U. D. C. 576.8.095.3 : 547.495.9

64. 鈴木友二, 村岡三郎, 牧野輝勇: アミノ酸拮抗物質の研究 (第 8 報*)

微生物におけるアルギノコハク酸およびカナバノコハク酸の生成

Tomoji Suzuki, Saburo Muraoka, and Teruo Makino: Studies on the Antimetabolites of Amino Acids. VIII. Formation of Arginosuccinic Acid and Canavanosuccinic Acid in Microorganisms.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto**)

Acetone-dried cells of *Escherichia coli* and *Lactobacillus arabinosus* were prepared and the formation of arginosuccinic acid (ASA) and canavanosuccinic acid (CSA) from arginine or canavanine and fumarate was followed by paper electrophoresis and paper chromatography. ASA was found to be formed by the parent strain of *E. coli* but it was not detected with its arginine-requiring mutant (cannot be compensated with ornithine or citrulline). Even with the parent strain, its culture in a medium containing arginine causes disappearance of arginosuccinic activity and ASA formation does not take place. The formation of CSA was identical with the case of ASA. With *Lact. arabinosus*, ASA was formed from citrulline and aspartic acid, as well as from arginine and fumarate. CSA itself inhibits proliferation of *Lact. arabinosus* and this inhibition is easily recovered with arginine. Considerations were made on the action mechanism of canavanine from these experimental results.

(Received January 8, 1957)

さきに著者等は *Lact. arabinosus*, *Lact. fermenti* において, アルギニンおよびその前駆物質とカナバニンの拮抗をしらべた^{1,2)}. また一方カナバニンはアルギニンを生合成できる細菌にのみ強く作用することを認め, これらの事実を併せ考えて, これら細菌に於いてはカナバニンはアルギニンの生合成 (おそらくはシトルリンからアルギニンへの過程) を抑制すると報告した³⁾. シトルリンからのアルギニンの生成には, アスパラギン酸のみが N の donor として役立つことが以前から認められていたが⁴⁾, その後シトルリンとアスパラギン酸との縮合体と考えられるアルギノコハク酸 (ASA) が Ratner⁵⁾, Walker⁶⁾ によつて見出され, このものがアルギニン合成の中間体と考えられるようになった. 更にシトルリンとアスパラギン酸を縮合させて ASA を生ずる condensing enzyme system は ATP と Mg^{++} を必要とすること, また生成した ASA は酵素的に分解してアルギニンとフマル酸になることを Ratner 等は認め⁷⁾, ASA を分解する酵素を splitting enzyme とよび, この酵素反応の可逆性を明らかにした. Ratner 等の研究は主として肝臓の酵素についてであるが, Walker はクロレラや微生物の酵素系でアルギニンとフマル酸の縮合並びに ASA の分解についてしらべ, Ratner 等の splitting enzyme に対応する酵素を arginosuccinase (ASAase) と呼び, その性格について論じている^{8,9)}.

著者等はまずナタマメの酵素を用いて ASA の Ba 塩を作り, *Lact. casei*, *Strep. faecalis*, *Lact. fermenti*, *Leuc. mesenteroides* に対するアルギニン代用物質としての活性をしらべたが, 200 γ /cc でいずれの菌でも不活性であつた. これは Ratner 等もいうように, ASA は不安定で環生成しやすく⁵⁾, 環生成したものは ASAase の基質となりえないことにもよろう. そこで著者等は *E. coli* の親株およびアルギニン要求性変異株や *Lact. arabinosus* でアセトン乾燥菌を作り, Walker の方法に準じて, これらの菌によるアルギニンまたはカナバニンとフマル酸からの ASA 及びカナバノコハク酸 (CSA) の生成についてしらべ, これら生成能とアルギニン要求性

* 第 7 報: 本誌 74, 1338(1954).

** Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) 鈴木, 村岡: 本誌 74, 534(1954).

2) 鈴木, 村岡, 小延: 本誌 74, 537(1954).

3) 鈴木, 村岡, 小延: 本誌 74, 540(1954).

4) "A Symposium on Amino Acid Metabolism," The John Hopkins Press, 233(1955).

5) S. Ratner, B. Petrack, O. Rochovansky: J. Biol. Chem. 204, 95(1953).

