Studies on the Tricarboxylic Acid Cycle in Murine Leprosy Bacillus

TATSUO MORI, KAYOKO DOHMAE AND KENJI KOHSAKA

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

Cultivation of the leprosy bacillus and the murine leprosy bacillus is difficult and the attempt is being made for find a way to overcome this problem by clarification of the metabolic system. We have been conducting studies on the respiratory enzyme system in the murine leprosy bacillus for the past several years. It has been found that the inability of the murine leprosy bacillus to oxidize most substrates is due to the absence of the cytochrome system and lack of the electron transport system. In the present study, the various enzyme systems of the TCA cycle were examined at each step. It was found that in the ground extract of murine leprosy bacillus, hydratase and condensing enzyme are present in considerable amount while addition of an artificial electron acceptor is necessary for dehydrogenase and the activity of decarboxylase and the enzyme for oxidative decarboxylation are very weak.

As may be seen in Fig. 2, the murine leprosy bacillus possesses fumarate hydratase (fumarase) activity and forms radio active malic acid from radio active fumaric acid. As no cytochromes are present in the crude extract, malic dehydrogenase is unable to act and malic acid accumulates.

Fig. 3, shows that the murine leprosy bacillus has succinic dehydrogenase activity and produces radio active fumaric acid and malic acid from radio active succinate. Auto-oxidisable phenazine methosulfate was added as an electron transport system of succinic dehydrogenase. This dye, at the same time, becomes an electron acceptor for the malic dehydrogenase system but as the decarboxylation of pyruvate are inhibited, condensing enzyme is not able to act and as a result malic acid and fumaric acid accumulate.

As may be seen in Table 2 and 3, the murine leprosy bacillus has citrate synthase (condensing enzyme) activity but citrate is not formed from the oxaloacetate alone or oxaloacetate plus pyruvate systems. This suggests that the formation of acetyl CoA from oxaloacetate and pyruvate is inhibited in the cell free system.

The aconitate hydratase (aconitase) activity of the murine leprosy bacillus is quite strong as shown in Table 2 and citrate is formed from cis-aconitate and isocitrate.

Quantitative determination of the dehydrogenase activity of crude extract using triphenyl tetrazolium chloride as the electron acceptor gives the results indicated in Table 1. and a characteristic finding is apparent. With oxaloacetate as the substrate, formation of formazan, equivalent to the substrate used, is not observed. Oxalosuccinate, which is said to be spontaneously decarboxylated by animal tissue, is utilized with difficulty by the murine leprosy bacillus and formation of α -ketoglutarate appears to be difficult.

Examination of the quantitative relationship of the formazan which is formed to the substrate shows that with citrate, cis-aconitate or iso-citrate as substrate, the formation is strongest with citrate followed in descending order by cis-aconitate and iso-citrate.

The dehydrogenase step in the TCA cycle is the state of iso-citrate dehydrogenase so the order of formazan formation should be iso-citrate, cis-aconitate, citrate. On the other hand, formazan is not formed when only oxaloacetate is used so that malic acid is not formed by reverse action of condensing enzyme.

As inactivation of some enzyme system may take place at the stage of preparation of the ground extract of the murine leprosy bacillus a definite conclusion cannot be made regarding the metabolic system of the live organism on the basis of the present study alone but the findings suggest the presence of a metabolic system for citrate which does not pass through the TCA cycle. When α -ketoglutarate is used as the substrate formazan formation is observed but succinate is not formed and as shown in Fig. 4, almost all of the substrate is converted to glutamic acid.

Isocitrate lyase (isocitritase) activity is said to be strong when the organism is cultivated under anaerobic conditions and a study was carried out in an attempt to verify this but as may be seen in Table 4, marked glyoxylate formation was not found.

It has been reported that succinic semialdehyde is formed, as a kind of amino acid fermentation, by a transamination reaction between γ -amino butyric acid, which is produced by glutamic acid decarboxylase, and α -ketoglutaric acid and succinic acid is then formed from the succinic semialdehyde.

When radio active glutamic acid is added to the crude extract of murine leprosy bacillus, however, neither γ -amino butyric acid nor succinic acid could be detected.

