Penicillin 生産菌の変異に関する研究 (第 12 報) *Penicillium chrysogenum* Q 176 の黄色色素消失変異の遺伝生化学的研究 (其の 2)

有馬 啓, 中村秀雄, 駒形和男 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 27 年 17 月 15 日 受理

Studies on Variation of Penicillin Producing Mold. Part 11. Biochemical Genetical Studies on the Yellow Pigments Losing Mutation of *Pen. chrysogenum* Q 176 to Pigmentless Sultant *Pen. chrysogenum* Q 176 ARIMA et OGASAWARA. (2)

By K. ARIMA, H. NAKAMURA and K. KOMAGATA (Dept. of Agr., Univ. of Tokyo)

実験 1) Paper chromatography による黄色色素の研究

前報に於て確立した条件を用いて, paper chromatography による本菌の生産する黄色色素を検べた。

培養液: C 培地⁽¹⁾を用い, 500 cc 肩付きフラスコに 100 cc ずつ 5 本, 前報と同条件に振盪培養した濾液を用いた。消泡剤としての oil の使用は避けた。本培養液の 1/10 稀釈液の Pulfrich photometer の extinction は前報により約 0.625 である。

試料の調製: Fig. 1 の如く行つた。即ち alkali 性に於ける石油エーテル抽出を行わぬ前の色素液を用い Fig. 1. Preparation of the Yellow Pigments from the Broth. すると, spot の分別形成が悪い。培養及び精製時を変えた資料 1, 2, 3 について行つた実験の総括を Table 1, 2 に示す。

Table 1. Paper Chromatogram of the Yellow Pigments of *Pen. chrysogenum* Q 176 (Sample No. 1)

Paper stripe exp. No.	Develop-ment. Front	Spot		R_F value	
		I	II	I	II
1	30.0cm	20.5	14.5	0.68	0.48
2	30.2	20.0	14.0	0.66	0.47
3	30.1	21.0	14.5	0.70	0.48
4	30.0	19.5	14.0	0.66	0.47
5	30.0	20.0	14.5	0.66	0.48
6	29.8	21.0	14.5	0.69	0.48

i. Only two spots can be detected, without tail phenomenon.

ii. Spot I is brownish yellow; Spot II is yellow.

黄色色素の Paper Chromatogram の判定結果

i) 試料 1, 2, 3 は何れも培養時を異にし, 菌株も *Pen. chrysogenum* Q 176 の Normal Type である

が, 異つた subculture を用いたのであるが, spot は何れも 2 つのみであり, spot I は R_F 0.66~0.67, spot II は 0.49~0.50 で, 前者は brownish yellow, 後者は yellow である。

ii) 試料の調製法は試料 1, 2 と試料 3 (即ち NaHCO_3 処理をし, NaHCO_3 液に移らぬ部分を除いたもの) では結果に差はない。

iii) Table 2 に於て明らかなる如くに, 試料別, 実験番号別の R_F 値は再現性があり, R_F 0.15~0.80 の間で, R_F 値の許容誤差限界である 0.05 以内である。

iv) 以上の 2 つの spot 以外の spot は認めず且つ又原点に於ける色素の残存, その他の tailing も認められぬ。

v) Spot 1 の方は alkali color reaction によりやや濃い brownish yellow に変じ FeCl_3 液の噴霧により brown になる。Spot 2 は何れの反応をも示さず肉眼のときと同じく yellow である。

vi) 試料は調製後古くなると tail 現象が強くなり spot の出現が不明瞭となる。

vii) 量的には spot 1 が spot 2 よりも多いように見える。

Table 2. Paper Chromatogram of the Yellow Pigments from several Cultures of *Pen. chrysogenum* Q 176.

