

結核菌の焦性ブドウ酸代謝について

(第 2 報)

国立療養所刀根山病院 (院長 渡辺三郎博士)

山村 雄一・永管 徳子・今津 史郎

名古屋大学医学部第一内科 (主任 日比野進教授)

山 本 正 彦

(受付 昭和 30 年 3 月 22 日)

(本論文の要旨は第 28 回日本結核病学会総会において発表した)

I 緒 言

われわれは結核菌の物質代謝に関する研究を行つてゐるがその一部として焦性ブドウ酸の代謝について実験を行つた。

動物組織による焦性ブドウ酸の酸化的脱炭酸については、近年 Schweet 等¹⁾, Green 等²⁾, および Ochoa 等³⁾により比較的詳細に研究せられている。

一方細菌に関しては、1932 年 Barron⁴⁾の *Neisseria gonorrhoeae* による研究以来、*Lactobacillus delbrueckii*⁵⁾, *Proteus vulgaris*⁶⁾, *Escherichia coli*⁷⁾, *Clostridium butylicum*¹⁰⁾, *Streptococcus faecalis*¹¹⁾, 等を用いた研究が行われているが、その酵素化学的研究特に反応に關与する助酵素についての成績は必ずしも一致していない。

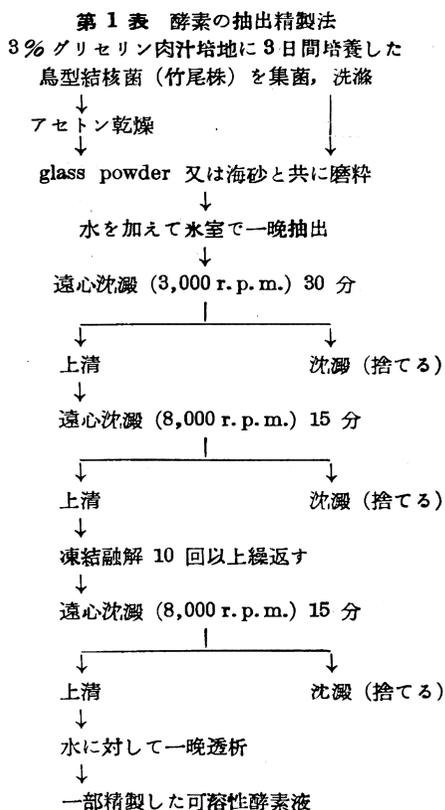
山村等はすでに鳥型結核菌 (竹尾株) の生菌浮游液が焦性ブドウ酸を酸化し、またそのアセトン乾燥菌によつて焦性ブドウ酸が酸化的脱炭酸を受け酢酸を生ずることを報告している¹²⁾¹³⁾。この報告においては、鳥型結核菌より焦性ブドウ酸脱水素酵素を抽出し、一定度精製を行つて、溶解性の酵素液とすることに成功し、その酵素化学的性状について検討を行つた成績を報告する。

II 実験方法

1. 酵素の抽出および精製

鳥型結核菌 (竹尾株) を 3% グリセリン肉汁培地に 37°C で 3 日間培養、濾過による集菌、滅菌生理的食塩水による洗滌を行つた後これをアセトン乾燥菌とするか、またはそのままよく冷却しながら海砂または glass powder とともに磨砕、滅菌蒸溜水を加えて水室で一晩抽出する。抽出液は 3,000 r. p. m. 30 分間遠心分離を行い、上清液をさらにアセトンドライアイスを用いて 10 回以上凍結融解を繰返す。生じた不活性の蛋白質を高速遠心沈澱 8,000 r. p. m. 15 分 2 回によつて除きその上清液を 0°C でプロチオン膜中にて蒸溜水に一晩透析する。かくして得た酵素液は無細胞状態で可溶性のほとん

ど透明なものである。その方法をまとめると第 1 表の如くである。



2. 酵素作用の測定

酵素作用の測定は次の三つの方法を用いた。

[a] メチレン青を水素受容体として酵素吸収によつて測定する方法

酵素吸収量は反応液の組成を酵素液 1.0 ml, メチレン青 1000 r, 焦性ブドウ酸ソーダ 100 μM, thiamine pyrophosphate (co-carboxylase, TPP と以下略記する) 200 r, MnCl₂ 500 r, M/10 磷酸緩衝液 (pH 6.0) 0.5 ml, 全量 2.2 ml として反応容器中央小室に 20% KOH 0.2 ml を入れて空気中で測定した。即ちこの場

