



Title	稻熱病菌の生化学的研究（第2報）：L-アミノ酸酸化酵素の存在について
Author(s)	中村, 幸彦; NAKAMURA, Yukihiko; 下村, 得治 他
Citation	北海道大學農學部邦文紀要, 2(3), 30-34
Issue Date	1955-10-31
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/11589">https://hdl.handle.net/2115/11589</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	2(3)_p30-34.pdf



# 稻熱病菌の生化学的研究(第2報)

L-アミノ酸酸化酵素の存在について

中村幸彦・下村得治・杉本辰夫\*

Biochemical studies of *Piricularia oryzae* CAVARA.

Part II, Presence of L-amino acid oxidase.

By

Yukihiko NAKAMURA, Tokuji SHIMOMURA and Tatsuo SUGIMOTO

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

著者等は第1報<sup>1)</sup>に於て、稻熱病菌は、炭素源欠除の場合に於ても、これにL-アミノ酸を加えるときはよく生育を行い、この際の利用の第一階梯は、脱アミノによる $\alpha$ -ケト酸の生成であることを認め、ロイシンより、 $\alpha$ -ケトイソカプロン酸<sup>2)</sup>、バリンよりヂメチルピルビン酸<sup>3)</sup>をそれぞれ確認し、更にフェニルアラニンよりフェニルピルビン酸<sup>4)</sup>の生成を定性的に認めることができた。一方田中氏等<sup>5)</sup>により、亜硫酸塩添加或いはサイアミン欠乏状態のもとに、本菌はグルタミン酸より $\alpha$ -ケトグルタル酸を生成することも報告せられた。これらの事実より、稻熱病菌が、アミノ酸々化酵素、少くともそのL型のものを有することが当然考えられてくる。しかして微生物特に糸状菌類の同酵素については、Thayer及びHorowitz<sup>6)</sup>、Burton<sup>7)</sup>の*Neurospora crassa*に関する研究、Knight<sup>8)</sup>の*Penicillium*属及び*Asp. niger*についての研究が見られ、いずれも同酵素の存在、性質及びその生成に関する報告がなされているが、一般に同酵素が、D-アミノ酸々化酵素に比し種々の操作に対して著しく不安定であるために、L型酵素の研究はその数が極めて少い現状にある。著者等は上述の観点よりして、稻熱病菌の同酵素の存在について若干の検討を行つたので、その結果について報告する。

## 実験の部

第1表の如き蔗糖を炭素源とする培地に接種、26~7°に於て14~17日間培養して充分生育した菌体のフ

Table 1. Culture soln. used in experiments.

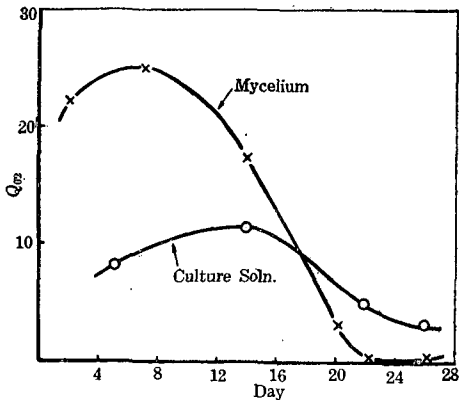
	First Culture (mg)	Second Culture (mg)
KNO <sub>3</sub>	60.0	180.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.0	90.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15.0	45.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.0	9.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	0.6
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.05	0.15
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4	1.2
Biotin	1 $\gamma$	3 $\gamma$
Thiamine	10 $\gamma$	30 $\gamma$
Sucrose	900.0	0
L-Amino Acid	0	100.0
Water	30 cc	90 cc

ラスコ3本分を、第1報の如くして、L-アミノ酸を蔗糖の代りに含む培地に移して二次培養を同温度に於て続けた。一定日数後濾過して、その新鮮菌体、濾液、及びそれぞれの各種処理試料について検圧法により、酸素気中或いは空気中に於てその酸素吸収を測定した。

