

# 納豆菌の Gelatinase について (第2報)

## Gelatinase の性状

蟹江松雄・森原和之

### I. 緒言

Bergmann等<sup>1)</sup>は天然パペイン又は活性パペインが phenylhydrazine で阻害される酵素と阻害されない酵素とから成ることを見出し、前者を papain-peptidase I, 後者を papain-peptidase II と命名した。細菌 protease は Gorini, Gorbach<sup>2)</sup>のように papainase 説又は類似説を唱える人もあるが、Maschmann<sup>3)</sup>のように反対する人もある。吾々は納豆菌 No. 8 の蛋白分解酵素をゼラチンを基質として検討し、phenylhydrazine 存在下の酵素作用がパペインに近似した性質を見出したので以下報告する。

### II. 実験方法

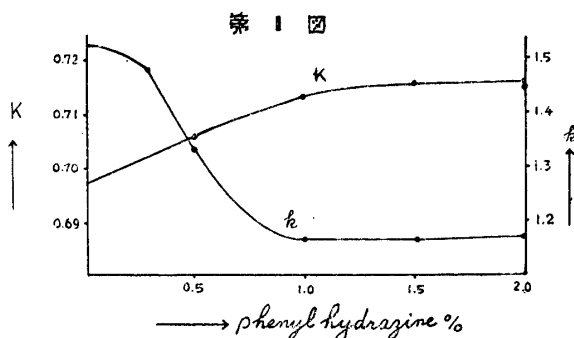
福本氏<sup>4)</sup>に従った5%大豆粕培養基は納豆菌 No. 8 の gelatinase 生産にも良好なものであることを認めたので500cc三角フラスコに100cc宛入れ37°C. で培養し、その濾液を酵素液とした。

gelatinase 力価は二つの方法を用いた。粘度の低下は前報<sup>5)</sup>にならい3%ゼラチン液6cc (pH 7.0の  $\frac{M}{10}$  (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 緩衝液3cc を含有) に一定量の phenylhydrazine を含む水溶液で10倍に希釈した酵素液1ccを加え、50°C. で1時間作用させ、その5ccをとり Ostwald型粘度計を用いて30°C. における流下速度を求め、対照液のそれとの比を求めてKで現わした。

生成アミノ酸量の測定は10%ゼラチン5cc, 上記硼酸・燐酸ソーダ緩衝液 (pH 7.0) 10cc, 上記の如く希釈した酵素液5ccを混じ、40°C. で17時間作用させ、その4ccをとり Van Slyke法でNH<sub>2</sub>-N量(cc)を求め、対照液のそれとの差を求めてkで現わした。対照液とは何れも酵素液を10分間蒸煮し酵素を破壊した液である。

### III. 実験結果及び考察

#### (1) phenylhydrazine による酵素作用の部分的阻害



第1図に見る如く、phenylhydrazine の存在下に酵素作用を測定するとその濃度が大きくなるに従つてアミノ酸の生成及び粘度の低下作用は阻害されるが、1.0%になると阻害は最高に達し、それ以上濃度をましても残部の酵素作用を阻害することは出来ない。この結果は

Maschmann<sup>3)</sup>が hydrazine について得た結果とは明かに相違して、アミノ酸の生成量からも粘度測定からも Bergmann 等<sup>1)</sup>が、パパインに認められたような phenylhydrazine による部分的阻害が認められ2種類の酵素の存在が推論される。従つて吾々は phenylhydrazine に阻害される部を gelatinase I 阻害されない部分を gelatinase II と仮称することとする。

## (2) gelatinase I 及び II の耐熱・耐酸性

### (a) 耐熱性

酵素液を 60°C., 70°C. に各一定時間保つた後該処理酵素液を用いて phenylhydrazine 1% の存在における k (gelatinase II の作用) 及び無添加における k (全 gelatinase の作用) を測定し、(全 gelatinase の作用) - (gelatinase II の作用) から (gelatinase I の作用) を算出した結果は第1表の如くである。

第1表 gelatinase I 及び II の耐熱性  
(酵素液; 5日間培養液)

処理温度 (°C)	酵素の種類	処理時間 (時)		
		0	1	3
60	I	0.22	0.20	0.25
	II	0.92	0.50	0.36
	全	1.14	0.70	0.61
70	I	0.22	0.15	0.00
	II	0.92	0.00	0.00
	全	1.14	0.15	0.00

