放線菌の生産する細胞膜溶解酵素に就て(第 1 報)*

生産菌株の検索並びに溶解試験

古 屋 晃, 池田庸之助 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 34 年 7 月 28 日 受 理

緒

論

細菌の細胞膜を溶解する酵素に関しては卵白中に含まれる lysozyme を始めとして多くの研究が報告されているが^(1,2), 酵母及びカビの細胞膜を溶解する酵素に就ての報告は非常に少い。酵母の細胞膜を溶解する酵素としては J. Giaja⁽³⁾により発見されたカタツムリの消化管内に含まれる“Snail Enzyme”が最もよく知られている。この外堀越等⁽⁴⁾は *Bacillus circulans* の生産する溶解酵素が *Aspergillus*, *Penicillium* に属する菌株の細胞膜を溶解すること及び *Saccharomyces cerevisiae* に対してもかなりの溶解能を有することを報告している。

著者等はカタツムリ以外の材料より酵母の細胞膜を溶解する酵素を得る目的で微生物の検索を行い、一放線菌の生産する未知の溶解因子が酵母細胞膜を短時間で溶解することを認めたのでその結果につき報告する。

なお、本報で溶解因子と云っているものがいくつかの酵素の集合体であることに就ては、次報で触れることにする。

実 験 の 部

[I] 溶解因子生産菌株の検索法

培地: 固体培地 (Y-培地) 市販圧搾パン酵母 100g, K_2HPO_4 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g, 寒天 20g, 蒸溜水 1l, 殺菌前 pH 6.8 に調整。液体培地 (Y-G 培地) 市販圧搾パン酵母 50g, KH_2PO_4 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g, グルコース 5g, 蒸溜水 1l, 殺菌前 pH 6.5 に調整, 殺菌はいずれも 120° 5 分間の加圧殺菌を行った。

1) 第一次検索 各土壌試料 (約 5g) を 10ml の殺菌水に懸濁し, 上澄液を $10^3 \sim 10^4$ 倍に希釈, その 0.1 ~ 0.2ml を Y-培地約 15ml を含むプレート上に塗りつけ, 30° にて約 1 週間培養を行う。2 日目頃から培地表面に多数のコロニーが生育し, コロニー周辺部がやや透明となったものが若干認められるようになる。このようなコロニーに特に留意して観察, 釣菌を行い, 同一 Y-培地上で単一コロニー分離を繰り返して純粋にした。このようにして約 100 の土壌試料から放線菌及び細菌と思われる約 150 菌株を分離することが出来た。この場合 Y-培地上でコロニー周辺を透明とする菌株は, 寒天培地中に含まれる熱処理酵母細胞を溶解する酵素様物質を分泌するものと考えられる。

分離された 150 菌株中特にコロニー周辺部の溶解円が明瞭で大きな菌株放線菌 5 株, 細菌 5 株, 計 10 株を選び, Y-G 培地を用いて振盪培養を行い, 培養液の熱処理酵母細胞に対する溶解能の有無を経時的に調べたが, 活性を示す菌株は一株も認められなかった。このため前記 150 菌株の中から, 液体培養を行った場合にも熱処理酵母細胞に対して溶解能を有する菌株の選択を改めて行った。

2) 第二次検索 分離された 150 菌株を Y-G 培地 20ml を含む大型試験管に接種し 30° で振盪培養を行い, 培養液の熱処理酵母に対する溶解能を次の方法により経時的に測定した。

Y-培地 15ml 宛プレートに分注し, 37° 孵卵器中に 48 時間放置して乾燥する。このように前処理した Y-培地上に抗生物質力価検定に用いられるスチールカップを 6~7 ケ置く。各菌株培養液を 24 時間毎にサンプリングし, ピペットを用いて無菌的にカップに注入, 30° 孵卵器中に 48 時間放置してカップ周辺に溶解円が生ずるか否かを観

写真 1 カップ法による溶解能の測定

* Studies on the Cell Wall Lytic Enzymes produced by *Streptomyces* Species. Part I. The Strains and their Lytic Activity towards *Saccharomyces*.

