



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヘテロ乳酸菌におけるグルコン酸 - 6 - 燐酸の代謝機構に関する研究
Author(s)	八島, 重昂; YASHIMA, Shigetaka
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 8(1), 5-29
Issue Date	1971-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11818
Type	departmental bulletin paper
File Information	8(1)_p5-29.pdf



ヘテロ乳酸菌に於けるグルコン酸-6-燐酸の 代謝機構に関する研究

八島重昂

(北海道大学農学部農芸化学科微生物工学教室)

Studies on the mechanism of 6-phosphogluconate metabolism in heterolactic bacteria

SHIGETAKA YASHIMA

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

Received November 21, 1970

緒 論

ヘテロ乳酸菌の嫌氣的ブドウ糖代謝経路は DEMOSS ら¹³⁻¹⁷⁾, GIBBS ら²⁹⁾, GUNSALUS ら³¹⁾, HORECKER ら^{34,40)} 及び HURWITZ⁴¹⁾ 等により, 主に *Leuconostoc mesenteroides* を用いて研究され, ブドウ糖が五単糖リン酸側路を経て脱炭酸を受け, キシルロース-5-リン酸となり, 更にこの物質がアセチル・リン酸及びグリセルアルデヒド-3-リン酸へと開裂し, 前者からエタノールが, 後者から乳酸が生成するものと推定されている。しかし乍ら, ELTZ ら²⁴⁾ は, 同じくヘテロ乳酸菌である *Lactobacillus brevis* を用いた実験結果より, この菌種に五単糖リン酸側路が果して存在するのかどうか疑問も提出している。即ち, 同氏らはこの菌の無胞抽出液を用い, ブドウ糖-6-リン酸及びグルコン酸-6-リン酸を基質とし炭酸ガスの発生速度について検討したが, 前者を基質とした時の発生速度が, 後者の場合に比して著しく速い事を見出した。一般に五単糖リン酸側路に於いては, ブドウ糖-6-リン酸がグルコン酸-6-リン酸となった後に酸化的脱炭酸を受けリブロース-5-リン酸となるものとされているので ELTZ らの報告は注目に値するといえよう。

一方, 五単糖リン酸側路に於いてグルコン酸-6-リン酸の脱水素及び脱炭酸反応を触媒し, リブロース-5-リン酸を生成する酵素は, グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] であるとされているが, この脱水素, 脱炭酸反応が単一酵素による一段階の反応か, 又は中間体を経る二段階の反応か, 従来より多くの論議がなされてきた。即ち, 最初に SCOTT ら⁶¹⁾ は DICKENS の方

法¹⁹⁾ により部分精製した酵母のグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素を用いて反応生成物を分離同定した結果, リブロース-5-リン酸, アラビノース-5-リン酸, グリセルアルデヒド-リン酸, ペントース・リン酸及び2-ケト-グルコン酸-6-リン酸等を認めたが, 反応機構の推定には至らなかった。更に HORECKER ら^{37,38)} はアルコール酵母のグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素を用い, グルコン酸-6-リン酸からリブロース-5-リン酸が生成する事を確認したが, その際中間体として3-ケト-グルコン酸-6-リン酸の存在を推定した。しかし, この中間体の存在に対する直接的な証明は未だなされていない。又, DEMOSS ら¹⁸⁾ は中間体として2-デオキシ-グルコン酸-6-リン酸を想定して, その証明を試みたが否定的な結果を得た。以上の経過から, 中間体として3-ケト-グルコン酸-6-リン酸の存在が一般に考えられていたが, PONTREMOLI ら⁵⁸⁾ は *Candida utilis* より精製した結晶状のグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素を用いてその諸性質を検討した結果, グルコン酸-6-リン酸は同酵素により一挙に脱水素及び脱炭酸を受けリブロース-5-リン酸となるが, その際, 中間体は存在しないものと結論している。これらの事を総合して考えると, グルコン酸-6-リン酸の酸化的脱炭酸反応機構については未だ明確な結論が得られていないと考える方が妥当であろう。

以上に記して来た如く, ヘテロ乳酸発酵の代謝経路に関しては, 五単糖リン酸側路が果して存在するのかどうか, 更にもし存在するとすれば, グルコン酸-6-リン酸の酸化的脱炭酸反応の詳細な反応機構は如何なるものであるか等が未解決の問題として提起される。そこで, こ

これらの諸点に着目しつつ一連の研究を行ない、若干の新知見を得たのでここに報告する。

実験材料

Leuconostoc mesenteroides BO7. *Leu. mesenteroides* var. Sake, *Lactobacillus brevis* ATCC 8281, *L. brevis* ST は、東京大学応用微生物研究所第一研究部より、*Leu. mesenteroides* IFO 3426 及び *L. brevis* IFO 3960 は財団法人発酵研究所よりそれぞれ恵与されたヘテロ乳酸菌である。これらの菌株は全て、炭酸石灰を含む麦芽抽出液-肉汁寒天中で穿刺培養法により、30°C、2日間培養したのち実験に使用した。更に、*Aerobacter aerogenes* IAM 1183 及び *Pseudomonas fluorescens* IAM 1016 は東京大学応用微生物研究所第三研究部より分譲され、肉汁斜面寒天上に前者は32°C、後者は27°Cでそれぞれ2日間培養したのち実験に供した。

ブドウ糖-6-リン酸、グルコン酸-6-リン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、2-ケト-D-グルコン酸、D-アラビノース、NAD、NADP、NADPH₂、FAD、FMN、ATP、ADP 及びリボフラビンは、Nutritional Biochemical 社(米国)より購入し、グルコン酸-6-リン酸はブドウ糖より SEEGMILLER ら⁶²⁾の方法に従い化学的に調製した標品も併せて使用した。NADH₂ は RAFTER ら⁵⁹⁾の方法に準じて NAD より調製した。D-グルコン酸、AMP、5-ケト-D-グルコン酸、チアミノピロリン酸及びピリドキサル・リン酸は、武田薬品工業株式会社より、酸性フォスファターゼは三共株式会社よりそれぞれ入手した。更に、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸は *Aer. aerogenes* より調製した 2-ケト-グルコノキナーゼを用い、FRAMPTON らの方法²⁶⁾に従い調製した。D-リブロース及び D-キシロースは、それぞれ D-アラビノース又は D-キシロースより GLATTHAAR ら³⁰⁾又は SCHMIDT ら⁶⁰⁾の方法により調製した。D-マンノン酸及び D-ガラクトン酸は通常の臭素酸化法に従い、それぞれ D-マンノース又は D-ガラクトースより調製し、L-イドン酸は 5-ケト-D-グルコン酸を HAMILTON らの方法³²⁾により化学的に還元する事により調製した。更に D-アロン酸は、3-ケト-ショ糖より FUKUI ら²⁸⁾の方法により調製した。尚、3-ケト-ショ糖は東京大学応用微生物研究所、福井作蔵博士より贈与された標品を使用した。

2-ケト-グルコン酸-6-リン酸還元酵素 [EC 1.1.1.43] は、FRAMPTON らの方法²⁷⁾により *Pseud. fluorescens* を用いて精製標品を得た。

又、各種の酵素精製の際に使用したリン酸石灰ゲルは MASSAY の方法⁵⁰⁾に準じて調製した。

実験方法

本研究に用いられた全てのヘテロ乳酸菌は、ブドウ糖 2%、無水酢酸ナトリウム 2%、ポリペプトン 1%、肉エキス 1%、食塩 0.5%、酵母エキス 0.2%、及び硫酸マンガ(結晶水 7 分子) 0.05% (滅菌前 pH 7.0 に調整) なる組成を有する液体培地中で 30°C に於いて静置培養され、対数的増殖期後期に至り、遠心分離 (10,000×g, 3~4°C) により集菌された。得られた菌体を更にそれぞれ 40 倍容の 0.8% 食塩水を用いて 2 回遠心分離により洗浄し、洗浄菌体として実験に供した。

グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素活性は、基質の酸化と共に生ずる NADH₂ に由来する波長 340 mμ に於ける吸光度増加の初速度を測定する事により算出した。標準反応液は、300 μmoles のリン酸緩衝液 (pH 7.0)、30 μmoles の塩化マグネシウム、3 μmoles の NAD 及び適量の酵素液に蒸留水を加えて 2.9 ml とし、これに 0.1 M のグルコン酸-6-リン酸溶液を 0.1 ml 加えたものである。尚、反応は 30°C で行ない、酵素液中に NADH₂ 酸化酵素が混在する場合には、窒素気相中で反応を行なった。

ブドウ糖-6-リン酸脱水素酵素活性の測定は、上記反応液のグルコン酸-6-リン酸及び NAD の代りに、それぞれブドウ糖-6-リン酸及び NADP を使用して同様の方法により行なった。アルコール脱水素酵素活性は、同様にエタノール及び NAD を使用して測定した。又、NADH₂ 及び NADPH₂ 酸化酵素活性の測定は、NADH₂ 又は NADPH₂ を基質とし、好気条件下に於いて波長 340 mμ の吸光度減少の初速度を求める事により行なった。又、何れの場合にも、NADH₂ 及び NADPH₂ の波長 340 mμ に於ける分子吸光係数としては 6.02×10⁶/cm²/mole なる値を使用した。

2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素活性は、ワールブルグ検圧計を用いて脱炭酸反応の初速度を測定する事により算出した。標準反応溶液は、2 ml 中に、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸 10 μmoles、酢酸緩衝液 (pH 5.0) 50 μmoles、システイン 2 μmoles 及び適量の酵素を含むものである。常法により、測定時には 0.1 N 硫酸を 2 ml 加えて測定したが、この際、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸の自動的脱炭酸は認められなかった。尚、反応は 30°C で行なった。

これら諸酵素活性の 1 単位は、上記測定条件下で 1 hr

当り 1 μmole の基質を変化せしめる酵素量と決め、比活性は蛋白質 1 mg 当りの単位数と規定したが、蛋白質の定量は LOWRY らの方法⁴⁷⁾ により行なった。

2-ケトグルコン酸-6-リン酸の定量は、*Leu. mesenteroides* BO7 より精製したグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 及び NADH_2 を用い、波長 340 $\text{m}\mu$ に於ける吸光度の減少により測定した。即ち、リン酸緩衝液 (pH 7.0) 300 μmoles , NADH_2 0.35 μmole , 塩化マグネシウム 30 μmoles 及び 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を 0.05 から 0.15 μmole の範囲で含む未知試料に蒸留水を加えて 2.9 ml とし、5 分間、35°C に保ち、約 5 単位の精製酵素を含む酵素液を 0.1 ml 加え、30 分間、35°C で反応を行なった。反応終了時に 340 $\text{m}\mu$ に於ける吸光度を測定し、反応開始前の吸光度に対し減少した吸光度を算出する。ここに得られた値から、別に作製してある標準曲線を利用して未知試料中の 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸量を算出した。

グルコン酸-6-リン酸、無機リン酸及び乳酸の定量は、それぞれ HOHORST³⁵⁾, FISKE ら²⁵⁾ 及び BARKER ら³⁾ の方法に準じて行なった。又、ケトペントースの定量は、システイン-カルバゾール反応²⁰⁾, オルシノール反応³⁶⁾, カルバゾール硫酸反応²¹⁾ 等により行なった。更に、ケトペントースのフェニルヒドラジン誘導体は GLATTHAAR ら³⁰⁾ の方法により調製した。

濾紙ペーパークロマトグラフィーは、東洋濾紙 No. 51 を用いて室温に於いて上昇法により展開した。濾紙電気泳動は、15°C に於いて、3,000 V, 30 mA の電圧及び電流を用い、ギ酸緩衝液 (0.1 M, pH 3.0) を使用して、Whatman No. 1 上で 50 分間泳動を行なった。

実験結果

I. *Leu. mesenteroides* BO7 のグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素

既に緒論に於いて述べた観点に立ち、典型的なヘテロ乳酸菌である *Leu. mesenteroides* BO7 のグルコン酸-

6-リン酸脱水素酵素について多くの予備実験を行なった結果、グルコン酸-6-リン酸を基質とした場合に、NAD の還元速度と炭酸ガスの発生速度が一致しない反応条件のある事が認められた。この事実は、グルコン酸-6-リン酸の酸化的脱炭酸反応が異なる段階で生ずる事を示唆するものであり、従来認められなかった現象である。そこで、まずこの酵素の精製を試みその基本的諸性質の検討を行なった。

1) グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素の精製

培養液 20 ℓ より得られた *Leu. mesenteroides* BO7 の洗浄菌体を、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、80 ml とし、0°C に於いて 30 分間、10 kc の音波処理を行なった。処理液を遠心分離し、得られた黄色上澄液を無細胞抽出液とし、更に常法により硫酸アンモニウム 40% 飽和と 80% 飽和の間で沈殿する白色沈殿を集めこれを 20 ml の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解後、約 200 倍容の同緩衝液に対し一夜透析し、透析内液を硫酸アンモニウム画分 (40~80% 飽和) とした。ついで、この画分を波長 280 $\text{m}\mu$ に於ける吸光度が 20.0 になるように上記緩衝液で希釈したのち、前記の方法に準じて硫酸アンモニウム画分 (50~60% 飽和) を調製した。

次に、DEAE-cellulose column (3.5 \times 30 cm) に、この画分中の酵素を常法により吸着せしめ、5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 500 ml , ついで 0.1 M の塩化カリウムを含む同緩衝液 800 ml を用い洗浄した。洗浄後、0.3 M の塩化カリウムを含む 1 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を用い、1 分間当り 3 ml の溶出速度で溶出し、530 ml から 650 ml にわたり溶出される溶出液 (120 ml) を集め、1 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 2 ℓ に対し 0°C に於いて 4 hr ずつ 3 回透析し、この透析内液を DEAE-cellulose 溶出画分とした。

更に、この画分にリン酸石灰ゲル (乾燥重量として 350 mg) を加え、0°C で 10 分間攪拌したのち遠心分離 (2,000 \times g; 5 min) により生ずる上澄液を除去し、残りの沈殿部から酵素を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 10 ml を

Table 1. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase

Fraction	Total activity ($\mu\text{moles/hr}$)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	2,900	0.6	1.0	100
Ammonium sulfate (0.4~0.8 saturation)	2,400	1.7	2.8	83
Ammonium sulfate (0.5~0.6 saturation)	1,335	3.0	5.0	46
DEAE-cellulose	260	14.0	24.2	9
Calcium phosphate gel	174	19.1	33.0	6

