われる。

終りに臨み終始御指導をいただいた本学佐橋佳一教授に深謝いたしますと同時に、実験に協力してくださった本学生物化学研究室の諸氏に御礼申し上げます。また研究費の一部を援助していただいた味の素株式会社に感謝いたします。

(1) K. Okunuki et al. : <i>Bat. Mag.</i> , 51 , 270 (1937).	(4) T. Suzuki, A. Maekawa, T. Hasegawa, M. Ito, H. Honda, T. Nagano, S. Saito, Y. Sahashi : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan.</i> , 22 , 39 (1958).
(2) 佐橋佳一, 鈴木隆雄, 前川昭男 : 本誌, 29 , 422 (1955).	(5) T. Suzuki, T. Hasegawa, A. Maekawa, Y. Sahashi : <i>ibid.</i> , 22 , 341 (1958).
(3) 前川昭男, 鈴木隆雄 : 東京農大農学集報, 3 , 29 (1956).	

〔農化 第36巻, 第6号, p.504~506, 1962〕

植物酵素による含硫アミノ酸と α -ケトグルタル酸とより L-グルタミン酸の生成に関する研究 (第2報)*

南瓜果皮より L-glutamate forming transaminase の分離

長谷川忠男, 鈴木隆雄 (東京農業大学農芸化学科)

昭和36年10月9日受理

緒 言

南瓜果皮より分離せる酵素蛋白として L-glutamic acid decarboxylase^(1~3) 及び L-glutamate- γ -aminobutyrate transaminase^(4,5) 等はすでに知られている。著者等は別報⁽⁷⁾でこれら酵素蛋白標品中には基質に L-メチオニンと α -ケトグルタル酸を添加した場合 L-glutamate forming transaminase 活性の存在することを明らかにした。そこでさらにこの酵素蛋白の単離を硫酸飽和度を変えた塩析法⁽⁶⁾により、分離精製を行う方法にて活性度の強い部分の検索に努め、またこの L-glutamate forming transaminase に関連する酵素系の存在について基質含硫アミノ酸を数種用いて L-glutamic acid の生成の有無から判定を試み、2, 3 の知見を得たので以下に報告する。

実 験 の 部

(1) 実験材料 : 市販東京南瓜収穫末期 (10月中旬) のものを用いた。

(2) 酵素標品調製法 : 南瓜果皮 1kg から第1報第1表の方法に準じて磨砕汁液を調製した後、最初硫酸を 0~0.2 飽和に添加して 3,000 r. p. m., 10 分間遠心分離後沈澱を分離、その上層液に 0.2~0.4 飽和になるように硫酸を追加して沈澱を生ぜしめ、以下順次同様の方法にて 0.4~0.6, 0.6~0.8, 0.8~1.0 各飽和とし、それぞれの塩析蛋白部分を分離し、Visking cellulose tube に注加し、水道水にて 24 時間流水透析した後、水に不溶部分を 3,000 r. p. m., 10 分間遠心分離し、それぞれの沈澱を陶土板上に集めて塩化カルシウム真空デシケーターにて乾燥し酵素標品を得た。各飽和部分より得た酵素標品得量は第1図の如くである。この際 0.8~1.0 飽和のものは得量少く透析せず、そのまま酵素反応に用いた。また透析操作の際遠心分離して水に不溶の蛋白を分離後、その上澄液の酵素蛋白を再度それぞれの相当する各飽和度になる如く硫酸を加えて沈澱を生ぜしめ、3,000 r. p. m., 10 分間遠心分離後、沈澱を陶土板上にて乾燥した。酵素標品の得量は第2図の如くである。

(3) 反応液組成及び実験法 : 上記各飽和度の酵素標品 100mg を用いて第1報に示した反応組成及び実験

* Formation of L-Glutamic Acid from Sulfur Amino Acid and α -Ketoglutaric Acid by Transaminase in Plant. Part II. On Preparation of L-Glutamate Forming Transaminase from Squash Ring.
By Tadao HASEGAWA and Takao SUZUKI (Department of Agricultural Chemistry, Tokyo Agricultural University)

