

鳥型菌竹尾株のコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素について

森 龍 男

大阪大学微生物病研究所結核研究部

受付 昭和34年4月6日

前報¹⁾において鳥型菌竹尾株の洗滌生菌による Glutamic acid (GA) と γ -Aminobutyric acid (γ -ABA) との間のアミノ転移反応について報告し、また γ -ABA と α -Ketoglutaric acid (α -KGA) を基質とした場合 One step の反応の生成物である Succinic semialdehyde (SSA) がほとんど検出されず、Succinic acid (SA) が生成されている点から、菌に SSA を酸化して SA を生成する能力のあることについても一部報告した。Aldehyde の脱水素酵素として Dixon ら²⁾ はパン酵母において Acetaldehyde が Diphosphopyridine nucleotide (DPN) を介して醋酸になることを報告し、Racker ら³⁾ も牛の肝臓において Aldehyde が DPN を介して酸になることを発表しており、また Stadtmann ら⁴⁾ は Clostridium kluyveri においては Acetaldehyde が DPN, Co-enzyme A (CoA) および無機磷酸 (Pi) の存在にて醋酸になることを報告している。著者も鳥型菌竹尾株から抽出した酵素による SSA の酸化について検討を試み以下の成績をえた。

実 験 材 料

〔試薬〕 SSA は Dakin の方法⁵⁾ により当研究室にて合成した。DPN (84% 純度のもの) は阪大理学部奥貫研究室より分与されたものを用いた。CoA は Stadtmann らの方法⁶⁾ で酵母より調製し、Kaplan-Lipmann の方法^{7) 8)} で 2.5 unites/mg の活性を示す標品を用いた。他の試薬は市販のものを用いた。

〔酵素調製法〕 グリセリンブイヨンに 3 日間培養の鳥型菌竹尾株の洗滌菌 20 g に 2 倍量のガラス粉を混じ、0°C の氷室にて 1 時間 磨砕し、M/100 Triamino methan-HCl 緩衝液 (Tris 緩衝液) pH 7.0 の 200 ml にて酵素を抽出した。3,000 r.p.m. にて 0°C 15 分間遠心沈澱してガラス粉および菌体を遠沈し、この上清を 11,000 r.p.m., 0°C 40 分間遠心沈澱して無細胞抽出液をえた。この抽出液に固形硫酸を 1/3 飽和になるように加え 0°C にて遠心分離しその沈澱はすて、この上清に固形硫酸を 2/3 飽和になるように加え、生じた沈澱を 0°C にて遠心分離し、この沈澱を少量の蒸溜水にとかし、2 日間 0°C の蒸溜水に対し透析した。この透析内液に再び飽和硫酸溶液を 1/3 飽和になるように加え、0°C にて遠心沈澱して沈澱をすて、この上清に飽和硫酸溶液を 2/3

飽和になるように加え、生じた沈澱を 0°C にて遠心分離し、その沈澱を少量の蒸溜水にとかし、2 日間 0°C の蒸溜水に対し透析した。このときに生じた不溶性の沈澱を 10,000 r.p.m. 15 分間 0°C にて遠心除去し、この上清を 38,000 r.p.m. (約 100,000 × g) にて 0°C 60 分間超遠心して、上清を酵素液として用い、沈澱を顆粒 (Particulate particle)⁹⁾ として 1/20 M Tris 緩衝液に懸濁し、Optical density を一定にして (Coleman 分光光度計にて 0.5) 用いた。

実 験 方 法

〔DPNH の測定〕 日立製 Beckmann 分光光度計 DU 型を用い、5°C, 好氣的条件にて還元 DPN (DPNH) の吸収を 340 μ にて測定した。容器の巾 10 mm, 内容 4 ml。

〔SSA および SA の酸化〕 Warburg 検圧計を用い、SSA の酸化を酵素の吸収量により測定した。酵素と助酵素と、および酵素と助酵素と阻害剤との接触は基質を加える前 15 分間とした。反応生成物である SA 量は Umbreit の変法¹⁰⁾ により鶏の心臓より抽出したコハク酸酸化酵素系を用い、Warburg 検圧計にて吸収した酸素の量より測定した。

