微生物による酒石酸の分解について (第 2 報)

酒石酸分解の際の $C^{14}O_2$ 固定反応について

野村 真 康 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 28 年 4 月 16 日 受理

The Decomposition of *d*-Tartarate by the Microorganism. Part 2.On the Anaerobic Decomposition of *d*-Tartarate in the Presence of Radioactive Bicarbonate.

By Masayasu NOMURA (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

筆者は第 1 報に於て *Pseudomonas incognita* strain 3 L* を用い、酒石酸の分解について定量的研究を行った結果、この菌による酒石酸の嫌氣的分解は次式に従う事を示した⁽¹⁾。

この嫌氣的分解の際に放射性炭酸ガス $C^{14}O_2$ を重炭酸塩として反応液中に入れておくと、生産物及び残存酒石酸への C^{14} の固定が認められる。それ故各化合物へ入った C^{14} の位置及び量を測定比較する事により、この分解機構を推定する事ができる。本報に於てはこれらについて行つた実験結果について述べる。

実 験 の 部

1. 放射性重炭酸塩存在下における酒石酸の嫌氣的分解 前報に用いた *Pseudomonas incognita* strain 3 L を NH_4 -tartarate 1.2%, 肉エキス 0.8%, ペプトン 0.5%, NaCl 0.5%, pH = 6.0 の培地に接種し、30° で 40 時間静置培養をする。得られた菌体を一度水道水で洗滌した後 resting cell suspension を作り次のような組成で $C^{14}O_2$ 存在下に酒石酸を嫌氣的に分解させた。容器は大型の Thunberg 管を用い予め充分排気して嫌氣条件を与えた。

反応液組成：生菌浮遊液(乾燥量として 285 mg の細菌を含む)、M/15 磷酸緩衝液(pH=6.91) 15 cc, $C^{14}O_2$ in N/10 NaOH 0.5 cc (約 140 万 c.p.m. の放射能をもつ)、酒石酸ソーダ(遊離酒石酸として 193.7 mg), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, 全量 40 cc。

30° で 3 時間 incubate した後、carbonate free の 1.6 N NaOH 2 cc を入れて反応を止め、且つ発生炭酸ガスを吸収させた。遠心分離をして菌体を分離洗滌した後、上澄液を H_2SO_4 で酸性にして、吸収炭酸ガスを発生させて之を 1.6 N NaOH 5 cc に再び吸収させ、 BaCl_2 を加えて BaCO_3 として沈澱させた後、上澄液を酸で滴定してその量を定量した。得られた BaCO_3 は水、アルコールでよく洗滌した後、その放射能を測定した。硫酸酸性となつた反応液は、一部をとつて酸性水蒸気蒸溜を行い、溜液を湯煎上で蒸発濃縮し、之に carrier の蟻酸を加えた後 アルカリ性で KMnO_4 で蟻酸を酸化して CO_2 となし、 BaCO_3 としてその放射能を測定した。尚この際、蟻酸の量は JONES の方法⁽²⁾で定量した。以上のようにして微量に副生した放射性的蟻酸を除いた残液を、再び酸性で水蒸気蒸溜し、溜液を中和滴定して醋酸を定量した。中和した溜液は濃縮して一定量とし、一部を試料皿にとり蒸発乾固し、醋酸ソーダとして醋酸の放射能を測定した。水蒸気蒸溜残液は KOH で中和した後、一部をとつて MATCHETT 等の方法⁽³⁾により酒石酸を比色定量した後、残部の酒石酸を酸性カリ塩として沈澱させた。この酸性カリ塩による分離をもう一度繰返して不純物を除いた後、得られた酸性カリ塩を中和して水に溶解し、carrier の酒石酸を加え、鉛塩として酒石酸を沈澱させ、 H_2S で Pb を除いた後 脱炭処理を行い湯煎上で濃縮結晶させた。この酒石酸には弱い明かに放射能が認められたので、次のようにして各炭素位置の放射能を測定した。即ち、まず SPRINSON 等の方法⁽⁴⁾に大体従い、微アルカリ性で過沃素酸塩により酒石酸を酸化して蟻酸と CO_2 とにし、次に蟻酸は水蒸気蒸溜をして分離した後、アルカリ性 KMnO_4 で酸化して

