Penicillin 生産菌の變異に関する研究 (第 13 報)

Pen. chrysogenum Q 176 の黄色色素消失變異の遺傳生化学的研究 (其の 3)

有馬 啓, 駒形和男, 中村秀雄 (東京大学農芸化学科)

昭和 27 年 12 月 15 日 受理

Studies on Variation of Penicillin producing Mold. Part 13. Biochemical Genetical

Studies on the Yellow Pigment Losing Mutation of *Pen. chrysogenum* Q 176

to Pigmentless Sultant *Pen. chrysogenum* Q 176. ARIMA et OGASAWARA.

By Kei ARIMA, Kazuo KOMAGATA, and Hideo NAKAMURA

(Dept. of Agri. Chem., Univ. of Tokyo, Japan.)

前報に於て本菌の生産する黄色色素は sorbicillin, penitric acid 及びその分解物であることが明らかとなつたが、本報に於いては、両色素の単離及び両色素の *Pen. chrysogenum* Q 176 及びその pigmentless sultant の培養に於ける消長につき実験を行つた。

実 験 の 部

実験 1) 両色素の単離 既に CRAM は粗ペニシリン粉末の水溶液から sorbicillin を Na 塩として結晶せしめ、遊離色素はその Na 塩溶液を酸性にしエーテルから再結したと報じ、STODOLA は培地をタンニン酸又は、アセトンにて除蛋白後、真空濃縮後エーテルにて抽出し alumina の chromat 塔に通じ、エーテル：エチルアセテート 75:25 の溶剤で展開溶出し、第 2 の劃分より isopropyl alcohol により penitric acid を結晶状に得ている。何れもペニシリン工業に黄色色素を共生する菌株を用いた時期の研究であつて、試料の黄色色素晶は大量を用い得たのであるが、著者等のこの実験は、ペニシリン工業に於て色無し菌株 (Pigmentless-sultant) を実用した時期であるので、大量の黄色色素が得られず、研究室でフラスコ培養して得た微量の色素

Fig. 1. Purification Process of the Pigments from Culture Broth.

Culture media* 3 l

↓
adjust pH to 5.6

↓
remove protein by addition of $ZnSO_4$

↓
filtrate

↓
extract with toluol

↓
evaporate toluol, then extract with ether

↓
dissolve pigments in $NaHCO_3$ water

↓
extract with ether (pH 4.0)

↓
evaporate ether

↓
dissolve pigments in dil. NaOH and extract with petroleum ether

↓
acidify and again extract with ether, then evaporate ether

↓
dissolve pigments in chloroform

↓
precipitate pigments by addition of petroleum ether

↓
crude powder of yellow pigments (170 mg)

* C-medium, shaking culture

を以てしては、上の方法により結晶を得ることが出来なかつた。依つて先づ Fig. 1 に依り精製を行つた。

ここに得られた粉末は：

$FeCl_3$ 反応 dark brown ; Phosphomolybdic reaction, green ; Paper chromatogram により sorbicillin, penitric acid の 2 spots が出る。

i) Counter current distribution extracting⁽¹⁾ 法による分別 上述の黄色色素粗粉末は solvent の種類を変えることにより、又は Alumina chromatography による分別は、微量のため成功しなかつたので、試験管と分液ロートによる Counter current distribution extracting 法を用いた。

i 使用溶媒：水と混合せぬ溶媒が用いられ、Butylacetate-0.5 M phosphate buffer (pH 7.4) の system を用いた。

ii 分配の決定 (定量法)：BECKMAN spectrophotometer による吸収の測定より濃度を決定した。即ち結晶 sorbicillin 10 γ /cc 迄は 318 m μ の最高

吸収は直線関係がある (cf. Fig. 2)。依つてこの standard 直線を利用して分配された黄色色素の定量を行つた。

a) 使用溶媒の吸収に及ぼす影響：水を control (BECKMAN spectrophotometer control cuvette 中に入れる) とし butylacetate を溶媒として用いた場合は多少影響が認められるので避けねばならぬが、butylacetate を control におき、溶媒として buffer (pH 7.4) で飽和した butylacetate, KH_2PO_4 にて飽和した

