〔農化 第 36 卷, 第 11 号, p.873~879, 1962〕

有孢子細菌の抗生物質生産 (第11報)*

バシトラシンX群, spot 6 物質の精製と既知バシトラシンへの転換

相 田 徳 二 郎 (東北大学農学部農業微生物研究室)

昭 和 36 年 12 月 25 日 受 理

バシトラシン生産菌 *Bacillus subtilis* st. Tracy の protoplast の生成するバシトラシン活性物質中には既知の市販バシトラシンとは異なる活性物質群が存在したが、著者はこれをバシトラシンX群と呼んだ⁽¹⁾。バシトラシンX群は生菌の生育時あるいは種々の条件下での incubation によっては菌体細胞外には分泌されないが、かかる生菌細胞を破碎抽出する場合は抽出液中にバシトラシンX群が認められる⁽²⁾。さらに、本菌の protoplast を滲透圧的に破碎して得た protoplast membrane 標品はバシトラシン活性を生成する能力をもったが、ここに生成されるバシトラシン活性物質はバシトラシンX群を主体とした⁽³⁾。前報⁽⁴⁾において著者は本菌の菌体抽出液からバシトラシンX群区分を分画し、その若干の性質をしらべ、これらX群が明らかに既知市販バシトラシンと異なる物質群であるが、他面、類似性も認められ、相互に関連する物質群であることを示唆したが、その中の1つ spot 6 物質を部分的に精製分画して他のバシトラシン活性物質を含まない単一抗菌性 spot の標品を得た。しかし、本標品はなお、若干の着色物質を含み、かつニンヒドリン陽性の他の物質をも含むので、本報では spot 6 物質をさらに精製し、ニンヒドリン反応で単一 spot を与える無色の精製標品を得て、本標品の水解実験等からペプチド性物質であることを明らかにした。

他方、バシトラシンX群は protoplast では反応液中に生成されるが⁽¹⁾、生菌体によっては体外に分泌されない⁽²⁾。他面、これらの生菌体内にはバシトラシン群が存在すること⁽²⁾、また醗酵中の菌体細胞内のバシトラシンX群蓄積の時期は細胞外への既知バシトラシンの分泌と密接に関連すること⁽⁴⁾等からバシトラシンX群は細胞外既知バシトラシン生成の可能な中間体と想定される⁽²⁾。さらに滲透圧的衝撃によって破碎した protoplast から得た活性の membrane 標品の生成するバシトラシン活性物質は、既知バシトラシンを微弱にしか与えず、バシトラシンX群を主体とすることから、バシトラシンX群から既知バシトラシンへの転換は細胞質部分で起るものと想定した⁽³⁾。よって、本報では protoplast を滲透圧的衝撃によって破碎した shockate あるいは sonicate を用いて検索し、これらの細胞質供試液がこの転換反応を接触することを認めた。

本報においてはこれらの得られた成績を報告する。

実験材料及び方法

使用菌株とその培養：バシトラシン生産菌としては既報⁽⁵⁾同様、*Bacillus subtilis* st. Tracy を用いた。本菌の培養は既報⁽⁶⁾同様、1% 澱粉グイオン培地で 16~24 時間、30° に振盪培養し、あるいは、大豆粉培地⁽⁴⁾中で 30° で通気攪拌培養して得た。

アセトン乾燥菌体の調製：大豆粉培地で 30°、18 時間醗酵槽内で通気攪拌した培養（培地中のバシトラシン活性 65 u/ml, submaximal）200 l を前報⁽⁴⁾に従ってアセトン乾燥菌体を得た。菌体収量約 800 g。

細胞質供試液の調製：1% 澱粉グイオン培地 100 ml で 18 時間振盪培養して得たバシトラシン生産菌の培養から集菌、洗滌後、既報⁽¹⁾に従って蔗糖液中で lysozyme 処理し、protoplast を形成した。protoplast は 0° で遠心して集め、20% 蔗糖液約 8 ml に再懸濁した。この protoplast 懸濁液 1 ml をとり、1% NaCl 塩液⁽⁶⁾ 2 ml を添加して滲透圧的に lysis させ、0° で 12,000 回、20 分遠心してその上清をとり、'OLP-1:2'（稀釈度 1:2）とし、また protoplast 懸濁液 2 ml をとり 1% NaCl 塩液 2 ml を添加、同様処理して上清をとり 'OLP-1:1'（稀釈度 1:1）を得た。さらにまた protoplast 懸濁液 2 ml に 40% 蔗糖液 0.5 ml、1% NaCl 塩

