微生物によるグリセリン代謝機構に関する研究 (第 3 報)

グリセリン酸化機構について

大塚 謙 一 (山梨大学醸酵研究所)

昭和 28 年 8 月 18 日 受理

Studies on the Mechanism of Glycerol-Metabolism by Microbes.

Part 3. On the Mechanism of Glycerol-Oxidation

By Ken-ichi OTSUKA (The Research Institute of Fermentation, Yamanashi University)

緒 言

グリセリンが微生物により酸化を受ける場合には他の糖源と同様にトリカルボン酸サイクルにより酸化されて CO_2 になることは充分考えられる所である。WOOD-WERKMAN 反応がグリセリンより C_4 化合物生成に関して提唱されたこと、結核菌のグリセリン酸化に C_4 -カルボン酸系が関与すること⁽¹⁾等がその裏書きとなる。然し最近 KING, CHELDELIN⁽²⁾ は *Acetobact. suboxydans* で否定的結果を報告しているので、著者はここに *Bact. succinicum*⁽³⁾ を用いてグリセリン酸化に於ける TCA サイクルについて検討した。同時にその酸化機構の性質をしらべ、oxidative phosphorylation の存在、 α -グリセロリン酸を径ての代謝系、dioxycetone 生成系等について検討し以下の結果を得たので報告する。

実 験 の 部

材料及び方法： 使用せる菌株は *Bact. succinicum* で、培養方法、乾燥菌体、菌体磨砕液等の調製法は前報⁽⁴⁾の如くである。酸化力測定は WARBURG 検圧法に依つた。

実験の進め方として、前報に述べた如くグリセリンより α -グリセロリン酸が生成されたことはグリセリン酸化にリン酸の関与する系の存在が充分考えられるので、先ずリン酸関与系の検討を行い、次に DOA 系の証明と TCA 系の関与如何を検討した。

(1) Oxidative Phosphorylation の証明

a) 無機リン酸の影響： 乾燥菌体を用い、リン酸は M/15 SÖRENSEN リン酸緩衝液 (pH 5.7) を 0.05 ml, 0.1 ml 添加と無添加の場合について酸素吸収を比較すると、Table 1 の如く明らかにリン酸を添加しなければグ

Table 1. The Effect of Inorganic Phosphate on Glycerol-Oxidation by Dried Cells.

	Autorespiration		None (Only glycerol)		0.05 ml phosphate added		0.1 ml phosphate added	
	E_o None ph.	E_p 0.1 ml ph.	G_{Eo}	G ($G_{Eo} - E_o$)	G_{Ep}	G ($G_{Ep} - E_p$)	G_{Ep}	G ($G_{Ep} - E_p$)
30 min	11	22	15	4	42	20	43	21
60	20	39	34	14	96	57	100	61
End pH		5.7		5.6		5.7		5.9

0.5 ml of 0.85% NaCl and 0.5 ml of dried cells-suspension were added per vessel

Substrate: 0.2 ml of 1% glycerol (ca. 20 μM).

リセリン酸化は著減する。このことは無機リン酸の関与を示している。

b) Oxidative Phosphorylation: 近來組織及び微生物の物質代謝に oxidative phosphorylation は重要要素と考えられている。その証明には酸素の存否による有機リン生成の比較による方法が簡易である。著者は先述の酵素液を用いて好氣的には WARBURG'S vessel を、嫌氣的には THUNBERG'S tube (N_2 -gas にて置換洗滌) を使つて有機リン生成量を測定比較した所、Table 2 に示す如く好気下に於てグリセリン区は著しいリン酸

Table 2. Oxidative Phosphorylation by Extract from *Bact. succinicum*

Time of Incubation	Aerobic Condition (in air)				Anaerobic condition (in vacuum)	
	Autorespiration		Glycerol added		Autorespiration	Glycerol added
	Organic P formed	O_2 consumed	Organic P formed	O_2 consumed	Organic P formed	Organic P formed
30 min	1 γ	27 c. mm	16 γ	38 c. mm	37 γ	17 c. mm
60	40	47	148	72	60	42
140	10	102	83	167	46	64

1.0 ml of extract of ground cells (from 0.9 g dried cells) and 1.0 ml of M/60 phosphate buffer soln. (pH 6.9) were added per vessel.

Substrate: 20 μM glycerol.

