HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Aspergillus oryzae による amylase の生成及び分泌について （第１報）
Author(s)	中村, 幸彦; 菅原, 四郎
Citation	北海道大學農學部邦文紀要, 2(3), 23-29
Issue Date	1955-10-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11588
Type	bulletin (article)
File Information	2(3)_p23-29.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Aspergillus oryzae による amylase の生成及び分泌について (第1報)*

中村幸彦・菅原四郎**

Studies on the formation and secretion of amylase by *Aspergillus oryzae* (Part I)

By

Yukihiko NAKAMURA and Shiro SUGAWARA

(Department of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

緒　言

Amylase の産生機構に関しては既に幾つかの報告が行われている。

L.E. Hokins (1951)[1]は動物の膵臓に於ける実験に於て, glucose の存在が必要であり且つ amylase 生成のための不可欠のアミノ酸を指摘している。然し微生物を用いての研究では, 田辺氏 (1954) 等によると[2,3] Asp. oryzae では澱粉, maltose 以外の炭素源では生成の遅れることから, 適応的生産であるとし, 更に有機酸, 燐酸の問題につき研究し, また P. Shu 等[4] (1951) は Asp. niger の適応的生産を報告している。しかし福本氏等[5](1952) によると Bac. amyloliquefaciens に於ては glucose, pyrvic acid, succiic acid も優れた炭素源でありまた燐酸塩の添加なき時は生成が行われないと報告している。

著者等は Asp. oryzae の菌体 homogenate による実験から上述の報告と異つた結果を一部得たので報告する。

実 験 結 果

實験材料及び方法：

麹菌は既に田辺氏等[2]も報告せる如く, glycerin を炭素源とする合成培地に於ては殆ど amylase を生産しない。著者等は amylase を含まぬ菌体 homogenate を得るため, 菌体を集めるのに使用した培養基は, 1 l 中 glycerin 30 g; NH_4NO_3 5 g; K_2HPO_4 2 g; KCl 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g; $FeSO_4$ 0.01 g なる組成を有するものである。この培養基に胞子懸濁液 2 cc を添加し, 30°C で約 50 時間培養する。

菌体 homogenate は, 培養終了後菌体を集め滅菌水にて洗滌し, 約10秒 Waring blendor にかけ, これを滅菌水に懸濁したものを使用した。

実験方法は一般に, 200 cc 三角フラスコに homogenate suspension 10 cc(乾物として約 50 mg); M/15 燐酸塩 15 cc(pH 6.8) 及び試験すべき物質を加え全量を 30 cc とし, 30°C, 24時間保つ。24時間後濾過し, 濾液を外生酵素(exogenous enzyme)とし, 菌体は水洗後アセトンで洗滌乾燥し M/10 醋酸緩衝液(pH 5.0)10 cc で抽出し内生酵素 (endogenous enzyme) として用いる。

amylase 作用の測定は酵素液 5 cc; 1% sol. starch 10 cc; M/10 醋酸塩緩衝液(pH 5.0) 10 cc の混液より 10 cc をとり反応 (40°C, 30 分) 前後の還元力の差を求める。糖の測定は小林, 田淵氏[6]による Somogyi 変法を用い, amylase の活性は N/20 $Na_2S_2O_3$ の滴定数で表わした。即ち以後の図及び表に於ては外生酵素は 5 cc 酵素液による N/20 $Na_2S_2O_3$ 滴定数の 6 倍, 内生酵素は 2 倍した数値をもつて表示した。

実験結果：

§1. 糖類及び糖誘導体の影響

糖類の生成効果は maltose 及び sol. starch 以外には認められない(第1表)。また**第1図**及び**第2図**に於ける如く Jodoacetate の添加により糖の消費

---

* 酵素の生成及び転換に関する研究 (第一報)

** 北大農学部農芸化学教室

第1表 各種単糖類及び二糖類の amylase 生成効果

単糖類

	exo.	endo.	total
glucose	2.34	0.18	2.52
fructose	1.20	0.04	1.24
mannose	1.08	0.06	1.14
galactose	0.90	0.16	1.06
(none)	2.64	0.20	2.84

