

[J. Ferment. Technol., Vol. 45, No. 11, p.1040~1048, 1967]

炭酸固定発酵に関する研究*

(第11報) *Schizophyllum commune* における尿素およびオルトリン酸の L-Malic acid 生成促進効果の酵素化学的意義

立花 精・梅原 万義**・塩出 十一

(立命館大学工学部化学科)

Studies on CO₂-fixing Fermentation(XI) Enzymatic Significances of Orthophosphate and Urea in the L-Malate Production using *Schizophyllum commune*

Sei Tachibana, Kazuyosi Umehara and Jiuchi Siode

(Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University, Kita-ku, Kyoto)

It was previously reported that orthophosphate, CaCO₃ and urea were limiting factors for the L-malate production by CO₂-fixing fermentation using *Schizophyllum commune* under culture conditions. By using the homogenate of the mold, L-malate was formed from glucose, 3-phosphoglycerate and pyruvate in presences of orthophosphate and KHCO₃, where glucose was most effective as the substrate, and the higher concentration orthophosphate inhibited the L-malate formation from pyruvate, but it did not inhibit from 3-phosphoglycerate. Therefore, L-malate would not be formed through the oxidative process such as TCA cycle and glyoxylate bypath. By using the cell-free extract of the mold, it was also revealed that the inhibitory effect of orthophosphate on the oxaloacetate formation from pyruvate was reduced by the addition of ATP. On the contrary, the oxaloacetate formation from 3-phosphoglycerate was markedly stimulated by the addition of both of orthophosphate and KHCO₃. The formation from phosphoenolpyruvate was much more stimulated by them. In these experiments, it was shown that the effect of urea was resembled to that of KHCO₃. The optimum concentration of orthophosphate added was 0.4 and 0.8 mM in KHCO₃ and urea containing system, respectively.

Consequently, both of the occurrences of pyruvate carboxylase- and phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase-like enzymes seemed to be observed in the extract, while the latter reaction was expected to be more active than the former in the CO₂-fixing fermentation because of the latter's superiority in bioenergetics as shown in equation (3) and (4).

In many cases, it was shown that the pyruvate formation was parallel to the oxaloacetate formation. The phenomenon seems to be explained by an unknown enzyme which produces pyruvate from phosphoenolpyruvate accepting its phosphate on orthophosphate,

* 昭和38年度文部省科学試験研究費補助金 (No. 58135) による研究

** 現在藤沢薬品工業株式会社

but, on the other hand, it can be reasonably understood by the phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase followed by oxaloacetate decarboxylation.

緒 言

CaCO₃ 添加を必要とする *Schizophyllum commune* Fries (スエヒロタケ) の L-malate 発酵の培養試験において、urea にある程度の CaCO₃ 代替効果のあることを見出し¹⁾, その CO₂ 源としての役割を論じた²⁾. またオルトリン酸のある範囲内での濃度と L-malate 生成率との間には正の相関々係があることも見出した³⁾.

本報ではこれら培養試験によって得られた結果のよってきたところをスエヒロタケ菌糸の粗無細胞抽出液を用いて究明し、もって酵素レベルでのスエヒロタケの L-malate 生成機構の研究の手掛かりを得ようとした。

実験材料と方法

1. 菌株 *S. commune* Fries IFO 4928 を使用した。これを麦汁寒天斜面培地あるいはブドウ糖 3g, ペプトン 0.2g, NH₄NO₃ 0.1g, KH₂PO₄ 0.1g, MgSO₄·7H₂O 0.05g, KCl 0.05g, 水道水 100ml, 寒天 1.5g からなる合成斜面培地に接種し, 30°C で 1 週間以上培養し, 約 1 ヶ月ごとに植え継いだ。以上ほぼ既報³⁾ の通りである。

2. 種培養 1 気圧で 30 分加圧殺菌した麴, 松鋸屑, 水 (1:1:2) の固形培地を 100~500 ml 容三角フラスコに入れ, この 40g に対し上記保存培地から 2~3 白金耳の菌糸を接種し, 2 週間, 30°C で培養し, 以後室温に放置した。以上ほぼ既報の通りである³⁾。

3. 培養 500 ml 肩付振盪フラスコ中の 60 ml 培地に上記種培養約 0.3g を接種し, 30°C で振盪培養した。培地組成は上記合成保存培地組成から寒天を除き, それに酵母エキス 0.2g を加えたものである。培養期間はとくに断わらない限り 4~7 日である。酵母エキスの代わり, 0.2% 程度の CaCO₃ 添加培地でも試験したが, その場合の培養期間は 8~15 日を要し, 以下の試験の対象となる酵素活性も高くないことを知った。その実験結果はここに記さない。

