HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	塩辛の細菌学的研究：第9報 Bacillus subtilisのグルタミン酸脱水素酵素について
Author(s)	長尾, 清
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 5(1), 62-67
Issue Date	1954-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22847
Type	departmental bulletin paper
File Information	5(1)_P62-67.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

塩辛の細菌学的研究

第9報 *Bacillus subtilis* のグルタミン酸脱水素酵素について

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"

9. On the glutamic dehydrogenase of *Bacillus subtilis*

Kiyoshi NAGAO
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Abstract

The formation of enzyme within the cell was conditioned by the chemical constitution of the medium, by the physicochemical conditions holding during growth and by the age of the culture.

1. The change in the external pH during growth was followed by alteration in glutamic dehydrogenase content of the cells, but the pH optimum activity (pH7.4) does not vary with growth pH.

2. The variation of potential activity and effective activity of enzyme with pH of medium during growth were studied. The potential activity was roughly constant whatever the pH in the medium. The effective activity was greatly affected by the pH of medium during growth. The potential activity is that activity estimated at the optimal activity pH of the enzyme and it represents the total formation of enzyme within the cell; The effective activity is the activity estimated at the pH of the environment in which the cell was grown.

3. The presence of sodium chloride in the substrate solution inhibits any activity of this enzyme.

4. This enzyme was formed to a greater extent when growth occurs at 37° than when at 23,° 30° and 42.°

5. This enzyme was formed during growth, reaching a maximum at about the time of cessation of cell division. After the end of the growth the activity declined.

細菌によるアミノ酸の生合成について次の反応が知られている。

(1) Aspartic acid $\overset{\text{aspartase}}{\rightleftarrows}$ fumaric acid + NH_3

(2) Glutamic acid + CoII $\overset{\text{glutamic dehydrogenase}}{\rightleftarrows}$ α—iminoglutaric acid + reduced CoII
α—iminoglutaric acid $\rightleftarrows$ α—ketoglutaric acid

(3) Glutamic acid + R・CO・COOH $\overset{\text{transaminase}}{\rightleftarrows}$ α—ketoglutaric acid + R・$CHNH_2$・COOH

(4) Serine + indol → tryptophan + H_2O

Glutamic dehydrogenase により glutamic acid より α—ketoglutaric acid が生成されるが，このものは糖代謝に重要な役割をはたすと共に，transaminase の反応に関与しアミノ酸の生合成に重要な鍵の役目を

している。又 alanine, serine 及び cysteine が分解されるといずれも pyruvic acid を生成するが，この pyruvic acid は又 transaminase の反応に関与している。

著者は前に塩辛熟成中の呈味の原因は monoamino—N 量の増加に起因するであらうと述べたが，[1] 呈味の源と考えられるアミノ酸が細菌（塩辛の熟成に関与する細菌）の生細胞の内外でいかにして生合成され或は代謝されて行くかと云ふ問題特に glutamic dehydrogenase と transaminase との関連について詳細に研究し，塩辛の呈味の問題を解決しようと思ふ。本報に於ては著者が塩辛中より分離した *B. subtilis* の glutamic dehydrogenase について実験した結果について報告する。

実　験　方　法

1. 菌浮遊液の調製法　前報[2]に同じ，本報に於ては常に 1.28mg. dry wt./cc の菌量の菌浮遊液を用いた。尚菌体は寒天斜面培地に37,° 18時間培養発育させた。

2. 酵素作用力の測定法　Thunberg 管の反応管に $^{M}/_{50}$glutamate 3 cc, $^{M}/_{15}$燐酸 buffer 3 cc及び$^{M}/_{10000}$ methylene blue 1 ccを入れ，側室に菌浮遊液1 ccを入れ，30° の水槽中で排気後，側室の菌浮遊液を反応管に混入させ，反応を開始させ，反応開始時から methylene blue の脱色する迄に要した時間を測定した。この場合 methylene blue の脱色する時間は光電比色計を用ひ，620mμ のfilter を用い透過中100%になるまでの時間である。

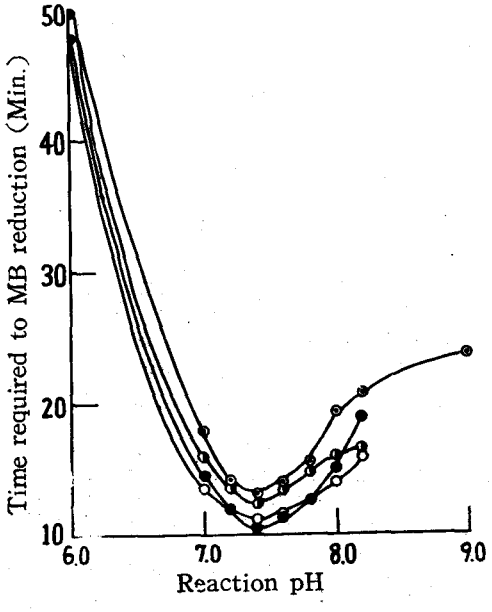

Fig. 1. Variation with reaction pH of acitivity of glutamic dehydrogenase of *Bac. subtilis* grown at various pH values. Shows that pH of optimum activity does not vary with growth pH

