3. カドミウムはステアリン酸脱水素酵素系に対しては阻害剤とはならないが、レンチンは阻害性を示す。

(1) W. Frenke, H. Frehse : <i>Z. Physiol. Chem.</i> , 298, 1 (1954).	(4) E. Le Breton, J. Champougny-Clément : <i>Arch. Sci. Physiol.</i> , 2, 243 (1948).
(2) E. Annau : <i>Enzymologie</i> , IX, 150(1941); E. Annau, A. Eperjessy, Z-L. Zanthyr-szky : <i>Z. physiol. Chem.</i> , 279, 66(1943).	(5) H. von Euler, H. Hellström : <i>Z. physiol. Chem.</i> , 252, 31 (1938).
(3) O. Lang, F. Adickes : <i>Z. physiol. Chem.</i> , 262, 123 (1939) ; 263, 227 (1940).	(6) G. A. LePage : <i>J. Biol. Chem.</i> , 180, 975 (1949).

細菌サッカラーゼに関する研究 (第 6 報)*

酵母型サッカラーゼの産生機構

根 来 秀 夫 (大阪市立工業研究所)

昭和 31 年 9 月 27 日 受 理

著者は前報⁽¹⁾に於て *Bac. subtilis* var. *saccharolyticus* n. sp. がビール酵母の細胞から得られた多糖類区分 (酵母マンナン?) の存在下に於て酵母型サッカラーゼ**を分泌するとの事実を指摘したが、その機構を追究した結果、このサッカラーゼの生成には酵母多糖類の他に磷酸塩を必要とすること、これらの共存に於てこのサッカラーゼの生成を支配する特定の因子 (多糖類?) が細胞内に形成されることを認め、この因子の生成にあずかる酵素系の性質を吟味した。更にこのサッカラーゼの生成を支配する諸条件をある程度明らかにし得たので、それらについて報告する。

実 験 の 部

実験方法

(1) サッカラーゼ活性度の測定方法 : 既報⁽²⁾の方法によった。即ち酵素の一定希釈液 2 cc, 磷酸緩衝液 (Sørensen, pH 7.0) 2 cc 及び 2% 蔗糖液 4 cc の配合で 40° に作用させ、生成する転化糖量をマイクロペルトラン法により求め、酵素液 1 cc が 5 時間に生成する転化糖量 (mg) を以て酵素力を示した。なお酵母型サッカラーゼの測定には醋酸-醋酸ソーダ緩衝液 (Michaelis, pH 4.5) を用いた。

第 1 図 酵母多糖類添加量と酵母型サッカラーゼ分泌量 (I)

配合 :	細胞	24.5mg	} 全量 60cc
	蔗糖	1%	
	磷酸緩衝液	1/4 モル, pH 7	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1/20 モル	
	水		

(2) サッカラーゼの生成条件 : 既報⁽³⁾の通りである。即ち肉汁ペプトン培地に 40 時間培養した細胞 (特に記載した場合を除く) を集め乳鉢で磨砕し、毎回約 5 倍量の水道水にて洗滌し遠心分離する。このようにして 6 回洗滌した細胞を磷酸緩衝液 (pH 7, 1/4 モル) に懸濁し、試験物質と共に 33~35° に振盪した。酵素活性の測定は濾液について行った。

(3) 酵母多糖類 : 調整法ならびにその化学的性状は既報⁽¹⁾の通りである。

実験結果

I. 酵母多糖類の添加量と酵母型サッカラーゼの分泌量 酵母多糖類の添加量と酵母型サッカラーゼ分泌量との関係はこの多糖類区分が酵母型サッカラーゼを生成する機作を知る上に意義が深いと考えられるので

* Studies on Bacterial Saccharase. Part VI. The Mechanism of Yeast-type Saccharase Production.