4. 磨砕液 菌体を沪取り, フラスコ 1 本当り, 100~200 ml の冷 0.01 M phosphate buffer (pH 6.8) で洗滌し, 軽く沪紙で挟んで脱水したのち -20°C に保存した。冷乳鉢中で凍結菌体を速やかに碎きながら, 冷 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) をその 10 倍量加えて磨砕抽出し, 磨砕液とした。この間, 洗液は洗滌の途中生成される粘質物により極めて粘性を帯びるし, また磨砕液をしばらく放置したり, 5°C の冷蔵庫に 1 夜保存した場合など, 液面に粘質物の被膜の形成が認められた。これらの粘質物はあらかじめ菌体中に存在していたものではなく, 以上の操作の間に新たに合成されたもののように見えた。

5. 粗無細胞抽出液 上記凍結菌体を冷乳鉢中で速やかに融解しながら, 等量の Celite 545 を加え 10 分間磨砕し, それに 2 倍量の 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) を加え磨砕抽出したのち, 15 分間 4500 rpm で遠心分離し, 上清を得て, これを粗無細胞抽出液として用いた。

またこれとは別に, 冷滅菌水で洗滌した菌体を速やかにピーカーにとり, これに菌体が漸く没する程度の量の -20°C のアセトンを加えよく菌体をほぐす。このアセトン処理を 5 回くりかえしたのち, エーテルで乾燥し, acetone powder とし減圧デシケーター中に保存した。とくに断わらない限りこの acetone powder からはずぎのようにして粗無細胞抽出液を調製した。acetone powder を冷乳鉢中にて, その 10 倍量の 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) を加えて磨砕抽出したのち, 4500 rpm で 10 分遠心分離し, 上清を得, そのまま粗無細胞抽出液とした。

6. L-Malate dehydrogenase Gale ら⁴⁾ の方法に準じ Thunbery 管を用い 2,4-dinitrophenyl indophenol の脱色試験によった。

7. Malic acid の定量 Hummel の微量蛍光法⁵⁾ によったが, 若干変更してつぎの通り行なった。酵素反応液を 5 分間, 95~100°C で加熱したのち, 東洋沪紙 No. 5°C で沪過する。この沪液 0.025 ml (1 μg 以下の malic acid を含有) と水 0.025 を試験管にとり, 20 分間 105°C で加熱, 蒸発乾固させる。冷暗所に保存した 100 ml の 12.5% H₂SO₄ に 80 mg の Orcinol を溶解した Orcinol 液の 8 ml を濃 H₂SO₄ で 100 ml に希釈してのちその 3 ml を上記試験管に加え, よく振盪して, 20 分間 100°C に保つ。これを冷却してのち, これに濃

H₂SO₄ 2 ml を加え、島津・コタキ蛍光光度計を用いて測定した。

8. **α-Keto acids の定量** 反応液にその 0.6倍の0.5% 2,4-dinitrophenylhydrazine 2N HCl 液を加え、室温に10分保ったのち、そのまま東洋濾紙 No. 2 に帯状に塗布し、3% NH₄OH 飽和 *n*-butanol で1液ペーパークロマト展開する。Rf 0.37 と 0.13 のそれぞれ pyruvic acid (PyA) と oxaloacetic acid (OAA) の hydrazone の分離帯を切り取り、細断後一定量の 10% Na₂CO₃ 液を加えてよく抽出し、濾過後濾液に一定量の 1.5 N NaOH を加える。ベックマン型日立分光光度計を用い 450 mμ の吸光度を測り定量した。以上、Friedemann-Haugen 法⁶⁾などを参考にした。

9. **基質** Na-pyruvate はメルク製品、Ba-3phos-phoglycerate, Na-phosphoenolpyruvate はシグマ製品。K₂SO₄ または MgSO₄ と MnSO₄ の混合物を用いて脱 Ba した。しかし Na 塩はそのまま使用した。

