- Gen. Appl. Microbiol.*, 3, 13 (1957). (7) T. E. Friedemann, G. E. Haugen : *J. Biol. Chem.*, 147, 415 (1943).
 (6) D. Cavallini, N. Frontali, G. Toschi : *Nature*, 163, 568 (1949). (8) T. Shimizu : *J. Biochem.*, 37, 421 (1950).

酸化醗酵に関する研究 (第 18 報)*

α -ケトグルタル酸醗酵 (その 4)

朝井勇宣, 清水克己, 室岡治義 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 33 年 7 月 31 日 受 理

著者等は前報⁽¹⁾に於て α -ケトグルタル酸生産菌 *Kluyvera citrophila* α を用い, グルコースより α -ケトグルタル酸の生成機構を追究した結果, グルコースは分解されてピルビン酸を通り, TCA cycle の経路に入り, 該酸が生成蓄積されると推定される事実を得た. この推定に従い, ピルビン酸が TCA cycle の経路に入るものとするならば, ピルビン酸の CO_2 固定があるはずである. 今回は放射性同位元素 C^{14} を用いてその証明を行い, 且つ α -ケトグルタル酸の炭素鎖のどの位置に C^{14} が incorporate されているかを調べることににより, α -ケトグルタル酸生成経路の検討を行った. 尚, 片桐等⁽²⁾は大腸菌群細菌を用い, α -ケトグルタル酸生成経路に, ピルビン酸と酢酸の縮合を推定しているが, *K. citrophila* にもこの事実が存在する否かを検討した. 本報はこれらについて行った実験結果を報告する.

実 験 方 法

使用菌種 *Kluyvera citrophila* α nov. sp. Asai.

洗滌菌体の調製法 前報と同様の方法で洗滌菌体の調製を行った.

反応方法 反応はすべて洗滌菌体を用い振盪機或はワールブルク・マノメーターの装置を用いて, 30° で振盪しながら好氣的に反応を行った.

分析方法 α -ケトグルタル酸及びピルビン酸の確認は前報に述べた如く, 2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンのペーパークロマトグラフィー⁽³⁾によって判定し, 定量は Friedemann-Haugen 法⁽⁴⁾を改良した清水法⁽⁵⁾に従って行った. 還元糖の定量は micro-Somogyi 法⁽⁶⁾によった.

放射能の測定 α -ケトグルタル酸及びピルビン酸が放射性同位元素 C^{14} でラベルされたか否かは, オートラジオグラフィーによって判定した. α -ケトグルタル酸, コハク酸, 菌体等の放射能は Van Slyke-Foich の方法に従って wet oxidation⁽⁷⁾を行い炭酸バリウムの懸濁液としてアルミニウムの皿に spot し, 赤外線ランプで静かに乾燥し, 後, Geiger-Müller 計数管により測定し, 自己吸収の補正を行った.

放射性炭酸水素ナトリウムの調製法⁽⁸⁾ ワールブルク検圧器用の容器の主室に放射性炭酸バリウム, 副室に炭酸バリウムに対して計算量の水酸化ナトリウム, 側室に乳酸を入れ, コックを閉じてから側室の乳酸を入れ炭酸ガスを発生させて水酸化ナトリウムに吸収させ調製した.

実 験 結 果

1. 炭酸水素ナトリウムの α -ケトグルタル酸生成に及ぼす影響 CO_2 の固定を検討する場合, C^{14}O_2 を反応液中に炭酸水素ナトリウム ($\text{NaHC}^{14}\text{O}_3$) として混合し, 反応を行わせるのが便利である. 故に, この実験を行

第 1 表 炭酸水素ナトリウムの α -ケトグルタル酸生成に及ぼす影響

NaHCO_3 添加量 (μM)	α -ケトグルタル酸生成量 (γ)
20	104
0	98

反応液の組成: グルコース $10\mu\text{M}$, 菌体 5mg (乾燥量), $\text{M}/15$ 磷酸緩衝液 ($\text{pH}=6.0$) 1.0ml , 全量 2.8ml . 反応条件: 30° , 4.5 時間

うに先立って先ず炭酸水素ナトリウムの α -ケトグルタル酸生成に及ぼす影響について検討を行った. ワールブルク検圧計の容器を用いて, グルコース $10\mu\text{M}$ を基質とし, 炭酸水素ナトリウム $20\mu\text{M}$ を添加したものと, 添加しないものとの間の α -ケトグルタル酸生成量の比較を行った. その結果第 1 表に示す如くその差異が認められなかった. 即ち, α -ケトグルタル酸の生成過程に CO_2 固定反応が行われているか否かを検討する場合に, 炭酸

