

報告番号 * 中第 2183号

主論文の要旨

題名

Streptomyces griseofuscus S-41の
グルコースイソメラーゼに関する研究

氏名 春見隆文

主論文の要旨

報告番号

※甲第

号

氏名

春見隆文

本論文は、有用なグルコースイソメラーゼ生産菌、Streptomyces griseofuscus S-41の同定とその酵素の生産、基礎的性質、および固定化法の研究に関するものである。

放線菌 Streptomyces sp. No. 41 はグルコースイソメラーゼ生産菌として分離されたが、その菌学的性質については明らかでなかった。胞子の形態および細胞壁成分の一つであるジアミノペメリン酸の種類から Streptomyces に属すると認められた。次いで、種々の培地中で培養し、生理学的、形態学的特徴を詳細に検討した結果、Streptomyces griseofuscus の近縁種であることが明らかにされた。

S. griseofuscus とは生理、形態的特徴の他、酵素の生産能においても極めてよく似ていたが、抗菌性物質の生産性において異なっており、S. griseofuscus が種々の抗生物質の生産菌として知られているのに対し、No. 41 株では、ほとんど生産しなかった。これらの結果より、No. 41 株を S. griseofuscus S-41 と命名した。本菌は、炭素源として D-キシロースを培地中に添加したとき、強いグルコースイソメラーゼ活性およびキシロース

イソメラーゼ活性を発現した。キシロース 100% よりもその一部 (20~30%) をグルコースに置き代えた方が、菌の生育は良好であり、従って全酵素活性は上昇した。また、低濃度のコバルトの添加は、菌体収量を低下させたが、酵素の比活性をかなり上昇させる効果があった。本菌を分離直前に加温死滅させ、懸濁液として低温に放置しておくことにより、グルコースイソメラーゼを効率的に菌体外に溶出させることができた。この遠心上清液は夾雑蛋白質量が少なく、二度の DEAE-セファテックスカラム処理のみで、電気泳動的、超遠心的に均一な標品となった。また、これから硫酸添加により、結晶酵素を得ることができた。

本酵素は熱に対して非常に安定で、至適温度は 85°C と極めて高く、 80°C 、30分間の加熱でもほとんど失活しなかった。一方至適 pH は 8.5 であり、低 pH (特に 5.0 以下) 域では失活し易かった。D-グルコース、D-キシロース以外に、D-リボースにもわずかながら作用して、対応するテトースに転換した。反応は典型的な Michaelis-Menten 型であり、平衡定数は 1.0 となった。

糖アルコールや他の糖により拮抗的阻害を受けるとは、特にキシリトール、ソルビトールなどによる阻害が著しかった。しかし、PCMB, モノヨード酢酸, シアン化カリウムなどの阻害剤の影響は全く受けなかった。これより本酵素は、活性に直接関与するSH基をもっていないことが示唆された。本酵素は、前述の如くキシロースにより特異的に誘導されること、グルコースよりもキシロースに対しより高い親和性を示すことから、*D*-xylose ketol-isomerase (EC 5.3.1.5) であると判定された。種々の物理化学的パラメーターより本酵素の形状を推定した所、摩擦係数 1.24 の球状蛋白質で、Stokes 半径は 47\AA 、回転楕円体と仮定した場合の軸比は 5 (偏長) または 0.2 (偏平) であった。分子量 180,000 の酸性蛋白質 (PI 4.0) で、ほぼ均一な 4 個のサブユニットより成っていた。サブユニットへの解離と、酵素活性の低下は完全に一致しており、従ってこれらのサブユニットは、単独では活性をもたないものと考えられた。全アミノ酸分析、DTNB 滴定の結果から、1 分子当り 6 個の SH 基をもっており、そのうちの 2 個は遊離状態で存在していることが判った。

これより SS 結合の数は 2 個であり、しかも還元剤処理の結果から、その SS 結合はサブユニット間ではなく、サブユニット内に存在するものと考えられた。SS 結合の存在は、フルコースイソメラーゼではこれまで報告が見当たらない。