実験結果

1. **磨砕液による Malate の生成** *S. commune* の上記の磨砕液がいかなる活性を示すかを、D-glucose, 3-phosphoglycerate (3-PGA) および pyruvate (PyA) を基質としてしらべた。その結果は Table 1 に示す通りであってかなりのリンゴ酸生成活性を示した。また基質の種類、添加 KHCO₃ の有無、オルトリン酸の量の効果が大であることも同時に判明した。基質としては glucose が最もすぐれ、3-PGA, PyA の順に劣った。TCA cycle, malate synthetase と glyoxylate bypath によって malate 生成が起るとすれば PyA が基質として最もすぐれているはずである。これに反し還元的に生成されるとすれば、glucose から glycolysis で生ずる glyceraldehyde-3-phosphate の水素が有効となるから glucose が最もすぐれていることになる。結果は後者に該当するし、これは既報の培養試験の結果と矛盾しない。CO₂ 添加の影響の最も著明なもの glucose で、PyA が最低であるのは、PyA がこの3者の中で最も脱炭酸されやすいためか、あるいは phosphoenolpyruvate (PEP) が CO₂ の受容体として PyA より有効であるためかなどによるものであろう。実験 I で PyA からは malate の生成が認め難かったのは実験 II の2倍の濃度の 0.05 M の orthophosphate 添加のためかも知れない。*Aspergillus niger* の pyruvate carboxylase では 0.05 M の orthophosphate で50%の阻害が認められたという⁷⁾。

Table 1. Malate formation by the homogenate of *Schizophyllum commune*.

The complete system contained the following (in micromoles); D-glucose, 10; 3-phosphoglycerate (3-PGA), 11; or Na pyruvate (PyA), 10; pH 6.8 phosphate buffer, 200 (0.05 M) or 100 (0.025M); KHCO₃, 50; mannitol, 20; MgSO₄, 3; MnSO₄, 2; and also 10 μg of biotin and 1 ml of homogenate. The total volume was 4 ml; incubation was for 30 minutes at 37°C.

Substrate		Experiment I*		Experiment II**	
		Percent fluorescence (%)	Difference (%) (Malate)	Percent fluorescence (%)	Difference (%) (Malate)
Glucose	Complete	56.0	19.5 (0.23 μmoles)	—	—
	Without KHCO ₃	36.5			
3-PGA	Complete	45.0	14.0 (0.17 μmoles)	80.2	35.3 (0.41 μmoles)
	Without KHCO ₃	31.0		44.9	
PyA	Complete	32.0	-5.8	85.1	28.6 (0.34 μmoles)
	Without KHCO ₃	37.8		56.6	

* Experiment I: 0.05 M phosphate buffer

** Experiment II: 0.025 M phosphate buffer

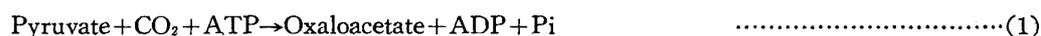
2. **Pyruvate から oxaloacetate の生成** 上記実験により orthophosphate (Pi) の高濃度における L-malate 生成阻害が認められたので、pyruvate carboxylase の存在が考えられる。そこでその点を確認するため、Table 2 に示す条件で acetone powder から粗無細胞抽出液を調製して、PyA からの oxaloacetate (OAA) の生成をしらべ Table 2 に示す結果を得た。この実験ではさらに Pi の濃度を高め 0.12 M としたうえで、添加 ATP の効果を期待したが、結果は予想通りで、ATP無添加では生成 OAA は trace であるのに対して、ATP

Table 2. Pyruvate carboxylase in *S. commune*.

The complete system contained 5 μ moles of Na pyruvate, 50 μ moles of KHCO_3 , 5 μ moles of ATP, 20 μ moles MgSO_4 , 150 μ moles of phosphate buffer (pH 6.8, 0.12 M), 0.5 ml of cell-free extract in total volume 1.3 ml. The incubation was for 30 minutes at 37°C. The extract was prepared as following: 0.5 g of acetone powder were ground for 10 minutes with 10 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.3) in a cold mortar, the mixture was centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm, the supernatant was used for the reaction.

System	Oxaloacetate formed Molar per cent Yield (%)
Complete	0.73
Without ATP	trace
Without KHCO_3	0.35

添加により OAA が著明に生成された。 KHCO_3 無添加でも OAA が生成したのは溶存 CO_2 によるものであろう。上記の磨砕液による結果と考え合わせて pyruvate carboxylase の反応を示す(1)式が成立する可能性が強くなった。



