[農化 第 44 卷, 第 6 号, p.283~286, 1970]

Thiamine 要求性 *Corynebacterium* 属細菌の グルコン酸代謝に関する研究 (第3報) ピルビン酸の蓄積 (2)

嶋村 睦夫, 吉武 寿一
(合同酒精株式会社中央研究所)

昭和 44 年 9 月 16 日 受 理

Gluconate Metabolism by a Thiamine-requiring Species of *Corynebacterium* Part III. Accumulation of Pyruvic Acid (2) [Note]

By Mutsuo SHIMAMURA and Juichi YOSHITAKE
Central Research Laboratory of Gōdō Shusei Co., Ltd., Matsudo

It was reported in the preceding paper that *Corynebacterium* sp. No. 208 required thiamine for growth and accumulated a large amount of pyruvate in the extracellular fluid when it was cultivated in the thiamine-deficient medium. The present investigation was undertaken to demonstrate the effect of thiamine on pyruvate accumulation with the suspensions of resting cells grown in the thiamine-deficient and thiamine-sufficient media. The thiamine-deficient cells which were able to produce pyruvate from gluconate showed poor utilizing-ability for pyruvate added to the suspension as a substrate, and the ability was increased by the addition of thiamine. Pyruvate was also oxidized at a decreased rate by the suspension of thiamine-deficient cells. Moreover, the thiamine-deficient cells demonstrated poor oxidative ability for acetate, lactate, malate, fumarate and α -ketoglutarate. Resting cells grown in the thiamine-deficient medium supplemented with iron utilized and oxidized pyruvate and other organic acids described above at a increased rate. The addition of arsenite gave a increase in the accumulation of pyruvate.

It is possible to conclude from the present results that the accumulation of pyruvate by the thiamine-deficient cells is a consequence of the low level of pyruvate dehydrogenase in the cells.
(Received September 16, 1969)

緒 言

前報⁽¹⁾において, thiamine 要求性の *Corynebacterium* sp. No. 208 を, グルコン酸を炭素源とする thiamine 制限培地で培養するとき, 培地中にピルビン酸が蓄積する現象について報告したが, 本菌によるピルビン酸蓄積には, 培地中の thiamine 濃度が重要な影響を及ぼし, 生育に sub optimum な thiamine 濃度がピルビン酸の蓄積に最適であることが認められた。

本報では, 本菌によるピルビン酸蓄積と thiamine との関係を生菌体懸濁液を使用して検討した結果について報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株 *Corynebacterium* sp. No. 208 を使用した。本菌は生育に thiamine を要求し, グルコン酸の資化能がグルコースなど他の炭素源に比べて著しく高い性質を有している⁽²⁾。

2. 生菌体懸濁液の調製 グルコン

酸カリウム 6.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, (pH 6.5) の組成の基本培地に, thiamine 制限量 (20 $\mu\text{g/l}$) および充分量 (100 $\mu\text{g/l}$) 添加し, 植菌後, 30°C において 48 時間振盪培養を行なった. 培養液を遠心分離して集菌し, 菌体を蒸留水で洗浄後, 燐酸塩緩衝液に懸濁したものを生菌体懸濁液として使用した. この場合, thiamine 20 $\mu\text{g/l}$ 培地はピルビン酸蓄積に適した培地であり, この培地に生育した菌を thiamine-deficient cell とし, thiamine 100 $\mu\text{g/l}$ 培地に生育した菌を thiamine-sufficient cell とした.

3. 分析 ピルビン酸の定量は Friedemann and Haugen 法^(3,4)によった.

4. 酸素吸収の測定 Warburg 検圧計により測定した.

実 験 結 果

1. 生菌体によるピルビン酸の生成と分解

グルコン酸を炭素源とする thiamine 20 $\mu\text{g/l}$ 培地および thiamine 100 $\mu\text{g/l}$ 培地で 48 時間および 72 時間培養して得られた生菌体の懸濁液を使用して, グルコン酸を基質とするピルビン酸の生成およびピルビン酸を基質としたときのピルビン酸の分解についてしらべた結果

Table I. Pyruvic Acid Production and Consumption by Resting Cells

	Thiamine 20 $\mu\text{g/liter}$		Thiamine 100 $\mu\text{g/liter}$		Thiamine 20 $\mu\text{g/liter}$ plus Fe^{2+} 1 ppm	
	48 hr- cell	72 hr- cell	48 hr- cell	72 hr- cell	48 hr- cell	72 hr- cell
Pyruvate produced (mmoles)	0.63	0.27	0.03	0.03	0.42	0.31
Pyruvate consumed (mmoles)	0.18	0.29	0.75	0.74	0.28	0.45

The growth medium contained K-gluconate 6.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, and thiamine 20 $\mu\text{g/liter}$ or 100 $\mu\text{g/liter}$.

