シロネズミのピルビン酸代謝に及ぼすビタミンB₁₂の影響について*

林 淳 三 (共立女子大学短期大学部)

昭和 34 年 7 月 16 日受理

緒 言

著者等は先にビタミン B₁₂ (以下 B₁₂ と略す) の欠乏したシロネズミは B₁₂ 給与シロネズミに比べピルビン酸脱炭酸能の低いこと⁽¹⁾, さらにこの欠乏組織に B₁₂ を添加しても脱炭酸能回復に役立たないことを指摘し⁽²⁾報告した。それはこの時に関与するピルビン酸酸化酵素系の複合酵素の作用に B₁₂ が影響していることと考えられる。しかし B₁₂ がこれら酸化酵素系の補酵素生成に影響を及ぼしているためか, 又はこれらのアポ酵素生成に関与しているかなどは尚充分な補酵素について検討しないと推論できない。

Gunsalus 等⁽³⁾によるとピルビン酸酸化酵素系の最初の段階と考えられるピルビン酸酸化酵素の補酵素はコエンチーム I (DPN), コエンチーム A (CoA), リボイン酸 (LiA), コカルボキシラーゼ (DPT) が関係することを述べている。又 B₁₂ 欠乏動物に於いて補酵素の含量に影響する文献はこれらの四つの補酵素の場合が最も多く, 著者等^(4,5)も既にこのことを認め報告した。

そこで本実験では B₁₂ 欠乏シロネズミをつくり, その肝臓ホモジネートに補酵素類を添加して先の報告⁽¹⁾を追試するとともに, ピルビン酸酸化酵素の補酵素とグルタチオンの影響を知るためワールブルグ検圧計によってピルビン酸酸化及び脱炭酸能を測定検討した。

実 験 の 部

実 験 I

1. 実験動物及び飼育法 実験に使用した動物は体重 25~32 g のシロネズミの雄 30 匹である。これを二群に分け, カゼイン中に含まれている B₁₂ をアルコールで抽出除去した精製カゼインを蛋白源とする基礎飼料で飼育した。基礎飼料の組成は第 1 表に示されている。このうち一群には B₁₂ を毎日一匹当たり 0.2γ 経口投与し B₁₂ 給与区とした。尚シロネズミは一匹宛金アミゴで飼育し, 飼育室の温度は 20±3° になるように調節した。シロネズミの生育状態は 5 日毎に体重を測定し, 又 7 日毎に赤血球数及び赤血球径を測定して B₁₂ 欠乏状態を知る資料にした。

第 1 表 シロネズミ基礎飼料の組成

馬 鈴 薯 澱 粉	55.7 g
精 製 カ ゼ イ ン	15.0
大豆油+肝油 (重量比 10:1)	7.0
マッカラム塩 (No. 185)	4.0
コ リ ン	0.2
シ ス チ ン	0.1
ビ タ ミ ン 混 合	1.0

ビタミン混合は B₁ 5mg, B₂ 10mg, ナイアシン 20mg, パントテン酸カルシウム 25mg, イノシトール 200mg, パラアミノ安息香酸 2.5mg, ビオチン 0.1mg に亜鉛を添加して 100g としたもの。

第 1 図 シロネズミの育成表

— B₁₂ を与えた区 B₁₂ を与えない区

このようにして飼育したシロネズミの成育に伴う生体重の増加状態は第 1 図のようである。即ち飼育開始後次第に増加しているが, B₁₂ を与えない区と B₁₂ を与えた区では漸次体重差がつき 60 日目に於いて B₁₂ を与えない区が約 20 g 低かった。この時の赤血球数及び赤血球径は第 2 表の如くで, 赤血球径については大差を認められなかったが赤血球数は B₁₂ を与えない区が少かった。このシロネズミは頸動脈切断法により屠殺し, 採血した。血液及び肝臓中の B₁₂ 含有量を L. leichmannii 法⁽⁶⁾によって測定した結果は B₁₂ を与えない区が低く (第 2 表), これらのシロネズミは明らかに B₁₂ の欠乏的な症状を示しているものと考えられる。

2. ピルビン酸酸化の測定 シロネズミの屠殺後直ちに肝臓を採り出し氷冷しホモジネートとした後, ワールブルグ検圧計によってピルビン酸酸化力を測定した。肝臓に媒質として KCl 等張液を添加してホモゲナイザーによって均一懸濁したのみの液, 即ち無洗滌ホモジネートは第 2 図のように非常に自己呼吸が高い。

* Effect of Vitamin B₁₂ on the Metabolism of Pyruvate in the Rats.