By Akira FURUYA and Yonosuke IKEDA (The Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

第 1 表 土壤中より分離された放線菌及び細菌の示す溶解能

放 線 菌 菌株番号	溶 解 円		細 菌 菌株番号	溶 解 円	
	直径	透明度		直径	透明度
22	10mm	+	26	(10)mm	+
55	14	冊	38	(10)	+
59	17	冊	39	(10)	+
61	14	冊	44	11	+
62	17	冊	45	20	冊
64	15	冊	76	16	冊
71	19	冊	96	17	冊
73	(10)	冊	101	16	冊
			107	16	冊

溶解能は 2~3 日液体培養液をカップ法により測定した。
( ) ……溶解円の周辺部が不明瞭なもの。

の実験は上記 8 放線菌株を用いて行った。

3) 8 放線菌株培養液の示す溶解能 Y-斜面培地に保存してある各放線菌株の胞子を Y-G 培地 10 ml を含む試験管に植菌, 30° 24 時間振盪培養を行う。その 0.5 ml を 100 ml Y-G 培地を含む振盪フラスコに接種し, 30°, 120 r. p. m. 振盪機上で培養, 24 時間毎にサンプリングを行って培養液の示す溶解能を前述したカップ

第 2 表 8 放線菌株培養液の溶解能の経時的变化

菌株番号	1 日 溶 解 円		2 日 溶 解 円		3 日 溶 解 円		4 日 溶 解 円		5 日 溶 解 円	
	直 径	透 明 度	直 径	透 明 度	直 径	透 明 度	直 径	透 明 度	直 径	透 明 度
22	12mm	冊	15	冊	9mm	+	0mm	—	0mm	—
55	12	冊	14	冊	12	冊~+	7	冊~—	0	—
59	7.5	+	12	冊	10	+	10	冊	10	冊
61	12	冊	12	冊	10	冊	7	冊~—	0	—
62	10	冊~+	17	冊	18	冊	18	冊	17	冊
64	7	冊	15	冊	14	冊	7	冊~—	7	冊~—
71	11	冊	12	冊	13	冊	7	冊~—	7	冊~—
73	0	—	(7)	冊	(7)	冊	(7)	冊~—	0	—

溶解能はカップ法により測定を行った。

法により測定した。その結果を第 2 表に示す。各菌株培養液の溶解能は 2~3 日目に最も強いことがわかる。特に No. 62 菌株はかなり長期間にわたり溶解能を示すことが認められた。

この 8 放線菌株の 2 日目培養液を取り, 遠心分離により菌体を分離, ザイツ濾過器を用いて培養液を清澄とし, その 10 ml に 100° で熱処理を行った *Saccharomyces cerevisiae*-No. 6 (東大応用微研第 2 研保存) 細胞懸濁液 (懸濁液を 100° に加熱後直ちに冷却したもの, 細胞数 3.3×10^8 /ml) 1 ml を加え, 37° 水浴中でゆるく攪拌しつつ比濁度の減少をコタキ K.K. 製 5-D 型で測定した。この結果いずれの菌株培養液においても 1 及至 2 時間以内に顕著な比濁度の減少が認められ, 熱処理酵母細胞に対し溶解能を有することが明らかとなった (第 1 図参照)。

これら培養液の酵母生細胞に対する溶解能を同様な方法により測定を行ったが 2 及至 3 時間においては比濁度の減少は認められなかった。この点に関しては放線菌 No. 62 菌株培養液を用いて後に検討を行ってある。

以上の結果第一次及び第二次検索を行うことにより土壤中から熱処理酵母細胞に対しかなり強い溶解能を示す菌株を分離出来ることが明らかとなった。以後の実験は No. 62 菌

察した。熱処理酵母細胞に対し溶解能を有する菌株培養液では写真 1 に示すようにかなりはっきりした溶解円が認められる。この方法により各培養液の溶解能力の有無をかなり定量的に測定することができた。

この結果 150 菌株より放線菌 8 株, 細菌 9 株が培養液中 2 日及至 3 日目にかかなり強い溶解能活性を示すことが明らかとなった。第 1 表にこれら菌株培養液の示した溶解円の直径及び透明度を表示する。

一般に放線菌の示す溶解円は細菌のものに比べて明瞭で周辺部もはっきりしており, 直径も大きかった。また細菌の培養液は非常に粘稠となるものが多く, 後に述べる溶解活性の比濁計による測定, 培地中から溶解因子の分離等の操作のためには不便であるので以後

第 1 図 8 放線菌株の熱処理酵母細胞に対する溶解能

株を用いて行ったがこの株を選んだ理由は 1) 培養液の溶解能が他の菌株に比べて強いこと、2) 第 2 表に見られるように溶解能が培養中かなりの長期にわたり示されること、3) No. 22, No. 55, No. 61, No. 71 菌株は培養液中暗褐色の色素を生産するために比濁計による測定が正確に行いにくいこと、等のためである。

