

琉球大学学術リポジトリ

泡盛麹菌の D-ロイシン酸化酵素(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: 当山, 清善, 与那覇, 和雄, 知名, 定一, Toyama, Seizen, Yonaha, Kazuo, China, Teiichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4151

泡盛麹菌のD-ロイシン酸化酵素

当山清善*・与那覇和雄*・知名定一*

Seizen TOYAMA, Kazuo YONAHA and Teichi CHINA:
D-Leucine oxidase of *Aspergillus awamori*

I 緒 言

D-アミノ酸を酸化して α -ケト酸とアンモニアの生成反応を触媒するD-アミノ酸酸化酵素は動物組織、特に肝臓および腎臓に存在し、本酵素の酵素化学的性質や反応機構が明らかにされている。⁶⁾ 一方、微生物菌体中にも本酵素の存在が認められ、細菌^{2, 3)}および酵母¹¹⁾のD-アミノ酸酸化酵素についての研究が行われている。カビにおけるD-アミノ酸酸化酵素については、Emersonら¹⁾が*Penicillium*属に本酵素の存在を認め、Mizushimaら⁸⁾が麹菌の一種*Aspergillus ustus*よりD-グルタミン酸とD-アスパラギン酸を特異的に酸化する酵素を得ている。さらに、Mizushima⁹⁾は各種カビにおけるD-アミノ酸酸化酵素活性の分布を調べ、*Aspergillus oryzae*にD-グルタミン酸を特異的に酸化する酵素が存在することを明らかにした。著者らは泡盛麹菌における分枝鎖アミノ酸の代謝に関与する酵素系を明らかにすることを目的としてアミノ酸の酸化反応を触媒する酵素について調べた結果、泡盛麹菌菌体中にD-ロイシンを酸化して α -ケトイソカプロン酸の生成反応を触媒する酸化酵素が存在することが明らかとなった。本報では、各種泡盛麹菌の無細胞抽出液を酵素液としてD-ロイシン酸化酵素活性を調べるとともに、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

実験に供した菌株は、研究室保存の泡盛麹菌菌株および泡盛製造に使用する友種麹から分離した泡盛麹菌菌株である。

2. 培地組成と菌株の培養

供試菌株の培養に用いた液体培地はグルコース2.0%、ペプトン0.2%、リン酸第一カリウム0.2%、リン酸第二カリウム0.2%および硫酸マグネシウム0.05%を含む組成で、pH 5.5に調整後120°Cで20分間殺菌して使用した。前培養は上記液体培地5.0 ml'を試験管(1.8×18cm)に採り、供試菌株の孢子を接種し30°Cで24時間振とうして行った。本培養は500 ml'容振とうフラスコに上記液体培地130 mlを採り、前培養菌体を接種し30°Cで48時間振とうして行った。

* 琉球大学農学部農芸化学科

3. 酵素液の調製

麹菌菌体の無細胞抽出液は、本培養後の菌体を浚別して採り、0.85%食塩水および0.01 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で洗浄した菌体に海砂を加え乳鉢中で磨砕したのち、上記緩衝液で抽出して調製した。同抽出液中の菌体残渣および海砂を遠心分離(9,000rpm, 20分)により除き、上清液を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酵素液として用いた。

4. 蛋白質の定量

酵素液中の蛋白質の定量はLowry⁴⁾の方法に準じて行った。

5. 酵素活性の測定

酵素反応混液の組成は、D-ロイシン 20 μ moles, リン酸カリウム緩衝液(pH 8.0) 50 μ moles および酵素で、総量 1.0 ml とした。酵素反応は 37°C で 30 分間行ない、25%三塩化酢酸 0.1 ml を加えて反応を止め、遠心分離により除蛋白を行った。酵素活性の測定は、酵素反応で生成した α -ケトイソカプロン酸を3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)を用いるSodaの方法¹⁸⁾により次のように行った。除蛋白後の反応混液 0.5 ml に 1.0 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0) および 0.1% MBTH(塩酸塩) 0.8 ml を加え、50°C で 30 分間保ち、 α -ケトイソカプロン酸と MBTH との反応で生成したアジン化合物の 320 m μ における吸光度を測定した。本測定条件で α -ケトイソカプロン酸の量と 320 m μ における吸光度との関係を調べて検量線を作成し、酵素反応で生成した α -ケトイソカプロ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 α -ケトイソカプロン酸の 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. 泡盛麹菌におけるD-ロイシン酸化酵素活性の分布

