ビブリオ属の一菌株の自家融解現象に関する研究

第3報 粗製自解濾液のカゼイン、オリーブ油、澱粉基質への作用

浅 木 快 造

鳥取大学医学部細菌学教室（主任 高木篤教授）

〔受付：2月11日・1960年〕

細菌の自家融解の過程は細胞諸成分に作用する諸種の酵素過程を伴った複雑な化学反応と考えられているが、その複雑な過程の機序にはなお、解明するまでに至っていない点が多い。私は前報^{1) 2)}において、*Vibrio sputigenus* によく似た生物学的性状をもつ水ビブリオの一菌株を用いて、その菌の自家融解に及ぼす若干の物理的・化学的因子の影響と電子顕微鏡による形態学的変化を観察した。また、自家融解の際、細胞内容物と共に一般には自家融解に関与する溶解活性因子が媒液に遊離してくると思われているので、この菌の自解濾液による加熱死菌溶解に及ぼす物理的・化学的諸因子の影響並びに数種の酵素によるこの菌の加熱死菌基質の溶解の状態を検討した。

本報ではこの菌の自解濾液の加熱死菌溶解活性作用を確める為、既知の基質カゼイン、オリーブ油、澱粉に自解濾液を作用させ、それぞれの基質の分解の状態とその菌の自家融解におけるDNA、RNAの遊離の状態を化学的に定量したので報告する。

実験方法

1. 使用菌株

教室保存の生物学的性状が *Vibrio sputigenus* 類似の水ビブリオの一菌株（以後WV株と略）を使用した。

2. 粗製自解濾液

WV株を普通寒天平板上に37°C 15時間培養し、滅菌蒸溜水で一回遠沈洗滌の後、滅菌0.85%食塩含有 $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝液（pH=7.4）に浮遊させた。そのまま丸コルペンに入れて37°Cで5日間おいた後、菌液5.0mlにつきトルオール0.2 ml 宛加えて37°Cに24時間放置する。次に毎分8000回、30分間高速遠沈した上清をアンプルに納めて共和式冷凍乾燥機DL-500型で真空冷凍乾燥して粉末を作り、その4mg/ml 0.85%食塩含有 $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝溶液として使用した。

3. 使用酵素

Trypsin は持田製薬（結晶 Trypsilin）、Lipase（豚の脾臓から採ったもの）は東京化成、 β -Amylase は Nutritional Biochemicals Corporation の製品を用い、いずれも100 γ /ml 0.85%食塩含有 $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝溶液（pH=7.4）として使用した。

4. 基 質

Caseinum Natrium は Merk、オリーブ油は日本製薬、溶性澱粉は和光純薬の製品を用い、実験目的によつて0.85%食塩含有 $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝液（pH=7.4）に所定の濃度となるよう溶解した。

5. 酵素作用の測定

4mg/ml 自解濾液凍結乾燥粉末溶液を実験目的により一定量のカゼイン溶液、オリーブ油、澱粉溶液に加えて所定の時間37°Cの恒温槽中におき、100 γ /ml 結晶Trypsin Lipase、 β -Amylase をそれぞれの基質に作用させたものと比較検討した。酵素作用はカゼイン基質では Sørensen の Formol 滴定法^{3) 4)}、オリーブ油基質では Willstätter のアルカリ滴定法^{5) 6)}、澱粉基質では Bertrand の酸化還元法^{7) 8)}を用いて測定した。

6. 遊離核酸の定量

DNAとRNAの遊離状態は、WV株のデフェニールアミン法でDNA検出可能菌液濃度即ち、乾燥菌量6.74mg/ml になるよう0.85%食塩含有 $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝液（pH=7.4）に浮遊したものを10ml 宛試験管に分注しトルオール0.4 ml を加えて所定の時間37°Cの恒温槽中におき自家融解を起こさせ、その8000回30分間高速遠沈した上清を被検液とした。DNAの定量ではデフェニールアミン法^{9) 10)}、RNDの定量では Kerr らのオルシン

ASAKI Kaizo: Studies on the autolytic phenomenon of a strain of water vibrio. 3rd Report. The action of its autolysate on casein, olive oil and starch. Department of Bacteriology, School of Medicine, Tottori University.—Jap. J. of Bact., 15(8), 748-751, 1960.

