



Title	塩辛の細菌学的研究：第13報 細菌のL-アミノ酸酸化酵素の特異性について
Author(s)	長尾, 清; NAGAO, Kiyoshi
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 7(1), 43-48
Issue Date	1956-05
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/22949">https://hdl.handle.net/2115/22949</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(1)_P43-48.pdf



## 塩辛の細菌学的研究

### 第13報 細菌のL-アミノ酸酸化酵素の特異性について\*

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"

#### 13. On the special characteristics of L-amino acid oxidizing enzymes in the isolated bacteria

LATE Kiyoshi NAGAO

#### 緒 言

L-アミノ酸酸化酵素のアミノ酸の種類に対する特異性については不明な点が多い。光学的異性体に対して特異性を有するL-アミノ酸酸化酵素とD-アミノ酸酸化酵素が知られている。下等生物の代謝生産物或は菌体構成成分としてD系アミノ酸を含んだペプチド或は特種なD-アミノ酸自身が発見されつつあり、これらのうちには強い抗菌性或は毒性を示すものがあるが、このような生理作用は立体配置を異にするアミノ酸を構成成分としている事による分子形態の変化によるものと考えられるが、D-アミノ酸自体の生理作用については未だ明らかになつていない。それ故にD-アミノ酸酸化酵素の生理的意義は不明であるが、D-アミノ酸分子はD-アミノ酸酸化酵素の作用により相当するケト酸に変形され、次にアミノ基転移によつてL-アミノ酸に変形する機会を待つてゐるものであらう。然し動物組織或は微生物のD-アミノ酸酸化酵素もL-アミノ酸酸化酵素もアミノ酸の種類によつて酸化する速度が異なるのに、これが同一のD-アミノ酸酸化酵素或はL-アミノ酸酸化酵素によるものか、基質に対して特異性を有する数種の酸化酵素の混合によるものか明らかになつていない。それで Krebs は一応次の様に分類している<sup>1)</sup>。

- 1) General D-amino acid oxidases
  1. Mammalian D-amino acid oxidase
  2. D-amino acid oxidases of molds
  3. Bacterial D-amino acid oxidases
- 2) General L-amino acid oxidases
  1. Mammalian L-amino acid oxidases
  2. Ophio-L-amino acid oxidases
  3. L-amino acid oxidases
  4. Bacterial L-amino acid oxidases
- 3) Specific amino oxidases
  1. Specific D-amino acid oxidases (aspartic acid)
  2. Specific L-amino acid oxidases (glutamic acid, cysteine, proline and hydroxyproline, phenylalanine and tyrosine, histidine)
  3. Specific  $\alpha$ -amino acid oxidases (glycine, ornithine, and lysine)

\* 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)

Stumpf & Green<sup>2)</sup> は “L-amino acid oxidase of *Proteus vulgaris*” という名で呼んで特に区別しているが、この酵素の酸化能は菌浮遊液では21種のアミノ酸を酸化するが、この菌から得られた cell free 標品では11種のアミノ酸を酸化するに過ぎない。この中 norleucine が最も強く酸化され、次いで phenylalanine, leucine, tryptophane, methionine, tyrosine, norvaline, histidine, arginine, isoleucine,  $\alpha$ -aminobutyric acid の順で活性は弱くなる。菌浮遊液では glycine, serine 及び proline に対する酸化酵素が最も不安定で、次に alanine, valine, aspartic acid 及び glutamic acid に対する酸化酵素がやゝ安定であるが、0°で1週間及び33°で24時間放置した菌浮遊液で酸化されるアミノ酸は cell free 標品が酸化し得るアミノ酸と一致する。これらの事実より Green 等は *Proteus vulgaris* の菌浮遊液には数種のアミノ酸酸化酵素が混在しているであろうと述べている。

本報においては *Bac. subtilis* sp. の菌浮遊液の各種アミノ酸の酸化能に対する酵素阻害剤の影響、食塩の影響、食塩に対する適応性及び酵素の安定度を比較し、これら菌浮遊液には基質に対する特異性を有する数種の酸化酵素があるか否か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た *Bac. subtilis* sp. の菌株。
2. 菌浮遊液調製法 前報に記載した通りである。
3. 酸化能の測定法 前報に記載した通りである。但し酵素阻害剤を用いる場合には0.067M 磷酸 buffer 液 (pH 7.4) 0.5cc,  $5 \times 10^{-2}$ M アミノ酸 0.5cc, 阻害剤 0.5cc, KOH 0.3cc, gas phase 空気, 反応温度 30°, 菌浮遊液 1 cc.

