

琉球大学学術リポジトリ

泡盛麹菌における L-アラニン：
 α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼの失活現象(農
芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石原, 昌信, 与那覇, 和雄, 当山, 清善, Ishihara, Masanobu, Yonaha, Kazuo, Toyama, Seizen メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4051

泡盛麹菌におけるL-アラニン： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼの失活現象

石原昌信*・与那覇和雄*・当山清善*

Masanobu ISHIHARA, Kazuo YONAHARA Seizen TOYAMA :
Inactivation of L-alanine : α -Ketoglutarate transaminase
in *Aspergillus awamori*

I 緒 言

トランスアミナーゼは、動植物及び微生物に広く存在し^{4,13,22)}、生体内においてアミノ酸の合成および分解などの代謝に重要な役割を果している。現在までに、各種のアミノ酸と α -ケトグルタル酸との間のアミノ基転移反応が見い出されている^{12,18)}。そのうち、L-アラニンをアミノ基供与体、 α -ケトグルタル酸をアミノ基受容体とするアラニントランスアミナーゼ(GPT)は、動物組織から単離・精製され^{1,6)}、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(GOT)^{9,23)}とともに酵素化学的性質が明らかにされている。しかし、微生物、特にカビ起源のアラニントランスアミナーゼは不安定であり、本酵素の性質に関する研究はほとんど行われていない。

著者らは、泡盛麹菌の無細胞抽出液からアラニントランスアミナーゼの単離・精製を行なったが⁸⁾、精製過程で酵素の失活現象が起こり、低い収率しか得られなかった。本報では、本酵素の失活現象を明らかにすることを目的として、麹菌から調製した酵素液を用いて、酵素の性質について検討したので報告する。

II 実 験 方 法

(1) 供試菌株：実験には蔗糖・ペプトン含有培地で良好な生育を示し、アラニントランスアミナーゼ活性が高い *Aspergillus awamori* IFO 4122 菌株を用いた。

(2) 培地組成と供試菌株の培養：培養に用いた液体培地は蔗糖 2.0%，ペプトン 0.2%，リン酸第一カリウム 0.1%，リン酸第二カリウム 0.2%，塩化カリウム 0.05%，硫酸マグネシウム 0.02%，及び酵母エキス 0.02% を含む組成 (pH 6.0) で、常法通り滅菌 (120℃, 20 分間) した。前培養は上記液体培地 5.0ml を試験管 (1.8 × 18cm) に採り、供試菌株の胞子を接種したのち、30℃ で 24 時間振盪して行なった。本培養は 500ml 容振盪フラスコに上記液体培地培養菌体を接種し、30℃ で 24 ~ 72 時間振盪して行なった。

(3) 酵素液の調製：培養後の菌体は沓紙またはガーゼ沓過により集菌し、0.85% 食塩水、蒸留水及び 0.01 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) で洗浄した。洗浄菌体を乳鉢に採り、海砂を加えて磨砕した後、

* 琉球大学農学部農芸化学科

10^{-5} Mピリドキサールー5'-リン酸 (PLP) および 0.01% 2-メルカプトエタノールを含む上記緩衝液を加えて酵素を抽出した。無細胞抽出液から菌体残渣及び海砂を遠心分離により除き、上清液をPLPを含む上記緩衝液に対して一夜透析を行ない、遠心分離後の上清液を粗酵素液として用いた。

(4) 蛋白質の定量：酵素液の蛋白質の定量はLowryら¹⁰⁾の方法に従った。

(5) 酵素活性の測定法：酵素反応組成はL-アラニン 20 μ moles, α -ケトグルタル酸 (α -KG) 20 μ moles, PLP 0.1 μ mole, リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) 100 μ moles および酵素で総量 1.0 ml とした。酵素反応は, 37°C で20分間行ない, 反応生成物の定量は次の如く行なった。反応で生成したグルタミン酸の定量は, 反応混液に 25% 三塩化酢酸 0.1 ml を加えて反応を停止し, 遠心分離により除蛋白したのち上清液についてペーパークロマトグラフィー・ニンヒドリン法¹⁷⁾ によって行なった。また, 反応で生成したピルビン酸の定量は, サリチルアルデヒド法²⁾ を次の如く改変して行なった。すなわち, 反応混液に 60% KOH 1.0 ml を加えて反応を停止したのち, 0.2% サリチルアルデヒド (99% エタノールに溶解) 0.5 ml を加え, 37°C で30分間保ったのち蒸留水 1.0 ml を加えた。ピルビン酸との反応で生成した化合物の色度を 480 nm における吸光度を測定し, 同条件で作成した標準ピルビン酸の検量線からピルビン酸量を算出した。酵素活性の単位は, 反応1分間に生成するグルタミン酸またはピルビン酸の μ mole 数で表わし, 比活性は蛋白質 1 mg 当りの単位数で示した。

