



|              |                                                                                   |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Aspergillus nigerのacid phosphatase生産様式に関する研究                                      |
| Author(s)    | 島田, 裕司                                                                            |
| Citation     | 大阪大学, 1977, 博士論文                                                                  |
| Version Type | VoR                                                                               |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/1479">https://hdl.handle.net/11094/1479</a> |
| rights       |                                                                                   |
| Note         |                                                                                   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Aspergillus niger の acid phosphatase

生産様式に関する研究

島田 裕司

## ま え か き

近年、分子生物学、分子遺伝学の飛躍的な発展に伴ない、これらの手法が醗酵工業に應用され、種々の醗酵現象が理論的に解明されてきた。特に、アミノ酸醗酵、核酸醗酵における酵素生合成機構の研究は、その最たるものである。しかしながら、酵素工業における加水分解酵素の生合成機構に関する研究は、単に現象面の把握にとどまり、生理学的に解析された例は少ない。そこで著者は、加水分解酵素の生合成機構の解明を目的とし、Aspergillus niger の生産する *acid phosphatase* をモデルとして取り上げた。本研究では、Asp. niger の *acid phosphatase* を蛋白質レベルで解析し、工業的應用への基礎的知見を得ることを目的とした。ここに省みるとき、まだ解明されねばならない問題を多分に残しており、今後ともその究明に努力する所存である。

1976年 12月

著者

# 目 次

頁

## 緒論

1

## 第1章 Acid phosphatase の局在性と多型性

### 第1節 緒言

5

### 第2節 実験材料および方法

6

### 第3節 実験結果

#### 1. Acid phosphatase の局在性

10

#### 2. Acid phosphatase の多型性

11

#### 3. 「セルラーゼ・オノズカ」処理による

成分 e, i から c への変換

17

### 第4節 考察

19

### 第5節 要約

20

## 第2章 Acid phosphatase 3成分の形成と

### 相互変換性

### 第1節 緒言

21

### 第2節 実験材料および方法

22

### 第3節 実験結果

#### 1. Acid phosphatase 3成分の生産挙動

25

#### 2. 培養浮液および細胞抽出液中に存在 する成分の相互変換性

29

#### 3. 3成分 e, i, c と培養液, 培養浮液, 細胞抽出液との反応

32

4. e, i 兩成分および converted form i の  
電気泳動的性質

37

第4節 考察

39

第5節 要約

41

第3章 Acid phosphatase 2成分 e, i の精製と比較

第1節 緒言

43

第2節 実験材料および方法

44

第3節 実験結果

1. 精製成分 e および i の単一性

50

2. 精製兩成分の酵素化学的性質

55

3. 精製兩成分の分子量

63

4. 精製兩成分の糖組成

67

5. 精製兩成分のアミノ酸組成

69

第4節 考察

71

第5節 要約

73

総括および結論

75

文献

79

## 緒論

単一組織、単一細胞において生合成された酵素が、多型性を示す例は多く報告されている。そして、この多型性を示す要因として次の様なことが考えられる。

i) 異なった遺伝子により一次構造の異なる酵素が生合成され多型性を示す。この例として、malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase 等は、cytoplasm型、mitochondria型の2成分が存在する。

ii) 一旦生合成された酵素が、蛋白合成以後の段階で修飾を受け多型性を示す。この蛋白質レベルでの修飾について、lactate dehydrogenase に認められる様なサブユニットの解離、解合<sup>1)</sup>、zymogen type の酵素に認められる様な酵素分子の一部切断<sup>2)</sup>、また蛋白分子に糖あるいは脂質分子等が付加される場合等が報告されている。

一方、工業的利用価値の高い加水分解酵素は分泌酵素であり、一般に真核細胞により生産される分泌酵素は糖蛋白質である。そして、糖蛋白質が多型性を示し、多型性を示す要因が糖区分にある例もいくつか報告されている<sup>4,5)</sup>。従って、加水分解酵素の生合成機構を解析するためには、多型性を示す糖蛋白酵素をモデルとして用いることは適当であると考えられる。

糖蛋白葡萄糖鎖の役割として、以下の様な可能性が報告されているが、依然明確な証明には至っていない。

i) 活性発現に必須である(酵素活性<sup>6,7)</sup> 抗原活性、病

原活性等)。

ii) 分子の安定性に影響している (pH 安定性、熱安定性、<sup>8,9)</sup> protease に対する安定性<sup>10-12)</sup> 等)。

iii) 分子の細胞外への分泌と関係している。<sup>13)</sup>

糖蛋白質糖鎖の生合成機構については、sugar nucleotide からそれぞれ特異的な glycosyl transferase によって、一つずつ単糖残基が転移する反応と、ある大きさのオリゴ糖を結合したリピド中間体が合成され、このオリゴ糖が peptide に転移する反応とによって、一つの糖鎖が完成するのではないかと考えられている。<sup>14,15)</sup>

そこで、分泌酵素であり、多型性を示す糖蛋白酵素であると考えられる *Aspergillus niger* の acid phosphatase をモデルとして、本酵素の構造的、機能的関係について検討し、工業的に利用されている加水分解酵素生合成機構を解析する基礎的知見を得る目的で、本研究を行なった。

本研究の材料として用いた acid phosphatase に関する研究は、以下の様に分類することができる。

i) Acid phosphatase は一般に多型性を示し、その構造的差異についての解析が行なわれている。Ostrowski は<sup>16)</sup> human prostate, Campbell は<sup>17)</sup> pig liver の acid phosphatase において、シアル酸残基数の違いにより多型性を示すことを報告している。

ii) Acid phosphatase は広く生物界に分布しているが、その生理学的意義は不明である。そこで、酵素化学的性質を調べることにより、その解析が行なわれている。

植物組織の *acid phosphatase* については、発芽<sup>18)</sup>、分化<sup>19)</sup>、炭素物の貯蔵<sup>20)</sup>、*active transport*<sup>21)</sup> 等に関係しているという説が提ねされている。

iii) *Acid phosphatase* は、菌体成育に必須でないことより、酵素生産の遺伝子レベルでの制御機構についての解析が行なわれている。一般に *acid phosphatase* は、低濃度リン酸存在下で生合成される *repressible enzyme* と、培地中のリン酸濃度に関係なく生合成される *constitutive enzyme* に分けることができる。Toh-e は、*Saccharomyces cerevisiae* の *repressible acid phosphatase* の制御機構について、次の様に報告している<sup>22-25)</sup>。 *pho R* および *pho U* (*pho R* または *pho U*) gene が *pho S* gene の制御を受け、高濃度リン酸存在下で active な repressor を生産する。生産された repressor は *pho D* の operator *pho O* と結合することにより、*pho D* gene の発現を止める。そして *pho D* gene の生産物は、構造遺伝子 *pho E* の発現を *positive control* している。

以上、*acid phosphatase* について報告されている内容を述べてきたが、多型性を示す糖蛋白酵素の構造的、酵素的差異について検討し、その生合成機構を解析した例はほとんど報告されていない。そこで本研究は、工業的に利用されている酵素の給源として利用価値の高い *Asp. niger* を用い、そのアデニン要求株の生産する *acid phosphatase* を材料とし、多型性を示す糖蛋白酵素を蛋白質レベルで比較することにより、その生合成機構を考察した。なお本論文は、以下の様な構成で記述されている。

る。

第1章では、Asp. niger U20-2-5 *acid phosphatase* 生産の生理学的解析の基礎的知見を得るために、本酵素の局在性および局在性の異なるそれぞれの酵素の生産挙動について検討した。また、DEAEセルロースカラム分画を行ない、本酵素が3成分e, i, cからなることを確認し、各成分の局在性および2,3の酵素学的性質について検討した。

第2章では、細胞外酵素中の3成分e, i, cの生産挙動について検討したところ、培養後期に成分iが減少し成分eの増加が認められた。この要因について解析を行ない、成分iからeへの変換を示唆する結果が得られた。

第3章では、3成分のうち相互変換性が認められた2成分e, iの精製を行ない、酵素化学的、蛋白化学的性質について検討し、第1,2章の結果と合わせて、e, i 2成分の生産様式を総合的に考察した。

## 第1章 Acid phosphatase の局在性と多型性

### 第1節 緒言

Acid phosphatase (Orthophosphoric-monoester phosphohydrolase E.C. 3.1.3.2.) は、動物、植物、微生物等、広く生物界に分布しており、一般に多型性を示すことが報告されている。例えば、ゲル濾過法では単一のピークを示すが、DEAEセルロースカラム、電気泳動法で2成分に分けられる human prostate の acid phosphatase<sup>26)</sup>、ゲル濾過法で3成分に分けられる bovine liver の acid phosphatase<sup>27)</sup>、さほじめ pig liver<sup>17)</sup>、human red cell<sup>28)</sup> 等、単一動物組織中に存在する acid phosphatase は多型性を示す。植物組織についても同様、bean leaf<sup>29)</sup>、wheat germ<sup>30)</sup>、sweet potato root<sup>31)</sup>、rice<sup>32)</sup>、tomato fruit<sup>33)</sup> 等の acid phosphatase も多型性を示す。また微生物細胞において、Aspergillus nidulans の acid phosphatase<sup>34)</sup> が電気泳動法により3成分に、Asp. oryzae の acid phosphatase<sup>35)</sup> が至適 pH の違い、および NaF の阻害率の違いにより2成分に分けられることが報告されている。

Acid phosphatase の細胞内局在性に関する報告は少なく、依然明らかにされていない。酵母の acid phosphatase の局在性について、Saccharomyces cerevisiae<sup>36, 37)</sup>、Saccharomyces millii<sup>38)</sup> は、細胞外に分泌されず細胞表層に結合して存在し、酵素活性は細胞破碎後遠心分離上澄液分に回収され

る事が報告されている。カビ類の *acid phosphatase* の細胞内局在性について、*Asp. oryzae*<sup>35)</sup> には、0.5M KCl 溶液中で細胞から遊離してくる成分と、遊離してこられない成分の2種類が存在する。そして、前者は細胞壁に結合した状態でのみ存在するか、後者は細胞壁および細胞膜に結合した状態で存在することか、電子顕微鏡下で確認されている。

本章では、*Aspergillus niger* の *acid phosphatase* に局在性の異なる3種の酵素、細胞外、細胞内、細胞結合酵素が存在すること、および本酵素が多型性を示すことを確認し、各成分の酵素学的性質について検討した。

## 第2節 実験材料および方法

使用菌株: 当研究室保存の *Aspergillus niger* U20-2-5 (アデニン要求性)<sup>39)</sup> を使用した。

培地組成: 培地組成は 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.6) 1ℓ 中に、可溶性デンプン 100g、ペプトン 7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g、アデニン 750 $\mu\text{mole}$  を加えたものを使用した。以下この培地を「基本培地」と称する。前培液にはペレット形成防止のため、「基本培地」可溶性デンプンおよびアデニンの代わりに馬鈴薯デンプン 150g、酵母エキス 7g を加えた「デンプン培地」を使用した。

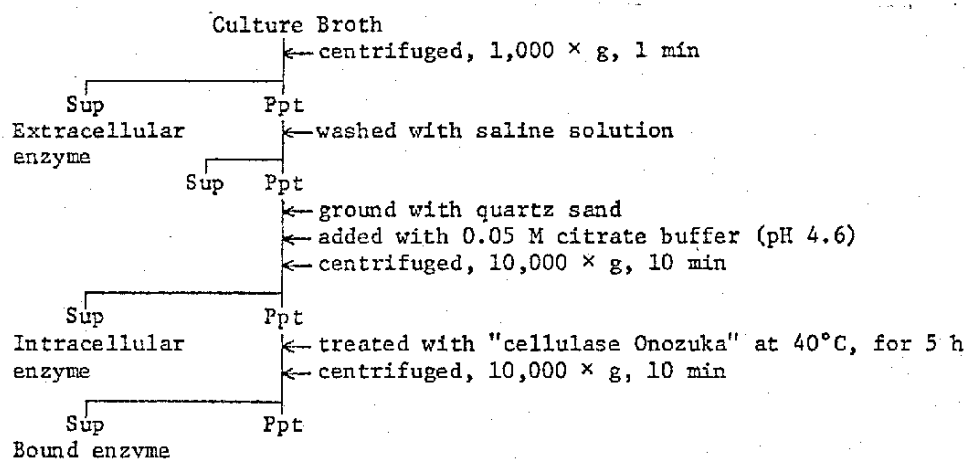
培養方法: 前培液は寒天斜面より胞子懸濁液を作

り、「デンブン培地」に接種し40時間培養した。本培養は先培養菌体を無菌生理食塩水にて洗浄後、元の容量になる様に無菌水に懸濁し、菌容量が15%になる様に「基本培地」に接種した。培養は500ml容あるいは1l容マイヤーフラスコ（実容それぞれ100ml, 200ml）を用い、30°Cでロータリーシェーカー（回転速度120rpm, 回転半径4cm）により振盪培養を行なった。

菌体量の測定： 目盛付遠心管（10ml容）を用い、 $1,000 \times g$ 、1分間で沈降した培養液10ml当りの菌体充填容量で求めた。

Acid phosphatase 活性の測定： p-ニトロフェニルリン酸（以下 pNPP と略す）を基質とする常法<sup>40)</sup>に従った。酵素液0.5mlに5mM pNPPを含む0.1Mクエン酸緩衝液（pH 4.0）2mlを加え、40°C、20分間酵素反応を行なわせた。反応の停止および発色には、0.4M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5mlを加え、410nmの吸光度を測定した。活性の表示は、上記条件下で1分間に1 $\mu\text{mole}$ のp-ニトロフェニールを生成する酵素量を1 unit とした。

細胞外、細胞内、細胞結合酵素の調整： 本菌の生産する acid phosphatase は、その局在性より細胞外、細胞内、細胞結合酵素の3種類に分けられ、それぞれの調整手順を第1-1図に示す。培養液を遠心分離（ $1,000 \times g$ 、1分間）により上澄液分と菌体画分に分け、上澄液分を細胞外酵素とした。菌体画分を生理食塩水で3回洗浄後、菌体を石英砂と共に磨砕し、0.05M クエン酸緩衝液（



第1-1図 細胞外、細胞内、細胞結合酵素の調整法

pH 4.6) を用い、遠心分離 ( $10,000 \times g$ , 10 分間) により菌体内成分を抽出した。この抽出操作を数回繰り返し、抽出画分を細胞内酵素とした。抽出残渣中にも酵素活性の存在が認められ、この活性は  $2\text{M NaCl}$ 、界面活性剤 Tween 80 の添加、あるいは再度の磨砕においても遊離してこなかった。しかし「セルラーゼ・オノヅカ」(1.3% 溶液、近畿ヤリルト) で pH 5.0,  $40^\circ\text{C}$ , 5 時間の処理により、抽出残渣中に認められた酵素活性の 90% 以上が可溶性画分に回収され、この画分を細胞結合酵素とした。なお「セルラーゼ・オノヅカ」は 50-80% アセトンにて分画し使用した。このアセトン分画した酵素液を pNPP と  $40^\circ\text{C}$  で 30 分間酵素反応させても、その分解活性は認められなかった。

細胞外、細胞内、細胞結合酵素の精製: 細胞外、細胞内、細胞結合酵素の精製手順を第 1-2 図に示す。粗酵素液に冷アセトン ( $-15^\circ\text{C}$ ) を最終濃度 60% になる様

Crude enzyme solution

↓  
Acetone fractionation

↓  
Gel filtration on Sephadex G-200 column  
eluted with 0.02 M citrate buffer (pH 4.6)

↓  
Stepwise fractionation on DEAE-cellulose column  
eluted with 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.0)  
containing 0, 0.1 and 0.2 M NaCl

### 第1-2図 細胞外、細胞内、細胞結合酵素の精製手順

に加え、生成した沈殿を遠心分離 ( $10,000 \times g$ , 10 分間) により回収した。この沈殿画分を 0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 4.6) に溶解し、同一緩衝液で平衡化したセファデックス G-200 カラム ( $18\text{mm}\phi \times 800\text{mm}$ ) を用い、0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 4.6) で溶出しゲル通過した。活性区分を減圧濃縮後 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、同一緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE セルロースカラム ( $15\text{mm}\phi \times 150\text{mm}$ ) 上で、0, 0.1, 0.2 M NaCl を含む 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を用いて段階的に溶出させた。なお各操作は、特に述べないかぎり  $0-5^{\circ}\text{C}$  で行なった。

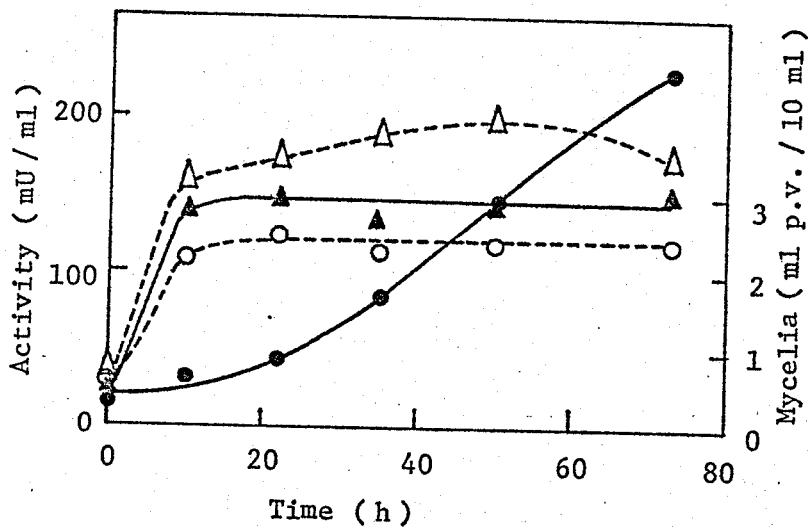
ディスク電気泳動: 7% 標準ゲル (pH 8.0)<sup>41)</sup> を用い、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $1.5\text{mA}/\text{tube}$  ( $6\text{mm}\phi \times 70\text{mm}$ ) で泳動を行なった。泳動ゲルは、 $1\text{mg}/\text{ml}$   $\alpha$ -ナフチルリン酸、 $5\text{mg}/\text{ml}$  Fast Blue を含む 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.0) に浸漬し、活性染色した。<sup>42)</sup>

## 第3節 実験結果

# 1. Acid phosphatase の局在性

本菌の生産する acid phosphatase はその局在性から、培養液中に存在する細胞外酵素、菌体に保持された状態で存在し、磨砕後緩衝液中で抽出される細胞内酵素、および磨砕後 NaCl、界面活性剤を添加しても抽出残渣から遊離してこない細胞結合酵素の3種類に分けられる。

これら局在性の異なる3種類の酵素の調整方法は、第1-1図に示した。この方法に従って調整した細胞内酵素と細胞結合酵素の和は、洗浄菌体をアセトンドライ、または凍結乾燥後、菌体懸濁液のままに測定した酵素活性と一致したことから、この調整方法で全酵素活性が回収されているものと考えられる。



第1-3図 細胞外、細胞内、細胞結合酵素の生産挙動

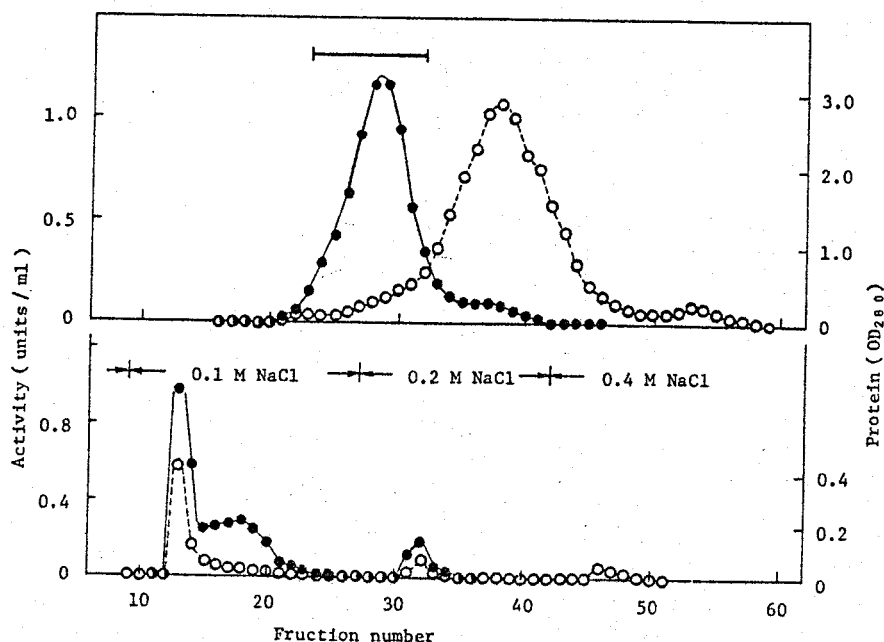
-----○-----: 菌体量, —●—: 細胞外酵素, ----△----: 細胞内酵素, —▲—: 細胞結合酵素

局在性の異なるこれら3種酵素の生産経過について検討した結果を第1-3回に示す。苜体増殖は約15時間後に停止し、以後一定値を保った。増殖停止期にアデニン再添加を行なうと、増殖が再開したことより、増殖の停止はアデニン欠乏によるものと考えられた。培養経過にともなう細胞内および細胞結合酵素生産量は、苜体量当り一定で典型的な増殖連動型を示した。細胞外酵素生産量は、苜体増殖が停止した後も逐時増加し、増殖非連動型を示した。

