微生物のクエン酸分解に関する研究 (第 3 報)

黒カビのクエン酸生成及び分解におよぼす α , α' -ジピリジルの影響

高 橋 甫 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 28 年 5 月 2 日 受 理

Studies on the Decomposition of Citrate by Microorganisms. Part 3. On the Effect of α , α' -Dipyridyl on the Decomposition and Formation of Citrate by *Asp. niger*.

By Hajime TAKAHASHI (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., University of Tokyo)

黒カビの有機酸代謝中クエン酸の生成については、今日のところオキサロ酢酸と酢酸の縮合によることがほぼ証明されているが⁽¹⁾、クエン酸の分解については定説がなく LYNEN 等はトリカルボン酸系 (以下 TCA-サイクルと称する) 類似の径路を想像しているが⁽²⁾、WALKER 等はこれを否定している⁽³⁾。多田氏は *Asp. niger* のクエン酸分解が一部 *Bact. succinicum* において認められるような C_4 酸と C_2 酸への直接的な分解を伴うことを報告している⁽⁴⁾。

筆者等は *Bact. succinicum* のクエン酸分解に及ぼす α , α' -ジピリジルの阻害について既に報告したが⁽⁵⁾、今回は黒カビのクエン酸生成及び分解に及ぼすジピリジルの影響を調査し、2, 3 の知見を得たのでここに報告する。

実 験 の 部

I. 菌株の選択 坂口研究室保存の黒カビ 5 株について次に示めす基本培地を用い酸性側 (pH 4.5) で生酸試験を行った。

基本培地: ブドウ糖 10%, 硫酸 0.35%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.03%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%

基本培地 75 cc を 300 cc 容三角瓶に入れ、31° に 7 日間培養し生産物を定量した。糖はフェーリングレーマンシュール法、クエン酸はペンタブロムアセトン重量法、酢酸は醋酸不溶の Ca 塩を過マンガン酸カリで滴定

Table 1. Analysis of the Fermentation Medium of Various Strains of *Asp. niger*.

Strain used	No. 2	No. 26	No. 17	S-292A
Initial amount of glucose (mg)	64.0	64.0	64.0	77.7
Glucose remained (mg)	2.1	8.4	9.2	6.6
Glucose consumed (mg)	61.9	55.8	54.8	71.1
Conversion (%) [*]	97	87	86	92
Weight of the fungus mat (mg)	1170	830	642	990
Citric acid produced (mg)	0	0	0	11.8
Conversion (%) ^{**}	0	0	0	33
Oxalic acid produced (mg)	0.2	0	0	0
Conversion (%) ^{**}	0.3	0	0	0

Initial pH of the medium was 4.0~4.5. The total volume of the medium was 75 ml. Fermentation was carried out at 31° for 7 days. All values except the weight of the fungus mat were expressed as values per ml. of the medium.

^{*} Conversion; Glucose consumed/Initial amount of glucose

^{**} Conversion; Products(mg)/Glucose consumed (mg)

この結果はジピリジルが培地中の鉄を奪った為にひきおこされたとも考えられる。Table 2 第 2 項の実験結果は基本培地、二次培地ともに局法注射用ブドウ糖を用いたので、このような可能性は少ないと思われるが、念のため二次培地のブドウ糖液 (局法注射用) をイオン交換樹脂を用いて精製し、ジピリジルによる Fe^{++} の発色が認められないことを確認し、これを用いて同様の実験を試みた。実験結果を Table 2 の 3 項に示めす。

した。

分析の結果を Table 1 に示めす。

Table 1 の試験結果から、以下の実験にはクエン酸生産株として S-292A、非生産株として No. 26 (京都赤) を用いることとした。

II. 黒カビのクエン酸生成に及ぼす α , α' -ジピリジルの影響 前項の基本培地に S-292A を接種し、5 日間 30° に培養し、生成した菌蓋を殺菌水で充分洗滌した後、M/1000 α , α' -ジピリジルを含むブドウ糖液を注入し 48 乃至 72 時間後に二次培養液の分析を行った。

分析の結果を Table 2 の第 1 項及び第 2 項に示めすが、ジピリジル添加区では糖の消費、クエン酸の生成ともに毒物を添加しない対照にくらべ増大するが、特にクエン酸生成の増加はいちじるしく 90~110% の生成速度の増大が認められる。しかし CAMPBELL 等あるいは JOHNSON 等は培地中の過剰の鉄がクエン酸の生成を減少させることを報告している^{(6), (7)}ので、