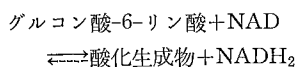
用い2回抽出した。抽出液を集め、50倍容の蒸留水に対し、5°Cで4hrずつ4回透析し、透析内液をリン酸石灰ゲル抽出画分とし、この画分を部分精製酵素標品として以下の実験に供した。以上に記した精製結果をまとめると Table 1 の様になり、6%の収率で約33倍に精製出来た。又、この精製酵素標品中に、ブドウ糖-6-リン酸脱水素酵素、NADH₂酸化酵素、NADPH₂酸化酵素及びアルコール脱水素酵素等の活性は検出されなかった。

2) グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素の諸性質

まず最初に、グルコン酸-6-リン酸の酸化により生成する NADH₂ と炭酸ガスの発生速度との関係について検討したところ、NADH₂ の生成は認められたが、pH 6.0から8.6の間で炭酸ガスの発生は全く認められず、この事から、本酵素はグルコン酸-6-リン酸の脱水素及び脱炭酸を一挙に触媒する酵素ではなく、脱水素反応のみを触媒する酵素であると思われた。ヘテロ乳酸菌にこのような酵素の存在が実証された事はなく、当然その諸性質も不詳であったので、その基本的諸性質について検討を行なった。

基質特異性を調べたところ、NAD 又は NADP の存在下で、2-ケト-グルコン酸、グルコン酸、5-ケト-グルコン酸、ブドウ糖-6-リン酸又はグリセルアルデヒド-3-リン酸等の脱水素反応を触媒せず、調べた範囲内で、グルコン酸-6-リン酸に対してのみ活性を示した。又、NADP を補酵素とした時、NAD を用いた場合の1.2%の活性しか示さず、この酵素は一応 NAD のみを水素受容体として要求するものと考えられる。

次に LINEWEAVER らの方法⁴⁶⁾により、NAD 及びグルコン酸-6-リン酸に対する Michaelis-Menten 定数 (Km) を求めたところ、それぞれ 2.6×10^{-5} M 及び 2.0×10^{-4} M となった。更に、標準反応条件に於ける最適 pH 及び温度は、それぞれ 7.5 及び 37°C である事が明らかとなった。又、標準反応条件に於いて NAD を過剰量 (30 μ moles) 用い、0.2 μ mole のグルコン酸-6-リン酸を基質とした場合の反応終了時に於ける NADH₂ の生成量は 0.188 μ mole となり、1分子のグルコン酸-6-リン酸より2原子の水素が NAD に移り1分子の NADH₂ を生成したと考える事が出来る。即ち、この脱水素酵素は次式の反応を触媒する酵素であると思われた。



更に、この反応はマグネシウムイオンにより著しく促進され、その Km 値は 8.3×10^{-3} M である事が認められた。又、カリウム、ナトリウム、リチウム、マンガン、

カルシウム、二価鉄及び三価鉄の影響は認められなかった。ついで阻害剤の検討を行なったが、 5×10^{-4} M のパラクロル安息香酸第二水銀、モノヨード酢酸、フェニル硝化第二水銀又は硫酸銅の存在でそれぞれ100%、85%、95%、又は53%の阻害が認められ、この酵素は多分 SH-酵素であろうと推定された。又、ATP 及び ADP も阻害作用を示し、それぞれに対する阻害定数 (Ki) は 9.5×10^{-4} M 及び 1.8×10^{-3} M となった。

又、この酵素の安定性については、精製酵素標品を -20°C に5週間保存すると約30%の活性が消失し、45°C に於いては15分間で完全に失活する事を認めた。

3) 反応生成物の単離、同定

現在まで知られているグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素は、脱水素のみを行なって2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を生成する酵素 [EC 1.1.1.43]²³⁾ と脱水素、脱炭酸を同時に行ないリブローズ-5-リン酸を生成する酵素 [EC 1.1.1.44]²³⁾ であり、五単糖リン酸側路に於いて作用するのは後者であると考えられている。しかし、ここに得られた酵素は脱水素反応のみを触媒する酵素であり、明らかに前者に類似した性質を有する。先に記した如く、HORECKER ら^{37,38)} は五単糖リン酸側路に於いて、グルコン酸-6-リン酸が脱水素された中間生成物として、3-ケト-グルコン酸-6-リン酸を推定したが、酵素的にも物質的にも証明はなされていない。従って、ここに得られた酵素による反応生成物の同定を試みる事は、意義ある事と思われたので以下の実験を行なった。

反応生成物を多量に調製する為の反応液は、50 ml 中にグルコン酸-6-リン酸 5 mmoles, NAD 0.3 mmole, 塩化マグネシウム 0.5 mmole, トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 2 mmoles, 精製グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 2,000 単位, NADH₂ 酸化酵素 4,000 単位を含むものである。NADH₂ 酸化酵素は反応中に生ずる NADH₂ を酸化し、常に NAD を供給する目的で用いた。この反応液を 35°C に於いて 6 hr 振盪した結果、加えたグルコン酸-6-リン酸の95%以上が消失したので、反応生成物の単離、同定に供した。

多くの予備実験の結果を総合すると、反応生成物はケト-グルコン酸-6-リン酸である可能性が強いと思われたので、まず反応生成物を脱リンしたのち、ケト-グルコン酸の精製法に準じて単離を試みた。

即ち、前述の反応終了液 25 ml を 0.1 N 塩酸を用い pH 6.0 に調整し、これに酸性フォスファターゼ 10 mg を加え 30°C に於いて 3 hr 反応させた。反応 2 hr 以降に無機リンの増加は既に認められず、この時の無機リンの

総量は、23 mmoles に達し、反応液中には先の反応生成物が約 2.5 mmoles 存在している筈なので、この処理によりほぼ完全に脱リンされたといえる。ついで、この処理液に 20% 三塩化酢酸溶液を 8 ml 加え、4°C に 18 hr 保持したのち遠心分離により沈殿を除去した。この上清液に等容のエチルエーテルを加え三塩化酢酸の抽出除去を行ない、同様の抽出を更に 3 回行なった。ついで、水相部分をアンバーライト-IR-120H⁺ 型 column (200~400 mesh: 2×15 cm) を用いて 1 分間当り 0.5 ml の流速に於いて陽イオンの除去を行なった。更に、この流出液を集め、炭酸カリウムで pH 6.7 に調整後、70°C に於いてシロップ状になるまで減圧濃縮し、98% エタノール 10 ml を加え 2 hr 室温に放置した。生じたゴム状の褐色沈殿を除去し、白濁液を 48 hr 4°C に保持したのち、遠心分離により白色沈殿を集めた。

得られた沈殿を 4 ml の蒸留水に溶解し、99% エタノール 15 ml を試験管の管壁を伝わらせ乍ら徐々に加え 4°C に 48 hr 静置し、生じた無色板状結晶を集め、同様の方法で 3 回再結晶を行なった。この結晶標品を 10 ml の冷エチルエーテルで洗浄後、減圧乾燥した。このようにして得られた結晶を無水ケト-グルコン酸カリウム塩として計算すると 0.91 mmole に相当し、モル収率は 37% となった。

まず、この標品の元素分析を行ない、その結果を Table 2 に示したが、ケト-グルコン酸の一例として分析した 2-ケト-グルコン酸カリウム塩の実測値とほぼ一致した。

Table 2. Elementary analysis of dephosphorylated compound

	Calculated (%)		Found (%)	
	Gluconate*	Keto-gluconate*	2-Keto-gluconate*	Compound
C	30.76	31.03	31.58	31.40
H	4.73	3.88	4.07	4.05
O	47.81	18.23	48.39	48.13
K	16.69	16.83	16.36	16.85

* Potassium salt

つぎに、グルコン酸-6-リン酸が脱水素を受けた位置が問題となるが、可能性としては 2 位から 5 位に至る炭素骨格に於いて生ずる事が考えられ、従って、この結晶標品も 2-ケト-グルコン酸から順次 5-ケト-グルコン酸までの可能性があるといえよう。一般に還元糖は、水素化ホウ素ナトリウムによる還元で糖アルコールになる事が知られているが (1, 72)、或る条件に於いては糖酸のラ

クトンが対応する還元糖にまで還元されるという事も知られており⁷³⁾、更に、HAMILTON ら³²⁾ は 5-ケト-D-グルコン酸を還元する事により L-イドン酸及び D-グルコン酸を調製している。これらのことから考えると、ケト-グルコン酸を水素化ホウ素ナトリウムで還元するとグルコン酸及びカルボニル基の位置に対応した別のヘキソ糖を生ずる可能性がある。

即ち、この還元反応により、2-ケト-D-グルコン酸は D-グルコン酸及び D-マンノン酸に、3-ケト-D-グルコン酸は D-グルコン酸及び D-アロン酸に、4-ケト-D-グルコン酸は D-グルコン酸及び D-ガラクトン酸に、更に 5-ケト-D-グルコン酸は D-グルコン酸及び L-イドン酸に変化する可能性がある。

従って、先に得られた結晶標品を水素化ホウ素ナトリウムで還元し、その生成物を同定する事によりカルボニル基の位置の推定を試みた。即ち、HAMILTON らの方法³²⁾ に準じ、40 mg の標品を 10 ml の蒸留水に溶解し、これに水素化ホウ素ナトリウム 20 mg を加え、室温に 3 hr 放置後 4°C に一夜放置した。この反応液をアンバーライト-IR-120H⁺ 型 column (100~200 mesh: 0.4×7 cm) を通過せしめ、シロップ状まで減圧濃縮したのちに 1.2% メタノール性塩酸溶液 5 ml を加え約 5 hr 還流し、ホウ酸化合物を分解した。ついで炭酸銀を加え中和し、沈殿を除去し、その上清液を更に上記のアンバーライト-IR-120H⁺ 型 column を通過せしめたのちシロップ状になるまで減圧濃縮した。更に、ラクトン化を完全にする為に 60°C に 4 hr 保ち、ついでペーパークロマトグラフィーを行なった。即ち、この標品と、D-グルコノラクトン、D-ガラクトノラクトン、D-マンノノラクトン、D-アロノラクトン及び L-イドノラクトンの各標準品を用い、KAGAWA の方法⁴²⁾ によりペーパークロマトグラフィーを行なった結果、Table 3 に示すように、この標品はグルコノラクトン及びマンノノラクトンを含む事、ガラクトノラクトン、イドノラクトン及びアロノラクトン等が含まれない事等が判明した。又、標準 2-ケト-D-グルコン酸を同様に還元、ラクトン化しペーパークロマトグラフィーを行なったが、この場合もグルコノラクトン及びマンノノラクトンが検出され、未知標品とのココロマトグラフィーに於ける R_f 値も一致した。

以上に記した如く脱リンされた反応生成物は 2-ケト-グルコン酸であると思われたので、更にこの点を確める為に、この標品と標準 2-ケト-グルコン酸の比較検討を行なった。

その結果は Table 4 に要約して示したが、融点、比

Table 3. Paper chromatographic determination of the dephosphorylated compound (reduced with NaBH₄)

	Rf values		
	Solvent A	Solvent B	Solvent C
Compound	{ 0.18 0.42	0.37 0.50	0.28 0.42
D-Gluconolactone	0.40	0.50	0.43
D-Mannonolactone	0.17	0.35	0.29
D-Idonolactone	—	—	0.35
D-Galactonolactone	0.25	0.40	0.34
D-Allonolactone	0.30	0.43	0.36

Solvent system: (A) Methyl ethyl ketone: boric acid: acetic acid (9:1:1).

(B) BuOH: acetic acid: water (4:1:2).

(C) BuOH: EtOH: water (4:1:1).

Detection: First spray; MeOH saturated with hydroxylamine-HCl.

Second spray; 6%FeCl₃ in 6% trichloroacetic acid.

Table 4. Properties of the dephosphorylated compound

Test	Dephosphorylated product	2-Keto-D-gluconate
Melting point (C)	150~152	151~153
$[\alpha]_D^{25}$ (c=1.0)	-69.2	-68.6
Quinoxaline derivative		
Absorption maximum (m μ)	335	335
OD _{360 mμ} /OD _{300 mμ}	1.53	1.53
Paper electrophoresis	(+) 4.8 cm	(+) 4.9 cm
Paper chromatography (Rf)		
Acetone: HCOOH: water (6:2:2)	0.42	0.40
MeOH: ammonia: water (6:1:3)	0.63	0.66
Color reactions		
Bromocresol Green	Yellow	Yellow
<i>p</i> -Anisidine	Reddish brown	Reddish brown
O-Phenylenediamine		
Visible light	Green	Green
Ultraviolet ray	Fluorescent	Fluorescent

旋光度、ペーパークロマトグラフィーに於ける Rf 値及び濾紙電気泳動に於ける泳動距離等もよく一致した。更に、LANNING ら⁴⁵⁾ は 2-ケトヘキソン酸に対する特異的な反応として、O-フェニレンジアミンによるキノキサリン誘導体の形成について報告しているが、この誘導体の吸収スペクトルは両者共に 335 m μ に吸収極大を有し、又 360 及び 330 m μ に於ける吸光度比も一致した。

又、未知標品及び標準品を濾紙上にスポットし、O-フ

ェニレンジアミン試薬を噴霧すると両者共に緑色を呈し、紫外線照射下で強いケイ光を発する事が認められたが、この結果は CIFERRI ら⁸⁾ 及び DELAY¹⁰⁾ が 2-ケトグルコン酸を用いて得た結果と一致した。又、他の呈色反応の結果も両者の間に差異は認められなかった。更に赤外吸収スペクトルの比較も行なったが、これもよく一致した⁷⁴⁾。更に、この標品中に 2-ケト-3-デオキシグルコン酸が存在するかどうか、WEISSBACH ら⁷¹⁾ 及

び DELAY ら¹¹⁾の方法に従って検討したが、その存在は全く認められなかった。

以上列記した如く、検討した総ての点で、この結晶標品は標準 2-ケト-D-グルコン酸の性質と一致したので、この標品を 2-ケト-D-グルコン酸カリウム塩と同一とした。

この様に、脱リンされた反応生成物が、2-ケト-D-グルコン酸である事が判明したので、反応生成物が 2-ケト-D-グルコン酸-6-リン酸であろうという推定が容易になされた。この物質については、既に DELAY⁹⁾及び FRAMPTON ら²⁶⁾が研究しており、前者はこの物質がバリウム可溶アルコール不溶画分に属する事及び O-フェニレンジアミンにより特異的に紫色を呈する事等を報告し、後者はダウエックス-1-ギ酸型 column を用いた効率よい精製法を報告している。

そこで、既に記した方法により調製した反応終了液を用い、O-フェニレンジアミンによる呈色反応を試みたところ強い紫色を呈し、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸の存在が示唆された。従って、反応終了液よりこの物質の単離を試みた。

