度も対照より非常に高まった。C. H. も対照とやや異って減少が速かに起ったと推定される。尚チオグリコール酸ソーダによる酵素の活性化は認められなかった。

考 察

洗滌菌体振盪法によって酵素を生産せしめる場合、酵素生産の誘導期に菌体中の炭水化物が減少し、その後再び増加するが、この増加期に $\text{NH}_3\text{-N}$ の放出速度が増大し酵素の生産が行われ、見掛上 $\text{NH}_3\text{-N}$ の放出と酵素の生産と関連が深い。 $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成と蛋白分解酵素の生産との関連については三宅等⁽⁴⁾が納豆菌の growing culture について蛋白分解酵素の生産に先行して $\text{NH}_3\text{-N}$ が生成することを指摘している。これらの事実から栄養的に豊富な培地に生育した細胞が外部の栄養源を除かれて好氣的に保たれた場合、菌体の貯蔵物質の中で先ず利用され易い炭水化物を主として消費し、容易に利用し得る炭水化物が無くなると次に主として窒素化合物を消費し始めて $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成が盛になることが考えられる。これが前報に於て述べた主動的代謝の切かわりに相当するのではないかと推定される。この切替後の代謝と酵素生産の間に何かの関連があることが考えられ、グルコース添加の誘導期延長は細胞外に利用され易いエネルギー源が与えられた為この切替がおくれた結果と考えられる。又酵素生産期に M/100 のグルコースを添加した場合 E. A. と共に T. N., $\text{NH}_3\text{-N}$ が減少した事実はグルコース添加によって再び正常な増殖代謝が主導的になったと推定される。一度減少した C. H. の増加及びチオグリコール酸ソーダの促進作用については現在の所何等推定出来ない。

要 旨

1. 洗滌菌体振盪法によると約 3 時間の誘導期の後に酵素の生産が起る。
2. 酵素生産期に窒素ガスで置換すると酵素の生産速度は低下し、炭酸ガスで置換すると E. A. は低下する。
3. 菌体中の炭水化物は誘導期に減少し、其後再び増加する。
4. グルコース (M/500) を添加すると誘導期が延長され、酵素生産期にグルコース (M/500) を添加すると酵素生産速度は低下し、M/100 添加すると E. A., T. N. 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ がいずれも減少する。
5. チオグリコール酸ソーダを添加すると誘導期は殆んど短縮されず、酵素生産速度が増大する。
6. $\text{NH}_3\text{-N}$ の放出と酵素の生産は見掛上関連が深い。

終りに御指導を賜った東京大学坂口謹一郎教授、本学野本只勝教授、御助力戴いた切田義憲、谷地 仁の両氏に厚く感謝します。本研究費の一部は科学研究助成金により、又本報の要は昭和 30 年 3 月の日本農芸化学会大会に於て講演した。

- (1) 塩田日出夫：本誌，30，724 (1956)。
- (2) 江上不二夫等編：標準生化学実験法 p. 208 (1953 年)。

- (3) 江上不二夫等編：標準生化学実験法 p. 17 (1953 年)。
- (4) 三宅 捷、渡辺 憲：生化学，27，209 (1955)。

微生物によるグリセリン代謝機構に関する研究 (第 7 報)*

Hansenula anomala によるグリセリン酸化経路について

大塚 謙 一, 増 田 博 (山梨大学醸酵研究所)

昭和 31 年 10 月 5 日 受 理

緒 言

前報に於て著者等は *Hansenula anomala* がグリセリンを酸化する機構は α -グリセロ磷酸を経て焦性ブドウ酸へ変転し遂には炭酸ガスになることを示した^(1,2)。この間著者等の得た酵素液はグリセロ磷酸の他にグルコース-6-磷酸を強く酸化出来ることから、生菌体によるグリセリン酸化には所謂 Warburg-Dickens-Cohen 呼吸型

* Studies on the Mechanism of Glycerol Metabolism by Microbes. Part VII.

On the Oxidative Pathways of Glycerol by *Hansenula anomala*.