Exp. No.	Paper stripe No.	Sample No.1. R_F -value		Sample No.2. R_F -value		Sample No.3. R_F -value	
		Spot I	Spot II	Spot I	Spot II	Spot I	Spot II
1	1	0.68	0.48	0.68	0.49	0.678	0.489
	2	0.66	0.47	0.70	0.49	0.698	0.500
	3	0.70	0.48	0.68	0.49		
	4	0.66	0.47	0.68	0.49		
	average	0.675	0.476	0.685	0.490	0.688	0.495
2	1	0.66	0.50	0.65	0.48	0.684	0.489
	2	0.66	0.52	0.65	0.48	0.697	0.482
	3	0.66	0.52	0.66	0.48		
	4	0.66	0.52	0.68	0.50		
	5	0.64	0.51	0.66	0.48		
	average	0.655	0.515	0.662	0.484	0.691	0.468
3	1	0.67	0.51	0.68	0.51	0.688	0.505
	2	0.66	0.50	0.71	0.51	0.661	0.505
	3	0.65	0.49	0.68	0.50		
	4	0.67	0.51	0.68	0.49		
	average	0.663	0.503	0.687	0.502	0.675	0.505
4	1	0.67	0.51	0.69	0.51	0.664	0.518
	2	0.66	0.50	0.68	0.51	0.662	0.516
	3	0.65	0.53	0.65	0.51	0.656	0.507
	4	0.64	0.50	0.65	0.48	0.657	0.516
	average	0.655	0.510	0.667	0.502	0.659	0.514
Total average		0.662	0.501	0.666	0.492	0.677	0.501
Max. error		+0.013 -0.007	+0.041 -0.025	+0.021 -0.025	+0.014 -0.019	+0.014 -0.018	+0.013 -0.015
		0.02	0.039	0.046	0.029	0.032	0.028

以上により本菌の生産する黄色色素は2種あり、その各の R_F を決定したが、次にこの2種の色素が如何なるものであるかを検べるべく実験を進めた。

実験 2) *Pen. chryso.* Q 176 Normal type の 2 Pigments の決定

平行的に行つた色素の分離精製実験により得られた黄色色素の性質よりの hint もあり、CRAM より送られた結晶 sorbicillin⁽²⁾, STODOLA⁽³⁾よりの結晶 penitric acid 及びその脱炭酸した異性体化合物 α -penitric, β -penitric, 小田武氏⁽⁴⁾より分与された結晶 penitric acid, α -penitric, β -penitric を用い、之等の結晶をエーテル, アセトン混合溶液に溶解し、前報の実施決定条件に従い、paper chromatography を行つた。

結果は Table 3 に示す(但し STODOLA よりの penitric acid 及び α -, β -penitric の資料各 3mg 程度しかなかったため、この実験には用いず次報の infrared spectrum の実験に用い、小田の試料と同一物なるを確認した)。

Table 3. R_F Values of Crystalline Sorbicillin, Penitric acid, α -Penitric and β -penitric.

Sample exp. No.	Paper stripe No.	Sorbicillin R_F	Penitric acid R_F	α -Penitric R_F	β -Penitric R_F	Sample No. 2 R_F	
						Spot 1	Spot 2
No. 1	1	0.694	0.518	0.850	0.800	0.671	0.490
	2	0.695	0.500	0.870	0.790		
	3	0.704	0.500	light	light		
	4			yellow	yellow		
No. 2	1	0.677	0.508	spot	spot		
	2	0.680	0.508				
	3	0.697	0.516				
	4						
No. 3	1	0.709	0.528				
	2	0.681	0.507				
	3	0.690	0.510				
	4		0.510				
Total average R_F		0.690	0.511	0.860	0.795	0.671	0.490
		+0.018	+0.017				
Max. error		-0.014	-0.011				
		0.032	0.028				

Table 3 に明らかなる如く, Spot 1 は sorbicillin, Spot 2 は penitric acid と R_F の許容限界 0.05 以内で一致するが, sorbicillin は Spot 1 より, 又 penitric acid は spot 2 よりも何れもやや高い。

依つて penitric acid と sorbicillin の両者の共存する場合は, 各単独の場合に比し, R_F 値がやや影響をうけるのではないかと考え, 実験を行つた結果は Table 4 に示す

Table 4. R_F Values of Mixture of Sorbicillin and Penitric acid.

