糸状菌のデキストラン分解酵素について (第 3 報)*

Michaelis 恒数及びその基質分子量による変化**

小 林 恒 夫 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 31 年 12 月 26 日 受理

糸状菌の dextranase によるデキストランの分解は、ある程度の分解率に達すると實際上反応が停止して、完全分解に達しない。この見かけの分解限度は酵素量の多少によっても変化するので、デキストランの構造上の特殊性、或いは反応の平衡などに由来するものとは考え難い。著者⁽¹⁾はさきにこの理由として、デキストランがある程度分解されて分子量が小さくなると、酵素の親和力が減少するために殆んど分解が行われなくなるという可能性を述べておいた。その後著者は dextranase 反応についての Michaelis 恒数を種々の分子量のデキストランを基質として測定したところ、この値が基質デキストランの分子量の低下と共に増大することを見出した。すなわち K_{SM} (基質のモル濃度であらわした Michaelis 恒数) は平均分子量 66,000 のデキストランについて 6.4×10^{-6} , 分子量 43,000 のものについて 4.4×10^{-5} , 分子量 17,000 のものについて 1.3×10^{-4} なる値を得た。この結果は基質分子量が減少すると共に酵素の親和力が急激に減少することに相当しており、dextranase 反応において基質デキストランが分解されるに従って以後の分解を受け難いものになることを示している。従って dextranase によるデキストラン分解に見かけの分解限度があらわれる理由の大部分はこの事実に帰し得るものと考えられる。

実 験 及 び 結 果

デキストラン分解の限界及び分解中間物に対する酵素の分解力の減少

上述の如く、糸状菌の dextranase によるデキストランの分解は通常の場合 60% 以上の分解率の或る点において實際上停止する。これが反応の平衡に由来するものか、デキストランの構造上の特殊性によるものか、或いは他の原因によるかを判定するため、酵素量を変え、又分解中間物に新たに酵素を加える等の試験を行った。その中の 1 例を以下に示す。

1% デキストラン溶液 100 cc, pH 5.8 の 0.1N 酢酸塩緩衝液 10 cc の混合液に *P. funiculosum* の培養濾液 40 cc を酵素液として添加して 30° で作用させた所、24 時間後約 70% の分解率に達して作用が停止した(第 1 図, 曲線 a)。これと同じ組成の反応液を 1 時間後、及び 2 時間後に煮沸して酵素作用を止め、あらためてその 20 cc に対して新たに酵素液 2 cc ずつを添加して作用させたが曲線 a に比してはるかに分解は緩徐であった

(第 1 図, 曲線 b 及び c)。

第 1 図 Dextranase によるデキストラン分解限度

a. 反応液組成: 1% デキストラン溶液 100 cc + 0.1N 酢酸塩緩衝液 (pH 5.8) 10 cc + 酵素液 40 cc.

b 及び c は a と同じものを矢印の点で作用を止め、改めて同じ酵素液を加えたもの。

d は a と同じものを矢印の点で作用を止め、濃縮酵素液を加えたもの。

従ってデキストランはある程度分解されると次第に分解され難い形になることがわかるが、これも酵素量を増せば更に分解される。すなわち a と同じ組成の反応液を 3 時間後に作用を止め、その 20 cc につき原酵素液からアセトン 75% で沈澱させ原容の 1/5 容の水に溶解して濃厚にした酵素液 2 cc を添加したところ、反応は a の場合より進んで 70% 以上の分解率に達した(第 1 図, 曲線 d)。

この結果から、デキストランの分解限度は一定しているものでなく、すなわちデキストラン自体の構造の特殊性によるものでなく、又可逆反応の平衡に原因するものでもないことが理解される。そしてこの分解限度が酵素量によって変化することから、ある程度分解

* Dextran-destroying Enzyme of Molds. Part III. The Michaelis Constant for Dextranase-Dextran System and Its Variation with Molecular Weight of the Substrate.

