

(注意) この論文には正誤表があります

香川大学農学部学術報告 第24巻第2号 正誤表

URL

http://www.lib.kagawa-u.ac.jp/metadb/up/AN00038339/AN00038339_24_2_e.pdf

Notice

Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University

Vol.24 No.2 Errata

URL

http://www.lib.kagawa-u.ac.jp/metadb/up/AN00038339/AN00038339_24_2_e.pdf

海洋性細菌のペントース・イソメラーゼ

山中啓, 何森健, 鍋島彰宏*, 谷本忠雄

I ま え が き

細菌類のペントースの代謝系は、乳酸菌のペントース発酵の経路およびペントース・サイクルに代表される嫌氣的代謝系と、*Pseudomonas* 属細菌にみられるペントースからペントン酸への酸化により開始される好氣的代謝系^(1,2)とに分けることができる。前者の嫌氣的代謝系においては、いずれの場合もペントースはそれぞれのイソメラーゼの作用によりまず相当するケトペントースに変化した後に附りんされて C-C 結合が開裂される。還元系としてペントースが還元されてペンチトールとなり次いでペンチトール脱水素酵素により脱水素されてケトペントースとなり、これがりん酸化されてペントース・サイクルに入る経路がかび類に広く分布しているが、細菌類にこの代謝系の存在はまだ見出されてはいない。従って、ペントースの好氣的代謝系以外は、D-リボースの場合を除き、ペントースの代謝能は、それぞれのペントース・イソメラーゼ活性の有無により判断することができる。

以上の結果は、すべて陸生細菌について得られた知見であり、生育環境条件の全く異なる海洋性細菌のペントースの代謝系については現在まで全く検討されていない。海洋性細菌についての生理学的検討は、主としてその耐塩性、栄養要求、塩類の能動輸送等について行われ、その生産する酵素についての検討は比較的少なく、特にペントース代謝系の酵素活性についての検討はない。

我々は、海洋性細菌の示すペントース資化性を検討し、ペントースの代謝系を知る目的で菌株のスクリーニングを行なった。その結果、海洋性細菌からペントース・イソメラーゼ活性を見出したので、これらの酵素を部分精製し、既に知られている陸生菌のペントース・イソメラーゼと性質を比較検討した。

II 実 験 方 法

1. 使用菌株

瀬戸内海各地、特に香川県沿岸の海水より分離した菌株および大平洋各点の各種深度の海水より分離した菌株を用いた。これらの菌株は、0.1%ペプトン、0.2%酵母エキスを含む沝過海水 (pH を7.0に補正) に寒天を2%添加した斜面培地に接種し、2°Cで保存した。海水は屋島の県栽培漁業センターで沝過したものを使用した。

2. 培 養

ペントース資化性の検討には、沝過海水に0.05%ペプトンを加え pH を7.0に調整し、1.0%ペントースを炭素源とした培地5mlを試験管に分注したものを用いた。各試験管には生酸の検定のため0.02%ブロムクレゾールパープル(BCP)を1滴宛添加した。ペントースとして、D-キシロース、L-アラビノース、D-アラビノースおよびD-リボースを用い、比較のためにD-グルコースを用いた。

まず0.05%ペプトン、0.05%酵母エキスを含む海水 (pH 7.0) 培地 5.0ml に保存菌株の斜面培地より1白金耳を接種し、30°C、20時間振盪培養した。この培養液を前記ペントース-海水培地に殺菌ピペットにて1滴ずつ添加し、30°Cで4日間振盪培養した。

菌体の生育は、試験管のまま 600m μ における吸光度で測定し、その吸光度をそのまま生育値として表示した。糖より酸が生成されると、BCPは青紫色 (pH 6.8) より黄色 (pH 5.2) に変化し、黄変したものを+として表示した。

菌体の集取のためには、0.1%ペプトン、0.1%酵母エキス、0.01%Mn SO₄·4H₂O、1.0% D-キシロース (またはL-アラビノース) を含む海水培地 (pH 7.0) 100ml に30°C、18時間振盪培養した。