二糖類

	exo.	endo.	total
maltose	16.80	0.66	17.46
cellobiose	1.80	0	1.80
trehalose	2.16	0	2.16
sucrose	1.68	0.26	1.94
lactose	0.24	0.08	0.32
(none)	1.44	0.18	1.62

(糖類各 100 mg)

第2表 麦芽糖並に澱粉誘導体の amylase 生成効果

麦芽糖誘導体

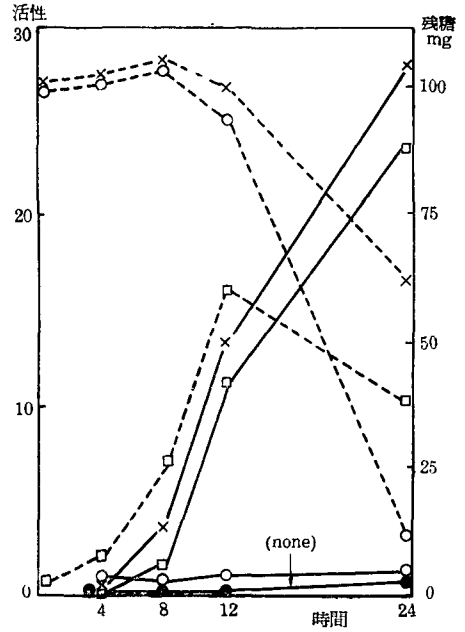
	exo.	endo.	total	%
maltose	28.20	3.02	31.22	(100)
acetate	5.28	0.98	6.26	20
oson	0.90	0.14	1.04	
osazone	1.32	0	1.32	
bionic acid	0.54	0.06	0.60	
(none)	0.60	0.06	0.60	

澱粉誘導体

	exo.	endo.	total	%
sol. starch	24.54	0.78	25.32	(100)
acetate	4.50	0	4.50	18
butyrate	1.86	0.10	1.96	
benzoate	5.46	0.26	5.72	23
(none)	0.66	0	0.66	

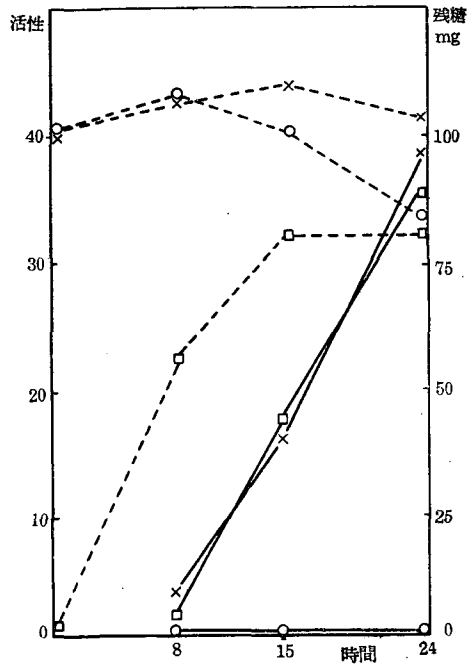
(誘導体及び糖：各 100 mg)

分解を抑制しても amylase の生成は全く抑制されぬばかりか第7表及び第8表より明らかなる如くむしろ増大している。更に，麹菌により分解消費を受けない糖誘導体の添加によつても，麦芽糖では acetate，澱粉では acetate, butyrate 及び benzoate に於てそ



○ glucose; × maltose; □ sol. starch.
—— アミラーゼ活性; ····· 残糖。

第1図 糖消費とアミラーゼ生成との関係



記号は第1図と同じ。
Jodo-acetate M/100 存在。

第2図 Jodo-acetate の存在に於ける糖消費とアミラーゼ生成との関係

れぞれある程度生成効果が認められた(第2表)。

§2. 有機酸類の amylase 生成効果

第3表 有機酸の amylase 生成効果

	exo.	endo.	total
pyrvic	0	0.02	0.02
succinic	0	0.06	0.06
malic	0	0.02	0.02
tartaric	0	0.16	0.16
citric	0	0	0
acetic	0	0	0
(none)	0	0.16	0.16

