HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	鳥型結核菌のendogenous dehydrogenationについて
Author(s)	山下, テイ子(リッシンベンに貞); 佐藤, 孝治
Description	
Citation	結核の研究, 11, 24-27
Issue Date	1959-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26674
Type	departmental bulletin paper
File Information	11_P24-27.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

鳥型結核菌の endogenous dehydrogenation について

山下慎子・佐藤孝治
（北海道大学結核研究所細菌部　主任　大原　達教授）

（昭和 34 年 6 月 15 日受付）

結核菌は一般に高い内部呼吸を有し，しかも長時間にわたつてこれを持続する。すなわち，菌株や培養条件によつて高さは種々ではあるが，その Q_{O_2} は 2～20，時にはそれ以上にも及び，基質を添加した場合の Q_{O_2} と比較してその値は多くの場合無視することができない。

またその持続時間は蒸溜水中，37°C で数時間以上，燐酸緩衝液中では 3～4 日後も殆ど低下せず，実験中完全な休止菌を得ることは甚だ困難である。

このような内部呼吸は結核菌の有する特性の 1 つと考えられる。しかし現在迄のこの方面での研究は諸条件（酸素分圧，阻害剤その他の添加等）の内部呼吸に及ぼす影響に関するものが大部分であつて，内部呼吸酵素及びその基質については未だ臆測の域を出ない状態である。

著者はこの点について研究を進めて行くことによつて，この特異的な内部呼吸の結核菌における意義を明らかにし，結核菌の特性の一端をうかがい知ることが出来るのではないかと考えて実験を始めた。実験の最初の段階において，生物学的な複雑さを幾分でも少なくしようとしてアセトン乾燥菌よりの抽出液を粗酵素液として使用したところ，酸素吸収をともなわない endogenous dehydrogenation がかなり強く存在することを知つた。これが量的に内部呼吸の全体に対応するのか，或いはその 1 部分にのみ対応するのかは不明であるが，この endogenous dehydrogenation について予備実験的な 2，3 の観察をしたのでその結果を報告する。

実験材料及び実験方法

実験材料：鳥型結核菌竹尾株（当研究所保存のもの），Sauton 培地に 37°C で通常 4～5 日培養した菌膜より懸濁液，粗酵素液を作つて実験に使用した。

実験方法：

1．粗酵素液の調製——acetone 乾燥菌を石英砂と共に磨砕，M/50 燐酸緩衝液（pH 7.2）を加えて氷室中で 24～40 時間抽出し，遠沈した上清（12,000 r.p.m.，20 min.）をセロファン嚢に入れ，氷室で 1 晩脱イオン水で透析，その内液を粗酵素液とした。

2．粗酵素液の硫酸アンモニア分画——上記の方法で粗酵素液を調製する時，透析する前に適当な飽和度の硫酸アンモニアで沈澱させ，遠沈した沈渣を脱イオン水で透析して用いた。

3．基質——1．における透析外液を加熱濃縮したもの。アンバーライト IR 120 で free のアミノ酸を除去し，アルコール，次いでエーテルで沈澱する部分を乾固してこれを基質とした。

4．Paperchromatography による基質の分画——濾紙は東洋濾紙の No. 50，ブタノール・醋酸・水（9：1：7）を展開液として 37°C で展開，発色剤には Aniline phtharate を使用，110°C で発色させた。

5．脱水素酵素活性の測定——Thunberg 法を用いた。水素受容体には 2.6-dichlorophenol indophenol を使用し 37°C で反応させて脱色時間を測定した。

6．内部呼吸の測定——Warburg 検圧計によつて酸素消費量を測定，Q_{O_2} であらわした。

実験成績

先ず基質を精製し，それが何であるかを知る為に，加熱或いは有機溶媒による分画を行い，その酵素活性に及ぼす影響を Thunberg 法によつて観察した。結果は第 1 表に示す通りである。すなわちこの基質は熱に安定な物質で，アルコール，エーテルには不溶性，アセトンによる透析内液，外液が共に effective であるところから，単一物質ではなく，2 種類又はそれ以上の有効成分があると考えられる。これ等の結果から，以後の実験では透析外液を加熱濃縮し，アルコール，次いでエーテルで透析，内液を乾固して得られた白色粉末を使用することにした。