3. 粗酵素液の調製

菌体を遠心分離により集め、3% NaCl を含む 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、遠心分離により

* 現在株式会社大塚製薬工場勤務

菌体を集めた。洗滌菌体を NaCl を含まない上記緩衝液に懸濁し、氷冷し乍ら10分間 20kc 超音波処理を行なった。これを遠心分離 (12,000rpm, 20分) した上清を粗酵素液とした。

4. 酵素活性の測定

D-キシロース・イソメラーゼおよび L-アラビノース・イソメラーゼの活性は既報^(3,4)の方法により測定し、単位として表示した。

III 結 果

1. 海洋性細菌のペントース資化性

1%糖を単一炭素源とする海水培地を用いて80株のペントースの資化性を検討した。4日間の振盪培養の結果、D-キシロース、L-アラビノース、D-アラビノース、D-リボースおよび D-グルコースに全く生育しなかった菌株は22株 (27.5%) であった。これらはすべて大洋起源の菌株であったので、総数75株中の29.3%となった。5種の糖の資化性の分布を第1図に示した。菌の生育度が0.5以上を示し、最終 pH が 3.0~5.4にあるものを資化性菌とすると、

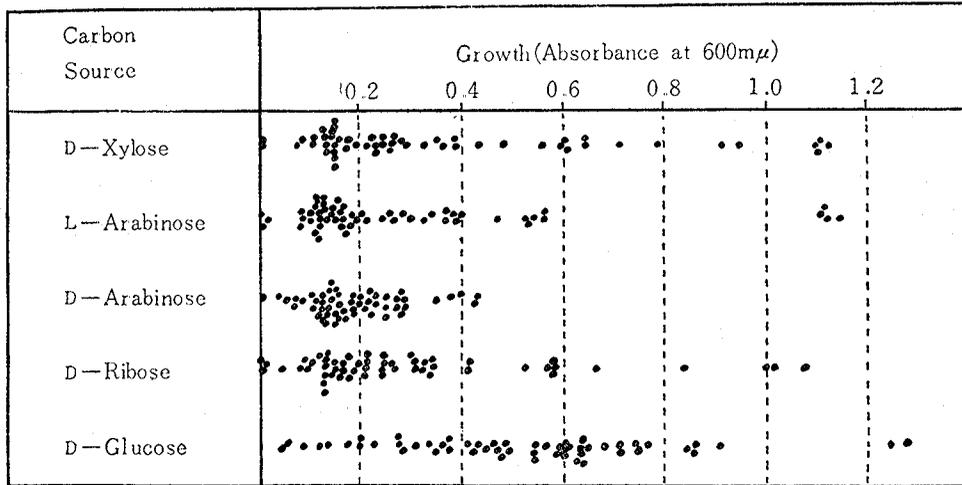


Fig. 1. Growth on various pentoses and glucose by isolated marine bacteria.

D-キシロース資化性菌14株、L-アラビノース資化性菌9株、D-リボース資化性菌10株となったが、D-アラビノース資化性菌は全く見出すことができなかった。これに反して、グルコースの資化性は半数の菌株に認められた。いずれの糖に対しても資化性のなかった22菌株を更に28日間継続して培養すると、14株はグルコースに生育を示すようになり、そのうちの7株は D-キシロースに生育した。しかし、その他のペントースの資化性の発現は弱く、ペントースのみを資化する菌株および D-アラビノースを資化する菌株は全くなかった。

2. ペントース・イソメラーゼ活性の検出

大平洋海水より分離した75菌株より D-キシロースおよび L-アラビノース資化性菌11菌株、香川県東部沿岸海水より分離した50菌株より D-キシロースおよび L-アラビノース資化性菌7株を選び、ペントース・イソメラーゼ活性の有無を検討した (第1, 2表)。

その結果、これら選定菌はペントース・海水培地に充分に生育し、約半数の菌株はそれぞれのイソメラーゼを生産する。すなわち、D-キシロースに生育する大平洋起源の海洋菌の大部分に D-キシロース・イソメラーゼ活性を検出した。しかし、沿岸海水より分離した菌株の D-キシロース・イソメラーゼ活性は低く、D-キシロースはイソメラーゼを経ない径路を通して代謝される可能性がある。L-アラビノース・イソメラーゼ活性は、大洋起源、沿岸起源をとわず、活性を示す菌株が多かった。

