た。

ii) 4-Hydroxy-5,7-dimethoxy-2-naphthoic acid (IIIa) 反応液から苛性ソーダで抽出されるものはごく少量で精査できなかつたが、抽出残液から水蒸気蒸溜で溶媒を除去した結晶性残渣を数回稀エタノールから再結すると m. p. 133~135° の殆ど無色の結晶となる。苛性ソーダに不溶、塩化鉄反応陰性。C₁₅H₁₀O₅ 計算値 C 65.21, H 5.84; 実験値 C 65.44, H 6.06。

上のエステル 0.2 g を 5% 苛性ソーダ 15 cc と煮沸すると次第に黄色透明となる。約 1.5 時間加熱後冷却し塩酸で微酸性とするとゲル状の沈澱となる。これに適量のエタノールを加え温めて黄色透明にとかし、熱時濃過すると濃液から黄色の微細な結晶が析出する。収量 0.15 g. m. p. 244~246°。これを減圧で昇華して精製すると m. p. 249~250° の微黄色針晶となる。C₁₅H₁₀O₅ 計算値 C 62.90, H 4.89; 実験値 C 63.07, H 4.91。

上記の酸 0.1 g を無水醋酸 15 cc および新たに溶解した無水醋酸ソーダ 0.5 g と 1.5 時間煮沸し冷却後水で分解するとほとんど無色の結晶性沈澱を生じ、これを稀醋酸から再結をくりかえすと m. p. 251° の無色の結晶となる。もとの酸 (IIIa) と混融すると m. p. 220~230° に降下する。C₁₅H₁₀O₅ 計算値 C 62.06, H 4.86, 実験値 C 62.01, H 4.96。

(1) 八木 : 農化, 29, 198 (1954).

(2) 八木 : 農化, 24, 313 (1951).

(3) R. D. HAWORTH and G. SHELDRIK : *J. Chem. Soc.*, 636 (1935).

(4) 化学実験学反応篇 IP. 230, 260 (出河書房).

(5) 同上, P. 284.

(6) E. MOETTIG and H. M. DUVAL : *J. Am.*

Chem. Soc., 59, 367 (1937).

(7) A. J. BIRCH and F. W. DONOVAN : *Australian J. Chem.*, 6, 373 (1953).

(8) W. F. BEECH and N. LEGG : *J. Chem. Soc.*, 1887 (1949).

(9) R. D. HAWORTH, B. JONES and Y. M. WAY : *J. Chem. Soc.*, 10 (1943).

Summary

As the bromination-dehydrobromination method could not be successfully applied for the preparation of 4-hydroxy-5,7-dimethoxy-2-naphthoic acid (IIIa) from 4-keto-5,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoic acid (IIa), the dehydrogenation method was applied 4-Keto-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoic acid (IIb) and its ethyl ester, chosen as model substances, were dehydrogenated under various conditions and the best yield of 4-hydroxy-2-naphthoic acid (IIIb) was obtained when the latter was treated with boiling biphenyl in the presence of palladium charcoal. Under this condition, ethyl ester of IIa was also smoothly dehydrogenated to the ethyl ester of IIIa, from which monomethyl-2-sorigenin (Ib) is expected to be synthesized.

アミラーゼ生産菌 (*Bac. subtilis*) の

溶菌現象に関する研究 (第1報)

Anaerobic lysis について

野 村 真 康 (東京大学応用微生物研究所第五研究部)

昭和 30 年 5 月 23 日 受 理

The Lytic Phenomena of *Bacillus subtilis*.

Part 1. The Anaerobic Lysis of *Bacillus subtilis*.

