Clostridium perfringens BP 6 K 培養濾液中の Diaphorase 様酵素に関する研究

第 1 報 酵素の産生, 活性の測定, その一部の性質について

内 ケ 崎 節 三

埼玉県衛生研究所病理細菌部 (指導 早野正己博士)

[受付: 7 月 30 日・1958 年]

緒 言

従来 *Cl. perfringens* は多数の菌体外毒素を産生することと知られており, α 毒素が lecithinase と同定された如くその毒素のあるものは酵素とされている。そして *Cl. perfringens* はその毒素産生の Pattern により更に 6 つの Type に分類されている。

今回著者は *Cl. perfringens* Type A BP 6 K 株の培養濾液中に従来未記載の Diaphorase 様酵素を見出したので報告する。

Diaphorase は呼吸酵素として広く生物界に分布しているものであるが細菌についての報告は比較的少く, かかる酵素のかなりの量が細菌の培養濾液中に見出されたことは興味あることである。

実験材料

1. 使用菌株: 予研村田博士より分与された *Cl. perfringens* Type A BP 6 K 株を Logan, Tytell, Danielson & Griner¹⁾ の培地に 2 週間の間隔で継代保存。又は同培地より集めた菌を凍結乾燥により保存して用いた。これは長期に亘って継代保存したものは酵素活性が弱くなる様な傾向を認めたためである。

2. 酵素産生用培地: 次の組成によった。

(A) カザアミノ酸 (Vitamin free, Difco Co., Ltd.)

	10 g
酵母エキス (Difco Co., Ltd.)	4 g
チオグリコール酸ソーダ	0.5 g
硝酸マグネシウム ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	0.5 g
蒸留水	970 ml

(B) 磷酸 1 カリウム (KH_2PO_4) 32 mg

磷酸 2 ナトリウム ($Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$)

	1.6 g
蒸留水	20 ml
(C) ブドー糖 (又は果糖)	5 g
蒸留水	20 ml
(D) トリプトファン	1000 mg
ニコチン酸	100 mg
サイアミン	100 mg
パントテン酸カルシウム	100 mg
ピリドキシン	100 mg
リボフラビン	10 mg
ビオチン	250 γ
蒸留水	100 ml

組成 (A) (B) (C) を別々に 15 ボンド 15 分滅菌。流水で急速に冷却後 (A) (B) (C) 全量を静かに混和し, 更に以上に加えると培地が pH 7.6 になる様に予め測定しておいた量の苛性ソーダ (1 l に対し 8 % 苛性ソーダ液約 2 ml) の添加によつて pH 修正を行う。別にザイツ濾過によつて滅菌した (D) を培地 1 l に対して 1 ml の割に加える。培地は使用直前に調製する。

3. 培養: 凍結乾燥から新しく前記 Logan の培地に接種し, 37°C 一夜培養した菌液 0.2 ml を Seed Culture として酵素産生用培地の 15 ml にうつし, 37°C 18 時間培養。その全内容を更に 1 l の培地に接種し 37°C に 5 時間, その後培地を pH 7.6 に修正し, 更に 25°C に 4 時間

UCHIGASAKI Setsuzo: Studies on Diaphorase-like Enzyme in Culture Filtrate of *Clostridium perfringens* BP 6 K. I. Production, Estimation of Enzymatic Activity and Some Properties, Saitama Institute of Public Health, — Jap. J. of Bact., 14(1), 13-18, 1959.

培養した。

4. 粗酵素：培養後遠心（4000 rpm 30分）によって菌体を分離。得られた上清を pH 5 に修正後固型硫酸アムモニウムを以て 0.8飽和とし一夜氷室（4℃）に放置。生じた沈澱物を遠心によって集め少量の水冷蒸留水に溶解，セロファン囊によつて流水に対して48時間透析。更に氷室内において，蒸留水に対し24時間透析。不溶沈澱物を遠心によつて除き凍結乾燥して保存した。収量はかなり区々であったが17～47単位/mg のものが1 l から約40～70 mg 得られた。

5. 乾燥重量：酵素活性は単位1乾燥 mg で示した。乾燥量は塩化バリウム溶液によつて酵素液が Salt-free であることを確めた上乾燥して重量を測定したものである。

