

[醸工 第44巻, 第11号, p. 797~804, 1966]

## 細菌の Uricase に関する研究

(第 2 報) 粗酵素の抽出および性質

木田準之助・国久 昌弘・白石 節子

(小野薬品工業株式会社)

## Studies on Bacterial Uricase

(II) Extraction of Uricase from Bacterial Cells and  
Some Properties of Crude Enzymes

Junnosuke Kida, Masahiro Kunihiisa and Setsuko Shiraishi

(Ono Pharmaceutial Co. Ltd., Higashinari, Osaka)

It has been reported in a previous paper that two bacteria, *Micrococcus varians* and *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* were isolated as uricase producers, and some conditions of the enzyme production were investigated. In this paper an uricase (an endoenzyme) extraction method and some general characteristics of crude bacterial uricase were investigated.

As ultrasonic extraction is difficult to apply for industrial purpose, other extraction methods were tested. For strain *Micrococcus varians* a freezing and thawing method using dry-ice followed by extraction with phosphate buffer solution showed a 60% yield. The best yield was obtained with a phosphate buffer of pH 8.0~9.0 for 24 hours at 25°C.

Strain *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* was found to have the ability to accumulate uricase in the broth when cells were incubated in the basal medium added with 0.1~1.0% nonionic surfactant. Among 10 nonionic surfactants tested, Nikkol-R-2020 (a condensation product of polyoxyethylene octylphenol and formaldehyde), polyoxyethylenelaurate and Nikkol HCO-60 (polyoxyethylene castor oil derivative) were found to be most effective. Induced external production of uricase by nonionic surfactant required a carbon source added to the medium, and only carbon sources capable to support the bacterial growth was found to be effective.

Some properties of the crude uricase preparations were examined. The crude uricase was obtained either by using  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  between 0.2-0.6 saturation (*Micrococcus varians*) or acetone precipitation with acetone (*Brevibacterium vitarumen* var. *uricum*).

The optimum pH for activity was found to be 8.5-8.8 with either enzyme and it had optimum stability at 9.0 (*Micrococcus varians*) and 8.0 (*Brevibacterium vitarumen* var. *uricum*) respectively. Both enzymes showed similar behavior to

inhibitors. KCN, PCMB and hydroxylamine inhibited them seriously but EDTA and heavy metal ions had only minor effects. Reducing agents such as cysteine and ascorbate stimulate the enzyme reaction.

## 緒 言

微生物 uricase の抽出精製は *N. crassa*<sup>1)</sup> や土壌細菌<sup>2)</sup> などで行なわれているが、菌体内酵素の抽出に超音波破碎法が用いられた。しかしこの方法は工業的な生産に適當ではない。前報<sup>3)</sup>で報告した uricase 生産菌 *Micrococcus varians* および *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* を用いて、酵素の抽出を検討し、ドライアイスを用いる凍結融解法が優れていることを認めた。また非イオン性表面活性剤を用いると培地中に uricase を蓄積するのを発見し、その条件について種々検討した。従来表面活性剤を用いた菌体内酵素の抽出は、イオン性表面活性剤を用いて saccharase を抽出した<sup>4)</sup> と報ぜられているほか、一般に菌体内酵素の抽出剤として広く利用されている。しかるに非イオン性表面活性剤には菌体内酵素の抽出作用は知られていない。たゞ、Streptokinase 生産培地に Polyoxyethylene monolaurate を添加すると、培地中の酵素蓄積量が増大する<sup>5)</sup> との報告がある。

つぎに両菌から得られた粗製 uricase の種々の性質をしらべた結果、動物臓器の uricase<sup>5)</sup> に比べて二、三の点で相違している。

本報告では、この粗製 uricase の抽出法および粗酵素のいくつかの性質について報告する。

## 実 験 方 法

1) 使用菌株と培養 *Micrococcus varians* および *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* を使用し、培養は前報<sup>3)</sup>に報告した方法で行なった。湿菌体を一回水洗し酵素抽出材料とした。