4) 溶解因子生産菌株の同定 分離された 8 放線菌株のうち代表的菌株と思われる No. 55, No. 59, No. 62 の 3 菌株の同定を協和醗酵 K. K. 東京研究所 阿部重雄、岡本福三郎両氏に依頼した。この結果 No. 55 菌株は *Streptomyces olivaceus* に属し、No. 59 菌株は *St. griseoflavus* 類似の菌株であり、また以後の実験において使用される No. 62 菌株は *St. albus* 類似の菌株であることがわかった。Waksman の分類⁽⁵⁾によると *St. albus* の気菌糸は spiral form であり conidia は球形であるが、No. 62 菌株の気菌糸は straight form であり conidia は楕円形である。しかしこれ以外の形質はいずれも *St. albus* と一致した。

[II] 放線菌 No. 62 菌株の生産する細胞膜溶解因子に就て

培養法 : No. 62 菌株の培養は I-3 項に記したと同一方法により行った。即ち Y-G 培地 100ml を含む振盪フラスコに前培養液 0.5ml を接種、30° 120 r. p. m. 振盪機上で培養を行った。

溶解試験酵母懸濁液 : *Saccharomyces cerevisiae*-No. 6 菌株を Lindegren 完全培地⁽⁶⁾ 100ml を含む振盪フラスコに接種、30° 24 時間振盪培養を行い、菌体を遠心分離により集め、蒸留水で 2 回洗滌後 0.85% 食塩水に懸濁する。懸濁液を 60° 温湯中で 30 分間加熱後直ちに冷却し、細胞数 3.3×10^8 /ml に調製した。

1) 溶解因子の活性度測定法

測定法 : No. 62 菌株の培養液より遠心分離により菌体を分離し、ザイツ濾過器を用いて清澄とした液 10ml と熱処理酵母懸濁液 1ml とを T 字型振盪管に容れ、37° の Monod 恒温槽中でゆるく攪拌しつつ反応を行わせ、比濁度の減少を光電比濁計を用いて経時的に測定した。

72 時間培養液を用い上記方法により測定した結果を第 2 図に示す。なお比濁度の測定と同時に血球計数器を用い細胞数を測定した結果を第 2 図に示してある。図に見られるように比濁度の減少とほぼ比例して細胞数が減少する事が明らかである。

比濁度減少曲線と比濁減少率曲線 : 各試料の溶解因子活性を比較するため、上記方法により測定して得られた比濁度減少曲線を比濁減少率曲線に改めて比較した。このために、反応各時間における比濁度 (d_t) から酵母懸濁液を加える前の比濁度即ち blank 値 (D_0) を引いた値 ($d_t - D_0$) と、反応開始時における比濁度 (d_0) から blank 値 (D_0) を引いた値 ($d_0 - D_0$) との比、すなわち $\frac{d_t - D_0}{d_0 - D_0} \times 100$ を比濁減少率とした。この比濁減少率曲線は反応開始時に酵母懸濁液を加えたために生じた比濁度が反応各時間に於て何パーセントまで減少したかを示す曲線である。

このような方法により溶解因子活性を測定し、比濁減少率曲線より活性度を比較することが適当であるかどうか調べるために、次に培養液を緩衝液で順次希釈した希釈液の示す比濁減少率曲線を測定した。

培養液の各希釈液の示す比濁減少率曲線 : No. 62 菌株培養液を M/20 磷酸緩衝液 pH 7.6 で順次希釈した各液の示す溶解因子活性を測定して、比濁減少率曲線を求めた。その結果を第 3 図にかかげる。加えた培養液の量即ち溶解因子の濃度に比例した比濁減少率曲線が得られたことからこのような測定法及び表示法が適当であると考えた。

溶解因子活性単位 : 溶解因子の活性度を数値的に示す便宜的方法として溶解因子活性単位を次の如く定めた。すなわち、第 3 図に示した如く、比濁減少率曲線上に比濁度の減少が始まってから 30~40 分間に於ける曲線のはほぼ平均の勾配を示す直線を引き、その直線が 10 分間に示す減少率の値を使用した試料溶液の ml 数で割

第 2 図 No. 62 菌株培養液による熱処理酵母細胞の溶解

——比濁計による測定
 .....血球計測器による細胞数
 ---比濁減少率

第 3 図 No. 62 菌株培養液の各希釈液の示す溶解能

	培養液	磷酸緩衝液	M/20. pH 7.6	
D-1	+	10ml	0ml	C-1.....D-1 に於ける細胞数減少率
D-2		8"	2"	
D-3		6"	4"	C-3.....D-3 " "
D-4		4"	6"	

