

アカパンカビ (*Neurospora sitophyla*) の蔗糖 分解酵素の本性について

高野 克夫

蔗糖分解酵素については、酵母、糸状菌などで古くからその存在が知られ、単糖による阻害の様式⁽¹⁾や、蔗糖類似糖の水解に関する特異性⁽²⁾などから fructosaccharase と glucosaccharase の2種に分けられ、酵母の蔗糖分解酵素は前者に、糸状菌のそれは後者に属すると考えられてきたが、近年、各種水解酵素が基質を水解する働きと同時に基質の一部を他の適当な受容体に転移する働きをも有することが明らかにされ、水解酵素による転移反応の研究^{(3)~(6)}が進展するにつれてこの分け方は当を得たものではないことが明らかになった。従来 glucosaccharase に属すると考えられていた糸状菌の蔗糖分解酵素も、fructosaccharase に属すると考えられていた酵母の蔗糖分解酵素も酵素的糖残基転移の研究^{(7)~(8)}から共に β -fructofuranosidase であることが証明された。

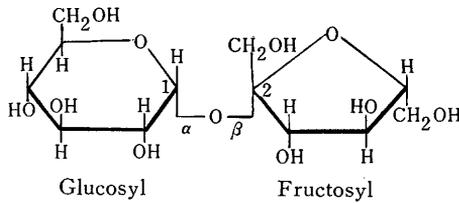
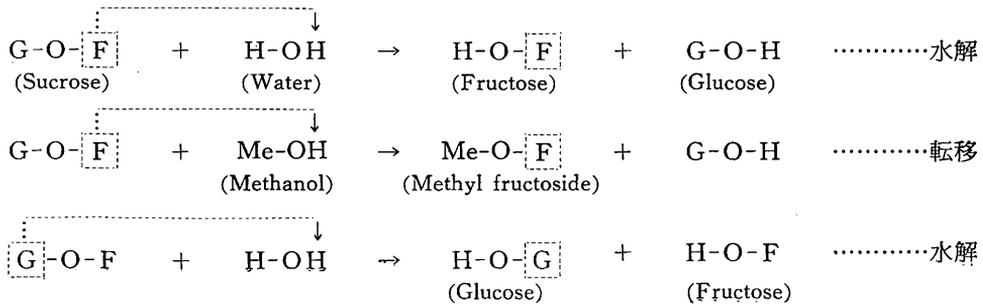


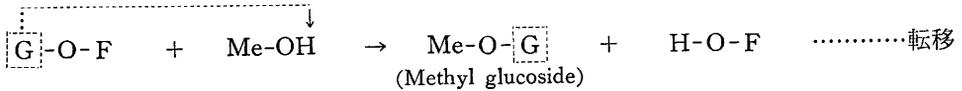
Fig. 1. Structure of sucrose

蔗糖の構造は 1- α -glucopyranoside-2- β -fructofuranoside であるので、蔗糖は α -glucopyranosidase あるいは β -fructofuranosidase によって水解される。どちらの酵素が働いても遊離 glucose と遊離 fructose とを生ずるのでふつうの水解ではこの両酵素の働きを区別することはできないが、水以外の糖残基受容体 R-OH を用いれば、転移生成物が R-O-G であるか

R-O-F であるかを検することによって α -glucopyranosidase と β -fructofuranosidase の働きを区別することができる。筆者らはこの方法を用いて数多くの動・植物の蔗糖分解酵素の性質を明らかにしてきた^{(9)~(11)}が、これまでのところでは蔗糖が β -fructofuranosidase によって水解される例が多い。アカパンカビの蔗糖分解酵素も他の糸状菌のそれと同じく β -fructofuranosidase である。

蔗糖分解酵素の有する水解能と転移能とは互に異種のものではない。水解とは酵素の働きで糖残基が水へ転移する反応であると解釈すれば、水解も転移も糖残基が共に適当な受容体に転移される反応であると一元的に把握することができる。





