

D-アラビノース(L-フコース)脱水素酵素の精製と性質

山中 啓, 何森 健, 松本 圭介

緒 言

細菌類によるペントースの代謝系は、乳酸菌および *Klebsiella aerogenes* で代表される嫌氣的代謝系と、*Pseudomonas* 属細菌にみられる好氣的代謝系とに分けることができる。前者は、ペントース・イソメラーゼによりケトペントースに異性化され、続いてリン酸化された後 D-キシロース-5-リン酸となるペントース・リン酸経路であり、後者は、Doudoroff 等により *Pseudomonas saccharophila* の L-アラビノースおよび D-アラビノースの代謝系として発見された経路で⁽¹⁻⁴⁾、両アラビノースは NAD または NADP を介してそれぞれのアラボン酸に酸化される。この反応を触媒する酵素が L-アラビノース脱水素酵素 (EC. 1. 1. 1. 46)^(1,2)、および D-アラビノース脱水素酵素 (EC. 1. 1. 1. 116)⁽³⁾ である。*Pseudomonas* 以外の菌においては、L-アラビノース脱水素酵素が *Rhizobium japonicum*⁽⁵⁾ より、D-アラビノース脱水素酵素が *Neurospora crassa*⁽¹⁵⁾ より、および L-キシロース脱水素酵素が酵母⁽⁶⁾ より見出されている。

Hu および Cline は、*Pseud. saccharophila* の保存菌株より分離した *Pseudomonad* が少なくとも 5 種の糖脱水素酵素を生産することを認め、糖脱水素酵素生産の複雑さを指摘した⁽⁷⁾。すなわち、2 種の NAD 要求性および NADP 要求性の D-ガラクトース脱水素酵素、1 乃至 2 種の D-アラビノース脱水素酵素、1 種の NAD 要求性のグルコース脱水素酵素および特異性の低い NAD 要求性のアルドース脱水素酵素である。これらの脱水素酵素はそれぞれ精製され⁽⁸⁾、それらのうち、NADP 要求性の D-ガラクトース脱水素酵素が結晶状に単離された。D-アラビノース脱水素酵素については、上記の *Pseudomonad* からの酵素は NAD あるいは NADP を要求するが^(9,10)、動物起源の D-アラビノース脱水素酵素 (豚肝臓⁽¹¹⁻¹³⁾、羊肝臓⁽¹⁴⁾) は全て NAD のみを要求し、NADP は不活性であった。一方、*Neurospora crassa* の酵素は NAD のみを要求した⁽¹⁵⁾。また、いずれの D-アラビノース脱水素酵素も基質として D-アラビノースの他に L-フコースにも作用し⁽¹¹⁻¹⁴⁾、L-ガラクトースにも作用した。

本報では、我々が D-アラビノース資化性細菌を検索した結果、土壌より分離した 1 分離菌が D-アラビノース脱水素酵素を強く生産することを認めたので、分離菌の D-アラビノース脱水素酵素の生産条件を検討し、酵素を精製し、その諸性質について検討した結果について報告する。

実 験 方 法

1. 資化性菌の分離

各ペントース資化性菌の分離には、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.26%, KH_2PO_4 0.24%, K_2HPO_4 0.56%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, 酵母エキス 0.01% に各ペントース (D-アラビノース, L-アラビノースまたは D-キシロース) 0.5% を含む培地を用いた。資化性菌は常法により寒天平板法を用いて、各地の土壌試料より分離した。分離菌は同一の組成の培地に 30°C で振盪培養を行ない、数代の集積培養を続けた後、寒天平板法を繰返して純化した。最終的に得た分離菌は、上記の組成の培地に 2% 寒天を添加した斜面培地に接種し、4°C で保存した。得られた分離菌のうち、D-アラビノース脱水素酵素を最も強く生産する 1 株 (仮称 K-7 菌) を選び、本実験に使用した。

2. 培 養

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.26%, KH_2PO_4 0.24%, K_2HPO_4 0.56%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, peptone 0.1% および D-アラビノース 0.5% を含む培地を、pH 7.0 に調整して用いた。D-アラビノースおよび $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ は他の塩類と別に加圧滅菌した。培養はすべて 30°C で振盪培養を行なった。

3. 酵素活性の測定

脱水素酵素活性は次の反応組成液を用いて測定した。すなわち、0.05M トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.6) 0.5ml, 0.05M

D-アラビノース 0.1ml, 0.01M NAD 0.02ml および酵素液に脱イオン水を加えて反応液量を 1.0ml とし, 30°C で反応を行なった。この条件下で 1 分間に 1 μ mole の NADH を生成する酵素量を 1 単位とした。比活性は蛋白 1mg 当りの酵素の単位数で表わした。蛋白は Warburg, Christian に従って 280 および 260nm の紫外部吸収値より求めた。

本酵素は D-アラビノースおよび L-フコースに作用するが, 活性の測定は D-アラビノースについて行なった。従って酵素の精製は D-アラビノース脱水素酵素活性で示した。

