〔農化 第 37 卷, 第 5 号, p. 268~271, 1963〕

微生物に対する表面活性剤の作用 (第3報)*

酵母からの cytochrome c 及び alcohol dehydrogenase の抽出

大 林 晃 (鹿児島大学農学部)

昭和 37 年 11 月 15 日 受 理

緒 言

酵母の cytochrome c (cyt-c) の抽出法として酢酸エチル処理酵母から 10% 硫安溶液にて抽出する方法が奥貫等⁽¹⁾により提出されている。しかし、この方法では以後樹脂吸着にて cyt-c を精製する際、まず硫安を除去する必要がある。また alcohol dehydrogenase (ADHase) は一般に乾燥菌体を自己消化させて抽出されているが、これも酵母を乾燥させる必要があるとともに、乾燥操作中の酵素の失活も当然考えられる。

酵母の intact cell 懸濁液に表面活性剤を添加すると、これらの酵素が抽出されるのを認めたので、cyt-c 含量の高い *Candida krusei* を用いて表面活性剤による cyt-c 及び ADHase の抽出法について検討し、さらに市販のパン酵母にてこの抽出法の普遍性を調べた。

実 験 方 法

***Candida krusei* の intact cell :** グルコース 10%, 尿素 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, KCl 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001% を含む培地 (pH 5.8) 60 ml を 300 ml の三角フラスコに分注し、殺菌後接種、30° にて 52 時間振盪培養し、遠心分離にて菌体を集め、蒸留水にて 3 回水洗して intact cell を得た。この条件では 60 ml の培養にて乾燥量として約 500 mg の菌体を得られる。また、本菌は培養液の pH が 4.0 以下になると cyt-c の含量が低下するようであるので、培養中の pH を 4.0 以上に保つため培地に 1% もの多量の尿素を添加した。

パン酵母 : 市販の圧搾パン酵母(大日本精糖製)を約 10 倍量の蒸留水で洗滌、遠心分離した菌体を使用した。

表面活性剤による抽出 : Intact cell を M/20 磷酸緩衝液 (pH 5.5 または 8.3) に懸濁し、これに表面活性剤 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) を乾燥量 1 mg に対し 60 r 相当量を添加し全容を 5 ml として、一定温度に放置後遠心分離にて菌体を除き透明な抽出液を得た。

その他の抽出法 : Intact cell を速かに凍結乾燥した乾燥菌体を同じく磷酸緩衝液に懸濁して抽出した。cyt-c は奥貫等の方法⁽¹⁾にて酢酸エチル処理菌体から 10% の硫安溶液 (pH 8.3) にて抽出して比較した。

Cyt-c の定量 : 抽出液は第 1 図の如き吸収スペクトルを示すので、抽出液に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を添加し、吸収極大の 548 m μ と極小の 534 m μ の吸光度の差から計算にて cyt-c を求め、抽出操作液の菌体濃度 100 mg dry cell/ml の場合の抽出液 1 ml 中に含まれる cyt-c 量に換算して表わした。ただし、cyt-c の分子量として馬の心筋のものから得られた 12,000⁽²⁾ を用い、548 m μ , 534 m μ の吸光係数をそれぞれ Paul⁽³⁾ による

第 1 図 抽出液の吸収スペクトル
抽出操作: *C. krusei* 88 mg dry cell/ml
CTAB 60 γ /mg cell
pH 8.3, 33°, 1 時間抽出
点線は $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 添加

* Actions of Surface Active Agents upon Microorganisms. Part III. Extraction of Cytochrome c and Alcohol Dehydrogenase from Yeasts.

By Akira ÔBAYASHI (Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

550 m μ , 536 m μ の吸光係数 2.77×10^7 cm²/mole, 0.77×10^7 cm²/mole を適用した。

ADHase の測定: Racker の方法⁽⁴⁾に従って DPN を還元する速度を 340 m μ における吸光度の増加にて求めて測定し, cyt-c と同じく, 抽出操作液の菌体濃度が 100 mg dry cell/ml の場合の抽出液 1 ml 中の unit に換算して表わした。

