[農化 第 37 卷, 第 8 号, p. 453~463, 1963]

微生物による核酸関連物質の蓄積 (第 1 報)*

各種保存菌株及び変異株による蓄積

有馬 啓, 深見悌一, 藤原光彦, 横田 勝, 田村学造 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 38 年 3 月 18 日 受 理

微生物がその生育に際して核酸関連物質を菌体外に分泌蓄積する現象に関しては、これまで多くの研究が行なわれている⁽¹⁾。これらの多くは微生物の核酸類の de novo の合成経路に genetic な block を受けた変異株を用いた研究、また生育途上において紫外線、X線等により損傷を受けた場合についての研究、薬剤を作用せしめた場合等についての研究であり、いずれも核酸合成系のなんらかの阻害による場合、生成した核酸類の分解による場合、またはこの両者による場合が考えられる。一方、樋口、植村^(2,3)は酵母の生菌の懸濁液を用いて、その緩衝液中へ RNA の 2'-あるいは 3'-の nucleotide の分泌蓄積が行われることを報じ、また岡林、増尾⁽⁴⁾は *Brevibacterium* 属の 1 菌株がグルコース及びガザミノ酸を主体とした培地で培養した場合、種々の 5'-nucleotide を放出蓄積することを報じている。われわれは多くの保存菌株及び微生物及び酵母の栄養要求変異株について、その生育の際に核酸関連物質を菌体外に分泌蓄積する現象について調べ、併せて蓄積に対する二、三の培養条件等も検討したので報告する。

材料及び方法

供試菌株：東大農学部醸造学教室保存の保存菌株のうちの 407 株 (微生物 217 株, 酵母 52 株, 放線菌 38 株, 細菌 100 株) 及び *Aspergillus oryzae* KB, *Asp. oryzae*, *Asp. nidulans* の栄養要求変異株 31 株及びその親株、並びに *Sacch. cerevisiae* の栄養要求変異株 9 株、及びその親株を核酸関連物質の菌体分泌蓄積に関する検討の対象とした。

培養：各蓄積用培地 10~15 ml を大型試験管に入れ綿栓、常法により殺菌したものに供試菌株の斜面より 1~2 白金耳を植菌し、30°で所定の時間振盪培養を行った。

試料の採取：培養を終えた菌液は東洋濾紙 No. 1 による濾過、あるいは 5,000 r. p. m., 10 分の遠心分離により菌体を分離、培養濾液を得た。

核酸関連物質の定量：培養液中に含まれる蓄積せられた核酸関連物質の定量には *E. coli* Pu (non-exacting purine auxotroph) 及び *E. coli* F₂ (arginine+non-exacting pyrimidine auxotroph) を用いてプリン及びピリミジンの定量を行った。

検定用培地としては Gray & Tatium の培地を改変したものを用いた (第 1 表)。

検定用試料 0.5 ml を検定用培地 4.5 ml の入った試験管に入れ、ついでその 0.5 ml を同じく 4.5 ml の検

第 1 表 *E. coli* 変異株によるバイオアッセイ用培地

NH ₄ Cl	5.0 g	* trace elements solution
NH ₄ NO ₃	1.0	sodium tetraborate 88mg
Na ₂ SO ₄	2.0	ammonium molybdate 37
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.1	ferric chloride 970
CaCl ₂	1 mg	zinc sulfate 800
K ₂ HPO ₄	3.0 g	cupric chloride 270
KH ₂ PO ₄	1.0	manganous chloride 72
*Trace elements sol.	1.0 ml	distilled H ₂ O で 1,000 ml とする。
Glucose	2.0 g	
distilled H ₂ O で 1,000 ml とする。		
(E. coli Pu の場合は上述の培地, E. coli F ₂ の場合はこれに L-アルギニンを 200 mg/l 加えた培地)		

定用培地で順次 3~4 段階に希釈したものを綿栓、常法により殺菌したものに検定菌 *E. coli* Pu あるいは *E. coli* F₂ の 20 時間前培養水洗した菌体の懸濁液を作り (菌の濃度大略 10⁵~10⁶/ml) 1~2 滴を植菌し、24 時間 30°で静置培養した。培養後の菌液は蒸留水を用い、適宜希釈、比濁計により生育度を測定し、一方 0~50 r/ml のプリン及びピリミジンの段階希釈培地における生育度を同様に測定した。*E. coli* Pu はアデ

* Accumulation of Nucleic Acid Derivatives by Microorganism. Part I. Studies for the Accumulation by Strains of Stock Cultures and Mutant Strains.

By Kei ARIMA, Teiichi FUKAMI, Mitsuhiro FUJIWARA, Masaru YOKOTA and Gakuzo TAMURA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, the University of Tokyo)

ニン, ヒポキサンチン, グアニン, キサンチン及びこれらの nucleoside 及び nucleotide のいずれかを補足した培地で *E. coli* F₂ はウラシル, シトシン及びこれらの nucleoside, nucleotide 及びオロチン酸のいずれかを補足した培地で生育するが, これらの各物質によりその生育量には差違がみられる一方, 試料中には種々のプリン類, 種々のピリミジン類が含まれていることが考えられるので正確な蓄積量の表現の取り扱いが困難であるが, γ/cc として表わした場合の生育量は各プリン類, 各ピリミジン類の間に大きな差がなかったので, アデニン及びウラシルによる生育量を対照に取り, プリン及びピリミジンの量を表わすこととした。

ペーパークロマトグラフィー: *E. coli* の変異株によるバイオアッセイの値の大なる試料については BuOH-NH₃-aq.⁽⁶⁾, iso-PrOH-HCl-aq.⁽⁷⁾ を溶媒とし, 東洋濾紙 No. 51 を用いてペーパークロマトグラフィーを行ない, 254 m μ フィルター付紫外線灯を用いて濾紙上の UV 吸収スポットを検出し, その R_F 値を調べることに より, またこのスポットを 1 N HCl を用いて溶出し, その紫外外部吸収曲線を調べることに より試料中に存在する物質を推定した。