* Antibiotic Production by Spore-forming Bacteria. Part XI. Purification of Bacitracin X Group, Spot 6 Substance and its Transformation to the Known Bacitracin.
By Tokujiro AIDA (Laboratory of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

液 0.5 ml をこの順序に加え, 10 kc の sonic oscillator で 5 分間処理, 直ちに 0° で 12,000 回, 20 分遠心してその上清をとり 'SDP' とした。

バシトラシンX群標品の調製: 転換反応の基質として用いるバシトラシンX群供試液は次の如くにして得た。バシトラシン生産菌のアセトン乾燥菌体 150 g を水 335 ml, Al_2O_3 200 g と共に 1.5 時間乳鉢中で磨砕, 水を加えて約 1.5 l とし, 3,000 回で遠心して, 濁った上層をとり, 塩酸酸性で pH 4.2 に修正, 遠心して透明な上清を捨て, 沈渣を 0.1 N 塩酸-50% メタノール水で 5 回, 全量 640 ml で抽出, 抽出液を合して苛性ソーダで pH 7.0 に修正, 生ずる沈澱を除去, 減圧下に濃縮して約 150 ml とし, 濃縮中に生ずる沈澱を除去した後, *n*-ブタノールで 12 回振盪してブタノール層に抗菌能がなくなるまで洗滌, 水層をエーテルで 2 回洗滌し, セロファン膜を隔てて純水に対して 4 時間透析, 無機塩を除いた後, 冷アセトンを終末 60% 濃度に加え生ずる沈澱を除いた後, さらにアセトンを加えて分画し, アセトン濃度 70% から 80% の間に沈澱する区分をとり, 供試液とした。この区分の全活性 88 バシトラシン単位, 17.6 u/ml の水溶液として用いた。本供試液は少量の spot 4 及び 5 物質を含む spot 6 物質標品で, 既知バシトラシン (spot 1 物質) は全く含まない。

転換反応の反応液: アミノ酸混液 [カザミノ酸 (日産研究所製) 588 mg, トリプトファン 5 mg, シスチン 5 mg を 10 ml に溶解] 0.2 ml, ATP 溶液 (40 mg/ml) 0.1 ml, HDP 溶液 [市販 Ba 塩 HDP (N.B.C. 製)] を Na_2SO_4 で Na 塩とし, 133 mg/ml 濃度] 0.1 ml, バシトラシンX群供試液 0.8 ml, 細胞質供試液 1.0 ml, 全容 2.2 ml, pH 7.2。

転換反応の測定: 反応終了後, 直ちに *n*-ブタノール 1 ml を反応液に加え, 塩酸酸性で pH 4.0 で振盪し, ブタノール添加前の全活性及びブタノール振盪後のブタノール層の活性を常法⁽⁷⁾通り, *Micrococcus flavus* の平板上で微生物学的に定量した。また, ブタノール層の抗菌能はブタノール-酢酸-水 (4:1:2) を溶媒系として濾紙クロマトグラフィーを行い, *M. flavus* 平板上の bioautography⁽¹⁾ で反応生成物を確認した。なお, 標準市販バシトラシンは科薬抗生物質研究所製, 45 u/mg である。

実 験 結 果

1. Spot 6 物質の精製 既知バシトラシンは中性あるいは微酸性で *n*-ブタノールと振盪すると, 水溶液からブタノール層へ移行し, バシトラシンX群と容易に分別し得ること, かくして得たバシトラシンX群の水溶液を活性炭あるいは酸性白土で処理すると活性物質を完全に吸着させることができるが, これらに吸着した活性は極めて溶離されにくいこと, 他方, バシトラシンX群の水溶液は短時間の透析では透析されず, 活性の重大な損失を伴わずに脱塩しうること, またバシトラシンX群の濃厚液に冷アセトンを順次添加すると, アセトン濃度 50~60% で着色性物質の大部分が沈澱し, その後この上清にさらにアセトンを添加すると, spot 6 物質を主体とするバシトラシンX群が沈澱することを見出し, かかる精製濃縮液をブタノール-酢酸-水を溶媒系として, 繰返し濾紙クロマトグラフィーを行い濾紙の相当 R_F 部分を純水で抽出して結局, 無色透明のニンヒドリン反応単一 spot の精製標品を得た。