〔SSA の脱水素反応〕 DPNH の水素の受容体として Triphenyl tetrazonium chloride (TTC), 2, 6-Dichlorophenol indophenol (DCPP) および Methylene blue (Mb) を用い Thunberg 管にて 10 mmHg の嫌氣的条件で行い、赤色の Formazan が形成されはじめるに要する時間、および色素が完全に退色するに要する時間を測定した。

実 験 成 績

1. SSA の脱水素反応

1) 助酵素: 実験条件は図 1-a, 1-b に表示した。酵素液と SSA, あるいは酵素液と DPN のみでは DPNH は証明されないが、酵素液と DPN と SSA を組合わせると、340 μ に吸収の極大を示す DPNH がすみやかに形成される (図 1-a, 1-b)。DPNH が形成されたのちに Particle を加えると DPNH はすみやかに減少する。これは Particle に存在する終末電子伝達系により、DPNH の水素が Particle を介して移動し、

図 1-a DPNH の吸収曲線

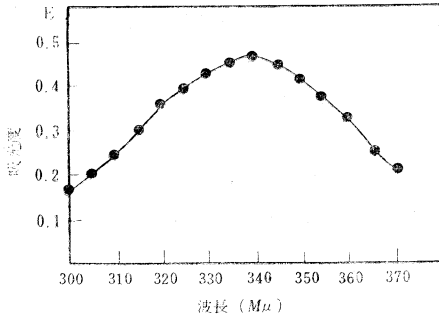
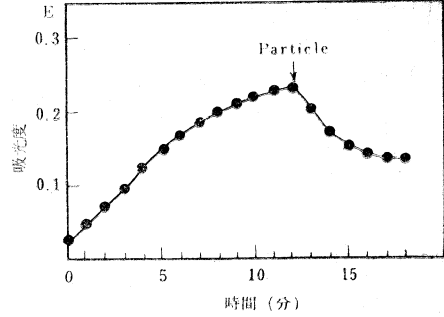


図 1-a の実験では酵素液 1ml, M/20 Tris 緩衝液 pH 7.0 2.5 ml, DPN 1 mg/ml を 0.25 ml (= 25%) SSA (約 4 μM) 0.25 ml, 図 1-b の実験では緩衝液を 2.25 ml とし Particle 0.25 ml を添加して (他の条件は 1-a に同じ) 好氣的条件 5 C にて分光光度計で DPNH の紫外部の吸収を測定した。

図 1-b Particle の添加による DPNH の減少



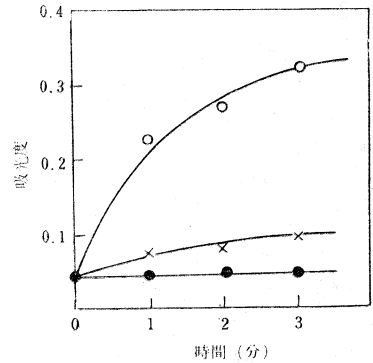
DPNH が DPN になつたためと考えられる。DPN の代りに Triphosphopyridine nucleotide (TPN) を用いても還元 TPN (TPNH) の 340 mμ における吸収はあらわれない。また図 1-a に示した反応系に M/10 磷酸緩衝液 0.25 ml および CoA (1 mg) 0.25 ml を追加しても DPNH の形成に影響はみられなかつた。

2) 基質特異性: 酵素液 + DPN に基質として Acetaldehyde を用いた場合は図 2 に示すように SSA を基質とした場合の % くらいの活性を示したが, Glycer-aldehyde を基質としたときは全く活性を示さなかつた。

