Lactobacillus arabinosus 17-5 と *Streptococcus faecalis* R の栄養共生に関する研究 (第 2 報)

Streptococcus faecalis R の生成するフェニルアラニン様 活性物質 (Factor-P) について

佐橋佳郎, 北原覚雄*

(三共株式会社生産技術研究所, *東京農業大学農芸化学科)

昭和 45 年 11 月 25 日 受理

Studies on the Syntrophism of *Lactobacillus arabinosus* 17-5 and *Streptococcus faecalis* R

Part II. Formation of Factor-P by *Sc. faecalis* R and Some Properties of the Factor

By Yoshio SAHASHI and Kakuo KITAHARA*

Product Development Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Tokyo; *Department
of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture

In the syntrophic culture of *L. arabinosus* 17-5 (ATCC 8014) and *Sc. faecalis* R (ATCC 8043), it has been observed that these bacteria produced factors active for each other. A factor showing an activity as phenylalanine (Factor-P) for *L. arabinosus* was extracted at pH 2.0 with ethylacetate from the culture broth of *Sc. faecalis* grown in the synthetic medium which lacks phenylalanine. The factor can be utilized as well as phenylalanine by phenylalanine-requiring *L. arabinosus*, *L. fermenti* 36 (ATCC 9338) and *L. casei* ε (ATCC 7469), but not by *Leuconostoc mesenteroides* P-60 (ATCC 8042; *Pediococcus acidilactici*). It was confirmed that the Factor-P was not the following biochemical compounds: phenylalanine, phenylpyruvic acid, shikimic acid or cinnamic acid and some substance having peptidic structure. The factor may be one of the intermediary compounds related to the biosynthesis of phenylalanine.

It is noteworthy that, among the strains for microbiological assay of "phenylalanine," only *Leuc.* P-60 is suitable for determination of phenylalanine itself.

(Received November 25, 1970)

緒 言

葉酸の微生物定量をはじめ多くのアミノ酸、ビタミン類の定量に活用される *Streptococcus faecalis* R (以下 *Sc. faecalis* と略す) が *Lactobacillus arabinosus* 17-5 (以下 *L. arabinosus* と略す) との間に栄養共生を行なうとき、互いに相手菌の生育に必要な活性物質を菌体外に生成していることは前報にて報告した⁽¹⁾。これらの物

質について Krieg らは若干の検討、考察を行なっているが⁽²⁾、明瞭な結論は得ていない。

Sc. faecalis の生産するフェニルアラニン様活性物質については、本物質がフェニルアラニン欠培地において比較的短時間のうちに生成され熱に対しても安定なことをわれわれは明らかにしている。本報ではこのフェニルアラニン様活性物質の抽出法を検討するとともに、その性質の一部を明らかにすることができたので報告する。

実 験 方 法

1. フェニルアラニン活性物質の蓄積培養 前報⁽¹⁾
の培地Ⅱの組成で、アミノ酸はフェニルアラニン以外の
17 種類をそれぞれ所定の濃度に配合したものを用い、こ
れに *Sc. faecalis* の約 20 時間培養洗浄菌体を接種し
た。培養は 37°C で約 72 時間行ない、培養後遠心分離
またはザイツ濾過によって培養濾液を得た。

2. フェニルアラニン活性の測定 *L. arabinosus*,
L. fermenti 36, *L. casei* ε, *Leuc. P-60* (*Pediococcus*
acidilactici)⁽³⁾ に対するフェニルアラニン活性は、培地
Ⅰからフェニルアラニンを除外したいわゆるフェニルア
ラニン定量用基礎培地を用い、1 で得た *Sc. faecalis* の
培養濾液あるいはその他の試料を適宜希釈して添加し、
以下微生物定量法の常法⁽⁴⁾にしたがって操作し 72 時間

培養したのち、生成した乳酸をアルカリ滴定によって測
定し、フェニルアラニン活性を算出した。

3. バイオオートグラフ法

濾 紙: 東洋濾紙 No. 52, 幅 20mm, 長さ 400mm

展開剤: n-ブタノール・酢酸・水 (4:1:2)