3. **3-Phosphoglycerate から Oxaloacetate の生成** 既報の通り、培養試験で P_i による L-malate 生成促進効果を認め、上記の Table 1 で PyA からの L-malate 生成を阻害する P_i 濃度でも 3-PGA からの L-malate 生成は阻害されないことを知ったので、3-PGA からは PyA を経ない OAA 生成経路によることも推論できる。そこで acetone powder の無細胞抽出液による 3-PGA からの OAA 生成に対する添加 P_i の効果をしらべ、Table 3 の結果を得た。添加 P_i の促進効果は著明で、30分反応では 0.004 M P_i 添加により 15 μ moles の 3-PGA から 0.035 μ moles (0.23%) の OAA が生成したのに対し、 P_i 無添加のものには OAA の生成は認め難かった。しかし時間の経過とともに P_i 無添加のものにも OAA 生成が認められた。これは粗無細胞抽出液中の P_i ならびに pyruvate carboxylase によるものかも知れない。 P_i 添加の有無にかかわらず PyA 生成も同時に認められ、しかも P_i 添加のものに著明であることも判明したが、これらに関しては考察の項で討議する。

Table 3. Effect of orthophosphate.

The complete system contained 15 μ moles of 3-PGA, 50 μ moles of KHCO_3 , 10 μ moles of phosphate buffer (pH 7.0), 75 μ moles of Tris-Hcl buffer (pH 7.0), 18 μ moles of MgSO_4 , 0.5 μ moles of MnSO_4 , 0.8ml of cell-free extract in total volume 2.46 ml. The temperature was 30°C.

System	30 min reaction		60 min reaction		180 min reaction	
	PyA Molar %	OAA Molar %	PyA Molar %	OAA Molar %	PyA Molar %	OAA Molar %
Complete	8.5	0.23	10.8	1.45	16.1	1.68
Without phosphate	2.8	trace	6.2	0.76	10.4	2.00

Table 4 ではまた 3-PGA からの OAA 生成に対する添加重炭酸塩の効果をしらべた結果を示した。 P_i は Table 3 の実験同様 0.004 M で行なった。30分反応では KHCO_3 無添加のものには OAA の生成は認め難かった。60分では KHCO_3 無添加のものにも若干 OAA の生成が認められたが180分では消失した。これに対して KHCO_3 添加のものでは時間の経過とともに順調に増加した。Table 3 と Table 4 の結果から 3-PGA から OAA に至る経路には CO_2 ならびに P_i を必須因子とする経路が存在することがほぼ確定的となったといつてよからう。また見かけ上 PyA の生成も P_i ならびに KHCO_3 添加により促進せられたように見える。これは

Table 4. Effect of bicarbonate.

The complete system contained 15 μ moles of 3-PGA, 50 μ moles of KHCO_3 , 10 μ moles of phosphate buffer (pH 7.0), 98 μ moles of Tris-HCl buffer (pH 7.0); 18 μ moles of MgSO_4 , 0.5 μ moles of MnSO_4 , 0.8 ml of cell-free extract in total volume 2.5ml. The temperature was 30°C.

System	30 min reaction		60 min reaction		180 min reaction	
	PyA Molar %	OAA Molar %	PyA Molar %	OAA Molar %	PyA Molar %	OAA Molar %
Complete	11.5	0.23	13.8	0.69	20.0	1.08
Without KHCO_3	5.1	trace	7.1	0.23	24.6	trace

PEP と Pi から PyA と PPi を生成する未知の酵素によるものなのか, それとも PEP, Pi と CO_2 から PPi と OAA が既知の酵素により生成され, ついで酵素的, 非酵素的脱炭酸がおこって PyA となったものなのかいずれともわからぬ。

4. Phosphoenolpyruvate から oxaloacetate の生成 3-PGA からの OAA 生成径路上に phosphoenolpyruvate (PEP) が存在するかどうかを知る目的で, PEP と 3-PGA からの OAA 生成を Pi と KHCO_3 の共存のもとで試験し比較した。また今回は培養試験で認められた尿素の L-malate 生成促進効果をしらべた。acetone powder からの無細胞抽出液調製は実験方法の項に記載した通りである。このときの活性が比較的低かったので反応時間を4時間とした。その結果は Table 5 に示す通りであって PEP は 3-PGA より多量の OAA を与えること, Pi ならびに CO_2 を添加しない場合 PEP からも 3-PGA と同様 OAA 生成が認め難いことが判明した。よって PEP は 3-PGA からの OAA 生成径路上に存在するとみなすことができよう。

Table 5. Effect of phosphoenolpyruvate and urea.

The complete system contained 15 μ moles of phosphoenolpyruvate (PEP) or 3-PGA, 50 μ moles of KHCO_3 , 10 μ moles of phosphate buffer (pH 7.0, 0.004 M), 50 μ moles of Tris-HCl buffer (pH 7.0), 15 μ moles of MgSO_4 , 0.5 μ moles MnSO_4 and 1 ml of cell-free extract in total volume 2.5 ml. The incubation was for 4 hours at 30°C.

