

琉球大学学術リポジトリ

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(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, 石原, 昌信, 儀間, 勝, Toyama, Seizen, Yonaha, Kazuo, Ishihara, Masanobu, Gima, Masaru メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4152

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

当山清善*・与那覇和雄*・石原昌信*・儀間 勝*

Seizen TOYAMA, Kazuo YONAHARA, Masanobu ISHIHARA and
Masaru GIMA: L-Leucine : α -ketoglutarate transaminase
of the strain AY-634 of awamori yeast

I 緒 言

Ehrlich が酵母におけるアミノ酸の資化、分解についてその様式を確立して以来、その分解機構を解明するために多くの研究が行なわれ、特に、アルコール発酵過程における高級アルコール(フーゼル油)の生成との関係が明らかにされつゝある。⁶⁾ 植村¹⁷⁾は清酒酵母およびビール酵母によるアミノ酸の分解を調べ、アミノ酸が酸化的脱アミノ反応を受け α -ケト酸が生成されることを明らかにした。Bigger-Gehring¹⁾は、*Saccharomyces fragilis*が α -ケトグルタル酸と各種アミノ酸との間のアミノ基転移反応を触媒する酵素を有することを証明し、反応生成物としてグルタミン酸とケト酸の生成を確かめている。Sentheshanmuganathan⁹⁾は、*Sacch. cerevisiae*の無細胞抽出液中に各種アミノ酸のアミノ基転移反応およびその生成物であるケト酸の脱炭酸反応も触媒する酵素の存在を証明するとともに、脱炭酸反応生成物であるアルデヒド化合物の還元反応をも触媒する酵素の存在を明らかにした。しかし、酵母によるアミノ酸の資化・分解経路の第一段階であるアミノ基転移反応に関与するトランスアミナーゼの酵素化学的研究はほとんど行なわれていない。本研究は酵母におけるアミノ酸の代謝に関与する酵素系、特に醸造酵母におけるロイシン、イソロイシンおよびバリン等のアミノ基転移反応に関与するトランスアミナーゼの性質を明らかにすることを目的としている。本報においては、泡盛酵母におけるL-ロイシン： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ活性を調べるとともに、本酵素の性質を検討したので報告する。

II 実験方法

1. 供試菌株

実験に供した酵母菌株は泡盛醪から分離された泡盛酵母ならびに研究室保存の清酒酵母、ブドウ酒酵母および焼酎酵母等の菌株である。

* 琉球大学農学部農芸化学学科

2. 培地組成と供試菌株の培養

培地組成はグルコース 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 0.1%, 硫酸マグネシウム 0.05% および酵母エキス 0.05% で、pH 5.4 に調整し、120°C で 20 分間滅菌して使用した。供試菌株の前培養は培地 5.0 ml を試験管に採り 30°C で 20 時間振とうして行ない、本培養は 500 ml 容振とうフラスコに培地 150 ml を採り、前培養菌体を接種し 30°C で 24 時間振とうして行なった。

3. 酵素液の調製

本培養後の菌体を遠心分離により集菌後、0.85% 食塩水で洗浄し、さらに 0.1 mM ピリドキサル 5'-リン酸を含む 0.01 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した。洗浄菌体に酸化アルミニウムを加え乳鉢中で破碎し、上記緩衝液を加えて抽出を行なった。遠心分離により酸化アルミニウムおよび細胞残渣を除去し、上清液を上記緩衝液に対して一夜透析したものを酵素液として用いた。

4. 蛋白質の測定

酵素液中の蛋白質の測定は Lowry⁴⁾ の方法に従って行なった。

5. 酵素活性の測定

酵素液の組成は L-ロイシン 20 μ moles, α -ケトグルタル酸 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、総量を 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 を加えて反応を停止した。遠心分離により除蛋白質を行ない、上清液について生成したグルタミン酸の定量を行なった。グルタミン酸の定量は Soda¹²⁾ の方法に準じペーパークロマトグラフィー-ニンヒドリン法で行なった。酵素活性の単位は反応 1 分間に生成するグルタミン酸の μ mole 数で表わし、比活性は蛋白質 1 mg 当りの単位で示した。

