



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	塩辛の細菌学的研究：第12報 細菌の発育時に培地中に存在するGlucoseがL-アミノ酸酸化酵素形成に及ぼす影響について
Author(s)	長尾, 清; NAGA0, Kiyoshi
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 7(1), 38-42
Issue Date	1956-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22948
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(1)_P38-42.pdf



塩辛の細菌学的研究

第12報 細菌の発育時に培地中に存在する Glucose がL-アミノ酸酸化酵素形成に及ぼす影響について

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"

12. Influence of glucose on the formation of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria during growth

LATE Kiyoshi NAGAO

緒 言

前報¹⁾において塩辛の熟成中の呈味の源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言う問題特に Braunstein 等²⁾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云う問題即ちひいては一般的な蛋白質の生合成の機作の一面について解析をこゝろみた。

本報においては細菌の発育時培地中に存在する glucose 及び pH がL-アミノ酸酸化酵素系形成にどのように影響するかについて実験した結果について報告する。

実 験 方 法

使用菌株、培養法、菌浮遊液の調製法、酸化能の測定方法は前報¹⁾に記載した通りである。

実 験 結 果

1) 細菌の発育時に培地中に存在する glucose が L-アミノ酸酸化酵素系形成に及ぼす影響について

Bac. subtilis, *Bac. subtilis* sp. 及び *Esch. coli* の菌株を2% glucose agar 培地に培養し、これらの菌の浮遊液についてアミノ酸化能を測定した結果を Figs. 1, 2 及び 3 に図示した。即ち *Bac. subtilis* の場合アミノ酸の酸化能は非常に弱まり、しかもアミノ酸酸化酵素の形成も殆んど表われず僅かに DL-alanine 及び L-arginine が基質である場合に少量の酵素形成がみられる。L-lysine 及び L-tyrosine に対しては酸化作用はなかつた。*Bac. subtilis* sp. の場合、DL-alanine, glycine 及び DL-valine に対する酸化能は agar-agar 培地で培養した菌体と同様反応と同時に酸素の消費がみられるがその活性は弱い。L-aspartic acid, L-proline, L-glutamic acid, L-leucine が基質である場合、酵素形成のための lag phase が長くなり、酵素形成量も少ない。L-tyrosine に対して酸化作用はない。*Esch. coli* の場合 L-aspartic acid, DL-alanine, L-glutamic acid 及び L-proline に対する酸化能は agar-agar 培地で培養した菌体では反応と同時に酵素の消費がみられたが、glucose agar 培地で培養した菌体では20~30分の lag phase がみられ酵素形成量も少ない。基質が L-glutamic acid である場合には80分以後酵素の崩壊がみられる。L-tyrosine に対して微弱な酸化作用が反応と同時に起り、L-arginine に対しては約80分の lag phase の後微量ながら酵素が形成

* 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)

されている。

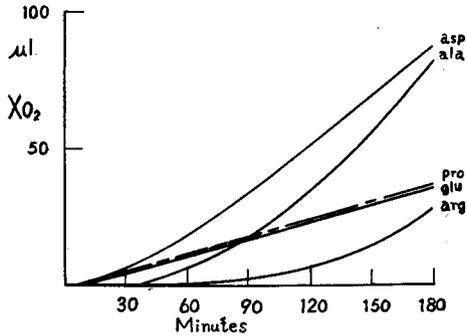


Fig. 1. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* which grown in 2% glucose agar

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 5×10^{-2} M substrate and 1cc of 0.067M phosphate buffer of pH 7.4. 0.3cc alkali in center well. Gas phase, air.

Substrate tipped in from side bulbs of Warburg vessels after temp. equilibration, 30°. Oxygen consumption due to auto-respiration was subtracted.

