

鳥型結核菌のDアミノ酸同化機作

(第3報) Dアミノ酸に対するラセミゼーション

齋藤正敏・田中伸一

名古屋大学医学部第一講座

受付昭和31年1月7日

第1章 緒言

第1報および第2報において、私は鳥型結核菌のDアミノ酸に対する Oxidative deamination および Transamination の現象的の認知を報告した。しかしながら後者に関しては、D→L化する Racemization が前段階として Transamination が行われたのかも知れないという疑問が持たれる。私はこの見地より、Dアミノ酸に対して、鳥型菌のアセトンパウダーを Enzyme とし、Racemization の実験を行い、その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、供試鳥型結核菌、供試アミノ酸、アセトンパウダーの調製、ペーパークロマトグラフの材料は第1、2報と同じ。

グルコース・ブイオン

2%の割合に葡萄糖を含む普通ブイオンをアルカリ性(pH 7.8)と酸性(pH 5.6)のものを作製し、蒸気釜で120°C、1時間3回滅菌して使用した。

第2節 供試大腸菌の種類

Bacillus. coli communis を使用した。

第3節 実験方法

(1) ソートンの培地に3~5日培養せる鳥型結核菌をアセトンパウダーとした。その30mgを1mlのpH 7.2 1/5M 磷酸緩衝液に浮遊せしめ、これを Enzyme preparation とし、1/5MDアラニン、あるいはDグルタミン酸0.5ml、蒸溜水0.5ml(全量2.0ml)試験管内に混じ、これを37°C恒温槽にて、3時間振盪し、5分間沸騰水に浸して反応を停止した。なお、

A: Dグルタミン酸と菌と作用したものの上清

B: Dアラニンと菌と作用したものの上清とする。

(2) 上記pH 7.8、pH 5.6の2種類の葡萄糖ブイオンに37°C、8時間培養された大腸菌をさらにそれぞれ、前記2種のアルカリ性、あるいは酸性のブイオンに15~16時間培養せしめた。それを遠沈し、蒸溜水にて3回洗滌したものを、Lグルタミン酸 Decarboxylase prepara-

tion (酸性培地)、およびLアラニンならびにLグルタミン酸 Oxidase preparation (アルカリ性培地)とした。しかして Warburg の Manometer を用い、(1)よりえた上清について、それぞれの preparation を働かせて型の判定を検した。換言すると、鳥型菌に Racemase が存在すれば(1)によりえた上清はそれぞれL型のアミノ酸が存在することになる。その判定に上記L型に対する Decarboxylase preparation を用い、その脱炭酸を検し、またL型に対する Oxidase を用い、その酸素吸収を見たのである。

(i) Dグルタミン酸+鳥型菌

(a) 酸性培地に発育せる大腸菌湿潤量 30 mg を 1/5M pH 4.5 の Acetate 緩衝液に浮遊せしめ、それを蒸溜水 0.8 ml とともに Warburg の Cup 主室に、また上清 A を側室に加え、37°C 恒温槽にて、5分間振盪、次いで側室内液を主室に傾入し、約10分毎に検圧計のヨミをとり、60分の間 CO₂ の発生を検した。また反応前後において Paperchromatography を行い、反応後のアミノ酸の存在を検した。

(b) またアルカリ性培地に培養した大腸菌をLグルタミン酸、Oxidase preparation とし、Aを基質とし、Manometric method により、酸素吸収を検した。

以上を要約して表示すると表1の如くである。

表1 Racemase 反応系 I

I. (1) 鳥型菌アセトンパウダー (30mg) 浮遊液	1.0 ml
(2) 1/5MDグルタミン酸	0.5 ml
(3) 蒸溜水	0.5 ml
3時間、37°C恒温槽にて振盪、5分間沸騰水に浸して反応停止、上記上清をAとす。	
II. (1) 大腸菌(酸性 Bouillon にて培養したもの)	30 mg
(2) pH 4.5 Acetate 緩衝液	1.0 ml
(3) A	0.2 ml
(4) 蒸溜水	0.8 ml
Warburg Manometer にて脱炭酸を検す。	
III. (1) 大腸菌(アルカリ性 Bouillon にて培養したもの)	30 mg

- (2) pH 7.2 磷酸緩衝液 1.0 ml
- (3) A 0.2 ml
- (4) 蒸溜水 0.8 ml
- (5) 20% KOH (副室) 0.2 ml

Warburg Manometer にて酸素吸収を検す。

(ii) Dアラニン+鳥型菌

この場合も前者と同様に、酸性ブイオンに培養した大腸菌とBを Manometric method で作用せしめ、その脱炭酸を検した。(表2参照)

表2 Racemase 反応系II

- I. (1) 鳥型菌アセトンパウダー (30mg) 浮游液 1.0 ml
- (2) 1/5MDアラニン 0.5 ml
 - (3) 蒸溜水 0.5 ml

上記上清をBとす。

- II. (1) 大腸菌 (アルカリ性 Bouillon に培養せるもの) 30 mg
- (2) pH 7.2 磷酸緩衝液 1.0 ml
 - (3) B 0.2 ml
 - (4) 蒸溜水 0.8 ml
 - (5) 20% KOH (副室) 0.2 ml