Table 1. Production of pentose isomerases from D-xylose medium*.

| Strain No. | Final pH** | Protein in crude extracts (mg) | D-Xylose isomerase activity (units/100 ml medium) | L-Arabinose isomerase activity (units/100 ml medium) |
|------------|------------|--------------------------------|---|--|
| 424 | 5.1 | 67.5 | 2.0 | 0 |
| 430 | 6.2 | 12.5 | 0.8 | 0 |
| 491 | 6.5 | 30.0 | 8.5 | 0.4 |
| 492 | 5.3 | 52.5 | 0.8 | 0 |
| 506 | 4.8 | 60.0 | 12.1 | 0 |
| 529 | 5.0 | 47.0 | 8.8 | 0 |
| 544 | 5.1 | 28.0 | 25.8 | 4.6 |
| 551 | 4.7 | 47.5 | 41.0 | 8.2 |
| 552 | 4.6 | 71.5 | 15.7 | 10.7 |
| 556 | 5.1 | 71.0 | 20.8 | 7.1 |
| 4 | — | 56.1 | 2.2 | — |
| 10 | — | 23.4 | 2.2 | — |
| 11 | — | 39.2 | 2.8 | — |
| 22 | — | 123.6 | 0.8 | — |
| 34 | — | 28.1 | 0.9 | — |
| 35 | — | 29.3 | 0.8 | — |

* Cells were obtained from 100 ml of medium with 1% D-xylose as carbon source.

** After 18 hours culture with shaking at 30°C.

Table 2. Production of pentose isomerases from L-arabinose medium*.

| Strain No. | Final pH | Protein in crude extracts (mg) | L-Arabinose isomerase activity (units/100 ml medium) | D-Xylose isomerase activity (units/100 ml medium) |
|------------|----------|--------------------------------|--|---|
| 430 | 6.8 | 12.5 | 1.9 | 0.7 |
| 491 | 6.2 | 35.0 | 0 | 0 |
| 492 | 6.2 | 27.5 | 0 | 0 |
| 543 | 5.9 | 51.0 | 27.5 | 8.7 |
| 544 | 4.5 | 144.0 | 14.9 | 0 |
| 551 | 4.7 | 140.0 | 16.6 | 5.2 |
| 552 | 4.8 | 70.0 | 12.7 | 0 |
| 4 | — | 64.4 | 4.0 | — |
| 10 | — | 46.6 | 26.9 | — |
| 11 | — | 48.2 | 2.9 | — |
| 21 | — | 59.8 | 4.4 | — |
| 22 | — | 54.1 | 33.4 | — |
| 34 | — | 11.0 | — | — |
| 35 | — | 16.5 | 0.5 | — |

* Cells were obtained from 100 ml of medium with 1% L-arabinose as carbon source.

** After 18 hours culture with shaking at 30°C.

3. D-キシロース・イソメラーゼの生産

第1表の結果, D-キシロースによく生育し, D-キシロース・イソメラーゼを最もよく生産する菌株として No.551 菌を選定し, 本菌の D-キシロース・イソメラーゼの生産について検討した。