(有機酸各 Na-塩として 100 mg)

第4表 maltose 存在に於ける有機酸の amylase 生成に及ぼす影響

	exo.	endo.	total	%
pyrvic	31.80	1.64	33.44	82
succinic	38.04	2.24	40.28	98
malic	13.20	0.50	13.70	32
tartaric	44.82	3.52	48.34	118
citric	38.28	1.60	39.88	97
acetic	47.40	1.44	48.84	119
(maltose, only)	38.28	2.64	40.92	(100)
(none)	0.90	0.24	1.14	

(maltose 100 mg; 有機酸各 Na-塩として 50 mg)

即ち第3表に於ける如く所謂 Krebs' cycle に含まれるような有機酸は単独では amylase 生成のための基質とはならない。amylase が生成され得るような条件では(第4表), tartaric 及び acetic acid は促進するが malic acid は強い阻害作用を示すことが分つた。

§3. アミノ酸及び蛋白質の amylase 生成に及ぼす影響

casein の酸加水分解液及びアミノ酸混合液 (L-lysine; L-histidine; L-glutamic acid; DL-serine; DL-valine; L-proline; L-leucine; L-aspartic acid; L-phenylalanine; glycine; L-asparagine; L-tyrosine; L-tryptphan; L-alanine; DL-isoleucine; L-methionine; L-arginine; L-cystine; DL-threonine) を基質として用いても amylase は全く生成されず, 各アミノ酸単独の場合に於ても同様である。amylase の生成が行われるような条件に於ては (第5表) cysteine が約 30% 抑制する以外は影響は殆ど認められない。

蛋白質並びにペプトンの場合も (第6表) アミノ酸と同様の結果であつた。

第5表 maltose の存在に於けるアミノ酸及びアミノ酸混合液の amylase 生成に及ぼす影響

	exo.	endo.	total	%
L-lysine	61.38	3.70	65.08	106
L-histidine	55.98	2.82	58.80	96
L-asp. acid	61.98	3.94	65.92	107
L-glut. acid	60.30	3.56	63.86	104
L-phenylala.	56.64	3.00	59.64	98
glycine	57.30	2.96	60.26	98
L-tyrosine	54.72	3.60	58.32	95
DL-isoleucine	55.50	3.28	58.78	95
L-arginine	56.64	3.34	59.98	97
L-alanine	54.60	2.88	57.48	93
L-cysteine	41.34	1.32	42.66	69
amino acids mixture	61.78	4.60	66.38	108
(maltose, only)	58.56	3.00	61.56	(100)
(none)	1.74	0.26	2.00	

(maltose 100 mg; アミノ酸 30 mg)

第6表 蛋白質及びペプトンの amylase 生成に及ぼす影響

	exo.	endo.	total
Egg albumin	4.08	0.16	4.24
maltose + egg albu.	33.72	2.16	35.88
maltose + peptone	35.22	1.78	37.00
(maltose, only)	40.74	2.40	43.14
(none)	3.42	0.14	3.56

(maltose 100 mg
蛋白質及びペプトン { 単独の場合 100 mg
併用 〃 50 mg)

§4. 燐酸塩の amylase 生成に対する影響及び培地濃度と生成との関係

燐酸塩の amylase 生成に及ぼす影響として先ず燐酸の関与する系を阻害する物質の影響を調べた (第7表及び第8表)。DNP, Jodo-acetate, Na_2HAsO_4, K_3AsO_3 の中, K_3AsO_3 が最も強く生成を抑制し燐酸塩 M/30 の存在で 3×10^{-3} M の添加により 60%抑制され, 燐酸塩を与えぬ時は K_3AsO_3, Na_2HAsO_4 共に完全に amylase の生成を抑制する。DNP も同様で燐酸塩を外部より与えぬ時は 3×10^{-4} M で約 50% 抑制するが, Jodo-acetate は第2図にも示した如く

抑制作用は認められず，むしろかなり促進せしめている。また，24時間後に於ける菌体 homogenate 量の増加は amylase 生成の抑制作用の大なるものほど低下している（なお嫌気的には amylase は全く生成されない）。