一塩酸法¹¹⁾¹²⁾を用いて測定した。

なお、予め既知濃度のDNA (東京化成製) とRNA (和光純薬製) を使用して作製したDNA燐量とRNA燐量検量曲線を用いて、被検液の比色定量の結果からDNA燐量, RNA燐量をよみとり、WV株の乾燥菌量6.74 mg/mlの菌液におけるDNA燐量とRNA燐量に対する被検液のDNA燐量, RNA燐量の割合をDNA, RNAの遊離率(%)とした。また、使用したDNAとRNAは使用目的が自家融解による媒液中の核酸遊離の状態の比較にあるので、高重合のコウシ胸線DNAナトリウム塩、精製酵母RNAナトリウム塩の代りに純度の高い市販の製品を用いた。

実験結果

1. 自解濾液のカゼイン基質への作用

酵素液として4 mg/ml 自解濾液凍結乾燥粉末溶液と100 γ /ml 結晶 Trypsinを用いた。酵素液5.0ml とカゼインを3%の割合に0.85%食塩含有 $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝液に溶かしたもの25.0ml, 防腐剤としてトルオール0.4 mlをコルベンに入れ密栓し、37°Cの恒温槽中においた。所定の間隔をおいて取り出し、Sørensen の Formol 滴定法を用いて、その酵素作用による peptide 結合の開裂にともなう増加するアミノ基をホルマリンと結合させ、残るカルボキシル基を0.05Nの苛性ソーダで滴定し、時間の経過による滴定量の増加を観察した。図1に示す様に Trypsin を加えたものでは直後から苛性ソーダの滴定量の増加が著しく、3時間をすぎるとその増加率は減少してゆくが、滴定量の増加の傾向は続く。自解濾液を加えたものでは Trypsin を加えたものにやや劣るが、それに類似した苛性ソーダの滴定量の増加をみた。なお、対照として酵素液の代りに0.85%食塩含有 $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝液(pH=7.4)を加えたものでは苛性ソーダの滴定量の増加は殆どみられない。この事実はWV株の自解濾液には相当に強い蛋白分解酵素系が含まれていることを示している。

2. 自解濾液のオリーブ油基質への作用

酵素液として4mg/ml 自解濾液凍結乾燥粉末溶液と100 γ /ml Lipase を用い、酵素液10.0ml, オリーブ油2.0ml, $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝液(pH=8.2)1.0mlをコルベンに入れ密栓した。なお、基質としてオリーブ油を使用する時は出来るだけ安定で均一なエマルジョンを作らないと酵素液が作用し難いのでその目的にポリビニールアルコールを用いた。即ち、酵素液, オリーブ油, 緩衝液(pH=8.2)の三者を加えたものに Fiore 及び Nord の方法¹³⁾

図1 自解濾液の Casein 基質への作用

○—○ 4 mg/ml 粗製自解濾液凍結乾燥粉末
△—△ 100 γ /ml 結晶 Trypsin
□—□ 対照 (緩衝液)

図2 自解濾液のオリーブ油基質への作用

○—○ 4 mg/ml 粗製自解濾液凍結乾燥粉末
△—△ 100 γ /ml Lipase

により作製したポリビニールアルコール溶液25.0mlを加えて37°Cで振盪しながら作用させた。所定の時間間隔をおいて順次に取り出し、Willstätter のアルカリ滴定法を用いてその酵素作用によつて分解遊離した脂肪酸を0.1 Nの苛性リカで滴定し、時間の経過によるオリーブ油の分解度(%)の増加を求めた。図2に示すようにLipaseを加えたものでも全く安定した均一なエマルジョンを得ることが困難なため、最初は自解濾液を加えたものに比較して分解度に全く大きな開きがないが、時間の経過と共に溶解が進み均一なエマルジョンと変つてくるにつれ分解度は増大した。自解濾液を加えたものの分解度は極めて小で時間が経つても初めと殆ど変化がない。即ち、この自解濾液にはLipase類似酵素が殆ど含まれていないか、あつても極く僅かであろうと推察される。