このように蔗糖分解酵素は本質的には転移酵素であるので水解の性質だけでなく転移に関する特異性に関して特にくわしく検討されなければならない。

本研究はアカパンカビの蔗糖分解酵素について、転移に関する特異性の一端を明らかにしようとした。

実 験

材 料

アカパンカビ (*Neurospora sitophyla*) を麦芽糖化液で5日間、25°で生育させ、生じた菌体を充分水洗した後、冷アセトンで脱脂・脱水を行ない、風乾し、さらにデシケーター中（塩化カルシウム使用）で除湿し、粉碎機で微粉末とした。

酵素の調製

アカパンカビ粉末標品10gに200mlの水を加え、アンモニア水を滴下してpHを9.0に調整し、室温で5時間かくはん振とうした後布でしぼり、さらに遠心分離して得られた上澄液に5%酢酸を滴下してpHを4.0に下げ、生じた沈殿を分別した上澄液を5%炭酸ナトリウムを用いて中和し、流水に対して3日間透析したものを酵素液として使用した。

酵素作用の測定

0.048 M 蔗糖液 2 ml, 0.2 M 酢酸塩緩衝液, pH 4.7, 2 ml, 水（場合によっては 10 M Methanol）2 ml, 酵素液 4 ml, 反応温度30°

時間の間隔をおいて反応液を0.5mlずつ取り出し Shaffer-Somogyi法で生成還元糖を測定した。またアルドースの定量は Dumazert 法によった。

Methyl β-fructofuranoside の調製

石沢ら⁽¹²⁾の方法に従って調製した。

ペーパークロマトグラフィー

ブタノール・酢酸・水（4：1：2）上昇法およびブタノール・ピリジン・水（10：1：2）下降法を採用した。発色試薬はレゾルシン・塩酸試薬およびベンチジン・トリクロール酢酸試薬を用いた。

カラムクロマトグラフィー

転移生成物の単離のため charcoal-celite（1：1）カラムを用いた。溶出には水および水・エタノール混液を用いた。単離した oligosaccharides の比旋光度の測定および組成の決定は前報告⁽⁸⁾⁻⁽¹⁰⁾と同様に行なった。

実 験 結 果

アカパンカビの菌体抽出液は比較的高い蔗糖水解能をもっている。Fig. 2 で示したようにその至適pHは4.5～5.0付近にあり、それより酸性側ではなおかなりの活性を示すが、アルカリ側では急激に活性の低下がみられpH 6以上ではほとんど働かない。

Table 1. Enzymatic transfer of β -fructosyl group from sucrose to methanol by *Neurospora saccharase*.

Acceptor	Reaction time	Aldose	Ketose	Transfer
Water	70min	0.45mg/ml	0.46mg/ml	— %
	120	0.68	0.70	—
Methanol	70	0.47	0.40	15.9
	120	0.71	0.59	17.0

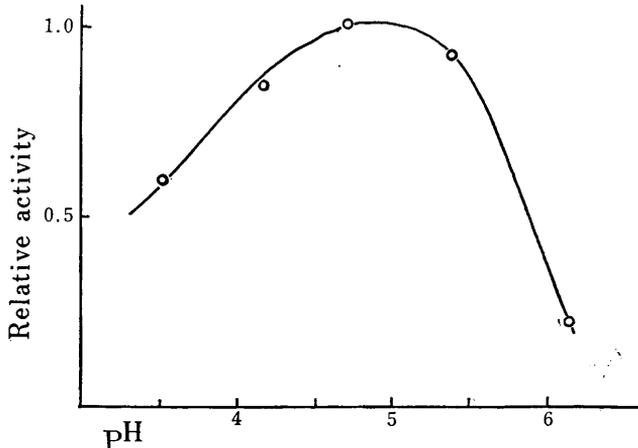


Fig. 2. Activity pH curve of sucrose hydrolysis by the enzyme preparation from *Neurospora*.