### 1. L-ロイシンの分解

第1報記載の如く、本菌は無糖条件下に於てもロイシンを利用して生育を行い得ることが知られているので、まずロイシンに対する酵素的分解能を調べた。即ち第1表二次培養の如くして、L-ロイシン100mg添加のもとに培養した時の菌体と培養液の同アミノ酸に対する酸化能を酸素気中で測定した結果は第1図の如

\* 北海道大学農学部農芸化学教室



Estimation was performed manometrically.  
 Main chamber: 50~60 mg of fresh Mycelium washed or 2cc of concentrated (below 35° in vacuo) culture soln.  
 + M/15 phosphate-buffer, 2.0 cc (pH 6.9)  
 Side arm: M/30 L-leucine, 0.5 cc  
 Center well: 10 % NaOH, 0.2 cc  
 Reaction temperature, 30°; gas-phase, oxygen;  
 Q<sub>o2</sub>=O<sub>2</sub> μl/100 mg (mycelium) or 100 cc (culture soln. original)/hr.  
 (control values were subtracted)

Fig. 1. Oxygen Uptake by Mycelium or Culture Soln. of *P. oryzae* CAVARA grown in Medium contg. L-leucine as Carbon Source.

くで、菌体内の酵素活性は接種後急激に増加するが、約7日目を最高として減少を始め、約20日前後には全く消失する。このことは *Neurospora* に於ては比較的短期間の培養に於てのみ同酵素の活性が強く出現するとの Horowitz<sup>4)</sup>, Burton<sup>5)</sup> の研究結果と同じ傾向を見ることが出来る。他方培養液内に分泌される同酵素の活性は見かけ上は遙かに低く、且つ最大活性点は約14日後で、前者にくらべて培養の後期にずれて出現し、更にその終期に於てもなお若干の活性を示している。このことは、Horowitz<sup>4)</sup>が、培養濾液より粗製 L-アミノ酸オキシダーゼを調製するには、少なくとも3~4週間の培養を必要とするとの事実とも類似している現象である。更に両者の場合の最も大きい差異の一つとしてはその生成及び減少の速度であつて、菌体内酵素の活性は、その何れの場合に於ても、液内酵素にくらべて遙かにその速度の大きいことが知られた。

## 2. 酵素の抽出とその性質

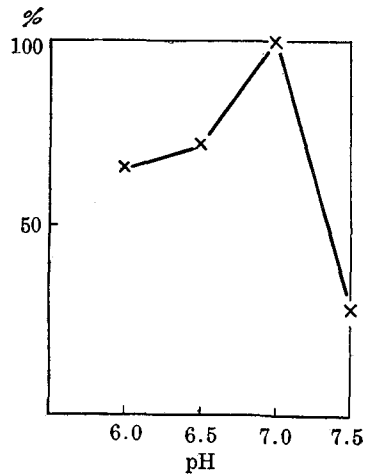
実験1により、稻熱病菌々体及びその培養濾液は、L-ロイシンに対する酸化能を有することが明かになつたので、つぎに、その各々よりの酵素の抽出の可否について実験を試みた。

まず培養2週間後(含アミノ酸無糖培養)の濾液を試料として用い、その0.8硫酸飽和による沈澱、その上澄、その透析液(流水、24時間)、の3種試料について、実験1の如く L-ロイシンに対する酸化能力を測定したが、何れも酸素吸収は認められなかつた。これはもともと濾液中の同酵素の活性の低いこと及び不安定性によるものと考えられ、この点は *Neurospora* の場合とは著しくその趣を異にしていることが知られた。