Ken-ichi OTSUKA and Hiroshi MASUDA (Research Institute of Fermentation, Yamanashi University)

(本報告の要旨は昭和 31 年 4 月、日本農芸化学会にて講演発表した)。

式が関与するのではないかと予想し実験を進めていた。最近 Hauge 等⁽³⁾が *Acetobact. suboxydans* のグリセリン酸化が Pentose cycle を経て代謝されることを示したことは注目される。

著者等は *H. anomala* による三炭糖代謝系と六炭糖代謝系との関連性について以下の結果を得たので報告する。以下の略号を用いる。グリセリン G, グルコース Gl, α -グリセロリン酸 GP, グルコース-6-リン酸 G6P, 6-リン酸グルコン酸 6PG, フラクトース-6-リン酸 F6P, フラクトース-1,6-リン酸 FDP, トライオースリン酸 TP, 3-リン酸グリセリン酸 3PG, 焦性ブドウ酸 Py.

実 験 方 法

G6P⁽⁴⁾ 及び 6PG⁽⁵⁾ は著者等の合成したものを用いた。FDP は GBI 製, F6P はこれより調製した⁽⁶⁾

酵素液の調製は前報⁽²⁾の通り行った。代謝ガス量は Warburg 検圧法により測定した。Py は 2,4-dinitro-phenyl hydrazone の比色により定量した⁽⁷⁾。TP は 1 規定アルカリ分解法の測定値⁽⁸⁾より算出した。

リン酸エステルの同定はペーパークロマトグラフィによった^(9,10)。即ち反応液に 20% トリクロール醋酸を 5 分の 1 量加え、混和して遠心分離した上澄液をとり、苛性カリにて中和し(フェノールフタレン)、醋酸バリウムを加え混和後、90%アルコールを 3 倍量加え放置後遠心分離して沈澱を集める。これにイオン交換樹脂 IR 410 を加えてカチオンを除いた透明液について 2 次元法にてペーパークロマトグラフィを行った。溶媒はイソプロパノール:イソブタノール:アンモニア:水 (60:20:1:39) 及びイソプロパノール:トリクロール醋酸:アンモニア:水 (75:5g:0.3:25) を用いた。

第 1 図 酵素液のグリセリン酸化に対する色素 (チオニン), DPN の効果

- (1) チオニン+DPN (2) DPN
(3) チオニン (4) GP のみ

反応条件: 燐酸緩衝液 0.5 ml, 酵素液 (12000 r.p.m. 処理) 1.0 ml, GP (0.5 M) 0.2 ml, チオニン (0.001 M) 0.1 ml, DPN ca. 1 mg, 全容 1.8 ml, 温度 30°, pH 5.8, ガス腔, 空気。

第 1 表 酵素液による GP 及び G6P 酸化と RQ の変化

反応時間 (分)	GP			G6P		
	O ₂ (μ M)	CO ₂ (μ M)	RQ	O ₂ (μ M)	CO ₂ (μ M)	RQ
30	0.8	0.5	0.61	1.1	0.7	0.64
50	1.4	0.9	0.62	2.4	1.9	0.80
70	1.9	1.2	0.63	3.3	4.0	1.20
100	2.9	1.9	0.65	4.7	7.1	1.51

反応条件: 燐酸緩衝液 0.5 ml, 酵素液 (7000 r.p.m., 3 分処理) 1.0 ml, チオニン (DPN を含む) 0.2 ml, GP (0.5 M) 0.2 ml, G6P (0.1 M) 0.2 ml, 全容 1.9 ml, 温度 30°, pH 5.8, ガス腔, 空気。

実験の I. 生菌磨砕酵素液の性質

(a) 各種基質酸化力: 該酵素液は前報⁽²⁾の如く, G 及び Gl に対しては無活性であってキナーゼ系が欠

第 2 図 酵素液による焦性ブドウ酸の分解 (好気条件)

反応条件: 燐酸緩衝液 0.5 ml, 酵素液 1.0 ml, チオニン 0.1 ml, MgSO₄ (0.05%) 0.1 ml, 焦性ブドウ酸ソーダ 0.2 ml (26.5 μ M), 温度 30°, pH 5.8, ガス腔 空気。 (反応後の消費基質量 11.2 μ M)

第 2 表 遠心力の差に基く酵素液の酸化力の変化

反応時間 (分)	GP		G6P	
	O ₂ ^{a)}	O ₂ ^{b)}	O ₂ ^{a)}	O ₂ ^{b)}
30	1.4	0.8	1.2	0.9
50	2.4	1.1	1.7	1.3
70	3.2	1.5	2.6	1.8
100	4.4	2.1	3.5	2.3

