第 3 表 精製酵素のアミノ酸組成

アミノ酸	BuOH:MeOH :AcOH	R_F 値 フェノール (VII 段階)	精製酵素
シ ス チ ン	0.11	0.067	± or —
ヒ ス チ ジ ン	0.19	0.31	卅
リ ジ ン	0.24	0.14	卅
セ リ ン	0.26	0.20	卅
アスパラギン酸	0.26	0.034	卅
アルギニン	0.28	0.18	卅
グリシン	0.28	0.28	卅
スレオニン	0.35	0.34	卅
グルタミン酸	0.36	0.12	卅
アラニン	0.43	0.50	卅
プロリン	0.52	0.79	卅
チロシン	0.61	0.46	± or —
メチオニン	0.66	0.65	+
バ リ ン	0.70	0.67	卅
フェニールアラニン	0.80	0.74	± or —
イソロイシン	0.83	0.72	±
ロ イ シ ン	0.87	0.75	卅
トリプトファン	—	0.78	±
不 明	0.17	—	+

致しているように考えられる。

一般にアリファティック又はジカルボキシリックなアミノ酸の含有量が多いようである。

要 約

糸状菌 *Aspergillus oryzae* (Korean-B) 菌体から葡萄糖脱水素酵素を抽出, 精製し, 少くとも電気泳動的に単一と考えられる酵素標品を分離した。即ち圧搾菌体から燐酸緩衝液 (pH 8.2) で酵素を抽出, 硫安分割 (60~100%), 水酸化アルミニウム・ゲル吸着溶出, 硫安分割 (75~100), 電気泳動分離を行い, 原抽出液に対して約 40 倍の活性を有する精製標品を得た。 Q_{O_2} (蛋白) 360, 収量 9.1% で電気泳動による易動度は pH 6.8 で $2.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, 等電点 4.6; 蛋白態窒素 16.85% であった。又アミノ酸組成はリジン, グルタミン酸, アラニン, バリン, ロイシン等多く, ヒスチジン, セリン, アスパラギン酸, アルギニン, グリシン, スレオニン, プロリン, メチオニン及び不明アミノ酸等 14 種を検出した。又精製酵素は 260~290 m μ に亘る平滑な吸収スペクトルを示し, 280 m μ 附近に特別の吸収の見られないことは, 組成にチロシン等が欠除していることと一致している。

本研究に御指導下さいました農学博士三宅捷先生に御礼申し上げます, 又電気泳動実施に当って御援助戴いた新潟大学理学部講師菅野浩氏, 糸状菌を分譲戴いた東大坂口研究室に感謝致します。研究費の一部は伊賀上に与えられた文部省科学助成金によった。なお本報告は昭和 31 年 3 月日本農芸化学会で講演した。

- (1) 倉沢文夫, 伊賀上郁夫: 本誌, 30, 553 (1956).
- (2) 倉沢文夫, 伊賀上郁夫: 本誌, 30, 556 (1956).
- (3) Y. Ogura: *Acta phytochim.*, 11, 127 (1939).
- (4) 永久正志, 小倉安之: 植物学雑誌, 56, 137 (1942).
- (5) H. J. Strecker, S. Korkes: *J. Biol. Chem.*, 196, 769 (1952).
- (6) R. Willstätter, H. Kraut, O. Erbacher: *Ber.*, 58, 2448 (1925).

糸状菌の糖類脱水素酵素に関する研究 (第 7 報)*

酵 素 の 化 学 的 性 質

倉沢文夫, 伊賀上郁夫 (新潟大学農学部)

昭和 33 年 10 月 6 日 受 理

緒

論

葡萄糖脱水素酵素は 1931 年, Harrison⁽¹⁾ が哺乳動物の肝臓の中に見出し, 分子状酸素を利用出来ずメチレンブルーのような水素受容体が必要であるといっている。

又三宅, 倉沢⁽²⁾は植物種子中に糖類脱水素酵素を見出した。一方 *Asp. niger* 及び *Pen. glaucum* に glucose oxidase が存在することは 1928 年 Müller⁽³⁾ によって見出され, 酸素の存在でぶどう糖はグルコン酸に酸化されることを知った。ぶどう糖以外にマンノース, ガラクトースが作用は弱い酸化されるという。最適 pH は 4.7~6.0 とした。Franke⁽⁴⁾は Müller の glucose oxidase は aeroglucose dehydrogenase であると考えた。

* Studies on Sugar-Dehydrogenase of Mould. Part VII. Chemical Properties of Glucose-Dehydrogenase.

