



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	α -Amino isobutyric acid の代謝 : 第1報 <i>Piricularia oryzae</i> による α -Amino isobutyric acid の利用
Author(s)	本間, 守; HONMA, Mamoru; 下村, 得治 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 7(1), 1-5
Issue Date	1969-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11780
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(1)_p1-5.pdf



α -Amino isobutyric acid の代謝

第1報 *Piricularia oryzae* による α -Amino isobutyric acid の利用

本間 守・下村得治

(北海道大学農学部農芸化学科生物化学教室)

Metabolism of α -amino isobutyric acid

Part 1. Utilization of α -amino isobutyric acid by *Piricularia oryzae*

Mamoru HONMA and Tokuji SHIMOMURA

(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received December 20, 1968

緒 言

一般に α -dialkyl- α -amino acids は天然アミノ酸の同族体として、生物及びある種の酵素に対して阻害作用を示し、拮抗阻害剤として総括されている^{7),18),2)}。その中の一つである α -amino isobutyric acid (AIB) については阻害作用に関係するよりは、むしろ、不活性な或いは代謝されないアミノ酸として、細胞内へのアミノ酸吸収のモデル物質に度々使用されている^{9),14)}。しかし、このアミノ酸は蛋白質^{9),13)}及び抗生物質¹⁰⁾の構成成分として自然界に存在することが知られてきたので、その生体内に於ける挙動を知ることは興味あることである。AIBの生物による利用に関しては2,3の細菌⁹⁾が窒素源として利用することが古くから知られ、最近になって、このアミノ酸を唯一の炭素源、窒素源として生育する細菌¹⁾も見い出された。更にAIBの分解についてもその細菌の無細胞抽出液が pyridoxal phosphate, pyruvate の存在の下にAIBをアセトンに変化させることが見い出され¹⁾、その分解を触媒する酵素も精製されている^{13),14)}。

著者等も、種々のL-アミノ酸を含む培地に生育する糸状菌、稲熱病菌^{12),16)}がAIBを適応的に分解し、蔗糖の存在の下に窒素源として利用し、生育することを観察した。

本報においては、この糸状菌によるAIBの吸収、AIBへの適応及びその消費を含むAIBの利用全般に関する実験結果について記述する。

実験方法

1. アセトンの定量

強アルカリ溶液中でアセトンを salicylaldehyde と反応させる方法³⁾によって発色させ、500 m μ のフィルターを用いて比色定量した。

2. AIBの定量

AIBを次亜塩素酸ソーダで分解するとアセトンを生ずることが知られている^{9),11)}。AIB (0.1~2.5 μ moles)

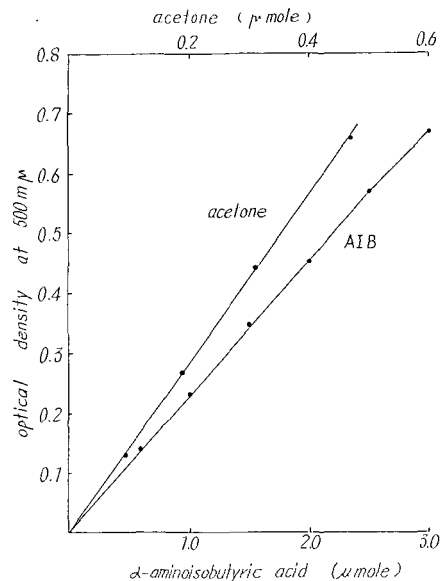


Fig. 1. Assay of α -aminoisobutyric acid and acetone.