◑ Growth pH6.0 ● Growth pH7.0 ○ Growth pH8.0 ⊙ Growth pH9.0

Thunberg tute contained, M/50 glutamate 3cc, M/15 phosphate buffer 3cc and M/10,000 methylene blue 1cc in the reaction tube and 1cc of bacterial suspension (1.28mg. dry wt./cc) in the side cap.

Buffer solution: pH 6.0～8.3 phosphate buffer, pH 8.3～9.0 veronal buffer.

実　験　結　果

1. 細胞内酵素形成に及ぼす培地 pH の影響

いろいろな培地 pH で発育した *B. subtilis* の glutamic dehydrogenase の活性度の反応pHによる変化を測定した結果を Fig. 1 に図示した。実験結果より酵素の至適 pH は7.4であり，しかも至適 pH は発育時の培地 pH によつて影響を受けない事がわかる。

次に発育時の培地 pH に伴ふ *B. subtilis* の glutamic dehydrogenase の潜在活性度（potential activity）と見掛け活性度（effective activity）の変化を Fig. 2 に図示した。潜在活性度とは至適 pH で測定した場合の methylene blue の脱色する時間を以て表はし，これは細胞内に於ける酵素の全成量を表はす。見掛け活性度とは細胞の発育する環境 pH で測定した場合の methylene blue の脱色する時間を以て表はした。実験結果より潜在活性度は発育時の培地 pH の如何に拘らず大体一定に保たれている事が解る。又見掛け活性度は発育時の培地 pH に依り影響され，アルカリ性培地よりも酸性培地に発育した場合にこの活性度は非常に減少している。

2. 適応酵素か否か

寒天斜面培地（pH7.0）に37°，18時間培養した菌体の菌浮遊液を用ひ，Warburg検圧装置の反応容器に $^{M}/_{15}$燐酸 buffer液（pH7.4）3 cc, $^{M}/_{5}$ glutamate 10cc 及び菌浮遊液 3cc (1.28mg. dry wt./cc)

を入れ，30°で12分間接触させた後，反応液を遠心分離，菌体を充分水洗した後，再び蒸溜水に懸濁させた菌浮遊液を用い前同様の方法で methylene blueの脱色する時間を測定した結果を Fig. 3 図に示した。即ち反応 pH7.4に於ては3分間で脱色された。

3. 食塩による影響及び食塩に対する適應性

（a） 普通 agar-agar 培地(食塩無添加)に発育した菌体を用い菌浮遊液を作り，Thunberg 管の反応管に $^{M}/_{15}$ 燐酸 buffer 液（pH7.4） 3cc, $^{M}/_{5}$ glutamate 液に20%になる様 NaCl を加えた基質液 3cc 及び $^{M}/_{10000}$ methylene blue 1cc を入れ，側室に前記菌浮遊液 1cc を入れ前同様の方法で methylene blue が脱色される迄に要した時間を測定した結果，3時間経過しても methylene blue の色は殆んど変化なかつた。

（b） 普通 agar-agar 培地（食塩無添加）に発育した菌体を用い菌浮遊液を作り，Warburg 検圧装置の反応容器に燐酸 buffer 液（pH7.4） 3cc, $^{M}/_{5}$ glutamate 液に20%になる様 NaCl を加えた基質液 10cc 及び前記菌浮遊液 1cc を入れ，30°にて3時間接触させた後，菌体を集め，充分水洗した後再び蒸溜水に懸濁させた菌浮遊液を用い，(a)の場合と同様の方法で methylene blue が脱色される迄に要した時間を測定した結果2時間経過後，僅かに透過率が大になつたにすぎなかつた。(反応開始時及び2時間後の透過率は夫々 33% 及び 48% であつた)。

