原 著

細菌性ウイルスの酵素化学的研究

寺 田 正 中* 柴 崎 健 三*

MASANAKA TERADA, KENZO SHIBAZAKI: ENZYMOLOGICAL STUDIES OF BACTERIAL VIRUSES

〔受稿 10月23日1957.〕

I 緒 言

Bacteriophageそのものに酵素作用が存するや否やの問題は phage の本質に関する根本問題である。phage—細菌系の酵素作用に関しては、多くの研究²⁾³⁾⁴⁾があるが phage そのものに酵素作用を証明した研究⁵⁾⁶⁾は殆どない。又動物性ウイルスに関しては、Vaccinia virus に metabolic cofactor なる copper, biotin, riboflavine の存在が認められている。

我々は寺田等により1950年、分離確認された *S. gallinarum* (Akita strain) phage の酵素作用を広範に検索したが生活酵素の存在は認められず、微弱な H_2 O_2 分解作用を認めた。以下得られた成績について述べる。

II 実験材料

S. gallinarum (Akita strain) (以下Sgと略す) を host として増強した。 *S. gallinarum* (Akita strain) phage (以下 Sg Bp と略す) を、Sharples 超遠心機 tripsin との併用で、可及的に精製濃縮した材料を用いた。上記の如くして得た Sg Bp は 5×10^{10} /cc 濃度で電子顕微鏡により検したが Bp が多数集っている他は夾雑物が極めて少く、良効な材料が得られた。

このものの総窒素量は 0.706mg/cc で化学組成は、

C	38.66%
H	6.14%
N	14.40%
P	3.92%

であつた。

酵素材料：前記の如く精製濃縮したもので、力価は $3 \sim 5 \times 10^{10}$ /cc のもので、精製の都度、電子顕微鏡で、夾雑物を調べ、可及的良効な前記材料に近い性質のものをを用いた。

菌材料：一昼夜培養の Sg を、生理的食塩水で洗滌

Fig. 1 *S. gallinarum* (Akita strain) Phage Purified and concentrated with super-centrifuge.

し、凍結乾燥して保存、用時生理的食塩水で、菌浮游液とした。

菌の無細胞酵素液：Sg を砂と共に磨碎、水溶液としたものを遠心分離し、その上清液を用いた。

III 実験方法ならびに実験結果

主に、Warburg apparatus, Thurnberg tube を用いて、(1) 精製 Bp を酵素標品とし、各基質に対して、どのような反応を示すか。(2) Sg 及び Sg の無細胞酵素液の場合はどうか。(3) Bp + Sg の無細胞酵素液との場合が無細胞酵素液のみの場合に比して、どのような変化が認められるか。を検した。

反応終了後、上清液について、夫々 paper chromatography によつて、定性的に、反応産物をとらえて、反応の方向を定めている。以下逐一実験方法並に、実験結果を述べる。尚反応温度は、特別の記載のない限り $37^\circ C$ である。

1. Catalase

上記材料を用い、Warburg apparatus⁷⁾⁸⁾ 及び $KMnO_4$ 法で、catalase 作用を検した成績は次の如くである。

* 東京慈恵会医科大学細菌学教室

即ち、この Bp の宿主である Sg は、

	Kat. f	Qkat.
Warburg 法	4024	2400
KMnO ₄ 法	4000	

Sg を宿主として材料をつくつた時の精製 Bp は、

	Kat. f	Qkat.
Warburg 法	3.4	14.3
KMnO ₄ 法	3.2	

Fig. 2 Catalase Activity

- (1) Curve of bacterial material with 4×10^{10} particles
- (2) Curve of viral material with 5×10^{10} particles
- (3) Curve of viral material with 2.1×10^{10} particles substrate 0.015 mol H₂O₂ pH 6.8, Shaking frequency 140/min.