3) 至適 pH: この酵素の活性の至適 pH は図 3 に示すように pH 8.5 付近に存在した。

4) 酵素の安定性: 酵素液を 0°C で 3 ヶ月間保存しても活性はほとんど減少しなかつた。熱に対しては図 4

図 2 Acetaldehyde および Glycer-aldehyde を基質としたときの DPN の還元



実験条件は図 1-a に同様であるが測定は 10°C にて行つた。
○—○ SSA 約 5 μM 0.25 ml, ×—× Acetaldehyde 約 5 μM 0.25 ml, ●—● Glycer-aldehyde 5 μM 0.25 ml

図 3 pH による酵素活性の変化

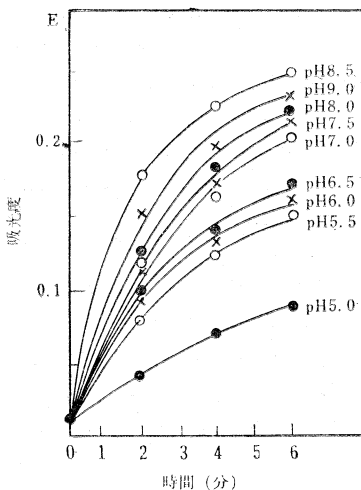
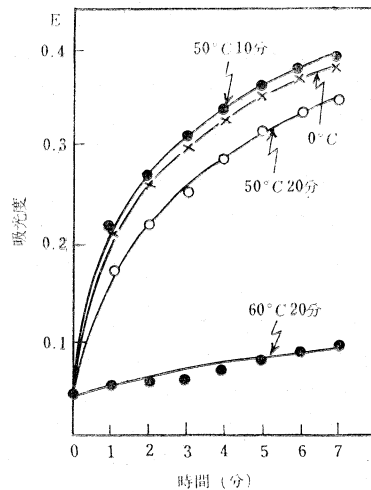


図 3, 4 の実験条件は図 1-a に同様であるが測定は 10°C にて行つた。図 3 の至適 pH の検査にさいしては pH 5.0 から pH 9.0 までは M/20 Tris 緩衝液を用いた。図 4 の実験は pH 8.0 の Tris 緩衝液を用いた。

図 4 加熱による酵素活性の変化

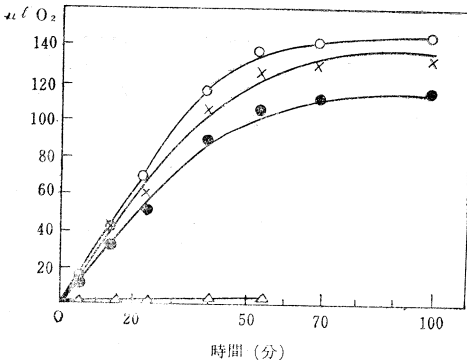


に示すように酵素液を 50°C 20 分間加熱してもほとんど失活しないが、60°C 20 分間の加熱にては著明に活性が減少した。

II. SSA の酸化

1) 酸化反応: Warburg 検圧計にて酸素の吸収を測定したのに、酵素液に Particle および DPN を加えないと SSA の酸化は全く起らず、Particle および DPN を加えると図 5 に示すように、すみやかな酸素の吸収がみられた。この反応系による SSA の酸化は M/10 磷酸緩衝液 0.25 ml または CoA 250 γ 0.25 ml の添加によりやや促進された。

図 5 酵素系による SSA の酸化



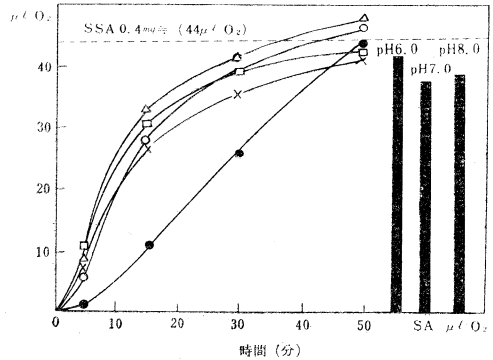
Warburg 検圧計の主室に酵素液 1ml, M/20 Tris 緩衝液 (pH 7.0) 1ml, Particle 0.25 ml, DPN 0.25ml (250 γ) を入れまた必要に応じて Pi 0.25ml M/10 磷酸緩衝液(pH 7.0) あるいは CoA 0.25ml (250 γ) を、またはこの両者をさらに添加し(ただしこれらの場合は Tris 緩衝液量を所要量だけすくなくする)、側室に SSA 0.5 ml (約11 μ M) を、副室には 20% KOH 0.2 ml を入れて、容器内液量を全量にて 3.2ml とし、空气中で 38°C にて測定した。

