

Clostridium saccharoperbutylacetonicum の autolysinのアニオン交換体に対する特異的挙動

吉野, 貞蔵
九州大学農学部発酵学教室

緒方, 靖哉
九州大学農学部発酵学教室

林田, 晋策
九州大学農学部発酵学教室

<https://doi.org/10.15017/22291>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 36 (2/3), pp.115-122, 1982-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

Clostridium saccharoperbutylacetonicum の autolysin の アニオン交換体に対する特異的挙動

吉野 貞蔵・緒方 靖哉・林田 晋策

九州大学農学部発酵学教室

(1982年2月5日 受理)

Peculiar Behavior of Autolysin of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* on Anion Exchanger

SADAZO YOSHINO, SEIYA OGATA and
SHINSAKU HAYASHIDA

Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-02, Fukuoka 812

オートリシン (自己細胞壁融解酵素) は、細胞壁の伸長、隔壁形成及び娘細胞の分離など、細菌細胞の分裂増殖において重要な役割を果している (Forsberg and Rogers, 1971). その *in vivo* における作用についての研究は、多くの研究者により行なわれているが、オートリシンが分離精製され、その酵素的諸性質について詳細な研究がされた例は極めて少ない。これはオートリシンが細菌にとって必須のものである一方、少量でその機能を果しうするため、多くの菌株のオートリシンが細胞壁に強く結合するため、その分離が困難であったことによるものと考えられる (村尾, 1977). しかしいくつかの菌株では、オートリシンが菌体外に遊離することが知られており、これはオートリシンの研究、およびその精製にとり非常に有利な性状である。

Clostridium saccharoperbutylacetonicum は、高浸透圧条件下におくと激しくオートリシス (自己融解) する。しかもそのオートリシン (N-アセチルムラミダーゼ) は、本菌の増殖に従い、菌体外に遊離蓄積されていく特異性を有している (吉野ら, 1978). この菌体外オートリシンを用い、その酵素的諸性質について検討をおこなおうとしたが、本酵素はイオン交換体に強く吸着され、通常の解離条件での溶出は見られなかった。本実験では、本酵素のイオン交換体からの解離条件を詳細に検討し、吸着に関与するイオン交換体の結合基と、その結合様式を明らかにしようとした。

材料および方法

1. 使用菌株と培養条件

本実験では、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N 1-4 株 (ATCC 13564) を使用した。その培養には TYA 培地 (Hongo and Murata, 1965) を用いた。培養法として減圧法 (5-10 mmHg) あるいは発酵栓を施した静置法を用い、30°C で培養をおこなった。オートリシン調製や細胞壁調製のためには、50 l の大量培養をおこない、培養初発の濁度を 660 nm の吸光度 (OD₆₆₀) で 0.1 になるように接種し、これが対数増殖中期、OD₆₆₀ で約 0.5 になったものを用いた。

2. 菌体外オートリシンの調製

対数増殖中期、OD₆₆₀ で 0.5 の培養液を、連続遠心機により、12,000 rpm、5 l/30 分の流速で遠心分離をおこない、その遠心上澄液をオートリシン調製に用いた。なお分離された菌体は細胞壁の調製に用いた。遠心上澄液は、60 %飽和硫酸アンモニウムで塩析し、その沈澱物は、傾瀉法および 12,000 rpm、10 分の遠心分離により集め、67 mM リン酸緩衝液 pH 6.0 に溶解し、50 倍量の同上緩衝液で 3 回透析した。透析後、20-40 %飽和硫酸アンモニウムで塩析分画をおこなった。得られた沈澱を同上緩衝液に溶解し、50 倍量の同上緩衝液で 3 回透析した。得られた酵素液を、Sephadex G 75 (4.5×80 cm) でゲル濾過し、細胞

壁溶解活性をもつ画分を集め、60%飽和硫酸アンモニウムで塩析し、沈澱を同上緩衝液に溶解し透析した後、粗オートリシン酵素液として用いた。なお全ての操作は4°Cでおこなった。