Preculture of the cells was carried out at 30°C for 48~72 hr with shaking.

The reaction mixture consisted of 1 mmole of gluconate or pyruvate, 4 ml of 1/15 M phosphate buffer (pH 6.0), 25 μmoles of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 3 ml of cell suspension (cell dry weight 80 mg) in a total volume of 10 ml.

Incubation was carried out at 30°C for 16 hr with shaking.

Table II. Effect of Thiamine and Oxythiamine on Pyruvic Acid Production and Consumption by Resting Cells

Additions	Thiamine 20 $\mu\text{g/liter-cell}$		Thiamine 100 $\mu\text{g/liter-cell}$	
	Pyruvate produced (mmoles)	Pyruvate consumed (mmoles)	Pyruvate produced (mmoles)	Pyruvate consumed (mmoles)
None	0.50	0.18	0.07	0.77
Thiamine 600 $\mu\text{g/liter}$	0.04	0.93	—	—
Oxythiamine 10 mg/liter	—	—	0.10	0.73

Preculture of the cells was carried out at 30°C for 48 hr with shaking.

The reaction mixture consisted of 1 mmole of gluconate or pyruvate, 4 ml of 1/15 M phosphate buffer (pH 6.0), 25 μmoles of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 ml of cell suspension (cell dry weight 80 mg), and thiamine or oxythiamine in a total volume of 10 ml.

Incubation was carried out at 30°C for 16 hr with shaking.

を Table I に示した.

Thiamine-deficient cell では, thiamine-sufficient cell に比べてピルビン酸の生成能が高く, thiamine-sufficient cell ではピルビン酸の生成は微量であった. 一方, ピルビン酸の分解については, thiamine-deficient cell では分解能が低かった. 鉄イオン添加 thiamine 制限培地で生育した菌体では thiamine-deficient cell に比べてピルビン酸分解能の上昇が認められた.

2. ピルビン酸の生成および分解に及ぼす thiamine および oxythiamine の添加効果

Table I の結果より, thiamine-deficient cell ではピルビン酸生成能が高く, これはピルビン酸の分解能が低いためであると考えられたので, この生菌体懸濁液にあつたに thiamine を添加して, ピルビン酸の生成および分解に及ぼす効果についてしらべた. その結果を Table II に示したが, thiamine-deficient cell に thiamine を添加することにより, ピルビン酸生成能の低下とピルビン酸分解能の著しい上昇が認められた. これらの結果から, thiamine-deficient cell では細胞内の thiamine 濃度の低下によって, ピルビン酸の酸化的分解が抑制され, ピルビン酸が蓄積するものと考えられる.

Oxythiamine は本菌の生育を阻害するが, thiamine-sufficient cell によるピルビン酸の生成および分解に対しては添加効果は認められなかった.

3. 代謝阻害剤の添加効果

Thiamine-deficient cell によるピルビ

Table III. Effect of Various Reagents on Pyruvic Acid Production by Thiamine-deficient Cells

Reagents added	Concentration	Pyruvic acid (mmoles)
None	—	0.38
NaAsO ₂	1×10^{-2} M	0.72
CH ₂ ICOOH	2×10^{-3} M	0
2, 4-Dinitrophenol	1×10^{-3} M	0.10
NaN ₃	5×10^{-3} M	0
AgNO ₃	1×10^{-3} M	0
CuSO ₄	6×10^{-3} M	0.22
Tetracycline	5 mg/10 ml	0.16
Cetyl pyridium bromide	10 mg/10 ml	0
Nonion S-6	50 mg/10 ml	0

Preculture of the cells was carried out at 30°C for 48 hr in thiamine 20 μ g/l medium with shaking.

