(5) Raistrick 等の提出した Geodin の構造式及び彼等により構造を決定された DHG trimethylether より推定される DHG の構造式を借りて, Geodin と DHG の相互変換にともなう構造上の変化につき考察した。

(1) H. Raistrick, G. Smith : <i>Biochem. J.</i> , 30, 1315 (1936).	(8) 西川英次郎 : 本誌, 12, 1 (1936).
(2) 小松栄太郎 : 本誌, 31, 349 (1957).	(9) 西川英次郎 : 本誌, 13, 1 (1937).
(3) 小松栄太郎, 阿部重雄 : 本誌, 31, 449 (1957).	(10) 西川英次郎 : <i>Acta Phytochim.</i> , 11, 167 (1939).
(4) 小松栄太郎 : 本誌, 31, 698 (1957).	(11) A. E. Oxford et al. : <i>Biochem. J.</i> , 33, 240 (1939).
(5) H. Raistrick et al. : <i>Biochem. J.</i> , 31, 1089 (1937).	(12) P. W. Brian et al. : <i>Brit. Mycol. Soc. Trans.</i> , 29, 173 (1946).
(6) H. Raistrick et al. : <i>Biochem. J.</i> , 33, 579 (1939).	(13) J. F. Grove, J. C. McGowan : <i>Nature.</i> , 160, 574 (1947).
(7) H. Raistrick et al. : <i>Biochem. J.</i> , 41, 458 (1947).	(14) J. F. Groves et al. : <i>J. Chem. Soc.</i> , 3949 ~ 4008 (1952).

Geodin に関する生化学的研究 (第 8 報)*

P. estinogenum K. & A. の銅欠乏菌体に Dihydrogeodin (DHG) の存在及び DHG を Geodin にする酸化系の欠如

小 松 栄 太 郎 (三菱化成工業株式会社)

昭和 32 年 5 月 27 日 受 理

著者はすでに *Penicillium estinogenum* Komatsu and Abe⁽¹⁻³⁾ (*P. estinogenum* と略す) を銅欠乏培地で培養するとき Geodin を産生しないこと (第 4 報参照)⁽⁴⁾, 次いで銅を豊富に含む培地^(4,5) に発育させた同菌或はその洗滌菌体, 又はその抽出液は強力な Dihydrogeodin (DHG)⁽¹⁾ 酸化能を示すこと (第 6 報)⁽⁶⁾ を, 一応別個の現象として報告した。然しその後更に, DHG 酸化能を示す同菌或はその洗滌菌体が空気欠乏下に於ては, 逆に Geodin を還元して DHG とする能力を発揮する事実 (第 7 報)⁽⁷⁾ が明かとなるに至り, 銅欠乏下に発育した菌に於てもなお DHG の酸化能或は Geodin 還元能が保有されるものであるか否かを見とどける必要に迫られたのであった。すでに第 4 報に於て“何故に銅がなければ Geodin は産生されないか”の問題が提出されたのであったが, 銅欠乏菌体のその他の生理を知らずしては本問題に解答が与えられるはずはないのである。なお本報に於ても有力な実験手段として役立つものは, 銅富裕菌体より得た DHG 酸化作用を有する抽出液⁽⁶⁾ と, その作用による DHG の Geodin への変化を, その際発現する抗菌力を測定することによつて検知する生物学的方法⁽¹⁾ とであった。

実 験 及 び 結 果

1. 銅欠乏菌体は DHG 酸化能を持たない

銅欠乏菌体 : 銅欠乏培地⁽⁴⁾ に *P. estinogenum* 3-17 株を常法通り, 25° で 5 日間振盪培養した後濾過し, 菌体を充分水で洗滌して圧搾して実験に供した。

菌体抽出液 : 上記銅欠乏菌体 5 g を乳鉢にとり, pH 6.0 の phosphate buffer (M/15) 25 cc を加えて充分磨砕した後遠心分離して乳褐色半透明の上澄液 20.5 cc を得た。乾燥重量 10 mg/cc。