- (a) ●—● 酵素液+DPN+Particle+SSA
- (b) ×—× 酵素液+DPN+Particle+Pi+CoA+SSA
- (c) ○—○ 酵素液の+DPN+Particle+Pi+SSA
- (d) △—△ (a) の反応系より DPN を除いた場合 (Particle を、あるいは両者を除いても同様)

2) 反応系の pH と SSA の酸化ならびに反応生成物: 図 9 に示すようにアルカリ性側においては SSA の酸化はすみやかであり、酸性側においては遅れるが、いずれの場合でも加えた SSA はほとんど完全に SA になった。

3) 色素の還元: 実験条件は表 1 に表示した。表 1 にかかげたように酵素液 + TTC + SSA + DPN に Particle を加えると CoA, Cysteine および Pi の有無にほとんど関係なく 15 分以内に Formazan の形成がみられたが、Particle が存在しないと Formazan の形成に 30 分以上を要した。DCPP を用いた場合は Particle の有無にかかわらず 5~15 分にて脱色した。酵素液 + Mb + SSA + DPN の場合は Particle を加えても脱色は起らなかつた。したがって TTC および DCPP は SSA 脱水素酵素による DPNH の水素の受容

図 6 pH の変化による SSA の酸化とその反応生成物



Warburg 検圧計の主室に酵素液 1ml, M/20 Tris 緩衝液 1ml, DPN 0.25ml (250 γ), Particle 0.25 ml を、側室に SSA 0.5ml = 4 μ M を、副室には 20% KOH 0.2ml を入れて、容器内液量を全量にて 3.2 ml とし、空气中、38°C にて測定した。Tris 緩衝液の pH は 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 の 5 種を用いた。●—● pH 5.0, ○—○ pH 6.0, □—□ pH 7.0, △—△ pH 8.0, ×—× pH 9.0

体となりうるが、Mb は受容体となりえない。

III. 阻害剤の影響

島津紫外線鑑識器 (3,600Å 附近) を用い酵素液および Particle を 0°C に冷却しつつこれらに紫外線の照射を行つて、反応系を酵素液 + DPN + Tris 緩衝液 + SSA として、Warburg 検圧計で SSA の酸化を測定した。酵素液に紫外線を 15 cm, 4~8 分間照射しても SSA の酸化の阻害はみられないが、Particle に紫外線を 15 cm, 4~8 分間照射すると照射時間に応じて 20~60% の阻害がみられた。また上記の反応系に以下の阻害剤を添加したのに、Acryflavine は 10⁻⁴M では SSA の酸化を阻害しないが、10⁻³M では 95% の阻害を示した。KCN は 10⁻⁴M および 10⁻³M でそれぞれ 20% および 30% の阻害しか示さなかつた。Azide の 10⁻²M および 10⁻³M, Monoiodoacetic acid の 10⁻³M はいずれも阻害を示さなかつた。Hydroxylamine は SSA の当量以上に用いると SSA の酸化を完全に阻害するが、SSA の当量以下であれば軽度ながらも酸素吸収が認められた。Para chloromercuribenzoic acid (PCMB) は 5 × 10⁻⁵M で 50%, 5 × 10⁻⁴M で 100% の阻害を示した。BAL 10⁻⁸M, Antimycine A 10⁻⁶M および Ethanol diamine tetraacetate (EDTA) 10⁻³M はいずれも SSA の酸化を阻害しなかつた。硫酸銅 10⁻⁴M, 10⁻³M および硝酸銀 10⁻³M, 10⁻⁴M はすべて完全に阻害した。