然し Sg 自身に catalase 作用があるので、精製濃縮 Bp 材料中に Sg の破壊片が混じてそれが catalase 作用を表わすとも考えられるので catalase 作用を示さ

Fig. 3 Catalase Activity

- (1) Curve of viral material multiplied with *Sh. dysenteriae* with 3.2×10^{10} particles
- (2) Curve of viral material multiplied with *Sh. dysenteriae* with 2.2×10^{10} particles

ない *Sh. dysenteriae* を宿主とした精製濃縮 Sg Bp の activity を測定したが、次の如く弱い、activity を示した。

	Kat. f	Qkat.
Warburg 法	4.3	11.5
KMnO ₄ 法	3.1	

蛋白と結合する catalase の hematin が pyridine と結合して、pyridine-hemochromogene¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾ の typical な極大吸収が 53mμ, 557mμ に生ずる故、Sg を宿主とした精製 Sg Bp (凍結乾燥して、粉末にしてある) を pyridine で練り、sodium-hydrosulfite で還元し、Beckman spectrophotometer 及び Microspectroscope で分析し、531 mμ, 557 mμ の極大吸収を得た。又宿主を、*Sh. dysenteriae* とした場合の精製 Sg Bp は 530 mμ, 557 mμ の極大吸収を得たが、*Sh. dysenteriae* の場合は如何にしても、該当する極大吸収は得られなかった。

精製 Sg Bp の微弱な H₂O₂ 分解作用は、hematin 様物質による事は、吸収スペクトルにより明かであるが、それが Bp 側のものであるか、又 *Sh. dysenteriae* に catalase の pre-enzyme が存在し、Sg Bp の attack により enzyme active となり、その fraction による contamination とも考えられるが、その証明は困難である。

2. Glycolysis¹³⁾

Ringer solution に基質として 0.2% の割に、glucose galactose, arabinose, maltose, rhamnose を加え、Bp (3×10^{10}) を添加し、anerobic (N₂) で Warburg apparatus を用いて測定したが何れの基質に対しても酸発生による CO₂ の liberation は認められなかった。aerobic に於ても O₂-uptake は認められなかった。又 0.5% の割にこれ等基質を加えた Barsiekow の培地に精製 Bp (3×10^{10}) を加え、16 時間培養するも酸発生による pH の変化は認められなかった。

3. α-Glycerophosphate Dehydrogenase

Thurberg tube を用い、No. 1,¹⁴⁾ No. 2¹⁵⁾ とともに methylene blue の脱色の時間を測定したが Sg Bp については No. 1, No. 2 とともに methylene blue の脱色は認められなかった。その時の反応液の組成は、

No. 1: 0.1M phosphate buffer (pH 7.2)	1ml
0.1M sodium glycerophosphate	1 ml
0.5% methylene blue	0.3 ml
enzyme solution Sg Bp 5×10^{10} (1 ml)	
(in case of Sg	50 mg 1 ml)

Table 1-(1)
 α -Glycerophosphate Dehydrogenase No. 1

	Amount of Material	Decolorization Time (hours)		Enzyme Activity
		Test	Blank	
Sg Phage	5×10	$\sim$	$\sim$	Absent
Sg	50 mg	2.0	$\sim$	Present

Table 1-(2)
 α -Glycerophosphate Dehydrogenase No. 2

	Amount of Material	Decolorization Time (hours)		Enzyme Activity
		Test	Blank	
Sg Phage	5×10	$\sim$	$\sim$	Absent
Sg	50 mg	1.5	$\sim$	Present

No. 2: 0.5M phosphate buffer	0.25 ml
0.02% methylene blue	0.5 ml
0.5M sodium glycerophosphate	0.25 ml
Apoenzyme	0.25 ml
yellow enzyme (0.7 mg)	0.25 ml
enzyme solution Sg Bp 5×10^6 1 ml	
(in case of Sg 50 mg	1 ml)

4. Krebs TCA cycle

TCA cycle は哺乳動物と鳥類の組織及び原虫に証明され、細菌に於ても、その機能が存在するであろうと考えられてその証拠は集りつゝあるがその意味で Sg Bp, Sg 及びその無細胞酵素液について実験を試みた。

i) Pyruvic acid¹⁶⁾¹⁷⁾

Warburg apparatus を用い Sg Bp 4×10^6 , 0.5M phosphate buffer (pH 6.0), 1M sodium pyruvate で CO_2 の liberation は認められなかった。

ii) Citric acid metabolism¹⁸⁾ (Citric acid, cis-Aconitic acid, α -Ketoglutaric acid)

Warburg apparatus で O_2 -uptake, CO_2 -liberation を観察した。

Fig. 4 Pyruvic Acid Oxidation

Dotted line is in case of Sg phage, no O_2 -uptake observed.

