

細菌のグルタミン酸代謝に関する研究

第一編

大腸菌のグルタミン酸代謝とその定量分析への応用

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

秋 田 悦 示

〔昭和 32 年 2 月 4 日受稿〕

緒 言

細菌の代謝に於て、グルタミン酸がアスパラギン酸と共に非常に重要な地位を占めている事は、かなり古くから知られており、これに関しては幾多の研究がある。即ち、細菌はその環境条件によりグルタミン酸の脱炭酸反応、或は脱アミノ反応を行う¹⁾。又グルタミン酸はアミノ基転移反応に於て中心的役割を示すことが知られている²⁾。

大腸菌のみについても多くの記載がある。即ち Adler (1938)³⁾等はその脱アミノ反応の機構について、Gale (1942) 等⁴⁾はその脱アミノ反応及び脱炭酸反応の細菌生理的研究について報告している。

又グルタミン酸の微生物学的定量法については、Clostridium Welchi SR 12 を用いてする Gale 等の方法⁵⁾、又大腸菌を用いてする AyanGar 等 (1951)⁶⁾ の方法が報告されている。

著者は当教室保存の大腸菌を用いて、そのグルタミン酸代謝の生理面を追究し、更にそれを拡げてグルタミン酸の定量分析への応用にまで及ぼした。

実験材料及び実験方法

供試細菌：当教室保存の *E. coli communis* を使用した。

培養方法：普通寒天平板上に 37°C, 18 時間培養したものの 1 白金耳を 10ml のブイヨンに接種し、その 18 時間培養を更に 1000ml

のブイヨンに注加、37°C で 18 時間培養増殖させたものを用いた。

活性測定方法：ワールブルグ検圧計を用い、37.5°C に於て常法に従つて測定を行つた。

菌量：菌量はブルフリッヒ比色計を用い比濁法により測定し、特別の場合の外は通常一容器宛乾燥重量 5mg を用いた。

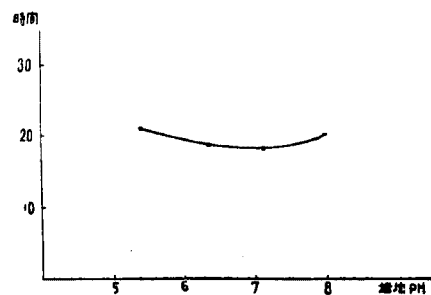
実験結果

第一節 培養 pH と発育との関係について

1. 大腸菌は大凡 pH 4.2~9.5 の範囲内であればどの様な pH の培地にも発育する事が出来るが、培養 pH の値によりその発育程度はかなり異なる。即ち、今 pH を 5.4~8 迄の範囲で変えた培地に大腸菌を接種し、その増殖を比濁法により追跡して、静止期に至る迄の時間を測定すると図 1 の如くなる。

即ち、pH 7.0 附近で最も早く発育し、静止期に入る事が解る。

図 1 培地 pH と発育との関係



培地：普通ブイヨン、横軸：培地 pH、縦軸：静止期に入る迄の所要時間

以下の実験には特別の場合の外は、この静止期迄培養したものを用いた。

2. 発育による培地 pH の変化

発育による培地 pH の変化を一定時間培養後に各 pH 別の培地について測定すると、培養前後に於て表 1 の如き変化がある。

表 1 菌の発育による培地 pH の変化

培養時間	pH		
	培養前	培養後	平均
20時間	8.0	7.9	7.95
18 "	7.0	7.2	7.1
20 "	6.0	6.7	6.35
20 "	5.4	6.2	5.8

実験方法は図 1 と同様。

即ち、発育前の pH がその至適 pH をはなれる程発育前後の pH の変化が大きくなっている。そして菌は自己の生存乃至発育にとって不利な条件をその発育と共に、より有利な条件へと変えて行く事が解る。

第二節 反応至適 pH について

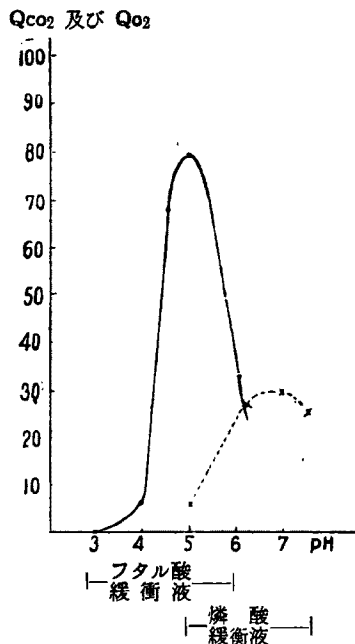
各酵素はその基質特異性と同時に、その基質に対し最も強い活性を示すところの至適 pH を有つ事は衆知の事実である。殊にグルタミン酸の様な両性イオンの基質についてはその反応 pH が非常に大きな影響を持つ事は明らかである。著者はグルタミン酸を基質としてその至適 pH をしらべた。

