U. D. C. 576.851.48.1 : 577.158.072

246. 西村千昭：超音波による大腸菌の破壊とコハク酸酸化酵素の分離*

Chiaki Nishimura : Preparation of Succinoxidase from *E. coli* irradiated with Supersonic Wave.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

Coli bacilli were destroyed by irradiation of supersonic waves and succinic oxidase was extracted. It was found that irradiation of 560 Kc., 1800 V., and 0.29~0.30 A, for 15 minutes resulted in almost complete extraction of succinic oxidase in cell-free state. When the *coli* bacilli are destroyed under above conditions and centrifuged at 10,000 r.p.m., succinic oxidase activity is detected in the microsomes of 20~50 m μ . The succinic oxidase so extracted is precipitated in the majority by 60~70% saturation of ammonium sulfate.

(Received June 4, 1956)

大腸菌の菌膜を破壊してコハク酸酸化系を分離するために、著者は凍結融解法、磨砕法¹⁾などを試みたが十分な酵素活性が得られなかつた。次に Green²⁾ の超音波破壊法を試みて好結果を収めたのでここに報告する。Green らは上澄液中の窒素量を測定することにより菌体の破壊の状況を調べている。著者は曝射後の菌体懸濁液及びこのものを更に 10,000 rpm で遠心分離して得た上澄のコハク酸酸化活性を測定し、両活性が殆んど一致する点をもって完全に菌膜が破壊されているものと考えて超音波の曝射条件を調べた。また得られた試料を電子顕微鏡で観察した結果、この酵素は 20~50 m μ の微粒子部分に存在すると考えられる。即ち 560 KC, 1800 V, 0.29~0.30 A の曝射条件で 6 分間浮游液に超音波をあて、これを電子顕微鏡で観察すれば菌体は一部分破壊されているのみであつたが、15 分間の曝射では試料中に菌体の原形を認めず、ミトコンドリアと考えられる 200~350 m μ の顆粒及び 20~50 m μ の微粒子のみを認めた (Fig. 1)。これを 10,000 rpm で 30 分間遠心分離すればその上澄は 20~50 m μ の微粒子のみを含み (Fig. 2)、しかもコハク酸酸化酵素はすべて上澄に存在していた。上の遠心分離操作によつてミトコンドリアが破壊される可能性も考えられるが、20~50 m μ の微粒子だけが認められる状態となつてもコハク酸酸化酵素の活性は認められる。

Fig. 1. Electromicrogram of *E. coli* irradiated with Supersonic Wave

Conditions : Input	100 volt
Plate voltage	1800 volt
Plate current	0.29~0.30 ampere
Frequency	560 KC

Fig. 2. Electromicrogram of Supernatant centrifuged at 10,000 r. p. m., for 30 mins.

* 前報：鈴木、西村、小延：本誌 74, 1108(1954).

1) W. W. Umbreit, et al. : "Manometric Techniques and Tissue Metabolism," 6th printing (1951).

2) D. E. Green : J. Bacteriol. 51, 487(1946).

超音波曝射の条件 560 KC, 1500 V, 0.23~0.25 A の超音波を 3, 6, 9, 15 分の各時間曝射し, これを遠心分離して得た上澄にはコハク酸酸化酵素を得ることが出来なかつた. 更にプレート電圧とプレート電流をあげ, 560 KC, 1800 V, 0.29~0.30 A の超音波をそれぞれ上記の時間曝射して酵素活性を測定したところ, 6 分及び 10 分の曝射でわずかに酵素活性を上澄に求めることができ, 15 分間の超音波曝射では殆んど完全にコハク酸酸化酵素を上清に移すことができた (Fig. 3). この際の上澄は淡黄色半透明である. 上述の実験においては菌体を蒸留水に懸濁せしめて超音波を曝射したが, 等張の生理食塩液に菌を浮遊させて同一条件の超音波をあてると懸濁液のコハク酸酸化活性の約 60% は上澄に移るが沈殿部分にもなお酵素活性が残存している. 低張液中に菌体を懸濁させて超音波を曝射する方が菌体はよりよく破壊されることになる.

Fig. 3. Enzyme Activity of *E. coli* irradiated by Supersonic Wave

I : Control (substrate : succinic acid).

II : 1,800 volt for 15 mins.

III : 1,500 volt for 15 mins.

抽出コハク酸酸化酵素の硫酸分割 上の方法で得られたコハク酸酸化酵素を更に精製する目的で, 硫酸アンモニウムによる分割沈殿をおこなつた. すなわち実験の部にのべるような各飽和度に硫酸アンモニウムを加えて一昼夜氷室に放置し, 生じた沈殿を蒸留水に懸濁して再びもとの容積にし, このコハク酸酸化活性を測定した. 硫酸アンモニウムの飽和度の高まるにつれて抽出酵素液の酸素吸収量 ($\mu\text{L-O}_2/30 \text{ mins.}$) は増加し, 80% 以上の飽和度で沈殿した割分では酸素吸収量は殆んど変らなくなる (Table I). 各 10% 飽和段階における酵素活性は 60~70% の硫酸アンモニウム飽和で最もよく沈殿する. ここに得られたコハク酸酸化酵素は $10 \mu\text{M}$ のマロン酸で特異的に阻害され, コハク酸とマロン酸は拮抗する. また, 10^{-4} M の *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) で著しく阻害される (Fig. 4). この酵素は $10 \mu\text{M}$ のコハク酸を完全酸化するのに $100.0 \mu\text{L}$ の酸素を吸収し (Fig. 5), したがって基質 1 mol に対して $\frac{1}{2}$ mol の酸素を消費することになる. この酵素によつてはモノカルボン酸並びにコハク酸以外のジカルボン酸は全く酸化されない.