By Hideo NEGORO (Osaka Municipal Technical Research Institute)

** 既報⁽¹⁾の如くこの菌本来のサッカラーゼはその作用の最適 pH は 7.0 であるが、ビール酵母の細胞多糖類⁽¹⁾の存在下では酵母サッカラーゼと同じく最適 pH 4.5 を示すサッカラーゼが分泌される。本研究に於ては前者を A₂ 型サッカラーゼ、後者を酵母型サッカラーゼと仮称する。

第 1 表 酵母多糖類の添加量と酵母型サッカラーゼの分泌量

酵母多糖類 mg/60cc	燐 酸 塩 活性測定時 の pH	酵 素 力			
		0		1/4 モル	
0		4.5	7	4.5	7
5		0.2	0.4	0.4	5.2
10		3.5	5.4	12.2	18
15		7.4	6.4	15.8	13.8
20		15.4	18.8	17.8	12.8
25		18.4	17.4	17.2	16

細胞 27.5 mg
蔗糖 1%
燐酸緩衝液 0, 1/4 モル
酵母多糖類 (NH₄)₂SO₄ 1/20 モル
水 } 全量 60cc

上記配合で 30° に 5 時間振盪後の濾液について酵素力を測定した。

第 3 表 酵母型サッカラーゼ産生に対する蒟蒻マンナンの阻害作用

マン ナン mg	酵 素 力							
	3 時間後				7 時間後			
	pH4	pH4.5	pH6	pH7	pH4	pH4.5	pH6	pH7
0	1.5	3	2.5	3	10	15	13	12
4	1	2	3	3	8	12	10	9
10	1	2.5	2.5	2	5	10	9	9
20	0.5	2	3	3.5	0	3	7	9
40	0.5	2	3	3	0	2.5	7	9

配合 : 細胞 17.2 mg
蔗糖 1%
燐酸緩衝液 1/4 モル
酵母多糖類 20 mg
マンナン 4~40 mg
(NH₄)₂SO₄ 1/20 モル } 全量 60cc

サッカラーゼの分泌量と酵母多糖類の添加量との間にはある程度比例的な関係があり、少量添加の場合には殆んど酵母型サッカラーゼが分泌されないことが知られた。その 1 例を示せば第 1 表の如くである。

かかる事実から燐酸塩の存在においては微量の酵母多糖類によって酵母型サッカラーゼ産生を支配する何等かの因子が形成されるものと推察される。

これを確めるために次のような実験を試みた。即ち未適応細胞を微量の酵母多糖類及び燐酸塩と共に 30° で 5 時間及び 9 時間振盪した各細胞の抽出液* について酵母型サッカラーゼ形成に対する効果をみると第 2 表の如くなる。なお燐酸塩無添加の条件で同様処理した細胞の抽出液についても試験した。

この結果未適応の細胞を燐酸塩及び微量の酵母多糖類と共に振盪することにより、菌体細胞内に酵母型サッカラーゼの産生を支配する有効区分の生成されることが確められた。

II. 蒟蒻マンナンの影響 前報⁽¹⁾に報告した如く酵母型サッカラーゼの形成を支配する区分はマンナン様の物質であると推定せられたので、蒟蒻マンナンの効果について吟味するを考え次の如き実験を試みた。即ち未適応の洗滌細胞を燐酸緩衝液に懸濁し蔗糖 (1%)、酵母多糖類及び種々の量の蒟蒻マンナンと共に 35° に振盪し、経時的に酵母型サッカラーゼの分泌量を比較した。なお対照として蒟蒻マンナン無添加の場合についても行った(第 3 表)。

第 2 表 酵母型サッカラーゼの産生を支配する有効因子の生成

細胞抽出液	処 理 条 件 活性測定時 の pH	酵 素 力			
		燐酸塩添加		燐酸塩無添加	
		4.5	7	4.5	7
無		4.2	15	4.2	15
未処理細胞		4.5	18	4.5	18
5 時間振盪細胞		16	6	5	12
9 "		22	18	4	11

細胞処理条件 :

細胞	1.2 g
蔗糖	1%
燐酸緩衝液	0, 1/4 モル
酵母多糖類	5 mg
水	

} 全量 60cc

内容 1 l の平底フラスコに入れ 30° で 5 時間及び 9 時間振盪した。

サッカラーゼ生成条件 :

