

鳥型結核菌の Cysteine desulfhydrase について

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・酒井 淳三・湯浅 幹夫

(受付 昭和 30 年 5 月 9 日)

(本研究は昭和 30 年 4 月 4 日日本生化学会総会において発表した)

緒 言

さきにわれわれは「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^{1), 2)}」において、結核菌における B₂ 酵素系に関して研究を行つて来たが、その際 B C G に Cysteine よりの脱硫化水素能力のあるのを発見、さらにその後鳥型結核菌よりの抽出粗酵素液を用いてその酵素化学的性状を検討し、殊に KCN の影響について興味ある成績を得たので、これらを昭和 29 年 11 月の結核病学会近畿地方会³⁾に報告した。今回はさらに精製酵素を用いて特に KCN の影響を中心として実験を行つたので、それ等の成績を報告する。

Cysteine desulfhydrase については Tarr⁴⁾, Fromageot⁵⁾, Delwiche⁶⁾, Kallio⁷⁾, 三橋⁸⁾, 田宮⁹⁾, 常俊等¹⁰⁾, 市原等¹¹⁾により報告され、さらに Bernheim 等¹²⁾は Mycobacterium にその存在することを報告しているが、その反応機序等については必ずしも一致をみていない。このこともわれわれが本研究を遂行した理由の一つである。

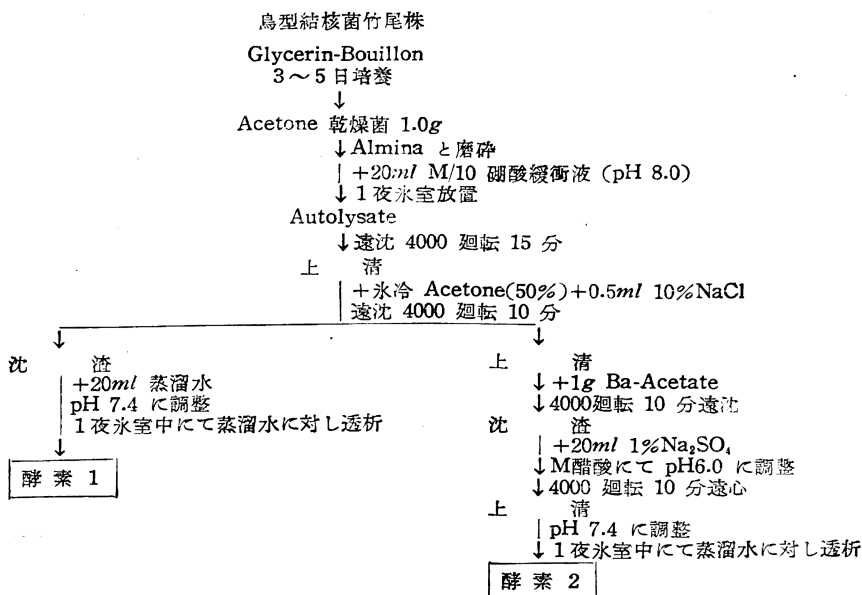
実験材料および方法

酵素材料は次の図の如くにして鳥型結核菌 竹尾株の Acetone 乾燥菌より抽出精製した。この中酵素 2 は酵素活性が非常に弱いので、以下の実験は酵素 1, すなわち 50% Acetone にて沈澱する部分を酵素液として使用した。

Cysteine は L-Cysteine 塩酸塩 (石津製薬製) の 20 μM を用いた。

かくて前に報告した²⁾如き反応管中にて、酵素液 2cc, M/10 磷酸緩衝液または硼酸緩衝液 (pH 7.8) 1cc, Cysteine 0.5cc (20 μM), 阻害剤 0.5cc 等を蒸溜水にて総量 4.5cc, とし、脱気後 37.5°C 60~90 分反応せしめ、50% 硫酸 0.5cc にて反応を停止せしめた後、山本²⁾の報告した方法で H₂S を定量した。NH₃ の定量は H₂S を放出せしめた残りの反応液につき、Conway の微量拡散装置を用い滴定法により行つた。

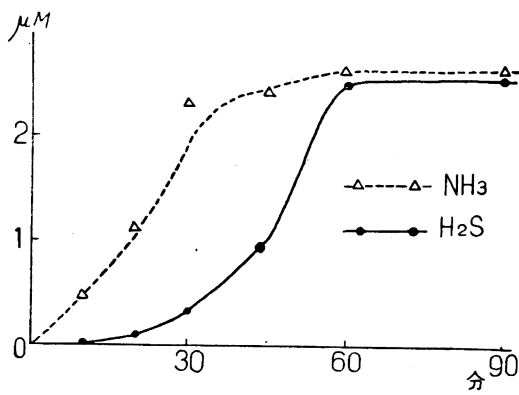
Paper chromatography による焦性葡萄糖の証明については実験成績の項に記す。



