HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	塩辛の細菌学的研究：第8報 Bacillus subtilisによるArginineの代謝について
Author(s)	長尾, 清
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 5(1), 55-61
Issue Date	1954-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/22846
Type	bulletin (article)
File Information	5(1)_P55-61.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

塩辛の細菌学的研究

第8報 *Bacillus subtilis* による Arginine の代謝について

長尾　清
（北海道大学水産学部水産細菌学教室）

Bacteriological Studies of Shiokara or "Soused Squid"

8. On the metabolism of arginine by the intact cells of *Bacillus subtilis*

Kiyoshi NAGAO
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Abstract

1. The intact cells of *Bac. subtilis* were able to accumulate arginine, in the free state in the internal environment, and the concentration within the cells was higher than that existing in the external medium at equilibrium. The concentration of free arginine within the cell was determined by the balance between the rate at which the amino acid entered the cell and the rate at which it was being metabolized within the cell. A considerable portion of arginine that entered the cell appeared to be converted into cellular matter in subsequent reactions. The passage of the arginine into the cell may be produced by physical diffusion or by an active process on the part of the cell.

2. The washed cell suspensions of *Bac. subtilis* yielded evidence consistent with the idea that the following metabolic pathway was involved.

Arginine
↓
Ornithine + Urea
↙ ↓
Carboxylic acid ← Proline ← Glutamic acid

Citrulline was not found as an intermediate and was not attacked and therefore was ruled out as a possible intermediate.

著者は塩辛中に ornithine が存在している事を報告した。[1] これはイカ肝臓の arginase か或は細菌の arginine分解酵素によつて生じた代謝産物であると思われるので，先ず著者が塩辛中より分離した*B.subtilis* の arginine 代謝について実験した。動物肝臓等の arginase については有名な Krebs の ornithine cycleが知られている。腐敗細菌による arginine の分解について，arginine から ornithine を生成する。これは arginase と urease の作用によつて生成されたものであらうと云ふ古い報告がある。[2] しかし細菌による arginine の分解の際には尿素が生成されないと古くから云われている。 Hills[3] はグラム陽性球菌による arginine の分解について，１分子の arginine から１分子の ornithine，２分子の NH_3と１分子のCO_2を生ずる。Citrulline はこの酵素によつて分解されないから，citrullineは中間生成物でない。Hillsはこの酵素を肝臓の arginase と区別する為に arginine dihydrolase と名付けた。Slade及びSlamp[4]はgroup *D.streptococcus* について arginine を含む培地に培養すると arginine dihydrolase の活性度大であると報告している。Horn[5]

は *B. pyocyaneus* による arginine の分解について中間生成物として citrulline を分離し，この反応に関与する酵素を arginine desimidase と名付けた。友田[6]も *B. pyocyaueus*, *Salmonella enteritidis* にこの酵素の存在する事を報告している。最近赤松，関根[7]は *Streptococcus faecalis* について，arginine dihydrolase は2つの酵素の混合によるもので，Hills と異なり中間生成物として citrulline を生成する。この2つの酵素を metarginase と citrullinase とよび，metarginase は Horn の arginine desimidase と同一のものであると報じている。

$$\text{Arginine} \xrightarrow[\text{or arginine desimidase}]{\text{metarginase}} \text{citrulline} + NH_3 \qquad \text{Citrulline} \xrightarrow{\text{citrullinase}} \text{ornithine} + NH_3 + CO_2$$

Schmidt, Logan 及び Tytell[8] は *Clostridium perfringens* (BK6K) について，Oginsky 及び Gehrig[9]は *Streptococcus faecalis* について同様の結果を得ている。

著者が *B. subtilis* について以上の各代謝形式と異なる結果を得たのでこゝに報告する次第である。

実験方法

1. 菌浮遊液の調製法 Bouillon 培地 (broth, pH7.0) に *B. subtilis* を接種し，37°，18時間培養した菌体を集め，菌体を2度蒸溜水で洗滌，最後に菌体を homogenizer にて homogenize し，蒸溜水に懸濁させた。菌量は光電比色計を用い，懸濁液の吸収度を測定して適当な濃度に稀釈する。予め菌体懸濁液の吸収度と菌体乾燥重量の標準曲線を出しておく。著者は 4 mg. dry wt./cc の菌量の菌浮遊液を常に用いた。

2. Arginine の定量法[10] 反応液に三塩化醋酸を加え，除蛋白した液を坂口反応の改良法で呈色させ，530mμ の filter を用い光電比色した。坂口反応は arginine のみならず guanidyl 基を有する物質はすべて呈色する。