Amylase 生成を増大せしめる Jodo-acetate に於ては，菌体量も無添加のものに比して大きい値を示しているが，しかし増殖に平行的と考えられるべき糖の消費は DNP, K_3AsO_3, Na_2HAsO_4 と同様に抑制されており，しかも Jodo-acetate に於て最も強く抑制されている（第9表）。なお第9表に於て 24 時間後の残糖が初糖以上の定量値を示しているものがあるが，すべて maltose として定量した数値である。

第7表 DNP, Jodo-acetate, K_3AsO_3, Na_2HAsO_4 の amylase 生成に対する影響（燐酸塩 M/30 存在の場合）

		exo.	endo.	total	%	菌体量
						mg
(none)		1.62	0.22	1.84		76
(maltose, only)		43.74	3.20	46.94	(100)	76
DNP	3×10^{-4}M	41.52	3.38	44.90	96	72
	1.5×10^{-4}M	43.68	3.36	47.04	100	78
Jodo-acetate	3×10^{-3}M	53.10	10.10	63.20	135	82
	1.5×10^{-3}M	51.30	8.54	59.84	129	84
Na_2HAsO_4	3×10^{-3}M	42.12	2.62	44.74	96	69
	1.5×10^{-3}M	47.94	4.00	51.94	111	78
K_3AsO_3	3×10^{-3}M	16.20	1.66	17.86	38	57
	1.5×10^{-3}M	41.40	4.08	45.48	97	66

(maltose 100 mg; 燐酸塩 M/30; 使用菌体 52 mg)

第8表 DNP, Jodo-acetate, K_3AsO_3, Na_2HAsO_4 amylase 生成に対する影響（燐酸塩存在せざる場合）

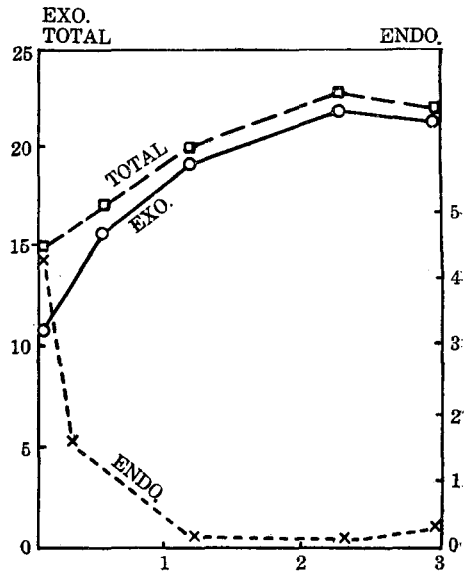
		exo.	endo.	total	%	菌体量
						mg
DNP	3×10^{-4}M	5.82	7.06	12.88	52	56
Jodo-acetate	3×10^{-3}M	11.94	13.80	25.74	105	58
Na_2HAsO_4	3×10^{-3}M	3.18	0.38	3.56	0	38
K_3AsO_3	3×10^{-3}M	2.40	0.28	2.68	0	35
燐酸塩	$^1/_{30}$M	40.74	2.40	43.14		61
(maltose, only)		15.48	9.06	24.54	(100)	68
(none)		3.42	0.14	3.56		51

(maltose 100 mg; 燐酸塩なし; 使用菌体 45 mg)

第7表及び第8表より燐酸塩が amylase 生成に関与することは明らかであるが，次に燐酸塩濃度と生成との関係について検討した。この結果を**第3図**及び**第4図**に示す。第3図に於ては incubation flask の内容は homogenate-maltose-phosphate であつて，この場合は燐酸塩の濃度低下と共に外生酵素は減少し，内生酵素は増加している。そして total amylase は 1/45 M の燐酸塩濃度に於て peak value を示し，燐酸塩を全く添加しない時は約 30 % 生成は低下してい

