豚脾臓細胞 microsome 分画中の adrenalin sensitive lipase の各種真菌, 放線菌及び細菌に対する lytic action について (2)

三 島 誠 也

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

著者¹⁾は第1報で豚脾臓 microsome 分画の adrenalin sensitive lipase の各種真菌, 放線菌及び細菌に対する溶菌作用の形態学的変化について報告し, 本酵素が細胞壁に作用して溶菌現象をおこさせることを観察した. 今回の報告では本酵素の溶菌現象に対する pH 及び inhibitor, activator の影響をしらべた.

pH と fungi-lysis との関係

実験方法としては磷酸緩衝液と Sørensen の pH 基準液である citrate-NaOH 混合液を用いて pH 6, 7, 8 及び 9 の緩衝液を作製した. 当教室の山田が van Lanker & Holtzer 法に従って作製した adrenalin sensitive lipase を含む豚脾臓の f 分画を脾臓組織 1 g 当たり 2.5ml の 0.5M の冷蔗糖液に懸濁したものを粗酵素液とした. 両者を 1:1 の割合に混じ, 再度 pH meter (Hitachi-Horiba) で pH をはかった. *Penicillium spp.*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus* の場合は mycobiotic agar (日産製) 上に, *Streptomyces* 及び *Mycobacterium* は Czapek agar (日産製) 上に均一に充分発育させた, 平板培養 8 日目の菌苔に滴下し lysis の起る状態を時間を追って観察した.

1) *Penicillium citrinum* では pH 5.8 では 1 時間半で lysis を開始し, 2 時間半で中等度に, 3 時間半で lysis を完了した. pH 7.9 では 1 時間後に pH 6.7 と 8.5 ではやや遅れ 1 時間半後に lysis の開始が認められた.

pH 6.7 及び 7.9 では 3 時間後に lysis を完了したが, 8.5 では 3 時間半後に完了した.

2) *Penicillium sp.* C 株の場合は pH 6.7 では 30 分後に lysis を開始した. pH 5.8, 7.9 及び 8.5 ではこれよりやや遅く開始する. lysis の完了は pH 6.7 では 2 時間半後であるのに, pH 7.9 の場合も 2 時間半後で, pH 5.8 及び 8.5 の場合は 3 時間後であった.

3) *Penicillium sp.* E 株の場合は pH 6.7 及び 7.9 では

5 分後に lysis を認め, pH 5.8 及び 8.5 では 15 分後であった. lysis の完了する時間は何れの pH の場合も 30 分であった.

4) *Penicillium sp.* F 株の場合は pH 6.7 及び 7.9 では 15 分で lysis の開始が見られ, 1 時間で完了した. pH 5.8 及び 8.5 では 30 分で lysis の開始が見られ, 1 時間半で完了した.

5) *Penicillium citanum* の場合は pH 6.7, 7.9 及び 8.5 では 1 時間後に lysis の開始が見られ, 2 時間半で完了した. pH 5.8 ではやや遅れ 1 時間半後に lysis の開始が見られ, 4 時間後に完了した.

6) *Penicillium chrysogenum* Q 176 の場合は各 pH 共 4 時間後に lysis の開始が見られたが, 10 時間後でも完了が見られないし, 各 pH 間の差異も殆んど認められなかった.

7) *Aspergillus fumigatus* の場合は lysis の開始は pH 6.7 のとき 15 分後に認められ, 30 分後にははっきり認められる. 何れの pH でも 30 分後には lysis を開始し, 2 時間後に完了する.

8) *Trichophyton mentagrophytes* の場合は pH 6.7 の場合に 3 時間後に lysis を開始するが, 何れの pH でも 5 時間後に lysis をはっきりと示し, 7 時間後には lysis を完了した.

9) *Streptomyces griseus* NIHJ 10 の場合は 5 時間後に lysis を認め, 9 時間後にははっきりするが, 24 時間後に完了した.

10) *Mycobacterium smegmatis* の場合には 1 時間後に lysis の開始が見られ, 3 時間後には何れの pH でも lysis を完了した.