Substrate	System	PyA Molar %	OAA Molar %
PEP	Complete	60.5	2.88
PEP	Complete minus both of Pi and KHCO_3	28.8	trace
3-PGA	Complete	34.5	0.39
3-PGA	Complete minus KHCO_3 plus Urea, 50 μ moles	37.5	4.99
3-PGA	Complete minus both of Pi and KHCO_3	55.2	trace

Urea が KHCO_3 の代替効果を示すことも Table 5 の結果から判明し, 培養試験結果 2 を酵素レベルで支持できそうである。

5. Urea ならびに KHCO_3 の濃度効果 Table 5 の結果から無細胞抽出液による OAA 生成にも urea が KHCO_3 の代替的效果を示すことが判明したので, その効果をさらに確認するために, 各種濃度における影響を KHCO_3 のそれらと比較した。濃度は 0~50 μ moles (0~20 mM) で行なった。urea ならびに KHCO_3 の試験はそれぞれ Table 6, 7 に示した。2 者ともこの濃度範囲では濃度に応じて OAA 生成を増加せしめること, urea が KHCO_3 より濃度による差が著明であること, 前者が後者より遅れて OAA 生成に作用するらしいことなどが判明した。3 時間反応では前者が後者に比してより多量の OAA を蓄積せしめた。これら 2 者ともその添加により PyA の量も増加した。以上の結果から判断するに, urea も KHCO_3 と同様 CO_2 源として役立っているとみなして差し支えなからう。

Table 6. Effect of urea concentration.

The reaction mixture contained 15 μ moles of 3-PGA, 15 moles of $MgSO_4$, 1 μ moles of $MnSO_4$, 10 μ moles phosphate buffer (pH 7.0), 50 μ moles of Tris-HCl buffer (pH 7.5), and urea and $KHCO_3$ as described in Table. The reaction volume was 2.55 ml. The temperature was 37°C.

Added μ moel	30 min reaction		180 min reaction	
	PyA Molar %	OAA Molar %	PyA Molar %	OAA Molar %
Urea 0	37.8	0.08	57.3	0.23
Urea 10	69.7	0.23	72.8	0.39
Urea 20	72.8	—	70.2	0.70
Urea 50	74.4	0.13	74.4	1.06
$KHCO_3$ 50	67.5	0.30	82.2	0.25

Table 7. Effect of bicarbonate concentration.

The reaction conditions were same as Table 6.

Added μ mole	30 min reaction		180 min reaction	
	PyA Molar %	OAA Molar %	PyA Molar %	OAA Molar %
$KHCO_3$ 0	16.4	0.31	49.5	0.11
$KHCO_3$ 10	57.3	0.50	78.0	0.50
$KHCO_3$ 20	59.7	0.47	72.9	—
$KHCO_3$ 50	56.1	0.80	71.4	0.30
Urea 50	69.0	0.59	80.3	0.50

6. Orthophosphate の濃度効果 当該スエヒロタケの無細胞抽出液による 3-PGA からの OAA 生成に Pi が必要であることは Table 3 から知る事ができる。今回は Pi の濃度と OAA 生成との関係を知るため、2 種類の実験を行なった。Table 8 に示す通り、まず、 CO_2 源、Pi 源をそれぞれ $KHCO_3$ と KH_2PO_4 とした実験と、ついでそれらを urea と phosphate buffer (pH 7.0: KH_2PO_4 と Na_2HPO_4 の比が 1:2) に変えた実験の 2 種類である。前者では 4 mM、後者では 8 mM 附近に Pi の至適濃度が認められた。しかし前者では 8 mM 以上の濃度では KH_2PO_4 のため pH の低下を来たしている恐れがあるので pH 低下による活性の低下

Table 8. Effect of orthophosphate concentration.

The reaction mixture contained 15 μ moles of 3-PGA, 50 μ moles of $KHCO_3$ or urea, 15 μ moles of $MgSO_4$, 1 μ moles of $MnSO_4$, 100 μ moles of Tris-HCl buffer (pH 7.6) and 1 ml of cell-free extract in total volume 2.5 ml. The incubation period was 60 minutes, temperature was 37°C. The extract was prepared from 1.5 g of acetone powder of 4 days cultivation mycelia, which was ground for 7 minutes with 15 ml of 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) in a cold mortar and centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm. The supernatant was used.