III 結 果

1. 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活性

各種酵母をペプトン-グルコース液体培地で振とう培養して得られた菌体の無細胞抽出液を酵素として用い、 α -ケトグルタル酸をアミノ基受容体とする L-ロイシントランスアミナーゼ活性について調べたのが Table 1 である。AUR, AY 符号の菌株は泡盛醪から分離されたもので、耐アルコール性および耐酸性でアルコール発酵能の高い *Saccharomyces cerevisiae* タイプの泡盛酵母である。酵素活性は供試した泡盛酵母、清酒酵母 (Kyokai), 焼酎酵母 (SH₄), プドウ酒酵母 (OC No. 2) およびアルコール酵母 (No. 396) の各菌株に存在する。比較的高い活性を示した菌株は AY-632, AY-634, Kyokai No. 7 および SH₄ 等である。以下の実験では供試菌株で高い活性を示した AY-634 菌株を使用した。

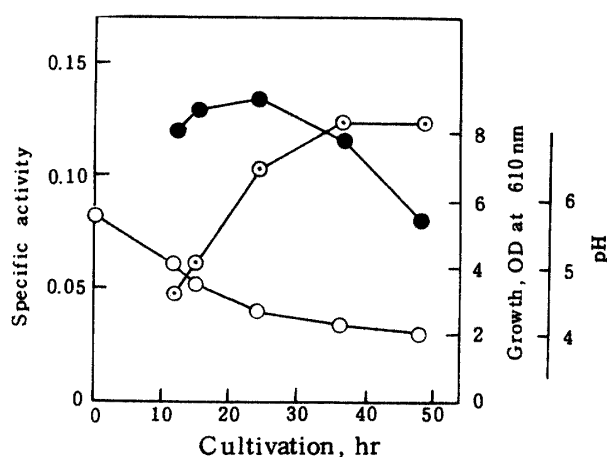
2. 酵母の培養時間と酵素活性

Fig. 1 は、泡盛醪から分離された AY-634 菌株をペプトン-グルコース培地で各時間培養し、得られた菌体の無細胞抽出液を用いて L-ロイシン： 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である。図から明らかなように、酵素活性は培養前期菌体中にも存在し、培養 24 時間目で最高の活性が得られる。最高の生育度を示す培養 36 時間目以降は活性が低下した。培養液の pH は生育に伴

Table 1. Distribution of L-leucine: α -ketoglutarate transaminase activity in various strains of yeasts

Strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Specific activity
AY 317	0.098
320	0.090
632	0.121
634	0.138
850	0.081
Kyokai No. 6	0.097
No. 7	0.114
No. 9	0.101
SH ₄	0.125
OC No. 2	0.082
No. 396	0.091

The growth medium consisted of 0.2% peptone, 2.0% glucose, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.05% yeast extract. The yeasts preincubated were grown in 150 ml of the medium at 30°C for 24 hr with vigorous shaking on a reciprocating shaker. The cells harvested by centrifugation were washed with 0.85% NaCl. The washed cells were disrupted by grinding in a mortar with aluminum oxide and extracted with 0.01M potassium phosphate buffer (pH 8.0), containing 10^{-5} M pyridoxal 5'-phosphate. The supernatant solution obtained by centrifugation was dialyzed against the same buffer and employed as the enzyme source. The standard reaction system consisted of 20 μ moles of L-leucine, 20 μ moles of α -ketoglutarate, 0.1 μ mole of pyridoxal 5'-phosphate, 50 μ moles of potassium phosphate buffer (pH 8.0) and enzyme in a final volume of 1.0 ml. Reaction was carried out at 37°C for 30 min and the reaction was terminated with 0.1 ml of 25% trichloroacetic acid. The glutamate formed was determined by paper chromatography. One unit of the enzyme was defined as the amount of enzyme which catalyzes the formation of 1 μ mole of glutamate per min. The specific activity was expressed as unit per mg of protein. The strains of AY were isolated from awamori mash.


 Fig. 1. Time course of L-leucine: α -ketoglutarate transaminase formation by the strain AY-634 of awamori yeast

Cultivation was carried out for the indicated time. Other conditions are the same as Table 1. Growth (○), Activity (●), pH (○)

ない低下し、培養40時間目で4.0になった。以下の実験に供した酵素液は培養24時間目で得られた菌体から調製した。

3. 培地中のL-ロイシンと酵素活性

L-ロイシントランスアミナーゼ活性に及ぼす培地中のL-ロイシンの影響を調べるために、L-ロイシン含有培地でAY-634菌株の培養を行なった。その結果はTable 2に示すように、ペプトン-グ

Table 2. Effect of L-leucine in the medium on transaminase activity

Medium	Growth OD at 610nm	pH	Specific activity
Peptone	6.96	4.60	0.135
Peptone + L-Leucine	6.43	3.94	0.131
L-Leucine	5.92	4.14	0.128

Strain AY-634 was grown in the medium contained 0.2% peptone or 0.2% L-leucine as nitrogen source, and the enzyme activity was determined. Other conditions are the same as Table 1.