蛋白質の測定: ビューレット反応による Robinson 等の方法⁽⁵⁾に従って測定し, cyt-c と同様に抽出量を表した。

実験結果及び考察

I. *Candida krusei* からの cyt-c 及び ADHase の抽出 *C. krusei* の intact cell 及び凍結乾燥菌体を用い, cyt-c, ADHase の抽出における温度, pH の影響を調べた結果は第 1 表に示される。CTAB 処理により cyt-c は 4°, 33° のいずれの温度にても抽出されるが, 4° では 33° における 1/3 量が抽出されるに過ぎない。一方, ADHase は 4° ではほとんど抽出されないが, pH 8.3, 33° での CTAB 処理では凍結乾燥菌体を 33° に保ち, 自己消化させたときに比べ遙かに効果的である。もちろん, この場合凍結乾燥菌体の自己消化との比較であって, ふつう行われている風乾してかなり自己消化した乾燥菌体を用いる ADHase の抽出法との比較でないのはいうまでもない。

第 1 表 *Candida krusei* からの cytochrome c 及び alcohol dehydrogenase の抽出 (1)

細胞	抽出操作*	initial		抽出液	
		表面活性剤 60 γ /mg dry cell	pH 温度	cytochrome c (100 mg dry cell/ml) γ /ml	alcohol dehydrogenase (100 mg dry cell/ml) unit/ml
intact cell	CTAB		5.5 33°	117.8	13,700
"	"		8.3 "	114.6	24,000
"	"		5.5 4°	36.4	200
"	"		8.3 "	46.0	400
凍結乾燥菌	—		5.5 33°	0	2,600
"	CTAB		" "	67.5	—
"	—		8.3 "	0	9,900
"	CTAB		" "	76.0	—

* 90 分抽出, 抽出時の菌体濃度 56 mg dry cell/ml

第 2 表 *Candida krusei* からの cytochrome c 及び alcohol dehydrogenase の抽出 (2)

抽出操作 ^{a)}			抽出液 (菌体濃度 100 mg dry cell/ml に換算)		
細胞	温度	時間 hr	cyto- chrome c γ /ml	alcohol dehydrogenase unit/ml	蛋白質 mg/ml
intact cell	33°	1	85.0	10,400	2.96
"	"	2	95.0	27,400	7.50
"	"	3	110.8	36,800	9.90
"	"	2 ^{b)}	109.2	38,700	10.62
"	4°	1	26.7	—	—
"	"	2	55.0	—	—
"	"	3	73.3	—	—
"	"	5	98.3	1,300	0.45
"	磨細抽出	—	—	44,800	22.67
酢酸エチル 処理菌体	4°	15 ^{c)}	100.0	—	2.00
"	"	" ^{d)}	33.3	—	1.12

a) pH 8.3, CTAB 60 γ /mg dry cell 添加, 72 mg dry cell/ml.

b) 抽出操作液に 10% 硫酸を添加。

c) 奥貫等の方法に従って酢酸エチル処理し, 洗滌した菌体を pH 8.3 の 10% 硫酸液にて抽出する (奥貫法)。

d) 酢酸エチル処理菌体から常法の如く CTAB にて抽出する。

また, cyt-c, ADHase はともに pH 5.5 に比べ pH 8.3 において抽出され易いのを認めたので, 次に pH 8.3 にて 33° 及び 4° における CTAB 処理による cyt-c, ADHase の抽出と時間の関係を調べ, 比較のため cyt-c は奥貫等の方法により抽出し, ADHase は intact cell を乳鉢中にて石英砂とともに磨砕してから M/20-磷酸緩衝液 (pH 8.3) にて 33°, 1 時間抽出した (第 2 表)。

cyt-c は 33° に 2~3 時間, 4° には 5 時間 CTAB 処理すると, 奥貫法によるのとほとんど同量が抽出される。ADHase は 33°, 3 時間処理にて磨砕抽出の約 80% が抽出されたが, 4° では 5 時間後にもほとんど抽出されず, 菌体の自己消化がともなわなければ抽出されないと考えられる。また, CTAB 処理による cyt-c, ADHase の抽出は 10% 硫酸の添加により促進される。

以上の実験において ADHase は CTAB がなくても菌体が自己消化すると抽出されるに対し, cyt-c は CTAB の添加なしには全く抽出されず, CTAB の cyt-c 抽出作用は単に細胞の透過性に変化を与えたり, 自己消化の促進作用等だけでは説明されないようである。

