

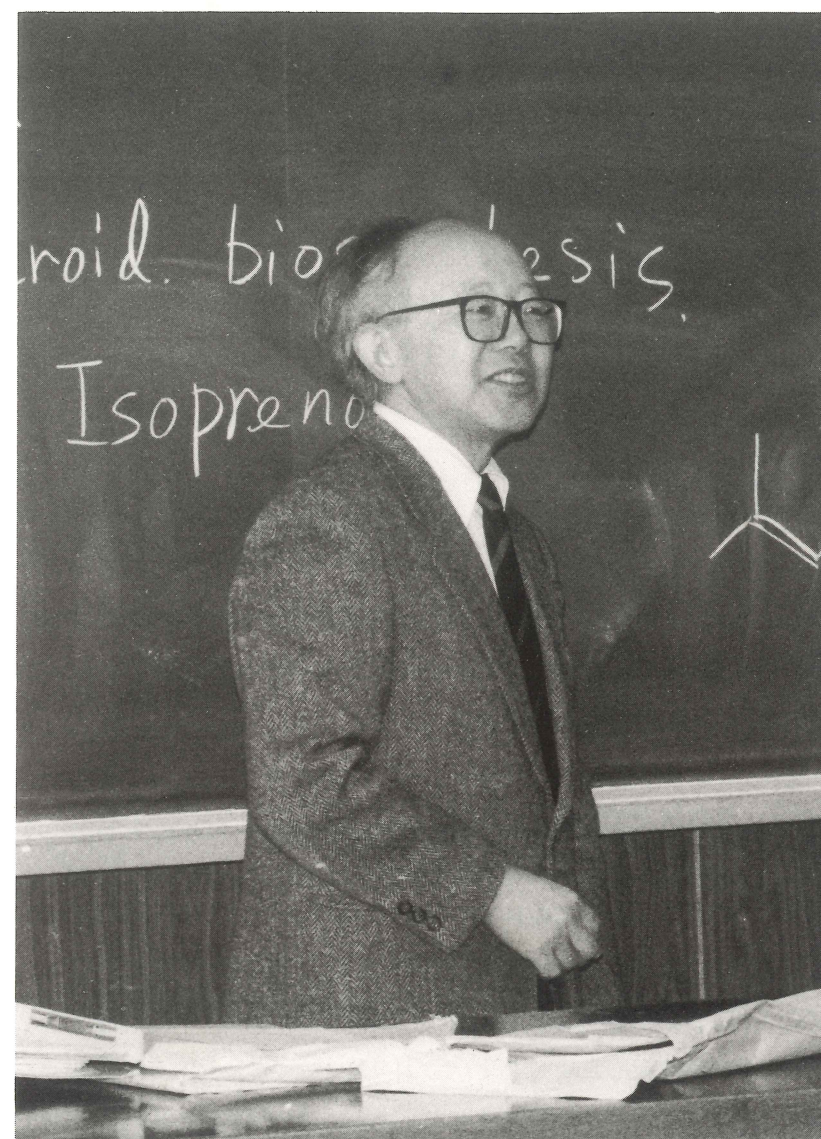
石本 真 教授業績集

# 嫌気性呼吸と硫黄代謝

1988年春

北海道大学薬学部微生物薬品化学講座  
石本 真 教授 定年退官記念会





講義中の石本真教授 (1988年1月27日)



## 石本 真 教授 経歴

- 1925年 東京市本郷区本郷に生まれる  
1943年 第一高等学校理科乙類卒業  
1946年 東京帝国大学理学部化学科卒業  
東京大学大学院入学  
1947年 東京大学理学部化学科副手  
1948年 東京大学大学院中退  
1949年 東京大学理学部化学科助手  
1954年 理学博士（東京大学）  
1955年 日本生化学会奨励賞受賞  
1959年 東京大学理学部助教授  
1961年 ハンガリー国ブタペシュト医科大学留学（一年三ヶ月）  
1962年 ドイツ連邦共和国フランクフルト大学医学部留学（二年一ヶ月）  
1967年 北海道大学薬学部教授  
1970年 日本薬学会北海道支部長  
1971年 北海道大学評議員（二年間）  
1974年 山路ふみ子自然科学奨学賞受賞  
日本生化学会副会長  
1983年 北海道大学教養部講師併任（1987年まで）  
1985年 日本薬学会北海道支部長  
1987年 生命の起原および進化学会副会長  
1988年 北海道大学定年退官  
北海道大学名誉教授

## 嫌気性呼吸と硫黄代謝

はじめに

嫌気性呼吸は、分子状酸素以外の最終電子受容体を利用する呼吸形態で、各種の細菌において広く行われている。江上不二夫、佐藤了によって硝酸呼吸として提案された概念である。その中で、硫酸呼吸はいわゆる硫酸還元菌においてのみ見られる過程で、無機硫黄代謝の一部である。

1945年私は左右田徳郎先生のスルファターゼの研究に参加し、そののち野島徳吉氏らとヒアルロニダーゼの研究を行ったが、つづいて硫酸塩の還元・同化に興味を持ち、硫酸還元および硝酸還元、スルホン酸の分解などを、多くの方々の協力を得ながら主として酵素的レベルで追求してきた。停年を迎えるに当り、今までの研究のうち嫌気性呼吸とスルホン酸分解に関する研究を、若干その過程を含めてここに記して見たい。

勿論この研究は私一人の力で出来るわけではなく、東大・北大を通しての職員・学生の方々の多年の協力の賜であり、また多くの方々にいろいろお世話になったものである。ここに厚く感謝の意を表します。

1988. 3. 31

石 本 真

## 目 次

はじめに

|                                                     |     |
|-----------------------------------------------------|-----|
| I. 硫酸呼吸                                             | 1   |
| 1. 元素の存在と形                                          | 1   |
| 2. 硫黄循環と硫酸還元菌の位置                                    | 3   |
| 3. 硫酸還元菌の代謝と成長                                      | 8   |
| 4. 硫酸還元菌における硫酸塩の亜硫酸塩への還元                            | 10  |
| 5. 亜硫酸の還元                                           | 15  |
| 6. チオ硫酸還元酵素                                         | 29  |
| 7. チトクロムC <sub>3</sub> とフラボドキシン                     | 32  |
| 8. 再び硫酸還元菌生菌の反応について                                 | 43  |
| 9. 硫酸還元菌諸酵素の免疫反応、種・株間交差によるDesulfovibrio<br>分類・同定の検討 | 46  |
| II. 硝酸塩の還元                                          | 50  |
| 1. Clostridium perfringensにおける硝酸還元                  | 52  |
| 1) 硝酸発酵における生成物と菌の成長                                 | 53  |
| 2) 酵素系の研究                                           | 57  |
| 2. 硝酸呼吸における大腸菌の代謝と成長                                | 66  |
| 1) 硝酸呼吸における酵素レベルと代謝産物                               | 67  |
| 2) 硝酸呼吸下における成長                                      | 75  |
| 3) 水素及びギ酸の酸化による成長                                   | 77  |
| 4) 硝酸呼吸下における代謝系の切り換え                                | 80  |
| 5) 好気条件と硝酸還元酵素の生成                                   | 84  |
| 3. プロピオン酸発酵に対する硝酸還元の影響                              | 88  |
| 4. Mitsuokella multiacidusの硝酸還元                     | 92  |
| 5. アミノ酸分解に対する硝酸還元の影響                                | 95  |
| III. トリメチルアミンNオキシドの還元                               | 100 |
| 1. Nオキシドの還元と嫌氣的呼吸                                   | 100 |
| 2. 嫌氣的呼吸の基準                                         | 101 |



|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 3. 大腸菌の代謝と成長に及ぼすTMANO還元の影響 | 102 |
| 4. TMANO還元酵素               | 106 |
| 5. TMANO還元と水素イオン輸送         | 107 |
| 6. TMANO還元の遺伝生化学           | 108 |
| IV. 腸内嫌気性細菌の研究             | 114 |
| 1. フマル酸の還元                 | 114 |
| 2. アンモニア同化                 | 117 |
| V. 生命の起原・進化と嫌氣的呼吸          | 123 |
| VI. スルホン酸分解酵素の研究           | 128 |
| 1. タウリンの細菌酵素による分解          | 128 |
| 2. 芳香族スルホン酸の分解             | 133 |
| 論文目録                       | 137 |
| 編著書・訳書                     | 145 |

## I . 硫酸呼吸

### 1. 元素の存在と形

硫黄は生物体を構成する元素の中で第5番目から第8番目の位置を占めるもので、生物体乾燥物の0.5-1.6%程になる(図表1)。生物体の元素組成を地殻の元素組成と比較すると、C, H, N, S, Pが多く、Siおよび金属元素が少ないことが目だつ。生物が炭素と水を基盤として成立している系であることは明白である。硫黄は無機界にも多量に存するが、有機物の生成と生物の進化の過程で生物系に必然的に入ってきたのである。

生体における硫黄の形態はさまざまである。無機物として、過硫酸は存在しないにしても、6価の硫酸塩、4価の亜硫酸塩、単体、-2価の硫化物の各酸化段階が存在する。さらに硫黄原子が相互に結合したチオ硫酸・ポリチオン酸・多硫化物なども見られる(図表2)。その上に、各々の酸化段階に対応する有機形態も見出される。システイン、メチオニンなどのスルフィド、シスチンのようなジスルフィド、スルフォキシド、スルフィン酸、スルホン酸、硫酸エステルなど、結構多量に存在するものも多い。この多様性は、他の元素と比較して、硫黄の著しい特徴である。窒素は生体成分としてずっと多量に含まれており、無機物としては確かに硝酸塩からアンモニアまでの形で存するが、有機物としてはもっとも

表1. 硫黄含量

| 含量 (g/kg) |      |     |                         | 順位 |
|-----------|------|-----|-------------------------|----|
| 生物体 (乾燥量) |      |     |                         |    |
| 細菌        | 5.3  | 8   | C, O, K, N, H, P, Mg, S |    |
| キャベツ      | 16.0 | 7   | C, O, H, N, Ca, K, S    |    |
| ヒト肝       | 7-12 | 5-7 | C, O, H, N, P, K, S     |    |
| 腎         | 9    | 7   | C, O, H, N, Cl, Na, S   |    |
| 地殻        |      |     |                         |    |
| 海水        | 0.26 | 16  |                         |    |
|           | 0.91 | 6   | O, H, Cl, Na, Mg, S     |    |

還元されたアミンおよびその誘導体ばかりで、酸化されたニトロおよびニトロソ化合物の例は決して多くない。硝酸および亜硝酸のエステルは知られていない。これに対し、リンでは、無機物・有機物とも還元された形では存在せず、ホスホン酸が若干知られていることを除けば、ピロリン酸を含めたリン酸とリン酸エステルが主要な形である。図表2においては、多量に存在するものにアンダーラインを付してある。

硫黄のこの特殊な位置は、図表3に示すように、その酸化物と還元物との間の

図表2. 生体中の各元素の化合物の型

|   | Inorganic                             |                    |                        |                                 | Organic                                |                                       |
|---|---------------------------------------|--------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| N | <u><math>\text{NO}_3^-</math></u>     | $\text{NO}_2^-$    | $\text{NH}_2\text{OH}$ | <u><math>\text{NH}_3</math></u> | $\text{RNO}_2$                         | <u><math>\text{RNH}_2</math></u>      |
| P | <u><math>\text{HPO}_4^{2-}</math></u> |                    |                        |                                 | <u><math>\text{ROPO}_3^{2-}</math></u> | <u><math>\text{RPO}_3^{2-}</math></u> |
| S | <u><math>\text{SO}_4^{2-}</math></u>  | $\text{SO}_3^{2-}$ | $\text{S}^0$           | <u><math>\text{SH}_2</math></u> | <u><math>\text{ROSO}_3^-</math></u>    | <u><math>\text{RSO}_3^-</math></u>    |
|   |                                       |                    |                        |                                 | $\text{RSO}_2^-$                       | <u><math>\text{RSH}</math></u>        |
|   | $^- \text{S-SO}_3^-$                  |                    |                        |                                 | $\text{RS-SO}_3^-$                     | <u><math>\text{RSSR}</math></u>       |
|   | $^- \text{O}_3\text{S-S-SO}_3^-$      |                    |                        |                                 |                                        |                                       |
|   |                                       |                    |                        |                                 |                                        |                                       |

表3. 酸化還元電位と平衡点

| 元素 | 酸化型                       | 同じ $\text{H}_2$ 圧における<br>平衡点 | 還元型                  | 標準酸化還元<br>電位 $E_0'$ (V) |
|----|---------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|
| O  | $\text{O}_2$              | -----▼                       | $\text{H}_2\text{O}$ | +0.83                   |
| N  | $\text{NO}_3^-$           | -----▼                       | $\text{NH}_4^+$      | +0.358                  |
| S  | $\text{SO}_4^{2-}$        | ▼-----                       | $\text{H}_2\text{S}$ | -0.208                  |
| C  | $\text{CO}_2$             | ▼-----                       | $\text{CH}_4$        | -0.246                  |
| P  | $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ | ▼-----                       | $\text{H}_3\text{P}$ | -0.40                   |

標準酸化還元電位  $E_0'$  が炭素化合物における酸化還元電位に近いことによると思われる。これに対して、窒素では酸化還元電位が遙かに高く、リンでは遙かに低いので、ニトロ化合物やリン化水素などは生体内あるいは成育環境で重きを為さないであろう。図表3のように、炭素化合物の酸化体と還元体が同濃度存在する系と平衡状態にあるとすれば、硫黄は両方の形が共存するが、酸素・窒素では還元体、リンでは酸化体が圧倒的に重きを為すのは当然である。以上のことから、硫黄代謝の中間反応においては、C-S結合の生成分解とともに、硫黄の酸化還元が重要な部分を占めることとなる。

## 2. 硫黄循環と硫酸還元菌の位置

硫黄が生物体内においていろいろな形で存在することは、硫黄が生体の代謝作用によって形態変化することと関連し、その結果生物によって地球上の硫黄の循環と形態変化とが促進されている。

地球大気の5分の1を分子状酸素が占めるという現在の状況の下では、無機界における硫黄のもっとも安定な形は硫酸塩である。火山・温泉などで放出される硫化水素・亜硫酸などは酸化されて容易に硫酸になる。この変化は化学的にも進行するが、硫黄細菌の作用によって促進される。硫黄細菌には化学合成的な細菌と光合成細菌とが存在する。この化学合成細菌は、硫化水素・チオ硫酸など還元性の硫黄化合物を酸素によって酸化することによって生活のエネルギーを得ている。化学合成細菌では、自立栄養細菌に属する *Thiobacillus* などがよく知られているが、栄養的に複雑な *Beggiatoa* なども存在する。これらは酸素への電子伝達に与るチトクロム系をもつ好気性菌である。これらに対し、光合成硫黄細菌は赤や緑の色を持ち、光のエネルギーを利用して、還元的硫黄化合物によって二酸化炭素を還元・同化して有機物を生じる。酸素のないところで光合成を行う嫌気性菌である。

これに対して、硫酸塩の生物的還元は、植物・藻類や多くの微生物による同化的還元と、硫酸還元菌によるエネルギー代謝的還元によって行われる。同化的還元も亜硫酸・硫化水素を経由して行われるのであるが、その過程で硫化水素や亜



硫酸は殆ど蓄積することがない。硫化物の段階で0-アセチルセリンなどセリン誘導体と反応してシステインを形成するのが、有機硫黄生成の主要な道である。硫酸還元菌は専ら硫化水素を発生する。

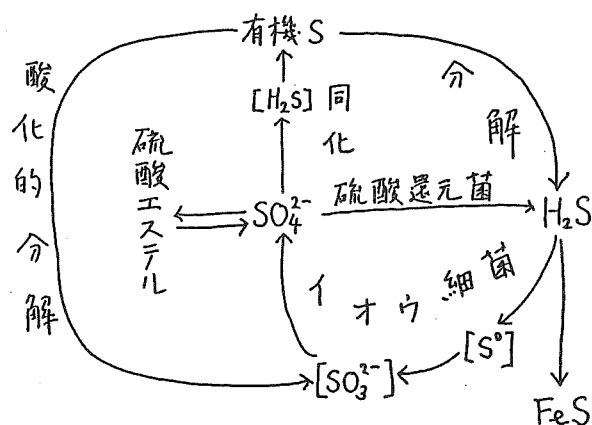
有機物の分解は無酸素的には硫化水素を生成することが多く、場合によりメチルメルカプタンやジメチルスルフィドなどを生じる。これらはメチオニンの分解物と考えられる。動物体内では酸化されて硫酸・チオ硫酸などとして尿中に排出される。システインの酸化的分解経路も知られ、スルホン酸の分解と同じように、無機物としての直接の生成物の多くは亜硫酸である。

以上をまとめると図表4のようになる。

硫酸還元菌には、孢子を形成しない *Desulfovibrio* と孢子を形成する *Desulfotomaculum* の2属が以前から知られていたが、最近硫酸を還元する種々の細菌が分離され、その属は9に達した。生化学的には *Desulfovibrio* が最もよく研究されてきた。私たちは専らこの *Desulfovibrio* を扱ってきたので、以下硫酸還元菌と言えば *Desulfovibrio* のことを指すと御了解頂きたい。

*Desulfovibrio* は偏性嫌気性細菌で、Bergey's Manual によれば7種に分かれるが、緑色の亜硫酸還元酵素を持つなど生化学的に近い種は、*D. desulfuricans*, *D. vulgaris*, *D. salexigens*, *D. africanus*, *D. gigas* の5種である。これらは形態および分解基質の種類などによって分類されている。多くは名前の示すよ

図表4. 生物による硫黄の形態変換



うにやや湾曲した棒状菌で鞭毛があり、活発に運動する。栄養が複雑なものが多く、ペプトン・酵母エキス・肉エキスの存在でよく成長するが、グルコースを利用しないものが多く、乳酸が最もよい有機基質である。ビルビン酸も利用できるが、リンゴ酸・コリンなどを利用するものもある。

こういう生理的・代謝的性質は、硫酸還元菌の生態とも関連する。それは、第1に嫌気性であり、酸素の存在では成育できないことである。実験室での純粋培養においては嫌気状態を保つ苦勞があり、2価鉄などの還元剤の添加が必要である。一度成長が始まれば硫化水素が生成し、その自動酸化により環境へ入ってくる酸素が除かれるので、成育が保護される。自然環境では好気性菌との共生が必要である。

第2には乳酸の利用である。周知のように乳酸は最も多い発酵生産物の1つで、多くの微生物によって炭水化物から作られ蓄積するが、これを嫌氣的にさらに分解代謝する生物は必ずしも多くはない。硫酸還元菌の他にはプロピオン酸菌などが知られているに過ぎない。硫酸還元菌はそれらの菌とともに、いわば第2次有機基質利用生物である。

この二つの事情は、硫酸還元菌と好気性菌ないし通性嫌気性菌との共生を成立させる。さらに現実の生態系としては、多量の有機物の存在が、順次に微生物の増殖・酸素不足・乳酸蓄積を招き、さらに硫酸が存在すれば、硫酸還元菌の多量成育と硫化水素の発生を起こすのである。ある量までの硫化水素はそこに存する鉄塩などと反応して硫化物として固定されるが、さらに増せば毒性ある硫化水素として空气中へ放出されることとなる。

硫酸還元菌の生成した硫化物の害の最大の例は、老朽化水田すなわち稲の秋落ちの発生である。湛水時の水田土壌内は嫌氣的に保たれ、硫酸還元によって生成した硫化鉄はゾル化して溶脱し、鉄の不足した土壌が生成する。これは植物に鉄分の不足を起こし、また硫化水素の遊離発生を促すことによって、結実期にある稲に害を与えることになる。かつて昭和初年、全国200万町歩の水田のうち80万町歩がその害に会ったといわれる。これは日本の農学者・土壌学者の解決すべき大問題で、硫酸還元菌の作用によることが突き留められた。現在は、深耕や客土という形でこの対策が講じられているようであるが、日本で硫酸還元菌の基礎的研究が行われたのもここに源を持つのである。 私たちが硫酸還元菌の硫酸還元過

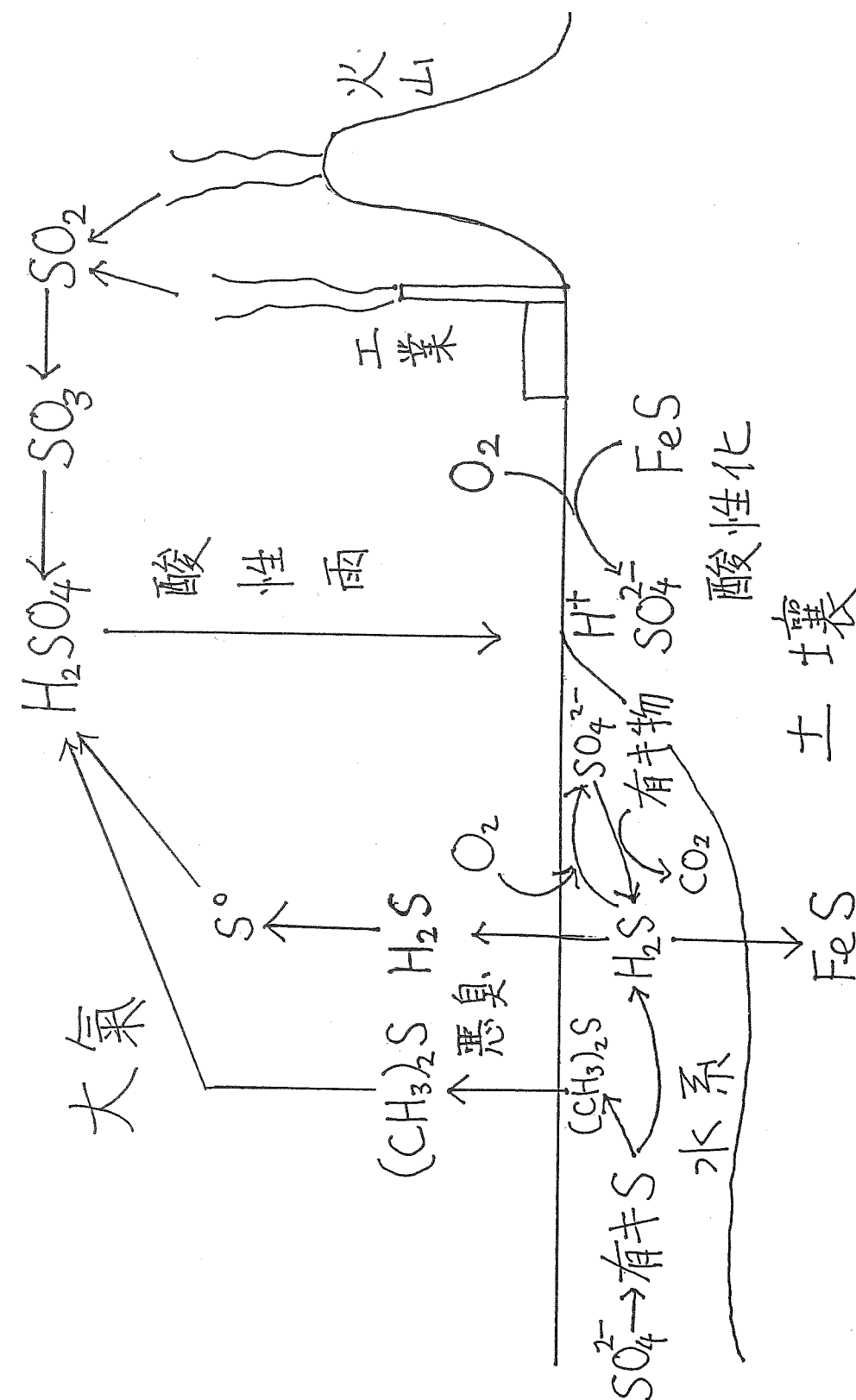
程の酵素的研究に取り掛かったとき、当時農学部農芸化学科に居られた高井康雄氏は半日を費やして、ご自身の研究を含め、土壌学における今までの硫酸還元菌の研究を詳しく話して下さい。また後に、水田土壌の研究の中心であった塩入松三郎先生のお宅に、学士院の Proceedings に論文投稿の紹介をお願いしに伺ったときのことを思い出す。

第2の例は、水系における硫化水素発生の問題である。このことで公害事件となった一つの例は、田子の浦港の硫化水素発生である。製紙工場からのパルプかすを含んだ廃液が、海岸の掘さくによって作られた港に流れ込み、そこで沈澱してヘドロとなった。微生物によって分解されて嫌氣的条件が生じ、海水中の硫酸塩を使って硫酸還元菌が繁殖し、多量の硫化水素を生じたものである。私たちは、静岡薬科大学大場不二夫教授の協力を得て田子の浦港のヘドロを採取し、硫酸還元菌をはじめとする菌の計数、硫黄化合物の分析などを行った。確かに硫酸還元菌は  $10^4/\text{ml}$  のオーダー存在したが、栄養要求が複雑で分離には到らなかった。ヘドロ中の水には塩素イオンが少なくとも海水の  $1/2$  あったにも関わらず、硫酸イオンが全く存在せず、代わりにその分だけ硫化水素が見出された。このことはヘドロ中で硫酸還元菌が活発に硫酸還元作用を行って、海水中の硫酸が殆ど硫化物に変化したことを示す。

このように有機物と硫酸塩とが存在すれば、硫酸還元菌の増殖と硫化水素の発生を起こすことになる。流水中では酸素の供給があるので硫酸還元菌は生えないが、停滞した水の中あるいは底土中では盛んに発生が起こる。海辺の若干の汽水湖においては硫黄細菌との共生が観察されている（西条、松山）。有機物汚染の進んだ海浜の潮間帯においては干潮時に硫化水素の大気中への放出が見られるという（中井）。満潮時にも当然起こっているのであろうが、硫化水素の溶解性と易酸化性によって空気中への放出は起こらない。以上のように、硫化水素の放出は現在よく見られる現象で、公害問題の一つである。

また硫酸還元菌の作用は、生成した硫化物の酸化による硫酸生成・酸性化として二次的にも現れる。昔からの海成層は多かれ少なかれ硫化物を含むが、開発などにより地表に現れると、おそらく硫黄細菌の作用により酸化が行われ、遊離の硫酸が現れる。海岸耕地・干拓地の土壌の酸性化、開発地における鉄建造物の腐食など多くの問題を引き起こしている。これらの現象は、酸性雨と並んで、人間

図表5. 硫黄の循環と環境問題





活動が硫黄循環に及ぼした作用の結果起こったものであり、環境破壊の著しい例でもある。その模式図を図表5に示す。

### 3. 硫酸還元菌の代謝と成長

私たちが研究に使った硫酸還元菌は、宮崎県都城の老朽化水田から岩崎秀一氏が分離された菌株である。従って Miyazaki 株と名付けた。培養を重ねたり、方々の研究室と授受を繰り返しているうちに2つの株が出来てしまい、Miyazaki K (IAM 12602) と Miyazaki F (IAM 12604) 株ということにした。また F株に近く、ギ酸デヒドロゲナーゼ活性を欠く Miyazaki Y (IAM 12603) 株も存在する。以下、場合によりそれぞれ MK, MF, MY 株と略記する。

当時、私のいた東大理学部化学教室の左右田研究室に植物教室の田宮研究室から話があって、硫黄代謝ということで硫酸還元菌の研究を引き継いだ。最初手掛けたのは田宮信雄氏らであった。その後田宮氏が病気になる、やる人がなくなったので、私が引き受け、卒業研究にこられた小山次郎氏と始めたのであった。後に大村恒雄氏が加わった。

当初、菌の培養には馴れないので苦労した。グルコース・ペプトンを使っていたが、極めて成長が悪かった（湿菌 0.1 g/l 程度）。しかし、乳酸が電子供与体としてよいことが分かって、培地のグルコースを乳酸で置き換えたところ菌の成長量が 1 g/l まで増加した。また鉄塩を加えないでも培養できるようになった。最初は、培養菌を生菌のまま用いて硫酸塩からの硫化水素発生を観察した。田宮氏が *Proteus vulgaris* のシステイン分解を見た方法を使った。

検討の一つは電子供与体の種類で、水素ガスを通気するか、あるいは有機基質を加えて窒素ガスを通気し、生成する硫化水素を定量する方法で行った。その結果、硫酸塩の還元には水素あるいはギ酸がよい電子供与体であった。乳酸あるいはピルビン酸もよいが、30分以上の lag があり、時間が掛かった。結局、菌の懸濁液に乳酸を加えて窒素通気するか水素を通気して、30°Cで放置して硫化水素の臭いがするようになってから、測定を開始すると再現性のあるデータが得られることがわかった。もう一つは電子受容体の検討で、硫酸の他、亜硫酸・チオ硫酸

・テトラチオン酸などが還元されることを認めた。

やがてワールブルグ検圧計を用いて硫酸還元に使われる水素ガスの消費量を測定することにした。この場合も収穫した菌をそのまま使っても駄目で、30°Cで水素通気して硫化水素を発生するようになった菌を使えば測定できることを見出した。37°Cでインキュベートした菌では水素吸収半ばで突然反応を停止するという変なことを見つけ、30°Cにしたのである。その点に注意すれば、ワールブルグの方法は再現性が極めてよく、それまでの実験下手のコンプレクスを解消したのであった。もっとも、そういうブリーインキュベーションが必要だったのは、菌の収量が低く、少量の菌を取り扱っていたときのことであった。おそらく菌が空気に曝されて酸化状態になったためであろう。

亜硫酸・チオ硫酸は何れも定量的に硫化水素まで還元されたが、硫酸は85%ぐらいまでであった。反応速度は亜硫酸・硫酸・チオ硫酸の順であった。亜硫酸と他の酸を一緒に加えると、最初亜硫酸が還元されて、その後やや遅い速度で硫酸あるいはチオ硫酸が還元されているように見える。硫酸とチオ硫酸を共存させると、水素吸収は硫酸単独の場合より遅く、チオ硫酸が硫酸還元を阻害しているように見える。このことは後に<sup>35</sup>S硫酸を使った実験から確認された。

硫酸還元菌の成長は嫌気条件を完全に作ることが困難なためか厳密な再現性を得ることが難しく、また多かれ少なかれ硫化鉄の生成を伴うので、その過程を正

確に追跡することは難しい。MK株の培養の1例を図表6に示すが、硫酸を最終電子受容体として培養したときに比べて、チオ硫酸を用いたときは成長速度がやや遅く、成長量も低下する。亜硫酸の場合は成長開始まで lag があることが多いが、成長が始まると速度は速く、成長量も多くなる。培養条件により酵素の量も変動する（後述）。培地中の乳酸は、硫酸が充分にあるときは、D, L を問わず成長に伴い殆どなくなる。

図表6. 硫酸還元菌の成長

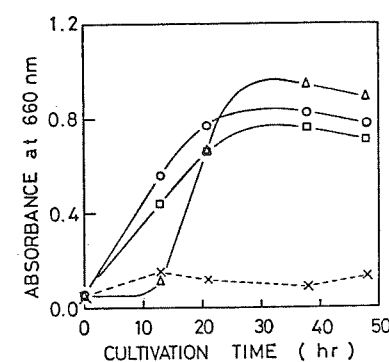


Fig. 1. Growth curve of *Desulfovibrio vulgaris*. The cells were grown on sulfate (O), sulfite (Δ), or thiosulfate (□) as an electron acceptor. The dashed line indicates the case when none of the sulfur compounds was added. For details, see the text.

#### 4. 硫酸還元菌における硫酸塩の亜硫酸塩への還元

硫酸塩の還元は困難な反応である。周知のように、濃硫酸に銅を加えて熱すれば二酸化硫黄を生じるし、亜鉛では硫化水素を発生する。しかし、希硫酸、さらには中性の硫酸イオンはどのようにしても殆ど還元されない。これは硫酸イオンの反応性の乏しさにもよるが、その熱力学的安定性にも関わっている。硫黄酸素酸の酸化還元電位を詳しく検討して見よう。1気圧の水素によるそれらの還元反応の標準自由エネルギー差  $\Delta G^\circ$  と標準酸化還元電位  $E_0'$  とを図表7に示す (pH 7)。

前に述べたように硫酸/硫化物の酸化還元電位は決して高くないが、特に硫酸/亜硫酸の標準酸化還元電位は極めて低い。1気圧の水素による還元は吸エルゴン反応で、pH 7で硫酸-亜硫酸 1:1の系と平衡にある水素の気圧は100気圧以上となる。それに対して亜硫酸から硫化水素あるいは単体硫黄への還元は発エルゴン反応で、電位も高い。しかし考えてみると、亜硫酸から2電子還元で生じるべきスルホキシル酸  $\text{H}_2\text{SO}_2$  は存在せず、極めてエネルギーの高い不安定な物質と考えられる。従ってそのレベルを通過するとすれば、亜硫酸の還元は必ずしも容易

図表7. 硫酸還元菌の自由エネルギー変化 ( $\Delta G^\circ$ ) と酸化還元電位 ( $E_0'$ )

|                                 | $\Delta G^\circ/\text{kcal mol}^{-1}$ | $E_0'/\text{V(pH 7)}$ |
|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| $\text{H}_2\text{S(pH 7)}$      |                                       |                       |
| $\text{S}^0(\text{s})$          | -6.5                                  | -0.275                |
| $\text{SO}_3^{2-}(\text{pH 7})$ | -34.6                                 | -0.038                |
| $\text{SO}_4^{2-}$              | +3.0                                  | -0.479                |
| $\text{H}_2\text{S(pH 7)}$      |                                       |                       |
| $\text{SO}_3^{2-}(\text{pH 7})$ | -41.1                                 | -0.120                |
| $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$     | +0.1                                  | -0.423                |
| $\text{SO}_3^{2-}(\text{pH 7})$ |                                       |                       |
| APS                             | -19.0                                 | -0.002                |

図表8. 炭素化合物の自由エネルギー変化 ( $\Delta G^\circ$ ) と酸化還元電位 ( $E_0'$ )

|                                              | $\Delta G^\circ/\text{kcal mol}^{-1}$ | $E_0'/\text{V(pH 7)}$ |
|----------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| $\text{CH}_4(\text{g})$                      | -27.42                                | +0.180                |
| $\text{CH}_3\text{OH}(\text{aq})$            | -10.4                                 | -0.189                |
| $\text{CH}_2\text{O}(\text{aq})$             | +5.7                                  | -0.538                |
| $\text{HCOO}^-(\text{pH 7})$                 | +0.9                                  | -0.435                |
| $\text{CO}_2(\text{g})$                      |                                       |                       |
| $\text{CH}_3\text{CH}_3(\text{g})$           | -21.11                                | +0.044                |
| $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}(\text{aq})$ | -12.63                                | -0.139                |
| $\text{CH}_3\text{CHO}(\text{g})$            | +10.34                                | -0.639                |
| $\text{CH}_3\text{COO}^-(\text{pH 7})$       |                                       |                       |

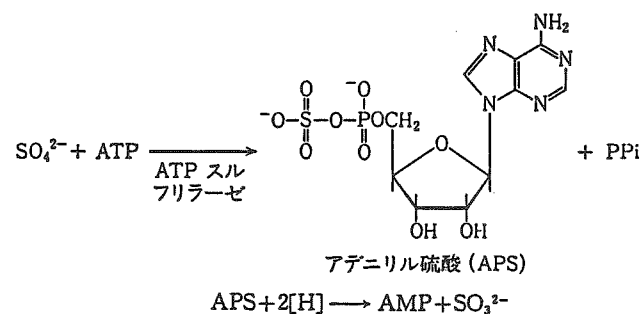
でないはずである。ただ亜硫酸は硫酸イオンと違って硫黄原子に非結合電子対を持つことができ、金属と結合して錯体を形成することもあり、反応性が高い。スルホキシル酸の次の還元段階  $\text{H}_2\text{SO}$  は単体硫黄に相当するが、これはS原子が相互に結合した  $\text{S}_8$  の状態で安定化されている。このように、硫黄酸素酸では、最も酸化が進んだ硫酸と最も還元された硫化物が安定で、中間的酸化還元状態にある物質は熱力学的・反応論的に不安定なものと思なされる。

中間的酸化還元状態の化合物が相対的に不安定であるということは、硫黄のみならず、炭素・窒素など他の元素についてもみられる。図表8に示すように、炭素の場合、 $\text{C}_1$ 化合物においても鎖状化合物においても、各酸化段階の化合物は一応安定に存在するが、中間のアルデヒドが一番高いエネルギー水準にある。これは同種分子間の酸化還元すなわち異同変換 *dismutation* によってアルコールとカルボン酸とへ変化し得る。また相互に結合してC-C結合を作り、炭水化物を生じるのも反応性およびエネルギーの高いことを示すものである。

なお中間的酸化物は、極めて高温において安定化される傾向がある。火山などの高温の熱源により供給されることもあるのではないだろうか。

このように、硫酸から亜硫酸への還元は1気圧の水素をもってしても大きなエ

エネルギーの添加を必要とする反応である。硫酸還元菌の抽出液では、亜硫酸・チオ硫酸などは還元され得るが、硫酸塩は全く還元されなかった。この抽出液に ATP を加えると硫化物に至る硫酸還元が進行する。硫酸エステル化の中間物で「活性硫酸」とも呼ばれる 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) は還元されなかったが、adenosine 5'-phosphosulfate (APS) は還元された。従って、この硫酸還元は、硫酸と ATP からの APS の生成と APS の還元の 2 段階で行われる。



ATP なしで硫酸を還元しようとする試みは、硫酸還元菌抽出液を作って最初に行った実験であるが、熱力学的に無理があるので、進行しなくて当然と思っていた。従って、酵素の研究の順番としては、最も反応のしやすかったチオ硫酸還元から始め、硫酸の還元の研究は時間的には後になる。

1957 年国際生化学連合の第 2 回国際シンポジウムが酵素化学をテーマとして東京および京都で行われたとき、私たちの硫酸還元菌のチトクロム c<sub>3</sub> の報告に対して、アメリカの Bandursky から、APS の還元を試みたかと聞かれた。その時は勿論まだやっていなかったが、その後 Lipmann らの硫酸エステル化の酵素的機作の研究が進み、J. Biol. Chem. に論文が発表されたので、その点の検討を始めた。丁度研究室の長が赤堀四郎先生から江上不二夫先生に換わったときであった。一人で Lipmann の実験を追試して、ニトロフェノールの硫酸エステル化という初めての実験をぼつぼつやっていた。その時 4 年生の藤本大三郎氏が卒業研究に來られて、一緒に硫酸還元菌をいじることとなった。ワールブルグのマノメーターの二回目の練習として、肝臓の酵素で硫酸を ATP により活性化して、共存させた硫酸還元菌の抽出液によって還元が進行するかどうか試みた。その結果、何と肝臓の酵素を含まない対照実験も若干の水素を吸収するではないか。少量ではあるが、硫化水素も明らかに出来ている。次の実験として、抽出液に ATP を加えて硫酸の還元を見たのは言うまでもない。反応が弱いことに備えて <sup>35</sup>S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> を用いたが、

反応は亜硫酸還元並みに速く、普通の分析で事足りた。

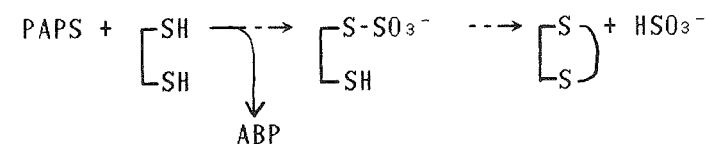
この実験が成功に終って、以前の共同研究者で東大伝染病研究所に移られた小山次郎氏に早速電話を掛けた。不在で、たまたま電話に出られた野島徳吉氏に伝言を頼んだところ、家へ帰ったら、小山氏から祝電が来ていた。

実は ATP 添加の実験をその前に試みないわけではなかったが、自分で作った ATP 標品を少量加えた程度だったので、はっきり分からなかったのだと思う。成功した実験に使った ATP はアメリカの Gest から買ったものであった。

その後の研究は中間物をはっきり同定するとともに、主に APS 還元酵素を明らかにすることに向けられた。酵素の精製を進めたが、測定がワールブルグによる水素吸収測定なので、基質の APS の合成とともに、大変労力が掛かったが、20 倍程度に比活性を高めることが出来た。

アメリカの Peck は丁度同時に同じことを発見したが、経路の確定はわれわれの方が少し早かった。後に Peck は、APS 還元酵素を逆反応で測定する方法を確立し、単一のタンパク質まで精製した。フラビンタンパク質で、分子量 21.8 万。これと較べると、われわれの到達した精製度は約 50 % というところだった。

当時、硫酸同化の道すじとしては酵母で PAPS の還元が明らかにされていたが、細菌では直接還元されるものが PAPS であるか APS であるかはまだ明らかでなかった。そこでわれわれは大腸菌について調べ、PAPS の還元で亜硫酸を作れることを明らかにした。メチルヴィオロゲン系の他にも、酵母についての報告と同じく、ジヒドロリボ酸がよい電子供与体となった。生理的には、低分子の SH タンパク質であるチオレドキシンが電子伝達体であるといわれる。このチオレドキシンは、デオキシリボヌクレオチドの生成に与るリボヌクレオチド還元酵素の電子供与体としても働く。PAPS 還元酵素は単なる還元酵素ではなくて、スルフヒドリル基へのスルフリル移転酵素である可能性もある。すなわち



ABP Adenosine 3',5'-biphosphate



図表 9. APSとPAPSの生成反応の自由エネルギー変化 $\Delta G^\circ$   
(pH 7, kcal) と平衡定数 K

| 反応                                                               | $\Delta G^\circ$ | K         |
|------------------------------------------------------------------|------------------|-----------|
| $ATP + SO_4^{2-} \rightleftharpoons APS + PP_i$                  | +11              | $10^{-8}$ |
| $PP_i + H_2O \rightleftharpoons 2 P_i$                           | -7               | $10^5$    |
| $ATP + SO_4^{2-} + H_2O \rightleftharpoons APS + 2 P_i$          | +4               | $10^{-3}$ |
| $APS + ATP \rightleftharpoons PAPS + ADP$                        | -4               | $10^3$    |
| $2 ATP + SO_4^{2-} + H_2O \rightleftharpoons PAPS + ADP + 2 P_i$ | 0                | 1         |

酵母抽出液における PAPS の還元反応は、硫酸還元菌による APS の還元と比べると 1/100 の速度で、同化に要する硫化物の供給のための還元量と、エネルギーを得るための還元量との違いが明白であった。

APS の生成は図表 9 に示すように極端な吸エルゴン反応で、平衡が出発系に大きく傾いている。生じた  $PP_i$  がピロフォスファターゼで直ちに加水分解されるので、若干緩和される。また、PAPSを作るには ATP が 1 分子余計に消費されるが、反応の平衡を生成系の方へずらすこととなり、進行が容易になる。同化的還元は少量であるため ATP の追加的消費は、その生物にとって大した障害ではない。これに対して硫酸還元菌の硫酸還元が、ATP の消費量の少ない APS の還元で行われるのは当然かも知れない。

硫酸還元菌の ATP スルフィラーゼについてはまだ検討は余り進められていない。 $^{32}P$  ビロリン酸を使って APS と反応させ、逆反応で出来た  $^{32}P$ -ATP を活性炭に吸着させてカウントする測定法を開発したが、やはり APS の補給で詰まってしまった。Postgate は硫酸還元菌のピロホスファターゼが還元により可逆的に活性化することを発見し、還元時に APS 生成が促進され、硫酸還元が進行する調節作用を提案している。

## 5. 亜硫酸の還元

亜硫酸は化学的に元来還元剤として知られ、酸化剤として使われることは稀である。従って亜硫酸の還元は硫酸程でないにせよ、特に中性においては、そう容易な反応ではない。亜硫酸還元が一番いい還元剤は硫化水素である。しかし、生じるものは硫黄単体とポリチオン酸であり、単純な電子の授受という還元反応ではないかも知れない。亜硫酸水素ナトリウムを亜鉛で還元すると、亜二チオン酸塩  $S_2O_4^{2-}$  を生じる。これは生じた  $SO_2^-$  ラジカルの二量体で、単量体と相互に平衡にある。また、亜硫酸の目立つ反応にはジスルフィド結合の切断  $R-S-S-R + HSO_3^- \rightleftharpoons R-S-SO_3^- + HS-R$  がある。この反応は無機ポリスルフィド、例えば硫黄単体やテトラチオン酸とも行われるので、亜硫酸の関与する反応を複雑にしている。さらにカルボニル化合物への付加や金属錯体の形成も見られる。

硫酸還元菌の抽出液は水素により亜硫酸を還元する。中間電子伝達体としてメチルヴィオロゲンを加えることによって促進され、3 モルの水素を吸収して硫化水素を生じる。MK株では pH 6 で亜硫酸の還元は 2 段階に進行し、最初の速い反応から遅い反応に入った時点においては、チオ硫酸の蓄積が認められる。この株では、亜硫酸の還元の方がチオ硫酸の還元より初期において速く進行する。

亜硫酸還元酵素の精製・同定と亜硫酸還元系の解析は小林邦彦氏らによって為された。測定に水素-ヒドロゲナーゼ-メチルヴィオロゲンを電子供与系に使用して

図表 10. 亜硫酸の部分的還元

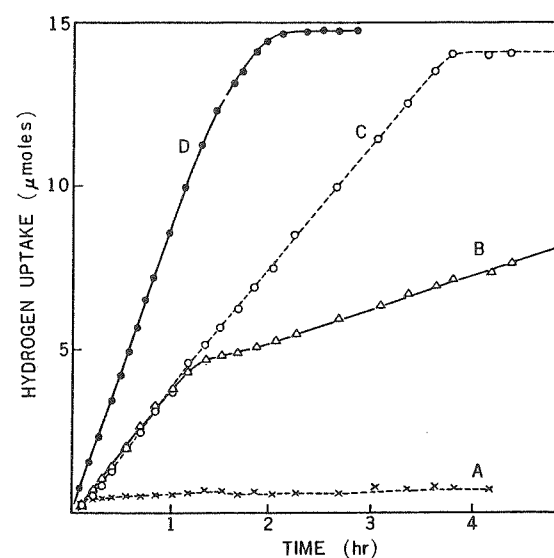


FIG. 1. Hydrogen uptake by the sulfite reductase preparations.

