

# 酵母インベルターゼについて

## (1) SH基保護試薬による抽出とインベルターゼアイソザイムの分別

長崎 亀・山本晋平・久保博昌

(農学部 発酵及醸造学研究室)

### On Yeast Invertase

#### (I) Thiol Induced Release of Invertase and Separation of Invertase Isozyme

Susumu NAGASAKI, Shimpei YAMAMOTO and Hiromasa KUBO

(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture)

The  $\beta$ -mercaptoethanol-induced release of invertase ( $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase, EC, 3. 2. 1. 26) from *Saccharomyces cerevisiae* LK 2 G 12 has been demonstrated to be a direct effect of the added thiol. Three invertase components of thiol-induced release invertase are distinguished from each other for the behavior to DEAE-cellulose. Upon the separation of these three forms, differences are demonstrated in the distribution and in the biosynthesis: invertase I and II are synthesized rapidly, whereas invertase III is synthesized accompanied with culture time.

#### 緒 論

Berthelet<sup>1)</sup> が酵母中にインベルターゼを発見して以来インベルターゼについては数多くの研究がなされ酵素化学の発展に大きな影響をもたらした。純化については近時ようやく行われ<sup>2,3,4)</sup> 酵母インベルターゼは細胞壁に由来すると考えられている多量のマンナン (~50%) を含み蛋白部分と糖部分の結合点はグルコサミン-セリンあるいはスレオニンまたはアスパラギンであると種々報告がなされている<sup>5,6,7)</sup>。糖部分を全く含まない酵母細胞内インベルターゼも純化され<sup>3)</sup> 糖部分を持つインベルターゼと比較検討がなされ生成様式、アイソザイムなどについて考察が加えられている<sup>5)</sup>。近年 *Neurospora* のインベルターゼも純化され<sup>8)</sup> アイソザイム、活性あるサブユニット、細胞内分布などについても検討が加えられてきた<sup>9,10,11,12)</sup>。

このようにインベルターゼについては古くから研究されているにもかかわらずアイソザイム、合成などの面では多くの問題を残している。

本報告においては酵母細胞表面に存在するインベルターゼがSH基保護試薬、ホスホマンナナーゼなどにより酵母菌体より遊離されることを見出したのでその抽出条件およびインベルターゼの分別分布について報告する。

#### 実験材料および方法

酵母は *Saccharomyces cerevisiae* LK2G12 \*1, パン酵母 (オリエンタル製, 鐘化社製) および既知酵母 \*2 を用いた。

培養は シュークロース 1%, マルトエキストラクト (Difco) 0.3%, 酵母エキス (大五) 0.3% およびバクトペプトン (Difco) 0.5% からなる Wickerham 改良斜面寒天培地 (pH 6.8) に酵

\*1: Rutgers, The State Univ. の J. O. Lampen 博士より分与されたものである。

\*2: 財団法人発酵研究所より分与されたものである。

母を植菌し、30°C 3~7日培養した。斜面寒天培地より同組成液体培地 100 ml (500 ml 振盪フラスコ) に移植,あるいはジャーファメンターを使用する場合は前培養液 100 ml を同組成培養液 8 l に移植し, 30°C, 16時間振盪あるいは通気攪拌培養を行なった。菌体は脱イオン水, ついで PR 緩衝液\* で3回洗浄後, PR 緩衝液 1 ml 当り 4 mg (乾物重) の濃度に懸濁し酵母懸濁液とした。

細胞壁は音波処理後(海上電機社製, 10KC, 500W, 音波処理器, 0~5°C, 1時間) 50%シュークロースを用いて分画遠心する古屋らの方法<sup>13)</sup> で調製し, 電子顕微鏡(日立製 HS-7S) 下で完全細胞の存在しないことを確認して用いた。

インペルターゼの抽出は酵母懸濁液 1.5 ml, PR 緩衝液 2.5 ml を含む抽出反応液(全量 5.0 ml) を 40°C で振盪して行なった。除菌後, 抽出液を 0.01 M Na-acetate 緩衝液(pH 5.0) に16時間攪拌透析して粗酵素標品とした。インペルターゼ活性は酵素標品 0.5 ml に 0.14 M シュークロース(pH 4.7, 0.5 M Na-acetate 緩衝液中) 0.5 ml を添加し 30°C 3分間反応後, 生成還元糖を 3,5-ジニトロサリチル酸法<sup>14)</sup> で定量した。30°C, 1分間に 1  $\mu$  mole のシュークロースの水解を触媒する酵素量を 1 単位とした。

蛋白の定量は Lowry 変法<sup>15)</sup> あるいは 280 m $\mu$  吸光度の測定により卵白アルブミンを標準蛋白として用いて定量した。糖の定量はフェノール硫酸法<sup>16)</sup> により定量した。

DEAE-Cellulose は Brown 社製を用い, 0.005 M Na-acetate 緩衝液(pH 6.2) で緩衝化して使用した。

ディスク電気泳動は Ornstein<sup>17)</sup> および Davis<sup>18)</sup> の方法により行なった。pH 8.0 および pH 4.0 でのディスク電気泳動は Williams & Reisfeld<sup>19)</sup> および Reisfeld *et al.*<sup>20)</sup> の方法でそれぞれ行なった。

パペイン(E. Merck Darmstadt, N. F. VIII, 1:350) は Balls *et al.* の方法<sup>21)</sup> で活性化して用いた。その他の試薬は市販品を用いた。

## 実験結果

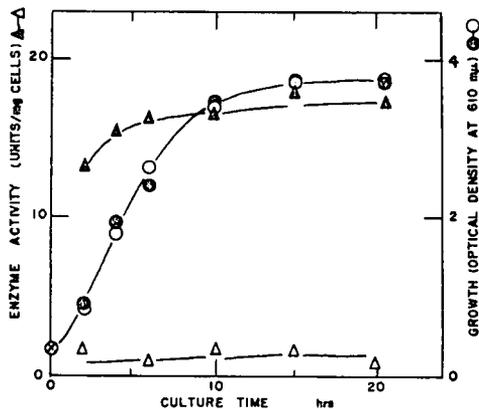


Fig. 1. Requirement of Sucrose for Invertase Formation.

○-△: Glucose-Wickerham medium  
●-▲: Sucrose-Wickerham medium

インペルターゼの誘導生成: 未適応の *S. cerevisiae* LK2 G12 洗浄菌体をシュークロース Wickerham 改変培地 および グルコース Wickerham 改変培地に移植し, 30°C で振盪培養を行ない経時的に生育と菌体のインペルターゼ活性を測定した。その結果 Fig. 1 に示したようにインペルターゼはシュークロースにより誘導生成され, 生育初期から生育末期にいたるまで比活性(インペルターゼ活性/菌体量)はほぼ一定であり, また, 生育においてもシュークロース Wickerham 改変培地, グルコース Wickerham 改変培地で同一であった。これらの事実からインペルターゼ生成は metabolite repression が調節機構であると考えられる。

\*: PR 緩衝液は 5 M KCl 200 ml, 0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 44 ml, 0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 56 ml を HCl で pH 6.2 に調節後 1 l に希釈して調整した。

SH 基保護試薬などによるインベルターゼの抽出:  $\beta$ -メルカプトエタノール<sup>22,23,24)</sup> およびホスホマンナーゼ<sup>25,26)</sup> を酵母に作用させるとインベルターゼが遊離化することが報告されている。シュークロース Wickerham 改変培地で適応生成させたインベルターゼを種々のSH基保護試薬などにより抽出を試みた (TABLE I)。その結果  $\beta$ -メルカプトエタノールを含む種々のSH基保護試薬でインベルターゼが抽出された。 *Bacillus circulans* AKU 0211 のホスホマンナーゼおよび *Flavobacterium dormitator* var *glucanolyticae* FA 5-6 および Fungi Imperfecti sp.

TABLE I. Effect of Thiol and Related Reagents on the Release of Invertase

Reagent	Released Invertase (units/ml)
None	0.00
$\beta$ -Mercaptoethanol, 0.3 M	1.42
Reduced glutathione, 0.1 M	0.00
L-Cysteine, 0.1 M	0.08
Dithiothreitol, 0.001 M	0.90
Papain, 290 $\mu$ g/ml	0.92
" , 174 $\mu$ g/ml	0.67

の生産する protoplast forming factor (Phosphomannanase?) によってもインベルターゼは効果的に抽出された。

一方 Fig. 2 のようにインベルターゼ活性は  $\beta$ -メルカプトエタノールによって阻害され、透析に

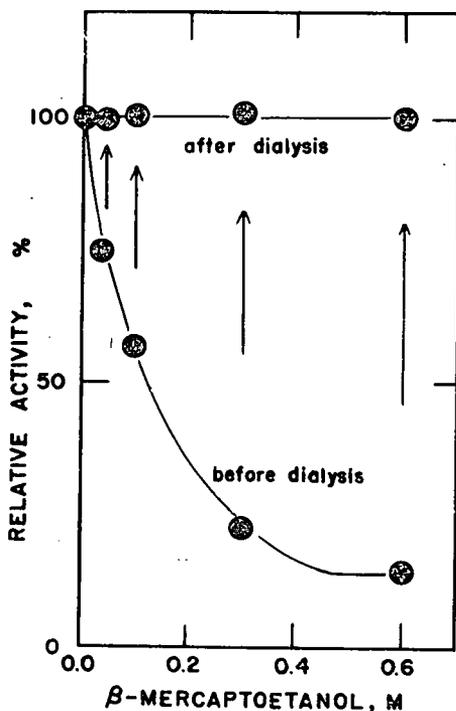


Fig. 2. Inhibition of Invertase by  $\beta$ -Mercaptoethanol and Reactivation by Dialysis.