4. 試 薬

NAD は Sigma Chemical Company, D-アラビノース は分析用には E. Merck 社のを, 培養には和光純薬工業 KK のを用いた。

実 験 結 果

1. D-アラビノース資化性菌の分離と分離菌の性質

1) 資化性菌の分離

各地(石川県, 兵庫県, 大阪府, 奈良県, 鳥取県, 島根県, 広島県, 香川県)の土壤試料30点より, ペントースの資化性菌を分離した。前述の培地組成より MgSO₄·7H₂O を除いた培地を用いた場合, D-アラビノース資化性菌 3 株, L-アラビノース資化性菌 7 株, D-キシロース資化性菌 7 株を得た。次いで MgSO₄·7H₂O を含む前述の培地を用いて再び各地の土壤試料20点より D-アラビノース資化性菌を検索した結果 9 株を得た。以上のペントース資化性菌株 26 株中ペントース脱水素酵素を生産する菌株は, D-アラビノース脱水素酵素を生産する 1 菌株のみで, 他は全てイソメラーゼのみを生産する菌株であった。尚, D-アラビノース脱水素酵素を生産する 1 菌株(仮称 K-7 菌)はイソメラーゼを全く生産しなかった。

2) K-7 菌の形態

K-7 菌は電子顕微鏡の結果, 1.5×0.6 μ の鞭毛を有する桿菌で, 好氣的条件下で生育し, 寒天平板では緑色の光沢を有するコロニーを形成した。また, 各種の糖および糖アルコールに生育した場合にも, 培地中に緑色の色素を生成した。以上の結果, K-7 菌は *Pseudomonas* 属の細菌であろうと思われる。

3) 酵素の生産条件

本菌の培養条件を, 炭素源の濃度, 通気量, 培養時間につき検討した。その結果, D-アラビノース脱水素酵素の生産は, D-アラビノースの濃度が 0.5% の時に最高となり, 500ml 容の三角フラスコに培地を 100ml 添加して培養した時, また 22~24 時間の培養時間で酵素の生産量は最大に達した。

4) 糖の資化性能

直径 18mm の試験管に 0.5% の各種の糖を炭素源とする前記の培地 5ml (pH 7.0) を加え, K-7 菌を 30°C, 24 時間振盪培養し, 生育度を測定して資化性を検討した。ペントースよりも D-アラビトール, リビトール, D-ソルビトール, D-マンニトール等の糖アルコール, および D-グルコース, D-ガラクトース, D-マンノース等のヘキソースによく生育した。ペントースの資化性は, D-アラビノース, L-アラビノース, D-リボース, D-キシロースの順であった。L-キシロース, D-リキソースおよび D-フコースにはほとんど生育しなかった。

5) 各種糖および糖アルコール脱水素酵素の生産

18mm の試験管に 0.5% の各種の糖を炭素源とする培地を 5ml 添加して, 同様に 30°C で 24 時間振盪培養した。この培養液 1ml を 500ml 容の三角フラスコ中の 100ml 培地に添加して 20~22 時間, 30°C で培養した。遠心分離して菌体を集めて洗滌後, 菌体を 10⁻²M MnCl₂ を含む 0.05M トリス HCl-緩衝液 (pH 7.5) 約 10ml に懸濁し, 20kc, 8~10 分間超音波処理をして酵素を抽出した。遠心分離をして不溶性残渣を除いた上澄を粗酵素液とした。得られた粗酵素液中の各種糖および糖アルコール脱水素酵素活性を測定した。測定には Gilford 分光光度計 240 型を使用した。結果を Table 1 に示した。すなわち本菌は D-アラビノースおよび L-フコースを炭素源として生育したときに, D-アラビノース脱水素酵素活性および L-フコース脱水素酵素活性が, また L-アラビノース, D-ガラクトースに生育したときに L-アラビノース脱水素酵素活性および D-ガラクトース脱水素酵素活性が検出された。その他 D-アラビトール脱水素酵素および D-マンニトール脱水素酵素が生産されたが, D-キシロース, D-リボース, D-リキソース, キシリトール, リビトール, D-グルコースと D-マンノース脱水素酵素活性はいずれの糖培地よりも全く検出されなかった。

Table 1. Production of dehydrogenases

Carbon source (0.5%)	Cell yield (dry weight, mg)	Protein (mg)	Dehydrogenase activity (units/100 ml of culture)*														
			D-Arabinose	L-Arabinose	D-Xylose	D-Lyxose	D-Ribose	D-Arabitol	Xylitol	Ribitol	D-Glucose	D-Galactose	D-Mannose	D-Sorbitol	D-Mannitol	L-Fucose	
D-Arabinose	132	40.3	6.06	tr**	0	tr	0	tr	0	0	0	0	0	0	0	tr	4.60
L-Arabinose	99	36.1	tr	1.67	tr	0	0	tr	0	0	0	1.45	0	0	tr	0	
D-Xylose	70	25.9	0	tr	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	tr	0	
D-Ribose	75	23.8	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	tr	
D-Arabitol	184	28.8	tr	tr	0	0	0	0.68	0	0	0	tr	0	0.29	1.22	tr	
Ribitol	174	39.4	tr	tr	0	0	0	0.32	0	0	0	tr	0	0	0.23	0	
D-Glucose	198	102.1	0	tr	0	0	0	0.32	0	0	0	tr	0	0	0.23	0	
D-Galactose	215	69.2	0	3.52	tr	0	0	0.31	0	0	tr	4.41	0	0	0.37	0	
D-Mannose	213	65.8	0	tr	0	0	0	tr	0	tr	0	tr	0	0	tr	0	
D-Sorbitol	224	66.0	0	0	0	0	0	1.64	0	0	0	0	0	0.23	2.67	0	
D-Mannitol	272	81.1	0	tr	0	0	0	1.54	0	0	0	0	0	0.24	1.91	0	
L-Fucose***	113	21.3	5.93	tr	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	0	4.50	

* Expressed as units in the cells obtained from 100 ml of medium, ** trace,
*** cultured in 8 test tubes of 5 ml of medium and expressed as 100 ml of medium.