の溶解 酵母懸濁液を各条件で熱処理を行い溶解因子による溶解速度の変化を比濁法により測定した。熱処理は酵母生細胞懸濁液を 120° (加圧殺菌), 100° (100° 迄加熱後直ちに冷却), 100°, 10 分 (100° 迄加熱 10 分間 100° に保った後直ちに冷却), 60° 60 分 (60° 水浴中で 60 分間加熱後直ちに冷却), 60° 30 分の各条件で行った。加熱後細胞数 $3.3 \times 10^8/\text{ml}$ に調整した。第 5 図はその結果を示す。熱処理の条件が強いほど酵母細胞は溶解されやすくなることが明らかになった。

溶解因子生産菌株の検索において、分離された 8 放線菌株培養液が熱処理酵母に対してはかなり強い溶解能を示すが酵母生細胞に対しては溶解能が認められなかったことを述べたが、第 5 図の結果からみても酵母生細胞は熱処理細胞に比べてかなり溶解されにくいことがわかる。即ち 100° 10 分間熱処理を行った細胞

第 4 図 No. 62 菌株培養液中の溶解因子活性変化

第 5 図 各条件により熱処理を行った酵母の溶解

り、得られる値を試料溶液 1ml の示す溶解因子活性度と定めた。

この方法により第 3 図の D-1, D-2, D-3, D-4 の各曲線より使用した培養液の溶解因子活性度を算出すると、D-1=1.5, D-2=1.5, D-3=1.3, D-4=0.9 単位となる。使用する試料溶液の溶解活性が低い場合には値が小さく出るが、D-1, D-2, D-3 の範囲ではかなり一致した値が得られる。従って D-1~D-3 の範囲内ではこのようにして活性度が比較出来ると考えた。

2) 溶解因子の培養液中に於ける消長

No. 62 菌株の Y-G 振盪培養液中に於ける溶解活性を経時的に比濁法により測定した。測定の際各培養液の pH は 7.6 に調節した(第 4 図参照)。この結果振盪培養 3 日目のものが最も強い活性を示すことが明らかとなった。

3) 各条件で熱処理を行った酵母細胞

第 6 図 培養液中より溶解因子の分離

溶解され難く、また培養液の溶解因子活性も生細胞を溶解するほど充分強くないためと考えられる。この点を明らかにするため、培養液中から溶解因子の分離・濃縮を行った。

4) 培養液中より溶解因子の分離 No. 62 菌株 Y-G 振盪培養液から溶解因子の分離を第 6 図に示す方法に従って行った。即ち硫安分割 (70% 飽和) による沈澱部をフィルターセルを用い集め、M/20 磷酸緩衝液 pH 7.6 に溶解し、磷酸カルシウム沈澱により色素を除去、透析等の方法により溶解因子を分離・濃縮した。この過程における B、E-1、E-2 の溶解因子活性は夫々 1.4、11、80 単位/ml であった。従って溶解因子は約 60 倍の濃度に濃縮されたことになる。今後の実験においては主として E-1 区分を用いて実験を行っている。

第 7 図 溶解因子による酵母生菌体の溶解
—— 比濁度 ---- 細胞数

これら菌株培養液の示す溶解能をカップ法で測定することにより、振盪培養で溶解因子を作る菌、放線菌 8 株、細菌 9 株を選択した。

(2) 分離した放線菌 8 株の培養液がいずれも熱処理酵母細胞に対しかなり強い溶解能を示すことを比濁法ならびに顕微鏡下の観察により明らかにした。

は 60°, 30 分間処理の細胞に比べて略 2 倍以上の速度で溶解されること、また、第 3 図より溶解因子の量が二分の一になると比濁度の減少が著しく鈍ることなどから、酵母生細胞を用いた場合比濁度の減少が認められなかったのは、溶解因子が生細胞に対し全く溶解能を持たないためではなく、生細胞が熱処理細胞に比べて

5) 酵母生細胞の E-1 区分による溶解 上記方法に従って分離濃縮された溶解因子含有液 (溶解因子活性度 12 単位/ml, E-1 区分) を用いて酵母生細胞の溶解を試みた。Sacc. cerevisiae No. 6 株を用い II 項の初めに記したと同一条件で培養し洗滌後 M/20 磷酸緩衝液中に細胞数 3.3×10^8 /ml になるよう懸濁、その 1 ml, 因子含有液 4 ml, M/20 磷酸緩衝液 6 ml を加え 37° の Monod 式恒温槽中でゆるく攪拌しつつ、比濁度の減少及び細胞数の減少を測定した。その結果第 7 図に示すように酵母生細胞も No. 62 菌株の生産する溶解因子により容易に溶解されることが明らかとなった。

