而して蚕品種によってもある範囲内に相異することを現している。

要 約

- 1) 桑葉成熟度の相異により比較的若い桑葉で得られた繭は硬化桑葉で得られた繭に比して絹全蛋白のグリコロール量及びチロシン量を増加しトレオニン量を減少した。
- 2) 桑葉成熟度の相異により比較的若い桑葉で得られた繭は硬化桑葉で得られた繭に比しセリシンを完全に除去して調製したフィブロイン中のグリコロール量及びチロシン量を増加しトレオニン量を減少した。
- 3) 上に述べた 1), 2) の結果は夫々の蛋白質の総窒素量に対する夫々のアミノ酸態窒素量の割合についての变化も同様の結果であった。
- 4) 上記 2), 3) の結果は蛋白質の合成条件によりその化学的構造がある範囲において变化することを推定し得られる。

(1) 貴志雪太郎 : 本誌, 11, 303 (1935).

(3) Shinn, Nicolet : *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 1615 (1939).

(2) 貴志雪太郎 : 京工織大繊維, 1, 433(1956).

細菌 アミラーゼに関する研究 (第 21 報)*

細菌アミラーゼ及びプロテイナーゼの産生機構 (その 4)

糖類と酵素産生との関係 (1)

福本寿一郎, 山本武彦, 鶴 大典 (大阪市立大学理工学部)

昭和 32 年 1 月 14 日 受 理

著者等は細菌のアミラーゼ及びプロテイナーゼの形成, 分泌(産生)の機構を知るため *Bac. amyloliquefaciens* Fukumoto の洗滌細胞を用いて実験を行い, まず洗滌細胞は磷酸塩の存在に於て炭素源を呼吸代謝すれば両酵素を産生することを明かにした⁽¹⁾. 次いでその後の研究に於て炭素源としては澱粉は勿論種々の糖類や有機酸塩も一応有効であるが, しかしそれ等炭素源の酵素産生に対する効果の度合は炭素源の種類によって異なり, またその効果は細胞呼吸の大小とは必ずしも一致しない等のことを明かにした⁽²⁾.

細菌アミラーゼの工業的生産に於ては一般に澱粉が最適炭素源として使用される. しかしそれは菌の増殖に対する効果をも考慮に入れた上のことであって, 澱粉がアミラーゼの形成, 分泌そのものに他の炭素源より特に勝れていると云うのではない.

著者等はこれまでと同様に洗滌細胞を用いて, 種々の糖類のアミラーゼ及びプロテイナーゼ産生に対する影響を再検討した. その結果培養試験の場合と異なり, アミラーゼ産生に対してはラクトース, ガラクトース, アラビノース, セロビオース及びグルコン酸ソーダ等が可溶性澱粉と同程度に或はそれ以上に有効であること, 一方グルコースは極めて低濃度の場合にはラクトースと略々同程度に有効であるが, ある濃度以上の場合には酸素吸収を増大さすにも拘らずアミラーゼ産生を著しく阻害すること, しかしプロテイナーゼ産生に対してはラクトース, ガラクトース等よりマルトース, グルコース等がむしろ有効である等のことが判明した.

実 験 の 部

I. 実験材料及び方法

供試菌, その培養条件, 洗滌細胞の調製法, アミラーゼ及びプロテイナーゼ並に酸素吸収の測定等は前報⁽²⁾に準じた.

II. 実験結果

(1) 各種糖類の酵素産生に及ぶ影響 : アミラーゼの産生は糖の種類によって著しく異なる. 磷酸緩衝液に懸濁した洗滌細胞に種々の糖類を夫々 0.5% 濃度に添加し, 14 時間振盪した場合のアミラーゼ及びプロテイナー

* Studies on Bacterial Amylase. Report XXI. Formation of Bacterial Amylase and Proteinase (Part 4). Effects of Sugars as the Carbon Source on the Enzyme Formation. (1). By Juichiro FUKUMOTO, Takehiko YAMAMOTO and Daisuke TSURU (Institute of Polytechnics, Osaka City University)