高濃度の塩類溶液にて酵母 cyt-c が抽出される理由として, 萩原⁽⁶⁾は酵母の cyt-c

が細胞構造物と強く結合しており、高濃度の塩類の存在でこの結合が切れるためと考えている。従って CTAB 処理にて cyt-c が抽出されるのも CTAB が細胞構造と cyt-c との結合を切る働きがあるためと考えるべきであろうがその機構は明らかでない。Reich 等⁽⁷⁾及び Das 等⁽⁸⁾は cyt-c が phospholipid と容易に結合することを、Gilby 等⁽⁹⁾は CTAB が菌体の phospholipid と結合することを報告しているが、このような事実、すなわち cyt-c と CTAB が同じく phospholipid に結合する性質のあることが CTAB による cyt-c 抽出の機構に関係しているのではないかと考えられる。また、酢酸エチル処理菌体や乾燥菌体の CTAB 処理では intact-cell そのままを CTAB 処理するより cyt-c が抽出され難い事実は CTAB による cyt-c 抽出の機構や cyt-c の細胞内での存在様式を検討する手掛りになるかも知れない。

なお、根来等^(10,11)が酵母 saccharase の抽出に陽イオン表面活性剤を添加すると酵母の自己消化が促進され、酵素がより速かに抽出されるのを認めていることから考え、*C. krusei* の CTAB 処理にて ADHase とともに他の酵素も同時に抽出されると思われる、事実、33° における 3 時間の CTAB 処理抽出液は強い catalase 作用を示した。

II. パン酵母からの cyt-c, ADHase の抽出

第 3 表 パン酵母からの抽出

抽出操作 ^{a)}				抽出液 (菌体濃度 100 mg dry cell/ml に換算)		
細胞	pH	温度	時間 hr	cytochrome c r/ml	alcohol dehydrogenase unit/ml	蛋白質 mg/ml
intact cell	8.3	33°	2	14.7	3,300	0.82
"	"	"	4	29.0	11,200	1.44
"	"	"	2 ^{b)}	31.5	7,500	3.76
"	"	"	4 ^{b)}	36.0	21,600	8.75
"	"	4°	5	16.5	—	—
"	"	"	15	33.5	1,200	0.82
"	5.5	33°	4	16.5	4,000	1.18
"	"	4°	15	14.0	600	—
酢酸エチル 処理菌体	8.3	"	" ^{c)}	33.5	—	0.48
"	"	"	" ^{d)}	5.5	—	0.43

a) CTAB 60 γ/mg dry cell 添加, 120 mg dry cell/ml.

b), c), d) はそれぞれ第 2 表と同じ。

多少抽出に時間を要し、また cyt-c の抽出も pH 5.5 においてはかなり劣る以外は *C. krusei* の場合と同じ結果が得られ (第 3 表), CTAB による cyt-c, ADHase の抽出は酵母に普遍的に適用し得ると思われる。

III. パン酵母からの cyt-c

の調製 圧搾パン酵母 450 g を 7 g の CTAB を溶解した 500 ml の蒸留水に懸濁し、1 N-NaOH にて pH を 8.3 とし、4° にて 20 時間放置後、遠心分離にて菌体を除き、31.8 r/ml の cyt-c を

第 2 図 精製 cytochrome c の吸収スペクトル

---:還元型 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ による)
—:酸化型 (赤血塩による)

第 3 図 *Candida krusei* からの各種物質の分別抽出操作

第4表 *Candida krusei* からの分別抽出液中の各物質含量抽出液中の含量
(菌体濃度 100 mg dry cell/ml に換算)

抽出液	A	DPN	cytochrome c	alcohol dehydrogenase	蛋白質
		r/ml	r/ml	unit/ml	mg/ml
	A	231	6.2	—	0.25
"	B	—	92.4	900	0.32
"	C	—	9.4	37,900	11.55
対照の { pH 8.3, 4°, 4時間	—	—	103.4	1,000	0.48
抽出* { pH 8.3, 33°, 2時間	—	—	107.6	38,000	12.41

* 比較のために同じ intact cell を用いて, 別に普通の方法にて CTAB による抽出を行った。

にて pH 7.0 に調節した 5% 硫酸にて溶出し, 溶出液を蒸留水に対し 1 夜透析, 再び同様に樹脂吸着, 溶離, 透析を行って cyt-c 液 35 ml を得た. この液は 368 r/ml の cyt-c を含み (始めの抽出液からの収率 64.2%), 第2図のようなスペクトルを示した.

