Citrate is fermented anaerobically in the presence of radioactive bicarbonate, and the effect of dipyriddy on the incorporation of C^{14} into succinate carboxyl carbons is examined.

Dipyriddy inhibits the incorporation of carbon dioxide into succinate greatly (Table 2), and the rate of inhibition is almost equal to that of oxalacetate decarboxylation by the reagent. Therefore, it was clearly demonstrated that the WOOD-WERKMAN's reaction is responsible for the incorporation of carbon dioxide into succinate. As the incorporation of carbon dioxide cannot be explained by the mere exchange⁽¹⁾, so it is very favorable that the direct splitting reaction of citrate to oxalacetate and acetate really occurs in this organism.

It is found that the addition of dipyriddy does not change the metabolic pathways in this organism, since the accumulation of intermediates in citrate fermentation is not recognized even in dipyriddy containing medium. However small amounts of α -ketoglutarate and pyruvate are always detected by paper chromatography in the fermentation medium.

(1) H. TAKAHASHI: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 27, 832 (1953).

磷酸化合物の Ba による分別法について

大 村 京 生 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 28 年 10 月 18 日 受 理

Studies on the Ba-Fractionation of Phosphorylated Compounds.

By Takao OMURA (Dept. of Agricultural Chemistry, University of Tokyo)

前報^(1,2)で緑豆もやしの oxidative phosphorylation において生成した磷酸エステル類の検索に LEPAGE の Ba 塩分別法⁽³⁾及び paper chromatography を応用したことを報告した。すなわち緑豆もやしの homogenate を用いた場合(大村, 福生⁽²⁾の Fig. 4a 及び 4b); Ba-insoluble fraction の 2 次元 radioautogram には無機のオルト磷酸の他に, 磷グリセリン酸 (PGA) 及び hexose diphosphate (HDP) の spot が見られた。しかるに Ba-soluble fraction にも hexose monophosphates と思われる spots の他に, 2 つの radioactivity の高い spots が見られ, その位置は Ba-insoluble fraction の PGA 及び HDP と対応していた。一般に磷酸エステル類の Ba 塩, pH 8.2 における分別では, 無機のオルト磷酸, adenosine di-及び tri-phosphate (ADP, ATP), PGA, HDP 等は Ba-insoluble fraction に, hexose monophosphates, グリセリン磷酸, 磷焦性ブドウ酸等は Ba-soluble fraction にくることになつていて (e.g. LEPAGE⁽³⁾; KAPLAN, GREENBERG⁽⁴⁾; SACKS⁽⁵⁾) 現在一般につかわれている酸可溶性磷酸化合物の定量的分別法の基礎をなしている。しかしながら, この分別法が定量的であるか否かの検討は, CORI⁽⁶⁾の筋肉抽出液中の hexose monophosphates についての詳細な研究の他には個々の磷酸化合物, 個々の組織抽出液についての研究は少い。逆に, HDP の Ba 塩が pH 8.2 で約 0.5% の溶解度をもつことは知られていて⁽⁷⁾, その分離精製法に利用されており (LEPAGE⁽³⁾は無機磷酸の共存量が少い時, HDP を完全におとすには酒精を 10% になるやうに添加する必要があるといっている), 又 PGA についてもその Ba 塩が中性でかなりの溶解度をもつことがその分離精製法⁽⁸⁾から推定される。ATP, ADP についても SACKS⁽⁵⁾はねずみの肝臓抽出液で Ba-soluble fraction にきてしまうことがあるが, この fraction を Ca で処理することにより定量的に回収されると報告し, 更に SACKS⁽⁹⁾は adenylic acid が Ba-insoluble fraction にきてしまった事例につき言及している。

これらの事実はこの Ba 塩分別法が必ずしも定量的にはゆかぬ場合もあることを示唆するものである。よつてこの分別法によつて PGA 及び HDP が Ba-insoluble fraction に定量的にくるものであるかどうか, P^{32} を含む PGA 及び HDP を用いて検討した。

方 法 及 び 材 料

定量法 全磷酸 (Total P) 及び無機のオルト磷酸 (Inorg P) は ALLEN⁽¹⁰⁾により fructose は ROE⁽¹¹⁾により定量した。Radioactivity (P^{32}) は Lauritzen 驗電器により測つた。Paper chromatography は大村, 福生⁽²⁾によつた。pH 測定は飯野電機製 pH meter により直接測るか, 又は phenolphthalein の着色度を予め pH meter により calibrate しておいて, それとの比較により判定した。