By Junzo HAYASHI (Kyoritsu Women's University Junior College, Tokyo)

第 2 表 実験 I シロネズミの飼育 60 日目に於ける B₁₂ 欠乏状態

生 体 重 (g)		B ₁₂ を与えた区		B ₁₂ を与えない区	
		平 均	標準偏差	平 均	標準偏差
赤 血 球 数 ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	最大値~最小値	165	± 13.0	144	± 12.0
	標準偏差	188~144		158~123	
赤 血 球 径 (μ)	最大値~最小値	939	± 76	821	± 68
	標準偏差	1167~878		868~631	
血液 B ₁₂ 含量 (mg/ml)	最大値~最小値	8.0	± 0.25	8.1	± 0.12
	標準偏差	8.3~7.4		8.3~7.9	
肝臓 B ₁₂ 含量 ($\gamma\%$)	最大値~最小値	1.10	± 0.12	0.96	± 0.16
	標準偏差	1.31~0.89		1.04~0.79	
肝臓 B ₁₂ 含量 ($\gamma\%$)	最大値~最小値	11.00	± 1.82	6.25	± 1.42
	標準偏差	17.6~8.6		8.42~4.31	

B₁₂ 含量は L. leichmannii 法による測定値

ので, Wright 等⁽⁷⁾の方法に従い第 3 表の如く肝臓を 0.25 M 蔗糖液及び 0.04 M MgCl₂ 液で洗滌したホモジネートを調製して使用した. これらの処理中は出来る限り低温に保つべく留意した. 洗滌ホモジネートの一部でケールダール法により窒素量を求めた結果, 2.8~4.1 mg/ml を示した. ワールブルグ測定に使用した容器内反応液組成は, Wright 等⁽⁷⁾の方法を改良した第 4 表のようなものであり, 又測定は 37.5° の空気相で行った. この洗滌ホモジネートを使用すると基質の酸化と自己呼吸の差が大きく良結果が得られるので, 以下の実験には主としてこれを使用した.

a. B₁₂, グルタチオン添加によるビルビン酸酸化の影響: B₁₂ を与えた区 (B₁₂ 給与区) 及び B₁₂ を与えない区 (B₁₂ 欠乏区) のシロネズミの肝臓洗滌ホモジネートに第 4 表の反応液のうち B₁₂, グルタチオン, LiA 及び CoA を除いた組成, 即ち何れの場合も全容量 2.6 ml のうち洗滌ホモジネート, サイトクローム C, ナイアシンアミド, ATP, DPN, DPT, 磷酸緩衝液, ビルビン酸ソーダ及び 0.6 ml の水を加えた液, 又これに LiA を加え水の添加量を 0.5 ml とした液, 更に LiA と CoA を加えて水を 0.4 ml とした液の三つの場合にそれぞれ B₁₂ とグルタチオンを添加して添加相当容量の水を減じた組成により酸素吸収量を測定した. その結果は第 5 表に示される如く Q_{O₂(N)} 値であらわしその影響を比較検討した. B₁₂ とグルタチオンを添加しない場合は LiA 及び CoA の存在如何にかかわらず B₁₂ 欠乏区が低い値を示した. 洗滌ホモジネートに B₁₂ 0.1 γ の添加は飼育時の B₁₂ 給与, 無給与に関係なく酸化促進に役立たなかった. 又 B₁₂ の代りに 0.01 M グルタチオン 0.1 ml の添加も同様であった. しかし B₁₂ とグルタチオンを同時添加すると約 39~57% の促進が行われるが, B₁₂ 欠乏区の洗滌ホモジネートとともに B₁₂ 給与区の洗滌ホモジネートもほぼ同率で増加するので, その差を

第 2 図 肝臓洗滌ホモジネート及び無洗滌ホモジネートの自己呼吸及びビルビン酸の酸化

—△— 無洗滌ホモジネート —○— 洗滌ホモジネート
 ...△... 同 自己呼吸 ...○... 同 自己呼吸
 反応組成: 第 4 表の反応組成によった. 但しホモジネートは肝臓洗滌ホモジネート又は無洗滌ホモジネートを使用した.
 反応条件: 気相 空気, 温度 37.5°, 反応時間 60 分.

第 3 表 肝臓洗滌ホモジネートの調製法

肝 臓
↓ 9 倍量の冷 0.25 M 蔗糖等張液添加
ホモジネート
↓ 速心分離, 600×g, 10 分
上澄液
↓ MgCl ₂ を添加し, 0.04 M MgCl ₂ 液を調製
↓ 速心分離 2200×g, 10 分
沈 澱
↓ 冷 0.04 M MgCl ₂ 液添加, 攪拌,
↓ 速心分離 2200×g, 5 分
沈 澱
↓ 冷 0.04 M MgCl ₂ 液添加, 攪拌,
↓ 速心分離 2200×g, 5 分
沈 澱
↓ 冷 0.04 M MgCl ₂ 液添加
洗滌ホモジネート