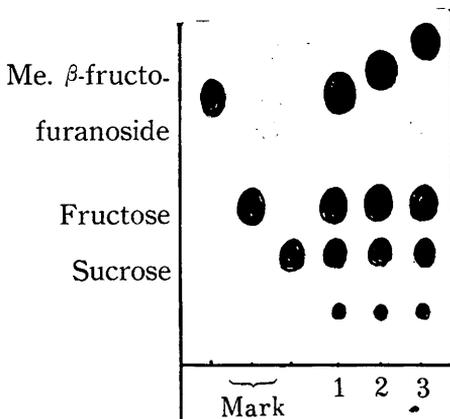


Fig. 3. Ascending paper chromatogram showing the formation of alkyl fructoside by the enzyme preparation from *Neurospora*.

6% Sucrose 1 ml, 0.2 M acetate buffer, pH 4.7, alcohol 0.5ml and enzyme solution 2 ml.

Sprayed with resorcinol reagent.

1. Reaction mixture containing methanol.
2. Reaction mixture containing ethanol.
3. Reaction mixture containing *n*-propanol.

アカパンカビの酵素液を低濃度の蔗糖に作用させ、生ずる遊離 glucose と遊離 fructose とを分けて定量すると、ほぼ等量の値が得られるが、Table 1 に示したように反応液にメタノールが存在するときは遊離 glucose 量にくらべて遊離 fructose 量の不足がみられた。これは蔗糖の fructosyl 基がメタノールへ転移したことを予想させる。

さらに fructosyl 基の転移を確かめるためにメタノール、エタノール、*n*-プロパノールの存在のもとで、高濃度の蔗糖液にアカパンカビ酵素液

を作用させ、転移生成物を上昇クロマトグラフィーで検した。Fig. 3 で示したように、これらの場合にはいずれも fructose のスポットの上方にレゾルシンで発色する新しいスポットがみられ、メタノール添加の場合は対照としておいた methyl β -fructofuranoside の位置とほとんど同じであった。エタノール添加の場合の新スポットの位置は対照とした methyl β -fructoside の位置よりやや高く、また *n*-プロパノール添加の場合の新スポットの位置はさらにやや高いところに見出された。これらはそれぞれ methyl, ethyl, *n*-propyl β -fructoside であると予想される。これら新スポットの color intensity はかなり高いのでこれらのアルコールは fructosyl 基の有効な受容体として働いているものと思われる。

メタノールの存在で蔗糖にアカパンカビ酵素を作用させたときに生じた転移生成物が methyl β -fructofuranoside であるかどうかを確認するためにこの生成物の単離が試みられた。反応液を carbon-celite カラムに吸着させ、水で単糖を溶出した後、さらに水溶出

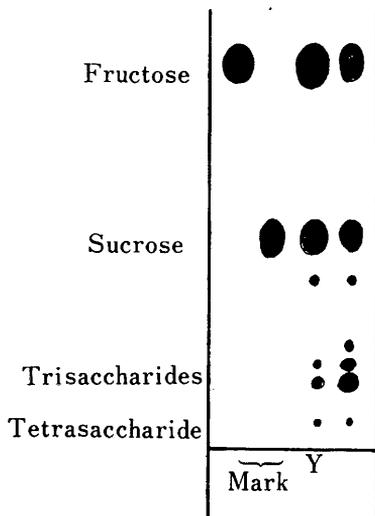


Fig. 4. Descending paper chromatogram showing the formation of oligosaccharides by transglycosylation with *Neurospora* preparation.

Sprayed with resorcinol reagent.
Y. Yeast saccharase upon sucrose (final) concentration 20%.
This incubation served for the comparison of the transfer products.