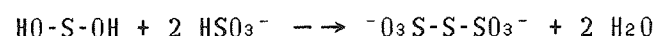
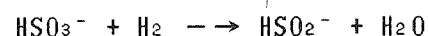
Each Warburg vessel contained 5  $\mu$ moles of  $NaHSO_3$ , 1  $\mu$ mole of methyl viologen, 100  $\mu$ moles of sodium phosphate buffer, pH 6.2, 0.1 ml of *Desulfovibrio* hydrogenase preparation and an enzyme preparation(s) in a total volume of 1.0 ml. The center well contained 0.2 ml of 10% KOH and a strip of filter paper. Gas phase was replaced with oxygen-free hydrogen. The reaction was started by dumping the sulfite solution in the side arm into the main compartment.

Temperature: 30°C.

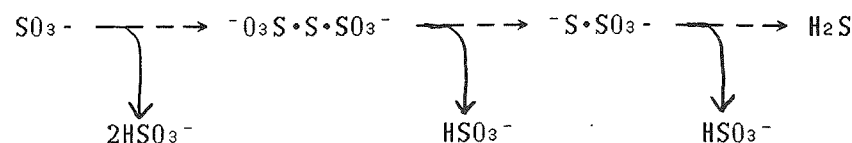
Enzyme preparations used were: A) 0.2 ml of Fraction A (1 mg of protein), B) 0.2 ml of Fraction B (5 mg of protein), C) 0.2 ml of Fraction A plus 0.2 ml of Fraction B, and D) 0.1 ml of crude extract (10 mg of protein).

ワールブルグ検圧計で水素吸収を測る手数のかかる仕事である。亜硫酸還元は抽出液でみられるのに、亜硫酸還元酵素の精製はなかなか捗らなかった。精製・単離の糸口は、チオ硫酸還元酵素精製のためのヒドロキシルアパタイト吸着によって開けた。ある吸着画分が始めは速い速度で亜硫酸を還元するにも関わらず、3モルの水素を吸収せずに、途中で突然遅くなってしまったのである(図表10, 曲線B)。このとき、亜硫酸を再添加すると反応が再び起こり、加えた亜硫酸に対して同じ比率で水素を吸収してまた遅くなった。しかし新たに同じ酵素画分を加えても反応は速くならなかった。このことは反応の低下が酵素の失活によるのではなくて、亜硫酸の消失に起因するもので、硫化水素以外の中間的還元段階の物質が生成したことを示す。それ自身では亜硫酸還元能力のない(A)他の抽出液画分を加えておくと、反応は最後まで同じ速度で進行した(C)。その物質を還元する酵素が含まれているのであろう。反応速度が中間で低下した反応液のろ紙クロマトグラフィーを行ったところ、思いもかけずトリチオン酸が出来ていることが分かった。またこれはチオシアン法による定量分析によっても確かめられた。

この結果から還元酵素による亜硫酸の還元産物が硫化物ではなくて、トリチオン酸  $^{-}O_3S-S-SO_3^{-}$  であると考えた。亜硫酸の還元の結果スルホキシル酸ができ、2分子の亜硫酸と結合すると考えれば、トリチオン酸が生成する。



この反応は、二塩化硫黄  $SCl_2$  と亜硫酸塩を反応させるとトリチオン酸を生じることからも支持される。粗抽出液はメチルヴィオロゲンの存在下においてトリチオン酸とチオ硫酸をよく還元する。これらのことから、亜硫酸の還元は、亜硫酸還元酵素 SiR・トリチオン酸還元酵素 TrR・チオ硫酸還元酵素 ThR によって3段階に進行するという説を立てた。



亜硫酸が必ずしも硫化水素にならないことが分かって、精製を進めたところ、

亜硫酸還元酵素は以前から知られていた緑色のタンパク質と一致することが分かった。これはチトクロムc<sub>3</sub>と同時に、私たちおよびPostgateによって独立に発見されたものであり、Postgateによってデスルフォヴィリジンと名付けられていた。しかし困ったことは、亜硫酸の還元産物がトリチオン酸ばかりでなく、チオ硫酸や硫化水素も含むことであった。しかも、この酵素は同条件でトリチオン酸やチオ硫酸を加えても還元しないので、これらの酸に対する還元酵素が混入しているとは考えられない。また、ポリアクリルアミドゲル中の電気泳動の結果によれば、他のタンパク質の混入は見られないが、緑色の主要バンドの他にもう1本緑色バンドが存在した。

後者については後に関康秀氏が分離して性質を比較し、やはり同様の還元反応を行う亜硫酸還元酵素であることを明らかにした。硫酸還元菌の他株、他種においても、多くの場合電気泳動でデスルフォヴィリジンの2本のバンドが存在することも示されている。

反応生成物については、反応条件を変えて検討を加えた。亜硫酸還元の際して、メチルヴィオロゲンあるいはヒドロゲナーゼの量を増すとトリチオン酸が減って硫化水素あるいはチオ硫酸が増加する(図表11)。亜硫酸濃度が高いと逆に生

図表11. 亜硫酸還元酵素反応に対するメチルヴィオロゲン・ヒドロゲナーゼ濃度の影響

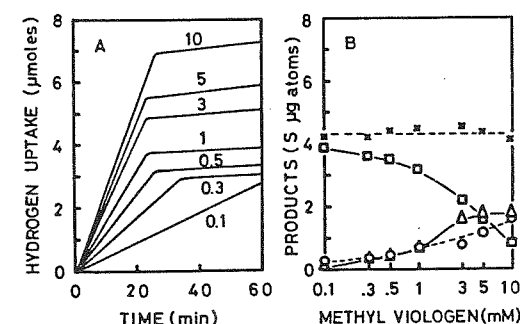


Fig. 2. Effect of methyl viologen concentration on sulfite reduction. Reaction conditions were same as in the experiment in Fig. 1, except for the concentration of methyl viologen. A) Time course of hydrogen uptake for sulfite reduction in the presence of the indicated concentration of methyl viologen (mM). B) Product formation during 60 min reaction in the presence of various concentrations of methyl viologen. —, hydrogen uptake; □, tri-thionate; Δ, thiosulfate; ○, sulfide; ×, total sulfur.

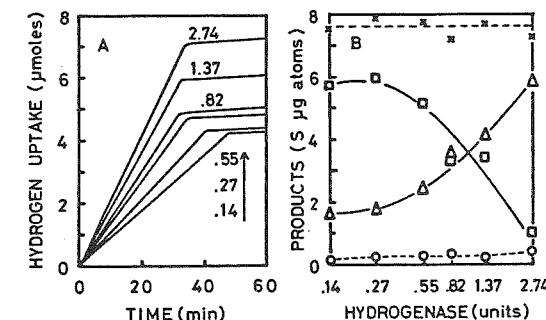
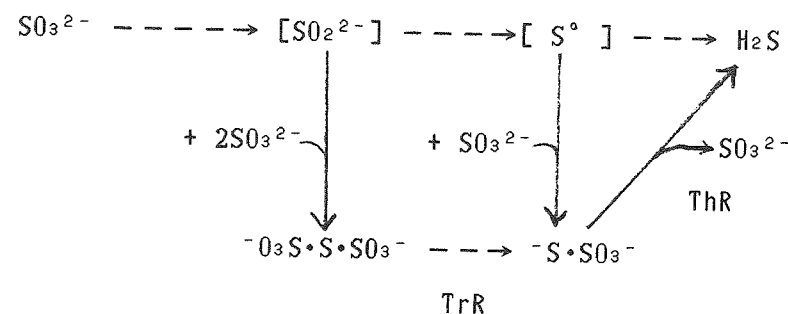


Fig. 3. Effect of hydrogenase concentration on sulfite reduction. The reaction was carried out under the standard conditions except for the amount of solubilized hydrogenase (9.5 units/mg protein). DEAE-cellulose fraction (2.2 mg of protein) was used as the enzyme preparation. A) Time course of hydrogen uptake for sulfite reduction in the presence of the indicated amount of hydrogenase (units). B) Products formed during 60 min in the presence of various amounts of hydrogenase. The symbols are same as in Fig. 2.

TABLE III. Effect of sulfite concentration on the product composition of sulfite reductase. The experiment was the same as in Fig. 4. Reaction time was 240 min.

| HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> added<br>(μmoles) | Products        |                                                             |                                             |       | S atom distribution |                                                    |                                             |
|-------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------|---------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                                                 | S <sup>2-</sup> | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup><br>(μg atoms S) | S <sub>3</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup> | total | S <sup>2-</sup>     | S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup><br>(%) | S <sub>3</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup> |
| 2.5                                             | 0.60            | 0.46                                                        | 1.62                                        | 2.68  | 22                  | 17                                                 | 60                                          |
| 5                                               | 1.02            | 0.86                                                        | 3.27                                        | 5.13  | 20                  | 17                                                 | 64                                          |
| 10                                              | 1.39            | 1.42                                                        | 6.78                                        | 9.59  | 15                  | 15                                                 | 71                                          |

Sir



ここに示すように、亜硫酸は還元されてスルホキシル酸になる。これはさらに還元を受ければ単体硫黄を経て硫化水素になるが、亜硫酸と結合すればトリチオン酸を作る。単体硫黄が亜硫酸と反応すればチオ硫酸になる。おそらく亜硫酸還元酵素は最初の還元だけに関与して、後は反応環境との化学反応によると思われる。生成したトリチオン酸・チオ硫酸の還元はそれぞれの特異的酵素によると考えられる。

酵素反応には副産物はない、酵素は極めて特異的であるという考えにこれは反するわけであるが、その例外はないわけではない。例えば、ビルビン酸デカルボキシラーゼは周知のようにアセトアルデヒドと二酸化炭素を生成するが、反応が進んで反応液の中のアセトアルデヒド濃度が高くなると、副産物としてアセトイン  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_3$  を生じる。反応の中間に出来る活性アルデヒドとアセトアルデヒドの反応によるものである。

図表 13. 亜硫酸還元酵素の分子活性と細胞内含量

| Organism,<br>Enzyme        | Assay            | Purified enzyme                                                      |                                        |                                  | Crude extract                                                        |                          |
|----------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|
|                            |                  | Specific<br>activity<br>( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ) | Mol.<br>weight<br>( $\times 10^{-3}$ ) | Molecular<br>activity<br>( /min) | Specific<br>activity<br>( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ) | Enzyme<br>content<br>(%) |
| Spinach, SiR               | H <sub>2</sub> S | 44.6                                                                 | 136                                    | 6,100                            | 0.0019                                                               | 0.0044                   |
| <u>A. nidulans</u> , SiR   | H <sub>2</sub>   | 5.0                                                                  | 600 ?                                  | 3,000 ?                          | 0.015                                                                | 0.3                      |
| <u>S. cerevisiae</u> , SiR | NADPH            | 1.85                                                                 | 604                                    | 1,100                            | 0.0048                                                               | 0.26                     |
| <u>E. coli</u> , SiR       | NADH             | 2.9                                                                  | 670                                    | 1,900                            | 0.0084                                                               | 0.29                     |
| <u>Desulfovibrio</u>       |                  |                                                                      |                                        |                                  |                                                                      |                          |
| SiR                        | H <sub>2</sub>   | 0.086                                                                | 180                                    | 15                               | 0.044                                                                | 11                       |
| Thiosulfate<br>reductase   | H <sub>2</sub>   | 141                                                                  | 85                                     | 12,000                           | 0.243                                                                | 0.17                     |
| Hydrogenase                | H <sub>2</sub>   | 1,000                                                                | 50                                     | 50,000                           | 5                                                                    | 0.5                      |
| Siroheme                   | H <sub>2</sub>   |                                                                      |                                        |                                  |                                                                      |                          |
|                            |                  |                                                                      |                                        | 2.6 (pH 6)                       |                                                                      |                          |
|                            |                  |                                                                      |                                        | 30 (pH 4)                        |                                                                      |                          |



この結果は生化学会の年会に報告したが、英文を J. Biochem. に発表する前、Peckが、亜硫酸還元酵素とデスルフォヴィリジンとが同じ物質であるという論文を発表した。ただ、生成物には触れず、2つのバンドについては会合物であろうということで済ましてしまっていた。また、亜硫酸還元の機構については、われわれの最初の段階説の影響が強く、まだその引用が結構広く行われていることは困ったことである。

亜硫酸の還元については、日本人二世のアメリカ人Akagiらがチオ硫酸が中間生成すると言う説を出していた。また、デスルフォヴィリジンはこの研究の10年以上前に発見され、部分精製もされていたのに、同定するのに時間が掛かったわけである。その原因の一つは測定が困難であったことによる。水素吸収による以外によい方法がないのであるが、生成物であるトリチオン酸およびチオ硫酸の還元が水素吸収の値に入ってくるので、精製によりトリチオン酸還元酵素やチオ硫酸還元酵素が除かれると、活性が見かけ上低くなる。このため酵素の失活と紛れて精製過程に自信が持てず、なかなか先へ進められなかった。第2には、精製された酵素標品の活性が極めて低いことによる（後出）。

1分子の酵素が1分間に作用する基質の分子数を分子活性また回転数と称するが、この亜硫酸還元酵素はその値が極めて低い。図表13に示すように数十のオーダーである。これは単にMK株のデスルフォヴィリジンのみならず、Desulfovibrio 他株・他種のデスルフォヴィリジンにも共通して言えることである。植物や菌類などの亜硫酸還元酵素や、硫酸還元菌の他酵素の分子活性は数千・数万のオーダーなので、硫酸還元菌の亜硫酸還元酵素の特徴である。但しこのタンパク質の細胞内含量は極めて高く、スペクトル測定によれば、全タンパクの10%に達することもある。従って他生物の亜硫酸還元能にひけをとらないことになる。この2つの理由で同定が遅れたのだと思う。

硫酸還元菌の亜硫酸還元酵素は分子量20万のタンパク質で、5.5万と4.5万の2種のサブユニットからできており、 $\alpha_2\beta_2$ という構造を持つと考えられる。硫酸還元菌の各種から発見され、Desulfovibrio 属の同定にも使われる。緑色で、図表14に示すように吸収帯のピークは630 nm, 410 nm 付近にあり、還元や一酸化炭素によっても殆ど変化しない。この吸収はシロヘムの存在によるが、その他非ヘム鉄・無機硫化物の存在が見出された。蛋白分解酵素によって部分的にペプ

図表14. 硫酸還元菌亜硫酸還元酵素の吸収スペクトル

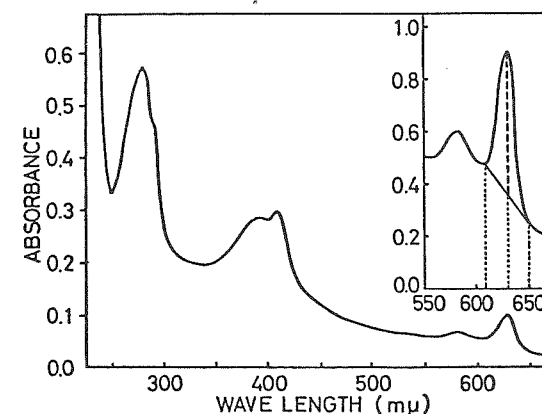
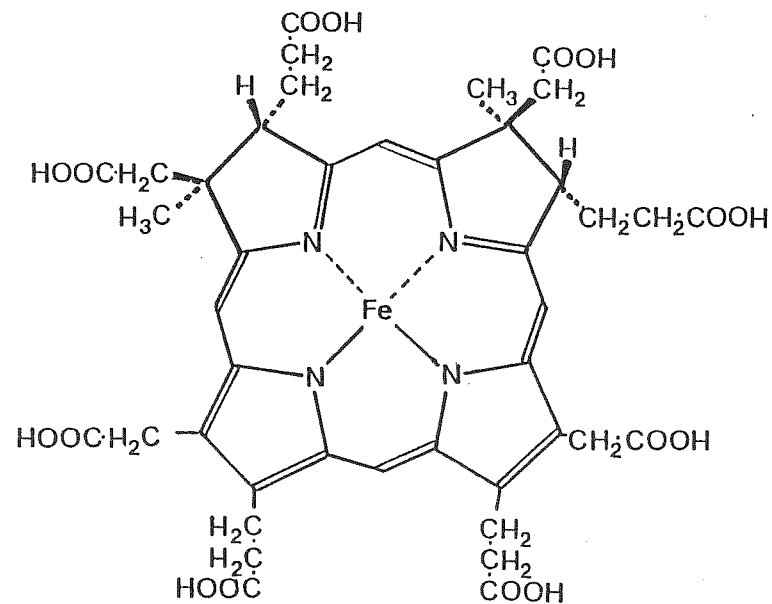


Fig. 5. Absorption spectrum of purified sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris*. The spectrum of hydroxylapatite fraction was taken in a 1-mm cuvette. Protein concentration was 3.4 mg based on Lowry's method (24) per ml of 0.01 M Tris buffer, pH 7.0. The inset indicates a spectrum taken in a 10-mm cuvette, and shows the determination method for desulfovibrin.

チド鎖が切断されても活性は殆ど変わらず保存される。亜硫酸塩の還元の至適 pH は pH 6 にあり、亜硫酸塩はこの pH では主に  $\text{HSO}_3^-$  の形にある ( $\text{pK}_2 = 7.0$ )。従って、bisulfite reductase と呼ぶ人もあるが、亜硫酸還元酵素がやや酸性領域に至適 pH を持つからといって、本当に  $\text{HSO}_3^-$  が作用を受けるのか、 $\text{SO}_3^{2-}$  が作用を受けるのか分からないので、私は sulfite reductase という言葉を使っている。硫酸還元菌の亜硫酸還元酵素を示す言葉としてデスルフォヴィリジン desulfovibrin という呼び名も保存されている。亜硫酸塩の代わりにヒドロキシルアミン、トリメチルアミン N オキシドなども還元される。阻害剤としては亜硫酸により部分阻害されるが、あまり強力ではない。

この亜硫酸還元酵素の活性部位と考えられるのはシロヘム（図表15）である。シロヘムは調べられた限り生物種を問わず全ての亜硫酸還元酵素に存在するし、光合成硫黄細菌 Chromatium の亜硫酸還元酵素にもある。このシロという名称も実は亜硫酸還元酵素の略の SiR からつけられたものである。われわれは C. vinosum からこの亜硫酸還元酵素を抽出して精製を始めたが、ドイツの Turper たちに先を越された。この酵素の場合は逆方向の硫化物の酸化に用いられているらしい。またこの菌に存在するチトクロム c' も、弱いながら亜硫酸還元酵素活性

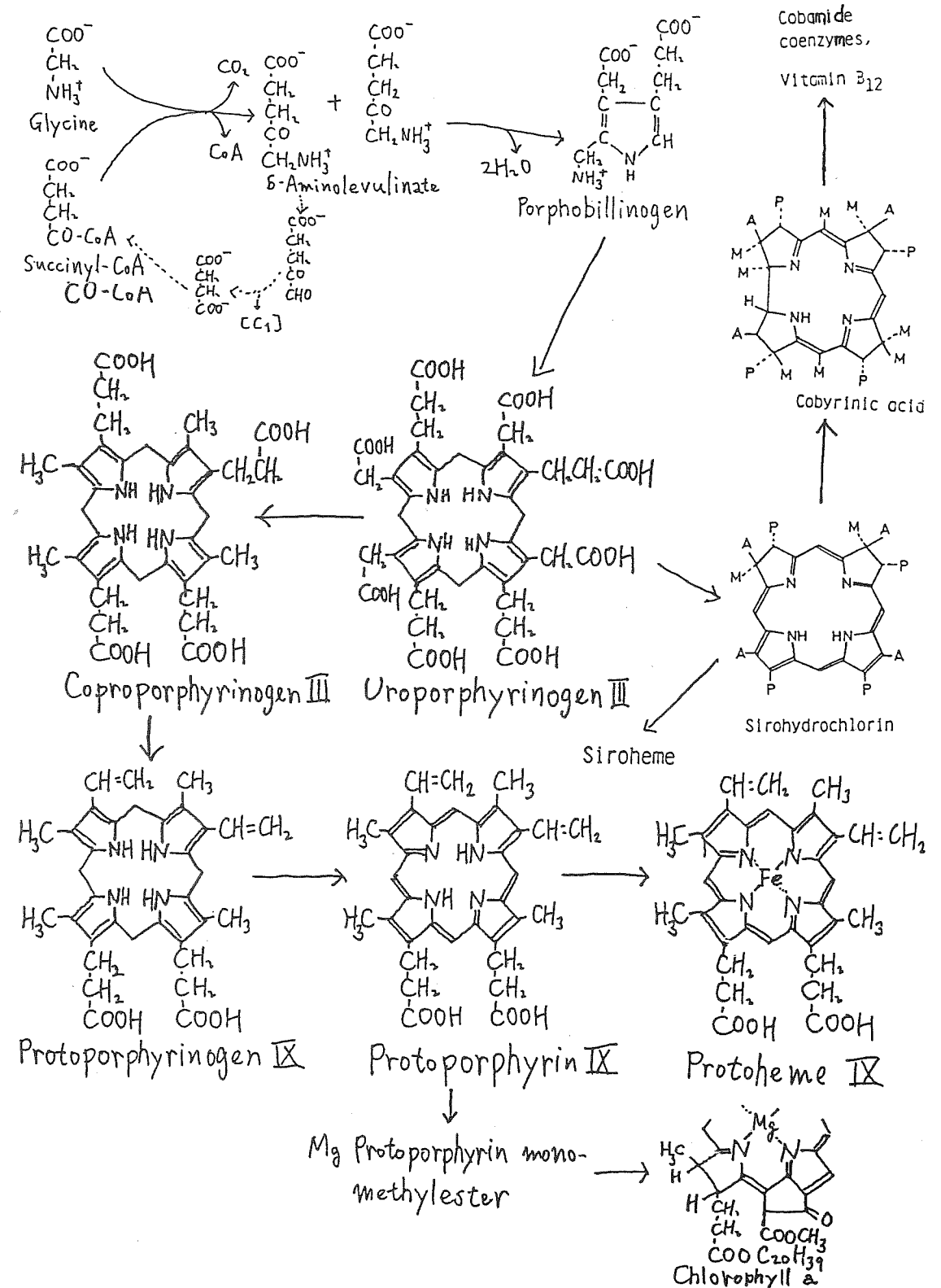
図表 15. シロヒドロクロリン



を示した。さらに若干の亜硝酸還元酵素も活性基としてシロヘムを含んでいる。多くの亜硫酸還元酵素はシロヘムに由来して褐色で、570 nm付近に吸収帯を持つ。デスルフォヴィリジンだけが緑色であるのは、ヘムの状態が異なるためらしい。吸収帯の波長が異なり、630 nm付近に存在する。酸性アセトン処理において通常の亜硫酸還元酵素からはシロヘムが分離するが、デスルフォヴィリジンからは、鉄を含まないシロヒドロクロリン sirohydrochlorin が得られる。これはアルカリ性で赤色の強い蛍光を生じるので、デスルフォヴィリジンあるいは Desulfo-vibrio 属の同定に用いられる。

生合成においてシロヒドロクロリンは、ヘム合成の中間物のウロポルフィリンから生成し、ビタミンB<sub>12</sub>、シアノコバラミン、コバミド補酵素合成の中間物である。生合成経路を図表 16 に示す。

図表 16. ヘム・シロヘム・ビタミンB<sub>12</sub>の合成経路



アポタンパク質から分離して得られたシロヒドロクロリンは、 $\text{Fe}^{2+}$ の存在で亜硫酸還元触媒活性をもつ（関康秀氏）。即ち、水素-ヒドロゲナーゼ-メチルヴィオロゲン系と共役することによって亜硫酸を還元し、水素吸収が観察される（図表17）。反応はビビリジンで阻害される。別に調製したシロヘムにも亜硫酸還元触媒活性が存在する（図表18）ので、シロヒドロクロリンと鉄とが反応して出来たシロヘムの作用によると考えられる。反応は酸性の方が速い。もっともよい条件では亜硫酸還元酵素の作用と余り変わらない（図表19）。しかし、生成物がチオ硫酸と硫化水素であること、また $K_m$ が若干大きいなどの差はある。同様にヒドロキシルアミンの還元も行われるが、これは極めて速い。ヒドロキシルアミンの場合、至適pHはアルカリ性で、最大速度は亜硫酸塩の1000倍以上に達す

図表17. シロヒドロクロリンの亜硫酸還元触媒活性

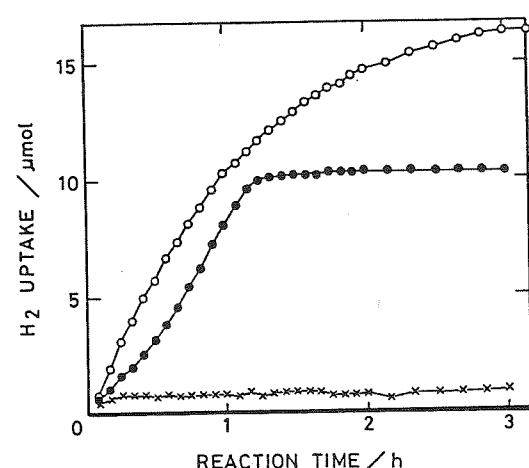


Fig. 1. Sulfite reduction by desulfoviridin and its chromophore. The reaction mixture contained either desulfoviridin or chromophore preparation, hydrogenase preparation (6 units) from *D. vulgaris*, 2  $\mu\text{mol}$  of methyl viologen, 80  $\mu\text{mol}$  of phosphate buffer, pH 6.0, and 10  $\mu\text{mol}$  of  $\text{NaHSO}_3$  in a total volume of 1.0 ml in a Warburg flask previously flushed with  $\text{H}_2$  gas. The center well contained 0.1 ml of 20% KOH adsorbed on fluted filter paper. The reaction was started by tipping sulfite from the side arm into the main compartment. The reaction was carried out at 30°C. O, Chromophore prepared from 40 nmol of desulfoviridin; ●, 4 nmol of desulfoviridin; x, in the absence of chromophore and desulfoviridin (a control for hydrogenase preparation).

図表18. シロヘムの亜硫酸還元触媒活性

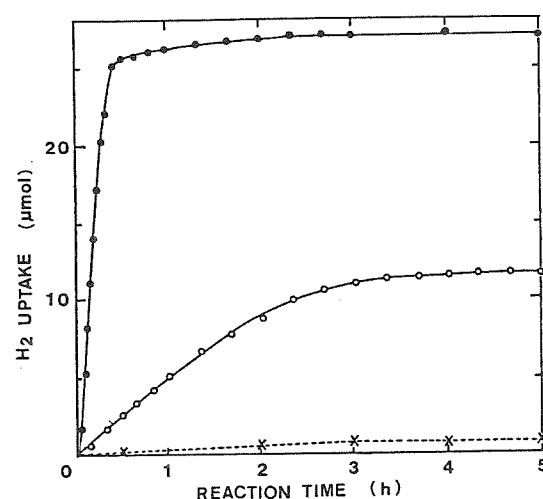


Fig. 1. Sulfite reduction by siroheme and sulfite reductase. The reaction conditions were described under "MATERIALS AND METHODS." The reaction was started by tipping sulfite from the side arm into the main compartment. O, siroheme; ●, sulfite reductase (2 nmol heme content) in place of 20 nmol siroheme; x, in the absence of siroheme and sulfite reductase (a control for the hydrogenase preparation).

図表19. シロヘムによる亜硫酸およびヒドロキシルアミンの還元

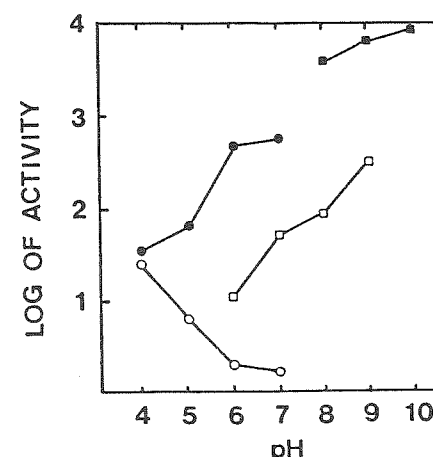


Fig. 3. Effect of pH on reducing activities of siroheme and sulfite reductase. The assay conditions were as in Fig. 1, but McIlvaine's buffer of the indicated pH and sulfite reductase (heme content of 0.28 nmol) were used. Amounts of siroheme were 2.8 and 1.4 nmol in sulfite (20 mM  $\text{NaHSO}_3$ ) and hydroxylamine reduction, respectively. O,  $\text{NaHSO}_3$  and □,  $\text{NH}_2\text{OH}$  reduction by siroheme; ●,  $\text{NaHSO}_3$  and ■,  $\text{NH}_2\text{OH}$  reduction by sulfite reductase. Activity is expressed as mol of  $\text{H}_2$  uptake per min per mol heme.

る（図表19）。

これらの還元活性はシロヘム以外にプロトヘムにも見られるが、若干弱い。

元来、補酵素は多かれ少なかれ触媒活性を持つことが多く、アポ酵素はその活性を強めること、特異性を高めること、あるいは安定性を増すことに役立っていると思われる。その例を図表20に示す。

以上のシロヘムの作用を考えると、デスルフォヴィリジンは亜硫酸還元酵素として些か奇妙な立場におかれる。確かにシロヒドロクロリンを安定化する役には

図表20. 補酵素類似体による触媒反応（酵素モデル）

|                     |                                                                         |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Pyridoxal           | amino acids degradation                                                 |
| Amines              | keto acid decarboxylation                                               |
| Thiamine            |                                                                         |
| Biopterin           | phenylalanine hydroxylation                                             |
| Heme                | peroxidase reactions                                                    |
| $\text{MoO}_4^{2-}$ | $\text{NO}_3^-$ reduction                                               |
| FeMo-Cofactor       | $\text{N}_2$ reduction                                                  |
| Siroheme            | $\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{NO}_2^-$ , $\text{NH}_2\text{OH}$ reduction |

立っているが、活性はシロヘムとあまり変わらず、低活性であるが、その代わり細胞内に莫大な量存在する（p.20, 図表13参照）。他の生物が、硫黄同化のために亜硫酸還元酵素を利用する中で、進化においてその比活性を上げることに向かったのに、硫酸還元菌では多量生産することに進んで量的に解決したとしか言いがたい。確かに硫酸還元によって発酵生産物たる乳酸を嫌氣的に酸化するのは、他に競争者がいないので、多少能率が悪くてもよかったのかも知れない。

しかし、硫酸還元菌の粗抽出液における亜硫酸還元速度は、最初の段階が亜硫酸還元酵素によるとして、亜硫酸還元酵素量から計算した速度では説明できない。抽出液における還元は遙かに速やかで、少なくとも数倍の酵素が必要である。また抽出液の調製によって異なるが、亜硫酸塩がうすいときの方が水素吸収が速いことが多く、付加物を作るビルビン酸などのカルボニル化合物が促進を示すことがある。こういうことは、精製された亜硫酸還元酵素が  $K_m = 3.6 \text{ mM}$  を示すことと矛盾する。これらのことは、あるいはトリチオン酸還元酵素やチオ硫酸還元酵素などとの協同作用によるためとも考えられるが、まだ解決に至っていない。

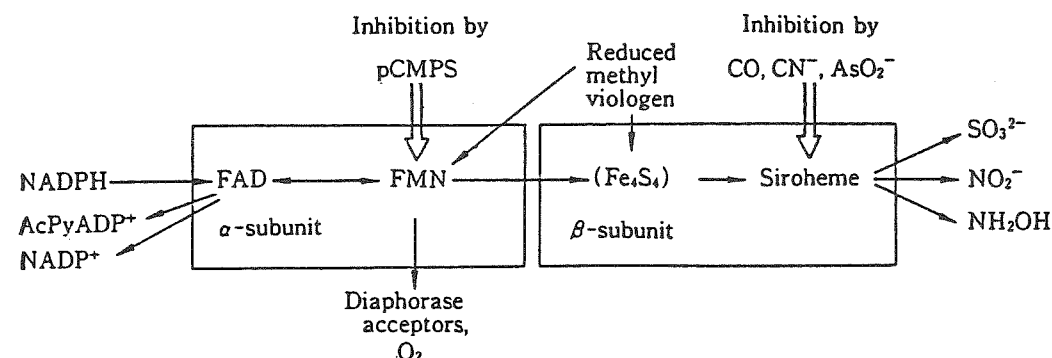
精製された亜硫酸還元酵素を用いた実験でも、濃い亜硫酸の還元においては水素吸収は数段階に進行し、速度は見かけ上不連続に変化する。これは酵素の性質というよりは亜硫酸および還元生成物の性質によるものと思われるが、まだ解析されていない。なお、前述のように亜硫酸はメチルヴィオロゲン還元型と作用して亜二チオン酸と平衡状態にあるといわれるが、チトクロム  $c_3$  還元型も亜硫酸

を還元して亜二チオン酸を生じることは、反応液の吸収スペクトルの  $315 \text{ nm}$  の吸収帯の増大からみられる。亜二チオン酸が亜硫酸還元の中間体であるという可能性も否定されていない。

他の生物の亜硫酸還元酵素は硫酸同化の過程で働くが、その構成はもっと複雑である。植物・酵母・カビにおいてはシロヘムとともにFAD, FMNを含み、あるいはさらに非ヘム鉄も存在する複雑なものである。電子供与体としてはNADPHが用いられ、図表21のような電子伝達系が存在する。生成物は硫化物のみである。これによりNADPHからの電子が他に流れることなく、確実に亜硫酸の還元に使われて、少量にせよ定常的に硫化物が供給される条件を確保したものであろう。

デスルフォヴィリジンについては、*D. vulgaris* Miyazaki K株のみならず、他にMiyazaki F株および*D. africanus*からも精製して性質を調べ、他研究室の結果とも比較した（図表22）。*D. africanus* のデスルフォヴィリジンは吸収帯の位置が  $6 \text{ nm}$  長波長にあるので、異なった性質を示すことを期待したが、著しい差はなかった。また免疫的な交差反応を行ったが、それは硫酸還元菌の他のタンパク質と一緒に後述する。

図表21. 大腸菌の亜硫酸還元酵素の分子構成



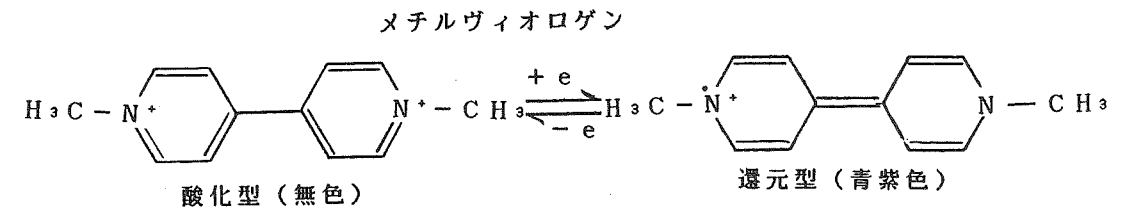
Electron flow in *E. coli* sulfite reductase<sup>24,27</sup>. AcPyADP, 3-acetylpyridine adenine dinucleotide phosphate; pCMPS, *p*-chloromercuri phenylsulfonate.



## 6. チオ硫酸還元酵素

研究の順序からいえば、還元酵素として最初に手掛けた酵素であった。硫酸還元菌の還元酵素系の研究を始めたとき、当時名大理・化学の江上研では硝酸還元酵素の研究が盛んに行われていた。それ以前、硝酸塩の還元などは化学的に非酵素的に進行すると思われていた時代があった。基質の脱水素反応により中間電子伝達体が電子を受け取って還元され、それが今度は硝酸還元酵素によって硝酸塩に電子を渡すという考えが定着し、還元型のメチレンブルーを電子供与体を用いて硝酸還元酵素の性質検討が進められていた。この考え方にならって、水素-ヒドロゲナーゼ-色素系を電子供与系として硫黄の酸素酸を還元し、水素吸収によって還元酵素の検出・定量を行おうとしたのだった。まずメチレンブルーを用いたときは、水素吸収は起こらなかった。標準酸化還元電位が高いので当然と考えて、次の実験では標準酸化還元電位の低いメチルヴィオロゲン（図表23,  $E_0' = -0.43$  V）を使用した。

図表23. メチルヴィオロゲン



この実験で、チオ硫酸がよく還元されて水素を吸収したので、出来ることから考えて、チオ硫酸の還元の研究に着手したのだった。異なった酸化還元電位を持つ種々の色素を中間電子伝達体として使ったときのチオ硫酸還元の過程を図表24に示す。 $E_0'$ の低いものの方が有効である。

ついでながらメチルヴィオロゲンを最初に下さったのは高宮篤先生だった。その後しばらくは自分で合成して使っていた。窒素中でピリジンにナトリウムを加えて4,4'-ビピリジンを作り、これをメチル化する簡単なものであったが、ナトリウム処理の後で爆発を起こして火柱が目の前に立ったことがあった。後になってメチルヴィオロゲンはパラコートとして農薬に広く使用され、試薬としても買えるようになり、危険な目に合わないで済むようになった。この物質は

図表22. 異化型亜硫酸還元酵素の比較

| Trivial name                                            | Organism (strain)                             | $M_r \times 10^{-3}$ [520, w] | Subunits [ $M_r \times 10^{-3}$ ] | Absorption maxima (nm) [ $\epsilon_{\text{cm}^2 \text{M}^{-1}}$ ]         | Physio-logical electron donor | Products detected $\text{S}^{2-}, \text{S}_2\text{O}_3^{2-}, \text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Desulfoviridin                                          | <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (Miyazaki K)    | 200~240 [115]                 | $\alpha_2, \beta_2$ [55][45]      | 280, 390, 410, 585, 628 <sup>11</sup>                                     | cytochrome c <sub>2</sub>     | +                                                                                       |
| Desulfoviridin                                          | <i>D. vulgaris</i> (Hildenborough)            | 226 [124S]                    | $\alpha_2, \beta_2$ [50][42]      | 278, 390, 408 <sup>12</sup> , 580 <sup>11</sup> , 628 <sup>11</sup> [150] | n.r. <sup>12</sup>            | +                                                                                       |
| Desulfoviridin                                          | <i>D. vulgaris</i> (Miyazaki F)               | 180                           | $\alpha_2, \beta_2$ [50][39]      | 278, 390, 409, 582, 629                                                   | n.r.                          | +                                                                                       |
| Desulfoviridin                                          | <i>D. gigas</i>                               | 200 [10.2S]                   | $\alpha_2, \beta_2$ [61, 45]      | 390, 408 <sup>11</sup> , 580 <sup>11</sup> , 628 <sup>11</sup> [200]      | n.r.                          | +                                                                                       |
| Desulfoviridin                                          | <i>D. africanus</i> (Benghazi)                | 2X10 <sup>2</sup>             | $\alpha_2, \beta_2$               | 278, 392, 412, 585, 638                                                   | n.r.                          | +                                                                                       |
| Desulfoviridin                                          | <i>D. desulfuricans</i> (Norway)              | 225 [9.8S]                    |                                   | 392, 545, 580, 720 [200]                                                  | n.r.                          | +                                                                                       |
| P-582                                                   | <i>Desulfotomaculum nigrificans</i>           | 145                           |                                   | 280, 392, 582, 710                                                        | n.r.                          | +                                                                                       |
| Desulfofuscin                                           | <i>Thermodesulfobacterium commune</i> (YSR-1) | 167                           | $\alpha_2, \beta_2$ [47][47]      | 279, 389, 576, 693 [663] [31] [89]                                        | n.r.                          | +                                                                                       |
| Bisulfite reductase II "Assimilatory" sulfite reductase | <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (Hildenborough) | 50                            |                                   | 360, 400, 590                                                             | n.r.                          | +                                                                                       |
| Sulfide/sulfur "oxidase"                                | <i>D. vulgaris</i> (Hildenborough)            | 26.8 [3.7S]                   | monomer                           | 275, 405, 545, 500 [12] [3.2]                                             | n.r.                          | +                                                                                       |
| Sulfur "oxidase"                                        | <i>Chromatium vinosum</i> (D)                 | 280                           | [42][37]                          | 280, 392, [302]                                                           | n.r.                          | +                                                                                       |
| Sulfur "oxidase"                                        | <i>Thiobacillus denitrificans</i> (RT)        | 160                           | [43][38]                          | 278, 393, [280][181]                                                      | n.r.                          | +                                                                                       |

<sup>11</sup> The deviation of the values less than 5 nm.  
<sup>12</sup> n.r.: Not reported. 1C

図表 24. チオ硫酸の還元と中間電子伝達体

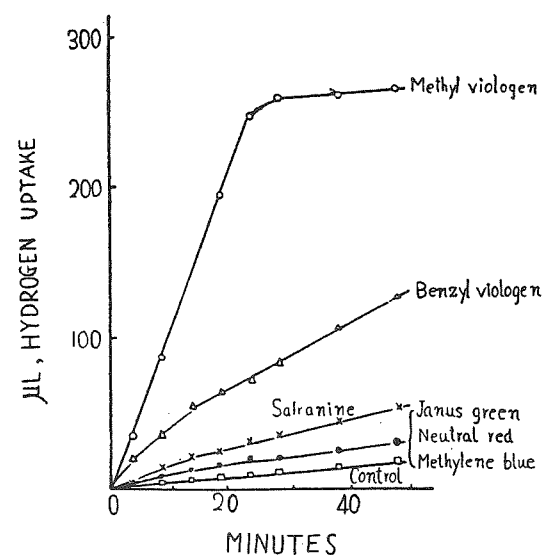
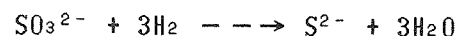


FIG. 4. Thiosulfate reduction with hydrogen in the presence of various dyes.

Conditions: Manometers were employed. Main compartments received cell-free extract 2 ml., side arms dye solution 0.3 ml. (1:2,500, but 1:5,000 in the case of benzyl viologen) and 0.05 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0.2 ml. and center wells 20% alkali, 0.2 ml. Atmosphere: hydrogen. Temperature: 30°.

