

# 琉球大学学術リポジトリ

泡盛麹菌の L-アラニン：  
 $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼの精製と性質(  
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 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4089">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4089</a>

# 泡盛麹菌のL-アラニン： $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼの精製と性質

石原昌信\*・与那覇和雄\*・当山清善\*

---

Masanobu ISHIHARA, Kazuo YONAHARA and Seizen TOYAMA:  
L-Alanine: $\alpha$ -ketoglutarate transaminase from *Aspergillus awamori*; purification and properties

---

## I 緒 言

アミノ酸のアミノ基転移反応を触媒するアミノ基転移酵素（トランスアミナーゼ）は、生体内における各種アミノ酸及びケト酸の代謝分解あるいは合成経路で重要な役割を果たしており、本反応に関与する各種の酵素が単離されている<sup>3,7</sup>。特に、 $\alpha$ -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は、アラニン及びグルタミン酸の分解や合成反応に関与し、アスパラギン酸トランスアミナーゼとともに動物、植物及び微生物に広く存在し<sup>6,9,12</sup>、酵素活性も高いことが知られている。本酵素は、動物組織から単離・精製され酵素化学的性質が明らかにされているが<sup>3,5,11,15</sup>、微生物起源の酵素を用いた研究は極めて少ない。

著者らは、泡盛麹菌におけるアミノ酸代謝に関与する酵素の性質を明らかにすることを目的として、すでに同菌株が生産するD-ロイシン酸化酵素<sup>22</sup>、 $\alpha$ -ケトグルタル酸をアミノ基受容体とするL-アラニン酪酸トランスアミナーゼ<sup>23</sup>及びシステインスルフィン酸トランスアミナーゼ<sup>24</sup>について調べた結果、泡盛麹菌が本酵素を生産し、高い活性を有していることが明らかとなった。本報では、泡盛麹菌の無細胞抽出液を酵素液としてL-アラニン： $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼの反応特性を調べるとともに、本酵素の単離・精製を行ない、精製酵素の性質を検討したので報告する。

## II 実験方法

(1) 供試試薬： DEAE-セルロースはBrown社より、セファクリルS-200及びセファデックスG-150はPharmacia社より購入した。アミノ酸及びサリチルアルデヒドは半井化学薬品(株)、ピリドキサール-5'-リン酸(PLP)は協和醗酵工業(株)、ピルビン酸ナトリウム塩はMerk社よりそれぞれ購入した。ヒドロキシアパタイトはTiseliusの方法<sup>21</sup>、*o*-アミノベンツアルデヒドはSmithとOpieの方法<sup>18</sup>に準じて調製した。

(2) 供試菌株： 麹菌における酵素活性の検索には、研究室保存の黒麹菌株及び黄麹菌株等を用い、

---

\* 琉球大学農学部農芸化学科

酵素の精製には *Asp. awamori* (IFO4122) を用いた。

(3) 培地組成と供試菌株の培養： 培地組成は蔗糖 2.0%，ペプトン 0.2%， $K_2HPO_4$  0.2%， $KH_2PO_4$  0.1%，KCl 0.05%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%，及び酵母エキス 0.02% で、pH 6.0 に調製した。供試菌株のフラスコ培養は培地 150 ml を 500 ml 容振とうフラスコに採り、常法通り滅菌したのち、同培地 (5 ml) で前培養した菌糸体を接種し、30°C で 12~24 時間振とうして行なった。大量培養は、培地 26 l を 30 l 容ジャーフェーマンターに採り、蒸気滅菌したのちフラスコ培養菌糸体液 (450 ml) を接種し、30°C で 20 時間通気攪拌して行なった。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。

(4) 粗酵素液の調製： 菌体の磨砕は、洗浄菌体を乳鉢に採り、0.1 mM PLP 及び 0.02% 2-メルカプトエタノールを含む 0.01 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) 及び海砂を加えて低温で行ない、さらに同緩衝液を加えて抽出した。遠心分離後の上澄液を同緩衝液に対して十分透析を行なった。透析後の無細胞抽出液を粗酵素液として用いた。

(5) 蛋白質の定量： 酵素液中の蛋白質は Lowry<sup>10)</sup> の方法に準じ、酵素の精製過程では 280 nm における吸光度を測定することにより定量した。

(6) 酵素活性の測定： 酵素反応組成は L-アラニン 20  $\mu$  moles,  $\alpha$ -ケトグルタル酸 20  $\mu$  moles, PLP 0.1  $\mu$  mole, リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) 50  $\mu$  moles 及び酵素液で、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% 三塩化酢酸の 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澄液を用いてペーパークロマトグラフィー・ニンヒドリン法<sup>19)</sup> によって行なった。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<sup>4)</sup> を改変して行なった。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、別に作成したピルビン酸の検量線からピルビン酸の量を算出した。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  $\mu$  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。