即ち 60°C. 処理では I は殆ど力価の変化は認められないが, II は急速に不活性化しており, 70°C. 処理では 1時間の処理で II は完全に失活しているにも拘わらず, I は猶力価の残存していることが分る。このことから gelatinase I は II より耐熱性が大であると結論することが出来る。

### (b) 耐酸性

酵素液を  $\frac{N}{10}$  の HCl, NaOH で各種の pH となし 30°C で 2時間保つた後直ちに中和し,

該処理酵素液で前述と同様の方法で gelatinase I 及び II を求めた結果は第2表の如くである。

第2表 gelatinase I 及び II の耐酸性  
(酵素液; 5日間培養液)

酵素の種類	pH				
	2.0	4.0	5.5	7.0	9.0
I	0.00	0.45	0.20	0.27	0.27
II	0.00	0.31	0.60	0.83	0.81
全	0.00	0.76	0.80	1.10	1.08

即ち耐酸性においても gelatinase I は gelatinase II よりもすぐれているということが出来る。

又上表において pH 4.0 で II のアミノ酸生成力が 1/2 以下に減少しているに反し, I はかえつて賦活されていることを知る。これに関し天

然パパインで papain-peptidase I と II とが結合して夫々の作用が不活性となつているという Bergmann 等<sup>1)</sup>の仮説を適用して考えれば, この場合にも結合状態のものから II の破壊によつて I が遊離され活性となつたと考えることが出来説明がつくように思われる。然しこの場合にはパパインのように, 又は Gorbach 等<sup>2)</sup>が *Mammococcus Gorinii* について指摘したように HCN での活性化が認められなかつた事実からパパインと同型の結合物の存在は疑問視される。これ等の点については更に検討を続け度いと思つている。

### (3) gelatinase II の抹殺について

gelatinase I 及び II の耐熱, 耐酸性の相違を利用して gelatinase II だけを抹殺する目的で種々

の pH に調節した後 50°C. に 2 時間処理した結果は第 3 表の如くである。

第 3 表 gelatinase I の抹殺  
(酵素液; 3 日間培養液)

酵素の種類 \ pH	2.0	4.0	5.5	7.0	9.0
I	0.00	0.22	0.11	0.12	0.15
II	0.00	0.00	0.37	0.90	0.87
全	0.00	0.22	0.48	1.02	1.02

表から pH 4.0 で 50°C. に 2 時間加温すれば, gelatinase I は完全に失活し, これに反し II は賦活されて残存することが分る. 換言すれば上の処理液は 1% phenylhydrazine の存在で完全に酵素作用が阻害される. 従つて gelatinase に対する phenylhydrazine の作用は異つた 2

種類の酵素 (I 及び II) によつて示される特性であると考えることが出来る。

#### (4) gelatinase I 及び II の酵素作用の特徴

gelatinase I 及び II が予想される如く 2 種の酵素であれば当然その酵素作用にも特徴が認められる筈である. このことを粘度の低下とアミノ酸の生成の両作用の上から検討した。

即ち酵素液を pH 4.0, 50°C. に 2 時間保ち, 該処理酵素液 (gelatinase I) による K を測定し, 一方無処理酵素液を処理酵素液のアミノ酸生成量と等しくなる様に稀釈 (5 倍稀釈) して K を測定した結果は第 4 表の如くである。

第 4 表 アミノ酸生成量を等しくした  
処理及び無処理酵素液の K 値  
(酵素液; 5 日間培養液)

酵素の処理法		無処理 (5 倍稀釈)	pH 4.0, 50°C., 2 時間
酵素組成		(I + II) × 1/5	I
作用時間 (分)	20	0.675	0.986
	40	0.587	0.945
	60	0.550	0.927

第 5 表 処理酵素液の K と等しくな  
る無処理酵素液の稀釈度  
(酵素液; 5 日間培養液)