実験及び結果

I. 各種保存菌株についての試験

1) 黴: 黴類の振盪培養培地としてはペプトン 0.5% を補足した Czapek-Dox 培地 (第 2 表) を用い, 前述の条件で 4 日間培養した後の培養濾液につきバイオアッセイを行って, プリン, ピリミジンの量を求めた結果を第 3 表に示した。

第 2 表 各種蓄積実験用培地組成

1) 黴類 (Czapek-Dox 改変培地)	2) 酵母 (Knopp 改変培地)
Sucrose 30 g	Glucose 100 g
NaNO ₃ 2 g	Ca(NO ₃) ₂ 1 g
K ₂ HPO ₄ 1 g	KCl 0.12 g
KCl 0.5 g	KH ₂ PO ₄ 0.25 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.5 g	MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.25 g
Polypeptone 5 g	Casamino acid 5.0 g
蒸溜水で 1 l とする (pH 7)	FeCl ₃ (1% sol.) 2 drops
	蒸溜水で 1 l とする (pH 6.8~7.0)
3) 放線菌 (Krainky 改変培地)	(Hayduck 改変培地)
Glucose 10 g	Sucrose 100 g
Asparagine 0.5 g	K ₂ HPO ₄ 1.0 g
K ₂ HPO ₄ 0.5 g	Asparagine 2.5 g
Peptone 5 g	MgSO ₄ ·7 H ₂ O 3.0 g
蒸溜水で 1 l とする (pH 7.4)	Polypeptone 2.5 g
	Yeast extract 2.5 g
	蒸溜水で 1 l とする (pH 6.8~7.0)

この結果を概観すると, 以上の条件では *Aspergillus*, *Penicillium* 属に核酸関連物質を比較的多量に蓄積する株が見られた (100 γ/cc 以上のプリンあるいはピリミジンを蓄積する株として *Asp. pulverentus* IAM 2170, *Asp. alliaceus*, *Asp. fonsecaeus* IAM 2045, *Asp. niger* IAM 2093, *Asp. luchuensis* IAM 2104, *Asp. japonicus*, *Pen. islandicum* の 1 株, *Pen. sp.* の 1 株) が, 1 方 *Rhizopus*, *Mucor*, *Monascus* 等の黴では顕著な蓄積が見られなかった。

2) 酵母: 酵母の振盪培養培地としては Knopp の改変培地 (第 2 表) を用い, 前述の条件で 3 日間振盪培養を行って, この培養濾液中に含まれる核酸関連物質の量をバイオアッセイにより定量した。またこれら酵母のうち一部を Hayduck の改変培地 (第 2 表) を用いて同様に 3 日間培養した試料についても調べた (第 4 表)。

以上の条件では黴類の場合に比し, その核酸関連物

第 3 表 黴類による purin 及び pyrimidine の蓄積

strains	purine γ/cc	pyrimidine γ/cc	strains	purine γ/cc	pyrimidine γ/cc
<i>Absidia</i>			<i>Aspergillus</i>		
<i>archidia</i>	50	0	<i>aureus</i> var. <i>acidus</i> IAM 2089	0	0
<i>cylindrospora</i>	20	0	<i>aureus</i> var. <i>acidus</i> IAM 2090	0	20
<i>ginsan</i>	30	0	<i>aureus</i> var. <i>brevis</i> IAM 2091	30	30
<i>glauca</i>	0	0	<i>aureus</i> var. <i>fuscus</i> IAM 2088	0	0
"	0	0	<i>awamori</i> var. <i>minimus</i>	10	30
<i>regnieri</i>	30	0	<i>awamori</i> var. <i>fuscus</i>	0	0
"	0	0	<i>awamori</i>	0	0
<i>Aspergillus</i>			<i>awamori</i> var. <i>piceus</i>	0	10
<i>alliaceus</i> IAM 2159	0	0	<i>awamori</i> var. <i>fumeus</i>	10	20
<i>alliaceus</i>	50	140	IAM 2101		
<i>amsterodami</i> IAM 2035	20	90	<i>awamori</i> var. <i>minor</i>	10	<10
<i>asperescens</i> IAM 2036	0	10	IAM 2102		
<i>aureus</i> IAM 2085	0	0			

strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc	strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc
<i>Aspergillus</i>			<i>Aspergillus</i>		
<i>awamori</i> var. <i>murinus</i> IAM 2103	0	10	<i>niger</i>	10	10
<i>awamori</i>	10	30	<i>niger</i> mut.	50	40
<i>batatae</i> IAM 2098	10	20	<i>niger</i> mut.	30	70
<i>candidus</i> IAM 2132	0	0	<i>niger</i> var.	20	0
<i>candidus</i>	0	0	<i>niger</i> var.	0	0
<i>candidus</i> IAM 2174	0	<10	<i>ochraceus</i> IAM 2135	0	40
<i>carbonarius</i> IAM 2099	0	40	<i>ochraceus</i>	0	20
<i>cellulosae</i> IAM 2154	0	20	<i>ochraceus</i>	0	<10
<i>cellulosae</i> IAM 2169	10	0	<i>oryzae</i>	0	0
<i>chevalieri</i> IAM 2039	0	20	<i>oryzae</i> IAM 2182	0	0
<i>cinnamomeus</i> IAM 2134	0	0	<i>ostianus</i> IAM 2139	0	<10
<i>cinnamomeus</i> IAM 2040	60	40	<i>parasiticus</i> IAM 2150	0	<10
<i>citrosporus</i>	0	0	<i>parasiticus</i> IAM 2151	0	90
<i>clavatus</i> IAM 2120	40	0	<i>parasiticus</i> IAM 2168	30	0
<i>clavatus</i> IAM 2157	0	20	<i>penicillospis</i>	0	0
<i>clavatus</i> IAM 2041	0	<10	<i>pseudoflavus</i> IAM 2147	0	<10
<i>fischeri</i> IAM 2127	20	40	<i>pseudoflavus</i> IAM 2148	0	40
<i>fischeri</i> IAM 2128	20	<10	<i>pulverulentus</i> IAM 2170	40	150
<i>fischeri</i> IAM 2042	0	80	<i>pulverulentus</i> IAM 2084	30	30
<i>fischeri</i> IAM 2043	0	10	<i>quadrilineatus</i> IAM 2048	0	20
<i>ficuum</i> IAM 2081	30	30	<i>repens</i> IAM 2123	0	20
<i>flairis</i>	0	80	<i>rugulosus</i> IAM 2052	40	0
<i>flavipes</i>	0	0	<i>schiemanni</i> IAM 2167	0	0
<i>flavus</i> IAM 2143	0	<10	sp.	0	40
<i>flavus</i> IAM 2144	0	0	sp.	0	<10
<i>flavus</i> IAM 2145	0	0	sp.	0	30
<i>flavus</i> IAM 2146	0	0	sp.	0	<10
<i>flavus</i> IAM 2044	20	0	sp.	0	0
<i>fonsecaeus</i> IAM 2045	60	130	sp.	10	0
<i>fumigatus</i> IAM 2129	20	10	sp.	0	30
<i>fumigatus</i> IAM 2176	40	20	sp.	0	<10
<i>fuscus</i> IAM 2131	20	90	sp.	0	0
<i>giganteus</i> IAM 2121	0	0	<i>sydowi</i> IAM 2078	0	<10
<i>glaucus</i> B	60	20	<i>tamaritii</i> IAM 2137	0	40
<i>glacus</i> IAM 2124	0	20	<i>tamaritii</i> IAM 2138	0	0
<i>glaucus</i>	0	0	<i>tamaritii</i>	0	0
<i>glaucus</i> var. X	20	40	<i>tamaritii</i> IAM 2173	0	0
<i>gymnosardae</i> IAM 2149	0	0	<i>tamaritii</i> IAM 2178	0	0
<i>insultus</i> IAM 2172	0	0	<i>terricola</i> var. <i>americana</i>	0	<10
<i>japonicus</i>	0	0	<i>terreus</i> IAM 2179	50	<10
<i>japonicus</i>	0	100	<i>terreus</i> IAM 2054	50	0
<i>luchuensis</i> IAM 2082	0	10	<i>ustus</i> IAM 2079	40	0
<i>luchuensis</i> IAM 2104	30	180	<i>versicolor</i> IAM 2080	30	0
<i>melleus</i> IAM 2064	0	0	<i>violaceus</i> IAM 2163	0	0
<i>minimus</i> IAM 2126	30	<10	<i>wentii</i> IAM 2133	0	<10
<i>miyakoensis</i> IAM 2092	0	0	<i>wentii</i> IAM 2162	0	0
<i>mollis</i> IAM 2122	30	0	<i>wentii</i> IAM 2180	40	50
<i>nidulans</i> IAM 2130	0	<10	<i>Monascus</i>		
<i>nidulans</i> IAM 2155	30	80	sp.	0	0
<i>nidulans</i>	0	70	sp.	0	0
<i>niger</i> IAM 2158	40	30	sp.	0	0
<i>niger</i> IAM 2093	40	100	sp.	0	0
<i>niger</i> IAM 2094	10	10	sp.	20	0
<i>niger</i>	10	20	sp.	0	0
<i>niger</i> IAM 3008	0	30	sp.	0	0
<i>niger</i>	10	10	sp.	0	20
<i>niger</i>	50	80	sp.	0	0
<i>niger</i>	0	0	<i>Monilia</i>		
<i>niger</i> IAM 2109	0	0	<i>formosa</i>	0	10
			sp.	0	0

strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc	strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc
<i>Mucor</i>			<i>Penicillium</i>		
<i>plumbeus</i>	0	0	sp.	<10	50
<i>pusillus</i>	0	0	"	10	50
<i>spinescens</i>	0	0	"	0	0
<i>Penicillium</i>			"	0	0
<i>chrysogenum</i>	0	<10	"	0	0
"	0	0	"	0	0
"	0	0	"	0	20
"	0	<10	"	10	30
"	10	20	"	0	10
"	0	20	"	20	80
"	0	<10	"	0	10
"	<10	30	"	10	30
"	0	0	"	0	20
"	0	10	"	20	100
<i>citrinum</i>	20	40	"	0	<10
"	<10	0	"	0	0
"	10	<10	"	0	20
<i>frequentas</i>	0	<10	"	0	10
<i>islandicum</i>	30	100	"	10	<10
"	0	20	"	0	10
"	<10	20	"	<10	<10
"	0	10	"	10	0
<i>notatum</i>	20	50	"	0	10
"	0	<10	"	0	10
"	<10	30	"	0	0
<i>purpurogenum</i>	<10	0	"	10	10
"	20	20	"	0	10
"	<10	0	"	0	0
"	0	10	<i>urticae</i>	<10	30
"	<10	0	"	<10	<10
"	10	10	<i>veruculosum</i>	<10	<10
<i>roqueforti</i>	0	<10	<i>Rhizopus</i>		
"	<10	10	<i>nigricans</i>	0	0
sp.	0	0	"	0	0
"	0	0	"	0	0
"	10	30	"	0	0
"	0	50	<i>javanicus</i>	0	0
"	10	50	sp.	0	0
"	0	0	"	0	0
"	10	80	"	0	0

