The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	抗酸菌から分離されたBiuret分解酵素について
Author(s)	西原, 弘
Citation	大阪大学, 1966, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28891
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【41】

氏名・(本籍)	西原　弘（にしはら　ひろし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 897 号
学位授与の日付	昭和41年3月28日
学位授与の要件	医学研究科内科系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**抗酸菌から分離された Biuret 分解酵素について**
論文審査委員	(主査) 教授 堀　三津夫 (主査) 教授 須田　正巳　教授 山村　雄一

論文内容の要旨

〔目　　的〕

Biuret ($NH_2CONHCONH_2$)（以下「ビ」と略す）は人工的尿素誘導体で，この物質が細菌の代謝物質あるいは菌体成分中に認められたという報告は現在まで皆無である。当研究室において抗酸菌の amide 化合物分解能を検索中，一部の菌株（鳥型菌A—62株，Mycobacterium ranae, 非定型抗酸菌山本一株)が「ビ」を分解して NH_3 を生成することを認めた。当時大豆より抽出された結晶 urease が微弱ながら「ビ」分解活性を示すという報告はみられたが，特異的「ビ」分解酵素に関する報告は全くみられなかったので，その存在を明らかにすることは酵素学的に新しい知見をもたらすものであり，またそれが，抗酸菌の未知の代謝経路を明らかにする端緒となるかもしれないと考えこの研究に着手した。

〔方　　法〕

1) 使用菌株ならびに培地：M. ranae, 4%グリセリン肉汁培地を用いた。

2) 酵素活性の測定：小型 Thunberg 管を用い主室に反応液 2ml を，側室に 2N H_2SO_4 0.5ml を入れ，一定時間保温後　直ちに側室の H_2SO_4 を主室に流入させ混和し反応の進行を止めたのち，各 0.5ml をとり生成 NH_3 量を測定した。NH_3 の定量は Conway の微量拡散法により 0.015M H_2SO_4 溶液に捕集した後 indophenoe 法により発色させ，Beckmann type spectophotrometer を用いて 625mμ で比色定量した。

3) 蛋白の定量：Lowry 法を用い，結晶牛血清アルブミンを standard に比色定量した。

4) 酵素単位と比活性：「ビ」分解活性の測定には，基質 0.005M, glycine-NaOH buffer 0.05M (pH9.5)，全量 2.0ml を標準反応液とし，この条件で37°C，30分間に1μmole の NH_3 を生成する酵素量を1酵素単位と定め，酵素単位/mg蛋白 で比活性を示した。なお，urease 活性の測定には

基質 0.005M. phosphate buffer 0.05M (pH 7.5), 全量 2.0ml の組成の反法応液を用いた。

5) CO_2 の定量：Warburg 装置を用い検圧法により測定した。

〔成　　績〕

1) M. ranae は「ビ」分解活性のほかに urease 活性を示す。4％グリセリン肉汁培地培養菌浮遊液を用いて培養日数と両活性の変動を比較検討した結果，urease 活性は培養初期に高く次第に減弱して4日目以後はきわめて微弱となるが，これと対照的に「ビ」分解活性は初期には低いが次第に上昇して8日目に最高になる。

2) 菌体を石英砂と共に磨砕した後高速遠心分画を行ないえた画分のうち,「ビ」分解活性は105,000×g，60分遠心上清にある。

3) 以上の知見より抽出材料として上記培地8日培養菌体を用いた。「ビ」分解酵素の精製方法は，菌体を石英砂と共に磨砕した後 pH 7.5 phosphate buffer で抽出し 遠心・ろ過・透析により crude extract をえた (step 1)。これに protamine 処理 (step 2)，硫安分画 (30〜50％飽和) (step 3)，燐酸カルシウム・ゲルによる不純蛋白の吸着除去 (step 4)，硫安再分画 (30〜50％飽和) (step 5) の操作を行なった後，澱粉を支持体とする分域電気泳動法による精製を行なった。最も活性の強い画分では crude extract に対して約80倍の比活性を示すが，この画分のみでは収量がきわめて低いため，比較的比活性の高い画分を集めて硫安で濃縮し これを最終の酵素標品とした (step 6)。この画分は 28倍に精製されているが，収量は5.2％である。Step 5 と 6 の標品を以下の実験に用いた。

4) 至適 pH は glycine-NaOH buffer で9.5附近にある。

5) Step 6 の酵素標品は60°C 10分の加熱で約80％，80°C 5分の加熱で100％失活する。

6) step 6 の酵素標品はきわめて厳密な基質特異性をもち，検討した範囲では biuret 以外の構造類似の物質はすべて分解しない。

7) 本酵素は 2.5×10^{-4}M の濃度で Ag^{+}, Hg^{++}, Pb^{++}, Mn^{++} などの重金属イオンにより85％以上の阻害を受ける。SH 阻害剤である PCMB により 2.0×10^{-4}M 以上の濃度で完全に阻害され，この阻害は glutathione, cysteine の添加により完全に回復する。EDTA によっても弱い阻害をうけるが，その程度は実験条件により動揺し，Mg^{++} の添加により回復する。

8) 本酵素活性に対する基質濃度の影響を検討し，Lineweaver-Burk 法で算出した Michaelis 定数は 6.1×10^{-4}M である。

9) 「ビ」分解過程には：

(Ⅰ) $NH_2CONHCONH_2 \xrightarrow{+2H_2O} 3NH_3 + 2CO_2$

(Ⅱ) 〃 $\xrightarrow{+_2HO} NH_3 + NH_2CONHCOOH$ (allophanic acid)

