[農化 第36巻, 第1号, p.13~18, 1962]

フラビンによるアミラーゼ活性の阻害に関する研究 (第3報)*

フラビンの光分解産物による α -アミラーゼ活性の阻害

曾 根 清 秀 (東北大学農学部)

昭和36年4月1日受理

前報⁽²⁾では、光存在下におけるリボフラビン (FR) の α -アミラーゼ活性阻害が光照射によって励起された FR と酵素との直接的ラジカル反応によって与えられることを推察するとともに、そのさい FR の光分解が同時に進行していることを指摘した。また光存在下、FR 共存による酵素活性度の経時的低下⁽¹⁾から本阻害が単純な一次反応形式によるものでないことを知ることができた。FR による酵素活性阻害が複雑な反応形式をとるのは、光照射時間が長びくにつれて FR の残存率が次第に低下すること⁽³⁾、およびその光分解産物であるルミフラビン (Lf)、ルミクロム (Lm) が化学構造上さらに本阻害反応に参加できる可能性をもつことによってある程度推測される。さらに FR の光化学的触媒作用を推定するためには、FR の光分解産物の生成を量的に把握したうえで FR の酵素活性阻害を検討する必要がある。

また化学構造の類似点からみると、以上述べてきた FR による酵素活性阻害はさらにフラビン酵素の補酵素として知られたフラビン・モノヌクレオチド (FMN)、およびフラビン・アデニン・ジヌクレオチド (FAD) にも共通したものであることが予想される。また光分解産物の生成と関連して、光に極めて不安定な FMN⁽⁴⁾ と比較的安定な FAD⁽⁵⁾ との間に酵素活性阻害力のうえて差違を生ずることが予測される。

以上の考えに基づいて、本報では B₂ (FR, FMN, FAD を総称する) およびその光分解産物である Lf, Lm などが酵素活性に与える影響を検討し、若干の知見をえたのでその結果を報告する。

実 験 の 部

1. 実験方法および材料 光照射 (明所) は前報⁽²⁾に掲げた光照射装置によっておこなった。光処理条件は以下実験の各項で詳述するが、供試酵素は関東化学株式会社 (I) および長瀬産業株式会社 (II) 製の結晶細菌 α -アミラーゼであり、酵素液は前報⁽²⁾同様の方法によって調製した。酵素活性度の測定は不破の方法⁽⁶⁾により、吸光度の測定は DU 型ベックマン分光光度計によっておこない、フラビンの定量は下記の方法によっておこなった。すなわち、光処理を終えた FR 液または反応液の pH を 4.5 に調節したのち、これに無蛍光クロロホルムを加え、強振、遠心分離し、この水溶液層が 450 m μ で与える吸光度を、FR 吸光度標準曲線と比較して残存 FR 量を算出した。一方クロロホルム層に転溶した Lf は調製 Lf 結晶水溶液を標準に用いて蛍光的に比色定量した。なお本実験に使用した Lf および Lm は和田らの方法⁽⁷⁾によって調製したものであり、緩衝液には Michaelis の緩衝液 (pH 4.1~9.2) を使用した。

2. 被照射 FR 溶液添加による酵素活性の変化 酵素活性の阻害が FR の光分解産物によっても与えられるのであれば、反応液中に溶存する FR の分解産物量は光照射によって経時的に増加するため、これによって酵素活性になんらかの影響が現われることが予想される。このような予想のもとに被照射 FR 液添加の影響を暗所で試験し、第1表の結果をえた。

本表をみると、被照射 FR 液は酵素の活性度にはほとんど影響していないが、この場合酵素に対する光分解産物の作用が緩慢なため影響が現われにくいことも考えられるので、次に、酵素を完全に失活させるに足る作用時間を用い同様の試験をおこなった。すなわち、あらかじめ5時間の光照射をおこなった被照射 FR 液を酵素液に加え、暗所における酵素活性度の経時変化を観察し、第2表の結果をえた。また暗所〔酵素+未照射 FR〕が静置5時間で活性度を6%低下することも知られた。

このような点から本表をみると、被照射 FR による酵素活性度の低下は添加5時間後にわずかに認められるが、対照の100%失活と比較すればかなり少なく、被照射 FR 液中の溶存物質が暗所で与える酵素活性阻害は明所に

* Studies on the Inhibition of Amylase Activity by Flavins. Part III. Inactivation of α -Amylase by Photolysed Products of Flavin.