## 2. *Acid phosphatase* の多型性

局在性の異なる3種類の酵素、細胞外、細胞内、細胞結合酵素の酵素化学的、蛋白化学的性質について、比較検討するために、各酵素の部分精製を行なった。50時間培養液より調整した細胞外、細胞内、細胞結合酵素を、アセトン分画、セファデックスG-200ゲル分過、DEAEセルロースカラム分画を行ない、その結果を第1-4, 5, 6回に示す。アセトン分画、セファデックスG-200ゲル分過、DEAEセルロースカラム分画における活性の回収率は、それぞれ95, 90, 80%以上であった。セファデックスG-200ゲル分過による *acid phosphatase* 活性の溶出パターンは、細胞外(第1-4回)、細胞内(第1-5回)、細胞結合酵素(第1-6回)とも単一ピークを示し、大差は認められなかった。しかし、その活性区分のDEAEセルロースカラムの溶出パターンより、細胞外酵素中に3成分(第1-4回)、細胞内酵素中に2成

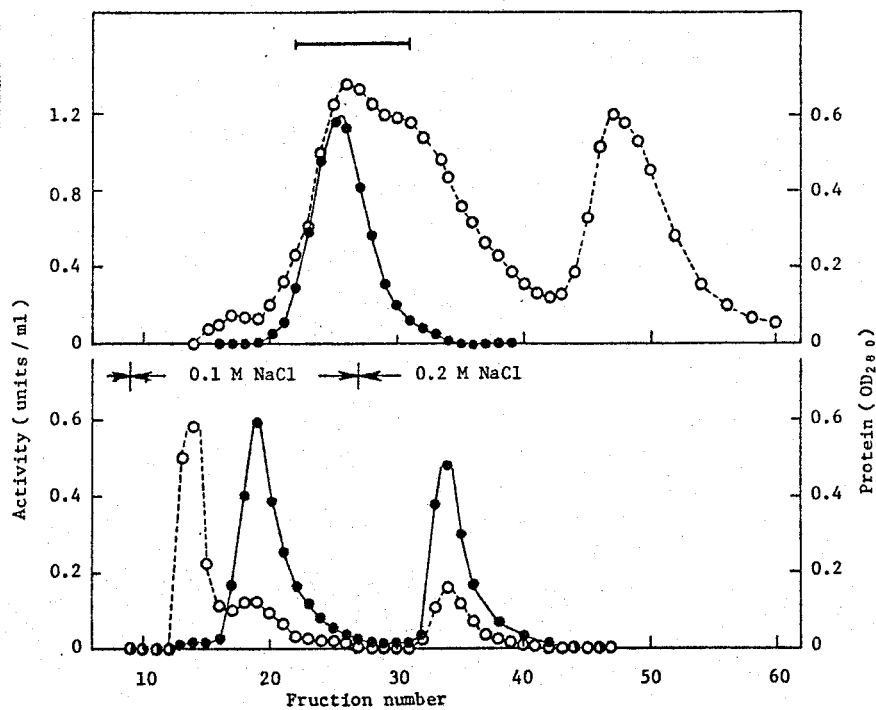
分(第1-5回)、細胞結合酵素中に1成分(第1-6回)存在する事が示唆された。



#### 第1-4回 細胞外酵素のカラムクロマトグラム

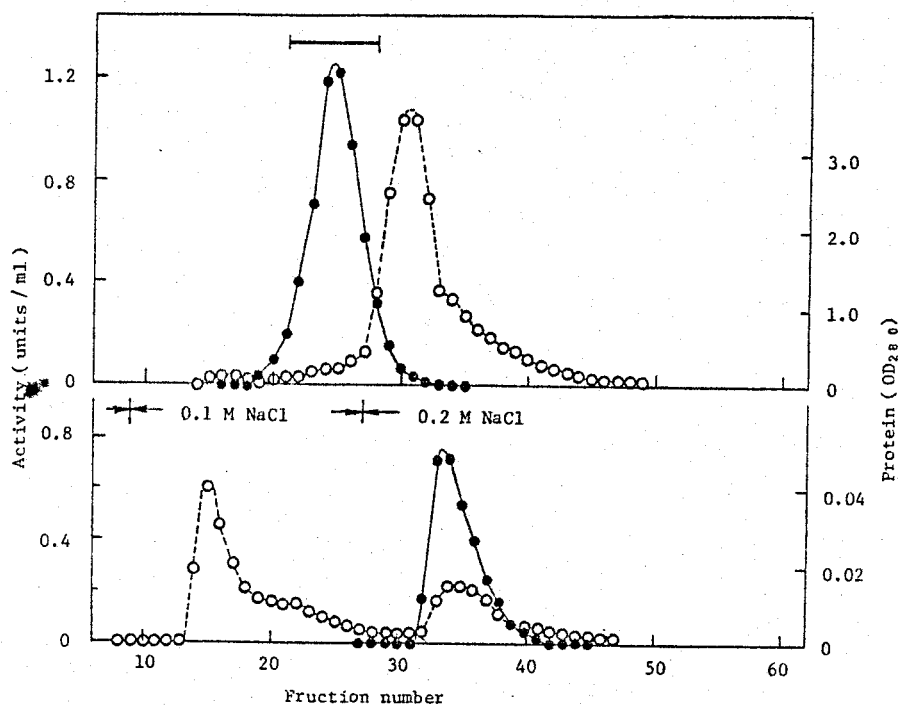
粗酵素液をアセトン分画(0-60%)し、沈殿画分をセフデックス G-200 カラムを用いて分画した結果を上図に、更に活性画分を DEAE セルロースカラム上で分画した結果を下図に示す。なお両カラムを用いた分画は、第2節実験方法に準じて行なった。

---○--- : 蛋白, —●— : 活性



### 第1-5図 細胞内酵素のカラムクロマトグラム

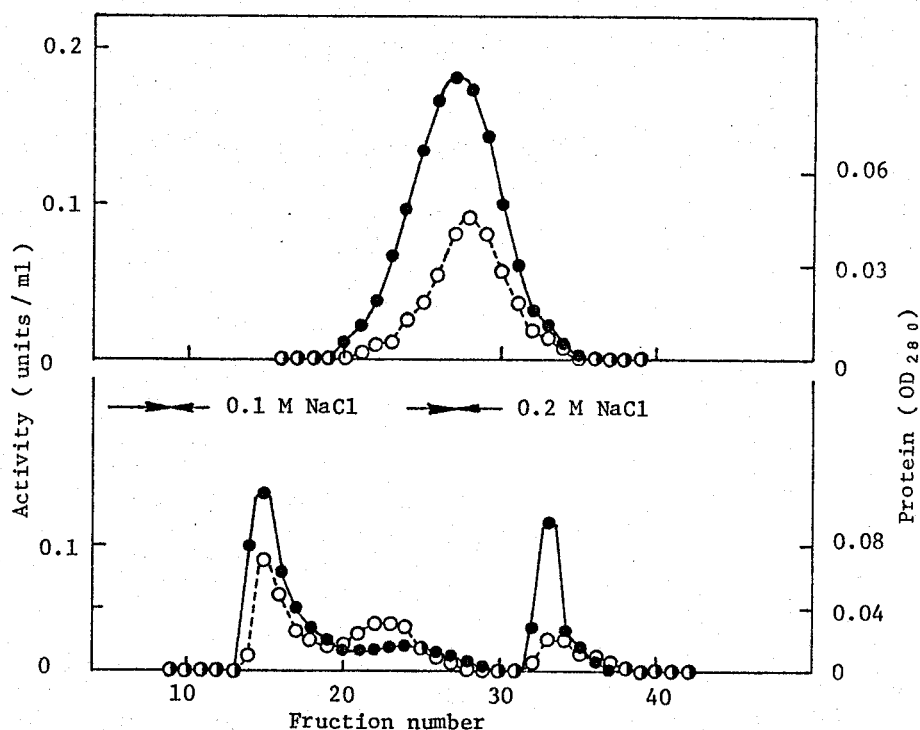
上図にセファデックスG-200カラム分画, 下図にDEAEセルロースカラム分画の結果を示す。両カラムを用いた分画は, 第1-4図に準じて行なった。----○----: 蛋白, —●—: 活性



第1-6図 細胞結合酵素のカラムクロマトグラム

「オノズカ」処理により抽出残渣から溶離してきた酵素液をアセトン沈殿し、沈殿画分をセファデックスG-200カラムを用いて分画し(上図)、更にこの活性区分をDEAEセルロースカラムを用いて分画した(下図)。両カラムを用いた分画は、第1-4図に準じて行なった。

局在性の異なる3種類の酵素、細胞外、細胞内、細胞結合酵素中に存在する各成分のDEAEセルロースカラム上での対応性について検討した。細胞外酵素0.1M NaCl溶出画分最初の活性ピークに相当する酵素成分、細胞内酵素0.1M NaClで溶出される酵素成分、細胞結合酵素0.2M NaClで溶出される酵素成分をそれぞれ3:1:2の比率に混合し、セファデックスG-200ゲル透過、およびDEAEセルロースカラム分画を行なった結果を第1-7図に示す。セファデックスG-200ゲル透過では単一のピークを示し、DEAEセルロースカラムク



第1-7図 3成分e, c, b混合酵素液の再クロマトグラム

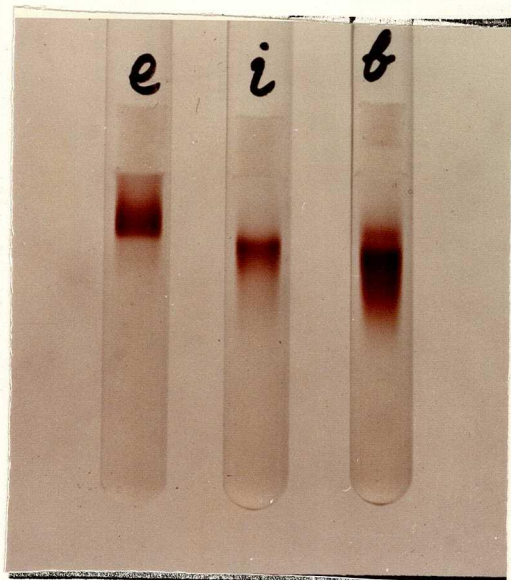
細胞外、細胞内、細胞結合酵素から調整した成分e, c, bを3:1:2の割合に混合し、セファックスQ-200カラムを用いて分画(上図)した後、その活性区分をDEAEセルロースカラムで分画した(下図)。両カラムを用いた分画は、第1-4図に準じて行なった。

クロマトグラムは、0.1M NaCl 溶出画分に2つの活性ピーク、0.2M NaCl 溶出画分には1つの活性ピークが認められ、この活性ピークの面積比は3:1:2であった。以上の結果から、細胞内酵素 DEAEセルロースカラムクロマトグラムの0.1M NaCl 溶出画分の活性ピークに相当する酵素成分は、細胞外酵素 DEAEセルロースカラムクロマトグラムの0.1M NaCl 溶出画分2番目の活性ピークに相当する。以後、この酵素成分は、細胞内酵素中に多く存在することから成分cとした。細胞外

酵素 DEAE セルロース カラム クロマト グラム の 0.1 M NaCl 溶出画分最初の活性ピークに相当する酵素成分は、細胞内酵素、細胞結合酵素中には認められなかった。以後、この酵素成分は、細胞外酵素中のみ存在することから成分 e とした。細胞外酵素 DEAE セルロース カラム クロマト グラム の 0.2 M NaCl 溶出画分の活性ピークに相当する酵素成分は、細胞内酵素、細胞結合酵素中にも認められた。しかし、細胞結合酵素中にはこの成分しか存在しないうため、以後この酵素成分を成分 c とした。

3 成分 e, i, c をそれぞれ細胞外、細胞内、細胞結合酵素より調整し、各成分のディスク電気泳動を行なった。第 1-8 図にその結果を示す。各成分の main band は一本で、成分 e, i, c の移動度には明らかに差が認められた。

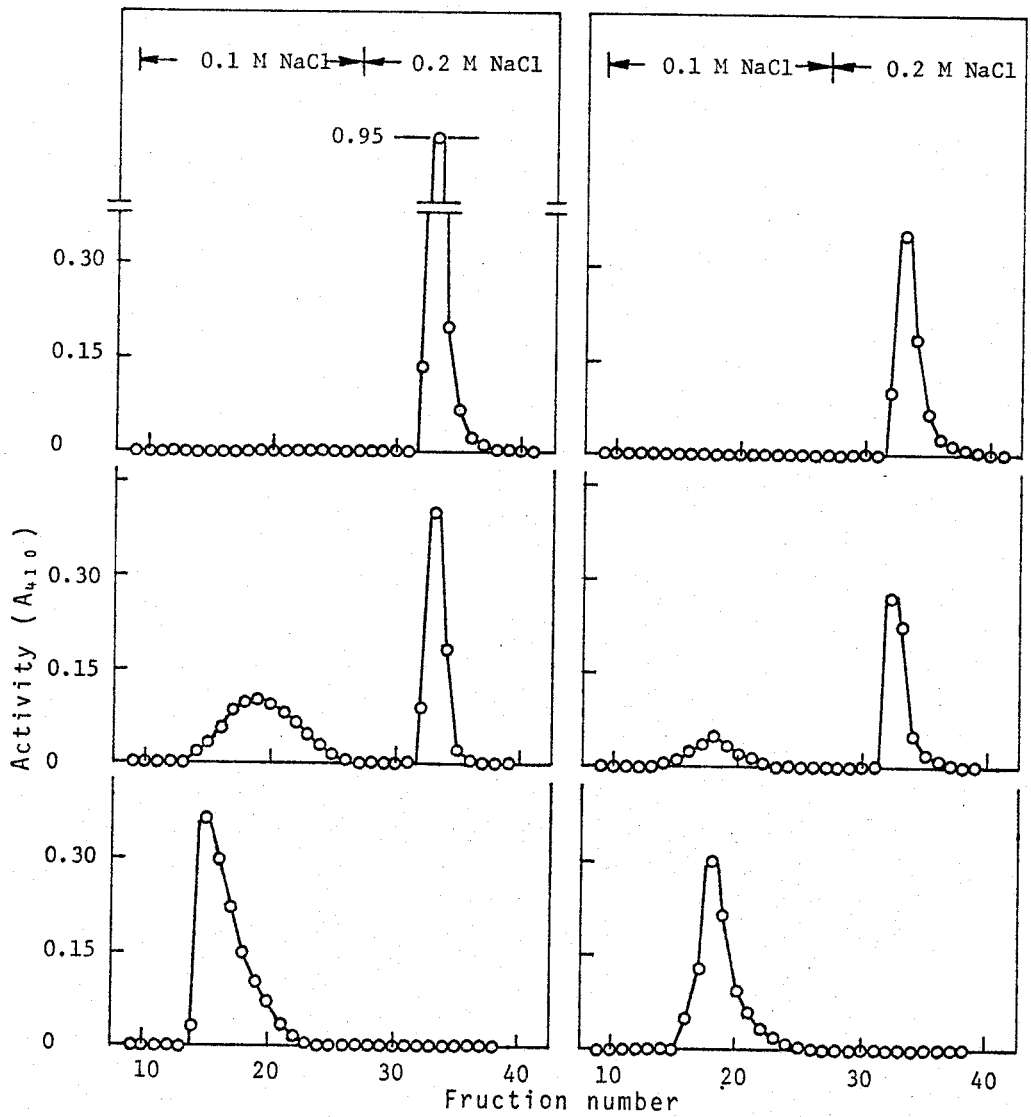
以上の結果より、本菌の生産する acid phosphatase は、少なくとも 3 つの酵素成分 e, i, c よりなる事が示唆された。



第 1-8 図 3 成分 e, i, c のディスク電気泳動。使用した酵素量は、各々約 1.0 unit。泳動は実験方法に準じて行ない、泳動後、ジアゾニウム法により活性染色した。

### 3. 「セルラーゼ・オノズカ」処理による成分e, c からの変換

*Trichoderma viridi* からの酵素標品「セルラーゼ・オノズカ」処理によって溶離してきた細胞結合酵素中には、唯一の酵素成分cしか認められなかった。この結果が、酵素処理による人為的な結果であるか否かを検討するため、以下の様な実験を行なった。成分e (750 units) または成分c (500 units) に「セルラーゼ・オノズカ」(最終濃度 1.3%) を加え、0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 中、40°C で反応させた。なお「セルラーゼ・オノズカ」は、50~80% アセトンにて分画した酵素液を用い、この酵素液中に pNPP 分解活性は認められなかった。反応後、反応混液をアセトンにて分画(最終濃 60%) した後、沈殿画分を 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、DEAE セルロースカラム上で種々濃度の NaCl を用い段階的に溶出させた。その溶出パターンを第 1-9 図に示す。成分e および c は、「セルラーゼ・オノズカ」で 5 時間処理する事により、完全に成分c に変換されたが、成分c はそれ以上変換されなかった。以上の結果より、細胞結合酵素から溶離してくる成分c は、「セルラーゼ・オノズカ」処理による人為的な結果の可能性もあると結論され、細胞結合酵素がどの様な成分から構成されているかは不明である。



第1-9圖 「セルラーゼ・オノズカ」存在下における e, c 両成分の変換性  
 DEAEセルロースカラムを用いた分画は、第2節実験方法に準じて行  
 なった。下図：「オノズカ」を加えていない成分 e および c の DEAE  
 セルロースカラムの溶出パターン。中, 上図：成分 e, c に「オノズカ」  
 を加え 1, 5 時間反応後の DEAEセルロースカラムの溶出パターン。

#### 第4節 考察

一般に単一組織、単一細胞で生産される acid phosphatase は、多型性を示す事が報告されている。そして、第1-4, 5, 6 回の DEAE セルロースカラムクロマトグラム、および第1-8 回 ディスク電気泳動後の活性染色のパターンより、本召の生産する acid phosphatase は、成分 e, i, c の3成分よりなることが示唆された。第1-4 回、細胞外酵素 0.1M NaCl 溶出画分最初の活性ピークに相当する酵素成分、第1-5 回、細胞内酵素 0.1M NaCl 溶出画分の活性ピークに相当する酵素成分、および第1-6 回、細胞結合酵素 0.2M NaCl 溶出画分の活性ピークに相当する酵素成分を混合し、DEAE セルロースカラム上で再分画した第1-7 回の結果より、細胞内酵素 0.1M NaCl 溶出画分の活性ピークは、細胞外酵素 0.1M NaCl 溶出画分の2番目の活性ピークに対応することが示唆された。従って、これらの成分 e, i, c の局在性は、成分 e は細胞外酵素中にのみ存在し、成分 i は細胞外、細胞内酵素中に存在し、細胞内酵素の主成分で、成分 c は細胞外、細胞内、細胞結合酵素中に存在するか、細胞結合酵素中にはこの成分しか存在しない。

細胞外酵素より調整した成分 e、細胞内酵素より調整した成分 i、細胞結合酵素より調整した成分 c をそれぞれ 3:1:2 に混合し、DEAE セルロースカラム上で再分画した結果、成分 e, i, c に対応する活性ピークは 3:1:2 の面積比を示した(第1-7 回)。従って、DEAE セルロースカラムを

用いることにより、各成分の定量が可能であることが示唆された。

第1-13回より、成分e, cは「オノズカ」処理により完全に成分cに変換されたが、成分cはそれ以上変換されなかった。従って「オノズカ」処理により細胞結合酵素から溶離してきた成分cは、「オノズカ」処理により生成した成分である可能性も考えられ、細胞結合酵素がどの様な成分から構成されているかは不明である。

## 第5節 要約

1. Aspergillus niger U20-2-5の生産する acid phosphatase は、局在性から大別して、細胞外、細胞内、細胞結合酵素の3種類に分けられる。そして、これらの3種酵素の生産挙動について、細胞内酵素および細胞結合酵素は増殖連動型、細胞外酵素は増殖非連動型を示した。

2. 本品の生産する acid phosphatase は、DEAEセルロースカラム分画法、デイスコ電気泳動法により3成分e, c, c'に分けられ、外型性を示す事が示唆された。そして、細胞外酵素中には3成分e, c, c'が、細胞内酵素中には2成分c, c'が、細胞結合酵素中には1成分cが存在した。

3. 成分e, cは、「オノズカ」処理により成分cに変換され、成分cはそれ以上他の成分に変換されなかった。従って、in vivoで細胞結合酵素がどの様な酵素成分から構成されているかは不明である。

