み, その結果大部分の酵素の抽出に成功し²⁾, またこのサイクルに関与する一部の反応はアセトン乾燥菌を用いて証明することができた³⁾。すなわち TCA サイクルの各 step の反応が菌体中に存在している。

実験方法

酵素の調製法

鳥型結核菌竹尾株を使用し, 培養条件は前報¹⁾と同様にして行つた。酵素の抽出は次のような方法に従つた。

i) 磨砕法: 菌体を集菌洗滌後乳鉢中で少量の石英砂と混合し約 30 分間磨砕し, ついで蒸溜水に懸濁して 1 夜氷室に放置する

(5°C)。後懸濁液を 12,000 回転, 40 分間遠心沈澱してその上清液を酵素製品とする。

ii) 凍結融解法: 菌体をそのまま 24 時間凍結した後 37°C で融解, この操作を反覆して蒸溜水に懸濁し, さらに氷室中に 24 時間放置して抽出を行う。

iii) アセトン乾燥法: 菌体を 20 分間多量のアセトン中に懸濁した後遠心沈澱してアセトンを除きついで濾紙上に薄層に拡げデシケータ中で真空乾燥してアセトン乾

燥菌を得る。このようにして得られたアセトン乾燥菌は氷室中に保存すると少なくとも 2 週間活性を失わない。この乾燥菌体を蒸溜水と混合し 1 夜氷室中に放置して酵素を抽出する。

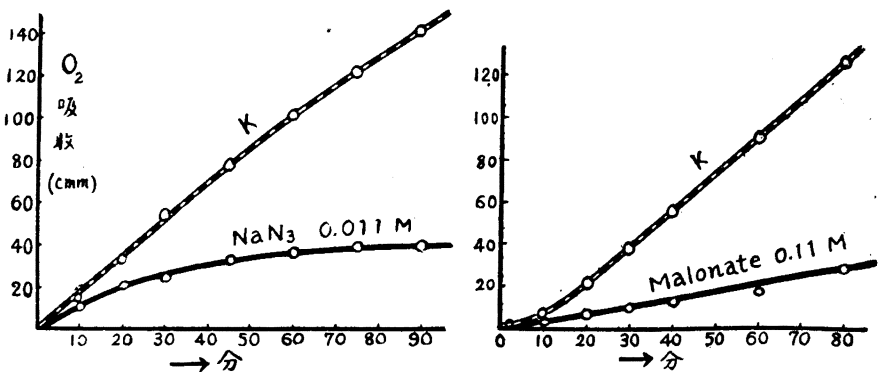
定量法

酸化酵素の活性は前報¹⁾と同様ワールブルグ検圧計を用いて測定した。但しクエン酸 α 化酵素の測定にはペロナール塩酸緩衝液 (0.1 M, PH 6.0) を, その他は磷酸塩緩衝液 (0.2 M) を使用した。コハク酸・L-リンゴ酸・焦性ブドウ酸 (α -ケト酸)・クエン酸及び α -ケトグルタル酸の定量はそれぞれ Krebs⁴⁾, Blanchard⁵⁾, Silverman & Werkmann⁶⁾, Umbreit et al⁸⁾ 及び Krebs⁹⁾ の方法に従つた。

実験成績

I) コハク酸 α 化酵素

石英砂磨砕法により抽出されるが, 凍結融解またはアセトン乾燥法により抽出されない。また常に一定の強い活性を有する酵素製品を得難い。この酵素はメチレン青の添加を必要としないでコハク酸を酸化し, マロン酸及

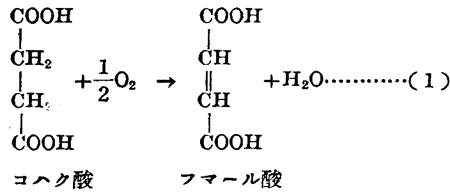
第 1 図 コハク酸 α 化酵素に及ぼすマロン酸及びアジドの影響Warburg 検圧計: コハク酸 50 μ M; 磷酸塩緩衝液 (PH 6.2, M/5);