III 結 果

1. 泡盛麹菌の培養時間と酵素活性

Fig. 1 は, 供試泡盛麹菌 *Aspergillus awamori* IFO 4122 の孢子懸濁液を蔗糖・ペプトン培地に接種し, 各時間培養を行ない, 得られた菌体の無細胞抽出液について, L-アラニン： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ (GPT) 活性を調べた結果である。

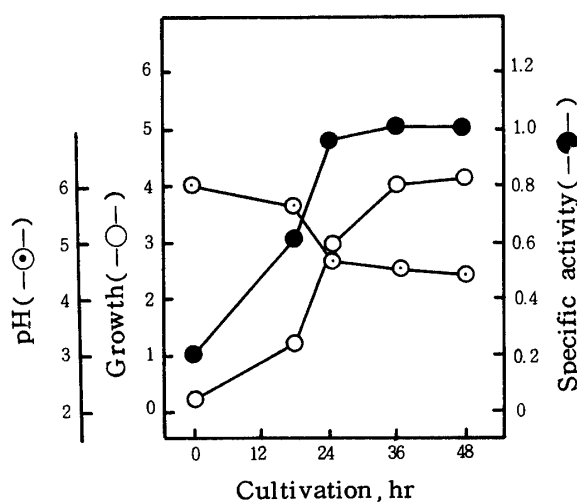


Fig. 1. Time course of L-alanine : α -Ketoglutarate transaminase for - mation by *Aspergillus awamori*

The growth medium contained 2.0 % sucrose, 0.2 % peptone, 0.2 % K_2HPO_4 , 0.1 % KH_2PO_4 , 0.05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02 % KCl and 0.02 % yeast extract. The organism were grown at 30°C for various time with shaking and the cell-free extracts were employed as enzyme sources. Enzyme reaction was carried out at 37°C for 20 min. Pyruvate formed in the enzyme reaction was determined by salicylaldehyde method. One unit of the enzyme was defined as amount of enzyme which catalyzes the formation of pyruvate per min.

The specific activity was expressed as unit per mg of protein.

The degree of growth was shown as the amount of pressed mycelia (g, wet weight).

図で明らかなように、酵素活性は接種した孢子中にも存在し、培養 24 時間目で最も高い活性が得られた。培養液の pH は麹菌の生育に伴ない低下し、培養後期では pH 4.0 となりほぼ一定であった。

以下の実験では液体培地で泡盛麹菌を 24 時間振盪培養を行ない、得られた菌体の無細胞抽出液を用いて酵素の性質を調べた。

2. 酵素活性に及ぼす PLP および 2-メルカプトエタノールの影響

供試麹菌が生産する GPT は PLP 存在下では比較的安定であるが、酵素の精製過程で著しい失活現象がみられた。この失活現象と PLP および 2-メルカプトエタノールとの関係について調べたのが Fig. 2 である。

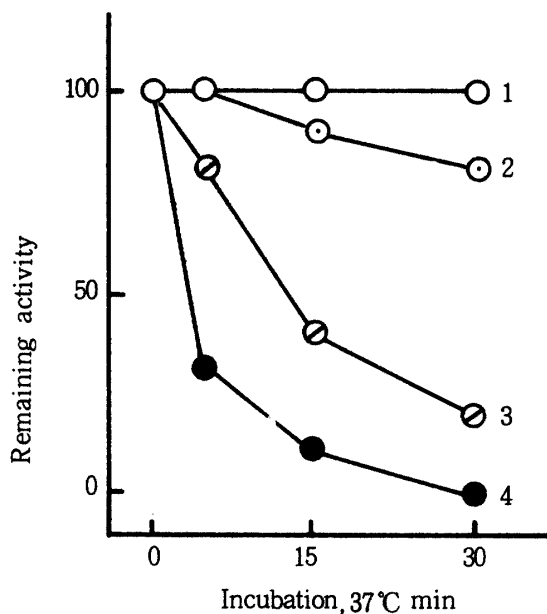


Fig. 2. Effect of 2-mercaptoethanol and pyridoxal-5'-phosphate on the stability of L-alanine transaminase

The enzyme solution was incubated with or without pyridoxal-5'-phosphate (PLP) and 0.02% 2-mercaptoethanol (ME) at 37°C, and then the remaining activity was determined by a salicylaldehyde method.

