

納豆菌によるアミノ転移について (第2報)

柿本大壱・金沢昭夫

Study on the Transamination in Bac. Natto No. 8. (II)

Daiichi KAKIMOTO and Akio KANAZAWA

著者等は Bac. Natto No. 8 がアミノ転移を行うか否かについての予備的研究として此の菌を繁殖せしめた培養基中のアミノ酸の消長を濾紙クロマトグラフィーによつて試験しその結果過去の研究者が発表しているアミノ転移と同様な現象が認められたことを報告した⁽¹⁾ (第1報). 然し乍ら此の様な方法では生活している細菌細胞が営む他の色々な代謝も同時に行われ, その結果培養基中の或る成分からアミノ酸が合成されたり, 基質中の成分が分解されたりすることも予想しなければならぬのでアミノ転移の観察方法としては聊か不完全である. 著者等は以上の理由から更に Bac. Natto No. 8 がアミノ転移を行つているか否かを明かにするため培養基を Cell-free にした粗酵素液を作り此の粗液について第1報と同様な方法で培養基中のアミノ酸の変化を検べると共にアミノ転移に関与すると思われるケト酸類についても検索を行つた. アミノ転移に関するこれまでの研究では多くの場合或る組織又は細胞中のアミノ転移酵素を分離し, それに助酵素, ケト酸及びアミノ酸を加えて転移が行われるか否かを生成物の変化から観察している. 之に対し著者等の方法では出来るだけ生体内の反応をそのままの状態を観察するように工夫した. 即ちアミノ転移が生体内反応であるならば細菌が或る基質中で繁殖する場合に当然アミノ転移に必要な基質例えばケト酸, 助酵素を自ら生産しなければならない. そこで Bac. Natto No. 8 がマーサン氏培養液の如き人工培地で繁殖しアミノ酸代謝を行うにあたり培養液中のアスパラギンが如何なる変化をするかに就て実験を進める一方, ケト酸の二次的生産を予想しつつ実験したが, 果してアミノ転移に該当するケト酸の検出に成功し且つ第1報にある如くアスパラギン酸 \rightleftharpoons アラニン, アラニン \rightleftharpoons グルタミン酸, アスパラギン酸 \rightleftharpoons グルタミン酸の転移を認めここに始めて Bac. Natto No. 8 によるアミノ転移の現象をほぼ明確にすることが出来たのでその成果を報告する次第である.

実 験 の 部

実験 I 粗酵素液によるアミノ転移

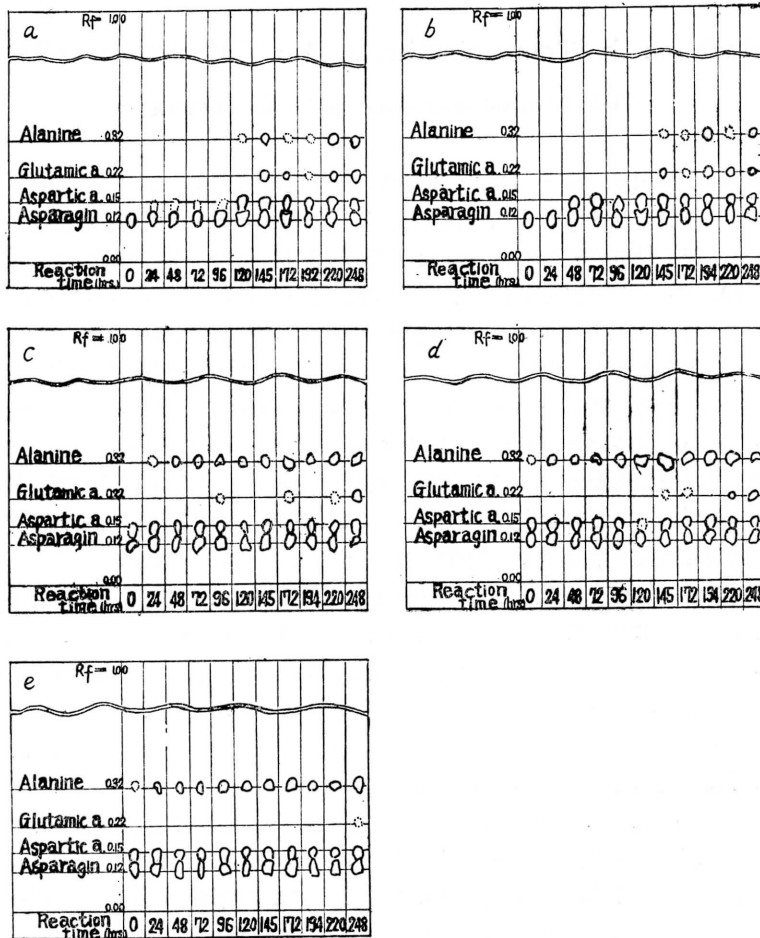
第1報で述べたと同一のマーサン氏培養基に Bac. Natto No. 8 を移植し一定時間培養したる後細菌濾過管を用いて Cell-free とした培養液 (粗酵素液) にアスパラギンを添加し時間の経過によつてこれがどのように変化するかを第1報と同様アミノ酸の濾紙クロマトグラフィーで検べた結果は第1図に示した通りである.