* 本菌の菌学的性質は大体前報⁽¹⁾に示したが、その他に (1) 無機培地で振盪培養すると水溶性の黄緑色色素を生産し、この色素は紫外線下で緑色螢光を発する。(2) 30°~37° で最もよく成育する。(3) リトマスミルク培地では 5 日目頃に酸性を示し、ガスを生じ、8 日目頃に凝固し、且つ次第にリトマスを白色に還元する。以上及び前報記載の諸性質から、BERGEY's *Manual of Determinative Bacteriology*, 6th Ed. (1948) により *Pseudomonas incognita* に属する事を確かめた。

CO₂ となし、それぞれ発生 CO₂ を BaCO₃ として放射能を測定した。

なおこの過沃素酸塩による酸化は、本実験下に於ては酒石酸にのみ特異的に反応するものであり、且つこの酸化反応は定量的に進行する事を生成蟻酸及び CO₂ の定量から確認した。

酒石酸を酸性カリ塩として沈澱させた濾液は、酸性水蒸気蒸留をして醋酸を除いた後 約 60 時間エーテル抽出を行つた。抽出部はエーテルを蒸発させた後、一定量とし、一部をとつて LUGG 等の方法⁽⁵⁾ により Paper chromatography にかへ生成酸を検した。且つこの paper を 0.5 cm 乃至 1 cm の幅に切り、乾燥後各部分の放射能を測定した。この結果は Fig. 1 に示す 図から分るようにコハク酸以外に酸性カリ塩として除去し切

Fig. 1. Radioactivity in Ether Soluble Fraction

れなかつた酒石酸の spot が若干認められた。それ故他の一部をとつて succinodihydrogenase を用いる方法⁽⁶⁾ によりコハク酸を定量した後、carrier のコハク酸を加え、再び酸性カリ塩として酒石酸を除き、その濾液の醋酸を水蒸気蒸留で除いた後、28時間エーテル抽出をしてコハク酸を抽出し、脱色炭処理後水から再結した (mp. = 183.5°, 混融確認)。このコハク酸は一部を取つて VAN SLYKE-FOLCH の方法⁽⁷⁾ により wet oxidation を行ない、BaCO₃ としてコハク酸分子全体の放射能を測定した。コハク酸のカルボキシル基の放射能は、大体 FOSTER 等の方法⁽⁸⁾ になら

この場合 succinodihydrogenase は豚心臓より STOTZ 等の方法⁽⁹⁾ により、fumarase は牛心臓より OCHOA の方法⁽¹⁰⁾ によりそれぞれ調製した。コハク酸のメチレン基は、分子全体の放射能とカルボキシル基の放射能との差からも算出できるが、別に上記の degradation によつて得られた乳酸をエーテル抽出した後、FRIEDMAN 等の方法⁽¹¹⁾ により次式のように acetaldehyde とし、之を 2,4-dinitrophenylhydrazone に導き、直接之についても測定した。(いづれの方法によつてもメチレン基の放射能は 0 であつた)。

以上のようにして得られた化学的定量値及び放射能の測定値を Table 1 に示す。尚以上とは別に、ほぼ同様な実験を行ない大体 Table 1 と同様な結果を得たが、その測定値は省略する。

なお放射能の測定は end-window 型 Geiger-Müller 計数装置を用い、すべて Self Absorption, Natural Count などの補正を行つた。

