Reduced Coenzyme I Peroxydase Activity of Murine Leprosy Bacillus

TATSUO MORI, KAYOKO DOMAE and KENJI KOHSAKA

Department of Leprology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

It has become clear that the reduced coenzyme I (NADH) produced by malic dehydrogenase is oxidized by Diaphorase I but the route by which NADH is oxidized in the murine leprosy bacillus is not known. Since there is no cytochrome system in the murine leprosy bacillus, catalyzation by oxygen in air will not take place. In cultivating the organism in vitro, a pathway for the hydrogen of NADH must be made in order that energy may be produced, else cultivation is not possible. Elucidation of the conditions which will adequately fulfil the flow of electrons will become an important starting point for the in vitro cultivation of the murine leprosy bacillus.

As the initial step, it has been found that NADH is converted to NAD and water by NADH peroxydase in the presence of H_2O_2 . This NADH peroxydase is present not only in murine leprosy bacillus but is also present in vitro cultivated *M. Jucho* and BCG. The enzyme is easily inactivated by heat but is stable to dialysis.

When the murine leprosy bacillus is present in the host cell, H_2O_2 is produced by the cell so the flow of electrons may proceed smoothly and energy produced through the action of NADH peroxydase but utilization of this pathway is difficult in vitro.

(We are partially indebted to the aid of WHO's fund. Prof. S. Nishimura)

鼠癩菌の NADH-Peroxydase 活性

森 龍 男, 堂 前 嘉 代 子, 高 坂 健 二

大阪大学微生物病研究所 癩研究部

(主任 西村真二 教授)

(受付 1964. 10. 22)

緒 言

著者ら¹⁾はここ数年来そらい菌の呼吸酵素系を研究してきたが、リンゴ酸脱水素酵素により生成された還元助酵素 I (NADH) の酸化機構が不明であった。NADH はジアホラーゼにより triphenyl tetrazolium chloride (TTC) を水素受容体として酸化されるが、生体内には TTC のごときものは存在しないので、生理的状态においてはいかなる機構により酸化されるかを種々検討した。Grant ら²⁾は *Trypanosoma rhodesiense* のエネルギー代謝機構として、 α -グリセロリン酸酸化酵素により生成されたジハイドロオキシアセトンリン酸に NADH の水素が伝達されて再び α -グリセロリン酸が生ずる酵素系があることを報告しているが、森³⁾らはそらい菌についてこの酵素系を検討したが、陰性に終わった。ここにやっと NADH-peroxydase により NADH が酸化されることを見出した。NADH-peroxydase については古来多くの研究がなされている。Tanenbaum⁴⁾が *Acetobacter peroxidans* で NADPH-peroxyase を、Morton⁵⁾が *Clostridium perfringens* で NADH-peroxydase を、Akazawa⁶⁾は西洋わさびで、NADH, NADPH-peroxydase を報告している。NADH-peroxydase について最も詳細に研究したのは Dolin^{7) 8) 9) 10)}で *Streptococcus faecalis* の無細胞抽出液から NADH-peroxydase を精製し、この酵素はフラビン酵素であり、過酸化水素の存在にて NADH を酸化して NAD と水を生成することを報告している。

チトクロームをもたぬそらい菌の終末呼吸系の 1 つとして NADH-peroxydase がみつかったことは、前報¹¹⁾に報告したそらい菌のフラビンの特異性とも関連して甚だ興味があり、そらい菌の人工培養への手がかりとして重要な点であると思う。

実験材料及び方法

そらい菌ハイワイ株は C3H δ $\times$ CF1 ♀ の雑種マウスの胸部皮下に生じた結節より、そらい菌熊本株はフーデ

ットラットの腹部皮下に生じた結節より、低速遠沈法¹²⁾により集菌した。

獣調菌及び BCG はソートン変法培地に夫々 4 日及び 3 週間培養の菌を無菌的によく洗滌し、M/20, pH 7.0 のリン酸緩衝液に懸濁し、6 時間、37°C にて通気して後リン酸緩衝液 M/10, pH 5.0 にて酸性として一夜氷室に放置せしめて、菌体保有の栄養源の starvation を行なった。無細胞抽出液の調製法、集菌したそらい菌は凍結乾燥し、培養した菌は濾紙にて水分を十分除き、石英砂とともに 0.25 M sucrose M/10 pH 7.0 のリン酸緩衝液でペースト状となし、よく磨砕し、同様緩衝液にて抽出、10,000 rpm 30 分遠沈の後、この上清を Spinco L 型の超遠沈機にて 40,000 rpm 90 分間遠沈した後、遠沈管の底に穴をあけて中層の透明な部分を採集した。

