Aspergillus oryzae による アミラーゼの 生成に関する研究 (第 2 報)*

α -1,4-グルコシド結合に対する適応性 (補遺)

中村 幸彦, 菅原 四郎 (北海道大学農芸化学教室)

昭和 32 年 5 月 15 日 受 理

結 言

前報⁽¹⁾に於て *Asp. oryzae* によるアミラーゼの生成は澱粉, マルトース及びこれらの二, 三の誘導体を基質とした場合にのみ見られ, 従って α -1,4-グルコシド結合に対する適応的生成であり, *Asp. oryzae* の生育に必要な基質とアミラーゼの生成に必要な基質とは別個に考えられるべきことを報告した。

然し乍ら α -1,4-グルコシド結合を有しない糖, 例えばブドウ糖がこの酵素生成の炭素源となり得ることは既に認められているところであり^(2,3), 更には乳糖もまた生成効果を有すると云われる。

その後著者等もブドウ糖を炭素源とした場合, 糖消費の進んだ時期に於てアミラーゼが生成されることを認めた。そこで α -1,4-グルコシド結合に対する適応性が厳密なる意味に於て存在するものか否かを検討した結果, 再確認し得たので報告する。

実 験 の 部

実験方法 培養基の組成, 酵素の生成試験, 活性の測定及び還元力の測定等は前報⁽¹⁾に記載した通りである。ブドウ糖の影響を観察するための培地も炭素源以外の組成は同じである。マルトースの定量はパン酵母を用いる醸酵法によった⁽⁴⁾。糖のペーパークロマトグラフィーはブタノール-ピリジン-水 (6:4:3) による上昇法で行い, 発色はアニリン-フタル酸を用いた⁽⁵⁾。

実験結果並に考察 第 1 図は炭素源がブドウ糖の場合のアミラーゼ生成と糖の消費の関係を示したものである。ブドウ糖は各々 2%, 1% 及び 0.5% に於て比較した。第 1 図より明かな如くアミラーゼはブドウ糖の濃度の低いほど生成も速かであり, 且つ何れの場合に於てもブドウ糖が殆ど消費された頃に強い活性が認められる。

このようにブドウ糖を与えた場合にもアミラーゼの生成は明らかに認められたが酵素生成は糖消費の時期に関係のある事が知られた。そこで著者等はアミラーゼの生成が, その時期に生産された inducer による誘導であらうと推定し第 2 図に示した実験を行った。

即ち, 培養日数によるアミラーゼ活性

(Endogenous 及び Exogenous amylase) の変遷を追跡し, この事が inducer の存在量による事を予想して, この存在量を先ずアミラーゼ誘導力として求めた。この結果は第 2 図に於ける如く各培養日数で培地の誘導力に差があり, 然もこれが其時のアミラーゼ生成量を決定している事が分る。即ち例えばアミラーゼ誘導力は第 5 日目に於て最大であるが, アミラーゼ生成量は第 6 日目に最大 (Endo. amylase) の値を示している。これは第 5 日目の誘導力が実際に数量的結果として現われるのは第 6 日目に於ける酵素活性である。第 2 図はこの関係が平行的である事を示している (Exo. amy-

第 1 図 ブドウ糖を炭素源とする培地に於ける糖の消費とアミラーゼの生成

培養は 500 cc 三角フラスコに各 100 cc 宛。

—: アミラーゼ活性 : 残糖 (1 cc 中のブドウ糖 mg)

ブドウ糖濃度: ○=0.5%, ×=1%, □=2%

* Studies on the Formation of Amylase by *Aspergillus oryzae*. Part II. Adaptive Formation to α -1,4-Glucosidic Linkage. (Supplement)
By Yukihiko NAKAMURA and Shiro SUGAWARA (Department of Agricultural Chemistry, Hokkaido University)

第2図 培養日数によるアミラーゼ活性の変遷とアミラーゼ誘導力及びマルトースの生成

培養基のブドウ糖濃度は2%, Exo. amylase は培養液1cc, Endo. amylase は乾燥菌体より10ccの酢酸緩衝液(pH 5.0)で抽出したものの1ccを以て測定した。