値は μ M で示す。

a) 7000 r.p.m. (5 分) 処理酵素液

b) 12000 r.p.m. (15 分) 処理酵素液

反応条件: 燐酸緩衝液 (M/15) 0.5 ml, チオニン (0.0001 M) 0.1 ml, 酵素液 1.0 ml, α -GP-Na (0.2 M) 0.2 ml, 全容 1.8 ml, ガス腔 空気, 温度 30.5°, pH 5.8。

除しているが, GP に対しては活性であり (ATP 効果はない), 又色素 (チオニン) の存在は酸化力を増加せしめる (第 1 図参照). 酵素液はさらに GP の他に G 6 P, F 6 P, FDP, 6 PG に対しいずれも炭酸ガス発生を伴う酸化能を示した (第 1 表及び第 8 表参照). 第 1 表に示す如く R. Q. は GP では 0.6 であるが, G 6 P では酸化の進行と共に増大し炭酸ガス発生は大となる.

Py に対しては好気条件でも炭酸ガス発生しか認められず酵素液にはデカルボキシラーゼしかない. 第 2 図で消費 Py と CO_2 曲線の彎曲点に於ける CO_2 量とは等モル数である.

第 3 図 酵素液のグルコース-6 磷酸酸化に対する DPN の効果

(1) 樹脂処理+DPN

(3) 透析処理

(2) 透析処理+DPN

(4) 樹脂処理

反応条件: 磷酸緩衝液 (M/15) 0.5 ml, チオニン (0.001 M) 0.1 ml, 酵素液 1.0 ml, DPN ca. 1 mg (60% pure), グルコース-6 磷酸 (0.1 M) 0.2 ml, 全容 2.2 ml, 温度 30°, pH 5.8.

第 3 表 酵素液の FDP 酸化に於ける TP の生成

反応時間 (分)	O_2 吸収量 μM	CO_2 発生量 μM	Py 生成量 μM	TP 生成量 μM
5	0.84	0.44	0.41	3.25
15	1.20	3.34	0.62	1.85
30	1.56	9.06	0.69	0.32
50	—	—	0.47	1.05

反応条件: フタル酸緩衝液 (pH 5.8) 0.5 ml, 酵素液 1.0 ml, チオニン 0.1 ml, DPN 0.1 ml, FDP (0.1 M) 0.2 ml, 全容 1.9 ml, 温度 30°, ガス腔 空気.

反応後 20% トリクロル醋酸 0.5 ml を混和し, 遠心して上澄液 1.0 ml 宛につき Py 及び TP を定量する.

第 4 表 酵素液反応による生成磷酸エステルの R_F (好気条件)

基 質	正常の場合	弗化ソーダ添加の場合	ヒドラジン添加の場合	標準値*	判 定
	a) b)	a) b)	a) b)	a) b)	
GP	89, 100	83, 123		91, 112	3 PG
	101, 12	100, 18	100, 0	100, 0	TP (アルカリにて分解)
		85, 14		S_1	
G 6 P			100, 157	S_2	
			93, 228	S_3	
	66, 116	68, 126	64, 122	68, 125	F 6 P
	100, 9	97, 0	100, 0	100, 0	6 PG (TP も含む)
FDP		90, 114		91, 112	3 PG
	61, 6	51, 0		S_4	
		85, 0		S_1	
FDP	56, 108	53, 112		54, 109	G 6 P
	70, 114	68, 123		68, 125	F 6 P
	86, 106	88, 111		91, 112	3 PG
	100, 17	100, 10		100, 0	TP (6 PG も含む)

値は 2 次元法ペーパークロマトグラフィで得られた R_F 値でオルソ磷酸を 100 として算出した.

a) 溶媒はイソプロパノール: イソブタノール: アムモニヤ: 水 = 40: 20: 1: 39

b) 溶媒はイソプロパノール: トリクロル醋酸: アムモニヤ: 水 = 75: 5: 0.3: 25

濾紙は東洋濾紙 No. 52 を使用し, 温度 5° 附近, 約 16 時間展開した.

* 大村等⁽⁹⁾の値からオルソ磷酸 100 として算出して引用したが著者等の得た平均値も GP (91, 146), G 6 P (57, 109), FDP (54, 74) で同様の値を示した.

