[農化 第 41 卷, 第 3 号, p.94~98, 1967]

微生物の麴酸代謝に関する研究 (第9報)

麴酸分解菌 *Arthrobacter ureafaciens* K-1 菌の D-galacturonate ketol-isomerase について

妹背 醇, 野々村誠一, 辰巳忠次 (大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 41 年 9 月 19 日 受 理

Studies on Kojic Acid Metabolism by Microorganisms Part IX. D-Galacturonate ketol-isomerase in *Arthrobacter ureafaciens* K-1 a Kojic Acid-decomposing Bacterium

By Jun IMOSE, Seiichi NONOMURA and Chuji TATSUMI

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka, Japan

In the previous report, the authors proposed the mechanism of kojic acid decomposition by *Arthrobacter ureafaciens* K-1 on the basis of the identification of a few intermediates. According to the reaction sequence, D-galacturonic acid is isomerized to form its corresponding keto acid, D-tagaturonic acid. It was suggested that the enzymic isomerization was catalyzed by D-galacturonate ketol-isomerase.

This paper is concerned with the partial purification and properties of uronic acid isomerase and the identification of the reaction product.

The results was follows: The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation and column chromatography with Sephadex G-75. The activity increased to 24-fold. The maximum activity was observed at pH 7.5 and the optimum temperature was 30°C for incubation time of 60 minutes. By treatment with high temperature (80°C, 5 minutes), the activity was almost lost. The enzyme reacted with D-glucuronic acid as well as D-galacturonic acid. The enzyme seemed not to require any divalent metal ion for its action and was not affected by chelating reagents. On the other hand, the enzyme activity was strongly inhibited by the addition of pCMB. The isomerization product was identified by paper chromatography.

(Received September 19, 1966)

緒 言

著者ら⁽¹⁾は先に麴酸分解菌による麴酸代謝を研究する目的で、麴酸分解菌 *Arthrobacter ureafaciens* K-1 菌の休止菌を用いて麴酸を分解させ、その反応液中から 2, 3 の中間物を分離・同定し、その結果から本菌による麴酸分解経路を推定して報告したが、その経路中 D-ガラクトロン酸の分解は、D-ガラクトロン酸ケトールイソメラーゼの作用により異性化を受けて D-タガツロン酸に convert されると推定した。

ウロン酸イソメラーゼについては渡辺ら⁽²⁾により、*Escherichia coli* K-12 の D-グルクロン酸を炭素源とした培地より得られた菌体から、Takagi⁽³⁾ らにより同株の D-グルクロノラクトンを単独炭素源とした培地より

得られた菌体からとり出された。他に神田⁽⁴⁾ も同じ *E. coli* K-12 において、朝井⁽⁵⁾ は *Pseudomonas ovalis* において同様なイソメラーゼの存在を認めた。また、Ashwell⁽⁶⁾ は *E. coli* を単独炭素源として D-ガラクトロン酸で、Payne⁽⁷⁾ は Marine bacterium を D-グルクロン酸で培養した菌体から本酵素の存在を示した。McCorrie⁽⁸⁾ らは、*Aerobacter aerogenes* を用いて、Payne⁽⁹⁾ らは *Serratia marcescens* を用いて、それぞれイソメラーゼの存在を報告している。このように諸氏により報告されているが、培養の際の炭素源や異性化反応の際の金属塩の要求性などが異なる微生物の各酵素を特徴づけている。

本報では、本菌の D-ガラクトロン酸から D-タガツロン酸への異性化能と本酵素の性質について、麴酸を炭素

源として培養して得られた菌体の部分精製酵素を用いて検討した結果を報告する。

実験方法

(1) 使用菌株：野々村ら⁽¹⁰⁾が先に報告した麩酸分解菌 *Arthrobacter ureafaciens* K-1 菌。

(2) 培養方法：0.2% 麩酸含有ブイヨン培地 (和光純薬製肉エキス 0.5 g, 片山化学製ペプトン 1.0 g, NaCl 0.5 g, 蒸留水 1 l, KOH で pH 7.2 に調節) 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに入れ、殺菌後、同寒天斜面培地に 1 日間培養しておいたものを 1 白金耳接種し、30°, 110 r. p. m. で 48 時間振盪培養した。

