

分並に蜂蜜の pH, 酸度, 比旋光度について検討し, 次の結果を得た.

- 1) 蜂蜜の一般成分は, 炭水化物が最も多く, 約 80% を占め, その殆んどが還元糖であり, 次いで水分が 20% 前後含有し, 粗脂肪, 粗タンパク質及び灰分は少なかった.
- 2) 市販蜂蜜の一般成分は主に還元糖量と粗繊維及び水分との間における変動がみられ, 給食用蜂蜜 I において最も著しかった. またその他の成分においても市販蜂蜜の種類によって成分に差異が認められた.
- 3) 蜂蜜の主成分である Glucose と Fructose の分布比 (F/G) は大部分がほぼ 1 に近い値を示し, Glucose より Fructose が僅かに多かった. しかし市販蜂蜜 II, III, 水飴, 中共産楯などにおいて分布比を異にした.
- 4) 蜂蜜中の全糖, 還元糖, 非還元糖, 転化糖については, 全糖として 80% 前後の含量を示し, 還元糖は全糖に較べ大きな変動が認められ, 非還元糖及び転化糖は一般に低値であった.
- 5) 市販蜂蜜の pH, 酸度及び比旋光度は殆んどの蜂蜜において pH 4 附近を示し, 弱酸性で有機酸の存在が予測された. また, 酸度は必ずしも pH と一致しなかった. 比旋光度は大部分の蜂蜜が左旋性を示すに対して, 給食用蜂蜜 I, II, III, 中共産レンゲ II, アルゼンチン産蜂蜜では右旋性であった. このことは, 糖の含量に差異のあることが推察された.
- 6) 市販蜂蜜の中には, Maltose, Sucrose, Sorbitol などの糖を含むものがあり天然蜂蜜と比較して糖の含量に異常が認められた.

終りに臨み, 本研究に当り, 材料の恵与などにおいて御協力を賜った国産薬品工業株式会社大久保守正氏に厚く感謝いたします.

文 献

- 1) 渡辺, 後藤, 石川: 薬学雑誌, **74**, 30 (1954)
- 2) 渡辺, 後藤: 薬学雑誌, **74**, 157 (1954)
- 3) 渡辺, 後藤: 薬学雑誌, **74**, 160 (1954)
- 4) 石川, 林, 山下: 衛生化学, **12**, 317 (1966)
- 5) Somogyi, M.: J. Biol. Chem., **117**, 771 (1937)
- 6) Morris, D.L.: Science, **107**, 254 (1948)

杉浦^{*1} 衛, 加納邦雄^{*1}, 清水 浩^{*1}: 酵母ウリカーゼに関する研究(1)
 酵母ウリカーゼの部分精製について (酵素剤の研究第 55 報)^{*2}^{*3}

Mamoru Sugiura, Kunio Kano and Hiroshi Shimizu: Studies on Yeast Uricase. 1
 Partially purification of Yeast Uricase (Studies on Enzymes LVI)

(Received September 22, 1969)

Summary

An uricase was extracted by freezing, thawing and autolysis from *Candida utilis* grown on a medium

*1. 小野薬品中央研究所

*2. 本研究は日本薬学会第 88 年会 (1968. 4. 東京) において発表した.

*3. 前報 (54報) 杉浦, 小木曾, 岩田, 加藤, 薬誌投稿中

contained of uric acid. The uricase was purified by ammonium sulfate fractionation (0.3—0.5 saturation), Sephadex G-100 and DEAE-cellulose column chromatography. The enzyme was purified about 80-fold by this procedure from original extracts. The enzymatic properties of the purified enzyme was studied. Optimum pH was 8.0, stable pH range was from 7.0 to 11.0 and optimum temperature was 35°C. The activity was inhibited by Cu^{2+} , Mn^{2+} , CN^- and PCMB, while the activity was activated by glutathion. The lyophilized enzyme was stable at room temperature for a long time.