実験成績

第1図は pH 7.8 磷酸緩衝液中における Cysteine よりの NH₃ および H₂S の離脱状況を検した成績であるが、NH₃ の遊離が先行し、H₂S は遅れて Sigmoidal curve を描いて生成するのを認めた。

第 1 図

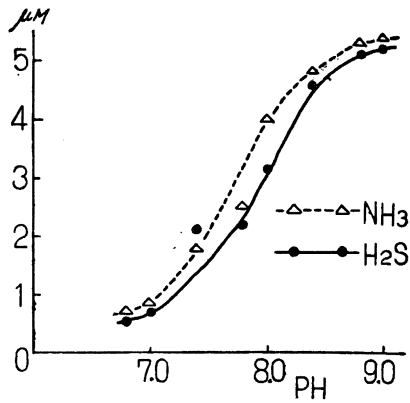


第2図は各 pH における脱 NH₃, 脱 H₂S の状況を検した成績である。pH 8 以上は磷酸緩衝液に 2N-NaOH を加えて調整した。図に示す如く pH9.0 迄の範囲では pH の高い程、多量の NH₃, H₂S の生成を認め、両者それぞれほぼ等 Mol を証明した。

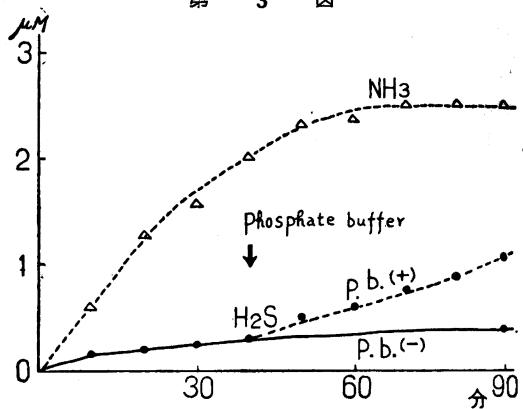
つぎに Cysteine よりの分解産物として焦性葡萄糖の形成を予想して以下の実験を行った。すなわち Cysteine 100μM (3.0cc), 粗酵素液 5.0cc (M/10 磷酸緩衝液にて抽出), M/10 磷酸緩衝液 2.0cc (pH 7.8) を無気的に 37.5°C 90分間反応せしめ、25% 三塩化醋酸 2.0cc を加えて遠心沈殿し、その上清を法の如く 2:4-Dinitro-phenylhydrazine により焦性葡萄糖を Hydrazone とし、これを Paper chromatography にて追跡した。その結果 3% NH₃ 飽和 Butanol にて展開した際 Rf 0.33 のところに顕著な焦性葡萄糖の Hydrazone の Spot を証明した。

次に第3図は磷酸塩の影響をみた成績である。すなわち磷酸緩衝液中にて反応を行った際には、NH₃ 形成は磷酸緩衝液中におけるのと同様な曲線を描くが、H₂S の生成はほとんど認められず、これに磷酸緩衝液を添加すると、少量ではあるが H₂S が生成す

