

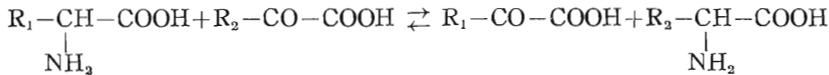
納豆菌によるアミノ転移について (第1報)

柿本大啓・金沢昭夫

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

Daiichi KAKIMOTO and Akio KANAZAWA

アミノ転移の反応は 1937 年 Braunstein⁽¹⁾等により明らかにされた生体内反応であり、実験方法の進歩にとともにアミノ転移酵素、及びその作用範囲、助酵素の性質等も漸次明らかになると共にアミノ酸の生体内代謝に重要な役割を演じていることも認められるようになった。これ等の事実に関しては P. P. Cohen⁽²⁾による総合的著述並に山下氏⁽³⁾の記述によつて尙詳細を知ることが出来る。アミノ転移の反応はアミノ転移酵素によつて行われる反応で此の酵素は広く動植物組織や微生物等に分布している。アミノ転移を簡単な反応式で示すと次のように書き表すことが出来る。



式で示すようにアミノ転移は或るアミノ酸から NH_2 が放たれることなく NH_2 基が同時に存在する α -ケト酸に移動してアミノ酸はその α -ケト酸となると同時に最初存在していた α -ケト酸はそれに相当するアミノ酸になる反応を言い、此の反応は可逆的である。自然界で最も良く見受けられる転移反応は次の 3 種類であることが知られている。

グルタミン酸 + オキサロ酢酸 \rightleftharpoons アスパラギン酸 + α -ケトグルタル酸

グルタミン酸 + 焦性葡萄糖酸 \rightleftharpoons アラニン + α -ケトグルタル酸

アスパラギン酸 + 焦性葡萄糖酸 \rightleftharpoons アラニン + オキサロ酢酸

然し乍ら近年に到り他の多くのアミノ酸が酸性アミノ酸類とアミノ転移を行い得ることも証明されている⁽⁴⁾。又アミノ転移にあずかる助酵素がピリドキサルリン酸である⁽⁵⁾等、次第にアミノ転移の本質が判明しつつある。著者等は Bac. Natto No. 8⁽⁶⁾ がマーサン氏培養基に含まれるアスパラギンを他のアミノ酸類に変化せしめることを観察したので、該菌のアミノ転移作用を確かめる為、3の研究を行つた。次にその結果を報告する。

実験並に考察

本研究に使用した菌は鹿児島大学農学部に於て蟹江氏がゼラチン分解酵素の研究に用いている Bac. Natto No. 8 である。アミノ転移に関する従来迄の研究では生活細胞から酵素を分離又は濃縮し、これにアミノ転移に関係のあるアミノ酸類、ケト酸類、並に助酵素を加えて転移の行われたか否かを観察しているが、アミノ転移反応が前述のように生体内反応であるとすれば細菌が或る基質中で繁殖する場合アミノ転移に必要な基質を自らの力で生産する筈である。斯かる推論の下に著者等は納豆菌をマーサン氏、フランケル氏、ピンスキー氏の人工培地に培養し、アミノ転移が行われるか否かをアミノ酸の濾紙クロマトグラフィーによつて実験した結果、上記の人工培地は何れも同様なアミノ転移を行う培

本報告は昭和 27 年 12 月 6 日、日本水産学会九州支部秋季大会(佐世保)に於て発表したものである。

地であることが判つた。以下記述するアミノ転移はマーサン氏培地に就いて実験したものである。

培養基；マーサン氏液は次の如き組成のものを用い pH を 8.0 に調節した。即ちマーサン氏培地に於ける該菌の発育状態は pH 7.5~8.0 が最も旺盛であつたのでアミノ転移とは別に上記の水素イオン濃度を採用した。勿論水素イオン濃度によつてアミノ転移が種々相異なることも考えられるのでこれについては目下研究中である。

マーサン氏培養基（苛性カリ水溶液で pH を 8.0 に調節する）。

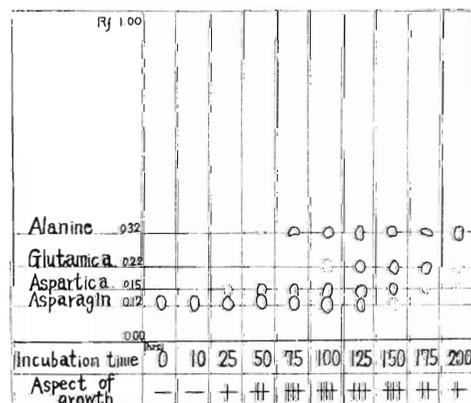
葡萄糖… 20 g, 林検酸…0.7 g, アスパラギン… 10 g, Na₂CO₃ 結晶…2.5 g, Na₂HPO₄… 2.0 g, MgSO₄·7H₂O… 0.4 g, CaCl₂…0.01 g, 蒸溜水 1l