合はメチレン青を水素受容体として焦性ブドウ酸の酸化分解を酸素吸収によつて測定した。

[b] 赤血塩を水素受容体とした場合

反応液の組成を酵素液 2.0 ml, 赤血塩 150 μ M, 焦性ブドウ酸ソーダ 100 μ M, TPP 100 τ , $MgCl_2$ 500 τ (*) M/2 磷酸緩衝液 (pH 6.0) 0.4 ml 全量 3.1 ml として容器は 100% 窒素ガスを充填して測定した。この場合 TPP, 焦性ブドウ酸をあらかじめ酵素と接触させて後赤血塩を側室より加えて反応を始めた時は第2表の如く他の場合より高い活性が得られる。これは基質と酵素とがあらかじめ接触しているために赤血塩による酵素の不活性化が防がれた為と思われる。この場合は赤血塩を水素受容体として生成する炭酸ガスを定量することによつて焦性ブドウ酸の脱水素反応を測定することになる。

第2表 酵素と反応物質との接触と酵素活性との関係
温度が平衡に達した後側室の物質を主室に入れて反応を開始する。数値は発生 CO_2 量 (μ l) を示す。

| 検 圧 計 | 主 室 | TPP, 焦性ブドウ酸, 赤血塩 | TPP, 焦性ブドウ酸 | TPP, 赤血塩 |
|-------------|-----|------------------|-------------|-------------|
| | 側 室 | — | 赤 血 塩 | 焦 性 ブドウ酸 |
| 反応時間 (分) | 10' | 17 μ l | 55 μ l | 5 μ l |
| | 30' | 97 μ l | 127 μ l | 12 μ l |

* $MnCl_2$ は $K_3Fe(ON)_6$ と不溶性の沈澱を生ずるので $MgCl_2$ を使用した。

[c] 2,6-dichlorophenol indophenol を水素受容体とした場合

反応液の組成は酵素液 1.0 ml, 焦性ブドウ酸ソーダ 50 μ M, TPP 200 τ , $MnCl_2$ 500 τ , M/10 磷酸緩衝液 (pH 6.0) 1.5 ml, 飽和 2,6-dichlorophenol indophenol 1.0 ml, 水を加えて全量 4.0 ml として Beckman 分光光度計を用いて波長 600 $m\mu$ における optical density の減少から脱色速度を測定する。この場合 2,6-dichlorophenol indophenol を水素受容体としてその還元的脱色によつて焦性ブドウ酸の脱水素反応を測定することが出来る。

3. 焦性ブドウ酸の定量

Friedman 法の清水氏改良法¹⁴⁾ により 2,4-dinitrophenylhydrazin を加えて生成する hydrazone のアルカリ性における呈色を Beckman 分光光度計を用いて波長 442 $m\mu$ において比色定量した。

さらに硫酸セリウム法¹⁵⁾をも参考として行つた。

4. 酢酸の定量

E. Ciaranfi and A. Fonnesu 法¹⁶⁾によつて行つたが、蒸溜法¹⁷⁾をも参考とした。

5. 基質その他の材料の調整

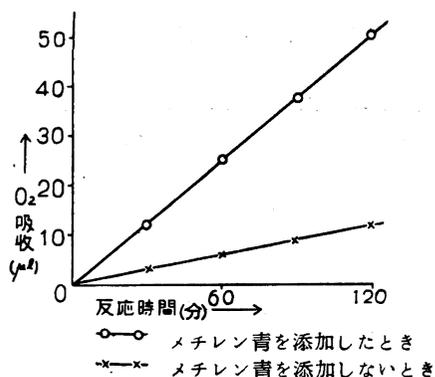
焦性ブドウ酸ソーダは市販の焦性ブドウ酸より Robertson 法¹⁸⁾により, diphosphopyridine nucleotide (DPN と以下略記する), triphosphopyridine nucleotide (TPN と以下略記する), coenzyme A (COA と以下略記する), adenosin triphosphate (ATP と以下略記する) はそれぞれ LePage¹⁹⁾²¹⁾, Ochoa²¹⁾, DuBois²²⁾の方法により合成あるいは抽出し, flavinnucleotide (FMN と以下略記する) は日本衛材会社より購入, TPP は武田薬品研究部より譲与せられた。

