(16) 田中勝宣, 秋田定夫, 木村一雄, 木下祝郎 :
農化, 昭和 34 年度大会講演 (1959 年 4 月).

(17) S. Kinoshita : *Advances in Applied Microbiol.*, 1, 201 (1959).

L-アラニン 醗 酵 (第 2 報)*

No. 483 株による L-アラニン醗酵の酵素学的知見

鮫島廣年, 藤田忠三, 奈良 高, 木下祝郎 (協和醗酵工業株式会社東京研究所)

昭和 35 年 5 月 17 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁾に於ては No. 483 株は土壌より得られた細菌の一株であり, 菌体外にアラニンのみを著量蓄積することとを特徴とし, 且つその生成するアラニンは L-型であることを確めた. 尚, この株の培養過程に於て, ビルビン酸或いは乳酸をアンモニウム・イオンと共に添加することにより, アラニンの生成量は著るしく増大し, 最高 35 mg/ml に達した. 更に乳酸アンモニウムを添加した場合, 以後振盪培養, 静置培養の何れに於てもアラニンの生成が促進されたことから, 本株に於ては乳酸脱水素酵素とアラニン脱水素酵素 (以下 ALD と略称する) との共転反応が存在するのではないかと考察した.

現在迄に, アラニン生合成の経路として二つの途が知られている. 即ち下の式に示される transamination と ALD による reductive amination との二つである.

(A) Transamination によるアラニンの生成

(B) Reductive amination によるアラニンの生成

前者の transamination によるビルビン酸からのアラニンの生成に関しては, かなり以前から報告があるが, 後者の ALD による reductive amination によるアラニンの生合成に関しては, 1955 年に英国の Wiame 及び Piérard⁽²⁾ が *Bacillus subtilis* の一栄養要求株が ALD の活性を有することを初めて認め, 次で 1956 年に Fairhurst 等⁽³⁾が *B. subtilis* の菌体懸濁液を用いた実験に於て, 同株によるアラニンの生成は transamination よりも寧ろビルビン酸の reductive amination により生じた可能性が強いことを示唆した. 1959 年に至り, 米国の Goldman⁽⁴⁾ は *Mycobacterium tuberculosis* の一株からかなり純粋に ALD を抽出精製し, その酵素学的諸性質を研究しており, 一方ソ連の Braunstein 等⁽⁵⁾は *Bacillus* 属及びグラム陽性細菌群中には ALD が可成り広く分布していることを報告している.

著者等の今回の報告も主として No. 483 株に ALD 活性が存在するかどうか, 又存在した場合 ALD がアラニン生成の主経路にあずかっているかどうか, そして又 ALD と乳酸脱水素酵素との共転反応が存在するかどうかという点に重点を置いた.

実 験 方 法

〔I〕菌体懸濁液の調製法 菌体を獲得するための培地としては前報⁽¹⁾の A 培地 (グルコース 10%, 硫酸 2%, ペプトン 0.2%, 酵母エキス 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, CaCO_3 2%, 殺菌前の pH 7.5) を用いた.

No. 483 株を上記の培地 300 ml を入れた 2 l 容の三角フラスコ中で 37° で約 48 時間振盪培養し, 収獲した培養液は先ず低速遠心分離 (約 1,000 r.p.m.) で 5 分間処理して培地中の CaCO_3 を除き, 其の後上層懸濁液を 0° で約 10,000 r.p.m. の遠心分離にかけて集菌した. 菌体は生理食塩水を用いて 2 回遠沈洗滌を行い, 最後に同食塩水に再懸濁して約 100 mg/ml の菌体懸濁液をつくった. この菌体懸濁液はそのまま intact cell 実験に

* L-Alanine Fermentation. Part II. Enzymatic Aspects on L-Alanine Fermentation by No. 483 Strain.

By Hirotoishi SAMEJIMA, Chuzo FUJITA, Takashi NARA and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd.)

