[農化 第 37 卷, 第 3 号, p. 151~153, 1963]

細菌による糖の異性化反応に関する研究 (第 5 報)*

Bacillus megaterium A-1 によるフラクトースの代謝経路

高崎 義幸, 田 辺 脩 (工業技術院発酵研究所)

昭和 38 年 9 月 10 日 受 理

緒 言

前報までに *Bacillus megaterium* A-1 のグルコース異性化酵素の存在とその性質およびその作用機作等について報告し, また本菌にはグルコースの代謝系としてグルコース脱水素酵素による酸化発酵系およびヘキソキナーゼ, グルコース-6 リン酸イソメラーゼ, グルコース-6 リン酸脱水素酵素も存在することを認めた. 本報ではグルコース異性化酵素により生成したフラクトースがいかなる代謝経路により分解されるかについて試験した.

実 験 方 法

使用菌株: *Bacillus megaterium* A-1 を用いた.

使用酵素液: 前報に示す条件で培養した菌体を集菌し水洗後, 超音波破砕器で 10 kc, 15 分間破砕し, 10,000 r. p. m. で 10 分間遠心した上澄液を酵素液として使用した.

フラクトキナーゼの測定: Hers⁽¹⁾ の方法に従って行った. すなわち ATP の存在下におけるフラクトースの消費量をもって測定した. ここでは異性化酵素活性を止めるために硫酸塩を添加した.

アルドラーゼの測定: Warburg & Christian⁽²⁾ による測定法を用いた. すなわちフラクトース-1,6-二リン酸を基質とし, これがアルドラーゼにより分解されて生成する D-グリセリンアルデヒドリン酸が D-グリセリンアルデヒドリン酸脱水素酵素および DPN, 硫酸塩の存在下で脱水素されると同時に DPN が還元され, それに準じて生ずる 340 mμ における吸収の増加を測ることによりアルドラーゼ活性を測る間接的方法である.

フラクトース-6 リン酸キナーゼの測定: 上記の方法において基質としてフラクトース-6 リン酸を用い, 同様 DPN の還元型を 340 mμ の吸収の増加で測定した.

実験結果および考察

(1) アルドラーゼ, グリセリンアルデヒドリン酸脱水素酵素の存在 反応液は第 1 図に記した条件で行った. すなわち硫酸ソーダ, グルタチオンの存在下でフラクトース-1,6-二リン酸を基質として加えたときに生成する DPNH を 340 mμ の吸光度で測定した. 結果は第 1 図に示すごとくアルドラーゼおよび DPN に link したグリセリンアルデヒドリン酸脱水素酵素の存在を認めることができる.

(2) フラクトース-6 リン酸キナーゼの存在 反応液は第 2 図に示すごとくである. すなわち基質としてフラクトース-6 リン酸を用い, ATP が存在するときと存在しないときの DPNH の生成を 340 mμ の吸光度で測定した. 結果は第 2 図に示すごとく ATP が存在するときには明らかに DPNH の生成を認めることができるが, ATP が存在しないときにはほとんど認めることがで

第 1 図 アルドラーゼとグリセリンアルデヒドリン酸脱水素酵素

完全反応液: 0.1M トリス緩衝液 (pH 7.5) 1.5 ml, 0.025M フラクトース-1,6-二リン酸 0.2 ml, 1 mg/ml DPN あるいは TPN 0.1 ml, 0.1M Na₂HAsO₄ 0.2 ml, 0.025M グルタチオン 0.2 ml, 無細胞抽出液 0.8 ml, 全量 3.0 ml, 室温 (20°)

●—● DPN (完全反応液)
○—○ 完全反応液—グルタチオン
△—△ TPN (完全反応液)
×—× 完全反応液—Na₂HAsO₄

* Studies on the Isomerization of Sugars by Bacteria. Part V. Pathway of Fructose Degradation in *Bacillus megaterium* A-1.

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

第2図 フラクトース-6リン酸キナーゼ, アルドラーゼとグリセリンアルデヒドリン酸脱水素酵素

完全反応液: 0.1M トリス緩衝液 (pH 7.5) 1.5 ml, 0.025M フラクトース-6リン酸 0.2 ml, 1 mg/ml DPN 0.1 ml, 0.1M $MgCl_2$ 0.15 ml, 0.1M Na_2HAsO_4 0.2 ml, 0.025M グルタチオン 0.2 ml, 0.1M グリシン 0.2 ml, 無細胞抽出液 0.4 ml, 全量 3.0 ml, 室温 (20°)

×——× 完全反応液 ●——● 完全反応液-ATP

第3図 フラクトキナーゼ

完全反応液: 0.1M トリス緩衝液 (pH 7.5) 4.0 ml, 0.025M フラクトース 0.4 ml, 0.05M ATP 0.4 ml, 0.1M $MgCl_2$ 0.4 ml, 0.1M NaF 0.1 ml, 0.2M Na_2HAsO_4 * 0.4 ml, 無細胞抽出液 2.0 ml, 全量 8.0 ml, 35° で反応

