



Title	大豆根瘤菌による酒石酸とアンモニウム塩より生成するアミノ酸について
Author(s)	沢井, 功; 下村, 得治; 中村, 幸彦
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 5(1), 23-27
Issue Date	1964-06-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11732
Type	departmental bulletin paper
File Information	5(1)_p23-27.pdf



大豆根瘤菌による酒石酸とアンモニウム塩より生成するアミノ酸について

沢井 功 下村得治 中村幸彦

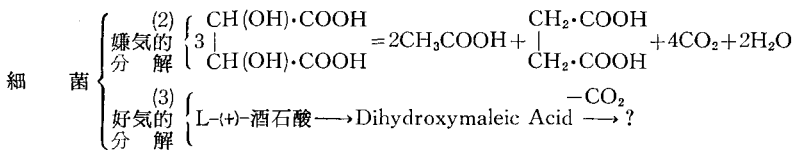
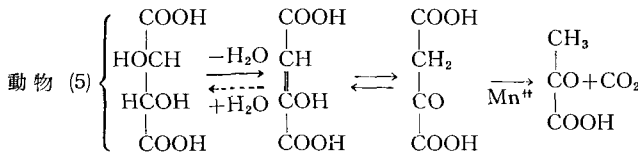
まえがき

前報で¹⁾、大豆根瘤菌はアンモニウム塩の存在下で、TCA サイクルを構成する各有機酸をよく利用して生育するが、これらの酸の他に、酒石酸、アジピン酸、グルタル酸等の二塩基性酸を与へてもよく生育することを報告した。

酒石酸が植物界に広く存在することは古くから知られていたが、最近二、三の微生物²⁾⁻⁴⁾及び動物組織^{5),6)}から部分的に精製した酵素標品を用いて、酒石酸代謝の機構を明らかにせんとする研究が発表された。これらの研究を概括すれば次の諸点となる。

(1) 動物組織では、DL-酒石酸及び meso-酒石酸を分解するが、自然界に存在する L-(+)-酒石酸は殆んど分解しない。細菌では、L-(+)-酒石酸が最も強く分解され、meso-型や DL-型は前者の 1/5 位しか分解されない。

(2) 動物と細菌では代謝経路が異なる。



細菌による好氣的分解では Dihydroxymaleic Acid 以下の分解は複雑で未だ明らかにされていないが、動物又は細菌による嫌氣的分解では、中間代謝産物として、醋酸、オキザロ醋酸、コハク酸、ピルビン酸の様な TCA サイクルの酸が生成され、それらが TCA サイクルを経て酸化されて行くことがわかる。

大豆根瘤菌によって、酒石酸が分解される際に、その中間代謝産物の一部は当然共存するアンモニヤを取入れて菌体蛋白の構成成分であるアミノ酸の合成を行なうものと考えられる。本実験では、生育初期の段階で、合成さ

れるアミノ酸はどの様なものであるか、又それ等のアミノ酸が酒石酸の代謝とどんな関係にあるかについて二、三の結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 培養液の組成 NH₄Cl, 0.2 g; KH₂PO₄, 0.5 g; MgSO₄·7H₂O, 0.2 g; NaCl, 0.1 g; L-(+)-酒石酸, 0.7 g; FeCl₃·6H₂O, 微量; MnSO₄·4H₂O, 微量; 蒸留水, 1000 ml; NaOH で pH 6.5 に調節。

2. アミノ基の定量 所定の培養日数毎に、培養液を無菌的に分取し、ザイツ濾過器で菌体を濾別し、夫々の濾液 25 ml に飽和炭酸ソーダ 1 ml を添加し、重蒸煎上で蒸発乾固し、アンモニヤを除去する。残渣を水に溶かし、濾過洗滌する。濾液は三塩化醋酸で沈澱を生じないので、可溶性蛋白質の存在は無視出来る。塩酸で pH を 5.0 としてから、水を加えて 50 ml とし、これから 1 ml をとり YEMM 等の方法⁷⁾により、ニンヒドリンによる呈