ルコース培地にL-ロイシンを加えても酵素活性は変化せず、L-ロイシンを唯一窒素源とした培地でもほとんど同じ酵素活性が得られた。また、各種濃度のペプトン含有培地で供試菌株の培養を行ない酵素活性を調べたが、ペプトン濃度による比活性の差異はほとんどみられなかった。

4. 麹抽出液培養菌体の酵素活性

供試菌株はペプトン-グルコース培地でL-ロイシントランスアミナーゼを生成するが、麹抽出液を

Table 3. Effect of culture conditions on transaminase activity

Culture conditions	Growth OD at 610 nm	pH	Specific activity
Stationary	4.70	4.21	0.125
Shaking	9.20	3.90	0.037

Strain AY-634 was grown in the medium of koji-extract with stationary or shaking culture, and the activity was determined. Other conditions are the same as Table 1.

用いた培養菌体でも本酵素活性を有するかどうかを調べた。麹抽出液は泡盛麹菌を用いた米麹から抽出して調製し、ブリックス 10 および pH 5.4 に調製して用いた。培養は 48 時間振とうまたは静置して行なった。生育度、培養液の pH および酵素活性について調べた結果を Table 3 に示す。麹抽出液を用いて供試菌株を振とう培養すると良好な生育を示すが、酵素活性は著しく低い。一方、静置培養すると生育度は低いが酵素活性は高い値を示した。

5. L-ロイシン： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ反応と反応生成物の同定

α -ケトグルタル酸をアミノ基受容体とする L-ロイシントランスアミナーゼ反応におけるグルタミン酸の生成条件の検討を行なった。Table 4 は、AY-634 菌株の無細胞抽出液を酵素液として用い、各種反応系におけるグルタミン酸の生成を調べた結果である。酵素反応混液から L-ロイシンまたは α

Table 4. L-Leucine: α -ketoglutarate transaminase reaction by the enzyme of strain AW-634

Reaction system	Glutamate formed (μ moles)
Complete	2.43
Minus L-leucine	0
Minus α -ketoglutarate	0
Boiled enzyme	0

Cultivation and assay conditions are the same as Table 1.
Enzyme used was 0.6 mg.

α -ケトグルタル酸を除いた系ではグルタミン酸の生成はみられず、また煮沸して失活した酵素を用いた系でもグルタミン酸の生成はみられない。

次に、酵素反応で生成したグルタミン酸の光学的特性を確かめるために、本グルタミン酸が L-グルタミン酸脱炭酸酵素で脱炭酸反応を受けるかどうかを Najjar⁵⁾ の方法に従い Gilson のレスピロメーターを用いて調べた。その結果、生成したグルタミン酸は定量的に脱炭酸されることから L-型と同定された。さらに、酵素反応において L-ロイシンがアミノ基転移反応を受けて生成するケト酸を Friedemann ら³⁾ の方法に従って、4-ジニトロフェニルヒドラゾンとし、当山ら¹³⁾ の方法に従ってヒドラゾンの吸収スペクトルの測定およびペーパークロマトグラフィーを行なった。その結果、酵素反応で生成したケト酸のヒドラゾンは α -ケトイソカプロン酸のヒドラゾンと一致した。

6. 基質特異性

AY-634 菌株の無細胞抽出液中に存在する酵素が α -ケトグルタル酸をアミノ基受容体として L-ロイシン以外のアミノ酸のアミノ基転移反応をも触媒するかどうかを検討した。Table 5 は、各種アミノ酸をアミノ基供与体とした反応において生成するグルタミン酸を定量し、比活性について比較した結果である。L-ロイシンとともに、L-イソロイシンおよび L-バリンが本酵素の良好な基質となった。L-フェニルアラニンおよび L-スレオニンも弱いながら本酵素の基質となり得た。一方、本酵素のアミノ基受容体としては α -ケトグルタル酸が活性を示し、ピルビン酸は基質となりえなかった。

