HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	塩辛の細菌学的研究：第5報 細菌の蛋白質分解酵素について(其の1) Bacillus subtilisの蛋白質分解酵素の二，三の性質について，第6報 細菌の蛋白質分解酵素について(其の2) Bacillus subtilisの蛋白質分解酵素の賦活性物質について
Author(s)	長尾, 清
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 4(1), 96-107
Issue Date	1953-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/22797
Type	bulletin (article)
File Information	4(1)_P96-107.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

塩辛の細菌学的研究

第5報 細菌の蛋白質分解酵素について（其の1）
Bacillus subtilis の蛋白質分解酵素の二，三の性質について

第6報 細菌の蛋白質分解酵素について（其の2）
Bacillus subtilis の蛋白質分解酵素の賦活性物質について

長尾　清（水産細菌学教室）

BACTERIOLOGICAL STUDIES OF SHIOKARA OR "SOUSED SQUID"

5. On the Proteolytic Enzymes of Bacteria. (Part I)
Some Properties of the Proteolytic Enzyme of *Bacillus subtilis*.

6. On the Proteolytic Enzymes of Bacteria. (Part II)
On the Activator of the Proteolytic Enzyme of *Bacillus subtilis*.

Kiyoshi NAGAO

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

The present author prepared a proteolytic enzyme of *Bac. subtilis* which was isolated from Shiokara, by using either lysis, lyophilization, or treatment with acetone and ether. The enzyme showed optimal activity at pH of 6.8 to 7.2 and temperature of 40°C. It is of interest that the enzyme was not much affected by presence of a high concentration of sodium chloride. The proteolytic activity of an enzyme prepared by acetone-ether treatment was nearly the same to that by lyophilization, whereas that of an enzyme prepared by lysis was lower than the others.

This enzyme was activated by either Mn^{++}, or cysteine. When Mn^{++} was added at the start of hydrolysis, a definite lag phase was observed before the first order reaction took place. When the enzyme was treated, however, with Mn^{++} at 37°C. for about three hours before the substrate was added, the hydrolysis took place without any lag according to the first order reaction. This suggests that the activation may give rise as a results of combination of the metal with enzyme protein. The proteolytic activity ran parallel with the concentration of Mn^{++} within a certain range of the concentration. In case of cysteine, on the contrary, a higher activity was obtained when it was mixed simultaneously with the enzyme and the substrate. These experimental results are shown in Figs. 6,7,8 and 9.

細菌の蛋白質分解酵素は非常に多数ある様に見える。しかし動物の蛋白質分解酵素に関する研究に比較すると、其の研究は非常に少ない。

Maschmann[1] は或る細菌の培養液から得た蛋白質分解酵素につき広汎な研究をし、次の3種の蛋白質分解酵素を得ている。即ち (1) *Bac. pyocyaneus, Serratia marcescens* の培養液から Egg albumin や Clupein を含む多数の蛋白質を分解し、賦活性物質として Cysteine を必要としない酵素、(2) ガスを生成する嫌気性細菌の培養液から Gelatin と Gluten のみを分解する酵素、及び (3) *Bac. botulinus* から SH 化合物とシアン化物に依つて活性化される酵素を得ている。

Gelatin を分解する酵素は広く多くの細菌に存在し Bidwell[2], Kocholaty[3], Evans[4], Ramon[5], Gorini[6] 等の研究がある。Kocholaty[3] は *Clostridium histolyticum* の培養液から Gelatin を分解する酵素を得た、この酵素の最適水素イオン濃度は pH 6.0～7.5 で、電気泳動的に均一な蛋白質で、少量の Tyrosine と Tryptophane を含み、Fe^{++} と SH 化合物に依つて活性化される。Gorini[6] は *Micrococcus lysodeikticus* から Gelatin や Casein を分解する酵素を得た、この酵素は 0.01M Ca^{++} を加えると活性化される。

著者は塩辛の熟成現象を細菌学的に研究して来た。一般に魚肉が自家消化を起す場合には、蛋白質はアミノ酸にまで分解され、それ以上は分解されないと言われている。アミノ酸は細菌の酵素により脱炭酸や脱アミノされて分解する。しかもこの様な低級分子にまで分解する速度は他の動物組織から得られる酵素に比し迅速に行われるものと考えられる。著者は塩辛の熟成に関与する細菌がいかなる機構により蛋白質を分解するか、即ち蛋白質の Peptide 結合の切れる様子、Exopeptidase であるか Endopeptidase であるか否か、いかなる Peptide 結合を分解するかを究明し、更に進んでアミノ酸の分解機構、アミノ基転移の機構を究明したい。

本報に於ては著者が塩辛中より分離した *Bac. subtilis* を使用し、細菌々体を Acetone-Ether 処理及び冷結真空乾燥処理に依つて得た乾燥菌体より酵素を抽出し、又 Lysozyme にて細菌々体を溶解し酵素液を得た。これ等の酵素の Gelatin を基質とした場合の最適水素イオン濃度、最適温度、酵素抽出法の差異による活性度の比較、食塩の影響及び酵素の賦活性物質につき研究した結果について報告する。

実 験 方 法

(I) 酵素抽出法

細菌々体より酵素を抽出するには次の様な方法がある[7][8]

①細菌々体を微細な硬い粒子と混ぜて磨擦して破壊する方法、②或る範囲の振動数の超音波を菌体浮遊液にあて細胞構造を破壊し、酵素を抽出する方法、③加圧状態で高速度に廻転する Ball-mill で機械的に破壊する、④細菌々体を自家分解する方法、⑤溶菌性物質を加えて溶菌する方法、⑥細菌々体を冷結真空乾燥する方法、⑦細菌々体を Acetone Ether で処理して乾燥粉末を得る方法