6. 乳酸脱水素酵素：牛心筋より Straub²⁾ の方法により結晶化した。

7. 還元助酵素 I (reduced Diphosphopyridine nucleotide DPNH と略す)：助酵素 I (DPN) はパン酵母より Lepage³⁾ の方法によつて作り，純度40%。

この還元型は酵素学的に作製された。即ち助酵素 I 40 mg を $1/200$ M セミカルバジツドソーダ及び 2.4% エチルアルコールを含む $1/15$ M pH 8 磷酸緩衝液 10 ml に溶解し，Racker⁴⁾ の方法によつて結晶化したアルコール脱水素酵素 1 mg と共に 25℃ に 30 分おき，分光々度計により DPN の還元を確認してから 100℃ 2 分間加熱。冷却後高速遠心により DPNH を含む透明な上清を得た。保存はツンベルグ管に分注。排気後 4℃ に保存。

DPNH は還元後 2 週間以内のものを使用した。使用に際し所要濃度を得る如く $1/15$ M pH 8 磷酸緩衝液を以て希釈した。DPNH の測定は光電分光々度計（日立製 Beckman DU 型）により，340 m μ における吸光係数 6.22×10^6 Sq cm/mole⁵⁾ を用いて行つた。

8. θ ヘモリジン単位 (H.u. と略す)：溶血単位の測定は Roth & Pillemer⁶⁾ の方法によつた。

9. 赤血球基質：牛血球より Ponder⁷⁾ の方法により作られ，凍結乾燥によつて保存された。

実験方法及び結果

1) 乳酸脱水素酵素系のメチレン青還元にあつた粗酵素の影響

ツンベルグの手技に準じメチレン青が還元されて白色のロイコメチレン青となるに要する褪色時間の測定によつた。

その組成は表 1 に示す様に基質として乳酸リチウム，乳酸脱水素酵素，助酵素として DPN, KCN, 水素の受容体としてメチレン青（国産化学 KK 製）を各管に入れ，それに粗酵素を 2 倍段階希釈の量を以て加え，更に混合時の総量が 3 ml になる様に $1/15$ M pH 7.5 磷酸緩衝液を加えた。対照として乳酸脱水素酵素，DPN，粗酵素の何れかを欠くもの，及び 100℃ 2 分間加熱した粗酵素を加えたものをおいた。表の上方より 4 物質を主管に，以下を側管に入れ排気の条件を等しくするため枝付の真空ポンプに接続して一齊に排気し，37℃ の水浴に浸して温度の平衡をとつた後主管と側管の内容を混和して褪色時間を測定した。結果は表に見る様に粗酵素の増量

表 1 乳酸脱水素系のメチレン青還元にあつた粗酵素の影響

		1	2	3	4	5	6	7	8
1M 乳酸リチウム**	(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
DPN (1 mg/ml)	(μ)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—	0.2
1000×メチレン青水溶液	(μ)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
粗酵素 (160 γ /ml)	(μ)	0.8	0.4	0.2	0.1	0.8**	—	0.8	0.8
乳酸脱水素酵素稀釈液	(μ)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
1M KCN***	(μ)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
pH 7.5 0.2M 磷酸緩衝液	(μ)	0.6	1.0	1.2	1.3	0.6	1.4	0.8	0.8
脱色に要した時間	(分, 秒)	3.50	8.00	10.30	17.45	30.	40.	>120. (—)	>120. (—)

* 使用前に NaOH で pH 7.5 に修正

** 100℃ 2 分間加熱粗酵素

*** 使用前に HCl で pH 7.5 に修正

にしたがつて褪色時間の促進が見られ、酵素を欠くものでは褪色時間は著しく遅い。加熱酵素を加えた第5管においても対照の第6管に比べてやや促進が見られるが非加熱の同量の酵素を入れた第1管に比べるとはるかにその褪色は遅い。培地中にはDPNHの存在なしに非特異的にメチレン青を還元する物質があるがそれは透析によつて取除かれる。以後使用した製品はすべてかかる還元物質のないものである。又乳酸脱水素系の1つを欠く組合せてはメチレン青の褪色は見られなかった。

2) DPNHをelectron donorとして2・6-Dichlorophenol indophenol (国産化学 KK 製。2・6-DPIP と略す) を Acceptor とした場合の酵素の作用