を続けると蔗糖が溶出されてくる以前に alkyl glycoside が出てくる。この部分を集め、ここに存在する物質の比旋光度を測定したら $[\alpha]_D = -50.3^\circ$ の値が得られた。この値は methyl β -fructofuranoside の $[\alpha]_D = -50.5^\circ$ ⁽¹³⁾ とよく一致する。この結果は蔗糖からメタノールへ転移する糖残基は β -fructosyl 基だけであり α -glucosyl 基の転移はないことを示す。

高濃度の蔗糖にアカパンカビ酵素を作用させた反応液の paper chromatogram について、蔗糖のスポットの下方に oligosaccharide と考えられる新スポットが認められる。このスポットの color intensity はかなり強くこの部分に着目して行なった下降法のクロマトグラフィーでさらにいくつかのスポットに分かれた。Fig. 4 に示したように trisaccharides と考えられるスポットの他に、おそらく tetra- および disaccharide と思われる微弱なスポットも観察された。酵母の蔗糖分解酵素を蔗糖に働かせた際に生成する oligosaccharides の量は僅かであり、より高濃度の蔗糖を用いた場合 (Y) のその量よりもアカパンカビ酵素液を用いた場合の oligosaccharides の生成量が多いことは注目し得る。アカパンカビ蔗糖分解酵素はきわめて能率よく供与体としての蔗糖

から糖残基を受容体の糖に転移する特異性をもつことが明らかにされたことになる。

酵素的糖転移の結果生じと考えられる oligosaccharides のうち trisaccharides の単離が試みられた。5g の蔗糖に、pH 4.7, 0.2 M 酢酸・酢酸塩緩衝液 4 ml とアカパンカビ酵素液 20ml を加え、30°で4時間反応させた後 boil して酵素反応を停止させ、沈澱を濾別し、濾液を carbon-celulose カラム (35g : 35g, 高さ約 8.5cm, 直径約 7.0cm) に吸着させ、最初は水で、続いてエタノール

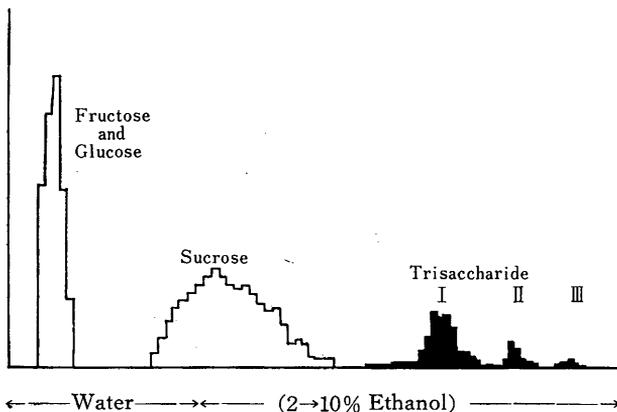


Fig. 5. Separation of transfer products formed from sucrose by *Neurospora* enzyme.

を含む水(2%→10%)で、次第にエタノールの濃度を高めながら連続溶出を行なった。この操作で異なった trisaccharide (I, II および III とする) をそれぞれ含むフラクションが得られた。(Fig. 5) この溶出区分を濃縮し再びカラムクロマトグラフィーにかけることによって他の oligosaccharide を全く含まないで, trisaccharide I, II および III をそれぞれ純粋に含む溶出区分が得られた。溶出順に I, II, III とすると生成量の最も多いものは trisaccharide I であり, paper chromatography における Rf 値は $I < II < III$ の順になる。

これら trisaccharides の組成をしらべるために 0.05N 塩酸を用いて 100°, 30 分間加熱し、加水分解させ、生ずる glucose および fructose を別々に定量すると両者の量はいずれも 1 : 2 に近い値が得られ、これらの oligosaccharides は glucose 1 分子, fructose 2 分子からなる trisaccharide であることが明らかになった。また、これら trisaccharides の比旋光度が測定された (Table 2)。

Table 2. Sugar composition and specific rotation of trisaccharides formed by enzymatic transfructosylation.

