

結核菌のアミノ酸代謝について

第2編 アスパラギナーゼについて

名古屋大学医学部内科第一講座（主任 日比野 進教授）

片山 富男・田中 伸一・青木 国雄

（昭和 29 年 7 月 2 日受付）

緒 言

第1編において著者は、鳥型結核菌が窒素源として多数のアミノ酸を利用して生育できること、並びに Streptomycin (以下 SM と記す) 感受性株と耐性株の両者について、これ等アミノ酸を窒素源とした際の発育の状態を定量的に比較観察した。同時に該アミノ酸の培地中よりの消退と、新種アミノ酸の出現状況を Paperchromatography で検討して、いずれのアミノ酸を窒素源とした時にも、感受性株と SM 耐性株との間に差異が存在しなかつたが、Asparagine を窒素源とした時のみ興味ある差異が存在することを見出した。すなわち Asparagine を窒素源として鳥型結核菌調剤を培養すると、感受性株は SM 耐性株より発育が極めて迅速であるにも拘わらず、Asparagine の消耗は SM 耐性株において大きく、Aspartic acid の出現もこれと比例して耐性株に大であることを知った。

古くより結核菌の培地における窒素源として、Asparagine に関する業績を二、三散見するが¹⁾²⁾、SM 問題を導入した業績としてはこれをみず、最近庄司等³⁾がアミノ酸の生合成に関し、SM との関係を追及したのが目をひくのみである。

著者は第1編の培養実験から、Asparagine に纏わる諸問題に、若干興味を覚るもののあることを知ったので、本研究においてアスパラギナーゼの活性測定、及びこの際離脱した無機 NH₃ の運命の問題に関し、基質として Asparagine を添加した際のアミノ酸の出納状況、さらに又、実験的に添加した無機 NH₃ の同化作用の状態をその消失より追究した。そして随時 SM による影響をこれ等諸反応について検討するとともに、SM 感受性株と SM 耐性株との両者の比較研究をしたので報告する。

実験材料及び実験方法

I アスパラギナーゼ活性の測定

1) 酵 素 材 料

酵素として生菌懸濁液及びこれのアセトン乾燥粉末や、又凍結融解磨砕して無細胞状態に分離した酵素を使用した。

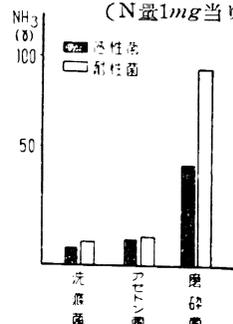
(1) 生菌懸濁液は Glutamic acid を窒素源とする Sauton 合成培地に 4~5 日培養した鳥型結核菌竹尾株、及びその SM 耐性株を使用した。耐性株の耐性度は >1,000 per ml であつた。両株の菌塊をそれぞれ別々に、ガ

ーゼ数枚で濾過して採取し、Potter Elvehjem 型 Homogenizer⁴⁾で均等化後遠心集菌した。この Homogenizer による均等化後、遠心の操作を 2~3 回反復すれば、培地中の成分をほぼ完全に洗滌除去できた⁵⁾。これを後述のような反応系で実験に供した。

(2) アセトン乾燥粉末を作製するには、-5~-10°C の氷冷下で、過マンガン酸カリによる被酸化物を含まない再蒸溜アセトンの 4~5 容を加えて結核菌を処理し、-5~-10°C に 15~20 分放置時々攪拌した。これをブフナー漏斗で濾過し、圧縮して充分アセトンを除去した。乾燥は室温で広く拡げて行つた。かくして調製したアセトン乾燥粉末はかなりの期間乾燥器内に保存できたが、長期は不可能であつた。