ウリカーゼ (urate: O_2 Oxido redactase, 1. 7. 3. 3) は, urico oxidase, urate oxidase ともいわれているが, プリン核の酸化的開裂に関係している酵素で, 古くから多くの研究者によって研究されている^{1~5)}。ウリカーゼは, 哺乳類 (霊長類を除く)⁶⁾ の全て, 多くの脊椎動物 (鳥類と一部の爬虫類を除く)⁷⁾ や, 昆虫 (蜘蛛を除く) を除いた無脊椎動物に存在し, 植物組織にもみられ⁸⁾, また, 微生物にも存在が認められている⁹⁾。ウリカーゼは, 人体内の尿酸蓄積に起因する種々の疾患の診断のため, 血液, その他に存在する尿酸量測定用酵素として用いられている。Keilin^{10~12)} らが述べているように, 痛風, 関節炎, その他尿酸蓄積に起因する炎症性疾患の治療のため, 直接, 血液への注入が要望視されている¹³⁾。

しかし, 現在まで, 高度に精製されたウリカーゼは, 1955年に Mahler¹⁴⁾ らによって, 豚の肝臓から超遠心的に単一されている程度である。しかし, 動物臓器起源のウリカーゼは, 細胞内で Subcellular Particle に強固に結びついており¹⁵⁾, 酵素の可溶化は煩雑で困難である。そのうえ, 酵素原料としての動物臓器は本邦において入手しにくいので, 高純度の製品を高収量で得ることは困難であり, 原料が高価であることなどより, 種々の制約を受ける。これに対し, ウリカーゼの製品原料として, もしも, 微生物を使用すれば, 微生物は大量培養が可能であるので, 量的にも, 価格的にも臓器に優ることは明らかである。

そこで, 著者等は, 微生物よりウリカーゼの製造を目的として, 細菌, 糸状菌, 酵母から尿酸分解菌のスクリーニングを行なったところ, 酵母 *Candida utilis* が最も強い尿酸分解作用を有することを発見した。その酵母 *C. utilis* からウリカーゼを抽出し, 部分精製した標品につき酵素化学的諸性質を検討した結果, 種々の知見が得られたので報告する。

実験方法及び結果

1. ウリカーゼ生産菌の選択

尿酸分解菌のスクリーニングは, 種々の細菌, 糸状菌, 酵母を対照としておこなった。各地の土壌, 空気中より分離した, あるいは各種研究所より供与された微生物を, それぞれ適当な培地に尿酸を添加して, 培地中の尿酸の減少を指標として検索した。

実験に使用した酵母は *C. utilis* 6020 で, 大阪大学醸酵研究所より供与された菌株で, 培地中の尿酸の減少が最も著しく, また, 尿酸に適応させた *C. utilis* 菌体からの種々の方法での抽出液中に, 高単位のウリカーゼ活性を認めた。

2. ウリカーゼ活性の測定法

尿酸の 290 $\text{m}\mu$ における吸光度の減少を測定する方法によった。0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) の 1 ml 当り, 尿酸 10 μg を含む溶液の 2 ml に, 0.3 ml の水と 0.5 ml の酵素溶液を 25°C で加えた。5 分後, 0.2 ml の 20% KOH 溶液を酵素反応を停止するために反応液に加えた。そして混液の 290 $\text{m}\mu$ での吸光度を測定した。対照には, KOH の溶液を酵素添加の前に基質に加えた。その条件で反応液の吸光度が, 1 分間に cm 当り 1 低下したとき, 酵素活

性は ml 当り 0.526 単位と定めた。この酵素活性の 1 単位は 1 分間当り、尿酸の 1μ モルを酸化する酵素量に相当する。

3. 蛋白量の定量

酵素蛋白質の量は、酵素溶液の cm 当りの $280 m\mu$ での吸光度で測定した。

4. 酵母の培養とウリカーゼの誘導生成

500 ml の坂口フラスコに、グルコース 5%，アスパラギン 2.5%，リン酸 2 カリ 1%，硫酸マグネシウム 3%，硫酸安 4% を含む培地 100 ml を入れ、*C. utilis* を接種し、48 時間、 25°C で振盪培養した。酵母菌体は遠心分離で集め、純水で 3 回洗浄する。通常、酵母の収量は、培地 1 l 当り約 45 g (Wet) である。

ウリカーゼの誘導には、洗浄湿菌体 1 g につき、グルコース 5 g、リン酸 2 カリ 0.1 g、硫酸マグネシウム 0.2 g、尿酸 10 mg、水道水 100 ml の培地中で、約 4 時間、 25°C で振盪して行った。なお、尿酸は、振盪開始後約 80 分で完全に培地中から消失し、培地中の尿酸の減少につれて *C. utilis* のウリカーゼ活性は増大し、180~240 分適応で活性は最高を示した。