(7) その他：精製酵素の吸収スペクトルはベックマン自動分光光度計 (OB-GT) で測定した。酵素のディスクゲル電気泳動は Davis の方法により行ない、分子量の測定は Andrews の方法<sup>1)</sup> に従って行なった。

### III 実験結果

#### 1. 各種カビにおける L-アラニン： $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ活性の分布

Table 1 は、蔗糖・ペプトン含有培地で各種のカビを 20 時間振とう培養し、得られた菌体の無細胞抽出液を酵素源として酵素活性を調べた結果である。供試菌株で、C, G, F 記号の菌株は泡盛麹から分離された黒麹菌株である。表から明らかなように、酵素活性はすべての供試菌株でみられ、特に黒麹菌株は生育良好で、培養後の pH が低下し、高い酵素活性が得られた。以下の実験では、比較的高い活性を有し、良好な生育を示した *Asp. awamori* IFO 4122 菌株を用いた。なお、本菌株を用いて、培地組成と酵素活性との関係を調べた結果、培地にグルタミン酸及びアラニン等の各種アミノ酸を加えても酵素活性の増加はみられなかった。

Table 1. Distribution of L-alanine: $\alpha$ -ketoglutarate transaminase activity in various strains of molds

Strains	Growth	pH	Specific activity
<i>Aspergillus awamori</i> AUR 3130	8.3	3.6	0.70
<i>awamori</i> IAM 2101	7.9	3.8	0.60
<i>awamori</i> IAM 2088	9.7	3.6	0.85
<i>awamori</i> IFO 4033	3.1	3.6	0.30
<i>awamori</i> IFO 4122	6.0	3.5	0.99
<i>awamori</i> IFO 5708	6.6	3.6	0.27
AUR F-111	3.8	4.0	0.70
AUR F-113	3.5	3.9	0.40
AUR G-124	3.5	4.0	0.41
AUR G-126	5.8	4.8	0.40
AUR C-102	3.0	4.4	0.41
<i>kawachii</i> IFO 4308	8.7	3.6	0.34
<i>usamii</i> IFO 4397	5.0	3.7	0.06
<i>usamii</i> IFO 6082	4.4	3.7	0.04
<i>niger</i> IFO 4338	4.0	3.8	0.08
<i>niger</i> AUR 3124	5.8	3.9	0.63
<i>oryzae</i> IAM 2630	3.6	5.0	0.26
<i>oryzae</i> IFO 4181	3.6	5.6	0.27
<i>oryzae</i> AUR 3101	1.8	5.6	0.25
<i>sojiae</i> IFO 4389	2.2	5.1	0.34
<i>Neurospora sitophila</i> AUR 3450	2.8	6.0	0.42
<i>crassa</i> IFO 6660	2.5	6.0	0.38
<i>Penicillium notatum</i> IFO 4640	1.3	5.4	0.30
<i>Mucor javanicus</i> IFO 4604	0.6	7.0	0.02
<i>Rhizopus oryzae</i> AUR 3050	0.8	7.0	0.52

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 organisms were grown at 30°C for 24 hr 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 1  $\mu$ mole 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). *Asp. awamori* IFO 4122 was chosen for purification and characterization of the enzyme.

## 2. L-アラニン： $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応とL-グルタミン酸：ピルビン酸トランスアミナーゼ反応

供試菌株 (*Asp. awamori* IFO 4122) の無細胞抽出液を酵素源として用い、L-アラニンと $\alpha$ -ケトグルタル酸を基質とした反応で生成するグルタミン酸とピルビン酸について調べたのがTable 2である。反応混液から両基質を除いた系及び加熱失活酵素を用いた系ではグルタミン酸及びピルビン酸の生

Table 2. Transaminase reaction between L-alanine and  $\alpha$ -ketoglutarate by the cell-free extract of *Asp. awamori*

Reaction system	Products formed ( $\mu$ moles)	
	Pyruvate	L-Glutamate
Complete	1.60	1.50
minus L-alanine	0	0
minus $\alpha$ -ketoglutarate	0	0
minus PLP	1.12	1.01
with boiled enzyme	0	0

The enzyme reaction was performed at 37°C for 20 min with 90  $\mu$ g of cell-free extract. Pyruvate and L-glutamate formed were determined by the methods of salicylaldehyde and paper chromatography, respectively. PLP; Pyridoxal-5'-phosphate.

