のウレアーゼの存在は一般にあまり大きくはならないが、飼料、季節によって変動した。

更に上記のウレアーゼの適応的生成が非常に遠心沈澱し易いプロトゾアによってなされることは興味深い。しかし尚無菌的なプロトゾアの培養が成功していないので、これに関する詳細な論述は今後の研究に俟ちたい。我々の得たプロトゾアはインフゾリアの一種で殆ど全部が *Entodinium* 属^(12,18) に属するものであった。

要 約

(1) 反芻胃内のウレアーゼの存在について検索し次の知見を得た。即ちウレアーゼは反芻胃内容物に構成及び適応酵素として存在する。構成酵素量は一般に微弱であるが飼料、季節によって変動する。これに対し適応酵素は常に顕著に認められ、尿素添加後 30~60 分の lag phase を経て急速な分解が起る。その条件及び機作について検討した。

(2) 遠心沈澱法によって反芻胃内容物を分割し、上記のウレアーゼ生成がプロトゾアによってなされるものであることを明らかにした。

本実験に際して御指導を得た東京大学神立 誠教授、亀高正夫助教授並びに実験に際して御助力を戴いた本学津田恒之助教授に厚く感謝する次第である。

(1) 志村憲助, 副島正美, 菊池栄一 : 本誌, 32, 913 (1958).	(9) M. I. Wegner, A. N. Booth et al. : <i>J. Dairy Sci.</i> , 24, 835 (1941).
(2) W. W. Repp, W. H. Hale et al. : <i>J. Animal Sci.</i> , 14, 118 (1955).	(10) A. de Vuyst, M. Vanbelle : <i>Zootechnica</i> , 4, 5 (1955).
(3) R. M. Pearson, J. A. B. Smith : <i>Biochem. J.</i> , 37, 148 (1943).	(11) 亀岡喧一, 森本 宏等 : 農技研報, G 7, 175 (1953).
(4) C. N. Huchtanen, L. S. Gall : <i>J. Bacteriol.</i> , 69, 102 (1955).	(12) 神立 誠, 高橋直躬 : 本誌, 29, 833 (1956).
(5) 岩田久敬等 : 日本畜産学会報, 23, 26 (1952).	(13) L. Mary and McNaught : <i>Biochem. J.</i> , 56, 561 (1954).
(6) K. Kimura, M. Umezū : <i>Tohoku J. Agr. Research</i> , 4, 141 (1954).	(14) R. Davies and E. F. Gale : "Adaptation in Microorganisms" (Third Symposium of the Society for General Microbiology) (1953). London,
(7) G. W. Watt, J. D. Chrisp : <i>Analyt. Chem.</i> , 26, 452 (1954).	
(8) D. B. Hudman : <i>J. Agr. Food. Chem.</i> , 17, 1063 (1953).	

反芻動物による尿素利用の機作に関する研究 (第 3 報)*

N¹⁵ を含む尿素を用いての利用経路の検索

菅原 潔, 副島正美, 匂坂勝之助, 志村憲助 (東北大学農学部生物化学研究室)

昭和 33 年 4 月 11 日 受理

緒 言

反芻獣に於いては尿素が蛋白質の代りとして利用され得る事が一般に認められて居り^(1~4), 実際に N¹⁵ を含む尿素の使用により、尿素より体蛋白質の生成が証明されて居る⁽⁵⁾。この尿素の利用機作については、第 1 胃内の微生物により一旦菌体蛋白質となり、それが更に動物体に利用されるものと考えられて居る^(6~9)。その反応は主としてバクテリアに依存するものであり、プロトゾアの存在を必要としないという実験結果^(10,11)も得られて居るが、第 1 胃内容物中のバクテリア数は飼料摂取後に最大となりプロトゾア数の増大と共に減少して行く事実から、プロトゾアがバクテリアを摂取して増加するものであると考えられて居る^(12,13)。又前報⁽¹⁴⁾で既に述べた様に第 1 胃中のウレアーゼ作用はプロトゾアの適応的な酵素作用によるものであって、バクテリアによるものでない事、プロトゾア-N が反芻胃内容物の N の 50% 程度を常に占めて居る事、及びプロトゾアの蛋白質の消化率

* Studies on the Mechanism of Urea Utilization by Ruminant. Part III. Mode of Urea Utilization studied with N¹⁵-Urea.