実験 1) において見られる様にこの酵素はDPNHの酸化を接触し、メチレン青を還元する Diaphorase 様の酵素であるが、更に活性度を数量的に取扱うために分光光度計によつて実験を行つた。又色素としては Diaphorase の測定に通常用いられる2・6-DPIPを用いた。

a) 2・6-DPIP の還元速度 (単位) の測定

Diaphorase の活性測定法及び単位の決定は現在までに報告された各人によつて区々であるが、何れもDPNH, 酵素, メチレン青又は2・6-DPIPを用い、2・6-DPIPの還元速度又はDPNHの酸化速度を測定している。著者は原則として厚さ1cmの硝子製吸光セルを用い、DPNH $0.3 \mu\text{M}$ 2・6-DPIP $0.16 \mu\text{M}$ 及び適当量の酵素を含み、総量は $1/15 \text{ M}$ pH 8 磷酸緩衝液を以て3mlとした。Blank は磷酸緩衝液として波長 $600 \text{ m}\mu$ において2・6-DPIPの分子吸光係数 $1.91 \times 10^4 \text{ Sq cm/mole}^9$ を用いて2・6-DPIPの還元に伴う吸光度の減少を測定した。反応の開始は2・6-DPIPの投入を以てし、時間毎の読みをとつた。以下に用いる酵素の単位は上記条件で25°Cにおいて反応開始後30秒から90秒までの1分間に吸光度0.1を変化せしめる活性度を以て1単位とした。温度による活性の変化は後にのべる温度係数を用いて補正した。

図1 (A) には以上の反応系に酵素が漸次増量して加えられた場合の2・6-DPIPの吸光度の減少が時間を追つて示されている。

図に見られる様に吸光度の減少は反応開始後2分位までの間は略直線に近い線を示しているのてこの範囲内をとれば正確な活性の表示が可能である。図 (B) は酵素量と活性値との関係を示したもので図 (A) に示した酵素量を横軸に、30秒から90秒までの1分間における吸光度の減少値を縦軸にとつた。図では反応速度は低濃度の所を除き酵素量に比例することが示されている。又か

図 1 酵素濃度の反応速度に及ぼす影響

I は酵素の入らないもの。
II は酵素 0.46 mg (2 単位)
III は酵素 0.92 mg (4 単位)
IV は酵素 1.84 mg (8 単位)
V は酵素 3.68 mg (16 単位)
を使用。反応温度 8°C

* 反応速度は1分間当りの2・6-DPIPの吸光度減少値

かる短時間の観察では酵素だけによる2・6-DPIPの還元は全く見られなかった。

b) DPNH酸化速度の測定

以上の反応系において2・6-DPIPの褪色の代りに $340 \text{ m}\mu$ におけるDPNHの酸化に伴う吸光度の低下を観察するに両者の間には平行関係が認められた。然しDPNHの酸化速度によつて活性度を測定することはDolin⁹⁾も指摘している様に色素が $340 \text{ m}\mu$ においてもある程度の吸光を示すので不便である。又一度減少したDPNHの吸光度はハイドロサルファイトソーダの添加によつて最初の吸光度の80%近くまでの回復が直ちに現れた。このことはDPNHの吸光度の低下は還元型のDPNが脱水素されて酸化型となったものであり、Nucleosidase 又は Pyrophosphatase によるDPNの分解によるものではないことを示している。

3) 酵素の反応速度に及ぼす温度の影響

分光光度計に恒温装置を欠くために次の方法によつた。即ちツンベルグ管を用い側管に2・6-DPIPの $0.12 \mu\text{M}$ を、主管にはDPNH $0.3 \mu\text{M}$ 、酵素 4.35単位を入れ、 $1/15 \text{ M}$ pH 8 磷酸緩衝液を以て混合時の内容が総量3mlになる様にした。排気後図2に示した各温度の恒温槽に浸して温度の平衡をとつた後内容を混和、2・6-DPIPが完全に無色となるに要する時間を測定した。

結果として図2には1分間当りの平均色素還元量を半対数図表で表したものを示した。

反応至適温度は40°C附近にあり、50°Cでは反応速度はやや低下する。実験に測定に用いた7°C~35°Cの範囲内

図 2 反応速度に及ぼす温度の影響

での反応曲線は直線に近いので温度係数を定めることが可能である。又 Q_{10} は 1.56 ~ 2.2 であった。

4) 反応速度に及ぼす pH の影響

$1/15$ M 第一磷酸カリ及び $1/15$ M 第二磷酸ソーダによつて pH 6.5 から 8.2 に至る各 pH 緩衝液を作り、8.5 及び 9.0 は苛性ソーダを用いてベックマン型 pH 計によつて作製した。各 pH 緩衝液中には DPNH 0.3 μ M 2.6-DPIP 0.12 μ M 酵素 6 単位を含み、単位の測定と同様の方法によつて活性を測定した。pH 8.0 における活性を 100% とし、各 pH における活性はそれに対する % で表した。

