

修士論文

硫酸還元菌のチオ硫酸還元酵素について

小林 邦彦

指導教官 石本 真

(1967. 2. 20)

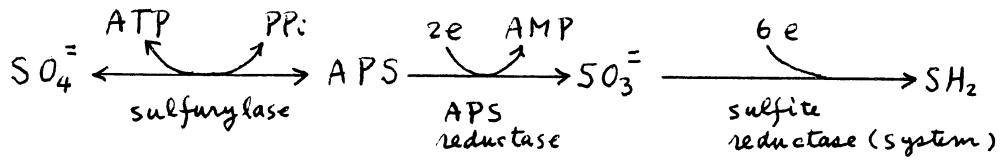
東京大学 大学院 理学系 研究科

[要 約]

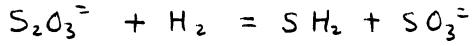
1. ヒドロサルファイトにより 化学的に還元した Methyl viologen を電子供与体とする キオ硫酸還元酵素活性の簡易測定法を考案した。
2. この測定法を用ひて 硫酸還元菌 のキオ硫酸還元酵素を約60倍に精製し、その性質を調べた。緑色色素と、他の色素はほとんど含んでいない。
3. 精製標品を用ひて 酵素阻害剤の影響、酵素の安定性等又、キオ硫酸還元の逆反応の条件を検討した。
4. 増硫酸還元酵素活性をもたない 酵素標品を得て、キオ硫酸還元酵素か 増硫酸還元酵素とは ちがう酵素であることを認めた。

硫酸還元菌は 硫酸塩を最終電子受容体として 有機物
および水素の酸化を行なう。 (硫酸呼吸)¹⁾

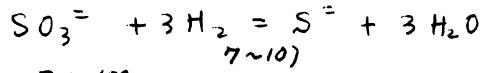
このとき 硫酸塩は スルフリカーゼ^{3, 4, 5)} アデノシン フォスフォカルボキシ²⁾
(APS) 還元酵素、 亜硫酸還元酵素(系)⁶⁾ により APS、 亜硫酸
塩を経て最終的に硫化水素となる。



硫酸還元菌^{7~11)} は、これらの酵素活性とは別に 4才硫酸^{12~14)} 塩を還元する活性をもつ。これは菌抽出液においてもみられる。木素による 4才硫酸¹⁵⁾ 塩還元は、次の式によく一致する



菌抽出液²⁾は、共存する亜硫酸還元酵素¹⁾により 亜硫酸は速に還元される



阻害剤の影響^{6, 12, 15)}、抽出液の分画における活性比⁹の変化より、4才硫酸還元は 亜硫酸還元とは別々の還元酵素系¹²⁾により行なわれることと示された。²⁰⁾推定された。

しかし、この酵素の性質その他はまだほとんど研究されていない。硫酸還元(代謝)との関係は明確でない。

ところで、4才硫酸¹⁶⁾の代謝には 微生物に多く見られるものあり、その代表的な例¹¹⁾は、光合成および化学合成 4才硫酸細胞などによる衍生物的代謝である。一方 4才硫酸¹⁷⁾の還元も、硫酸還元菌¹⁸⁾の他に 酵母や Proteus, E. coli, Micrococcus¹⁹⁾ など、細胞の無細胞系²⁰⁾で行なわれるところが知られる。

113 が、酵素といふ性質や、その生理的機能は明瞭かでない
ものが多いた。

この研究では、半胱氨酸還元酵素の簡易測定法を
考案し、これにより酵素を約60倍濃縮した。半胱氨酸還元
酵素を含まない酵素が得られたことは、半胱氨酸還元酵素の
半胱氨酸還元酵素とは別の酵素であることを明瞭に示すものである。
また、精製標品を用いて酵素の性質を調べて生理的意義を考察
した。

[材料 および 実験法]

菌 は、水田より分離された硫酸還元菌 Desulfovibrio vulgaris (従来の Desulfovibrio desulfuricans²¹⁾ を用いた。

従来、培養条件¹⁰⁾ で嫌気的に一夜培養したものを連続遠心分離菌とした。菌の収量が非常に少少 (0.7 g wet weight / 1 culture) ので、一回の実験では 30~100 L の培養により菌を得た。

菌は、0.15% NaCl, 0.05 M PB (pH 7) で洗い、0.05 M PB (pH 7) で 1:1 (w/w) で懸垂した。

酸化還元色素

市販のもとを使用した。

Methyl viologen (*N,N'*-Dimethyl-*β,β'*-dipyridinium chloride, 1% F MV と略記), Benzyl viologen (*N,N'*-dibenzyl-*β,β'*-dipyridinium chloride, 1% F BV と略記) : British Drug House,

Neutral red : E. Merck, Phenosafranin : Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Janus green : Dr. G. Grübler & Co. Leipzig,

Cytochrome C₃

石本らの方法により²²⁾ Amberlite IRC-50 を用いて精製した。

$OD_{410} / OD_{280} = 13.3$ で 3. 反応 1 mL 10 mg / mL 濃度で 0.1 mL ずつ使用した。 $(M.W = 10^4 \text{ で } 0.1 \mu\text{mole})$

ヒトロゲンの調製と活性測定

菌の音波破碎抽出液を 3,500 × g 15 分 遠心で破片を除いた後、16,000 × g 20 分 の遠心で沈降部分を 0.05 M PB (pH 7.0) で 3 回 洗い、同上緩衝液で 52.7 mL (左毛) (P₁₆)

23)
ヒドロゲナーーゼ (以下 H₂ase と記す) 標品とした。標品は H₂ 気中凍結して保存した。

活性測定は、固密な方法より。N₂ 気中 Na₂S₂O₄ ²⁻ 還元した MV の H₂ 発生を Warburg 檢圧計で測定した。
IRB の濃度は 0.12 M (final) である。酵素活性は 1 U = 1 μmole H₂ evolution / hr であった。

亜硫酸還元酵素活性の測定

亜硫酸還元酵素 (以下 S_iR と記す) の測定は、H₂, H₂ase, MV, SO₃²⁻ 存在下 Warburg 檢圧計により H₂ 吸収速度をはかる方法⁶⁾ によった。(pH 6.2)

チオ硫酸還元酵素活性の測定

チオ硫酸還元酵素 (以下 ThR と記す) の精製を進行する際には、主に測定法 b) によった。測定法 b) の検討と酵素の種々の性質を調べる際には測定法 a) を用いた。

測定法 b) は今回簡易法として参考したものである。[実験および結果] の項参照。

○ 測定法 a) Warburg 檢圧計により H₂, 温剤 H₂ase, MV, S₂O₃²⁻ 存在下 S₂O₃²⁻ 還元による H₂ 吸収を測定する。¹³⁾
標準反応液 (1.4 mL) には次のものが含まれる。

主室: IRB (pH 9.5) 80 μmoles, MV 1 μmole, H₂ase (110 U)
酵素。

側室: Na₂S₂O₃ 5 μmoles.

気相: H₂ 30°C.

center well には 10% KOH 0.2 mL を入れ、発生する SH₂ を吸収させた。

酵素活性は、 H_2S 吸収の直線部分の速度より求めた。混在する SQR 活性を加強い場合はこれを差引いた。

○測定法 b) $Na_2S_2O_4$ により化す約 12 還元した MV を電子供与体とし、 $S_2O_3^{2-}$ 還元による SH_2 を定量する。

測定には Warburg 積圧計用のフラスコを用い次のよう 12 行なう。

主室(反応液 1 ml) : IP-B (pH 7.5) 80 μmoles, MV 1 μmole,
 $Na_2S_2O_3$ 5 μmoles, 酵素試料。

側室 : 結晶 $Na_2S_2O_4 \cdot NaHCO_3$ (1:1 w/w) 約 20 mg

Center well 12 は H_2S 吸収液 0.2 ml (= 沖紙 (2 × 6 cm) を浸す。 $37^\circ C$ の恒温槽で温度平衡に達した後、フラスコを栓をして密閉し、測定室の $S_2O_4^{2-}$ を反応液に加えることによって反応を開始する。5 分後、フラスコを flash mixer により 1 回振盪して反応を止め、 $S_2O_4^{2-}$ は気相の O_2 により酸化され、完全に還元力がなくなければ MV (酸化型:無色、還元型:青色) は脱色する。反応終了後恒温槽中に発生した SH_2 を十分吸収した後吸収させ、15 分後、center well の沖紙を栓をして試験管に移し、St. Lorant の方法により SH_2 を比色定量する。