6) J. B. Walker: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 38, 561(1952).

7) S. Ratner, W. P. Anslow, B. Petrack: J. Biol. Chem. 204, 115(1953).

8) J. B. Walker, J. Meyers: Ibid. 203, 143(1953).

9) J. B. Walker: Ibid. 204, 139(1953).

との関係について考察した. また *Lact. arabinosus* のアセトン乾燥菌でシトルリン+アスパラギン酸からの ASA の生成をみると, condensing enzyme system の存在を証明した. 一方 CSA の Ba 塩を Walker の方法⁹⁾ で作り, これを用いて *Lact. arabinosus* の増殖を抑制した. これらの結果からカナバニンの作用機序について若干の考察を加えた.

アルギニンとフマル酸からの ASA の生成 *E. coli* K12-W の親株およびアルギニン要求性変異株* のアセトン乾燥菌を作成し, アルギニン+フマレイトからの ASA の生成を濾紙電気泳動法と濾紙クロマトグラフィーで観察した. その結果親株では ASA 形成が認められたが, 変異株では ASA の生成はみられなかった. しかし親株でも, アルギニンを含む培地 (例えばペプトン 1%含有の Davis 培地) で培養したときには, ASA は全く検出されなくなる (Fig. 1).

Fig. 1. Arginosuccinic Acid Formation by Acetone-dried Cells of *E. coli*

1. Arginine (control) 2. Acetone-dried cells of *E. coli* K12-W (grown in inorganic salts medium) 3. *E. coli* (grown in arginine-containing medium) 4. *E. coli* K12-W arginine requiring mutant

Paper electrophoresis: *M*/60 phosphate buffer (pH 7.2) 600 V., 1mA./cm., 50 mins.

すなわち ASAase は無機培地からアルギニンを生合成できる *E. coli* 親株には存在するが, アルギニン合成能をもたない変異株およびアルギニンを含む培地で培養した親株には存在しない. また上と同じ実験を, アルギニン合成能をもつ *Lact. arabinosus* のアセトン乾燥菌についても行い, ASA の生成を認めた. これらの結果は ASAase がアルギニンの生合成に関係をもつ酵素であると同時に, 適応的な性格をもつことを示すものと考えられる (著者等の場合とは多少性格を異にするが反応生成物を培地に加えて培養すると合成酵素が退化する例としては, Davis の N-acetylornithinase¹⁰⁾, Monod の methionine synthase¹¹⁾ がある).

カナバニンとフマル酸からの CSA の生成 上の ASA のときと同じく, カナバニンとフマレイトを基質としてアセトン乾燥菌を作用させ, ペーパークロマトグラフィーで CSA の生成を検した. その結果, 無機培地で培養した *E. coli* 親株では CSA の生成が見られ, 同時にアスパラギン酸の生成を認めたが, *E. coli* アルギニン要求性変異株およびアルギニンを含む培地で培養した親株では CSA の生成はみられなかった.

シトルリンまたはカナバニンとアスパラギン酸からの ASA または CSA の生成 *E. coli* のアセトン乾燥菌ではシトルリン+アスパラギン酸で ASA を生成させることはできなかつたが, 同じ条件で *Lact. arabinosus* のアセトン乾燥菌を用いると ASA の生成をみた. しかし *Lact. arabinosus* の場合も, 菌浮游液そのままを用いた実験では ASA の生成はみられない. また *E. coli* のアセトン乾燥菌でもカナバニン+アスパラギン酸からは CSA の生成がみられる. これらの結果については次のように考えられる.

E. coli に於いても当然 *Lact. arabinosus* と同じく condensing enzyme system をもち, シトルリン+アスパラギン酸からの ASA の生成能をもつが, 上の実験では *E. coli* のもつアスパルターゼが作用してアスパラギン酸をフマル酸とする反応が優位となり, またたとえ ASA が少量生成されたとしても, ASAase によつて分

* この株はアルギニンを厳密に要求し, オルニチン, シトルリンはアルギニン代用物質にならない.

10) H. J. Vogel: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 39, 578(1953).

11) J. Monod: Compt. rend. 236, 746(1953).

