

Macerating enzyme に関する研究

V Zone electrophoresis によるペクチン分解酵素の分離

梶 明, 梶 禎 男*, 粟飯原 重男**, 穴吹 吉夫

Studies on macerating enzyme

V Separation of pectic enzymes by zone electrophoresis

Akira KAJI, Sadao TACHIBANA, Shigeo AIHARA and Yoshio ANABUKI

(Laboratory of Technical Microbiology)

(Received July 13, 1959)

TISELIUS の電気泳動法は酵素の精製、分離並びに純度の判定に応用されて著しい成績をあげている。しかし、この方法の泳動には酵素溶液として約2%の蛋白濃度の溶液を数 ml 必要とする。著者は細菌のペクチン分解酵素について研究を行ってきたが⁽¹⁻⁶⁾、取扱った酵素は精製されたときは、やや不安定となり、濃縮溶液を相当量得ることは困難であった。ここにおいて、少量の試料を使用して電気泳動を実施する計画をたて、濾紙電気泳動法および zone electrophoresis 法によってペクチン分解酵素の泳動を行った。なかでも、zone electrophoresis によって pectinesterase, liquefying polygalacturonase 並びに macerating enzyme の分離を行うことができたので本報においてその結果を報告する。

実験および結果

A. 濾紙電気泳動法による macerating enzyme の泳動

濾紙電気泳動法による macerating enzyme (ME) の電気泳動の結果については既に第4報⁽⁶⁾において簡単に報告した。Cl. felsinum var. sibirianum の ME は pH7.4 の M/50 磷酸緩衝液を使用して泳動せしめたとき陰極側へ泳動することが分った。泳動後、直ちに濾紙を120°Cにおいて30分間加熱して酵素蛋白を固定した後、bromphenol blue またはAmidoschwarz 10B によって染色し、洗滌液および水中において呈色部以外の色素を除去した。このときまでは泳動した蛋白部の呈色帯は極めて鮮明で巾も狭く、純度の判定も簡単に行うことができた。しかし、濾紙を洗滌液から取出して乾燥するとき、呈色部は次第に拡散して巾が広がった。従って、イオン交換樹脂のカラムを使用して ME を単離した後、その純度の判定を行うには便利であるが、濾紙電気泳動法を使用して二種類以上のペクチン分解酵素の分離を行うことは困難であると判断した。

B. zone electrophoresis によるペクチン分解酵素の分離

zone electrophoresis 法は KUNKEI および SLATER⁽⁷⁾ によって発表されて以来、簡単な装置を使用して著しい効果をあげている。蛋白を泳動した研究報告は多数みられるが、酵素蛋白の泳動結果についても phosphatase,⁽⁸⁾ cellulase⁽⁹⁾, isoamylase⁽¹⁰⁾ 等について発表されている。泳動装置についても SMITHIES⁽¹¹⁾ は詳細に検討を行い、supporting medium についても澱粉を使用するものから、^(7, 11) セルロースの粉末を処理したもの、^(12, 13) 澱粉、アミロース、Hyflo super cel の混合体を使用するもの⁽¹⁴⁾ 等が提案されている。著者等は最も簡単に行い得る方法として澱粉を supporting medium とする zone electrophoresis をペクチン分解酵素に適用してその分離を行った。

1. 泳動装置

tray の大きさは、深さ(内寸)1.4cm, 巾3cm, 長さ25cm のものと、深さ1cm, 巾5cm, 長さ45.2cm のものと二種類を使用した。両極は白金板を使用し、各極には2個宛の electrode compartment を使用して、各々に M/50 磷酸緩衝液 (pH7.4) を入れた。2個の compartment の間には濾紙をつめて緩衝液を浸漬した U 字管のブリッジを4個宛使用した。compartment の間には1個の tray をおき、tray には下記のようにして澱粉を充填し、その両端には tray と大体同じ巾の濾紙を4枚又は5枚重ねて compartment 内の緩衝液と連絡した。これ等の装置は泳動用の箱に収め、硝子板で蓋をして、低温で泳動を行う必要があるときは全装置を氷室に入れて実験を遂行した。