By Humio KURASAWA and Ikuo IGAUE (Faculty of Agriculture, Niigata University)

即ちぶどう糖 + $H_2O + O_2 \rightarrow$ グルコン酸 + H_2O_2 を触媒する酵素で且つ直接酸素とも反応し, CN に非感受性で, 活性とフラビン含量が関連することからフラビン酵素であるとした. 更に酸素以外に外の水素受容体例えばインドフェノール色素と反応する.

小倉等⁽⁵⁾は *Asp. oryzae* から直接に酸素と反応せず, 2,6-ジクロールフェノールインドフェノール, チオニン等を水素受容体とする glucose dehydrogenase を認め, 最適 pH は 7.8 で Franke の酵素とは別のものであるという.

その後 Müller⁽⁶⁾は前記標品中には glucose oxidase (酸素を直接利用) と dehydrogenase (水素受容体を要求) とが混在すると述べた.

Franke⁽⁷⁾は更に詳細に研究し, *Pen. glaucum*, *Asp. niger*, *Asp. oryzae* 等には彼の aeroglucose dehydrogenase のみが存在していて, 種々の結果が出るのは酵素が不純なためであるとした. 以上のように糸状菌の酸化酵素については研究者によって異った考え方をしている. よって私達は繁殖力おう盛で酵素活性の強い *Asp. oryzae* (Korean B) から酵素を抽出し, 酵素の精製に重点をおいて実験した. 前報⁽⁸⁾において主として酵素の精製について述べたが, 本報では酵素の化学的性質を種々検討したので報告する.

実 験 の 部

(1) 酵素試料: 主として前報⁽⁸⁾で得られたⅥ段階精製酵素を実験の都合上使用した.

(2) 活性測定法: 前報⁽⁸⁾で述べた Thunberg 法及び Warburg 検圧法を用いた.

実 験 結 果

a. 最適水素イオン濃度 酵素液 (0.10 mg 蛋白/0.5 ml) を M/2 磷酸緩衝液で夫々 pH 6.0, 6.5, 7.4, 7.8, 8.0, 8.2, 8.5 に調製し, チオニン (1:5000) に対する脱色時間を測り最適水素イオン濃度を求めた. 結

第 1 図 最適水素イオン濃度

第 2 図 最適温度

x.....x 色素還元力 (分), ●.....● 還元力 (ぶどう糖 mg)
△.....△ 同上, 自発作用 (非酵素対照)

果は第 1 図に示すようである. 第 1 図から最適水素イオン濃度は pH 7.8 附近にある.

b. 最適温度 Thunberg 法では温度が高くなると測定することが出来ないで, micro-Bertrand 法⁽⁹⁾を併用した. 即ち 12°, 20°, 25°, 30°, 35°, 40° の温度に反応系を保ち, Thunberg 法と且つ micro-Bertrand 法によるぶどう糖の還元力の減少度 (作用時間 80 分値) を測定する 2 つの方法によって最適温度を求めた. 結果は第 2 図のようである. Thunberg 法の場合, 色素は 2.6 Dp を用い, 酵素濃度 0.025 mg/0.5 ml である. micro-Bertrand 法の場合の反応系は M/100 ぶどう糖 0.5 ml, 2.6 Dp (1:500) 0.5 ml, M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.8) 0.5 ml, 酵素液 (0.04 mg 蛋白/0.3 ml) 0.3 ml を Thunberg 管に入れ, 3 mm/Hg で 80 分後還元力を測定した. 第 2 図から最適温度約 30° である.

c. 耐熱性 酵素液 (0.06 mg 蛋白/0.5 ml, pH 5.2) を夫々 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 100° で 5 分間加温する. これらを酵素液として Thunberg 法で脱色時間を求めた. 対照 (未処理) 酵素液の脱色時間は 4 分, 自発作用 (非酵素対照) は 24 時間以上を要した. 結果は第 3 図に示す. 55° を超えると酵素活性は急激に減少した.

d. 酸化還元色素に対する反応力 2.6 Dp ($E_0' = +0.217$), チオニン ($E_0' = +0.064$), メチレンブルー (E_0'

