



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	α -Amino isobutyric acid の代謝 : 第2報 Piricularia oryzae による α -Amino isobutyric acid の吸収
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), 6-11
Issue Date	1969-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11781
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(1)_p6-11.pdf



α -Amino isobutyric acid の代謝

第2報 *Piricularia oryzae* による α -Amino isobutyric acid の吸収

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 2. Uptake 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

α -amino isobutyric acid (AIB) は代謝を受け難いアミノ酸として動植物組織、微生物による中性アミノ酸の吸収、或いはアミノ酸の腸壁透過に対するモデルアミノ酸^{2),10)}として、アミノ酸吸収現象の研究に使用されてきた。AIB 吸収のエネルギー依存性については、代謝阻害物質を用いた実験^{3),5),11)}にとどまらず、酸素吸収等細胞内部の代謝とのより直接的関係を述べている報告^{7),9),11)}も提出されている。

筆者等⁸⁾は、*Piricularia oryzae* が AIB を急速に吸収し、極めて緩慢にアセトンに分解することを観察し、短時間では分解の影響なしに、吸収現象を調べることができることを指摘した(第1報)。これに関する種々の観察の中で、本菌の AIB 吸収に酸素吸収の増大が伴うことを認めた。この酸素吸収の増加は AIB の吸収に多少遅れて平行に進行した。本報文に於いては、AIB 吸収と酸素との関係を中心に、*P. oryzae* による AIB 吸収現象の諸性質について述べる。

実験方法

1. 菌糸懸濁液の調製

前報⁸⁾の方法により調製した菌糸懸濁液は、内部呼吸量が大きく (Fig. 1), 従って酸素吸収に対する AIB 添加の影響を調べる実験では、その影響を明確にするため、内部呼吸を小さく抑えることが望ましい。そこで前報⁸⁾の記載に従って合成培地 100 ml に生育させ、処理した菌糸を、更に M/10 リン酸緩衝液 (pH 7.0) 100 ml 中で

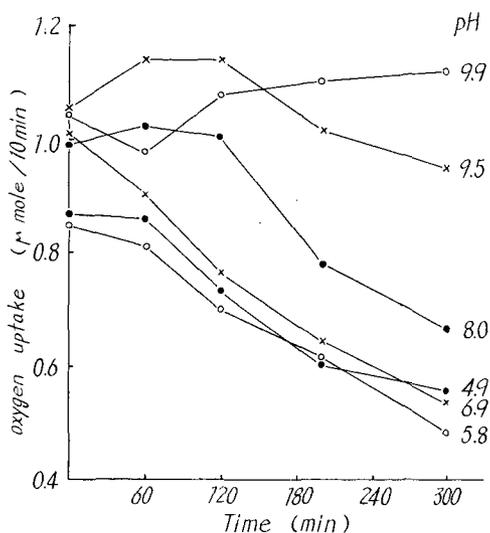


Fig. 1. Change of Oxygen Uptake by *P. oryzae*.

Buffer; M/10 sodium phosphate buffer (pH 4.9~8.0).
M/10 sodium bicarbonate buffer (pH 9.5~9.9).
Mycelia (as dry weight) 16 mg, 26°C.

12~15時間振盪後濾過、水洗して所定の溶液に懸濁した。この操作では内部呼吸量は大きく減少するが、AIB 吸収速度は大きな変動を受けなかった。

2. 酸素吸収の測定

ワールブルグ検圧計を用い、主室に菌糸懸濁液 2 ml, 側室に AIB 溶液 0.25 ml を含む全容 3 ml とし、25°C に於いて常法に従って酸素吸収量を測定した。

