- (2) 酵素分解前後の hydrocellulose の銅数比はそれらの試料の重量比と逆比例している。
- (3) 沃度数から推定すると重合度 8~12 の celloextrin が酵素液により分解された場合、分解前後の沃度数比も亦それら試料の重量比に逆比例している。
- (4) 以上の事実から我等は、cellulase は cellulose の長鎖をその末端から cellobiose の間隔をおいて逐次分解するものと推論する。

- (1) L. A. HILLER and E. PASCU: *Text. Research J.*, 16, 490 (1946).
- (2) W. GRASSMANN, L. ZECHMEISTER, G. TOTH und R. STADLER: *Ann.*, 503, 167 (1933).
- (3) 宮本三七郎, 西沢一俊: 陸軍獣医団報, 396, 778 (1942).
- (4) K. NISIZAWA, H. MATSUZAKI and A. HIGUCHI: *Symposia on Enzyme Chem.*, 4, 75 (1950); *Chem. Abst.* 46, 2096 (1952).
- (5) F. F. NORD and J. C. VITUCCI: *Advances in Enzymol.*, 8, 258 (1948).
- (6) H. PRINGSHEIM: *Z. physiol. Chem.*, 78, 266 (1912).
- (7) H. PRINGSHEIM und K. BAUER: *Z. physiol. Chem.*, 173, 188 (1928).
- (8) E. S. SEILLIERE. *Compt. rend. Soc. biol.*, 63, 515 (1907).

Summary

The investigation in the mode of the action of cellulose-splitting enzymes, by which polysaccharides having 1,4 β -glucosidic linkage are broken down finally to glucose, has been carried out. The results obtained are summarized as follows:

- (1) It was confirmed by measuring the reducing ability, the rotatory power and the R_F value, that the split sugar out of hydrocellulose by a cellulase solution freed from β -glucosidase and cellobiase was almost all cellobiose except very small amount of glucose, and moreover the cellobiose was isolated in crystalline form from the sugar solution.
- (2) The ratio of the copper numbers of different kinds of hydrocelluloses before and after the enzymic attack is almost inversely proportional to the weight ratio of these specimens.
- (3) The ratio of the iodine values and the weight of those different kinds of celloextrins before and after the enzymic break-down, which should be the degree of polymerization of 8-12, are also inversely proportional to each other.
- (4) In view of these results it is inferred that cellulase cuts off successively cellobiose from the end portions of the long chain of cellulose.

繊維素分解酵素に関する研究 (第3報)

Irpex lacteus に於ける cellulase の β -glucosidase との特異性限界

西 沢 一 俊, 小 林 敏 雄 (信州大学繊維学部化学研究室)

昭和 27 年 9 月 20 日 受理

Cellulose-splitting Enzymes. Part 3. Specificity Limit of Cellulase to β -Glucosidase in *Irpex lacteus*.

By Kazutosi NISIZAWA and Toshio KOBAYASHI (Chem. Labor., Facult. of Text. and Sericult., Shinshū Univ. Ueda)

Cellulose の酵素的な水解に就ては、少なくとも 1,4- β -glucosidic linkage のみからなる長鎖分子の場合には、この分子の cellulase による cellobiose への水解と、この糖の cellobiase による glucose への水解の 2 段階に於て行われる事は、従来の細菌⁽³⁾、糸状菌⁽¹⁾、麦芽⁽⁴⁾などに於ける研究並に我等の最近の木材腐朽菌に於ける研究⁽²⁾から明らかなことである。併し乍ら cellulase は基質の glucose 鎖が何の位短くなるまで作用し得るか、換言すれば cellulase の基質の最低重合度の限界問題に就ては、GRASSMANN, ZECHMEISTER 等⁽¹⁾の *Aspergillus oryzae* に於ける研究を除いては今日に至るも殆んど全く行われていない。彼等の実験に於ては大體 cellohexaose より長鎖のものは cellulase により、短鎖のものは cellobiase により水解されるという結果が得られた。

曩の実験に於て我等は *Irpex-cellulase* が 1,4- β -glucosidic linkage の cellulose 系基質に作用する際には、長鎖の末端から cellobiose を単位として逐次水解するという結論に到達した。従つて cellulose 水解は GRASSMANN, 等の実験に於けるが如く cellohexaose の段階に止まらず、更に進んで cellotetraose 或いは cellotriose となり、最後には全部 cellobiose 若しくは cellobiose 及び glucose となり得る可能性も考えられる。それ故に我等はこの点を追求し、cellulase の β -glucosidase 若しくは cellobiase との特異性限界を明確にする目的で、構造上 cellotriose に相当し且つ aglucone の定量が容易の *p*-nitrophenol- β -cellobioside に対する cellobiase 及び β -glucosidase を含まない *Irpex-cellulase* の水解能並に cellulase を含まない *Irpex*- β -glucosidase 及び β -cellobiase のこの cellobioside に対する作用を観察した。