第 4 表 酵母による purine 及び pyrimidine の蓄積

strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc	strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc
(Knopp 改変培地)			<i>Rhodotorula</i>		
<i>Candida utilis</i>	0	0	<i>marina</i>	0	<10
<i>Debaryomyces sake</i>	0	<10	<i>minuta</i>	<10	0
<i>Endomycopsis fibuliger</i> IAM 4113	0	<10	<i>pallida</i>	<10	<10
<i>Pichia</i>			<i>rubra</i>	0	<10
<i>membranaefaciens</i> IAM 4774	<10	<10	<i>texensis</i>	0	<10
<i>miso</i>	<10	0	<i>Saccharomyces</i>		
<i>Rhodotorula</i>			<i>cerevisiae</i> BrH 2-10	0	<10
<i>diffuens</i>	0	<10	" BY 2-1	<10	0
<i>gelatinosa</i>	<10	<10	<i>formensis</i> BrH 7-10	<10	<10
<i>glutinus</i>	0	<10	<i>fragilis</i> NRRL Y-610	<10	<10
<i>glutinus</i> var. <i>dairensis</i>	0	<10	<i>lactis</i> NRRL Y-1140	30	<10
<i>lactosa</i>	0	<10	<i>miso</i>	10	0
<i>laurentii</i>	<10	0	<i>rouxii</i>	<10	0
<i>luteolus</i>	<10	50	<i>sake</i> SH 4-6	<10	<10

strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc	strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc
<i>Saccharomyces</i>			<i>Willia</i>		
<i>sake</i> SH 4-7	0	20	sp. will-10	0	<10
<i>Schizosaccharomyces</i>			<i>Zygosaccharomyces</i>		
<i>miso</i>	0	<10	sp. ZS-1	20	<10
<i>octosporus</i> SHS 1-8	20	0	sp. ZS-2	10	<10
<i>Torula</i>			sp. ZS-3	0	<10
<i>lactis</i> LH-1	0	<10	sp. ZS-4	<10	0
<i>lactis</i> LH-6	0	<10	sp. ZS-5	<10	<10
<i>rubra</i> TH-6	0	<10	sp. ZS-6	0	<10
sp. TH-2	0	<10	sp. ZS-7	<10	10
<i>spora</i> TH-10	0	0	sp. ZS-8	<10	20
<i>utilis</i>	0	0	(Hayduck 改変培地)		
<i>Torulopsis</i> sp.	0	<10	<i>Saccharomyces</i>		
<i>Trigonopsis variabilis</i>	<10	<10	<i>cerevisiae</i> BrH 2-10	10	0
<i>Untergärige</i>			<i>formensis</i> BrH 7-10	140	0
Hefe BH 1-1	0	30	<i>sake</i> BH 4-6	0	0
O.C. No. 2	0	<10	" BH 4-7	10	0
<i>Willia</i>			<i>Torula lactis</i> LH-6	0	0
<i>anomala</i>	<10	0	<i>Willia</i>		
sp. will-2	0	0	sp. will-5	30	0
sp. will-5	10	20	sp. will-9	0	0
sp. will-7	0	<10	<i>Untergärige</i> Hefe	0	0
sp. will-9	0	<10	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. ZS-5	0	0

第 5 表 放線菌による purine 及び pyrimidine の蓄積

strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc	strains	purine r/cc	pyrimidine r/cc
<i>Streptomyces</i>			<i>Storeptomyces</i>		
<i>albikoensis</i>	30	<10	<i>hachijoensis</i>	40	<10
<i>albus</i>	30	70	<i>halstedii</i>		0
<i>allireticuli</i>	0	<10	<i>hygroscopicus</i>	100	10
<i>antibioticus</i>	<10	<10	<i>lavendulae</i>	0	<10
<i>arinamoensis</i>	10	<10	<i>mashuensis</i>	<10	<10
<i>aureofaciens</i>	<10	<10	<i>naganishii</i>	<10	<10
<i>bikiniensis</i>	40	<10	<i>nitropsis</i>	50	150
<i>bobiliae</i>	50	<10	<i>noboritoensis</i>	<10	<10
<i>californicus</i>	100	30	<i>rubescens</i>	<10	<10
<i>coelicolor</i>	20	10	<i>rutgersensis</i>	<10	<10
<i>ehimensis</i>	10	<10	<i>salmonicida</i>	0	<10
<i>erythreus</i>	80	<10	<i>scabies</i>	<10	<10
<i>fladiae</i>	10	<10	<i>shindenensis</i>	<10	<10
<i>flavovirens</i>	30	<10	<i>sulphrens</i>	110	20
<i>flavus</i>	160	80	<i>tanashiensis</i>	100	80
<i>griseocerneous</i>	60	70	<i>thioluteus</i>	20	<10
<i>griseochromogenus</i>	30	<10	<i>virginiae</i>	30	<10
<i>griseolus</i>		0	<i>viridochromogenus</i>	20	<10
<i>griseus</i>	<10	<10	<i>zaomyceticus</i>	<10	<10

質の蓄積量は一般に少ないこと, また培地の種類による蓄積量の変化は菌株により必ずしも一定していないことが判る。

3) 放線菌: 振盪培地としてはペプトン 0.5% を補足した Krainsky の培地 (第 2 表) を用い, 前述の条件で 4 日間培養を行った後の培養液について調べた結果を第 5 表に示す。その結果を見れば放線菌の場合, 核酸関連物質の蓄積量の多い株として *Strep. californicus*, *Strep. flavus*, *Strep. nitropsis*, *Strep. hygroscopicus*, *Strep. sulphrens* *Strep. tanashiensis* がプリンあるいはピリミジン 100 r/cc 以上の蓄積を示した。

4) 細菌: Nutrient broth を用いて細菌を 3 日間振盪培養した場合の蓄積量は, 第 6 表に示すようになった。この結果を見れば, 各種細菌の中でも比較的蓄積量の多い属, たとえば *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* 等と, 比較的蓄積量の少ない属, たとえば *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Sartina* 等に区別せられることが観察