3. AIB 吸収の測定

酸素吸収を同時に測定する実験以外は前報⁸⁾に記載した条件を用い、AIBの定量も前報の方法に従った。ワールブルグ検圧計を用いる時は、前記の条件下で反応後、AIBの吸収を停止せしめるために反応液の温度が8°C以下に低下するまで氷冷水を加え、菌糸を濾過後、一定量の脱塩水に懸濁し、沸騰水中5分間加熱して、吸収されたAIBを抽出、再び濾過後濾液に含まれるAIBを定量した。カルボキシル基を標識したAIBを用いた実験では、全容6mlで行なう通常の条件の下に吸収反応を進行させた後、ただちに濾過し、菌糸は約50mlの氷冷水で洗滌、濃硫酸上、減圧下に乾燥して、6mlのM/10リン酸緩衝液(pH 7.0)で加熱抽出し、最初の濾液と菌糸抽出液とのそれぞれ2mlについて含まれる放射活性を測定した。放射活性の測定はガスフローカウンターを用い、試料の乾燥固着状態をより均一にするため、試料溶液2mlに0.4M塩化カルシウム溶液0.2mlを加えてリン酸カルシウムの沈澱を生成させてから乾燥した。

結果と考察

1. AIB 吸収と温度

*P. oryzae*によるAIB吸収の温度依存性はFig. 2に示すように、30°C附近に最大をもち、12°C、55°Cでは極めて低く、8°C以下では殆んどAIBの吸収を認め得なかった。又、それぞれの温度に120分間Preincubationを行なった菌糸も同様の傾向を示した。

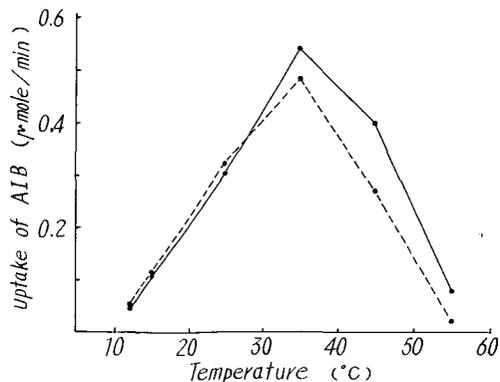


Fig. 2. The Dependence of AIB Uptake on Temperature.

Incubation; 4/10 M-NaH₂PO₄ 1.5 ml, AIB 3 μmoles, mycelia (as dry weight) 36 mg, final volume 6 ml, 5 min at 12° and 15°C, 2 min at 25°, 35°, 45° and 55°C. Before addition of AIB, mycelia were preincubated in buffer solution for 10 min (●—●) or 120 min (●---●) at the same temperature as the incubation.

2. AIB 吸収と pH

AIB吸収のpH依存性を調べた結果(Fig. 3) AIBの吸収速度はpH 4.5から7.0の間では著しい変動はなく、4以下、7以上で減少している。しかし、それぞれのpHの下にPreincubationを行なうことにより特にアルカリ側で大きい吸収速度の増加が認められた。これらの傾向は、ナトリウム塩をカリウム塩に置き換えても認められた。従って、多くの実験に於いて、60~120分のPreincubationを行なった菌糸について、可能な限り短時間に操作を完了した。

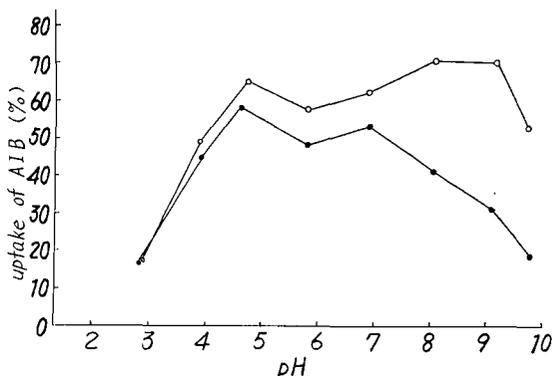


Fig. 3. pH Dependence of AIB Uptake.

Incubation; M/10 buffer, AIB 3 μmoles, mycelia (as dry weight) 40 mg, final volume 6 ml, 25°C, 5 min.

Buffer; M/10 sodium citrate buffer (pH 2.8~4.0).

M/10 sodium phosphate buffer (pH 4.5~8.1).