即ち、反応終了液 25 ml に最終濃度 5% になるように三塩化酢酸を加え、生じた沈殿を除去し、上清液に等容のエチルエーテルを加え、三塩化酢酸を 4 回抽出除去した。ついで水相部分を、1 分間当り 0.5 ml の速度でアンバーライト-IR-120H⁺ 型 column (100~200 mesh: 1.2 × 10 cm) を通過せしめ、その通過液を集め通気し乍ら炭酸バリウムを添加して pH 5.0 に調整した。次にアン

モニア水により pH 8.2 とし、生じた沈殿を除去したのち、その上清液に等容量の 99% エタノールを加え、4°C に一夜放置した。生じた沈殿を集め、0.1 N 塩酸に溶解し、これに 0.05 N 硫酸を加え、生じた硫酸バリウムを遠心除去し、1 N 水酸化ナトリウムを用い pH 7.5 に調整した。更に精製する為に、FRAMPTON らの方法²⁶⁾に準じ、上記の中和溶液をダウエックス-1-ギ酸型 column (200~400 mesh: 5.0 × 65 cm) に添着し、ついで 4 N ギ酸から 1 N ギ酸アンモニウムに至る直線の濃度傾斜 (全量 2 l) に於いて 1 分間当り 4 ml の流速で溶出を行なった。O-フェニレンジアミンで紫色に呈色する溶出部分を集め、3 N アンモニア水で pH 7.5 に調整後、凍結乾燥を繰り返し、ギ酸及びギ酸アンモニウムを除去した。得られた乾燥粉末を水に溶解後 6 N 塩酸で pH 4.0 とし、更に飽和水酸化バリウム溶液を用い pH 5.0 に調整した。更にアンモニア水により pH 8.2 としたのち、等容量の 98% エタノールを加え生じた沈殿を集め、冷 50% エタノール約 20 ml を用い洗浄した。ついで塩化カルシウムの共存下で減圧乾燥し白色粉末を得た。この粉末の重量を 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸バリウム塩として換算すると 1.17 mmole となりモル収率は 46% であった。

ここに得られた白色粉末を未知標品とし、標準 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸と比較検討した結果、各種溶媒系に於ける Rf 値、O-フェニレンジアミン⁹⁾、プロモクレゾールグリーン⁴⁸⁾、モリブデン酸アンモン試薬³³⁾等による呈色反応等はよく一致した。更に未知標品を硫酸分解又は酸性フォスファターゼによる分解を行なったとこ

Table 5. Properties of the dehydrogenation product

Test	2-Keto-6-phosphogluconate	Dehydrogenation product
Paper chromatography (Rf)		
MeOH: ammonia: water (6:1:3)	0.46	0.44
Acetone: 25% trichloroacetic acid (8:2)	0.85	0.81
BuOH: acetic acid: water (4:1:3)	0.32	0.30
MeOH: formic acid: water (8:1.5:0.5)	0.48	0.50
Pyridine: ammonia: water (6:2:1)	0.11	0.12
Color reactions		
O-Phenylenediamine	Violet	Violet
Bromocresol Green	Non-fluorescent	Non-fluorescent
Ammonium molybdate	Yellow	Yellow
	Blue	Blue
Phosphorous (moles/mole)		
Total (2NH ₂ SO ₄ : 100°C: 2 hr)	0.94	0.91
Acid phosphatase (37°C: 2 hr)	0.90	0.92

ろ共にほぼ等モルの無機リン酸の遊離が認められた。以上の諸結果を要約し、Table 5 に表示した。

更に、標準品及び未知標品の比旋光度 $[\alpha]_D^{23}$ ($c=1.5$) はそれぞれ (+) 4.9 及び (+) 4.6 とほぼ一致し、両者のキノキサリン誘導体の示す吸収極大波長は $335\text{ m}\mu$ と一致した。以上の結果から、この物質は 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸であると思われるが、もし事実とすれば、既に *Pseu. fluorescens* 等に見出されている²⁷⁾ 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸還元酵素の基質となり得る筈である。

そこで、*Pseu. fluorescens* IAM 1006 より FRAMP-TON らの方法²⁷⁾ に従いこの酵素を精製し、 NADPH_2 の存在下に標準品と共に基質として用いると Fig. 1 (A) に示す如く西者共にこの酵素の基質となり得る事が判明した。又、同様の事を、*Leu. mesenteroides* BO7 より得たグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素を用いて行なうと Fig. 1 (B) に示す如く、 NADH_2 の存在下で、共に基質となり得た。このように標準品、未知標品共に、既知酵素の基質特異性に対しても同一特性を示し、Table 5 に

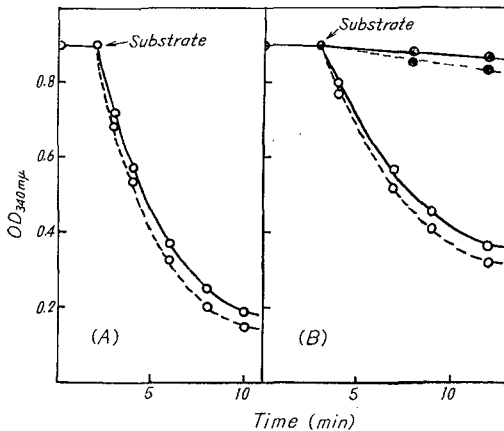


Fig. 1. Reduction of 2-keto-6-phosphogluconate and dehydrogenation product. The reaction mixture contained $0.45\ \mu\text{mole}$ of coenzyme, $6\ \mu\text{moles}$ of substrate, $30\ \mu\text{moles}$ of MgCl_2 , $300\ \mu\text{moles}$ of phosphate buffer (pH 7) and purified enzyme (total volume; $3.0\ \text{ml}$).

(A) 2-Keto-6-phosphogluconate reductase from *Pseudomonas*. NADPH_2 and 2-keto-6-phosphogluconate (—) or compound (---).

(B) 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Leuconostoc*.

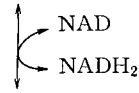
NADH_2 (○) and 2-keto-6-phosphogluconate (—) or compound (---).

NADPH_2 (●) and 2-keto-6-phosphogluconate (—) or compound (---).

示した結果等も考え併せて、この物質を 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸と同定した。

以上の諸結果より *Leu. mesenteroides* BO7 の有するグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素は、

グルコン酸-6-リン酸



2-ケト-グルコン酸-6-リン酸

なる反応を触媒する酵素であると結論した。

II. *Leu. mesenteroides* BO7 の有する2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の諸性質

五単糖リン酸側路に於いては、グルコン-6-リン酸からリブロース-5-リン酸が生ずるものと信ぜられているが、上述の如く本菌には、グルコン酸-6-リン酸から2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を生成する酵素が存在する事が判明した。もしも、この酵素が実際に五単糖リン酸側路に関与するものとすれば、後者から何らかの経路により、リブロース-5-リン酸を生成する酵素又は酵素系が存在する筈である。この点について種々検討を重ねた結果、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸の脱炭酸を触媒する酵素の存在を示唆する事実を認めた。このような酵素は、現在まで生物界に於いて認められておらず、もしも実在するとすれば糖代謝経路と関連し非常に興味深いので、精製及びその諸性質の解明を試みた。

1) 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の精製

4 l の培地を用いて得られた洗浄菌体を $0.01\ \text{M}$ のリン酸緩衝液 (以下特別に記さない限りは、緩衝液は常に $1\ \text{mM}$ のシステインを含有する) $30\ \text{ml}$ に懸濁し、音波処理 ($10\ \text{kc}$) を 45 分間行なったのち、遠心分離 ($20,000 \times g$; $20\ \text{min}$; 5°C) により上清液を得、無細胞抽出液とした。ついで、抽出液に $0.1\ \text{N}$ 酢酸を加えて pH 6.0 とし、3% 硫酸プロタミン (pH 6.0) $6\ \text{ml}$ を加え生じた沈殿を除去した。つぎに、この上清液を $1\ \text{mM}$ のシステイン水溶液 (pH 7.0) を用いて希釈し波長 $280\ \text{m}\mu$ に於ける吸光度を 20.0 に調整後、硫酸アンモニウムを 25% 飽和になるように加えた。生じた沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清液に更に硫酸アンモニウムを加え 50% 飽和とし沈殿を集めた。この沈殿を $0.01\ \text{M}$ のリン酸緩衝液 (pH 6.5) $10\ \text{ml}$ に溶かし $300\ \text{ml}$ の同一緩衝液に対し一夜透析し、透析内液を硫酸アンモニウム分画 (I) とした。更に、この分画に $8\ \text{ml}$ のリン酸石灰ゲル (乾燥重量, $17\ \text{mg/ml}$) を加え 20 分間緩やかに攪拌したのち遠心分離によりゲルを除去し、得られた上清液をリン

酸石灰ゲル上清液分画とした。つぎに、この上清分画を 0.1 N 酢酸を用いて pH 6.0 に調整し、12 ml のリン酸石灰ゲルを加え 20 分間緩やかに攪拌したのち遠心分離により上清液を除去した。ここに得られたゲルに 0.1 M リン酸緩衝液 10 ml を加え酵素の抽出を 2 回行なった。各抽出液を集め、この混合液をリン酸石灰ゲル抽出分画とした。ついで、この抽出液に硫酸アンモニウムを 30% 飽

和になるまで加え、生じた沈殿を除去し、上清液に更に硫酸アンモニウムを加えて 40% 飽和として沈殿を集め、0.01 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 5 ml に溶解後、同一緩衝液 500 ml に対し一夜透析し、透析内液を硫酸アンモニウム分画 (II) として最終精製標品とした。以上の精製結果をまとめたものが Table 6 であるが 37% の収率で約 43 倍に精製する事が出来た。

Table 6. Purification of 2-keto-6-phosphogluconate decarboxylase

Fraction	Total activity (μ moles/hr)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (folds)	Yield (%)
Crude extract	17,400	16	1.0	100
Protamine supernatant	16,660	21	1.4	94
Ammonium sulfate I	13,000	49	3.1	75
Calcium phosphate gel supernatant	10,000	181	11.7	58
Calcium phosphate gel eluate	8,530	321	20.0	49
Ammonium sulfate II	6,440	682	42.8	37

最終標品中には、グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43 及び 1.1.1.44], NADH_2 及び NADPH_2 酸化酵素等の活性は認められなかった。

2) 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の諸性質

まず精製酵素の基質特異性について検討したが、2-ケト-D-グルコン酸、D-グルコン酸、5-ケト-D-グルコン酸及び D-グルコン酸-6-リン酸等は基質となり得ず、調べた範囲内では、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸に対し特異的に作用し脱炭酸反応を触媒する酵素である事が判明した。

そこで、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸に対する K_m 値を求めたところ $8.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ となり、ヘテロ乳酸発酵に関与する他の諸酵素の示す値とはほぼ一致した。次に、この酵素活性に対する最適温度及び最適 pH を求めたところ、それぞれ 40°C 及び 5.0 となり、特に pH に関しては鋭い依存性を示した。即ち、最適 pH は 5.0 であるが、pH 5.25 以上及び 4.75 以下では急速に活性が低下する事が認められた。

又、この酵素反応はマグネシウムイオンを必須としなが 10^{-2} M の塩化マグネシウム又は硫酸マグネシウムにより活性は約 50% 促進された。しかし、マンガン、カルシウム、カリウム、リチウム、ナトリウム、二価鉄、三価鉄等の金属イオンは、この酵素に対し何ら影響を示さなかった。

更に、それぞれ 10^{-3} M のチアミン・ピロリン酸、チアミン塩酸塩、ピリドキサール・リン酸、リボフラビン、ピ

オチン、FAD、FMN、シアノコバラミン、ATP、ADP、NAD、NADP、 NADH_2 及び NADPH_2 等も特別な影響を示さなかった。このように、一般に脱炭酸酵素に対して影響を示す物質の添加効果が認められない事は興味ある事実である。又、 NADH_2 が精製酵素に対して阻害を示さない事から、粗抽出液に於いて顕われる NADH_2 の阻害効果は、グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] の存在により基質がグルコン酸-6-リン酸に還元される為に生じたものと考えられる。

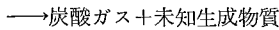
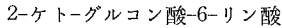
又、 10^{-3} M の硫酸銅、フェニル硝化第二水銀及び 10^{-4} M の p-クロロ安息香酸第二水銀によって、活性がそれぞれ 58%、56% 及び 61% 阻害される事から、この酵素はいわゆる SH-酵素である可能性が強いと思われる。

次に、酵素の安定性については、粗抽出液中の活性は、 -20°C に 3 週間保存しても活性の低下は認められなかった。精製酵素標品は 10^{-3} M のシステインを含む 10^{-2} M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解して -20°C に保存した場合、5 日間で 4%、15 日間で 52% の活性低下が認められた。又、同一緩衝液に溶解して 30°C に 2 hr 保持しても活性の低下は生じないが、 55°C 20 分間の処理で完全に失活した。

又、過剰 (25 単位) の酵素を用い、 $4 \mu\text{moles}$ 又は $8 \mu\text{moles}$ の 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を基質として、標準条件下に反応を行なわせると、約 30 分間で炭酸ガスの発生は停止するが、この時の発生量はそれぞれ $3.8 \mu\text{moles}$ 及び $7.8 \mu\text{moles}$ となり、2-ケト-グルコン酸-6-

リン酸1分子から、1分子の炭酸ガスを発生せしめる酵素である事が判明した。

以上の諸結果から、この酵素は下記の反応を触媒する性質を有する、従来知られていなかった新しい酵素である事が判明した。



3) 反応生成物の単離, 同定

反応生成物の同定に先立ち、まず反応終了液を用いて各種の定性試験を行なった。即ち、上記反応式より考えると、生成物としては、ペントース-5-リン酸又はケトペントース-5-リン酸が容易に考えられる。そこで反応終了液に酸性フォスファターゼを作用せしめたのち、オルシノール-塩化第二鉄反応²⁰⁾を行なうと明かに強い反応を示し、その吸収スペクトルに於ける吸収極大は、540 m μ 及び670 m μ に存在した。又、波長670 m μ に対する540 m μ に於ける吸光度比は0.88となり、リブローズについて報告²⁰⁾されている値とほぼ一致した。更に、他の定性的諸性質もケトペントース、特にリブローズの諸性質と類似したので、この点を更に確める為に反応生成物の単離精製を行なった。