* 現在の勤務先は徳島農業高等学校

**現在の勤務先は神戸屋パン株式会社

氷室の温度は5°Cであった。

2. tray 中へ澱粉を充填する方法

上記の小型の tray を使用するとき、次のように澱粉を充填した。局方馬鈴薯澱粉100gを250mlの蒸留水中に投入し、攪拌して30分間放置し、上澄液を除去する。この操作を5回反覆して水洗を完了する。次に M/50 磷酸緩衝液 (pH7.4) を使用して同様の操作で3回洗滌する。一夜同じ磷酸緩衝液に浸漬して放置した後、緩衝液を除去し、できる限り少量の緩衝液を加えて澱粉乳として tray に洗し込む。3時間放置して緩衝液が流出し、澱粉の表面の過剰の液も濾紙で除去した後、泳動に使用した。

3. supporting medium に酵素液を導入する方法

supporting mediumの澱粉ブロックに試料を導入する前に30分間電流を通した。

Cl. felsineum var. *sikokianum* の ME および polygalacturonase (PG) は陰極側へ泳動することは、濾紙電気泳動法によって明らかになっていた。また、*Pen chrysogenum* および *Sclerotinia Libertiana* のペクチン分解酵素は何れも陰極側へ泳動することも分った。従って、tray の陽極側の端から約 $\frac{1}{8}$ の個所を選定して、小型 tray のときは澱粉ブロックを巾1cmの大きさに切りとり、大型 tray のときは巾2cmに切りとって、これをビーカー中に入れて各酵素液を加えてよく攪拌し、再びもとの個所へ充填した。この際気泡が入らないように注意した。各酵素液は予め M/50 磷酸緩衝液を外液として24~48時間透析した。

4. 電気泳動中の電圧および電流並びに泳動時間

電圧を250-280V、電流を5.0-5.2mAに調節して泳動を行った。泳動時間は24時間を標準とした。

5. 電気泳動後の酵素の溶出法

試料を導入した個所から両側へ1cmの巾に順次に澱粉ブロックを切りとって、陽極側のものを+1, 2, 3……, 陰極側へ切りとったものを-1, 2, 3……と fraction の番号を附した。大型の tray を使用したときは2cm巾に切りとった。各々の fraction の澱粉ブロックを試験管に入れ、蒸留水30mlを加えてよく攪拌した後、2,000rpmで5分間遠心沈澱して上澄液を使用して酵素作用を測定した。

6. 酵素作用力の表示法

(1) PG の作用力はペクチン酸溶液の粘度低下および還元力の増加を以て表示した。その詳細については既に記載した。^(1,2) また PG の単位は和紙原料の発酵精練法の第14報⁽³⁾に記載の方法に従った。還元力の増加は作用液1ml当りの0.02N沃度溶液の所要ml数に換算して記述した。

(2) PE の作用力は KERIESZ の方法の改良法⁽¹⁵⁾ に従い、1% citrus pectin 溶液20ml に酵素液と水を配合して30mlとし、30°Cにおいて作用せしめ、一定時間後に M/10 NaOH 溶液を滴下して所定の pH 値になる迄の所要 ml 数を求め、KERIESZ の PE の力価表示法によって酵素液1ml当りの PMU_{ml} を以て表現し、または1%ペクチン溶液10ml 当りに換算した N/10 NaOH 溶液の所要 ml 数を以て PE の力価を表現した。

(3) maceration の作用は馬鈴薯、三稜または雁皮の切片に酵素作用を及ぼし、37°C において17時間後にその開繊状況を判定した。作用液の配合割合は、酵素液と水が1.5ml、McILVAINE の磷酸緩衝液0.5ml、植物の切片1個、トルオール3滴であり、馬鈴薯の場合は直径1cm、厚さ1mmの小さい円板とし、三稜または雁皮の場合は1×1cmの皮を切りとって使用した。

7. *Cl. felsineum* var. *sikokianum* の macerating enzyme および polygalacturonase の電気泳動