酵素液及び阻害剤, 38°

びアジドにより阻害を受ける (第 1 図)。

本酵素液中には強い活性を有する fumarase 及び L-リンゴ酸 α 化酵素が存在するため反応生成物として fumar-

ル酸を証明することはできないがおそらくこの酵素により(1)式が catalyze されると考えられる。



II) フマラーゼ

凍結融解法により容易に抽出される。フマラーゼ作用の証明は次のような方法で行った。ツンベルグ管中に酵素液、フマール酸及び磷酸塩緩衝液 (PH 7.0, M/5) を添加し、嫌氣的に 37°, 5分間 incubate 後、反応液を煮沸水浴中で3分加熱、遠心沈澱することにより得られた上清液中の生成 L-リンゴ酸を定量した。L-リンゴ酸の定量は *Lactobacillus arabinosus* の L-リンゴ酸適応菌を用いて生成する炭酸ガス量を測定した。対照として煮沸酵素液及びフマール酸を除いた場合について同様の実験を行った(第1表)。

第1表 フマラーゼの証明

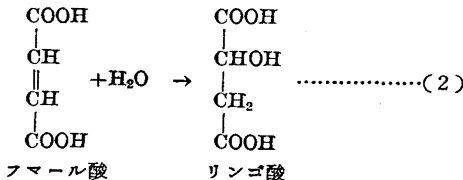
試料	発生炭酸ガス	生成 L-リンゴ酸
酵素+フマール酸 10 μM	228 μl	8.2 μM
酵素	23	—
煮沸酵素+フマール酸 10 μM	44	0.8

ワールブルグ検圧計:

主室: 各反応液

側室: *Lactobacillus arabinosus* (L-リンゴ酸含有肉汁培地 2日培養) の洗滌菌浮游液
 の 5% N₂+5% CO₂; 38°
 CO₂ 発生が止む迄反応せしめる (4時間)

第1表によると使用酵素液は 37°, 5分間に 10μM のフマール酸中約 8μM を L-リンゴ酸に変化している。故にこの酵素により(2)式が catalyze される。



III) L-リンゴ酸々化酵素

凍結融解と石英砂による磨砕を反覆することによって抽出される。抽出液による L-リンゴ酸の酸化はメチレン青、チトクローム C 及びコチマーゼの添加により促進されない(第2表)。

酵素-基質間の Michaelis 恒数は約 6×10⁻² Mol/l で至適 PH は PH 6.0~8.0 に亘っている。阻害剤の影響は第3表の如くである。

第2表 carrier, cozymase の影響

添加物	酸素吸収量 μl/60分	
	対照	添加
メチレン青 50Y	156	138
チトクローム C	156	154
コチマーゼ	64	68

ワールブルグ検圧計:

酵素液; 磷酸塩緩衝液 (PH 6.2, M/5); dL-リンゴ酸 (100 μM)
 38°

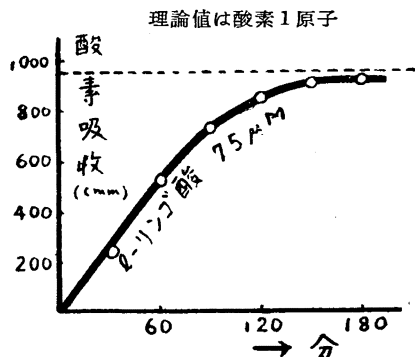
第3表 種々の阻害剤の影響

阻害剤	終末濃度	酸素吸収量 μl/60分		阻害%
		対照	添加	
青酸	7.4×10 ⁻³ M	104	49	35
アチド	1.6×10 ⁻³	155	94	39
マロン酸	7.4×10 ⁻²	192	157	16
ヨード醋酸	2.0×10 ⁻³	138	112	19
弗化ソーダ	7.4×10 ⁻³	192	194	0
硝酸銀	4.0×10 ⁻⁴	138	0	100
硫酸銅	4.0×10 ⁻⁴	155	64	59

反応条件は第2表と同じ

酵素液を 4° 以下で 16時間蒸留水に透析するも全く影響はみとめられない。また硫酸 50% 飽和により酵素は好収量で沈澱部分に移行する。乳酸々化酵素の精製¹⁰⁾に有効であつた酢酸による沈澱の方法は本酵素を完全に破壊するので用いられない。この酵素によつて添加 L-リンゴ酸 1分子に対しほぼ 1原子の酸素が吸収され、(第2図) 約 1分子の α-ケト酸と炭酸ガスが生成する(第4表)。