		K (作用時間 60 分)
無処理酵素液 (I + II) の稀釈度	10 倍	0.614
	100 倍	0.929
処 理 酵 素 液 (I)		0.927

無処理酵素では顕著な粘度低下作用が認められるに反し, 処理酵素液では非常に小さな力価しか認めることが出来ない。

次に無処理酵素液を順次稀釈して処理酵素液の K 値と等しくなる様にするには第 5 表の如く 100 倍稀釈を要する。

今 gelatinase I の処理酵素液中における残存率を 100% とすれば上記酵素液については

アミノ酸生成量に関しては

$$\text{gelatinase I} : \text{gelatinase II} \div 1 : 4$$

粘度の低下作用に関しては

$$\text{gelatinase I} : \text{gelatinase II} \div 1 : 100$$

となる. 処理酵素液中の gelatinase I の残存率はアミノ酸生成量の上から見れば第 3 表の示す如く 100% 以上 (賦活) である. 従つて該酵素液の gelatinase は両作用の何れから見ても gelatinase II が大部を占めているといえる. 又上式から粘度の低下作用を一定にした場合のアミノ酸生

成量の比は I:II  $\doteq$  25:1 となり、又アミノ酸生成量を一定にした場合の粘度低下作用の比は I:II  $\doteq$  1:25 となり、gelatinase I はアミノ酸生成作用が大であり、II は粘度の低下作用が大であるという両酵素の特徴を知ることが出来た。この結果が papain-peptidase I 及び II の作用と一致するか否か尙検討を要するが、類似した特徴をもつ様に思われる\*。又(1)においてKに対する phenylhydrazine の阻害作用が小さかつた理由も上の酵素作用の特徴によることを知り得た。

以上の結果から納豆菌 No. 8 の gelatinase 中にはアミノ酸の生成及び粘度の低下の各顕著な特徴を有する 2 酵素の存在することが明かにされた。従つて何等かの条件で両種酵素の組成比が著しく変化した場合には 1 作用の測定だけで以て全体の酵素力価を決定することは危険であると思われる。

\* 酵素作用の最適 pH は両酵素共 pH7.0~8.0 辺であつて明かに papain と異なる。

#### IV. 要 約

(1) 納豆菌 No. 8 の培養液中の gelatinase は phenylhydrazine で阻害される酵素 (I) と阻害されない酵素 (II) との少くとも 2 酵素から成ることが指摘された。

(2) gelatinase I は II に比較して耐熱性・耐酸性共に大である。

(3) 上の性質を利用して gelatinase II を抹殺して gelatinase I を残存させることが出来ることを知り得た。

(4) gelatinase I はアミノ酸生成力が大であり反対に粘度の低下作用は小さいが、これに比較して gelatinase II はアミノ酸生成力は小さく粘度の低下作用は大である。且使用した酵素液の大部分は gelatinase II からなることを知つた。

#### 文 献

- 1) M. Bergmann, and W. F. Ross; J. Biol. Chem. **114**, 717 (1936)
- 2) C. Oppenheimer; Die Fermente und ihre Wirkungen **II** 946  
G. Gorbach and R. Ulm; Arch. f. Mikrobiol. **6**, 362 (1935)
- 3) E. Maschmann; Biochem. Z. **234**, 1 (1937)
- 4) 福本; 日農化 **19**, 789 (昭18)
- 5) 蟹江・森原; 鹿農専学術報告 **15**, 102 (昭24)

## Résumé

On the Gelatinase of *Bac. natto*.

## II. Characters of the Gelatinase

Matsuo KANIE and Kazuyuki MORIHARA

The gelatinase of the cultures of *Bac. natto* No. 8 on 5% soy bean cake extract was found to be inhibited partially by phenylhydrazine. This inhibition reaches its maximum value by approximately 0.1 per cent phenylhydrazine, and the further increase in the phenylhydrazine concentration does not effect further inhibition.

The hydrolysis by the gelatinase of this bacterium was suggested to consist, therefore, of two different enzymic processes, one of which is inhibited by phenylhydrazine (gelatinase I), the other not (gelatinase II).

This suggestion was ascertained by maintaining the enzyme solution at pH 4.0 and 50°C. for two hours. By this treatment gelatinase II was completely inactivated, while gelatinase I remained, i. e., gelatinase I is more resistant to heat and acid than II.

By measuring the amounts of the amino acids formed in gelatin solution and the changes of the viscosity of the solution before and after inactivation of gelatinase II by the treatment mentioned above, it was observed that gelatinase I has a strong amino acids forming action and II a remarkable liquefying action and, in addition, the greater part of the gelatinase of the cultures used is composed of gelatinase II.