Invertase (40 units) was incubated for 30 minutes with  $\beta$ -mercaptoethanol at a concentration as indicated in the Fig. After the incubation,  $\beta$ -mercaptoethanol was removed by dialysis against 0.01 M Na-acetate buffer (pH 4.6).

よって  $\beta$ -メルカプトエタノールを取り除くことによって回復する  $\beta$ -メルカプトエタノールによる可逆的阻害現象が観察された。

$\beta$ -メルカプトエタノールによるインベルターゼの抽出条件の検討： $\beta$ -メルカプトエタノールでインベルターゼを抽出する場合の  $\beta$ -メルカプトエタノール濃度および抽出時間について検討した。Fig. 3-Aのように  $\beta$ -メルカプトエタノールの濃度増加とともに抽出インベルターゼ量は増大し 0.3~0.4 M 濃度の時、最大抽出量が検出されそれ以上の濃度では抽出量は減少した。以後  $\beta$ -メルカプトエタノールでインベルターゼを抽出する場合は 0.3 M 濃度を用いた。抽出時間については Fig. 3-Bのように急速に抽出され 2~4 時間で抽出量は最大に達した。不純蛋白の抽出、抽出されたインベルターゼの変性などを考慮して以後抽出時間は 2 時間とした。

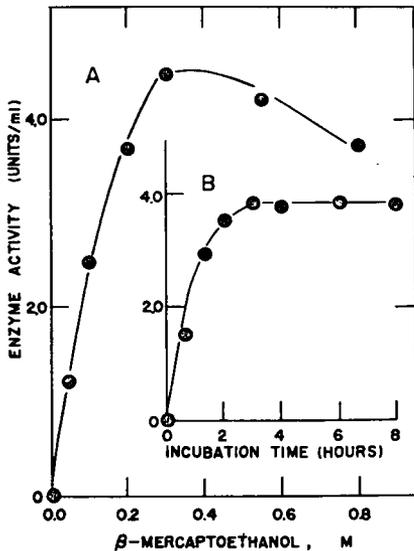


Fig. 3. The Relation of  $\beta$ -Mercaptoethanol Concentration (A) and Incubation Time (B) to the Release of Invertase from *S. cerevisiae* LK2G12.

Both experiments were carried out with 13 mg cells per ml.

抽出インベルターゼと細胞壁との再結合：カビインベルターゼは菌体と共存させることにより菌体に再吸着されることが報告されているが酵母インベルターゼについても同様な現象が生ずるか否かを検討した。

生菌体、煮沸菌体、 $\beta$ -メルカプトエタノール抽出後の菌体、生細胞壁、煮沸細胞壁、 $\beta$ -メルカプトエタノール抽出後の細胞壁、Peat *et al* の方法<sup>28)</sup> で得た酵母グルカンを用い、それを 0.01 M Na-acetate 緩衝液 (pH 4, 5, 6) および 0.01 M K-phosphate (pH 6, 7, 8) に 1 ml 当り 5 mg (乾物重) になるように懸濁し  $\beta$ -メルカプトエタノール抽出インベルターゼを終濃度 10 単位/ml に添加した反応液 5.0 ml を 30°C で 1 時間ゆるく攪拌しながら反応させた。反応終了

後遠心分離し (9000 rpm, 20分) その上澄液についてインベルターゼの増減を測定したが、いずれの標品、条件においても再結合は認められなかった。

インベルターゼアイソザイムの分画：インベルターゼ粗酵素標品は酵母懸濁液 20 ml, 3 M  $\beta$ -メルカプトエタノール 4.0 ml を含む反応液 (4.0 ml) を 40°C, 2 時間振盪した後抽出液を 0.01 M Na-acetate 緩衝液 (pH 5.0) に 16 時間攪拌透析して得た。0.05 M Na-acetate 緩衝液 (pH 6.2) で緩衝平衡化させた DEAE-cellulose カラム (20×200-mm) に吸着させ同組成 0.05 M Na-acetate 緩衝液 (pH 6.2) で洗滌した。その後 0.1 M Na-acetate 緩衝液 (pH 3.8) および 0.05 M NaCl 含 0.1 M Na-acetate 緩衝液 (pH 3.8) で step-wise にインベルターゼを溶出し Fig. 4 に示したように 3 種のアイソザイムを得た。これらの各々の分画は再クロマトグラフィーを行っても全く同位置に溶出された。これらの分画については溶出順に従ってインベルターゼ I, II および III と仮称した。

市販インベルターゼ標品 (半井化学製) を用いて同様に DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーを行なったが *S. cerevisiae* LK2G12 と同様な溶出パターンでインベルターゼ I, II およ

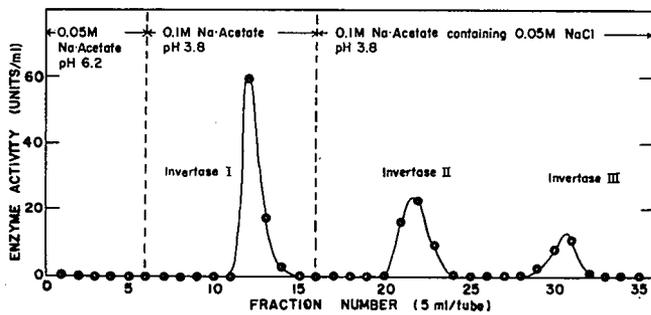


Fig. 4. Separation on DEAE-Cellulose of the Invertase I, II and III. A step-wise elution was employed on 20×200-mm column of DEAE-cellulose (acetate form) at a flow rate of 20 ml per hour.

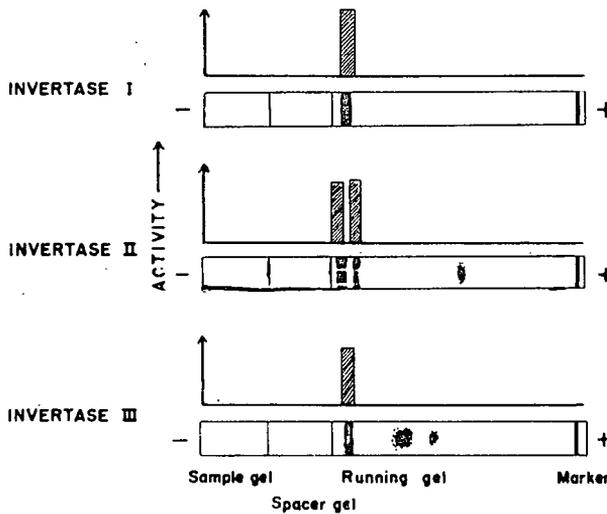


Fig. 5. Disk Gel Electrophoresis of Invertase I, II and III.

Electrophoresis was conducted in 0.02 M Tris-glycine buffer, pH 8.6. The current was discontinued when the marker, bromphenol blue, was almost at the anode end of the gel (bottom).

びIIIが得られた。これら各々のインベルターゼのディスク電気泳動を行ない純度を検定するとともにその蛋白像に合わせて同一条件で泳動した新しいゲルを細断してその各々の切片を 0.01M Na・acetate (pH 4.7) で2時間 5 °Cで抽出し、抽出液についてインベルターゼ活性を測定した。その結果 Fig. 5に示したようにインベルターゼIは単一にまで精製されていたがIIおよびIIIについては不純蛋白を少量含有していた。特にインベルターゼIIは二本の活性ある帯に泳動されさらに複雑なインベルターゼ成分の存在を示していた。

インベルターゼ・アイソザイムの分布：抽出条件、菌株、培養時間などの差異によってインベルターゼの成分系が異なるか否かを調べるために *S. cerevisiae* LK2 G12 およびパン酵母のインベルターゼをβ-メルカプトエタノール抽出法および自己消化法によって抽出し DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーで分離しインベルターゼI, IIおよびIIIについて検討した。

$\beta$ -メルカプトエタノール法は前述の方法で行ない、自己消化法は PR 緩衝液で3回洗浄した湿潤菌体25 g を Na $\cdot$ acetate 20 g, toluene 37.5 ml と共に37°C 7日間自己消化を行なわせた。自己消化終了後 pH を acetic acid で 6.2 に調節した後遠心分離 (12,000 rpm, 30分, 5°C) を行なった。上澄液は 0.05 M Na $\cdot$ acetate 緩衝液 (pH 6.2) に対し 16時間20°C で透析を行ない自己消化液とした。各酵素標品を前述の方法で DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによるアイソザイムの分画を行なった。

その結果 Fig. 6 に示したように *S. cerevisiae* LK2 G12 およびパン酵母の自己消化液にはいずれの場合もアイソザイムⅢは検出されずインペルターゼ I および II のみであった。またパン酵母の  $\beta$ -メルカプトエタノール抽出インペルターゼは、インペルターゼ I のみでインペルターゼ II およびⅢは全く検出されなかった。

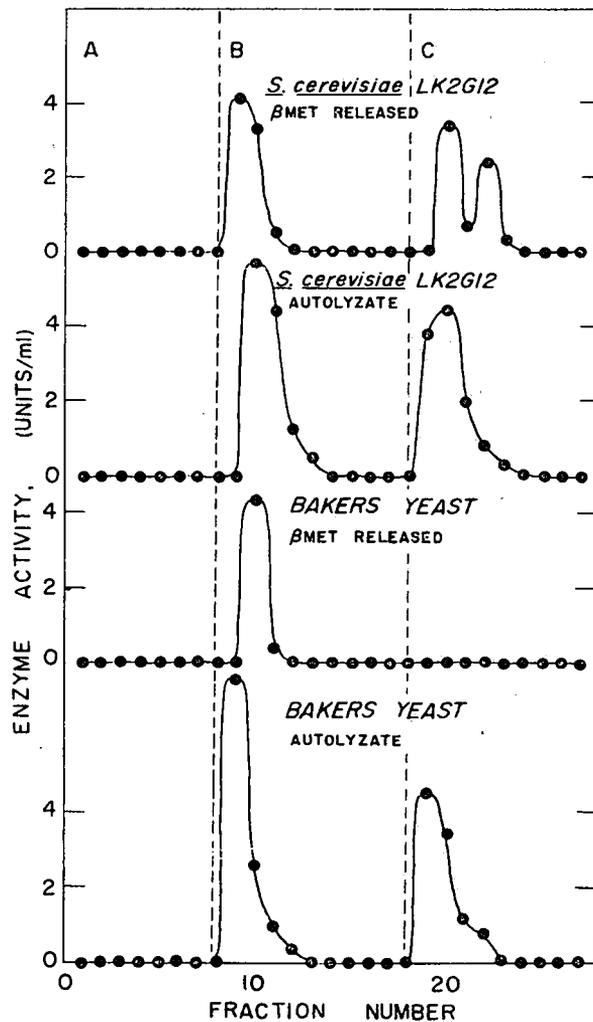


Fig. 6. Comparison of Invertase Form in  $\beta$ -Mercaptoethanol released Enzyme and in Autolyzate.