By Kiyohide SONE (Faculty of Agriculture, Tohoku University)

第1表 酵素活性におよぼす照射リボフラビン溶液添加の影響 (1)

(t 時間光照射したリボフラビン溶液を直ちに酵素液に加えて1時間暗所に静置)

照射時間 (hr)	0	1	3	5	24
酵素活性					
相対値*					
酵素	100.0	100.0	97.4	96.2	94.0
酵素+FR	95.0	94.0	91.6	90.8	89.3
照射FR溶液添加による阻害%	5.0	6.0	6.0	5.6	5.0

* 総精化力 4.38/ml を相対値 100 とした。

処理条件:

光照射……光源距離 (30 cm), 作用温度 (25°), 照射時間 (t hr)

反応液組成:

酵素……10⁻²% 酵素液 I (10⁻² M 酢酸カルシウム溶液に溶解)

(1.0 ml) + pH 6.0, 酢酸緩衝液 (1.0 ml) + 水 (0.5 ml)

酵素+リボフラビン……上記「酵素」中の水の代りに pH 6.0 で t 時間光照射した 10 mg% FR 溶液を添加。

第2表 酵素活性におよぼす照射リボフラビン溶液添加の影響 (2)

(5 時間光照射したリボフラビン溶液を直ちに酵素液に加えて t 時間暗所に静置)

照射時間 (hr)	0	1	3	5	対照
酵素活性					
相対値*					
酵素	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
酵素+FR	92.4	93.2	92.0	86.2	0.0
照射FR溶液添加による阻害%	7.6	6.8	8.0	13.8	100.0

* 総精化力 4.63/ml を相対値 100 とした。

処理条件:

光照射……照射時間を 5 hr にしたほかは第1表(1)と同じ。

反応液組成:

酵素……第1表 (1) と同じ。

酵素+リボフラビン: 上記「酵素」中の水の代りに pH 6.0 で 5 時間光照射した 10 mg% FR 溶液を添加。

対照……酵素液, pH 6.0 酢酸緩衝液, 10 mg% FR 溶液を上記の割合で加え, これを 5 時間光照射。

第3表 光照射によるルミフラビン, ルミクロム溶液の吸光度の変化

フラビン	照射時間 (min)	-log T			
		260 mμ	265 mμ	350 mμ	440 mμ
Lf	0	—	1.070	—	0.402
	30	—	1.069	—	0.398
	90	—	1.076	—	0.402
	120	—	1.069	—	0.397
Lm	0	0.293	—	0.092	—
	30	0.299	—	0.097	—
	90	0.300	—	0.096	—
	120	0.295	—	0.094	—

処理条件:

光照射……光源距離 (20 cm), 作用温度 (20°)

反応液組成……10⁻⁴ M フラビン溶液 (5 ml) + pH 5.8, 酢酸緩衝液 (2.5 ml) + 水 (5 ml)

aldehyde, D-erythrose, D-erythronic acid, D-ribose, formaldehyde, formic acid, glycolic acid などが FR 側鎖部の分解産物として知られている。一方 isoalloxazine 核自体はかなり光に安定であり, 高濃度アルカリとの共存によってようやく Lf から 1,2-dimethyl-4-amino-5-methylaminobenzene を生ずる⁽¹²⁾にすぎない。以上の諸結果から, 普通生体条件下では Lf および Lm が FR 環構造部からえられる光分解最終産物になってい

における阻害の主要素となりえないことが知られた。

3. PPC による B₂ 光分解産物の検索 FR^(3,7-11)

および FMN⁽⁴⁾, FAD⁽⁵⁾ の光分解に関しては数多くの報告が出されているが, 本実験の条件下でもこれを検討しておくことは今後の実験を進めるため必要と考えられたので, 追試を兼ねペーパー・パーティション・クロマトグラフィー (PPC) による B₂ 光分解産物の検索を試みた。

Kocent⁽¹¹⁾, 清水⁽⁸⁾, 和田⁽⁹⁾によると, FR が光照射によって分解される場合 isoalloxazine 核 9 位の N に接続するリビチール側鎖はかなり任意の位置でラジカル開裂を起すようで, glycerolaldehyde, glycolal-