3. 細胞壁の調製

遠心分離により集めた菌体を、1 l の氷冷水に懸濁し、音波破砕機（インソネーター 200 M 久保田製作所製）で 9,000 Hz、20 分処理した後、分別遠心により粗細胞壁画分を集めた。粗細胞壁画分は1%ドデシル硫酸ソーダで 35°C、15 時間処理した後、12,000 rpm、30 分遠心分離し、集めた沈澱を温水で再懸濁し、さらに遠心分離、再懸濁を繰り返してドデシル硫酸ソーダを除去した (Ogata *et al.*, 1975)。得られた細胞壁は凍結乾燥した後、実験に供した。

4. 各種樹脂でのオートリシンの吸着溶出条件の検討法

使用した種々の樹脂でのオートリシンの吸着溶出条件を明らかにするため、以下に示したバッチ法を用いた。

乾燥重量 1 g の樹脂を、67 mM リン酸緩衝液 pH 6.0 で緩衝化した後、4.5 ml の同上緩衝液に懸濁した。その後 0.5 ml のオートリシン粗酵素液を加え、水中で 30 分間、時々攪拌しながら、酵素の樹脂への吸着をおこなった。吸着完了後、9,000 rpm、10 分の遠心分離をおこない、上澄液を回収し、未吸着画分とした。沈澱した樹脂には 5 ml の 2 M NaCl を含む同上緩衝液を加え、水中で 30 分間、時々攪拌した後、同上条件で遠心分離をおこない、上澄液を回収し、これを NaCl 溶出画分とした。さらに各種薬剤で溶出を試みた場合、その薬剤名を冠した溶出画分と称した。以上の各画分は、細胞壁溶解活性を検し、添加した全オートリシン活性に対する回収率を算出した。

5. オートリシン活性の測定法

オートリシン活性は、酵素液 0.1 ml、100 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.9 ml および細胞壁 1 mg からなる反応液を 30°C で反応させ、660 nm における吸光度の減少により測定した。活性の力価は以下のように算出した。

$$\text{力価 (ユニット)} = \frac{\text{OD}_{660} \text{ の減少値} \times 10^3}{\text{反応時間 (分)}}$$

結 果

オートリシンの等電点

オートリシンの精製に先だち、高河原ら (1977) の方法に従い、その等電点を測定した。Fig. 1 に示すように、pH 3.5-10 のアンフォライトを用いた焦点電気泳動法によつて、本酵素の等電点 pI は 4.1 付近にあることが明らかとなった。これは、本酵素がその安定 pH である pH 4 から 8 において、ほぼ負に荷電していることを示しており、その精製にアニオン交換体であるジエチルアミノエチル (DEAE)-セルロース、トリエチルアミノエチル (TEAE)-セルロース、ECTEO-LA-セルロースが使用できることを示している。

アニオン交換体での吸着溶出条件の検討

種々の pH の緩衝液で緩衝化したアニオン交換体を用いて、オートリシンの吸着溶出条件の検討をバッチ法を用いておこなったと

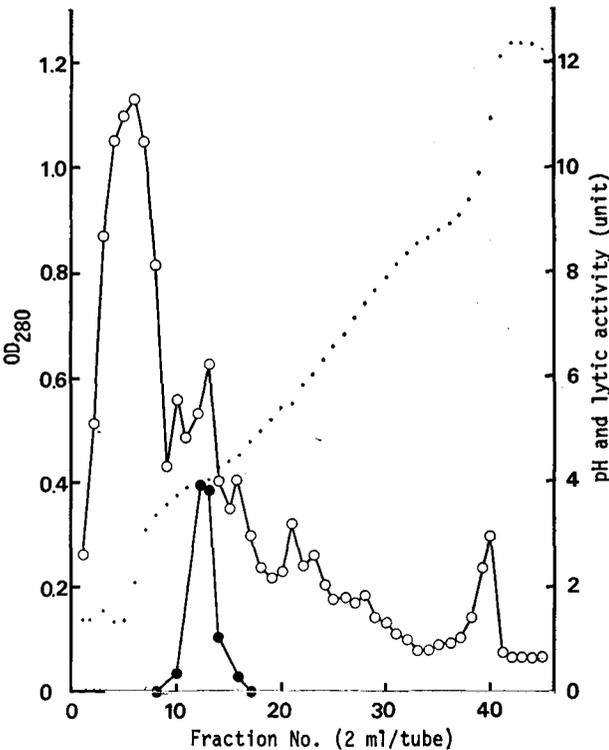


Fig. 1. Electrophoresis of autolysin on isoelectric focusing. The crude enzyme solution was applied on a 110 ml-LKB column, and electrophoresis was carried out with the potential gradient of 400 to 900 V for 48 hr, maintaining column temperature at 4°C by circulating chilled water. Lytic activity was assayed as described in Materials and Methods. Dots indicate pH, ●—● indicates lytic activity and ○—○ indicates optical density at 280 nm.

