

Rhodosporidium sp. J-5B 株の生産するアミラーゼについて*

赤木盛郎 ・河村龍二郎**
山田哲也*** ・岡野節子

On the Amylase produced by *Rhodosporidium* sp. J-5B Strain

Morio AKAKI, Ryuziro KAWAMURA, **
Tetsuya YAMADA *** and Setsuko OKANO

諸 言

アミラーゼは澱粉加水分解という生理学的にも工業的にも重要な役割りを荷っており、古くより多くの研究業績が積み重ねられてきている。しかしながらこれらの研究の中で微生物起源のアミラーゼについては、細菌、放線菌、糸状菌に関するものがほとんどであり、酵母起源のアミラーゼとりわけ菌体外アミラーゼ生産菌としては *Endomycopsis fibuligera*¹⁻⁹⁾、*Saccharomyces diastaticus*¹⁰⁻¹²⁾ が報告されているにすぎず、その学術的、応用的研究は少ない。

赤木ら¹³⁻²⁰⁾ は、自然界から分離同定した赤色酵母 *Rhodosporidium* sp. J-5B 株について一連の研究を進めているが、本報では主に赤色酵母の生産するアミラーゼの諸性質について検討した結果を報告する。

実験の部

1. 実験方法

1・1 粗酵素標品の調製

小麦ふすま 5%，米ぬか 0.5% の培地 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注し、常法通り殺菌後、Table 1 に示した培地で前培養した供試菌 (1×10^7 cells/ml) 1 ml を接種し、28℃、5日間、200rpm の振とう培養を行い、菌を遠心分離 (4000rpm, 15分間) により回収後上澄液に微量の

* 澱粉資化性酵母に関する研究

** 持田製薬株式会社

*** 三重大学

メルカプトエタノールを添加後80%飽和の硫酸塩析を行った。次いで沈澱物を遠心分離(8000rpm,20分間)により集め,0.02Mの酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解した後,一昼夜流水中で透析し,凍結乾燥を行い粗酵素標品とした。

Table 1. Composition of basal Medium.

Soluble starch	2.0 (%)
Polypepton	0.7
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Yeast extract	0.01
pH	5.5

1・2 DEAE—cellulose column chromatography

DEAE—cellulose column(SERVA—Gel)1.8×12cmを0.025M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) で一夜活性化した後,粗酵素液10 ml (30mg/mlとなるように0.01M酢酸緩衝液 pH6.5に溶解した)を供し,0.01M酢酸緩衝液 (6.5) で溶出し,最終濃度1 MとなるようにNaClの濃度勾配をかけた。溶出速度は1 ml/min,12.5 mlずつ分画を行った。次に得られた活性画分を集め,80%飽和の硫酸塩析を行い,遠心分離(8000rpm,20分間)により沈澱物を集め,一昼夜流水中で透析後,凍結乾燥を行い冷所に保存した。

1・3 焦点電気泳動²¹⁾

110 ml 容カラム (2.4φ×25 cm, KATO 製) を使用し,蔗糖並びに Ampholine (pH 域 4～6 LKB 社製) の濃度勾配は,以下に示した濃溶液および淡溶液を用い,最終 Ampholine 濃度約1%となるように調製した。

濃溶液:希釈 Ampholine の全量 (40%原液2.5 ml を蒸留水で10 ml とする) の $\frac{3}{4}$ に相当する7.5 ml を4.2 ml の蒸留水で希釈し,これに28 g の蔗糖を溶解した。

淡溶液:残りの希釈 Ampholine 溶液 $\frac{1}{4}$ (2.5 ml) を蒸留水60 ml で希釈して調製し,これに酵素試料10mg (凍結乾燥試料) を溶解した。

なお,陽電極は,0.2 ml のリン酸を蒸留水14 ml で希釈し,これに12 g の蔗糖を溶解して調製し,陰極液は0.2 ml のエチレンジアミンに蒸留水10 ml を加え調製した。

