芽胞形成菌における Dipicolinic Acid 生合成 および蓄積機構に関する研究

I. Diketopimelate-NH₃ Complex の Dipicolinic Acid 生成反応 に関する活性物質の物理的、化学的性状

川崎 近 太 郎 桜 井 純 近 藤 雅 臣

大阪大学薬学部衛生化学教室

[受付：7月1日，1968年]

緒 言

Diketopimelic acid (DKP) とアンモニウム塩の混液に芽胞形成期の細胞の無細胞抽出液を添加すると急激な酸素吸収を伴ない Dipicolinic acid (DPA) が生成され、しかも芽胞形成直前すなわち DPA 生合成直前の細胞に最も高い活性が認められることを前報で報告した(川崎，近藤，桜井，1967)。この反応について Tanenbaum (1964) らは *Penicillium citreo-viride* を用いた実験において，DKP とアンモニウム塩の混液をそのまま 24 時間放置した際 DPA が自動的に合成されることを報告している。しかし，前報においても明らかなごとく，この自動合成は，用いた反応条件下では 4 時間以内には全くおこらず，この際無細胞抽出液を添加するとただちに DPA の合成が完了することが明らかである。このことは芽胞形成直前の細胞内に，この反応を触媒する物質が出現することを示すものである。そこでこの触媒物質を明らかにするために急速に DPA を生合成しつつある Sporangia の原形質部分のみをとり出し，触媒物質を種々の方法で分画し，まずその化学的ならびに物理的性質について検討した。

実 験 方 法

a) 培養方法および無細胞抽出液の調製

Bacillus subtilis NRRL 558 を Kondo (1964) らと同様の方法で培養し，芽胞形成を行なわしめた。無細胞抽出液は芽胞形成期の細胞をブラウン細胞破壊機(2,000 RPM, 1 時間)で完全に破壊し，10,000 RPM, 1 時間遠心分離して調製した。

b) DPA 合成の活性測定

DKP (10 μ mole)，塩化アンモニウム(10 μ mole)，

1/10 M リン酸緩衝液 2.0 ml に蒸留水を加えて全量 4.0 ml とし，37°C，30 分間振とうし，この時の消失 DKP 量，または生成 DPA 量を測定して活性とした。消失 DKP 量の測定は 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法(衛生試験法注解，1965)に改良を加えた方法により行なつた。

c) 化学的分析

蛋白質量の測定には Folin 試薬を用い Lowry (1951) らの変法を用いた。

活性分画に含まれるペプチドのアミノ酸分析は，6N 塩酸に分画を溶解し，封管中 105°C，24 時間加水分解したのち，塩酸を完全に除去し，一定量の緩衝液(pH 2.2)に溶解してアミノ酸自動分析装置を用いて行なつた。

シスチン，システイン量の測定は蛋白質またはペプチド分画を過ギ酸酸化し，これを 6N 塩酸に溶解して油浴中 100°C，24 時間加水分解したのち完全に塩酸を除去し，アミノ酸自動分析装置でシステイン酸量を測定しシスチン，システインの和を求める方法によつた。

鉄の測定は矢野(1958)らによるニトロソ R 塩法に従つて行なつた。蛋白質中の鉄は蛋白質含有液 1 ml と 1% 塩酸とをよく混和し，3°C の水槽中に 3 時間以上放置し，鉄を遊離させたのちトリクロル酢酸溶液で蛋白質を除去し，その溶液を鉄測定の検体とした。

d) クロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーは n-BuOH：酢酸：水(4：1：5)の展開溶媒で 15 時間展開した。DEAE-セルローズカラムクロマトグラフィーは Valentine (1962) らのフェレドキシン分離法に使用された方法に一部改良を加えて行なつた。

e) その他

DKP はジエチルオキザル酢酸から Cope(1967) らの方法に従って合成した。

実験結果

i) 触媒物質の熱安定性

DKP とアンモニウム塩から DPA を合成する反応が Bach (1966) らの提唱する酵素の関与により進行するか、あるいは芽胞形成に伴ない細胞質中に出現する他の物質によるかを明らかにするための方法のひとつとして、まず熱に対する安定性をしらべた。無細胞抽出液を 100°C で 10, 20, 30 分間加熱したのち DPA 合成能を測定した結果第 1 表に示されるように約 90 % の活性が残存することが明らかとなった。このことは反応に関与する触媒物質が、熱に対して非常に安定であることを示し、熱により容易に変性しない物質が主役を演じているものと考えられる。