すなわち, バシトラシン生産菌のアセトン乾燥菌体 150 g に Al_2O_3 200 g 及び H_2O 400 ml を加え, 乳鉢中で 2 時間磨砕, 600 ml の水を加え, 4 時間冷蔵, 抽出し, Al_2O_3 及び生菌を遠沈し, 濁った上層を塩酸酸性 pH 4.2 とし 1 夜冷蔵して遠心, 透明な上清を捨て沈澱部分をとり, 0.1 N-HCl-50% メタノール水 300 ml を加えて攪拌, 遠心して上清をとり, 沈澱部は繰返し同様処理して結局 5 回抽出した。最後の抽出液は痕跡程度の抗菌能しか含まないのでこれを捨て, 4 つの抽出液を合し (全活性 3147 u), 減圧下に濃縮してメタノールを溜去, 水溶液を苛性ソーダで pH 7.0 に修正し生ずる沈澱を遠心して除去, 濃縮液を得た。全活性 2990 u。この濃縮液に 300 ml の *n*-ブタノールを添加, 振盪して既知バシトラシンをブタノール層へ抽出, 水層は繰返し同様にブタノールで処理し, 結局 6 回この処理を行い, 既知バシトラシンを含まない活性の水溶液を得た。ブタノール層の既知バシトラシン全活性 1253 u, 水溶液の全活性は 1692 u であった。この水溶液を減圧下に濃縮し, 濃縮液をセロファン膜を隔てて純水に対して 3 時間透析して脱塩し, 濃縮して約 50 ml とし, これに冷アセトンを加え, 終末アセトン 50% 濃度とし, その上清に順次アセトンを添加して結局 90% 濃度までとし, その上清はバシトラシン活性を含まないのでこれを捨て, 途中の各沈澱区分を水に溶解, 結局 5 この沈澱区分を水溶解とした。この段階までの精製過程は第 1 図に要約される通りである。この精製過程でのバシトラシン活性の移動は第 1 表にまとめて示した。アセトン沈澱区分のバシトラシン活性は 70%, 80% 及び 90% アセトン濃度時の沈澱区分

第 1 表 パシトラシン X 群精製過程の活性

精製区分*	比活性 (u/ml)	容量 (ml)	全活性 (u)
S-1	2.8	1000	2800
S-2	1.3	1000	1300
S-3~S-6 の合計		915	3147
S-8	4.6	650	2990
B-1~B-6 の合計 (A)			1253
Aq-6	3.6	470	1692
Aq-6+(A)			2845
C-1	8.6	160	1376
D	3.9	190	741
C-2	10.3	50	515
50 S	4.8	100	480
60 S	4.3	125	537.5
70 S	2.9	167	493.3
90 S	0	500	0
50 P	1.95	8	15.6
60 P	1.4	6	8.4
70 P	2.15	14	30.1
80 P	4.6	20	92
90 P	6.7	23.5	157.5

* 精製区分の符号は第 1 図のそれに対応する。

第 2 図 アセトン沈澱区分の活性物質

被検菌: *M. flavus*

供試液: 70P: アセトン70%沈澱区分の水溶液, 2.15 u/ml; 80P: アセトン80%沈澱区分の水溶液, 4.6 u/ml; 90P: アセトン90%沈澱区分の水溶液, 6.7 u/ml, 各 0.05 ml 宛使用, 標準市販パシトラシン(st.)は 80 u/ml 溶液を 0.015 ml 使用した。アセトン沈澱区分の調製は本文を参照。

(それぞれ 70 P, 80 P 及び 90 P と呼ぶ) に主として認められ, その全活性はそれぞれ 30.1 u, 92 u 及び 157.5 u であった。また, これら 3 区分の bioautogram はい