3. Citrulline の定量法[11] 反応液に三塩化醋酸を加え，除蛋白後，尿素を除き diacetylmonoxime でpink色に呈色させ，470mμ の filter を用い光電比色した。この場合酸化剤として燐酸ー硫酸混液を用いた。

4. Ornithine 及び proline の定量法[12][13] 反応液に三塩化醋酸を加え，除蛋白後，pH 1 の酸性で ninhydrin と反応させると ornithine は特有の赤色を呈するので，530mμ の filter を用い光電比色した。しかしこの場合 proline も ornithine と同様に呈色するので，両者が存在する場合はその総量が測定される。

5. 尿素の定量法[14] 反応液に三塩化醋酸を加え，除蛋白後，diacetylmonoxime で黄色に呈色させ，470mμ の filter を用い光電比色した。

6. 検圧法による尿素の定量法[15] Warburg 検圧計を用い間接法により測定した。菌浮遊液 2 cc (8 mg. 菌体)，arginine 0.4cc (40μM)，M/5醋酸 buffer (pH5.0) 1 ccを38°で反応させ，一定時間後，この反応液を15分間煮沸して酵素を破壊し，次にこの液を再び主室に入れ，更に3N 醋酸 buffer 1 cc及び 2 ccを入れ，側室に3%urease 溶液0.5ccを入れ，CO_2量を測定しこれより尿素量に換算した。使用した urease は市販 urease 粉末を用いた。

7. CO_2の測定法[15] Warburg 検圧計を用い間接法により測定した。主室に菌浮遊液 2 cc (8 mg. 菌体)，M/5醋酸 buffer (pH5.0) 1 cc及び 2 ccを入れ，側室に arginine 0.4cc (40μM) を入れ38°にて検圧した。

8. Paper chromatography による検出法 一次元，上昇法による。東洋濾紙 No.50を用いた。

9. Urease の測定法 使用菌体の urease を測定する為，主室に菌浮遊液 2 cc (8 mg. 菌体)，醋酸buffer 1 cc及び 2 ccを入れ，側室に0.6μM尿素を入れ，38°にてCO_2量を測定した。

実験結果並びに考察

細菌の酵素は発育時の培地pH 及び反応pHにより，その反応機構及び酵素活性が異なる。今回は発育時の培地pH7.0，反応pH5.0，反応温度38°の場合についてのみ報告する。

基質 L-arginine 40μM，醋酸 buffer 液及び菌浮遊液を Warburg 検圧計の容器に入れ，38°で反応させ，CO_2 量及び尿素量を測定し，又一定時間後，容器中の反応液に三塩化醋酸を加え，遠心分離後，上澄液中の

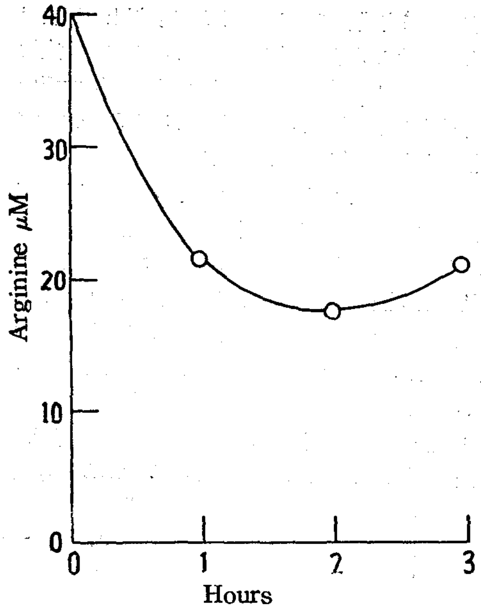

Fig. 1. Changes of rate of arginine disappearance during the incubation of arginine with washed cell suspensions of *Bac. subtilis*

Incubation temperature 38°C. pH of reaction mixture 5.0; acetate buffer employed. The Warburg flasks contained 1 cc of 5/M acetate buffer, pH 5.0, 2cc of cell suspension (8 mg. dry wt. of cells) and 0.4cc of arginine (40 μM). The arginine content of 10 per cent trichloroacetic acid filtrates of reaction mixtures was measured by the Sakaguchi method as modified by Macpherson.[10] Final coloured solution adjusted to 25cc.

