[農化 第 35 卷, 第 4 号, p. 323~326, 1961]

Helminthosporium 類縁菌類の生産する抗生物質の研究 (第 3 報)**Helminthosporium turcicum* によるオフィオボリンの生産

石 橋 慶 次 郎 (三共高峰研究所)

昭和 35 年 9 月 5 日 受 理

第 1 報⁽¹⁾で植物病原菌の生産する抗生物質の検索を目的として, 149 菌株についてその培養濾液の抗菌性を検討した結果, 40 株が抗菌力をしめし, そのうち *Helminthosporium* 類縁菌が 20 株でその有効株分離率は 46.5% であった, と報じた。続いて各有効 *Helminthosporium* 類縁株の生産する培養濾液中の有効成分の単離, 精製およびその理化学的生理的性質を検討したが, そのうち本報では *Trichophyton interdigitale* に対して抗菌力をしめした *Helminthosporium turcicum* Passerini の生産する培養濾液の有効成分について検討した結果を報告する。

Helminthosporium turcicum⁽²⁾ は玉蜀黍煤紋病の病原菌で, 相当に生育した玉蜀黍の葉に発生し幼苗に発生することはまれである。病斑は普通最初から紡錘形で, 時に楕円形, まれに円形に近いことがあるが, その後の病斑の拡大と共に完全な紡錘形の大斑となり, 青味を帯びた灰白色で周囲の近くは褐色から灰黄色を呈するようになる。Drechsler⁽³⁾ が Farneti の *Helminthosporium oryzae* と *Helminthosporium turcicum* とは形態学的にも同類の菌であるという報告を支持しているように, 稲における *Helminthosporium oryzae* と玉蜀黍における *Helminthosporium turcicum* は類似の病原菌であるといえる。

中村と共に著者⁽⁴⁾は稲胡麻葉枯病菌の病斑形成にはオフィオボリンの生成が大きな要因の一つになっていることを推定したが, 稲胡麻葉枯病菌 (*Ophiobolus Miyabeanus*=*Helminthosporium oryzae*) と類似の植物病原菌である *Helminthosporium turcicum* の培養濾液中にもオフィオボリンあるいはこれに類似する物質の生産が予想された。そこで第 1 報⁽¹⁾で *Trichophyton interdigitale* に対して抗菌力を示した *Helminthosporium turcicum* に属する H-8 株の培養濾液について, オフィオボリンの精製方法に準じて有効成分の単離, 精製を試みた結果, H-8 株の培養濾液から無色柱状の結晶が得られた。この結晶の理化学的性質からオフィオボリンと同一物質であることが同定された。その次第と結果を報告する。

実 験

[1] H-8 株の菌学的性質 H-8 株は東京大学応用微生物研究所から分譲をうけた *Helminthosporium turcicum* (FI-73) I.A.M. p.p. 4-4 株である。

(1) 菌叢: 加糖馬鈴薯煮汁寒天培地 (2% 蔗糖添加, 馬鈴薯 200 g/l 煮汁) の斜面培養上で灰色を呈し, 粗毛状をなさない絨氈様の気菌糸が生育し, 寒天面菌糸は灰黒色から黒褐色を呈す。2% 蔗糖, 0.2% ペプトン添加馬鈴薯煮汁培地で振とう培養すると黒緑色の綿状菌糸が培養液全体に生育して粘稠となる。

(2) 分生孢子: 稲ワラ煮汁寒天 (イネワラ 50 g/l 煮汁) や加糖馬鈴薯煮汁寒天の斜面培養上では着生数が少ない。分生孢子的形状は中央部が最も太く, 両端は円味を帯びた細い直形の紡錘形で典型的な突出した臍をもっている。隔膜数は 6~8 個で分生孢子的大きさは $60\sim70\mu\times15\sim20\mu$ である。