## 第2章 Acid phosphatase 3 成分の形成と相互変換性

### 第1節 緒言

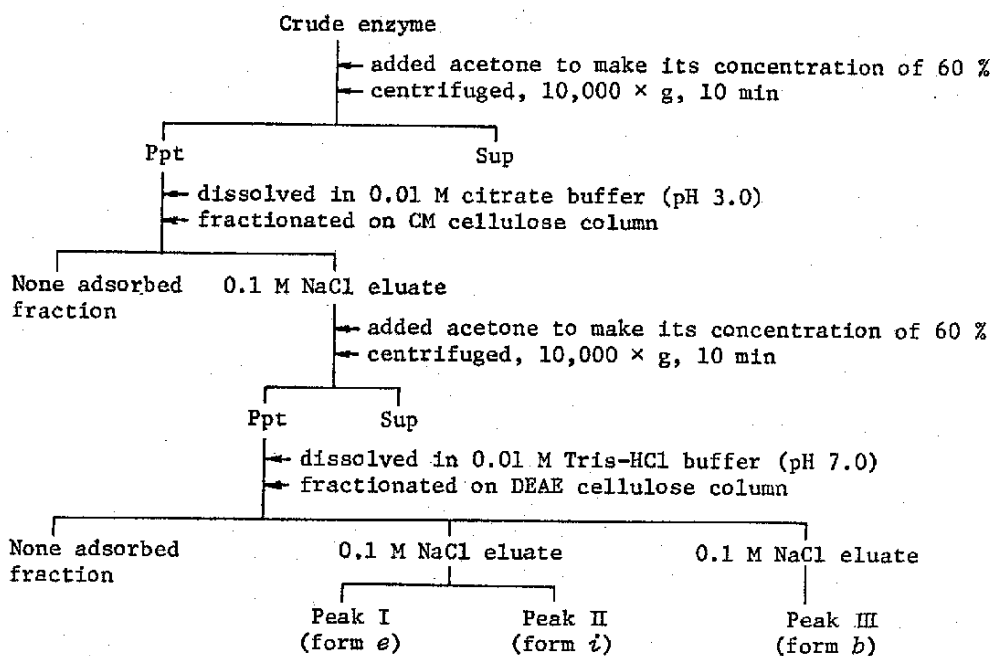
単一組織、単一細胞で生合成された酵素分子が、多型性を示し、各成分間で相互変換が認められ、その生物学的意義について考察している例がいくつか報告されている。Rat liver の tyrosine aminotransferase<sup>43)</sup> は、一旦生合成された酵素成分 I が carbamylation を受け、成分 II から成分 III に変換される。そして carbamylation を受けた成分 III は、生体内で急速に分解される。この蛋白合成以後の段階における carbamylation は、生体内での酵素分子 turn over の調節機構と関係している。Human の glutamine pp-ribose-p amidotransferase<sup>44)</sup> には、AMP、GMP でアロステリック阻害を受ける large form (2 量体) と、AMP、GMP で阻害されない small form (単量体) の 2 成分が存在し、pp-ribose-p 存在下で large form から small form に変換される。そして、この蛋白質レベルの変換 (酵素分子の解離、解合) は、AMP、GMP によるアロステリック効果と関係している。Bacillus licheniformis の penicillinase<sup>45, 46)</sup> は、膜結合酵素から phospholipid が切断されることにより細胞外酵素に変換される。この蛋白質レベルでの変換は、酵素分子分泌における必須条件で、酵素分子の安定性にも関係している。このほか、酵素分子が多型性を示し、各成分間で相互変

換の可能性が認められているが、生物学的意義の不明な例として、Neurospora crassa alkali phosphatase<sup>47)</sup> の mycelia-型と exo-型の相互変換性、Penicillium variabile<sup>48)</sup>、Pyricularia oryzae<sup>49)</sup> の cellulase における相互変換性等が報告されている。一方 acid phosphatase においても、human prostate<sup>50)</sup>、pig liver<sup>17)</sup> の acid phosphatase は、酵素分子中に含まれるシアル酸残基数の違いにより多型性を示し、neuraminidase 処理による相互変換性が認められているが、その生物学的意義は不明である。

本菌の生産する acid phosphatase は、3成分 e, i, c からなり多型性を示す。そして、本菌 acid phosphatase の生合成様構を解明するためには、3成分が各々独立に生合成されるのか、あるいは一旦生合成された蛋白質が修飾を受け、他の成分に変換されるのか、について検討しなければならない。また、多型性を示す生物学的意義を解明するためにも、3成分の相互変換性の有無について検討する必要がある。そこで、本章では、本菌によって生産される3成分 e, i, c の、in vivo, in vitro における相互変換性の有無について検討した。

## 第2節 実験材料および方法

3成分 e, i, c の調整： 成分 e は 75 時間培養細胞外酵素から、成分 i および c は 24 時間培養細胞内酵素から第 2-1 図に従って調整した。以下の各操作は、特に述

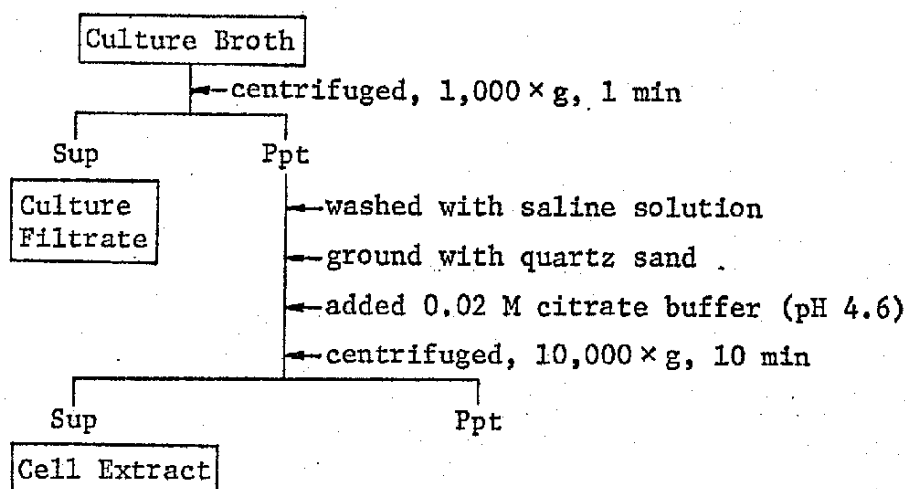


#### 第2-1回 3成分e, i, bの調整方法

べないかぎり 0~5℃で行なった。粗酵素液に冷アセトン (-15℃) を最終濃度 60% になる様に加え、生成した沈殿を 10,000×g, 10分間の遠心分離により回収した。沈殿画分を 0.01M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) に溶解し、同一緩衝液で平衡化した CM セルロースカラム (19mmφ×250mm) 上で 0, 0.1 M NaCl を含む 0.01M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) を用いて段階的に溶かすせた。酵素活性は、0.1M NaCl 溶か画分に回収され、この活性区分を更に 60% アセトンにて沈殿させた。沈殿画分を 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、同一緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE セルロースカラム (15mmφ×150mm) 上で 0, 0.1, 0.2 M NaCl を含む 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を用いて溶かすせ

た。酵素活性の溶出パターンは、第1章で示した様に3つの活性ピークに分かれ、成分c, d, eに相当する活性区分を回収し、0.05Mクエン酸緩衝液(pH4.6)に溶解した酵素液を以下の実験に使用した。

培養液、培養上清液、細胞抽出液の調整： 培養液、培養上清液、細胞抽出液は、第2-2図に従って調整した。



第2-2図 培養液、培養上清液、細胞抽出液の調整方法

各操作は、全て 0-5℃で行なった。50 ml 培養液を 1,000 × g, 1分間の遠心分離により、上澄画分と沉淀画分に分け、上澄画分を培養上清液とした。沉淀を 150ml 生理食塩水で何度も洗浄 (Wattman No.2) 後、洗浄沉淀を等量の石英砂とともに磨砕し、15ml クエン酸緩衝液 (pH4.6) を加え、細胞内成分を遠心分離 (10,000 × g, 10分間) により抽出する。抽出画分に同一緩衝液 (pH4.6) を加え 25ml とし、細胞抽出液とした。なお培養液は 50 時間培養、培

培養液、細胞抽出液は60時間培養から調整した。

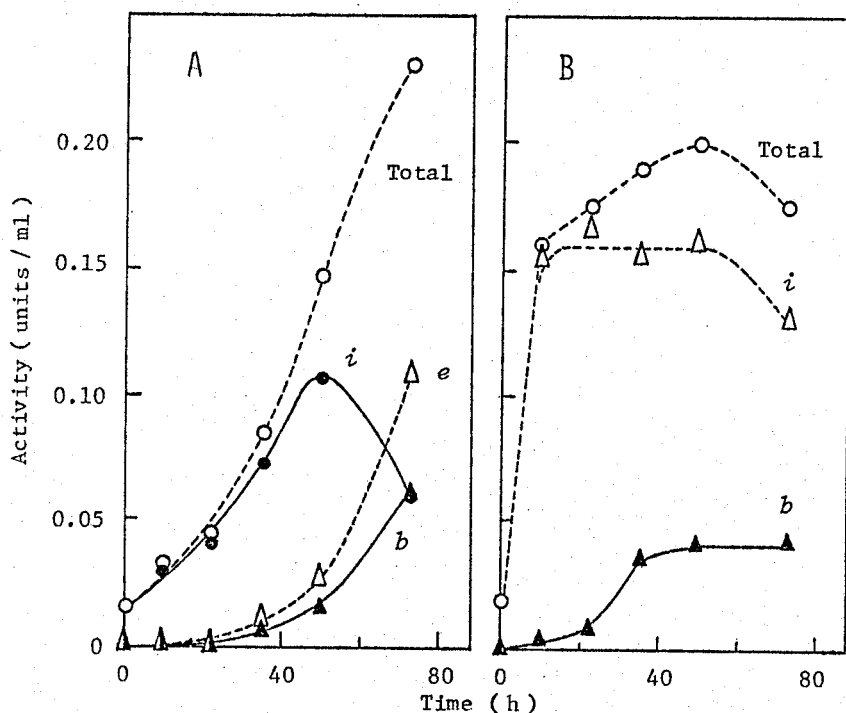
3成分e, i, cと培養液、培養液、細胞抽出液との反応： 培養液、培養液、細胞抽出液存在下における3成分e, i, cの相互変換性を検討するために、3成分e, i, cと培養液、培養液、細胞抽出液を30℃で反応させた。培養液存在下での相互変換実験は、ガイッツ処理した成分e, i, c (10ml) に培養液 (10ml) を、また培養液存在下における相互変換実験は、ガイッツ処理した成分e, i, c (10ml) にガイッツ処理した培養液 (10ml) を無菌的に加え反応させた。細胞抽出液存在下での相互変換実験は、無菌操作なしで成分e, i, c (10ml) に細胞抽出液 (10ml) を加え反応させた。

3成分e, i, cの定量： 以下の各操作は、特に述べないかぎり 0-5℃で行なった。試料に冷アセトン (-15℃) を最終濃度60%になる様に加え、生成した沈殿を10,000×g, 10分間の遠心分離により回収する。沈殿画分を、0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、同一緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したDEAEセルロースカラム (15mmφ × 150mm) 上で、0, 0.1, 0.2 M NaCl を含む同一緩衝液を用いて段階的に溶かさせ、その溶出パターンのピーク面積から成分e, i, cの定量を行なった。

### 第3節 実験結果

#### 1. Acid phosphatase 3成分の生産挙動

本菌によって生産される acid phosphatase は、細胞外酵素中に3成分*e*, *i*, *b*が、細胞内酵素中に2成分*i*, *b*が存在する。細胞外酵素中に存在する3成分*e*, *i*, *b*の生産挙動について検討した結果を第2-3(A)図に示す。成



第2-3図 3成分*e*, *i*, *b*の生産挙動

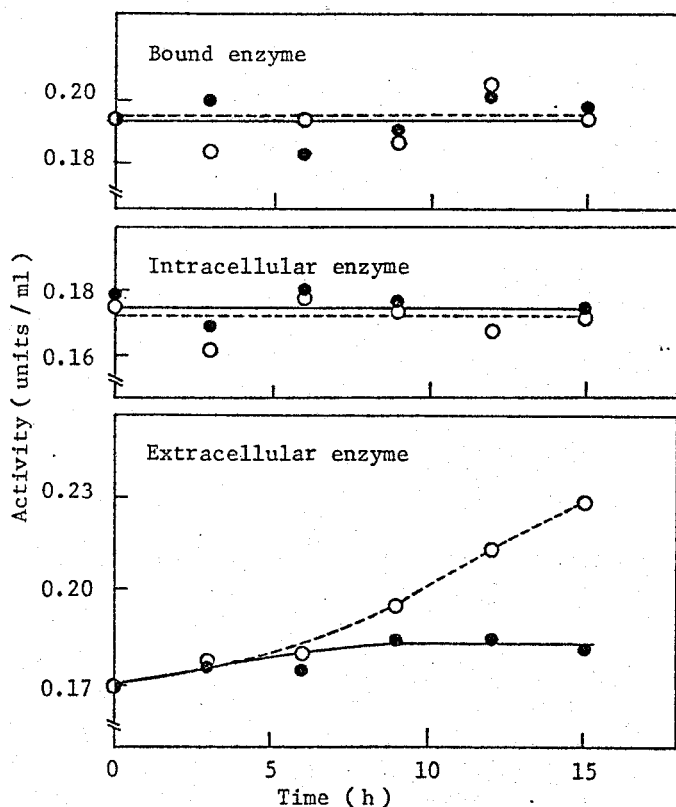
3成分*e*, *i*, *b*の定量は、第2節実験方法に準じ DEAE セルロースカラムを用いて行なった。A図：細胞外酵素中に存在する3成分*e*, *i*, *b*の生産挙動。B図：細胞内酵素中に存在する2成分*i*, *b*の生産挙動。

成分*i*は培養前期から細胞外酵素中に認められ、培養経過にともない逐時増加するが約50時間以後減少する。一方、成分*e*および*b*は増殖停止(約15時間)後細胞外酵

素中に認められ、培養経過とともに増加した。細胞内酵素中に存在する2成分およびその生産挙動について検討した結果を第2-3(B)図に示す。成分cは培養経過中菌体量当り一定値を保ち、成分bは菌体増殖停止後細胞内酵素中に認められ、約40時間以後一定値を保った。

第2-3(A)図、細胞外酵素中の3成分の生産挙動について、48-72時間の間で、成分cが減少し成分eおよびbが増加した。この成分cの減少にともなう成分eおよびbの増加について、約50時間以後は、成分eおよびbが生産され、成分cが生産されず失活のみおこるという可能性が考えられる。この仮説について検討した結果を第2-4図に示す。48時間培養液に蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドを添加し、以後の酵素生産の経時変化を細胞外、細胞内、細胞結合酵素に分けて検討した。なおシクロヘキシミドは、細胞内へのロイシン取り込みを停止させる最少量、 $20\mu\text{g/ml}$ になる様に添加した。培養経過中菌体量は変化なく一定値を保った。細胞内、細胞結合酵素は、シクロヘキシミド添加、無添加に拘わらず培養経過中一定値を維持した。細胞外酵素は、シクロヘキシミド無添加の場合生産が持続するのに対し、シクロヘキシミドを添加した場合、3時間のlagの後に生産が停止し一定値を保った。以上、シクロヘキシミド添加により酵素生産を停止させても、全酵素量の減少は認められず一定値を維持した。従って、第2-3(A)図、培養後期に認められる成分cの減少は、失活によるものとは考えら

れない。そこで、以下成分から成分EまたはFへの  
変換の可解性について検討した。



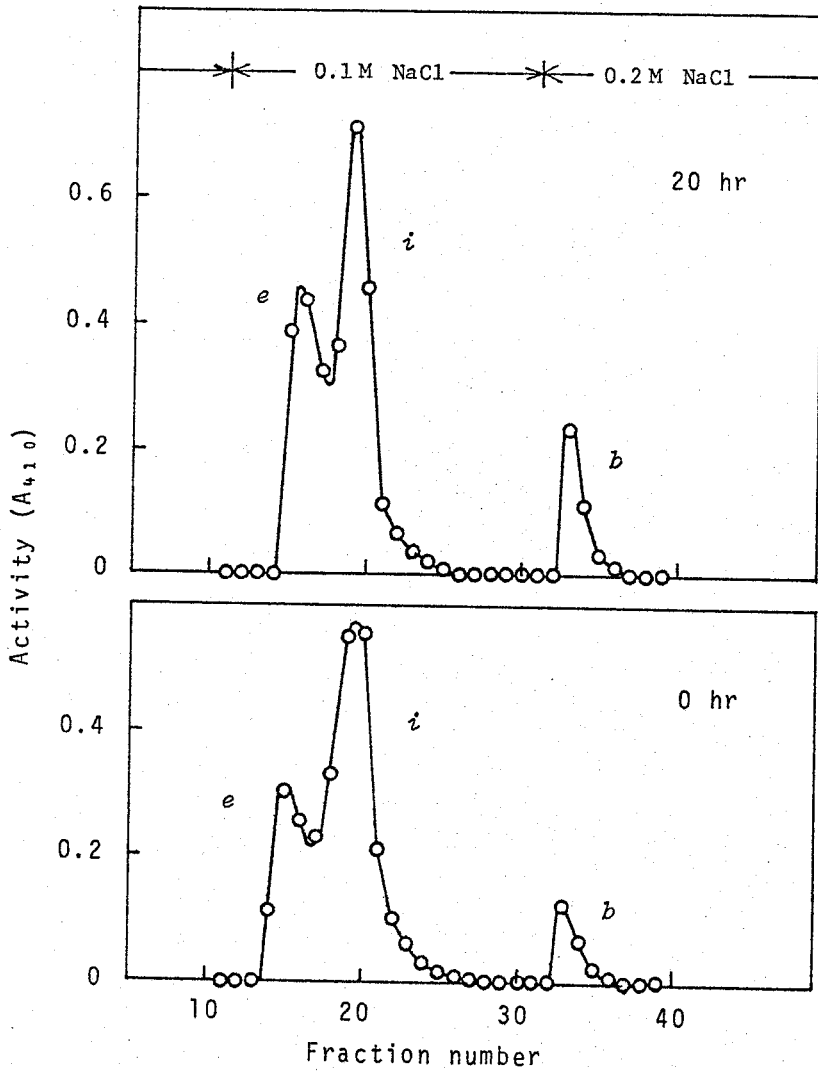
第2-4図 細胞外、細胞内、細胞結合酵素生産におよ  
ぼすシクロヘキシミドの影響。48時間培養液  
にシクロヘキシミドを添加(20 $\mu$ g/ml)し、以後の  
酵素生産量を細胞外、細胞内、細胞結合酵素に分  
けて示した。局在性の異なる3種酵素の分画方  
法は第1章に準じた。----○----: シクロヘキ  
シミド無添加。——●——: シクロヘキシミド添加

## 2. 培養液および細胞抽出液中に存在する成分の相互変換性

3成分間で相互変換が起こっているとするならば、第2-3図より増殖停止後である。以下、60時間培養から調整した培養液、細胞抽出液を保温することにより、3成分の相互変換性について検討した。

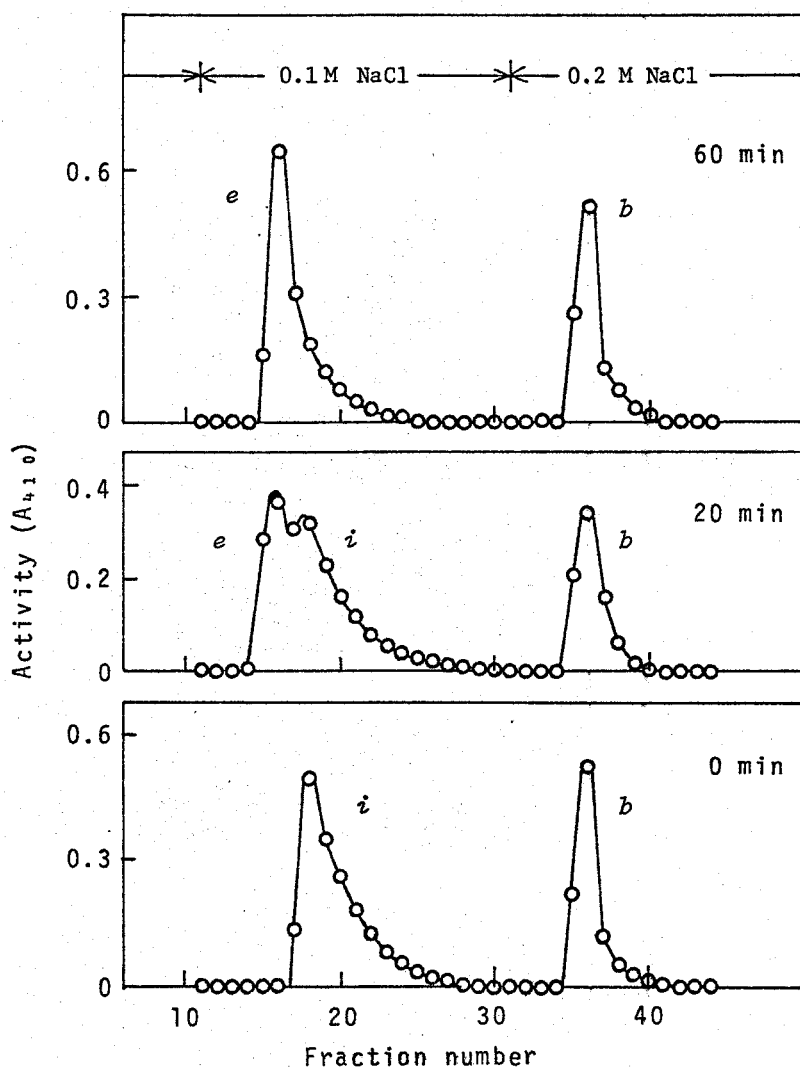
ザイツー処理した60時間培養液を30℃で保温した。保温前後の acid phosphatase 活性は、それぞれ 0.83 (0時間)、0.82 (10時間)、0.82 units/ml (20時間) と変化なかった。各試料 (2ml) をアセトン (最終濃度60%) にて沈殿させ、沈殿画分を 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、同緩衝液で平衡化した DEAE セルロースカラム上で種々濃度の NaCl を含む 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を用いて溶出させた。このときの溶出パターンを第2-5図に示す。60時間培養液中には3成分e, c, bが含まれており (第2-5下図)、30℃で20時間保温しても3成分e, c, bの溶出パターンに変化は認められなかった (第2-5上図)。