加熱濃縮の際の状態からこの基質中には相当量の糖類を含んでいると思われたが，Bertrand 法によれば還元糖の存在は微量であり，ヨード反応もごく僅かしか見ら

表 1 基質に施された各種の処理と脱水素酵素の活性

反応液の組成：粗酵素液，0.3 m*l*；基質（各種処理後，脱イオン水で抽出時の5倍の濃度にしたもの），0.2 m*l*；燐酸緩衝液（M/50, pH 7.2），0.5 m*l*；2.6-dichloro-Phenolindophenol（M/250），0.2 m*l*；脱イオン水で全量を 2.0 m*l* とする。

基　質	脱色時間（min.）
——	187
透析外液	
室温で濃縮	36
約 100°C で濃縮	44
アルコール透析内液	40
〃　〃 外液	200<
エーテル透析内液	40
〃　〃 外液	200<
アセトン透析内液	38
〃　〃 外液	41

れなかつた。

またこの液のニンヒドリン反応は可成強度の陽性を示したが，アンバーライト IR 120 による処理後，ニンヒドリン反応が陰性になつた液を用いても脱水素酵素の反応に変化は認められなかつた。

上記のように，熱に対する安定性から見て，FAD, DPN 等の助酵素の effect は考えられないと思われたが，粗製の FAD, DPN を用いて之をたしかめた。FAD は北大理学部植物学教室から分与されたもの，DPN はパン酵母から硝酸銀塩として沈澱させたもの[1]である。結果を図 1，表 2 に示す。図 1 から見て，基質液中に 260 mμ に吸収をもつ物質が存在することは明らかであるが，粗 DPN との比較で見られるように，それが基質としての重要な部分とは考えられない。猶基質液で 340 mμ における DPNH に特有な吸収は全く見られなかつた。

次にこの基質液を 1 次元 Paperchromatograhy によつて展開させると，Aniline phtharate によつて発色する数個の spot が得られ，原点に残る相当量の物質も発色する。この各 spot の部分を別々に脱イオン水で抽出し，これを基質として用いると，原点に残る部分を含めて 5 つの部位に effect が見られた。基質液を 1N 硫酸で数時間，沸騰水中で加水分解後同様の実験を行えば，原点部分の発色，脱水素反応は共に認められなくなる。

この effective な各部位がどのような物質であるかは未だ不明であるが，Rf 値から見て対照にとつた数種の糖等の中，Raffinose, Inositol に対応するのではないか

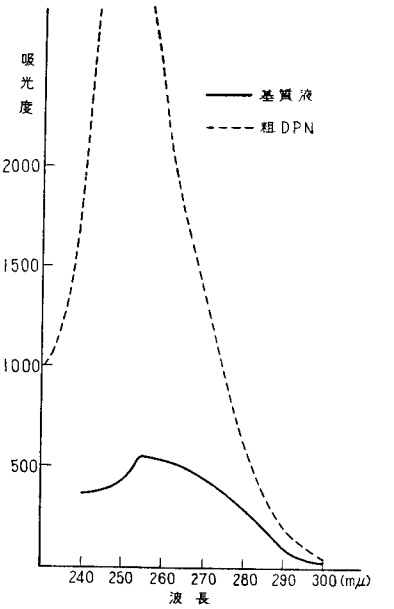

図 1 基質液と粗 DPN の吸収スペクトル

表 2 脱水素酵素の活性に及ぼす粗 FAD, 粗 DPN と基質の effect

（反応液の組成は表 1 と同じ）

	対照	基質液	DPN	FAD
吸光度（260 mμ）		530	∞	
脱色時間（min）	250<	40	77	250<

と思われる部分があるので，これ等を含めて数種の糖の基質としての effect をしらべてみた（表 4）。すなわち，

表 3 脱水素酵素活性に対する数種の糖の effect

（反応液組成は表 1 と同じ）

基　質	脱色時間（min）
——	240<
Glucose	240<
Mannose	240<
Inositol	80
Raffinose	110
Dextrin	40
基質液	23

