

鳥型結核菌のDアミノ酸同化機作

(第2報) Dアミノ酸に対するアミノ基転移反応

齊藤正敏・田中伸一

名古屋大学医学部内科第一講座—指導 日比野進教授

受付 昭和31年1月7日

第1章 緒言

鳥型結核菌がDアミノ酸(Dグルタミン酸, Dアラニン)を単一窒素源とするソートンの培地に発育するという事実より, 鳥型菌のDアミノ酸に対して, Oxidative deamination 能を有することを第1報に述べた。本研究の共同研究者たる川瀬¹⁾は前報に述べた如く, グルタミン酸, パリン, アルギニン等14種のアミノ酸が菌体構成アミノ酸であることを認めている。

しかしながら14種の多種のアミノ酸を生ずるには, グルタミン酸とそれぞれのアミノ酸に相当するケト酸との間のアミノ基転移(Transamination)の存在を推定せしめる。事実伊藤ら²⁾は1954年鳥型菌のLアミノ酸に対するTransaminaseの存在を報告している。私の実験においても, これらのDアミノ酸に対するTransaminationの可能性を考え, Dアミノ酸を基質として, 菌のアセトンパウダーをEnzymeとし, Transamination反応を検した。得た知見をここに報告する。

第2章 実験材料および実験方法

第1節 実験材料

使用培地, 供試細菌, 供試アミノ酸は前報と同様

(イ) 鳥型結核菌アセトンパウダーの調製

ソートンの培地に3~5日37°培養器で培養した鳥型菌を集菌しPotter Elvehjem Homogenizerにて均等化せしめ, 蒸溜水にて3回速洗洗滌した。氷冷蒸溜アセトン(-15°-)に約15分浸し攪拌せしめた菌をスツチエにて吸引濾過し, 真空乾燥器にて乾燥しアセトンパウダーを調製した。

(ロ) 1/2M焦性葡萄糖ソーダの調製

焦性葡萄糖ナトリウム粉末110mgを2mlの蒸溜水に溶解せしめ実験に供した。

(ハ) 1/2Mαケトグルタル酸の調製

αケトグルタル酸粉末146mgを2mlの蒸溜水に溶解せしめた。

(ニ) Paperchromatographの材料

i) 80% Phenolの調製

Phenolを温水にて溶解し, 蒸溜水と2:8の割に混じ,

これを溶媒に用いた。

ii) 0.02% Ninhydrin 液の調製

Ninhydrin 粉末0.2mlを含水Butanol 100mlに溶解し, 発色剤として用いた。

第2節 実験方法

アミノ酸は前述した如く, Dグルタミン酸, Dアラニンを用いたが, 対応するLアミノ酸についても対照として同様に実験した。

菌アセトンパウダー30mgを1/2M磷酸緩衝液pH7.2に浮遊せしめたものと, 1/2MD-あるいはL-グルタミン酸0.5ml, 1/2M焦性葡萄糖0.2ml, 蒸溜水0.3mlを試験管内に混合せしめた。また一方前者同様, 菌アセトンパウダー-浮遊液と1/2MD, あるいはLアラニン, 1/2Mαケトグルタル酸0.2mlと混じた。表示すると, 表1の如くである。

表1 アミノ基転移反応系

I	1. 菌(アセトンパウダー)	30 mg
	2. 1/2M磷酸緩衝液 pH 7.2	1.0 ml
	3. 1/2MD-あるいはL-グルタミン酸	0.5 ml
	4. 1/2M焦性葡萄糖	0.2 ml
	5. 蒸溜水	0.3 ml
II	1. 2. 5. 前者と同様	
	3. 1/2MD-or L-アラニン	0.5 ml
	4. 1/2Mαケトグルタル酸	0.2 ml