### 実 験 結 果

#### 1) 阻害剤の影響

一般に酵素に対する阻害剤の行動には次の様な場合がある。

1. 酵素の補欠分子簇と阻害剤とを初めに結合させる。
2. -SH基, -OH基或は -COOH基等の必須の反応性側鎖を破壊し若くは結合させる。
3. Spatial configuration の変化即ち蛋白分子の立体構造の変化で所謂変性。
4. 基質と構造類似の物質と酵素の active center を結合させ、基質に対する酵素作用を阻害させる。
5. 酸化的磷酸エステル化の阻害。

等があげられる。これ等の各項目に対する阻害剤の行動がわかれば酵素の異同を区別する事が出来るが、現在は不明な点が多いので、一応酸化酵素及び酸化的磷酸エステル化の阻害剤と言われる methylene blue, azide, sodium dehydroacetate, 2,4-dinitrophenol, KCN, crystal violet, caprylic alcohol 及び tenzoic acid に対する挙動よりアミノ酸酸化酵素の特異性の問題について解析しようとした。

実験結果を Table 1 に表示した。尚酸素吸収量は反応後最初の20分間に消費する酸素の量を測定したものである。Caprylic alcohol の飽和溶液中ではいずれの基質に対しても完全に酵素活性は阻害された。終末濃度  $10^{-2}$ M の benzoic acid でもいずれの基質に対しても酵素活性は完全に阻害された。

#### 2) 食塩による影響及び食塩に対する適応性

著者は前に *Bac. subtilis* の glutamic dehydrogenase 活性に対する食塩の影響及び食塩に対する適応性について報告した。即ち普通 agar-agar 培地 (食塩無添加) に発育した菌体の浮遊液では基質溶液中に食塩が存在すると酵素作用は阻害される。この同じ菌浮遊液を食塩を加えた基質に30°, 3時間接触させても、基質溶液中に食塩が存在すると methylene blue は還元されない。食塩含有の培地で発育した菌の酵素活性は食塩を含まない普通 agar-agar 培地に発育した菌の酵素活性より弱い。食塩含有の培地で発育した菌の浮遊液でも反応系中に食塩が存在すると酵素活性は表われなかつた。

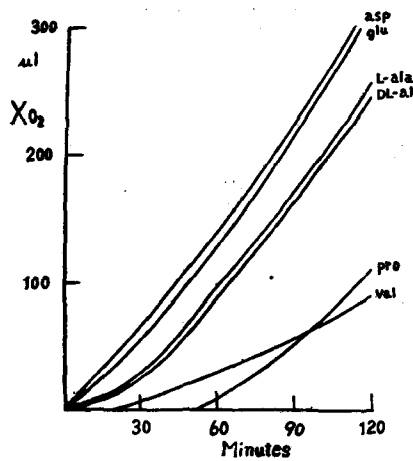


Fig. 1 Effects of the presence of sodium chloride during growth on the activities of L-amino acid oxidases

The velocity of oxidation was measured manometrically as usual. Each manometric cup contained 1cc of bacterial suspensions (2mg dry weight/cc), 0.5cc of  $5 \times 10^{-2}M$  substrate and 1cc of 0.067 M phosphate buffer of pH7.4. 0.3cc of alkali medium contained 10% sodium chloride.

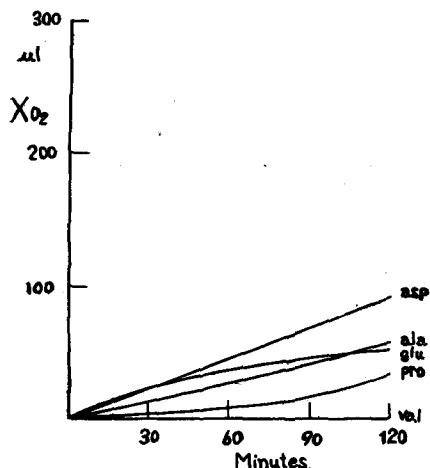


Fig. 2 Effects of the presence of 5% sodium chloride in the reaction system on the velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp. which grown in agar-agar