著者はこの細菌のペクチン分解酵素の精製について研究を遂行してその成果を発表し、⁽³⁾ 続いて ME と液化型 PG とを分離し、^(4,5) 前者は植物組織の maceration を強く出現させる新しいペクチン分解酵素であり、後者即ち液化型 PG も maceration 作用を示すが、両酵素はペクチン酸に対する作用において大きい相異を示すことを指摘した⁽⁶⁾。ME および PG の分離には専ら緩衝化したイオン交換樹脂を使用した。この結果から判断すれば、当然電気泳動法によっても両酵素は分離されるものと考えられた。ここにおいて著者等は、*Cl. felsineum* var. *sikokianum* の培養液よりペクチン分解酵素を既報の方法⁽³⁾に準じて精製し、この酵素液を使用して zone electrophoresis による PG, ME の分離を行った。

(1) 酵素液の調製法およびその酵素作用力

Cl. felsineum var. *sikokianum* の培養は和紙原料の発酵精練法の第13報⁽¹⁶⁾に報告したように行った。72時間培養後、発酵液を遠心沈澱し、色素および不純物を除去するために Duolite A-7 を通過せしめた。次に、通過液を酸

性化した Amberlite IRC-50, 50ml を含むカラム上に滴下して PG および ME を樹脂に吸着せしめた後, カラムを水洗し, 1%アンモニア溶液 50ml を加えて酵素を溶出した。この溶出液は酵素濃度が低いので, 減圧下 25-30°C において約 1/3 容量迄濃縮し, 濃縮液は M/50 磷酸緩衝液 (pH7.4) を外液として透析をかけ, 氷室で 24 時間透析後, この内液 1ml を使用して zone electrophoresis を行った。この透析液には ME, PG を含有し, 粘度低下法によって測定した PG の単位数を窒素 1mg に換算すれば 7042.2 単位となった。酵素液調製過程中の PG の作用力は第 1 表に示す通りであった。

第 1 表 精製過程中の polygalacturonase の作用力

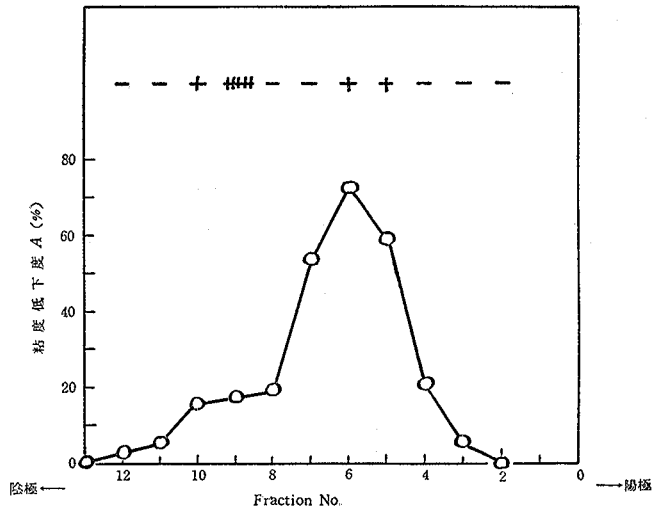
精製過程	液量 ml	PG unit		収率 %	液中 N mg/100ml	PG unit/N1mg
		1ml 当り	全量			
遠沈液	500	37	18500	100	43.6	84.9
Duolite A-7 通過液	490	28	13720	74	18.0	155.6
Amberlite IRC-50 吸着, 溶出液	52	164	8528	47	—	—
濃縮, 透析液	9.5	500	4750	26	7.1	7042.3

(2) 電気泳動による PG および ME の分離

zone electrophoresis には上記の tray の中大きいものを使用した。陽極から約 1/3 の距離において澱粉ブロックを 2 cm の巾に切りとり, 前記の精製酵素液を添加した。使用した酵素蛋白の量は 0.67mg であった。280V の電圧で 5.0mA の電流を流し, 5°C において 27 時間泳動を行った。泳動後酵素を導入したブロックから両側へ 2 cm の巾に澱粉を切りとり, 上記の方法によって PG および ME を溶出して酵素作用力を測定した。ME の作用は馬鈴薯の切片の maceration で表現した。作用液の配合割合は前記の通りとし, 酵素液の使用量は 0.2ml とした。別の zone electrophoresis において, ME 区分の酵素溶出液によって雁皮の maceration が明らかに出現することを確認した。泳動結果を第 1 図に示す。