(3) 菌体より酸素を無細胞状態に抽出するには、上述の如くガーゼにて濾過集菌した菌塊を乳鉢に入れて氷炭酸と共に磨砕した。かくて凍結融解を 5~10 回反復操作した。又乳鉢を寒剤の入つた桶に入れれば、菌塊を充分凍結せしめることもできた。磨砕にはアルミナもしばしば使用されているが、著者は純精なガラス粉を利用した。この磨砕菌を pH 7.0 の磷酸緩衝液に懸濁し、氷室に超夜遊置し、アスパラギナーゼを菌体より溶離させることができた。かくすることによりアスパラギナーゼを

第1図 アスパラギナーゼの活性比較 (N量1mg当り)



元の菌体に比較して、窒素量当りの活性を 5~10 倍に濃縮精製できることを知った(第1図)。

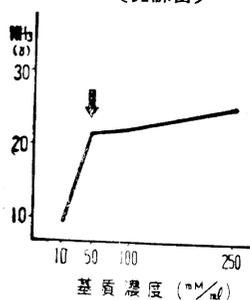
2) アスパラギナーゼの反応系について、基質濃度、反応時間、至適 pH、共存物質の影響、酵素量等を検討吟味した。

(1) アスパラギナーゼの濃度は、終濃度 50 ではほぼ飽和するように考えられた(第2図)。

(2) 反応時間は第3図に示す如き実験事実⁶⁾に立脚し、90~120 分で反応を停止せしめた。

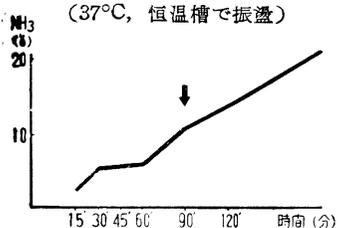
(3) 磷酸の共存がアスパラギナーゼ活性を促進せしめる事が知られているが⁶⁾、磷酸緩衝液で至適 pH を検討

第2図 アスパラギナーゼ活性と基質濃度 (洗滌菌)



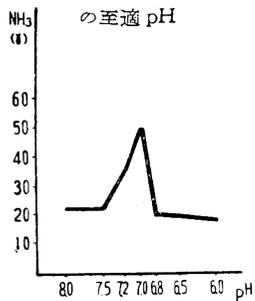
を檢討してみると、M/50~M/1,000 (終濃度) でこれ

第3図 反応時間 (37°C, 恒温槽で振盪)

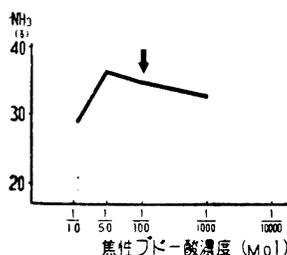


- 1) 酵素
 - i 洗滌菌 (乾燥菌量) 5~20 mg
 - ii アセトン乾燥菌 5~30 mg
 - iii 磨砕菌 (N量) 1~1.5 mg
- 2) アスパラギン 50mM (終濃度)
- 3) 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 20mM (終濃度)
- 4) 焦性葡萄糖ソーダ 10mM (終濃度)

第4図 アスパラギナーゼの至適 pH



第5図 アスパラギナーゼ活性と焦性ブドウ酸添加 (洗滌菌)



gine よりの NH₃ の放出は極めて僅少であつた。なお

してみると7.0近辺にピークがあつた(第4図)。この場合の磷酸緩衝液は終濃度 20mM であつた。

(4) Acylamidase活性を焦性葡萄糖が活性化することを天竺鼠の肝臓を酵素源として認められているので、生菌浮游液のアスパラギナーゼ活性に及ぼす焦性葡萄糖の影響を活性化することが実験的に認められた(第5図)。上記のような反応条件の予備実験による検討成績から、以下のような反応系を採用した。

反応系の総量 4.0ml
 このような反応系にて実験を行つたのであるが、反応停止はトリクロール醋酸(終濃度5~10%)で行い除蛋白、上清中の無機 NH₃ を炭酸カリ又は磷酸緩衝液で、pH 12の弱アルカリの下に、Conway の拡散皿の中で一定量の酸に拡散吸収せしめ、余剰の酸を逆に滴定して検体中の NH₃ を定量した⁸⁾。この際拡散の時間、温度は2時間、37°C で過不足なく、又この pH12, 37°C, 120分拡散の実験条件で、基質 Aspara-