2. 酵素の精製

Table 1 の結果より、本菌の D-アラビノース 生育菌体には D-アラビノース 脱水素酵素活性および L-フコース脱水素酵素活性が強く、その他の糖および糖アルコール脱水素酵素活性は検出されず、また D-アラビノース・イソメラーゼも全く検出されなかったため、本菌の大量培養を行ない酵素の精製を行なった。D-アラビノース (0.5%) を炭素源とする培地 (5ml) 2本に菌を接種し、30°C で24時間振盪培養した。この培養液全容を同組成の培地 1l を入れた 5l 容三角フラスコ 2本に植継ぎ、30°C, 22時間振盪培養した。培養終了時、培地の pH は6.61, 残糖は27.1%であった。得られた菌体 (4.3g 生菌重量) を 10⁻³M MnCl₂ を含む 0.05M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で洗滌後同緩衝液 100ml に懸濁し、超音波処理 (20kc) を20分間行なった。10,000回転、20分間の遠心分離にて上澄を分離した後、沈澱を同緩衝液 100ml に溶かし、同様に超音波処理を20分間行ない遠心分離にて上澄を得た。前記の上澄液と合わせて粗酵素液を 200ml 得た。

粗酵素液に新たに調製した 1% プロタミン溶液 10ml をゆっくり攪拌しながら添加し、30分後12,000回転、20分間遠心分離して核酸を除去した。上澄に固形硫酸 33.7g (30%飽和) を徐々に添加し、生じた沈澱を遠心分離して除き、

Table 2. Purification of D-arabinose dehydrogenase

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	D-Arabinose dehydrogenase			
			Total units	Specific activity	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	200	1700	174	0.102	100	1
Protamine supernatant	208	1206	172	0.143	98.9	1.4
Ammonium sulfate 30-50% ppt	27.0	945	144	0.152	82.8	1.5
1st DEAE-Cellulose eluate	5.0	107	75.2	0.703	43.2	6.9
Sephadex G-200	2.8	23.7	63.2	2.67	36.3	26.2
2nd DEAE-Cellulose eluate	1.6	3.2	24.8	7.75	14.3	76.0

さらに上澄に固形硫酸 26.7g (50%飽和) 添加して生じた沈澱を遠心分離にて集め、同上の 0.05M トリス-HCl 緩衝液 27ml に溶解し、一夜同緩衝液に対して透析した。この酵素液を同 0.05M トリス-HCl 緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose のカラム (2×18.5cm) に吸着させ、0~0.4M の KCl (240ml) の linear gradient で酵素を溶出した。D-アラビノース脱水素酵素活性区分を集め、50%飽和まで硫酸を添加して生じた沈澱を遠心分離にて集め、少量の同上の 0.05M トリス-HCl 緩衝液に溶解して同緩衝液で一夜透析した (5.0ml)。この酵素溶液を Sephadex G-200 のカラム (2×37.5cm) で同緩衝液を用いてゲル濾過を行なった。溶出した活性区分を集めて、同様に50%飽和まで硫酸を添加して生じた沈澱を集め、同緩衝液に対して 4°C で一夜透析した (2.8ml)。この酵素液を再度 DEAE-cellulose のカラム (2×18cm) に添加して、0~0.4M の KCl (500ml) の linear gradient で溶出した。活性区分に同様に50%飽和まで硫酸を添加し、生じた沈澱を遠心分離にて集め、同緩衝液に対して透析した (1.6ml)。以上の結果、酵素は76倍まで精製され、その収率は14%であった (Table 2)。

3. 精製酵素の性質

1) 至適 pH および pH 安定性

酵素反応の至適 pH は、pH 9.6 付近であった (Fig. 1)。酵素の pH 安定性は、酵素液 0.02ml を各種 pH の緩衝液 0.18ml に添加し、30°C、10分間保持した後、その 0.01ml を反応液 0.99ml に添加して残存活性を測定した。Fig. 2 に示したように安定 pH 範囲は 7~9 付近であり、pH 7 以下および pH 9 以上では酵素は不安定で、すみやかに失活した。

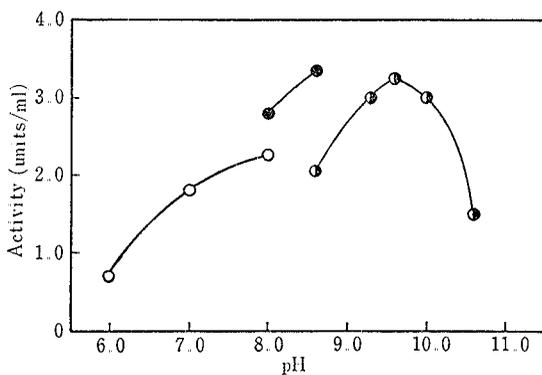


Fig. 1. Effect of pH on the enzyme activity.

Tris-malate buffer (○), Tris-HCl buffer (●) and glycine buffer (◐) were used.

