

## 鳥型結核菌のDアミノ酸同化機作

(第1報) アミノ酸に化つて

斉藤正敏・近藤九・児玉光雄

青木国雄・田中伸一

名古屋大学医学部内科第一講座一指導 日比野進教授

受付 昭和31年1月7日

## 第1章 緒 論

E. Fisher 以来の広範な研究において、自然界に存するアミノ酸は $\alpha$ 炭素に関してすべてL系に属することが認められ、これは“natural form”と名付けられ、D系アミノ酸はこれに対して“unnatural form”と呼ばれてきたのである。したがってD系アミノ酸は人工的に合成される以外には自然界にそのまま存在することはないと信ぜられた時代が続いたのであつた。

しかしながら、Kögl および Erxleben<sup>1)2)</sup>は、1939年悪性腫瘍中の蛋白を水解して、Dグルタミン酸の存在を報告した。以来自然界に存するDアミノ酸はclose upされ、世界の注目を惹いたと言つてよからう。事実Köglの報告以来、多くの追試が行われ、反対論も少なしとしないが<sup>3)~9)</sup>、White<sup>3)</sup>は健常人肝臓より、Johnson<sup>15)</sup>は健常鼠肝臓よりDグルタミン酸の存在を認め、Dアミノ酸の天然的存在を報告しているのである。またLipmann<sup>4)</sup>は健常組織悪性腫瘍、Insulin、Bence-Jones 蛋白等を検して総蛋白窒素の0.6~3.7%がD型として存在することを認めた。

また微生物においても、Bruckner および Ivánovics<sup>5)</sup>は、*Bacillus anthrax*, *B. mesentericus*, *B. subtilis* を培養、菌体を除いた液よりDグルタミン酸をえている。Jacob および Craig<sup>6)</sup>、Smith および Timmis<sup>7)</sup>は、麦角アルカロイド中よりD-プロリンを認めている。Hotchikis および Dubos<sup>8)</sup>は土壌菌よりグリミシヂンおよびグリミシヂン酸をえた。これはトリプトファンが2~3分子あるPolypeptideであるが、これを加水分解して、約半分が非天然型アミノ酸であることを報告している。しかして後のSynge<sup>20)</sup>の報告によるとグリミシヂンSはフェニールアラニン、ヴァリン、プロリン、ロイシン結合物でフェニールアラニンはD型なることが明らかにされている。この報告と同様に最近では、1952年、Padmasine ayenger, Eugene Roberts<sup>9)</sup>は*Lactobacillus arabinosus*の加水分解において、全アミノ酸のほぼ半分がD型であると報告している。

以上によつて推測される如く、現在の趨勢としては、

ある菌にはDアミノ酸の存在するのは最早疑い難い現実である。

さてここで目を結核菌に転ずることとする。結核が病態論的、疫学的に特殊の様相を呈することは周知の事実であるが、結核症の本態の究明は病原体である結核菌の生態を正確に把握するにあることは論をまたないところであろう。日比野内科結核研究室はここに着目し、結核治療に病的存在である耐性問題と関連して結核菌の生化学的研究に数年来従事しているが、私もその一環として、Dアミノ酸と結核菌との関連について研究実験を行った。

結核菌が発育するに、グルタミン酸、アスパラギン等のLアミノ酸を窒素源とするソートンの培地に発育することは周知の事実であり、また現在大いに利用されているところであるが、私共の共同研究者である片山<sup>24)</sup>はDアミノ酸(Dグルタミン酸、Dアラニン)を窒素源とした培地においても、それに対応するL型とほぼ同様に発育することを認めた。この事実により、結核菌は非天然型たるDアミノ酸を菌体内に同化しうること論をまたないところであろう。

私は鳥型結核菌尾株を用い、Dアミノ酸の鳥型結核菌による同化機作を研究した。研究に先だつて、3つの可能性を考慮し、そのおのおのについて実験を施行した。すなわちOxidative deamination, transamination, racemizationである。