溶液に4N-次亜塩素酸ソーダ溶液0.5ml, ホウ酸緩衝液(M/2 ホウ酸ソーダ溶液, 1N-水酸化ナトリウム溶液の等量混合液) 1mlを加え, 水蒸気蒸溜を行ない, 溜出液を1% 重亜硫酸ソーダ溶液2mlを含むフラスコに導いて25mlになるまで継続し, その5mlについて含まれるアセトン前記の方法に従って比色定量した(第1図)。この定量操作ではAIB以外のアミノ酸のうち valine, alanine, leucine, isoleucine も反応し, 各々AIBの1/8~1/4, 1/120, 1/60, 1/90~1/120の値を示した。従ってこれらのアミノ酸を含む試料については, この影響を減ずるために次の操作を行ない, それらに原因する値を各々未処理の場合の1/4, 4/5, 1/3, 1/2にまで低下せしめることができた。すなわち, α -methyl- α -amino acids は通常の α -アミノ酸に比しニンヒドリンと反応し難いこと⁵⁾を利用したもので, アミノ酸溶液3mlに5% ニンヒドリンのメチルセロソルブ溶液0.2mlを加え, 沸騰水中に10分間加熱後, 1N-硫酸1mlを加えて酸性とし, ベンゼン1mlを加えてよく攪拌, 全体を水蒸気蒸溜装置に移して約20mlを溜出した後, 1N-水酸化ナトリウム1ml, 前記ホウ酸緩衝液1ml, 次亜塩素酸ソーダ溶液0.05mlを加え, 前記の方法によって比色定量した。

3. 菌糸懸濁液の調製

P. oryzae は当教室保存菌株¹²⁾を用いた。その菌糸懸濁液を合成培地¹⁷⁾ 100mlを含む500ml三角フラスコに接種し, 5~6日間28°Cで振盪培養(毎分100回)したものをブレンダーで軽く処理し, 濾過, 水洗後, 1.5gの蔗糖を含むM/10リン酸緩衝液(pH 7.0) 100mlに懸濁して, 更に1日振盪してから菌糸を分離し, M/10リン酸緩衝液又は脱塩水60~80mlに懸濁した(菌糸乾燥重量6~18mg/ml)。AIBに適応させた菌糸を得るためには, 操作中, 蔗糖を含む緩衝液をAIB 9mg, 蔗糖1.5gを含むリン酸緩衝液100mlに置き換えた。

4. 菌糸によるAIB吸収の測定

リン酸緩衝液(pH 7.0, 最終濃度M/10), AIB 3 μ moles, 菌糸懸濁液4mlを含む全容6mlを50cc三角フラスコにとり, 28°C, 100回/分で振盪した。所定時間後ただちに濾過し, 濾液に含まれるAIBを定量し吸収率を計算した。

5. 菌糸によるAIB消費の測定

前項の条件の下に振盪した後, 沸騰水中に5分間加熱して濾過後, 濾液中のAIBを定量し, 消費率を計算した。この加熱操作によって菌体内の未分解のAIBは定量的に外液に放出されることが予備実験で確かめられて

いる。AIBの分解及びそれへの適応を調べる実験では, 細胞内へのAIBの吸収の影響を除くため, AIBと菌糸とを20分間振盪して, AIBが殆んど完全に吸収されてから実験を開始した。

6. AIB分解酵素の活性測定

菌体を乳鉢で磨碎し, M/10リン酸緩衝液(pH 7.4)で抽出後遠心分離, 上清に含まれる酵素活性を pyridoxal phosphate, pyruvate, AIBを含む反応系²⁰⁾でアセトンの生成量として測定した。

結果及び考察

1. *P. oryzae* によるAIBの利用

本菌は炭素源である蔗糖をAIBで置換した合成培地¹⁷⁾では生育を示さなかった。一方窒素源の硝酸塩をAIBで置き換えると第2図の如く, 長いlagの後, 生育を始め, そのlagの長さは硝酸カリウムと置き換えるAIBの量に依存した。すなわち, AIBを唯一の窒素源とした培地に生育することができるが, しかし生育に長時間を要する。従ってAIB適応菌糸を得るためには, 方法の項に記述した培養法をとる方が有利である。

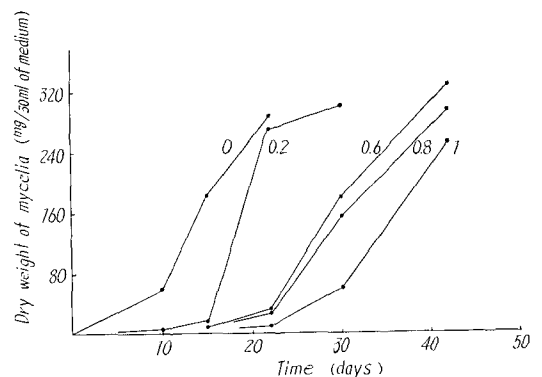


Fig. 2. Growth of *P. oryzae* on AIB

A number of each line represents a ratio of AIB-N to total-N in medium containing nitrate and AIB as N-source.