各種 inhibitor 及び activator と fungilysis との関係

実験方法としては各種 inhibitor 及び activator を pH

第1表 各種真菌，放線菌及び抗酸菌の溶菌現象とpHの関係

作用時間	15分	30分	1時間	1.5時間	2時間	2.5時間	3時間	5時間	7時間	9時間	24時間
1) <i>Penicillium citrinum</i>											
pH 5.8	—	—	±	+	+	++	+++				+++
6.7	—	—	±	+	++	++	+++				+++
7.9	—	±	+	+	++	++	+++				+++
8.5	—	—	±	+	+	++	+++				+++
2) <i>Penicillium sp. C</i> 株											
pH 5.8	—	—	±	+	+	++	+++				+++
6.7	—	±	+	++	++	+++	+++				+++
7.9	—	—	±	+	++	+++	+++				+++
8.5	—	—	±	+	+	++	+++				+++
3) <i>Penicillium sp. E</i> 株											
pH 5.8	++	+++									+++
6.7	+++	+++									+++
7.9	+++	+++									+++
8.5	++	+++									+++
4) <i>Penicillium sp. F</i> 株											
pH 5.8	—	±	+	+++							+++
6.7	+	++	+++	+++							+++
7.9	+	++	+++	+++							+++
8.5	—	+	+++	+++							+++
5) <i>Penicillium citanum</i>											
pH 5.8	—	±	+	+++							+++
6.7	+	++	+++	+++							+++
7.9	+	++	+++	+++							+++
8.5	—	+	+++	+++							+++
6) <i>Penicillium chrysogenum</i> Q 176											
pH 5.8	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
6.7	—	—	—	—	—	—	—	+	+	++	+++
7.9	—	—	—	—	—	—	—	+	+	++	+++
8.5	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
7) <i>Aspergillus fumigatus</i>											
pH 5.8	—	±	+	++	++	+++					+++
6.7	±	+	++	++	+++	+++					+++
7.9	—	±	+	+	++	+++					+++
8.5	—	±	+	+	++	+++					+++
8) <i>Trichophyton mentagrophytes</i>											
pH 5.8	—	—	—	—	—	—	—	+	+++		+++
6.7	—	—	—	—	—	—	±	+	+++		+++
7.9	—	—	—	—	—	—	—	+	+++		+++
8.5	—	—	—	—	—	—	—	+	+++		+++

9) <i>Streptomyces griseus</i> NIHJ 10												
pH	5.8	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
	6.7	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
	7.9	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
	8.5	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
10) <i>Mycobacterium smegmatis</i> My 33												
pH	5.8	—	—	±	±	+	++	+++				+++
	6.7	—	—	±	±	+	++	+++				+++
	7.9	—	—	±	±	+	++	+++				+++
	8.5	—	—	±	±	+	++	+++				+++

第2表 Adrenalin sensitive lipase の fungilysis に対する NaCl の影響

菌 種	15分	30分	1時間	1.5時間	2時間	2.5時間	3時間	5時間	7時間	9時間	24時間
<i>P. sp.</i> E株											
対 照	+++										+++
1 Mol NaCl	+++										+++
<i>P. citanum</i>											
対 照	+	++	+++								+++
1 Mol NaCl	+	++	+++								+++
<i>A. fumigatus</i>											
対 照	±	+	++	++	+++						+++
1 Mol NaCl	±	+	++	++	+++						+++
<i>T. ment.</i>											
対 照	—	—	—	—	—	—	±	+	+++		+++
1 Mol NaCl	—	—	—	—	—	—	±	+	+++		+++
<i>S. griceus</i>											
対 照	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
1 Mol NaCl	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
<i>M. smegmatis</i>											
対 照	—	—	±	±	+	++	+++				+++
1 Mol NaCl	—	—	±	±	+	++	+++				+++

第3表 Adrenalin sensitive lipase の fungilysis に対する NaF の影響

菌 種	15分	30分	1時間	1.5時間	2時間	2.5時間	3時間	5時間	7時間	9時間	24時間
1) <i>P. sp.</i> E株											
対 照	+++										+++
0.2 Mol	—	++	+++								+++
2) <i>P. citanum</i>											
対 照	+	++	+++								+++
0.2 Mol	—	—	+	++	+++						+++