酵素活性は 1 μmole SH_2 evolved/hr を 1 単位とする。

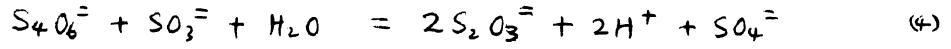
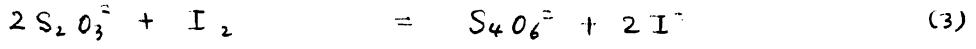
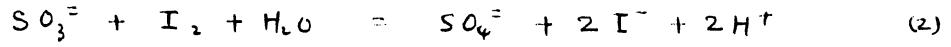
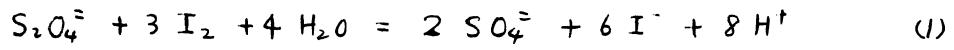
相対的な活性を示す必要ない場合 12 は標準液濃度より $Na_2S_2O_3$ を除いた反応液の活性を測定した。

蛋白の定量

Cu-Folin 法 12 より 26) ウシ血清アルブミンを標準試料として求めた。各種ウリコトカラーフィーの溶解曲線は $OD_{280 \text{ nm}}$ によつて。

$S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} , S^{\cdot} の定量 Kurtenacker²⁷⁾ 1=23。

- $S_2O_4^{2-}$ 水溶液中 の $S_2O_3^{2-}$ の量を求める場合。過剰の I_2 で $S_2O_4^{2-}$, SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$ を酸化 (式-1, 2, 3) の後、再び過剰の SO_3^{2-} で $S_4O_6^{2-}$ を還元し (式-4), 既に酸性又は フォルムアルデヒドで過剰の SO_3^{2-} を除くとヨード滴定 (式-3) する。



- 反応液中 I_2 失存する $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} , S^{\cdot} をそれぞれ求めよ場合。
次の 3つの条件でのヨード滴定値から求めよ。

反応液 2 ままで (a) $ZnCl_2$ で S^{\cdot} を取り除いたもの (b)

S^{\cdot} が えき、既に酸性又は フォルムアルデヒドで SO_3^{2-} を除いたもの (c)

$$[S_2O_3^{2-}] = c, [SO_3^{2-}] = (b - c)/2, [S^{\cdot}] = (a - b)/2$$

[実験および結果]

1. 千万硫酸還元形態の簡易測定法の考案 および検討

従来 THg の測定法としては [実験法] 2) 示した測定法 a) つまり H_2 , $HgAsO_2$, MV , $S_2O_3^{\cdot-}$ の存在下、 $S_2O_3^{\cdot-}$ 還元 Hg より H_2 吸収速度 あるものと、無気的条件 2)、還元型 MV (青色) $\xrightarrow{23)}$ $S_2O_3^{\cdot-}$ 還元により脱色する時間から求めた方法があつた。

このいずれの場合にも、液相を完全な無酸素状態にするために非常に時間がかかる。測定法 a) の場合、混在する O_2 は $HgAsO_2$ より H_2O を生成し、 O_2 還元より H_2 吸収が起こる。又、還元型 MV の脱色時間より求めた方法 2) は、 O_2 の混在 2) 還元型 MV の脱色が進行する。この測定法 2) は、Thumberg 管ことに嫌気性が異なるため値が信用できないことかしばしばある。

これより、無酸素状態にする操作とはいくために、Lowe,
Panegue²⁹⁾ の硝酸還元形態、亜硝酸還元形態の測定法^{22), 30)} 2) 気相を空気のままで行う測定法 b) を考えた。

$Na_2S_2O_4$ は強力な還元剤²²⁾、酸素存在下で MV を還元²²⁾。過剰の $S_2O_4^{\cdot-}$ があれば MV をかなりの時間還元型²²⁾ 保つことができる。ただし、 $S_2O_4^{\cdot-}$ はその好気的嫌気的分解²²⁾ で SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{\cdot-}$ など種々のイオンを生成する²²⁾。イオウ化合物²²⁾ その他他の還元剤²²⁾ とかしながら $NaBH_4$, 金属 Zn , Al 等²²⁾ は液相か空気のときは MV を還元しなかつた。

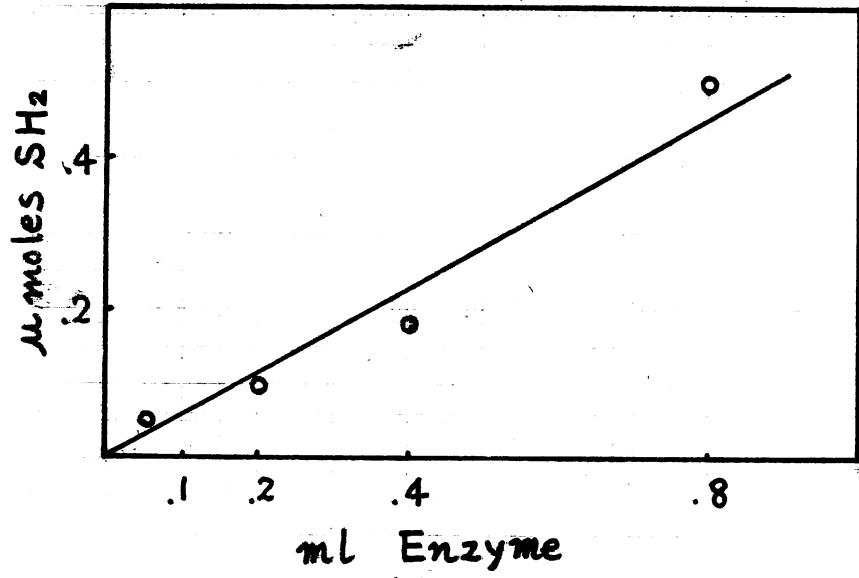
$Na_2S_2O_4$ の添加により pH が下がることを防ぐための 1) 等量の $NaHCO_3$ を同時に加えた。

標準測定法の条件 2)、SH₂ 発生は白巻素量²²⁾ に比例する。
(Fig. 1)

< Fig. 1 >

Fig. 1

Relationship between Activity and Volume of Enzyme



The standard assay procedure b) was used with variation in volume of enzyme preparation as indicated

Enzyme preparation : DEAE fraction

Activity : μ moles SH₂ evolved per 5 min. reaction.

非酵素的又 SH_2 発生や、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、MV を加えない時、 SH_2 発生は全く認められなかつた。(0.01 mmole / 5 min 反応)

一方、 $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ を反応液に加えなかつても、いなり SH_2 発生(酵素的)がある。特に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ - NaHCO_3 混合物がつくりたるものは、 $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ を加えんものと変わらない酵素活性が示された。調整してから数日間放置していゝもの(数日)では、 SH_2 発生は $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ を加えずか加えないかで ~~酵素活性が大きくなつて~~ 大きく変わる。 $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ を加えなかつても酵素によく SH_2 発生がある $\xrightarrow{?}$ は、 $\text{S}_2\text{O}_4^{\pm}$ 中、あるいはその分解物中に(?)ある $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ - NaHCO_3 では $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ が生じてことによるとのと思われる。事実 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ - NaHCO_3 の 20 mg 離より、測定の条件で 1~2 nmoles の ~~SH_2~~ $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ の存在が認められた。

$\text{S}_2\text{O}_4^{\pm}$ 溶液中では SO_3^{\pm} も存在するか、次のような私設がある。この測定法がおおむね SIR をあらわすものであると考えられる。