By Masayasu NOMURA (Division of Enzymology, Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

アミラーゼを多量に生産する *Bac. subtilis* に属する数種の細菌を用いて、アミラーゼの生成機構を研究中、振盪培養によつて得た菌体を集める為に振盪を中止すると、著明な溶菌が起り、液が透明になる現象が認められた。好氣的に生育させた細菌を比較的嫌気状態においた時に autolysis を起す事は時時報ぜられているが⁽¹⁾⁽²⁾、これに関する立入った研究は殆んど見当らず、又、その原因に関しても全く不明である。著者等の認めた現象は非常に著明であり、又、実際の細菌アミラーゼ生産工業との関係も深いと考えられるので、この現象を取り上げて溶菌現象の本質を解明し、且つこの現象と細菌の他の生理現象、例えばアミラーゼの生成、胞子の形成などと

の関係をも調べようと考え、本研究を開始した。

実 験 方 法

細菌類 アミラーゼ生産菌として *Bac. subtilis* に属する菌株, *H*, *N*, *R*, *F*, *J*, *T* の 6 株を用いた。この中, *H*, *N*, *R* の 3 株については、静置培養によるアミラーゼ生産に関して荻原の詳細な研究がある⁽³⁾。その他 *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megatherium* 等の菌株は東大応用微生物研究所保存の菌株を用いた。

Medium

Soybenn extract medium (abbreviated as Soy medium): Soluble starch 8%, Na citrate 0.04 M, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.15 M, KCl 0.02 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 M, CaCl_2 0.001 M, ethyl alcohol 1% (v/v), soybean extract (5% weight of soybean was extracted with 0.1% NaOH at boiling temperature for 1 hour), pH=7.2.

d medium: Soluble starch 0.2%, glucose 2%, succinic acid 0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.025 M, KCl 0.02 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 M, CaCl_2 0.001 M, peptone 0.5%, soybean extract ($1/10$ amount of that in Soy medium), pH=7.2.

GB medium: Glucose 0.5%, peptone 1%, meat extract 0.5%, NaCl 0.2%, pH=7.2.

溶菌過程の測定 分光光度計を用い、通常 600 mμ の波長で細菌浮遊液の optical density (O.D.) をはかり、溶菌過程を調べた。又 nephelometer によつて菌量の測定をした場合もある。

アミラーゼの定量 荻原氏による WOHLGEMUHT 法の改良法を用いた⁽³⁾。この測定法によると、結晶細菌 α-アミラーゼは $D_{410}^{20} = 37,000 \text{ u. / mgN}$ である。

実 験 結 果

Bac. subtilis H を Soy 培地に 30° で振盪培養し、24 時間後その一部を試験管にとり、直ちに液の濁度を測定した後、そのまま 37° の恒温器に入れ、経時的に液の濁度を測定した。結果の 1 例を Fig. 1. に示す。図から明らかなように、振盪培養を止めて液層がかなり厚い状態で静置をしておくと、急激な溶菌現象が起り、30 分

Fig. 1. Anaerobic lysis induced by stopping the shaking culture.

At the time 0 one part of the culture grown by shaking removed and left without further aeration (stationary), and the other part was cultured by shaking as before. Strain, *Bac. subtilis H* grown for 24 hours in Soy medium.

乃至 1 時間位で終了する(以下この現象を anaerobic lysis と称する)。この場合振盪培養を続けたものは、見かけ上の菌量の増加、アミラーゼの生成が進行している。図に示した例に於ては、溶菌後の液中アミラーゼ力価は、溶菌前のものに比して若干増加しているが、増加の認められない実験例もあり、この点については更に実験を進めて確かめねばならない。又、振盪を中止して直ちに氷冷したものは殆んど溶菌が認められない。又振盪を中止してそのまま静置しておいたものと、蒸留水で 6 倍に稀釈した後静置しておいたものを比べてみたが、両者の溶菌過程は大体同様に進行した。溶菌完了後の液を位相差顕微鏡で調べると、細胞内容物を失つた為に透明に見える死骸が大部分となり、正常の桿菌はほとんど認められなくなつていた。次ぎに如何なる条件下でこのような溶菌現象が起るかを調べてみた。

1. 成育時期と溶菌性 *Bac. subtilis H* を Soy 培地にうえ 30° で振盪培養をする。菌の成育と培地中のアミラ

ーゼ力価との時間的变化を測定した結果の 1 例を Fig. 2 (a) に示す。この時、図中に示した各点の時期に於て振盪を中止して静置し、液の濁度の変化を調べた (Fig. 2 (b)).

