絲狀菌の發育のための硫黄源としての ヒヨリン硫酸エステル*

板橋美智子, 江上不二夫**

Michiko ITAHASHI and Fujio EGAMI***: Choline sulfate ester as
sulfur source for the growth of mold.

ヒヨリンの醋酸エステル, 磷酸エステルに関しては, 既に多くの研究があり, その生物界に於ける重要性は一般に知られているところであるが, その硫酸エステルに関する研究は殆んどない。唯それが絲狀菌類により生産されることは, Woolley, Peterson¹⁾ により報告され, Raistrick, Vincent²⁾ 等は, それが硫黄代謝の中間體であろうと報告している。しかし, まだその酵素的合成, 分解に就いては全く知られていない。それ故, ヒヨリン硫酸エステル $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OSO}_3^-$ を合成し³⁾, 絲狀菌の代謝におけるその意義を研究する目的で, 先ずこれを硫黄源として, コウジカビ, ビール酵母, 大腸菌を培養した場合の發育度と, ヒヨリン硫酸エステルの硫黄源としての効率との関係について, 得られた結果を報告する。

微生物の培養に用いられる通常の合成培地には, 無機硫酸鹽の形で十分な量の硫黄が含まれている。最近 Schultz, McManus⁴⁾ は約 80 種の酵母を用いて, 無機硫酸鹽, メチオニン, グルタチオン及びチスチンの硫黄源としての効力について報告しているが, ヒヨリン硫酸エステルについては全く觸れていない。

實 験

A. 絲狀菌

本實驗に用いた菌株は, コウジカビ *Aspergillus oryzae* である。

(1) 對照培地

蔗 糖	2.5 g.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.12 g (M/100)
KH_2PO_4	0.01 g.	FeCl_3	痕 跡
NH_4NO_3	0.5 g.	水	50 cc.
(pH 5.4)			

(2) 無硫黄培地

上記の對照培地から MgSO_4 を除き, Mg^{++} としてこれと等モル濃度 (M/100) の MgCl_2 を加える。

(3) ヒヨリン硫酸培地

無硫黄培地に, 硫黄源として對照培地の無機硫酸と等モル濃度 (M/100) のヒヨリン硫酸エステルを加える。

* 本研究の一部は文部省科學研究費 (板橋, 愛知學藝大學) に依つて行つたものである。

** 名古屋大學理學部化學教室

*** Kemia Instituto, Scienca Facultato, Nagoya Universitato.

以上3種の培地を、50 cc. ずつ深型シャーレに入れて、滅菌、接種し、37°C で5日間静置培養する。菌體を採集し、残った培地に水を加えて正確に50 cc. とし、その中から10 cc. をとって残存する SO_4^{--} 及びヒヨリン硫酸エステルを BaSO_4 として定量する。

ヒヨリン硫酸エステルの水溶液は、かなり安定で、pH 5 附近ではオートクレーブ内で10 ポンド (115°C), 20 分間加熱しても SO_4^{--} が遊離することはない。培地中に残存するヒヨリン硫酸エステルの定量法は、培地10 cc. に對して濃鹽酸2 cc., 10% BaCl_2 水溶液1 cc. 及び蒸溜水10 cc. を加えて、約20分間煮沸すると、エステルは完全に加水分解して、 BaSO_4 の白沈を生ずる。それを更に水浴上で加熱して鹽酸を追出し、残った白沈に水を加え、濾過、秤量する。

ヒヨリン硫酸培地中の硫酸エステルが、殆んど消失してしまう5日間の培養期間中には、培地中に遊離の SO_4^{--} が全くみとめられなかつたので、恐らく、ヒヨリン硫酸エステルは加水分解をうけないで、エステルの形のままで菌體內へ吸収されるものと思われる。

最初、培地に加えた MgSO_4 及びヒヨリン硫酸エステルの硫酸基を BaSO_4 に換算すると、培地10 cc. について、夫々20.8 mg. 及び20.4 mg. である。結果を第1表に示す。

第1表

培地中の 硫黄源	發 育 狀 態	乾燥菌體量	残存する SO_4 (BaSO_4 として)	吸収された SO_4 (BaSO_4 として)	
		g.	mg.	mg.	%
(1) 無機硫酸 (對照)	菌膜は液面全體を被い略々均一に肥厚する。 上面には一様に少量の胞子をつける。	0.6 0.2	15.4 —	5.4 —	26.0 —
(2) なし	極めて薄い菌膜を數片生じ各々に胞子をつける。				
(3) ヒヨリン 硫酸エス テル	菌膜は液面全體を被うが一樣に肥厚せず、 菌膜の下面には硬化した瘤狀の隆起を多數に生じ、凹凸甚しい。上面には部分的に極めて僅かの胞子をつける。	1.0 * (0.65)	0.0 *(9.3)	20.4 *(11.1)	100.0 *(54.4)