第2図 L-リンゴ酸の酸化



Warburg 検圧計: L-リンゴ酸 75 μM; 磷酸塩緩衝液 (PH 6.2, M/5); 酵素液, 38°

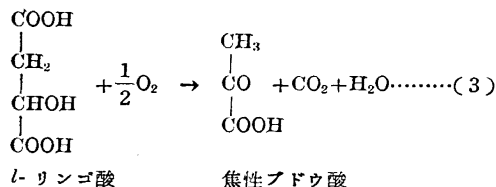
第4表 L-リンゴ酸の酸化

添加 L-リンゴ酸	10.0 μM
消費酸素	4.7
生成炭酸ガス	9.0
生成ケト酸	9.1

ワールブルグ検圧計:

L-リンゴ酸 10 μM;
 磷酸塩緩衝液 (PH 6.2, M/5);
 酵素液
 38°

生成 α-ケト酸が焦性ブドウ酸であることは次のようにして確認した。ワールブルグ容器中で 38°, 3時間反応後 (容器2個を使用) 半容の 6 N塩酸を添加直ちに遠心沈澱を行いその上清液に 3 cc の 2 N 塩酸に溶解した 2% 2.4-ジニトロフェニルヒドラジンを加え, 20分間放置後生じたヒドラジンを捕集しこれを酢酸エチルに溶解, ついで10%炭酸ソーダを加えてよく振とうし下層部分を分離してこれを塩酸で酸性にする。生じた沈澱を濾別後真空乾燥を行い, 融点を測定した。試料の融点は 212.5°~213.5° で焦性ブドウ酸の融点 (213.0°) に殆んど一致した。且つ焦性ブドウ酸との混融点は 213.5° であつた。故に上述の実験条件下ではこの酵素により (3) 式が catalyze される。



なおアセトン乾燥菌はオキザロ酢酸脱炭酸酵素を含むから, (3) 式は中間物としてオキザロ酢酸が生成する 2-step の反応であると思われる。

IV) クエン酸の生成

最近 Ochoa 11) 等は動物組織よりクエン酸生成にあづかる“condensing enzyme”の結晶化に成功しクエン酸の生成機作を明らかにした。さらに人型結核菌の抽出液中にもこの酵素の存在を報告している。われわれもまた鳥型結核菌のアセトン乾燥菌体を用いオキザロ酢酸と酢酸より嫌氣的にクエン酸が生成することをみとめた。この場合オキザロ酢酸のみからでも著明にクエン酸が生成する。またオキザロ酢酸の代わりに好氣的条件でフマル酸またはリンゴ酸を用いても全く同様にクエン酸が生成する (第5表)。さらに酢酸の代わりに焦性ブドウ酸を用いてもクエン酸を生成するがこれらの物質はともに C₄ デカルボン酸の存在を必要とする。

われわれは菌体よりクエン酸生成の酵素系を無細胞状態に抽出することに未だ成功していないがアセトン乾燥

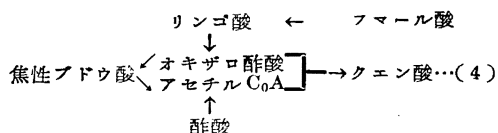
第5表 クエン酸の生成

基質	フマル酸々化による酸素消費量	クエン酸生成量
フマル酸 80 μM + 酢酸 100 μM	9.2 μM	6.1 μM
フマル酸 80 μM	10.0	4.8
酢酸 100 μM	—	0.7
対照	—	0.5