Fig. 2. Relation between concentration of sorbicillin and extinction at 318 $m\mu$ (max. absorption) by BECKMAN spectrophotometer*

* solvent butylacetate

butylacetate, buffer 液を pH 2.0 とし butylacetate にて抽出した液との吸収を見たが殆ど影響はない。

b) Sorbicillin の分配：

Plates (試験管)： No. 0. - No. 12.

System： butylacetate - 0.5 M phosphate

buffer (pH 7.4) 各 10 cc. (butylacetate は

buffer にて, buffer は butylacetate にて予め飽和)

Original concentration： 0.984 mg/10 cc butylacetate.

Sorbicillin の最高吸収 318 $m\mu$ の吸光度を測定し各 plate に於ける分配を検した結果は Fig. 3 に示す如くであつて, sorbicillin の殆ど 98% が最後の試験管に集る。

c) Penitric acid の分配：

plates, system： sorbicillin と同様である。

original concentration： 103.6 γ /10 cc

Penitric acid の最高吸収 365 $m\mu$ を測定し, 分配を検べると, tube No. 4, 5, 6 に集ることは Fig. 3 に明らかである。

d) β -Penitricin：

Plate, system： sorbicillin に同じ。

Original concentration 316 γ /10 cc.

β -Penitricin の最高吸収 295 $m\mu$ の測定による分配は殆ど sorbicillin と同じ行動をし, 最後の tube に殆ど集まる。Fig. 3 は, 本法により, sorbicillin と penitric acid は分別しうるが, 若し β -penitricin が共存すれば sorbicillin との分別不可能を示している。

e) 試料の分配： 以上の結果を利用し, さきに調製した色素粉末中の各色素の分別を行つた。試料の濃度は 2.0 mg/10 cc 12 plates と 25 plates により分配実験を行つたが, その結果は Fig. 4 に示す。測定を行つた波長は, 試料の最高吸収を示す 295 $m\mu$, penitric acid の最高吸収 285 $m\mu$, 365 $m\mu$, sorbicillin の最高吸収 310 $m\mu$ に於てである。前例の純粋物質の場合と異なり, 図中の extinction は, その plate に於けるその波長混合物の吸収の和が示されているので, 本図より直ちに, 各 plate に於ける sorbicillin 又は penitric acid の分配量を決定することは出来ぬが, 前例の純物質の分配曲線と照合し, 大体同様の傾向にある。即ち sorbicillin は No. 12 又は No. 25 plate に来, penitric acid は中間の plates に集まる。但し, 12 plates の場合も 25 plates の場合も, No. 1~3 に於て吸収が強い。ここに集る物質が何であるかは不明であ

Fig. 3. Distribution of the pigments on twelve plates

Fig. 4. Distribution of pigments on each tube

Fig. 5. Ultra-violet absorption spectra of Preparate B and C

実験 4) 培養経過による両色素生産の消長

i) Paper chromatography による両色素生産の追跡 *Pen. chrysonegum* Q 176 の黄色色素は 2 種で

Table 2. Paper Chromatography of Yellow Pigments in the Broth during Culture.

Sample	Dev. front cm	R_F	
		Spot I	Spot II
3rd day's culture medium*	27.9	0.673	0.494
	27.8	0.676	0.521
	28.0	0.667	0.510
5th " " "	27.7	0.671	0.519
	27.9	0.673	0.494
	27.9	0.655	0.494
7th " " "	28.0	0.671	0.517
	28.0	0.658	0.500
	28.4		

* C-medium ; Shaking culture.

