



Title	塩辛の細菌学的研究：第7報 細菌の蛋白質分解酵素について(其の2) 再び <i>Bacillus subtilis</i> の蛋白質分解酵素の賦活性物質について
Author(s)	長尾, 清; NAGAO, Kiyoshi
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 5(1), 47-54
Issue Date	1954-05
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/22845">https://hdl.handle.net/2115/22845</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	5(1)_P47-54.pdf



# 塩辛の細菌学的研究

## 第7報 細菌の蛋白質分解酵素について (其の2)

### 再び *Bacillus subtilis* の蛋白質分解酵素の賦活性物質について

長 尾 清

(北海道大学水産学部水産細菌学教室)

#### Bacteriological Studies of Shiokara or "Soused Squid"

##### 7. On the proteolytic enzymes of bacteria

##### Part II. On the activator of the proteolytic enzyme of *Bacillus subtilis* (continued)

Kiyoshi NAGAO

Faculty of Fisheries, Hokkaido University

#### Abstract

The present author prepared a proteolytic enzyme of *Bac. subtilis* which was isolated from Shiokara, by treatment with acetone and ether.

(1) This enzyme was activated by  $\text{Co}^{++}$  and  $\text{Zn}^{++}$ . When  $\text{Co}^{++}$  or  $\text{Zn}^{++}$  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  $\text{Co}^{++}$  or  $\text{Zn}^{++}$  at  $37^{\circ}\text{C}$ . for three hours before the substrate was added, the hydrolysis took place according to the first order reaction without any lag phase. This enzyme was not activated by  $\text{Mg}^{++}$ .

(2) The  $\text{Co}^{++}$ -enzyme was more active in the presence of phosphate buffer than veronal buffer.

(3) The hydrolysis rate was proportional to the enzyme concentration.

(4)  $\text{Ca}^{++}$  ion acts as an inhibitor of this enzyme in the absence of phosphate, but this inhibition did not occur with phosphate buffer apparently because of the removal of calcium.

(5) This enzyme was also activated by ascorbic acid and reductic acid.

(6) The author attempts to determine the mechanism of enzymatic protein breakdown. The proteolysis was compared to an explosive disintegration whereby the large molecule is split into many small products without an accumulation of intermediates. Such "all or none" splitting was observed when gelatin was exposed to the action of this enzyme.

著者は前報<sup>1)</sup>に於て塩辛中より分離した *B. subtilis* の菌体より acetone-ether 処理によつて得た乾燥菌体より蛋白質分解酵素を抽出し、この酵素が  $\text{Mn}^{++}$  及び cysteine により活性化される。Endopeptidase が之等賦活性物質により活性化された為か、酵素液中に共存している exopeptidase 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が、 $\text{Mn}^{++}$  は酵素蛋白質と緩慢に作用し、化学的に結合する様で、 $\text{Mn}^{++}$  と酵素を磷酸 buffer 溶液と共に 3 時間、 $37^{\circ}$  にて作用させた後、基質を加えた場合は、 $\text{Mn}^{++}$ 、酵素、磷酸 buffer 溶液及び基質を同時に加えた場合よりも活性度は大である。又  $\text{Mn}^{++}$

の濃度と活性度は正比例する。之に反して cysteine で活性化される場合は cysteine, 酵素及び基質を同時に加えた場合が活性度大である事を述べた。

本報に於ては $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , ascorbic acid 及び reductic acid による影響についての実験結果を報告する。動物組織から得られた exopeptidase は  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  及び  $\text{Mg}^{++}$  により活性化される事が知られている。即ち leucine aminopeptidase<sup>3) 8)</sup> は  $\text{Mg}^{++}$  及び  $\text{Mn}^{++}$ , glycylglycine dipeptidase<sup>3) 4) 5)</sup> は  $\text{Co}^{++}$  及び  $\text{Mn}^{++}$ , glycyl-L-leucine dipeptidase<sup>6)</sup> は  $\text{Mn}^{++}$  及び  $\text{Zn}^{++}$ , prolidase<sup>7)</sup> は  $\text{Mn}^{++}$ , yeast polypeptidase<sup>8)</sup> は  $\text{Zn}^{++}$  及び  $\text{Co}^{++}$ , prolinase<sup>9) 10)</sup> は  $\text{Mn}^{++}$ , Carboxypeptidase<sup>11)</sup> は  $\text{Mg}^{++}$  によつて活性化される。著者の実験に供した酵素液は恐らく色々な酵素が混合していると思われ、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ると、この酵素には leucine aminopeptidase, glycylglycine dipeptidase, glycyl-L-leucine dipeptidase, prolidase, prolinase, carboxypeptidase 等の exopeptidase が共存していると思われる。著者の実験結果からこの酵素は  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ , ascorbic acid 及び reductic acid によつても活性化される。 $\text{Mg}^{++}$  によつては殆んど活性化されない。 $\text{Ca}^{++}$  により阻害されるが、 $\text{Ca}^{++}$  による阻害は磷酸 buffer 溶液を使用する事により除かれる事がわかつた。