泳動条件は,2℃,60時間,500 Vで行い,泳動後フラクションコレクター SF-100G (Toyo)で2 ml ずつ分画し,280 nm の吸収,アミラーゼ活性,pH を測定した。

1・4 ディスク電気泳動

7.5%アクリルアミドゲル,pH9.4のゲルを Daris²²⁾の方法に準じて調製し,ガラスカラムは

内径 5 mm, 長さ 9.5 cm のものを使用した。試料用ゲルは, 濃縮用ゲル組成の水を試料液にかえて調製し, カラム 1 本当たり 100 μ g 程度となるように調製した。

泳動は, 室温カラム 1 本当たり 3 mA, 約 2 時間行った。その際マーカーとしてブロムフェノールブルー水溶液を用い, 染色は染色液 (0.12% コマジブリリアントブルー-G250, 50% メタノール, 9.2% 酢酸) 中室温で一夜行い, 脱色液 (50% メタノール, 7.5% 酢酸) で脱色を行った。なお脱色の際, 70°C の湯浴中で行うとはやく脱色されるが, 長時間の処理はバンドが消失する恐れがあるので注意を要した。加温による脱色処理後は, さらに 7% 酢酸中で脱色および保存を行った。

1・5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10% (W/V) アクリルアミド-0.1% SDS ゲルを林ら²³⁾の方法に従って調製し, ガラスカラムは内径 5 mm, 長さ 9.5 cm のものを使用した。

試料タンパク質は 100 μ g/ml 程度になるように蒸留水に溶解し (試料が溶液の場合は濃縮または希釈した), 保存液 (50% グリセリン, 2% SDS-0.02M リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.2) と等量に混合し, 2-メルカプトエタノールを最終濃度 3% となるように加えたのち室温で一夜放置して調製した。泳動用緩衝液は 0.1% SDS-0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.2 を使用した。泳動条件はカラム 1 本当たり 8 mA を流し, 約 4 時間泳動させた。その際マーカーとしてはブロムフェノールブルー水溶液を用いた。

泳動後, 染色液 (0.12% コマジブリリアントブルー-G250, 50% メタノール, 9.2% 酢酸) 中一夜染色し, 脱色液 (50% メタノール, 7.5% 酢酸) で脱色を行った。脱色後は 7% 酢酸溶液中に保存した。

分子量の推定は, 標準タンパク質として BSA(M.W.67000), Ovalbumin(M.W.45000), Chymotrypsinogen(M.W.25000) を使用し相対移動度を測定して行った。

1・6 超遠心法による分子量の測定

英国 MSE 社 Centriscan75 を使用し, 沈降平衡法により測定した。測定条件は 20°C, 10000rpm, 試料濃度 (0.1M 酢酸緩衝液中) 280nm における OD=0.4 で行った。

1・7 Optical Rotation の測定

日本分光 Model ORD-UV 5 により, 2% Soluble starch 3 ml, 精製酵素 0.5 ml (50 IU/ml), 25°C で反応させ 5 分間ごとに Optical Rotation を 589nm で測定した。

1・8 反応速度の測定

精製酵素について, マルトースを基質として反応させ, Michaelis 定数 (Km 値) について検討した。反応条件は, 酵素液 0.05 ml (10 IU/ml), 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 0.45 ml,

マルトース溶液0.5 ml, 40°C, 30分間反応させ, 生成グルコースをDNS法²⁴⁾によって定量した。

1・9 全糖量の定量

フェノール硫酸法²⁵⁾により, グルコースを標準物質として定量した。

1・10 タンパク質の定量

牛血清アルブミンを標準タンパク質として, Itzhaki, Gill のマイクロビュレット法²⁶⁾により定量した。

2. 実験結果

2・1 粗酵素の精製

DEAE-cellulose column chromatography による溶出パターンを Fig. 1 に示した。3つの活性画分が得られ, 最初に溶出される活性画分を A-fraction, つづいて溶出される活性画分を B-fraction, 0.15M NaCl 付近で溶出される活性画分を C-fraction として以後の実験に供した。また, A, B, C, 各 fraction の占めるアミラーゼ活性の比は 7 : 2 : 1 程度であった。