By Tsuneo KOBAYASHI (Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo)

** デキストランに関する研究 第 6 報 (Studies on Dextran. Part VI.)

を受けた基質に対して酵素が作用しがたくなることが予想される。この点を実証するためには、次に述べる酵素-基質複合体の見かけの解離恒数、すなわち Michaelis 恒数の測定が必要であった。

2. Michaelis 恒数の測定

i) 基質：はじめに酵素で分解していないデキストランについて測定した。このデキストランの平均重合度は後述のように粘度法によって 66,000 と測定された。

ii) 酵素液：前報^(1,2)と同様にして得た *P. funiculosum* の培養濾液からアセトン 75% による沈澱を行って精製した酵素を使用した。

iii) 実験条件の決定：この測定には反応の初速度と酵素量とが比例するような条件、すなわち零次反応的に進行する条件を見出すことが必要である。種々検討した結果、1% デキストラン溶液 10 cc から 30° で 10 分間に 1.75 mg 以内のイソマルトースを生ずる酵素量を用いればこの条件が満足されることを見たので、この条件下において以下の測定を行った。

iv) 反応初速度と基質濃度との関係：種々の濃度の基質溶液 10 cc を 30° に保ち、別に適当量の酵素液と 0.1 N 酢酸塩緩衝液 (pH 5.8) 1 cc を混じて水で 5 cc に希釈したものを用意し、両者を 30° で混合して反応を開始させる。反応開始時、10 分後及び 20 分後に 1 乃至 2 cc の反応液を採取し、Hanes 法によって還元糖を定量して二糖類として計算する。反応液 2 cc 中に 10 分間に生成したイソマルトース量 (mg) を以て反応初速度をあらわした。

種々の濃度のデキストラン溶液に対して同一量の酵素を加えて反応初速度を測定した結果は第 2 図曲線 (1) の如くである。

v) Lineweaver-Burk 法による Michaelis 恒数の決定：反応初速度 V と Michaelis 恒数 K_S との関係は

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_S + [S]} \quad \text{であらわされる。}$$

ここに $V_{\max}$ は基質濃度が充分大なるときの最大速度、 $[S]$ は基質濃度である。恒数 K_S は酵素-基質複合体の見かけの解離恒数であり、 $V = V_{\max}/2$ なるときの $[S]$ として求められる。しかし第 2 図から $V_{\max}$ の判定は困難であるので、次の Lineweaver-Burk 式⁽³⁾を適用して K_S を求めた。

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_S}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

すなわち $1/[S]$ に対する $1/V$ の変化をグラフに盛ると直線となり、その勾配は $K_S/V_{\max}$ であり、縦軸を切る点が $1/V_{\max}$ に相当する。

結果は第 3 図 (1) の如くになり、 $K_{S\%}$ (基質濃度を % であらわした K_S) として 4.2×10^{-2} なる値を得た。

3. 部分分解デキストランの調製とその分子量測定

基質の分子量の大小による Michaelis 恒数の変化を実測するために、デキストランを酵素である程度分解したものを調製し、その平均分子量を測定した。

i) 部分分解デキストランの調製：デキストラン 25 g を水に溶かして 500 cc となし、これに *P. funiculosum* の 10 日培養濾液 50 cc 及び 0.1 N 酢酸塩緩衝液 (pH 5.8) 50 cc を加え、水で全量 750 cc として 30° に保つ。30 分反応させた後、反応液半量をとって 100° に 5 分間加熱して酵素作用を止め、直ちに 3 倍量のエタノール中に投じて沈澱させ一昼夜放置する。反応液の残部は 2 時間反応させた後同様に処理する。

ここに生じた餅状の沈澱を乳鉢中で無水エタノールと共に磨砕し、遠心分離後多量の無水エタノールと共に 30 分還流煮沸してアルコール可溶物を除去し、ガラスフィルターで濾別後真空デシケーター中で乾燥して白色粉末を得る。収量は 30 分分解物 10.8 g, 2 時間分解物 11.0 g であった。

ii) 粘度法による平均分子量の測定：上記の部分分解デキストラン及び原デキストランについて粘度法によって平均分子量を測定した。30° ± 0.01° の恒温水槽中で水溶液について Ostwald 型粘度計を用いて粘度を測定

第 1 表 デキストランの粘度と平均分子量

	Intrinsic viscosity [η]	数平均分子量 M_N
原デキストラン	0.308	66,000
30分分解デキストラン	0.243	43,000
2時間分解デキストラン	0.150	17,000