5. 酵母菌体からのウリカーゼの抽出

-20°C で貯蔵しておいた、尿酸に適応した *C. utilis* 100 g (湿量) に、500 ml の 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、 25°C で約 16 時間放置して自己消化を行ってから遠心分離により菌体を分離後、冷水で洗浄し、上澄液を集めるとウリカーゼ抽出液が得られた。この報文ではこの抽出液をウリカーゼ精製の出発原料として用いた。抽出液のウリカーゼ活性は、0.34~0.5 単位/ml で、比活性 (酵素溶液の $280 m\mu$ 吸収値 1 当りの酵素活性) は 0.035~0.06 であった。*C. utilis* 湿菌体 1 g 当りの平均ウリカーゼ活性は 2.0~5.0 単位であった。

酵母菌体からのウリカーゼの抽出条件は、種々の因子によって影響されるが、詳細は他誌に記述してある。¹⁶⁾

6. ウリカーゼの精製

a) 硫酸塩析での部分精製

上記のごとく *C. utilis* から抽出したウリカーゼ溶液は、硫酸での分別塩析によってかなり精製できる。Fig. 1 に添加硫酸濃度と酵素沈殿との関係を示した。酵母抽出液 (pH 8.0) 5 ml に硫酸を加えて各飽和濃度とした。5 時間室温で放置後、遠心分離して上清のウリカーゼ活性と蛋白濃度を測定した。これより、精製には次の操作がよいことが判明した。即ち、ウリカーゼ抽出液に、まず 0.3 飽和となるように硫酸を添加し、5 時間冷室で放置後遠心分離し、その上清に更に 0.5 飽和となるように硫酸を添加して放置する。この硫酸分別沈殿により、ウリカーゼ抽出液の粘質物が除去でき、以後の精製操作が非常に容易となる。

b) Sephadex G-100 でのゲル濾過

上記硫酸での分別沈殿物を少量の M/30 リン酸緩衝液、pH 7.0 にとかし、Sephadex G-100 でのゲル濾過を行い、硫酸の除去を兼ね分子量的な分画を行った。M/30 リン酸緩衝液、pH 8.0 で平衡化した Sephadex G-100 のカラム 3.0×50 cm に硫酸分別後のウリカーゼ溶液 10 ml (110 単位) を負荷し、同緩衝液の 300 ml で溶出した。そのパターンを Fig. 2 に示す。Fr. 25~Fr. 30 を集め次の精製に用いた。

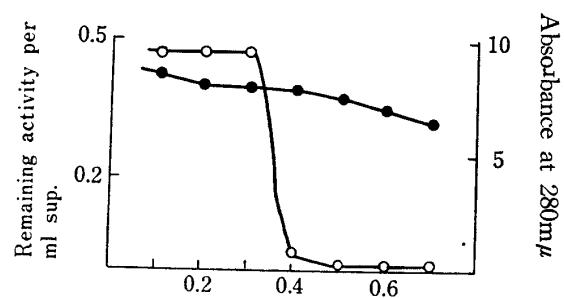


Fig. 1. Concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and Precipitability of Uricase in the Yeast Extract. —○—, uricase activity; —●—, Conc. of protein.

c) DEAE-cellulose でのカラムクロマトグラフィー M/30 リン酸緩衝液, pH 8.0 で緩衝化した DEAE-cellulose に, 上記の Sephadex G-100 ゲル濾過したウリカーゼ溶液を負荷させ, 同緩衝液で洗浄すると, ウリカーゼは吸着されずに素通りし, 不純蛋白, 色素の大部分が吸着される. この操作で, ウリカーゼの比活性は約 10 倍上昇する. このウリカーゼ活性区分に 0.5 飽和硫酸塩析後, 沈殿を集め, M/30 リン酸緩衝液, pH 8.0 に透析してから凍結乾燥し, 部分精製ウリカーゼ標品とした. 尚, 凍結乾燥でのウリカーゼ活性の低下は認められなかった.