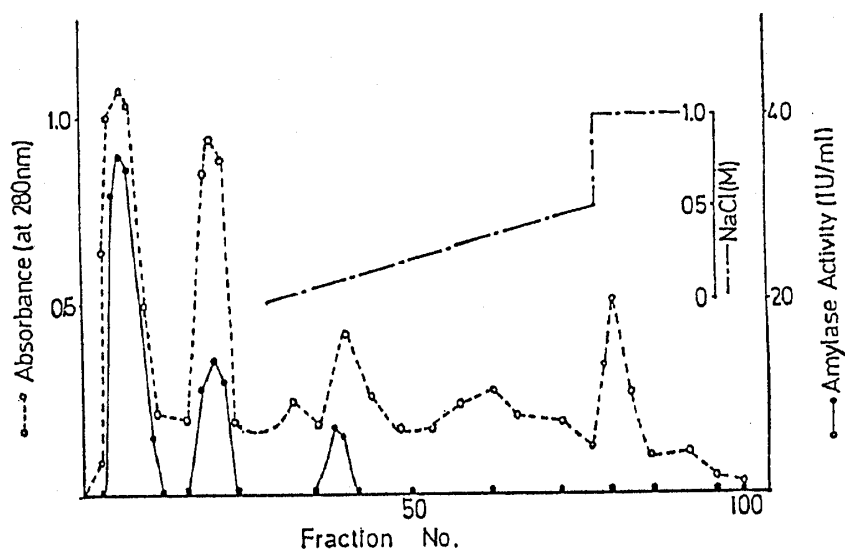


Fig. 1. DEAE Cellulose Column Chromatography.

Condition: Colum SERVA-Gel(equilibrated pH 7.5)1.8×12cm.

Eluent 0.01M acetate buffer(pH 6.5).

Flow rate 1ml/min.

Fraction volume 12.5ml.

次に70%の活性を占める A-fraction を焦点電気泳動に供した結果を Fig. 2 に示した。その結果, 3つの活性画分が得られ, pH4.5付近の活性画分を A-1, pH 5.2付近の活性画分を A-2, pH5.8付近の活性画分を A-3 として以後の実験に供した。これらのうち A-2および A-3 画分は, Photo. 1 に示したように, ディスク電気泳動および SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳

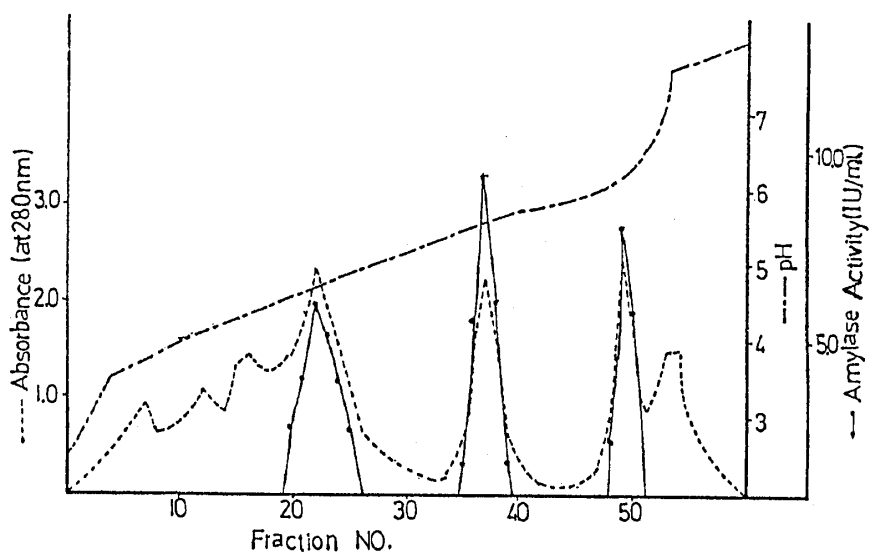


Fig. 2. Isoelectric Focusing Pattern.