第4表 ペーパークロマトグラフィーによる光分解産物の検出

フラ ビン	pH	光 照 射	展 開 剤	濾 紙	作用 温度	R_F									
						0.05~ 0.06 黄	0.12~ 0.14 青(黄)	0.25~ 0.28 黄	0.34~ 0.35 黄	0.37~ 0.41 黄	0.46~ 0.49 黄	0.66~ 0.70 青	0.76 黄	0.85~ 0.88 黄	
FR	5.8	{	D	ル	25°										
FMN			D	ミル											
Lm			D	ア											
Lf			D	ソ											
FR			L	アル											
FR	5.8	{	L	飽和水	25°										
FMN			L	イソ											
FR			L	ソ											
FMN			L	アル											
FR			L	飽和水											
FR	5.8	{	D	ル	25°										
FAD			D	ー											
Lm			D	酸(1)											
Lf			D	ブ											
FR			L	タ											
FR	5.8	{	L	ノ	25°										
FAD			L	ン											
Lm			L	(4):											
Lf			L	酢酸											
FR			L	(5):											
FAD	5.8	{	L	水	25°										
FR			L	(4):											
FAD			L	水											
FR			L	(5):											
FAD			L	水											

記号: D (暗処理), L (明処理), ± (蛍光不明瞭), + (蛍光が認められる), 卅 (強い蛍光が認められる), 卅 (極めて強い蛍光が認められる), (黄) は FMN

処理条件: 光照射……光源距離 (30 cm), 作用温度 (25°), 照射時間 (3 hr)

反応液組成……10⁻²% 酵素液 (10⁻² M 酢酸カルシウム溶液に溶解) または水 (10 ml) + 10⁻⁴ M フラビン溶液 (5 ml) + pH 5.8, 酢酸緩衝液 (10 ml)

るとみて差し支えなからう。このことは第3表に掲げた Lf および Lm の吸光度測定結果から推察される。すなわち酵素Ⅱの至適 pH 5.8 では、2時間の光照射をおこなっても Lf および Lm の吸光度になんら変化が認められていない。

次に以上の諸結果を参考にしながら B₂ の単独溶液、および B₂ 溶液に酵素液を加えたものそれぞれについて光分解産物の検索を蛍光的におこなった。結果は第4表に示す通りである。

なお B₂ 溶液に酵素液を加えた場合、えられる蛍光 spot の位置および色調は B₂ 溶液単独のさいと全く同じであったので、本表中これを省略した。第4表によれば、本実験条件下では FAD, FMN とともに光照射によって FR を生じ、さらに Lm および Lf を生成していることが明らかに認められる。

4. B₂ およびその光分解産物による酵素活性阻害 被照射 FR 液中の溶存物質が酵素活性を暗所でわずかに阻害しないことがさきの実験によって知られたが、FMN および FAD は FR 同様光存在下で isoalloxazine 核 1, 10 位にラジカル N (N) をもつことが可能であり、同様の可能性はそれらの光分解産物である Lm, Lf についても考えられる。このような点から本項では、等モルの FR および FMN, FAD, Lf, Lm, formaldehyde, formic acid が酵素活性に与える阻害をさらに明、暗条件下で試験し、第5表の結果をえた。

第5表 フラビンおよび同光分解産物による酵素活性阻害

	フラビン その他	FR	FMN	FAD	Lf	Lm	ギ酸	ホルム アルデ ヒド
酵素活性								
相 対 値*	{暗 所	98.6	98.3	98.0	94.6	102.1	103.1	102.5
	{明 所	83.6	78.5	84.3	22.6	90.0	98.2	97.1
光照射による阻害%		15.2	20.1	14.0	76.1	11.8	4.8	5.3

* 糊精化力 4.23/ml を相対値 100 とした。

処理条件：光照射……光源距離 (30 cm), 作用温度 (25°), 光照射時間 (2 hr)

反応液組成……5×10⁻³% 酵素液 (10⁻² M 酢酸カルシウム溶液に溶解) (1.0 ml)+pH 5.8, 酢酸緩衝液 (1.0 ml)+10⁻⁴ M フラビン溶液またはギ酸, ホルムアルデヒド (0.5 ml)。

