ことは明らかである。一方本実験の清酒酵母は生育に伴って生じたK含量の差であって、この間に醱酵に関係のある菌体成分に何等かの差が生じているものと考えられる。このものは何かということについては今後の詳細な検討が必要であろう。ともあれ酵母はその培養条件によって獲得する醱酵能に差があり、おのおのの醱酵能が外部から受ける影響は同じ程度であるといえる。

清酒醸造において KH_2PO_4 添加により力の強い酒母が得られるという事実は、単に生育量のみでなく、今回のこの醱酵能にも差があることを見れば明らかに説明ができるものと考えられる。しかしまた過剰の添加は酒質を悪くすることも知られており、この点から見ればK及びNaと酵母の窒素代謝の関係が二、三報告されている^(15,16)が、これらと呈味成分との関係についての検討が必要となるであろう。ともあれ酒造に対するKの重要性は醱酵能の面からも認められた。

要 約

清酒酵母の醱酵能に対するKの影響を検討した結果次のことが判明した。培養時の培地のK濃度の差によって、酵母の獲得する醱酵能の強さに差を生ずる。しかし醱酵時に外部から受ける影響については酵母による差がない。すなわち醱酵液のKによってHの阻害作用を回復されるのはパン酵母における結果と同じである。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜った恩師坂口謹一郎先生、有馬啓先生を始め、種々御助言御助力をいただいた東京大学醸酵学教室関係の各位に、また白鶴酒造株式会社の各位に、深甚の謝意を表する次第である。また、本研究は日本酒造組合中央会研究奨励費の助成をいただき、併せて謝意を表する次第である。

(1) 黒野勘六, 藤田 実: 醸試報, 94 , 345(1927).	1, 191 (1942).
(2) 野白喜久雄: 醸協, 49 , 44(1954); 52 , 900 (1957).	(10) J. A. Muntz: <i>J. Biol. Chem.</i> , 171 , 653 (1947).
(3) 猿野淋次郎: 醸工, 32 , 495 (1954).	(11) O. Meyerhof, A. Kaplan: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 33 , 282 (1951).
(4) 小武山温之他: 醸協, 52 , 58, 59 (1957).	(12) A. Rothstein, C. Demis: <i>ibid.</i> , 44 , 18 (1953).
(5) A. Rothstein, L. H. Enns: <i>J. Cellular Comp. Physiol.</i> , 28 , 231 (1946).	(13) 竹村成三: 本誌, 36 , 569 (1962).
(6) A. Harden: <i>Biochem. J.</i> , 11 , 64 (1917).	(14) 竹村成三: 本誌, 36 , 561 (1962).
(7) A. Lasnitzki, E. Szorényi: <i>ibid.</i> , 29 , 580 (1935).	(15) R. Davies, J. P. Folkes, E. F. Gale, L. C. Bigger: <i>Biochem. J.</i> , 54 , 430 (1953).
(8) S. N. Farmer, D. A. Jones: <i>Nature</i> , 150 , 768 (1942).	(16) F. Alten, O. Werk: <i>Z. Naturforschung</i> , 13b , 315 (1958).
(9) C. Neuberg, H. Lustig: <i>Arch. Biochem.</i> ,	

〔農化 第36巻, 第9号, p.720~723, 1962〕

有胞子細菌の抗生物質生産(第7報)* Protoplast 分解因子について(3)

相田徳二郎, 伊藤幹子 (東北大学農学部農業微生物研究室)

昭和36年11月4日受理

さきに *Bacillus subtilis* st. 427-4 の培養濾液からバントラシン生産菌の protoplast を崩壊する因子をみだし, protoplast 分解因子(PD因子)とよんだが、本因子は塩析あるいは透析等の成績から酵素様物質とみられた⁽¹⁾。しかし、反面、本因子に著明な耐熱性が認められ⁽¹⁾かつアセトン等の有機溶媒に溶解することが知られ⁽²⁾、蛋白性物質としては疑問がもたれた。しかし、本因子の精製が進み、精製標品の呈色反応あるいは沈澱反応、さらには精製標品の加水分解等の成績から本因子は結局、蛋白性物質であるとみられた⁽³⁾。同時に電気泳動その他

* Antibiotic Production by Spore-forming Bacteria. Part VII. On the Protoplast Dissolving Factor. (3)

By Tokujiro AIDA and Mikiko ITO (Laboratory of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

の成績から酸性物質であることが示され⁽²⁾, 本因子は酸性蛋白質であるといえる。

しかし, 本因子の protoplast に対する作用は, 本因子標品が, これまで protoplast 崩壊作用があるとされている諸酵素活性を含まない⁽¹⁾ ことから, 既知のプロテアーゼ, リパーゼあるいは RN アーゼ等の酵素的崩壊作用としては理解されない。これに対して, 最近 Gilby ら⁽³⁾ は, ionic detergent による protoplast の崩壊を報告しているが, 著者の PD 因子が酸性蛋白質である点から興味深い。

