〔農化 第 35 卷, 第 14 号, p.1378~1381, 1961〕

アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第 7 報)*

グルタミン酸ラセマーゼの精製とその性質

田中正生, 加藤 洋, 木下祝郎 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 36 年 5 月 26 日 受理

先に第 4 報⁽¹⁾, 第 5 報⁽²⁾において *Lactobacillus fermenti* の生産するグルタミン酸ラセマーゼについて報告し, それが単一の酵素であり, さらにこの酵素は今まで推測されていたようにビリドキサル燐酸を補酵素とするのではなく, フラビンがその反応に関連しているのではないかと考えられることを述べた。

著者等はこの酵素のフラビンとの関係を知ることを目的として酵素の精製を行ない, 高純度のグルタミン酸ラセマーゼ資料を得, この酵素の性質を検討した結果, この酵素がフラビン酵素である可能性がさらに強くなった⁽³⁾。本報では酵素の精製についての詳細と, その精製資料について検討した二, 三の酵素化学的性質を報告する。

実 験 方 法

1. 酵素資料: 前報まで^(1~4)と同じ方法によって得られた *L. fermenti* の凍結乾燥菌体を使用した。菌の培養も前報までの培地で静置して行なったが, 本実験では大量の資料を得るため 300 l 鉄タンクにて培養を行ない, 対数増殖期の終りの菌体を集め使用した。
2. 分析方法, 並びに酵素活性: 分析方法もすべて前報までの方法に従い, また酵素活性の表わし方は第 4 報⁽⁴⁾にて報告した方法によった。
3. その他: 実験に使用した燐酸カルシウムゲル, アルミナ Cr ゲルはそれぞれ Sakar⁽⁵⁾ 及び Willstätter の方法⁽⁶⁾により調製したものである。また DEAE-セルローズは L. Light 社のセルローズ粉末より Peterson 等の方法⁽⁷⁾により調製したものかもしくは東洋濾紙株式会社及び生化学研究所の製品を使用した。

実 験 結 果 及 び 考 察

I. 酵素の精製

1) 酵素の抽出に関する検討: 酵素の資料として使用した凍結乾燥菌体よりグルタミン酸ラセマーゼを抽出し, 無細胞抽出液の調製を行なうのは前報のように 10 kc の超音波処理によったが, 本酵素は酸化失活しやす

第 1 図 塩析曲線 (上清)

塩析条件: 0°, pH 6.0

○—○ グルタミン酸ラセマーゼ
 △—△ 蛋白質
 ●—● アラニンラセマーゼ

く, 空気の混入の多い条件で処理する場合には完全に失活し, 回復しない。このため超音波処理の条件について検討を行なった。

pH 7.5 の M/20 燐酸緩衝液中で処理した場合活性の抽出は非常に急速であるが, 同時に失活も起り, この抽出条件では収率よく酵素を回収することは困難であった。一方, 前報⁽²⁾でも述べたように, この酵素の透析の際シスチンを含む燐酸緩衝液中での透析が最も良い結果を得ているので, この場合にもシスチン含有燐酸緩衝液中での処理を検討して, 良好な結果を得ることができた。シスチン濃度は 0.005 M 程度がよく, これ以下ではやや失活をさけることができない。超音波処理時間としては 15 分前後が良好と考えられる。菌体濃度は 50~100 mg/ml が適当であった。

2) 透析条件の検討: この酵素抽出液の透析に関しては第 5 報⁽²⁾に述べたように, シスチン含有の燐酸緩衝液の使用が良く,

* Enzymatic Studies on the Optical Activity of Amino Acids. Part VII. Purification and Some Properties of Glutamic Acid Racemase.

By Masao TANAKA, Yo KATO and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)

第 1 表 塩析 pH の検討 (硫安飽和度 0.3)

pH	グルタミン酸ラセマーゼ活性			
	沈 澱		上 清	
	比活性 u/mg 蛋白	全活性 u	比活性 u/mg 蛋白	全活性 u
5.5	0	0	1.03	91.3
4.5	0.42	14.0	1.03	96.5
3.8	0.55	27.3	11.38	79.7
3.4	0.95	41.6	18.37	55.1
3.1	1.02	49.9	31.25	37.5
2.9	1.02	49.9	41.88	33.6

酵素資料: 全活性 100.3 u, 比酵素活性 1.03 u/mg 蛋白

第 2 表 塩析 pH の検討 (硫安飽和度 0.2)

pH	グルタミン酸ラセマーゼ活性			
	沈 澱		上 清	
	比活性 u/mg 蛋白	全活性 u	比活性 u/mg 蛋白	全活性 u
5.8	0	0	4.12	121.2
3.4	0.73	13.2	19.39	108.9
2.9	1.46	27.8	21.89	83.9
2.6	—	—	24.76	96.4
2.5	1.67	29.4	26.48	97.8
2.3	1.24	27.6	23.05	92.4