(3) 最適培養温度: $25\sim26^{\circ}$ 。

(4) 最適培養 pH: pH 5.0~5.5。

[2] H-8 株による有効成分生成の培地の検討 有効成分生成のための培養条件として培地組成の検討を行った。各種組成の培地 100 cc を 500 cc 容振とうフラスコに分注して常法にしたがい滅菌し, 2% 蔗糖添加馬鈴薯煮汁培地で同様に振とう培養した前培養 2 cc 宛を接種し, $25\sim26^{\circ}$ に 72~96 時間振とう培養した (振幅 6 cm, 振とう数 120 r.p.m.)。培養終了後菌体を分離濾過した培養濾液について, 常法通り *Trichophyton interdigitale* を試験菌としてカップ法により抗菌力を測定し阻止円の直径 (mm) により有効成分の生成量を検討

* Studies on Antibiotics from *Helminthosporium* sp. Fungi. Part III. Ophiobolin Production by *Helminthosporium turcicum*.

By Keijiro ISHIBASHI (Takamine Laboratory, Sankyo Co., Ltd.)

第1表 培地組成と有効成分の生成

培地組成 % (pH 5.5~5.6 調整)	抗菌力 (阻止円 mm)	
	72時間培養	96時間培養
硝酸カリ 1.0, 蔗糖 3.0, 第1磷酸カリ 0.5, 硫酸苦土 0.25	—	—
グルタミン酸ソーダ 1.0, 蔗糖 3.0, 第1磷酸カリ 0.5, 硫酸苦土 0.25	—	±
照内ペプトン 1.0, 蔗糖 3.0, 第1磷酸カリ 0.5, 硫酸苦土 0.25	—	15
コーンステープリカー 0.2, 葡萄糖 5.0, ペプトン 1.0	—	22
麦芽糖化液 (Blg. 10°)	±	—
照内ペプトン 0.2, 蔗糖 2.0 添加馬鈴薯煮汁 (200 g/l)	21	20
" 0.5, "	18	18
" 1.0, "	—	15
" 2.0, "	—	—

した。結果は第1表に示した。

すなわち窒素源として硝酸カリ、グルタミン酸ソーダを使用した場合、菌体は生育するが有効成分は生成されない。窒素源にペプトン、コーンステープリカーを使用した場合に有効成分が生成された。以上の結果から H-8 株有効成分生産培地として 2% 蔗糖、0.2% ペプトン添加馬鈴薯煮汁培地 (馬鈴薯 200 g/l 煮汁) を使用することにした。

〔3〕 H-8 株の培養および有効成分の抽出精製 500 cc 容振とうフラスコに 2% 蔗糖、0.2% ペプトン添加馬鈴薯煮汁培地を 120 cc 宛分注滅菌し、同一培地に振とう培養した前培養を 1 白金耳量宛接種し、25~26° で 4 日間振とう培養した (振幅 6 cm, 振とう数 120 r. p. m.)。前培養を多量に接種すると菌体の生育早く菌体量も多いが、極めて粘稠となり菌体と培養濾液の分離が困難となる。培養終了時には黒緑色の綿状菌体が培養液全体に生育する。

第2表 H-8 株有効成分の抽出精製

抽出母液	培養濾液 1 l
	等量ベンゼン 2 回振とう抽出
	減圧濃縮 ベンゼン溜去
	赤褐色油状物 無色柱状粗結晶
油状物	冷エーテル洗滌
	粗結晶
	エーテル再結
	無色柱状結晶 約 45 mg

こうして得られた培養濾液は *Trichophyton interdigitale* に対して、カップ法により 20~21 mm の阻止円を示した。有効成分の抽出は培養濾液 1 l に対して等量のベンゼンを加えて約 20 分間振とう抽出し、同様に 2 回繰り返して抽出する。ベンゼン抽出液と培養濾液を分液し、ベンゼン抽出液を 60° 以下で減圧濃縮し、ベンゼンを溜去すると淡い赤褐色の油状物と共に無色柱状の粗結晶が析出してくる。この粗結晶を冷エーテルで洗滌して油状物を除去し温エーテルで溶解し再結晶すると無色柱状結晶約 45 mg が得られた。本結晶は 2.0 mcg/ml の濃度で寒天連続稀釈法により *Trichophyton interdigitale* の生育を阻害した (第2表)。