Transaminationの惹起はPaperchromatographyにより検した。すなわち上記反応系を37°C恒温槽にて6時間振盪作用せしめた。これに氷醋酸1滴滴下, 沸騰水に約5分間接触反応を停止した。しかしてその上清を0.01ml, 東洋濾紙No. 50に塗布し, 80% Phenolを溶媒とし, 一次元のPaperchromatogramで約24~36時間展開した。展開は25°C(±1°C)の孵卵器内に置いた径25cm, 高さ50cmの標本瓶内にて実施した。濾紙を乾燥後, 0.2% Ninhydrin Butanolを霧吹きで一様に噴霧し, 乾燥発色せしめた。

第3章 実験成績

第2章表1の如き反応系を用い, Paperchromatographyにより, Transamination Reactionを実施し,

次の如き結果をえた。

〔I〕 Dグルタミン酸+焦性葡萄糖

→αケトグルタル酸+アラニン

まず予備実験にて、L, Dグルタミン酸, LDアラニンの Rf はそれぞれ 0.21, 0.56 であることを確認した。LDとも Spot の大きさ, 濃度は同様であつた。

i) 表1 I の反応系による実験成績は図1の如くで、反応前では、基質たるグルタミン酸のみの出現しか見ないが、反応後では、アラニンの Spot をD, Lともに認めた。しかし Rf 値はアラニン 0.56 で、Sample の Rf 値と一致した。また、生成アラニンの上方 Rf 0.74 に不明の小 Spot を認めた。

また表2の如く、Dグルタミン酸と菌のみのもの、焦性葡萄糖と菌のみのもの、菌のみのものについては、アラニンの Spot を見なかつた。また、出現アラニンの Spot の大きさはLグルタミン酸を基質としたものよりも小であり、色調も淡かつた。

ii) 出現アラニンの Spot をきり出し、アセトンにて抽出し Beckman の分光光度計にて測定し、Lグルタミン酸を基質とした場合の出現アラニンの Spot と比較するに、Spot は後者の65%であつた。

表 2

反 応 系	アミノ酸の Spot	
	グルタミン酸	アラニン
Dグルタミン酸+焦性葡萄糖+菌	○	○
Dグルタミン酸+焦性葡萄糖	○	/
Dグルタミン酸+菌	○	/
焦性葡萄糖+菌	/	/
菌	/	/

iii) 阻害反応として、終濃度 1/4M KCN, 1/8 M AgNO₃ のおのおのの阻害反応を検した。Spotの大きさにより判定するに、KCN には著明な阻害を見ず、AgNO₃ に阻害を見た。

iv) 反応時間による最高活性を見るために、2, 4, 5, 6, 7 時間についておのおのの反応を停止して観察した。2 時間後のものは、アラニンの Spot をほとんど認めることはできなかつたが、4 時間以後のものは、アラニンの Spot を明らかに認めえた。しかし鮮明度は6時間>#7, 4, 5時間>2時間であり、6時間後のものが、一番最高活性が高い結果をえた。

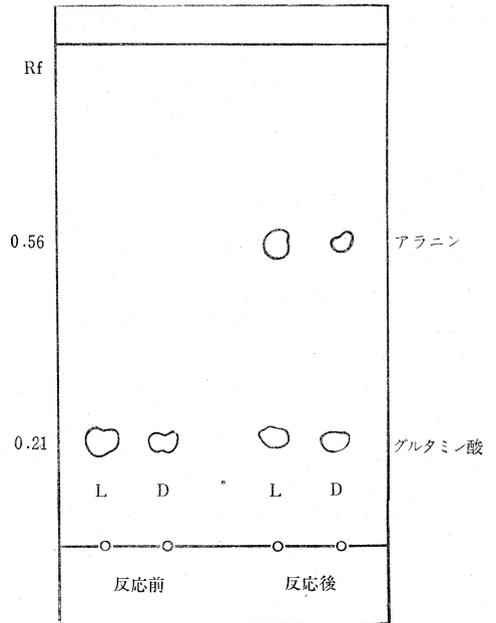
v) またSM耐性菌にこの反応に対する差異の有無を検するため、同様の実験を行つたが、同様にアラニンの Spot を認めその大きさ、鮮明度は感受性菌によると同様で、感受性菌との間に何らの差異を認めなかつた。