* (3) の培地で5日間培養したものでは、培地中のSは全く消失していたため同じ條件で4日間培養したものについて得られた結果を()の中に示した。

第1表によれば、ヒヨリン硫酸エステルは、無機硫酸よりも速かに吸収されること、及びヒヨリン硫酸エステルを硫黄源として發育した菌體が、形態的な異常を呈することが分つたので、無機硫酸とヒヨリンとを別々にあたえた。即ち、M/100 MgSO_4 を含む前記對照培地に、次の各濃度の鹽化ヒヨリンを加え、同じ條件で5日間培養する。結果は第2表に示す。

加えられた鹽化ヒヨリンの濃度がM/100 以上の場合には、 SO_4^{--} の吸収が促進されるが、M/500 以下の場合には、 SO_4^{--} の吸収に對する影響はみられない。又鹽化ヒヨリンの濃度に應じて、菌膜の異常形態がみられるので、ヒヨリン硫酸エステルによる菌膜の異常肥厚も、恐らく、ヒヨリンの作用によるものと思われる。

第 2 表

培地中の鹽化 ヒヨリンの 濃度	發 育 状 態	乾燥菌體量 g.	SO ₄ 殘存量 (BaSO ₄ として 20.8 mg. 中) mg.
M/50	特に菌體の部分的肥厚著しく、鹽化ヒヨ リンの濃度に比例して菌膜の下面に硬化 した瘤狀の隆起が目立つ。 菌膜がやや不均一に肥厚する。	0.95	7.7
M/100		0.85	10.0
M/500		0.80	14.4
M/2500		0.80	14.8
なし (對 照)	正常	0.80	14.5

次に培地の硫黃源として、ヒヨリン硫酸エステルのみをあたえた場合の、その濃度と發育狀態との關係を第3表に示す。培養條件は前記に同じ。

第 3 表

培地中のヒヨ リン硫酸エス テルの濃度	發 育 状 態	乾燥菌體量 g.	SO ₄ 殘存量 (BaSO ₄ として) mg.
(1) M/100	ヒヨリン硫酸エステルの濃度の減少に伴 つて發育は順次に劣るが、いずれも菌膜 は液面全體に擴る。 菌體の部分的異常肥厚は (1), (2) にお いて著しく, (3) はあまり目立たぬ。 (1) は孢子をつけない。 (2), (3) は極めて僅かの孢子をつける。 (3) に比べてかなり發育が劣る。 僅かに孢子をつける。	0.95	3.0 (20.4 mg.)
(2) M/500		0.75	0.0
(3) M/2500		0.50	—
(4) M/7500		0.25	—
(5) M/25000		0.15	—
(6) なし (Sulfate-free)	著しく發育不良。 孢子を生ずる。	0.15	—

B. 酵母

下面ビール酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、絲狀菌の場合と同じくヒヨリン硫酸エステルを硫黃源とした場合の發育度をしらべた。

(1) 對照培地

蔗 糖	100 g.	K ₂ HPO ₄	1 g.
アスパラギン	2.5 g.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.2 g. (M/200)
水	1 L	(pH 6.0)	

この合成液 14 cc に対して、酵母の煮汁 1 cc を加えたものを、對照培地とする。

(2) 無硫黃培地

上記對照培地から MgSO₄ を除去し、M/200 の MgCl₂ を加えたもの。

(3) ヒヨリン硫酸培地無硫黄培地に次の各濃度のヒヨリン硫酸エステルを加える。

M/200, M/1000, M/5000

以上5種の培地を15 cc ずつ試験管にとり、接種して、室温で(24-6°C) 4日間培養した。その結果は次表に示すように、この酵母はヒヨリン硫酸エステルを硫黄源として利用することが出来ない。

第4表

培地中の硫黄源	乾燥菌体量 mg.	備考
M/200 無機硫酸鹽 (對照)	58.2	残りの培地中に最初あたえたヒヨリン硫酸エステルに相當するだけの BaSO ₄ が残存していた。
M/200 ヒヨリン硫酸エステル	27.8	
M/1000 "	27.6	
M/5000 "	27.0	
なし	26.5	