蛋白質の酵素分解の機構を確定しようとする 2, 3 の研究があるが、未だ明確なる結果を得ていない。Ovalbumin が pepsin の作用を受けると、約 35% の蛋白質が分子量 1,000 以下の peptide に分解され、25% が分子量 1,000—10,000 の peptide に、10% が 10,000—30,000 の分子量の断片に、30% が更に大きな断片になる。<sup>12)</sup> Tiselius 及び Eriksson-Quensel<sup>13)</sup> は醋酸中に於ける ovalbumin を少量の pepsin で分解した生成物を電気泳動によつて研究し、分解された大部分はかなり分子の小さい polypeptide になつてしまつているのに拘らず、なほ元の ovalbumin が残つている事を認めた。即ち酵素の作用を受けた蛋白質分子はバラバラに小さく分解されているに反し、残つた分子は全然変化を受けていない。言いかえれば、それは限られた数の peptide 結合の急激な分解であつて、沢山の結合の緩慢な分解ではない。この様な分解を Tiselius 及び Eriksson-Quensel は “all or none” 型分解或は爆発的分解 (explosive decomposition) と云つている。しかし Moring-Claesson<sup>14)</sup> はこの説を否定する様な結果を報告している。彼等は結晶性卵 albumin を pepsin で分解したものについて丹念な研究を行い、分解初期に於ける生成物は decapeptide 又はそれ以上の高分子 peptide で、分解末期には大部分が tripeptide であつた。所が Beloff 及び Anfinsen<sup>15)</sup> は “all or none” 説を支持する様な結果を得ている。彼等は卵 albumin, 血清 albumin,  $\gamma$ -globulin 及び fibrin を pepsin 又は trypsin で種々の程度に分解し、各段階に於て残つた蛋白質を沈澱せしめた後、残つた polypeptide について全アミノ窒素及び末端アミノ窒素を測定し、その比は常に大体 3 : 1 であつた。しかもこの値が分解の如何なる段階に於ても同じであつたので、上記の様な蛋白質が酵素で分解される時は初めから tripeptide が出来ることになる。この事は明らかに “all or none” 分解説を支持するものである。著者は細菌酵素によつて蛋白質を分解した際も分解された大部分がかなり小さい分子になつているに拘らず、なほ元の蛋白質が残つている事を認めたので “all or none” 説を支持する結果を得たので実験結果について報告する。

## 実験方法

**酵素液調製法** Bouillon (broth) 培地に *B. subtilis* を接種し、37°, 24時間培養し、發育した菌苔を集め水洗後、濾紙にて水分を吸取り湿潤菌体を得た。この湿潤菌体を冷 acetone 処理、冷 acetone-ether 処理後、冷 ether で脱水、デシケーターに入れ乾燥粉末を得た。この乾燥菌体に 75% glycerine 溶液を加え、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。

**酵素活性化の測定法** 酵素液 0.5cc に 0.067M 磷酸 buffer 溶液 (pH7.2) 4cc を加え、この中に  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , ascorbic acid 及び reductic acid の濃度が夫々  $10^{-3}$ M となる如く  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , ascorbic acid 及び reductic acid を加え (実際には酵素液 0.5cc に磷酸 buffer 溶液 3 cc を加え、これに賦活性物質を入れた buffer 液 1 cc を加え、全量 4.5cc 中に賦活性物質の濃度が  $10^{-3}$ M となる様

にした), 3時間, 37°の恒温水槽中にて反応させた後, 0.1% gelatin 液 8 cc と更に磷酸 buffer 溶液 7.5 cc を加え, 37°に保ち, 前報<sup>1)</sup> 同様の方法で上記反応液 2 cc について未分解の gelatin を除いた液中の  $\text{NH}_2$ -N 量を Folin 法により sodium  $\beta$ -naphthoquinone-4-sulfonate で呈色させ, 過剰の naphthoquinone を脱色剤で脱色し, この液を 25 cc とし, この液を厚さ 1.5 cm の Cüyett にとり  $\text{NH}_2$ -N 量を比色定量した (従つて賦活性物質の反応液中の終末濃度は  $2.25 \times 10^{-3} \text{M}$  となる)。又酵素液 0.5 cc に磷酸 buffer 溶液 4 cc 及びこの混液に  $10^{-2} \text{M}$  となる様に夫々賦活性物質を加え, 同時に磷酸 buffer 溶液 7.5 cc と gelatin 液 8 cc を加えたものと及び賦活性物質を全然加えないものにつき前同様の方法で  $\text{NH}_2$ -N 量を測定した。