2. オキザロ酢酸の脱炭酸反応 Table 1 で分るように、前実験に於て生成コハク酸のカルボキシル基に非常に強い放射能が認められた。この機作については、後に考察するように酒石酸分解の中間体としてオキザロ酢酸を考え、このものが次式の WOOD-WERKMAN 反応により C¹⁴O₂ と非常によく平衡していると考えるのが最も妥当である。

Table 1. Anaerobic Decomposition of *d*-Tartarate in the Presence of Radioactive Bicarbonate

	Chemical Data		Isotopic Data	
	mg.	mM.	Specific activity c. p. m. per μ M carbon	Total activity c. p. m.
Tartaric acid remained	134.7	0.898	1.85	6,645
{ -CH(OH)-			0	0
{ -COOH			3.70	6,645
Tartaric acid consumed	59.0	0.393		
Acetic acid formed	14.9	0.247	0	0
Succinic acid formed	9.2	0.078	1565.6	488,000
{ -CH ₂ -			0	0
{ -COOH			3397.0	529,900
CO ₂ formed	27.8	0.632	1358.5	858,600
Formic acid formed	1.8	0.040	860.6	34,400
Cell Residue				7,610

Carbon Recovery 94.2%.

そこで本菌が果して上式のオキザロ醋酸脱炭酸能をもっているかどうか、又その活性度がどの位強いかわか調べた。まず前記のようにして培養した生菌をよく洗滌した後、シャーレに入れて CaCl_2 上で一晩真空乾燥し乾燥標本を作った。この乾燥標本を用い、ワールブルグ氏換圧法により、窒素ガス下に於てオキザロ醋酸を基

Fig. 2. Anaerobic Decomposition of Oxalacetate and *d*-Tartarate by the Dried Cell Preparation.

The CO₂ evolutions were measured by the Conventional Warburg apparatus at 30° under the N₂-atmosphere. Each vessel contained 1.0 ml M/15 Phosphate buffer (pH=5.4), 20 μ M substrate, 10.0 mg dried cell preparation and water to the total volume of 1.7 ml. Boiled dried cell suspension was used to measure the non-enzymatic decomposition of oxalacetate and this was subtracted from the experimental value.

なる反応を考えるか、又は

のように中間体として CO₂ と非

よく平衡している X という化合物を考えるかせねばならない。之等はそれぞれ後に述べる Scheme I, II に相当する。コハク酸のメチレン基は之に反して、計算によつても、又直接 acetaldehyde-2, 4-dinitrophenyl hydrazone についての測定からも全く放射能のない事が示された。又コハク酸以外には、微量に副生した蟻酸に強い放射能が認められたが醋酸には全く放射能は認められなかつた。蟻酸の specific activity は最終炭酸

とした時の CO₂ の発生速度を測定し、同時に酒石酸からの CO₂ 発生速度を測定して両者を比較した。この際乾燥標本を 100°C で 4 分処理したものを用い non-enzymatic のオキザロ醋酸の分解速度を測定し、之を実験値から差し引いて enzymatic の分解速度とした。結果を Fig. 2 に示す。図から Q_{CO_2} を算出すると、オキザロ醋酸に対しては 26.6, 酒石酸に対しては 8.4 (μ l/hr. /mg dried preparation) の値が得られ、オキザロ醋酸の脱炭酸能は、(6) 式が酒石酸分解機構に関与している事を支持しうる程十分強力である事が証明された。

考 察

本菌による酒石酸の嫌氣的分解は (1) 式に従う。この際放射性炭酸ガス C¹⁴O₂ を重炭酸塩として共存させておくと Table 1 のような結果が得られ、生成コハク酸のカルボキシル基に強力な C¹⁴ の固定が認められた。このカルボキシル基の specific activity は最終炭酸ガスの specific activity の約 2.5 倍も強く、生成したコハク酸と外圍の CO₂ との間の単なる交換反応に基く C¹⁴ の固定でない事は明かである。それは

