observed. The level of amylase activity varied with C-sources and their concentrations. Marked increase of amylase formation was afforded by starch, glycogen and maltose. A little increase was afforded by glucose and glycerol, and, on the contrary, they showed even an inhibitory action in some cases. However, the effects by pyruvic, malic, succinic and tartaric acid were little or nothing.

乳酸菌の酵素に関する研究* (第9報) “Coracemiasse” の存在に就て

北原 覚雄, 大林 晃 (京都大学食糧科学研究所)

昭和 28 年 11 月 16 日 受理

Studies on the Enzymes of Lactic Acid Bacteria. Part 9. Identification of “Coracemiasse”

By Kakuo KITAHARA and Akira ÔBAYASHI

(Laboratory of Applied Microbiology, Research Institute for Food Science, Kyoto University)

緒 言

Racemiasse はラセミ性乳酸を造る乳酸菌の体内酵素として発見されたが⁽¹⁾, 乳酸生成と直接関係の無いブタノール菌⁽²⁾や *Staphylococcus ureae*⁽³⁾ に於ても同様な作用が相次いで指摘された。然し大戦の関係で深い追究は中断されていたが, 1950 年以来, 当研究室では乳酸菌を用い, 片桐教授等はブタノール菌を用いて研究を再開した。殊に 1951 年以後, 光学的活性体のラセミ化に関与する同類の酵素として alanine racemase⁽⁴⁾, glutamic racemase⁽⁵⁾ などが知られるに至つたため, この方面への関心は一段と深まつて来たように思われる。又 racemiasse なる名称も従つて lactic racemase と呼ぶのが妥当かも知れない。

Table 1. Characteristics of Racemiasse from Different Origin.

Lactic acid bacteria	Butanol bacteria
Almost never excreted out of the cells	Comparative easily excreted out of the cells
Unstable toward $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Stable toward $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

乳酸菌の racemiasse とブタノール菌の racemiasse とは種々の点に於て性状を異にするようであつて, その主な差異は Table 1 に示される。

ブタノール菌の乳酸ラセミ化酵素に就て TATUM 等⁽²⁾は最初これは耐熱性のアポ酵素と非耐熱性の助酵素より成るとの見解を発表したが, 後同じ研究室の CHRISTENSEN 等⁽⁶⁾はこの説を否定し, 培養が古くなると酵素は体外に排出されると述べた。最近片桐, 今井等⁽⁷⁾は一株のブタノール菌を用いて, racemiasse は培養基中に予め活性乳酸を添加した場合に顕著に生産される一種の adaptive enzyme であること及びこの培養濾液から硫酸沈澱法によつて酵素標品を取得し得ると報じた。

乳酸菌の racemiasse は殆んど菌体外に出ることがないため⁽⁸⁾, これを cell-free に採ることは容易でなかつたが, 乾燥菌体を其儘細砂と磨砕することによつて初めて成功した⁽⁹⁾。乳酸菌の racemiasse はアセトン, 硫酸等の沈澱剤に対して不安定なため, 純化が又一段と困難である。

著者等は乳酸菌 racemiasse 純化の一階梯として, *Lactobacillus plantarum* から得た cell-free racemiasse の透析を試みた所, 非透析性の apoenzyme と透析性の coenzyme とに分け得ることを知つた。Coenzyme の構造を定め得れば酵素の作用機構も従つて窺知し得る筈であるから, racemiasse が coenzyme を持つことは本研究に重要な意義を持つことになる。従つて本報では coracemiasse 証明の経路及び今日までにこれに就て探り得た点を記載する。

実 験

I. 透 析 の 影 響

方 法 : 一前報の方法に従つて *L. plantarum* No. 11 の乾燥菌体を磨砕抽出した cell-free racemiasse 液をセロファン (# 300 市販品) 膜を用いて 4° の蒸溜水で 24 時間透析した。対照として透析を行わずに同温に同時間放置したもの及び同一乾燥菌体から抽出直後の酵素液を比較に用いた。

これら酵素試料の既知量 (総て元の乾燥菌体量に換算して表わす) を一定量の L-乳酸 (曹達塩) に混じ pH

* 乳酸酸酵に関する研究 第 1 部の VI.