$KHCO_3$				Urea			
KH_2PO_4 Orthophosphate		PyA Molar %	OAA Molar %	Phosphate buffer (pH 7.0)		PyA Molar %	OAA Molar %
added μ mole	mM			added μ mole	mM		
0	0	65.1	0.39	0	0	71.0	0.28
10	4	62.7	0.86	5	2	71.8	0.23
20	8	57.4	0.47	10	4	74.1	0.12
40	16	50.2	0.50	20	8	81.6	0.76
80	32	51.9	0.52	40	16	82.2	0.37
160	64	44.1	0.23	80	32	72.5	0.03

を考慮せねばならぬ。したがって強いて云えば至適濃度は 8 mM に近いとみなされる。無細胞抽出液中の Pi も考慮せねばならぬので Pi の至適濃度を 8 mM 附近とみなすのはむしろ妥当であろう。

考 察

S. commune Fries IFO 4928 の菌糸体の磨砕液およびその acetone powder の粗無細胞抽出液を用いた実験において、OAA 生成に基質として PEP ならびに 3-PGA を用いたばあいは Pi ならびに KHCO_3 の添加が不可欠であることを見出した。したがってつぎの(2)式の成立の可能性が考えられる。

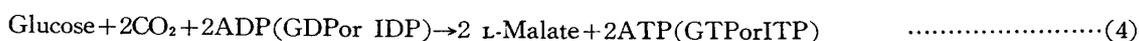


PEP のリン酸結合は高エネルギー結合で $-\Delta F^\circ = 12.4 \text{ kcal/mole}$ のエネルギーを保有し、また inorganic pyrophosphate (PPi) のピロリン酸結合には $-\Delta F^\circ = 6.0 \text{ kcal/mole}$ のエネルギーが保有されているから、ピルビン酸に CO_2 を固定し、OAA を生成する反応は 6 kcal/mole の吸熱反応ではあるが(2)式のエネルギー収支は正となり、エネルギー収支論的にも成立しうる式である。Pomerantz⁹⁾ はプロピオン酸菌、*P. shermanii* の粗抽出液による CO_2 固定による OAA 生成がその煮沸抽出液により促進されること、その効果は Pi により代替されることを発見し、ついで Wood らにより1961年、(2)式を可逆的に触媒する新酵素 phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase がそのプロピオン酸菌に発見せられ⁹⁾、同酵素の至適 pH 7.8, 至適 Pi 濃度 10 mM などが判明している¹⁰⁾。上述の通り当該スエヒロタケの粗抽出液で(2)式が成立しそうであり、その至適 Pi 濃度が 8mM 附近であることなどから類推すれば当該スエヒロタケにも、プロピオン酸菌以外にまだその存在が知られていない phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase 様酵素の存在の可能性が強くなってきた。

ここで glucose が glycolysis で分解され、glyceraldehyde dehydrogenase と malic dehydrogenase が共働すると仮定すれば、この phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase 関与の L-malate 発酵式は(3)式となる。



これに対してこの炭酸固定発酵の研究の当初提出した¹¹⁾



ところの ADP を PEP の Pi の受容体とする phosphoenolpyruvate carboxylase¹²⁾ ないしは GDP, IDP をその Pi の受容体とする phosphoenolpyruvate carboxykinase¹³⁾ 関与の式は(4)式で示される。

さらにまた上記の Table 1, 2 でその存在の可能性が示される pyruvate carboxylase で L-malate が同様に生成されるとすると(1)式により glycolysis で生成する glucose 1 モル当りの 2 モルの ATP が消費されるからその発酵式は(5)式となる。



この(3), (4), (5)の 3 式を比較するに、エネルギー収支が零の(5)式は生菌の営む発酵式としては不経済であろう。したがって炭酸固定発酵式として可能性のあるものとしてはこのばあい(3), (4)の 2 式がより有望であろう。

PEP と CO_2 から OAA と Pi を生ずる phosphoenolpyruvate carboxylase¹⁴⁾ が関与するばあいは(5)式が成立する。しかしこの酵素は heterotrophic 微生物には未発見である**のここではふれないこととする。

(3)と(4)式を比較するに、当該スエヒロタケの培養試験では Pi の量と L-malate の量の間にある範囲内での正の相関関係が認められたこと、Meyerhof¹⁵⁾ によれば酵母のアルコール発酵の培養条件では Pi が制限因子とならないことなどを考え合わせると、(4)式よりもむしろ(3)式の方が優勢に作動している可能性が強くなる。しかし PPi のピロリン酸結合エネルギーは $-\Delta F^\circ = 6.0 \text{ kcal/mole}$ で、ATP の末端のピロリン酸結合のそれは 7.0 kcal/mole であるから、(3)は(4)より若干エネルギー効率が低いしたがって仮りに inorganic pyrophosphatase が存在し(6)式によって Pi