酵素液 (7000 r.p.m. 処理) には particle が幾分含まれており, さらに遠心力を強くかけると (12,000 ~ 15,000 r.p.m.) GP 酸化能は低下する. 即ち第 2 表の如く 7,000 r.p.m., 5 分の上澄液の GP 酸化は G 6 P のそれより強かったが, 12,000 r.p.m., 15 分の上澄液の GP 酸化はかなり低下する. GP 酸化能は酵素液の調製条件によってかなり強弱があり, これらの事は GP 酸化酵素は particle により緊密に附着しているため条件によりかなり抽出量が異ってくるためと考えられる.

(b) 助酵素 (DPN) の効果: G 6 P 酸化代謝には TPN⁽¹²⁾ 及び DPN が必要とされ⁽³⁾, GP 脱水酵素も DPN を必要とすることは古くから知られている⁽¹⁴⁾. 著者等は酵素液を透析又はイオン交換樹脂 (IR-410 Cl 型) 処理によって助酵素を除き, これに新たに 90% 純度の DPN を添加してみると第 3 図の如く G 6 P 酸化が助酵素除去により著しく低下したものが DPN により増大した. GP 酸化も同様の結果であった.

以上のことから酵素液には GP 酸化系の他に G 6 P 酸化系が含まれていることが解る.

実験の II. FDP $\rightleftharpoons$ TP 反応系の証明

GP が酸化されるには第一段階として TP が生成することは当然であり⁽²⁾, TP が C_6 系を経るには aldolase 反応の有無が問題である. Aldolase は FDP $\rightleftharpoons$ TP を可逆的に接触するが平衡は著しく右側に寄っており (1: 9), 実験的には FDP の分解又は TP の生成を追及する方が簡易である.

著者等は酵素液で FDP を酸化せしめ,

第 5 表 酵素液による生成磷酸エステル (嫌気条件)

基 質	生成磷酸エステル
G 6 P	(G 6 P)
	F 6 P
F 6 P	(F 6 P)
	G 6 P
FDP	(FDP)
	G 6 P
	F 6 P
	T P

カッコ内は残存磷酸エステル
反応条件その他はガス腔を N_2 で行った以外は第 4 表と同一である.

TP 生成を経過的に測定した所、第 3 表の如く初期に TP が著しく増加し以後減少する結果を得た。即ち初め 5 分に於て TP の生成量は炭酸ガス及び Py の生成に比して多く、この時の TP は FDP から直接生成したことは確実である。更に同様の実験を嫌氣的に行ってみてもやはり TP の生成が認められる。以上のことから酵素液にはかなり強力な aldolase が含まれていることは確実であって恐らく生体内の条件では逆反応も当然行われると考えられる。

実験の III. $\text{FDP} \longrightarrow \text{F6P} \rightleftharpoons \text{G6P} \longrightarrow \text{6PG}$ 反応系の証明

a) $\text{FDP} \longrightarrow \text{F6P} \longrightarrow \text{G6P}$: FDP を酵素液にて酸化せしめた反応液についてペーパークロマトグラフィを行ってみると第 4 表の如く、F6P 及び G6P の生成が認められた。F6P の R_F はリボース-5-リン酸のそれと区別されないが、嫌氣的に FDP を反応させたものでも同じ位置にスポットを生ずるので (第 5 表)、F6P であることは確実である。

b) $\text{F6P} \rightleftharpoons \text{G6P}$: G6P を基質とした場合、反応液には第 4 表の如く F6P の生成が認められた。これは嫌気条件の場合も (この際ガスの消長はない) F6P が生成する。一方 F6P を基質としてみると G6P の生成が認められた (第 5 表)。従って $\text{F6P} \rightleftharpoons \text{G6P}$ なる可逆反応系の存在は確実である。

c) $\text{G6P} \longrightarrow \text{6PG}$: G6P, F6P, FDP より生成物には以上の他に酸性溶媒 (a) で殆ど移動しないスポットの存在が認められる。これは 6PG に一致し、嫌気条件のものでは生成しないので (第 5 表) $\text{G6P} \xrightarrow{+\text{O}} \text{6PG}$ の酸化系の存在は確実である。

さらに G6P, FDP の酸化生成物には Py が認められ、弗化ソーダ添加下では 3PG が蓄積しており、又 TP 代謝を阻害するヒドラジン⁽¹³⁾存在下では 3PG が消滅する。このことは $\text{TP} \longrightarrow \text{3PG} \longrightarrow \text{Py}$ 系が存在し、G6P 及 FDP 代謝系中にも同様な系が関与していることを示している。