A : 0.05 M Na $\cdot$ acetate (pH 6.2)

B : 0.1 M Na $\cdot$ acetate (pH 3.8)

C : 0.1 M Na $\cdot$ acetate (pH 3.8) containing 0.05 M NaCl

For experimental details see the text.

*S. cerevisiae* LK2 G12 の培養時間の経過とアインザイム生成の割合を検討するためにシュークロス Wickerham 改変培地に16時間振盪培養を行なった前培養液 10 ml を 10 ml シュークロス Wickerham 改変培地に移植し経時的に集菌,  $\beta$ -メルカプトエタノール抽出を行ないそのインベルターゼ・アインザイムの存在様式について検討した。その結果 Fig. 7 に示したように培養初期にはインベルターゼ I および II のみであるが培養時間の経過と共にインベルターゼ III が出現し

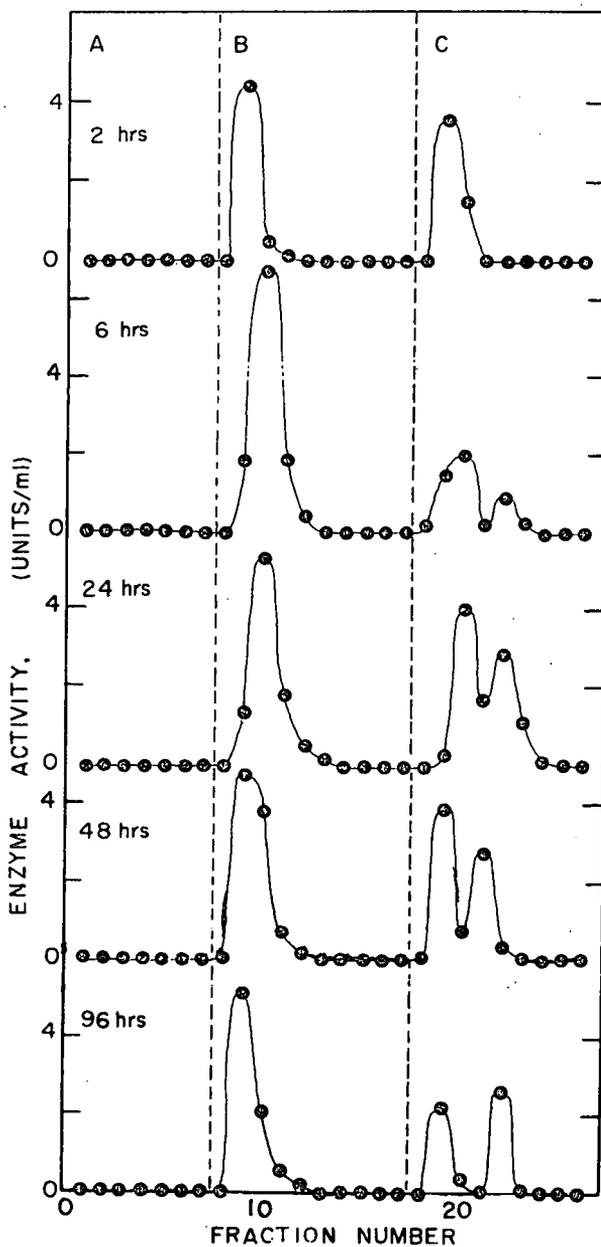


Fig. 7. The Relation of Invertase I, II and III to the Culture Time.

A : 0.05 M Na<sup>+</sup>acetate (pH 6.2)

B : 0.1 M Na<sup>+</sup>acetate (pH 3.8)

C : 0.1 M Na<sup>+</sup>acetate (pH 3.8) containing 0.05 M NaCl

For experimental details see the text.

て最終的にはインベルターゼⅡとⅢの比がほぼ1に近づいてきた。なお、2時間培養の際に出現したインベルターゼⅡは前培養菌体に由来するものか、本来培養時間の経過と共に出現してきたのかは不明である。

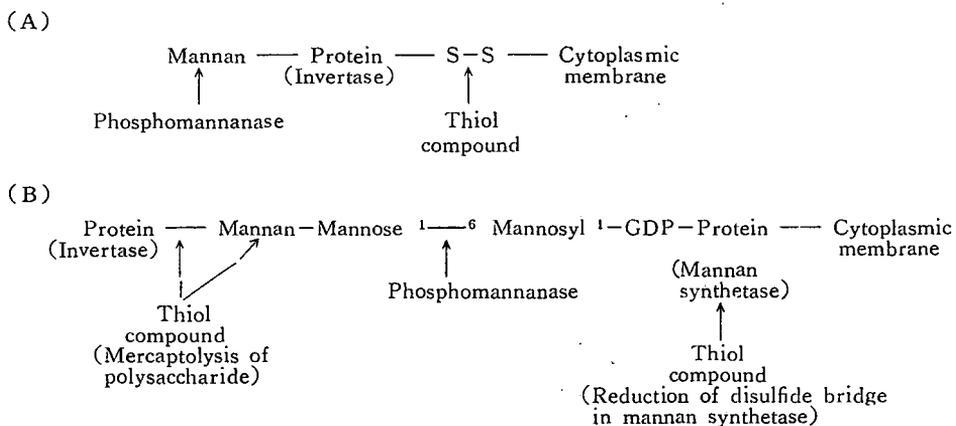
## 考 察

酵母インベルターゼは細胞壁成分であるマンナンと結合して細胞壁と原形質膜の間に存在し、シュクロースの細胞内透過に重要な役割を果していることは既に明らかにされており<sup>29,30,31,32</sup>、またそれが、カタツムリ消化液を用いてプロトプラストを調製する際に細胞外に遊離してくる現象も見出されている<sup>29,33,31,32</sup>。しかしプロトプラスト製作機構の一部が解明された現在<sup>34</sup>（一部未発表）、カタツムリ消化酵素中のホスホマンナーゼがインベルターゼのマンナン生合成の部分にある $\alpha$ -1,6-mannobiosyl-1-phosphateのmannoside部<sup>35,36,37</sup>の水解に働くことからその位置の水解によるインベルターゼ遊離であることが始めて推定された。

ホスホマンナーゼ以外のパパインや種々のSH基保護試薬によるインベルターゼ遊離化機構についてはほとんど研究がなされていない。パパインによるインベルターゼ遊離化機構については次のことが推察される。すなわち、まず第一に市販パパインに混在するかも知れないホスホマンナーゼの存在、第二にインベルターゼと菌体との間の未知の結合がパパインの蛋白分解作用によって切断されてインベルターゼが遊離される、第三にパパインによってインベルターゼ作用をもつ active fragment の遊離である。これらいずれに相当するものであるのは今後の研究にまたなければならない。

SH 保護試薬によるインベルターゼの遊離化についてはSH基保護試薬が-S-S-架橋を開裂、SH基保護の作用のあることとパン酵母や *Candida albicans* の細胞分裂と関係した蛋白-マンナン複合体中の-S-S-架橋と protein disulfide reductase の関係についての Nickerson の研究<sup>38</sup>とを対比すればインベルターゼの遊離に-S-S-架橋のSH基保護試薬による開裂を結びつけることができる (Fig. 8-A)。しかしながら遊離化したインベルターゼを細胞壁に再び-S-S-架橋の

Fig. 8. Schematic Diagram of the Action of Thiol Compound and Phosphomannanase.



