終りに臨み本研究の発表を許可された加藤弁三郎社長及び幹部各位又終始御指導を戴いた木下研究所長に感謝の意を表します。

(本報告の要旨は昭和34年9月26日, 日本農芸化学会関東支部第195回講演会で講演した。)

(1) A. Fleming : <i>Proc. Roy. Soc.</i> , B 93, 306 (1922).	(4) K. Horikoshi, S. Iida : <i>Nature</i> , 183, 186 (1959).
(2) K. Horikoshi, K. Sakaguchi : <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 4, 1 (1958).	(5) 古屋 晃, 池田庸之助 : 本誌, 34, 38(1960).
(3) K. Horikoshi, S. Iida : <i>Nature</i> , 181, 917 (1958).	(6) R. S. Breed et al. : <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> 7th ed. (1957).

Brevibacterium の生産する溶菌酵素に関する研究 (第2報)*

溶菌酵素の性質

高山健一郎, 宇田川清, 阿部重雄 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和35年2月2日受理

緒 言

第1報⁽¹⁾に述べた如く *Brevibacterium lyticum* sp. nov. をかび菌体を含む肉汁培養基で培養した際, 培養液中のかび菌体を溶解し, 且つ培養濾液中に溶菌性物質を分泌集積する事実を認めた。微生物の生産する溶菌酵素に関する報告は細菌に対するものが殆んどであり, 何れもリゾチム類似の作用機能を有するものである。かび細胞膜を溶解する酵素に関する報告は堀越等^(2~4)及び古屋等⁽⁵⁾のみであるが, これら酵素試料は入手できず比較検討が不可能であった。本報に於いては *Brevibacterium lyticum* の生産する溶菌性物質の諸特性に就いて報告する。

実 験 の 部

〔I〕溶菌性物質試料の調製 *Asp. oryzae* の培養菌体 1% を含有する肉汁培養基に本菌を接種し, 30°, 24 時間振盪培養して得られた培養液を遠心し菌体を除去, 上清を 70% 硫酸飽和とする。塩析物を M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し, 同緩衝液にて一夜透析, 再び 50% 硫酸飽和として得られる沈澱を冷凍乾燥して粗試料とする。

〔II〕溶菌性物質の一般的性質

(i) 最適 pH と最適温度 :

上記粗試料による cell wall 溶解能を, 反応温度 30° に於ける各種 pH 及び反応 pH 7.2 に於ける各種温度に就いて試験した結果は第1図及び第2図の通りである。結果から本試料の最適 pH は 7.0~7.5 付近にあり, 30° 付近に至適温度が観察される。

(ii) 熱に対する安定性 :

溶菌性物質試料液を各温度にて処理した後, cell wall と反応

第1図 (30°) 反応 pH と O.D. 減少率の関係
..... D₁₂₀ — D₀₀

第2図 pH 7.2, 反応温度と O.D. 減少率の関係
..... D₁₂₀ — D₀₀

* Studies on the Lytic Enzyme produced by *Brevibacterium*. Part II. Properties of the Lytic Enzyme.

By Ken'ichiro TAKAYAMA, Kiyoshi UDAGAWA and Shigeo ABÉ (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd.)

第 3 図 熱に対する安定性

第 4 図 各種酵素の影響

	Cell wall	Intact cell	Boiled cell
細菌アミラーゼ	1	1	1
細菌プロテアーゼ	2	2	2
リゾチム	2	2	2
放線菌プロテアーゼ	2	3	4
フィチン	2	3	4
溶菌酵素	5	6	6
無酵素対照	1	1	1