- 1) アミノ基転移 transamination
  - 2) ラセミゼーション Racemization
- D-aminoacid  $\rightarrow$  L-aminoacid

以上の方途につきおのおの実験を行い、若干の知見をえたのであるが、ここに第1篇として、Dアミノ酸に対するOxidative deaminationについて述べる。

## 第2章 実験材料および実験方法

## 第1節 使用培地の種類および試薬

(1) ソートン培地

菌の培養はソートンの液体培地を用いた。培地成分はグリセリン50ml、硫黄0.5g、第二磷酸カリ0.5g、クエ

ン酸アンモニヤ鉄 0.05 g, クエン酸ソーダ 2.5 g, 蒸溜水 940 ml, 窒素源として味の素グルタミン酸 4.0 gで、この割合で培地を作成し、pH 7.2 に修正し 1 時間 Autoklav にて滅菌使用した。

(a) 1/10M 磷酸緩衝液 (pH 7.2 に調製)

(b) 1/5M アミノ酸の調製

i) 1/5M グルタミン酸の調製

L, D 共グルタミン酸末 147mg を 5 ml の 1/10M, pH 7.2 の磷酸緩衝液に溶解した。

ii) 1/5M アラニンの調製

上記同様アラニン 89mg を 5 ml の磷酸緩衝液に溶解した。

**第2節 供試細菌の種類**

実験に供した鳥型結核菌は竹尾株である。

**第3節 供試アミノ酸**

アミノ酸はミノファーゲン本舗供試の特級アミノ酸を用いた。種類は L, D アラニン, L, D グルタミン酸である。供試アミノ酸の比旋光度は、液層の長さ 2 dm の管で 20°C において D 線 (5893Å) にて測定した<sup>2)</sup>。その際旋光計の測定誤差は ±0.02° であつた。測定値を表示すれば表 1 の如しである。またグルタミン酸についてはより溶解度の高いアルカリ側 (2 N NaOH) で比旋度を測定し文献値<sup>22)</sup>とほぼ一致することを確認した。すなわち表に見る如く、D グルタミン酸は  $[\alpha]_{20}^D = -9.12^\circ$ , D アラニンは  $[\alpha]_{20}^D = -2.62^\circ$  で D 型なることを確認した。

表 1 供試アミノ酸の比旋光度

	測定値	文献値
D アラニン	-2.62°	-2.7°
D グルタミン酸	-9.12°	-10.5°
L アラニン	+2.74°	+2.7°
L グルタミン酸	+10.1°	+10.5°

**第4節 実験方法**

(i) Warburg 検圧法

供試菌はソートン培地に 4~5 日 37°C 孵卵器において培養したものを、ガーゼで濾過し集菌し、それを Potter Elvehjem 型, Homogenizer にて均質化せしめ、さらに遠心 3 回洗浄せしめて用いた。すなわち洗滌菌体の湿潤重量 30mg を 1/10M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) とともに 1.0ml の浮遊液となし、約 5 分放置後、Warburg cup の主室に入れた。側室には 1/5M アミノ酸 0.1ml, 副室には CO<sub>2</sub> を吸収するために 20% の KOH を入れ反応系を作成した。(表 2 参照) 反応系は 37°C 恒温槽において、5 分間振盪後、側室の基質溶液を主室の菌浮遊液に静かに移し、さらにその後 2 時間振盪せしめ、検圧計において、約 10 分

毎に酸素吸収量を測定した。

(ii) 反応後発生アンモニヤ定量

恒温槽にて振盪後発生アンモニヤの定量は Conway 氏法により、Conway の dish を用いて実施した。Conway dish 内室に 1/50M の硫酸 1 ml, 外室に検体 1 ml を入れ、蓋を皿にワックスを以て密着せしめ、外室に磷酸緩衝液 (pH 10~12) を加え、さらに蓋を密着し、37°C 孵卵器において 2 時間放置し、蓋をあげ、内室における酸を 1/100M の苛性ソーダにて逆滴定し、アンモニヤを定量した。