〔4〕 H-8 株有効成分の理化学的性質 H-8 株有効成分は無色柱状ないし針状結晶で、融点は 180~182°, 2.5% クロロホルム溶液中での $[\alpha]_D^{25}$ は

308.4°である。エタノール溶液中における紫外外部吸収スペクトルは第1図に示すように 237~238 mμ に最大吸収を示している。Nujol 中およびクロロホルム中における赤外部吸収スペクトルは第2図および第3図に示す通りである。本有効成分はクロロホルムに極めて易溶、ベンゼン、酢酸エチル、エチルアルコール、メチルアルコール、アセトン、四塩化炭素に易溶、石油エーテル、エチルエーテルに難溶、水には甚だ難溶である。これらの理化学的性質は、先に報告した⁽⁴⁾ *Ophiobolus Miyabeanus* の生産する抗生物質オフィオボリンと極めてよく類似している (第1~3図)。

元素分析の結果は、実験値: C 74.90, H 8.34, O (16.76) % でオフィオボリン $C_{24}H_{32}O_4$ の計算値: C 74.96, H 8.34, O (16.71) % とよく一致した。これ

第1図 H-8 株有効成分の紫外外部吸収スペクトル

第 8 図 H-8 株有効成分の赤外部吸収スペクトル (Nujol 中)

第 3 図 H-8 株有効物質赤外部吸収スペクトル (クロロホルム中)

らの結果から H-8 株の生産する有効成分はオフイオボリンと同一物質であると考えられる。

要 約

Helminthosporium 類縁菌類の生産する抗生物質についての一連の研究において, *Helminthosporium turcicum* Passerini の生産する抗生物質について検討した。

Helminthosporium turcicum H-8 株 (東京大学応用微生物研究所株) を 2% 蔗糖, 0.2% ペプトン添加馬鈴薯煮汁培地にて 25°, 4 日間振とう培養し, 培養濾液をベンゼンで抽出する。溶媒を溜去後, エーテル溶液から再結して無色柱状結晶の抗生物質が得られた。この抗生物質は理化学的性質から *Ophiobolus Miyabeanus* (= *Helminthosporium oryzae*) の生産する抗生物質オフイオボリンと同一物質であると考えられた。

終りに御懇篤なる御鞭撻, 御助言を賜り原稿の御校閲を戴いた九州大学農学部本江元吉教授に深く感謝する。本研究を行なうにあたり, 終始御鞭撻を戴いた当研究所松居宗俊所長, 中村路一田無工場長, 岡崎浩研究室長に深謝する。また貴重な菌株を分与された東京大学応用微生物研究所飯塚廣教授に感謝する。あわせて元素分析をお願いした当研究所微量分析室の小野江敏浩氏, 赤外部および紫外部吸収スペクトル測定をお願いした理化学測定室の肥後崎信行氏, 樋口速雄氏, 甘粕 治氏に感謝する。

(本報告の要旨は昭和 34 年 4 月, 本学会大会で講演した。)

(1) 石橋慶次郎 : 本誌, 35, 253 (1961).

(3) C. Drechsler : *J. Agr. Res.*, 24, 727 (1923)-

(2) 西門義一 : 大原農研特別報告, 4, 98 (1930).