成は全くみられない。反応混液からPLPを除くと生成物が30%減少しており、本反応を触媒する酵素がPLPを補酵素としていることを示している。なお、酵素反応で生成したグルタミン酸の光学活性を調べるために、反応混液を*Escherichia coli*から調製したL-グルタミン酸脱炭酸酵素を用いNajjarの方法<sup>14)</sup>に準じてGilsonのRespirometerにより分析した結果、グルタミン酸は定量的に脱炭酸され、L-型と同定された。

次に、供試菌株の酵素が逆反応、すなわち、L-グルタミン酸とピルビン酸を基質とした反応も触媒するかどうかを調べた。その結果、本反応でアラニンと $\alpha$ -ケトグルタル酸が等モル生成されることが認められ、本酵素は逆反応も触媒することが明らかとなった。

## 3. 酵素の精製

供試菌株 (*Asp. awamori* IFO 4122) の大量培養 (20時間) を行ない、洗浄菌体約3kgを用いて無細胞抽出液を調製し酵素の精製を行なった。なお、洗浄菌体を凍結保存すると酵素の失活がみられたので、培養直後の菌体を用いて粗酵素液を調製した。また、酵素の安定化を図るために、各精製過程で得られる酵素液をPLP及び2-メルカプトエタノール存在下で37°C、20分間加温処理を行なった。酵素の精製にはすべて0.01% 2-メルカプトエタノール及び0.01mM PLPを含むリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) を用い、精製操作はすべて4°Cで行なった。

硫酸アンモニウムによる分画：無細胞抽出液に、pHを7.5~8.0に保ちながら固体硫酸を加え25%飽和にして放置したのち、遠心分離して沈澱を除いた。上澄液に硫酸を加えて80%飽和にして放置後遠心分離を行なった。得られた沈澱を0.01Mリン酸カリウム緩衝液に溶解した。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー：0.01Mリン酸緩衝液に対して十分透析した硫酸分

画酵素液を、同緩衝液で緩衝化したDEAE-セルロースカラム (6 × 75 cm) に吸着させた。カラムを 0.1M 食塩を含む緩衝液で十分洗浄したのち、0.2M 食塩を含む緩衝液で溶出した結果、酵素活性を有する蛋白質が溶出された (Fig. 1)。この活性区分を集め、これに固体硫安を 80% 飽和になるように

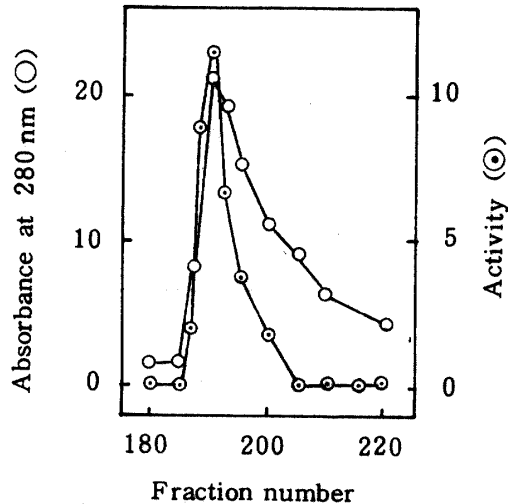


Fig. 1 DEAE-cellulose column chromatography

Cell-free extracts were applied to a column of DEAE-cellulose equilibrated with 0.01M potassium phosphate buffer (pH 8.0), and the enzyme was eluted with the same buffer supplemented with 0.02 M NaCl.

加え、生じた沈澱を 0.001M リン酸カリウム緩衝液に対して透析した。

ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー： 上記酵素液を 0.001M リン酸カリウム緩衝液で緩衝化したハイドロキシアパタイトカラム (5 × 50 cm) でクロマトグラフィーを行なった。活性を有する蛋白質は非吸着画分にあり、活性区分を集め、80% 飽和の硫安濃縮を行なった。

セファアクリルS-200カラムクロマトグラフィー： 硫安濃縮後の沈澱を 0.01M リン酸カリウム緩衝液に溶解し、同緩衝液で緩衝化したセファアクリルS-200カラム (3 × 170 cm) でゲル透過を4回に分けて行なった。活性区分を集め、80% 飽和になるように固体硫安を加え、生じた沈澱を同緩衝液に対して透析した。

ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー： 透析後の酵素液を 0.001M リン酸カリウム緩衝液で緩衝化したハイドロキシアパタイトカラム (3 × 50 cm) により第2回目のクロマトグラフィーを行なった (Fig. 2)。非吸着画分の活性区分を集め、精製酵素として以下の実験に供した。