1. 脱炭酸反応：菌は主室に、基質は側室に入れ、気相には窒素を用いた。各反応 pH は M/15 フタル酸緩衝液により 3～6 に調製した (図 2)。

即ち、pH 5 に於てその活性は最高であり、5 の前後に於て急激に低下する。

尚、脱炭酸反応後その遠沈上清につきペーパー・クロマトグラフィーを行つて γ -aminobutyric acid を証明した。即ち、 $\text{HOOC}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CHNH}_2\cdot\text{COOH}\rightarrow\text{HOOC}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{NH}_2+\text{CO}_2$ の所謂グルタミン酸脱炭酸反応を行う。

図 2 グルタミン酸脱炭酸反応及び脱アミノ反応の至適 pH



菌液 1 ml (菌乾燥重量 5 mg) L-グルタミン酸 (10⁻¹M) 0.3 ml, 各 pH の 0.2M 緩衝液各 1 ml, 水により全量 3 ml とする。37.5°C, — 脱炭酸反応, ×……×脱アミノ反応

2. 脱アミノ反応

容器内容では、副室内に 20% KOH, 0.5 ml を入れ、気相に空気を用いた外は脱炭酸反応の場合と同様である。

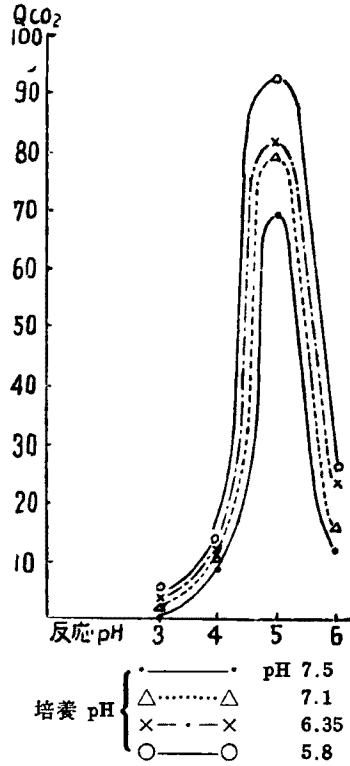
Qo₂ は pH 7.0 附近に於て最高となるが、その山は脱炭酸反応のもの程著名でない (図 2)。即ち本菌は pH 4～5 に於ては主として脱炭酸反応により炭酸基を除き、pH 7.0～7.6 に於ては主として脱アミノ反応によりアミノ基を除き、その中間の pH に於てはこの両方の反応を行う。

第三節 培養 pH と活性

前記の様な培養 pH が 7.0 前後から離れる程、菌の発育は悪くなる。その際の培養 pH と活性との関係についてしらべた結果は図 3 及び 4 の如くである。即ち培養 pH を変える事によりその至適 pH は何等の変化を受けず、又培養 pH が下る程そこに発育した菌のグル

タミン酸脱炭酸活性は高くなる事が認められた。

図3 培養 pH とグルタミン酸脱炭酸反応至適 pH との関係



菌液 1ml (菌乾燥重量 5mg) L-グルタミン酸 (10⁻¹M) 0.3ml, 各 pH の 0.2M フタル酸緩衝液各 1ml, 水により全量 3ml とする。気相: 窒素, 37.5°C

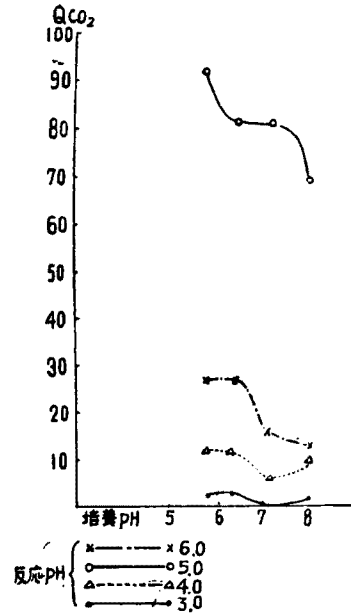
第四節 ピリドキシンとグルタミン酸脱炭酸活性

グルタミン酸脱炭酸酵素がその助酵素としてピリドキサル磷酸を要求する事が知られている⁷⁾。著者は脱炭酸酵素活性のより高い菌を得るために、この事実及び前記の種々の結果より、表2の如き培地を調製した。

