Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-30

納豆菌蛋白質分解酵素に関する研究（第一報）：蛋白質分解酵素の結晶に就いて

三宅，捷
清水，淳一

(Citation)
兵庫農科大學研究報告．農芸化学編,1(1):11-14

(Issue Date)
1953-12

(Resource Type)
departmental bulletin paper

(Version)
Version of Record

(JaLCDOI)
https://doi.org/10.24546/81008119

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/81008119

KOBE UNIVERSITY

納豆菌蛋白質分解酵素に関する研究

蛋白質分解酵素の結晶に就いて （第一報）

三宅　捷，清水淳一（生物化学講座）

The Studies on *Bacillus natto* Protease.

On Crystallization of Protease (1)

Suguru Miyake and Junichi Shimizu

緒　　言

蛋白分解酵素の結晶に関しては，初めて Northrop[1] が，動物胃液の *Pepsin* を結晶状に取出した．最近に於て微生物からは Crewther, G. 及び Lennox, G.[2] 等が，*Asp. oryzae* の培養液より，其後赤堀が 1952 年にタカヂアスターゼより夫々 protease を結晶状に分離し得た．又 Elliott, D.[3] は，*Streptococal* protease を，福本[4] は，*Bucillus amyloliquefaceins* Fukumoto の protease を結晶状に得た．一方納豆は，我が国の特産物であるが，この中に含まれている protease については，1925 年大島[5] によつて其精製及び性質について報告されているが結晶状に得られなかつた．

著者等は，脱脂大豆抽出液を培養基として是に *Bacillus natto* Sawamura を繁殖せしめ此の液を精製し，蛋白質分解酵素を結晶として分離せしめたので此の結果を報告する．

実　験　の　部

1) 培養基の調製

脱脂大豆 2分に対し0.2%HCl 溶液 100分を加え，加圧釜にて 110°C で，30 分間蒸煮し，冷却後布にて濾過し濾液に NaOH 溶液を加えて pH 4.5～5 となし，100°C にて10分間加熱し蛋白質を凝固せしめて後濾過し，その濾液を再び NaOH 溶液で pH 7.2 となし，一夜放置後上澄液を 500c c 三角フラスコに 100cc の割合にいれ，120°C にて殺菌する．培養基中の N 量は0.05%であつた．

2) 酵素力試験法

protease の作用力の測定方法として種々あるが，本実験に於いては次の三方法について作用力を検した．

(イ) Milk の凝固試験法

此の試験法としては，著者等は次の方法で行つた．即ち20gの粉乳（明治乳業製）を乳鉢中で徐々に水を加えながら充分磨砕して後，pH 7 に保ち水を加えて100 となし，ガーゼで濾過する．此処に得られた Milk を溶液とし，5cc宛試験管に取り一定量の酵素液を加え 40°C20分間作用せしめた．End point は，凝固直前迄の分数を以て表わした．

(ロ) Casein の消化力試験法

大島変法に準じて行つた．即ち，0.5% Casein 溶液5 cc宛を試験管に取り，これに一定量の酵素液を加え，40 °C 1時間作用せしめた．End point 試薬としては，醋酸酒精液（醋酸1，水 49，酒精50）を用い，これによつて白濁する点を求めた．Casein は岸田化学の製品を用いた．

(ハ) Gelatin の液化力試験法（福本法と同じ）

pH 7 の 4% Gelatin 溶液を5cc 宛試験管に取り一定量の酵素液を加え40°C,2時間作用せしめ直ちに1°C の氷水中にいれ30分後凝固の直前の場合の酵素のcc数をもつて表わした．酵素液1ccが4% Gelatin 溶液 5ccを2時間で凝固直前にその時を以て一単位とする．

3) 菌　　株

Bacillus natto Sawamura *394* 菌

仙台市原の町鹿島町．三浦二郎氏より恵与されたものである．

4) 培　養　法

上記液体培養基に，3日間斜面培養（30分間蒸煮した脱脂大豆粕抽出液に 2.5%の寒天を加え pH 7 に調整した培地）して得た納豆菌を無菌水にて稀釈し接種した．35° C の孵卵器中に2日間培養した．