本表をみると、暗所では Lf がわずかに阻害を示し、ほかのフラビン類、および B₂ 側鎖部の分解産物, formaldehyde, formic acid は阻害を示していない。さらに光照射時におけるフラビンの酵素活性阻害効果は、FR および FAD と較べて FMN がわずかに大きいことが知られたが、FR および FAD の間には相違が認められなかつた。

また B₂ の isoalloxazine 核部からえられる Lf および Lm が示す阻害は Lf の場合とくに著しく、B₂ によって与えられる酵素活性の阻害が、Lf および Lm の生成割合によってかなり影響されることが考えられる。

5. 異った pH 条件下におけるフラビン光分解産物の PPC による検索 Lf, Lm の生成が B₂ 溶液の pH 条件によって異なることはすでに知られたところであるが、酵素活性阻害時における反応液 pH の相違は単に酵素の安定性に関係するばかりでなく、Lf, Lm の生成にも影響し、ひいては B₂ の酵素活性阻害に影響することが予想される。このような点から、異った pH 域で B₂ および Lf, Lm が示す活性阻害を検討するに先立ち、定性的に FR および FMN の光分解産物を PPC によって調べ、第6表の結果をえた。

第6表 ペーパークロマトグラフィーによる光分解産物の検出

pH	フラ ビン	光 照射	R_F								
			0.12~ 0.14 青*	0.22~ 0.24 黄**	0.31 黄	0.38~ 0.41 黄	0.67 赤	0.78~ 0.82 黄	0.87~ 0.88 黄	0.90~ 0.92 黄	0.94~ 0.95 黄
5.0	{ FR FMN	{ D L	+			+					
		{ D L	+	+		±				+	+
7.0	{ FR FMN	{ D L	+	±		±	±				
		{ D L	+	+		±	±	±		+	+
9.2	{ FR FMN	{ D L	+	±	+	+					
		{ D L	+	+		±	±			+	+

(展開剤：イソアミルアルコール飽和水, 濾紙：東洋濾紙 No.2)

* Lm ** Lf

記号：D (暗処理), L (明処理) ± (螢光微弱), + (明らかに螢光が認められる), ++ (強い螢光が認められる)

処理条件：光照射……光源距離 (20 cm), 作用温度 (20°), 光照射時間 (3 hr)

反応液組成……緩衝液 (5 ml)+10⁻⁴ M フラビン溶液 (5 ml)

pH 5.0 では FR, FMN とともに光の照射によって完全に分解し, Lm を生ずるが, FMN は Lm のほかに微量の Lf および FR を同時に生産している. pH 7.0 では分解がやや複雑となり, FR は pH 5.8 の場合と同様に Lf, Lm を生ずるほか, さらに rhodoflavin と思われる赤色蛍光性の物質を僅かながら R_F 0.67 に与え, また FMN も Lf, Lm, FR のほかに 2 個の未知蛍光 spot を与えている. pH 9.2 では FR, FMN とともに再び完全に分解し, FR は Lf, Lm のほか R_F 0.31 に未知蛍光 spot を与え, 一方 FMN は pH 5.0 の場合と同様の Lf および Lm, FR を生じている. 以上の結果から pH 5.0 における FR の阻害作用はおもに Lm について検討すればよく, FMN ではこのほかに Lf をあわせ検討する必要がある. また pH 5.8, 7.0, 9.2 における阻害作用は, pH 5.0 における FMN の場合と同様, Lf, Lm について検討される必要があると考えられる.

6. 異った pH 条件下における FR および Lf, Lm の酵素活性阻害 光存在下で B_2 が示す酵素活性阻害は, おもに FR および Lf, Lm によるものが PPC 試験の結果から推察されるが, さらに酵素の安定性と関連してこれらフラビンの活性阻害力に変化を生ずることが考えられるので, 次に FR, Lf, Lm の酵素活性阻害力を異った pH 条件下で検討し, 第 7 表の結果をえた.