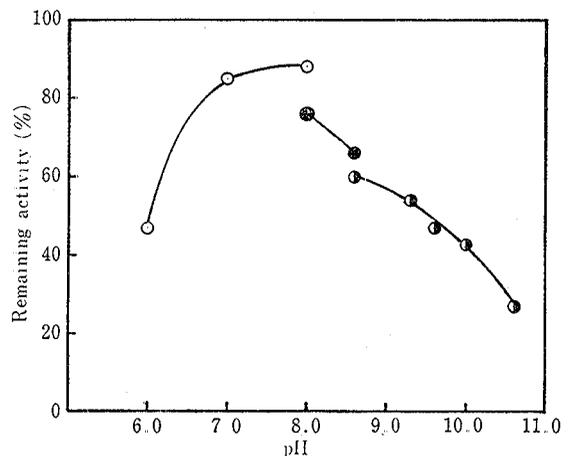


Fig. 2. Effect of pH on the enzyme stability. See the legend in Fig. 1 and text.

2) 至適温度および熱安定性

酵素反応の至適温度は 40°C 付近であった (Fig. 3)。また酵素の熱安定性は、酵素とトリス-HCl 緩衝液 (pH 8.6) 中で各温度で 5 分間保って熱処理を行ない、残存活性を測定した。また NAD (10^{-3} M) を添加した酵素溶液を 40, 45, 50°C で同様に 5 分間熱処理して残存活性を測定した。Fig. 4 に示したように本酵素は比較的熱に対して不安定であり、35°C、5 分間での活性の残存度は 33%であった。しかし NAD は保護作用を示し、 10^{-3} M NAD の存在で酵素の安定度は増し、5 分間の処理では 40°C まで安定となった。

3) 等電点

アンフォライン焦点電気泳動法によって本酵素の等電点を求めた。600V, 1mA で 71 時間通電した後、40ml/hr の速度で分画し、各分画の pH および活性を測定したところ等電点は 6.04 であった (Fig. 5)。

4) 基質特異性

本酵素の基質特異性は比較的高く、Table 3 に示したように、D-アラビノースおよび L-アラビノースに対して特異的に作用し、その他の糖に対しては NAD を補酵素としてほとんど作用しなかった。

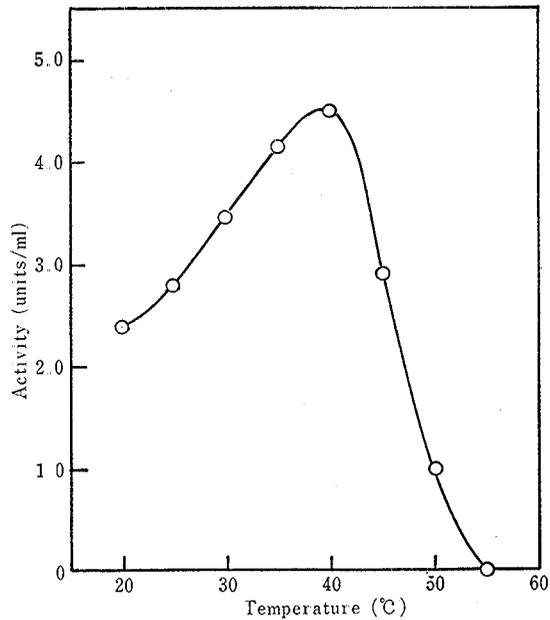


Fig. 3. Effect of temperature on the enzyme activity.
D-Arabinose dehydrogenase activity was assayed under the standard assay condition at various temperatures as indicated.

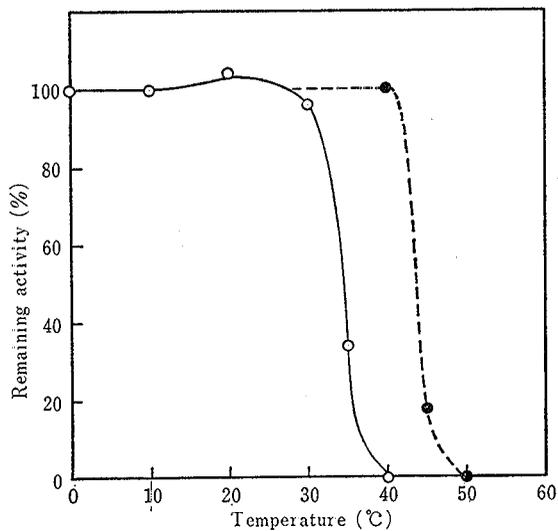


Fig. 4. Effect of temperature on the enzyme stability.
The enzyme solution (0.58 unit) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.6) was incubated at various temperature for 5 min. The remaining activity was assayed at 30°C. Enzyme was incubated without NAD (○) or with 1 mM NAD (●).