酵素材料中に既存する無機 NH₃ を no substrate の条件下で全く同様の手法で計測した盲験値を計算の際に削除した。

第1表 SM 耐性菌(R)と感受性(S)のアスパラギナーゼ活性比較 (NH₃ 定量による)

	酵 素 量 (乾燥菌量)	S	R	比 較
		NH ₃ (Y)	NH ₃ (Y)	
洗	16	6.8	12.0	S < R
	5	29.4	32.0	S < R
	8	34.5	38.0	S < R
	20	45.0	49.2	S < R
滌	5	9.7	15.3	S < R
	9.5	15.5	20.8	S < R
	21	25.7	37.5	S < R
	12	17.1	17.4	S < R
菌	15	28.2	37.1	S < R
	10	30.1	30.1	S = R
	22.6	21.8	12.6	S > R
	4	29.6	18.6	S > R
	6	32.4	21.9	S > R
	15	39.8	34.1	S > R
	5	23.8	18.3	S > R
	10	28.6	23.8	S > R
18	36.0	31.5	S > R	

第2, 第3表 SM 耐性菌(R)と感受性菌(S)のアスパラギナーゼ活性比較 (NH₃ 定量による)

	菌 量	S	R	比 較
		SNH ₃ (Y)	RNH ₃ (Y)	
アセトン菌	10.0	9.4	9.8	S ≈ R
	6.0	16.2	16.3	
	30.0	30.0	31.0	
	20.0	40.7	43.7	

	酵 素 量 (N量 mg)	S	R	比 較
		SNH ₃ (Y)	RNH ₃ (Y)	
磨 砕 菌	0.51	12.6	15.4	S ≪ R
	1.53	37.8	60.0	
	0.41	19.4	28.2	
	1.23	58.1	110.9	

II 無機 NH₃ の同化

われわれはアスパラギナーゼ活性と SM の問題を検討中、無機 NH₃ の出納を動的に把握することが必要であると考え、以下のような反応系で無機 NH₃ の同化作用の問題を研究した。

- 1) 酵素 { i 洗滌菌(乾燥菌量) 5~20 mg
ii アセトン乾燥菌 5~30 mg
- 2) 無機 NH₃ 10mM(NH₄)₂SO₄ (終濃度)
- 3) SM 10%, 100%, 1,000% (終濃度)
- 4) 焦性葡萄糖ソーダ 10mM

反応系の総量 4.0 ml とし 2 時間, 37°C で作用させた。

iii Paperchromatography⁹⁾¹⁰⁾

Asparagine 問題を動的に把えるためには, さらに Asparagine の消失, Aspartic acid の生成, 又生成した NH₃ が例えばケト酸に aminate して生ずるアミノ酸を検索してみることが必要になつてきたので, われわれは主に 80% フェノール水による一次元 Paperchromatography で試料 0.015 ml を東洋濾紙 No. 50 に形の如く附着さし展開, 風乾後 0.2% ニンヒドリン・ブタンオール溶液を噴霧して, ガスの遠火にて加熱, アミノ酸群を発色させ, この問題を主として定性的に研究し, 併せて発色 spot の大きさの比較検討を行つた。