DHG 溶液 : DHG 20 mg を 0.1 N-NaOH 2 cc に溶した。

さて試験管に菌体抽出液を 3 cc とり, DHG 溶液を 0.2 cc 加えて 25° で 1 時間振盪した後, 混液の Geodin 力価を検定したが認められなかった。

次に同様に菌体抽出液を 3 cc 取り, これに 4×10^{-5} M の硫酸銅溶液 0.3 cc を加えた後 DHG 溶液を 0.2 cc 加え, 同様 1 時間振盪したが, やはり Geodin 力価の発現は見られなかった。

* Biochemical Studies on Geodin. Part VIII. On the Presence of Dihydrogeodin (DHG) and the Absence of the Oxydizing System of DHG to Geodin in the Copper-Deficient Mycelium of *icillium P. estinogenum* K. and A. A.,
By Eitaro KOMATSU (Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.)

2. 銅欠乏菌体と Geodin

Geodin 溶液 : Geodin 30 mg をアセトン 2 cc に溶し phosphate buffer で 44 cc に稀釈した。即ち本溶液の Geodin 濃度は 684 γ /cc.

普通菌体抽出液 : 標準培地で培養して得た *P. estinogenum* 3-17 株の菌体より調製した。乾燥量 10 mg/cc. DHG 酸化力を有する (第 6 報参照)⁽⁶⁾.

(1) Thumberg 4 本に銅欠乏菌体 (1. 参照) を 2 g 宛取り, 第 1 管だけ蒸気滅菌器内で 30 分間加熱した後, 第 1, 2, 3 管に Geodin 溶液を 10 cc 宛, 第 4 管には phosphate buffer を 10 cc 分注した。次に第 1 管及び第 2 管内の空気を真空ポンプで排除した後, 全管を振盪機上に横たえて 25° に 3 時間振盪した。次いで全管を蒸気中で 4 分間加熱した後水で冷却し, 開管して内容物を取り出して濾過し, 各濾液について Geodin 含有量を測定した。結果は第 1 表のごとく, 予め菌体に熱処理を加えた第 1 管に Geodin が認められたのみで, 同様に Geodin 溶液を加えた第 2, 3 管には Geodin 力価は検出されなかった。すなわち空気が存在するしないにかかわらず, Geodin 溶液中の Geodin は銅欠乏菌体の存在によって何んらかの変化を起したことが分る。そうしてこの変化は, 菌体を予め加熱することによって妨げられをこととも上記の結果を示す通りである。

第 1 表 銅欠乏菌体*の Geodin に対する態度
使用菌株 : *P. estinogenum* 3-17

Thumberg 管	Geodin, γ /cc (25°, 3 時間後)
第 1 管 銅欠乏菌体 2g(加熱) + Geodin 溶液 (684 γ /cc) 10cc (空気排除)	580
第 2 管 銅欠乏菌体 2g + 同 上 (同 上)	0
第 3 管 銅欠乏菌体 2g + 同 上	0
第 4 管 銅欠乏菌体 2g + phosphate buffer 10 cc	0

* 銅欠乏培地に発育させた菌体

第 2 表 Geodin 処理銅欠乏菌体の普通菌体抽出液による Geodin 力価の再生 (第 1 表に続く)

	25°, 1 時間振盪後の Geodin 力価, γ /cc
第 2 管 { 菌体磨砕汁 1cc + 普通菌体抽出液 1cc + phosphate buffer 5cc	81
{ 濾液 1cc + 同 上 + 同 上	4
第 3 管 { 菌体磨砕汁 1cc + 同 上 + 同 上	57
{ 濾液 1cc + 同 上 + 同 上	6
第 4 管 { 菌体磨砕汁 1cc + 同 上 + 同 上	21
{ 濾液 1cc + 同 上 + 同 上	0