第 4 表 ワールブルグ容器中の反応液組成

肝臓洗滌ホモジネート	1.0ml
0.001 M サイトクローム C	0.1
0.1 M ナイアシンアミド	0.1
0.01 M アデノシントリフォスヘイト (ATP)	0.1
0.05 M コエンチウム I (DPN)	0.1
0.01 M コカルボキシラーゼ (DPT)	0.1
0.01 M リボイン酸 (LiA)	0.1
0.005 M コエンチウム A (CoA)	0.1
1 γ /ml B ₁₂	0.1
0.01 M グルタチオン	0.1
0.1 M ビルビン酸ソーダ	0.2
M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.3)	0.3
水	0.2
全 容 量	2.6

第 5 表 肝臓洗滌ホモジネートのビルビン酸酸化に及ぼす B₁₂ 及びグルタチオンの影響

実験 番号	添 加 補 酵 素	B ₁₂ 給与区		B ₁₂ 欠乏区		B ₁₂ 欠乏 B ₁₂ 給与
		QO ₂ (N)	%*	QO ₂ (N)	%*	
1	サイトクローム C, ナイアシンアミド, ATP, DPN, DPT	23	100.0	14	100.0	60.8%
	" + B ₁₂	22	95.6	16	114.2	72.7
2	サイトクローム C, ナイアシンアミド, ATP, DPN, DPT, LiA	41	100.0	23	100.0	56.1
	" + B ₁₂	38	92.6	24	104.3	63.1
	" + グルタチオン	36	87.8	20	86.9	55.5
	" + B ₁₂ , グルタチオン	57	139.0	36	156.9	62.1
3	サイトクローム C, ナイアシンアミド, ATP, DPN, DPT, LiA, CoA	34	100.0	16	100.0	44.1
	" + B ₁₂	41	120.5	14	87.5	34.1
	" + B ₁₂ , グルタチオン	51	147.0	22	137.8	43.1

反応組成: 肝臓洗滌ホモジネート 1.0 ml, 0.1 M ビルビン酸ソーダ 0.2 ml, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.3) 0.3 ml, 補酵素類各 0.1 ml, 水を加えて全容量 2.6 ml としたもの。

反応条件: 気相 空気, 温度 37.5°, 反応時間 30 分。

* 同一実験番号に於いて B₁₂ 又はグルタチオンを添加しない時を 100% としたもの。

第 6 表 シロネズミ肝臓洗滌ホモジネートのビルビン酸酸化に於ける補酵素の影響

実験 番号	添 加 補 酵 素	B ₁₂ 給与区	B ₁₂ 欠乏区	B ₁₂ 欠乏 B ₁₂ 給与	縮めることは出来な かった。このように 促進が行われるので 以下の実験にはこれ らグルタチオン及び B ₁₂ を添加すること とした。
		QO ₂ (N)	QO ₂ (N)	%	
1	ナ シ*	11	4	36.3	b. DPT, LiA, DPN 及び CoA の影 響: 反応液組成の うちビルビン酸酸化 酵素の補酵素として 知られている DPT, LiA, CoA 及び DPN が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		19	10	52.6	
2	サイトクローム C, ナイアシンアミド, ATP, B ₁₂ , グルタチオン	20	12	60.0	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		16	7	43.7	
3	" + DPT	27	14	51.8	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		26	27	103.8	
4	" + LiA	18	5	27.8	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		23	10	43.4	
5	" + DPN	37	27	72.9	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		19	14	73.9	
6	" + CoA	28	24	85.7	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		15	10	66.6	
7	" + DPT, DPN	47	30	63.7	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		32	17	53.1	
8	" + DPN, DPT, CoA	44	25	56.8	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		41	25	56.8	
9	" + CoA, DPT, LiA	41	25	56.8	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		41	25	56.8	
10	" + DPN, DPT, LiA	81	68	83.9	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		38	24	60.5	
11	" + DPN, CoA, LiA	37	20	54.1	が, B ₁₂ 欠乏区シロ ネズミ肝臓洗滌ホモ ジネートの酸化能の 低下にどのような影
		54	42	77.8	
12	" + DPN, CoA, LiA, DPT	57	27	47.3	

反応条件: 気相 空気, 温度 37.5°, 反応時間 30 分。

反応組成: 肝臓洗滌ホモジネート 1.0 ml, 0.1 M ビルビン酸ソーダ 0.2 ml, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.3) 0.3 ml, 水 1.1 ml, 全容量 2.6 ml。

響を及ぼしているかを知るため実験を行った。即ち第 6 表の如く洗滌ホモジネートにこれらの補酵素を単独に或は組みあわせて加えビルビン酸酸化能を測定し, B₁₂ 給与区と欠乏区に於ける QO₂(N) を比較検討した。尚各実験番号は B₁₂ 給与区と B₁₂ 欠乏区のシロネズミを同時に屠殺し, 洗滌処理操作も並行的に行ったものである。従って各実験番号毎に動物及び処理後の時間経過が異なるため酵素の活性に高低があり, 多数の補酵素を添加しても値が低いのがあるのはそのためである。これらの結果 DPT 添加の一例を除き, B₁₂ 給与区に比べ B₁₂ 欠乏区の QO₂(N) 値が常に低く, 補酵素存否に関係が少いことを知った。