再生によって再結合させることが不可能である事実および $\beta$ -メルカプトエタノールの場合 pKs が 9.3 付近であり、その-S-S-架橋に対する反応は sulphide ion による求核反応であると考えられるので-S-S-架橋開裂によるインベルターゼの遊離化を理解することはできない。また、それと同時にホスホマンナーゼのインベルターゼ遊離機構とSH基保護試薬によるインベルターゼ

遊離機構が同一との証明もできない。なぜならば、ホスホマンナーゼは前述のように  $\alpha$ -1,6-mannobiosyl-1-phosphate の mannoside 水解酵素であり、protein disulfide reductase 活性があると考えられないからである。

前述のことから  $\beta$ -メルカプトエタノールのような SH 基保護試薬によるインベルターゼの遊離化とホスホマンナーゼによるインベルターゼの遊離化を考え合せると Fig. 8-B のように模式できよう。すなわち、SH 基保護試薬のみでは完全にインベルターゼを遊離化できないことからマンナンが生合成されている途中のマンナン生合成酵素中の -S-S- 架橋を破壊しインベルターゼを遊離していると推察される。いま一つの可能性は SH 基保護試薬によるマンナン成分のメルカプトルシスであるがこれら二つの可能性について目下検討中である。

インベルターゼアイソザイムに関しては既に Kaya<sup>48)</sup>, Hoshino *et al.*<sup>49)</sup>, Hoshino and Momose<sup>42)</sup> によって二種のアイソザイムが存在することが報告され、さらに Gascon and Lampen<sup>2,3,5)</sup> により細胞内、外の二種のインベルターゼが純化されアイソザイムであると報告された。*S. cerevisiae* LK2 G12 より SH 基保護試薬により抽出されたインベルターゼは DEAE-cellulose カラムで三種のアイソザイムに分別精製されることが可能となった。このようにして得られたインベルターゼはいずれも糖を含有し従来の external invertase の範疇に入るものである。これらのアイソザイムは培養時間と共に変化し生育初期にはインベルターゼⅢは全く検出されないが生育中期ないしは末期にいたって漸次増加してくる。このことからマンナン鎖長によるインベルターゼ・アイソザイムの存在が推定された。

#### 参 考 文 献

- 1) BERTHELET, M., *Compt. Rend.*, 50, 980 (1860).
- 2) NEUMAN N. P. and LAMPEN, J. O., *Biochemistry*, 6, 468 (1967).
- 3) GASCON, S. and LAMPEN, J. O., *J. Biol. Chem.*, 243, 1567 (1968).
- 4) ANDERSON, B. and JORGENSEN, O. S., *Acta Chem. Scand.* 23, 2270 (1969).
- 5) GASCON, S., NEUMAN, M. P. and LAMPEN, J. O., *J. Biol. Chem.*, 243, 1573 (1968).
- 6) NEUMAN, N. P. and LAMPEN, J. O., *Biochemistry*, 8, 3552 (1969).
- 7) GREILING, von H., VÖGELE, P., KISTERS, R. und OHLENBUSCH, H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 350, 517 (1969).
- 8) METZENBERG, R. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 503 (1963).
- 9) METZENBERG, R. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 96, 468 (1962).
- 10) METZENBERG, R. L., *Biochem. Biophys. Acta*, 77, 455 (1963).
- 11) METZENBERG, R. L., *Biochem. Biophys. Acta*, 89, 291 (1964).
- 12) TREVITHICK, J. R. and METZENBERG, R. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16 319 (1964).
- 13) FURUYA, A. and IKEDA, Y., *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 34, 38 (1964).
- 14) BOREL, G., HOSTELLER, F., DEUEL, H., *Helv. Chim. Acta*, 35, 115 (1952).
- 15) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 16) DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. and SMITH, F., *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956).
- 17) ORNSTEIN, L., *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, Art. 2, 321 (1964).
- 18) DAVIS, B. J., *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, Art. 2, 404 (1964).
- 19) WILLIAMS, D. E. and REISFELD, R. A., *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, Art. 2, 373 (1964).
- 20) REISFELD, R. A., LEWIS, U. J. and WILLIAMS, D. E., *Nature*, 195, 281 (1962).
- 21) BALLS, A. K. and LINEWEAVER, H., *J. Biol. Chem.*, 130, 669 (1939).
- 22) DAVIS, R. and ELVIN, P. A., *Biochem. J.*, 93, 8 p (1964).
- 23) WEINBERG, R. and ORTON, W. L., *J. Bacteriol.*, 91, 1 (1966).
- 24) KIDBY, D. K. and DARRS, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 201, 261 (1970).
- 25) NAGASAKI, S., NEUMAN, N. P., ARNOW, P., SCHNABLE, L. D., and LAMPEN J. O.,

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 158 (1966).
- 26) MCLELLAN, W. L. and LAMPEN, J. O., *J. Bacteriol.*, 95, 967 (1968).
  - 27) YABUKI, M., *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 40, 201 (1966).
  - 28) BELL, D. J. and NORTHCOTE, D. H., *J. Chem. Soc.*, 1950 (1944).
  - 29) BURGER, M., BACON, E. E. and BACON, J. S. D., *Biochem. J.*, 78, 504 (1961).
  - 30) FUENTE, G. D. L. and SOLS, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 49 (1962).
  - 31) SUTTON, D. D. and LAMPEN, J. O., *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 303 (1962).
  - 32) ISLAM, M. F. and LAMPEN, J. O., *Biochim. Biophys. Acta*, 58, 294 (1962).
  - 33) EDDY, A. A. and WILLIAMSON, D. H., *Nature*, 183, 1101 (1959).
  - 34) NAGASAKI, S. and YAMAMOTO, S., *Res. Rep. Kochi Univ.*, 17, 93 (1968).
  - 35) BEHRENS, N. H. and CABIB, E., *J. Biol. Chem.*, 243, 502 (1963).
  - 36) TANNER, W., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 35, 144 (1969).
  - 37) BRETTHAUER, R. K., KOZAK, L. P. and IRWIN, W. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 820 (1969).
  - 38) NICKERSON, W. J., *Bacteriol. Rev.*, 27, 305 (1963).
  - 39) HIRASE, S. and ARAKI, T., *Bull. Chem. Soc., Japan*, 27, 105 (1954).
  - 40) KAYA, T., *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 38, 417 (1964).
  - 41) HOSHINO, J., KAYA, T. and SATO, T., *Plant Cell Physiol.*, 5, 495 (1964).
  - 42) HOSHINO, J. and MOMOSE, A., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 12, 163 (1966).

(昭和45年 9 月30日受理)

# 酵母インベルターゼについて

## (2) インベルターゼ・アイソザイムの性質

山本晋平・長崎 亀・久保博昌

(農学部 発酵及醸造学研究室)

## On Yeast Invertase

### (2) Properties of Invertase Isozymes

Shimpei YAMAMOTO, Susumu NAGASAKI and Hiromasa KUBO

(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture)

The enzymatic and physiological properties of three invertase isozymes (EC 3. 2. 1. 26,  $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase) released from *Saccharomyces cerevisiae* LK2 G12 by the treatment of  $\beta$ -mercaptoethanol show similarities. On the otherhand, invertase isozymes differ from each other considerably in the modification for and the affinities of inhibitor for the sulfhydryl groups on enzyme protein. Invertase II, a subcomponent of multiple forms of invertase in  $\beta$ -mercaptoethanol extract from *S. cerevisiae* LK2 G12, is converted to another form, a major component (invertase I) by the action of  $\alpha$ -mannanase ( $\alpha$ -1, 2- and 1, 3-mannosidase), suggesting that the invertase II is formed from invertase I as a result of some enzymatic modification of its polysaccharide (mannan) structure.

### 緒 論

既報において *Saccharomyces cerevisiae* LK2 G12 のインベルターゼが SH 基保護試薬, フォスフオスマンナースおよび protoplast forming factor によって菌体外に遊離され, しかも DE AE-cellulose カラムクロマトグラフィーで三種のアイソザイムに分画できうることを報告した<sup>1)</sup>。インベルターゼアイソザイムに関しては, これまで, Kaya<sup>2)</sup>, Hoshino et al<sup>3)</sup> および Hoshino and Momose<sup>4)</sup> の報告がありその存在が認められており, 酵素化学的, および物理化学的に区別することができないと報告している。また Hoshino and Momose<sup>5)</sup> は, その生合成段階あるいは, 単なる温置で相互転換の起ることを報告している。

本報告においては, インベルターゼ I, II および III の化学的修飾による酵素化学的性質の差異およびインベルターゼ成分系相互転換を比較検討した結果を報告する。

### 実験材料および方法

インベルターゼ成分系の分画精製, 酵素活性の定量法およびディスク電気泳動などは既報方法にしがった<sup>1)</sup>。 $\alpha$ -マンナースは, *Flavobacterium dormitator var glucanolyticae* より純化して用いた (未発表)。その他の材料および方法は特に記さない限り既報にしがった。

### 実験結果

酵素化学的性質: これまで, 酵母インベルターゼの反応動力学に関する種々のパラメーターについては広く研究がなされているが, インベルターゼ I, II および III の  $K_m$ , pH, 活性化エネルギーについて検討した結果を TABLE I に示した。シュクロースについては 5~100 mM, またラ

TABLE I. Summary of Some Properties of Invertase I, II and III

	Km (mM) for		Optimal pH	Stability	Activation Energy	Carbohydrate Content
	Sucrose	Raffinose				
Invertase I	26	155	4.6	4.0-7.0	11000 cal	47.7%
II	25	149	4.6	4.0-7.0	11000	61.6
III	26	151	4.6	4.0-7.0	11000	34.4
External invertase*	26	150	3.5-5.5	3.0-7.5	-	50
Internal invertase*	25	150	3.5-5.5	6.0-9.5	-	<3

\* Data taken from Gascón *et al.*<sup>9)</sup>

フィノースについての Km は 50~100 mM 濃度範囲を用い標準条件下で反応を行なった。Km は Lineweaver-Bark plots<sup>9)</sup> から算出した。シュクロースに対する Km は 25~26 mM, ラフィノースについての Km は 149~155 mM と三種のアイソザイム間に差は認められなかった。そしてこれらの値は既に知られている酵母インベルターゼの値と良く一致している。pH 2.2-6.5 Na·acetate 緩衝液および pH 6.0-8.0 K·phosphate 緩衝液の種々の pH で Km を求め Dixon plots<sup>7)</sup> により pKe を求めた (Fig. 1)。その結果、pKe はいずれのインベルターゼも 3.1 であつた。

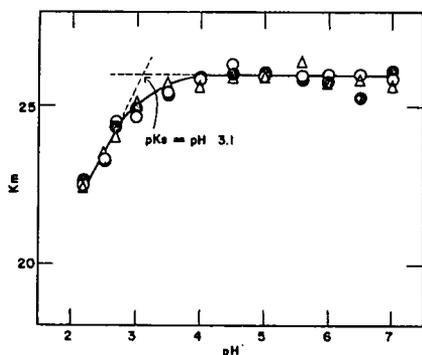


Fig. 1 Effect of pH on Km of Invertase I, II and III.