一般に培地中にアミラーゼが生成するのは、菌の log phase の末期頃からであるが、anaerobic lysis の現象も丁度この頃から認められ、log phase の若い菌に於てはこの現象は認められない (Fig. 2 (b), 曲線 ①)。又図中の曲線 ② (13 時間培養の菌) で示したように、丁度アミラーゼが培地に生じ始めたばかりの頃の phase の比較的若い菌を取ると、振盪を止めてからなお 30 分位は増殖が認められ、それから徐々に溶菌を起していく。

Fig. 2. Anaerobic lysis at the various stages of growth phase.
 (a) Growth curve and amylase production. (b) Anaerobic lysis at the various stages corresponding to the point shown by the arrows in Fig. 2 (a). Figures shown in the parenthesis indicate the amylase activities in the medium. Strain, *Bac. subtilis* H.

又、曲線⑥でみられるように、アミラーゼの生成が maximum に達した頃の古い菌では溶菌は著明でない。併しこの頃の phase の菌を検鏡してみると、正常桿菌は少なく、autolysis した後の細胞残渣や胞子が多く、その為に見掛け上 anaerobic lysis の現象が著明でないものと思われる。

2. 成育培地の種類と anaerobic lysis 前述してきた実験は、すべてアミラーゼ生産を良好にする為に特別に処方された Soy 培地に成育させた菌によるものであったので、次には培地の種類をかえて、その場合にも anaerobic lysis が認められるか否かを調べてみた。Soy 培地の特長としては、(1) 磷酸濃度の高い事、(2) 炭素源の濃度の高い事、(3) 大豆抽出液の入っている事があげられる。そこでこれらの濃度をなるべく少なく抑えた培地で菌を成育させて実験をしてみた。この場合は *Bac. subtilis* N, *Bac. subtilis* R を用いて実験したが (*H* 菌についても大体同様の結果が得られた)、Soy 培地の場合とはほぼ同様であり、14 時間位迄の間、即ち菌が log phase にあつてまだ培地中にアミラーゼの認められない時には全く溶菌が認められず、アミラーゼが培地に生成し始めた頃にこの現象が著明に認められた。

次に菌の成育は良好であるがアミラーゼの生成は極めて悪い (最高 60 u/ml に達するにすぎない) GB 培地に菌を成育させて実験を行なつた。その結果は、アミラーゼを生成しつつある phase の菌に於てはやはりかなりの程度の anaerobic lysis が認められたが、一般に Soy 培地の時程著明ではなかつた。

3. 溶菌過程の培地組成の影響 今迄述べた実験はすべて、菌体を振盪培養をして振盪を中止した後、そのまま或いは水で稀釈して静置しておいたものについて溶菌を観察したものである。即ち、成育培地中の種種の成分が菌の溶菌過程にも存在しているので、これらのもの (例えば培地中に生成したプロテアーゼ等) が溶菌に関係しているかも知れない。それ故次の実験によつてこの点を調べてみた。*Bac. subtilis* H を Soy 培地に 24 時間振盪培養をし、振盪を止めると同時に寒剤によつて急冷し、冷凍遠心機によつて菌体を集め、1 度塩溶液 (Soy 培地中の塩類と同じ組成のもの) で洗つた後、半分は同じ塩溶液に懸濁し、半分は新しいペプトン培地 (ペプトン 1%, NaCl 0.5%, pH=7.2) に懸濁させ、30° に戻した後、静置して経時的に溶菌過程を調べてみた。結果は Fig. 3 に示すように、両者とも同様に溶菌現象を呈した。それ故、この anaerobic lysis の現象は菌体外の物質の作用によるものではなく、菌体内に存在する内因に基づくものである事が分る。

Fig. 3. Anaerobic lysis of the washed cell suspension.
 Strain, *Bac. subtilis* H grown for 25 hours in Soy medium.