上昇法, 展開距離 約 30cm

抽 出: 風乾後の濾紙を 15 等分してそれぞれ細切し、
水を加えて加温抽出した。

測 定: *L. arabinosus* によるフェニルアラニン活性
の測定

実験結果および考察

1. *Sc. faecalis* の生成するフェニルアラニン様活
性物質の各種乳酸菌に対する生育促進効果
すでに報告⁽¹⁾ したとおり *Sc. faecalis* の生成するフ

第 1 図 フェニルアラニン様活性物質の各種乳酸菌に対する活性

●—● L-フェニルアラニン標準品添加
×---× *Sc. faecalis* R 培養濾液添加
△---△ *L. arabinosus* 17-5 + *Sc. faecalis* R 混合培養濾液添加

フェニルアラニン様物質が本菌と栄養共生を行なう *L. arabinosus* に対して活性を有することは明らかであるが、そのほかフェニルアラニン要求性をもつ *L. fermenti* 36, *L. casei* e および *Leuc. P-60* に対しても同様の効果をもつか否かを検討した結果は、第1図①～④のとおりである。

図にみられるように、*L. fermenti* 36 および *L. casei* e に対してこの物質はいずれも *L. arabinosus* におけると同様かつ同程度の活性を示しているが、*Leuc. P-60* には全く活性を示さない。

Leuc. P-60 を *Sc. faecalis* とともにフェニルアラニン、葉酸の両者を欠く培地で混合培養したときには、第2図にみられるようにほとんど生育せず栄養共生を認めることはできないが、その原因として *Sc. faecalis* の生成するこの物質が、本菌株に対してフェニルアラニン活性を持たないことによるものと考えられる。

以上の事実から、本物質はフェニルアラニンそのものではないと考えざるを得ない。また天然物等のフェニルアラニンを定量する際には、フェニルアラニン以外の物質の影響をなくするために、定量菌として *Leuc. P-60* を用いる必要があることを示唆するものである。

なお本実験では、*Sc. faecalis* の単独培養濾液のほか *L. arabinosus* と *Sc. faecalis* の栄養共生培養を行なった濾液中のフェニルアラニン活性を測定し、第1図にそれぞれあわせて示したが、これにはほとんど活性を認めなかった。このことは *Sc. faecalis* の生成したフェニルアラニン活性物質を *L. arabinosus* がすでに消費して

第2図 フェニルアラニンおよび葉酸欠培地における *Leuc. P-60* および *Sc. faecalis* R の生育曲線

●—● *Leuc. P-60* + *Sc. faecalis* R
 ▲---▲ *Leuc. P-60* および *Sc. faecalis* R
 ○····○ それぞれ単独培養

第3図 Factor-P のバイオオートグラフィー
 展開剤: n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2)
 測定菌: *L. arabinosus* 17-5

しまったことを意味するものと考えられる。

2. フェニルアラニン様活性物質のバイオオートグラフィー

Sc. faecalis がフェニルアラニンを欠く培地で生成するフェニルアラニン様活性物質 (以下 Factor-P とよぶ) の本態を知るため、ペーパークロマトグラフ展開後バイオオートグラフィーを行なった。

本実験では活性物質のほか、フェニルアラニンおよびフェニルアラニンの生合成に関連ある物質の1つとして shikimic acid を併列して展開し、活性の測定を行なった。

第3図のように Factor-P の R_f 値は 0.90 であるのに対し、フェニルアラニンは 0.77, shikimic acid は 0.57 でいずれも異なる物質である。

第 1 表 各種条件による活性物質の抽出

	pH 2.0			pH 9.0		
	n-ブ タ ノール	酢 酸 エ チ ル	ベン ゼ ン	n-ブ タ ノール	酢 酸 エ チ ル	ベン ゼ ン
溶 媒 層 (全活性)	1.2 mg	1.2 mg	0.05 mg	0.4 mg	0 mg	0 mg
抽出後濾液層 (1ml 当りの残留活性)	1 μ g	1 μ g	11 μ g	12 μ g	12 μ g	12 μ g

はじめの全活性 1.2 mg (培養液中 1ml 当り 12 μ g) (数値は L-フェニルアラニン換算値)