## 実験結果

### I. $\text{Co}^{++}$ , $\text{Zn}^{++}$ 及び $\text{Mg}^{++}$ による影響について

実験結果を Fig. 1 に図示した。即ち著者の使用した酵素は  $\text{Co}^{++}$  及び  $\text{Zn}^{++}$  によつて活性化される。又  $\text{Co}^{++}$  及び  $\text{Zn}^{++}$  と酵素を 3 時間作用させた後, 基質を加えて分解したものと, 同量の金属イオン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。  $\text{Mg}^{++}$  によつては殆んど活性化されないのみならず,  $\text{Mg}^{++}$ , 酵素及び基質を同時に加えた場合は阻害する。

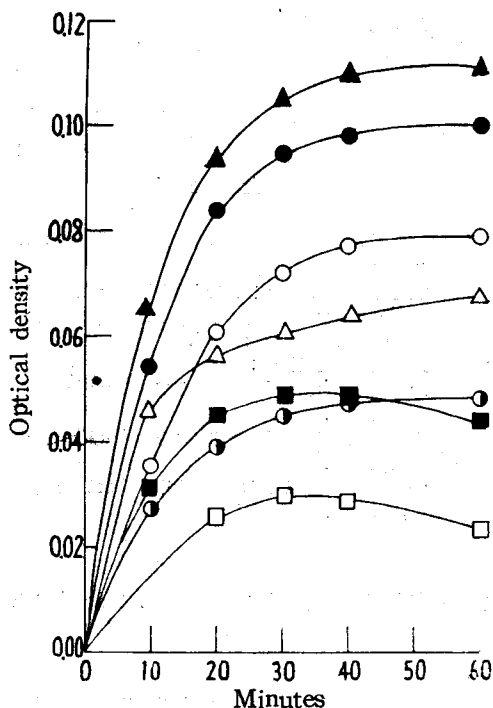


Fig. 1. Effect of  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$

When  $\text{Co}^{++}$  or  $\text{Zn}^{++}$  was added at the start of hydrolysis, a definite lag phase was observed. When the enzyme was treated, however, with  $\text{Co}^{++}$  or  $\text{Zn}^{++}$  at 37°C. for three hours before the substrate was added, the hydrolysis took place according to the first order reaction without any lag phase. This enzyme was not activated by  $\text{Mg}^{++}$ .

- $10^{-2} \text{M}$   $\text{Co}^{++}$  (final concentration  $2.25 \times 10^{-3} \text{M}$ ) + Enzyme, Preincubated.
- $10^{-2} \text{M}$   $\text{Co}^{++}$  (*ibid*) + Enzyme + Substrate, Simultaneously.
- ▲  $10^{-2} \text{M}$   $\text{Zn}^{++}$  (*ibid*) + Enzyme, Preincubated.
- △  $10^{-2} \text{M}$   $\text{Zn}^{++}$  (*ibid*) + Enzyme + Substrate, Simultaneously.
- $10^{-2} \text{M}$   $\text{Mg}^{++}$  (*ibid*) + Enzyme, Preincubated.
- $10^{-2} \text{M}$   $\text{Mg}^{++}$  (*ibid*) + Enzyme + Substrate, Simultaneously.
- No addition.

Enzyme solution : Supernatant from 0.0531g. bact/cc glycerin (in the case of  $\text{Co}^{++}$  and  $\text{Zn}^{++}$ ), 0.0487g. bact/cc glycerin (in the case of  $\text{Mg}^{++}$ ).

### II. Buffer 溶液による影響について

$\text{Co}^{++}$  で酵素を活性化する場合, buffer 溶液として磷酸 buffer を用いた場合と veronal buffer を用いた場合を比較した結果を Fig. 2 に図示した。即ち磷酸 buffer を使用した場合は veronal buffer を使用した場合より活性度大である。

### III. 酵素濃度と反応速度について

$\text{Co}^{++}$  で酵素を活性化する場合,  $\text{Co}^{++}$  は一定量 ( $10^{-2} \text{M}$ , 反応液中の終末濃度は  $2.25 \times 10^{-3} \text{M}$ ) 加え, 酵素の濃度を変えて, gelatin の分解速度を比較した結果を Fig. 3 に図示した。即ち酵素濃度と反応速度は正比例する。

