

結核菌及び各種抗酸性菌の

エステラーゼについて

(第 2 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)

小倉克彦・今津史郎・加藤允彦・山村雄一

(本論文の要旨は、第28回日本結核病学会総会、及び第5、6回酵素化学シンポジウムにおいて発表した)

(昭和 28 年 11 月 27 日受付)

第 1 章 緒 言

抗酸性菌は他の一般細菌に較べると甚だ強力なエステラーゼ作用を有している。人型結核菌・牛型結核菌・B.C.G.・恥垢菌・チモテー菌のエステラーゼは加熱によつて破壊せられるが、鳥型菌に属する菌株のエステラーゼは加熱に対して甚だ安定であり、pH7.0, 100°C 10 分の加熱によつて約 30~60% の活性を残している。われわれは第 1 報において、前者を非耐熱性エステラーゼ (Esterase I), 後者の加熱によつて不活性化しないエステラーゼを耐熱性エステラーゼ (Esterase II) と名付け、そのおのおのを無細胞状態に抽出し、その酵素化学的性状を検討した¹⁾。本報においては、鳥型菌の有する耐熱性エステラーゼの培養条件による耐熱性の変化を検討するとともに、Esterase I, Esterase II の基質特異性及びエステラーゼの分離精製に関して 2~3 の実験を試みた。

第 2 章 実験方法

エステラーゼ作用の測定には前回と同様、Rona u. Rasnitski の方法²⁾ に準じて Warburg の検圧法を用いた。酵素液としては菌液及び前報の方法により鳥型菌・チモテー菌より抽出した粗酵素液を用いた。すなわちグリセリンブイオンに液面発育した鳥型菌(竹尾株)菌体をアセトンで 3 回、アセトンエーテル等量混合液で 2 回、更にエーテルで 2 回脱脂乾燥し、ガラス粉末又は石英砂と混じり充分磨砕して、これを 1/4N アンモニア水で低温抽出(一夜冷蔵庫内放置)、遠心沈澱により菌体を除き、更にガラス粉末の薄層で濾過し、無細胞状態としたものを鳥型菌粗酵素液とした。又、グリセリンブイオンに発育したチモテー菌をアセトン、ドライアイスにより凍結融解を繰返し(約20回)、これを 1/4N アンモニア水で抽出、以下鳥型菌と同様の方法で菌体を除去したものをチモテー菌粗酵素液として用いた。基質は tributyrin, triacetin, ethyl butyrate, amyl butyrate, butyl benzoate, butyl propionate, ethyl n-valerate, methyl acetate, ethyl acetate を用いた。基質の終末濃度は tributyrin は 1/50M, 他はすべて 1/5M で行つた。反応の pH は 7.6(triacetin のみは pH 7.0) とし、緩衝液は重曹-炭

酸緩衝液を用い、Umbreit³⁾ の表に従い重曹濃度を変えらるることによつて所要の pH を得た。測定はすべて 37°C で行つた。

第 3 章 実験成績

第 1 節 耐熱性について

(1) 培養条件と耐熱性: tributyrin を基質とした場合、鳥型菌のエステラーゼ作用は培地の種類や培養日数の如何にかかわらず常に一定の耐熱性を示している。(第 1 表, 第 2 表)。従つてこの耐熱性エステラーゼ (tributy-

第 1 表 培養条件と耐熱性

(1) (培養日数と耐熱性の变化)

酵素液としては、種々の培養日数における鳥型菌浮游液 0.2ml を用い、基質は tributyrin (終末濃度 1/50M) を用いた。温度 37°C, pH 7.6

培 地	グリセリンブイオン						キルヒナー氏無蛋白培地				
	3	5	7	10	15	24	1	3	5	7	10
QCO ₂ *	286	165	222	267	125	119	205	150	177	148	—
耐熱度**	23	30	36	39	62	75	19	34	45	63	75

* QCO₂: 60分間に発生した CO₂ (cmm) / 使用菌量(乾燥量) mg

** 耐熱度: 100°C 10分加熱後、残存した酵素活性の、非加熱酵素の酵素活性に対する百分率(%)

第 2 表 培養条件と耐熱性

(2) (培地の種類と耐熱性の变化)