無色であるが、還元するかアルカリを加えると青紫色になる。1電子還元で生じるセミキノン型の化合物の生成による。

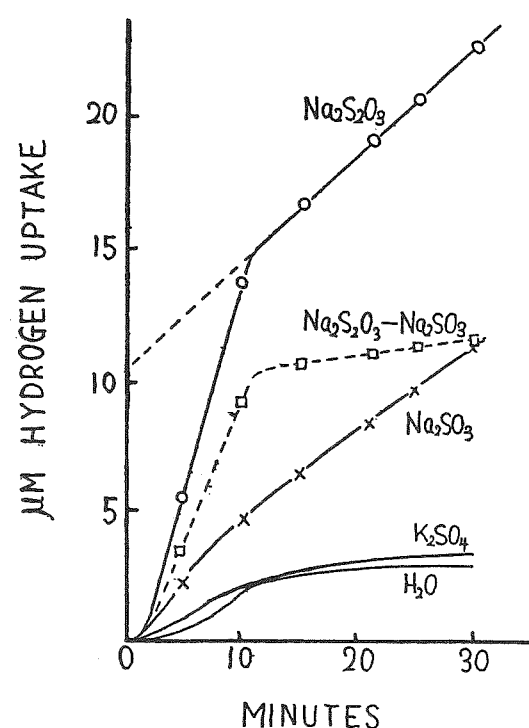
チオ硫酸還元の時間的経過を見ると、水素吸収は二段階に行われ、始めの速い吸収が終ると後半のゆっくりした水素吸収が続く。後の吸収過程を時間 0 に外挿すると、用いたチオ硫酸の量と等しいところで縦軸に交わる(図表 25)。これはチオ硫酸還元が



2つの反応の連携により行われることを示したもので、最初の速い段階は両方の反応が同時に進行していると思われる。第1段階が終った時点では反応液中に亜硫酸が検出された。また亜硫酸塩の還元はこの後半とほぼ同じ速度で行われた。

チオ硫酸還元酵素は *D. vulgaris*, Miyazaki F 株から明田川氏により精製された。この株のチオ硫酸還元酵素活性が他の株と比べて遙かに強い。硫安沈澱・DEAE-Toyopearl, UltroGel AcA34, ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及

図表 25. チオ硫酸還元過程



びポリアクリルアミドゲル電気泳動により580倍に精製し、単一標品を得た。分子量は8.5-9.8万で、サブユニット構造をもたない。チオ硫酸をメチルヴィオロゲンで還元して、1モルずつの亜硫酸と硫化水素とを与える。トリチオン酸や亜硫酸を還元しない。0.75 mM より濃いチオ硫酸によって阻害され、 $K_m$ を求めることが出来なかった。チトクロム  $c_3$  は電子供与体として有効であった。精製過程においてクロマトグラフィーで活性が若干落ちたが、鉄イオンの添加で部分的に回復したが、デスルフォヴィリジン画分の煮沸上清はさらに回復作用が強い。また、 $\alpha$ -フェナントロリン、2,2'-ビピリジンによって阻害がみられるので、鉄酵素であると思われる。

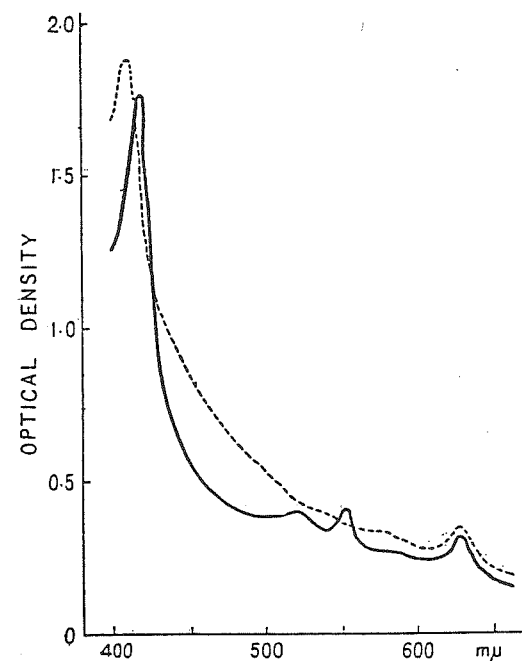
硫酸還元菌のチオ硫酸還元酵素は、*D. vulgaris*, Hildenborough から精製されている。核酸を含むが、タンパク質としては純粋で、分子量 16,300 と言われる。*D. gigas* のチオ硫酸還元酵素はまだ完全には純粋になっていないが、分子量 22万と推定されている。それらとは大分違った分子構成であった。硫酸還元菌の亜硫酸還元酵素がすべて約 20万の分子量を持ち、 $\alpha_2\beta_2$ の構造が決められているのに対して、まちまちであり、今後の検討が望まれる。菌株によりチオ硫酸還元酵素の性質がもし非常に異なっているのなら、この酵素が必ずしも硫酸還元菌に共通のものではなく、亜硫酸還元の主要経路にあるよりは補助的な役割をしていると考えられる。精製亜硫酸還元酵素は確かにチオ硫酸を生じるが、細胞内で電子供与系が強ければ、亜硫酸を硫化物まで一度に還元してチオ硫酸を生じない可能性もあるからである。チオ硫酸は硫化水素と亜硫酸の反応や硫化物の酸化などで容易に生成し、生体内にも自然環境中にも存在するので、この酵素は少なくともそのチオ硫酸の還元には関与しているのであろう。

トリチオン酸還元の酵素はまだ不明の点が多い。Drake, Akagi はトリチオン酸と亜硫酸との反応でチオ硫酸を形成する酵素を分離しているが、全ての菌株に通用するものではない。トリチオン酸の還元でデスルフォヴィリジンも必要であるという報告もあるが、必ずしもそうではなく、さらに検討することが必要である。

## 7. チトクロム $c_3$ とフラボドキシン

硫酸還元菌の培養を遠心すると、沈澱する菌体は黒灰色である。鉄塩を入れて培養したときは硫化鉄の色のために真黒だったので、微量の硫化鉄の混入によって黒くなっていると思っていた。細胞を破碎して上清を取ると、明らかに他の細菌とは違って暗褐色の液が得られる。最初は菌の生産量が低いため、うすい抽出液を使っていたので、黄褐色ということで、あまり意識しなかった。その頃は分光光度計など皆無で、吸収スペクトルを測る手段がなかった。化学教室にも、アーク燈を光源に使って、厚さを変えた液層を通した光をプリズム分光機で分け、直接写真乾板に感光させる装置があっただけだった。1950年になってベックマンの分光光度計が入ることになり、東大に来た3台のうち、田宮信雄氏の当初からの申請が効を奏して、化学教室にその一台が来て、彼が病氣だったので私がその掛になった。共同利用なので使用説明をすること、蓄電池の管理をすること、使用料を集めることなどで煩わしかったが、機械に詳しくなり、1週間に1回は自由に使えるようになった。

図表26. 硫酸還元菌抽出液の吸収  
スペクトル (--- 酸化、— 還元)



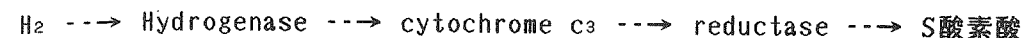
硫酸還元菌の研究に取り掛かったとき、最初からの課題の1つとしてチトクロムを調べて見るということがあったが、スペクトルを測れるようになって、最初に取り掛かったのがその仕事だった。亜二チオン酸ナトリウムを入れて各波長で吸光度を測って記録したわけだが、はっきりと553と225 nmに吸光極大があることを見出した(図表26)。また亜二チオン酸ナトリウムを入れなくても、長波長の630 nmには一つのピークが見られた。これがチトクロム  $c_3$  とデルスフオヴィリジンの発見だった。当時の研究グループは小山次郎、永井裕両氏との3人で、チトクロムは主に永井氏が実験していた。

生体酸化還元やその手段としてのスペクトルについての知識は私たちの研究室に伝統がなく、実験のみならず勉強にも大変骨が折れた。よい本も少なく、コピー手段もなく、一つ一つの前報をメモを取りながら読むより仕方がなかった。化学科の生物化学の学生実験にかこつけて、学生諸君と一緒に酸化還元酵素や補酵素の調製の練習実験をやり、体験を広げ、その後の実験に備えた。もっともそういうことが好きになって、一生練習実験ばかりやって過ごす結果になったのかも知れないが。

スペクトル検討の手段として、当時まで使われていたのはミクロスペクトロスコプという可視分光機であった。溶液の透過光をプリズム分光してスペクトル像を結ばせ、望遠鏡を使って目でみる装置で、顕微鏡の台座につけられるようになっていた。昔の大学教授というものはお金持ちで、個人で持っていられる方があったので拝借することが出来た。当時、植物教室に居られた小倉安之、医学部生化学教室にいられた吉川春寿の両先生で、二人とも親切に長期間貸して下さった。研究室にあった直径15 cmの巨大レンズで、200W電球に扇風機をかけながら、硫酸銅の溶液で熱線を吸収させた光を集めて、試料を通して見たのである。透明な液ならここまではする必要はなかったが、これで菌の濃い懸濁液の透過光をみることができ、オーバーグラス法などが使われる前までは重要な手段となった。硫酸還元菌の菌懸濁液をこの装置で観察すると、還元状態において、7色のスペクトルの中に黒い線が630, 553, 525 nmのところに見える。空気中で激しく振ると630 nmのみ残って553 nmのバンドは消え失せる。トゥンベルグ管内で脱気して水素ガスを入れて37°Cに暖めると、553, 525 nmが現れる。水素ガスを排気したのち、側室から硫酸・亜硫酸・チオ硫酸塩を加えるとバンドは薄くなる。放置すると殆ど見えなくなる。炭酸カドミウムの懸濁液を加えておくと、この消失は速やかにはっきりと観察できる。チトクロムを還元する作用のある硫化水素を抑えるためと思われる。水素を導入すると再還元が行われる。時間がたつと硫化カドミウムが出来て、黄色になった。菌抽出液においても、このチトクロムは亜二チオン酸では勿論、水素によっても還元されたが、硫酸などによる酸化は見られなかった。

630 nmのバンドは55°C、10分の処理で消失するが、チトクロムの553, 525 nmのピークは残るので、630 nmのピークは別の物質によるものと考えた。

以上のことから、硫黄酸素酸の還元において電子の伝達は次の順で行われるように思われる。



このチトクロムは空气中で酸化されるばかりでなく、水素で還元したのち、脱気して熱処理を行い、ヒドロキシルアミンを添加すると酸化された。後にこの方法で種々の物質による酸化を検討したが、その結果を図表27に示す。白木勝氏のデータである。硝酸以外の窒素化合物は酸化するのに、硫黄化合物ではテトラ

図表27. 還元型チトクロム $c_3$ と種々の化合物の反応

| Reduced cytochrome $c_3$                                                 |                                   |                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| is oxidized with                                                         | is not oxidized with              |                                                                      |
| colloidal sulfur                                                         | rongalit                          | $\text{NaNO}_3$                                                      |
| m-nitrobenzoic acid                                                      | $\text{K}_2\text{SO}_4$           | $\text{N}_2\text{H}_4$                                               |
| $\text{NaNO}_2$                                                          | $\text{Na}_2\text{SO}_3$          | $\text{NaN}_3$                                                       |
| $\text{NH}_2\text{OH}$                                                   | $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | $\text{NaPO}_2\text{H}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$                   |
| <chem>Oc1ccc(cc1)/N=N/c2ccc(cc2)S(=O)(=O)O</chem>                        | $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_6$ | $\text{Na}_2\text{SeO}_4$                                            |
| $\text{H}_2\text{SeO}_3$                                                 | $\text{Na}_2\text{S}_3\text{O}_6$ | $\text{KClO}_3$                                                      |
| $\text{H}_2\text{O}_2$                                                   | $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                  |
| $\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO})$                           | $\text{Na}_2\text{S}_5\text{O}_6$ | $\text{H}_{11}\text{PW}_{10}\text{O}_{38} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ |
| $(\text{CO}(\text{NH}_3)_6)\text{Cl}_3$                                  | cysteic acid                      | $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$                              |
| $\text{NH}_4\text{VO}_3$                                                 | cysteine-sulfinic acid            | KSCN                                                                 |
| $\text{CuSO}_4$                                                          | cystine disulfoxide               | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCS}_2\text{K}$                           |
| riboflavin                                                               | cystine                           | cyclohexanoxime                                                      |
| $2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 20\text{MoO}_3 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$ | lipoic acid                       | $\alpha$ -keloglutaric acid                                          |
| $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$       |                                   | DPN                                                                  |
| <chem>O=C1C(=O)C(=O)C(=O)C=C1</chem>                                     |                                   | $\text{CH}_3\text{CN}$                                               |

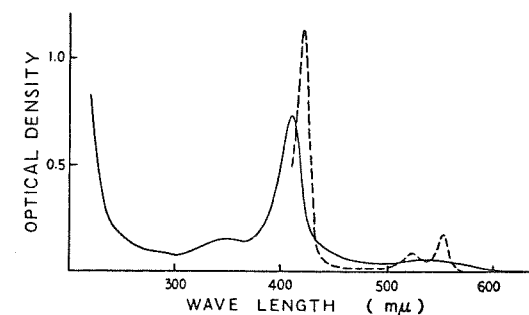
チオン酸とコロイド硫黄しか酸化能がなかった。ニトロ化合物は、水素-ヒドロゲナーゼ-チトクロム $c_3$ 系により計算量の水素を消費してアミノ化合物となる。

このチトクロムは、われわれと独立にイギリスの Postgate によって同じ頃発見された。彼によってチトクロム $c_3$ と命名され、その後この名前が広く使われている。

1925年 Keilin によってチトクロムが再発見されて以来、チトクロムは酸素呼吸の象徴と見なされてきた。嫌氣的生物には存在しないということが常識であった。名古屋大学江上研究室で硝酸の還元に関与することが発見され、硝酸呼吸の概念が提案されたが、それらは通性好気性菌であり、呼吸系の1部の借用とも受け取られる面があった。それに対して硫酸還元菌は偏性嫌気性菌で、硫酸還元以外の生活方式を殆ど持たないにもかかわらず、チトクロムが存在することは、酸素呼吸以外にもチトクロムの機能する面があることが意識され、硫酸呼吸・硝酸呼吸を含めた他の型の呼吸が存在することをはっきりさせたのであった。さらにその頃光合成への関与が見出され、チトクロムの機能はリン酸化との共役を含めて広く問題にされるようになる。また、フマル酸還元への参加も明らかにされて、嫌気呼吸がさらに一般的なものであることが分かった。

私たちは、チオ硫酸還元酵素・デスルフォヴィリジンとともにこのチトクロム $c_3$ を精製単離しようと試みた。動物心筋のチトクロムを陽イオン交換樹脂を使って精製する方法が Margoliash によって報告されたので、それを真似ることにした。1月間培養ばかりやって菌体をため、アセトン乾菌にして抽出した。これをアンバーライトIRC50のカラムを通した。当時セルロースイオン交換体はなく、タンパク質のクロマトグラフィーをするのは初めての経験であった。抽出液を流す

図表28. チトクロム $c_3$ の吸収スペクトル





に従って、カラムの上端表面が赤味を帯び始め、やがて赤い線になったときは興奮した。液を通過し終って洗浄、アンモニア水で洗うと赤い線が下方へどんどん移動し、血のように濃い溶離液のきれいだったこと！早速スペクトルを測ったら280 nm にピークがないことにも驚いた（図表28）。

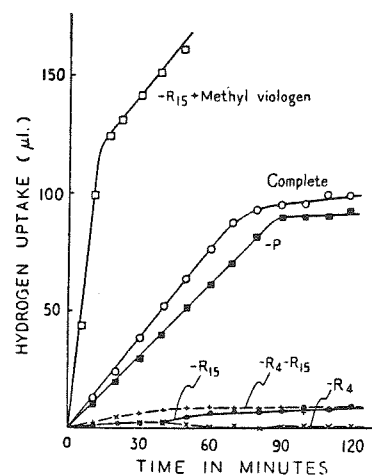
分離したチトクロムを使って最初にやった実験は、水素によるチオ硫酸の還元に対するチトクロムの作用であった。メチルヴィオロゲンを経電子伝達体として加えたとき、チオ硫酸の還元で水素吸収が進行することはすでに見ていたの、これをチトクロムc<sub>3</sub>で置き換えて、

水素 → ヒドロゲナーゼ → チトクロムc<sub>3</sub> → チオ硫酸還元酵素 → チオ硫酸

という系が成立するかどうか検討したわけである。陽イオン交換樹脂カラムの通過液を用い、沈澱状のヒドロゲナーゼ標品を補った。実験結果は図のようで、チトクロムc<sub>3</sub> (R15) だけ或は通過液 (R4) だけではチオ硫酸還元作用はないが、両者を共存 (-P) させるとチオ硫酸の還元が進行した（図表29）。ヒドロゲナーゼは通過液にもあるらしいが、別にヒドロゲナーゼ標品を加えたもの (Complete)

図表29. チオ硫酸還元に対するチトクロムc<sub>3</sub>の影響

反応液成分：ヒドロゲナーゼ(P)、チトクロム画分(R15)、酵素画分(R4)、チオ硫酸



図表30. 硫黄コロイド還元に対するチトクロムc<sub>3</sub>の影響

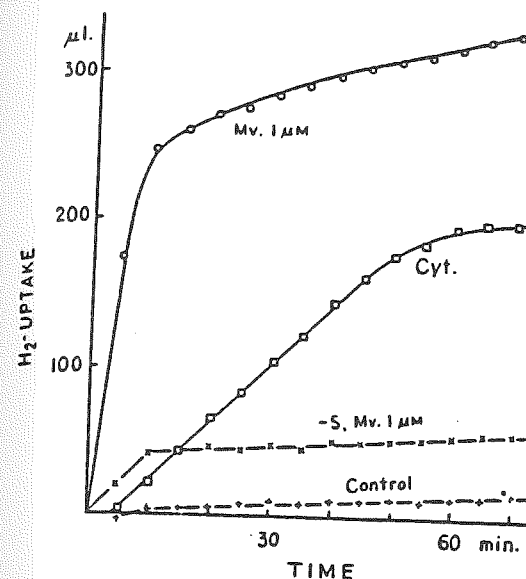
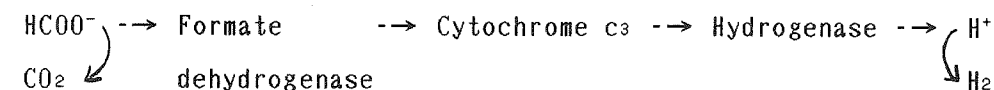


FIG. 1. Reduction of colloidal sulfur with hydrogen.

Each vessel contained 1.74 mg. N of enzyme preparation, deprived of cytochrome by passage through ion-exchange chromatography, colloidal sulfur, 6 mg. of egg albumin, 40  $\mu$ moles of phosphate buffer, pH 7.0, and water to make the volume to 1.4 ml. Atmosphere: hydrogen. Temperature: 30°. □: with 0.023  $\mu$  atom Fe of cytochrome, ○: with 1  $\mu$ mole of methyl viologen. +: without addition. ×: colloidal sulfur was replaced with supernatant after precipitation of sulfur with addition of sodium chloride to colloidal solution.

は速力が増した。硫化水素の生成もこの結果を裏書した。この実験がうまくいってチトクロムc<sub>3</sub>が還元酵素につながる事がわかったので、他の電子受容体について試みてみた。亜硫酸還元はいろいろな標品を使ってみたにも関わらず、なかなかよい結果が得られなかったが、菌の凍結融解上清を用いて、遅いながらもはっきりとチトクロムの影響を見ることが出来た。テトラチオン酸・硫黄コロイド（図表30）・ヒドロキシルアミンの還元についてもチトクロムc<sub>3</sub>の作用がみられた。硫黄コロイドの還元は結構ドラマチックで、濁りが消えて行くのが観察された。しかし、これらの物質はチトクロムを直接酸化するので、必ずしも還元酵素への電子伝達ではない。

これら一連の実験の中で、逆に水素の放出反応について検討した。ギ酸の二酸化炭素と水素への分解反応はギ酸ヒドロゲンリアーゼによって触媒されるというが、硫酸還元菌抽出液は窒素気中においてメチルヴィオロゲン添加によって活発にギ酸からガスを発生する。チトクロムc<sub>3</sub>も同様の促進作用があることを見出した（図表31）。これは



図表 3 1. ギ酸の水素と二酸化炭素への分解に対するチトクロム c<sub>3</sub>の影響

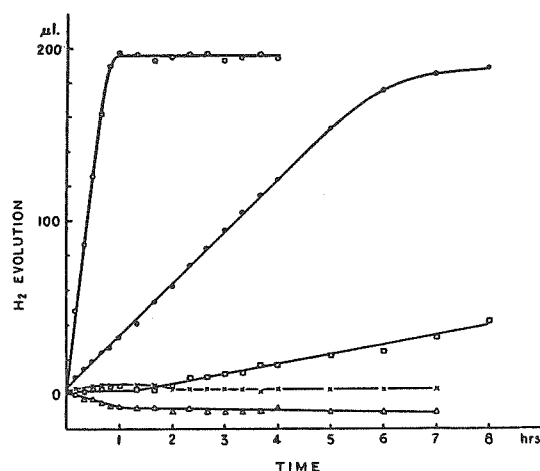


FIG. 3. Evolution of hydrogen from formate.

Each vessel contained 0.85 mg. of enzyme preparation deprived of cytochrome by passage through ion-exchange chromatocolumn, 9  $\mu$ moles of formate, 123  $\mu$ moles of phosphate buffer, pH 6.2 and water to make the volume 1.7 ml. Atmosphere; nitrogen. Center wells contained 0.2 ml. of alkali. Temperature: 30°. ●: with 0.043  $\mu$  atom Fe of cytochrome. ○: with 1  $\mu$ mole of methyl viologen. ×: enzyme was previously boiled for 5 minutes. □: without addition. △: formate was omitted.

による電子伝達が起こっていると考えられる。

丁度、その頃同じ研究室で田宮信雄氏がヒドロゲナーゼの研究を始められ、窒素中で亜二チオン酸ナトリウムで還元したメチルヴィオロゲンからの水素発生によってヒドロゲナーゼを定量する方法を開発されていた。そのメチルヴィオロゲンをチトクロム c<sub>3</sub>で置き換えてみようとした。最初の2回の実験は水素の発生は全く見られなかった。この反応系は、亜二チオン酸ナトリウムを入れると反応液が酸性になるため 0.25 M のリン酸緩衝液を使用して pH の低下を防いでいた。以前、Slater がチトクロムオキシダーゼ系の実験で、塩類の濃度が高いとチトクロムの電子伝達作用が低下すると報告していたのを思い出して、酸性化の危険を犯して緩衝液の濃度を思い切って下げてみた。丁度、酵素化学シンポジウムの直前で、私はこの実験を当時学生であった八木達彦氏に押し付けて、所用のため開催地の名古屋へ先に立ってしまった。学会の前夜八木氏から見事にチトクロムと亜二チオン酸からヒドロゲナーゼで水素が発生したことを聞き、報告に加えたこと

図表 3 2. 亜二チオン酸ナトリウム-ヒドロゲナーゼによる水素発生に対するチトクロム c<sub>3</sub>の影響

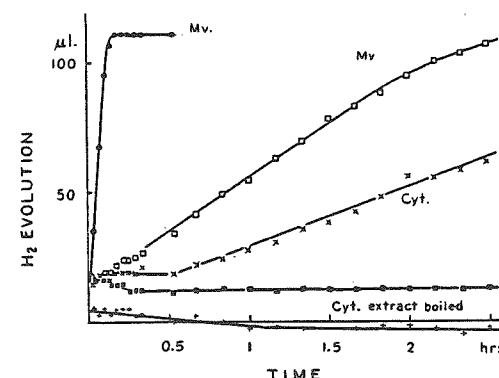
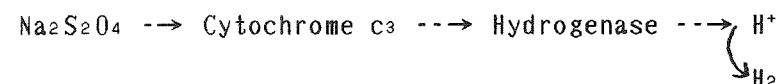


FIG. 4. Evolution of hydrogen from cytochrome reduced with dithionite.

Each vessel of Warburg manometer contained 1.15 mg. N of enzyme preparation deprived of cytochrome by passage through ion-exchange chromatocolumn, and 80  $\mu$ moles of phosphate buffer, pH 6.8, in total volume of 2.7 ml. in main compartment and 5 mg. of solid anhydrous sodium dithionite, in side arm. Atmosphere: nitrogen. Temperature: 30°. Content of the main compartments and side arms of the vessels were mixed and the reaction was started. ×: with 0.040  $\mu$  atom Fe of cytochrome. □: with 0.01  $\mu$ mole of methyl viologen. ●: with 1  $\mu$ mole of methyl viologen. ■: without addition. +: enzyme solution previously boiled was employed.

Evolution of hydrogen did not occur in the absence of dithionite.

を覚えている。図表 3 2 にその様な実験を示す。電子の流れとしては、



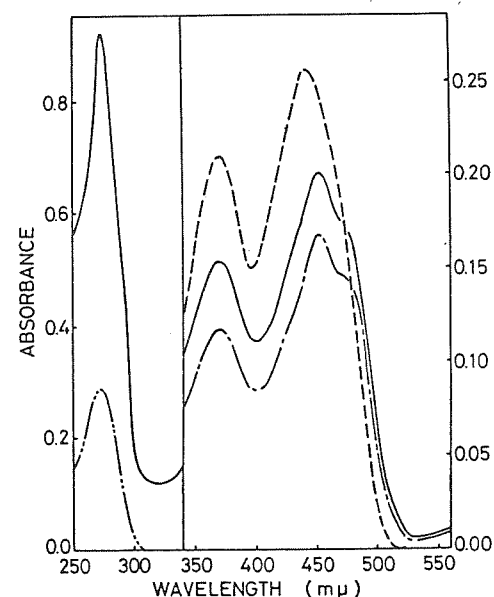
その後八木達彦氏により、このチトクロム c<sub>3</sub>が硫酸還元菌ヒドロゲナーゼの直接の電子受容体・供与体であることが示された。細胞中では細胞壁と細胞膜の間のペリプラズマにあるといわれる。

この水素発生の実験は、人になかなか信用して貰えなかった。江上先生もイギリスへ行って、Postgate がこの追試に成功したことを聞かれてから評価されるようになった。当時このチトクロムの酸化還元電位は -0.20 V と測定されていたので、その差も問題になった。私はチトクロムは 1 電子単体だから働く範囲が広

いのだと説明した。確かに当時はチトクロムが嫌気性菌にあることも常識はずれだったが、さらに電位の低い水素の発生に与るなど、とんでもないことであったに違いない。その後気が付くことは、電子伝達でもそうであるが、タンパク質同士の反応には塩類の種類とその濃度が微妙に影響することが多い。その例が出てくると、このチトクロム $c_3$ とヒドロゲナーゼの実験を思い出すのである。

その後、チトクロム $c_3$ の構造、性質、機能は八木達彦氏らによって研究された。このチトクロムはヘム $c$ を4個含む分子量1.4万の分子で、分子の大きな部分をヘムが占めることになる。アミノ酸の一次構造も決定された。クローニングも行われて、leading peptide が付いているといわれる。結晶のx線解析により立体的な分子構造も解析されている。最近、有機半導体の性質をもつことが明らかにされ、応用面が注目されている。昔、東大理学部で化学教室で、コの字型になった建物の左端でわれわれはこのチトクロムを見つけたのだが、建物の向い側の右端では、井口洋夫氏らが有機半導体を発見、その研究を進めていた。そのときは何の関係もないと思っていたが、年月を経て結びついたのは不思議な感じがする。

1963年、田川・Arnonがフェレドキシンを植物から分離し、これが光合成の電子伝達体であることが明らかにされた。それに続いて、窒素固定の電子供与体、ビルビン酸の Phosphoroclastic 反応の電子受容体、Clostridium などのヒドロ



図表33. フラボドキシンの吸収スペクトル

Fig. 10. Absorption spectra of native, dissociated, and reassociated flavodoxins. Concentration of native and treated flavodoxins as well as of FMN was  $20 \mu\text{M}$ . —, native flavodoxin; ---, PMA-treated flavodoxin; — · —, PMA-FMN-treated preparation; and ----, FMN. In ultraviolet region, only spectra of the native and PMA-treated flavodoxins were indicated. The latter had no absorbance in visible region.

ゲナーゼに直接働く電子伝達体としての機能が限定された。硫酸還元菌から取って反応との関与を調べてみようと思った。

このタンパク質は非ヘム性、無機硫化物を含む褐色の小分子の酸性タンパク質で、陰イオン交換体DEAEセルロースに強く吸着されるので、容易に分離できる。しかし、われわれのところで硫酸還元菌MK株から取れたのは褐色ではなく黄色で、フラボドキシンという物質であった。これは分子量は2.2万で、FMNを含む最小のフラビンタンパク質であって、報告にある他菌のものと特に著しい差はなかった。スペクトルおよびアポタンパクとFMNからの再構成実験を図表33に示す。フェレドキシンは取れなかった。フラボドキシンは、鉄不足のときなどにフェレドキシンの代わりに細胞内に生成し、フェレドキシンの機能をそのまま代行できると報告されている。

われわれの実験でも、ビルビン酸からの水素・二酸化炭素の発生にフラボドキシンとチトクロム $c_3$ が必要なことが示された。もう一つ著しいことは水素による亜硫酸還元への関与である。チトクロム $c_3$ とともにフラボドキシンを添加することによって、DEAEセルロースカラムを通した抽出液における亜硫酸還元が促進された(図表34)。世界の他の研究室では、硫酸還元菌からフェレドキシンが分離され、同様にビルビン酸の分解および亜硫酸還元の促進が示された。これらの実験は、抽出液をイオン交換セルロースカラムを通過させることによってフェレドキシンを吸着させその通過液を用いた実験が多い。精製した亜硫酸還元酵素とヒ

図表34. 亜硫酸還元に対するチトクロム $c_3$ とフラボドキシンの影響

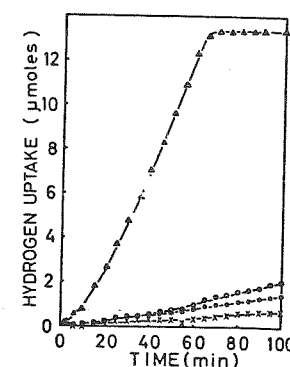


Fig. 6. Participation of flavodoxin and cytochrome  $c_3$  in sulfite reduction with hydrogen in carrier-free extracts. Hydrogen uptake for sulfite reduction was measured by manometry in the presence of hydrogenase. The reaction mixture contained 100  $\mu\text{moles}$  of phosphate buffer, pH 6.2, 5  $\mu\text{moles}$  of  $\text{NaHSO}_3$ , carrier-free extract (25 mg protein), particulate hydrogenase of *Desulfovibrio* (5 mg protein), 1 mg of cytochrome  $c_3$ , and 2 mg of flavodoxin in a total volume of 1.4 ml. The center well contained 5 mg of pyrogallol and 0.2 ml of 20% KOH. The atmosphere was hydrogen and temperature was  $30^\circ\text{C}$ . The reaction was started by tipping  $\text{NaHSO}_3$  from the side arm.  $\Delta$ , complete;  $\circ$ , complete minus cytochrome  $c_3$ ;  $\bullet$ , complete minus flavodoxin;  $\times$ , complete minus cytochrome  $c_3$  and flavodoxin.

ドロゲナーゼとチトクロム c<sub>3</sub>とフェレドキシンを用いて水素-亜硫酸還元系を再構成する実験は極めて最近八木達彦氏らによって行われた。亜硫酸還元は生起するが、極めて弱い。亜硫酸還元には、まだわれわれの知らない電子伝達体あるいは他の因子が必要なのであろう。

## 8. 再び硫酸還元菌生菌の反応について

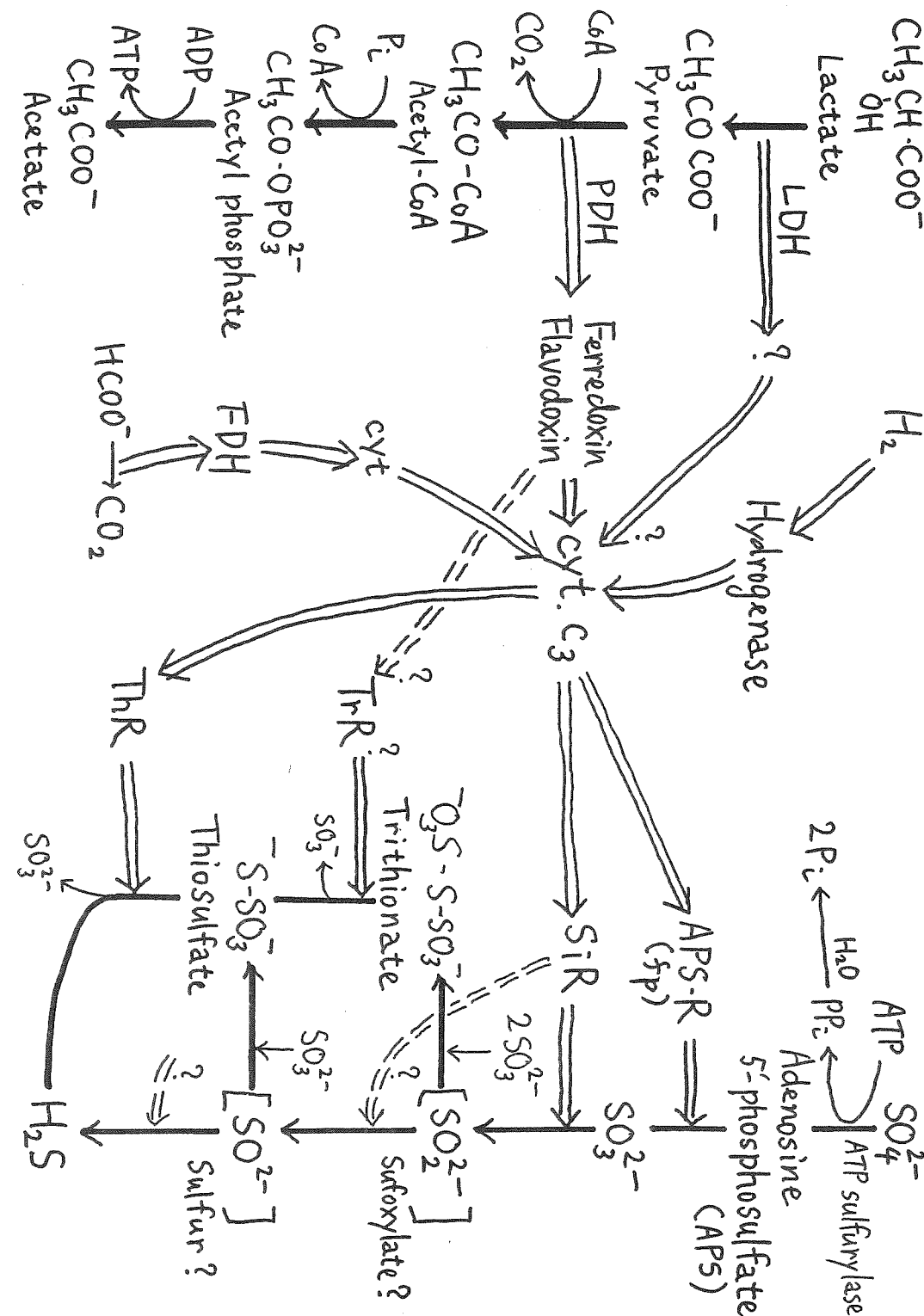
以上現在知られている酵素系と電子伝達系をまとめて書くと、図表35のようになる。

亜硫酸還元の電子伝達系とともに、特に不明なものは、乳酸の脱水素の電子受容系である。D, L-乳酸を用いて菌を培養すると、硫酸が過剰にあれば乳酸は殆ど消失している。D体もL体も利用できるらしい。菌抽出液はメチレン青など適当な色素を電子受容体として用いれば、D-乳酸が脱水素され、ピルビン酸が生成する。これは酵素の部分精製を含めて八木達彦氏により確認された。L-乳酸については、酸素に極端に不安定な脱水素酵素の存在が報告されている。いずれもNAD<sup>+</sup>を利用せず、生理的な電子受容体は不明である。これを明らかにするとともに、それにつながる他の電子伝達体あるいは還元酵素との関係を検討する必要がある。

上述のように亜硫酸還元系との電子伝達体もチトクロム c<sub>3</sub>・フェレドキシン以外にまだ不明な因子があるのかも知れない。

硫酸還元とATP生成との関係も不明である。1分子の硫酸の還元には、1分子のATP、この場合は2個の高エネルギーリン酸結合が消費される。これに対して硫酸の硫化水素への還元では化学量論的に2分子の乳酸がピルビン酸を経て酢酸まで酸化されるので、中間産物のアセチルリン酸からのリン酸基移転により2分子のATPが生成する。すなわち2個の高エネルギーリン酸結合が生成する。しかしこれだけではATPの収支はゼロとなり、余分なATPができないので、何処かで作らなければ生命を維持できないはずである。亜硫酸の硫化水素への還元の反応は結構酸化還元電位が高く、その電子伝達系に共役して酸化的リン酸化が起これば解決するが、その存在は証明されていなかった。

化学浸透説に基づけば、酸化的リン酸化が存在すれば、酸化還元反応と共役する細胞の水素イオンの放出が認められるはずである。われわれは硫酸還元菌の懸濁液に水素を通気しながら亜硫酸を加えると、媒質中の pH が下がることを観察



図表 35. 硫酸還元菌の酵素系



図表36. 硫酸還元菌細胞における水素による亜硫酸還元にと  
もなう水素イオン放出

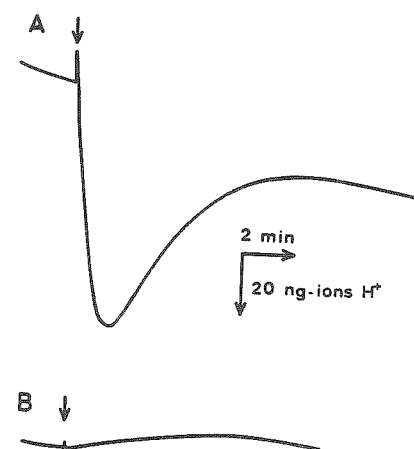


Fig. 1. pH changes associated with sulfite reduction in *D. vulgaris* cell suspensions. The cell suspensions contained 2.4 mg cellular protein/ml, 120 mM KCl, 15 mM KSCN, and carbonic anhydrase (25  $\mu$ g/ml). The gas phase was hydrogen. The extracellular pH was recorded from left to right. The suspensions were pulsed with 10 nmol NaHSO<sub>3</sub> (arrows) in the absence (A) and presence (B) of 10  $\mu$ M SF6847. A downward deflection indicates a decrease in pH.

するのに成功した。脱共役剤を加えると変化がない（図表36）。水素の代わりに窒素を通気したとき、あるいは亜硫酸の代わりに硫酸を用いたときはH<sup>+</sup>放出が認められなかった。

硫酸還元菌は有機栄養物とともに水素を通気すると成長が増加すると云われているので、硫酸の添加でATP生産が行われてもいような気もするが、あるいはこの条件ではATPの収支はゼロなのかも知れない。いずれにせよ、すくなくとも亜硫酸還元には酸化的リン酸化が共役しているのであろう。亜硫酸還元酵素と細胞膜との相互関係、電子伝達系の解明とともに将来の検討が期待される。

図表37. 硫酸還元菌諸タンパク質の種・株間免疫的交差

| Strain                            | Cross-reaction with antiserum prepared against |      |        |      |        |      |        |      |                 |    |
|-----------------------------------|------------------------------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|-----------------|----|
|                                   | MK-SiR                                         |      | MF-SiR |      | MK-Hse |      | MF-cyt |      | Somatic antigen |    |
|                                   | pptn                                           | titr | pptn   | titr | pptn   | titr | pptn   | titr | Hil             | MF |
| <i>D. vulgaris</i>                | ++                                             | ++   | +      | +    | ++     | ++   | ++     | ++   | +               | +  |
| Hildenborough <sup>r</sup>        | ++                                             | ++   | +      | +    | ++     | ++   | ++     | ++   | +               | +  |
| MK                                | +                                              | +    | ++     | ++   | -      | -    | ++     | ++   | -               | -  |
| MF                                | +                                              | +    | ++     | ++   | -      | -    | ++     | ++   | -               | -  |
| MY                                | +                                              | +    | ++     | ++   | -      | -    | ++     | ++   | -               | -  |
| <i>D. desulfuricans</i>           |                                                |      |        |      |        |      |        |      |                 |    |
| Essex 6 <sup>r</sup>              | +                                              | +    | ++     | ++   | -      | -    | -      | -    | -               | -  |
| NRC 49001                         | ++                                             | ++   | +      | +    | ++     | ++   | ++     | ++   | +               | +  |
| Norway 4                          | +                                              | +    | +      | +    | -      | -    | -      | -    | +               | +  |
| <i>D. gigas</i> <sup>r</sup>      | +                                              | +    | +      | +    | -      | -    | -      | -    | +               | +  |
| <i>D. africanus</i> <sup>r</sup>  | +                                              | +    | +      | +    | -      | -    | -      | -    | +               | +  |
| <i>D. salexigens</i> <sup>r</sup> | +                                              | +    | +      | +    | -      | -    | -      | -    | +               | +  |

Hse hydrogenase; Hil Hildenborough; nt not tested;  
pptn precipitin reaction; titr titration of enzymatic activity;

9. 硫酸還元菌諸酵素の免疫反応、種・株間交差による *Desulfovibrio* 分類・同定の検討

硫酸還元菌の各種・株から亜硫酸還元酵素・ヒドロゲナーゼ・チトクローム $c_3$ などを精製したので、熱処理菌体とともにそれらを用いて家兎を免疫して抗血清を得た。この抗血清の利用の一つとして、硫酸還元菌の異なった各種・各株の菌抽出液と反応させ、その交差性を検討した。反応には、Ouchterlonyによる寒天ゲル内における二重拡散法での沈降線の形成、酵素活性の阻害を見た。また菌体については熱処理菌体を免疫に用い、凝集反応で測定した(図表37)。

免疫抗原として、ある株のある酵素を用いたとき、得られた抗血清は当然そのタンパク質と反応するはずであり、もしその菌抽出液中の酵素の含量が充分高い場合は抽出液においても明瞭に反応する。一つの菌株の酵素に対する抗血清が他菌株の抽出液と反応することは、両株の対応する酵素がタンパク質として酷似していることを示すし、反応しないときは両者が異なっていることを表す。逆に言えば、そのような交差が起こることは2つの菌株が、少なくともその酵素については近縁のものだということができるし、多くの酵素について交差が見られれば、分類的にも近い種・株である可能性が大きい。

MK株およびMF株の亜硫酸還元酵素に対する抗血清は、程度の差はあるにせよ用いた *D. vulgaris*、*D. desulfuricans* 各株、*D. gigas*、*D. africanus*、*D. salexigens* の標準株(type culture)の抽出液すべてと交差した。沈降反応では緑色の沈澱ができる。酵素反応の阻害は必ずしも強くなく、殆ど見られないものもある(図表38)。これは反応に用いる亜硫酸還元のタンパク質としての量が比較的多いため、弱い反応ではその僅かな部分しか沈澱させることができなかったためと思われる。これに対して、MK株のヒドロゲナーゼに対する抗血清は、*D. vulgaris* Hildenborough、*D. desulfuricans* NRC 49001 としか反応しない。このヒドロゲナーゼは periplasm に存在するもので、MF株の膜結合性酵素と異なることが予想されたこととも一致している。MKの菌体に対する抗血清も同様に Hildenborough、NRC 49001 と反応し、Hildenborough 菌体に対する抗血清も同じ範囲で交差するので、この三株は同一でないにしても極めて類似のものと思われる。少なくとも、NRC 49001 は、*D. desulfuricans* ではなくて *D. vulgaris* と

図表38. 抗血清による亜硫酸還元酵素阻害

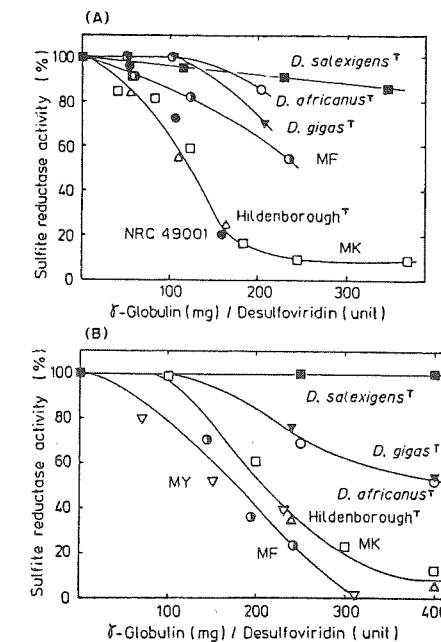
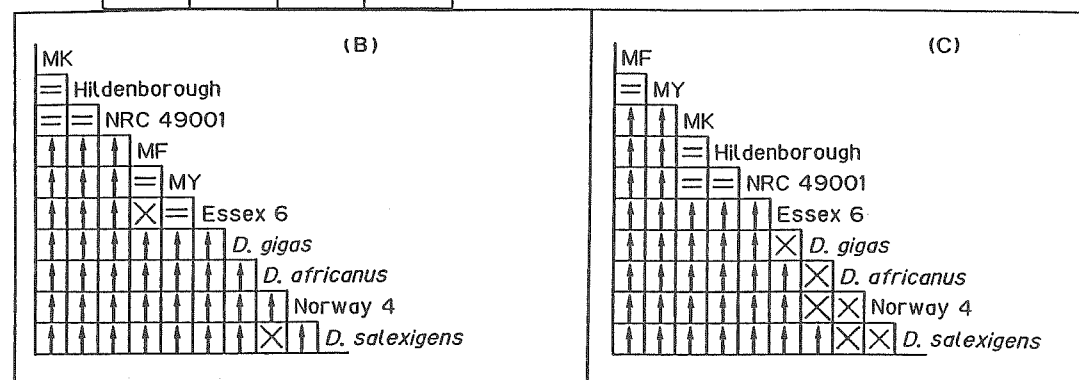


Fig 3. Immunotitration curves of sulfite reductase activities from *Desulfovibrio* spp. by the anti-sulfite reductase antisera. Soluble fractions ( $S_{105}$ ) of the extracts from strains of *Desulfovibrio* were preincubated with various amounts of antisera ( $\gamma$ -globulin fractions) against the MK (A) and MF (B) enzyme overnight at 4°C and the sulfite reductase activity in the supernatants obtained by centrifugation were assayed under the standard conditions. Desulfovibrin was determined from the absorption spectrum of the  $S_{105}$  fractions (see MATERIALS AND METHODS). The residual activity was plotted against the amount of the antiserum per desulfovibrin unit of  $S_{105}$  fraction.  $S_{105}$  fractions were prepared from the following strains: □: MK, ○: MF, ▽: MY, △: Hildenborough<sup>T</sup>, ●: NRC 49001, ▼: *D. gigas*<sup>T</sup>, ○: *D. africanus*<sup>T</sup>, ■: *D. salexigens*<sup>T</sup>.