この結果に示されるように, 液化型 PG は -6 の fraction に最大の作用力が認められ, maceration の効果はこの fraction にも小さい作用力が出現するが maceration の最大の効果は -9 の fraction に認められた。即ち, ME は -9 に最も多く泳動したことが分った。下記に示すように, Sclase の結果と異なる現象であり, *Cl. felsineum* var. *sikokianum* が特異的に ME を生産する公算が大きい。またこの細菌の ME, PG をイオン交換樹脂のクロマトグラフィによって分離した研究成果を既に発表した^(4,5) その結果と本報における泳動結果とはよく一致することも確認できた。

第 1 図 *Cl. felsineum* var. *sikokianum* の PG, ME の zone electrophoresis



(備考) 図中上部に各 fraction の maceration の作用度を示した。

8. Sclase の pectinesterase および polygalacturonase の電気泳動

Sclase は *Sclerotinia Libertiana* FUECKEL のペクチン分解酵素製剤である。⁽¹⁷⁾ この菌のペクチン分解酵素の作用については里村^(18,19) がその研究成果を発表している。

著者等は Sclase の抽出液を試料として, これを部分的に精製した酵素混合体を zone electrophoresis にかけて, PE と PG とを分離した。

(1) 粗酵素液の調製法およびその酵素作用力

Sclase 10g に蒸留水50ml を加えて氷室中で1夜酵素の抽出を行い、ガーゼで濾過した後、濾液を遠心沈澱して上澄液を得た。この粗酵素液に硫酸を飽和して、酵素蛋白の塩析を行い、吸引濾過して得た粗酵素をできる限り少量の蒸留水に溶解し、M/50 磷酸緩衝液(pH7.4)を外液として24-48時間透析を行い、この酵素試料を電気泳動に使用した。この酵素液の作用力は、液化型 PG の力価が1733unit/ml で、PE の力価は 6.8PMUmg であって、馬鈴薯の maceration 作用も有していた。この酵素液の蛋白含量は100ml中594.9mg であった。

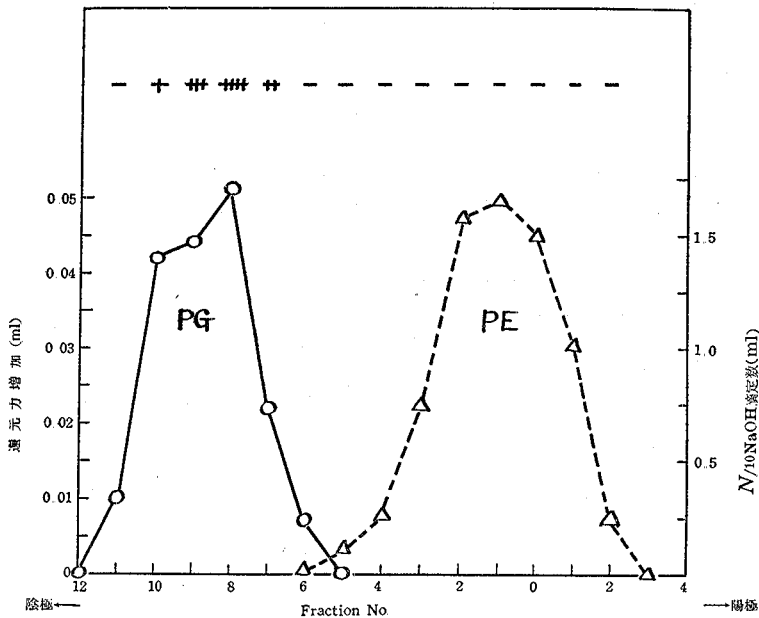
(2) 電気泳動による PG および PE の分離

上記の酵素液 1ml を電気泳動に使用した。泳動後の各 fraction の酵素液を3倍に希釈してその酵素作用力を決定した。その結果を第2図に示す。この図において示されるように、*Sclerotinia Libertiana* の PG, PE を pH7.4 で泳動させるときはともに陰極側へ動き、泳動距離は PE よりも PG が大きく、両者の分離が可能であった。即ち、PG の作用力のピークは-8 の fraction にあり、PE のときは-1 に認められた。一方、馬鈴薯の切片の maceration 作用は-8 の fraction にピークが存在し、この作用は PG によって出現したものと判断された。