実験の IV. GP よりの生成物

a) 正常酸化の場合 : 生成物として確認されるリン酸エステルは TP 及び 3PG である (第 4 表)。TP は 6PG と同一の位置にスポットを生ずるが、この場合 1 規定アルカリ処理により完全に分解してしまうので TP であることは確実である (G6P からのものはアルカリに安定なものが残るので TP の生成も否定されないが 6PG の存在は明らかである)。

b) 弗化ソーダ添加の場合 : TP 及び 3PG の生成は顕著である。この他 S_1 と S_2 (第 4 表) の 2 つの不明のスポットを認めた (弗化ソーダの終濃度は 0.0025 M)。

c) ヒドラジン添加の場合 : TP 及び S_1 の他に酸性溶媒に対し高い R_F を示すスポットを生じた (S_3)。この場合は 3PG の生成は無く、 $\text{TP} \longrightarrow \text{3PG}$ 反応のヒドラジン阻害が認められる (ヒドラジンは $\text{NH}_2\text{NH}_2\text{H}_2\text{O}$ を硫酸にて中和し終濃度として 0.001 M 添加した)。

以上のことから $\text{GP} \longrightarrow \text{TP} \longrightarrow \text{3PG} \longrightarrow \text{Py}$ 系が証明された。

次に C_3 代謝系と C_6 代謝系との関連性について以下検討した。

実験の V. 阻害実験

a) ヒドラジン阻害 : 該試薬が TP の代謝を阻害することは前記の結果でも示されたが、ここではヒドラジン添加下の酸素吸収、炭酸ガス発生、TP 及び Py 生成について検討した。第 6 表に結果を示す。酸素吸収は GP 及び G6P では阻害があり FDP は顕著でない。然し炭酸ガスは何れも阻害され、 CO_2/O_2 比で比較すると G6P は約 80%、GP は約 20%、FDP は中間の 50% と比率がヒドラジンにより低下している。TP はヒ

第 6 表 酵素液の基質酸化に対するヒドラジン阻害

基 質	反応時間 (分)	毒 物	O_2 吸収量 (μM)	CO_2 発生量 (μM)	Py 生成量 (μM)	TP 生成量 (μM)	CO_2/O_2
GP	110	—	2.0	1.1	0	—	0.55
		ヒドラジン	1.4	0.5	0	—	0.36
G6P	70	—	2.0	3.1	0.68	0.58	1.55
		ヒドラジン	1.6	0.4	0.44	0.87	0.25
F6P	110	—	2.8	1.6	0.49	3.88	0.57
		ヒドラジン	2.7	0.9	0.49	4.33	0.33

第 7 表 酵素液の基質酸化に対する弗化ソーダ阻害

基 質	反応時間 (分)	毒 物	O_2 吸収量 (μM)	CO_2 発生量 (μM)	Py 生成量 (μM)	$(\text{CO}_2 + \text{Py})/\text{O}_2$	阻害率 %
GP	150	—	3.7	2.1	0.03	0.58	20.7
		NaF	3.6	1.7	0.02	0.46	
G6P	90	—	3.1	3.6	1.34	1.57	92.3
		NaF	1.5	0.1	0.10	0.12	
F6P	60	—	2.1	2.9	0.60	1.70	78.8
		NaF	1.3	0.4	0.04	0.36	

ドラジンにより明らかに蓄積量が増加した。Py はヒドラジンがあってもかなり蓄積している (G 6 P では Py 量は減少しているが, FDP では変らなかった。GP では対照区も Py は蓄積されていないが, これは GP 脱水素酵素の活性度が低いと、生成 Py は分解方向が強く行われたためとみられる)。

以上の結果で TP 代謝阻害剤のヒドラジン存在下でも, G 6 P 及び FDP からは Py が生成していることは TP を通らない Py 生成系が別にあるものと思われる (この点について考察の項で記す)。

ここでは FDP がヒドラジン阻害に対し GP と G 6 P との中間の値を示したことを記しておく。

b) 弗化ソーダ阻害: 酵素液による基質酸化の際に弗化ソーダを添加すると第 7 表の如く, G 6 P と FDP よりの炭酸ガス発生と Py 生成は著しく阻害されるが, GP よりの炭酸ガス発生は約 20 % 位しか阻害されない。G 6 P の阻害が最も著しいのは 6 PG の開裂が弗化ソーダで阻害されるため、結局 enolase と二重の阻害効果によるものであろう。(CO₂+Py)/O₂ 比をみると弗化ソーダによる比率の低下は GP で 20%, G 6 P で 92% であって FDP は 78% である。

