



Title	Mycobacterium aviumの抽出液中に含まれるenzyme unitについて
Author(s)	東野, 一弥
Citation	大阪大学, 1960, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28220
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【 30 】

氏名・(本籍)	東野一弥 ひがし の かず や
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 75 号
学位授与の日付	昭和 35 年 3 月 16 日
学位授与の要件	医学研究科内科系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	Mycobacterium avium の抽出液中に含まれる enzyme unit について
論文審査委員	(主査) (副査) 教授 堂野前維摩郷 教授 堀 三津夫 教授 須田 正巳

論 文 内 容 の 要 旨

目 的

鳥型菌竹尾株の無細胞抽出液中の malate の酸化的リン酸化系は、此の液の硫酸 0.3 飽和画分に含まれてくる。故に、この画分にはある構造をもった enzyme unit が存在すると考えられるので特に興味あると思われた enzyme unit 中の bound DPN 存在の有無を検討することにより、enzyme unit の生化学的性格を明らかにしようとした。

方 法

1. 菌無細胞抽出液及びその硫酸画分の調整法—鳥型菌竹尾株を 3 日間, glycerol- bouillon に培養後, 集菌洗滌し等重量の石英砂とともに磨砕し, 3 倍量の冷却した 0.9% KCL 液で抽出した。抽出液を中和後, 3,500 回転, 40 分遠心し, その上清を更に 12,000 回転, 20 分遠心した上清を無細胞抽出液とした。これに固形硫酸を 0.3 飽和の割りに加え, 12,000 回転 30 分遠心した沈渣を同飽和度の硫酸水溶液で洗滌し, 沈渣を M/100 リン酸緩衝液 PH7.2 に懸濁し, 脱イオン水に 2 時間透析したものを 0.3 画分とした。操作は 0°~5°C で行った。

2. Dehydrogenase の調整—alcohol dehydrogenase は乾燥パン酵母より奥貫らの方法により抽出純化した。DPN/dependent isocitric dehydrogenase はパン酵母より Kornberg らの方法により抽出純化した。

3. DPN の定量—alcohol dehydrogenase を用いて DPN を還元し, 340m μ の吸光度より計算した。或は methyl ethyl ketone 法を用い, fluorometric に測定した。4. 0.3 画分中の cytochrome の分光分析—試料を hydrosulfite で還元し handspectroscope を用いて吸収帯を検査した。

5. Light scattering 法—日立 EPU-2 型分光光電光度計を用い, 適当に稀釈した 0.3 画分の 520m μ における吸光度をしらべた。

結 果

1. 0.3 画分中に含まれる酵素及び Cytochrome—0.3 画分による malate の酸化的リン酸化活性 (P : O) は、無細胞抽出液による酸化的リン酸化活性とほとんど等しいので終末電子伝達系及びその系の電子移動に共軛するリン酸化系は 0.3 画分に含まれる。0.3 画分には分光分析的に Cytochrome a, b, c, を証明し、また酵素としては、malic 及び succinic dehydrogenase 活性を証明することが出来たが iso-citric 及び α -ketoglutaric dehydrogenase, あるいは aconitase, fumarase 及び oxalacetic decarboxylase 活性を証明することは出来なかった。このような酵素分布は楠瀬らが同菌よりえた顆粒成分中の酵素分布と一致していたので、0.3 画分及びその分画成分の形態学的検索を行った。

2. 電子顕微鏡検査—0.3 画分及びそれを超遠心分画して得た画分の電子顕微鏡的観察から、0.3 画分が大部分顆粒成分よりなり、上記酵素系は顆粒成分中に含まれることを生化学的に明らかにした。このような 0.3 画分及び超遠心でえた顆粒成分を用いて以下の実験をした。

3. 0.3 画分中の DPN—菌無細胞抽出液中の DPN を alcohol dehydrogenase を用いて定量すると、0.3 画分中には存在せず、それ以上の硫酸飽和度の画分中に含まれていた。故にパン酵母よりえた alcohol dehydrogenase あるいは DPN-dependent isocitric dehydrogenase は、基質と 0.3 画分を加えたのみでは酸素を消費しないが、更に DPN を添加すると酸素消費を示す。これに反して 0.3 画分による malate 酸化には DPN を添加する必要はなく、また添加しても反応速度は変らなかった。この事実から 0.3 画分中に DPN が含まれているとすると構造物に結合した状態にあって容易には遊離してこないものと思われる。