Trisaccharide	Glucose : Fructose	$[\alpha]_D$
I	1 : 1.95	+26°
II	1 : 2.05	+30°
III	1 : 2.05	+23°

これらの値から trisaccharide I, II および III はそれぞれ

- 6-Kestose, $O\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl-(2}\rightarrow\text{1)-o-}\beta\text{-D-fructofuranosyl-(2}\rightarrow\text{1)-}\alpha\text{-D-glucopyranoside}$
- 1-Kestose, $O\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl-(2}\rightarrow\text{1)-o-}\beta\text{-D-fructofuranosyl-(2}\rightarrow\text{1)-}\alpha\text{-D-glucopyranoside}$
- Neokestose, $O\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl-(2}\rightarrow\text{6)-o-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-fructofuranoside}$

であろうと思われる。

考 察

酵母や特別な糸状菌を除いて一般に蔗糖分解酵素が β -fructofuranosidase であるか α -glucopyranosidase であるかについての報告は必ずしも多くはないが、本研究においては糖転移の行動からアカパンカビ蔗糖分解酵素の性質が研究された。

蔗糖を供与体、糖やアルコールを受容体として酵素的糖転移をしらべると、蔗糖から転移される糖残基は β -fructofuranosyl 基であり α -glucopyranosyl 基ではないのでアカパンカビ蔗糖分解酵素は α -glucosidase ではなくて、 β -fructofuranosidase である。

蔗糖およびメタノール、エタノール、*n*-プロパノールのような低級アルコールが蔗糖の fructofuranosyl 基の受容体として、特に蔗糖が能率よい受容体として働いた。糖への酵素的糖転移の結果、各種の oligosaccharides の生成が認められたが trisaccharides の生成量が最も多く、以前に知られた酵母蔗糖分解酵素の働きによる trisaccharides 生成量よりはるかに多量の trisaccharides が生成された。これら trisaccharides は 6-kestose, 1-kestose, neokestose であると想像され、6-kestose の生成が最も多量であった。蔗糖分子が糖残基受容体として働くときは fructosyl および glucosyl 部分とも第一アルコール基が acceptor site として働いているように思われる。酵母蔗糖分解酵素が働く場合と同様に、アカパンカビ酵素が働いた場合少量の disaccharide および tetrasaccharide の生成が paper chromatogram で認められるが、これらは少量のため単離は試みられなかった。しかし disaccharide は還元力があること、R_f 値が蔗糖のそれよりやや小さいことなどから glucose の 6 位の第一アルコールに fructosyl 基が 2 位で結合した形の pseudosucrose であろうと予想できる。

総 括

1. アカパンカビ蔗糖分解酵素の性質が糖残基転移の立場からくらべられた。
2. アカパンカビ蔗糖分解酵素は蔗糖の fructosyl 基を水, アルコールまたは糖に転移させる転移酵素 β -fructofuranosidase である。
3. Fructosyl 転移において蔗糖が能率よい受容体として働き 3種の異なった trisaccharides が生成する。これらはそれぞれ 6-kestose, 1-kestose および neokestose である。
4. 受容体特異性は酵素起源によっている。

文 献

- 1) Kuhn, R., *Z. physiol. Chem.*, **129**, 57 (1923)
- 2) Kuhn, R., and Münch, H., *Z. physiol. Chem.*, **150**, 220 (1925) ; **163**, 1 (1927)
- 3) Bacon, J. S. D., and Edelman, J., *Arch. Biochem.*, **28**, 467 (1950)
- 4) Blanchard, P. H., and Albon, N., *Arch. Biochem.*, **29**, 220 (1950)
- 5) Miwa, T., *Protein, Nucleic acid and Enzyme*, **2**, 429 (1957)
- 6) Edelman, J., *Adv. Enzymol.*, **17**, 189 (1957)
- 7) Bealing, F. J., *Biochem. J.*, **55**, 93 (1953)
- 8) Takano, K., *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku*, **B**, **11**, 105 (1962)
- 9) Takano, K., *Sic. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku*, **B**, **9**, 155 (1960)
- 10) Takano, K., *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku*, **B**, **11**, 91 (1962)
- 11) Takano, K., *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku*, **B**, **10**, 89 (1961)
- 12) Ishizawa, K., Iriki, Y., and Miwa, T., *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku*, **B**, **8**, 102 (1957)
- 13) Schlbuch, H. H., and Bartels, H. E., *Ann. d. Chem.*, **541**, 76 (1936)