

アミラーゼ生産性枯草菌に於けるデオキシリボ核酸 分解酵素活性

渡辺, 健治
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21498>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 17 (3), pp.269-275, 1959-12. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

アミラーゼ生産性枯草菌に於けるデオキシ リボ核酸分解酵素活性

渡 辺 健 治

On the Desoxyribonuclease activity of a *Bacillus subtilis* strain producing amylase

Kenji Watanabe

緒 言

核酸分解酵素の一つである Desoxyribonuclease (DNase) の研究の歴史は浅く、酵素の特異性や作用機序に就いては現在でも未知の問題が多く残されている。例えば DNase を、膵臓等に存在し中性附近に最適 pH を有する DNase I と、胸腺等に広く存在し最適 pH を酸性側に有する DNase II に大別する事が広く行われているが、此の区別も厳密なものではない。

細菌の DNase は一般に Mg^{++} で活性化され、pH 7.0~7.5 に最適値をもち、DNase I に属するものと考えられている。著者は生物体内の核酸代謝、特にパイラスの誘発時や形質転換現象に於ける本酵素の挙動追求を目的として研究しつつあるが、本報では先に phage 感染菌として使用した *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefactens* Fukumoto-K 49⁸⁾ を材料として、其の無細胞菌体抽出液中に酵素活性を検索し得たので、其の二三の性質に就いて報告する。

実 験 方 法⁹⁾

高重合 DNA 水溶液の粘度低下現象は、DNase に依る DNA 分解の最も初期に現われる変化であると考えられているので、酵素作用の測定には Ostwald 型粘度計を用い、蒸質 DNA の DNase 作用に依る粘度低下を観察した。

(1) 蒸質 DNA の調製

常法^{4,6,7)}に従い牛脾臓を 0.14 M-NaCl で処理して細胞の核部分を取り、1M-NaCl で抽出後 DNA を含む粘調な上澄を 2 倍量の ethylalcohol に加え特有の糸状沈澱を生成させる。

これを octylalcohol を含む chloroform で除蛋白し、更に同様の NaCl 抽出、alcohol 沈澱を繰り返して精製し、最後に無水 alcohol, ether で洗浄、 $CaCl_2$ を入れた desicator 中で減圧乾燥して DNA 標品とした。標品中 N=12.2%, P=6.7%, 又 $E_{max}(260)/E_{min}(230)=2.1\sim 2.6$, $\epsilon(P)=8000$, Biuret 反応陰性、Folin N は 0.05% 以下。

(2) 酵素溶液

菌体を大豆粕アルカリ浸出培地を用い 30°C で約 18 時間 振盪培養する。⁸⁾ 収量は 100 ml の培養基より約 1 gr の菌体沈澱。遠心分離して収菌、洗浄後再び菌体沈澱の 20 倍量の蒸

溜水に懸濁し 10 KC の音波発生装置 (久保田製) で 15 分処理して菌体を破壊する。ついで菌体残骸を遠心分離で除去した乳白色の上澄を無細胞菌体抽出液として用いた。後述する如く此の菌体抽出液を凍結乾燥すると同程度の酵素活性を有する粉末状乾燥標品が得られる。これを酵素液として使用する場合は約 8 mg/ml に蒸溜水に溶かし菌体抽出液と同濃度にして使用した。

(3) 粘度測定実験操作法

基質として 0.15% DNA 1ml (最終濃度 0.05%), 緩衝液 1ml, 0.1M MgSO₄ 0.15ml (最終濃度 5×10^{-3} M) を 32°C の恒温槽中に装置した粘度計内に入れ, ゴム管より少量の空気を吹き込み其の気泡で攪拌する。約 15 分放置後, 予め 32°C に 5 分保っていた酵素液 1ml を直接大球内の基質に添加, 同様にして混和する。此の時を零時間として以後 5 分毎に常法に従って落下所要時間を測定した。使用粘度計はいずれも純水の同温度に於ける落下所要時間が 36~38 秒。又粘度変化は通常 30 分観察した。水の粘度計数, 比重, 落下時間を η', d, t' とし DNA 溶液のそれを η, d, t とすると, 相対粘度 (η_{rel}), 比粘度 (η_{sp}) は次式で与えられる。

即ち

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = \eta/\eta' - 1 = dt/d't' - 1$$