In studying the TCA cycle system in the murine leprosy bacillus, it must be considered that the enzyme systems may be as well as inactivated at the stage of extraction, and studied their activities related to the terminal electron transport systems. There are many unknown factors but from the standpoint of cultivation of the murine leprosy bacillus, it is believed that the clarification of the terminal electron transport system is more important than the problem of what carbon source to use in the culture medium.

(This investigation was partially supported by a grant from the World Health Organization.)

鼠癩菌における Tricarboxylic Acid Cycle の酵素系について

森 竜 男, 堂前嘉代子, 高坂 健二

大阪大学微生物病研究所, 癩部門

(受付 1966年9月20日)

結 言

癩菌, 鼠癩菌の培養が甚だ困難であることから, 鼠癩菌の代謝系をしらべて培養への手がかりを得ようと, 我々は数年来鼠癩菌の呼吸酵素系についてしらべてきた。Gray 等²⁾は数十種の基質を用い, ワールブルグ検圧法により鼠癩菌の酸素消費を測定し, いずれの基質も鼠癩菌の酸素消費を増加せしめなかったと報告している。伊藤・園田²⁾はそれを追試するとともに鼠癩菌の酸素消費を増加せしめる因子の研究を行った。森等³⁾はもし鼠癩菌が特別に利用しうる炭素源があるとするならば, それらの炭素源が酸化されるためには, 何らかの電子伝達系を経なければならぬと考え, 鼠癩菌のデアホラーゼ活性を検討した。その結果, 還元助酵素1・トリフェニール・テトラゾリウムクロライド還元酵素活性を認めたが, 電子受容体として人工色素を用いない場合, 自然の状態での電子伝達系が, 無細胞抽出液の段階では完全に中断されていることを見出した。日下等⁴⁾は鼠癩菌のチトクローム系を詳細に検討して, 鼠癩菌にはチトクローム系が全然見出されないことを明らかにした。かくして Gray 等によって始められた鼠癩菌の基質酸化能の欠損は, チトクロームの欠損にもとづく電子伝達系に由来したものであり, 鼠癩菌が特別に利用しうる炭素源が存在するのではないことがわかった。

今回は鼠癩菌のチトクローム系の欠損を人工色素で補ってやる方法を用い, Tricarboxylic Acid Cycle (TCA サイクル) 系の諸酵素活性について検討した。

実 験 方 法

鼠癩菌の集菌法: C3H₈ × dd0♀ の交配 F₁ マウスの胸部皮下に鼠癩肉芽腫の1000倍乳液 0.2 ml を注射し, 4~5ヶ月後にできた鼠癩肉芽腫を原料とした。このマウスにでる鼠癩肉芽腫は結合組織が少く, 菌の収量が非常

によいので, 森⁵⁾⁶⁾の方法を簡略にした Fig. 1 の方法によって集菌した。

鼠癩菌磨砕抽出液作成法: 凍結乾燥した鼠癩菌を秤量し, 冷却した乳鉢にて同重量のガラス粉とともに磨砕し, 少量の緩衝液にて菌をペースト状にして約60分間磨砕した。緩衝液にて抽出後 8000 rpm にて遠沈し, 生菌を除き, その上清を粗酵素液として用いた。

ペーパークロマトグラフィーの試料の調製法: 反応液を Visking の透析用セロファン袋に入れて, 少量の蒸留水に対して氷室中で透析し, 外液を12時間毎に3回交換し, その透析外液を集めて凍結乾燥した。残渣を 0.5 ml の蒸留水にとかして, その 0.1 ml をペーパークロマトグラフィー用に用いた。

ペーパークロマトグラフィー: 有機酸はブタノール: 蟻酸: 水=10:2:5の溶媒で上昇法展開した後, 室温に4日放置して十分に蟻酸を除き, 0.1%のブロモクレゾール・グリーンアルコール溶液を噴霧した。なお濾紙全体が黄色で有機酸のスポットの判定に困難な場合には, アンモニヤの微量に存在する部屋にて, 濾紙がグリーンになるのを待って黄色のスポットを判定した。