①②及び③の方法では特殊な器具を必要とし、④の方法では自家分解中に酵素の活性が低下する。⑤の方法で溶菌性物質を加えて溶菌させる著名な方法は、Lysozyme に依る溶菌作用である。Lysozyme に依る溶菌作用は Penrose, Quastel 両氏[9]が発見し、其の後 Herbert[10]が *Micrococcus lysodeikticus* を Lysozyme にて溶菌し、結晶性細菌 Catalase を得ている。Lysozyme は *Micrococcus lysodeikticus*[10][11], *Achromobacter fischeri*[12], *Bac. subtilis*[13][14][15], *Bac. megatherium*[16] を溶菌するが、*Bac. anthracis* に対しては溶菌しない。

著者は以上の方法の中⑤⑥⑦の方法で細菌々体より酵素を抽出した。

即ち Bouillon (broth) 培地に *Bac. subtilis* を接種し、37°C にて24時間培養し、発育した菌苔を集め

水洗後、濾紙にて水分を吸い取り、湿潤菌体を得た。溶菌法にて酵素を抽出する為に著者はこの湿潤菌体の Cell Suspension (Non-proliferating Cell 又は Resting Cell とも云う) に Lysozyme を加え菌体を溶菌し、遠心分離、上澄液を酵素液とした。Lysozyme は G. Alderton 法[17]に従い、卵白より結晶状に抽出したものを使用した。冷結真空乾燥する場合には著者は Fig. 1 に示す如き冷結真空乾燥装置を使用した。Fig. 1 のA部に Dry-ice と Ether を注入、B部のナス型フラスコに湿潤細菌々体を入れ、C部を真空ポンプに連結し、冷結真空乾燥を行い乾燥菌体を得た。

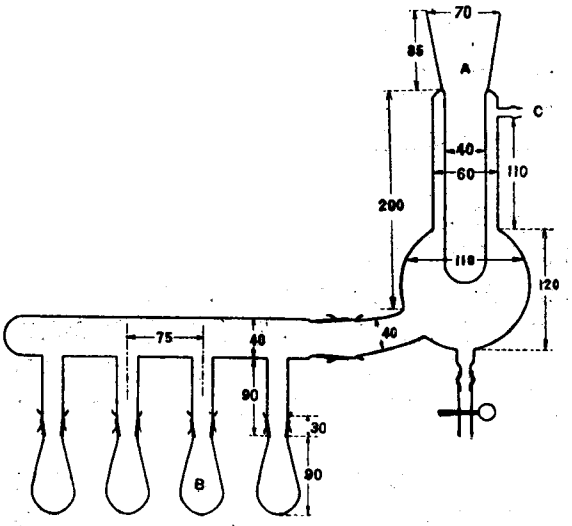


Fig. 1 Lyophilizing Apparatus

Acetone-Ether で処理して乾燥粉末を得るには湿潤菌体を冷 Acetone で処理、冷 Acetone-Ether で処理後、冷 Ether で脱水、デシケーターに入れ乾燥粉末を得た。この様にして得られた乾燥菌体に 75% Glycerine を加え、メノー乳鉢にてよくつぶし、酵素を抽出後、遠心分離し上澄液を酵素液とした。

(II) 最適水素イオン濃度の測定

0.1% Gelatin 溶液8cc、0.067M 燐酸Buffer 溶液8cc、酵素液4cc を混和、37°C の恒温水槽中におき一定時間後 NH_2-N量の増加を Folin の Naphthoquinone 法 (保利氏の改良法[18]) で比色定量した。比色には 470mμ の Filter を用い、光電比色計を使用した。NH_2-N量を測定する際、分解しないで残つている Gelatin を除かなければならないので、Gelatin除去法は、柏田、柿本氏法[19]で行つた。即ち前記の混液 2cc に 10%醋酸鉛溶液を加えて、生ずる沈澱を濾別し、濾液に稀硫酸を加えて過剰の醋酸鉛を除去する。その濾液が酸性ならば苛性ソーダで中和した後、Folin-Wu 試薬 (10%タングステン酸ソーダ 1 容に対し⅔N H_2SO_4 2～3容) を加え、暫時放置後濾過し、$^N/_{10}$ H_2SO_4 にて洗滌した濾液を合せ、この濾液について Folin法で Naphthoquinone で呈色させ、過剰の Naphthoquinone を脱色剤で脱色し、この液を一定量 (18cc) とし、この液より7cc をとり (Cüvett容量 7cc、厚さ1.5cm) NH_2-N量を比色測定した。0時の試料の透過率を 100% に合せ、時間の経過と共に NH_2-N量の増加、減少に相当する透過率の変化を見た。尚熱を加え変性させた酵素液を使用した場合には、NH_2-N量の増加は見られなかつた。

一般に蛋白質を酵素にて分解する際には、等量の α-COOH基と α-NH_2基を生ずるが、Gelatin の場合は、Proline や Hydroxyproline の様な Imino 基を含む Peptide 結合を多く含む蛋白質であるので[20] (Gelatin の主なアミノ酸含量は、Glycine 25.5%、Proline 19.4%、Hydroxyproline 9.4%、Arginine 9.1%、Alanine 8.7%、Leucine 7.1%、Lysine 5.9%、Glutamic acid 5.8%である。[21]) 分解されると NH_2基よりも COOH基を多く生ずる。著者は基質として Gelatin を使用したので、細菌の酵素に依り Gelatin を分解した際にも、α-NH_2 基よりも α-COOH基を多く生ずると思われるので Formol 滴定に依り測定して見たが滴定の終点が不明瞭で、やゝ不正確であるので今度は省略した。