実 験 の 部

[I] 基質及びその水溶液の濃度 Salicin, *p*-nitrophenol- β -glucoside (結晶水 1. mol, mp. 164°), Cellobiose, *p*-nitrophenol- β -cellobioside* は 0.0136 mol. の水溶液。Cellodextrin, C.M.C 即ち Cellulose-methylcarbonic acid の Na 塩は 1.1766% 水溶液。

[II] 酵素作用の条件並にその測定法 β -glucosidase (=cellobiase**) 並に cellulase の酵素作用を測定する場合には何れも基質水溶液 1, 0.1 mol. 醋酸緩衝液 2, 酵素液 1 の割合に混合し、適當の時間 30° 恒温槽中にて反応させた後、その 1 cc につき SCHAFER-HARTMANN 微量法により還元力を定量し、*p*-nitrophenol を aglucone とする基質の水解に於ては時としては反応液 1 cc 中の遊離 *p*-nitrophenol を普通の比色法に従い定量した。

[III] β -Glucosidase (cellobiase) 作用のない cellulase 溶液の調製 *Irpex lacteus* の培養液の濃縮透析液から β -glucosidase を除く方法として、我等は最初 Al-metaoxide の chromatography によつた

Table 1. Destruction of β -Glucosidase and Cellulase by Means of Alkali

Enzyme solution Substrate	Starting solution	Enzyme solutions exposed to pH 9.0 for				pH of the reaction mixture
		1 hr.	3 hrs.	5 hrs.	8 hrs.	
C.M.C	5.70	3.50	2.90	2.90	2.80	4.0
Cellodextrin	8.80	—	—	5.00	4.60	4.0
Cellobiose	2.10	0.20	0.10	0.0	0.0	4.8
Salicin	3.10	0.40	0.20	0.0	0.0	4.8

Note. Figures to each substrate show cc of N/200 thiosulphate solution in the determination of reducing sugar by SCHAFER-HARTMANN'S micromethod after 18 hrs.

9.0 にした酵素液に於ける時間に伴う β -glucosidase 並に cellulase の破壊状況を示したものである。

表中の各基質に対する数値は 18 hrs. 後に於ける N/200 thiosulphate 溶液の cc を示す。表により明らかな如く 5 時間放置のものは實際上全く β -glucosidase 作用がない。

[IV] β -Glucosidase (cellobiase) 作用のない二・三の cellulase 溶液による *p*-nitrophenol- β -cellobioside の水解 Table 1 に示した酵素原液及び 5, 8 時間 pH 9.0 にて放置した各酵素液並に 8 時間放置した

Table 2. Comparison of the Activities of Cellulase Solutions kept at pH 9.0 for Various Length of Time, toward *p*-Nitrophenol- β -cellobioside

Substrate	Enzyme solution	Starting solution	Enzyme solutions exposed to pH 9.0 during		Enzyme solution treated with Al-metaoxide after 8 hrs. exposure to pH 9.0	pH of the reaction mixture
			5 hrs.	8 hrs.		
<i>p</i> -Nitrophenol- β -cellobioside	Separated reducing sugar	cc	3.10	1.80	1.60	4.0
		%	40.4*	4.05†	36.1†	
	Separated aglucone	mg	0.103	0.085	0.0767	
		%††	21.8	18.0	16.3	
					0.80	
					20.0†	
					0.04	
					8.5	

Note. The figure with sign * show the split percentage of the reducing sugar, all of which was assumed to be only glucose by reason of the powerful activity of β -glucosidase. The figures with sign † and †† show respectively the split percentage of hollosidic and agluconic linkage.