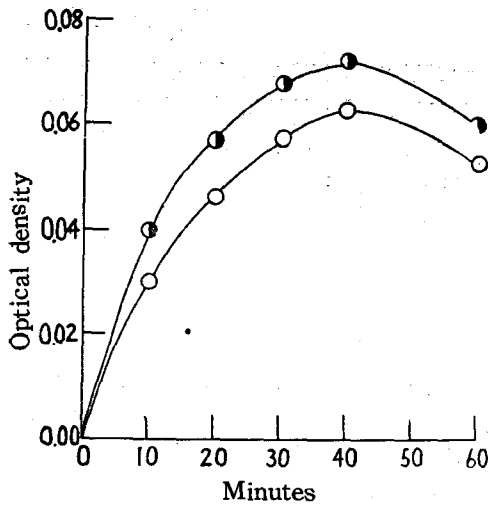


Fig. 2. Effect of metal ion and phosphate

- $10^{-2}M$   $Co^{++}$  (final concentration  $2.25 \times 10^{-3}M$ ) + M/10 Phosphate + Enzyme, Preincubated.
  - $10^{-2}M$   $Co^{++}$  (ibid) + M/10 Veronal + Enzyme, Preincubated.
- Enzyme solution: Supernatant from 0.0279g. bact/cc glycerin.

#### IV. $Ca^{++}$ による影響について

色々な哺乳動物組織から得られた glycy-L-leucine dipeptidase は  $Mn^{++}$  及び  $Zn^{++}$  により活性化されるが、磷酸 buffer を使用しない場合、 $Zn^{++}$  及び  $Ca^{++}$  により阻害される。<sup>6)</sup> 著者は酸、アルカリで pH を調節し、 $10^{-2}M$   $Ca^{++}$  を加えた場合(反応液中の終末濃度は  $2.25 \times 10^{-3}M$  となる) 酵素作用は阻害されるが、磷酸 buffer を使用した場合は  $Ca^{++}$  による阻害は除かれる事を知った。之は磷酸塩の存在下では磷酸カルシウムとなる為であると思われる。実験結果を Fig. 4 に図示した。

#### V. Ascorbic acid 及び Reductic acid による影響について

Ascorbic acid による酵素の活性化は Fig. 5 に図示した様に ascorbic acid と酵素を 3 時間作用させた後、基質を加えた場合は、ascorbic acid と酵素及び基質を同時に加えた場合より活性度は大であった。この結果は前報りに於て報告した cysteine による活性化の場合と逆になっている。Cysteine による活性化は還元作用か或は SH 基の作用のいずれかにより、ascorbic acid による活性化は還元作用によるものと考えられるので、この点を確める為還元作用を有する reductic acid による影響を測定した結果  $10^{-2}M$  濃度(反応液中の終末濃度は  $2.25 \times 10^{-3}M$ ) で顕著な活性化が見られ、しかも reductic acid と酵素を予め作用させたものが活性度大である。次に還元型の reductic acid を沃度で処理して、酸化型にした場合は阻害作用が表われた。しかしこの際は沃度カリの影響もあるので、これのみでは断定出来ない。Ascorbic acid の水溶液を数週間自然に室温に放置して酸化型にした場合、殆んど活性化せず、酸化型 ascorbic acid と酵素及び

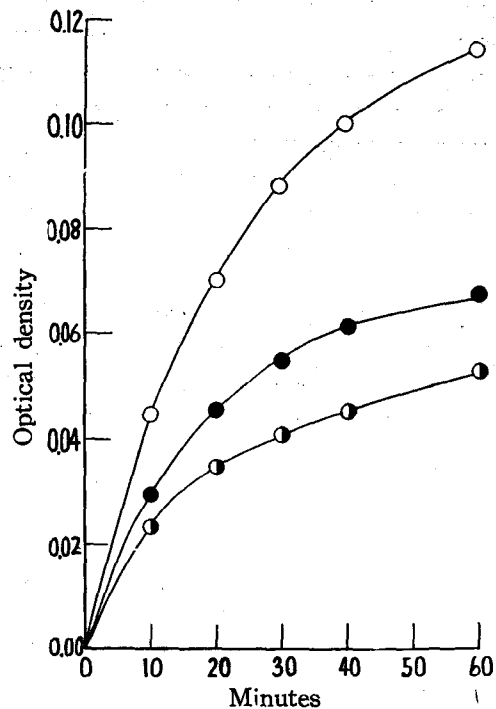


Fig. 3. Effect of the enzyme concentration

The enzyme was treated with  $10^{-2}M$   $Co^{++}$  (final concentration  $2.25 \times 10^{-3}M$ ) before the substrate was added.