反応生成物を多量に得る為に、4 mmolesの2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を0.1 Mの酢酸緩衝液(pH 5.0) 40 mlに溶解し、これに8,000単位の精製脱炭酸酵素を添加し、30°Cで反応を行なうと、70分間で殆ど基質が消失したので、更に20分間反応させたのち、これを脱炭酸反応終了液として反応生成物の単離に供した。

まず最初に脱リンされた生成物の単離、同定を試みた。即ち、上記反応終了液に1 M塩化マグネシウム溶液を1 ml及び酸性フォスファターゼ10 mgを加え30°Cで反応させると、経時的に無機リン酸の増加が認められ約80分以後は増加が停止したが、この時まで生じた無機リン酸は3.82 mmolesであり、最初に用いた2-ケト-グルコン酸-6-リン酸が4 mmolesであった事からほぼ等モルの無機リン酸が遊離した事となる。

そこで、この処理液に、20%三塩化酢酸を10 ml加え、生じた沈殿を遠心分離により除去した。上清液にそれぞれ等容量のエチルエーテルを加え、三塩化酢酸の抽出除去を3回行ない、水層をアンバーライト-IR-120H⁺型column(200~400 mesh: 1.2 \times 12 cm)を通過せしめ陽イオンを除き、ついで、ダウエックス-I-Cl⁻型column(200~400 mesh: 1.2 \times 12 cm)を通過せしめる事により、陰イオンの除去を行なった。更に、これらの樹脂を50 mlの蒸留水で水洗し、水洗液と通過液を混合したのち1.5 g

の活性炭を加え、室温に於いて20分間攪拌した。ついで活性炭を濾別し、少量の蒸留水で水洗したのち、濾液と洗液を混合し、混液がシロップ状になるまで40°Cに於いて減圧濃縮を行なった。

この様にして得られたシロップはリブローズとして2.56 mmolesに相当し、モル収率は64%であった。

ここに得られたシロップ状標品を用い、ペーパークロマトグラフィーを行なった結果、Table 7に示すように、3種類の展開溶媒系に於いて、何れもRf値はリブローズ標準品と一致し、他のスポットは認められなかった。

Table 7. Paper chromatographic determination of the dephosphorylated compound

	Rf values		
	Solvent A	Solvent B	Solvent C
Compound	0.64	0.34	0.59
D-Xylulose	0.57	0.38	0.50
D-Ribulose	0.62	0.33	0.57
D-Xylose	0.46	0.25	0.42
D-Ribose	0.58	0.29	—
D-Arabinose	0.50	0.22	—

Solvent system: (A) 76% Phenol in water.

(B) BuOH:EtOH:water (4:1:5).

(C) Acetic acid:EtOH:water (3:3:1).

Detection: Mixed solution of 50 ml of 0.2% naphthoresorcinol in EtOH, 50 ml of 0.25 N HCl, and 5 ml of phosphoric acid was sprayed.

更に、Table 8に示すように、各種呈色反応、O-フェニールヒドラジン誘導体の融点、比旋光度、塩化第二鉄-オルシノール反応に於ける吸光度の比等も総てリブローズ標準品の場合と一致した。又、上記誘導体の融点は混融試験に於いても変化は認められなかった。

又、システィン・カルバゾール反応に於いては、その発色が最大に達するまでの時間がそれぞれのケトペントースに対し特異的であるが、標品、標準品共に14~16分で波長540 m μ に於ける吸光度が最大に達し、この点に於いても両者よく一致した。

以上の諸結果より、脱リンされた反応生成物を、リブローズと同定した。この事より、反応生成物はリブローズ-5-リン酸である可能性が強くなったので、先に記した脱炭酸反応終了液からPONTREMOLIら⁵⁷⁾により報告されたリブローズ-5-リン酸の精製法に準じ、脱炭酸反応生成物の単離を試みた。

Table 8. Properties of the dephosphorylated compound

Test	Dephosphorylated product	D-Ribulose
Color reactions		
Orcinol-trichloroacetic acid ^{a)}		
Visible light	Pink	Pink
Ultraviolet ray	Orange	Orange
Naphthoresorcinol ^{b)}	Green yellow	Green yellow
Orcinol-aniline-phthalate ^{c)}		
Visible light	Gray purple	Gray purple
Ultraviolet ray	Bright pink	Bright pink
O-Nitrophenylhydrazone		
Melting point (°C)	166~168	167~169
$[\alpha]_D^{20}$ (c=1.0)	-49.2	-48.6
FeCl ₃ -orcinol reaction		
OD _{540 mμ} /OD _{670 mμ}	0.88	0.86

- a) A solution of 0.5 g orcinol and 15 g trichloroacetic acid in 100 ml of water saturated *n*-BuOH.
 b) A mixture of 0.2% naphthoresorcinol in EtOH, 0.25 N HCl and phosphoric acid (10:10:1).
 c) First spray: Orcinol-trichloroacetic acid reagent. Second spray: 0.93 g aniline and 1.66 g phthalate in 100 ml of water saturated *n*-BuOH.

即ち、反応終了液 10 ml に 30% 三塩化酢酸 2 ml 及び活性炭 100 mg を加え、氷水中に 20 分間保持したのち、グラスフィルターを用いて濾別し、残渣を 5 ml の蒸留水で洗浄したのち、濾液と洗液を合わせて混液とした。この混液に 1 M の酢酸バリウム溶液 1 ml を加え、20 分間氷水中に保持したのち、生ずる微量の沈殿を除去し、上清液を水酸化バリウムを用いて pH 5.7 に調整後、更に水酸化カリウムにより pH を 6.7 に調整した。ついで、4 倍容の冷 99.8% エタノールを加え 1 hr 室温に放置し、生じた白色沈殿を遠心分離により集め、80% エタノールで洗浄後、室温に於いて減圧乾燥した。ここに得られた白色粉末は、リブロース-5-リン酸バリウム塩であると思われたが水に難溶性の為、水溶性のリチウム塩とする事を試みた。即ち、この白色粉末を 0.1 N 酢酸 25 ml に溶解後、ダウエックス-50-H⁺ column (200~400 mesh: 2.5×16 cm) を通し、バリウムを除去し、更に樹脂を蒸留水で洗浄し、洗液及び通過液を併せて混液とした。ついで、混液の pH を 0.1 N 水酸化リチウム溶液を用いて 6.8 に調整し、0°C に 1 hr 放置後、10% のエタノールを含む冷アセトンに 10 倍容量加え生じた沈殿を遠心分離により集めた。この沈殿を、更に上記の溶媒で洗浄後、塩化カルシウム上で減圧乾燥し白色粉末を得た。この白色粉末を、無水リブロース-5-リン酸リチウ

ム塩とすると、0.68 mmole となり、モル収率は約 68% となった。

ここに得られた白色粉末を用いて、カルバゾール硫酸反応を行ない、その発色液について、波長 540 m μ 及び 710 m μ に於ける吸光度比を求めると 1.40 となり DISCHE ら²²⁾ が D-リブロース-5-リン酸を用いて得た結果とほぼ一致した。更に、オルシノール反応に於ける呈色液の 540 m μ と 670 m μ に於ける吸光度比は 0.34 となり、この値も KAMEYAMA ら⁴³⁾ がリブロース-5-リン酸について報告した値と一致した。又、HORECKER ら³⁷⁾

Table 9. Properties of the decarboxylated product

Test	Decarboxylated product	D-Ribulose-5-phosphate ^{a)}
$[\alpha]_D^{20}$ (c=3.0 in 0.2 N HCl)	-38.4	-40.0 ³⁷⁾
Carbazole-H ₂ SO ₄ reaction		
OD _{540 mμ} /OD _{710 mμ}	1.40	1.43 ²²⁾
Orcinol reaction		
OD _{540 mμ} /OD _{670 mμ}	0.34	0.34 ⁴³⁾

- a) These data are cited from the respectively indicated references.

は D-リブロース-5-リン酸の比旋光度を -40 と報告しているが、この標品は、 -38.4 を示しほぼ一致した。これらの結果をまとめたものが Table 9 である。

更に、この標品を酸性フォスファターゼで処理すると 1.0 及び $2.0 \mu\text{mole}$ の反応生成物より、それぞれ 0.94 及び $1.98 \mu\text{mole}$ の無機リン酸が遊離し、反応生成物 1 分子は、リン酸 1 分子を含有する事が確かめられた。

一方、PONTRFMOLI ら^{57,58} は、*Candida utilis* よりグルコン酸-6-リン酸の脱水素及び脱炭酸を一挙に触媒するグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] を精製し、この酵素は D-リブロース-5-リン酸及び炭酸ガスを特異的な基質として、NADPH₂ の酸化を伴いグルコン酸-6-リン酸を生成する事を見出している。従って、ここに得られた脱炭酸反応生成物が D-リブロース-5-リン酸であるならば、当然この酵素の基質となり得る筈である。そこで、*Candida utilis* IFO 0576 を用い、同氏らの方法に従いこの酵素を精製し、脱炭酸反応生成物を基質として反応を行なわせた結果、Fig. 2 に示す如く基質となり得る事が判明した。以上の諸結果より、2-ケトグルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の反応生成物を D-リブロース-5-リン酸として同定した。

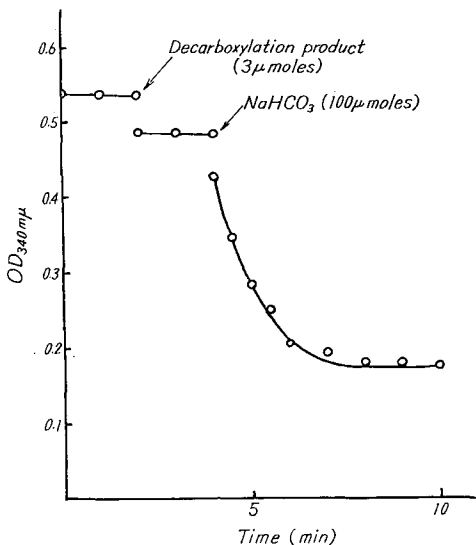
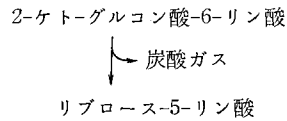


Fig. 2. Oxidation of NADPH₂ with decarboxylation product and CO₂. The reaction mixture contained, in 3 ml, 0.25 μmole of NADPH₂, 0.3 μmole of glycylglycine buffer (pH 7.5) and 6-phosphogluconate dehydrogenase [EC 1.1.1.44]. The decarboxylation product and NaHCO₃ saturated with CO₂ were added at indicated time. Reaction was carried out at 32°C.

尚、この精製酵素を用い、D-リブロース-5-リン酸と炭酸ガスを基質として各種の条件で反応の有無を調べたが、NADH₂ 又は NADPH₂ 等の存在下でも全く反応は認められない事から、この酵素は、2-ケトグルコン酸-6-リン酸の脱炭酸を非可逆的に触媒し、リブロース-5-リン酸も生成する酵素である事が判明した。

即ち、この酵素の触媒する反応式は下記の如くなる。



III. ヘテロ乳酸菌類に於けるグルコン酸-6-リン酸の酸化的脱炭酸反応機構

既に記した如く、*Leu. mesenteroides* BO7 に於いては、グルコン酸-6-リン酸が2-ケトグルコン酸-6-リン酸となり、ついで脱炭酸を受けてリブロース-5-リン酸となる経路が存在する事が確認された。このように中間体として、2-ケトグルコン酸-6-リン酸が存在する事実は、生物界に於いて始めて明かにされたものである。しかし乍ら、五単糖リン酸側路及び Entner-Doudroff の経路、更に多くの細菌、カビ等によるグルコン酸発酵等に関する研究に於いて、グルコン酸-6-リン酸の代謝経路は従来から研究者の注目を集めて来たにもかかわらず、現在まで、何故2-ケトグルコン酸-6-リン酸を直接脱炭酸する酵素の存在が見出されなかったのかという疑問が生ずる。

そこでまず、*Leu. mesenteroides* BO7 に於いて見出されたグルコン酸-6-リン酸の代謝経路が少なくともヘテロ乳酸菌に普遍的な事実として存在するのかどうかを確かめる事を試みた。

即ち、典型的なヘテロ乳酸菌である *Leu. mesenteroides* var. Sake, *Leu. mesenteroides* IFO 3426, *L. brevis* ST, *L. brevis* ATCC 8281 及び *L. brevis* IFO 3960 及び *Leu. mesenteroides* BO7 等について、それぞれ無細胞抽出液を調製し、2-ケトグルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素活性の有無について調べた。その結果は、Fig. 3 に示すように、*Leu. mesenteroides* BO7 及び *L. brevis* ST のみに、この酵素活性の存在が認められ、他の菌株から得た無細胞抽出液中には何れの反応 pH に於いても、この酵素活性は認められなかった。又、*L. brevis* ST の有する脱炭酸酵素の反応最適 pH は 4.5 となり、基本的に、*Leu. mesenteroides* BO7 の有する酵素と類似しているといえよう。

このように、6種類のヘテロ乳酸菌のうち、4菌株に

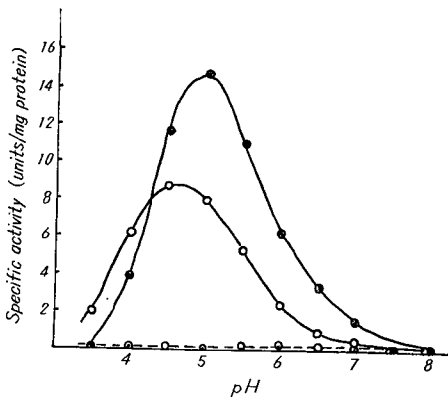


Fig. 3. Activities of 2-keto-6-phosphogluconate decarboxylase in the cell-free extract of heterolactic bacteria. Determinations were carried out under the standard assay condition except that Tris-buffer (pH 9~7.5), phosphate buffer (pH 7.5~6) or acetate buffer (pH 6~3.5) was used.

- *Leuconostoc mesenteroides* BO7.
- *Lactobacillus brevis* ST.
- Other strains.