第1表 異なる酸化還元色素による酸素の吸収

酸化還元色素	Q_{O_2} (蛋白)	E_0'
2・6 Dp	432.5	+0.217
チオニン	98.0	+0.064

重金属類 Ag, Hg, Cu 等は著しい阻害を示した。エチルウレタンは濃度の高い所で阻害が見られたが他のものは顕著な阻害は認められなかった。

f. Michaelis定数 酵素の Michaelis 定数を求めるために検圧法によって基質濃度と酵素活性の曲線を求め、これから Michaelis 定数 K_m を計算した。今基質濃度を S , 酸素吸収量を v として, S を種々変えた際の v 値を測定した。今縦軸に $1/v$, 横軸に $1/S$ をとると第4図のようである。これから K_m は $1.10 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ の値が得られた。

g. ぶどう糖に対する脱水素作用, 還元力変化及び生成物 b項で述べたと同様な反応系でぶどう糖に酵素を作用させた際の還元力変化は第5図に示すようである。この反応系で5時間33分で色素は脱色されたが、脱色後は還元力の変化はみられなかった。各種糖類に対する脱水素作用はぶどう糖が最も強く脱水素され、キシロース、ガラクトース、マンノースがこれに次ぎ、アラビノース、果糖は僅かに脱水素され、糖酸に対しては殆んど作用はなかった。

$$1/V_{\max} = 1.18 \times 10^{-2}$$

$= +0.011$) などの色素を用いて酵素の反応力を実験した。Thunberg 法では 2・6 Dp の場合が反応力最も大きく、チオニンはこれに次いで作用があったが、メチレンブルーでは作用がなかった。よって Warburg 検圧法を用いて 2・6 Dp 及びチオニンを夫々水素受容体として酸素の吸収量を測定した。結果を第1表に示す。

e. 阻害剤の影響 重金属類及びその他の阻害剤の酵素に対する影響を Thunberg 法で実験した。結果を第2表に示す。

第2表 酵素に対する阻害剤の影響

イ) 重金属類: 酵素蛋白 0.04 mg/0.5 ml 2・6 Dp に対する脱色時間 (分)

阻 害 剤	最終濃度	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	対 照 (無添加)
HgCl ₂	24 時間<	24 時間<	85	15	9	
AgNO ₃	24 時間<	24 時間<	24 時間<	12	9	
CuSO ₄	—	24 時間<	110	15	9	
Fe ₂ (SO ₄) ₃	6	7	—	—	9	
MgSO ₄	12	—	—	—	9	
MnSO ₄	9	—	—	—	9	
ZnSO ₄	9	—	—	—	9	
CoCl ₂	15	—	—	—	9	
BaCl ₂	9	—	—	—	9	

ロ) その他の阻害剤: 酵素蛋白 0.03 mg/0.5 ml

阻害剤	最終濃度	10 ⁻¹ M	5×10 ⁻² M	2×10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	対照 (無添加)
エチルウレタン	20	15	—	—	12	
CH ₂ JCOOH	—	—	12	12	12	
NaF	—	—	—	12	12	
Na ₃ AsO ₃	—	—	—	12	12	
NaCN	—	—	12	8	12	

酵素蛋白 0.02 mg/0.5 ml

阻害剤	最終濃度	10 ⁻¹ M	10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	対 照 (無添加)
オルソフェニレンジアミン		—	20	—	—	20
ヒドロキシルアミン		20	26	25	21	20

次に生成物について検索した。即ち酵素液 70 ml (M/10 磷酸緩衝液 1 ml に酵素 0.05 mg の割合), M/5 ぶどう糖 30 ml, 2・6 Dp (1:1000) 75 ml を Thunberg 管中で 3 mm/Hg, 30°, pH 7.8 で 24 時間反応させ、生成物を既法⁹⁾と同様にしてペーパークロマトグラフィーで検したのに、エーテル不溶部にグルコン酸を検出した。

h. 酵素の作用基についての二、三の検討 葡萄糖脱水素酵素

は一般に蛋白体であるアポ酵素と作用基である補酵素とから成り、両者を加えることによりホロ酵素として作用すると考えられている。よって本酵素について作用基に関する二、三の実験を行った。