使用し、又後述の cell free extract の調製原料として使用した。

〔II〕 Cell free extract の調製法 上述の菌体濃度約 100 mg/ml の懸濁液を 10 kC の sonic oscillator にかけて、2 乃至 3° で約 30 分間処理し、後冷凍遠心分離器を使用して、0°, 10,000 r. p. m., 約 30 分間の処理を行い透明な cell free extract を得た。この cell free extract はそのまま酵素標品として使用したが、後には約 30 倍容の 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) に対して一晚透析したものを実験に用いた。

〔III〕 反応液の組成 反応液の組成は各実験結果の項に示した。

〔IV〕

a) ALD 及び乳酸脱水素酵素の活性の測定： 当該酵素標品にそれぞれアラニン及び乳酸を与えた時に起る DPN の還元によって生ずる 340 m μ に於ける吸収の増加を日立製自記式スペクトロフォトメーターを用いて測定した。

b) Transaminase 活性の測定： 酵素液にピルビン酸又は α -ケトグルタル酸とアミノ基供与体である各種アミノ酸を加えたとき生成するアラニン又はグルタミン酸を夫々 *Leuconostoc citrovorum* 及び *Leuconostoc mesenteroides* を用いる bioassay (比濁法) により測定した。

c) 培養実験の際生成したアラニンは丸田等⁽⁶⁾の報告によるペイパークロマトグラフィとニンヒドリン比色の併用法により測定した。

d) 菌体量は 1 ml の培養液に 1 ml の 2 N HCl を加えて CaCO₃ を溶かし、蒸留水で 20 ml の定容に合せ、後波長 660 m μ での optical density を測定し菌体生成量の目安とした。

実 験 結 果

〔I〕 No. 483 株に於けるアラニン脱素酵素 (ALD) の存在について 第 1 図に示した反応液及び反応条件により ALD による DPN の還元の結果生ずる 340 m μ の吸収の増加を測定して ALD 活性の存在を確かめた。

第 1 図その 1 に用いた酵素標品は未透析の cell free extract であるが、340 m μ での吸収の増加はアラニンの存在下に於てのみ認められた。又同図の様に酵素液を五分の一に稀釈して用いると吸収の増加速度は図の様に低下し、この反応が明らかに酵素反応により起ることを示した。

又、第 1 図その 2 では未透析の cell free extract と透析後の cell free extract との ALD 活性を比較したが、透析後の酵素標品の方がより強い活性を示したので、以後の実験には全て透析した cell free extract を使用した。

〔II〕 ALD 活性の最適 pH について pH 5.55 から 10.0 に涉って ALD によるアラニンの oxidative deamination の活性の最適 pH を求めた。用いた緩衝液は pH 5.55 から 7.0 迄は 0.3 M 磷酸緩衝液を、又 pH 8.2 から 10.0 迄は 0.3 M diol 緩衝液を用いた。実験結果は第 2 図に示した。

(その 1) 酵素濃度の影響

(その 2) 透析及び非透析無細胞抽出液のアラニン脱素酵素活性の比較

第 1 図 No. 483 株のアラニン脱素酵素活性
反応液組成: 0.3 M Diol 緩衝液 (pH 9.8) 1.0 ml, 0.06 M DL-アラニン (pH 9.8) 1.0 ml, DPN (約 10 mg/ml) 0.1 ml, 水 0.8 ml, 酵素液 0.1 ml, 全容 3.0 ml.
反応温度: 室温 (13°)

第 2 図 アラニン脱素酵素の活性に及ぼす pH の影響

反応液組成: 0.3 M 緩衝液 (pH 5.55 乃至 10) 1.0 ml, 0.06 M DL-アラニン (夫々の pH に調節) 1.0 ml, DPN (約 10 mg/ml) 0.1 ml, 水 0.8 ml, 酵素液 0.1 ml.
反応温度: 13°

第3図 アラニン脱水素酵素の活性に及ぼすアラニン濃度の影響 (その1)

反応液組成: 0.3M Diol 緩衝液 (pH 9.8) 1.0ml, DL-アラニン (pH 9.8, 0.01 乃至 0.18M) 1.0ml, DPN (約 10mg/ml) 0.1ml, 水 0.8ml, 酵素液 0.1ml.

反応温度: 13°

註: 図中の mM は DL-アラニンの濃度である.

第4図 アラニン脱水素酵素の活性に及ぼすアラニン濃度の影響 (その2)

反応液の組成: 0.3M Diol 緩衝液 (pH 9.8) 1.0ml, DL-アラニン (pH 9.8, 0.01 乃至 0.18M) 1.0ml, DPN (約 10mg/ml) 0.1ml, 水 0.8ml, 酵素液 0.1ml.

反応温度: 13°

その結果, 最適 pH は 9.8 であり, pH 7.0 以下では全く活性を示さないことが判った. この結果は Goldman⁽⁴⁾ の結果と略々一致している.