By Kiyoshi SUGAWARA, Masami SOEJIMA, Shōnosuke SAGISAKA and Kensuke SHIMURA
(Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

がバクテリアのそれよりもすぐれて居ること等の実験結果^(15,16) は、プロトゾアが尿素の利用に重要な役割を有する事を推定させるものである。我々はこれらの関係をより詳細に解明する目的で、 N^{15} を含む尿素を山羊に投与し、その利用経路を追跡した。

実験方法

1) N^{15} -尿素の合成法 Diphenyl Carbonate⁽²²⁾ 3.7 g (0.0173 mol) を乳鉢で良く磨砕し、第1図の如き内容 50 ml の細首のフラスコに入れ、これにエチルアルコール 10 ml, 水 5 ml を加え、 -10° に冷却しておく。一方ジムロート、滴下ロート及び通気管を付した三口フラスコに N^{15} を含む硫酸アンモニウム 2.16 g (0.0161 mol) を入れて少量の水でとかし、これに滴下ロートより過剰の 20% NaOH 溶液を加え5分後に徐々に加温した。冷却してある反応容器へのアンモニアの移行が認められなくなった時に二方コック A, B を閉じてから寒剤を取り去り、装置全体を三日間室温に放置した。尚アンモニアの移行を知るのには図の様にU字管Cにアルカリを1滴落しておくとも便利である。三日後に前と同様に反応容器を冷却しておき、三口フラスコ中に時々空気をふきこみながら 40 分間加

第1図 尿素合成装置

熱した。加熱後は前と同様に二方コックを閉じ寒剤を取り除き室温に放置した。二日後に更に同様の操作を行った。六日間で反応を終了した。反応生成物は 10 ml のエーテルで各 5 回振って水層の着色が認められなくなつてから湯浴 $60\sim 70^{\circ}$ で減圧濃縮し粗尿素 0.9 g を得、エチルアルコール、エーテルで洗滌し、0.77 g を得た。mp $130\sim 132^{\circ}$ 。

2) 尿素の投与 試験動物として生後 5 カ月の牡山羊を用いた。胃内容物の採取はカテーテルを用い水流ポンプによる吸引力によって行った。

試験にあたっては約 1 週間前から飼料として麩 200 g, 米糠 50 g, 食塩 2 g を朝に与え日中は放牧して青草を自由に摂取させ予備飼育した。飼料を与えてから 4~5 時間後、 N^{15} -尿素 1.5 g (N^{15} 7% atom excess) をオブラートに包み経口的に与え試料採取後には飼料を与えない様にした。

3) 第一胃内容物の分割 第1胃内容物を尿素投与後 1, 4, 7.5 時間後に採取、各回約 25 ml を採った。試料の分割は略亀岡等⁽¹⁷⁾ に準じて行い、採取した試料の 1 部に適当量の水を加えて稀釈した後ガーゼで濾過、濾液を 1,000 rpm, 1 分間遠心分離、沈殿に上澄液と同量の蒸留水を加えて 1 回洗滌し得られた沈殿をプロトゾア区分とした。更に最初の上澄液を 8,000 rpm, 10 分間遠心分離し生じた沈殿物をバクテリア区分とした。分別法を簡単に第2図に示した。

第2図 胃内容物分別法

収による方法⁽¹⁹⁾、尿素はウレアーゼによる方法⁽¹⁸⁾ によって夫々定量した。又 N^{15} -分析の目的には尿素をキサントヒドロール法⁽²⁰⁾ により分離した。

実験結果及び考察

通常の尿素を投与した場合に於ける各時間後の第1胃内容物中の窒素分布の変化は第1表の如くである。尚尿素を給与しない場合の成績は第2表に示した。給与した尿素は第1表の上澄液中のアンモニア量の変化に見られ