菌株: 鳥型菌竹尾株, 実験条件は第 1 表に同じ

培 地	培 養 日 数	QCO ₂	耐熱度
グリセリンブイオン	10	267	39
グリセリン寒天	3	141	53
岡・片倉卵培地	3	94	31
グルコース培地*	7	68	33
Dubos 培地	13	123	25
Dubos (Tween60)** 培地	13	122	24
キルヒナー氏無蛋白培地	5	177	45

* キルヒナー氏無蛋白培地よりグリセリンを除き、ブドウ糖を 3% の割合に加えたもの

** Dubos 培地の Tween 80 のかわりに Tween 60 を用いたもの

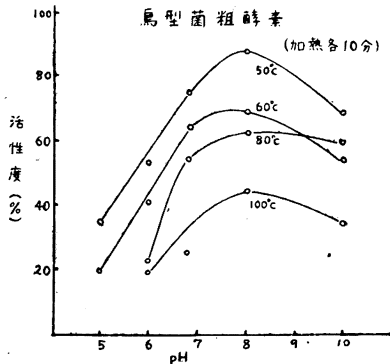
zinase) の存在は鳥型菌に個有のものであり、物質代謝の面からの菌型鑑別に应用することができる⁴⁾。

(2) 加熱と pH の影響：鳥型菌粗酵素の酵素活性に及ぼす加熱と pH の影響をみるために、次の実験を行った。粗酵素液 5 ml を $1/10$ N アンモニア水又は $1/10$ N 酢酸溶液で一定の pH とし、小型アンプルに封入、所要の温度に保つた湯浴中で 10 分間加熱し、直ちに冷却、内液を $1/10$ N 酢酸溶液又は $1/10$ N アンモニア水で pH 7.6 に修正、蒸溜水で全量 10ml としたものを加熱粗酵素液とする。対照としては、粗酵素液 5 ml を蒸溜水で全量 10ml に稀釈したものを用いた。鳥型菌粗酵素の耐熱性はアルカリ側において著明であり、酸性側における加熱には比較的不安定である(第 1 図)。

第 1 図

粗酵素液に対する加熱と pH の影響

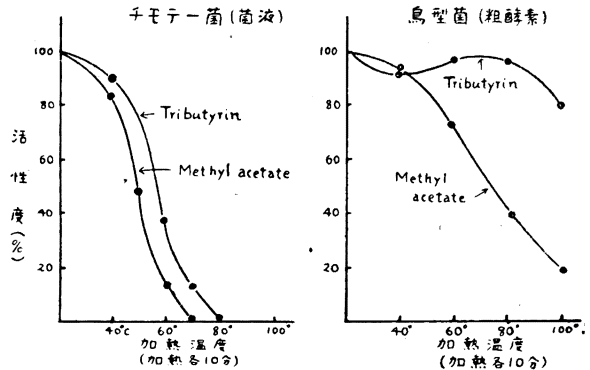
実験条件：酵素液 0.5ml, 9.6×10^{-2} M tributyrin 0.5 ml, 0.04M 重曹加リンゲル液 1.4ml, ガス腔を 5% CO_2 加 N_2 で充す (pH7.6)。活性度は、非加熱酵素の酵素活性に対する加熱酵素の活性度の百分率を現す



(3) 耐熱性と基質特異性：チモテー菌々液及び鳥型菌粗酵素液を用い、tributyrin, methyl acetate を基質とした場合の耐熱性を比較すると、チモテー菌のエステラーゼ作用はいずれのエステルに対しても耐熱性を示さず 70~80°C 10 分加熱によつて不活性化するが、鳥型菌においては一定の耐熱性を示し、そのうち methyl acetate の分解力は比較的熱に不安定であるが、tributyrin 分解力は著明な耐熱性を示し、100°C 10 分加熱になお 80% の活性を残している(第 2 図)。鳥型菌粗酵素の両エステル分解力に対する耐熱性の差異は酵素の加熱時間を長くした場合、更に明確に示される。すなわち、pH 7.0 で 100°C に加熱すると methyl acetate 分解力は 20 分で完全に破壊されるが、tributyrin 分解力は 60 分加熱によつてなお 20% の活性を残している(第 3 図)。この事実は鳥型菌のエステラーゼは単一のものでなく、少なくとも二種以上の酵素の混在していることを想像せしめるので、更に次の如く解析を試みた。