C. 細菌

大腸菌: *B. coli communis* について、前記と同様の実験を行った。

無硫黄培地

グリセリン	15 cc	Na ₂ CO ₃	0.5 g.
アスパラギン	1.5 g.	NaCl	0.7 g.
くえん酸アンモニウム	1.5 g.	FeCl ₃	痕跡
KH ₂ PO ₄	1.0 g.	水	300 cc
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.25 g.	(pH 7.6)	

上記の培地に、M/200, M/1000, M/5000 の各濃度の無機硫酸鹽及びヒヨリン硫酸エステルを加えて、接種し、37°Cで40時間培養後、菌の發育度を比濁計の読みによつて示した。大腸菌も亦ヒヨリン硫酸エステルを硫黄源とすることが出来なかつた。

第1圖

總括

(1) *Aspergillus oryzae* はヒヨリン硫酸エステル (M/100) を硫黄源とする培地では、それと等モル濃度の無機硫酸 (M/100 MgSO₄) を含む對照培地よりも速く生長する。且、その硫酸エステルは無機硫酸よりも速く吸収される。

(2) ヒヨリン硫酸培地における培養期間中には、遊離の SO₄²⁻ がみとめられなかつたの

で、恐らく、硫酸エステルは加水分解をうけないで、直接に、カビによつて同化されるものと思われる。

(3) ヒヨリン硫酸エステルを硫黄源とする場合は、菌體に形態的な異常がおこる。

(4) 一定濃度の無機硫酸 ($M/100 \text{ MgSO}_4$) に鹽化ヒヨリンを加えた場合のカビの發育に對する影響を研究した。

a) 鹽化ヒヨリンの濃度が $M/100$ 以上の場合は SO_4^{--} の吸収が促進される。

b) 加えたヒヨリンの濃度に應じて菌體に異常形態がみられる。

(5) 以上の結果から、*Asp. oryzae* においては、ヒヨリン硫酸エステルは、無機硫酸からの硫黄同化の正常な中間體であるが²⁾、ヒヨリン硫酸をあたえると、それから生ずるヒヨリンの量が多いために、カビに有害となつて異常形態をひきおこすものと考えられる。

(6) *Sac. cerevisiae* 及び *B. coli* は硫黄源として、ヒヨリン硫酸エステルを利用することが出来ない。

Resumo en Esperanto

(1) *Aspergillus oryzae* kreskas pli rapide en la medio kun holinsulfatestero ($M/100$) kiel sulfura fonto ol en la kontrola medio kun neorganika sulfato ($M/100 \text{ MgSO}_4$). Tiam la sulfatestero estas pli rapide ensorbita de la ŝimo ol neorganika sulfato.

(2) Dum la kreskado de la ŝimo kun la sulfatestero, oni ne povas rimarki la produktadon de neorganika sulfato. Tial ni konsideras ke la sulfatestero estas direkte, ne hidrolizite, asimilita de la ŝimo.

(3) Sed ĥolinsulfatestero kiel sulfura fonto kaŭzas al la ŝimo morfologian nenormalecon.

(4) Efektoj de ĥolinklorido kunestanta kun neorganika sulfato ($M/100 \text{ MgSO}_4$) sur la kreskado de la ŝimo estas studitaj. La rezultatoj estas jenaj:

(a) Ĥolinklorido en kvanto pli multa ol $M/100$ akcelas la sorbadon de sulfato.

(b) Proporcio al la denseco de ĥolinklorido aldonita la ŝimo montras nenormalecon.

(5) De supraj rezultatoj ni estas kondukataj konsideri ke ĥolinsulfatestero povas esti normala intermezo ce *Aspergillus oryzae* en la sulfura asimilado al neorganika sulfato. Sed ĉar tro multo da ĥolino el ĝi produktita estas toksa al la ŝimo, la sulfatestero kaŭzas al la ŝimo morfologian nenormalecon.

(6) *Sac. cerevisiae* kaj *B. coli* neniom utiligas ĥolinsulfatesteron kiel sulfuran fonton.

文 獻

- 1) Wooley, Peterson (1937): J. Biol. Chem., 122, 213. 2) Raistrick, Vincent (1948): Biochem. J., 43, 90. 3) Schmidt (1904): Ann. Chem. 87, 337. 4) Schulz, McManus (1950): Arch. Biochem. 25, 401.