要 約

Scheme (2) に示した経路で DL- γ -trimethylamino- β -hydroxypropanesulfonic acid (DL-anticarnitine と仮称*) を合成した。

本研究に当り、御鞭撻いただいた山本亮教授、住木諭介教授に謝意を表する。無機塩を含む厄介なマイクロ分析をして下さった東大農芸化学有機微量分析室の諸嬢に深く感謝する。

(1) G. Fränkel, M. Blewett : <i>Biochem. J.</i> , 41, 469 (1944).	P. K. Bhattacharyya, K. R. Weldman, G. Fränkel : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 38, 405 (1952); 35, 241 (1952).
G. Fränkel, M. Blewett, M. Coles : <i>Nature</i> , 161, 981 (1948).	(3) M. Bergmann, F. Rodt : <i>Ber.</i> , 54, 1648 (1921).
(2) H. E. Carter, P. K. Bhattacharyya, K. R. Weldman, G. Fränkel : <i>Federation Proceedings</i> , 10, 170 (1953); H. E. Carter,	(4) <i>Org. Syn. Coll. vol. II</i> pp. 405.

酵素のポーラログラフ的研究* (第 3 報)

アクトミオシンの SH 基について

伊藤昌英, 鈴木達雄 (三重県立大学水産学部化学教室)

昭和 31 年 10 月 29 日 受 理

緒 言

Barron⁽¹⁾ がはじめてミオシンが SH 酵素であることを見出して以来, Bailey⁽²⁾, Kuschinsky⁽³⁾, Kielley⁽⁴⁾ 等によって, ミオシン, アクトミオシンの SH 基とアデノシントリホスファターゼ (ATPase) 活性との間には密接な関係があることが明らかにされてきた。一方, 秦⁽⁵⁾ は SH 基と *p*-chloromercuribenzoate (*p*-CMB) との反応をポーラログラフ的に研究し, *p*-CMB の還元波の波高を測定して SH 基を定量する方法を考案したが, さらにパバインを電解還元して増大する SH 基をこの方法を用いて定量し, 電解還元によって出現する酵素の SH 基量と酵素活性との間には比例関係があることを報告している⁽⁶⁾。

著者等は秦の方法⁽⁵⁾を用いて, アクトミオシンの SH 基をポーラログラフ的に定量し, 酵素の SH 基量と酵素活性との関係を検討した結果, 一定の酵素濃度の範囲内では, 酵素の SH 基含量と ATPase 活性との間には比例関係が存在し, また, *p*-CMB の波高の減少量で表わされる SH 基量が "native" な酵素の活性の指標として用いられる可能性を認めた。

実 験 の 部

1. 装 置

柳本製写真記録型ポーラログラフを使用した。用いた滴下電極の毛细管特性は, $m=0.91$ mg, 蒸留水中, 零加電圧において, $t=3.65$ 秒である。また検流計は最大感度 3.67×10^{-9} A/mm/m の検流計を感度 1/2 として使用した。

2. 酵素液の調製

前報⁽⁷⁾のごとく, 酵素は新鮮な家兎筋肉より渡辺の方法⁽⁸⁾に従って抽出し, 精製を 5 回繰り返して, これより 0.6 M KCl 酵素液を調製した。Q_p の値は約 1260 である。酵素濃度はセミマイクロセルダール法によって定量した蛋白態素量をもって表示した。この実験に用いた酵素液の濃度は 0.61 mgN/ml である。

3. 試薬の調製

(a) 10^{-2} M *p*-Chloromercuribenzoate (*p*-CMB) 溶液: 市販の *p*-CMB を Hellerman⁽⁹⁾ の方法に従って 3 回精製を繰り返した。この精製 *p*-CMB 末 1.7855 g を精秤し, 小過剰の 0.1 N KOH に溶解した後, 水を加えて 500 ml とした。

この溶液は基準溶液として使用するために, さらに, Hellerman の方法に従って溶液中の水銀量を分析して

* Polarographic Studies on Enzymes. Part III. The Sulfhydryl Groups of Actomyosin.
By Masahide ITO and Tatuo SUZUKI (Chemical Laboratory, Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie)

