

結核菌及び各種抗酸性菌のエステラーゼについて

(第 1 報)

大阪市立医科大学刀根山結核研究所 (指導 渡辺三郎教授)

国立療養所刀根山病院 (指導 渡辺三郎博士)

山村雄一・小倉克彦・今津史郎

(昭和 27 年 7 月 23 日受付)

(本論文の要旨は第24回日本生化学会総会及び第4回日本結核病学会近畿地方会において発表した。)

第 1 章 緒 言

結核菌は脂質を多量に含有する点において他の微生物と異っており、その酵素系のうちでは、Lipase 及び Esterase が初期に研究された。1902年 Carrière¹⁾ は結核菌が Monobutyryn を分解して酸を産生することを知り、これは菌体内の Lipase 又は Monobutyrynase によると考えた。1912年 Wells & Corper²⁾ はグリセリン寒天上に発育した結核菌を24時間トルオール水で振盪殺菌した後、この菌浮遊液をオリーブ油、醋酸ブチル、トリアセチンに作用せしめて酸の産生状況を測定した。その結果結核菌は強力な脂肪分解力を持たないが、上記三つの基質を徐々に水解する能力を有することを知った。彼等はこれ等三つのエステルに作用するのは同一の酵素であろうと述べている。さらに1914年 Kendall, Walker & Day^{3), 4)} は種々の抗酸性菌 (人型・牛型結核菌・鳥型菌・レブラ菌・恥垢菌等) の培養濾液中にはヒマシ油及び醋酸エチルを分解する酵素が存在することを確認し、さらにこれらの酵素は 100°C 15 分の加熱に耐えることを認めた。戸田⁵⁾ はグリセリン寒天上に発育した各種抗酸性菌の菌浮遊液を用いて、そのトリブチリン分解能を検した結果、蛙結核菌において最も強く、人型及び牛型結核菌がこれに次ぎ、鳥型菌が最も弱いことを知った。われわれは数年来結核菌の物質代謝に関し系統的研究を行つているが、その一部として結核菌の Esterase, Lipase 作用について検し、二、三の知見を得たので報告する。

第 2 章 実験方法

菌株としては、鳥型菌 (竹尾株・細谷株・AV株等)、人型結核菌 (青山B株・高垣株・H₂株)、牛型結核菌 (三輪株・R₁₃株等)、B.C.G., 恥垢菌及びチモテー菌を用い、基質はトリブチリン、オリーブ油及びその他各種の油脂を使用した。Esterase 作用の測定は主として Warburg の検圧法 (Rona & Lasnitzki 法⁶⁾) を用い、Lipase 作用の測定は Willstätter 等のアルカリ滴定法⁷⁾ に準じて行つた。

検圧法においては、主室に酵素液 (菌液) 0.2 cc, リン

ゲル-重曹溶液 1.7 cc を、副室に M/10 トリブチリン 0.5 cc を入れ、ガス腔は N₂ と CO₂ を 95:5 の割合に混じたもので充し (PH はほぼ 7.4 となる)、37°C の恒温槽に入れ、温度が平衡に達した後両液を混和し、発生する CO₂ 量 (cmm) を 10 分毎に計測した。対照としては、〔酵素液及びリッゲル-重曹液〕及び〔基質及びリッゲル-重曹液〕の 2 組を用いた。しかし Q_{CO₂} を以て酵素活性度をあらわし、E. E. (Esterase 単位) を以て酵素量をあらわした。

但し、

$$Q_{CO_2} = \frac{60 \text{分に発生した } CO_2 \text{ 量 (cmm)}}{\text{使用酵素量 (乾燥量) mg}}$$

E. E. = 上記の実験条件において、酵素液 1 cc によつて 1 分間に発生する CO₂ 量が 1 cmm である時の酵素量を、1 E. E. とする。

滴定法においては、第 1 表に示す如く酵素液・基質・M/20 磷酸緩衝液を一定の割合に混じ、37°C で 30 分間振盪し、以後 37°C の孵卵器に一定時間静置した後、酸度の上昇を N/10 KOH アルコール溶液で滴定した (指示薬フェノールフタレイン)。なお雑菌発育防止のためトルオールを一滴添加した。

