マンノース, フラクトース培地に植えたときには, グルコース培養菌体の約 55%, キシロース培地培養菌体は約 35% の活性を認めた。

(3) 培養経過と菌体酵素活性について試験を行なった結果, 酵素活性は菌体生育の初期に強く, 生育の終期には非常に低下する。従って菌体量と酵素活性からみて培養時間は 10 時間前後が適当であろうと考えた。

終りに臨み, 種々御指導を賜った東大応用微生物研究所教授飯塚廣先生, 並びに同教室の古屋先生に深く感謝致します。

本研究は昭和 37 年 6 月 23 日, 日本農芸化学会関東支部講演会で発表した。

(1) 赤堀四郎, 上原喜八郎: <i>Proc. Japan Acad.</i> ,
28, 39 (1952).	大会講演.
(2) 上原喜八郎: 日化誌, 73, 311 (1952).	(13) 実験農芸化学, 上巻, 朝倉書店, p. 235(1960).
(3) 上原喜八郎: 同上, 73, 411 (1952).	(14) N. R. Smith, R. E. Gordon, F. E. Clark :
Aerobic Spore Forming Bacteria, United
States Department of Agriculture, 1952,
p. 40.
(4) 上原喜八郎: 同上, 73, 716 (1952).	(15) R. S. Breed, E. G. D. Murray, N. R. Smith :
Bergey's Manual of Determinative Bacteri-
ology, 7th Ed., the Williams and Wilkins
Co., Baltimore (1957).
(5) S. Mitsuhashi, J. O. Lampen : <i>J. Biol. Chem.</i> ,
204, 1011 (1953).	(16) M. Somogyi : <i>J. Biol. Chem.</i> , 160, 61
(1945); 195, 19 (1952).
(6) S. S. Cohen : <i>J. Biol. Chem.</i> , 201, 71 (1953).	(17) Z. Dishe, E. Borenfreund : <i>J. Biol. Chem.</i>
192, 583 (1951).
(7) M. W. Slein : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 1663
(1955).	(18) 山中 啓 : 日農化会関西支部秋季大会第
183 回.
(8) R. M. Hochstr, R. W. Watson : <i>Arch.
Biochem. Biophys.</i> , 48, 120 (1954).	(19) 山中 啓 : 昭和 37 年度日農化大会.
(9) N. J. Palleroni, M. Doudoroff : <i>J. Biol.
Chem.</i> , 218, 535 (1956).	(20) 名武昌人, 吉村貞彦 : 昭和 37 年度日農化
大会.
(10) R. O. Marshall, E. R. Kool : <i>Science</i> , 125,
648 (1957).	
(11) N. Tsumura, T. Sato : <i>Agr. Biol. Chem.</i> ,
25, 616 (1961).	
(12) 高崎義幸, 田辺 脩 : 昭和 37 年度日農化	

[農化 第 36 卷, 第 12 号, p. 1013~1016, 1962]

細菌による糖の異性化反応に関する研究 (第 2 報)*

グルコース異性化酵素の酵素的性質

高崎 義 幸, 田 辺 脩 (工業技術院発酵研究所)

昭和 37 年 6 月 29 日 受 理

緒 言

著者らは前報⁽¹⁾において新たに分離した細菌がグルコース異性能のあることを認め, この菌が *Bacillus megaterium* に属する菌であること, またこの菌は炭素源としてグルコースを含む培地に植えたときに強い異性化作用を認め, キシロース, その他の糖では活性が非常に低いことをのべた。またこの異性化酵素の作用機作についての試験からこの酵素は酸化還元酵素である可能性が強いことについて報告⁽²⁾した。本報では *Bacillus megaterium* A-1 の洗滌菌体および無細胞抽出液を用いて, このグルコース異性化酵素の酵素的性質について試験を行なったので報告する。

* Studies on the Isomerization of Sugar by Bacteria. Part II. Enzymatic Properties of Glucose Isomerase.