当時斜面培養に使用せる培地は大豆20分に水 200 分を加え120°C で30分間蒸煮して得た大豆粕抽出液に 2.5 % の寒天を加えpH7としたものを用いた．

5) 培養基組成と protease の生産量との関係

培養基調製の項に於いて述べた方法に準じた．但し抽

京都大学に於る日本農芸化学会関西支部例会にて発表（1953年4月25日）

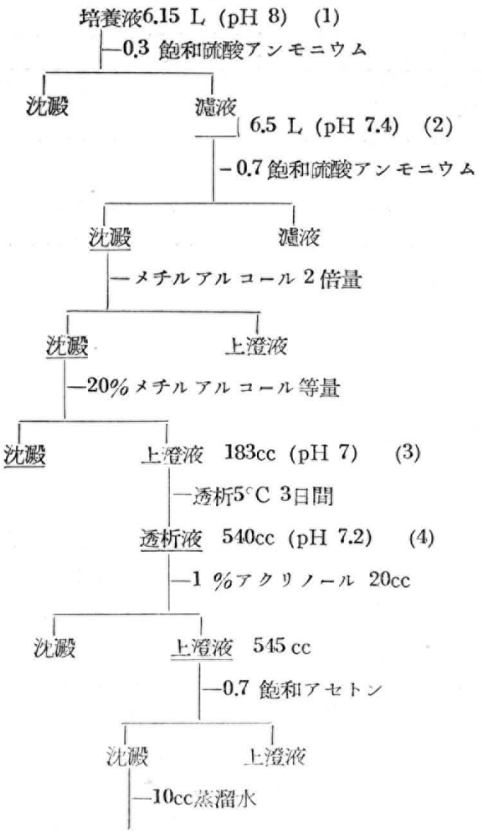
出用の脱脂大豆粕の量を変えて培養基を調整した．酵素の活度測定は Casein の消化力試験法を用いた．

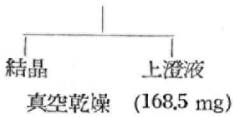
Defatted soy beans residuum extract

Defatted soy beans residuum used for extraction (%)	2%	4%	6%	8%
Weight of Nitrogen (%)	0.05	0.06	0.07	0.07
pH (Initial)	7.2	7.2	7.2	7.2
pH (Final) for 2nd day	7.8	7.8	7.6	7.6
Activity/cc	6.6	6.6	5	5
pH (Final) for 4th day	9.2	9.6	8.4	8.4
Activity/cc	2.5	5	5	5
pH (Final) for 5th day	9.4	9.2	9.0	9.0
Activity/cc	2.5	2.5	2.5	2.5

此の結果よりして2%大豆粕抽出液を今日実験に使用す．大豆粕2%の抽出液で二日間培養せる場合が本実験に最も適する事を認めた．

納豆菌蛋白質分解酵素の精製過程





精製過程に於ける活度の変化

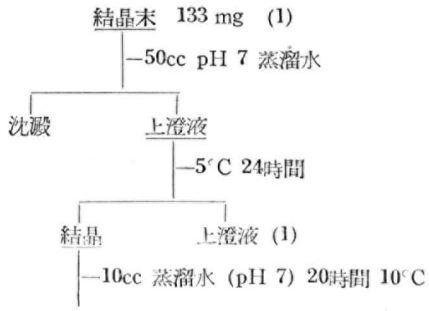
Fraction	Volume	Milk-clotting Activity /cc	Total-Activity	Recovery of (%) enzyme activity	Activity / mg, N.
1	6.15 L	12	73,800	100	38
2	6.5 L	6.9	44,850	61	—
3	183 cc	228	41,724	57	—
4	540 cc	23	12,420	17	99
Crystal	(168.5 mg)		1,895	3	77

Fraction	Volume	Digestion of Casein Activity /cc	Total-Activity	Recovery of (%) enzyme Activity	Activity /mg, N.
1	6.15 L	6.6	40,590	100	21
2	6.5 L	—	—	—	—
3	183cc	144	26,352	65	—
4	540cc	22	11,880	29	95
Crystal	(168.5 mg)		5778	14	214