〔III〕 ALD 活性に及ぼすアラニン濃度の影響 基質であるアラニンの濃度を 0 乃至 36 mM の範囲で変化させて経時的な 340 mμ に於ける吸収の増加を測定した結果を第3図に示す.

この図で興味ある点は, アラニンの濃

度が 2 乃至 4 mM の低濃度では一旦上昇した 340 mμ の吸収が下降を開始することである. 之は恐らく一旦生じた DPNH を再び DPN に酸化する副反応がこの酵素標品中に存在することを示している. 又, アラニンの濃度が 36 mM の様に可成り高くなると 340 mμ の吸収の増加が途中から横ばい状態になり, DPN の還元が停止したことを示す. この現象は基質であるアラニン自体が ALD 活性を阻害した結果になっている. 又第4図は第3図を書き換えたもので, 横軸にアラニンの濃度を取り, 縦軸には最初の一分間に於ける 340 mμ に於ける ΔO.D. をとっている.

この図に於てもアラニンの濃度が 4 mM 以上になると却って DPN の還元速度が急速に低下し, 20 mM 以上になるとかなり低い位置で平衡状態に達する. この点からもアラニン自体による ALD 活性の阻害現象が支持されている.

〔IV〕 乳酸脱水素酵素の存在について ALD 活性の試験に用いられた透析前後の cell free extract を用いて pH 5.55 乃至 9.8 に涉って下記の反応液を用いて, DPN の還元により乳酸脱水素酵素の存在を試験した.

反応液の組成は次の通りであった.

0.3M buffer (pH 5.55 乃至 9.8) 1.0ml, 0.03M Na-lactate (夫々の pH に調節) 1.0ml, DPN (約 10mg/ml) 0.1ml, 水 0.8ml, 酵素液 (cell free extract) 0.1ml.

試験の結果, 用いた全ての pH 範囲に於て乳酸脱水素酵素の活性は全く認められなかった. この理由としては次の二つの考え方ができる. 即ち, 1) 酵素調製時に於ける酵素活性の破壊, 2) 本菌に於ける乳酸からピルビン酸への酸化は DPN 以外の水素受容体を必要とする酵素系により接触されている. 以上の二つであるが 1) の点については再度酵素標品を調製しても活性は認められず, 且つ, 何れの場合でも ALD の活性或いは後述する或る種の transaminase の活性は有しており, 乳酸脱水素酵素だけが完全に活性を失ったという見方には首肯し難い. 一方 2) の点については乳酸からピルビン酸への酸化を司る酵素系で DPN 以外の水素受容体として FMN, FAD 或いはチトクローム系を必要とする場合が既に知られており, 寧ろこの方の可能性が強いのではないかと考える.

何れにせよ, 前報で示唆した所の DPN を共通の補酵素とする乳酸脱水素酵素と ALD との共転反応が存在する可能性は少ないといえよう.

〔V〕 菌体懸濁液による乳酸アンモニウムからのアラニンの生成 Cell free extract を用いる実験に於ては, DPN に依存する乳酸脱水素酵素の活性は認められなかったが, 醗酵過程で乳酸アンモニウムを添加するこ

第 1 表 菌体懸濁液による乳酸アンモンからのアラニンの生成

pH	5 時 間 目		17 時 間 目	
	アラニン 量 γ/ml	アラニン μM/5ml	アラニン 量 γ/ml	アラニン μM/5ml
8.3	>500	>28	>500	>28
7.8	>500	>28	>500	>28
7.3	285	16.0	>500	>28
7.0	158	8.9	395	22.2
6.4	150	8.4	290	16.3
5.9	75	4.2	195	11.0
5.6	85	4.7	140	7.9

反応液の組成: 乳酸アンモン 200 μM, 硫酸 200 μM, 磷酸又はトリス緩衝液 400 μM (pH 5.6~7.0 磷酸緩衝液, pH 7.3~8.3 トリス緩衝液), 菌体 86 mg, 全容量 5 ml.

反応温度: 37° で振盪培養した.

とによりアラニンの生成量が著しく増加することは前報⁽¹⁾に示された通りである. それ故, 菌体懸濁液を用いて乳酸アンモニウムからのアラニンの生成につき試験を行った. 反応液の組成は第 1 表に示される通りであり, 且つ pH は 5.55 から 8.3 の範囲で試験を行った.