こゝでは *Bac. subtilis* sp. の各種アミノ酸酸化能に対する食塩の影響及び食塩に対する適応性について Warburg 検圧計で定量的に測定した。食塩を含む培地で培養した場合と普通 agar-agar 培地で培養した場合のアミノ酸酸化酵素の活性を比較するために、10% NaCl を含む培地で培養した菌体の酵素活性を測定した結果を Fig. 1 に図示した。即ち L-aspartic acid 及び L-glutamic acid に対する酸化能は普通 agar-agar 培地で発育した菌体に比しあまり変化がないが酸化酵素系形成は少し阻害されている。Alanine に対する酸化能は前二者に比し阻害度大であるが生成された酵素の全量はあまり変化ない。L-proline 及び DL-valine に対しては約50分及び20分の lag phase 後酵素が形成されている。特に proline に対する酸化酵素の形成量は非常に少くなっている。普通 agar-agar 培地で培養した菌の浮遊液で基質中に 5% NaCl を含有させた場合の酸化能及びアミノ酸酸化酵素系の形成を測定した結果を Fig. 2 に図示した。即ちいずれの基質に対しても反応液中に 5% NaCl を含有すれば酵素活性及び酵素系形成は著明に阻害された。

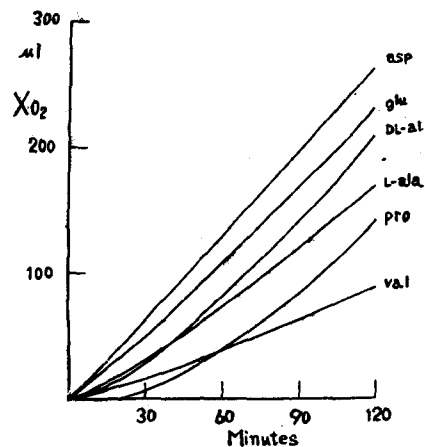


Fig. 3 Effects of the presence of 5% sodium chloride in the reaction system on the velocity of oxidation of amino acids by cell suspensions of *Bac. subtilis* sp. which grown in agar-agar contained 10 per cent of sodium chloride

次に10%NaClを含む agar-agar 培地で培養した菌体で基質中に7%及び10%NaClを含有させた場合は酵素活性は非常に阻害された。更に高濃度の NaCl を含有する培地に発育した菌体でも反応系中に7%以上のNaClが存在すると酵素活性及び酵素形成は著しく阻害された。

### 3) 酵素の安定度

*Bac. subtilis* sp. の菌浮遊液を5°で12時間,30°で2, 4及び6時間放置した場合の安定度を測定した結果をTable 2に表示した。酵素の安定度は菌浮遊液を調製した時直ちに酵素活性を測定し反応後60分に消費する酸素の総量を100とした場合の酵素活性減少を%で表わした。

Table 1. Effect of various reagents on activity of enzyme

Reagent	Final concent.	Inhibition per cent					
		Auto- resp.	Glutamic acid	Aspartic acid	Alanine	Proline	Glycine
Methylene blue	10 <sup>-2</sup> M	74	94	100	94	92	—
	10 <sup>-3</sup> M	51	82	86	76	—	—
	10 <sup>-4</sup> M	31	56	77	47	—	—
Azide	10 <sup>-2</sup> M	68	80	95	84	31	—
	10 <sup>-3</sup> M	10	34	35	30	stimu.	—
	10 <sup>-4</sup> M	stimu.	12	33	10	—	—
Sodium dehydro- acetate	10 <sup>-2</sup> M	70	92	92	87	100	—
	10 <sup>-3</sup> M	66	80	95	—	—	—
	10 <sup>-4</sup> M	27	56	41	45	—	—
2,4-dinitrophenol	10 <sup>-3</sup> M	stimu.	74	100	91	stimu.	50
	10 <sup>-4</sup> M	stimu.	stimu.	—	stimu.	stimu.	46
	10 <sup>-5</sup> M	stimu.	stimu.	15	stimu.	stimu.	43
KCN	10 <sup>-3</sup> M	13	100	90	96	38	100
	10 <sup>-4</sup> M	0	stimu.	29	stimu.	stimu.	35
	10 <sup>-5</sup> M	0	stimu.	stimu.	stimu.	stimu.	5
Crystal violet	10 <sup>-4</sup> M	100	100	91	100	100	100
	10 <sup>-5</sup> M	84	93	46	60	100	56
	10 <sup>-6</sup> M	6	stimu.	0	stimu.	100	30