色を光電比色計で定量した。標準曲線には DL-アラニンを用いた。

3. 酒石酸の定量 上記のザイツ濾過器で濾過した濾液夫々 8 ml を 2 ml 迄重蒸煎上で濃縮したものにつき、GORBACH 等⁸⁾の方法で定量した。

4. アミノ酸の分離確認 3

日目の培養液約 300 ml を 5 分間煮沸後、遠心分離 (12,000 r.p.m.) して菌体を除去する。上澄液を約 50 ml 迄減圧濃縮し、予め処理をしたアンバーライト IR-120 (メツシュ, 400) のカラム (内径 2 cm, 長さ 25 cm) に注ぐ。2N-アンモニヤ水で溶出し、最初の溶出液 250 ml を減圧で乾固し、残渣を少量の水にとかし、濾過する。濾液は更に HIRS⁹⁾等の方法に準じてカラムクロニトグラフィーを施行した。HIRS 等の方法と異なる点は、Dowex 50-X8 を用いたこと及び Dowex 50-X8 のカラムの長さが 80 cm であることである。確認はペーパークロマトグラフィーによった。展開剤は水飽和フェノ

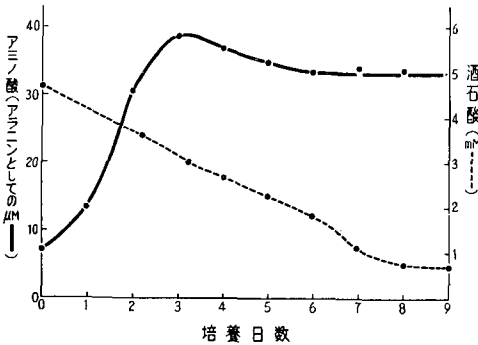
ールと *n*-ブタノール:醋酸:水 = 4:1:5 の上層液との二種を用いた。

5. 酸素及び炭酸ガスの定量 ワールブルグ検圧法によった。反応温度は 38°C。気相は空気。

6. 乾燥菌及び cell-free 抽出液の調製 NaCl, 0.2 g; KH₂PO₄, 0.5 g; MgSO₄·7H₂O, 0.2 g; NaCl, 0.1 g; L-(+)-酒石酸, 5 g; FeCl₃·6H₂O, 微量; MnSO₄·4H₂O, 微量; 寒天, 20 g; 蒸溜水, 1000 ml; NaOH で pH を 6.5 とする。この寒天培地に菌を接種し, 30°C, 4 日間培養後, 菌体を集め, EISENBERG¹⁰⁾ の方法により乾燥菌を調製した。又乾燥菌から LINDSTROM¹¹⁾ の方法により cell-free 抽出液を調製した。

実験結果と考察

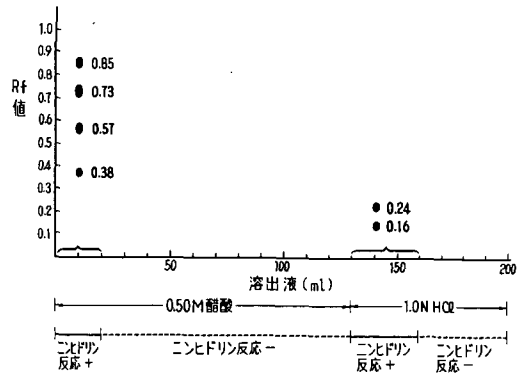
前記培養液 300 ml に一白金耳の菌を接種し, 30°C で静置培養する。培養日数毎に培養液中のアミノ基を定量した結果は第 1 図の通りである。又同時に消費される酒石酸を定量した結果も第 1 図に示した通りである。



第 1 図 培養中のアミノ酸の生成と酒石酸の消費 (培養液 1000 ml 当り)

