

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

## D-アラビノース・イソメラーゼ生産菌の分離, および酵素の誘導の特徴

何 森 健, 山 中 啓

### 緒 言

ペントース・イソメラーゼの中で, D-キシロース・イソメラーゼと L-アラビノース・イソメラーゼはすでに種々の微生物より精製結晶化されており研究が進んでいる<sup>(1-4)</sup>。その他のペントース・イソメラーゼとして, D-アラビノース (L-フコース)・イソメラーゼ<sup>(5,6)</sup>と D-リキソース・イソメラーゼ<sup>(7)</sup>の存在が報告されているが十分な研究が行われていない。その最も大きな原因は, 両酵素とも非天然のペントースに作用するイソメラーゼであるため, 酵素を生産する菌株が得難く, その上酵素活性の強い菌を得ることが困難であることがあげられる。

本報では, D-アラビノース・イソメラーゼ生産菌株の分離を試み, 海水中より多量の酵素を生産する1菌株を得たので, 本菌の分類学的性質および, D-アラビノース・イソメラーゼの誘導の特徴について報告する。

### 実 験 方 法

#### 1. 分 離

分離源としては, 香川県の土壌, 瀬戸内海の海水を用いた。分離には D-アラビノース0.5%, 硫酸0.26%,  $K_2HPO_4$  0.56%,  $KH_2PO_4$  0.24%,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.01%,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.005%, 酵母エキス0.01%を含む培地を用いて D-アラビノースを単一炭素源として生育する菌株を検索した。30°C 振盪培養により数代修飾培養を続けたのち, 常法通り平板培養によって純化後, ブイヨン寒天培地に保存した。

#### 2. 培 養

各種のペントース・イソメラーゼの誘導実験は, 分離培地の D-アラビノースのかわりに各ペントースを単一炭素源とし, 500ml 容三角フラスコに培養基 100ml を入れ, 30°C 18時間振盪培養した。

生育実験は, 16.5mm 試験管に培養液 5ml をとり 30°C で振盪培養し, 経時的に生育度を, 日立101光電比色計を用いて直接 600m $\mu$  の吸光度を測定した。

#### 3. 酵素活性の測定

酵素は, 菌体を蒸留水で洗浄後 0.05M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5 ( $10^{-8}$  Mメルカプトエタノールを含む) に懸濁し 20kc で20分間超音波処理を行い抽出, 12000rpm 20分間遠心分離した上清を粗酵素液として用いた。各ペントース・イソメラーゼは, それぞれの最適 pH<sup>(8-10)</sup>(D-アラビノース・イソメラーゼは 0.025M グリシン緩衝液 pH 9.3) で 35°C, 10分間酵素反応の後, 生成したケトペントースをシステイン・カルバゾール法<sup>(11)</sup> によって測定する方法を用いた。L-フコース・イソメラーゼ活性はシステイン・カルバゾール反応の吸光度 (550m $\mu$ ) を用いて表わした。

### 実験結果および考察

#### 1. 菌株の分離

D-アラビノース・イソメラーゼを多量に生産する菌株を, 瀬戸内海の海水中より分離した。平板培養において D-アラビノース単一炭素源で生育したコロニーは, ほとんど同一の形状を示した。D-アラビノース・イソメラーゼ生産量にも大差がないことからみて, 生育したコロニーは一種の菌株によるものと思われた。最も酵素生産量の高い M-7 株を分離株とした。

#### 2. M-7 株の菌学的性質

M-7 株の形態学的, 生物学的性質は Table 1 に示すとおりである。ゼラチン液化陰性, 運動性陽性, デンプンを

資化しないなど *Aerobacter aerogenes* と *Aerobacter cloacae* との中間的性質を示すが、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology seventh edition に従って *Aerobacter aerogenes* M-7 と命名した。

本菌株は、Mortlock 等<sup>(7,12,13)</sup>により各種ペントース・イソメラーゼ生産菌株として研究が進められている *Aerobacter aerogenes* PRL-R3 と比較してペントースの資化性など類似点が多い。しかしペンチトールの資化性において完全に異り、*Aerobacter aerogenes* PRL-R3 は全てのペンチトールを資化することができるが、*Aerobacter aerogenes* M-7 はペンチトールを全く資化することができない。これはペンチトール脱水素酵素を全て欠損していることを示しており、本菌の大きな特徴である。