濃度を検定した。すなわち、この溶液の一定量を pH 7.0 のリン酸塩緩衝液中において、0.02 N *o*-iodosobenzoate 基準溶液と反応させた後、遊離する I_2 を 0.01 N $Na_2S_2O_8$ 標準溶液で滴定して水銀含量を求めた。その結果、理論値 56.17%Hg に対して、分析値 56.97%Hg の値を得た。したがって、この *p*-CMB 溶液は基準溶液として使用して差支えないものと見做した。

(b) 緩衝液：酵素の SH 基の定量には 1 M リン酸塩緩衝液 pH 7.0、酵素活性の測定には 0.1 M ヴェロナール緩衝液 pH 7.0 をそれぞれ調製して使用した。pH 値は pH 試験紙を用いて測定した。

以上のほか、実験に用いた試薬はいずれも再結晶による精製品を使用した。精製困難なものは市販の和光純薬製特級品をそのまま使用した。蒸留水は硝子製蒸溜器による再蒸留水である。

4. 実験操作

(1) アクトミオシンの SH 基の定量法

(a) *p*-CMB の標準曲線の作製：*p*-CMB の一定量 (10^{-2} M *p*-CMB 基準液 0.1~0.4 ml) にリン酸塩緩衝液の 3.0 ml、最終 KCl 濃度を一定とするために 0.6 M KCl 溶液の 6.0 ml (定量の際と同濃度) をそれぞれ加えた後、水を加えて全量 10 ml とする。溶液を電解瓶に移し、水素ガスを 30 分間通じて溶存酸素を除いた後、常法に従って温度 $20.5^\circ \pm 0.1^\circ$ 、加電圧範囲 0~1.0 V、検流計感度 1/2 においてポーラログラムを記録する。得られた一連のポーラログラムを最大曲率法で作図し、*p*-CMB の第 1 波の波高を求め、*p*-CMB の濃度と波高との関係から *p*-CMB の標準曲線を作製した。

(b) *p*-CMB と酵素との反応および SH 基の定量： 10^{-2} M *p*-CMB の 0.2 ml にアクトミオシンの 2.0~6.0 ml、リン酸塩緩衝液 3.0 ml を加え、さらに最終 KCl 濃度が一定となるよう 0.6 M KCl を添加した後、水を加えて全量 10 ml とする。この反応液を温度 $20.5^\circ \pm 0.1^\circ$ の恒温槽中に 30 分間保持して反応を完結させる。この反応条件は予備実験において詳しく検討し、*p*-CMB の波高が一定となる点をもって反応完結とみなした。この反応液を上記の操作と全く同じようにしてポーラログラムを記録し、波高を測定する。標準曲線から過剰の *p*-CMB 量を求め、消費された *p*-CMB 量をシステイン量に換算して酵素の SH 基量を定量した。

(2) 酵素活性の測定

前報⁽⁷⁾のごとく、反応混液を $36.5^\circ \pm 0.1^\circ$ において 5 分間反応させた後、混液中に遊離するリン酸を Fiske-Subbarow⁽¹⁰⁾ の方法に従って、Pulfrich 光度計を用いて比色定量し酵素活性とした。反応混液の組成は次のとおりである。すなわち、 8×10^{-3} M adenosin triphosphate 1.0 ml、酵素液 0.5~1.5 ml、ヴェロナール緩衝液 (pH 7.0) 2.0 ml、 10^{-2} M $CaCl_2$ 0.5 ml に KCl 濃度を一定とするために 0.6 M KCl を添加して全量 5.0 ml とする。

(3) 酵素の蛋白波の記録

上記 SH 基量と蛋白波の波高との関係を検討するために酵素の蛋白波も調べた。すなわち、酵素液の一定量 (0.5~4.0 ml) を取り、前報のごとく、 Co^{++} を含むアンモニウム緩衝液 3.0 ml を加え、さらに KCl 濃度を一定とし、水を加えて全量 10 ml とする。常法に従って直ちに感度 1/20、加電圧範囲 -0.8~-1.8 V において蛋白波を記録する。今回は SH 基と密接な関係にあるといわれる蛋白波の第 2 波を対象とした。蛋白波の波高は Co^{++} の残余電流の部分から蛋白波の第 2 波の頂点までの高さを測定し、 Co^{++} の波高を差引いて蛋白波の波高とした。