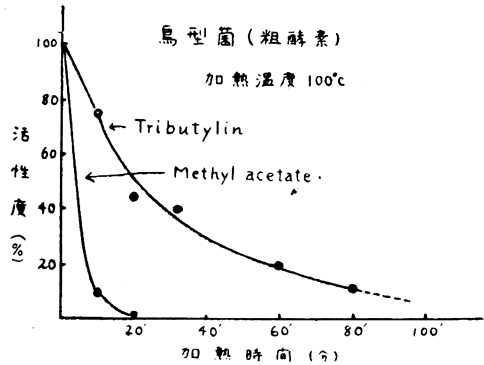
第 2 図 耐熱性の基質による差異

酵素加熱時の pH は 7.0, 酵素液 (チモテー菌液, 鳥型菌粗酵素液)：各 0.5ml, 基質終末濃度 tributyrin は $1/50$ M, Methyl acetate は $1/5$ M, 測定 pH 7.6, 37°C。活性度は第 1 図に同じ



第 3 図 鳥型菌粗酵素の耐熱性

鳥型菌粗酵素を pH 7.0 で 100°C に加熱、一定時間後 0.5ml をとり酵素活性を測定。実験条件は第 2 図に同じ



第 2 節 鳥型菌エステラーゼについて

(1) 基質特異性：鳥型菌粗酵素は tributyrin, methyl acetate, benzyl acetate 等をも分解するが、Cholin esterase 作用はない。Tween 80 (Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate), Tween 60 (Polyoxyethylene Sorbitan Monostearate) も Ca^{++} の存在のもとに分解せられるが、tributyrin に較べると分解速度が極めて遅い。tributyrin, methyl acetate を基質とした場合のミカエリス恒数はそれぞれ 8.8×10^{-3} M, 2.5×10^{-2} M であり、至適 pH はそれぞれ 8.0, 7.6 である。粗酵素の耐熱性と基質構造の関係は、第 3 表に示す如く、酪酸・プロピオン酸・ヴァレリアン酸のエステル分解作用は tributyrin の場合と同様に極めて強い耐熱性を示している。これに反し、酢酸エステルの分解力は前者に較べるとすべて熱に対して比較的不安定である。Fodor 等^{5), 6), 7)} は豚の膵臓ホモジネートを用いて、その耐熱性 (60°C 25 分に耐える)、耐アルカリ性によつてグリセライドを水解する酵素と、1 価、2 価アルコールのエステルを水解する

酵素の二種が存在することを認め、その耐熱性はエステルを形成しているアルコール側に関係があり、グリセライドのみに認められると述べているが、鳥型菌の場合は Foder 等の成績と異つて、エステルを形成している酸根と関係がありアルコール側には関係しない。

第3表 鳥型菌エステラーゼの基質による耐熱性の差異

酵素液：鳥型菌粗酵素液を pH 7.0, 100°C 10分, 30分, 60分加熱し、冷却後それぞれ 0.5ml をとり、各基質に対する活性度を測定する

実験条件は本文記載の通りである。数値は非加熱酵素の酵素活性に対する加熱酵素の活性度(%)を現す(—は実験を行っていない)

基 質	100°C 加 熱		
	10分	20分	30分
tributyrin	84	61	30
ethyl butyrate	96	63	26
amyl butyrate	85	59	29
butyl benzoate	90	63	21
butyl propionate	82	52	28
ethyl valerate	81	41	—
triacetin	20	0	0
ethyl acetate	25	—	—
methyl acetate	5	0	0
benzyl acetate	29	—	—

第4表 脂肪酸の影響

酵素：鳥型菌粗酵素液 0.5ml, 基質：tributyrin (終末濃度 1/60M), Ca⁺⁺の影響をさけるためリンゲル氏液のかわりに 0.04M 重曹加 0.9% 食塩水を用い、ガス腔を 5% CO₂ 加 N₂ で充した(pH 7.6 となる)