Table 1. Buffer condition for elution of autolysin adsorbed to DEAE-cellulose. One gram of DEAE-cellulose was equilibrated with initial buffer, and after addition of autolysin, each resin adsorbed autolysin was washed with elution buffer in batchwise system, as mentioned in Materials and Methods. Each pH of buffer was 100 mM acetate buffer (pH 4.0 and pH 5.0), 67 mM phosphate buffer (pH 6.0 and pH 7.0) and 100 mM borate buffer (pH 8.0 and pH 9.0). + indicates recovery of lytic activity in elution buffer and - indicates no recovery. Gdn·HCl is abbreviation of guanidine HCl.

Elution buffer	Initial buffer					
	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
pH 4.0	-	-	-	-	-	-
pH 5.0	-	-	-	-	-	-
pH 6.0	-	-	-	-	-	-
pH 7.0	-	-	-	-	-	-
pH 8.0	-	-	-	-	-	-
pH 9.0	-	-	-	-	-	-
pH 6.0+2M NaCl	-	-	-	-	-	-
pH 6.0+4M NaCl	-	-	-	-	-	-
pH 6.0+5M LiCl	-	-	-	-	-	-
pH 6.0+1M gdn HCl	N. T.	+	+	+	N. T.	N. T.

ころ、Table 1 にみられるように、DEAE-セルロースでは、pH 4 から pH 8 までの本酵素の安定 pH 域で吸着がおこった。しかし、吸着された本酵素は、pH の低下あるいは塩濃度の増加によつても溶出されなかつた。これは pH の低下による酵素荷電の中和、あ

るいは酵素とイオン交換体の解離基とのイオン結合の減少によつても本酵素が溶出されなかつたことを示している。しかし、本酵素の DEAE-セルロースからの解離、溶出は、蛋白変性剤である塩酸グアニジンの存在下でおこつた。同様の結果が ECTEOLA-セルロース、TEAE-セルロースにおいても得られた。しかし、後述するように、ECTEOLA-セルロースと TEAE-セルロースでは、バッチ法では NaCl 溶出画分にも活性の回収がみられたが、カラムを用いた場合には 2 M NaCl によつても溶出せず、塩酸グアニジンを含む溶出液でのみ活性の回収がみられた。

塩酸グアニジンが、アニオン交換体に結合した本酵素の溶出に適していることが明らかになったが、塩酸グアニジンは元来強い蛋白変性剤であるので、本酵素の安定した溶出のための条件の検討をおこなつた。Fig. 2 に示すように、本酵素は pH 6.0 のとき、高濃度の塩酸グアニジン存在下でも比較的安定で、また効率よく溶出されることがわかつた。

種々のアニオン交換体における溶出条件の比較

本オートリシンは、DEAE-セルロース、TEAE-セルロースおよび ECTEOLA-セルロースに強く吸着し、塩酸グアニジンにより初めて溶出し得た。これらのアニオン交換体は、解離基の解離度の大きさは、TEAE>DEAE>ECTEOLA の順である。しかし、本酵素を吸着する強さは、DEAE>ECTEOLA>TEAE の順であつた。Fig. 3 に示すように、バッチ法による各溶出画分の酵素活性の回収は、DEAE-セルロースでは 2 M NaCl 溶出画分では全くみられず、2 M 塩酸グアニジン画分で約 40 %であつた。一方

