



Title	塩辛の細菌学的研究：第10報 Bacillus subtilisのアミノ基転移酵素について
Author(s)	長尾, 清; NAGAO, Kiyoshi
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 5(1), 68-72
Issue Date	1954-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22848
Type	departmental bulletin paper
File Information	5(1)_P68-72.pdf



塩辛の細菌学的研究

第10報 *Bacillus subtilis* のアミノ基転移酵素について

長 尾 清

(北海道大学水産学部水産細菌学教室)

Bacteriological Studies of Shiokara or "Soused Squid"

10. On the transaminases in *Bacillus subtilis*

Kiyoshi NAGAO

Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Abstract

The occurrence and general importance of transaminases for the formation of amino acids has been variously discussed. The advent of paper chromatographic methods afforded an opportunity to clarify the knowledge of the occurrence of transaminases and their possible relationship to amino acid formation. This paper reports the results of studies on a series of transaminases present in *Bac. subtilis*, which was isolated from Shiokara.

1. The enzyme was prepared by treatment of intact cells with lysozyme and then dialyzed for 20 hrs. at 0° to get amino-acid-free enzyme.

2. Glutamic-oxalacetic transaminases have been demonstrated which produce glutamic acid from α -ketoglutaric acid with the following amino donors: aspartic acid, alanine, tyrosine, methionine, phenylalanine, valine and histidine, and, to a lesser degree, with lysine, arginine and leucine.

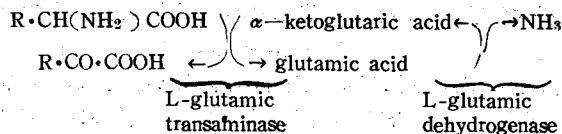
3. Glutamic-pyruvic transaminases have been demonstrated which produce alanine from pyruvic acid with the following amino donors: aspartic acid and glutamic acid.

著者は前に塩辛熟成中の呈味の原因は monoamino-N 量の増加に起因するであらうと述べたが、呈味の源と考えられるアミノ酸が細菌(塩辛の熟成に關与する細菌)の生細胞の内外でいかにして生成され或は代謝されて行くかと云ふ問題特に glutamic dehydrogenase と transaminase との關連について詳細に研究し、塩辛中の呈味の問題を解決し様と思ふ。前報²⁾に glutamic dehydrogenase について報告した。本報はかゝる目的で transaminase について実験した結果を報告する。

近年に於ける生化学の最もめざましい進歩の一つは、ある種の原子団或は基がある分子から他の分子へ転移する反応を触媒する酵素が数多く存在するという事である。この転移反応は生物学的系のエネルギー論、殊に生合成にとって重要な役割をしている事が発見された事である。酵素によつて触媒的に転移されるものとしては1対の水素原子、グリコシド、ペプチド、アミノ基、イミノ基、アミドン基、カルバミル基、メチル基チオール基、及びアセチル基等がある。こういう転移反応を触媒する酵素は転移酵素(transferring enzyme)と呼ばれる様になつてきた。

アミノ酸は生体内に於ては先ず脱アミノを受けるのが最も一般的な代謝経過である。脱アミノの方法には種々あるが、酸素を得てアミノ基を脱し α -ケト酸に移行する所謂酸化的脱アミノはその最も重要なものである。Braunstein 及び Bychkov³⁾ は多くのアミノ酸の酸化的脱アミノは、最初アミノ基が transaminase に

より α -ketoglutaric acid に移行し、生じた glutamic acid が脱水素酵素により脱アミノを受け間接的に脱アミノ系を形成するものであらうとの考えを提出した。Braunstein 等は transaminase, glutamic de hydrogenase, α -ketoglutaric acid からなる酵素模型を作り、これに L-alanine を加えると容易に脱アミノを受け NH_3 を放出する事を認めた。この際 α -ketoglutaric acid が alanine の脱アミノに触媒的に動く。更に Braunstein 及び Azarkh⁴⁾ は肝臓や腎臓組織中では α -ketoglutaric acid の添加によつて aspartic acid, leucine, valine 等の脱アミノが極めて促進される事を証明した。