Ba 塩分別法—LEPAGE⁽³⁾ に準じて行つた。組織トリクロル醋酸 (TCA) 抽出液 5~10 cc (P として 1~4 mg を含む) に大過剰の醋酸バリウム (P 1 mg 当り 2.5% 水溶液 0.25 cc) を加え、NaOH で pH を調節し、15 分間氷水中にひやし、遠心し、沈澱を更に小容の 0.1 N HCl にとかし、前回同様醋酸バリウム (25% 液 0.1 cc) を加え、pH を調節し、冷して遠心した。上澄液は合して水で 15 cc にし Ba-soluble fraction とした。沈澱は 0.1 N HCl にとかし水で 15 cc にして Ba-insoluble fraction とした。溶解度の測定等においては遠心後、各上澄についてそのまま Total P, P³² 等を測定した。

組織抽出液の調製——筋肉抽出液は 30 g のねずみの筋肉を 40 cc の 7.5% TCA と共に氷水で冷しながら、blendor で homogenize し、遠心し、上澄液を NaOH で中和して用いた。肝臓抽出液はねずみの肝臓 12 g を 10% TCA 60 cc と共に homogenize し、遠心して得られた上澄液 60 cc に 95% 酒精 70 cc を加えて遠心して glycogen を除き、こまかくくだいた Ba(OH)₂ を加えて phenolphthalein で僅かに pink に着色するようにし、95% 酒精を更に 70 cc 加えて遠心した。沈澱を乾燥後 25 cc の 5% TCA にとくして使用した。

P³² を含む 3-phosphoglyceric acid の調製——緑豆もやし homogenate 140 g, P³² を含む M/10 磷酸緩衝液 pH 7.4 10 cc, M/3 NaF 20 cc, 0.9% KCl 100 cc の混合物を室温で 5 時間振盪して phosphorylation をせしめた。このものに終濃度 5% になるように TCA を加え、遠心して抽出した液を NaOH で中和し、2 倍容の醋酸バリウム及び 4 倍容の 95% 酒精を加えておとし、沈澱をそのまま小容の水で 3 回洗い可溶物を除き、水に懸濁した。H⁺ form のカチオン交換樹脂 Amberlite IR-120 を加えて攪拌溶解せしめ、不溶物を濾去し、アムモニアで pH を 10 にした。このものを KHYM, COHN⁽¹²⁾ にしたがって、anion exchange resin chromatography により分別した。用いた樹脂は Amberlite-IRA 410 (100~300 mesh) である。radioactivity 及び total P で追跡して、その 0.01 N HCl 溶出液をとり、減圧濃縮し醋酸バリウムを加え pH 5 で 2 倍容の 95% 酒精を加えておとし、沈澱を 0.1 N HCl に溶解せしめ、pH 5, 2 倍容の酒精で酸性 Ba 塩としておとす操作を更に 2 回繰返し、最後に 0.1 N HCl にとかし、pH を NaOH で 5 にしてやつと濁濁を生ずるまで酒精を加え、冷蔵庫中に 48 時間おいて結晶せしめ、濾過し、95% 酒精で洗つて硫酸上真空で乾かした。収量約 250 mg. P の含量 8.52% (理論値 8.67%)。Molybdate を添加して促進される rotation は $\alpha_D = -690^\circ \pm 50^\circ$ (文献記載値⁽¹³⁾ -745°) で定量の誤差以内で 3-phosphoglyceric acid の酸性 Ba 塩と一致した。Ketose の SELIWANOFF 反応⁽⁹⁾は negative, pentose の BIAL 反応⁽¹⁴⁾は trace である。4 種の溶媒を用いて一次元に paper chromatography を行つたところ (大村, 福士⁽²⁾ の溶媒 a, b, c, f), 磷酸の発色, radioactivity は共に全く single spot で PGA の位置と全く一致した。このものを別に同様な方法でつくつた P³² を含まない PGA で radioactivity を適当に稀釈し実験に用いた。