3. ビルビン酸を基質としたときの炭酸ガス生成量の測定 B₁₂ 給与シロネズミと B₁₂ 欠乏シロネズミの肝臓洗滌ホモジネートはビルビン酸酸化能に差のあることを知ったが, これが完全酸化されて炭酸ガス生成までの過程にはどのような影響があるかを知る意味で, 肝臓及び大腿筋の無洗滌ホモジネートを用い脱炭酸能も測定した。前報⁽¹⁾で肝臓及び大腿筋の無洗滌ホモジネートのビルビン酸脱炭酸能が B₁₂ 無給与シロネズミに於いて低いことを報告したが, これと同様な反応液組成, 即ち 25% KCl 等張液添加による肝臓又は大腿筋無洗滌ホモジネート 0.5 ml を入れた容器に, 基質として 0.0167 M ビルビン酸ソーダ, 補酵素として 9×10⁻⁶ M サイトクローム C, 2×10⁻³ M ATP, 2.5×10⁻⁴ M DPN, 0.01 M ナイアシンアミド, 3×10⁻⁴ M DPT, 0.01 M MgCl₂, そ

れに 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.3) を含む反応液に B₁₂ を添加してその影響を見た。尚, 測定は Q_{CO₂} であらわした。その結果は第 7 表の如く B₁₂ 欠乏ホモジネートに B₁₂ 0.1 γ, 0.01 γ 添加は無効であった。

肝臓洗滌ホモジネートによる測定: ビルビン酸の酸化能は B₁₂ とグルタチオンの同時添加によって活性化されたが, 脱炭酸能についても同様な実験を行った。又, 補酵素群中 DPN, CoA, LiA, DPT の存否による脱炭酸能も併せ測定した。反応液その他は酸化能測定と同じでその値は Q_{CO₂(N)} で表わした。結果は第 8 表の如くであるが, これらの実験は実験番号ごとに行なったため同一実験番号で比較検討した。ビルビン酸脱炭酸能も B₁₂ とグルタチオン同時添加で約 40~55% 高められるが,

しかし実験番号 7 以下で明かなように B₁₂ 給与と欠乏の差を縮めていない。又補酵素群の欠除は欠除しない場合 (実験番号 11) の比率に比べ, B₁₂ 給与と欠乏の割合に影響を及ぼさないようである。

実験 II

1. 実験動物
及び飼育法
シロネズミの雄
20 匹 (体重 20
~32 g) を前の

第 7 表 シロネズミ肝臓及び大腿筋の無洗滌ホモジネートの Pyruvate 酸化に於ける B₁₂ 添加の影響

肝臓 (25% ホモジネート)			B ₁₂ 欠乏区			
B ₁₂ 給与区						
ネズミ No.	B ₁₂ 無添加 反応液	ネズミ No.	B ₁₂ 無添加 反応液	B ₁₂ 0.01 γ 添加反応液	B ₁₂ 0.1 γ 添加反応液	
	Q _{CO₂} *		Q _{CO₂} *	Q _{CO₂} *	Q _{CO₂} *	
1	2.76	11	1.49	1.31	1.36	
2	1.96	12	0.83	0.90	1.05	
3	2.10	13	1.75	1.65	1.46	
4	2.96	14	1.85	1.95	1.25	
5	2.53	15	1.72	0.97	1.31	
平均	2.48	平均	1.53	1.35	1.29	

大腿筋 (25% ホモジネート)						
ネズミ No.	B ₁₂ 無添加 反応液	ネズミ No.	B ₁₂ 無添加 反応液	B ₁₂ 0.01 γ 添加反応液	B ₁₂ 0.1 γ 添加反応液	
	Q _{CO₂} *		Q _{CO₂} *	Q _{CO₂} *	Q _{CO₂} *	
1	3.73	11	3.00	—	2.95	
2	2.96	12	2.16	—	2.16	
3	3.60	13	2.67	—	2.59	
5	2.83	15	1.94	—	1.95	
平均	3.28	平均	2.44	—	2.41	

反応組成: 肝臓無洗滌ホモジネート又は大腿筋無洗滌ホモジネート 0.5 ml, 0.0167 M ビルビン酸ソーダ, 9×10⁻⁶ M サイトクローム C, 2×10⁻³ M ATP, 2.5×10⁻⁴ M DPN, 0.01 M ナイアシンアミド, 3×10⁻⁴ M DPT, 0.01 M MgCl₂ 及び 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.3) を含む全容量 2.0 ml.