第 1 表 他の微生物に対する溶解能

菌 株	生菌体	熱処理菌体	菌 株	生菌体	熱処理菌体
<i>Asp. oryzae</i> A-72	++	++	<i>Streptomyces olivaceus</i>	+	++
<i>Asp. oryzae</i> A-124	++	++	<i>St. phaeochromogenes</i>	++	++
<i>Asp. parasiticus</i>	++	++	<i>Sacch. cereviceae</i>	±	++
<i>Asp. flavus</i>	±	+	<i>Torula utilis</i>	—	++
<i>Asp. sojae</i>	++	++	<i>Hansenula anomala</i>	+	++
<i>Asp. niger</i>	++	++	<i>Bacillus cereus</i>	+	+
<i>Pen. purpurogenum</i>	++	++	<i>Bacillus circulans</i>	—	—
<i>Pen. chrysogenum</i>	++	++	<i>Micrococcus roseus</i>	—	+
<i>Rhi. javanicus</i>	±	+	<i>M. lysodeikticus</i>	—	—
<i>Rhi. chungkuoensis</i>	—	±	<i>Sarcina lutea</i>	—	+
<i>Muc. alternus</i>	++	++	<i>E. coli</i>	—	—
<i>Muc. javanicus</i>	+	++	<i>Aerobacter aerogenes</i>	—	—

させたときの optical density (以下 O.D.) の減少曲線は第 3 図の通りである。即ち 60°, 5 分処理にて略々完全に失活し、又 25~30° にて数時間の放置で活性が極めて損失されることから、本試料は熱に極めて不安定であると見做される。

以上の如く、本溶菌性物質は硫酸にて塩析され非透析性であり、その溶菌活性が比較的熱に対して不安定であるなどの諸点から酵素と考えられるので、以下本物質を酵素として取り扱うことにした。

〔III〕 他の微生物細胞に対する作用能 24~48 時間各種培地にて振盪培養により得た各微生物を十分水洗し、生細胞或いは 100°, 10 分加熱処理した細胞に就いて、粗酵素の作用を O.D. の減少と顕微鏡観察の両者から検討した。その結果は第 1 表に示す通りである。即ち *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Streptomyces* の大部分並びに熱処理した酵母に対しては溶菌作用を示すが、かびの中で *Rhizopus* にはその作用を示さない。細菌に対しては各菌種間に差異が認められるが、一般的には作用しない。

〔IV〕 麹菌細胞膜に対する各種酵素の作用 細菌アミラーゼ、細菌プロテアーゼ、放線菌プロテアーゼ、フィチン、リゾチムによる麹菌の cell wall, intact cell 及び 100°, 10 分加熱処理細胞の溶解作用に就いては第 4 図の通りである。

第 5 図 溶菌に伴う細胞膜成分の溶出

●—● O.D. ○—○ ヘキソーズ ▲—▲ アミノ酸
 菌体量 2 mg/ml O.D. は 2 倍に希釈して測定
 ヘキソーズ: グルコースとして アミノ酸: グルタミン酸として
 ヘキソサミン: グルコサミンとして

4 図の通りである。

放線菌プロテアーゼ、フィチンが intact cell, 熱処理菌体の場合に若干の O.D. の減少が認められるが、他の酵素では溶解現象は認められない。これら酵素の 2 或いはそれ以上の組み合わせに於いても細胞に対する影響は認められなかった。Cell wall の場合は本酵素以外の酵素では全く溶解が認められず、又本酵素に就いても intact cell に比較して O.D. の減少は小さい。

〔V〕 溶菌に伴う細胞膜成分の溶出 かびの細胞膜は一般に蛋白質, 多糖類及びキチン質から成ると考えられている⁽²⁾。従ってそれらの構成成分であるアミノ酸, ヘキソーズ, ヘキソサミンの溶出を試験した。アミノ酸は Yemm-Cocking 法⁽⁶⁾, ヘキソーズは Anthrone 法⁽⁷⁾, ヘキソサミンは Elson-Morgan 法⁽⁸⁾によった。第 5 図は cell wall と intact cell を作用基質とした場合である。

Intact cell からアミノ酸の溶出が観察されるが, 放線菌プロテアーゼ処理の cell wall からはその溶出が殆んど観察されないことから, cell wall には蛋白組成が大体除去されていることが明らかで, 更に本酵素試料中にはプロテアーゼ作用能を有することが推察される。このことは第 4 図に於いて cell wall よりも intact cell に於いて溶解性がやや高いことから肯定される。