解されて検出されにくくなる。この考えは前項に於いて *E. coli* の親株のアセトン乾燥菌でカナバニン+フマレイトから CSA の生成を証明したときに、同時にアスパラギン酸を生じたことから妥当といえるであろう。また *E. coli* のアセトン乾燥菌でカナバニン+アスパラギン酸から CSA の生成をみたのは、アスパルターゼによつてアスパラギン酸からフマル酸を生じたことによるものであろう。またカナバニンはアルギニンの場合と異なり arginine desimidase の作用をうけないことが Oginsky¹²⁾ 及び井出¹³⁾ によつて確かめられたので、カナバニンが carbamylcanaline となつて後、condensing enzyme system によつてアスパラギン酸と縮合して CSA を生成するとは考えにくい。

また *E. coli* のアセトン乾燥菌ではシトルリン+アスパラギン酸で ASA の生成をみず、*Lact. arabinosus* では同じ条件で ASA の生成をみた点については、目下の所、両酵素標品のアスパルターゼ活性の強弱の違いによるものと考えているが、アスパルターゼ活性の強弱の比較研究は、目下、井出によつて進められつつあり、若干の知見をえている¹³⁾。

カナバノコハク酸の増殖抑制作用 ナタメの ASAase を用いてカナバニン+フマレイトから CSA の Ba 塩を作成し、*Lact. arabinosus* の増殖に対する影響をしらべた結果、Fig. 2 に示すようにグルタミン酸とピリドキサルからアルギニンが合成される条件²⁾ で増殖抑制効果を示した (200 γ /cc で完全抑制)。

Fig. 2.
Effects of Canavosuccinic Acid on the Growth of
Lact. arabinosus 17-5. (growing at 30°C for 24 hrs.)

また、その抑制能はカナバニンに比べると弱い、カナバニンの場合と同様に培地にアルギニンを添加すると増殖の回復がおこり、高濃度の CSA を加えても完全抑制はおこりにくくなる (例えば 5 γ /cc のアルギニンが存

Fig. 3. Presumed Mechanism of Canavanine Inhibition
in Microorganisms

12) Oginsky, Gehring: J. Biol. Chem. **198**, 799(1952).

13) 井出: 本誌投稿予定.

14) 北川, 山田: 農化 **8**, 1135(1932).

在すると, CSA 2000 γ /cc で 40%抑制にすぎない). ここに用いた CSA の Ba 塩はニトロプルシッド・フェリシアン化カリ反応¹⁴⁾ 陰性で不純物としてカナバニンを含まず, また増殖抑制が示された培養液から遊離のカナバニンは検出されないで, この作用はおそらくは CSA 自身の作用に基づくものと考えてよいと思う.

結 論 以上の実験結果から, カナバニンは自らは CSA となることによつてアルギニンの生合成を抑制することが考えられる. CSA 生成の機序については, 今回アセトン乾燥菌を用いて ASA ase によるカナバニンとフマレイトの縮合を証明した. 元来 ASAase による反応は平衡がアルギニン生成の側に傾いているが, カナバニンの負荷によつて増殖時に CSA が生成することは充分考えられる. これを模式的に書くと Fig. 3 のようになる. 著者等の別の実験で, カナバニンは *Staph. aureus*¹⁵⁾ や *Neurospora*¹⁶⁾ の休止菌によるアルギニンの uptake を抑制した. また *E. coli* の義酸放水素酵素の適応の形成で, カナバニンは蛋白合成へのアルギニンの利用をも妨げる¹⁷⁾ という結果をえているので, カナバニンとアルギニンの拮抗ということも当然ありうる. 実際に小延は *Neurospora* のアルギニン要求株でカナバニンとアルギニンのせり合い的拮抗を観察しているが¹⁶⁾, 従つて, カナバニンは微生物のアルギニンサイクルのいくつかの過程を抑制して, 強力な増殖抑制物質としての効力を発揮するものといえよう.

本研究の費用の一部は文部省科学研究費によつた. 謝意を表する. また大腸菌変異株を恵与された阪大医学部岡田利彦氏及び有益な御助言をいただいた予研水野伝一博士に深謝する.