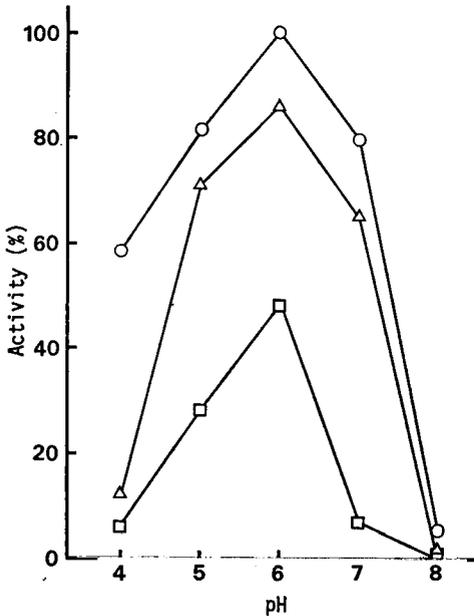


Fig. 2. pH stability of autolysin in the existence of guanidine HCl. Autolysin was treated with each concentration of guanidine HCl at various pH for 2 hr at 0°C, and residual activity was measured. ○—○ indicates 1M guanidine HCl, △—△ indicates 2 M guanidine HCl and □—□ indicates 3 M guanidine HCl.

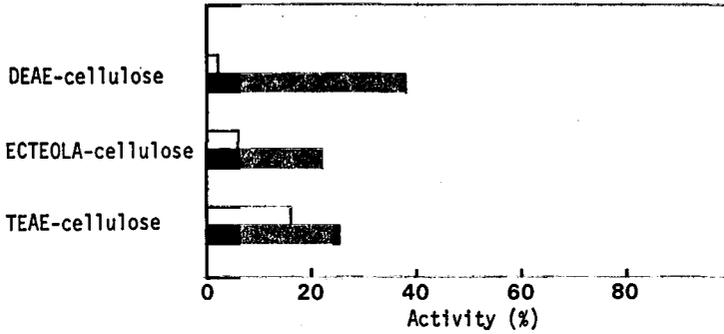


Fig. 3. Elution of autolysin adsorbed to DEAE-cellulose, ECTEOLA-cellulose and TEAE-cellulose by treatment of 2M NaCl or 2M guanidine HCl. One gram of each anion-exchanger was equilibrated with 67mM phosphate buffer pH 6.0 and 5 units of autolysin was added. □ indicates activity of 2M NaCl-eluted fraction and ■ indicates 2M guanidine-HCl-eluted fraction.

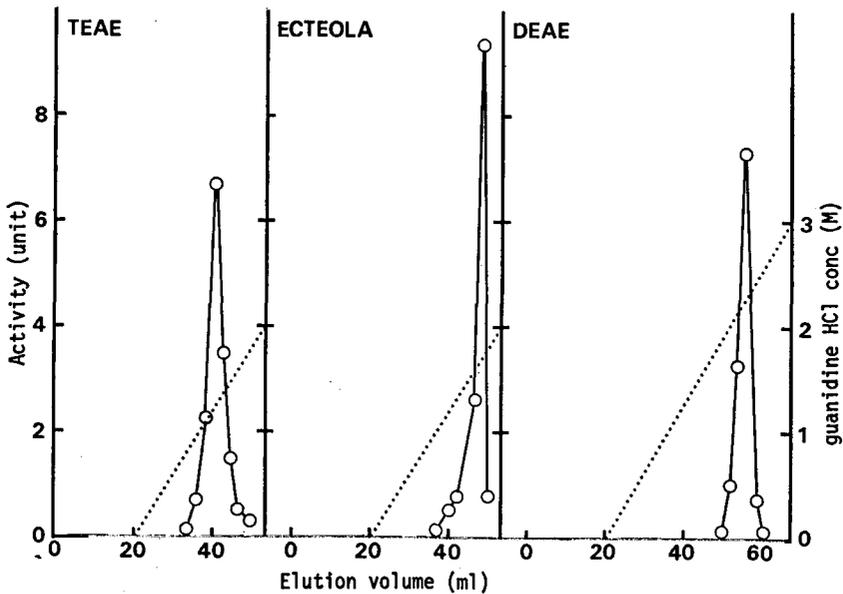


Fig. 4. Linear gradient elution pattern of autolysin on DEAE-cellulose, ECTEOLA-cellulose and TEAE-cellulose. A 15 unit of autolysin was applied on the column (0.8×10 cm) packed with each anion-exchanger equilibrated with 67mM phosphate buffer pH 6.0. Adsorbed autolysin was eluted by increasing of guanidine-HCl concentration from 0 to 2 or 3M. ○—○ indicates autolysin activity.