4. 種々の菌株による anaerobic lysis の試験 上述してきた anaerobic lysis の現象が *Bac. subtilis* H に特有なものか、或いは更に広く一般的に認められるものかを次に調べてみた。まず *Bac. subtilis* に属す

Fig. 4. Anaerobic lysis of the several amylase producing strains of *Bac. subtilis*.

Figures shown in the parenthesis indicate amylase activities in the medium.

Fig. 5. Comparative anaerobic lysis of the several strains of *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus* and *Bac. megatherium*.

(a) 24 hours culture. (b) 48 hours culture.

Figures shown in the parenthesis indicate amylase activities in the medium.

分の孢子を殺した後、常法通り平面培養をして生存していた孢子から生じた単一のコロニーを数株分離し、これらについて振盪培養をして上記の anaerobic lysis を起すか否か試験した。その結果は試験した菌株はいずれも上述したものと全く同様の anaerobic lysis を起し、この現象が遊離のバクテリオファージのようなものの感染の為に起るものではなく、これらの菌に内在する遺伝的性質に基づくものである事が明らかとなった。

考 察

好氣的に振盪培養をした数株の *Bac. subtilis* 菌を比較的嫌気状態においた時に著明に溶菌を起す事を認めたが、このような現象の生ずる原因に関しては従来の研究にも殆んど見当らない。著者はこの現象が如何にして起るかに関して現在研究中であり、又すでに溶菌液中に bacteriocine に類似したような性質をもつ抗生物質と、自己及び類縁菌の菌体をとく autolysine とを見出しているが、これらについては後報に譲る⁽⁴⁾。また、振盪を止めるという事が、嫌気状態にすることを意味する事は、種種の実験から推定されるのであるが、まだ確実な証明実験に成功していないので今後の実験にまたねばならない。又、観察された anaerobic lysis の現象が、菌の phase, 培地, 菌株などの点でアミラーゼ生産と外見上の並行関係を示しているのは興味深く、アミラーゼ生成機構に関して何等かの示唆を与えるように思われるが、この点も今後の研究にまたねばならない。併しとにか

る菌でアミラーゼを多量に生産する他の菌株, *N*, *R*, *F*, *J*, *T* の 5 株を Soy 培地に 24 時間振盪培養した後、静置状態においてその溶菌過程を調べた (Fig. 4)。その結果は、いずれの菌株も *H* 菌とほぼ同様の anaerobic lysis の現象を示した。次に、その他の *Bac. subtilis* 数株, *Bac. mesentericus*, *Bac. megatherium* などの菌株を用いて同様の試験をした。Soy 培地に 24 時間振盪培養した菌の振盪中止後の O.D. の変化と、その時の培地のアミラーゼ力価とを Fig. 5 (a) に、48 時間培養した菌についてのものを Fig. 5 (b) に示す。同じ *Bac. subtilis* に属する菌株でも B-4-10, K-8 などに於てはこの現象は殆んど認め難かつたが、K-2 は *H* 菌と同程度に著明な溶菌を示した。B-4-10 及び K-8 の菌株はいずれもアミラーゼの生産が極めて微弱であつたが、K-2 のみは比較的多くのアミラーゼを生成していた。それ故、見掛け上、この anaero-

bic lysis とアミラーゼ生成能と関係があるように思われる。又、試験した *Bac. mesentericus*, *Bac. megatherium* はいずれも全く anaerobic lysis の現象を示さなかつた。*

5. Anaerobic lysis を示す性質の遺伝性について 振盪を中止して静置した時に著明に認められる溶菌現象が、遊離のバクテリオファージの感染によるという可能性も否定できない。そこで寒天斜面培地から *H* 菌の孢子をかきとり、滅菌水に懸濁し、30 分の加熱処理をして大部

