酵素によるペクチン酸の分解 (第 11 報)

4,5-不飽和ガラクトクロニド結合を加水分解する酵素と
エキソポリガラクトクロナーゼの同一性について

畑 中 千 歳, 小沢潤二郎
(岡山大学農業生物研究所)

昭和 43 年 5 月 31 日 受 理

Enzymic Degradation of Pectic Acid Part XI. Identity of the Enzyme Hydrolyzing 4,5-Unsaturated Galacturonidic Linkage with Exopolygalacturonase

By Chitoshi HATANAKA and Junjiro OZAWA
Institute of Agricultural Biology, Okayama University

The present study has been undertaken to determine whether the activity on 4,5-unsaturated galacturonidic linkage is due to a specific enzyme or to an exopolygalacturonase (exo-PG) which hydrolyzes both saturated and unsaturated galacturonidic linkages. Ratio of activities on 4,5-unsaturated digalacturonic acid and pectic acid was practically constant before and after heat treatment of the enzyme preparations. The competitive inhibition by galacturonic acid was observed when saturated or unsaturated digalacturonic acid was used as the substrates. The two compounds also inhibited competitively the hydrolysis of the other. These results suggest that the enzyme hydrolyzing 4,5-unsaturated galacturonidic linkage is identical with exo-PG.

(Received May 31, 1968)

緒 言

にんじん⁽¹⁾とスクラーゼ⁽²⁾ (ペクチナーゼ剤, 三共株式会社) のエキソポリガラクトクロナーゼ (exo-PG) は非還元性末端に 4,5-不飽和ガラクトクロニド結合を持つペクチン酸には作用しない. ところが前報⁽³⁾で述べたように, 黒麹菌の菌体から得た酵素標品は, 作用形式からみて exo-PG の 1 種と考えられるが, 4,5-不飽和ガラクトクロニド結合を加水分解することができる. 前報では, この不飽和ガラクトクロニド結合を加水分解する作用といわれる exo-PG 作用とが同一酵素に起因するか否か判定できなかった. その後の実験で, 両作用が同一酵素に起因することを示す結果が得られた.

実験の材料と方法

1. 粗酵素液 前報⁽³⁾の No. 8 の酵素標品を使用する. すなわち, *Aspergillus niger* (腐敗したサツマイモから分離した菌株) の菌体抽出液を Duolite CS-101 で

処理し, 吸着する区分について DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行ない, 4,5-不飽和ガラクトクロニド結合を加水分解する区分を粗酵素液とする.

2. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー 培地 2400 ml 分から得た前記の粗酵素液 (約 20 ml) を pH 4.6 の 0.02 M 酢酸塩緩衝液で緩衝化した DEAE-セルロース (0.9 meq./g) のカラム (2×6 cm) に加え, 直ちに同じ pH の酢酸塩緩衝液の gradient (0.02 M 250 ml → 0.3 M 250 ml) を流し, 5 ml のフラクションをとる.

3. その他の方法 基質の調製と分析方法はすべて前報⁽³⁾にしたがった.

実験結果

1. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる酵素の精製

粗酵素液を DEAE-セルロースのカラムに加え, 酢酸塩緩衝液の gradient を流し酵素を溶出すると, Fig. 1

Fig. 1. Rechromatography of No. 8 on a DEAE-Cellulose Column.

Assay conditions : acid-insoluble pectic acid ; 0.25%, acetate buffer, pH 4.6, about 0.1 M ; incubation, 35°C, 30 min.

(PGu) ml : μ mole of bonds split (determined by reducing power measurement) per ml of enzyme solution per hr.

○—○ (PGu) ml, ●—● protein concentration, acetate buffer concentration.

Fig. 2. Rate of Inactivation of Rechromatographed No. 8 at 50° and 60°C.

No. 8 (rechromatographed with DEAE-cellulose) was incubated in 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) at 50° or 60°C and then the remaining activity was assayed at the same pH, using 0.2% pectic acid and 4,5-unsaturated digalacturonic acid as the substrates. Incubation was the same as described for Fig. 1.

The preparation, pretreated at 60°C for 10 min, was referred to below as the enzyme H.

○—○ Pectic acid, ●—● 4,5-unsaturated digalacturonic acid, pretreated at 50°C, — pretreated at 60°C.

Fig. 3. pH-Activity Curves.

Assay conditions : substrate, 0.2% ; acetate buffer, 0.1 M ; suitable amounts of enzyme ; incubation, 35°C, 30 min.