総括と考察

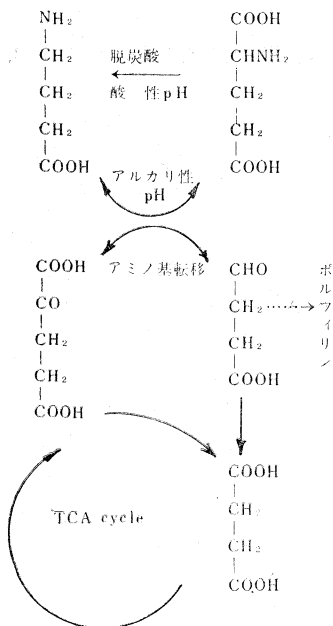
鳥型菌竹尾株から前記の方法で調製した SSA 脱水素酵素は助酵素として DPN を必要とし SSA より SA を生成するが、酵素の精製が十分でないので、他

表1 SSAの脱水素にともなう色素の還元

酵素	色素	DPN	Pi	CystあるいはCoA	Particle	基質	還元時間
+	TTC	-	-	-	-	SSA	発色せず
+	TTC	+	-	-	-	SSA	5.5 ~ 6.5分
+	TTC	+	+	-	-	SSA	
+	TTC	+	+	Cyst	-	SSA	
+	TTC	+	+	CoA	-	SSA	
+	TTC	-	-	-	+	SSA	ほとんど発色せず
+	TTC	+	-	-	+	SSA	12 ~ 13分
+	TTC	+	+	-	+	SSA	9 ~ 10分
+	TTC	+	+	Cyst	+	SSA	8分
+	TTC	+	+	CoA	+	SSA	7分
+	TTC	+	+	CoA	+	-	発色せず
+	TTC	+	+	CoA	+	SA	ほとんど発色せず
+	DCPP	-	-	-	-	SSA	脱色せず
+	DCPP	+	-	-	-	SSA	15分
+	DCPP	+	+	-	-	SSA	15分
+	DCPP	+	+	Cyst	-	SSA	7 ~ 8分
+	DCPP	+	+	CoA	-	SSA	10分
+	DCPP	+	-	-	+	SSA	14分
+	DCPP	+	+	-	+	SSA	15分
+	DCPP	+	+	Cyst	+	SSA	9 ~ 10分
+	DCPP	+	+	CoA	+	SSA	5 ~ 6分

Thunberg 管の室内に酵素液 1ml, M/20 Tris 緩衝液 pH 7.0 1 ml, DPN 1mg/ml 0.5ml, ならびに TTC M/500 溶液 0.5ml あるいは DCPP M/1,000 溶液 0.5ml または Mb M/1,000 溶液 0.5ml を入れ, 必要に応じて Particle 0.5ml あるいは M/10 磷酸緩衝液 pH 7.0 0.5ml, Cysteine 10⁻²M 溶液 0.5ml, CoA 1mg/ml 0.5 ml を単独にまたは適宜組合せてさらに添加し, 側室に SSA または SA 0.5ml (約 100μM) を入れ, 全量を 5ml とし, 10mmHg の嫌気的条件下にし, 38C° にて測定した。

表2 鳥型菌竹尾株の GA を中心とする代謝系



の因子をも必要とするか否かはなお明らかにしていません, この点今後の研究にまたねばならない。またこの酵

素は Acetaldehyde に対し弱いながらも活性を示すが, Glycerinaldehyde に対しては活性を示さないもので, すべての Aldehyde 類に対しては共通の活性を有しているのではなく, あるいは Acetaldehyde 脱水素酵素が混在しているのではないかと考えられる。この酵素により SSA から離脱された水素は DPN → DPNH を介して TTC および DCPP あるいは鳥型菌竹尾株から同時に調製した Particle⁹⁾ の終末電子伝達系に伝達されるが, Mb は Particle が存在してもしなくても水素受容体とはなりえない。Mb がなぜ水素受容体となりえないかについてはこれらの色素の酸化還元電位からのみでは説明することはできず, 将来の研究にゆずりたい。なおこの酵素による SSA の酸化は PCMB によつて完全に阻害されることから, 酵素活性に蛋白の SH 基が密接に関与していることが考えられるが, Antimycine A や BAL による SSA の酸化の阻害が認められないことは, この酵素の水素伝達系が動物組織のコハク酸酸化酵素系と大いに異なっていることを示している。