TEAE-セルロースでは、2M NaCl 溶出画分でも活性の回収がみられた。ECTEOLA-セルロースは、使用したイオン交換体中最も弱いアニオン交換体であるが、2M NaCl 溶出画分での活性の回収が6%と少く、TEAE-セルロースよりも強い吸着を示した。

これらアニオン交換体に吸着した本酵素の、塩酸グアニジンによる溶出条件を、カラムを用いて検討した。Fig. 4に示したように、DEAE-セルロースでは2.3M 塩酸グアニジン濃度で活性のピークがみられ、

ECTEOLA-セルロースでは1.7M、TEAE-セルロースでは1.3M でみられた。カラムを使用した場合でも、バッチ法で得られた結果と同様に、イオン交換体としての解離度の順位 (TEAE>DEAE>ECTEOLA) と本酵素の吸着の強さ (DEAE>ECTEOLA>TEAE) とはことなっていた。

イオン交換体の担体への吸着の検討

本酵素のアニオン交換体への強い吸着は、その等電点付近でもおこるなど、イオン結合のみによつて引き

おこされるものではないと考えられた。また、イオン交換体はイオン結合に与る解離基と、その担体としての樹脂とから出来ているので、これらの樹脂部分も、本酵素の強い吸着に関与している可能性がある。そこで、通常イオン交換体の担体として用いられているセルロース、アガロースおよびセファデックスについて、イオン交換体と同様にパッチ法を用いて、本酵素の吸着能を検討した。しかし、いずれの樹脂においても酵素活性は未吸着画分のみ認められ、全く吸着されなかった。それゆえ、本酵素のイオン交換体への強い吸着は、イオン交換体の担体樹脂部分によるものではないことが明らかとなった。

イオン交換体からの溶出を促す薬剤の検索

イオン交換体への本酵素の強い結合が、その樹脂部分に依存するものではないことから、本酵素がイオン結合以外の結合力によつて、イオン交換体の解離基に吸着されるものであると考えられた。そこで、種々の薬剤を用いて、本酵素のイオン交換体からの溶出の有無を検し、Table 2 に示した。ジオキサンとエチレングリコールは、緩衝液の極性を下げ、疎水的相互作用をもつ物質の溶出に使用されるが (Andersson *et al.*, 1979), これらの物質の存在下、DEAE-セルロースからの本酵素の溶出がみられた。特にエチレングリコールでは、30%近い活性が回収され、これは塩酸グアニジンによるものに匹敵していた。

Table 2. Elution of autolysin adsorbed to DEAE-cellulose by various reagents affecting on hydrophobic interaction. One gram of DEAE-cellulose was equilibrated with 67 mM phosphate buffer pH 6.0, and then 10 unit of autolysin was added. Various reagents were added to the slurry, and the lytic activity recovered to the supernatant was measured.

Elution condition	Activity (%)
Control	100.0
1M NaCl	1.3
1M NaCl+0.1% Triton X-100	2.0
1M NaCl+10% Dioxane	6.9
1M NaCl+50% Ethylene glycol	27.3
3M NaSCN	0.7

アミノ基及びアルキル基への親和性

1) アミノアルキル基への吸着

本酵素のイオン交換体への吸着が、その解離基であるアミノ基への特異的吸着によるものである可能性がある。そこで、種々の鎖長をもち、末端にアミノ基を有するアミノアルキルセファロースを自製し、本酵素

の吸着能をみた。アミノアルキルセファロースは、種々の鎖長のジアミノアルカンをリガンドとして、BrCN 活性化セファロースに結合させて調製した (山崎・赤沼, 1975; Shaltiel, 1974)。イオン交換体と同様にして、パッチ法により各溶出画分への酵素活性の回収率をみたところ、Fig. 5 に示すように、アミノアルキル基のアルキル鎖が長くなるに従つて、本酵素のアミノアルキル基への吸着力が増していた。即ち、NaCl 溶出画分中にみられる活性は、鎖長が長くなるに従い減少し、一方、より厳しい溶出条件である 2M 塩酸グアニジン溶出画分の活性は増加していた。この結果から、アルキル基が本酵素の吸着を引きおこしていると考えられた。