第1図に於て a は培養 16 時間後 Cell-free として得た粗酵素液を更に 37°C の恒温器内に放置し時間的に粗酵素液内のアスパラギンが変化する状態を示したクロマトグラムで, b 以下 e までは各々培養 25, 50, 75, 120 時間後 Cell-free とし, a の場合と同様アミ

本報告は昭和28年4月6日, 日本水産学会(東京)に於て発表したものである.

Fig 1.

The transamination indicated by paper chromatography of amino acids in cell freed Maassen's solution.



ノ酸類の変化を示したクロマトグラムである。これによつて判るように a の場合 Cell-free 直後はマッセン氏液中の添加アスパラギンのみが認められるが 24 時間でわずかにアスパラギン酸が認められ 120 時間で甚だ明瞭になる。此の時間に於て更にアラニンもわずかに現われ 145 時間ではアラニンと共にグルタミン酸も出現し爾後 248 時間に到るまでその状態が保たれている。25 時間培養後の Cell-free 液 (b) は 16 時間後のものとあまり差異がないが、50 時間後のもの (c) になると最初から Cell-free 後直ちに濾紙クロマトグラフイーを行つたが既にアスパラギンの他にアスパラギン酸が認められアラニンが 24 時間後に現われる。75 時間以上 (d 及び e) の場合には最初からアラニンを確認することが出来る。以上のことからアスパラギン酸とアラニンの転移を行う酵素は培養時間に比例して増加したものと考えることが出来る。然るにグルタミン酸の生成は必ずしもアラニンの如くではなくむしろ反対の現象を示している。即ち 16 時間培養後 Cell-free になしたるもの (a)

は 145 時間後にグルタミン酸を認め 248 時間に到るも変化が認められない。これに反し 120 時間後 Cell-free としたもの (e) では 248 時間後に痕跡のグルタミン酸を確認し, 75, 50 時間後のもの (d 及び c) に於ても 培養後 16 時間後に現われるグルタミン酸に比べ甚だ稀薄である。此の原因に就いては更に研究中である。

前報ではアミドからの直接轉移も予想されたが, Cell-free 液についての本実験によれば甚だ明瞭に而も短時間に アスパラギン酸を生ずるので, 先ずアスパラギンが脱アミノされてアスパラギン酸が生ずる過程を経ると考える方が妥当のようである。