著者らはさきに鳥型菌竹尾株が菌体中に多量の遊離 GA を蓄積していること¹⁾, またこの GA は酸性 pH において脱炭酸されて γ-ABA となり¹²⁾, γ-ABA と α-KGA は, アルカリ性 pH において Trans-

amination により GA と SA になること¹⁾を報告した。 γ -ABA と α -KGA との Transamination にさいしては当然 γ -ABA から SSA が生成されねばならないのに、これを証明しえず、ただ鳥型菌竹尾株の洗滌菌により SSA が SA に酸化されることを明らかにしえたにとどまつたが¹⁾、上記の研究によつて竹尾株は SSA を SA に酸化する酵素系を有することを立証した。したがつて竹尾株は菌体内に蓄積した GA から表 2 に示した経路によつても SA を形成することができ、TCA cycle の中間代謝物質である SA がこのような経路によつても生成されることは、GA および γ -ABA の代謝とも関連してきわめて興味ある所見である。

摘 要

1) 鳥型菌竹尾株より抽出したコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素は助酵素として Diphosphopyridine nucleotide (CoI) を必要とし、同時に調製した顆粒の共存下にコハク酸セミアルデヒドをコハク酸に酸化する。この脱水素酵素の至適 pH は 8.5 附近にあり、熱に対しては不安定であるが氷室にては長期間にわたつて安定である。

2) 還元 Diphosphopyridine nucleotide の水素は鳥型菌竹尾株よりえられる顆粒により酸素にまで伝達され、また Triphenyl tetrazonium chloride や 2, 6-Dichlorophenol indophenol も水素の受容体となりうるが、Methylene blue はこれに代りえない。

3) この酵素に対する阻害剤の態度から、この酵素は SH 酵素と考えられる。

稿を終るに臨み御懇篤な御指導、御校閲を賜つた堀三津夫教授および庄司宏助教授に深謝する。

文 献

- 1) Shoji, K., Mori, T. & Ito, K. : Med. J. Osaka Univ., 8 : 607, 1958.
- 2) Dixon, M. & Lutwak-mann, C. : Biochem. J., 31 : 1347, 1937.
- 3) Racker, E. : J. Biol. Chem., 177 : 883, 1949.
- 4) Stadtman, E.R. & Barker, H.A. : J. Biol. Chem., 180 : 1055, 1059, 1117, 1169, 1949 ; 181 : 221, 1949 ; 184 : 769, 1950.
Burton, R.M. & Stadtman, E.R. : J. Biol. Chem., 202 : 873, 1953.
- 5) Dakin, H.D. : Biochem. J., 11 : 79, 1917.
- 6) Stadtman, E.R. & Kornberg, A. : J. Biol. Chem., 203 : 47, 1953.
- 7) Kaplan, N.O. & Lipmann, F. : J. Biol. Chem., 174 : 37, 1948.
- 8) Novelli, G.D., Kaplan, N.O. & Lipmann, F. : J. Biol. Chem., 177 : 97, 1949.
- 9) 楠瀬・永井・楠瀬・山村 : 生化学, 25 : 53, 昭28.
- 10) Umbreit, W.W., Burris, R.H. & Stauffer, J.F. : Manometric techniques and tissue metabolism, 2nd ed. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1949.
- 11) Shoji, K. Yamagami, A. & Mori, T. Med. J. Osaka Univ., 7 : 787, 1957.
- 12) 山上朗 : 大阪大学医学雑誌, 10(4) : 53, 昭33.