分類し直さなければならないのではないだろうか。MF株菌体に対する抗血清はMFおよびMYとしか反応しないようである。

亜硫酸還元菌抗血清が広い範囲で、ヒドロゲナーゼ・菌体抗血清が狭い範囲で交差するのに対し、MF株チトクローム $c_3$ に対して作った抗血清はNRC49001を除けば、*D. vulgaris* 種内だけ交差する。スパーも生じないので極めて近いものと思われる。チトクローム $c_3$ は分子が小さいので、反応できる抗体の種類が少なく、交差反応が広い範囲で行われないのかも知れないが、この反応は *D. vulgaris* の同定に用いることができるかも知れない。今まで、硫酸還元菌の分類を見ると、

| (A)                | (a) | (b) | (c) |
|--------------------|-----|-----|-----|
| Precipitin pattern |     |     |     |
| Symbol             |     |     |     |



なお、亜硫酸還元酵素抗血清に対する交差反応をまとめたのが図表 39 である。この表はスパーの出方によって近縁性を示したものである。抗血清はモノクローナルのものではないので、タンパク分子の多くの部分とそれぞれ反応する抗体グロブリン各種を含んでいる。Ouchterlony 法では、中心の穴に抗血清を入れ、回りの穴には菌抽出液を入れている。図 (A) の (a) (b) (c) において、下の丸は抗血清を入れた穴、上の丸は m 株、n 株の抽出液を入れた穴とすると、抗体及び抗原はそれぞれ寒天ゲル内を拡散して中間で反応して沈澱をつくり、沈降線を示す。(a) のように沈降線が完全に融合したことは、同じ抗体が両方の抽出液と反応したことを示し、抗原の同一性あるいは近縁性を物語る。もし (b) のような形でスパーが n 側に出るとすれば、n とは反応しなかった抗体が n の作った沈降線の上側まで拡散して m 中の抗原と反応したことで、m には n にはない抗原を抗血清に対して持っていると言える。これは少なくとも亜硫酸還元酵

MK亜硫酸還元酵素に対する抗血清では  $MK > MF > D. desulfuricans$  Essex 6  $> D. gigas > D. africanus > D. vulgaris$  Norway,  $D. salexigens$  の順、NF亜硫酸還元酵素に対する抗血清では  $MK, Hildenborough > D. desulfuricans$  Essex 6  $> D. gigas > D. africanus, D. vulgaris$  Norway  $> D. salexigens$  の順で近縁であるという結果になった。やはり  $D. vulgaris$  同士あるいは  $D. desulfuricans$  同士が近く、その属間がそれに続くようである。勿論、分類には多くの菌株の性質の総合的判断が必要であるが、この免疫的分子的方法はさらに広く適用されてよいのではないと思われる。

## 11. 硝酸塩の還元

戦後、名古屋大学理学部江上研究室において行われた細菌による硝酸塩の還元、硝酸呼吸の研究は、日本の生化学の研究の敗戦後の発展の中で一つの目立った潮流であった。それは硝酸還元の呼吸としての意義を明らかにし、チトクロムの関与から比較生化学、さらには硝酸還元酵素の精製・本性の解明へと進められた。それは生体反応の意義を判らせ、酵素化学的解析へと進めるものであった。当時の若い生化学者を惹き付け、困難な研究条件の中で生化学への期待と確信を養ったのであった。

江上先生が東京へ移られてから、この方面の研究は一段落して研究者も減ったので、私は何か機会があれば手を染めてみたいと思っていた。東京にいたときから、唯一の炭素源として酢酸を用い、硝酸呼吸で生活する細菌の代謝を検討しようと思って、そういう細菌の分離を試みたこともあった。

北大へ赴任してから本格的に硝酸還元に関する研究を始めることにした。硫酸還元は呼吸としては独特な細菌硫酸還元菌だけが行う代謝であり、その独自の酵素を研究できる。しかしながら一方では一般の好気性細菌との関係が薄く、酸素呼吸あるいは発酵との切り替え・電子受容体の変化による有機基質の酸化・代謝の多様性と調節、あるいは他の嫌気性呼吸がこの菌にはみられず、そういった側面や関係、さらには代謝の進化を論じるには、硫酸還元菌の研究だけでは不足であり、硝酸還元においてみられる複雑な生化学的現象に触れてみたいと考えた。

硝酸呼吸は大腸菌のような好気性生物も行うことができ、有機基質の酸化を含めて代謝系の切り換え・調節が知られ、さらには遺伝的取扱が容易である点などが期待された。

一つの生物によって硝酸呼吸が酸素呼吸とともに行われることは、基本的には窒素酸素酸還元の標準酸化還元電位  $E_0'$  が高いことが背景にあると思われる(図表40)。硝酸還元は、先に示した硫黄酸素酸と較べて酸化還元電位が遙かに高く、炭素のレベルを越えて酸素に比することが出来るのである。

現在の酸化的な地球表面の環境で、熱力学的に最も安定な窒素の形態は硝酸である。Lewisの有名な熱力学の本によれば、熱力学的には空気中の酸素と窒素とは化合して海水に溶け、薄い硝酸になるべきであるという。幸か不幸か、反応論的

図表40. 硝酸還元の自由エネルギー変化 ( $\Delta G^\circ$ ) と酸化還元電位 ( $E_0'$ )

|                                 |                                 | $\Delta G^\circ/\text{kcal mol}^{-1}$ | $E_0'/\text{V}$ |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| $\text{NH}_4^+$                 | $\text{H}_2\text{O}$            | -60.51                                | 0.894           |
| $\text{NH}_2\text{OH}$          | $\text{H}_2$                    | -9.9                                  | -0.205          |
| $\frac{1}{2}(\text{NOH})_2$     | $\text{H}_2$                    | -33.9                                 | 0.315           |
| $\text{NO}_2^-$                 | $\text{H}_2\text{O}$            | -38.98                                | 0.426           |
| $\text{NO}_3^-$                 | $\text{H}_2$                    |                                       |                 |
| $\text{NH}_4^+$                 | $\frac{1}{2}\text{H}_2$         | -9.42                                 | -0.284          |
| $\frac{1}{2}\text{N}_2$         | $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ | -40.79                                | 1.35            |
| $\frac{1}{2}\text{N}_2\text{O}$ | $\frac{1}{2}\text{H}_2$         | -36.58                                | 1.168           |
| $\text{NO}$                     | $\frac{1}{2}\text{H}_2$         | -17.5                                 | 0.340           |
| $\text{NO}_2^-$                 | $\text{H}_2\text{O}$            | -38.98                                | 0.426           |
| $\text{NO}_3^-$                 | $\text{H}_2$                    |                                       |                 |

には進行しないためそうならないが、海洋など酸素の富んだところでは硝酸が主要な固定窒素の形態であるには違いない。従って硝酸を酸素の代わりに利用する生物は多く、高い酸化還元電位のため原則的にはどのような有機基質でも酸化できるはずである。

硝酸から亜硝酸への還元は硝酸還元酵素によって行われるが、この反応の標準酸化還元電位  $E_0'$  は +0.42 V である。亜硝酸の還元は生物の種類によって異なり、それ以上の還元が進行しないで亜硝酸で止まる場合、アンモニアまで還元される場合、酸化窒素・一酸化二窒素を経て分子状窒素に至る場合(脱窒)が知られて



いる。また硝酸塩が存在する限り、しばしばその還元が優先されて亜硝酸の還元が進行せず、亜硝酸の蓄積が見られる場合も多い。

亜硝酸の還元  $E_0'$  は、ヒドロキシルアミンを生成物とした場合 (0.055 V) も、酸化窒素  $\text{NO}$  を生成物とした場合 (0.340 V) も高く、 $\text{NH}_2\text{OH}/\text{NH}_3$  は極めて高い (0.894 V)。

ここにおいて、まず興味を惹いたのは、硝酸呼吸においては有機基質の代謝が酸素呼吸と比較してどのように変化しているか、エネルギー面を主として成長増殖はどう変わっているか、という問題であった。これを大腸菌はじめ、嫌気性細菌の *Clostridium perfringens*, プロピオン酸菌、腸内細菌 *Mitsuokella multiacidus* などについて検討した。さらには、細菌における硝酸の同化的還元はまだ明らかではなく、また偏性嫌気性細菌においてはまだ硝酸還元の酵素系が研究されず、その追求が一つの課題であった。

この節においては記述の都合から、まず偏性嫌気性細菌クロストリジウムにおける硝酸還元を述べ、代謝系の変化・増殖の関連を含めて大腸菌など各種の細菌についての研究を取り上げたいと思う。

### 1. *Clostridium perfringens* における硝酸還元

*C. perfringens* における硝酸還元の問題は、江上先生らによって提起された。硝酸還元を行う細菌には通性嫌気性細菌が多く、硝酸還元と酸素呼吸との切り換えが見られ、その電子伝達系にチトクロムが関与していることが見いだされた。呼吸系やチトクロムのない生物では、硝酸還元はどのように行われるか？ そのエネルギー獲得はどうなっているのか？ *C. perfringens* はチトクロム系がないので酸化的リン酸化は起こらないが、硝酸還元は必然的に酸化を伴うので、発酵に比べて基質レベルのリン酸化がより多く行われることは間違いない。それで「硝酸発酵」という名前が提案されたのであった。その後、東大伝染病研究所で曾良氏らが取り上げられて、抽出液レベルでの研究まで行われたが、酵素の性質・代謝系の解析には至らなかった。

この問題は私達の研究室で関幸子氏らによって明らかにされてきた。最初に細菌生理学的なことを記し、続いて酵素の研究を示したいと思う。

### 1) 硝酸発酵における生成物と菌の増殖

*C. perfringens* は、一方で食中毒の原因菌のウェルシ菌として知られ、もう一方でガス壊死を起こす病原菌でもある。用いた菌株 HM1 は、北大医学部の飯田広夫教授が病理解剖試料から分離されたガス壊死病原菌である。普通の危険性はないが、誤って注射針で組織に刺さないようにとの注意をうけた。特に酸素を除かなくても、肝片加ブイヨン培地で深層培養するとよく生える。増殖などの実験および大量培地にはペプトン・肉エキスをを用いた。この菌は、遠心分離を行っても、洗浄を繰り返すと液状に分離し、遠心管の底に固着しないので、菌量の測定が正確に行えないのが欠点である。

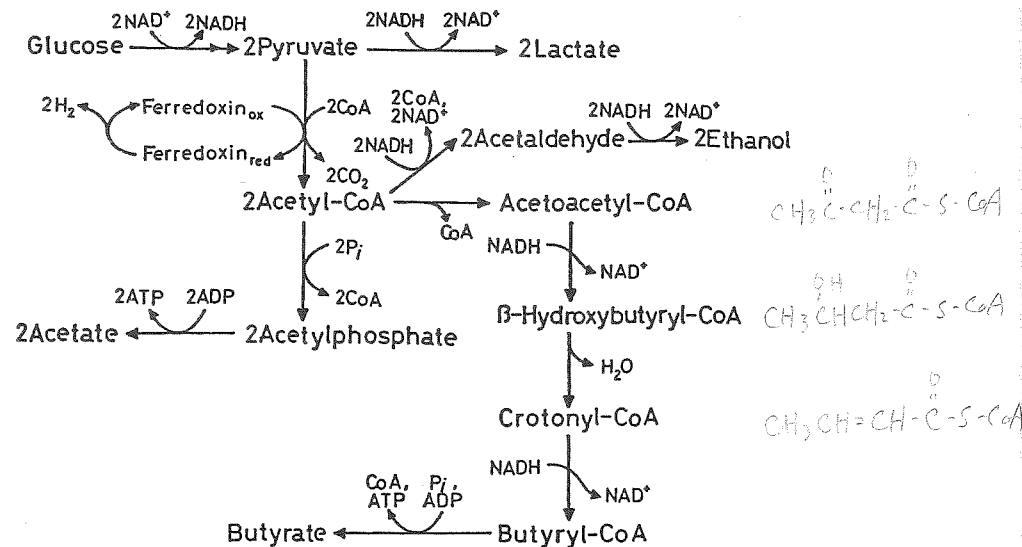
この菌は嫌氣的にグルコースを分解し酪酸を生じるのが特徴である。他に酢酸・エタノール・乳酸を生じる。水素を含むガスの発生もみられる。これに硝酸塩を加えると、還元して亜硝酸を蓄積するが、発酵生産物のうち酪酸は検出できなくなり、生成物は専ら酢酸となる。エタノールも生ぜず、また水素の発生も止まる (図表 4 1)。

図表 4 1. *Clostridium perfringens* によるグルコースの発酵  
生産物に対する硝酸還元の影響

|                          | Culture without $\text{NO}_3^-$ |     | Culture with $\text{NO}_3^-$ |     |
|--------------------------|---------------------------------|-----|------------------------------|-----|
|                          | mM                              | Eq  | mM                           | Eq  |
| Glucose consumed         | 13.2                            | 100 | 13.8                         | 100 |
| $\text{NO}_2^-$ produced | —                               |     | 2.1                          |     |
| Lactate produced         | 2.6                             | 10  | 3.0                          | 11  |
| Ethanol produced         | 8.2                             | 31  | 0.2                          | 1   |
| Acetate produced         | 9.7                             | 33  | 24.4                         | 88  |
| Butyrate produced        | 3.2                             | 24  | <0.5                         |     |
| $\text{H}_2$ evolved     | 29                              | 91  | 0                            | 0   |

この代謝経路は図表 4 2 のように示される。ピルビン酸の分解で生じたアセチルCoA 2 分子の結合で  $\text{C}_4$  骨格をもつアセトアセチルCoAが作られ、その二段階の還元で酪酸が生じることとなる。また、エタノールは、アセチルCoAからアセトア

図表 4 2. Clostridium perfringens の代謝経路



ルデヒドを経る2段階の還元で作られる。還元に使われるNADHは、グルコースからピルビン酸に至る過程で生み出されたものである。酸素が関与しない以上、何処かで還元に使われて  $\text{NAD}^+$  を再生しなければ、グルコースの分解が止まってしまう。そのためアセチルCoA・アセトアセチルCoAが還元されてエタノール・酪酸を生じるのである。硝酸があれば、NADHからの電子は硝酸還元の方へ流れ、アセチルCoAは他の目的に用い得る。このときは、アセチルリン酸を経て酢酸に到り、そのときATPを形成するのである。またピルビン酸の脱水素によりフェレドキシンが還元され、ヒドロゲナーゼにより水素イオンに電子が渡されると水素ガスを発生することになるが、硝酸の存在では硝酸還元系に電子が流れる。

生物の有機物代謝経路において、基質レベルのリン酸化でATPを生じる反応の中で、アルデヒドの酸化あるいはアシルCoAの分解がもっとも一般的なものであるが(図表43)、前者は勿論、後者もその生成にカルボキシル基形成を必要とする点において、酸化が前提となる。従って、ATPを基質レベルで生じるには酸化が必要であるが、嫌気条件ではその酸化に共役して還元を行わなければならない。そのため、獅子の分け前として、分解すれば容易にATPを作ることの出来る折角のア

図表 4 3. 基質レベルのリン酸化反応

| 生成高エネルギーリン酸化化合物の型        | 生成反応                                                                                                                                                               | 反応を含む過程の例   |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| RCOOP                    | $\text{RCHO} + \text{Pi} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{RCOOP} + \text{NADH}$ (アルデヒド酸化)                                                                          | EMP         |
| "                        | $\text{RCO-SCoA} + \text{Pi} \rightarrow \text{RCOOP} + \text{HSCoA}$ (チオエステル分解)                                                                                   | ピルビン酸分解     |
| "                        | $\text{CH}_2\text{OHCOCHOH-R} + \text{Pi} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOP} + \text{OCH-R}$ (ホスホクトラゼ反応)                                                           | PK          |
| ATP(GTP)                 | $\text{RCO-SCoA} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{RCOO}^- + \text{ATP}$ (チオエステル分解)                                                                       | TCA         |
| ATP                      | $\text{Formyl-THF} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{THF} + \text{HCOO}^- + \text{ATP}$ (ホルミルTHF分解)                                                       | プリン分解       |
| ATP                      | $^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{COO}^- + \text{DH}_2 + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{D} + \text{ATP}$ (グリシン還元) | Stickland反応 |
| $\text{H}_2\text{NCOOP}$ | $\text{H}_2\text{NCONHR} + \text{Pi} \rightarrow \text{H}_2\text{NCOOP} + \text{RNH}_2$ (ウレイド分解)                                                                   | アルギニン、プリン分解 |

THF: テトラヒドロ葉酸,  $\text{DH}_2$ : 適当な水素供与体

図表 4 4. 有機物の酸化還元電位 ( $E_0'$ )

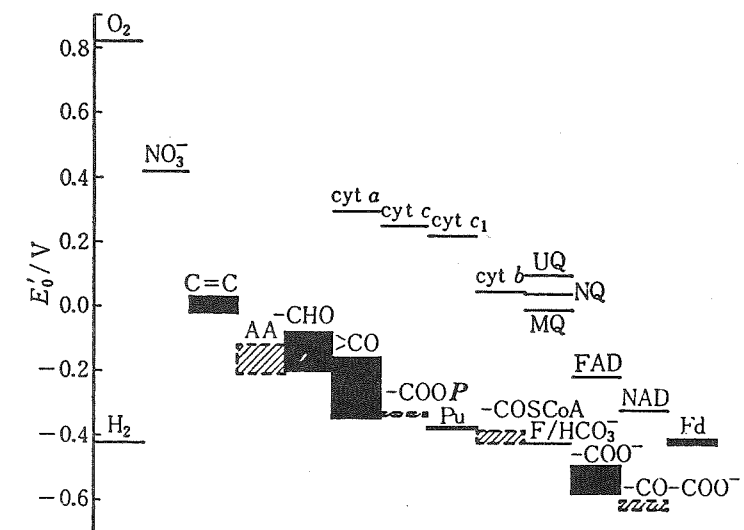


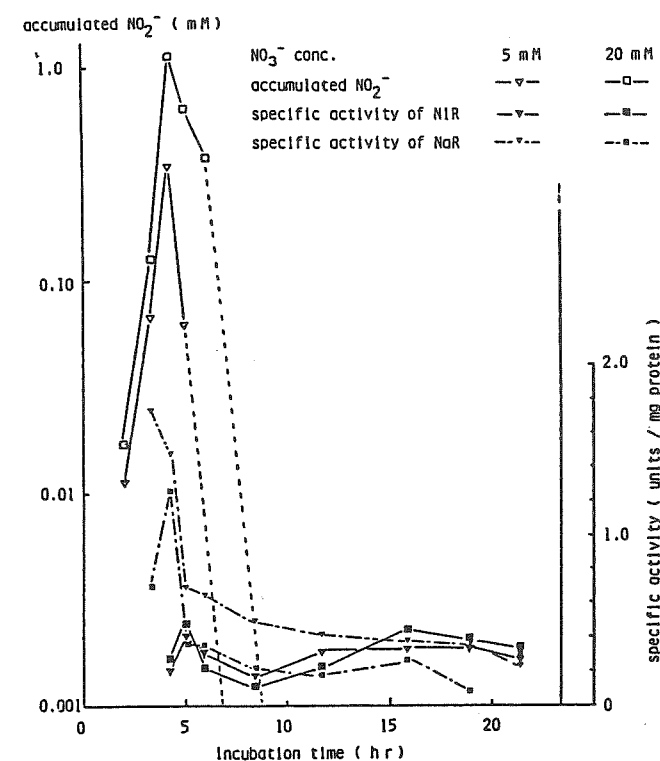
図 3.2 有機物酸化還元系の  $E_0'$ . 黒地は  $E_0'$  の範囲, 斜線部分は条件によって  $E_0'$  が変化する系を示す. cyt: チトクロム, UQ: ユビキノン, NQ: ナフトキノン, MQ: メナキノン, Fd: フェレドキシン, C=C: 2重結合のH付加, AA: アミノ酸/ $\alpha$ -ケト酸, -CHO: アルコール/アルデヒド, >CO: アルコール/ケトン, -COOP: アルデヒド/アシルリン酸, Pu: プリン, -COSCoA: アルデヒド/アシルCoA, F: ギ酸, -COO<sup>-</sup>: アルデヒド/カルボン酸, -CO-COO<sup>-</sup>:  $\alpha$ -ケト酸/カルボン酸+ $\text{CO}_2$ .

セチルCoAなどを還元して、酸化還元の収支をとるのである。還元としてもっといい方法は水素イオンに電子を渡して水素ガスを発生する反応だが、 $H^+ / H_2$ は標準酸化還元電位が低い ( $-0.42 V$ ) ので、さらに電位の低いピルビン酸の酸化 ( $CH_3COO^- + CO_2 / CH_3COCOO^-$ ,  $-0.53 V$ ) でしか賄えない (図表44)。嫌気的なエネルギー生産反応についていえば、むしろ電子受容体が不足しているのであって、なるべく有利な還元反応が望まれるわけであり、多くの型の発酵が存在するのは正に異なった各種の受容体を用いることによる。有機基質の還元反応においては、化合物の型によって  $E_0'$  が異なるが、もっとも高いのは  $C=C$  二重結合の還元である。この意味で酪酸・コハク酸の生成は多量のエネルギーを生み出し、ATPの生産と共役することも有り得る。硝酸塩の還元は遙かに電位も高く、また有機物を還元に戻す必要がなくなり、ATP生産に使用できるという意味でも、さらにより還元反応である。*C. perfringens*の場合、硝酸塩があればアセチルCoAなどは電子受容体として用いられなくなって、硝酸塩の還元に切り替えられるのである。

しかし、このことはエネルギー面、すなわちエネルギー摂取の結果である菌の成長の効率面からはっきり実証されなかった。細胞構成の材料として十分な栄養を与えたとき、成長量はエネルギー摂取の量に比例するはずであり、もし硝酸還元でより多くのリン酸化が行われていれば、同じグルコース消費量でも成育菌量は増加するに違いない。しかし、硝酸塩の添加・無添加で成長量の比較を行ったところ、殆ど変化がなかった。両方の条件において、成長速度も十分高くまた等しく、菌の成長の到達点も殆ど差がなかった。後になって、アメリカの Hassan と Hall が同様の実験を行い、より低い濃度の硝酸塩の存在において、成長量が無添加に比べて若干高くなるという結果を出しているので、おそらくわれわれの場合は硝酸塩の濃度が高く、必ずしも最適な条件ではなかったと考えられる。

もう1つの可能性としては、クロトニルCoAのブチリルCoAへの還元は標準酸化還元電位が高いので、その段階で酸化的リン酸化を行っているのかも知れない。そうすれば最終電子受容体が硝酸に変わっても、ATPの生産量は変わらないことも有り得る。しかし、多くの酸化的リン酸化関与の酵素のごとく、クロトニルCoA還元酵素が膜内にあるという証拠はないし、勿論チトクロムは存在しないので、必ずしもこのような酸化的リン酸化が起こっているかどうかは不明である。

図表45. *Clostridium perfringens* 成長時における亜硝酸と還元酵素生成



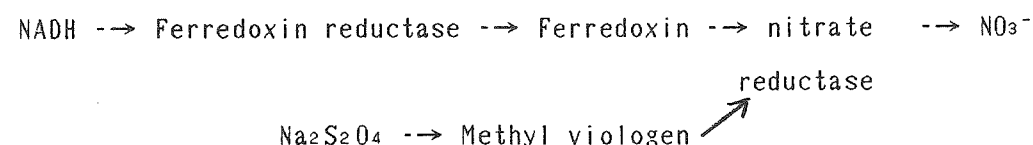
なお、この菌の硝酸還元酵素は誘導性であり、硝酸塩を添加して培養した菌は硝酸を還元するが、無添加で培養したものは硝酸を還元しない。硝酸還元の結果、亜硝酸を蓄積するが、硝酸がなくなると亜硝酸は減少し、アンモニアになる (図表45)。

また、タンゲステン酸を添加して培養すると、硝酸塩の存在でも硝酸還元活性を示さない。モリブデン酸を添加し共存させたときは還元を行う。これらの点は大腸菌などと同じく、硝酸還元酵素がモリブデン酵素であることを示す。また、大腸菌と同じく塩素酸塩の存在で成長しないが、自然突然変異によって生じた硝酸還元酵素欠失変異株は耐性で、塩素酸の存在で成長し、分離することが出来る。

## 2) 酵素系の研究

*C. perfringens* の静止菌はグルコースを用いて、嫌気条件で硝酸塩を亜硝酸によく還元する。抽出液ではメチルヴィオロゲン + 亜二チオン酸の他に NADH ある

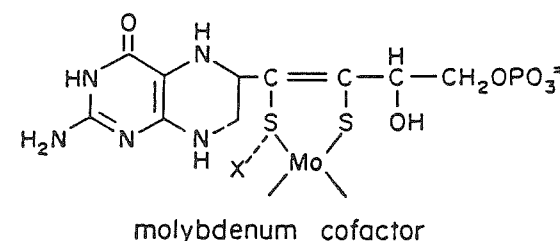
いは  $\text{NAD}^+$  + 亜二チオン酸がよい電子供与体となる。抽出液を DEAE-セルロースのカラムを通すと  $\text{NADH}$  による硝酸還元的作用はなくなったが、カラムに吸着したフェレドキシン画分を添加したところ作用が回復した。フェレドキシンを亜二チオン酸とともに加えると、亜硝酸を生じるので、硝酸還元の電子伝達が、



のように行われると考えた。酵素活性の測定には、亜二チオン酸・メチルヴィオロゲンを電子供与系に用いて、生成する亜硝酸を定量した。

硝酸還元酵素の精製は、イオン交換および分子ふるいクロマトグラフィーを組み合わせて行ったが、それだけではうまく行かず、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の過程を加えた。精製が成功した後、精製標品をウサギに注射して硝酸還元酵素に対する抗血清を作った。それをセファロースに結合させたものを担体として用いてカラムを作り、菌抽出液を通過させて硝酸還元酵素のみを吸着させ、分離することに成功した。いわゆる抗体アフィニティークロマトグラフィーによって精製する方法を開発したわけである。核酸がくっついてきてなかなか除けないのが欠点だが、それでもこの方法によって、多大な時間と労力を要した精製過程を2日間に短縮することができ、硝酸還元酵素の物質的検討が遙かに容易になった。

精製された硝酸還元酵素は分子量90,000、褐色のタンパク質で、400 nmに吸収の肩があり、非ヘム鉄、酸不安定硫黄を含む。鉄硫黄クラスターが $\text{Fe}_2\text{S}_2$ か $\text{Fe}_4\text{S}_4$ の何れのタイプか決定しようとしたが、吸収曲線がどちらともつかず成功していない。最近、モリブデン酵素のモリブデンが、ブテリンと結合したモリブデン因子の形で含まれることが示された。無機物の鉄モリブデン因子を含むニトロゲナーゼを除いて、他のモリブデン



酵素は、硝酸還元酵素・キサンチンデヒドロゲナーゼ・ギ酸デヒドロゲナーゼから亜硫酸酸化酵素に至るまで、総て同一のモリブデン因子を含むことが示さ

れている。本酵素もモリブデン因子を含むことが精製酵素からの抽出、蛍光スペクトルで示された。アカバシカビ *Neurospora crassa* の *nit1* 変異株はモリブデン因子を合成する能力を欠いて、同化的硝酸還元酵素のアポ酵素のみを生成する。抽出液にモリブデン因子を加えると硝酸還元酵素が再構成されるので、その方法によって *C. perfringens* 硝酸還元酵素標品中にモリブデン因子が存在することを確認した。また、タングステン酸塩添加培養した菌からは、抗硝酸還元酵素抗体と交差する不活性タンパク質が得られた。分離精製したものはモリブデンを含んでいなかった。このタンパク質にモリブデン因子を添加して、*in vitro*で再活性化することにはまだ成功していない。

*C. perfringens* の硝酸還元酵素にとってもう一つ特徴的なことは、主に抽出液の可溶性画分に存在することで、今までの通性菌の硝酸還元酵素が膜結合性であることと異なっている。分子構成も、例えば大腸菌の硝酸還元酵素が16万のA、6万のB、2万のC(チトクロムb)から1:1:2の比で作られているのに対して、1本のペプチドである。電子供与体としてはヴィオロゲン色素が有効で、FAD, FMN,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADPH}$  などは作用がなかった。フェレドキシンが作用し、亜二チオン酸の共存下で亜硝酸をよく生成する。フェレドキシンとしては *C. perfringens* のフェレドキシンのみならず、*C. pasteurianum* のフェレドキシンも有効で、作用は *C. pasteurianum* の方が2倍ほど強い。 $K_m$ は硝酸に対して0.1 mMであった。ただ、至適 pH は用いる電子供与体によって異なり、メチルヴィオロゲンでは pH 9、フェレドキシンでは pH 7であった。またメチルヴィオロゲンを用了とき、 $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  が促進作用を示した。

これはフェレドキシンを使用する硝酸還元酵素の最初の発見であった。フェレドキシンは今まで光合成、窒素固定、水素発生、ビルビン酸酸化などの酵素反応の電子伝達体として知られてきたが、その新しい機能を発見したことになる。なお、その後、らん藻 *Plectonema boryanum* (井田ら)、腸内嫌気性細菌 *Mitsuokella multiacidus* の硝酸還元酵素がフェレドキシンを使用することが明らかになった。本菌において、硝酸塩添加培養によって水素発生が止まるのも、硝酸還元酵素がフェレドキシンから電子を奪ってヒドロゲナーゼに与えないためと考えられる。

このような硝酸還元酵素が、実験に用いた HM1株に特殊なものか、あるいは *C.*

perfringensの種に共通のものかという問題は、分類学的にも重要である。異なった試料から分離した *C. perfringens* の菌株を方々から頂いて、HM1を含めた5株について比較研究を行った。粗抽出液について血清反応およびポリアクリルアミドゲル電気泳動と活性染色を行い、またKmなどの反応速度論的定数を求めた。HM1の硝酸還元酵素に対する抗血清は、Ouchterlonyによる寒天ゲル内の二重拡散法において全ての株の抽出液に対して単一の沈降線を生じて、スパーなしに融合した。電気泳動的には若干泳動度が異なる二つのグループに分かれた。分子量は同じで、電荷の差によると思われる。Kmなどは殆ど差がなかった。これで、HM1株で明らかにした硝酸還元酵素の性質が *C. perfringens* の種に共通のものであることが示された。

この菌の亜硝酸還元酵素も、硝酸還元酵素と同じく、硝酸塩添加培養で誘導される。直接硝酸塩の作用かどうかは不明であるが、硝酸添加培養において硝酸還元酵素より遅れて生成し、硝酸塩がなくなって硝酸還元酵素が低下しても活性は残る(p.59, 図表45)。精製の結果、分子量54,000のタンパク質であることがわかった。電子伝達体として有効なものはヴィオロゲン色素であるが、フェレドキシンも作用することがわかった。生成物はアンモニアと予想したが、精製酵素では生成せず、ヒドロキシルアミンと一応同定した。ヒドロキシルアミンの定性・定量は、酸化して亜硝酸にして呈色反応により行うので、他の可能性も全くないわけではないであろう。亜硝酸還元酵素の生成物としてヒドロキシルアミンを見出した例は最近は殆どなく、奇異な感じすらする。本亜硝酸還元酵素もメチルヴィオロゲンによりヒドロキシルアミンを還元する作用を若干持つが、別に抽出液の他の画分にもヒドロキシルアミン還元作用が明らかに存在するので、本菌がヒドロキシルアミンを経由して硝酸・亜硝酸を還元することは充分可能である。

この酵素は、今まで調べられた他の生物の亜硝酸還元酵素と較べると図表46のようになる。すなわち、多くは銅タンパク質あるいはシロヘムタンパク質であるが、この酵素は色がなく、どちらにも該当しない。残念ながら金属を同定していないので、今後明らかにする必要がある。いずれにしても偏性嫌気性菌に存在するものとして、亜硝酸還元酵素の特別なカテゴリーに属するものであろう。

本菌のフェレドキシンも分離し、性質を決定した。*Clostridium* 他種のフェレドキシンと同じく、DEAE-セルロースに強く吸着するので、同様の方法で精製した。

図表46. 種々の生物の亜硝酸還元酵素の比較

| Source                                          | Molecular weight | Prosthetic group | Electron donor    | Product                      |
|-------------------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------------------|
| Assimilatory                                    |                  |                  |                   |                              |
| Spinach                                         | 61,000           | siroheme         | Fd                | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |
| <i>Chlorella fusca</i> , 211-15                 | 63,000           | siroheme         | Fd                | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |
| <i>Neurospora crassa</i> , 5297a                | 290,000          | siroheme         | NAD(P)H           | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |
| <i>Escherichia coli</i> , OR75 Ch15             | 190,000          | siroheme         | NADH              | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |
| Dissimilatory                                   |                  |                  |                   |                              |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> , S-6               | 120,000          | Cu               | Cyt               | NO                           |
| <i>Achromobacter cycloclastes</i> , IAM 1013    | 69,000           | Cu               | Cyt               | NO                           |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> , IAM 1015          | 90,000           | c,d-type heme    | Cyt               | NO                           |
| <i>Achromobacter fischeri</i>                   | 95,000           | c-type heme      | FMNH <sub>2</sub> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , ATCC 27774 | 66,000           | c-type heme      | FADH <sub>2</sub> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |
| <i>Clostridium perfringens</i> , HM-1           | 54,000           | ?                | Fd                | NH <sub>2</sub> OH           |

分子量6,000で他種のフェレドキシンと一致するが、鉄が4個、硫黄が4個で、他の *Clostridium* フェレドキシンの 1/2 の含量である。前述のように、硝酸還元酵素の電子供与体としての活性は *C. pasteurianum* フェレドキシンの 1/2 くらいで、鉄硫黄クラスターの量と比例するともいえる。アミノ酸の一次構造を決定するよう、阪大・松原研究室にお願いして、N端の若干を決定したが、その部分は *C. pasteurianum* のものと差がなかった。C末端まで検討する価値があると思われる。

本菌の抽出液は NADH により硝酸塩を還元する作用を持つので、NADH フェレドキシン還元酵素の存在を予想したが、その証拠は簡単に得られなかった。ところが、精製硝酸還元酵素下において、NADHで硝酸塩を還元するのに必要な物質を抗体アフィニティカラム通過液のDEAEクロマトグラフィー画分中に探したところ、2画分が必要で、その一つが以前その画分から精製したルブレドキシンで置き換えられることがわかった(図表47)。もう一つの画分には NADH-ルブレドキシン還元酵素が含まれていた。フェレドキシンはルブレドキシンの代わりにはならず、ルブレドキシンの系に添加しても亜硝酸の生成は増加しなかった。

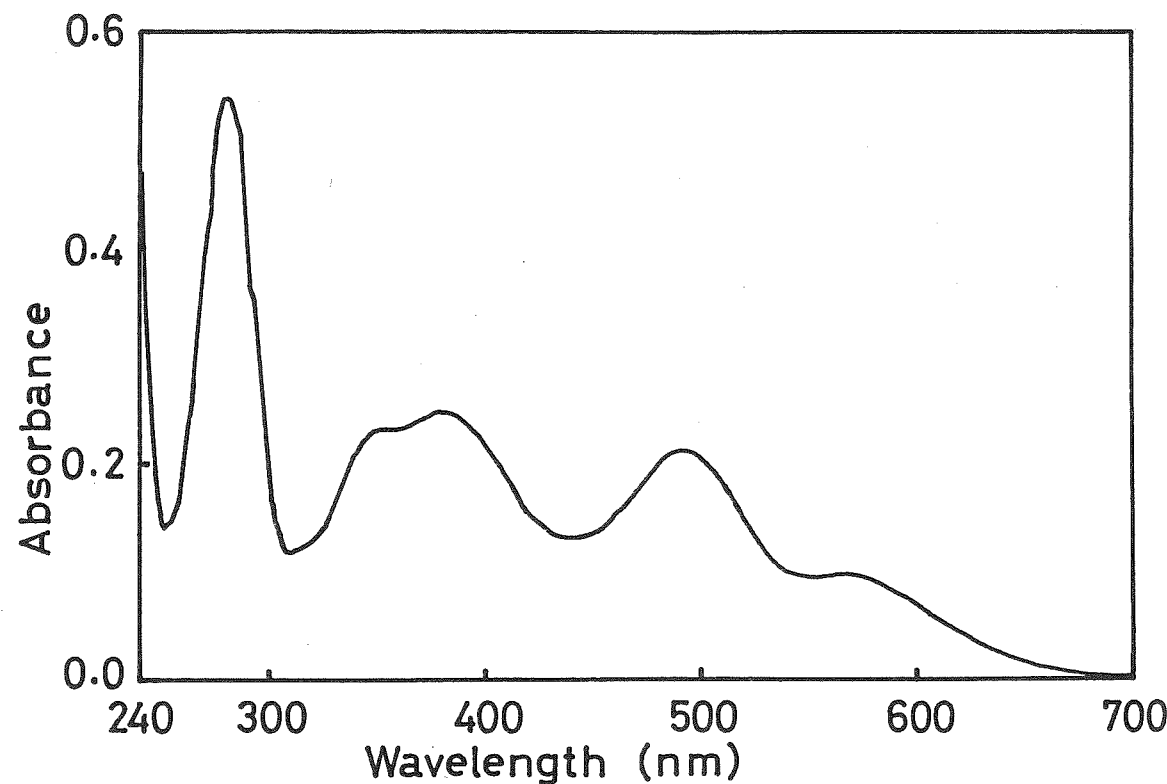
ルブレドキシンは嫌気性・好気性を問わず多くの細菌から分離される、分子量の小さい(6,000)赤色の非ヘム鉄タンパク質で、酸不安定性硫黄を含まず、ペプチド鎖中のシステインのスルフヒドリル基4個が鉄1個と結合しているものである。吸収スペクトルは490 nm付近その他にピークを持ち(図表48)、還元で可逆的



| System       | Amount of NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> formed<br>(nmol) |
|--------------|---------------------------------------------------------|
| complete     | 61                                                      |
| - Rd         | 1                                                       |
| - fraction A | 1                                                       |
| - NaR        | 2                                                       |
| - NADH       | 3                                                       |
| - Rd, + Fd   | 4                                                       |

図表47. *Clostridium perfringens* の NADH-硝酸還元系に対するルブレドキシンの関与  
 KNO<sub>3</sub>, NaR, ルブレドキシン、フラクションA、NADHを含む。フラクションAは抗NaR 血清カラム通過液のDEAE-クロマトグラフィーの低塩濃度溶出区分で、ルブレドキシン・フェレドキシンを含まない。反応時間90分。

図表48. ルブレドキシンの吸収スペクトル

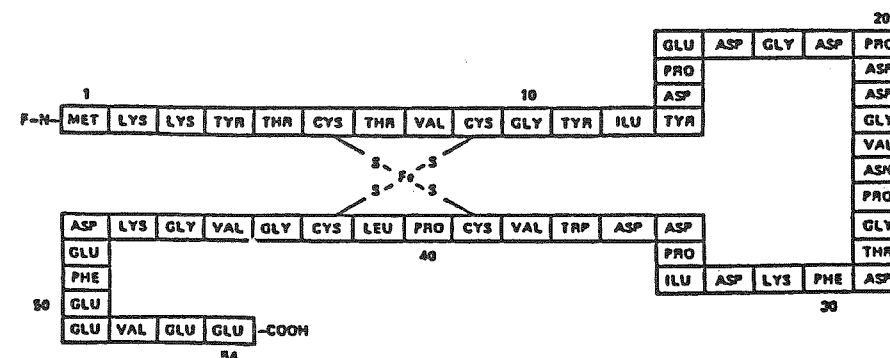


図表49. ルブレドキシンの一次構造

# Primary Structure of Rubredoxin Proteins

|                        |                                                                |    |
|------------------------|----------------------------------------------------------------|----|
| <i>C. perfringens</i>  | Met-Lys-Lys-Phe-Ile-( )-Asp-Val-( )-Gly-Tyr-Ile-Tyr-Asp-Pro-   | 15 |
| <i>C. pasteurianum</i> | f-Met-Lys-Lys-Tyr-Thr-Cys-Thr-Val-Cys-Gly-Tyr-Ile-Tyr-Asp-Pro- | 10 |
| <i>P. elsdenii</i>     | Met-Asp-Lys-Tyr-Glu-Cys-Ser-Ile-Cys-Gly-Tyr-Ile-Tyr-Asp-Glu-   | 15 |
| <i>M. elsdenii</i>     | Met-Gln-Lys-Phe-Glu-Cys-Thr-Leu-Cys-Gly-Tyr-Ile-Tyr-Asp-Pro-   | 15 |
| <i>D. vulgaris</i>     | Met-Lys-Lys-Tyr-Val-Cys-Thr-Val-Cys-Gly-Tyr-Glu-Tyr-Asp-Pro-   | 15 |
|                        | Ala-Val-Gly-Asp-Pro-Asp-Asn-Gly-Ser-Val-Pro-Gly-Thr-Glu-Phe-   | 20 |
|                        | Glu-Asp-Gly-Asp-Pro-Asp-Asp-Gly-Val-Asn-Pro-Gly-Thr-Asp-Phe-   | 25 |
|                        | Ala-Glu-Gly-Asp-----Asp-Gly-Asn-Val-Ala-Ala-Gly-Thr-Lys-Phe-   | 30 |
|                        | Ala-Leu-Val-Gly-Pro-Asp-Thr-Pro-Asp-Gln-Asp-Gly-----Ala-Phe-   | 35 |
|                        | Ala-Glu-Gly-Asp-Pro-Thr-Asn-Gly-Val-Lys-Pro-Gly-Thr-Ser-Phe-   | 40 |

Abbreviations: *C.*, *Clostridium*; *P.*, *Peptostreptococcus*; *M.*, *Micrococcus*; *D.*, *Desulfovibrio*



The amino acid sequence of rubredoxin from *C. pasteurianum* (from McCarthy, 1972).

に無色になる。このルブレドキシンのC末端付近の構造と既知のルブレドキシンの一次構造とを図表49に示す。何らかの系で電子伝達体として働いている可能性があるとして、多くの人々によって検討されてきたが、今まで明らかにされたのは、*Pseudomonas testosteroni*において炭化水素あるいは高級脂肪酸アルキル鎖のω水酸化に際して酸素に対する第二の電子供与体として有効に働くことである。その後、一酸化炭素の脱水素酵素に対してルブレドキシンがフェレドキシンより優れた電子受容体として働くことが示されている。ルブレドキシンは標準酸化還元電位が +0.020 ~ -0.060 V で、フェレドキシンより大分高いこともこれらの反応と合致しているが、偏性嫌気性菌にも存在するのは、他の反応にも関与するからであろう。硝酸還元を含めて、上記の反応は何れも特殊なもので、嫌気

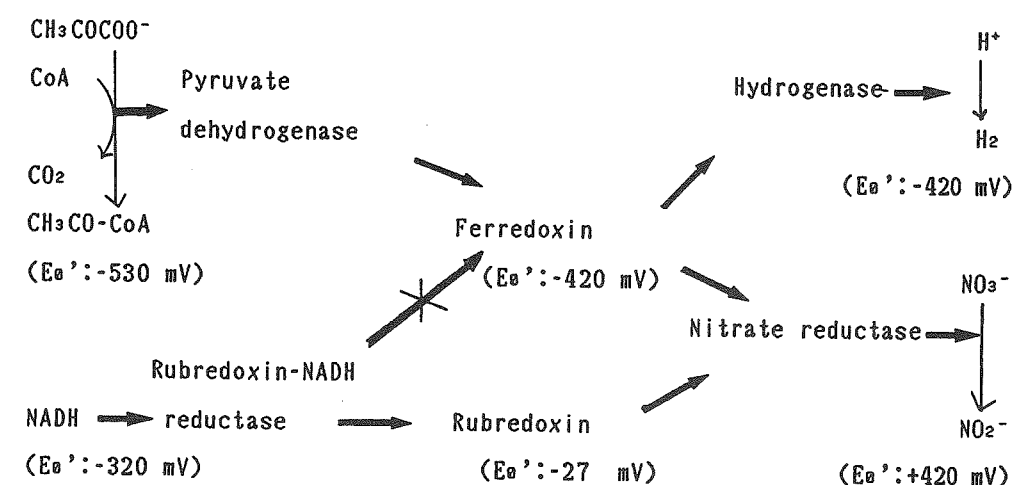
性菌における意義はまだ明らかにされていない。

*C. perfringens* の硝酸還元系における関与も現在解析中であるので、まだ論ずるには早い。ルブレドキシンを必要とする第2の系を構成することに成功したことは確かである。第2の必要画分はNADHあるいはNADPHによりルブレドキシンを還元する。その画分を、ルブレドキシンをも還元することのできるハウレンソウのNADPHフェレドキシン還元酵素（部分精製品）によって置き換えても、硝酸還元酵素の存在においてNAD(P)H硝酸還元系を再構成できる。しかし、不思議なことに、フェレドキシンと違って、亜二チオン酸ナトリウムによりルブレドキシンを還元して硝酸還元酵素存在下で硝酸塩を還元することは成功しなかった。亜二チオン酸ナトリウムは、NADH-フェレドキシン還元酵素-ルブレドキシン-硝酸還元酵素系の反応も阻害するので、何か阻害作用があるのであろう。まだ最適の条件を探し当てていない可能性もある。

この反応を明らかにするため、NAD(P)H-ルブレドキシン還元酵素の精製や速度論的解析など、今後進めなければならないことが多く、まだこの生理的意義を論ずるには尚早であろう。しかし、案外大きな意味をもっているのかも知れない。

最初、NADHと硝酸還元酵素との間の電子伝達にフェレドキシンが作用せず、ルブレドキシンが作用するらしいと聞いたとき、まさかと思った。しかし、再現性はあるし、充分合理的であると考えようになった。The Bacteria, Vol. 2に出ている各種の微生物の発酵生産物の分析値を検討してみると、ビルビン酸がアセチルCoAと二酸化炭素になるとき与えられる電子はおそらくフェレドキシンを経て水素の生成に用いられ、NADHを経て有機基質の還元に使われている形跡は殆どない。ビルビン酸から生じるギ酸も同様である。つまりビルビン酸のカルボキシル基のC1部分とアセチル基のC2部分の間では開裂後も相互の酸化還元が行われず、隔離されているのである。前述のように、ビルビン酸-脱水素酵素-フェレドキシン系の還元力は極めて強く、水素イオンに電子を与えて水素ガスを発生させることが可能である。有機化合物を電子受容体として還元を行うことは、それほど強い還元力を必要としないのみならず、前述のように有機物の酸化反応・リン酸化を犠牲にすることになり、ATP生成面からは不利である。このためフェレドキシン系とNADH系とは隔離して置かなければならない。光合成生物においてはフェレドキシンはNADP<sup>+</sup>の還元を行うことに使われており、ビリジン補酵素への電子

図表50. *Clostridium perfringens*の硝酸還元電子伝達系



伝達の方がフェレドキシンの役割として一般に通用しているが、嫌気性細菌ではフェレドキシンの役割が違っているのである。今まで報告された嫌気性細菌のNAD(P)Hフェレドキシン還元酵素が概して弱く、余りはっきりしていないのも何か関係があるのかも知れない。

もしこの想像が本当だとすると、図表50のように硝酸還元においてルブレドキシンがNAD(P)Hからの電子伝達に関与し、フェレドキシンはビルビン酸からの電子伝達に作用しているということになる。この方が酸化還元電位が低い順にならなくて、その点合理的である。NADHによってフェレドキシンを還元することは、最終電子受容体が硝酸である以上不可能ではないが、働き難いものであろう。なお、ルブレドキシンの含量は硝酸塩の有無によって変動なく、誘導性ではない。従って硝酸還元のみならず、他の系においても作用していると考えられる。特に酪酸生成系においてクロトニルCoA還元酵素などについて充分検討する必要がある。

## 2. 硝酸呼吸における大腸菌の代謝と成長

大腸菌は現在もっともよく研究された生物と言われるが、硝酸還元の研究も大腸菌において幾つもの研究グループによって進められてきたし、進められている。

硝酸還元酵素の精製も、上記江上研究室の谷口氏らの他 MacGregor, DeMoss, Enoch, Clegg らの人々によって報告されている。細胞膜に結合した不溶性酵素で、膜タンパク質中の含量は最高 15 % に達すると言われる。可溶化抽出したものは、分子量 100 万、プロトマーは 20 数万で、A (分子量 16 万), B (6 万), C (2 万) のサブユニットの 1:1:2 の結合体である。A はモリブデン因子と非ヘム鉄を含み、活性単位である。B は膜との結合に与ると思われる。C は b 型のチトクロムである。突然変異でヘムの合成能を失った突然変異株 *hemA* では、ヘムを培養液に添加しない限り、C が合成されず、生成した A B 結合体がメチルヴィオロゲン電子伝達体とする硝酸還元酵素活性を示すが、膜と結合せず、細胞質の液部分に溶けた状態で存在する。酵素の可溶化のとき、アルカリ処理すると、C 単位が失われて A B のみの硝酸還元酵素が得られる。人によっては C を硝酸還元酵素の中に入れて考えない人もいる。シアン化物によっては余り強く阻害されないが、アジドやチオシアン酸によって阻害される。また、硝酸塩によって誘導され、酸素によって抑制される。