By Yoshiyuki TAKASAKI and Osamu TANABE (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Chiba)

実験方法

使用菌株： 著者らの分離した *Bacillus megaterium* A-1 を使用した。

培養： 3% グルコース添加バイオン培地 80 ml を 200 ml 容三角フラスコに入れ、1 白金耳接種し、28°, 160 r. p. m. で 12 時間振盪培養した。

酵素液： 上記培養菌体を 7,000 r. p. m. で 5 分間遠心分離し、生理食塩水で 2 回洗滌し、後蒸留水で 1 回洗滌し、蒸留水に懸濁（乾燥重量約 20 mg/ml）した菌体懸濁液およびこの菌体懸濁液に適量の石英砂を加え乳鉢で 30 分間磨砕し、10,000 r. p. m. で 10 分間遠心した上澄液を酵素液として用いた。

酵素活性の測定： 前報でのべた方法で行なった。

実験結果および考察

(1) フラクトース生成の時間的経過 M/20 硼砂-M/10 磷酸-カリ緩衝液 (pH 7.7) 1.0 ml, M/10 グルコース 0.1 ml, 菌体懸濁液 0.5 ml, 全容 2.0 ml にし、35° で各時間インキュベートし生成フラクトースを定量

第1図 Fructose 生成の時間的経過

第2図 最適 pH

した。結果は第1図の如くである。

反応は 10 分位まで直線的である。

(2) 最適 pH 各 pH の M/20 硼砂-M/10 磷酸-カリ緩衝液 1.0 ml, M/10 グルコース 0.1 ml, 菌体懸濁液 0.5 ml, 全容 2.0 ml にし、35°

で 10 分間インキュベートし生成フラクトースを定量した。結果は第2図に示す如く最適の pH は 7.7 附近に認められる。

(3) 熱に対する安定性 菌体懸濁液 0.5 ml, M/20 硼砂-M/10 磷酸-カリ緩衝液 1.0 ml, 全容 1.9 ml にし、30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80° でそれぞれ 2 分間加熱後急冷し、M/10 グルコース 0.1 ml を加えて 35°, 10 分間インキュベートした。結果は第3図の如く 40° を越えると活性は急激に低下し、70° の処理で殆んど活性は認められなかった。生菌体を用いた実験であるが、本酵素は熱にかなり不安定な酵素であると思われる。

第3図 熱に対する安定性

(4) 最適温度 M/20 硼砂-M/10 磷酸-カリ緩衝液 (pH 7.7) 1.0 ml, M/10 グルコース 0.1 ml, 菌体懸濁液 0.5 ml, 全容 2.0 ml にし、各温度に 10 分間インキュベートした。結果は第4図に示すごとく、35° 附近に最適の作用温度を認めた。

第4図 最適温度

(5) 基質特異性 基質として D-グルコースのほか、D-マンノース、D-ガラクトース、D-キシロース、D-アラビノース、L-ラムノースおよび D-ソルビトール、D-マンニトールの糖アルコールから相当するケトースの生成について試験した。試験方法は実験方法において記載した方法と同じく、基質としてそれぞれ M/10 濃度、0.1 ml を加えた。結果は第1表に示すごとく基質特異性が高く、グルコースのみに作用し、他

第 1 表 基質特異性

	Ketose 生成量		Ketose 生成量
D-Glucose	60 μ g	D-Mannose	0 μ g
D-Galactose	0	D-Xylose	0
D-Arabinose	0	D-Ribose	0
L-Rhamnose	0	D-Mannitol	0
D-Sorbitol	0		

反応液: M/10-phosphate buffer (pH 7.7) 1.0 ml, M/10-substrate 0.1 ml, 菌体懸濁液 0.5 ml, 全容 2.0 ml, 35°, 10 分間反応。

第 2 表 SH 試薬の効果

	Fructose 生成量		Fructose 生成量
None	80 μ g	Cysteine	90 μ g
Glutathione	77	Cystine	84

反応液: M/20-borate-M/10-phosphate buffer (pH 7.7) 1.0 ml, M/10-glucose 0.1 ml, M/10-SH-reagent 0.1 ml, 菌体懸濁液 0.7 ml, 全容 2.0 ml, 35°, 10 分間反応。

第 3 表 阻害剤の影響 (それぞれ 1×10^{-3} M)

	相 対 活性度		相 対 活性度
None	100	MIA	111
NH ₂ NH ₂	70	PCMB	108
NH ₂ OH	53	Arsenate	65
NaN ₃	63	Arsenite	18
Thiourea	86	<i>o</i> -Phenylenediamine	100
Urea	86	<i>m</i> -Phenylenediamine	110
KCN	86	2,4-DNP	104
NaF	97	<i>p</i> -Nitrophenol	73