るが, paper chromatography に於て古くなつた試料は原点に残り且つ tail 現象を示すが, かかる物質かとも考えられる.

ii) 色素の分離: 以上の方法に依り, 両色素の分離が可能と考えられるので 12 plates を用い, さきに調製した色素粉末 70 mg を用い, 分別実験を行つた. 0~2 plates 部を A, 4~7 plates 部を B, 10~12 plates 部を C とする.

各部の濃縮物より solvent による沈澱物質の除去, ion exchange resin (IRC-50) による脱塩, 後クロロフォルムに溶解, 石油エーテルで沈澱をつくる. ここに得られた B 部, C 部 (A 部はのぞき) の物質の性質は Table 1 の如くである (結晶状としては得られなかつた).

Table 1. Properties of the Pigment isolated.

	Pigment from B fraction	Pigment from C fraction
Color	yellow	light yellow
FeCl ₃ react.	brown	brown
Phosphomolybdic acid react.	green	—
R_F	0.519 (0.681 small spot)	0.681
Absorption Spectrum	max absorption 290 mμ, 370 mμ.	max. absorp. tion 300 mμ.

猶 B, C 物質の紫外線吸収スペクトラムは Fig. 5 の如くであるが, B は penitric acid のそれと良く一致するが, C は paper chromatogram より抽出した場合と同じく, 290~300 mμ に specific な最高吸収を有するが, 360 mμ 附近に低い鈍い吸収の山があり, 精製途中に於ける脱炭酸による penitric 生成又は原培養液中より小量の混入を思わせる.

しかし以上の counter current distribution extracting の方法により, 色素の量が多い場合には分別後, 結晶化まで両物質を精製分離することは可能と考えられ, 黄色色素粗粉末中には sorbicillin 及び penitric acid がその主要成分として含有されていると考えられる.

Fig. 6. Ultra-violet absorption spectra during culture C-medium. dilution $\times 10$ *Pen. chrysogenum* Q 176

Fig. 7. Ultra-violet absorption spectra during culture. STONE-FARRELL medium dilution $\times 5$ *Pen. chrysogenum* Q 176

Fig. 8. Ultra-violet absorption spectra during culture C-medium dilution $\times 10$ Pigmentless sultant Q 176

I 2nd day.
II 3rd day.
III 4th day.
IV 5th day.
V 6th day.
VI 7th day.
VII 8th day.

Fig. 9. Ultra-violet absorption spectra during culture STONE-FALLELL medium dilution $\times 5$ Pigmentless sul tant Q 176

Fig. 10. Absorption of culture media at 280 mμ and 360 mμ

○—○—○ Q 176, C-medium 280 mμ
●—●—● Q 176, C-medium 360 mμ
□—□—□ Pigmentless sult. C-medium 280 mμ
▢—▢—▢ Pigmentless sult. C-medium 360 mμ
△—△—△ Q 176, STONE-FARRELL medium 280 mμ
▴—▴—▴ Q 176, STONE-FARRELL medium 360 mμ
+—+—+ Pigmentless sult. STONE-FARRELL medium 280 mμ
#—#—# Pigmentless sult. STONE-FARRELL medium 360 mμ.
* dilution of medium $\times 10$

sorbicillin と penitric acid なることが明らかとなつたが、培養経過に従い、両色素の量比が変化する、又は一方の色素から他方へ移行することも考えられるので、培養各日の両色素の消長を検べた。結果は Table 2 の如くである。即ち 3 日目は両色素共にやや薄かつたが、3, 5, 7 日に於いて差を認めず、2 種の色素は平行的に増加しつつ生成すると考えられる。pigmentless sultant 株の培養も同様の実験を行つたが、全く黄色色素の spot は出なかつた。

ii) Ultra-violet absorption spectrum による追跡 以上 Q 176 株により、2 色素が平行的に生成され

ることは明らかとなつたが、BECKMAN spectrophotometer による培養各 stage に於ける吸収を見れば、paper chromatography によりは、検出出来ぬ微量の色素、又 pigmentless 株の培養液中に sorbicillin 等の核化合物と類似の構造を有する。色素の所謂 precursor が発見出来る可能性があり、この実験を行つた。