しかしながらかかる系が実際に生体でアミノ酸の脱アミノにどの程度に関与しているか、又 transaminase に関与する脱アミノ機構が実在するとしても、実際にどのアミノ酸がどの程度迄この機序で酸化されているかは直接知る事は出来ない。

最近 Feldman 及び Gunsalus⁵⁾ は *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* 及び *B. subtilis* の乾燥菌体を用ひ広範囲なアミノ基転移の起る事を証明した。著者が塩辛中より分離した *B. subtilis* が同様に極めて広範囲なアミノ基転移の起る事を知つた。以下著者の得た実験結果について報告する。

実験方法

1. 酵素抽出法 Agar-agar (pH7.0) に *B. subtilis* を接種、20時間、37°で培養し、発育した菌体を集め、水洗後、菌体を蒸留水に懸濁し、(1.28mg. dry Wt./cc), 之に菌体の 1/1000 重量の lysozyme を添加、100分室温にて溶菌させた後、20時間氷で冷却しながら透析を行つた。透析後、扇風器で通風し透析液の容量を透析前と同じ容量になるまで濃縮した。この透析したものを酵素液とした。

2. lysozyme の調製法⁶⁾ Alderton 法に従ひ、卵白より結晶状に抽出した。

3. α -ketoglutaric acid の調製法⁷⁾ Glucose 100g, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1g, $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, 蒸留水1000cc 及び CaCO_3 2.5% よりなる培地に *Pseudomonas fluorescens* 33F を接種、30°で培養後、醗酵液より α -ketoglutaric acid の結晶を得た。m.p. 112°, 2,4-dinitrophenylhydrazine 溶液を加えて得た hydrazone を paper chromatography を行つた結果、文献の Rf 値と一致した。

4. Pyruvic acid 市販品を使用した。

5. アミノ基転移の実験法 試験管中に 1M 磷酸 buffer 液 (pH 7.3) 0.5cc, 0.1 M α -ketoglutaric acid 2.5cc (或は 0.1M pyruvic acid 2.5cc), 0.125M L-アミノ酸 1cc. と前記の方法によつて調製した酵素液 1cc を入れ、これを 37°の恒温水槽に 60分 incubate する。60分後 10% 三塩化醋酸 1cc を添加して反応を停止させる。この反応液を東洋濾紙 NO.50 に capillary pipette を用ひて滴下する。10%含水 phenol を溶媒として常法通り chromatography を行つた。呈色には ninhydrin の butanol 液を使用した。アミノ酸の確認には標準アミノ酸の Rf 値、色調及び其の他の色々な溶媒 (n-butanol, 15% 含水 cresol, butanol-pyridine-acetic acid-H₂O の混液) を使用した場合の Rf 値及び色調から確認した。

実験結果

Transaminase の助酵素は pyridoxal phosphate である。^{8) 9) 10)} Feldman 及び Gunsalus⁵⁾ が実験した方法は菌体乾燥標本に pyridoxal phosphate, α -ketoglutaric acid 及びアミノ基供与体である各アミノ酸を加えた反応系でアミノ基転移の行われている事を証明している。著者は生菌浮遊液、 α -ketoglutaric acid 及び各アミノ酸を加えた反応系ではアミノ基転移が行われなかつた。Pyridoxal phosphate は入手困難であつた為細胞内の酵素及び助酵素を活性の状態で細胞から抽出する事が第一に必要である。著者はこの為に lysozyme を加え溶菌し、細胞内の物質を活性の状態で抽出出来たが、この方法に依ると細胞内に遊離の状態