1. With PLP and ME
2. With PLP
3. Without PLP
4. With ME

粗酵素液を PLP および 2-メルカプトエタノール存在下、または非存在下で加温 (37°C) し、GPT 活性の変化を調べた。本酵素は、PLP とともに 2-メルカプトエタノールが存在すると安定であったが、PLP 非存在下あるいは 2-メルカプトエタノールのみでは加温時間とともに著しく失活した。粗酵素液に PLP のみを添加しても酵素の安定化が認められたが、加温時間とともに徐々に失活した。

3. 酵素の熱安定性

粗酵素液を用いて GPT の熱安定性を調べるために、 10^{-5} M PLP および 0.02% 2-メルカプトエタノールを含む酵素液を各温度に保ち、経時的に GPT 活性の変化を調べた結果が Fig. 3 である。

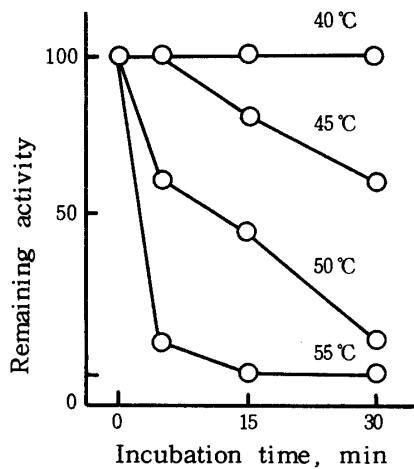
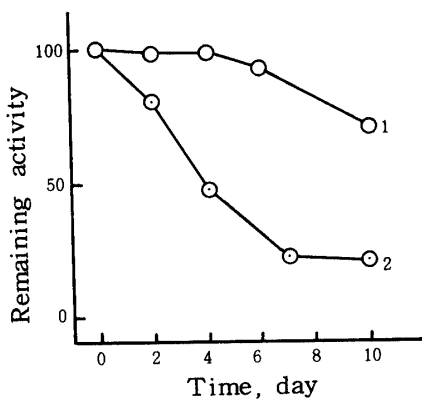


Fig. 3. Effect of temperature on L-alanine transaminase activity

The enzyme solution was incubated with pyridoxal - 5'-phosphate ($10^{-5}M$) at various temperatures, and then the remaining activity was determined by a salicylaldehyde method.



1. Cell-free extract
2. Ammonium sulphate-fractionated enzyme

Fig. 4. Stability of crude enzyme and ammonium sulphate-fractionated enzyme

The cell-free extract (crude enzyme) and ammonium sulphate - fractionated enzyme were stored at 4°C, and then remaining activity was determined by a salicylaldehyde method.

本酵素はPLP および 2-メルカプトエタノール存在下では, 40°Cで30分間加温しても安定であった。しかし, 45°C以上の温度では経時的に失活し, 55°C以上では5分間で完全に活性を失った。

4. 酵素の安定性

Fig. 4は, 粗酵素液と硫酸アンモニウムで80%飽和した酵素液を4°Cに保ち, 経時的に酵素活性の変動を調べた結果である。

粗酵素液はPLP および 2-メルカプトエタノールが存在すると比較的安定であり, 6日間でも活性の低下はみられない。一方, 硫酸分画した酵素は経時的に酵素活性が減少した。しかし, 本失活酵素にPLP および 2-メルカプトエタノールを加えて37°C, 30分間加温処理することにより, 部分的に酵素活性の回復がみられた。

5. 酵素の活性化に及ぼすPLPおよび2-メルカプトエタノールの影響

硫酸アンモニウム塩析によって失活した酵素をPLP および 2-メルカプトエタノール存在下で加温処理すると活性が回復することが明らかとなったので, 次に酵素の活性化に及ぼすPLP および 2-メルカプトエタノール濃度と加温時間の影響について調べた (Fig. 5)。