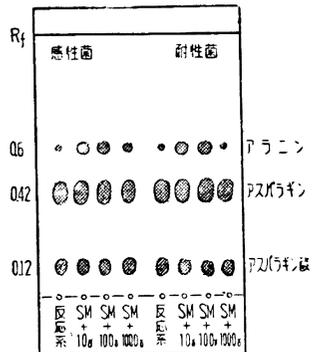
実験成績

i) SM 感受性株と耐性株とのアスパラギナーゼ活性を比較してみると, 生菌懸濁液では第 1 図, 第 1 表に示す如く両者に著しい差を認めなかつた。

ii) アセトン乾燥菌においても SM 感受性株と耐性株との間に差を見なかつた(第 1 図, 第 2 表)。

iii) 次に磨砕菌を使用した実験の結果であるが SM 感受性株と耐性株との活性を比較してみると, この磨砕操作により耐性菌では洗滌菌体の場合に比しアスパラギナーゼ活性が 7~8 倍に上昇, 感受性菌の場合は同じくそれが 5~6 倍に上昇し, いずれの場合もアスパラギナーゼがこの手技によりかなり精製されることがわかつた(第 1 図)。

第 6 図 SM の影響(アスパラギナーゼ反応系)



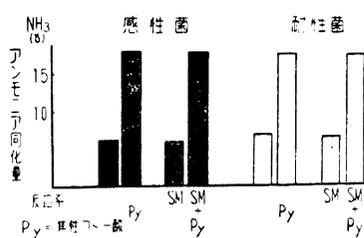
もにアスパラギナーゼ活性を抑制する傾向がみられた。

v) 無機 NH₃ の同化作用を先述した洗滌生菌浮遊液で実験した結果は第 7 図に示す如く, 無機 NH₃ の受容体になると考えられる焦性葡萄糖を反応系に添加すると, NH₃ の消失が増大した。又, SM を添加してみるも,

この NH₃ の蓄積に何等の影響も与えなかつた。

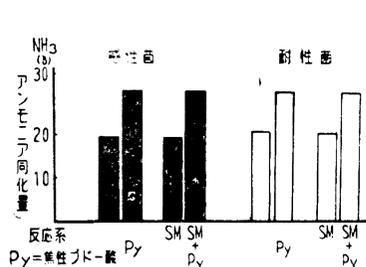
vi) 無機 NH₃ の同化作用をさらにアセトン乾燥菌で実験した結果は第 8 図に示す如く, SM は NH₃ の同化に対して全く影響を与えず, 生菌浮遊液の実験結果と全

第 7 図 アンモニアの同化(洗滌菌)



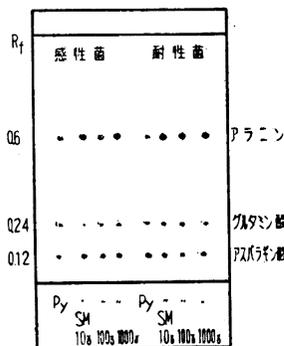
同様であつた。又, 耐性菌株の場合も, 無機 NH₃ の同化量, 及び SM のこれに影響を及ぼさない結果は, 感受性株の場合と全く同じ成績を得た。

第 8 図 アンモニアの同化(アセトン菌)



で追究してみると, これに平行してアスパラギンの spot

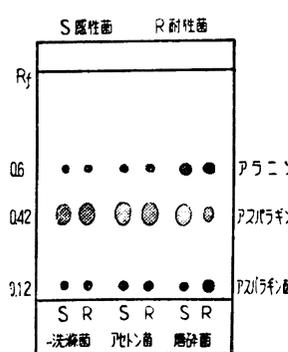
第 9 図 無機アンモニアと菌体及び SM の影響



の減少が見られたのは当然であるが, これに SM を作用させるとアスパラギンの spot の減少はなかつたが, Alanine の spot が大きくなるのを認めた(第 9 図)。

又, SM 感受性株と耐性株との比較を見るに,

第 10 図 アラニン形成(アスパラギナーゼ反応)



アラニンの蓄積に関しては差を認めず, 又, アスパラギンの消失よりアスパラギナーゼ活性を比較してみると, 生菌浮遊液, アセトン乾燥菌で差異なく; 磨砕菌よりの抽出物にて, 耐性菌の方がアスパラギナーゼ活性