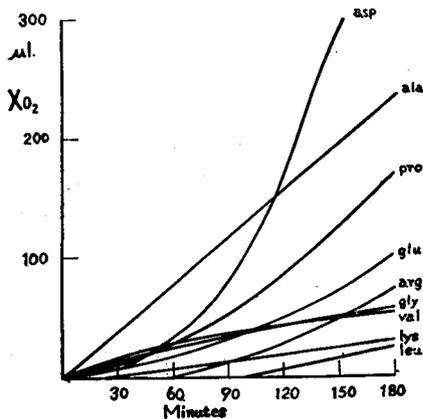


Fig. 2. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp. which grown in 2% glucose agar

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

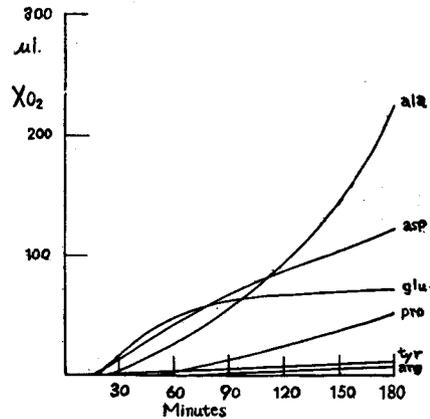


Fig. 3. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Esch. coli* which grown in 2% glucose agar

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

Stephenson & Gale³⁾ は *Esch. coli* の alanine, glycine 及び glutamic acid に対する酸化酵素の形成が発育時に glucose が存在していると、どのような影響を及ぼすかについて研究し、glucose を加えないアミノ酸培地に発育した菌の酵素量は glucose を含む培地で発育した菌の酵素量の約20倍に達する。しかし glucose を加えないアミノ酸培地に発育した菌の浮遊液に glucose を加えてもこの菌のアミノ酸酸化酵素の活性には何等の影響もない。それ故 glucose は細胞内に酵素がつくられてしまった後に作用するものでなく、発育中に起る酵素形成を阻害するものであらうと述べている。*Bac. subtilis* を agar-agar 培地に培養した場合 L-glutamic acid に対する酸化酵素は構成酵素として存在しているが、この菌の浮遊液に 10^{-2} M glucose を加えた場合の L-glutamic acid に対する酸化能をしらべた結果を Fig. 4 に図示した。即ち glucose の存在により L-glutamic acid に対する酸化酵素の活性は減少した。

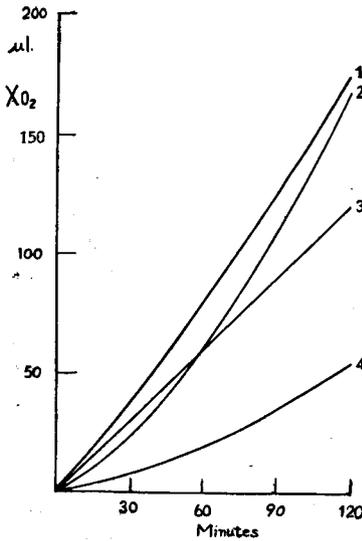


Fig. 4. The effect of addition of glucose to washed suspensions of *Bac. subtilis* on the L-amino acid oxidase activities of the cells
 Curve 1. Glucose + glutamic acid
 Curve 2. No addition of glucose, glutamic acid only.
 Curve 3. Glucose
 Curve 4. Curve 1-Curve 2

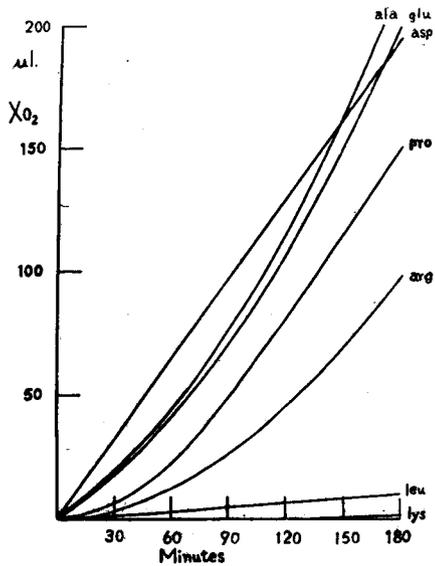


Fig. 5. The velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* which grown in agar-agar adjusted to pH 6.2
 The experimental conditions are the same as in Fig. 1 with the exception of 0.067M phosphate buffer (pH 6.2) used.