は2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素活性が認められず、これらの菌株は従来より推定されている経路、即ち、グルコン酸-6-リン酸が一挙に酸化脱炭酸を受ける経路によりヘテロ乳酸発酵を行なっている可能性が強い。もしもグルコン酸-6-リン酸が単一の酵素により同時に酸化脱炭酸を受けているとすると、各種の反応条件に於いて、グルコン酸-6-リン酸を基質として用い

た場合の NADH_2 の生成速度と炭酸ガスの発生速度比は常に1.0になる筈である。この点について検討した結果をまとめて表示したものが Table 10 である。この結果からわかるように、*Leu. mesenteroides* var. Sake, *Leu. mesenteroides* IFO 3426, *L. brevis* IFO 3960 及び *L. brevis* ATCC 8281 は、同時に脱水素及び脱炭酸が生じていると推定され、この事は Fig. 3 に示されたように、これらの菌株が2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素をもたない事実からも支持されよう。

更に、*Leu. mesenteroides* BO7 については、pH 9.0 に於いて脱水素反応のみが認められたが、この菌株の有する2-ケト-グルコン酸脱炭酸酵素が、この pH に於いては活性を発現し得ない事実 (Fig. 3) から当然生じ得る現象であると思われる。更に、pH 5.0 に於いて脱水素、脱炭酸の比が1.0に近い事は、この pH が脱炭酸酵素の最適 pH である事から、これも当然の結果であろう。

つぎに、*L. brevis* ST については、2種類のグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43 及び 1.1.1.44] 及び2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素を有するものと推定した。即ち、この菌株が、脱炭酸酵素を有する事は、Fig. 3 から明かであるが、この脱炭酸酵素の作用し得ない pH 9.0 に於いても、グルコン酸-6-リン酸の脱炭酸が生ずる事から、グルコン酸-6-リン酸の脱炭酸を直接触媒する酵素 [EC 1.1.1.44] の存在が推定され、更にこの pH に於いてグルコン酸-6-リン酸からの脱水素反応速度が脱炭酸反応速度よりも速い事からグルコン酸-6-リン酸の脱水素反応のみを触媒する酵素 [EC

Table 10. Relative rate of dehydrogenation to decarboxylation of 6-phosphogluconate in cell-free extracts of heterolactic bacteria

Organism	R_H^a/R_D^b		
	pH 5	pH 7	pH 9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>			
IFO 3426	0.98	0.96	1.02
var. Sake	0.97	1.03	0.96
BO7	1.05	1.38	10 ^{c)}
<i>Lactobacillus brevis</i>			
IFO 3960	1.02	1.02	1.06
ATCC 8281	1.04	1.00	0.97
ST	1.13	1.84	2.66

a) Specific rate of dehydrogenation ($\mu\text{moles/hr/mg protein}$).

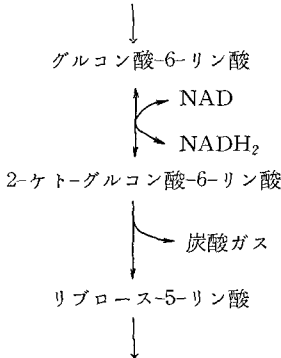
b) Specific rate of decarboxylation ($\mu\text{moles/hr/mg protein}$).

c) Decarboxylation could not be observed.

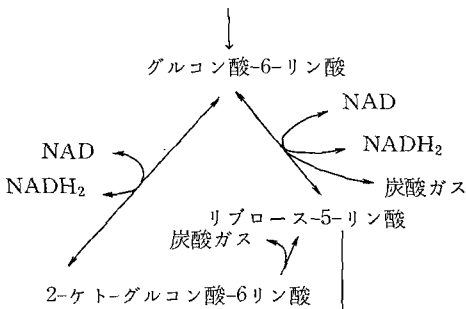
1.1.1.45] も存在する事が推定された。この点を更に確める為に、これら3種類の酵素の分別精製を試みた結果、硫酸塩析、DEAE-cellulose column 等を用いる事により、それぞれの酵素を分別する事が出来た。即ち、無細胞粗抽出液を用い常法通りに硫酸アンモニウム塩析を行なうと、脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] は23~32% 飽和画分に存在し、この画分に脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] 及び脱炭酸酵素は存在しない。後者の両酵素は35~55% 飽和画分に共存するが透析後 DEAE-cellulose を用いてカラムクロマトグラフィーを行なうと、0.2 M の塩化カリウムを含む5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) により脱炭酸酵素が溶出され、脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] は0.4 M の塩化カリウムを含む同緩衝液により溶出され、明確に両者が分離した。更に、興味ある事に、この菌の有する脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] は、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を基質となし得ない事、即ち脱炭酸を行ない得ない事も判明した。

上述した結果から考えると、ヘテロ乳酸菌に於けるグルコン酸-6-リン酸の代謝経路には、少なくとも次の3種類の経路が存在すると思われる。即ち、

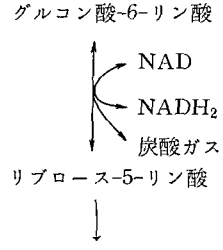
(i) *Leu. mesenteroides* BO7 の有する経路:



(ii) *L. brevis* ST の示す経路:



(iii) *Leu. mesenteroides* var. *Sake* 等の示す経路:



しかし乍ら、上記推定経路は定性的な酵素レベルの知見に立脚したものであり、細胞内で実際にこれらの経路によりヘテロ乳酸発酵が行なわれているか否かを確める為には更に詳細な検討が必要となる。細胞内代謝経路の推定という見地より考えると、上記推定経路 (i) については、ブドウ糖を炭素源として発酵中の細胞内に代謝中間体として、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸の存在が予想され、(ii) については、実際に (i) の経路が流れていれば、この物質は存在する筈であり、更に、(iii) の経路については、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸は存在しないものと思われる。

この点を確認する為に、6種類の菌株を用いブドウ糖を炭素源としてヘテロ乳酸発酵中の生細胞内に、実際に2-ケト-グルコン酸-6-リン酸が存在するかどうかについて検討を行なった。

即ち、それぞれ2 l の培養液から得た洗浄菌体を、2 mmoles のブドウ糖及び10 μmoles の塩化マグネシウムを含む0.1 M のリン酸緩衝液10 ml に懸濁し、30°C に於いて、ヘテロ乳酸発酵を行なわせた。残存ブドウ糖が2/3から1/3に達した時に、発酵液を90 ml の沸騰蒸留水に加え、そのまま5分間煮沸を続けた。冷却後、20,000×g で30分間遠心分離し、上清液を減圧濃縮して5 ml とし、アンバーライト-IR-120-H 型樹脂を用いて陽イオンを除き、炭酸バリウムを用いてpH 5.5に調整した。ついで、2 N アンモニア水でpH 8.2とし、生じた沈殿を除去し、上清液に等容量のエタノールを加え4°C に16 hr 放置した。生じた沈殿を集め、0.1 N 塩酸に溶解し、ついで0.05 N 硫酸を加え生じた硫酸バリウムの沈殿を除いたのち、上清液を1 N 水酸化カリウムによりpH 7.0とし、ペーパークロマトグラフィーを行なった。

Table 11 に示す様に (i), (ii) の経路に属する *Leu. mesenteroides* BO7 及び *L. brevis* ST から得られた試料中には、明かに2-ケト-グルコン酸-6-リン酸の存在が認められ、(iii) に属する4菌株から得られた試料中には認められなかった。このように、細胞内中間代謝物の面から考えても、先に記した3種類の代謝系がヘテロ乳酸菌に存在する可能性が強い。

Table 11. Paper chromatographic detection of 2K-6PGA in boiled extracts^{a)}

Solvent system	Authentic 2K-6PGA (Rf)	Sample prepared from <i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> ST (Rf)	Sample prepared from <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> BO7 (Rf)
Methanol: ammonia: water (6:1:3)	0.44	0.42	0.46
Acetone: 25% TCA (8:2)	0.82	0.85	0.84
Butanol: acetic acid: water (4:1:5)	0.35	0.32	0.34
Pyridine: ammonia: water (6:3:1)	0.13	0.15	0.17
Methanol: formic acid: water (8:1.5:0.5)	0.48	0.52	0.48

a) See text for details.

そこで、更に、代謝経路 (iii) に属する菌株の代表とし *L. brevis* ATCC 8281 のグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素の諸性質の解明を試みた。

5 ℓ の培養液から得られたこの菌株の洗浄菌体を 10⁻³ M のシステインを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に懸濁し、音波処理 (10 kc) を 0°C に於いて 30 分間行なった。ついで遠心分離 (15,000×g: 15 min: 3~5°C) により得られた上清液を、300 倍容量の 10⁻² M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対し 4°C に於いて一夜透析し、透析内液を無細胞抽出液とした。ついで、同緩衝液を用いて、280 mμ に於ける吸光度が 20.0 になるように調整し、硫酸アンモニウムの 30% 飽和と 45% 飽和の間で沈殿する部分を集め、5 mM リン酸緩衝液 5 ml に溶解したのち同緩衝液 2.5 ℓ に対し 4°C に於いて一夜透析した画分を硫酸アンモニウム (30~40% 飽和) 分画とした。更に、この分画を DEAE-cellulose column (2×13 cm) にかかけ、吸着せしめたのち、0.1 M の塩化カリウムを含む 5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 200 ml で column を洗浄し、0.3 M 塩化カリウムを含む同緩衝液を用い 1 分間当り 0.5 ml の溶出速度で溶出した。溶出開始後 30 ml から 80 ml にわたり溶出される部分を集め混液とし、200 倍容量の

5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に対し 4°C に於いて一夜透析し、この透析内液を DEAE 分画 (I) とした。つぎに、この分画の酵素を濃縮する為に、DEAE-cellulose column (1×3 cm) に吸着せしめ、5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 10 ml で洗浄後、6.5 M の塩化カリウムを含む同緩衝液を用い 10 分間当り 0.5 ml の溶出速度で溶出を行ない、2~6 ml にわたり溶出される部分を混じ、この混液を 10⁻² M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 800 ml に対し 4°C に於いて 10 hr 透析した。この透析内液を DEAE 分画 (II) とした。ここまでの精製操作により、Table 12 に示す如く、この酵素を収率約 50% で約 18 倍に精製する事が出来た。更に、この分画には、グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43]、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸炭酸酵素、NADH₂ 及び NADPH₂ 酸化酵素等の活性は認められない事、又この酵素はグルコン酸-6-リン酸の酸化的脱炭酸反応を一挙に触媒し、リブローズ-5-リン酸を生成する脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] である事を確認した。

ここに得られた DEAE 分画 (II) を用いて諸性質の検討を行なったのであるが、既に記した如く、ヘテロ乳酸菌にはグルコン酸-6-リン酸の基本的代謝経路として (i)

Table 12. Purification of 6PGA dehydrogenase (decarboxylating) from *Lactobacillus brevis* ATCC 8281

Fraction	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (folds)	Yield (%)
Crude cell-free extract	1,780	1.2	1.0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction (30~45% saturation)	1,230	3.6	3.0	69
1st DEAE fraction	980	20.5	17.1	55
2nd DEAE fraction	905	22.0	18.3	51

Table 13. Effect of complete saturation with ammonium sulfate on 6PGA dehydrogenase (decarboxylating) of *Lactobacillus brevis* ATCC 8281^{a)}

Fraction	NADH formation ($\mu\text{moles/hr/mg protein}$)	CO ₂ evolution from 6PGA ($\mu\text{moles/hr/mg protein}$)	CO ₂ evolution from 2K-6PGA ($\mu\text{moles/hr/mg protein}$)
2nd DEAE fraction	21.6	20.3	not detectable
(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	18.0	1.2	26.7

a) Determinations were carried out under the standard assay conditions as described in Methods.

及び (iii) の経路が考えられ、それらの混合系として (ii) の存在を考える事が出来る。このような事実から、一つの作業仮説としてグルコン酸-6-リン酸から直接にリブローズ-5-リン酸を生成する脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] は脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 及び 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の複合酵素である可能性を推定し得よう。そこで、この分画を用い、各種の処理により、この分画中に 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素活性が生じ得るか否かの点について検討を重ねた。その結果、この分画に微粉末状硫酸アンモニウムを徐々に加え 100% 飽和とし、4°C に 2 hr 放置後生じた沈殿を遠心分離により集め、1 mM のシステインを含む 10⁻²M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した溶液中に 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素活性が生ずる事を認めた。即ち、Table 13 に示す如く、DEAE 分画 (II) を酵素液として用いた場合、グルコン酸-6-リン酸を基質とした時に脱水素、脱炭酸速度はよく一致し、更に 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を基質とした時には脱炭酸は全く認められなかった。この事から DEAE 分画 (II) はグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] を含むが、グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 及び 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素を含まない事がわかる。しかし、この分画を硫酸アンモニウム処理 (100% 飽和) すると、グルコン酸-6-リン酸の脱水素反応は生ずるが脱炭酸反応速度は非常に低くなり、更に 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を基質として脱炭酸反応を生ずる事が認められた。これらの事から、この処理により、[EC 1.1.1.44] の脱水素酵素が [EC 1.1.1.43] の脱水素酵素及び 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の両者に解離した事が推定された。

この点を更に確める為に、DEAE 分画 (II) 及び硫酸アンモニウム分画 (100% 飽和) をそれぞれ DEAE-cellulose column を用いてクロマトグラフィーを行なった結果を Fig. 4 に示した。即ち、Fig. 4 (A) に示される如く、DEAE 分画 (II) のクロマトグラフィーに於いては、0.3 M の塩化カリウムにより溶出される部分にグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] が存在し、他の部分にも [EC 1.1.1.43] 及び脱炭酸酵素等の活性は認められなかった。これに反し、硫酸アンモニウム分

ては、0.3 M の塩化カリウムにより溶出される部分にグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] が存在し、他の部分にも [EC 1.1.1.43] 及び脱炭酸酵素等の活性は認められなかった。これに反し、硫酸アンモニウム分

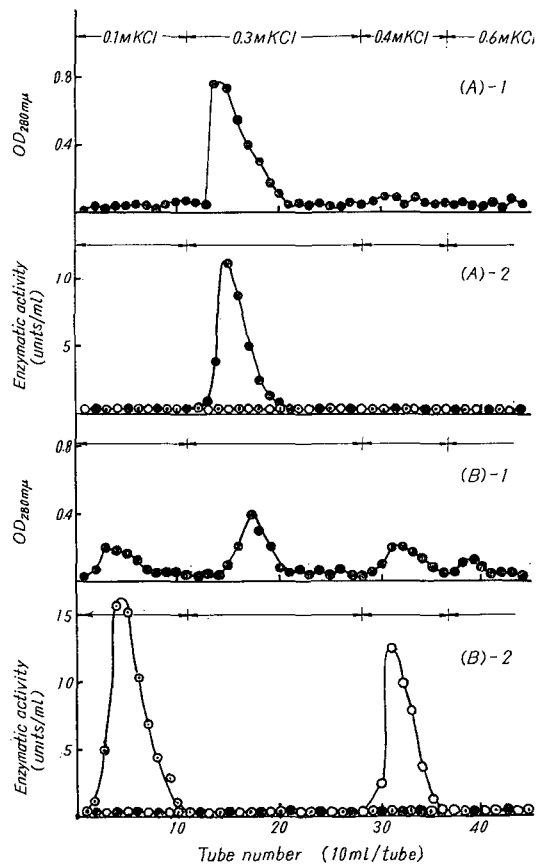


Fig. 4. Elution profiles on DEAE-cellulose column chromatography of the 2nd DEAE-fraction (A) and (NH₄)₂SO₄ (100% saturation) fraction (B). In (A)-1 and (B)-1, elution profiles of protein were shown. In (A)-2 and (B)-2, those of 6-phosphogluconate dehydrogenases, [EC 1.1.1.44] (●) and [EC 1.1.1.43] (○), and 2-keto-6-phosphogluconate decarboxylase (⊙) were designated.