(i) 酵素作用の透析による影響：先に粗酵素が透析によって失活しないことを認めたが、精製酵素についても同様に 3~6 日の透析で殆んど失活しないことを知った。今既法⁽¹⁰⁾ V 段階精製酵素 (Q_{O_2} 61.3) を用い、酵素液 10 ml をぼうこう膜又はセロファン膜で少量のトルオール添加の下約 6 日間透析し、色素還元力を測定⁽⁸⁾した結果は第 3 表のようである。

第 3 表 酵素作用の透析による影響

	酵 素 酵 素 自 発 作 用 (ぼうこう膜) (セロファン膜) (非酵素対照)
透析前	8 分 8 分 24 時間<
透析後	9 8 24 時間<

(ii) 酵素作用の活性炭処理による影響：Cori 等⁽¹¹⁾, Velick 等⁽¹²⁾はグリセリンアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の助酵素である DPN (ジフォスフォビリジンスクレオチッド) が Norit 処理で除かれることを認めている。よって私達も精製酵素に対する Norit 処理の影響を実験した。即ち酵素液 (V 段階酵素 2.06 mg/ml) に 1% Norit (Norit 社製 "Extra") を添加し、冷所で 5 分間緩かに攪拌する。吸引濾過して酵素液とし、検圧法、Thunberg 法で酵素作用を測定した。結果は第 4 表のようである。DPN は科研製を用いた。

酵素を Norit 処理して酵素活性に及ぼす影響を検圧法で調べたのに対照と変化なく、処理区、未処理区に DPN を添加したが DPN 無添加区と変りがなかった。又 Thunberg 法で粗酵素 (I 段階) 及び精製酵素 (V 段階) について同様に実験したが、2.6 Dp の脱色にも影響は認められなかった。

又精製酵素を稀塩酸で加水分解して、分解物の還元力を調べたが還元性物質は存在しなかった。又粗酵素 (I 段階) では 260 m μ に吸収スペクトルを呈するが、精製と共にこの吸収は見られなくなる。そこで粗酵素

を Norit 処理したものについて吸収スペクトルをとると、同じ位置に極大吸収が見られ、吸収の位置の変化は見られなかった。260 m μ の吸収は恐らく核酸系物質に基くものと考えられる。以上のように透析性、吸収スペクトル、Norit 処理、酸加水分解物に還元性物質の存在しないことなどから助酵素としての DPN は効果がないと思われる。

(iii) フラビンについて：Franke⁽⁴⁾ は *Asp. niger* から得た酵素を glucose aerodehydrogenase として活性とフラビン含量が関連することからフラビン酵素であるとした。小倉等⁽⁶⁾は小倉の得た酵素にフラボプロテイン或いは Franke の作用団を加えても効果がなかったという。私達も得られた酵素試料についてフラビン添加の影響を実験した。

反応系。酵素液 (V 段階, 10 mg 蛋白/ml) 0.5 ml, M/2 ぶどう糖 0.3 ml, M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.8) 1.0 ml, FMN (フラビン・アデニン・モノスクレオチッド) 又は FAD (フラビン・アデニン・ジスクレオチッド) 0.2 ml (40 γ), メチレンブルー (1:5000) 0.5 ml を 30°, 3 mm/Hg で Thunberg 管中でメチレンブルーの還元を調べたが還元は見られなかった。

又上記反応系からメチレンブルーを除いたものについてフラビンの還元を実験したがフラビンの還元は起ら

第 5 図 ぶどう糖に酵素を作用させた際の還元力の変化

●—● 酵素作用, $\triangle$ — $\triangle$ 自発作用 (非酵素対照)
↓は酸化還元色素の脱色点

第 4 表 酵素作用に及ぼす Norit 処理の影響：検圧法

Norit 処理	添加 DPN γ	Q_{O_2} (蛋白)*	処理酵素の未処理酵素に対する活性比 %	蛋白質量 mg/ml	収量 %
未処理酵素	0	61.3	100	2.06	100
	50	55.0			
	100	63.8			
Norit 1 回 処理 酵素	0	63.0	103	1.29	64.4
	50	58.1			
	100	64.6			
Norit 2 回 処理 酵素	0	59.1	96.4	0.99	46.3
	50	53.4			
	100	57.2			

* 30 分値, endogeneous (未処理酵素で Q_{O_2} 6.5) を差引いた値

ず, 吸収スペクトルの変化もみられなかった. 以上のようにしてフラビンを添加してもその還元は見られず, 添加の影響はなかった.