(3) 酵素の調製：上記培養で得た菌体を 6,000 r. p. m., 5 分間遠心分離し、殺菌水で 3 回洗浄してのち 1/45 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.2) に懸濁させ、0~5°, 20 分間の超音波処理 (20 kc, 75 W) により菌体を破壊し、12,000 r. p. m., 20 分間冷凍遠心分離を行ない、上澄液をとり無細胞抽出液とした。これを用いて酵素活性を測定する場合には蒸留水に対し、冷蔵庫中で 20 時間透析したものを用いた。つぎに、この無細胞抽出液に硫酸を攪拌しながら加え 50% 飽和とし、生ずる沈殿を遠沈除去した上澄液にさらに硫酸を加え、60% 飽和として生ずる沈殿を 12,000 r. p. m., 20 分間冷凍遠心分離で集め、1/45 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.2) に溶解させた。これを用いて酵素活性を測定する場合は蒸留水に対し冷蔵庫中で 20 時間透析したものを用いた。ついでこの硫酸画分をあらかじめ 1/45 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.2) で平衡にしておいた Sephadex G-75 のカラムにのせ、同緩衝液で溶出させ、異性化活性区分を集め、部分精製酵素として用いた。その比活性は無細胞抽出液に比し 25 倍に上昇した。第 1 表に部分精製の例を示す。

(4) 酵素活性の測定：1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml に酵素液を加え、蒸留水にて全容 1.8 ml とし、1/50 M D-ガラクトuron酸 0.2 ml を加え、30°, 60 分間反応させた。比活性はこの条件において酵素蛋白量 1 mg 当たりの D-タガツロン酸生成量 1 μ を 1 unit とした場合の単位数として算出した。

(5) D-タガツロン酸の定量：Dische⁽¹¹⁾ の硫酸カルバゾール反応の渡辺ら⁽¹⁾の変法によった。

(6) 蛋白質の定量：Warburg and Christian 法により算出した。

(7) 基質として用いた D-ガラクトuron酸は N. B. C.

第 1 表 酵 素 の 調 製

酵 素 標 品	液量 (ml)	蛋 白 質		比活性	全活性	収量 (%)
		(mg/ml)	全量 (mg)			
無細胞抽出液	25	20	500	5.0	2500.0	100
硫酸60%飽和沈殿	10	4.8	48	20.3	974.4	38.9
Sephadex G-75	4	2	8	70.0	560.0	22.4

社製のものを、D-タガツロン酸は Ehrlich and Gutterman 法⁽¹²⁾により調製した。

実験結果と考察

(1) 酵素蛋白量と D-タガツロン酸生成量との関係
1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 各酵素蛋白量の部分精製酵素 0.5 ml, 蒸留水で全容 1.8 ml にし、1/50 M D-ガラクトuron酸 0.2 ml を加え、30°, 60 分間

第 1 図 酵素蛋白量と D-タガツロン酸生成量との関係

反応液組成：1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 各酵素蛋白量の部分精製酵素 0.5 ml, 蒸留水 0.3 ml, 1/50 M D-ガラクトuron酸 0.2 ml. 30°, 60 分間反応。

第 2 図 最適 pH

反応液組成：1/15 M 各 pH の磷酸塩緩衝液 1.0 ml, 部分精製酵素 0.5 ml, 蒸留水 0.3 ml, 1/50 M D-ガラクトuron酸 0.2 ml. 30°, 60 分間反応。

第3図 D-ガラクトツロン酸生成の時間的経過

反応液組成: 1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5), 1.0 ml, 部分精製酵素 0.5 ml, 蒸留水 0.3 ml, 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml, 30°, 各時間反応。

第4図 最適温度

反応液組成: 1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 部分精製酵素 0.5 ml, 蒸留水 0.3 ml, 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml, 各温度, 60 分間反応。

反応させた結果, 第1図に示したように, 1 mg/0.5 ml までの生成量に比してそれ以上の濃度では生成量が低下する傾向が見られるので, 以下の実験に際しては 1 mg/0.5 ml のものを用いることにした。

(2) 最適 pH

1/15 M 各磷酸塩緩衝液 1.0 ml, 部分精製酵素液 0.5 ml に蒸留水で全容 1.8 ml にし, 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml を加え, 30°, 60 分間反応させた。第2図に示す結果から最適 pH は 7.5 付近と認められた。

(3) D-タガツロン酸生成の時間的経過

1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 部分精製酵

第5図 熱に対する安定性

反応条件: 1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 部分精製酵素 0.5 ml, 蒸留水 0.3 ml を加え, 各温度 5 分間加熱後急冷, 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml を加え, 30°, 60 分間反応。

素 0.5 ml, 蒸留水で全容 1.8 ml にし, 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml を加え, 30° 各時間反応させた。結果は第3図に示すように 60 分までは直線的に増加している。