〔II〕 Dアラニン+αケトグルタル酸

→焦性葡萄糖+アラニン

i) 表2 IIによる反応系による実験成績は図2に見る如く、反応前では、グルタミン酸の Spot を見ないが、反応後では Rf 0.21 に対照の Sample と同様にグルタミン酸の Spot を認めた。

図 1 L-D-グルタミン酸に対するアミノ基転移反応



また表3の如く、Dアラニンとαケトグルタル酸(以下αKGと略)、Dアラニンと菌、αKGと菌、菌のみのものではグルタミン酸の Spot を見なかつた。また出現グルタミン酸の Spot はLアラニンを基質としたものより、大きさも小さく、鮮明度もやや淡かつた。

表 3

反 応 系	アミノ酸の Spot	
	グルタミン酸	アラニン
Dアラニン+αKG+菌	○	○
Dアラニン+αKG	/	○
Dアラニン+菌	/	○
αKG+菌	/	/
菌	/	/

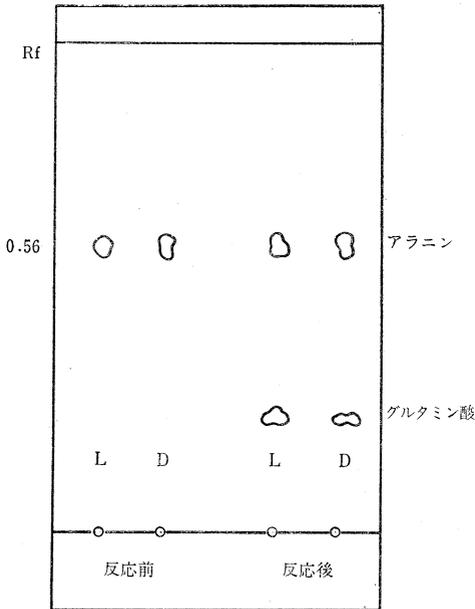
ii) 分光光度計による Spot の大きさの比較はLアラニンを基質とした場合の62.1%であつた。

iii) 阻害反応は前者と同様に AgNO₃ に阻害をみ、KCN には阻害は全く見なかつた。

iv) 活性の時間的変動は前者の実験と同様に、2 時間ではグルタミン酸の出現を見ず、6≐7時間>4.5時間>2時間であつた。

v) SM耐性菌による実験も同様にグルタミン酸の Spot を感受性菌と同様に認めた。

図2 L-D-アラニンに対するアミノ基転移反応



第4章 小括および結論

Transamination は周知の如く、甲アミノ酸から NH_3 が放たれることなく、同時に存する α ケト酸に NH_3 が移動して、甲アミノ酸はその α ケト酸となると同時に、乙アミノ酸が形成される過程を言うのである。この Transamination は Braunstein および Kritzmann³⁾ が 1937年鳩の胸筋を用いてグルタミン酸と焦性葡萄糖とから、 NH_3 の生ずることなく α -KG とアラニンの生ずることを認めたことに始まる。かれらはこの反応は大抵の Monocarboxylic aminoacid は Aminoacceptor として α -KG またはオキザロ酢酸により Transamination を行うものであり、また転移によるアミノ酸は天然型すなわち L アミノ酸に限るものと報告した。しかしながら Euler ら⁴⁾ は D アミノ酸に対する Transamination の存在を思惟せしめる成績を報告している。すなわち Jensen 氏肉腫の D アミノ酸に対する Transamination を L アミノ酸に対する Transamination と比較して、加えたオキザル酢酸の消失は、L グルタミン酸の場合が、D グルタミン酸の場合より遙かに速かであるが、肉腫エキスでは後者が顕著であることを認めた。また Braunstein ら⁵⁾ はこれに対して廿日鼠腫瘍を用いて追試し、腫瘍組織での Transamination は L アミノ酸のみが健常組織より弱いだけで、D アミノ酸においては、腫瘍の方が健常より高いか、あるいは少なくとも同程度であることを認めている。1940年 Cohen⁶⁾ は筋肉組織よりこの酵素を抽出