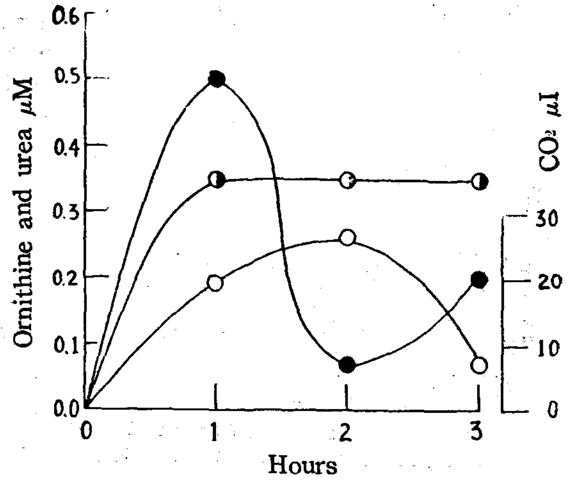

Fig. 2. Changes during the incubation of arginine with washed cell suspensions of *Bac. subtilis*

Incubation temperature 38°C. pH of reaction mixture 5.0; acetate buffer employed. The Warburg flasks contained same mixture as described in fig.1 in the case of ornithine determination. The ornithine content of 10 per cent trichloracetic acid filtrates of reaction mixtures was mesaured colorimetrically by a procedure employed by Stein and Moore.[13] CO_2 was measured by Warburg's "indirect method." Urea was measured by mancmetric method.[15]
◑ Ornithine production ○ CO_2 production
● Urea production

arginine, ornithine 及び citrulline を測定した結果を Fig. 1, 2 に図示した。即ち arginine 量は顕著に減少するに拘らず, ornithine, 尿素及び CO_2 量は微量生成されているにすぎない。尿素の量は検圧法と比色法で測定したが殆んど同じであつた。又 citrulline は生成されていない。これは何か別な物質に代謝されていると思われるので, paper chromatography で代謝産物の検出を行つた。溶媒は phenol (phenol 100gに水23gを添加), methanol (methanol : 水=8:2) 及び m-cresol (25%量の水を加えた)を用い, 一次元, 上昇法により展開し, ninhydrin の butanol 溶液で呈色させると, Fig. 3に図示した様に arginine, ornithine のほかに glutamic acid, proline 及び黄色に呈色する未知物質が検出された。Citrulline は chromatography によつても検出されない。又 phenol で展開したものに坂口反応液[16]をスプレーすると Rf 0.4~0.7に亘つて坂口反応陽性の物質が検出された。n-butanol・pyridine・氷醋酸・水 (4:1:1:2) の混液を溶媒として展開し, 坂口反応液をスプレーすると arginine (Rf 0.20) のほかに稀に Rf 0.35, 0.45, 0.60に spot が検出される場合がある。Glutamic acid の量は測定していないが, chromatogram 上の呈色強度から見ると少量しか存在しない様である。Proline は前述の様に ornithine との総量が測定されているのでこの量も非常に少ない。Glutamic acid が検出されているので, α—ketoglutaric acid の存在を推定し, 2,4—dinitrophenylhydrazin を加えたがα—ketogluataric acidのhydrazoneは検出されなかつた。[17] Chromatogram 上でninhydrin 反応で黄色を呈する未知物質は amine が考えられるが, diazo 反応, 亜硝酸反応, isonitril 反応, Wagner 試薬反応及び Mayer 試薬反応はいずれも陰性である。塩化第二鉄による有機酸の定性反応で赤褐色の沈澱

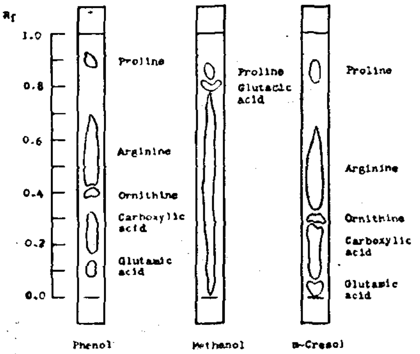

Fig. 3. Paper chromatograms of reaction mixtures

Run in phenol (contained 23 per cent of water), methanol (methanol:water=8:2), m-cresol (contained 25 per cent of water). Sprayed with ninhydrin-butanol solution.