細胞	24 mg
蔗糖	1%
燐酸緩衝液	1/4 モル
細胞抽出液(細胞 10mg 相当量)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1/20 モル
水	

} 全量 60cc

上の配合で 30° に 5 時間振盪後の濾液について酵素活性を求めた。

次のような実験を試みた。即ち未適応洗滌細胞の燐酸緩衝液懸濁液を蔗糖 1% 及び種々の量の酵母多糖類と共に 30° に 15 時間振盪した後、濾液について酵素力を求めると第 1 図の如くなる。

この結果比較的僅少の酵母多糖類の添加においても既に著量の酵母型サッカラーゼの分泌されることが認められた。しかし燐酸塩が共存しない場合には酵母型

* このように処理した各細胞を 50 倍量の 2% NaOH で 37° に 24 時間抽出し、細胞を濾別し稀 HCl で pH 7.0 とし、水道水に対し透析後濾過したもの。

第 4 表 菌体の老若と酵母型サッカラーゼの分泌量

細胞	作用 pH	酵素力/1 mg 細胞			
		無		有	
		4.5	7	4.5	7
40 時間培養		5	20	20	16
80 時間培養		5	30	4	15
配合：		細胞 35.4 mg			
		蔗糖 1%			
		1/4 モル			
		酵母多糖類 5 mg			
		水			
		全量 60 cc			

上記の配合で 35° に 7 時間振盪し、その濾液について酵素活性を求めた。

第 5 表 細胞処理条件と生成酵素型

細胞	酵母多糖類 mg	酵素力/7 時間後				
		pH 3.5	pH 4.5	pH 6	pH 7	pH 8
pH 4.5 処理	0	0	0.7	1.5	4.5	2.5
	5	0	0.6	1.7	4.4	2.4
pH 7 処理	0	0	1.2	2.0	4.8	3
	5	6.5	31	38	26	16

この結果蒟蒻マンナン⁹⁾の供与は A₂ 型サッカラーゼの形成に対しては殆ど影響を与えないに反し、酵母型サッカラーゼの形成を特異的に阻害すること、その阻害度は蒟蒻マンナンの添加量にほぼ比例して増大することが認められた。サッカラーゼの本態が多くの報告⁽⁴⁻⁶⁾にみられる如く蛋白体と多糖の複合体であるとするならば、蒟蒻マンナンは酵母多糖類がサッカラーゼ形成に参与するいずれかの過程を拮抗的に阻害するのではないかと推察されるが、この阻害機構に関してはサッカラーゼの蛋白区分と多糖類区分の結合様式から考察を加えたので後に報告する予定である。

III. 菌体の老若と酵母型サッカラーゼ分泌量 既報⁽⁹⁾の A₂ 型サッカラーゼの場合と比較対照して酵母型サッカラーゼの形成能と細胞の老若との関係を追究した。

即ち肉汁-ペプトン培地に 40 時間及び 80 時間培養した細胞をそれぞれ洗滌後磷酸緩衝液に懸濁し、酵母多糖類添加時と無添加の場合について酵母型及び A₂ 型両型サッカラーゼの形成能を比較すれば第 4 表の如くなる。

この結果、酵母型サッカラーゼの産生は若細胞からのみ認められ、既報⁽⁹⁾の A₂ 型サッカラーゼの場合と趣を異にしていることが明らかとなった。

IV. 細胞処理条件と生成酵素型 この酵母型サッカラーゼの形成は使用する細胞の生理的条件ならびに細胞内の酵素系によって支配される。

著者は、細胞を種々の条件で処理し酵母型サッカラーゼの分泌力に対する影響を検討中、たまたま pH 4.5 の磷酸緩衝液で処理すればこのサッカラーゼの分泌に比較的大量の酵母多糖類を必要とするが、この処理によって細胞から磷酸緩衝液中に移行された区分を添加すれば少量の多糖類で充分なことが認められた。