著者は PD 因子を, バシトラシン生産菌の subcellular 系におけるバシトラシン生成の問題との関連で検索しているが, PD 因子で処理した protoplast はバシトラシン生成能を失うことが認められたので, この種の protoplast membrane に対する PD 因子の作用を検索した。

本報においては PD 因子の protoplast に対する作用および protoplast membrane に対する作用について得られた結果を報告する。

実験材料及び方法

使用菌株及びその培養: バシトラシン生産菌は既報⁽⁴⁾ 同様に *Bacillus subtilis* st. Tracy を用い既報⁽⁴⁾ に従って 1% 澱粉ブイオン培地で 17~20 時間, 注意深く 30°~31° で振盪培養した。PD 因子生産菌は *Bacillus subtilis* st. 427-4 を用い, 前報⁽¹⁾ に従って硫酸, ブドウ糖ブイオン培地で 30°, 18 時間振盪培養した。PD 因子の被検菌として, *Bacillus megaterium* st. DeBary, *B. megaterium roseus*, *B. mesentericus vulgatus*, *Escherichia coli* st. Yamaguchi 等を用いたが, これらはいずれも当研究室保存の菌株である。これらの菌株はいずれもブドウ糖ブイオン培地 (ブドウ糖 1%, 肉エキス 0.5%, ペプトン 0.5%, 食塩 0.25%, pH 7.2) で 18 時間, 30° で振盪培養した。ただし, *E. coli* は糖を含まないブイオン培地中で 30°, 20 時間静置培養後, その 20 ml を 100 ml のブドウ糖ブイオン培地に接種し, 6 時間, 30° で振盪培養して用いた。

Protoplast の調製: *B. subtilis* st. Tracy, *B. subtilis* st. 427-4, *B. megaterium* 2 株, および *B. mesentericus* の protoplast は前報⁽⁵⁾ に準じて, 集菌, 洗滌した菌体を *B. subtilis* st. Tracy の場合と同様の方法で 20% 蔗糖液中で lysozyme 処理して得た。*E. coli* の 'protoplast' は, Repaske⁽⁶⁾ の記載に準じて, 20% 蔗糖液中で EDTA (終末 0.13 mg/ml 濃度) 存在下で終末濃度 0.034 mg/ml の lysozyme を作用させて得られた。

PD 活性の測定: バシトラシン生産菌の protoplast を基質にして, 前報^(1,2) に従って比濁法によって測定した。

PD 因子標品の調製: 既報⁽¹¹⁾ に従って標品 V を, また前報⁽²⁾ に従って精製標品を調製, PD 因子供試品とした。活性は標品 V は最少有効濃度 66 μ g/ml (終末), 精製標品は 4 μ g/ml (終末) である。

Protoplast membrane の調製: バシトラシン生産菌の protoplast を蔗糖液 (20%) に懸濁 (約 30 mg 乾菌/ml に相当の濃度), この懸濁液に冷 1% NaCl 塩液 (NaCl 1 g, KH_2PO_4 250 mg, K_2HPO_4 250 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, MnSO_4 5 mg, 水 100 ml, pH 7.2) を加え 1:3 稀釈とし, 得られる lysate を直ちに 0° で 12,000 回 20 分遠心して pellet を集め, 1% NaCl 塩液に懸濁し membrane 懸濁液とした。39 mg 乾燥量/ml。

バシトラシン生成系: Membrane のバシトラシン生成はアスパラギン酸 (DL, 50 mg/ml) 0.15 ml, グルタミン酸 (DL, 50 mg/ml) 0.15 ml, システイン (L, 25 mg/ml) 0.15 ml, ATP (40 mg/ml) 0.1 ml, HDP (Ba 塩として 200 mg/ml) 0.1 ml, 1% NaCl 塩液 0.25 ml, 添加物 0.1 ml, membrane 懸濁液 1 ml, 全容 2.0 ml で 30°, 4 時間反応させた。ATP は Schwarz Lab. 製の Na 塩, HDP は N.B.C. 製の Ba 塩を Na_2SO_4 で Na 塩として用いた。