この粗酵素液は Inositol, Reffinose に弱い effect が見られるが，Glucose, Mannose には effect なく，また Dextrin でかなり強い酵素活性が見られた。但し，後に

述べるような酵素液の硫安分画を用いた時には，Inositol, Raffinose の effect は更に低下するようであつた。

次に粗酵素液の硫酸アンモニア分画を行つて活性の存在部分をしらべたところ，硫安 50% 飽和以下では全く活性が見られなかつた。50% 飽和以上の各分画における脱水素酵素活性は次のようであつた（表 4）。但しこれは粗酵素液の硫安 45% 飽和液での上清を更に各飽和度の硫安で沈澱させたものである。基質液に粗 DPN を加えることによつて酵素活性の高まるのが見られた。粗 DPN のみを添加しても色素の脱色時間を全然短縮出来ないことから，この DPN が基質として用いられているのではないと考えられる。

表 4 粗酵素液の硫安分画と脱水素酵素の活性

脱色時間 (min) ＼ 添加 ＼ 酵素液	50% 飽和	60%	70%	80%*	90%*	100%**
——	260<	260<	260<	180<	180<	180<
粗 DPN	260<	260<	260<	180<	180<	180<
基質液	90	40	22	20	—	54
基質液 粗 DPN	35	24	14	18	22	34

*, **：粗酵素液は 50～70% 飽和のものとは違う。現在のところ，粗酵素液の活性は調製の度毎に異り（菌自体にも 10～20% の差はあるが，磨砕の程度を量的にたしかめる方法がない），之を一定にすることはむつかしい。

更に上記の基質液の生細胞における effect をみるために，生細胞を飢餓操作後基質液を加えて酸素吸収を検圧法，及び Thunberg 法でしらべた（表 5）。Thunberg 法による脱色時間は基質液を加えないもので 70 分，加えた場合は 25 分であつた。

表 5 内部呼吸に及ぼす基質液の effect

反応液の組成：菌懸濁液，0.3 m*l* (Sauton 5 日培養のもの)；基質，0.2 m*l*；燐酸緩衝液 (M/50, pH 7.2)，0.5 m*l*；脱イオン水で全量を 2.8 m*l* にする。

菌液	添加	Q_{O_2}
fresh	——	13.7
脱イオン水に懸濁 incubation (37°C. 6 hrs)	——	5.2
	基質液	17.0
	glycerin	9.3

考擦並に結語

微生物の内部呼吸についての研究はこれ迄あまり多く見られず，しかもその多くは内部呼吸に及ぼす基質，阻害剤添加，酸素分圧の変化等の影響に関するものである。すなわち Moses & Syrett[2] は Chlorella vulgaris, Baker's yeast 等を用いて，内部呼吸によつて排出される炭酸ガス量が生物の種類，添加基質の種類によつて阻害から促進にいたる様々な影響を受けることを見て居り，Blumenthal 等[3]，Reiner 等[4]も Penicillium, Yeast から同様の結果を得ている。内部呼吸の基質は勿論生物によつて異なつているであろう。Yeast について Stier 等[5]や Spiegelman 等[6]は Polysaccharide であるとしたが，Reiner 等[4]は Yeast の endogenous metabolic CO_2 がその脂質部分に由来することをたしかめているし，更に沢井[7]は酵母の一種，Mycotorula japonica ではウレタンによつて阻害される部分と，NaF によつて阻害される部分のあることを見ている。又 Dawes & Holms[8] は Sarcina lutea においては細胞内部におけるアミノ酸プールが主要な基質であると云い，高橋[9]は糸状菌 Rhizopus G. 34 の内部呼吸基質は核酸に近縁な物質であろうと述べている。結核菌における内部呼吸基質が何であるかについては未だ全く知られていないが，透析外液中にあること，frec のアミノ酸を除去した後も effective であることから，アミノ酸，ペプタイド，蛋白質等ではないと考えられる。結核菌体内に多量に有する脂質，脂肪酸よりも糖類の可能性が大きいと考えたのは主としてその精製過程における観察に基くものである。山村等[10]は鳥型菌のアセトン乾燥菌を磨砕，抽出液中に脂肪酸脱水素酵素の活性を見ているが，著者の使用している粗酵素液では脂肪酸は基質にはなり得なかつた。しかしこの点については更に検討中である。表 3 に選んだ糖類は，結核菌体成分として見出されているものの 1 部であるが，結核菌体中の糖は大部分複雑な化合物を作つていると云われ