を生ずるので有機酸であると思われる。以上の実験で arginine 量は顕著に減少しているが，その代謝産物である ornithine, 尿素, CO_2, glutamic acid, proline 及び有機酸らしい物質が検出されたが，これ等はいずれも微量生成されているにすぎない。

しかし Gale[18] は *Streptococcus faecalis* が細胞膜を通じて環境即ち細胞膜外のアミノ酸 (lysine, glutamic acid, ornithine 及び histidine) を外界の濃度の約40倍の濃度に細胞膜を通じて濃縮し，しかも遊離の状態で保持している。又13種のグラム陽性菌及び3種の酵母についてもこのアミノ酸の濃縮作用が見られるが11種のグラム陰性菌は lysine 及び glutamic acid を濃縮する事が出来ないと報じている。著者はこの濃縮機構によつて arginine が *B. subtilis* の細胞内に濃縮されているのではないかと考えた，そこで菌体 40mgに対して醋酸 buffer を入れた 200μM arginine に38°，1時間接触させた菌体を充分水洗後，硫酸で加水分解したものと，arginine に接触させない同量の菌体を硫酸で加水分解したものゝ全窒素を micro-Kjeldahl 法で測定すると， 菌体 8 mgに対し， 接触させたものは 0.6480mg-N,接触させないものは0.4866mg-Nで,接触させた事によつて0.1614mg-N が菌体中に増加した事になる。次に菌体 8 mg に対して醋酸 buffer と共に40μMの arginine に38° で接触させ，遠心分離した後菌体を充分水洗し，沸騰水中で20分間加温し[18] 細胞膜を破壊し，遠心分離後， 細胞内に遊離の状態で存在する arginine の量を坂口反応で呈色，光電比色した。対照として接触させない同量の菌体を同様の方法で加温，遠心分離後，坂口反応で呈色させたものゝ透過率を 100% に合せた。Fig. 4 はこの方法で菌体内に遊離の状態で濃縮増加された arginine 量を図示した。即ち接触1時間後には 8.25 μM の arginine が菌体内に増加している。それ以後菌体内の遊離の arginine 量は減少しているが，之は菌体内で他のアミノ酸に代謝されたか或は体構成蛋白質になつた為と思われる。勿論こゝで遊離の arginine と云ふているのは厳密に言へば guanidyl 基を有する物質を云ふ，又 ornithine も同様濃縮作用が考えられるが，尿素及びCO_2量から考えて微量生成されているにすぎないから，若し濃縮されたとしてもこの量は問題にならないであらう。

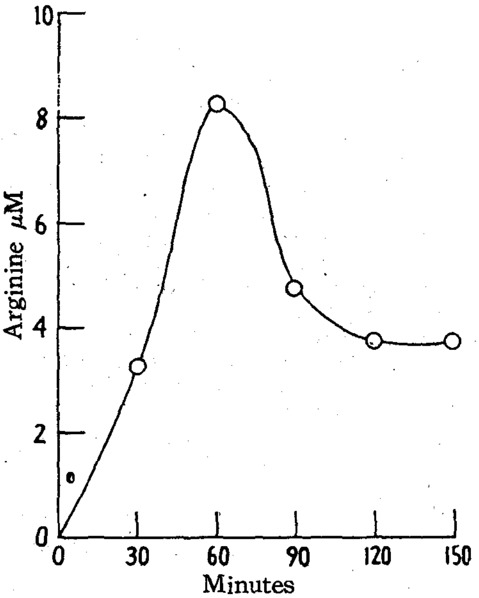

Fig. 4. Accumulation of free arginine within *Bac. subtilis*

Organism grown for 18 hrs. at 37°C. in broth. Accumulation of internal free arginine determined before and after incubation at 38°C. in buffered salt solution containing 0.4 cc arginine(40μM), 1 cc acetate buffer (pH5.0) and 2 cc cell suspension (8 mg. dry wt. of cells). Determination of free arginine within cells was as follows: reaction mixture was heated for 20 minutes in a boiling water bath and this heated reaction mixture was assayed for arginine by the Sakaguchi method. Final coloured solution adjusted to 25 cc. Results expressed as μM increased in free arginine/8 mg. dry wt. of cells.