即ち肉汁-ペプトン培養基に 24 時間培養した細胞を洗滌後 pH 4.5 の磷酸緩衝液 (1/4 モル) に懸濁して 30° で 4 時間振盪した後、充分洗滌した細胞について酵母型及び A₂ 型サッカラーゼの分泌量をみると第 5 表の如くなる。なお対照として pH 7.0 の磷酸緩衝液で処理した細胞について同様に行い比較に供した。

この結果 pH 4.5 で処理した細胞は酵母型サッカラーゼの形成能を殆ど消失しているように見受けられるが* A₂ 型サッカラーゼの形成は対照と大差を認めない。

この事実から酵母型サッカラーゼの産生を支配する特定の因子が細胞から外に移行されたのではないかと推察されたので次のような吟味を試みた。即ち上述の如く pH 4.5 で処理した細胞にその細胞の上澄液を追補したも

第 6 表 細胞上澄液添加と酵母型サッカラーゼ分泌量

細胞 上澄液 cc	酵母 多糖類 mg	酵素力/7 時間後					
		pH3.5	pH4.5	pH6	pH7	pH8	
0	0	0	0.2	0.6	0.6	0.4	
0	5	0	1.0	2.0	2.6	1.4	
20	0	0	0.2	0.6	0.7	0.4	
20	5	5.5	9.0	8.4	6.4	5.0	
配合：	細胞 細胞上澄液 蔗糖 酸緩衝液 水	(pH 4.5 で処理) 20cc 1% 1/4 モル					全量 60cc

上記配合で 33° に 7 時間振盪後の濾液について酵素力を測定した。

第 7 表 細胞上澄液の加熱処理

細胞上澄液	酵素力 (7 時間後)		
	pH 4.5	pH 6	pH 7
無添加	0.2	1.0	1.4
20cc	6.4	8.0	5.6
" (熱破壊物)	1.0	3.2	1.6
pH 7.0 処理細胞の上澄液	0.4	0.8	1.2
配合：		(pH 4.5 処理) 68mg	
		(pH 7 に調整) 20cc	
		蔗糖 1%	
		1/4 モル	
		酵母多糖類 5mg	
		水	
		全量 60cc	

* この細胞も比較的大量の酵母多糖類の存在下に於てはその量に応じて酵母型のサッカラーゼを分泌することが認められたが、その詳細は後に記述する。

第 8 表 処理細胞による酵母型サッカラーゼ分泌量と酵母多糖類の添加量

細胞	酵母多糖類 mg	酵素力/1 mg 細胞	
		pH 4.5	pH 7
pH 4.5 処理	0	0	79
	1	5	88
	5	26	84
	10	45	80
	20	75	75
pH 7.0 処理	0	0	76
	1	28	82
	5	82	107
	10	82	106
	20	90	100
無 処 理	0	0	35
	1	27	48
	5	62	81
	10	69	78
	20	80	75

第 9 表 細胞上澄液による有効因子の生成

細胞抽出液	酵 素 力				無
	pH 4.5 で処理した細胞の抽出液		pH 7.0 で処理した細胞の抽出液		
	細胞 10mg 相当量	細胞 20mg 相当量	細胞 10mg 相当量	細胞 10mg 相当量	
抽出液を調整した細胞					
未 処 理	2	2	2	2	2
3 時間振盪	12	18	"	"	"
7 "	25	31	"	"	"
10 "	32	38	"	"	"
細 胞 (pH 4.5 処理)	24.5mg				} 全量 60cc
蔗 糖 1%					
磷酸緩衝液 1/4 モル					
細胞抽出液 (細胞 10mg 相当量)					
細胞抽出液 (細胞 20mg 相当量)					
水					

上記配合で 30° に 7 時間振盪後の濾液について活性度を求めた。

のについて酵母型サッカラーゼの分泌量を求めた(第 6 表)。なお対照として細胞上澄液無添加の場合について比較した。

この結果酵母型サッカラーゼの産生を支配する何等かの有効因子が細胞から外液に移行されたことが推定される。次にこの因子が酵素系であるか否かを確かめるために沸騰湯浴中 30 分間加熱したものについて効果をみると第 7 表の如くなる。