アミノ酸は水飽和フェノールの溶媒で上昇法展開した後, 室温乾燥して0.1%ニンヒドリンの水飽和ブタノール溶液を噴霧し, 110°C 10分加熱の後にアミノ酸のスポットを判定した。

アクチグラフ: ペーパークロマトグラフにて展開した放射性化合物を発色せしめ, アクチグラフ (Nuclear Chicago Co.) にて放射性化合物の counts を自記せしめ, 合成品 spot と対比した。

酵素活性の測定法: 脱水素反応はトリフェニール・テトラゾリウム・クロライドを電子受容体とし, ツーンベルグ管にて嫌氣的に行い, 生成されたフォルマザンの赤色を醋酸エチルにて抽出し, 480 mμ にて比色定量した。フマレート・ハイドラテースはフマル酸からリンゴ酸

Fig. 1. Collection Method of Murine Leprosy Bacillus

Murine leproma 9.7 g (dry weights 2.25 g) were minced with scissors, homogenized for 2 minutes with 10 ml distilled water in Waring blender, added 35 ml of distilled water.

の形成をペーパークロマトグラフィーにて検討した。コハク酸脱水素活性はフェナジンメトサルフェイトを自動酸化還元系として加え、コハク酸からフマル酸およびリンゴ酸の形成を、ペーパークロマトグラフィーにて検討した。アコニテート・ヒドラーゼスアコニターゼはシス・アコニット酸および DL-イソクエン酸からクエン酸の形成を、サイトレート・ジンテース (縮合酵素) はオキザロ醋酸とアセチル CoA からクエン酸の形成をみた。イソサイトレート・リアーゼ (イソサイトリテース) は DL-イソクエン酸からグリオキシル酸の形成をみた。

化学的定量法: クエン酸は Natelson⁷⁾ の方法, グリオキシル酸は Friedmann & Haugen⁸⁾ の直接法によった。

材料: 1, 4 ¹⁴C フマル酸; specific activity 4.94 mc/mM, 2, 3 ¹⁴C コハク酸; specific activity 4.0 mc/mM, 5 ¹⁴C α-ケトグルタル酸; specific activity 9.33 mc/mM

は日本放射性同位元素協会のもをを第一化学薬品KKから、オキザロ醋酸, グリセルアルデヒド 3 磷酸は Nutritional Biochemicals Co. より, シス・アコニット酸は Mann Research Laboratories Inc. より, DL-イソ・クエン酸, CoA, アセチル CoA, ピリドキサル 5' 磷酸, 助酵素 I (NAD), 助酵素 II (NADP), フェナジン・メトサルフェイト (PMS) は Sigma Chemical Co. より, リボ酸, チアミンピロ磷酸, オキザロコハク酸は東京化成工業KKにより, α-ケトグルタル酸は協和醗酵工業KKより, グルコース 6 磷酸, フマル酸, コハク酸は和光純薬KKより, グリオキシル酸は Maruwaka 化学, DL-リンゴ酸は石津化学工業KKより夫々購入し, 他の試薬は市販の特級品を用いた。

結 果

アコニテート・ヒドラーゼス: フマル酸に水が附加

されてリンゴ酸ができる フマレート・ハイドラテース (フマラーゼとも云う) 活性をみるために, 1, 4- ^{14}C フマール酸を基質に用い, 放射性リンゴ酸の形成をペーパークロマトグラフにて観察した。Fig. 2 に示すように著明なリンゴ酸の形成がみられた。フマール酸とリンゴ酸の放射活性の割合から, この反応はリンゴ酸形成の方向にかたよっていると考えられる。

コハク酸脱水素酵素: 鼠癩菌にはチトクローム系が欠損しているので, コハク酸脱水素酵素につながる電子伝達系として, 自動酸化性のフェナジンをメトサルフェイト⁹⁾を加えて, 時々振盪しながら好氣的に反応を行わせた。基質として 2, 3- ^{14}C コハク酸を用い, 放射性反応生成物をペーパークロマトグラフィーにて検討した。Fig. 3 にみられるように放射性のフマール酸とリンゴ酸の形成がみられた。コハク酸脱水素酵素により形成されたフマール酸から, 同時に存在しているフマレート・ハイドラテースによってリンゴ酸が形成されたものである。