Table 1 The Thermostability of Active Fraction

Heat time* (min)	0	10	20	30	120
Activity (%)	100	88.0	88.2	88.0	76.8

* Samples were heated at 100°C

ii) 酵素処理による活性の変化

触媒物質が熱に対して安定であることからこの触媒反応に関与する物質が蛋白性のものである可能性が低くなったが、もしこの考えが妥当であれば、無細胞抽出液を蛋白質分解酵素であるプロナーゼ、トリプシン、パパイインあるいはペプシンなどにより処理しても活性に影響をおよぼさなはずである。そこで無細胞抽出液をこれらの酵素により処理し、経時的に DPA 合成活性を検討したところ、第 2 表に示すようにプロナーゼ処理では 4 時間で無細胞抽出液の蛋白質はほぼ完全に加水分解されているにもかかわらず、活性は約 80 % 保持されることが判明した。24 時間処理では約 50 % に活性が減少した

Table 2 Effect of Pronase Treatment on the Activity of Active Fraction

Reaction time* (hr)	Activity	
	Without treatment	With treatment
4	100%	85.7%
24	100	42.9

* Time of Pronase treatment at 50°C in M/25 Tris buffer (pH 7.8)

が、これは酵素分解による直接の影響であるかどうかはわからない。また、他の酵素により処理した場合には活性は全く影響を受けず、これらの結果からこの触媒物質の本体が蛋白性のものである可能性はさらに低くなった。

iii) 透析膜に対する透過性

触媒物質が耐熱性であり、また蛋白質分解酵素の処理によってもほとんどその活性に影響がないことから、この物質が蛋白質でないことが示唆された。そこで、この物質を単離するための方法のひとつとして透析膜に対する態度を検討した。まずセロハン膜内に 24 時間プロナーゼ処理した無細胞抽出液を入れ、48 時間蒸溜水中で透析すると第 3 表のごとくセロハン膜内に若干の活性は残ったが透析膜外に多くの活性が検出された。しかし、プロナーゼ未処理の無細胞抽出液を用いた場合セロハン膜外の活性は約 1/4 に減少し非透析部分に高い活性が認められた。一方、プロナーゼ未処理の無細胞抽出液を分子量 10,000 以下のものを通過するコロジオン膜に入れ減圧でろ過するとこの触媒物質は完全に透過することが判明した。これらの結果から触媒物質はかなり分子量の小さいものであることが明らかとなった。

Table 3 Behavior of Active Fraction to Dialysis

	DPA formed	DKP consumed
Sack content	6.5%	6.0%
Dialysate	16.8	14.0

* Dialysis by cellophane membrane for 24 hours after Pronase treatment

iv) 触媒物質と DPA 生成量の関係

DPA 合成反応が酵素の関与でなく分子量の小さい化学的物質であるならば無細胞抽出液量と DPA 生成量の間に比例関係が成り立つはずである。そこで、各濃度に稀釈した無細胞抽出液を用いて DPA 生成量を検討した結果第 1 図に示したように無細胞抽出液の濃度と DPA 生成量の間に比例関係が存在することがわかり、DPA 前駆物質と触媒物質との反応は一次反応により進行するものと考えられた。

v) 各種試薬に対する活性の変化

DKP とアンモニウム塩からの DPA 合成が Dehydrodipicolinic acid (DHDP) を経由して進行するという可能性から考えると、この物質が DHDP を脱水素して DPA を生成することが予想される。そこで、こ

Fig. 1 Dipicolinic Acid Production versus Active Fraction

の物質の化学的性質を検討する際とくに酸化還元試薬に対する態度を明らかにすることにした。その結果第4表に示したように各 $10 \mu\text{mole}$ のシスチン、モノヨード酢酸、PCMB、アスコルビン酸を添加した場合いずれも20%前後活性が阻害され、 $10 \mu\text{mole}$ のシアンカリウムでは完全に阻害された。一方、各 $10 \mu\text{mole}$ のシステイン、 β -メルカプトエタノールを添加した場合いずれも反応を促進し、とくに後者の場合はいちじるしい促進がみられた。これらの試薬の性質から考えてSH基がこの反応に大きな役割を演じていることが推察された。その他の知見としてはEDTAの添加や硫化水素ガスの吹き込

Table 4 Effect of Various Reagents on the Activity of Active Fraction

Reagent	Activity $\mu\text{g/ml}$	Relative activity
Cell-free extract	60	100
2-Mercaptoethanol	188	313
Cysteine	74	123
Cystine	48	80
Monoiodoacetic acid	52	87
PCMB	44	73
Ascorbic acid	40	67
Potassium cyanide	0	0

