

鳥型結核菌の Transaminase に就いて

(第 1 報)

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前教授)

伊藤 文雄・菅野 忠彰

(昭和 29 年 6 月 12 日受付)

緒 言

曩に酒井は「イソニコチン酸ヒドラジドの作用機序に関する実験的研究」(第 1 報)¹⁾に於いて、BCG に於ける Glutamin 酸-Asparagin 酸間の Transaminase の存在を報告した。動植物組織や他の細菌に於ける Transaminase に就いては数多くの研究がなされて来たが、抗酸性菌の本酵素に就いては未だ全く報告に接しない。

今回著者等は鳥型結核菌竹尾株を酵素材料として、その Transaminase に就いて検討を試みたのでその成績を報告する。

実験材料及び実験方法

酵素材料：鳥型結核菌竹尾株を Glycerin bouillon 上に 3~5 日間培養せるものを以下の如くにして用いた。

(1) 菌浮游液：菌塊を硝子玉と共に振盪して均等浮游液となし、数回遠心沈菌を反復して、湿菌量 50 mg/cc の菌浮游液を作成、その 0.25 cc を使用した。

(2) Aceton 乾燥菌：法の如くにして作った Aceton 乾燥菌を乳鉢で充分に磨り、M/10 pH 7.4 の磷酸緩衝液にて 25 mg/cc の均等浮游液となし、その 0.25 cc を使用した。

(3) 抽出粗酵素液：Aceton 乾燥菌を乳鉢にて Almina と共に約 30 分間磨砕し、M/20 pH 7.8 の磷酸緩衝液を 25 mg/cc の割合に添加、氷室中にて 2 日間浸出し、10,000 廻転 10 分間遠心沈澱後、その上澄液 0.5 cc を粗酵素液として使用した。

α -Ketoglutar 酸： α -Ketoglutar 酸 20~50 μ M を 0.25 cc の蒸留水中に溶解、苛性ソーダにて中和後使用、菌浮游液或いは Aceton 乾燥菌の際には 20 μ M を、抽出粗酵素液の際には 50 μ M を使用した。

Amino 酸或いは塩化安門：Asparagin 酸或いはその他の Amino 酸又は塩化安門の各 20 μ M を 0.25 cc の蒸留水に溶解使用した。

以上の酵素材料、 α -Ketoglutar 酸及び Amino 酸を pH 7.4 (抽出粗酵素液を用いた際には pH 7.8) 最終 M/15 磷酸緩衝液と混合、反応液総量を 1.5 cc とし、これを Thunberg 管に入れ、+5 mmHg 程度迄脱気後、37.

5°C 2 時間半 (抽出粗酵素液を用いた際には 3 時間) 反応せしめ、遠心沈澱せる上澄液の一定量 (量を記していない時には 0.02 cc) を濾紙に定量的に附着せしめ、濾紙 Chromatography の操作により、生成せる Glutamin 酸量を測定した。展開液は通常 0.5% Ammonia 水を 20% の割に加えた Phenol を用い、これのみにてまぎらわしい場合には Butanol : 醋酸 : 水 (4 : 1 : 2) の混合物を用いた。発色剤は Ninhydrin 試薬である。

Glutamin 酸生成度の判定は第 1 表の如き基準に従った。各実験の際には常に既知量の l-Glutamin 酸を同時に展開せしめて比較判定したが、その成績は第 1 表に示した如く、卍は 4Y, 卐は 3Y, + は 2Y, ± は 1Y の Glutamin 酸に夫々相当した。

第 1 表 判定基準

	発 色 度	スポットの 大きさ	Glutamin 酸 濃 度
卍	極 明 瞭	1 cm 以上	≒ 4Y
卐	明 瞭	0.5~1 cm	≒ 3Y
+	比較的明瞭	0.5 cm 以下	≒ 2Y
±	極 薄	点 状	≒ 1Y

実 験 成 績

I 菌浮游液を使用せる実験

酵素材料として菌浮游液を使用せる実験成績は以下の如くであるが、同程度の反応を示したものは便宜上一つの表にまとめた。表に於いて菌は菌浮游液、A は Amino 酸又は塩化安門、 α KG は α -Ketoglutar 酸を表す。

第 2 表は α -Ketoglutar 酸の相手として l-Asparagin 酸を用いた成績であるが、0.02 cc の試料により卍の Glutamin 酸を証明した。菌浮游液、 α -Ketoglutar 酸 Amino 酸の三者共入った反応系以外の各対照に於いては以下の実験を通じ Glutamin 酸は全く証明されなかつた。

第 3 表は α -Ketoglutar 酸に対する Glycine, dl-Phenylalanine, l-Leucine, dl-Valine の各々を用いた際の成績であるが、0.02 cc の試料により卐の Glutamin 酸を証明した。なお dl 体を使用した場合には 40 μ M を使用した。

第2表

試料 cc	0.005	0.01	0.02
反応液			
菌 + A + α KG	+	+	+
菌 + A	-	-	-
菌 + α KG	-	-	-
A + α KG	-	-	-
菌	-	-	-

