大腸菌の L-グルタミン酸脱炭酸酵素に関する研究 (第 3 報)

L-グルタミン酸脱炭酸酵素の生体内役割について

江藤義春, 堀津浩章*, 友枝幹夫*

(中京女子大学家政学部食物学科, *岐阜大学農学部農芸化学科)

昭和 46 年 9 月 4 日 受 理

Studies on L-Glutamate Decarboxylase Activity in *E. coli* Part III. Physiological Role of L-Glutamate Decarboxylase

By Yoshiharu ETO, Hiroyuki HORITSU* and Mikio TOMOYEDA*

Chukyo Women's University, Ohbu, Aichi; *Department of Agricultural
Chemistry, Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu

A physiological role of L-glutamate decarboxylase in *E. coli* was investigated. (1) The variation of the growth of cells, consumption of sugar and L-glutamate decarboxylase activity at different pH of the medium during growth of *E. coli* were pursued. In the case pH non-controlled culture, the growth of cells and the consumption of glucose were lower than those of the pH controlled culture (at pH 7.0), but the activity of L-glutamate decarboxylase was higher than that of the pH controlled culture. (2) From both the model and the cultural experiments, it may be concluded that the γ -aminobutyric acid which was caused from decarboxylation of L-glutamic acid was combined with lactic acid, and therefore, free lactic acid was rarely found in the culture broth.

These results show that the decarboxylation is closely associated with the control of pH of the medium. Namely, when the pH of the medium during growth inclines toward acid side, the decarboxylation of L-glutamic acid is accelerated.

(Received September 4, 1971)

緒 言

L-グルタミン酸脱炭酸酵素の存在は、微生物をはじめ各種の高等動植物と、その分布域がきわめて広範囲⁽¹⁻¹¹⁾であることから、本酵素がなんらかの形で、生体内で重要な役割を占めているであろうということは大いに想像されるが、この点に関しては今日まで、わずかに Gale ら⁽¹²⁾のいう培地の中性化作用、Roberts ら⁽¹³⁾のいわゆる“flow of nitrogen”における役割、および Schales⁽¹⁴⁾による窒素代謝過程における本酵素の重要性が、唱えられているにすぎない。一方、著者ら⁽¹⁵⁾はすでに大腸菌の培養条件による L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性の変動と、その場合の生成酸の変化について報告したが、それらの事実からしても、本酵素がなんらかの生体内での重要な役割をつかさどっているものと推察することができ

る。本報では、大腸菌の L-グルタミン酸脱炭酸酵素の生体内の役割について得られたいくつかの結果を報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌 *Escherichia coli* O-55
2. 培養方法 Table I に示したそれぞれの培地 10 ml を用いて、37°C で 16 時間前培養したものを同じ培地 190 ml に移して、37°C で一定時間静置培養を行なった。
3. 菌体懸濁液の調製および酵素活性の測定 前報に準じて行なった。
4. 糖の定量は逸見、友枝のベルトラン改良法⁽¹⁶⁾によって行なった。
5. 培地中の L-グルタミン酸の定量 L-グルタミ

ン酸脱炭酸酵素標品(協和醸酵株式会社製)による bioassay 法を用いた。

6. 培地中のアミノ酸のペーパークロマトグラフィー 菌体を除去した後の培養液を減圧濃縮し, ブタノール:酢酸:水(4:1:1)の溶媒を用いて展開した後, 0.1% ニンヒドリン溶液にて発色させた。

7. 乳酸の定量 Barker Summerson の比色定量法⁽¹⁷⁾によって行なった。

8. γ -アミノ酪酸の定量 Moore and Stein のニンヒドリン比色法によって行なった。

実験結果および考察

1. 培地の pH を調節した場合の酵素活性の変動

Table I に示した 4 種の培地を用いて, M-II および M-IV の場合は培地の pH を 7.0 付近にコントロールしながら静置培養を行ない, 経時的に菌体発育, グルコースの消費およびグルタミン酸脱炭酸酵素活性の変化を測定した結果を, それぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示す。まず, pH を調節しない, いわゆる standard の場合は Fig. 1 に示すごとく, 培養 24 時間において, すでに pH は 4.5 付近に低下する。また, pH を調節した場合は, 調節しないものに

Fig. 1. Changes in pH, Dry Weight and Residual Sugar with Time Course.

— medium I, ---- medium II, ● pH, ○ dry weight, × residual sugar.

Fig. 2. Change in L-Glutamate Decarboxylase Activity with Time Course.

— medium I, ---- medium II, × PALP added to the reaction mixture at measuring time for the enzyme activity, ○ no addition.