第 3 章 実験成績

第 1 節 菌浮遊液による油脂の分解

鳥型菌浮遊液を用い各種油脂の分解を滴定法によつて検すると、第 1 表の如く落花生油・オリーブ油・黒芥子油・菜種子油・ヒマシ油等は若干分解せられるが、その他の油脂分解作用は一般に弱い。

第 2 節 菌浮遊液によるトリブチリンの分解

1) 各型菌浮遊液の Esterase 作用

各種抗酸性菌浮遊液のトリブチリン分解能を検圧法を用いて検すると、第 2 表に示す如くいずれも強力な Esterase (Tributyrynase) 作用を有している。本作用は豚肝エステラーゼに較べれば弱い、他の一般細菌、例えば大腸菌、ブドウ球菌よりも著しく強力である。なお培養濾液中にも弱い Esterase 作用を認めることができる。

第1表 各種油脂の分解

油脂名	分 解	
	滴定に要した N/10 KOH (cc)	分解度 (%)*
落花生油	1.57	4.95
オリーブ油	1.30	4.07
黒芥子油	1.04	3.67
菜種子油	1.02	3.60
ヒマシ油	0.71	2.28
鱈肝油	0.63	2.08
ゴマ油	0.60	1.92
カボック油	0.51	1.62
大豆油	0.43	1.35
ヤシ油	0.54	1.27
ヒマワリ油	0.39	1.26
椿油	0.37	1.19
荏油	0.26	0.83
綿実油	0.23	0.71

菌液：鳥型菌（竹尾株）酸性グリセリンブイオン培養 10日目の菌

測定：菌浮游液 (13.5 mg/cc).....10.0 cc
 油脂.....1.0 cc
 M/20 磷酸緩衝液 (PH 7.4) 1.0 cc
 蒸溜水..... 2.0 cc

上記の割合に混じり 37°C 19 時間静置後、0.02% フェノール・フタレン加アルコール 10.0 cc, エーテル 2.0 cc を加え、充分振盪してこれを 0.1 N KOH アルコールで滴定

$$* \text{分解度}(\%) = \frac{5.61 \times a \times 100}{c \times b \times d}$$

- a: 滴定に要した 0.1 N KOH アルコール溶液 (ml)
- b: 添加油脂量 (ml)
- c: 油脂の鹼化値
- d: 油脂の比重

第2表 各型菌のエステラーゼ

菌型	菌 株	培 地	培養日数	Q _{CO₂}
人型菌	青山 B	グリセリンブイオン	18日	325
		無蛋白培地 (キルヒナー)	14日	204
	高垣	〃	30日	83
		H ₂	〃	27日
牛型菌	三輪	〃	42日	56
	R ₁₁	〃	15日	229
鳥型菌	竹尾	グリセリンブイオン	2日	570
		〃	6日	278
	細谷	〃	7日	433
		AV	〃	7日

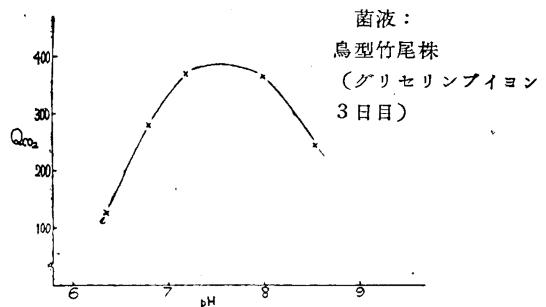
B.	C.	G.	無蛋白培地 (キルヒナー)	12日	196
恥垢菌	〃	〃	グリセリンブイオン	2日	260
チモテー菌	〃	〃	〃	3日	470
大腸菌(西野株)	〃	〃	〃	20時間	0
ブドー状球菌 (寺島株)	〃	〃	〃	〃	18
培養濾液 (鳥型竹尾株)	〃	〃	〃	10日	11
豚肝抽出液 ¹⁾					4250
タカヂェスターゼ ²⁾					8

註：1) Pantschenko-Jurewitz 法に準じて新鮮豚肝より抽出せる粗酵素液
 2) 市販タカヂェスターゼ (三共製) の蒸溜水溶解濾液

2) 鳥型菌の Esterase

(i) 至適 PH: トリブチリンを基質とすると、第1図に示す如く PH 7.2~8.0 である。

第 1 図



(ii) 培養日数と Esterase: 培地の如何に関わらず、培養の陳旧化につれて単位菌量に対する酵素作用は低下の傾向を示している (第3表)。

第3表 培養日数とエステラーゼ作用

培地	グリセリン寒天	グリセリンブイオン	無蛋白培地 (キルヒナー氏)
培養日数			
2	249.4	515.1	319.1
3	—	269.1	114.8
4	167.8	314.0	111.0
5	142.0	378.0	66.5
6	135.6	277.5	36.9