化が認められた。気嫌下に於ける *autorespiration* 区で有機磷が比較的多いのは酵素液中の有機磷の遊離した結果と考えられる。好気下、グリセリン区の 60 分に於ける P/O 比は $4.8 \mu M / 2.3 \mu M = 2$ となる。

有機磷の定量：反応液（全量 2.2 ml）を氷冷し、氷冷せる 10% トリクロール醋酸 4 ml を加え、よく混和して沈澱管にとり遠心分離（3000 回転にて 2 分にて充分）して上澄液 1 ml 宛につき直接磷酸及び全磷酸（ H_2SO_4 及び HNO_3 にて加熱分解）を FISKÉ, SUBARROW⁽⁵⁾ 法にて比色定量する（Erma 製光電比色計 Model D にて測定）。全磷酸と直接磷酸との差を有機磷酸量とした（冷トリクロール醋酸にて抽出される有機磷は主として糖磷酸エステル、labile-磷酸が含まれる）。

c) 各種阻害剤による Oxidative Phosphorylation 阻害：阻害剤として monoiodoacetic acid (MJA), arsenite (As_2O_3) は Coenzyme I の関与する Redox-system を, NaF は enolase を阻害すると云われ、従つて、酸素吸収量にも影響があり phosphorylation にも阻害が認められる筈である。又 NaN_3 及び 2, 4-dinitrophenol (DNP) は糖代謝に於て酸素吸収量には影響はないが, phosphorylation を阻害すると云われる。又 As_2O_3 は arsenosis を起す。以上の阻害剤を用いてグリセリンを基質として場合の酸素吸収量と有機磷酸生成量を測定した。Table 3-1 及び 3-2 に示す如く阻害剤添加区は何れも有機磷生成は阻害されている。MJA, NaF, As_2O_3 は酸素吸収も阻害し, As_2O_3 , NaN_3 は阻害しない。DNP もグリセリンの場合は酸素吸収も阻害される。以上の結果はグリセリン酸化に於ける oxidative phosphorylation の存在を裏書している。

Table 3-1. Inhibition by Various Gifts on Oxidative Phosphorylation.

	Only Glycerol	MJA	NaF	As_2O_3	As_2O_5	NaN_3
Molar concentration of gifts	— mol.	1/2400	1/240	1/2400	1/2400	1/4800
O_2 Consumed in 70 min.	105c.mm	76	71	79	94	112
Organic P formed	59 γ	28	35	31	33	33
1.0 ml of extract of ground cells (from 0.5 g of dried cells) and 1.0 ml M/60 phosphate-buffer soln. (pH 6.5) were added per vessel.						
Substrate : 20 μM glycerol. Each values contains a value of the <i>autorespiration</i> .						

Table 3-2. Inhibition by 2,4-dinitrophenol on Oxidative Phosphorylation of Glycerol and α -Glycerophosphate

	Glycerol		α -Glycerophosphate	
	DNP 4.3×10^{-4} mol.	None	DNP 4.3×10^{-4} mol.	None
Organic P formed	19 γ	48	—	—
O_2 -consumed in 70 min	24c.mm	58	12.9	12.0
Percentage of Inhibition in- O_2 consumed	58.6	—	0.7	—

ここで使用せる NDP 濃度は普通使われる濃度より 10 倍程度濃く、対照として glucose の場合も約 56% 阻害が認められた。グリセリンの場合でも DNP が $10^{-5} M$ 程度では酸素吸収はむしろ増大する。

(2) Glycerol $\rightarrow$ α -Glycerophosphoric acid 系経路の証明。

a) DNP 阻害 Table 3-2 に示した如く DNP (4.3×10^{-4} mol.) はグリセリン酸化には阻害を示すのに α -グリセロリン酸に対しては阻害を示さない。DNP は oxidation と phosphorylation との共軛を阻害するといわれており、上に得た結果はグリセリンのリン酸化阻害による酸化阻害とみられ、グリセロリン酸無阻害は glycerol $\rightarrow$ glyceroph. 経路の存在を裏書きしている。

b) α -グリセロリン酸生成：第 2 報に於て証明した。

c) グリセリン酸化に及ぼすグリセロリン酸の影響： $A = O_2$ (Glycerol) + O_2 (Glyceroph.), $B = O_2$ (Glycerol + Glyceroph.) とした場合、Table 4 に示す如く $A > B$, 即ち両基質に基づく酸素吸収量に additivity

Table 4. The Effect of Glycerophosphate on Glycerol-Oxidation by Extrat of Ground Cells.