2) 細菌の発育時の培地pHの影響

塩辛の熟成時の pH は約 6.2 である。*Bac. subtilis* を 2% glucose agar 培地に培養した後の培地 pH 約 6.2 である。前記の測定はすべて agar-agar 培地 (pH 7.0) に発育した菌の浮遊液について、反応 pH 7.4 で行つた実験である。この pH がかならずしも細菌アミノ酸化酵素の最適 pH であるとは云い得ない。基質の種類及び菌株によつてアミノ酸化に対する最適 pH が異なる可能性も全然排除出来ない。アミノ酸の酸化能の弱い細菌でも pH を変化させれば、或はより強い酸化が起るかも知れない。

Bac. subtilis を agar-agar 培地 (pH 6.2) に培養した菌の浮遊液について反応 pH 6.2 で測定した場合のアミノ酸の酸化能及び酸化酵素形成について実験した結果を Fig. 5 に図示した。即ち培地 pH 7.0、反応 pH 7.4 の場合に比し、やゝ酵素活性及び酵素形成が減少しているに過ぎない。L-arginine に対しては酵素形成のための lag phase がやゝ短縮されているが、生成された酵素の全量には殆んど変らない。一般に L-histidine 等の塩基性アミノ酸に対する細菌の脱アミノ酵素は pH 6.0 附近に最適 pH を有している事が知られているが、著者の実験結果では pH が酸性側になつてもあまり変化がない事を示している。

Bac. subtilis を agar-agar 培地 (pH 7.0) に培養した菌の浮遊液について反応 pH 6.2 で測定した場合のアミノ酸酸化能とアミノ酸酸化酵素系の形成について実験した結果を Fig. 6 に図示した。即ちこの場合も pH 7.0 反応 pH 7.4 の場合に比しやゝ酵素活性及び酵素形成が減少しているに過ぎない。

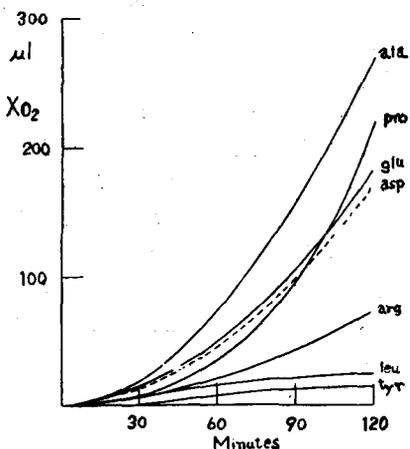


Fig. 6. The velocity of oxidations of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* which grown in agar-agar adjusted to pH 7.0

The experimental conditions are the same as in Fig. 1 with the exception of 0.067M phosphate buffer (pH 6.2) used.

考 察

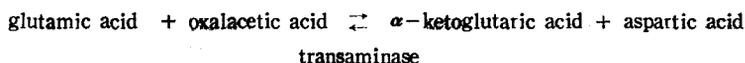
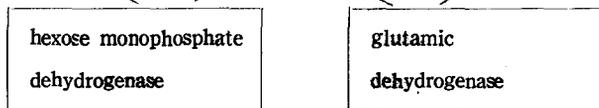
適応酵素の形成は微量の基質の存在下で行われるが、しかし特異基質以外の物質が、酵素の形成または活性に或る役割を演ずることがある。その最も著しい例が培地に醗酵をうける炭水化物が存在する場合である。かかる場合色々な酵素の活性又は形成を阻害する事が知られている。その要因として、

1. 酸の形成とその結果起る培地 pH の変化
2. 嫌気状態を伴うガスの形成
3. 菌塊の著明な増加
4. 発育中や醗酵中の細胞内における一時的な多糖類の形成
5. Protein sparing 作用

