

*Penicillium expansum*の糖化型ポリガラクトクロナーゼ

小沢潤二郎・岡本賢一

人参のポリガラクトクロナーゼの特異性に就て前に報告したが⁽¹⁾, *Pen. expansum*の酵素液にも之と類似した糖化型のポリガラクトクロナーゼが見出されたので, この酵素の作用機構並に性質に就て行つた実験結果を報告する。

1. *Penicillium expansum* の糖化型ポリガラクトクロナーゼの作用機構

酵素液:*Pen. expansum*の菌糸抽出液は液化型のポリガラクトクロナーゼも含んでいる⁽²⁾。しかしペクチン酸培養液(Rh. triticiの液化型ポリガラクトクロナーゼによつて一部分解したペクチン酸2%, NH_4NO_3 0.5%, KH_2PO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 酵母水1/20容量, NaOHにてpH5.5に調節する)に5日間27°Cに培養した菌糸の抽出液は極めて弱い液化力を示したので, 之を酵素液として用いた。作用条件及び作用力測定法: 前報と同じにした, 実験結果は第1表の通りであつた。

第 1 表

Reaction time (hrs.)		0	5	10	22
	η_{rel}	2.010	1.867	1.810	1.776
Pectic acid	0.66%		0.50	0.75	0.95
	0.17%		0.12	0.20	0.23*
Digalacturonic acid	0.20%		—	0.26	0.39
	0.06%		—	0.16	0.20
Pectic acid oxidized by hypiodite			0.28	0.52	0.88
Pectinic acid			—	—	0.24**
Methylglycoside of polygalacturonic methylester			—	—	0.21

** ペクチンのmethylesterの3.0%がpectin-esteraseによつて分解していた。

Pen. expansum の糖化型ポリガラクトクロナーゼによる場合, ペクチン酸溶液の粘度の下降は還元糖の生成に比較して極めて緩徐であつた。ポリガラクトクロナーゼの活力に対するデガラクトクロン酸の分解作用は人参の酵素より強いが, Rh. triticiの糖化型ポリガラクトクロナーゼよりは弱かつた。人参の酵素と同様反応初期よりd-ガラクトクロン酸のみ生産し, oligosaccharideは生成しなかつた。Paper chromatographyの面積法によつて測定した反応液のd-ガラクトクロン酸の量は人参の場合と同様全還元糖量に大体一致した。ペクチン酸のglycoside結合を14%以上分解する事が出来なかつた。末端を酸化したペクチン酸を酸化しないものと同様に分解した。(この場合初期に反応が遅れるのは酸化したペクチン酸溶液が高粘度であつた爲ではないかと思われる。)以上の結果より*Pen. expansum*の糖化型ポリガラクトクロナーゼは人参の酵素に類似している事が判つた。但しデガラクトクロン酸分解作用が可成

り顯著であり、その K_m 恒数も小さいようであるから、末端より作用してデガラクトユロン酸を分解するようなポリガラクトユロナーゼを想定し、oligase によつてd-ガラクトユロン酸が生成する場合を考える事も出来る。

Pen. expansum の酵素液はメチルエステルとなつたペクチンにも作用する。之は酵素液の中に僅に含まれているpectin esteraseの爲であるか、或はMatusの結果⁽⁵⁾のようにPen. expansum のポリガラクトユロナーゼがメチルエステルとなつたペクチンの glycoside 結合をも分解する爲であるかも知れない。何れにしても Pen. expansum の糖化型ポリガラクトユロナーゼはペクチン酸をペクチンよりも容易に分解し、Roboz等の polymethylgalacturonase には属しないとされる。

第1表*及び前報⁽³⁾第5表0.17%ペクチン酸 12hrs に於て、反応液に4倍量の酒精を添加し、未反応のペクチン酸を沈澱せしめ、塩酸にてpH2.0となし、酒精で洗滌乾燥後溶解したものに対する Pen. expansum 及び人参の酵素液の作用を元のペクチン酸に対する作用力と比較した実験結果を第2表に示した。実験方法は第1表の場合と同じにした。

第 2 表

	Original pectic acid	Pectic acid, partially decomposed by the polygalacturonase of Pen. expansum	Pectic acid, partially decomposed by the polygalacturonase of carrot
Pen. expansum 12hrs.	0.88	0	0.03
24hrs.	0.92	0.03	0.07
Carrot 12hrs.	0.52	0	0.07
24hrs.	0.56	0	0.11