P³² を含む HDP の調製——乾燥ビール酵母を ROBISON, MORGAN⁽⁷⁾ にしたがって P³² を含む液中で醗酵せしめ、その TCA 抽出液に醋酸バリウムを加え、pH 8.2 で半容の 95% 酒精を加えて沈澱せしめた。乾燥した沈澱を PGA の調製と同様にカチオン交換樹脂で Ba をとつてとかし、アムモニアで pH 10 にして anion exchange resin chromatography にかけた。その 0.02 N HCl, 0.02 M NaCl で溶出してくる液をとり、pH 8.2 で醋酸バリウムを加え、半容の酒精でおとし乾燥した。乾燥物を 200 倍重の pH 8.2 の水と共に乳鉢中で磨砕し溶解させ、少量の不溶物を濾去し、10% になるように酒精を加え、液を 70° に加熱して生じた沈澱を熱時遠心、濾過してとり、酒精で洗つて硫酸上真空でかわかした。このものを 76° で 5 時間 P₂O₅ 上で乾かしたものの分析値は、P 10.0% (理論値 10.1%), Ba 43.0% (理論値 45.0%) でほぼ理論値と一致した。一次元の paper chromatography では磷酸の発色, radioactivity 共に痕跡量の無機オルト磷酸を含む他, single spot で位置は HDP と一致した。このものはそのまま以下の実験に用いた。

実験及び結果

1. pH 8 附近における PGA 及び HDP の Ba 塩の溶解度——PGA-Ba 約 50 mg 及び HDP-Ba 約 130 mg を 0.1 N HCl にとかし、醋酸バリウムを大過剰 (P 1 mg 当り 25% 液 0.25 cc) に加え、NaOH で pH を調節し、氷水でひやして 15 分後遠心し、沈澱を更に 0.1 N HCl にとかし、Ba (25% 醋酸バリウム 0.1 cc) を加え、pH を調節して、中性 Ba 塩の沈澱をくりかえした。得られた各上澄液の分析値を Table 1 及び 2 に示す。表に見られるように PGA は約 190 γ P/cc の溶解度を示し、この値は pH によりたいして変らない (但し 4, 5 回目の沈澱は量が少く充分飽和になつていなかったと考えられる)。HDP の溶解度は pH によつてかな

Table 1. Solubility of PGA in the Presence of Ba(OAc)₂.

Supernatants	cc.	pH	P ³² (div./min./cc.)	Total-P (γ/cc.)
1 st	5.2	8.4	1.78	196
2 nd.	4.8	7.7	1.75	194
3 rd.	5.8	8.5	—	199
4 th.	3.2	8.1	—	178
5 th.	3.3	9.1	0.78	84

Table 2. Solubility of HDP in the Presence of Ba (OAc)₂.

Supernatants	cc.	pH	P ³² (div./min./cc.)	Tot-P (γ/cc.)
1 st.	2.1	8.8	10.5	726
2 nd.	2.5	7.9	12.3	826
3 rd.	2.5	8.0	13.0	858
4 th.	4.0	8.8	10.5	713
5 th.	2.5	8.2	8.8	625
6 th.	5.8	8.3	4.6	311

Table 3. Ba-Fractionation of PGA in the Presence of KH₂PO₄. (pH 8.5)

P*GA containing 32.5 div./min. -P³² and 665 γ-P and KH₂PO₄ containing 445 γ-P are used.

Ba-Soluble Fraction	cc.	P ³² (div./min./cc.)	Tot-P (γ/cc.)	Inorg-P (γ/cc.)
1 st.	10.8	1.89	35.9	1.2
2 nd.	2.8	1.16	—	—
3 rd.	3.5	0.63	—	—
4 th.	2.8	0.48	—	—
5 th.	2.5	0.37	—	—
Ba-Insoluble Fraction	5.2	0.76	90.9	78.7

Table 4. Effect of KH₂PO₄ on the Precipitation of HDP-Ba at pH 8.2.

HDP* containing 19.4 div./min. -P³² and 980 γ-P and KH₂PO₄ containing 202 γ-P are used.

	Ba-Soluble Fraction cc. P ³² (div./min./cc.)	Tot-P (γ/cc.)
without Inorg. -P	4.0	3.76
with Inorg. -P	4.0	2.18
		39.5
		24.0

て回収試験を行つた。即ち組織 TCA 抽出液に既知量の PGA 及び HDP を添加して Ba 塩分別を行い、各 fraction の添加による Total P の増加及び radioactivity の値から PGA 及び HDP の回収をしらべた。その結果を Table 5 及び 6 で示す。添加した PGA は筋肉、肝臓共に約 40% しか Ba-insoluble fraction から回

Table 5. Recovery Test of P*GA.

i) Rat Muscle TCA Ext.