Fraction	Volume	Liquefaction of Gelatin Activity /cc	Total-Activity	Recovery of (%) enzyme Activity	Activity /mg. N.
1	6.15 L	48	295,200	100	152
2	6.5 L	36	234,000	79	—
3	183cc	1,152	210,816	71	—
4	540cc	160	86,400	27	692
Crystal	(168.5mg		49,032	17	1816

再結晶操作

結晶168.5 mg 中より133 mg を取り再結晶した．



結晶　　上澄液 (2)

—6cc 蒸溜水 (pH 7) 20時間10°C

結晶(45.3 mg)　上澄液 (3)

真空乾燥

Weight of crystal	Protein-N	Milk clotting		Digestion of casein		Liquefaction of gelatin	
		Activity	ac/mg. N.	Activity	ac/mg. N.	Activity	ac/mg. N.
133 mg	21.3 mg	1495	70	4558	214	38680	1816
45.3mg	7.3 mg	620	85	1825	250	13271	1818

40日間真空乾燥器中に保存せるもの.

Weight of Crystal	Protein-N	Milk clotting		Digestion of Casein		Liquefaction of gelation	
		Activity	ac/m.g N	Activity	ac/mg. N	Activity	ac/mg. N
45.3 mg	7.3 mg	—	—	1260	172	9996	1369

再結晶を行つて次の3部分に分けその作用を試験した，結果は次の通りである．再結晶の結果 Activity は殆んど変らない．

Fraction	Volume	Digestion of Casein	Liquefaction of gelatin
		Activity	Activity
1	49cc	1347	10843
2	10cc	62	500
3	6cc	36	200

総　　括

培養液中の Protcase はその液の一部を取り遠心分離によつて菌を分離し測定した．但し完全に分離する事が不可能な為にNの測定に幾分菌も関係している．

0.3飽和 $(NH_4)_2SO_4$ では pH8～7.4 に下る．此の時菌は，上面に浮上り二層に別れる．次にサイホンで，液部を取り残部を吸引濾過して濾液を前液と合し0.7飽和 $(NH_4)_2SO_4$ にする．此の時液の pH が酸性に傾くので，NH_4OH 液が NaOH 液にて pH 7～7.2 に調節し時々攪拌し乍ら一日放置する．

塩析物は，最初上部に浮くが，漸次沈澱する様になる．

完全に沈澱物が底部に沈んで後，サイホンで上澄液を取る．次に，その塩析物を，遠心分離機にかけ出来るだけ液を除いて後，その沈澱に対して約2倍量の Methyl Alcohol[4] を加える．此の時 $(NH_4)_2SO_4$ が析出する．遠心分離で上澄液を除いて後，沈澱と等量の20% Methyl Alcohol[4] を加え充分攪拌溶解後遠心分離して不溶性になつた物質を除き上澄液をセロファン膜で透析[3]する．透析の際外液を pH7.8～8に調節する．透析の後酵素液をあらかじめpH7～7.2 に保ち，アクリノール液を加える．此の時に生じた沈澱を分離した液を 2°C で 0.7 飽和 Aceton[5] 液にする．此の時繁状の沈澱を生ずる．5°Cにて一夜放置後沈澱を分離し pH 7.2 の H_2O を適当量加えると一旦溶解した液中より30分後粒状の沈澱を生じ漸次成長するに従つて放射状になり 5 C で一夜保つと針状の結晶となる．

針状の結晶を真空乾燥器中で乾燥すると結晶形が崩れる．次に乾燥結晶末を H_2O より再結すると四角或は六角板状[6]の結晶を得る．此の結晶は乾燥しても原形をとどめている．

考　　察

1) Methyl Alcohol を使用すると不純物と酵素液を分離するのに好結果を与える様である．

2) 20% Methyl Alcohol の代りに H_2O (pH 7) を使用しても良い．

3) 透析時に活度が漸次減少する．此の原因については不明であるが，

㋑透析外液を pH 7.8～8 に保つと比較的損失をまぬがれる．

㋺透析外液に結晶 (Enzyme) の形成を阻害しない程度の稀薄なる NaCl 液を使用すると活度の損失が減少するのではないかと思う．(未実験)