○—○ A, ●—● B, ⊙—⊙ C, ●—● H.
(i) Pectic acid (ii) Digalacturonic acid
(iii) 4,5-Unsaturated digalacturonic acid

のように, 1つのほぼ左右対称の山が得られた。これを 3つの区分 A, B, C に分け以下の実験に使用した。

2. 熱処理による酵素の失活

前記と同様に粗酵素液について DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行ない酵素活性のある部分を集める。pH 4.0 の 0.1 M 酢酸塩緩衝液を含む酵素液を 50°C と 60°C で一定時間加熱後水冷し, 基質濃度 0.2%, pH 4.0 の酢酸塩緩衝液 0.05 M, 35°C, 30 分の条件でペクチン酸と 4,5-不飽和ジガラクトジュロン酸に作用させ, 酵素活性を比較すると Fig. 2 のような結果が得られた。この酵素は 50°C では安定であるが, 60°C ではかなり速かに失活され, 10 分間の処理で約 50% の酵素が失活した。しかし両基質に対する酵素活性の割合はほとんど変化しなかった。以下の実験では 60°C, 10 分間の処理を行なった酵素標品を酵素 H として使用した。

3. 酵素活性と pH との関係

前記の 4つの酵素区分をペクチン酸, ジガラクトジュロン酸および 4,5-不飽和ジガラクトジュロン酸に作用させ pH の影響を調べると Fig. 3 のような結果が得られた。3種類の基質に対する最適 pH はそれぞれ 4, 5 および 4.6 付近で酵素区分による差はほとんど認められない。

4. ペクチン酸, ジガラクトジュロン酸および 4,5-不飽和ジガラクトジュロン酸に対する酵素活性の割合

3種類の基質に対する活性度を比較すると Table I の

Table I. The Enzyme Activities on Pectic Acid, Digalacturonic Acid and 4,5-Unsaturated Digalacturonic Acid

Substrate	Enzyme	Aldehyde groups released μmole/ml of enzyme/hr	Relative rate*
Pectic acid	A	1.456	1
	B	1.832	1
	C	1.784	1
	H	1.720	1
Digalacturonic acid	A	8.85	6.08
	B	11.50	6.28
	C	11.25	6.31
	H	10.95	6.37
4,5-Unsaturated digalacturonic acid	A	0.129	0.089
	B	0.164	0.090
	C	0.163	0.091
	H	0.151	0.088

Assay conditions: substrate, 0.2%; acetate buffer, 0.05 M, pH 4.0 (pectic acid), pH 4.9 (digalacturonic acid), pH 4.6 (4,5-unsaturated digalacturonic acid); suitable amounts of enzyme; incubation, 35°C, 30 min.

* Based on the same enzyme concentration and on the initial linear portions of the rate curves.

ような結果が得られた。ジガラクトジュロン酸と不飽和ジガラクトジュロン酸に対する活性度はそれぞれペクチン酸に対する活性度の約 6.3 倍と 0.09 倍であり, A~H 間にはほとんど差は認められない。

5. HgCl₂ の影響

ジガラクトジュロン酸に対する活性度と HgCl₂ との関係を調べると Fig. 4 のような結果が得られた。いずれの場合も HgCl₂ の最適濃度は 1~2 μM であり, 10 μM では阻害が現われた。

Fig. 4. Influence of HgCl₂ Concentration on the Enzyme Activities.

Assay conditions: digalacturonic acid, 0.1%; acetate buffer, pH 4.9, 0.05 M; suitable amounts of enzyme; incubation, 35°C, 30 min. Symbols are the same as described for Fig. 3.

6. 酵素濃度と反応経過

基質濃度 0.2%, 35°C で酵素濃度を変え反応経過を調べると Fig. 5 のような結果が得られた。ペクチン酸とジガラクトジュロン酸に対しては約 1.8 PG 単位⁽⁸⁾の酵素液を 1, 2, 4 倍希釈したものを用い, 不飽和ジガラクトジュロン酸に対しては約 10 PG 単位の酵素液を 1, 2 倍希釈したものを用いた。基質の分解率が比較的低い範囲内では酵素量と分解生成物の増加量との間に直線的な関係が認められ, 反応は零次反応として進むようである。本報ではすべて直線関係の得られる範囲内で酵素活性の測定を行なった。

7. 4,5-不飽和ガラクトジュロニド結合を加水分解する作用と exo-PG 作用との関係

(a) 酵素反応の速度と基質濃度との関係: ジガラクトジュロン酸と不飽和ジガラクトジュロン酸を基質として, 種々の基質濃度における反応初速度を測定した結果を

Fig. 5. Relation of Time and Enzyme Concentration to the Hydrolysis of Pectic Acid, Digalacturonic Acid and 4,5-Unsaturated Digalacturonic Acid.