表 2 D アミノ酸酸化反応系

洗滌菌	30 mg (湿潤重量)
1/10M 磷酸緩衝液	pH 7.2 1.0 ml
1/5M アミノ酸 (側室)	0.1 ml
蒸溜水	0.9 ml
20% KOH (副室)	0.2 ml
全量	2.2 ml

(ii) 反応後アミノ酸減少の判定

反応前後における基質の減少を判定するに、Nafton 氏法<sup>25)</sup>により Paperchromatograph, Beckman の分光光度計を用いた。すなわち 1/100M 基質 0.01 ml を No. 50 の東洋濾紙に塗布し、約 24 時間水飽和 Phenol を溶媒として展開し、室温にて乾燥後 0.2% の Ninhydrin 溶液を噴霧し発色せしめた。さらに発色せしめた Spot を切り出し、70% Aceton に浸し、5 分間振盪抽出し、抽出液を Beckmann 分光光度計を用い 630 mμ の波長で検した。

**第3章 実験成績**

**第1節 Warburg manometer による成績**

前記方法、反応条件にて、SM 感受性鳥型菌洗滌菌体の D グルタミン酸, D アラニンに対する酸素吸収を観察した。なお結核菌に基質を作用させて、その酸素吸収を測定する場合、多くの人によつて<sup>26)</sup>指摘されたる如く、菌の内部呼吸は甚だ大である。その弊を除くために菌体を aeration するとか、氷室内に staresage 生存せしめてその内部呼吸量を減少せしめるなどの方法があるが、いずれも零とすることは不可能であり、また適応酵素の産生を阻止する弊があるとされている。私は従つて新鮮菌液を実験に供した。従つてこの実験成績は、基質を加えた酸素消費量から内部呼吸量を減引したものをその基質を酸化した酸素消費量としてあらわした。

D グルタミン酸, D アラニンとも、適応期を見ることなし、ほぼ直線的な酸素吸収曲線を認めた。しかして D アラニンは D グルタミン酸に比して酸素吸収量は、1 時間後 65 l (D グルタミン酸 20 μl) 2 時間後 158 l (D グルタミン酸 41 μl) の値を示し、培養成績とほぼ一致

する結果をえた。

**第2節 Lアミノ酸酸化とDアミノ酸酸化の比較**

上記反応条件で、菌のL型アミノ酸に対する酸素吸収との比較を検した。すなわち同一条件において、D型、L型のアラニン、およびグルタミン酸を菌と作用せしめたが、図1 A, Bに見られる如く、両者の間には有意な差は認められなかつた。換言すれば、Dアミノ酸に対するOxidationはL型のものに対するそれとほぼ差がない。

**第3節 反応後発生アンモニアの定量**

第1節に述べたDアミノ酸に対する酸素吸収は、果してOxidationであるかを確実ならしめるため、2時間反応後の容器についてNH<sub>3</sub>の定量をConway氏法により実施した。

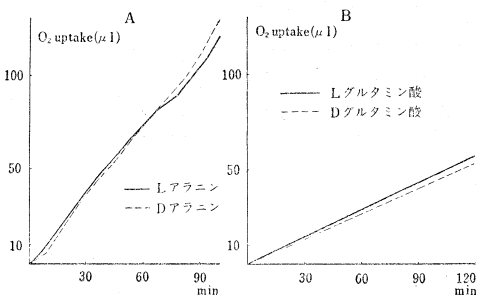
表3において見られる如く、反応後、それぞれNH<sub>3</sub>の発生せるを認めた。しかして発生NH<sub>3</sub>量は対応するL型アミノ酸とほぼ同値であり、アラニンはグルタミン酸よりも多量であるのは、第1節、第2節のWarburgのManometerによる実験成績を裏書して極めて興味深い。しかしながら表に見る如く、いずれも酸素吸収より計算した理論値に比較すると低値であるが、これはNH<sub>3</sub>が、可逆反応によりrecoverされるのか、あるいはそのまま菌体に同化されるのか不明である。