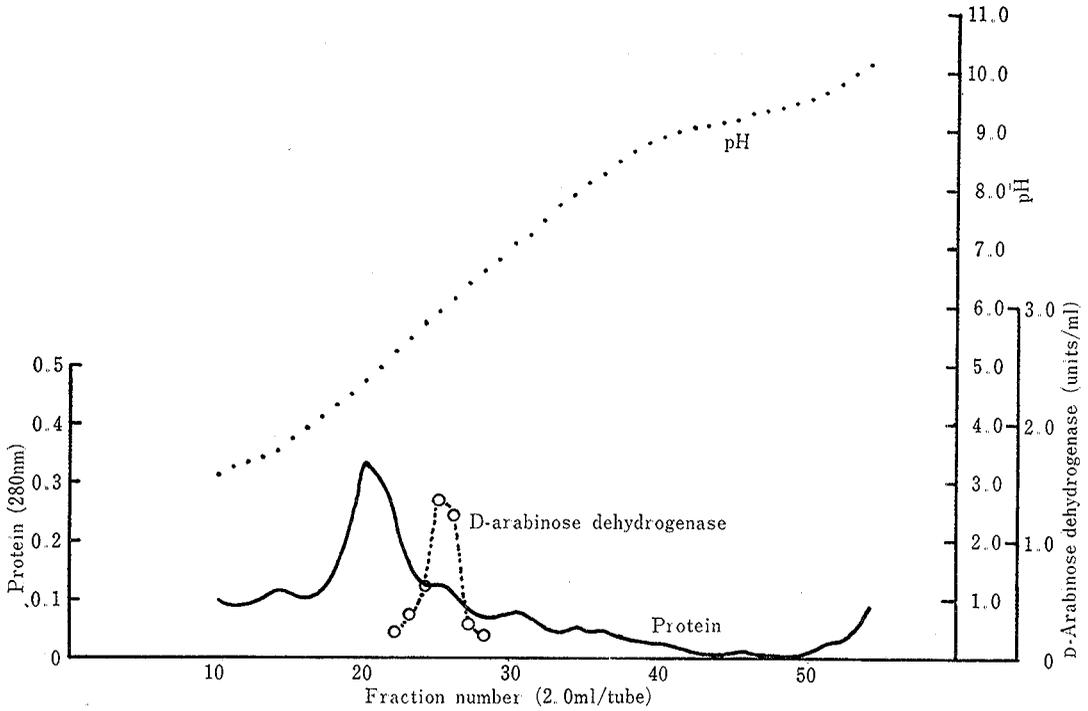


Fig. 5. Ampholine electrofocusing of D-arabinose dehydrogenase.

しかし、補酵素に対する特異性は低く、NAD および NADP に対し、共に活性を示した (Table 4)。

基質と補酵素に対するミハエリス定数を Lineweaver-Burk の方法に従って求めた。D-アラビノースと L-フコースに対する Km 値は補酵素として $2 \times 10^{-4} \text{M}$ NAD を用いて測定した。結果は Fig. 6 および 7 に示したように D-アラビノースに対する Km 値は $5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 、L-フコースに対しては $1.8 \times 10^{-4} \text{M}$ であり、L-フコースの Vmax 値は D-アラビノースのその86.6%であった。NAD に対する Km 値は $8.7 \times 10^{-5} \text{M}$ 、NADP に対しては $4.8 \times 10^{-5} \text{M}$ でやや NADP が小さかったが、NADP を用いた場合の Vmax 値は D-アラビノースおよび L-フコースを基質とした時、それぞれの NAD を用いた場合の Vmax 値の68.5%、64.7%であった。

Table 3. Substrate specificity (1)

Substrate (5 mM)	Relative activity (%)
D-Arabinose	100
L-Fucose	78.2
L-Arabinose	2.6
D-Xylose	0
D-Lyxose	1.0
D-Ribose	0
D-Arabitol	0
Xylitol	0
Ribitol	0
D-Glucose	0
D-Galactose	0
D-Mannose	0
D-Sorbitol	0
D-Mannitol	0

For each assay, 19.6 μg of enzyme protein was used. Activity was assayed with 0.2 μmole NAD in the standard condition.

Table 4. Substrate specificity (2)

Pentose ($5 \times 10^{-3} \text{M}$)	Activity (A_{340}/min)	
	with NAD	with NADP
D-Arabinose	0.124	0.108
L-Fucose	0.081	0.073
L-Xylose*	0.00	0.00

For each assay, 0.006 unit of enzyme was used.

* L-Xylose (10^{-2}M) and 0.025 unit of enzyme was used.

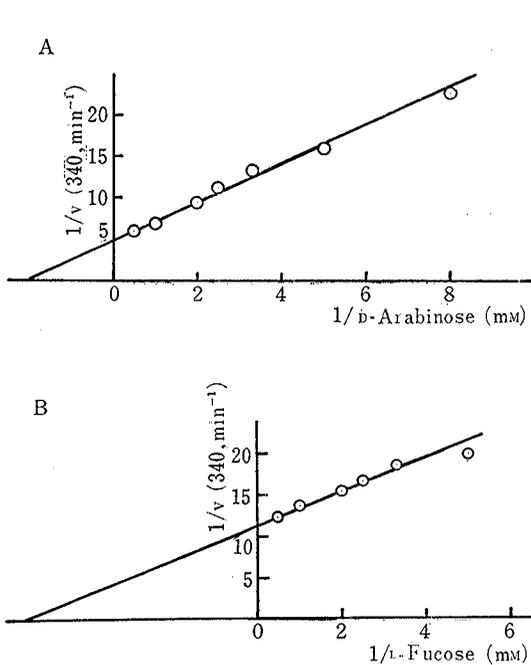


Fig. 6. Effect of concentration of sugars.
A: D-arabinose; B: L-fucose. Amounts of enzyme used were 49 μ g for D-arabinose and 98 μ g for L-fucose.