が再生して glycolysis に Pi が補給せられたり、adenyplate kinase が存在して(7)式が成立し Pi ならびに ATP

* PPi: Pyrophosphate (inorganic)

** ただし投稿時現在では *E. coli* など heterotrophic 微生物にも見い出されている。たとえば *Biochem. J.* **94**, 28p (1965)。

が再生され, P_i とエネルギーが補給せられようとも, エネルギー効率を(4)式に少しでも近づけるため, 一部



glucose を TCA cycle で消費して ATP を効率よく生産することを当該スエヒロタケは余儀なくされているかも知れない。

つぎに OAA 生成量の多いばあい, PyA 生成量も多いという現象をいかに解釈するかという問題があるが, (8)式を



成立せしめる未知の酵素の仮設により, (2)式同様 P_i によって OAA と同時に PyA の生成も促進される道がひらかれる。しかし(8)式の仮設によっても CO_2 によって見かけ上(8)式が促進されるとしなければ Table 7 の結果を説明し難い。したがって(8)式を触媒する未知の酵素の存在を全く否定するわけではないが, 現段階ではつぎのように既知の酵素だけによる説明が妥当であろう。すなわち OAA は酵素的にも非酵素的にも極めて脱炭酸されやすいので(9)式は



P_i , CO_2 により促進せられる(2)式と同時に進行する可能性は十分ある。したがって(2)と(9)式の和は(10)式の



成立を促し, Table 3~7 の P_i , CO_2 による OAA と PyA の生成の同時促進現象を説明する。

また Table 3 の 3 時間反応で見られるように P_i 無添加のものに OAA が多く生成されたのは(11)式の pyruvate kinase が作用してのち, (1)式の pyruvate carboxylase



反応が進行したためと解釈することも可能である。

培養試験ではこれら副反応による PyA の生成増加を見ることなく(3)式に近い収率で L-malate 生成が進行するのは glyceraldehyde dehydrogenase との共転反応によって極めて速やかに OAA が還元され L-malate となるためと考えられる。L-malate の Gale ら⁴⁾の方法による酸化は認め難かったので, 一たん生成した L-malate は分解されることなく蓄積し, よって(3)式の成立に至るものと考えられる。恐らくこの実験に malic dehydrogenase と $NaOH_2$ を用いれば PyA の 2 次的生成なしのより高い CO_2 固定率ひいては P_i および CO_2 添加効果をより著明に認めることができたであろう。こうした助酵素を使用する実験とか, urea がいかなる機構によって CO_2 源となって行くのかなどの研究はさらに酵素の精製, ラジオアイソトープの使用などによって進めなければならぬ。

以上要するに既報の培養試験において認めた, P_i ならびに urea さらにまた $CaCO_3$ の効果などを, 当該スエヒロタケの磨砕液および粗無細胞抽出液による酵素化学的レベルでの試験によっても確認することができ, その効果のもつ意義についても, 培養試験における推論を支持することができた。しかし最終的結論に達するには, ここではまだ取り上げなかった pyruvate carboxylase に対する Acetyl-CoA* の促進作用¹⁶⁾, ビオチンとの関係¹⁷⁾ など多くの問題を解決しておかねばならぬ。

さて本実験結果からだけでも, 当該スエヒロタケにおいても PEP, PyA, OAA の 3 者が極めて密接な相互関係におかれ, その関係もいかに複雑であるかが明白となった。この 3 者を頂点とする三角形は一般に glycolysis, glycogenesis, glyconeogenesis などの糖代謝をはじめとして, 脂質代謝, アミノ酸代謝の大きい流れ, あるいはまたエネルギー代謝の流れのターミナルに位置し, 異化と同化のターミナルという一面も有している関係上, 生体代謝の扇の要にたとえられている。したがってこの 3 者を結ぶ役割を演ずる酵素, 補酵素その他の諸因子は既知, 未知のものを含めて極めて重要な意義をもつものであり, その影響は直接, 間接に生物の全代謝に大きく及ぼされるものである。ここにおいて主題の炭酸固定発酵の研究にはこれら諸因子の相互関係をより詳細に究め, 代謝調節の実態を把握することがいかに必要なことであるかが当然のことながら再認識されるであろう。