(4) 最適温度

1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 部分精製酵素 0.5 ml, 蒸留水で全容 1.8 ml にし, 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml を加え, 各温度で 60 分間反応させた。本酵素の最適作用温度は 30° であることが認められた (第4図)。

(5) 熱に対する安定性

1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 部分精製酵素 0.5 ml, 蒸留水で全容 1.8 ml にし, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80° で, それぞれ 5 分間加熱後急冷し, 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml を加え, 30°, 60 分間反応させた。結果は第5図のようで, 50° で急激に活性は低下し, 70° で 85%, 80° で完全に失活する。

(6) 基質特異性

第2表から基質として用いた各種のもののうち, D-ガラクトツロン酸と D-グルクロン酸からは相当するケトウロン酸がそれぞれ生成された。Takagi⁽⁹⁾ および Ashwell⁽⁶⁾ が別々に, D-ガラクトツロン酸→D-タガツロン酸, D-グルクロン酸→D-フラクトツロン酸の異性化は全く同一の酵素で行われるということを精製酵素での実験で報告している。本酵素も両ウロン酸から相当するケトウロ

第 2 表 基質特異性

基 質	ケトウロン酸または ケトース生成量
D-Galacturonic acid	0.36 μ M
D-Glucuronic acid	0.30 μ M
D-Galactose	0
D-Glucose	0
D-Arabinose	0
D-Xylose	0
D-Ribose	0

反応液組成: 1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 部分精製酵素 0.5 ml, 蒸留水 0.3 ml, 1/50 M 濃度の各基質 0.2 ml. 30°, 60 分間反応。

第 3 表 各種試薬の影響

試 薬 (1×10^{-3} M)	相 対 活性度	試 薬 (1×10^{-3} M)	相 対 活性度
None	100	Sodium fluoride	80.3
pCMB	0	o-Phenanthroline	80.6
MIA	50.2	Oxalate	110.4
Arsenite	30.5	Citrate	92.5
Hydroxylamine	90.7	α, α' -Dipyridyl	100.0
Sodium azide	93.1	EDTA	83.5
Thio urea	95.3		

反応液組成: 1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 部分精製酵素 0.5 ml, 各種試薬 (最終濃度 1×10^{-3} M) 0.2 ml, 蒸留水 0.1 ml, 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml. 30°, 60 分間反応。

ン酸を生成するが, 部分精製酵素であるため, なお検討しなければならない。そのほかのアルドースについても同様の反応条件下で反応させ, 相当するケトースの生成を調べたところ, 作用しないことが認められた。

(7) 各種試薬の影響

(i) 阻害剤の影響: pCMB, arsenite, moniodo-acetic acid はその作用形式は異なるが, いずれも SH 試薬であり, それらにより阻害効果が認められた (第 3 表)。

(ii) キレート試薬による影響: いずれの場合も活性低下が認められないところから金属が trap された結果, 活性の低下が行なわれるとは考えられない (第 3 表)。

(iii) pCMB による阻害のグルタチオン添加による回復: 本酵素は pCMB により強い阻害をうけるが, グルタチオンの添加により回復される。1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml に部分精製酵素 0.5 ml, pCMB 0.2 ml (最終濃度 1×10^{-3} M) を加え, 10 分間室温反応後, グルタチオン 0.1 ml (最終濃度 1×10^{-3} M), さらに 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml を加え, 30°, 60 分間反応さ

第 4 表 2 価金属イオンの影響

金 属 塩 (1×10^{-3} M)	相 対 活性度	金 属 塩 (1×10^{-3} M)	相 対 活性度
None	100	NiSO ₄	80.3
CaCl ₂	96.0	FeSO ₄	91.3
MgSO ₄	97.8	ZnSO ₄	30.5
MnSO ₄	114.0	CuSO ₄	11.6
CoCl ₂	90.0	HgCl ₂	0

反応液組成: 1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 1.0 ml, 部分精製酵素 0.5 ml, 各種金属塩 (最終濃度 1×10^{-3} M) 0.2 ml, 蒸留水 0.1 ml, 1/50 M D-ガラクトツロン酸 0.2 ml. 30°, 60 分間反応。

せた結果, グルタチオン添加により原活性の 80% を回復することが認められた。このような結果や先の SH 試薬の影響, さらに後述の Hg²⁺ や Cu²⁺ によっても活性の低下が認められるところから, その酵素活性に SH 基が重要な役割を持っているものと考えられる。