第 6 表 細菌による purine 及び pyrimidine の蓄積

strains	purine γ/cc	pyrimidine γ/cc	strains	purine γ/cc	pyrimidine γ/cc
<i>Pseudomonas</i>			<i>Aerobacter</i>		
<i>schuylikilliensis</i> B-4-1	0	90	" B-171-4	0	0
" B-4-5	50	10	<i>cloacae</i>	20	0
"	40	10	"	10	0
<i>pavonacea</i> B-5-5	60	40	<i>Serratia</i>		
<i>riboflavinas</i> B-5-3	0	60	<i>marcescens</i> B-181-1	30	10
<i>aeruginosa</i> B-11-1	120	70	" B-181-2	10	10
" B-11-2	10	30	" B-181-3	50	50
" B-11-3	10	60	" B-181-4	100	80
<i>trifolii</i> B-21-1	0	0	" B-181-5	20	20
<i>xanthae</i> B-21-2	20	40	" B-181-6	40	30
<i>seguis</i> B-21-3	0	0	" B-181-7	30	10
<i>aureofaciens</i> B-1-1	30	50	" B-181-8	30	10
<i>crusiviae</i> B-1-2	0	60	<i>Ervinia carotovora</i> B-191-1	30	10
<i>dacunhae</i> B-1-3	0	50	<i>Proteus vulgaris</i> B-196-1	20	10
<i>Micrococcus</i>			<i>Vibrio</i>		
<i>caseolyticus</i> B-61-8	0	0	<i>metchnikovii</i> B-301-1	30	10
<i>lysodeikticus</i> B-61-9	0	0	<i>tyrogenes</i> B-301-2	30	20
<i>luteus</i> B-61-1	0	0	<i>Bacillus</i>		
<i>lysodeikticus</i> B-61-2	0	0	<i>cereus</i> B-204-1	30	20
<i>luteus</i> B-61-3	0	0	" B-204-2	70	50
"	0	0	" B-204-3	70	40
<i>varians</i> B-61-5	0	0	"	50	10
"	0	0	" B-204-6	20	30
<i>rubrus</i> B-61-7	0	0	" B-204-7	40	20
<i>varians</i> B-61-5	30	10	" B-204-8	50	40
<i>pilotonensis</i> B-10-7	30	10	<i>megatherium</i> B-204-10	0	0
<i>Flavobacterium</i>			<i>subtilis</i> B-201-1	40	10
<i>sewanense</i> B-121-1	0	0	" B-201-2	20	20
<i>lactis</i> B-121-2	0	0	" B-201-3	20	50
<i>arborescens</i> B-121-3	0	0	" B-201-4	0	0
<i>suareolens</i> B-121-4	0	0	" B-201-5	10	10
<i>fuscum</i> B-121-6	90	100	" B-201-6	0	0
<i>gasogenus</i> B-121-8	10	10	" B-201-7	20	30
<i>rigense</i> B-121-9	0	0	" B-201-8	20	10
<i>surfureum</i> B-121-10	50	30	" B-201-9	40	140
<i>Escherichia</i>			" B-201-10	20	10
<i>coli</i> B-151-1	0	10	<i>megatherium</i>	20	90
" B-151-2	10	10	"	10	0
" B-151-3	30	30	"	20	0
" B-151-4	20	20	"	0	0
" B-151-5	0	10	"	30	10
<i>Bacterium succinicum</i> B-161-1	0	0	<i>polymyxa</i> B-205-5	0	0
<i>Aeromonas</i>			<i>sphericus</i> B-205-8	0	20
<i>hydrophilus</i>	20	50	<i>pumilus</i> B-205-9	70	40
sp.	20	20	<i>brevis</i> B-206-1	40	40
<i>Sarcina</i>			<i>mycoides</i> B-206-2	20	0
<i>lutea</i> B-91-3	0	0	<i>circulans</i>	0	0
<i>aurantiaca</i> B-91-2	0	0	<i>firmus</i> B-206-6	0	20
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0	0	<i>macerans</i> B-206-8	0	0
"	0	0	<i>roseus</i> B-206-10	0	0
<i>Achromobacter</i>			<i>Corynebacterium</i>		
<i>cycloclastes</i> B-101-1	0	0	sp. B-271-1	40	10
<i>Aerobacter</i>			" B-271-2	10	0
<i>aerogenes</i> B-171-1	10	10	" B-271-3	0	10
" B-171-2	0	0	<i>Xanthomonas citri</i>	30	20
" B-171-3	0	0			

第 7 表 Mutant strain による purine 及び pyrimidine の蓄積

	purine 7/cc	pyrimidine 7/cc
<i>Asp. oryzae</i>		
KB (prototroph)	0	160
KB m-1 thiamine ⁻	0	60
KB m-3 threonine ⁻	0	340
KB s-1 adenine/hypoxanthine ⁻	0	70
KB s-2 pyridoxal/pyridoxine ⁻	0	340
KB s-4 arginine ⁻	0	130
KB s-5 lysin/histidine/glycine ⁻	0	70
KB s-6 lysine ⁻	0	340
KB s-6-1 lysine ⁻	0	50
KB f-2 lysine ⁻	0	20
KB f-3 threonine ⁻	0	30
KB f-6 tryptophan ⁻	0	130
KB h-3 adenine/hypoxanthine ⁻	0	50
KB h-4 adenine/hypoxanthine ⁻	0	60
KB k-3 arginine ⁻	0	170
KB k-4 arginine ⁻	0	370
KB c-1 methionine ⁻	0	60
<i>Asp. oryzae</i>		
51 (prototroph)	0	190
51 u-1 histidine ⁻	0	0
51 u-3 adenine/hypoxanthine ⁻	0	20
51 u-3-2 adenine/hypoxanthine ⁻	0	130
51 u-4 histidine ⁻	0	190
51 u-5 methionine ⁻	0	20
51 u-6 adenine/hypoxanthine ⁻	0	230
51 u-7 adenine/hypoxanthine ⁻	0	20
51 B-22 lysine ⁻	0	500
51 B-23 leucine ⁻	0	510
<i>Asp. nidulans</i>		
P (prototroph)	270	0
P ad adenine/hypoxanthine ⁻	100	20
P m-1 proline ⁻	60	0
P m-5 proline ⁻	70	0
P m-7 riboflavine ⁻	170	0
P u-1 adenine/hypoxanthine ⁻	80	0
P s-9 adenine ⁻	220	60
<i>Sacch. cerevisiae</i>		
P-20-21 (parent strain)	10	30
P-18-15	20	10
Q-17-42	40	50
P-8 A-18	50	0
P-10-42	60	20
P-9-41	50	10
N-13 A-34	40	20
P-13-58	70	20
M-25	70	20
F-13-10	40	20