ずれも spot 6 物質を主体とし, 若干の他の X 群の spot を含むが, 既知パシトラシン (spot 1 物質) は全く含まない (第 2 図)。

70 P, 80 P 及び 90 P の水溶液は抗菌 spot と対応しない R_F にもニンヒドリン陽性の spot を示すので, さらに精製標品を得るためにこれら 3 つの水溶液を用いてブタノール-酢酸-水 (4:1:2) を溶媒系とする濾紙クロマトグラフィーで精製した。すなわちこれらの活性の沈澱区分水溶液を減圧下に濃縮し, 濃縮液をクロマト用濾紙 (東洋濾紙 No. 50) の下端に線状につけ, ブタノール-酢酸-水の溶媒系で展開, 乾燥後, 原点附近の濾紙の部分短冊状に切りとり下降法で純水を以て抽出すると, 抽出液はブタノール-酢酸-水の系の濾紙クロマトグラフィーでなおニンヒドリン反応で数この spot を示すので, 抽出液を減圧下に濃縮し, 同様にクロマトグラフィーをさらに 2 回繰返し, 結局ニンヒドリンで単一 spot を与える抽出液を得た。この抽出液は第 3 図にみられるように, 原点に留まる単一の灰淡紫色のニンヒドリン呈色 spot を示し *M. flavus* 平板上では濁った抗菌像を与える。収量はアセトン沈澱区分 (全活性約 180 u) から約 70 u。

第3図 精製 spot 6 物質の paper chromatogram

供試液：クロマトグラフィーを3回繰返して得た抽出液，番号は抽出液の batch No. おのおの 0.02 ml 使用，溶媒系：ブタノール-酢酸-水 (4:1:2) 発色：0.5% ニヒドリン-ブタノール溶液を噴霧，加温，発色した

第4図 バシトラシンX群の透析

供試液：st.：標準市販バシトラシン；70P：アセトン 70% 濃度沈澱区分 (本文参照)；41 hr 及び 48 hr：st. と 70P の混合液をそれぞれ 41 時間あるいは 48 時間，セロファン膜を隔てて流水に透析，膜内液を供試液とした
Bioautogram：溶媒系あるいは被検菌は本文の通り。

第5図 Spot 6 物質の加水分解物のクロマトグラフィー

供試液：精製 spot 6 物質の塩酸加水分解液 (本文参照)

標準アミノ酸溶液：Ileu.：イソロイシン，His.：ヒスチジン，Lys.：リジン，Glut.：グルタミン酸，Asp.：アスパラギン酸，Val.：バリン，ニヒドリン陽性 spot：1. フェニルアラニン，2. ロイシン/イソロイシン，3. バリン，4. ヒスチジン，5. オルニチン/リジン，6. グルタミン酸，7. アスパラギン酸，8. システイン酸，9, 10. 未同定 (セリン?)

溶媒系：1次：水飽和フェノール (0.1% α -ベンゾインオキシム含有)，2次：n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2)

2. 精製 spot 6 物質の加水分解 上述のようにして得た精製 spot 6 物質はニヒドリンで灰淡紫色の原点に留まる spot を示したが，次に本物質の透析性をしらべるために spot 6 物質からなる粗標品 (アセトン 70% 濃度の沈澱区分標品) を標準市販バシトラシンと混じ，セロファン膜を隔てて流水に 48 時間透

析した。透析中のセロファン膜内の液をとり，*M. flavus* 平板上で bioautography を行い，膜内液のバシトラシン活性物質の移動をしらべた。その結果は第4図にみられる通り，標準市販バシトラシンも spot 6 物質も 48 時間の透析では膜内に留まった。よって spot 6 物質は非透析性のニヒドリン陽性物質といえる。

さらに，本物質がペプチド性物質であることを確かめるために，前述の精製 spot 6 物質を供試液として加水分解を行い，水解生成物をニヒドリン反応でしらべた。すなわち上述のクロマトグラフィー後の抽出液を合し，減圧下に濃縮，約 5 ml とし (全活性約 60 u)，これに等量の濃塩酸を加え，閉管中で 15 lbs.，7 時間加圧分解し，水解液を湯煎上で濃縮，乾固に至らしめ，これを少量の水に溶解し供試液とした。この供試液を用い，濾紙上で2次元のクロマトグラフィーを行った。すなわち第1次に水飽和フェノール (0.1% α -ベンゾインオキシム含有)，第2次にブタノール-酢酸-水 (4:1:2) をそれぞれ溶媒系として展開，ニヒドリンで発色した。その結果は第5図にみられるように，フェニルアラニン，イソロイシン/ロイシン，バリン，ヒスチジン，オルニチン/リジン，グルタミン酸，システイン酸，アスパラギン酸及びセリン様の未同定の 2 spot が与えられた。このうち，バリン及びセリン様未同定 spot を除く 9 種のアミノ酸はバシトラシン A の構成アミノ酸と一致するし，バリンはバシトラシン B に含まれることが知られている⁽⁸⁾。