精製過程における活性と収量をまとめたのが Table 3 である。本酵素のディスクゲル電気泳動を行なった結果、主バンドの他にうすい2つのバンドが認められた。電気泳動カラムにおける酵素蛋白質のバンドを確認するために、カラムを切断し、各画分の活性を調べたのが Fig. 3 である。酵素活性は主バンドの蛋白質に存在することが明らかとなった。

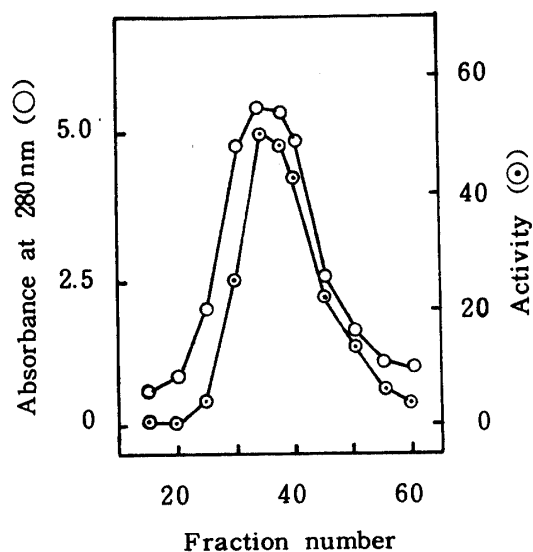


Fig. 2 Hydroxylapatite column chromatography

The enzyme fraction from Sephacryl S-200 column was applied to a column of hydroxylapatite equilibrated with 1mM potassium phosphate buffer (pH 8.0), and the enzyme was eluted with the same buffer.

Table 3. Summary of purification of L-alanine:  $\alpha$ -Ketoglutarate transaminase

Purification step	Total protein (mg)	Total units	Specific activity	Yield (%)
Crude extract	28193	23186	0.8	100
Ammonium sulfate (25-80%)	19217	24388	1.3	105
DEAE-cellulose	2759	1076	0.4	4.6
Hydroxylapatite	408	2242	2.5	9.7
Sephacryl S-200	32	1728	5.5	7.5
Hydroxylapatite	26	1238	5.4	5.3

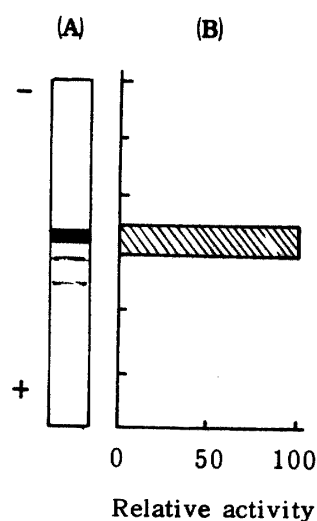


Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of L-alanine:  $\alpha$ -ketoglutarate transaminase

The purified enzyme preparation ( $50 \mu\text{g}$ ) was electrophoresis (A). The column was divided into 0.5cm-fragments. After the enzyme was extracted from the gel slices with 0.1M potassium phosphate buffer (pH 8.0), the activity was determined (B).

#### 4 酵素の吸収スペクトル

Fig. 4は、精製酵素を0.01Mリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0)に溶解し、吸収スペクトルを調べた結果である。本酵素は280nmの吸収極大の他に、320nm及び418nmに吸収がみられた。418nmの吸収

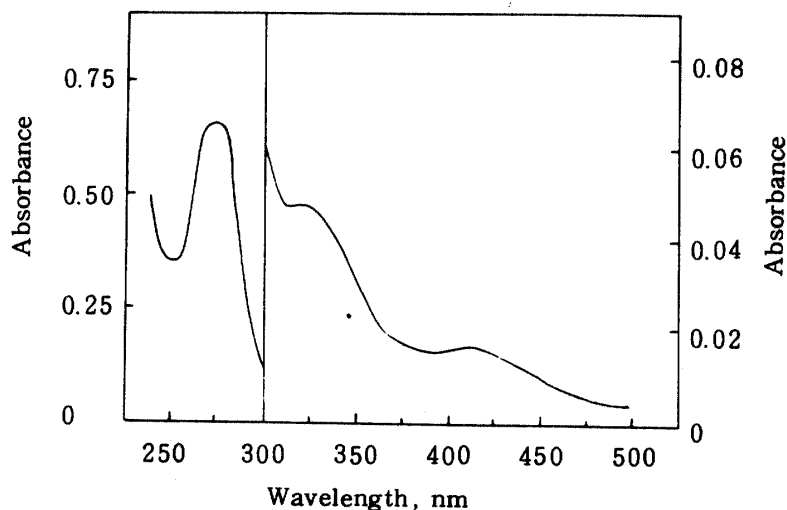


Fig. 4 Absorption spectrum of L-alanine:  $\alpha$ -ketoglutarate transaminase

The absorption spectrum of the enzyme was measured in 10 mM phosphate buffer (pH 8.0).