以上の如くヒドラジン、弗化ソーダの阻害効果は GP 酸化と G 6 P 酸化とは異なる結果を示し, FDP はその中間の結果であった。このことは酵素液では G 6 P は C₆ 系即ち 6 PG 系を経、GP は大部分が直接 C₃ 系のまま代謝され, FDP は C₃ 及び C₆ 系の両方の系で酸化されると考えられる。

実験の VI. C₆ 代謝系の磷酸による制御作用

Dickens⁽¹⁶⁾, Lynen⁽¹⁷⁾, Johnson⁽¹⁸⁾, Le Page⁽¹⁹⁾, Cohen⁽²⁰⁾ は高濃度磷酸が G 6 P 代謝を抑制することを認め、Pasteur 効果に考察を与えている。著者等は酵素液による GP, G 6 P, F 6 P 及び FDP 酸化の際に 0.018 モルと 0.3 モルの磷酸濃度に於て、酸素吸収量と炭酸ガス発生量とを比較した(第 8 表)。G 6 P 酸化のガスの収

第 8 表 酵素液による基質酸化に対する磷酸濃度の影響

基 質	反応時間 (分)	磷酸濃度	G 6 P		F 6 P		FDP		GP	
			O ₂ (μM)	CO ₂ (μM)	O ₂ (μM)	CO ₂ (μM)	O ₂ (μM)	CO ₂ (μM)	O ₂ (μM)	CO ₂ (μM)
20	a)		1.5	7.1	1.7	2.2	1.1	5.5	0.8	0.8
	b)		0	0	0	0	1.4	0	0.1	0.3
50	a)		2.5	15.1	2.7	8.2	2.7	18.3	2.1	1.8
	b)		1.0	0.1	0	0	3.1	1.1	0.5	1.1
100	a)		4.9	27.2	4.8	18.7	3.9	22.9	3.6	2.3
	b)		1.8	1.3	0.5	0	4.6	4.3	0.8	1.8
200	a)		6.4	30.8	5.2	24.1	4.9	24.3		
	b)		2.3	4.0	0.8	0	5.8	12.9		

a) 0.018 M 磷酸濃度, b) 0.29 M 磷酸濃度 (いずれも終濃度)

支は磷酸が濃いと著しく抑制され、殊に F 6 P は殆ど抑制された。これに対し FDP では酸素吸収量は磷酸の濃い方がむしろ多く、炭酸ガスも lag はあるがかなり発生する。GP は酸素吸収はかなり抑えられるが炭酸ガスは磷酸の稀い方に比して半分程発生が認められる。結局 G 6 P と F 6 P は磷酸濃度に対して同様の傾向を示し, FDP は逆の結果を示す (GP は GP 脱水素酵素の要因が入ってくるので酸素吸収については同一に考えられないが、炭酸ガス発生点では FDP の傾向に属する)。このことは高濃度磷酸は C₆ 代謝系を抑制し, FDP は aldolase により C₃ 代謝系を経るために異なる結果を示したものとみることが出来る。

考 察

I. C₃ 代謝系について Hauge 等⁽³⁾の報告では *Acetobact. suboxydans* がグルコース酸酵能を欠除していることから Embden-Meyerhof scheme の存在を否定し, GP が直接 C₃ 系で代謝されず C₆ 系を経ることを主張している。著者等の結果では *H. anomala* が酸酵能をもち酵素液での結果では FDP はむしろ直接 C₃ 系を経る傾向が強く, aldolase 平衡のずれからみても GP からの TP 生成量位では TP → 3 PG 系が存在する以上, FDP 生成 (aldolase の逆行) は酵素液の場合は一部しか行われないと考えられる。然し磷酸濃度が低ければ C₆ 代謝系は強力に進められるから恐らく生菌体酸化で低磷酸濃度では GP → TP → FDP → G 6 P → 6 PG 系が容易に行われるのであろう。

II. Pasteur 効果について Pasteur 効果については古くから問題にされて来たが, Lynen 等は磷酸濃度が Pasteur 効果に関係することを提示している。著者等の結果からも C₆ 代謝系が高濃度磷酸で抑制されることは Pasteur 効果に示唆を与えるものと考えられる。又著者等の結果では磷酸濃度の効果は F 6 P と FDP とで判然と差が認められ, Engelhardt⁽²¹⁾ が Pasteur 効果は fructokinase が酸素により阻害されることであ