第 1 表 胃内容物各区分中の窒素化合物の変動

	尿素投与後の時間 (時)	全 窒 素	可溶性窒素	蛋白質態窒素	可溶性窒素区分			
					NH ₃	アミド態	アミノ酸態	尿素
プロトゾア	1	415 (26%)	24	391	18	1	8	0
	4	570 (34)	20	558	12	4	6	0
	7.5	565 (56)	27	538	8	7	10	0
バクテリア	1	340 (21)	29	311	16	0	9	0
	4	530 (32)	27	503	15	0	13	0
	7.5	200 (20)	10	190	5	3	4	0
上 澄 液	1	840 (53)	435	405	350	4	13	51
	4	570 (34)	257	311	200	10	19	13
	7.5	250 (25)	144	106	99	6	13	0

数字は γ -N/胃内容液 1 ml で示した。

括弧内の数字は第一胃内容物全窒素に対する各区分の全窒素の割合を%で示した。

第 2 表 尿素を与えない場合の胃内容物各区分中の窒素化合物の変動

	飼料摂取後の時間(時)	全 窒 素	可溶性窒素	蛋白質態窒素	遊離アンモニア
プロトゾア	1	454 (31%)	29	425	—
	4	540 (55)	28	512	—
	7.5	523 (56)	39	484	—
バクテリア	1	210 (14)	17	193	—
	4	210 (21)	17	193	—
	7.5	250 (27)	15	235	—
上 澄 液	1	800 (55)	260	540	200
	4	240 (24)	130	113	102
	7.5	162 (17)	116	46	100

数字は γ -N/胃内容液 1 ml で示した。

括弧内の数字は第 1 表と同じ意味を示す。

割合を時間的に追跡した。その結果は第 3 表に示す通りである。この表からバクテリアによる摂取がプロトゾアの摂取に先行する事、7.5 時間後に於いてもバクテリア区分の方が 2 倍以上の atom % excess N¹⁵ を示して居る事が見られる。以上の事実及び第 1 報、第 2 報の研究結果から考察して見ると、給与した尿素は第 1 胃に於いて先ず、プロトゾアの生産するウレアーゼによりアンモニアに分解される。次にこのアンモニアはバクテリアに利用され、又このバクテリアのかなりの部分がプロトゾアに利用される。更にこれらのバクテリア及びプロトゾアの蛋白質が第 4 胃又は小腸に於て宿主である反芻獣に利用されるのではないかと推定される。

要 約

N¹⁵ を含む硫酸より尿素を合成し、山羊を用いて反芻胃に於ける尿素の利用機作を追跡した。

- (1) 投与した尿素は第 1 胃に於いて速かにアンモニアに分解される。
- (2) このアンモニアも飼料からの蛋白質と共に第 1 胃中の微生物により利用される。
- (3) 微生物によるアンモニアの利用経路は次の如くであると考えられた。すなわちアンモニアは先ずバクテリアにより摂取され、そのバクテリアの一部はプロトゾアにより利用され、第 4 胃及び小腸に於いてバクテリア及びプロトゾアは共に消化吸収され体蛋白質の合成に利用される。

終りに臨み御指導を戴いた東京大学神立 誠教授、亀高正夫助教授に衷心より感謝の意を表します。又御助言、御助力を戴いた本学津田恒之助教授に深謝します。

- (1) 森本 宏、広瀬 恒：尿素，185，215 (1952) 高陽書院。
- (2) 田先威和夫：畜産の研究，12，141(1958)。
- (3) W. D. Gallup：J. Agr. Food Chem.,

- 4，625 (1956)。
- (4) W. H. Hale：J. Agr. Food Chem., 4，948 (1956)。
- (5) C. J. Watson et al.：Sci. Agr., 29，185