第 1 表 炭素源の種類と酵素産生
細胞 60 mg; 糖 0.5%; 磷酸塩 M/12, pH 7.0
全容 15 cc, 37°C, 14 時間振盪

炭素源	アミラーゼ 力/cc	プロテイナーゼ 力/cc
無 添 加	7.5	3.4
キシロース	4.0	3.5
アラビノース	39.0	6.7
グルコース	7.5	8.7
フラクトース	7.0	7.9
マンノース	10.1	7.9
ガラクトース	43.0	7.0
マルトース	30.0	10.0
蔗 糖	8.0	8.4
ラク トース	48.0	6.3
セロビオース	36.0	7.2
メリビオース	30.0	5.0
可 溶 性 澱 粉	35.0	7.0
アミロース	41.0	7.0
アミロペクチン	41.0	7.0
グリコーゲン	41.0	7.0
マンニット	28.0	5.0
グルコン酸ソーダ	31.0	5.9

ぜの産生を第 1 表に示す。即ちラクトース、ガラクトースはアミラーゼ産生に対して極めて有効であるが、グルコース、フラクトースは全く無効である。しかしプロテイナーゼの産生に対しては略逆の関係でラクトースやガラクトースよりグルコース、マルトース等がむしろ有効である。

次にラクトース、グルコース及び可溶性澱粉のアミラーゼ産生に対する最適糖濃度 (使用細胞量, 3.3mg/cc) を検討した (第 1, 2, 3 図)。即ちアミラーゼの産生はラクトース及び可溶性澱粉の場合にはいずれもその濃度 0.4% の場合に最大であり、一方グルコース炭素源の場合にはその濃度が大きくなる程アミラーゼ産生は炭素源無添加の場合よりもむしろ不良になることが知られる。

このような現象は細胞培養時の炭素源の種類に関係なく常に認められる。可溶性澱粉、マンニット、グルコース及びラクトースを夫々炭素源とした合成培地に

該細菌を培養して先ず増殖並びに酵素産生を調べ、次いでそれ等より夫々調製した洗滌細胞を用いて酵素産生に対する糖類の効果を検討した。その結果 (第 2 表)、培養実験に於ては炭素源が可溶性澱粉の場合に菌の増殖も酵素産生も極めて良好で、ラクトース炭素源の場合にはグルコース炭素源の場合と同様それ等は著しく不良である。然し洗滌細胞によるアミラーゼ産生についてみるとラクトース、ガラクトースはグルコースより遙かに有効で、而もその効果は細胞培養時の炭素源の種類とは殆んど無関係に現れること、同様のことはプロテイナーゼ産生についても或程度認められ、その場合はグルコースの方がガラクトース等よりむしろ勝れていることが判る。

次に洗滌細胞を用い、N 源として磷酸アンモニアを併用した場合の種々糖類の酵素産生に対する効果を検討した。即ち第 3 表に示すようにグルコースやマルトース炭素源の場合は磷酸アンモニアの添加によってアミラーゼ

第 1 図 ラクトースのアミラーゼ産生に及ぼす影響
(細胞 50 mg, 磷酸塩 M/12, pH 7.0, ラクトース, 全容 15 cc, 37° 振盪)
ラク トースの濃度% : A 0; B 0.025; C 0.1; D 0.4; E 1.0

第 2 図 可溶性澱粉のアミラーゼ産生に及ぼす影響
(条件は第 1 図に同じ)
可溶性澱粉の濃度% : A 0; B 0.025; C 0.1; D 0.4; E 1.0

第3図 グルコースのアミラーゼ産生に及ぼす影響
(条件は第1図に同じ)

グルコース濃度%: A 0; B 0.025; C 0.1; D 0.4; E 1.0

第4図 糖の種類と呼吸(細胞 5mg, 糖 5×10^{-3} M, 燐酸塩 M/12, pH 7.0, 全容 2.5 cc)