図に示した様に, 失活酵素をPLP および 2-メルカプトエタノール存在下で, 37°Cで加温処理すると加温時間とともに部分的に酵素活性の回復がみられ, 酵素活性が2.2倍に増加した。しかし, PLP または 2-メルカプトエタノールのみでは活性の回復はみられなかった (Fig. 5 A)。また, 失活酵素の活性化とPLP および 2-メルカプトエタノールの濃度との関係について調べた結果, 失活酵素にPLP (0.01mM) および 2-メルカプトエタノール (10mM) を加えて, 37°Cで30分間加温処理することにより高い活性が得られた (Fig. 5 B)。

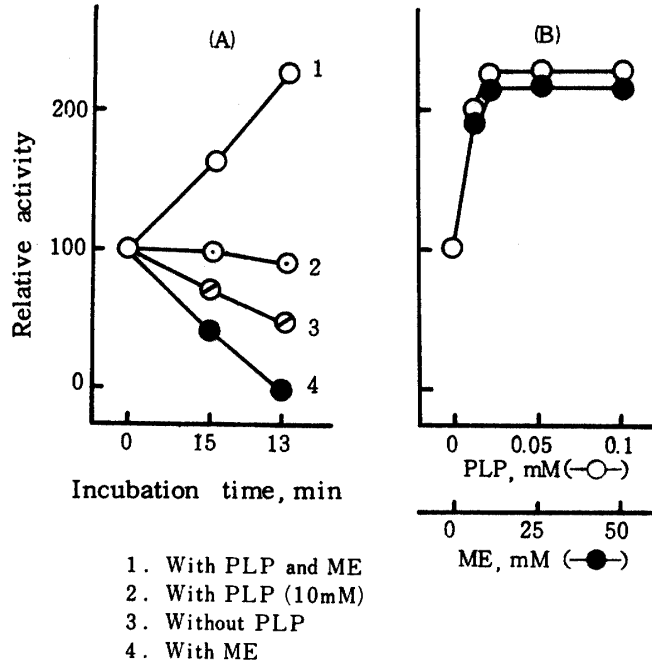


Fig. 5. Activation of inactivated enzyme with pyridoxal-5'-phosphate and 2-mercaptoethanol

(A) The inactivated enzyme by ammonium sulphate fractionation was incubated with or without pyridoxal-5'-phosphate (PLP) and 2-mercaptoethanol (ME) at 37°C, and then the enzyme activity was determined by a salicylaldehyde method.

(B) The inactivated enzyme was incubated at 37°C for 30 min with various amounts of PLP or ME, and then the enzyme activity was determined.

6. 酵素活性に及ぼすP-クロルマーキュリ安息香酸の影響

酵素の安定化及び活性化に2-メルカプトエタノールが関与していることが明らかになったので、次にSH試薬であるP-クロルマーキュリ安息香酸(PCMB)と酵素活性との関係について調べた。

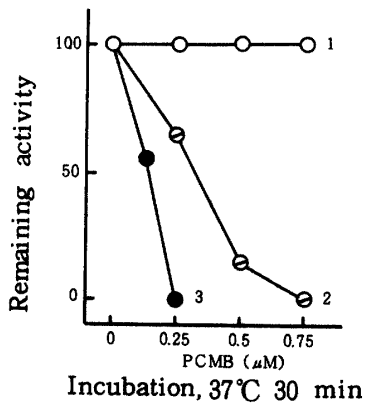


Fig. 6. Effect of p-chloromercuribenzoic acid on enzyme activity

The enzyme solution was incubated with various concentrations of p-chloromercuribenzoic acid (PCMB) at 37°C for 30 min with or without pyridoxal-5'-phosphate (PLP) and 2-mercaptoethanol (ME), the remaining activity was determined by a salicylaldehyde method.