M/10 sodium bicarbonate buffer (pH 9.0~10.0).

Mycelia were preincubated in each buffer solution for 10 min (●—●) or 150 min (○—○).

Table 1. The Effect of Buffer Concentration.

Component of buffer solution		Ratio of AIB uptake
KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	0 M	97
	1/100	103
	1/50	109
	1/20	104
	1/10	100
NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	1/100	94
	1/10	109
KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	1/100	106
	1/10	85
	1/10	72

Incubation; AIB 3 μmoles, mycelia (as dry weight) 59 mg, final volume 6 ml, 25°C, 5 min.

3. 塩濃度の影響

Table 1 に示すように AIB 吸収に対する塩濃度の影響は小さく、塩溶液を加えない場合(菌糸は水で2回洗滌)でも、通常用いた M/10 濃度のリン酸塩の場合と大差なかった。又、ナトリウム塩をカリウム塩に置き換えた時の AIB 吸収の差は明らかに認められたが、しかし、このナトリウムイオンの影響は動物組織¹²⁾, marine bacteria⁴⁾に認められている程大きいものではなかった。

4. 他のアミノ酸による阻害

種々の生物において、アミノ酸の吸収 site の問題を考えるために、アミノ酸相互の間に吸収の拮抗阻害の現象が調べられている。*P. oryzae* による AIB の吸収は

Table 2. The Inhibitory Action of Amino Acids to AIB Uptake.

Inhibitors	amount	Inhibition rate of AIB uptake	
		1 μ mole (%)	5 μ moles (%)
glycine		31	67
L-alanine		62	88
L-threonine		16	54
L-valine		48	75
L-leucine		53	100
L-isoleucine		26	57
L-methionine		45	82
L-phenylalanine		55	80
L-tyrosine		48	66
L-tryptophane		57	97
L-proline			9
L-hydroxyproline			7
L-cysteine			92
L-cystine			3
L-glutamic acid			16
L-aspartic acid			8
L-glutamine			79
L-asparagine			59
L-lysine	24		80
L-hystidine	48		100
L-arginine	52		82
ammonium chloride	49		68

Incubation; M/10 phosphate buffer (pH 7.0), AIB 3 μ moles, mycelia 57~76 mg, final volume 6 ml, 25°C, 5 min. AIB uptake was determined in presence and in absence of an inhibitor.

Table 2 に示す如く、種々のアミノ酸によって阻害される。プロリン、ヒドロキシプロリン、シスチンを除いた中性アミノ酸、塩基性アミノ酸及びアンモニアは強い阻害を示し、特にシスチン、ロイシン、ヒスチジン、トリプトファン等が強く、CHRISTENSEN 等^{1),10)} がガン細胞で指摘した A-site, L-site の差は、この実験条件の下では特に認められなかった。更に、*P. oryzae* における AIB 吸収においては、プロリン、ヒドロキシプロリン、シスチンが他の中性アミノ酸に比し、極めて弱い阻害作用しか持たないということが特徴的である。シスチンの阻害については、腸において中性アミノ酸の吸収 site に対するシスチンの親和性が弱いという結果⁶⁾ に対応し、又、プロリンの阻害については同様の結果が骨組織⁹⁾ のナトリウムイオン非依存性 site において得られている。更に酸性アミノ酸による阻害は小さいが、そのアミドによる阻害は中性アミノ酸と同程度であった。

5. 吸収された AIB の放出

前報⁶⁾ に示したように *P. oryzae* は、用いられた条件に於いて、短時間 (40 分以内) に AIB を殆んど完全に吸収し、medium 中のその濃度は非常に小さくなる。そして、その時間内に AIB の分解は認められなかった。このように吸収された状態にある AIB は Table 3 に示すように、加熱、急激な凍結-融解、酸又はアルカリ処理等の激しい条件の下で、大部分が放出された。従って、このような激しい条件の下で破壊されるような壁を隔て

Table 3. Release of Intracellular AIB into the Medium.