㋩透析時間の程度が結晶の収量と関係ある様である．

此の事に就いては酵素液中に存在する $(NH_4)_2SO_4$ と

の関係について実験を行つている．

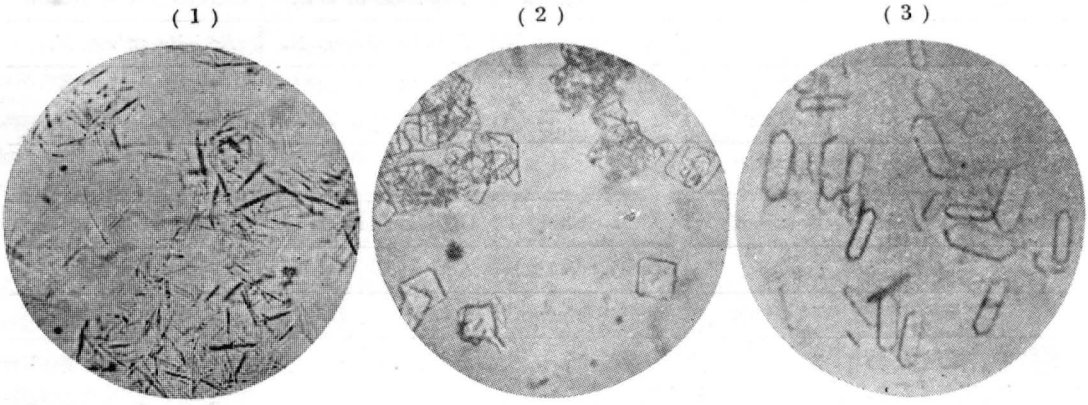
4)　アクリノール液は不純物に結合するに充分な最少量を使用すべきである．多量に用いる時はアセトン沈澱の際酵素が不純物の沈澱に吸着されて容易に分離出来ないで結晶の生成を阻害する．

5)　Aceton 沈澱の際軽い絮状の沈澱を生じたが此の沈澱粒子の軽重は脱塩の程度による沈澱粒子の重い程塩の量が多い様である．

6)　再結晶の際四角又は六角の結晶を得るが，これに就いては目下検している．

本研究を行うに当り，吉村貞彦教授より多大の援助を得た．同教授に対して心から謝意を表する．

本研究の所要経費の一部分は文部省の科学研究費に依る．



(1)　納豆菌蛋白質分解酵素　第一回結晶

(2)　納豆菌蛋白質分解酵素　再結晶

(3)　納豆菌蛋白質分解酵素　再結晶

Summery.

Bacillus natto Sawamura was cultured in defatted Soy beans residuum extract. To the cultured medium was added ammonium sulphate till it becomes 0.3 N. The precipitate thus obtained was removed by filtration. Then to the filtrate was added more ammonium sulphate to 0.7 N. The precipitate yielded was washed with the pure methanol, and then precipitate was extracted by 20% methanol. The salt was removed from the extracted solution by the dialysis, to its soln was added acetone till it becomes 70%. And to its precipitate was added distilled water. Then precipitate changed to crystallene. Thus the authors obtained the needle of the *Bacillus natto*-protease by this experiment. It was dried up under the vaccum, dissolved in the dist, water but soon crystallines as the crystals became the square-or hexagonal-plate. The methods for determining protease activity of this crystals were tested by the digestion of its casein or liquefaction of its gelatin and its milk-clotting and the results as follows.

When the crystal was dissolved in water, the activity was for mg. N. as follows.

Weight of recrystal	Milk clotting	Digestion of Casein	Liquefaction of Gelatin
	Ac/mg. N.	Ac/mg. N.	Ac/mg. N.
45.3 mg	85	250	1818

References

1) Northrop. J. H., *J. Gen. Physiol*, **19**. 991 (1936)
2) Crewther. W. G., and Lennox. F. G., *Nature*. **165**, 680 (1950)
3) Elliott. S. P., *J. Exp. Med*., **92**. 201 (1950)
4) Juichiro Fukumoto, *Proc. Jap. Acad*. **27**, 441-444 (1951)
5) 赤堀；酵素化学シンポジウム．8, 53 (1953)
6) 大島；納豆菌の酵素化学的研究 (I) 札幌農林学会報，大正14年4月，10—21頁

(Laboratory of Biological Chemistry, Hyogo Univ. of Agr.)