この酵素は硝酸のみならず塩素酸・臭素酸をも還元する。塩素酸が還元されると亜塩素酸を生じるが、それは容易に塩素になるので、硝酸還元酵素活性をもつ菌は、塩素酸を与えるとその作用のため殺されることになる。大腸菌は、硝酸還元酵素誘導が抑制される好気条件では塩素酸があっても還元せず死なないが、嫌気条件では生えない。生じるコロニーは、自然突然変異で硝酸還元能を失ったもので、これを利用して容易に塩素酸耐性変異株 *chl* を分離することが出来る。その多くはモリブデンの吸収 (*chlD*)・モリブデン因子の合成 (*chlA*, *B* など) あるいはアポタンパク質への取り込みなどが不完全なものである。*chlC* のみが硝酸還元酵素の構造遺伝子で、*narC* と云われるようになった。*chl*, *nar* 各種の遺伝子の相互の調節作用が最近よく研究されている。

私たちが大腸菌の硝酸還元に取り掛かるとき最初の課題として考えたのは、硝酸呼吸によって有機基質の代謝がどう変化するかということであった。この方面の研究は山本勇氏らによる。

## 1) 硝酸呼吸における酵素レベルと代謝産物

最初に行った研究は、培養条件の差異による代謝系酵素のレベルの変化であった。主にトリカルボン酸回路 (TCA サイクル) の酵素を中心として、好気条件 (呼吸)、嫌気条件 (発酵)、硝酸塩添加嫌気条件 (硝酸呼吸) においてグルコースを含む培地で培養した大腸菌 K10 の細胞抽出液中の活性を測定した。図表 5 1 は、呼吸条件における各酵素の活性を 1 として、好気硝酸添加・発酵・硝酸呼吸条件における活性の相対値を表している。好氣的に硝酸を加えたときは還元は起こらず、殆どすべての酵素は活性が全く変化しない。TCA サイクルに含まれる多くの酵素は、発酵条件では呼吸条件の 0.1-0.3 倍の活性しか持たないが、硝酸呼吸条件ではその中間の値を示した。TCA サイクルには脱水素反応が含まれ、 $\text{NAD}^+$ ,  $\text{FAD}$  が還元されることが回転の前提になるので、生じた補酵素還元型  $\text{NADH}$ ,  $\text{FADH}_2$  が電子伝達系に電子を渡して、酸化型  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{FAD}$  を再生することが必要である。最終電子受容体である酸素がない嫌気条件では殆ど進行しないことを反映している。ここで興味深いのは、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性が発酵条件ではそれほど低くなく、硝酸呼吸下で最も低いことである。コハク酸脱水素の逆反応はフマル酸の還元であるが、この反応は嫌気条件で大腸菌の発酵生産物の一つであるコハク酸の生成に与っている。この還元を行うフマル酸還元酵素はコハク酸デヒドロゲナーゼと違う酵素であるが、コハク酸デヒドロゲナーゼの活性測定には充分掛かってくる。従って発酵条件の値はフマル酸還元酵素による部分が大きい可能性がある。フマル酸の還元は  $\text{C}=\text{C}$  二重結合の還元で標準酸化還元電位が高く、チトクロム b が関与し、酸化的リン酸化が共役する。この反応は大腸菌においても発酵条件で行われるが、硝酸があれば硝酸呼吸に切り替えられて行われなくなるので、両方の酵素が減少したことが活性の低下として表れたと思われる。現在、硝酸によるフマル酸還元酵素の抑制現象は遺伝子レベルで解析されつつある。

第 2 の特徴は、硝酸呼吸条件におけるアコニット酸ヒドラターゼの著しい低下であった。図表 5 1 の実験では、クエン酸を基質にしてイソクエン酸デヒドロゲナーゼの反応と連動させて測定したもので、若干高い活性を示している。アコニット酸ヒドラターゼ活性の直接的な測定では更に小さな値が得られる。

また発酵に関与するアルコールおよび乳酸デヒドロゲナーゼは酸素の有無によ

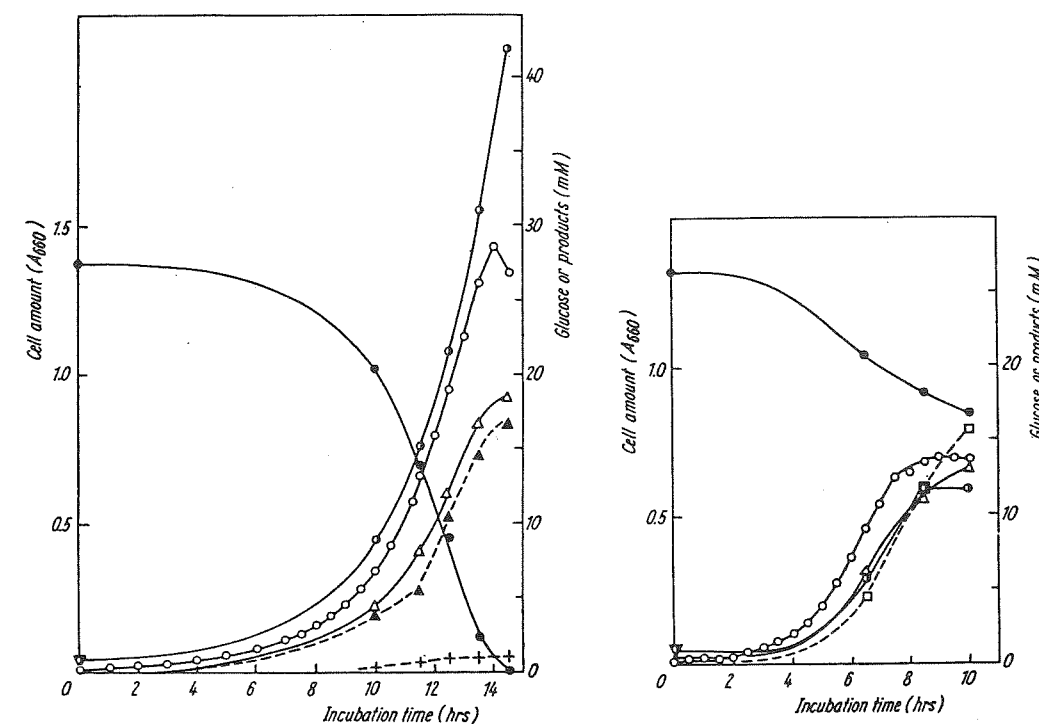
図表51. 呼吸・硝酸呼吸・発酵条件における成育大腸菌の酵素活性の比較

| デヒドロゲナーゼ                          | 酵素活性の相対値*                             |                                       |                                         |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
|                                   | 好気培養                                  |                                       | 嫌気培養                                    |                                       |
|                                   | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>(呼吸) | -NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>(呼吸) | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>(硝酸呼吸) | -NO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>(発酵) |
| アコニット酸ヒドラターゼ                      | 0.9                                   | 1                                     | 0.2                                     | 0.1                                   |
| イソクエン酸<br>デヒドロゲナーゼ                | 1.1                                   | 1                                     | 0.2                                     | 0.1                                   |
| 2-オキソグルタル酸<br>デヒドロゲナーゼ            | 1.1                                   | 1                                     | 0.6                                     | 0.3                                   |
| コハク酸デヒドロゲナーゼ                      | 0.9                                   | 1                                     | 0.2                                     | 0.7                                   |
| リンゴ酸デヒドロゲナーゼ                      |                                       | 1                                     | 0.2                                     | 0.1                                   |
| ビルビン酸デヒドロゲナーゼ                     |                                       | 1                                     | 1.0                                     | 0.3                                   |
| リンゴ酸酵素                            | 1.0                                   | 1                                     | 0.5                                     | 0.7                                   |
| グルタミン酸<br>デヒドロゲナーゼ                | 1.0                                   | 1                                     | 0.7                                     | 0.7                                   |
| グルコース6リン酸<br>デヒドロゲナーゼ             | 1.9                                   | 1                                     | 0.8                                     | 0.7                                   |
| アルコールデヒドロゲナーゼ                     | 1.1                                   | 1                                     | 0.2                                     | 0.9                                   |
| 乳酸デヒドロゲナーゼ<br>(NAD <sup>+</sup> ) |                                       | 1                                     | 0.7                                     | 0.8                                   |
| D-乳酸デヒドロゲナーゼ                      | 1.0                                   | 1                                     | 0.4                                     | 0.2                                   |

\*好気硝酸無添加を1とする。

図表52. 嫌氣的グルコース・アンモニア培地における硝酸の有無による大腸菌の成長と生産物の変化

左：硝酸無添加、右：硝酸添加。 ○成長量 (OD<sub>660</sub>)、●グルコース、○ギ酸、△酢酸、▲エタノール、□亜硝酸濃度。



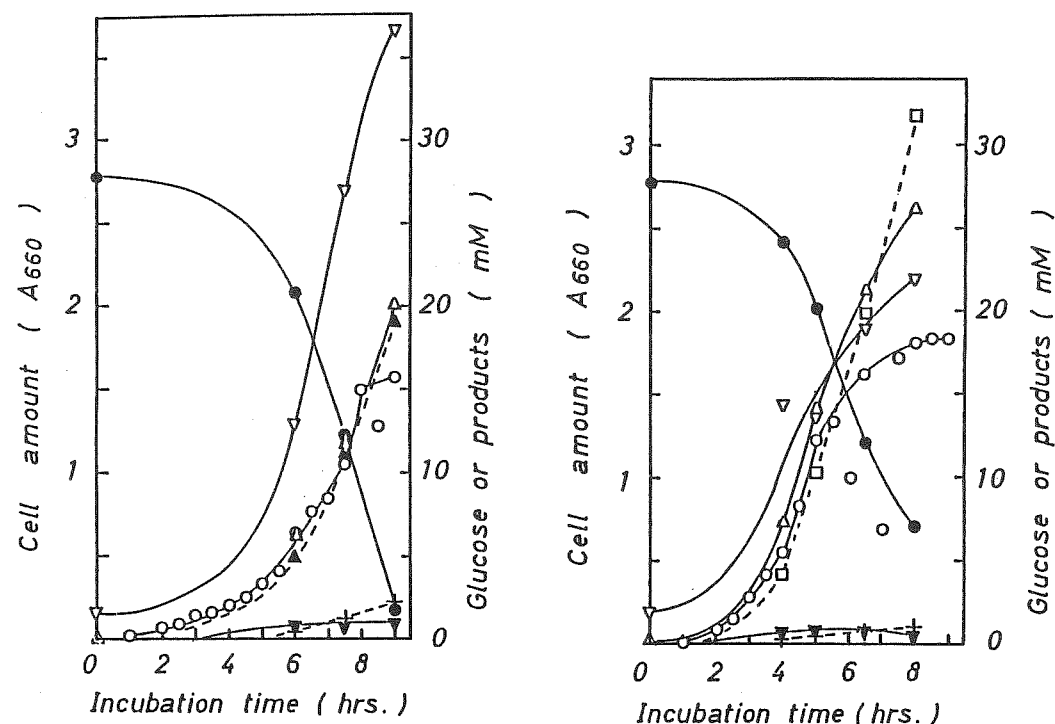
って大きな影響を受けないが、硝酸呼吸では低下し、特にアルコールデヒドロゲナーゼは1/5になる。これは、一般に大腸菌において呼吸条件ではエタノールなどの生成がみられるのに対して、硝酸呼吸条件ではエタノールが生成しないこととも対応する。

同様の研究は同じ頃やや早くイギリスのWimpennyらによって為され、異なった菌株であるが、よく一致した結果が得られているので、大腸菌の特徴と考えてよいだろう。

以上のように、酵素レベルの検討から硝酸呼吸においては呼吸条件に較べてTCAサイクルの進行が低下して、完全酸化の能力が落ちていると思われるが、代

図表53. 嫌氣的グルコース・複合培地における硝酸の有無による大腸菌の成長と生産物の変化

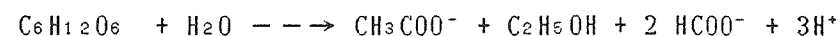
左：硝酸無添加、右：硝酸添加。○成長量（OD<sub>660</sub>）、●グルコース、▽ギ酸、△酢酸、▲エタノール、▼乳酸、+コハク酸、□亜硝酸濃度。



謝産物の面でどうであろうか？ これについては 1955 年にアメリカで行われた硝酸還元のシンポジウムで、オランダの Verhoeven が硝酸添加による発酵生産物の変化について報告している。乳酸、エタノール、コハク酸が減少し、酢酸が増加する結果を示していたが、菌株・培養条件など不明な点も多いので、大腸菌 K10株について検討することにした。

培養条件としてはグルコース・アンモニア限定培地と肉エキス・ペプトンの複合培地を用い、呼吸・硝酸呼吸・発酵の3条件で、菌の成長を測定しながら、時間的に生成物を分析した。その結果を図表52-54に示す。

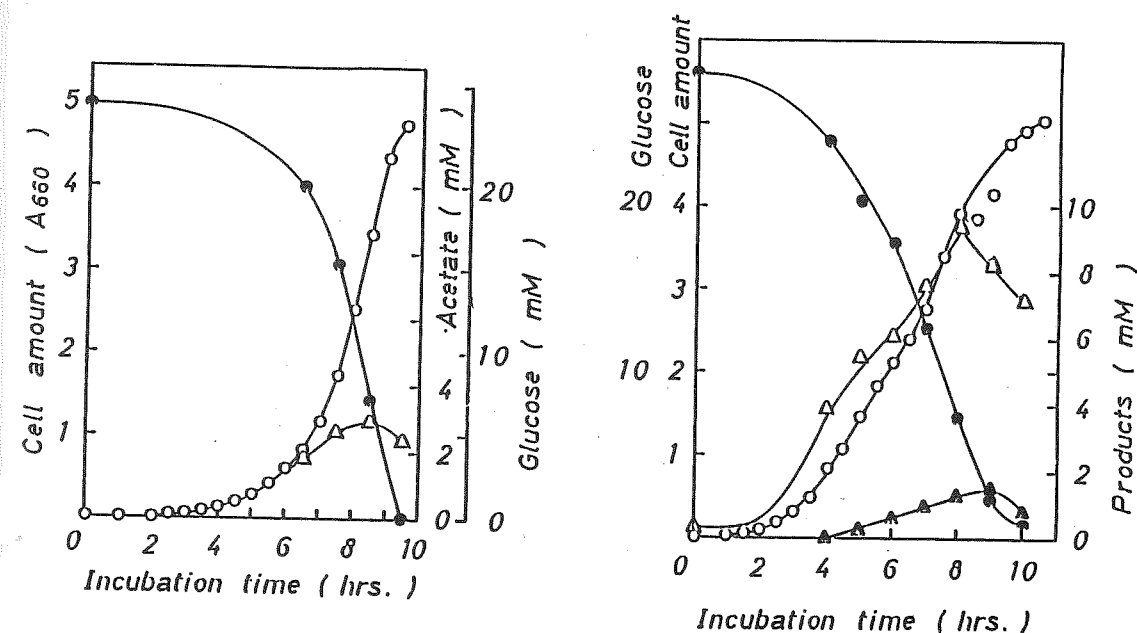
限定培地において pH 7 に調節しながら K10 を培養すると、発酵条件でグルコースは主に酢酸・エタノール・ギ酸になり、その比はほぼ 1:1:2、コハク酸と乳酸の生成は少量であった（図表52左）。この反応は次の式で表される。



菌体への同化分を計算に入れて、減少グルコースの炭素の80%の行方が明らかにな

図表54. 好氣的グルコース培養における大腸菌の成長と生産物の変化

左：グルコース・アンモニア培地、右：グルコース複合培地。○成長量（OD<sub>660</sub>）、●グルコース、▽ギ酸、△酢酸、▲エタノール



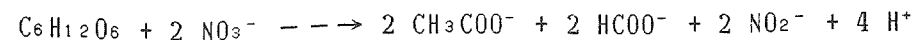
ったことになる。グリセロールなど他の物質の生成も若干あるのであろう。培養液の pH を調節しないと酸性になり、水素ガスの発生が起こり、ギ酸が減少し、また乳酸が若干増加した。古くから知られているように、酸性ではギ酸ヒドロゲンリアーゼが誘導され、 $HC00^- \rightarrow C0_2 + H_2$  の反応が進行したと思われる。この反応でエネルギーは供給されないが、培地の酸性化を防ぐことになる。消極的ではあるが、乳酸の生成もピルビン酸の濃度を減らし、ギ酸と酢酸への分解を少なくし、pHの低下を防ぐ意味があるのかも知れない。

グルコース・ペプトン・肉エキスからなる複合培地では、成長が速く、コハク酸・乳酸の生成量が若干多いが、特に大きな変化はなかった（図表53左）。

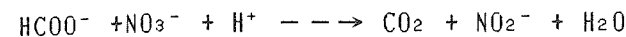
限定培地において、嫌気条件で硝酸を添加すると亜硝酸が蓄積し、エタノールの生成が見られなくなり、代わりに酢酸が増加した。菌の増殖も他の条件と異なっていて、グルコースが残っているにもかかわらず、停止する（図表52右）。濃度が低いときグルコースは完全に消耗するので、濃度の高いとき途中で成長が止まるのは他の原因、おそらく亜硝酸の蓄積によるのだろう。この場合、8-9 時間までは亜硝酸の生成量と酢酸・ギ酸の蓄積量とは一致し、1:1:1 の関係が成立する。



次式による反応が進行するのであろう。



10 時間を過ぎると、ギ酸の増加が落ち、その分だけ亜硝酸が余分に増加することが目立つ。これは



の反応で説明できる。

複合培地における硝酸呼吸条件では、成長が速く、菌の成長停止レベルも高い。従って生成物の量も多いが、上記の関係も殆ど成り立つ（図表 5 3 右）。

限定培地・呼吸条件では、培養の途中で一時的に酢酸の蓄積（3 mM、23 mM のグルコースから）が見られるのみで、他の発酵生産物は中間生成しなかった。酢酸はグルコースの消失にともなって一部消費された（図表 5 4 左）。

複合培地を用いた好気培養はむしろ一番顕著な変化があった（図表 5 4 右）。成長速度は決して増加せず、成長の途中でエタノールおよび酢酸が蓄積した。それぞれ最高 2 mM、10 mM に達した。Ohne らによれば、クエン酸シンターゼはグルコースおよびグルタミン酸あるいは 2-オキソグルタル酸の存在で抑制を受け、グルコースの酸化が行われなくなるという。大腸菌は好気条件下でもよく発酵を行うという記載（Atkinson）があるが、それはこのような複合培地における現象を言ったのかも知れない。大腸菌他株においても検討する価値があるが、K10株において好気培養は複合培地と限定培地とで大きな差があることは確かである。以上の結果は、硝酸呼吸下のグルコース分解は多少酸化になるだけであって、TCA サイクルで二酸化炭素への完全酸化が盛んに進行すると言う証拠は何もない。亜硝酸は硝酸がある限りそれ以上還元されないで蓄積するのが普通なので、亜硝酸の量が酸化量を表すものとする、酢酸の生成とギ酸の酸化だけで収支が償ってしまう。Verhoeven は大腸菌の硝酸呼吸を incidental reduction と呼んで、脱窒菌の硝酸呼吸と区別した。後者の場合、硝酸は窒素まで還元されるばかりでなく、有機物は同化分を除いて二酸化炭素まで完全に酸化される。

大腸菌においては本当にグルコースの完全酸化が起こらないのか？ この検討を行うために、2-[<sup>14</sup>C]-グルコースを用いて、<sup>14</sup>C が生成する二酸化炭素の中へ入らないかどうか試験した。グルコースの 2 位の炭素は、発酵ならエタノールのメチレン基 C、酢酸のカルボキシル基 C になるはずである。好氣的に TCA サイクルに

図表 5 5. <sup>14</sup>C-グルコース及び乳酸の大腸菌による分解

Table 2. Distribution of radioactivity after growth on <sup>14</sup>C-substrates.

| Substrates                      | Growth conditions                        | Radioactivity <sup>a</sup> |                        |          |       |
|---------------------------------|------------------------------------------|----------------------------|------------------------|----------|-------|
|                                 |                                          | CO <sub>2</sub>            | Acidified culture sup. | Recovery |       |
| DL-[2- <sup>14</sup> C]-Lactate | anaerobic + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | 39.3                       | 49.8                   | 6.5      | 95.6  |
|                                 | anaerobic                                | 0.7                        | 100.3                  | 1.8      | 102.8 |
|                                 | aerobic                                  | 55.9                       | 10.4                   | 15.1     | 81.4  |
| D-[2- <sup>14</sup> C]-Glucose  | anaerobic + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | 4.2                        | 83.9                   | 13.2     | 101.3 |
|                                 | anaerobic                                | 0.9                        | 93.0                   | 8.1      | 102.0 |
|                                 | aerobic                                  | 46.2                       | 21.0                   | 15.1     | 82.3  |

<sup>a</sup> count (%).

入れば、2 回転以後二酸化炭素として放出されるはずである。呼吸・硝酸呼吸・発酵の 3 条件で、気層の二酸化炭素などを補足してみた結果を図表 5 5 に示す。発酵条件では二酸化炭素中への <sup>14</sup>C は殆ど入らず、呼吸条件下では全活性の 46 % が現れた。これに対して硝酸呼吸の場合は 4 % に過ぎなかった。この条件でグルコースが完全に消費されていることを考えれば、硝酸呼吸における TCA サイクルの進行が好気条件の 1/10 以下に過ぎないとも言えよう。

図表 5 6. 乳酸塩による大腸菌の成長

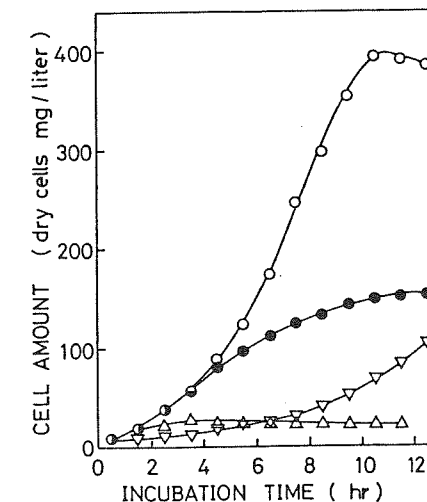


Fig. 1. Anaerobic growth on lactate during nitrate respiration.

Growth of cells was determined as described in MATERIALS AND METHODS.

○, The amount of cells grown in the complete medium containing DL-lactate, KNO<sub>3</sub>, peptone and other mineral salts; ●, in the medium without lactate; ▽, without peptone; and △, without KNO<sub>3</sub>.

しかし、硝酸呼吸で全ての場合完全酸化が行われなかったかという点、必ずしもそうではない。グルコースの代わりに乳酸を使ったときは相当程度進行する。乳酸は発酵生産物として嫌氣的には分解し難い物質であるが、好氣的には酸化されるし、硝酸の存在の下では嫌氣的にも分解し、大腸菌の生活を支える。乳酸を含むペプトン培地では図表56のように増殖する。2- $[^{14}\text{C}]$ 乳酸を加えたときは、図表55に示すように二酸化炭素中に現れる。この場合も発酵条件では0に等しいが、呼吸条件の55%に対して、硝酸還元条件では39%という決して少なくない数字である。低分子画分に半分は留まるが、呼吸条件の2/3程度の完全酸化が行われていると言えよう。

このことは、乳酸培養菌のTCAサイクル酵素の活性からも裏付けられる(図表57)。多くの酵素は呼吸条件より強い。コハク酸デヒドロゲナーゼおよびアコニット酸ヒドラターゼは極めて低い、これは定常期に達した菌の値で、急速に成長しつつある菌では呼吸条件の1/4程度のレベルに達する。フマル酸ヒドラタ

図表57. 呼吸および硝酸呼吸条件においてグルコースあるいは乳酸培地に成長した大腸菌のTCAサイクル酵素の活性

|                        | 酵素活性の相対値 |       |         |       |
|------------------------|----------|-------|---------|-------|
|                        | 乳酸培地     |       | グルコース培地 |       |
|                        | 呼吸       | 硝酸呼吸  | 呼吸      | 硝酸呼吸  |
| クエン酸シンターゼ              | 2.3      | 2.6   | 1       | 0.26  |
| アコニット酸ヒドラターゼ           | 3.1      | 0.002 | 1       | 0.005 |
| イソクエン酸デヒドロゲナーゼ         | 1.2      | 2.4   | 1       | 0.58  |
| 2-オキソグルタル酸<br>デヒドロゲナーゼ | 2.1      | 2.0   | 1       | 0.24  |
| スクシニルCoAシンターゼ          | 3.1      | 6.4   | 1       | 0.20  |
| コハク酸デヒドロゲナーゼ           | 1.2      | 0.0   | 1       | 0.02  |
| フマル酸ヒドラターゼ             | 1.5      | 0.57  | 1       | 0.03  |
| リンゴ酸デヒドロゲナーゼ           | 1.2      | 1.9   | 1       | 0.39  |

ーゼは若干低い、対数成長期にも同様に低かった。亜硝酸が多量に蓄積する時期になってそれらの酵素活性が極めて低くなることは、亜硝酸の直接の害作用とも考えられるかも知れない。

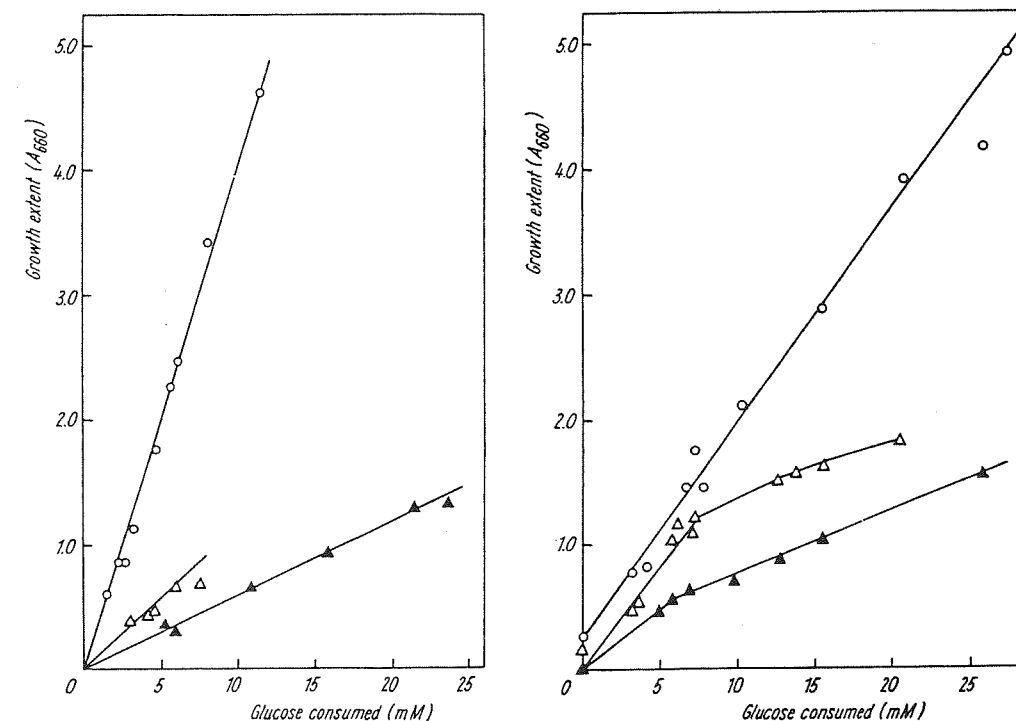
乳酸培養と違ってグルコース培養においてTCAサイクルの回転が悪いことは、グルコースの調節作用に基づくのであろう。大腸菌は環境のグルコースを最もよく利用するために、その量によって著しい変化を受けるように進化してきたのである。窒素有機物の過剰なところからアンモニアしかないところまで、生活可能なためには、代謝の切り替えが必要で、これが硝酸呼吸の場合違った形で現れたのかも知れない。

## 2) 硝酸呼吸下における増殖

発酵・呼吸・硝酸呼吸の3つの条件により菌の増殖量も大きく変化する。いくつかのグルコース濃度を用い、成長量とグルコース消費量との関係を見た結果を図表58に示す。限定培地(A)では始めのグルコース濃度によらず、この関係は直線であり、呼吸・硝酸呼吸・発酵の順にその勾配すなわち消費グルコース当りの菌体合成量が低下する。複合培地(B)の場合、好気培養においてはこのプロットがやはり直線になるが、原点を通らず、その傾きは、グルコース・アンモ

図表58. 培地中のグルコース量と大腸菌の成長

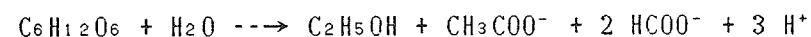
左 限定培地、右 希釈複合培地。○ 呼吸、△ 硝酸呼吸、▲ 発酵条件。



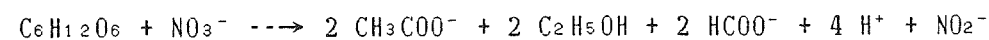
ニア限定培地よりゆるくなる。この場合栄養物の供給は遙かによいから、細胞構成物質の合成能率が悪いとは考え難い。むしろエネルギー摂取の能率が悪いことによるのであろう。発酵条件においては、複合培地では限定培地より傾斜が急であるが、グルコース消費量が多くなると少し下に曲がり、菌の成長収量は低下する。栄養物の消耗によるのかも知れない。硝酸呼吸条件ではグルコース消費量が少ないときは呼吸条件と余り差がないが、消費量が増すとはっきり下に折れて、発酵条件に近い勾配になる。

グルコース消費量と菌の成長量との比は、グルコース1モル当りの乾燥菌量(g/モル)に換算され、モル成長収量と呼ばれる。充分栄養を与えたとき種々の嫌気性細菌で測定されて、ATP生成量と関係があることが分かり、ATP生成モル当りの菌体合成量 $Y_{ATP}$ は菌の種類によらず比較的一定で、10.5 g/ATPモルとさえ言われている。菌の生命維持のための基礎量など補正する必要があるともいうが、一応 ATP 生成の目安となる。逆にその代謝におけるATP生成量の判定に使われる場合もある。

われわれの実験の場合、菌の成長量と消費グルコース量の曲線の勾配から求めたモル成長収量を図表59に示す。複合培地の場合は低消費の方の値を示してある。複合培地における発酵が、式



に従って行われるとすると、ATPの生成は3モルと考えられるから、 $Y_{ATP}$ は12.3 gとなる。これで硝酸呼吸のモル成長収量を割ると5.5が得られる。



ではATP4モルの基質レベルのリン酸化が認められるから、それとの差1.5モルは他の反応、おそらく硝酸還元電子伝達から生じるのであろう。その量は呼吸条件の値が低いので、推量することが出来ないが、単なる基質レベルのリン酸化だけでこれだけのATPを生じることは出来ないで、ATP生産には電子伝達に共

図表59. 大腸菌のモル成長収量  
(乾菌 g/グルコースモル)

|      | 限定培地 | 複合培地 |
|------|------|------|
| 呼吸   | 160  | 69   |
| 硝酸呼吸 | 46   | 67   |
| 発酵   | 24   | 37   |

役する酸化的リン酸化も関与しているのであろう。

### 3) 水素およびギ酸の酸化による成長

微生物の栄養において、多くの栄養物質は一方では体物質を合成する材料となり、他方ではその分解によってエネルギーを供給するという2面を持っている。その2つを切り放して扱うことが出来れば、エネルギーと成長との関係をより単純に考察することができる。このような見地から、酸化されればエネルギー源にはなるが、細胞構成物質の材料にはなり得ない基質は水素とギ酸である。水素は炭素を含まないし、ギ酸も酸化されて二酸化炭素を生じるだけで、他の反応・同化は、少なくとも大腸菌においては、量的に問題にならない。硝酸呼吸のエネルギーを酸素呼吸などのエネルギー摂取と比較するために、大腸菌におけるギ酸酸化に伴う菌の成長を調べてみた。

ギ酸を含むペプトン培地における大腸菌の成長を図表60に示す。嫌気条件下では硝酸などの電子受容体なしに成長は殆ど起こらない。硝酸塩があるときは、ギ酸がなくてもペプトンが硝酸で酸化されるために若干の成長がみられるが、ギ酸の存在で約3倍に高められ、急速な成長が起こる(60B)。フマル酸を硝酸のかわりに加えたときは、ギ酸抜きでは成長は低く抑えられ、ギ酸の添加で成長が起こる(60C)。トリメチルアミンNオキシド TMANO の添加によっても同様である(60D)。酸素の存在ではペプトンだけで相当な成長が見られる(60A)。結局、酸素・硝酸・TMANO・フマル酸の順に酸化力が強く、ペプトンの酸化によってもエネルギーを受け取るが、ギ酸の酸化で成長量と成長速度が顕著に増すので、それからエネルギーを得ていることは疑いない。ペプトンの酸化に対する補正を加えて、ギ酸1モルの酸化に対して硝酸の場合6.5 g, フマル酸の場合7.6 g, TMANOの場合7.0 gの菌量であった。

水素の酸化による成長も同様に硝酸の存在において認められた(図表61)。硝酸塩などの電子受容体のない場合成長は殆どないが、硝酸の存在でよい成長が見られる。同時に亜硝酸が生成し、水素により還元を受けていることは確かである。硝酸の代わりにフマル酸やトリメチルアミンNオキシドを用いても成長した。このことは水素によるそれらの電子受容体の還元でエネルギーが得られることを物語る。水素の酸化量と細胞物質の合成量との比はどの場合も同じで7.8 g/モル

図表 60. ギ酸による大腸菌の成長

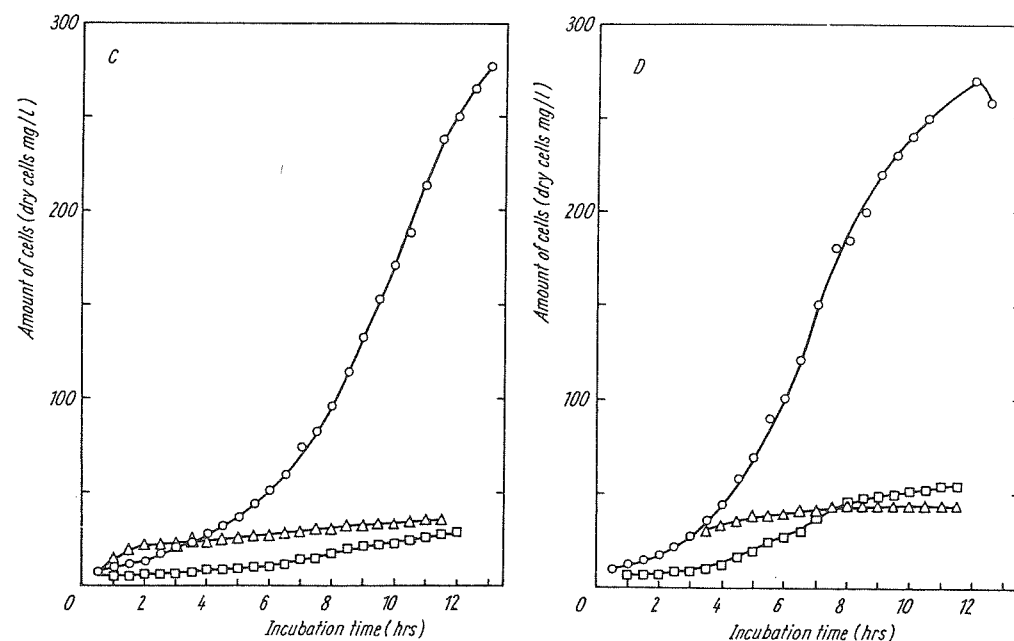
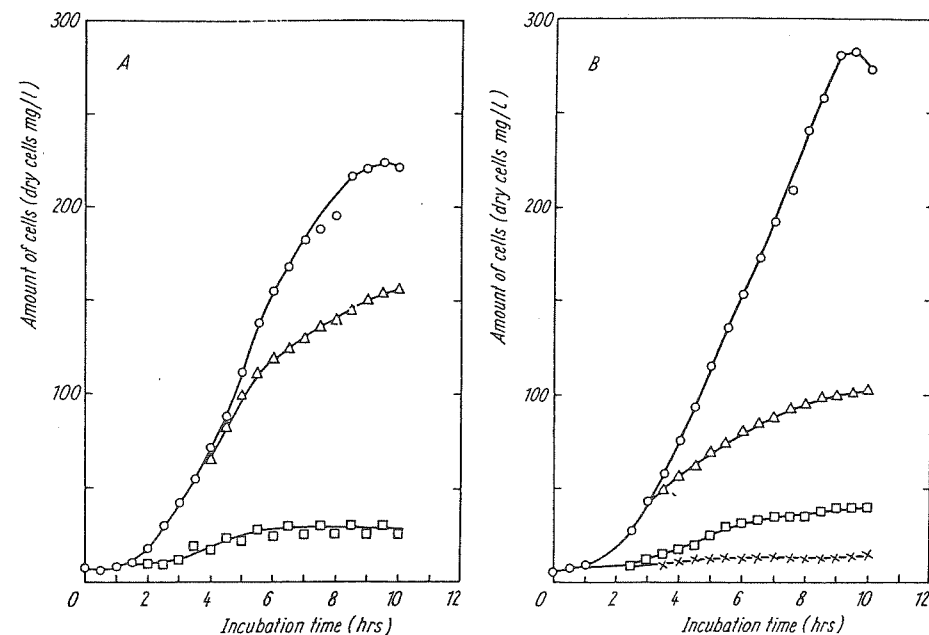


Fig. 1. Growth of *E. coli* by oxidation of formate under aerobic and anaerobic conditions in the presence of nitrate, fumarate and trimethylamine N-oxide. The complete systems in anaerobiosis contained 50 mM formate, 0.5% peptone, and 50 mM acceptor and in aerobiosis the former two. A: Aerobiosis, B: anaerobiosis with nitrate, C: with fumarate, D: with trimethylamine N-oxide. ○ Complete system, △ formate omitted, □ peptone omitted, × acceptor omitted

図表 61. 水素による大腸菌の成長

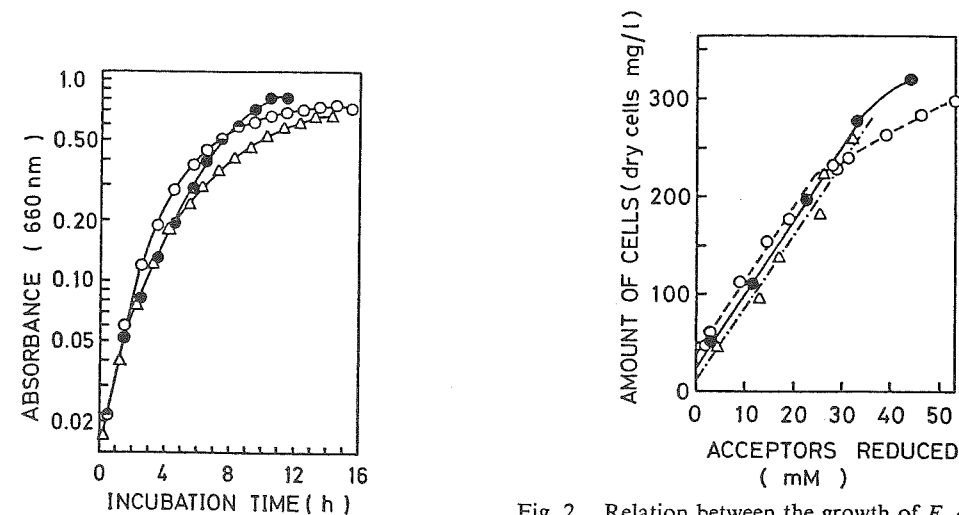


Fig. 1. Anaerobic growth of *E. coli* in the presence of nitrate, fumarate, or TMANO under an  $H_2$  atmosphere. Details were given in "EXPERIMENTAL PROCEDURE." Nitrate (○), fumarate (●), and TMANO (△) were added as acceptors.

Fig. 2. Relation between the growth of *E. coli* cells on hydrogen and the accumulation of reduced products of electron acceptors. Amounts of cells estimated in terms of  $A_{660}$  were plotted against the concentration of accumulated nitrite from nitrate (○), succinate from fumarate (●), and trimethylamine from TMANO (△).

であった。しかし、水素に直接反応するヒドロゲナーゼの活性はフマル酸培養の場合が一番強く、硝酸培養では弱くなる。この場合も、酸素による水素の酸化で大腸菌の成長を見ようと試みたが、水素の影響ははっきりみられなかった。この場合、酸素によりヒドロゲナーゼが不活性化されるためか、ペプトンの酸化が優先して合成原料が消耗してしまうためかは不明である。いずれにしても爆発の危険を伴う危ない実験で、培養容器内の気層を少なくし、空気と水素を別の管から吹き込んで行った。

これらの実験によりギ酸・水素の酸化でエネルギーを得ることが示されたが、これは電子伝達に共役する酸化的リン酸化以外には機構が考えられない。その存在を示すと思われる。

なお、周知のように微生物は栄養的に、有機物を成長に必要とする従属栄養生物と有機物を必要としない自立栄養生物とに分類される。後者は二酸化炭素から自己の体を合成できるというわけであるが、微生物の中にはその大部分の物質の合成能力を持っているが、ビタミンを少量必要とするものがある。それで、体構成物質の原料として有機物を必要としても、エネルギーを無機的な反応から取れ

る生物を lithotroph (無機力源生物)、有機物の反応から取る生物 organo-troph (有機力源生物) として分類することが提案された。しかし、上述の実験は大腸菌が水素-硝酸の反応でエネルギーを取って成長し得ることを示したもので、大腸菌も lithotroph ということになる。このような生活様式はむしろありふれたものである。

#### 4) 硝酸呼吸下における代謝系の切り換え

話はグルコース培養に戻る。以上の限定培地における成長実験の多くは、限定培地で好氣的に培養した菌を接種して行ったが、複合培地で培養した菌を用いたときには、硝酸呼吸条件で必ずしも成長がよくないことに気付いたので、その点の検討を行った。

この種の成長実験の再現性をよくするためには、接種に用いる前培養の条件を一定にすることが大事であり、前培養を一定にするためには前前培養を一定にしなければならない。実際には、新しい寒天斜面から菌を一白金耳取って試験管中の培地に接種して、1夜静置培養し、翌日、40倍の複合培地に移して9時間静置培養する。これを2回繰り返して前培養を得ていた。これを人間がやるのではなくたびれてしまうので、前前培養から前培養への接種は、タイマーを用いて熱帯魚水槽の通気用ポンプを働かせ、U字管で培養した前前培養を前培養容器の中に吹き出させる自動装置で行った。これはハンガリー留学のとき Dr. Zabos から習った方法である。夕方一人で実験していたら、いきなり目覚し時計がなって振とう培養機が動き出したのでびっくりしたことがある。目覚し時計のベルのネジの巻戻しでスイッチを入れていたのである。

こうして得た培養をグルコース・アンモニアの限定培地に移して、空気中で振とう培養すると、菌の成長は lag なしに始まり、2段階に行われる(図表62)。最初の速い成長が終わると一時速度が落ちた後、若干遅いが一定の速度で成長が再開し、グルコースの消失とともに停止する。発酵条件で成長は低い速度で進行し、pHが下がるとゆっくりになるが、pHを調節したときにはグルコース消失まで速度は余り低下しない。硝酸添加嫌気培養の場合は、当初の成長速度は呼吸条件と殆ど差がないが、呼吸条件の一段目の成長が終わる段階で、グルコースが残っているにもかかわらず、成長が止まってしまう。何故成長が止まるか、検討してみた。

図表62. 呼吸・硝酸呼吸・発酵条件下におけるグルコースによる大腸菌の成長

図表63. 呼吸条件下におけるグルコースによる大腸菌の成長、複合培地添加の影響

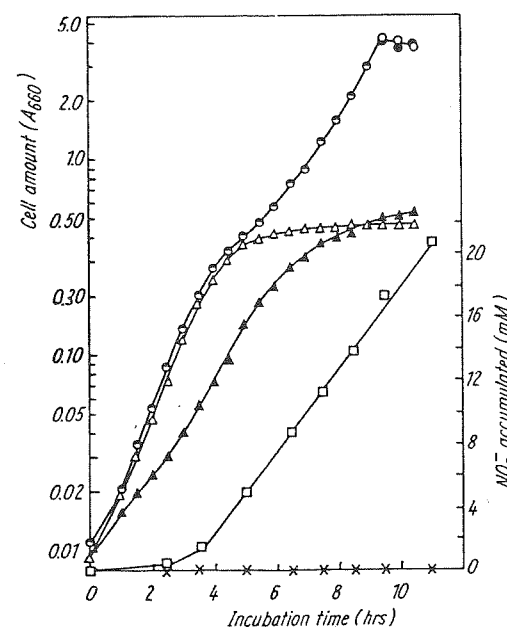


Fig. 1

Fig. 1. Aerobic and anaerobic growth in defined medium with and without nitrate and nitrite formation.

A culture in complex medium was transferred to 40 volumes of defined medium. ● Aerobic growth in the presence and ○ absence of nitrate. When the plots coincided the symbols ● or ○ were used. △ Anaerobic growth in the presence and ▲ absence of nitrate. □ Nitrite formed in the anaerobic and × aerobic culture

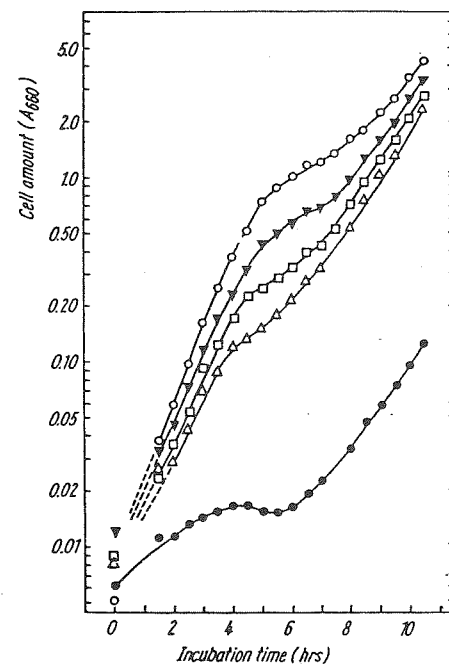


Fig. 2

Fig. 2. Aerobic growth in defined medium in the presence of different amounts of the supernatant of the preculture.