Table 2. The Effect of α, α' -Dipyridyl ($M/1000$) on the Production of Citric Acid by *Asp. niger* strain S-292A

α, α' -Dipyridyl	-		+		-		+		-		+	
Incubation time (hrs.)	48		48		72		72		48		48	
Weight of the fungus mat (mg)	1125		1025		1058		1554		1020		1104	
Initial amount of glucose (mg)	6843		6843		5056		5056		7440		7440	
Glucose consumed (mg)	2250		2432		1774		2937		2520		3116	
Conversion (%)*	23.9		35.5		35.1		58.1		33.9		41.9	
QGL** ($\times 10^{-1}$)	2.31		2.75		1.29		1.46		2.56		3.27	
Acceleration of glucose consumption (%)			19.8				13.1				27.7	
Citric acid formed (mg)	592		1027		526		1638		610		1278	
Conversion (%)***	26.3		42.2		29.7		55.8		24.2		41.0	
QCA**** ($\times 10^{-1}$)	0.57		1.09		0.36		0.76		0.65		1.26	
Acceleration of citrate formation (%)			91.2				111.1				93.8	

* Glucose consumed/Initial amount of glucose

** QGL represents the amount of glucose (μM) consumed by 1 mg of fungus mat per hour.

*** Citric acid formed/Glucose consumed

**** QCA represents the amount of citric acid formed (μM) by 1 mg of fungus mat per hour.

Table 2 第 3 項の結果から明かであるが、糖液をイオン交換樹脂で処理した場合も全く同様の結果が得られた。従つてデピリジルが培地中の鉄を奪取した為にクエン酸生成率が増加したのではなく、菌体酵素系に何等かの影響を及ぼして、このような著しい現象を起したものと考えられる。

III. クエン酸分解におよぼすデピリジルの影響 次にクエン酸生産株 S-292A 及び非生産株 No. 26 を用い、前実験と同様の方法で菌蓋を作り、菌蓋下に pH 4.5 の 0.5% クエン酸ソーダ液を注入し、クエン酸の分解に及ぼすデピリジルの影響を調べた。分析の結果を Table 3 に示す

Table 3. The Effect of α, α' -Dipyridyl ($M/1000$) on the Decomposition of Citrate by *Asp. niger*.

Strain used	S-292A				No. 26			
	-		+		-		+	
Dipyridyl	-		+		-		+	
Incubation time (hrs.)	41		45		40		45	
Weight of the fungus mat (mg)	1010		568		900		1150	
Initial amount of citric acid (mg)	269.6		269.6		309.3		309.3	
Citric acid consumed (mg)	269.6		77.0		305.2		138.4	
Conversion (%)*	100		28.6		98.7		44.7	
QCA** ($\times 10^{-2}$)	3.38		1.72		3.93		1.39	
Inhibition (%)	49.1		64.6		84.3		60.8	

* Citric acid consumed/Initial amount of citric acid

** QCA represents the amount of citric acid (μM) decomposed by 1 mg fungus mat per hour.

Table 3 より明かなようにクエン酸生産株あるいは非生産株何れもクエン酸の分解は $M/1000$ デピリジルによりいちじるしく阻害される。従つて S-292A の場合デピリジル存在下に於けるブドウ糖よりクエン酸生成率の著しい増大は、デピリジルによるクエン酸分解の阻害にもとづくものと結論される。

IV. 酢酸の酸化分解におよぼすデピリジルの影響 ブドウ糖よりクエン酸の収量がデピリジルの存在下でいちじるしく増大することはクエン酸合成酵素いわゆる "condensing enzyme" はデピリジルに対し安定であることを示している。従つて酢酸の酸化が TCA-サイクルによるものとすれば、クエン酸分解を阻害するデピリジルは酢酸の酸化をも阻害する筈である。そこで S-292A 及び No. 26 の菌蓋を用い、pH=4.5 の酢酸ソーダ液を基質としてその酸化分解に及ぼすデピリジルの影響を見た。分析の結果を Table 4 に示す。

Table 4. The Influence of α, α' -Dipyridyl ($M/1000$) on the Decomposition of Acetate by *Asp. niger* S-292A.