菌の生育と酵素の生産の経時変化を第2図に示す。本菌は1% D-キシロースを炭素源とする時, D-キシロース・

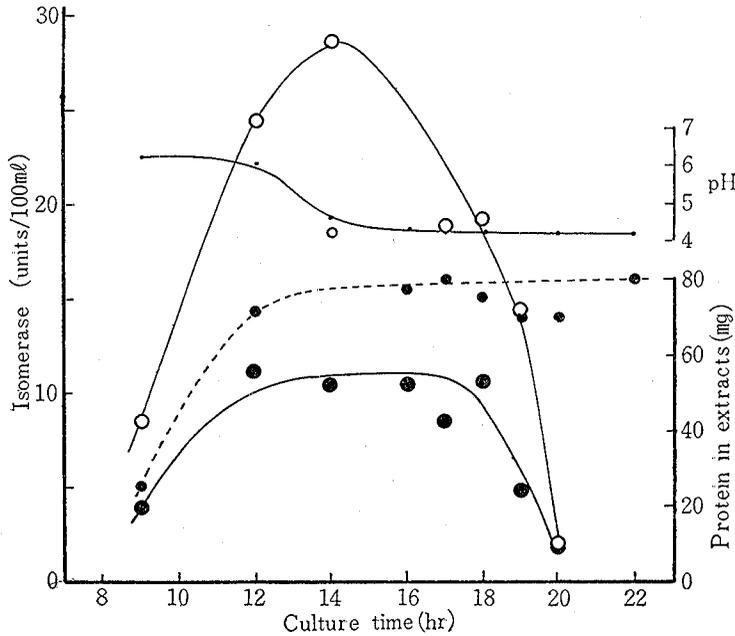


Fig. 2. Time courses of production of pentose isomerases by a marine bacteria, strain No. 551.

○—○, D-Xylose isomerase; ●—●, L-arabinose isomerase; ----, protein in crude extract; ●—●, pH in medium.

イソメラーゼを生産し, その生産は培養14時間後に最大に達する。本菌は D-キシロース培地より, L-アラビノース・イソメラーゼも生産し, その生産量は D-キシロース・イソメラーゼの約半量に達した。第1表から明らかなように, D-キシロース生育菌の約半数は, D-キシロース・イソメラーゼの他に L-アラビノース・イソメラーゼを生産する。本菌は D-キシロースおよび L-アラビノースを資化し, D-リボースおよび D-アラビノースを資化しない (第3表)。

Table 3. Effect of pentoses and glucose on the bacterial growth of strain No. 551.

| Peptone (0.05%) | Yeast extract (0.05%) | Sugar (1%) | Growth (A _{600mμ}) | pH |
|-----------------|-----------------------|-------------|------------------------------|------|
| + | | | 0.338 | 8.3 |
| | + | | 0.300 | 8.3 |
| + | + | | 0.640 | 8.4 |
| | + | glucose | 0.650 | 5.4 |
| + | | glucose | 1.120 | 5.0 |
| + | + | glucose | 1.100 | 5.4 |
| + | | D-xylose | 1.100 | 4.45 |
| + | | L-arabinose | 1.110 | 4.5 |
| + | | D-arabinose | 0.200 | 8.0 |
| + | | D-ribose | 0.305 | 8.0 |

本菌は糖を除いた培地でも生育するが、無糖培地より得られる菌体には D-キシロース・イソメラーゼおよび L-アラビノース・イソメラーゼはこんせきしか認められず、D-キシロース生育菌の両酵素量の 2.3 および 1.9% に相当する。従って、本菌による両ペントース・イソメラーゼの生産は誘導的であると考えられる。

