



Title	塩辛の細菌学的研究：第11報 細菌のL-アミノ酸酸化能と生細胞内酵素形成について
Author(s)	長尾, 清; NAGA0, Kiyoshi
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 7(1), 31-37
Issue Date	1956-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22947
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(1)_P31-37.pdf



塩辛の細菌学的研究

第11報 細菌のL-アミノ酸酸化能と生細胞内酵素形成について*

故 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"

11. On the activities of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria and the formation of the enzyme in the living cell

LATE Kiyoshi NAGAO

緒 言

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ろうと述べた¹⁾。イカ肉は新鮮時既に遊離のアミノ酸が多く、塩辛調製時既に aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, valine, leucine, phenylalanine, tyrosine, arginine, lysine, histidine, proline, serine, threonine, ornithine 等が遊離アミノ酸として検出され、これらのアミノ酸が塩辛熟成中いかなる消長をたどるか paper chromatography にて観測し²⁾、又呈味の源と考えられるアミノ酸が細菌の生細胞の内、外で、どの様にして生成され或は代謝されて行くかと言う問題特にグルタミン酸脱水素酵素とアミノ基転移酵素との関連について報告した^{3,4)}。アミノ酸は生体内において先ず脱アミノを受けるのが最も一般的な代謝経路である。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 & Bychkov⁵⁾は多くのアミノ酸の酸化的脱アミノは、最初アミノ基がアミノ基転移酵素により 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のであるとの考えを提唱した。しかしながらかかる系が実際は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、又アミノ基転移酵素に関与する脱アミノ機構が存在していても、実際にどのアミノ酸がどの程度迄この機序で酸化されるのか直接知る事は出来ない。

本報においてはかかる目的で塩辛の熟成に関与する細菌によるL-アミノ酸の酸化能及びL-アミノ酸酸化酵素系の形成について実験した結果について報告する。

実 験 方 法

1) 使用菌株 著者が塩辛中より分離し、今まで本研究で主として使用していた *Bac. subtilis* 及び *Bac. subtilis* sp. (著者が塩辛中より分離した当時は *Bac. mesentericus fuscus* であると記載したが、1948年の Bergey の分類ではこの菌株は *Bac. subtilis* に包含されているので、今まで使用していた *Bac. subtilis* と区別する為に *Bac. subtilis* sp. と記す) と、当教室保存の *Esch. coli* の菌株を使用した。

2) 菌浮遊液調製法 培養基は特に明記しない限り agar-agar を使用し、37°で20時間培養、前報⁶⁾と同じ方法で菌浮遊液を調製した。

3) 酸化能の測定方法 Warburg 検圧計を用いて酸素の消費量を測定した。0.067M 磷酸 buffer液 (pH 7.4) 1 cc, 5×10^{-2} M アミノ酸溶液0.5cc, 菌浮遊液 1 cc, KOH 0.3cc, gas phase 空気, 反応温度 30°。

* 本論文は故長尾清氏の遺稿であつて、木村喬久氏これを整理し、谷川英一氏の校閲を経て出版の運びとなつたものである。(編集委員)

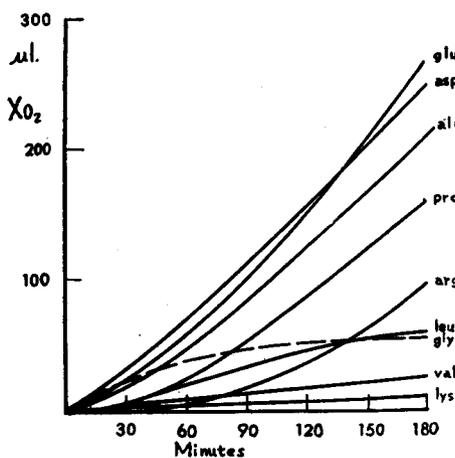


Fig. 1. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis*

The velocity of oxidation was measured manometrically by the rate of oxygen uptake in the presence of excess of substrate. Each manometric cup contained 1cc of bacterial suspension (2mg dry weight/cc), 0.5cc of $5 \times 10^{-2}M$ substrate and 1cc of 0.067M phosphate buffer of pH 7.4. 0.3cc of alkali in center well. Gas phase, air. Substrate tipped in from side bulbs of Warburg vessels after temp. equilibration, 30°. Oxygen consumption due to autorespiration was subtracted.