を 6.4 に調整して全容を 15 cc としトルエンを加えて 30° で 14 時間反応せしめ、生じた D-乳酸を前報記載の微量定量法⁽¹⁰⁾にて定め、その値を 2 倍してラセミ化乳酸とした。

結 果 :—結果は Table 2 の如くであつて、抽出酵素液はこれを低温に保持すれば力の損失はあまり見られないが、24 時間透析すると、内液の力価は殆んど失われる、このことは酵素がセロファン膜を通過したのか、又は racemase が透過性の coenzyme を持つのか両者の一つと考えられる。

Table 2. Effect of Dialysis.

Enzyme		Quantity: converted to the wt. of original dried cells	Substrate L-Lactic acid	Lactic acid racemized
Specimen				
Cell-free extract used immediately	}	440 mg	595 mg	150 mg
Cell-free extract stand for 25 hrs. at 4°C		440	595	130
Cell-free extract, dialyzed for 24 hrs. at 4°C		440	595	21

Table 3. Behaviour of the Dialyzed Inside- and Outside-Solutions.

Enzyme		Quantity: converted value	Substrate L-Lactic acid	Lactic acid racemized	Degree of racemization
Specimen					
Cell-free extract, stand for 48+72 hrs.	}	475 mg	75 mg	26.2 mg	35.0%
Inside solution		475	75	7.3	9.8
Outside solution		475	75	0	0
Inside soln. + Outside soln.		475	75	18.9	25.2

の coenzyme—coracemase—とに分け得ることが知られる。

II. 助酵素区分の濃縮

透析外液の減圧濃縮及び乾燥 :— 酵素抽出液をやや多量の冷水を以て反覆換水透析し、外液を集めて 50° 以下で減圧濃縮を行つたもの、及びこれを更に硫酸デシケーター中で真空乾燥して得られる黄色粉末について coracemase の力の有無を検して Table 4 の結果を得た。即ち透析外液は認むべき力の損失無しに、減圧濃縮し又更にこれを乾燥粉末とすることが出来ることが知られる。

Table 4. Coracemase Activity of Concentrated and Dried Preparations Obtained from the Outside Solution.

Enzyme		Quantity: converted value	Substrate L-Lactic acid	Lactic acid racemized	Degree of racemization
Specimen					
Cell-free extract left to stand in the cold (control)	}	300 mg	50.0 mg	41.0 mg	82.0%
Inside solution		340	50.0	6.5	13.0
Concentrated outside solution		340	50.0	0	0
Inside soln. + Conc. outside soln.		340	50.0	34.7	69.4
Inside soln. + Dried prep. of outside soln.		340	50.0	30.4	60.8

る区分に活度の全部が移行する。乳酸菌の racemase はアセトンによつて容易に無力化するが⁽⁸⁾、その助酵素区分がアセトンに対し極めて安定であることは特記しなければならない。

濃縮外液を標準量の半分しか使わない場合もラセミ化度がそれに相当して減少しないのは、ラセミ化度の支配因子がこの場合寧ろ内液即ち apoenzyme の量にあるためと解せられる。即ちこれについて行つた実験結果の 1 例を示すと Table 6 のようであつて、一定量の apoenzyme に対し coenzyme の添加量が多ければ多い程ラセミ化度は大きい、その度合が決して coenzyme の量に比例しないのは上記の考えを肯定するものである。

それで次に原酵素液をその 1.5 倍量の冷蒸留水中で 48 時間透析し、更に換水して 72 時間透析を行つた後、両外液を合せて透析外液とし、各区に就て L-乳酸のラセミ化を検した所 Table 3 の結果が得られた。

方法の関係上透析其の物の不完全なのはやむを得ないけれども外液には全く racemase の力を欠くから酵素自体が透析されることは無いが、内外両液を合せると著しく racemase の力を回復する傾向が見られる。このことから racemase は透析不能の apoenzyme と透析性

アセトンによる分別沈澱 :— 透析外液を濃縮してこれにアセトンを加えて分別沈澱を行い、アセトンを駆出した後、各区分について coracemase としての活度を検した、結果は Table 5 の如くであつて、50%アセトンで沈澱する区分は殆んど認むべき活度を持たぬが、その濾液に更に多量のアセトンを添加して 90% の濃度とした時沈澱す

Table 5. Fractionation of the Outside Solution by Acetone, and Coracemiase Activity of the Fractions