第 1 図 南瓜果皮 1 kg より硫安各飽和度により得られた酵素蛋白標品得量 (流水透析)

第 3 図 南瓜果皮より硫安各飽和度により得られた酵素蛋白標品の L-グルタメート-L-メチオニントランスアミナーゼ活性力

* 未透析物

L-GA: 反応液 0.02 ml 中の L-グルタミン酸生成量 (μg)

第 1 表 南瓜果皮より得られた L-グルタメート-L-メチオニントランスアミナーゼの他の含硫アミノ酸に対する特異性

基質含硫アミノ酸	基質 α -ケト酸	L-グルタミン酸生成量 (μg)
L-メチオニン	α -ケトグルタル酸	31.9
DL-メチオニン	α -ケトグルタル酸	11.0
L-システイン	α -ケトグルタル酸	52.5
L-シスチン	α -ケトグルタル酸	0
DL-ホモシステイン	α -ケトグルタル酸	0

* L-グルタミン酸生成量: 反応液 0.02 ml 中の μg

多く、活性度も顕著に表われることが明らかとなった。0.4~0.6 及び 0.6~0.8 は得量は少ないが活性度は比較的高い。これらはいずれも透析を行わない粗酵素標品に比して著しく活性度が高い。また上澄液の再塩析物については 0~0.2 飽和部分では酵素蛋白を得ることができず、0.2~0.4 飽和部分において最も得量多く活性度も認められたが、流水に不透析部分に比べると著しく弱いことが明らかとなった。0.4~0.6 及び 0.6~0.8 飽和部分の場合は活性度は極めて微弱となる。これらの現象を考慮すると L-glutamate forming transaminase は流水に不透析蛋白部分と強く結合した状態で存在するのではないかと考えられる。硫安 0.2~0.4 飽和部分の酵素蛋白標品を用い含硫アミノ酸に対する特異性につき検討を加えた。その結果メチオニンの場合 L 型と DL 型で L-グルタミン酸の生成量が前者では 0.02 ml 中に 31.9 γ , DL 型では 11.0 γ となり、この酵素蛋白は L 型に特異的に作用することを示唆した。ほかに L-システインからは極めて高濃度の L-グルタミン酸生成が認められたが、L-シスチン、DL-ホモシステインでは全く生成が認められなかった。

第 2 図 同上流水透析を行った際の上澄液より再塩析せる酵素蛋白標品得量

第 4 図 南瓜果皮 1 kg より硫安各飽和度により得られた酵素蛋白の透析外液より再塩析せるトランスアミナーゼ活性力

L-GA: 反応液 0.02 ml 中の L-グルタミン酸生成量 (μg)

方法により、L-グルタミン酸の定量を行い生成量の多少から酵素活性度の強弱を判定した。結果は第 3 図に示す。また透析処理後遠心分離した際に生ずる上澄液から再塩析せる酵素標品 (第 2 図) を用いた酵素活性度を第 4 図に示す。

(4) 南瓜果皮より分離した L-glutamate forming transaminase 標品の含硫アミノ酸に対する基質特異性:

酵素蛋白標品としては南瓜果皮硫安 0.2~0.4 飽和部分より得られたものを用い、第 1 報に示す反応組成のうち、基質含硫

考察及び要約

以上の実験から南瓜果皮より L-glutamate forming transaminase を分離する際、硫安 0~0.2 飽和の部分で生ずる沈澱は量的には比較的多いが、しかし活性度は微弱であり、0.2~0.4 飽和の部分で最も得量も