Warburg Manometer にて酸素吸収を検す。

第3章 実験成績

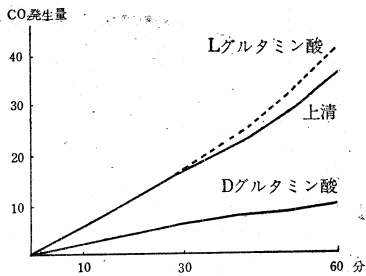
〔I〕 Dグルタミン酸に対する Racemization

前節に述べたように、Dグルタミン酸と鳥型菌アセトンパウダーを作用した上清に、大腸菌のLグルタミン酸 Decarboxylase, Oxidase を作用した成績を次に述べる。

(1) Lグルタミン酸 Decarboxylase preparation による成績

図1に見る如く、対照としてDグルタミン酸のみを振盪したものに、大腸菌の Decarboxylase preparation を

図1 結核菌とDグルタミン酸を作用せしめた上清に対する大腸菌の脱炭酸作用

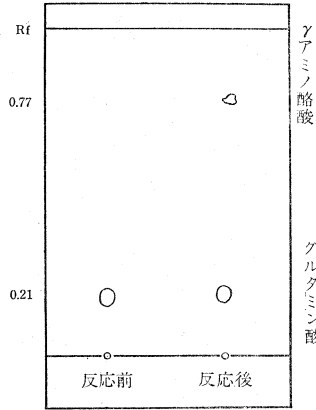


作用せしめたものは、わずかにCO₂発生を認めたにすぎなかつた。しかしながら、菌のアセトンパウダーを作用せしめた上清は、対照であるLグル

タミン酸に対する Decarboxylation と同様な CO₂ 発生を認めた。

また反応前後の Paperchromatograph において、反応後の、paper において Rf. 0.77 に Spot を見、γアミノ酪酸の存在が推測される。(図2参照)

図2 Dグルタミン酸に対するラセミゼーション反応前後の Paperchromatograph

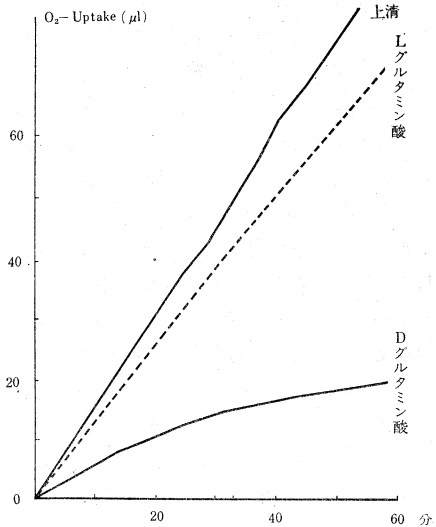


(2) Lグルタミン酸 Oxidase による成績

Dグルタミン酸に対する鳥型菌の Racemization 能をさらに確実ならしめるため、大腸菌の Oxidase preparation を作用せしめ Manometric method にて O₂ 吸収を見た。図3に見る如く、この場合も同様に上清

Aに対しては、酸素吸収は顕著で、Lグルタミン酸に対するよりも、大なる結果をえた。

図3 結核菌とDグルタミン酸を作用せしめた上清に対する大腸菌の酸化作用



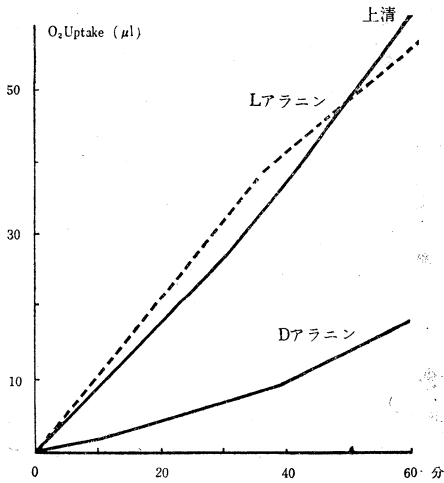
以上大腸菌のLグルタミン酸に対する Oxidase, Decarboxylase を利用し、結核菌のD型→L型グルタミン酸への Racemase の存在を思惟せしめる成績を得た。

〔II〕 Dアラニンに対する Racemization

この場合は大腸菌のLアラニンに対する Oxidase を利用して、Manometric method で検した。図4で見られる如く、Dアラニンに対する場合は酸素吸収は低いが、菌と作用せしめた上清は酸素吸収は大で、対照でLアラニンに対する酸素吸収に極めて近い値をえた。

以上〔I〕,〔II〕の成績を総合するに鳥型菌はDグルタミン酸, Dアラニンに対して、L型に Racemization する Rasemase の存在を推測せしめる結果をえた。