第3表

試料 cc	0.005	0.01	0.02
反応液			
菌 + A + α KG	±	+	+
菌 + A	-	-	-
菌 + α KG	-	-	-
A + α KG	-	-	-
菌	-	-	-

第4表は L-Alanine の場合の成績であるが、0.02 cc の試料で+の Glutamin 酸を証明する程度であつた。

第5表は L-Histidine, L-Tryptophane, L-塩酸 Cysteine, L-Tyrosine, 塩化安門の場合の成績であるが、この際の Glutamin 酸形成度は非常に弱く、0.02 cc の試料により±程度を証明するに過ぎなかつた。

第4表

試料 cc	0.005	0.01	0.02
反応液			
菌 + A + α KG	-	±	+
菌 + A	-	-	-
菌 + α KG	-	-	-
A + α KG	-	-	-
菌	-	-	-

第5表

試料 cc	0.005	0.01	0.02
反応液			
菌 + A + α KG	-	±	±
菌 + A	-	-	-
菌 + α KG	-	-	-
A + α KG	-	-	-
菌	-	-	-

II Acetone 乾燥菌を使用せる実験

Acetone 乾燥菌を用いた場合には菌体内の遊離 Glutamin 酸が反応液中に放出されてくるので、Acetone 乾燥菌の入った反応系では総べてに±程度の Glutamin 酸を証明される場合がある。

著者等の実験では証明される場合の方が少なかつたので、以下の表は一応として記した。

なお AP は Acetone 乾燥菌の略である。

第6表は α -Ketoglutar 酸の相手として L-Asparagin 酸或いは dl-Valine 或いは L-Leucine を用いた場合の成績であるが、その Glutamin 酸の形成度は非常に顕著であり、0.02 cc の試料により+を証明した。

第6表

試料 cc	0.005	0.01	0.02
反応液			
AP + A + α KG	+	+	+
AP + A	-	-	-
AP + α KG	-	-	-
A + α KG	-	-	-
AP	-	-	-

第7表

試料 cc	0.005	0.01	0.02
反応液			
AP + A + α KG	±	+	+
AP + A	-	-	-
AP + α KG	-	-	-
A + α KG	-	-	-
AP	-	-	-

第7表は dl-Phenylalanine の場合の成績で、0.02 cc の試料によつて+の Glutamin 酸を証明し得た。

その他の Amino 酸或いは塩化安門を用いた場合には、Glutamin 酸の形成は非常に僅かか或いは全く証明出来ない程度であつた。

III 抽出粗酵素液を使用せる実験

以上の実験に於いて Glutamin 酸形成の著明に認められた α -Ketoglutar 酸と Asparagin 酸, Valine, Leucine, Phenylalanine の4つの Amino 酸との間の Transaminase について抽出粗酵素液を用い、更に以下の如き酵素化学的検討を試みた。なお本条件下では酵素液中に Glutamin 酸を検出し得なかつた。

1) 至適 pH

各反応系に於ける Glutamin 酸の形成度は第8表に示した如くで、何れも pH 7.8 に於いて最も著明に認められた。

第8表 pH の影響

pH	7.0	7.4	7.8	8.0
Amino酸				
Asparagin 酸	+	+	+	+
Valine	±	+	+	±
Leucine	±	+	+	±
Phenylalanine	±	±	+	±

2) 反応時間

無気的条件下に於ける反応時間と Glutamin 酸の生成度との関係を α -Ketoglutar 酸と Asparagin 酸間の反応系により検討したのが第9表の成績であり、3時間の反

応により生成 Glutamin 酸は平衡に達している。以上両実験の成績より以下の実験は pH7.8, 反応時間3時間を以て行つた。

第9表 反応時間の影響

反 応 時 間	1時間	2時間	3時間	4時間
Glutamin酸 形 成 度	±	+	卅	卅

3) 阻害剤の影響

第10表は各反応系に対する青酸カリ, Quinhydrone, p-Phenylendiamine, Isonicotin 酸 hydrazide (INAH) 及び硫酸銅の影響を各 M/100 (最終濃度) に於いて比較した成績であるが, 表示した如く何れも相当程度に阻害を認めた。

第10表 阻害剤の影響

阻 害 剤	対 照	KCN	Quin- hydro- ne	p- Phen- ylen- diami- ne	INAH	CuSO ₄
Amino 酸						
Asparagin 酸	卅	—	+	卅	卅	+
Valine	卅	+	+	卅	+	+
Leucine	卅	+	+	卅	+	+
Phenylalanine	+	—	—	±	±	+

4) 酵素の耐熱性

第11表は α -Ketoglutar 酸—Asparagin 酸 Transaminase に対する各温度3分間加熱の影響をみた成績であるが, 80°C 3分間の加熱により完全に不活性化されるのを認めた。

第11表 加熱の影響

加熱温度	対照	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
Gluta- min 酸 形 成 度	卅	卅	+	±	—	—	—

