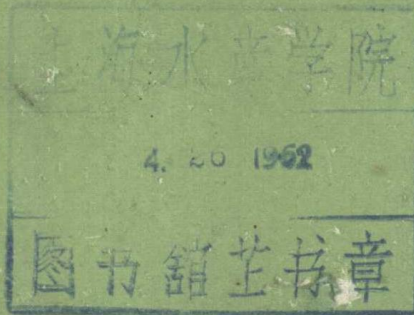




生化学講座

微生物の生化学 I



10

生化学講座

10

編集

赤堀四郎
伊勢村寿三
市原 硬
浮田忠之進
内野仙治
江上不二夫
片桐英郎
佐橋佳一
島 蘭 順 雄
鈴木友二
田中正三
広畑 竜 造
牧野 堅
森 高次郎

微生物の生化学 I



共立出版株式会社

第10卷 編集担当者

京都大学(名誉教授) 片桐英郎

執筆者

九州大学(名誉教授)	山崎何恵
大阪府立大学農学部	
東京大学農学部	有馬啓
東京大学農学部	伊崎和夫
東京大学応用微生物研究所	水島昭二
東京大学農学部	別府輝彦
ヤマサ醤油株式会社研究所	国中明
東京大学農学部	矢野圭司
三共株式会社研究所	岡崎浩
東京大学農学部	安井恒男

(執筆順)

序

酵母ことにそれが呈するアルコール発酵の研究は Buchner によるチマーゼの発見に端を発し、歴代の生化学者の努力によって美事に実を結んだ代表的な研究業績で示されるように、現代生化学の一方の体系を形作っているといっても過言ではない。

一方カビは酵素の資料として、あるいは有機酸の生産、抗生物質の製造ことにわが国の発酵工業の大きな特色をなしているなど、その応用面がきわめて広汎であるが、その生化学的研究は酵母に比して立ちおくれた感がある。しかしその種類が千差万別であって、生化学反応の各種のモデルをカビによって求められる。いいかえればカビは広範な生化学的研究課題の提供者としても有用であると思う。

本書はわが国において古くから取り扱われているこれらの微生物の生化学を微生物の種類に応じて、それぞれの権威者によって纏めあげられたものであって、他に例を見ない新しい体系をなしている大きな特長をもつ力作である。

本書の姉妹篇である本講座第 11 巻「細菌の生化学」と本書とを合わせて通覧して、微生物の生化学的研究の進歩がいかに急速であるかを見いだされるとともに、微生物の研究が近代生化学とこれほどまでに密接な関連を有することを理解していただきたい。

昭和 35 年 11 月

編集担当 片 桐 英 郎

目 次

第 1 章 酵母の生化学

1.1 発酵（無酸素状態での炭水化物の分解）	1
1.1.1 チマーゼによる発酵	1
A. 機構解明の歴史	1
B. Embden-Meyerhof-Parnas scheme の各部分反応	10
C. Harden break の原因	24
D. マンノースおよびガラクトースの発酵経路	26
E. 発酵のエネルギー	29
1.1.2 酵母細胞による発酵	30
A. 細胞発酵の様相	30
B. 単糖類の発酵	33
C. カ糖類 (Oligosaccharide) の発酵	36
D. 多糖類の発酵	40
E. 複糖類の“直接発酵”	43
F. 適応による糖の発酵	47
G. グリセリン発酵	56
1.2 糖の好氣的分解	59
1.2.1 呼吸（糖の好氣的完全分解）	59
A. 酸素分圧と呼吸	59
B. 糖の濃度と呼吸	60
C. 自家呼吸	60
D. 呼吸と毒物ならびに Warburg の“呼吸酵素”	61
E. 呼吸色素	63
F. 基質の脱水素酸化	65
G. フラビン酵素	67