By adding CoA to cell free extract, O_2 -uptake spontaneously increased, but in case of Sg phage no O_2 -uptake was observed.

Sg Bp (4×10^6), phosphate buffer (1/15M, pH 7.4) で各基質 $10 \mu\text{M}$ に対して、反応を試みたが Sg Bp では O_2 -uptake は認められなかった。

Sg では Fig. 5, 6 の如く、lag phase が長い。Sg の citric acid oxidation は succinate, glutamate, glycerophosphate の添加により lag phase が短縮さ

Fig. 5 Citric Acid Oxidation

By adding Succinate, Glutamate, the lag phase was shorten.

Substrate $10 \mu\text{M}$, Adding Substrate $1 \mu\text{M}$

Table 2 Succinic Dehydrogenase Malic Dehydrogenase

	Material	Amount of Material	Decolorization Time (hours)		Enzyme Activity
			Test	Blank	
Succinic Dehydrogenase	Sg Phage	4×10	$\sim$	$\sim$	Absent
	Sg	50 mg	2.0	$\sim$	Present
Malic Dehydrogenase	Sg Phage	4×10	$\sim$	$\sim$	Absent
	Sg	50 mg	2.5	$\sim$	Present

れる。citric acid oxydation の O_2 -uptake は end point で 50 を与える。逐次適応反応を試みた結果 citric acid から α -ketoglutaric acid 迄の酸化は、adaptive と思われる。従つて Sg は、 C_4 -dicarboxylic acid cycle を経る酸化経路の方が主な代謝と思われる。

Fig. 6 Citric Acid Oxydation

The O_2 -uptakes have long lag phase in Citric Acid, cis-Aconitic Acid, α -Ketoglutaric Acid.

Dotted line (A) is the O_2 -uptake of Citric Acid by *S. gallinarum* adapted with Citric Acid.

Dotted line (B) is the O_2 -uptake of Aconitic Acid by *S. gallinarum* adapted with Citric Acid. Substrate $10\mu M$

- iii) Succinic¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾ acid, Fumaric acid, malic acid²²⁾²³⁾, Oxaloacetic acid²⁵⁾²⁶⁾, Lactic acid²⁷⁾ metabolism

Warburg apparatusで、各基質に対して、Sg BP 4×10^{11} の濃度で、反応を試みたが O_2 -uptake を認め得なかつた。この時の succinic acid の場合の反応液の組成を例にとると、

主室	pH 7.4	0.1M phosphate buffer	2 ml
		0.1N KCN (neutralized)	
	pH 7.4	0.1M phosphate buffer	2 ml
		0.1N KCN (neutralized)	0.3ml
		0.01M methylene blue	0.5ml
		0.5M sodium succinate	0.3ml
側室		enzyme solution 4×10^{11} 1ml (SgBp) (in case of Sg)	
		enzyme solution 4×10^{11} 1ml (Sg Bp) (in case of Sg 50mg)	

ガス腔 空気

又、Succinic Dehydrogenase, Malic Dehydrogenase の測定には、Thurnberg tube をも用い methylene blue の脱色時間を測定した。その反応液の組成

Fig. 7 Enzymes in TCA cycle

Sg Phage observed no O_2 -uptake against substrates, but Sg (50 mg) reacted with above substrates.