は、本酵素の補助酵素であるPLPに由来する吸収であることが示唆される。

### 5. 酵素の分子量

精製酵素の分子量を Andrewsの方法<sup>1)</sup>に従い、セファデックスG-150のカラム (3.5×170 cm) を用いて測定したのが Fig. 5 である。標準蛋白質としては、カタラーゼ、 $\omega$ -アミノ酸：ピルビン酸トランスアミナーゼ、アルドラーゼ、牛血清アルブミン、卵アルブミン、キモトリプシノーゲンA及びチトクロームCを用いた。精製酵素の分子量は104,000であった。

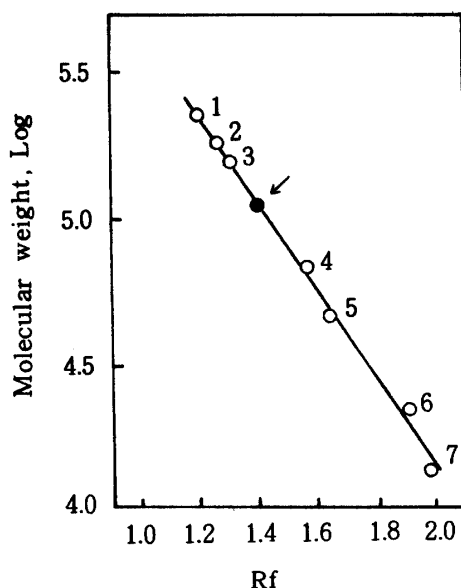


Fig. 5 Determination of the molecular weight of L-alanine:  $\alpha$ -ketoglutarate transaminase by gel filtration of Sephadex G-150 column

The arrow indicates L-alanine:  $\alpha$ -ketoglutarate transaminase. Standard proteins and their molecular weights are: 1, catalase (240,000); 2,  $\omega$ -amino acid: pyruvate transaminase (172,000); 3, aldolase (158,000); 4, bovin serum albumin (68,000); 5, ovalbumin (45,000); 6, chymotrypsinogen A (25,000); 7, cytochrome C (12,000).

### 6. 酵素の基質特異性

Table 4 は、 $\alpha$ -ケトグルタル酸をアミノ基受容体として各種のアミノ酸に対する精製酵素の活性を調べた結果であり、比較のために粗酵素液を用いて調べた活性も示した。なお、酵素活性は反応で生成するグルタミン酸を定量して測定した。表から明らかなように、粗酵素液ではアスパラギン酸、 $\alpha$ -アミノ酪酸、フェニールアラニン及び $\beta$ -アラニン等が基質となったが、精製酵素ではL-アラニンに対して高い特異性を示した。従って、粗酵素液中に存在した他のトランスアミナーゼは、精製過程で完全に除去され、精製酵素標品はL-アラニンを基質とするトランスアミナーゼであることが明らかとなった。

Table 4 Amino donor specificity of the crude extract and purified enzyme preparation

Amino donors	Relative activity	
	Crude extract	Purified enzyme
L-Alanine	100	100
L-Aspartate	91	0
L- $\alpha$ -Aminobutyrate	16	3
L-Ornithine	8	0
L-Lysine	—	0
L-Phenylalanine	27	0
L-Leucine	—	0
$\beta$ -Alanine	5	0

The L-glutamate formed in the reaction was determined by paper chromatography.

#### 7. 酵素活性に及ぼす基質濃度の影響

酵素活性と基質濃度との関係を調べるために、精製酵素を用いて各種濃度の L-アラニン及び  $\alpha$ -ケトグルタル酸を基質とした反応を行ない、生成するピルビン酸の量を測定した。ピルビン酸の生成は基

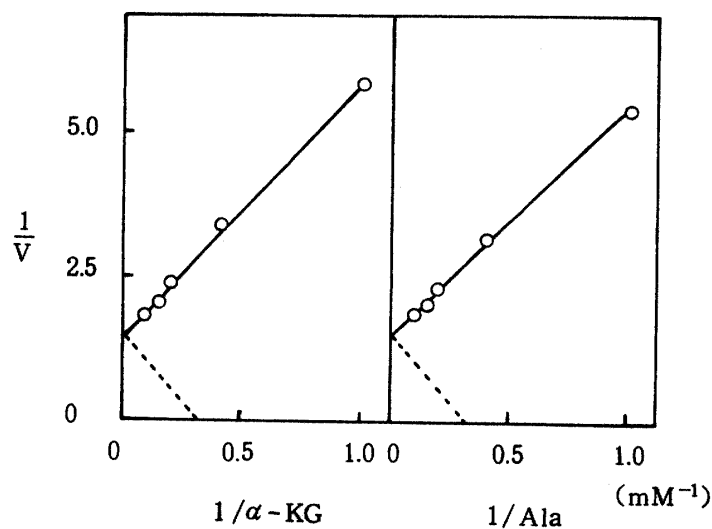


Fig. 6 Effects of varying concentrations of  $\alpha$ -ketoglutarate and L-alanine on the rate ( $V$ ) of the transaminase reaction