反応条件: 気相 空気, 温度 37.5°, 反応時間 30 分.

* mg wet tissue

第 8 表 シロネズミ肝臓洗滌ホモジネートのビルビン酸脱炭酸に及ぼす補酵素の影響

実験 No.	添 加 補 酵 素	B ₁₂ 給与区		B ₁₂ 欠乏区		B ₁₂ 欠乏 給与%
		Q _{CO₂(N)}	%	Q _{CO₂(N)}	%	
1	サイトクローム C, ナイアシンアミド, ATP, DPN, DPT, LiA	24	100	—	—	
	" + B ₁₂	23	96	—	—	
2	" + B ₁₂	—	—	30	100	
	" + B ₁₂	—	—	27	90	
3	" + グルタチオン	42	100	—	—	
	" + グルタチオン	44	104	—	—	
4	" + グルタチオン	—	—	11	100	
	" + グルタチオン	—	—	15	136	
5	" + B ₁₂ , グルタチオン	31	100	—	—	
	" + B ₁₂ , グルタチオン	48	155	—	—	
6	" + B ₁₂ , グルタチオン	—	—	20	100	
	" + B ₁₂ , グルタチオン	—	—	28	140	
7	サイトクローム C, ナイアシンアミド, ATP, B ₁₂ , グルタチオン	67	—	48	—	72
	DPN, DPT, LiA	27	—	15	—	52
8	" + DPN, DPT, CoA	32	—	16	—	50
9	" + DPN, CoA, LiA	23	—	15	—	65
10	" + CoA, LiA, DPT	26	—	16	—	62
11	" + CoA, LiA, DPT, DPN	29	—	19	—	65

反応組成: 肝臓洗滌ホモジネート 1.0 ml, 0.1 M ビルビン酸ソーダ 0.2 ml, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.3) 0.3 ml, 補酵素類 (濃度第 4 表に示す) 各 0.1 ml, 水を加えて全容量 2.6 としたもの。

反応条件: 気相 空気, 温度 37.5°, 時間 30 分。

実験と同じ基礎飼料及び条件で飼育した。尚, このうち 10 匹には 1 週間毎に B₁₂ 1 γ 宛皮下注射を行った。60 日目に於ける生体重, 赤血球数, 赤血球径, 肝臓及び血液中の B₁₂ 量の各平均値は第 9 表の如くである。これから B₁₂ を注射しない区のシロネズミは注射したシロネズミに比べ, ほぼ欠乏の症状を示すものと考え以下の実験に使用した。

2. ビルビン酸の酸化力測定

a. フマル酸ナトリウム及び flavin adenine dinucleotid (FAD) 追加の影響: 実験 I で使用した補酵素群には酸化還元酵素系に関係のある FAD が含まれていないため, 以後の実験には追加した。又今までの実験で

第 9 表 実験Ⅱシロネズミの飼育60日目に於ける B₁₂ 欠乏状態

		B ₁₂ を注射した区		B ₁₂ を注射しない区	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差
生 体 重 (g)	標準	185	±16.8	158	±19.3
	最大値~最小値	215~171		190~141	
赤 血 球 数 (×10 ⁴ /mm ³)	標準	815	±77.4	728	±87.5
	最大値~最小値	925~715		819~609	
赤 血 球 径 (μ)	標準	8.6	±0.21	8.7	±0.17
	最大値~最小値	9.0~8.3		9.0~8.6	
血液 B ₁₂ 含量 (mg/ml)	標準	1.42	±0.36	1.00	±0.22
	最大値~最小値	2.04~0.97		12.0~0.65	
肝臓 B ₁₂ 含量 (%)	標準	12.00	±3.13	7.45	±1.39
	最大値~最小値	19.60~8.56		9.32~5.00	

B₁₂ 含量は Ochromonas 法による測定値

は TCA サイクル中の微量が含まれていなかったでフマル酸も加えた。即ち、第4表の反応組成中の水の代りに 0.02 M フマル酸ナトリウム 0.1 ml と 0.001 M FAD 0.1 ml を加え全容量は 2.6 ml とした。第3図は B₁₂ 注射シロネズミの肝臓洗滌ホモジネートを使用して、フマル酸ナトリウム添加の影響を調べた結果である。これからフマル酸ナトリウム添加効果は約2倍の酵素吸収を示す結果を得た。