実験結果

1. PD 因子活性の菌株特異性 PD 因子は, 始めバシトラシン生産菌の protoplast に対する崩壊作用として見いだされたものであるが, 生菌に対する溶菌性物質⁽⁴⁾ の場合は鋭い菌株特異性が認められているので, 数種のバクテリアの protoplast について崩壊能をしらべた。終末 0.8 mg/ml の PD 因子 (標品 V) の存在下で, 6 菌株のバクテリアの protoplast を 30° で 10 分間 incubate すると, 第 1 表にみられるように, PD 因子は供試の 6 菌株, *B. subtilis* st. Tracy, *B. subtilis* st. 427-4, *B. megaterium* st. DeBary, 同 *roseus*, *B. mesentericus vulgatus* および *E. coli* のすべての protoplast に対して同様に作用した。*E. coli* の 'protoplast'

第1表 種々のバクテリア protoplast に対する PD 因子の作用

菌 株	Protoplast 懸濁液の濁度 ($-\log T$)		
	始 発	反応後	
		PD 因子なし	PD 因子添加
<i>B. subtilis</i> st. 427-4	0.780	0.660	0.043
<i>B. mesentericus vulgatus</i>	0.510	0.410	0.035
<i>B. megaterium roseus</i>	0.460		0.070
	0.410	0.310	
<i>B. megaterium</i> st. DeBary	0.900	0.740	0.065
<i>E. coli</i> st. Yamaguchi	0.690		
	0.620	0.650	0.080
<i>B. subtilis</i> st. Tracy	0.510	0.470	0.015

反応液組成: Protoplast 懸濁液 (緩衝蔗糖液中) 4 ml, PD 因子 (標品 V を 2 mg/ml 濃度に 20% 蔗糖液に溶解) あるいは 20% 蔗糖液 1 ml, 全容 5.0 ml.

反応: 30° で 10 分間放置.

第1図 *E. coli* st. Yamaguchi の生菌懸濁液に対する lysozyme, EDTA 及び PD 因子の作用

反応液組成: 40% 蔗糖液 3 ml, 生菌懸濁液 0.5 ml, M/10 トリス緩衝液 (pH 8.6) 2.5 ml, EDTA 溶液 (4 mg/ml) 0.22 ml, lysozyme 溶液 (1 mg/ml) 0.22 ml, PD 因子溶液 (標品 V, 1 mg/ml) 1.0 ml, 全容 7.44 ml.

-x-x-x: 完全系, -Δ-Δ-Δ: 完全系-PD 因子, -O-O-O: 完全系-(EDTA, lysozyme 及び PD 因子).

反応条件: 30° で静置.

品) は 120 μ g あるいは 230 μ g/ml のような高濃度で 60 分間反応させても protoplast membrane の濁度のわずかな減少しか示さなかった. Protoplast に対しては同じ PD 因子標品は 4 μ g/ml の終濃度で 5 分間でほとんど透明にする作用があるから, PD 因子の protoplast membrane に対する溶解作用はあるにしても極めて弱いものである.

これに反して protoplast membrane のバントラシン活性物質生成能は, PD 因子によって完全に阻害される (第3表). すなわち, PD 因子無添加時にみられる 0.34 u/ml のバントラシン活性の増大は, 終末 125 μ g/ml の PD 因子の存在する場合は 0.11 u/ml の減少となることが認められた.

考

察

PD 因子のバクテリアの protoplast に対する作用は菌株特異性がなく, 試験した 6 菌株すべての protoplast を同様に崩壊させた. グラム陰性の *E. coli* の 'protoplast' (spheroplast) では細胞壁が完全に除去されている. という証明は今のところ与えられていない⁽⁷⁾ ので, この事実は PD 因子がこれらグラム陽性菌および陰性菌の

形成と PD 因子によるその崩壊は第1図に示す通りである. 終末 34 μ g/ml の lysozyme 存在下で EDTA (終末 130 μ g/ml) を添加すると, 20 分後には完全に 'protoplast' に転換されていることが位相差顕微鏡で確認された. その後, PD 因子を添加すると終末 134 μ g/ml 濃度で 5 分間に著明な lysis が起り, ほとんど完全に透明となる. かくして PD 因子のバクテリアの protoplast に対する作用は菌株特異性がなく, グラム陰性の *E. coli* にまでおよぶといえる.

2. PD 因子の protoplast membrane に対する作用 PD 因子の protoplast membrane に対する作用をバントラシン生産菌の protoplast membrane 溶解能およびバントラシン活性物質生成能に対する作用でしらべた. 第2表に示すように, PD 因子 (精製標

第2表 PD 因子の protoplast membrane 溶解能 濁度 (O. D., $-\log T$)

添加物	始発 濁度	30° に incubation 後の濁度				
		5 分	10 分	25 分	35 分	60 分
H ₂ O	0.40		0.42	0.33	0.30	0.29
PDF, 120 μ g/ml	0.39		0.35	0.30	0.26	0.22
PDF, 230 μ g/ml	0.40	0.30				0.19

反応液組成: Protoplast membrane 懸濁液 (39 mg 乾燥重量/ml) 1.5 ml, 1% NaCl 塩液 (本文参照) 1.5 ml, 添加物 0.15 ml, 全容 3.15 ml.

