And we have tested the fugistatic agents against these two strains.

発芽植物の物質代謝 (第 4 報) クエン酸生成反応

舟橋三郎, 赤 沢 堯 (名古屋大学農学部生物化学教室)

昭和 29 年 4 月 5 日 受 理

Metabolism of Germinating Plants. Part 4. Enzymatic Synthesis of Citric Acid.

By Saburō FUNAHASHI and Takashi AKAZAWA

(Nagoya University. Faculty of Agriculture, Laboratory of Biochemistry)

動植物を問わず, TCA サイクルの初発反応として, クエン酸生成反応は生理学的に極めて重要な意味を持つているが, この合成反応のメカニズムが焦性ブドウ酸或いは酢酸が先ず Acetyl-CoA^(註)になつてから (反応 [I] 及び [II a] [II b]) オキサロ酢酸と縮合するもの (反応 [III]) であることは動物組織或いは微生物の酵素系で既に詳細に解析されている⁽¹⁾.

先に吾吾は大豆もやしの particulate enzyme のクエン酸生成がやはり CoA 関与のものであらうと推定したが確定的な結果を得るまでには至らなかつた⁽²⁾⁽³⁾. それは酵素系自体が動物組織のいわゆる cyclophorase system と同じく複合酵素系であるためにすべての cofactor がほとんど完全に整つていることとか (事実この部位に特に CoA 含量が多い⁽³⁾). 又粗製の CoA 標品を用いたことなどがその原因と考えられた. けれども動物組織のミトコンドリアによる酢酸酸化が CoA の添加で顕著に促進されるとの報告もある⁽⁴⁾ので, 吾吾は繰返して植物組織の particulate enzyme (Mw) による焦性ブドウ酸酸化及びクエン酸合成に対する CoA の効果を検討すると共に, 一方バクテリアの酢酸活性化酵素系即ち Acetyl-CoA 供給反応系との共転によつてこのクエン酸生成反応の機構を検討した. その結果高等植物の焦性ブドウ酸酸化及びオキサロ酢酸との縮合によるクエン酸生成はそれぞれ反応 [I], [III] にしたがうものであることが判つた. 即ちこれは吾吾が前報にのべた推定を確かなものとすると共に, LIPMANN 等⁽⁵⁾がいくつかの植物組織中に存在を確めた CoA の一般的な生理的意義にも関連する実験結果である. Mw は調製上の便宜のために主として緑豆もやしを用いたが, 大豆もやしの酵素系についても同様の結果が得られた. 緑豆もやしのミトコンドリアの焦性ブドウ酸酸化系は MILLERD 等⁽⁶⁾によつて詳細に研究されているが, その主反応たるクエン酸合成のメカニズムがここに明かになつたと言える.

実 験 方 法

a) 植物酵素液 (Particulate enzyme, Mw) の調製 緑豆 (2 日目), 大豆 (4 日目) もやしを前報⁽³⁾にのべたと同じ方法で磨砕分調速心する. 但し 1 回目の Mw を洗滌後再び高速度冷却速心して得た沈殿の懸濁液を酵素液として使用したがこれは MILLERD 等⁽⁶⁾の方法によつた.

b) バクテリア酵素液 (酢酸活性化酵素の調製) 供試 *Escherichia coli* の株は東大坂口研究室から分譲されたもので, 培養方法及び酵素液の調製方法 (抽出, 透析) は OCHOA 等⁽⁷⁾の方法に同じ. 透析 24~48 時間 (0~4°) 後使用.

c) 反応系の組立てとクエン酸の定量 反応条件は第 2 報にのべたと同様の検圧法によつたが, N₂ ガスで置換して嫌氣的に反応を行わせ (30°), 一定時間後に三塩化酢酸で除蛋白した反応濾液について, NATELSON⁽⁸⁾, TAYLOR⁽⁹⁾ の方法に準拠してクエン酸を比色定量した.