A 糖なし, B グルコース, C マンノース, D ガラクトース, E ラクトース

第2表 培養時炭素源の影響

培養時*の炭素源		可溶性澱粉		マンニット		グルコース		ラクトース	
72培	細胞増殖量, mg/300 cc	1300		1000		790		600	
時養	アミラーゼ力/cc	380		150		100		150	
間後	プロテイナーゼ力/cc	14		12		12		10	
		↓**		↓		↓		↓	
洗浄細胞の炭素源		Am.	Pr.	Am.	Pr.	Am.	Pr.	Am.	Pr.
グルコース		19.1	34	17.0	45.0	6.6	16.0	14.3	19.2
キシロース		4.0	3.2	7.5	—	5.6	6.4	10.0	6.2
ガラクトース		120.0	30.0	135.0	30.0	46.0	17.0	48.0	11.0
マンニット		71.0	45.0	72.0	45.0	—	—	—	—
ラクトース		—	—	—	—	35.0	16.0	68.0	15.0

* 炭素源 5%; クエン酸ソーダ 0.5%; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.0%; NaCl 0.2%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, CaCl_2 各 0.01%; pH 7.0, 37°C, 静置培養.

** 使用菌体量は乾物として 5~3 mg/cc.

表中 Am. はアミラーゼ力/cc, Pr. はプロテイナーゼ力/cc. (15時間)

第3表 糖類の効果に及ぼす窒素源添加の影響

細胞 80 mg, 糖 0.5%, 燐酸塩 M/12, pH 6.8, 全容 15cc, 15時間振盪

糖	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.2mg N/cc) の添加	pH	アミラーゼ 力/cc	プロテイナーゼ 力/cc	糖消費 mg/cc
なし	—	6.8	14.3	2.7	—
	+	7.1	16.2	3.0	—
キシロース	—	6.4	12.2	2.7	1.2
	+	6.6	14.7	2.8	1.4
アラビノース	—	6.7	83.3	7.3	3.9
	+	6.7	127.0	8.3	4.3
グルコース	—	6.6	14.5	8.8	4.8
	+	6.7	93.0	18.0	5.0
ガラクトース	—	6.7	90.0	7.3	3.9
	+	6.7	150.0	9.5	4.4
マルトース	—	6.7	42.5	11.0	4.3
	+	6.7	107.0	24.0	4.4

スの場合には酸素吸収は比較的緩慢であるが、しかしかなり長い間、定常的な状態を維持することが知られる。

(3) アミラーゼ産生に及ぼす微量グルコースの連続添加の影響: 第3図に示すように0.025%のグルコースは僅かながらアミラーゼの産生を促進するが、このような微量のグルコースは間もなく消費される(第4図)ので、先ず最初に終濃度 1×10^{-3} M になるようグルコースを添加し、以後6時間にわたって20分毎にそれと同量のグルコースを補給し乍らアミラーゼ産生を追跡した。即ち第5図に示すようにそのような条件下に於てはグルコースでもラクトースと略同程度にアミラーゼ産生を促進することが判明した。

もプロテイナーゼも共にかなり増大するが、ガラクトース或はアラビノース炭素源の場合は主にアミラーゼ産生のみが増大する。なおキシロースは燐酸アンモニアの有無に拘らずいずれの酵素産生に対しても殆んど効果がない。

(2) 糖類の種類と細胞呼吸との関係: グルコース、マンノース、ガラクトース及びラクトースを炭素源とした場合の酸素吸収を経時的に測定した結果を第4図に示す。即ちグルコースの場合は当初に酸素吸収は著しく増大するが、間もなく衰え、遂にはいずれの糖よりも早く auto-respiration の値に接近する。

一方ガラクトースやラクトース

第 5 図 微量グルコース連続添加の場合のアミラーゼ産生

(細胞 50 mg, 燐酸塩 M/12, pH 7.0, 全容 12 cc, 37° にて振盪)

A 糖無添加, B 3×10^{-2} M グルコース, C 1.5×10^{-2} M ラクトース, D 2 mg のグルコースを 20 分毎に添加。

実がかなり多く知られるに至った。

著者等の実験に於て前記糖類が酵素産生に対し、一部エネルギー源として役立っていることは oxidative phosphorylation の uncoupler である 2,4-dinitrophenol 或はメチレンブリウ等によって酵素産生が阻害されること⁽²⁾や、酵素産生に際しては必ず呼吸を伴う等のことから明かであるが、しかしラクトースやガラクトースが特にアミラーゼ産生を促進し、又呼吸基質として最も好適なグルコースがむしろその産生を阻害する等のことからラクトースやガラクトース等の炭素源は単にエネルギー源であるばかりでなく、何等かの意味で細胞内のアミラーゼ素材をアミラーゼ形成へ方向づける役割をも有するものと考えられる。