の大なることが Paperchromatography から確認することができた(第10図)。

総括及び考按

第1編でわれわれは培養実験より、SM 耐性株は感受性株に比して Asparagine をより多量に消費し、これに対して Aspartic acid の出現も SM 耐性株において大であること、すなわち SM 耐性株の方が感受性株よりアスパラギナーゼ活性が大なることを Paperchromatography で確認報告した。この培養実験で得た成績をさらに納得せしめる結果を今回の酵素化学的実験からも得たわけであるが、さらに又、SM はアスパラギナーゼ活性に抑制的に動くこと、及び Alanine の蓄積をもたらすという結果を得た。又無機 NH_3 を結核菌は同化利用することができるが、これに SM は全く影響を与えず、SM 耐性株と感受性株との間に差異を見なかつた。

すなわち SM 耐性株において Asparagine の消費大であるということは、SM 耐性株の方が Asparagine の acylamide 基を感受性株より労費するともいうべきことである。この acylamide の生化学的的重要性は最近頃に重要性を加えてきており、Meister¹¹⁾等は Glutamine から α -ケト酸への直接アミノ転位が起ることを証明している。すなわち従来は Glutamine の如きアミドは加水分解後に Transamination を起すと考えられていたが、Tyrosine, Phenylalanine, Leucine, Isoleucine 等のそれぞれ相当するケト酸と、Glutamine とがアミノ転位反応を起すことを見出し、上記のアミノ酸と α -Ketoglutamic acid を生じこの際遊離する NH_3 は γ -アミド基によるものであり、転位反応が Glutamic acid を使用した時よりも Glutamine との方が早いことより、加水分解後に転位が起るのではないと報告している。又 Asparagine、や Glutamine は組織内にはかなりの量が含有されており、これ等に対する acylamidase は生物界に広く分布していること、及び無機 NH_3 は生体に有毒であること等より、かかる acylamide 化合物は NH_3 の無害な Pool とも見なされている¹²⁾¹³⁾。のみならず Asparagine, Glutamine は古くから蛋白合成と密接な関係があると考えられており、Glutamine や Asparagine の acylamide 基が NH_3 と交換して Peptide bond のできることが酵素化学的に立証されている¹⁴⁾¹⁵⁾。かくの如く Asparagine と Glutamine の α -アミノ酸では興味ある報告があり、われわれの行つた Asparagine での実験結果を比較するとき非常に興味がある。

しかしながらアスパラギナーゼ活性の SM 耐性株と感受性株との比較において、洗滌菌及びそのアセトン乾燥菌による実験では、両者間に有意な差を見ていないから、これから直ちに耐性株ではアスパラギナーゼ活性が強大であると断定することは早計かも知れない。がしかし、洗滌菌にて有意な差異が得られなかつた理由として、透

透性等が原因となつているかも知れないから、やはり一応 SM 耐性株には感受性株より、より多くの Asparagine の acylamide 結合を利用するような菌体内複合酵素系が組立てられているものと想像され得る。

なお、第1、2表に示す如き個々の data が実験材料によつてかなり著しい動揺があるのは菌の Age of culture によつてアスパラギナーゼ活性にかなり大幅の変化のあることを物語つており、特に Age の進んだものでは活性が著しく低落することを私どもは経験しているので、われわれは使用菌の培養日数は最も慎重な配慮を必要とするとして、集菌の時期を logarithmic phase 終了の暫時前とした。すなわちアスパラギナーゼは細菌の発育と当然密接な相関関係を持つ酵素であるから、われわれはこの問題に充分な配慮を払い、SM 耐性株と感受性株との活性を比較するときは、同一培地の同一条件で培養した同一培養日数の菌について比較定量するようにした。

SM がアスパラギナーゼ作用を抑制した如き、実験結果は、庄司³⁾が報告しており、又、われわれも同様の結果を得た如く、SM は Alanine の蓄積をもたらすということと関係がある。すなわち Asparagine から遊離した発生期 NH_3 の利用過程を SM が促進的に作用すると想像される。