要 約

(1) 酵母細胞膜溶解酵素生産菌株を求める目的で、まず熱処理酵母細胞を含む寒天培地上でコロニー周辺に溶解円を示す菌 150 株を土壤中から分離し、つぎに

(3) 放線菌 No. 62 菌株の生産する溶解因子が酵素であるとの推定のもとに活性度の測定法を定め、溶解因子の分離濃縮を試みた。また活性度の高い濃縮液を用いれば酵母生細胞が溶解されることを明らかにした。

終りに臨み放線菌の同定をしていただいた協和醸酵 KK 東京研究所阿部重雄、岡本福三郎の両氏に感謝の意を表します。(本報は昭和 34 年 6 月 27 日、日本農芸化学会第 193 回関東支部講演会に於て報告した)

(1) M. R. J. Salton : <i>Bact. Rev.</i> , 21, 82 (1957).	(5) S. A. Waksman, H. A. Lechevalier : "Actinomycetes and their antibiotics", Williams and Wilkins Company (1953).
(2) M. Welsch : <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 18, 491 (1958).	(6) C. C. Lindegren : "The Yeast Cell, Its Genetics and Cytology", Educational Publishers, Incorporated, Saint Louis, pp 10-3 (1949).
(3) J. Giaja : <i>C. R. Soc. Biol. Paris</i> , 86, 708 (1922).	
(4) K. Horikoshi, K. Sakaguchi : <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 4, 1 (1958).	

放線菌の生産する細胞膜溶解酵素に就て (第 2 報)*

—放線菌 No. 62 菌株の生産する溶解酵素に就て—

古 屋 晃, 池田庸之助 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 34 年 7 月 28 日 受 理

緒 論

前報⁽¹⁾に於て、土壌中から分離された放線菌 No. 62 菌株の生産する未知因子が *Saccharomyces cerevisiae*-No. 6 株の生細胞及び熱処理細胞を短時間に溶解することを明らかにし、溶解に関係する因子を溶解因子と名付けたが、もともと本因子は熱処理酵母細胞を溶かす点に特長があり、また本報で論ずる如く酵素としての特性をいくつかもっているの以下細胞膜溶解酵素として扱うことにする。なお微生物の代謝物でこのカテゴリーに入る溶解酵素はいくつか知られている⁽²⁾。

実 験 方 法

酵素液調製法 : No. 62 菌株の培養は前報 I-3 に記したと同一培地及び方法により行った。酵素液 (因子液) 調製法も前報 II-4 の方法に従い、硫酸分割 (70% 飽和) 一回及び M/20 磷酸緩衝液 pH 7.6 に対し 48 時間透析を行ったものを用いた。

試験酵母 : *Saccharomyces cerevisiae*-No. 6 株を前報 II と同一方法により培養、60° で 30 分間熱処理を行い、細胞数を 3.3×10^8 /ml に調整した懸濁液を用いた。

溶解酵素活性測定法 : 前報 II-1 と同一方法により熱処理酵母細胞懸濁液の比濁度の減少を光電比濁計により測定、比濁減少率曲線により図示した。酵素単位は前報と同一規定により算出した。

実 験 の 部

1) 最適 pH 酵素液を更に蒸留水に対し 24 時間透析を行ったもの 1.5 ml を各 pH の M/20 磷酸緩衝液 (pH 6.4, 7.0, 7.2, 7.6, 8.0) 8.5 ml 中に加え更に酵母懸濁液 1 ml (60°, 30 分処理) を加えて測定した。この結果第 1 図及び第 2 図に示すように、溶解酵素の最適 pH は 7.6 であることが明らかとなった。同様の実験を M/20 Tris 緩衝液を用い行い、同じ様な結果が得られたが、Tris 緩衝液では各 pH での溶解酵素活性が磷酸緩衝液の場合より若干低い値を示した。

2) 熱に対する安定性 酵素液 2 ml を M/20 磷酸緩衝液 pH 7.6, 8 ml 中に加え、60° 水浴中で 5 分、15 分、30 分加熱後直ちに冷却し溶解酵素活性を測定した。第 3 図にその結果を示す。60°, 5 分の加熱でかなり活性が失われ、60°, 30 分では溶解が認められなかった (但し 100 分以内)。このことからこの酵素は熱に対し不安定であることがわかる。

* Studies on the Cell Wall Lytic Enzymes produced by *Streptomyces* Species. Part II. The Lytic Enzymes of *Streptomyces* No. 62 Strain.

By Akira FURUYA and Yonosuke IKEDA (The Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)