以下 bound DPN の検索を進めながら顆粒成分中の enzyme unit の構造を生化学的に検討した。

- 1) 菌無細胞抽出液調整を脱イオン水、0.9% KCL あるいは 5% sucrose で行っても malate の酸化的リン酸化活性 (P : O) に大した相違がない。又画分を脱イオン水で稀釈し数日間氷室に放置しても 520m μ の吸光度は変らなかった。酸化的リン酸化の uncoupler である Ca⁺ thyroxine は顆粒成分の濁度に影響を与えない。以上のことより顆粒成分は相当安定な構造を持つものと思われる。
- 2) このように安定した構造物を解体することを試みた。無機イオン、界面活性剤、蛋白質分解酵素、ribonuclease, lipase の顆粒成分懸濁液に及ぼす影響を Light scattering 法で検討したが界面活性剤、上記諸酵素によって濁度の減少を認めた。
- 3) しかし界面活性剤を顆粒成分に作用させても pyridine nucleotide は遊離して来なかった。
- 4) 蛋白質分解酵素, ribonuclease, lipase を顆粒成分に作用させても pyridine nucleotide は遊離し来なかった。
- 5) 界面活性剤, 酵素作用により顆粒成分から遊離する nucleotide を column chromatography で分析し DPN の溶出画分を更に Paper chromatography によって分析したが pyridine nucleotide は存在しなかった。

以上の成績から顆粒成分中の DPN を化学的に把えることは出来なかったので malic dehydrogenase の DPN 要求性から bound DPN の存否を知らうと試みた。

- 1) 0.3画分中の malic oxidase 活性は高濃度の nicotinamide で阻害されたが高濃度の DPN を添加

しても活性は全く回復しなかった。

- 2) amytal は malate oxidase を全く阻害しなかった。しかし、DPNH oxidase も阻害されなかった。
- 3) 高濃度の oxalacetate を添加しても malate の酸化速度は影響を受けなかった。
- 4) 顆粒成分に anaerobic な状態で malate を加えても DPN の添加の有無に関せず $340m\mu$ の吸光度の上昇はなかった。

これらの実験から顆粒成分中の malic dehydrogenase が DPN を補酵素とする根拠は得られなかったが、勿論 DPN を補酵素としない積極的根拠もない。そこで0.3画分より digitonine, 超音波破壊, 凍結融解, 石英砂磨砕によって malic dehydrogenase の遊出を試みたが, succinic dehydrogenase は digitonine 処理によって構造物より遊出したが malic dehydrogenase は界面活性剤により DPN を添加しても酵素活性を失っていた。その他の方法では両者とも遊出されなかった。

総 括

Mycobacterium avium 竹尾株抽出液の硫酸飽和 0.15~0.3 画分中に終末電子伝達系をもつ enzyme unit が集約されてくることを生化学的及び形態学的に確かめた。この enzyme unit は生化学的にはその構造が相当安定であり構成分即ち酵素及び終末電子伝達系はなかなか遊離してこなかった。それらの構成分のうち、当初存在の予想された DPN を遊離させるために enzyme unit に種々の侵襲を加えたが、その存在を化学的に把えることはできなかった。またその enzyme unit 中の malic dehydrogenase が DPN, あるいは TPN を補酵素とする根拠は得られなかったので enzyme unit 中には bound PPN は含まれていないものと思われる。その enzyme unit の細胞内の由来から考えると興味ある現象である。

論文の審査結果の要旨

鳥型結核菌竹尾株無細胞抽出液中の malate の酸化的リン酸系は、硫酸 0.3 飽和画分に含まれるので、この画分には構造をもった enzyme unit が存在すると考え、このものの生化学的性格を検索し、以下の成績をえた。

