

結核菌における TCA cycle の短絡経路について

I クエン酸代謝

中 神 一 雄

大阪大学医学部第三内科教室 (主任 堂野前教授)

大阪大学微生物研究所第一結核研究部 (主任 伊藤教授)

受付 昭和 32 年 4 月 13 日

緒 言

結核菌の良く知られた特性の 1 つは、その発育が遅いということであり、臨床上種々の不便を齎している。

著者はこれらの特性を菌のエネルギー代謝と結びつけて解明しようと試みたのである。

文献によると現在までに結核菌のエネルギー代謝を明らかにしたものは限られた数篇にすぎない。

1951年結核菌の物質代謝を総説した Edson¹⁾ は、結核菌のエネルギー獲得および利用についても言及し、Hexokinase および ATP による Hexosemonophosphate への磷酸化および Phosphoglycerate の嫌氣的分解に伴う ATP の生成を見ようという努力は失敗に帰したと記載している。

一般に生物においては、ブドウ糖の酸化によるエネルギー生成の大部分は、TCA cycle の中間代謝産物の酸化に共軛するといわれているが、結核菌においても TCA cycle が働いているという事実を予想させるいくつかの文献^{2)~4)}がある。また最近 Volk⁵⁾ は *M. smegmatis* において Hexokinase を証明し、特に Brodie⁶⁾ は *M. phlei* において TCA cycle の中間代謝産物を基質として酸化的磷酸化を認めている。

著者も 1954 年来鳥型結核菌の酸化的磷酸化を取扱ってきたが、当初は TCA cycle の酸化的活性と共に、かえって無機磷の反応 medium 中への放出を認めた。このことは TCA cycle の中間代謝産物の代謝経路が TCA cycle 以外の経路をも通る可能性を示すものであると思われる。

最近 TCA cycle の中間代謝物質の短絡経路が幾つか見出されてきたが、著者もまたクエン酸を鳥型結核菌竹尾株の抽出液と incubate すると、CoA と ATP により活性化されることを見出したので報告する。

実験方法

Srere^ら¹⁵⁾ は鳩の肝臓の homogenate がクエン酸を基質とした場合に、無機磷の liberation と同時に、Acetyl CoA の生成があることを証明し、かつこの経路が citrate

condensing enzyme の逆反応ではないと述べている。そこで著者もクエン酸を基質とした場合の短絡経路の可能性として Acyl-hydroxamate 生成を検討した。

a 菌抽出液

3% Glycerol 肉汁液体培地に 38°C 3 日間培養の鳥型結核菌竹尾株の菌体を集め、0.9% KCl 冷溶液で 3 回洗滌後、菌体と等重量の石英砂を加え、5°C 以下の氷室内で乳鉢にて約 30 分間磨碎、しかる後菌量のほぼ $\frac{3}{2}$ 量の 0.9% KCl 溶液を加え pH を約 7.0 に修正後、約 10 分間よく攪拌した。3500r.p.m. にて約 40 分間遠心することにより、やや濁せる帯黄色の上清を得た。これを氷室内にて攪拌した冷蒸溜水に対し 3 時間透析、再び pH を約 7.0 に修正し、これを酵素液として用いた。この酵素液は実験の都度、当日調製した。

b 補酵素

ATP は市販品 (和光純薬) を用い、Ba 塩の場合は K 塩とした後使用した。

CoA の粗 Ba 塩は Lipmann らの方法⁷⁾により兔の肝臓より調製したが、第 2 の Ba 塩処理の段階のものである。K 塩に修正して用いた。

c 酸化能の測定

ワールブルグ検圧計を用いた。温度は 38°C。

d オルト磷酸および Acyl-hydroxamate の測定 無機磷の測定は反応終了後、反応液に 12% 三塩化醋酸を加え除蛋白後、Fiske & Subbarow 法⁸⁾にて行つた。

Acyl-hydroxamate の定量は Lipmann & Tuttle の方法¹⁹⁾によつた。ferric hydroxamic acid complex の発色標準には Succin-hydroxamate を用いた。Succin-hydroxamate は Lipmann & Tuttle 法により Succin anhydride (石津製薬) から調製した。

e ケト酸および Acyl-hydroxamate の Paperchromatography による同定

ケト酸の同定には Hawary & Thompson の方法¹⁰⁾を用いた。すなわち反応液を除蛋白後、ケト酸を 2, 4-Dinitrophenylhydrazone とし、東洋濾紙 No. 50 を用い、一次元上昇法にて展開した。溶媒は実験成績と共に記載した。

Acyl-hydroxamate は Stadtman & Barkerの方法¹⁾を用い、一次元上昇法にて展開後、塩化第二鉄溶液を噴霧して発色同定した。

実験成績

a クエン酸より Acyl-hydroxamateの生成

実験は下記の如き組成をもつて行つた。

反応時間は45分、温度は 38°C である。

菌抽出液	1.0ml
クエン酸加里	20 μ M
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
緩衝液	100 μ M
ATP (Na塩)	1.1mg
Mg ⁺⁺	20 μ M
F ⁻	66 μ M