Table 5. Transaminase reactions between various amino acids and α -keto-glutarate by the enzyme of strain AY-634

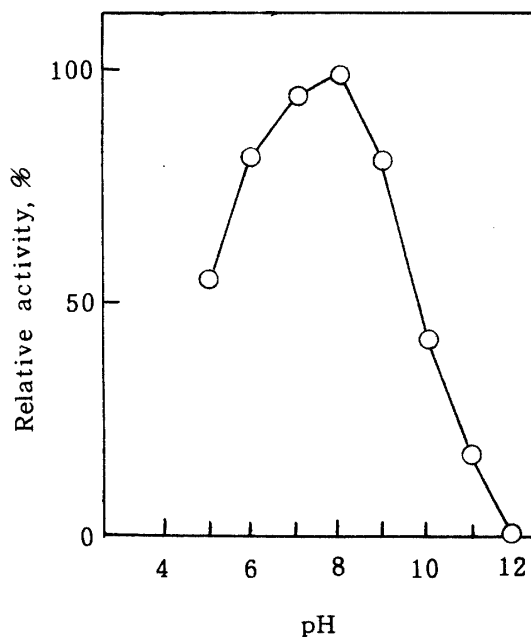
Amino acids	Specific activity
L-Leucine	0.133
L-Isoleucine	0.131
L-Valine	0.130
L-Threonine	0.019
L-Phenylalanine	0.053

Cultivation and assay conditions are the same as Table 1.

7. 酵素活性に及ぼすpHの影響

L-ロイシン： α -ケトグルタル酸トランスアミナーゼ活性とpHとの関係を調べるために、酵素反応を各pHで行ない活性を測定したのがFig. 2である。AY-634菌株から調製した酵素の反応最適pHは8.0にあり、pH 7.0以下およびpH 9.0以上では活性が低下した。また、本酵素のpH安定性を調べるために酵素液を各種pHで加温処理（37°C, 30分）を行なった。その結果、ピリドキサル-5'-リン酸が存在しないと本酵素はpH 8.0でも不安定で失活現象がみられた。

Fig. 2. Effect of pH on the transaminase activity.



The enzyme was prepared from strain AY-634. The activity was assayed at various pH. Other assay conditions are the same as Table 1. Buffer used: sodium acetate, pH 5-6; Tris-HCl, pH 8-9; Glycine-KCl-KOH, pH 9-11; K₂HPO₄-KOH, pH 10-12

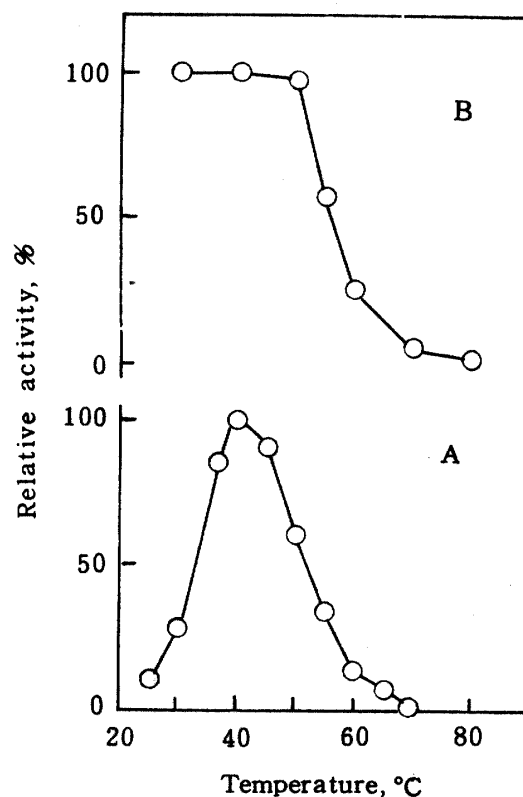
8. 酵素活性に及ぼす温度の影響と酵素の熱安定性

AY-634菌株からえた酵素によるトランスアミナーゼ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. 3 (A)である。酵素反応の最適温度は40°Cにあり、反応温度45°Cでも高い活性を示した。また、本酵素の熱安定性を調べるためにピリドキサル-5'-リン酸存在下(0.01mM)

で酵素液をpH 8.0, 各温度で5分間処理したのち酵素活性を測定したのがFig. 3 (B)である。本酵素は50°C 処理でも安定であるが, 55°C 以上では急激に失活した。しかし, ピリドキサル-5'-リン酸が存在しないと40°C でも本酵素は不安定であった。

Fig. 3. Effect of temperature on the transaminase activity and the enzyme stability

The enzyme was prepared from strain AY-634. The activity was assayed at various temperatures (A). The enzyme was incubated at various temperatures and at pH 8.0 for 5 min in the presence of pyridoxal 5'-phosphate, and the activity was then assayed (B). Other conditions are the same as Table 1.