第 7 表 フラビンによる酵素活性阻害と pH との関係

pH	フ ラ ビ ン	対 照		FR			Lf			Lm			
		酵素活性 相対値*		光照射 による 阻害 %	酵素活性 相対値*		光照射 による 阻害 %	酵素活性 相対値*		光照射 による 阻害 %	酵素活性 相対値*		光照射 による 阻害 %
		暗所	明所		暗所	明所		暗所	明所		暗所	明所	
5.0		77.6	48.5	37.5	76.5	35.2	54.1	64.6	0.8	98.8	82.6	42.2	48.9
5.8		100.0	97.2	2.8	100.0	79.6	20.4	89.8	29.2	67.5	99.3	93.4	5.9
7.0		100.0	98.7	1.3	91.6	60.1	34.4	94.3	19.9	78.8	89.6	87.2	2.7
9.2		41.4	37.8	8.7	43.0	39.7	7.8	37.4	20.3	45.7	41.9	41.9	0.0

* 糊精化力 4.30/ml を相対値 100 とした.

処理条件: 光照射……光源距離 (30 cm), 作用温度 (25°), 光照射時間 (2 hr)

反応液組成…… $5 \times 10^{-4}\%$ 酵素液 II (10^{-2} M 酢酸カルシウム溶液に溶解) (1.0 ml) + 緩衝液 (1.0 ml)
+ 10^{-4} M FR 溶液または水 (0.5 ml)

各 pH における使用酵素 II の活性は, 光条件と関係なく pH 5.8 および 7.0 で高値を与えるが, pH 5.0 では光照射によって明らかに低下をきたしている. 次にフラビン添加の影響をみると, 暗所, pH 5.0 および 5.8 では Lf だけが活性阻害を示し, pH 7.0 では各フラビンともわずかに阻害を示している. 光存在下で認められた FR の活性阻害は, 対照にみられた活性低下を考慮に入れると pH 7.0 で最も著しく, 次いで微酸性側となり, pH 9.2 ではほとんど阻害が認められない. 一方, Lf は pH 7.0 で最大の阻害を示し, 次いで微酸性側, 微アルカリ性側の順となるが, 本実験の各 pH 域で一様に阻害を示している点 FR および Lm と相違している. また Lm は pH 5.0 で最大の阻害を示すが, pH が大となるにしたがって阻害性を失っている. しかも光存在下, pH 5.0 における FR および Lm の阻害率は近似の値を与えている. またさきの PPC 試験の結果, pH 5.8 以上では Lm のほかに Lf および未知蛍光性物質の生成を認めたが, これら物質の生成を FR, Lf, Lm 単独添加時の阻害と併せ考えれば, 光存在下, FR によって与えられる活性阻害はおもに pH 5.0 では Lm, 9.2 では Lf に基因しているものと解される.

7. 酵素活性とフラビン添加量との関係 和田ら⁽⁹⁾はさきに作用温度を 70° としたほかは本実験と大同小異の光処理条件下で FR の光分解試験をおこない, FR 溶液濃度が高くなるにつれて FR 残存率が大きくなることから, FR 光分解のさい, FR 自身およびその分解産物が FR^aの分解を阻止すると解釈している. もしそうであれば, 光存在下にみられる FR の酵素活性阻害も FR の濃度如何によって影響を受け, 阻害度に変化をきたすことが予想される. このような観点から, 酵素活性阻害時における酵素とフラビンの量的関係を検討し, 第 1 図および第 2 図の結果をえた.

酵素 I, II の活性度はフラビンの添加量が増すにつれて低下をきたし, 酵素 I は FR の 100 μ g 添加によって完全に失活しているが, 酵素 II は FR 添加 22.6 μ g 以後活性度に変化をきたしていない. 一方, Lf, Lm は, この程度の添加ではなお阻害率の増加を示している.

8. FR 光照射による Lm, Lf の生成 第 4 表 PPC 試験の結果から, pH 5.8 では FR の光分解によって Lm および Lf を生成することが定性的に知られており, しかも第 5 表から明所における酵素活性阻害が FR お

第1図 酵素活性とリボフラビン添加量との関係

処理条件:

反応液組成…… $5 \times 10^{-3}\%$ 酵素液 I (10^{-2} M 酢酸カルシウム溶液に溶解) (1.0 ml) + FR 溶液 (0.5 ml) + pH 6.0 酢酸緩衝液 (1.0 ml)照射条件……光源距離 (30 cm), 作用温度 (25°), 照射時間 (2 hr)