実験結果ならびに考察

上述の実験方法に従って得られた結果は次のとおりである。

(1) *p*-CMB の標準曲線

第 1 表に示すように、0.1 mM から 0.4 mM までの濃度範囲について調べた結果、濃度と波高の間には満足な比例関係が見出された。これらの関係を図示すれば第 1 図のようになり、*p*-CMB の標準曲線が得られる。この場合に、標準曲線が原点を通らないのは、実験条件を一定とするために KCl 濃度を異常に高くしたためと考えられる。

(2) アクトミオシンの添加による *p*-CMB の還元波の減少量と酵素の SH 基含量

上述の実験条件に従って *p*-CMB と酵素とを反応させ、*p*-CMB の波高から消費された *p*-CMB 量を求め、システイン量に換算して酵素の SH 基含量を定量した。その結果、第 2 表に示すように *p*-CMB の波高は、添加

第 1 表 *p*-CMB の濃度と波高との関係

<i>p</i> -CMB 濃度 (mm)	波高 (mm)	感度	半波電位 (V vs. S. C. E.)
0.1	37	1/2	-0.22
0.2	59	"	"
0.3	79	"	"
0.4	97	"	"

第 2 表 アクトミオシンの添加による
p-CMB の波高の減少量と酵
素の SH 基含量

酵素添加量 (ml)	<i>p</i> -CMB の波高 (mm)	<i>p</i> -CMB の波高の減少量 (mm)	SH 基含量システインとして (μ M)
0	58	0	—
2.0	52	6	0.30
3.0	49	9	0.45
4.0	45	13	0.65
6.0	39	19	0.95

酵素濃度 0.061 mgN/ml : *p*-CMB 濃度 0.2 mm

した酵素量の増加とともにほぼ定量的に減少することから、酵素の *p*-CMB と反応性の SH 基量は酵素濃度に比例すると考えられる。この場合の *p*-CMB のポーラログラムの変化は第 2 図に示した。

第 2 図 アクトミオシンを添加した場合の *p*-CMB の波高の変化

(A)	0.2 mm <i>p</i> -CMB (対照)	
(B)	"	+ アクトミオシン 2.0 ml
(C)	"	" 3.0 "
(D)	"	" 4.0 "
(E)	"	" 6.0 "

のように酵素活性は濃度に大体比例する。得られた結果は第 3 表に示した。

第 3 表 酵素濃度と酵素活性との関係

酵素濃度 (mgN/ml)	酵素活性 (Lib. Py/5ml/5min)
0.06	54
0.12	107
0.18	148

示したごとく、酵素の蛋白波の波高と酵素濃度との関係は、前報⁽¹²⁾においてすでに論じたごとく、いわゆる Langmuir の吸着式に従うようである。

第 1 図 *p*-CMB の標準曲線

なおこの場合に、同じ条件の下で、ニトロプルシッドを指示薬として過剰の *p*-CMB をシステインで逆滴定すると、これから求められる酵素の SH 基含量と、ポーラログラフ法による値とは $\pm 4\%$ の範囲内でよく一致するから、上述の結果は、おそらく酵素の SH 基と *p*-CMB との反応に基づくものと思われる。また、さらに高濃度の酵素液について実験を行う場合には、適当に *p*-CMB 量を増加する必要があるが、この場合には、秦⁽⁶⁾、錫谷⁽¹¹⁾等によってすでに報告されているごとく、電解液の粘度増加、蛋白質と金属イオンとの相互作用等による *p*-CMB の減高の減少が考えられるので充分に注意が必要と思われる。

(3) 酵素濃度と酵素活性との関係

酵素濃度が希薄な場合には、一般に酵素活性は酵素濃度に比例するが、本実験の酵素濃度の範囲内においても同

(4) 酵素濃度と蛋白波の波高との関係

上述の SH 基量と蛋白波の関係を検討するために、 Co^{++} を含むアンモニウム緩衝液における蛋白波の第 2 波についてその波高を調べた。その結果、第 4 表に