### 2) 粗酵素の調整

(1) ドライアイスによる凍結融解 湿菌体 5g を乳鉢に入れ、ドライアイスを加えて凍結させる。乳棒でよく磨砕した後室温で約1時間放置して融解させる。この操作を3回繰返す。ついで M/15 borate buffer 50ml を注加して 25°C に一夜放置する。抽出に用いる buffer の pH を 4~9 とし、24時間および48時間 25°C で抽出後、uricase 活性を測定した結果を Fig. 1 に示す(測定の際、pH は 8.5 に調整する)。図から pH 8~9 で1日放置で充分のようである。

抽出液に 0.2 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、生成する沈澱を celite-cornstarch (1:1) を濾過助剤に用いて濾過する。濾液にさらに硫酸アンモニウムを添加し、0.6 飽和塩析物を同じ濾過助剤を用いて集める。つぎに沈澱を M/30 phosphate buffer (pH 8.5) で溶解し、粗酵素液とした。

(2) 非イオン性表面活性剤を用いる方法 uricase 生産培地<sup>3)</sup> に非イオン性表面活性剤 Nikkol R-2020 を 0.1% 加え、菌体 1g/100ml を接種して、25°C で16時間振盪培養する。その後 3000rpm で30分間遠心分離し、上澄液を集めて 3~4 倍量の冷却アセトンを加え、白色沈澱を M/30 phosphate buffer (pH 8.5) に溶解し、不溶部を遠沈して除き、上澄液を集めて粗酵素液として用いた。

3) 酵素活性の測定 前報<sup>3)</sup>と同じである。

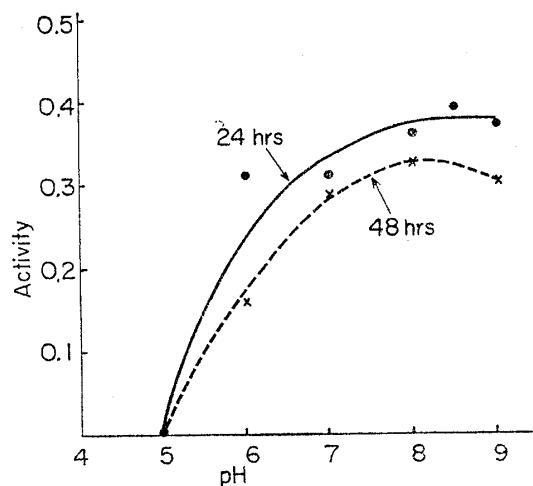


Fig. 1. Effect of pH on the extraction with dry-ice.

50g of wet cell was freezed using dry-ice in the moter, crushed and thawed. 50ml of buffer solution was added and kept at 25°C over night. Then the extract was centrifuged and uricase activity was measured. Activity represents the decrease of O.D. at 290m $\mu$  when uric acid solution was incubated with uricase at 25°C for 20min.

## 実 験 結 果

## 1) 酵素の抽出

菌体より uricase を抽出するために種々の方法を試みた結果、一般の磨砕法では 10~15%, 自己消化法では 15%. lysozyme 処理法では 15%しか酵素を抽出せず、アセトン乾燥菌体より抽出する方法では全然効果がなかった。しかしドライアイスを用いた凍結融解法によって、*Micrococcus varians* より *in vivo* の uricase 活性の約60%の活性が抽出された。また、*Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* からの uricase 抽出に後述のように非イオン性表面活性剤を用いて菌体外に uricase を取出した。

(1) ドライアイスによる凍結融解 *Micrococcus varians* を用いた酵素抽出の各ステップの酵素活性および比活性を Table 1 に示す。

Table 1. Preparation of crude enzyme of *Micrococcus varians*.