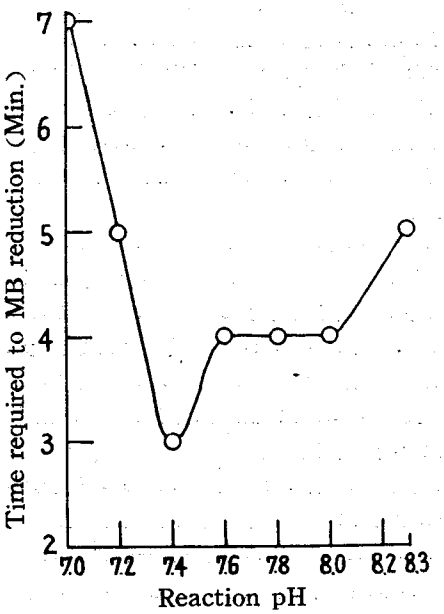

Fig. 3. Adaptability of glutamic dehydrogenase of *Bac. subtilis*
The pH of medium during growth was 7.0. The cells adapted with glutamic acid were prepared by the incubation of glutamate with intact cells at 30° for 12min., then the cells were washed with distilled water.

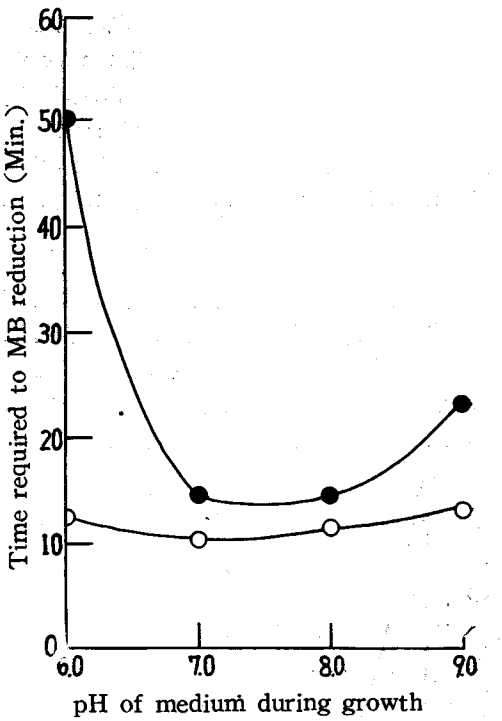

Fig. 2. Variation of potential activity and effective activity of glutamic dehydrogenase of *Bac. subtilis* with pH of medium during growth
Potential activity = time required to the moment of methylene blue reduction estimated at the optimal activity pH. Effective activity=time required to the moment of methylene blue reduction estimated at the pH of the environment in which the cell was grown.
○ Potential activiy ● Efffective activity
Buffer solution: pH 6.0～8.0 phosphate buffer, pH 9.0 veronal buffer.

（c）肉エキス1%，ペプトン 1%，NaCl 15%，寒天 1.5% 及び M/50 になる様 glutamate を添加した培養基に 37° にて 18時間培養後，発育した菌体を用い菌浮遊液を作り，（2）の場合と同様 glutamate に 30,° 12分接触，水洗した菌を使用し，Thunberg 管の反応管に燐酸 buffer 液 3cc，M/50 glutamate 液（NaCl 無添加） 3cc 及び methylene blue 1cc を入れ，側室に前記菌浮遊液 1cc を入れ，前同様の方法で methylene blue が脱色される迄に要した時間を測定した結果を Fig. 4 に図示した。

（d）（c）の場合と同じ培地に培養（37,° 18時間），この菌浮遊液を glutamate に 30,° 30分，1時間及び2時間接触，水洗した菌を使用し，Thunberg 管の反応管に燐酸 buffer 液 3cc，M/50 glutamate（15% NaCl 含有）3cc 及び methylene blue 1cc を入れ，側室に前記 glutamate に接触させた菌浮遊液 1cc を入れ前同様の方法で methylene blue が脱色される迄に要した時間を測定した結果，glutamate に30分，1時間及び2時間接触させた菌浮遊液は測定開始後2時間経過しても methylene blue の色は殆んど変化なかつた。

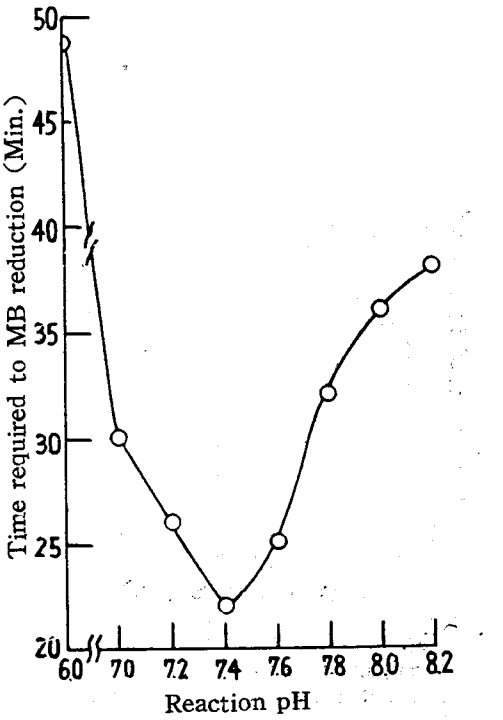

Fig. 4. Effects of the presence of sodium chloride during growth
Medium: 1% meat extract, 1% peptone, 15% sodium chlordie, M/50 glutamate and 1.5% agar. 18 hrs. culture at 37°., then these cells were adapted with glutamate with intact cells at 30° for 12 min., then the cells were washed twice with distilled water. Activity was estimated as usually.