第 4 表 酵素濃度と蛋白波の波高との関係

酵素濃度 (mgN/ml)	波高(第 2 波) (mm)
0.03	23
0.06	38
0.09	48
0.12	51
0.24	51

以上の実験結果をまとめて、酵素の SH 基含量、酵素活性および蛋白波の波高をそれぞれ酵素濃度に対して図示すると第 3 図のようになる。すなわち、酵素との反応によって減少した *p*-CMB の還元波から求められる *p*-CMB と反応性の酵素の SH 基量は、この実験の濃度範囲内では酵素濃度に比例する。一方、酵素活性も酵素濃度が希薄な場合には酵素濃度に比例する。

したがって、酵素活性と SH 基量との間には比例関係が存在するものと思われる。これらのことは、SH 酵素における SH 基の役割^(13,14)、ミオシン、アクトミオシンの酵素活性と SH 基との関係⁽¹⁴⁾ についての数多くの研究から容易に予想せられるところであり、したがってアクトミオシンの SH 基をポーラログラフ的に追求することによって、この酵素の活性と SH 基との

関係を知り、ひいては、この酵素の“native”な状態における酵素活性を、ポーラログラフ的に *p*-CMB の波高の減少量で示される SH 基量をもって表わされる可能性があるのではないと思われる。また、蛋白波の第 2 波と蛋白質の SH 基との間には密接な関係があることは、Brdička⁽¹⁵⁾ をはじめ多くの研究者によって明らかにせられているが^(16,17)、酵素の SH 基含量と蛋白波の波高との間には直線関係は認められず、やはり、蛋白波の波高をもって酵素の SH 基含量を論ずることは困難なように思われる。ただ、この実験に供したアクトミオシンの純度に多少問題があるので、いずれの場合にもただちに結論を述べることはできない。

総 括

p-Chloromercuribenzoate (*p*-CMB) を用いてアクトミオシンの SH 基をポーラログラフ的に定量した。その結果、酵素と *p*-CMB との反応によって *p*-CMB の還元波は減少し、それから求められる *p*-CMB と反応性の酵素の SH 基量と酵素活性の両者は、酵素濃度に対して直線関係を示し、したがって“native”な酵素の活性はポーラログラフ的に *p*-CMB の波高の減少量で示される SH 基量をもって表わされる可能性を認めた。

終りに臨み、終始御懇篤なる御教示を賜った京都大学、館勇教授ならびに京都大学食糧科学研究所、秦忠夫教授に深甚なる謝意を表する。尚、この報告の要旨は昭和31年10月20日の日本農芸化学会中部・関西支部合同大会において講演した。

第 3 図 アクトミオシンの SH 基量、酵素活性および蛋白波の波高と酵素濃度との関係

—▲—▲— 酵素活性, —●—●— SH 基量, —○—○— 蛋白波

- (1) E. S. G. Barron, T. P. Singer : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 56, 120 (1944).
- (2) K. Bailey, S. V. Perry : *Biochim. Biophys. Acta*, 1, 506 (1947).
- (3) G. Kuschinsky, F. Turba : *Biochim. Biophys. Acta*, 6, 426 (1951).
- (4) L. B. Bradley, W. W. Killey : *J. Biol. Chem.*, 218, 653 (1956).
- (5) 秦 忠夫 : 京都大学食糧科学研究所報告, 第 5 号, 42 頁 (昭和 26 年).
- (6) T. Hata, S. Matsushita : *Mem. Res. arch. Inst. Food. Sci. Kyoto Univ.*, No.

- 9, 19 (1955).
- (7) 鈴木達雄, 伊藤昌英 : 生化学, 27, 574 (1955).
- (8) 渡辺静雄 : 江上不二夫編, 標準生化学実験 244 頁 (文光堂) (昭和 28 年).
- (9) L. Hellerman, F. P. Chinard : *Method of Biochemical Analysis*, 1. p. 14 (1954), Edited by David Glick. Interscience Publishers. N. Y.
- (10) H. C. Fiske, Y. Subbarow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925).
- (11) 錫谷 徹 : 生化学とポーラログラフィ講演

- 要旨集XIII-1 (昭和31年).
- (12) 鈴木達雄, 伊藤昌英: 日本化学会第9年会において発表 (昭和31年).
- (13) 平出順吉郎: SH の進歩7頁 (医学書院) (昭和30年).
- (14) E. S. G. Barron: *Advances in Enzymology*, 11, 201 (1951), Edited by F. F. Nord, Interscience Publishers, N. Y.
- (15) R. Brdička: *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 5, 112 (1933).
- (16) 小出真次: ポーログラフィの研究, 2, 29 (1954).
- (17) 秦 忠夫: ポーログラフィ, 4, 11 (1956).