実験結果を Fig. 2,3に図示した。以上の実験結果から *Bac. subtilis* の蛋白質分解酵素の最適水素イオン濃度は pH 6.8～7.2附近にある。

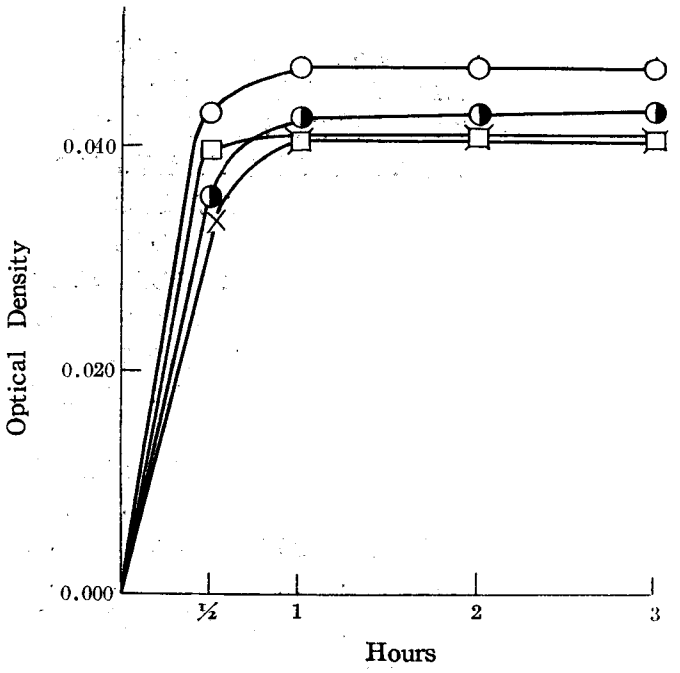


Fig. 2 The effect of pH on the hydrolysis of gelatin by the proteolytic enzyme from *B. subtilis*. Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.9857g. of bacterial powder in 50 cc of 75% glycerine.

× pH5.0 □ pH6.0
○ pH7.0 ◑ pH8.0

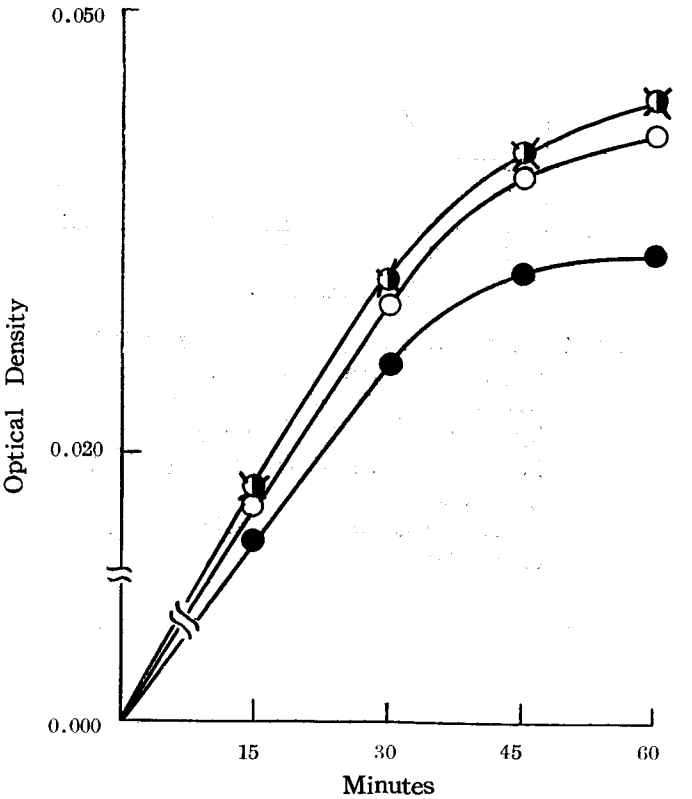


Fig. 3 The effect of pH on the hydrolysis of gelatin by the proteolytic enzyme from *B. subtilis*. Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.8435g. of bacterial powder in 50 cc of 75% glycerine.

○ pH6.8 ◑ pH7.0
× pH7.2 ● pH7.4

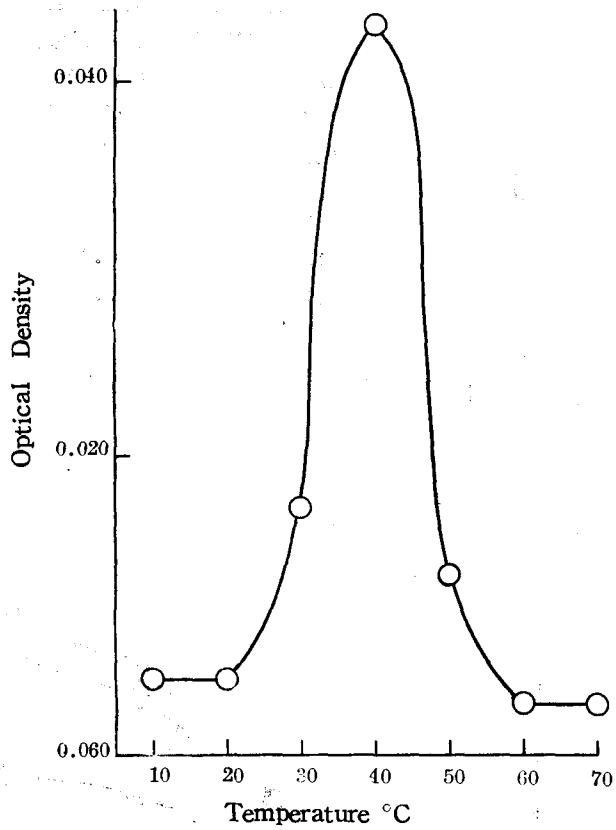


Fig. 4 The effect of temperature on the hydrolysis of gelatin by the proteolytic enzyme from *B. subtilis*. Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.9335g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.
Optical density was measured thirty minutes after mixed.