この培地は調製後直ちに使用するか、或は1~2日間氷室に保存した後使用する時は、格別滅菌する必要はない。

普通寒天平板上に 37°C で18時間培養した大腸菌を、前記培地の各々約 100ml に1白金耳接種し 37°C に於て20時間培養、その培養液を再び前記培地各々 1000ml 中に注ぎ

図4 培養 pH とグルタミン酸脱炭酸活性との関係



反応条件は図3の場合と同様

表2 半合成培地

培地 A		培地 B	
ペプトン	0.5%	ペプトン	0.5%
グルコース	0.8%	グルコース	0.8%
グルタミン酸ソーダ	0.5%	グルタミン酸ソーダ	0.5%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.8%	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.8%
KH ₂ PO ₄	0.8%	KH ₂ PO ₄	0.8%
ピリドキシン	0.001%		
水道水		水道水	
pH5.0に修正		pH5.0に修正	

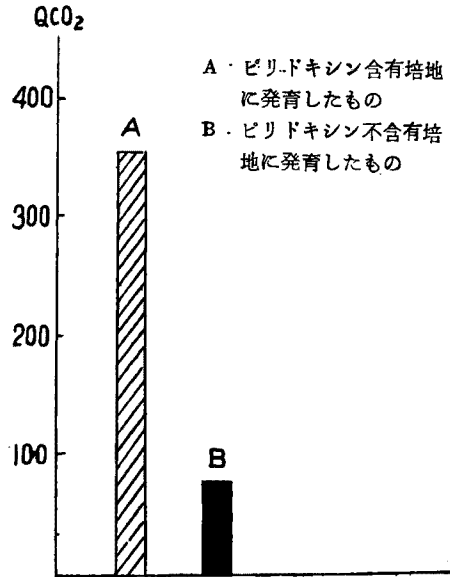
攪拌した後、37°C、20時間培養した。今この培地A及び培地Bに培養した大腸菌の生菌2mg (乾燥重量) を M/30 フタル酸緩衝液 (pH 4.4) 中に入れ、グルタミン酸を基質としてワールブルグ検圧計を用いて炭酸ガスの産生を調べた処、図5の如き結果を得た。即ち、培地A (ピリドキシン含有培地) に培養した菌は培地B (ピリドキシン不含有培地) に培養したものに比し非常に大きいグルタミン酸脱炭酸活性を示す。従つて以下の実験に於ては培地Aに培養した大腸菌を用いた。今

この培地 A に培養した大腸菌の生菌 1mg (乾燥重量) を用いて, M/30 フタル酸緩衝液 (pH 4.4) 中で, 各 M/100 のグルタミン酸, α -ケトグルタル酸, アスパラギン酸, アラニン, 焦性ブドウ酸を基質としてその酸素吸収及び炭酸ガス発生を測定すると表 3 の如くなる。即ち, この培地 A に培養した大腸菌は上記反応条件に於ては, グルタミン酸脱炭酸活性は非常に大であるが, それ以外のものに対しては殆んど活性を示さない。殊に 20 分以内に反応を測定する時は上記基質中, グルタミン酸以外のものに対する活性は全く無視出来る。

第五節 アセトン乾燥菌

前記培地 A に培養した大腸菌を 1 回速沈して集め, M/50 磷酸緩衝液 (pH 5.0) で洗滌し, その濃厚浮遊液を $-10^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ に冷却した約 20 倍量のアセトン中に攪拌しながら徐々に加える。数分後にブフナー漏斗で強く吸引濾過し, 更に冷却アセトンを少量加えて

図 5 ビリドキシシンとグルタミン酸脱炭酸活性との関係



菌液 1 ml (菌乾燥重量 2 mg), L-グルタミン酸 (10⁻¹M) 0.3 ml, 0.2M フタル酸緩衝液 (pH 4.4) 0.5 ml, 水を加えて全量 3 ml とする。気相: 空気, 37.5°C.