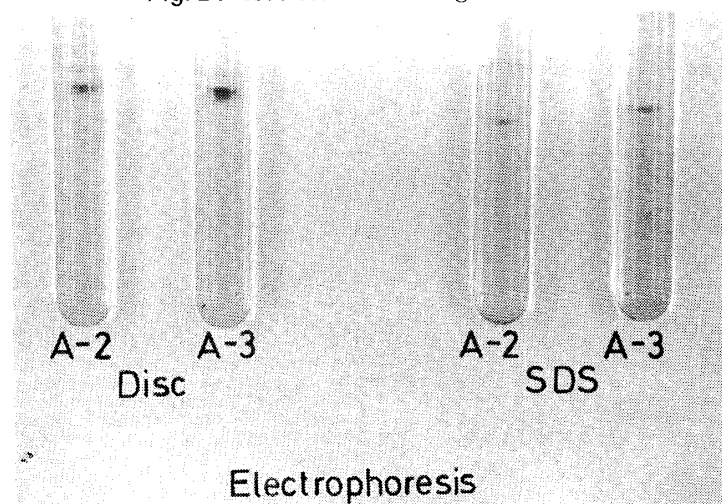


Photo. 1. Disc and SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoretic Patterns.

動において単一バンドを示した。これまでの各精製段階を Table 2 にまとめた。

Table 2. Purification of Glucoamylase.

Step of purification	Amylase activity (IU/ml)	Protein (μ g/ml)	Specific activity (IU/mg)
1. Crude enzyme	6.1	169.4	35.8
2. DEAE-cellulose			
A-fraction	7.3	174.9	41.5
B-fraction	2.9	183.8	15.9
C-fraction	0.4	149.7	2.9
3. Isoelectric focusing			
A-1-fraction	10.6	89.4	118.3
A-2-fraction	11.5	128.9	89.1
A-3-fraction	7.6	90.9	83.6

2・2 部分精製酵素および精製酵素の諸性質

A, B, C 各部分精製酵素の至適 pH および pH 安定性を Fig. 3 及び Fig. 4 に示した。

その結果, 各 fraction ともに至適 pH は 5.0 付近, pH 安定性は pH 4 ~ 7 付近と大きな差はなかった。

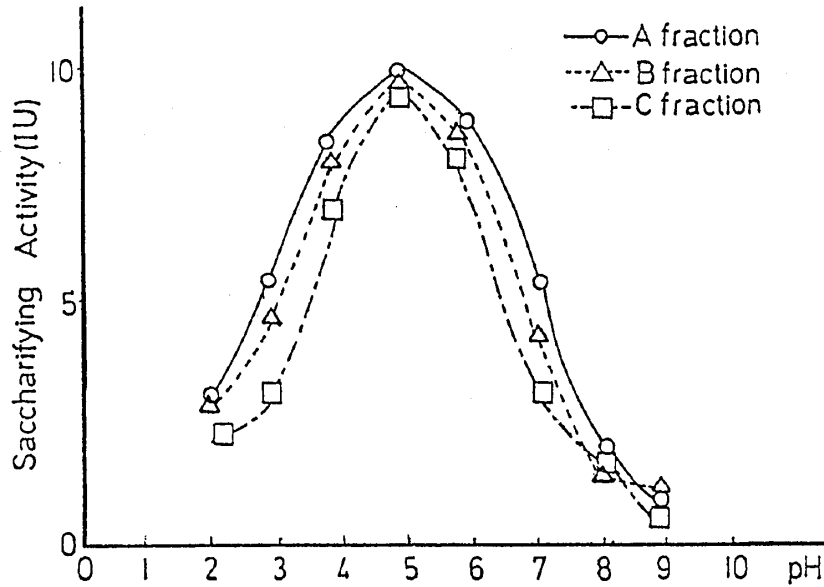


Fig. 3. Effect of pH on the Glucoamylase Activity.