等があげられているが、現在の所酵素の形成に対する炭水化物の影響を以上5つの要因と関連させるにはいたっていない。

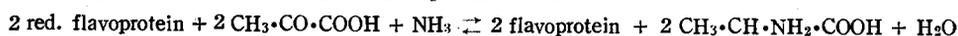
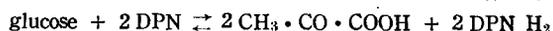
Esch. coli を glucose と galactose の混合物で発育させると構成酵素である glucozymase の形成が適応酵素としての galactozymase の形成を抑制する。これについて Monod は酵素抑制 (enzyme suppression) によるものだと考えている。この抑制の機構については未だ不明な点が多いが、Gale は両酵素は共に或る限られた量の蛋白をその precursor としてもつために構成的な glucozymase がつくられる時にその precursor が消費され、適応的 galactozymase がつくられなくなるだらうと述べている。

著者の実験結果では *Bac. subtilis* の場合 glucose の影響は培地 pH の変化にも影響されるが、これのみによつては説明されない。Aspartic acid, alanine, glutamic acid 及び proline のようなアミノ酸は速かに酸化されて、それぞれのケト酸が菌体外において作られ、それと共に有機磷酸のエステル化を随伴し、エネルギーが遊離される。こゝで生成されたケト酸が菌体内に透入し、菌体内においてアミノ基転移酵素により他のアミノ酸を生成したり、酵素蛋白や菌体蛋白の生成に関与しているだらうと述べたが、glucose が代謝された場合に中間代謝産物として pyruvic acid や oxalacetic acid の様なケト酸の生成が当然考えられるので glucose による酵素活性及び酵素形成量の低下は或る限られた量の蛋白をその precursor としてもつためであるとは考えにくい。むしろ補欠分子簇或は助酵素の行動によつて説明した方が妥当であると考えられる。即ち今糖の代謝、glutamic dehydrogenase 及び transaminase の系を考えた場合



その結果 $\text{glucose-6-phosphate} + \text{oxalacetic acid} + \text{NH}_3 = \text{phosphoglyceric acid} + \text{aspartic acid}$ 最初に glutamic acid がこれに連結している dehydrogenase によつて $\alpha\text{-ketoglutaric acid}$ がつくられ、次に transaminase の存在によつてアミノ基が oxalacetic acid に転移されて aspartic acid がつくられ、そして $\alpha\text{-ketoglutaric acid}$ と glutamic acid とは差引されてしまう。事実 $\alpha\text{-ketoglutaric acid}$ が NH_3 の運搬体として触媒的に作用しており、これは丁度助酵素が水素の運搬体として作用しているものと同じであつて、 $\text{glucose-6-phosphate}$ の酸化によつてこれら3つの酵素と2つの運搬体の助けをかりて oxalacetic acid のアミノ化が行われている系が考えられる。この場合 CoII がどちらの dehydrogenase に使用されるか、両方の dehydrogenase に使用されるなら CoII の量が問題になる。黴や細菌の glucose oxidase はL-アミノ酸酸化酵素と同一の flavin を有する他の flavoprotein であり、*Penicillium notatum* は glucose を酸化して gluconic acid と H_2O_2 を生成する事が知られている。するとL-アミノ酸酸化酵素と glucose oxidase とで flavin を共働する事になり flavin の量が問題になる。

次に flavoprotein と DPN との関連について次の様な系も考えられよう。



以上の点から考察すると glucose によるアミノ酸酸化酵素の活性及び酵素形成に及ぼす影響は補缺分子簇或は助酵素の行動にも起因すると思われる。

要 約

細菌の発育時に培地中に存在する glucose はL-アミノ酸酸化酵素の活性及び酵素形成を阻害する。この要因として糖の存在による酸の形成とその結果起る培地 pH の変化のみによつて glucose による阻害機構は説明出来ない。むしろ酵素の補缺分子簇或は助酵素の行動によつて説明した方が妥当であろうと考察した。

文 献

- 1) 長尾 (1956) 北大水産彙報 7 (1), 31.
- 2) Braunstein, A. E. & Bychkou, S. M. (1939). *Nature* 144, 351.
- 3) Stephenson, M. & Gale, E. F. (1937). *Biochem. J.* 31, 1316.
- 4) Keilin, D. & Hartree, E. F. (1948). *Biochem. J.* 42, 221.