60時間細胞抽出液を30℃で保温した。保温前後の acid phosphatase 活性は、それぞれ 0.44 (0分間)、0.42 (20分間)、0.43 units/ml (60分間) と変化しなかった。各試料 (3.5ml) の DEAE セルロースカラム上での溶出パターンを第2-6図に示す。60時間細胞抽出液中には成分cおよびbが含まれており、30℃で20、60分間保温しても、0.2M NaCl 溶出画分に認められる酵素成分bの量には変化がなかった。しかし、0.1M NaCl 溶出画分に認められる



第2-5図 培養液中に存在する3成分の相互変換性。  
 DEAEセルロースカラムを用いた分離方法は、第2節実験方法に準じた。上図：60時間培養液を30℃で20時間保温した試料のDEAEセルロースカラムクロマトグラム。下図：60時間培養液のDEAEセルロースカラムクロマトグラム。

酵素活性の落ちパターンは、保温しなかった場合成分iの活性ピークのみ(第2-6下図)で、20分間保温後には成分



第2-6図 細胞抽出液中に存在する2成分の相互変換性。  
DEAEセルロースカラムを用いた分画方法は、第2節実験方法に準じた。60時間細胞抽出液のDEAEセルロースカラムクロマトグラムを下図に、60時間細胞抽出液を30℃で20分、60分間保温した試料のDEAEセルロースカラムクロマトグラムをそれぞれ中、上図に示す。

eとiに対応する活性ピークが認められ(第2-6中図)、60分保温後には成分eに対応する活性ピークのみ認められ

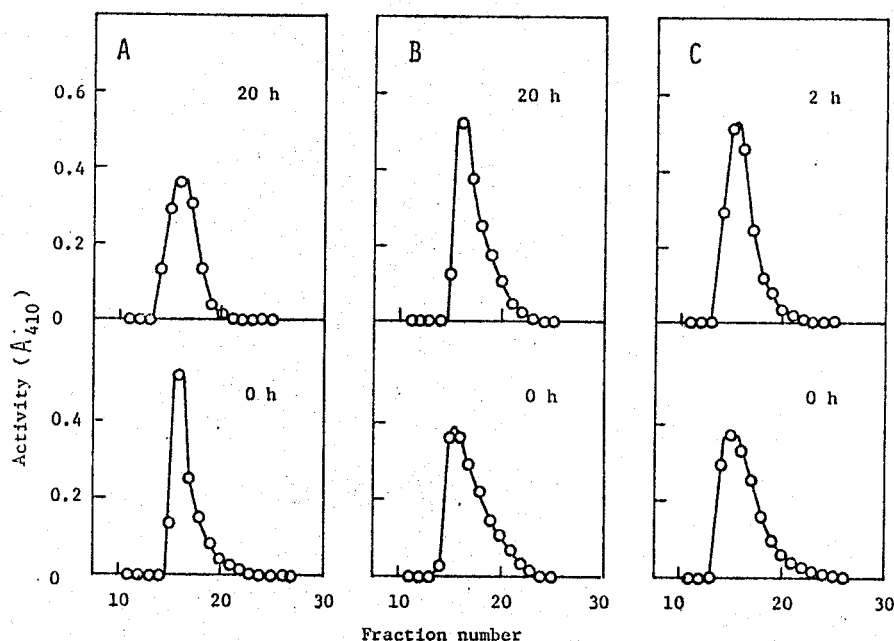
た(第2-6上図)。以下、成分 $i$ を *in vitro* で反応させることにより、DEAEセルロースカラム分画で成分 $e$ に対応する画分に溶出されてきた成分を *converted form i* と称する。

第2-5, 6図より、培養液を保温しても3成分 $e, i, c$ の比率は変化しなかったが、細胞抽出液を保温した場合、成分 $i$ が減少し *converted form i* が増加した。以上の結果は、成分 $i$ から $e$ への変換の可能性を示唆しており、このことを詳細に検討する目的で、3成分 $e, i, c$ と培養液、培養液、細胞抽出液を反応させ、3成分の相互変換性について検討した。

### 3. 3成分 $e, i, c$ と培養液、培養液、細胞抽出液との反応

3成分 $e, i, c$ と培養液、培養液、細胞抽出液を反応させ、各成分間の相互変換性の有無について検討した。第2-3図より相互変換の可能性が認められるのは、増殖停止後で、成分 $i$ の減少が認められるのは約50時間以後であることを考慮に入れ、培養液は50時間、培養液、細胞抽出液は60時間培養より調整した。成分 $e$  (0.88 units/ml) 10ml に培養液 10ml を加え 30℃ で反応させ、反応後遠心分離により上澄画分を調整する。反応前後における遠心分離上澄画分の酵素活性は、0.50 (0時間)、0.54 units/ml (20時間) であった。この酵素活性の増加は、甘体存在下で保温しているため、この間に生産さ

れた酵素量を表わしているものと考えられる。この上澄画分(2ml)に冷アセトン(-15°C)を最終濃度60%になる様に加え、生成した沈殿画分を0.01M Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)に溶解し、第2節実験方法に準じ、DEAEセルロースカ

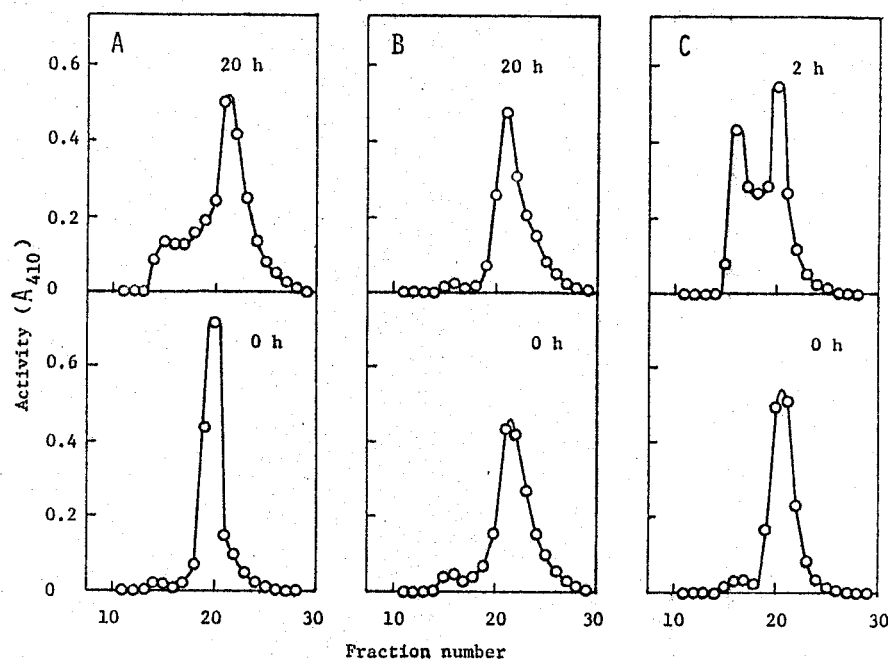


第2-7図 成分eを培養液、培養液、細胞抽出液と反応させたときのDEAEセルロースカラムクロマトグラム。DEAEセルロースカラムを用いた分画は、第2節実験方法に準じた。成分eを培養液と反応させ、反応後におけるDEAEセルロースカラムクロマトグラムをA図に、培養液、細胞抽出液と反応させたときのDEAEセルロースカラムクロマトグラムをそれぞれB, C図に示した。

ム上で食塩濃度を段階的に変化させ、分画した結果を第2-7(A)図に示す。成分e (0.88 units/ml) 10ml に培養液10mlを加え、30°Cで反応させた。反応後における酵素活性の変化は認められず0.52 units/mlであった。反

応混液を上述した方法に従って DEAE セルロースカラム上で分画し、その結果を第 2-7(B) 図に示す。成分 e ( $0.96 \text{ units/ml}$ )  $10 \text{ ml}$  に細胞抽出液  $10 \text{ ml}$  ( $20 \text{ ml culture eq.}$ ) を加え  $30^\circ\text{C}$  で反応させた。反応前後における酵素活性の変化は認められず  $0.56 \text{ units/ml}$  であった。反応混液  $2 \text{ ml}$  を上述した方法に従って、DEAE セルロースカラム上で分画した結果を第 2-7(C) 図に示す。以上第 2-7 図より、成分 e は培養液、培養上清液、細胞抽出液とそれぞれ  $20, 20, 2$  時間反応させたとき、全ての酵素活性が  $0.1 \text{ M NaCl}$  溶出画分に回収された。そして、活性ピークは単一で成分 e に対応する画分に溶出され、反応前後における溶出パターンに差は認められなかった。

成分 i を上述した成分 e と同様の方法に従って、培養液、培養上清液、細胞抽出液と反応させた後、DEAE セルロースカラム上で分画した。成分 i ( $1.42 \text{ units/ml}$ ) を培養液とともに反応させたとき、古体存在下で保温しているため、遠心分離上澄画分の酵素活性は  $0.76 \text{ units/ml}$  ( $0$  時間) から  $0.81 \text{ units/ml}$  ( $20$  時間) まで増加した。この試料  $2 \text{ ml}$  を DEAE セルロースカラム上で分画し、その結果を第 2-8(A) 図に示す。成分 i ( $1.41 \text{ units/ml}$ ) を培養上清液と反応させたとき、反応前後の酵素活性に変化は認められず  $0.78 \text{ units/ml}$  であった。この試料  $2 \text{ ml}$  を DEAE セルロースカラム上で分画した結果を第 2-8(B) 図に示す。成分 i ( $1.41 \text{ units/ml}$ ) を細胞抽出液と反応させたとき、反応前後の酵素活性に変化は認められず  $0.77 \text{ units/ml}$  であった。この

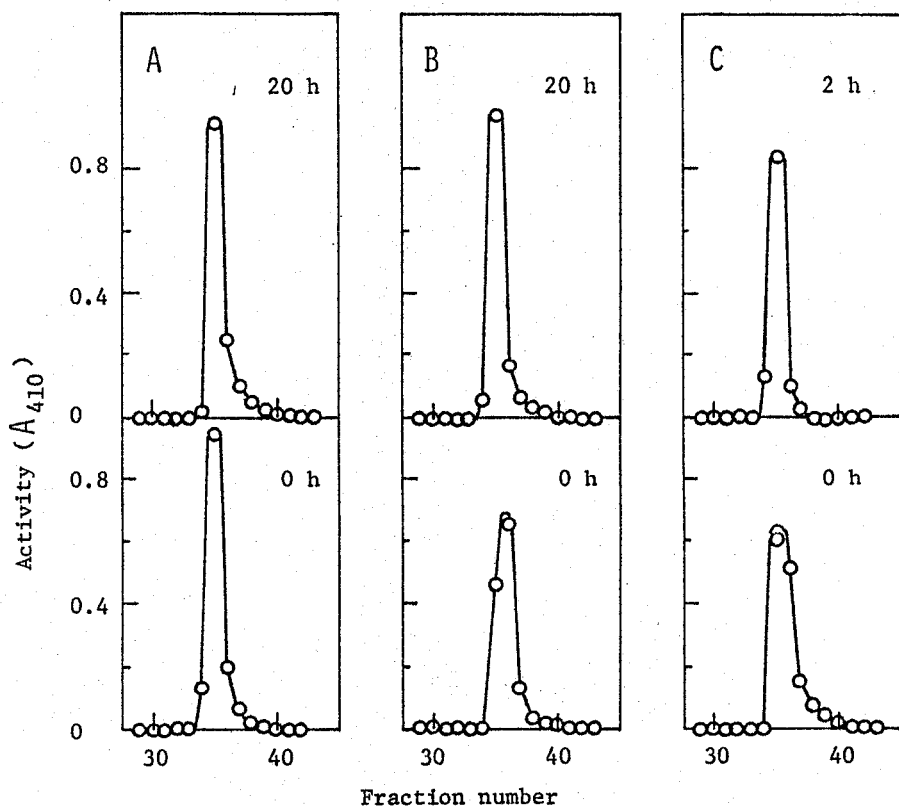


第2-8図 成分2を培養液、培養液、細胞抽出液と反応させたときのDEAEセルロースカラムクロマトグラム。DEAEセルロースカラムを用いた分画は、第2節実験方法に準じた。成分2を培養液と反応させ、反応後におけるDEAEセルロースカラムクロマトグラムをA図に、培養液、細胞抽出液と反応させたときのDEAEセルロースカラムクロマトグラムを、それぞれB、C図に示した。

試料2mlをDEAEセルロースカラム上で分画した結果を第2-8(c)図に示す。以上成分2を培養液、培養液、細胞抽出液と、それぞれ20, 20, 2時間反応させ、DEAEセルロースカラム上で分画した結果、全ての酵素活性は0.1M NaCl溶出画分に回収された。培養液と20時間反応させても活性ピークは単一で、成分2に対応する画分に溶出され、反応後で酵素活性の溶出パターンに差は認められなかった。しかし、培養液と反応させたとき、反応前は成分2に対応する活性ピークしか認められなかったのが、20時

同反応させると成分cの活性ピークが減少し、*converted form*cの活性ピークの増加が認められた。20時間反応後の酵素活性の溶出パターンから、*converted form*cと成分cの活性比は1:4であった。細胞抽出液と反応させたとき、反応前は成分cの活性ピークしか認められなかったのが、2時間反応させると成分cの活性ピークが減少し、*converted form*cの活性ピークの増加が認められた。2時間反応後の酵素活性の溶出パターンから、*converted form*cと成分cの活性比は、1:2であった。

成分cも同様、培養液、培養上清液、細胞抽出液と反応させ、DEAEセルロースカラムで分画した。成分c (0.96 units/ml) を培養液と反応させたとき、遠心分離上澄み画分の酵素活性は、0.56 units/ml (0時間) から 0.58 units/ml (20時間) まで増加した。この試料2mlをDEAEセルロースカラム上で分画し、その酵素活性の溶出パターンを第2-9(A)図に示す。成分c (0.93 units/ml) を培養上清液と反応させた試料2mlのDEAEセルロースカラムクロマトグラムを第2-9(B)図に、成分c (0.93 units/ml) を細胞抽出液と反応させた試料2mlのDEAEセルロースカラムクロマトグラムを第2-9(C)図に示す。反応前後の酵素活性に変化は認められず、培養上清液、細胞抽出液それぞれ0.52, 0.55 units/mlであった。以上、成分cを培養液、培養上清液、細胞抽出液と反応させたとき、全この酵素活性は、0.2 M NaCl 溶出画分の成分cに対応される画分に溶出され、反応前後の溶出パターンに変化は認められなかった。



第2-9図 成分を培養液、培養上清、細胞抽出液と反応させたときの DEAE セルロースカラムクロマトグラム。DEAE セルロースカラムを用いた分画は、第2節実験方法に準じた。成分を培養液と反応させ、反応後における DEAE セルロースカラムクロマトグラムを A 図に、培養上清、細胞抽出液と反応させたときの DEAE セルロースカラムクロマトグラムを、それぞれ B, C 図に示した。

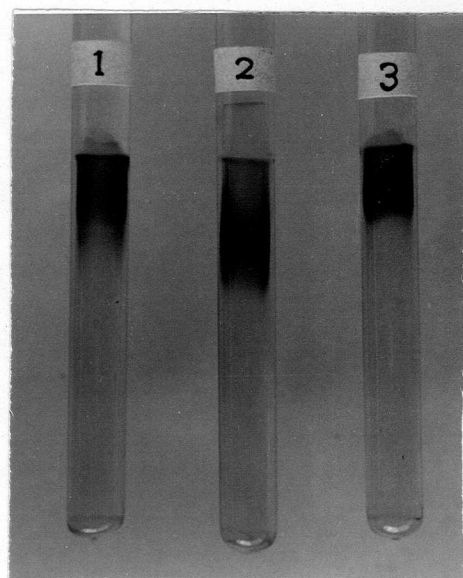
#### 4. e, i 両成分および converted form i の電気泳動的性質

前章で述べた様に、DEAE セルロースカラムの異なる画分に溶出される e, i 両成分は、ディスフ電気泳動により差が認められた。そこで、成分 i を細胞抽出液存在下で

30℃、2時間反応させた後、DEAEセルロースカラムで $e$ に対応する画分に溶かされた成分 (*converted form i*)、および $e$ 、 $i$ 両成分の3種について、電気泳動的性質を検討した。

成分 $i$  15ml (30 units) を 25ml 細胞抽出液 (50ml culture eg.) と 0.05M クエン酸緩衝液 (pH 4.6) 中、30℃ 2時間反応させた。反応混液を 60% アセトンにて沈殿させた後、沈殿画分を 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、DEAE セルロースカラム上で、種々濃度の食塩を含む同一緩衝液 (pH 7.0) を用いて段階的に溶かさせた。そして DEAE セルロースカラム上で、成分 $e$ に対応する画分に溶かされた成分を *converted form i* として以下の実験に使用した。

各成分についてディスク電気泳動を行ない、泳動後各ゲルをジアゾニウム法により活性染色した結果を第2-10図に示す。成分 $e$  (ゲル1)、成分 $i$  (ゲル2)、の移動度には



第2-10図 成分 $e$ 、 $i$ および*converted form i*のディスク電気泳動。  
泳動は第1章に準じて行ない、泳動後各ゲルはジアゾニウム法により活性染色した。ゲル1：成分 $e$ 、ゲル2：成分 $i$ 、ゲル3：*converted form i*。

差が認められ、converted form (ゲル3) の移動度は、成分cの移動度と一致した。

## 第4節 考察

第2-3(4)回細胞外酵素中の3成分について、50時間以後に成分cの減少およびe, bの増加が認められた。

この減少について少なくとも次の3つの仮説が考えられる。

i) 50時間以後、成分cは生産されず失活のみ起こり、成分eおよびbは生産され続ける。 ii) 前章より *in vivo* で細胞結合酵素は、どの成分から構成されているか不明であり、50時間以前では細胞が成分cまたはb、あるいは両成分e, bを保持する親和性が強いが、50時間以後では成分cを保持する親和性が強くなる。

従って、50時間以後、細胞外酵素中の成分cと細胞結合酵素中の成分eまたはbとの交換反応が起こる。

iii) 50時間以後、成分cが蛋白合成以後の段階で修飾を受け成分eまたはbに変換される。

i) の仮説について、もし成分cが失活し、成分e, bが生産され続けるとしたなら、その時期は50時間以後であると考えられる。そこで48時間培養液に蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドを加え *de novo* 合成を停止させた。その結果、全酵素活性の減少が認められなかったことから、成分cが失活している可能性はない(第2-5回)。また第2-6回より60時間培養液を30℃で保温しても、

全酵素活性に変化は認められず、DEAEセルロースカラムの落  
ちパターンから成分cの酵素量に変化はなかった。従っ  
て、50時間以後細胞外酵素中で成分cが失活すると言う  
可能性は考えられない。ii)の仮説について検討した。  
成分c (1.42 units) に50時間培養液 1ml を加え反応させた  
(第2-8(a)図)。このとき細胞結合酵素が全て成分cを  
持たせ、あるいはc, b両成分で構成されていたとしても、  
その量は 0.15 units 程度である。従って、20時間反応さ  
せることにより細胞結合酵素の全てが細胞外酵素中の成  
分cと交換されたとしても、細胞外酵素中に存在すると  
推定されるc, b両成分の合計は最高 0.15 units である。  
しかし、第2-8(a)図の落ちパターンから計算すると、細胞  
外酵素中の成分cの量は 0.32 units で成分bは検出されな  
かった。従って、この考え方では成分cの減少にとも  
なう成分c, bの増加を量的に説明することはできない。  
iii)の可能性について検討した。第2-6図において、細  
胞抽出液だけを保温したときの落ちパターンより、成分b  
の酵素量に変化は認められず、c, b両成分については、  
保温前が成分cのみであるのに対し、20分間保温すると  
converted form c と成分cが約半分ずつ、そして60分間保  
温後には成分cは認められず converted form c しか認め  
られなかった。この結果より、成分cは細胞抽出液存  
在下で直接 converted form c に変換される、または一旦他  
の成分(成分b)に変換された後 converted form c に変換  
されるという2つの可能性が考えられる。第2-8(c)図