溶液の濃度が小さい時に酵素を作用させると t は急速に減少するが d は殆ど一定で 1 であるから, 近似的に d を省略して簡単に, $\eta_{sp} = t/t' - 1$ として見做される。²⁾ 従つてこの式に依り DNA 分解様式を比粘度-時間曲線として表わす事にした。

実 験 結 果

(1) 音波処理菌体抽出液の DNase 活性の検索

菌体抽出液に依る反応液の粘度低下を比粘度-時間曲線で示すと第 1 図の如くなる。

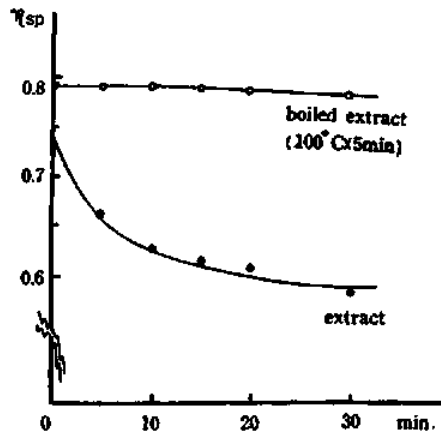


Fig. 1. Change of viscosity of DNA solution. Reaction mixture contained 1 ml of 0.15% DNA, 1 ml of M/5 Atkins-Pantin's buffer (H₃BO₃·KCl+Na₂CO₃) pH8.5, 0.15 ml of M/10 MgSO₄ and 1 ml of enzyme solution (cell free extract).

対照としては抽出液を沸騰水中に5分浸漬したものを使用した。100°Cで5分加熱する事に依り菌体抽出液のDNase作用は完全に失われる。反応の初期程単位時間内の粘度降下は大で通常測定時間30分で比粘度—時間曲線は殆ど水平に近くなる。

(2) 酵素の活性度表示法

Laskowski *et al.*³⁾ は酵素活性を示すのに次式の $K=1 \times 10^{-3}$ をもつて one viscosity unit (V. U.) とした。即ち

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{\eta_{rel-0}}{\eta_{rel-t}}$$

但し η_{rel-0} , η_{rel-t} は夫々 0, t 時間後の相対粘度 (relative viscosity)。著者は η_{rel} の代りに η_{sp} , 時間として分をとり 20 分間の平均値を与えられた条件下に於ける V. U. ($K \times 10^3$) として表示する事にした。

其の方法の妥当性を確認する為 K の値と酵素量, DNA 量との関係を調べたが第2図, 第3図に示される如く酵素量は菌体抽出液の濃度以下で, 又 DNA は通常用いられる範囲内で分子反応の式にほぼ従う。即ち上述の方法は酵素活性の表示法として適当である事を確認した。

(3) 温度処理と酵素活性との関係

此の DNase は熱に対して非常に不安定である。第4図に菌体抽出液を各温度で5分処理した場合の活性度との関係を示す。図から明らかな如く, 40°C で5分間加熱する事に依つて活性は半減し, 70°C では殆ど完全に失活する。

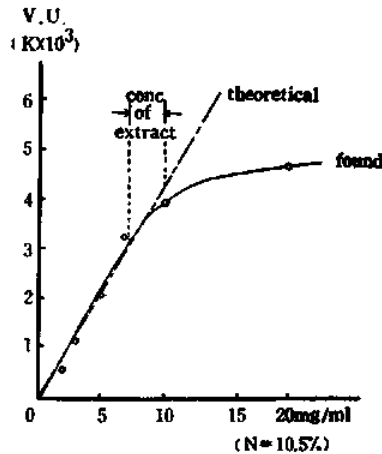


Fig. 2. Relation between the value of K and the amount of enzyme used (mg of lyophilized powder). Reaction mixture was the same as in the experiments of Fig. 1., except the concentration of the enzyme N (nitrogen). Cell free extract generally contains 0.7~1.1 mg N per ml.

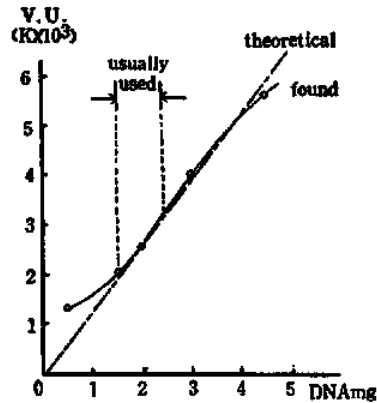


Fig. 3. Relation between the value of K and the amount of DNA employed. Reaction mixture was the same as in the experiments of Fig. 1., but the DNA concentration varies from 0.5 to 4.5 mg.