Table 2. Lost per cent of its activity on stored cell suspensions

substrate	12 hours at 5°C	2 hours at 30°C	4 hours	6 hours
L-aspartic acid	98	36	100	100
L-glutamic acid	71	40	41	71
DL-alanine	80	48	75	100
L-proline	50	0	54	100
L-leucine	—	50	90	100
L-arginine	33	0	0	—

## 考 察

呼吸においては、2, 4-dinitrophenol をはじめとする数種の phenol 置換体,  $\text{NaN}_3$ , methylene blue その他の色素類, グラミチンやオーレオマイシンなどの抗生物質, ウスニン酸の如き地衣成分などが mitochondria の呼吸作用を阻害しない濃度で oxidative phosphorylation を阻害することが報告されている。この機構については不明であつたが, Loomis & Lipmann<sup>8)</sup>, Cross, Taggart, Covo & Green<sup>9)</sup> 等が 2, 4-dinitrophenol は酸化了的磷酸エステル化に対する典型的な“uncoupling agent”である事を発見し, 次第にこの機構が明らかになつて来た。即ち 2, 4-dinitrophenol は呼吸を阻害しないで adenosine triphosphate (ATP) の生成を阻害するというのである。所が 2, 4-dinitrophenol は呼吸を阻害しないのみでなく, 或る濃度範囲ではかえつて呼吸を促進する作用があるので, この呼吸促進機構については又不明になつた。最近になつて Potter & Recknagel<sup>5)</sup>, Lardy & Wellman<sup>6)</sup> 等は弱い ATPase 活性を有する肝臓 mitochondria を注意深く調製し, この mitochondria は phosphate-acceptor 系が存在しないと呼吸は弱いが, phosphate-acceptor 系或は dinitrophenol を加えると著しく呼吸作用が増大すると述べている。

著者の実験結果でも  $10^{-3}\text{M} \sim 10^{-5}\text{M}$  の濃度範囲で呼吸は促進されるが,  $10^{-3}\text{M}$  濃度で glutamic acid, aspartic acid 及び alanine に対する酸化が強く阻害された。即ち有機磷酸エステルがこの酵素作用及び  $10^{-3}\text{M}$  濃度で酸化が促進されているが恐らくもう少し高濃度では阻害されると思われる。

Azide の作用については, Spiegelman<sup>8)</sup>-<sup>11)</sup>等によつて, このものが低濃度 ( $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$ ) で解糖を阻害せず, 無機磷酸のエステル化のみを著しく阻害することが報告されている。著者の実験結果では  $10^{-2}\text{M}$  及び  $10^{-3}\text{M}$  濃度で呼吸作用は 68% 及び 10% 阻害されるが,  $10^{-4}\text{M}$  では呼吸作用は促進されている。Glutamic acid, aspartic acid 及び alanine に対する酸化は  $10^{-2}\text{M}$  濃度で強く阻害されている。

Crystal violet の作用様式について, Gale<sup>12)</sup> は Gram 陽性菌における glutamic acid の細胞膜透過や細胞内代謝の様な“energy-linked”な過程の crystal violet による阻害が 2, 4-dinitrophenol や azide による阻害と全く同一の様式で行なわれる事を発見している。著者の実験結果では  $10^{-4}\text{M}$  の様な低濃度においてすら呼吸作用も各アミノ酸に対する酸化作用も共に強く阻害された。

Dehydroacetic acid は微生物の生育を強く阻害する事が知られているが, Table 1 に示したように呼吸作用もアミノ酸酸化酵素の活性をも強く阻害する。

Methylene blue は dehydroacetic acid とほぼ同程度に呼吸作用も, アミノ酸酸化酵素の活性を阻害する。CN に対しても  $10^{-3}\text{M}$  濃度でアミノ酸酸化酵素は強く阻害された。

以上の諸実験は菌浮遊液による実験であるので之等阻害剤に対する影響も複合酵素系に対する挙動であり之等の実験から L-アミノ酸酸化酵素の基質に対する特異性について明確な区別をなし得なかつた。