Substrate added	Glycerol (A)	Glyceroph. (B)	Glycerol and Glyceroph. (C)	A+B (D)	C+D (E)
Duration of oxidation					
10 min	26cmm	5cmm	25cmm	31cmm	6cmm
40	135	38	144	173	29
60	210	65	225	275	50

0.5 ml of extract of ground cells (from 0.5 g dried cells) and 1.0 ml of M/15 phosphate-buffer soln. (pH 6.5) were added per vessel.

Substrate : 0.2 ml of 0.05 M glycerol and 0.2 ml of 0.1 M glycerophosphate.

が成立しない。このことはグリセロール酸化速度がグリセロリン酸添加により減少せしめられたことを示す。即ち Table 4 の結果は約 20% の遅れを示している。これには QUASTEL⁽⁶⁾ のいう 2 基質による同一酵素の

active center' の取り合いによる原因と、反応生成物の濃度増加による反応速度低下とが考えられる。グリセロリン酸脱水素酵素は EULER⁽⁷⁾ 及び GREEN⁽⁸⁾ により各分離されており、グリセリンには働かないから、第 1 の同一酵素という原因は考えられず、第 2 の原因が妥当である。而して上述の如くグリセリン酸化に phosphorylation が関与すること、及び DNP の阻害 (2)-(a) の結果からグリセリンが直接リン酸化によりグリセロリン酸を生ずると考えられる。この際のリン酸化酵素については未詳である。

なおここに使用したグリセロリン酸は市販の Ca-塩より Ba(NO₃)₂ 複塩に導き、複塩の溶解度の差より α-グリセロリン酸を分離し Na-塩としたものである。グリセリン酸化に比して中間体と考えられるグリセロリン酸酸化が弱いことは GUNSALUS⁽⁹⁾ も指摘しており、α-L(-)-form が biological active であり D-form が阻害すると述べている。著者の使用せるものも両型の混合であることが酸化力の低い原因と考えられる。

(3) Glycerol → Dioxyacetone 系経路の証明

a) Dioxyacetone (DOA) の分離証明 : 緒言にも述べた如く、グリセリンより DOA 生成については高橋、朝井⁽¹⁰⁾ 及び池田⁽¹¹⁾ 等の報告があるが何れも長期培養液より分離されており、直接的生成経路であるとは即断し難い。KING, CHELDELIN⁽²⁾ は coenzyme I の酸化に対する activity から直接経路を想定している。著者は乾燥菌体を用いて、3 時間の反応により DOA 生成を確認した。即ち *Bact. succinicum* の乾燥菌体 0.5 g を生理的食塩水に懸濁して、半部宛をグリセリン無添加区と添加区に分けて使用した。反応液組成 : M/15-リン酸緩衝液 (pH 6.5) 5 ml : 食塩水 10 ml., 0.5 g glycerol. 反応条件は 30°, 3 時間振盪。

DOA の分離確認 : 反応後、10 NH₂SO₄ 1 ml を加えよく攪拌して遠心分離して菌体を除き、上澄液をエーテルにて約 60 時間抽出した。抽出液はエーテル駆逐後 2,4-dinitrophenylhydrazine の H₂SO₄-Ethanol 飽和液 2 ml を加えて、加温して放置すると赤橙色の沈澱を生ずる。これを pyridine と ethanol にて再結すると、265° にて熔融 (分解) した。別に DOA より同様に調製したものと混融により融点の降下は認められず、該融点は triose の 2,4-dinitrophenylglycerosazone 融点と一致する。更にこのものは酒精苛性カリに紫色に溶ける。このことも triose の osazone なることを証明している。然し DOA か glyceraldehyde かの区別は出来ない。そこでエーテル抽出物を Butanol : 醋酸 : 水 (4:1:1) を用いて上昇法により paper chromatography を行い、AgNO₃ 試薬 (10% AgNO₃ を butanol に飽和せしめたもの) で加熱発色せしめると R_F = 0.47 に spot が認められ、standard-DOA の R_F = 0.47~0.49 と一致する。以上により生成 triose は DOA なることを確認した。なおメチレン青使用の THUNBERG 法によつても同様の物質を得た。このことは DOA 生成が一次的脱水素なることを予想せしめる (以上の実験に於てグリセリン無添加区は全く DOA は検出出来なかつた。又元来 DOA はエーテル不溶とされているが長時間抽出によりかなり抽出されるようである。)

b) グリセリン脱水素反応に対する DOA の影響 : Table 5-1 に示す如く、THUNBERG 法に於けるグリセリン脱水素反応に対して又 Table 5-2 に示す如くグリセリン酸化能に対して DOA 添加は些もその反応を増大せしめないことは両者の additivity が成立せず Glycerol → DOA なる直接経路を裏書きしている。

Table 5-1. Effect of Dioxyacetone on Glycerol-Dehydrogenation by Dried Cells.