Enzyme solution:

- Supernatant from 0.0633g. bact/cc glycerin.
- Supernatant from 0.0319g. bact/cc glycerin.
- ⊙ Supernatant from 0.0159g. bact/cc glycerin.

基質を同時に加えた場合や、阻害作用が表われている。以上の実験から ascorbic acid と reductic acid による活性化は還元作用によるものと思われ、この場合酵素と賦活性物質を予め作用させたものが活性度大である。Cysteine による活性化は SH 基の作用によるものと思われ、この場合は酵素、賦活性物質及び基質を同時に加えた方が活性度大である。

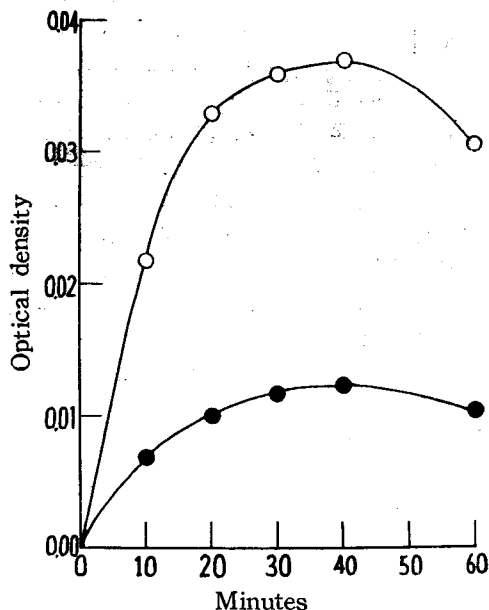


Fig. 4. Effect of  $\text{Ca}^{++}$

This ion acts as an inhibitor of this enzyme in the absence of phosphate, but such inhibition was not observed with phosphate buffer.

- $10^{-2}\text{M}$   $\text{Ca}^{++}$  (final concentration  $2.25 \times 10^{-3}\text{M}$ ) + Phosphate + Substrate + Enzyme, Simultaneously.
  - $10^{-2}\text{M}$   $\text{Ca}^{++}$  (*ibid*) + Substrate + Enzyme, Simultaneously.
- Enzyme solution : Supernatant from 0.0250g. bact/cc glycerin.

#### VI. 蛋白質分解の機構について

$\text{Co}^{++}$ にて酵素を活性化した後 (37°, 3時間) 基質を加え、一定時間毎に未分解の gelatin-N 量と  $\text{NH}_2$ -N 量を測定した結果を Fig. 6 に図示した。しかし Folin 法によるとアミノ酸以外の物質でも呈色するので、この方法で測定した吸光度から  $\text{NH}_2$ -N 量に換算すると誤差を生ずるので、同時に Ninhydrin 法<sup>16) 17)</sup>で  $\alpha$ -アミノ酸を定量し、之より  $\text{NH}_2$ -N 量に換算した。Ninhydrin 法で  $\alpha$ -アミノ酸を定量した場合、40分まで増加しているが以後減少している。これは  $\alpha$ -アミノ酸が更に低級

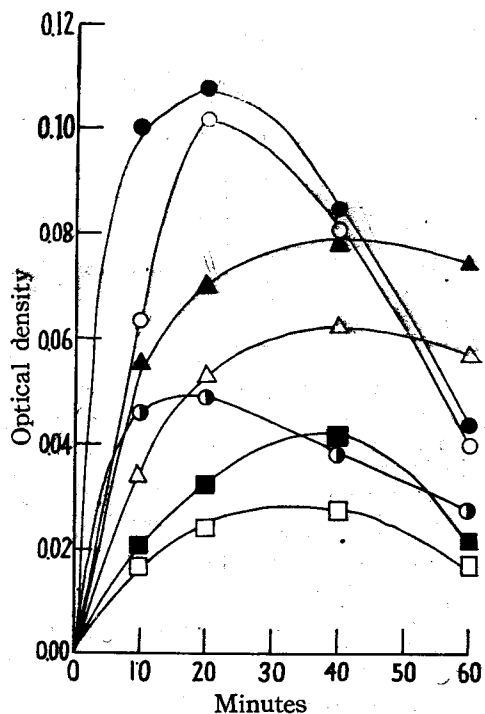


Fig. 5. Effect of ascorbic acid and reductic acid

- ▲  $10^{-2}\text{M}$  Ascorbic acid (final concentration  $2.25 \times 10^{-3}\text{M}$ ) + Enzyme, Preincubated.
- △  $10^{-2}\text{M}$  Ascorbic acid (*ibid*) + Enzyme + Substrate, Simultaneously.
- $10^{-2}\text{M}$  Reductic acid (*ibid*) + Enzyme, Preincubated.
- $10^{-2}\text{M}$  Reductic acid (*ibid*) + Enzyme + Substrate, Simultaneously.
- ⊙  $10^{-2}\text{M}$  Reductic acid (*ibid*, oxidized with  $\text{I}_2$ ) + Enzyme, Preincubated.
- $10^{-2}\text{M}$  Ascorbic acid (*ibid*, naturally oxidized) + Enzyme, Preincubated.
- $10^{-2}\text{M}$  Ascorbic acid (*ibid*, naturally oxidized) + Enzyme + Substrate, Simultaneously.