(4) 中村路一, 石橋慶次郎 : 本誌, 32, 739 (1958)-

〔農化 第35巻, 第4号, p. 326~331, 1961〕

磷酸カルシウムクロマトグラフィーに現れた 卵白アルブミンの不均一性について (第1報)*

米沢大造, 田中弘 (大阪府立大学農学部)

昭和35年9月30日受理

卵白アルブミンは最も古くから知られている結晶蛋白の一つで、既に1890年にHofmeister⁽¹⁾により結晶状に分離されている。以来、定義の明確な蛋白として、また一応の純粋蛋白として、広く蛋白研究の対象として用いられてきた。しかし厳密な意味では、卵白アルブミンは不均一であるとする事実が現在までに二、三指摘されている。

Sørensen は溶解度試験の結果、卵白アルブミンの溶解度は厳密には液底体の量に無関係でないことを示し、卵白アルブミンの均一性について疑問を投じた⁽²⁾。Tiselius 及び Eriksson-Quensel⁽³⁾, Longsworth, Cannan 及び MacInnes⁽⁴⁾, Cann⁽⁵⁾ 等が電気泳動分析を行なった結果によって、卵白アルブミンは A_1 , A_2 , A_3 の3成分から成ることが明らかとなった。Cann⁽⁵⁾ によればその量比は A_1 76%, A_2 18.2%, A_3 5.8% である。但しこの量比は標品によって多少変動することが知られている⁽⁶⁾。Perlmann⁽⁷⁾ は卵白アルブミンに或る種のホスファターゼを作用させると卵白アルブミンの A_1 が A_2 に、 A_2 が A_3 に変ずることを電気泳動的に観察し、かくして得られた A_1 , A_2 , A_3 の量比を異にする標品について、それらの磷酸含量を定量した。その結果 A_1 , A_2 , A_3 の相異点はその磷酸含量にあって、 A_1 , A_2 は蛋白1分子当りそれぞれ2箇及び1箇の磷酸を含有し、 A_3 は磷酸を含有しないことを結論した。

Perlmann の実験によれば、卵白アルブミンはその磷酸部分を除けば電気泳動的に一応均一となるとみなされるが、これが果して磷酸以外の点では同一の蛋白の集合であるか否かはなお疑問とされるところである。最近 Tiselius 等⁽⁸⁾は、磷酸カルシウムをアルカリ処理することによって調製した“hydroxylapatite”を用いてクロマトグラフ分析を行ない、卵白アルブミンがクロマトグラフ的に性質を異にする4種類の区分に分かれることを認めた。卵白アルブミンの不均一性の本質を明らかにすることは卵白アルブミンを取り扱う上に肝要なことであるが、Tiselius 等の結果はこの問題を論ずる上に重要な手がかりを与えるものと考えられる。そこで著者等はこの Tiselius 等の結果を追試検討すると共に、その実験結果に基づきクロマトグラフ分析にあらわれた不均一性の原因について考察を加えた。

試料及び方法

卵白アルブミン : 硫安法⁽⁹⁾により結晶として分離した卵白アルブミンを3回再結精製して飽和硫安液下に沈め、冷蔵庫中に保存した。この標品から電気透析又はイオン交換によって十分硫安を除去して凍結乾燥することにより卵白アルブミンの粉末を調製した。これを電気冷蔵庫中に保存して実験に供した。

溶出用磷酸塩緩衝液 : 0.2M 第一磷酸ソーダ溶液と0.2M 第二磷酸ソーダ溶液を等量混合した pH 6.8 の0.2M 磷酸塩緩衝液を原液として貯蔵し、これを蒸留水で稀釈することにより必要な濃度の磷酸塩緩衝液を調製して、クロマトグラフ分析の実験に供した。

クロマトグラフ分析 : Tiselius 等⁽⁸⁾の方法に従って調製した hydroxylapatite を0.001M の磷酸塩緩衝液に懸濁し、これを先端にガラスウールを詰めた内径1.6cm のガラス管に注入して長さ16~17.5cm のカラムを作った。0.005M の磷酸塩緩衝液を1夜流下することにより、カラムを緩衝液に対して平衡に達せしめた後、同

* Heterogeneity of Egg Albumin in Calcium Phosphate Chromatography. Part I.

By Daizo YONEZAWA and Hiromu TANAKA (College of Agriculture, University of Osaka Prefecture)