よつて専らアミノ酸添加(L-ロイシン 50mg/フラスコ)の下に5~7日二次培養した菌体を試料として酵素の性質及び分離抽出の実験を行つた。

### a) 乾燥との関係

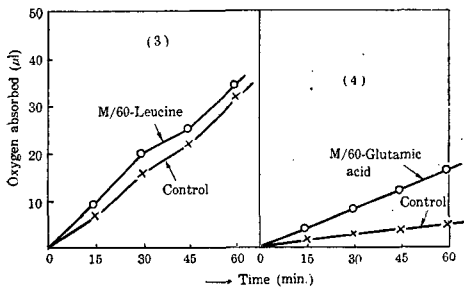
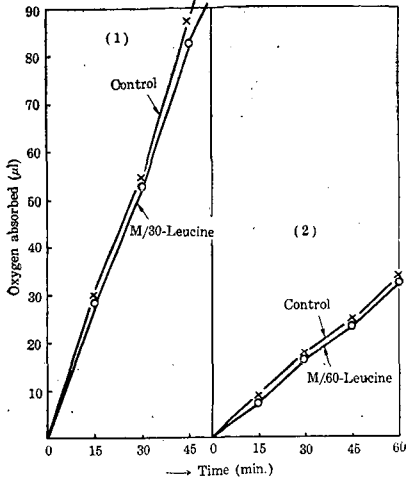
新鮮洗滌菌体 50~60 mg を常温にて2時間減圧乾燥した場合の Q<sub>o2</sub> は未処理の場合の 73.6% に減少し、24時間乾燥では0に激減し、少くともこのままの



Enzyme material was the fresh mycelium after 5~6 days' cultivation in the medium contg. L-leucine and no sucrose. Other experimental details were the same with those in Fig. 1.

Results were shown in per cent to the value of pH 7.0.

Fig. 2. Influence of pH to Oxygen Uptake by L-Amino Acid Oxidase.



- (1): Extraction for 24hrs. Enzyme soln; 1.0 cc
  - (2): " " " 48hrs. of each extract.
  - (3): " " " 72hrs. Other experimental
  - (4): " " " 96hrs. details were the same
- with those in Fig. 1.

Fig. 3. Oxygen Uptake by M/15 Phosphate Buffer Extracts of Mycelium grown in Medium contg. L-leucine.

状態では乾燥に対しても極めて不安定であることが知られた。

b) pH との関係

未処理の新鮮菌体を用い、実験1の如くして、L-ロイシンに対する酸化能を種々の pH に於て測定したところ、その最適 pH はほぼ 7.0 にあり、それよりアルカリ側に於ては急激に活性の低下が見られる。pH 7.0 の場合の  $Q_{O_2}$  を 100 とする時の各 pH における酸素吸収の割合は第 2 図に示す如くであつた。

c) 磷酸塩緩衝液による抽出

上記の各実験は何れも生鮮菌体を使用したものであるが、更に無細胞状態における酵素作用を検討するためにまずその菌体よりの抽出を試みた。即ち無糖、L-ロイシン含有の条件下に 7~9 日生育した菌体を分離、水洗した後充分水分を除いたものを磨碎して、その 1 g 当り M/15 磷酸塩緩衝液 (pH 6.9) 4 cc を加えて得た抽出液について、30°, pH 5.0~8.0 の範囲で L-ロイシン及び L-グルタミン酸を基質として、実験1の如く、空气中に於て酸素吸収を測定したが、抽出1時間以内では何れの場合も酸素の消費が見られなかつた。よつて抽出時間を延長し、トルオール添加のもとに pH 6.9 に於て 27°, 24 時間保持後遠心分離し、その残渣に 1g 当り 1cc の前記緩衝液を加えて再度 24 時間抽出し、この操作を繰返して得られた抽出液を流水に対して 24 時間透析したものについて、ロイシン或いはグクタミン酸に対する酸素吸収を測定した結果は第 3 図及び第 4 図に示す如くであつた。