された。そのうちプリンあるいはピリミジンを 100 7/cc 以上蓄積した株としては *Ps. aeruginosa* B-11-1, *Flavobacterium fuscum* B-121-6, *Serratia marcescens* B-181-4, *Bac. subtilis* B-201-9 が挙げられる。

II. 各種栄養要求変異株についての試験

次に *Aspergillus* 属菌 3 種, *Saccharomyces* 属酵母 1 種を親株とするアミノ酸, ビタミン, 核酸塩基等を要求する各栄養要求変異株についてその核酸関連物質の蓄積に関して調べた。*Aspergillus* 属菌の栄養要求変異株及び親株の振盪培地としてペプトン 2% を加えた Czapek-Dox 培地で 4 日間, また *Sacch. cerevisiae* の変異株及び親株の振盪培地として Burkholder の培地⁽⁸⁾の改変培地で 3 日間, 前述の如き条件で振盪培養を行ない, 前と同様な方法でその培養液中に含まれるプリン及びピリミジンの量を測定した。その結果は第 7 表に示される。

この条件で振盪培養した場合, 親株よりも各変異株の蓄積量は減少したものと増大したものが見られたが, *Aspergillus oryzae* 51-B-22 (ロイシン要求) *Asp. oryzae* 51-B-23 (リジン要求) が各々ピリミジンとして (ウラシルと推定される) 約 500 7/ml の蓄積量を与え, 親株の蓄積量に比し約 3 倍の増加を示した。また各変異株の要求する物質と蓄積量との間に相関関係は見出されなかった。

III. 蓄積物質のペーパークロマトグラフィ

以上の各種保存菌株及び各種変異株のうちバイオアッセイによる蓄積量の異なるものにつき (1) BuOH-NH₃-H₂O, (2) iso-propanol-HCl-H₂O によってペーパークロマトグラフィを行ない, その R_F 値より蓄積物質の推定を行った。

その結果プリンとして定量値の高かったものの多くからはヒポキサンチン [(1) の R_F=0.19, (2) の R_F=0.29], イノシン [(1) の R_F=0.08, (2) の R_F=0.30], アデニン [(1) の R_F=0.40,

(2) の R_F=0.32], キサンチン [(1) の R_F=0.01, (2) の R_F=0.21] 等の位置を示すスポットが見られ, またピリミジンとして定量値の大であった試料の多くからはウラシル [(1) の R_F=0.33, (2) の R_F=0.66] の位置を示すスポットが検出され, そのスポットを溶出して測定した紫外外部吸収曲線もこれと対応した結果を得たが, その他紫外外部吸収をもつスポットのうちには R_F 値よりみて不明のものも多かった。

IV. 培養条件に関する試験 次に *Aspergillus* 属菌 6 株, *Penicillium* 属菌 2 株について, 培養の条件により, その蓄積値はいかに変るかに関しての検討を行った。

1) 培養時間による変化: ペプトン 0.5% を補足した Czapek 培地で 30°, 8 日間振盪培養し, 2 日ごと

の蓄積量を前述の方法で測定して求めた結果を第 8 表に示す。この条件ではプリンとピリミジンとでは蓄積の最大値を与える日数が異なり (たとえば *Asp. fonsecaeus* のプリン類蓄積の最大は 6 日目で 170 r/cc であるが、ピリミジン類蓄積の最大は 4 日目で 160 r/cc) 培養日数による蓄積物の量的及び質的变化が考えられる。

2) ペプトン添加量の影響 : Czapek に補足するペプトンの量を 0% より 0.5%, 2.5%, 5% に変化せしめた培地で 30°, 4 日間培養し, その蓄積量の変化を調べた結果を第 9 表に示した。この条件下では 0.5~2.5% を補足した場合に最大値を示す株が多かった。すなわちプリン類の蓄積に関してはペプトン 0.5% の添加で *Pen. sp.* (80 r/cc), *Asp. fuscus* (90 r/cc), *Asp. niger* (160 r/cc) が, 2.5% の添加で *Pen. islandicum* (160 r/cc),

第 8 表 培養日数と蓄積量の関係

	purine					pyrimidine			
	2 days r/cc	4 days r/cc	6 days r/cc	8 days r/cc		2 days r/cc	4 days r/cc	6 days r/cc	8 days r/cc
<i>Pen. sp.</i>	20	30	60	70	<i>Pen. sp.</i>	100	160	10	20
<i>Pen. islandicum</i>	80	30	50	150	<i>Pen. islandicum</i>	10	170	20	40
<i>Asp. fonsecaeus</i>	20	50	170	130	<i>Asp. fonsecaeus</i>	30	160	20	<10
<i>Asp. pulverentus</i>	90	50	70	90	<i>Asp. pulverentus</i>	20	80	0	20
<i>Asp. alliaceus</i>	10	20	140	30	<i>Asp. alliaceus</i>	0	40	10	10
<i>Asp. luchuensis</i>	10	50	32	50	<i>Asp. luchuensis</i>	20	160	40	10
<i>Asp. japonicus</i>	0	30	60	70	<i>Asp. japonicus</i>	10	70	60	20

第 9 表 ペプトンの添加濃度の蓄積に及ぼす影響

	purine					pyrimidine			
	0% r/cc	0.5% r/cc	2.5% r/cc	5% r/cc		0% r/cc	0.5% r/cc	2.5% r/cc	5% r/cc
<i>Pen. sp.</i>	20	80	10	60	<i>Pen. sp.</i>	0	30	40	0
<i>Pen. islandicum</i>	70	110	160	110	<i>Pen. islandicum</i>	40	70	150	30
<i>Asp. fuscus</i>	0	90	40	0	<i>Asp. fuscus</i>	0	120	70	70
<i>Asp. pulverentus</i>	30	110	210	110	<i>Asp. pulverentus</i>	20	260	100	<10
<i>Asp. alliaceus</i>	<10	80	230	200	<i>Asp. alliaceus</i>	0	150	70	10
<i>Asp. niger</i>	0	160	0	0	<i>Asp. niger</i>	0	30	0	0
<i>Asp. luchuensis</i>	<10	0	140	100	<i>Asp. luchuensis</i>	0	0	130	80