註：数値は、Q_{CO₂} を示す

3) 耐熱性

各型菌の Esterase 耐熱性を検すると、第4表に示す如く、人型結核菌・牛型結核菌・恥垢菌・チモテー菌に属する各菌株はすべて PH 7.0 で 60°~70°C 10 分の加熱により、その酵素作用の大部分を消失する。しかし鳥型菌に属する各菌株は 60°~70°C 加熱により全活性の 60~70% を消失するが、残りの 30~40% は 100°C 10

分の加熱によつても破壊せられない。これらの事実から、抗酸性菌の Esterase には耐熱性 Esterase と非耐熱性 Esterase の 2 種類の酵素が存在すると考えられる。しかして鳥型菌はこの両種の Esterase を有しているが、他の抗酸性菌は非耐熱性 Esterase のみを有している。なお豚肝 Esterase, タカヂアスターゼの Esterase はともに非耐熱性である。

第 3 節 抽出液の Esterase 作用

1) 酵素抽出液に対する加熱の影響

菌体をアセトン, エーテル乾燥後, 又はエーテル, ドライアイス凍結融解後, N/4 アンモニア水にて抽出した後, 遠心沈澱により菌体を除去すると, かなり強いエス

テラーゼ作用を示す無細胞状態の濃黄色微濁の粗酵素液を得る。この粗酵素液について加熱の影響をみると, 第 5 表に示す如く菌浮游液の場合と同様に, 鳥型菌は耐熱性 Esterase と非耐熱性 Esterase とよりなり, その他の抗酸性菌は非耐熱性 Esterase のみからなつている。そこで次の如く両酵素を菌体よりそれぞれ抽出し, 両者の性状を比較することとした。非耐熱性酵素の抽出は表により明かな如く凍結融解法がアセトン・エーテル乾燥法より優れている。

2) 両酵素の抽出とその性状

(i) 耐熱性酵素

鳥型菌(竹尾株)菌体を 4 倍量のアセトンで 3 回, アセトン・エーテル混液で 1 回振盪, 脱脂乾燥後海砂と混じり十分に磨砕し, これを 10 倍量の N/4 アンモニア水で抽出(37°C で 3 時間振盪, 1 夜冷室放置), 上清を中和後, 70°C 10 分間加熱し, 遠心沈澱した上清を耐熱性粗酵素(Esterase II)とする。

(ii) 非耐熱性酵素

人型結核菌(青山 B 株)又はチモテー菌々体を少量の蒸留水と混じり海砂とともに磨砕し, エーテル, ドライアイス寒剤で凍結, これを 30°C で融解(本操作を 10 数回繰返す)し, 菌体を 10 倍量の N/4 アンモニア水で抽出(1 夜冷室放置)遠心沈澱した上清を非耐熱性粗酵素(Esterase I)とする。

(iii) 両酵素の性状

上記の方法で得た Esterase I と Esterase II の性状を比較すると第 6 表に示す如くである。

第 4 表 菌浮游液に対する加熱の影響

菌型	菌株	培地	培養日数	Q _{CO₂}	加 熱 温 度 (°C)						
					40	50	60	70	80	90	100
人型菌	青山 B	キルヒナー氏無蛋白培地	14	91	100	94	17	0	0	0	0
	高垣		30	82	92	63	0	0	0	0	0
	H ₃₇ RV		25	32	100	71	9	0	0	0	0
	H ₂		27	136	100	62	21	0	0	0	0
牛型菌	三輪	同上	42	56	100	57	28	17	0	0	0
	R ₁₄		15	229	100	60	0	0	0	0	0
B. C. G.			10	—	100	98	41	0	0	0	0
鳥型菌	竹尾	グリセリン・ブイヨン	3	—	100	81	29	32	34	31	32
	細谷		7	433	100	88	64	42	43	—	36
	AV		7	495	91	85	55	46	59	52	59
豚肝菌	同上	2	261	79	—	0	—	0	—	0	
チモテー菌	同上	3	470	111	64	8	—	0	—	0	