1. 0.3 画分中に含まれる酵素系：0.3 画分を分光分析的に調べると、cytochrome a, b および C, が含まれていた。また malic および succinic dehydrogenase 活性を証明することができたが isocitric および α -ketoglutaric dehydrogenase あるいは aconitase, fumarase および oxaloacetic decarboxylase 活性を証明することはできなかった。このような酵素分布は楠瀬らが同菌よりえた顆粒成分中の酵素分布と一致していたので、0.3 画分およびその分画成分の形態学的検索を行った。

2. 電子顕微鏡検査：0.3 画分およびそれを超遠心分画して得た画分の酵素学のおよび電子顕微鏡の観察から、0.3 画分が大部分顆粒成分より成り、上記酵素系は顆粒成分中に含まれることを明らかにした。

3. 0.3 画分中の DPN：菌無細胞抽出液中の DPN を定量すると、0.3 画分中には全く存在せず、それ以上の硫酸飽和度の画分中に含まれていた。故に、パン酵母よりえた DPN を補酵素とする alcohol dehydrogenase あるいは isocitric dehydrogenase は、基質と 0.3 画分を加えたのみでは酸素を消費しなかったが、更に DPN を添加すると初めて酸素消費を示した。これに反し、0.3 画分による malate の酸化

には DPN の添加を必要とせず、添加しても反応速度は全く影響を受けなかった。以上の事実から、0.3 画分中に DPN は全く含有されていないのか、または DPN は画分中の構造物と強固に結合して遊離し難いのか、あるいは遊離した時に分解されるとも考えられる。以下0.3 画分中の DPN の検索を進め乍ら、画分中の構造物を生化学的に検討した。

菌無細胞抽出液の酸化的リン酸化は、菌抽出の際脱イオン水で行っても、あるいは塩類、蔗糖溶液で行っても P:O 比には大きな影響を与えなかった。また 0.3 画分あるいは顆粒成分は懸濁した medium の tonccity を変えても、light scattering 法で形態変化を把えることはできなかった。しかし、界面活性剤あるいは各種分解酵素を 0.3 画分または顆粒成分に作用させると、その懸濁液の濁度の減少が認められた。恐らく顆粒成分の破壊があったのであろう。しかしこれらの作用によって遊出してくる酸可溶性画分中に Dowex-1 による column chromatography で DPN が溶出すべき画分にある nucleotide が溶出してきたが、このものが DPN あるいはその分解産物であるという証拠はえられなかった。以上の成績から、0.3 画分あるいは顆粒成分中の DPN を化学的に把えることができなかったため、malic dehydrogenase の DPN 要求性から DPN の存在を知ろうと試みた。

0.3 画分または顆粒成分に DPN を添加しても、anaerobic に malate による還元は認められなかった。malate の酸化は nicotinamide で阻害されたが、DPN 添加で恢復せず、また oxaloacetate で阻害されることもなかった。次に 0.3 画分あるいは顆粒成分を破壊して (digitonin, 超音波, 凍結融解または石英砂磨砕処理による) malic dehydrogenase の遊出を試みた。succinic dehydrogenase は digitonin 処理により遊出したが、malic dehydrogenase が遊出してくるのは認めることができなかった。他の方法では、両者とも遊出されなかった。

以上の実験成績を総括すると、鳥型結核菌竹尾株抽出液の硫酸 0.3 飽和画分中に、終末電子伝達系をもつ構造物が集約されてくることを、生化学的および形態学的に確かめ、その構造物中に存在すると予想される boun DPN の検索を進めることにより、構造物の生化学的性格の一端を明らかにしたものである。即ちこの構造物は相当安定であり、その中に含まれる酵素および終末電子伝達系は、なかなか遊離せず酵素系は enzyme unit を形成しているものと思われる。それらの構成分のうち、当初存在の予想された DPN を遊離させるために、構造物に種々の侵襲を加えたが、その存在を化学的に把えることはできなかった。またその構造物中の malic dehydrogenase が DPN あるいは TPN を補酵素とする証拠はえられなかった。上記の成績は、構造物中に DPN が含まれていないとすれば、説明しうるものと思われる。構造物の細胞内の由来から考えると興味ある現象である。

著者の実験は鳥型菌竹尾株の微細構造の解釈に興味ある事実を生化学的な面から附加したもので、結核菌の構造と機能に関する研究の進展に寄与する所大であると思われる。