Original Solution	Ba-Sol. 15 cc.	Ba-Insol. 15cc.
Inorg-P γ	86	622
Tot-P γ	470	805
P*GA containing 950 γ-P and 25.3 div./min. -P ³² is added.		
Inorg-P γ	88	645
Tot-P γ	1020	1205
P ³² div./min.	14.0	9.8

ii) Rat Liver TCA Ext.

Original Solution	Ba-Sol. 15 cc.	Ba-Insol. 15cc.
Inorg-P γ	37	452
Tot-P γ	603	530
P*GA containing 950 γ-P and 19.6 div./min. -P ³² is added.		
Inorg-P γ	40	443
Tot-P γ	1085	970
P ³² div./min.	11.7	7.1

り変動しおよそ 750~850 γP/cc である。いずれにしろ、この値はかなり高く、PGA 及び HDP は純粋な状態では Ba 塩 pH 8.2 における分別で定量的には沈澱されず、むしろ Ba-soluble fraction にくることを示している。

2. Ba 塩分別にたいする無機オルトリン酸の共存の影響——HDP は無機オルトリン酸が共存すると complex をつくり、Ba 塩として沈澱され易くなることは既に ROBISON, MORGAN⁽⁷⁾ が指摘している。よつて PGA 及び HDP の Ba 塩分別にたいする無機オルトリン酸の共存の及ぼす影響をしらべてみた。Table 3 は PGA に KH₂PO₄ を添加して Ba 塩沈澱をくりかえして得られた各回の上澄液及び最後に残つた沈澱の分析値であるが、無機オルトリン酸の共存はこの程度では Ba-PGA は完全には沈澱せず、2~3 回の再沈澱で大部分の PGA が Ba-soluble fraction にきてしまう。Table 4 は HDP に KH₂PO₄ を加えて Ba 塩、pH 8.2 でおとして得られた上澄液の分析値を示す。

KH₂PO₄ の存在は HDP の Ba 塩の沈澱に著しく影響するが、この程度 (P として HDP の約 1/5) の無機リン酸の共存ではまだ HDP を定量的におとすにいたらない。

3. 回収試験—実験 1, 2 の結果に拘らず、実際に組織 TCA 抽出液を Ba 塩で分別を行つた場合、共存物の影響のため、HDP 及び PGA が定量的に Ba-insoluble fraction にくるようになるのではないかと考えられるので、ねずみの筋肉及び肝臓抽出液を用い

Table 6. Recovery Test of HDP*.

i) Rat Muscle TCA Ext.

Original Solution	Ba-Sol 15 cc.	Ba-Insol 15 cc.
Inorg-P γ	152	1265
Tot-P γ	940	1610
HDP* containing 980 γ-P and 17.5 div./min. -P ³² is added.		
Inorg-P γ	139	1355
Tot-P γ	1255	2280
P ³² div./min.	6.6	10.3

ii) Rat Liver TCA Ext.

Original Solution	Ba-Sol 15 cc.	Ba-Insol 15 cc.
Inorg-P γ	44	935
Tot-P γ	1210	1350
HDP* containing 980 γ-P and 15.8 div./min. -P ³² is added.		
Inorg-P γ	26	1010
Tot-P γ	1560	2030
P ³² div./min.	5.9	9.1