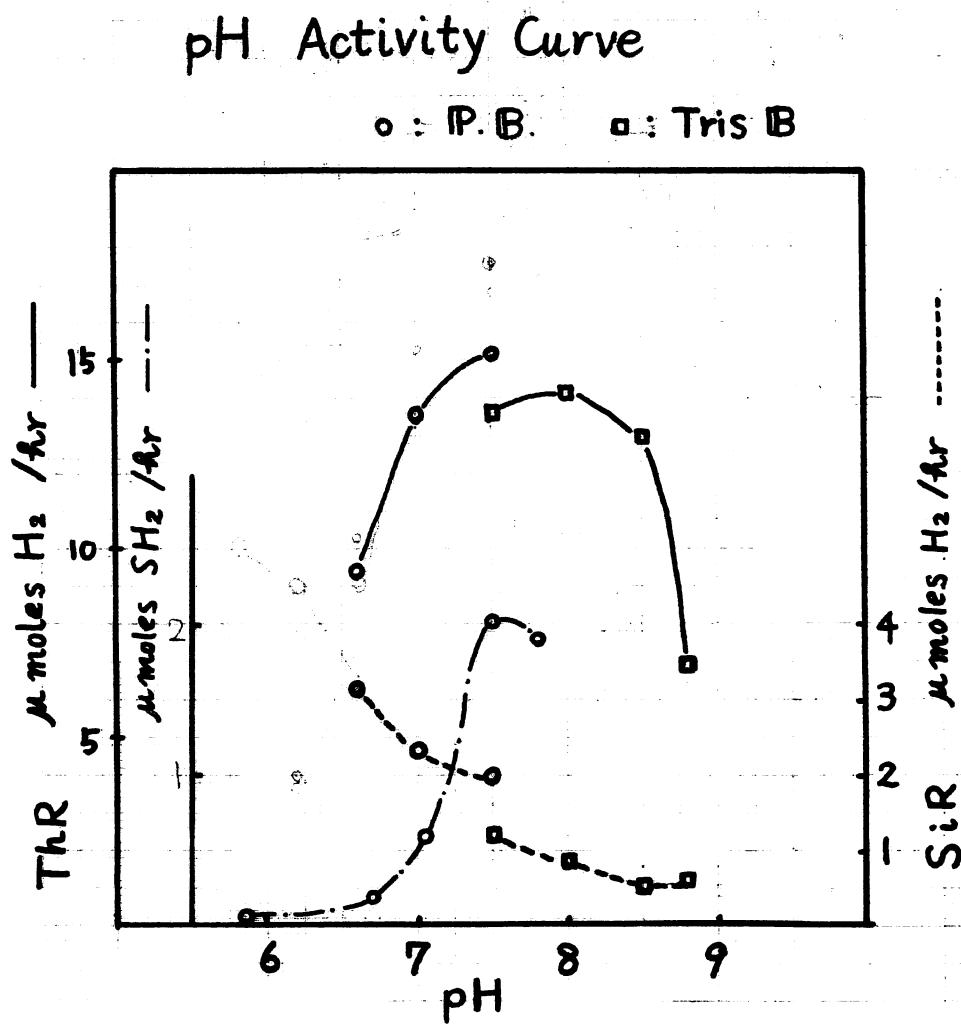
1. pH-activity curve (Fig. 2) より。

測定法 a) $\text{pH} \xrightarrow{\text{至適}} 7.5 \sim 8.0$ であるから測定法 b) によれば同じである。一方 SIR は pH 6 附近で至適 pH をもつ。

< Fig. 2 >

2. 各種クロマトグラフにおいて、測定法 a) およそ b) は必ず活性性は平行し、SIR 活性とは平行しない。その例は Fig. 4 および Fig. 8 で示される。Fig. 8. と同様 Sephadex G-200 からで、SIR は数本早く溶出される。

Fig. 2.



---○--- 66, 11, 5

ThR activity was figured with — for assay a) 66, 12, 16 (M-15)
 --- for assay b) 66, 11, 5

Sephadex G-25 column fraction 24

2. 千才硫酸還元酵素の精製

酵素は、Fig. 3. にまとめたようにして精製した。

< Fig. 3 >

80 l の培養により、集めた苗 (55 g wet weigh) のケンタウ液を 20 KC の超音波で破砕し、細胞破片を除く。更に $16,000 \times g$ 20分の沈降部分 (P_{16}) を除いたもの (S_{16}) を精製の出发物とした。これで P_{16} は、不溶性の Hase 標品と同 ThR 測定法 a) で使用される。また、測定法 b) では Hase 加量が食まれて還元型 Mv が H_2 を発生し、Mv の還元型が早く消費され ThR が正確な値が得られない。

S_{16} を超遠心分離 ($100,000 \times g$ 60') の上清 (S_{100}) を硫安分画する。 $\frac{1}{3}$ 飽和の $\frac{2}{3}$ 飽和までの沈降を $0.02 M$ IP-BB (pH 7.0) 40 ml で溶解する ($P_{\frac{2}{3}}$)。これを Sephadex G-75 カラム (5×50 cm) に注ぐ。 $0.02 M$ IP-BB pH 7.0 - $0.1 M$ NaCl でゲル洗過する。Sephadex G-75 では ThR は一素通り区分 12 洗出があるか、ThR はそれよりやへ遅れる。2, 220's ThR の分子量は数万程度と思われる。Sephadex G-75 ゲル洗過の ThR 洗出区分 (Sephadex fraction) を、同じ緩衝液で平衡化して DEAE-cellulose カラム (3×40 cm) にかけた。ThR は吸着され素通りして洗出性はないと思われる。緩衝液で洗浄後、NaCl 濃度を $0.1 M$ から $0.3 M$ まで直線的に変化させ溶解する。ThR は $0.2 M$ NaCl で溶出されれる。DEAE-cellulose 7 号マットソン 71-9131 は Fig. 4 に示される。この例では、

Fig. 3. Procedure of Purification of Thiosulfate Reductase

Cell suspension 55 g wet weight in 140 ml of 0.05 M P.B. (pH 7)

- UltraSonic oscillation ($\frac{10}{20}$ KC, 15 min)
- Centrifuged $3,500 \times g$ 15 min

Sup. - Centrifuged $16,000 \times g$ 20 min debris

Sup. (S₁₆) 115 ml ppt

- Centrifuged $100,000 \times g$ 60 min

Sup. Sup. (S₁₀₀) 94 ml P₁₆

- Ammonium sulfate fractionation
- ppt between $\frac{1}{3}$ and $\frac{2}{3}$ saturation
- Solved
- Resolved in 0.02 M P.B. (pH 7.0) - +

P_{2/3} 40 ml (67. 1/4)

- Gel filtration on Sephadex G-75 column (5 x 50 cm)
- Developed with 0.02 M P.B. (pH 7.0) - 0.1 M NaCl

Sephadex

frs. 36 - 52 (Sephadex fraction) 160 ml

- Applied on DEAE-cellulose column (3 x 40 cm)
- Washed with the same B (67. 1/4)
- Linear gradient elution with 0.02 M P.B. (pH 7.0) - 0.1 M NaCl in mixing chamber, 0.02 M P.B. (pH 7.0) - 0.3 M NaCl in reservoir.

frs. 103 - 117 (DEAE fraction) 140 ml

- Applied on hydroxyl appatite column (2.8 x 2.0 cm) (67. 1/20)
- Washed with 0.02 M P.B. (pH 7.0)
- Eluted with 0.05 M P.B. (pH 7.0)

frs. 21 - 26 (hydroxyl appatite fraction) 60 ml

NaCl 濃度を 0 から 0.4 M まで 2-9 倍に配して溶出 (Fig. 2-3)。
 溶離後、活性が高いう部分 (DEAE fraction) は hydroxyl ^{apatite} appatite
 P₃G (2.8 × 2 cm) 12 分け吸着せず。0.02 M IP. IB で洗浄後、
 0.05 M IP. IB (pH 7.0) で溶出する。溶出曲線は Fig. 5 と
 同じである。区分 no 21~26 は (hydroxyl ^{apatite} appatite fraction) となる。