表3 反応後発生アンモニアの定量 (Conway 氏法)

基 質	実測値 (γ)	実測値 平均	理論値 (γ)	実測値: 理論値 (%)	実測値: 完全酸化理論値 (%)
Lグルタミン酸	5.0 6.5	5.7	46.2	12.1	3.4
Dグルタミン酸	5.0 6.5	5.7	44.2	12.9	3.4
Lアラニン	15.2 17.8	16.5	50.2	32.8	9.7
Dアラニン	16.5 17.8	17.2	47.6	36.2	16.0

**第4節 Beckman 分光光度計による基質の減少の定量**

図1 Dアミノ酸酸化とLアミノ酸酸化の比較



前記 Warburg の Manometer にて2時間反応せしめた Cup について、反応前と反応後において、第2章に述べた方法により (Paperchromatography) 基質の減少度を Beckman の分光光度計にて検し、表4の如き結果をえた。すなわち基質の減少は表の如く明らかである。

表4 Dアミノ酸の減少 (酸化反応後)

ペーパー展開後分光光度計による測定

	減少 (%)	平均 (%)
D ア ラ ニ ン	48.1	52.1
	56.1	
D グ ル タ ミ ン 酸	44.3	45.5
	46.6	

**第5節 Dアミノ酸酸化阻害反応**

第1節に述べたDアミノ酸酸化反応において INAH, KCN, AgNO<sub>3</sub> による阻害反応を実施した。図2に見られる如く、Dアラニン、Dグルタミン酸とも、AgNO<sub>3</sub> の阻害を著明に受け、KCN, INAH に対しては阻害をほぼ認めなかつた。表示すると、表5に見られる如くである。

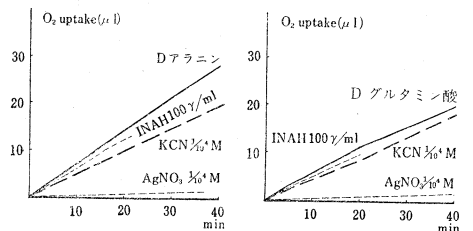
表5 Dアミノ酸酸化阻害反応

	終 濃 度	阻 害 度
AgNO <sub>3</sub>	1/10 <sup>2</sup> ~1/10 <sup>4</sup> M	著 大
KCN	1/10 <sup>3</sup> ~1/10 <sup>4</sup> M	略 認 め ず
INAH	100 γ/ml	略 認 め ず

**第6節 Dアミノ酸酸化に適水素イオン濃度**

Dアラニンに対してのOxidation Reactionにおいて最適pHを検した。すなわちpH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.2, 8.0, 9.0の7種類の磷酸緩衝液およびVeronal緩衝液を調製し、この異なるpH溶液を前記菌体浮遊液に加え、37°Cの恒温槽内

図2 Dアミノ酸酸化阻害実験



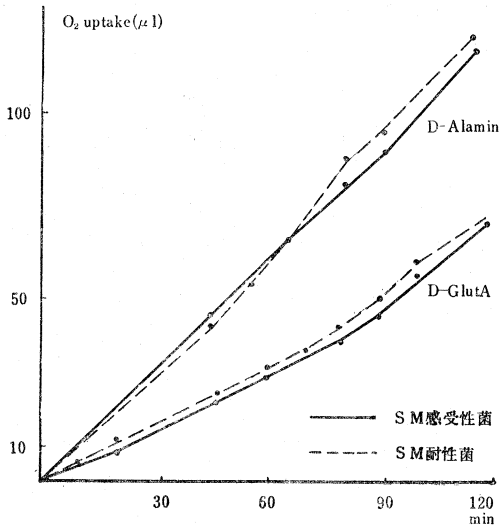
で作用せしめ、酸素吸収量を定量的に比較した。すなわち酸性側においては、pH 5.0 附近、アルカリ性側では、pH 8.0, 9.0 附近では、O<sub>2</sub> uptake は極めて低く、pH