0.9%KCl 溶液にて全量を3.0ml とした。

実験結果は表1の如くである。

表1 クエン酸分解による Acyl-hydroxamate 生成と反応 medium 中の無機磷の増加

生成 Acyl hydroxamate	medium 中に増加した無機磷	酸素消費
0.53 μ M	0.58 μ M	32 μ l

数値は基質を加えない対照値を差引いたものである

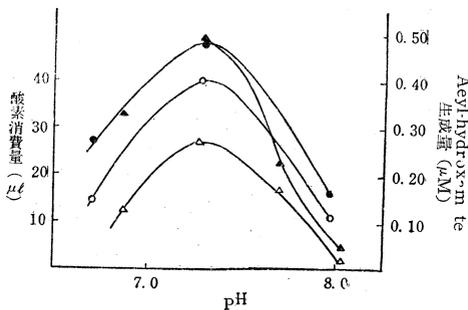
すなわちクエン酸を基質とした場合に、Acyl-hydroxamate の生成を認め、同時に反応 medium 中の無機磷の増加を証明した。

b Acyl-hydroxamate 生成の至適 pH

Veronal 緩衝液および Tris 緩衝液を用いた。

結果は図1の如くで至適pHは7.3附近にある。

図1 Acyl-hydroxamate 生成の至適 pH



反応液組成

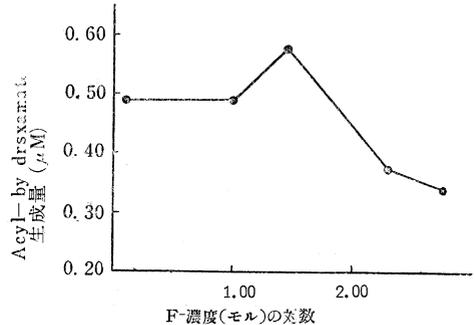
菌抽出液	1.0ml	MgCl ₂ 20 μ M
クエン酸加里	20 μ M	ATP(Na塩) 1.1mg
Na F	66 μ M	Hydroxylamine 200 μ M
0.1M Veronal 曹達-0.1N HCl 緩衝液	1 ml	または 100 μ M Tris 緩衝液
全量 3 ml	反応時間 60分	温度 38°C

- — ○ 酸素消費
- — ● Acyl-hydroxamate 生成量 } Veronal 緩衝液
- △ — △ 酸素消費
- ▲ — ▲ Acyl-hydroxamate 生成量 } Tris 緩衝液

c 弗素イオンの Acyl-hydroxamate 生成に及ぼす影響

図2に示した。すなわち弗素イオンは抑制的に作用する。

図2 Acyl-hydroxamate 生成に及ぼす F⁻ の影響



d Mg⁺⁺ の及ぼす影響

実験結果は表2に示したが Acyl-hydroxamate 生成には適当濃度の Mg⁺⁺ を必要とするように思われる。

表2 Mg⁺⁺ の Acyl-hydroxamate 生成に及ぼす影響

生成 Acyl-hydroxamate (μM)	Mg ⁺⁺ 最終濃度 (μM)		
	200	20	2
0	0	0.60	0.48

e Acyl-hydroxamate 生成に対する CoA, ATP の必要性

前処理したイオン交換樹脂 I R C50 を菌抽出液と混和し、氷室にて30分放置後遠心、上清を酵素液として使用した。

表3 Acyl-hydroxamate 生成における CoA ATP

	生成 Acyl-hydroxamate (μM)
完全組成	0.39
CoA (-)	0.15
ATP (-)	0

結果は表3の如く、本反応には CoA, ATP を必要とすると考えられる。CoA を加えなくとも Acyl-hydroxamate 形成が見られるのはイオン交換樹脂により CoA が完全に除かれなかつたためであろう。

酵素液を硫酸安門にて割分しようと試みたが酵素液が不活性化して成功しなかつた。

f クエン酸よりの Acyl-hydroxamate の同定

前記の方法¹⁾により、反応液中の Acyl-hydroxamate の同定を行つたが、溶媒としては水を飽和せしめたブタ

ノールを用い、12時間30°Cで展開した。Rf値は0.08で未だ同定するに至らない。なお、標準 Acyl-hydroxamate として Succin-hydroxamate および Propion-hydroxamate を展開したがそれぞれ0.30, 0.83の Rf 値を示した。

Succin-hydroxamate より Rf 値が低いので Acet-hydroxamate ではない。

g 反応液中のケト酸の同定

前記の方法¹⁰⁾により反応液を除蛋白後、2, 4-Dinitro-phenylhydrazine を加え、生成した Hydrazone の Paper-chromatography を行つた。溶媒は n-Butanol, Ethanol, 0.5N NH₄OH をそれぞれ 70, 10, 20 の割合で混じたものを用い 30°C で10時間展開せしめた。