Dipyridyl	-	+
Incubation time (hours)	45	45
Weight of the fungus mat (mg)	85	85
Initial amount of acetic acid (mg)	62.6	62.6
Acetic acid consumed (mg)	12.2	5.5
Conversion (%)*	19.5	8.8
QAA**	5.3×10^{-2}	2.4×10^{-2}
Inhibition (%)	—	54

* Acetic acid consumed/Initial amount of acetic acid

** QAA represents the amount of acetic acid (μM) decomposed by 1 mg of fungus mat per hour.

V. No. 26 のクエン酸集積に及ぼすデピリジルの影響 デピリジルがクエン酸の分解を阻害することは以

上の諸結果より明かであり、クエン酸非生産株によるクエン酸の分解もまたいじりしく阻害される。No. 26 がクエン酸を集積しない原因が TCA-サイクルによる糖の完全酸化にあるとすれば、デピリジルの存在下ではクエン酸の集積が期待される。そこで No. 26 の菌蓋を用い、デピリジルの存在下で糖の醗酵を試みた。実験結果を Table 5 に示めすが、デピリジル存在下に於いてもクエン酸の集積は認められなかった。

また S-292A 及び No. 26 両菌株ともデピリジル ($M/1000$) を添加した培地に孢子を接種した場合は殆ど全く生育しない。

VI. デピリジルの阻害部位 *Bact. succinicum*
 のクエン酸分解の場合のデピリジルの阻害部位については既に報告したが、黒黴の場合についてもデピリジルの阻害する反応を追求するため 1, 2 の実験を試みた。前項迄に述べた実験結果はデピリジルがアコニターゼを阻害したとすればすべて説明され、アコニターゼは Fe^{++} を active center とし、デピリジルにより阻害されることが知られている⁽⁸⁾ので、まずアコニターゼにおよぼすデピリジルの影響を見た。

S-292A の菌蓋をシスアコニット酸ソーダ溶液 (20 mg/10 cc.) に作用させ、デピリジル添加無添加のものを 16 時間培養し、生産物を定性的にペーパークロマトグラフ法で見たが、何れの場合もクエン酸の生成が認められたので、アコニターゼは一応阻害されないものと想像されるが今後検討を要する点と思われる。

考 察

クエン酸生産株の糖からのクエン酸生成がデピリジルの添加によりいじりしく増大することはクエン酸分解をデピリジルが阻害する事実から容易に説明される。また糖の消費率、クエン酸の生成率ともにデピリジルにより増加することから、黒黴の場合、解糖酵素系及びクエン酸合成酵素系両者とも $M/1000$ デピリジルに対し安定である事は明かである。

クエン酸生産株及び非生産株何れの場合も醋酸の分解がデピリジルによりクエン酸分解とほぼ同程度の阻害を受ける事実は、両菌株とも醋酸はクエン酸をへて TCA-サイクルにより分解されるとする推定を強力に支持するが、No. 26 の場合デピリジル存在下においてもクエン酸の集積が認められない原因は現在のところ不明である。

デピリジルの阻害部位は TCA-サイクルの何れかの反応であろうと思われるが、アコニターゼではないように推定される。*Bact. succinicum* の場合デピリジルの阻害部位は焦性ブドウ酸の酸化系とクエン酸合成酵素または醋酸の活性化と想像されるが、黒黴の場合かなり阻害部位が異なるように思われるのは興味のある事実である。

総 括

1. クエン酸生産株 *Asp. niger* S-292A を用い菌蓋培養法でブドウ糖よりクエン酸の集積に及ぼす $M/1000$ α, α' -デピリジルの影響をしらべ、クエン酸の集積速度は約 100%, 取得率もまた約 60% 増加することを認めた。
2. デピリジルは *Asp. niger* S-292A 及びクエン酸非生産株 *Asp. niger* No. 26 (京都赤) 両菌株のクエン酸分解を約 50% 阻害する。前項のクエン酸収量の増大はデピリジルによるクエン酸分解の阻害により説明される。デピリジルの阻害部位は未決定であるがアコニターゼではない。
3. デピリジルは両菌株の醋酸の酸化分解をもクエン酸と同程度に阻害する。従つて醋酸の分解は少くとも一部クエン酸を経るものと考えられる。

本研究にあたり終始御懇篤な御指導を賜つた坂口謹一郎先生、有馬 啓先生に厚く感謝するとともに、本実験の 1 部を担当された清水 徹氏に深謝する。

(本報告の 1 部は昭和 27 年 7 月日本農芸化学会東京支部講演会で講演した。)

- (1) CARSON, S. F., MOSBACH, E. M., PHARRER, E. F. : *J. Bact.*, 62, 235 (1951).
- (2) LYNEN, F., LYNEN, F. : *Ann.*, 560, 149 (1948).
- (3) WALKER, T. K. : *Adv. in Enzymol.*, 9, 537 (1949).