NADH-peroxydase 活性の測定法はベックマン型日立光電分光光度計にて 340 m μ の NADH の吸光度の減少を追跡した。

透析外液画分の調製法、抽出酵素液を少量の蒸留水に對し一夜透析し、その透析外液を Norite A に吸着し、よく蒸留水で洗滌した後、1% アンモニアルカリ性 50% アルコール及び 1% アンモニアルカリ性 50% アセトンにて溶出し、溶出液を濃縮乾固し、再び蒸留水に溶解して pH を中性にした。

NADH は Nutritional Chemical Corporation 製のものの H₂O₂ は和光純薬製のものを用いた。

実験結果

過酸化水素により NADH が直接酸化されないように反応液中に牛血清アルブミン Fraction V を加えた。Table 1 及び Fig. 1 において対照 C₁ は H₂O₂ により分解される NADH を見たものであるが、殆ど変化がない。また対照 C₂ は H₂O₂ なしに NADH が酸化される NADH-oxydase 活性を見たものであるが、甚だ活性が弱い。しかしながら H₂O₂ の存在においては著明な NADH の酸化がみられた。ここに用いた酵素液は粗製抽出液であるため、何か不明の物質が介在していて、NADH により還元されたものが水素の供与体となっているの

Table 1 NADH-peroxydase activity of the ground extract of murine leprosy bacilli, Kumamoto strain

			Optical density of NADH at 340 m μ				
			0 min.	15 min.	30 min.	45 min.	65 min.
C1	phosphate buffer	3.0ml	0.70	0.64	0.63	0.60	0.59
	0.25% bovine serum						
	albumin fraction V						
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml					
C2	H ₂ O ₂ (3.5×10^{-6} mol)	0.1ml	0.72	0.64	0.60	0.54	0.50
	*enzyme solution	3.0ml					
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml					
	water	0.1ml					
Sample	*enzyme solution	3.0ml	0.68	0.47	0.34	0.25	0.125
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml					
	H ₂ O ₂ (3.5×10^{-6} mol)	0.1ml					

*The ground extract 5ml of lyophilized 0.2g murine leprosy bacilli, Kumamoto strain was centrifuged for 60 min. at 35,000 rpm. The clear zone of the supernatant was used.

Fig. 1. Cell free extract of murine leprosy bacilli **Fig. 2.** Cell free extract of BCG**Table 2** NADH-peroxydase activity of the ground extract of BCG

			Optical density of NADH at 340 m μ				
			0 min.	25 min.	55 min.	85 min.	115 min.
C1	phosphate buffer	2.0ml	0.62	0.60	0.58	0.56	0.54
	bovin s. album. f. V	1.0ml					
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml					
	H ₂ O ₂ (10^{-5} mol)	0.1ml					
C2	*enzyme solution	2.0ml	0.64	0.66	0.64	0.59	0.55
	bovin s. album. f. V	1.0ml					
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml					
	water	0.1ml					
Sample	*enzyme solution	2.0ml	0.69	0.53	0.45	0.34	0.32
	bovin s. album. f. V	1.0ml					
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml					
	H ₂ O ₂ (10^{-5} mol)	0.1ml					

*The ground extract 20ml of wet weights 6.3g BCG bacilli was centrifuged for 90 min. at 40,000rpm. The clear zone of the supernatant was used.

Table 3 NADH-peroxydase activity of the ground extract of Myco. Jucho

			Optical density of NADH at 340 m μ			
			0 min.	10 min.	25 min.	40 min.
C1	*enzyme solution	1.0ml	0.55	0.52	0.48	0.42
	bovin s. album. f. V	1.0ml				
	phosphate buffer	1.0ml				
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml				
	water	0.1ml				
C2	*enzyme solution	1.0ml	0.10	0.27	0.31	0.29
	bovin s. album. f. V	1.0ml				
	phosphate buffer	1.0ml				
	NAD(6×10^{-7} mol)	0.1ml				
	water	0.1ml				
Sample	*enzyme solution	1.0ml	0.51	0.38	0.29	0.24
	bovin s. album f. V	1.0ml				
	phosphate buffer	1.0ml				
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml				
	H ₂ O ₂ (10^{-5} mol)	0.1ml				

*The ground extract 25 ml of wet weights 4.8 g Myco. Jucho was centrifuged for 90 min at 40,000 rpm. The clearzone of the supernatant was used.