は、

pH 7.2	0.1M phosphate buffer	1 ml
	0.1M sodium malate (or succinate)	1 ml
	0.5% methylene blue	0.3ml
pH 8.0	0.2M NaCN	0.2ml
	enzyme solution (Sg Bp 4×10^{11})	1 ml
	(in case of Sg 50 mg)	

結果は Table 2 に示す如く Sg Bp に於ては、脱色は認められなかつた。

Sg の無細胞酵素液に Sg Bp を加えて、TCA cycle の酵素量の変化を観察したがその増加も減少も観察し得なかつた。

Sg Bp に於ては TCA cycle 諸酵素の存在は認め得ない。

5. Transaminase²⁵⁾

Amino acid decarboxylase は通常では、aspartic acid, alanine からは脱炭酸しないが、 α -ketoglutaric acid が存在すると脱炭酸を行う。之を利用して、生じた CO_2 の量から逆に transamination が行われたか否かを測定した。

Pyruvic acid $\rightarrow$ Acetaldehyde CO_2

Glutamic acid $\rightarrow$ Aminobutylic acid CO_2

Asparatic acid + α -Ketoglutaric acid $\rightarrow$

Acetaldehyde + Aminobutyric acid + 3CO_2

上式から 1 M の asparatic acid から 3M の CO_2 が生じ
それをとらえて, manometric に transamination を
判定する.

反応液の組成は,

主室 Sg Bp (5×10^{11})

(in case of Sg 50 mg) 1 ml

0.1M phosphate buffer(5.8)(pH5.8) 1 ml

側室 Fig. 8 (1) α -Ketoglutaric acid $6.3\mu\text{M}$

(2) α -Ketoglutaric acid $6.3\mu\text{M}$

+ Asparatic acid $1.5\mu\text{M}$

Total volume 2.5ml

反応終了と同時に 0.1ml の $3\text{NH}_2\text{SO}_4$ を添加する.
結果は, Sg Bp に於ては, CO_2 -liberation を観察し
得ず, Sg の場合のみ CO_2 -liberation が認められた.

(図の如く $1.53\mu\text{M}$ の asparatic acid が $4.4\mu\text{M}$ の CO_2
を生じ 3M に近い CO_2 発生量となり, transamination
が行われたと考えられる.)

6. Amino Acid Oxydase²⁸⁾

Amino Acid を Amino Acid Oxydase が酸化す

Fig. 8 Transamination

Above figure is in case of Sg.

(Sg Phage observed no CO_2 liberation.)

It shows $4.5\mu\text{M}$ CO_2 are obtained from
 $1.53\mu\text{M}$ Asparatic Acid and 3M CO_2 are
obtained from 1M Asparatic Acid, decar-
bonation is taken place quantitatively.

る場合, Keto Acid と NH_3 を産生する. 従つて本実
験に於ては, Amino Acid を基質として, 酸素吸収が
起つた場合に, 酸素吸収測定と同時に酸化産物たる
Keto Acid を 2,4-dinitrophenylhydrazine として
とらえ, NH_3 の定量を Nessler Method で Colorim-
etry により定量したが, 何れも吸収酸素と排出アン
モニアの量比は 1:2 であり, Amino Acid が Oxyda-
se により酸化されたと考えた. (Sg の場合のみ O_2 -up-

Table 3 Amino acid oxydation

Substrate	Enzyme Preparate	Sg dry w- eight (2.5 mg) O_2 -up- take (A) in hour (μl)	Crud Cell free extr- act (0.5ml) O_2 -uptake (B) in hour (μl)	Cell free extract (frozen and thawed)	Sg Phage (6hours) (C)	Sg Phage (frozen and thawed)	(B) + Phage	QO_2 of Sg	Total Volum of O_2 uptake (μl)	libera- ted NH_3 (μg)	O_2 uptake (μg) liberate- d NH_3 (μg)
L-Arginine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-Asparagine	—	22.8	18	15	—	—	18	52	114	188	$\frac{1}{2}$
L-Glutamic acid	—	47.0	4.2	4.0	—	—	4.2	117	235	376	$\frac{1}{2}$
D-Glutamic acid	—	54.1	32.3	32.3	—	—	32.3	135	270.5	432.8	$\frac{1}{2}$
DL-Alanine	—	90.8	25.4	21	—	—	25.4	225	454	726.4	$\frac{1}{2}$
DL-Phenylalani- ne	—	8.5 (4 hrs.)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DL-Methionine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DL-Histidine	—	7.1	—	—	—	—	13	36	—	49.6	$\frac{1}{2}$
DL-Valine	—	5.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DL-Isoleucine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-Leucine	—	22.4	20.9	18	—	—	20.9	56	112	179.5	$\frac{1}{2}$
DL-Asparatic acid	—	27.3	25	22	—	—	25	68	136.5	218.4	$\frac{1}{2}$
L-Asparatic acid	—	25.6	18.2	5	—	—	18.2	64	128	184.8	$\frac{1}{2}$
L-Tryptophane	—	14.1 (2hr.)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-Lysine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cystine	—	11.1	—	—	—	—	—	27	55.5	88.7	$\frac{1}{2}$