< Fig. 4 >

< Fig. 5 >

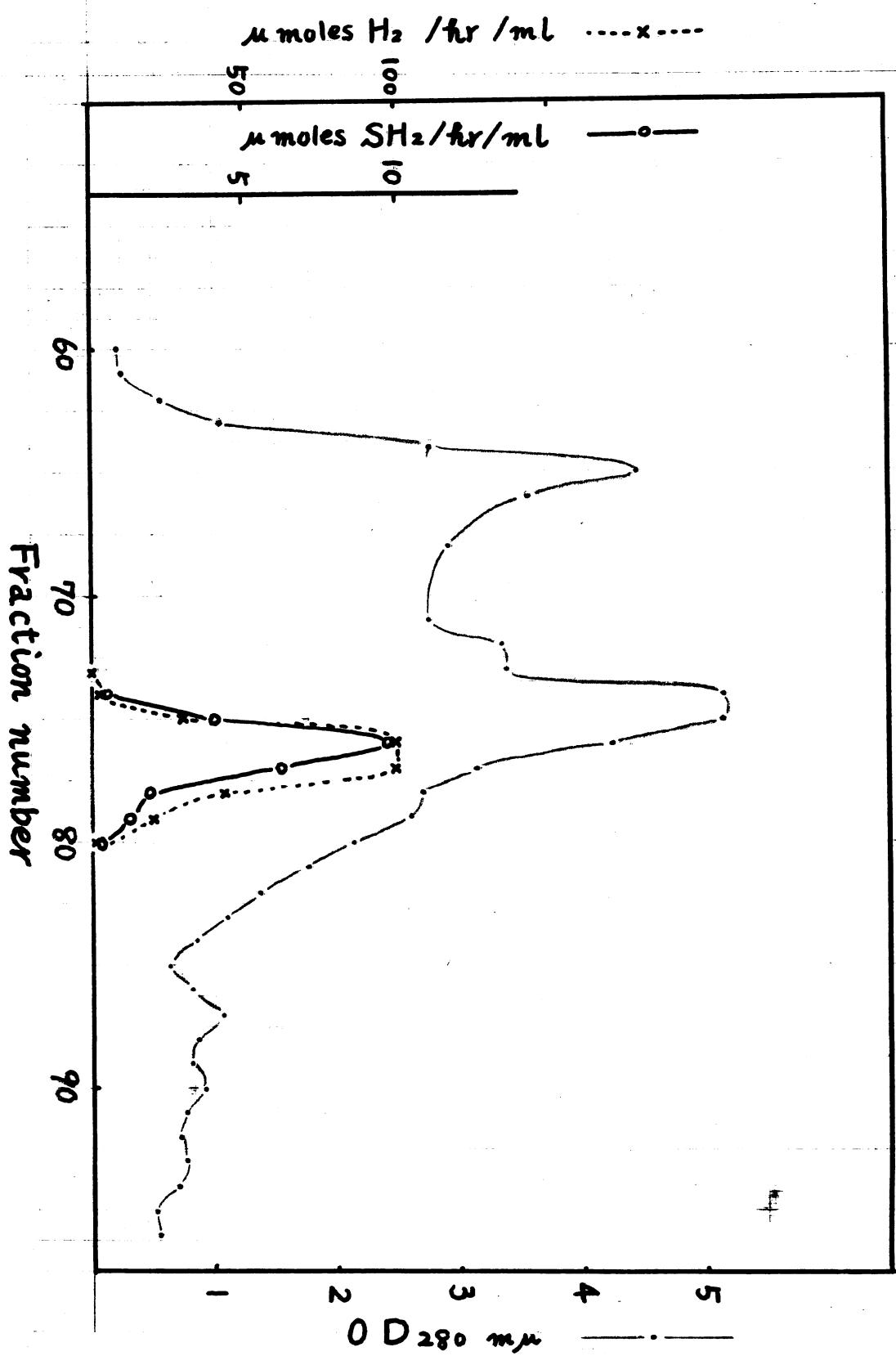
DEAE fraction 12 分けれども緑色色素は hydroxyl ¹⁶⁾ appatite
 12 ほど強く吸着され 0.05 M IP. IB で洗浄後、0.2 M IP. IB (pH 7.0)
 で溶離する。

各段階での色素活性、収量、比活性を 表-1 に示す。

表-1

Summary of Purification of Thiosulfate Reductase

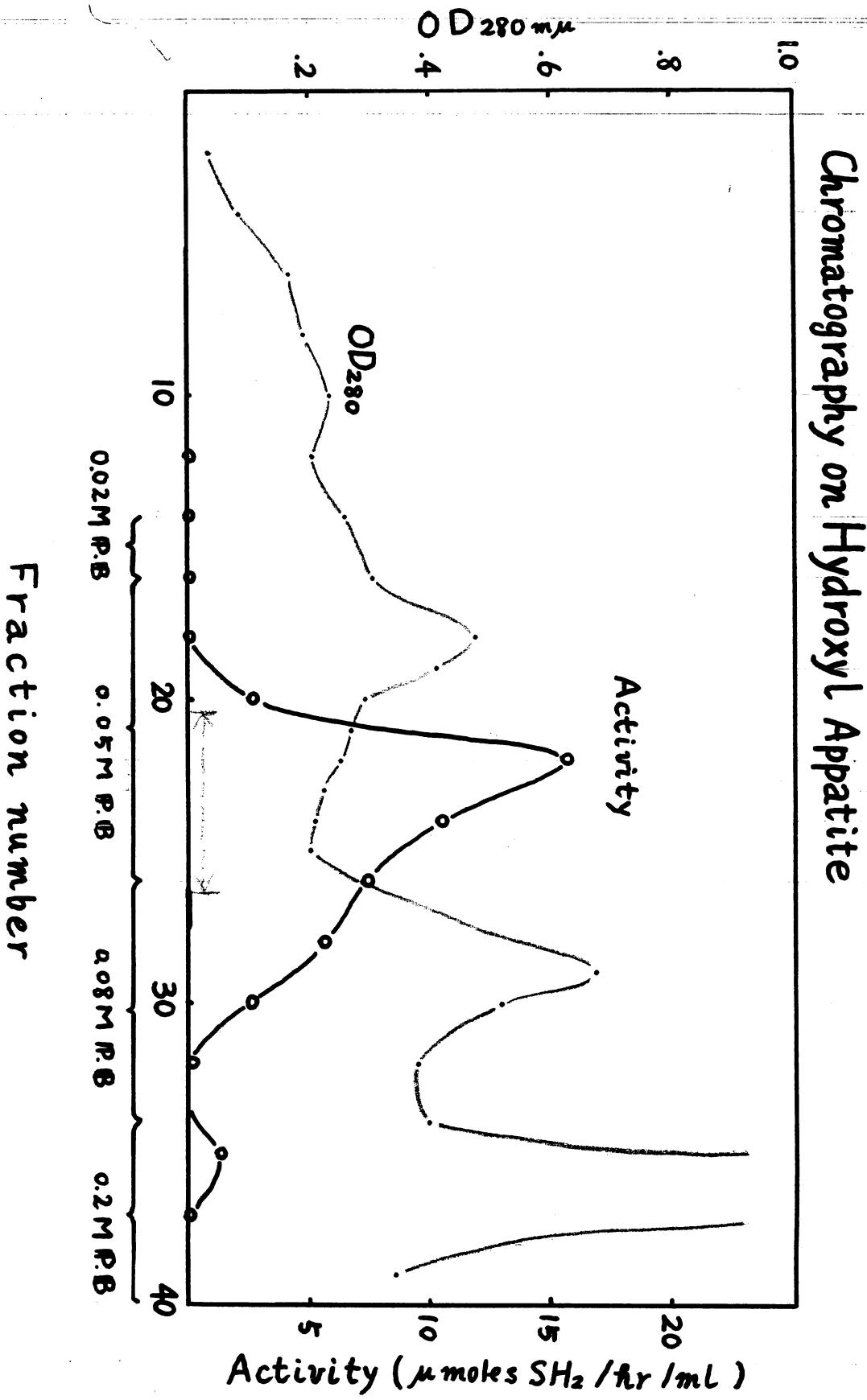
Fraction	Volume (ml)	Protein (mg)	Total activity (Unit)	Yield (%)	Specific activity (U/mg)	factor
S ₁₆	115	16800	9010	100	0.54	1
S ₁₀₀	94	6870	5800	63	0.84	1.6
P ₃ G	40	3380	6570	73	1.94	3.6
Sephadex	160	2900	6500	72	2.2	4.1
DEAE	150	225	2490	28	11	21
hydroxyl ^{apatite} appatite	60	21.6	702	7.8	33	61



Chromatography on DEAE-Cellulose

16

十一



こうして TiR を約 60 倍に精製することができる。

ケル電気泳動では P_{34} の蛋白成分が少くとも 90% 以上である。最終段階で主な蛋白成分は $\text{27920} \mu\text{L}$, 2.3 。

ここで得られた DIAF fraction 又は hydroxyl apatite fraction を用いて次に述べる酵素の種々の性質を調べた。

3. 酵素の性質

酵素による半胱酸還元反応の進行

精製酵素標品 (hydroxyl apatite fr. no 22) を用いて、測定法 a)により、 H_2 , Hase , Mv 存在下、 $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ の H_2 による還元と H_2 吸収によつて見れば、Fig. 6 の上側の線のように進行する。