The reaction mixture consisted of 1 mmole of gluconate, 4 ml of 1/15 M phosphate buffer (pH 6.0), 25 μ moles of MgSO₄7aq., 3 ml of cell suspension (cell dry weight 80 mg), and reagents shown in the table in a total volume of 10 ml.

Incubation was carried out at 30°C for 16 hr with shaking.

Table IV. Effect of Arsenite on Pyruvic Acid Production by Thiamine-sufficient Cells

Arsenite concentration (M)	Pyruvate produced (mmoles)
0	0.10
5×10^{-3}	0.24
5×10^{-2}	0.48

Preculture of the cells was carried out at 30°C for 48 hr in thiamine 100 μ g/liter medium with shaking.

Composition of reaction mixture and incubation conditions were the same as those shown in Table III.

ン酸の生成に及ぼす阻害剤添加の影響をしらべた結果を Table III に示した。使用した阻害剤のうち亜砒酸塩のみがビルビン酸蓄積に効果がみられたが、それ以外の物質では、いずれもビルビン酸の生成が阻害された。亜砒酸塩はケト酸の酸化的脱炭酸反応を阻害することが知られているが、亜砒酸塩添加の影響は Table IV のごとく thiamine-sufficient cell においてもみられ、ビルビン酸生成量が増大した。

4. 生菌体によるグルコン酸およびビルビン酸の酸化

Thiamine 欠乏によるビルビン酸の酸化的分解の抑制が、ビルビン酸蓄積の主因であることを明らかにするために、生菌体のグルコン酸およびビルビン酸に対する酸

Table V. Oxidation of Gluconate and Pyruvate by Resting Cells grown on Thiamine-deficient and-sufficient Media

Substrates	QO ₂ (O ₂ μ l/mg/hr)					
	Thiamine 20 μ g/liter		Thiamine 100 μ g/liter		Thiamine 20 μ g/liter plus Fe ²⁺ 1 ppm	
	40 hr-cell	48 hr-cell	40 hr-cell	48 hr-cell	40 hr-cell	48 hr-cell
Gluconate	23.5	33.9	16.5	19.2	28.8	32.9
Pyruvate	6.3	4.6	15.1	9.4	9.2	9.4

Preculture of the cells was carried out at 30°C for 48 hr with shaking.

The reaction mixture consisted of 10 μ moles of substrate, 1.0 ml of 1/10 M phosphate buffer (pH 6.0), 0.4 ml of cell suspension, and 0.2 ml of 20% KOH in a total volume of 2.0 ml.

Oxygen uptake was measured manometrically at 30°C.

Table VI. Oxidation of Various Substrates by Resting Cells grown on Thiamine-deficient and -sufficient Media

Substrate	QO ₂ (O ₂ μ l/mg/hr)		
	Thiamine 20 μ g/liter-cell	Thiamine 100 μ g/liter-cell	Thiamine 20 μ g/liter plus Fe ²⁺ 1 ppm-cell
Pyruvate	6.3	14.8	11.6
Acetate	12.6	20.9	21.8
Succinate	7.0	10.0	11.5
Malate	6.5	12.2	9.2
Fumarate	6.7	11.3	10.9
α -Ketoglutarate	0	1.7	1.8
Citrate	0	0	0
Isocitrate	0	0	0
Lactate	5.4	8.0	—

Composition of reaction mixture and incubation conditions were the same as those shown in Table VI.

化能をしらべた。その結果を Table V に示したが、thiamine-deficient cell は thiamine-sufficient cell に比較してグルコン酸の酸化能が高く、ビルビン酸の酸化能は低かった。また、鉄イオン添加 thiamine 制限培地で生育した菌体では、ビルビン酸の酸化能の上昇が認められた。

5. 生菌体による各種有機酸の酸化

TCA サイクルのメンバーを含む各種有機酸に対する酸化能についてしらべた結果を Table VI に示した。

Thiamine-deficient cell ではビルビン酸をはじめ、酢酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸、 α -ケトグルタル酸および乳酸の酸化能の低いことが認められた。鉄イ

オン添加 thiamine 制限培地で生育した菌体では、これらの酸化能の昇がみられた。クエン酸およびイソクエン酸では酸素吸収がみられなかったが、これは細胞膜の透過性によるものと考えられる。