Enzyme solution : Supernatant from 0.0487g. bact/cc glycerin (in the case of ascorbic acid), 0.0250g. bact/cc glycerin (in the case of reductic acid and naturally oxidized ascorbic acid), 0.0326g. bact/cc glycerin (in the case of reductic acid which was oxidized with  $\text{I}_2$ ).

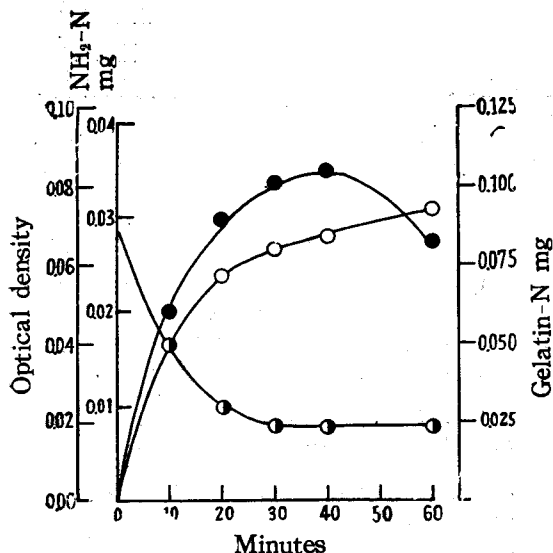


Fig. 6. Changes in the amount of amino-nitrogen and gelatin-nitrogen during the hydrolysis

The enzyme was treated with  $10^{-2}M$   $Co^{++}$  (final concentration  $2.25 \times 10M^{-2}$ ) before the substrate was added.

- $NH_2-N$  by the Folin Method.
- $NH_2-N$  by the Ninhydrin Method.
- Gelatin-N

Enzyme solution : Supernatant from 0.0230g. bact/cc glycerin.

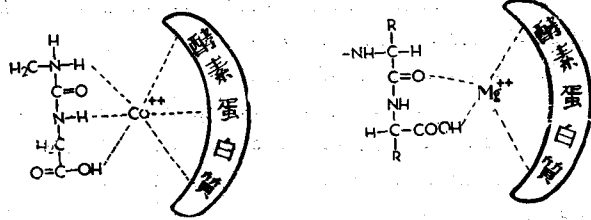
#### 考 察

*B. subtilis* の菌体を acetone-ether で処理し、乾燥菌体を作り、之より抽出した酵素液は gelatin を基質とすると  $Mn^{++}$  <sup>1)</sup>,  $Co^{++}$ ,  $Zn^{++}$ , cysteine <sup>1)</sup>, ascorbic acid 及び reductic acid によつて活性化され、 $Mg^{++}$  によつては殆んど活性化されず、 $Ca^{++}$  によつて阻害される。この酵素液は色々な酵素の複合酵素系であり、基質は高分子の蛋白質である為、endopeptidase がこれ等賦活性物質で活性化された為か、exopeptidase が活性化された為かは合成 peptide を基質として研究を進めないと断定する事は勿論出来ない。尙之等賦活性物質で酵素を活性化し、gelatin の分解を Folin 法で測定した場合、用いた賦活性物質の種類により吸収度が最高に達した後、そのまま一定値を保つ場合と減少する場合とがある。又稀に同一賦活性物質を用いてもこの様な現象が表われる事がある。これは如何なる理由によるか不明である。アミノ酸が更に低級分子に分解された為と一応は考えられるが、それにしても減少度が甚だしい場合があるのでこの原因は目下の所不明である。実験はすべて数回繰返し行つたものである。