(Ⅲ) 〃 $\xrightarrow{+H_2O} NH_3 + CO_2 + NH_2CONH_2$ (urea)

の3過程が考えられるが，① urease 活性を欠く精製酵素標品では基質初濃度と等モル以上の NH_3 の生成は認められない。② NH_3 と CO_2 の生成量を経時的に検討した結果，大約 1：1 のモル比の生成をみる。③ 100°C，5分加熱して反応を止めた後 urease を添加すると著明な NH_3 の生成

が認められる，などの結果から（Ⅲ）の過程をとるものと考えられる。

〔総　　括〕

抗酸菌の一部の菌株の示す「ビ」分解反応は特異的「ビ」分解酵素により触媒される反応であることを明らかにし，この酵素を M. ranae より分離精製してその酵素学的性状を明らかにした。しかし精製方法は特に収量の面で更に検討の要があり，またこの酵素の抗酸菌における生理的意義も，種々検討したが現在まで明らかにされておらず，これらは今後に残された研究課題である。

論文の審査結果の要旨

〔研究目的〕

1961年研究室の北村らは抗酸菌の amide 化合物分解能を検索中一部の菌株の生菌浮遊液が biuret を分解して NH_3 を生成することを認知した。当時，結晶 urease がきわめて微弱ながら biuret 分解活性を有するという報告がみられたほか，特異的分解酵素に関する知見は全くえられていなかったので，著者はこの反応に注目し，まずこの反応の本態を究明するため鳥型菌A—62株の無細胞抽出液を用いて予備実験を行ない，酵素反応であることをたしかめた。その約半年後，Wheldon et al.(1962) は Pseudomonas aeruginosa を用いて biuret 分解酵素の誘導的生成を報告したが，その酵素学的性状についてはほとんど明らかにされていなかったので著者はこの酵素の基質特異性，酵素学的性状の検討を目的に M. ranae を供試菌株として本酵素の単離精製を試みた。

〔方法ならびに成績〕

M. ranae はbiuret 分解活性とともに urease 活性をもつため，培養日数による両活性の変動を検討した結果，グリセリン肉汁培地培養菌では培養初期に urease 活性が強く次第に減弱するのに反して，biuret 分解活性は初期には弱く次第に増強して 8 日目前後に最も強い活性を示すことが明らかとなった。そこで 8 日培養菌体を抽出材料とし，これを石英砂とともに磨砕して粗酵素液を調製 (step. 1) 次いで Protamine処理 (step. 2)，硫安分画（30〜50%飽和）(step. 3)，Ca phosphate gel 処理 (step. 4)，硫安再分画（30〜50%飽和）(step. 5) 等の操作ののち，澱粉を支持体とする分域電気波動を行ない，その活性画分を硫安で濃縮して粗酵素液の28倍の比活性をもつ精製酵素標品 (Step 6) をえた。step. 5 と 6 の標品を用いてその性状を検討した結果，本酵素の至適 pH は glycine-NaOH buffer で9.5附近にあり，基質特異性はきわめて厳密で biuret 以外の被検物質は全く分解されない。本酵素は 80°C，5 分の加熱で完全に失活し，また，Ag^{+}, Hg^{++}, Pb^{++}, Mn^{++} などの重金属イオンにより強い阻害をうける。p-Chloromercuri-benzoate (PCMB) は低濃度で完全に本酵素活性を阻害し，この阻害は glutathione, cysteine などの SH 化合物の添加により完全に回復することから，本酵素はいわゆるＳＨ酵素に属するものと考えられる。

本酵素の Michaelis 定数は 6.1×10^{-4}M である。

本酵素の biuret 分解機序としては

1) $NH_2CONHCONH_2 \xrightarrow{+2H_2O} 3NH_3 + 2CO_2$

2) $NH_2\ CONHCONH_2 \xrightarrow{+H_2O} NH_3 + NH_2CONHCOOH$ (Allophanic acid)

3) $NH_2CONHCONH_2 \xrightarrow{+H_2O} NH_3 + CO_2 + NH_2CONH_2$

などの過程が考えられるが，(1) urease 活性を欠く精製酵素標品を用いて長時間 NH_3 の生成量を追跡したが，基質初濃度と等モル以上の NH_3 の生成は認められない。(2) 100°C，5分の加熱により反応を杜絶したのち urease を添加したところ，その後さらに著明な NH_3 の生成が認められた。(3) NH_3 と CO_2 の生成量を同時に測定した結果，大約 1：1 のモル比の生成が認められた。以上の成績より本酵素は biuret を水解的にそれぞれ1モルのアンモニアと炭酸ガスと尿素に分解することが明らかにされた。

〔総　　括〕

著者は抗酸菌の一部の菌株の示す biuret 分解反応が特異的 biuret 分解酵素によるものであることを明らかにし，この酵素を M. ranae より単離精製してその酵素学的性状を詳細に検討した。本酵素は基質とする物質が生体の代謝とは無縁と考えられている人工的合成物質であり，しかも constitutive enzyme である点で非常に興味あるものである。抗酸菌における本酵素の生理的意義については現段階では不明であるが，その研究の進展とも関連して，著者の本研究は，抗酸菌の未知の代謝過程，あるいは酵素学的な新しい研究の端緒となるものと期待される。