2. *P. oryzae* によるAIBの吸収と消費

AIBに適応させた菌糸の懸濁液を用い, AIBの吸収と消費を調べた結果が第3図で, このアミノ酸は急速に吸収された後, 緩慢に消費されることが認められた。吸収されたAIBは大部分消費されず, 加熱によって放出されるような状態で細胞内に長時間保持されている。又AIBへの適応操作を受けない菌糸はAIBを急速に吸収するが, しかしAIBの消費は後述する如く6時間以上のlagを示した。従って *P. oryzae* によるAIBの吸収

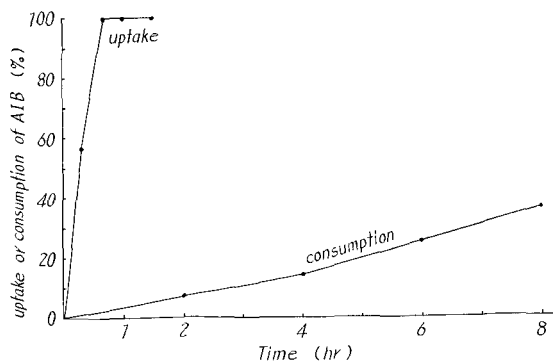


Fig. 3. Uptake and consumption of AIB

Incubation; M/10 phosphate buffer (pH 7.0), AIB 3 μ moles, mycelia (as dry weight) 68 mg, final volume 6 ml, 28°C. Mycelia were adapted for AIB in advance before the experiment.

現象を AIB の消費から分離して取り扱うことができる。

3. AIB からアセトンの生成

AIB に *P. oryzae* 菌糸を作用させた反応液の水蒸気蒸溜溜出液から、カルボニル化合物を 2,4-dinitrophenyl

Table 1. Formation of acetone from AIB

Degradation	Formation of [¹⁴ C] acetone	
	from [1- ¹⁴ C] AIB	from [3- ¹⁴ C] AIB
by hypochlorite	—	+
by <i>P. oryzae</i>	—	+

Formation of [¹⁴C] acetone was detected by radioactive acetone 2,4-dinitrophenyl hydrazone on paper chromatogram.

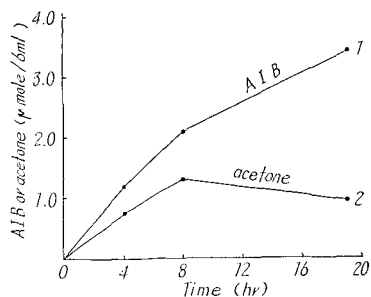


Fig. 4. Formation of acetone from AIB

Incubation; M/10 phosphate buffer (pH 7.0), AIB 4 μ moles, adapted mycelia (as dry weight) 72 mg, final volume 6 ml 28°C.

- 1; Consumption of AIB.
2; Formation of acetone.

hydrazone として集め、ペーパークロマトグラフィー (n-Heptane-Methanol; 2:1 v/v)¹⁹⁾、及び融点測定から、その大部分がアセトンの hydrazone であることを認めた。更に [3-¹⁴C] AIB に *P. oryzae* 菌糸を作用させて得たアセトンの hydrazone は放射活性を有することが、autoradiography によって認められた²⁰⁾ (第1表)。AIB の消費とアセトン生成の関係の一例を第4図に示した。AIB の消費に比しアセトンの生成が時間と共に小さくなっており、この消失はアセトン水溶液を用いた予備的実験から、空気中への蒸散による部分が大いと思われる。なお、密栓した試験管中で行なった実験では6時間に消費した AIB 0.87 μ mole に対して生成したアセトン 0.81 μ mole であった。すなわち、消費した AIB の大部分はアセトンに分解されて外液に放出されるものと考えられる。AIB からアセトンを生成することは、AIB 分解酵素活性が AIB 適応菌体のみ認められることから確認された (第2表)。

Table 2. Adaptation for AIB and AIB-decomposing enzyme activity

Process of adaptation for AIB		Enzymy activite
Time (hr)	Consumption of AIB (%)	
0	0	—
6	6	—
20	45	+

Incubation in adaptation process; M/10 phosphate buffer (pH 7.0), AIB 3 μ moles, sucrose 180 mg, mycelia (as dry weight) 44 mg, final volume 6 ml, 28°C.