東北火山灰土壌中の *Azotobacter* (IV)*

A. agile ATCC 9046 の適応能 (1)

須 藤 恒 二 (東北大学農学部農芸化学科農業微生物研究室)

昭和 31 年 9 月 6 日 受理

周知のように *Azotobacter* は広汎な種類の炭素物を生育基質として利用する. Jensen (1952)⁽¹⁾ のまとめる所でも 5 炭糖を除く糖類, アルコール類, 低級脂肪酸から, 芳香族では安息香酸, フェノールにまで及んでいる. これらの炭素物はまたそれぞれ酸化の基質となり多くは適応的に酸化されることも古くから認められている. 従って一つの基質に適応した菌体と他の基質に適応した菌体でそれぞれの代謝系の共通な面と共通でない面とを明かにするなら, この菌に於ける構成的な代謝系と適応的な代謝系とを明かにし得るし, 他方に於て窒素固定系はこの菌の構成的な代謝系とみなし得るから, この系を上述の炭素物酸化経路に於ける構成的な酵素系と関連させて検討すれば, 窒素固定機作解明に新しい側面を加え得ると考えられる.

以上のような想定に基づき種々の基質に生育した *Azotobacter agile* の酸化能を検討して得た結果の 2, 3 について報告する.

実 験 方 法

菌株: *A. agile* ATCC 9046** は無窒素培地で比較的粘質物の生産が少く, 遠心分離に好適であるので, 実験には本菌株を用いた.

培地: Starkey の塩液 (K_2HPO_4 0.8 g, KH_2PO_4 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025 g, $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.0005 g, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 0.0005 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.0005 g, H_2O 11) に所要の基質を 2 乃至 0.5% 加え調製する. 滅菌は15封度10分加圧で行った.

培養: 30° で往復振盪培養を行った. 培養時間は48時間である.

菌懸濁液: 培養を 4000 回で遠心して集菌し, 2 回純水で洗い, 上記塩液の 2 培の濃度のものに懸濁した.

磨砕標品: 遠心集菌した菌の泥状物にほぼ同容のアルミナと塩液 2~3 ml を加え, 氷をいれた Werkman-mill で冷却下に磨砕した. 磨砕操作を 2 回行い適当量の塩液を加えて冷凍遠心器で零度附近で遠心分離を行った. 10,000 回15分遠心後傾斜して得た上澄は濃褐赤色で混濁しているが顕微鏡下では生菌の混在は認められない. 尚磨砕標品は上記のように強い褐赤色を呈するが Wilson⁽²⁾ らはこれに haemoprotein の存在を認めている. この液の 0.2~0.3 ml が酸素吸収試験に用いられた. 窒素含量は 10 mg/ml 前後である.

基質: 基質はすべて M/20 に調製した. 酸は Na 塩の形のものが用いられた.

酸素吸収の測定: Warburg の検圧計を用いその構成は, 主室, 塩液 2 ml, 菌液 0.5 ml; 側室, 基質 0.5 ml (25 μ M); 副室 30% KOH 0.3 ml; ガス腔, 空気, 反応温度は 30° であった.

実 験 結 果

A) 葡萄糖生育菌体の諸種基質に対する態度

供試の *Azotobacter* 菌株の葡萄糖生育菌は第 1 図に示すように葡萄糖, 果糖, ピルビン酸, 酒精, 酢酸に対

* *Azotobacter* in the Acidic Volcanic Ash Soil in Tohoku District. Part IV. Adaptability of *A. agile* ATCC 9046. (1).

By Tsuneji SUTO (Laboratory of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

** 東大有馬助教の好意で入手した. 記して謝意を表する.