

微生物による核酸関連物質の生成 (第2報)

Penicillium 属, 放線菌および細菌の特殊条件下における核酸関連物質の分泌

今原 広次・岩井 正憲

HIROTSUGU IMAHARA and MASANORI IWAI: Production of nucleic acid related substances by micro-organism (Part II)
Secretion of nucleic acid related substances by *Penicillium* species, Streptomyces and bacteria in the regulated condition

摘要 前報に述べたと同じ目的で糸状菌として *Penicillium* 属を, 更に放線菌および細菌について数種の特異物質を添加して培養する方法による核酸関連物質分泌試験を行なった. その結果 *Penicillium velutinum* が弗化ソーダ添加培養によってグアニル酸約147/ml, およびウリジル酸約14.57/ml 分泌することが認められ, また放線菌 J-182号菌ではストレプトマイシン添加培養によってグアニン約97/ml およびウラシル約 6.57/ml 分泌することを認めた. しかし試験に供した細菌中ではこのような条件下で分泌を示すものは見出せなかった.

緒 論

著者らは前報において, 主として酵母類について直接醸酵法による核酸関連物質の生成分泌能を検討し, 微生物の代謝に影響を及ぼす 2, 3 の物質を添加した条件下で培養を行ない, その分泌を期待する方式を試みた. 同様なことを糸状菌, 放線菌および細菌について検討したのでその結果を報告する.

実験の部

I *Penicillium* 属の核酸関連物質分泌能

糸状菌は一般に酵母, 細菌などに比較してやや菌体内核酸含量が少ないが, 杉本ら¹⁾は弗化ソーダ添加により培養条件下においてかなりの核酸関連物質の分泌を行なう糸状菌として *Penicillium commune* を見出している. 著者らも糸状菌に関しては先ず *Penicillium* 属菌について特殊物質の添加培養条件下における分泌能の検討を行なった.

第1表 *Penicillium* 属用培地

グルコース	30g
バクトペプトン	10
KH ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
純水で1lとする.	

実験方法は前報に準じたが, 培地は第1表に示したものをい 30°C, 7日間培養を行なった.

なお添加物質としては前報で用いた7種について, それぞれ検討を行なったが, 比較的可能性のあると見られたマロン酸ソーダ, 弗化ソーダ, ストレプトマイシンの3種についての結果を示す.

第2表に示すとおり酵母類においてかなりの効果を見出し得たマロン酸ソーダ, ストレプトマイシンは使用せる *Penicillium* 属菌については殆んど効果を認めることはできず, 弗化ソーダ添加培養の場合において *Penicillium citrinum*-PN と *Penicillium velutinum* の2株が分泌可能であることを見出し得た. そこで *Penicillium velutinum* の弗化ソーダ添加培養の濾液について前報と同様に Carter の方法によりペーパークロマトグラフィーを行ない, その紫外線吸収曲線を求めたところ第1図のとおりであった.

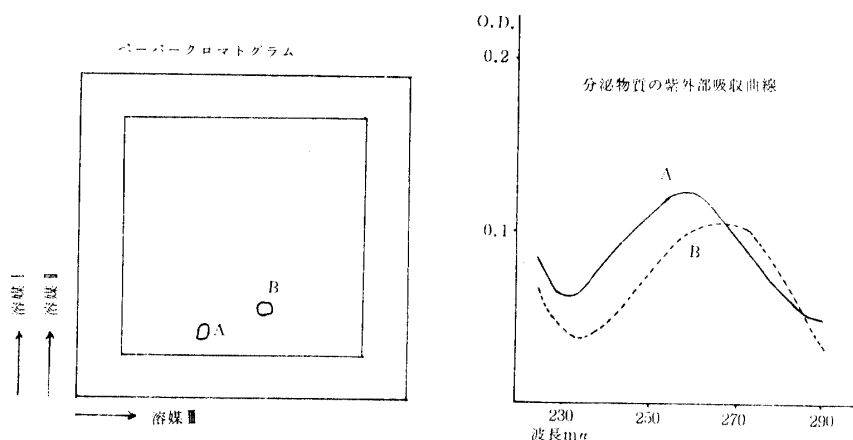
ただしこの場合分析試料は培養濾液を5倍濃縮したものを直接使用すると分離が困難であったので杉本ら²⁾の方法を参照して第2図に示すような方法で処理したものを供試液とした.