註 : 混合前各部の溶液には Geodin は検出されなかった。

この結果は第 2 表にまとめて示したように, 第 4 管 (第 1 表) よりの濾液を用いた場合以外は, 程度の差こそあれいづれも Geodin 力価が認められた。そうしてこの現象は, 第 7 報にも述べたように, それ自体には DHG を含まないが DHG 酸化能を有する普通菌体抽出液と混合することにより, 抗菌価を発現するに至った母体物質 DHG が菌体磨砕汁或は濾液に存在したものと解釈されるのである。しかも予め Geodin 溶液に接触させなかった銅欠乏菌体が, 上記処理により明かに抗菌価 (Geodin として 21 γ /cc) を発現していることは, 銅欠乏菌体に固有の DHG が含まれ, その他に第 2, 3 管の菌体には, 最初に与えた Geodin を還元して貯えた DHG が保有されたものと考えられるのである。最初に与えた Geodin は各管につき 6840 γ であり, これが銅欠乏菌体によって DHG に還元され, 上記処理によって再び Geodin となり回収された分を計算すると, 菌体磨砕汁の全容を約 12 cc, 濾液の全容を約 10 cc とすれば,

$$\begin{aligned} \text{第 2 管} \left\{ \begin{array}{l} \text{菌体} \cdots (81-21) \times 7 \times 12 = 5040 \\ \text{濾液} \cdots 4 \times 7 \times 10 = 280 \end{array} \right\} & 5320 \gamma \cdots 78\% \\ \text{第 3 管} \left\{ \begin{array}{l} \text{菌体} \cdots (57-21) \times 7 \times 12 = 4320 \\ \text{濾液} \cdots 6 \times 7 \times 10 = 420 \end{array} \right\} & 4740 \gamma \cdots 69\% \end{aligned}$$

となる。

3. 銅欠乏菌体より DHG の分離

前記実験に用いたのと同様収穫の銅欠乏菌体 200 g を, 通風乾燥器を用い 35° で乾燥した後, 肉ひき機にかけ

(2) 次に第 1 管を除いた 3 管の菌体を濾紙上で phosphate buffer を注いで充分洗滌した後ガーゼに包み, 圧搾して菌体を取り出し各々に phosphate buffer 10 cc を注いで乳鉢内でよく磨砕した。この磨砕汁について Geodin が検出されぬことを確認した後, これら各々に, 前記 3 管よりの濾液を 1 cc 宛試験管にとり, これらに別に調製して置いた普通菌体の抽出液を 1 cc 宛分注して密栓し, 25° に 1 時間振盪した。次いで各管に phosphate buffer を 5 cc 宛分注して濾過し, 濾液について Geodin 力価を測定した。

て粉末 (33 g) とした。これをクロロホルム 150 cc を用い、25° で 30 分間振盪して抽出した後、更に同容のアセトンで同様に抽出した。抽出兩部の溶媒を減圧蒸発させて残った飴状物を合併し、これを 10 cc のベンゼンと温めた後濾過して褐色のベンゼン溶液を除去し、不溶物をアルコール 3 cc に溶し、攪拌しながら徐々に水 6 cc を加えれば、黄色の微細結晶が析出する。濾過して結晶を黄白濁した液より分ち、これをアセトン 2 cc に溶し水 4 cc を加える方法を 2 回繰返して再結し、黄色の針状結晶 40 mg を得た。m.p. 217~218°。Geodin より接触還元して得た DHG (m.p. 216~218°) と混融して融点を降下しない。元素分析値は C 51.00, H 3.70, Cl 17.71%。合成 DHG の夫は C 51.16, H 3.55, Cl 17.60%。そのアルカリ溶液を *P. estinogenum* の普通菌体抽出液に混合振盪することより発する抗菌力は、合成 DHG を同様処理した場合に全く等しい、但し被検菌は *B. subtilis* PCI 219。以上の諸点より *P. estinogenum* 銅欠乏菌体より分離した上記物質を DHG と確認した。