TCA サイクル系の基質を用いてのフォルモザン形成能: TCA サイクル系で脱水素反応の過程はイソクエン酸脱水素酵素, α -ケトグルタル酸脱水素酵素, コハク酸脱水素酵素, リンゴ酸脱水素酵素および焦性ブドウ酸脱水素酵素の 5 カ所である。TCA サイクル系の基質を用い鼠癩菌の磨砕抽出液により形成されるフォルモザンの

Fig. 2. Fumarate Hydratase Activity of Murine Leprosy Bacillus: Formation of Radio Active Malic Acid from Radio Active Fumaric Acid

0.06 mc of 1,4- ^{14}C fumaric acid, specific activity 4.94 mc/mM was used as substrate without adding carrier cold fumarate. 0.2g of lyophilized murine leprosy bacilli (Hawaiian Strain) were ground with 2 ml of phosphate buffer M/100, pH 7.0. The supernatant was used as enzyme solution. Incubation was carried out in 37°C for 300 minutes under anaerobic condition. Paper-chromatography: reaction material was developed with butanol: formic acid:water=10:2:5 by ascending method,

量を定量した成績が Table 1 である。焦性ブドウ酸は酸化的脱炭酸によりアセチル CoA になるとともに脱水素反応が組合さっているのであるが¹⁰⁾, 殆ど活性がみられない。リンゴ酸は最も活性が強く, リンゴ酸脱水素活性とビタミンKを経るリンゴ酸酸化酵素活性¹¹⁾ (この酵素活性については別の機会に報告する) の総和として表わされている。オギザロ酢酸は脱炭酸¹²⁾されて焦性ブドウ酸となつてから, あるいはアセチル CoA と縮合してクエン酸となつてから, または酸化的脱炭酸として直接¹³⁾脱水素されるわけであるが, フォルマザンの形成は対照と差がない。コハク酸はやや活性がみられるが用いた TTC がコハク酸脱水素酵素に直接に接続した電子受容体でないためか, それ程強い活性を示さない。

α -ケトグルタル酸はコハク酸より活性が強い。この理由として, α -ケトグルタル酸脱水素酵素とコハク酸脱水素酵素の両方の総和がでているのか, 他の系に流れてから基質として作用しているためなのかあきらかでない。オギザロコハク酸は脱炭酸されて α -ケトグルタル酸になってから脱水素酵素の段階に入るのであるが¹⁴⁾, フォルマザンの形成が対照と差がないことから, オキザロコハク酸の脱炭酸は行なわれないのではないかと考えら

Fig. 3. Succinic Dehydrogenase Activity of Murine Leprosy Bacillus: Formation of Radio Active Fumaric and Malic Acids from Radio Active Succinic Acid

0.05 mc of 2,3- ^{14}C succinic acid, specific activity 4.0 mc/mM was used as substrate without adding carrier cold succinate. Murine leprosy bacilli (dry weights 1.4g) were suspended in 20 ml of phosphate buffer M/100, pH 7.0, and disintegrated by French press under 500 atmospheric pressures. 2 ml of the disintegrated cell suspension was used as enzyme. 2 mg of phenazine methosulfate was used as electron catalyzer. Incubation was carried out in 37°C for 300 minutes occasionally shaking under aerobic condition. Paper-chromatography: reaction material was developed with butanol: formic acid:water=10:2:5 by ascending method,

Table 1. Dehydrogenase Activities of Murine Leprosy Bacillus

substrates	formazan formed $\times 10^{-7}$ mol
—	4.9
*—	4.8
pyruvate	5.0
malate	14.8
*oxaloacetate	4.8
succinate	6.5
* α -ketoglutarate	8.4
*oxalosuccinate	4.8
isocitrate	7.0
cis-aconitate	10.0
citrate	11.0
*pyruvate+oxaloacetate	4.9
lactate	6.5
glucose	4.7
glucose-6-p	7.0
glyceraldehyde-3-p	4.8

0.5 g of lyophilized murine leprosy bacilli (Hawaiian Strain) were ground with glass powder and extracted with 20 ml of phosphate buffer M/20, pH 7.0 contained 4×10^{-6} mol/ml cysteine. The supernatant was used as the enzyme solution. 1.0 ml enzyme solution, 0.1 ml NAD 2×10^{-7} mol, 0.5 ml H_2O in main vessels, 0.2 ml substrate 2×10^{-5} mol, 0.2 ml TTC 10^{-5} mol in each side vessel. Incubation was carried out at 37°C for 150 minutes under anaerobic condition.

