腸内細菌によるこんにゃくマンナンの代謝機構に 関する研究 (第 4 報)

On Mechanism of “Konjac” Mannan Metabolism
by Gastrointestinal Bacteria

Aerobacter mannanolyticus の代謝経路とこんにゃくマンナンの代謝機構

On Metabolic Pathway in *Aerobacter mannanolyticus* and on Mechanism
of “Konjac” Mannan Metabolism by *Aerobacter mannanolyticus*

(昭和 40 年 10 月 13 日 受理)

印 南 敏 長谷川 忠 男*
(Satoshi Innami) (Tadao Hasegawa)

鈴木 隆 雄* 佐 橋 佳 一*
(Takao Suzuki) (Yoshikazu Sahashi)

The authors previously suggested that a possible mechanism for the “Konjac” mannan metabolism by *A. mannanolyticus* may be related to glyoxylate pathway. However, later it was found that isocitritase was significantly formed in the cells grown on citrate medium, while no enzyme activity was measured in the cells grown on glucose medium. It was presumed from this that isocitritase may be adaptively formed by *A. mannanolyticus* grown on citrate medium.

In the present paper, each enzyme activity concerning the TCA cycle in *A. mannanolyticus* was measured.

Most of the enzymes relating to the TCA cycle have been demonstrated to be presented constitutively in cell free extracts of *A. mannanolyticus* grown on citrate medium from the experimental data.

In conclusion, the authors correct the previous hypothesis for the “Konjac” mannan metabolism and propose as follows; “Konjac” mannan in human diet is decomposed to glucose and mannose by *A. mannanolyticus* in intestine, and subsequently a part of these sugars may be finally metabolized via TCA cycle by *A. mannanolyticus* in our gastrointestinal.

ま え が き

著者らはさきに人体内におけるこんにゃくマンナン分解細菌の一種である *A. mannanolyticus* の代謝経路について研究して、本菌がグリオキシル酸サイクルを有する可能性の高いことから、本菌によるこんにゃくマンナンの代謝も最終的にはグリオキシル酸サイクルを経て行なわれる可能性もあることを示唆した¹⁾。しかしながらその後の研究²⁾により本菌はクエン酸を唯一の炭素源としたときは isocitritase (isocitrate lyase) を生成するが、グルコースあるいはマンノースを炭素源とするときは isocitritase を生成しないことが判明した。このことはクエン酸を唯一の炭素源としたときに isocitritase が誘導的に生成されたものであり、グリオキシル酸サイク

ルが本菌に constitutive なものでないことを示すものであろう。従って、通常の TCA サイクルが本菌によるこんにゃくマンナンの最終的な代謝機構であると推察される。

そこで、今回は本菌がクエン酸を唯一の炭素源とした場合でも、TCA サイクルの各メンバーを代謝し得る能力があるかどうかについて検討すると同時にグリオキシル酸サイクルについても言及し、さらにこれらの結果よりこんにゃくマンナンの代謝機構について考察を加えたので報告する。

実 験 方 法

1. 菌株：井上³⁾によりこんにゃくマンナン分解細菌として人糞便より分離同定された *A. mannanolyticus*

suzu-II を使用した。

2. 培地組成および培養方法：Koser のクエン酸培地すなわち， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%， KH_2PO_4 0.1%， $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ 0.15%， Na-citrate 0.3% を前培養培地とし，これに 37°C ，24 時間培養したのち，上記培地の 2 倍濃度の培地を増殖用培地とし，500 ml 容三角フラスコに 150 ml ずつ分注後滅菌したものに，前記前培養菌体を接種し， 37°C ，48 時間静置培養した。

Table 1. Medium Composition

Components	Gram/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4
KH_2PO_4	1.0
$\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$	3.0
Na-Citrate	6.0

3. 酵素液の調整法：培養終了後集菌洗滌し，超音波発振器にて 20 分間処理して菌体を破壊したのち，11,000 r. p. m. にて遠沈した無細胞抽出液を酵素液として使用した。

4. アコニターゼ：クエン酸から本酵素によって生ずるイソクエン酸を isocitric dehydrogenase によって，オキザロコハク酸とし遊離する 2 H を NADP と共軛させ NADPH^+ による 340 $\text{m}\mu$ の吸収増加を測定する⁴⁾⁵⁾。

5. イソクエン酸脱水素酵素：イソクエン酸を基質とし，340 $\text{m}\mu$ における NADP の還元による吸光度の増加を測定することによって酵素活性を測定した⁶⁾。