翻つて SM 問題では、著者等の研究室においては⁵⁾、SM は磷酸転位反応系にその侵襲点の中心があり、特に PNA において荒廃極に達し、SM を作用させた感受性株より興味ある一新核酸関係物質 Bound Nucleotide が新生してくる事を発見した。かかる RNA を中心とする磷酸代謝の擾乱は、複合酵素系の unbalance を招来することは当然の帰結である¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。Asparagine 問題に関して、SM が SM 感受性株に対してとる態度については上述の如く、これを生化学的に断定的決論を出すことは未だ早計といわざるを得ないが、動的 net work をなす metabolic mosaic において、いわゆる複合酵素系の unbalance が招来され、Asparagine に関してわれわれの得たような諸事実が惹き起されるであろうことは、容易に考えられる。いずれにしても SM の Asparagine 問題に関連する真相は、今後の検討に待たなければならないが、以上を総合考察してみると、窒素の Pool ともいうべき Asparagine の acylamide 基が、感受性株よりも SM 耐性株の方がより多量に消費される如き特異な代謝経路を具備していると想像され、SM 耐性株における窒素代謝の特殊性が伺われた。

結 論

われわれは鳥型結核菌竹尾株及びその SM 耐性株を使用して、Asparagine に対する同化作用について観察した。

1) アスパラギナーゼ活性測定の方法を多角的に吟

殊検討してその条件を決定した。

2) SM 感受性株と耐性株とのアスパラギナーゼ活性を比較して、生菌浮游液、菌のアセトン乾燥粉末では差なく、磨砕菌よりの抽出物で耐性株の方が感受性株より著大なることがわかった。

3) アスパラギナーゼ活性測定反応系に SM を添加すると Alanine の蓄積が見られた。

4) 結核菌は実験的に添加した無機 NH_3 を同化利用できるが、これに対し SM は全く影響を与えなかった。

文 献

- 1) William, F.D. and Anatole Andrejew: *Met. Tuberc. Bacil.*, 1953.
- 2) 戸田忠雄: 結核菌と BCG
- 3) 庄司宏: 結核 28, 577, 昭 28.
- 4) Potter, V.R. and Elvehjem, C.C.,: *J. Biol. Chem.* 114, 495, 1936.
- 5) 日比野進: 第 29 回日本結核病学会特別講演
- 6) Hiwatashi, D.: *J. Exp. Med.* 41, 384, 1941.
- 7) Greenstein, J.P., V.E. Price, and J.M. Goncalves.: *J. Biol. Chem.* 167, 881, 1947.
- 8) 石坂音治訳: 微量拡散分析及び誤差論.
- 9) R. Conden, A.H. Gordon and A.J.P.Martin: *Bioch. J.* 38, 224, 1944.
- 10) Dounce, Rothstein, Aser, Beyer, Thanhauser, Meister, Rebecca, Freer and Richard.: *J. Biol. Chem.* 174, 361, 1948.
- 11) Meister, A., and S.V. Tice: *J. Biol. Chem.* 187, 173, 1950.
- 12) Baldwin, E.: *Dynamic aspect of biochem.*, 1951.
- 13) 千原硬: アミノ酸及蛋白質の生化学(共立社版)
- 14) Gunsalus, I.C.,: *Fed. Proc.*, 9, 236, 1950.
- 15) Fruton, J.S., R.B. Johnston, and M.J. Fried.: *J. Biol. Chem.* 190, 39, 1950.
- 16) Schneider, W.C., A. Claude, and G.H. Hogeboom, : *J. Biol. Chem.* 172, 619, 1948.
- 17) Lehninger, A.L., and E.P. Kennedy, : *J. Biol. Chem.* 173, 753, 1948.
- 18) Dounce A.L. and G.T. Beyer, : *J. Biol. Chem.* 174, 159, 1948.
- 19) Sumner, J.B., and K. Myrback, : *The Enzymes*, Vol.1, Vol.2.