Table 4 The effect of dialytic fraction to the NADH-peroxydase activity of dialyzed enzyme (BCG)

			Optical density of NADH at 340 m μ				
			0 min.	10 min.	20 min.	35 min.	50 min.
C1	*fractionated enzyme	2.0ml	0.54	0.49	0.44	0.39	0.33
	phosphate buffer	0.5%					
	bovin serum albumine	1.1ml					
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml					
	water	0.2ml					
C2	*fractionated enzyme	2.0ml	0.51	0.365	0.28	0.20	0.12
	phosphate buffer	0.5%					
	bovin serum albumine	1.0ml					
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml					
	H ₂ O ₂ (3.5×10^{-6} mol)	0.1ml					
Sample	*fractionated enzyme	2.0ml	0.53	0.365	0.27	0.20	0.12
	phosphate buffer	0.5%					
	bovin serum albumine	1.0ml					
	NADH(6×10^{-7} mol)	0.1ml					
	H ₂ O ₂ (3.5×10^{-6} mol)	0.1ml					
	dialytic fraction	0.1ml					

*The ground extract 100 ml of wet weightd 23.8g BCG bacilli was centrifuged for 40 min. at 10,000 rpm. The supernatant was dialyzed overnight against a small volume of distilled water, and was fractionated with ammoniumsulfate. The enzyme fraction between 1/3 and 2/3 ammoniumsulfate saturation was dialyzed and was centrifuged for 60 min. at 40,000 rpm. The supernatant was used.

Fig. 3. Cell free extract of *Myco. jucho*

かも知れない。このような中間体を追跡するために、そらい菌を用うことは、菌の収量の面から考えて甚だ困難であるので、培養可能な抗酸菌として獣調菌及びBCGを用いた。Table 2 及び Fig 2は培養したBCGの無細胞抽出液による NADH-peroxydase 活性をみたものであるが、BCGにもこの活性が存在していることを認めた。BCGに NADH-peroxydase 活性があるのなら、非病原性抗酸菌である獣調菌にもこの活性があるだろうと検討したところ Table 3, Fig 3にみられるように獣調菌の無細胞抽出液にも NADH-peroxydase 活性をみとめた。BCG及び獣調菌は通気による starvation を行なっているが、それらの菌の無細胞抽出液には菌体中の微量の基質及びNADにつながる種々の脱水素酵素が存在している。NADH-peroxydase によりNADHがNADに酸化される一方、何らかの脱水素酵素によりNADHの再生産が行なわれているため、見かけ上 NADH-peroxydase 活性は弱く表現されている。

NADHの脱水素伝達の中間体の存在をBCGから抽出した無細胞抽出液により検討した。無細胞抽出液を蒸留水に対して透析外液画分を作り、透析内液から硫酸アンモニウムにより酵素蛋白質を分別し、十分に透析した後、この酵素液により NADH-peroxydase 活性をしらべた。Table 4, Fig4にみられるように、硫酸アンモニウム画分、透析によっても、NADH-peroxydase 活性は保持されているし、又透析外液画分を加えても、活性に影響がないことから、NADHにより還元される未知物質は一応存在しないものと考えられる。

Table 5 及び Fig 5 はそらい菌熊本株の無細胞抽出液の透析及び加熱による NADH-peroxydase 活性の影響をみたものであるが、嫌気的条件下ではC₂ 対照にみられるように NADH-peroxydase 活性以外によるNADHの

Fig. 4. Effect of dialytic fraction on the cell free extract of BCG

崩壊は殆どみられない。また 95°C10分間の加熱により NADH-peroxydase は完全に失活する。この NADH-peroxydaseは透析に対し安定であり、BCGの酵素と同様、中間体を必要としない。

討 論

Dolin⁷⁾ 8) 9) 10) は *streptococcus faecalis* から NADH-peroxydaseを精製し、この酵素はフラビン酵素であり、 $2\text{NADH} + \text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{NAD} + 2\text{H}_2\text{O}$ なる反応式に従って NADHが H_2O_2 により酸化されて H_2O と NADが生ずることを報告している。しかしながら人工培養が不可能なそらい菌を大量に集菌して NADH-peroxydase を精製することは甚だ困難である。そらい菌の無細胞抽出液中には catalase 活性もあるし、又NADにつながる脱水素酵素も存在しているから、 H_2O_2 の減少及びNADの生成を stoichiometric に定量することはできなかった。今回は H_2O_2 の存在下においてNADHの減少を測定したにすぎなかったが、そらい菌の終末呼吸系として NADH-peroxydaseが重要な役割を演じていることは事実であろう。前報¹¹⁾においてそらい菌のリボフラ빈は蛋白質と結合して安定な還元型を保ち、空気中の酸素によっては自動酸化性でないだろうとのべておいたが、そらい菌の電子伝達系において次のようなことが考えられる。即ち、cytochrome系をもたないそらい菌を空気中にとりだしても菌体内にあるフラビン酵素の大部分は還元型のままでとどまっているが、過酸化水素が存在していると、その還元型フラビン酵素が再び酸化型となり、菌体内の酸化還元による電子の流れがうまく働いて、エネルギー獲得機構へとつながっているであろう。これらそらい菌の *in vitro* 培養に直結したフラビン酵素の問題は cytochrome系をもたないこの菌のエ