3. 自解濾液の澱粉基質への作用

酵素液として4 mg/ml 自解濾液凍結乾燥粉末溶液と100 γ /ml β -Amylaseを用いた。酵素液5.0mlと澱粉を

図 3 自解濾液の澱粉基質への作用

図 4 WV 株の自家融解における DNA, RNA の遊離

2%の割合に0.85%食塩含有 $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝液に溶かしたもの15.0mlを三角コルペンに入れ密栓し、37°Cで振盪しながら作用せしめた。それを所定の時間間隔において順次に取り出し、Bertrand法でその酵素作用による分解産物の還元力を測定し、時間の経過による澱粉基質の分解量の増加を求めた。図3に示す様に β -Amylaseを加えたものでは直後から糖量の増加が著明で6時間でほぼ飽和に近ずいた。自解濾液を加えたものでは常に測定範囲以下(10mg以下)の糖量を示した。しかし、Amylaseの中で β -Amylaseだけが澱粉をmaltoseにまで分解させるが、他の多くの性状を異にするAmylaseは総て還元糖にまで分解するものでない¹⁰⁾。それ故分解産物の還元糖の生成を測定することによって概にその澱粉溶解活性の程度を決定することは出来ないが、この自解濾液には β -Amylase類似の酵素は殆ど含まれていない

か、あつても極く僅かであろうことは推察される。

4. 自家融解におけるDNA, RNAの遊離

WV株を普通寒天平板上に37°C15時間培養したものを蒸留水で1回遠沈洗滌の後、乾燥菌量が6.74mg/mlとなるよう0.85%食塩含有 $1/10$ Mol 磷酸塩緩衝液(pH=7.4)に浮遊したものを試験管に10.0ml 充分注し、トルオール0.4ml 宛加えて37°Cの恒温槽中においた。時間の経過と共に順次に取り出し、8000回30分間高速遠沈した。その上清のDNA定量ではデフェニールアミン法⁹⁾¹⁰⁾を用い、RNAの定量ではKerrらのオルシン塩酸法¹¹⁾¹²⁾を用いて自家融解によって媒液中に遊離した核酸の糖成分即ちデソキシペントースとペントースを比色定量した。なお、RNAの比色定量に関しては被検液中のRNA含量が多過ぎるため、4~5倍に稀釈した試料を比色定量した。図4に示す様にDNAは直後から著明な遊離をみ、3時間後には94%の遊離率を示して殆ど飽和に達した。もはやこの時期ではその沈渣を採ってデフェニールアミン法でDNAを比色定量しても測定範囲以下の僅量しか含まれていなかった。RNAでも直後から著明な遊離をみ、3時間後にはやや遊離率増加の割合は低下し、6時間後に84%の遊離率を示した。また、WV株を3時間自家融解させたものについて、Feulgen 顆粒の状態を知るためRobinow変法染色顆粒¹⁵⁾¹⁶⁾の染色像を観察した。正常な菌では1N塩酸4分の加水分解でRobinow変法染色顆粒が観察されるが、3時間自家融解した菌では同じ加水分解時間で殆どの顆粒は消失した。以上のことからWV株に自家融解を起こさせた時、主に細菌の核質に含まれるDNAは自家融解の早期に殆ど完全に媒液中に遊離し、又主に細胞質質に含まれるRNAも早期に殆どが遊離する。しかして、前報¹⁾で観察した電子顕微鏡像と考えあわせて、極めて一部のものについては徐々に遊離してくるものもあることを示している。

考 按

自家融解は本来細菌細胞の酵素的自己崩壊であつて、本質的にその細胞内容物の加水分解と周囲の媒液への溶出の過程が含まれている。私は前報¹²⁾において菌液の透明化、言い換えると細胞内容物が酵素的加水分解によって低分子化し、周囲の媒液に溶出した場合の吸光率の減少で自家融解の程度を測定した。このような意味に解する限り、既に前報²⁾において考察したように自家融解の始動とは細菌細胞のcell wallに酵素的加水分解を起こさせてその透過性を高め、続いて低分子化した細胞内容物を周囲の媒液へと溶出を始める原因または因子との