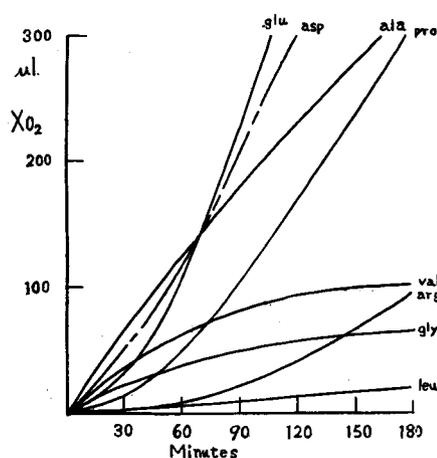


Fig. 2. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp.

The experimental conditions are the same as in Fig. 1.

実験結果

1) アミノ酸の酸化能及び生細胞内で酸化酵素系が形成される速度

細菌のアミノ酸に対する酸化能は、アミノ酸の種類及び菌株により著しく差がある事が知られている^{7,8)}。著者が本研究で主として使用していた *Bac. subtilis* の菌浮遊液では Fig. 1 に示した結果を得た。即ち L-aspartic acid が最も速に酸化され、次に glycine, L-glutamic acid, DL-alanine, L-proline, L-leucine, DL-valine, L-lysine, L-arginine の順序で酸化された。この結果をみると L-leucine に対する酸化能は *Proteus vulgaris*^{7,8)} より非常に微弱であるが、aspartic acid, alanine, 及び glutamic acid の様なアミノ基転移に大いに関与するアミノ酸に対する酸化能が大である事と proline に対する酸化能が大である事に注目される。

今菌細胞の酸素消費速度が、L-アミノ酸酸化酵素の存在量で決定されると仮定すると、Fig. 1 の曲線は酵素形成の時間的変化を表わすことになる。Aspartic acid, glutamic acid 及び alanine に対しては反応と同時に酸素の消費がみられるが、或る時期をすぎると、酸素消費速度は加乗的に増大している。即ち適応的に酵素が形成されている事を示している。Glycine に対しては反応と同時に酸素が消費されるが、次第に酸素消費速度は減衰している。即ち酵素の崩壊を意味する。Proline, leucine 及び arginine に対しては初め殆んど酸素の消費がみられないが、lag phase 後酸化酵素系が形成されている。

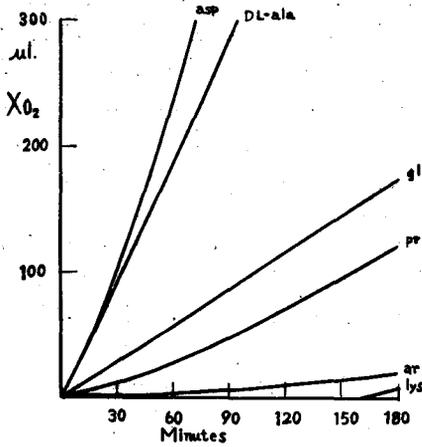


Fig. 3. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Esch. coli*

The experimental conditions are the same as in Fig. 1.

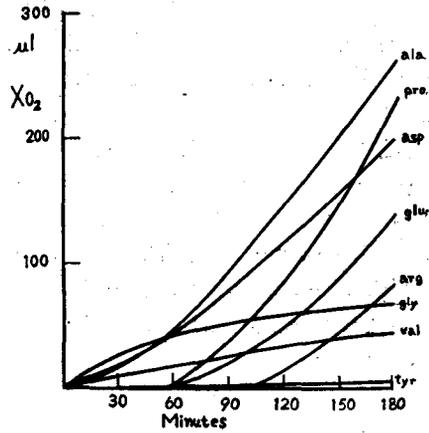


Fig. 4. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* which grown in agar-agar contained amino acid mixtures

Bacteria was grown in agar-agar which contained 1cc of $2.5 \times 10^{-2} M$ L-aspartic acid, DL-alanine, L-proline, DL-valine, L-leucine, L-lysine, L-arginine, L-glutamic acid, DL-ornithine, and L-tyrosine per 100cc of broth. The experimental conditions are the same as in Fig. 1.