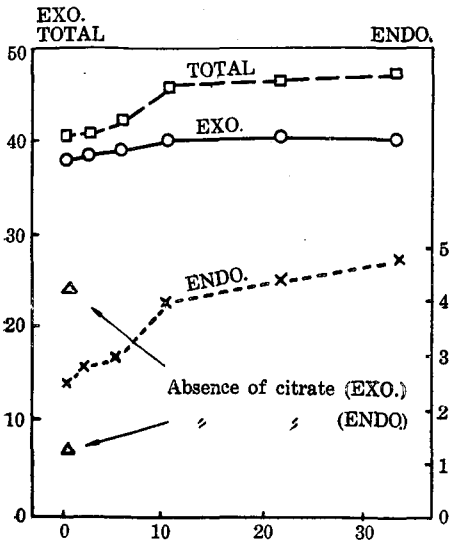
第9表 DNP, Jodo-acetate, K_3AsO_3, Na_2HAsO_4 の添加による糖の消費

			初糖	残糖
			mg	mg
DNP 3×10^{-4}M	燐酸塩	M/30	97.7	38.7
	〃	0	101.3	87.5
Jodoac. 3×10^{-3}M	〃	M/30	100.4	72.9
	〃	0	99.6	(139.1)
Na_2HAsO_4 3×10^{-3}M	〃	M/30	100.4	47.0
	〃	0	102.4	93.2
K_3AsO_3 3×10^{-3}M	〃	M/30	114.2	(117.9)
	〃	〃	111.1	(121.5)
無添加	〃	M/30	100.8	52.7
	〃	0	101.3	71.2



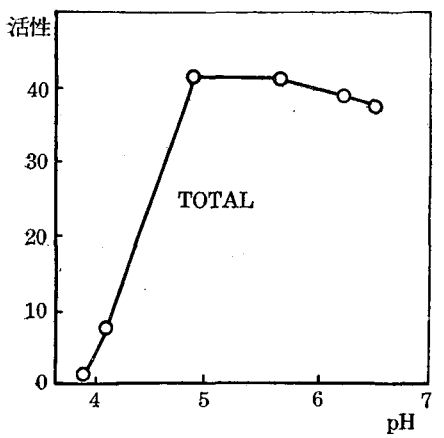
基質：maltose 100 mg.

第3図 燐酸塩濃度のアミラーゼ生成に及ぼす影響(1) buffer として phosphate のみの場合



基質：maltose 100 mg.
Citrate は citrate-NaOH (M/10) buffer として使用した。

第4図 燐酸塩濃度のアミラーゼ生成に及ぼす影響 (2) Phosphate + Citrate の場合



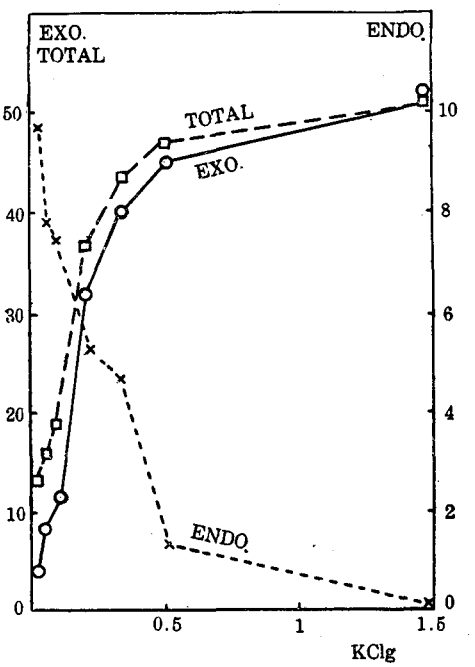
基質：maltose 100 mg.
pH は final pH.

第5図 アミラーゼ生成と pH の関係

る(なおこの場合, final pH は燐酸塩濃度の低くなる程低下し濃度0に於て pH 5.1 であるが, この程度の pH 低下は第5図に示した如く amylase 生成には殆ど変りない)。

然るに上記の実験条件では, 燐酸塩の濃度低下は同時に培地中の全物質濃度が低下していることになる。そこで各 flask の内容の濃度を一定にするために燐酸塩の減少量を M/10 citrate buffer で補つてやると, 第4図に示した如く燐酸塩の濃度の相異による生成量には殆ど差が認められない。なお citrate は第3表及び第4表より明らかな如く amylase 生成に対して何等影響を示さない。