6.0 近辺で peak が見られ、Optimal pH は pH 6.0 近辺にある。

### 第7節 ストマイ感受性菌と耐性菌のDアミノ酸酸化に対する比較

図3に見られる如く、Dアラニン、Dグルタミン酸に対する感受性菌と耐性菌の  $O_2$  uptake はほとんど差異を見出しえなかつた。すなわち耐性菌、感受性菌はDアミノ酸に対する代謝は差異がないと言つてよい。また両者とも、 $O_2$  uptake に適応期を要しなかつた。

図3 Dアミノ酸に対するSM感受性菌、耐性菌の酸化反応の比較



## 第4章 考 案

Dアミノ酸酸化酵素に関しては H.A. Krebs<sup>10)</sup>が1933年この酵素が動物組織に存在することを明らかにし、さらに5年後、O. Warburg, W. Christian<sup>11)</sup>はその本体が FAD を co-enzyme とした黄色酵素であることを報じ、この酵素の広い分布が動物組織、微生物に存在することが示されている。私は前章において述べた如く、Dアラニン、Dグルタミン酸を基質とし、鳥型結核菌浮遊液を以つてその酸化的脱アミノを検した。

しかしてDアミノ酸に対して、鳥型結核菌がL型のアミノ酸とほとんど同様に酸化的脱アミノする推測性を、アンモニアの定量、基質の減少度測定と同時に Warburg の Manometer を主体とせる実験において認めた。Manometric method における酸素吸収曲線は、菌の培養実験成績に一致し、また Conway 氏法によるアンモニアの定量成績は、Manometric method における成績に合致していた。以上によつて鳥型菌がDアミノ酸に対して Oxidative deaminase を、対応するL型のものと同様に有することが認められると言つてよいだろうと思ふ。

また共同研究者たる川瀬<sup>12)</sup>は鳥型菌を加水分解して菌体内アミノ酸が次の種類よりなることを報じている。すなわちアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、グリシン、スレオニン、アラニン、バリン、メチオニン、ロイシン、フェニールアラニン、リジン、アルギニン、シスチン、プロリン以上14種のアミノ酸を認めている。しかしてこの実験において、生じたアンモニアは菌体内においてケト酸と反応してアミノ酸を合成して行く過程が推測されるのである。

緒論に述べた如く、Lactobacillus arabinosus<sup>9)</sup>の構成アミノ酸のほぼ半分がD型であることが認められているのであるが、この問題に関しても同様に、今後、結核菌体構成アミノ酸のD型存在の決定にすむべきであろう。

私は後の実験において、鳥型菌に Racemase の存在を推測せしめる結果を得た。従つてこの実験においてDアミノ酸に対する Oxidative deamination はまず Racemization を前提とするのではないかとの想像が持たれる。しかしながら、阻害実験において前記した如く、KCN, INAH にほぼ阻害なく、 $AgNO_3$  に著明な阻害を認めた事実より、直接Dアミノ酸に対する Oxidative deaminase の存在を認めてよいと思ふ。すなわち米田<sup>15)</sup>は Vitamin B<sub>6</sub> Pyridoxal phosphate に対して INAH が inhibitor であることを認めているが Pyridoxal phosphate は Racemase の co-enzyme であることより、Racemization の前提は否定できると言つてよからう。また FAD は重金属ことに  $AgNO_3$  によつて阻害され、また青酸はD-アミノ酸 Oxidase に影響を与えないという事実<sup>23)</sup>によるのである。