PDF: 精製 PD 因子標品 (終末最少有効濃度 4 μ g/ml)

第3表 Protoplast membrane によるバントラシン活性物質生成に対する PD 因子の効果

反 応 液	バシトラシン活性 物質生成量 (u/ml)		阻 害 率 (%)
	Δ 生成量		
(1) 完全系	1.22	0.34	
(2) (1)+PDF	0.77	-0.11	123
(3) (1)-AAs* & [ATP·HDP]	0.88	—	

完全系: DL-アスパラギン酸 7.5 mg, DL-グルタミン酸 7.5 mg, L-システイン 3.75 mg, ATP 4 mg, HDP 200 mg, 1% NaCl 塩液 (pH 7.2) 0.25 ml, protoplast membrane 39 mg (乾燥重量), 全容 2.0 ml, 30°, 4 時間放置.

PDF: 精製 PD 因子標品 (最少有効濃度, 終末 4 μ g/ml) 0.25 mg.

*AAs: アミノ酸 (上掲の 3 種) の混液.

protoplast (または spheroplast) に共通する構成成分に対して作用するものとみられる。かかる観点からさらに、動物組織細胞とバクテリアの protoplast とを対比させて、血球細胞やガン細胞 (Ehrlich の腹水ガン) に対する予備的実験から PD 因子がこれらの細胞を lysis させることを認めたが、これらの事実は PD 因子の広範な作用を示唆する。

次報⁽⁸⁾に明らかなように、バシトラシン生産菌の protoplast を 1% NaCl 塩液で浸透圧処理を加えて得た lysate から遠心して集めた pellet はバシトラシン活性物質を生成する能力がある。ここに得られる pellet は Weibull ら⁽⁹⁾の成績その他⁽¹⁰⁾から protoplast membrane に相当する。

他方に、PD 因子の protoplast に対する作用はおそらく protoplast membrane に対する作用を第 1 次作用とするとみられるので、本因子の membrane に対する作用をまずその溶解能でしらべた。バシトラシン生産菌の protoplast から調製した membrane 標品の懸濁液は PD 因子との接触によって微弱な濁度の減少しか示さなかった。Intact protoplast の崩壊時には membrane の osmotic barrier に変化が起れば、内容物の流出によって濁度の顕著な減少を伴うであろうが、membrane 懸濁液の場合は membrane 物質の部分的 resolution が必ずしも顕著な濁度の減少を伴わないとみられるので、protoplast membrane に局在することの判明している⁽⁸⁾バシトラシン活性物質生成能に対する作用で検索した。本報に明らかなように、PD 因子は protoplast membrane のバシトラシン活性の生成を強く阻害した。この事実は PD 因子が protoplast membrane に作用することを示唆する。

著者はさらにバシトラシン生産菌の protoplast を本因子を含む溶菌性物質標品で処理する場合、protoplast のバシトラシン活性生成能が失活することを認めているが⁽¹⁾、この場合、protoplast の崩壊も起こっているので、PD 因子が直接にバシトラシン生成系に作用した結果か、あるいは protoplast の崩壊による機能的組織化の損傷によるものか不明であったが、本報で PD 因子が活性な protoplast membrane の生成能を阻害することから少なくとも前者が関係するものといえよう。

総 括

B. subtilis st. 427-4 の培養から分離された protoplast 分解因子の作用について検索した。

(1) 本因子のバクテリアの protoplast に対する作用は菌株特異性がなく、試験した全部に作用を示した。このうちには、数種のグラム陽性菌と共に、グラム陰性の *E. coli* も含まれる。

(2) 本因子はバシトラシン生産菌の protoplast membrane に作用し、membrane のバシトラシン活性物質生成能を強く阻害した。

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並びに研究室の諸兄姉に感謝します。

- (1) 相田徳二郎他：本誌，33, 936 (1959).
- (2) 相田徳二郎他：本誌，36, 531 (1962).
- (3) A. R. Gilby et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 23, 19 (1960).
- (4) 相田徳二郎：本誌，31, 259 (1957).
- (5) 相田徳二郎：本誌，33, 325 (1959).
- (6) R. Repaske: *Biochim. Biophys. Acta*, 22, 189 (1956).

- (7) K. McQuillen: in "The Bacteria" edd. I. G. Gunsalus and R. Y. Stanier, I, 1960, p. 249.
- (8) 相田徳二郎：本誌，36, 724 (1962).
- (9) C. Weibull et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 20, 519 (1959).
- (10) A. R. Gilby et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 29, 21 (1958).