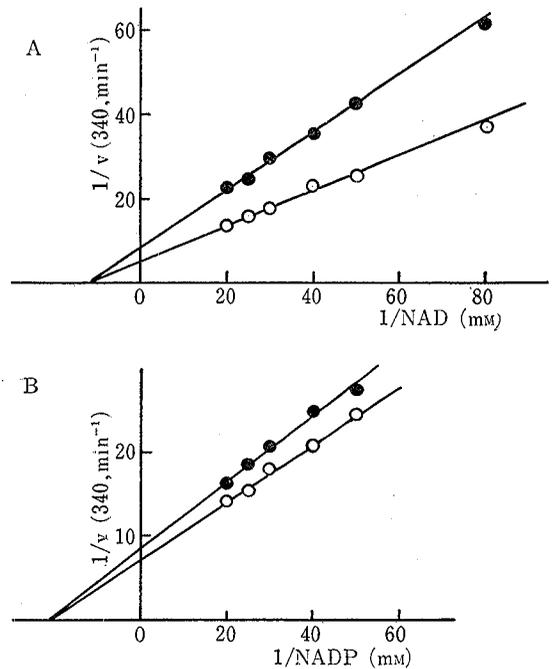


Fig. 7. Effect of concentration of NAD and NADP.
A: NAD; B: NADP. For both cases, 5 mM of D-arabinose (○) or 5 mM of L-fucose (●) were added with 41 μ g of enzyme.

5) D-アラビノース脱水素酵素活性とL-フコース脱水素酵素活性の同一性

前述のごとく、本菌のD-アラビノース脱水素酵素活性は、D-アラビノース生育菌体の他L-フコース生育菌体中にも見出され、両者共L-フコース脱水素酵素活性を有する。Table 1の各種脱水素酵素生産能を調べた結果、D-アラビノースおよびL-フコース脱水素酵素活性の比は一定で、D-アラビノース生育菌体では1:0.76、L-フコース生育菌は1:0.76であり完全に一致した。またTable 5のD-アラビノース脱水素酵素の精製過程において、D-アラビノースとL-フコースに対する活性比はほとんど一定であった。

Table 5. Ratios of two dehydrogenase activities during purification

Purification step	Dehydrogenase activity (units)		Ratio (A: B)
	D-Arabinose (A)	L-Fucose (B)	
Crude extract	78.8	66.2	1.19
Protamine supernatant	67.2	56.4	1.19
Ammonium sulfate 30-50% ppt	45.0	37.8	1.19
1st DEAE-Cellulose eluate	34.2	29.4	1.16

更にNADおよびNADPに対するKm値は、Fig. 7に示したごとくD-アラビノース、L-フコースのいずれを基質として求めても全く同じであった。また、基質として(A) 5×10^{-5} M D-アラビノース、(B) 5×10^{-5} M L-フコース、(C) 5×10^{-5} M D-アラビノース + 5×10^{-5} M L-フコースを用いてNADの還元速度を測定するとFig. 8に示したように反応に加算性が認められず、かえって阻害が認められた。

以上の結果より、D-アラビノース脱水素酵素とL-フコース脱水素酵素は同一酵素であると考えられる。

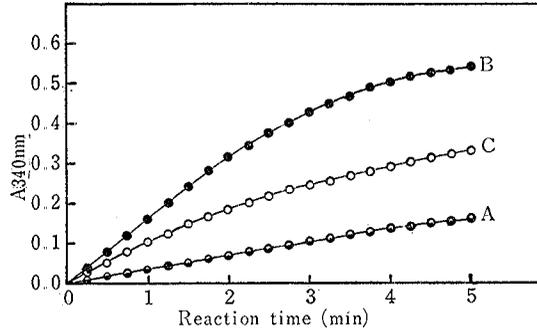


Fig. 8. Effect of D-arabinose and L-fucose on the enzyme activity. Reduction of NAD at 340 nm was followed with 0.05 mM D-arabinose (A), 0.05 mM L-fucose (B) and 0.05 mM D-arabinose + 0.05 mM L-fucose (C). Absorbance was read at each 15 seconds interval for 5 min.

6) Anomeric specificity

本酵素は、基質分子の C-1 における酸化を触媒するため、C-1 の立体構造の差が重要であるか否かについて検討した。すなわち、本酵素の D-アラビノースの anomer に対する特異性について検討した。基質 D-アラビノースを水に溶解して長時間放置して平衡化したもの (α , β -D-アラビノース) を酵素反応に用いた場合と、反応液に β -D-アラビノースの粉末を添加し、すばやく溶解して直ちに測定した場合とについて反応速度を比較した。結果は Fig. 9 に示したように、 α , β -D-アラビノースを基質として反応させた方が、よく反応した。

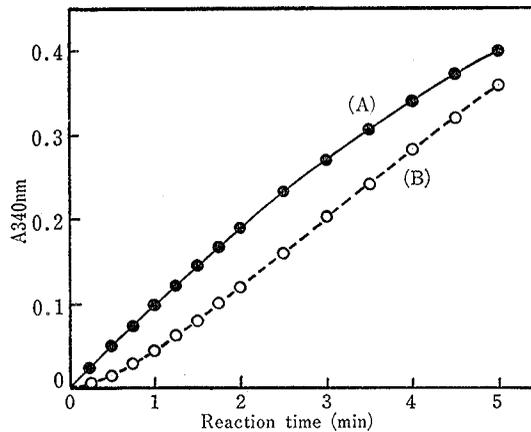


Fig. 9. Effect of anomer of D-arabinose on the enzyme activity. With α , β -D-arabinose (A), and β -D-arabinose (B).