図4 結核菌とDアラニンを作用せしめた上清に対する大腸菌の酸化作用



第4章 小括および考察

Racemase が種々の細菌に存在するのを報告したのは、ここ数年前からのことである。すなわち1952年 Padmasine Ayenger^{1,2)} らは *Lactobacillus arabinosus* にDグルタミン酸をL型に転化する Racemase の存在を報告している。

また、1947年 Dunn, M.S. Camien³⁾ はDグルタミン酸を含む培地で培養した *Lactobacillus arabinosus* の加水分解で、菌体内全グルタミン酸の5%がD型であると報告しているが、Padmasine は一部はL型に Racemization され、別の部分は直接菌体蛋白に合成されるのだろうと推測している。またこの報告で興味を持たれるのは、*Streptococcus faecalis* のアラニン Racemase が Co-enzyme として Pyridoxal phosphate を必要とするのに対し、この場合も Pyridoxal phosphate が Co-enzyme として推測されるにもかかわらず、酵素活性を賦活しなかつたことである。従つて彼は Pyridoxal phosphate を Co-enzyme とみなし難いとしている。しかし彼はこの酵素系はアラニン Racemase と同様に広く存在するだろうと推測を下している。またアラニン Racemase に関しては Wood Gunsalus⁴⁾ が *Streptococcus faecalis* においてLアラニンをD型に転化する Racemase の存在を報告している。また彼は *Streptococcus* 以外に、*P. fluorescense*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *R. rutrum welchii*, *L. mesenterides*, *A. aerogens*, *Proteus vulgaris* 等の菌にその存在を認めたと述べている。

私の用いた実験方法は Ernst F. Gale⁵⁾ の1951年著した *The Chemical Activities of Bacteria* に述べられた大腸菌の酵素学的特徴を参考にし、Padmasine Ayenger²⁾ らの *Glutamine Racemase* の報告に基いて実施した。

すなわち Gale はその第4章において、*Esch. coli* を酸性培地に培養すると、それはある種のアミノ酸を脱炭酸して炭酸ガスを遊離し、同時にアルカリ性のアミンをつくる。またアルカリ性培地に培養すると、アミノ酸脱炭酸酵素は作られず、代わりにアミノ酸を脱アミノする酵素を作り、アンモニアを遊離し、同時に酸性の生成物を作るとのべている。

またその第9章において、*Esch. coli* はグリシン、Lアラニン、Lグルタミン酸の3種のアミノ酸にのみ、酸化的脱アミノ能を有し、菌株により分布は異なるが、グルタミン酸、アルギニン、リジン、オルニチン、ヒスチチン等のアミノ酸の脱炭酸作用を有すると述べているのである。

また Padmasine, Ayenger 等は *Lactobacillus arabinosus* について Substrate 1 ml, Cell の浮遊物あるいは、アセトンパウダーの homogenate 1 ml, Buffer 1 ml, 3 ml の反応系を3時間37°Cにて振盪し、その上清について、大腸菌のグルタミン脱炭酸酵素を働かせて、CO₂の形成と、アミノ酪酸の形成を見ている。

以上 Gale と、Ayenger の報告に基き鳥型結核菌のDグルタミン酸、Dアラニンに対する Racemization Reaction を実施し、前章に述べた成績をえたのである。ただ私は決定に用いたLアミノ酸に対する Decarboxylase preparation, oxidase preparation は生菌浮遊液を用いたので、それぞれ酵素能にやや鋭敏度を欠いたのは遺憾であるが、定性的にその Racemase の存在の可能性は大いに信ずるに足るものであろうと思われる。しかしながら、さらに酵素の精製、その Co-enzyme の決定 etc. に研究はすすめられるべきであろう。

この Racemase の存在により、先に述べたDアミノ酸に対する Transamination は Racemization を前提としている可能性が濃いように思われる。

第5章 結 論

鳥型結核菌のDアミノ酸に対する Racemization Reaction を、大腸菌の有するLアミノ酸脱炭酸能、酸化能により、manometric method により検し次の結果をえた。

鳥型結核菌は、Dグルタミン酸、Dアラニンに対して Racemization 能を有することが思惟される。

(1) (i) Dグルタミン酸と鳥型菌を作用せしめた上清は、アルカリ培地に培養した大腸菌により酸化される。

(ii) またその上清は酸性培地に培養した大腸菌により脱炭酸され、反応後、アミノ酪酸の存在を Paper chromatograph で認めた。

(2) Dアラニンと鳥型菌を作用せしめた上清はアルカリ培地に発育せる大腸菌により酸化される。

文 献

- 1) Ayenger, p. , Roberts, E. et al. : J. Biol. Chem., 193, 781, 1951.
- 2) Padmasine Ayenger ; Eugene Roberts : J. Biol. Chem., 197, 1, 1952.
- 3) Dunn, M.S., Camien, M.N., Shankman, et al. : J. Biol. Chem., 168, 43, 1947.
- 4) W.A. Wood and I.C. Gunsalus : J. Biol. Chem., 190, 403, 1951.
- 5) Ernest F.Gale : The Chemical Activities of Bacteria, 1951.