b. 補酵素 (DPT, CoA, LiA, DPN) の影響: 前の実験に於いて DPT, CoA, LiA, DPN の添加及びそれらを欠除させた場合、B₁₂ 欠乏ホモジネートが B₁₂ 給与より低い酸化能を有する結果を得たが、各実験番号毎にシロネズミの酵素材料が異なるため、これら四つの補酵素の何れがどのくらい影響しているかを知ることが出来なかった。そこで B₁₂ 注射と欠乏に差を有することを確認した肝臓洗滌ホモジネートによって、それぞれ同一洗滌ホモジネートに DPN, CoA, LiA, DPT を添加又は欠除させて補酵素の影響を実験した。第10表の実験番号1は B₁₂ 注射及び欠乏シロネズミの肝臓洗滌ホモジネートの酸化能に差を有する酵素材料に DPN, CoA, LiA, DPT を添加した時を100%として各補酵素を一個ずつ添加した場合の影響を見たものであり、又実験番号2は同じようにして四つの補酵素のうち一個ずつ欠除させて影響を調べたものである。補酵素の添加を一個ずつしか添加しないと酸化力が低下するが、B₁₂ 欠乏と B₁₂ 注射区のどちらも同じ低下状態を示した。唯 DPT の添加は B₁₂ 注射区が 74.2 %であるに対し B₁₂ 欠乏区

第3図 シロネズミ肝臓洗滌ホモジネートのビルビン酸酸化に於けるフマル酸添加の影響

—×— ビルビン酸ソーダ+フマル酸ソーダ
—□— ビルビン酸ソーダ —△— フマル酸ソーダ
—○— 自己呼吸

反応組成: 肝臓洗滌ホモジネート 1.0 ml, 補酵素類 (第4表のものに 0.001 M FAD 0.1 ml を追加) 各 0.1 ml, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.3) 0.3 ml, これらに 0.1 M ビルビン酸ソーダ 0.2 ml, フマル酸ソーダ 0.1 ml 又は水を加えて全容量を 2.6 ml とする。

反応条件: 気相 空気, 温度 37.5°, 時間 60 分。

第10表 シロネズミ肝臓洗滌ホモジネートのビルビン酸酸化に於ける補酵素の影響

実験 No.	添加補酵素	B ₁₂ 注射区		B ₁₂ 欠乏区		B ₁₂ 欠乏区 B ₁₂ 注射区 %
		Q _{O₂} (N)	%	Q _{O₂} (N)	%	
1	DPN, CoA, DPT, LiA	64.1		52.7		82.2
	DPN, CoA, DPT, LiA	55.0	100.0	48.3	100.0	
	DPN	45.4	82.5	38.1	81.0	
	CoA	43.8	79.6	34.2	70.8	
	DPT	40.8	74.2	42.7	88.4	
	LiA	36.4	66.2	30.6	63.4	
2	ナ	40.0	72.7	29.5	61.1	64.0
	DPN, CoA, DPT, LiA	62.5		40.0		
	DPN, CoA, DPT, LiA	60.2	100.0	32.0	100.0	
	DPN, CoA, DPT	58.9	97.8	33.7	105.0	
	CoA, DPT, LiA	56.0	93.0	27.5	85.6	
	DPT, LiA, DPN	55.5	92.2	30.6	95.6	
	LiA, DPN, CoA	53.6	89.6	26.8	83.8	
	ナ	43.7	72.6	20.6	64.0	

反応組成: 肝臓洗滌ホモジネート 1.0 ml, 0.1 M ビルビン酸ソーダ 0.2 ml, 0.001 M サイトクローム C 0.1 ml, 0.01 M グルタチオン 0.1 ml, 0.1 M ナイアシンアミド 0.1 ml, 0.01 M ATP 0.1 ml, 0.001 M FAD 0.1 ml, 1 μ/ml B₁₂ 0.1 ml, 0.02 M フマル酸ソーダ 0.1 ml, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.3) 0.3 ml, DPN, CoA, DPT, LiA (濃度第4表) 又は水を加えて 2.6 ml (全容量)。

反応条件: 気相 空気, 温度 37.5°, 時間 30 分。

第 11 表 シロネズミ肝臓洗滌ホモジネートのビルビン酸脱炭酸能

実験 No.	B ₁₂ 注射区		B ₁₂ 欠乏区		B ₁₂ 欠乏 B ₁₂ 注射
	体重 (g)	QCO ₂ (N)	体重 (g)	QCO ₂ (N)	%
1	197	54.5	180	39.0	71.5
2	186	44.3	175	29.0	65.4
3	220	60.9	190	29.5	48.4
4	230	50.9	175	41.8	82.6
平均		52.6		34.6	65.7

反応組成: 肝臓洗滌ホモジネート 1.0ml, 0.1M ビルビン酸ソーダ 0.2ml, 0.001M サイトクローム C 0.1ml, 0.01M グルタチオン 0.1ml, 0.1M ナイアシンアミド 0.1ml, 0.01M ATP 0.1ml, 0.001M FAD 0.1ml, 1γ/ml B₁₂ 0.1ml, 0.02M フマル酸ソーダ 0.1ml, 0.05M DPN 0.1ml, 0.01M DPT 0.1ml, 0.01M LiA 0.1ml, 0.005M CoA 0.1ml, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.3) 0.3ml, 全容量 2.6ml.