考 察

全国各地の土壌より分離した各ペントース (D-アラビノース, L-アラビノース, D-キシロース) 資化性細菌 26 株のうち、ペントース脱水素酵素活性が検出されたのは、D-アラビノース脱水素酵素を生産する K-7 菌 1 菌株のみであり、他は全てペントース・イソメラーゼ生産菌株であった。以上の結果より、一般に細菌のペントースの代謝は、脱水素酵素によりペントン酸に酸化される経路よりも、イソメラーゼによりケトペントースに異性化される経路により代謝されるものと考えられる。D-アラビノース資化性菌として分離された K-7 菌は、D-アラビノース・イソメラーゼを全く生産せず脱水素酵素を生産するので、D-アラビノースは D-アラボン酸を経る代謝系により代謝される

ものと考えられる。又、本菌の L-アラビノース 生育菌にもその脱水素酵素が生産されるので、L-アラビノースも同様の代謝系により分解されると考えられる。

本報の K-7 菌は、その形態的特徴および糖の資化性より考えて *Pseudomonas* に属する細菌と考えられる。D-アラビノース脱水素酵素は、主として *Pseudomonas*⁽⁷⁾, *Neurospora crassa*⁽¹⁵⁾ 及び動物の肝臓⁽¹¹⁻¹⁴⁾ より見出されているが、本報の K-7 菌の D-アラビノース (L-フコース) 脱水素酵素は、Cline らの *Pseudomonas* 属の D-アラビノース脱水素酵素⁽⁷⁻¹⁰⁾ とその諸性質が類似している。既報の各種起源の D-アラビノース脱水素酵素の基質および補酵素要求性とそれらに対する Km 値を比較のため Table 6 にまとめた。これらの酵素は、すべて D-アラビノースと L-

Table 6. The Michaelis constants of D-arabinose dehydrogenase from various origins

Substrate	Km (mM)					
	K-7 in this paper	<i>Pseudomonas</i> ⁽⁹⁾	<i>Neurospora crassa</i> ⁽¹⁵⁾	Pig liver ⁽¹⁷⁾	Pig liver ⁽¹⁸⁾	Sheep liver ⁽¹⁹⁾
D-Arabinose	0.50	0.82	0.67	190	2.1	7.2
L-Fucose	0.18	—	—	5.3	0.32	1.5
L-Galactose	—	—	—	—	8.0	—
NAD	0.087	22.0	0.29	0.024	0.22	0.19
NADP	0.048	2.3	inactive	—	—	—

フコースに作用し、同一酵素により触媒されると考えられる。本菌の D-アラビノース脱水素酵素も次の理由で L-フコース脱水素酵素と同一酵素であると考えられる。すなわち、D-アラビノースおよび L-フコース 生育菌体からの、D-アラビノース脱水素酵素と L-フコース脱水素酵素の活性化は一定であり (Table 1)、また、D-アラビノース脱水素酵素の精製過程において、D-アラビノースと L-フコースに対する活性比がほとんど一定であった (Table 5)。更に NAD および NADP に対する Km 値は、Fig. 7 に示したように D-アラビノース、L-フコースのいずれを基質として求めても全く同じであったことによる。それぞれの基質に対する Km 値は、細菌起源の酵素が動物の肝臓からの酵素に比して非常に小さい。しかも、いずれの酵素も L-フコースに対してより強い親和力を示しているが、両基質に対する活性比は、*Pseudomonas*⁽⁹⁾ では、D-アラビノース : L-フコースが 100 : 62、本報の K-7 菌の酵素では 100 : 66~78.2 で、いずれも D-アラビノースに対する活性の方が大であるため、D-アラビノース (L-フコース) 脱水素酵素と呼ぶのが適当であろう。

本酵素の基質特異性はやや広く、*Pseudomonas*⁽⁹⁾ の酵素では L-ガラクトースにも作用 (D-アラビノースの 27%) するが、L-ガラクトースを入手できなかったため、我々の酵素については検討していない。酵母で発見された L-キシロース脱水素酵素⁽⁶⁾ は、NADP を補酵素として、L-キシロースの他、D-アラビノース、L-フコースにも作用すると報告されている。すなわち、NADP を補酵素として、D-キシロース (37)、D-アラビノース (11)、D-リキソース (4) に作用し、D-エリスロース、D-スレオースには作用しない (カッコ内は活性比を示す)。しかし、同じ標品が NAD を補酵素とする時、D-スレオース (9) D-エリスロース (7) に対してのみ活性を示し、L-キシロース、D-アラビノース、D-リキソースに対しては全く活性を示さない。NAD, NADP いずれを補酵素とした場合も、L-アラビノース、D-リボース、D-キシロース、D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-クラクトースには活性を示さなかった。また *Pseudomonas* 属細菌の D-スレオ・アルドース脱水素酵素は、L-グルコースのほか、L-キシロース、D-アラビノースおよび L-フコースを NAD 共存下で酸化することが報告された⁽¹⁶⁾。これらの基質に対する Km 値は、それぞれ 150, 4.5, 2.8, 2.1 mM であった。従って、基質特異性は補酵素要求性と相関してかなり複雑である。本菌の D-アラビノース (L-フコース) 脱水素酵素は、NAD, NADP のいずれも要求するので、基質特異性について更に検討した (Table 4)。その結果、NADP を補酵素としても D-アラビノース、L-フコースのみに作用し、L-キシロースには全く作用しなかったため、L-キシロース脱水素酵素、D-スレオ・アルドース脱水素酵素とは異なる酵素であると考えられる。

また、anomeric specificity については、*Pseudomonas* の酵素⁽⁹⁾ は、D-アラビノースについては $\alpha, \beta > \beta$ で我々の結果と合致している。このことより、基質 D-アラビノースの分子は α 型であり、C-1, C-2, C-3 の OH 基はすべ