本酵素は、活性の発現に二価の金属イオンを必須とし、特にマグネシウムおよびコバルトによって強い賦活化を受ける。そこで両金属の活性化機構を迅速平衡法により解析した。平衡系中に 4 つの酵素種 E, ES, EM, EMS が存在すると仮定して導いた速度式は、実験的に求めた金属、基質濃度と酵素の反応速度パターンに非常によく一致をみた。従って、本酵素に対する基質、金属イオンの結合様式は、二基質反応におけるランダム機構に近いものと推定され、ordered 機構をとるとする他のフルコースイソメラーゼについての報告と異なっていた。金属イオンの存在しない状態で、実際に酵素と基質との結合が起こることを、別に分光学的手法により確認した。マグネシウムとコバルトは、酵素の同一部位または極めて近い部位に結合する拮抗的な賦活化剤であり、酵素に対する親和性はコバルトの方が高いが、賦活化能はマグネシウムの方が高い。

コバルトは熱、酸、変性剤などによる失活を抑制する働きをもっていたが、マグネシウムにはそのような作用はみられなかった。本酵素は、分子内に高次構造に關与するコバルト原子を4個もっており、うち3個はEDTAや尿素処理により、容易に除去されるが、残る1個は、6M塩酸グアニジンや、酸性下の尿素処理など、酵素が完全にサブユニットに解離する条件下でないと除去することができなかった。即ち、この1個は、本酵素の高次構造、特に四次構造の保持に密接な關連があるものと判断された。添加コバルトイオンによって、熱、酸、変性剤などによる失活から保護されるのは、酵素分子からのコバルトの脱離が抑えられ、そのためサブユニットへの解離が抑制されるためと推定された。マグネシウムとコバルトの活性化機構、およびコバルトの高次構造の保持に關する知見は、グルコースイソメラーゼに關しては、これが最初である。

次に、本酵素の応用に關して重要な課題である、固定化法について検討し、不溶性担体としてキトサンを用いる新しい手法を開発した。キトサンは、キチンの脱アセチル誘導体であり、分子内に多数の

遊離アミノ基を含む。従って、このアミノ基と酵素のカルボキシル基との間で共有結合を形成させ、固定化するもので、試薬としてペプタド結合形成剤である、水溶性カルボジイミドを用いた。キトサンを弱酸に溶解し、pHを6.0に調整した後、これに酵素液と水溶性カルボジイミドを加え、室温に数時間放置するだけで、極めて簡単に固定化酵素を調製することができた。活性の平均回収率は32%と低かったが、酵素活性の保持力に関しては、かなり安定であった。至適pHや安定pH域がもとの酵素に比べて酸性側に移動する傾向がみられたが、これはキトサンの正電荷の影響によるものと考えられた。次いで、キトサンを用いた菌体凝集法による固定化手法を考案した。本菌は、キトサンによって速かに凝集反応を起し、フロックを形成する。このフロックは極めて安定で、一度生成すると、酸、アルカリ、緩衝液中に長時間浸漬しても元に戻らない。従って、これをそのまま固定化菌体として用いることが可能であったが、さらに菌体の結着力を強め、酵素活性の保持力を良好にするため、ゼラチンを加えて成型加工した後、グル

カルアルデヒドで架橋処理を行なった。

このものは遊離の酵素に比較して、熱、酸、重金属イオンの阻害を受けにくく、非常に安定であった。カラムによる連続異性化試験の結果、本固定化菌体の酵素活性の半減期は、40日と算定された。キトサンへの共有結合による固定化法は、日本国特許として登録され、また、凝集法による固定化菌体調製物は、活性の保持力、物理的強度、および操作性において、実用に十分耐え得るものと判断され、国内メーカーより市販されるに至った。

以上、放線菌 Streptomyces griseofuscus S-41の生産するグルコースイソメラーゼについて、基礎から応用につながる一連の研究を行ない、その酵素的性質に新知見を得るとともに、新しい有用な固定化法の開発を行なった。