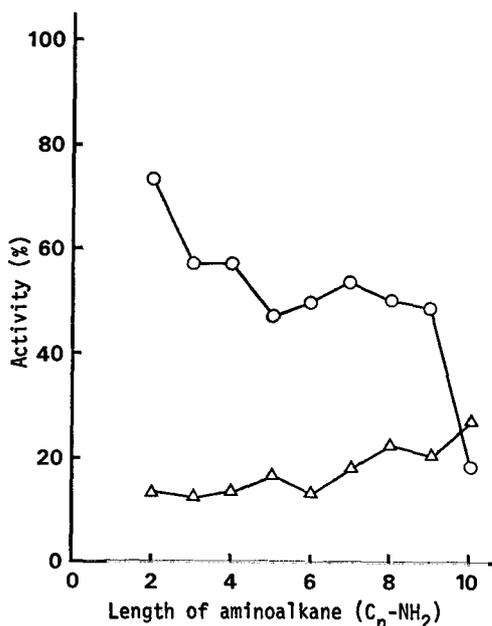


Fig. 5. Effect of aminoalkane length in aminoalkyl-Sepharose on adsorption of autolysin. One gram of each aminoalkyl-Sepharose was equilibrated with 67 mM phosphate buffer pH 6.0 and autolysin was added. ○—○ indicates 2 M NaCl-eluted activity and △—△ indicates 2 M guanidine-HCl-eluted activity.

2) アルキル基への吸着

アミノアルキル基のアルキル基が、本酵素の吸着に関与していると考えられたので、末端にアミノ基を持たない、アルキルセファロースを調製し、本酵素の吸着能をみた。アルキルセファロースはアミノアルカンをリガンドとし、BrCN 活性化セファロースに結合

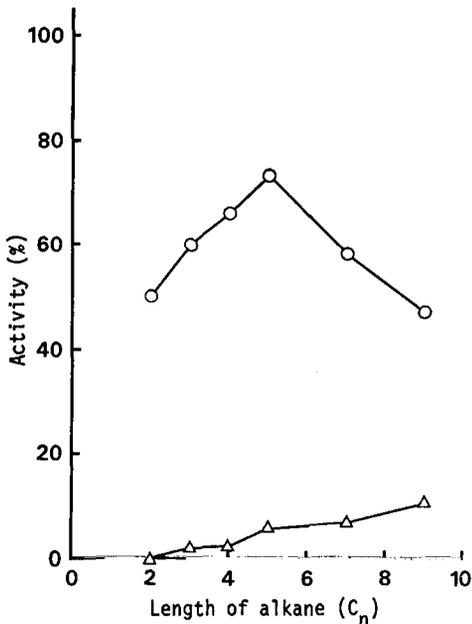


Fig. 6. Effect of alkane length in alkyl-Sephacrose on adsorption of autolysin. One gram of each alkyl-Sephacrose was equilibrated with 67 mM phosphate buffer pH 6.0 and autolysin was added. ○—○ indicates 2 M NaCl-eluted activity and △—△ indicates 2 M guanidine-HCl-eluted activity.

させて調製した。Fig. 6 に示すように、本酵素はアミノアルキル基におけると同様に、アルキル基の鎖長の長くなるに従い、吸着力が増加していた。しかし、アニオン交換体の一種であるアミノアルキルセファロースに比べ、吸着力は弱かったが、DEAE基を構成するエチル基など、短鎖のアルキル基に本酵素が吸着することが明らかになった。

DEAE-セルロースのオートリシン精製への応用

本酵素がアニオン交換体に強く吸着され、高塩濃度下でも溶出せず、塩酸グアニジン等によつて溶出するというこれまでの結果をふまえてその精製をおこなった。セファデックス G-75 で部分精製したものを、DEAE-セルロースに吸着させ、2 M NaCl を含む 67 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)、および 0.5 M 塩酸グアニジンを含む 同上緩衝液で溶出させ、さらに