上記の実験の事実からこの有効因子は特定の酵素系であろうと推察される。そこでこの酵素系が如何なる機構で酵母型サッカラーゼの分泌を支配しているかを究明するために先ず前述の如く処理した細胞と対照の細胞(未処理)について酵母多糖類の添加量と酵母型サッカラーゼ分泌量との関係を検討した結果、この処理細胞も比較的大量の酵母多糖類を供与すれば酵母型サッカラーゼを分泌し得ることが認められた。その 1 例を示せば第 8 表の如くなる。

未処理の洗滌細胞及び pH 4.5 或いは pH 7.0 で処理した細胞をそれぞれ 1/4 モルの磷酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、蔗糖 1% 及び種々の量の酵母多糖類と共に 35° で 7 時間振盪した濾液について酵素力を測定し、菌体単量当りのサッカラーゼ分泌力を比較した。

これらの事実からこの酵素系はおそらく酵母型サッカラーゼの分泌を支配する特定の因子(多糖類区分?)の形成に関与しているのであろうと推察される。

この推論を確かめるため次のような実験を試みた。即ちこの酵素系(細胞の上澄液)を処理細胞に添加し、酵母多糖類、蔗糖及び磷酸塩と共に 30° に 3 時間、7 時間及び 10 時間振盪した後各細胞の抽出液* について、酵母型サッカラーゼ産生に対する効果をみると第 9 表の如くなる。

実験結果にみる如く 3 時間、7 時間及び 10 時間振盪した細胞の抽出液は酵母型サッカラーゼの生成を増大するが、対照の各区分はその生成を支配する効果が全く認められないことが明らかとなった。

第 2 図 有効因子生成の最適温度

第 3 図 有効因子生成の最適 pH

この事実から細胞外に移行された酵素系は酵母型サッカラーゼの産生を支配する有効区分の形成に関与するものと推察される。次にこの酵素系による有効区分形成の最適温度をしらべた。前述の配合にて 30°, 37°, 45° 及び 50° にそれぞれ振盪し、7 時間目の各区分について酵母型サッカラーゼ形成に対する効果を

* 細胞抽出液： 上記の条件で処理した細胞を洗滌後終末 2% の NaOH 約 50 倍量で 40° に 24 時間抽出し、稀 HCl で pH 7.0 としこれを水道水に対し充分透析したもの。

第 10 表 有効因子の酵素分解

多 糖 類 区 分	酵素力/7 時間後	
	pH 4.5	pH 7
<i>Vibrio</i> 菌酵素(熱破壊物)で処理したもの	14	6
<i>A₇</i> 菌酵素(熱破壊物)で処理したもの	12	6.5
<i>Vibrio</i> 菌酵素で処理したもの	6.5	13
<i>A₇</i> 菌酵素で処理したもの	5	20
無 添 加	0	5
配合: 細胞 (pH 4.5 処理) 22.5mg	全量 60cc	
蔗糖 1%		
燐酸緩衝液 1/4 モル		
多糖類区分 10mg		
(NH ₄) ₂ SO ₄ 1/20 モル		
水		

上記配合で 33° に 7 時間振盪後の濾液について酵素力を求めた。

菌^{(7)*}又は *Vibrio agarliquefaciens* n. sp. Fukumoto et Ishimatsu^(8~11) の酵素**で処理を試みた。即ち 10 時間迄に形成された有効区分をこれらの精製酵素で pH 7.0, 40° に 20 時間分解したものについて酵母型サッカラーゼ産生に対する効果をみると第 10 表の如くなる。