Bac. Natto No. 8 は使用に先立ち大豆寒天培養基より前記のマーサン培養基に 2 回馴養しその一白金耳をアミノ転移被検培地に移植し 37°C の恒温器内で培養した。該菌の発育状況を見るに、約 15 時間で液面に被膜を形式し、約 3 日で繁殖最も旺盛となり 5 日目頃から被膜が沈降し始める。

濾紙クロマトグラフィー及び結果の考察

東洋濾紙 No. 50 を用い展開剤にはブタノール・醋酸・水 (4 : 1 : 1) 及びフェノール (25% 含水) を用い、発色にはエンヒドリン・ブタノール溶液を使つた。実験方法としてマーサン培養基に納豆菌を植え一定時間培養後の培養基中のアミノ酸を濾紙クロマト法により検出した。対照となるマーサン培養基の菌無添加のものは常にアスパラギンの斑点を明確に与えるが、試験区に於ては時間と共に第 1 図に示した如く、アスパラギン以外にアミノ酸の出現が認められた。

Fig 1. Transamination by Bac. Natto No. 8
The reaction was recognized in Maassen's solution when Bac. Natto No. 8 was cultured for many hours at 37°C.
The figure shows the transamination with the paper chromatography.



第 1 図の如く Bac. Natto No. 8 は培養後 25 時間で濁濁を示し、此の培養液の濾紙クロマトグラフィーではアスパラギン酸の位置にかすかにエンヒドリンによる呈色を認め得る程度である。培養後 50 時間ではアスパラギン酸の生成は甚だ明瞭となり更にアラニンが

かすかに認められるが 75 時間後には一層明瞭になる。引続き培養すると 100 時間後にグルタミン酸の色斑が現われ始め 125 時間では明瞭になる。又 150 時間後にはアスパラギンは消費されて濾紙クロマトグラフィーには甚だ薄い色斑となり 175 時間に到り全て消失するに到る。

次にマーサン氏液中のアスパラギンが直接アミノ転移を起すものか又は脱アミノ作用の結果アスパラギン酸に変化した後転移が行われるかに就て検べるために、培養液中のアス

Table 1. The changes of amino acids when Bac. Natto No.8 are incubated in modified Maassen's medium in which the amino acids (dl- aspartic acid, d-glutamic acid, dl-alanine) take the place of asparagine.

Incubation hrs.	dl-Aspartic a.		d-Glutamic a.		dl-Alanine		Asparagine	
	Aspect of growth	Amino acids found in medium	Aspect of growth	Amino acids found in medium	Aspect of growth	Amino acids found in medium	Aspect of growth	Amino acids found in medium
0	—	none	—	none	—	none	—	none
10	—	''	—	''	—	''	—	''
25	±	''	+	''	±	''	+	''
50	++	''	++	''	+	''	++	aspartic a.
75	+++	''	++	''	++	''	+++	{aspartic a. alanine
100	+++	''	++	''	+++	''	+++	{aspartic a. alanine
150	++	glutamic a.	++	''	+++	''	+++	{aspartic a. alanine
200	++	glutamic a.	±	''	+	glutamic a.	+	{glutamic a. alanine

パラギンを夫々アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン等に置き代えて Bac. Natto No. 8 を培養した結果は第1表に示す如くアスパラギン酸では約150時間後に始めてグルタミン酸の出現が認められ、グルタミン酸の場合は培養後200時間を経過したものでも他のアミノ酸の出現が認められなかつた。又アラニンの場合では約200時間でグルタミン酸の出現を認めることが出来た。上述のグルタミン酸はd型を使用したがあミノ転移に関する従来の研究から考えて当然なこととも思われる。第1表に見られる如く基質にアスパラギンを含むものと之れをアスパラギン酸に置き代えた場合とではグルタミン酸の出現するまでの時間は常に前者の場合が速かである。此の事実のみで直ちに転移の過程を論ずることは出来ないが、アスパラギンから直ちにグルタミン酸への転移を起すアミドとアミノ酸の間にも一部転移が行われているのではないかと考えられる。なお此の事実は Meister 等⁷⁾の研究にも既に発表されている。

