細菌サッカラーゼに関する研究 (第13報)*

結晶サッカラーゼの酵素化学的諸性質

根 来 秀 夫 (大阪市立工業研究所)

昭和 31 年 10 月 1 日 受理

サッカラーゼは基質が簡単で且活性度の測定が容易な為、酵素反応の研究材料として古くから極めて多数の研究が行われ、酵素の作用機作、動力学等の根本的な面で貢献した所が甚だ多い。しかし乍らこれらの研究は何れも未だかなり不純と考えられる酵素標品について行われたものであり、その活性構造については未だ推論^(1,2)の域を出ない。著者は既報⁽³⁾の如く *Bac. subtilis* var. *saccharolyticus* n. sp. のサッカラーゼを結晶状に得ることに成功し、この標品の化学的性状及びその他の諸性質からその本態は蛋白体と多糖類の複合体であり、サッカラーゼの安定性及びその作用に対して多糖類区分が深く関与していると推論するに至ったが、更にこの多糖類区分が酵素活性に必須であるかどうかを確かめるために多糖類区分と反応する種々の試薬のサッカラーゼ作用に対する影響を検討し、作用機作の面からそれらの関係を考察した。

又細菌サッカラーゼの酵素化学的性質については従来殆んど知られていないので、酵母サッカラーゼと比較対照し乍ら若干の性質を吟味した。

実 験 の 部

実験方法

- (1) サッカラーゼ活性度の測定法：既報^(4,5)の方法によった。
- (2) 本菌の適応細胞多糖類、酵母多糖類及びペクチンの調製法はそれぞれ本研究第4報⁽⁶⁾、第5報⁽⁷⁾及び第11報⁽⁸⁾に記述した如くである。

I. 酵素化学的性質の概要

このサッカラーゼの酵素化学的性質についてはある程度精製した標品を対象として既に一応吟味したが⁽⁴⁾、今回結晶標品或いは殆んど純粋と考えられる標品について再検討を加えた。

先ず酵素作用と温度或いは pH の関係をみると crude の場合と同じく最適温度は 40°, 最適 pH は 7 にあることが認められた。その一例を示せば第1図及び第2図の如くである。

第1図 酵素作用と pH の関係

実験条件：精製酵素液 2 cc, 緩衝液 2 cc, 2% 蔗糖液 4 cc の配合で 40° に 30 分間作用させ生成せる転化糖量を micro Bertrand 法により測定し酵素活性を比較した。なお使用した緩衝液は次の通りである。

pH 3~5...Michaelis の酢酸-酢酸ソーダ pH 6~8...Sørensen の磷酸緩衝液
pH 9...Sørensen のグリコール苛性ソーダ

第2図 酵素作用と温度の関係

又 pH と安定性及び耐熱性について吟味した結果各種 pH に対する安定性は未だかなり不純な標品と大差を認めないが耐熱性が著しく増大していることが認められた (第3図, 第4図)。

* Studies on Bacterial Saccharase. Part XIII. Some Enzymic Properties of the Crystalline Preparations

By Hideo NEGORO (Osaka Municipal Technical Research Institute)

第3図 pH と 安定度

第1表 安定性に対する適応細胞多糖類の影響

適応細胞多糖類	処理条件	酵素力		
		無処理	55°, 10分	65°, 10分
0		8.90(100%)	6.75(76%)	1.4(15.7%)
2 mg		8.90(")	8.75(98.5%)	5.0(56.2%)
4 mg		8.90(")	8.75(")	5.8(65%)

第2表 安定性に対する酵母多糖類の影響

酵母多糖類	処理条件	酵素力	
		無処理	65°, 10分間
0		9.2(100%)	1.1(12%)
2 mg		" (")	1.2(13%)
3 mg		" (")	" (")
4 mg		" (")	" (")

第3表 安定性に対するペクチンの影響

ペクチン	処理条件	酵素力	
		無処理	65°, 10分間
0		9.2(100%)	1.2(13%)
2 mg		" (")	4.7(51%)
3 mg		" (")	7.2(78%)
4 mg		" (")	7.4(80.5%)

た結果、この菌の適応細胞多糖類は安定性を増大するが、酵母多糖類は殆んど影響を与えないことと、ペクチンは安定性を増大することが認められた。その一例を示せば第1~3表の如くである。