Procedure		Enzyme		Substrate L-Lactic acid	Lactic acid racemized
Concentrated outside solution (Fr. I)		Specimen	Quantity: converted value		
+Acetone to 50%		Cell-free extr. (control)	220 mg	50 mg	21.6 mg
Precipitate (Fr. II)		Inside solution	220	50	1.2
Supernatant		Inside soln. + Fr. I	220	50	10.4
+Acetone to 90%		Inside soln. + 1/2 × Fr. I	220*	50	9.1
Precipitate (Fr. III)		Inside soln. + Fr. II	220	50	2.8
Supernatant (Fr. IV)		Inside soln. + Fr. III	220	50	11.2
		Inside soln. + Fr. IV	220	50	0.9

* At this case apoenzyme and coenzyme correspond to 220 and 110 mg of dried cells respectively.

Table 6. Quantitative Relationship between the Apoenzyme and Coenzyme in the Cell-free Racemiase.

Quantity : converted value		Substrate L-Lactic acid	Lactic acid racemized
Inside solution (Apoenzyme)	Outside solution (Coenzyme)		
440 mg	440 mg	50 mg	37.0 mg
440	220	50	31.4
440	110	50	24.6
440	0	50	8.9

の助酵素的物質で置換し得るかを否かを検して見た。

ビタミン類, 無機塩類, ATP : ビタミン B 群の諸物質は酵素の co-factor として働きこれがビタミンとしての作用の本質をなすとの考えが強くなっている。本題の研究に最も近い例としては alanine racemase の助酵素が B₆ の一構成要素たる pyridoxal の磷酸化合物であることが知られ, 従つて alanine のラセミ化は一種の transamination として理解される如きである。

Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ 等の無機イオンもやはり各種酵素系の co-factor となる場合が段々知られつつある。

そこで今充分量と思われるビタミン混合物及び無機塩類の存在の許に乳酸のラセミ化実験を行つて見たが, 尙

恰度 ATP (T. Schuchardt) を入手し得たのでその単独の効果も同時に調べた。それらの結果は Table 7 の

Table 7. Effect of Vitamin B Complex, Metallic Ions and ATP upon the Apoenzyme of Racemiase.

Enzyme		Substrate, L-Lactic acid	Lactic acid racemized
Construction	Quantity: converted value		
Intact cell-free extract	410 mg	50 mg	32.2 mg
Inside solution (Apoenzyme)	410	50	3.2
Apoenzyme + Coracemiase	410	50	27.4
Apo. + Vitamin mixture	410	50	3.7
Apo. + Inorganic salts A	420	50	3.4
Apo. + Inorganic salts B	340	50	2.0
Apo. + ATP*	420	50	3.9

Vitamin mixture (γ) : - p-aminobenzoic acid 400, pantothenic acid 200, nicotinic acid 300, biotin 2.4, folic acid 100, i-inositol 4 mg, B₁ 400, B₂ 400, B₆ 200, B₁₂ 15 and 1/100 molar concentration of phosphate buffer (pH 6.4)

Inorganic salts A : - M/500 MgSO₄·5H₂O, MnSO₄·7H₂O and M/100 K-phosphate (pH 6.4)

Inorganic salts B : - M/750 MgSO₄·7H₂O, MnSO₄·5H₂O, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O, Co(NO₃)₂·6H₂O, CuSO₄·5H₂O and M/100 K-phosphate (pH 6.4)

* ATP 200, M/100 phosphate buffer (pH 6.4)

P₂O₅ 6.34% を含有し BECKMAN の分光光度計による吸収スペクトルは Fig. 1 の如く 260 mμ に顕著な極大吸光を示し, 他の波長の吸収は全く見られない。このことからこの物質は或は DPN (coenzyme I) ではないかとの期待を生ずる。詳細は続報で論ぜられる筈であるが, 乳酸菌の lactic dehydrogenase の助酵素が DPN であることも知られたので, 若し coracemiase が DPN であれば乳酸のラセミ化は D-, L-両型 lactic dehydrogenase の協同によるピルビン酸を介する酸化還元反応として再び浮上つて来ることになる。

III. Coracemiase の作用を持つ物質の検索

L. plantarum 磨碎抽出液の透析外液が coracemiase として働くことが明らかになつたので, この物質を純化し更にその構造を知ることが乳酸ラセミ化の機構を解明する鍵となることが当然考えられる。先ず手順の一つとして本助酵素作用が何か既知

この結果から見てここに使用した諸物質は何れも racemiase の助酵素とはなり得ないようである。

IV 粗製 Coracemiase の性質

透析外液の濃縮物から上記の如く 90% アセトンで沈澱させて得た粗製 coracemiase の標品は淡黄色琥珀状を呈し, 乾菌 1g から 70~80 mg の収量で得られ, 無機 P₂O₅ 9.72%, 有機

Table 8. Effect of DPN*.