IV 考 察

微生物におけるアミノ基転移反応を触媒する酵素については多くの研究があり, 特に細菌起源の各種酵素が精製され酵素化学的性質が明らかにされている²⁾。著者ら^{14) 15)}も細菌から ω -アミノ酸トランスアミナーゼの単離精製を行ない酵素化学的性質を明らかにした。酵母起源のトランスアミナーゼについては*Sacch. fragilis*,¹⁾ *Sacch. cerevisiae*^{8) 9)} および *Trigonopsis variabilis*¹⁰⁾ 等に酵素の存在が確かめられているが, 酵素化学的性質についての研究は極めて少ない。

本研究で, 泡盛酵母の無細胞抽出液中にL-グルタミン酸と α -ケトイソカプロン酸の生成反応を触媒する酵素が存在することが明らかとなった。本酵素は, 酵母による高級アルコール類の生成と関連がある分枝鎖アミノ酸のL-ロイシン, L-イソロイシンおよびL-バリンに対して高い活性があり, またL-スレオニンおよびL-フェニルアラニンも本酵素の基質となった。*Senthe Shanmuganathan*⁹⁾ は *Sacch. cerevisiae* の無細胞抽出液中に α -ケトグルタル酸をアミノ基受容体としたトランスアミナーゼの存在を認め, ロイシン等多くのアミノ酸が基質となりえたが, 部分精製酵素はチロシンに特異的であることを報告している。供試泡盛酵母から得た酵素の基質特異性については, 酵素の単離精製を行ない詳しく調べる必要がある。

最近, SchulthessとEttliger⁷⁾ は *Sacch. cerevisiae* による高級アルコールの生成と培地中の分枝鎖アミノ酸との関係を調べ, イソアミルアルコール, 活性アミルアルコールおよびイソブタノールの生成が, それぞれロイシン, イソロイシンおよびバリン濃度に関係することを報告している。L-ロイシン含有培地で供試泡盛酵母の培養を行ない酵素活性を調べたが, 無細胞抽出液中の酵素活性は培地に加えるL-ロイシンによってほとんど影響されなかった。しかし, 麹抽出液を用いた培養において振とう

培養菌体よりも静置培養してえた菌体の酵素活性が高く、培養条件が酵素活性に影響することを示しており、さらに検討する必要がある。

高級アルコールは酵母における炭水化物の代謝過程で生成した α -ケト酸を経て生成されることも知られており、⁶⁾Yoshizawa¹⁶⁾は洗浄酵母菌体を用いてピルビン酸から高級アルコールが生成されることを明らかにした。酵母のトランスアミナーゼ活性は、培地中の窒素源、特に分枝鎖アミノ酸と菌体内における炭水化物の代謝産物の濃度バランスに関係しているものと考えられる。SinghとKunkee¹¹⁾はブドウ酒酵母におけるアルコール脱水素酵素活性と高級アルコールの生産性との間に相関があることを報告しており、トランスアミナーゼ活性との関係についても泡盛酵母を用いて検討したい。

*Sacch. fragilis*¹⁾および*Sacch. cerevisiae*⁹⁾からえられた酵素はピリドキサル-5'-リン酸の添加で活性が増加しているが、泡盛酵母から調製した酵素の活性はほとんど影響されなかった。しかし、ピリドキサル-5'-リン酸は酵素の熱失活に対して保護効果がみられた。本酵素の補酵素については、酵素の単離精製を行なって詳しく調べたい。

V 要 約

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活性を調べた結果、本酵素活性が各種の醸造用酵母に存在することがわかった。高い活性が泡盛膠から分離された泡盛酵母AY-634菌株で得られたので、本菌株を用いて酵素の性質を調べた。本菌株をペプトン-グルコース培地で振とう培養してえた菌体の無細胞抽出液はL-ロイシンと α -ケトグルタル酸からL-グルタミン酸と α -ケトイソカプロン酸を生成するアミノ基転移反応を触媒した。培地にL-ロイシンを加えても活性の増加はみられなかったが、本菌株を麴抽出液培地で培養すると高い活性が得られた。本酵素はL-イソロイシン、L-バリン、L-スレオニンおよびL-フェニールアラニンのアミノ基転移反応も触媒した。本酵素の反応至適pHは8.0で、至適温度は40°Cであった。本酵素はピリドキサル-5'-リン酸の存在下で熱に安定であった。