4. L-アラビノース・イソメラーゼの生産

表2表より、L-アラビノース・イソメラーゼ生産菌として、沿岸海水より分離した No. 22 菌を選定した。

菌の生育と酵素の生産の経時変化を第3図に示す。本菌の L-アラビノース・イソメラーゼの生産も誘導的であり、

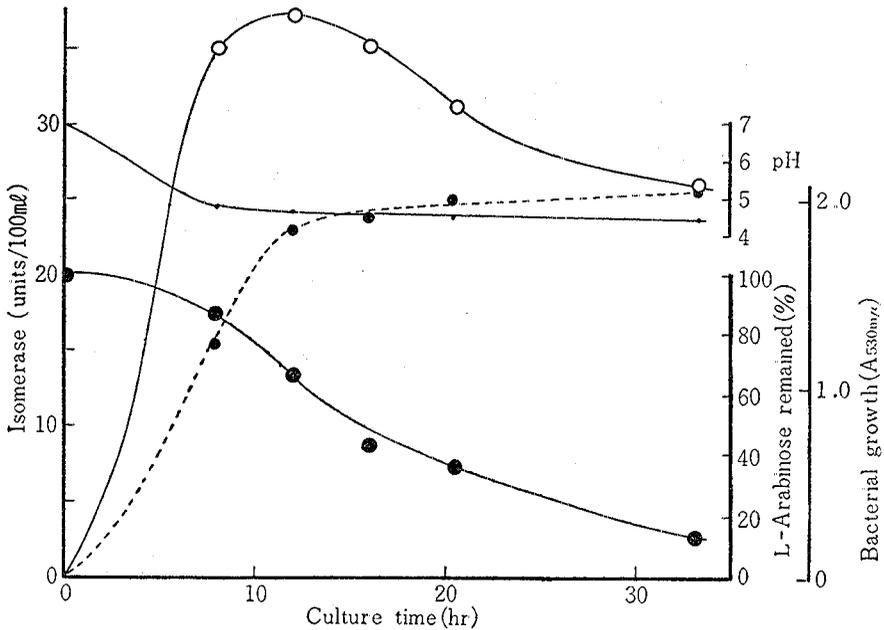


Fig. 3. Time courses of production of L-arabinose isomerase by a marine bacteria, strain No. 22.

○, L-Arabinose isomerase; ●, amount of L-arabinose remained in medium; - - -, bacterial growth; ●—●, pH in medium.

Medium was composed of 0.1% yeast extract, 0.1% peptone, 0.02% MnCl₂ and 0.5% L-arabinose in artificial sea water.

培地より L-アラビノースを除去すると、酵素の生産は1/10にまで減少する。また L-アラビノースの代りに1%の各ヘキソースおよびペントースの影響を検討した結果、D-マンノースで42%の酵素が生産されたが、D-グルコース、D-マンニト、D-リボース、D-キシロースおよび D-アラビノースでは対照と差なく全く無効であった。D-フラクトースおよび D-ガラクトース生育菌に微弱な活性が認められた。

a. 塩類の影響

ペントース・イソメラーゼは活性に Mn イオンを要求し、その生産も Mn イオンの添加により著しく促進されることが知られている。海洋性細菌起源の酵素の生産についても、Mn イオンの効果が期待されたので検討した(第4図)。前培養に塩類を含まない培地に接種し、次いで各塩類を単独に含む培地に培養すると、Mn SO₄ 添加の場合、菌の生育はやや抑制されるが、酵素の生産は著しく促進された。この Mn 塩の効果は人工海水培地 (2.675% NaCl, 0.075% KCl, 0.342% MgCl₂, 0.051% CaCl₂, 0.210% MgSO₄) においても顕著である。更に天然海水に Mn SO₄ を添加すれば充分酵素を生産することができた。

b. 酵素の精製

No. 22 菌を用いて L-アラビノース・イソメラーゼを精製した。培地は人工海水塩溶液に0.1%ペプトン、0.1%酵

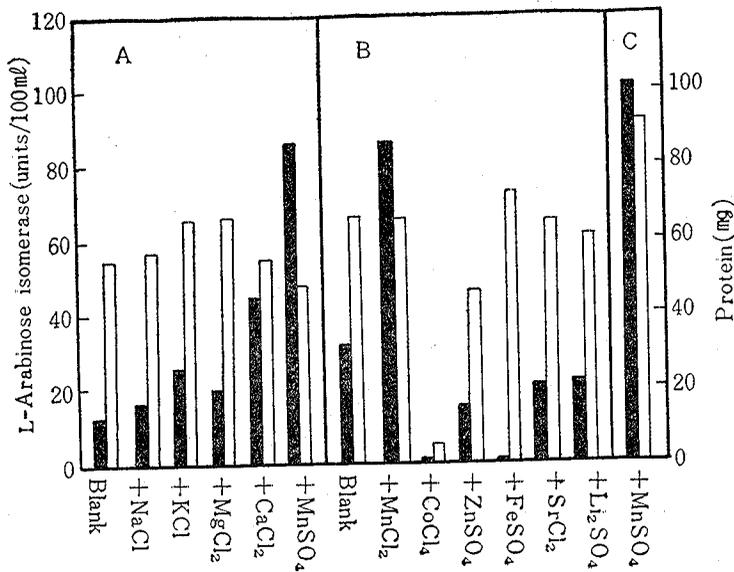


Fig. 4. Effect of salts on the production of L-arabinose isomerase by a marine bacteria, strain No. 22.