III 実験結果

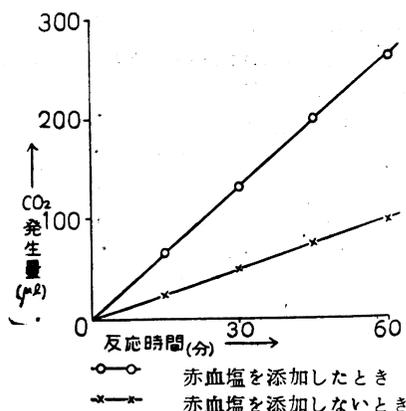
1. 水素受容体

第1図, 第2図および第5図に示す如く本酵素はメチレン青, 赤血塩, 2,6-dichlorophenol-indophenol を水素受容体としてそれぞれ焦性ブドウ酸を脱水素することが出来る。この場合水素受容体を添加しないと反応速度は著明に低下する。

第1図 メチレン青の影響



第2図 赤血塩の影響



2. 至適 pH

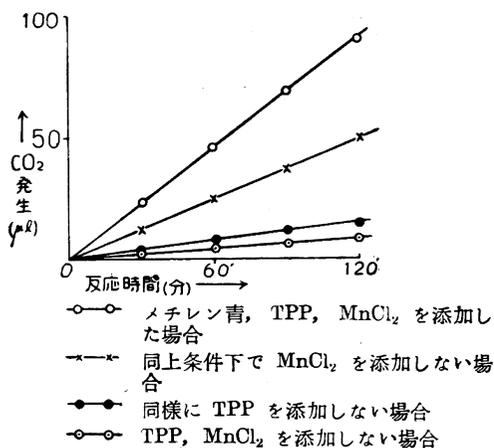
異つた pH の磷酸緩衝液を使用してメチレン青を水素受容体として酸素吸収量を測定したところ至適 pH は約 6.0 である。

3. 助酵素および金属イオンの影響

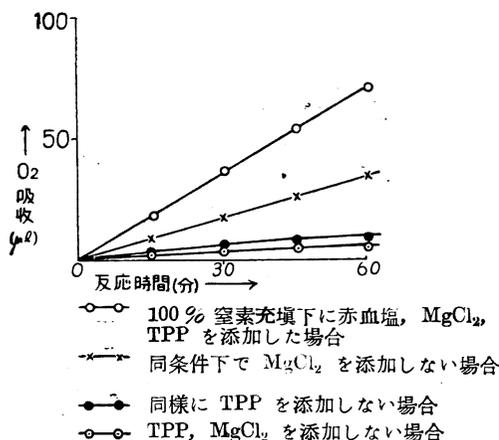
本酵素反応は水素受容体の如何にかかわらず助酵素として TPP と Mn^{++} または Mg^{++} 等の 2 価の金属イオンを必要とする。第3図, 第4図および第5図に示す如く金属イオン酵素標品より完全に除くことが困難なため