* On the Oxidative Fermentation. Part XVIII. α -Ketoglutaric Acid Fermentation (4).
 By Toshinobu ASAI, Katsumi SHIMIZU and Haruyoshi MUROOKA (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

水素ナトリウムを使用することが可能であることが分った。

2. 放射性炭酸水素ナトリウム存在下におけるグルコース及びピルビン酸から α -ケトグルタル酸の生成
グルコース及びピルビン酸からの α -ケトグルタル酸生成の過程に, CO_2 固定反応が存在するか否かを検討するために, ワールブルク検圧計の容器を用いてグルコース, ピルビン酸ソーダそれぞれ $20\mu\text{M}$ を基質とし, これに C^{14}O_2 を炭酸水素ナトリウムの形で $20\mu\text{M}$ を添加して本菌の洗滌菌体を作用せしめた。反応は 30° でグルコースを基質とした場合は 4.5 時間, ピルビン酸ソーダを基質とした場合は 1 時間行った。反応終了後側室の硫酸を主室に流し込み, 反応液を酸性にして発生する炭酸ガスをことごとく副室中の苛性カリに吸収せしめるために更に 1 時間振盪を続けた。後, 反応液の一部をとり, 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンにみちびぎ, キシロールに対する溶解性を利用して α -ケトグルタル酸のヒドラゾンとピルビン酸のヒドラゾンを分離して, 別々にペーパークロマトグラフィーで展開し, オートラジオグラフィーによってこれらのヒドラゾンの放射能の有無を調べた。その結果は第 1 図に示す如くグルコース及びピルビン酸を基質とした場合とも生成した α -ケトグルタル酸のヒドラゾンにのみ放射能が認められた。ピルビン酸を基質とした場合, 反応液中に残存するピルビン酸に放射能が認められず, α -ケトグルタル酸にのみ放射能がみられることから α -ケトグルタル酸への C^{14}O_2 の incorporation は単なる物理的な incorporation ではないことは明らかである。猶, この実験に於てグルコースを基質とした場合, 反応後のグルコースの消費量, 添加した放射性炭酸水素ナトリウムの量, 反応後, 反応液中に存在する CO_2 の量, 生成した α -ケトグルタル酸及びその他の化合物の量, 菌体の量及びそれらの比放射能を示すと第 2 表の如くなる。以上の結果グルコース及びピルビン酸から α -ケトグルタル酸生成の過程に CO_2 固定が存在することは確実と思われる。

第 1 図 放射性炭酸水素ナトリウム存在下においてグルコース及びピルビン酸から生成された α -ケトグルタル酸のペーパークロマトグラム及びオートラジオグラム
P: ペーパークロマトグラム R: オートラジオグラム

3. 放射性 α -ケトグルタル酸の degradation 次に C^{14}O_2 を固定して生成した α -ケトグルタル酸のどの位置に C^{14} が入っているかを決定するために, α -ケトグルタル酸の分離を行い, Krebs の行った方法^①に従って, 過マンガン酸カリによる degradation を行った。この反応は次式の如く 1 モルの α -ケトグルタル酸から 1 モルの CO_2 と 1 モルのコハク酸を生ずる反応である。

第 2 表 放射性炭酸水素ナトリウム存在下におけるグルコースからの α -ケトグルタル酸の生成

	$\mu\text{M BaCO}_3$	specific activity c. p. m./ μMC	total activity c. p. m.
NaHCO_3 (反応前)*	20.3	11,870.0	241,000
NaHCO_3 (反応後)**	78.5	3,020.0	237,000
α -ケトグルタル酸	10.1	575.2	5,810
その他の C-化合物	40.5	6.0	243
菌体	121.5	6.5	790

グルコース添加量 (μM)	グルコース消費量 (μM)	α -ケトグルタル酸 生成量 (μM)
20	12.2	2.7(22.0%)

* 反応前に NaHCO_3 として添加した量

** 反応後に回収された量

反応液の組成: グルコース 20 μM , 菌体 5 mg (乾燥量), 炭酸水素ナトリウム 20 μM , M/15 燐酸緩衝液 (pH=6.0) 1.0 ml (以上主室), 20% 苛性カリ溶液 0.2 ml (副室), 3N 硫酸 0.2 ml (側室), 全量 3.0 ml.第 3 表 放射性 α -ケトグルタル酸の degradation

	(μM)	specific activity c. p. m./ μM	total activity c. p. m.
α -ケトグルタル酸	40	38.5	1540
コハク酸	31	5.2	161
CO_2	34	26.8	911