糸状菌のアミラーゼ形成がグルコースの添加によって阻害されることは田辺等⁽¹⁴⁾によって報告されている。又グルコースによる β -ガラクトシダーゼ形成阻害に関しては多くの研究があり^(13, 16-18)、例えば Cohn 等⁽¹³⁾はそれによる阻害はその酵素が適応的に形成される場合のみ認められることを明らかにし、また Koppel⁽¹⁸⁾等はグルコースやフラクトースが β -ガラクトシダーゼの形成を阻害するのはそれ等糖類が inducer analogue として作用するためであると推論している。著者等の実験に於てグルコースを少量宛間歇的に添加するとアミラーゼの産生は著しく促進されること、また或濃度以上に於て阻害作用を示す糖類はいずれも化学構造的に或る共通性を有する等のことから Koppel 等の推論に通ずるように思われる点もあるが、然し供試菌に対しグルコースやフラクトースは生酸性糖類であり、一方ラクトースやガラクトースは非生酸性糖類であること⁽¹⁹⁾、また窒素源の存在に於てはグルコース炭素源の場合にもかなりのアミラーゼが産生される (第 3 表) 等のことからグルコース等のアミラーゼ形成阻害の原因については更に検討を要すると思われる。

要 約

Bac. amyloliquefaciens Fukumoto の洗滌細胞を用いて酵素産生に及す種々糖類の影響を検討した結果

(1) アミラーゼ産生に対し、ラクトース、ガラクトース、アラビノース、セロビオース等は可溶性澱粉以上に、またはそれと同程度に有効である。

(2) グルコースは最も速かに代謝されるにも拘わらず、或る濃度以上に於てはアミラーゼ産生を阻害するよ

考 察

ある種細菌や糸状菌のアミラーゼ形成は適応的と見做される場合もあるようである⁽³⁻⁷⁾。しかし著者等の実験では第 1 表より明かなように、洗滌細胞を用いる場合にはラクトース、ガラクトース或はアラビノース等がアミラーゼの産生を著しく促進し、一方グルコースやフラクトースは速かに代謝されるにも拘らずある濃度以上に於てはアミラーゼ産生に殆ど無効か或はむしろ阻害的である。Scott⁽⁸⁾等も *Clostridium acetobutylicum* のアミラーゼ生成がフラクトース、マンノース、マンニット及びセロビオースによって促進されることを報じている。このような現象は従来の所謂適応酵素の概念では簡単に説明することは出来ないが、しかし最近代謝の中間体が酵素形成の inducer となること⁽⁹⁾、或は又大腸菌の β -ガラクトシダーゼの生成が酵素の基質としては勿論、代謝基質としても全く無効であるメリビオーズによって induce されること⁽¹⁰⁾、又 *Saccharomyces cerevisiae* のマルターゼ形成も同じく代謝基質として殆んど無効な α -methylglucoside の添加によって促進されること⁽¹¹⁾、大腸菌の L-serine deaminase がグリシン及び L-ロイシンによって induce されること⁽¹²⁾等、酵素形成がその酵素の基質とはある程度無関係な物質の添加によって促進される事

うになる。しかし少量宛間歇的に加えるとラクトースと略々同程度にアミラーゼ産生を促進する。

(3) プロテイナーゼ産生に対してはマルトースやグルコースが特に有効である。

(4) 糖類の酵素産生に及ぼす影響を窒素源として磷酸アンモニアを添加しながら試験すると、グルコースの場合にはアミラーゼ、プロテイナーゼ両者が増加するが、ガラクトースやアラビノースの場合にはアミラーゼのみ増加する等のことが判明した。