反応液の組成

(註) CoA: Coenzyme A., ATP: Adenosine triphosphate, DPN: Diphosphopyridine nucleotide.
PP: Pyrophosphate

イ) 反応系 [I] + [III]: Phosphate buffer (pH 7.4) $50 \mu M$, $MgCl_2$ $10 \mu M$, 焦性ブドウ酸 $50 \mu M$, オキザロ酢酸 $30 \sim 40 \mu M$, DPN $2 \mu M$, CoA 30 units, cysteine HCl $20 \mu M$, 酵素液 1.0 cc を加えて 2.5~3.0 cc とする。

ロ) 反応系 [Iib] + [III] (バクテリア酢酸活性化酵素系との共転): 焦性ブドウ酸を酢酸 $40 \mu M$ でおきかえ, DPN を除いて ATP $3 \mu M$ を加える。酵素液として更にバクテリア抽出液 0.5 cc を加える。

d) 試薬 イ) オキザロ酢酸: ROBERTS⁽¹⁰⁾ の方法で自製, 純度 90%。ロ) ATP: DOUNCE⁽¹¹⁾ の方法で自製, Ba 塩の純度 90%。ハ) CoA: Pabst Laboratory の製品, 表示純度 90%。ニ) DPN: Pabst Laboratory の製品, 表示純度 99%。

実験結果と考察

1) 緑豆及び大豆もやしの Mw のクエン酸生成反応 (反応系 [I] + [III])

Table 1. Enzymatic Synthesis of Citric Acid by Plant Particulate Enzymes.[†]

Expt. No.	System	Mung bean		Soy bean	
		Citric acid assayed μM	Citric acid increase μM	Citric acid assayed μM	Citric acid increase μM
1	Enzyme control*	0.76		0.87	
2	Complete system (substrates: pyruvate + oxalacetate)	2.86	2.10	1.72	0.85
3	- CoA	2.26	1.50	1.36	0.49
4	- DPN	1.72	0.96		
5	Complete system** (substrates: acetate + oxalacetate)	1.14	0.38	1.01	0.14
6	- CoA	1.14	0.38	1.01	0.14

[†] The preparative method was the same as that of MILLER's paper⁽⁶⁾.

* The reaction mixture contained $50 \mu M$ of phosphate buffer (pH 7.4), $50 \mu M$ of pyruvate, $30 \sim 40 \mu M$ of oxalacetate, $10 \mu M$ of $MgCl_2$, $2 \mu M$ of DPN, CoA 30 units, and cysteine HCl $20 \mu M$. Enzyme suspension 1 cc was added at zero time (total volume 2.5 cc), and reaction was carried out for 1 hour at 30° in anaerobic condition of N_2 gas phase.

** In place of pyruvate and DPN, $40 \mu M$ of acetate and $3 \mu M$ of ATP were added respectively.

Table 2. Enzymatic Synthesis of Citric Acid by the Combination of Plant and Bacterial Enzymes*.

Expt. No.	System	Citric acid assayed μM	Citric acid increase due to combination of plant and bacterial enzymes μM
1	Complete system [†]	2.2 μM	0.61 μM
	- CoA	0.74	
	- Mung bean Mw	0.63	
	- Bacterial enzyme	0.96	
2	Complete system ^{††}	0.87	0.51
	- Mung bean Mw	0.11	
	- Bacterial enzyme	0.25	
3	Complete system ^{††}	0.74	0.46
	- CoA	0.27	
	- Soy bean Mw	0.11	
	- Bacterial enzyme	0.17	

[†] In addition to the complete system No. 5 of Table 1, the bacterial enzyme was added.

* Bacterial enzyme was prepared by the method of SERRA and OCHOA's paper⁽⁷⁾.

Cultural method of bacteria was also similar to them.

^{††} The same enzyme of bacterial extract (*E. coli*) was used.

性ブドウ酸酸化系をアセチル供与系とする system についてであつて, 酢酸とオキザロ酢酸を基質とする時には殆んどクエン酸の生成が認められず, 勿論 CoA の効果もない。即ち動物組織, 微生物が行う酢酸活性化反応はこの植物組織にはないと見てよいであろう。大豆もやしのクエン酸生成に対する CoA の効果は緑豆程著しくない。以上の結果はこれ等植物組成のクエン酸生成反応が [III] にしたがうことを明かにするものであるが, 先にのべたように複合酵素系と見做される Mw の反応系で CoA の添加効果が著しい事実については, 洗滌操作等で或る程度の cofactor が破壊又は除去されるような事情が考慮されるであろう。

2) バクテリアの酢酸活性化酵素系と植物 Mw の共転系 (反応系 [Iib] + [III])