酵素資料: 全活性 121.2 u, 比活性 4.08 u/mg 蛋白

第 3 表 アセトン分別沈澱
沈澱の酵素活性

アセトン 区分 (%)	全活性 (u)	全蛋白量 (mg)	比酵素活性 (u/mg)
0 ~ 37.5	21.5	10.5	2.04
37.5 ~ 44.5	57.7	172.0	0.34
44.5 ~ 52.2	131.5	113.4	1.15
52.2 ~ 61.2	517.5	12.0	43.2
61.2 ~ 80.0	64.5	0.4	15.3

酵素資料: 全活性 1166 u, 比酵素活性 3.36 u/mg

みたところ, 硫安飽和度 0.3~0.7 (pH 4.0) で沈澱した資料について, 磷酸カルシウムゲルやアルミナ C γ ゲルでは満足すべき結果は得られなかった。一方, DEAE-セルローズによるクロマトグラフィーにつき検討した結果非常に良好な結果を得ることができた。その操作は酵素の精製の項に述べる通りである。

なお純度の上昇による酵素の不安定化を防ぐため, ここに使用した磷酸緩衝液には 0.001 M の DL-グルタミン酸を添加した。

5) グルタミン酸ラセマーゼの精製: 以上述べたような種々の精製条件の検討結果に従って, グルタミン酸ラセマーゼを精製し非常に高純度の酵素資料を得ることができた。その 1 例を示せば以下のようである。

13.5 g の *L. fermenti* の凍結乾燥菌体を 0~3° で 15 分, 150 ml の M/20 磷酸緩衝液 (pH 7.5, 0.005 M シスチン) で 10 kc の超音波処理により破碎し, 1,500~2,500×G で 20 分遠沈して無細胞抽出液を得る。この抽出液に 2% プロタミン硫酸水溶液 20 ml を加えて生ずる沈澱を除く。この上清に 0.3 飽和まで硫安飽和水溶液を加えた後, pH を 0.1 N 塩酸にて 4.0 とし, 沈澱する蛋白を除去する。酵素蛋白はさらにこの上清に硫安を 0.7 飽和まで加えて沈澱せしめる。沈澱した酵素蛋白は再び 40 ml の M/20 磷酸緩衝液 (pH 7.5, 0.005 M シスチン, 0.001 M DL-グルタミン酸) (以後の処理はすべてこの緩衝液を使用した) に溶解し, 1 l の同じ緩衝液に対して 16 時間透析する。透析内液を再び pH 2.9 で硫安処理を行ない, 硫安飽和度 0.2 から 0.65 までの沈澱を集める。沈澱は 15 ml の磷酸緩衝液に溶解して 1 l の緩衝液に対して透析した後, 冷アセトンによる分別沈澱を行なう。アセトン濃度 (v/v) 52~62% に黄色の沈澱が得られる。この部分を集め再び 5 ml の緩衝液に溶解し, 不溶物を除いた後, その内 4 ml を DEAE-セルローズのカラムを通過せしめ活性フラクションを

この場合も攪拌等の操作はさけた方が安定であった。なお EDTA を添加して透析した場合安定効果は認められるが, シスチンに比して効果は不十分であった。

3) 硫安塩析及びアセトン沈澱条件: 上記の透析によって得られた抽出液について硫安塩析を行なった結果は第 1 図のようである。塩析は 0° で行ない, 硫安飽和水溶液を使用した。この結果よりすると硫安飽和度 0.3~0.6 でほとんどの蛋白が沈澱し抽出液に含まれるアラニンラセマーゼ活性はほぼ蛋白と並行して沈澱するに對し, グルタミン酸ラセマーゼ活性はややくれて沈澱する。この傾向は pH が低くなると強くなり, 第 1 表, 第 2 表に示すように pH 3.0~2.0 ではグルタミン酸ラセマーゼをほとんど沈澱せしめることなく不純蛋白を除くことができる。この処理でのグルタミン酸ラセマーゼ活性の損失はほとんど起らず, 比較的酸性で安定な酵素であると考えられる。このようにして得られた資料はアラニンやバリンに対してラセミ化活性を示さない。