し、Arrhenius-Duclaux の関係⁽⁴⁾を用いて極限粘度 (intrinsic viscosity, [η]) を求めた。この値をデキストランの粘度について Wolff 等⁽⁵⁾の提出した次式に代入して数平均分子量 M_N を算出した。

第 2 図 反応初速度と基質濃度の関係

曲線 (1) : 平均分子量 66,000 のデキストラン
 (2) : " 43,000 "
 (3) : " 17,000 "
 30°, pH 5.8

但し曲線 (1) に用いた酵素は (2) 及び (3) に用いたものと活性が異なる。

第 3 図 Dextranase 反応の $1/V$ と $1/[S]$ の関係
 曲線上の数字は第 2 図に同じ。

$$[\eta] = 8.85 \times 10^{-4} M_N^{0.528}$$

結果は第 1 表の如くであった。

4. 部分分解デキストランについての Michaelis 恒数の測定

前項に得た部分分解デキストランについて、2 項に述べたと全く同様にして dextranase による分解の初速度と基質濃度との関係を求め、Michaelis 恒数を測定した。

結果は第 2 図及び第 3 図の曲線 (2) 及び (3) に示す如くであり、 $K_S\%$ として 30 分分解デキストランについて 1.9×10^{-1} 、2 時間分解デキストランについて 2.2×10^{-1} の値を得た。

考 察

上の実験によって求められた dextranase 反応の Michaelis 恒数を基質の平均分子量と対応して示せば第 2 表の如くであり、基質デキストランの分子量の減少と共に Michaelis 恒数が増加することを明らかに認めることができる。上の実験では基質濃度として % をとって $K_S\%$ を求めたのであるが、基質の分子量が測定してあるから

第 2 表 デキストランの平均分子量と Michaelis 恒数及び親和恒数との関係

	平均分子量 M_N	$K_S\%$	K_{SM}	親和恒数 $K_m (=1/K_S\%)$
原デキストラン	66,000	4.2×10^{-2}	6.4×10^{-6}	24
30 分分解デキストラン	43,000	1.9×10^{-1}	4.4×10^{-5}	5.3
2 時間分解デキストラン	17,000	2.2×10^{-1}	1.3×10^{-4}	4.5

ば種々の基質に対する同一酵素の親和力を比較し得る数値、すなわち親和恒数 (affinity constant) を得る。第 2 表にみられるように、基質の分子量が小さくなるに従って酵素の親和力は著しく減少することを示している。

一般に dextranase 反応の如く高分子物質の酵素的分解においては、基質は常に一定のものでなく、分解が進むにつれて基質は次第に分子量の小さなものとなる。従って反応の各段階における速度は、それぞれの段階に存在する基質に対する酵素-基質複合体の生成速度によって支配せられる。上に得られた如く、基質分子量が小になると Michaelis 恒数が増大するという結果は、分解が進むに従って基質の分子量が減少すると基質酵素間の親和力が減少することを意味する。これはすなわち酵素-基質複合体の生成速度が減少し、従って反応速度が遅くなることに他ならない。ある程度分解が進み、残存基質に対する酵素の親和力が 0 に近づけば、もはや殆ど酵素は作用しなくなるわけである。しかしこの段階でも酵素が多量にある場合には酵素-基質複合体は幾分生成されて反応は更に進行する。従ってこのような種類の酵素反応では分解率は酵素量によって変化することになる。

尚上のような現象はアミラーゼについても一部予想せられており⁽⁶⁾、一般に高分子物質の酵素的分解に際して常に考慮すべきことと考えられるが、本報のように明確にされた例は余り知られていない。

かくの如く、dextranase によるデキストランの分解が 100% に達せず、ある分解率に達した後實際上停止する現象は、基質の重合度の減少に伴う酵素-基質間の親和力の減少によって大部分説明し得るものと考えられる。しかしもう一つの可能性として、dextranase が自己のデキストラン分解作用で生じた生成物によって阻害