1) の結果から植物組織に於けるクエン酸生成の直接のアセチル供与体が Acetyl-CoA であることが根拠づけられたので, バクテリアの酢酸活性化酵素系によつて Acetyl-CoA を供給すれば自らの condensing enzyme によつてクエン酸生成を行うことが期待される。勿論この時にはバクテリアのクエン酸生成能力 (condensing enzyme の activity) は出来るだけ小さいことが望ましく, 一方植物については酢酸活性化が行われぬことが必要であるが, 後者は Table 1 の結果が満すところである。Escherichia coli の Acetyl-CoA 供給反応系に緑豆, 大豆もやしの Mw をかみ合わせた時の生成クエン酸の定量結果を Table 2 に示す。明かに CoA の促進効果が認められるが, 両酵素系を共転させたものから CoA を除くと殆んどクエン酸の出来ぬのは, バクテリアの酢酸活性化が [II b] にしたがうところから当然である。然しクエン酸生成量が Table 1 の結果に較べて著し

く僅少な事実については目下のところ説明出来かねるが、或いは実験条件の不備によるものかもしれない。OCH-OA 等はこのバクテリアの Amtyl-CoA 供給反応系に各種動物組織の aqueous extract を共転させて、これ等組織中の condensing enzyme の存在を証明しているが⁽⁷⁾、吾吾は緑豆、大豆ともに硫酸塩析で得た蛋白部分に condensing enzyme の作用力を認めることは出来なかつた。

3) 考 察

これまで植物の物質代謝研究が動物に較べて立ちおくれていたのは植物の酵素系自体の特殊性と実験条件規整のむづかしさによつたものと思われるが、然し最近の研究の進歩で高等植物の行う多くの物質代謝系が動物組織或は微生物のそれと同じか非常に類似したものであることが次々と明かにされて来ている。就中高等植物に於ける TCA サイクルの実在は BONNER の研究室の秀れた業績で大変確かなものとなつた⁽⁶⁾⁽¹²⁾。吾吾はこのサイクル中の焦性ブドウ酸酸化及びクエン酸生成反応と CoA の関係を追究して、これが動物組織等の酵素系で確立された [I], [III] のメカニズムによることを明かにした。但しこの反応機構を厳密に証明するためには、各反応段階に特定な可溶性酵素系を以て再構成する方法によらねばならぬが、上記実験結果もこのメカニズムを説明するに足るものである。焦性ブドウ酸酸化系について最近 REED 等⁽¹³⁾ の研究で Lipothiamide pyrophosphate (LTPP) の関与する Fig. 1 の反応機構が提出されたが (*Escherichia coli* の変異株の酵素系)、これが生体一般に成立つか否かは未解決の問題としても、植物組織中には lipoic acid の分布が広く、しかもこれが光合成の CO₂ 固定反応に関与するとの仮説が提出されている⁽¹⁴⁾ので、植物の焦性ブドウ酸酸化系は CoA のみならず更に lipoic acid 或は LTPP との関連の下に考察されることが期待される。

Fig. 1.

実験に御協力頂いた瓜谷郁三氏並に山田秀子さんに感謝します 又 *Escherichia coli* の菌株を御分譲下さつた東大坂口研究室、名大医学部細菌学教室、並びに貴重な CoA を御恵与下さつた米国 Pabst Laboratory. (A. FRIEDEN 博士) に深謝します。

尙この研究の経費の一部は文部省科学研究費によつたものである。附記して謝意を表します。

(1) H. A. BARKER : in Phosphorus Metabolism., 1, 204 (1951).	(9) TAYLOR. : <i>Biochem. J.</i> , 54, 48 (1953).
(2) 舟橋, 瓜谷, 赤沢 : 農化, 27, 684(1953).	(10) J. C. ROBERTS. : <i>J. Chem. Soc.</i> , 1952, 3315.
(3) 舟橋, 赤沢, 瓜谷 : 農化, 27, 842(1953).	(11) A. L. DOUNCE et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 174, 361 (1948).
(4) W. B. ELLIOT., and KALNITZKY. : <i>J. Biol. Chem.</i> ; 186, 477 (1950).	(12) R. H. BURRIS. : in <i>Ann. Rev. of Plant. Physiol.</i> , 4, 91 (1953).
(5) N. O. KAPLAN, and F. LIPMANN : <i>J. Biol. Chem.</i> , 174, 37 (1948).	(13) L. J. REED and B. G. DEBUSK. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 1261 (1953).
(6) A. MILLERD. : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 42, 149 (1953).	(14) M. CALVIN. : <i>Chem. and Eng. News.</i> , 31, 1735 (1953).
(7) J. R. STERN, and S. OCHOA. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 193, 161 (1951).	
(8) S. NATELSON et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 175, 745 (1948).	