	Auto-respiration min.	Glycerol min.	Dioxy-acetone min.	Glycerol + DOA min.
Time of reduction	26.1	15.8	16.1	16.5
1.0 ml dried cells suspension, 0.5 ml of 0.0001 M methylene blue and 0.5 ml of phosphate-buffer soln. (pH 7.0) were added per THUNBERG's tube. Substrate: 0.1 ml of M/16.5 glycerol and 0.1 ml of M/200 DOA.				

(4) Tricarbons 酸サイクル (TCA-cycle) の関与について

a) Glycerol より有機酸生成の証明 : Triose 分離の際のエーテル抽出物を Butanol : 醋酸 : 水 (4:1:1) を用いて上昇法により paper chromatography を行つた所、Table 6 に示す如く, citric, malic, succinic, fumaric acid を検出した。グリセリン無添加区は succinic acid のみを検出した。

b) 有機酸の酸化 : KING, CHELDELIN⁽²⁾ は *Acetobact. suboxydans* が TCA-cycle 中の有機酸を

Table 5-2. The Effect of Dioxyacetone on Glycerol-Oxidation by Dried Cells.

	A Dioxy-actone min.	B Glycerol cmm	C DOA + Glycerol cmm	D A + B cmm	E D ~ C cmm
12	18	28	31	46	15
21	34	54	56	88	32
40	63	125	117	188	71
60	74	208	195	282	87
1.0 ml of dried cells suspension (9.2 mg) was added per vessel. Substrate: 0.2 ml of 1% glycerol and 0.2 ml of 1% DOA. pH: 5.2. Temp.: 30°.					

グリセリンの有無に拘らず酸化しないことより、グリセリン酸化に於ける TCA-cycle の関与を否定している。

Table 6. Detection of Acids of TCA-cycle by Paper Chromatography in Resultant Medium of Glycerol-oxidation by Dried Cells.

Acids	R_F Experiment	R_F Standard
Citric	0.30 ?	0.37
Malic	0.44	0.50
Succinic	0.71	0.73
Fumaric	0.83 ?	0.87

然し著者の *Bact. succinicum* は乾燥菌体で (b) の実験で各有機酸を少量宛生成し、而も Fig. 1 に示す如く fumarate, citrate, succinate を酸化し、酵素液でも第 2 報⁽⁴⁾で述べた如く pyruvate, citrate, malate succinate, fumarate を酸化し得た。このことはグリセリン酸化に TCA-cycle が関与することを示している。

c) マロン酸阻害：グリセリン酸化に対するマロン酸の影響については、Fig. 2 に示す如く始め 10 分間

Fig. 1. Oxidation of Acids of TCA-cycle by Dried Bacterial Cells

Fig. 2. Effect of Malonate on Glycerol-Oxidation by Dried Bacterial Cells.

0.1 ml of dried cells suspension and 0.5 ml of phosphate buffer soln. (pH 7.0) were added per vessel. Substrate: 3.03 μ M glycerol. Gift: 0.2 ml of M/5 malonate.

はマロン酸の有無に拘らず、酸素吸収量に差はなく、以後に於て阻害が認められた。

以上の事よりグリセリン酸化は TCA サイクルを経ることは確かである。

考 察

解糖機構に於て MJA は Triose-ph $\rightarrow$ Ph-glycerate を, NaF は Ph-glycerate $\rightarrow$ Ph-pyruvate に関与する enolase を阻害すると云われており、グリセリン酸化がこの両者により阻害されれば、これらの系の存在の可能性を示すわけである。Table 7 に示す如くグリセリン酸化は M/1400 の MJA により又 M/140 の NaF

Table 7. Effect of Monoiodacetate and Sodium Fluoride on Glycerol-Oxidation.