（Ⅲ） 最適溫度の測定

最適水素イオン濃度測定の場合と同様に0.1%Gelatin溶液8cc、Buffer溶液8cc(pH 7.0)、酵素液4ccを混和、各溫度の恒溫水槽中に保ち、30分後、上記混液2ccにつき未分解のGelatinを除いた液中のNH_2-N量をFolin法にて比色定量した。

実験結果をFig. 4に図示した。以上の実験結果より *Bac. subtilis* の蛋白質分解酵素の最適溫度は40°C附近である。

（Ⅳ） 酵素抽出法の差異に依る酵素活性度の比較

著者は *B. subtilis* の菌体を冷結真空乾燥及びAcetone-Ether乾燥に依り得られた菌体粉末を75% Glycerine溶液に入れ、抽出した酵素液及びLysozymeに依り溶菌し、得た酵素液の活性度を比較した。実験方法は最適水素イオン濃度測定の場合と同様。但し測定溫度 37°C、pH 7.0 で行つた。今蛋白質分解反応を単分子反応と仮定すると、活性度は次の様にして算出する事が出来る。

$$K=\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x},\qquad C_s=\frac{K/}{/E}$$

K : First order velocity constant.
a : Total NH_2-N in mixed solution. (hydrolyse with HCl)
x : NH_2-N after t min. in mixed solution.
t : Time. (min.)
C_s : Proteolytic coefficient.
E : Enzyme concentration. (mg. Nitrogen per cc)

実験結果を表示すればTable 1の如くになる。

Table 1 Comparison of the Proteolytic Activity of the Enzyme Prepared by Acetone-Ether Treatment, Lyophilization and Lysis Method from *B. subtilis*.

Time (Min.)	Acetone-Ether Treatment *		Lyophilization **		Lysis Method ***	
	Optical Density	NH_2-N mg.	Optical Density	NH_2-N mg.	Optical Density	NH_2-N mg.
0	0.000		0.000		0.000	
10	0.018	0.006	0.022	0.008	0.004	0.002
20	0.032	0.012	0.036	0.014	0.009	0.004
30	0.041	0.016	0.046	0.018	0.013	0.005
40	0.046	0.018	0.051	0.020	0.022	0.008
60	0.046	0.018	0.051	0.020	0.032	0.012

* 0.8825g. of bacterial powder in 50 cc of 75% glycerine, 0.0122mg-N per 1 cc of enzyme solution, 0.0048mg-N of enzyme per 2 cc of mixed solution, a=0.1080mg NH_2-N in 2 cc of mixed solution.

** 1.0988g. of bacterial powder in 50 cc of 75% glycerine, 0.0156mg-N per 1 cc of enzyme solution, 0.0062mg-N of enzyme per 2 cc of mixed solution, a=0.1092mg NH_2-N in 2 cc of mixed solution.

*** Wet bacteria (dry weight 0.4262g.) in 60 cc of water, 0.0062mg-N per 1 cc of enzyme solution, 0.0024mg-N of enzyme per 2 cc of mixed solution, a=0.1025mg NH_2-N in 2 cc of mixed solution.

実験結果より Acetone-Ether 乾燥法、冷結真空乾燥法及び溶菌法に依つて得た酵素液の C_s を夫々 $C_s^1, C_s^2; C_s^3$ とすれば　$C_s^1 = 0.20$, $C_s^2 = 0.21$, $C_s^3 = 0.13$

即ち Acetone-Ether乾燥法と冷結真空乾燥法では活性度は殆んど同じであつたが、溶菌法に依つて得た酵素液の活性度は前二者に比し劣る。これはこの方法に依つて得た酵素液は水溶液であり Glycerine 溶液に比し不安定な為と、溶菌してから実験に供するまでに48時間を経過していた為活性度が低下した為と思われる。

（V） 食塩の影響について

塩辛中には約15～20%の食塩が含有されている。塩辛の熟成に関与する細菌は、好塩細菌或は耐塩細菌と思われる。本実験に使用した *Bac. subtilis* は著者が塩辛中より分離した菌であるので、試験菌より抽出した酵素は高濃度の食塩を含有する基質に対しても相当に強く作用すると思われるので、以下この点を究明した。

0.1% Gelatin 溶液 8^{cc}、0.067M 燐酸 Buffer 溶液（pH7.0）8^{cc}、酵素液 4^{cc}、を混和、この混合液に対し NaCl 濃度が10%及び15%となる如く NaCl（化学用）を添加した。NaCl無添加の場合を対照試験として行つた。これ等の混液を37°C の恒温水槽中に保ち、30分後、前同様上記混液 2^{cc} につき未分解の Gelatin を除いた液中の NH_2-N 量を Folin 法にて比色定量した。

実験結果をFig. 5 に図示した。以上の実験結果より、供試菌は塩辛中より分離した為、相当高濃度の食塩に対し適応しておる様で、食塩を加えない基質と、10%になる様食塩を加えた基質に対する活性度は殆んど差異はない。15%になる様に食塩を加えた基質に対しては、やゝ活性度は低下する。