* $MgCl_2$ 10^{-6} mol, lipoic acid 2×10^{-7} mol, TPP 2×10^{-7} mol and Co A 2×10^{-7} mol were added.

る。あるいはイソクエン酸から酸化的脱炭酸により一挙に α -ケトグルタル酸ができるために、中間代謝産物のオキザロコハク酸を経ないのかも知れない。イソクエン酸、シス・アコニット酸およびクエン酸は TCA サイクル系に従えばイソクエン酸の段階で脱水素されるのであるが、フォルマザンの形成量を見ると、クエン酸、シス・アコニット酸およびイソクエン酸の順になっており、イソクエン酸脱水素酵素によるフォルマザンの形成とは考えにくい。むしろイソクエン酸はシス・アコニット酸からクエン酸を経て脱水素されていると考えるべきであろう。クエン酸からどのような経路で脱水素過程に入るかはわからないが、サイトレート・ジンテースの逆回転によりリンゴ酸ができてから脱水素されると仮定すれば、オキザロ醋酸が基質にならない矛盾がある。焦性ブドウ酸とオキザロ醋酸を加えた系では、クエン酸ができてか

ら脱水素されるわけであるが、対照と殆ど差がない。焦性ブドウ酸を用いたのではサイトレート・ジンテース活性がみられない。醗酵系、Hexose-Pentose 回路との関連を知るために、乳酸、グルコース、グルコース 6 磷酸、グリセルアルデヒド 3 磷酸を追加したが、醗酵系の酵素は殆ど活性がなく、グルコースも磷酸化したものを与えないと活性がみられないことから、粗抽出液ではグルコースの磷酸化能が阻害されていると考えられる。

アコニテート・ハイドラテース (アコニテース): シス・アコニット酸とイソ・クエン酸からクエン酸の形成をみた。Table 2 にみられるように、どちらの基質からもクエン酸の形成がみられた。

サイトレート・ジンテース (縮合酵素): Table 3 にみられるように、オキザロ醋酸とアセチル CoA からは著明なクエン酸の形成があるが、アセチル CoA の代りに焦性ブドウ酸を用いたものでは殆どクエン酸の形成がみられない。オキザロ醋酸のみの場合も同様である。山村、楠瀬等¹⁵⁾が鳥型菌竹尾株の粗抽出液でサイトレート・ジンテース活性をみている成績では、オキザロ醋酸のみにて著明にクエン酸の形成がみられているが、鼠癩

Table 2. Aconitate Hydratase Activity of Murine Leprosy Bacillus

substrate	citrate formed $\times 10^{-6}$ mol
—	0
cis-aconitate 4×10^{-5} mol	16.0
DL isocitrate 8×10^{-5} mol	4.0

0.5 g of lyophilized murine leprosy bacilli (Hawaiian Strain) were ground with glass powder, and the enzyme was extracted with 10 ml of tris buffer M/20, pH 7.6. The supernatant was used as the enzyme solution. 2 ml of enzyme and 0.5 ml of substrate were incubated for 300 minutes at 37°C under anaerobic condition.

substrate	citrate formed $\times 10^{-6}$ mol
—	0
cis-aconitate 4×10^{-5} mol	9.9
DL isocitrate 8×10^{-5} mol	3.0

0.6 g of lyophilized murine leprosy bacilli (Hawaiian Strain) were ground, and extracted with 20 ml of tris buffer M/20, pH 7.0. Incubation times were 150 minutes. The other conditions were same above,