超音波曝射による各種カルボン酸の酸化能の変化 上述の如く 10,000 rpm の上澄中にはコハク酸以外のカルボン酸の酸化能は全く存在しないが, 超音波曝射後の菌懸濁液には義酸酸化酵素の活性も存在する. すなわち Krebs cycle 上及びその他のカルボン酸 (フマル酸, リンゴ酸, オキサロ酢酸, 焦性ブドウ酸, 義酸, コハク酸, 酢酸) の酸化能のうち超音波の曝射によつて懸濁液に残存するのはコハク酸酸化酵素及び義酸酸化酵素のみで他の酸化酵素は殆んど失活する (Fig. 5). 更にこの懸濁液を 10,000 rpm で 30 分遠沈すれば上澄にはコハク酸酸化酵素のみを得る. 義酸酸化酵素は上記超音波曝射によつてあまり失活しないが, その酵素活性は前記の上

Fig. 4.

Fig. 5.

Fig. 4. Oxidation of Succinoxidase and its Inhibition with Malonate or *p*-Chloromercuribenzoate

I : Control (no PCMB, succinate $10 \mu\text{M}$).

II : (I) + Malonate $10 \mu\text{M}$.

III : (I) + PCMB 10^{-4} M .

Fig. 5. Oxidation of TCA-Cycle Members by the Suspension of *E. coli* irradiated by Supersonic Wave

Substrate $10 \mu\text{M}$: I Succinate, II Formate, III Oxalacetate, IV Malate, V Pyruvate, VI Fumarate.

澄部分には存在しなかつた。

超音波曝射破壊大腸菌の電子顕微鏡像 560 KC, 1800 V, 0.29~0.30 A の超音波を生菌浮游液に 15 分間曝射すると、コハク酸酸化酵素を遠心上澄に得ることは上述したが、更にこの実験と平行して各曝射時間後 (3, 6, 9, 15 分) の懸濁液の電子顕微鏡像を調べた。曝射 6 分及び 9 分後の試料では破壊されつつある菌体を観察することができたが、視野中にはなお原形を保った菌体を一部認める。且つ菌膜の破壊は殆どの場合菌体中央部よりおこっている。15 分曝射したものでは菌体原形を認めず視野には 150~300 m μ の顆粒及び 20~50 m μ の微粒子の存在を認める。この懸濁液を遠心分離した上澄の電子顕微鏡像には 20~50 m μ の微粒子のみがみられる。著者は酵素活性の測定と電子顕微鏡像の観察を平行して行うことにより、コハク酸酸化酵素は 20~50 m μ の上澄部分に存在することを知った。この酵素が初めから微粒子部分として存在していたか否かについてはなお検討したい^{3,4)}。

Table I. Salting-out of Succinoxidase from *E. coli*
irradiated with Supersonic Wave

Supernatant (cc.)	Satd. (NH ₄) ₂ SO ₄ (cc.)	Succinoxidase activity (μ L/30 mins.)
1.0	0.10	5.4
1.0	0.26	21.3
1.0	0.40	42.1
1.0	1.00	63.1
1.0	2.30	162.7
1.0	4.00	167.7

終りにのぞみ御懇篤なる御指導を賜わった京大薬学科鈴木友二先生、有益な助言をいただいた武田研究所鈴置二郎氏に厚く感謝する。電子顕微鏡写真は京大医学部生理学教室鍋島 泰氏の御厚意によるもので終始御援助を賜わった同氏に深謝する。

実 験 の 部

菌体浮游液の調製 *E. coli* S を Bouillon 寒天培地に 24 時間培養し、常法により集菌、洗滌、蒸留水に懸濁して菌体浮游液とする。浮游液中の菌体濃度は 7~9 mg 乾燥菌/cc.

超音波の曝射 菌体浮游液約 25 cc を大型試験管にとり、560 KC, 1800 V, 0.30 A の超音波を曝射、この懸濁液を対照にとり、コハク酸 10 μ M を加えて基質とし、ワールブルグ検圧計で酸素吸収を測定。また同一懸濁液を高速遠心分離、その上澄をとりコハク酸 10 μ M を基質として酸素吸収を測定、基質酸化能を測定して破壊の状態を調べた。

コハク酸酸化作用の測定 生菌浮游液 0.2 cc (または抽出酵素液)、M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 1.5 cc を主室に、コハク酸 10 μ M を側室に加える。発生する CO₂ は主室中央部に入れた 15% KOH 液 0.2 cc で吸収。検圧計を恒温槽に装置し、恒温になる迄振盪後、主室及び側室の内容液を混合して酸素吸収を測定。

抽出酵素の硫酸分離 上記条件によつて得られた淡黄色半透明の抽出酵素液 1.0 cc に 10, 20, 30, 50, 70, 80% 飽和になるように硫酸アンモニウム飽和液を加えて一昼夜氷室に放置。遠心分離、上澄を除き、沈澱に蒸留水を加えて溶かし、最初の酵素液量とし、前記 3 の方法で酵素活性を測定。

京都大学医学部薬学科

3) W. C. Schneider : J. Biol. Chem. **165**, 585 (1946).

4) W. C. Schneider, G. H. Hogeboom : Ibid. **172**, 451 (1948).