3) <i>A. fumigatus</i>											
对 照	±	+	++	++	+++						++
0.2 Mol	—	—	±	+	+	++	++				++
4) <i>T. ment.</i>											
对 照	—	—	—	—	—	—	±	+	++		++
0.2 Mol	—	—	—	—	—	—	—	±	++	++	++
5) <i>S. griseus</i>											
对 照	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	++
0.2 Mol	—	—	—	—	—	—	—	—	±	++	++
6) <i>M. smegmatis</i>											
对 照	—	—	±	±	+	++	++				++
0.2 Mol	—	—	—	—	±	+	++	++			++

第4表 Adrenalin sensitive lipase の fungilysis に対する adrenalin の影響

菌 種	15分	30分	1 時間	1.5時間	2 時間	2.5時間	3 時間	5 時間	7 時間	9 時間	24時間
<i>P. sp.</i> E 対 照 2 千倍稀釈	卅 卅										卅
<i>P. citanum</i> 対 照 2 千倍	十 卅	卅 卅	卅								卅 卅
<i>A. fumigatus</i> 対 照 2 千倍	± 十	十 卅	卅 卅	卅 卅	卅 卅						卅 卅
<i>T. ment.</i> 対 照 2 千倍	— —	— —	— —	— —	— —	— ±	± 十	十 卅	卅		卅 卅
<i>S. griceus</i> 対 照 2 千倍	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	± ±	十 十	卅 卅	卅 卅
<i>M. smegmatic</i> 対 照 2 千倍	— —	— —	± ±	± ±	十 十	卅 卅	卅 卅				卅 卅

第5表 Adrenalin sensitive lipase のfungilysis に対するinsulin の影響

[illegible]

<i>P. citanium</i>											
対 照	+	++	+++								+++
25単位	+	++	+++								+++
<i>A. fumigatus</i>											
対 照	±	+	++	++	+++						+++
25単位	±	+	++	++	+++						+++
<i>T. ment.</i>											
対 照	—	—	—	—	—	—	±	+	++		+++
25単位	—	—	—	—	—	—	±	+	++		+++
<i>S. griseus</i>											
対 照	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
25単位	—	—	—	—	—	—	—	±	+	++	+++
<i>M. smegmatis</i>											
対 照	—	—	±	±	+	++	++				+++
25単位	—	—	±	±	+	++	++				+++

7の Clark-Lubs phosphate buffer solution に溶解したり、この液で稀釈したりし、前述の豚脾臓 f 分画を 1 g 当り 2.5 ml の 冷蔗糖液に懸濁した粗酵素液を 1 : 1 の割合に氷水中で混和した。このものを各種の菌苔上に滴下して lysis 現象を時間を追って観察した。対照液として粗酵素液そのものの滴下を併用した。

1) NaCl

山田²⁾によると lipoprotein lipase の inhibitor である NaCl は本酵素に対しては、高濃度の 1.5～2.0 Mol 迄では阻止に 働らくが、1.0 Mol 以下では全く影響をしないという。著者は 1.0 Mol の状態で各種菌種に対して溶菌現象を実験した。その結果は第 2 表の様で対照と全く同様の結果を得て、1.0 Mol では影響しないことを知った。

2) NaF

山田によると lipase の inhibitor である NaF は最終濃度が 0～1 Mol (1.0 Mol 以上は溶解しない) になる様 NaF を秤量して、試験管に入れこの buffer solution 2 容に対し酵素液 1 容を加えたもので、菌苔に対する fungilysis をしらべると、NaF 濃度が 0.1 Mol で 30% 近く inhibit, 0.8 Mol では 50～60% inhibit されたという。

著者は最終濃度が 0.2 Mol となる様に各種菌苔に対する fungilysis への inhibit の状態をしらべた。

(第 3 表)

Penicillium sp. E 株では対照では 15 分後に溶菌現象が認められるのに、30 分後になって急に溶菌現象を認められる様になり、その時間がずれて遅れるのが顕著である。