ると提唱していることを併考すると興味深い。結局 Pasteur 効果は次の如く想定される。生菌体の場合酸素の豊富な条件では、酸素により Pasteur 酵素が働き菌体内の磷酸濃度が低下して、 C_6 代謝系が優先的に進み F 6 P は G 6 P へ強く進むので fructokinase の基質減少 (fructokinase の阻害も協同効果となる) の結果, Warburg-Cohen 呼吸型式が進行する。もし嫌気条件になれば菌体内の磷酸濃度が高まり C_6 代謝系は抑制されて醗酵過程即ち Embden-Meyerhof 型式が進行する。

H. anomala の場合は G 及び GP は生菌体の場合でも嫌気的には代謝されず、代謝される場合は酸素があるので C_6 代謝系は強力に進むから G 酸化は C_6 系を経るものと想定される。

III. G 6 P 代謝系の検討 Warburg⁽¹²⁾ の研究以来 G 6 P が TPN を助酵素として 6 PG に酸化されることは確実となっている。しかし以後の経路については 3 つの説がある。

(Warburg-Dickens)

(Cohen)

(Wood 22)

尚 (2) の経路には Horecker⁽²³⁾ の transaldolase 及び transketolase の反応系も当然考慮されねばならない。

これらの経路について著者等の第 6 表の結果から検討してみると、G 6 P を基質としたヒドラジン阻害の場合 TP 系を経るならば Py 生成を阻害する筈にも拘らず、明らかに Py が生成していることは (0.44 μM)、(1) 及び (2) の経路の如く TP を経ての Py 生成系を考えることは困難である。

そこで (3) の経路についてみると、今ヒドラジン添加の場合は $TP \longrightarrow Py$ 系が阻止されているから、蓄積した [TP] と [Py] (分解生成物の $[CO_2]$ を加えたもの) とは等モル数になるわけである。第 6 表の実測値では $TP=0.87 \mu M$, $Py+CO_2=0.44+0.4=0.88 \mu M$ で等しい値を示している。従って (3) の経路を満足している。

さらにこの経路の裏書きとして次の考察を行った。(3) 経路で生成した TP のうち Py に酸化された量を $x \mu M$ とすると $[TP]+x=(Py+[CO_2])-x$ が成立する。ここで x 以外は第 6 表の実測値が代入される。

$$\text{即ち} \quad x = \frac{[Py] + [CO_2] - [TP]}{2} = \frac{0.68 + 3.1 - 0.58}{2} = \frac{3.2}{2} = 1.6$$

従って Py に酸化された 1.6 μM の TP に相当する酸素 (O として) 量は 1.6 μM である。

実測の全酸素消費量 (O_2) は 2.0 μM であるから酸素原子としては 4.0 μM で、これより x を差引いた 2.4 μM は $G 6 P \longrightarrow 6 PG$ の酸化に消費された酸素 (O) 量に相当する。これは開裂して生じた TP 又は Py と等

H. anomala によるグリセリン酸化型式

(1) Glycerokinase; (2) GP-dehydrogenase; (3) TP-isomerase; (4) Aldolase, (5) Phosphatase (Phosphohexokinase); (6) Phosphohexoisomerase; (7) Zwischenferment; (8) 6 PG-dehydrase; (9) KDPG-aldolase (split-enzyme); (10) Decarboxylase; (11) TP-mutase; (12) Enolase, (13) 6 PG-dehydrogenase; (14) KPG-decarboxylase, (15) R 5 P-aldolase; (16) Transketolase:

DHAP=ジオキシアセトン磷酸, GAP=グリセリンアルデヒド磷酸, GSP=麟グリセリン酸, KPG=2-ケト-6 麟グルコン酸, KDPG=2-ケト-3 デソキシ-6 麟グルコン酸, R 5 P=リボース-5磷酸

モデルでなければならない。実測の TP は $0.58 + 1.6 = 2.18 \mu\text{M}$ であって $\frac{2.18}{2.4} = 0.91$ の比率になり、大体 1 に近い。これが 1 より小さい事は 6 PG その他が幾分蓄積されているためと考えられる。

以上の事により、毒物無添加の場合も (3) の経路は実測値に大体当てはまるわけである。しかし毒物無添加の場合は (2) の経路も実測値を満足するので完全には否定されない。ヒドラジン添加の場合は (3) の経路が重点的に行われることは確かであろう。