実 験 の 部

ナタマメの arginosuccinase によるアルギノコハク酸及びカナバノコハク酸の作成 i) 酵素の調製: ナタマメ 80 g を粉末とした後, 水 250 cc を加えて室温で 1 時間攪拌, 遠心分離後, 上澄液に 1 M 酢酸を加えて pH 5.1 と 4.2 の間に生じる沈澱を集める. これをアセトン乾燥し粗 arginosuccinase とする. 収量 0.8 g.

ii) アルギノコハク酸のバリウム塩: 上記酵素 1.6 g, 0.77 M アルギニン溶液 8 cc, 0.77 M フマル酸溶液 10 cc, 水 70 cc を混合, pH 7.4 でトルエンを加えて 30°, 24 時間反応させる. 反応液からは Walker⁶⁾ の方法に従つて ASA Ba 塩を単離. 収量 0.8 g. ここにえられた Ba 塩は坂口反応陰性, ニンヒドリン反応陽性で, 水飽和フェノールでの Rf 値 0.18 であつた. なお, 至適反応時間をくらべるために 0, 4, 8, 16, 20, 24 時間目の反応液についてアルギニンの減少率を坂口反応で追跡した結果, アルギニンの減少はそれぞれ 0, 20, 43, 52, 55, 56% となり ASA の生成量は 16 時間目にほぼ最大に達する. iii) カナバノコハク酸バリウム塩: ASA と同様な方法でカナバニン塩酸塩とフマル酸からナタマメ ASA ase を用いて作成. ここにえられた CSA Ba 塩はニトロプルシッド・フェリシアン化カリ反応陰性, ニンヒドリン反応陽性で, 水飽和フェノールでの Rf 値 0.12.

大腸菌及び *Lact. arabinosus* によるアルギノコハク酸及びカナバノコハク酸の生成 *E. coli* K12-W の親株及びアルギニン要求性変異株を用いた. 親株には Davis 培地, 変異株には Davis 培地に 1%ペプトンを加えたものを用い, 30°, 24 時間培養後菌体を集め, 20 倍容のアセトン (-10°) 中でアセトン乾燥菌とした. ついでアセトン乾燥菌 5%, アルギニン及びフマル酸をそれぞれ 0.05 M になるように M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.3) に加え, 30°, 24 時間フランシス器中に放置する. CSA 生成のときはアルギニンの代りにカナバニンを加える. 生成した ASA または CSA は, ペーパークロマトグラフィー, 汎紙電気泳動法で分離後, ニンヒドリン試薬で呈色させた. なお, ASA 生成を汎紙電気泳動法を用いて時間的に追跡した結果, 30 分後に ASA のスポットがあらわれ, このスポットは 4 時間, 20 時間と反応時間を延長しても大きくならない.

Lact. arabinosus で ASA を生成させるときは, ブドウ糖 1%, ペプトン 1%, 肉エキス 0.5%, 酵母エキス 0.1%よりなる培地で 37°, 24 時間培養した *Lact. arabinosus* の菌体を遠心分離して集菌後, 生理食塩水で 3 回洗浄. 生菌による実験のときは 5%の菌液 (乾燥量基準) となるよう生理食塩水で希釈. アセトン乾燥菌のときは前述の大腸菌の場合と同様にアセトン処理を行い, 何れの場合も上記の大腸菌のときと同一の条件で反応させた.

アルギノコハク酸及びカナバノコハク酸の微生物の増殖に及ぼす影響 ASA のアルギニン活性試験には *Lact. fermenti*, *Lact. casei*, *Strep. faecalis* R 及び *Leuc. mesenteroides* P-60 を使用し, 基礎培地, 接種菌などは前報¹⁸⁾ と同様にした. その結果, ASA Ba 塩, および Ba を硫酸で外して ASA 遊離型としたものの何れでも 200 γ /cc まで 30°, 72 時間培養でアルギニン代用物質とならなかつた. CSA の増殖抑制作用は遊離型および Ba 塩について, *Lact. arabinosus* を用いて前報²⁾ と同一の条件でしらべた.

京都大学医学部薬学科

15) 村岡, 高田: 本誌 74, 1338(1954).

17) 小延, 金光: 本誌投稿予定.

16) 小延: 本誌投稿予定.

18) 鈴木, 村岡: 本誌 72, 1405(1952).