図 3 反応速度に及ぼす pH の影響

結果は図 3 に示された様に pH 8.0 附近が作用至適 pH であり、その両側、特にアルカリ側においては急激な活性の低下を見た。

5) 各種 pH における酵素の安定性

実験 4) におけると同様に pH 6.0 ~ 8.0 の範囲は $1/15$ M 磷酸緩衝液を用い、pH 5.0 以下は HCl で、pH 9.0 以上は NaOH を以て各種 pH の緩衝液を作り、乾燥酵素を各 pH 緩衝液に溶解し 37°C に 1 時間放置後 pH を 0.8 に修正、溶液量を一定にしてから単位測定と同条件により活性を測定した。

処理前の活性を 100% とし処理後の活性をそれに対する % で表した。

図 4 各種 pH における酵素の安定度

図 4 に示された様に pH 5 において最も安定であった。

6) 保存における酵素の安定性

系統立つた研究は行わなかったが硫酸飽和液中に分散して保存すれば比較的安定である。

水溶液では氷室に保存しても数日で活性は著しく低下する。凍結乾燥したものは 7 月後活性は約 $1/3$ に低下していた。

7) 抗血清の影響及びマウスに対する毒性

濾液を Cysteine により活性化して家兎に注射することによつて得た免疫血清及び予研から分与されたガス壊疽抗毒素血清を実験 2) の a) の系に加えて抗血清の反応に及ぼす影響を見たが何れの血清も全く影響を与えなかった。

毒性試験は粗酵素約 3 mg 及びこれに含まれる既知毒素を中和するに足る混合免疫血清を混じマウスの尾静脈に注射したが、注射した 3 匹は共に 48 時間後何等の変化も認められなかった。

8) 酵素と θ 毒素の赤血球基質への吸着に対する相違

今回培養濾液から得られた酵素は *Cl. perfringens* において従来報告されている毒素に類似を求めれば可逆的に酸化還元されるという点で θ 毒素に一部共通した性格

が認められる。培養濾液の硫安 0.8 飽和沈澱物は当然 θ 毒素を含有しているので θ 毒素が赤血球基質に吸着される性質を利用して酵素と θ 毒素との区別を試みた。用いた方法及び結果は表 2 に示す。

表 2 赤血球基質吸着による酵素と θ 毒素との分離

(A) 粗酵素 (2800 H.U., 430 D.U.) + $1/15$ M Cysteine 10 ml	
35°C 15 分活性化	
100°C 2 分間加熱 せる赤血球基質 0.5 g 添加	
37°C 30 分吸着	
8000 rpm 30 分遠心	
上 清 硫安飽和	沈 澱
沈 澱 蒸溜水溶解	上 清
透 析 (40°C 蒸溜水中 48 時間)	
(B) 上清 (0 H.U., 154 D.U.)	沈 澱

処理前 (A) の粗酵素は Diaphorase として 430 単位, θ 毒素として 2800 H.U. を含むものを用いたが赤血球基質処理後は Diaphorase として 154 単位, θ 毒素は全く証明されなかった。即ち θ 毒素は完全に赤血球基質に吸着されたが、この酵素は $1/15$ 程度に活性が低下したが尚かなりの活性が保たれていた。尚赤血球基質を 100°C 2 分間加熱処理したのは基質に存するという DPN-ase¹⁰⁾ を不活性化するためである。

考 按

従来 *Clostridium* の培養濾液中に多数の毒素、酵素の存在が報告されているが、以下今回濾液から得られた物質を検討してみるに凍結乾燥して得られた物質は培地として半合成培地を使用したと比べ比較的僅少であるがセロファン膜 48 時間透析に対して非透析性であり、100°C 2 分間の加熱によって完全に活性を失う。硫安塩析では 0.8 飽和においてその大部分が沈澱する。DPNH を酸化してメチレン青、2,6-DPIP の様な高い酸化還元電位をもつ色素を還元する。又反応系の温度、pH に高い