第 4 表 α -ケトグルタル酸生成におけるビルビン酸と酢酸の縮合反応に対する検討

基 質	ビルビン酸 消費量 (μM)	α -ケトグルタル酸 生成量 (μM)	収率 (%)
ビルビン酸 酢酸 (μM) (μM)			
4,000 —	3,877	156	4.0
4,000 2,000	3,707	148	4.0
2,000 2,000	1,997	37	1.9
2,000 —	1,997	38	1.9
— 4,000	—	0.8	<0.1
— 4,000	—	0.8	<0.1

反応液の組成: ビルビン酸ソーダ, 酢酸ソーダ (それぞれ記載量), 硫酸マグネシウム 0.1 mM, 菌体 150 mg (乾燥量), 燐酸緩衝液 (pH=6.2) 5 mM, 全量 40 ml.

の縮合反応の存在を想定しているが, その根拠の 1 つとして, ビルビン酸を基質とした場合に酢酸を添加すると, α -ケトグルタル酸の生成量が増加される事実を挙げている. 著者等は *K. citrophila* に於てもこの酢酸添加の影響があるか否かを検討するために次の実験を行った. 500 ml 容の振盪フラスコを使用して, ビルビン酸を基質とし酢酸を添加したものとししないものに, それぞれ本菌の洗滌菌体を加え 30° で 7 時間振盪機 (r. p. m. = 115) の上で好氣的に作用せしめ, α -ケトグルタル酸の生成量を比較した. 第 4 表に示された如く, 本菌に於てはビルビン酸を基質とした場合, 酢酸を添加しても α -ケトグルタル酸の生成量に影響を与えないことが分った. 従って本菌に於てはビルビン酸と酢酸の縮合反応の存在を積極的に考えることはできない.

考 察

K. citrophila α によるグルコースから α -ケトグルタル酸の生成過程に, ビルビン酸が中間体として存在していると考えられることは, 前報に於て報告した. グルコースからビルビン酸に到る経路については暫くおき, ビルビン酸より α -ケトグルタル酸に到る経路について見ると, ビルビン酸が CO_2 の存在下で oxalacetic decarboxylase の作用によって CO_2 が固定される, 所謂 Wood-Werkman 反応が考えられる. 放射性同位元素 C^{14} を利用した本報の実験結果が示す如く α -ケトグルタル酸生成に CO_2 固定があることは明瞭であり, この Wood-Werkman 反応が起っていると推定される. 而して前報に報告した本菌による糖の末端代謝系に TCA cycle の存在が略々確実であるので, ビルビン酸→オキザロ酢酸→クエン酸→シスアコニット酸→イソクエン酸→オキザロコハク酸→ α -ケトグルタル酸なる経路を通して, α -ケトグルタル酸が生成され则认为することは妥当であろう. Ogston の説⁽¹¹⁾が支持されるならば Moses⁽¹²⁾ の言うように CO_2 を固定して生成された α -ケトグルタル

まず 2. に於いて述べた方法と全く同じ方法に従って, グルコースに本菌の洗滌菌体を作用させ, 放射性炭酸水素ナトリウムの存在下で α -ケトグルタル酸の生成を行った. 反応終了後, 反応液を遠心分離して菌体を除いた後, 硫酸酸性とし, carrier の α -ケトグルタル酸を加えて 24 時間エーテル抽出を行い, エーテル可溶部から放射性 α -ケトグルタル酸を得た. これを前記方法に従って degradation をを行い, 生じたコハク酸及び CO_2 の放射能を測定した. コハク酸及び α -ケトグルタル酸は wet oxidation を行つてその放射能を測定した. 第 3 表に示す如く decarboxylation によって放出された CO_2 の比放射能はコハク酸の比放射能にくらべて圧倒的に大きかった. 即ち C^{14}O_2 は大部分生成した α -ケトグルタル酸の α -カルボキシル基に固定されていることが分った.