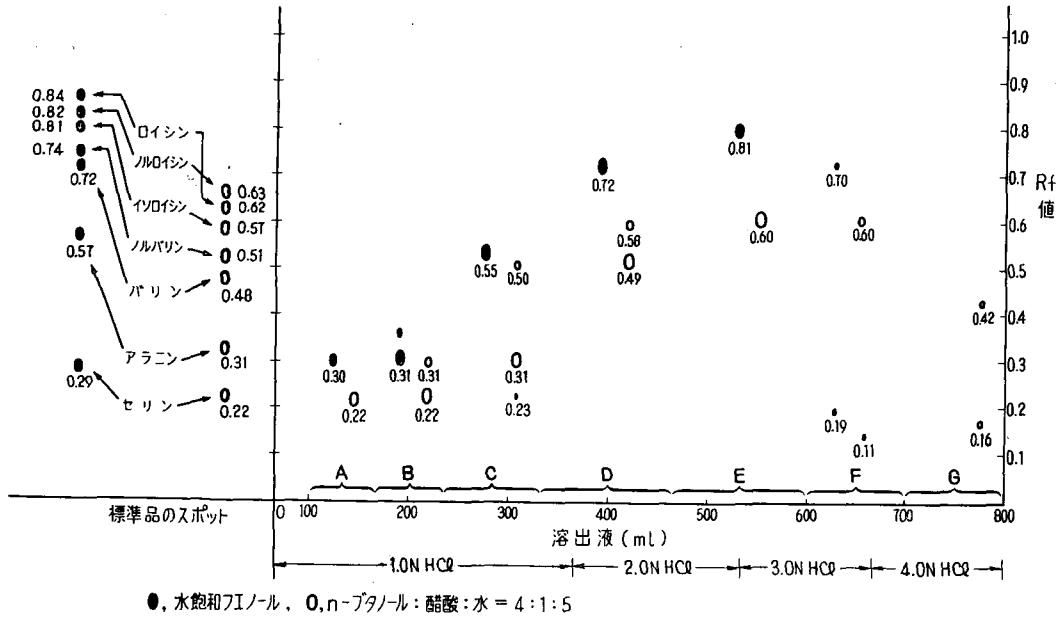
第 1 図からわかることは, ニンヒドリン呈色物質が培養後 3 日目迄急激に増加し, 以後は漸時減少し, 更に 6 日目以後では一定の値を示した。尚培養 0 日の培養液中にわずかにニンヒドリン呈色物質が存在した。前報で述べた如く, この場合, 菌の生育は 4~5 日目が生育の極大であることから, このニンヒドリン陽性物質は菌体の自己消化等で菌体から培養液中に溶出したものではない。一方酒石酸の消費は大体一定の割合で進み, 培養後 9 日目では殆んど消費されている。ここでみられたニンヒドリン陽性物質がアミノ酸であろうと云ふ前提の下に, 前記の方法に従いアミノ酸の分離確認を行なった。

培養 3 日目の培養液 3000 ml を前記の方法に従い, 先づアンバーライト 1R-120 のカラムで大体脱塩後, 最初の溶出液 250 ml を約 2 ml 迄減圧濃縮し, これを Dowex



第 2 図 Dowex 1-8 のカラムからの溶出液の Rf 値 (展開剤: フェノール水飽和溶液)

1-X8 (mesh, 200) のカラム (内径 1 cm, 長さ 30 cm) で, 0.5 M 醋酸を溶出剤として溶出した。溶出液は 20 ml 宛分取し, 溶出液が 130 ml 流出後に 0.5 M 醋酸を 1N HCl に切替えて更に 100 ml 溶出を続けた。各区分を重蒸留中で蒸発乾固後, 残渣に少量の水を加へ, ニンヒドリンの呈色反応をしらべた。その結果は, 第 2 図に示した如く, 最初から 20 ml 迄の区分及び 131 ml 以後 160 ml 迄の 30 ml の区分はニンヒドリン陽性であった。これらの区分を夫々一緒に集め, 水飽和フェノールを展開剤として, ペーパークロマトグラフィーを行なえば, 第 2 図の如く, 最初の 20 ml の溶出区分には, 4 ヶのスポットが示され, 131 ml から 150 ml までの区分には 2 ヶのスポットが示された。後者の 2 ヶのスポットの中 0.16 がアスパラギン酸, 0.24 がグルタミン酸によるスポットであることは文献記載⁹⁾ の溶出区分とこれらが大体近い区分に溶出していること及び純粋のアスパラギン酸とグルタミン酸とを対照にして, ペーパークロマトグラフィーで比較した時, 同一の Rf 値が示されたことから知られた。前者の区分に含まれる 4 ヶのニンヒドリン陽性物質を確認するために, これを 2 ml 迄濃縮して, Dowex 50-X8 (mesh, 200) をつめた第 2 のカラム (内径 1 cm, 長さ 80 cm) に注ぎ, 濃度の異なる塩酸で溶出した。第 3 図に示した如く, A 区分は溶出液 101 ml から 160 ml までの 60 ml, B 区分はその次の 60 ml, C 区分は更にその次の 90 ml, 以下同様に D 区分 120 ml, E 区分 120 ml, F 区分 90 ml, G 区分 90 ml を夫々分取し, 減圧濃縮後, 二つの異った展開剤を用い, ペーパークロマトグラフィーを行なった。A 区分にはセリン, B 区分にはセリンとアラニンの混合したものの存在が知られた。C 区分は水飽和フェノールで展開すれば, アラニンに相当したスポット 1 ヶがあらわれるのに, *n*-ブタノール・醋酸・水の時