Condition		Release of AIB (%)
1. in anaerobic condition*	120 min	13
	240 min	25
2. in 2,4-dinitrophenol solution (1.7 $\times 10^{-3}$ M)	90 min	9
	270 min	25
3. freezing and thawing**		95
4. heating in boiling water	5 min	98
5. in acidic solution, N/4 HCl	10 min	94
6. in alkaline solution, N/4 KOH	10 min	85

Cells were treated in each condition after pre-incubation with AIB at 25°C for 20 min.

* Anaerobic condition was attained by gassing with nitrogen.

** Freezing was carried out with mixture of dry ice and methanol.

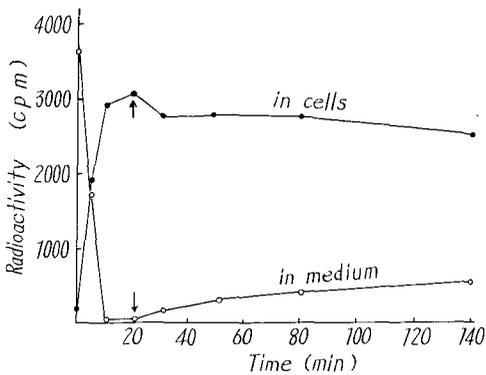


Fig. 4. Exchange of intracellular AIB with extracellular AIB.

Incubation; M/10 phosphate buffer (pH 7.0), [1-¹⁴C] AIB 3 μ moles ($3.3 \times 10^{-2} \mu$ c), mycelia (as dry weight) 46 mg, final volume 6 ml, 25°C. After 20 min (at arrow), 100 μ moles of unlabeled AIB were added. Radioactivity in 2 ml of medium or cell extract was determined with the procedure in "Methods".

た内側に外側より大きい濃度で AIB が保持されていると考えられる。又、予め [1-¹⁴C] AIB を吸収させた菌糸を、標識しない AIB 溶液に incubate した実験 (Fig. 4) は、細胞外 [1-¹⁴C] AIB の僅かの増大と細胞内 [1-¹⁴C] AIB の僅かの減少とを示し、その速度は吸収速度に比して極めて小さかった。従って、AIB の流れは壁の外から内への吸収方向に大きく傾いていると考えられる。ここで [1-¹⁴C] AIB が細胞外液に放出される割合は 90 分で 11%, 120 分で 14% となり、Table 3 に示した嫌気条件或いは呼吸阻害下に於ける細胞内 AIB の放出と近似した。[1-¹⁴C] AIB の放出は、細胞外液の unlabeled-AIB の濃度が高い場合には細胞内から外液への AIB の流れと近似していると考えられる。従って、上記の内から外への流れ (放出) は呼吸とは直接関係せず、以下に示すように外から内への流れ (吸収) のみが呼吸に依存していると見ることも可能である。

6. 呼吸阻害剤の影響

上記の如く、AIB 吸収は、一方で他のアミノ酸によって阻害を受ける部位を通して進行し、他方で pH 依存性、温度依存性を示し、細胞内の代謝過程との関係が考えられる。細胞内に濃縮された AIB が呼吸阻害によりある程度放出されるということは、AIB 吸収と呼吸との関係を示唆する。他のいくつかの実験で AIB 吸収のエネルギー依存性を見るために、代謝阻害剤の使用が試みられ、呼吸阻害と AIB 吸収の阻害との間に平行関係が

Table 4. Inhibition of AIB Uptake by Respiratory Inhibitors.

Inhibitors	(mM)	Inhibition of AIB uptake (%)
potassium cyanide	0.02	37
	0.17	75
2,4-dinitrophenol	0.02	0
	0.17	44
	0.83	81
potassium arsenite	1.67	15
	16.7	45
sodium azide	0.02	0
	0.17	15
	8.33	97
anaerobic condition*		100

* Air was displaced by gassing with nitrogen.