表 3 ビリドキシシン培地発育生菌の基質特異性

時間	基質 M/10		グルタミン酸		α -ケトグルタル酸		アスパラギン酸		アラニン		焦性ブドウ酸		自己呼吸	
	呼吸量 μl		CO ₂		O ₂		CO ₂		O ₂		CO ₂		O ₂	
	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂
10分	+60	+15		-1	0	+2		+2		0	0	0	0	
20分	+116	+5		-3	0	-2		0		-2	+2	-2		
80分	+341	0		-4	0	-4		-3		-8	0	-3		

菌液 1 ml (菌乾燥重量 1 mg), 基質 (10⁻¹M) 0.3 ml, 0.2M フタル酸緩衝液 (pH 4.4) 0.5 ml, 水を加えて全量を 3 ml とする。気相: 空気, 37.5°C

再び強く吸引し, 直ちに真空乾燥器中で減圧乾燥を行う。

こうして得られたアセトンパウダーは真空乾燥器に $-10^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ に保存すれば, 数ヶ月間その活性を失わない。

今このアセトンパウダーの一定量を乳鉢中で M/15 フタル酸緩衝液 (pH 4.4) を加えて磨砕し, 1 容器当りの乾燥重量 2 mg を用いてその活性をみると表 4 の如くなる。

即ちグルタミン酸に対し非常に強い脱炭酸作用を示すが, 他の α -ケトグルタル酸, アスパラギン酸, アラニン, 焦性ブドウ酸の何

れにも殆んど活性を示さず, 殊に 20 分以内にその反応をとめる時は, これ等の基質に対する活性は全く無視し得る。

第六節 アセトンパウダーをグルタミン酸脱炭酸酵素とした場合の至適 pH 及びその定量分析への応用

前記の如く, このアセトンパウダーはグルタミン酸のみに特異的に作用するので, 今この反応 pH を種々に変えてその活性との関係を見ると図 6 の如くなる。

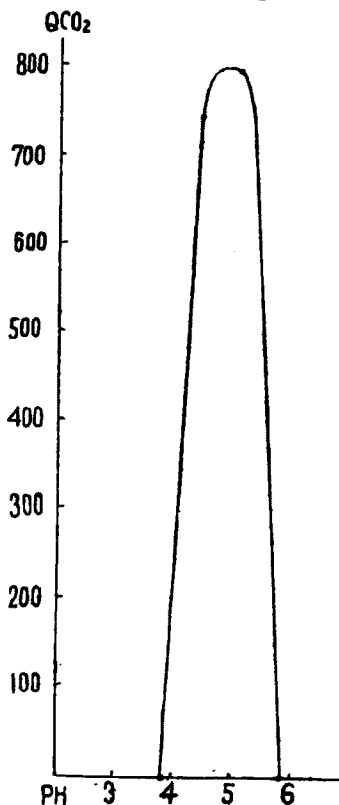
即ち, pH 4.4~pH 5.1 の範囲では非常に強いグルタミン酸脱炭酸作用を示すが, それ

表 4 アセトン乾燥菌の基質特異性

時間	基質 M/100 呼吸量 μ l		グルタミン酸		α -ケトグル タル酸		アスパラギ ン酸		アラニン		焦性ブドー酸		自己呼吸	
	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂
10分	+145	+34	+2	+2	+2	+2	+2	0	0	0	0	0	0	0
20分	+322	+15	+2	-3	+2	-2	+2	0	0	0	0	+2	-2	
80分	+467	0	+2	-6	0	-6	+2	-3	0	+2	+2	+2	-3	

アセトン乾燥菌 2mg, 基質 (10⁻¹M) 0.3ml, M/15 フタル酸緩衝液 1.5ml, 水を加えて全量を 3ml とする。
気相: 空気, 37.5°C

図 6 アセトンパウダーによるグルタミン酸脱炭酸反応の至適 pH



アセトンパウダー 2mg, 10 μ M L-グル
タミン酸, フタル酸緩衝液終濃度 M/30, 気
相: 空気, 37.5°C.