数値は脂肪酸を添加しない場合の酵素活性を 100 とした時の、添加した場合の活性度(%)を現す

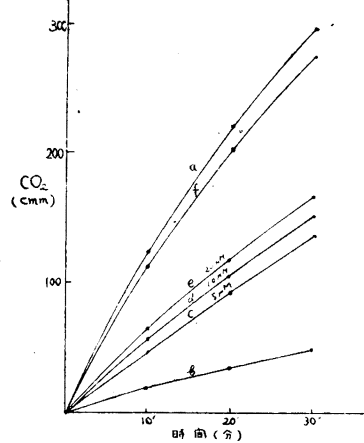
終末濃度 脂肪酸	終末濃度				
	1×10 ⁻²	5×10 ⁻³	2.5×10 ⁻³	1×10 ⁻³	5×10 ⁻⁴
オレイン酸	7	16	24	36	42
ウンデシレン酸	34	45	46	54	59
酪酸	100	100	100	100	100
プロピオン酸	100	100	100	100	100
カプロン酸	100	100	100	100	100

(2) 阻害剤の影響：tributyrin を基質とした場合、オレイン酸・ウンデシレン酸は著明な阻害作用を示すが、酪酸・プロピオン酸・カプロン酸は無影響である(第4表)。オレイン酸阻害は Ca⁺⁺ の微量添加により或程度除去される(第4図)。アルブミンも同様にオレイン酸の阻害を除去するが、その程度は Ca⁺⁺ に較べるとはるかに弱い。各種エステルの分解に対するオレイン酸の影響は特異的であり、酪酸・プロピオン酸・ヴァレリアン酸等のエステルの分解を強く阻害するが、酢酸エステルの分解に対する影響は少ない(第5表)。ヨード・アトキン

ール・塩酸キニーネも同様に酪酸エステル分解を強く阻害する(第6表)。すなわち、この酵素による酪酸エステル水解力と酢酸エステル水解力に及ぼす加熱の影響は明らかに異つており、両者は又、阻害剤に対する態度からも区別される。

第4図 オレイン酸阻害と Ca⁺⁺ の影響

酵素：鳥型菌粗酵素液 0.2ml, 基質：tributyrin (終末濃度 1/50M) 測定は pH 7.6, 37°C で行つた。(a) 対照(オレイン酸ソーダ, CaCl₂ を添加せず)。(b) オレイン酸ソーダ添加(終末濃度 1/800M)。(c), (d), (e) はオレイン酸ソーダ添加酵素(終末濃度 1/800M)に更に CaCl₂ を 5, 10, 20μM 加えた。(f) は CaCl₂ のみ 5μM 添加せるもの



第5表 鳥型菌エステラーゼの各種エステル水解力に及ぼすオレイン酸の影響

酵素液：鳥型菌粗酵素液, 基質：表中記載のものを用い、その他の実験条件は第4表に準じて行つた。数値はオレイン酸非添加酵素に対する添加酵素の活性度(%)を示す

基 質	オレイン酸終末濃度				
	1×10 ⁻²	5×10 ⁻³	2.5×10 ⁻³	1×10 ⁻³	5×10 ⁻⁴
tributyrin	7	16	24	36	42
ethyl butyrate	24	27	33	46	68
amyl butyrate	0	11	30	33	62
butyl benzoate	0	0	19	26	46
butyl propionate	12	40	62	80	88
ethyl valerate	20	66	42	69	53
triacetin	70	78	90	100	100
ethyl acetate	63	95	100	100	100
methyl acetate	63	76	86	100	100
benzyl acetate	56	80	91	91	—

第6表 鳥型菌エステラーゼに対する阻害剤の影響

酵素液：鳥型菌粗酵素液, 基質：tributyrin (終末濃度 1/50M), triacetin (1/5M), 測定は tributyrin を基質とした時は pH 7.6, triacetin の時は pH 7.0 で行つた。温度 37°C。数値は阻害剤非添加の場合の酵素活性に対する阻害剤添加酵素の活性度(%)を示す

阻害剤(終末濃度)	ヨード ($1 \times 10^{-2} M$)	アトキシール ($5 \times 10^{-3} M$)	塩酸キニーネ ($5 \times 10^{-3} M$)
tributyryn	0	39	43
triacetin	45	80	64

第3節 チモテー菌エステラーゼについて

チモテー菌粗酵素液の各種エステル分解作用に対する加熱の影響は、鳥型菌の場合と異り、いずれの場合も加熱に対して不安定であり、基質による差異を認めない(第7表)。又、オレイン酸・ヨード・アトキシールの阻害度にも基質による差異を認めない(第8表)。従つてチモテー菌では酪酸エステル分解酵素と酢酸エステル分解酵素との分離には成功していない。