5) 緩衝液の影響

次に磷酸緩衝液の代りに硼酸緩衝液を用いて両者を比較した。即ち抽出操作以下, 同濃度の両緩衝液同量を用いて処理せる両反応系を比較した成績が第12表の如くであるが, 表示せる如く磷酸緩衝液を使用せる場合の方が, 硼酸緩衝液の場合に比し, Glutamin 酸形成は多少著明であつた。

第12表 緩衝液の影響

緩 衝 液	磷酸緩衝液	硼酸緩衝液
Amino 酸		
Asparagin 酸	卅	卅
Valine	卅	卅
Leucine	卅	卅
Phenylalanine	+	±

6) 氷室保存の影響

粗酵素液を 0°C 氷室中に放置した際の活性の推移を α -Ketoglutar 酸—Asparagin 酸反応系を用いて検した成績が第13表に示した如くで, 6日間放置するも著明な活性の低下は認められなかつた。

第13表 氷室保存日数の影響

保存日数	0	1	2	3	4	6
Glutamin酸 形 成 度	卅	卅	卅	卅	卅	卅

7) 好気的条件との比較

第14表は α -Ketoglutar 酸—Asparagin 酸反応系を用いて, 無気条件と好気条件に於ける Glutamin 酸形成を比較した成績であり, 好気条件にても Glutamin 酸形成度の顕著な低下は認められなかつた。

第14表 好気的条件との比較

条 件	無 気 的	好 気 的
Glutamin 酸 形 成 度	卅	卅

8) 各硫酸分劃に於ける酵素活性分布

酵素精製の第1段階として粗酵素液より硫酸門の30%以下飽和, 30~50%飽和, 50%以上飽和により沈澱する部分を原粗酵素液の半量の磷酸緩衝液に溶解, その1ccを酵素として使用, 各分劃に於ける酵素活性の分布を検した。その成績は第15表に示す如く, 30%以上の飽和度の部分に活性の強いのが知られた。

α -Ketoglutar 酸—Phenylalanine 系に於いては, 硫酸分劃により常に活性は消失した。なお硫酸分劃中の硫酸安門の影響をみる為に酵素液に α -Ketoglutar 酸のみを加えた対照をとつてみたが, 表に示す如く Glutamin 酸の形成は全く認められなかつた。

第15表 各硫酸分劃に於ける酵素活性分布

分 劃	未分劃	30%以上	30~50%	50%以上
反 応 系				
α KG + Asparagin 酸	卅	+	+	卅
α KG + Valine	卅	±	卅	卅
α KG + Leucine	卅	+	卅	卅
α KG + Phenylalanine	+	—	—	—
α KG	—	—	—	—

総括及び考按

以上鳥型結核菌竹尾株に於ける α -Ketoglutar 酸と各 Amino 酸との間の Transamination 反応に就いて一通りの検討を試みた結果, α -Ketoglutar 酸と Asparagin 酸, Valine, Leucine, Phenylalanine の各 Amino 酸とを反応せしめた時に Glutamin 酸の形成が比較的強い

のが認められた。

そこでこの4つの Transaminase に就き抽出粗酵素液を用いてその性質を探索したのであるが、その至適 pH 7.8 は BCG を用いた際にも認められた点であり、他の酵素材料よりの同酵素に関し報告されているものに比し、少しくアルカリ性にかたよっている。

本反応を好氣的条件下で行えば TCA サイクル²⁾等により酸化される可能性が考えられる。そこで無氣的・好氣的両条件に於ける Glutamin 酸形成を比較したのであるが、好氣的条件下では少し弱くなる程度であつた。即ち斯かる反応条件に於いては Transaminase 反応系は非常に活発に働いている事が想像せられる。そしてかかる反応が結核菌に於ける Amino 酸合成ひいては蛋白質合成に極めて重要な役割を果していることを推察するものである。

結 論

1 鳥型結核菌尾株を用い α -Ketoglutar 酸と各 Amino 酸間の Transamination に就いて検した所、

Asparagin 酸, Valine, Leucine, Phenylalanine の各 Amino 酸の場合に比較的顕著な Glutamin 酸の形成が認められた。

2 上記4つの Transaminase の性質を抽出粗酵素液を用いて検し、至適 pH は 7.8 附近にあり、青酸カリ, Quinhydrone, Isonicotin 酸 hydrazide, 硫酸銅の各 M/100 により相当程度の阻害を受け、80°C 3 分の加熱で完全に不活性化され、比較的長期の氷室保存に耐え、硫酸安門 30% 以上飽和により沈澱する部分に活性の強いのを認めた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜つた堂野前教授及び河盛助教授に深謝する。

本研究費の一部は文部省科学研究費によつた。記して謝意を表す。

文 献

- 1) 酒井：結核, 29, 161, 1954.
- 2) 楠瀬・楠瀬：結核, 28, 34, 1953.

追 加 訂 正

7 月号, 244 頁(原著者 甲斐崎 勇) 第 6 表空欄の所は下記の通りになります。

体 温		赤 沈		結 核 菌 所 見		
37°C ~ 以下	37.5°C ~ 38°C	10 以上	以下	~30 ~50 以上	50 以上	—