で存在していたアミノ酸がそのまま細胞外に出される為、酵素液自身の中にアミノ酸が存在し、アミノ基転移の実験を行うには不適當である。酵素液中のアミノ酸を除去する為には透析を行つたが、この場合助酵素である pyridoxal phosphate も一緒に透析されてしまう恐れがあるので、アミノ酸が除去され、しかも pyridoxal phosphate が除かれない様に透析しなければならぬ。著者は菌体を lysozyme にて溶菌後、セロファン紙を用い、水で冷却しながら30分、1時間、6時間及び20時間透析を行つた後、paper chromatography に依り酵素液中のアミノ酸を検出した処、20時間透析を行つた酵素液中にアミノ酸が検出されなかつたが、これより短時間の透析では酵素液中に微量のアミノ酸が検出された。20時間透析した酵素液を使用し、酵素液、 α -ketoglutaric acid (或は pyruvic acid) 及びアミノ基供与体である各アミノ酸を加えた反応系では Fig. 1, 2, 3 及び4に図示した様に極めて広範囲なアミノ基転移の起る事が証明された。即ち著者の実験結果から酵素液、 α -ketoglutaric acid 及び次の様なアミノ基供与体からなる反応系から glutamic acid が生成される事がわかつた (glutamic-oxalacetic transaminase)。

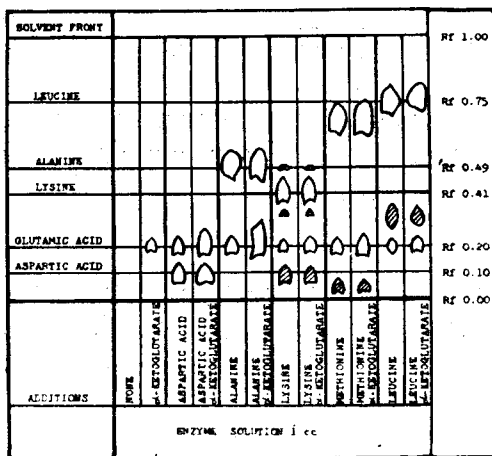


Fig. 1. Transaminases present in *Bac. subtilis*

The reaction mixture, incubated for 1 hr. at 37°, a mixture containing 1M phosphate buffer (pH7.3) 0.5cc, 0.1M α -Ketoglutaric acid 2.5cc, 0.125M L-amino acid 1cc and enzyme solution 1cc (1.23mg. dried cells/cc). The reaction was stopped by the addition of 1cc of 10 per cent trichloroacetic acid, and 0.02cc was transferred to Toyo No.50 filter paper sheet. The amino acids were identified by paper chromatography, sprayed with ninhydrin (0.25mg. per cc of water-saturated butanol). Solvent, phenol (contained 10 per cent water). ⊙ Unknown spot.

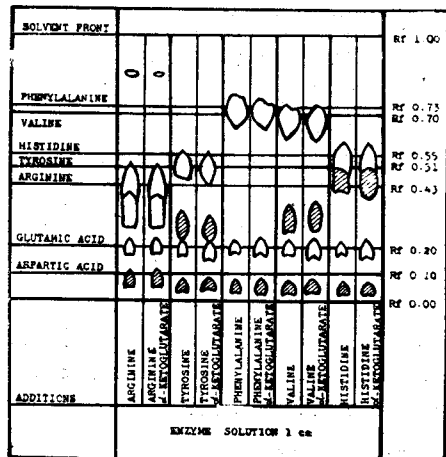


Fig. 2. Transaminases present in *Bac. subtilis*
Conditions as for fig. 1

ノ基供与体として aspartic acid 及び glutamic acid が作用する。尚 Fig.2に於て arginine, arginine + α -ketoglutaric acid の chromatogram 上 Rf 0.35 及び 0.85 の spot は夫々 ornithine 及び proline である。

考 察

Adler,^{11) 12)} Cohen¹³⁾ は酵母及び *E. coli* 等で glutamic acid と aspartic acid の反応を認めたが、Dicsfalusy¹⁴⁾ は *E. coli*, *Staph. mesentericus* で、又 Konikova は *B. brevis* でアミノ基転移を認め得なかつた。