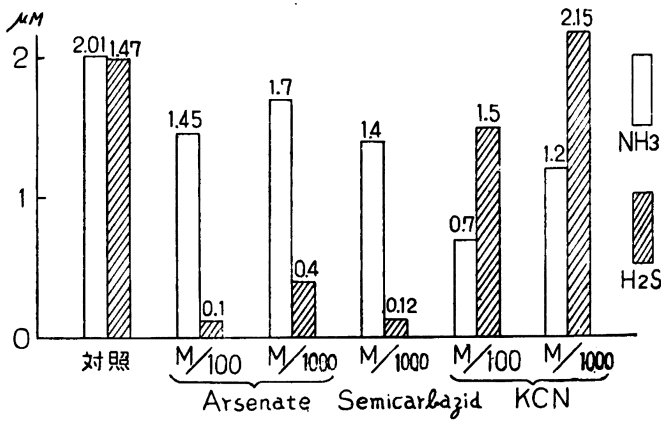
第 2 図



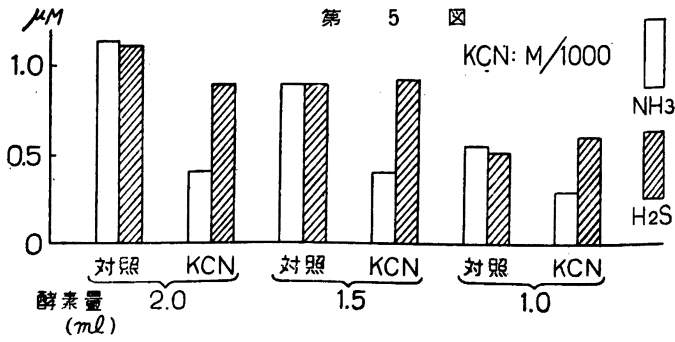
第 3 図



第 4 図



第 5 図



る。すなわち脱 NH_3 は磷酸 Ion の関与なしに起るが、 H_2S の離脱には磷酸 Ion の存在が必要である。

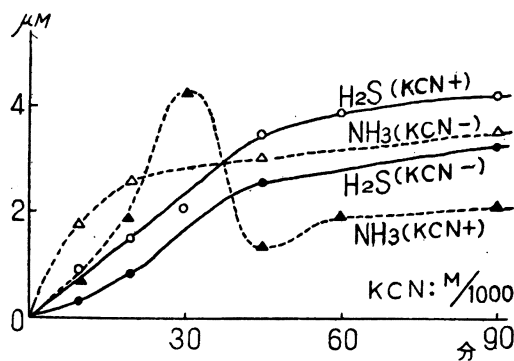
第4図は各種阻害剤の影響を検した成績である。硫酸 Na, Semicarbazid はそれぞれ記載せる如き濃度では、 NH_3 に比し H_2S の放出を遙かに著明に阻害する。以上の実験成績は市原等¹¹⁾ の報告している酵素と本質的にことなつたところはない。

ところが KCN の影響は全く逆であつて H_2S に比し NH_3 の離脱が著明に阻害される。殊に M/1000 の濃度においては、 H_2S の形成は全く影響をうけないが、時には促進される如き観を呈するにもかかわらず、 NH_3 の形成は常に対照に比し少量しか認められない。この事実は上述の実験成績とは全く相反するものである。そこで本現象の本態を解明すべく以下の実験を行つた。

まず KCN の濃度を M/1000 とし、酵素量との関係を検した成績が第5図の如くであるが、本実験においては酵素液 1.5cc を用いた際には H_2S 生成にはほとんど影響なく、 NH_3 生成のみが阻害された如くに見られた。

次に M/1000 KCN の影響を時間的に追及してみた。その成績は第6図に示す如く、KCN のない場合には NH_3 , H_2S 各 $3.4\mu\text{M}$ 前後を証明したに対し、KCN の存在下では両者各 $4\mu\text{M}$ 余りの生成を認め、KCN の存在下では NH_3 , H_2S 生成ともに促進された如き観を呈した。しかも NH_3 は KCN の存する場合に 30 分で最高の Peak を示した後、再び減少するのが認められた。この実験成績より KCN は Cysteine より脱 NH_3 , 脱 H_2S を阻害するものではないことが判明した。すなわち前述の実験は反応時間が 60~90 分であるために NH_3 形成が強く阻害される如くに見えたものである。

第 6 図



この NH_3 の再減少の機序の解明のためにさらに次の実験を行つた。第1表は Conway の微量拡散装置での NH_3 の定量に対する KCN の影響を検した成績であるが、本定量法において KCN は全く影響のないことを示している。

第 1 表

M/100(NH_4) ₂ SO ₄	1.0	1.0	1.0
M/10 Ph-buffer	3.0	3.0	3.0
Aq dest	0.5	/	/
M/10 KCM	/	0.5	/
M/100 KCM	/	/	0.5
50% H ₂ SO ₄	0.5	0.5	0.5
NH ₃	理論値	68γ/ml	68γ/ml 68γ/ml
	実測値	70.2γ/ml	68γ/ml 70γ/ml

第 2 表

	1	2	3	4	5	
Enzyme	2.0ml	2.0	1	2.0	1	
M/10 P-Buffer (pH 7.8)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
M/100 KCN	0.5	/	0.5	/	/	
3M/400(NH_4) ₂ SO ₄	0.5	0.5	0.5	/	0.5	
Aq dest	0.5	1.0	2.5	1.5	3.0	
50% H ₂ SO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
NH ₃	理論値	255γ/5.0ml	255γ	255γ	1	255γ
	実測値	130/5.0ml	210γ	260γ	(80γ)	255γ

そこで NH_3 が KCN の存在下、酵素の作用で何等かの変化を受けるのではないかと考え、第2表に示した如き各実験系列を作成、これを無気的条件下で、37.5°C 90 分反応せしめ、50% H₂SO₄ にて反応を停止せしめた後、同様な操作で NH_3 の定量を試みた。その成績は第2表に示した如くであり、硫酸安門のみのものおよび硫酸安門と KCN を incubate したもとの理論値とほとんど変わらないのに対し、硫酸安門と酵素とを incubate したものの NH_3 量は 210γ で少しく減少し、さらにこれに KCN を加えた incubate したものの NH_3 量は 130γ で著明な減少が認められた。なお本実験において酵素液のみのものにも 80γ の NH_3 が定量されたので、上述の酵素液を含む系列における NH_3 量は、80γ を差引いた値を記したものである。