< Fig. 6 >

はじめの急速な吸収は、主として $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ 還元による H_2 吸収で、吸収したモル数は加えた $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ のそれと一致する。

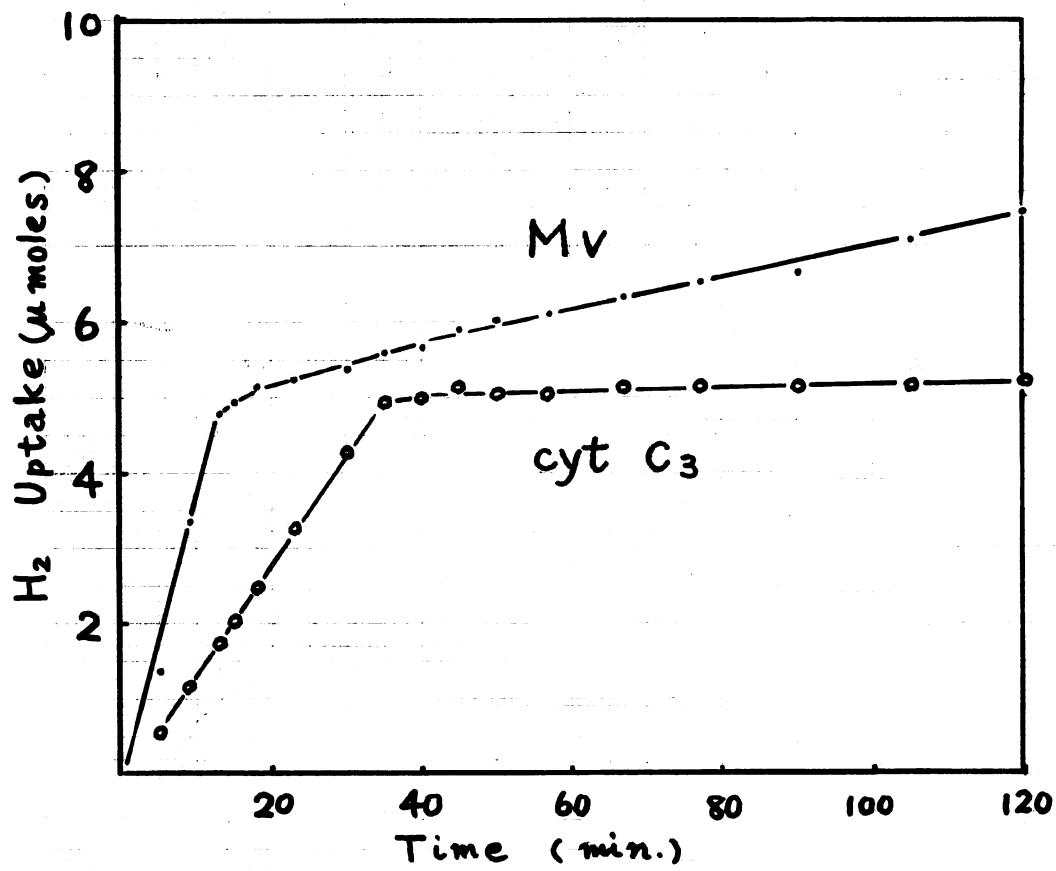
この酵素標品には、まだわずかに (H_2 吸収速度 $\approx 5\%$ (pH 7.5)) SiR が含まれている。折れ曲がる後のゆるやかな H_2 吸収は、 $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ が還元して生成した SO_3^{\pm} が、混在する SiR により還元されることを示している。

Warburg 構造計で測定可能な精度では、このように H_2 吸収はほぼ直線的に進行する。 $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ 還元による H_2 吸収速度が残存する $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ の濃度と依存すると仮定し K_m 値を計算すると 約 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ となる。

69. 1. 20 (M-19)
69. 1. 12 (M-18)

Fig. 6

Participation of Cyt C₃ as Electron Carrier in S₂O₃²⁻ Reduction



The standard assay a) was used. Enzyme preparation: hydroxylapatite fr no 22 0.2 ml.

Cyt C₃ (0.1 μmole) or Mv (1 μmole) was added to the reaction mixture as electron carrier as indicated.

種々の日差し還元色素によるチオ硫酸還元活性

測定法 b)により Mn^{2+} がかりに種々の低電位の日差し還元色素を電子供与体として $S_2O_8^{2-}$ 還元速度を求めた(表-2)

表-2

Thiosulfate Reduction Activity with Various Redox Dyes

Redox dye	umole	Redox potential $E^\circ(pH7.0)$	$S_2O_8^{2-}$ produced umoles/5 min	%
Methyl viologen	1	-0.440	93	100
Benzyl viologen	1	-0.359	45.	48
Neutral red	1	-0.325	32.	34
Phenosafarinin	1	-0.252	5	5
Janus green	1	-0.225	3	3
cyt c ₃	0.1	-0.205	56	60
cyt c ₃	0.1 (no enzyme)		.4	4
none			7	8

得られた結果は、測定法 a)により粗抽出液と同様¹³⁾人工の色素とは電位、活性とも同じ電子供与体として活性は高いが、この薬の天然の電子伝達体である cyt c₃ が、これらより電位が高いためかわざず電子供与体としてよく働くことは注目に値する。

Cyt c₃ は、粗抽出液と同じ²²⁾この精製酵素標品についても、Trasac の下の $H_2O_2 + S_2O_8^{2-}$ 還元の中间電子伝達体として有効であった(Fig. 6.) THR が cyt c₃ と直接電子を授受する可能性は大きい。これに対して cyt c₃ を中間電子

伝達体とした場合 SO_3^- の還元は SiR が混在しても起こらない。
 SO_3^- 還元には SiR , cytc₃ の ~~他の色素~~ 同の電子伝達に
 更に他の要素が必要と考えられる。

吸収曲線

精製白酵素標品 (hydroxyl apatite fr. no. 22) の吸収スペクトルを
 自己分光光度計により求めた (Fig. 7)。

(Fig. 7)

可視部の全域にわたり 明らかに吸収極大は認められない。
 ここで、ヘムの 410, 450 nm における吸光係数をそれぞれ
 11×10^3 , $3 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mole}$ (cytc とし), フラビンの 450 nm における
 それを $10^7 \text{ cm}^2/\text{mole}$, これらの濃度における吸光度をそれぞれ
 ヘムとフラビンによるとし、蛋白濃度 (0.22 mg/ml) および
 色素含量を計算すると、分子量 5万あたり ヘム (cytc
 とし) 0.05 mole , フラビン 0.2 mole となる。精製が
 まだ不完全な段階なので決定的とは言えないが、少なくとも
 この酵素はこれらの色素を含んでいないらしいと思われる。

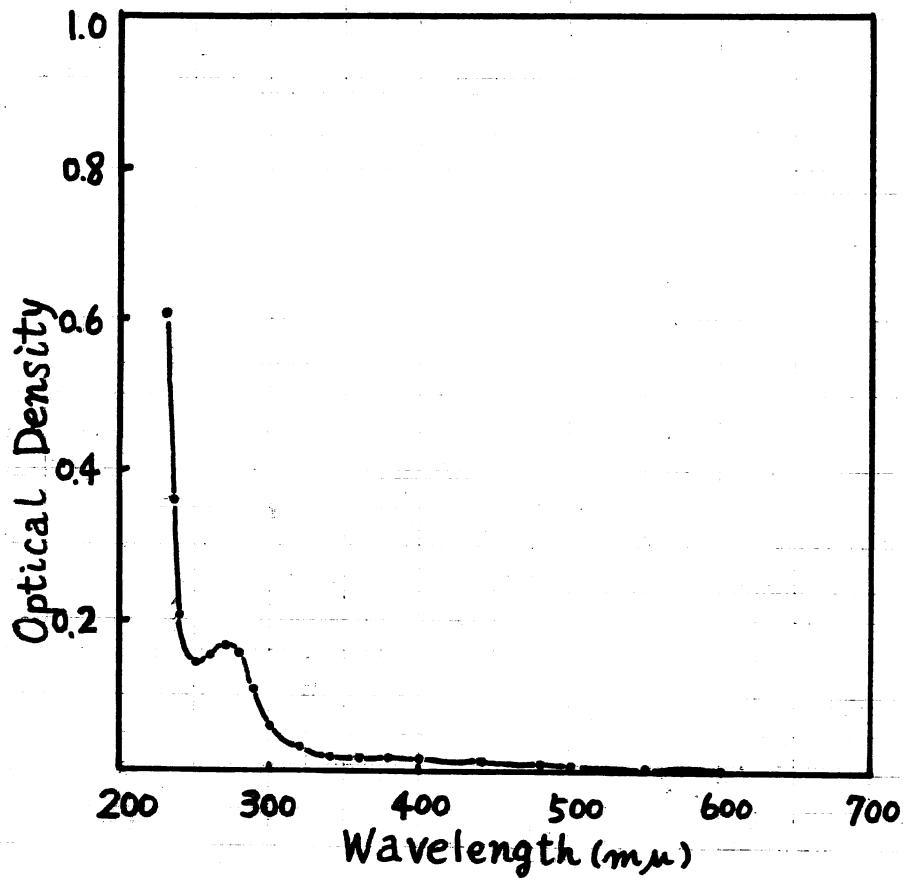
酵素の安定性

酵素は、氷室中で 1ヶ月にわたり 数 10% の活性を保つ。しかし
 凍結保存により著しく失活する。凍結融解のみでは失活しない。
 高温に対するかなりの安定性ある。(表-3)