Medium (100 ml) was composed of each 0.1% of peptone and yeast extract and 0.3% L-arabinose. Culture was made at 27 - 28°C for 17 hrs.

A: Basal medium was made with deionized water and 0.02% of salt was added.

B: Artificial sea water was used and 0.01% of salt was added.

C: Sea water was used with 0.02% MnSO₄

■, L-Arabinose isomerase activity; □, protein.

母エキス, 0.02% MnSO₄, 0.3% L-アラビノースを添加した培地 100ml を 500ml 容の振盪用フラスコに入れ, 試験管に前培養した浮遊菌液体 0.2ml を接種して 30°C, 17時間培養した. 20本のフラスコ (2l) より集菌した. 洗滌菌体を 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH=8.0) に懸濁し, 20kc で超音波処理で30分間細胞を破碎した. 遠心分離により得られる上澄液を粗抽出液として酵素の精製の出発材料とした. 粗抽出液に 1M MnCl₂ を 0.05容滴下し, pH を 7.0 ~ 7.2 とし, 30分間放置後遠心分離により沈殿を除去した (Mn 処理上清). これに固型硫酸を加え, 飽和度 0.5 より 0.8 の間に生ずる沈殿を集め, 沈殿を 0.02M トリス-塩酸緩衝液 (pH=7.5) にとかし, 5mM MnCl₂ を含む同緩衝液に対して一液透析した. 透析酵素に 0.1M MnCl₂ を 1/20容加え, 50°C で 5分間熱処理を行ない, 凝固た

Table 4. Purification of L-arabinose isomerase.

| Step | Protein (mg) | Total units | L-Arabinose isomerase Specific activity (units/mg of protein) | Yield (%) |
|--|--------------|-------------|---|-----------|
| Crude extracts | 2,360 | 3,570 | 1.5 | 100 |
| MnCl ₂ supernatant | 1,600 | 3,310 | 2.1 | 92.8 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5-0.8 sat. ppt | 1,030 | 2,000 | 1.9 | 56 |
| Heated | 410 | 1,700 | 4.1 | 47.6 |
| 2nd (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5-0.7 sat. ppt | 170 | 1,300 | 7.5 | 36.5 |
| DEAE-cellulose eluate | 34 | 800 | 33.7 | 22.5 |
| Sephadex G-200 eluate | 6 | 520 | 84.7 | 14.7 |

ん白を遠沈して除去した(熱処理)。次いで硫酸塩析を行ない、0.5飽和から0.7飽和で生ずる沈でんを集め、上記同様に透析した(硫酸0.5-0.7飽和沈でん区分)。0.02M トリス-塩酸緩衝液(pH=7.5)で緩衝化したDEAE-セルロースのカラム(39×2.4cm)に酵素液を添加し、0-0.5M KClのグラジエントでたん白を溶出した(DEAE-セルロース区分)。酵素液に硫酸を加え、0.8飽和で沈でんする区分を集め、セファデックスG-200に対してゲル透過を行った。以上の精製結果を第4表にまとめた。酵素は56倍に精製され、収率は14.7%であった。本精製酵素を用いて、性質を検討した。

5. L-アラビノース・イソメラーゼの性質

a. pH, 温度の影響

反応の最適pHは、 $10^{-3}M$ $MnCl_2$ の存在下で35°C, 10分の反応で6.5-7.0であった。また $10^{-2}M$ $MnCl_2$ の存在下で50°C, 10分間の熱処理により安定pHを求めると、pH 7.5-8.0で最も安定であった。反応時間10分における最適温度は $10^{-3}M$ $MnCl_2$ の存在下で45°Cで活性は最大を示した。これらの性質は既に得られている陸生菌、*Lactobacillus gayonii*の結晶L-アラビノース・イソメラーゼ⁽⁴⁾、*L. plantarum*⁽⁵⁾、*Escherichia coli*⁽⁶⁾、*Clostridium acetobutylicum*⁽⁷⁾、*Streptomyces*⁽⁸⁾のL-アラビノース・イソメラーゼとよく類似している。