IV. CTAB による DPN, cyt-c 及び ADHase の分別抽出法 前報⁽¹²⁾にて diphosphopyridine nucleotide (DPN) の抽出について述べたが, CTAB による *C. krusei* からの DPN, cyt-c, ADHase の抽出条件をまとめると, DPN は pH 3.5 で 4° にて 60 分以内, cyt-c は pH 8.3, 4° にて 4~5 時間で, ADHase は pH 8.3, 33° にて 2~3 時間にてそれぞれ充分抽出し得るのであり, この条件を組合わせ第3図の如く *C. krusei* から分別抽出した各区分の DPN, cyt-c 及び ADHase の含量は第4表のとおりであり, このような操作にて各物質の分別抽出の可能性が認められる. ただし, この場合 CTAB を始めに添加して DPN を抽出した後, 菌体を磷酸緩衝液に懸濁しただけで cyt-c や ADHase が抽出されるのは奇異に思われるが, CTAB は容易に菌体と結合する^(13,14)ので DPN の抽出の際にすでに CTAB は菌体と結合して次の cyt-c や ADHase の抽出に役立つと考えられる.

さらに, この分別抽出にて最後の ADHase 抽出後も菌体中の核酸は蛋白質と結合した核蛋白として残存しているようであって, ADHase 抽出後菌体よりの核酸の抽出も可能と考えられるが, これについては別に報告する.

要 約

Candida krusei 及びパン酵母の懸濁液に表面活性剤 CTAB を作用させると cytochrome c 及び alcohol dehydrogenase が抽出される. cytochrome c は pH 8.3 にて CTAB 処理すると 4°, 33° のいずれの温度にても抽出され, *C. krusei* では 4° にて 5 時間, 33° では 3 時間でほとんどの cytochrome c が抽出された. alcohol dehydrogenase の抽出は 4° ではほとんど起らず, 33° にて処理する必要があるが, *C. krusei* を pH 8.3, 33° にて 3 時間 CTAB 処理すると菌体を磨砕して抽出される量の 80% の alcohol dehydrogenase が抽出された.

C. krusei を順次 pH 3.5, 4°, 30 分; pH 8.3, 4°, 4 時間; pH 8.3, 33°, 2 時間 CTAB 処理することにより, それぞれ DPN, cytochrome c, alcohol dehydrogenase をほぼ別々に抽出することができ, これらの物質の分別抽出の可能性が認められた.

本実験に対し御指導いただいた東京大学北原覚雄教授, 本学蟹江松雄教授及び実験に援助いただいた本学学生小林武一君に深謝します.

- (1) B. Hagihara, T. Horio, J. Yamashita, M. Nozaki, K. Okunuki: *Nature*, **178**, 629 (1956).
- (2) D. Margoliash: *Biochem. J.*, **56**, 535 (1954).
- (3) K. G. Paul: "Methods in Enzymology", 2, ed. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, 1955, p. 749.
- (4) E. Racker: *J. Biol. Chem.*, **184**, 313 (1950).
- (5) H. W. Robinson, C. G. Hogden: *ibid.*, **135**, 727 (1940).
- (6) 萩原文二: 蛋白質 核酸 酵素, **2**, 53 (1957).
- (7) M. Reich, W. W. Wainio: *J. Biol. Chem.*, **236**, 3058 (1961).
- (8) M. L. Das, H. Hiratsuka, J. M. Machinist, F. L. Crane: *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 433 (1962).
- (9) A. R. Gilby, A. V. Few: *J. Gen. Microbiol.*, **23**, 19 (1960).
- (10) 根来秀夫, 平野幸夫, 福本寿一郎: 科学と工業, **35**, 423 (1961).
- (11) 根来秀夫, 平野幸夫: 同上, **36**, 11 (1962).
- (12) 大林 晃: 本誌, **37**, 265 (1963).
- (13) 大林 晃, 岩野貞雄, 日下 巖, 北原覚雄: 本誌, **34**, 16 (1960).
- (14) M. R. J. Salton: *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 391 (1951).