(1) 福本寿一郎, 山本武彦 : 酵素化学シンポジウム, 7, 3 (1951). (2) 福本寿一郎, 山本武彦 : 本誌, 31, 421(1957); 福本寿一郎, 山本武彦, 鶴大典 : 本誌, 31, 429 (1957). (3) J. J. Goodman : <i>Science</i>, 112, 176(1950). (4) 田辺 修, 外村健三 : 本誌, 28, 227(1954). (5) A. Markovitz, H. P. Klein : <i>J. Bact.</i>, 70, 641 (1955). (6) F. J. Simpson, E. McCoy : <i>Applied Microbiol.</i>, 1, 228 (1953). (7) P. S. Thayer : <i>J. Bact.</i>, 66, 656(1953). (8) D. Scott, L. R. Hedrick : <i>J. Bact.</i>, 63, 795 (1952). (9) R. Y. Stanier : <i>Adaptation in Microorganisms</i>, p. 136 (1953). (10) J. Monod et al. : <i>Biochim. Biophys. Acta</i>,	7, 586 (1951). (11) S. Spiegelman, H. O. Halvorson : <i>Adaptation in Microorganisms</i>, p. 98 (1953). (12) A. B. Pardee, L. S. Prestidge : <i>J. Bact.</i>, 70, 667 (1955). (13) M. Cohn, J. Monod : <i>Adaptation in Microorganisms</i>, p. 139 (1953). (14) 田辺 修, 大山次郎 : 酸研報, 11, 21(1955). (15) S. Løvtrup : <i>Biochim. Biophys. Acta</i>, 19, 247 (1956). (16) A. Davies : <i>J. Gen. Microbiol.</i>, 12, iii (1955). (17) B. V. Hofsten : <i>Nature</i>, 177, 844(1956). (18) J. L. Koppel et al. : <i>J. Gen. Physiol.</i>, 36, 703 (1953). (19) 福本寿一郎 : 本誌, 19, 634 (1943).

細菌アミラーゼに関する研究 (第 22 報)*

細菌アミラーゼ及びプロテイナーゼの産生機構 (その 5)

糖類と酵素産生との関係 (2)

福本寿一郎, 山本武彦, 鶴 大典 (大阪市立大学理工学部)

昭和 32 年 1 月 14 日 受理

細菌や糸状菌のアミラーゼは澱粉やマルトースを炭素源として適応的に形成されるとの報告もある⁽¹⁻⁶⁾が, *Bac. amyloliquefaciens* Fukumoto の洗滌細胞によるアミラーゼの産生はラクトース, ガラクトース或はセロビオースを炭素源とするときに顕著に認められ, グルコースや蔗糖を炭素源とするときはむしろ阻害される⁽⁶⁾。

供試菌に対しグルコースや蔗糖が生酸性糖であり, ラクトースやガラクトースが非生酸性糖である事実⁽⁷⁾はそれ等糖の代謝が相異なることを示唆するものであるが, 或はそのことがグルコースのアミラーゼ産生阻害と関係があるのではないかと考えられる。本報ではグルコース, ガラクトース両糖が共存する場合の酵素産生並びにそれ等糖類をそれぞれ炭素源とした場合の二, 三細胞内酵素の活性とその場合の代謝生産物等について比較検討を行った。その結果グルコースはラクトース等の酵素産生に対する効果をも消去してしまうこと, グルコースを炭素源とした場合の alkali phosphatase やその他二, 三の酵素活性はガラクトース炭素源の細胞のそれに比較して低下していること, またグルコースの代謝生産物とガラクトースのそれとはかなり異なること等が判明した。

材料及び方法

供試菌, その培養条件, 洗滌細胞の調製法及びアミラーゼ, プロテイナーゼの測定法は前報に準じた⁽⁶⁾。細胞の alkali phosphatase 活性は細胞を 1% β -glycerophosphate 2 cc に作用 (pH 9.2, 37°, 1 時間) させ, 遊離する無機磷を測定し, その量 (μ g) を細胞 100 mg 当りに換算して示した。また細胞内プロテイナーゼは

* Studies on Bacterial Amylase. Report XXII. Formation of Bacterial Amylase and Proteinase (Part 5). Effects of Sugars as the Carbon Source on the Enzyme Formation. (2). By Juichiro FUKUMOTO, Takehiko YAMAMOTO and Daisuke TSURU (Institute of Polytechnics, Osaka City University)