3. バシトラシンX群から既知バシトラシンへの転換 予備実験的に粗 spot 6 物質供試液 (前報⁽⁴⁾参照) をバシトラシン生産菌の洗滌菌体と磷酸塩緩衝液 (pH 7.2) 中で好氣的に incubate (30° に 4 時間) し，直ちに遠心，菌体を除き反応液上清を bioautogram でしらべたが，spot 6 物質から spot 1 物質 (既知バシトラシン) への転換は認められなかった。この場合は反応液組成が転換反応に適当でない可能性もあり，かつ生菌体ではバシトラシンX群の透過性にも問題がある。他方，spot 6 物質が既知バシトラシンよりも高分子であり，前者の加水分解で後者，すなわち既知バシトラシンへ変形される可能性を考え，spot 6 物質供試液を磷酸塩緩衝液 (pH 7.2) 中でバクテリアのプロテアーゼ (長瀬産業株式会社製，結晶ナガーゼ) と反応させた。しかし，この場合も spot 6 物質から spot 1 物質への転換は認められなかった。

かくして転換反応を接触する酵素液とその反応液組成について検討し，intact protoplast ではアミノ酸混液と力源 [ATP-HDP] の系で既知バシトラシンが生成される事実⁽¹⁾から転換反応の反応液組成にもこれらが必要と考え，前駆体としてのバシトラシンX群の他にアミノ酸混液と力源 [ATP-HDP] を添加した。また，転換反応を接触する酵素液としては細胞質部分を用いたが，protoplast の滲透圧的衝撃によって得られる shockate 上清を

第 2 表 パントラシン X 群から既知パントラシンへの転換

Tube No.	酵素液	前駆体 標 品	反応後のパントラシン活性	
			全活性 (u)	ブタノール層の活性
1	なし	80 P	6.8	—
2	OLP 1:2	なし	0	—
3	"	80 P	6.4	+
4	SDP	なし	0	—
5	"	80 P	9.5	+
6	OLP 1:1	なし	0	—
7	"	80 P	11.9	+

反応液組成及び反応条件: アミノ酸混液 0.2 ml (カザミノ酸 11.76 mg, トリプトファン 0.1 mg, シスチン 0.1 mg), ATP 0.1 ml (4mg), HDP 0.1 ml (13.3 mg), 前駆体 (パントラシン X 群標品, 80P, 17.6 u/ml) 0.8 ml, 酵素液 (細胞質供試液) 1 ml, 全容 2.2 ml (pH 7.2), 30° に 5 時間静置, パントラシン X 群標品あるいは細胞質供試液の調製については本文を参照。

第 6 図 パントラシン X 群から既知パントラシンの生成

- 1: 標準市販パントラシン
- 2: 供試パントラシン X 群標品, 80 P (本文参照)
- 3: 反応液 tube 3 の反応後のブタノール層 (第 2 表及び本文参照)
- 4: 反応液 tube 5 の反応後のブタノール層 (第 2 表及び本文参照)
- 5: 反応液 tube 7 の反応後のブタノール層 (第 2 表及び本文参照)