表 -3 (次頁につづく)

Fig. 7

Absorption Spectrum of Purified Enzyme



Absorption spectrum was determined by Hitachi automatic spectrophotometer (model EPS-2U) H.O. (Ei, 5) fr. no 22

Effect of Various Conditions on Thiosulfate Reductase Activity

Conditions	μmoles $S\text{H}_2/5\text{ min}$	
Control (4°C)	194	(100)
Rapidly frozen and kept in deep-freezer for 5 hrs	8	(4)
Kept for 5 hrs in deep-freezer	11	(6)
Frozen-and-thawed (dry ice-acetone - 30°C water) $\times 5$	244	(126)
"	189	(97)
48°C 10 min	248	(127)
60°C 10 min	148	(76)
100°C 5 min	2	(1)

Enzyme preparation : DEAE fr. no 125 0.5 ml

pH による酵素活性の影響

測定法 a) より b) 2-IB および Tris-IB を用いて pH 4 ～ 3 ThR 活性の変化を測定した (Fig. 2)。測定法 b) 2-IB 反応中若干の pH のずれが認められるが、同一の反応液を pH 4-2-2-2-測定し $S_2\text{O}_4^{2-}$ を加えた直後の pH を 2.0 の pH とした。至適 pH は 7.5 ～ 8.0 である。これに反して SIR はやく酸性側に至適 pH をもつ。測定法 a)。ThR と SIR は同一の試料の値であり、測定法 b) では ThR の値とは別の試料による値である。

酵素阻害剤の影響

種々の阻害剤の ThR に対する影響を測定法 a) より b) により調べた (表-4)

O-SH 酵素阻害剤の影響。測定法 a) (HgCl₂) 2-阻害剤として CuSO₄ (10^{-3}M), HgCl₂ (10^{-5}M), ヨード酢酸 (10^{-2}M) 2-

Table - 4

Effects of Enzyme Inhibitors on Thiosulfate Reductase

Inhibitor	conc.(M)	ThR residual activity (%)		H ₂ ase residual activity (%)
		H ₂ Uptake (assay a)	S _{H₂} Evolution (assay b)	
pCMB	10 ⁻⁴	98	100	
Cu SO ₄	10 ⁻³	6	0	
	10 ⁻⁴	90	1	93
	10 ⁻⁵	95	84	
Hg Cl ₂	10 ⁻³	2	0	
	10 ⁻⁴	34	1	38
	10 ⁻⁵	51	3	
Na As O ₂	10 ⁻³	86	3	
I CH ₂ COOH	10 ⁻²	5	14	123 *
O=I Cl COOH	5·10 ⁻⁵	95~100	87	
KCN	10 ⁻³	77	6	
	10 ⁻⁴	102	29	
	10 ⁻⁵	54		
Na N ₃	10 ⁻²	107	70	
EDTA	10 ⁻²	82		
Phenanthroline	10 ⁻⁴	97	87	
α,α'-dipyridyl	5·10 ⁻⁴	90	92	

* H₂ase was inhibited by iodoacetate in the absence of hydrosulfite.

pCMB (10^{-4} M), ヨード安息香酸 ($5 \cdot 10^{-5}$ M), NaAsO_2 (10^{-3} M) などは阻害しない。一方、測定法 b) (SH₂ 発生) では、 CuSO_4 (10^{-4} M), HgCl_2 (10^{-5} M), ヨード酢酸 (10^{-2} M) の他に NaAsO_2 (10^{-3} M) も阻害される。H₂ 吸収の阻害をみると必ず阻害剤となる。 CuSO_4 (10^{-4} M) は Hase 活性を阻害しない。 HgCl_2 (10^{-4} M) は若干の阻害をあらわすが、その程度では Hase は THR 测定に十分の活性をもつ。しかし、ヨード酢酸では、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 選元反応がはいるときに還元型 Mv の色が消えてしまうことから、Hase を完全に阻害していると思われる。

(実験法) 述べた Hase 定量法では、ヨード酢酸では Hase の阻害はあらわれない。これは $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 濃液中の何かかヨード酢酸の阻害作用を妨害するからであろう。(したがって CuSO_4 , HgCl_2 による阻害は THR 自体が阻害をうけたと考へよいか ヨード酢酸による阻害は THR 自体ではなかろうかといふがわからぬ)。ヨード酢酸では SH₂ 発生も阻害をうけいる。しかし、ヨード酢酸が生成した SH₂ と反応するこも考へられる。 AsO_2^- による SH₂ 発生の阻害は、H₂ 吸収の阻害のみならぬこと考へて、生成した SH₂ を AsO_2^- が捕捉したものと考へられる。

一般に、-SH 阻害剤は $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ と反応して複合体を形成したり分解されたりする二通りある。³¹⁾ 又、SH₂ との反応も考へられる。

(したがって) [基質] >> [阻害剤] では 基質の活性は -SH が必須である。可逆的な阻害剤では 基質上 阻害剤がこなすことは、基質 -SH の活性に必要なくとも 基質上 阻害剤による阻害のみあらわれる。

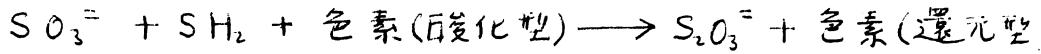
HgCl_2 では阻害がある。pCMB では阻害が認められないのは HgCl_2 では 非可逆的なメルカプタイト形成がおり、pCMB では $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ を添加しても 固定するような可逆的なメルカプタイト形成のみ

か? あるいは といふことを示していなかもしれぬ。しかし いずれにせよ SH 試薬と反応性のある物質を基質あるいは生成物とする酵素反応の阻害実験は、もとより精密な実験によらなければ、はつきりした結論は下せぬ。

- 金属結合阻害剤。KCN が SH_2 発生を阻害する ¹²⁴²。種々の金属酵素阻害剤が THR を阻害しない。CN⁻ が発生する SH_2 と反応するところが考えられる ⁹²。THR が金属活性性を必要とするところが如くは、今、とては認められぬ。

4才硫口液還元の逆反応

THR 標品が $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$ 還元の逆反応を触媒することを、次の系を組立てることにより確めた。



反応は普通の試験管を用い。反応液 5 ml は 22 a ものが含まれる、 Na_2S 25 μmoles, Na_2SO_3 5 μmoles, BV 5 μmoles, P.B (pH 7.5) 200 μmoles, 色素標品 (THR 4 単位)。反応は 37°C で行つ。反応後 [実験法] 12 往復、反応液中の $\text{S}_2\text{O}_3^{\pm}$, SO_3^{\pm} , S^{\pm} を定量した。(表-5)

Reverse

表-5

Back Reaction of Thiosulfate Reduction

System reaction time (min.)	Complete			-Enz	-S [±]	-SO ₃ [±]	-BV
	0	5	10	10	10	10	10
S [±] μmoles/ml	2.8 4.4	2.6 4.2	2.6 4.2	3.1 4.7	2.9 2.5	2.7 4.3	2.7 2.7
SO ₃ [±]	0.7	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.3
S ₂ O ₃ [±]	0.5	0.8	1.0	0.5	0.6	0.4	0.9