The apparent Michaelis constants were calculated by the double reciprocal plot method of Lineweaver and Burk.

質濃度に依存し、反応速度は直角双曲線となった。基質濃度と反応速度との関係を知るため、Lineweaver-Burkの逆数をプロットしたのが Fig. 6 である。図から明らかなように、両者には直線関

係が得られ、L-アラニン及び $\alpha$ -ケトグルタル酸に対する $k_m$ 値は共に2.9mMであった。

### 8. 酵素反応に及ぼすpHの影響と酵素のpH安定性

酵素反応を各種pHで行ない、活性とpHとの関係を調べたのがFig. 7(A)である。反応の至適pHは7.0~8.0にあり、pH 6.0以下及びpH 10.0以上では活性は全くなかった。Fig. 7(B)は、精製酵素を各種pHで37°C、10分間加温処理したのち活性を測定し、酵素のpH安定性を調べた結果である。本酵素はpH 7.0~8.0で安定であり、pH 6.0以下あるいはpH 8.5以上で処理すると急激に失活した。

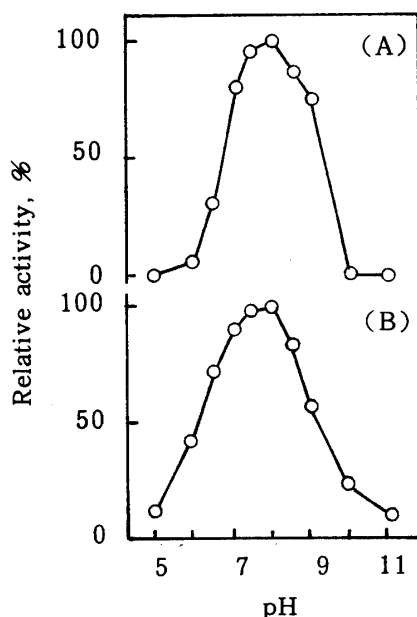


Fig. 7 Effect of pH on the activity of L-alanine:  $\alpha$ -ketoglutarate transaminase (A) and the enzyme stability (B)

The activity was assayed at the indicated pH (A). The enzyme was incubated at various pHs and 37°C for 10 min, and the activity was assayed at pH 8.0 (B). Buffers used: sodium acetate, pH 5-6; potassium phosphate, pH 6-8; Tris-HCl, pH 8-8;  $K_2HPO_4$ -KOH, pH 9-11.

### 9. 酵素反応に及ぼす温度の影響と酵素の熱安定性

Fig. 8(A) は酵素反応を各種温度で行ない、活性と温度との関係を調べた結果である。反応の至適温度は45°Cにあり、50°C以上では活性が急激に低下した。精製酵素の熱安定性を調べるために、酵素液をpH 8.0でPLP(0.1 mM)存在下及び非存在下で、各温度に10分間保ったのち残存活性を測定した。その結果をFig. 8(B)に示した。本酵素は、PLP非存在下でも40°Cまでは安定であったが、50°C以上では急激に失活した。PLPは本酵素の熱失活に対して保護効果がみられた。

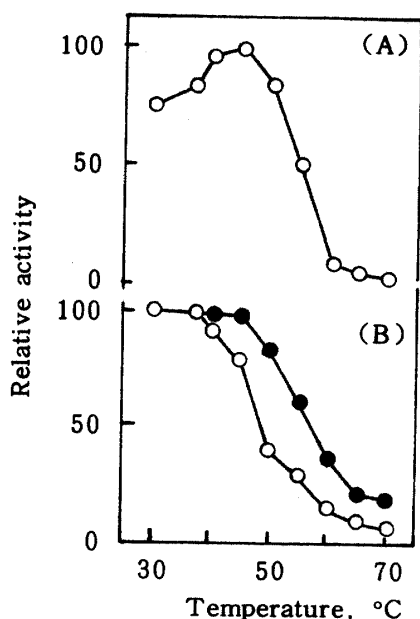


Fig. 8 Effect of temperature on the activity of L-alanine:  $\alpha$ -ketoglutarate transaminase activity (A) and the enzyme stability (B)