Ammonium sulfate (15.2 g per 100 ml extract) was added to the extract and was filtered with celite-cornstarch (1 : 1) as a filter aid. Moreover, ammonium sulfate (28.2 g per 100 ml extract) was added and was filtered again. Precipitation was dissolved by M/30 phosphate buffer (pH 8.5) and uricase activity was measured.

Treatment	Volume (ml)	Specific activity	Total activity (units)
Crude extract	70	1.74	29.05
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionated precipitation with 0.2—0.6 saturation	15	9.83	20.24

Table 2. Screening test of non-ionic surfactants.

0.1% various non-ionic surfactants were added to 100 ml medium in 500 ml meyer flasks respectively. Then 1 g wet cell was inoculated and incubated under shaking condition at 25°C for 16 hr. Cultured broths were centrifuged and both endo- and exo-uricase activity was measured.

Surfactants name	H. L. B.	Growth dry matter (mg/ml)	Uricase activity (units/100 ml broth)	
			Endo-	Exo-
*Nikkol BC-15-TX	12.5	6.4	1.45	1.82
*Nikkol BC-30-TX	16.0	7.0	4.67	2.13
**Nikkol BL-25	16.5	7.2	2.02	1.55
***Nikkol HCO-50	13.4	7.2	4.67	1.43
***Nikkol HCO-60	14.1	6.6	4.64	4.10
****Nikkol MYL-10	12.6	6.0	3.55	4.94
*Nikkol MYS-25	15.2	7.0	4.44	1.66
*Nikkol MYS-45	17.9	6.8	3.69	1.97
*Nikkol PBC-33	10.6	6.0	1.82	1.77
*Nikkol PBC-34	16.4	6.2	2.45	1.86
*Nikkol PBC-44	12.9	7.0	2.83	2.04
*Nikkol R-2020	20.4	7.2	4.14	6.13
*Nikkol TL-10	16.9	7.4	4.47	3.35
*Nikkol TP-10	15.9	6.6	4.32	2.88
*Nikkol TS-10	14.9	6.8	4.19	2.36
Control		8.2	4.40	1.21

\*Polyoxyethylene cethylalcohol ether  
 \*\*\*Polyoxyethylene castor oil derivatives

\*\*Polyoxyethylene laurylalcohol ether  
 \*\*\*\*Polyoxyethylene laurate

\*Polyoxyethylene stearate

\*Polyoxypropylene polyoxyethylene cetylalcohol ether

\*Condensation product of polyoxyethylene octyl phenol form aldehyde

\*Polyoxyethylene sorbitan monolaurate

\*Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate

\*Polyoxyethylene sorbitan monostearate

(2) 表面活性剤による抽出 表面活性剤で菌体外への酵素の蓄積を試みた。その結果非イオン性表面活性剤にのみ効果が見られた。また培地中に表面活性剤を添加する際、ある程度以上の菌濃度が必要であること、また菌生育に必要な組成の培地を用いなければ酵素を培地中に蓄積しないことを認めた。

a. 表面活性剤のスクリーニング 培地 100ml を 500ml 容振盪フラスコに入れ、各種表面活性剤 0.1% を添加して殺菌する。つぎに菌体 1g を接種し、25°C で16時間振盪する。遠心分離し、菌体および上澄液の酵素活性を測定した。その結果 Table 2 に示すような非イオン性表面活性剤にのみ培地への酵素蓄積効果が見られ、イオン性表面活性剤としては Sodium lauryl sulfate, Cetyl pyridinium chloride, Benzalkonium chloride などについて検討したが、いずれも効果は見られなかった。非イオン性表面活性剤のうちでは、Nikkol R-2020 が最高の酵素蓄積効果を示し、他に Nikkol MYL-10, Nikkol HCO-60 など良好な結果を示した。