H. 呼吸に伴う電子伝達系	71
1. 酸化還元電位	73
1.2.2 Citric Acid (Krebs) Cycle	75
A. 酢酸の酸化	75
B. Citric Acid Cycle	76
C. 酸化的脱炭酸系 (oxidative decarboxylations system)	79
D. 酸化的リン酸エステル化反応 (oxidative phosphorylation)	82
1.2.3 Hexose-monophosphate の酸化経路 (HMP酸化経路)	85
A. Hexose-monophosphate の酸化	85
B. Pentose-phosphate の分解	87
C. Hexose-monophosphate Cycle	90
1.3 Pasteur 効果	92
A. 発酵と呼吸との関係	93
B. Pasteur 効果の機構	97
1.4 炭素の資化	101
A. 炭素給源	101
B. 資化の検圧法による観察	104
C. 資化に対する細胞毒の影響	109
D. 増殖中の細胞による資化	112
E. より低級な炭素化合物からの六炭糖の合成	114
F. 六炭糖からトレハロースの合成	115
G. グリコーゲン, マンナンならびにグルカンの合成	116
H. 脂肪の合成	120
I. 脂肪生成の化学機構	121
1.5 窒素の代謝	125
A. 窒素の資化	125
B. ペプチドおよび蛋白の分解	125
C. アミノ酸の分解	128
D. アミノ酸の資化	133
E. その他の有機窒素物の資化	136

F. アミノ酸の合成	137
G. アミノ基転移反応	137
H. アミノ酸の合成とその相互関係	139
I. 核酸の代謝	154
J. ペプチドおよび蛋白質の合成	160
K. イオウの代謝	169
参考文献	171

第2章 カビの生化学

2.1 序	181
2.2 糸状菌の細胞構造 (とくに細胞壁構造について)	183
参考文献	189
2.3 炭水化物の代謝	190
A. 解糖反応 (glycolysis)	190
B. 六炭糖リン酸側路 (hexosemonophosphate shunt)	192
C. トリカルボン酸 (TCA) 回路	194
D. 末端電子伝達系	199
E. グルコン酸発酵 (gluconic acid fermentation)	201
F. コウジ酸発酵 (Kojic acid fermentation)	203
G. 乳酸発酵 (lactic acid fermentation)	208
H. フマル酸発酵	211
I. クエン酸発酵	214
J. シュウ酸発酵	221
K. イタコン酸発酵	223
参考文献	225
2.4 カビの窒素代謝	228
A. 序 論	228
B. 無機窒素の代謝	229
C. 有機窒素の代謝	235
D. アミノ酸の生合成	239

参考文献	246
2.5 核酸の代謝	250
A. 核 酸	250
B. 核酸とその関連物質の酵素分解	260
C. 核酸とその関連物質の生合成	270
参考文献	279
2.6 ベンゼン核化合物の代謝	286
A. 序 論	286
B. ベンゼン核化合物の生合成	289
C. ベンゼン核化合物の分解	295
D. む す び	314
参考文献	315
2.7 カビのアミラーゼ	318
A. ま え が き	318
B. カビアミラーゼの種類	319
C. 研究の歴史(コウジ菌を中心にして)	321
D. カビアミラーゼの精製, 結晶化および性質	325
E. カビのアミラーゼ系	336
F. カビアミラーゼの定量法	339
G. あ と が き	340
参考文献	340
2.8 カビの蛋白質分解酵素	346
A. 緒 論	346
B. 黄コウジ菌のアルカリまたは中性で作用するプロテアーゼ	346
C. 酸性もしくは弱酸性で作用するプロテアーゼ	359
D. カビのプロテアーゼ系およびその分類	366
E. ペプチダーゼ	371
F. 生産条件と機構	373
G. 応 用	378
参考文献	380

2.9 カビの代謝産物	383
A. 炭水化物	384
B. ペプチド	384
C. エチレンおよびアセチレン系化合物	385
D. カロチノイド	387
E. 有機酸	388
F. 芳香族化合物	390
G. トロポロン化合物	394
H. 含酸素環状化合物	395
I. 含窒素異環化合物	396
J. そのほか	398
参考文献	399
和文索引	1~8
欧文索引	1~6

第 1 章 酵母の生化学

1.1 発 酵 (無酸素状態での炭水化物の分解)

酵母の生化学として特異性の高いものは発酵のそれであろう。しかも発酵の化学機構は十分明らかになっているのでまずこれを先にして次いで細胞による発酵に移ることにする。

1.1.1 チマーゼによる発酵

A. 機構解明の歴史

酵母のアルコール発酵において、糖とその生産物との量的関係については、古く Cay-Lussac (1815) が分析によって定めたものが今日まで真実とされている。