Table 4 Amino Acid Decarboxylase

Enzyme	Sg Phage	Sg	Sg Extract	Sg Phage (f. t.)	Sg Extract(f. t.)
Arginine pH 5.2	—	—	—	—	—
Asparatic Acid pH 4.5	—	—	—	—	—
Lysine pH 6.0	—	+	+	—	—
Histidine pH 5.0	—	+	+	—	—
Tryptophane pH 5.0	—	—	—	—	—

f. t. ....frozen and thawed

take が認められた.)

反応液の組成は,

主室 Sg Phage 34×10^{11} 1 ml
(in case of Sg) (25 mg)

1/5M Phosphate buffer(pH 7.2) 1 ml

側室 Substrate(1/6M Amino Acid) 0.5ml

副室 10% KOH 0.2ml

結果は Table 3 の如く Sg Phage に於ては, O_2 -uptake は認め得なかつた.7. Amino Acid Decarboxylase²⁸⁾

脱炭酸されて生じた CO_2 ガスをとらえる. 反応終了後, 上清を paperchromatography で生じた Amine を定性的にとらえる手順をとった.

反応液の組成は,

主室 Sg Bp 5×10^{11} (Sg 場合乾燥量 25mg) 1 ml

第1側室 基質 (1/6M Amino Acid) 0.5ml

第2側室 $8NH_4SO_4$ (反応終了後主室に加える為)
0.25ml

主室に加える 1/5M-phosphate buffer は基質の種類により pH 4.5~5.8 のものを選ぶ.

結果は, Table 4 の如く Bp については CO_2 liberation もなく paperchromatography²⁹⁾³⁰⁾の結果加えた Amino Acid 以外のものは認められなかつた.

IV 考 按

H_2O_2 分解作用の場合, Sg Bp material の control として, Sg broth culture を Sg Bp 精製と同一の操作を施したものを使用し, Fig. 2, 3 の曲線は夫々 control の O_2 -output を差引いたものである. 酵素材料は総て無菌的に処理し, Warburg 等の操作も無菌的に行っている.

Sh. dysenteriae の吸収スペクトルは, 吸光係数 1.5 位の所から, back ground はあるが pyridinehemochromogene の typical な吸収帯は如何にしても得られなかつた.

Vaccinia virus に metabolic cofactor の Copper, Bion, Riboflavine の存在が認められているが Sg Bp の場合, 微弱ではあるが, H_2O_2 を分解するのは, Hematin 様物質による事は吸収スペクトルにより明かであるが, それが Phage 側のものとも, 又 Sh. dysenteriae に Catalase の pre-enzyme があつて, Sg Bp の attack により enzyme active となり, その fraction によるとも考えられ, その証明は困難である.

Sg の Citric Acid 酸化の O_2 -uptake (50 を得た), CO_2 liberation ($4CO_2$ を与える) から分解は,

と考えられ, これは酸化が TCA Cycle を通るとした式と一致する.

Sg Bp には呼吸酵素, Amino Acid Oxydase, Amino Acid Decarboxydase, Desmolase, Transaminase, Transacetylase 等の主要酵素を欠くという事は, Bp が Bp 自体の生活, 合成をも宿主に依存している事を示すもので従つて Bp の生成, 増殖機構を解明する為には Bp 自体の酵素系を検索するのではなしに Host-Phage 系の場合で追求すべきである.