以下に Nikkol R-2020 を用いて酵素を培地中へ蓄積させる種々の条件を検討した。

b. 抗生物質の影響 培地に Nikkol R-2020 0.1% を添加し、Penicillin, Streptomycin, Fradiomycin, Bacitracin, Polymyxin をそれぞれ添加して菌体 1g/100 ml 培地を接種し、25°C で 20時間振盪培養した。結果は Table 3 の通りで Penicillin, Bacitracin, Streptomycin, Fradiomycin は実験に使用した濃度で菌の発育および uricase の蓄積を抑制した。Polymyxin は発育はわずかに抑制するが uricase の蓄積は減少しない。Polymyxin, Fradiomycin, Streptomycin では発育の盛んな場合に uricase 蓄積が増加する。

c. 炭素源の影響 Nikkol R-2020 を 0.1%加えた培地で炭素源を種々に変えて、各1%加えて培地 pH を 7.4 に調整し、25°C で 20時間振盪培養後遠心分離し上澄液の uricase 活性を測定した。菌体接種量はすべて

Table 3. Effect of some antibiotics.

Various antibiotics were added to the medium containing 0.1% Nikkol R-2020. Then 1g of wet cell per 100 ml medium was inoculated. It was incubated at 25°C under shaking condition for 20 hrs and exo-uricase activity was measured.

Antibiotics	Polymyxin		Fradiomycin		Bacitracin		Penicillin		Streptomycin		Control
Concentration	u/ml		mcg/ml		u/ml		u/ml		mcg/ml		
	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10	
Growth (mg/ml)	4.4	4.6	3.0	2.6	2.6	2.6	—	2.2	2.2	1.9	5.5
Uricase activity (u/100 ml)	2.12	2.33	1.54	1.00	0.02	0	0	0.04	1.16	0.85	2.30

Table 4. Effect of various carbon sources.

1% of various sources were added to the medium containing 0.1% Nikkol R-2020. After inoculating 1g of wet cell, it was incubated at 25°C under shaking condition for 16 hrs. Then, cultured broth was centrifuged and exo-uricase activity was measured.

Carbon sources	Growth (Dry cell weight mg/ml)	Uricase activity (units/100 ml)
Glucose	7.2	2.43
Mannitol	3.0	1.07
Ethanol	1.0	0.80
Methanol	4.6	0.04
Glycerine	1.4	1.03
Sorbitol	1.6	0.91
Na-malonate	1.2	0
NH <sub>4</sub> -maleate	1.8	0
NH <sub>4</sub> -malate	1.0	0
Na-acetate	0.8	0.09
Na-succinate	1.2	0.22
Na-citrate	0.8	0.25

1g/100ml であった (Table 4). グルコース培地において最高の活性を得た. マンニトール, グリセリンなどの多価アルコールを炭素源に用いた場合も蓄積は行なわれたが, メタノール, エタノールおよび有機酸を用いた場合には培地への蓄積効果は見られなかった.

## 2) 粗酵素の性質

(1) 最適 pH pH 3.0~5.0 には acetate buffer, pH 6.0~7.0 には phosphate buffer, pH 8.0~11.0 には borate buffer および  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を用いて, 各 pH に調整した酵素溶液で 25°C に30分間放置し, 酵素活性を測定した. その結果 *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* と *Micrococcus varians* より得られた粗酵素は, ともに作用最適 pH 8.5~8.8 附近にあることがわかった (Fig. 2).

(2) 安定 pH 上述と同様の方法で pH 5~10 に調整した酵素溶液を 25°C で24時間放置した後, 酵素液の pH を 8.6 に調整し, 残存酵素活性を測定した. その結果アルカリ側ではかなり高い pH でも安定であるが, pH 5.0 以下では完全に失活した (Fig. 3).

(3) 最適作用温度 M/15 borate buffer (pH 8.5) で希釈した粗酵素溶液を 25°C~60°C の各温度で20分間 uric acid と反応させて最適温度を調べた. その結果 30°C~40°C の間で最高活性を得, それ以上の温度では酵素の失活が見られた (Fig. 4).