第7表 チモテー菌エステラーゼの基質による耐熱性の差異

酵素液：チモテー菌粗酵素液、pH 7.0 にて種々の温度で各 10 分間加熱し、冷却後各々 0.5ml をとり、表記の基質に対する水解力を測定した

実験条件は本文に記載の通りである。数値は第3表に同じ

基 質	加 熱 各 10 分					
	50°	60°	70°	80°	90°	100°
tributyryn	89	56	11	0	0	0
ethyl butyrate	73	30	—	0	0	0
triacetin	80	36	10	3	0	0
ethyl acetate	95	54	31	0	0	0

第8表 チモテー菌エステラーゼに対する阻害剤の影響

酵素液：チモテー菌粗酵素液、基質の終末濃度は tributyrin のみ $\frac{1}{60} M$ 、他はすべて $\frac{1}{6} M$ 、測定は triacetin を基質とした時は pH 7.0、他のエステルを基質とした時はすべて pH 7.6 で行つた。温度 37°C、数値は第6表に同じ

阻害剤(終末濃度)	オレイン酸 ($1 \times 10^{-2} M$)	ヨード ($1 \times 10^{-2} M$)	アトキシール ($5 \times 10^{-3} M$)
tributyryn	20.4	31	92
ethyl butyrate	28	35	55
triacetin	65	49	—
ethyl acetate	61	82	76

第4節 抗酸性菌エステラーゼの分類

前述の実験より抗酸性菌のエステラーゼには、耐熱性を示す Esterase II(鳥型菌型)と非耐熱性の Esterase I(チモテー菌型)の2型があり、Esterase II は更に耐熱性の程度と、阻害剤に対する態度から、主として酪酸・プロピオン酸・ヴァレリアン酸のエステルを分解する酵素と、主として酢酸エステルを分解する酵素の2種類が存在すると考えられる。Esterase I ではこの2種類の酵素作用を分けることは出来ない(第9表)。これ等の酵素の

うち最も強い耐熱性を示すものは、鳥型菌型の酪酸エステル分解酵素であり、この酵素は後述の如く単離精製可能である。

第9表 抗酸性菌エステラーゼの分類

	Esterase I (チモテー菌型) heat-labile	Esterase II (鳥型菌型) heat-stable
	酢酸エステル	○ ← 70°C, 10分 → ⊙
酪酸 プロピオン 酸	?	○ ← 100°C, 10分 → ⊙ オレイン酸・ヨード・アトキシール
ヴァレリアン酸	○ ← 80°C, 10分 → ⊙	○ ← 80°C, 10分 → ⊙

第5節 耐熱性酪酸エステル分解酵素の精製とその性状

グリセリンブイオン上に発育した鳥型菌(竹尾株)より第10表の方法に従つて抽出精製した酵素 P_1 は、粗酵素 E_1 の約15倍の酵素活性を有し、水に易溶であるがアセトン・エタノール・メタノール・エーテルに難溶性である。その水溶液はキサントプロテイン・ミロン・ニンヒドリン・ビュレット・モーリッシュ反応はすべて陽性であり、透析による活性の低下は認められない。本酵素の至適 pH は 7.4、ミカエリス恒数は $1.6 \times 10^{-3} M$ (基質: tributyrin) で、triacetin 分解力は、tributyryn 分解力に較べると極めて弱い。この精製酵素も粗酵素と同様に強い耐熱性を示し(第5図)、その耐熱度はアルカリ側において著明である(第6図)。酸加水分解物についてペーパークロマトグラフィーを行うと、アルギニン・ヒスチジン・リジン・プロリン・ヴァリン・フェニルアラニン・ロイシン・チロジン・アラニン・スレオニン・