実験 II ケト酸の検索

次にアミノ轉移に必要なケト酸類が培養中に生成されるか否かを Cavallini 等⁽²⁾の 2,4-Dinitrophenylhydrazin を用いて行う方法で検べた。実験方法として Bac. Natto No.8 を前述と同様にマーサン氏培養基にうえて培養し所定時間後濾過しその濾液について次の如き方法でヒドラゾンを作つた。なおマーサン氏液には葡萄糖及び林檎酸の二種類の炭素源が含まれているがアミノ轉移に際し必要なケト酸は之等の化合物から生成されるものと推測される。先づ 2,4-Dinitrophenylhydrazin 100 mg を乳鉢で磨碎しこれに 2 N 塩酸を除々に加えて 100 cc とし濾過した濾液を褐色瓶に入れ氷室中に貯える。前記試料に 2,4-Dinitrophenylhydrazin の塩酸溶液を加えて 37°C に放置すればヒドラゾンが生成する。

ここに生じた赤橙色のヒドラゾンを pH 7.2 の磷酸緩衝液に溶解した後苛性ソーダで正確に中和して濃縮し直ちに濾紙クロマトグラフィーの試料とした。展開剤としては 3% アンモニア水飽和ブタノール, 及び n-ブタノール・エタノール・水 (5:1:4) の 2 種類を用い, 濾紙は東洋濾紙 No. 50 を用いた。展開は全て 25°C の恒温器内で行つた。試料中のヒ

Fig 2.

The chromatograms obtained by paper chromatography of hydrazone.

In these figures it was demonstrated that Bac. Natto No. 8 produced the keto nic acids during the growth in Maassen's medium.

Fig 2 a; Development was carried by n-butanol (3% NH₄OH sat.)

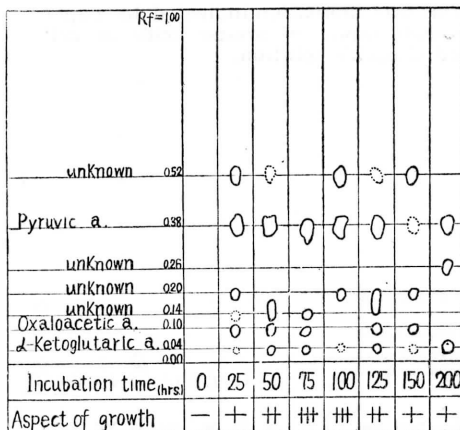
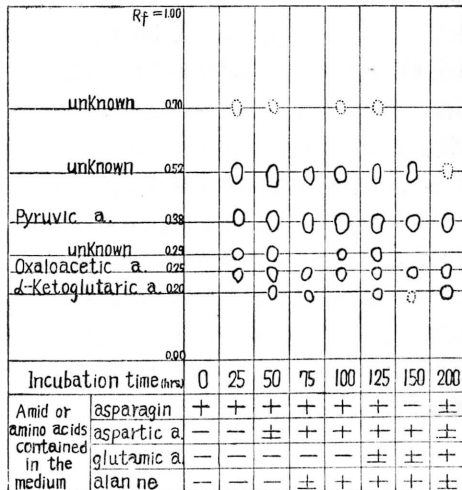


Fig 2 b; Development was carried by n-butanol-ethanol·H₂O (5:1:4)



ドラゾンは黄色の斑点となつて濾紙上に止まるので特にアルカリによつて呈色しなくとも良い。尙標準として別に市販の α -ケトグルタル酸、焦性葡萄糖酸、オキザロ醋酸を用い同様にヒドラゾンに変え同時に濾紙クロマトを行い比較した。濾紙クロマトグラフィーの結果は第2図の通りであり6ケの斑点を認め得る。前記3種のケト酸のヒドラゾン以外のものについては恐らく葡萄糖又は林檎酸よりケト酸への代謝過程に生ずる中間体ではなからうかと考えているが此の点明らかではない。

第2図に見られる様にケト酸の生成は比較的短時間のうちに行われアミノ転移に先行している。 α -ケトグルタル酸は200時間後初めて明瞭に確認出来たがグルタミン酸が殆んど同時に生成されている。従て最初アスパラギンがアスパラギン酸にかつた後焦性葡萄糖酸と共にアラニンとオキザロ醋酸に転移し、アスパラギン酸とアラニンが α -ケトグルタル酸の存在でグルタミン酸に転移するのではなからうかと考えられる。