b. 基質特異性

本酵素はL-アラビノースにのみ特異的に作用し、D-アラビノース、D-キシロース、L-キシロース、D-リボースのペンチトス類には10倍量の糖を作用させても全く作用しなかった。そのミハエリス定数は0.015Mであった(第5図)。

c. ペンチトールによる阻害

*L. gayonii*の結晶L-アラビノース・イソメラーゼは基質L-アラビノースと構造類似のL-アラビトールその他、リビトール、キシリトールにより拮抗的に阻害されるが⁽⁴⁾、海洋菌の本酵素もこれらペンチトールにより拮抗的に阻害される。それぞれの阻害定数は、0.0011M(L-アラビトール)、0.0011M(リビトール)、0.0188M(キシリトール)であった(第6図)。D-アラビトールはほとんど阻害しなかった。

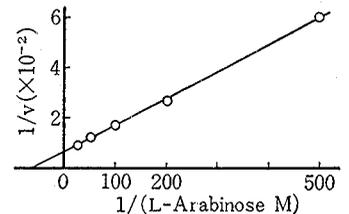


Fig. 5. Effect of concentration of L-arabinose on enzyme activity.

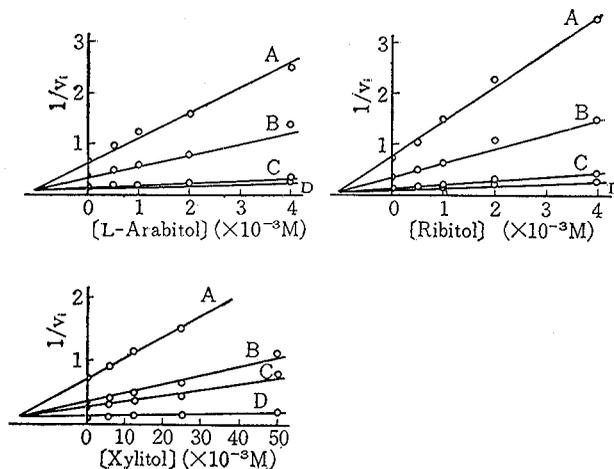


Fig. 6. Inhibition by pentitols of L-arabinose isomerase activity.

The incubation was carried out with 0-0.004M concentration of L-arabitol, ribitol or 0-0.05M concentration of xylitol. L-Arabinose was added 0.002M(A), 0.005M(B), 0.02M(C) and 0.04M(D) in each incubation mixture with the above mentioned concentration of each pentitol.

IV 考 察

ペントース資化性の海洋菌にペントース・イソメラーゼ活性を見出した。従って環境の全く異なる海洋または海水起源の細菌においても、陸生菌において見出されたペントース・イソメラーゼを出発酵素とする代謝系が作用しているものと考えられる。海水中の有機成分として糖質の存在が報告されているが、その主なるものはグルコースであり、ペントースの量は $0.5\mu\text{g/l}$ 程度の微量である。従って、海洋菌の示すペントース・イソメラーゼ活性の生理的意義は明らかではない。またイソメラーゼを経由しないペントースの代謝系の存在の可能性があるが、今回は充分検討しなかった。

精製酵素の性質については、既報の陸生菌のそれと全くよく類似しており、海洋起源による特殊性を見出すことができなかった。

特に L-アラビノース・イソメラーゼは陸生菌の *L. gayonii*⁽⁴⁾, *L. plantarum*⁽⁵⁾, *E. coli*⁽⁶⁾ の酵素と同様に Mn イオンにより活性化された。L-アラビノースに対するミハエリス定数は、 0.055M (*L. gayonii*⁽⁴⁾), 0.028M (*L. plantarum*⁽⁵⁾), 0.06M (*E. coli*⁽⁶⁾) よりやや小さく 0.0108M (*Cl. acetobutylicum*⁽⁷⁾) と大体同じく 0.015M であり、 0.107M (*Candida utilis*⁽⁹⁾) より小さい。ペンチトールによる阻害定数は、第 5 表に示したように、陸生菌 2 種のそれより小さく、ミハエリス定数の小さいことと相俟って、本菌の酵素の親和力は高いものと考えられる。