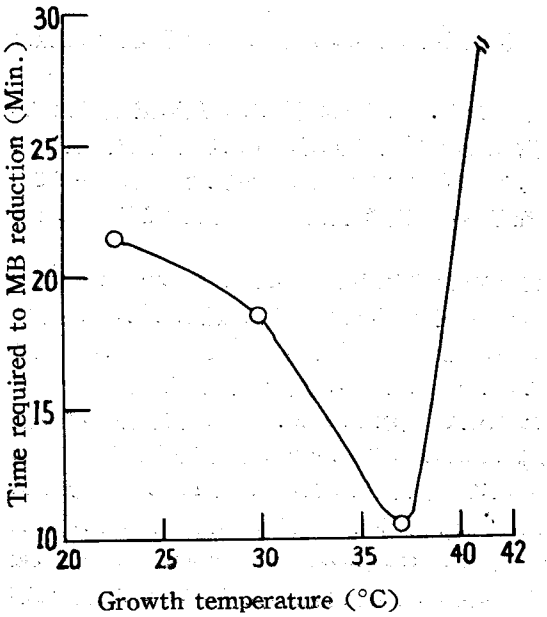

Fig. 5. Effects of growth temperatures on enzyme constitution
Medium: agar-agar, 18 hrs. culture

4. 細菌の発育温度及び培養時間が酵素形成に及ぼす影響

（a）発育温度の影響，Agar-agar（pH7.0）に *B. subtilis* を接種，23°，30°，37° 及び 42° にて18時間培養し，常法により methylene blue の脱色に要した時間を測定した結果を Fig. 5 に図示した。基質中に NaCl を添加していない，尚 42° にて培養した菌体は発育状態悪く，培養基も軟かで，反応開始後 50 分経過しても methylene blue は脱色されなかつた（反応開始時及び 50分後の透過率は夫々 33% 及び 72% であつた）。

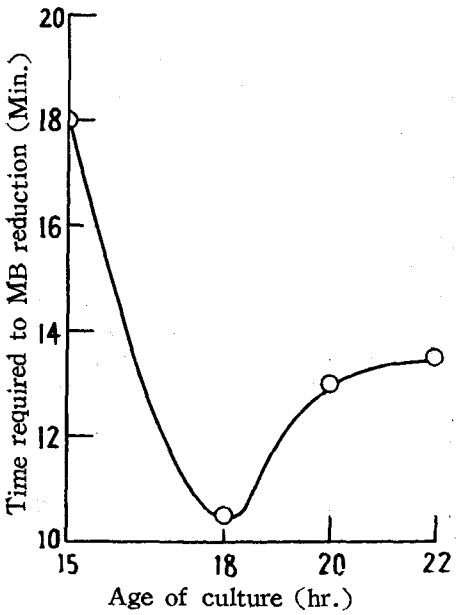

Fig. 6. Effects of the age of the culture on enzyme constitution
Medium: agar-agar, Culture temperature 37°

（b） 培養時間の影響

Agar-agar (pH7.0) に *B. subtilis* を接種，37°にて，15，18,20及び22時間培養し，常法によりmethylene blue の脱色に要した時間を測定した結果をFig. 6 に図示した。

考　　察

細菌細胞内での酵素形成は細胞形成の際の培地 pH の影響を著しく受けるが，酵素の型と機能によつて培地pHの効果が異なる，[3] その効果を類別すると次の三型に要約される。

（1） 中和機構。細菌は非常に広い範囲の pH をもつ培地中で発育出来る。それは細菌が外界の酸度やアルカリ度を中和し，内部環境を安定させる機能をもつているからである。例へば *Esch. coli* をアミノ酸を含む酸性培地で培養すると，或る種のアミノ酸を脱炭酸してCO_2を遊離し同時にアルカリ性のアミンを作る又アルカリ性で培養するとアミノ酸を脱アミノする酵素を作りNH_3を遊離し同時に酸性の生成物をつくるのである。