スの specific activity より少々小であるが、量が僅少な事に基く化学的定量値の信頼性の不足などの点もあり大体 CO_2 と十分平衡状態にあるものと考えられる。(他の実験に於ては、蟻酸、最終炭酸ガスの specific activity は、それぞれ 110, 133 c. p. m./ μM carbon であつた): 次に酒石酸の C^{14}O_2 の incorporation についての報告は今迄全くないが、本実験に於ては残存酒石酸に弱いながら明らかに放射能を認め、その放射能の位置はカルボキシル基のみであり、 $-\text{CH}(\text{OH})-$ 基には全く C^{14} の認められない事を証明した。

以上の結果から考へて、(1) 前述の様にオキザロ酢酸の様な中間体 X の生成なしに、コハク酸が直接酒石酸の還元によつて生成するという様な機作は考えられない。(2) コハク酸のカルボキシル基に強い放射能が認められるに拘らず酢酸には全く放射能の認められない事実から、THUNBERG-WIELAND の反応

は、少くとも本実験条件下では起つていないと考えられる。

(3) 蟻酸が微量に存在しており、且つ強い放射能をもつていて殆ど CO_2 と平衡している事実から SAKAMI の反応⁽¹²⁾を連想させられるが、この反応も本実験結果と矛盾する。

(4) 結局 Table 1 に示した isotope の data を都合よく説明し、且つ (1) 式に示す量的関係を満足する酒石酸分解反応の機作としては、前述のように CO_2 を中間体として考える次の Scheme I か、或いは CO_2 と非常によく平衡していると考えられるオキザロ酢酸を前述の中間体 X として考える Scheme II かが妥当なものとして考えられる。

Scheme I.

Scheme II .....Summary に示す

植物の光合成については、放射性炭酸ガスを用いた実験から最初に蓄積する放射性的炭酸ガス固定化合物は磷酸グリセリン酸である事が知られており⁽¹³⁾、CALVIN, BENSON 等は之等の幾多の実験事実から、光合成の機作として有名な CALVIN-BENSON の C_4 デカルボン酸サイクルを考えている⁽¹⁴⁾。上記の Scheme I に於ては、酒石酸分解の第一段階として脱カルボキシルして磷酸グリセリン酸となる反応を考えており、且つ酒石酸のカルボキシル基に C^{14} の認められる事実はこの反応の可逆性を容認するので、丁度酒石酸が CALVIN-BENSON-cycle の “active C_4 化合物” の位置を占める事となり、酒石酸が植物界に広く存在する事実と考え合せて非常に魅力的な Scheme である。併し筆者はこの点について種々の実験を行い(之等については後報する)。現在の所磷酸グリセリン酸が中間体である事を否定する幾つかの実験結果を得ている。一方実験 2 に於て示した如く、本菌は (6) 式に示されるようなオキザロ酢酸の脱炭酸能を有しており、且つその活性度は Fig. 2 にみられるように酒石酸の分解速度に比し遙に強力で、(6) 式が酒石酸の嫌氣的分解反応に関与しているという考えを支持する。この WOOD-WERKMAN 反応は可逆的であつて、種々の化合物への放射性炭酸ガス固定の primary fixation reaction となつている事は広く知られた事実である⁽¹⁵⁾。それ故酒石酸の嫌氣的分解反応の機作としては、すでに第 1 報で考えたように Scheme II が最も妥当なものと思われる。(但しこの Scheme では、便宜上、磷酸化合物或いは coenzyme と結合した “active intermediate” はすべて省略し、唯 carbon chain の変化のみを示

した。例えば酒石酸からオキザロ酢酸への変化は、当然 ATP 関与の磷酸化反応が予想される)。

なお、残存酒石酸のカルボキシル基に C^{14} の固定の認められた事実から、本機作による酒石酸の分解反応は可逆的なものと思われる。酒石酸の植物体中における生成機構は現在全く知られていないが、Scheme II が可逆的と思われる点から、一つの仮説として植物体中においてもオキザロ酢酸から酒石酸が生成するのでないかと考えられる。