P. citanium の場合も対照が 15 分後に溶菌を開始するのに 1 時間後になってやつと認められる。そして対照では溶菌完了が 1 時間後であるのに 2 時間後となる。

A. fumigatus の場合は対照では 15 分後に溶菌を始め完了するのが 2 時間後であるのに、1 時間後に溶菌を始め完了するのが 3 時間後であつた。

T. mentagrophytes の場合には対照では 3 時間後に溶菌現象が見られ初め完了するのが 7 時間後であるのに、5 時間後に溶菌現象が見られ始め完了するのが 9 時間後であつた。

S. griseus の場合には対照では 5 時間後に溶菌現象が初まり 9 時間後に中等度であるのに、溶菌現象の初まるものが 7 時間と遅れる。9 時間以後の溶菌現象は対照と同様である。

M. smegmatis の場合には対照では 1 時間後に溶菌現象が初まり完了するのが 3 時間後であるのに、2 時間後に溶菌現象が初まり完了するのが 5 時間後であつた。

以上の様に各菌種共 0.2 Mol NaF の添加で fungilysis が inhibit される。

3) adrenalin

山田によれば塩化 adrenalin は 2 千～3 万 2 千倍稀釈

で本 adrenalin sensitive lipase の fungilytic action を促進するという。著者は 2 千倍稀釈の状態では各種菌種に対する溶菌現象の促進の状況を観察した (第 4 表)。

P. sp. E 株の場合には対照と比べて著しい溶菌現象の促進は見られない。

P. citanum の場合には対照よりも強く溶菌現象を起こしその完了も対照の 1 時間後に対して 30 分後である。

A. fumigatus の場合には対照では 15 分後に溶菌の初まる兆しがあるのに、15 分後ではつきり溶菌現象を示した。

T. mentagrophytes の場合には溶菌現象が対照では 3 時間後に初まるのに 2 時間半で初まる。溶菌完了も対照が 7 時間後であるのに 5 時間後であった。

S. griseus 及び *M. smegmatis* の場合には共に対照との間に著しい違いが認められなかった。

千倍稀釈塩化 adrenalin は本酵素の fungilytic action を activate する様である。

4) insulin

山田によれば insulin は 6～50 単位 1 ml では全く本酵素の fungilytic action に無影響であったという。著者は注射用 insulin に pH 6.0 の buffer solution を加えて insulin を懸濁させ、4,000 回転 10 分遠沈して glycerin を洗い去り、このことを 2 度くり返した沈渣に pH

7.0 の buffer solution を原液量迄加え溶解した。この insulin を 25 単位 1 ml 加えて各種菌苔に滴下して本酵素の fungilytic action をしらべたのが第 5 表である。

対照との間に全く差異がなかった。

結 語

豚膵臓から抽出した adrenalin sensitive lipase を含む f 分画液の各種 pH 時の fungilysis の模様をしらべた所、pH 7.0 前後に各種真菌、放線菌及び抗酸菌に対して最も強く反応することを知った。lipase に対する activator 及び inhibitor の fungilysis に対する影響をしらべた所、adrenalin は activate し、NaF は inhibit した。insulin 及び NaCl は著しい影響を与えなかった。しかもこのことは *Penicillium*, *Aspergillus* 及び *Trichophyton* の場合のみで、*Streptomyces* 及び *Mycobacterium* の場合は無関係であった。

参考文献

- 1) 三島誠也：豚膵臓 microsome 分画中の adrenalin sensitive lipase の各種真菌、放線菌及び細菌に対する lytic action について (1), 真菌と真菌症, 7 (1), 14～22, 1966.
- 2) 山田稲好：豚膵抽出液中の溶真菌酵素の研究, 真菌と真菌症, 6 (4), 252～270, 1965.
(昭和 41 年 9 月 3 日受付)

Studies on the Lytic Action of Microsome Fraction (Adrenalin Sensitive Lipase) of Pig Pancreas Cell on Several Eumycetes, Actinomycetes and *Mycobacterium* (II)

Seiya Mishima

Department of Parasitology, School of Medicine, Gifu University.

(Prof. T. Morisita)

Yamada (1965) isolated an enzyme from the pancreas extracts of pig, dog and rabbit, which showed fungilytic action and identified this enzyme as the adrenalin sensitive lipase of microsome fraction of pancreas cells. A wide range of pH for the lytic action of adrenalin sensitive lipase was seen against *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Streptomyces* and *Mycobacterium* but the maximum fungilytic activity was observed in pH 7. The effect of inhibitors and activative reagents were investigated. In the case of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Trichophyton*, NaF showed apparent inhibition and direct addition of adrenalin activation and on the other hand, insulin and NaCl showed no effects. In the case of *Streptomyces* and *Mycobacterium*, NaF, NaCl, adrenalin and insulin showed no effects.