* 糊精化力 3.32/ml を相対値 100 とした。

第8表 リボフラビン照射によるルミフラビン, ルミクロムの生成

照射前	FR 初濃度* μg/ml	3	6	9	12	15
照射後	FR 残存率 %	48.9	55.1	64.4	68.2	77.8
	Lf 生成率 %	3.0	2.9	2.5	1.8	1.6
	Lm 生成率** %	30.1	26.2	20.6	18.1	12.8

* 反応液中の FR 濃度 ** 計算値

処理条件:

照射条件……光源距離 (20 cm), 作用温度 (20°), 照射時間 (2 hr)反応液組成…… 2×10^{-4} M FR 溶液 (2.5 ~ 0.5 ml) + pH 5.8, 酢酸緩衝液 (2.5 ml) + 水 (7.5 ~ 9.5 ml)

第9表 全阻害率中に占める FR および Lf, Lm の阻害比率

反応液中 FR 初濃度 μg/ml	総計*	Lf	Lm	Lf+Lm	FR**
15	66.9	6.6	3.5	10.1(15)	56.8(85)
12	66.9	7.6	3.8	11.4(17)	55.5(83)
9	66.2	6.6	3.4	10.0(15)	56.2(85)
6	54.4	4.7	2.8	7.5(14)	46.9(86)
3	38.8	2.6	1.8	4.4(11)	34.4(89)

* 実測値 ** 計算値: 総計 - (Lf + Lm)

() 内の数字は全阻害率中に占める比率を示す (%)。

らに一考を要する。すなわち、酵素 II の至適 pH 5.8 で生産される Lf, Lm の量は比較的僅少であり、さらに実験 7 の結果をもとにこれらフラビンの阻害率を計算すれば第 9 表にみる通りであって、Lf, Lm が全阻害率中に占める割合は 2 者を合計してもようやく 11~17% 程度となるにすぎない。一方 FR は、全体を通じて全阻害率のはば 86% 程度を占めている。

このような点から、 B_2 が光存在下で与える酵素活性阻害を、Lf および Lm の作用だけによって説明することは不可能であり、また本阻害に O_2 が関与すること⁽²⁾を考へ併せると、これまでにみられた酵素至適 pH での阻害反応は、大部分 B_2 自身の光化学的触媒性によって与えられたとみることが可能と推定される。また B_2 による酵素活性の阻害反応は、FR および FMN, FAD の光分解反応と同時に進行できるものであり、 B_2 の光分解によってえられた Lf および Lm が逐次本阻害反応に参加してくることによって、酵素活性度の低下が B_2 作用時間と直線関係を示さなくなっているものと理解される。

第2図 酵素活性とフラビン添加量との関係

処理条件:

照射条件……光源距離 (20 cm), 作用温度 (20°), 照射時間 (2 hr)反応液組成…… $5 \times 10^{-3}\%$ 酵素液 II (10^{-2} M 酢酸カルシウム溶液に溶解した $10^{-2}\%$ 酵素原液 0.25 ml に加水して 100 ml としたもの) (1.0 ml) + 10^{-4} M フラビン液 + pH 5.8 酢酸緩衝液 (0.5 ml) + 水

* 糊精化力 6.8/ml を相対値 100 とした。

** FR: $\times 7.52 \mu\text{g}$, Lf: $\times 5.12 \mu\text{g}$, Lm: $\times 4.84 \mu\text{g}$

よび Lf, Lm によって与えられることが推定されたので、本項では FR の光分解による Lf および Lm の生成を量的に検討した。なお Lm 量は FR 残存量, Lf 生成量の実測値をもとにして算出した。結果は第 8 表に示す通りである。

本表をみると、和田⁽³⁾が報じてるように、照射時の FR 残存率は FR 濃度が高くなるにつれて増加しており、一方 Lf, Lm の生成率は反対に低下していることが知られる。

考 察

以上の諸結果から、光存在下における B_2 の酵素活性阻害作用には B_2 側鎖部分の光分解産物が関与していないことが考えられる。また実験 2~6 の結果から判断すると、光存在下、酸性側に認められた酵素活性度の低下は、おもに Lm, アルカリ性側の低下は Lf によって与えられたものと解されるが、反応液 pH 5.8 および 7.0 における酵素活性度の低下に関しては、さ