Exp. No.	Sorbicillin (CRAM) + Penitric acid		Sorbicillin* + Penitric acid	
	spot I	spot II	spot I	spot II
1	0.704	0.480	0.646	0.509
2	0.676	0.480	0.665	0.487
3	0.698	0.472	0.665	0.534
4	0.696	0.492	0.671	0.480
5	0.661	0.492		
total av. R_F	0.687	0.483	0.661	0.502
	+0.017	+0.009	+0.010	+0.032
max error	-0.026	-0.011	-0.015	-0.022
	0.043	0.020	0.025	0.054

* Sorbicillin powder isolated by the authors.

即ち sorbicillin と penitric acid は混在するとき, 単独の場合の各の R_F 値に比し, 何れも多少低下して前述の試料 1, 2, 3 の結果と殆ど同一になる。即ち両物質に於ては, 単一の場合の方が, 混合した場合よりも常に R_F 値が高く出ること興味ある事実である。以上の結果より, spot 1 は sorbicillin, spot 2 は penitric acid と同定する。

i) Spot 1, Spot 2 の物質の吸収曲線: 更に上の決定を裏づけるべく spot を形成する両黄色色素の Beckman spectrophotometer による紫外外部吸収曲線を取つた。即ち展開終了した濾紙を風乾し, 各 spot の部分を切り取り, desiccator 中に乾燥, 稀 NH_4CH 水にて色素を溶出, 酸性にしエーテル抽出し, 蒸発, 無水エタノールに溶解し取つた吸収曲線は Fig. 2 の如くである。

Sorbicillin は $300 \text{ m}\mu$ に, penitric acid は $270 \text{ m}\mu$ 及び $370 \text{ m}\mu$ に最大吸収を有し, spot 1 及び spot 2 抽出部の最大吸収はそれぞれ良く一致する。なお spot 1 には $370 \text{ m}\mu$ に於て, ゆるい山が出るが, 之は, この波長に最高吸収を有する, 僅かに副生する α -, β -penitric acid が spot 1 に僅かに残るためと考えられる。

総 括

1. 前報に於て決定した paper chromatography の実施条件により, *Penicillium chrysogenum* Q 176 の生産する黄色色素は R_F 0.65~0.66 と R_F 0.49~0.50 に spot を有する 2 種の黄色色素である。

2. 次いで結晶 sorbicillin 及び penitric acid の同条件に於ける paper chromatography に於ける R_F 及び紫外線吸収スペクトルとの比較を行い, 二色素は sorbicillin 並びに penitric acid であることを確認した。

終りにのぞみ, 本研究に当り終始御懇篤なる御指導を賜つた恩師坂口謹一郎教授に深く感謝申し上げる。又ペーパークロマトグラフィーに於て御教示を賜つた千葉大佐竹一夫氏, 又黄色色素サンプルをいただいた八洲化学小田武氏, California 大学 D.G. CRAM 博士, NRRL, F.H. STODOLA 博士に深く感謝申し上げる。

- (1) 朝井勇宣: *J. of Antibiotics*, I-2, 65 (1947).
- (2) D. G. CRAM: *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 4238, 4240 (1948).
- (3) F.H. STODOLA et al.: *J. Biol. Chem.* 159, 67 (1945).
- (4) 小田 武: *J. of the Pharma. Soc., Japan*, 72, 1564 (1952).

Summary

By paper chromatographic studies, using the conditions decided in the previous report, on the yellow pigments produced by *Penicillium chrysogenum* Q 176, it was ascertained that

Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of spot I and II.

1: Spot I 2: Spot II 3: Penitric acid
4: Sorbicillin

only two pigments were produced by this mold and that these two spots have the R_F values of 0.65~0.66 and 0.49~0.50 respectively.

These two pigments were identified as sorbicillin and penitrinc acid by comparison with the R_F values and ultraviolet absorption spectrum of the extract of each spot to those of crystalline sorbicillin and penitrinc acid, which is kindly given by Dr. D. G. CRAM of California University, Dr. F. H. STODLA of NRRL and Dr. T. ODA of Yashima company and for whom the authors wish to express their sincere thanks.