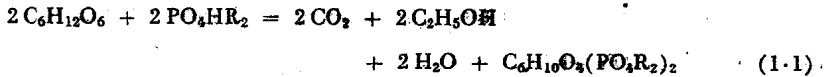
しかしこの場合に糖がどのような過程を経てアルコールと CO_2 とに化成するかについては、その生化学的な研究の道はその後ほぼ 100 年に近い間空白であった。Pasteur も Liebig も、まず酵母の細胞膜を破って内容原形質を抽出すれば何かの手がかりが得られるであろうという考えから実験を行ったが、すべて徒勞に終わった。1897 年に、この願望は、全然それを目標としていなかった Buchner らの実験によって、偶然に達成された。すなわち、Buchner は、その助手 Hahn とともに、下面ビール酵母細胞を砂やケイソウ土とともにすりつぶし、それを強力で圧搾して酵母搾汁 (yeast press juice) を得ることに成功した。もっとも、これは元来は酵母を薬として製剤する目的で行ったものであるので、その腐敗を防ぐ方法としてもっとも安全な高濃度の砂糖液の防腐力によることにして、甘シヨ糖を多量に添加したところ、思いもかけぬアルコール発酵が生起するという偶然の事実に出会い、ここにアルコール発酵酵素系 (zymase complex) を発見するに至ったのである。これによって細胞を離れた発酵 (cell free fermentation) が可能になったので、Pasteur と Liebig との間で激し

く討論された「発酵は細胞の生理現象である」という主張と「特定の酵素による」とする説との論争に対して、一応酵素説を事実として証明したこととなった。したがって以後は酵母搾汁によるチマーゼ発酵と細胞による発酵との2様の方法によって研究を行うことが可能となり、それ以来今日までの研究に、はなはだ貢献したのである。この酵母搾汁は1kgの生酵母から450~500mlの程度に得られ、その発酵力はクロロホルムやトルエンのような防腐剤によっては害を受けないが、NaFではいちじるしく阻害される。発酵を受ける糖類については、甘シ〇糖のほか、マルトース、グルコース、フラクトース、マンノースなどはほぼ等速度で発酵されるが、ガラクトースはいちじるしく弱い。これはしかしガラクトースに適応した酵母から得た搾汁の場合はほとんどグルコースに近いことがのちに知られた。五炭糖や乳糖は非発酵性である。また、デキストリン、可溶性デンプンおよびグリコーゲンなどは、生酵母では細胞内にとり入れられないために非発酵性であるが、この酵母搾汁によっては発酵される。発酵生成物として、アルコールとCO₂とはまったく等モルに生成されたが、ただグリセリンおよびコハク酸は生酵母の場合と相違してほとんど定量にかかるほどの生成はなかった。以上からチマーゼによる発酵も生酵母によるものと本態はまったく同じであると認められた。ただ発酵力を原料生酵母のそれと比較するともちろんいちじるしく弱くて1/40以下であり、またその進みかたも緩やかで、糖を加えてから15min後から開始し、25~30°Cで48~96hrぐらいの間にわたって徐々に発酵する。

Lebedew (1911) の酵母浸セキ汁 (yeast maceration juice) は、Buchnerらの酵母搾汁にほとんど等しい発酵力をもつチマーゼ汁 (zymase juice) で、しかも方法がいっそう簡単のためによく使われている。この方法の大筋は、まず下面ビール酵母をすみやかにかわかして乾燥酵母 (dried yeast) をつくり、これを一定量の水で一定温度に一定時間浸セキし、口過または遠心分離して作用力のある浸セキ汁を得るものである (近年Lipmannによると水のかわりにM/15 Na₂HPO₄ リン酸緩衝液を用いて、パン酵母など上面酵母にも応用可能といわれている)。なおこのような乾燥酵母や、また生酵母そのものをアセトンに投

入して急速に脱水乾燥した Buchner らのチミン ("Zymin", acetone-dried yeast) などが等しくチマーゼ標品として研究に役だってきた。酵母搾汁やチミンでは、細胞内のグリコーゲンが残っているから、それが発酵していわゆる自家発酵を伴う。

このような酵母チマーゼ汁 (yeast zymase juice) を使って, Harden と Young (1905) は発酵への無機リン酸塩の効果を研究していわゆるアルコール発酵の等式を定めた。