Apoenzyme 分子は2つの重要な機能即ち(1)結合族(prosthetic group)の賦活、(2)基質との結合、という機能をもつていてと考えられる。この結合族の賦活を説明する為、結合族は apoenzyme によつて基質との反応に特に都合のよい様な空間的配置に固定されると仮定されている。この様にして基質と活性団との衝突が容易にされるという事は非常に考え易い。一方或る apoenzyme は単に結合族と結合するのみならず、一時的に基質分子とも結合するらしい。金属を含んだ peptidase の作用様式がこれであつて、その金属原子は基質と金属の結合の配位中心となる。<sup>10) 18</sup> 基質-結合族-apoenzyme 複合体の作用により基質が apoenzyme に非常に近接されるので反応がより一層容易に起り得ると考えられる。現在結合族或は基質と結合する apoenzyme の之等の反応基の化学的性質に関してはなにも解っていない。しかしこの問題の解決は酵素作用を理解する上の先決条件である。現在に於ける最良の理解像は、apoenzyme の結合基は極性基であ

な物質に分解された為と思われる。未分解の gelatin は  $\alpha$ -アミノ酸量が最大に達した時にも存在する。 $\alpha$ -アミノ酸量が最大に達した時の  $NH_2-N$  量は、この反応液を塩酸で完全加水分解したものの  $NH_2-N$  量(反応液 1cc 中に 0.054mg)の約 64% に相当する。しかもこの時の未分解の gelatin 量は初濃度の約 34% 残存し、これ以後未分解の gelatin はそのまま残存するが、 $\alpha$ -アミノ酸は更に低級分子に分解されると思われる。Gelatin 分子と  $\alpha$ -アミノ酸の中間分子については測定していないが、未分解の gelatin 量と  $\alpha$ -アミノ酸量から考えると、中間の polypeptide は殆んど存在していないと思われる。これは細菌酵素による gelatin の分解は Tiselius 及び Eriksson-Quensel の云ふ "all or none" 型にて分解されると云つてよいと思ふ。

り、この極性基が一種の結合族或は基質の逆の写し (negative print) を作るので、これ等結合族や基質は逆の鑄型 (negative mold) の中にはまり、そこで相補的に出来上つた面と面との間の多数の双極子—双極子結合により固定されるのではないかと考えられる。<sup>11) 18) 19)</sup> 以上の論点から Smith は  $\text{Co}^{++}$  と  $\text{Mg}^{++}$  による exopeptidase の賦活は右図の様に基質—結合族—apoenzyme の複合体を作っているだらうと述べている。



著者の実験結果から Smith の云ふ

基質—金属—apoenzyme 複合体を作っているとは勿論断定出来ないが、之等金属イオンは酵素蛋白質との間に緩慢な反応が行われ、金属イオンと酵素を予め作用させた後基質を加えて分解したものと、金属、酵素及び基質を同時に加えたものと比較すると、前者の分解速度が大である事実は恐らくこの複合体を作っているものと考えられる。

蛋白質分子の分解様式について2つの機構が考えられる。即ち(1)酵素の作用点からアミノ酸を切りはなしていくこと。その為蛋白質分子を作っている peptide 鎖は、全部アミノ酸に分解されてしまうまで順次に分解されていくことになる。(2)は蛋白質の巨大分子をある程度の大きさの subunit に分解し、次いでそれが更に小さい断片に分解され遂にアミノ酸にまで分解されていくと云ふもの。尙(1)と(2)の中間の分解過程や、双方の組合せも考えられる。この蛋白質分解の機構についての明確な解決は、理論的に重要であるのみならず、化学的、生物学的立場からも非常に重要な問題である。もし蛋白質分解が(1)の如く行われるならば、蛋白質は直接アミノ酸に変わるはずで、中間の polypeptide は極く少量、しかも短かい間存在するだけである。一方蛋白質が一旦大きな subunit に分解されるとすると、これ等の polypeptide は多量存在しなくてはならず、又その結果細胞液の滲透圧や其他の物理化学的特性を著しく変える事になるであらう。Kühne (1885) 並びに Hofmeister 一派の実験は、蛋白質が胃液や脾液等の酵素混合液で処理された場合、中間産物として albumose と peptone が出来るとした。勿論 albumose も peptone も様な物質ではなくて、色々の大きさの polypeptide の混合物である事は明らかである。更に cysteine や tyrosine の様な若干のアミノ酸は、albumose や peptone と一緒に塩析される。それ故これ等の物質自体に関する研究は信用されていない。しかし蛋白質分解の際の之等中間産物は蛋白質構造に関する問題の解決への最も有力な実験的証拠である。著者の実験結果を見ると、 $\alpha$ -アミノ酸量が最大になつた時の量は、この反応液を塩酸で完全加水分解した場合の $\alpha$ -アミノ酸量の約64%に達している。しかもこの時期にも未分解の gelatin が高分子のまま存在している。この時期をすぎると未分解の gelatin はそのまま残存するが、 $\alpha$ -アミノ酸は更に低分子に分解されていると思われる。Gelatin 分子と $\alpha$ -アミノ酸の中間分子については測定していないが、未分解の gelatin 量と $\alpha$ -アミノ酸量から考えると、中間の polypeptide は殆んど存在していないと思われる。これは前記(1)の機構によるものと思われ、Tiselius 及び Eriksson-Quensell の云ふ "all or none" 型にて分解されたと思われる。尙 Ninhydrin 法では $\alpha$ -アミノ酸のみ測定出来るが、Folin 法でアミノ酸以外の物質でも呈色するので、Folin 法で測定した値は Ninhydrin 法で測定した値より大きな値が出る様に思われたが、実際にはこの逆であつた。これは gelatin の主な構成アミノ酸である hydroxyproline が他のアミノ酸に比べ Folin 法による呈色強度が弱い<sup>20) 21)</sup>ためと、又 Ninhydrin 法では aspartic acid と cystine は ninhydrin と反応して2分子の炭酸ガスを出す為起因していると思われる。