(3) 電気泳動によって分離したPGの作用についての検討

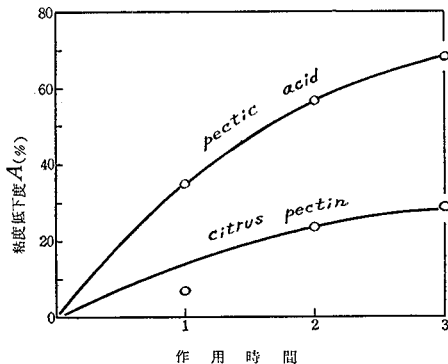
上記の方法によって分離されたPGは粘度低下度が大いので一応液化型PGと考えられる。次にこの酵素の poly-methylgalacturonase⁽²⁰⁾ との比較を行うために、基質としてペクチン酸および citrus pectin の両者を使用して酵

第2図 *Sclerotinia Libertiana* の PG, PE の zone electrophoresis

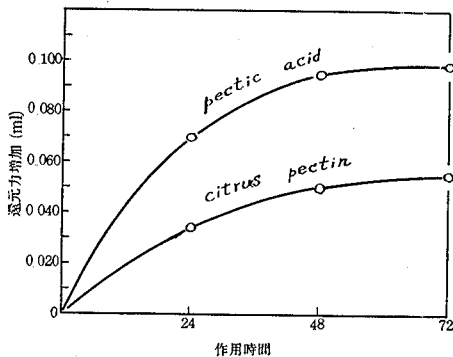


(備考) 1. 還元力の増加は作用液 1ml について消費された 0.02N I₂ 溶液の ml 数を以て表現した。
2. 図中上部に各 fraction の maceration の作用度を示した。

第3図 電気泳動によって分離された Sclase の PG の作用型式 (I 粘度低下度)



第4図 電気泳動によって分離された Sclase の PG の作用型式 (II 還元力増加)



(備考) 還元力の増加は作用液 1ml について消費された 0.02N I₂ 溶液の ml 数を以て表現した

素作用を検討した。citrus pectin は Exchange Lemon Products Company の Slow set No 451, 150 grade を 70% エタノールとともに煮沸して精製したものであり、ペクチン酸については既にその調製法を記載した如く、⁽¹⁾ アルカリによる調製法によった。メトキシ基の含量は ZEISEL 法によって定量したところ、citrus pectin において 10.36%、ペクチン酸、0.66% (何れも絶乾体%) であった。この両者に対する泳動によって得た PG の加水分解の作用を第 3 図および第 4 図に示す。泳動後の PG の作用力が最高の fraction をとりこれを 3 倍に稀釈して常法通り配合して粘度低下度および還元力増加を測定した。この結果が示すように、citrus pectin よりもペクチン酸の加水分解が急速に進行した。従って、ここに得られた酵素は通常の PG であって、polymethylgalacturonase の如き型の酵素ではないものと判断される。

考 察

以上の実験結果に示された通り、*Cl. felsineum* var. *sikokianum* および *Sclerotinia Libertiana* の生産するペクチン分解酵素は何れも pH7.4 において陰極側へ泳動することが分った。前者の場合には PG と ME との分離が行われ、後者の場合には PG と PE との分離が行われた。

植物組織の maceration は、PG の区分に出現したが、*Cl. felsineum* var. *sikokianum* の場合には ME 区分においても強い maceration 効果が出現した。これ等の事実から判断するときは、液化型 PG 単独の作用によって maceration の作用は進められることおよび ME 単独の作用によってもこの現象が出現することが明白になった。然して、著者等の既報の研究結果によれば、maceration の効果は液化型 PG 単独の作用によるより ME 単独の作用による時の方が強く出現する。一般に、液化型 PG は多種の微生物によって生産されることが分っているが、ME についてその分離を行いその存在を指摘したのは著者の既報の成果があるのみである。⁽⁴⁻⁶⁾