において、成分 $i$ を細胞抽出液と反応させたとき、成分 $i$ が減少しその分だけ *converted form i* が認められた。

しかしこのとき成分 $e$ は認められなかった。また第2-9(c)図において、成分 $e$ を細胞抽出液と反応させても、成分 $e$ から他の成分への変換は認められなかった。従って、成分 $i$ は細胞抽出液存在下で直接 *converted form i* に変換されるものと思われる。

in vivo において、細胞外酵素中で成分 $i$ の減少および成分 $e$ の増加が認められた(第2-3(A)図)。そして成分 $i$ を培養液(第2-8(A)図)、細胞抽出液(第2-8(c)図)と反応させたとき、成分 $i$ から *converted form i* への変換が認められ、デイスツ電気泳動の結果 *converted form i* の移動度は、成分 $e$ の移動度と一致し成分 $i$ の移動度との間に差が認められた。以上 in vitro で成分 $i$ が *converted form i* に変換され、*converted form i* と成分 $e$ は電気泳動的に一致した。そこで本頁 Asp. niger U20-2-5 によつて生産される *acid phosphatase* 3成分の内、少なくとも  $e, i$  2成分について、成分 $e$ は一旦生合成された成分 $i$ が変換、即ち蛋白質値レベルでの修飾を受け生合成されたものであると考えられる。

## 第5節 要約

1. 細胞外酵素中の3成分 $e, i, e$ の生産挙動について、成分 $e$ および $e$ は菌体増殖停止後(約15時間)細胞

外酵素中に認められ、培養経過にともない逐時増加し、成分iは培養初期から細胞外酵素中に認められるが後期に減少した。細胞内酵素中の2成分e, cの生産挙動について、成分iは培養経過中百体当り一定で、成分cは百体増殖停止後細胞内酵素中に認められ40時間以後一定値を保った。

2. 3成分e, i, cの相互変換性について、成分eおよびcは、培養液、培養序液、細胞抽出液存在下で他の成分への変換は認められなかった。成分iは培養液と反応させたときは除々に、細胞抽出液と反応させたときは急速に成分iから *converted form i* への変換が認められた。

3. e, i 両成分と *converted form i* の電気泳動的性質について検討した。デイスリ電気泳動の初動度において、*converted form i* は成分eと同じ初動度を示し、成分iと比較して明らかに差が認められた。

4. *in vitro* において、成分iは *converted form i* に変換され、*converted form i* と成分eは電気泳動的に同じ性質を示した。そこで *in vivo* において、成分eは一旦生合成された成分iが蛋白質レベルでの修飾を受け生合成されると考えられる。そして、細胞外酵素中の3成分e, i, cの生産挙動について、培養後期に成分iが減少し成分eが増加する現象は、この成分iからeへの変換性により説明できる。

### 第3章 Acid phosphatase 2成分e, iの精製と酵素 化学的、蛋白化学的性質の比較

#### 第1節 緒言

Orthophosphoric-monoester phosphohydrolase は、alkali phosphatase (E.C. 3.1.3.1) と acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) の2種類に分けられ、両酵素は至適pHの違い（アルカリ側、酸性側）によ、て分類されている。Acid phosphatase は自然界に広く分布しており、一般に種々リン酸エステル分解活性、およびリン酸基転移活性を有する。歴史的には、1924年 Martland<sup>51)</sup> により、phosphatase 活性が赤血球中に存在することが始めて報告された。その後、1931年 Roche<sup>52)</sup> により、至適pHが酸性側にある酵素と、アルカリ側にある酵素の存在が報告された。そして1968年には、Igarashi, Hollander<sup>53)</sup> により rat liver acid phosphatase の結晶化が行なわれた。

近年、human prostate<sup>54)</sup>、Neurospora crassa<sup>55)</sup>、Candida albicans<sup>56)</sup>、Saccharomyces cerevisiae<sup>57)</sup> の acid phosphatase が酵素分子に糖を含む糖タンパクであることが報告されている。そして Sacch. cerevisiae の acid phosphatase は、hexose isomerase の阻害剤である 2-デオキシグルコース添加により、生合成が阻害されることより、酵素分子を構成している糖区分が活性の発現に重要な役割を果たしていること<sup>58,59)</sup> が報告されている。

前章より、成分eは一旦生合成された成分しか蛋白合成以後の段階で修飾を受けて生合成される可能性を示唆する結果を得た。そこで本章では、e, i 両成分を精製し、精製酵素を比較することにより、成分eはiが蛋白合成以後の修飾により生合成されたものであるか否かまたその修飾かどの様なものかを検討するとともに、両成分の構造的、科学的差異について検討した。

## 第2節 実験材料および方法

培養方法: 希々培養は、「デンプン培地」で40時間、希培養は、「基本培地」で24時間、1ℓ 容マイヤーフラスコ（実容200ml）を用い第1章培養方法に準じて行なった。本培養は「基本培地」で100ℓ ジャーファーマンター（丸菱）を用い、実容60ℓで、通気量1vvm、回転数100rpm、30℃、24時間または75時間行なった。なお本培養における植苗量は5%とした。

蛋白、糖、無機リン酸量の測定: 蛋白量はLowry法<sup>60)</sup>を用い、bovine serum albumin 換算量で表わした。全糖量はフェーホル硫酸法<sup>61)</sup>を用いグルコース換算量で表わした。酵素反応により種々リン酸エステルから遊離したリン酸量は、Fiske-SabbaRow 法<sup>62)</sup>を用いて測定した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動: ディスク電気泳動は、7% 標準ゲル(pH 8.0)<sup>41)</sup>を用い、4℃、1.5 mA/tube (0.6 cmφ × 7 cm) で行なった。泳動後、蛋白、

糖、活性バンドは、各々アミドブラック、PAS染色<sup>63)</sup>、ジアゾニウム法<sup>42)</sup>を用いて染色した。

SDS電気泳動は、Shapiro らの方法<sup>64)</sup>に従い、7.5% アクリルアミドゲルを用いて行なった。1% SDS、0.2% ジチオスレイトール存在下で15時間変性させた後、泳動は0.1% SDS存在下室温で8 mA/tube (0.6 cmφ × 7 cm)で行なった。泳動ゲルは0.25% コマジーブルーで染色した。

中性糖組成の決定: 精製酵素中に含まれている中性糖組成は、Misaki らの方法<sup>65)</sup>に従って決定した。十分透析した精製酵素を1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>下、100°C 9時間加水分解し、Dowex 50×4 (H<sup>+</sup>型)、Dowex 1×8 (HCOO<sup>-</sup>型)を用いて分画した。両イオン交換樹脂非吸着物質を中性糖画分とした。中性糖画分をNaBH<sub>4</sub>で還元した後、ピリジン/無水酢酸(1:1混液)存在下で100°C 2時間加熱しアセチル化した。中性糖アルコールアセチル誘導体を3% ECNSS-Mカラム(200 cm)を用いたガスクロマトグラフィー(島津GC-6AM、ガスクロマトグラフィー装置)によって定量した。カラム温度は180°Cで行なった。

Dowex 50×4、Dowex 1×8両イオン交換樹脂吸着物質は、アミノ酸組成を決定する試料とした。

アミノ酸組成の決定: 精製酵素のアミノ酸組成は、Moore の方法<sup>66)</sup>に従って決定した。上述したDowex 50×4、Dowex 1×8の吸着物質を各々3N HCl、3N HCOOHで溶出した。この溶出画分を0.2% インドールエチルアミン

を含む 4N メタンスルホン酸で 110°C 24 時間加水分解した後、アミノ酸自動分析計 (日立 KLA-3B) で定量した。トリプトファンは Goodwin らの吸光係数<sup>67)</sup>を用いて定量した。システインは 8M 尿素を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.9) 中  $\text{NaBH}_4$  で還元した後、Ellman 法<sup>68)</sup>によって定量した。

ヘキソサミンの定量: 精製酵素を 4N HCl 存在下 100°C 14 時間加水分解した後、Elson-Morgan 法<sup>69)</sup>により定量した。

### Acid phosphatase 成分 c の精製

Step 1. 粗酵素液の調整: Acid phosphatase 成分 c の粗酵素液は、75 時間培養液より調整した。120 l 培養液を布で濾過し、凸体を除去した培養液を成分 c の粗酵素液とした。以下、各操作は特に述べないかぎり 0-5°C で行なった。

Step 2. エタノール分画: 粗酵素液 (約 100 l) に冷エタノール (-15°C) を最終濃度 60% になる様に加え、一夜放置後生成した沈殿を 10,000 × g 連続遠心分離 (平均滞留時間 2 分) により回収した。回収した沈殿は、最少量の 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) に溶解し、脱イオン水に対して透析した。

Step 3. CM セルロース分画: Step 2 の  $\frac{1}{4}$  量酵素液 (約 400 ml) を 20 l 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) で希釈する。同一緩衝液で平衡化した CM セルロース (150 g dry

ut, Serva) に希釈酵素液 2.5 l を加え, 3 l 容ビーカー内で時々攪拌しながら 30 分間放置する。吸引・濾過により非吸着物質を除いた後, CMセルロースをビーカーに移し, 再度希釈酵素液 2.5 l を加えて同じ操作を繰り返す。最後に, 吸着樹脂をカラム (86 mm  $\phi$   $\times$  500 mm) に充填し, 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) で非吸着物質を洗い出した後, 0.1 M NaCl を含む同一緩衝液で吸着物質を溶出した。活性区分に冷アセトン (-15°C) を最終濃度 60% になる様に加え, 生成した沈殿を 10,000  $\times$  g, 10 分間の遠心分離により回収し, 最少量の 0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 4.6) に溶解した (50 ml)。

Step 4. セファデックス G-200 ゲル濾過: Step 3 の酵素液 (10 ml) を 0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 4.6) で平衡化したセファデックス G-200 カラム (26.4 mm  $\phi$   $\times$  450 mm) でゲル濾過した。溶出は, 0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 4.6) を用い, 流速 20 ml/時間で行ない 100 ml から 170 ml の溶出画分を回収した。

Step 5. DEAE セルロースカラム分画: Step 4 ゲル濾過活性画分を, アミコン PM-30 メンブランで限外濾過した。脱塩濃縮した酵素液を 0.01 M Tris で pH 7.2 に調整した後, 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) で平衡化した DEAE セルロースカラム (20 mm  $\phi$   $\times$  220 mm) を用いて分画した。溶出は, NaCl を含まない緩衝液で非吸着物質を洗い出した後 0-0.5 M 直線勾配濃度の NaCl を含む 800 ml 上記緩衝液を用い, 流速 50 ml/時間で行なった。酵素活性ピークの

塩濃度は  $0.09\text{ M NaCl}$  で  $290 - 360\text{ ml}$  溶出画分を回収した。

Step 6. CMセルロースカラム分画: Step 5 の活性区分を限外濾過により脱塩濃縮した後、 $0.01\text{ M}$  クエン酸で  $\text{pH}$  3.0 に調整し、 $0.01\text{ M}$  クエン酸緩衝液 ( $\text{pH}$  3.0) で平衡化した CMセルロースカラム ( $19\text{ mm}\phi \times 250\text{ mm}$ ) を用いて分画した。溶出は、 $\text{NaCl}$  を含まない緩衝液で非吸着物質を洗い出した後、 $0 - 0.5\text{ M}$  直線勾配濃度の  $\text{NaCl}$  を含む  $800\text{ ml}$  緩衝液を用い、流速  $45\text{ ml/時間}$  で行なった。酵素活性ピークの塩濃度は  $0.05\text{ M NaCl}$  で、 $150 - 230\text{ ml}$  溶出画分を回収した。

Step 7. セファデックス G-200 ゲル濾過: Step 6. の活性区分を限外濾過により脱塩濃縮 ( $5\text{ ml}$ ) した後、 $0.02\text{ M}$  クエン酸緩衝液 ( $\text{pH}$  4.6) で平衡化した セファデックス G-200 カラム ( $26.4\text{ mm}\phi \times 900\text{ mm}$ ) でゲル濾過を行なった。溶出は同一緩衝液を用い流速  $25\text{ ml/時間}$  で行ない、 $260 - 360\text{ ml}$  の溶出画分を回収した。

Step 8. 等電点分画: 等電点分画は、Svensson の方法<sup>70)</sup> に準じて行なった。Step 7 の活性区分を脱塩濃縮した後、 $\text{pH}$  勾配 4-6 の carrier ampholyte (LKB, Sweden) を用いて等電点分画を行なった。最初の 20 時間は  $400\text{ V}$ 、以後  $70\text{ V/時間}$  で電圧を増加させ  $900\text{ V}$  に達した後更にこの電圧で 20 時間加電した。酵素活性ピークの  $\text{pH}$  は 4.6 で  $36 - 40\text{ ml}$  溶出画分を回収した。

## Acid phosphatase 成分cの精製

Step 1. 粗酵素液の調整: Acid phosphatase 成分cの粗酵素液は、24時間培養液より調整した。120 l 培養液を布で濾過し、回収した百体を 0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 4.6) に懸濁し、Dyno-Mill (Type KDL, W.A. Bachofen, Switzerland) で破砕した。破砕条件は、0.6 l 連続式コンテナで 0.75 mm  $\phi$  ガラスビーズを用い、平均滞留時間 2 分で連続破砕した。処理中の試料温度は 7°C 以下。破砕後、15,000  $\times g$ , 10 分間遠心分離した後、上澄画分を成分cの粗酵素液とした。以下、各操作は特に述べないかぎり 0-5°C で行なった。

Step 2. アセトン分画: 粗酵素液 (約 20 l) を冷アセトン (-15°C) で 30-60% のアセトン分画した。沈殿画分を 10,000  $\times g$ , 10 分間の遠心分離により回収し、最少量の 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) に溶解した。

Step 3. CMセルロース分画: 成分cの精製 step 3 の項で述べた方法に準じて行なった。

Step 4. DEAEセルロース分画: Step 3 の酵素液を脱イオン水に対して透析した後、2.5 l の 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、同一緩衝液で平衡化した DEAEセルロースを用い、成分cの精製 step 3 の項で述べた方法に準じて行なった。なお溶出には、0.15 M NaCl を含む 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) を用いた。活性区分に冷アセトン (-15°C) を最終濃度 60% になる様に加え、生成した沈殿を 10,000  $\times g$ , 10 分間の遠心分離により回収し、

最少量の 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 4.6) に溶解した。

Step 5. セファデックス G-200 ゲル濾過: 成分 E の精製 step 4 の項に準じて行ない、120~170 ml 溶出画分を回収した。

Step 6. DEAE セルロースカラム分画: 成分 E の精製 step 5 の項に準じて行なった。活性ピークの塩濃度は 0.1 M NaCl で 220~310 ml 溶出画分を回収した。

Step 7. CM セルロースカラム分画: 成分 E の精製 step 6 の項に準じて行なった。活性ピークの塩濃度は 0.06 M NaCl で 170~220 ml 溶出画分を回収した。

Step 8. セファデックス G-200 ゲル濾過: 成分 E の精製 step 7 の項に準じて行ない、240~280 ml 溶出画分を回収した。

Step 9. 等電点分画: 成分 E の精製 step 8 の項に準じて行なった。酵素活性ピークの pH は、4.6 で 42~48 ml 溶出画分を回収した。

### 第3節 実験結果

#### 1. 精製成分 E および F の単一性

成分 E は 72 時間培養液から、成分 F は 24 時間細胞抽出液から、エタノール沈殿、アセトン沈殿、CM セルロースカラム、DEAE セルロースカラム、セファデックス G-200 ゲル濾過、等電点分画を組み合わせて精製した。成分 E および F の各精製過程における結果を、第 3-1 および 2 表に示した。

第3-1表 *Acid phosphatase* 成分の精製の要約

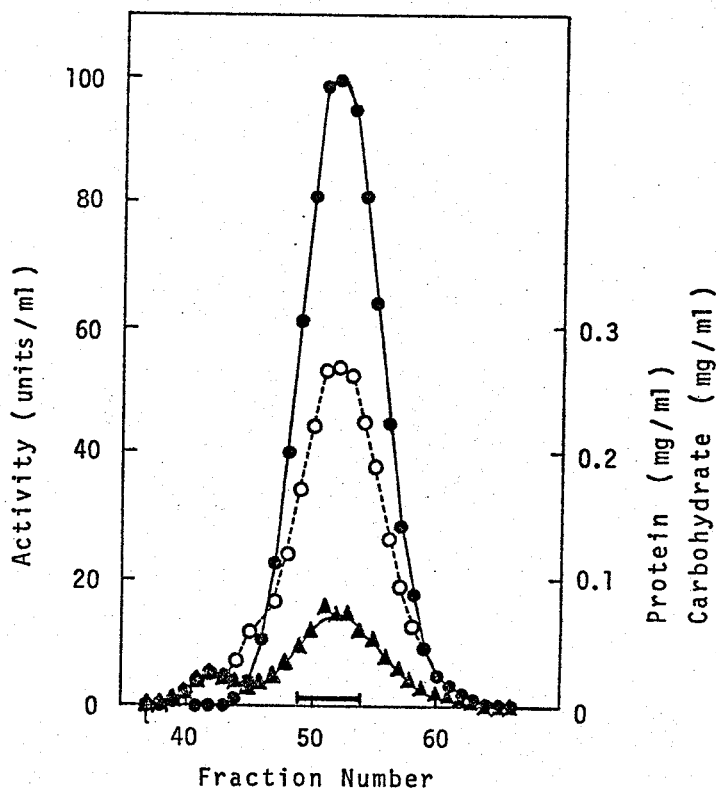
| Purification Step                      | Total Activity<br>(units) | Total Protein<br>(mg) | Total Sugar<br>(mg) | Specific Activity    |                    | Yield<br>(%) |
|----------------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------|
|                                        |                           |                       |                     | (units / mg protein) | (units / mg sugar) |              |
| 1. Culture filtrate                    | 14,200                    | 488,000               | 4,970,000           | 0.0281               | 0.00286            | 100          |
| 2. Ethanol fractionation<br>( 0-60 % ) | 12,900                    | 58,500                | 550,000             | 0.220                | 0.0234             | 90.8         |
| 3. CM cellulose (batch)                | 10,600                    | 3,740                 | 2,010               | 2.84                 | 5.27               | 74.6         |
| 4. Sephadex G-200                      | 9,450                     | 1,760                 | 516                 | 5.36                 | 18.3               | 66.5         |
| 5. DEAE cellulose (linear)             | 7,040                     | 238                   | 77.1                | 29.6                 | 91.3               | 49.6         |
| 6. CM cellulose (linear)               | 6,510                     | 133                   | 51.9                | 48.9                 | 125                | 45.8         |
| 7. Sephadex G-200                      | 4,900                     | 40.2                  | 10.7                | 122                  | 457                | 34.5         |
| 8. Isoelectric fractionation           | 2,960                     | 8.65                  | 2.50                | 304                  | 1,180              | 20.8         |

第3-2表 *Acid phosphatase* 成分の精製の要約

| Purification Step                      | Total Activity<br>(units) | Total Protein<br>(mg) | Total Sugar<br>(mg) | Specific Activity    |                    | Yield<br>(%) |
|----------------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------|
|                                        |                           |                       |                     | (units / mg protein) | (units / mg sugar) |              |
| 1. Crude extract                       | 18,400                    | 55,400                | 63,600              | 0.332                | 0.290              | 100          |
| 2. Acetone fractionation<br>(30 - 60%) | 15,000                    | 9,350                 | 6,840               | 1.60                 | 2.19               | 81.5         |
| 3. CM cellulose (batch)                | 11,500                    | 1,880                 | 544                 | 6.12                 | 21.1               | 62.5         |
| 4. DEAE cellulose (batch)              | 8,540                     | 1,040                 | 300                 | 8.21                 | 28.5               | 46.4         |
| 5. Sephadex G-200                      | 8,180                     | 696                   | 242                 | 11.7                 | 33.8               | 44.5         |
| 6. DEAE cellulose (linear)             | 6,090                     | 180                   | 41.8                | 33.8                 | 146                | 33.1         |
| 7. CM cellulose (linear)               | 4,820                     | 68                    | 21.0                | 70.9                 | 229                | 26.2         |
| 8. Sephadex G-200                      | 4,400                     | 35.2                  | 10.4                | 125                  | 423                | 23.9         |
| 9. Isoelectric fractionation           | 3,300                     | 12.5                  | 3.67                | 264                  | 899                | 17.9         |