第 10 表 K_2HPO_4 の添加濃度の蓄積に及ぼす影響

	purine					pyrimidine			
	0% r/cc	0.25% r/cc	0.5% r/cc	1.0% r/cc		0% r/cc	0.25% r/cc	0.5% r/cc	1.0% r/cc
<i>Pen. sp.</i>	0	10	0	0	<i>Pen. sp.</i>	<10	20	0	0
<i>Pen. islandicum</i>	0	0	30	0	<i>Pen. islandicum</i>	<10	20	30	0
<i>Asp. fuscus</i>	<10	0	0	0	<i>Asp. fuscus</i>	<10	0	0	0
<i>Asp. fonsecaeus</i>	0	0	0	<10	<i>Asp. fonsecaeus</i>	<10	<10	10	0
<i>Asp. pulverentus</i>	0	<10	10	0	<i>Asp. pulverentus</i>	30	40	10	0
<i>Asp. alliaceus</i>	0	<10	0	<10	<i>Asp. alliaceus</i>	<10	30	0	0
<i>Asp. niger</i>	<10	0	<10	0	<i>Asp. niger</i>	30	30	20	0
<i>Asp. luchuensis</i>	0	10	0	0	<i>Asp. luchuensis</i>	<10	20	<10	0

第 11 表 $NaNO_3$ の添加濃度の蓄積に及ぼす影響

	purine				pyrimidine		
	0% r/cc	1.0% r/cc	5.0% r/cc		0% r/cc	1.0% r/cc	5.0% r/cc
<i>Pen. sp.</i>	20	70	60	<i>Pen. sp.</i>	0	40	<10
<i>Pen. islandicum</i>	70	30	40	<i>Pen. islandicum</i>	30	20	<10
<i>Asp. fuscus</i>	0	0	0	<i>Asp. fuscus</i>	0	<10	0
<i>Asp. fonsecaeus</i>	0	0	<10	<i>Asp. fonsecaeus</i>	0	<10	<10
<i>Asp. pulverentus</i>	30	20	30	<i>Asp. pulverentus</i>	20	40	0
<i>Asp. alliaceus</i>	<10	0	<10	<i>Asp. alliaceus</i>	0	10	0
<i>Asp. niger</i>	0	0	0	<i>Asp. niger</i>	0	<10	0
<i>Asp. luchuensis</i>	<10	0	<10	<i>Asp. luchuensis</i>	0	<10	<10

第 12 表 細菌における有機態窒素添加の蓄積に及ぼす影響
培養: 30°, 3 日振盪培養

strain added substance*	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Serratia marcescens</i>		<i>Flavobacterium fuscum</i>	
	purine r/cc	pyrimidine r/cc	purine r/cc	pyrimidine r/cc	purine r/cc	pyrimidine r/cc
Casamino acid	20	10	110	40	140	40
Aspartic acid	20	10	100	90	50	30
Glutamic acid	20	20	80	60	20	20
Glycine	30	20	70	50	20	10
Asparagine	20	10	90	80	230	120
Ammonium tartarate	20	10	90	50	30	20
Ammonium lactate	20	10	50	80	70	30
Arginine	20	10	80	40	30	60
Histidine	20	10	60	80	30	20
Urea	20	10	80	120	40	20
Glutamine	20	10	50	120	30	30

* 0.5% of each substance was added to the following basal medium.

basal medium:

Glucose	20 g	Thiamine HCl	200 r/ml
Casamino acid	5	Pyridoxine HCl	200
K ₂ HPO ₄	3.5	p-aminobenzoic acid	50
KH ₂ PO ₄	1.5	Nicotinic acid	200
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1	Ca-pantothenate	200
Trace elements sol.	1 ml/l	Biotin	2
(第 1 表)		Distilled water	1,000 ml
		(pH 7.0)	

Asp. pulverentus (210 r/cc), *Asp. alliaceus* (230 r/cc), *Asp. luchuensis* (140 r/cc) が各々最大値を与え, またピリミジン類の蓄積についてはペプトン 0.5% の添加で *Asp. fuscus* (120 r/cc), *Asp. pulverentus* (260 r/cc), *Asp. alliaceus* (150 r/cc), *Asp. niger* (30 r/cc) が, また 2.5% 添加で *Pen. sp.* (40 r/cc), *Pen. islandicum* (150 r/cc), *Asp. luchuensis* (130 r/cc) が各々最大値を示した。

3) K₂HPO₄ の添加量による影響: Czapek 培地中の K₂HPO₄ の量を 0.1% から 0.35%, 0.6%, 1.0% と増量させた培地で同様に 4 日間の培養を行い, 第 10 表に示す如き結果を得たが, これらの菌株では顕著な影響は見られなかった。

4) NaNO₃ の添加量による影響: Czapek 培地中の NaNO₃ の量を 0.2% から 1.2%, 5.2% に増量させた培地で同様に 4 日間の培養を行い, 第 11 表のごとき結果を得たが, これらの菌株では顕著な影響は見られなかった。

次に細菌の保存菌株のうち, 前述の蓄積試験で蓄積量の大きであった 3 株, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Flavobacterium fuscum* につき, その基礎培地 (第 12 表) に添加する有機態窒素の蓄積に対する影響を調べた結果を第 12 表に示した。これを見ると *Serratia marcescens* 及び *Flavobacterium fuscum* の場合にはアスパラギン酸の如きアミノ酸やグルタミン, アスパラギンの如き酸アミドや尿素の添加がカザミノ酸添加と同程度の蓄積増大に対して影響のあることがわかる。

考 察

(1) 以上のごとく, 各種保存菌株及び各種変異株を各々の蓄積用振盪培地で振盪培養し, その培養液を調べた結果, プリン類及びピリミジン類が蓄積することを述べた。これらの株がなぜこのように核酸関連物質を菌体外に分泌するかについての理由は明らかでないが, その蓄積量の大きなものを考えた場合, その値が菌体内の核酸量に比して著しく多量であること (約 10~50 倍と概算される), またその分泌蓄積せられた物質の種類が多くの場合 RNA を構成する 4 種の塩基成分よりも種類が少ないこと等から考えて, これらの菌の単なる自己消化に基因するものではないと考えられる。