Clostridium 属の微生物中には、*Cl. felsineum*,⁽²¹⁾ *Cl. felsineum* var. *sikokianum*⁽²²⁾, *Cl. acetobutylicum*,⁽²³⁾ *Cl. butyricum*⁽²³⁻²⁵⁾ の如く発酵精練に有用なる細菌が多いことが報告されている。これ等の細菌中特に maceration の効果を強く示すものは、ME の生産に富むためであると考えられ、一方液化型 PG をも同時によく生産するので両酵素のペクチン分解の作用が相協力して maceration の作用が強く出現するものであると考えられる。

著者等は *Cl. felsineum* var. *sikokianum* および *Sclerotinia Libertiana* のペクチン分解酵素の外に、*Pen. oxalicum* var. *pectinovorum* の酵素製剤の Clarinase⁽²⁶⁾ および *Pen. chrysogenum* のペクチン分解酵素についても zone electrophoresis を行った。その結果、これ等のかびの場合も PG の作用によって maceration が起ることが明らかであった。

これ等の事実から判断するときは、*Sclerotinia Libertiana*, *Pen. chrysogenum*, *Pen. oxalicum* var. *pectinovorum* の如き微生物によって maceration が遂行されるのは、液化型 PG の作用が中心であり、PE がこれに協力することも考えられる。更に、*Asp. niger* の如き蓂酸を生産する菌^(27, 28) においてはこれが液化型 PG の作用を強力に促進し、maceration 効果が完遂されるものと判断される。再度に渡って報告したように、^(29, 4, 20) oxalate は単独でも maceration の効果を現わすが、 $\frac{1}{600}$ - $\frac{1}{1000}M$ の如き、それ自身では maceration を示さない程度の濃度にあっても、液化型 PG が存在するときは maceration の効果を強く促進することが単離された PG を使用して確認されている。

御懇篤なる御指導を賜った京都大学教授片桐英郎博士に深く感謝いたします。

(本研究の要旨は昭和34年4月8日、日本農芸化学会大会講演会において発表した。)

文 献

- | | |
|---|---|
| (1) 梶：農化，27，699(1953)。 | (9) MILLER, G. L., BLUM, R.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 218, 131(1956)。 |
| (2) 梶：同誌，27，855(1953)。 | (10) 小林：農化，31，865(1957)。 |
| (3) 梶，穴吹：同誌，29，775(1955)。 | (11) SMITHIES, O.: <i>Biochem. J.</i> , 61, 629(1955)。 |
| (4) 梶： <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 20, 8(1956)。 | (12) FLODIN, P., PORATH, J.: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 13, 175(1954)。 |
| (5) 梶：本誌，9，141(1958)。 | (13) CAMPBELL, P. N., STONE, N. E.: <i>Biochem. J.</i> , 62, 9(1956)。 |
| (6) 梶： <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 23, 131(1959)。 | (14) BERNFELD, P., NISSELBAUM, J. S.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 220, 851(1956)。 |
| (7) KUNKEL, H. G., SLATER, R. J.: <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 80, 42(1952)。 | |
| (8) HARRIS, E., MEHL, J. W.: <i>ibid.</i> , 90, 521(1955)。 | |

- (15) KERTESZ, Z. I.: "Pectic Enzymes", Methods in Enzymology (COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O.) Vol. I, p. 159(1955).
- (16) 梶, 穴吹: 本誌, 7, 67(1955).
- (17) 石橋, 木造, 里村: 三共高峰研報, 3, 66(1951).
- (18) 里村: 農化, 26, 486(1952).
- (19) 里村: 同誌, 27, 15(1953).
- (20) SEEGMILLER, C. G., JANSEN, E. F.: *J. Biol. Chem.*, 195, 327(1952).
- (21) CARBONE, D., TOBLER, F.: *Faserforsch.*, 2, 163 (1922).
- (22) 梶, 齊藤: 醸酵工学, 30, 242(1952).
- 梶, 齊藤23, 穴吹: 同誌, 30, 339(1952).
- (24) TRÉCUL, A.: The Microbiology of Cellulose, Hemicellulose, Pectin and Gums (THAYSEN, A. C. and BUNKER, H. J.) p.36(1927)より引用.
- (25) VAN TIEGHEM: 同書, p. 36(1927)より引用.
- (26) 岩崎: 日本農業研報告, No.1, p. 16(1951).
- (27) 朝井, 佐野, 井上: 農化, 23, 398(1950).
- (28) 朝井, 齊藤: 同誌, 25, 307(1951).
- (29) 梶, 穴吹: 農化会関西支部大会講演会, 昭31.5.19
- (30) 梶: 香川六農学部紀要, No.4, p. 45(1959).