* 投稿時現在 phosphoenolpyruvate carboxylase に対する促進作用も知られている。たとえば Cánovas, J. L., Kornberg, H. L.: *Biochem. Biophys. Acta*, **96**, 169 (1965)。

総 括

1. *Schizophyllum commune* の磨砕液による L-malate 生成試験において, glucose, 3-phosphoglycerate および pyruvate から KHCO_3 存在のもとで L-malate の生成を認めた. そのさい基質として glucose が最もすぐれ, pyruvate が最も劣った. 高濃度の orthophosphate はこの pyruvate からの L-malate 生成を阻害した.
2. 当該スエヒロタケの acetone powder から得られた粗無細胞抽出液を調製してその酵素活性をしらべつぎの結果をえた.
3. pyruvate からの oxaloacetate (OAA) 生成には ATP が必要で, orthophosphate によりその反応が阻害されたので pyruvate carboxylase の存在を推定した.
4. 3-phosphoglycerate からの OAA 生成には orthophosphate と KHCO_3 が必要であることが判明した.
5. phosphoenolpyruvate からの OAA 生成にも orthophosphate と KHCO_3 を必要とするが, 3-phosphoglycerate からの OAA より多い OAA を与えた.
6. 3-phosphoglycerate からの OAA 生成にさいして, urea に KHCO_3 の代替効果のあることが判明し, その濃度効果は KHCO_3 とほぼ等しく, 0~50 μmoles の範囲内で濃度に応じて OAA が増加すること, また urea は KHCO_3 より若干その効果が遅れて現われることも認められた. そのとき orthophosphate の最適濃度は KHCO_3 を用い, KH_2PO_4 で pH を調節したとき 4 mM, urea を用い phosphate buffer (pH 7.0) で pH を調節したとき 8 mM を示した.
7. これらの結果を総合し, 当該スエヒロタケには phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase 様酵素が存在するだろうとした.
8. OAA と同時に pyruvate も orthophosphate と CO_2 により生成が促進されたかのごとき所見が得られた. これは OAA の脱炭酸によるものかも知れないが, 別に未知の酵素によるものかもしれないとした.
9. phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase 関与の L-malate 発酵式を示し, これと既報ならびに pyruvate carboxylase 関与の発酵式と比較し, 考察を加えた.

この研究は日本化学会第17年会(1964.4)にて発表済み(同要旨集, 199(1964))

文 献

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) 立花:本誌, 45, 436 (1967). 2) 立花, 塩出, 渡瀬:本誌, 45, 595 (1967). 3) 立花:本誌, 45, 353 (1967). 4) Gale, E. F., Stephenson, M.: <i>Biochem. J.</i>, 33, 1245 (1939). 5) Hummel, J. P.: <i>J. Biol. Chem.</i>, 180, 1225 (1949). 6) Friedemann, T. E., Haugen, G. E.: <i>J. Biol. Chem.</i>, 147, 415 (1943). 7) Bloom, S. J., Johnson, M. J.: <i>J. Biol. Chem.</i>, 237, 2718 (1962). 8) Pomerantz, S. H.: <i>Fed. Proc.</i>, 17, 290 (1958). 9) Siu, P. M. L., Wood, H. G., Stjernholm, H. L.: <i>J. Biol. Chem.</i>, 236, PC 21 (1961). 10) Siu, P. M. L., Wood, H. G.: <i>J. Biol. Chem.</i>, | <ol style="list-style-type: none"> 237, 3044 (1962). 11) 立花:本誌, 44, No. 2, 129 (1966). 12) Woronick, C. L., Johnson, M. J.: <i>J. Biol. Chem.</i>, 235, 9 (1960). 13) Utter, M. F., Kurahashi, K.: <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 75, 758 (1951). 14) Suzuki, I., Werkman, C. H.: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i>, 72, 514 (1957). 15) Meyerhof, O.: <i>J. Biol. Chem.</i>, 180, 575 (1949). 16) Utter, M. F., Keech, D. B.: <i>J. Biol. Chem.</i>, 238, 2603 (1963). 17) 立花, 塩出:本誌, 45, 358 (1967). |
|---|--|

(昭42. 8. 24受付)

訂 正

	誤	正		誤	正
Vol. 44, No. 9, 592 下から11行目	しないから	しながら	Vol. 45, No. 7, 609 Fig. 4の曲線	—○—○—	—●—●—
Vol. 45, No. 8, 705 上から5行目	, 当該	, algae では当該	Vol. 45, No. 8, 705 文献3)	26	22
Vol. 45, No. 7, 601 文献 3)	Enaymes	Enzymes			