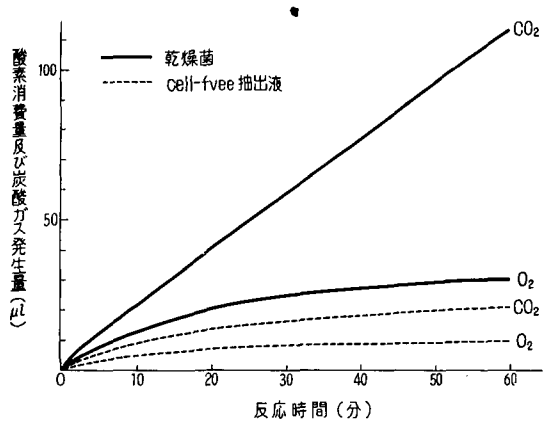


第3図 Dowex 50-X8 カラムからの各溶出区分の示すニンヒドリン呈色スポット

には、少量のセリンとバリンの他に多量のアラニンに相当するスポットが見られた。即ち後者の展開剤の方が前者より分離能がよいことがわかる。D 区分中にはバリンと少量のイソロイシン、E 区分中にはイソロイシンのみ、F 区分中には少量のイソロイシンの他に Rf が非常に小さい微量のニンヒドリン陽性物質の存在が夫々知られた。又 G 区分にも不明の微量のニンヒドリン陽性物質がみとめられた。

以上のことから、菌によって生成されたアミノ酸はアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、アラニン、バリン、イソロイシンである。これらの中、アラニン、バリンが最も強いニンヒドリン呈色を示し、次がセリン、イソロイシンで、大体同じ程度の呈色を示し、アスパラギン酸、グルタミン酸はいずれも非常に弱い呈色を示した。このことは、アスパラギン酸とグルタミン酸は他のアミノ酸より代謝される速度が早い為、培養液中の濃度がうすいものと考えられるが、この点は更に検討する必要がある。

酒石酸とアンモニヤから、この様にアミノ酸が生成することは、当然、酒石酸の代謝経路のどこかの段階でアンモニヤが固定されてアミノ酸を生ずる反応があるためと考えられる。この点を明らかにするには、先づ菌による酒石酸の代謝経路を知る必要があり、前記方法で調製した乾燥菌及び cell-free 抽出液を用い、酒石酸が分解され



主室 { cell-free 抽出液 0.5 ml 又は乾燥菌 25 mg を水 0.5 ml に分散したもの
M/5 磷酸緩衝液 (pH 7.0), 0.5 ml
側室 { I L-(+)-酒石酸ソーダ (30 mM), 0.5 ml
II 3N-H₂SO₄, 0.2 ml
副室 20% KOH, 0.2 ml 気相: 空気; 反応温度 38°C

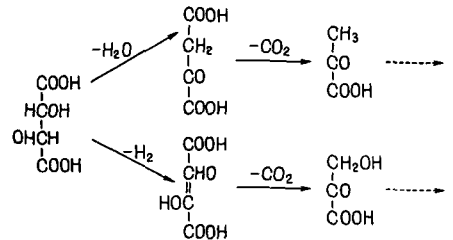
第4図 乾燥菌及び cell-free 抽出液による酒石酸の酸化と脱炭酸

る際に、消費される酸素と発生する炭酸ガスをワールブルグ検圧計で測定した。第4図に示した結果は、いずれも Endogenous の値を引いたものである。乾燥菌の場合、酸素 1 モルの消費量に対して、炭酸ガスは約 4 モル近く発生していることがわかる。又 cell-free 抽出液の場合