第 1 表に示される様に, 乳酸アンモニウムからのアラニンの生成速度は必ずしも速いとはいえないが, 明らかに起っており, 又用いた pH の範囲内では pH が高い程アラニンの生成は速かであった. この点では, 先述の ALD の活性の最適 pH が 9.8 で可成り高かった事と関連があり, 乳酸アンモニウムからのアラニン

の生成が ALD の支配を受けている一つの傍証ともいうべきであろう. 又, この実験結果から乳酸が何等かの酵素の作用によってピルビン酸になったということはいい得ると思う.

[VI] Transamination によるアラニンの生成について アラニン生成の今一つの経路として, ビルビン酸と他のアミノ酸との間の transamination の問題が残されている. これを試験する目的で, 先に ALD 活性の試験に用いた透析後の cell free extract を使用し, 第 2 表に示す反応液並びに温度, 時間の下で生じたアラニンの量を bioassay で測定した. 第 2 表には各種のアミノ酸をアミノ基供与体として用いたときのアラニンの生成量を示した.

表に示される様にピルビン酸は殆んどのアミノ酸との間に transamination を起さないか, 又は起しても極く微弱であった. この結果から No. 483 株に於けるアラニンの生成は ALD 活性によるピルビン酸の reductive amination によるものであって, transamination によるアラニン生成は殆んど起らないといえよう.

第 2 表 トランスアミナーゼによる L-アラニンの生成

添加アミノ酸	アラニン 生成量 μM	添加アミノ酸	アラニン 生成量 μM
無 添 加 (対照)	0	グ リ シ ン	2.52
L-グルタミン酸	0	L-セ リ ン	0
L-アスパラギン酸	0	L-ス レ オ ニ ン	3.36
L-バ リ ン	0	DL-メ チ オ ニ ン	0
L-フェニルアラニン	0	L-ア ル ギ ニ ン	0
DL-α-アミノ酪酸	0	L-ヒ ス チ ジ ン	0
DL-イソロイシン	0.73	L-リ ジ ン	3.65
L-ロ イ シ ン*	0	L-オ ル ニ チ ン	0

反応液の組成: 0.3 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 2.0 ml, 0.1 M ビルビン酸ソーダ (pH 7.0) 1.0 ml, 0.1 M アミノ酸 (pH 7.0) 1.0 ml, ビリドキサル・フォスフェート (0.3 mg/ml) 0.1 ml, 酵素液 (透析無細胞抽出液) 1.0 ml.

37° で 6 時間反応後, 100° で 10 分加熱して後測定した.

* ロイシンのみ 0.05 M 溶液で 1.0 ml 加えた.

第 3 表 トランスアミナーゼによるグルタミン酸の生成

添加アミノ酸	アラニン 生成量 μM	添加アミノ酸	アラニン 生成量 μM
無 添 加 (対照)	0	DL-α-アミノ酪酸	1.70
硫 安	2.56	DL-イソロイシン	5.55
DL-ア ラ ニ ン	1.70	L-ロ イ シ ン*	8.50
L-アスパラギン酸	39.0	グ リ シ ン	2.55
L-バ リ ン	13.3	L-セ リ ン	0.44
L-フェニルアラニン	25.6	L-ス レ オ ニ ン	0.44

反応液の組成: 0.3 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 2.0 ml, 0.1 M α-ケトグルタル酸ソーダ (pH 7.0) 1.0 ml, 0.1 M アミノ酸 (pH 7.0) 1.0 ml, ビリドキサル・フォスフェート (0.1 mg/ml) 0.1 ml, 酵素液 (透析無細胞抽出液) 1.0 ml.

37° で 6 時間反応後, 100° で 10 分加熱して後測定した.

* ロイシンのみ 0.05 M 溶液で 1.0 ml 加えた.

[VII] Transamination によるグルタ

ミン酸の生成について 本菌に於けるアラニン蓄積の一因として, 一旦生じたアラニンが他のケト酸との間にtransaminationを起して消失することがないということが予測される. ここではその一例としてアラニンとα-ケトグルタル酸との間のtransaminationによるグルタミン酸の生成につき検討した. 尚, 同時に他のアミノ酸とα-ケトグルタル酸との間のtransaminationによって生ずるグルタミン酸の量もbioassayにより測定し第3表に示した.