Table 1は、グルコースペプトン含有液体培地で各種泡盛麹菌を振とう培養して得られた菌体の無細胞抽出液を酵素液として用い、D-ロイシン酸化酵素活性の分布を調べた結果である。供試菌株中AUR符号の菌株は泡盛製造において使用される友種麹から分離された泡盛麹菌である。表から明らかなように、すべての供試菌株に酵素活性が存在し、特に*Asp. awamori* IAM 2112, IAM 2088, IFO 4122, AUR 3140, AUR 107, 113 および 123の菌株で高い活性が得られた。以下の実験では比較的高い酵素活性を示した*Asp. awamori* IAM 2112菌株を用いた。

Table 1. Distribution of D-leucine oxidase in various strains of *Aspergillus awamori*

Strains of <i>Asp. awamori</i>		Specific activity	Strains of <i>Asp. awamori</i>		Specific activity
IFO	4033	0.005	AUR	3130	0.008
	4125	0.004		3140	0.020
	4314	0.007		109	0.009
	4122	0.020		107	0.021
IAM	2112	0.035	113	0.026	
	2391	0.009	123	0.025	
	2101	0.021	126	0.004	
	2088	0.025			

The growth medium (pH 5.5) contained 0.2% peptone, 1.0% glucose, 0.2% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 and 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. The molds preincubated were cultured in the medium at $30^\circ C$ on a reciprocating shaker for 48 hr. The mycelia were harvested by filtration through gauze and washed with distilled water, then pressed by hand between the filter papers to remove excess water. The pressed mycelia were ground in a mortar with sea sand and extracted with 0.01M potassium phosphate buffer (pH 7.0). The supernatant solution obtained by centrifugation was dialyzed against the same buffer and employed as the enzyme source. D-Leucine oxidase activity was assayed as follows; The reaction mixture (1.0 ml) contained $20\mu moles$ of D-leucine, $50\mu moles$ of potassium phosphate buffer (pH 8.0) and enzyme. Reaction was carried out at $37^\circ C$ for 30 min. α -Ketoisocaproate formed was determined. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme which catalyzes the formation of $1\mu mole$ of α -ketoisocaproate per min. The specific activity was expressed as unit per mg of protein.

2. 泡盛麹菌の培養時間と酵素活性

Table 1で高いD-ロイシン酸化酵素活性を示した *Asp. awamori* IAM 2112 菌株の液体振とう培養を行ない、培養時間と酵素活性との関係を調べたのがFig. 1である。本酵素は培養16時間目から生成され、最も高い酵素活性は培養48時間目で得られた。以下の実験では液体培地で本泡盛麹菌を48時間振とう培養を行ない、得られた菌体の無細胞抽出液を酵素液として用いた。なお、泡盛麹菌の培養過程における生育度を調べた結果、培養36~48時間目で高い生育度を示した。また、培養液のpHは培養時間とともに低下し、培養48時間目のpHは4.6であった。

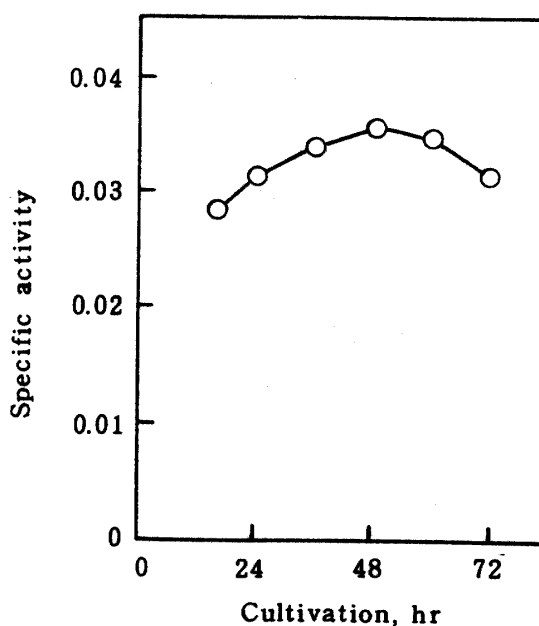


Fig. 1. Time course of D-leucine oxidase formation by *Asp. awamori* IAM 2112

Cultivation was carried out for the indicated time. Other conditions are similar to those in Table 1.