* 合成並に諸性質についての記載：西沢一俊，若林和正：生化学，24，36 (1952)。

** *Irpex lacteus* に於ては β -glucosidase = cellobiase であると推定される。小林敏雄，若林和正，西沢一俊：信州大学繊維学部研究報告 第 2 号，102 (1952)。

酵素液に更に Al-methaoxide を加えて pH 3.5 にて攪拌吸着した酵素液に就き、それらの *p*-nitrophenol- β -cellobioside の水解能を検したところ第 2 表の如く、この cellobioside は原液には勿論、 β -glucosidase を含まないその他の酵素液によつてもよく水解されることが判つた。即ち表中の cc は反応液 1 cc 中の遊離還元糖に対応した *N*/200 thiosulphate の容積であり、mg は 1 cc 中の遊離 *p*-nitrophenol の量を示す。従つて原液に於ても共に後者の水解率（表中 ↑ 印）というのは同時に agluconic linkage の水解率をも示す。之に反し hollosidic linkage の水解率（表中 ↑ 印）は β -glucosidase を含む原液に於ては求められないが、それ以外の酵素液に於ては次のようにして求めた。即ち酵素反応の結果遊離した *p*-nitrophenol から之に対応する cellobiose の量を出し、更に sugar table によりこの糖に対応した *N*/200 thiosulphate の cc を求めれば、これはさきに定量の結果得られた全遊離還元糖に対する *N*/200 thiosulphate の cc と等しいか或いは大きい筈である。若しそれが後者より大きければ、その差は hollosidic linkage 切断のため生成された glucose に基因するものと考えねばならないので、その百分率は即ち hollosidic linkage の水解率を示すことになる。かくして第 2 表を更によく視ると、 β -glucosidase を含まない酵素液による holloside 及び aglucone 両結合の水解率は何れもこれらの酵素液の cellulase 作用と平行的関係を示している（Table 1 参照）、cellobioside の両結合の水解は共に cellulase により行われているものと思われる。然るに 原液に於ては前記の如く cellulase の外に β -glucosidase (=cellobiose) 作用が強くその上に [VI] の実験に於て明らかなように cellobioside は β -glucosidase によつても水解されるので、cellobioside は原液によつて早晚全部が glucose 及び *p*-nitrophenol となつて了う筈である。併し水解の途中生成されるであろう cellobiose など多少なりとも残存しているかも知れないので、agluconic linkage の水解率の方は前記の如く求められても hollosidic linkage のそれは正確に知ることは出来ない。それ故に原液に於ては還元糖の全部が glucose であると見做してその水解率を出した（表中の * 印）。

[V] Cellulase 作用のない β -glucosidase 溶液の調製 [IV] の実験に於て β -cellobioside は cellulase により水解を受けることが明らかにされたが、 β -glucosidase は果してこの cellobioside を水解するかどうか、又若しするとすれば如何様に行うか何うかなどの点を明確にするため、先ず cellulase を含まない β -glucosidase 標品の調製を試みた。即ち径 6 mm、長さ 58 cm の硝子管に活性 alumina を詰めて、その一方の端を吸引し乍ら他端から *Irpex lacteus* の人工培養液の濃縮透析液 100 cc を通過させた後、管を 4, 4, 5, 5, 10, 15, 15 cm の順に 7 区分に切断し、それぞれの内容物を 0.05 *N* アンモニア 15 cc に 30 分間溶出した。各溶出液を稀醋酸にて pH 5.0 にした後濾液と共に酵素力を検したところ Table 3 に示すような結果を得たが、No. 7 分別は實際上 cellulase を含まない β -glucosidase 溶液であると見做すことが出来る。

Table 3. Chromatographic Separation of β -Glucosidase from Cellulase with Active Alumina.

Substrate	pH of the reaction mixture	Reaction time hr.	Starting solution	Length of cut tubes and No. of adsorbates (after elution with 0.05 <i>N</i> -ammonia)							Filtrate
				4 cm 1	4 cm 2	5 cm 3	5 cm 4	10 cm 5	15 cm 6	15 cm 7	
C.M.C	4.0	21.5	—	3.70	3.00	2.90	2.50	2.00	1.30	0.0	0.0
		23.5	4.70	—	—	—	—	—	—	—	—
		41.5	—	4.60	3.90	3.50	3.30	2.80	2.00	0.0	0.0
Cellodextrin	4.0	19.0	—	—	—	—	—	—	—	0.10	—
		43.0	—	—	—	—	—	—	—	0.30	—
Cellobiose	4.8	19.0	—	—	—	—	—	—	—	1.00	—
		43.0	—	—	—	—	—	—	—	2.30	—
Salicin	4.8	21.5	—	1.20	0.0	0.0	0.0	0.30	1.20	1.50	0.50
		23.5	3.40	—	—	—	—	—	—	—	—
		41.5	—	2.20	0.20	0.0	0.10	0.80	2.60	3.10	0.80
<i>p</i> -Nitrophenol- β -glucoside	4.8	21.5	—	1.60	0.0	0.0	0.20	1.00	1.30	1.60	0.30
		41.5	—	3.30	0.20	0.0	0.60	2.40	2.80	3.50	0.70