Cohen は短時間嫌氣的に実験した結果, glutamic acid \rightarrow aspartic acid は各種細菌で盛に起るが, glutamic acid \rightarrow alanine, aspartic acid \rightarrow alanine は極めて弱いことを認めた。Housewright¹⁵⁾ は *B. subtilis* で glutamic acid \rightarrow phenylalanine, glutamic acid \rightarrow tyrosine の反応が起ると報告している。最近 Feldman 及び Gunsalus¹⁶⁾ は *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, 及び *B. subtilis* について α -ketoglutarate と次の様なアミノ基供与体である各アミノ酸の反応系から glutamic acid が生成される。即ちアミノ基供与体として aspartic acid, alanine, valine, leucine, norleucine, tryptophan, tyrosine, phenylalanine 及び methionine が関与し, isoleucine, histidine, lysine 及び threonine は微弱なが

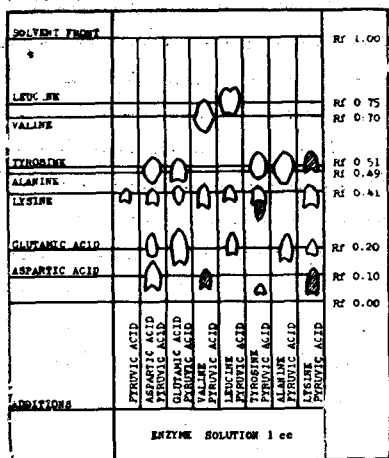


Fig. 3. Transaminases present in *Bac. subtilis*

The reaction mixture, incubated for 1 hr. at 37°, a mixture containing 1M phosphate buffer (pH7.3) 0.5cc, 0.1M pyruvic acid 2.5cc, 0.125M L-amino acid 1cc and enzyme solution 1cc (1.23mg. dried cells/cc). The reaction was stopped by the addition of 1cc of 10 per cent trichloroacetic acid. The amino acids were identified by the same procedure as fig. 1. ● Unknown spot.

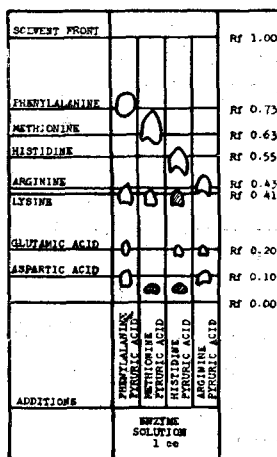


Fig. 4. Transaminases present in *Bac. subtilis*
Conditions as for fig. 3

ら作用する。又細菌の種類によりアミノ基供与体として関与するアミノ酸の種類が異なり又酵素量も異なると述べている。著者の実験結果でも極めて広範囲なアミノ基転移が起る事がわかった。

もしも Braunstein の構想が正しければ, glutamic acid transaminase と共にそれに対応する dehydrogenase をも含んでいる組織の中で大量の L-アミノの脱アミノを起すためには, 触媒的微量の α -ketoglutaric acid さえあれば十分であらう。Braunstein 自身は L-alanine が肝臓抽出液によつて glutamic acid の触媒的微量の存在下において酸化的に脱アミノされるということを示した。彼は glutamic acid と CoI 及び精製した L-glutamic dehydrogenase をある程度精製した glutamic acid transaminase の試料に加えることによつて alanine を脱アミノできる系を作ることができた。最近の研究からこの系が一般にアミノ酸の脱アミノに関係出来る事及び pyridoxal phosphate が助酵素の役割を果すことがはつきりした。L-amino acid oxidase 及びこの系との両者によつて, 事実上天然にあるすべてのアミノ酸の脱アミノを説明する事が出来る。著者の使用した *B. subtilis* には上記の様に極めて広範囲のアミノ基転移が行われており又前報の如く glutamic dehydrogenase が存在し, 更に又 L-glutamic acid oxidase が存在する*。