か、金属イオンの添加なしでも一定の活性を示すが、TPP を添加しないと反応はほとんど進行しない。

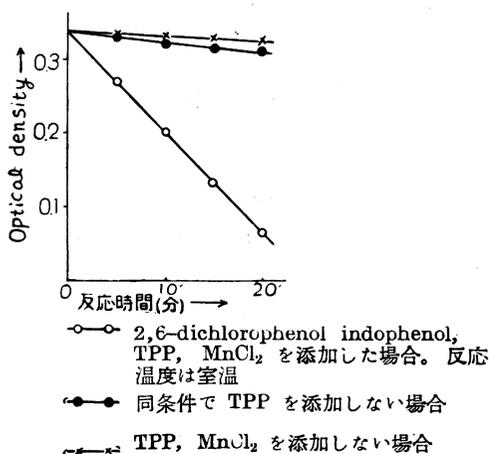
第3図 メチレン青を水素受容体とした場合の Mn²⁺, TPP の影響



第4図 赤血塩を水素受容体とした場合の Mg²⁺, TPP の影響

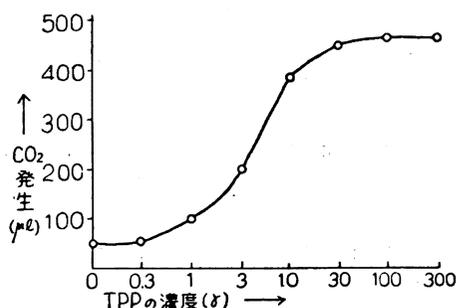


第5図 2,6-dichlorophenol indophenol の脱色に対する TPP, Mn²⁺ の影響



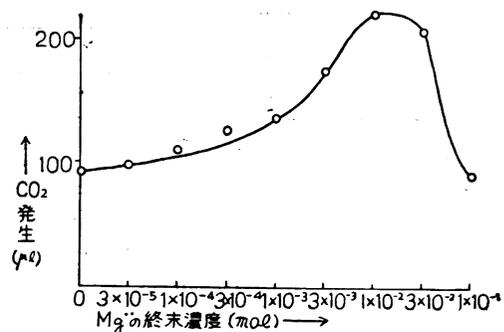
種々の濃度の TPP を加えた場合の影響を赤血塩を水素受容体として検すると第6図の如く 30 r で反応速度は最大に達する。Mg²⁺ についても同様の実験を行うと添加終末濃度 1×10⁻² M の場合に最大の活性を示しそれ以上の濃度ではむしろ阻害のおこることが第7図によって知られる。

第6図 反応速度と TPP の濃度との関係



赤血塩を水素受容体として測定種々の濃度の TPP を添加した

第7図 反応速度と Mg²⁺ の濃度との関係



赤血塩を水素受容体として測定 TPP は 200 r 添加し MgCl₂ の濃度を種々に変えた。

その他の種々の2価の金属イオンのうち促進作用を示すものは第3表の如くであり、Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ が特に著しい。

第3表 各種の二価金属イオンの賦活作用

メチレン青を水素受容体として 60 分間の酸素吸収量 (μl) を測定すべて金属は CoCl₂, NiCl₂, MnCl₂, MgCl₂, BaCl₂, CaCl₂, CdCl₂ の形で塩化物を加えた。終末濃度は 3×10⁻³M

| 金属 | Co ²⁺ | Ni ²⁺ | Mn ²⁺ | Mg ²⁺ | Ba ²⁺ | Ca ²⁺ | Cd ²⁺ | Fe ²⁺ | 対照 |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----|
| O ₂ 吸収 (μl) | 107 | 99 | 92 | 91 | 90 | 88 | 80 | 79 | 52 |

つぎに ATP を家兎筋肉より抽出し FMN と共に加えたが全く影響をみとめなかつた。

さらにこの酵素に家兎の肝臓、パン酵母、豚の肝臓よりそれぞれ抽出調製した CoA, DPN, TPN を添加したが、メチレン青、赤血塩を水素受容体としたいずれの場合においても全く影響をみとめなかつた。

これによつて本酵素は Ochoa⁹⁾ が *Escherichia coli* より抽出した CoA, DPN を必要とするものとは異なり, O'Kane⁷⁾ により *Proteus vulgaris* より抽出した酵素, あるいは Green 等¹⁾ によつて鳩の胸筋から得られた CoA, DPN を必要としないものと似ているものと思われる。

なおわれわれは他の助酵素の存在を知るために多量の透析外液を減圧濃縮したものや加熱酵素液等を加えてみたが TPP, 2 価の金属イオンの影響の他には著明な影響はみとめられなかつた。

4. 阻害

本酵素反応は第 4 表に示す如く Ag⁺, Hg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Al³⁺ 等の金属イオンによつて強く阻害される。この場合 2 価の鉄イオンが軽い促進作用を有するのに対して 3 価の鉄イオンが強い阻害作用を有することは興味深い事である。

第 4 表 各種金属による阻害影響

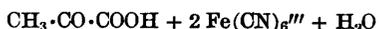
メチレン青を水素受容体として 60 分間の O₂ 吸収量 (μl) を測定各金属は AgNO₃, HgCl₂, CuCl₂, Al₂(SO₄)₃, FeCl₃ として添加

最終濃度は Ag⁺, Hg²⁺, Cu²⁺.....3×10⁻⁴ M
Al³⁺, Fe³⁺.....3×10⁻³ M

| 金属名 | 対照 | Ag ⁺ | Hg ²⁺ | Cu ²⁺ | Al ³⁺ | Fe ³⁺ |
|-------------------------|----|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| O ₂ 吸収量 (μl) | 53 | 7 | 5 | 15 | 7 | 7 |