表に見られる様にアラニンとα-ケトグルタル酸との間のtransamination反応は微弱であり, アラニンがα-ケトグルタル酸へのアミノ基供与体として消失する可能性の少いことを示している. しかし, アスパラギン酸, フェニルアラニンからのα-ケトグルタル酸へのtransaminationは強力であり, 又バリン, イソロイシン及びロイシンからのtransaminationは中等度であった. 使用した他のアミノ酸からのtransaminationは微弱であった. 尚, 硫

第 5 図 アラニンの醗酵生産に及ぼす 2,4-ジニトロフェノールの効果

●—● 48 時間目 ×—× 72 時間目
培養は A 培地中で 37° で振盪培養し, 2,4-ジニトロフェノールは培養 24 時間目に加えた。

安を添加したときのグルタミン酸の生成が弱い点から本菌のグルタミン酸脱水素酵素の活性は弱いのではないかと推測される。

【VIII】 アラニン醗酵に及ぼす 2,4-ジニトロフェノールの効果 アラニンの生成が主として ALD 活性により行われることが判った。そこで補酵素である DPN と直接に関係のある呼吸系に関連のある薬剤の効果をしらべることは興味ある問題と考え、先ず呼吸と之に附随する oxidative phosphorylation との uncoupling agent として知られている 2,4-ジニトロフェノールの効果について試験した。

No. 483 株を A 培地 (30 ml in 250 cc flask) 中で振盪培養し、24 時間目に夫々 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 及び 10^{-3} M の濃度になるように 2,4-ジニトロフェノールを培地に添加して培養を続行した。培養開始後 48 及び 72 時間目のアラニンの生成量を測定した結果を第 5 図に示す。

この図に見られる様に 2,4-ジニトロフェノール添加後 24 時間目 (培養開始後 48 時間目) では 10^{-5} M 以上の 2,4-ジニトロフェノール (以下 2,4-D と略称する) が存在する群は、無添加のものに比べて著しくアラニンの蓄積が速進されている事が判る。しかし添加後 48 時間目 (培養開始後 72 時間目) では無添加のものと 10^{-5} M 以上の 2,4-D を加えた群とのアラニン生成量は大きな差なくなる。注目すべきは 2,4-D の濃度が 10^{-6} M に於ては培養開始後 48 時間目及び 72 時間目のアラニンの生成は共に著しく阻害される。

2,4-D がアラニン醗酵に及ぼす効果としては、 10^{-6} M の低濃度ではアラニンの生成を著しく阻害し、一方 10^{-5} 乃至 10^{-3} M の濃度では、却ってアラニンの生成速度を促進する効果があった。但しこの場合でも培養時間が長びくにつれて無添加のものとアラニン生成量の差はなくなってくる。

考

察

以上の実験結果から No. 483 株によるグルコースからのアラニンの生成は第 6 図に示される様に ALD によるピルビン酸の reductive amination によるものであって、transamination によるアラニンの生成の可能性は極めて少ないことが判った。

第 6 図 No. 483 株に於けるアラニン生合成経路に関する想定図

(I) Alanine dehydrogenase (II) Lactic dehydrogenase

又、乳酸アンモニウムを酸酵過程に加えることによって起るアラニン生成量の増加は ALD と乳酸脱水素酵素との共転反応によるものと予想したが、目下乳酸を基質とした際の DPN の還元が認められていない。この点につき、現在知られる乳酸脱水素酵素は全てその反応平衡が著しく乳酸側に傾いているので、実験手法としてはピルビン酸を基質とした時の DPNH の酸化能を測定する余地が残されている。

尚、本菌のアラニン蓄積の一因としては、例えば α -ケトグルタル酸-アラニン間の transaminase の活性が殆んど認められない点からも、あるいは他のケト酸との間の transamination 反応も弱く、その結果アラニンはこの菌に於ては末端生成物として蓄積したのではないと思われる。

更に、この菌に於けるアラニン蓄積の生理的意義を推察するに、本菌では glycolysis の速度が枸橼酸サイクルその他のピルビン酸を消費する反応系の速度よりも速く、このため過剰となったピルビン酸の over flow の現象であろうと考える。しかも本菌では DPN-specific な乳酸脱水素酵素の存在が実験条件下では認められず、一方の DPN-specific の ALD の存在が認められる点から triosephosphate dehydrogenase の反応と ALD の反応とが DPN を共通補酵素として共転したと考えるのが妥当なのかもしれない。