The activity was assayed at various temperatures (A). The enzyme was incubated at various temperatures at pH 8.0 for 10 min in the presence or in the absence of pyridoxal-5'-phosphate (PLP), and the residual activity was assayed (B). +PLP (●), -PLP (○)

#### IV 考 察

微生物における L-アラニン： $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼの生理的意義を解明するための研究が行われ、本酵素活性と生育との関係あるいは胞子の発芽との関係が明らかにされつつある<sup>8,2)</sup>。*Asp. niger*<sup>20,25)</sup>及び*Neurospora crassa*<sup>16,17)</sup>の胞子発芽過程と酵素活性との関係が明らかになり、*Asp. soyae*<sup>13)</sup>における酵素活性が生育条件によって異なることが明らかになっている。供試泡盛麹菌株(*Asp. awamori*)を用いて、生育と菌体中の酵素活性との関係について調べた結果、胞子中にも活性は存在するが、胞子の発芽・増殖に伴ない活性が増大し、発芽後20時間目に最高値に達した。供試菌株の胞子発芽と本酵素活性及びその他のトランスアミナーゼ活性との関係については、今後さらに詳しく調べる予定である。

供試泡盛麹菌から調製した酵素は不安定で、精製過程で活性の低下がみられた。従って、精製酵素標品の収率が極めて低い。PLP及び2-メルカプトエタノール存在下で、酵素を加温処理(37°C, 20分間)することによって酵素の失活をかなり防ぐことができた。本酵素の失活現象と安定化因子等については別に報告する予定である。なお、動物起源の酵素も不安定であることが知られている<sup>15)</sup>。

泡盛麹菌の酵素は、ディスク電気泳動的に単一になるまでには精製され得なかった。粗酵素はアパラギン酸等の数種のアミノ酸に対して活性を有していたが、精製酵素はこれらアミノ酸には不活性で、L-アラニンに特異的となった。従って、基質特異性からみた本酵素は、かなり高度に精製されたものと考えられる。精製酵素はL- $\alpha$ -アミノ酪酸に対しても僅かに活性があり(L-アラニンの3.0%)、動物

組織から高度に精製された酵素<sup>15)</sup>も同じく本アミノ酸に対して活性(1.4%)を有している。動物起源酵素<sup>3,7)</sup>の分子量は114,000~115,000で、今回精製された泡盛麹菌起源酵素の分子量は104,000であった。

精製酵素は、pH8.0で280nmにおける吸収極大の他に、320nm及び418nmに吸収がみられたが、各pHでの吸収スペクトルの変化は調べなかった。今後、本酵素の精製過程における失活現象を防ぐ手段を講じて精製を行ない、精製酵素の各種阻害剤による影響及び補酵素等について調べ、ビタミンB<sub>6</sub>酵素としてのさらに詳しい酵素化学的性質を明らかにしたい。

## V 要 約

各種カビにおけるL-アラニン： $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ活性を調べた結果、泡盛麹菌 (*Asp. awamori* IFO4122)を蔗糖-ペプトン含有培地で振とう培養し、得られた菌体の無細胞抽出液中に高い酵素活性が得られた。本酵素はL-アラニンと $\alpha$ -ケトグルタル酸からL-グルタミン酸とピルビン酸を生成するアミノ基転移反応を触媒し、本反応の逆反応も触媒した。本酵素は、供試泡盛麹菌株の無細胞抽出液から硫酸分画及び各種のカラムクロマトグラフィーにより55倍に精製された。精製酵素のゲル濾過法で求めた分子量は104,000であり、吸収スペクトルは280nm, 320nm及び418nmに吸収極大があった。精製酵素はL-アラニンに特異的で、L-アラニン及び $\alpha$ -ケトグルタル酸に対する $K_m$ 値は2.9mMであった。酵素反応の至適pHは7.0~8.0で、至適温度は45°Cであった。