Summary

Previously we obtained some evidences that the enzymatic synthesis of citric acid of plant tissues was dependent on CoA as it was confirmed in animal or microbial tissues. Additional results are given in the present paper indicating that the citrate synthesis in mung bean or soy bean from pyruvate and oxalacetate should proceed through reaction (I) and (III). The reaction sequence was verified as follows :

(I) Addition of catalytic amounts of CoA was effective in the synthesis of citrate from py-

ruvate and oxalacetate by twice-washed particulate enzyme (presumably mitochondria) of mung bean or soy bean seedlings as shown in Table 1.

(II) The plant enzyme was devoid of acetate activating activity even in the presence of CoA, but in combination with *E. coli* preparations, it actively catalyzed the citrate synthesis from acetate, oxalacetate, CoA, and ATP (reaction IIB and III). The results can be taken as an indirect evidence for the presence in the plant preparations of "condensing enzyme" which catalyzes the synthesis of citrate from acetyl-CoA and oxalacetate. (Table 2).

えのきたけの生化学的研究 (第2報) 培地の Sucrose/ NaNO_3 ratio が菌糸体の生育及び発芽に及ぼす影響

脇 田 正 二 (横浜国立大学学芸学部)

昭和 29 年 4 月 14 日 受 理

Biochemical Studies of *Collybia velutipes* Part 2. Effect of Sucrose/ NaNO_3 ratio on the Growth of Mycelium and the Fructification of Fungus.

By Shoji WAKITA (Yokohama National University)

STEINBERG は *Aspergillus niger* についての研究で窒素源として NH_4NO_3 を用いたとき菌体中の乾物量生成は培地の糖の増加するに随つて増加するという事を発表し、糖の増加は菌糸の発育を盛んにする事を認めている⁽¹⁾。又 WAKSMAN 等の研究によれば培地中に窒素を多く含む程、又は直ちに利用し得る炭水化物の少い時 (Low c/N ratio) に菌体中の蛋白質の量が多いという事を報告している⁽²⁾。著者は sucrose 及び NaNO_3 の用量を種種 modify した 24 種の CZAPEK sol. にえのきたけ菌糸を移植し、菌糸の生育並に発芽について実験を行つたのでその結果を報告する。

実 験 の 部

1. 供試菌種 *Collybia velutipes* No. 67.

2. 培養液窒素源の選定 菌糸の生育及び発芽に及ぼすアンモニヤ態窒素と硝酸態窒素の比較を行つた。培養基は次の如き組成のものである。蒸溜水 800 cc, 磷酸緩衝液* 200 cc, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.1 g, vitamin B_1 , 40 mg, glucose 30 g, $\text{**NH}_4\text{Cl}$ 1.387 g $\div$ 0.363 g N/l, NaNO_3 2.204 g $\div$ 0.363 g N/l (* Na_2CO_3 及び H_2SO_4 で pH を調節, ** pH 7 以上については殺菌後無菌的に NH_4Cl を加えた) 10日間 24° で培養の結果は Fig. 1 の如くである。即ち培養基が酸性の場合でも、アルカリ性の場合でも菌糸は窒素源として硝酸ソーダより塩化アンモニウムによく生育し、両者共 pH 6.5 附近が最もよく生育した。然しこの培養を 60 日間継続すると二つの窒素源の間に顕著な差は生育の上に見られなくなり、然も pH 4.5 の硝酸ソーダ培養区には菌糸の生育は極めて貧弱であるにもかかわらず 3 割のものに菌が發生した。他の実験に於ても窒素源として硫酸アンモニウムよりも NaNO_3 及び KNO_3 培養基に菌がよく發生した。又麦芽エキスを磷酸緩衝液で pH を変えた培養基に於ては合成培養基に於ける程菌糸の生育並に菌の發生は培地の pH に敏感でなかつた (Table 1)。

Fig. 1. Effect of NH_4Cl and NaNO_3 at different pH values, upon the amount of mycelial growth.

Cultures incubated 10 days in liquid medium at 25°

3. 炭素源の選定 前記 2 の実験に使用した如き用量の培養基 (窒素源は NaNO_3) に炭素源としてそれぞれ 3% の glucose 及び sucrose を用い (pH 6.5) で培養を行つた処両者の間に生育に於て顕著な差はなかつた (Table 2)。

4. 培養液中の Sucrose/ NaNO_3 ratio と菌糸体の生育及び発芽との関係