なお, 酸性硫安処理の前にプロタミン或いはストレプトマイシンによって核物質を除くことにより, この硫安処理の収率は良くなる。この前処理は上清の 280 m μ と 260 m μ の吸収比が 1.0 となるように, プロタミン硫酸或いはストレプトマイシン硫酸を添加して行なった。硫安塩析によって比較的その比活性が上昇することが明らかとなったが, さらにこの酵素はアセトンによる分別沈澱によって純度を上げることができる。氷冷した酵素液 (pH 7.5) に冷アセトン (-20°) を滴下し, 操作中の温度を -5° より上昇しないよう留意して行なった分別沈澱の結果は第 3 表に示したようである。

4) DEAE-セルローズクロマトグラフィー: 以上の沈澱法を組合せることによって相当グルタミン酸ラセマーゼの純化を行なうことができるが, この酵素の種々の吸着剤による精製をも試

凍結乾燥菌体 (13.5 g)

第 2 図 精製過程

第 4 表 精製過程の要約

フラクション	比酵素活性 u/mg 蛋白	全活性 u
無細胞抽出液	1.32	7210
プロタミン処理上清	1.39	6630
硫酸沈澱 pH 4.0	3.46	3900
" pH 2.9	9.75	2060
アセトン沈澱	76.2	1097
DEAE-セルローズ処理液*		
フラクション 4	703	549
フラクション 5	517	300

* 各フラクション 4 ml ずつ

集める。DEAE-

セルローズは 16

×1.5 cm のカラム

に充填し, 同じ緩

衝液を通過せしめ

て平衡せしめたも

のである。資料溶

液をカラム上端よ

り加え, 同じ緩衝

液によって集める, 押し出すと, 資料中の不純物は吸着され高純度の酵素溶液を得ることができる。この精製過程及び各フラクションの酵素活性を第 2 図及び第 4 表に示す。

この精製処理によって蛋白当りの比酵素活性を原無細胞抽出液の 500~700 倍の高純度に上げることができた。このフラクションはやや黄色を呈し, アルカリ性で, 紫外線下強い螢光を発する。この酵素液はこれを凍結乾燥して -5° に保存すれば長期間 (1 週間以上) 活性を失なわない。

II. 酵素の性質

1) 酵素反応: この酵素によるグルタミン酸のラセミ化反応については, 第 6 報⁽⁴⁾において部分精製酵素を使用して検討した結果を報告したが, ここに得られた高純度の酵素資料を使用して実験したところ, まったく同じ結果を得ることができた。すなわち反応平衡は pH, 温度基質濃度, 酵素濃度に無関係に 50% D-, 50% L-の点であること, また反応次数は 1 次であり, この反応は可逆一次反応であることが確認された。

反応速度についての検討結果も第 6 報⁽⁴⁾と同様で, pH は 7.5

で最もよく反応が進行し, 温度は 42° 前後が最適であった。反応速度と基質濃度の関係より求められる Michaelis 恒数は $4.7 \sim 5.0 \times 10^{-2} M$ で比較的大きな値であった。これらの結果は基質として D-グルタミン酸及び L-グルタミン酸を使用した場合, いずれも同じ結果を得ることができた。

2) 基質特異性: グルタミン酸ラセマーゼの基質特異性に関しては全く報告がなく, 同時に第 4 報で述べたように *L. fermenti* の菌体には非常に多くの種類のアミノ酸のラセミ化活性があるので, 精製酵素資料を使用して一般のアミノ酸及びグルタミン酸関連物質について検討した。実験方法は今までと同じに D または L 異性体よりその光学対掌アミノ酸の生成を分析し, グルタミン酸誘導体については反応後加水分解して分析した。

実験の結果は 0.12 mg の酵素蛋白を使用した 1 時間の反応 (pH 7.5, 42°) によって $50 \mu\text{mol/ml}$ の D- 及び L-グルタミン酸よりはそれぞれ $6.7 \mu\text{mol/ml}$, $6.1 \mu\text{mol/ml}$ の対掌異性体の生成が見られたのに対して, L-アラニン, L-ロイシン, L-イソロイシン, L-バリン, L-メチオニン, L-フェニルアラニン, L-チロシン, L-プロリン, L-ヒドロキシプロリン, L- α -アミノ酪酸, L-リジン, D-アスパラギン酸等の α -アミノ酸に対しては同条件でまったく活性を示さなかった。

同時にグルタミン酸関連物質として L-ピログルタミン酸, L-グルタミン酸- γ -モノエチルエステル, アセチル-L-グルタミン酸, L-グルタミンも本酵素によってラセミ化はうけず対掌異性体の生成は認められなかった。この結果より, グルタミン酸ラセマーゼはグルタミン酸のみに特異的に作用すること, 並びにグルタミン酸の γ -カルボキシル基或いは α -アミノ基がブロックされた誘導体にも活性を示さないことが明らかとなった。