### 3. *Aerobacter aerogenes* M-7 による各種ペントース・イソメラーゼの生産

D-アラビノース・イソメラーゼ生産菌株として分離された M-7 株は、D-アラビノース・イソメラーゼの他に D-キシロース・イソメラーゼ、L-アラビノース・イソメラーゼおよび D-リキソース・イソメラーゼを生産する。これらのペントース・イソメラーゼは全て誘導酵素で、各ペントースに生育した場合にのみ対応するペントース・イソメラーゼを菌体内に誘導する (Table 2)。これは Wood, Mortlock 等の *Aerobacter aerogenes* PRL-R3 によるペントース・イソメラーゼの誘導実験の結果と一致している<sup>(12)</sup>。

D-アラビノース・イソメラーゼ活性は、D-アラビノースの他に L-フコースに生育した場合にも誘導される (L-フコース・イソメラーゼ)。異なる inducer によって誘導される両酵素の異同は興味ある問題である。

### 4. D-アラビノース・イソメラーゼと L-フコース・イソメラーゼの同一性

#### 1) 生育実験による検討

*Aerobacter aerogenes* が D-アラビノースに生育するためには、D-アラビノース・イソメラーゼを含む D-アラビノースの代謝酵素系が誘導されなければならない。そのため菌体内に D-アラビノース代謝酵素系が誘導されている場合と、誘導されていない場合とでは生育初期の誘導期の長さに差が生ずる。L-フコースに生育する場合も同様である。すでに代謝酵素系が誘導されている場合は誘導期が短く、誘導されていない場合は長くなることを用いて、D-アラビノースおよび L-フコース・イソメラーゼの異同について検討した。

M-7 株を 0.02% D-グルコース、D-アラビノース、および L-フコースをそれぞれ単一炭素源とする培養基で試験管を用いて振盪培養し、炭素源を消費し尽し生育が止った時点で各々の試験管に最終濃度 0.02% D-アラビノースを追加して培養を続けた。生育の経時的変化を測定した結果を Fig. 1 に示す。D-アラビノースまたは L-フコースに生育した菌体はほとんど誘導期がなく、D-アラビノースを添加すると直ちに生育を開始し、D-グルコースに生育した菌体は約 1 時間の誘導期ののちに生育が始まった。この結果から L-フコースに生育した菌体はすでに D-アラビノース代謝酵素系を誘導しているため、ほとんど誘導期がなく直ちに生育するものと思われる。

同様の実験を L-フコースに対する生育について検討した結果を、Fig. 2 に示す。L-フコースに生育した菌体は、L-フコースを添加するとほとんど誘導期がみられず直ちに生育を開始する。D-アラビノースに生育した菌体は少し遅れ、D-グルコースに生育した菌はさらに遅れて生育が始まった。この結果は、D-アラビノース生育菌は L-フコース代謝酵素系を部分的にはあるがすでに誘導していることを示している。

これらの生育実験の結果は、GREEN, COHEN<sup>(8)</sup>が *E. coli* によって得た結果とよく一致しており、M-7 株の D-アラビノースおよび L-フコースによって誘導される D-アラビノース (L-フコース)・イソメラーゼは同一の酵素であることを指示するものである。

#### 2) 酵素活性の比較による検討

D-アラビノースと L-フコースはともに、D-アラビノースおよび L-フコース両方に作用するイソメラーゼを誘導する。それぞれの炭素源で培養した菌体に誘導されるイソメラーゼの、各々の基質に対する酵素活性の比を測定した。Table 3 に示すとおり、D-アラビノースおよび L-フコースによって誘導された酵素の D-アラビノースと L-フコースに対する活性比が一致したことは、両酵素が同一の酵素であることを示していると考えられる<sup>(13)</sup>。

今後さらに酵素を精製し単一の酵素蛋白によって、D-アラビノースおよび L-フコースがともに作用を受けることを確認する必要があるが、1), 2)の結果は最近の OLIVER, MORTLOCK<sup>(14,15)</sup>等が *Aerobacter aerogenes* PRL-R3 の変異株を用いて得た結果と考え合わせ、両酵素が同一の酵素であると考えてよいであろう。

Table 1. Properties of *Aerobacter aerogenes* M-7.