培養：C-medium と STONE-FARRELL 氏培地による shaking culture、各条件は前報に同じ。5本づつ *Pen. chryso.* Q 176 及びその Pigmentless 株を培養、菌体を除き、pH 2.0 に於て等量の *n*-butanol で抽出し、BECKMAN spectrophotometer により測定した。結果は Fig. 6, 7, 8, 9, 10 の如くである。即ち Q 176 株に於ては、270~290 $m\mu$ 及び 360 $m\mu$ の吸収は培養日数と共に増加するが、pigmentless sultant は殆ど増加を来さぬ。なおこの吸収曲線は sorbicillin と penitric acid のその合成したものであり、C-medium は STONE-FARRELL 培地の約 2 倍の吸収量を示す。但し pigmentless sultant の培養に於いて短波長部に若干の吸収のあること、又培養 7 日、8 日目に至り 260 $m\mu$ に吸収の谷の生ずる原因は不明である。(核酸類化合物の培地に於ける増大も一応は考えられる。培地自体及びペニシリンの吸収の影響については後述) 即ち Q 176 に於ける両色素の平行的生成に反し、pigmentless sultant に於ては、吸収スペクトラムの増減が殆ど起らず、両色素が全然生産されていないこと、又 sorbicillin の環状部⁽²⁾と類似構造を持つ色素の precursor と考へられる物質も全く生成されていないことは明らかである。又 pigmentless sultant に於ては、Q 176 の黄色色素の不飽和の二重結合の部が還元され、leuco type になり、黄色が消失するのであるとの推定もこの結果から否定された。

なお Precursor 物質がアルカリ性に於いて solvent に移行し易き物質なる場合を考へ、pH 9.5 に於いて *n*-butanol, chloroform 又 pH 2 の chloroform 抽出液の吸収を見たが (Corn steep liq.-lactose-phenylacetic acid 培地、菌は Pigmentless sultant 60 hr タンク培養液) 何れも殆ど吸収を示さなかつた。

iii) 吸収に影響する諸 Factor

a) 培地の吸収：各培地 10 cc を pH 2 で等量の *n*-butanol 抽出、10 倍稀釈して吸収を見ると、C培地はやや高く、STONE-FARRELL 培地は無視し得るが、共に培養液の吸収より差し引けば、色素自体の消長には影響がない。

b) pH 6.8 に於て 0.2% の骨炭処理した、培地についての吸収に対する影響を見るも Fig. 11 の如く殆ど

Fig. 11. Absorption spectrum of some factors which influence the absorption of the pigments.

- I C-media treated by carbon, dilution $\times 10$
- II STONE-FARRELL media treated by carbon, dilution $\times 5$
- III Penicillin 300/cc
- IV Penicillin attacked by penicillinase.

影響はない。c) 又 300u/cc のペニシリン⁽³⁾及び之をペニシリナーゼ分解液を pH 2 にて *n*-butanol 抽出した液の吸収を Fig. 11 に見る如く、penicillin 及び penicilloic acid の吸収は 260 $m\mu$ 以下の短波長であるので、稀釈を考慮に入れば殆ど影響せぬ。

附 培地中に於ける両色素の紫外線吸収に依る定量之等両色素の吸収は LAMBERT-BEER の法則に従うから、その吸光度 (E) は、 $E = kct$ で表わせる。k 吸光係数；c 濃度；t cell の厚さ。

両色素は、270~400 $m\mu$ の間に吸収があるので、sorbicillin の最高吸収 330 $m\mu$ (in butanol), penitric acid は 370 $m\mu$ を Key band として計算可能である。即ち例えば 330 $m\mu$ に於ける培地の吸収