6. α -ケトグルタル酸脱炭酸酵素： α -ケトグルタル酸からの炭酸ガスの排出をワールブルグ検圧法により測定することにより酵素活性を測定した⁷⁾。

7. コハク酸酸化酵素：水素受容体として赤血塩を用い，チトクローム酸化酵素を阻害するために青酸を加え，赤血塩の還元速度を波長 400 $\text{m}\mu$ における吸光度の減少により測定し，酵素活性を測定した⁸⁾。

8. フマラーゼ：紫外部におけるフマル酸の二重結合による吸収を光電光度計で測定する方法に従ってフマラーゼ活性を測定した⁹⁾。

9. リンゴ酸酵素：リンゴ酸を基質とし，340 $\text{m}\mu$ における NADP の還元による吸光度の増加によってリンゴ酸酵素活性を測定した⁵⁾。

10. リンゴ酸脱水素酵素：リンゴ酸を基質とし，340 $\text{m}\mu$ における NAD の還元による吸光度の増加によって酵素活性を測定した⁵⁾。

11. オキザロ酢酸脱炭酸酵素：オキザロ酢酸からの該酵素による脱炭酸をワールブルグ検圧法により酵素活性を測定した⁷⁾。

12. 縮合酵素：オキザロ酢酸と酢酸を基質にして生成

するクエン酸を倉富氏⁹⁾の方法によって定量し，縮合酵素活性を測定した。

13. リンゴ酸合成酵素活性：クエン酸生育菌体の無細胞抽出液を用い，グリオキシル酸と酢酸からリンゴ酸を経て生成するビルビン酸を前報にのべた方法に従って同定し Friedman and Haugen 法¹⁰⁾により定量することによって，リンゴ酸合成酵素活性の存在を検討した。

実 験 結 果

1. TCA サイクルの諸酵素

こんにゃくマンナン分解菌の一種である *A. mannolyticus* がクエン酸を唯一の炭素源とした場合でも，TCA

Table 2. Citric Acid Formation from Acetate and Oxalacetate by Cell-free Extract

	1	2	3
K-acetate (μM)	50	50	—
Oxalacetic acid (μM)	50	—	50
ATP (μM)	5	5	—
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (μM)	10	10	—
Phosphate buffer* (ml)	1.5	1.5	1.5
Cell extract† (ml)	1.0	1.0	1.0
Citric acid content in reaction mixture (γ)	140	15	10
Citric acid formed (μM)	0.43	—	—

* 0.066M Phosphate buffer, pH 7.4

† Cell-free extract 5.9 mg N per ml

Total volume, 3.0 ml

Reaction time, 10 min. 37°C

Fig. 1 Aconitase Activity of Cell-free Extract

Complete system of reaction contained 100 μM of sodiumcitrate, 1.5 μM of MnCl_2 , 0.375 μM of NADP and cell-free extract (0.13mg N) in a final volume of 3.0 of 0.05 M Tris buffer, pH 7.5.

サイクルの各メンバーを代謝し得る能力があるかどうかを検討した。

結果は第1図～第8図、第2表に示したごとく、クエン酸を唯一の炭素源として生育した *A. mannanolyticus* の無細胞抽出液にアコニターゼ(第1図)、イソクエン酸

Fig. 2 Isocitric Dehydrogenase Activity of Cell-free Extract

Complete system of reaction consisted of $30\mu\text{M}$ of sodium isocitrate, $15\mu\text{M}$ of MgCl_2 , $1.5\mu\text{M}$ of MnCl_2 , $0.375\mu\text{M}$ of NADP and cell-free extract (0.18mg N) in a final volume of 3.0ml of 0.05M Tris buffer, pH 7.5.

Fig. 3 Carbon Dioxide Evolution in the Decarboxylation of α -Ketoglutaric Acid by Cell-free Extract

The reaction mixture contained $20\mu\text{M}$ of α -ketoglutaric acid, $8\mu\text{M}$ of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and cell-free extract (1.35mg N) in a final volume of 3.0ml of 0.066M phosphate buffer, pH 7.4.

脱水素酵素 (第2図), α -ケトグルタル酸脱炭酸酵素 (第3図), コハク酸酸化酵素 (第4図), フマラーゼ (第5図), リンゴ酸酵素 (第7図), リンゴ酸脱水素酵素 (第6図), オキサロ酢酸脱炭酸酵素 (第8図), 縮合酵素 (第2表) などの TCA サイクル中の諸酵素活性の存在することを認めた。

Fig. 4 Succinic Dehydrogenase Activity of Cell-free Extract

Complete system of reaction consisted of $30\mu\text{M}$ of sodium succinate, $30\mu\text{M}$ of KCN, $1.2\mu\text{M}$ of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ and cell-free extract (0.4mg N) in a final volume of 0.066M phosphate buffer, pH 7.4.