3. 酵素活性と酵素反応時間

泡盛麹菌の菌体から調製した酵素液を用いてD-ロイシン酸化酵素活性と酵素反応時間との関係を調べたのがFig. 2である。本酵素液はD-ロイシンを基質として α -ケトイソカプロン酸の生成反応を触媒し、本反応は反応60分まで直線的に進行した。また、酵素活性と酵素蛋白量との関係を調べた結果、 α -ケトイソカプロン酸の生成量は酵素蛋白量に比例し、蛋白量1.2mgまでは直線関係が得られた。

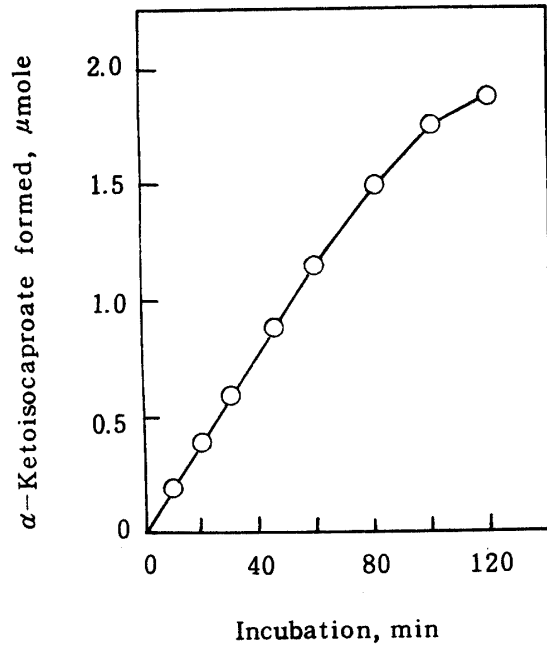


Fig. 2. α -Ketoisocaproate formation by the enzyme of *Asp. awamori* IAM 2112

Enzyme reaction was performed for the indicated time with 0.55mg of the enzyme. Other conditions are similar to those given in Table 1.

4. D-ロイシンの酸化反応

D-ロイシンの酸化反応における α -ケトイソカプロン酸の生成条件の検討を行ったのがTable 2で

Table 2. D-Leucine oxidation by the enzyme of *Asp. awamori* IAM 2112

Reaction system	α -Ketoisocaproate formed (μ moles)
Complete	0.750
Minus D-leucine	0
Minus enzyme	0
Boiled enzyme	0

Cultivation and assay conditions are similar to those given in Table 1. Enzyme used was 0.74 mg.

ある。 α -ケトイソカプロン酸はD-ロイシンが存在する反応系で生成され、反応系からD-ロイシンを除くと全く生成されない。また、反応系から酵素を除くかあるいは煮沸した酵素を含む反応系では α -ケトイソカプロン酸の生成は全くみられない。このことは麹菌菌体の無細胞抽出液中にD-ロイシンを基質として α -ケトイソカプロン酸の生成反応を触媒する酸化酵素が存在することを示している。

5. D-ロイシンおよびL-ロイシンの酸化反応

泡盛麹菌菌体から調製した酵素がL-ロイシンの酸化反応をも触媒するかどうかを確認するために、L-ロイシンを基質とした反応における α -ケトイソカプロン酸の生成を調べた。その結果はTable 3に示

Table 3. Oxidation of D-leucine and L-leucine by the enzyme of *Asp. awamori* IAM 2112

Amino acid	α -Ketoisocaproate formed (μ moles)
D-Leucine	0.870
DL-Leucine	0.850
L-Leucine	0.050

Cultivation and assay conditions are similar to those given in Table 1. Enzyme used was 0.85 mg.