註: 数値は, 加熱しない場合の酵素活性を 100 とした時の, 加熱酵素活性の 100 分率を示す
加熱時間 10 分, PH 7.0

第 5 表 粗製酵素抽出液に対する加熱の影響

菌	抽出法	Q _{CO₂}	加 熱 温 度 (°C)						
			40	50	55	60	70	80	100
鳥型菌 (竹尾株)	ドライアイス凍結融解	167.0	—	96.5	79.0	31.7	—	25.8	30.0
	アセトン乾燥	150.0	96.0	97	92	70	—	66	62
人型菌 (青山 B)	アセトン乾燥	39.9	96	—	23	—	0	0	0
チモテー菌	ドライアイス凍結融解	322.0	88	90	72	54	20	0	0
豚肝	アセトン乾燥	4250.0	91	91	89	80	11	0	0
タカヂアスターゼ	同上	8.0	100	80	—	13	0	0	0

註: 数値は, 第 4 表と同じ 加熱時間 10 分, PH 7.0

種々の物質の両酵素作用に及ぼす影響をみると第 7 表に示す如く両酵素とも酸化剤, キニーネ, アトキシルにより著明な阻害作用をうける。青酸, アルデヒド試薬(セミカルバチッド, α-ヂニトロフェノール, 2,4-ヂニトロフェニールヒドラジン), アミノ酸(ヒス

第6表 粗酵素の性状

	Esterase I	Esterase II
70° C, 10分加熱	不安定	安定
透析	安定	安定
至適PH	8.0	7.4
ミカエリス恒数 (基質: トリブチリン)	2.4×10^{-3}	1.6×10^{-3}

チデン, グルタミン酸ソーダ, トリアトファン, アルギニン等), Cu^{++} , Mn^{++} , ビタミンC, システイン及びクエン酸ソーダによつては両者とも殆んど影響されない。

塩酸キナーゼ, アトキシールに対しては, Esterase IIの方が Esterase I に較べてより強く阻害される。

第4章 結論

各種抗酸性菌の油脂分解能を滴定法により, トリブチリン分解能を検圧法により検して次の結果をえた。

1) 各種抗酸性菌はいずれも弱い油脂分解作用と, 強力なトリブチリン分解作用を有している。

2) Esterase には耐熱性のものと非耐熱性のものがあり, 鳥型菌は両者の酵素を有するが, その他の抗酸性菌は非耐熱性 Esterase のみを有している。

3) 両酵素はそれぞれ無細胞状態に抽出することができ, 各々の酵素化学的性状を比較した。

第7表 阻害剤の影響

阻害剤(終末濃度)	Esterase I				Esterase II			
	M/200	M/400	M/1000	M/2000	M/200	M/400	M/1000	M/2000
塩酸キナーゼ	75	86	95	100	15	26	20	58
アトキシール	89	81	84	100	25	42	42	71
ヨード	13	16	28	76	39	33	16	31
赤血塩	77	81	106	115	105	92	92	94
過酸化水素	(0.3%) 74	(0.03%) 92	(0.003%) 85	—	(0.3%) 84	(0.03%) 61	(0.003%) 61	—

註: 数値は, 阻害剤を加えない場合の酵素活性を100とした時の, 阻害剤添加酵素活性の100分率を示す

文 献

- 1) Carrière. Compt. r. Soc. Biol. 53, 320, 1901.
- 2) Wells, H. G., AND Carper, H. J., J. Inf. Dis. 11, 388, 1912.
- 3) Kendall, A. I., Walker, A. W., AND Day, A. A., J. Inf. Dis. 15, 443, 1914.
- 4) Kendall, A. I., Walker, A. W., AND Day, A. A., J. Inf. Dis. 15, 454, 1914.
- 5) 戸田忠雄: 日本微生物誌, 20巻, 大正15年.
- 6) Rona, P., AND Lasnitzki, A., Biochem. Z. 152, 504, 1924.
- 7) Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., AND Memmen, F., Z. Physiol. Chem. 125, 93, 1923.
- 8) Kraut, H., AND von Pantschenko-Jurewitz, W., Biochem. Z. 275, 114, 1935.