Table 5 The effect of heating and anaerobic condition against the NADH-peroxydase activity of the ground extract of murine leprosy bacilli, Kumamoto strain

				Optical density of NADH at 340 m μ			
				0 min	6 min	12 min	22 min
C ₁	heated enzyme	3.0ml					
	H ₂ O ₂ (3.5×10^{-6} mol)	0.1ml		0.56	0.56	0.55	0.54
	NADH (5×10^{-7} mol)	0.1ml					
C ₂	*enzyme	3.0ml					
	water	0.1ml		0.56	0.56	0.55	0.54
	NADH (5×10^{-7} mol)	0.1ml					
sample	*enzyme	3.0ml					
	H ₂ O ₂ (3.5×10^{-6} mol)	0.1ml		0.56	0.47	0.38	0.17
	NADH (5×10^{-7} mol)	0.1ml					

The ground extract 15 ml of lyophilized 0.75 g murine leprosy bacilli, Kumamoto strain was centrifuged for 60 min at 35,000rpm. The clear zone of supernatant was dialysed against M/10 pH 7.0 phosphate buffer and used. Heat-inactivation was carried out at 95°C for 10 min.

Fig. 5. Cell free extract of murine leprosy bacilli in anaerobic condition

エネルギー獲得機構とともになお詳細な検討を要するものと思う。

総 括

そらい菌の無細胞抽出液は過酸化水素の存在にて還元助酵素 I を酸化する NADH-peroxydase 活性を有する。この酵素活性は in vivo 増殖菌のみの特性ではなく、in vitro に増殖した獣調菌及び BCG にも存在していた。この NADH-peroxydase は透析に対し安定であるが、熱に対しては不安定で失活しやすい。

文 献

- 1) Mori, T., K. Kosaka and T. Ito : Carbohydrate Metabolism of the Murine Leprosy Bacillus, I. Studies on the Respiratory Enzyme System, especially the Diaphorase and Malic Dehydrogenase Activities. *Biken's Journal* **4**, 225-233 (1961)
- 2) Grant, P. T. and J. R. Sargent : Properties of L- α -Glycero-phosphate Oxidase and its Role in the Respiration of *Trypanosoma rhodesiense*. *Bioch. J.* **76**, 229-237 (1960)
- 3) Mori, T. : The Respiration Enzymes of Murine Leprosy Bacillus, especially Diaphorase I, II and Malic Dehydrogenase. *La lepro* **32**, 52, 77 (1963)
- 4) Tanenbaum, S. W. : The Metabolism of Acetobacter Peroxidans, I. Oxidative Enzymes. *Biochim. et Biophys. Acta* **21**, 335-342 (1957)
- 5) Mallin, M. L. and H. W. Saley : Some Relations of Hydrogen Peroxide to Oxygen Consumption by *Clostridium Perfringens*. *Arch. Biochem. and Biophys.* **73**, 306-314 (1958)
- 6) Akazawa, T. and E. E. Conn : The Oxidation of Reduced Pyridine nucleotides by Peroxydase. *J. Biol. Chem.* **232**, 403-415 (1958)
- 7) Dolin, M. I. : The Oxidation and Peroxidation of DPNH₂ in Extracts of *Streptococcus faecalis*. *Arch. Biochem. and Biophys.* **46**, 483-485 (1953)
- 8) Dolin, M. I. : The DPNH-oxidizing Enzymes of *Streptococcus faecalis*. II The Enzymes Utilizing Oxygen, Cytochrome C, Peroxide and 2, 6-Dichlorophenol indophenol or Ferricyanide as Oxi-

- dants. Arch. Biochem. Biophys. 55, 415—435 (1955)
- 9) Dolin, M.I. : The Streptococcus faecalis oxidases for Reduced Diphosphopyridine nucleotide. III Isolation and Properties of a Flavin Peroxidase for Reduced Diphosphopyridine nucleotide. J. Biol. Chem. 225, 557—573 (1957)
- 10) Dolin, M.I. : The Streptococcus faecalis Oxidases for Reduced Diphosphopyridine nucleotide. III. Properties of the Enzyme-substrate Complex formed between Reduced Diphosphopyridine nucleotide Peroxydase and Pyridine nucleotide. J. Biol. Chem. 235, 544—549 (1960)
- 11) 森, 堂前, 高坂 : 鼠癩菌のリボフラビンについて, レブラ 291—295 33, (1964)
- 12) 森, 高坂, 伊藤, 西村 : 鼠癩菌の集菌法, 日本細菌学雑誌, 16, 808—813 (1961)