この実験でもっとも注目すべきことは次の事がらである。すなわちチマーゼ汁では無機リン酸塩を添加すると発酵がいちじるしく促進されるが、これが次第に有機化して消失するに従って発酵はもとの低い速度に戻る。そのとき更にリン酸塩を添加すればふたたび同じ程度の促進が起る。この現象は繰り返される。そしてこの促進によって増しただけの CO_2 出量はまさに消費されて有機化した P と等モルの関係にある。この事実と更に、有機化した P は $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4(\text{PO}_4\text{R}_2)_2$ (fructofuranose-1, 6-diphosphate, Harden-Young エステル) として発酵液中に集積してくるという事実とを、そのまま式にしたものが式 (1.1) であるということである。この式 (1.1) に達した以後は、きわめて弱い発酵を伴いながら、無機リン酸がふたたび離れてくるのが認められる。更にいえば、促進期には消失したグルコースの一半は発酵して $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ と CO_2 となるが他の一半は Harden エステルになって液内に止まる。すなわち、発酵分解とリン酸エステル化とが一定の ratio を保ちながら並行に進むというかたちになる。なおまたこの際発酵する糖はグルコース、フラクトース、マンノースのいずれであっても常に fructofuranose の Harden エステルが得られる。のちに、Harden と Robison (1914~1922) は、この際 hexose-diphosphate だけでなく hexose-monophosphate もともにできることを認めたから、式 (1.1) に更に

$$3\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{PO}_4\text{HR}_2 = 2\text{CO}_2 + 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5(\text{PO}_4\text{R}_2)$$

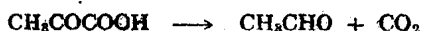
も同時に生起するとつけ加えた。di-ester と mono-ester との割合は、そのときのチマーゼ標品によって、90:10 から 20:80 までも変ることを認めた。のちにこの mono-ester は実は単一でなく、~~aldose~~ aldose-monophosphate が 4/5 くらいで ketose-monophosphate が 1/5 程度混じて平衡生成物をなしていると知られたが、aldose のほうは glucopyranose-6-phosphate と決定された。この hexose-phosphoric acid ester の生成の意義、あるいは発酵分解とリン酸エステル化との関係などについては、Harden らの時代としてはまだ不明であった。上の実験で arsenate は phosphate と同じように促進効果があるが、しかも hexose との化合物は得られなかった。

Harden ら (1906) の今一つの大きな発見は、発酵の酵素系 (zymase complex) は dialysis または collodion 膜による ultrafiltration によって、非透過性部分で高分子、非耐熱性のアポチマーゼ (apozymase すなわち apoenzyme) と、透過性、低分子で耐熱性のコチマーゼ (cozymase すなわち coenzyme) とに分けろうということを示したことである。以後は一般にコチマーゼ部分は酵母の煮沸汁として供給された。アポチマーゼ単独では発酵は起らない。これにコチマーゼを加えて初めて発酵が起る。そしてアポチマーゼとしては透析したチマーゼ汁のほか、一般に洗浄によってコチマーゼを溶出し去った乾燥酵母標品がよく使用された。

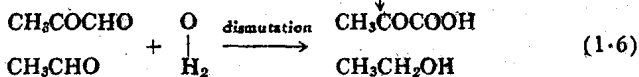
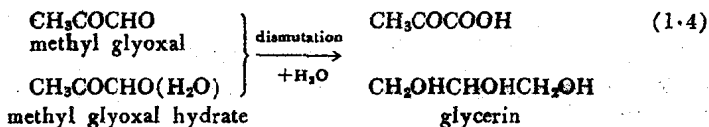
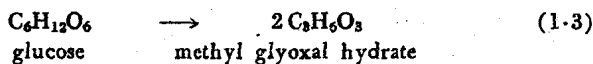
Euler は、1924~1929 にかけて、下面ビール酵母の煮沸汁から出発してコチマーゼの濃縮精製を行い、その最高作用力の標品について分析した結果から、adenine : PO_4 : pentose = 1 : 1 : 1 の nucleotide 性組成を明らかにし、その作用については、洗浄乾燥酵母をアポチマーゼ標品として実験した結果、発酵作用 (グルコースからアルコールと CO_2 の生成)、酸化還元作用 (hexose-phosphate がメチレンブルーによって脱水素される作用) およびリン酸エステル化作用 (hexose-phosphate を生成する作用) のすべての反応のコエンチームとして関与するという結果を得た。