Rods, 0.7 to 1.0 by 1.3 to 2.3 microns, occurring singly. Motile by means of peritrichous flagella.
Gram negative.
Gelating stab: No liquefaction.
Litmas milk: Acid with coagulation.
Indole: Not produced.
Hydrogen sulfide: Produced in peptone.
Acid from D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-mannose, saccharose, maltose, lactose, raffinose, melibiose, D-arabinose, L-arabinose, D-xylose, D-lyxose, D-ribose, L-rhamnose L-fucose, sorbitol, mannitol, glycerol, and L-sorbose. No acid from L-xylose, D-fucose, ribitol, xylitol, D-arabitol, L-arabitol, dulcitol, and starch.
Methyl red test: Negative.
Voges-Proskauer test: Positive.
Nitrites produced from nitrates.
Catalase positive.
Aerobic, facultatively anaerobic.
Source: Isolated from sea water.

Table 2. Pentose isomerase activities of cells grown on various pentoses.

Growth substrate	Isomerase activities*			
	D-Arabinose isomerase	L-Arabinose isomerase	D-Xylose isomerase	D-Lyxose isomerase
D-Arabinose	216	0	0	—
L-Arabinose	0	190	0	—
D-Xylose	0	0	110	5
D-Lyxose	0	0	0	80
L-Fucose	113	0	0	—

\* Units in the cells obtained from 100 ml of medium.

Table 3. Activities for D-arabinose and L-fucose isomerases in the cells grown on D-arabinose or L-fucose.

Growth substrate	D-Arabinose isomerase	L-Fucose isomerase	B/A
	activity (A)	activity (B)	
	(A <sub>540</sub> )*	(A <sub>550</sub> )*	
D-Arabinose	0.225	0.248	1.10
L-Fucose	0.128	0.149	1.14

\* Activity was expressed as the absorbance of cysteine-carbazol reaction at 540 m $\mu$  for D-arabinose isomerase and at 550 m $\mu$  for L-fucose isomerase.

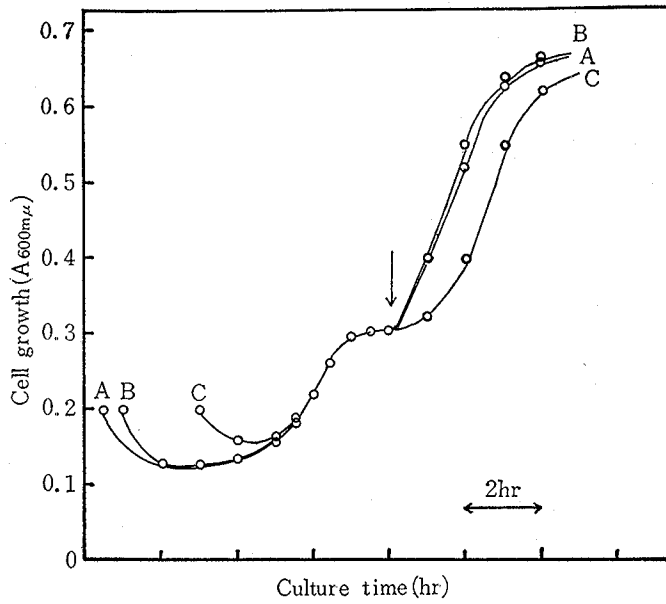


Fig. 1. Growth patterns on D-arabinose by cells grown on D-arabinose, L-fucose or D-glucose. Bacteria were grown on single sugar media of D-arabinose(A), L-fucose(B) or D-glucose(C). After growth was ceased, D-arabinose was added in each test tube at the point showed by arrow.