Table 3. Citrate Synthase (Condensing Enzyme) Activity of Murine Leprosy Bacillus

crude extract 1.3 ml	oxaloacetate 10^{-5} mol 0.3 ml	acetyl CoA 6×10^{-6} mol 0.4 ml	pyruvate 10^{-5} mol 0.4 ml	citric acid formed $\times 10^{-7}$ mol
+	—	—	—	0
+	+	—	—	1.0
+	—	+	—	1.5
+	+	—	+	1.1
+	+	+	—	22.0

0.4 g of lyophilized murine leprosy bacilli (Hawaiian Strain) were ground with glass powder, and the enzyme was extracted with 6.0 ml of phosphate buffer M/10, pH 7.4. The supernatant was used as the enzyme solution. Total volume make to two ml with distilled water, and incubation was carried out at 37°C for 240 minutes under aerobic condition.

Table 4. Isocitrate Lyase (Isocitritase) Activity of Murine Leprosy Bacillus

crude extract 1 ml	As ₂ O ₃ 0.5 ml 10^{-5} mol	substrate 0.5 ml	optical density at 540 mμ
+	—	—	0.25
+	—	DL isocitrate 8×10^{-5} mol	0.31
+	—	cis-aconitate 4×10^{-5} mol	0.32
+	+	—	0.22
+	+	DL isocitrate 8×10^{-5} mol	0.29
—	—	glyoxylate 5×10^{-7} mol	0.44
—	—	glyoxylate 10^{-6} mol	0.74
—	—	glyoxylate 2×10^{-6} mol	1.00

0.5 g of lyophilized murine leprosy bacilli (Hawaiian Strain) were ground with glass powder, and the enzyme was extracted with 10 ml of tris buffer M/20, pH 7.6. The supernatant was used as the enzyme solution. Reaction mixture make to 2 ml with distilled water, and was incubated for 300 minutes at 37°C under anaerobic condition. The reaction mixtures were treated with 0.4 ml of 10% TCA, and 1.6 ml of distilled water and 1 ml 2,4 dinitrophenyl hydrazine 2 N HCl solution were added to the deproteinized supernatants. After 3 minutes, 3 ml of 1.5 N NaOH solution was added to each tube, and make to 10 ml with distilled water.

菌の場合には菌磨砕抽出の段階で、オキザロ酢酸脱炭酸酵素活性および焦性ブドウ酸からのアセチル CoA 形成酵素が失活したのかも知れない。あるいは鼠癩菌には酸化的脱炭酸酵素活性が弱く、他の代謝系からアセチル CoA が供給されるのかも知れない。

イソサイトレート・リアーゼ（インサイトリターゼ）：嫌氣的に増殖した菌でイソクエン酸をコハク酸とグリオキシル酸に分解する酵素活性の強いことが報告されている¹⁶⁾。鼠癩菌では Table 4 にみられるように著明なグリオキシル酸の形成はみとめられない。

α-ケトグルタル酸脱水素酵素：α-ケトグルタル酸を基質にした場合フォルマザンの形成がかなりみられたので、5, ¹⁴C α-ケトグルタル酸を基質に用い、反応生成物をペーパークロマトグラフィーにて検討した。Fig. 4, 5 にみられるようにコハク酸、リンゴ酸の形成はみられず、殆どすべての放射性α-ケトグルタル酸はグルタミン酸になっていた。用いた酵素が粗酵素であったため、どこからかアミノ基が導入されたものと考えられる。

グルタミン酸脱炭酸酵素：α-ケトグルタル酸がグルタミン酸になり、グルタミン酸脱炭酸酵素により γ-アミ

Table 5. Glutamic Decarboxylase Activity of Murine Leprosy Bacillus

enzyme 1 ml	acetate buffer M/20, pH 4.8	substrate	formed γ -amino butyric acid
crude extract	1 ml	—	—
crude extract	1 ml	glutamate 10^{-5} mol	—
crude extract	1 ml	*radio active glutamate	—
crude extract + cell debris	1 ml	glutamate 10^{-5} mol	—

* reaction product of Fig. 4.