クロレラの磷酸代謝に及ぼす光の影響について

丸尾文治, 中村道徳, 大村京生, 河野哲郎, 松本志郎 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 27 年 12 月 15 日 受理

Effect of Light on the Phosphorus Metabolism of Chlorella.

By Bunji MARUO, Michinori NAKAMURA, Takao ÔMURA, Tetsurô KÔNO
and Shiro MATSUMOTO (Department of Agricultural Chemistry,
Fac. of Agr., University of Tokyo)

光合成の機構については最近多くの研究がなされてをり, かなりのことがわかつてきている⁽¹⁾⁽²⁾. 化学的に光合成の機構を研究するにあたって最も重要な問題の一は CO_2 が炭水化物に迄導かれる経路が如何なるものであるかということであり, 他は光のエネルギーが如何にして CO_2 の還元の化学的エネルギーに転換利用されるかということであろう. 第 1 の問題については, CALVIN 等⁽³⁾, ARONOFF 等⁽⁴⁾, FAGER 等⁽⁵⁾の C^{14} を用いた研究により大略の経路が知られるに至っている. しかし第二の問題, 即ち光のエネルギーの化学的エネルギーに変る機構については殆ど知られていない.

光合成に磷酸結合のエネルギーが利用されているのではないかという考は, LIPMANN⁽⁶⁾, RUBEN 等⁽⁷⁾によつて言われているが, 実際の根拠はない. EMERSON 等⁽⁸⁾はクロレラに CO_2 が無いところで光をあてると, Ba-soluble, resistant P の部分*が減少し, CO_2 があると光はこの部分を増加させることを見出し, 光合成に於て磷酸化の経路がエネルギー運搬に関与している可能性を示したとしている (*菌体のトリクロル酢酸(TCA)抽出液中の Ba 塩が水に不溶で, 加水分解され難い磷酸化合物). しかしながら, ARONOFF 及び CALVIN は P^{32} を用いて, ホウレン草の葉及びクロレラで, 光の照射と無機磷酸の有機化との間に直接的関連を見出せなかつたと報告している. 更に GEST 及び KAMEN⁽¹⁰⁾ はクロレラ及び *Rhodospirillum rubrum* を用いて, 光は P^{32} の turnover を大ならしめ, TCA 可溶部から不溶部への P^{32} の incorporation を促進し, 又, 光合成を阻害する KCN はこの反応をも阻害することを見出したが, 光合成過程において energy-rich phosphate compounds の生成を証明できず, 又菌の metabolic activity と P^{32} の incorporation との間の直接的関係を見出せなかつた. 又, 最近 KANDLER⁽¹¹⁾ は Chlorella に光をあてると菌体中の無機磷酸が一時的に減少し, 逆に暗くすると一時的にふえることを見ている.

結局現在迄のところ光合成と磷酸結合の形成との間の密接な関連を示す事実は甚だしい. 今, 磷酸が光合成に直接又は間接に関与するものとする, 植物体中の磷酸化合物の分布が, 光及び CO_2 の有無により変ることが予想される. 又, P^{32} を用いると光合成に関与する磷酸化合物の turnover の速度が, 他の部分より大になり, 特に光のエネルギーを媒介する energy-rich phosphate compounds において著しいということが期待される.

我々は植物として *Chlorella ellipsoides* を用いて上記の諸点を検討し, 光合成に磷酸が関与している可能性をしらべたので以下に報告する.

実 験 の 部

材料及び方法 *Chlorella ellipsoides** を Table 1 に示す組成の改良 Knop 液中で約 1000 Lux の照射下に 20~28° で, 1 日 2 回宛 CO_2 を通じて振盪し, 約 7 日間培養した. 菌体を遠心分離してとり, 数回培養液で洗い, 培養液に懸濁して冷蔵庫中に 0~2 日貯へた. 使用前に菌体約 1 cc をヘマトクリットで測り, 35 cc の

* 徳川生物学研究所より分与されたものである.