(4) 温度と失活率との関係 一定量の酵素溶液を 20, 30, 40, 50, 60°C の各温度に放置し, 酵素の温度に対する失活率と時間との関係を調べた結果, Fig. 5 に示すように *Micrococcus varians* からの粗酵素および *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* からの粗酵素とも 20°C 以下では安定であり, 50°C 以上の温度に対しては 1 時間で 90~100% 失活した.

(5) 酵素活性阻害剤および促進剤の影響 重金属, キレート試薬, 酸化試薬, 還元試薬などの各種試薬に対する粗酵素の活性の変化について検討した. すなわち酵素液に Table 5 に示す終濃度となるように各試薬を加え, 25°C で 30分間振盪した後, 尿酸を加えて20分間反応させ尿酸の減少量を測定した. その結果 Table 5 に示すように KCN では完全に活性は阻害され, P.C.M.B. および hydroxylamine では 80~90% 阻害される. また重金属類においては Cu, Mn, Fe について調べたところ, Cu によって特に阻害された. uricase は銅酵素として知られているが, 銅イオン濃度が高くなれば阻害される. Cysteine および ascorbic acid では逆に酵素活性は賦活された.

既知の動物臓器からの精製 uricase<sup>5)</sup> に対する各阻害剤の影響と比較すると, かなりの相異点が見られる. 特に ascorbic acid の阻害が細菌 uricase の場合には認められないこと. また重金属阻害に対しても動物 uricase に

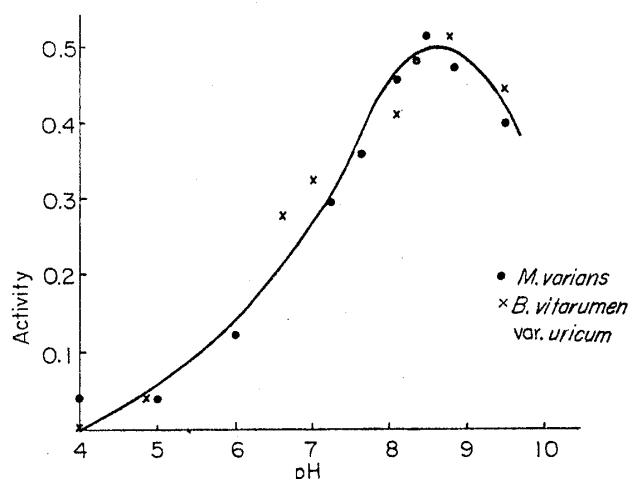


Fig. 2. pH optimum of crude enzyme.

Crude uricase preparation was dissolved in buffer solutions of various pH, and was kept at 25°C for 30min. Then pH was corrected to 8.5 and uricase activity was measured.

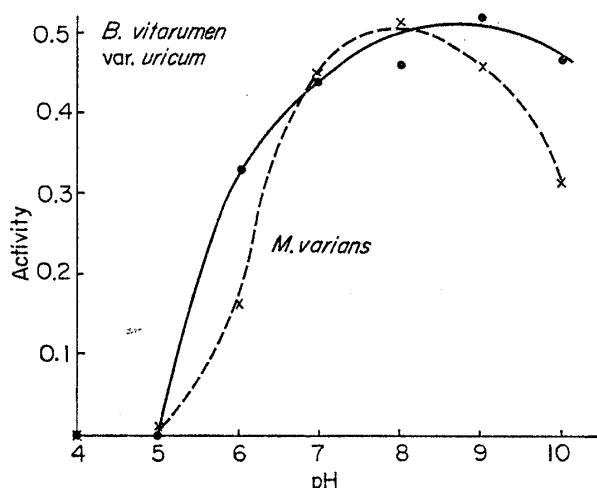


Fig. 3. pH stability of crude enzyme.

Crude uricase preparation was dissolved in buffer solution of various pH, and was kept at 25°C for 24hrs. Then pH was corrected to 8.5 and uricase activity was measured.