Glucoamylase activity was estimated under the standard assay condition at various pH.

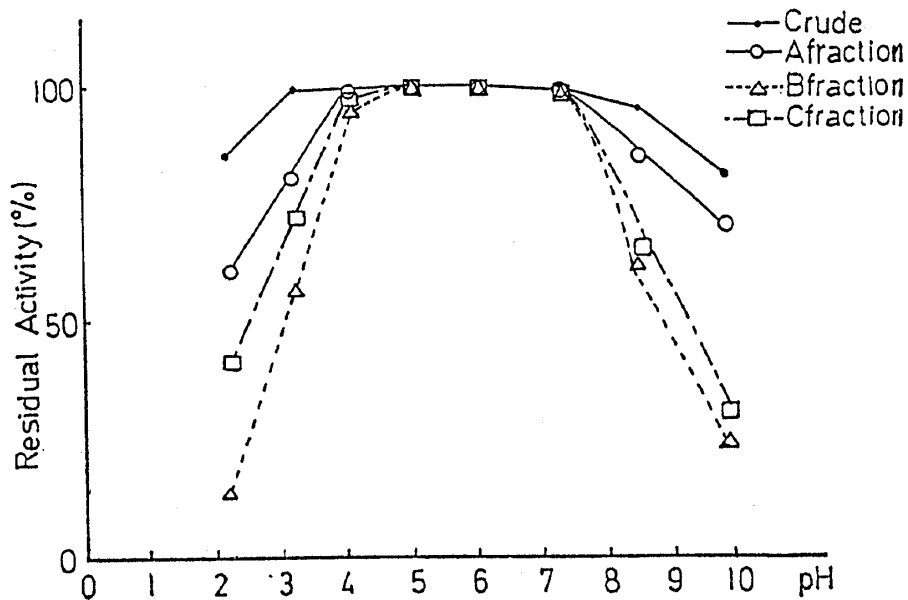


Fig. 4. Relation between pH and Stability.

Residual activity after storage for 24 hr at 30°C.

HCl-KCl buffer for pH 1.0-2.0

McIlvaine buffer for pH 2.4-8.0

Kolthof buffer for pH 8.5-10.0

電気泳動的に単一であることが確認された A-2, A-3 画分について, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量を検討した結果を Fig. 5 に示した。

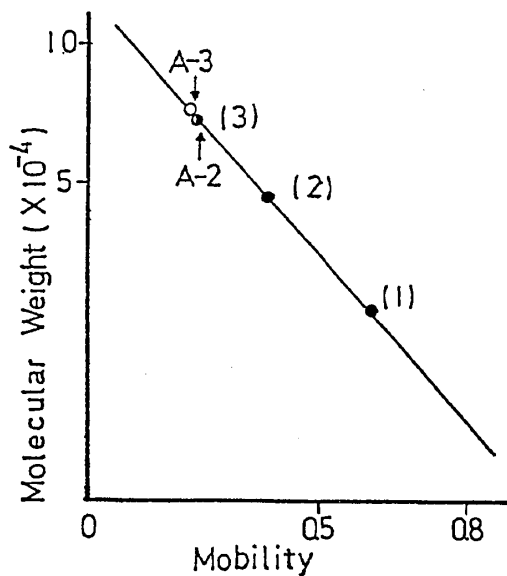


Fig. 5. Determination of the Molecular Weight of A-2, A-3 Fraction.