細菌によるアミノ酸の酸化は基質であるアミノ酸が高濃度の食塩溶液中にある時は, 普通細菌である時は勿論, 耐塩性細菌による場合もその作用は微弱であり, 又アミノ酸酸化酵素の形成も著しく阻害される。

著者は前に報告した様に *Bac. subtilis* の蛋白質分解酵素は食塩に対して適応し, 高濃度の食塩を含有する基質に対しても活性が大である。塩辛の熟成中 monoamino-N 量は塩辛調製後 12 日位まで対数的に増加し 12 日より 20 日目位まで殆んど一定, 20 日目以後又増加している。塩辛の熟成中における細菌数は 16~19 日位迄細菌の増殖が緩慢でありあまり増加しないが 19 日以後増殖速度は急激に増大し, 調製後 26 日位にて生存する細菌数は最大となる事を報告した。そうすると 20 日以後に増加する monoamino 酸は耐塩細菌によつて酸化的脱アミノを受け消失する事が少く, むしろこの時期から細菌の蛋白質分解酵素によつて生成されるアミノ酸が増加しているものであろう。

然しながら著者は食塩に対する影響からもアミノ酸酸化酵素の基質に対する特異性を明確に区別し得なかつた。

又 L-アミノ酸酸化酵素の安定度からは Green 等の実験の様にかなり基質に対して安定度を異にする事が

わかり、恐らく数種の基質に対して特異性を有する酵素の混合されている事が推定出来る。

#### 要 約

- 1) 2, 4-dinitrophenol の $10^{-3}M \sim 10^{-5}M$  の濃度範囲で呼吸は促進されるが、 $10^{-3}M$  濃度でアミノ酸酸化酵素は強く阻害される。即ち有機磷酸エステルがこの酵素作用及び酵素系形成に重要な役割を演じている事を示している。Azide では $10^{-2}M$  濃度で酸化能は強く阻害される。Crystal violet では $10^{-4}M$  のような低濃度においてすら呼吸作用もアミノ酸に対する酸化作用も共に阻害される。Dehydroacetic acid によつて呼吸作用もアミノ酸酸化作用も強く阻害される。Methylene blue, CN でも強く阻害される。以上の諸結果は複合酵素系に対する挙動であり、基質に対する特異性について明確な区別をなし得なかつた。
- 2) 細菌によるアミノ酸の酸化は基質であるアミノ酸が高濃度の食塩溶液中にある時は酸化酵素能も酵素形成も著しく阻害される。
- 3) L-アミノ酸酸化酵素の安定度からは Green 等の実験結果のようにならかなり基質に対して安定度を異にする恐らく基質に対して特異性を有する酵素が混合されている事が推定出来る。

#### 文 献

- 1) Krebs, H. A. (1951). *Oxidation of amino acid*. The enzymes, 2 (1), 499 Sumner, J. B. & Myrback, K., Academic Press Inc. N. Y.
- 2) Stumpf, P. K. & Green, D. E. (1944). *J. Biol. Chem.* 153, 387.
- 3) Loomis, W. F. & Lipmann, F. (1949). *Ibid.* 179, 503.
- 4) Cross, R. T., Taggart, J. V., Covo, G. A. & Green, D. E. (1949). *Ibid.* 177, 655.
- 5) Potter, V. R. & Recknagel, R. O. (1951). *The regulation of the rate of oxidation in rat liver mitochondria*. Phosphorus Metabolism, 1, 377, Willam, D. M. & Bentley, G., The Johns Hopkins press, Baltimore.
- 6) Lardy, H. A. & Wellman, H. (1952). *J. Biol. Chem.* 195, 215.
- 7) ————— & ————— (1953). *Ibid.* 201, 357.
- 8) Spiegelman, S. (1947). *J. Cellular Comp. Physiol.* 30, 315.
- 9) ————— & Reiner, J. M. (1947). *Ibid.* 30, 347.
- 10) ————— & Kamen, M. B. & Sussman, M. (1948). *Arch. Biochem.* 18, 409.
- 11) ————— & (1949). *Cold Spring Harbor Symp. Quan. Biol.* 11, 34.
- 12) Gale, E. F. (1941). *Biochem. J.* 48, 286.