1. With PLP and ME(10mM)
2. Without PLP
3. Without ME

PLPおよび2-メルカプトエタノール存在下で、粗酵素液に各種濃度のPCMBを加え、37°Cで30分間加温処理したのち、残存するGPT活性を調べたのがFig. 6.である。

本酵素は、PLPとともに2-メルカプトエタノール存在下ではPCMBを加えても安定であったが、2-メルカプトエタノール非存在下では、0.25 μ MのPCMBで完全に失活した。また、PLP非存在下では、0.75 μ MのPCMBで完全に酵素が失活した。

IV 考 察

動物起源のアラニントランスアミナーゼ(GPT)については、Saier^{14,15)}やMatsuzawaら¹¹⁾が酵素の精製を行ない、酵素化学的性質を明らかにしているが、微生物起源のGPTに関する研究報告は極めて少ない。本酵素は、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(GOT)とともに、 α -アミノ酸の分解に関与する重要な酵素であり、その生理的意義を明らかにする研究が行われている^{3,7)}。

供試泡盛麹菌株の無細胞抽出液中には α -ケトグルタル酸をアミノ基受容体とする各種のトランスアミナーゼの存在が明らかにされているが^{8,21)}、中でも特に、GPTおよびGOTは高い活性を有している。麹菌のGPTは不安定で、PLP非存在下では加温処理や硫酸アンモニウム塩析によって急激に失活が起った。本失活現象を調べた結果、酵素液中のピリドキサル-5'-リン酸(PLP)と2-メルカプトエタノールが酵素の失活現象に関与することが明らかとなった。硫酸アンモニウム塩析によって失活した酵素は、PLPおよび2-メルカプトエタノール存在下で加温処理することにより部分的に活性が回復した。また、酵素は動物起源酵素と同様に、PLPまたは2-メルカプトエタノール存在下ではPCMBによって失活をうけるが、PLPとともに2-メルカプトエタノールが存在するとPCMBに対して安定であった。本酵素の硫酸アンモニウム塩析による失活現象は、酵素とPLPとの結合が硫酸アンモニウム塩析によって部分的に解離することにより、活性基の酸化が促進されるためだと考えられる。一方、失活酵素の活性化は、この酸化された活性基がPLP存在下で2-メルカプトエタノール等のSH試薬によって還元されるためだと考えられ、SH基が活性発現へ関与することを示唆している。

PLP存在下で加温処理による失活酵素の活性化に関する研究には、動物起源酵素のチロシントランスアミナーゼを用いたShiojiら¹⁶⁾及びFedericら⁵⁾の報告があるが、酵素の活性化機構については明らかでない。一方、微生物起源酵素については、当山ら^{19,20,24)}が*Achromobacter superficialis*からタウリン： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼの精製を行ない、精製酵素を用いてPLP存在下、45~60°Cの高温での加温処理によって失活酵素の活性化が起こることを報告している。これらの酵素の失活現象や失活酵素の活性化機構の比較検討が望まれており、今後、さらに本酵素の失活現象について詳しく調べ、酵素の安定化について検討する必要がある。

V 要 約

供試泡盛麹菌(*Aspergillus awamori*)を蔗糖・ペプトン含有培地で培養を行ない、得られた菌体の無細胞抽出液についてL-アラニン： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ活性を調べた結果、培養24時間目で最も高い活性が得られた。本酵素は不安定であったが、本酵素をピリドキサル-5'-リン酸(PLP)と2-メルカプトエタノールとともに加温処理(37°C,30分間)すると安定化した。本酵素は硫酸アンモニウム塩析で失活が起った。本失活酵素はPLP及び2-メルカプトエタノールとともに加温処理すると活性の回復がみられた。また、本酵素はPLPまたは2-メルカプトエタノール非存在下ではP-クロルマーキュリ安息香酸によって失活をうけた。