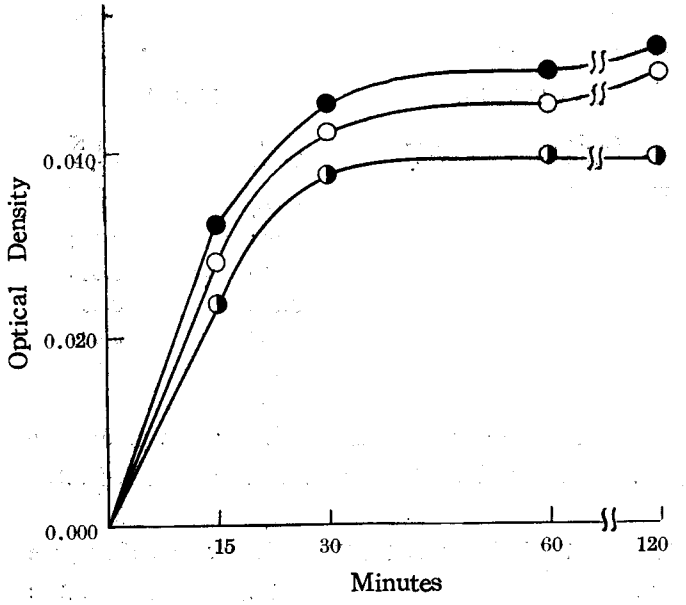


Fig.5 The effect of the concentration of NaCl on the hydrolysis of gelatin by the proteolytic enzyme from *B.subtilis*. Enzyme solution was prepapared by treatment with acetone and ether. 0.9275g. of bacterial powder in 50cc of 75%glycerine.

● Not added
○ 10%NaCl added
◑ 15%NaCl added

(VI) 賦活性物質について

細菌の蛋白質分解酵素に関する従来の研究では、細菌の培養液から SH化合物、シアン化物、Fe^{++} 或は Ca^{++} 等に依つて活性化される酵素が得られている。著者は細菌々体より抽出した酵素について Mn^{++} 及び Cysteine に依る活性化につき実験を行つた。

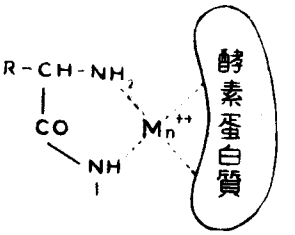
従来 Willstätter 一門の研究によつて Proteinase と Peptidase とがはつきり区別せられ、前者は高分子の天然の蛋白質にのみ作用してこれを Polypeptide にまで分解する酵素で、Peptidase は天然の蛋白質に対しては作用しないが種々の Polypeptide又は Dipeptideに作用するものと考えられていた。しかし M. Bergmann 等は1932年新らしい Polypeptide の合成法を考案して多数の Polypeptide について研究した結果、これ等の合成 Polypeptide の中には従来天然の蛋白質のみに作用すると考えられていた Proteinaseによつて容易に分解されるものが見出された。Bergmannは蛋白質分解酵素を Exopeptidase (遊離の極性基に隣接した Peptide 結合を分解する酵素) と Endopeptidase (Proteinase とも云い、蛋白質の Peptide 鎖の内部を切断する酵素) とに分けている。

著者の実験に供した酵素液は恐らく色々な酵素の混合したものと思われ、しかも基質として使用した Gelatin は特異な蛋白質で、その主なる構成アミノ酸は Glycine, Proline, Hydroxyproline や Leucine 等である。著者の使用した酵素が Gelatin を分解する事と、Gelatin の構成アミノ酸から考察すれば、著者の使用した酵素には Leucine aminopeptidase, Glycyl-L-leucine dipeptidase, Prolidase や Prolinase 等が共存していると想像された。しかも動物組織から得られた之等の Exopeptidase は Mn^{++} に依つて活性化される事が知られている[22][23][24][25][26]。Maschmann 等の細菌酵素に関する研究では Cysteine が賦活性物質として作用するか否か問題になつている様であるので、著者は Mn^{++} と Cysteine に依る影響につき実験を行つた次第である。

Mn^{++} 等に依つて活性化される所謂金属酵素は、Mn^{++} と酵素蛋白質との間に次の様な緩慢な反応が行われる[27][28]。金属原子は Apoenzyme と同じ様に基質との結合の配位中心 (Coordination center) となる。酵素一基質複合体に於て、金属イオンは一方では酵素の極性基と結合し、他方では

Peptideの極性基と結合する。この様にして夾合結合(Chelate ring)が形成され、Peptide結合の電子構造が加水分解を行いうる程度にルーズにされるのである[29][30][31]。

$$\text{Protein} + Mn^{++} \rightleftarrows Mn^{++}\ \text{Protein}$$



即ちMn^{++}と酵素を数時間作用させた後基質を加えて分解したものと、同量のMn^{++}と酵素及び基質を同時に加えて作用させたものを比較すると、前者の分解速度が大である。著者はこの点に留意して実験を行つた。

酵素液2^{cc}に0.067M燐酸Buffer溶液(pH7.0)4^{cc}を加え、この中にMn^{++}及びCysteineの濃度が夫々10^{-6}M, 10^{-5}M, 10^{-4}M, 10^{-3}M, 10^{-2}M, となる如く夫々$MnCl_2$及びCysteineを加え、3時間37°Cの恒温水槽中にて反応させた後、0.1% Gelatin溶液8^{cc}と更にpH7.0の燐酸Buffer溶液6^{cc}を加え、37°Cに保ち、前回同様上記混液2^{cc}につき未分解のGelatinを除いた液中のNH_2-N量をFolin法にて比色定量した。又酵素液2^{cc}に燐酸Buffer溶液4^{cc}及びこの混液にMn^{++}, Cysteine濃度が夫々10^{-2}Mとなる如く、$MnCl_2$及びCysteineを加え、同時に燐酸Buffer溶液6^{cc}と0.1% Gelatin溶液8^{cc}を加えたもの及びMn^{++}, Cysteineを全然加えないで行つたものにつき前同様の方法でNH_2-N量を比較した。