反応条件: 気相 空気, 温度 37.5°, 時間 30 分.

は 88.4% であり, 同じ B₁₂ 欠乏のホモジネートの補酵素添加したものの中の最高率を示した. 又実験番号 2 の場合に於いても DPT の欠除したものは 83.8% であり他の補酵素欠除のうち最も低い値を示した.

3. ビルビン酸を基質としたときの炭酸生成の測定
シロネズミの屠殺後, 肝臓洗滌ホモジネート調製の経過時間と処理状態を均一にして反応液に FAD とフマル酸ナトリウムを追加した補酵素群によってビルビン酸の脱炭酸能を測定した. その結果は第 11 表の如く B₁₂ 注射シロネズミの QCO₂(N) 平均値が 52.6 であるのに対し, B₁₂ 欠乏区の場合は 34.6 の低い値であった.

考 察

実験に使用したシロネズミは B₁₂ 給与又は注射した区と B₁₂ を与えない区間の体重差が実験 I, II とも約 21 ~ 27 g であり, 比較的その差が少なかった. しかし血液及び肝臓中の B₁₂ 含量や赤血球数は明かに B₁₂ を与えない区が低く, 一応 B₁₂ 欠乏的な症状をあらわしているものと推定される.

肝臓洗滌ホモジネートのビルビン酸酸化は複合酵素によるものである. 従って B₁₂ 欠乏と B₁₂ 給与シロネズミの酸素吸収量を比較実験する場合には, 当然これらの複合酵素系の補酵素による影響をも考慮しなければならぬ. 著者等の先の報告⁽¹⁾では出来得る限り関与補酵素を添加したが, B₁₂ 欠乏区のシロネズミの脱炭酸能が低かった. 又補酵素として B₁₂ の添加が無効であることも報告した⁽²⁾. しかし尚, 複合酵素のうち LiA, CoA, FAD が不足していた. 本実験ではこれら 3 つの補酵素を追加して測定したが, 酸化能及び脱炭酸能とも B₁₂ 欠乏区が低く, その上反応液は B₁₂ の添加の効果もまた得られなかった. しかし著者等は先に B₁₂ 欠乏ヒナのパントテン酸結合型とナイアシン結合型の含量が低いことを報告した⁽⁵⁾. 又, 牛のエネルギー代謝時に B₁₂ とともに B₁ を投与すると疲労回復に有効なことも認めた. 従って B₁₂ 欠乏になると DPN, CoA, DPT の含量に影響があることを想像される. 殊にこれら DPN, CoA, DPT は LiA とともに Gunsalus 等⁽³⁾によってビルビン酸酸化脱炭酸を行う第一段階であるところのビルビン酸酸化酵素の補酵素である. しかしながら CoA, LiA, DPN, DPT の欠除及び添加についてのこれらの実験から, B₁₂ 欠乏シロネズミの酸化能及び脱炭酸能が低いのは DPT 以外の他の補酵素不足によるものとはいえないようである. 又 DPT もその影響は僅かであり, 酸化及び脱炭酸能低下の本質には影響していないように思われる.

グルタチオンと B₁₂ の同時添加が酸化及び脱炭酸能を高めていることは, Dubnoff 等⁽⁶⁾の *E. coli* 215 の菌体を使用した報告とよく一致した. しかしそれでも尚 B₁₂ 欠乏区の酸化及び脱炭酸能の低いことは, 前述した補酵素の本質的な影響を及ぼさぬことと, B₁₂ を反応液に添加しても無効であることなどとともに酵素材そのものの即ち, ビルビン酸酸化酵素系のアポ酵素生成に B₁₂ が関係しているかも知れないことを推察せしめられる.

要 約

ビタミン B₁₂ 給与区シロネズミとビタミン B₁₂ 欠乏区シロネズミの肝臓のホモジネートを蔗糖等張液及び 0.04 M 塩化マグネシウム液で洗滌したものにビルビン酸酸化酵素系の種々の補酵素を添加して, ビルビン酸酸化及び脱炭酸能をワールブルグ検圧計で測定した.

(1) B₁₂ 欠乏区ホモジネートの酸化及び脱炭酸能は B₁₂ 給与のものに比べ常に低かった.

(2) B₁₂ 欠乏区ホモジネートに補酵素群を添加し, 更に B₁₂ を添加しても効果がなかった. B₁₂ とともにグルタチオンを添加すると, より酸素吸収及び脱炭酸量が増加したが, しかし B₁₂ 給与区と B₁₂ 欠乏区の差を縮めることは出来なかった.

(3) 補酵素群のうち DPN, CoA, LiA 及び DPT の添加及び欠除実験から, DPT は僅か影響しているがこれも本質的なものではない.

(4) B₁₂ 欠乏による酸化及び脱炭酸能の低下は, ビルビン酸酸化酵素系のアポ酵素に影響しているように思われる.