さて、1930 年までは糖のアルコール発酵に関する化学的過程についての模式としては一般に Neuberger が 1913 年に提出したものが認められていた。

Neuberg 氏 (1911) は発酵性のある酵母に広く分布している carboxylase を発見した。すなわち、この酵素はピルビン酸を



のように直接脱炭酸する反応を接触するもので、この発見は発酵による CO_2 の生成機構を解明したものである。この発見を基として、一方アルコール発酵は無酸素状態での変化であって酸化物である CO_2 と、糖に対しては還元物質であるアルコールとが生成するのであるからその変化の内容は酸素に無関係な酸化還元反応であるという古くからの考えに従ってアルデヒド基およびケトン基の dismutation 反応を取り入れて、次の模式を組み立てたのである。



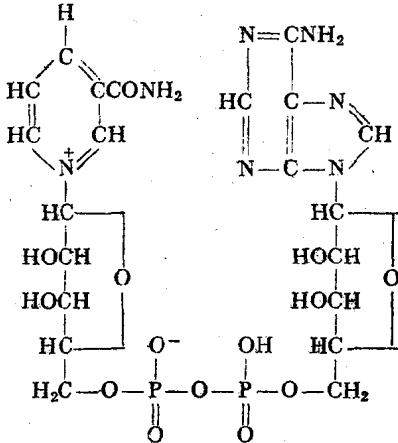
始発期には式 (1.3)、(1.4) とすすんでグリセリンが生成されるが、定常期になると式 (1.5) によって生じたアセトアルデヒドが式 (1.4) のメチルグリオキサール加水物にかわった式 (1.6) が主反応になるので、式 (1.4) は起らなくなってグリセリン生成の機会はない。式 (1.5) の carboxylase 反応は実験済みであり、また氏らのいわゆる fixation method によって生酵母の発酵中に多量のアセトアルデヒドを捕えることに成功したから、アセトアルデヒドが確かに中間物であることは証明された。しかし、式 (1.3) の C_3 化合物は果してメチルグリオキサールであるかどうか、式 (1.4) によるピルビン酸の生成機構、式 (1.6) の dismutation の事実などについては、その後の研究にかかわらず実証されなかった。これらの研究から Neuberg のいわゆるアルコール発酵の第二型および第三型となって、Gay-Lussac による本来の型 (第一型) に

よるアルコール製造を転換して、酵母の発酵によってグリセリンを製造する方法に発展し、実用的に顕著な成果をあげたのである（後述）。

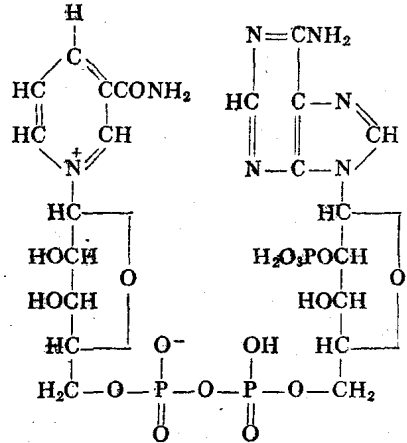
この模式には Harden らの発見によるリン酸塩の効果がとりあげられていない。Neuberg は、hexose-phosphate が生酵母によっては発酵されないことおよび無機リン酸塩の添加は生酵母に対して全々発酵促進の効果を示さないなどのことから、むしろ phosphorylation に関することは不自然な事象とみていた。更にコチマーゼの関与についても触れていない。のちに 1929 年ごろ、hexose-diphosphate を基質とし、これにいろいろな酵母標品を作用させて、メチルグリオキサールやピルビン酸が生成する事実を証明したと主張したが、メチルグリオキサールは triose-phosphate の二次的生成物であるという反証にあっている。

1930 年代になってまもなく、Nilsson, Embden らによって、発酵の中間物と認めることのできる C_3 化合物として phospho-glyceric acid が分離証明された。一方では、triose-phosphate の発酵が確立され、ことに主として Meyerhof 一派ならびにその他の多くの人々の研究によって、hexose-diphosphate や hexose-monophosphate が筋肉での炭水化物の無酸素的分解である解糖作用 (glycolysis) すなわちグリコーゲン \rightarrow 乳酸において、更にまた酵母汁での発酵においても、重要な中間物であることが証明された。更にこの hexose-diphosphate はチマーゼの部分酵素の一つである aldolase によって 2 分子の triose-phosphate に割れ、これが phospho-glyceric acid に酸化し、更に Embden の反応に従って phospho-pyruvic acid になり、ついに free pyruvate に至るという機構が明らかになった。ここに永年にわたって不明であった C_3 中間物の実態がめいりょうにされた。それとともに他方、コチマーゼについては、Warburg, Euler, Schlonk らによって、その化学構造が diphosphopyridine nucleotide (DPN) と明らかになるとともに、これが多くの dehydrogenase に対して共通にコエンチームとしての役割を果たすことが証明された。したがってコチマーゼの名はコエンチーム I (coenzyme I) と一般的に改められ、この構造に先鞭をつけた Warburg の発見によるグルコース-6-リン酸の酸化に関与