は両色素の吸収の和であるから次の連立方程式が成立する。

$$E_{330} = k_{330s} C_s + k_{330p} C_p \quad (1)$$

$$E_{370} = k_{370s} C_s + k_{370p} C_p \quad (2)$$

但し $E_{\lambda m\mu} = \lambda m\mu$ の吸光度； $k_{330s} = 330 m\mu$ に於ける sorbicillin の吸光係数、 C_s ：sorbicillin の濃度等の如く略号とする。

10 γ /cc の penitric acid 及び sorbicillin の吸収 (in *n*-butanol) は

Wave length	Penitric acid	Sorbicillin
330 m μ	0.3953	0.9544
370	0.9107	0.6108

故に k を $1\gamma/\text{cc}$ の際の恒数とすれば, $k_{330p}=0.03953$, $k_{370p}=0.09107$, $k_{330s}=0.09544$, $k_{370s}=0.06108$. より計算すれば, Fig. 12 の吸収直線と良く一致する.

Fig. 12. Relation between extinction and concentration of sorbicillin and penitric acid in water saturated *n*-butanol.

○—○ Sorbicillin
×—× Penitric acid.

を有する2種なることを知り, 次いで結晶 sorbicillin 及び penitric acid の R_F 及び紫外線吸収スペクトルとの比較を行い, 2色素は sorbicillin 並びに penitric acid なることを決定した.

2) 試験管による counter current distribution extracting 法による sorbicillin, penitric acid, β -penitric 等の各 plate に於ける分配を検べ, 本法を用い, 黄色色素粉末の分離を行い, sorbicillin 及び penitric acid の粉末を得た.

3) *Pen. chrysogenum* Q 176 及び pigmentless sultant の培養経過中に於ける培養濾液中の両色素の消長及び pigmentless sultant 濾液中の色素の precursor の存在を paper chromatography 及び BECKMAN spectrophotometry により追跡し, 両色素は平行的に増大し, 一方が他方へ転移するが如きことは認められぬこと, 又 pigmentless sultant 濾液中には precursor 物質存在による吸収の得られぬことを確認した.

4) 更に sorbicillin, penitric acid の吸光度と濃度の間の直線関係を利用し, 両色素の並びに C 培地に於ける生成量を定量し, C 培地に於いては sorbicillin $95\gamma/\text{cc}$, STONE-FARELL 培地 penitric acid $77\gamma/\text{cc}$, STONE-FARELL 培地に於ては sorbicillin $45\gamma/\text{cc}$, STON-FARELL $48\gamma/\text{cc}$ であつた.

終りにのぞみ, 終始御懇篤なる御指導を賜つた恩師坂口謹一郎教授に謹んで謝意を捧げる.

- (1) 住木諭介: *J of Antibiotict*, II-6, 400, Mar., 1949.
- (2) CRAM, D. G.: *J of Am. Chem. Soc.*, 70, 4238, 4240, 1948 ().
- (3) The Chemistry of Penicillin. 1946.

Summary

Distribution studies of sorbicillin, penitric acid and β -penitric by counter current distribution extracting method utilizing test tubes were carried out. From the above results, after factionation of sample of the yellow pigments, powder state but not crystalline sorbicillin and penitric acid were obtained.

By paper-chromatographic and Beckman's spectrophotometric studies on the both pigments (in case of Q 176) and their precursor (in case of the pigmentless sultant) in the broth during culture stages were carried out, and it was recognized that the two pigments increased parallel, either one pigment did not transform to the other, and the substances which were thought to be the precursors of the pigments could not be found in the broth of the

色素生成量の計算に当り, 培地及びその中の不純物の影響を除くため, 2~8日の全く色素より由来せぬと考へられる. pigmentless 株の吸収を差し引いた数値を以て Q 176 の色素の吸収とする. Fig. 6~Fig. 9 により計算すれば, 培養各日の色素生産は次の如くである.

culturing days	2	3	4	5	6	7	8
C-medium	Sorbicillin γ/cc						
	28.4	60.9	70.7	89.7	86.9	96.4	95.2
C-medium	Penitric acid						
	21.2	65.4	74.5	100.1	82.3	88.3	77.2
STONE-FARRELL medium	Sorbicillin						
	—	2.7	6.5	20.8	31.4	44.9	45.3
	Penitric acid						
	—	1.9	7.6	22.0	28.9	59.3	48.3

結 括

1) 前報に於て決定した paper chromatography の実施条件により, *Pen. chryo.* 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

pigmentless sultant.