終りに臨み本研究に終始御懇篤なる御指導を賜った東京農大佐橋佳一教授, 鈴木隆雄助教授, 三重大学岩本喜一教授に深甚なる感謝を申し上げますと共に, 種々御助力を頂いた東京農大佐橋研究室前川昭男氏, 大島竹一氏並びに研究室の皆様御礼申し上げます。更に貴重なコエンザイム A, リポイン酸を分譲して頂いた東京大学島蘭順雄教授, 慈恵医大牧野堅教授に御礼申し上げます。

本研究の一部は昭和 34 年農化大会で講演発表した。

(1) K. Iwamoto, J. Hayashi, Y. Sahashi: <i>J. Vitaminology</i> , 3, 279 (1957).	(5) Y. Sahashi, K. Iwamoto, J. Hayashi: <i>J. Vitaminology</i> , 1, 312 (1955).
(2) 岩本喜一, 林 淳三, 佐橋佳一: 農化大会講演発表 (昭和 31 年 4 月).	(6) 佐橋佳一, 鈴木隆雄, 林 淳三, 前川昭男: ビタミン, 16, 87 (1959).
(3) I. C. Gunsalus: Mechanism of Enzyme Action, First Ed., J. Hopkins, Baltimore, U. S. A., p. 545 (1954).	(7) R. C. Wright, E. M. Scott: <i>J. Biol. Chem.</i> , 206, 725 (1954).
(4) Y. Sahashi, K. Iwamoto, J. Hayashi: <i>J. Biochem.</i> , 40, 245 (1953).	(8) J. W. Dubnoff, E. Barton: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 61, 99 (1956).

細菌リゾチームの研究 (第1報)*

基質多糖類に対する作用及び特異性

岡田茂孝**, 福本寿一郎 (大阪市立大学理学部)

昭和 34 年 8 月 24 日 受理

B. subtilis に属する一細菌が分泌する細菌リゾチームの培養条件, 2, 3 の性質, 並びに精製結晶化については先に報告したが^(1,2), 細菌リゾチームが安定性や電氣的性質だけでなく, 生細胞に対する溶菌形式に於いて卵白リゾチームと異なる事実は, 基質多糖類の分解形式に於ける差異を示すものと考えられ, この点を明らかにする目的で, 両酵素に感受性を示す *Micrococcus lysodeikticus* から多糖類を抽出して, 抽出多糖類に対する溶菌酵素の作用を卵白リゾチームと比較検討した。

なお卵白リゾチームについて, 近年 Salton 等によって細胞膜多糖類に対する作用は或る程度究明され, 細胞膜多糖類から卵白リゾチームの作用によって分解形成される "small fragment" は構成糖としてグルコサミンと未知のアミノ糖からなっていることが報告されており⁽³⁾, 又 Berger, Weiser 等によっても卵白リゾチームが poly-N-acetylglucosamine を加水分解する polyglucosaminidase の作用のあることが報じられている⁽⁴⁾。

実験の部

I. 実験方法 供試酵素, 酵素力の測定は別報に準じた⁽¹⁾。細胞膜多糖類は *M. lysodeikticus* を 2% グルコース肉汁に 48 時間, 37° で表面培養した後, アセトン細胞とし 0.5 N NaOH 中で約 1 ヶ月放置分解後 Meyer の方法で精製した⁽⁵⁾。収量は約 10% であった。

還元力の測定は主として Somogyi の high alkalinity reagent⁽⁶⁾, hexosanine の測定には Elson-Morgan 法⁽⁷⁾及び一部 Dische の indol 法⁽⁸⁾を併用した。

酵素分解物の分割には charcoal-celite (1:1) 1.9×10 cm⁽⁹⁾ 及び蟻酸ソーダで緩衝化したアニオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 (100~200 mesh)⁽¹⁰⁾ 0.9×20 cm の column について行い, 溶出は charcoal-celite tube の際はピリジン溶液, IRA-400 樹脂柱については蟻酸溶液で行った。

構成糖の検出には 4 N 塩酸で 2 時間, 100° 加水分解を条件とし, ブタノール, 醋酸, 水 (4:1:1) を展開剤としてペーパークロマトグラフィーによって行い, スポットの検出同定には anilin hydrogenphthalate 及び ninhydrin を使用した。

II. 実験結果

1) 酵素作用: *M. lysodeikticus* から得た細胞膜多糖類に溶菌酵素を作用せしめた場合, 還元性物質の増加

* Studies on Bacterial Lysozyme. Part I. Mode of Actions to Cell Wall Polysaccharide.

By Sigetaka OKADA and Juichiro FUKUMOTO (Institute of Polytechnics, Osaka City University)

** 現在大阪市立工業研究所 (The Osaka Municipal Technical Research Institute)