アミラーゼ誘導力は培養液各50ccを20ccに濃縮して一度煮沸して酵素を殺し、グリセリンを炭素源として培養した菌体を用いる方法により生成されるアミラーゼの活性を測定したものである。

残糖は1cc中ブドウ糖mg, 生成マルトースは10cc中mg。

□---□ 残糖 ●---● 菌体量
●---● アミラーゼ誘導力 ×---× Endo. amylase
△---△ 生成マルトース ○---○ Exo. amylase

糖の定性を行った結果 $R_F \times 100 = 27$ でマルトースと一致するスポットを見出し、このスポット以外には糖反応を示すスポットは認められず、更に純粋なマルトースを添加した混合物を用いてもスポットの分離は認められなかった。又酸による純マルトース及び試料の加水分解に於て還元力の増加は略一致していた。更にオサゾン導き、その融点及び結晶形等からこの物質はマルトースである事を確認し得た。

マルトース生成量を測定した結果は第2図に示した通り、アミラーゼ誘導力と略一致している事が認められる。又本試料と純粋マルトースではアミラーゼ生成力に著しい差はなかった。

以上の実験結果よりブドウ糖のみを与えられた場合の *Asp. oryzae* によるアミラーゼの生成は、ブドウ糖が殆ど消費された時期にマルトースが生産され、アミラーゼ生成はこのマルトースによる誘導であると考えられる(マルトースはブドウ糖より合成される。これに関しては別に報告する⁽⁶⁾)。

即ち *Aspergillus oryzae* によるアミラーゼ生成は α -1,4-グルコシド結合に対する適応的生成である事を再確認し得たわけである。

要 約

- (1) *Aspergillus oryzae* はブドウ糖を炭素源とせる場合糖消費の進んだ時期にマルトースを生成する。
- (2) アミラーゼは生成したマルトースによる誘導で合成される事を明らかにし α -1,4-グルコシド結合に対する適応性について考察した。

lase は細胞で合成されたものから分泌したアミラーゼであると考えられるから誘導力と生成量との比較には考慮しなかった。

上記の結果と更に第2図の残糖量と誘導力等の関係をも併考して、ブドウ糖を炭素源とせる場合のアミラーゼ生成は inducer の出現による事は確実であり、次でこの分離確認を試みた。

即ち、ブドウ糖を2%与えた培地で5日間培養した汚液(約2l)を約200ccに濃縮しエタノールを70%(v/v)になるまで加え生ずる沈澱を遠心分離で除く。上澄からエタノールを溜去し100ccに濃縮する。これを吸着炭(武田製サギ印)20gのカラムを通してクロマトグラフを行った。吸着物より水、15%エタノール、30%エタノール、最後に1% NH_4OH を含む30%エタノールの順で各200cc宛を用い溶出を行い、各溶出液を15ccまで濃縮することによりエタノール及び NH_4OH を除去し、各フラクションのアミラーゼ生成効果を試験すると第1表の如き結果を得た。

即ち、inducer は15%エタノールで溶出される部分に集中されている。

次でこの部分につきペーパークロマトグラフによる

第1表 吸着炭クロマトグラフ後の各溶出部のアミラーゼ生成効果

(基質各2cc, 測定方法等は第2図と同じ)

溶 出 部	酵素活性
水	0.0
15% エタノール	5.6
30% エタノール	0.4
30% アムモニア性エタノール	0.2
吸着残液	0.0
対 照	0.2

(1) 中村幸彦, 菅原四郎: 北大農紀, Vol. 2, No. 3, 23 (1955).	(4) M. Somogyi: J. Biol. Chem., 119, 471 (1937).
(2) 福本寿一郎, 山本武彦: 酵素化学シンポジウム, 7, 3 (1952).	(5) A. Jeans et al.: Anal. Chem., 23, 3 (1951).
(3) L. E. Hokin: Biochem. J., 48, 320 (1951).	(6) 中村幸彦, 菅原四郎: 投稿中.