Mycelia from four flasks were disrupted with sea sand in a mortar, and extracted by 5.5 ml of M/10 phosphate buffer (pH 7.4).

Enzyme activity; phosphate buffer (pH 7.4) 1 m mole, AIB 10 μ moles, Pyridoxal phosphate 0.5 mg, Pyruvate 20 μ moles, extract 5 ml, final volume 10 ml, 30°C, 120 min.

今迄に AIB を利用することが知られている細菌のうち、1種を除いて他の細菌は糖等の炭素源の存在の下に AIB を利用し、生育する^{2), 19), 20)}。AIB を唯一の炭素源、窒素源として生育する細菌¹²⁾ では、その無細胞抽出液が AIB をアセトンに変化すると同時に、アセトンをも酸化することが示された。

一方、AIB を窒素源としてのみ利用できる細菌^{2), 20)} 及び *P. oryzae* では AIB を分解してアセトンを細胞外へ放出する。従って AIB を炭素源として利用できるか

どうかは、アセトンの酸化によって決定されるものと思われる。

4. AIB 利用に対する他のアミノ酸及び無機窒素化合物の影響

P. oryzae による AIB の利用は種々のアミノ酸の存在によって阻害される。本菌は種々のアミノ酸を炭素源窒素源として利用するので、窒素源として利用される AIB と他のアミノ酸との間に拮抗作用が存在すると考えられる。そこで AIB の利用の過程をかりに吸収、適応、消費に分けて、*P. oryzae* によって利用されることが知られているアミノ酸⁹⁾ 及び無機窒素化合物による阻害について調べた (第3表)。システイン、シスチンはその阻害様式が特異であるため特に挙げた。適応及び消費の過程については、吸収の影響を除くため、菌糸と AIB との Preincubation (20分) を行ない、AIB を殆んど完全に吸収させた後、阻害物質を添加した。

Table 3. Inhibition for AIB utilization

Inhibitor	μ mole	Inhibition of		Adaptation R*
		uptake (%)	consumption (%)	
L-glutamic acid	10	20	—**	1.0
	100	67	—	4.2
L-aspartic acid	10	7	—	0.8
	100	62	—	3.9
L-phenyl alanine	5	80	—	2.4
	30	—	—	—
ammonium chloride	5	68	—	2.0
	100	100	—	—
potassium nitrate	100	—	—	1.0
L-cysteine	5	92	99	—
L-cystine	10	8	87	—

Incubation; M/10 phosphate buffer (pH 7.0), AIB 3 μ moles, mycelia (as dry weight) 40~70 mg, final volume 6 ml, 28°C.

In adaptation experiment, 180 mg of sucrose was added. Duration of incubation was 5 min for uptake experiments and 6 hr for consumption experiments. AIB uptake and consumption were determined in presence and in absence of the inhibitors.

R*; Ratio of times for consumption of 10% substrate. (in presence of inhibitor/in absence of inhibitor)

** Compounds except for cysteine and cystine did not inhibit the consumption of AIB, as described in text.

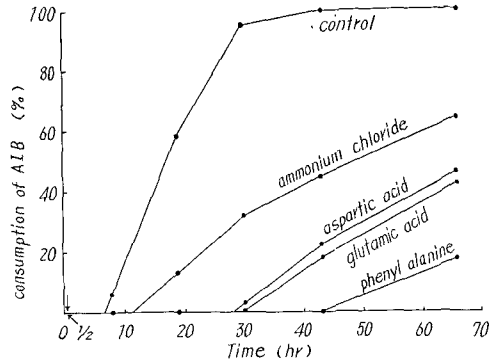


Fig. 5. Inhibition of adaptation for AIB by nitrogenous compounds

Incubation; M/10 phosphate buffer (pH 7.0), AIB 3 μ moles, sucrose 180 mg, mycelia (as dry weight) 54 mg, final volume 6 ml, 28°C.

Aspartic acid, glutamic acid, phenylalanine or NH_4Cl (100 μ moles) was added at the time indicated by an arrow.