要 約

細菌 α -アミラーゼの活性が光存在下, FR の共存によって阻害される事実を, FR および FMN, FAD の分解と結びつけて検討した. 酵素活性の阻害は FR だけでなく FMN, FAD によっても与えられるものであり, しかも本阻害には B₂ 側鎖部分の光分解産物が関与しないことを知るとともに, isoalloxazine 核をもとにえられた Lf, Lm が作用時の pH 条件によって特徴的な阻害性を現わすことを知った. さらに光照射時における Lf, Lm の生成およびその酵素活性阻害を量的に捕えることによって, α -アミラーゼの至適 pH では FR 自身が酵素に直接触媒的に作用し, 酵素の活性を阻害していることをおおよそ知ることができた.

終りに御指導いただいた恩師有山 恒教授ならびに FMN 結晶をいただいた京都大学 清水 祥一助教授, FAD 結晶をいただいた名古屋大学 八木 国夫助教授, わかもと製薬株式会社和泉屋正一氏に深甚の謝意を表します.

(1) 曾根清秀 : 本誌, 33, 1119 (1959).	糧, 5, 97 (1952).
(2) 曾根清秀 : 本誌, 36, 7 (1962).	(8) 清水祥一 : ビタミン, 6, 757, 761 (1953).
(3) 和田津る, 深井千晴, 桜井芳人 : 栄養と食糧, 5, 12 (1952).	(9) 和田津る, 桜井芳人, 二国二郎 : 栄養と食糧, 6, 3 (1953).
(4) H. Theorell : <i>Biochem. Z.</i> , 279, 186 (1935).	(10) 深町千晴, 桜井芳人 : ビタミン, 7, 939 (1954).
(5) 増田 亨, 沢 陽一, 浅井満子, 桑田 智 : 薬誌, 75, 802 (1955).	(11) A. Kocent : <i>Chemické Listy</i> , 47, 195 (1953).
(6) H. Fuwa : <i>J. Biochem. (Japan)</i> , 41, 583 (1954).	(12) R. Kuhn, T. Wagner-Jauregg : <i>Ber.</i> , 66, 1950 (1933).
(7) 和田津る, 深井千晴, 桜井芳人 : 栄養と食	

〔農化 第 36 卷, 第 1 号, p.18~23, 1962〕

Bacillus colistinus Koyama の生産する抗生物質

コリスチンについて (第 1 報)*

培養条件の検討 (I)

森 戸 敏 明 (万有製薬株式会社)

昭和 36 年 5 月 8 日 受 理

I) 緒 言

Bacillus colistinus Koyama の生産する抗生物質コリスチンについては小山^(1,2), 小田, 上田⁽³⁾, 栗原, 鈴木⁽⁴⁾の報告がある. 当社において藤正政人氏より譲り受けた原菌よりコリスチンを生産するに当り, 確たる培養条件, 精製法及び理化学的性質等が明らかでなかったため, それらについて検討した. 本報においてはまずその培養条件の検討の結果を報告する.

II) 実 験

I. *Bacillus colistinus* Koyama について コリスチンを生産する目的のため本菌の性状を調べたところ次のようであった. すなわち, 運動性桿菌で, 単独であり稀に連鎖をなす. 大きさは $0.5 \sim 1.0 \times 2.0 \sim 5.0 \mu$ である. 染色はグラム陽性で, 胞子は球状, 中存性である. 澱粉を加水分解する. ガスを発生し, 糖類を加水分解して有機酸類を生成する. 酸素を必要とする通性好気性菌である.

本菌の各種培養基での発育状態は第 1 表の通りで, 普通寒天, ブドウ糖寒天, 麦芽汁, Stansly's⁽⁵⁾ 培養基及び Stansly's 麦芽培養基での発育は良好である. 以後コリスチン生産のための検討にはブドウ糖寒天を使用して種々の条件を調べることにする.

II. 培養条件の検討 [I] 培養条件の検討において下記の要領で振盪培養及び力価検定等を行った.

* Antibiotic Colistin from *Bacillus colistinus* Koyama. Part I. Studies on the Culture of *Bacillus colistinus* Koyama (I).

By Toshiaki MORITO (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.)