Reagent: $10 \mu\text{mole}$

みによつては活性は影響されなかつた。またNADの添加あるいはDKPとアンモニウム塩溶液にNADのみを直接添加した場合も全く影響がなかつた。

vi) 加水分解および灰化による影響

触媒物質が分子量の小さい物質であることが判明したが、この物質の活性部分が有機性のものかあるいは無機性のものかについては明らかでない。これらの区別を確実にこなうことは困難であるが、その方法のひとつとしてこの物質の活性が酸およびアルカリ加水分解、あるいは灰化によりどのような影響を受けるかを検討した。まず、無細胞抽出液を1.5N HCl溶液中、 100°C 、1時間加熱すると完全に活性がなくなり、NaOHによる加水分解でも同様に活性がなくなることが判明した。つぎ

Fig. 2 Chromatogram of Cell Free Extract by DEAE Cellulose

に、この抽出液をルツボに入れ完全に灰化したのち水溶液とし活性を測定したが、完全に活性が消失した。これらの結果からこの触媒物質が有機性のもので、しかも加水分解される部分をもった物質であることが推察された。

vii) 触媒物質の分画

触媒物質を単離同定するために無細胞抽出液をリン酸型の DEAE-セルローズカラムによるクロマトグラフィーを行なつて分画し活性の分布を検討した。第2図に示されるように活性物質はふたつの分画に分かれ、DEAE-セルローズに吸着されることなく流出してくる分画は活性が高く、0.25 M リン酸カリウム溶液で流出してくる分画は活性が低かった。活性の分布と平行して蛋白量および鉄について検討した結果活性物質とこれらが同じ分画に存在することがわかった。そこで DPA 合成反応に鉄の関与が考えられるので反応系に鉄を添加し、その影響を検討したところ鉄のみでこの反応を促進することはできないが、無細胞抽出液に鉄を添加すると反応がより促進されたことからこの反応に関与する物質と鉄との間に相関関係があるものと考えられた。DEAE-セルローズに吸着されない活性分画の一定量を加水分解せずそのままのものと、この分画をさきの量に相当する量加水分解したのち両者をアミノ酸自動分析装置で比較分析したところ、メチオニン、プロリン、グリシン、アラニン、シスチンおよびシステインの6種のアミノ酸がとくに増加することが判明した。この結果から活性分画はペプチドを含んでいるものと推察される。一方、DEAE-セルローズカラムに吸着されない活性分画に等量の 20% TCA を加えたときわずかに沈でんがみられたが活性はすべて可溶性部分に存在することがわかった。沈でんを遠心機で除去後の上清をイソプロパノール：水：28%アンモニア水 (70：30：0.35) を展開溶媒としてペーパークロマトグラフィーを行ない、乾燥後 1 cm 幅に切つて各々について活性を測定した。その結果 Rf 0.9 附近に活性が分布し、その抽出液は 260 mμ に極大吸収を有することが判明し、核酸の共存あるいは関連物質であることが示唆された。

考 察

DKP とアンモニウム塩に *B. cereus* の無細胞抽出液を加えると DHDPA を經由して DPA が生成されることは Powell (1959) によりすでに報告されているが、この反応に関与する物質については全く不明である。一方、Tanenbaum (1965) らは *Penicillium citreo-viride*

を用いた実験において、DKP とアンモニウム塩の混液を長時間保温するだけで DPA が生成することから、DPA 生成の最終段階であるこの反応が触媒物質の関与を必要としない自動合成によるものであると論じている。しかし、前報(川崎、近藤、桜井、1967)において明らかにしたごとく pH 7.0 附近では 24 時間以内では自動合成はほぼ無視することができ、また、この条件下で無細胞抽出液を添加したとき極めて短時間に DPA が合成されることから、芽胞形成菌において DPA 生成の最終段階を促進する物質が存在することが明らかである。自動合成説についてはさらに芽胞形成菌が短時間に芽胞形成にともなつて DPA を生成することから時間的にも否定さるべきものと考えられる。この触媒物質は芽胞形成直前の細胞中に蓄積され、DPA 生成に関与するものと考えられる。