考えから、前報²⁾においては Nomura & Hosoda の方法¹⁷⁾で作製したWV株の cell wall にこの菌の自解濾液を作用せしめたが、cell wall 浮遊液の透明化を吸光率の減少についてみた限りでは著明な変化がみられなかった。そこで今回前報²⁾で報告したWV株の自解濾液によるこの菌の加熱死菌透明化の作用を確める目的で Trypsin, Lipase, β -Amylase で溶解さすことの出来る既知の基質カゼイン、オリーブ油、澱粉を選び、真空凍結乾燥法によつて濃縮した粗製自解濾液とこれらの酵素を各基質に作用させて、その分解産物を化学的に定量した。その結果WV株の自解濾液の加熱死菌液透明化の現象は蛋白分解酵素系のものが主体となしていることが明らかとなつた。Jones ら¹⁸⁾はグラム陽性菌である *Staph. citreus* B 9 と *Staph. albus* 9238 の自解濾液の中に至適 pH=7~8 でその菌の加熱死菌を溶解すると共に、カゼインとペプトンを溶解する蛋白分解酵素系の存在を報告している。しかし、今後WV株の自家融解始動の因子を究明するためには cell wall の透過性を高める因子の研究が必要であり、この点については自解濾液作製の方法の検討に進む必要がある。

Vosti ら¹⁹⁾はパン酵母が自家融解を起す際、核酸が急速に媒液中に遊離し、細胞の窒素性内容物の遊離が遅れると報告しているが、WV株が自家融解を起す際にもDNAの遊離率は8時間後に94%、RNAの遊離率は6時間後に84%に達し、前報¹⁾で述べたWV株の自家融解の溶菌率に比較してDNA並びにRNAとも急速に媒液中へと遊離してくるが、その機序は明らかでない。

結 論

ビブリオ属の一菌株の自解濾液凍結乾燥粉末を用いて、その濃縮溶液を作り、既知の基質カゼイン、オリーブ油、澱粉基質に対する作用を化学的に定量し、本菌株の自解濾液によるその菌の加熱死菌基質透明化の作用は蛋白分解酵素系が主に関与している事を明らかにした。本菌株はトルオール処理をすると自家融解の進行と共に急速にDNA、RNAを遊離する。

高木教授、川田助教授の御指導、御校閲を感謝する。

(本論文の要旨は1959年第12回日本細菌学会中国四国地方支部総会の席上発表した)。

文 献

- 1) 浅木快造：日本細菌学雑誌, 15(2), 141-146, 昭35(1960).
- 2) 浅木快造：日本細菌学雑誌, 16(3), 256-263, 昭35(1960).
- 3) 萩原文二, 米谷隆：赤堀四郎編, 酵素化学研究法 2, 朝倉書店, 247-251, 昭31(1956).
- 4) Sørensen, S. P. L.: Biochem. Z., 7, 45-101, 1907.
- 5) 伊藤良二：赤堀四郎編, 酵素化学研究法 2, 朝倉書店, 1-18, 昭31(1956).
- 6) Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E. und Memmen, F.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 125, 93-131, 1923.
- 7) 藤井暢三：生化学実験法, 定量篇, 南山堂, 125-127, 昭31(1956).
- 8) Bertrand, G. & Thomas, P.: Practical Biological Chemistry translated by Colwell, H. A. 3. ed., London, 61-74, 1920.
- 9) 八木康夫：江上不二夫編, 核酸及び核蛋白質上巻, 共立出版, 140-141, 昭26(1951).
- 10) Euler, v. H. & Hahn, L.: Arch. Biochem., 17, 285-291, 1948.
- 11) 八木康夫：江上不二夫編, 核酸及び核蛋白質上巻, 共立出版, 142-143, 昭26(1951).
- 12) Kerr, S. E. & Seridarian, K.: J. biol. Chem., 159, 211-225, 1945.
- 13) Fiore, J. V. & Nord, F. F.: Arch. Biochem., 23, 473-479, 1949.
- 14) 伊藤正春：赤堀四郎編, 酵素化学研究法 2, 朝倉書店, 120-127, 昭31(1956).
- 15) Robinow, C. F.: Dubos, R. J., The Bacterial Cell, Harvard University Press, Addendum, 355-362, 1949.
- 16) Smith, A. G.: J. Bact., 59, 575-587, 1950.
- 17) Nomura, M. & Hosoda, J.: J. Bact., 72, 573-581, 1956.
- 18) Jones, A. S., Stacey, M. & Webb, M.: Biochim. Biophys. Acta, 3, 383-399, 1949.
- 19) Vosti, D. C. & Joslyn, M. A.: Appl. Microbiol., 2, 70-78, 1954.