化学研究室の諸氏に御礼申し上げます。また研究費の一部を援助していただいた味の素株式会社に感謝いたします。

(1) K. Okunuki et al.: <i>Botan. Mag.</i> , 51 , 270 (1937).	(5) T. Suzuki, T. Hasegawa, A. Maekawa, Y. Sahashi: <i>ibid.</i> , 22 , 341 (1958).
(2) 佐橋佳一, 鈴木隆雄, 前川昭男: 本誌, 29 , 422 (1955).	(6) R. J. Ellis, D. D. Davies: <i>Biochem. J.</i> , 78 , 615 (1961).
(3) 前川昭男, 鈴木隆雄: 東京農大農学集報, 3 , 29 (1956).	(7) T. Suzuki, T. Hasegawa, Y. Sahashi: <i>J. Agr. Sci.</i> , (Tokyo Nogyo Daigaku) 印刷中.
(4) T. Suzuki, A. Maekawa, T. Hasegawa, M. Ito, H. Honda, T. Nagano, S. Saito, Y. Sahashi: <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan.</i> , 22 , 39 (1958).	

〔農化 第 36 卷, 第 6 号, p. 506~510, 1962〕

L-グルタミン酸醗酵に関する研究 (第2報)*

生長促進因子について (その3)

L-システインによる 7,8-diaminopelargonic acid の活性増大

奥村信二, 都河竜一郎, 角田俊直, 元崎信一 (味の素株式会社中央研究所)

昭和 36 年 10 月 14 日 受理

I. 緒 論

著者等は 7,8-diaminopelargonic acid, 7-keto-8-aminopelargonic acid, 7-amino-8-ketopelargonic acid, 7,8-diketopelargonic acid 等が強力な biotin 活性を有し, biotin 要求性 *Brevibacterium* 属細菌の L-グルタミン酸醗酵で biotin 代替活性を示し, L-グルタミン酸生産を円滑に進行させることをすでに報告した⁽¹⁾。これらの pelargonic acid 群物質は d-biotin の precursor と考えられ, L-グルタミン酸醗酵培地での使用量も d-biotin よりやや多量である特徴をもっている。醗酵培地での使用量節減を期待するために pelargonic acid 群物質の biotin 活性を増大させることを検討し, アミノ酸・ビタミン類の影響に注目した結果 システイン, シスチン, ホモシステイン等をそれぞれ単独で醗酵培地に添加すると 7,8-diaminopelargonic acid の活性が約 10 倍増大することを知ったのでここに報告する。

II. 実験と結果

(1) 方法 本報の L-グルタミン酸醗酵に用いる基礎培地はグルコース 10%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, Fe 2 p. p. m. (硫酸塩), Mn 2 p. p. m. (硫酸塩) の組成である。これの培地に biotin 系 growth factor, アミノ酸類, ビタミン類が添加される。培地は中性で 500 ml 坂口フラスコに 20 ml 分注し, 110°, 2 分殺菌する。醗酵菌は *Brevibacterium lactofermentum* No. 2256, *Brevibacterium flavum* No. 2247 の 2 菌株を使用した。醗酵菌のブイヨン寒天斜面 31°, 24 時間培養菌体を接種する。7 cm, 120 r. p. m. の住復振盪機で 31°, 40 時間振盪培養する。培養開始時並びに経過中に尿素を添加しアンモニアを供給する。培養完了液の生育・残糖・L-グルタミン酸が分析される。生育は培養液の 26 倍稀釈液の 562 mμ 吸光度, 残糖は Lehmann Schoorl 法による直接還元糖, L-グルタミン酸は *E. coli* 脱炭酸酵素の検圧法により示される。残糖・L-グルタミン酸は始発グルコースに対する重量百分率で表示する。d-biotin, dl-desthiobiotin は市販品, pelargonic acid 群物質並びに biotin diaminocarboxylic acid は本研究所にて合成したものである⁽¹⁾。

(2) アミノ酸類並びにビタミン類の 7,8-diaminopelargonic acid に対する影響 Pelargonic acid 群

* Studies on the L-Glutamic Acid Fermentation. Part II. No. 3. Increase of the Activity of 7,8-Diaminopelargonic Acid by L-Cysteine.

By Shinji OKUMURA, Ryuichiro TSUGAWA, Toshinao TSUNODA and Shin'ichi MOTOZAKI
(The Central Research Laboratory of Ajinomoto Co., Ltd.)