第1図においてそのスポットの相対位置および抽出液の紫外部吸収曲線の文献値などを参考にしてスポットAはグアニル酸, Bはウリジル酸と推定され, 各々の分子吸光係数より算出すると, グアニル酸として147/ml, ウリジル酸14.57/ml であった. またこの際

第2表 *Penicillium* 属菌の核酸関連物質分泌能 30°C, 7日培養

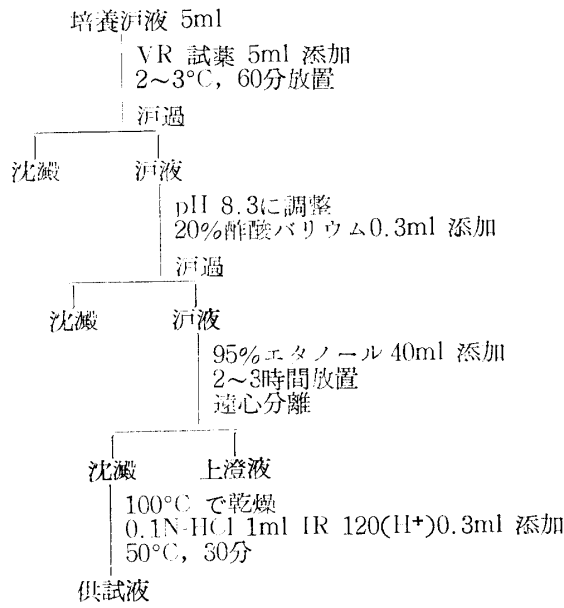
菌 株	添 加 物 質	E _{max} /E _{min}	分泌能
<i>Penicillium citrinum</i> -PN	無 添 加	0.62	--
"	マロン酸ソーダ M/50	0.53	--
"	弗化ソーダ M/50	1.13	±
"	ストレプトマイシン 100γ/ml	0.71	--
<i>Penicillium spinulosum</i>	無 添 加	0.44	--
"	マロン酸ソーダ M/50	0.58	--
"	弗化ソーダ M/50	0.61	--
"	ストレプトマイシン 100γ/ml	0.39	--
<i>Pericillium notatum</i>	無 添 加	0.62	--
"	マロン酸ソーダ M/50	0.54	--
"	弗化ソーダ M/50	0.48	--
"	ストレプトマイシン 100γ/ml	0.72	--
<i>Penicillium roqueforti</i>	無 添 加	0.48	--
"	マロン酸ソーダ M/50	0.55	--
"	弗化ソーダ M/50	0.71	--
"	ストレプトマイシン 100γ/ml	0.61	--
<i>Penicillium velutinum</i>	無 添 加	0.39	--
"	マロン酸ソーダ M/50	0.62	--
"	弗化ソーダ M/50	1.94	+
"	ストレプトマイシン 100γ/ml	0.55	--
<i>Penicillium chrysogenum</i>	無 添 加	0.48	--
"	マロン酸ソーダ M/50	0.51	--
"	弗化ソーダ M/50	0.92	--
"	ストレプトマイシン 100γ/ml	0.61	--

E_{max}: 260~270m μ 間, E_{min}: 235~245m μ 間.
 分泌能: ペーパークロマトグラフィー紫外部吸収スポット陽性を+,
 微小スポットまたは不鮮明スポット±, 陰性を-で示した.



展開試料 (第2図の方法で処理) 0.2ml
 溶媒Ⅰ: n-ブタノール: 酢酸: 水 = 4:1:1
 溶媒Ⅱ: アセトン: n-ブタノール: 水 = 8:1:1
 溶媒Ⅲ: 硫安飽和液: イソプロパノール: 水 = 7.9:0.2:1.9

第1図 *Penicillium velutinum* の分泌物質
 M/50弗化ソーダ添加, 30°C, 7日培養



第2図 ペーパークロマトグラフィー 供試液調整法

の糖消費率は約72%でありかなりの菌体生育条件下で生成されたものと考えられる。

次にこの場合の菌体内 RNA 含量を Ogur Rosen 法によって測定した結果は第3表のようになる。

第3表 *Penicillium relutinum* の菌体 RNA 含量

培養条件	RNA 含量(乾燥菌体当り)
無添加培養	0.945%
弗化ソーダ添加培養	0.382%

すなわち弗化ソーダの場合は無添加の場合に比して菌体内の RNA 含量は著しく少ない。このことは弗化ソーダ添加によって菌の正常な構成代謝が影響を受け、生育中にその異常生産物として分泌されたものかあるいは一旦菌体 RNA として合成されたものが自己消化などの機作により二次的に分泌されたものかいずれかと想像される。この点については更に詳細な検討を要すると考えられる。

II 放線菌の核酸関連物質分泌能

放線菌については核酸分解酵素系に関し多くの報告が見られ、また直接醸酵法による分泌の試みも報告されている。著者らも多数の放線菌の分離を行ない、それらについて核酸関連物質分泌能を前項と同じ方法で検討し、有効菌の選択を行なった。放線菌分離用培地および培養試験用培地は第4表に示すものを使用し、分離は常法に従って行ない、表面灰白色コロニーで色素の分泌を見られるものなど約300株を得たが、それらの中より5株を選び前報で用いた7種の添加物質をそれぞれ加え、その分泌能を試験した。その結果最も明らかに分泌能を示す1株の菌種 (J-182) をとり上げることにした。

第4表 放線菌用培地

分離用培地		培養試験用培地	
グルコース	1.0g	グルコース	10g
カザミノ酸	1.0	アスパラギン	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5	ペプトン	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	K ₂ HPO ₄	0.5
寒天	20	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
純水で1lとする。		純水で1lとする。	