細菌の物質代謝経路を追及する方法として逐次適応法（同時適応法）が広く用いられる様になり，tryptophane, tyrosine 等の代謝経路がこの方法で明らかにされた。この方法はＡという物質を基質として細胞群に加えるとＡを分解する酵素系が細胞内に生産される。ＡがＢ，Ｃ，Ｄ等の物質を経て代謝されるとするならば，Ａを加えた時細胞内に形成される酵素系はＡ→Ｂえの反応を触媒する酵素は勿論，Ｂ→Ｃ，Ｃ→Ｄ等の酵素をすべて含んでいる。つまり，Ａ→Ｂ→Ｃ→Ｄ→と酵素系が逐次に形成されるのである。Ａ適応菌はＢ，Ｃを誘導期なく直ちに分解する。又Ｂに適応した菌は同様Ｃを直ちに分解するが，Ａはある一定の誘導期を経て，即ちＡ→Ｂ間に関与する酵素系が形成されて始めて分解される。これ等の事実を逆に利用して未適応菌及び適応菌が中間代謝物と考えられる色々な物質をどの様に分解するかを調べ，代謝過程を推定する方法である。著者の実験の場合，主な代謝過程は生体内への arginine の濃縮過程であり，生体外に出される代謝産物は少量であるので，生体外に出される arginine の代謝経路を逐次適応法で Warburg 検圧計で O_2 の uptake を追及して行くのみでは難があるので，paper chromatography を用い代謝経路を追究した。先ず arginine 適応菌， ornithine 適応菌， glutamic acid 適応菌及び proline 適応菌を作り， arginine, ornithine, glutamic acid 及び proline を基質とし（いずれも 40μM）醋酸 buffer と共に38°，１時間反応後，三塩化醋酸で除蛋白した液を，一次元上昇法で展開し，ninhydrin で呈色させた。溶媒として phenolを用ひた実験結果をTable 1に表示した。未知物質と云ふのは Rf 0.1 の spot で赤く呈色している。逐次適応法により,この物質の代謝経路を表わすと次の様になる。

Arginine
↓
Ornithine ＋ Urea
↙ ↓
Carboxylic acid←Proline←Glutamic acid

Table 1. Metabolite in rection mixtures

	Cells adapted with arginine			Cells adapted with ornithine			Cells adapted with glutamic acid			Cells adapted with proline		
Metabolite \ Substrate	Ornithine	Glutamic acid	Proline	Arginine	Glutamic acid	Proline	Arginine	Ornithine	Proline	Arginine	Ornithine	Glutamic acid
Arginine				+			+			+		
Ornithine	+							+			+	
Glutamic acid	+	+			+							+
Proline	+	+	+		+	+			+			
Carboxylic acid	+	+	+		+	+			+			+
Unknown	+						+			+		

Incubation of substrate for one hr. at 38°C. with the cells adapted with each substrate. Adapted cells were prepared by the incubation of substrate with intact cells at 38°C. for one hr., then the cells were washed twice with distilled water. Ascending paper chromatograms were employed in the identification of metabolite.

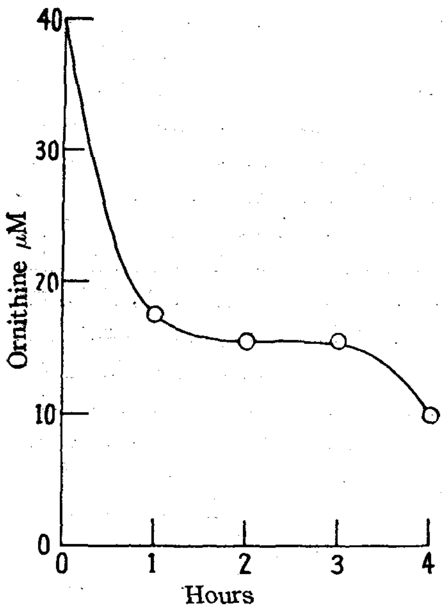

Fig. 5. Changes of rate of ornithine disappearance during the incubation of ornithine with cells adapted with arginine

Such adapted cells were made by the incubation of arginine (40μM) with intact cells at 38°C. for one hr., then the cells were washed twice with distilled water. Incubation temperature 38°C. pH of reaction mixture 5.0. The Warburg flasks contained 1 cc of acetate buffer (pH5.0), 2 cc of cell suspension (8 mg. dry wt cells) and 0.4 cc of ornithine (40μM). The ornithine contnent of 10 per cent trichloroacetic acid filtrates of reaction mixtures was measured colorimetrically by the same procedure as that employed by Stein and Moore.[12]