Assay conditions: substrate, 0.2%; acetate buffer, 0.1 M, pH 4.0 (pectic acid), pH 4.9 (digalacturonic acid), pH 4.6 (4,5-unsaturated digalacturonic acid); incubation, 35°C, 30 min.

(1) 1.8, (2) 0.9, (3) 0.45, (4) 10.0 and (5) 5.0 units of enzyme B were used in 2 ml of reaction mixture.

(A) Pectic acid (B) Digalacturonic acid
(C) 4,5-Unsaturated digalacturonic acid

Fig. 6. Influence of Substrate Concentration on the Reaction Rate.

(A) Substrate: digalacturonic acid. Assay condition: acetate buffer, pH 4.6, 0.1 M; enzyme, 0.3 unit of enzyme B per 2 ml of reactions mixture; incubation, 35°C, 20 min.

(B) Substrate: 4,5-unsaturated digalacturonic acid. Assay conditions: acetate buffer, pH 4.6, 0.1 M; enzyme, 8.1 units of enzyme B per 2 ml of reaction mixture; incubation, 35°C, 30 min.

v : μ mole of bonds split (determined by reducing power measurement) per ml of enzyme solution per hr.

○—○ v , ●—● $[S]/v$.

Fig. 6 に示す。Michaelis の関係式にしたがって Michaelis 定数 (K_m) を求めると、ジガラクトuron酸に対しては 4.3×10^{-4} M, 不飽和ジガラクトuron酸に対しては 9.23×10^{-6} M となる。

(b) ガラクトuron酸による酵素活性の阻害:ジ

ガラクトuron酸と 4,5-不飽和ジガラクトuron酸に対する酵素活性はいずれもガラクトuron酸によって阻害される。Fig. 7 に示したように、 $1/[S]$ に対して $1/v$ をプロットした Lineweaver-Burk の方法では明らかに拮抗的な阻害を示している。Lineweaver-Burk の関係

Fig. 7. Effect of Galacturonic Acid and 4,5-Unsaturated Digalacturonic Acid on the Enzyme Activity.

(A) Substrate: digalacturonic acid. Assay conditions were the same as described for Fig. 6 A.

(B) Substrate: 4,5-unsaturated digalacturonic acid. Assay conditions were the same as described for Fig. 6 B.

●—● +4,5-Unsaturated digalacturonic acid 2.442mM
○—○ +Galacturonic acid 2.338 mM

式より酵素-ガラクトジュロン酸結合物の解離定数 (K_i) を求めると, ジガラクトジュロン酸を基質にした場合は $5.15 \times 10^{-4} M$ となり, 不飽和ジガラクトジュロン酸を基質にした場合は $5.88 \times 10^{-4} M$ となる。

(c) ジガラクトジュロン酸と 4,5-不飽和ジガラクトジュロン酸の間の拮抗的關係: ジガラクトジュロン酸に対する酵素活性は不飽和ジガラクトジュロン酸によって阻害を受けるようである (Fig. 7 A). 不飽和ジガラクトジュロン酸自体が酵素によって分解されるので, 活性度を還元力から求めた場合, 正確な阻害度を得ることは困難である。しかし, pH 4.6 における不飽和ジガラクトジュロン酸に対する活性度はジガラクトジュロン酸に対する活性度の $1/60$ 以下であり, ジガラクトジュロン酸が共存するとさらに値は小さくなるので, 実際には影響はきわめて少ないものと思われる。両基質の間に拮抗的關係が存在することは明らかである。図から不飽和ジガラクトジュロン酸に対する K_i を求めると $8.67 \times 10^{-6} M$ となる。この値は前述の不飽和ジガラクトジュロン酸自体の K_m ($9.23 \times 10^{-5} M$) とかなりよく一致している。

ジガラクトジュロン酸による不飽和ジガラクトジュロン酸

に対する酵素活性の阻害を測定する場合, ジガラクトジュロン酸に対する活性度が不飽和ジガラクトジュロン酸に対する値よりはるかに大きいので, 反応開始と同時に分解生成物 (ガラクトジュロン酸) の影響が現われ, ジガラクトジュロン酸自体の阻害度を求めることは困難である。

Fig. 8 はガラクトジュロン酸とジガラクトジュロン酸の濃度をいろいろ変えて不飽和ジガラクトジュロン酸に対する酵素活性に及ぼす影響を調べたものである。ここでは $232 m\mu$ における吸光度の減少から不飽和ジガラクトジュロン酸に対する活性度を測定した。モル濃度で比較するとジガラクトジュロン酸による阻害の方が大きい, ガラクトジュロン酸濃度として比較するとジガラクトジュロン酸による阻害の方が小さい。

Fig. 9 はジガラクトジュロン酸と不飽和ジガラクトジュロン酸を単独あるいは混合して与えた場合の酵素活性の変化

Fig. 8. Effect of the Concentration of Galacturonic Acid and Digalacturonic Acid on the Enzyme Activity on 4,5-Unsaturated Digalacturonic Acid.