(2) 変異株のうちには, 親株に比しその核酸関連物質蓄積量の大きな株と小さな株とが見られたが, 変異株による蓄積量の最大値は親株の値の約 3 倍に達していることから, ある株の蓄積量を増大させるためには, 変異株を作る方法が一つの有効な方法であると考えられる。

第1図 Strain 442 菌の培養濾液の Dowex-Resin クロマトグラフィー
 Exchanger: Dowex-1-X 4 formate 200~400 メッシュ, 22 cm×0.9 cm²
 Elution: (a) 1N formic acid (b) 4N formic acid
 試料: 0.5% ペプトン添加 Gray & Tatum 培地 (グルコース 1%) で3日間 30° 振盪培養後の培養濾液

が、このような分泌を示す菌は割合少なかった (このような菌の1株, No. 422 の蓄積物質の分画結果を第1図に示す)。

塩基等の形で核酸関連物質が分泌されてくることは、これらの菌が前述の如き培養条件の下に分泌されてくる部分の核酸関連物質の合成が塩基あるいはヌクレオシドの形成までしか行われなかったものとも考えることもできるが、前述の如き正常の発育条件下でヌクレオチドを主として分泌する菌も存在することから考えれば、*de novo* の核酸類合成系によりヌクレオチドができたところで、あるいは一旦 RNA 中に組み入れられた後分解されて再びヌクレオチドになったところで、さらに分解酵素系により分解されて、塩基あるいはヌクレオシドとなって菌外に分泌されるものと考えられる。従ってもし分解酵素系によるこの分解を防ぐ条件を見出すことができ、あるいは細胞膜の透過性をなんらかの方法で変えて菌体外に分解酵素の作用する前に分泌させることができるならば、分泌せられている塩基あるいはヌクレオシド類をヌクレオチドの形で菌体外に分泌蓄積せしめることができるであろう。

(4) 培養条件の検討の例からも推察されるように、同一の菌であっても種々の培養条件によって、量的及び質的に異った蓄積を示すことが想像せられる。

要 約

(1) 各種保存菌株約 400 株及び黴及び酵母の栄養要求変異株約 40 株について、その生育中に培地中へ分泌蓄積する核酸関連物質の蓄積量を *E. coli* の変異株を用いて調べた。

(2) 保存菌株に関しては、各菌によりその蓄積量は異なり、蓄積量によって各種属を分類することは困難であった。調べられた条件下で比較的大きな蓄積値 (プリンあるいはピリミジンとして) 100 γ/cc 以上を示した菌株としては、黴では *Asp. pulverentus* IAM 2170, *Asp. alliaceus*, *Asp. fonsecaeus* IAM 2045, *Asp. niger* IAM 2093, *Asp. luchuensis* IAM 2104, *Asp. japonicus*, *Pen. sp.* の1株, *Pen. islandicum* の1株, 酵母では *Sacch. formensis*, 放線菌では *Strep. californicus*, *Strep. flavus*, *Strep. nitropsis*, *Strep. hygrosopicus*, *Strep. sulphurens*, *Strep. tanashiensis*, 細菌では *Ps. aeruginosa* B-11-2, *Flavobact. fuscum* B-121-6, *Serratia marcescens* B-181-4, *Bac. subtilis* B-201-9 であった。

(3) 変異株中では *Asp. oryzae* 51 B-22 (ロイシン要求), *Asp. oryzae* 51 B-23 (リジン要求) が最も高い蓄積値を示した (ピリミジンとして 500 γ/cc, 510 γ/cc)。これは親株の蓄積値の約3倍であった。

(4) *Aspergillus* 属黴6種, *Penicillium* 属黴2種, 細菌3種について核酸関連物質蓄積に関しての培地及び培養条件を調べたが、調べた条件のうち、添加ペプトンの量、二、三のアミノ酸、酸アミド等の添加、及び培

(3) 得られたバイオアッセイの結果から比較的蓄積量の大きな試料につきペーパークロマトグラフィーを行ってその中に含まれている核酸関連物質を調べたが、その多くはヒポキサンチン、ウラシルの如き核酸塩基類であった。またわれわれはヌクレオチドを大量に蓄積する菌を探索することを目的として、岡林、増尾の報告した方法⁽⁴⁾及び寒天培地上のコロニーを打抜き寒天中に分泌せられた紫外部吸収物質を濾紙上で調べる方法等により土壌中の微生物 2,000 株以上を調べた結果、100 γ/ml 以上のヌクレオチドを主体として蓄積する菌、数株を見出した

養日数が蓄積量に影響のある結果を得た。

終りに *E. coli* 変異株を御分譲いただいた東大薬学部水野伝一教授, 及び *Asp. oryzae* の変異株を御分譲いただいた東大応微研池田庸之助教授に厚く御礼申し上げます。また本研究に対し終始御協力をいただいた飯田俊男氏に対し心から感謝いたします。

-
(1) 岡林 直 : Microbioassay 集談会誌, 3 , 1 (1961).	(5) 岡林 直, 増尾栄太郎 : 昭和 36 年度日本農芸化学会大会「核酸及び核酸関連物質」シンポジウム, p. 13.
(2) 樋口昌孝, 植村定治郎 : 本誌, 33 , 304, 821 826 (1959).	(6) W. S. McNutt : <i>Biochem. J.</i> , 50 , 384 (1952).
(3) M. Higuchi, T. Uemura : <i>Nature</i> , 184 , 1381 (1959).	(7) G. R. Wyatt : <i>ibid.</i> , 48 , 584 (1951).
(4) T. Okabayashi, E. Masuo : <i>Chem. Pharmacol. Bull.</i> , 8 , 1084, 1089 (1960).	(8) P. R. Burkholder, D. Moyer : <i>Bull. Torrey Botan. Club.</i> , 70 , 372 (1943).
-