アミノ転移が行われるためには緒論でも述べた如く、ケト酸と助酵素のピリドキサル 3 磷酸が不可欠の因子である。著者等は納豆菌の繁殖によつてマーサン氏培養基中に斯かる物質が生成しているか否かを検べるためケト酸のみを 2,6-dichlorphenol-indophenol 試薬によつて試験してみた。即ち 20 mg % の 2,6-dichlorphenol-indophenol をマーサン氏培養基に入れて菌を接種し、37°C で培養したところ約2時間後に完全に試薬の紫色

Table 2. Changes of amino acids by Bac. Natto No.8 which occurs in the modified Maassen's medium in which the other amino acids take the place of asparagine.

Amino acid	l-Arginine-2HCl		l-Histidine-HCl		l-Lysine-2HCl	
	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium
0 hrs.	—	none	—	none	—	none
10	—	"	—	"	—	"
25	—	unknown(Rf 0.09)	+	"	—	"
50	+	"	卅	"	—	"
75	卅	"	卅	"	—	"
100	卅	"	卅	"	—	"
150	卅	"	卅	glutamic acid	—	"
200	+	"	卅	"	—	unknown(Rf 0.04)
250	—	"	+	"	—	"
Amino acid	Glycine		dl-Valine		l-Tyrosine	
	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium
0 hrs.	—	none	—	none	—	none
10	—	"	—	"	—	"
25	—	"	—	"	—	"
50	—	"	—	"	—	"
75	—	"	—	"	—	"
100	—	"	—	"	—	"
150	±	"	+	aspartic acid	—	"
200	卅	"	卅	" (trace)	—	"
250	卅	"	卅	"	—	"
Amino acid	dl-Phenylalanine		dl-Tryptophane		l-Leucine	
	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium
0 hrs.	—	none	—	none	—	none
10	—	"	—	"	—	"
25	—	"	—	"	—	"
50	—	"	—	"	—	"
75	—	"	—	"	—	"
100	—	"	—	"	—	"
150	—	"	—	"	—	"
200	—	"	—	"	—	"
250	—	"	—	"	—	"
Amino acid	l-Proline		dl-Methionine		dl-Serine	
	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium
0 hrs.	—	none	—	none	—	none
10	—	"	—	"	—	"
25	±	"	—	"	—	"
50	卅	"	—	"	—	"
75	卅	"	—	"	—	"
100	卅	"	—	"	+	"
150	卅	"	±	"	卅	"
200	卅	unknown ^{0.05} (Rf 0.11)	+	aspartic acid (trace)	卅	"
250	卅	" ^{0.22} (Rf 0.05) ^{0.05} (Rf 0.11)	+	"	卅	"
Amino acid	l-Cystine		l-Cysteine		l-Cystic acid	
	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium	Growth	Amino acid found in the medium
0 hrs.	—	none	—	none	—	none
10	—	"	—	"	—	"
25	—	"	—	"	—	"
50	—	"	—	"	—	"
75	±	"	—	"	—	unknown(Rf 0.06)
100	+	"	±	"	—	" (")
150	+	unknown(Rf 0.08)	+	"	—	" (")
200	+	" ^{0.08} (Rf 0.12)	卅	"	—	" (")
250	—	" ^{0.08} (Rf 0.12)	+	"	—	" (")

が消失した。然し乍らこのことのみからアミノ転移に関与すべきケト酸類が生成したものと見ることは出来ないで更に Cavallini 等の行つた方法を用い検討中である。マーサン氏液の炭素源としては葡萄糖と林檎酸の2種類がある。従つて本研究で認められたアミノ転移が起るためには上記の何れかがアミノ転移に関係あるケト酸の前駆物質でなければならない。Lockwood, Stodola 氏等⁽⁸⁾は *Ps. fluorescens* NRRL. No. B-6 が葡萄糖より α -ketoglutaric acid を生成すると報告して居り朝井, 相田等⁽⁹⁾は *Serratia marcescens* が葡萄糖より著量の α -ketoglutaric acid を生産することを確認しているので著者等の用いた *Bac. Natto* No. 8 に就ても此の様な反応が考えられないことはない。著者等の研究から推察すると種々のアミノ転移に対しアミノ転移酵素の活性度が培養基並に培養条件によつて相異しないとすればアラニンとアスパラギン酸の転移が最も迅速であるから焦性葡萄糖酸が先づ第一に葡萄糖より生成されると見做さねばならない。而して α -ketoglutaric acid は焦性葡萄糖酸の生成後に生じここにアラニン及びアスパラギン酸よりグリタミン酸が生ずると考えることが出来よう。