II. サッカラーゼ作用に対する carbonyl 試薬の影響

酵母サッカラーゼの作用は各種の carbonyl 試薬或いは KCN, NaHSO₃ 等によって阻害されるが、HCHO 等が共存するとそれらの阻害は全く認められない。Myrbäck⁽¹⁾ 等はこれらの阻害機構を追究しサッカラーゼの作用基は遊離のアルデヒド基であろうと推論している。

そこで本菌のサッカラーゼについて同様の実験を試みた。先ず混在する不純物（主として多糖類区分）の影響をさけるために殆んど純粋と考えられる酵素標品の一定稀釈液に下記の配合で、フェニールヒドラジンを終末 1/800 モル、1/400 モル及び 1/200 モルになる如くに加え常温に2時間 incubate した後、フェニールヒドラジンとそれぞれ等モルの HCHO を加えて更に2時間 incubate し一定量に稀釈し酵素活性を測定した。なお対照としてフェニールヒドラジン無添加の場合の酵素力を求め阻害度を算定した。その結果は第5図の如くである。

次に同様な実験を NH₂OH について行った。即ち下記の配合で NH₂OH を終末 1/3000 モル、1/1500 モル、1/600 モル、1/300 モル及び 1/150 モルになる如くに加え常温に2時間 incubate した後各区分について酵素活性を求めた。なお本菌の細胞多糖類 1 mg を共存した場合について比較した。

第4図 温度と安定性

1. 結晶標品
2. 粗製標品(4)
3. 部分的に精製した標品(3)
(タンニン酸沈澱後アセトン分画沈澱)

pH と安定度：稀 HCl, 稀 NaOH で各 pH に調整して 50° に 10 分処理後夫々 pH 7.0 (Sørensen の磷酸緩衝液) にて活性度を求めた。

温度と安定性：45, 50, 55, 60, 65, 70, 75° の各温度に 10 分間処理して未処理と比較した。

実験条件は第1図及び第2図の場合と同様である。

しかしタンニン酸で沈澱させた後アセトンで分画沈澱してかなり高度に精製した標品は、結晶標品よりも耐熱性ははるかに低く、又粗製品よりもかえって耐熱性が低い。これらの結果からここに得た結晶標品は Alkyl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride との塩類になっているために耐熱性が高くなっているであろうと推察される⁽³⁾。

次に酵母サッカラーゼが所謂 yeast gum によって安定性を増大すると報ぜられているので、このサッカラーゼの安定性に対する各種の多糖類の影響を検討し

第 5 図 フェニールヒドラジンによるサッカラーゼ作用の阻害

1. フェニールヒドラジン添加

2. フェニールヒドラジン+フォルマリン添加

配合 サッカラーゼ 10cc } 全量
フェニールヒドラジン塩酸塩 10cc }
燐酸緩衝液(1/15 モル, pH7) 10cc }
水 40cc }

この結果サッカラーゼの作用はフェニールヒドラジン, NH_2OH 等によって阻害されるが, HCHO , 本菌の適応細胞多糖類が共存すると阻害は認められない。

III. Borate の影響

Borate が各種の糖類と化合し, その為に coenzyme I, II 或いは riboflavin phosphate, VB_{12} 等の生理的作用が阻害される事実に着目して, サッカラーゼ作用に対する Borate の影響を検討した結果, 著しく阻害する

第 7 図 Borate 及び細胞多糖類の影響 (I)

実験条件: 酵素液 2cc, 1/10 モル燐酸-燐砂緩衝液 (pH 7.0) 2cc (対照は水 2cc), 本菌の適応細胞多糖類 (無添加の場合及び 4~40 mg を加えた場合), 1/10 モル燐酸緩衝液 (pH 7.0) 4cc に水を加えて全量を 30cc とし, 常温で 2 時間 incubate 後各区分について酵素活性を測定し阻害度を算定した。

第 9 図 サッカラーゼ作用に対する Borate 及び NH_2OH の競り合い阻害

1. NH_2OH 添加 2. NH_2OH 無添加

実験条件: 酵素液 2cc }
1/100 モル $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 0, 4cc } 全量
1/15 モル燐酸緩衝液 (pH 7) 2cc }
1/10 モル燐酸緩衝液 (pH 7) 2cc }
水 18cc }

上記の如く Borate 濃度を終末 1/180 モル~1/18 モルになる様に配合し, 常温に 2 時間 incubate 後それぞれ酵素活性を求め阻害度を算定した。