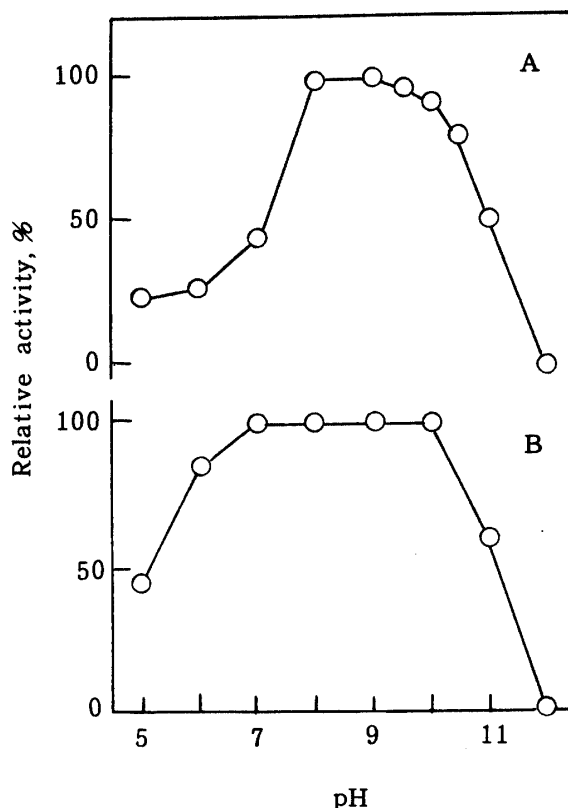
すようにL-ロイシンを基質とした反応でも α -ケトイソカプロン酸の生成がみられたが、その生成量はD-ロイシンを基質とした反応に比較して著しく低い値であった。DL-ロイシンを基質とした反応での α -ケトイソカプロン酸の生成量がD-ロイシンでの値と一致しており、このことはD-ロイシンを特異的に酸化する酵素が無細胞抽出液中に存在することを示している。

6. D-ロイシン酸化酵素反応に及ぼすpHの影響と酵素のpH安定性

Fig. 3 (A) は、D-ロイシン酸化酵素反応を各種pHで行ない、酵素活性とpHとの関係を調べた結果である。最も高い酵素活性はpH 8~9で得られ、pH 7.0 以下では活性が低く、pH 11.0 以上でも活性が低下した。酵素液を各種pHで37℃、10分間加温したのち酵素活性を測定して酵素のpH安定性を調べたのがFig. 3 (B) である。図から明らかなように、本酵素はpH 7~10で安定であり、pH 6以下およびpH 10以上では不安定であった。

Fig. 3. Effect of pH on the activity of D-leucine oxidase(A) and the enzyme stability (B)

The enzyme was prepared from *Asp. awamori* IAM 2112. The activity was assayed at various pH (A). The enzyme was incubated at various pH and 37°C for 10 min, and the activity was then assayed at pH 8.0 (B). Buffers used: Sodium acetate, pH 5-6; potassium phosphate, pH 6-8; Tris-HCl, 8-9; glycine-KCl-KOH, pH 9-11; K₂HPO₄-KOH, pH 10-12. Other assay conditions are similar to those given in Table 1.

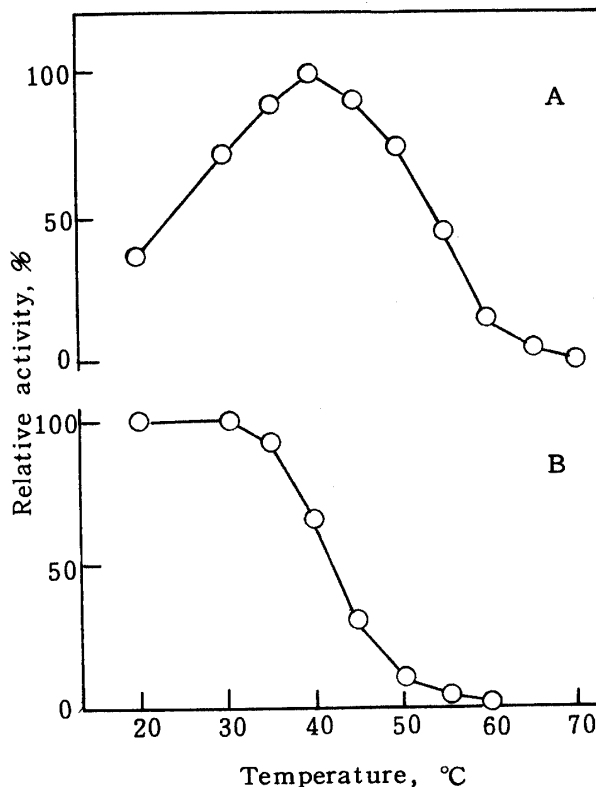


7. D-ロイシン酸化酵素反応に及ぼす温度の影響と酵素の熱安定性

D-ロイシン酸化酵素反応を各種温度で行ない、酵素活性と温度との関係を調べたのがFig. 4(A)である。酵素反応の最適温度は40°Cにあり、50°C以上では活性が急激に低下した。酵素液をpH 8.0に調製し、各温度で5分間保ったのち酵素活性を測定したのがFig. 4(B)である。本酵素は30°Cまでは安定であるが、温度の上昇とともに急激に失活した。このことは、基質が存在しないと本酵素は熱に不安定であることを示している。

Fig. 4. Effect of temperature on the activity of D-leucine oxidase (A) and the enzyme stability (B)

The enzyme was prepared from *Asp. awamori* IAM 2112. The activity was assayed at various temperatures (A). The enzyme was incubated at various temperatures and at pH 8.0 for 5 min, and the activity was then assayed. Other assay conditions are similar to those given in Table 1.