(iv) その他: 蛋白末端アミノ酸残基例えばジオキシフェニールアラニン残基 において水素伝受の

起りうる可能性も又考えられるが*, オルソフェニレンジアミン 又はヒドロキシルアミン (NH_2OH) 等が存在するときこれ等試薬の結合による水素伝達系の阻害がみられるわけで, 前項(e)でこれについて実験したが効果は認められなかった.

* 阪大赤堀教授の御教示による.

又永久, 小倉⁽⁵⁾は麹菌体抽出色素成分が葡萄糖脱水素酵素の一構成成分になりうるとして

〔ぶどう糖-葡萄糖脱水素酵素-菌体色素成分-オキシダーゼ- O_2 〕のような系が成立すると報告している.

以上のようにして私達は麹菌より葡萄糖脱水素酵素を抽出分離し得たが, その作用基についてはなお検討充分ならず今後の研究にまつものである.

しかしてこの酵素は Müller の glucose oxidase, Franke の aeroglucose dehydrogenase 等と種々の点で異っており, *Asp. oryzae* には彼等のいう酵素と別の葡萄糖脱水素酵素が存在する.

要 約

麹菌 *Asp. oryzae* (Korean B) 菌体から抽出精製した葡萄糖脱水素酵素について化学的性質を調べた.

- (1) 最適 pH 7.8, 最適温度 30°, 耐熱性は 55°, 5 分処理で急激に失活する.
- (2) 酸化還元色素に対する酵素の反応力は 2,6-ジクロールフェノールインドフェノールに対して最も大きく, チオニンの約 4 倍であった. メチレンブルーには反応しない.
- (3) 酵素作用に対する阻害剤の影響について Ag, Hg, Cu 等は顕著な阻害を示し, エチルウレタンは若干の阻害が見られた. NaF, CH_3COOH , Na_3AsO_3 等は全く阻害が認められなかった. 又ヒドロキシルアミン, オルソフェニレンジアミン等も殆んど阻害を示さなかった.
- (4) Michaelis 定数は $1.10 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ であった.
- (5) 各種糖類に対する酵素作用はぶどう糖が最も大きく, キシロース, ガラクトース, マンノースはこれに次ぎ, アラビノース, 果糖は僅かに脱水素された. 糖酸は殆んど脱水素されない. 又ブドウ糖に酵素を作用させた際の生成物はグルコン酸のみを認めた.
- (6) 酵素の作用基については, 従来の葡萄糖脱水素酵素の補酵素である DPN, フラビン等について実験し, Norit 処理酵素に対する DPN 添加の効果, フラビン添加の効果等から検討したが何れも活性に影響を与えず, 透析も酵素作用に影響しなかった.

又蛋白末端アミノ酸残基による水素伝達系についても阻害剤による実験から予期の効果を認めなかった.

実験に当り御指導戴いた三宅捷先生に感謝致します. 又蛋白末端アミノ酸残基による水素伝達の問題については阪大赤堀四郎先生の御教示を受けた. なお研究費の一部は伊賀上に与えられた文部省科学助成金によった. 併せて感謝致します. 本報告は昭和 31 年 3 月日本農芸化学会で講演した.

(1) D. C. Harrison: <i>Biochem. J.</i> , 25, 1016 (1931).	(7) W. Franke: <i>Ann.</i> , 555, 111 (1944).
(2) 三宅捷, 倉沢文夫: 熱帯農学会誌, 12, 99 (1940).	(8) 倉沢文夫, 伊賀上郁夫: 本誌, 33, 532 (1959).
(3) D. Müller: <i>Biochem. Z.</i> , 199, 136 (1928).	(9) G. Klein: <i>Handbuch der Pflanzenanalyse</i> , II, 786 (1932).
(4) W. Franke: <i>Ann.</i> , 532, 1 (1937); 541, 117 (1939).	(10) 倉沢文夫, 伊賀上郁夫: 本誌, 30, 556 (1956).
(5) 永久正志, 小倉安之: 植物学雑誌, 56, 137 (1942).	(11) G. T. Cori, M. W. Sleim, C. F. Cori: <i>J. Biol. Chem.</i> , 179, 605 (1948).
(6) D. Müller: <i>Enzymologia</i> , 10, 40 (1941).	(12) S. F. Velick, J. E. Hayes, J. Harting: <i>J. Biol. Chem.</i> , 203, 527 (1953).