System	Enzyme	Quantity of Apoenzyme: converted value	Substrate L-Lactic acid	Lactic acid racemized
Apoenzyme		360 mg	50.0 mg	1.1 mg
Apo. + Coracemiasse		360	50.0	13.7
Apo. + DPN (250 γ)		360	50.0	1.2
Apo. + DPN (500 γ)		360	50.0	2.8
Apo. + Vitamins, ATP, DPN, Mg ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , PO ₄ ^{'''}		360	50.0	2.1
Apo. + Methylene blue, DPN		360	50.0	1.5

* DPN: General Biochemicals, Inc. 90% purity

然し Table 8 に示される実験結果は全くこの考えを否定するものであつて、DPN 単独では勿論、B 群のビタミン類を初め Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, PO₄^{'''} 等の無機イオンや ATP など、助酵素又はその形成に役立つと考えられる各種物質の十分な存在に於ても、又 methylene blue の如き dehydrogenase の可逆性を促す如き物質⁽¹¹⁾の共存下に於ても racemiasse の助酵素たり得ないことを示している。

一方 OHLMEYER 法⁽¹²⁾に従つて粗製 coracemiasse の還元を試み、その吸光曲線を調べた結果も DPNH の特性たる 340 m μ の吸収帯を認めることは出来なかつた。

勿論粗製品の示す 260 m μ の吸収帯が coracemiasse そのものであるとは断定出来ないが、少なくとも DPN と coracemiasse とは異なること、従つて racemiasse が D-, L-lactic dehydrogenase の混合系とは全く別個のものであるとの著者等の見解は更に強く主張出来ると信ずる。

要 約

(1) *Lactobacillus plantarum* No. 11 から得た cell-free racemiasse の溶液を透析して、racemiasse には透析性の助酵素のあることを認めた。

(2) この Coracemiasse 溶液は殆んどその力を減衰することなく減圧濃縮し又乾燥粉末とすることが出来る。

(3) Coracemiasse 溶液をアセトンで分別沈澱すると、50% と 90% の間で沈澱する区分に活力の殆んど総てが移行する。

(4) 90%アセトンで沈澱させた粗製 coracemiasse 区分の収量は乾菌 1 g に対し 70~80 mg で黄色琥珀状を呈し、有機性 P₂O₅ 6.34% を含有し、260 m μ の紫外線部に顕著な吸収帯を示す。OHLMEYER 法による還元を行つても吸収帯には全く変化が見られない。

(5) ビタミン B 複合体、無機イオン、ATP、DPN 等通常考え得る助酵素類及びその混合物を以つてしても coracemiasse の作用を代替し得ない。

(6) Racemiasse の作用機構がピルビン酸を介する水素授受でないという自説を更に強く主張した。

終りに臨み本実験に種々の側面的事実を提供された福井農学士に心から謝意を表し度い。尙本研究の経費の一部は文部省科学研究費に仰いでいることを附記する。

Fig. 1. Absorption Spectrum of Coracemiasse.

Concentration: 6.52/cc, Layer-thickness: 1 cm

- (1) 片桐, 北原: 農化, 12, 844 (1936).
- (2) E. L. TATUM, W. H. PETERSON, E. B. FRED: *Biochem. J.* 30, 1892 (1936).
- (3) 片桐, 北原: *Biochem. J.* 31, 909 (1937).
- (4) W. A. WOOD, I. C. GUNSALUS: *J. Biol. Chem.*, 190, 403 (1951).
- (5) P. AYENGAR, E. ROBERTS: *J. Biol. Chem.*, 197, 453 (1952).
- (6) W. B. CHRISTENSEN, M. J. JOHNSON, W. H. PETERSON: *J. Biol. Chem.* 127, 421 (1939).
- (7) 片桐, 今井, 枅倉, 中村: 酵素化学シンポジウム, 8, 107 (1953).
- (8) 片桐, 北原: 農化, 14, 645 (1938).
- (9) 北原, 大林, 福井: 農化, 26, 162 (1952); *Enzymologia*, 15, 259 (1952).
- (10) 北原, 福井: 農化, 26, 555 (1952).
- (11) 北原, 福井: 農化, 27, 306 (1953).
- (12) P. OHLMEYER: *Biochem. Z.*, 297, 66 (1938).