2つの Spot を認め、その Rf はそれぞれ0.04および0.10であつた。これは同時に展開した α-Ketoglutarate および Oxalacetate の Hydrazone の Rf 値と一致した。

考 察

クエン酸を基質としたとき、鳥型結核菌抽出液を酵素液とする酸化的磷酸化を検討したが、実験の初めころは反応 medium 中の無機磷の減少を認めることができず、かえつて無機磷の増加を認めた。この場合 Phosphatase 作用はもちろん考慮せねばならないが、クエン酸を除いた対照ではこのようなことは認められない。

この事実は、クエン酸の分解機構に TCA cycle 以外の経路を考慮せねばならないことを示している。

細菌においては、TCA cycle の中間代謝物質の正常経路以外の短絡経路が、多数知られている。結核菌においても、最近山村ら¹²⁾はリンゴ酸のオキザロ酢酸への酸化とフマル酸のコハク酸への還元の共軛の事実を証明した。また竹内ら¹³⁾は、結核菌により生成されるクエン酸はストレプトマイシンで焦性ブドウ酸の酸化を抑制しても変わらないことから、クエン酸代謝に TCA cycle 以外の経路のあることを示唆している。

著者の実験の結果、クエン酸の分解に伴つて無機磷の反応液中における増加、Acyl CoA およびオキザロ酢酸の生成を認めたが、酵素液の純化に未だ成功していないので、これらの間の化学量論的關係は明らかでない。

この場合に生ずるオキザロ酢酸が結核菌に存するといわれる citrate condensing enzyme¹⁴⁾の逆方向の結果と考えることはできない。何となれば同時に生じた Acyl-hydroxamate は Acet-hydroxamate でないことは実験成績より推定されるからである。反応液中に同時に証明された α-Ketoglutarate は正常の TCA cycle の経路を通り生成されるものであらうと考えているが、現在実験続行中である。

著者は現在のところクエン酸の分解経路は正常の TCA cycle 以外に次の如き反応が同時に行われるのであ

うと推定している。



このような短絡経路の持つ意味については、実験続行中である。

総 括

1. 鳥型結核菌竹尾株の抽出液とクエン酸を incubate すると、Acyl CoA およびオキザロ酢酸の生成と、同時に反応 medium 中の無機磷の増加が認められる。
2. Acyl CoA 生成の最適 pH は 7.3 附近にある。弗素イオンは反応を抑制するが適当濃度の Mg⁺⁺ は反応を促進させる。
3. Acyl CoA 生成には CoA と ATP が必要である。
4. 生成された Acyl CoA は未同定であるが Acetyl CoA または Succinyl CoA ではない。
5. 以上の事実から菌抽出液にはクエン酸を分解する TCA cycle 以外の経路が予想される。

擲筆にあたり、御指導、御校閲を賜つた第三内科堂野前教授、河盛助教授ならびに微研伊藤教授に深謝し、直接御指導頂いた微研守山隆章博士に厚く御礼を申し上げます。

(本論文要旨は昭和31年5月日本結核病学会にて報告した。)

文 献

- 1) Edson, N.L. : Bact. Rev., 15: 147, 1951.
- 2) Kusunose, M., E. Kusunose, and Y. Yamamura : J. Biochem. (Japan). 39: 34, 1952.
- 3) Holmgren, N.B., I. Millman, and G.P. Youmans : J. Bact., 68: 405, 1954.
- 4) Millman, I., and G.P. Youmans : J. Bact., 69: 320, 1955.
- 5) Volks, W.A., and Q.N. Myrvik : Am. Rev. Tuberc., 73: 589, 1956.
- 6) Brodie, A.F., and C.T. Gray : J. Biol. Chem., 219: 853, 1926.
- 7) Lipmann, F., N.O. Kaplan, G.D. Novelli, L. C. Tuttle, and B.M. Guirard : J. Biol. Chem., 186: 235, 1950.
- 8) Fiske, C.H., and Y. Subbarow : J. Biol. Chem., 81: 629, 1929.
- 9) Lipmann, F., and L.C. Tuttle : J. Biol. Chem., 195: 21, 1945.
- 10) Hawary, M.F.S. El., and R.H.S. Thompson : Biochem. J., 53: 340, 1953.
- 11) Stadtman, E.R., and H.A. Barker : J. Biol. Chem., 184: 769, 1950.

- 12) 山村・楠瀬・永井・楠瀬・山村・谷・寺井・長須賀: *Med. J. Osaka Univ.*, 6: 489, 1955.
- 13) 竹内・山本・野村・田中: *結核*, 30: 503, 1955.
- 14) Ochoa, S., J.R. Stern, and M.C. Schneider: *J. Biol. Chem.*, 193: 691, 1951.
- 15) Srere, S.A., and F. Lipmann: *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 4874, 1951.