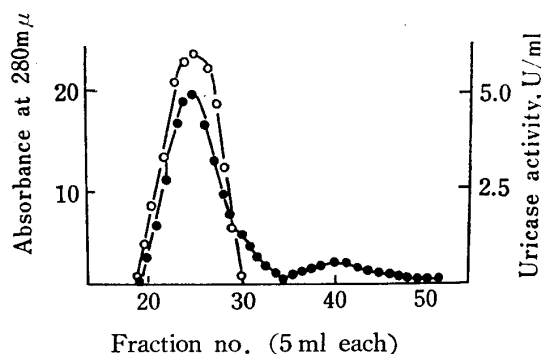


Fig. 2 Gel Filtration of Yeast Uricase by Sephadex G-100.

—○—, uricase activity; —●—, conc. of protein.

Table 1. に *C. utilis* ウリカーゼの精製操作の各段階の収量, 比活性をまとめて示した.

Table 1. Summary of Purification Procedure of Yeast Uricase

Step	Fraction	Total vol., ml	$E_{280m\mu}$	Activity U/ml	Total activity	Specific* activity	Recovery yeald of activity, %
1.	Extraction of yeast cells	700	13.0	0.51	357	0.04	100
2.	Enzyme after salting out	10	85.0	22.1	221	0.26	62
3.	Gel filtrated enzyme by Sephadex G-100	125	4.53	1.36	170	0.3	47.7
4.	Purification enzyme on DEAE-cellulose before salting out	360	0.08	0.21	76.5	2.8	21.5
	after salting out and dialysis	23	1.07	3.2	73.4	3.0	20.6

* Activity (U/ml) per $E_{280m\mu}$

7. 部分精製酵母ウリカーゼの性質について

部分精製ウリカーゼ標品を用いて種々の酵素化学的性質について検討した.

a) 紫外外部吸収スペクトル

酵母ウリカーゼの紫外外部吸収スペクトルは Fig. 3 に示すごとくで, 典型的な蛋白の吸収曲線である. 極大吸収は $280m\mu$ で, 極少吸収は $250\sim 253m\mu$ であり, 0.1% の酵素溶液の $280m\mu$ での吸収値は 0.892 を示した, また, $E_{280cm}^{280}/E_{cm}^{260}=1.69$ の値は核酸の存在しないことを示している.

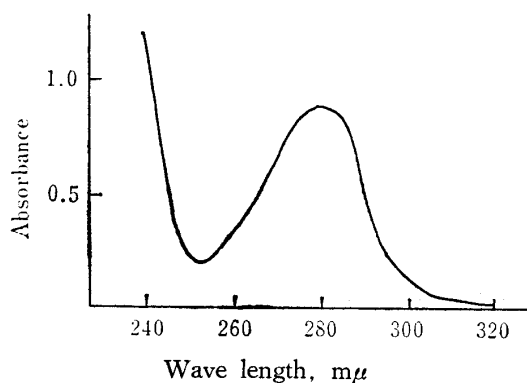


Fig. 3 U. V. Absorption Spectra of Yeast Uricase. (0.1% uricase solution, pH 7.0)

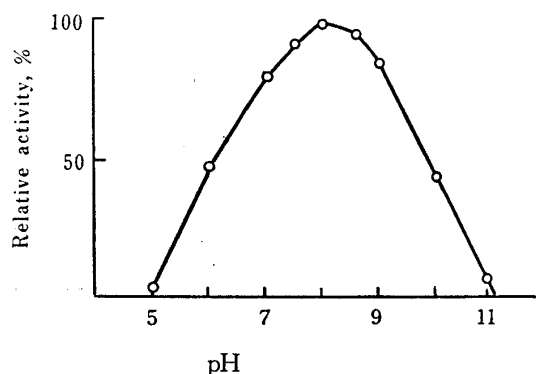


Fig. 4 pH-Activity of Yeast Uricase. 25°C, 5 min. reaction

b) pH 活性

種々の緩衝液を用いて、酵母ウリカーゼの活性に対する pH の影響を調べた結果を Fig. 4 に示した。pH 5～pH 6 は酢酸緩衝液、pH 6.5～pH 8 はリン酸緩衝液、pH 8.5～pH 9.0 はホウ酸緩衝液、pH 9.5～pH 11 はホウ砂一炭酸ソーダ緩衝液を用いた。pH 8.0 付近で最大活性を示した。