0.4 g of lyophilized murine leprosy bacilli (Hawaiian Strain) were ground with glass powder, and the enzyme was extracted with 5 ml of distilled water. The supernatant and cell debris were used as enzyme. Pyridoxal-5-p 10^{-7} mol was added to each tube, 3 ml of reaction mixture was incubated for 300 minutes at 37°C under anaerobic condition. The formation of γ -amino butyric acid was observed as a ninhydrin positive spot or radio active peak on the paper-chromatography, developed with water saturated phenol.

ノ酪酸ができ、 γ -アミノ酪酸と α -ケトグルタル酸とのトランスアミネーションによりサクシニク・セミアルデヒドが形成され、これの酸化によりコハク酸ができる経路が鳥型菌竹尾株で証明されている¹⁷⁾。鼠癩菌におけるケトグルタル酸からのコハク酸形成反応をみるために、グルタミン酸脱炭酸酵素を検討したが、Table 5 にみられるように γ -アミノ酪酸の形成はみられなかった。

Fig. 4. Radio Active Glutamic Acid Formation from Radio Active α -Ketoglutaric Acid
0.05 mc of ^{14}C α -ketoglutaric acid, specific activity 9.33 mc/mM was used as substrate without adding carrier cold α -ketoglutarate. 1.5 g of lyophilized murine leprosy bacilli (Hawaiian Strain) were ground with glass powder, and suspended to 2 ml of phosphate buffer M/50, pH 7.0. The ground cell suspension was used as enzyme, adding 1 mg of phenazine methosulfate and 5 mg of Difco bacto yeast extract. Total volume 3.4 ml reaction mixtures were incubated for 300 minutes at 37°C under aerobic condition occasionally shaking. Paper-chromatography: reaction material was developed with butanol:formic acid:water=10:2:5 by ascending method.

Fig. 5. Radio Active Glutamic Acid Formation from Radio Active α -Ketoglutaric Acid
Paper-chromatography: same material, Fig. 4. was developed with water saturated phenol by ascending method.

討 論

鼠癩菌の生菌の内部呼吸をみると、チトクロームがみられないにもかかわらず、かなり大量の酸素消費を示す。また鼠癩生菌の加熱抽出液中にはリンゴ酸の蓄積はみられず、むしろグルタミン酸の蓄積がみられる。これらのことから、生菌では円滑に代謝系が進行しているので、磨砕抽出液にて活性が認められなくても、鼠癩菌にその酵素活性がないとは言えない。鳥型菌竹尾株におけるオキザロ酢酸脱炭酸酵素は至適 pH が 5.0 位でしかも透析して Mg^{++} を加えると活性が増強されると言われている¹⁵⁾。また焦性ブドウ酸、 α -ケトグルタル酸、イソクエン酸などの酸化的脱炭酸反応には、複雑な酵素系が働いているので、磨砕抽出液では失活する可能性もたかい。鳥型菌竹尾株でも α -ケトグルタル酸の酸化的脱炭酸反応はアセトン乾燥菌ではみとめられるが、磨砕抽出液ではみとめられないと言われている¹⁵⁾。TCA

サイクル系で活性のみとめられなかった酵素活性については、別の代謝系を検討するとともに、鼠癩菌の終末電子伝達系と関連せしめて研究しなければならない。まだこの間に不明なことは多々あるが、初期の目的である鼠癩菌培養の手がかりと云う点において、問題は培地に用いる炭素源にあるのではなく、終末電子伝達系にあると云えるであろう。

総 括

1. 鼠癩菌はフマレート・ハイドラテース活性を有し、フマル酸からリンゴ酸を形成する。
2. 鼠癩菌はコハク酸脱水素酵素活性を有し、コハク酸からフマル酸を形成する。
3. 鼠癩菌はアコニテート・ハイドラテース活性を有し、シス・アコニット酸およびイソクエン酸からクエン酸を形成する。
4. 鼠癩菌はサイトレート・ジンテース（縮合酵素）活性を有し、アセチル CoA とオキザロ酢酸からクエン酸を形成する。しかしアセチル CoA の代りに焦性ブドウ酸、チアミンピロリン酸、助酵素 I, CoA, リボ酸を用いてもクエン酸の形成はみられなかった。
5. 鼠癩菌のイソサイトレート・リアーゼ（イソサイトリテース）活性を検討したが、イソクエン酸からグリオキシル酸の形成はみられなかった。
6. 鼠癩菌の α -ケトグルタル酸脱水素酵素活性を検討したが、 α -ケトグルタル酸からコハク酸の形成は検出することができなかった。
7. 鼠癩菌は α -ケトグル酸からグルタミン酸を形成する。
8. 鼠癩菌のグルタミン酸脱炭酸酵素活性を検討したが、 γ -アミノ酪酸の形成は認められなかった。