Fig. 6, 7, 8, 9は実験結果を表示したものである。

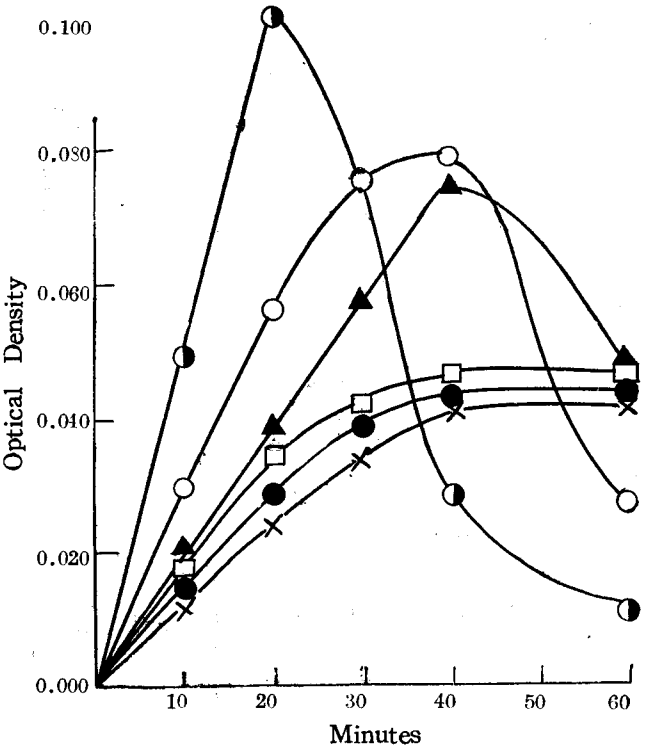


Fig.6 The effect of concentration of Mn^{++} on the hydrolysis of gelatin by the enzyme from *B. subtilis*.

The enzyme was treated with Mn^{++} at 37°C. in the presence of 0.067M phosphate buffer for about three hours before the substrate was added.

◑10^{-2}M Mn^{++} ○10^{-3}M Mn^{++}
▲10^{-4}M Mn^{++} □10^{-5}M Mn^{++}
●10^{-6}M Mn^{++} × No Addition

Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.9346g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.

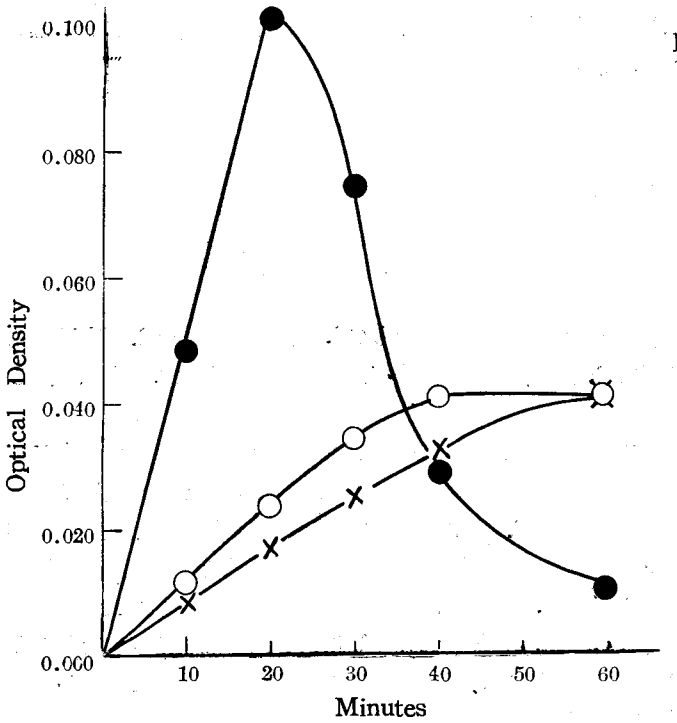


Fig.7 Activation of the enzyme by Mn^{++}. When Mn^{++} was added at the start of hydrolysis, a definite lag phase was observed before the first order reaction took place. When the enzyme was treated, however, with Mn^{++} at 37°C. for about three hours before the substrate was added, the hydrolysis took place without any lag according to the first order reaction.

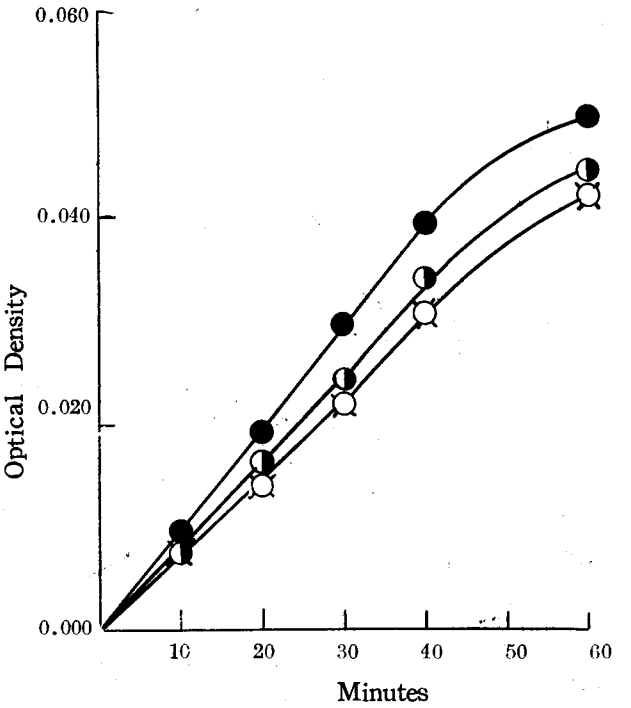
● 10^{-2}M Mn^{++}+Enzyme, Preincubated.
× 10^{-2}M Mn^{++}+Enzyme+Substrate, Simultaneously.
○ No Addition

Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.9346g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.