4. α -ケトグルタル酸生成に於けるビルビン酸と酢酸の縮合反応に対する検討

片桐等⁽¹⁰⁾は大腸菌群細菌による α -ケトグルタル酸の生成機構にビルビン酸と酢酸

ル酸の放射能は大部分 α -カルボキシル基に見出さなければならない。著者等の実験によれば C^{14} でラベルされた α -ケトグルタル酸を分解して見ると、放射能の大部分は α -カルボキシル基にあることから、この推定経路をより確実ならしめるものとする。しかもその specific activity は最初反応系に存在する CO_2 の specific activity の約 25% に相当し、この場合グルコースの代謝によって発生する CO_2 を考慮すれば、この経路が α -ケトグルタル酸生成の main route であるという推定も強く支持されなければならない。猶、該酸蓄積の理由であるが、恐らく α -ケトグルタル酸 $\rightarrow$ コハク酸の oxidative decarboxylation の反応速度が低いためであろう。一度生成された α -ケトグルタル酸も長時間菌体を作作用させると、分解して行くことは前報に報告した通りである。以上、ピルビン酸を通り且つ TCA cycle の経路をたどって、 α -ケトグルタル酸が生成される経路を支持する実験結果を得たが、ピルビン酸より TCA cycle の経路を通らず、 α -ケトグルタル酸を生成する過程については片桐等⁽¹⁰⁾が大腸菌群細菌を用いて実験を行い、ピルビン酸と酢酸 (Acetyl-CoA) の縮合反応を提案している。本菌に於てもこの事実があるか否かを検討したが、それを積極的に支持する結果は得られていない。

猶、Walker⁽¹³⁾ が 1947 年提出した生成機構の仮説は中間体にピルビン酸を想定せず、又 Weinberg 及び Doudoroff⁽¹⁴⁾ は *Pseudomonas saccharophila* を用いた実験で、アラビノースよりピルビン酸を中間体としないで α -ケトグルタル酸が生成され则认为られる実験結果を得ているが、著者等はその経路の存在が本菌に於ても並存するか否かを別に実験を行って検討した。アラビノースを基質として本菌を作作用させると α -ケトグルタル酸の生成は確かに見られるが、同時にピルビン酸の生成も観察されるので、ピルビン酸を通らずに α -ケトグルタル酸が生成される事は疑わしい。

要 約

前報に引き続き α -ケトグルタル酸生産菌 *Kluyvera citrophila* の該酸生成機構を追究し、次の結果を得た。

(1) 本菌の洗滌菌体を放射性炭酸水素ナトリウム ($NaH^{14}CO_3$) の存在下に於て、グルコース或はピルビン酸に作用させると生成した α -ケトグルタル酸に強い放射能があることをオートラジオグラフィにより確認した。従って本菌によるグルコース或はピルビン酸からの α -ケトグルタル酸の生成過程に炭酸固定反応が存在することは確実と思われる。

(2) グルコースを基質とし放射性炭酸水素ナトリウムの存在下に於て、本菌の洗滌菌体を作作用せしめて得た放射性 α -ケトグルタル酸の degradation を行い、その放射能の大部分が α -カルボキシル基に存在することを認めた。以上前報で推定したグルコースより α -ケトグルタル酸生成の経路、グルコース $\rightarrow$ ピルビン酸 $\rightarrow$ TCA cycle $\rightarrow$ α -ケトグルタル酸をより確実ならしめる結果を得た。

(3) ピルビン酸を基質とした場合、本菌の洗滌菌体による α -ケトグルタル酸生成量の酢酸添加による増加促進は見られなかった。即ち本菌に於ては α -ケトグルタル酸生成に於けるピルビン酸と酢酸 (Acetyl-CoA) の縮合反応を積極的に支持する結果は得られなかった。

本研究を行うに当り、有益な助言を得た当研究室の相田 浩助教授に感謝する。尚本研究は昭和 33 年 5 月 5 日、日本農芸化学会大会に於て発表した。

- (1) 朝井勇宣, 清水克己, 室岡治義 : 本誌, 33, 266(1959).
- (2) H. Katagiri, T. Tochikura : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 22, 143 (1958).
- (3) D. Cavallini, N. Frontali, G. Toschi : *Nature*, 163, 568 (1949).
- (4) T. E. Friedemann, G. E. Haugen : *J. Biol. Chem.*, 147, 415 (1943).
- (5) T. Shimizu : *J. Biochem.*, 37, 421(1950).
- (6) P. A. Schaffer, M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, 100, 695 (1933).
- (7) M. Calvin, C. Heiderberger, J. C. Reid, B. M. Tolbert, P. F. Yankwich : *Isotopic*

- Carbon, p. 93 (1949).
- (8) S. Aronoff : *Techniques of Radiobiology*, p. 143 (1956).
- (9) H. A. Krebs : *Biochem. J.*, 32, 108(1938).
- (10) H. Katagiri, T. Tochikura : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 22, 143 (1958).
- (11) A. G. Ogston : *Nature*, 162, 963 (1948).
- (12) V. Moses : *J. Gen. Microbiol.*, 16, 534 (1957).
- (13) T. K. Walker : *Advances in Enzymology*, Vol. 9, 575 (1949).
- (14) R. Weinberg, M. Doudoroff : *J. Biol. Chem.*, 217, 607 (1955).