之等の事が他の菌株についても云い得るか否かを比較検討するため、著者が塩辛中より分離した *Bac. subtilis* に属する他の菌株 (*Bac. subtilis* sp. と記す) について同様の実験を行い、その結果を Fig. 2 に示した。即ちこの菌株では前に使用した菌株に比し各アミノ酸に対する酸化能は大であり、DL-alanine が最も速かに酸化され、次いで L-aspartic acid, DL-valine, L-glutamic acid, glycine, L-proline, L-arginine, L-leucine の順序で酸化された。前の菌株と同様に leucine に対する酸化能は微弱であるが、アミノ基転移に大いに関与する aspartic acid, alanine, 及び glutamic acid 等のアミノ酸及び proline に対する酸化能が大である事が認められた。Alanine, glutamic acid, aspartic acid に対しては反応と同時に酸素の消費が起り、次第に速度を増し、酵素の形成が明らかに観察される。Proline に対しては約 30 分の lag phase の後急激な酵素形成が起る。Glycine, valine に対しては反応と同時に酸素の消費が起るが、約 100 分の後酸素の消費は停止し、酵素の崩壊が起つている。Arginine に対しては初め殆んど酸素の消費がみられないが、約 60 ~ 90 分の lag phase 後酵素が形成されている。

Bac. subtilis は Gram 陽性の菌である。一般に Gram 陽性菌と Gram 陰性菌とでは栄養要求及び細胞膜の透過性に顕著な差異がある事が知られている。Gram 陰性の菌についてアミノ酸の酸化能及び L-アミノ酸酸化酵素系の形成速度をみるために、当教室保存の *Esch. coli* の菌株を使用して同様の実験を行い、その結果を Fig. 3 に示した。即ち L-aspartic acid が最も速やかに酸化され、次いで DL-alanine, L-glutamic acid, L-arginine 及び L-lysine の順序で酸化された。L-leucine に対しては全然酸化がみられなかつた。又これ等のアミノ酸に対しては反応と同時に酸素の消費がみられた。L-lysine の場合約 160 分の lag phase の後僅かに酸素の消費が観察された。

細菌の菌体内で酵素が形成される場合、細菌の発育時の環境条件に大いに支配される。その形成を左右する重要な要素となるものは、培地中の基質の有無、培地 pH、発育温度、菌体内への基質の透過性、補欠分子簇の存在の有無、及び細菌が補欠分子簇を生合成し得るや否や等である。この中発育時の基質の存在の有無による影響については基質を含まない培地に発育させた菌体について検討すればわかるが、基質を含まない培地においても菌が発育するという事は菌体構成の蛋白質を生合成している事を意味するのであるから、基質がL-アミノ酸である場合非常に困難な問題となる。今まで述べて来た実験は細菌を agar-agar 培地に培養し、その菌の浮遊液について得られた結果である。Agar-agar 培地は色々なアミノ酸が含まれていると思われるが、今 agar-agar 培地 100cc 中に L-aspartic acid, DL-valine, DL-alanine, L-proline, L-lysine, L-leucine, L-arginine, glycine, L-glutamic acid, DL-ornithine 及び L-tyrosine の各アミノ酸の 2.5×10^{-2} M 溶液 1 cc ずつ全部加えた培地に発育させ、その菌浮遊液について実験した結果を Figs. 4 及び 5 に示した。

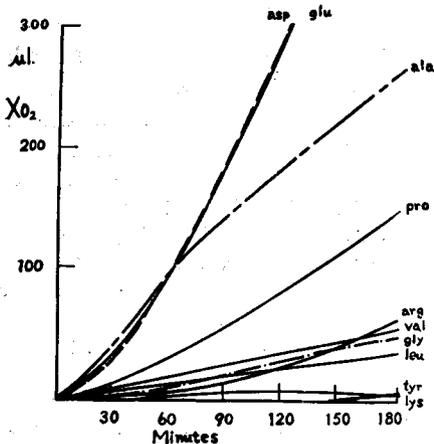


Fig. 5. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp. which grown in agar-agar contained amino acid mixtures

The experimental conditions are the same as in Fig. 4.