Fig. 5 Fumarase Activity of Cell-free Extract

Complete system of reaction consisted of $30\mu\text{M}$ of sodium fumarate, and cell-free extract (0.08mg N) in a final volume of 3.0ml of 0.066M phosphate buffer, pH 7.4.

Fig. 6 Malic Dehydrogenase Activity of Cell-free Extract

Complete system of reaction consisted of $30\mu\text{M}$ of sodium L-malate, $30\mu\text{M}$ of NaCN, $1.5\mu\text{M}$ of NAD and cell-free extract (0.10 mg N) in a final volume of 3.0 ml of 0.05 M Tris buffer, pH 7.5.

Fig. 7 Malic Enzyme Activity of Cell-free Extract

Complete system of reaction consisted of $30\mu\text{M}$ of sodium L-malate, $1.5\mu\text{M}$ of MnCl_2 , $0.75\mu\text{M}$ of NADP and cell-free extract (0.11 mg N) in a final volume of 3.0 ml of 0.05 M Tris buffer, pH 7.5.

2. グリオキシル酸サイクルの存在

すでに、著者らは *A. mannanolyticus* がクエン酸を唯一の炭素源あるいは酢酸+グリオキシル酸、リンゴ酸などをそれぞれ炭素源として生育した場合も、その洗滌菌体あるいは無細胞抽出液がクエン酸からグリオキシル酸を生成することを確認した²⁾。

そこで、さらに malate synthetase が存在するかどうかを確かめるためにクエン酸を唯一の炭素源として生育

Fig. 8 Carbon Dioxide Evolution in the Decarboxylation of Oxalacetic Acid by Cell-free Extract

The reaction mixture contained $20\mu\text{M}$ of oxalacetic acid, $8\mu\text{M}$ of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and cell-free extract (1.22 mg N) in a final volume of 3.0 ml of 0.066 M phosphate buffer, pH 7.4.

した洗滌菌体がグリオキシル酸と酢酸からリンゴ酸を生成するか否かをピルビン酸の生成の有無で検討した。

結果は第3表に示す如く、グリオキシル酸と酢酸を基質とし、ピルビン酸の生成を認めた。このことはグリオキシル酸と酢酸から malate synthetase によりリンゴ酸が生成し、生成リンゴ酸は上述の実験によって存在の判明した malic enzyme, malic dehydrogenase, oxalacetic carboxylase などの作用によってピルビン酸を生成したものと推定できる。

Table 3. Pyruvate Formation from Glyoxylate and Acetate by Intact Cells of *A. mannanolyticus*

Substrate	Pyruvate formed in reaction mixture(μM)
Acetate	0.07
Glyoxylate	0.61
Acetate + Glyoxylate	0.65

Complete system of reaction contained each $100\mu\text{M}$ of Na-acetate and Na-glyoxylate, $12\mu\text{M}$ of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 103 mg of intact cells in a final volume of 3.0 ml of 0.066 M phosphate buffer, pH 8.0. Temperature, 37°C . Time, 24 hours.

これらの結果から、クエン酸を唯一の炭素源として生育した *A. mannanolyticus* にはグリオキシル酸サイク

ルの各酵素が適応的に生成されたものと考えられる。すなわち、グリオキシル酸サイクルの存在を推定できる。

考 察

著者らは人体内に存在するこんにゃくマンナン分解細菌の一種である *A. mannanolyticus* の代謝経路について研究して、本菌がグリオキシル酸サイクルを有する可能性の高いことから、本菌によるこんにゃくマンナンの代謝もグリオキシル酸サイクルを経て行なわれる可能性もあることを示唆したり。

しかしながら、前報²⁾にも記載した通り、本菌はクエン酸を唯一の炭素源としたときは、isocitritase を生成するが、グルコースを炭素源とするときは isocitritase を生成しないことが判明した。このことはクエン酸を唯一の炭素源としたときに isocitritase が適応に生成されたものであり、グリオキシル酸サイクルが本菌に constitutive なものでないことを示すものであると考えられた。従って、通常の TCA サイクルが本菌の代謝経路であると推察された。