色素と共に BV を用いると、反応 12 より S^{\cdot} , SO_3^{\cdot} の減少と $S_2O_3^{2-}$ の生成が認められる。化学量論例 12 は、さきの BV 12-^{正反応} になく、これは S^{\cdot} , SO_3^{\cdot} の自動酸化や液相からの拡散、定量の固定などによるものと認められる。

電子受容体として BV を用いた反応系では、反応の進行と共に BV は還元され青色を呈してくれる。この還元による着色は 腐素あるいは S^{\cdot} を除いたときは全く起こらない。 SO_3^{\cdot} を除いた場合にはわずかに着色が起こる。腐素 12 混在する SiR 12 より SO_3^{\cdot} 還元の逆反応が起こるか、 S^{\cdot} 12 混在する SO_3^{\cdot} 12 より $S_2O_3^{2-}$ 還元が起こることと想われる。

亜硝化還元色素のうち、Methylene blue, Janus green 12, pH 7.5 12 あるいは SH_2 に還元される。それより電位の低い Phenosafranin, Neutral red, BV, MV 12 は SH_2 12 より還元されない。これら、12, BV 12 には S^{\cdot} と SO_3^{\cdot} , ThR 12 も還元はほとんど行なわれない。ThR の正反応 12 あるいは MV が ~~は~~ 電子供与体として一番活性が強かつて SH_2 に対し逆反応の BV 方が電子受容体となりやすくなる。BV が MV より亜硝化還元電位が高いためである。 (表-2)

4. 亜硫酸還元酵素を含まない才石硫酸還元酵素

2. 12 あるいは最終的に得られた最も比活性の高い才石 (hydroxyl apatite fr. no 22) 2-² わずかに SiR を含まれる。(Fig. 6)

SiR を含まない ThR を得るために 2. とは別の半導型を用いた。硫安分画 2-² を 2. と同様に行なう。P_{2O} を

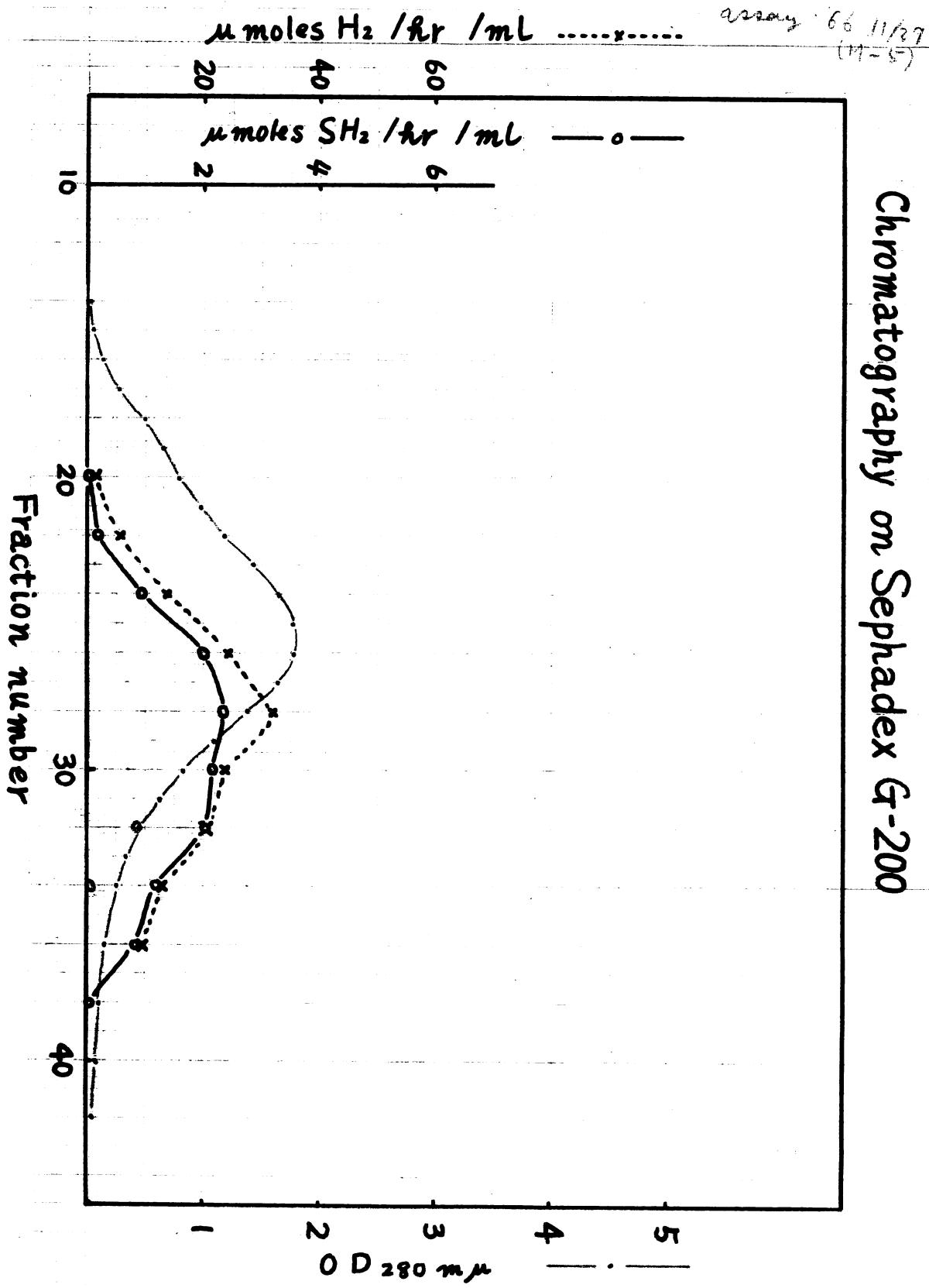
Sephadex G-200 のカラム (3×120 cm) で ゲル 滤過し、DEAE-cellulose カラム (3×33) で NaCl 濃度によると同様のソルベトグラフを行なう (Fig. 4)。ここで得られた THR 分を 再び Sephadex G-200 カラム (3×36) で ゲル 滤過する (Fig. 8)。ここで得られた標準 (G-200 fr. no 33) によると $S_2O_3^{\cdot}$ は Fig. 9 のよき如く進行し、 SO_3^{\cdot} は全く還元されないからである。

SiR を含まない THR が得られたことは THR と SiR との別々の酵素であることを示すものである。

<Fig 8>

<Fig 9>

Fig. 8



Chromatography on Sephadex G-200

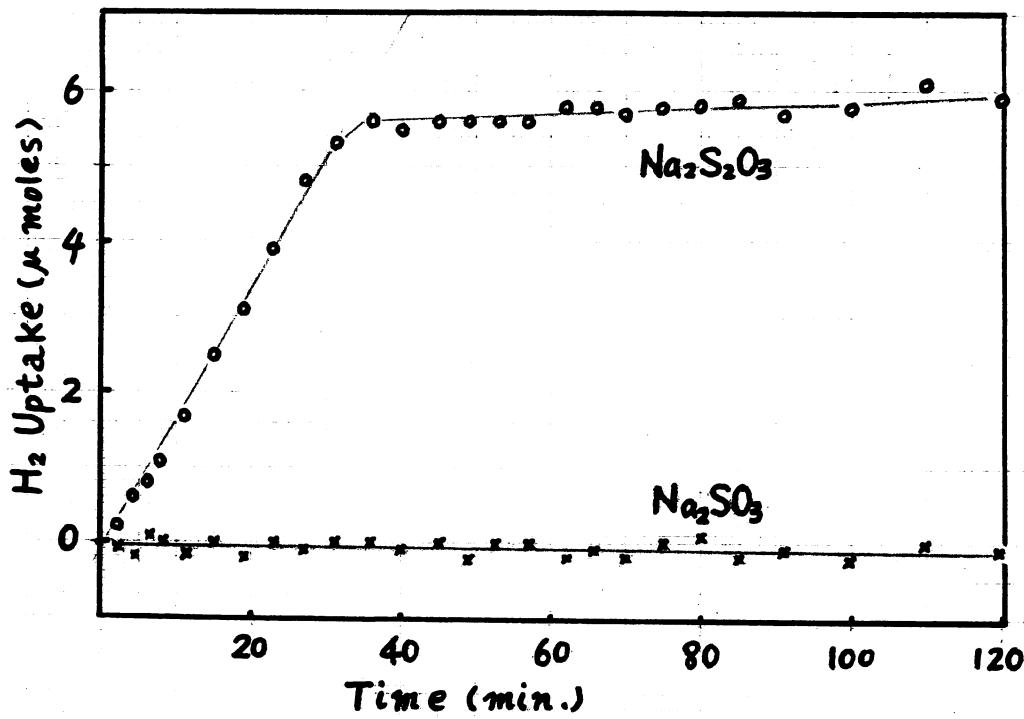
Fig. 9

P-2

Sephadex G-200 (Fig. 8)

E₁ 1.0 mg.