○—○: Invertase I  
●—●: " II  
△—△: " III

を求めた。Arrhenius plots は直線となり、水解酵素にしばしば見出される変曲点は存在しなかった。活性化エネルギーはインベルターゼについて、11000 cal と Arrhenius 式より求められ、三種のインベルターゼに差は認められなかった。

マンナン含量: インベルターゼ I, II, および III について糖含量をフェノール-硫酸法で測定し、蛋白 ( $\mu\text{g}$ )/糖 ( $\mu\text{g}$ ) の比を求めた結果それぞれ 0.9~1.1, 0.6~0.9 および 1.9~2.3 の値が得られた。またインベルターゼ酵素標品 (半井化学製) を DEAE-cellulose でインベルターゼ I, II および III に分離し蛋白/糖の比を同様に求めてみると 0.9~1.0, 0.8~0.9 および 1.5~2.3 という値が、それぞれ得られた。

化学的修飾: Hoshino & Momose<sup>4)</sup> は  $10^{-2}$  M システインによりパン酵母の 2 種のインベルターゼは約 4 倍活性化されると報告しており、また Gascón *et al.* は、全く活性化も促進もしないと報告している<sup>9)</sup>。S. cerevisiae LK2G12 のインベルターゼ I, II および III についても同様にシステイン、還元型グルタチオンおよび p-クロロマーキュリーベンゾエイト (以下 pCMB と略) の効果を検討した。

至適 pH を求めるために pH 2.3~6.5 Na·acetate 緩衝液 pH 6.0~8.0 K·phosphate 緩衝液を用いて測定した。いずれのインベルターゼも 4.6 に至適 pH を持っており、全く同一の pH 活性曲線を示した。また前述の範囲の緩衝液を用い 55°C 5 分間処理を行ない、その後 pH 4.6, Na·acetate 緩衝液の標準条件下で反応を行ない、熱安定 pH を測定したが、この場合も三種のインベルターゼともに pH 4~7 で安定であり、その熱失活曲線も全く同一であった。活性化エネルギーを求めるために 5~50°C の温度範囲以外は標準条件下で活性を測定し、Arrhenius plots<sup>8)</sup> によって活性化エネルギー

0.1 M (終濃度) シスチンおよび還元型グルタチオンを含む 0.1 M Na·acetate 緩衝液 (pH 4.7) 中で 30°C, 30 分間インベルターゼ (80 units) を放置すると, いずれのインベルターゼも阻害を受けた (TABLE II, Line 1, 2)。その後 0.01 M Na·acetate 緩衝液 (pH 5.0) に透析を行ない, シスチン (Fig. 2-A) および還元型グルタチオン (Fig. 2-B) を除くと活性は回復

TABLE II. Chemical Modification of Invertase I, II and III

Procedure	Inhibition (%)		
	Invertase I	Invertase II	Invertase III
Cystein treatment	50	80	78
GSH treatment*1	20	42	45
pCMB treatment*2	41	84	76
Guanidine treatment	100	100	100
DTNB treatment*3	0	0	0
Iodination	100	100	100
Acetylation	27	28	28
Guanidination	29	43	37

\*1 : Reduced glutathione  
 \*2 : p-Chloromercuribenzoic acid  
 \*3 : 5,5'-Dithio-bis-(2-nitro) benzoic acid

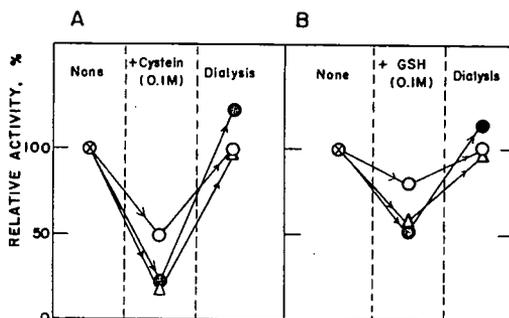


Fig. 2. Inhibition of Invertase I, II and III by Cysteine and Reduced Glutathione. Conditions of the experiment were described in the text.

○—○ : Invertase I  
 ●—● : " II  
 △—△ : " III

した。このことは, 酵素蛋白の -S-S- 結合の開裂閉鎖が活性発現に一つの役割を果していることを暗示させるものである。また, この場合, 酵素活性の行動はインベルターゼ II と III はお互に非常に似た行動を示し -S-S- 結合を含むその周辺の蛋白構造の類似性を示しているものかも知れない。

-SH 基阻害剤である pCMB の阻害とチチオスレイトールによる回復を検討した (TABLE II, Line 3, Fig. 3-A)。pCMB 10<sup>-4</sup> M (終濃度) を含む 0.1 M Na·acetate 緩衝液 (pH 4.7) 中で, 30°C, 20 分間各インベルターゼ (20 units) を処理し, SH 基を pCMB でマスクした場合, いずれのインベルターゼも阻害を受け, 次いで 0.1 μM (終濃度) チチオスレイトールの添加で 2~30% の回復がみられた。また次に, 最初にチチオスレイトールを添加して 30°C, 20 分間処理しても, その活性はほとんど失われず, 次いで pCMB 処理を前述のように行なったがこの場合にはほとんど阻害を受けなかった (Fig. 3-B)。

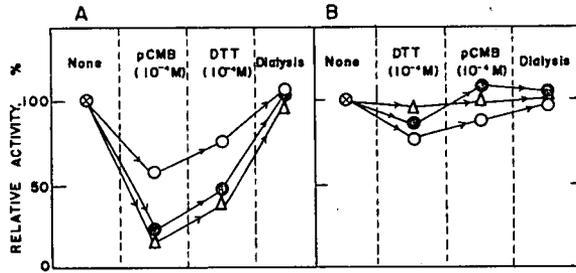


Fig. 3. Inhibition of Invertase I, II and III by *p*-Chloromercuribenzoic acid and Reactivation of Invertase by Dithiothreitol.

Reaction mixtures were incubated at 30°C in *p*-chloromercuribenzoic acid (*p*CMB) or dithiothreitol (DTT) for 60 minutes. Conditions of the experiment were described in the text.

○—○ : Invertase I  
 ●—● : " II  
 △—△ : " III

酵素のSH基修飾においてインベルターゼIはインベルターゼIIおよびIIIとは異った挙動を示していた。

蛋白質の高次構造を破壊するグアニジンを用いて、高次構造の破壊とSH基保護試薬による回復の現象が行なわれるか否かを検討するためにSH基保護試薬としてβ-メルカプトエタノールおよびジチオスレイトールを用いて行なった。

再再結を行なったグアニジンをpH 4.7に調整し、5M終濃度に酵素標品(各160 units)に添加し、15分間室温で反応後、グアニジンを0.05M Na-acetate 緩衝液(pH 4.7)で緩衝平衡化させたSephadex G-15(10×200-mm)で除き、酵素活性を測定したがいずれのインベルターゼも完全に活性を失っており(TABLE II, Line 4, Fig. 4-A) β-メルカプトエタノールおよびジチオスレイトールの添加で回復しなかった。β-メルカプトエタノールを用いた場合をFig. 4-Bに示した。インベルターゼI, IIおよびIIIの差異を酵素蛋白のその他の化学的修飾によって検討を行なった結果をTABLE IIに示した。

Ellman<sup>10)</sup>の報告したSH基定量試薬5,5'-dithio-bis-(2-nitro) benzoic acid(以下DTNBと略)を用いて、酵素蛋白表面にあるSH基をマスクして、SH基の活性に対する役割を検討した。

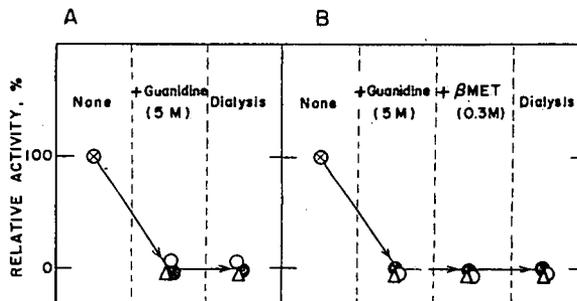


Fig. 4. Denaturation of Invertase I, II and III by Guanidine.

For experimental details see the text.