考 案

Cysteine desulhydrase の反応機序については脱 Amino が先行するか、あるいは脱硫化水素が先に行われるかで多くの議論がなされた。われわれの鳥型結核菌竹尾株よりの酵素による実験成績は市原、須田等¹¹⁾ の土壌菌より抽出した酵素における成績によく一致している。すなわち NH_3 の離脱が先行し、脱 H_2S がこれに続く。しかも脱 H_2S には無機磷酸が必要である。また Arsenate, Semicarbazid による阻害も脱 H_2S のみを強く阻害する点で、該酵素が二元的に働いていること

の一つの裏づけともなり得る。すなわち Cysteine は本酵素によりまず NH_3 が遊離し、次に無機磷酸の関与のもとに H_2S が生成し、反応産物として焦性葡萄糖が形成されるものと考えられる。ただし脱 NH_3 中間産物については確定的な成績を得ることは出来なかつた。また本酵素が Mercapto pyruvate より脱 H_2S を行い得るや否やも、本物質を入手し得なかつたので実験を行っていない。

KCNの影響は NH_3 形成のみが強く阻害される点より、上記の如き反応機序と相反する如く思われ、興味を以て実験を行つたのであるが、前述の実験成績より、KCNは Cysteine よりの脱 NH_3 及び脱 H_2S に対しては阻害作用のないことを知り得た。その際認められた NH_3 の再減現象は NH_3 が KCN の存在のもとで、本酵素の作用により何かに利用される可能性を示すように思われる。そこで NH_3 , KCN, 酵素の反応系列を同様反応せしめたところ、同様に NH_3 の減少するのが認められた。かかる現象は全くの新事実であるので、なお実験継続中であるが、目下のところ酵素反応によるものであるとも未だ断定し得ないし、また反応産物についても全く不明の状態である。

総 括

鳥型結核菌竹尾株より抽出精製した Cysteine desulfhydrase について実験を行つた結果、

- 1) 本酵素活性は 50% Acetone により沈澱する部分に含まれる。
- 2) pH9 迄の範囲では pH の高い程活性が強い。
- 3) 反応はまず脱 NH_3 が起り、脱 H_2S がこれに続き、反応産物として焦性葡萄糖が生成する。脱 H_2S には無機磷酸の存在が必要である。 NH_3 および H_2S はほぼ等 Mol を証明する。
- 4) Arsenate, Semicarbazid は NH_3 に比し H_2S

形成を著明に阻害する。

5) KCN が存在すると一旦放出された NH_3 は時間とともに再び減少する。すなわち NH_3 は KCN の存在のもとで本酵素の作用により定量し得ない形となる。

終りに臨み、常に御懇切なる御指導、御鞭達を賜り、御校閲を戴いた堂野前教授および河盛助教授に深謝する。

文 献

- 1) 酒井：結核, 29, 161, 1954.
- 2) 山本：結核, 30, 252, 1955.
- 3) 伊藤・酒井・湯浅：昭和 29 年 11 月日本結核病学会近畿地方会
- 4) Tarr, H.L.A.: Biochem. J., 27, 1839, 1933.
- 5) Fromageot, C., Wookey, E. and Chaix, P.: Enzymologia, 9, 198, 1940.
Fromageot, C.: The Enzyme, 1, 1237, 1951.
- 6) Delwiche, E.A.: J. Bact., 62, 717, 1951.
- 7) Kallio, R.E.: J. Biol. Chem., 192, 371, 1952.
- 8) 三橋：日本細菌学雑誌, 4, 109, 1949.
- 9) Tamiya, N.: J. Biochem., 41, 199, 1954.
Tamiya, N.: J. Biochem., 41, 287, 1954.
- 10) Ohigashi, K., Tsunetoshi, A., Uchida, M. and Ichihara, K.: J. Biochem., 39, 211, 1952.
- 11) Suda, M., Kizu, Y., Saigo, T. and Ichihara, A.: Med. J. Osaka Univ., 3, 469, 1953.
Suda, M., Saigo, T. and Ichihara, A.: Med. J. Osaka Univ., 5, 127, 1954.
市原・西郷・須田：酵素化学シンポジウム, 第 10 集, 43, 1954.
- 12) Bernheim, F. and DeTurk, W.E.: Enzymologia, 16, 69, 1953.