8. D-ロイシン酸化酵素活性に及ぼすD-ロイシン濃度の影響

D-ロイシンの酸化反応におけるD-ロイシン濃度と α -ケトイソカプロン酸の生成との関係を調べたのがFig. 5 (A)である。 α -ケトイソカプロン酸の生成は基質濃度に依存し、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調べるため、Lineweaver-Burkの逆数プロット法により基質濃度および反応速度の逆数をプロットしたのがFig. 5 (B)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、D-ロイシンに対する k_m 値は 1×10^{-3} Mであった。

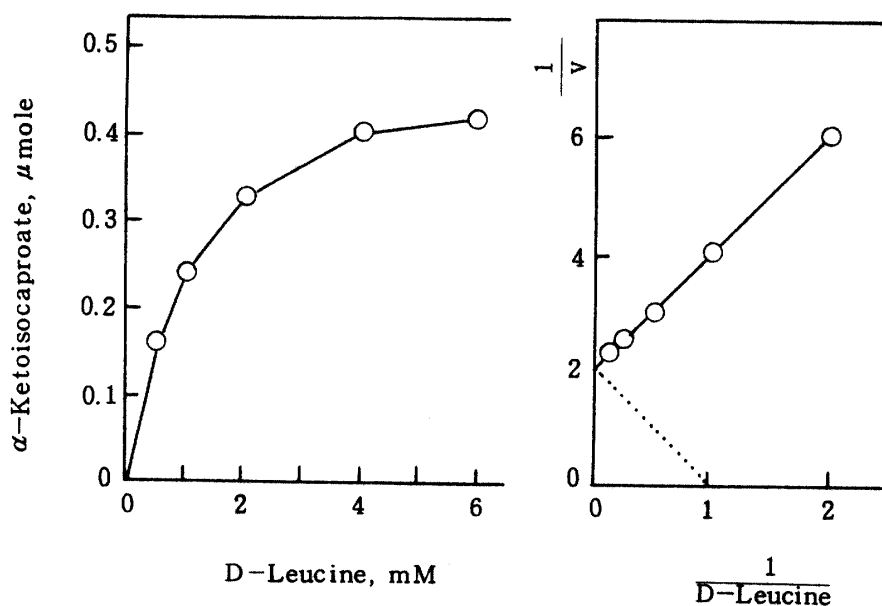


Fig. 5. Effects of varying concentrations of D-leucine on the rate (v) of the oxidase reaction

The enzyme was prepared from *Asp. awamori* IAM 2112. α -Ketoisocaproate was determined by the assay conditions given in Table 1, except concentrations of D-leucine. Enzyme used was 0.4 mg.

IV 考 察

微生物におけるD-アミノ酸酸化酵素の生産は培地組成によって異なり、Mizushima⁹⁾は *Aspergillus*, *Penicillium* および *Monascus* 属の菌株をD-グルタミン酸-グルコース培地で培養して得た菌体に活性が高く、ペプトン-グルコース培地養菌体では活性が低いことを報告している。また、Emersonら¹⁾は *Penicillium chrysogenum* を硫酸アンモニウム含有培地で培養すると酵素活性が低下することを認めている。本研究で、泡盛麹菌をペプトン-グルコース培地で培養すると各種菌株の菌

体にD-ロイシン酸化酵素活性が存在することが明らかになったのであるが、酵素活性と培地組成との関係についてはさらに検討する必要がある。

微生物が生産するD-アミノ酸酸化酵素はほとんどのD-アミノ酸を基質とすることができ、構造特異性は低い。*Pen. chrysogenum*¹⁾ および *Asp. oryzae*⁷⁾ から得た酵素ではD-ロイシン、D-メチオニンおよびD-アラニン等が良好な基質となり、*Asp. ustus*⁹⁾ の酵素ではD-グルタミン酸およびD-アスパラギン酸が良好な基質となる。酵母の *Trigonopsis variabilis*¹¹⁾ および *Candida tropicalis*³⁾ の酵素は多くのD-アミノ酸を基質とすることができる。本研究ではD-ロイシンを基質とした反応について調べたのであるが、泡盛麹菌酵素の基質特異性については今後調べる予定である。なお、泡盛麹菌の無細胞抽出液を酵素液としてL-型の分枝鎖アミノ酸の酸化反応について調べた結果、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリンおよびL-フェニルアラニンの酸化能を有する菌株が検索されたが、低い活性しか得られなかった。