既知パントラシンが生成したことが証明された。

考 察

著者はさきにパントラシン生産菌の活性な protoplast membrane によるパントラシン X 群の生成を認め、その他の知見をも総合してパントラシン X 群から既知パントラシンへの転換は本菌の細胞質部分で起り得るものと想定した⁽³⁾。本報の成績はこの想定に一応の証明を与えた。しかし、細胞質供試液によるパントラシン X 群の転換反応は再現性のある状態では達成されておらず、この種の反応はなおかなり不安定であるといわねばならないが、パントラシン X 群をパントラシン生成の前駆体とみることに支障はない。Barry ら⁽⁹⁾はグラミシジン S の生合成において *B. brevis* の 'early' または 'middle stage' の細胞の音波処理抽出液がグラミシジン S を生成しないのに対して、'late cell' の抽出液は生成能を示すことから、かかる細胞ではグラミシジン S 生合成の中間体が生成されており、このものからアミノ酸を要求せずに、最終生産物、グラミシジン S へ変形されるものと考えたが、該菌の抽出液中には確認しうる中間体を見い出していない。これに対して著者のパントラシン生成の場合は抗菌活性をもつほどに特異化されたペプチド性の前駆体をみいだしたが、この前駆体から最終生産物、既知パントラシンへの転換反応はアミノ酸混液と力源の共存下でおこり得た。しかし、反応液中のアミノ酸混液あるいは力源が、果して転換時に必須条項であるか否か、またもし必要であればそれらの反応への関与の仕方等について

細胞質供試液として用いる場合は不可避免的に酵素液の薄まりがおこる (活性な protoplast membrane を得るためには通常 1:2~1:4 稀釈を適用しているが、この場合は 3~5 倍にうすまる), この薄まりを回避するために別に protoplast を音波処理して破碎, その抽出液をも用いた。使用菌体細胞は 1% 澱粉ブイヨン培地で 30°, 18 時間振盪培養の菌体である。

かかる反応液組成及び酵素液を用いて, パントラシン X 群から既知パントラシンへの転換を行わせ, 反応終了後, 反応液に一定量のブタノールを添加し, よく振盪後ブタノール層をとり, その抗菌活性を測定した。供試のパントラシン X 群標品は抗菌能がブタノール層に検出されなくなるまでブタノールで処理されているし, 第 6 図にみるように事実既知パントラシンを含まない。反応は 30° に 5 時間静置し反応後, 反応液の全

活性及びブタノール層の活性を測定すると第 2 表に示す通り, ここに用いた酵素液はいずれもアミノ酸混液と力源のみからはいかなるパントラシン活性物質をも生成せず, パントラシン活性物質の生成には protoplast membrane の存在が必須であるという既報⁽⁶⁾の知見が再確認された。他方, 酵素液を添加しない場合はブタノール層にパントラシン活性は認められず, 使用したパントラシン X 群供試液は実験の条件下でそれ自身で (非酵素的に) ブタノールへ転溶しうる活性物質を含まないことを示している。これに対して, パントラシン X 群と酵素液の両者が共に存在する場合はいずれも抗菌活性がブタノール層に出現し, パントラシン X 群の転換を示した。

ここに転換, 生成する反応生成物 (ブタノール層の活性物質) は既知パントラシンと見なされるが, この点をさらに確実にするために, 転換の認められた反応液 (tube 3, 5 及び 7) のブタノール層をとり, ブタノール-酢酸-水 (4:1:2) を溶媒系として濾紙クロマトグラフィーを行い, *M. flavus* 平板上で bioautography を行った。その結果は第 6 図に示す通りであって, 供試の反応液のブタノール層の活性物質はいずれも明瞭に既知パントラシンに相当する R_F (spot 1) 物質が認められ, これらの場合は転換反応の結果,

第7図 バシトラシンAの構造⁽¹²⁾

シンの場合はもっと複雑ではあるが環状構造をとる⁽¹²⁾関係上(第7図), バシトラシンX群の転換反応にかかる閉環反応も含まれるものと想定され, あるいは力源が必要ともみられる。これに対して転換反応時の反応液組成中のアミノ酸混液は上述のグラミシジンあるいはペニシリンの生合成の成績からあるいは本質的には必要でなく, cell-free 系での反応の安定性に関係する可能性も考えられよう。

バシトラシンX群の中の1つ, spot 6 物質の精製供試液は既知バシトラシンの被検菌 *M. flavus* に対して濁った抗菌像を示し, 既知バシトラシンの透明な抗菌像と明瞭に異なる。このことはバシトラシンX群がバシトラシン-ペプチド生成前駆体としてかなり特異的であり, 何らかの modification を受けて最終の既知バシトラシンに変わりを示唆するが, バシトラシンX群はセロファン膜に対する透析では既知バシトラシン同様に非透析性であることが示されたし, 精製 spot 6 物質供試液の加水分解の成績からは本物質が一応, ペプチド性物質であることが示され, バシトラシンX群が化学的にも既知バシトラシンと密接に関連することが示された。精製 spot 6 物質の加水分解物のアミノ酸組成はバシトラシンAおよびBのアミノ酸組成に類似することも示されたが, 供試精製 spot 6 物質標品の単一性についてはなお検討の余地があるので, さらに精査される必要がある。