依存性を有している。

これらの点からこの物質は従来 *Clostridium* 培養濾液中に未記載の酵素と思われる、その機能からすると最初に Euler & Hasse¹¹⁾, Euler & Günther¹²⁾ によつて動物臓器及びビール酵母中に、Green & Dewan¹³⁾ によつてパン酵母、*B. coli*, *Proteus*, *B. subtilis* の菌体中に見出された Diaphorase 様の酵素である。元来 Diaphorase は Slater's factor を通じてチトクロム系につながるフラビン酵素であるが、チトクロム系を欠くと云われる¹⁴⁾ *Clostridium* における意味は現在の所不明である。又酵素中のフラビンについては分光々度計を用いて 350 m μ から 500 m μ に至る吸光スペクトルを観察した所 430 m μ 附近にヒドロサルファイトソーダの添加によつて消失するや、著明な吸収帯を見たが酵素に褐色の不純物が多く決定はできなかった。然し硫安沈澱法をくりかえした酵素を酸性において煮沸し遠心後の上清液に紫外線を照射すると螢光を発することが認められた。各種 pH 溶液中における酵素の安定性については Green & Dewan¹³⁾ は pH 4.0 に 3 分間で失活は 75%, pH 9.0 では 90%, pH 4.6 では失活はなかったと述べているが、著者のものは氏等の報告に比べてアルカリ側でや、安定の様である。たゞ最も安定なのが pH 5 附近であることは両者が略一致している。

次にこの酵素と θ 毒素との異同についてふれると、 θ 毒素を高度に精製し θ 毒素も酵素であろうと結論した Roth & Pillemer⁶⁾ の報告と比較してみるに酵素活性についての温度の効果曲線は甚だ類似しているが、作用至適 pH は θ 毒素が pH 6.8 であるのに対してこの酵素は pH 8 附近であつた。更に両者の相違を確認するために行つた赤血球基質吸着に対する態度においてもその相違は明かにされた。

結 論

- 1) *Clostridium perfringens* BP 6 K 株の培養濾液中に Diaphorase 様の酵素を見出した。
- 2) 酵素の作用至適温度は 40°C 附近。作用至適 pH は 8。pH 5 で最も安定であつた。
- 3) 酵素は赤血球基質に吸着されず、この点において明かに θ 毒素と区別される。
- 4) マウスに対する直接の毒性及び抗原性は認められなかった。

終りに臨み周密な御校閲を賜つた信州大学田崎教授に深謝し、終始御懇篤な御指導を賜つた埼玉衛研病理細菌部長早野博士に深甚の謝意を表する。

又菌株及びガス壊疽抗毒素血清を分与され御助言を賜った予研血清部長村田博士に厚く感謝する。

本論文の要旨は昭和32年6月第10回日本細菌学会関東支部例会で発表した。

文 献

- 1) Logan, M. A., Tytell, A. A. Danielson, I. S. & Griner, A. M.: J. Immunol., 51, 3, 1945.
- 2) Straub, F. B.: Biochem. J., 34, 483, 1940.
- 3) Lepage, G. A.: J. Biol. Chem., 168, 623, 1947.
- 4) Racker, E.: J. Biol. Chem., 184, 313, 1950.
- 5) Horecker, B. L. & Kornberg, A.: J. Biol. Chem., 175, 385, 1948.
- 6) Roth, F. B. & Pillemer, L.: J. Immunol., 75, 50, 1955.
- 7) Ponder, E.: J. Gen. Physiol., 28, 349, 1944.
- 8) Basford, R. E.: J. Amer. Chem. Soc., 77, 3873, 1955.
- 9) Dolin, M. I.: Arch. Biochem. Biophys., 55, 415, 1955.
- 10) Alivasator, S. G. A. & Denstedt, O. F.: Science, 114, 281, 1951.
- 11) Euler, H. V. & Hasse, K.: Naturwissenschaften, 26, 187, 1938.
- 12) Euler, H. V. & Günther, G.: Naturwissenschaften, 26, 676, 1938.
- 13) Green, D. E. & Dewan, J. G.: Biochem. J., 32, 1200, 1938.
- 14) Porter, J. R.: Bacterial Chemistry and Physiology, 553, Johnwiley & Sons, Inc., New York., 1950.