Table 5. The Effect of α, α' -Dipyridyl ($M/1000$) on the Citrate Formation in *Asp. niger* strain No. 26

α, α' -Dipyridyl	—	+
Initial amount of glucose (mg.)	95.3	93.4
Glucose consumed (mg)	55.2	59.2
Conversion (%)	42.1	36.5
Weight of the fungus mat (mg)	825	810
Citric acid formed (mg)	0	0

Incubation was carried out at 30° for 45 hours.

- (4) 多田靖次 農化, 18, 90 (1942).
- (5) 高橋 甫, 野村真康 : 農化, 26, 99 (1952), 高橋 甫 : 農化, 27, 84 (1953).
- (6) TOMLISON, N., CAMPBELL, J. J. R. : *J. Bact.*, 59, 217 (1950).
- (7) SHU, P., JOHNSON, T. *Ind. Eng.*

Chem., 40, 1202 (1948).

J. Biol. Chem., 188, 379 (1951).

(8) DICKMAN, S. R., CLOUTIER, A. A :

Summary

1. The influence of α, α' -dipyridyl on the citrate formation from glucose by the fungus *Asp. niger* was studied. The reagent had been found by the authors to inhibit the anaerobic decomposition of citrate by *Bact. succinicum*.

The remarkable increase of citrate formation occurred in the glucose medium containing $M/1000$ α, α' -dipyridyl. This effect was always observed even in the purified glucose medium containing no ferrous ion, so it was concluded that this effect was not due to the deprivation of ferrous ion from the medium by the reagent.

2. Aerobic decomposition of citrate by two strains of *Asp. niger*, one the citrate former (S-292-A) and the other without the ability of citrate production (No. 26), was greatly inhibited by $M/1000$ α, α' -dipyridyl. This inhibition of citrate decomposition was presumed to be the cause of the promotion of citrate formation from glucose by the reagent. But in the case of No. 26, the addition of dipyridyl did not result the accumulation of citrate.

3. The aerobic decomposition of acetate by these strains was also inhibited by α, α' -dipyridyl. The degree of inhibition of acetate oxidation by the reagent was almost equal to that of citrate. So it was concluded that acetate was oxidized by a way of tricarboxylic acid cycle.

It was not clear enough that, what reaction of tricarboxylic acid cycle was inhibited by dipyridyl, but it was demonstrated by paper-chromatography that aconitase was not inhibited.

放射性同位元素による微生物の物質代謝に関する研究

酵母及び糸状菌の磷酸代謝に及ぼす諸条件の検討

高橋 甫, 野村 真康, 国 中 明 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 28 年 5 月 9 日 受 理

Isotopic Studies on the Metabolism of Microorganisms. Influence of Various Factors on the Phosphorus-Metabolism of Yeast and Fungi.

By Hajime TAKAHASHI, Masayasu NOMURA and Akira KUNINAKA

(Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

微生物の磷酸代謝を放射性同位元素 P^{32} を用いて研究した例は, SPIEGELMAN^{(1), (2)} らが主に蛋白合成との関連を酵母について, 又本邦では三浦^{(3), (4)} らが抗生物質との関連を *Staphylococcus* について検討している他比較的少く、糸状菌についてのこの種の研究は従来殆ど報告がない。

われわれは P^{32} を用い先ず酵母について SPIEGELMAN らと同様の実験を行つたところ, グルコース存在下の酵母菌体各割分の P turnover が彼の得た値より全般的にかなり高く, 窒素源の影響についても SPIEGELMAN らと若干の異なる知見を得た。これに関連して酒石酸アンモンが硫酸に比し酵母菌体 (特に冷トリクロル醋酸不溶性割分) の P turnover を顕著に促進する事実を新たに見出した。更に糸状菌についても若干の知見を得たので, ここに以上とりまとめて報告する。

実 験 の 部

供試菌株: 酵母として清酒酵母協会 5 号 (*Saccharomyces sake*), 醤油酵母 (*Zygosaccharomyces soja*) の 2 株を, 糸状菌は *Aspergillus oryzae* A を用いた。

Table 1a. Composition of Growth Medium for Yeast.

	NH ₄ -tartarate Medium	Ammonium sulfate Medium
Yeast juice*	1 l	1 l
Glucose	70 g	70 g
NH ₄ -tartarate	3.5 g	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	2.5 g
KH ₂ PO ₄	1 g	1 g

* 1 litre is prepared from 67 g pressed yeast,

Table 1b. Composition of Growth Medium for Fungi.

Glucose	50 g
Peptone	5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g
CaCl ₂	0.4 g
Tap water	1 l