AIB への適応操作を受けない菌糸は AIB の消費に 6 時間以上の lag を示した (第5図)。従って、適応の過程については第5図に示すように AIB の 10% を消費するに要する時間の比から阻害の程度を比較した。すなわちこの値が大ならば、AIB 消費が認められるまで、より長時間を要することを示す。

AIB 消費に対して、システイン、シスチンを除く他のアミノ酸及び塩化アンモニウムは、阻害的に作用するよりはむしろ、促進的に作用することが認められた。しかしその効果は実験毎に大きく変動するので、第3表では AIB 消費に対して阻害作用を呈しないという意味のみを表わすために (—) で記した。

この実験において阻害剤としてのアミノ酸等の濃度は合成培地¹⁷⁾ の窒素濃度に匹敵する M/16 以下を用いた。この濃度範囲では、用いたアミノ酸及び塩化アンモニウムは AIB の吸収過程及び適応過程を阻害し、消費の過程には阻害を示さなかった。唯、システイン、シスチンは消費過程に強い阻害を示し、そのため適応過程に対する影響はこの方法では調べられなかった。このシステインの強い阻害は AIB 分解酵素の pyridoxal phosphate との反応から理解されるかもしれない²¹⁾。*P. oryzae* により利用される硝酸カリウムは AIB 利用に対して阻害を示さないことが AIB 消費利用全体に対する影響を調べた他の実験からも認められた。

要 約

1. α -dialkyl- α -amino acids の1つである AIB は *P. oryzae* によって適応的に分解され、蔗糖の存在の下に窒素源としてその生育を支えることができる。
2. *P. oryzae* は AIB を急速に吸収し、後緩慢に消費し、その大部分をアセトンとして外液へ放出する。
3. AIB の利用過程を吸収、適応、消費の3つの過程に分け、他のアミノ酸及びアンモニウム塩の影響、特に阻害作用を調べた。
4. AIB の比色定量法を検討した。

参 考 文 献

- 1) AASLESTAD, H. G. and A. D. LARSON 1964. *J. Bacteriol.* 88: 1926.
- 2) BAILEY, C. B. and W. B. DEMPSEY 1967. *Biochemistry* 6: 1526.
- 3) BEHRE, J. A. and S. R. BENEDICT 1926. *J. Biol. Chem.* 70: 487.
- 4) BRAUNSTEIN, A. E. 1960 "The Enzyme" ed. by P. D. Boyer, Henry Lardy and Karl Myrbäck, academic press, New York and London Vol. 2, p. 115.
- 5) CHRISTENSEN, H. N., T. R. RIGGS, H. FISCHER and I. M. PALATINE 1952. *J. Biol. Chem.* 198: 1.
- 6) CHRISTENSEN, H. N. • A. J. ASPEN and E. G. RICE 1956. *J. Biol. Chem.* 220: 287.
- 7) FASELLA, P., A. GIARTOSIO and G. G. HAMMES 1966. *Biochemistry* 5: 197.
- 8) 本間 守・下村得治 1969. 北大農学部邦文紀要. 7: 6
- 9) KANDATSU, M. and KIKUNO, K. 1961. *Agr. Biol. Chem.* 25: 234.
- 10) KENNER, G. W. and R. C. SHEPPARD 1958. *Nature* 181: 48.
- 11) LANGHELD, K. 1906. *Ber.* 42: 392, 2360.
- 12) 中村幸彦・下村得治 1953. 農化 27: 694.
- 13) 大島康義 1953. 農化 27: 102.
- 14) OXENDER, D. L. and H. N. CHRISTENSEN 1963. *J. Biol. Chem.* 238: 3686.
- 15) SCHEPARTZ, A. I. 1961. *J. Chromatog.* 6: 185.
- 16) SHIMOMURA, T. and NAKAMURA, Y. 1958. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* 22: 193, 108.
- 17) ——— and ——— 1955. *ibid.* 19: 178.
- 18) SHIVE, W. and C. G. SHINNER 1963. "Metabolic Inhibitors" ed. by R. M. HOCHSTER and J. H. QUASTEL, Academic Press, Vol. 1.
- 19) STEPHENSON, M. "Bacteriol Metabolism" Longmans, Green and Co. London, 1948. p. 191.
- 20) 田原哲士・本間 守・下村得治 1969. 北大農学部邦文紀要. 7: 12
- 21) UMBREIT, W. W. 1955. "Symposium on Amino Acid Metabolism" p. 48.