次にその J-182号についての実験結果を第5表に示す。

第5表 放線菌 J-182号株の核酸関連物質分泌能 30°C. 4日培養

添加物質	E _{max} /E _{min}	分泌能
無添加	0.56	—
E D T A M/10000	1.10	±
クエン酸ソーダ M/50	0.41	—
マロン酸ソーダ M/500	0.38	—
窒化ソーダ M/500	0.49	—
D N P M/500	0.78	—
弗化ソーダ M/100	0.46	—
ストレプトマイシン 50γ/100ml	1.57	+

E_{max} : E_{min} : +, ±, — は前項に同じ。

第5表に示すようにストレプトマイシン添加の場合かなりの分泌を認め得たので、その培養液について前報と同様に Carter の方法によりペーパークロマトグラフィーを行ない、その紫外線吸収のスポットの位置およびその抽出液の紫外外部吸収曲線を求めたところ第3図のようであった。

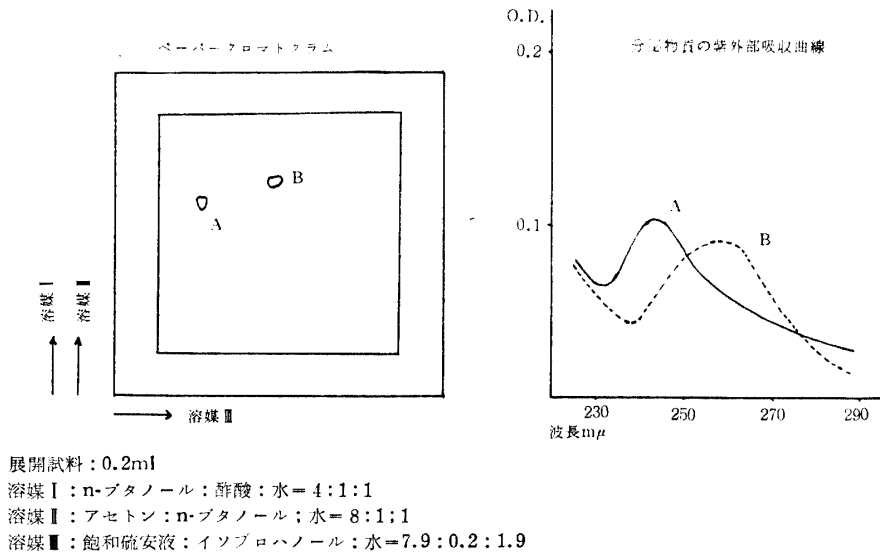
更にスポットの相対位置などを参考にしてスポット Aはグアニン、スポット Bはウラシルと推定した。また前項と同様にしてその分泌量を計算したところグアニンとして 9γ/ml, ウラシルとして 6.5γ/ml であった。

III 細菌の核酸関連物質分泌能

研究室保存の *Bacillus* 4株および新たに土壌、腐敗物などより分離せる18株について第6表に示す細菌用培地を用い、前項と全く同様な検討を行なったが、いずれも効果的な結果が得られなかった。したがって細菌については更に広く他の菌株について検討を要

第6表 細菌用培地

グルコース	10g
肉エキス	10
ペプトン	10
NaCl	5
純水にて1lとする。	



第3図 放線菌 J-182号菌の分泌物質
 ストレプトマイシン50r/100ml 添加, 30°C, 4日培養

し、また細菌の場合このような物質添加培養法に更に工夫を要するものと考えられる。いずれにしても細菌についての検討は今後に残された問題である。

考 察

以上著者らは酵母、糸状菌、細菌にわたり多数の菌株を集め、その特殊条件下における核酸関連物質の分泌性を試験し、酵母、糸状菌、放線菌において、マロン酸ソーダ、ストレプトマイシンあるいは弗化ソーダなどがそれぞれ菌株により異なるがある程度効果的で

あることを認めた。しかしながらこの方式は正常な菌株を用い、特殊条件下において菌体の生育をはかりつつ同時に核酸関連物質の分泌を期するものであり、多くの実験例のうちよりごくわずかの有効条件しか見出しえなかった。したがってここに選択せる菌株の変異株を育成してその正常あるいは特殊条件下における核酸関連物質の分泌を期することも興味ある問題と考えられる。

終りに臨み終始ご懇篤なご指導を賜った中浜敏雄教授に深謝の意を表する。

文 献

- 1) 杉本, 岩浅, 石山, 横塚 (1962): 日農化., **36**: 690.
- 2) 杉本, 岩浅, 石山, 横塚 (1926): 日農化., **36**: 277.

Summary

On the method of previous paper, we would find the effective conditions secretion of nucleic acid related substances in the culture fluid growing of penicillia, streptomycetes and bacteria isolated from putrefied substances or soil. Consequently we found that *Penicillium velutinum* secreted about 14 γ /ml of guanylic acid and about 14.5 γ /ml of

uridylic acid during its growth in the culture fluid added NaF and a strain of *Streptomyces* named J-182 secreted about 9 γ /ml of guanine and about 6.5 γ /ml of uracil by adding of Streptomycin. On the other hand, we couldn't recognize the secretion of nucleic acid related substances in all bacteria tested on the same conditions.