画を透析後、同様のクロマトグラフィーを行なうと、Fig. 4 (B) に示すように 0.1 M の塩化カリウムによる溶出部分に 2-ケト-グルコン酸脱炭酸酵素活性が、更に 0.4 M の塩化カリウムで溶出される部分にグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] が溶出される事がわかり、この際どの溶出部にも [EC 1.1.1.44] の活性は認められなかった。更に、このようにして分離された両酵素の再構成を種々の条件で試みたが、現在まで未だ成功していない。

つぎに、Fig. 4 (A) 及び (B) に示される 3 種類の酵素について、それぞれ最適反応 pH を求めたところ、グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 及び [EC 1.1.1.44] 共に約 7.0 となり、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素のそれは、約 5.5 となった。このように、*L. brevis* ATCC 8281 より得られたグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 及び 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の最適 pH が、*Leu. mesenteroides* BO7 に天然に存在する両酵素の pH 値と一致する事は興味深い事実である。

ついで、これらの酵素の基質及び補酵素等に対する Km 値を求めたところ、脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] のグルコン酸-6-リン酸及び NAD に対する値は、それぞれ、 $6.1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 及び $2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ となった。更に、この酵素を硫酸アンモニウム (100% 飽和) 処理する事により得られた脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] のそれは、それぞれ $1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ 及び $1.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ となり、NAD に対する値はほぼ不変であるが、グルコン酸-6-リン酸に対する値は処理により約 4 倍高い値となった。又、処理により得られた 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の基質に対する Km 値は、 $1.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ となり、前述の *Leu. mesenteroides* BO7 の同酵素の示す値 ($8.3 \times 10^{-5} \text{ M}$) よりやや高い値を示した。尚、*L. brevis* ATCC 8281 から得られた 2 種類のグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素は共に、NAD を特異的に補酵素として要求し、NADP は補酵素となり得ず *Leu. mesenteroides* の脱水素酵素の特性と一致した。又、*L. brevis* ATCC 8281 の有する脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] は、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を基質とし、脱炭酸反応を触媒する事は出来ず、この点、既に述べた *L. brevis* ST の有するこの酵素の性質と一致した。

IV. *Leu. mesenteroides* BO7 の有するグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] の細胞内活性

既に述べてきたように、*Leu. mesenteroides* BO7 及び *L. brevis* ST 等に於いては、グルコン酸-6-リン酸

が 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を経てリブロース-5-リン酸になる新しい経路が存在している事が推定された。このような代謝経路が実際に生細胞内で生じているものとすれば、ヘテロ乳酸菌に於ける問題にとどまらず、広く生物界全般の糖代謝に関連する興味ある問題である。そこで改めて、*Leu. mesenteroides* BO7 に於けるこの代謝経路を推定するに至った理由について考えてみると、1) グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] が存在する事、2) 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素が存在する事、3) グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] 活性が認められない事、及び 4) ブドウ糖を炭素源としてヘテロ乳酸発酵を行なっている生細胞内に 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸が検出された事等が挙げられる。従って、主に定性的側面から経路の推定がなされた事となる。

一方、実際これらの代謝が生ずる場合は細胞内であり、当然関連諸酵素も細胞内環境諸条件のもとに作用しているといえよう。又、理論的には生細胞の示す発酵速度と同一速度でこれらの諸酵素は細胞内でも活性を発現していなければならない。もしも、発酵中の生細胞内環境諸条件が決定されれば、別に調べられた当該酵素の諸性質及び細胞内に含まれる全酵素量を利用する事により細胞内活性の算出が可能となる筈であり、算出された細胞内活性が生細胞の示す発酵速度とほぼ一致すれば、実際にその酵素が細胞内で発酵の代謝経路に関与している事を定量的に推定した事となろう。このような観点にたった一連の研究が既に TAKEBE 氏⁶⁵⁻⁶⁷⁾によりなされている。即ち、彼らは *Leu. mesenteroides* BO7 の細胞内環境諸条件 (原形質容量、細胞内 pH、細胞内イオン濃度、細胞内基質濃度及び細胞内補酵素濃度等) を発酵中の生細胞について求め、ブドウ糖-6-リン酸脱水素酵素及び乳酸脱水素酵素の全活性及びこれらの酵素の諸性質から細胞内活性を算出し、算出された値が生細胞の示すヘテロ乳酸発酵速度とほぼ一致する事を見出し、これらの酵素が細胞内に於いて、実際にヘテロ乳酸発酵に関与している事を定量的に推定している。

更に同様の定量的研究が MIZUSHIMA 氏⁵¹⁻⁵⁵⁾ 及び MACHIDA 氏⁴⁹⁾により、ホモ乳酸菌である *L. plantarum* No. 11 を用いて行なわれ、ホモ乳酸発酵が解糖系によるものである事が定量的に支持された。

そこで、*Leu. mesenteroides* BO7 に於いて、新しく推定されたグルコン酸-6-リン酸の代謝経路が実際に細胞内でヘテロ乳酸発酵に関与しているのか否かを判定する為に、まずこの菌株のグルコン酸-6-リン酸脱水素

酵素についてその細胞内活性の推定を試みた。尚、発酵中の細胞内環境諸条件は既に TAKEBE ら⁶⁵⁾により求められており、筆者もその追試を行なった結果、報告された値とほぼ一致する結果を得たので、細胞内環境諸条件は同氏らにより報告された値を使用した。

まず、この酵素の細胞内活性を求める為には、当然発酵中の細胞内に於けるグルコン酸-6-リン酸の濃度を知ることが必要となる。

発酵中の生細胞内に於ける諸物質濃度を決定する為には、瞬間的に全ての酵素活性を失活せしめ、同時に目的とする物質を完全に抽出する必要がある。そこで各種の抽出法について検討した結果、発酵中の細胞懸濁液を約10倍容の沸騰蒸留水を攪拌し乍らこれに加えると良好な結果が得られる事を認めた。即ち、この方法によると $U-^{14}C$ -ブドウ糖を用いて発酵せしめた場合、処理後の抽出残渣中に残る放射活性は、無処理の生細胞内に存在する放射活性の0.5~1.5%にとどまり、ほぼ完全な抽出が行なわれている事が判明した。

そこで乾燥重量として1gの洗浄菌体を、ブドウ糖2.5 mmole及び塩化マンガン $1.5 \mu\text{mole}$ を含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.6: 30°C) 50 mlに懸濁し、30°Cで発酵を行なった。約10分間発酵させ、この発酵液を450 mlの沸騰蒸留水中に注ぎ混合し乍ら更に2分間煮沸した。冷却後、遠心分離により得られた上清液を減圧濃縮して30 mlとした。まず、この濃縮液中の乳酸を定量したところ $967 \mu\text{moles}$ の乳酸が存在した。この値から乳酸発酵の速度を算出すると、 $5.8 \mu\text{moles/mg} \cdot \text{dry cells/hr}$ となり、この菌株の正常な発酵速度とほぼ一致した。

つぎに、濃縮液中のグルコン酸-6-リン酸の定量を行なった。即ち、濃縮液1.5 ml, NAD $6 \mu\text{moles}$, 精製グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] $100 \mu\text{g}$, 精製2-ケトグルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素 $20 \mu\text{g}$ 及び全量を3 mlに規正するに必要な量の0.1 M酢酸緩衝液を含む溶液を30°Cに40分間保持し、波長 $340 \text{ m}\mu$ の吸光度を測定した。尚、この際ブランクとしては、上記反応溶液からグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素を除いた溶液を用いた。その結果、先の濃縮液中には $1.6 \mu\text{mole}$ のグルコン酸-6-リン酸が存在し、この菌の原形質容量は $1.38 \text{ cm}^3/\text{g} \cdot \text{dry cell}$ ⁶⁵⁾である事から、発酵中の細胞に於けるグルコン酸-6-リン酸の濃度は $1.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ と算出された。

ほぼ同様の値が熱水抽出時間を5分及び10分とした場合にも得られ(5 min: $1.16 \times 10^{-3} \text{ M}$, 10 min: $1.25 \times 10^{-3} \text{ M}$)、2分間の抽出でほぼ完全にグルコン酸-6-リン

酸は抽出され、同時にこの抽出で、この物質の分解は生じない事がわかった。更に発酵中の菌体外液にグルコン酸-6-リン酸は存在しない事も確認した。

このようにして、細胞内基質濃度が決定されたので、つぎにグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素の全活性を求めた。まず、発酵中の細胞懸濁液を氷水中で急冷し、遠心分離により集菌した細胞を 10^{-3} M のシステインを含む 10^{-2} M リン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁し、0°Cに於いて音波処理(10 kc)を行ない、経時的に $280 \text{ m}\mu$ の吸光度測定により蛋白質の溶出を測定し、併せてこの脱水素酵素活性の溶出を経時的に測定した。その結果はFig. 5に示されるが、蛋白質及び酵素活性の溶出はほぼ並行して生じ、更に、蛋白質の溶出が停止したのちに於いても酵素活性の低下は認められなかった。即ち、この事から音波処理によりこの酵素は、ほぼ定量的に抽出され、しかも処理による酵素の先活は認められないといえる。

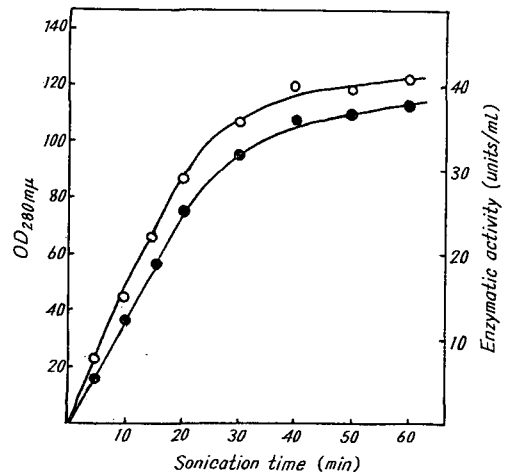


Fig. 5. Stability of the 6-phosphogluconate dehydrogenase [EC 1.1.1.43] during the course of sonication.

●— Enzymatic activity.
○— OD_{280 mμ}.

従って、音波処理60分の酵素活性から算出すると、この酵素は $0.45 \text{ unit/mg} \cdot \text{dry cell}$ の割合で存在するといえる (Table 14)。しかし乍ら、この酵素単位は標準測定条件下で得られたものであり、細胞内活性を求める為には、試験管内で得られた活性を細胞内諸条件で補正しなければならない。そこで、先に記したこの酵素の諸性質、細胞内グルコン酸-6-リン酸濃度及び既に知られている細胞内諸条件⁶⁵⁾等を用いて細胞内活性を算出したところ、 $0.19 \text{ unit/mg} \cdot \text{dry cell}$ となり、生細胞の示す発

Table 14. Tentative estimation of intracellular activity of 6PGA dehydrogenase

Activity	
($\mu\text{moles/hr/mg dry cells}$)	
Assay conditions	
pH 5.9	
6PGA 2.0×10^{-3} M	
MgCl ₂ 1.0×10^{-2} M	0.45
NAD 1.0×10^{-3} M	
Temperature 30°C	
Intracellular conditions	
pH 5.9	
6PGA 1.2×10^{-3} M	
Mg ²⁺ 1.3×10^{-3} M	
NAD 1.8×10^{-3} M	0.19
ATP 6.0×10^{-4} M	
ADP 1.6×10^{-2} M	
Temperature 30°C	

酵速度 ($5.8 \mu\text{moles/hr/mg} \cdot \text{dry cells}$) より極度に低い値となった。この結果を示したものが Table 14 である。従って、*Leu. mesenteroides* BO7 に於いて、グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] は、ヘテロ乳酸発酵に関与していないか、又は関与しているとすれば未知因子により細胞内で活性化されているものと考えられる。従って、これらの諸点について検討を続けたところ、酵素濃度と反応の平衡定数及び酵素の比活性の間に特異な関係のある事が見出された。即ち、平衡定数が、高濃度の酵素が存在すると著しく 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸の生成側に偏る事が認められた。

酵素濃度と平衡定数 (K) の関係については、既に THEORELL ら⁶⁸⁻⁷⁰), CHANCE ら⁶) 及び NEILANDS⁵⁶) 等により研究されており動力学的な解析は ALBERTY²) によりなされ、反応に関与する諸物質に対する酵素の親和力から巧みに説明されている。即ち、ALBERTY の解析によれば、ある酵素反応系 (1) に於いて、酵素濃度が充分低く、酵素-基質、酵素-生成物複合体濃度が



無視出来るならば、その時得られる平衡定数が“真の平衡定数” (K_{eq}) であり、酵素濃度が高く、無視出来ない場合に得られる平衡定数が“みかけの平衡定数” (K_{app}) であるとし、 K_{eq} と K_{app} の関係について解析を行なっている。即ち、反応系 (1) の平衡状態に於いて存在する遊

離の A, B, C, D の割合を f_A, f_B, f_C, f_D とすると (2) 式

$$K_{app} = K_{eq} (f_A \cdot f_B / f_C \cdot f_D) \quad (2)$$

が成立する。従って、系 (1) に於いて、酵素に対する C, D の親和力が A, B のそれより強ければ、 $K_{app} > K_{eq}$ となり、逆の場合は $K_{app} < K_{eq}$ となる。高い酵素濃度で求められた K 値は、酵素-基質、酵素-生成物等の解離定数 (d) の差により K_{eq} とは異なった値を示す事になるのもこの式から判明する。即ち、もしも系 (1) に於いて C のみが酵素と複合体 E·C を形成しその解離定数を $d_{E \cdot C}$ とすると酵素濃度 [E] を充分高くした場合には (3) 式に示されるように、 K_{app} は [E] に比例して増加する事となる。

$$(K_{app}/K_{eq})_{[E] \rightarrow \infty} = n [E] / d_{E \cdot C} \quad (3)$$

註： n は酵素分子当りの活性部位の数

又、生成物 C, D が共に複合体を形成し、その解離定数を $d_{E \cdot C}$ 及び $d_{E \cdot D}$ とすると (4) 式が得られ

$$(K_{app}/K_{eq})_{[E] \rightarrow \infty} = (n [E])^2 / d_{E \cdot C} \cdot d_{E \cdot D} \quad (4)$$