c) ウリカーゼ活性に及ぼす温度の影響

M/15 ホウ酸緩衝液、pH 8.5 で 5 分間、各温度で反応を行った。Fig. 5 に示すように、35°C 付近が最高活性を示した。

d) pH 安定性

pH 活性測定と同じ緩衝液を用いて、ウリカーゼ溶液 (1.0 単位/ml) と各緩衝液 (M/5) を同量加え、25°C で 4 時間放置後、溶液の活性を測定した。その結果を Fig. 6 に示す。ウリカーゼは酸性では非常に不安定であるが、pH 7 以上ではかなり安定である。

e) 熱安定性

ホウ酸あるいはリン酸緩衝液を含むウリカーゼ溶液 (1.0 単位/ml) を、種々の温度で 10 分加熱後、直ちに冷却してからその溶液のウリカーゼ活性を測定した。Fig. 7 にその結果を示す。熱に対して不安定で 30°C 以上で失活が認められ、40°C 以上では急激に活性の低下がある。70°C、10 分処理ではウリカーゼは完全に失活した。

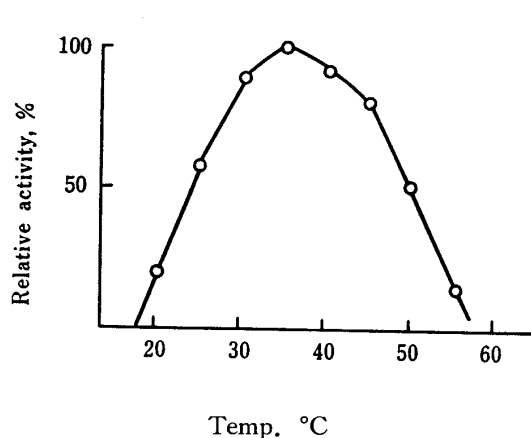


Fig. 5 Effect of Temperature on the Activity of Yeast Uricase.

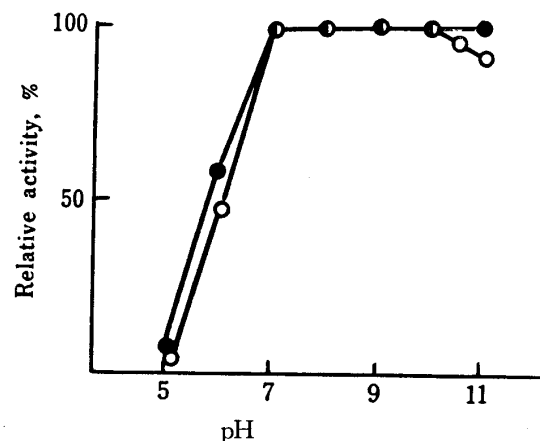


Fig. 6 pH-Stability of Yeast Uricase
—●—, 4 hrs; —○—, 24 hrs

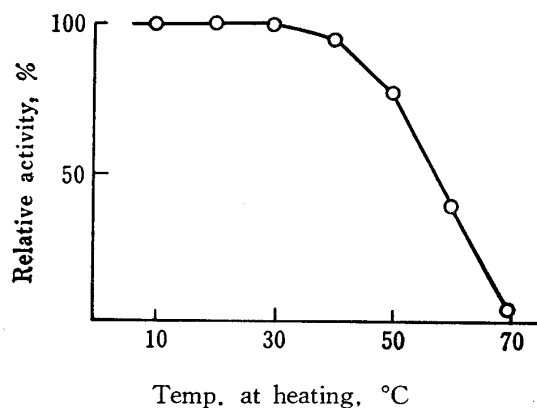


Fig. 7 Thermal Stability of Yeast Uricase.

f) 化学試薬のウリカーゼ活性に及ぼす影響

各種試薬について, Table 2. に示す濃度となるようにウリカーゼ活性測定溶液に加え, ウリカーゼ活性に対する影響を観察した. CuSO_4 , KCN, PCMB が強くウリカーゼ活性を阻害している. 一方, glutathion, cystein はウリカーゼ活性を賦活している. また, メタノール, *n*-プロパノール, アセトン等の有機溶媒に対して非常に不安定であった.