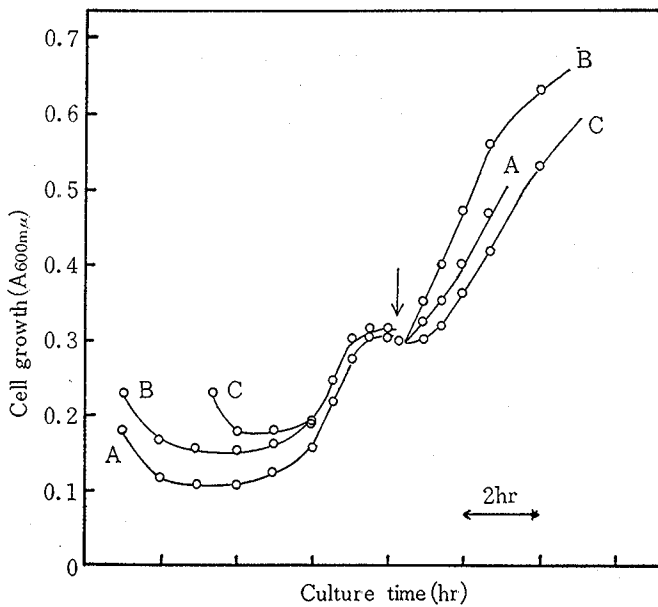


Fig. 2. Growth patterns on L-fucose by cells grown on D-arabinose, L-fucose or D-glucose. Bacteria were grown on single sugar media of D-arabinose(A), L-fucose(B) or D-glucose(C). L-Fucose was added in each test tube at the point showed by arrow.

## 摘 要

瀬戸内海の海水中より、D-アラビノース・イソメラーゼを多量に生産する1菌株を分離し、*Aerobacter aerogenes* M-7と同定した。

本菌は、D-アラビノース・イソメラーゼの他に、D-キシロース・イソメラーゼ、L-アラビノース・イソメラーゼおよびD-リキソース・イソメラーゼを誘導的に生産する。

D-アラビノース・イソメラーゼは、D-アラビノースの他に、L-フコースによっても誘導され、L-フコースに対しても活性を持っている。生育実験および各基質に対する酵素活性の比較によって、D-アラビノースおよびL-フコースによって誘導されるD-アラビノース (L-フコース)・イソメラーゼは、同一の酵素であろうと推定した。

## 引用文献

- |   |   |
|---|---|
| (1) YAMANAKA, K.: <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , <b>151</b> , 670-680 (1968).  | (9) ANDERSON, R. L.: <i>ibid.</i> , 593-596 (1966).   |
| (2) TAKASAKI, Y., KOSUGI, Y., KANBAYASHI, A.: <i>Agr. Biol. Chem.</i> , <b>33</b> , 1527-1534 (1969).                       | (10) YAMANAKA, K., WOOD, W. A.: <i>ibid.</i> , 596-602 (1966).                              |
| (3) DANNO, G.: <i>Agr. Biol. Chem.</i> , <b>34</b> , 1795-1804 (1970).  | (11) DISCHE, Z., BORENFREUND, E.: <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>192</b> , 583-587 (1951).      |
| (4) NAKAMATSU, T., YAMANAKA, K.: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , <b>178</b> , 156-165 (1969).                               | (12) MORILLOCK, R. P., WOOD, W. A.: <i>J. Bacteriol.</i> , <b>88</b> , 838-844 (1964).      |
| (5) COHEN, S. S.: <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>201</b> , 71-83 (1953).  | (13) CAMYRE, K. P., MORILLOCK, R. P.: <i>J. Bacteriol.</i> , <b>90</b> , 115 7-1158 (1965). |
| (6) GREEN, M., COHEN, S. S.: <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>219</b> , 557-568 (1956).   | (14) OLIVER, E. J., MORILLOCK, R. P.: <i>J. Bacteriol.</i> , <b>108</b> , 287-292 (1971).   |
| (7) ANDERSON, R. L., ALLISON, D. P.: <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>240</b> , 2367-2372 (1965).                                 | (15) OLIVER, E. J., MORILLOCK, R. P.: <i>J. Bacteriol.</i> , <b>108</b> , 293-299 (1971).   |
| (8) YAMANAKA, K., WOOD, W. A.: "Methods in Enzymology", Vol. IX, Academic Press Inc., New York, Wood, W. A. 588-593 (1966). |   |

ISOLATION OF D-ARABINOSE ISOMERASE PRODUCING BACTERIA AND CHARACTERISTICS ON THE INDUCTION OF THE ENZYME

Ken IZUMORI and Kei YAMANAKA

## Summary

A bacteria M-7 was isolated from sea water of SETONAIKAI as a potent producer of D-arabinose isomerase and was identified to be a strain belonging to *Aerobacter aerogenes*.

The production of D-arabinose isomerase was inducible and the inducer were D-arabinose and L-fucose. Activity for the isomerization of L-fucose as well as D-arabinose could be observed in extracts of cells grown on both D-arabinose and L-fucose as the sole carbon source.

It was postulated that a single enzyme might be responsible for the isomerization of D-arabinose and L-fucose.

(昭和47年10月31日 受理)