てエカトリアル, C-4 の OH 基のみアクシャルな構造である。L-フコースにもよく作用する点より, C-5, C-6 の配位については要求性はないと考えられる。

本酵素の応用として, 本菌の生産する D-アラビノース (L-フコース) 脱水素酵素の基質特異性が高く, かつそれらの K_m 値が低いことから, D-アラビノースおよび L-フコース の微量定量法への応用について検討し, 日本農芸化学会関西支部第292回講演会 (昭和50年5月, 大阪) および, 日本生化学会昭和50年度総会 (昭和50年10月, 福岡), コロキウム「酵素を用いる生体成分の定量」において発表した。現在ペントースの特異的微量定量法は全くなく, 特に L-フコース は生体成分として比較的広く分布しているので, 酵素による ペントースの微量定量法として十分実用に適しているものと考えている⁽¹⁷⁾。

要 約

土壌よりペントース資化性菌を分離し, 分離菌についてペントース脱水素酵素生産の有無を検討した結果, D-アラビノース脱水素酵素を強く生産する1菌株を得た。本菌が生産する D-アラビノース脱水素酵素を76倍まで精製して性質を調べた。至適 pH は9.6, 安定 pH は7~9, 反応の至適温度は40°C, 熱安定性は30°C, 5分間の処理で安定であるが, NAD 存在下では40°Cまで安定であった。基質として D-アラビノースと L-フコース に特異的に作用し, NAD および NADP のいずれかを補酵素として要求した。ミハエリス定数は, D-アラビノース, L-フコース, NAD, NADP に対して, それぞれ 5.0, 1.8, 0.87, $0.48 \times 10^{-4} M$ であった。本菌の D-アラビノース脱水素酵素と L-フコース脱水素酵素は同一酵素であるが, D-アラビノースに対する活性の方が高いので, D-アラビノース (L-フコース) 脱水素酵素であることを確認した。

引用文献

- | | |
|---|---|
| (1) WEINBERG, R., DOUDOROFF, M.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 217 , 604 (1955). | (10) CLINE, A. L., HU, A. S. L.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 240 , 4498 (1965). |
| (2) WEINBERG, R.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 234 , 727 (1959). | (11) URETA, T., RADOJKOVIC, J.: <i>FEBS Letters</i> , 9 , 57 (1970). |
| (3) PALLERONI, N. J., DOUDOROFF, M.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 223 , 499 (1956). | (12) SCHACHTER, H., SARNEY, J., MCGUIRE, E. J., ROSEMAN, S.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 244 , 4785 (1969). |
| (4) PALLERONI, N. J., DOUDOROFF, M.: <i>J. Bacteriol.</i> , 74 , 180 (1957). | (13) MAIJUB, A. G., PEGHI, M. A., MILLER, G. R., CARPER, W. R.: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 315 , 37 (1973). |
| (5) PODROSA, F. O., ZANGAN, G. T.: <i>J. Bacteriol.</i> , 119 , 336 (1974). | (14) MOBLEY, P. W., MEIZGER, R. P., WICK, A. N.: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 139 , 83 (1970). |
| (6) UEHARA, K., TAKEDA, M.: <i>J. Biochem.</i> , 52 , 461 (1962). | (15) PINCHEIRA, G., LEON, G., URETA, T.: <i>FEBS Letters</i> , 30 , 111 (1973). |
| (7) HU, A. S. L., CLINE, A. L.: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 93 , 237 (1964). | (16) 笹島賢一, SINSKEY, A. J.: 日本農芸化学会昭和49年度大会発表。 |
| (8) CLINE, A. L., HU, A. S. L.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 240 , 4488 (1965). | (17) YAMANAKA, K.: <i>Agr. Biol. Chem.</i> , 39 , 2227 (1975). |
| (9) CLINE, A. L., HU, A. S. L.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 240 , 4493 (1965). | |

PURIFICATION AND PROPERTIES OF D-ARABINOSE (L-FUCOSE)
DEHYDROGENASE FROM A BACTERIUM

Kei YAMANAKA, Ken IZUMORI and Keisuke MATSUMOTO

Summary

A bacterium which was capable of growth on D-arabinose was isolated from soil. This bacterium produced D-arabinose (L-fucose) dehydrogenase (D-arabinose (L-fucose): NAD⁺ 1-oxidoreductase (EC 1.1.1.116)) from the D-arabinose or L-fucose media. However, D-arabinose (L-fucose) isomerase activities were not detected from the same media. The dehydrogenase was extracted from the D-arabinose-grown cells and purified by protamine sulfate treatment, ammonium sulfate fractionation (30–50% saturation), DEAE-cellulose chromatography and gel filtration on Sephadex G-200. The final preparation was purified to 76-fold in its specific activity. pH optimum for the dehydrogenation of D-arabinose was found at pH 9.6. The enzyme was stable between pH 7–9 at 30°C. The enzyme was active either on D-arabinose or L-fucose, but other sugars and sugar alcohols tested were inert as the substrate. The enzyme required either NAD or NADP for the dehydrogenation of two pentoses. Michaelis constants were calculated as 0.5 mM for D-arabinose, 0.18 mM for L-fucose, 87 μM for NAD and 48 μM for NADP.

With several evidences, it was confirmed that a single enzyme was responsible to the dehydrogenation reaction of D-arabinose and L-fucose. This enzyme was different from NADP-dependent L-xylose dehydrogenase found in yeast and from NAD-dependent D-threosaldose dehydrogenase of *Pseudomonas* sp.

(1975年10月31日 受理)