Reduction of $S_2O_3^{\cdot-}$ by Purified Enzyme



The standard assay (2) was used. Enzyme prep.

Sephadex G-200 (Fig. 8) (Fig. 8) 0.2 ml (6.7 ml · 0.346 × 0)
 $Na_2S_2O_3$ 5 μmoles or Na_2SO_3 5 μmoles were added to the reaction mixture as indicated,

[考 察]

酸化還元電位の低い電子伝達体を、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 1%より還元して電子供与体として、硫元素活性の測定に用いることは、亜硫酸還元、^{28), 29)} 硫酸還元硫元素 H_2asc ²⁴⁾ とすこにあてなわれていた。

硫酸還元、亜硫酸還元の還元 H_2asc とされ、イオウ代謝の硫元素をあつかう場合、 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ より半度のイオウ化合物が反応系に加わることになり、また他のつかない反応の活性に影響を与えることはことも考慮される。ここに考慮した THR 測定法は、簡便法としては十分使いうると思われる。少くともこの尚の硫元素では、SIR はこの測定にはほとんど影響しないようである。

THR の阻害剤特に SH 試葉による阻害実験では、基質、生成物と阻害剤との反応が妨害して、阻害剤の硫元素活性への作用がはつきりと結論づけられない。巷説、阻害剤の濃度比を変えて、系に加えし初期量を変える等の、より精密な実験が必要であろう。

ところが、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ は化学的に SH 基と反応しやすい。阻害実験で SH 硫元素であることを論づけることはできなかつて、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の関与する反応 SH 硫元素により触媒されると構成は十分考へられる。硫元素の THR につき、さうなる模式が提出され得る。

THR の生理的意義と a) $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の還元、b) $\text{S}^{\cdot}, \text{SO}_3^{\cdot}$ より $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の生成(還元)、二つに大別して考へよう。

a) SH_2 は、化学的 O_2 と接触すれば $\text{S}^{\cdot}, \text{SO}_3^{\cdot}$ を生じ、これとは容易に反応して $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の生成する。硫元素還元物の生成量はもこのよしな反応の常によく、かなりの量、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ が

環境に蓄積していると思われる。 $S_2O_3^{2-}$ 還元の生理的意義は、これらの $S_2O_3^{2-}$ を有機物酸化の電子受容体として使用し、エネルギーを得ることである。

6) 不硫磺還元菌では、 SO_4^{2-} , $S_2O_3^{2-}$ は SO_3^{2-} を至る最終的に SH_2 に還元される。これらの還元反応のうち、熱力学的にはエネルギー獲得が可能な段階は SO_3^{2-} の還元である。しかし用いた菌種では、 SO_4^{2-} は SO_3^{2-} を培養に用いても尚ほ生産しない SH_2 。塊地中で SO_3^{2-} の高濃度は存在するには尚、生産しない SH_2 であると認められる。后者の段階では、ATP と SO_4^{2-} が APS と生成する反応、スルフリラーゼか SO_3^{2-} の存在下では ATP の水分子解離



を触媒する ³²⁾ ことが示された。従って何らかの原因で SO_3^{2-} が高濃度に蓄積されたような場合に、 SH_2 の還元反応を触媒して一時的に SO_3^{2-} を H_2S により $S_2O_3^{2-}$ へと除くことか意味をもつてゐるのではないだろうか。

$S_2O_3^{2-}$ 還元、 SO_3^{2-} 還元のうち、亜硝化還元電位の有機物との大きな差があるのは SO_3^{2-} 還元、段階であり、この段階で亜硝化的リノ酸化が起こるといふことが考えられる。¹⁴⁾

Desulfovibrio gigas では、最近これが証明された。³³⁾ $S_2O_3^{2-}$ 還元の段階では電位から考へし亜硝化的リノ酸化は起こらないと思われる。

ところが、Mv を電子伝達体として精製した SDR は、他の成分を加えないと cyt c₃ から電子をうけ取ることからできず。⁶⁾ ThR では直接 cyt c₃ から電子をうけ取ることからできることである。

このことは、SiR12比べて ThR より簡単な反応素系であることを示している。反応素系の複雑さといふにせよ、酸化マリン酸化ヒカル比がどうとか、どうかなどと、非常に簡単に書かれます。

合

References Cited

- 1) F. EGAMI, M. ISHIMOTO & S. TANIGUCHI (1961): in "Haematin Enzymes", Pergamon Press, p. 392.
- 2) J. M. AKAGI & L. L. CAMPBELL (1962): *J. Bacteriol.*, 84, 1194.
- 3) M. ISHIMOTO (1959): *J. Biochem.*, 46, 105.
- 4) ————— & D. FUJIMOTO (1959): *Proc. Japan Acad.*, 35, 243.
- 5) ————— & ————— (1961): *J. Biochem.*, 50, 299.
- 6) ————— & T. YAGI (1961): *J. Biochem.*, 49, 103.
- 7) 石本真・小山次郎 (1953): 日本化学会誌, 74, 853.
- 8) ————— (1953): 日本化学会誌, 74, 903.
- 9) 石本真 (1954): 生物科学, 6, 7.
- 10) M. ISHIMOTO, J. KOYAMA, T. OMURA & Y. NAGAI (1954): *J. Biochem.*, 41, 53?
- 11) J. R. POSTGATE (1949): *Nature*, 164, 670
- 12) 石本真・小山次郎 (1954): 酵素化学シンポジウム, 10. 77.
- 13) M. ISHIMOTO, J. KOYAMA & Y. NAGAI (1955): *J. Biochem.*, 42, 41.
- 14) H. D. PECK (1960): *J. Biol. Chem.*, 235, 2734
- 15) M. ISHIMOTO, Y. KONDO, T. KAMEYAMA, T. YAGI & M. SHIRAKI (1958): *Proc. Int. Symp. on Enz. Chem.* 1957, p. 229.
- 16) M. ISHIMOTO, J. KOYAMA & Y. NAGAI (1954): *Bull. Chem. Soc. Japan*, 27, 565
- 17) A. KAJI & W. D. McELROY (1959): *J. Bacteriol.*, 77, 630.
- 18) M. KAWAKAMI, T. IIZUKA & S. MITSUHASHI (1957): *Japan J. Exptl. Med.*, 27, 317.
- 19) M. ARTMAN (1956): *J. Gen. Microbiol.*, 14, 315.
- 20) C. A. WOOLFOLK (1962): *J. Bacteriol.*, 84, 659.
- 21) J. R. POSTGATE (1966): *Bacteriol. Rev.*, 30, 732
 ^{& L. L. Campbell}
- 22) M. ISHIMOTO, J. KOYAMA, T. YAGI & M. SHIRAKI (1957): *J. Biochem.*, 44, 413.

- 23) M. ISHIMOTO & J. KOYAMA (1957): *J. Biochem.*, 44, 233.
- 24) N. TAMIYA, Y. KONDO, T. KAMEYAMA & S. AKABORI (1955): *J. Biochem.*, 42, 613.
- 25) 酶素研究法, 2巻, p. 774.
- 26) 実験化学講座, 23巻, p. 317.
- 27) A. KURTENACKER (1938): in "Analytische Chemie der Sauerstoff-säuren des Schwefels"
- 28) R.H. LOWE & H.J. EVANS (1964): *Biochim. Biophys. Acta*, 85, 377.
- 29) A. PANEQUE, F.F. DEL CAMPO, J.M. RAMIREZ & M. LOSADA (1965): *Biochim. Biophys. Acta*, 109, 79.
- 30) J.M. RAMIREZ, F.F. DEL CAMPO, A. PANEQUE & M. LOSADA (1966): *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 58.
- 31) P.A. TRUDINGER (1965): *J. Bacteriol.*, 89, 617.
- 32) L.G. WILSON & R.S. BANDURSKI (1958): *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 5576
- 33) H.D. PECK Jr (1966): *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 22, 112