D-アミノ酸の分布は極めて広く、動物では遊離の状態でも存在し、植物および微生物では結合型として見出されている^{10, 13)}。特に、微生物では細菌細胞壁またはペプチド性抗生物質の構成成分となっているが、泡盛麹菌菌体におけるD-アミノ酸の存在については知られていない。しかし、その他のカビ^{1, 9)}や酵母^{5, 11)}と同じく泡盛麹菌株もD-アミノ酸の質化分解能を有しているものと考えられる。最近、D-アミノ酸の定量やラセミ体の分割等において微生物起源酵素の利用が注目されており³⁾、泡盛麹菌酵素の利用性についても今後検討したい。

V 要 約

泡盛麹菌のD-ロイシン酸化酵素活性を調べた結果、本酵素活性が各種泡盛麹菌菌株の無細胞抽出液中に存在することがわかった。最も高い酵素活性を示した *Aspergillus awamori* IAM 2112 を用いて酵素の性質を調べた。本菌株をペプトン-グルコース培地で48時間振とう培養して得た菌体で高い酵素活性が得られた。本酵素はD-ロイシンを酸化して α -ケトイソカプロン酸の生成反応を触媒し、D-ロイシンに対するkm値は10mMであった。本酵素の反応至適pHは8.0~9.0で、反応至適温度は40°Cであった。

文 献

1. Emerson, R. L., Puziss, M. and Knight, S. G. 1950 The D-amino acid oxidase of molds, *Arch. Biochem.*, **25** 299~308
2. Izaki, K., Takahashi, H. and Sakaguchi, K. 1955 Degradation of D-glutamic acid in bacterium, *農化* **29** 176
3. Kawamoto, S., Kobayashi, M., Tanaka, A. and Fukui, S. 1977 Production of D-amino acid oxidase by *Candida tropicalis*, *J. Ferment. Technol.*, **55** 13~18
4. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193** 265~275
5. Laure, T. A. and Spencer, J. F. T. 1967 The utilization of D-amino acids by yeasts, *Can. J. Microbiol.*, **13** 777~788
6. Meister, A. 1965 *Biochemistry of the amino acids*, 2nd ed, Academic Press
7. Mizushima, S., Izaki, K., Takahashi, H. and Sakaguchi, K. 1956 Studies on the metabolism of D-amino acid in microorganisms, Part II. Oxidation of

- D-glutamic acid by a new enzyme of mold, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 20 36~41
8. Mizushima, S. and Sakaguchi, K. 1956 Studies on the metabolism of D-amino acid in microorganisms, Part III. On the presence of D-monoamino dicarboxylic acid oxidase, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, 20 131~134
 9. Mizushima, S. 1958 Studies on the metabolism of D-amino acid in microorganisms, Part 6. The occurrence of D-glutamic acid oxidizing enzymes in fungi, J. Gen. Appl. Microbiol. 4 12~20
 10. 小川正, 佐々岡啓 1976 天然におけるD-アミノ酸, 化学と生物 14 610~616
 11. SentheShanmuganathan, S. and Nickerson, W. J. 1962 Transaminase and D-amino acid oxidase of *Trigonopsis variabilis*, J. Gen. Microbiol. 27 465~471
 12. Soda, K. 1967 Spectrophotometric microdetermination of keto acids with 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone, Agric. Biol. Chem., 31 1054~1060
 13. 左右田健次 1978 D-アミノ酸の生化学, 化学 32 517~526, 627~635

Summary

The activity of D-leucine oxidase was distributed in various strains of *Aspergillus awamori*. A high activity of the enzyme was found in *Asp. awamori* IAM 2112, and the strain was chosen for characterization of the enzyme. When the strain was grown on peptone-glucose medium with shaking for 48 hr, the strong D-leucine oxidase activity of the cell-free extract was obtained. The enzyme catalyzed the oxidation of D-leucine to produce α -ketoisocaproate, and the Michaelis constant for D-leucine was 1×10^{-3} M. The enzyme had a maximum activity in the pH range of 8.0 - 9.0. The optimum temperature for the reaction was at 40°C.