4. 普通菌体に DHG の検出

P. estinogenum 3-17 株を常法どおり標準培地 50 cc を含む 400 cc 容フラスコで 25° に振盪培養し、4 日目には培養を取出して菌体を濃烈圧搾した。分離液の pH 5.0, Geodin 力価 204 γ/cc。圧搾菌体は pH 6.0 の phosphate buffer (M/15) で充分洗滌し、最早洗液に Geodin が検出できなくなった時に圧搾して、これ (2.7 g) を 8 分間蒸気滅菌器内で加熱した。次いでこれを乳鉢内に移し、phosphate buffer 15 cc を加えて充分磨砕し、この磨砕汁を 2 cc 宛 2 本の試験管に取り、第 1 管には実験 3. に用いたのと同じ普通菌体抽出液を 2 cc、又これを加熱して DHG 酸化能を失わせたものを 2 cc 第 2 管に加えて、25° に 1 時間振盪した後 Geodin 力価を測定した。

この結果は第 1 管のみ Geodin 力価 15 γ/cc を示し、第 2 管には Geodin は検出されなかった。このことは供試菌体内に DHG が存在して、普通菌体抽出液の有する DHG 酸化能により Geodin に変化した結果を示すものと解釈することができる。ここに得られた Geodin 力価より供試菌体 (水分含量約 80%) の乾燥物 1 g 中に存在した DHG を計算すれば約 0.7 mg となる。ちなみに *P. estinogenum* は従来の培養例によれば、普通 1 フラスコ当り 1 g の菌体 (乾燥量) を生じ、このときの培養濃液約 40 cc の Geodin 力価は 600 γ/cc 前後が普通であるから Geodin の全生産量は 24 mg となる。

考 察

以上の実験によって著者は *P. estinogenum* の生理について次のような認識を得た。

(1) 銅欠乏状態⁽⁴⁾で発育し、したがって Geodin を産生しなかつた、いわゆる銅欠乏菌体の抽出液には、銅が豊富に存在する環境^(4,5)で生育した菌体の抽出液⁽⁶⁾が有する DHG 酸化能を認めることができない。

(2) 然しこのような菌体にも Geodin 還元能⁽⁷⁾は存置されていて、しかもこの機能は銅富裕菌体と異り、空氣が存在しても自由に発揮され、Geodin を DHG として菌体に集積する。

(3) 更に銅欠乏菌体には固有の DHG が含まれる。著者はこれを分離して証明した。

(4) 増殖及び Geodin 産生が最盛期にある菌体を加熱し DHG 酸化能を失わせた後に、これに DHG 酸化能を有する菌体抽出液を作用させることにより、銅富裕菌体にも微量の DHG が存在することを検知した。

上記の所見より次の結論を与えることができる。

P. estinogenum が DHG 酸化能を形成するためには銅の存在を必須条件とする。銅欠乏下に発育した同菌は Geodin を産生しないが、このような菌は比較的少量であるが DHG を形成保有しているのであるから、Geodin 不産生の原因は一に銅欠乏菌が DHG 酸化能を欠如することに帰着される。これを換言すれば *P. estinogenum* が有する Geodin 産生の末端機構に於ては、先ず銅とは無関係に形成された DHG が、一方銅の参加をまって形成し得られた DHG 酸化系の媒介によって、Geodin に転換されるものと言うことができる。

以上著者は実験の示す事実に基づき、*P. estinogenum* の Geodin 産生機構を解明し、銅が無ければ何故に Geodin は産生されないかという問題に解答を与えたのであるが、Geodin は単に菌体に形成された DHG が酸化されて体外に排泄されたもの、としての意味しか有たぬものであろうか。著者はすでに、Geodin を産生した *P. estinogenum* は好氣的条件下に於ては DHG を酸化し⁽⁶⁾、又嫌氣的状態下には Geodin を還元する⁽⁷⁾事実を見たのであるが、今回は更に銅欠乏菌は好氣的状態に於ても、空氣欠乏下に於けると殆んど変らぬ Geodin 還元能を発揮する事実を認めた。このような銅欠乏菌体の生理は、銅富裕菌体の有する Geodin 還元機構も前者の夫と異らぬかぎり、同様空氣の存在下に於ても機能し得ることを暗示している。したがって DHG 酸化機構と Geodin 還元