Aspergillus oryzae によるアミラーゼの 生成に関する研究 (第 3 報)*

アミラーゼ生成に及ぼすポリヌクレオチドの影響

中村 幸彦, 菅原 四郎 (北海道大学農芸化学教室)

昭和 32 年 5 月 15 日 受理

緒 言

蛋白質の生合成に核酸の存在或は co-synthesis が必要である事については多くの研究結果が報告されている。然し如何なる核酸が関与するか、又例えば適応酵素生成に於ける核酸の特異性等の問題については不明の所が多い。E. F. Gale 等は *Staphylococcus aureus* の超音波処理による broken cell を用いる実験により、カタラーゼ生成は用いた菌のリボ核酸 (RNA) が必要であるが、 β -ガラクトシダーゼの適応的生成に於てはプリン-ピリミジン混液を必要とし RNA では効果が認められず、従って適応酵素の生成には RNA の co-synthesis が関連するとしている^(1,2)。更に Gale 等⁽³⁾は同じ *Staphy. aureus* の RNA よりジ-及びトリ-ヌクレオチドがアミノ酸の incorporation に於ける特異性を観察している。

プリン、ピリミジンの同族体が微生物の適応酵素生成を阻害することは Spiegelman⁽⁴⁾, Pardee⁽⁵⁾, Chantrenne⁽⁶⁾ 等が報告しているが、外村等⁽⁷⁾は糸状菌アミラーゼの生成に於てプリン-ピリミジンは有効であるが、その同族体は阻害作用を示さないとしている。又 Reiner 等⁽⁸⁾は *E. coli* に於けるグルコキナーゼの誘導には適応した菌体のポリヌクレオチドが活性を有すると予想している。

著者等は *Asp. oryzae* のアミラーゼ生成に於てこの問題をとりあげた結果、アミラーゼ生成に適応した菌体から得られた核酸のみがアミラーゼ誘導に効果があり、且つこれを加水分解すると有効性を失うことからこの核酸は特異的なポリヌクレオチドと予想されるに至った。又種々のモノ-ヌクレオチドもアミラーゼ生成を増大せしめたが、これは菌体の増殖に及ぼす影響と考えられた。

実 験 結 果

1. 実験方法及び材料

核酸抽出のための培養はブドウ糖 5%, カゼイン酸加水分解物 0.5%, KCl 0.05%, $MgSO_4$ 0.05%, K_2HPO_4 0.1%, $FeSO_4$ 0.001% なる組成のものを用いた。核酸抽出は比較のためアミラーゼ生成に対し未適応及び適応の両者の場合について試みたが、未適応菌体は 30°, 72 時間培養し、適応菌体は 50 時間培養後、菌体を分離水洗、次でマルトース 2%, リン酸 M/50 (pH 6.8) を与えて約 15 時間培養した菌体を用いた。

酵母核酸は Clarke, Schryver 法⁽⁹⁾で抽出後 Osborne 法⁽¹⁰⁾で精製し更にクロロフォルム-ゲル法で除蛋白した。アデニル酸、グアニル酸及びシチジル酸は酵母核酸より分離した。

アミラーゼ生成試験に用いる菌体の培養、酵素生成試験、活性の測定等は前報⁽¹¹⁾の通りである。

2. 麹菌より核酸の分離調製

核酸の抽出は、はじめ麹菌体を分離水洗して硝子粉末若しくは砂と共に磨砕液化せしめクエン酸ソーダ (M/10) を含む 2 M-NaCl で抽出を試みたが活性を有するポリヌクレオチドの分離は成功しなかった。一度磨砕した菌

* Studies on the Formation of Amylase by *Aspergillus oryzae*. Part III. The effects of Polynucleotide on the Amylase Formation.
By YUKIHIKO NAKAMURA and SHIRO SUGAWARA (Department of Agricultural Chemistry, Hokkaido University)