以上の結果より本菌のグルタミン酸ラセマーゼはグルタミン酸のみに特異的に作用する単一の酵素であって, 今までの報告で述べたようにグルタミン酸のラセミ化は単一のグルタミン酸ラセマーゼによって起ることを確認することができた。この他阻害剤等の影響については第 5 報⁽²⁾にて報告したが, 高純度の試料についても試験を

行ない、同じ結果を得ている。この点については本酵素とフラビンとの関連性に関係があるので、次報において報告する。

要 約

(1) *L. fermenti* のグルタミン酸ラセマーゼをその凍結乾燥菌体より精製した。超音波処理により得られる無細胞抽出液より、プロタミン処理、2 度の酸性硫酸沈澱とアセトン分別沈澱及び DEAE-セルローズ処理によって原抽出液の 500~700 倍の比酵素活性を有する精製資料を得ることができた。この資料はやや黄色を有し、アルカリ性で紫外線下螢光を有する。

(2) 精製資料を使用して検討した結果、その酵素反応について反応平衡は 50% D-, 50% L-であること、反応は可逆一次反応であること、反応最適 pH は 7.5、温度は 42° であること、並びに D- 及び L-グルタミン酸に対する Michaelis 恒数は $4.7 \sim 5.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ であることが再確認された。本酵素の基質特異性はグルタミン酸のみに限られ、他のアミノ酸及びグルタミン酸誘導体たとえばピログルタミン酸、アセチルグルタミン酸、グルタミン酸- γ -モノエチルエステル、グルタミン等 γ -カルボキシ基または α -アミノ基に置換基を有するものには活性を示さぬことが明らかとなった。

(本報告の概要は 1961 年 3 月、九州大学における第 4 回アミノ酸酵集談会シンポジウムにおいて発表した。)

(1) 田中正生 : 本誌, 34, 1022 (1960).	(5) N. K. Sarkar, J. B. Summer : <i>Enzymologia</i> , 14, 280 (1951).
(2) 田中正生 : 本誌, 35, 210 (1961).	(6) S. P. Colowick : <i>Method in Enzymology</i> , I, 1955, p. 97.
(3) M. Tanaka, Y. Kato, S. Kinoshita : <i>Biochem. Biophys. Research. Communication</i> , 4, 114 (1961).	(7) E. A. Peterson, H. H. Sober : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 78, 751 (1956).
(4) 田中正生 : 本誌, 35, 557 (1961).	

[農化 第 35 巻, 第 14 号, p.1381~1385, 1961]

アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第 8 報)*

グルタミン酸ラセマーゼの配合群について

田中正生, 加藤 洋, 木下祝郎 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 36 年 5 月 26 日 受 理

アミノ酸ラセマーゼの補酵素については既報⁽¹⁾においてのべたように、アラニンラセマーゼのピリドキサルリン酸⁽²⁾、スレオニンラセマーゼの ATP 又は AMP⁽³⁾、プロリンラセマーゼの DPN^(4,5) が知られているが、Snell 等のピリドキサル関与の酵素反応機構の研究^(6~12)以来、一般のアミノ酸のラセマーゼの補酵素がピリドキサルリン酸と考えられがちであった。事実第 4 報⁽¹³⁾でも述べたようにバリン等のアミノ酸のラセミ化にはピリドキサルリン酸が関与しているようである。このような点から、グルタミン酸ラセマーゼの補酵素についても *Lactobacillus arabinosus* の補酵素について Wood 等⁽¹⁴⁾及び Glaser⁽¹⁵⁾ が活性への影響とか、ヒドロキシルアミンによる阻害、或いはまたアラニンラセマーゼよりの類推よりピリドキサルリン酸ではなかろうかと推定して報告している。しかし、ピリドキサルリン酸によるこの酵素の活性増加は Ayengar⁽¹⁶⁾ と Glaser⁽¹⁵⁾ はその効果を認めていないし、著者等もその影響をまったく認めることができなかった。このような知見よりすればグルタミン酸ラセマーゼの補酵素をピリドキサルリン酸とするのはいささか疑問がある。

著者等はこの点を明らかにする目的で *L. fermenti* のグルタミン酸ラセマーゼを精製し^(1,17)、その精製酵素について検討した結果、この酵素が FAD を配合群とするフラボ蛋白である可能性がさらに強くなった⁽¹⁾。本報ではこの検討の結果について報告する。

* Enzymatic Studies on the Optical Activity of Amino Acids. Part VIII. On the Prosthetic Group of Glutamic Acid Racemase.

By Masao TANAKA, Yo KATO and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)