更に又重要な事はアミノ基転移の可逆性である。何となれば, それはアミノ酸の分解に与ると共に, 非蛋

* 日本水産学会年会 (1954年4月) にて発表

白質性の給源からのアミノ酸の合成に与る。アミノ基転移は可逆的過程であるから、適当な α -ケト酸が存在すれば、glutamic acid を使つて新しいアミノ酸分子が合成され得る。少くとも三つのかゝる α -ケト酸が炭水化物代謝の過程中に出来て来る。それは即ち α -ketoglutaric acid, oxalacetic acid 及び pyruvic acid とである。glutamic acid は α -ketoglutaric acid から L-glutamic dehydrogenase の逆の作用で合成され、そして aspartic acid, alanine 等のアミノ酸が oxalacetic acid と pyruvic acid からアミノ基転移によつて合成される場合のアミノ基の供給者として働き得る。この様にアミノ基転移はその可逆性のために、窒素化合物の同化作用において異化作用におけると同様に基本的重要な役割を演ずることは疑いない。

植物体では光合成により固定された炭素鎖と根から吸収された窒素とからアミノ酸が合成されることは疑ふ余地がない。この際窒素同化の最初の有機物として酸性アミノ酸が出来ることが略々明かになっている。従つてこの場合にもアミノ基転移の反応と何等かの関係があるであらうことが予想される。

Hanes 及び Isherwood は、腎臓と肝臓の抽出物を用いて、glutathione と其の成分アミノ酸である glycine, cysteine 及び glutamic acid との間のアミノ酸転移の可能性を調べる実験を行ひ、消化物を chromatography でしらべ新しい peptide の生成を示す spot を見出した。この peptide 転移反応は α -ペプチド連鎖構造中に於けるアミノ酸残基の再配列の機構を示し得るもので、蛋白質合成と密接に関連している事が判る。この様に転移反応は生物学的エネルギー論、ことに生合成にとつて基本的な重要性をもつものである。

要 約

1. *B. subtilis* の菌体を lysozyme で溶菌し、 0° で 20 時間透析しアミノ酸を含まないアミノ基転移酵素を得た。

2. Glutamic-oxalacetic transaminase の反応系では aspartic acid, alanine, tyrosine, methionine, phenylalanine, valine 及び histidine がアミノ基供与体として作用した。Lysine, arginine 及び leucine も関与するが其の作用は微弱であつた。

3. Glutamic-pyruvic transaminase の反応系では aspartic acid 及び glutamic acid がアミノ基供与体として作用した。

終りに臨み *Pseudomonas fluorescens* 35F の菌株を御分譲下された、東大 坂口謹一郎教授、朝井勇宜教授に深甚なる謝意を表すると共に、本研究に協力された日野昭弘氏に感謝の意を表します。

引 用 文 献

- (1) 長尾・木村 (1951). 北大水産彙報 1, 81.
- (2) 長尾 (1954). 北大水産彙報 5,
- (3) Braunstein, A. E. & Bychkov, S. M. (1939). *Nature* 144, 351.
- (4) Braunstein, A. E. & Azarkh, R. M. (1945). *J. Biol. Chem.* 157, 421.
- (5) Feldman, L. I. & Gunsalus, I. C. (1950). *J. Biol. Chem.* 187, 821.
- (6) Alderton, G. Ward, W. H. & Fevold, H. L. (1945). *J. Biol. Chem.* 157, 43.
- (7) 朝井・相田 (1952). 日農化 26 523.
- (8) Gunsalus, I. C. & Umbreit, W. W. (1945). *J. Biol. Chem.* 161, 313.
- (9) Green, D. E. (1945). *J. Biol. Chem.* 161, 559.
- (10) O' Kane, & Gunsalus, I. C. (1947). *J. Biol. Chem.* 170, 425.
- (11) Adler, E., Hellström, H., Günther, G. & Euler, H. V. (1938). *Z. physiol. Chem.* 255, 14.
- (12) Adler, E., Günther, G. & Everett, J. E. (1938). *Z. physiol. Chem.* 255, 27.
- (13) Cohen, P. P. (1942). *A symposium on Respiratory Enzymes.* 210.
- (14) Dicsfalusy, E. (1942). *Biochem. Z.* 313, 75.
- (15) Housewright, Thorne, (1950). *Proc. Soc. Am. Bact.* 133.