Assay conditions: substrate, 4,5-unsaturated digalacturonic acid, 1.344 mM; acetate buffer, pH 4.6, 0.1 M; enzyme, 4 units of enzyme B per ml of reaction mixture; incubation, $35^\circ C$, 30 min. Reaction rate was computed from the decrease in absorption at $232 m\mu$.

○—○ Galacturonic acid, ●—● digalacturonic acid, ●—● digalacturonic acid (expressed as galacturonic acid unit).

Fig. 9. The Enzyme Activity on 4,5-Unsaturated Digalacturonic Acid and Digalacturonic Acid.

Assay conditions: substrate, (1) digalacturonic acid (2.564 mM), (2) 4,5-unsaturated digalacturonic acid (2.688 mM), (3) digalacturonic acid (2.564 mM) + 4,5-unsaturated digalacturonic acid (2.688 mM); acetate buffer, pH 4.6, 0.1 M; enzyme, 1.6 units of enzyme B per ml of reaction mixture; incubation, 35°C. Reaction rate was determined by reducing power measurement (ml of 0.002 N I_2 consumed per 0.5 ml of reaction mixture).

を示したものである。両基質が共存する場合、全体としての反応速度は単独に与えた場合の速度の和よりもはるかに小さい。

考 察

黒麹菌の菌体抽出液から得た 4,5-不飽和ガラクトンロニド結合を加水分解する区分について 2 回の DEAE-セルロースクロマトグラフィーを行なうと、ほぼ左右対称の 1 つの山が得られた。この山の酵素を部分的に熱失活させたもの (H) と山を 3 つに分けたもの (A, B, C) について特性を比較したが、各区分の間にはほとんど差は認められなかった。とくに不飽和ジガラクトン酸とペクチン酸に対する作用比を調べると、各区分、あるいは

いろいろな程度に熱失活した酵素標品の間で全く変化が認められなかった。このことから本実験に使用した酵素標品はかなり均一であると考えられる。

4,5-不飽和ガラクトンロニド結合を分解する作用といわれる *exo-PG* 作用とが同一酵素に由来することのさらに確かな裏づけを得る目的で、不飽和ジガラクトン酸とジガラクトン酸を基質に選び、両基質の間に拮抗の関係が認められるか否かを調べた。ジガラクトン酸の分解に対する不飽和ジガラクトン酸の阻害は Lineweaver-Burk の方法では明らかに拮抗的な阻害を示した。このときの不飽和ジガラクトン酸に対する K_i ($8.67 \times 10^{-5} M$) は不飽和ジガラクトン酸自体の K_m ($9.23 \times 10^{-5} M$) とかなりよく一致している。またジガラクトン酸と不飽和ジガラクトン酸を混合して与えた場合、全体としての反応速度は、両基質を単独に与えた場合の速度の和よりもはるかに小さくなった。また分解生成物であるガラクトン酸はいずれの基質に対しても拮抗的な阻害を示した。同じ pH においてガラクトン酸に対する K_i を求めると、ジガラクトン酸を基質にした場合は $5.15 \times 10^{-4} M$ 、不飽和ジガラクトン酸を基質にした場合は $5.88 \times 10^{-4} M$ となり、値がよく一致した。

以上の結果から、4,5-不飽和ガラクトンロニド結合を加水分解する作用といわれる *exo-PG* 作用とは同一酵素に起因するものと推定してよいであろう。にんじんとスクラーゼの *exo-PG* が非還元性末端に 4,5-不飽和ガラクトンロニド結合を持つペクチン酸に全く作用しないことから考えると、黒麹菌の *exo-PG* はきわめて特異的であり、新しいタイプの *exo-PG* と考えられる。

- (1) 畑中千歳, 小沢潤二郎: 農化, 40, 421 (1966).
- (2) 畑中千歳, 小沢潤二郎: 農化, 43, 67 (1969).
- (3) 畑中千歳, 小沢潤二郎: 農化, 43, 77 (1969).