考 察

微生物によるピルビン酸蓄積における thiamine の役割に関しては、*Mucor mandshuricus*⁽⁶⁻¹⁰⁾ についての研究があるが、動物については、thiamine とケト酸代謝の関係がひろく研究され⁽¹¹⁻¹⁶⁾、thiamine 欠乏によりピルビン酸の酵化的分解が抑制され、ピルビン酸濃度の昇が認められている。

Thiamine を必須生育因子とする *Corynebacterium* sp. No. 208 によるグルコン酸の酵化的代謝において、thiamine 制限条件下でみられるピルビン酸蓄積現象も、細胞内の thiamine 濃度が低下し、ピルビン酸の酵化的分解能が低くなったためであると推測される。

この点に関して、本報では、thiamine 制限培地で生育した菌体の懸濁液を使用して検討したのであるが、Table II にみられるように、ピルビン酸を蓄積する thiamine-deficient cell ではピルビン酸の分解能が低く、これに thiamine を添加するとピルビン酸の分解能が回復されてピルビン酸の生成量が減少した。さらに、Table V に示されたように、thiamine-deficient cell ではグルコン酸の酸化能に対してピルビン酸の酸化能の低いことが認められた。また、亜硫酸塩の添加によってもピルビン酸蓄積の増大が認められたが、これらの事実は、thiamine 欠乏による pyruvate dehydrogenase 活性の低下が、本菌によるピルビン酸蓄積の主因であることを示すものであると考えられる。

Table VI のごとく、thiamine-deficient cell ではピルビン酸のみでなく、各種の有機酸の酸化能が一般に低くなっているが、今田ら⁽¹⁷⁾も同様な結果を報告している。

鉄イオンを添加した thiamine 制限培地で生育した菌体では、鉄イオンの添加により、ピルビン酸の分解能および酸化能が高くなった。また各種有機酸の酸化能も上昇した。thiamine 制限培地に鉄イオンを添加して本菌を培養すると、培地中に蓄積されたピルビン酸の急激な分解がみられたのであるが、鉄イオンの添加により酵化的酵素の活性が上昇し、ピルビン酸の酵化分解が促進されるものと考えられる。

本研究にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました合同酒精株式会社中央研究所長今井富雄博士に深謝いたします。また発表を許可されました合同酒精株式会社に感謝いたします。

本研究の内容は昭和41年4月4日および昭和43年4月2日、日本農芸化学会大会において講演した。

- (1) 嶋村陸夫, 吉武寿一: 農化, **44**, 195 (1970).
- (2) 嶋村陸夫, 吉武寿一: 農化, **44**, 185 (1970).
- (3) T. H. Fridemann and G. F. Haugen: *J. Biol. Chem.*, **147**, 415 (1943).
- (4) 福井作蔵: 蛋白質 核酸 酵素, **2**, 287 (1957).
- (5) 北原覚雄, 福井作蔵: 酵工誌, **29**, 227 (1951).
- (6) 北原覚雄, 福井作蔵: 同上, **29**, 287 (1951).
- (7) 北原覚雄, 福井作蔵: 同上, **29**, 326 (1951).
- (8) 北原覚雄, 福井作蔵: 同上, **29**, 378 (1951).
- (9) 北原覚雄, 福井作蔵: 同上, **30**, 267 (1952).
- (10) K. Kitahara and S. Fukui: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1**, 61 (1955).
- (11) R. A. Peters: *Brit. Med. Bull.*, **5**, 313 (1948).
- (12) R. A. Peters: *ibid.*, **9**, 116 (1953).
- (13) C. C. Ling: *Biochem. J.*, **82**, 429 (1962).
- (14) C. J. Gubler: *J. Biol. Chem.*, **236**, 312 (1961).
- (15) H. B. Lofland, H. O. Goodman, J. B. Clarkson and R. W. Richard: *J. Nutr.*, **79**, 188 (1963).
- (16) N. J. Benevenga, R. L. Baldwin, M. Ronning and A. L. Black: *J. Nutr.*, **91**, 63 (1967).
- (17) 今田幸男, 相田 浩, 山田浩一: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 234 (1966).