Defined medium was inoculated with washed cells grown in complex medium. The supernatant of the preculture in complex medium was added to the culture. The amount was ● none, △ 0.63%, □ 1.25%, ▼ 2.5%, and ○ 5% in volume

以上の実験では、培養液ごと前培養を新しい培地に加えていたが、前培養を遠心分離して菌だけ集め、生理的食塩水で洗って、その懸濁液を限定培地に加えてみた。また、さらに前培養培地上清を様々な量加えて、その影響を見た。呼吸条件、すなわち空気中で振とう培養したときは、すべて成長は2段に進行したが、1段目の成長終了時の菌の成長量は、加えた上清の量に比例した(図表63)。上清を加えないときは、菌量の極めて低い段階で1段目が終わり、長時間たった後後半の成長が始まった。一段目の早い成長は培養上清に残った複合培地中の栄養物によるのであって、その消失にともなって限定培地のグルコース・アンモニア栄養に切り替えが起こると考えられる。確かに、前培養上清の代わりに複合培地



図表 6 4. 硝酸呼吸条件下におけるグルコースによる大腸菌の成長、  
複合培地添加の影響

図表 6 5. 硝酸呼吸条件下における大腸菌の成長停止に対する  
複合培地添加の影響

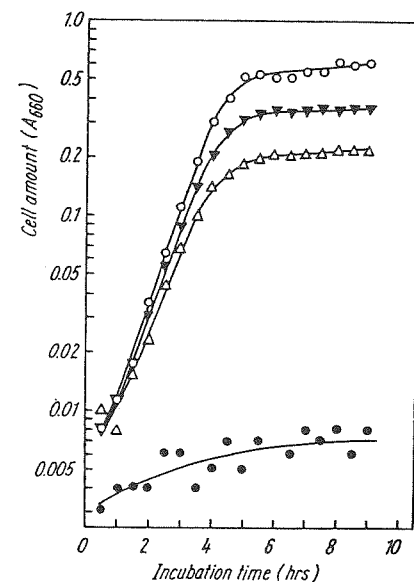


Fig. 3

Fig. 3. Anaerobic growth in defined medium with nitrate in the presence of different amounts of complex nutrient.

Washed cells grown in complex medium were inoculated. The amount of complex medium added to the culture was ● none, △ 1.25%, ▼ 2.5%, and ○ 5% in volume

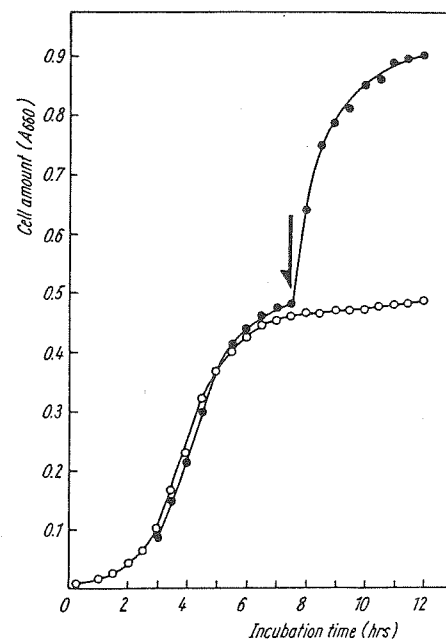


Fig. 4

Fig. 4. The effect of adding complex nutrient on growth after the cessation of growth in defined medium with nitrate.

A culture in complex medium (2.5% in volume) was transferred to defined medium with nitrate and growth was followed under anaerobic conditions. ● Complex medium (2.5%) was added to the culture after 7.5 hours incubation, as indicated by an arrow, and ○ not added. As the plots coincided almost completely in both cases during the first 3 hours of incubation, closed circles were not drawn

小量を添加したときも同じような2段の成長がみられる。栄養切り替えによる2段の成長は、古くから観察され、diauxieと呼ばれていた。グルコースとラクトースの両者を含む培地で大腸菌を飼うとこのような現象が起こる。グルコースの消耗に際してラクトースの分解酵素が誘導されて2段目の成長にはいる。始めからラクトースのみの培地では酵素の合成に時間が掛かり成長が遅れるが、共存では切り替えは短時間で行われるのである。この複合培地から限定培地への大腸菌の適応がこの2段階の成長を示したのである。

同様に硝酸添加限定培地に複合培地培養菌を洗って加えたときには、窒素ガス通気の嫌気培養で成長は見られなかった。前培養上清の添加により成長するが、

その量に応じて成長が止まる(図表64)。そこへさらに上清を再添加すると、また成長が再開し、その量に応じて停止した(図表65)。この結果は、硝酸呼吸条件下における成長の停止が栄養の不足に基づくもので、グルコース・アンモニア以外の物質を必要とすることを示す。

接種菌として限定培地に好氣的に生育した菌を使用するとき、成長の第1段にある菌は硝酸添加限定培地で嫌氣的に成長できないが、第2段に入った菌は同じ条件で充分生育することが分かった。このことはグルコース・アンモニアに適応した菌なら硝酸呼吸条件下でも生育することを示すものである。未適応菌は呼吸条件下では適応できるが、硝酸呼吸条件下では適応出来ないこと、すなわち必要栄養物合成のための代謝の切り換えが出来ないのである。

その物質は何であろうか？ その酵素は何か？ ペプトン・肉エキスに含まれる物質として先ず第1にアミノ酸が考えられるので、その混合物であるカサミノ酸を試してみた。これが有効であったので、20種のアミノ酸を全部試験したところ結局イソロイシンとバリンがその物質であることが分かった。イソロイシンとバリンを添加することによって、硝酸添加嫌気条件下で限定培地中の成長が行われる。バリンの残存によるレプレッションが考えられないこともないが、イソロイシンあるいはバリンが消耗して合成が進まないことには違いない。

合成系のどの酵素がないか明らかにするため若干の酵素を定量してみた。その結果、トランスアミナーゼは健在であるが、アセトヒドロキシル酸シンターゼ活性が低下していることが分かった。あるいは還元で生じた亜硝酸がこの酵素を極端に低下させているのかも知れない。しかし、一方で適応した菌が硝酸呼吸下でグルコース・アンモニアで成長できるので、必ずしもそれだけではないだろう。

酵素の誘導のきっかけにどう作用するか、今後の検討が興味持たれる。

なお、嫌氣的に成長しつつある発酵条件の大腸菌に、硝酸あるいは亜硝酸を添加すると直ちに成長が止まる。始めから硝酸存在下で培養を始めたときには、多少の亜硝酸があっても充分生育するのに、不思議なことである。

以上の現象が K10株に特有なことか、あるいは大腸菌の種の特徴であるかはまだ検討していない。特に K10 はいわゆる relax 株なので、普通の stringent 株で検討する必要がある。

## 5) 好気条件と硝酸還元酵素の生成

硝酸還元は生理的意義から同化的還元とエネルギー代謝的還元とに分けられて、よく比較対照される。後者は一般に異化的還元と呼ばれるが、硝酸塩自身にとって異化というのはおかしい話である。しかし異化過程と結びつく還元という意味と考えればいいのかも知れないので、以下そのように使うこととする。

細菌には広く異化的硝酸還元酵素が存在するが、植物・藻類・菌類には同化的な硝酸還元酵素があり、よく研究されてきた。両者ともモリブデン酵素であり、チトクロムを成分ユニットとして含むものであるが、分子としての体制は大きく異なっている。図表66に示すように、大腸菌などの異化的硝酸還元酵素は膜結合性で、キノンないしチトクロムを電子供与体とするのに対して、同化的酵素

図表66. 同化的硝酸還元酵素と異化的硝酸還元酵素

|              | Assimilatory                                                                                                             | Dissimilatory                                                                                                                                                                 |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Significance | N source<br>"Nitrate<br>assimilation"                                                                                    | Terminal oxidation<br>"Nitrate<br>respiration"                                                                                                                                |
| Organism     | plant, fungi, algae, bacteria<br>(bacteria, cyanobact.)                                                                  | bacteria                                                                                                                                                                      |
| Pathway      | $\begin{array}{c} \text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{NaR}} \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{NiR}} \text{NH}_3 \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{NaR}} \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{NiR}} \text{N}_2 \\ \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{NiR}} \text{NH}_3 \end{array}$ |
| Repression   | NH <sub>3</sub>                                                                                                          | O <sub>2</sub>                                                                                                                                                                |
| NaR          |                                                                                                                          |                                                                                                                                                                               |
| Cofactor     | Mo, heme, FAD                                                                                                            | Mo, Fe, S, (heme)                                                                                                                                                             |
| State        | soluble                                                                                                                  | membrane-bound                                                                                                                                                                |
| Content      | 0.2 %                                                                                                                    | 3 %<br>(10 % of mem. protein)                                                                                                                                                 |
| NiR          |                                                                                                                          |                                                                                                                                                                               |
| Cofactor     | siroheme                                                                                                                 | cyt d, cyt c<br>or Cu                                                                                                                                                         |

はフラビンを含み、NADPHを電子供与体とする。いわば、分子内（サブユニット集合体）の中に小さな電子伝達系を持っていて、その出口が硝酸になるのである。この機構は同化的亜硫酸還元酵素に似ている。反応性が強く、強力な電子受容体である分子状酸素が存在する好氣的条件において還元を確保するためには、有効な手段なのかも知れない。なお、同化型硝酸還元酵素はアンモニアなどによってレプレシオンを受けるが、異化型は酸素によってレプレシオンを受ける。

大腸菌において異化的硝酸還元酵素の他に同化的硝酸還元酵素が存在するかどうかは、以前から関心の払われた問題であった。好氣的条件で硝酸を与えると、呼吸の意味はないが、同化の目的で還元を受けるのではないかと考えられていた。Aerobacter aerogenes などが好氣的に硝酸を窒素源として利用して生活する過程が観察されていたが、大腸菌ではその記載はなかった。

それで、硝酸を唯一の窒素源として含むグルコース限定培地に大腸菌K10株を接種して空気中で培養し成長を調べてみた。静置培養したときには成長したが、振とう培養したときには全く成長が見られなかった。勿論、アンモニアの存在ではどちらの場合もよく成長する。静置培養したときは、酸素消費により部分的にはむしろ嫌気培養になる。接種菌の成長条件をいろいろ変えても（硝酸添加嫌気・好気）、好氣的には硝酸を唯一の窒素源として生えないことには変わりなかった（図表67）。これは、少なくとも好氣的には、この菌が硝酸同化をしないことを示す。

ここで、好氣的に硝酸を同化しないことが大腸菌の一般的性質かどうか調べるために、人体からの分離菌を含めて、大腸菌37株について、他の細菌各種とも調べてみた。図表68の結果が示すように、調べた限り大腸菌は総て好氣的には硝酸塩を窒素源として生えることが出来なかった。これと同じ性質を示したのは Citrobacter のみで、腸内細菌科 Enterobacteriaceae に属する Aerobacter, Klebsiella, Proteus はすべて好氣的に硝酸を利用して成長した。大腸菌の異化的硝酸還元能は好氣的条件で抑制されることはよく知られていたが、これ程ははっきりと種の違いを見せつけられたことはなかった。

しかし、好氣的条件で同化も行われないことは確かであるが、同化のための硝酸還元酵素が異化的酵素の他に存在するか否か？

大腸菌の塩素酸耐性株の一つは嫌気条件で硝酸を唯一の窒素源として成長する

図表 6 7 . 大腸菌の硝酸同化成長と酸素の影響

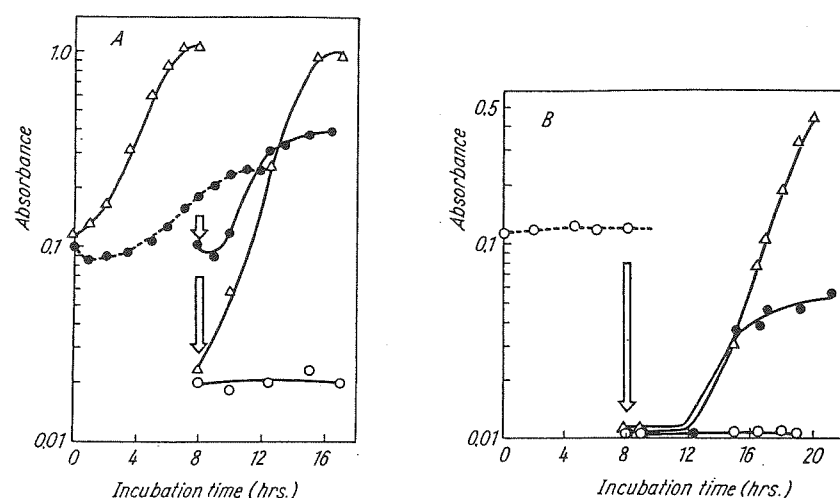


Fig. 2. Influence of a shift of conditions and of nitrogen source on growth of cells from a synthetic medium containing nitrate  
Cells grown anaerobically (A) or incubated aerobically (B) in a nitrate-synthetic medium were collected after 8 hrs and incubated in a synthetic medium containing nitrate or ammonium. Changes in absorbance were followed under aerobic or anaerobic conditions ( $\circ$   $\text{NO}_3^-$  aerobic,  $\bullet$   $\text{NO}_3^-$  anaerobic,  $\Delta$   $\text{NH}_4^+$ , standing under air)

図表 6 8 . 大腸菌および多種細菌諸株の硝酸同化成長に対する酸素の影響

Table 4  
Influence of oxygen on nitrate assimilation of various strains of *E. coli* and other bacteria

| Bacterial strains                                                                                                                                                                               | Conditions of cell growth                             |                                          |                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                 | N-source:<br>$\text{NH}_4^+$<br>standing<br>under air | $\text{NO}_3^-$<br>aerobic<br>conditions | $\text{NO}_3^-$<br>anaerobic<br>conditions |
| <i>Escherichia coli</i> , K-10, AB 2277, IAM 1268, CMF, E 52, C, K-12, B, YAMAGUCHI, No. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34 | ++                                                    | -                                        | +                                          |
| <i>Citrobacter</i> , No. 1, 2, 3, 4, 5                                                                                                                                                          | ++                                                    | -                                        | +                                          |
| <i>Klebsiella-Aerobacter</i><br><i>Klebsiella</i> , No. 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 23<br><i>Aerobacter aerogenes</i> , AHU 1340, AHU 1538                             | ++                                                    | +                                        | +                                          |
| <i>Klebsiella</i> , No. 13, 17, 19<br><i>Aerobacter aerogenes</i> , AHU 1338                                                                                                                    | ++                                                    | -                                        | +                                          |
| <i>Proteus</i> , No. 6, 13                                                                                                                                                                      | ++                                                    | +                                        | +                                          |
| <i>Proteus</i> , No. 9, 11                                                                                                                                                                      | ++                                                    | -                                        | +                                          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , P 15                                                                                                                                                            | ++                                                    | +                                        | -                                          |

ことが出来たが、この菌の硝酸還元酵素活性は有機窒素の存在下で低下した。これは同化的酵素の属性なので、この菌から硝酸還元酵素を抽出して可溶化し、性質を調べようとしたが、不安定で先へ進められなかった。

最近、大腸菌に第2の硝酸還元酵素が存在するという報告がある。また、広島大学にいられた日野精一氏は、硝酸同化条件で分離した細菌について同化的硝酸還元酵素を抽出して性質を検討されている。異化型と比べて活性が弱くその存在に覆われてしまうこと、不安定であることがその発見を妨げたと言えよう。

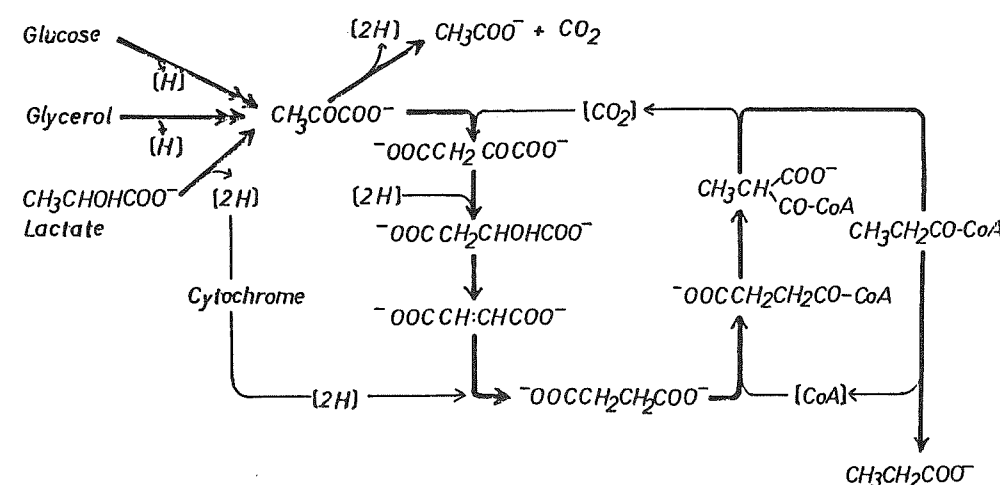
### 3. プロピオン酸発酵に対する硝酸還元の影響

上述のように、硝酸還元により、*Clostridium perfringens* の酪酸発酵、大腸菌の混合酸発酵が酢酸の生成に切り換えられることを明らかにしたが、他の型の発酵はどのような変化をうけるであろうか？ 硝酸を電子受容体としてNADHなどが酸化されれば、どういう生成物を与えるだろうか？ プロピオン酸菌は嫌気性菌であるがチトクロムを含み、呼吸的にフマル酸を還元することが曾根氏によって報告されているので、プロピオン酸発酵について検討を加えた。

菌は *Propionibacterium acidipropionici* (旧 *P. plantarum*) を使用したが、多くの株は硝酸還元能を持っていない。菌を乳酸培地で硝酸存在下に培養しているうちに突然硝酸還元能を持った菌が出現して増殖したので、その株を分離して使うこととした(2B3 株)。

プロピオン酸菌はグルコースあるいは乳酸あるいはグリセロールをプロピオン酸・酢酸・二酸化炭素に分解する菌で、プロピオン酸生成のための複雑な経路を持っている。(図表69)。C<sub>4</sub>ジカルボン酸の生成・コハク酸への還元・CoA結合状態で行われる異性化と脱カルボキシルによってプロピオン酸が合成される。中間生成物相互の間のカルボキシル基移転・CoA移転によってエネルギーを節約するように進行し、フマル酸のコハク酸への還元にはチトクロム系が電子伝達を行い、

図表69. プロピオン酸発酵経路



図表70. *Propionibacterium acidipropionici* の呼吸および硝酸呼吸条件下における成長

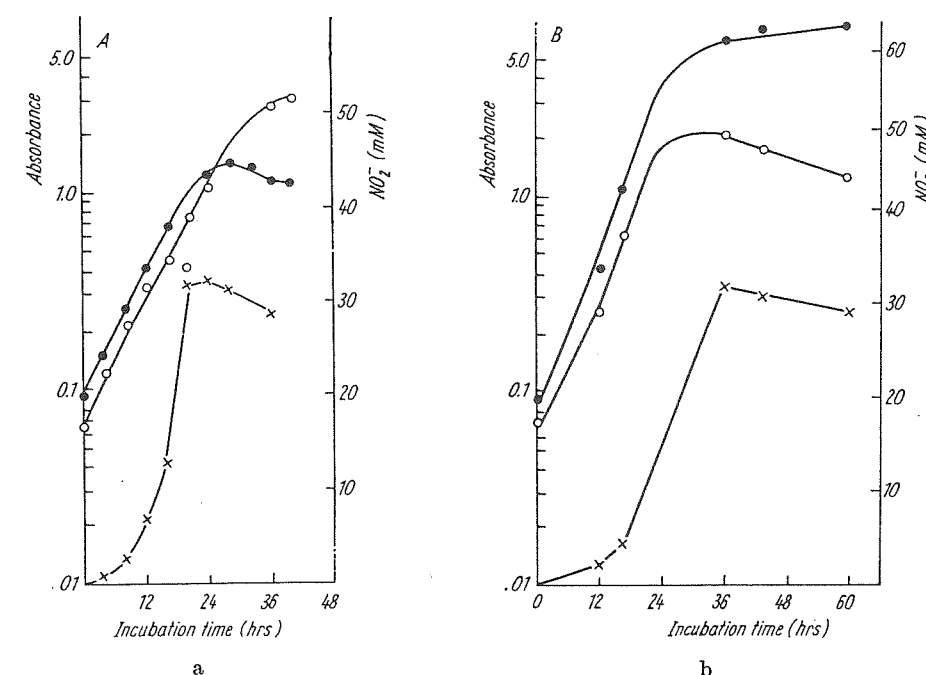


Fig. 1. Anaerobic growth of *P. acidipropionici* 2B3 on lactate (A) and glucose (B) and nitrite formation. A) ● Growth in the presence of nitrate, ○ growth in the absence; B) ○ growth in the presence of nitrate and ● growth in the absence; and × nitrite accumulated

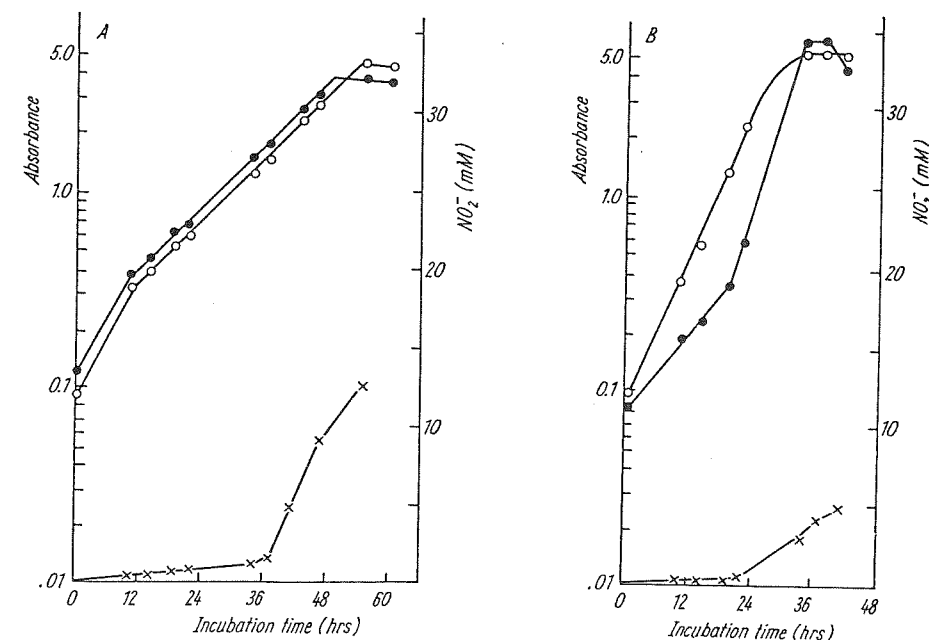


Fig. 2. Aerobic growth of *P. acidipropionici* 2B3 on lactate (A) and glucose (B) and nitrite formation. Symbols are the same as in Fig. 1A

それと共役して ATP を形成するらしい。プロピオン酸のような還元が進んだ物質を作るので、一方で酸化的に酢酸を作ることができ、これもATP生成につながる。この菌は嫌気性菌であるが、酸素に特に弱いわけではなく、TCAサイクルも持っていると言われる。成長は大腸菌などと比べると遙かに遅く、定常期に達するのに2日かかる。しかし、消費グルコース当りの菌成長量はよく、多量のATPの生産および能率のよい合成反応を行っているに違いない。

用いた菌はよく硝酸を還元したにもかかわらず、その成長は硝酸の存在により顕著な影響を受けなかった(図表70)。もっとも空气中で振とうしても成長には影響がない。これに対して、大腸菌では酸素があれば殆ど硝酸還元が止まるが、この菌では空气中で振とうしても、硝酸を加えれば亜硝酸を生じる。

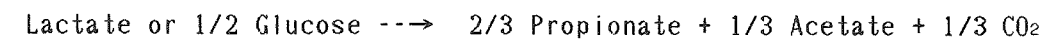
このプロピオン酸菌の成長は大腸菌と較べて遙かに遅いので、その測定のサンプルは3時間ごとに取らなければならない。一定時間ごとに動くフラクションコレクターとタイマーを用いて、低温室の中で菌を培養してポンプを動かし、取り出した培養液を冷えた状態で翌朝まで放置する方法を取った。低温室の中に発熱体を持ち込んだということで評判が悪かったが、当時冷却槽を持っていなかった

図表71. *Propionibacterium acidipropionici* の  
発酵生産物に対する硝酸還元の影響

|    |        | 嫌気条件                          |                               | 好気条件                          |                               |
|----|--------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|    |        | -NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | -NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| 消費 | 乳酸     | 1                             | 1                             | 1                             | 1                             |
| 生成 | プロピオン酸 | 0.50                          | 0.24                          | 0.03                          | 0.05                          |
|    | 酢酸     | 0.29                          | 0.33                          | 0.86                          | 0.71                          |
|    | ビルビン酸  | 0.01                          | 0.48                          | 0.01                          | 0.02                          |
| 消費 | グルコース  | 1                             | 1                             | 1                             | 1                             |
| 生成 | プロピオン酸 | 1.40                          | 0.53                          | 0.07                          | 0.94                          |
|    | 酢酸     | 0.42                          | 1.13                          | 1.49                          | 1.23                          |
|    | ビルビン酸  | 0.01                          | 0.09                          | 0.00                          | 0.01                          |

ので仕方なかった。

乳酸およびグルコースの嫌氣的分解生成物を図表71に示す。消費基質を1として生成物のモル数を与えてある。式



にほぼ従うように見えるが、硝酸の存在では、プロピオン酸が減少し、酢酸・ビルビン酸が増加する。酸素の存在においてはプロピオン酸が極めて少なくなり、酢酸が著しく増すが、炭素の回収は概して低くなる。二酸化炭素への完全酸化も行われているのかも知れない。

硝酸還元によって全体的に、還元的なプロピオン酸経路が弱くなり、酸化的な酢酸の生成が増すことは明かであるが、*C. perfringens* や大腸菌のように還元的発酵産物の生成が殆ど抑えられるということはなかった。

*P. acidipropionici* の硝酸還元酵素の検討を行った。本菌の抽出液はグリセロールリン酸・NADH・乳酸によってよく硝酸を還元して亜硝酸を生じる。この反応は酸素ばかりでなく、フマル酸によっても部分的に阻害を受ける。メチルヴィオロゲン電子供与体として硝酸還元酵素を測定すると、膜画分にあることが分かった。これを Emulgen 810 で可溶化し、DEAEセルロース・セファローズ4B・DEAEセファデックスのクロマトグラフィーで46倍まで部分精製した。それほど安定ではないが、分子量23万、等電点5.0-5.5であることが分かった。硝酸に対するKmは0.1mM。ヴィオロゲン色素は電子供与体となるが、FAD, FMNを含めて補酵素は供与体にならなかった。精製の途中でチトクロムを含む赤い画分が得られたが、それともつながらなかった。アジド・シアン化物・チオシアン酸は阻害を示す。培養時にタングステン酸を添加すると活性が落ち、モリブデン酸の共存で回復するので、やはりモリブデン酵素と思われる。



#### 4. *Mitsuokella multiacidus* の硝酸還元

各種の細菌で硝酸還元を検討していて、嫌気性菌の培養に馴染んだので、人体に関係ある細菌ということで、腸内偏性嫌気性細菌の代謝を検討し始めた。ヒトの腸内細菌で最も多いのは *Bacteroides* 属に属する細菌である。この菌は強度の嫌気性菌で、微量の酸素の存在においても成長できない。それにもかかわらず、チトクロムを持ち、フマル酸を還元してコハク酸を生じる。硝酸を還元するものは必ずしも多くないが、その一つ *B. multiacidus* を選んで、発見者の光岡知足氏から頂き、その硝酸還元を研究することにした。この菌は通常の *Bacteroides* とは若干異なるようで、後に *Mitsuokella multiacidus* と改められた。

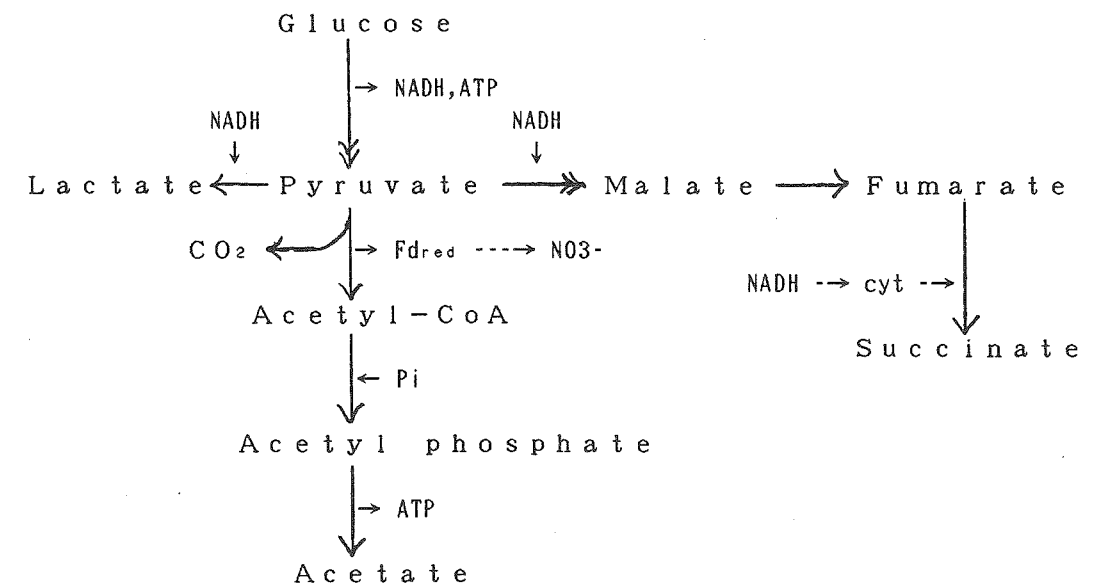
硝酸塩の有無におけるこの菌の成長および発酵生産物は、消費グルコース1モル当りの生成モル数として図表72に示す。培養はペプトン・酵母エキス・グルコース培地で行い、ヘミンを添加した。グルコースからの炭素の回収率は酢酸・乳酸・ピルビン酸・コハク酸の和を消費グルコースのモル数の2倍で割って求められるが、余り高い値ではない。乳酸・コハク酸が主要生産物であることは確かである。硝酸添加で還元が起こると、乳酸・コハク酸が減少する。生じた亜硝酸は時間がたつと減少し、酸化還元のバランスはさだかではない。推量される代謝経路図を、図表73に掲げる。

図表72. *Mitsuokella multiacidus* によるグルコース分解生成物に対する硝酸還元の影響

| 添加              |     | 生成物 (グルコース 1 モルより) |      |      |       |      | 回収 (%) |
|-----------------|-----|--------------------|------|------|-------|------|--------|
| $\text{NO}_3^-$ | ヘミン | $\text{NO}_2^-$    | 酢酸   | 乳酸   | ピルビン酸 | コハク酸 |        |
| —               | —   | —                  | 0.03 | 1.15 | 0.03  | 0.19 | 70     |
| —               | +   | —                  | 0.06 | 1.16 | 0.03  | 0.19 | 72     |
| +               | —   | +                  | 0.32 | 0.97 | 0.01  | 0.11 | 70     |
| +               | +   | +                  | 0.27 | 0.85 | 0.01  | 0.11 | 62     |
| +               | +   | 0.25               | 0.21 | 1.03 | 0.02  | 0    | 63     |

\*  $\text{NO}_3^-$  50mM, 他は 10mM

図表73. *Mitsuokella multiacidus* の代謝経路



抽出液はメチルヴィオロゲンで硝酸・亜硝酸・フマル酸を還元するが、その硝酸およびフマル酸の還元活性は主に超遠心沈澱画分に見出される。硝酸・亜硝酸の還元活性は硝酸添加培養で数倍増加するが、フマル酸還元活性は逆に低下する。ヘミンの添加培養では硝酸還元活性は影響を受けないが、亜硝酸およびフマル酸還元活性は2,3倍増加した。タングステン酸の添加培養は硝酸還元活性低下を起こすが、フマル酸還元活性を若干増加させる。モリブデン酸の共存はこの効果を失わせるので、硝酸還元酵素はやはりモリブデン酵素らしい。抽出液でこれらの還元に対する電子供与体としては、メチルヴィオロゲン・ベンジルヴィオロゲンが有効であったが、フマル酸に対してはNADHも1/10程度の作用があった。また硝酸還元に対しては *Clostridium pasteurianum* のフェレドキシンが有効であった。メチルヴィオロゲンと比べては決して強いとは言えないが、 $K_m$  は 0.1 mM であった。本菌には c型らしいチトクロムがあり、抽出液で NADH により還元され、フマル酸によって酸化される。硝酸による酸化は部分的で遅く、硝酸還元酵素へのつながりはフマル酸還元酵素に対するつながりより悪い(図表74)。

フェレドキシンを電子供与体とする点、この硝酸還元酵素は *C. perfringens* の硝酸還元酵素と類似しているので興味深く、その精製を試みた。膜画分から1%

図表74. *Mitsuokella multiacidus* のチトクロム

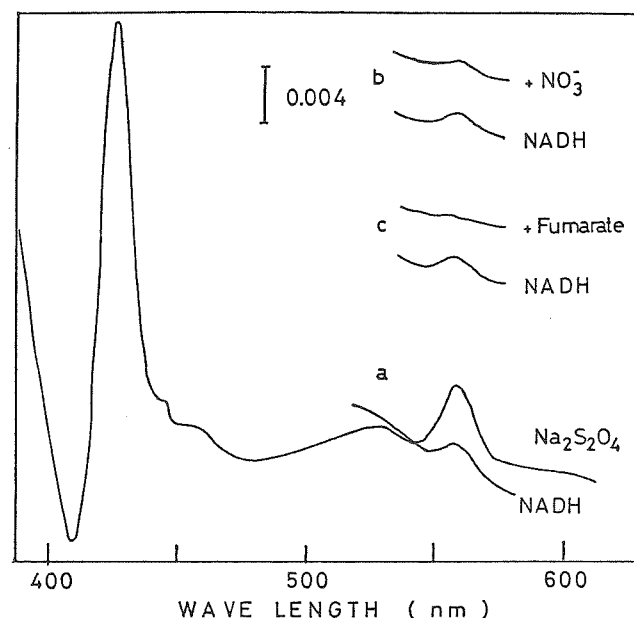


Fig. 2. Difference spectra of extract from *B. multiacidus*.

Crude extract from cells grown in a medium containing hemin was employed. The reference was the extract oxidized by adding 5 mM ferricyanide. a, reduced by dithionite and by 0.45 mM NADH; b, reduced by NADH and then 6 mM nitrate was added; c, reduced by NADH and then 6 mM fumarate was added.

デオキシコール酸によって可溶化し、DEAEセファローズでクロマトグラフィーを行った。概して不安定でその先の精製が困難であったので、抗体アフィニティークロマトグラフィーを行って精製した。それには、DEAEセファローズ部分精製標品を表面活性剤の存在でポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、メチルヴィオロゲン還元型・硝酸の液に浸して染色して、脱色した酵素バンドを切り取る。これをまた濃度の異なったゲルの上に乗せて電気泳動を再び行った。この活性バンドに含まれるタンパク質は異なった条件の電気泳動で単一であったので、免疫に使った。バンドを切り取り、ホモジェナイズして、アジュバントとともにウサギに注射したのである。得られた抗血清は可溶化酵素と単一の沈降線を作り、挟雑タンパクとは反応しなかった。この血清のγグロブリンを Affi-Gel につけてカラムを作り、DEAEセファローズ精製標品を吸着させ、洗浄後、2 M  $MgCl_2$ -1 M KI を用いて溶離して、純品を得ることができた。抽出液に比べて 40 倍の比活性の上昇であったが、一部は不活性化しているかも知れない。分子量 16 万の単一ペプ

チド鎖からなるタンパク質である。モリブデン因子を含むことも証明した。 $K_m$ は硝酸に対して 0.1 mM、フェレドキシンに対して 0.2 mM であった。シアン化物・アジド・チオシアン酸によって阻害を受けた。

以上のデータからこの硝酸還元酵素は *C. perfringens* の酵素と特に似ているということはない。分子量は大腸菌などの A サブユニットに似ていて、膜との結合も類似している。しかしフェレドキシンとの反応は前者と近く、中間的な性質を持つとも言える。

## 5. アミノ酸分解に対する硝酸還元の影響

上述のように、糖の発酵に対して硝酸還元はどの菌に於ても酸化的作用を及ぼした。アミノ酸の代謝においてはどうか？

この問題は古く江上先生がフランスに留学したとき、Aubel の研究室で土壌から分離した菌が、アラニンを硝酸塩によりピルビン酸とアンモニアに酸化することを見出している。それが江上研における硝酸還元研究の発端であった。

この問題に答えるために、北大農場の水田の泥から、硝酸塩の存在下でカサミノ酸に嫌氣的に生える菌を集積培養を行って分離した。土壌の熱処理をしたので、最初は *Bacillus macerans* かと思ったが、*Klebsiella pneumoniae* と分類し直し、結局 *Enterobacter cloacae* ということになった。随分同定が変わったように見えるが、細菌分類の専門家の話でも、最初のグラム染色・孢子形成の判定は十分に念を入れないと、全く違った分類になってしまうというので、起こりがちのことと思われる。

以下は菊池慎太郎氏らの研究である。

分離した菌は糖もよく分解したが、好氣的条件あるいは硝酸添加嫌氣的条件で、アミノ酸混合物を栄養源として成長する。硝酸から亜硝酸を定量的に生成する。硝酸がないと、アミノ酸に嫌氣的に生えない。培地上清のアミノ酸をアミノ酸分析したら、セリン・トレオニン・アルギニンが完全になくなり、アスパラギン酸・グルタミン酸・イソロイシンは 30% まで減少、メチオニン・ロイシン・フェニルアラニン・チロシン・ヒスチジン・リジンは殆ど使われていなかった。アミノ

図表 75. 硝酸呼吸条件における *Enterobacter cloacae* の  
アミノ酸による成長

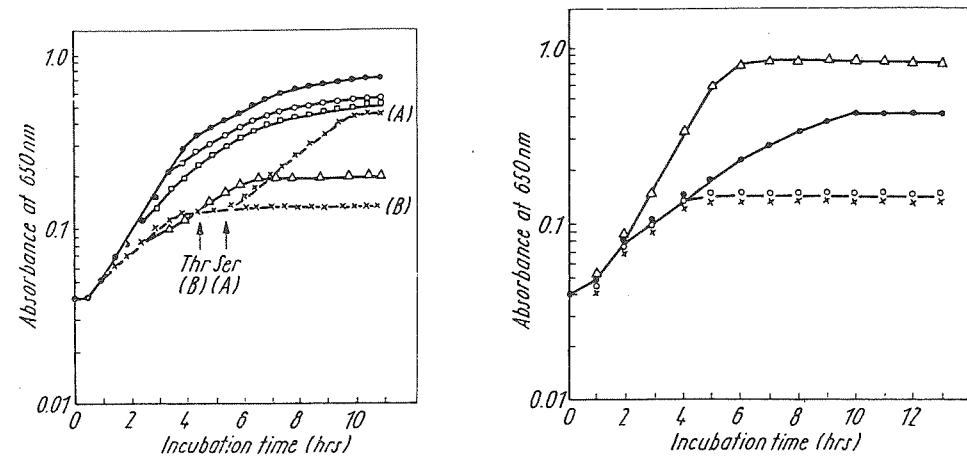


Fig. 1.

Fig. 1. Anaerobic growth of *K. pneumoniae* in the presence of nitrate on the mixture of ten amino acids.