K_{app} は酵素濃度の 2 乗に比例して増加する事になる。更に B 及び C が酵素と複合体を形成し、その解離定数を $d_{E \cdot B}$ 及び $d_{E \cdot C}$ とすると (5) 式に示すように、酵素濃度を充分に高くしていった場合に K_{app} はある一定値に近かつく事となる。

$$(K_{app}/K_{eq})_{[E] \rightarrow \infty} = d_{E \cdot B} / d_{E \cdot C} \quad (5)$$

以上のように、この解析法を用いると、上記以外の種々の場合を想定してその時の K_{app} と K_{eq} の関係を求める事が出来る。逆に実測された K_{app} 及び K_{eq} の関係から反応の理論的解析に近づく事が出来る。

そこで、グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] を用い、最適反応 pH である 7.5 及び発酵中の細胞内 pH である 5.9⁶⁵) に於いて K_{eq} と K_{app} の関係を求めたところ、Table 15 に示されるような結果を得た。即ち、pH 7.5 に於いては、酵素濃度が 3.6 mg/ml と 5.4 mg/ml の間で急激な K_{app} の増加が認められ、pH 5.9 於いては 1.8 mg/ml と 2.7 mg/ml の間で同様な現象が認められた。この現象を詳細に説明する為には、酵素 1 分子当りの活性部位数、酵素と反応に関与する物質の複合体の解離定数等が決定されねばならないが、ある酵素濃度を境にして急激に K_{app} が増加する事は上記の解析法を用いても説明出来なかった。従って、酵素濃度と平衡定数の関係を活性部位の数及び解離定数を一定と考えて、唯単に酵素濃度と反応に関与する諸物質の濃度比に起因すると考えるより、ある酵素濃度を境にして酵素

Table 15. Effect of 6PGA dehydrogenase concentration on the apparent equilibrium constant for the reaction and specific activity of the dehydrogenase at varied pHs

pH	Enzyme concentration (mg/ml)	$\frac{K_{app}^a)}{K_{eq}}$	Relative ^{b)} specific activity
7.5	0.009	1.0	1.0
	0.045	1.0	1.1
	0.9	1.7	1.0
	1.8	1.4	1.2
	2.7	1.8	1.5
	3.6	2.4	1.3
5.9	5.4	93.0	10.2
	0.009	1.0	1.0
	0.045	1.4	0.9
	0.9	2.0	1.0
	1.8	4.7	1.2
	2.7	64.3	12.1
	3.6	111.3	11.9
	5.4	118.2	12.8

a) The value of K_{eq} was determined at the lowest concentration of the enzyme under the assay conditions described in Table 16 (20°C).

b) The specific activity at the lowest concentration of the enzyme is defined as 1.0. Assay conditions were described in Table 16 (20°C).

の活性部位数又は酵素-基質、酵素-生成物の解離定数が変化したと考える方が妥当であろうと思われた。

もし、このような変化が生じているとすれば当然比活性変化又は高次構造変化が伴うものと思われる。そこでまず、酵素濃度と相対比活性の関係を求めたところ、Table 15 に示されるように、 K_{app}/K_{eq} の急速な変化と共に比活性にも急激な変化が認められた。即ち、 K_{app}/K_{eq} の急速な変化をもたらす濃度の酵素濃度となると、pH 7.5 に於いては、比活性は約 10 倍に、pH 5.9 に於いては、約 13 倍に増加する事が認められた。更に pH 5.9 に於いて、酵素濃度 1.8 mg/ml 及び 2.7 mg/ml で超遠心分析を行なった結果、それぞれ 3.8 及び 4.9 なる沈降定数 $[S]_{w,20}$ を得た事から、この酵素は高濃度になると重合状態となりそれに伴って比活性の上昇が発現するものと考えられる。

このように、酵素濃度自体が比活性に大きな影響を与える事が判明したので、発酵中の細胞内に於ける酵素濃度を求めた。即ち、精製酵素の比活性を 0.01 mg/ml 濃度で pH 5.9 に於いて算出し、更に音波処理上清液中の活性を充分低濃度蛋白質の状態に測定し、その全活性を算出した。これらの値から発酵中の原形質に於ける酵素濃度を求めると 7.3 mg/ml となった。又、精製酵素を更に種々の方法で精製し、比活性変化の有無を調べたがみるべき変化は得られなかった。従って、上記の値を一応原形質内酵素濃度と考えた。又、この酵素が可溶性酵素である事も超遠心分離 (105,000×g: 120 min: 3~5°C) により確認した。

この酵素濃度は明らかに比活性の高い酵素濃度範囲にある。従って、この比活性の補正を行ない細胞内酵素活性を求めると、Table 16 に示すように、2.8 units/mg-dry cell となりオーダー的に生細胞の示す発酵速度 (5.8 μ moles/hr/mg dry cells) と一致する。更に実際に、

Table 16. Intracellular activity of 6PGA dehydrogenase

Assay conditions		Activity ^{c)}
		(μ moles/mg dry cells/hr)
pH 5.9		
6PGA	5×10^{-4} M	
MgCl ₂	1×10^{-2} M	
NAD	4×10^{-4} M	0.21
Enzyme: Low specific activity (0.08 mg/ml) ^{a)}		
Temperature 30°C		
Intracellular conditions		
pH 5.9		
6PGA	1.2×10^{-3} M	
Mg ²⁺	1.3×10^{-3} M	
NAD	1.8×10^{-3} M	
ATP	6.0×10^{-4} M	2.81
ADP	1.6×10^{-3} M	
Enzyme: High specific activity (7.3 mg/ml)		
Temperature 30°C		

a) The enzyme concentration in the sonicate was estimated from specific activity of the purified dehydrogenase determined at lower enzyme concentration.

Table 16 の下欄に示された条件で酵素活性を測定したところほぼ同様の値を得る事が出来た。

これらの事から、*Leu. mesenteroides* BO7 より得られたグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] が実際に発酵中の細胞内でヘテロ乳酸発酵に関与している事を定量的に推定した。

V. *Leu. mesenteroides* BO7 の有する 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の細胞内活性

発酵中の細胞に於ける 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素の細胞内活性を求める為には、細胞内の 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸濃度を知る必要がある。

そこで乾燥重量として 0.8 g に相当する洗浄菌体を、ブドウ糖 2 mmoles, 塩化マグネシウム 120 μ moles 及び塩化マンガン 1.2 μ mole を含有する 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 6.6, 30°C) 40 ml に懸濁し、30°C に於いて 10 分間発酵を行なわせた。瞬間的に発酵を停止せしめ同時に細胞内物質を抽出する事を目的として、この発酵液を沸騰蒸留水 360 ml に加え、攪拌しながら更に 2 分間煮沸を続けた。この液を室温まで冷却したのち、20,000 \times g 15 分の遠心分離により得られた上清液を減圧濃縮により約 20 ml とし 1 M リン酸ニカリウム塩水溶液を用いて pH 7.5 に調整後、蒸留水を加えて 30 ml とした。

まず、この濃縮液中の乳酸の定量を行ない、乳酸生成速度が 6.1 μ moles/hr/mg dry cells である事を認めたが、この発酵速度は正常な速度の範囲内にあった。

ついで、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸の定量を試みた。即ち、3 ml 中に濃縮液 1.5 ml, NADH₂ 0.5 μ mole, 及び精製グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 150 μ g を含む溶液を 30°C で反応せしめ、波長 340 m μ に於ける吸光度減少の初速度を測定した。ここに求められた初速度から 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸濃度を算出したのであるが、算出に当っては、標準品を用い別に製作された標準曲線を用いた。又、抽出操作の段階から標準品を加えて回収試験を行なった結果、95% \pm 3% である事を確認した。このような方法に従って定量した結果、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸の細胞内濃度は 3.5×10^{-3} M と算出された。抽出時間を 5 分とした時も、この値は 3.6×10^{-3} M となり、2 分間の抽出操作により細胞内の 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸がほぼ定量的に抽出され、しかもこの処理による分解は生じない事が確かめられた。更に、菌体外の発酵液中に 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸は認められなかった。

つぎに、発酵中の細胞の有する 2-ケト-グルコン酸-6-

リン酸脱炭酸酵素の総活性を求める為、発酵中の細胞を急冷集菌し、洗浄したのち乾燥重量として 1.2 g に相当する洗浄細胞を、20 μ moles のシステインを含む 0.01 M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に懸濁し、0°C に於いて音波処理 (10 kc) を行ない、菌体からの蛋白質の溶出を 280 m μ の吸光度測定により経時的に定量し、併せて脱炭酸酵素活性の溶出を測定した。Fig. 6 に示されるように、蛋白質の溶出は処理 40 分間で最大に達するが、酵素活性は 25 分後より徐々に低下した。音波処理 40 分後の活性失活度から処理による失活速度は 5 分間当り 5% 以下なので総活性は下記の式により算出した。

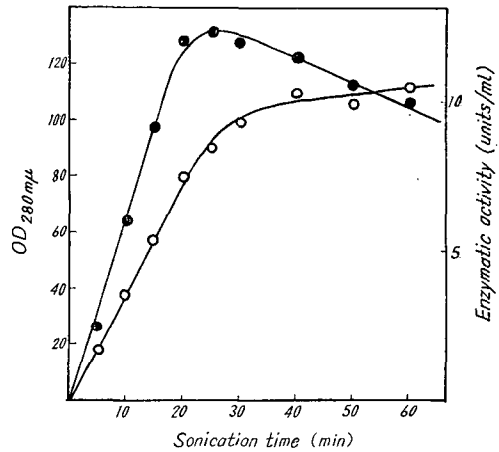


Fig. 6. Stability of 2-keto-6-phosphogluconate decarboxylase during the course of sonication.

- Enzymatic activity.
- OD_{280 mμ}.

$$\text{総活性} = \frac{(\text{5分後の活性}) \times (\text{40分後の吸光度})}{(\text{5分後の吸光度})}$$

このようにして求められた総活性から、乾燥菌体重量 1 mg 当り 23.5 単位の脱炭酸酵素が含まれる事が判明した。しかし乍ら、この値は試験管内で設定された標準測定条件に於いて算出された活性であり、細胞内活性を推定する為には、ここに得られた活性を細胞内諸条件で補正しなければならない。

この脱炭酸酵素活性は、基質濃度、マグネシウムイオン濃度、pH 及び温度等により影響される事が既に知られている。細胞内 pH、マグネシウム濃度は既に TAKEBE ら⁶⁵⁾ により決定され、細胞内 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸濃度は筆者らによって求められた。そこで、これらの各因子についてそれぞれ補正を行ない、発酵中の細胞内に於けるこの酵素活性を算出すると Table 17 に示す

ように、7.2 units/mg dry cells となり、この細胞の示す発酵速度 (6.1 μ moles/hr/mg dry cells) とほぼ一致する結果が得られた。同様の結果が、実際に細胞内条件に於いて測定した場合に於いても得られた。

Table 17. Intracellular activity of 2-keto-6-phosphogluconate decarboxylase

Activity (μ moles/hr/mg of dry cells)	
Assay condition	
pH 5.0	
2K-6PGA 5×10^{-3} M	23.5
Temperature 30°C	
Intracellular condition	
pH 5.9	
2K-6PGA 5×10^{-3} M	7.2
Mg ²⁺ 1.5×10^{-3} M	
Temperature 30°C	

従って、*Leu. mesenteroides* BO7 に於いて、2-ケトグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素が実際に細胞内でヘテロ乳酸発酵に関与している事を定量的側面から結論づけた。

考 察

既に本論に記した如く、*Leu. mesenteroides* BO7 はグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 及び2-ケトグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素を有する事が判明し、更に、これらの酵素の細胞内活性がこの菌の示すヘテロ乳酸発酵速度とほぼ一致する事から、この菌株に於いては、グルコン酸-6-リン酸がまず脱水素され2-ケトグルコン酸-6-リン酸となり、ついで脱炭酸をうけてリブローズ-5-リン酸となる系が存在する事が判明した。ここに得られた脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] は NAD を特異的に要求する点で異なるが、既に *Aerobacter* 属¹²⁾ 及び *Pseudomonas* 属²⁷⁾ に見出されているいわゆる2-ケトグルコン酸-6-リン酸還元酵素 (グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 EC 1.1.1.43) と基本的に類似した酵素である。*Pseudomonas* 属に於けるこの酵素の生理的意義としては、細胞内に生じた2-ケトグルコン酸-6-リン酸を還元してグルコン酸-6-リン酸とし Entner-Doudroff の経路に導入する作用が考えられている²⁷⁾。一方 *Leu. mesenteroides* PRL 33 を用い、2-ケトグルコン酸を単一炭素源とする培地に培養すると、2-ケトグル

コン酸キナーゼが誘導的に合成され、2-ケトグルコン酸-6-リン酸が生成する事が認められているが、ここに生じた2-ケトグルコン酸-6-リン酸は、まず脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] によりグルコン酸-6-リン酸に還元されたのち、酸化的脱炭酸反応を一挙に触媒する脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] の作用によりリブローズ-5-リン酸になるものと推定されてきた^{4),7),8)}。しかし乍ら、この推定の一つの根拠は、2-ケトグルコン酸-6-リン酸を直接にリブローズ-5-リン酸とする酵素が知られていなかった事が挙げられ、本論に記した如く、2-ケトグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素が新らしく見出された以上、微生物に於けるグルコン酸代謝は改めて検討されねばならないといえよう。

即ち、ヘテロ乳酸菌類に於いて、i) 脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] のみを有する菌株、ii) 脱水素酵素 (EC 1.1.1.43) 及び2-ケトグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素を有する菌株及び iii) 上記3種類の酵素を全て有する菌株が存在する事が認められたが、上記の *Leu. mesenteroides* PRL 33 がたまたま、[EC 1.1.1.43] 及び [EC 1.1.1.44] の両脱水素酵素を有する新しい型の菌株である場合のみ、先に記した推定は事実となる可能性があるといえるのである。