Amounts of sorbicillin and penitric acid Produced in the broth were estimated from the standard straight lines between concentration and optical density of the pigments.

The amounts of sorbicillin and penitric acid produced in C-medium are 95.2 γ /cc and 77.2 γ /cc, in Stone-Farrell madium 44 γ /cc and 48 γ /cc respectively.

Penicillin 生産菌の変異に関する研究 (第14報)

Pen. chrysogenum Q 176 の黄色色素消失変異の遺傳生化学的研究(其の4)

有馬 啓, 駒形和男, 中村秀雄 (東京大学農芸化学科)

昭和27年12月15日受理

Studies on Variation of Penicillin producing Mold. Part 14. Biochemical

Genetical Studies on the Yellow Pigment Losing Mutation of *Pen.*

chrysogenum Q 176 to Pigmentless Sultant *Pen. chryso.* Q 176 ARIMA et OGASAWARA.

By Kei ARIMA Kazuo KOMAGATA and Hideo NAKAMURA

(Dept. of Agricultural Chemistry, Univ. of Tokyo, Japan.)

前報⁽¹⁾に於いて *Pen. chrysogenum* Q 176 → Pigmentless sultant への変異の際に消失する色素は, sorbicillin, penitric acid の2種の黄色色素なることが判明した。由来, この両色素はそれぞれ異なる菌株より異なる研究者により分離されたもので, *Pen. chrysogenum* Q 176 より両色素が平行的に生産されることを報告したのは著者等が最初である。Sorbicillin は CRAM⁽³⁾ により既に構造が決定されているが, [1-(2,4-dihydroxy-3,5-dimethyl phenyl) hexadiene 2,4-one-1.] penitric acid は STODOLA⁽⁴⁾ により二, 三の化学的性質が明らかにされたが, その化学構造は未決定である。本文中に示す如く, 両色素の化学的性質には類似点が多くなく, 又遺伝生化学上より同時に構造の全く異なる2種以上の色素生成能が変異消失することは, BEADLE等の説に矛盾するので消失せる色素間の構造の類似性に期待出来るが, 試料少量のため, 特に赤外線吸収スペクトル吸収により両者の構造の類似性を論じ, 本変異の遺伝生化学的機構の一模式を提出した。なお Q 176 の各 mutant 型菌株及び Q 176 に近縁のペニシリン生産青かびの黄色色素につき研究し, 著者等の推定の矛盾を立証した。

実験 1) 黄色色素の赤外線吸収スペクトル 東大総合研究所内の Infrared recording spectrophotometer. Baird mode BNo. 143 の器機を用い, 鎌田講師に依頼し, 黄色色素試料の赤外線吸収スペクトルを取り且つ解析を行つた。

試料は sorbicillin (CRAM), penitric acid (STODOLA, 小田), α -, β -penitric (STODOLA) 並びに著者等の粉末 sorbicillin を用いた。即ち KNO_3 の結晶板中に色素結晶を Nujol oil 中に良く摩砕して paste 状に suspend して挟む。試料は通常本法によると, 1回 10 mg を要するが, sorbicillin を除いては皆約 3 mg 程度の少量を用いたが明確なる spectrum を得ることが出来た。

結果は Fig. 1~2 に示す

Fig. 1. Infrared absorption spectra of sorbicillin, penitric acid, α penitric and β penitric.

1. Sorbicillin 2. Penitric acid
3. α -Penitric 4. β -Penitric

Fig. 2. Infrared absorption spectrum of methylsorbate⁽⁶⁾