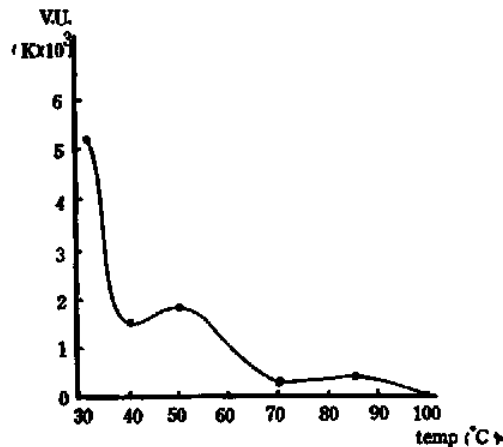


Fig. 4. Heat inactivation curve of DNase action. Incubation mixture was the same as in Fig. 1., except that the enzyme solution was treated for 5 minutes at the temperature stated.

(4) DNase 活性に及ぼす Mg^{2+} , Mn^{2+} の影響

DNase の多くは Mg^{2+} で賦活されるので本酵素に対する其の作用を知る為に $MgSO_4$ の濃度を種々変えて菌体抽出液の DNase 活性を測定した。結果を第 5 図に示す。

本酵素は図から判るように $10^{-2}M$ の Mg^{2+} で明らかに活性化される。同様に Mn^{2+} の影響を $MnSO_4$ を用いて調べたがやはり同程度の濃度で賦活される事が明らかにされた。しかし対照として同酵素の活性を同条件で Mg^{2+} 添加で測つた所に依ると Mn^{2+} の効果は Mg^{2+} のそれに比較すると少々弱い (第 6 図)。

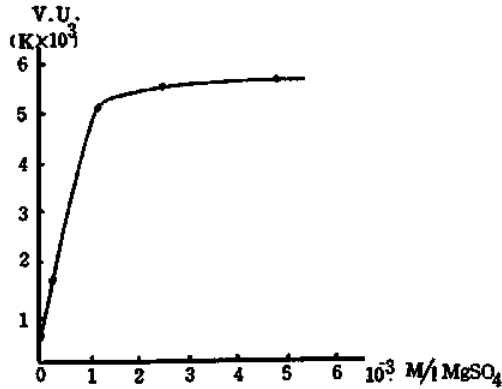


Fig. 5. Effects of magnesium ion on DNase action. Reaction mixture contained 1ml of 0.15% DNA, 1ml of M/10 phosphate buffer (pH 8.5), 0.15ml of M/10~M/200 MgSO_4 and 1ml of enzyme solution.

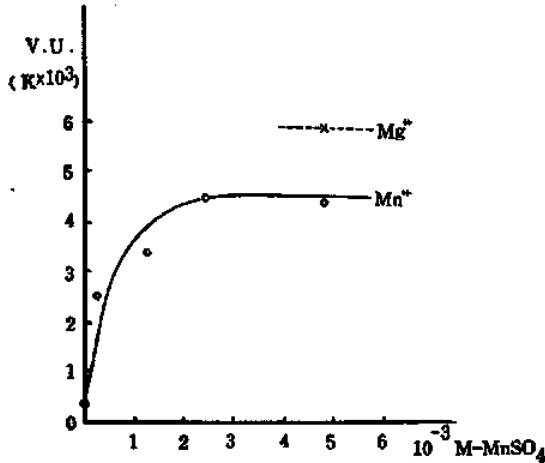


Fig. 6. Effects of manganese ion on DNase action. Reaction mixture contained 1ml of 0.15% DNA, 1ml of Atkins-Pantin's buffer (pH 8.6), 0.15ml of M/10~M/200 MnSO_4 and 1ml of enzyme solution.