○—○ : Invertase I  
 ●—● : " II  
 △—△ : " III

$10^{-3}$  M (終濃度) を含む 0.05 M Na·acetate (pH 4.7) 中で各インベルターゼ (50 units) を  $30^{\circ}\text{C}$ 、20 分間反応させ、その後、0.05 M Na·acetate 緩衝液 (pH 4.7) で緩衝平衡化させた Sephadex G-25 (10×200-mm) で DTNB を除き酵素活性を測定したが、いずれのインベルターゼも全く阻害を受けないことから、酵素蛋白表面に SH 基が存在しないか、あるいは存在するとしてもその SH 基は酵素活性に影響を与えないものと推定されよう (TABLE II, Line 5)。

酵素蛋白中のチロシン残基をヨウ素化させる目的で、0.01 M  $\text{I}_2$ -0.5 M KI 混液とインベルターゼ (500 units) を 0.005 M K·phosphate 緩衝液 (pH 7.5) 中で  $30^{\circ}\text{C}$ 、5 時間反応させた後、0.05 M Na·acetate 緩衝液 (pH 4.7) に対して透析を行ない  $\text{I}_2$ -KI を除いた<sup>11)</sup>。このチロシンのヨウ素化により各インベルターゼは完全に活性を失ったことから、インベルターゼ I、II および III はいずれも活性中心付近あるいは活性中心にチロシンの存在を示唆するものである (TABLE II, Line 6)。

インベルターゼ 50  $\mu\text{g}$  と等容の飽和 Na·acetate を添加し、5 ml とし  $0\sim 5^{\circ}\text{C}$  で無水酢酸を 1  $\mu\text{l}$  宛 2 回添加し、1 時間遊離アミノ基のアセチル化を行ない 0.05 M Na·acetate 緩衝液 (pH 4.7) に対して透析を行ない、Na·acetate および無水酢酸を除去した<sup>12)</sup>。このようにして遊離アミノ基のアセチル化を行なったインベルターゼはいずれも 30% 程度失活した (TABLE II, Line 7)。

*o*-メチルイソ尿素によってリジン残基中の  $\epsilon$ -アミノ基のグアニジル化を次のように行なった。すなわち各インベルターゼ 100  $\mu\text{g}$  に 0.01 M K·phosphate 緩衝液 (pH 8.0) を等量添加し、1.0 ml とし、1 M *o*-メチルイソ尿素 1.0 ml をさらに添加して、 $5^{\circ}\text{C}$  で 4 日間リジン残基中の  $\epsilon$ -アミノ基のグアニジル化を行なった。次いで 0.05 M Na·acetate 緩衝液 (pH 4.7) に対して透析を行ない残存する *o*-メチルイソ尿素を除き、酵素活性を測定した。その結果インベルターゼ II および III は約 40% 失活し、インベルターゼ I は約 30% の失活を示し、両者の間に有意の差のあることが認められた (TABLE II, Line 8)。

**相互転換：**酵母インベルターゼの糖部分がマンナンであることは既に多くの証明がなされ、前述のように、インベルターゼ I、II および III の糖部分もマンナンであることを証明した。このマンナン部分を *F. dormitator* var. *glucanolyticae* FA 5-6 より得られた  $\alpha$ -マンナネースで加水分解を行なうことによって、インベルターゼの相互転換を行なうことを試みた。DEAE-Cellulose によって分画されたインベルターゼ I あるいは II 4.0 ml (600 units)、 $\alpha$ -マンナネース 0.8 ml (720 units)、1 M-K·phosphate 緩衝液 (pH 7.0) 0.4 ml で  $40^{\circ}\text{C}$  7 時間反応後、0.05 M Na·acetate 緩衝液 (pH 6.2) に対して透析した。透析終了後、DEAE-cellulose カラムで分画してインベルターゼの転換を検討した。その結果 Fig. 5 および 6 に示したようにインベルターゼ II はインベルターゼ I に転換していることが示された。一方、インベルターゼ I は全く変化していなかった。

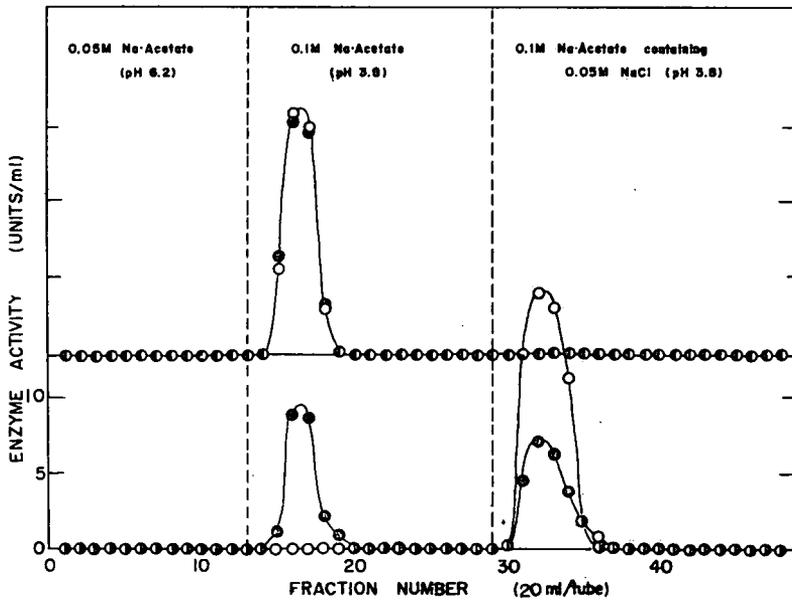


Fig. 5. Partial Conversion of Invertase I (upper) and II (lower) by the Action of  $\alpha$ -Mannanase. Separation of invertase was employed on DEAE-cellulose column (15×290 -mm) at a flow rate of 20 ml per hour. Other experimental conditions see the text.  
 ○—○ : Before  $\alpha$ -mannanase reaction.  
 ●—● : After  $\alpha$ -mannanase reaction.

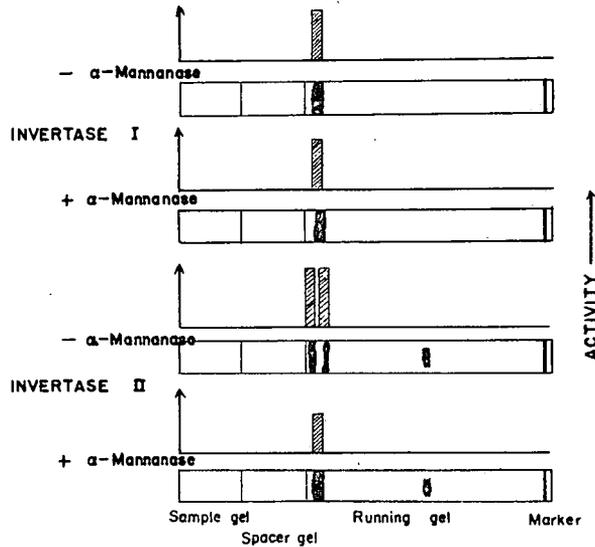


Fig. 6. Disk Gel Electrophoresis of Invertase I and II after and before the  $\alpha$ -Mannanase Reaction. Electrophoresis was conducted in 0.02 M Tris-glycine buffer, pH 8.6. The current was discontinued when the marker, bromphenol blue, was almost at the anode end of the gel (bottom).

## 考 察

DEAE-Cellulose によって分画されたインベルターゼ・アイソザイム各々の酵素化学上のパラメーターは、従来報告されたものとは著しい差は認められなかった。ただ、Gascón *et al*<sup>9)</sup> および Gascón and Lampen<sup>14)</sup> の報告した細胞内インベルターゼとの差が見られた。細胞内インベルターゼは糖部分の存否に由来するもの以外にアミノ酸組成などの点からも全く別個のアイソザイムと言うべきものであろう。他方、細胞外インベルターゼについての報告<sup>2,15,16)</sup> のものと本報告のインベルターゼ・アイソザイムとは同一であろうと考えられる。しかしながら SH 基保護試薬に対する挙動が非常に他のものと異っていた。化学的修飾のうち *p*CMB の含む種々の SH 基阻害試薬による SH 基阻害では、酵素反応に SH 基が関与していることを推定させるのに十分な結果が得られた。この SH 基は DTNB による阻害現象が認められなかったことから、SH 基は酵素蛋白質内部に埋没しており、しかも、 $\beta$ -メルカプトエタノールなどの SH 基保護試薬による阻害という点から -S-S- 結合を形成していると推定される面もある。

一連の化学的修飾ならびに阻害からインベルターゼⅡとⅢは非常に酷似した挙動を示し、明らかにインベルターゼⅠとは異っていた。既報<sup>1)</sup> においてインベルターゼ生合成段階でインベルターゼⅠおよびⅡがまず生成され、次いでインベルターゼⅢが生成されることからインベルターゼⅠおよびⅡのいずれかより、インベルターゼⅢが生成されるものではないかと推定され、糖含量の点からはインベルターゼⅢはインベルターゼⅠにより近い含量を示すことから、インベルターゼⅠより生成するものではなかろうかと考えられる。 $\alpha$ -マンナネースによる糖部分の分解によってインベルターゼⅡからインベルターゼⅠへの移行は生合成の逆反応を示すものであろう。

$\alpha$ -マンナネースによるマンナン部分の分解によるインベルターゼの転換は  $\alpha$ -マンナネースの基質特異性(未発表)から  $\alpha$ -1,2- および  $\alpha$ -1,3-マンノサイド結合の加水により糖部分の低分子化に基くものである。酵母インベルターゼのマンナン部分の構造についての Clifonelli and Smith の研究<sup>17)</sup> によれば、そのマンナンは  $\alpha$ -1,6-マンノサイド結合のマンナンを主鎖とし主鎖より  $\alpha$ -1,2-マンノサイド結合で分岐して、 $\alpha$ -1,2- および  $\alpha$ -1,3-マンノサイド結合でマンノースが1~3個存在するのである。この報告から  $\alpha$ -マンナネースによるインベルターゼの転換は糖部分の特に側鎖マンノサイド結合の除去ということになる。この糖部分については今後の研究を待たなければならないが蛋白質部分についても若干の差があり、この点についても今後検討して行く予定である。

## 参 考 文 献

- 1) NAGASAKI, S., YAMAMOTO, S. and KUBO, H., *Res. Rep. Kochi Univ.*, 19, 153 (1970).
- 2) KAYA, T., *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 38, 417 (1964).
- 3) HOSHINO, J., KAYA, T. and SATO, T., *Plant Cell Physiol.*, 5, 495 (1964).
- 4) HOSHINO, J. and MOMOSE, A., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 12, 163 (1966).
- 5) HOSHINO, J. and MOMOSE, A., *J. Biochem. (Tokyo)*, 59, 192 (1966).
- 6) LINEWEAVER, H. and BURK, D., *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1938).
- 7) DIXON, M., *Biochem. J.*, 55, 161 (1953).
- 8) DIXON, and WEBB, D. C., "*Enzymes*" Longmans, Green and Co., Ltd., London, 1964.
- 9) GASCON, S., NEUMAN, N. P. and LAMPEN, J. O., *J. Biol. Chem.*, 243, 1573 (1968).
- 10) ELLMAN, G. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70 (1959).
- 11) FRANKEL-CONRAT, H., *Arch. Biochem.*, 27, 109 (1950).
- 12) DIXON, G. H. and NEWRATH, H., *J. Biol. Chem.*, 225, 1049 (1957).
- 13) HUGHES, Jr. W. L., SAROFF, H. A. and CARNEY, A. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2476 (1949).