ワールブルグ検圧計: アセトン乾燥菌; 磷酸塩緩衝液 (PH 7.3, M/5); 各基質 38°

100 分反応後クエン酸を定量

菌による以上の成績及び Ochoa 11) 等の報告より結核菌中でも (4) 式のような機作でクエン酸が生成するものと考えられる



V) クエン酸々化酵素系

アセトン乾燥法または凍結融解法により容易に抽出される。本酵素は酸素分子と反応するためにメチレン青, マンガン及びコチママーゼを必要とする (第3図)。

a) メチレン青の影響: メチレン青の濃度変化による影響を示すと第6表の如くである。

第6表 メチレン青の影響

添加メチレン青	0 γ	25 γ	250 γ	2500 γ
酸素消費量 μl/90分	5	49	137	183

ワールブルグ検圧計: クエン酸 50 μM; ベロナール塩酸緩衝液 (PH 6.0, M/10); MnSO₄ 20 μM; 酵素液 38°

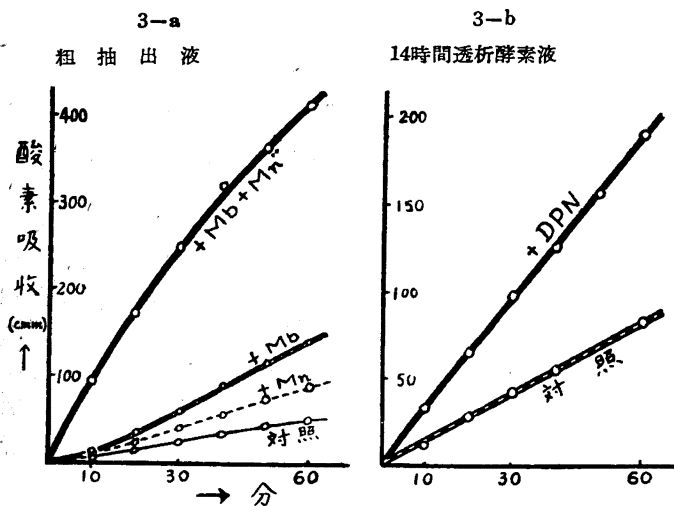
b) 金属イオンの影響: マグネシウムはマンガンと同様の作用を示す。種々の金属イオンの影響を示すと第7表の如くである。

第7表 種々の金属イオンの影響

	μg Mn	μg Mg	μg Fe	μg Ni	μg Al	対象	μg Zn	μg Ca	μg Cu
実験 I	313	254	180	160	/	135	/	81	50
II	244	/	/	/	120	110	91	/	/
III	314	353	180	185	/	140	/	100	99

ワールブルグ検圧計: クエン酸 50 μM; ベロナール塩酸緩衝液 (PH 6.0; M/10); メチレン青 500 γ; 添加金属はカドミウム (CdCl₂) の他はすべて硫酸塩 20 μM を使用 38°
 数値は酸素吸収量 μl/60分を示す

第3図 クエン酸の酸化に及ぼす Mn^{++} , Mb, DPN の影響



Warburg 検圧計:

- 3-a: 粗酵素液; クエン酸 $50 \mu M$; ペロナル塩酸緩衝液 (PH 6.0, $M/10$); $MnSO_4$ $20 \mu M$; メチレン青 500γ
- 3-b: 14時間透析酵素液; クエン酸 $50 \mu M$; ペロナル塩酸緩衝液 (PH 6.0, $M/10$); $MnSO_4$ $20 \mu M$; メチレン青 500γ ; DPN.

o) コチマーゼの影響: 粗製酵素液にコチマーゼを添加しても著明にクエン酸の酸化を増加しない(第8表)。しかるにこの酵素液を氷冷蒸溜水に14時間透析するかまたは酢酸でPH 4.5で沈澱させると明らかに一部分アポ酵素と助酵素部分とに分離し, コチマーゼによる賦活がみとめられる(第3-b図), (第8表)。

第8表 コチマーゼ及び煮沸酵素液の影響

酵 素	対 照	添 加 物						煮 沸 酢 酸 酵 素 液 沈 澱 上 清
		コ チ マ ー ゼ						
		0.1 cc	0.3 cc	0.5 cc	0.8 cc	1.5 cc		
原 酵 素 液	155	/	/	/	203	/	/	
透 析 0°, 16 時 間	84	115	117	141	180	190	154	
酢 酸 沈 澱 PH 4.5	196						384	

ワールブルグ検圧計: クエン酸 $50 \mu M$; ペロナル塩酸緩衝液 (PH 6.2, $M/10$); $MnSO_4$ $20 \mu M$; メチレン青 500γ ; 酵素液 38° , 数値は酸素吸収量 $\mu l/60$ 分を示す。

d) PH: 至適 PH は 5.5~6.2 である (第9表)。

第9表 PH の 影 響

PH	4.8	5.5	6.2	7.0	7.5	8.0	9.8
酸素吸収量 $\mu l/30$ 分	80	168	167	161	148	146	70

ペロナル塩酸緩衝液使用

e) 阻害剤の影響: 種々の阻害剤の影響を示すと第10表の如くである。

第10表 阻害剤の影響

阻 害 剤	終末濃度	阻害%
ヨード酢酸	$6.6 \times 10^{-3} M$	37%
弗化ソーダ	//	0
ピロ磷酸ソーダ	//	0
亜 砒 酸	1.2×10^{-3}	37
硝 酸 銀	6.6×10^{-4}	45

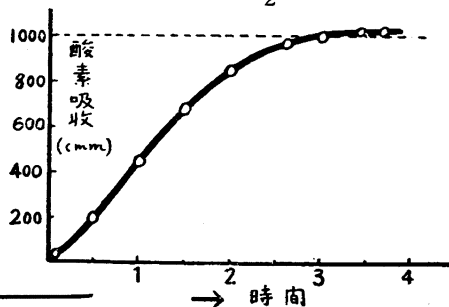
ワールブルグ検圧計:

クエン酸 $50 \mu M$; ペロナル塩酸緩衝液 (PH 6.0, $M/10$); $MnSO_4$ $20 \mu M$; メチレン青 500γ ; 酵素液及び阻害剤 38°

f) 反応式: この酵素により添加クエン酸1分子に対してほぼ1原子の酸素が吸収される(第4図)。また反応物質の定量の結果(第11表)(5)式がこの酵素により catalyze される。

第4図 クエン酸の酸化

理論値~酸素 $\frac{1}{2} O_2$



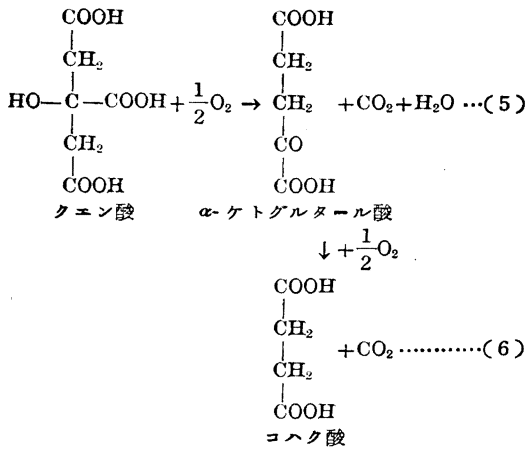
Warburg 検圧計:

クエン酸 $80 \mu M$; ペロナル塩酸緩衝液 (PH 6.0, $M/10$); $MnSO_4$ $20 \mu M$; メチレン青 500γ ; 酵素液 38°

第11表 反応物質の定量

実 験 番 号	I	II	III	
消 費	クエン酸 (μM)	42.8	/	/
	酸 素 (μM)	19.5	9.2	36.3
生 成	α -ケトグルタル酸 (μM)	/	/	57.3
	コハク酸 (μM)	/	/	8.3
	炭酸ガス (μM)	/	19.1	/

ワールブルグ検圧計: クエン酸; ペロナル塩酸緩衝液 (PH 6.0, $M/10$) $MnSO_4$ $20 \mu M$; メチレン青 500γ ; 酵素液, 38°



第11表の少量のコハク酸の生成はこの酵素液中にα-ケトグルタル酸々化酵素が存在するためと想像される。

g) クエン酸の嫌氣的酸化：酸素分子と同様メチレン青もまた良好な Hydrogen-Acceptor となるがチトクロームCはなり得ない(第12表)。

第12表 クエン酸の嫌氣的酸化

添 加	炭酸ガス発生量 μl/50分
対 照	16
チトクロームC	0
メチレン青 20 μM	184

ワールブルグ検圧計：クエン酸 50 μM；ペロナール塩酸緩衝液 (PH 6.0, M/10)；
 MgSO₄ 20 μM；メチレン青 20 μM；チトクロームC；酵素液，
 95% N₂ 及び 5% CO₂ ガス腔中，38° で反応

VI) α-ケトグルタル酸々化酵素

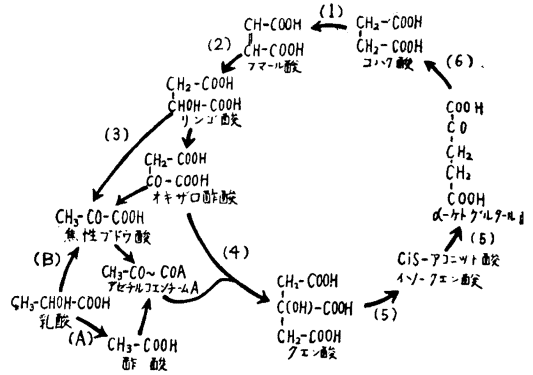
本酵素を好収量で菌体から抽出することはまだ成功していない。しかし第11表に示す如く活性は少ないが明らかにこの酵素が抽出液中に含まれている。なお、アセトン乾燥菌は著明にα-ケトグルタル酸を酸化するから(6)式を catalyze する酵素は明らかに菌体中に存在すると思われる。

考 察

以上の実験成績によると、鳥型結核菌中においてTCAサイクルの各 step に関する酵素系がごとごとく存在しており、且つこれらの諸酵素の活性はかなり強力である。このことはこの菌においてもこれらの諸酵素が次の表(第13表)のようなTCAサイクルを形成し、菌の終末呼吸系 (terminal respiratory system) として働いていることを示している。