反応液: M/20-borate-M/10-phosphate buffer (pH 7.7), 1.0 ml, M/10-glucose 0.1 ml, M/10-inhibitor 0.1 ml, 菌体懸濁液 0.5 ml, 全容 2.0 ml, 35°, 10 分間反応。

第 4 表 金属イオンの影響 (それぞれ 1×10^{-3} M)

	相対活性度		相対活性度
None	100	NiSO ₄	65
MgSO ₄	96	BaCl ₂	105
MnSO ₄	91	CuSO ₄	33
CoCl ₂	88	CaCl ₂	65
FeSO ₄	37	HgCl ₂	39
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0	CdCl ₂	50
ZnSO ₄	80		

反応液: M/20-borate-M/10-phosphate buffer (pH 7.7) 1.0 ml, M/10-glucose 0.1 ml, M/100-metal 0.2 ml, 菌体懸濁液 0.5 ml, 全容 2.0 ml, 35°, 10 分間反応。

第 5 表 キレート試薬及び金属結合剤の影響

	相対活性度		相対活性度
None	100	EDTA	104
Oxalate	106	Citrate	107
α, α' -Dipyridyl	111		

反応液: M/10-phosphate buffer (pH 7.7) 1.0 ml, M/10-chelating agent 0.1 ml, 菌体抽出液 0.5 ml, 全容 1.9 ml を室温で 10 分間インキュベート後 M/10-glucose 0.1 ml 添加, 35°, 10 分間反応。

(8) 各種金属イオンの影響 第 4 表に示すように 13 種の金属イオンを終濃度 1×10^{-3} M になるように添加しその効果を試験した。金属イオンを添加していないときの活性を 100 として各種の金属イオンの効果を示したものである。表から明らかなごとく Fe⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Hg⁺⁺ により強く阻害をうける。また, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺ によっても阻害効果を認めた。このことは一般のペントースイソメラーゼ, ヘキソースイソメラーゼが Mg⁺⁺(4,6,10), あるいは Mn⁺⁺(4,11), Co⁺⁺(10,12) により賦活されるという報告とは異なることである。しかし, Palleroni

のヘキソース, ペントース, 糖アルコールから相当するケトースの生成は認められなかった。

(6) SH 試薬の効果 Palleroni⁽⁸⁾ らは *Pseudomonas saccharophila* によるマンノースイソメラーゼがグルタチオンにより賦活されることをのべている。また Slein⁽⁴⁾ は *Pasteurella pestis*, Strain A-1122' によるキシロースイソメラーゼがシステインにより賦活されることをのべている。そこでグルコース異性化酵素に対する SH 試薬の影響について試験をこここみた。

使用した試薬はグルタチオン, システイン, シスチンでそれぞれ 5×10^{-3} M になるように添加した。結果は第 2 表に示すごとくいずれも大した添加効果もなく, また阻害作用も認められなかった。後にのべるように Hg⁺⁺ による阻害作用は認められたが, *p*-クロロマーキュリベンゾエート, モノヨード酢酸による阻害が認められないので SH 酵素ではないのでないかと考えられる。

(7) 阻害剤の影響 各種のペントースイソメラーゼやヘキソースイソメラーゼに各種試薬あるいは代謝系阻害剤を加え, 他の酵素系を停止させたり, またイソメラーゼの平衡を shift させたりしている実験は数多く報告されている。例えば Hochster⁽⁶⁾ らがキシロースイソメラーゼ反応に NaF を添加していることや, Marshall⁽⁶⁾ や津村⁽⁷⁾ 氏がが硫酸緩衝液を用いることによりグルコースからフラクトースの生成を増加せしめている報告がある。また, 一般にペントースイソメラーゼは硼酸を加えることにより平衡が著しくケトース側に shift することが認められている(4,5,8,9)。

そこで各種阻害剤についての影響を調べた結果は第 3 表に示すごとくである。阻害剤を添加していないときの活性を 100 とし各種阻害剤の影響を示したものである。

Marshall や津村氏が報告している硫酸の効果についてはかえって阻害作用のあることを認めた。

また, この酵素は, アザイド, ヒドロキシルアミン, ヒドラジン等により阻害をうける。しかし, *p*-クロロマーキュリベンゾエート, モノヨード酢酸, 2,4-ジニトロフェノール, フッ化ソーダ等による阻害は認められなかった。