を受けることも考慮する必要がある。実際著者はこの酵素が、自己の作用の分解生成物によって阻害を受けることを観察している。これについては目下検討中であるが、実際の dextranase 反応ではかかる低分子生産物が殆んど検出されないほどの初期からすでに反応速度の減少が起るから、この生産物阻害はもしあるとしても、分解限度に対しては余り大きな影響を及ぼすものではないと考えられる。

総 括

(1) 糸状菌の dextranase によるデキストラン分解の限度はデキストランの構造や反応の平衡にもとづくものでなく、酵素量によって変動することを示した。

(2) 酵素により部分的に分解したデキストランを作り、その分子量を測定した。

(3) 平均分子量の異なるデキストラン及び部分分解デキストランについて糸状菌 dextranase の Michaelis 恒数を測定し、基質分子量が小になるに従ってこの恒数が増大することを示した。

(4) Dextranase によるデキストランの分解がある限度で停止する現象を、基質分子量の減少に伴う酵素-基質間の親和力の減少によって説明した。

終りに終始御指導を賜った舟橋三郎教授、本報及び前報⁽²⁾記載の実験に協力された矢野俊正、有馬孝行、関卓郎の三氏に感謝する。

- (1) 小林恒夫：本誌，28，352 (1954)。
- (2) 小林恒夫：本誌，31，494 (1957)。
- (3) H. Lineweaver, D. Burk : *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934)。
- (4) 例えば J. Duclaux, E. Wollmann : *Bull. Soc. Chim.* IV, 27, 414 (1920); 桜田一郎：工業，35, 1108 (1932)。

- (5) I. A. Wolff, C. L. Mehlretter, R. L. Mellies, P. R. Watson, B. T. Hofreiter, P. L. Patrick, C. E. Rist : *Ind. Eng. Chem.*, 46, 371 (1954)。
- (6) K. Myrbäck, G. Neumüller : *The Enzymes* (J. B. Sumner, K. Myrbäck (eds.)), Vol. I, Part 1, p. 653 (1950)。

桑葉成熟度の相異による繭層全セリシンの質的変化*

貴 志 雪 太 郎 (京都工芸繊維大学)

昭和 32 年 1 月 7 日 受 理

著者は桑葉成熟度の相異によるその成分の相異^(1,2,3)により得られた繭が繭の解舒を相異し即ち比較的若葉を以て飼育して得られた繭が硬化桑葉によって得られた繭に比しその解舒が良好なることを既に早くより明かにしておいた^(4,5)が、之等に関連し桑葉成熟度の相異による繭層全セリシンの溶解性を中心として実験した結果を述べれば次の様である。而して本研究の要は 1936 年 5 月日本農学会臨時大会における日本農芸化学会及び同会西日本支部連合講演会において講演発表したもので、戦時中蚕蛹ビタミン B₂ の工業化研究、技術院委嘱焼土法の研究等に追われ且つ終戦後転戦の後には実験過労のため報文が延引していたものである。

実 験 の 部

1. 桑葉成熟度の相異による繭層セリシンの稀酸添加沈澱法による分別定量

桑葉成分の相異による例えば土質、気象、栽桑その他による所謂原料対策等に関する繭のセリシン内容の変化を知らんがためには繭層セリシンの変性を避け自然的なそのセリシンの化学的様態を知る様な方法によらなくてはならない。之の目的のためには繭層セリシンの溶出方法が第一に検討されなければならない。今之等に関して行った実験は第 1 表の様である。但し方約 0.3 cm に細切し雌雄等重に取った生繭層重に対し 2 回溶出の場合には 40 倍量 (1 回溶出の場合にはこれの倍量) の水を加え第 1 回溶出終了の後 0.5 mm 目位の細金網を重ね離れた絹繊維の通過しない濾過網を以て濾過し⁽⁶⁾繭層の水分を可及的搾った後再び 40 倍量の水を加えて溶出を繰り返す夫々の溶出法に従ってセリシンを溶出した後熱水で洗滌し洗液と前後の溶出濾液とを合一して一定量とした。

* On the Qualitative Changes of Sericin in the Cocoon Silk by the Difference in the Growth of the Mulberry Leaves.

By Yukitarō KISHI (Kyoto University of Industrial Arts and Textile Fibers)

(桑葉の主として其の成分の相異と原料菌糸との関係、第 3 報)