Table 5. Comparison on the inhibition constants by pentitols.

| Pentitol | Ki value (M) | | |
|------------|-----------------|----------------------------------|-------------------------------|
| | Marine bacteria | <i>L. gayonii</i> ⁽⁴⁾ | <i>E. coli</i> ⁽⁶⁾ |
| L-Arabitol | 0.001 | 0.0075 | 0.018 |
| Ribitol | 0.001 | 0.006 | 0.006 |
| Xylitol | 0.019 | 0.038 | — |

謝辞 大平洋各地の海水より分離された多数の海洋性細菌の保存菌株を快よく分譲していただいた京都大学農学部農芸化学科緒方浩一教授の御厚意に対して厚く御礼を申し上げる。

V 要 約

海洋性細菌のペントースの資化性を検討した結果、80株中、D-キシロースを資化するもの 14株、L-アラビノースを資化するもの 9株、D-リボースを資化するもの 10株を得たが、D-アラビノースを資化するものを見出すことができなかった。

D-キシロースおよび L-アラビノース資化性菌に、それぞれのペントース・イソメラーゼ活性を見出した。これらの酵素の生産は誘導的であった。

瀬戸内海の海水より分離した No. 22 菌株の L-アラビノース・イソメラーゼを精製し、その性質をしらべた。最適 pH 6.5-7.0, 最適温度 45°C , Km 0.015M , ペンチトールによる阻害はすべて拮抗阻害であり、その阻害定数は、 0.0075M (L-アラビトール), 0.006M (リビトール) および 0.038M (キシリトール) であった。

引用文献

- (1) WEINBERG, R., DOUDOROFF, M.: *J. Biol. Chem.*, **217**, 607-624 (1955).
 (2) WEINBERG, R.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 727-732 (1959).
 (3) YAMANAKA, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 670-680 (1968).
 (4) NAKAMATSU, T., YAMANAKA, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 156-165 (1969).
 (5) HEATH, E. C., HORECKER, B. L., SMYRNOIIS, P. Z., TAKAGI, Y.: *J. Biol. Chem.*, **231**, 1031-1037 (1958).
 (6) PATRICK, J. W., LEE, N.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 4312-4318 (1968).
 (7) TOMOEDA, M., HORITSU, H., SASAKI, I.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 151-157 (1969).
 (8) YAMANAKA, K., IZUMORI, K.: *Agr. Biol. Chem.*, (In press).
 (9) HORITSU, H., SASAKI, I., TOMOYEDA, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 676-683 (1970).

PENTOSE ISOMERASES FROM MARINE BACTERIA

Kei YAMANAKA, Ken IZUMORI, Akihiro NABESIMA and Tadao TANIMOTO

Summary

Dissimilation of pentoses by marine bacteria was examined. Among eighty strains tested, it was found that 14 strains were able to grow on D-xylose, 9 strains on L-arabinose and 10 strains on D-ribose. None of them dissimilated D-arabinose. Activities of D-xylose and L-arabinose isomerase were found in the bacterial cells grown on D-xylose or L-arabinose, respectively. They were inducible.

L-Arabinose isomerase was partially purified 56-fold in specific activity from a marine bacteria strain No. 22 which was grown on L-arabinose. Properties of the enzyme was compared with that from the terrestrial bacteria. Close similarity was found between both enzymes. This enzyme was specific for L-arabinose, and its Michaelis constant was rather small than that of the terrestrial origin as 15 mM. The enzyme activity was strongly inhibited by pentitols whose inhibition constants were 7.5 mM for L-arabitol, 6 mM for ribitol and 38 mM for xylitol. These inhibitions were competitive.

(昭和47年10月31日 受理)