(昭和28年7月19日 日本農芸化学会関西支部例会にて口演済)

Summary

(1) The existence of a coenzyme has been shown by dialysing the cell-free racemiasse; extracted from *Lactobacillus plantarum*.

(2) The solution of coracemiasse can be concentrated by diminished pressure and further dried up into yellowish powder, without any loss of its activity.

(3) If the concentrated coracemiasse solution be precipitated fractionally by acetone, almost all the activity moves into the fraction which precipitates between 50 and 90% of acetone concentrations, and we call this fraction as crude coracemiasse.

(4) The yield of the crude coracemiasse amounts about 70 to 80 mg per 1 g of dried cells. It is amber-like yellow substance containing over 6% of organic P_2O_5 , and it reveals very remarkable absorption at the wave length of 260 m μ , but never absorb any wave of other length.

(5) Vitamin B complex, inorganic ions, ATP and DPN which are considered as cofactors of many types of enzyme, can not be made to substitute for the coracemiasse, however they are used individually or in combination.

(6) The authors reinforced their opinion that the mechanism of the racemiasse reaction does not follow the reversible dehydrogenation.

微生物のクエン酸分解に関する研究 (第5報)

α, α' -Dipyridyl による *Bact. succinicum* の炭酸ガス固定の阻害について

高 橋 甫 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和28年11月16日受理

Studies on the Decomposition of Citrate by Microorganisms. Part 5. The Inhibitory Effect of α, α' -Dipyridyl on the Fixation of $C^{14}O_2$ in *Bact. succinicum*.

By Hajime TAKAHASHI (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Tokyo Univ.)

前報⁽¹⁾に於いて筆者は *Bact. succinicum* の嫌氣的分解の際、培地に放射性炭酸 ($C^{14}O_2$) を添加しておくこと、生産物中のコハク酸のカルボキシル基に多量の放射性が認められるが、他の主な生産物である醋酸は殆んど全く放射性を示さないことを証明した。かつ、この炭酸ガス固定は C_4 デカルボン酸系による metabolic exchange によつては説明されない。従つて、クエン酸は直接的分解によつてオギザル醋酸と醋酸に分解され、オギザル醋酸は WOOD-WERKMAN 機構によつて外圍の炭酸ガスと平衡するためカルボキシル基がラベルされ、ラベルされたオギザル醋酸は速かに還元されてカルボキシル基に C^{14} の入ったコハク酸が生成されると推定した。WOOD-WERKMAN 反応を接触する酵素はオギザル醋酸の脱炭酸酵素であるが、この菌が強力なオギザル醋酸の脱炭酸を行うこと⁽¹⁾も前記の推定を強く支持する事実である。

この菌のオギザル醋酸の脱炭酸は $M/1000$ 程度の α, α' -dipyridyl によつて強く阻害される⁽¹⁾。従つて前記の推定が正しければ、クエン酸分解の際のコハク酸カルボキシル基への炭酸ガスの固定は dipyridyl の添加によつて強く阻害される筈である。今回 dipyridyl 添加時の炭酸ガス固定を測定したところ明瞭な強く阻害が認められたのでここに報告する。

実 験 の 部

実験 1. クエン酸の嫌氣的分解の際の $C^{14}O_2$ の固定に及ぼす α, α' -Dipyridyl の影響

(A) 実験方法

(a) 菌体の調製 牛肉エキス各1%, クエン酸ソーダ, 食塩各0.5%の培地2lを用い、これに *Bact. succinicum* を接種、30°に45時間静置培養した。培養終了後、遠心分離して菌体を集め、0.2%のKCl溶液で1度洗滌し、蒸留水11ccに懸濁して実験に供した。懸濁液の細菌濃度は22.0mg(乾燥量)/ccである。

(b) 放射性炭酸 $BaC^{14}O_3$ から発生させた $C^{14}O_2$ を $N/10$ NaOH に吸収させた溶液 (約 2.2×10^{-4} M)