Pen. expansum と人参の酵素は同じくペクチン酸を大体 14% 以上分解する事が出来ない事及び第2表の結果より、ポリガラクトユロナーゼⅡは基質として用いたペクチン酸に作用し、それ以上分解され難いペクチン酸を残す事が判る。之は(1)基質として用いたペクチン酸に異常結合が存在する爲であるか、(2)ポリガラクトユロナーゼⅡが分解率14%に於てもはや其以上の低分子のpolygalacturonide に作用し得なくなつた爲であるか、(3)ポリガラクトユロナーゼⅡは本質的にはoligaseであり、ペクチン酸の分子量が不均一であつて低分子のものがoligaseの作用によつて消費し盡された爲であるかである。(2)は分解率14%に於る未分解のペクチン酸が元のペクチン酸と殆ど変らない高分子としての性質を持つている事より、(3)は基質として用いたペクチン酸を Norris 及び Resch⁽⁴⁾の方法によつて5回分別沈澱して低分子のペクチン酸を除去したものに対しても元のペクチン酸と同様に酵素が作用する事より、該当しないと思う。従つて(1)の場合即ちペクチン酸分子内に異常結合の存在が考えられる。基質として用いたペクチン酸の methoxyl 基は数回の鹼化により完全に除去されて居り、又ペクチン酸の鹼化溶解等の爲のアルカリ処理の程度によつて分解率に多寡を来すような事がないので、この異常結合はペクチン酸の調製中に生成したものではないと思われる。ペクチンの異常結合に就いて Palmer 等は X 線廻折により主鎖にアラビノーズ、ガラクトーズ等を交えている可能性があると言ひ、Kertesz⁽⁶⁾ はペクチンの鎖状分子の結合による巨大分子を想像している。兎も角上記の結果より、酵素学的にはペクチン分子内に 1~4 galacturonide 以外の何等かの異常結合が存在するようである。

2. *Penicillium expansum*の糖化型ポリガラクトチクロナーゼの性質

McIlvaine の buffer を 1/10 容量用い、其他の条件を第 1 表の場合と同じにして、*Pen. expansum*の糖化型ポリガラクトチクロナーゼの活力と pH の関係に就て行つた実験結果を第 3 表に示した。作用時間は 19hrs とした。

第 3 表									
pH	3.0	3.7	4.0	4.2	4.6	5.0	5.6	6.0	6.4
N/50 I ₂ ml	0.53	0.73	0.86	0.84	0.67	0.59	0.44	0.24	0.11

人参のポリガラクトチクロナーゼの最適 pH は 5.0 附近にあるが⁽⁶⁾、第 3 表の結果より、*Pen. expansum*の糖化型ポリガラクトチクロナーゼの最適 pH は 4.0 附近にあるようである。

トマトの depolymerase は耐熱性であると言われている⁽⁷⁾。1/10 容量の McIlvaine の buffer (pH 5.0) を酵素液に添加し、100°C に於て処理した結果、人参及び *Pen. expansum* の糖化型ポリガラクトチクロナーゼは 5 分間で完全に破壊された。Rh. tritici のポリガラクトチクロナーゼは 5 分間で 7% 15 分間で 3% 酵素力が残し、30 分間で完全に破壊された。従つて人参及び *Pen. expansum* の糖化型のポリガラクトチクロナーゼにはトマトや Rh. tritici の液化型のポリガラクトチクロナーゼの如き耐熱性はないようである。

要 約

- 1) *Pen. expansum* の糖化型ポリガラクトチクロナーゼは人参の酵素と同じく基質分子の末端より作用するものと思われる。但し人参の酵素液よりデガラクトチクロン酸の分解作用強く、又その K_m も小さいようである。
- 2) 人参及び *Pen. expansum* の糖化型ポリガラクトチクロナーゼの作用から考えて、基質として用いたペクチン酸の非還元性末端より平均約 1/7 の位置に何等かの異常結合が存在するようである。
- 3) *Pen. expansum* の糖化型ポリガラクトチクロナーゼの最適 pH は 4.0 附近にある。人参の酵素と同じく、トマト及び Rh. tritici の液化型ポリガラクトチクロナーゼに見られるような耐熱性はなかつた。

終りに御懇篤な御指導を賜つた片桐英郎先生に深謝する。本研究の費用の一部は昭和 27 年度文部省科学助成金によつた。茲に感謝の意を表する。本報告の要旨は 1953 年 6 月 13 日日本農芸化学会関西支部例会に於て発表した。

文 献

- (1) 小沢：ペクチン質分解酵素の研究（第 1 報）農化，26, 505 (1952)
- (2) 小沢，武田，林：ペクチン醱酵に就て（第 8 報）農学研究，38, 123 (1949)
- (3) 小沢，武田，岡本：同上（第 16 報）農学研究，41, 21 (1953)
- (4) Norris, F. W. and Resch, C. E.: The pectic substances of plants V. Biochem. J., 31, 1945 (1937)
- (5) Kertesz, Z. I.: The Pectic Substances, p. 45—57, p. 356—358 (1951)
- (6) 小沢，岡本：ペクチン醱酵に就て（第 12 報）農学研究，40, 103 (1952)
- (7) McColloch, R. J. and Kertesz, Z. I.: An unusually heat-resistant pectolytic factor from tomatoes. Arch Biochem., 17, 197 (1948)