最近、細菌の terminal respiration について種々の研究が行われているが¹⁾その機作はなお明確でない。

第13表 結核菌のTCAサイクル



註：(A),(B)はそれぞれ乳酸々化酵素I及びII(4,10)によつて catalyze される。

Karlsson & Barker¹²⁾ は適応酵素及び同位元素等を用いて *Azotobacter agilis* がTCAサイクル及びDCAサイクル(ジカルボン酸サイクル)のいずれをも経ずに酢酸を酸化することを示し、Barron¹³⁾等は *Corynebacterium Creatinovorans* の休止菌により酢酸がDCAサイクルを経て酸化されると考え、さらに酢酸の存在でメレン青を脱色する無細胞酵素液を得ている。Ajl等¹⁾も種々の菌種について実験を行いDCAサイクル及びTCAサイクルの存在をみとめているがその方法は主として同位元素を使用したもので未だ決定的とは言えない。細菌に関する研究の困難性の一つとして強力な活性を有する無細胞酵素液の得難いことがあげられているが、われわれの用いた酵素製品は細菌におけるTCAサイクルの存在を支持する有力な証拠の一つにはなるであろう。

結 論

鳥型結核菌からTCAサイクルに関する諸酵素すなわちコハク酸々化酵素・フマラーゼ・リンゴ酸々化酵素及びクエン酸々化酵素を無細胞状態に抽出し、又アセトン乾燥菌を用いてクエン酸合成酵素系及びα-ケトグルタル酸々化酵素の存在を証明した。

おそらくこれらの諸酵素がTCAサイクルを形成して鳥型結核菌の terminal respiration を推進するものと考えられる。

終りに御指導と御校閲を賜つた恩師渡辺三郎教授、大阪大学理学部赤堀四郎教授ならびに本研究所山村雄一助教授に深謝の意を表す。なお、オキサロ酢酸は永井定助手の合成による。記して感謝する。本研究は文部省科学研究費によつた。

文 献

- 1) Ajl, S.J.: Bact. Rev. 15, (1951) 211.
- 2) 楠瀬・楠瀬：第4回日本結核病学会近畿地方学会発表(1951).
- 3) 楠瀬・楠瀬・山村：第24回日本生化学会総会発表

- (1952).
- 4) 楠瀬・村瀬・山村：結核 27, (1952) 72.
 - 5) Krebs, H. A.: Biochem. J. 31, (1937) 2095.
 - 6) Blanchard, M. L., Korke, S., Campillo, A. & Ochoa, S.: J. Biol. chem. 187, (1950) 875.
 - 7) Silverman, M & Werkmann, C. H.: J. Biol. chem 138, (1941) 35.
 - 8) Umbreit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer, J. F.: Manometric Techniques & Tissue Metabolism, Revised Edition, Burgess publishing co., Minneapolis. (1949) 163.
 - 9) Krebs, H. A.: Biochem. J., 32, (1938) 108.
 - 10) 楠瀬・村瀬・山村：結核 27, (1952) 243.
 - 11) Ochoa, S., Stern, J. R. & Schneider, M. C.: J. Biol. chem. 193, (1951) 691.
 - 12) Karlsson, J. L., & Barker, H. A.: J. Biol. chem. 175, (1948) 913.
Karlsson, J. L.: J. Biol. chem. 183, (1950) 549.
 - 13) Barron. E.S. G., Ardao, M. I. & Hearon, M.: Arch. Biochem. 29, (1950) 130.

増刷出来!

東大教授 佐々貫之博士監修

診療百科医典

佐々博士外50大家が各専門部門を担当し、実地診療に重点をおいて編集された名著

上 卷	{	第一分冊	内科 総論篇	(660頁) 定価500円 送費実費
		第二分冊	内科 各論篇	(1,088頁) 定価850円 送費実費
		第三分冊	小児科・精神科篇	(520頁) 定価400円 送費実費
下 卷	{	第一分冊	外科・整形外科篇	(800頁) 定価650円 送費実費
		第二分冊	産婦人・皮膚性病・泌尿器・耳鼻咽喉・眼科・齒科篇	(880頁) 定価700円 送費実費

発行所 株式会社 東西医学社 東京都中央区銀座西七ノ一 電話銀座(57)2126-2129番 振替口座東京2818番