* 併しこれらの anaerobic lysis の認められなかつた菌株も、実験条件を種種かえて調べなければ、この性質のない事を確言する事はできない。アミラーゼを通常の条件では殆んどつくらぬ菌株についてこの現象の認められた場合もその後生じた。

く、*Bac. subtilis* に属するアミラーゼ生産菌が一般に（少くも著者等の調べた範囲内に於て）このような性質を内在している事は確かなので、実際に工場でこれらの菌を用いて生産に当る場合にも、この事を念頭において仕事を進めた方がよいと思われる。

終りに臨み終始御懇篤な御指導御鞭撻を賜つた赤堀四郎先生、丸尾文治先生、並びに有益な御助言御協力をいただいた研究室諸兄姉に厚く感謝いたします。又、アミラーゼ生産菌株を分譲して頂いた大阪大学理学部奥貫一男先生、荻原文二氏に深謝致します。

（本報告は昭和 30 年 2 月、日本農芸化学会関東支部会に於て講演した）。

(1) M. WELSCH : <i>Compt. rend. soc. biol.</i> , 143, 719, 721 (1949).	(3) B. HAGIHARA. <i>Ann. Rep. Scient. Works, Fac. Sci. Osaka Univ.</i> , 2, 35 (1954).
(2) H. J. WELSHIMER : <i>J. Bact.</i> , 61, 153, (1951).	(4) 野村真康 : 農化, 29, 678 (1955).

Summary

A very rapid lysis of several amylase producing strains of *Bac. subtilis* was observed, when they were grown aerobically by shaking culture and then left in a fairly anaerobic condition without further aeration (Fig. 1).

This phenomenon is first recognized at the last stage of the log phase when amylase begins to appear in the medium, and can be observed thereafter until the cessation of the amylase production (Fig. 2). Therefore, apparently both phenomena, amylase production and anaerobic lysis, take place in the same growth phase.

The effect of the variation of the growth medium on this phenomenon was examined.

The anaerobic lysis was also observed after the cells were harvested, washed and resuspended in the new medium or buffer (Fig. 3). Therefore, this phenomenon is not due to the external substance, but to the factor within the cell. The cells derived from the single spore survived after the heat treatment (100° for 30 min.), and still showed the same phenomenon. Accordingly, the lysis by carried bacteriophages was excluded and the anaerobic lysis seems to be the hereditary character of these organisms.

Several strains of *Bac. subtilis*, *Bac. megatherium* and *Bac. mesentericus* were examined as to their character of anaerobic lysis (Fig. 4, 5). This phenomenon has been pronounced only in the amylase producing strains of *Bac. subtilis*.

アミラーゼ生産菌 (*Bac. subtilis*) の 溶菌現象に関する研究 (第 2 報) 溶菌液中における Killing Factor 及び Autolysine の発見と紫外線による溶菌の誘発について

野 村 真 康 (東京大学応用微生物研究所第五研究部)

昭和 30 年 5 月 23 日 受 理

The Lytic Phenomena of *Bacillus subtilis*.

Part 2. Discoveries of the Killing Factor and Autolysine in the Lyzate
and Induced Lysis of *Bac. subtilis* with Ultraviolet Light.

By Masayasu NOMURA (Division of Enzymology, Institute of
Applied Microbiology, University of Tokyo)

著者は先に *Bac. subtilis* に属するアミラーゼ生産菌を振盪培養した後、振盪を中止して比較的嫌気状態におくと著明な溶菌を起す事 (anaerobic lysis) を認め、この現象が、遊離のバクテリオファージの感染している為に起るものではなく、菌に内在する遺伝的性質に基づくものである事を確かめた⁽¹⁾。このような溶菌現象に関する研究は非常に少ないが、WELSHIMER は *Bac. megatherium* について同様の現象を観察し、この際 lysogenic のファージ生産株のみが anaerobic lysis を起し、non-lysogenic の菌株はこの性質をもたないという興味ある報告をしている⁽²⁾。併しこの場合も何故この現象が起るのかについては全く分っていない。筆者も anaerobic