- (1949).
- (6) M. I. Wegner et al.: *J. Dairy. Sci.*, 23, 1123 (1940).
- (7) R. M. Pearson and B. Smith: *Biochem. J.*, 37, 153 (1943).
- (8) B. Connor et al.: *J. Animal Sci.*, 3, 287 (1944).
- (9) C. W. Duncan et al.: *J. Dairy Sci.*, 35, 505 (1952).
- (10) B. Smith and F. Baker: *Biochem. J.*, 38, 496 (1944).
- (11) B. Smith: *Proc. Nutrition Sci.*, 3, 203 (1945).
- (12) 赤司 景: 日本畜産学会九州支部会発表 (1952).
- (13) 赤司 景, 野間哲哉: 日本畜産学会春季大会発表 (1952).
- (14) 菊地栄一, 副島正美, 菅原 潔, 志村憲助: 本誌, 32, 917 (1958).
- (15) M. L. McNaugh et al.: *Biochem. J.*, 46, 32 (1950).
- (16) M. L. McNaugh et al.: *Biochem. J.*, 56, 151 (1954).
- (17) 亀岡喧一, 森本 宏, 高橋正也, 窪田大作: 農業技術研究所報告, G7, 175 (1953).
- (18) E. J. Conway: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, (1950), London.
- (19) J. R. Spies: *J. Biol. Chem.*, 195, 65 (1952).
- (20) R. Fosse: *Ann. Inst. Pasteur*, 30, 525 (1916).
- (21) I. W. McDonald: *Biochem. J.*, 56, 120 (1954).
- (22) L. Vanino: *Präparative Chemie*, 2, 586 (1923).

Streptomyces griseus 群の分類学的研究 (第 3 報)*

C 源利用能及び N 源利用能による分類に就いて

原田雄二郎, 久保重夫, 田中史郎 (協和醸酵工業株式会社 東京研究所)

昭和 33 年 2 月 28 日 受理

I. 緒 言

放線菌分類の鍵として C 源利用能を用いることは, つとに Waksman⁽¹⁾, Pridham & Gottlieb⁽²⁾, Benedict et al.⁽³⁾, その他多くの分類学者の一致して常用する方法である. *S. griseus* については岡見⁽⁴⁾は NaNO₃ を単一 N 源とした場合, SM 産生株はマルトースを利用するがグルコース, シュクロース, グリセロール中では生育せず *grisein* 産生株はこれら 4 つの糖を利用し, 桃色色素産生株はグリセロール中にのみ生育する. そして *S. griseus* はすべてキシロースを利用しラフィノース, ラムノースを利用しないと報告している. Perlman⁽⁵⁾は C 源利用能は生育によってのみ判定することは危険で夫々の残糖を測定することによって観察すべきだと述べている. 著者等も *S. griseus* に属する菌株及び類縁種について C 源利用能を検し分類を試みたので報告する.

又, 放線菌は蛋白含有培地などの N 源を多く含む培地では屢々特徴的な性状を示すことが認められており, N 源の種類が特徴的な性状を規定するのではないかと考えられる. 既に Waksman⁽¹⁾ も数種の N 源を合成液に加えその利用性をみているし, 岡見⁽⁴⁾も 2 種類の基礎培地を設定して各種放線菌の N 源利用能を検しているが何れも安定な標識とはなり難く, 他の特徴的な色素生産などが見られない限り, 発育促進アミノ酸のスペクトラムは特別な特徴のあるもののみが性状記載の補助的役目を果すのみであると言っている. 著者等はそれでも一応 *S. griseus* に属する菌株及び類縁種について各種 N 源の利用能を検したので実験結果も併せて報告する.

II. 実験方法

第 1 表に示す基礎培地, C 源, 無機 N 源, アミノ酸を使用し, 第 1 報第 1 表に示した供試菌株の洗滌胞子懸濁液を接種し, 28°, 14 日培養したのち, その生育度, 色素産生を記載した.

III. 実験結果

1. C 源利用能 各供試菌株の C 源利用能の結果は第 2 表の如くである. これを各系統別にまとめてみると第 3 表の如くなる.

* Studies on the Classification of *Streptomyces griseus* Group. Part III. Classification by the Utilization of Carbon and Nitrogen Compounds.

By Yujiro HARADA, Shigeo KUBO and Shiro TANAKA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Fermentation Ind. & Co. Ltd.)