機構を併有する銅富裕菌に於ては、次のような酸化還元系が成立し Geodin は水素伝達体として機能している可能性が無いとは言えないのである。

次に DHG 酸化系であるが、これは銅富裕菌体から安定に抽出し得られることは既に第 6 報に述べた。然しこれが銅欠乏菌体より得た抽出液に見出せぬことは、銅が DHG 酸化系の形成に不可欠の成分として役立っていることを示すものである。著者はこの酸化系に DHG オキシダーゼ⁽⁶⁾とも称すべき酵素の存在を予想するのであるが、恐らく銅はこの酵素形成の必須成分として要求されるものであると考えられる。これが銅酵素であるとすれば既知の銅酵素との異同も問題になるが、これら既知の銅酵素はいずれも青酸に敏感であるが、菌体抽出液を用いた実験では DHG 酸化系は青酸に対して少しも反応を示さなかった⁽⁶⁾。著者の実験の現段階で酵素学的問題に深入りするには、まだ資料が不充分であるが、下等菌類の領域に於ては、著者が *P. estinogenum* に見出した銅が特定の物質の酸化機構の成立に関係するといったような例が他に見当らぬことは、酵素学的立場からも充分注目するに値する事柄である。又高等植物に於てはアスコルビック・オキシダーゼ或はチロシナーゼ（ポリフェノール・オキシダーゼ）等の銅酵素の生理学的意義が問題となっているが⁽⁸⁻¹²⁾、*P. estinogenum* の Geodin 代謝は糸状菌に於て初めて明瞭な銅代謝の像を与えたものとして、比較生化学的見地からも興味ある問題である。

要 約

銅欠乏培地に発育させた *P. estinogenum* のいわゆる銅欠乏菌体は DHG 酸化能を示さず、空気存在の有無にかかわらず機能する Geodin 還元能を保有し、かつ菌体成分として DHG を含有すること。又銅富裕菌体にも DHG の存在を検知したことより次の結論を与えた。

P. estinogenum の Geodin 代謝の末端は、銅の関与せぬ DHG の形成及び Geodin 還元機構と、銅が絶対に要求される DHG 酸化機構より成る。

終りにのぞみ、終始御鞭撻下さった東大坂口謹一郎教授、東大応微研朝井勇宜教授、又御助言を与えられた同高橋補助教授に厚く感謝する。又本研究の実施に理解を示され且つ発表の許可を与えられた当社研究所長沢不二男所長及び会社同僚その他の関係各位に深く感謝する。

- (1) 小松栄太郎：本誌，31，349 (1957)。
- (2) 小松栄太郎：本誌，31，354 (1957)。
- (3) 小松栄太郎，阿部重雄：本誌，31，449 (1957)。
- (4) 小松栄太郎：本誌，31，564 (1957)。
- (5) 小松栄太郎：本誌，31，693 (1957)。
- (6) 小松栄太郎：本誌，31，698 (1957)。
- (7) 小松栄太郎：本誌，31，905 (1957)。
- (8) J.M. Nelson, C. Dawson : Advances in

Enzymology, 4, 132 (1944).

- (9) 佐橋佳一：化学の領域，8，618 (1954)。
- (10) W. O. James : Endeavour, No. 51, 155 (1954) ; 化学の領域，9，37 (1955)。
- (11) H.S. Mason : Advances in Enzymology, 16, 105 (1955)。
- (12) 本田幸一郎，三浦一夫：酵素化学の進歩 (第 5 集の I)，77 (1954)。