Medium containing each 0.1% of alanine, arginine, asparagine, aspartate, glutamate, glutamine, isoleucine, serine, threonine and valine in place of Casamino acids and 20 mM  $\text{KNO}_3$  was inoculated with 5% volume of subculture in Casamino acids medium. ●, Complete medium; ○, asparagine and aspartate omitted; □, alanine, arginine, isoleucine and valine omitted; and ×, serine and threonine omitted. Serine (A) or threonine (B) was added at the time indicated by arrows. When values of absorbance coincided with those in the complete medium or in the serine-threonine-omitted medium, plots were presented by ● or ×

Fig. 2. Growth of *K. pneumoniae* on serine under aerobic and anerobic conditions in the presence and absence of nitrate

In aerobiosis (△) and anaerobiosis in the absence (○) and presence (●) of nitrate. ×, Serine omitted in the presence of nitrate

酸混合物からどれかのアミノ酸を抜いて培養すると、好氣的には何を抜いても成長したが、硝酸添加嫌気条件ではセリンとトレオニンを抜くと生えなくなった。これにセリンを加えると成長が回復したが、トレオニンだけでは駄目であった(図表 75)。セリンのみの培地でも、速度はやや落ちるが、硝酸還元条件で成長は充分進行する。面白いことはジペプチドであるグリシルグリシンもセリンと同じく硝酸還元条件で成長を支えた。グリシルグリシンはグリシンに比べて細胞膜の透過がよく、細胞内に入ればグリシンも成長に有効なのかも知れない。

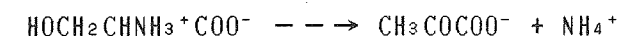
セリンの代謝産物は何だろうか？ グルコースと比較して、培養時の生成物を図表 76 に示す。この菌はグルコースの発酵の際は生成物としてエタノール・乳酸・酢酸が多いが、ギ酸とともにアセトン・ブタンジオールが見られる。硝酸の存在においては乳酸・エタノールがなくなり、酢酸・ビルビン酸が増加する。C4

図表 76. 硝酸呼吸条件における *Enterobacter cloacae*  
によるセリンおよびグルコースの分解物

| 生成物             | + $\text{NO}_3^-$ |       | - $\text{NO}_3^-$ |
|-----------------|-------------------|-------|-------------------|
|                 | セリン               | グルコース | グルコース             |
| $\text{NO}_2^-$ | 0.65              | 3.00  | -                 |
| 乳酸              | 0                 | 0     | 0.30              |
| ビルビン酸           | 0.12              | 0.28  | 0.02              |
| エタノール           | 0                 | 0     | 0.73              |
| 酢酸              | 0.40              | 0.68  | 0.21              |
| ギ酸              | 0.16              | 0.18  | 0.15              |
| アセトン            | 0.09              | 0.17  | 0.13              |
| アセトイン           | 0.02              | 0.07  | 0.01              |
| ブタンジオール         | 0.01              | 0     | 0.03              |
| コハク酸            | 0.01              | 0.06  | 0.01              |
| 細胞物質            | 0.19              | 0.19  | 0.14              |

化合物ではブタンジオールがなくなって、アセトインが増している。セリンからの生成物は、モル数で表してあるので2倍して比較しなければならないが、硝酸還元条件下のグルコースからの生産物と量的に近い。亜硝酸の生成量が少ないのは、セリンがグルコースより酸化の進んだ化合物であることによると思われる。

セリンの分解についてはセリンデヒドラターゼという酵素の存在が知られており、この菌からも抽出されるので、おそらくこの酵素によって以下の式のように分解されるのであろう。



この菌は硝酸の存在下において嫌氣的にビルビン酸+アンモニアでよく成長するので、セリンのビルビン酸への分解は可能性が大きい。

図表 77. *Enterobacter cloacae* 静止菌によるアミノ酸分解  
の生成物と  $\text{NO}_3^-$  の影響

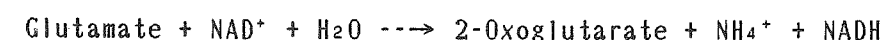
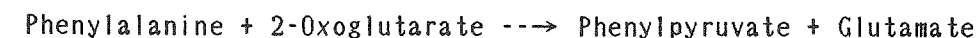
|                 | セリン              |                  | アラニン             | フェニルアラニン         |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                 | $+\text{NO}_3^-$ | $-\text{NO}_3^-$ | $+\text{NO}_3^-$ | $+\text{NO}_3^-$ |
| $\text{NO}_2^-$ | 1.14             | -                | 1.06             | 0.96             |
| ビルビン酸           | 0.06             | 0.01             | 0.07             | 0.00             |
| 酢酸              | 0.65             | 0.05             | 0.62             | 0.02             |
| ギ酸              | 0.64             | 1.24             | 0.54             | 1.02             |
| アセトン            | 0.11             | 0.37             | 0.15             | 0.02             |
| フェニル酢酸          | -                | -                | 0.00             | 0.83             |
| ブタンジオール         | 0.01             | 0.10             | 0.01             | 0.00             |

本菌の懸濁液は若干のアミノ酸を硝酸還元条件において分解する。硝酸があってもなくてもセリンの分解は嫌氣的に進行したが、アラニン・フェニルアラニンでは硝酸がなければ 3-4 % しか進まない。その結果を図表 77 に示す。セリンからの分解生成物はこの場合、アセトン・ギ酸が主で、ブタンジオールが多く、硝酸還元では酢酸が主要生産物となる。これは分解の中間に同じビルビン酸を経由するためかと思われる。フェニルアラニンからはフェニル酢酸の多量の生成が見出された。全体として硝酸による酸化で脱アミノと脱カルボキシル（ギ酸への）が次式のように起こったものと推量される。



本菌の抽出液はセリンをビルビン酸とアンモニアとに分解する。しかし、亜硝酸が生成するにもかかわらず、硝酸の添加はこの反応に大きな影響を与えない。またフェニルアラニンのフェニル酢酸への酸化は 2-オキソグルタル酸の存在によって促進される。グルタミン酸から 2-オキソグルタル酸が生成するので、フェニルアラニンの脱アミノ反応は、トランスアミナーゼとグルタミン酸デヒドロゲナ

ーゼの 2 段階の反応として行われるらしい。



この菌はカサミノ酸で分離したはずだが、D-セリンをよく利用し、抽出液での分解は L-セリンより D-セリンを強く分解した。同じ酵素が働いているように思えるので、D-セリンデヒドラターゼの精製を行った。ピリドキサルリン酸を加えて安定化して、DEAEセルロース（2回）・セファデクス G150・DEAEセファデクス・ヒドロキシルアパタイトのクロマトグラフィーにより、比活性を 140 倍に高め、単一の標品を得ることが出来た。この酵素の活性は D-セリンに比べて L-セリンは 1/40、D-トレオニンに対しては 14% であった。L-トレオニンは殆ど分解しない。D-セリン・L-セリン・D-トレオニンに対する  $K_m$  はそれぞれ 2.8 mM, 20 mM, 3.6 mM であった。ピリドキサルリン酸に対しては 2.5  $\mu\text{M}$ 。分子量は 4.0 万で、単一ペプチドからなる。

なおこの菌の硝酸添加嫌気アミノ酸培養細胞の抽出液は、還元により 556, 525, 431 nm に吸収ピークを示し、b 型のチトクロムの存在を示す。好気培養細胞はその他に 592, 632 nm にも極大を持つ。556 nm のピークの高さは、硝酸添加嫌気培養では好気培養と等しく、無添加嫌気培養の 4 倍であった。このチトクロムは NADH により還元され、硝酸添加で酸化を受けた。従って、アミノ酸培養細胞で硝酸還元酵素はチトクロムを利用しており、この面からもアミノ酸を基質とする嫌気呼吸と見なすことが出来る。

### III. トリメチルアミン N オキシドの還元

#### 1. N オキシドの還元と嫌氣的呼吸

硫酸還元と硝酸還元とがそれぞれ呼吸と類似した性質を持つことが明らかになったので、それらを併せて嫌氣的呼吸という術語が作られた。このカテゴリーに入るべきものが他にないかと考えたところ、トリメチルアミン N オキシドの還元が該当するのではないかと思いついた。戦後、酵素化学シンポジウムで当時東大薬学科におられた富沢純一氏が、大腸菌におけるトリメチルアミン N オキシド (TMANO) の還元を報告されたのを思い出す。富沢氏はその後ウィルス学に転じ、さらにアメリカに渡られて、このテーマについて長らく注目する人は殆どなかった。丁度当研究室で嵯峨井勝氏がヌクレオシド抗生物質の研究で、アデノシン N オキシドを合成していた。微生物におけるその代謝ということで、大腸菌の N オキシド還元の研究を始めたのであった。

アデノシン N オキシドは紫外部に特徴ある吸収帯を示し、その還元は分光学的に追跡できる。大腸菌の生菌もよく還元し、メチルヴィオロゲン電子供与系として使うことによりその酵素は容易に抽出が出来ることが分かり、相当のところまで精製を進めることが出来た。これは、アデノシン N オキシドばかりでなく、TMANOを含めた他の三級アミンの N オキシドの還元も行う。その測定には、亜二チオン酸-メチルヴィオロゲンを電子供与系に用いて、TMANO還元で消費される亜二チオン酸を 315 nm における吸光度の減少で測る方法を確立した。10 mm のキューベットに反応液を入れてから 9 mm のスパーサーを挿入して、光路 1 mm として吸光度を測定する。亜二チオン酸の薄い水溶液は酸化を受け易いが、この方法はそれを防ぐことにもなる。この方法はさらに種々の還元酵素の測定に使われた。

もう一つの開発した技術は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のゲルの中で酵素反応を起こさせ、酵素バンドを染める方法である。亜二チオン酸で還元した青色のメチルヴィオロゲン液に N オキシドを加え、ゲルを漬けて染色する。青色になったゲルを引き上げて空気中に放置すると、酵素の作用に基づく TMANO による酸化と空気による自動酸化により退色が起こる。還元酵素のバンドは、その位置がくびれ始め、やがて白い帯として抜ける (図表 7 8)。初めて試みて成功し

図表 7 8. TMANO 還元酵素の酵素活性による染色

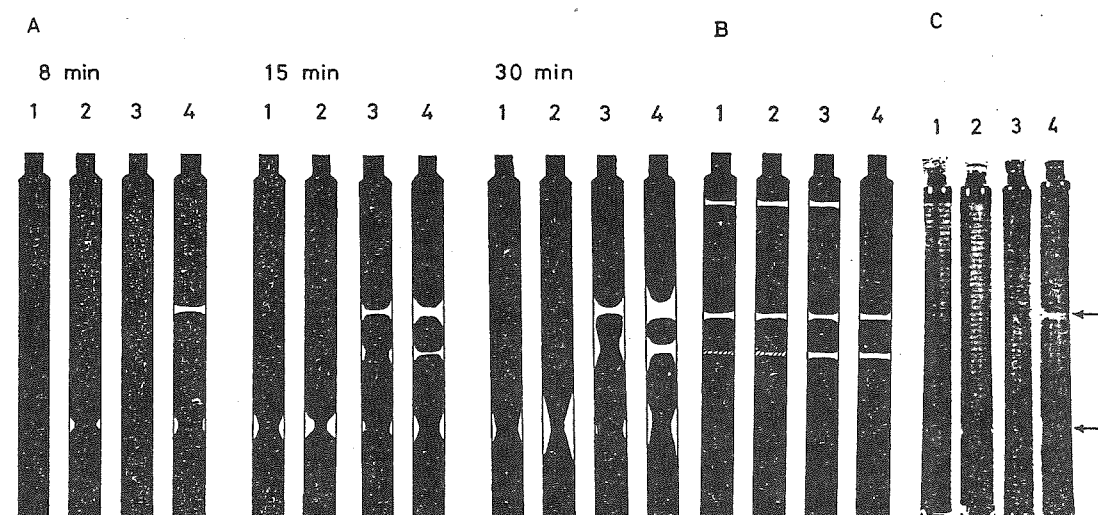


Fig. 12. Staining of enzyme bands in gel of disc electrophoresis. Experimental details are described in "MATERIALS AND METHODS." A: Extracts were centrifuged at  $100,000 \times g$  for 60 min and the supernatant was used. The time after staining is indicated. 1, from normal cells, stained in the presence of adenosine N-oxide; 2, from normal cells, stained in the presence of trimethylamine N-oxide; 3, from cells after induction with trimethylamine N-oxide, stained in the presence of adenosine N-oxide; 4, from cells after induction with trimethylamine N-oxide, stained in the presence of trimethylamine N-oxide. B: 5 min after staining. 1, PII, stained in the presence of adenosine N-oxide; 2, PII, stained in the presence of trimethylamine N-oxide; 3, PII', stained in the presence of adenosine N-oxide; 4, PII', stained in the presence of trimethylamine N-oxide. C: Photograph taken on a background of section paper. The samples were the same as those in A, 8 min after staining.

たときの見事な光景は今も忘れることが出来ない。

この活性染色と呼ばれる方法は、今ではいろいろな酵素について広く行われているが、当時はその報告は何もなかった。メチルヴィオロゲンを使ったときも、後でトリフェニルテトラゾリウムを作用させると、酸素に安定なフォルマザンが定着するので、固定・保存が容易に出来る。

#### 2. 嫌氣的呼吸の基準

N オキシド還元のような新しい反応を検討して、今までの嫌氣的呼吸の範囲に該当するかどうかということになると、嫌氣的呼吸の概念の検討が必要になる。硝酸呼吸と硫酸呼吸とを比べて、その基準を考えてみた。第 1 に、多量の有機基質など電子供与体の酸化である。この量は構成物質代謝に比べると、通常遙かに多い。第 2 に、最終電子受容体に対する還元酵素の存在、これはその還元が偶然的なものでないことを証する。第 3 には電子供与体と受容体とを結ぶ電子伝達系に対するチトクロムの関与、第 4 はその電子伝達に共役した ATP 合成、酸化的



リン酸化である。

TMANO 還元の研究は、これらの点を満足するかどうか考えながら進めることにした。

硫酸および硝酸の還元他にこのカテゴリーに入るものとしてはフマル酸の還元がある。しかし、有機物の嫌氣的な分解として発酵の中に含めて考えられ、呼吸としての意識はまだ一部に過ぎない。また、おそらくこの概念に外れるものは、ニトロ化合物の還元、亜テルル酸・亜セレン酸の還元、窒素固定すなわちアンモニアへの還元であり、亜硝酸のアンモニアへの還元も入らないケースが多いと思われる。実際に、大腸菌における亜硝酸の還元にもなう水素イオン放出が沢田美智子氏によって検討され、硝酸とは違って、放出が起こらないことが示された。3 価の鉄・4 価のマンガンなどは今後検討すべき問題であろう。

### 3. 大腸菌の代謝と成長に及ぼす TMANO 還元の影響

TMANO はトリメチルアミンの酸化物で、トリメチルアミンとは違って中性の物質で、水に溶解易い。生物では魚類に多くみられ、浸透圧の保持物質として含量が高く、窒素の最終生産物として排せつされる。比較生化学的見地から注目された。それと同時に、腸内細菌科 Enterobacteriaceae などの細菌によって還元され、トリメチルアミンを生じる。これは魚の干物の臭い、あるいは魚の腐った臭いにも含まれる。TMANO は、過酸化水素によるトリメチルアミンの酸化によって化学的に合成される。元来は原料が安い安価な試薬であったが、過酸化水素による爆発事故が起こるので、防御施設が必要なためか、高い試薬になった。生物による合成もトリメチルアミンの酸素化で行われるらしい。

前述のように、酵素活性染色によってアデノシン N オキシドの還元酵素と TMANO の還元酵素の電気泳動度が一致したので、同じ酵素で還元されることがわかり、TMANO 添加培養で誘導が起こり活性が高くなるので、以後は TMANO 添加培養を行ってその酵素を主に研究した。以下は下川修氏・山本勇氏らの研究である。

大腸菌 K10 の嫌気培養を TMANO の存在下で行うと明らかに成長の促進が見られる(図表 79)。複合培地で成長した菌をグルコース・アンモニア限定培地に加えると、初期の成長に続いて、グルコース・アンモニアを利用する 2 段目の成長

図表 79. 大腸菌の成長に対する TMANO 還元の影響

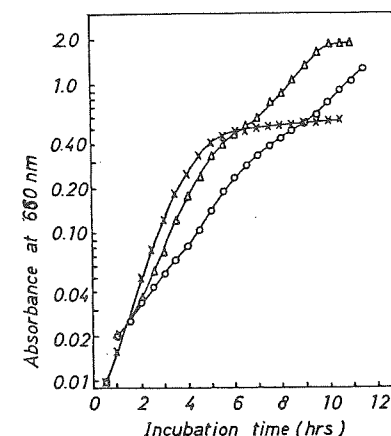


Fig. 1. Anaerobic growth on glucose in the presence of TMANO.

Defined medium was inoculated with 2.5% volume of culture grown in complex medium. For experimental details compare *Materials and methods*.  $\Delta$  40 mM TMANO were added,  $\times$  40 mM  $\text{KNO}_3$  were added, and  $\circ$  no addition, pH regulated to 6.8

が起こり、グルコースが消耗するまで成長が進行する。硝酸還元の場合より若干低い、無添加の場合と比べて成長速度が高く、酸素呼吸の場合よりは低い。

また速度は遅いが、乳酸培地における大腸菌の成長を支え、酢酸と少量のビルビン酸蓄積が見られた。酢酸・ビルビン酸の量よりトリメチルアミンの生成量の方が遙かに多いので、それらの酸の完全酸化が行われていると思われる(図表 80)。

図表 80. TMANO 還元条件における大腸菌の乳酸分解生成物

Table 1  
Anaerobic growth of *E. coli* on lactate in the presence of TMANO and formation of TMA, acetate, and pyruvate.  
Culture in complex medium without glucose incubated for 12 hrs was transferred to 40 volumes of defined lactate medium and was incubated for 62 hrs under  $\text{N}_2$  in an anaerobic jar.

| Addition        | Concentration (mM) | $A_{660}$ | Products (mM)   |         |          |
|-----------------|--------------------|-----------|-----------------|---------|----------|
|                 |                    |           | TMA             | Acetate | Pyruvate |
| None            |                    | 0.012     | 0.3             | 0.5     | 0.6      |
| TMANO           | 40                 | 0.161     | 28              | 6.3     | 0.3      |
| TMANO           | 60                 | 0.191     | 39              | 7.3     | 0.05     |
| TMANO           | 80                 | 0.203     | 44              | 6.8     | 0.04     |
| $\text{KNO}_3$  | 40                 | 0.222     | — <sup>1)</sup> | 5.4     | 3.1      |
| Lactate omitted |                    | 0.004     | —               | 0.3     | 0.01     |

<sup>1)</sup> — not determined

図表 8 1. TMANO 還元条件における大腸菌のグルコース分解生成物

| Exp. No. | 培地 | pH  | 添加                           | 生成 (消費グルコース1.00に対して) |       |      |       |      |      |                   |
|----------|----|-----|------------------------------|----------------------|-------|------|-------|------|------|-------------------|
|          |    |     |                              | 乳酸                   | エタノール | 酢酸   | ピルビン酸 | コハク酸 | ギ酸   | Me <sub>3</sub> N |
| 1        | 限定 | 6.8 | -                            | 0.03                 | 0.93  | 0.80 | 0.00  | 0.13 | 0.79 |                   |
|          |    | 6.7 | TMANO                        | 0.01                 | 0.67  | 0.80 | 0.00  | 0.07 | 0.51 | 1.52              |
| 2        | 複合 | 6.7 | -                            | 0.53                 | 0.71  | 0.60 | 0.01  | 0.10 | 0.88 |                   |
|          |    | 6.7 | TMANO                        | 0.16                 | 0.60  | 0.89 | 0.01  | 0.09 | 0.80 | 0.85              |
|          |    | 6.7 | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | 0.16                 | 0.02  | 0.97 | 0.20  | 0.01 | 0.77 |                   |
| 3        | 複合 | 7.4 | -                            | 0.01                 | +     | 0.94 | 0.00  | 0.07 | 2.04 |                   |
|          |    | 7.4 | TMANO                        | 0                    | +     | 1.01 | 0.00  | 0.02 | 0.76 | 2.62              |

グルコースからの生成物に対するTMANO還元の影響を図表8 1に示す。限定培地、pH 6.7において、C<sub>2</sub>・C<sub>3</sub>化合物の回収は無添加の場合 90 % 以上で、TMANO 添加の場合も 80 % 程であった。ギ酸は C<sub>2</sub> 化合物と等量生成すると推定されるが、実際の生成量はほとんどがその半分以下で、二酸化炭素と水素への分解あるいは二酸化炭素への酸化が起きていると思われる。無添加の場合は混合酸発酵によってエタノールと酢酸の比は 1:1 に近い。硝酸の添加ではエタノールが殆どなくなっていたが、それに対して TMANO を添加したときは、若干の低下に留まる。トリメチルアミンの生成の大部分はギ酸ないしその相当するものにより還元されて生成したと思われる。複合培地、pH 6.7 のときは乳酸の生成量が多く、エタノール・酢酸はやや少ない。TMANO の存在により乳酸が大幅に減少するが、エタノール・ギ酸は減少しない。酢酸は若干増加する。pH 7 以上の場合、ギ酸の生成はグルコース当り2モルで、エタノール・酢酸生成の式に合致するが、TMANO 添加でギ酸の酸化が進行する。C<sub>2</sub> についても二酸化炭素までの完全酸化が一部起きているらしい。菌のモル成長収量は図表8 2のようになる。pH 6.4, pH 7.4 のいずれにおいても、TMANO 添加によって、モル成長収量は 30-70 % 上昇している。このことは発酵が酸化 becoming 基質レベルのリン酸化が増すことだけでは説明がつかない。TMANO 還元の電子伝達に結びついた酸化的リン酸化の存在を考える。

図表 8 2. TMANO 添加培養におけるグルコースに対する大腸菌のモル成長収量 (g/mol)

| pH  | 添加    | 限定培地 | 複合培地 |
|-----|-------|------|------|
| 7.4 | -     | 26   | 40   |
|     | TMANO | 36   | 54   |
| 6.4 | -     | 20   | 27   |
|     | TMANO | 26   | 47   |

必要がある。

また前述のように、大腸菌において水素あるいはギ酸の TMANO による酸化によって菌の成長量の著しい増加がみられる。これらのことを併せて考えると、TMANO還元は酸化的リン酸化が共役しているように見受けられる。

最後にチトクロムの関与はどうであろうか？

色々の条件で複合培地で大腸菌を培養し、その抽出液で酸化還元差スペクトルを取り、558 nm のピークの高さ  $[A_{558} - (A_{540} + A_{580})/2]$  を算出してチトクロム量とし、異なった条件の培養菌で比較した。嫌気培養では好気培養の 1/2 になるが、TMANO 添加培養では好気培養にほぼ等しく、硝酸呼吸条件では好気培養の 2 倍以上に達した。培地中の複合栄養成分の濃度が薄くなると、552 nm にピークが生じる。これは藤田・佐藤によって、硝酸添加培養において以前観察されたチトクロム c552 とよく似ている。

図表 8 3. 大腸菌 TMANO還元に対するチトクロムの関与

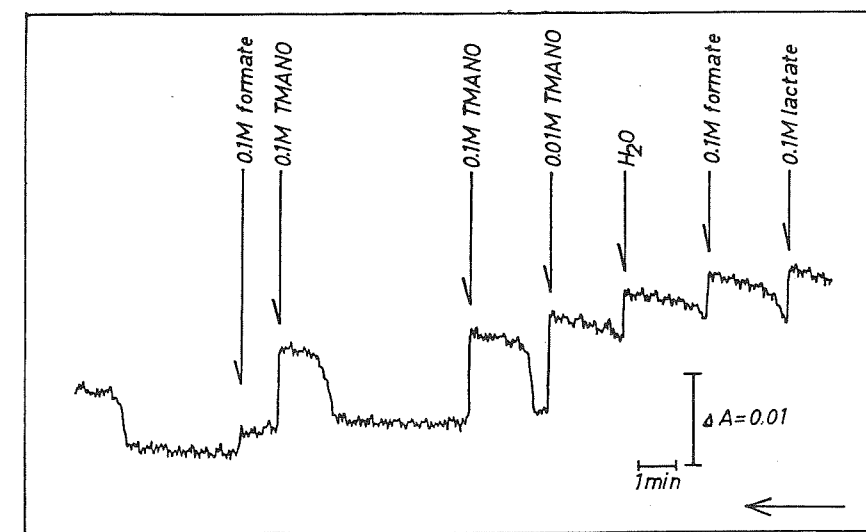


Fig. 2. Oxidation of cytochrome c-552 in extract by TMANO. The reaction mixture contained S<sub>20</sub> from cells grown in diluted complex medium with TMANO (65 mg protein and 320 units of amine N-oxide reductase) and 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, in a total volume of 2.5 ml at the beginning. A<sub>552</sub> - A<sub>580</sub> was measured and 0.1 ml of solution of various compounds was added successively as indicated in the Fig.

これらのチトクロムは図表83に示すように TMANO の添加によって酸化される。確かに水や基質を加えても吸光度は一時低下するが、間もなく回復し、薄まった分だけレベルが下がる。TMANO を加えたときは低下が大きく、濃度に比例した時間がたって、おそらく加えた TMANO が還元されて消失すると、希釈水準まで回復する。直接でないにしても、チトクロム系が TMANO 還元酵素とつながって酸化還元系を構成しているに違いない。

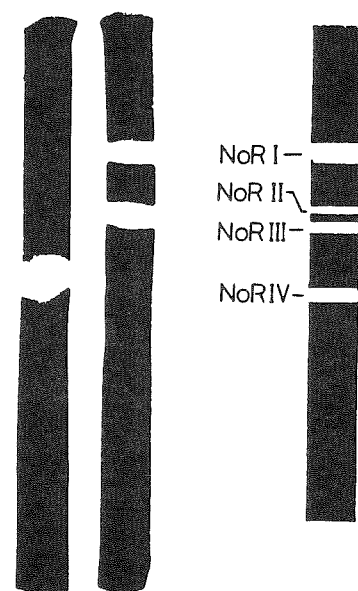
以上の点は TMANO の還元が、硝酸還元と同じく、一種の嫌気呼吸であることを示す。

#### 4. TMANO 還元酵素

先に述べたように、この還元酵素の研究はアデノシンNオキシドの還元の研究から始まったが、TMANO 添加培養によって10倍近く誘導されたので、その後の研究は主にその条件で生産される酵素に集中し、TMANO 還元が検討された。

TMANO 添加条件で培養した大腸菌の抽出液を遠心すると、酵素活性の半分以上が上清にくるが、場合により半分は沈澱に集まり、この酵素が膜結合性であるか

図表84. 大腸菌抽出液電気泳動  
ゲルのTMANO還元酵素活性染色  
TMANO無添加(左)、添加培養(中)。



どうか戸惑いさせる。この上清をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて酵素染色すると、還元バンドが4本現れる(図表84)。速度が遅い方から、I, II, III, IV と名付けたが、菌の培養条件によってその相対的・絶対的な濃さは変動する。先ず、TMANO無添加培養ではIVのみであったが、添加培養によりI, II, III が現れ、Iがもっとも強く、IVは弱くなる。塩素酸の還元も行う。Fergusonの方法により、ゲル濃度を変えて電気泳動を行い、移動度から分子量を推定すると、I 200,000, II 70,000, III 70,000, IV 100,000 という結果が得られた。II, IIIは分子量は同じだが、電荷が違ふようである。

沈澱画分の酵素もエマルゲン810によって可

溶化され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で酵素 I, II, III に相当するバンドを与えた。同じ酵素が両画分に分布しているように見える。

これらのTMANO還元酵素は、好気培養あるいは硝酸添加培養で活性低下する。またタングステン酸添加培養で活性低下し、モリブデン酸の存在でもとのレベルに留まるので、硝酸還元酵素と同じくモリブデン酵素と思われた。

酵素Iはもっとも量が多いので、これの精製を企てた。最初は硫安分画、DEAEセルロース・セファデクスG-200・DEAEセファデクス(2回)・ヒドロキシルアバタイトのクロマトグラフィーで精製した。後に70°30分の熱処理によって安定に保たれることが分かり、DEAEセルロース, BioGel A-1.5m, Reactive Blue アガロースクロマトグラフィーにより精製した。分子量20万であるが、SDS電気泳動で9.5万のサブユニットからなることが分かった。20万当り2個のモリブデン、1個の鉄、1.5個の亜鉛を含み、酸不安定硫黄は0.4以下であった。また、モリブデン因子の存在も、蛍光スペクトルおよびnit1酵素再構成から明らかにした。

ヴィオロゲン色素の外、FAD, FMN は電子伝達体として活性は1/10で弱く、チトクロムcはつながらなかった。本菌のチトクロムならつながるのかも知れない。また TMANO のみならず、アデノシン・ニコチン酸・ピコリン・ピコリンのNオキシドも還元されるので、この酵素はむしろ三級アミンNオキシド還元酵素と呼ぶべきなのかも知れない。なお、ヒドロキシルアミンの還元も行うが、至適pHは少し異なっている。アテブリンに若干の阻害がみられる他は強い阻害剤は見つからなかった。鉄塩に促進作用がある。

#### 5. TMANO 還元と水素イオン輸送

TMANO の還元はATPの生成が共役していることは、上記のような成長実験から間接的に示される。エネルギーの獲得が電子伝達に共役しているという直接の証明はなかなか手がつけられなかった。

Mitchel によって酸化的リン酸化が、電子伝達によって一次的に生じた膜電位とイオンの不均一分布によるエネルギー蓄積に基づくとする化学浸透説が提案されて、TMANO還元のエネルギー獲得反応について別な角度から検討出来るようになった。最初はミトコンドリアや葉緑体での実験が行われていたが、細菌細胞を用いて酸化還元に伴う水素イオンの放出の測定が可能になった。この研究は沢田美

図表 85. TMANO 還元による  
大腸菌の水素イオン放出

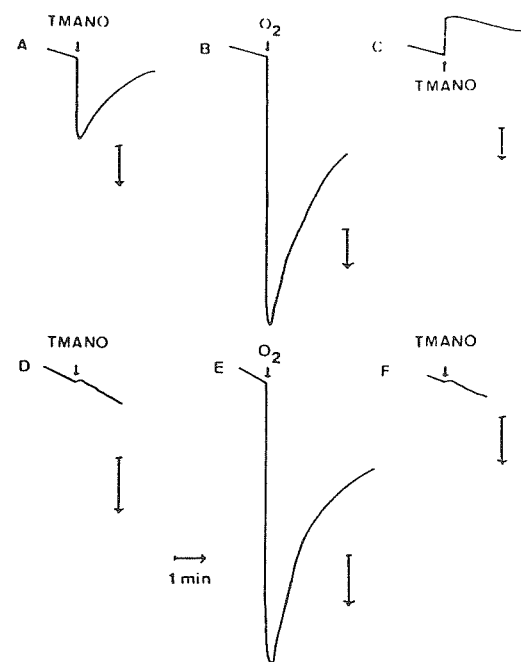


FIG. 1. Proton translocation in intact cells grown anaerobically in the presence of TMANO. *E. coli* strains K-10 (A, B, C) and S78-30 (D, E, F) were grown in the presence of TMANO. Cells were suspended in 120 mM KCl containing 30 mM KSCN and 25  $\mu$ g of carbonic anhydrase per ml. In the right-hand traces (C, F), 10  $\mu$ M SF6847 was also present in the medium. At the indicated points, 10 nmol of TMANO or 10 ng-atom of oxygen (20.5  $\mu$ l of air-saturated 120 mM KCl) was introduced into the suspension. The arrows correspond to 10 ng-ions of  $H^+$ . A downward deflection indicates a decrease in pH of the extracellular medium.

## 6. TMANO還元の遺伝生化学

TMANO還元に伴う水素イオン輸送の研究を発表したところ、分子遺伝学者たちから硝酸還元酵素との異同について質問が出された。TMANO還元酵素の精製標品では硝酸が還元されないことを一応見ていたが、遺伝学的に検討して硝酸還元酵素との差を明らかにしようということになった。

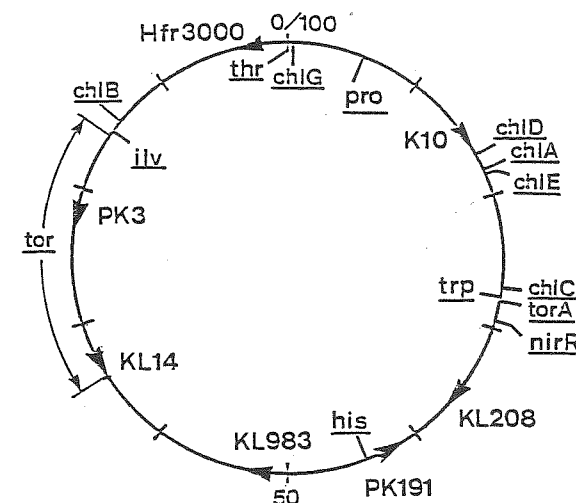
TMANO還元能のない菌は、TMANOを含んだ MacConkey 寒天平板上で赤いコロニーをつくる。この培地はコール酸とメチルレッドを含み、菌が酸を生産して酸性になると、コール酸が沈澱して色素を吸着して赤くなる。TMANOが還元されてトリ

智子（旧姓高木）氏によって行われたもので、当時岡山大学薬学部の二井教授の研究室の土屋氏との共同研究となった。

TMANO 添加培養した大腸菌細胞はTMANOの還元により媒質を直ちに酸性化するが、これは脱共役剤の3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene malononitrile (SF 6848) によって抑止される（図表85）。ギ酸と TMANO はまた EDTA 処理細胞に対して 3,3-dipropylthiocarbocyanine の蛍光を消光して、膜電位の発生を示唆する。TMANO 還元活性のない *chlA*, B, D 変異株ではこれらの現象がおこらなかったことも、TMANO の還元が、硝酸還元と同様なエネルギー保存機構と結び付いていることを示したものである。

先に述べた大腸菌の亜硝酸還元の際のエネルギー生産、硫酸還元菌による亜硫酸還元の際のエネルギー生産の実験もこのTMANO還元の研究に続いて行われた。

図表 86. 大腸菌の染色体地図と *tor* 遺伝子



矢印は Hfr 株の起点の位置と方向を表わす

メチルアミンが出来ると酸性にならず、白いコロニーが出来る。これを利用して TMANO を還元しない変異株を分離することが出来る。大腸菌 AN180 をニトロソグアニジン処理して TMANO-MacConkey 上で赤いコロニーを分離した。モリブデン利用の出来ない塩素酸耐性 *chl* 変異株も TMANO を還元しないので、塩素酸耐性の試験をして、塩素酸感受性の株を18株選んだ。さらにギ酸の存在で硝酸を還元して亜硝酸を蓄積する菌株 9株を取り、TMANO の還元を調べたところ、その内2株 TR-111, TR-6 が、硝酸還元酵素活性を示すにもかかわらず、TMANO 還元活性が弱いので、それを検討することとした。

TR111 は、遺伝子地図上に異なった開始点を持つ Hfr 数株（図表86）と接合組換えを起こさせ、*Tor*<sup>+</sup>になる頻度を求めた。図表87に示すように、KL209, KL14 が *Tor*<sup>+</sup>を生じる頻度が高い。従って *tor* 遺伝子が K14の開始点と KL228の開始点との間にあると結論した。なお PK3が若干高い値を示したので、PK3開始点と KL228開始点の間にある可能性を考えた（図表86）。いずれにしてもこの範囲は、現在知られている硝酸還元酵素に関する遺伝子の位置と違うことから、硝酸還元酵素と TMANO還元酵素とはおそらく異なった酵素であると思われる。*tor* の位置はその後検討しているが、まだ確定には至っていない。

一方フランスのパスカルらは大腸菌に Mud1 ファージを作用させることによって TMANO 還元酵素 1-III 欠失変異 *torA* 株を得ることに成功した。Mud1 ファージは大腸菌に感染すると、染色体に非秩序的に挿入され、各種の変異体を作る。

図表 87. *tor* 株と Hfr 株との遺伝子組換え

Results of conjugation experiments with the *tor* mutant

|                     | Donor   | Number of Tor <sup>+</sup> Str <sup>R</sup> | Number of donor | Tor <sup>+</sup> Str <sup>R</sup> /donor |
|---------------------|---------|---------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------|
| Exp. 1 <sup>a</sup> | PK191   | 3                                           | 2280            | 0.13                                     |
|                     | KL14    | 12                                          | 2200            | 0.55                                     |
|                     | PK3     | 3                                           | 2240            | 0.13                                     |
|                     | Hfr3000 | 1                                           | 5700            | 0.02                                     |
|                     | KL983   | 1                                           | 2400            | 0.04                                     |
|                     | Broda8  | 3                                           | 1800            | 0.17                                     |
|                     | KL228   | 7                                           | 4100            | 0.17                                     |
| Exp. 2 <sup>b</sup> | KL14    | 11                                          | 3600            | 0.31                                     |
|                     | PK3     | 6                                           | 8300            | 0.07                                     |
|                     | Hfr3000 | 0                                           | 2600            | 0.00                                     |
|                     | KL209   | 45                                          | 9200            | 0.49                                     |
|                     | KL228   | 47                                          | 8800            | 0.53                                     |

<sup>a</sup> Conjugation was for 35 min.

<sup>b</sup> Conjugation was for 50 min.

アンピシリン耐性の遺伝子と、プロモーターを欠いた *lac* をもち、感染した菌はアンピシリン耐性になるので、容易に分離される。また挿入位置の遺伝子のプロモーターの作用を受けることもあるので、欠損した遺伝子の代わりにガラクトシダーゼが発現する可能性がある。その場合は、元来の遺伝子の調節をガラクトシダーゼ活性で調べることが出来る。

*torA* 遺伝子は染色体上 28 分の位置にある。この株は TMANO 還元酵素 I-III を欠くが、TMANO 添加によってガラクトシダーゼ活性が誘導されるので、*torA* は TMANO 還元酵素の構造遺伝子と考えられている。

それでは *tor* の方はどういう遺伝子だろうか？ *torA* が構造遺伝子とするなら、調節遺伝子である公算が大きい。確かに、*tor* 株においては、皆無でないにせよ、TMANO 還元酵素の活性は低い。また、抽出液のポリアクリルアミドゲル電気泳動の活性染色では一応 TMANO 還元酵素 I-IV 全てが検出されるが、抗血清による検出では I-III の含量は低い。IV は抗血清との反応性が若干異なるので、これが TR111 に残った活性を示すものと思われる。

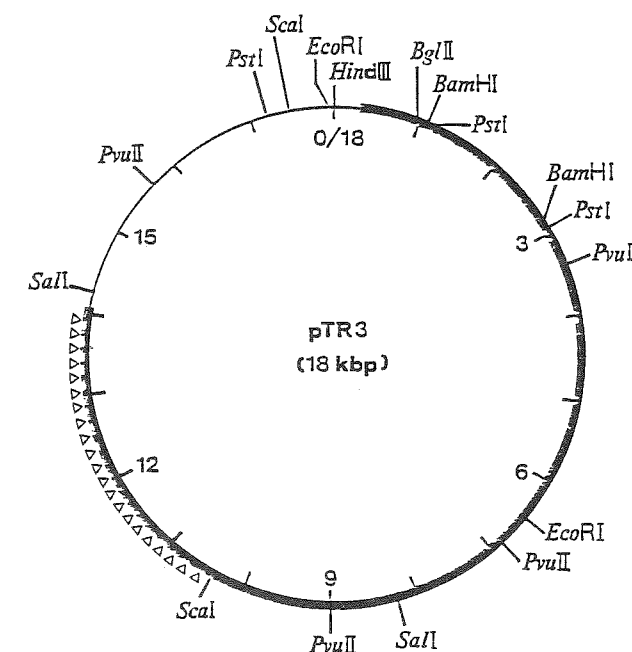
さらに、*tor* 遺伝子のクローン化を行った。制限酵素 *Sau3A* による大腸菌染色体 DNA の部分切断断片をプラスミド DNA *HindIII* 断片とつないで、*tor* 菌を形質転換し、Tor<sup>+</sup> になった株を分離する方法で行った。ただ、TR111 は形質転換の頻度が低い普通の株なので、各種の変異遺伝子を持った *tor* 株 IM313 を接合に

図表 88. *tor* プラスミドによる *tor* 変異株の TMANO 還元酵素活性の変化

| plasmid(kbp)\host | Sp. act. (U/mg protein) |      |
|-------------------|-------------------------|------|
|                   | HML77                   | RR1  |
| none              | 0.32                    | 1.39 |
| pTR1 (15)         | 1.74                    | 1.49 |
| pTR2 (18)         | 1.74                    | 1.84 |
| pTR3 (18)         | 1.46                    | 1.65 |
| pTR4 (18)         | 1.58                    | 1.51 |
| pTR5 (10)         | 1.16                    | 1.70 |
| pTR6 (10)         | 1.62                    | 1.57 |
| pTR7 (11)         | 1.57                    | 1.81 |

40mM TMANO 添加 LB で嫌気培養した菌を 50mM Tris-HCl (pH7.4) に懸濁させて使用した。

図表 89. *tor* プラスミド pTR3 の制限酵素地図



太線は *E. coli* 染色体、細線は pBR322 由来の DNA を表す

ΔΔΔ は *tor* 遺伝子が含まれている断片を示す



よって Hfr に換えて、形質転換の頻度の高い RR1 株と接合させ、torを持つ株 HM177 をつくり、それに形質導入してスクリーニングした。アンピシリン耐性になった形質転換株 14,000 から、TMANO-MacConkey 寒天上で白色コロニーを作る株を結局11株得た。この内7株は TMANO 還元酵素活性が野生株のレベルまで回復していた。これらは何れもプラスミドを持ち、この導入によって Tor<sup>-</sup>株を Tor<sup>+</sup>に換えることができる(図表88)。しかし野生株に対する導入は酵素活性の顕著な上昇を起こさない。これらのプラスミドを pTR1 から pTR7 と名づけたが、その中で pTR3 をさらに検討した。その制限酵素地図を図表89に示す。さらに制限酵素で切断してつなぎ、より小さい有効な部分プラスミド pTR31 を作った。現在さらにサブクローン化を進めている。

前述のように、tor 株は TMANO 還元酵素活性が低いばかりでなく、抗血清に対する交差タンパク質の量の低下が著しい。pTR3 の導入はこのレベルを回復する(図表90)。野生株に対しては影響を持たなかった。。

また、この検討中に tor 株の菌体が色の薄いことに気が付き、スペクトルを測ってみた。図表91に示すように、tor 株はチトクロム量が少ないが、pTR3 を導入するとそのレベルが回復した。このことはtorが単にTMANO還元酵素のみならず、それに対する電子供与系をも支配していることを示すものかも知れない。しかし、硝酸還元酵素の構造遺伝子の変異がチトクロムの含量を減少させることもあるので、間接的作用も否定できない。

torA 株に tor を入れた場合はどうなるか、またそれに対する pTR31 などの作

図表90. TMANO 還元酵素タンパク含量に対するプラスミドの影響

| 菌株/プラスミド   | 含量 (μg/mg protein) |                   |
|------------|--------------------|-------------------|
|            | S <sub>100</sub>   | PS <sub>100</sub> |
| RR1        | 30.4               | 28.0              |
| RR1/pTR3   | 30.1               | 28.7              |
| HM177      | < 0.5              | < 0.5             |
| HM177/pTR3 | 18.6               | 24.0              |

菌を 40 mM TMANO 添加 LB で嫌気培養後、音波破碎し抽出液を調製した。

図表91. 菌抽出液PS<sub>100</sub>画分のチトクロームb含量  
に対するtorプラスミドの影響

| 菌株/プラスミド   | 含量<br>(pmol/μg protein) |
|------------|-------------------------|
| RR1        | 0.67                    |
| RR1/pTR3   | 0.69                    |
| HM177      | 0.12                    |
| HM177/pTR3 | 0.47                    |

用はどうか? これを検討すれば、2つの遺伝子の関係が明らかになるであろう。現在、torA のアンピシリン耐性を利用して P1 ファージの形質導入によって torA を tor 株に移し、tor torA二重変異株らしいものを若干得ている。TMANO の作用でガラクトシダーゼ作用を生じる能力を持っていない。これはアンピシリン耐性なので、その遺伝子を失わせて、pTR31で形質転換させて、torA の性質を回復すれば、二重変異株であることの証明になるのであるが、まだそこへ至っていない。

# I V. 腸内嫌気性細菌の研究

腸内細菌と云えば大腸菌と一般に受け取られているように、腸内の細菌叢も大腸菌がその主要なものと長らく考えられてきた。ふん便はその半分が菌体であり、そこから寒天平板に塗って好氣的に培養すれば、必ず大腸菌が分離される。しかし、生菌数と全菌数の比は極めて小さく、便に含まれている大部分の菌体は大腸菌の死骸とされていた。嫌氣的技術が60年代後半に改良されて、嫌気性菌の培養法が改良されると、ふん便中の細菌は殆ど生きていて、大部分が偏性嫌気性菌であることが明らかにされた。その主なものは、*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*に属するもので、*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*なども存在する。大腸菌や *Streptococcus faecalis* などの好気性菌はそのうち0.1%程度と云われている。

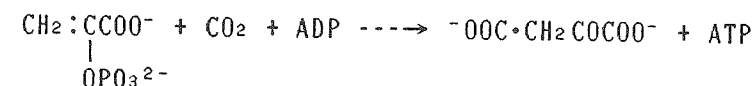
硝酸還元の研究において、それらの偏性嫌気性菌の中から硝酸還元性の菌を取り扱ってみようとして行ったのが、上述した *M. multiacidus* の研究であった。その研究は、むしろこの章に含めるべきであったのかも知れない。

続いて *Bacteroides* のうちから、その代表的な菌である *B. fragilis* などのフマル酸還元などを調べ、またアンモニア同化について検討したので、その概要を述べる。以下は山本勇氏らの研究である。

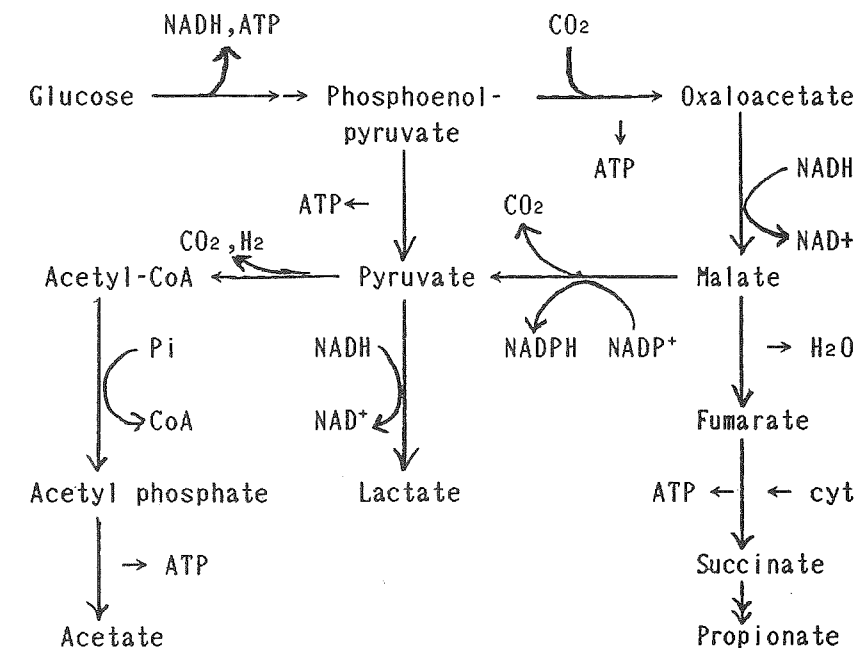
## 1. フマル酸の還元

既に述べたように、*M. multiacidus* はグルコースを分解し、ガスを発生し、乳酸・酢酸とともにコハク酸を生成する。チトクロムを含み、これがフマル酸の還元に与ると考えられる。

*B. fragilis* も同様にグルコースを分解するが、生成物にプロピオン酸を含むという。われわれの研究室では、培地にビタミンB<sub>12</sub>を特に加えなかったせいか、プロピオン酸の生成は認められなかった。酵素活性の測定では、フォスフォエノールビルビン酸カルボキシキナーゼの活性も認められるので、解糖の途中で生成するフォスフォエノールビルビン酸から、式

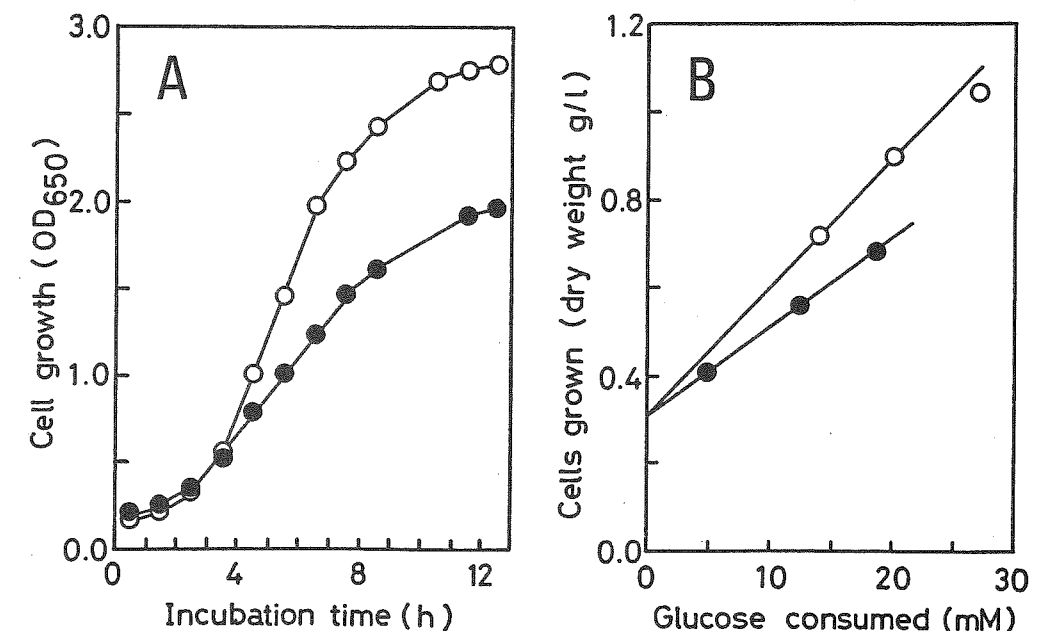


図表92. *Bacteroides fragilis* の発酵代謝経路



によってオキザル酢酸が出来、その還元でリンゴ酸・フマル酸を経てコハク酸に至ると思われる(図表92)。解糖においてはフォスフォエノールビルビン酸はビルビン酸になり、そのとき ATP を生成するが、オキザル酢酸を作るときも生成

図表93. *Bacteroides fragilis* の成長に対するフマル酸の影響



図表 9 4. *Bacteroides fragilis* のグルコース分解に対するフマル酸の影響

TABLE I. Fermentation products of glucose in *B. fragilis* anaerobically grown in the presence and absence of fumarate. Cultures of 11.5 h incubation with and without 20 mM fumarate were used for analysis.

| Substrate and product         | Culture without fumarate |                  | Culture with fumarate |                   |
|-------------------------------|--------------------------|------------------|-----------------------|-------------------|
|                               | concentration            |                  | concentration         |                   |
|                               | (mM)                     | (%) <sup>a</sup> | (mM)                  | (%) <sup>a</sup>  |
| Glucose (consumed)            | - 27.0                   |                  | - 18.6                |                   |
| Acetate                       | 8.0                      | 14.8             | 7.5                   | 20.2              |
| Pyruvate                      | 0.3                      | 0.6              | 0.8                   | 2.2               |
| Lactate                       | 1.9                      | 3.5              | 5.5                   | 14.8              |
| Fumarate (formed or consumed) | 0.3                      | 0.6              | - 8.1                 |                   |
| Succinate                     | 17.8                     | 33.0             | 13.5                  | 14.5 <sup>b</sup> |
| Total                         |                          | 52.5             |                       | 51.7 <sup>b</sup> |

Cells grown (mg dry weight per ml) 1.03 0.69

<sup>a</sup> carbon recovery as 100 x [ product ]/2[ glucose consumed ]

<sup>b</sup> estimated by reducing the amount of succinate formed from exogenous fumarate.