これより知られる如く、見かけ上は 48.時間までの抽出では殆んど酵素の存在は認められず、72 時間及び

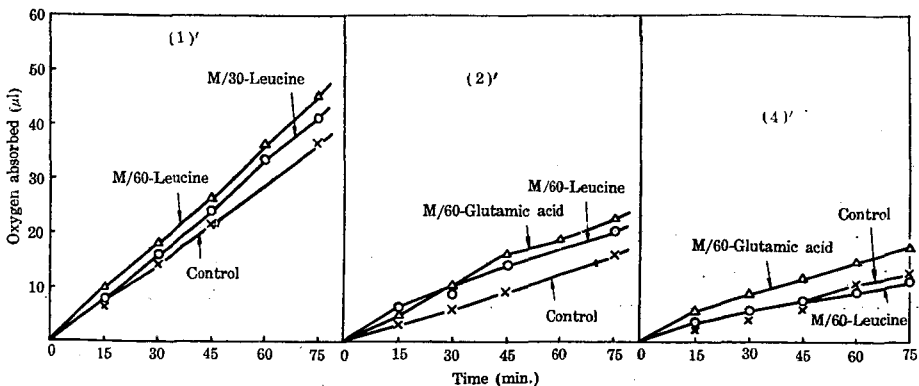


Fig. 4. Oxygen Uptake by dialyzed Buffer Extracts of Mycelium. Time of dialysis was 24 hrs. Other details were the same as in Fig. 3.

96 時間後にはそれぞれ ロイシン、グルタミン酸に対して明らかに酸素の吸収を認めることができた。且つ抽出時間の経過に伴い酸素消費量の減少するのは、種種の被酸化物質の順次抽出除去されることに起因するもので、この事は第4図の透析試料の曲線と比較する時は更にこの関係を明らかに窺い知ることができる。このようにして比較的長時間の抽出により酵素を無細胞状態にとり出す可能性が認められたが、この場合の活性は決して満足すべきものでなく、第3図(4)のグルタミン酸に対しては、60分後に於て、理論値の11.8%，75分後は16.1%の酸素消費であるにすぎなかつた。

抽出液の各透析試料について見ると、それぞれの未処理試料（第3図）に比して著しくその酸素吸収量を減少することが知られ、更に未処理試料では基質に対するその吸収を明らかに認めることができなかつた24時間或いは48時間の抽出区分についても、ロイシン或いはグルタミン酸に対する酸化能を知ることができた。しかし72時間以後の透析試料についてはロイシンに対する酸化能は失われ、最早対照と異なるところが無いが、グルタミン酸に対する能力は未だ残存している。これらのことは、本稲熱病菌のアミノ酸酸化酵素の活性が抽出によつてはそれ程強く現われないうちに、本来は24時間或いは48時間で十分に抽出可能であるが、実際の測定条件下に於ては基質以外の被酸化物質の相対量が多いためにその酸化能力が見失われていたものが、抽出の繰返し（第3図(3)）或いは透析（第4図）により、被酸化物質の急激な減少に伴つて認知され得るものと考えられる。更にこの透析処理による平均9.1%の増量による酵素試料の稀釈を考える時は、透析による酵素活性の検出が効果的であることが当然知られてくる。なお第4図(4)より知る如く、ロイシンに対する作用力は失われてもグルタミン酸に対する酸化能力が依然として残存することは、特異なアミノ酸オキシダーゼとしてのグルタミン酸脱水素酵素の存在を示すものと推定される。なおこれらの実験を通して、基質アミノ酸の濃度としてはM/30よりもM/60に於て比較的大きな活性を認めることができた。

#### d) 適応的生産について

種々の微生物に特定の酵素作用の基質となるべき物質を加えることにより、特定の酵素の新生或いは活性増を来すことはよく知られた事実であり、*Neurospora crassa* については Horowitz<sup>2)</sup> 等により、窒素源とし

てのカゼイン加水分解物の添加に適応して L-アミノ酸々化酵素の活性の増大が報告された。著者等の既述の実験も L-ロイシンに適応しての同酵素の生成の利用とも言うことができる。しかしこの場合のアミノ酸の意義は炭素源としてであり、且つその種類も1種に限定されている。一方稲熱病菌により種々のアミノ酸が窒素源として有効に利用されることは既に大谷氏<sup>7)</sup> により認められており、更に充分量の無機窒素源と炭素源の存在下においても添加アミノ酸よりは相当ケト酸も生成されること<sup>8)</sup> が著者等により知られている。よつて今回はまず、窒素源としてのアミノ酸混合物（カゼイン分解物）の存在による同酵素の活性増の能力の有無を稲熱病菌について調べてみた。即ち第1表に示した二次培養液の無機窒素源の代りにカゼイン加水分解物10cc（アミノ窒素として94.0mg）および蔗糖900mgを加えたものに、普通培地に10~14日培養した菌体の3フラスコ分を前述の如くにして移し、更に8日培養を続けた後濾別した菌体を充分水洗、その1g当り磷酸緩衝液2ccを用い、27°で45時間抽出、抽出液を24時間透析したものを1ccについて、L-ロイシンおよびL-グルタミン酸に対する酸化能を前実験の如くに測定した結果は第5図の如くであつて、何れの