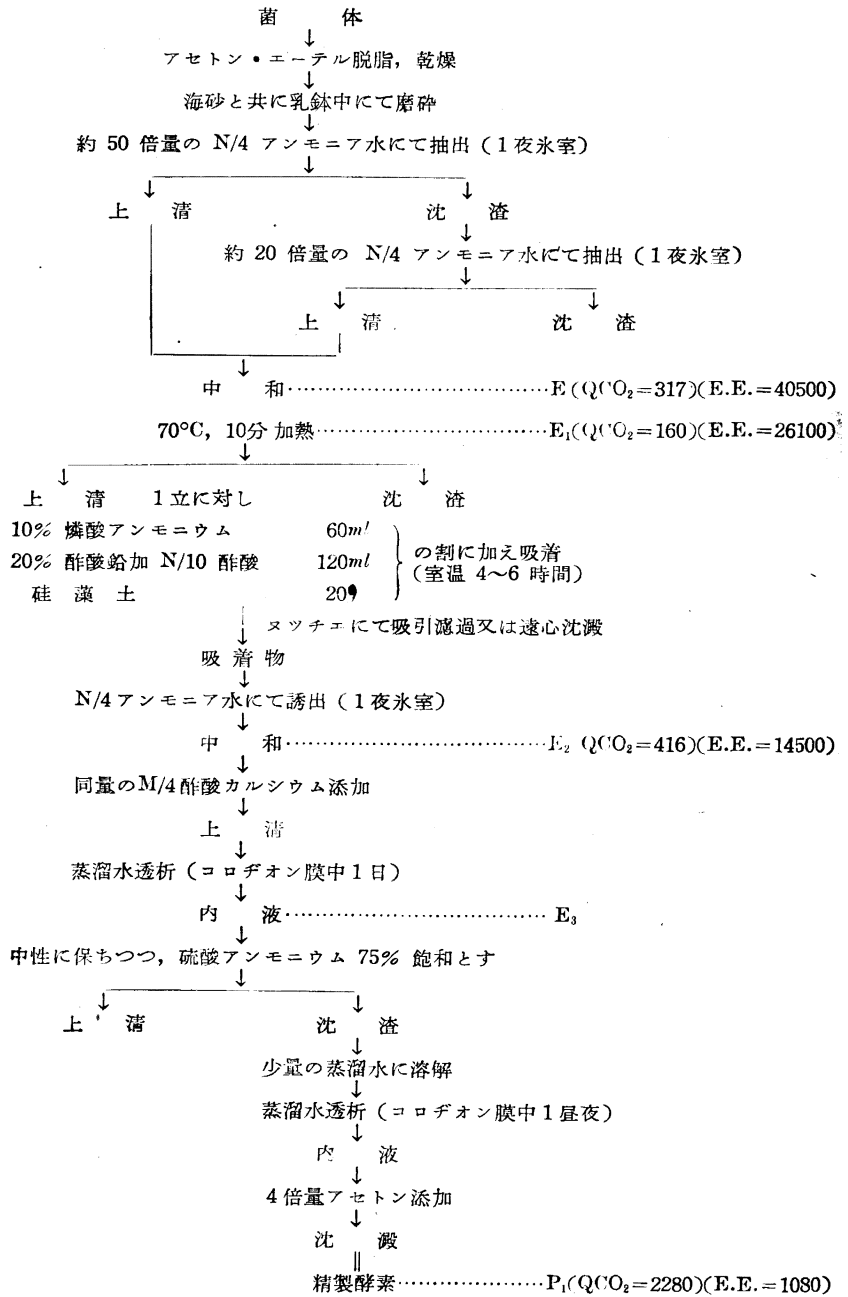
第11表 精製酵素 P_1 に及ぼす種々の物質の影響

精製酵素液 0.2ml, $9.6 \times 10^{-2} M$ tributyrin 0.5ml, 添加剤(すべて中性の水溶液とす) 0.2ml, 0.037M 重曹加 0.9% 食塩水 1.5ml, ガス腔を 5% CO_2 加 N_2 で充す (pH 7.6)。測定温度 37°C、数値は第6表に同じ

終末濃度	M/200	M/400	M/1000	M/2000
添加薬剤				
ヨード	0	0	0	11
塩酸キニーネ	18	30	80	120
アトキシール	44	50	78	84
赤血塩	100	100	100	100
オレイン酸ソーダ	0	10	20	30
酪酸ソーダ	100	100	100	100
$NaCN$	91	100	100	100
$CaCl_2$	100	100	100	100
ウレタン	110	110	110	110
ストリキニーネ	100	100	100	100
エゼリン	19	33	40	64