引用文献

- 1, Barman, T. E. 1969 "Enzyme handbook" p. 356~357, Springer - Verlag Berlin Heidelberg, New York
- 2, Bernstsson, S. 1955 Spectrophotometric determination of pyruvic acid by the salicylaldehyde method, *Anal. Biochem.* **27** : 1659~1660
- 3, Bulos, B., Handler, P. 1965 Kinetics of beef heat glutamic - alanine transaminase, *J. Biol. Chem.* **240** : 3283~3294
- 4, Eze, L. C., Echetebe, C. O. 1980 Same properties of aspartate and alanine aminotransferases from *Trichoderma viride*, *J. General Microbiology.* **120** : 523~527
- 5, Federici, G., Di Cala, D., Sacchetla, P., Dillo, C., Del Boccio, G., Polidoro, G. 1978 Reversible inactivation of tyrosine aminotransferase from quinea pig liver by thiol and disulfide compounds *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **81** : 650~655
- 6, Gatehouse, P. W., Hopper, S., Schatz, L., Segal, H. L. 1967 Further characterization of alanine aminotransferase of rat liver. *J. Biol. Chem.* **242** : 2319~2324
- 7, Hopper, S., Segal, H. L. 1964 Comparative properties of glutamic - alanine transaminase from several sources. *Arch. Biochem. Biophys.* **105** : 501~505
- 8, 石原昌信, 与那覇和雄, 当山清善 1980 泡盛麹菌のL-アラニン： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼの精製と性質, *琉大農学報* **27** : 89~102
- 9, Kagamiyama, H., Yagi, T. 1979 Aspartate transaminase from *E. coli* "Amino acid sequences of the NH₂-terminal 33 residues and chymotryptic pyridoxyl tetrapeptide" *Biochem Biophys. Res. Commun.* **89** : 1347~1353
- 10, Lowry, O. H., Rosebrought, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951 Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265~275
- 11, Matsuzawa, T., Segal, H. L. 1968 Rat liver alanine aminotransferase crystallization, composition, and role of sulfhydryl groups. *J. Biol. Chem.* **243** : 5929~5934
- 12, Roberts, E., Ayengar, P., Posner, I. 1953 Transamination of γ -aminobutyric acid and β -alanine in microorganisms. *J. Biol. Chem.* **203** : 195~204
- 13, Roberts, E. 1954 Studies of transamination. *Arch. Biochem. Biophys.* **48** : 395~401
- 14, Saier, Jr, M. H., Jenkins, W. T. 1967 Alanine aminotransferase "Purification and properties" *J. Biol. Chem.* **242** : 91~100
- 15, Saier, Jr, M. H., Jenkins, W. T. 1967 Alanine aminotransferase "The basis for substrate specificity" *J. Biol. Chem.* **242** : 101~108
- 16, Shioji, K., Imai, H., Tai, J., Ueda, I., Tanigawa, Y., Shimogama, M. 1978 Tyrosine aminotransferase from chick liver heat activation and cold inactivation of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta.* **522** : 96~103
- 17, Soda, K., Tochikura, T. and Katagiri, H. 1961 Studies on transamination in microorganisms. *Agric. BIOL. Chem.* **25** : 811~819
- 18, 当山清善, 与那覇和雄, 石原昌信, 儀間勝 1979 泡盛酵母のL-ロイシン： α -ケトグルタル酸

- トランスアミナーゼ 琉大農学報 26:125~133
- 19, Toyama, S., Misono, H., Soda, K. 1972 Crystalline taurine: α -ketoglutarate aminotransferase from *Achromobacter superficialis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46:1374~1379
- 20, Toyama, S., Misono, H., Soda, K. 1978 Properties of taurine: α -ketoglutarate aminotransferase of *Achromobacter superficialis* "Inactivation and reactivation of enzyme" Biochimica et Biophysica Acta. 523:75~81
- 21, 当山清善, 与那覇和雄, 石原昌信, 弘津達也, 1980 泡盛麹菌におけるシステインスルフィン酸: α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応, 琉大農学報 27:69~77
- 22, Wilson, D. G., King, K. W., Burris, R. H. 1954 Transamination reaction in plant. J. Biol. Chem. 208:863~874
- 23, Yagi, T., Kagamiyama, H., Motosugi, K., Nozaki, M., Soda, K. 1979 Crystallization and properties of aspartate aminotransferase from *Escherichia coli* B. Febs Letters. 100:81~84
- 24, Yonaha, K., Toyama, S. 1980 γ -Aminobutyrate: α -ketoglutarate aminotransferase from *Pseudomonas* sp. F-126 "Purification, crystallization and enzymologic properties. Arch. Biochem. Biophys. 200:156~164

Summary

When *Aspergillus awamori* IFO 4122 was grown on sucrose-peptone medium for 24 hr under shaking, a high activity of the transaminase was found in the cell-free extract. Both pyridoxal-5'-phosphate (PLP) and 2-mercaptoethanol protected the enzyme from heat inactivation. The inactivated enzyme by ammonium sulphate fractionation was activated by preincubation with PLP and 2-mercaptoethanol. The enzyme was inactivated with p-chloromercuribenzoate in the absence of PLP or 2-mercaptoethanol.