また次に, これらの実験結果より考えれば, amylase の生成と分泌は麹菌細胞のおかれている medium の濃度が大いに関係してくることが予想される。そこで一例として燐酸塩濃度を一定にして, これに種々の量の KCl を添加した時の amylase の生成量並びに分泌量の測定結果を第6図に示した。即ち KCl 濃度の低い程菌体に保持される酵素量が増大し, 濃度が大となるに従い分泌される酵素量が増加し, 全体として KCl 濃度と共に生成量は増大している。



基質：maltose 100 mg.
Phosphate M/30; pH 6.8

第6図 培地濃度とアミラーゼ生成との関係 (KCl 濃度の影響)

考　　察

酵素の適応的生成は, そこに生成される酵素により "attack" されるべき基質の存在する時に生成されると一般的に考えられる。著者等の実験結果に於ては,

amylase の基質とはなり得ない maltose が澱粉と同程度の amylase 生成効果を有し，且つ glucose 等の単糖類，β-glucoside 結合を有する cellulobiose，α-1, 1-glucoside 結合の trehalose，さらに sucrose, lactose に於ては生成効果が認められない．この結果は麹菌 homogenate による amylase 生成は α-1, 4-glucoside linkage に対する適応的生成と考えられる。細菌 amylase について報告されているところでは[5] glucose, citric acid, pyrvic acid も amylase 生産のための優れた炭素源であるとされているが，著者等の実験では Krebs' cycle に含まれる各有機酸及びアミノ酸，蛋白質等は何れも全く生成効果を有しない．

従つて麹菌 homogenate による amylase 生成のための炭素源は単なるエネルギー源としてではなく特定の linkage を有するものが必要であることが強調あれる．このことはさらに麹菌により分解消費され得ない maltose 及び澱粉の誘導体に於ても amylase を生成せしめるものがあることからも云い得よう．

また，jodo-acetate の如く，呼吸は阻害しないが糖の消費は抑制される場合，jodo-acetate を添加しないものに比して，amylase 生産量が高いのは，糖消費の抑制により基質濃度が高く保たれている結果と考えられるもので，麹菌 homogenate に於ては，適応基質の分解消費よりは，このものの存在そのものが amylase 生成に直接的関係を有していると思われる．

次に各種アミノ酸及びアミノ酸混合液液がほとんど amylase 生成に影響を示さず，cysteine は明らかな阻害効果があるが，その他のアミノ酸も少くとも酵素生成にプラスの影響は及ぼさない．この事より，本実験条件下に於て，amylase 蛋白は低級窒素化合物から新に合成され分泌されたとは考えられない．また，egg albumin の如き蛋白質さらにペプトンも同様でむしろ生成を低下せしめている．これらの点より，既に指摘されている如く[2),5)]，麹菌細胞内には amylase の precursor ともいうべき特定の酵素母体が存在し，このものが α-1, 4-glucosidic linkage を有する基質との接触により amylase として活性を得て分泌されて来るものと考えられる．

DNP, Na_2HAsO_4, K_3AsO_3 が amylase 生成を阻害し，燐酸塩の供与のない時は極めて顕著な阻害効果を示すことから燐酸が何等かの役割を果していることは容易に想像される．しかし jodo-acetate がかかる作用を示さず且つ前三者が菌体増殖を低下せしめていることからすれば，恐らくは oxidative phosphorylation の如く，呼吸に関与しているものと考えられる。なお amylase は CO_2 気流中では全く生成されない。

次に，それでは燐酸塩の供与は amylase の生成を促進するかという問題であるが，福本氏等[3)]によると細菌の場合，燐酸を与えぬと全く生成されず且つ硼酸塩は燐酸塩の代用とはならぬことを報告している。然し麹菌 homogenate に於ける著者等の実験では燐酸塩を供与せざる場合でも生成量に差はない。なお，硼酸塩は amylase 生成を阻害することが分り，且つ veronal buffer を用いた場合には citrate buffer と同様 amylase 生成力は充分である。これらの点より考えれば燐酸塩は amylase 生成に関与はするが菌体中に既存のもので充分といい得る。第4図に於て，実際には，燐酸塩＋枸橼酸塩の和は燐酸塩の低下するに従い数値もやや低下しているので，事実上燐酸塩添加の有無による amylase 生成量の差異はないものと考えられる。