V 総 括

我々は高濃度の良効な精製 Sg Bp を酵素材料とし, Warburg apparatus, Thurnberg tube 等を用いて酵素化学的に酵素作用を広範に検索した. 同時に宿主の Sg 及びその無細胞酵素液を用いて, その酵素作用を検索し, Sg Bp の酵素作用と比較検討した. 結果は次の通りである.

1) 精製 Sg Bp の微弱な H_2O_2 分解能力は, Hematin 様物質による事を吸収スペクトルにより明かにしたが, それが Bp 側のものか宿主側のものかの証明は困難である.

2) Sg Bp には呼吸酵素, Enzyme in Carbonhy-

drate metabolism (TCA Cycle の諸酵素も含む), Transacetylase, Transaminase, Desmolase, Amino Acid Oxydase, Amino Acid Decarboxylase 等の主要な生活酵素の存在を認め得ない。

引用文献

- 1) Terada, M., Tsai, F., and Kita, M., Tokyo Med., J., **67**, (9) 1950
- 2) Cohen, S. S., and Anderson, T. F., J. Exp. Med., **84**, 511, 1946
- 3) Cohen, S. S., J. Biol. Chem., **174**, 281, 1948
- 4) Price, W. H., J. Gen. Physiol. **33**, 17, 1949
- 5) Hallauer, C., Zb. Bakter. I., 129 265, 1939 ibid, **130**, 194 (206) 1940
- 6) Schüller, H., Biochem. Z., **276**, 254, 1935
- 7) 藤田秋治, 検圧法とその応用 (岩波) 386頁 1949
- 8) Appleman, D., Anal. Chem., **23**, 1627, 1951
- 9) Euler, H. von, and Josephson, K., Ann. **452**, 158, 1927
- 10) Aguer, K., Biochem. J., **32**, 1702, 1938
- 11) Zeil, K., and Hellström, H., Z. Physiol. Chem., **192**, 171, 1930
- 12) Kubo, H., Acta Phytochimica vol. **11**, No. 1, P. 195, 1939
- 13) Umbreit, W. W., Manometric Technique and Tissue Metabolism, P. 28, 1953
- 14) Euler, H., von, and Adler E., Z. Physiol. Chem., **291**, 1, 1937
- 15) Sumner, J. B., Chemistry and Method of Enzyme, P. 303, 1953
- 16) Green, D. E., J. Biol. Chem., **138**, 227, 1941
- 17) Barrón. E. S. G., J. Biol. Chem., **97**, 691, 1932
- 18) Sumner, J. B., Chemistry and Method of Enzyme, P. 402, 1953
- 19) Keilin, D., Proc. Roy. Soc., London B. **125**, 171, 1938
- 20) Potter, V. R., J. Biol. Chem., **137**, 13, 1941
- 21) McShan, W. H., Respiratory Enzymes, Burgess Publishing Co. Mineapolis, P. 117, 1947
- 22) Blanchard, M. L., J. Biol. Chem., **187**, 875, 1950
- 23) Nossal, P. M., Biochem. J., **49**, 407, 1951
- 24) Gale, E. F., and Stephenson, M., Biochem. J., **33**, 1245, 1939
- 25) Okunuki, K., and Sakurai, S., Pro. Japan Acad., **28**, 347, 1952
- 26) Kitahara, K., Warburg apparatus, vol. II, Nankodo Publishing Co., Tokyo, P. 26, 1955
- 27) Sumner, J. B., The Enzymes, **1**, 1002~1005 (1950, 51) ibid., **2**, 499~535 (1951, 52)
- 28) Umbreit, W. W., Manometric Technique and Tissue Metabolism, P. 180, 1953
- 29) Dent, Steka and Steward, Nature, **160**, 682, 1947
- 30) Block, R. J., and Durrum, E. L., A manual of paper-chromatography and paper-electro-phoresis, P. 109, 254, 1955