ら⁽⁹⁾は *Pseudomonas saccharophila* のマンノースイソメラーゼが, また Anderson ら⁽¹⁰⁾は *Aerobacter aerogenes* の L-キシロースイソメラーゼが Mg^{++} , Mn^{++} を添加しても効果が認められないとのべている。

(9) キレート試薬および金属結合剤の影響 キレート試薬および金属結合剤が本酵素に対していかなる効果があるかをみるために実験を行なった。酵素液としては無細胞抽出液を用い, 各種試薬を終濃度 $5 \times 10^{-8} M$ になるように添加し, 室温で 10 分間インキュベート後, グルコースを添加し活性を測定した。結果は第5表に示すごとくである。キレート試薬および金属結合剤を添加しても活性の低下は認められなかった。このことは前項の試験において, 金属イオン添加の効果を認めなかったように, 生菌体, あるいは無細胞抽出液を酵素液として用いる段階では金属イオンを要求しないのか, または金属イオンにより賦活される酵素でないことを示すものと思われる。いずれにしても精製した酵素について再試験をこころみねばならないが, Palleroni⁽³⁾ はマンノースイソメラーゼがエチレンジアミンテトラアセテートの添加により賦活されることをのべている。

要 約

- (1) *Bacillus megaterium* A-1 のグルコース異性化酵素についてその酵素的性質を調べた。
- (2) グルコース異性化酵素の最適 pH は 7.7 附近に, また最適温度は 35° 附近に認められた。
- (3) 熱に対してはかなり不安定で, 50°, 2 分間加熱することにより残存活性は約 28%, 70°, 2 分間加熱すると活性は殆んど認められない。
- (4) この酵素の基質特異性について試験した結果, 各種のペントース, ヘキソース, 糖アルコールからはいずれも相当するケトースの生成は認められず, グルコースのみに作用することがわかった。
- (5) SH 試薬として, グルタチオン, システイン, シスチンにつきその効果を調べたが, いずれも添加の効果もなく, また阻害作用も殆んど認められなかった。
- (6) 各種試験した阻害剤のうち, 砒酸, 亜砒酸, アザイド, ヒドロキシルアミン, ヒドラジン, *p*-ニトロフェノール, KCN, 尿素, チオ尿素等により阻害作用を認めた。*p*-クロロマーキュリベンゾエート, モノヨード酢酸, 2,4-ジニトロフェノール, フッ化ソーダ等による阻害は認められなかった。
- (7) 各種金属イオンの効果について試験した結果, Fe^{++} , Fe^{+++} , Hg^{++} により強く阻害をうけ, Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++} によってもわずかに阻害をうけた。
- (8) キレート試薬および金属結合剤について試験を行なった結果, 活性の低下は認められなかった。

本研究は昭和 37 年 6 月 23 日, 日本農芸化学会関東支部講演会で発表した。

(1) 高崎義幸, 田辺 脩 : 本誌, 36 , 1010 (1962).	(7) N. Tsumura, T. Sato : <i>Agr. Biol. Chem.</i> , 25 , 616 (1961).
(2) 高崎義幸, 田辺 脩 : 昭和 37 年度日農化大会講演.	(8) S. S. Cohen : <i>J. Biol. Chem.</i> , 201 , 71 (1953).
(3) M. J. Palleroni, M. Doudoroff : <i>J. Biol. Chem.</i> , 218 , 535 (1956).	(9) M. Green, S. S. Cohen : <i>ibid.</i> , 219 , 557 (1956).
(4) M. W. Stein : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77 , 1663 (1955).	(10) R. L. Anderson, W. A. Wood : <i>ibid.</i> , 237 , 296 (1962).
(5) R. M. Hochster, R. W. Watson : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 48 , 120 (1954).	(11) K. Yamanaka : <i>Agr. Biol. Chem.</i> , 25 , 272 (1961).
(6) R. O. Marshall, E. R. Kool : <i>Science</i> , 125 , 648 (1957).	(12) 山中 啓 : 昭和 37 年度日農化大会講演.