Fig.8 The effect of concentration of cysteine on the hydrolysis of gelatin by the enzyme from *B. subtilis*. The enzyme was treated with cysteine at 37°C. in the presence of 0.067M phosphate buffer for about three hours before the substrate was added.

● 10^{-2}M Cysteine
◑ 10^{-3}M Cysteine
○ 10^{-4}M Cysteine
× No Addition.

Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.8925g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.



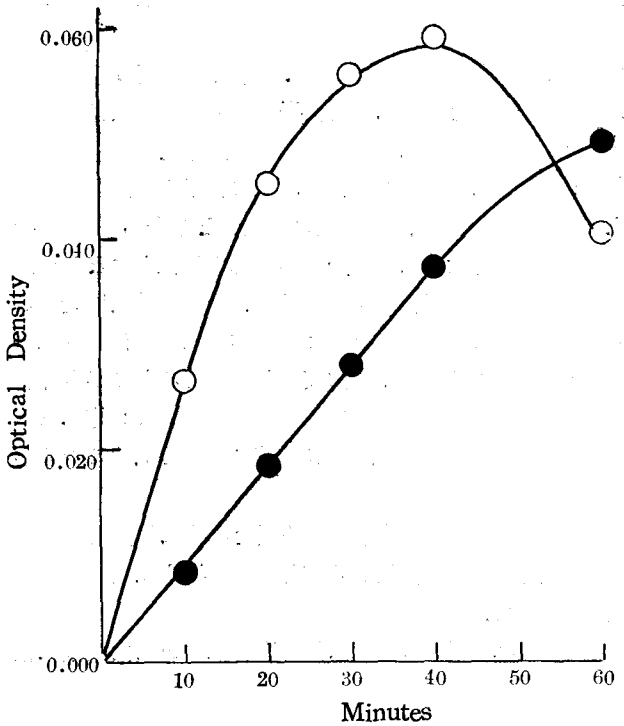


Fig.9 Activation of the enzyme by cysteine. When cysteine was added at the start of hydrolysis, hydrolysis took place without any lag according to the first order reaction, When enzyme was treated, however, with cysteine at 37°C. for about three hours before the substrate was added, a definite lag phase was observed before the first order reaction took place.

● 10^{-2}M Cysteine+Enzyme, Preincubeted.
○ 10^{-2}M Cysteine+Enzyme +Substrate, Simultaneously.

Enzyme solution was prepared by treatment with acetone and ether. 0.8925g. of bacterial powder in 50cc of 75% glycerine.

考　　察

塩辛より分離した*B. subtilis*の蛋白質分解酵素の最適水素イオン濃度はpH6.8～7.2附近である。最適溫度は40°C附近である。細菌々体より酵素を抽出する方法の差異による酵素の活性度の差を比較して見ると冷結真空乾燥法と Acetone-Ether 乾燥法では殆んど差異はなかつた。Lysozyme に依り溶菌し酵素を抽出する方法はやゝ前者に比して劣る様であるが、この方法に依つて得た酵素液は水溶液であり、Glycerine 溶液に比し不安定な為と、溶菌してから実験に供するまで48時間を経過していた為、活性度が低下したものと思われる。供試菌は塩辛中より分離した為、相当高濃度の食塩に対し適応している。即ち食塩を加えない基質と、10%になる様に食塩を加えた基質に対する活性度は殆んど差異はない。15%になる様に食塩を加えた基質に対しては、やゝ活性度は低下する。

著者の使用した酵素は Mn^{++} 及び Cysteine に依り活性化される。基質として使用した Gelatinは特異な蛋白質で、その主な構成アミノ酸はGlycine, Proline, Hydroxyproline, や Leucine等であり、著者の使用した酵素は恐らく多数の蛋白質分解酵素の混合したものと思われる。Gelatin の分解とその構成アミノ酸から考察すれば著者の使用した酵素には Leucine aminopeptidase, Glycyl-L-leucine dipeptidase, Prolidase, や Prolinase 等が共存しているものと想像される。しかも動物組織から得られた之等の ExopeptidaseはMn^{++}に依つて活性化される事が知られている[22][23][24][25][26]。著者の実験結果からMn^{++}に依つて活性化された酵素は恐らくLeucine aminopeptidase, Glycyl-L-leucine dipeptidase, Prolidase や Prolinase 等の Exopeptidaseであろうと思われるが、本実験結果から断定する事は勿論出来ない。EndopeptidaseがMn^{++}に依り活性化されたのかも知れないし或は又Endopeptidase

と Exopeptidaseの両者が Mn^{++}に依り活性化されたのかも知れない。この点については合成peptideを使用し、更に研究を進める予定である。

Mn^{++}は酵素の蛋白質と緩慢に作用し、化学的に結合する様で、Mn^{++}と酵素を3時間37°Cにて作用させた後、基質を加えた場合は、Mn^{++}と酵素及び基質を同時に加えた場合よりも活性度は大である。酵素の蛋白質の代りに基質蛋白質と Mn^{++} を3時間 37°C に作用させた後、酵素を加えた場合には、Mn^{++}と酵素及び基質を同時に加えた場合と活性度は同じであつた。以上の結果より酵素—基質複合体に於て、Mn^{++}は一方で酵素の極性基と結合し、他方では Peptideの極性基と結合し、Peptide結合の電子構造が加水分解を行いうる程度にルーズにされた為に加水分解が促進されたものと思われる。又Mn^{++}の濃度と活性度は正比例する。又Mn^{++}の濃度が大である時速かに NH_2-N量は増大するが或る量に達すると急激に NH_2-N が減少している。之は遊離されたアミノ酸が更に低級化合物に分解された為と思われるが、著者の行つたFolin法ではアミノ酸以外の物質でも呈色するものが多く、芳香属の一級アミンはアミノ酸と同程度に呈色し、アンモニア、一、二級の脂肪属のアミン等に依り阻害される。之等の物質が蛋白質分解過程中に生成された場合は、之等の物質の影響を受けておる事になるので、この点については後に詳細に研究する予定である。