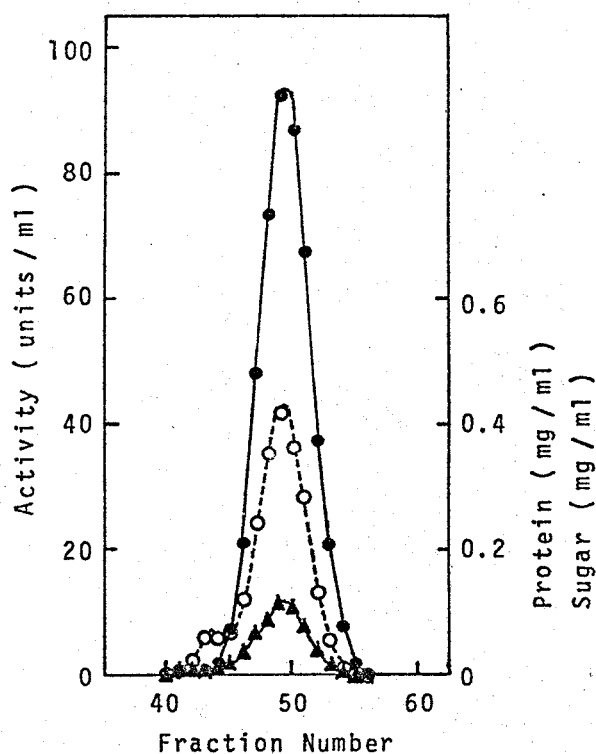
75時間培養液中には、成分cのみ存在し成分aおよびbは含まれていないことがディスク電気泳動の結果より確認された。そこで第3-1表に示した様に、成分cの精製過程で DEAEセルロースを用いたバッチ処理は省略した。一方 24時間培養液より調整した細胞抽出液中には、成分cは存在しないが成分aの他に成分bが含まれていた。そこで第3-2表に示した様に、成分aの精製過程 step 4 で DEAEセルロースを用いたバッチ処理を行なった。この結果得られた酵素液は、成分bを含まず成分aのみ存在していることがディスク電気泳動により確認された。第3-1表より、精製成分cは 120l 培養液より蛋白で 8.65mg 得られ、活性の回収率は 20.8%であった。また第3-2表より、精製成分aは 120l 培養液より蛋白で 12.5mg 得られ、活性の回収率は 17.6%であった。

第3-1および2表の精製過程に従って得られた精製成分c, aの単一性を、セファデックス G-200 ゲル濾過法、ディスク電気泳動法により検討した。第3-1表 step 8 の等電点分画より得られた活性区分を脱塩濃縮した後、セファデックス G-200 ゲル濾過した結果を第3-1図に示す。活性、蛋白、糖のピークは一致し、フラクション 49~54 で蛋白、糖に対する比活性は一定値を示し、各々 400 units/mg 蛋白値, 1,400 units/mg 糖 であった。またフラクション 39~46 に活性を持たない蛋白および糖のピークが認められるため、以後の実験にはフラクション 49~54 の酵素液を精製成分cとして使用した。第3-2表 step 9 等電



第3-1図 成分CのセファデックスG-200ゲル透過による再クロマトグラム。第3-1表等電泳電気泳動により得られた精製成分Cの酵素液をセファデックスG-200カラム(26.5mmφ×900mm)上で再分画した。溶媒は0.02Mクエン酸緩衝液(pH4.6)を用い、15ml/時間で行なった。-----○-----: 蛋白, —▲—: 糖, —●—: 活性。

再分画より得られた活性区分を脱塩濃縮後、セファデックスG-200カラムでゲル透過した結果を第3-2図に示す。活性、蛋白、糖のピークは一致し、フラクション48~53で蛋白、糖に対する比活性は一定値を示し、各々265 units/mg蛋白質, 910 units/mg糖であった。またフラクション41~46に活性を持たない蛋白および糖のピークが認められる。



第3-2図 成分CのセファデックスG-200ゲル浮遊による再クロマトグラム。第3-2表 等電点電気泳動により得られた精製成分Cの酵素液をセファデックスG-200カラム(264mmφ×900mm)上で再分画した。溶媒は0.02Mフエン酸緩衝液(pH4.6)を用い、15ml/時間で行なった。  
 ---○---: 蛋白, —▲—: 糖, —●—: 活性。

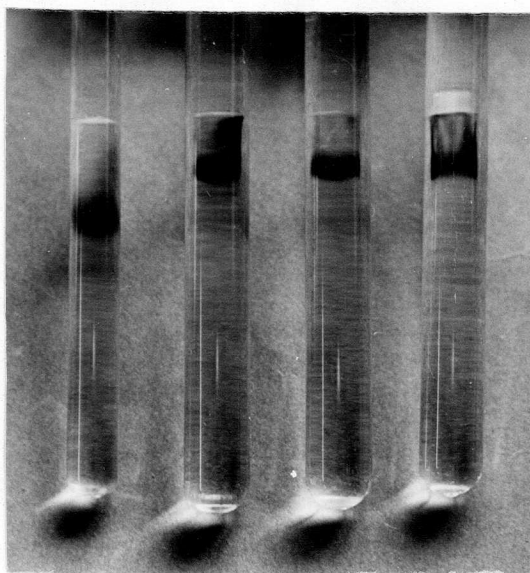
ため、以後の実験にはフラクション48-53の酵素液を精製成分Cとして使用した。

精製成分Cのディスク電気泳動の結果を第3-3図に示す。蛋白(ゲルB)、糖(ゲルC)、活性(ゲルD)のバンドは各々一本で、その移動度は完全に一致した。なおゲルAは、成分Cの蛋白バンドで、成分Cの移動度との間に

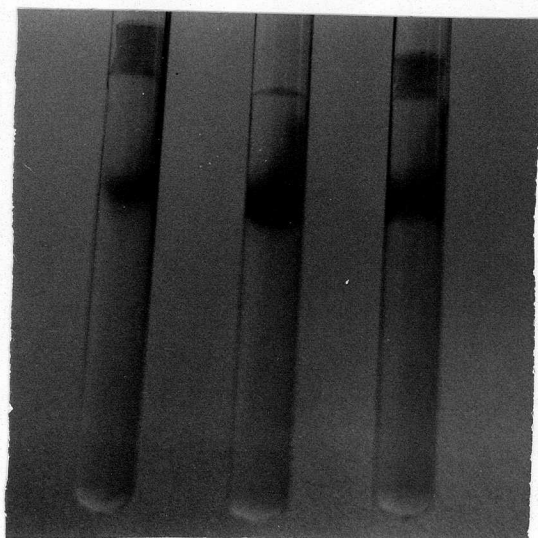
差が認められた。精製成分 $\alpha$ のディスク電気泳動の結果を第3-4図に示す。蛋白(ゲルA)糖(ゲルB)、活性(ゲルC)のバンドは各々一本で、その移動度は完全に一致した。以上、第3-1, 2表の精製過程に従って得られた精製成分 $\epsilon$ および $\alpha$ は、セファデックスG-200ゲル浮遊法(第3-1, 2図)、ディスク電気泳動法(第3-3, 4図)により十分精製されているものと結論した。

## 2. 精製成分の 酵素化学的性質

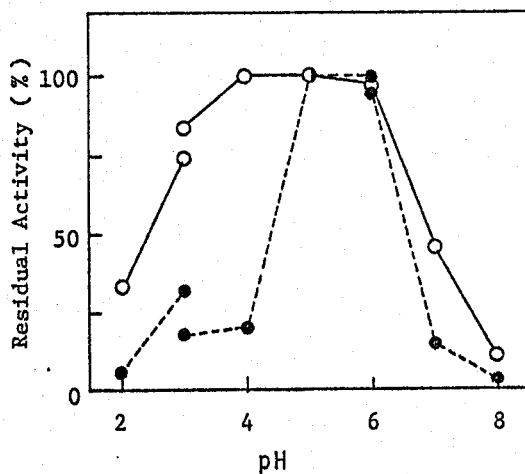
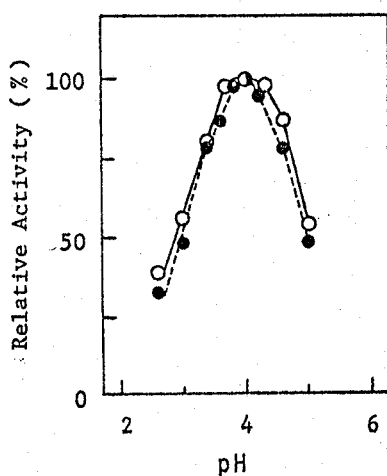
0.1 M クエン酸緩衝液系を用い、PNPP分解活性の至適pHについて検討した。第3-5図に示す様に、各pHにおける基質分解活性は、



第3-3図 精製成分 $\epsilon$ のディスク電気泳動  
ゲルA: 精製成分 $\epsilon$ の蛋白バンド、  
ゲルB: 精製成分 $\epsilon$ の蛋白バンド  
ゲルC: 精製成分 $\epsilon$ の糖バンド  
ゲルD: 精製成分 $\epsilon$ の活性バンド



第3-4図 精製成分 $\alpha$ のディスク電気泳動  
ゲルA: 蛋白バンド、ゲルB: 糖バンド、ゲルC: 活性バンド。

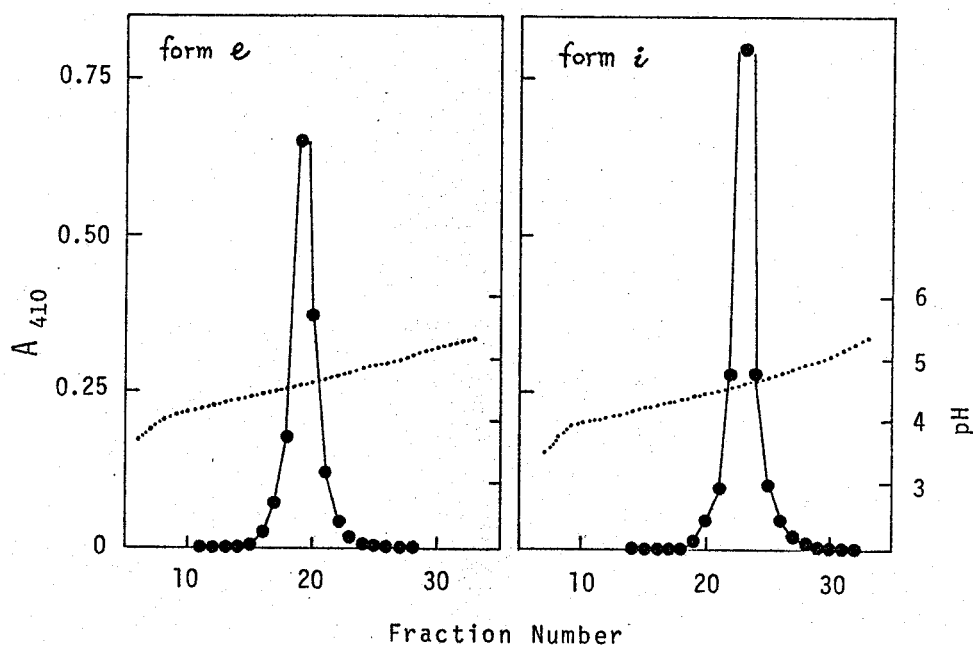


第3-5図(左図) e, l 兩成分の至適pH。各pHにおける値は、pH4.0における酵素活性に対する相対値で表わした。——○——: 成分e, ---●---: 成分l。

第3-6図(右図) e, l 兩成分のpH安定性。各pHで50°C, 3時間放置後の残存活性と、未処理の酵素活性に対する相対値で表わした。——○——: 成分e, ---●---: 成分l。

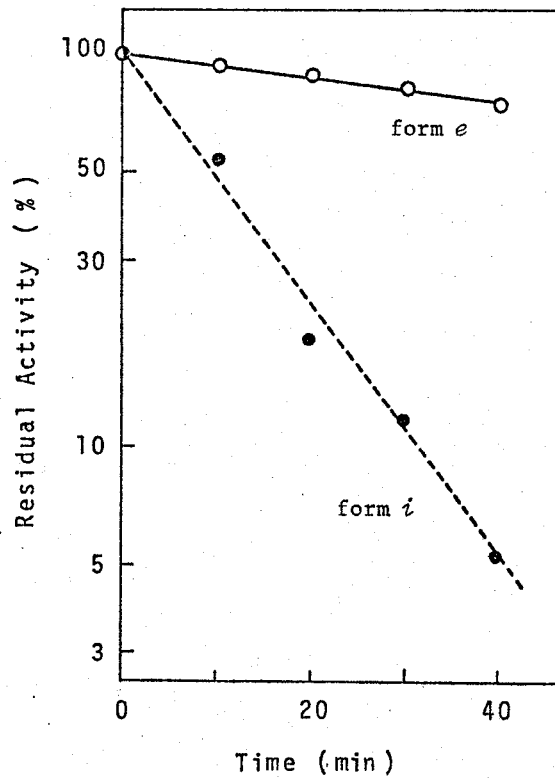
成分e, l で差は認められなかった。酵素分子の安定性におよぼすpHの影響を、0.05M グリシン-塩酸(pH2-3)、0.05M クエン酸(pH3-6)、0.05M Tris-マレイン酸(pH6-8)緩衝液を用いて、pH2-8の間で検討した結果を第3-6図に示す。成分eはpH4-6で、成分lはpH5-6で酵素の不活性化は認められず、成分eはlに比べて酸性領域で安定であった。等電点電気泳動法による両成分e, lの等電点について検討した結果、両成分ともpH4.6で差は認められなかった(第3-7図)。両成分の耐熱性について検討した結果を第3-8図に示す。0.05M クエン酸緩衝液(pH4.0)中、72°Cで40分間加熱した後、両成分の残存活性は、成分eが75%、成分lが5%と差が認められ

成分によりeの方が熱に対して安定であった。



第3-7図 等電異電気泳動法によるe,i両成分の等電点。等電異電気泳動はpH勾配4-6のcarrier ampholyteを用い110 mlカラムで行なった。最初の20時間400V、以後70V/時間で電圧を増加させ900Vに達した後、更にこの電圧で20時間加電した。泳動後、1フラクション2mlずつ分画し、各フラクションの酵素活性(—●—)およびpH(-----)を測定した。左図: form e, 右図: form i。

両成分の基質特異性を比較する目的で、種々リン酸エステルの分解活性について検討した結果を第3-3表に示す。表中全ての値は、10 mM種々リン酸エステル存在下で40分間酵素反応させた後、遊離してきたリン酸量を pNPP に対する相対値で表わした。両成分間で基質特異性に大差は認められず、両成分とも bis(p-nitrophenyl)



第3-8図 e, i 両成分の耐熱性。

0.05M クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 中, 72°C  
で加熱した後, 残存活性を加熱前の酵素  
活性に対する相対値で表わした。

phosphate, adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate, di-, tri-phosphate esters, fructose 1, 6-diphosphate に対する分解活性を持たないという一般的な acid phosphatase の性質を示した。そして両成分とも pNPP,  $\alpha$ -naphthylphosphate,  $\beta$ -glycerophosphate, adenosine 5'-monophosphate, cytidine 5'-monophosphate に対して高い分解活性を示し, sugar phosphate より alcohol phosphate, nucleotide phosphate に対して高い分解活性を示す傾向にある。

第3-3表 e, i 兩成分の基質特異性。各基質 10mM 存在下、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中 40°C 40 分間 酵素反応を行なわせた。反応の停止には、TCA を最終濃度 10% になる様に加え、遊離してきたリン酸量は Fiske-Sabbagow 法により測定した。

| Substrate                            | Relative Activity (%) |        |
|--------------------------------------|-----------------------|--------|
|                                      | form e                | form i |
| p-Nitrophenyl phosphate              | 100                   | 100    |
| α-Naphtyl phosphate                  | 72                    | 86     |
| α-Glycerophosphate                   | 38                    | 38     |
| β-Glycerophosphate                   | 66                    | 72     |
| Bis(p-nitrophenyl)phosphate          | 0                     | 2      |
| Adenosine 5'-monophosphate           | 91                    | 105    |
| Adenosine 5'-diphosphate             | 5                     | 14     |
| Adenosine 5'-triphosphate            | 0                     | 0      |
| Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate | 0                     | 0      |
| Cytidine 5'-monophosphate            | 111                   | 97     |
| Guanosine 5'-monophosphate           | 52                    | 33     |
| Glucose-1-phosphate                  | 33                    | 45     |
| Fructose-6-phosphate                 | 26                    | 32     |
| Fructose-1,6-diphosphate             | 0                     | 4      |
| Ribose-5-phosphate                   | 23                    | 36     |
| 6-Phosphogluconate                   | 12                    | 17     |

兩成分の阻害剤の効果について比較検討した結果を第3-4表に示した。表中全ての値は、4mM pNPP と各種阻害剤存在下で 20 分間酵素反応させ、阻害剤を含まないときの酵素活性に対する相対値で表わした。酵素活性にほぼ等しい阻害剤の効果について、兩成分間で大差は認められなかった。兩成分とも一般的な acid phosphatase の阻害剤である NaF,  $H_2PO_4$ ,  $H_3BO_3$ ,  $KH_2AsO_4$  で阻害され、(i)-tartarate では阻害されないが、(e)-tartarate では阻害される。兩成分とも 8mM 金属イオン ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) 存在下で酵素反応させても阻害効果は認められなかった。しかし、8mM  $Fe^{3+}$  存在

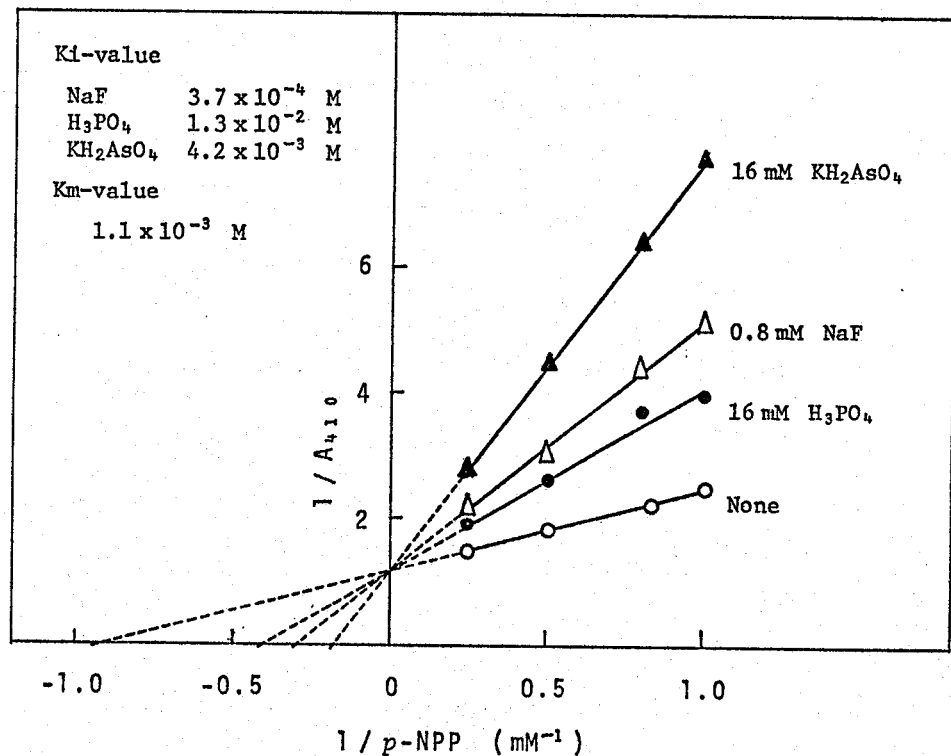
下で酵素反応を行なわせた場合、成分e, iとも約50%の酵素活性の阻害が認められた。上述したe, i両成分の

第3-4表 e, i両成分の酵素活性におよぼす阻害剤の効果(I)  
4 mM pNPP と各種阻害剤存在下、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 中で、40°C 20分間酵素反応させた。表中全この値は、阻害剤を含まないときの酵素活性に対する相対値で表わした。

| Inhibitor                        | Concentration | Relative Activity |        |
|----------------------------------|---------------|-------------------|--------|
|                                  |               | form e            | form i |
| NaF                              | 80 (mM)       | 1 (%)             | 0 (%)  |
|                                  | 8             | 3                 | 12     |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>   | 80            | 15                | 9      |
|                                  | 8             | 83                | 75     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>   | 80            | 68                | 73     |
|                                  | 8             | 90                | 96     |
| KH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub> | 80            | 17                | 9      |
|                                  | 8             | 70                | 67     |
| (-)-Tartarate                    | 80            | 82                | 92     |
|                                  | 8             | 77                | 66     |
| FeSO <sub>4</sub>                | 80            | 22                | 10     |
|                                  | 8             | 77                | 66     |
| FeCl <sub>3</sub>                | 80            | 94                | 90     |
|                                  | 8             | 56                | 45     |
| Sodium dodecyl sulfate           | 80            | 4                 | 4      |
|                                  | 8             | 4                 | 4      |
| None                             | -             | 100               | 100    |

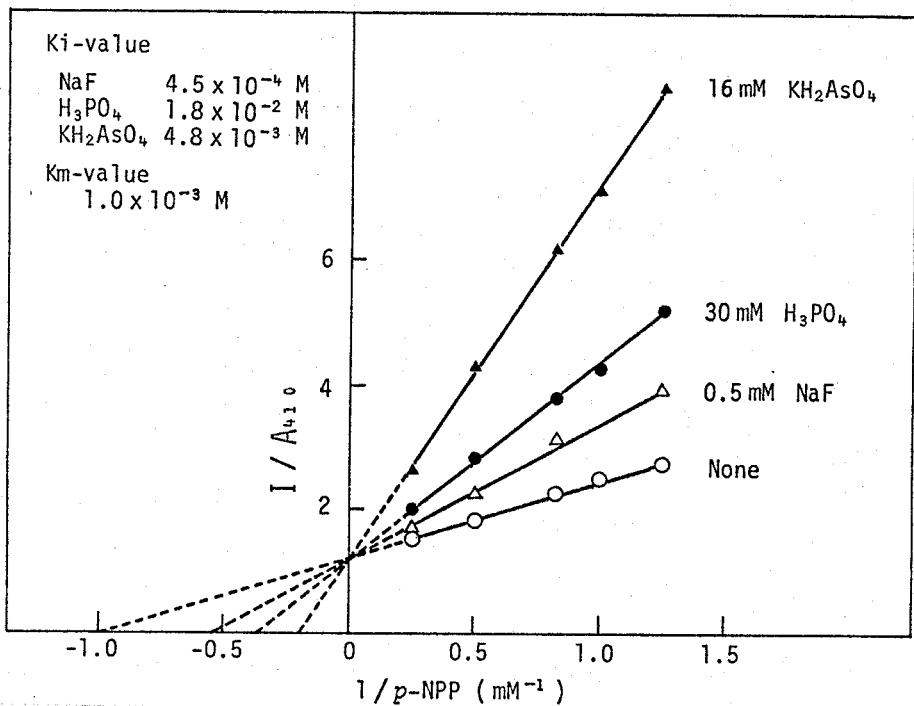
阻害剤のうち、NaF, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub> の阻害様式について検討した結果を第3-9および10図に示す。両成分とも pNPP 分解反応において、NaF, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub> は、拮抗型阻害様式を示した。そして、NaF, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub> に対する K<sub>i</sub>-値は、成分eが  $3.7 \times 10^{-4} M$ ,  $1.3 \times 10^{-2} M$ ,  $4.2$