0.5-3 M の塩酸グアニジンのリンアグラジェントによつてオートリシンを溶出させることによつて、Table 3 に示すように比活性が約 20 倍に上昇した。

考 察

通常イオン交換体は、蛋白質の等電点および液の pH とイオン強度の影響をうけて、蛋白質の吸着と解離をおこなう (藤田ら, 1980)。等電点 pI より高い pH で安定な蛋白質の場合はアニオン交換体を、低い pH で安定な蛋白質の場合はカチオン交換体を用いる。本菌のオートリシンは、その等電点 (pI 4.1) より高い pH で安定な蛋白質であるので、DEAE-セルロース等弱アニオン交換体を用いた。しかし、本酵素はその等電点付近においても強い吸着がおこり (Table 1)、その吸着がイオン交換体とのイオン結合によるもののみでないことを示唆していた。これらのイオン交換体の構造をみると、Table 4 に示すように、セルロース等を担体として、エチル基が窒素原子をとり囲んだ形のジエチルアミノエチル基あるいはトリエチルアミノエチル基がイオン基として結合している。この構造から、イオン結合以外の様式の可能性を考えた場合、セルロース等イオン交換体の基本骨格となつている担体との水素結合 (藤田ら, 1980)、およびジエチルアミノエチル基等の疎水性基に由来する疎水結合が考えられた。しかし前者の場合、硫酸アンモニア等カオトロピック効果の低い塩の存在下ではおこり得るが、通常の NaCl 等の塩では生じない。実際、イオン交換体の担体樹脂に対して、本酵素の吸着がみられなかったことから、水素結合が本酵素の DEAE-セルロース等弱アニオン交換体への強い吸着で主な役割を果しているとは考えられなかった。一方、本酵素がアミノアルキルセファロースやアルキルセファロースにおい

Table 4. Chemical structures of DEAE-cellulose and TEAE-cellulose.

DEAE-cellulose	cellulose-O-CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂
TEAE-cellulose	cellulose-O-CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₃

Table 3. Purification of autolysin.

Steps	Volume (ml)	Protein (OD ₂₈₀)	Activity (unit)	(unit/OD ₂₈₀)	Yield (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄ 60%	350	280.000	21.8	0.78	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-40%	48	104.000	129.5	1.24	81
Sephadex G-75	120	1.260	34.7	27.51	55
DEAE-cellulose	5	0.534	336.0	629.21	22

て、アミノエチル基やエチル基など短鎖のものに対しても強く結合し、さらにアミノアルキル基やアルキル基の鎖長が長くなるに従い、その吸着の強さが増すことから、疎水性基に強い親和性を有することが示された。

要 約

1. *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (AT-CC 13564) の autolysin は pI 4.1 で、DEAE-セルロース等のアニオン交換体に強く吸着され、蛋白質の溶出に通常用いられる条件では溶出されなかつた。種々の溶出条件を検討したところ、高濃度の塩酸グアニジン、ジオキサン、エチレングリコール等疎水性の結合を壊す薬剤により溶出することができた。

2. DEAE-セルロース, TEAE-セルロース, ECTEOLA-セルロースへの本酵素の吸着の強さを、塩酸グアニジンによる溶出で検討したところ、DEAE > ECTEOLA > TEAE の順位で強い吸着がみられた。これは解離基の解離度の大きさ TEAE > DEAE > ECTEOLA とことなっており、本酵素の吸着がイオン結合のみによるものでないことを示していた。一方、イオン交換体の担体であるセルロース、アガロース、セファデックスには吸着がおこらなかつた。

3. 種々の鎖長のアルキル基をもつアミノアルキルセファロース、アルキルセファロースを調製し、本酵素の吸着を検討したところ、本酵素はアルキル基の鎖長に比例して強く吸着した。また短鎖のアルキル基にも吸着した。

4. 以上の結果から、DEAE-セルロース等に対する本酵素の強い吸着には、DEAE基等を構成するアルキル基に対する疎水結合が与つているものと結論した。これらの性質を利用して、DEAE-セルロースと塩酸グアニジンにより本酵素の精製をおこなつたところ、セファデックスG-75ゲル濾過画分よりさらに20倍比活性の上昇がみられた。

文 献

Andersson, K., Y. Benyamin, P. Douzou and C. Balny 1979 The effects of organic solvents and temperature on adsorption of yeast 3-phosphoglycerate kinase from immunoadsorbent. *J. Immunol. Methods*, 25: 375-381
 Cleveland, R. F., A. J. Wicken, L. Daneo-Moore and G. D. Shockman 1976 Inhibition of wall autolysis in *Streptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipids. *J. Bacteriol.*,