IV. グリセリン酸化型式 *H. anomala* のグリセリン酸化について現在迄に著者等の得た結果を総括して前ページの型式を想定した。

終りに臨み終始御指導を戴きました東大坂口教授並びに朝井教授に感謝します。

- (1) 大塚謙一, 増田 博 : 本誌, 31, 11 (1956).
- (2) 大塚謙一, 増田 博 : 本誌, 31, 15 (1956).
- (3) J. G. Hauge, T. E. King, V. H. Cheldelin : *J. Biol. Chem.*, 214, 1, 11 (1955).
- (4) 江上不二夫等 : 標準生化学実験, 563 (1953).
- (5) 江上不二夫等 : 標準生化学実験, 564 (1953).
- (6) 江上不二夫等 : 標準生化学実験, 573 (1953).
- (7) W. W. Umbreit : *Manometric Techniques*, 163 (1951).
- (8) K. Lohmann, O. Meyerhof : *Biochem. Z.*, 273, 60 (1934).
- (9) 大村京生, 福土定雄 : 本誌, 27, 516 (1953).
- (10) J. P. Ebel : *Bull. Soc. Biol. Chem.*, 34, 330 (1952).
- (11) O. Warburg, W. Christian, A. Griesse : *Biochem. Z.*, 282, 157 (1935).
- (12) W. A. Wood : *Bacteriol. Rev.*, 19, 225 (1955).
- (13) H. V. Euler et al. : *Z. physiol. Chem.*, 249, 1 (1937).
- (14) O. Meyerhof, R. Junowicz-Kocholaty : *J. Biol. Chem.*, 149, 71 (1943); N. Entner, M. Doudoroff : *J. Biol. Chem.*, 210, 853 (1952).
- (15) F. Dickens : *Biochem. J.*, 32, 1628 (1938).
- (16) F. Lynen : *Ann.* 546, 120 (1941).
- (17) M. T. Johnson : *Science*, 94, 200 (1941).
- (18) G. A. Le Page : *J. Biol. Chem.*, 176, 1009, 1021 (1948).
- (19) D. B. M. Scott, S. S. Cohen : *J. Biol. Chem.*, 188, 509 (1951).
- (20) W. A. Engelhard, N. E. Sakov : *Bio-khimiya*, 8, 9 (1943) (cited by Dickens : *The Enzymes*, II, 681 (1952)).
- (21) R. Kovachevich, W. A. Wood : *J. Biol. Chem.*, 213, 745, 757 (1955).
- (22) B. L. Horecker, P. Z. Smyrniotis : *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2123 (1953).

黒斑病甘藷の病理化学的研究 (第 24 報)*

罹病甘藷の代謝活性と抵抗 (品種間の比較を中心として)

赤沢 堯, 瓜谷郁三, 平井篤造 (名古屋大学農学部)

昭和 31 年 10 月 10 日 受 理

甘藷が黒斑病菌の侵入を受けると、その被害部隣接健全部において、呼吸の増加、ポリフェノール成分 (クロロゲン酸, イソクロロゲン酸など), クマリン成分 (ウンベリフェロン, スコポレチン) の集積, 無機磷酸の有機磷酸化, 可溶性アミノ酸の蛋白質への移行がみられ、一方被害部において、精油成分 (イボメアロンなど) の生成と褐変がおこる。このような一連の活発な向合成的変化をわれわれは代謝活性と名付けてきた^(1,2)。

さらにこの代謝活性は、病菌侵入に対する甘藷の反応であり、抵抗のための一つの条件であるとみなした。このことは多湿低酸素圧で本菌の侵入をうけた甘藷が、代謝の活性を示さず病菌によってさらに侵されてゆくことから⁽³⁾、また本菌に対して強抵抗の馬鈴薯がその侵入を受けた場合に同様に代謝活性がみられることから⁽⁴⁾推定出来るわけであるが、ここで代謝活性の積極的意味をさらに明らかにするため、抵抗の異なる各種品種について、代謝活性の変化と抵抗の程度とを比較検討することにした。

* *Phytopathological Chemistry of Black Rot Sweet Potato. Part XXIV. The Relation of Metabolic Activation to Resistance in Black Rot Sweet Potato.*
By Takashi AKAZAWA, Ikuzo URITANI and Tokuzo HIRAI (Faculty of Agriculture, Nagoya University)