$\times 10^{-3} \text{ M}$  で、成分cが  $4.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $1.8 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  $4.8 \times 10^{-3} \text{ M}$  であつた。また pNPP に対する  $K_m$ -値は、成分cが  $1.1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , 成分dが  $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$  であつた。



第3-9圖 NaF,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{AsO}_4$  による成分cの阻害様式。

圖中に示した濃度の各阻害剤と種々濃度のpNPP存在下で  $40^\circ\text{C}$  20分間酵素反応させ、各値を Lineweaver-Burk の方法に従つてプロットした。



第3-10図 NaF,  $H_3PO_4$ ,  $KH_2AsO_4$  による成分①の阻害様式。

図中に示した濃度の各阻害剤と種々濃度の pNPP 存在下で  $40^\circ\text{C}$  20分間 酵素反応させ、各値を Lineweaver-Burk の方法に従ってプロットした。

e. ②両成分の活性中心について検討した結果を第3-5表に示した。阻害剤の効果については両成分とも差がなく、*ethylenediaminetetraacetate*, *diisofluoropropyl phosphate* は酵素活性に影響を及ぼさなかった。N-bromosuccinimide, 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide はそれぞれ  $0.01\text{ mM}$ ,  $1\text{ mM}$  で両酵素成分を完全に不活性化した。しかし、*p-chloromercuribenzoate*, *N-acetyl imidazole*, *tetranitromethane*, *p-diazobenzene sulfonic acid* は両酵素活性に影響を及ぼさなかった。以上

の結果より、両酵素成分において、トリフトファン残基が活性発現に重要な役割を果たしていると結論した。

### 第3-5表 e, i 両成分の酵素活性に及ぼす阻害剤の効果 (II)

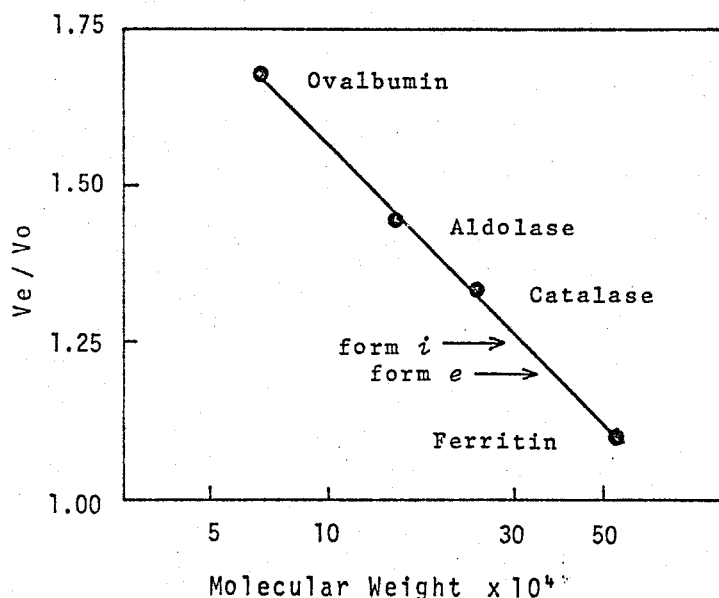
Ethylenediaminetetraacetate, p-chloromercuribenzoate, diisofluoropropyl phosphate, N-bromosuccinimide, 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide の場合は、0.05M 酢酸緩衝液 (pH4.0) 中、p-diazobenzenesulfonic acid, tetranitromethane の場合は、0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 中、また N-acetyl imidazol の場合は、0.05M ホウ酸緩衝液 (pH7.5) 中、室温で30分間放置した後、残存活性を測定した。表中全ての値は、阻害剤を含まないときの相対値で表わした。

| Inhibitor                       | Concentration | Relative Activity |         |
|---------------------------------|---------------|-------------------|---------|
|                                 |               | form e            | form i  |
| Ethylenediaminetetraacetate     | 1 (mM)        | 97 (%)            | 100 (%) |
| p-Chloromercuribenzoate         | 0.1           | 97                | 92      |
| Diisofluoropropyl phosphate     | 1             | 100               | 100     |
| N-Bromosuccinimide              | 0.01          | 0                 | 0       |
| 2-Hydroxy-5-nitrobenzyl bromide | 1             | 0                 | 0       |
| N-Acetyl imidazol               | 1             | 103               | 100     |
| p-Diazobenzene sulfonic acid    | 1             | 107               | 105     |
| Tetranitromethane               | 1             | 107               | 102     |
| None                            | -             | 100               | 100     |

### 3. 精製両成分の分子量

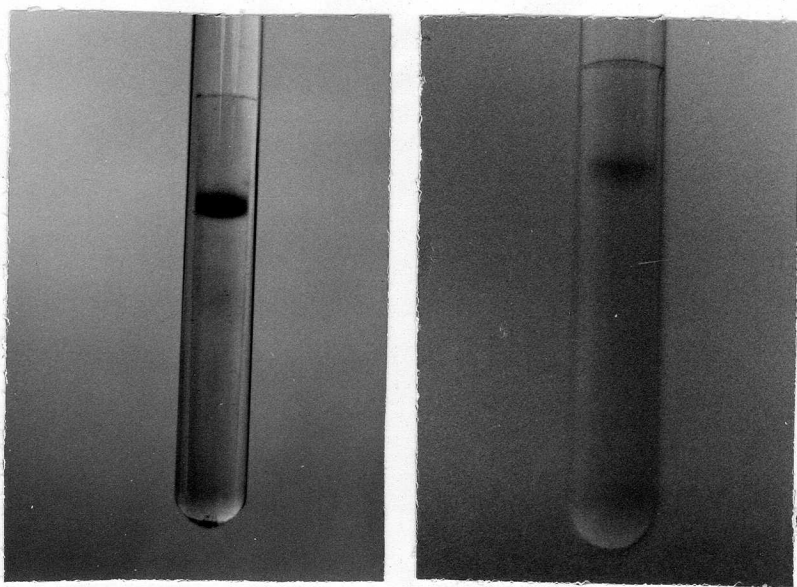
Andrews の方法<sup>71)</sup>に従い、セファデックス G-200 ゲル濾過法により e, i 両成分の推定分子量について検討した結果を第3-11図に示す。標準蛋白として ferritin, beef liver catalase, rabbit muscle aldolase, bovine serum albumin

(Boehringer Mannheim, W. Germany) を用いた。成分 *e* および *i* の推定分子量は、各々  $3.7 \times 10^4$  daltons,  $3.1 \times 10^4$  daltons で成分 *e* はより若干大きな値を示した。



第3-11図 セファデックスG-200ゲル透過法による *e*, *i* 両成分の推定分子量。各蛋白を 0.02M クエン酸緩衝液で平衡化したセファデックスG-200カラム (16mmφ × 600mm) を用いて溶出させた。溶出は同一緩衝液を用い、流速 5ml/時間、上昇法で溶出温度は 0-5°C で行なった。空容量 ( $V_o$ ) は、ブルーデキストランを用いて決定し、溶出容量 ( $V_e$ ) は、catalase 以外の標準蛋白の場合 280nm の吸光度により、また catalase の場合 過酸化水素水分解活性により決定した。

両成分 *e*, *i* のサブユニットの分子量を SDS アクリルアミドゲル電気泳動法により検討した。その結果、成分 *e* (第3-12図)、成分 *i* (第3-13図)とも蛋白バンドは単



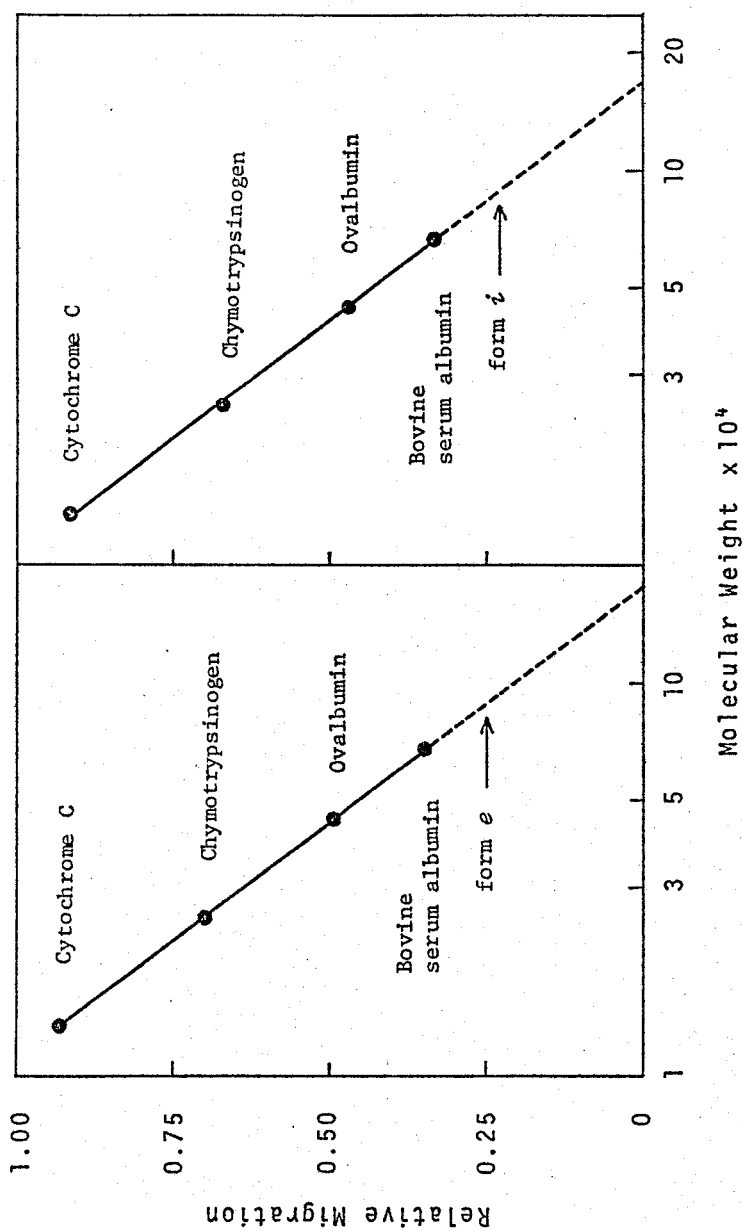
第3-12図(左図) 成分EのSDSアクリルアミドゲル電気泳動。

泳動は前節実験方法に準じて行なった。

第3-13図(右図) 成分CのSDSアクリルアミドゲル電気泳動。

泳動は前節実験方法に準じて行なった。

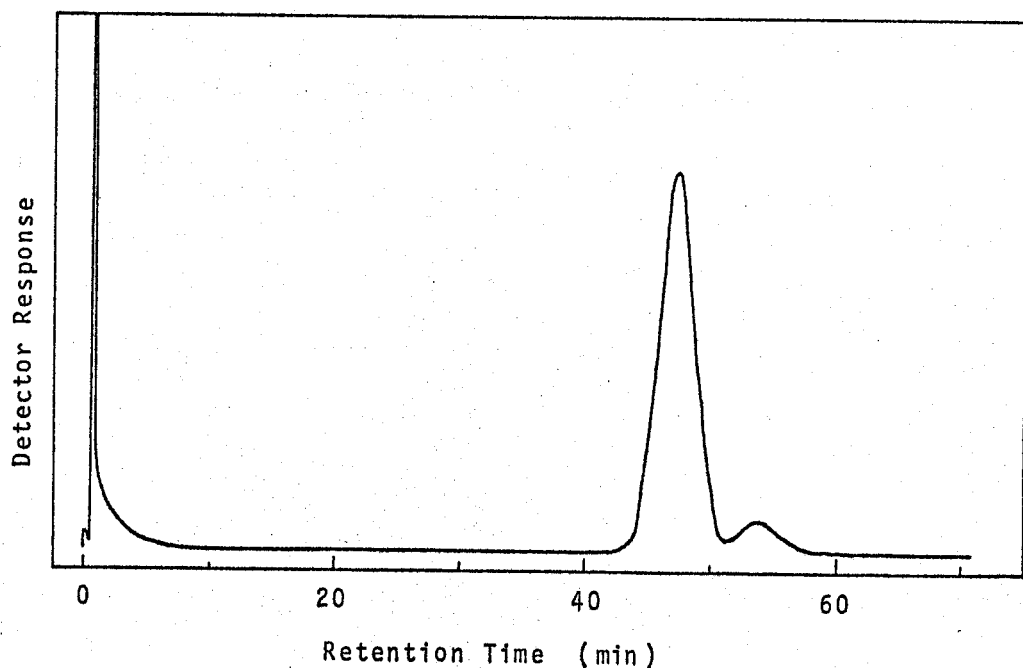
一で、それぞれ同じサブユニットから構成されているものと考えられる。そして、成分E, Cのサブユニットの推定分子量は、標準蛋白として *bovine serum albumin*, *ovalbumin*, *bovine pancreas chymotrypsinogen*, *horse heart cytochrome C* (Boehringer Mannheim, W. Germany) を用いて検討した結果、各々 88,000, 89,000 daltons でほぼ同じ値を示した。



第3-14図 SDSアクリルアミド電気泳動法による $\alpha_2$ 成分のサブユニットの推定分子量。  
 前節実験方法に準じてSDS電気泳動を行ない、bromophenol blue (BPP) の移動に対する各標準蛋白の相対移動度を分子量に対してプロットした。

#### 4. 精製両成分の糖組成

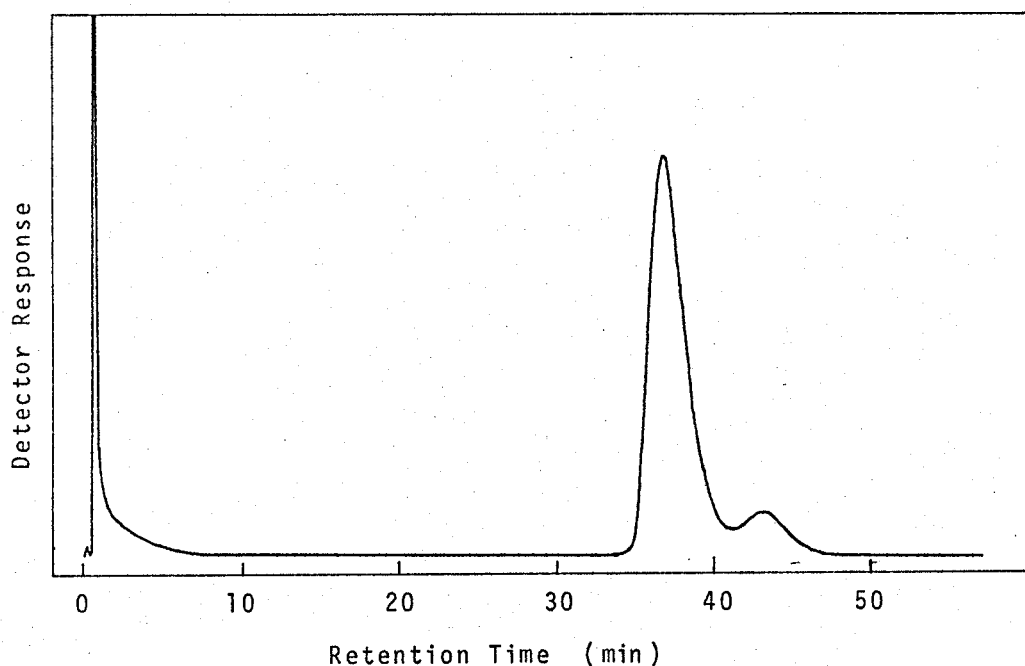
e.と両成分は、フェノール硫酸法、ディスク電気泳動ゲルのPAS染色、コンカナバリンAとの凝集反応より糖を含む糖タンパクであると結論した。両成分中の糖含有量をLowry法、フェノール硫酸法を用いて検討した結果、成分eの糖含有率は22.4%、成分iは22.5%で差は認められなかった。両成分中に含まれている中性糖の種類と量は、中性糖をアルコールアセチル誘導体とし、3% ECNSS-Mカラム(200cm)を用いたガスクロマトグラフィーによって決定した。第3-15図ガスクロマトグラムは、滞留時間47分(T<sub>x</sub>:



第3-15図 成分e中性糖画分アルコールアセチル誘導体のガスクロマトグラム。

中性糖画分をアルコールアセチル誘導体とし、3% ECNSS-Mカラム上で分離した。カラム温度は180℃、検出温度は240℃とした。キャリアー窒素ガスの流量は40 ml/minで行なった。

2.1) のメイジャーピークと滞留時間 54 分 ( $T_R: 2.4$ ) のマイナーピークよりなり、それぞれマンノース、ガラクトースのピークと一致した。これより成分乙は中性糖成分としてマンノース、ガラクトースを含み、そのモル比はマンノース：ガラクトース = 90 : 11 であった。一方第 3-16 図がスクロマトグラムは、滞留時間 38 分 ( $T_R: 2.1$ ) のメイジャーピークと滞留時間 42 分 ( $T_R: 2.4$ ) のマイナーピークよりなり、各々マンノース、ガラクトースのピークと一致した。以上の結果より、成分乙は中性糖成分としてマンノースおよびガラ



第 3-16 図 成分乙中性糖画分アルコールアセチル誘導体のガスクロマトグラム。  
中性糖画分をアルコールアセチル誘導体とし、3% ECNSS-M カラム上で分離した。カラム温度は 180°C、検出温度は 240°C とした。キャリア-窒素ガスの流速は 40 ml/分で行なった。

クトースを含み、そのモル比は マンノース : ガラクトース = 89 : 11 であった。以上、e, c 両成分の中性糖組成は マンノースおよびガラクトースで、その量比において両成分間に差は認められなかった。

#### 5. 精製両成分のアミノ酸組成

e, c 両成分のアミノ酸組成を、予備実験方法に準じて決定した。e, c 両成分中に含まれるアミノ酸、ヘキサミン、中性糖残基の酵素分子全体に対するモル比を第3-6表最初の欄に示した。成分cのグルコサミン含有量は、Elson-Morgan法により得られた値が4.88%、そしてアミノ酸分析計で得られた値が2.41%であった。予備実験において lysozyme とグルコサミンの混合試料を同じ方法で加水分解した後、アミノ酸自動分析計で定量した結果グルコサミンの回収率は55%であった。従って Elson-Morgan法によって決定されたグルコサミン含有量は妥当な値を示しているものと考えられる。第3-6表酵素分子中の各残基数は、成分e, cの分子量をそれぞれ88,000, 89,000として計算した。成分e, cを構成している各残基数を比較した場合、両成分ともほぼ同じ値を示した。またアミノ酸組成については、酸性アミノ酸が多く塩基性アミノ酸が少ない傾向を示し、他の acid phosphatase と比較しても、特に著しい差は認められなかった。<sup>54, 55, 72)</sup> なお成分cの括弧で包んだ値は、両成分のサブユニットの分子量、中性糖含有量、アミノ酸組成に差が認められない