文 献

1. Gray, C.T.: The respiratory metabolism of murine leprosy bacilli. *J. Bacteriol.* **64**, 305-313, (1952)
2. Ito, T. and Sonoda, R.: Biochemical studies on the murine leprosy bacillus. II. Respiration and respiration accelerating substances. *Biken's J.* **1**, 157-165, (1958)
3. Mori, T., Kosaka, K. and Ito, T.: Carbohydrate metabolism of the murine leprosy bacillus. I. Studies on the Respiratory enzyme system, especially the diaphorase and malic dehydrogenase activities. *Biken's J.* **4**, 225-233, (1961)
4. Kusaka, T., Yamanouchi, T., Shoji, K., Mori, T., Ito, T. and Sato, R.: Isolation of BCG cell grown *in vitro* and a comparative study of cytochromes in *Mycobacteria* grown *in vitro* and *in vivo*. *La Lepro*, **33**, 28-37, (1964)
5. Mori, T., Kosaka, K. and Ito, T.: Detection by Nile blue staining of tissue contaminants in murine leprosy bacilli preparation. *Biken's J.* **3**, 261-263, (1960)
6. Mori, T., Kosaka, K., Ito, T. and Nishimura, S.: Collection of murine leprosy bacillus. *Jap. J. Bact.* **16**, 808-813, (1961)
7. Natelson, S., J.B. Pincus and J.K. Lugovoy: Microestimation of citric acid, a new colorimetric reaction for pentabromo acetone. *J. Biol. Chem.* **175**, 745-750, (1948)
8. Friedmann, T.E. and G.E. Haugen: Pyruvic acid II, the determination of ketoacids blood and urine. *J. Biol. Chem.* **147**, 415-442, (1943)
9. Singer, T., E. Kearney and V. Massey: Newer knowledge of succinic dehydrogenase. *Advance in Enzymology.* **18**, 76-79, (1957)
10. Korkes, S., A.D. Campillo I.C. Gunsalus and S. Ochoa: Enzymatic synthesis of citric acid IV. pyruvate as acetyl donor. *J. Biol. Chem.* **193**, 721-735, (1951)
11. Asano, A., T. Kaneshiro and A.F. Brodie: Malate-vitamin K reductase, a phospholipid-requiring enzyme. *J. Biol. Chem.* **240**, 895-905, (1965)
12. Krampitz, L. O. and C. H. Werkman: The enzymic decarboxylation of oxaloacetate. *Biochem. J.* **35**, 595-602, (1941)
13. Vennesland, B. and E.A. Evans: The formation of malonic acid from oxaloacetic acid by pig heart preparations. *J. Biol. Chem.* **156**, 783-784, (1944)
14. Ochoa, S. and E.W. Tabori: Biosynthesis of tricarboxylic acid by carbon dioxide fixation II, oxalosuccinic carboxylase. *J. Biol. Chem.* **174**, 123-132, (1948)
15. Yamamura, Y., M. Kusunose, S. Nagai and E.

- Kusunose : Studies on the tricarboxylic acid cycle in Tubercle bacillus, I. some properties of the enzyme systems. J. Biochem. **41**, 513-528, (1954)
- 16) Saz, H.J. and E.P. Hillary : The formation of glyoxylate and succinate from tricarboxylic acids by *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. J. **62**, 563-569, (1965)
- 17) Shoji, K., T. Mori and K. Ito : Studies on the amino acid metabolism of *Mycobacterium Tuberculosis* II. γ -aminobutyric acid- glutamic acid transamination of *Mycobacterium avium*, strain Takeo. Medical Journal of Osaka University, **8**, 607-613, (1958)