を少しはずれると直ちにその活性を失う。

その際発生する炭酸ガス量と、基質として
加えた全グルタミン酸を定量的に脱炭酸した
際発生する炭酸ガス量の理論値とは殆んど一
致し、その誤差は約 2~3% に過ぎない (表
5)。

即ち、このアセトンパウダーはグルタミン

表 5 アセトンパウダーによるグルタミン酸の定量的脱炭酸

	pH 3.9	4.4	5.1	5.9
5分	0	+155	+185	0
10分	0	+225	+216	0
15分	0	+228	+218	0
20分	0	+228	+218	0

理論値 CO₂ 224 μ l

アセトンパウダー 2ml, 10 μ M L-グルタミン酸,
フタル酸緩衝液終濃度 M/30, 気相: 空気, 37.5°C

酸に特異的に作用し、而もそれを定量的に脱
炭酸する。なおこのアセトン乾燥菌を -10°
C ~ -15°C に真空乾燥器中に保存する時は、
数ヶ月後なお充分高い活性を維持している。

総括及び考按

細菌の生理を研究し、それを種々の面に応
用しようとする試みは非常に古くよりあるが、
これを生化学的物質の定性及び定量分析に応
用しようという試みはかなり新しいものでは
ある。その中、アミノ酸の定量分析への応用は
Gale により深く研究され、確立された⁵⁾。

然し微生物をアミノ酸の定量分析に応用す
るに際して非常に重要な、そして又困難な問
題は、適当な菌種乃至菌株を得る事である。
一度適当な菌を得る事が出来たなら、それを
応用して行うアミノ酸及びその他の物質の分
析は諸種有機化学的な方法に比して遙かに便
利なものである。著者は、著者の教室に保存
してある *Escherichia coli communis* の生理
をグルタミン酸代謝の面から追究して、その
分析への応用を試み、前記の如き結果を得
た。

即ち、本菌は pH5.4~8.0 の範囲では如何なる pH でもかなり高度に発育する。その際菌は培地の pH を自己の発育に適した状態即ち、略々中性に近づけ様とする。こうして菌は環境に働きかける事により、それを自己の生存及び発育に好適な条件へと変えていく。この時菌が環境に働きかけるためには物質代謝による以外に方法がない。これを追究するためにグルタミン酸代謝と pH との関係をしらべると、本菌は酸性側では強い脱炭酸反応を行い、中性乃至アルカリ性側では脱アミノ反応を強く行い、更に弱酸性側(pH 5.5~6.5)ではこの両反応を行う事がわかつた。そして脱炭酸反応は pH 5.0、脱アミノ反応は pH 7.0 附近にその至適 pH を持つている。即ち、菌は酸性側では脱炭酸反応によりカルボキシル基を除いて、環境をより中性側に近づけんとし、アルカリ性側では脱アミノ反応によりアミノ基を除いて、中性乃至弱酸性側に近づけんとする事がわかる。この様に菌はその環境を自己の生存乃至発育に都合よくする様な機構をその内に有している。この機構が環境に働いてその環境を変えるのであれば、逆にこの機構自体もまた環境の影響を受ける事が考えられる。今脱炭酸反応に注目してみると、著者の実験に於て、菌の発育培地の pH の如何に拘らず、その至適 pH は変らない。これは酵素の至適 pH は各酵素につき一定である事を考えれば理解出来る。又菌が発育し得る範囲内で培地 pH が低い程菌の発育乃至収量は悪くなるが、その脱炭酸活性は高くなる。即ち菌の環境がわるければ悪い程、菌はその環境を良くする機構乃至能力をより強く持つてくる事がわかる。以上の実験は普通ブイヨンに培養した菌について行つたが、この菌の活性をグルタミン酸の定性及び定量分析に迄応用するためには、菌の酵素化学的活性をグルタミン酸に対して特異的にする事が必要である。著者が調製したピリドキシン含有培地 (Ayen Gar⁶) の変法) に培養した場合、菌の収量はかなり多く、そのグルタミン酸脱炭酸活性は非常に高く、而もその基質特異性は非常に著

明であつた。更にこの培地に培養した菌のアセトン乾燥粉末は、なお充分高い活性を有し、その至適 pH は 4.4~5.1 に有り、その間ではグルタミン酸より定量的に炭酸ガスを発生した。又このアセトン乾燥菌を -10~-15°C に真空乾燥器中に保存する時は、数ヶ月間殆んどその活性を失う事なく保存し得た。以上の結果を総合してみると、著者がこの研究により調製した、著者の教室保存の *Escherichia coli communis* のアセトン乾燥粉末乃至生菌は、その調製の容易な事、基質特異性の著明な事、長期の保存に耐える事等の諸点より、従来知られている *Clostridium Welchi* SR 12 による方法⁵⁾、*E. coli* による方法⁶⁾、南瓜のグルタミン酸脱炭酸酵素による方法⁷⁾ 等に比し、より優れた方法という事が出来る。