は、全体として酸化も脱炭酸反応も乾燥菌より弱く、モル比は酸素1モルに対し炭酸ガス2モルとなっている。これは乾燥菌の方が cell-free 抽出液より、含まれている種々の酵素の活性が強い為であり、又両者のモル比が異なるのも、酸化反応より脱炭酸反応を行なう反応系の方が多く含まれている為と考えられる。乾燥菌体を用いて、反応を行なったワールブルグセルの内容物を濾過し、濾液に 2,4-dinitrophenylhydrazine の 2N 塩酸溶液を添加し、冷所に数時間放置すれば、黄色針状の結晶が析出した。結晶を濾別、含水アルコールから一回再結晶を行ない微量の結晶を得た。この結晶につき、*n*-ブタノール:水:エタノール=5:4:1 を展開剤として、ペーパークロマトグラフィーを行なえば、1ケのスポット (Rf=0.55) が得られた。この値は hydroxypyruvic acid の 2,4-dinitrophenylhydrazone の Rf と近い値を示す¹²⁾。又 m.p. は 150°C で文献記載¹²⁾ の値よりやや低いけれど、ここに得られた結晶は hydroxypyruvic acid の 2,4-dinitrophenylhydrazone であると考えられる。更に、hydroxypyruvic acid の hydrazone を多量に捕集する目的で、亜砒酸阻害による実験を行なった。即ち、前記培養液 100 ml に 5% K₃AsO₃ を 5 ml の割合で添加し、塩酸で pH を 6.5 にした培養液を調製した。これを 250 ml 容三角フラスコ 25 本に 30ml 宛分注し、殺菌後、一白金耳の菌を接種し、30°C、4 日間培養後、培養液を遠心分離 (12,000 r.p.m.) し菌体を除去する。上澄液を弱アルカリ性とし、減圧濃縮し、濃縮液を酸性にもどしてから、エーテルによる続連抽出 (8 時間) を行なった。抽出物の一部はヒドロキサム酸鉄試験¹³⁾ に供したが、脂肪酸の存在は認められなかった。他の一部は揮発性有機酸のペーパークロマトグラフィー¹⁴⁾ に供したが、TCA サイクルの有機酸の存在はみとめられなかった。抽出物の残部は常法の如く処理し、2,4-dinitrophenylhydrazine に誘導した。これを 3 回、含水アルコールから再結を行ない、ペーパークロマトグラフィー (展開剤: *n*-ブタノール:水:エタノール=5:4:1) を行なえば 4 ケのスポットが得られた。即ち、Rf=0.85, 0.62, 0.45, 0.36 であった。0.85 のスポットは他のスポットより遙かに大きく、又強い黄褐色を示した。このスポットを濾紙から切り取り、アルコールで抽出後、抽出液を減圧濃縮し、少量の水を加える操作を繰返し、精製したものは m.p. 148°C、元素分析の結果 N=25.46% であった。これは恐らく 2,4-dinitrophenylhydrazine の分解産物ではないと考えられる。0.62 と 0.36 のスポットは 0.45 のスポットより非常に小さい Pyruvic acid の 2,4-dinitrophenylhydrazone とペーパークロマ

トグラフィーで比較すれば、0.62 はその syn-type, 0.45 は anti-type に一致した。0.36 はオキザロ酢酸かグリオキシル酸の hydrazone の Rf に相当するが、これらの分離確認は行なはなかつた。従って、亜砒酸阻害では、hydroxypyruvic acid は捕集することが出来なかつた。

以上の実験結果から、酒石酸は菌によって次の二つの経路で分解されて行くものと考えられる。



従って、ここに生ずるオキザロ酢酸、ピルビン酸、hydroxypyruvic acid は夫々アラニン、セリン、アスパラギン酸の骨格を与えるものと考えられるが、バリン、イソロイシンの骨格かどの様にして生成されるかは本実験からは推定出来ない。又アンモニヤかどの様な機構で固定されてアミノ酸を生ずるかも、推測することは出来ない。

要 約

1. 根瘤菌は L-(+)-酒石酸とアンモニウム塩から、アラニン、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、バリン、イソロイシンを生成する。
2. 酒石酸は酸化及脱炭酸を受けて、分解されるが、代謝中間体として、Pyruvic acid, hydroxypyruvic acid 及び glyoxylic acid が oxalovotic acid がみとめられた。
3. これらのケト酸は夫々アラニン、セリン、アスパラギン酸の前駆物質となり得ることか推定された。

文 献

- 1) 中村幸彦・下村得治・沢井功: 農化, **34**, 136 (1960).
- 2) 野村真康: 酵素化学シンポジウム, **9**, 62 (1954).
- 3) 笹川泰治・木村徳次・片山久民: 酵素化学シンポジウム, **10**, 103 (1954).
- 4) J. W. M. LA RIVIÈRE: Biochim. et Biophys. Acta, **21**, 190 (1956).
- 5) 倉富一興・福永慶子・飯島克己: 順天堂医, **5**, 367 (1959).
- 6) E. KUN: J. Biol. Chem., **221**, 223 (1956).
- 7) E. W. YEMM and E. C. COCKING: Analyst, **80**, 209 (1955).

-
- 8) G. GORBACH und W. VAUPOTITSCH: Fette und Seifen, **58**, 865 (1956).
- 9) C. H. W. HIRS, S. MOORE and W. H. STEIN: J. Am. Chem. Soc., **76**, 6063 (1954).
- 10) E. S. LINDSTROM: J. Bact. **65**, 565 (1953).
- 11) MAX A. EISENBERG: J. Biol. Chem., **203**, 815 (1953).
- 12) A. MEISTER and P. A. ABENDSCHEIN: anal. Chem. **28**, 171 (1956).
- 13) 久保田尙志: 実験化学講座, **16**, 397, 昭和34.
- 14) H. F. LINSKENS: Papierchromatographie in der Botanik, 90 (1955).