上述の問題と関連して，第 3, 4 図より検討すれば amylase 生成は homogenate のおかれている培地の物質濃度に大きな関係を有することは明らかであり，これは第6図に於て一層明瞭に示されている。即ち生成された amylase が細胞外に分泌される場合，ある程度培地の物質の総濃度が大となる程分泌量が増加して来る。これは恐らく滲透圧等の関係によるものと思われるが，物質濃度以外の条件を一定にすると，分泌量と細胞に保持される量とは互に逆である。且つ total amylase は物質濃度の高い程大であるから分泌の促進は同時に生成を刺戟するものと思われる。

要　　約

1. 麹菌 homogenate による amylase 生成には炭素源として澱粉及び maltose 以外には生成効果なく，maltose 及び澱粉の誘導体にも生成効果が多少認められた。

従つて amylase の生成は α-1, 4-glucosidic linkage に対する適応的生成である。

2. 有機酸は単独で生成効果なく，maltose との共存に於て acetic 及び tartaric acid は促進し malic acid は強く阻害する。

3. アミノ酸も生成効果は認められず，maltose と共存に於ても cysteine が阻害する以外に殆ど影響を示さない。蛋白質及びペプトンもアミノ酸と同様であ

る。

4. DNP, K_3AsO_3, Na_2HAsO_4 は amylase 生成を阻害し，燐酸塩が生成に関与することを明らかにした。Jodo-acetate は阻害しない。燐酸塩は新たな供与を必要としない。

5. amylase の生成は培地の物質濃度に大いに影響され，濃度が低くなると細胞内に保持される酵素量が増加し，又，分泌量が多くなることは同時に生成をも刺戟する。

文　献

1) L.E. Hokins: Biochem. J. 48 (1951) 320.
2) 田辺脩・栗原一男・大健祥松: 発酵研報告 7 (1952) 36.
3) 田辺脩・外村健三: 農化 28 (1954) 227.
4) P. Shu and A.C. Blackwood: Can. J. Botany 29 (1951) 113.
5) 福本寿一郎・山本武彦: 酵素化学シンポジウム 7 (1952) 3.
6) 小林達吉・田淵武士: 農化 28 (1954) 171.

Summary

The mechanism of the formation and secretion of amylase by homogenate of Aspergillus oryzae has been described.

1) Amylase was formed only when maltose or starch was substrate. Monosaccharides, and disaccharides other than maltose were all ineffective. In some derivatives of maltose and starch the increase of amylase content was observed, though it was low level.

Consequently the amylase formation is adaptive to α-1,4-glucosidic linkage.

2) Organic acids were all ineffective when they were sole C-source. In maltose-containing media malic acid showed strongly inhibitory action, and acetic and tartaric acid accelerated considerably.

3) The homogenate exhibited no ability to synthesize the amylase protein from amino acids or protein under the experimental conditions. In maltose-containing medium, cysteine inhibited ca. 30 %. Other amino acids showed neither increasing nor inhibiting action, and protein or peptone reduced the amylase formation. From above results it is supposed that under the experimental conditions amylase-protein did not synthesize from the N-compounds of low molecular weight and consequently that there exists a certain "specific precursor-protein" in the homogenate.

4) Amylase formation was inhibited by 2:4-dinitrophenol, Na_2HAsO_4 and K_3AsO_3; and the inhibitory action increased in absence of phosphate. It seems that phosphate takes part in the formation of amylase. To supply phosphate, however, did not increased the formation. Jodoacetate exhibited no inhibition, while the sugar consumption was suppressed.

5) The formation and secretion of amylase was greatly concerned with the concentration of substances in medium. In higher concentration, to limited degree, the homogenates discharged more amylase in the medium than the lower concentration. The total amylase (exogenous and endogenous) increased with the concentration, and it is therefore supposed that secretion stimulates the formation of amylase.