第 10 表

鳥型菌 (竹尾株) グリセリンブイヨン 3 日目



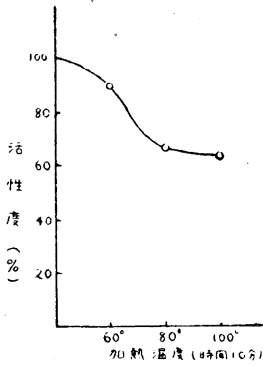
Q(CO₂)=60分間に発生せる (CO₂ 量 (cmm)/使用酵素量 (乾燥量 mg))

E.E.=基質として M/10 tributyrin 0.5ml を使用した時の酵素 1ml により 1 分間に発生する CO₂ 量が 1cmm である時の酵素量を 1 E.E. とす

グリシン・セリン及びグルタミン酸を認めた。本酵素の水溶液の吸収帯を Beckman の Spectrophotometer (DU 型) を用いてしらべると、265 $m\mu$ に極大吸収を認める。種々の物質が P_1 の酵素活性に及ぼす影響は第11表に示

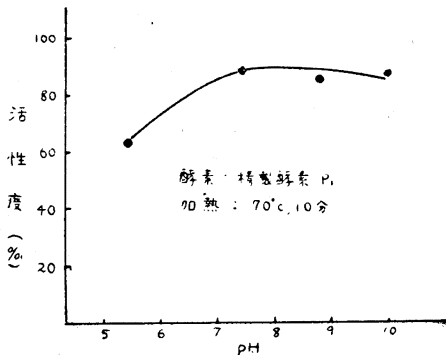
第5図 精製酵素 P_1 の耐熱性

精製酵素 P_1 の水溶液を pH 7.0 で種々の温度で 10 分間加熱し、冷却後 0.5 ml をとり残存する酵素活性を測定した。基質 tributyrin (終末濃度 $1/50M$)。実験条件は第1図の場合と同じ



第6図 精製酵素 P_1 に対する加熱と pH の影響

精製酵素 P_1 の水溶液を種々の pH で 70°C 10 分間加熱し、冷却後 0.5 ml をとり残存する酵素活性を測定した。基質 tributyrin (終末濃度 $1/50M$)。実験条件は第1図の場合と同じ



す如くであり、ヨード・アトキシール・塩酸キニーネ・オレイン酸及びエゼリンは著明な阻害作用を与える。

第4章 結 論

1) 鳥型菌のエステラーゼは培養条件の如何にかかわらず常に耐熱性を有している。

2) 抗酸性菌のエステラーゼには鳥型菌型の耐熱性エステラーゼ (Esterase II) と、チモテー菌型の非耐熱性エステラーゼ (Esterase I) の2型が存在する。

3) Esterase II は更にその耐熱性の差異と各種阻害剤 (オレイン酸・ヨード・アトキシール) に対する態度から酪酸 (プロピオン酸・ヴァレリアン酸) エステル水解酵素と、酢酸エステル水解酵素の2種類に区別することが出来る。Esterase I についてはこのような区別は不可能であつた。

4) 最も強い耐熱性を示すのは、Esterase II の酪酸エステル水解酵素で、pH 7.0, 100°C 30 分間の加熱を行つてもなお 40~60% の酵素活性を残している。この酵素は単離精製可能であり、精製酵素もまた耐熱性を示し、蛋白質又はポリペプチドの性状を有している。

院長 渡辺三郎博士の御校閲を感謝致します。

文 献

- 1) 山村雄一・小倉克彦・今津史郎；結核，28，51，1953.
- 2) Rona, P. & Lasnitzki, A.; Biochem. Z., 152, 504, 1924.
- 3) Umbreit, W.W., Burris, R.H. & Stauffer, J. F.; Manometric Techniques and Tissue Metabolisms, 27, Burgess publishing Co., Minneapolis, 1949.
- 4) 山村雄一；綜合研究結核研究委員会，昭和 28 年 3 月.
- 5) Fodor, P.J.; Arch. Biochem., 25, 223, 1950.
- 6) Fodor, P.J.; Arch. Biochem., 26, 307, 1950.
- 7) Fodor, P.J.; Arch. Biochem., 28, 274, 1950.