- (1) : Chymotrypsinogen.(M.W.25000)
- (2) : Ovalbumin.(M.W.45000)
- (3) : Bovine serum albumin.(M.W.67000)

その結果, A-2 は分子量68000, A-3 は分子量72000と推測された。さらに, A-2 は超遠心法により分子量65000と計測された。

また A-2, A-3 両酵素とも至適 pH5.0付近, 至適温度は50℃付近であった。施光度を検討した結果を Fig. 6 に示した。

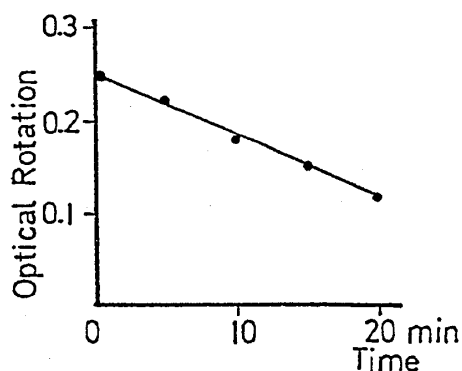


Fig. 6. Change in Optical Rotation.

反応が進むにつれて減少することから, 澱粉から遊離するグルコースが最初β型をなしていることが分かった。

マルトースを基質として反応速度を測定した結果, A-2 の Km は1.25mM, A-3 の Km 値は1.54mMで, *Rhizopus niveus* の1.20mM とほぼ近似した結果を得た。その際の Lineweaver Burk のプロットを Fig. 7 に示した。

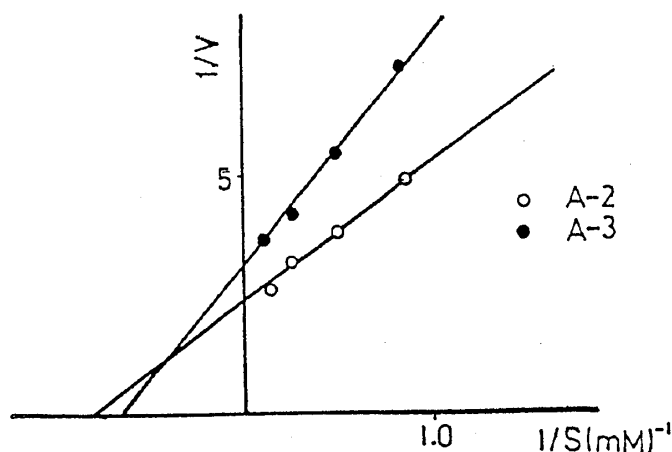


Fig. 7. Effect of Maltose Concentration on Glucoamylase A-2 and A-3.

For the estimation of K_m value, the reaction mixture containing 0.05ml of enzyme solution (10 IU/ml), 0.45ml of 0.1M acetate buffer (pH 5.0), indicated amounts of maltose in a final volume of 1 ml was incubated at 40°C for 30 min.

フェノール硫酸法により、A-2、A-3画分の糖含量を測定した結果、それぞれ33%、31%の糖を含む糖タンパク質であることが分かった。

考 察

赤木ら²⁰⁾は、*Rhodospiridium* sp. J-5B株の生産するアミラーゼはその大部分がグルコアミラーゼであることを報告した。酵母起源のグルコアミラーゼとしては、*Endomycopsis fibuligera* *Saccharomyces diastaticus* が知られているが、*Endomycopsis fibuligera* が単一のグルコアミラーゼのみを生産し、*Saccharomyces diastaticus* が3種のアイソザイムを生産し、*Saccharomyces diastaticus* には STA 1, STA 2, STA 3 の3種の異なる遺伝子の存在が確認されている²⁷⁾。*Rhodospiridium* sp. J-5B株が少なくとも3種以上のアイソザイムを生産することから、本菌のアミラーゼ生産には数種のアミラーゼ遺伝子が関与していることが考えられた。Table 3にグルコアミラーゼの性質の比較を示した。至適温度、至適 pH についてはほとんど差はみられなかったが、分子量では、*Endomycopsis fibuligera* に比べ10000~15000大きく、*Saccharomyces diastaticus* のそれとほぼ一致した結果を得た。坂井ら¹¹⁾は *Saccharomyces diastaticus* のグルコアミラーゼが澱粉の α -1,6結合に作用しにくく、Soluble starch に対しても100%分解することができなかつたと報告しているが、*Rhodospiridium* sp. J-5B株の場合、小麦やとうもろこしの生澱粉に対しても高い分解率を与えることから、分子レベルでの構造や澱粉吸着および作用機構には大きな相違があると考えられた。

Table 3. Comparison of Enzymatic Properties of Glucoamylase.