[VI] Cellulase 作用のない β -glucosidase 溶液による *p*-nitrophenol- β -cellobioside の水解 Table 3 に於ける No. 7 液に *p*-nitrophenol- β -cellobioside を作用させたところ、Table 4 の如く非常によく水解する結果を得た。即ち 19 及び 43 時間反応させた後反応液 1 cc につきその中の生成還元糖及び遊離 aglucone を定量したが、何れも相当多量に生成されており、而も前者を cellobiose のみと見做すと後者の水解率から計

算した理論数の約 2 倍にもなるので、この還元糖の殆んど大部分は glucose であることが推測される。実際 Table 3 でも明らかなように No. 7 分別の酵素液は β -glucoside 並に cellobiose に対する強力な水解能を

Table 4. Break-Down of *p*-Nitrophenol- β -cellobioside by β -Glucosidase Separated Chromatographically from Cellulase by Means of Active Alumina.

Reaction time (hrs.)	<i>p</i> -Nitrophenol- β -cellobioside				Salicin	pH of the reaction mixture
	Reducing sugar (cc)	(%)	(mg)	(%)		
19	2.30	31.3*	—	—	1.45	4.8
43	3.50	44.7*	0.194	41.0**	3.15	

Note. The figures with sign * show the split percentage of the reducing sugar, all of which was assumed to be only glucose, in view of such activity of this β -glucosidase to both *p*-nitrophenol- β -glucoside and cellobiose as shown in Table 3. The figure with sign ** shows the percentage of the separated aglucone.

持つていることから、当然この推定が首肯される。かくして還元糖と aglucone の水解率を見ると大体のところ同じ位の数値を示しているの、このことから β -cellobioside は β -glucosidase により hollosidic linkage も agluconic linkage も大体同じ速度で水解されるものと思われる。

最後に、研究に当りいろいろと御指導賜わつた三輪知雄教授に深謝の意を表する。

総 括

Irpex lacteus の cellulase の β -glucosidase との基質水解に於ける特異性限界を明確にする目的でそれ等の酵素の *p*-nitrophenol- β -cellobioside に対する作用を観察したところ、この β -cellobioside は β -glucosidase により glucose と *p*-nitrophenol に水解されるが、cellulase によつてもよく水解されることが確認された。而してこの際 glucose + *p*-nitrophenol- β -glucoside 及び cellobiose + *p*-nitrophenol の如く水解されることが、反応液の還元力及び遊離 aglucone の定量から推定出来る。

- (1) W. GRASSMANN, L. ZECHMEISTER, G. TOTTH und R. STADLER : *Ann.*, 503, 167 (1933).
- (2) 西沢一俊, 小林敏雄 : 農化, 27, 239 (1953).
- (3) H. PRINGSHEIM : *Z. physiol. Chem.*, 78, 266 (1912).
- (4) H. PRINGSHEIM und K. BAUER : *Z. physiol. Chem.*, 173, 188 (1928).

Summary

The action of cellulase and β -glucosidase (=cellobiase) in *Irpex lacteus* upon *p*-nitrophenol- β -cellobioside was observed, in order to investigate the specificity limit in the splitting of their substrates. It was found by an estimation of the reducing sugar and the separated aglucone in the reaction mixture of each enzyme, that this β -cellobioside was split into glucose and *p*-nitrophenol by β -glucosidase and, moreover, it was also broken down by cellulase in such manners as glucose + *p*-nitrophenol- β -glucoside and cellobiose + *p*-nitrophenol.

Fusaric Acid の植物生育阻害作用の機構に関する研究 (第 6 報)

ポーログラフに依る Fusaric acid 並びにその類縁化合物の

Chelation の強さの測定並びに之等の作用の下に生育せし

めた生育途中の遊離金属イオンの減少に就て

玉利勤治郎, 加 治 順 (潟新大学農学部)

昭和 27 年 8 月 25 日 受理

Studies on the Mechanism of Injurious Action of Fusaric Acid on Plant Growth, a Metabolic Product of the Causative Mould of "Bakanae" disease of Rice Plant.

Part 6. Studies on the Measuring of Chelation Intensity of Fusaric acid and its Analogous Chelation Substances with Cu^{++} or Fe^{+++} by Polarographic Method.

By Kinjiro TAMARI and Jun KAJI (Fac. of Agr., Univ. of Niigata)

- (1) 著者等は前報⁽¹⁾に於て沃度加里法に依つて chelation の強さを測定したが、尙正確を期する為め此の