又、アラニン酸酵に於て 2,4-D が 10^{-5} M 以上存在したとき、アラニンの生成速度が著しく促進されたことは、“パスツール効果”と関連して興味ある事実である。即ち、現在“パスツール効果”は酸素の供給がさかなくなり同時に呼吸速度が増すことに伴う oxidative phosphorylation の増加の結果 ATP の量が増加し、この ATP が fructokinase 及び phosphofructokinase の活性を阻害し、為に起る glycolysis の速度減退現象と考えられている⁽⁷⁾。本実験に於ける 2,4-D の効果は、2,4-D が呼吸と之に伴う oxidative phosphorylation とを uncoupled して細胞内の ATP 水準を低下させ、このため glycolysis の速度が増大し、之に伴い増産されたピルビン酸が ALD の作用によりアラニンとして蓄積されたものと解釈しうる。但し、この際 10^{-6} M の 2,4-D の添加が寧ろ逆に著しくアラニンの生成を抑制した理由としては Slater 及び Hüllsmann⁽⁸⁾ が報告している様に 2,4-D はある濃度では寧ろ oxidative phosphorylation を促進する事実があることから首肯し得よう。即ち、このような状態の下では ATP の蓄積は通常よりも大きくなり、この為 glycolysis の速度が著しく阻害され、その結果アラニンの蓄積も抑制されたと解釈することが出来る。

今一つこの菌の ALD に於て観察された興味ある問題は、ALD の基質であるアラニン自体が濃度が高くなると却って同酵素の活性を阻害する現象である。このような基質による酵素活性の阻害については、既に Theorell 等⁽⁹⁾は肝臓のアルコール脱水素酵素に於て 10 mM 以上の濃度でエタノールが存在すると同酵素の活性が阻害されることを認めており、又 Hakala 等⁽¹⁰⁾は乳酸脱水素酵素の活性が高濃度のピルビン酸の存在により阻害を受けることを認め、更に Goldman⁽⁴⁾ はアラニン脱水素酵素の活性がピルビン酸の高濃度により阻害されることを認めている。我々の実験結果も恐らくアラニンによる ALD 活性の阻害現象と思われる。このような基質自体による酵素活性阻害を Alberty⁽¹¹⁾ は“substrate inhibition”として説明を加えている。

要 約

(1) No. 483 株は DPN を補酵素とするアラニン脱水素酵素の活性を有し、又その活性の最適 pH は 9.8 であった。

(2) 本菌のアラニン脱水素酵素の活性は基質であるアラニンの濃度が高まると、却って阻害を受ける現象を見出した。

(3) DPN-specific な乳酸脱水素酵素の活性は用いた実験条件下では認められず、前報で示唆した DPN を共通補酵素とする乳酸脱水素酵素とアラニン脱水素酵素との共転反応が存在する可能性は少ない。

(4) Transamination によるアラニンの生成は殆んど認められず、本菌に於けるアラニン生成の主反応はアラニン脱水素酵素によるピルビン酸の reductive amination によるものと思う。

(5) α -ケトグルタル酸とアラニンとの transamination によるグルタミン酸の生成は微弱である。しかし α -ケトグルタル酸とアスパラギン酸及びフェニルアラニンとの transamination は強力に行われ、又バリン、イソロイシン及びロイシンの transamination 反応は中等度に起った。

(6) 本菌によるアラニン酸酵に対し、2,4-D は低濃度 (10^{-6} M) では顕著な阻害効果を与えたが、 10^{-5} 乃至 10^{-3} M の濃度では却ってアラニンの生成速度を促進する効果が見られた。