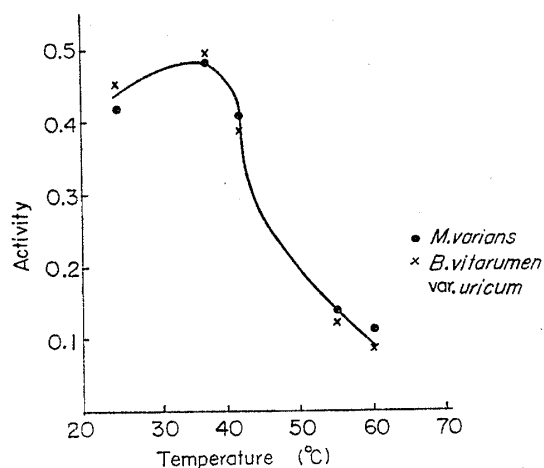


Fig. 4. Crude uricase preparation was dissolved in M/15 borate buffer (pH 8.5) and uric acid was added. Mixture was kept at various temperature for 20 min and cooled by ice water immediately.

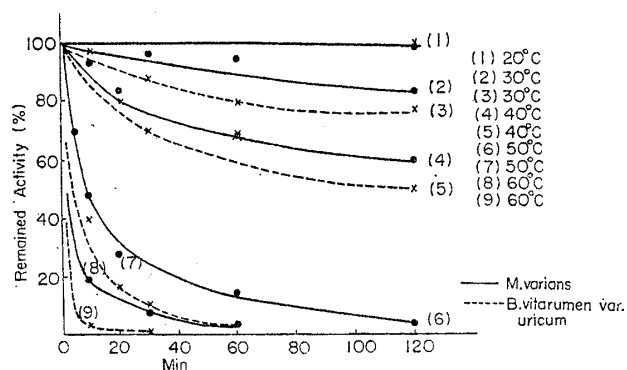


Fig. 5. Temperature stability of crude enzyme.

After keeping the crude enzyme preparation at various temperature the sample were took up from time to time. And was cooled in ice water immediately. Then uricase activity was measured.

Table 5. Effect of some inhibitors on the crude enzyme.

Various inhibitors were added to the crude uricase solution with the concentration indicated at the table. After shaking at 25°C for 30 min, uric acid was added and was kept for 20 min. Then the decrease of uric acid was measured.

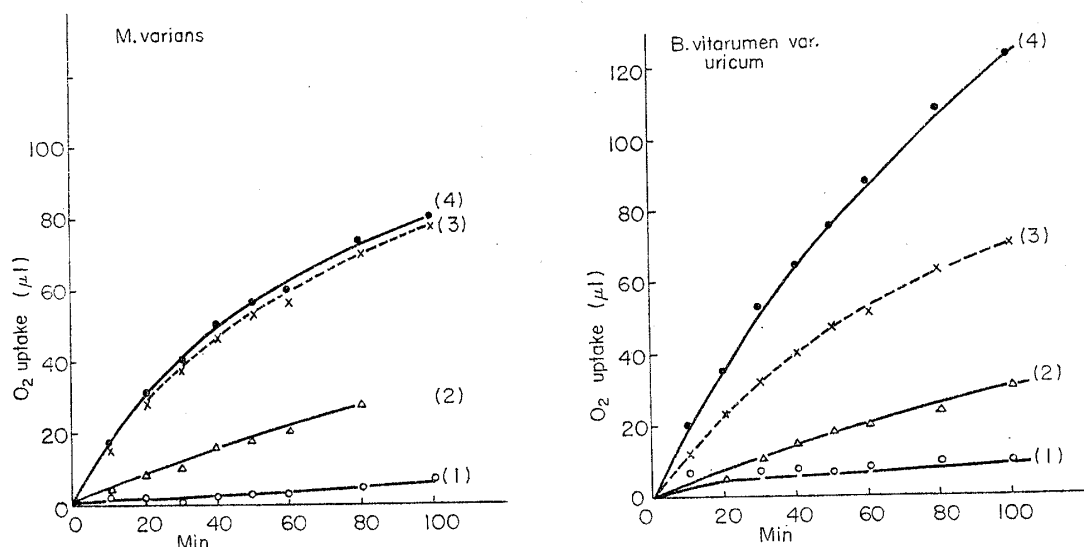
Inhibitors	Concentration in system (mol)	Percent inhibition	
		Uricase from <i>Micrococcus varians</i>	Uricase from <i>Brevibacterium vitarumen</i> var. <i>uricum</i>
KCN	$10^{-4}$	100	100
Hydroxylamine	$10^{-2}$	88	79
Ascorbic acid	$10^{-3}$	0*(53)	0*(28)
E. D. T. A.	$10^{-2}$	25	37
E. D. T. A.	$10^{-3}$	—	2
CuSO <sub>4</sub>	$10^{-3}$	65	57
MnSO <sub>4</sub>	$10^{-3}$	25	0
FeSO <sub>4</sub>	$10^{-3}$	6	33
Cysteine	$10^{-3}$	0*(52)	0*(53)
p-Chloromercuric benzoate	$10^{-3}$	59	87
p-Chloromercuric benzoate	$10^{-4}$	—	21