結 論

著者は教室保存の *Escherichia coli communis* を用い、次の如き結果を得た。

- 1) 本菌は pH 5.4~8.0 の範囲内では如何なる pH に於ても発育し得るが、pH 6.8~7.0 に於て、その発育は最も良好である。
- 2) 至適発育 pH を離れる程、菌は発育時その培地 pH を至適発育 pH に近づけんとする。これは酸性側に於て特に著明である。
- 3) グルタミン酸を基質とした場合、酸性側では主として脱炭酸反応を行い、中性乃至アルカリ性側に於ては、脱アミノ反応を行う。両者の中間、即ち pH 5.5~6.5 の範囲内ではこれらの両反応を行う。その至適 pH は脱炭酸反応に於ては、pH 5.0、脱アミノ反応では、pH 7.0 である。
- 4) グルタミン酸脱炭酸活性は、低い pH の培地に培養したもの程高くなる。然しその至適 pH は変らない。
- 5) ピリドキシン含有半合成培地に培養した菌はそれを含まない培地に培養したものに比して、非常に高いグルタミン酸脱炭酸酵素活性を有する。
- 6) このピリドキシン含有半合成培地に培養した菌はグルタミン酸に対して高い活性を

示すが、 α -ケトグルタル酸、アスパラギン酸、アラニン、焦性ブドウ酸には活性を示さない。

7) この菌のアセトン乾燥粉末はグルタミン酸脱炭酸活性をなお持つていて、長期の保存に耐える。その至適 pH は 4.4~5.1 であり、

この pH 域に於てはグルタミン酸より定量的に炭酸ガスを発生する。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上教授に深甚の謝意を表し、併せて御協力下さつた矢部、元井両氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Gale, E. F. . 細菌の化学的活性, 本田書店, 65, 1953.
- 2) Baldwin, E.: *Dynamic Aspects of Biochemistry*, Cambridge University Press, 136, 1952.
- 3) Adler, E., Hellström, V., Günther, G., and von Euler, H.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **255**, 14, 1938.
- 4) Gale, E. F., and Epps, H. M. R.: *Biochem. J.*, **36**, 600, 1942.
- 5) Gale, E. F.: *Biochem. J.*, **39**, 46, 1945.
- 6) AyenGar, P., Roberts, E., and Ramasarma, G. B.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 781, 1951.
- 7) 赤堀編: 酵素研究法, 朝倉書店, **2**, 721, 1956.
- 8) 赤堀編: 蛋白質化学, 共立出版社, **1**, 271, 1954.

Studies on the Glutamic Acid Metabolism of Bacteria

I: Glutamic acid metabolism of *Escherichia coli communis* and its application to the analysis of glutamic acid

By

Yoshimi Akita

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Professor Dr. Sakae Murakami)

It is well known that glutamic acid, as well as aspartic acid, plays an important role in the metabolism of microorganisms.

The author performed many experiments in order to study the physiological aspects of *E. coli communis* from the stand point of glutamic acid metabolism, and to apply it to the analysis of glutamic acid. The results were as follows:

- 1) *E. coli* can grow at any pH within the range from 5.4 to 8.0, but the growth is the best at pH 6.8 to 7.0.
- 2) The more remote from the optimum the cultural pH is, the nearer it comes to the optimum after the growth. This phenomenon is particularly remarkable on the acid side.
- 3) Using glutamic acid as substrate, the decarboxylation is chiefly carried out on the acid side, the deamination on the neutral or slightly alkaline side, and these two reactions are carried out simultaneously at pH 5.5 to 6.5. As for the optimum pH, pH 5.0 for decarboxylation and 7.0 for deamination.
- 4) The lower the cultural pH is, the higher the glutamic decarboxylase activity of the cultured organism becomes. The optimum reaction pH is, however, never shifted.
- 5) The *E. coli*, which was cultured in the pyridoxin-containing semi-synthetic medium, shows a very high activity to glutamic acid, but not to α -ketoglutaric acid, aspartic acid, alanine and pyruvic acid.
- 6) The acetone powder of the *E. coli*, which was cultured in the pyridoxin-containing semi-synthetic medium, still has the high glutamic decarboxylase activity. The optimum pH is from 4.4 to 5.1, where carbon dioxide is evolved quantitatively.