取せれず、残りの約 60% は Ba-soluble fraction にきてしまつている。HDP では筋肉、肝臓共に約 60% の回収率であつた。

考

察

PGA 及び HDP の Ba 塩が pH 8.2 でかなり水に溶けることが考えられるにも拘らず、Ba 塩 pH 8.2 における分別法で、PGA 及び HDP は定量的に Ba-insoluble fraction にくると一般に考えられていることの理由の一つとして、PGA 及び HDP の Ba 塩は pH 8.2 で一定の溶解度をもっているが、その値が小さいために、普通の添加実験では Ba-insoluble fraction に 100% の回収を示すようになり、あたかも定量的に沈澱したような結果が得られたということが考えられる。しかしながら、このような場合、添加物質を label しておけば、radioactivity は添加量に応じて Ba-insoluble 及び soluble の双方の fraction に分布するはずである。以上の考から、P*GA 及び HDP* を用いてその溶解度を調べ、回収実験を行つたのであるが、PGA 及び HDP の溶解度は予想外に大きく、普通の P の測定法で容易に測定しうる値を示し、radioactivity の使用は単に結果を二重に測定したにとどまつた。しかし、この二重の測定が完全に平行していることは、結果をよりたしかにしていると考えられる。上記の実験は PGA 及び HDP の Ba 塩は pH 8 附近でそれぞれ約 190 γ P/cc 及び 750~850 γ P/cc の溶解度を持ち、この溶解度は、pH、無機磷酸その他の共存物等により影響されるにしろ、組織抽出液に添加した PGA 及び HDP が Ba-insoluble fraction からそれぞれ約 40% 及び 60% という低い回収率でしか回収されない場合があることを示している。この実験に用いた例数は少ないが、その何れもが 100% には程遠い回収率を示したことは、之が単なる偶然によるとは考え難い。殊にこの実験に用いた筋肉抽出液は LEPAGE⁽³⁾ の、肝臓抽出液は SACKS の指示する条件にできるだけ準拠したものであるから、之らの分別法では HDP 及び PGA は Ba-soluble fraction にもくることがあることを示していると考えられる（遠心分離は室温（20~25°）で行つたため、この操作中に温度があがつてこのような結果がえられたという可能性は PGA⁽⁸⁾ も HDP⁽⁷⁾ も Ba 塩の溶解度は高温の方が低いという事実から考え難い。共存物の影響のため Ba 塩の溶解度が純粋なものとは逆に高温の方が高くなるという可能性は検討しなかつた。又、SACKS⁽⁵⁾ が ATP について指摘した Ca 塩による回収の可能性については Table 5 の Ba-soluble fraction に CaCl₂ を添加して 48 時間冷蔵庫に放置して生じた少量の沈澱に radioactivity が全くないことから、Ba-soluble fraction にきた P*GA は Ca で回収されないことを確めた。）

本実験は単に PGA 及び HDP についてのみ検討したが、その結果は同様な検討を他の磷酸化合物の個個について行う必要を強く示唆するものと考えられる。又、緑豆もやしの oxidative phosphorylation 系の Ba-soluble fraction から PGA、HDP が見出されたことは本実験から考えて当然といえよう。

この実験にあつて御指導を賜つた佐橋教授、丸尾助教授に厚く感謝します。又、実験費は文部省科学研究助成金によつた。

(1) 丸尾, 大村, 松橋, 福士: 農化, 27, 429 (1953).	(8) NEUBERG, C.: Arch. Biochem., 3, 105 (1943).
(2) 大村, 福士: 農化 27, 516 (1953).	(9) SACKS, J., in MCELROY, W. D. and GLASS, B.: 'Phosphorus Metabolism' Vol. II p. 23 (1952).
(3) LEPAGE, G. A., in Umbreit, W. W.: 'Manometric Techniques and Tissue Metabolism' p. 185 (1949).	(10) ALLEN, R. J. L.: Biochem. J., 34, 858 (1940).
(4) KAPLAN, N. O. and GREENBERG, D. M.: J. Biol. Chem., 156, 525 (1944).	(11) ROE, H.: J. Biol. Chem., 107, 15 (1939).
(5) SACKS, J.: J. Biol. Chem., 181, 655 (1949).	(12) KHYM, J. X. and COHN, W. E.: J. Am. Chem. Soc., 75, 1153 (1953).
(6) CORI, G. T. and CORI, C. F.: J. Biol. Chem., 94, 561 (1932).	(13) MEYERHOF, O. and SCHULZ, W.: Biochem. Z., 291, 60 (1938).
(7) ROBISON, R. and MORGAN, W. T. Biochem. J., 24, 119 (1930).	(14) DRURY, H. F.: Arch. Biochem., 19, 455 (1948).

Summary

Quantitative fractionation of phosphorylated compounds with Ba at pH 8.2 was investigated using P*GA and HDP*.

Solubilities of Ba salts of HDP and PGA at pH about 8 were 750~850 γ -P/cc. and 190 γ -P/cc., respectively. HDP* and P*GA, when added to the TCA extracts of rat muscle and liver, were recovered from Ba-insoluble fractions with recoveries of only 60 and 40%, respectively.