5. 化学量論的実験

赤血塩を水素受容体として焦性ブドウ酸の脱水素反応についての化学量論的実験を行ったところ, その結果は第 5 表に示す如く焦性ブドウ酸の消費量, 炭酸ガスの発生量, 生成した酢酸量はほぼ等 mol で次の反応式に従つて反応が進行すると考えられる。



すなわち焦性ブドウ酸は酸化的に脱炭酸せられて酢酸と炭酸ガスを生じ, このとき赤血塩は黄血塩に還元せられると考えられる。

第 5 表 化学量論的実験

| | 焦性ブドウ酸消費量 | CO ₂ 発生量 (*) | 酢酸生成量 |
|------|-----------|-------------------------|---------|
| 実験 1 | 29.0 μM | 23.5 μM | 22.7 μM |
| 実験 2 | 36.8 | 36.8 | |

* CO₂ の滞留を防ぐ為に 3 N, H₂SO₄ を 0.3 ml 添加して反応を止め CO₂ の測定をした。

これによつてわれわれはアセトン乾燥菌の場合と同様に, 無細胞性の本酵素液によつても焦性ブドウ酸が酸化的に脱炭酸せられて酢酸を生ずることを知ることができた。

IV 結 論

以上われわれは鳥型結核菌 (竹尾株) から焦性ブドウ

酸脱水素酵素を無細胞状態に抽出しある程度の精製に成功した。本酵素はメチレン青, 赤血塩, 2,6-dichlorophenol indophenol などを水素受容体とし, TPP および Mg²⁺, Mn²⁺ 等の 2 価の金属イオンを添加したとき焦性ブドウ酸を酸化的に脱炭酸して酢酸を生ずる事を知つた。

御校閲を頂いた渡辺三郎院長ならびに日比野進教授に感謝する。本研究は文部省総合研究結核研究班 (班長今村荒男博士) の研究費によつて行われた。記して謝意を表する。

文 献

- 1) Jagannathan, V., and Schweet, S. R.: J. Biol. Chem., 196, 551 (1952)
- 2) Stumpf, P. K., Zarudnaya, K., and Green, O. E.: J. Biol. Chem., 167, 817 (1947)
- 3) Korke, S., Campillo, A., Gunsalus, L. C., and Ochoa, S.: J. Biol. Chem., 193, 721 (1951)
- 4) Barron, E. S. G., and Miller, C. P.: J. Biol. Chem., 97, 691 (1932)
- 5) Lipmann, F.: Enzymologia, 4, 65 (1937)
- 6) Stumpf, P. K.: J. Biol. Chem., 159, 529 (1945)
- 7) Moyed, H. S., and O' Kane, D. T.: J. Biol. Chem., 195, 375 (1952)
- 8) Kalnitsky, G., and Werkman, C. H.: Arch. Biochem., 2, 113 (1943)
- 9) Ochoa, S., and et. al.: Nature, 166, 439 (1950)
- 10) Koepsell, H. J., and Johnson, M. J.: J. Biol. Chem., 145, 379 (1942)
- 11) Dolin, M. I. and Gunsalus, L. C.: J. Bact., 62, 199 (1951)
- 12) 山村雄一, 笹川泰治, 山本泰弘: 結核, 24, 473 (1950)
- 13) 山村雄一: 総合研究結核研究班報告, 昭和 27 年 6 月
- 14) 清水泰二: 生化学, 22, 108 (1950)
- 15) Silverman, M., and Werkman, C. H.: J. Biol. Chem., 138, 53 (1941)
- 16) Cialanfi, E., and Fonniesu, A.: Biochem. J., 50, 698 (1952)
- 17) Quastel, J. H., and Webley, D. M.: Biochem. J., 35, 192 (1941)
- 18) Robertson, W. B.: Science, 96, 93 (1942)
- 19) Le Page, G. A.: J. Biol. Chem., 168, 623 (1947)
- 20) Le Page, G. A.: J. Biol. Chem., 180, 975 (1949)
- 21) Korke, S., Campillo, A. del, Gunsalus, L. C., Ochoa, S.: J. Biol. Chem., 193, 721 (1951)
- 22) Du Bois, K. P., Albaum, H. G., and Potter, V. R.: J. Biol. Chem., 147, 699 (1945)