実験 III pH の影響

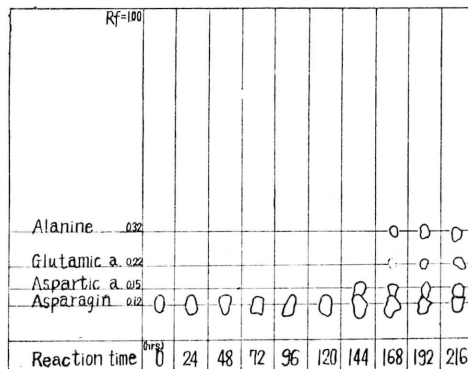
次にこれ等のアミノ転移現象が pH 条件によつて如何なる影響を受けるかを知るため、マーサン氏培養基に Bac. Natto No. 8 を16時間培養後 Cell-free とした培養液の pH を各々 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 に調節し、此等に就て前述同様にアミノ酸の変化をみると、pH 6.0 及び 7.0 ではアスパラギンよりアスパラギン酸、アラニンを生ずることなく約50時間後にグルタミン酸を生じ、pH 8.0 及び 9.0 ではアスパラギン酸、アラニンの生成を認めることが出来た。此の現象は相異なる二つの上記のアミノ転移系に関与する酵素に対する pH 条件の影響する程度が異なる為か、アミノ転移に関与するケト酸生成に対し pH 条件が影響したのか或は他の原因によるかは不明である。

実験 III 人工培養基の種類による転移

著者等の行つた上記の研究に於てはマーサン培養液の如く有機窒素を含む人工培養液を用いて来たが、次に無機窒素を組成とする培養液で Bac. Natto No. 8 を培養した場合について調べてみた。培養液としてマイヤー、ヘンネベルヒ、ツアペック、コーン、ネグリ、ペツファ、坂口・王を用いたがマイヤー、ヘンネベルヒ、ツアペックの培養基には良く Bac. Natto No. 8 が繁殖するが他のものでは繁殖が認められなかつた。このうち本研究ではツアペック氏液について50時間培養後 Cell-free とし前記マーサン氏液と同様にアスパラギンを投与してアミノ酸の時間的消長を検べた結果は第3図の通りで、此の図に示す通り150時間後にマーサン氏培養液に於けると同様アスパラギン酸、アラニン、グルタミン酸が出現しアミノ転移の行われている事が認められた。即ち最初の培養液にアミノ転移を行う基質が存在しなくともアミノ転移酵素の生成される事が判明した。

Fig 3.

The transamination indicated by Paper chromatography of amino acids in cell freed Czapek's solution.



要 約

- 1) Bac. Natto No. 8 の Cell-free 酵素液を用い、アスパラギン酸 \rightleftharpoons アラニン、アスパラギン酸 \rightleftharpoons グルタミン酸、アラニン \rightleftharpoons グルタミン酸のアミノ転移反応を認めた。
- 2) Bac. Natto No. 8 はツアペック氏の無機窒素源培地に於てもマーサン氏液と同様アミノ転移酵素を生成する。
- 3) 水素イオン濃度により転移の種類が異り弱塩基性ではアスパラギン酸とアラニンの転移が行われ弱酸性ではアスパラギン酸とグルタミン酸の転移を示す。

本研究に終始御助言を賜はつた本学柏田教授に深甚の謝意を表す次第である。

Résumé

- 1) By use of cell free enzyme of Bac. Natto No. 8, a series of transaminases was demonstrated which produced aspartic acid, alanine and glutamic acid from some ketonic acids with asparagine doner.
- 2) These transaminases produced in Czapek's medium, as well as in Maassen's by Bac. Natto No. 8.
- 3) Each transamination was affected by pH. Aspartic-alanine transamination chiefly was shown in weak alkali, but aspartic-glutamic acid transamination in weak acids.

文 献

- 1) 柿本, 金沢 : 本誌 121
- 2) Cavallini, Frontali, Toschi : Nature 163 568 (1949)