- 14) GASCON, S. and LAMPEN, J. O., *J. Biol. Chem.*, **243**, 1567 (1968).
- 15) NEUMANN, N. P. and LAMPEN, J. O., *Biochemistry*, **6**, 648 (1967).
- 16) ANDERSEN, B. and JORGENSEN, O. S., *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2270 (1969).
- 17) CLIFONELLI, J. A. and SMITH, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5682 (1955).

(昭和45年 9 月30日受理)

# 酵母インベルターゼについて

## (3) インベルターゼの新抽出法

長崎 龜・松岡英彦\*・山本晋平

(農学部 発酵及醸造学研究室)

## On Yeast Invertase

### (3) Novel Extraction of Invertase

Susumu NAGASAKI, Hidehiko MATSUOKA\* and Shimpei YAMAMOTO

(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture)

The novel extraction of invertase from commercial baker's yeast have been studied. It have been found that suspension of intact baker's yeast cells in 0.001 M Na-acetate, pH 5.0 containing 0.5 M  $\beta$ -mercaptoethanol and yeast cell lytic enzyme preparation results in the extraction of 70 % of the cell-bound invertase.

### 緒 論

従来、酵母からのインベルターゼを抽出する方法は主として自己消化法が採用されているが、自己消化法は長時間を要すると共に不純蛋白質の混入が多く以後の精製操作が複雑となる欠点があった。そこで我々は簡単なインベルターゼ抽出法を見出す目的で種々研究を行なった。

*Saccharomyces fragilis* Log phase 菌体を  $\beta$ -メルカプトエタノールで処理するとインベルターゼが遊離してくることは Davis and Elvin<sup>1)</sup> により認められていた。また Nagasaki *et al*<sup>2)</sup> により、*S. cerevisiae* の Log phase 菌体に PR-factor を作用させるとインベルターゼが遊離することが報告された。長崎、山本<sup>3)</sup> により、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼとホスホマンナーゼの協奏作用により酵母細胞壁が溶解されこの際、インベルターゼの遊離が認められている。

しかし、酵母インベルターゼの詳細な抽出条件の検討については、いまだ報告がない。そこで本報では  $\beta$ -メルカプトエタノールなどの還元性試薬および、微生物細胞壁溶解酵素などによる酵母インベルターゼの抽出条件について報告する。

### 実験材料および方法

酵母はシュクロース 1%，ペプトン 0.5%，酵母エキス 0.3%，麦芽エキス 0.3%，pH 6.8 で 30°C 40時間培養した。市販パン酵母は大日本製糖製のニットーイースト、および鐘淵化学製のカネカイーストブルーを使用した。酵素剤は *Bacillus circulans* の培養濾液を 70% エタノールで沈澱乾燥させた粗酵素、*Flavobacterium dormitator* var *glucanolyticae* FA5-6 の培養濾液、あるいはその Bio-Gel P-10 部分精製酵素を使用した。

### 実験結果および考察

1.  $\beta$ -メルカプトエタノール濃度：市販パン酵母（ニットーイースト）懸濁液 1 ml, PR 緩衝液<sup>3)</sup>

\* Amano Pharmaceutical Co., Ltd.

1.5 ml,  $\beta$ -メルカプトエタノールを加えて全量 3 ml とし, 40°C 2時間抽出後 3000 r.p.m 10分間遠心分離した。上清を pH 5.0, 0.01 M Na-acetate 緩衝液に対して16時間透析後インベルターゼ活性を測定した (Fig. 1)。 $\beta$ -メルカプトエタノールが 0.3 M まではインベルターゼは急速に抽出されるが, 0.3 M 以上ではわずかしこ増加しなかった。なお生菌よりの抽出率は  $\beta$ -メルカプトエタノール 0.5 M で 8%程度であった。

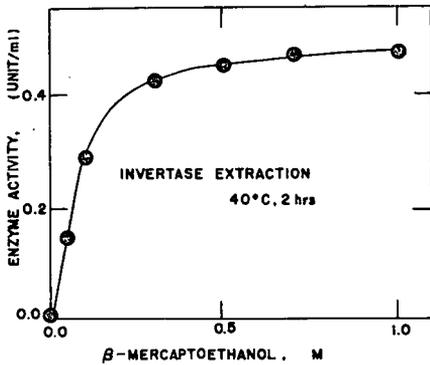


Fig. 1. Effect of  $\beta$ -Mercaptoethanol Concentration on the Extraction of Invertase from Baker's Yeast.

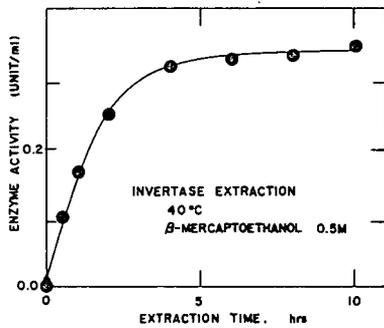


Fig. 2.  $\beta$ -Mercaptoethanol Extraction as a Function of Incubation Time.

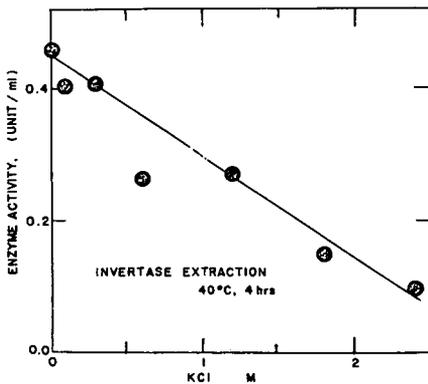


Fig. 3. Effect of KCl on  $\beta$ -Mercaptoethanol Extraction of Invertase

抽出されるが, 0.3 M 以上ではわずかしこ増加しなかった。なお生菌よりの抽出率は  $\beta$ -メルカプトエタノール 0.5 M で 8%程度であった。

2. 抽出時間: ニットーイースト懸濁液 1 ml, PR 緩衝液 1.5 ml,  $\beta$ -メルカプトエタノール 0.5 ml (終濃度 0.5 M) で 40°C, 経時的に抽出されたインベルターゼを前述のように透析後, 活性を測定した。

Fig. 2 に示すように 4 時間までは急激な増加がみられるが以後わずかしこ増加しなかった。最終的な抽出率は 12%程度であった。

3. 抽出液の組成と pH: 従来, 酵母インベルターゼの基本抽出液組成として酵母懸濁液 1 ml, PR 緩衝液 1.5 ml,  $\beta$ -メルカプトエタノール 0.5 ml 全量 3 ml という組成で行なっていたが目的酵素をできるだけ純粋に得ると共に精製操作を容易にするためには抽出液の成分の単純なことが望ましい。そこで緩衝液中の KCl 濃度を 0 から 2.4 M, pH を 4, 5, 6, (Na-acetate 緩衝液) および 6, 7, 8, (K-phosphate 緩衝液) についてニットーイーストを用いインベルターゼの抽出を行なった。

Fig. 3 および 4 のごとく KCl 濃度については, KCl が存在しない場合が最も良く, また

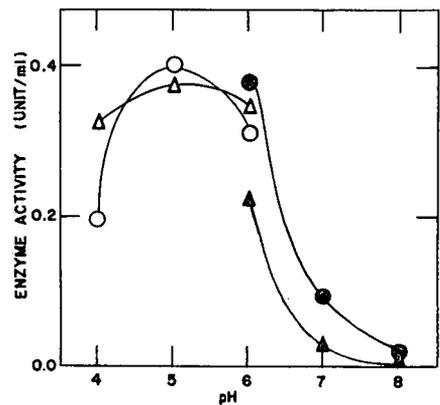


Fig. 4. Effect of pH on  $\beta$ -Mercaptoethanol Extraction of Invertase from Baker's Yeast.