Ornithine は5炭素アミノ酸で proline, glutamic acid との相互移行が考えられる。最近 Roloff[19] は重水素を含む ornithine を二十日鼠に与えその体蛋白質のアミノ酸を検べたところ，proline と glutamic acid に相当量の重水素が移行していたと述べ，Stetten及び Schoenheimer,[20] Stetten[21][22]は proline と ornithine は α—ケトδアミノ纈草酸を中間体として相互に移行し得ると云つている。この様に proline, glutamic acid 及び ornithine は化学的に近接している丈でなく生理的にも深い関係があり生体内で互に移行出来るものと見られる。著者の得た実験結果は Stetten 等が二十日鼠で行つた代謝経路と殆んど同じである。細菌についてこの様な代謝過程は未だ報告されていない様である。

又 arginine と菌浮遊液の接触により1時間後には ornithine と尿素がほとんど等モル濃度生成されている。Arginine 適応菌に醋酸 buffer と共に 40μMの L-ornithine に反応させると Fig. 5 に図示した様に反応液中のornithine は速かに代謝され減少するが，DL-citrulline に反応させると citrulline は代謝されない。Ornithine がこの様に速かに代謝されるとすると，arginine と反応して生成された ornithine も速かに代謝され消出されなければならないが実際は Fig. 2 に図示した様に反応一時間後は一定量に保たれている。これはいかなる理由によるか不明であるが，恐らく ornithine が代謝されたと云ふのは arginine の場合と同様に生体内に濃縮されて行く過程が主で生体外に代謝される量は微量である為であらう。尿素量は反応後1時間で最大量に達し，以後減少しているが之は菌体に適応的に urease が生成された事に起因すると思われたが，実際に菌浮遊液に尿素を作用させ検圧法及び反応液中の尿素の残存量を比色定量した結果では殆んどureaseは生成されなかつたので，arginine との反応により生成された尿素がどの様な機構により代謝されるか不明である。

要　　約

1. *B. subtilis* の生菌（intact cell）は生細胞内に遊離の状態で arginine を濃縮蓄積する事が出来る。生細胞内の遊離の arginine の濃度は環境の濃度より高い。細胞内に蓄積された遊離の arginine はその後の代謝により細胞構成物質に変化する。

2. *B. subtilis* の生菌により arginine は次の様な経路により代謝される。

```
                      Arginine
                         ↓
                      Ornithine  +  Urea
                       ↙     ↓
Carboxylic acid←Proline←Glutamic acid
```

citrulline は中間産物として検出されないし又生菌により酸化されない。従つて citrulline はこの代謝に関与しないと思われる。

終りに臨み，本研究に協力された宗像一郎氏に感謝の意を表します。

引 用 文 献

(1) 長　尾 (1953). 北大水産彙報 **3**, 259.

(2) Ackermann, D. (1908). *Z. physiol. Chem.* **56**, 305.

(3) Hills, G. M. (1940). *Biochem. J.* **34**, 1056.

(4) Slade, H. D. & Slamp, W. C. (1952). *J. Bact.* **64**, 455.

(5) Horn, F. (1933). *Z. physiol. Chem.* **216**, 244.

(6) Tomoda, S. (1941). *Tohoku J. Exp. Med.* **41**, 317.

(7) AKamatsu, S. & Sekine, T. (1951). *J. Biochem.* Japan **38**, 349.

(8) Schmidt. G. C., Logan, M. A. & Tytell, A. A. (1952). *J. Biol. Chem.* **198**, 771.

(9) Oginsky, E. L. & Gehrig, R. F. (1952). *J. Biol. Chem.* **198**, 791, 799.

(10) Macpherson, H. T. (1942). *Biochem. J.* **36**, 59.

(11) Archibald, R. M. (1944). *J. Biol. Chem.* **156**, 121.

(12) Stein, W. H. & Moore, S. (1951). *J. Biol. Chem.* **190**, 103.

(13) Chinard, F. P. (1952). *J. Biol. Chem.* **199**, 91.

(14) Ormsby, A. A. (1942). *J. Biol. Chem.* **146**, 595.

(15) Umbereit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer, J. F. (1951). *Manometric Techniques and Tissue Metabolism.*

(16) 佐　竹 (1953). 標準生化学実験.

(17) 朝井・相田 (1952). 日 農 化 **26**, 528.

(18) Gale, F. F. (1947). *J. Gen. Microbiol.* **1**, 53.

(19) Roloff, M., Ratner, S. & Schoenheimer, R. (1940). *J. Biol. Chem.* **136**, 561.

(20) Stetten, M. R. & Schoenheimer, R. (1944). *J. Biol. Chem.* **153**, 113.

(21) Stetten, M. R. (1949). *J. Biol. Chem.* **181**, 31.

(22) Stetten, M. R. (1951). *J. Biol. Chem.* **189**, 499.