	<i>E. fibuligera</i>			<i>S. diastaticus</i>	<i>Rhodosp. sp.</i>
	R1	IFO 1665	IFO 0111	IFO 1046	J-5B
Molecular weight	(57000	58000	55000	(64000, 72000, 80000)	(68000, 72000)
Optimum pH	5-6	5-6	5	5.0	5.0
Optimum temp.	50-60°C	50-60°C	ND	55°C	55°C

要 約

Rhodospiridium sp. J-5B 株の生産する酵素の精製を行った結果、少なくとも3種のアイソザイムの存在が認められ、そのうち2種は分子量約68000, 72000と推定され、糖含量33%, 31%の糖タンパク質であった。

文 献

- 1) Y. HATTORI: *Agric. Biol. Chem.*, 25, 737 (1961)
- 2) Y. HATTORI and I. TAKEUCHI: *Agric. Biol. Chem.*, 25, 895 (1961)
- 3) Y. HATTORI and I. TAKEUCHI: *Agric. Biol. Chem.*, 26, 316 (1962)
- 4) T. FUKUI and S. NIKUNI: *Agric. Biol. Chem.*, 33, 884 (1969)
- 5) L. J. WICKERHAM: *J. Bact.*, 48, 413 (1944)
- 6) H. EBERTOVA: *Folia. Microbiol.*, 11, 14 (1966a)
- 7) H. EBERTOVA: *Folia. Microbiol.*, 11, 422 (1966b)
- 8) J. SUKHUMAVASI, K. KATO and T. HARADA: *J. Ferment. Technol.*, 53, 559 (1975)
- 9) K. KATO, K. KUSWANO, I. BANNO and T. HARADA: *J. Ferment. Technol.*, 54, 831 (1976)
- 10) HOPKINS, R. H. and KULKA, D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 69, 45 (1957)
- 11) 斎藤清, 坂井拓夫: 昭和57年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1982, p566
- 12) 斎藤清, 坂井拓夫: 昭和58年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1983, p351
- 13) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也: 昭和58年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1983, p404
- 14) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 神本郁子, 山田哲也: 昭和58年度第87回日本農芸化学会中部支部大会講演要旨集, 1983, p8
- 15) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 神本郁子, 山田哲也: 昭和59年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1984, p180
- 16) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也: 農化, 58, 153 (1984)
- 17) 赤木盛郎, 野田武宏, 山田哲也: 昭和60年度第314・93回日本農芸化学会関西・中部支部合同大会講演要旨集, 1985, p37
- 18) 赤木盛郎, 野田武宏, 久松真, 山田哲也: 昭和61年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1986, p462, p659
- 19) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 中尾孝子: 本誌, 10, 1 (1990)

- 20) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 中尾孝子: 本誌, 11, 91 (1991)
- 21) 生化学実験講座 5, 酵素研究法下, 東京, 化学同人 p359
- 22) DAVIS.B.J: *Ann. NYAcad. Sci*, 121,404 (1964)
- 23) 林健志, 大場義樹: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法, 蛋白質・核酸・酵素, 17, 304~311 (1972)
- 24) 福井作蔵: 還元糖の定量法, 東京大学出版会, 1973, p19
- 25) 福井作蔵: 還元糖の定量法, 東京大学出版会, 1973, p45
- 26) R.F.ITZHAKI and D.M.GILL: *Anal.Biochem.*, 9, 401 (1964)
- 27) 秋山裕一編: 酵母の利用と開発, 学会出版センター, p43