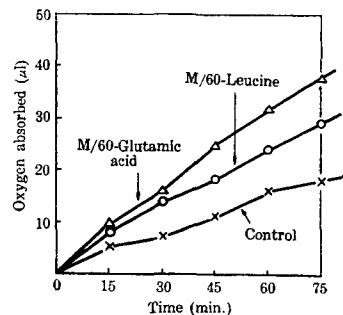


Fig. 5. Adaptive Formation of L-oxidase

基質に対しても反応初期より顕著な酸素吸収を示し、特にグルタミン酸に対する活性の増大せることは第4図との比較によつても明らかに窺い知ることが可能であり、本菌も窒素源としてのカゼイン加水分解物の添加によつてもそれに対応してその酸化酵素の活性を増すことを知ることができた。しかしその活性増に直接対応すべきアミノ酸の種類については今後の研究にまちなたい。

## 要 約

1. 炭素源の代りにアミノ酸（ロイシン）を含む培

地に稲熱病菌を二次培養するときは、菌体および培養液内に何れもアミノ酸々化酵素の活性を認めることができた。その 100 mg 或いは 100 cc 当りの  $Q_{O_2}$  は培養 2 週間までは菌体が遙かに培養液のものよりも高かつた。この際菌体内酵素の活性は初期において急激に高まり、14 日頃より急減するが培地内のもはその増加および減少ともにその速度は緩慢であつた。

2. 菌体内酵素の至適 pH はほぼ 7.0 であつた。
3. 磷酸塩緩衝液 (pH 6.9) による酵素の抽出には 24 ~ 48 時間で充分であり、この抽出液を透析することによりその活性を明らかに検知することができた。
4. グルタミン酸脱水素酵素の存在が推定された。
5. 窒素源としてのカゼイン加水分解物の添加に対応してアミノ酸々化酵素の活性を増すことが知られた。

#### 文 献

- 1) 中村・下村: 農化, 27, 694, 1953.
- 2) 未発表.
- 3) 田中・森脇: 第 25 回生化学会講演, 昭 28 年 4 月.
- 4) P. S. Thayer and N. H. Horowitz: J. Biol. Chem., 192, 755, 1951.
- 5) K. Burton: Biochem. J., 50, 258, 1951.
- 6) S.G. Knight: J. Bact., 55, 401, 1948.
- 7) 大谷: 植病, 17, 9, 1952.

#### Summary

When *P. oryzae* was cultured in medium containing amino acid (L-leucine) in place of sucrose, L-amino acid oxidase activity was recognized in both mycelium and culture solution. The  $Q_{O_2}$  per 100 mg mycelium was far greater than that per 100 cc culture solution within about 14 days cultivation. In the initial stage of cultivation (4~6 days) endoenzyme activity was rapidly increased but after 14 days it was also rapidly decreased and not nearly detected after 20 days. In contrast to this, the change of exoenzyme activity was very slow.

The optimal pH value of the endoenzyme was 7.0.

It was found that the time for extraction of endoenzyme with M/15 phosphate buffer solution (pH 6.9) was 24 ~ 48 hours and the dialysis of this extract against water was a most effective for detection of L-amino acid oxidase activity. Moreover, glutamic acid dehydrogenase was presumed to be present in this extract.

Adaptive formation of L-oxidase by this mold was known when it was nourished with casein hydrolysate as nitrogen source.