126: 192-197
 Forsberg, C. W. and H. J. Rogers 1971 Autolytic enzymes in growth of bacteria. *Nature*, 229: 272
 藤田 剛・鈴木康生・山内惇一・高河原 勇・藤井克美・山下仁平・堀尾武一 1980 水素結合クロマトグラフィーと酵素精製へのその応用. 蛋白・核酸・酵素, 別刷 22号: 93-100
 Ghuysen, J. and G. D. Shockman 1973 Biosynthesis of peptidoglycan. In "Bacterial Membranes and Walls," ed. by L. Leive, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 37-130
 Hamaguchi, K. and E. P. Geiduschek 1962 The effect of electrolytes on the stability of the deoxyribonucleate helix. *J. Amer. Chem. Soc.*, 84: 1329-1338
 Hongo, M. and A. Murata 1965 Bacteriophages of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 1. Some characteristics of the twelve phages obtained from the abnormally fermented broth. *Agric. Biol. Chem.*, 29: 1135-1139
 松尾雄志・堀尾武一 1966 蛋白質の電気泳動的等電点分画法. 蛋白・核酸・酵素, 12: 737-748
 村尾沢夫 1977 Glycosidase 型細菌細胞壁溶解酵素. 船津・鶴 編: 溶菌酵素. 講談社, 東京, 9-129頁
 Ogata, S., Y. Tahara and M. Hongo 1975 Chemical composition of cell wall peptidoglycan from *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* studied with phage endolysins and gas chromatography. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 21: 65-74
 Rogers, H. J. 1979 The function of bacterial autolysins. In "Microbial Polysaccharides and Polysaccharases," ed. by R. C. W. Berkeley, G. W. Gooday and D. C. Ellwood, Academic Press, London, New York and San Francisco, pp. 237-284
 Shaltiel, S. 1974 Hydrophobic chromatography. In "Method in Enzymology," Vol. 36, ed. by B. Jakoby and M. Wilchek, Academic Press, New York, San Francisco and London, pp. 126-140
 高河原 勇・藤田 剛・鈴木康生・山内惇一・藤井克美・山下仁平・堀尾武一 1977 酵母細胞内酵素の系統的精製法. 発酵と工業, 35: 737-760
 山崎 誠・赤沼宏史 1975 アフィニティークロマトグラフィーの基礎. 山崎ら編: アフィニティークロマトグラフィー. 講談社, 東京, 1-37頁
 吉野貞蔵・森山真塩・緒方靖哉・林田晋策 1978 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* の autolysin (その4). 昭和53年度日本農芸化学会講演要旨集: 24頁
 吉野貞蔵・緒方靖哉・林田晋策 1981 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* の autolysin (その7). 昭和56年度日本農芸化学会講演要旨集: 53頁

Summary

The autolysin (N-acetylmuramidase) of *Clostridium saccharoperbutylaceticum* (ATCC 13564) strongly adsorbed to anion exchangers such as diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose, triethylaminoethyl (TEAE)-cellulose and ECTEOLA-cellulose. Therefore, the adsorbed autolysin was not eluted with buffer containing various concentrations of NaCl or buffer of various pHs. However it could be eluted from them with the buffer containing high concentration of guanidine·HCl, dioxane and ethylene glycol, which were the reagents used for break of hydrogen bonding of proteins or weakening the hydrophobic interaction of proteins. These results indicated that the hydrophobic interaction would be participate in this strong adsorption of autolysin on the anion exchangers.

The autolysin could not adsorb to carriers of the anion exchangers (cellulose, agarose and Sephadex), while it adsorbed to aminoalkyl-Sepharose and alkyl-Sepharose prepared. The adsorption rate of autolysin toward those resins increased in proportion of the elongating length of alkyl chain. Therefore, its adsorption to the anion exchangers was thought to be caused by affinity for hydrophobic residues, namely alkyl residues of di-(or tri-)ethylaminoethyl groups of them.

These properties of autolysin were applied on its purification, and the specific activity of DEAE-cellulose eluents by guanidine·HCl increased in 20 times more than that of gel filtrated fraction.