Bac. subtilis の場合、普通 agar-agar 培地に発育させた場合と同じ様な酸化能をもっているが、たゞ酵素形成のための lag phase がやゝ長い事と、L-leucine 及び L-lysine に対しては全然酸化がみられなかつた。この原因は発育時培地中の基質の濃度や基質相互間の拮抗作用に起因しているのではなからうか。

Bac. subtilis sp. の菌株の場合、普通 agar-agar 培地に発育させた場合に比し、DL-valine に対する酸化能が弱い事と、L-proline に対しては酸化酵素の形成量が少ない様である。

2) Cell free 標品によるアミノ酸の酸化能

生細胞内で酵素が適応的に形成されたか否かを論ずる場合には、基質に対する細胞膜の透過性と安定性と吟味しなければならない。

著者は agar-agar 培地で培養した菌体及びこの菌体を L-aspartic acid の溶液に 30° , 100分接触させた菌体を著者が作製した冷結真空乾燥装置⁹⁾を用い、乾燥菌体粉末を作り、この菌体粉末の水溶液についてアミノ酸の酸化能を測定した結果を Figs. 6

及び 7 に示した。即ち agar-agar 培地に培養した菌体の乾燥粉末では DL-alanine, L-glutamic acid 及び L-aspartic acid に対して微弱ながら酸化能がある。DL-valine, L-lysine, L-tyrosine, glycine, L-leucine, L-proline 及び L-arginine に対しては酸化作用がない。L-aspartic acid に 30° , 100分接触させた菌体の乾燥粉末では DL-alanine, L-aspartic acid 及び L-glutamic acid に対して強い酸化作用がみられ L-tyrosine, L-lysine, DL-valine, glycine, L-arginine, L-leucine に対して微弱ながら酸化作用がみられた。即ち L-aspartic acid と接触させる事によつて適応的に酸化酵素系が形成されている事を示す。

尙非適応菌及び L-aspartic acid 適応菌からの cell free 標品でも lag phase がみられるのは Stumpf & Green⁷⁾ も述べている様に L-アミノ酸酸化酵素は細胞内の不溶性構成成分と結合しているため、乾燥粉末から水溶液中に溶出するのに時間を要するためであると思われる。

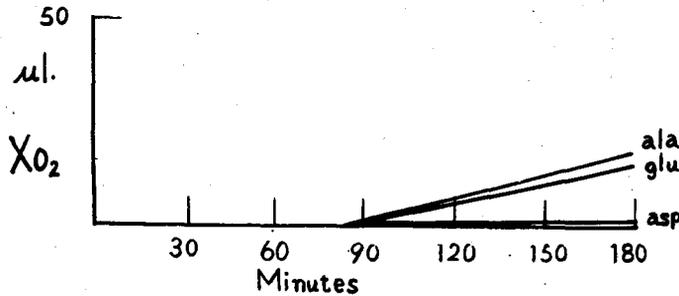


Fig. 6. The velocity of oxidation of amino acids by cell free enzyme of *Bac. subtilis*

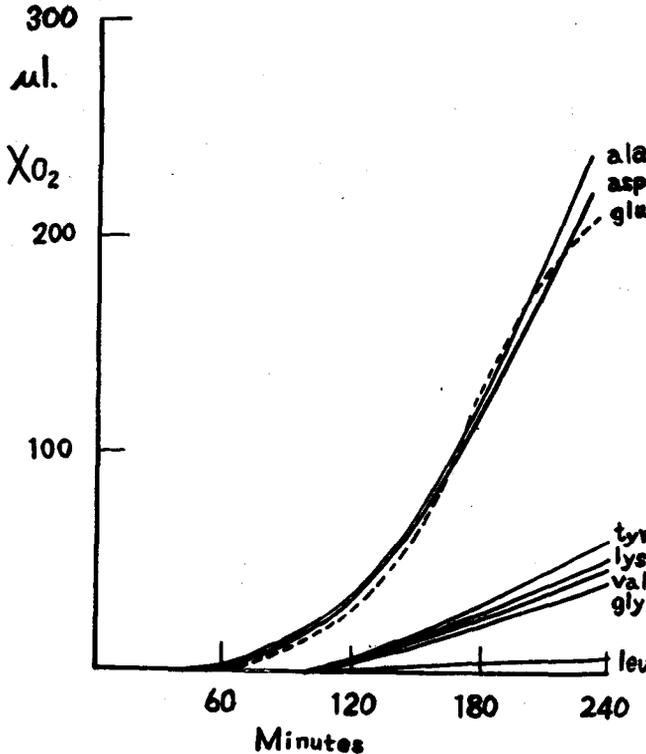


Fig. 7. The velocity of oxidation of amino acids by cell free enzyme which is extracted from the cells adapted with L-aspartic acid