第 6 図

1. NH_2OH

2. NH_2OH +細胞多糖類

配合 サッカラーゼ 2cc } 全量
 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 2cc }
燐酸緩衝液(1/15 モル, pH 6) 2cc }
細胞多糖類 1mg }

第 8 図 Borate 及び細胞多糖類の影響

1. 多糖類無添加

2. 多糖類 20 mg 添加

3. 多糖類 40 mg 添加

実験条件: 第 7 図の条件で Borate の量を終末 0.01~0.034 モルになる様に配合し阻害度を求めた。また本菌の細胞多糖類 20mg 或いは 40mg を共存させた場合についても試験した。

ことが認められたので, この阻害が細胞多糖類の共存によって相殺されるか否かを試験した。先ず Borate の濃度を終末 M/150 としてこれに種々の量の多糖類を添加した場合についてみると第 7 図の如くなる。

次に Borate の添加量を種々に変えた場合についてみると第 8 図の如くなる。

この結果適応細胞多糖類は Borate の阻害作用をかなり顕著に打消すことが認められた。

これらの結果から Borate はサッカラーゼの多糖類区分と反応して阻害すると想像されるので, carbonyl 試薬 (NH_2OH) と併用添加して酵素作用に対する影響をみると第 9 図の如くなる。

この事から Borate と NH_2OH はサッカラーゼの作用を競り合い的に阻害している様に見受けられるが, なおその阻害機構を追究して明らかにしたい。

第 10 図 基質濃度と Borate 阻害率

1. 蔗糖 1% 2. 蔗糖 2% 3. 蔗糖 4%

実験条件：酵素液 (1/10 モル, pH 7) 2cc
 磷酸緩衝液 (4% 2cc, 8% 2cc, 16% 2cc) 2cc
 蔗糖液 (1/10 モル 磷酸緩衝液 (2cc, 1cc, 0.5cc, 0) 0, 1cc, 1.5cc, 2cc) 全量 8cc
 水

蔗糖の終末濃度 1%, 2% 及び 4% の作用液において Borate の添加量と阻害率との関係を見た。

第 11 図 基質濃度と NH_2OH 阻害率

1. 蔗糖 1% 2. 蔗糖 2% 3. 蔗糖 4%

実験条件：酵素液 (1/10 モル, pH 7) 1cc
 磷酸緩衝液 (8% 1cc, 16% 1cc, 32% 1cc) 1cc
 蔗糖液 (1/40 モル $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (3.2cc, 2cc, 1.6cc, 1.2cc, 0.8cc, 0.4cc) 0.8cc, 2cc, 2.4cc, 2.8cc, 3.2cc, 3.6cc) 全量 8cc
 水

蔗糖 1%, 2% 及び 4% の作用液で NH_2OH 添加量 (終末濃度 1/100 モル ~ 1/800 モル) と阻害率の関係を見た。

次に NH_2OH 及び Borate の阻害度と基質濃度との関係を検討した結果、これらの阻害は蔗糖濃度が高くなるに従って減少することが認められた。その一例を示せば第 10 図、第 11 図の如くなる。

総 括

結晶サッカラーゼの酵素作用と pH 及び温度の関係ならびにその安定性を増大する諸因子を検討した。

又このサッカラーゼの作用は各種の carbonyl 試薬或いは Borate 等によって阻害されるが、本菌の適応細胞多糖類が共存するとそれらの阻害は殆んど認められないこと、基質濃度が高くなるに従い阻害度が減少することを明らかにした。これらの阻害機構から多糖類区分も酵素活性に関与している様に見受けられるが、現在の段階では必須であるとは断定出来ない。

終りに臨み本研究を指示され終始御懇篤なる御指導を賜った当研究所化学第四課長福本寿一郎博士に厚く感謝致します。又本研究の一部に協力された平野幸夫君に謝意を表します。

(1) K. Myrbäck : *Zeit. Physiol. Chem.*, 158, 160 (1926).

(2) I. W. Sizer : *Science*, 108, 335 (1948).

(3) 根来秀夫 : 本誌, 31, 253 (1957).

(4) 根来秀夫, 福本寿一郎 : 科学と工業, 28,

292 (1954).

(5) 根来秀夫 : 本誌, 31, 153 (1957).

(6) 根来秀夫 : 科学と工業, 29, 286 (1955).

(7) 根来秀夫 : 科学と工業, 30, 142 (1956).

(8) 根来秀夫 : 本誌, 31, 312 (1957).