（2） 防禦機構。Catalase の様な酵素は蓄積すると細菌に毒性を示す代謝物質を分解する機能をもつている。

（3） 発育時の培地pHが酵素活性の至適pH にある時最も多くつくられる酵素で，この群に属する酵素は中和或は防禦のいずれの機能ももつていない。

Glutamic dehydrogenase は(3)のグループに属する酵素で Fig. 1 に図示した様にこの酵素の至適 pH は 7.4 であり，しかも至適pHは発育時の培地pHによつて影響を受けず又発育時の培地 pH が，酵素活性の至適 pH にある時に最も多くつくられている。細胞のもつ見掛け上の酵素構成は，その潜在的な酵素構成の一部で，細胞の発育条件即ち (1) 培地の化学的組成，(2) 発育中の物理化学的条件，(3) 培養の発育齢，によつて取捨選択される。

Thunberg 管による測定では酵素の量的形成を測定する事は困難である。Fig. 3 に図示した様に 30° で12分間基質と接触させる事によつて methylene blue の脱色に要する時間は1/4以上に短縮されたが，この事実のみで適応的に酵素が形成されたとは云へない。Warburg 検圧装置を使用し，生細胞内で酵素が適応的に形成される様相を時間的に連続的に計測しなければならない。これは後に報告する予定である。

酵素生成に対する温度の影響は今迄殆んど研究されていない。僅かに *Esch. coli* の或る菌株のアミノ酸脱炭酸酵素の生成が20～30°培養の方が 37°培養よりも多い。しかし *Esch. coli* の他の菌株及び *Clostridium welchii* では高温培養の方が低温培養よりも同酵素生成が多い事が知られている[1]. 又 *Proteus vulgaris* によるアミノ酸々化酵素は，反応温度37°の方が24° よりも活性が高いにも拘らず，28° 培養の菌の方が酵素生成量が多いことが知られている程度である，[5] 著者の実験で *B. subtilis* の glutamic dehydrogenase 生成量は37°培養の菌が最も多かつた。又 Fig. 6 に図示した様に菌体の酵素量は培養の発育齢によつて変化する事がわかる。細胞の発育経過中における環境の物理化学的性質が，発育しつゝある細胞の物質代謝のはたらきによつて常に変り，細胞の酵素含量は，その酵素がつくられる時の環境に大部分支配される。著者の実験結果より，この酵素は発育中に次第につくられ，細胞分裂が停止する時期にその量は最大となる。発育が終つた後の活性は弱まるが，それは細胞が死滅して酵素蛋白質の酸化や消化などが起つたためと思われる。細菌

中の大部分の型の酵素は,培養経過とともに酵素活性もこの様な変化を示す様である。例へば脱アミノ酵素,脱炭酸酵素及脱水素酵素等である。又培養の発育齢とともに変りつゝある基質に対して示す細胞膜透過性に原因しているのかも知れない。近年の研究によれば,ふるい発育年齢の菌体には殆んど核酸様物質がないこと,lag phase の後期と log phase の初期に相当する発育相では,この物質が著明に増加するが,negative growth phase と maximum stationary phase にいたる間には,一様に減つてゆくことなどが明らかになつた。

要　　約

細胞中の酵素生成は培地の化学的組成,発育中の物理化学的条件及び培養の発育齢によつて影響される。*B. subtilis* の glutamic dehydrogenase 生成に影響を及ぼす之等の条件について実験し次の結果を得た。

1. 至適pHは7.4であり,しかも至適pHは発育時の培地pHによつて影響を受けない。
2. 細菌発育時の培地に伴ふ酵素の潜在活性度(potential activity)と見掛け活性度(effective activity)の変化を測定した。潜在活性度は発育時の培地 pH の如何に拘らず大体一定に保たれ,見掛け活性度は発育時の培地pHにより影響される。
3. 基質溶液中に NaCl が存在すると酵素作用は阻害される。
4. 酵素生成量は37°培養の菌が最も多い。
5. 酵素は発育中に次第につくられ,細胞分裂が停止する時期にその量は最大となり,発育が終つた後の活性は弱まる。

終りに臨み,本研究に協力された川村義夫氏に感謝の意を表します。

引　用　文　献

(1) 長尾・木村 (1951). 北大水産彙報 **1**, 81.
(2) 長尾　　(1954). 北大水産彙報 **5**, 55.
(3) Gale, E. F. & Epps, H. M. R. (1942). *Biochem. J.* **36**, 600.
(4) Gale, E. F. (1943). *Bact. Rev.* **7**, 139.
(5) 佐々木・宇佐美 (1952). 酵素化学シンポジウム **7**, 61.