文 献

1. Bigger-Gehring, L. 1955 Transaminase reactions in *Saccharomyces fragilis*, J. Gen. Microbiol., 13 45~53.
2. Braunstein, A. E. 1973 Amino group transfer, The enzymes (ed. by Boyer, P. D.), IX p. 379~481. Academic Press Inc.
3. Friedemann, T. and Haugen, G. E. 1943 Pyruvic acid, II. The determination of keto acids in blood and urine, J. Biol. Chem., 147 415~442
4. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the Phenol reagent, J. Biol. Chem., 193 265~275
5. Najjar, V. A. 1955 Amino acid decarboxylase of bacteria, Methods in enzymology (ed. by Colowic, S. P. and Kaplan, N. O.) II p. 185~189, Academic Press Inc.
6. Rainbow, C. 1970 Brewer's yeasts, The yeasts (ed. by Rose, A. H. and Harrison, J. H.), Vol. 2, p. 147~224

7. Schulthess, D. and Ettlinger, L. 1978 Influence of the concentration of branched chain amino acids on the formation of fusel alcohols, *J. Inst. Brew.*, **84** 240~243
8. SentheShanmuganathan, S. 1960 The mechanism of the formation of higher alcohols from amino acids by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.*, **74** 568~576
9. SentheShanmuganathan, S. 1960 The purification and properties of the tyrosine-2-oxoglutarate transaminase of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.*, **77** 619~625
10. SentheShanmuganathan, S. and Nickerson, W. J. 1962 Transaminase and D-amino acid oxidase of *Trigonopsis variabilis*, *J. Gen. Microbiol.*, **27** 465~471
11. Singh, R. and Kunkee, R. 1976 Alcohol dehydrogenase activities of wine yeasts in relation to higher alcohol formation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **32** 666~670
12. Soda, K., Tochikura, T. and Katagiri, H. 1961 Studies on transamination in microorganisms, *Agric. Biol. Chem.*, **25** 811~819
13. 当山清善, 安田正昭, 左右田健次 1975 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンを用いるタウリン-ピルビン酸トランスアミナーゼの活性測定法, *琉大農学報* **22** 215~223
14. 当山清善, 宮里興信, 当間孝子, 左右田健次 1973 細菌の細胞懸濁液によるタウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応について, *琉大農学報* **20** 105~113
15. Yonaha, K., Toyama, S., Yasuda, M. and Soda, K. 1977 Properties of crystalline ω -amino acid:pyruvate aminotransferase of *Pseudomonas* sp. F-126, *Agric. Biol. Chem.*, **41** 1701~1706
16. Yoshizawa, K. 1965 The formation of isobutanol and isoamylalcohol from pyruvic acid by washed yeast cells, *Agric. Biol. Chem.*, **29** 672~677
17. 植村定郎 1944 微生物によるL-アミノ酸分解に関する研究(第2報), 諸種の酵母によるL-フェニルアラニン, L-チロシンの分解及び清酒並びに麥酒酵母によるL-チロシンよりチロソールの生成に就て, *農化* **20** 295~303 .

Summary

The activity of L-leucine: α -ketoglutarate transaminase was distributed in various strains of brewer's yeasts. A high activity of the enzyme was found in the strain AW-634 of awamori yeast isolated from awamori mash, and the strain was chosen for characterization of the enzyme. The cell-free extract of the strain grown on peptone-glucose medium with shaking catalyzed the transamination reaction between L-leucine and α -ketoglutarate to produce L-glutamate and α -ketoisocaproate. The enzyme activity was not enhanced by addition of L-leucine to the medium. When the strain was grown on koji-extract medium with stationary culture, the strong activity was obtained. The enzyme also catalyzed the transamination of L-isoleucine, L-valine, L-threonine and L-phenylalanine to α -ketoglutarate. The pH and temperature optima for the activity were 8.0 and 45°C, respectively. The enzyme was heat stable at pH 8.0 in the presence of pyridoxal 5'-phosphate.