認められている^{3),5),11)}。P. oryzae においても Table 4 の如く、嫌気条件、呼吸阻害による AIB 吸収の阻害は顕著であった。しかし AIB 吸収のプロリンによる阻害の結果から P. oryzae の AIB 吸収 site に類似する site と推定された骨組織⁹⁾ のナトリウムイオン非依存性 site は、呼吸阻害剤に対しては異なった態度を示している。

7. AIB 吸収に伴う酸素吸収

AIB 吸収と酸素吸収との関係については Bacillus megaterium を用いた R. E. MARQUIS らの実験⁹⁾、すなわち菌体の酸素吸収量が大きい場合に AIB 吸収量も大きいという結果、及び Streptomyces hydrogenans を用いた K. RING らの実験¹¹⁾、すなわち AIB を吸収した細胞は、吸収しない細胞より酸素吸収が大きいという結果等が報告されている。P. oryzae の場合、Fig. 5 に示す如く、AIB 吸収が酸素吸収の増大を伴うことが認められた。すなわち AIB 添加に数分遅れて酸素吸収の増大がある。この実験に用いた時間以内に AIB の分解は認められず、又、吸収された AIB は菌糸の加熱抽出により殆んど完全に細胞外へ放出されるので (Table 3)、この酸素吸収の増大は AIB 吸収に伴って現れるものと考えられる。この過剰の酸素吸収量と AIB 吸収量との関係の一例を Fig. 6 に、又、過剰の酸素吸収量が吸収された (添加した) AIB 量に依存することを Fig. 7 に示した。AIB の吸収完了、すなわち添加した AIB を殆んど完全に吸収した後、酸素吸収の速さは AIB 添加以

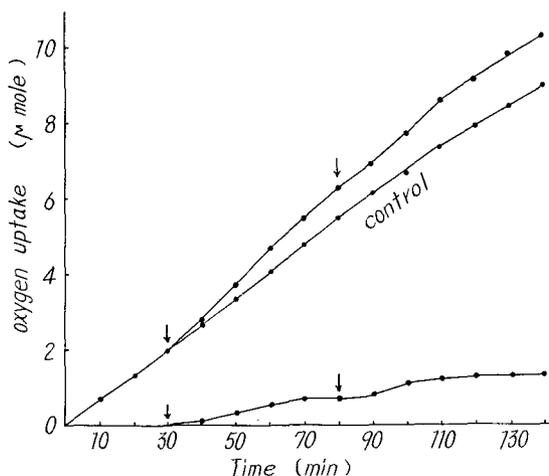


Fig. 5. Stimulation of Oxygen Uptake by Addition of AIB.

Incubation; NaH_2PO_4 300 μmoles , mycelia (as dry weight) 12 mg, final volume 3 ml, 25°C. AIB (1.5 μmoles) was added at the time indicated by arrows. The increase of oxygen uptake was shown in lower line.

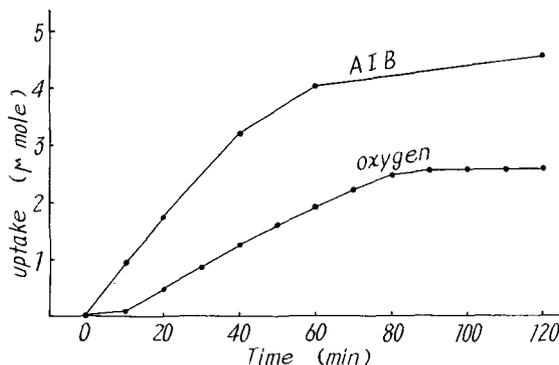


Fig. 6. Increase of Oxygen Uptake and of AIB Uptake.

Incubation; NaH_2PO_4 300 μmoles , AIB 5 μmoles , mycelia (as dry weight) 12 mg, 25°C.