精製し Transaminase と命名した。しかし彼はこの反応はグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンとそれらのケト酸との間にも認められると報告した。以後今日まで、この2つの Transaminase が、広く研究され、動物⁹⁾、細菌^{7,8)} に広く存在することが明らかになった。さらにそれに続いて、Lichstein, Umbreit^{7,8)} らにより、ピリドキサル磷酸が、Co-enzyme として働くことが分つてきた。1950年 Gunsalus¹⁰⁾ の報告によると、Transaminase を有する細菌は *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* etc. 多数の細菌がこれを有し、いずれも Aminoacceptor として α -KG, Aminodonor としてアスパラギン酸、アラニン、バリン、ロイシン、ノルロイシン、トリプトファン、チロジン、フェニールアラニン、メチオニン等の存在の下にグルタミン酸の形成を認めている。

結核菌については、酒井¹¹⁾ は 1954年 BCG および鳥型菌を使用してその浮遊液または抽出液が、 α -KG とアスパラギン酸との間に、Transamination の有するのを認め、庄司、山上¹²⁾ は、グルタミン酸と焦性葡萄糖からアラニンの生成することを認めている。私は D グルタミン酸、D アラニンを Aminodonor とした Transamination 実験を L 型のものに対する Transamination と対比しながら施行し、それらの D 型に対しての Transamination を Paperchromatography により現象的に認めた。しかしながら私は後の実験において、Racemization の可能性を認める成績をえたので、この Transamination は Racemization を前提として、化生せる L アミノ酸に対して Transamination が行われたのかも知れない。このことに関しては、さらに研究が必要とされよう。しかしながら鳥型結核菌に非天然型アミノ酸に対する Transamination が現象的に認められることは極めて興味深いと思われるのである。

また L 型のものに比して、両反応とも出現アミノ酸が小さいことは、前述せる Braunstein³⁾ の実験結果より首肯されうと思う。

第5章 結 論

鳥型結核菌アセトンパウダーを Enzyme とし、D グルタミン酸、D アラニンを Aminodonor、焦性葡萄糖、 α ケトグルタル酸を Aminoacceptor とする Transamination 実験を Paperchromatography 法により次の如き結果をえた。

- 1) D グルタミン酸と焦性葡萄糖との反応によりアラニンの出現を認めた。
- 2) 同様に D アラニンと α ケトグルタル酸との反応によりグルタミン酸の出現を認めた。
- 3) 両反応とも KCN の阻害はほとんど認めなかつたが、僅かながら AgNO_3 により阻害を認めた。

- 4) この反応はそれぞれ対応するL型に対するTrans-amination より活性度は低く、約62~65%であつた。
- 5) SM耐性菌も感受性菌と同様に転移能を有し、その間に差異は認められなかつた。

文 献

- 1) 川瀬好生：未発表
- 2) 伊藤文雄・菅野忠彰：結核，第29巻増刊，1954.
- 3) Braunstein, A.E., Kritzmman, M.G. : Enzymologia, 2, 129, 1937.
- 4) Euler et al. : Krebsforsch, 49, 46, 1937 ; H. 254, 61, 1938; H. 259, 201, 1939 ; Naturwissenschaften, 27, 214, 1939.
- 5) Braunstein : Enzymologia, 7, 25, 1939; Kritzmman : Nature, 143, 603, 1939.
- 6) Cohen, P.P. : J. Biol. Chem., 131, 565, 585, 1940.
- 7) Lichstein, Gunsalus, Umbreit : J. Biol. Chem., 161, 311, 1945.
- 8) Lichstein, Cohen : J. Biol. Chem., 195, 367, 1945.
- 9) Green, Leloir, Norito : J. Biol. Chem., 161, 559, 1945.
- 10) Feldmann, Gunsalus : J. Biol. Chem., 187, 821, 1950.
- 11) 酒井：結核，29, 161, 1954 ; 酒井・伊藤：結核，29, 237, 1954.
- 12) 庄司・山上：結核，28, 577, 1953 ; 29, 特別号, 44, 1954.