ことより、トリプトファン、システイン、グルコサミン残基のモル比も兩成分間に差はないと仮定し、成分この値を代用した。

第3-6表 e, i 兩成分の組成

| Composition     | Mole % * |       | Residues per molecule** |       | Nearest integral number of residues |     |
|-----------------|----------|-------|-------------------------|-------|-------------------------------------|-----|
|                 | e        | i     | e                       | i     | e                                   | i   |
| Amino acids     |          |       |                         |       |                                     |     |
| Lysine          | 1.69     | 1.84  | 11.8                    | 13.0  | 12                                  | 13  |
| Histidine       | 1.06     | 0.94  | 7.4                     | 6.6   | 7                                   | 7   |
| Arginine        | 2.39     | 1.80  | 16.7                    | 12.7  | 17                                  | 13  |
| Aspartic acid   | 7.55     | 9.98  | 52.8                    | 70.5  | 53                                  | 71  |
| Threonine       | 4.84     | 4.64  | 33.8                    | 32.8  | 34                                  | 33  |
| Serine          | 6.09     | 6.09  | 42.6                    | 43.0  | 43                                  | 43  |
| Glutamic acid   | 6.17     | 5.95  | 43.1                    | 42.0  | 43                                  | 42  |
| Proline         | 4.48     | 4.70  | 31.3                    | 33.2  | 31                                  | 33  |
| Glycine         | 7.77     | 7.72  | 54.3                    | 54.6  | 54                                  | 55  |
| Alanine         | 5.58     | 6.02  | 39.0                    | 42.6  | 39                                  | 43  |
| Valine          | 3.78     | 3.44  | 26.4                    | 24.3  | 26                                  | 24  |
| Methionine      | 1.10     | 1.04  | 7.7                     | 7.3   | 8                                   | 7   |
| Isoleucine      | 2.62     | 2.68  | 18.3                    | 19.0  | 18                                  | 19  |
| Leucine         | 6.13     | 4.64  | 42.8                    | 32.8  | 43                                  | 33  |
| Tyrosine        | 3.21     | 3.74  | 22.4                    | 26.4  | 22                                  | 26  |
| Phenylalanine   | 3.85     | 3.07  | 26.9                    | 21.7  | 27                                  | 22  |
| Tryptophan***   | (1.25)   | 1.25  | (8.7)                   | 8.9   | (9)                                 | 9   |
| Cysteine****    | (1.46)   | 1.46  | (10.2)                  | 10.3  | (10)                                | 10  |
| Glucosamine**** | (4.88)   | 4.88  | (34.1)                  | 34.5  | (34)                                | 35  |
| Neutral sugars  |          |       |                         |       |                                     |     |
| Mannose         | 21.69    | 21.42 | 151.6                   | 151.4 | 151                                 | 151 |
| Galactose       | 2.41     | 2.68  | 16.8                    | 18.9  | 17                                  | 19  |
| Total           | 100.00   | 99.98 | 698.7                   | 706.9 | 698                                 | 708 |

\* 各残基のモル比は、酵素分子全体を100%とした相対値で表わした。

\*\* e, i 兩成分の分子量をそれぞれ 88,000, 89,000 として計算した。

\*\*\* 分光分析により定量した。

\*\*\*\* 比色法により定量した。

## 第4節 考察

第3-3表に示した様に、基質特異性は両成分間で差が認められず、典型的な acid phosphatase の性質を示した<sup>27, 28, 34, 72, 73</sup> 即ち、種々リン酸エステル分解活性を有するが、bis(p-nitrophenyl) phosphate, adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate, fructose 1, 6-diphosphate, ADP, ATP に対する分解活性は持たない。第3-4表に示した様に、阻害剤の効果についても両成分間に差はなく、 $H_3PO_4$ , NaF,  $KH_2AsO_4$ ,  $H_3BO_3$ , 4-tartrate による阻害効果が認められ、典型的な acid phosphatase の性質を示した<sup>27, 28, 34, 72, 73</sup>。しかし、両成分とも N-bromosuccinimide, 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide で完全に不活性化され、p-chloro-mercuribenzoate, N-acetyl imidazol, p-diazobenzene sulfonic acid, tetranitromethane は酵素活性に影響をおよぼさなかった(第3-5表)。この結果より、両成分ともトリプトファン残基が活性に重要な役割を果たしているものと考えられる。Sweet potato の violet colored acid phosphatase<sup>72</sup> は  $Mn^{2+}$  イオンが、bovine brain acid phosphatase<sup>73</sup> は システイン残基が、human prostate acid phosphatase<sup>28</sup> は チロシン、トリプトファン残基が活性に重要な役割を果たしており、両成分はこれら acid phosphatase とは異なった性質を示した。

両成分とも フェノール硫酸法、ディスク電気泳動ゲルの PAS 染色、コンカナバリンA との凝集反応により、糖タン

パクであると結論した。 Acid phosphatase が糖タンパクである例はいくつか報告されており、human prostate acid phosphatase<sup>54)</sup> は、グルコサミン、シアル酸、フコース、マンノース、ガラクトース、グルコースを含み Neurospora crassa の acid phosphatase<sup>72)</sup> は、グルコサミン、マンノースを含んでいる。しかし、e, c 両成分はこれら acid phosphatase とは異なり、グルコサミン、マンノース、ガラクトースを含む糖タンパクである(第3-6表)。またコンカナバリンAは、糖鎖非還元末端に  $\alpha$ -D-マンノース、 $\alpha$ -D-グルコース、 $\beta$ -D-フラクトース、 $\alpha$ -D-アラビノースを有する場合にのみ特異的に凝集反応を起す<sup>74)</sup>。従って、両酵素成分糖鎖の非還元末端は  $\alpha$ -D-マンノースである。

本章より、成分cは一旦生合成された成分cが蛋白合成以後の段階で修飾を受け、生合成される可能性を示唆する結果が得られた。そして、本章において両成分の蛋白学的性質の異同について検討した結果、SDS アクリルアミド電気泳動法によるサブユニットの分子量(第3-14図)、中性糖含有量および組成比には差が認められず(第3-15, 16図)、またアミノ酸組成も両成分間でほとんど差が認められなかった(第3-6表)。そこで両成分の acid phosphatase 成分cおよびこの関係は、一旦生合成された成分cが蛋白質レベルで修飾を受け、成分cに変換されたのかもしれない。

## 第5節 要約

1. 本品により生産される acid phosphatase 3 成分のうち、2 成分 *c* および *c* をそれぞれ 75 時間培養浮液、24 時間細胞抽出液より精製した。精製酵素は、セファデックス G-200 ゲル浮過法、ディスク電気泳動法により十分精製されているものと結論した。

2. 両成分の酵素学的性質について検討したところ至適 pH (pH 4.0)、等電点 (pH 4.6)、pNPP に対する  $k_m$ -値 (1 mM)、基質特異性、阻害剤の効果、活性中心 (トリプトファン) には差が認められなかった。しかし pH 安定性 (酸性側では成分 *c* の方が安定)、熱安定性 (成分 *c* の方が安定) には差が認められた。基質特異性については種々リン酸エステル分解活性を有し、bis(p-nitrophenyl) phosphate, cyclic AMP, fructose 1,6-diphosphate, ADP, ATP に対する分解活性は認められなかった。また NaF,  $H_3PO_4$ ,  $KH_2AsO_4$ ,  $H_3BO_3$ ,  $\alpha$ -tartarate は、両酵素成分の阻害剤として作用した。この基質特異性、阻害剤の効果より、両成分は典型的な acid phosphatase であると結論した。

3. セファデックス G-200 ゲル浮過法による推定分子量は、成分 *c* が 370,000 daltons, 成分 *c* が 310,000 daltons で成分 *c* の方が若干大きく、SDS アクリルアミド電気泳動の結果、蛋白バンドは両成分とも単一で、サブユニットの推定分子量は、成分 *c* が 88,000 daltons, 成分 *c* が 89,000 daltons と差は認められなかった。

4. 両成分はグルコサミン, マンノース, ガラクトースを含む糖タンパク質で、中性糖含有量は両成分差は認められず24.1% (モル比) であった。また両成分のアミノ酸組成についてもほとんど差は認められなかった。

## 総括および結論

酵素工業の醗酵工業に占める割合は大きいが、その生産技術は依然経験に頼っている場合が多く、基礎的研究の必要性が切望されている。工業的に利用されている加水分解酵素は、大部分が分泌酵素であり、そして分泌酵素の多くは糖タンパクで多型性を示す事が報告されている。

Aspergillus niger U20-2-5 の生産する *acid phosphatase* は多型性を示す分泌酵素であることより、加水分解酵素生産様式を解明する一つのモデルとして適当な材料であると考えられる。また本菌株は、種々加水分解酵素生産の解析に用いられ、その性質がよく解っている。この利点を生かしてより多くの、より有効な酵素を生産するために、従来までの現象面の把握に留まり勝ちであった加水分解酵素生産の解析を、精製酵素成分を用い、構造的、种群的差異を比較検討したのが本論文である。ここで得られた結果は次の様に総括結論される。

第1章では、Asp. niger U20-2-5 の生産する *acid phosphatase* は、局在性の観点から大別して3種類、細胞外、細胞内、細胞結合酵素が存在し、細胞外酵素の生産挙動は増殖非連動型、細胞内、細胞結合酵素の生産挙動は増殖連動型であることを認めた。また酵素成分からは DEAEセルロースカラム、ディスク電気泳動により3成分 *e, i, c* に分けられ、細胞外酵素中には3成分 *e, i, c* が、細胞

内酵素中には2成分しか、そして「セルラーゼ・オリゴカ」処理により溶離させた細胞結合酵素中には1成分しか存在することゝ認められた。e, c 両成分を「オリゴカ」処理した場合成分cに変換され、成分cはそれ以上他の成分に変換されなかったことより、*in vivo* で細胞結合酵素がどの様な成分から構成されているかは不明であると結論した。

第2章では、細胞外酵素中の3成分e, c, b の生産挙動について検討した結果、培養後期に成分cが減少し成分eが増加した。この現象を説明するために、以下の様な3つの仮説を提出した。

i) 成分cの失活と成分eの *de novo* 合成。

ii) 細胞結合酵素成分が不明であることより、培養前期では細胞が成分eを保持する親和性が強く、培養後期には細胞が成分cを保持する親和性が強くなり、細胞結合酵素成分の交換反応が起こる。

iii) 成分cからeへの相互変換性。

i) の仮説は成分cの失活が認められないことより否定され、ii) の仮説は成分cの減少量および成分eの増加量が細胞結合酵素量以上であることより否定された。そしてiii) の仮説は以下の実験結果よりその妥当性が証明された。成分cを細胞抽出液存在下で反応させたとき、DEAEセルロースカラム上で成分cに相当する活性ピークが減少し、成分eに相当する活性ピークの増加が認められた。そして、この成分eに相当する画分に溶出された成分(*converted form*)の電気泳動的性質は、細胞外酵素より

調整した成分eと一致した。そこで培養後期における成分iの減少にともなう成分eの増加は、成分iからeへの相互変換性により説明できると結論した。

第3章では、3成分のうち相互変換性の認められた成分eおよびiの精製を行ない、両成分の構造的、機能的差異について検討した。成分eは75時間培養浮遊液、成分iは24時間細胞抽出液を粗酵素液とし、イタール分画アセトン分画、DEAEセルロースカラム、CMセルロースカラム、セファデックス G-200カラム、等電点電気泳動を組み合わせで精製した。精製酵素は、セファデックス G-200ゲル浮過法、ディスク電気泳動法により十分精製されているものと結論した。両成分の酵素化学的性質について検討したところ、至適 pH (pH 4.0)、等電点 (pH 4.6)、pNPP に対する  $K_m$ -値 (1 mM)、基質特異性、阻害剤の効果、活性中心 (トリプトファン) には差が認められなかった。しかし、pH 安定性 (酸性側では成分eの方が安定)、熱安定性 (成分eの方が安定) には差が認められた。基質特異性については、種々リン酸エステル分解活性を有し、*bis*(p-nitrophenyl) phosphate, cyclic AMP, fructose 1,6-diphosphate, ADP, ATP に対する分解活性は認められなかった。また NaF,  $H_3PO_4$ ,  $KH_2AsO_4$ ,  $H_3BO_3$ , m-tartrate は両成分の阻害剤として作用した。この基質特異性、阻害剤の効果より両成分は典型的な acid phosphatase であると結論した。セファデックス G-200ゲル浮過法による推定分子量は、成分eが 370,000 daltons, 成分iが 310,000 daltons で成分eの方が若干大

きく、SDS アクリルアミド電気泳動の結果、蛋白バンドは両成分とも単一で、サブユニットの推定分子量は、成分cが 88,000 daltons, 成分iが 89,000 daltons と差は認められなかった。両成分はフェール硫酸法、電気泳動ゲルのPAS染色、ユニカナバリニンAとの凝集反応により糖タンパクであると結論した。両成分の中性糖含有量は、24.1% (モル比) で両成分間に差は認められず、両成分の糖組成はグルコサミン、マンノース、ガラクトースであった。また両成分のアミノ酸組成についてもほとんど差が認められなかった。

以上の結果より、本品の *acid phosphatase* 生産様式について、以下の様な仮説を提出した。本品により生産される *acid phosphatase* 3成分のうち、成分cおよびiについて、一旦生合成された成分iが蛋白質レベルで修飾を受け成分cに変換される。その結果、酵素分子の荷電量が変化し、ディスリ電気泳動の移動度は少なくなる。この変換にともない酵素分子の *conformation* が変化し、セファデックス G-200 ゲル濾過法による推定分子量に差が認められる。また酵素化学的性質として、酵素分子の安定性は増加する。

## 文 献

- 1 Kaplan, N. O. (1964) Brookhaven Symposia in Biol. 17, 131
- 2 Pétra, P. H. and Neurath, H. (1969) Biochemistry 8, 5029-5036
- 3 Eylar, E.H. (1965) J. Theoret. Biol. 10, 89
- 4 遠藤 (1973) 化学と生物 11, 414-421
- 5 辻茂、竹西、浜田 (1976) 日本農芸化学会大会講演要旨集 pp.34
- 6 Kuo, S. C. and Lampen, J. O. (1972) J. Bacteriol. 111, 419-429
- 7 Lampen, J. O., Kuo, S. C., Cano, F. R. and Tkacz, J. S. (1972) Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today 819-824
- 8 Marshall, J. J. and Rabinowitz, M. L. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 167, 777-779
- 9 吉野、林田、本江 (1976) 日本農芸化学会大会講演要旨集 pp.33
- 10 Pazur, J. H. and Aronson, N. N. (1972) Advan. Carbohydr. Chem. Biochem. 27, 301-341
- 11 Coffey, J. W. and DeDuve, C. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3255-3263
- 12 Pazur, J. H., Knull, H. R. and Simpson, D. L. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 110-116
- 13 Spiro, R. G. (1970) Annu. Rev. Biochem. 39, 599-638
- 14 Hsu, A. F., Baynes, J. W. and Heath, E. C. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2391-2395
- 15 Molnar, J. (1975) Mol. Cell. Biochem. 6, 3-14
- 16 Ostrowski, W., Wazyl, Z., Weber, M., Guminska, M. and Luchter, E. (1970) Biochim. Biophys. Acta 221, 297-306
- 17 Campbell, H. D., Dudman, N. P. B. and Zerner, B. (1973) FEBS Letts. 31, 123-126
- 18 Uehara, K., Fujimoto, S. and Taniguchi, T. (1974) J. Biochem. 75, 627-638
- 19 Młodanowski, F. (1972) Z. Pflanzenphysiol. 66, 362-365
- 20 Flinn, A. M. and Smith, D. L. (1967) Planta 75, 10-22
- 21 Figier, J. (1968) Planta 83, 60-79

- 22 Toh-e, A., Ueda, Y., Kakimoto, S. and Oshima, Y. (1973) J. Bacteriol. 113, 727-738
- 23 Toh-e, A. and Oshima, Y. (1974) J. Bacteriol. 120, 608-617
- 24 Ueda, Y., Toh-e, A. and Oshima, Y. (1975) J. Bacteriol. 122, 911-922
- 25 Toh-e, A., Kakimoto, S. and Oshima, Y. (1975) Molec. Gen. Genet. 143, 65-70
- 26 Smith, J. K. and Whitby, L. G. (1968) Biochim. Biophys. Acta 151, 607-618
- 27 Heinrikson, R. L. (1969) J. Biol. Chem. 244, 299-307
- 28 Hollander, P. V. (1971) The Enzymes vol. 4, PP. 449-498 Academic Press, New York
- 29 Rudolph, K. and Stahmann, M. A. (1966) Plant Physiol. 41, 389-394
- 30 Verjee, Z. H. M. (1969) Eur. J. Biochem. 9, 439-444
- 31 Asahi, T., Sakano, K., Nomura, T., Ogawa, H. and Uritani, I. (1967) Agr. Biol. Chem. 31, 1394-1400
- 32 Ikawa, T., Nishizawa, K. and Miwa, T. (1964) Nature 203, 939-940
- 33 Baker, J. E. and Takeo, T. (1973) Plant & Cell Physiol. 14, 459-471
- 34 Harsanyi, Z. and Dorn, G. L. (1972) J. Bacteriol. 110, 246-255
- 35 Wakao, N., Sakurai, Y., Shiota, H. and Tanimura, I. (1975) J. Gen. Appl. Microbiol. 21, 233-249
- 36 Suomalainen, H., Linko, M. and Oura, E. (1960) Biochim. Biophys. Acta 37, 482-490
- 37 Schmidt, G., Bartsch, G., Laumont, M. C., Herman, T. and Liss, M. (1963) Biochemistry 2, 126-131
- 38 Weinberg, R. and Orton, W. L. (1964) J. Bacteriol. 88, 1743-1754
- 39 Kuroda, A. (1960) J. Ferment. Technol. 38, 366-369
- 40 Torriani, A. (1960) Biochim. Biophys. Acta 38, 460-479
- 41 Williams, D. E. and Reisfeld, R. A. (1964) Ann. New York Acad. Sci. 121, 373-381

- 42 Dorn, G. (1965) Genet. Res. 6, 13-26
- 43 Johnson, R. W., Roberson, L. E. and Kenney, F. T. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4521-4527
- 44 Holmes, E. W., Wyngaarden, J. B. and Kelley, W. N. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6035-6040
- 45 Sargent, M. G. and Lampen, J. O. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 65, 962-969
- 46 Sawai, T. and Lampen, J. O. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6288-6294
- 47 Burton, E. G. and Metzenberg, R. L. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4679-4688
- 48 Amemura, A., Ogawa, T. and Terui, G. (1967) J. Ferment. Technol. 45, 879-887
- 49 Sudo, T., Nagayama, H. and Tamari, K. (1976) Agr. Biol. Chem. 40, 1509-1514
- 50 Ostrowski, W., Wazyl, Z., Weber, M., Guminska, M. and Luchter, E. (1970) Biochim. Biophys. Acta 221, 297-306
- 51 Martland, M., Hansman, F. S. and Robison, R. (1924) Biochem. J. 18, 1152
- 52 Roche, M. J. (1931) Bull. Soc. Chim. Biol. 13, 841
- 53 Igarashi, M. and Hollander, V. P. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6084
- 54 Derechin, M., Ostrowski, W., Galka, M. and Barnard, E. A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 250, 143-154
- 55 Jacobs, M. M., Nyc, J. F. and Brown, D. M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1419-1425
- 56 Odds, F. C. and Hierholzer, J. C. (1973) J. Bacteriol. 114, 257-266
- 57 Boer, P. and Steyn-Paruvé, E. P. (1966) Biochim. Biophys. Acta 128, 400-402
- 58 Kuo, S. C. and Lampen, J. O. (1972) J. Bacteriol. 111, 419-429
- 59 Lampen, J. O., Kuo, S. C., Cano, F. R. and Tkacz, J. S. (1972) Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today 819-824
- 60 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275

- 61 Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350-356
- 62 Fiske, C. H. and SubbaRow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* 66, 375-400
- 63 Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H. and Woodlock, J. J. (1969) *Anal. Biochem.* 30, 148-152
- 64 Shapiro, A. L., Vinuela, E. and Maizel, J. V. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820
- 65 Misaki, A., Seto, N. and Azuma, I. (1974) *J. Biochem.* 76, 15-27
- 66 Moore, S. (1972) in *Chemistry and Biology of Peptides* pp. 629-653, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan
- 67 Goodwin, T. W. and Morton, R. A. (1946) *Biochem. J.* 40, 628-632
- 68 Ellman, G. L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77
- 69 Rondle, C. J. M. and Morgan, W. T. J. (1954) *Biochem. J.* 61, 586-589
- 70 Vesterberg, O. and Svensson, H. (1966) *Acta Chem. Scand.* 20, 820-834
- 71 Andrews, P. (1965) *Biochem. J.* 96, 595-606
- 72 Uehara, K., Fujimoto, S., Taniguchi, T. and Nakai, K. (1974) *J. Biochem.* 75, 639-649
- 73 Chaimovich, H. and Nome, F. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 9-16
- 74 Goldstein, I. J., Hollerman, C. E. and Merrick, J. M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 97, 68-76

## 謝 辞

この研究を行なうにあたり、終始御指導を賜りました合葉修一教授、岡田弘輔教授、田口久治教授、芝崎勲教授、大嶋泰治教授、市川邦介教授、原田篤也教授、江良敏郎助教授、山田靖宙助教授、高田信男助教授、新名脩彦博士、小川隆平博士、木下晋一博士、卜部裕博士ならびに教室員の方々に心から感謝致します。

また、通切なる御助言を賜りました大阪市立大学生理学部三崎旭教授、大阪大学蛋白質研究所崎山文夫助教授、そして研究の便宜を計って頂いた沢瀨洋子氏、佐本耕一氏に感謝致します。

本論文に關係ある主な報告

Characterization and Localization of Acid Phosphatases  
Produced by Aspergillus niger

Journal of Fermentation Technology, 52 369-377 (1974)

Purification and Properties of One Component of Acid  
Phosphatase produced by Aspergillus niger

Biochimica et Biophysica Acta, (in press)

Comparison of Two Components of Acid Phosphatase  
Produced by Aspergillus niger

(in preparation)

Post-Translational Modification of Acid Phosphatase  
Produced by Aspergillus niger

(in preparation)