実験結果にみる如く細胞上澄液の酵素系により形成された有効区分の作用は、*A₇* 菌又は *Vibrio* 菌の酵素で処理すれば殆んど完全に失われる。

総 括

酵母型サッカラーゼの産生機構を追究し、蒟蒻マンナンはこのサッカラーゼの分泌を特異的に阻害すること、その分泌量は使用した細胞の生理的還境によって支配され、例えば比較的若い細胞のみこのサッカラーゼを分泌し得ること、又この菌の洗滌細胞を pH 4.5 の燐酸緩衝液で処理すれば、比較的大量の酵母多糖類の存在下に於てのみこのサッカラーゼを分泌することが認められた。この処理によって細胞からある特定の酵素系が外に移行すること、この酵素系は酵母型サッカラーゼの産生を支配する多糖類区分の生成に関与することが推定された。又この有効多糖類区分の生成には燐酸塩の存在が必須なることが認められ、その生成の最適温度、最適 pH が明らかにされた。

終りに臨み本研究を指示され終始御懇篤なる御指導を賜った当研究所化学第四課長福本寿一郎博士に厚く感謝致します。又本研究の一部に協力された平野幸夫君に謝意を表します。

本研究の一部は昭和 28 年 12 月 12 日農化関西支部例会にて講演した。

* *A₇* 菌酵素: さきに福本研究室で強力なベクチナーゼ分泌細菌として分離した *Bacillus subtilis* の group に属する菌で、その他マンナーゼ、キシラナーゼ等の種々の多糖類分解酵素を分泌する。この菌を 5% 大豆粕浸出汁、corn steep liquor 及び澱粉を含んだ培養基に 37° で 4 日間培養した後 (NH₄)₂SO₄ 0.25 飽和で沈澱する区分を除き、0.25~0.5 飽和で沈澱する区分を集めて透析後、これを 65° に 10 分間加熱してプロテアーゼを破壊したもの。なおこの酵素の如何なる区分がこの様な効果を示すかについては別報に報告する。

** *Vibrio agarliquefaciens* n. sp. Fukumoto et Ishimatsu の酵素: この菌はさきに福本研究室で分離した強力な寒天分解細菌でその他著量のマンナーゼ、キシラナーゼを生成する。この菌体の自己消化液をリパノールで処理して不純物を除いた後、(NH₄)₂SO₄ 0.3~0.7 飽和の間に沈澱する区分を集めて透析したもの。これら酵素の各種多糖類の分解力及びこの酵素による多糖類の処理条件は既報⁽¹²⁾の通りである。

(1) 根来秀夫: 科学と工業, 30, 142 (1956).

(2) 根来秀夫, 福本寿一郎: 科学と工業, 28, 292 (1954).

(3) 根来秀夫, 福本寿一郎: 科学と工業, 29, 132 (1955).

(4) 武富 昇: 工化, 43, 955 (1940); 44, 553 (1941).

(5) K. Myrback: Z. physiol. Chem., 158, 160 (1926).

(6) J. B. Sumner and D. J. O'Kane: Enzymologia, 12, 251 (1948).

比較すれば第 2 図の如くである。なお対照としてこの酵素系を熱破壊したものについて同条件にて行い比較に供した。

又次に有効区分形成の最適 pH を吟味した。即ち pH 4.5, 6.0, 7.0 及び 8.0 の燐酸緩衝液に懸濁した細胞を前と同条件にて振盪し、各細胞の抽出液について酵母型サッカラーゼ分泌に対する効果を比較すれば第 3 図の如くなる。

これらの結果より、この酵素系による有効区分形成の最適温度は 37° 附近、最適 pH は 6 附近にあることが認められた。次にこの細胞上澄液によって形成された有効区分の性状を知る一つ的手段として既報の *A₇*

(7) 里村幸男, 岡田茂孝, 福本寿一郎: 農化関西支部例会講演 (1954. 6. 19).

(8) 福本寿一郎, 石松一雄: 大阪市立工業研究所報告, 13, 1 (1951).

(9) 石松一雄, 木部崎雄三: 酵素化学シンポジウム, 4, 75 (1950).

(10) 石松一雄: 大阪市立工業研究所報告, 14 ページ (1953).

(11) 石松一雄, 木部崎雄三: 醸酵工学誌, 30, 472 (1952).

(12) 根来秀夫: 科学と工業, 29, 286 (1955).