×——× 完全反応液 ●——● 完全反応液-ATP

* Na_2HAsO_4 はグルコース異性化酵素作用を止めるために加えた。

きない。

(3) フラクトキナーゼの存在 フラクトキナーゼの測定は Hers らによるフラクトースの消費量でもって測定した。反応液は第3図に示すとき条件で行い, 10, 20, 30 分目に 2 ml ずつ取り出し, 2% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 ml, 1.8% $B_3(OH)_2 \cdot 8H_2O$ 2 ml を加えて反応を止めると同時に生成するフラクトース-リン酸を沈澱せしめ, 上澄液についてシステイン-カルバゾール法で残存するフラクトースを定量した。第3図から明らかなごとく ATP が存在するときにはフラクトースの消失を認めることができる。このフラクトキナーゼがグルコキナーゼと同一酵素であるか否かは未だ検討していないが, Slein⁽⁹⁾ らによるとヘキソキナーゼによるフラクトースのリン酸エステル化はグルコース, マンノースの存在により完全に阻害されるといわれているが, 本酵素については第2表

第1表 フラクトキナーゼに対する Mg^{++} の影響

	フラクトース (μg)
完全反応液	270
“ -ATP	436
“ - $MgCl_2$	418

完全反応液: 0.1M トリス緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 0.1M フラクトース 0.1 ml, 0.05M ATP 0.1 ml, 0.1M NaF 0.1 ml, 0.2M Na_2HAsO_4 * 0.1 ml, 0.1M $MgCl_2$ 0.1 ml, 無細胞抽出液 0.4 ml, 全量 2.0 ml, 35°, 30 分間反応

* Na_2HAsO_4 はグルコース異性化酵素作用を止めるために加えた。

第2表 フラクトキナーゼに対するグルコース, グルコソンの影響

	フラクトース (μg)
完全反応液	218
“ -ATP	434
“ +グルコース	224
“ +グルコソン	220

完全反応液: 0.1M トリス緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 0.1M フラクトース 0.1 ml, 0.05M ATP 0.1 ml, 0.1M NaF 0.1 ml, 0.2M Na_2HAsO_4 * 0.1 ml, 0.1M $MgCl_2$ 0.1 ml, 無細胞抽出液 0.4 ml, 0.1M グルコース, グルコソン 0.1 ml, 全量 2.0 ml, 35°, 30 分間反応

* Na_2HAsO_4 はグルコース異性化酵素作用を止めるために加えた。

に示すようにグルコースによる阻害は認められず, またグルコソンはヘキソキナーゼを阻害⁽⁴⁾し, 酵母の嫌氣的発酵を阻害⁽⁵⁾すると報告されているが, グルコソンによる阻害も認められなかった。

グルコースがフラクトースに変化して後フラクトキナーゼでリン酸エステル化されるとすれば, フラクトキナーゼの生成は培地の炭素源に影響されるのでないかと考え実験を行った。炭素源としてグルコース, フラクトース, キシロース, アラビノース各 2%, カザミノ酸 2%, “C” 培地⁽⁶⁾ 80 ml を含む培地に植え, 30°,

第3表 フラクトキナーゼの生成と培養炭素源

培養炭素源	フラクトース (μg)	蛋白量 (mg)
無 添 加	400	1.7
D-グルコース	完全反応液 -ATP	435
	“ “ -ATP	147
D-フラクトース	完全反応液 -ATP	428
	“ “ -ATP	160
D-キシロース	完全反応液 -ATP	425
	“ “ -ATP	296
D-アラビノース	完全反応液 -ATP	402
	“ “ -ATP	312
	“ “ -ATP	408

培地: カザミノ酸 2%, グルコース, フラクトース, キシロースあるいはアラビノース各 2%, 30°, 160 r.p.m., 15 時間培養
フラクトキナーゼ活性の測定は前表と同様。

160 r. p. m. で 15 時間振盪培養し, 実験法において記載したと同様に調整した無細胞抽出液を酵素液として使用し, 活性を測定した結果は第 3 表に示すようにグルコース, フラクトースを炭素源とするときに強い活性が認められた.

以上のべた酵素の他に, *B. megaterium* A-1 は前報においてのべたグルコース異性化酵素, グルコース脱水素酵素等の諸酵素が含まれているので, 好気的な条件の下ではフラクトースがグルコースに異性化されて後, グルコース脱水素酵素が働いて酸化発酵されていく場合も考えられる.

要 約

Bacillus megaterium A-1 のフラクトース代謝系について試験した結果, 本菌がフラクトキナーゼ, フラクトース-6 リン酸キナーゼ, アルドラーゼ, グリセリンアルデヒドリン酸脱水素酵素等を有することを証明し, Embden-Meyerhof-Parnas 経路の存在の可能性を明かにした.

グルコース, グルコソニンによるフラクトキナーゼの阻害は認められなかった. フラクトキナーゼ活性は培養炭素源としてフラクトースあるいはグルコースに培養したときに強く認められた.

(1) H. G. Hers : <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , 8 , 416, 426 (1952).	(4) M. T. Hudson, G. E. Woodward : <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , 28 , 127 (1958).
(2) O. Warburg, W. Christian : <i>Biochem. Z.</i> , 314 , 149, 399 (1943).	(5) I. L. S. Mitchell, S. Bayne : <i>Biochem. J.</i> (London), 50 , XXVII (1952).
(3) M. W. Slein, G. T. Cori, C. F. Cori : <i>J. Biol. Chem.</i> , 186 , 763 (1950).	(6) 高崎義幸, 田辺 脩 : 本誌, 37 , 93 (1963).