無細胞抽出液を分子量 10,000 以下の物質を通過させるコロジオン膜で処理した際、通過する分画にすべての活性が存在するが、セロハンで透析した場合活性はほとんどセロハン膜内に残存し、プロナーゼ処理により活性部分が容易に透析されるようになる。また、この活性は熱に対して安定であり、活性分画の濃度と DPA 生成量との間に比例関係が成立することが示されている。これらの事実からこの触媒物質は酵素そのものである可能性は低く、酵素の active fragment あるいは補酵素または他の活性物質をふくむ peptide fragment であるものと推察される。触媒物質は EDTA の添加や H₂S ガスの通過では活性に影響なく、また無細胞抽出液を 1.5 N HCl で 100°C、1 時間加熱すると活性は完全に消失したことなどから金属などの無機物である可能性は低い。また、各 10 μ mole のシスチン、モノヨード酢酸、PCMB、アスコルビン酸で若干阻害され、各 10 μ mole のシステインおよび β-メルカプトエタノールでは促進されることから、SH 基を必要とする有機物質であるものと推定される。NAD を添加した場合および DKP とアンモニウム塩に NAD のみを添加した場合のいずれにおいても DPA 生成には全く影響のないことから NAD が関与している可能性は低い。

この触媒物質は DEAE-セルローズカラムによつても、またペーパークロマトグラフィーでも 2 種類に分離され、一方の分画に活性が強く、他の分画は低いことが示された。このことは触媒作用を有する物質が 2 種類存在するのか、あるいは活性物質とこれに何らかの物質が結合したものとがあるため 2 種類の分画としてあらわれたのか、いずれかであると考えられる。DEAE-セル

ローズを用いた分画法によれば、活性の高い分画は吸着されことなく流出されるので、この活性物質は中性または塩基性の性質をもっているものと考えられる。DEAE-セルローズに吸着されない活性の高い分画にTCAを添加し、遠心操作を行なうとすべての活性は上清に存在し、これをペーパークロマトグラフィーで展開して活性部分を溶出したとき、この溶液が260m μ に最大吸光度を有することがわかった。この結果から活性物質と核酸の関連が推察されるが、この点については現在精製法と平行して検討中である。

総 括

Sporangium に存在し、DKP とアンモニウム塩からDPAを生成する触媒物質の化学的、物理的性質を検討した。触媒物質は熱安定性であり、この濃度とDPA生成量との間には比例関係が成立する。この物質は分子量10,000以下の物質を通過させるコロジオン膜を通過するがセロハン膜は容易に通過しない。プロナーゼ処理により活性は短時間では変化しないが、この処理によりセロハン膜を通過するようになる。これらの事実から触媒物質は比較的低分子の物質であり、ペプチドを含む物質であると推定された。この物質の活性はKCNにより完全に阻害され、また、システインおよび β -メルカプ

トエタノールでは促進されることが判明した。DEAE-セルローズカラムによる分画で活性物質は2種類に分離されカラムに吸着されない活性の高い分画は260m μ に最大吸光度を示すことがわかった。

文 献

- Bach, M. L. and Gilvarg, C. (1966): J. Biol. Chem., **241**, 4563.
 Cope, A. C. and Fournier Jr., A. (1957): J. Am. Chem. Soc., **76**, 3896.
 Janssen, F. W., Lund, A. J. and Anderson, L. E. (1958): Science, **127**, 26.
 川崎近太郎, 近藤雅臣, 桜井純(1967): 日本細菌学雑誌, **22**, 505.
 Kondo, M., Takeda, Y. and Yoneda, M. (1964): Biken J., **7**, 153.
 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farrm, A. L. and Randall, R. J. (1951): J. Biol. Chem., **193**, 265.
 日本薬学会編, 衛生試験法注解(1965): p. 157.
 Powell, J. F. and Strange, R. E. (1959): Nature, **184**, 878.
 Tanenbaum, S. W. and Kaneko, K. (1964): Biochemistry, **3**, 1314.
 Valentine, R. C. (1962): Biochem. Biophys. Res. Commun., **7**, 453.
 矢野圭司(1958): 化学の領域臨時増刊, **33**, 19.

Studies on the Mechanisms of Biosynthesis and Accumulation of Dipicolinic Acid in Spore-Forming Bacteria

I. Some Physical and Chemical Properties of an Active Fraction Catalyzing Synthesis of Dipicolinic Acid From the Diketopimelate-NH₃ Complex

Chikataro KAWASAKI, Jun SAKURAI and Masaomi KONDO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

An active fraction catalyzing synthesis of dipicolinic acid from the diketopimelate-NH₃ complex was extracted from sporangium. Some physical and chemical properties of the fraction were investigated. The activity of this fraction was stable to heat treatment at 100°C for 2 hours and also to the proteinase digestion. The active fraction was dialysable against the cellophane and collodion membrane. When the effects of various reducing agents on the activity of the fraction were compared, it was found that the addition of β -mercaptoethanol to the reaction system showed a significant increase of dipicolinic acid formation. PCMB and monoiodoacetate partially inhibited the reaction. KCN completely inactivated the fraction. Neither acid hydrolysate nor ash of the fraction showed any activity.