## 要 約

著者が塩辛中より分離した *B. subtilis* の菌体を acetone-ether 処理し、乾燥菌体を作り、之より抽出した蛋白質分解酵素液は gelatin を基質とすると、

(1)  $\text{Co}^{++}$  及び  $\text{Zn}^{++}$  によつて活性化され、 $\text{Mg}^{++}$  によつて活性化されない。又  $\text{Co}^{++}$  及び  $\text{Zn}^{++}$  と

酵素を予め作用させた後基質を加えて分解させたものと、賦活性物質、酵素及び基質を同時に加えて分解させたものと比較すると、前者の分解速度は大である。

(2)  $\text{Co}^{++}$ で酵素を活性化する場合、buffer 溶液として磷酸 buffer を使用した場合は、veronal buffer を使用した場合より活性度大である。

(3) 反応速度は酵素濃度に比例する。

(4)  $\text{Ca}^{++}$ によつて阻害されるが、磷酸塩存在下では  $\text{Ca}^{++}$ による阻害は表われない。

(5) Ascorbic acid 及び reductic acid によつて活性化される。

(6) この酵素による gelatin の分解様式は Tiselius 及び Eriksson-Quensel の云ふ “all or none” 型である。

終りに臨み、貴重な reductic acid を心よく御分譲下され、種々御助言御指導をいただいた本学齋藤恒行教授に深甚なる謝意を表すると共に、本研究に協力された小菅孝男氏に感謝の意を表します。

#### 引用文献

- (1) 長尾 (1953). 北大水産彙報 4, 96.
- (2) Smith, E. L. (1946). *J. Biol. Chem.* 163, 15.
- (3) Berger, J. and Johnson, M. J. (1939). *J. Biol. Chem.* 130, 641.
- (4) Maschmann, E. (1941). *Biochem. Z.* 319, 28.
- (5) Smith, E. L. (1948). *J. Biol. Chem.* 173, 571.
- (6) Smith, E. L. (1948). *J. Biol. Chem.* 176, 9.
- (7) Smith, E. L. (1948). *J. Biol. Chem.* 173, 553.
- (8) Smith, E. L. (1951). *The Enzymes*. (edited by Sumner, J. P. & Myræck, k.) 1, 793.
- (9) Fruton, J. S. (1946). *J. Biol. Chem.* 166, 721.
- (10) Berger, J. & Johnson, M. J. (1940). *J. Biol. Chem.* 133, 639.
- (11) Smith, E. L. & Hanson, H. T. (1948). *J. Biol. Chem.* 176, 997.
- (12) Haurowitz, F. (1952). *Chemistry and Biology of Proteins*.
- (13) Tiselius, A. & Eriksson-Quensel, I. B. (1939). *Biochem. J.* 33, 1752.
- (14) Moring-Claesson, I. (1948). *Biochim. et Biophys. Acta.* 2, 339.
- (15) Beloff, A. & Anfinsen, C. E. (1948). *J. Biol. Chem.* 176, 863.
- (16) Christensen, B. E., West, E. S. & Dimick, K. P. (1941). *J. Biol. Chem.* 137, 735.
- (17) 長尾 (1953). 北大水産彙報 3, 265.
- (18) Smith, E. L. & Hanson, L. T. (1949). *J. Biol. Chem.* 179, 803.
- (19) Kaufman, S. & Neurath, H. (1949). *J. Biol. Chem.* 181, 623.
- (20) Frame, E. G., Russell, F. J. A. & Wilhelmi, A. E. (1943). *J. Biol. Chem.* 149, 255.
- (21) Chinard, F. P. & Van Slyke, D. D. (1947). *J. Biol. Chem.* 169, 571.