之に反し Cysteine に依り活性化される場合には、Cysteine と酵素及び基質を同時に加えた場合が一番活性化される。酵素と Cysteine を37°Cで3時間作用させた後、基質を加えた場合には前者に比し活性度は低下している。又 Cysteine の濃度と活性度は正比例する。

Mn^{++}及び Cysteine 以外に Co^{++}, Zn^{++}, Mg^{++}, Ascorbic acid 等に依る影響については次報に報告する予定である。

要　　約

著者が塩辛中より分離した *B. subtilis* の菌体より Acetone-Ether 処理及び冷結真空乾燥処理に依つて得た乾燥菌体より酵素を抽出し、又 Lysozyme にて菌体を溶菌し酵素液を得た。之等の酵素の Gelatin を基質とした場合の最適水素イオン濃度は pH6.8～7.2、最適温度は 40°C 附近である。又高濃度の NaCl を含有している基質に対しても作用する。之は高濃度の食塩に適応した為と思われる。Acetone-Ether 処理と冷結真空乾燥処理によつて得た酵素の活性度は殆んど差がなかつたが、Lysozyme にて溶菌して得た酵素の活性度はやゝ低下していた。

著者が使用した酵素はMn^{++}及び Cysteine に依り活性化される。Endopeptidaseが之等賦活性物質に依り活性化された為か、酵素液中に共存している Exopeptidese が活性化された為か、或は Endopeptidase と Exopeptidase の両者が活性化された為か否かは不明である。Mn^{++}は酵素の蛋白質と緩慢に作用し、化学的に結合する様で、Mn^{++} と酵素を燐酸 Buffer 溶液と共に3時間37°C にて作用させた後、基質を加えた場合は、Mn^{++}、酵素、燐酸 Buffer溶液及び基質を同時に加えた場合よりも活性は大である。又Mn^{++}の濃度と活性度は正比例する。之に反して Cysteine に依り活性化される場合にはCysteine、酵素及び基質を同時に加えた場合が一番活性化される。

終りに臨み本研究に協力下された、柏原浩之氏及び柳内直一氏に厚く謝意を表する。

文　　献

(1) E. Maschmann : Biochem. Z., **300**, (1939), 89; **302**, (1939), 332; **303**, (1939), 145; **307**, (1940), 1.

(2) E. Bidwell and W. E. van Heyningen : Biochem. J., **42**, (1948), 140.

(3) W. Kocholaty and L. E. Krejci : Arch. Biochem., **18**, (1948), 1.

(4) D. G. Evans : J. Gen. Microbiol., **1**, (1948), 378.

(5) G. Ramon, R. Richou, and P. Ramon : Compt. rend., **220**, (1945) 341.

(6) L. Gorini and C. Fromageot : Compt. rend., **229** (1949) 559.

(7) W. W. Umbreit, R. H. Burris and J. F. Stauffer (1951) : Manometric Techniques and Tissue Metabolism.

(8) E. F. Gale (1951) : The Chemical Activities of Bacteria.

(9) M. Penrose and J. H. Quastel : Proc. Roy. Soc., (London) B **107**, (1930), 168.

(10) Herbert, D and Pinsent, A. J. : Science, **160**, (1947),125.

(11) B. Baubudieri and G. B. Bietti : Archives of Ophthalmology, **34**, (1945) 449.

(12) G. H. Warren and J. G. Durso : J. Bact., **64**, (1952), 483.

(13) Laschtschenko, P : Z. Hyg. Infektionskr., **64**, (1909), 419.

(14) E. H. Boasson : J. Immunol., **34** (1938) 281.

(15) L. A. Epstein and E. Chain : British Journal of Experimental Pathology, **21**, (1940), 339.

(16) H. J. Walshiner and C. F. Robinow : J. Bact., **64**, (1952), 483.

(17) Gordon Alderton, W. H. Ward and H. L. Fevold : J. Biol. Chem., **157**, (1945), 43.

(18) 有山恒、志村憲助共著 (1951) : 蛋白質化学

(19) 柏田研一、柿本大壱 : 日水誌 **18**, (1952), 203.

(20) M. Bergmann, L. Zervas, and H. Schleich : Ber., **65**, (1932), 1747

(21) 赤堀四郎著 (1947) : アミノ酸及び蛋白質

(22) E. L. Smith : J. Biol. Chem., **163**, (1946) 15.

(23) E. L. Smith : J. Biol. Chem., **176**, (1948), 9.

(24) E. L. Smith : J. Biol. Chem., **173**, (1948), 553.

(25) J. S. Fruton : J. Biol. Chem., **166**, (1946), 721.

(26) J. Berger and M. J. Johnson : J. Biol. Chem., **133**, (1940), 639.

(27) E. L. Smith and M. Bergmann : J. Biol. Chem., **138**, (1941), 789.

(28) E. L. Smith and M. Bergmann : J. Biol. Chem., **153**, (1944), 627.

(29) E. L. Smith and L. T. Hanson : J. Biol. Chem., **176**, (1948), 997; **179**, (1948), 803.

(30) E. L. Smith : Ann. Rev. Biochem., **18**, (1949), 35.

(31) E. L. Smith et al : J. Biol. Chem., **180** (1948), 33.

(水産科学研究所業績 第170号)