(7) 以上の諸結果から No. 483 株に於けるアラニン生成蓄積の機作を考察した。

- (1) 鮫島広年, 奈良 高, 藤田忠三, 木下祝郎 : 本誌, 34, 832 (1960).
- (2) J. M. Wiame, A. Piérard : *Nature*, 176, 1073 (1955).
- (3) A. S. Fairhurst, H. K. King, C. E. Sewell : *J. Gen. Microbiol.*, 15, 106 (1956).
- (4) D. S. Goldman : *Biochem. Biophys. Acta*, 34, 527 (1959).
- (5) M. M. Hong, S. C. Shen, A. E. Braunstein : *Biochem. Biophys. Acta*, 36, 288 (1959).
- (6) 丸田芳樹, 鮫島広年, 田中正生 : 本誌, 28, 775 (1954).
- (7) A. B. Pardee : "The Enzymes", 2nd ed., p. 711, Academic Press, New York, N. Y., (1959).
- (8) E. C. Slater, W. C. Hülsmann : *Regulation of Cell Metabolism* p. 72 J. and A. Churchill Ltd., London, England, (1959).
- (9) H. Theorell, A. P. Nygaard, R. Bonnichsen : *Acta Chem. Scand.*, 9, 1148 (1955).
- (10) M. T. Hakala, A. J. Glaid, G. W. Schwert : *J. Biol. Chem.*, 221, 191 (1956).
- (11) R. A. Alberty : *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1777 (1958).

微生物によるステロイドの酸化に関する研究 (第 3 報)*

Cercospora 属菌による Reichstein's Substance S の酸化について

近藤栄二, 森原和之, 野崎義雄, 増尾栄太郎 (塩野義製薬株式会社研究所)

昭和 35 年 5 月 14 日 受理

Genus *Cercospora* は不完全菌類中の Order *Moniliales*, Family *Dematiaceae* に属する一群の糸状菌に対してあたえられた属名であって, その完全時代は子囊菌類 (Class *Ascomycetes*) 中の Order *Sphaeriales* に包含される Genus *Mycosphaerella* や Genus *Sphaerulina* 等に属することが知られている. 本属菌種の多くのものは植物の葉の斑点病菌であって菌糸は通常暗色を呈することが多い. 著者等はステロイド化合物の微生物による酸化転換の対照として香川大学農学部, 財団法人醸酵研究所並びに Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) より分譲をうけた *Cercospora* の菌株を使用し Reichstein's substance S の酸化性を検討したが, 供試 34 菌種のうち若干のものに基質の 11 α -hydroxylation 作用を, 更に 2, 3 の菌株においては *Cunninghamella blakesleeana*⁽¹⁾, *Curvularia lunata*⁽²⁾ その他の菌において報告せられている如き基質の 11 β -hydroxylation の可能なことをみとめた.

実 験 の 部

供試菌株

C. beticola Sacc. (C-32, C-33), *C. melongenae* Welles (C-36), *C. hibisci-cannabini* Sawada, *C. zinniae* Takahashi et Yoshida (C-20). (以上香川大学より分譲)

C. beticola Sacc. (IFO 6162), *C. apii* Fres. (IFO 6161), *C. canescens* Ell. et Martin (IFO 6163), *C. cruenta* Sacc. (IFO 6164), *C. sesami* Zimm. (IFO 6165). (以上財団法人醸酵研究所より分譲)

C. taiwanensis Mats. et Yam., *C. macrospora* Osterw., *C. oryzae* Miyake, *C. kaki* Ell. et Ev., *C. medicaginis* Ell. et Ev., *C. cladosporioides* Sacc., *C. calotropidis* Ell. et Ev., *C. cantuariensis* Salm. et Worm., *C. nicotianae* Ell. et Ev., *C. malvacearum* Killian, *C. vaginae* Krüger, *C. chenopodii* Fres., *C. musarum* Ashby, *C. rosicola* Pass., *C. musae* Zimm., *C. cari* Westerdijk et v. Luijk, *C. diazu* Miura, *C. melonis* Cke., *C. fusca* Rand, *C. zebrina* Pass., *C. italica* Cruzei, *C. cerasella* Sacc., *C. scirpicola* v. Z. Bakker, *C. violae* Sacc. (以上 CBS より分譲)

培養とステロイドの酸化方法 上記の菌種をグルコース 3.5%, ペプトン 2%, corn steep liquor 0.3% の組成よりなる培地 (pH 7.0) で 28° で振盪培養した. 菌体の旺盛な増殖をみとめた時期 (4~14 日後) に培養菌液又はこれより菌体を濾別水洗したもの水懸濁液に対し Reichstein's substance S を添加し振盪培養をつ

* Studies on the Oxidation of Steroids by Microorganisms. Part III. On the Oxidation of Reichstein's Substance S by *Cercospora* species.

By Eiji KONDO, Kazuyuki MORIHARA, Yoshio NOZAKI and Eitaro MASUO (Research Laboratory of Shionogi & Co., Ltd.)