Table 2. Effect of Various Chemical Reagents on Uricase Activity Chemical reagents Conc., M in the reaction Relative activity, %

	mixture	
None	—	100
CuSO_4	1×10^{-4}	0
MnSO_4	1×10^{-4}	88
"	1×10^{-3}	0
Xanthine	1×10^{-4}	100
"	1×10^{-3}	9
Ascorbic acid	1×10^{-4}	55
"	1×10^{-3}	11
$\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$	1×10^{-4}	100
"	1×10^{-3}	38
CH_3ICOOH	1×10^{-4}	100
"	1×10^{-3}	80
PCMB	1×10^{-4}	18
"	1×10^{-3}	0
NaN_3	1×10^{-4}	100
"	1×10^{-3}	82
EDTA	1×10^{-4}	110
"	1×10^{-3}	100
Cystein	1×10^{-4}	139
"	1×10^{-3}	100
Glutathion	1×10^{-4}	128
"	1×10^{-3}	126
O-Phenanthroline	1×10^{-4}	119
"	1×10^{-3}	100
$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}\cdot\text{CS}_2\text{Na}$	1×10^{-4}	100
"	1×10^{-3}	111
$\alpha\cdot\alpha'$ -dipyridyl	1×10^{-4}	100
"	1×10^{-3}	100
Thioglycollic acid	1×10^{-4}	100
"	1×10^{-3}	100

g) ウリカーゼの安定性に及ぼす化学試薬の影響

ウリカーゼ溶液に, 各種還元剤 (NaBH_4 , cystein 等), 酸化剤 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, H_2O_2 等), 中性塩, EDTA (エチレンジアミン4酢酸塩) を添加して, 室温に3日間放置しウリカーゼ活性を測定したが, 安定化作用のあったも

のは H_2O_2 , EDTA, $(NH_4)_2SO_4$ であり, 特に, EDTA は M/10000 以上の濃度の場合, 強力な安定化剤となり, 室温で6ヶ月放置の場合でもウリカーゼ活性の低下はみられなかった。

h) 部分精製ウリカーゼの毒性試験

マウスを使用して, ウリカーゼ標品の急性毒性を試験した結果, 腹腔内投与では致死量 2 g/kg 以上, 経口投与では致死量 3 g/kg 以上と毒性は極めて低かった。

考 察

ウリカーゼの発見以来, その性質, 精製, 酵素の分布や反応の機構についての研究が数多く報告されている。しかしながら, これらの研究にもかかわらず, 反応の詳細な機構については少ししか知られていない。現在まで最も高純度に調製されたウリカーゼは, Mahler 等により acetone-dried pork mitochondria から調製されたものである。¹⁴⁾ しかし, このウリカーゼ標品は溶解するのにアルカリ性の緩衝液を必要とする。

この報文での重要な点は, *C. utilis* からの水易溶性のウリカーゼが, 凍結融解とリン酸緩衝液中での自己消化により, 容易に菌体から抽出されることである。この凍結融解のみ, あるいは自己消化のみではウリカーゼはほとんど抽出されない。さらに, 自己消化の場合に必要な塩は, リン酸以外の塩, たとえば硫酸アンモニウム, 食塩, 塩化カリ, 硫酸ソーダ, クエン酸ソーダ, 乳酸ソーダ等は抽出効果が全くなく, pH 7 ~ pH 9.15 のリン酸塩のみが特異的に効果がある。

C. utilis ウリカーゼの粗抽出液中のウリカーゼの比活性は, ¹¹⁾ *Neurospora*, ¹⁷⁾ 犬の肝臓からの抽出液のそれに比して非常に低い。 *C. utilis* ウリカーゼは抽出液より, 硫酸分別, Sephadex G-100 ゲル濾過, DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー等によって, 抽出液の比活性より約 80 倍に精製された。 *C. utilis* ウリカーゼは, 動物起源のウリカーゼと溶解性の点で異っているが, CN^- , Cu^{++} イオンによって強く阻害されること, あるいは glutathion によって賦活される点で類似している。

EDTA がウリカーゼの安定剤となり, ウリカーゼ溶液に EDTA を添加することにより, 25°C で6ヶ月間以上経過しても, 全く活性の低下がないことは驚異的である。一般に EDTA は酵素に対して活性賦活剤, あるいは抑制剤となりうるが, ウリカーゼの安定化の場合, ウリカーゼ蛋白の活性基であると考えられている銅の部分と EDTA が結合することによる, 活性基の構造的変性の保護によるものと思われる。