そこで、今回は本菌がクエン酸を唯一の炭素源とした場合でも、TCA サイクルの各メンバーを代謝し得る能力があるかどうかを検討した結果、*A. mannanolyticus* の intact cell および cell-free extract のいずれにおいても TCA サイクルの各メンバーを代謝し得ることを証明することができた。従って、本菌はグリオキシル酸サイクルを有するが、それはクエン酸や酢酸、リンゴ酸などを炭素源とした場合にのみ誘導的に生成されるものであり、本菌に constitutive なものでなく、TCA サイクルが本菌に constitutive なものであることを裏付けている。かくして、著者らは、*A. mannanolyticus* による人体腸内におけるこんにゃくマンナンの代謝の一部は *A. mannanolyticus* の増殖機構¹⁾ そのものであり、次の如く行なわれるものと推定する。

すなわち、本菌はこんにゃくマンナンの有無に関係なしにある程度人体腸内に存在¹¹⁾ しており、多糖類を除く各種の糖やある種のアミノ酸やグリオキシル酸サイクルメンバーなどを炭素源として増殖し、ある程度のマンナーゼを生成分泌していると推定される。こんにゃくマンナンが入ってきた場合、まず最初に既存量のマンナーゼによりそれをマンノースとグルコースに分解する。次にこれら生成糖の一部は本菌により TCA サイクルを経て代謝される。本菌はこれによりますます増殖して多量のマンナーゼを生成分泌し、ますますこんにゃくマンナンの分解を行なうものであり、95~99%といわれるこんにゃくマンナンの消化率¹²⁾¹³⁾の一部はかくして行なわれるものと推定される。

要 約

こんにゃくマンナン分解細菌の一種である *A. mannanolyticus* がクエン酸を唯一の炭素源とした場合でも、TCA サイクルの各メンバーを代謝し得る能力があるかどうかを検討したところ、クエン酸を唯一の炭素源として生育した *A. mannanolyticus* の無細胞抽出液にアコニターゼ、イソクエン酸脱水素酵素、 α -ケトグルタル酸脱炭酸酵素、コハク酸酸化酵素、フマラーゼ、リンゴ酸酵素、リンゴ酸脱水素酵素、オキザロ酢酸脱炭酸酵素、縮合酵素などの TCA サイクル中の諸酵素活性の存在することを認めた。

また、クエン酸を唯一の炭素源として生育した *A. mannanolyticus* にはグリオキシル酸サイクルの各酵素が誘導的に生成される。すなわち、グリオキシル酸サイクルが存在するものと推定した。

これらの結果から、*A. mannanolyticus* による人体腸内におけるこんにゃくマンナンの代謝機構について考察を加え、こんにゃくマンナンが本菌の分泌するマンナーゼにより、グルコースとマンノースに分解されたのち、その一部は解糖経路を経て TCA サイクルに入り代謝されるものと推定した。

終わりに臨み、本実験にご協力いただいた東京農工大学農芸化学科栄養食品教室の日比野賢爾、草薙登夫、玉利正人、対馬徹、世古口幸弘、蓮香忠雄、大森正司の諸氏に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) S. Innami, T. Suzuki & Y. Sahashi: *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 164 (1961)
- 2) 印南 敏, 鈴木隆雄, 佐橋佳一: 農学集報, **9**, 76 (1963)
- 3) 井上憲政, 井上勝弘: 醸酵工学雑誌, **34**, 271 (1956)
- 4) E. Racker: *Biochem. et Biophys. Acta*, **4**, 21 (1950)
- 5) Yuan-Chi Su, N. Tanaka & K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 685 (1961)
- 6) S. Ochoa: *J. Biol. Chem.*, **174**, 133 (1948)
- 7) 宇佐美正一郎: 化学の領域増刊, **13**, ワールブルグ検圧法, p. 136 (1954)
- 8) E. L. Kuff and W. C. Schneider: *J. Biol. Chem.*, **206**, 677 (1954)
- 9) 倉富一興, 細谷憲政: 生化学, **27**, 72 (1955)
- 10) T. E. Friedemann and G. E. Haugen: *J. Biol. Chem.*, **147**, 415 (1943)
- 11) 井上憲政, 井上勝弘: 栄養学雑誌, **12**, 29 (1954)
- 12) 前田 実: 東京医学会雑誌, **25**, 518 (1911)
- 13) 井上憲政: 醸酵工学雑誌, **25**, 145 (1948)

(本稿は第19回日本栄養・食糧学会にて発表した)

(国立栄養研究所)
* (東京農工大学農学部農化教室)