Spot 6 物質精製の前段階でバシトラシン生産菌のアルミナ磨砕による菌体ホモジネートから著者は濁った遠心上層をとったが, この遠心分離の段階で透明な菌体抽出液とすると, バシトラシンX群区分(pH 4.2 沈澱区分)の活性は著しく損失される。濁った遠心抽出液ではアルミナと intact cell の大部分は除かれているが, 菌体の破片(細胞壁あるいは細胞質膜からなるとみられる)が多く残存する。この事実は, バシトラシンX群が可溶性の状態というよりはむしろ菌体構造に結合した状態で存在することを示唆するが, ストレプトマイシンの場合⁽¹³⁾もこの抗生物質が細胞壁に吸着しており, 0.1 N 塩酸で溶離されることが知られているし, また, 塩基性アミノ酸, リジンもバクテリアの細胞壁に吸着され, リジンの等電点 pH で溶離されることが知られている⁽¹⁴⁾ので, バシトラシンX群の塩基性ペプチドとしての性質から既報⁽⁹⁾に述べたように細胞壁に吸着され, 細胞外への排出が阻止されるものとみられる。

総 括

バシトラシン生産菌 *B. subtilis* st. Tracy のアセトン乾燥菌体をアルミナ磨砕し, 抽出液から pH 4.2 沈澱, 塩酸メタノール水抽出, ブタノール処理, 透析, アセトン分画等を経てバシトラシンX群を分画, 精製し, ブタノール-酢酸-水でクロマトグラフィーを繰返し, spot 6 物質をニンヒドリン反応で単一 spot に精製した。本標品はバシトラシンA及びBの構成アミノ酸の他に2つの未同定ニンヒドリン陽性物質を含むペプチドであって, セロファン膜で透析されない。本菌の protoplast の shockate あるいは sonickate 上清を細胞質供試液として, バシトラシンX群をアミノ酸混液と力源 [ATP-HDP] 共存下に incubate すると既知バシトラシンへの転換が認められた。よってバシトラシンX群はバシトラシン生成の前駆体であり, 本物質から既知バシトラシンへの転換は細胞質部分でおこるものと認められる。

本研究に当り終始御懇篤な御指導をいただいた植村定治郎教授, 種々御便宜をいただいた科薬抗生物質研究所小山康夫所長, 当研究室の諸兄姉に感謝します。

- (1) 相田徳二郎 : 本誌, 33, 325 (1959).
- (2) 相田徳二郎 : 本誌, 33, 329 (1959).
- (3) 相田徳二郎 : 本誌, 36, 793 (1962).
- (4) 相田徳二郎 : 本誌, 36, 797 (1962).

- (5) 相田徳二郎 : 本誌, 31, 259 (1957).
- (6) 相田徳二郎 : 本誌, 36, 724 (1962).
- (7) D. A. Hoff et al. : *Science*, 106, 551 (1947).
- (8) G. G. F. Newton, E. P. Abraham : *Biochem.*

は全く明らかでない。一方, Arnstein⁽¹⁰⁾ は最近, 放射性の L-cystinyl-L-valine を合成し, ペニシリンへのとり込み実験から, このものがアミノ酸に分解されずにペニシリン分子中にとり込まれることを認めた。この成績は生菌懸濁液での成績であるし, またペニシリン分子中のバリンはD型であるのに対し, D-valine 誘導体は前駆体とならない⁽¹¹⁾点など問題は残るので, 直ちに結論的とはいえないが, ペニシリン生合成の可能な前駆体とみられる。ペニシリンの場合も, この dipeptide が閉環すればペニシリン骨格の β -ラクタム・チアゾリジン環となるはずであるが, バシトラ