要 約

尿酸適応させた酵母 *C. utilis* から, 凍結融解, 自己消化により抽出したウリカーゼ抽出液からウリカーゼを, 0.3~0.5 飽和硫酸分別塩析後 Sephadex G-100 でのゲル濾過, ついで DEAE-cellulose カラムでのクロマトグラフィーを行い精製したところ, 比活性は菌体抽出液のそれより約 80 倍上昇した。精製酵素は, pH 8.0 の作用最適 pH, 35°C の作用最適温度を有し, pH 7 ~ pH 11 の間で安定である。また, Cu^{++} , Mn^{++} , CN^- , PCMB の存在で活性を強く阻害され, glutathion で賦活される。凍結乾燥品は室温でも長期間安定であることが判明した。

文 献

- 1) A. Schittenhelm, Z. Physiol. Chem., **46**, 354 (1905)
- 2) F. Batelli and L. Stern, Biochem. Z., **19**, 219 (1909)
- 3) St. J. V. Przylecki, Biochem. J., **24**, 81 (1930)
- 4) C. G. Holmberg, B. J., **33**, 1901 (1939)
- 5) E. Leone, Biochem. J., **54**, 393 (1953)

- 6) Stransky, Biochem. Z., **266**, 454 (1933)
- 7) R. Truszkowski and C. Goldmanowna, Biochem. J., **27**, 612 (1933)
- 8) St. J. V. Przyleki, Bull. Soc. Chim. Bil., **8**, 804 (1926)
- 9) R. Fosse, C. R., **195**, 1198 (1932)
- 10) M. M. Smith, Nature, **197**, 361 (1963)
- 11) R. C. Greene and H. K. Mitchelli, Arch. Biochem. Biophys., **20**, 603 (1957)
- 12) A. H. Roush and A. J. Dammas, Science, **124**, 125 (1956)
- 13) J. Keilin, Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc., **39**, 265 (1959)
- 14) G. Hubscher, H. Baum and H. R. Mahler, B. B. A., **23**, 43 (1957)
- 15) H. Beaufay, D. S. Bendall, P. Bandhuin and C. de Duve, B. J., **73**, 632 (1959)
- 16) 日本特許公告, 昭42-5192
- 17) F. W. Klemperer, H. C. Trimble and A. B. Hastings, J. Biol. Chem., **125**, 44 (1938)

杉浦 衛, 伊藤万蔵: *Aspergillus melleus* によるプロティナーゼの産生条件
(酵素剤の研究第43報¹⁾)

Mamoru Sugiura, Manzo Ito: Productive Conditions of Proteinase
from *Aspergillus melleus* (Studies on Enzymes XXXXIII¹⁾)

(Received September 24, 1969)

Summary

Effects of cultural conditions on the proteinase production were investigated by using *Aspergillus melleus*. Optimum moisture of bran-medium and temperature of culture for the proteinase production were 50-55% and 20-25°, respectively. At 25° and 50% of medium moisture, the proteinase production began at 2 days after inoculation.

Accumulation of the proteinase attained to the highest level after 5 days, the amount of which was 9×10^{-2} PU per gram of dry koji.

Aspergillus 属は大きく黒麹菌と黄麹菌に分類される。 *Asp. niger* および *Asp. Saitoi* に代表される黒麹菌は主として酸性プロティナーゼを産生し、吉田らにより、*Asp. Saitoi* より酸性プロティナーゼが結晶化され、その諸性質が検討されている。²⁻⁴⁾

一方、*Asp. oryzae* および *Asp. sojae* に代表される黄麹菌は主として中性およびアルカリ性のプロティナーゼを産生し、*Asp. oryzae* より結晶または均一標品として得られており、*Asp. sojae* の麹抽出物よりイオン交換樹脂 Amberlite IRC 50 を用いて結晶が、⁹⁾ DEAE セルロースを用いて均一標品が得られている。¹⁰⁾

また、*Asp. fumigatus* のプロティナーゼは Jönsson らにより研究が始められ、¹¹⁾ 経節によく繁殖し、肉質を不良にする *Asp. melleus* のプロティナーゼは住江らにより研究されているが、¹²⁾ まだ結晶または均一標品は得られていない。

著者らは消炎酵素剤としてのプロティナーゼを糸状菌より開発する目的で多数の *Aspergillus* 属の菌株をスクリ