次にマーサン氏培養液中の窒素源アスパラギンを他のアミノ酸類に置きかえて *Bac. Natto* No. 8 を培養した結果第2表の通りであつた。1-アルギンを窒素源とした場合は培養後25時間から Rf 0.09 なる1ヶの Spot が現われた。Knoop⁽¹⁰⁾によればアルギンと焦性葡萄糖酸の混合液を接触還元することによりオクトピンが生成するが、本研究ではこのことを確認するには到っていない。1-ヒスチジンの場合は150時間後に於てグルタミン酸が出現したがこれは Edlbacher, 瀬良氏等の説えているヒスチダーゼによる反応と符合し、恐らくアミノ転移による変化ではあるまい。1-リジンでは200時間で Rf 0.04 なる不明の Spot が出現しているがこれもアミノ転移を示すものであるか否かは疑わしい。dl-バリンでは150時間後に痕跡のアスパラギン酸が認められる。1-プロリンでは200時間後に3つの Spot が認められたが、Rf 値の判定では確実なところは知られなかつた。dl-メチオンは200時間後に痕跡程度のアスパラギン酸が認められる。1-シスチン, 1-システイン酸も100時間後及び75時間後に Spot が現われたがアミノ転移を断定するに至っていない。

以上アミノ転移以外の分解その他の化学変化も考えられるので単に以上の簡単な観察のみからアミノ転移の現象を認めることは早計である。併し著者等の用いた *Bac. Natto* No. 8 がアスパラギンを基質として之れから他のアミノ酸を生成する動作は従来認められているアミノ転移に偶然にも全く一致する。著者等は直接生活細菌細胞を用いて認めた此の様な現象をアミノ転移と認定したが更にアミノ転移を確証するに必要な他の手段によつて研究を続行中で、何れは魚体に於ける此の種の栄養現象の追及にまで発展せしめたいと考えている。

最後に本実験を行うにあたり終始御指導を賜つた本学柏田教授に深甚の感謝を表する次第である。

Résumé

1) Being supposed the transamination performed by *Bac. Natto* No. 8, authors studied it by paperchromatography. In the culture of this bacteria in Maassen's medium, following three reactons were confirmed.

1. Aspartic acid \rightleftharpoons Glutamic acid
2. Aspartic acid \rightleftharpoons Alanine
3. Glutamic acid \rightleftharpoons Alanine

As to the transamination by Bac. Natto No. 8, the following two reactions could also be observed.

1. Asparagine \rightarrow Glutamic acid or Alanine
2. Asparagine \rightarrow Aspartic acid \rightarrow Glutamic acid or Alanine

2) When the transamination had carried out by Bac. Natto No. 8 in Maassen's solution, it was conceivable that glucose changed into ketonic acid in the first place and this ketonic acid took part in transamination.

3) When amino acids was used as nitrogen source instead of asparagine in Maassen's solution, some visible changes occurred in the case of histidine, lysine, proline, cysteine, cystine, valine and methionine, but it was doubtful to attribute those changes to the transamination.

文 献

- 1) A.E. Braunstein and M.G. Kritzmam: *Enzymologia* 2, 129 (1937)
- 2) P.P. Cohen, "The Enzymes" edited by J.B. Sumner and K. Myrbäck see 1014 page.
- 3) 山下恭平: 化学の領域 vol 5, No. 11 (1951)
- 4) Hird, F.J.R., and Rowsell, E.V.: *Nature*. 166, 518 (1950)
- 5) H.C. Lichstein, I.C. Gunsalus, and W.W. Umbreit: *J. Biol. Chem.*, 161, 311 (1945)
- 6) 蟹江: 鹿兒島大学農学部学術報告 第1号
- 7) Meister, A., and Tice, S.V.: *J. Biol. Chem.*, 157, 173 (1950)
- 8) L.B. Lockwood and F.H. Stodola: *J. Biol. Chem.*, 164, 81 (1946)
- 9) 朝井, 相田: 農化 26, 10 528 (1952)
- 10) Knoop. F., and Martius, C.: *Physiol. Chem.*, 254, 1 (1938)