Table I. Composition of the Culture Media

M-I		M-II		M-III		M-IV	
glucose	1.5(%)	glucose	1.5(%)	glucose	1.5(%)	glucose	1.5(%)
K_2HPO_4	1.0	K_2HPO_4	1.0	K_2HPO_4	1.0	K_2HPO_4	1.0
peptone	1.0	peptone	1.0	peptone	0.75	peptone	0.75
yeast extract	1.0	yeast extract	1.0	yeast extract	0.75	yeast extract	0.75
				L-glutamate	0.5	L-glutamate	0.5
tap water		0.1 M phosphate buffer		tap water		0.1 M phosphate buffer	
(pH 7.5)		(pH 7.5)		(pH 7.5)		(pH 7.5)	

The incubation was performed for arbitrary period at 37°C by static method.

The each pH of medium II and IV during the incubation was occasionally adjusted to neutrality with sterilized-sodium hydroxide, and those of medium I and III weren't adjusted.

比べ菌の発育が活発で、かつ糖の消費量も多いが、L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性は Fig. 2 に示すごとく、逆に standard 培養に比べてかなり低い値を示している。しかし、その場合でもグルタミン酸脱炭酸酵素の生成はある程度行なわれていることがうかがわれる。また、その場合の培地中の L-グルタミン酸の消費量についてみると、Fig. 3 に示すごとく、L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性の強い standard 培養の方が多く、培養 48 時間で、すでにそのほとんどが消費されるのに反し、pH を

調節した場合では培養 120 時間後でも、なおかなりのグルタミン酸が残存している。さらに、その場合の培地中のアミノ酸のペーパークロマトグラムは、Fig. 4 に示すとおりで、standard 培養では 24 時間後に、すでに少量の残存グルタミン酸のスポットとともに、グルタミン酸の脱炭酸生成物である γ -アミノ酪酸のスポットが検出され、48 時間後にはグルタミン酸のスポットは、ほとんど検出されない。これに反して、培地の pH を調節した場合では、培養 120 時間後でもなおグルタミン酸のスポットが残存し、また γ -アミノ酪酸の生成も、ほとんど認められなかった。すなわち pH を調節した場合では、本酵素が存在するにもかかわらず、培地中に γ -アミノ酪酸の生成がみとめられないのは、本酵素の作用最適 pH が 4.5 と酸性側にあるために、その反応が進行しないものと思われる。このことは、また言い換えれば、作用する必要がないから反応しないとも推察される。つまり、本酵素作用と培地中の pH の間には非常に密接な関係があり、その生理的意義もまた、Gale ら⁽¹²⁾のいう培地の中性化作用説を考えると、非常に都合が良い。

2. 中性化作用に関するモデル実験

そこで、本酵素の生理的役割が培地の中性化にあると考え、次のモデル実験を行な

Fig. 3. Change in L-Glutamic Acid in Culture Broth with Time Course.

—x— medium I, --x-- medium II, —○— medium III, --○-- medium IV.

Fig. 4. Paper Chromatogram of the Amino Acids in Culture Broth with Time Course.

One-way ascending chromatography on Toyo Roshi No. 50 paper was carried out using *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1 by volume) as solvent.

1: medium I, 2: medium III, 3: medium II, 4: medium IV.

った。すなわち、前報⁽¹⁵⁾において振盪培養と静置培養で、その脱炭酸酵素活性が非常に異なり、またその場合の生成有機酸量も非常に異なっており、有機酸の中でも特に差異がみられたのは乳酸であることを述べた。それゆえ本実験においては、乳酸とグルタミン酸の脱炭酸生成物である γ -アミノ酪酸とを、特にとりあげて検討した。

1) 乳酸に γ -アミノ酪酸を添加した場合の pH の変化 : 乳酸の一定量 4.5 mg に、 γ -アミノ酪酸を順次増加して添加した場合の pH の変化を、Fig. 5 に示す。その結果、pH 5.0 くらいまでは、40 mg くらいの γ -アミノ酪酸の添加で急激な pH の上昇がみられるが、それ以

後の pH の上昇はきわめて緩慢である。この場合の pH の上昇は、 γ -アミノ酪酸の添加によって、なんらかの形で乳酸分子中の水素イオン濃度の減少が生じたためであろうと考えられる。

2) 乳酸- γ -アミノ酪酸混合液より遊離乳酸のエーテル抽出 : 次に、実際の培養終了時の pH とほぼ同じ 4.65 くらいになるように調製した乳酸と、 γ -アミノ酪酸との混合液を数回エーテル抽出をくり返し（エーテル部への乳酸の移行がなくなるまで）、エーテル抽出部の乳酸を 0.01 N NaOH で滴定した結果、Table II に示すごとく、総乳酸の約 41% が抽出されたにすぎなかった。ゆえに、残りの 59% の乳酸は、 γ -アミノ酪酸となんらかの形で結合することによって、エーテル不溶性となったものと考えられる。

3) イオン交換樹脂による乳酸と γ -アミノ酪酸の分離 : 続いて、このエーテル不溶性となった乳酸（結合型）を Amberlite IR-45 (Cl 型, pH 3.2) でカラムクロマトグラフィーを行なった結果、Fig. 6 に示すごとく、結合が切れて γ -アミノ酪酸は流出部に、そして乳酸は 0.25 N HCl 溶出部に、それぞれ 100% の回収率で分離、溶出された。