考 察

細菌のアミノ酸に対する酸化能は、アミノ酸の種類及び菌株により著しく差がある事が知られている⁷⁾⁸⁾。基質の分子構造とか菌株の種類とかに一定の法則を見出し難い。著者の実験結果と非常に似た結果がWolf¹¹⁾により報告されている。即ちペニシリンの生産に使用する *Penicillium notatum* Q176 の菌体が22種のアミノ酸をそれぞれ異なる速度で酸化するが、alanine, glutamic acid 及び proline が最も速かに酸化されると述べている。又 Krebs¹²⁾ は新鮮なネズミの腎臓は他のアミノ酸よりも aspartic acid 及び glutamic acid を最も速かに酸化すると述べている。

著者の実験結果で酸化され易いアミノ酸はその基質が完全酸化された場合に消費する酸素の量より遙かに多量の酸素を消費する事がある。このような事実を Stumpf & Green⁷⁾ も経験している。恐らく酸化的脱アミノを受けて生成された α -ケト酸が実際に代謝されたためであろう。

宇佐美等⁸⁾¹⁰⁾ は *Proteus vulgaris* 等の 2, 3 の腐敗菌が L-アミノ酸を強く酸化するが、これ等の菌は glucose の酸化作用が比較的弱く、アミノ酸酸化の際に有機燐

酸のエステル化を随伴することが認められるので、アミノ酸の酸化によりエネルギーを獲得し、このエネルギーを利用して酵素形成、生長、増殖等を行っていると考えられると述べている。著者が使用した *Bac.*

subtilis の菌株も glucose の酸化が比較的弱く、後で述べる様に酸化的磷酸エステル化を阻害する 2, 4-dinitrophenol 及び azide 等による影響よりみてアミノ酸酸化の際に有機磷酸のエステル化を行いエネルギーを獲得し、同時に酸化される速度の速い alanine, glutamic acid や aspartic acid の様なアミノ酸は自から代謝されながら、それぞれのケト酸を生じ、菌体内に透過し菌体内においてアミノ基転移酵素¹³⁾により他のアミノ酸を形成し、蛋白質構成素材として高分子化に関与するものであらうと思われる。

酵素蛋白の適応的形成的機構について Karstöm は構成酵素と適応酵素とに分けたが、その後 Monod は Karstöm の説を批判し、構成酵素も適応酵素も全く同一の機構で生細胞内で形成されるという一元論説を提唱した。一方 Spiegelman は plasmagene の自己増殖と言う点から plasmagene 説を提唱した。須田等⁸⁾⁹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ は酵素蛋白の形成の lag phase において inducer の作用下に素材アミノ酸の質的量的な集約の過程を経て、素材アミノ酸から dynamic precursor protein への高分子化(incorporation)の過程が行われ、次いで lag phase において precursor から特異な酵素蛋白への分化(differentiation)が行われる。Precursor は素材から蛋白質への過程の遷移的な物質として、しかも一定の範囲内で(例えば同一の系或は相互転化可能な系の)種々な蛋白質への分化し得る形で存在し、この段階で一応の特異性を持つが、最終的な特異性が決めるのは分化の過程が完了する段階である。一度形成された酵素蛋白は自から代謝機能を果すと同時に崩壊しつつ、cyclic な機構により再生産され、その動的な平衡状態を反映して蛋白質の消長が観察されると述べている。

又 Spiegelman はアミノ酸類似物を用いて、酵母における酵素形成について実験し、酵素蛋白合成は遊離のアミノ酸を主な窒素源として用いる事を明らかにした。

しかし特殊な蛋白合成に必要なアミノ酸群が定常的に細胞内に存在することは考えにくいし、enzyme precursor が細胞内に常にあるとも思われぬ。むしろ与えられた基質の影響下に lag phase の間に precursor が形成される。そのために先ず不可欠のアミノ酸の形成が起らなければならないと考えられる。実際に種々なアミノ酸の形成が lag phase の間に起るならば glutamic acid, aspartic acid, alanine のようにアミノ基転移系により自から代謝されながら他のアミノ酸を形成するような特殊な位置にあるアミノ酸は単に酵素蛋白構成素材として高分子化に関与するだけのアミノ酸の果す役割と必然的に異なる筈である。