て居り，単一物質について検討しただけでは Glucose, Mannose 等が基質ではないと断定することは出来ない。殊に Dextrin が可成の effect を有する点から見て，又，現在使用している粗酵素液の段階では，脱水素酵素以外の多くの酵素も混在しているであろうことを考える時，糖の燐酸エステルや比較的低分子の多糖類について実験を進めて行く必要があると考えられる。

図 1，表 2 に示した実験結果から見て，FAD，DPN 等の助酵素が透析外液（基質液）中で重要な役割を果しているとは考えられない。しかしその他の熱に安定な物質が混在して助酵素として作用しているかも知れない。又，表 4 の結果は粗 DPN に混在する物質が基質として作用しているのではなくて，助酵素として作用を促進しているのであろうと思われる点から，或いは酵素液中に透析によつては失われず硫安沈澱によつて酵素蛋白から離れる，いわば bound DPN の様な物質が存在して何等かの役割を演じていることも考えられる。基質液，酵素液の精製を進めて酵素作用を追求して行く段階迄残される問題の 1 つであろう。

更に，内部呼吸の問題を追求するのに，脱水素反応の段階から実験を始めた点にも問題は残されている。Dawes & Holms[8] も述べているように内部呼吸と色素の還元とは必ずしも全面的に対応するものではないかも知れない。この意味においては，表 5 に示した実験は，唯 endogenous dehydrogenation の基質が exogenous にも利用されるものであることを示しているに過ぎず，飢餓操作前後における基質量の変化の測定，同位元素使用による基質の行方の検討等多くの実験が必要であろう。又アセトン乾燥によつて活性の失われる脱水素酵素の存在も考えられるので，生菌の磨砕，或いは他の適当な処理による酵素液との比較も考慮している。

以上未だ全く予備実験の域を出ないが，鳥型結核菌の内部呼吸と少なくとも部分的に対応する endogenous dehydrogenation が単一の酵素反応ではなく，数種の物質を基質とすること，Inositol, Raffinose, Dextrin が夫々基質になり得ること等を知り，今後の実験の方向について検討した。

総　括

1. 鳥型結核菌竹尾株のアセトン乾燥菌より endogenous dehydrogenation の基質液及び酵素液を得た。

2. 基質は数種の糖或いはその化合物と思われる。

3. 酵素活性は硫安 50% 飽和以上で沈澱する部分にのみ見られる。

引用文献

1) D. E. Green et al.: Biochem. J., 31, 2327, (1937).
2) V. Moses & P. J. Syrett: J. Bact., 70-2, 201, (1955).
3) H. J. Blumenthal, H. Koffler & E. P. Goldschmidt: Science, 116, No. 3018, 475, (1952).
4) J.M. Reiner, H. Gest & M.D. Kamen: Arch. Biochem., 20, 175, (1949).
5) T.J.B. Stier & J.N. Stannard: J. Gen. Physiol., 19, 461, (1936).
6) S. Spiegelman & M. Nozawa: Arch. Biochem., 6, 303, (1945).
7) 沢井輝男：植物学雑誌，66, 775, (1953).
8) E.A. Dawes & W.H. Holms: Biochim. Biophys. Acta, 30, 278, (1958).
9) 高橋　甫：醗酵協会誌，9, 14, (1951).
10) 山村雄一，今津史郎：医療，3(9), 15, (1949).