する。更にフマル酸の還元には酸化リン酸化が共役し、ここでも ATP が生成する。また酢酸を生じるときも ATP 生成が伴う。

グルコースとともにフマル酸を添加して培養を試みたところ、成長の促進・成長量の増加ではなくて、逆に若干の障害が見られた (図表 9 3)。フマル酸の消費にも関わらず、コハク酸の生成はグルコース培養より減少し、乳酸・酢酸が増加した (図表 9 4)。チトクロムを含めて酵素活性のレベルには著しい変化はなかったが、ビルビン酸キナーゼの減少とリンゴ酸酵素の増加が見られた。活性の絶対値は測定条件に依存するので酵素間で簡単には比較できないが、それらの酵素活性は概して小さく、この変動がどれだけの意味を持つかわからないが、リン

ゴ酸・ビルビン酸を経てのフマル酸の分解が一部起きているのかも知れない。算定した ATP 生成量も含めて、フマル酸の障害は代謝面では明瞭な変化を起こしていないので、もっと他のことにその原因を求めるべきなのかも知れない。

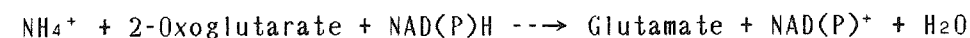
フマル酸還元のもう 1 つの研究は *B. ureolyticus* の成長・代謝であった。この菌は口腔・腸内など、また病巣からも分離されている。グルコース・ペプトン・酵母エキスなどでは成長が悪く、フマル酸と水素あるいはギ酸の存在でよく成長する。硝酸還元を行うことも、チトクロムとキノンの関与も認められている。

菌の成長収量を測定したところ、水素あるいはギ酸を用いたとき、生成コハク酸に対して菌量約 7 g/モルという結構大きな値が得られた。関与すると思われるヒドロゲナーゼ・ギ酸デヒドロゲナーゼ・フマル酸還元酵素およびチトクロム b は主に膜結合性であった。チトクロム c も存在するが、チトクロム b がフマル酸還元に関与するらしい。

## 2. アンモニア同化

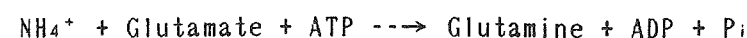
*B. fragilis* など腸内の *Bacteroides* の特徴は窒素源としてアンモニアを必要とし、アミノ酸を使用しないことである。腸内という一見栄養豊富な環境に生育しているのに不思議な気もする。腸内には食物の残渣も多いし、宿主の方から結構アミノ酸も分泌されると云われる。しかし、大腸菌もアンモニアを窒素源として生育可能であることと考え合わせると、菌の密度が非常に高い環境で生きながらえるためには、アンモニアを窒素源として成長できることが必要なのかも知れない。なおふん便中のアンモニア濃度は液部分で 14-42 μM と云われている。

一般にアンモニア同化によるアミノ酸生成は、グルタミン酸を経由してアミノ基移転反応によって行われる。グルタミン酸の生成には 2 つの経路が知られている。1 つは 2-オキソグルタル酸へのアンモニアの還元的固定で、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ GDH によって触媒される。



もう一つは、アンモニアがグルタミンのアミド N として固定された後、2-オキソグルタル酸の還元的アミノ化に用いられる 2 段の反応で、グルタミン合成酵素と

グルタミン酸シンターゼによって行われる。前者を GDH 経路、後者をグルタミン経路と呼ぼう。



最後の反応では2分子のグルタミン酸が出来るが、1分子が新しい合成で、1分子はグルタミンから生成したものである。

グルタミン経路は動物にないが、植物及び微生物に広く存在する。なお植物のグルタミン酸シンターゼは電子供与体として NADPH ではなくてフェレドキシンを使用する。細菌では環境のアンモニア濃度が低いときにはグルタミン経路、高いときには GDH 経路でグルタミン酸を生成する。このことは、高アンモニア濃度では GDH 活性が高くなり、グルタミン合成酵素活性が低くなるが、低アンモニア濃度では逆に GDH 活性が低下し、グルタミン合成酵素およびグルタミン酸シンターゼの活性が上昇することから示される。

グルタミン経路は全反応として、2つの式を合計して



となって、ATP を1分子消費することになるが、エネルギーが加わるので、平衡は生成系へずれ、低いアンモニア濃度でも容易にグルタミン酸が生成できることになる。

*B. fragilis* の培養液中のアンモニア濃度を変えて、培養菌中の各酵素の活性を測定した。図表95に示す結果によれば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼの活性はアンモニア濃度が低い方が高い。グルタミン合成酵素およびグルタミン酸シンターゼの活性も同様であるが、その絶対値はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性に較べると著しく低い。従って、グルタミン経路は本菌で全く存在しないわけではないが、グルタミン酸の生成には GDH 経路が主に使われていると推定できる。また、グルタミン合成酵素の阻害剤であるメチオニンスルホキシイミンの阻害がないことも、GDH 経路が働いていることを示している。

図表95. *Bacteroides fragilis* のアンモニア同化酵素に対するアンモニア濃度の影響

| Exp. No. | Ammonia (mM) | L-Glutamate (20 mM) | Specific activities (mU/mg protein) |             |                          |                      |                    |
|----------|--------------|---------------------|-------------------------------------|-------------|--------------------------|----------------------|--------------------|
|          |              |                     | Glutamate dehydrogenase             |             |                          | Glutamine synthetase | Glutamate synthase |
|          |              |                     | NADPH-linked                        | NADH-linked | NADH <sup>a</sup> /NADPH |                      |                    |
| 1        | 0.5          | —                   | 2,500                               | 454         | 0.18                     | 11.6                 | 0.6                |
|          | 5.0          | —                   | 1,260                               | 244         | 0.19                     | 5.5                  | 0.2                |
|          | 50           | —                   | 376                                 | 117         | 0.31                     | 2.1                  | 0.0                |
| 2        | 0.5          | —                   | 3,090                               | 544         | 0.18                     | 7.0                  | 0.2                |
|          |              | +                   | 3,530                               | 690         | 0.20                     | 7.2                  | 4.3                |
|          | 5.0          | —                   | 1,700                               | 440         | 0.26                     | 8.2                  | 1.6                |
|          |              | +                   | 2,120                               | 460         | 0.22                     | 5.3                  | 0.1                |
|          | 50           | —                   | 490                                 | 140         | 0.29                     | 0.3                  | 0.0                |

In each experiment cells harvested at stationary phase (14 hr incubation in Exp. 1, and 18 hr in Exp. 2) were used for the preparation of extract.

<sup>a</sup> Ratio of NADH-linked activity of GDH to NADPH-linked one.

このグルタミン酸デヒドロゲナーゼをイオン交換クロマトグラフィーなどによって精製し性質を調べた。分子量約 30万で、単一の分子量 5万のサブユニットからなり、6量体と考えられる。補酵素は NADP の方が NAD より5倍強いが、 $K_m$  は脱水素反応でグルタミン酸に対し 2.4 mM、 $\text{NADP}^+$  に対し 0.019 mM、 $\text{NAD}^+$  に対し 3.0 mM、NADPH による還元反応でアンモニアに対し 1.7 mM、2-オキソグルタル酸に対し 0.14 mM であった。アンモニアに対する $K_m$ は比較的小さい方で、この酵素がグルタミン酸生成に用いられていることを裏書している。

精製酵素を用いて家兎を免疫して、この酵素に対する抗血清を得ることができた。菌の抽出液と二重拡散法で単一の沈降線をつくるばかりでなく、反応液の酵素反応を阻害した。また、ヒト腸内の *Bacterioides* グループとして知られる *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. ovatus* の抽出液とも単一の沈降線をつくって融合する。それらの抽出液の GDH 活性を阻害するが、大腸菌の GDH は阻害しない。これらの *Bacteroides* の GDH が近縁であることを示す。

抗血清を用いた免疫電気泳動、いわゆるロケット免疫電気泳動により、GDH タンパク質の量を定量することが出来るようになった。

アンモニア濃度を変えて培養すると、菌抽出液における GDH の比活性は低濃度で10倍に上昇するが、これらの抽出液について GDH タンパク質量を測定し、分子

図表 9 6. *Bacteroides fragilis* のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ分子活性に対する培地中のアンモニア濃度の影響

Table 1. Specific activities and immuno-reactive protein content of GDH in extracts from *B. fragilis* grown at different concentrations of  $\text{NH}_4\text{Cl}$

Cells were harvested after 18 h growth in defined medium. Specific activities are expressed as units (mg protein) $^{-1}$ , amount of immuno-reactive protein as  $\mu\text{g}$  (mg protein) $^{-1}$ , and molecular activities as  $\text{min}^{-1}$ . Results are the mean values of two determinations for each extract, which differed from each other by no more than 10%.

| $\text{NH}_4\text{Cl}$ concn (mM) | $\text{OD}_{650}$ | GDH               |                                   |                    |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------|
|                                   |                   | Specific activity | Amount of immuno-reactive protein | Molecular activity |
| 1                                 | 0.385             | 5.11              | 82.2                              | 18700              |
| 5                                 | 0.714             | 3.17              | 56.2                              | 16900              |
| 10                                | 1.293             | 1.55              | 42.1                              | 11000              |
| 50                                | 2.160             | 0.458             | 44.5                              | 3090               |
| 100                               | 2.095             | 0.482             | 37.8                              | 3840               |

活性を求めてみた。図表 9 6 にしめすように約 6 倍の差が見られた。もし交差反応する他のタンパク質が存在しないとすれば、GDH に分子活性の高いものと低いものが存在することになる。

1 mM の低アンモニア培地で *B. fragilis* を培養すると、高活性の GDH をもつ菌が得られるが、これにアンモニウム塩を加えて終濃度 50 mM とすると、15 分以内に比活性、分子活性が低下した（図表 9 7）。また逆に、50 mM における培養菌を洗って低アンモニア培地中でインキュベートすると、菌の成長があまり起こらないのに比活性、分子活性とも 2 倍程度までは増加した（図表 9 8）。両方の変化ともクロラムフェニコール添加によって影響をうけないので、タンパク質の合成の関与がないと考えられる。免疫反応で定量しているのでおそらく、タンパク質分解酵素の作用で GDH タンパク質が崩壊しているのでもない。短時間で起こる変化なのでおそらく分子の修飾によるものと推量している。

両者の酵素は別々に各々の生成に適した培養条件の菌から取って、精製標品を得ることができた。分子量、サブユニット、電気泳動度などには変化がなかったが、アフィニティークロマトグラフィーに用いる担体 Reactive Red に対する吸着の強さが異なることがわかった。不活性型の方が若干強く、吸着した活性型の溶離  $\text{NaCl}$  濃度が 0.3 M、不活性型の溶離濃度が 0.6 M であった。この担体は NADP の代わりに酵素タンパク質と結合すると考えられるので、補酵素に対する  $K_m$  を測定して比較したところ、NADPH に対する  $K_m$  が活性型では  $6.2 \times 10^{-3}$  mM、不活性型では  $1.3 \times 10^{-2}$  mM であることが分かった。

図表 9 7. *Bacteroides fragilis* 低アンモニア培養菌のグルタミン酸デヒドロゲナーゼに対するアンモニアショックの影響

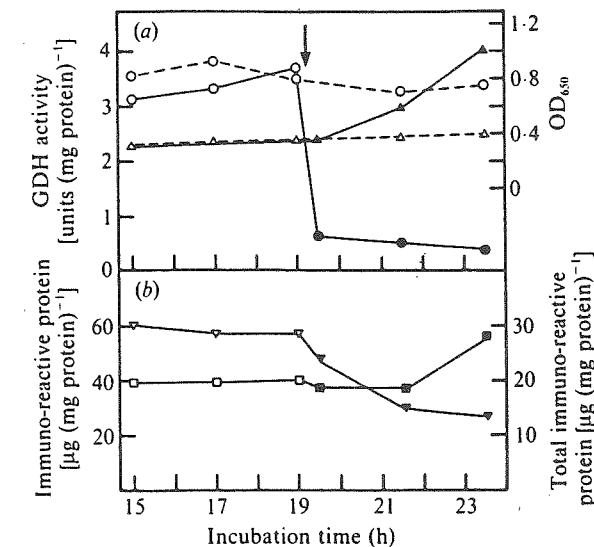


Fig. 2. Effect of ammonia shock on GDH activity in *B. fragilis* growing in medium containing 1 mM- $\text{NH}_4\text{Cl}$ .  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (to a final concentration of 50 mM) was added to the culture in the stationary phase of growth at the time indicated with an arrow (solid lines). Another culture without the shock treatment (dashed lines) was grown in parallel. Samples were taken to prepare crude extracts from the cells.  $\Delta$ ,  $\triangle$ ,  $\text{OD}_{650}$ ;  $\circ$ ,  $\bullet$ , specific activity of GDH;  $\nabla$ ,  $\blacktriangledown$ , immuno-reactive protein;  $\square$ ,  $\blacksquare$ , total immuno-reactive protein ( $\text{OD}_{650} \times \text{amount of immuno-reactive protein}$ ). The results obtained after ammonia shock are represented by filled symbols. Results are the mean values of two determinations for each sample, which differed from each other by no more than 10%.

図表 9 8. *Bacteroides fragilis* 高アンモニア培養菌のグルタミン酸デヒドロゲナーゼに対する低アンモニアの影響

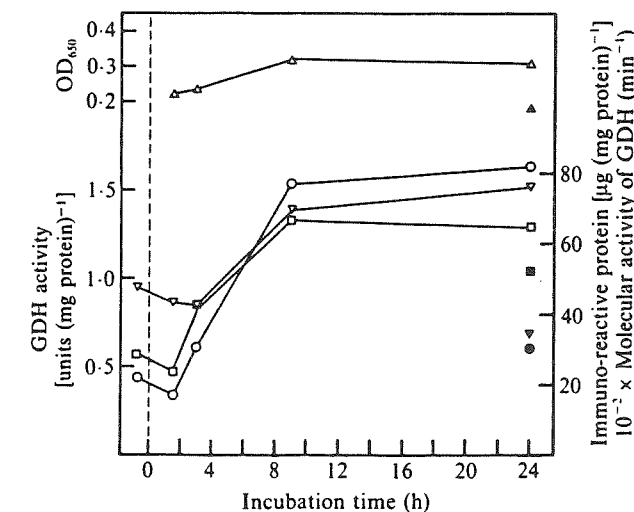


Fig. 1. Induction and activation of the dual coenzyme-specific GDH in *B. fragilis* under low ammonia conditions. Cells from an 18 h culture in 50 mM- $\text{NH}_4\text{Cl}$  were transferred to the defined medium containing 0.5 mM- $\text{NH}_4\text{Cl}$  (open symbols) and also to that containing 0.5 mM- $\text{NH}_4\text{Cl}$  plus chloramphenicol ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ , filled symbols). Enzyme activity and immuno-reactive protein (protein precipitated with anti-GDH antiserum) were assayed in crude extracts prepared from the cells by sonication.  $\circ$ ,  $\bullet$ , Specific activity of GDH;  $\nabla$ ,  $\blacktriangledown$ , immuno-reactive protein;  $\square$ ,  $\blacksquare$ , molecular activity of GDH;  $\Delta$ ,  $\triangle$ ,  $\text{OD}_{650}$ . Results are the mean values of two determinations for each sample, which differed from each other by no more than 10%.



この修飾の正体は何であろうか？ 限定加水分解によりペプチドの比較で明らかにされると思うが、まだ成功していない。 $^{32}\text{P}$ リン酸でラベルを試みたが、抗体との沈澱物を電気泳動にかけてもオートラジオグラフ法で GDH の位置にはスポットは現れなかった。リン酸化がたとえあったとしても GDH 30pモルに対して 5pモル以下のリン酸ということになり、おそらくリン酸関係の修飾ではないのであろう。

いずれにしても GDH のこのような修飾的な活性調節は他生物でも知られていないので、さらに明らかにする必要がある。

## V. 生命の起原・進化と嫌氣的呼吸

1930年代後半にオパーリンの著書「生命の起原」が刊行され、世界各国語に翻訳されて、その説は学問の各分野に非常に大きな影響を与えた。それまで、生命の起原は科学の問題ではないとされ、真面目な科学者は取り組んでいなかった。オパーリンは、1930年代当時の生化学分野を始めとする科学各分野の最新の成果を基に、それまでの既成概念をひっくり返して、生命発生に到る道筋の大要を示したのであった。

彼の説の要点の一つは、生命が忽然として生じたのではなく、生物の発生の以前には地球上に有機物が莫大に蓄積して長い時間の中で順次に複雑化し、高分子を含めて現在生体を構成している物質に近い物質が非生物的に生成し、それを基礎にして生命が発生したということである。この生体物質の生物によらない生成の過程は現在化学進化と呼ばれている。

この考えの基礎になったのは、生化学を含めた生物体の解析と各種生物の比較であった。現在、地球上の有機物は大部分が生物が生み出したものであり、無機物二酸化炭素からの有機物の生産は生物抜きには考えられない。そこに考えの基礎を置く限り、最初に生じた生物は光合成を行う生物でなくてはならない。しかし、生物である限りその身体は有機物でできていなければならないが、その有機物はどのようにして生じたのか？ 卵が先か鶏が先かという循環論に陥るのである。

生物体の解析が進められてきた結果、光合成生物は光合成を行わない生物にくらべて細胞構造も代謝過程も遙かに複雑であることがわかって来た。また植物は暗所で有機物栄養で養うこともできることが示された。これは有機栄養の体制の方が光合成の仕組みよりも各種生物に広く普遍的なものであること、おそらく光合成の方が進化の後の段階で生じたであろうことを暗示している。

また、現在地球上では、有機物が放置されれば、遅かれ早かれ、微生物によって利用され、完全に分解してしまうのが普通で、有機物が安定に永く存続することは思いもよらない。しかし、生物発生前は化学的分解しかないわけで、案外安定に長期保たれるものである。

オパーリンはそれを逆にひっくり返して、生物の代謝形態としては、有機物分解に基づく従属栄養の体制の方がより普遍的で古く、光合成は後にそれに付け加

えられた機構として提案した。化学合成細胞栄養生物を最初の生物とする説に対しても、同様にその後発性を説いた。

彼の努力は、地球の生成・変遷の中で炭素を中心とする非金属元素の形態変化に注目し、炭素化合物として有機物が生じたこと、また現在の生物体を構成しているような物質、糖・アミノ酸などが生成する可能性を指摘し、その過程をまとめることに注がれた。生物の発生以前には、地球上にはペプトン物質の池、アンモニアを含む海ができていたという叙述は、科学者を含めて多くの人々を惹きつけたのであった。原始地球における生物によらない有機物の生成については世界の科学者たちの大きな共感を呼んで、この線に沿った研究は実験的な事実が数多く与えられた。例えば、ミラーによる放電におけるメタン・アンモニア・水蒸気からのアミノ酸の生成の発見、あるいはシアン化アンモニウムからのアデニンの生成の研究などはその有名な例である。

もう一つ重要なことは、地球発生当時また生物の発生時には大気中に遊離酸素がなかったことで、呼吸形態よりは発酵形態の方が古いということである。これは30年代の代謝過程の解明の結果と各種微生物の代謝の比較とに基づくものである。現在の地球大気中の酸素は明らかに植物を始めとする光合成によって作られたものである。年間の炭素同化量は $10^{11}$  t になり、半分は海洋中の藻類によると云われる。この量は膨大なもので、これにともなって生じる酸素の量を計算すると、大気中の酸素の量の1/3000になる。出来た酸素がそのまま蓄積するとすれば、地球上の植物は3000年かかれば地球大気中の酸素を作ることが出来る。3000年はわれわれ個人の生命からいえば長いかも知れないが、地球47億年の歴史の中では一瞬に過ぎない。それだけ酸素を発生しているのに、空気中の酸素の含量が変化しないのは同じ量だけ消費していることであり、生物の呼吸による有機物の酸化分解また無機物の酸化がどれだけ大きいかわかる。

オパーリンの説の第二の重点は、生命の成立のことであって、これはコアセルヴェート説として提案された。要点は、生命は現在の細胞類似の形態として発生したということ、それは自己の存続・成長・増殖ということの能力の獲得が、個体間の生存競争という形で行われたという点にある。少しでも長く存在することができ、成長・増殖の能力を獲得したコアセルヴェート粒子が発展の中で残され、発展を担うものになったので、この過程で生物の自然淘汰・進化が行われるよう

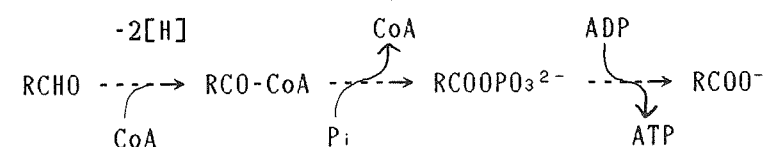
になり、「生物の合目的性」が生じたと説明している。バナールはコアセルヴェートではなくて、膜構造を始原状態と考えているが、オパーリンの意見は、あれこれ一つの分子ではなくて、多分子からなる複合形態が基になるという意味では基礎的に一致していると述べていた。

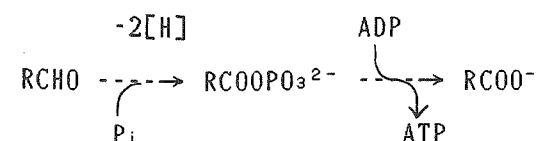
現在、タンパク質の合成や遺伝の機構が明らかにされて、生物のもっている機能が極めて複雑でかつ合目的であることが示されている。しかも、現在の生物ではすべての機構が殆ど等しく、異なった生物相互の比較からその原始的形態をつきとめることは不可能である。これを生物の基本的な仕組みとするなら、その起原の解明にはますます程遠いものがある。科学が進むほど、生命の起原解決には遠ざかるということになっている。

しかし、生物がその機構を選んで成立したからには、その原始的形態はあったはずであり、その歴史性と物理化学性から解決されるはずのものである。生物にあるものはそれ以前の結果であり、古い形を自己の内に記録しているものであるから。

差し当たって本稿において重要なのは、生命の嫌氣的形態から好氣的形態への発展進化の過程である。

最初の生物の代謝としてエネルギー代謝が成立したとき、それは呼吸でも光合成でもなく、発酵に近い嫌氣的有機物の分解であったに違いない。エネルギー代謝と構成物質代謝の分立にはATPなどのリン酸化系の成立が問題になるが、それには今は触れない。その初期の嫌氣代謝において基質レベルのリン酸化がATP生成の源となる。その過程は現在の生物において知られている種類はそれほど多様ではない。無機リン酸の結合、および低エネルギーのリン酸結合の高エネルギー化で生じたリン酸基のADPへの移転でなされる。もう一つは、そういう過程を一度に行うリガーゼの逆反応による。アルデヒドの脱水素、アシル化合物の生成、そのアシル基移転による高エネルギーリン酸の生成がもっとも普遍的に行われるようである。例えば





前者の例はアセトアルデヒドからのアセチルCoAおよびアセチルリン酸を経由するATPおよび酢酸の生成、後者の例はグルセルアルデヒド3リン酸の脱水素とリン酸基移転の反応である。後者の反応では、脱水素酵素のSH基にアルデヒド基が結合して脱水素されチオエステルを中間生成するので、上の形式とも近い。

これらの共通な点は脱水素すなわち有機物の酸化から、ATP生成に導いているという点であり、基質レベルのリン酸化が一般的に酸化反応を前提としていることは間違いない。

発酵においては、糖のような中間的酸化還元状態にある物質の一部が酸化されて必然的に基質レベルのリン酸化を導き、収支がつぐなう。ATPの生産により生命の維持・成長増殖が可能になるわけだが、その代償としては中間的酸化還元状態にある物質の減少、還元の進んだ物質および酸化の進んだ物質の蓄積が起こる。ある程度まで生成物は外界に出されて拡散すれば問題ないが、ある濃度に達すれば様々な障害を起こす。媒質の酸性化などはその著しい例である。その解決はやはり二酸化炭素までの酸化分解やメタン生成によって達せられるであろう。

このとき、電子受容体として炭素以外の化合物を用いることは、大きな利点があったにちがいない。硫酸塩・硝酸塩を最終電子受容体として利用することは、少なくとも代謝中間物の有機物を電子受容体として還元せずに、酸化に向けることによってATPの生成を増すことができるだろう。われわれの研究した *C. perfringens* の硝酸還元はそれに近いものである。

それらの還元過程へのチトクロムの関与と酸化的リン酸化の共役がどのようにして生じたかは不明である。しかし、次の段階として酸素呼吸の前に硫酸塩や硝酸塩などを利用する過程が成立したことは充分考えられる。硝酸還元について、かつてオーストリアのBrodaはむしろ逆に酸素呼吸の方が先で、硝酸呼吸はその退化した型と考えた。その根拠は、窒素は酸素発生以前には生成し得ないし存在しなかったという説であり、硝酸還元酵素は生命の進化の中で何回も繰り返して

図表99. 生物の起源と進化

| 時間尺度(億年) | -47               | -35  | -15                      | -10   | -5                |
|----------|-------------------|------|--------------------------|-------|-------------------|
| 大気成分     | O <sub>2</sub> なし |      | O <sub>2</sub> 生成(光合成)   |       | O <sub>2</sub> 蓄積 |
| 進化       | 化学進化              | 生命発生 | 生物進化                     | 多細胞性  |                   |
| 生物形態     | 原核生物              |      | 真核生物                     | 多細胞生物 | 陸上生物              |
| 代謝       | 発酵                |      | 光合成<br>嫌気呼吸<br>(硫酸・硝酸還元) | 呼吸    |                   |

新たに作られたという考えに基づいている。しかし、硝酸は酸素がなくても紫外線の作用でアンモニアから水中で形成し得ることが示された。また硝酸還元酵素は *C. perfringens* の酵素まで含めてすべてモリブデン因子を含み、その複雑な構造からいっても、おそらくは一回しか発生せず、それが子孫に伝えられたと考えるのは妥当であろう。

われわれの立てた図式は、発酵→硝酸発酵→硝酸呼吸→酸素呼吸という順であり、充分その可能性が大きいと思われる。現在の複雑な呼吸系などが一度に生じる可能性はなく、それ以前の多くの過程の成立とその改良・複合が現在の系を導いたに違いない。Brodaのように、現在の系の退化によって起こったとして、完全な系の一部が生化学的により簡単な系と似ているとすることは、安易であるが、その完全の系の成立の過程を追求することを放棄するものである。たしかに現在の電子伝達系は、光合成の電子伝達系に酷似する面が多いが、そういったものの共通の原型を捜し当て、あるいは推定することができれば、結構なことと思われる。図表99に、生命の起源と進化に関して簡単な年代記を掲げる。

いずれにしても、嫌気呼吸の機構の解析・比較研究によって、生命の進化の進んだ道を推定し、物理化学的必然性だけでなく、生物の進化に見られる歴史性の跡を辿ることができれば、望み得る最高の幸と感ずる。

## VI. スルホン酸分解酵素の研究

私が研究生を送ってきた40年は、戦後の日本の工業の再建と発展の時期であった。戦前の工業力に比べて質量とも大きく変化した、大規模になるに従って生活環境の破壊が行われ、多くのいわゆる「公害」事件が起こるようになった。以前は予想もしなかったことが、現在では大きな規模で広く進行している。生化学者としてそれに多少とも関連のある生化学的現象に関心を持ち、役に立つことがあれば取り上げてみたいと思っていたが、その一つは硫酸還元菌による硫化水素発生であり、もう一つはスルホン酸洗剤の分解過程であった。

スルホン酸の代謝の研究として最初に取り掛かったのは、タウリンの微生物による分解であったが、更にベンゼンスルホン酸の分解も検討したので、それについて述べる。

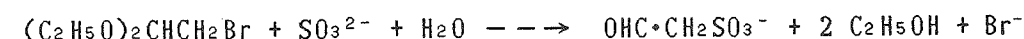
### 1. タウリンの細菌酵素による分解

この問題は以前、京大理学部化学教室の田中正三教授の研究室で池田加代子氏らによって取り上げられたものである。分解菌によってタウリンからアンモニアと硫酸が出来るが、不安定な硫黄化合物が中間に生じることが示されていた。その後、硫黄代謝の中でスルホン酸の代謝は研究が殆ど行われていないので、着手することにした。われわれの研究室でこの方面の研究を行われたのは近藤博之氏らである。

タウリンを分解する細菌は下水泥から容易に分離することが出来る。タウリンを唯一の炭素源・窒素源・硫黄源として含む培地に少量の泥を加えて放置すると、スルホン酸が分解して硫酸を生じて酸性になる。培地にプロムチモールブルーを指示薬として入れておくと、黄色のコロニーとして分解菌を分離することが出来る。得られた菌株は短かん菌で、グラム陰性であった。まだ同定していないが、好気性細菌で、嫌氣的には生えない。

この菌はタウリン  $\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$  を分解するが、培地中にアンモニアとともに亜硫酸を生じた。この菌の抽出液はタウリンから定量的にアンモニアを生じたが、遊離の亜硫酸あるいは硫酸を生じなかった、その含硫中間物の同定を行

った。アンモニアはおそらく酸化的に生じると考えられるので、生成物はタウリンに対応するスルホアセトアルデヒド  $\text{OHC}\cdot\text{CH}_2\text{SO}_3^-$  であると目星をつけてその合成を試みた。Organic synthesis にプロモアセタールの合成法があるのを見つけ、それと亜硫酸ナトリウムを反応させて、スルホン基の導入と加水分解とを狙ったのである。

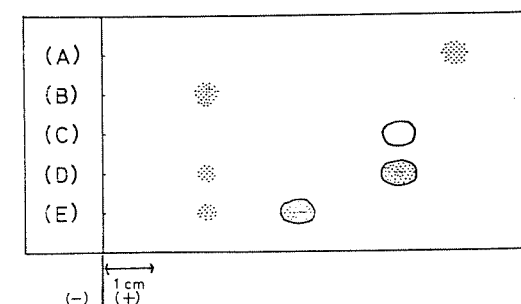


その結果、見事に結晶が得られたが、分析したら硫黄が2原子含まれていることが分かり、スルホアセトアルデヒドの亜硫酸付加物ナトリウム塩の2水和物  $\text{NaO}_3\text{S}\cdot\text{CHOH}\cdot\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  であろうと見当を付けた。バリウム塩で処理することによって遊離のアルデヒドを得ることができる。

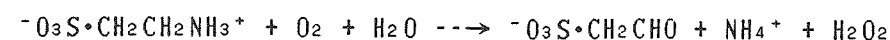
この化合物を菌懸溶液に加えると、分解して酢酸と亜硫酸を1:1で与えた。抽出液によるタウリン分解物の同定には $^{35}\text{S}$ -タウリンを合成して用いた。反応液は除蛋白後、スルホアセトアルデヒド亜硫酸付加物をキャリアーとして加え、ろ紙電気泳動にかけ、銀染色のスポットとラジオオートグラムによる $^{35}\text{S}$ のスポット

図表100. 菌抽出液におけるタウリン分解物のろ紙電気泳動による同定

(A)  $^{35}\text{S}$ -硫酸、(B) 反応液(煮沸酵素)、(C) スルホアセトアルデヒド標品、(D) 反応液 + スルホアセトアルデヒド亜硫酸付加物、(E)  $\text{BaCl}_2$  処理反応液



の一致で同定した（図表100，D）。また BaCl<sub>2</sub> 処理したものも遊離のスルホアセトアルデヒドとスポットが一致した（E）。反応液中にスルホアセトアルデヒドの亜硫酸付加物として蓄積していることが明かになった。おそらく、



により生じたスルホアセトアルデヒドが、一部分解して生じた亜硫酸と結合して生成したと考えた。

この脱アミノを行う酸化酵素は、抽出液を高速で遠心分離すると沈澱部分に集まり、膜画分に存在すると思われる。洗剤で処理して可溶化し、この酵素を精製してその性質を調べた。分子量は数十万で、巨大分子のためそれ以上の精製は困難である。電子受容体としてはフェナジンメトスルフェイトが必要で、酸素にはつながらない。調べた多くのアミンのうちタウリンだけが、酸化されるので、タウリンデヒドロゲナーゼと名付けた。タウリンから遊離のスルホアセトアルデヒドとアンモニアを生じた。タウリンに対する K<sub>m</sub> は 0.02 M で、比較的大きい。

粗抽出液によるスルホアセトアルデヒドの分解酵素は遠心上清にある。その生

図表101. スルホアセトアルデヒドの亜硫酸と酢酸への酵素的分解

| Concentration of bisulfite addition compound of sulfoacetaldehyde (mM) | Incubation time (hr) | Sulfite (mM) |          | Acetate (mM) |          |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------|----------|--------------|----------|
|                                                                        |                      | Found        | Increase | Found        | Increase |
| 0                                                                      | 0                    | 0.08         | —        | 0.4          | —        |
|                                                                        | 1.5                  | 0.08         | 0.00     | 0.3          | -0.1     |
|                                                                        | 3.0                  | 0.08         | 0.00     | 0.4          | 0.0      |
| 2                                                                      | 0                    | 2.24         | —        | 0.5          | —        |
|                                                                        | 1.5                  | 3.84         | 1.60     | 1.8          | 1.3      |
|                                                                        | 3.0                  | 4.24         | 2.00     | 2.1          | 1.6      |
| 4                                                                      | 0                    | 4.26         | —        | 0.6          | —        |
|                                                                        | 1.5                  | 6.68         | 2.42     | 2.6          | 2.0      |
|                                                                        | 3.0                  | 6.80         | 2.54     | 3.3          | 2.7      |
| 4 with boiled enzyme (100°C, 10 min)                                   | 0                    | 4.40         | —        | 0.4          | —        |
|                                                                        | 1.5                  | 4.30         | -0.10    | 0.4          | 0.0      |
|                                                                        | 3.0                  | 4.24         | -0.16    | 0.6          | 0.2      |

図表102. スルホアセトアルデヒドの分解におけるチアミンピロリン酸

の必要性

| Experiment number | Enzyme preparation                 | Amount used for reaction (mg protein) | Addition              | Sulfite formed         |                    |
|-------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|
|                   |                                    |                                       |                       | (μmole)                | (μmole/mg protein) |
| 1                 | Crude extract                      | 1.1                                   |                       | 0.51                   | 0.46               |
|                   |                                    |                                       | TPP, Mg <sup>2+</sup> | 0.74                   | 0.67               |
|                   | Dialyzed extract                   | 4.9                                   |                       | 0.31                   | 0.06               |
|                   |                                    |                                       | TPP, Mg <sup>2+</sup> | 1.74                   | 0.36               |
|                   | Eluate from a Sephadex G-25 column | 1.9                                   |                       | 0.04                   | 0.02               |
|                   |                                    |                                       | Membrane filtrate     | 0.34                   | 0.18               |
| 2                 |                                    |                                       | TPP, Mg <sup>2+</sup> | 0.52                   | 0.27               |
|                   |                                    |                                       |                       | Acetate formed (μmole) |                    |
|                   | Crude extract                      | 1.0                                   |                       | 0.60                   |                    |
|                   | Dialyzed extract                   | 1.0                                   |                       | 0.06                   |                    |
|                   |                                    |                                       | Membrane filtrate     | 0.25                   |                    |
|                   |                                    |                                       | TPP                   | 0.55                   |                    |
|                   |                                    |                                       | Mg <sup>2+</sup>      | 0.03                   |                    |
|                   |                                    |                                       | TPP, Mg <sup>2+</sup> | 0.61                   |                    |
|                   | None                               |                                       | Membrane filtrate     | -0.04†                 |                    |
|                   | None                               |                                       | TPP, Mg <sup>2+</sup> | -0.10†                 |                    |

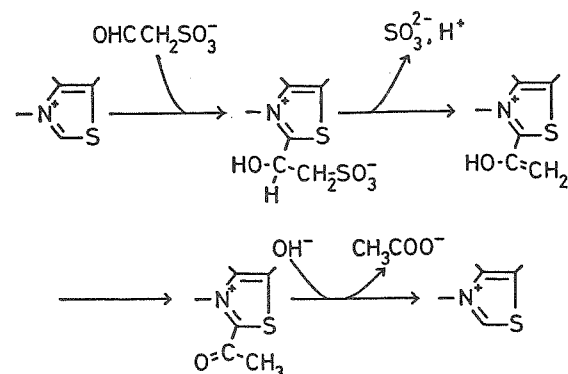
† Amount of acetate decreased.

成物は、亜硫酸と酢酸で、その量比は1:1であった（図表101）。抽出液を透析するかゲルろ過すると活性が低下する。膜ろ過液あるいは酵母エキスあるいは肝エキス濃縮物を加えると回復するので、その中に反応に必要な因子があるに違いないと考えた。既知の補酵素を片端からほうり込んで調べてみた結果、チアミンピロリン酸がマグネシウムイオンの存在で有効なことが分かった（図表102）。遊離のチアミンはチアミンピロリン酸の作用を抑制する。チアミンピロリン酸は活性アルデヒドを作る補酵素で、C-C結合の切断（2-オキソ酸の脱カルボキシル化など）あるいは切断移転（ケトールの移転）を行うものであるが、C-S結合の切断への関与は初めてであった。

この酵素を精製して性質を調べた。分子量8.5万。チアミンピロリン酸のK<sub>m</sub>は2.7 μM。pCMB、EDTA、亜硫酸が阻害を示した。スルホアセトアルデヒド以外のスルホン酸は分解されない。本菌をタウリン培養するときのみ生成する誘導酵素で



図表 103. スルホアセトアルデヒドスルホリアーゼ反応におけるチアミン  
ピロリン酸の作用機構



ある。

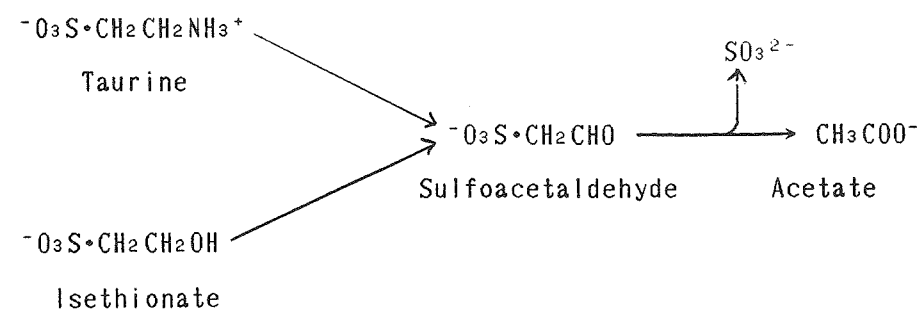
スルホアセトアルデヒドに対する作用は、チアミンピロリン酸のチアゾールにカルボニル炭素が結合し、スルホン酸が脱離し、生じるエノールがアセチル基として加水分解する機構（図表 103）を考えた。いずれにしても脱離反応と見なされるので、Sulfoacetaldehyde sulfo-lyase という名前を提案した。

なお、タウリンのアミノ基をヒドロキシル基で置換した化合物はイセチオン酸  $\text{HO}\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$  と呼ばれるが、これは高等動物の神経や心筋に多量に存する物質で、アニオンとして濃度は  $\text{Cl}^-$  に次ぐが、その役割はわかっていない。動物組織のホモジェネート中でタウリンから生成するという報告もある。本菌はタウリンの代わりに、アンモニアの存在においてイセチオン酸を主要な炭素源としてもよく成長する。この培養菌からイセチオン酸のデヒドロゲナーゼを抽出し、性質を検討した。膜結合性で低イオン濃度の液で可溶化された。FADの存在においてイセチオン酸を脱水素し、スルホアセトアルデヒドを生成する。カルボニル試薬（フェニルヒドラジン、セミカルバジド）、SH試薬（pCMB, ヨード酢酸）などは若干の阻害を示した。巨大分子らしくて、会合沈澱し易いので、それ以上精製を進められなかった。同じ標品はブタノールの酸化能を持つ。

またイセチオン酸培養菌はタウリン培養菌と同じようにスルホアセトアルデヒドスルホリアーゼをもつ。

以上の実験から、タウリンおよびイセチオン酸の分解経路は図表 104 のように示される。高等動物にも類似の経路が存在するかどうか検討したが、反応は認められなかった。

図表 104. タウリンとイセチオン酸の微生物による分解



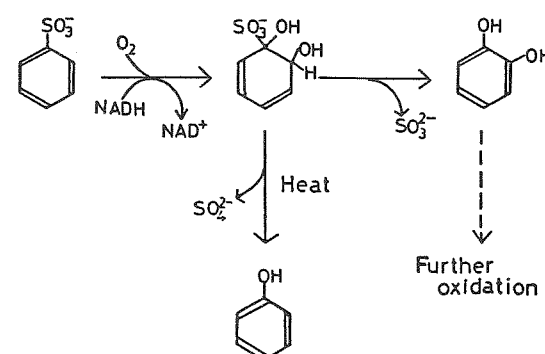
## 2. 芳香族スルホン酸の分解

タウリンにつづいてベンゼンスルホン酸の微生物による分解を調べた。下水泥からベンゼンスルホン酸を主要炭素源とし、微量の酵母エキスを含む培地で集積培養を行い、BTBを含む寒天上で生じた黄色のコロニーを取った。液体培地におけるベンゼンスルホン酸からの生成物はタウリンと同じく亜硫酸であった。

またベンゼンスルホン酸を含めて各種のスルホン酸を分解する菌を探索した。札幌周辺の河川水・底土などを採集して、スルホン酸培地に接種し、生えてくる菌を分離した。概して有機物汚染のひどいところに分解菌は多いが、ムラサキツユクサのような植物が腐ったところからも多く生育した。トルエンスルホン酸、フェノールスルホン酸などは分解菌がいたが、いずれも亜硫酸を生成した。スルファニル酸に生える菌は少なく、亜硫酸も生じなかった。長鎖のアルキルベンゼンスルホン酸の分解菌は得られなかった。これまで分岐アルキルベンゼンスルホン酸の洗剤としての使用が、その非分解性のため廃水の浄化を妨げることが問題になり、易分解性の洗剤として長鎖アルキルのついたベンゼンスルホン酸が使われるようになり、そのベンゼン環の微生物による分解が世界の幾つかの研究室で研究された。しかし、研究はアルキル基の酸化に専ら集中されて、スルホン酸部分の分解の研究は殆どなかった。

ベンゼンスルホン酸の分解菌を大量培養して、生菌での分解を観察するとともに、分解酵素の抽出を試みた。生菌で亜硫酸の生成を見られるので、それを指標にして、スルホン酸の分解酵素系を研究した。ベンゼンスルホン酸を炭素源とし

図表 105. ベンゼンスルホン酸の酵素的分解機構



て培養した菌を集め、音波破碎して抽出液を得た。抽出液を熱変性処理した液は多量の亜硫酸を含み、ブランクが大きくて測定し難かった。しかし、透析した抽出液はNADHを加え、空气中で放置することによって確かに $\text{SO}_3^{2-}$ を生じた。この活性は硫酸35-50%飽和沈澱区分に集まり、比活性は15倍上昇した。興味深いことは反応液を蒸留するとフェノールが得られることである。ベンゼン環がオキシゲナーゼによって水酸化され、スルホン酸がヒドロキシスルホン酸となって亜硫酸を生じるという機構を考えた(図表105)。

なおこの菌は、ベンゼンスルホン酸以外に、p-フェノールスルホン酸を60%ぐらいの速度で分解する。また、カテコールを酸化する能力を持つので、これがベンゼンスルホン酸の分解物である可能性も存在する。

さらにイオン交換セルローズを用いて亜硫酸生成系の分画精製にかかったが、分画された酵素は不安定で、4°Cでも1夜にして活性を失った。これにより、酵素を安定化する試薬を探して、5 mMのベンズアルデヒドが有効であることを見出した。さらに0.1 mMのPMSFを添加して安定化を行った。その結果、活性低下なしに分画を進めることができるようになり、ベンゼンスルホン酸からの亜硫酸生成には少なくとも3つのタンパク質画分が必要なことがわかった。各画分がどのような役割をしているかは、まだ明かではない。

トルエンスルホン酸の分解菌は別に分離されたが、ベンゼンスルホン酸には作用しなかった。結構特異性が高いようである。抽出液の酵素活性は沈澱画分に集まっていた。

芳香族スルホン酸の分解に関するわれわれの研究はそこまでであった。その後、ナフタレンスルホン酸の分解ではヒドロキシル化されたヒドロナフタレン誘導体が中間産物として分離され、構造が決められたようである。

スルホン酸は工業製品にも多いが、葉緑体中の脂質であるスルホリピドは、メチルペントースのメチル基にスルホン酸が結合したものを含んでいる。この物質がどういう生理的意義を持つものかは不明であるが、量的には決して少ないものではない。その合成も分解も研究する価値があると思う。生物はスルホン酸を強酸の塩として、また表面活性物質として利用してきたが、生体内においても比較的安定な物質であるように見える。硫黄の循環の一つの形としてもその代謝は追求されるべきであろう。

## 編集後記

微生物薬品化学講座教授 石本真先生は1988年3月31日、北海道大学薬学部を定年退官されました。ここに、これまでの長年に亘る御研究の成果を先生御自身にまとめて頂きました。

細菌の呼吸系の進化を縦糸とし、硫黄代謝を横糸とした織物に生命の歴史性が浮き出され、また、薬学の教育・研究者として尽くされた先生の姿勢を伺い知ることができます。

これからも変わらぬ御健勝と御活躍を祈ってやみません。

1988年 5月

石本真教授定年退官記念会

## 石 本 真 教授業績集

1988年 5 月 発行

発行者 札幌市北区北12条西6丁目  
北海道大学薬学部微生物薬品化学講座  
石本 真 教授定年退官記念会

印 刷 北海道大学生協同組合「北大印刷」