Summary

Separation of pectic enzymes has been performed by the method of zone electrophoresis. Macerating enzyme (ME), liquefying polygalacturonase (PG) and pectinesterase (PE) were obtained from the medium of *Cl. felsineum* var. *sikokianum* and the extract of *Sclerotinia Libertiana*.

Corn starch was employed for the supporting medium and its pH value was adjusted to 7.4 by using M/50 phosphate buffer solution. The same buffer solution was taken into electrode compartments containing platinum electrodes. Both ends of the tray were connected through four or five sheets of filter paper strips to the electrode compartments. Two kinds of trays were used for electrophoresis, and the size of one was 25×3cm base, 1.4cm high, and the other was 45.2×5cm base, 1cm high. Electrophoresis was conducted at potential gradients of 250V, giving a current of 5.2mA. The apparatus placed in an ice chamber at 5°C, and electrophoretic migration was carried out for 24 hrs.

Culture medium of *Cl. felsineum* var. *sikokianum* was centrifuged and the centrifuged solution passed through a column of Duolite A-7, and then the solution after passing was charged on the top of a column containing H-form of Amberlite IRC-50. PG and ME in the culture medium were adsorbed on the resin column, and the column was washed with water, and then 3.10 N ammonia solution was added to the column in order to elute those enzymes. The eluate was condensed to one-fifth volume in vacuo, at 25° to 30°C. This solution was dialyzed against M/50 phosphate buffer solution at pH 7.4, and the dialyzed solution was employed as enzymic solution in zone electrophoretic experiments. A 1×3cm slot was cut off from the starch block, and the slot was filled with 1 ml of enzymic solution, and then zone electrophoresis of pectic enzymes was carried on. After electrophoresis, starch block of supporting medium was cut transversely into 1cm sections in case of a smaller tray and cut into 2cm sections in case of a larger tray. Three ml of water was added to each section, and the mixtures were stirred, centrifuged, and transparent solution was employed for determination of enzymic activities.

As were reported in the previous papers, *Cl. felsineum* var. *sikokianum* produced least amount of PE. PG and ME which were produced by the organisms were found to migrate toward the cathode. A maximum action of liquefying PG was detected in the eluate obtained from fraction six, while maximum macerating action appeared in the fraction nine. The pectic enzymes were also extracted from *Sclerotinia Libertiana*. The pectic enzymes were salted out by the addition of ammonium sulfate, and the preparation of enzymes was dissolved in water, dialyzed against M/50 phosphate buffer solution, at pH 7.4. Dialyzed solution was employed for zone electrophoresis and the procedure was the same as electrophoresis of the enzymes produced by *Cl. felsineum* var. *sikokianum*. In case of *Sclerotinia*, PE and PG migrated toward the cathode, and maximum activity of liquefying PG was detected in the eluate of fraction eight, while activity of PE was maximum in fraction one. The maceration of plant tissues was found to be most active by the eluate of fraction eight.

Therefore, ME was not existed in the eluate of each section, and the maceration of plant tissues was found to be caused by the action of liquefying PG.

As was described above, it was found that ME was produced by *Cl. felsineum* var. *sikokianum* but not by *Sclerotinia Libertiana*. In the former, maceration of plant tissues seems to be caused by enzymic actions of ME and PG, while in the latter case PG was only the enzyme which acted on the pectic substances to cause maceration action of plant tissues.