\* Percent activation

比較してかなり安定なことなどである。 *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* からの粗酵素の性質は *N. crassa* からの uricase<sup>1)</sup> のそれに類似しているように思われる。

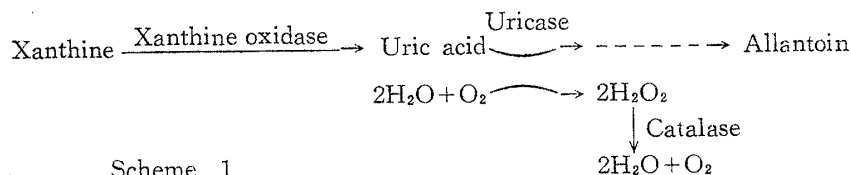
### 3) Warburg 装置による uricase 標品の O<sub>2</sub> 吸収

Uricase は uric acid を酸化して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と allantoin を生成する酵素であるが *Micrococcus varians* および *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* から得られた粗酵素を用いて uric acid 酸化の実験を行なった。すなわち基質として uric acid を用い、同時に catalase を加えたものおよび uric acid のかわりに xanthine を加えたものについて Warburg 装置により O<sub>2</sub> 消費量を比較測定した。その結果 Fig. 6 に示すように *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* からの粗酵素は catalase を加えた場合、無添加に比べて O<sub>2</sub> 消費量が約 2 分の

Fig. 6. O<sub>2</sub> uptake of crude enzyme.

- (1) Enzyme solution 1 ml + M/15 phosphate buffer 4 ml
- (2) Enzyme solution 1 ml + 0.013 M xanthine solution 1 ml + M/15 phosphate buffer 3 ml
- (3) Enzyme solution 1 ml + 0.012 M uric acid solution 1 ml + catalase solution 0.5 ml + M/15 phosphate buffer 2.5 ml
- (4) Enzyme solution 1 ml + 0.012 M uric acid solution 1 ml + M/15 phosphate buffer 3 ml

Every uricase solution has 0.035 u/ml. 1mg/ml of catalase solution was used. Enzyme reaction was acted using warburgs apparatus at 37°C.



Scheme 1

1 となり, Scheme 1 を満足している。しかし *Micrococcus varians* からの粗酵素においては, 未精製のため catalase が含まれていると思われる。また xanthine の分解もわずかながら両酵素において認められ xanthine oxidase も混在していると考えられるが, この場合の O<sub>2</sub> 吸収量はごくわずかである。このことから uricase とははっきりと区別されるし, またその含有量もわずかであると思われる。