考 察

第 1 報⁽¹⁾に於いて示した如く, 本酵素はかび菌体の存在に於いて適応的に生産される。従ってかび菌体を含む培基にて本菌を培養しその培養液から粗酵素を分離することができた。

本酵素試料は一般に諸種のかび菌体に対して溶菌作用を示すが, 就中 *Rhizopus* 属菌体に対して溶菌し難いことは堀越等⁽²⁾の報告と一致し, 該菌が他のかび菌種とその細胞膜構成上相違しているためと考えられる。更にリゾチウムに敏感な *Micrococcus lysodeikticus* が本酵素試料により全く溶解されない事実は, 本酵素が明らかにリゾチウムと異なることを指摘するものとする。

堀越等⁽²⁾によれば, かびの細胞膜は蛋白質, 多糖類及びキチン質から成るといわれる。放線菌プロテアーゼで処理した Cell Wall からはアミノ酸の溶出は認められないが, 非処理の細胞からはアミノ酸が遊離されることから, 本酵素試料中には蛋白分解酵素の存在が考えられる。糖類に就いてはペーパークロマトグラフィーによりグルコースの溶出が顕著に認められたが, 他は少量のため同定することはできなかった。グルコースを主体とするヘキソーズが主要構成成分であると推察される。又キチン質に就いては培養に際してかび菌体の代りにキチンを添加した培基に於いても溶菌酵素が生成されるという事実, 酵素反応液中にヘキソサミンの存在を認め, 且つペーパークロマトグラフィーによりグルコサミンが殆んどであることを確認したが, アミノ酸, ヘキソーズに比較して溶出量が少く又酵素反応に於いて約 30% の菌体が残存することから, キチン質分解系作用団が微弱かと推測される。

以上の如く, 本酵素試料による細胞膜溶解現象は, 蛋白分解能, 糖分解能及びキチン分解能の酵素活性から成ると見られる。

要 約

Brevibacterium lyticum sp. nov. の生産する溶菌性物質の諸特性の検討を行い次の事実を明らかにした。

本溶菌性物質は酵素と見做され, 50~70% 硫酸飽和により塩析され, 非透析性である。最適 pH 7.0~7.5, 最適温度 30° にあり, 温度に極めて不安定で 60°, 5 分処理で失活する。

Rhizopus 属を除きかび, 放線菌及び熱処理した酵母細胞を極めてよく溶解するが, 細菌に対しては殆んど溶解能を示さない。

かび細胞膜はプロテアーゼ, アミラーゼ, リゾチウム等の酵素によっては溶解されないが, 本酵素試料によりアミノ酸, ヘキソーズ, ヘキソサミンの溶出を伴い溶解される。

終りに臨み本研究の発表を許可された加藤弁三郎社長及び幹部各位, 又終始御指導を戴いた木下研究所長に感謝の意を表します。

(本報告の要旨は昭和 34 年 9 月 26 日, 日本農芸化学会関東支部第 195 回講演会で講演した。)

(1) 高山健一郎, 宇田川清, 阿部重雄: 本誌, 34, 652 (1960).	(5) 古屋 晃, 池田庸之助: 本誌, 34, 38 (1960).
(2) K. Horikoshi, K. Sakaguchi: <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 4, 1 (1958).	(6) E. W. Yemm, E. C. Cocking: <i>Analyst</i> , 80, 209 (1955).
(3) K. Horikoshi, S. Iida: <i>Nature</i> , 181, 917 (1958).	(7) C. W. Chung, W. J. Nickerson: <i>J. Biol. Chem.</i> , 208, 395 (1954).
(4) K. Horikoshi, S. Iida: <i>Nature</i> , 183, 186 (1959).	(8) R. Belcher et al.: <i>Analyst</i> , 79, 201 (1954).