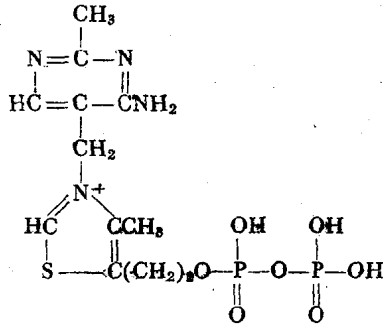
するコエンザーム II (coenzyme II) triphosphopyridine nucleotide (TPN) に
対称させられることになった。



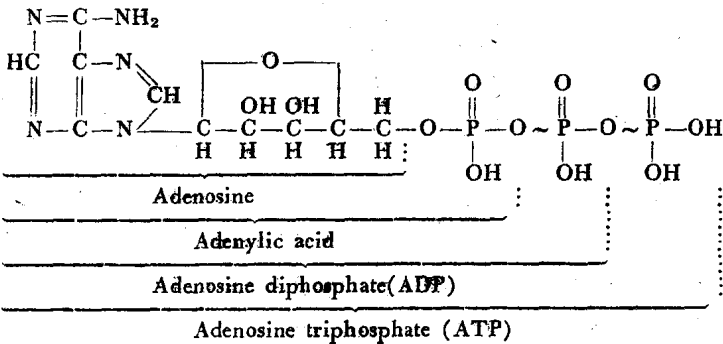
DPN (coenzyme I)



TPN (coenzyme II)



Thiamine pyrophosphate (cocarboxylase)



更に、筋肉による解糖作用の過程でのコエンチームとして、Lohmann が 1929 年に発見した adenosine-triphosphate (ATP)-Mg 塩は、コチマーゼ (コエンチーム I) とは別個に、リン酸基供与体の役割を担当して phosphorylation に関与することが明らかにされ、こうして、コエンチーム I が水素と電子との通伝体として酸化還元作用に関与することとあわせて 2 種類のコエンチーム機構が解明されるに至った。更に carboxylase の作用にも、thiamine-pyrophosphate がコエンチームとして関与することが、Auhagen (1932~1933) および Lohmann ら (1937) によって証明され、計 3 種のコエンチームの関与が明示された。他方、解糖作用の研究において筋肉の酵素系によってグリコーゲンから hexose-phosphate が分解生成することが Parnas (1935) によって発見され、ここに多糖類の糖化現象として従来の amylase による加水分解によって遊離の hexose が生ずるのに対し、リン酸が関与して hexose-phosphate が生ずる "phosphorolysis" 反応が新しく発見された。

つづいて Cori-Cori その他によって、この機構や hexose-phosphate 間の相互変化の機序などが明らかにされるに及んで、また Meyerhof (1927) の hexokinase の発見によって hexose が解糖作用や発酵の反応系へとり入れられる機序が解明されたことなどによって、糖がリン酸エステルの形で一步一步と分解されやすいものになっていき、ついに aldolase にかかって二つの triose-phosphate に割れるに至るまでの hexose のたどる経路もめいりょうになった。

1939~1940 年に Warburg らは、phospho-glyceraldehyde dehydrogenase を酵母浸セキ汁から単離し、これを同じく酵母浸セキ汁から結晶化させた alcohol dehydrogenase とともに、phospho-glyceraldehyde と acetaldehyde との混合物に作用させ、共通のコチマーゼ (コエンチーム I) を介して、前者が酸化して phosphoglyceric acid となり後者がアルコールに還元することを実験的に明らかにして、発酵の酸化還元作用がこの反応にあることおよびこの際無機のリン酸がとり入れられて、酸化に伴う phosphorylation が起ることを明らかにした。こうしてコチマーゼが関与する機構を解明するとともにチマーゼ発酵に無機リン酸がとり入れられる実態を明示するに至った。