前、又はそれより幾分大きい状態で、ほぼ直線的に推移する。そこで AIB を添加した時から酸素吸収が直線的变化に移る時迄の酸素吸収量から、対照の同じ時間の値を差し引いた値を仮りに、AIB 吸収に伴う酸素吸収量と考えて、AIB 吸収量に対する過剰の酸素吸収量の比を Fig. 7 の結果から算出すると約 0.6~0.8 の値が得られた。この値はそれぞれの実験により 0.5~1.0 の間で変動し一定しないが、R. E. MARQUIS 等⁹⁾が AIB 1 分子

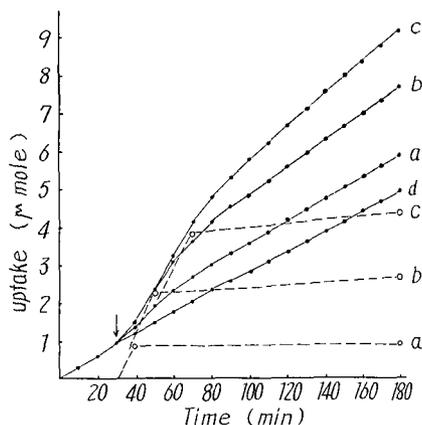


Fig. 7. Dependence of Oxygen Uptake on the Amount of AIB.

Incubation; NaH_2PO_4 300 μmoles , mycelia (as dry weight) 18 mg, AIB 1 μmole (a), 3 μmoles (b), 5 μmoles (c), 0 μmole (d), final volume 3 ml, 25°C. ●—● oxygen uptake. ○—○ AIB uptake.

を吸収する間に消費される酸素量として算出した値(6.7)よりは、はるかに小さく、より直接的関係を示すものと思われる。

要 約

1. *P. oryzae* による AIB の吸収は AIB のアセトンへの分解に比し極めて大きい速さで進み、その速さは温度、pH に依存し、シスチン、イミノ酸を除いた中性及び塩基性アミノ酸の存在によって阻害の影響を受けた。
2. 菌糸によって吸収された AIB は加熱、凍結—融解等細胞膜を破壊するような操作によって、殆んど全て外液へ放出される。一方、嫌気条件或いは外液の AIB 濃度が高いときに認められるように、細胞内 AIB の外への流れの速さは吸収の速さに比し極めて小さかった。
3. 菌糸による AIB の吸収は種々の呼吸阻害剤及び嫌気条件によって阻害を受けるが、正常な条件においては酸素吸収の増加を伴う。この過剰の酸素吸収は AIB の吸収に数分遅れて吸収と平行に進行し、AIB 吸収量に対する過剰の酸素吸収量の比は、実験毎に変動するが 0.5~1.0 の値を示した。

参 考 文 献

- 1) ADAMSON, L. F. and S. H. INGBER 1967. J. Biol. Chem. **242**: 2646.
- 2) CHRISTENSEN, H. N., A. J. ASPEN and E. G. RICE 1956. J. Biol. Chem. **220**: 287.

- 3) DRAPEAU, G. R., T. I. MATULA and R. A. MACLEOD 1966. *J. Bacteriol.* **92**: 63.
- 4) ——— and R. A. MACLEOD 1963. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**: 111.
- 5) FINERMAN, G. A. M. and L. E. ROSENBERG 1966. *J. Biol. Chem.* **241**: 1487.
- 6) HAGHIRA, H., E. C. C. LIN, A. H. SAMIY and H. WILSON 1961. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**: 478.
- 7) HELMREICH, E. and D. M. KIPNIS 1962. *J. Biol. Chem.* **273**: 2582.
- 8) 本間 守・下村得治 1969. 北大農学部邦文紀要 **7**: 1.
- 9) MARQUIS, R. E. and P. GERHARDT 1964. *J. Biol. Chem.* **239**: 3361.
- 10) OXENDER, D. L. and H. N. CHRISTENSEN 1963. *J. Biol. Chem.* **238**: 3686.
- 11) RING, K. and E. HEINZ 1966. *Biochem. Z.* **344**: 446.
- 12) THIER, S. O., A. BLAIR, M. FOX and S. SEGAL 1967. *Biochim. Biophys. Acta* **135**: 300.