- J., 53, 597 (1953).
- (9) J. M. Barry, E. Ichihara : *Nature*, 181, 1274 (1958).
- (10) H. R. V. Arnstein : in "Biochemistry of Antibiotics" (IV th Intern. Congr. Biochem.), edd. K. H. Spitzzy and R. Brunner, Pergmon Press, 1959, p. 62.
- (11) H. R. V. Arnstein, M. E. Clubb : *Biochem. J.*, 68, 528 (1958).
- (12) E. P. Abraham : "Biochemistry of Some Peptide and Steroid Antibiotics", John Wiley and Sons, N. Y. (1957).
- (13) D. J. D. Hockenhull : in "The Biochemistry of Streptomycin Production", edd. D. J. D. Hockenhull, London, Heywood & Co., Ltd., 1960, p. 133.
- (14) E. M. Britt, P. Gerhardt : *J. Bact.*, 76, 288 (1958).

[農化 第 36 卷, 第 11 号, p. 879~883, 1962]

米麴のプロテアーゼ組成に関する研究 (第 2 報)*

酸性プロテアーゼ及びアルカリ性プロテアーゼの基本的性質

布川弥太郎, 難波康之祐, 衣山陽三 (醸造試験所)

昭和 37 年 3 月 14 日 受理

麹菌プロテアーゼの諸特性に関しては Crewther 等⁽¹⁾, 三浦⁽²⁾, 井口等⁽³⁾, 松島⁽⁴⁾, 吉田等⁽⁵⁾, 坂本等⁽⁶⁾, 安井⁽⁷⁾及び Wallenfels⁽⁸⁾, Pechmann⁽⁹⁾ 等の数多くの報告がなされている。また米麴のプロテアーゼについても蔭山⁽¹⁰⁾の研究はあるけれども、この際用いた酵素液は粗抽出酵素液であり、しかも主としてプロテアーゼ組成についての検討であって、詳細な特性についての研究ではなく、米麴プロテアーゼの諸特性に関する研究は未だ着手されていない現状である。

その理由としては米麴プロテアーゼは非常に含量が少ないためにそれを分離精製することの困難であることが第一にあげられる。

著者等は前報⁽¹¹⁾において米麴のプロテアーゼは酸性及びアルカリ性プロテアーゼの他に 2 種の中性プロテアーゼを含むことを見たのであるが、この中性プロテアーゼは含量が極めて少なく、また出現しない場合も多いので、米麴プロテアーゼの主要成分は酸性プロテアーゼ及びアルカリ性プロテアーゼの 2 系統であることを認めた。そして別報⁽¹²⁾において DEAE-cellulose 等によるこの両プロテアーゼの分離精製を検討した結果、酸性及びアルカリ性プロテアーゼをそれぞれ単一な酵素として精製することができた (なお本精製手順では上記 2 種の中性プロテアーゼは捕捉することができずその行方は不明である)。そこでこの標品について種々特性を検討し、米麴プロテアーゼの基本的諸特質を明らかにすると共に、天然蛋白質に対する分解様式についても検討を加えることにした。

実 験 方 法

1. 酵素液の調整⁽¹²⁾ 第 1 表に示した手順により米麴抽出液より酸性プロテアーゼとアルカリ性プロテアーゼを分離し、これをさらに冷凍乾燥機により濃縮を行った。

アルカリ性プロテアーゼはそのまま十分精製されているが、酸性プロテアーゼの方は未だ相当量のアミラーゼが夾雑しているので第 2 表に示す如き手順で精製を行った。

酸性プロテアーゼは超遠心的には未だ夾雑物をわずか含んでいるが、両プロテアーゼは少なくともプロテアーゼとしては単一なものであることが第 1 図のゾーン電気泳動図により証明された。

2. 一般特性の検討

i) 作用至適 pH : 基質としてはミルクカゼイン、ヘモグロビン、アルブミン及びオリゼニンを用い、前 3 者は市販品を、後者は近藤等⁽¹³⁾の方法に準じて白米より調製したものにつき、前報に準じておのおのの基質に対する作用曲線を描いて検討した。

* Studies on the Constitution of "Rice-Koji" Protease. Part II. The General Properties of Acid- and Alkaline-Protease.

By Yataro NUNOKAWA, Yasunosuke NAMBA and Yōzō KINUYAMA (Research Institute of Brewing)