- Na-acetate
- △—△ Na-acetate + KCl
- K-phosphate
- ▲—▲ K-phosphate + KCl

pH については Na·acetate 緩衝液で pH 5 が最適であった。そこで PR 緩衝液の代りに, Na·acetate 緩衝液および, K·phosphate 緩衝液について抽出最適 pH を求めたところやはり pH 5 Na·acetate 緩衝液であった。そこで pH 5 Na·acetate 緩衝液について緩衝液濃度を検討した結果, Fig. 5 のように緩衝液濃度による影響は著しい差は認められなかった。

4. 酵母濃度と細胞壁溶解酵素の効果: 各濃度の酵母懸濁液 1 ml, pH 5 Na·acetate 緩衝液 (0.001 M) 1 ml, β-メルカプトエタノール 0.5 ml (3 M), 水または, 1%酵母細胞壁溶解酵素 0.5 ml の全量 3 ml について 40°C, 4 時間抽出を行ない, pH 5, 0.01 M Na·acetate 緩衝液に対して透析を行なった。TABLE I に示すように β-メルカプトエタノール単独では, 酵母濃度に関係なくほぼ抽出率は一定で抽出率は約20%であるがβ-メルカプトエタノールと酵素剤の併用ではβ-メルカプトエタノール単独の場合の3倍以上の抽出率が得られた。しかし, 酵母濃度が 0.5 mg/ml 以上になると抽出率が低下している。

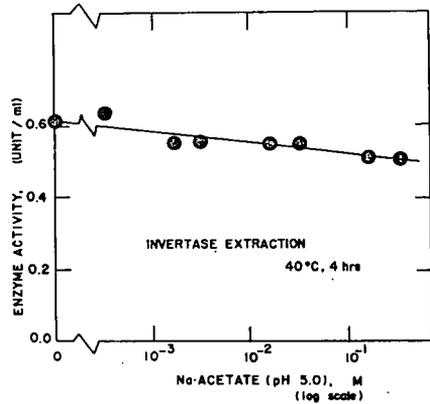


Fig. 5. Relation of Invertase Extraction by β-Mercaptoethanol to Na·Acetate Buffer Concentration.

TABLE I. Effect of Yeast Concentration on the Extraction of Invertase

Yeast Concentration	Invertase Activity in Yeast	Extraction Ratio	
		with β-MET**	with β-MET + <i>B. circulans</i> Enzyme***
0.17 mg/ml	0.2 units/ml*	12.4%	65.8%
0.80	1.1	15.8	69.8
1.67	2.1	19.4	67.8
8.00	10.8	19.0	40.6
16.67	20.1	20.5	28.8

\* Reaction mixture contained 5.0 mg cells of yeast

\*\* β-Mercaptoethanol

\*\*\* Precipitate (70% ethyl alcohol) from *B. circulans* culture filtrate (PR-Factor activity: 0.22 units/ml)

5. *Saccharomyces* 属酵母のインベルターゼ抽出率: *S. fragilis* をβ-メルカプトエタノールで処理するとインベルターゼが65%~100%抽出されることが Davis ら<sup>1)</sup> によって報告されている。また長崎ら<sup>4)</sup> は *S. cerevisiae* LK2G12 に PR-factor を作用させることによりインベルターゼが50%抽出されることを報告している。まず第一に種々の酵母を, シュエクロース1%, ペプトン0.5%, 酵母エキス0.3%, 麦芽エキス0.3%, pH 6.8で30°C, 40時間振盪培養を行ないインベルターゼをβ-メルカプトエタノール抽出法で抽出した。その結果 TABLE II に示すように *S. cerevisiae* LK2G12, *Baker's yeast*, *S. fragilis*, *S. ludwigii*, *S. carlsbergensis*, および *Trigonopsis variabilis* よりもインベルターゼが抽出された。そこで *Saccharomyces* 属の酵母についてβ-メルカプトエタノールおよび, β-メルカプトエタノールと酵素剤の併用による抽出率の比較を行なった。

*S. cerevisiae* LK2G12, *Baker's yeast*, *S. fragilis*, *S. carlsbergensis* は前述の方法で培

TABLE II. *Distribution of Invertase Activity in  $\beta$ -Mercaptoethanol Extract of Yeasts*

Strain	Invertase Activity	Strain	Invertase Activity
<i>Candida utilis</i>	0 units/ml*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.71 units/ml
<i>utilis</i>	0	(Baker's yeast)	
<i>pseudotropicalis</i>	0	<i>fragilis</i>	16.43
<i>Debaryomyces subglobosus</i>	0	<i>ludwigii</i>	1.12
<i>japonicus</i>	0	<i>carlsbergensis</i>	6.89
<i>Trigonopsis variabilis</i>	0.37	<i>cerevisiae</i>	9.28
<i>Torulopsis famata</i>	0	(LK2G12)	
<i>Tricosporon cutaneum</i>	0	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	0
<i>Pichia polymorpha</i>	0	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0
<i>Hansenula capsulata</i>	0	<i>glutinis</i>	0
<i>Nematospora coryli</i>	0	<i>rubra</i>	0
		<i>texensis</i>	0

\* Reaction mixture contained 5.0 mg cells of yeast

養した菌体を使用した。また市販パン酵母は、ニットーイースト、カネカイーストブルーを使用した。全て酵母は精製水で二回洗浄後 1 ml 当り 10 mg 乾物重になるように調製し酵母懸濁液とした。抽出方法は酵母懸濁液 1 ml, pH 5, 0.001 M Na-acetate 緩衝液 1 ml,  $\beta$ -メルカプトエタノール 0.5 ml, 水または酵素剤 0.5 ml 全量 3 ml について 40°C, 4 時間抽出を行ない前述同様に透析を行なった。TABLE III に示すごとく各菌株間に著しい抽出率の差が認められた。特に, S.

TABLE III. *Extraction of Invertase from Yeasts*

Strain	Invertase Activity in Yeast	Extraction Ratio	
		with $\beta$ -MET*	with $\beta$ -MET + B. circulans Enzyme**
		%	%
Baker's yeast	4.1 units/ml	25.5	40.5
<i>S. fragilis</i>	6.8	58.5	61.0
<i>S. carlsbergensis</i>	6.8	15.0	50.0
<i>S. cerevisiae</i> LK2 G12	11.1	33.7	49.0
KANEKA Blue yeast	70.5	7.2	45.6
NITTO yeast	5.1	23.8	48.3

\* :  $\beta$ -Mercaptoethanol

\*\* : Precipitate (70 % ethyl alcohol) from *B. circulans* culture filtrate.

*fragilis* は  $\beta$ -メルカプトエタノール単独でも高い抽出率を示したが, *S. carlsbergensis* あるいは市販パン酵母は低い結果を示した。しかし  $\beta$ -メルカプトエタノールと酵素剤を併用するといずれの菌株も抽出率が上昇し全てが40~60%の高い値を示し,  $\beta$ -メルカプトエタノールと酵素剤の著しい相乗効果が認められた。

6. 各種酵素剤によるインベルターゼの抽出効果: インベルターゼ抽出に  $\beta$ -メルカプトエタノールと酵素剤の併用が著しい効果を示したので, 各種の酵素剤について同様の方法で酵素剤単独, あるいは  $\beta$ -メルカプトエタノールと酵素剤の併用によるインベルターゼ抽出率の比較を行なった。TABLE III のごとく, いづれの酵素剤もインベルターゼ抽出効果を示し, また,  $\beta$ -メルカプトエタノールとの併用で著しい抽出率の向上を示した。特に PR-factor 活性の高い酵素剤Dについては, 酵素剤単独で高い抽出率を示していることなどからインベルターゼ抽出率と PR-factor 活性の相関関係が推定される。

TABLE IV. *Extraction of Invertase from "Blue Yeast" by Various Enzymes*

Enzyme	Invertase Activity in Extract	Extraction Ratio
None	0.4 units/ml	0.8%
$\beta$ -MET*	5.2	9.2
Enzyme A**	4.1	6.9
" B	14.1	25.0
" C	2.0	3.6
" D	33.4	59.5
$\beta$ -MET + Enzyme A	25.7	45.6
" " B	37.8	67.0
" " C	19.8	35.5
" " D	37.0	73.0

\*  $\beta$ -Mercaptoethanol (final concentration 0.5 M).

Enzyme	A: <i>B. circulans</i>	PR-Factor	$\beta$ -1,3-Glucanase
"	B: <i>Flav. dormitator</i> I	0.55 units/ml	13.2 units/ml
"	C: <i>Fungi Imperfect</i>	5.38	68.4
"	D: <i>Flav. dormitator</i> II	1.08	11.5
"		9.25	55.6

従来, Davis ら<sup>1)</sup> は *S. fragilis* を  $\beta$ -メルカプトエタノールで処理することにより65%以上のインベルターゼが抽出されることを報告している。ところが, TABLE III のごとく市販パン酵母では非常に抽出されにくい。しかし, ホスホマンナーゼ (PR-factor) を組合せると50%程度の抽出率が得られ, これらの相乗作用が認められた。

$\beta$ -メルカプトエタノールによるインベルターゼの抽出原理については, Nickerson<sup>4)</sup> や Davis ら<sup>1)</sup> による蛋白部分の S-S 結合の解裂に基づくという説以外に考えられないが,  $\beta$ -メルカプトエタノールにより *Hansenula horstii* のホスホマンナーゼの粘度低下が起るとする著者らの観察 (近く発表の予定) を重視すれば糖部分の解裂があるかも知れないという推論もできる。しかし, もしそのように仮定すればホスホマンナーゼの作用点と類似の部分に作用することになるので両者の相乗効果を説明しにくい。この点に関してはさらに検討を続けるつもりである。

## 要 約

市販パン酵母を材料として従来の自己消化法によらない純度の高いインベルターゼを抽出する方法を検討した。その結果 pH 5,  $\beta$ -メルカプトエタノール 0.5 M, 酵母細胞壁溶解活性をもつ酵素添加の条件で酵母菌体表層中のインベルターゼの約70%を抽出することができた。

## 参 考 文 献

- 1) DAVIS, R. and ELVIN, P. A., *Biochem. J.*, 93, 8 p (1964).
- 2) NAGASAKI, S., NEUMAN, N. P., ARNOW, P., SCHNABLE, L. D. and LAMPEN, J. O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 158 (1966).
- 3) NAGASAKI, S. and YAMAMOTO, S., *Res. Rep. Kochi Univ.*, 17, 93 (1968).
- 4) NICKERSON, W. J., *Bacteriol. Rev.*, 27, 305 (1963).

(昭和45年9月30日受理)