また山村<sup>14)</sup>は主としてD, Lロイシンに関して次の如く報告している。Lロイシンに対する適応菌はLロイシンに対して、酸化するに適応期を有さず、Dに対してはある程度の適応期を有し、その逆の場合も同様であり、すなわちこのアミノ酸 Oxidase は adaptive enzyme なることを認めているが、私のD, Lグルタミン酸、アラニンに対する Oxidation は適応期を認めず、constitutive enzyme の如き結果を得たのである。またSM耐性菌と感受性菌とともに同様な酸化曲線を得られたことは、耐性菌においてもDアミノ酸代謝の一環である Oxidation においてはなんら感受性菌と差異がないと言つてよい。

## 第5章 結 論

鳥型結核菌竹尾株の菌浮遊液を用い、Dアラニン、Dグルタミン酸に対する Oxidative deamination reaction につき Warburg manometer を主とした実験を行い、次の結果を得た。

1) 鳥型結核菌はDアラニン、Dグルタミン酸に対して Oxidative deaminase を有する。

i) 酸素吸収はDアラニンの方がDグルタミン酸より大である。(O<sub>2</sub> uptake は2時間反応後Dアラニン 158  $\mu$ l, Dグルタミン酸 41  $\mu$ l)

ii) 対応するLアミノ酸と酸素吸収においてはほとんど差は認められない。

iii) 酸化は適応期が認められない。

iv) 発生アンモニヤを定量し, Dアラニンは酸素吸収量よりの理論値の約36%, Dグルタミン酸は約13%であることを認めた。

v) 基質の減少を Paperchromatograph, Beckmann の分光光度計により認めた。

2) この反応は AgNO<sub>3</sub> によつて著明な阻害を受け, INAH, KCN による阻害は著明でない。

3) SM耐性菌, 感性菌とも酸化反応に差はほとんど認められない。

4) 至適 pH は 6.0 近辺である。

#### 参考文献

1)2) Kögl, F., Erxleben : H. 258, 57, 1939 ;

Nature, 144, 111, 1939.

3) White : J. Biol. Chem., 130, 435, 1939.

4) Lipmann Behrens, Kabat, Burk : Science, 91, 21, 1940.

5) Bruckner, Ivánovics : H. 247, 281, 1937 ; Ztscher Immunitäts, 90, 304 ; 91, 175, 1937.

6) Jacob, Craig : J. Biol. Chem., 104, 547, 1934.

7) Smith, Timmis : J. Chem. Soc., 396, 1936.

8) Hotchikis, Dubos : J. Biol. Chem., 132, 791,

1940.

9) Padmasine Ayenger, Eugene Roberts : J. Biol. Chem., 197, 1952.

10) H.A. Krebs : Zs. f. Physiol. Chem., 217, 191, 1933.

11) O. Warburg, W. Christian : Biochem. Z., 289, 150, 1938.

12) 川瀬好生 : 未発表

13) 米田正彦 : 生体の科学, 1952 ; Nature, 170, 803, 1952.

14) 山村雄一 : 酸素科学の進歩, 第2集, 1950 ; 結核菌の生化学, 1955.

15) Johnson, White, Chibnall : Ann. Rev., 9, 282, 1940.

16) Graff : J. Biol. Chem., 130, 13, 1939.

17) Chibnall, Rees, Iristram, Williams A. Bogland : Nature, 144, 71, 1939.

18) Town : Nature, 145, 312, 1940.

19) Konikova : Nature, 145, 312, 1940.

20) Synge : Biochem. J., 39, 363, 1945.

21) J.H. Hathew, J.W. Williams, G.W. Murrhy, R.A. Albery : Experimental Physical Chemistry, 1949.

22) 赤堀四郎 : アミノ酸および蛋白質, 1946.

23) 奥貫一男 : 標準生化学実験, p. 309, 1953.

24) 片山富男・田中伸一 : 結核, 29 : 11, 1954.

25) Nafton : Nature, 161, 963, 1948.

26) Edson, N.L. : Bact. p.v.v. 15 : 147, 1951.