Gift preparation	M/1400 MJA		M/140 NaF			
	Dried cells (3mg)		Dried cells (4.4 mg)		Extract of ground cells (25 mg)	
pH	5.5		6.8		7.2	
O ₂ consumed in 60 min	None	Gift	None	Gift	None	Gift
Percentage of inhibition	45.3	6.2	220.4	200.7	184.6	21.3
	—	86.3	—	8.9	—	88.5

されると考えられる。一方 DOA の生成はグリセリン酸化に別の経路のあることを想像せしめるのであるが、DOA 系の問題はグリセリンの嫌気分解の研究と併考して行う予定である。

結 語

により強く阻害される。NaF 阻害は乾燥菌体では認められず細菌磨砕液に於てのみ認められる。このことは NaF が乾燥菌体膜を通過し難いものと思われる。

以上の阻害実験よりグリセロリン酸は三炭糖リン酸を径て、焦性ブドウ酸に代謝されることが予想される。かくて TCA サイクルの関与によりグリセリンは CO₂ に酸化分解

Bact. succinicum の乾燥菌体及び菌体磨砕を用いて以下の結果を得た。

1. グリセリン酸化には無機磷酸を必要とし、その際行われる磷酸化作用は所謂 oxidative phosphorylation である。
2. 磷酸化の第1次生成物は α-グリセロ磷酸である。
3. 一方グリセロールより、デオキシアセトンが生成される。
4. グリセロール酸化はクエン酸サイクルにより行われる。

終りに臨み、終始御指導を賜りました東大、坂口教授、朝井教授に感謝致します。又種種御便宜を戴きました梨大、横塚助教授に感謝します。

(本報告は昭和 28 年 2 月 28 日、日本農芸化学会東京支部講演会にて発表した)。

(1) 山村雄一, 笹川了一: 阪大医雑 1, 6(1949).	(7) H. V. EULER: Z. phys. Chem., 1, 249 (1937).
(2) T. E. KING and V. H. CHELDELIN: J. Biol. Chem., 198, 127, 135 (1952).	(8) D. E. GREEN: Biochem. J., 30, 629 (1936).
(3) 坂口謹一郎, 多田靖次: 農化, 16, 663, 675 (1940); 17, 569 (1941).	(9) J. C. GUNSALUS and W. W. UMBREIT: J. Bact., 49, 347 (1945).
(4) 大塚謙一: 農化, 27, 580 (1953).	(10) 高橋 偵造, 朝井 勇宣: 農化, 11, 1008 (1935).
(5) FISKÉ and SUBBAROW: J. Biol. Chem., 66, 375 (1925).	(11) 池田庸之助: 農化, 26, 90 (1952).
(6) J. H. QUASTEL: Biochem. J., 1, 166 (1926).	

Summary

About the glycerol-oxidation by *Bact. succinicum* SAKAGUCHI et TADA, the following results were obtained by an experiment using dried cells or extract from ground cells.

1. Inorganic phosphate was required for glycerol-oxidation and this phosphorylation was demonstrated as the so-called "oxidative phosphorylation"
2. The first metabolite of the phosphorylation was α-glycerophosphoric acid.
3. While a small amount of dioxycetone was obtained as an other product of glycerol-oxidation.
4. Mainly, glycerol was oxidized to carbon dioxide by the TCA-cycle.

β-アミラーゼのアスコルビン酸に依る阻害に関する研究 (第3報)*

酸素圧の影響及び銅イオン存在下の自酸化の過程のアスコルビン酸に依る阻害

伊藤正春, 安部道夫 (東京農工大学農学部)

昭和 28 年 8 月 19 日 受理

Inhibitory Effect of Ascorbic Acid on β-Amylase. Part 3. Effect of Oxygen Tension and the Inhibition by Ascorbic Acid in its Different Stage of Autoxidation in the Presence of Cu⁺⁺.

By Masaharu ITO and Michio ABE

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

著者は第2報⁽¹⁾に於て、本阻害が reversible な mercaptide 型阻害と不可逆型阻害 (cysteine に依り除去されぬという意味に於て) の complex である事を示し、阻害全体が Cu⁺⁺ 存在下のアスコルビン酸の自酸化と密接な関係をもつ事を述べた。この事は本報で述べる酸素圧の阻害に及ぶ影響からも明かとなった。又、酸素圧の如何は第1報⁽²⁾で述べた阻害度の反転現象 (阻害曲線の交叉) とも関連をもつものである。

次に既報の実験はすべて阻害剤として溶解直後のアスコルビン酸を使用したものであるが、更に Cu⁺⁺ に依る自酸化の各段階のものを阻害剤とした場合の阻害曲線及び恢復曲線を調べた。本報に於ては、上記の2つの実験結果について述べる。

I. 実験方法及び実験結果

* 本報告の要旨は 1953 年 1 月 24 日 第 135 回日本農芸化学会東京支部講演会、及び 1953 年 4 月 6 日 日本農芸化学会大会に於て発表した。