終に臨み終始御懇篤な御指導御鞭撻を賜った坂口謹一郎先生、有馬啓先生、並びに教室員の諸氏に厚く感謝する。特に放射性炭素の実験について種種御協力、御指導を賜った高橋甫氏に深謝する。

(昭和 28 年 4 月 5 日、日本農芸化学会大会で講演した)。

(1) 野村真康 農化, 27, 46 (1953).	<i>Nat. Acad. Sci.</i> , 36, 219 (1950).
(2) F. P. TREADWELL and W. T. HALL <i>Analytical Chemistry</i> , II, 569, McGraw Hill (1935).	(9) E. STOTZ and A. B. HASTINGS : <i>J.</i> <i>Biol. Chem.</i> , 118, 479 (1937).
(3) J. R. MATCHETT, R. R. LEAGAU, C. C. NIMMO and G. K. NATTER : <i>Ind.</i> <i>Eng. Chem., Ind. Ed.</i> , 36, 851 (1944).	(10) S. OCHOA : in J. B. SUMNER and K. MYRBÄCK, <i>The Enzymes</i> , I, 1217, Aca- demic Press Inc., New York (1951).
(4) D. B. SPRINSON and E. CHARGAFF : <i>J.</i> <i>Biol. Chem.</i> , 164, 433 (1946).	(11) T. E. FRIEDEMAN, M. CONTONIO and P. A. SCHAFER : <i>J. Biol. Chem.</i> , 73, 335 (1927).
(5) J. W. LUGG and B. T. OVERELL : <i>Nat-</i> <i>ure</i> , 160, 87 (1947).	(12) W. SAKAMI : <i>J. Biol. Chem.</i> , 176, 995 (1948).
(6) W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER : <i>Manometric Techniques</i> <i>and Tissue Metabolism</i> , Burgess Publis- hing Co., Minneapolis (1949).	(13) M. CALVIN and A. A. BENSON : <i>Sci-</i> <i>ence</i> , 107, 476 (1948).
(7) M. CALVIN, C. HEIDELBERGER, J. C. REID, B. M. TOLBERT and P. E. YANKW- ICH : <i>Isotopic Carbon</i> , John Willey and Sons, Inc., New York (1949).	(14) A. A. BENSON, M. CALVIN V. A. HAAS S. ARONOFF, A. G. HALL, J. A. BASS- HAM and J. W. WEIGL : in J. FRANE and W. E. LOOMIS, <i>Photosynthesis in</i> <i>Plants</i> , Iowa State College Press, (1949).
(8) J. W. FOSTER and S. F. CARSON : <i>Proc.</i>	(15) M. F. UTTER and H. G. WOOD : <i>Adv.</i> <i>in Enzymol.</i> , 12, 41 (1951).

Summary

Anaerobic decomposition of *d*-tartarate was conducted with the resting cells of *Pseudomonas incognita* strain 31 in the presence of radioactive bicarbonate. The succinic acid produced was isolated and degraded. The methylene carbons showed no radioactivity, while the carboxyl carbons the specific activity showed 2.5 times as high as final bicarbonate. Therefore this incorporation of C^{14} could not be explained by the mere exchange reaction between the succinic acid and CO_2 .

Formic acid formed in a small amount was found to have about the same specific activity as that of final bicarbonate, while acetic acid showed no radioactivity. Residual tartaric acid was isolated and degraded. Carboxyl carbons showed weak activity but no activity was found in carbons of $-CH(OH)-$. (These results are presented in Table I.)

Dried preparation of cells was shown to have the strong activity of oxalacetic acid decarboxylase. (Fig. 2)

From these experimental results it was concluded that this decomposition may proceed *via* oxalacetate according to the Scheme II.

Scheme II

It is supposed that phosphorylated compounds or coenzyme-bound compounds are true intermediates, but these active forms were omitted for simplicity.

C* = radioactive carbon.