## 文 献

1. Andrews, P. 1964 Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration, *Biochem. J.* 91: 222 ~ 233
2. Aronson, J. N., Borris, D. P., Doerner, J. F. and Akers, E. 1975  $\gamma$ -Aminobutyric acid pathway and modified tricarboxylic acid cycle activity during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*, *Appl. Microbiol.* 30: 489 ~ 492
3. Barman, T. E. 1969 "Enzyme handbook" p. 356 ~ 357, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York
4. Bernstsson, S. 1955 Spectrophotometric determination of pyruvic acid by the salicylaldehyde method, *Anal. Biochem.* 27: 1659 ~ 1660
5. Bulos, B. and Handler, P. 1965 Kinetics of beef glutamic - alanine transaminase, *J. Biol. Chem.* 240: 3283 ~ 3294
6. Cornish, E. C., Cussen, C. M., Hird, F. J. R. and Todd, P. E. E. 1978 Comparative aspects of aminotransferases in the rat, pigeon and rainbow trout, *Comp. Biochem. Physiol.* 61B: 375 ~ 378
7. Dixon, M., Webb, E. C., Thorn, C. J. R. and Tipton, K. F. 1979 "Enzymes" P. 223 ~ 224, 550 ~ 567, Longman
8. 蜂須賀養悦, 堀越弘毅 1976 "耐久型細胞-微生物胞子の分子生物学-" P. 56~65, 岩波書店
9. Hopper, S. and Segal, H. L. 1964 Comparative properties of glutamic-alanine transaminase from several sources, *Arch. Biochem. Biophys.* 105: 501 ~ 505
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265 ~ 275

11. Matsuzawa, T. and Segal, H. L. 1968 Rat liver alanine aminotransferase: Crystallization, composition, and role of sulfhydryl groups, *J. Biol. Chem.* **243**: 5929 ~ 5934
12. Meister, A. 1965 "Biochemistry of the amino acids" p. 338 ~ 369, Academic Press, New York
13. Mizunuma, T. 1964 Studies on the metabolism of *Aspergilli*. Part 1V. Stimulation of transaminase formation by  $\gamma$ -glutamic hydrazide and hydrazine, *Agric. Biol. Chem.* **28**: 10 ~ 21
14. Najjar, V. A. 1955 Amino acid decarboxylase of bacteria, "Methods in enzymology" (ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, H. O.) **11**: p. 185 ~ 187, Academic Press Inc. New York
15. Saier, M. H. and Jenkins, W. T. 1967 Alanine aminotransferase, *J. Biol. Chem.* **242**: 91 ~ 108
16. Schmit J. C. and Brody, S. 1975 *Neurospora crassa* conidial germination: Role of endogenous amino acid pools, *J. Biol. Chem.* **124**: 232 ~ 242
17. Schmit, J. C. and Brody, S. 1976 Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination, *Bacteriol. Reviews*, **40**: 1 ~ 41
18. Smith, L. I. and Opie, J. W. 1955 "Organic synthesis" (ed. by Horning, E. C.), p. 56 ~ 60, John Wiley & Sons, Inc., New York
19. Soda, K., Tochikura, T. and Katagiri, H. 1961 Studies on transamination in microorganisms, *Agric. Biol. Chem.* **25**: 811 ~ 819
20. Takabe, I. and Yanagita, T. 1959 Origin of amino acids constituting cellular protein in germinating conidiospores of *Aspergillus niger*, *Plant & Cell Physiol.* **1**: 17 ~ 28
21. Tiselius, A., Hjerten, S. and Levin, O. 1956 Protein chromatography on calcium phosphate columns, *Arch. Biochem. Biophys.* **65**: 132 ~ 155
22. 当山清善, 与那覇和雄, 知名定一 1979 泡盛麹菌のD-ロイシン酸化酵素, 琉大農学報 **26**: 115 ~ 123
23. 当山清善, 与那覇和雄 1978 泡盛麹菌の $\omega$ -アミノ酸:  $\alpha$ -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ 発酵と工業 **37**: 336
24. 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トランスアミナーゼ反応, 琉大農学報 **27**:
25. 柳田友道 1961 クロコウジカビ胞子の発芽の生理化学, 蛋白質・核酸・酵素 **6**: 140 ~ 150

### Summary

The activity of L-alanine: $\alpha$ -ketoglutarate transaminase in the cell-free extracts of various molds has been determined. A high activity of the transaminase was found in the cell-free extract of *Aspergillus awamori* IFO 4122 grown on sucrose-peptone medium with shaking, and the strain was chosen for characterization and purification of the enzyme. The enzyme catalyzed reversibly the transamination between L-alanine and  $\alpha$ -ketoglutarate producing L-glutamate and pyruvate. The enzyme was purified 55 fold from the cell-free extract, using ammonium sulfate fractionation and various chromatographic techniques. A molecular weight of 104,000 was obtained by gel filtra-

---

tion. The purified enzyme exhibits absorption maxima at 280nm, 320nm and 418nm, at pH 8.0. The purified enzyme was highly specific for L-alanine and the  $K_m$  value for L-alanine and  $\alpha$ -ketoglutarate was estimated to be 2.9 mM. The optimal pH and temperature for the transaminase reaction were 7.0 – 8.0 and 45°C, respectively.