3. 培養液中の遊離および結合型乳酸の分離定量

以上のことから、次に実際の培養液中においても、同様の事実が存在するか否かを確認するために、standard 培養 (48 時

Table II. Composition Ratio of Extractable and Unextractable Lactic Acid with Ether from the Mixture

Composition	(mg)	(%)
Total lactic acid	10.0	100.0
Extractable	4.1	41.0
Unextractable	5.9	59.0

Table III. Composition Ratio of Extractable and Unextractable Lactic Acid with Ether from the Culture Broth

Composition	mg/100 ml	(%)
Total lactic acid	557.0	100.0
Extractable	31.0	5.6
Unextractable	526.0	94.4

Fig. 5. Change in pH Values under Mixing Lactic Acid with γ -Aminobutyric Acid.

The concentration of lactic acid is constant (4.5 mg).

Fig. 6. Separation of Lactic Acid and γ -Aminobutyric Acid from their Mixture on Amberlite IR-45.

Condition of the column, 1.7 $\times$ 32 cm, Cl-type, pH 3.2.

Chromatogram was developed by a stepwise elution of increasing NaCl molarity from 0 M to 0.2 M at a flow rate of 10 ml per minute.

間)の濾液について同様にエーテル抽出を行ない、エーテル可溶および不溶部の乳酸をそれぞれ定量した。その結果 Table III に示すごとく、培養液中の総乳酸が 557 mg/100 ml で、そのうちエーテル可溶性(遊離型)乳酸は、わずかに 31 mg で実際の培養液中での遊離の乳酸はきわめて少なく、そのほとんどがエーテル不溶性の型で存在していることが確認された。すなわち、培養液中に生成された乳酸(本実験では特に乳酸のみをとりあつかった)は、そのほとんどが結合型となることによって、溶液の pH の低下を抑えているものと思われる。結局、乳酸の相手の 1 つとして、 γ -アミノ酪酸が重要な役割をつかさどっているものと考えられる。

要 約

培地の pH を 7.0 付近に経時的に調節して培養した場合と、調節しない場合とでは菌の発育、糖の消費量ともに前者の方が多かったが、その場合の L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性は、後者の方がかなり高く、またグルタミン酸の消費も後者の方が大であった。すなわち、L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性は、pH の低下によって上昇し、逆に pH が高いと低下することが認められた。また、モデル実験においては、乳酸に γ -アミノ酪酸を添加することによって明らかな pH の上昇がみられたが、これは乳酸と γ -アミノ酪酸が、なんらかの形で結合した結果と思われる。さらに、実際の培養液中の乳酸のほとんどが結合型であるという結果と併せて、本酵素の生理的役割のその 1 つが、培養液の中和作用であるものと考えられた。

終りに臨み、本研究の遂行に熱心に協力していただいた吉野俊彦氏に対し、深甚なる感謝の意を表する。なお、本研究の一部は昭和 42 年 12 月 2 日、日本農芸化学会中部支部例会において発表した。

- (1) E. F. Gale : *Biochem. J.*, **34**, 392 (1940).
- (2) *idem* : *Brit. med. Bull.*, **9**, 135 (1953).
- (3) E. S. Taylor and E. F. Gale : *Biochem. J.*, **39**, 52 (1945).
- (4) R. Shukuya and G. W. Schwert : *J. Biol. Chem.*, **235**, 1649 (1960).
- (5) V. A. Najjar and J. Fisher : *ibid.*, **206**, 215 (1954).
- (6) P. R. Krishnaswamy and K. Giri : *Current Sci.*, **22**, 143 (1953).
- (7) O. Schales, V. Mims and S. S. Schales : *Arch. Biochem.*, **10**, 455 (1946).
- (8) E. Roberts and S. Frankel : *J. Biol. Chem.*, **187**, 55 (1950).
- (9) W. J. Wingo and J. Awapara : *ibid.*, **187**, 267 (1950).
- (10) H. Beevers : *Biochem. J.*, **48**, 132 (1951).
- (11) K. Okunuki and M. Inagaki : *Proc. Japan Acad.*, **27**, 658 (1951).
- (12) E. F. Gale and H. M. R. Epps : *J. Biol. Chem.*, **36**, 600 (1942).
- (13) E. Roberts, P. Ayengar and I. Posner : *ibid.*, **203**, 195 (1953).
- (14) O. Schales : "The Enzymes," Part 1, ed. by Sumner and Myrbäck, New York, Academic Press Inc., 1951, p. 216.
- (15) 堀津浩章, 江藤義春, 友枝幹夫 : *Amino Acid and Nucleic Acid*, No. 16, 65 (1967).
- (16) 逸見文雄, 友枝幹夫 : *農化*, **19**, 381 (1943), **21**, 5 (1946).
- (17) S. B. Barker and W. H. Summerson : *J. Biol. Chem.*, **138**, 538 (1941).