著者の実験結果から aspartic acid, alanine, glutamic acid 及び proline 等のアミノ酸を基質とすると酸化速度速く、しかもその基質と接触する事によつてアミノ酸酸化酵素系形成量も大である。それ以外のアミノ酸を基質とすると酸化速度が遅く、しかもそれ等の基質と接触する事によつて形成されるアミノ酸酸化酵素系の形成量も少ない。これらの事より酸化され易いアミノ酸は酸化的脱アミノを受け対応するケト酸が菌体外において作られ、この際エネルギーを獲得し、このエネルギーを利用してそれぞれのケト酸が菌体内に透し、菌体内においてアミノ基転移酵素の作用により他のアミノ酸を生成し、酵素蛋白や菌体蛋白の形成に関与しているものであらう。酸化され難いアミノ酸は恐らく arginine の場合のようにそのまま遊離の状態で細胞膜を透過している⁵⁾のではなからうか。菌体内に透入するケト酸は微量でも充分に他のアミノ酸に転移し得るであらうし、余分なケト酸は細胞外において速かに代謝されるのであらう。

L-アミノ酸酸化酵素は基質であるアミノ酸の種類によつて補欠分子簇その他の性質が異なる酵素蛋白である事が知られている。最近八木・奥田²⁰⁾は *Esch. coli* の菌株を glucose を含む合成培地に培養し休止菌とした場合、アミノ酸の酸化は殆んど認められないが、これに alanine を基質として適応実験を行うと約30分の lag phase 後アミノ酸酸化酵素が適応的に形成されるが、この場合適応する迄の lag phase の間に FAD が多いか少いかによつて酵素形成量が左右されると述べている。アミノ酸の種類によつて酸化される速度に差があり、又酸化酵素形成時の lag phase の長さには差異がある原因として補欠分子簇の形成速度に依るのかも知れない。

要 約

塩辛の熟成中の呈味の原因と考えられるアミノ酸が生細胞の内外でどのようにして生合成され、或は代謝

されて行くかという問題特に Braunstein 等が提唱したアミノ酸の酸化的脱アミノとアミノ基転移との系について実際にどのアミノ酸がどの程度この機序で酸化されるかを研究し、併せてアミノ酸酸化酵素系の形成という問題について解析をこころみた。即ち L-aspartic acid, DL-alanine, L-glutamic acid 及び L-proline 等のアミノ酸を基質とすると酸化速度が速く、しかもその基質と接触する事によつて酸化酵素形成量も大である。それ以外のアミノ酸を基質とすると酸化速度が遅く、しかもそれ等の基質と接触する事によつて形成されるアミノ酸酸化酵素量も少ない。

これ等の事より酸化され易いアミノ酸は酸化的脱アミノを受け対応するケト酸が菌体外において作られ、この際エネルギーを獲得し、このエネルギーを利用し、それぞれのケト酸が菌体内に侵入し、菌体内においてアミノ基転移酵素の作用により他のアミノ酸を生成し、酵素蛋白や菌体蛋白の形成に参与しているものであろう。酸化され難いアミノ酸は恐らく L-arginine の場合のようにそのまま遊離の状態を細胞膜を透過し、菌体内において代謝されるものであろうと考察される。

文 献

- 1) 長尾・木村 (1951). 北大水産彙報 1, 81.
- 2) ————— (1953). 同 誌 3, 259.
- 3) ————— (1954). 同 誌 5, 62.
- 4) ————— (1954). 同 誌 5, 68.
- 5) Braunstein, A. E. & Bychkov, S. M. (1939). *Nature* 144, 351.
- 6) 長尾 (1954). 北大水産彙報 5, 55.
- 7) Stumpf, P. K. & Green, D. E. (1944). *J. Biol. Chem.* 153, 387.
- 8) 宇佐美・佐々木・牧野 (1953). 生物科学シムポジウム進化特集号 49.
- 9) 長 尾 (1953). 北大水産彙報 4, 96.
- 10) 宇佐美・金子・仲尾 (1954). 酵素化学シムポジウム 9, 122.
- 11) Wolf, F. F. (1948). *Arch. Biochem.* 16, 103.
- 12) Krebs, H. A. (1935). *Biochem. J.* 29, 1620.
- 13) 長 尾 (1954). 北大水産彙報 5, 68.
- 14) 須田・早石・尾田 (1949). 酵素化学シムポジウム 1, 73.
- 15) 須 田 (1950). 同 誌 4, 11.
- 16) 直野・須田・尾田 (1952). 同 誌 7, 24.
- 17) 直野・須田 (1953). 同 誌 8, 27.
- 18) 須田・直野・井上 (1954). 同 誌 10, 238.
- 19) 直野・須田 (1954). 同 誌 9, 88.
- 20) 八木・奥田 (1954). 同 誌 10, 219.