(8) 金属イオンの影響

第 4 表に示す各種 2 価金属イオンを添加し, その影響を調べたところ, 本酵素はいずれの金属イオンによっても賦活効果を示されず, Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ により強い阻害を受け, Mn²⁺ によりわずかに賦活される。このことと先のキレート試薬での結果を考え合わせて, 本酵素はその作用に金属イオンを要求しないのではないかとと思われる。

(9) 反応生成物である D-タガツロン酸の確認

D-ガラクトツロン酸の確認はペーパークロマトグラフィーによった。反応液は 1/15 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.5) 50 ml, 部分精製酵素 25 ml (蛋白 1 mg/0.5 ml), D-ガラクトツロン酸 194 mg に蒸留水を加え, 全容 100 ml とし, 30°, 60 分間反応させ, 50% トリクロロ酢酸 2 ml で反応を停止させ, 12,000 r. p. m., 15 分間遠心分離により除蛋白を行ない上澄液を得た。この上澄液をアンバーライト IR-120 で脱塩処理を行ない, 溶出液は Ca(OH)₂ で中和後, 不溶石灰塩を除去する。上澄液を約 50 ml まて減圧濃縮し, 4 倍量エタノールを加えて生ずる石灰塩をアンバーライト IR-120 で脱塩処理を行なう。溶出液を減圧濃縮し, ペーパークロマトグラフィーに付し, n-ブタノール・酢酸・水 (5:2:3) で展開し, 発色にはブロムフェノールブルーと p-anisidine HCl butanol 溶液を用いた。結果は試料には R_F 値 (0.35~0.36), (0.26~0.27) の 2 つのスポットがあらわれ, これは標品 D-タガツロン酸の R_F 値 (0.36), D-ガラクトツロン酸の R_F 値 (0.27) とそれぞれ一致することから, 前者を反応生

成物の D-タガツロン酸, 後者を未反応の D-ガラクトン酸であることを認めた。

要 約

麩酸分解菌 *Arthrobacter ureafaciens* K-1 菌の D-ガラクトン酸ケトールイソメラーゼについて, 部分精製酵素によりその酵素的性質を調べた。

(i) 最適 pH は 7.5, 最適温度は 30° 付近に認められた。

(ii) 熱に対しては, 50°, 5 分間の加熱では 40%, 70° では 85% 失活し, 80° で完全に失活する。

(iii) 基質特異性については D-ガラクトン酸, D-グルクロン酸からは対応するケトウロン酸を生成するが, D-グルコース, D-アラビノース, D-キシロース, D-リボース, D-ガラクトースからは, それに対応するケト糖の生成は認められなかった。

(iv) 各種金属イオンの要求性については, いずれの金属イオンによっても賦活されず, キレート試薬による活性低下が認められないところから, その活性に必要とされないように思われる。

(v) 各種 SH 試薬により阻害され, pCMB による強い阻害がグルタチオンの添加により回復されること, Hg^{2+} , Cu^{2+} により強い活性低下が認められることなどから, 本酵素の活性に SH 基が重要な役割をもっている

ものと推定される。

本研究の概要は, 昭和 41 年度日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) 野々村誠一, 辰巳忠次: 本誌, **35**, 954 (1961); 野々村誠一, 辰巳忠次: 本誌, **38**, 216 (1964); 野々村誠一: *Bull. Univ. Osaka Pref.*, Ser. B, **13**, 59 (1962).
- (2) 渡辺正男, 新井昌基: 酵素化学シンポジウム, **12**, 201 (1957).
- (3) Y. Takagi, M. Kanda, Y. Nakata: *Biochim. Biophys. Acta*, **31**, 264 (1959).
- (4) 神田正幸: 阪大医, **12**, 1139 (1960).
- (5) 朝井勇宣, 那須野精一: *Bull. A. C. S. Japan*, **21**, 1 (1958).
- (6) G. Ashwell, A. J. Wahba, J. Hickman: *J. Biol. Chem.*, **235**, 1955 (1959).
- (7) R. A. Mcrorie, A. K. Williams, W. J. Payne: *J. Bacteriol.*, **71**, 212 (1959).
- (8) R. A. Mcrorie, G. D. Novelli: *Nature*, **182**, 1509 (1958).
- (9) W. J. Payne, R. A. Mcrorie: *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 466 (1959).
- (10) 野々村誠一, 辰巳忠次: 本誌, **38**, 213 (1964).
- (11) Z. Dische: *J. Biol. Chem.*, **167**, 189 (1949); Z. Dische: *ibid.*, **183**, 489 (1950).
- (12) F. Ehrlich, R. Gutterman: *Ber. deut. Chem. Ges.*, **65**, 573 (1934).