更に、*L. brevis* ATCC 8281 から得られた脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] が硫酸アンモニウム処理により、脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 及び2-ケトグルコン酸-6-リン酸脱水素酵素に解離した事、及びこの3種類の酵素の存在様式が菌株特異的である事を考えると、生物界全般に存在する五単糖リン酸側路に於いて、これらの酵素の“存在様式”が改めて問われる問題となる。既に、緒言で述べた如く、グルコン酸-6-リン酸の脱水素された中間体の存在の有無に関しては、古くから多くの研究者により論議がなされてきたが、これらの混乱の生じた原因として上述の“存在様式”の特異性を無視してきた事等が考えられる。又、“存在様式”如何では、当然代謝の流れの変化が考えられ、代謝調節機構上からも大変興味深い問題が提起されたといえよう。

又、*Leu. mesenteroides* BO7 に存在する脱水素酵素活性 [EC 1.1.1.43] がある酵素濃度を境にして急激に比活性の上昇を示す事は、これ又、代謝調節上非常に興味深い現象である。前述の、代謝の流れの変化を質的代謝調節機構と考えれば、比活性変化は量的代謝調節機構と考える事が出来る。ヘキソースからペントースを生成する重要な役割を果たすグルコン酸-6-リン酸の酸化的脱炭酸系に、両調節機構の存在が推定された事となり、こ

これらの点については、更に、将来詳細な研究が必要となるう。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、常に御指導、御言を頂いた北海道大学 佐々木西二教授、東京農業大学 北原覚雄教授、東京教育大学 阿部又三教授、東京大学 福井作蔵助教授、水島昭二博士、農林省植物ウイルス研究所 建部到博士に深甚なる謝意を表する。

又、各種菌株の分譲にあたり、御便宜を図って頂いた東京大学 飯塚 広教授、財団法人発酵研究所 長谷川武治博士、更に機器分析に際し御協力頂いた東京大学応用微生物研究所分析室の諸氏に心より感謝申しあげる。

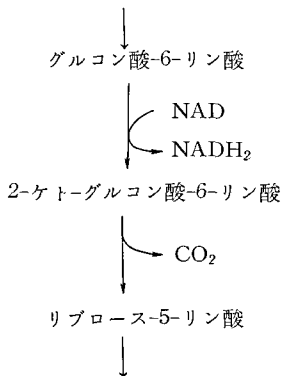
更に、常に御激励を頂いた武田薬品工業株式会社研究開発本部 立岡末雄博士、武田六郎博士、大村栄之助博士及び石田安成博士に対し深甚なる謝意を捧げる。

摘 要

1) 典型的なヘテロ乳酸菌である *Leu. mesenteroides* BO7 より NAD を特異的に要求し、グルコン酸-6-リン酸から 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸を生成する脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] を精製し、その諸性質を調べた。

ついで、2-ケト-グルコン酸-6-リン酸の脱炭酸を触媒し、リブロース-5-リン酸を生成する新脱炭酸酵素を精製しその諸性質について調べた。

更に、これら両酵素の細胞内活性が、この菌株の示すヘテロ乳酸発酵速度とほぼ一致することから、両酵素が実際に細胞内でヘテロ乳酸発酵に関与している事を推定し、この菌株に於けるグルコン酸-6-リン酸の代謝経路として下記の経路を考えた。



2) *Leu. mesenteroides* BO7 の有するグルコン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] は、或る酵素濃度以上になると高次構造変化と共に急激に比活性を増加する事が判明

した。

3) ヘテロ乳酸菌類に於いては、i) グルコン酸-6-リン酸の酸化脱炭酸反応を一挙に触媒する脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] のみを含む菌株、ii) グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 及び 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素のみを含む菌株、及び iii) 上記 3 種類の酵素を全て含む菌株の 3 群が存在する。

4) *L. brevis* ATCC 8281 の有するグルコン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.44] は硫酸アンモニウム処理 (100% 飽和) により、脱水素酵素 [EC 1.1.1.43] 及び 2-ケト-グルコン酸-6-リン酸脱炭酸酵素に解離する事を認めた。

引用文献

- 1) ABDELAKKER, M., HAMILTON, J. K. and SMITH, F., (1951): J. Am. Chem. Soc. **73**: 4691.
- 2) ALBERTY, R. A. (1953): J. Am. Chem. Soc. **75**: 1925.
- 3) BARKER, S. B. and SUMMERSON, W. H. (1941): J. Biol. Chem. **138**: 537.
- 4) BLAKLEY, R. B. and BLACKWOOD, A. C. (1957): Can. J. Microbiol. **3**: 741.
- 5) BURTON, R. M. and STADTMAN, E. R. (1953): J. Biol. Chem. **202**: 873.
- 6) CHANCE, B. and NEILANDS, J. B. (1952): J. Biol. Chem. **199**: 383.
- 7) CIFERRI, O. and BLACKWOOD, A. C. (1953): Dall Bolettino Della Societa Italiana Di Biologia Sperimentale. **XXXV**: 2123.
- 8) CIFERRI, O., BLAKLEY, E. R. and SIMPSON, F. J. (1955): Can. J. Microbiol. **5**: 277.
- 9) DELEY, J. (1954): Enzymologia, **17**: 55.
- 10) DELEY, J. (1954): Biochim. Biophys. Acta, **13**: 304.
- 11) DELEY, J. and DOUDROFF, M. (1957): J. Biol. Chem. **227**: 745.
- 12) DELEY, J. and VERHOFSTED, S. (1957): Enzymologia, **18**: 47.
- 13) DEMOSS, R. D., BARD, R. C. and GUNSALUS, I. C. (1951): J. Bacteriol. **62**: 499.
- 14) DEMOSS, R. D., GUNSALUS, I. C. and BARD, R. C. (1953): J. Bacteriol. **66**: 10.
- 15) DEMOSS, R. D. and GIBBS, M. (1955): J. Bacteriol. **70**: 730.
- 16) DEMOSS, R. D. (1954): Bacteriol. Proc. p. 109.
- 17) DEMOSS, R. D. (1954): J. Bacteriol. **68**: 252.
- 18) DEMOSS, R. D. and HAPPEL, M. E. (1955): J. Bacteriol. **70**: 104.
- 19) DICKENS, F. (1938): Biochem. J. **32**: 1628.

- 20) DISCHE, Z. (1953): J. Biol. Chem. **204**: 983.
- 21) DISCHE, Z. and BORENFREUND, E. (1951): J. Biol. Chem. **192**: 583.
- 22) DISCHE, Z. and LANDSBERG, E. (1957): Biochim. Biophys. Acta, **24**: 193.
- 23) DIXON, M. and WEBB, E. C. (1964): In "Enzymes", Longmans, Green and Co., Ltd., London, p. 678.
- 24) ELTZ, R. W. and VANDEMARK, P. J. (1960): J. Bacteriol. **79**: 763.
- 25) FISKE, C. H. and SUBBAROW, Y. (1925): J. Biol. Chem. **66**: 375.
- 26) FRAMPTON, E. W. and WOOD, W. A. (1961): J. Biol. Chem. **236**: 2578.
- 27) FRAMPTON, E. W. and WOOD, W. A. (1961): J. Biol. Chem. **236**: 2571.
- 28) FUKUI, S., HOCHSTER, R. M., DUBRIN, R., GREBNER, E. E. and FEINGOLD, D. S. (1963): Bull. Res. Council, Israel. **11 A** (4): 262.
- 29) GIBBS, M. and DEMOSS, R. D. (1951): Fed. Proc., **10**: 189.
- 30) GLATTHAAR, C. and REICHSTEIN, T. (1935): Helv. Chim. Acta, **18**: 80.
- 31) GUNSALUS, I. C. and GIBBS, M. (1952): J. Biol. Chem. **194**: 871.
- 32) HAMILTON, J. K. and SMITH, F. (1951): J. Am. Chem. Soc. **73**: 2923.
- 33) HANES, C. S. and ISHERWOOD, F. A. (1949): Nature, **164**: 1107.
- 34) HEATH, E. C., HURWITZ, J., HORECKER, B. L. and GINSBURG, A. (1958): J. Biol. Chem. **231**: 1009.
- 35) HOHORST, H. J. (1963): In "Methods of Enzymatic Analysis" ed. by BERGMAYER, H. U., Academic Press, Inc., New York. p. 143.
- 36) HORECKER, B. L. (1957): In "Methods in Enzymology" ed. by COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O., Academic Press, Inc., New York. p. 192.
- 37) HORECKER, B. L., SMYRNIOTIS, P. Z. and SEEGMILLER, J. E. (1951): J. Biol. Chem. **193**: 383.
- 38) HORECKER, B. L. and SMYRNIOTIS, P. Z. (1951): J. Biol. Chem. **193**: 371.
- 39) HOUGH, L. and JONES, J. K. N. (1950): J. Chem. Soc. p. 1702.
- 40) HURWITZ, J. and HORECKER, B. L. (1956): J. Biol. Chem. **223**: 993.
- 41) HURWITZ, J. (1958): Biochim. Biophys. Acta, **28**: 599.
- 42) KAGAWA, Y. (1962): J. Biochem. (Tokyo) **51**: 134.
- 43) KAMEYAMA, T. and SHIMAZONO, N. (1962): Biochim. Biophys. Acta, **64**: 180.
- 44) KOSHLAND, D. E. and WESTHEYMER, F. H. (1950): J. Am. Chem. Soc. **72**: 3383.
- 45) LANNING, M. C. and COHEN, S. S. (1951): J. Biol. Chem. **189**: 109.
- 46) LINEWEAVER, H. and BURK, D. (1934): J. Am. Chem. Soc. **56**: 658.
- 47) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDAU, R. J. (1951): J. Biol. Chem. **193**: 265.
- 48) LUGG, J. W. H. and OVERELL, B. T. J. (1947): Nature, **160**: 87.
- 49) MACHIDA, Y., MIZUSHIMA, S. and KITAHARA, K. (1963): J. Gen. Appl. Microbiol. **9**: 433.
- 50) MASSAY, V. (1960): Biochim. Biophys. Acta, **37**: 310.
- 51) MIZUSHIMA, S. and KITAHARA, K. (1964): J. Bacteriol. **87**: 1429.
- 52) MIZUSHIMA, S., MACHIDA, Y. and KITAHARA, K. (1963): *ibid.* **86**: 1295.
- 53) MIZUSHIMA, S., HIYAMA, T. and KITAHARA, K. (1964): J. Gen. Appl. Microbiol. **10**: 33.
- 54) MIZUSHIMA, S. and KITAHARA, K. (1964): Agr. Biol. Chem. **28**: 339.
- 55) MIZUSHIMA, S. and KITAHARA, K. (1964): *ibid.* **28**: 344.
- 56) NEILANDS, J. B. (1952): J. Biol. Chem. **199**: 373.
- 57) PONTREMOLI, S. and MANGIAROTTI, G. (1962): J. Biol. Chem. **237**: 643.
- 58) PONTREMOLI, S., DEFLORE, A., GRAZI, E., MANGIAROTTI, G., BONSIGNORE, A. and HORECKER, B. L. (1961): *ibid.* **236**: 2975.
- 59) RAFTER, G. W. and COLOWICK, S. P. (1957): In "Methods in Enzymology" Vol. III, ed. by COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O., Academic Press, Inc., New York. p. 887.
- 60) SCHMIDT, O. T. and TREIBER, R. (1933): Ber. Chem. Ges. **66**: 1765.
- 61) SCOTT, D. B. M. and COHEN, S. S. (1951): J. Biol. Chem. **188**: 509.
- 62) SEEGMILLER, J. E. and HORECKER, B. L. (1951): *ibid.* **192**: 175.
- 63) STADTMAN, E. R. (1952): *ibid.* **196**: 527.
- 64) STADTMAN, E. R., NOVELLI, G. D. and LIPMANN, F. (1951): *ibid.* **191**: 365.

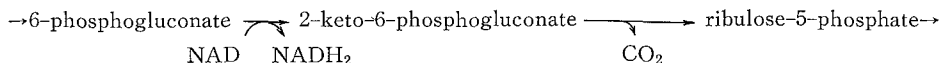
- 65) TAKEBE, I., SHIRAKAWA, T. and KITAHARA, K. (1964): J. Gen. Appl. Microbiol. **10**: 359.
- 66) TAKEBE, I., SHIRAKAWA, T. and KITAHARA, K. (1962): Abstracts of papers, 14-th "Koso Kagaku Symposium", Tokyo, p. 192.
- 67) TAKEBE, I., SHIRAKAWA, T. and KITAHARA, K. (1963): Abstracts of papers, 15-th "Koso Kagaku Symposium", Osaka, p. 162.
- 68) THEORELL, H. and CHANCE, B. (1951): Acta, Chem. Scand. **5**: 1127.
- 69) THEORELL, H. and BONNICHSEN, R. (1951): ibid, **5**: 329.
- 70) THEORELL, H. and BONNICHSEN, R. (1951): ibid, **5**: 1105.
- 71) WEISSBACH, A. and HURWITZ, J. (1959): J. Biol. Chem. **234**: 705.
- 72) WOLFROM, M. L. and WOOD, H. B. (1951): J. Am. Chem. Soc. **73**: 2923.
- 73) WOLFROM, M. L. and ANNO, K. (1952): ibid,

74: 5583.

- 74) YASHIMA, S. and KITAHARA, K. (1968): J. Gen. Appl. Microbiol. **14**: 359.

Summary

1. Using *Leuconostoc mesenteroides* BO7, a typical heterolactic fermenting coccus, it was found that both NAD-linked 6-phosphogluconate dehydrogenase [EC 1.1.1.43] catalyzing dehydrogenation of 6-phosphogluconate to yield 2-keto-6-phosphogluconate, and, a new enzyme, 2-keto-6-phosphogluconate decarboxylase producing ribulose-5-phosphate were present in this organism. The basic properties of these enzymes were studied, and intracellular activities of both enzymes were found to be agreed with the rate of heterolactic fermentation by the resting cells. From these results, the following metabolic pathway of 6-phosphogluconate was postulated in this organism.



2. It was concluded that specific activity of 6-phosphogluconate dehydrogenase [EC 1.1.1.43] from *Leuconostoc mesenteroides* BO7 was raised to about 10-fold when the concentration of this enzyme was higher than a critical concentration.

3. Among heterolactic bacteria, there were, at least, three groups of strain containing i) only 6-phosphogluconate dehydrogenase [EC 1.1.1.44], ii)

6-phosphogluconate dehydrogenase [EC 1.1.1.43] and 2-keto-6-phosphogluconate decarboxylase and iii) all three enzymes described above.

4. It was found that, by treatment with saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6-phosphogluconate dehydrogenase [EC 1.1.1.44] from *Lactobacillus brevis* ATCC 8281 was separated to the dehydrogenase [EC 1.1.1.43] and 2-keto-6-phosphogluconate decarboxylase.