(5) 種々の pH 値に於ける酵素活性

pH 8.5 以下では Sørensen の M/10 phosphate buffer, 8.5 以上では Atkins-Pantin の M/5 borate-carbonate buffer を用いて酵素作用の最適 pH を検索した。第7図に其の結果を示す。

Hakim¹⁾ は β -hemolytic streptococcus group の cellular alkaline DNase の最適 pH は 8.5 である事を認めているが、多くの細菌 DNase は中性附近に最適条件をもつていと言われている。本酵素は図から明らかな如く pH 8.5 附近に最適値を有し cellular

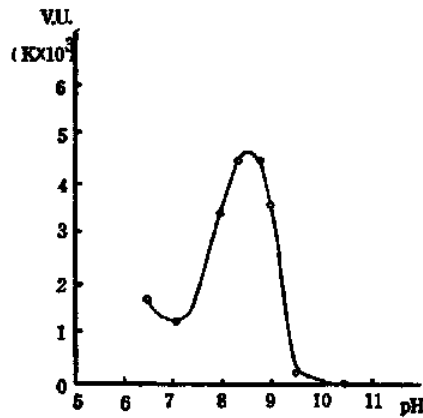


Fig. 7. Activity curve of crude extract of DNase from *B. subtilis* strain at different pH values. Reaction mixture the same as in Fig. 1.

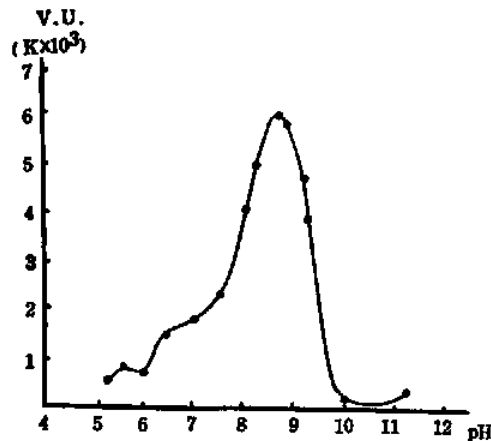


Fig. 8. Enzyme activity of lyophilized preparation at various pH values. Reaction mixture was the same as in Fig. 7. One ml of enzyme solution contains 10 mg-lyophilized powder.

alkaline DNase のカテゴリーに属するものである。しかし抽出液中の酵素は1種に限らず、又阻害剤の影響も考えると此の値が真の細菌 DNase の最適 pH とは必ずしも言えない。此の事は次の凍結乾燥剤を用いた詳細な曲線及びアセトン分別の操作で確かめられたがこれに就いては次報に報告する。

(6) 凍結乾燥標品の酵素作用と最適 pH

菌体抽出液を凍結乾燥すると綿状の粉末標品が得られる。放置後これを水に溶して元に戻し、其の酵素活性を検べ pH 曲線を描いた所、菌体抽出液の活性を其のまま保持している事が判明した(第8図)。従つて以後本酵素は凍結乾燥して保存する事にした。

要 約

アミラーゼ生産菌 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto-K 49 の音波処理菌体抽出液中に Desoxyribonuclease 活性を粘度法で確認した。これは Mg^{++} , Mn^{++} で賦活され、pH 8.5 附近に最適値を有する非耐熱性の酵素である事を明らかにした。

終りに臨み貴重なる菌株使用の便宜を与えられた大阪市立大学福本教授に厚く御礼申し上げます。御指導を頂いた本学山藤教授に謹んで感謝の意を表します。

文 献

- 1) Hakim, A. A., 1958. *Enzymologia*, **20**: 67.
- 2) 黒岩章晃・和田英一, 1958. 実験化学講座(丸善), **8**: 124.
- 3) M. Laskowski, 1951. *Enzymes* (edited by J. B. Sumner and K. Myrbäck), **1**(Part II): 968.
- 4) 榊 友彦, 1958. 蛋白質核酸酵素, **3**: 435.
- 5) 柴谷篤弘・木原弘二, 1952. 酵素研究法(朝倉), **2**: 172.
- 6) 渡辺格・鈴木學之, 1953. 核酸及び蛋白質(共立), 上巻: 165.
- 7) 渡辺 格・三浦謙一郎, 1957. 実験化学講座(丸善), **23**: 245.
- 8) 渡辺健治・山藤一雄, 1959. 九大農学芸雑誌, **17**: 253.

Summary

The existence of a DNase in the supernatant fluid of sonicated *Bacillus subtilis* strain was confirmed by the viscosimetric determination. The reaction is roughly of the first order and the value of the velocity constant, K , was used to compare the enzyme activity. The optimum pH of this DNase is 8.5. The enzyme is activated by both magnesium and manganese ions. The enzyme is completely destroyed by heating at 70°C for 5 minutes.