## 考 察

*Brevibacterium vitarumen var. uricum* を uricase 生産培地に接種し, 中性表面活性剤を添加すると, 培地中に uricase を蓄積する。種々の中性表面活性剤を使用して酵素蓄積作用を調べた結果, この作用は中性表面活性剤一般に認められる性質で, H.L.B. や中性表面活性剤を構成する脂肪酸または脂肪族アルコールの炭素数などとは相関関係はなかった。

細胞内酵素が自己消化の初期に遊離することは *cytoplasmic granule*<sup>7)</sup> で  $\beta$ -glucuronidase や phosphatase について認められている。また表面活性剤は酵母を自己消化させる<sup>8)</sup> 作用がある。しかし uricase の蓄積は培養中, 菌の発育の盛んな場合におこなわれている。また中性表面活性剤を加えた phosphate buffer 中で菌体を懸濁しても uricase を蓄積しない。ゆえにこの場合は, たんに中性表面活性剤が自己消化を促進する結果, 培地中に uricase を蓄積するとは考えがたい。

中性表面活性剤を含まない培地に菌を接種しても, 培地に少量の uricase が検出される。それが中性表面活性剤の添加培地で uricase の蓄積が飛躍的に増大するが, 培地に抗生物質を追加すると uricase 生産が影響される。この場合菌の発育も抑制されていて, Polymyxin, Fradiomycin, Streptomycin などでは菌の発育と培地 uricase

の生産が比例している。これらの抗生物質は uricase の生成, 分泌を妨げないのであろう。しかし uricase 分泌を促進する効果は認められない。

培地の炭素源の種類を変えて培養すると uricase 蓄積も影響を受ける。同時に菌の発育も影響されていて、グルコース、マンニトール、グリセリンなどでは菌の発育と uricase 蓄積とが比例している。ほかの炭素源では、菌が発育しても uricase 生産が低かったり、発育、uricase 生産ともに低かったりする。

以上の結果より培地での uricase 蓄積には常に菌の発育が必要であることが判る。したがって *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* を中性表面活性剤を含む培地に培養すると、菌が増殖して新たに形成された uricase が培地に分泌せられるものと解せられる。

## 要 約

- 1) Uricase 生産菌 *Micrococcus varians* および *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* より uricase の抽出および粗酵素の性質を検討した。
- 2) *Micrococcus varians* からはドライアイス凍結融解法によって uricase を抽出し、*Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* は中性表面活性剤を用いる方法で培地中に uricase を蓄積させた。
- 3) 中性表面活性剤を培地に加えて *Brevibacterium vitarumen* var. *uricum* を培養し、uricase を培地に蓄積させる場合菌の発育と uricase 生産性が比例する。
- 4) 粗酵素の種々の性質について検討した結果、既知の動物臓器からの精製 uricase とかなりの相異点が認められ、*N. crassa* からの uricase とは類似点が多い。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導を賜りました、大阪大学工学部醸酵工学教室 田口久治助教授、小野薬品工業株式会社研究室 山本勝美次長、発表を許可された小野雄造社長に深謝致します。

## 文 献

- |   |   |
|---|---|
| 1) Greene, R. C., Mitchell, H. K.: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> <b>70</b> , 603 (1957). | 6) Poelnitz, W. V., Schwick, H. G., Bickhard, J. H.: U.S. Pat. 3063914 (1962).                    |
| 2) 有馬, 矢野, 能勢: 昭和40年度日本農芸化学大会口演.  | 7) Van Lancker, M. D., J. L., Hotzer, B. S., R. L.: <i>Am. J. Pathol.</i> <b>35</b> , 563 (1959). |
| 3) 木田, 国久: 本誌, <b>44</b> , 789 (1966).  | 8) Vosti, D. C., Joslyn, M. A.: <i>Appl. Microbiol.</i> , <b>2</b> , 70 (1954).                   |
| 4) 根来, 平野, 福本: 科学と工業, <b>35</b> , 423 (1961).   |   |
| 5) Mahler, H. R.: <i>The Enzymes</i> , Vol. 8, 285, Academic press New York (1963).       | (昭41. 4. 18 受付)   |