3. フェニルアラニン様活性物質 (Factor-P) の抽出法

Sc. faecalis をフェニルアラニン欠培地に 72 時間培養したのち、ザイツ濾過器を用いて菌体を除き、得られた濾液を pH 2.0 および 9.0 に調節し、n-ブタノール、酢酸エチルおよびベンゼンによる抽出を検討した結果は、第 1 表に示すように酸性側において n-ブタノール、酢酸エチルによく転溶してくる。しかし n-ブタノールには活性物質以外に他の多くの培地成分が混入してくる傾向があるため、本物質の抽出法としては pH 2.0 で酢酸エチルを用いる方法が最も適するものと判定した。

以上の結果をもとにフェニルアラニン様活性物質の抽出には、第 4 図に示す方法を用いることにした。数回の実験結果は、いずれも Factor-P の抽出率 75% 以上でほぼ満足すべき数値であった。

4. Factor-P に関する二、三の検討

Factor-P は前述のようにバイオオートグラフィーにより、フェニルアラニンおよびその生合成に関連があるとされている shikimic acid のいずれとも異なることを明らかにした。さらに本物質の本態を確認する目的をもって、フェニルアラニンの生合成に関係あると考えられている諸物質と一致するかな否かを中心に以下二、三の実験を行なった。

4-1. 乳酸菌によるフェニルアラニン、チロシン生合成と Factor-P との関係：微生物における芳香族アミノ酸の生合成経路は Davis 一派による *Escherichia coli* の変異株を用いた巧妙な研究^(5,6) および *Neurospora* や *Aerobacter* による Gilvary⁽⁷⁾ や Meister⁽⁸⁾ の研究でその大筋は一応明らかにされている。そのうち特にフェニルアラニン、チロシンの生合成系はグルコースを出発点として途中 dehydroquinic acid, shikimic acid などを経て prephenic acid に至り、ここで分かれて一方は phenylpyruvic acid よりフェニルアラニンへ、また他は hydroxyphenyl-pyruvic acid を経てチロシンへとその系は続いている⁽⁹⁾。

しかし乳酸菌については、この生合成系を研究した報告はいまだみられないので、その様相を知るため shikimic acid, phenylpyruvic acid, cinnamic acid および Factor-P を中心にそのフェニルアラニン活性ならびにチロシン活性を検討した。実験に使用した乳酸菌は *L. arabinosus*, *L. fermenti* 36, *L. casei* ϵ および *Leuc.* P-60 の 4 株で、いずれもフェニルアラニンおよびチロシン両者を生育必須因子として要求する株である。

本実験の結果、*L. arabinosus* および *L. fermenti* 36 においてはいずれもフェニルアラニン欠、チロシン欠培地に shikimic acid を添加すると菌の生育が認められることから、shikimic acid はフェニルアラニン、チロシン両者との代替性を有している。もしこの 2 菌株が一般にいわれる生合成経路を持っていると仮定するなら

第 4 図 *Sc. faecalis* R の生成する Factor-P の抽出方法

第2表 各種乳酸菌に対するフェニルアラニン生合成関連物質の示す活性の比較

物質名 活性名 菌株名	Shikimic acid		Factor-P		Phenylpyruvate	Phenylalanine	Cinnamate
	フェニルアラニン活性	チロシン活性	フェニルアラニン活性	チロシン活性	フェニルアラニン活性	フェニルアラニン活性	フェニルアラニン活性
<i>L. arabinosus</i> 17-5	+	+	+	—	+	+	—
<i>L. fermenti</i> 36	+	+	+	—	+	+	/
<i>L. casei</i> ε	—	—	+	—	±	+	/
<i>Leuc.</i> P-60	—	—	—	—	±	+	—

ば, shikimic acid から prephenic acid を経てフェニルアラニンならびにチロシンへの生合成系を有している根拠となる。しかし, 他の2菌すなわち, *L. casei* と *Leuc.* P-60 は shikimic acid を全く利用し得ないことから前2菌とは生合成系を異にしているか, あるいは生合成系の一部を欠いているものと推定される。

また Factor-P は *L. arabinosus* および *L. fermenti* 36 に対してはフェニルアラニン活性を有しているが, チロシン活性は全く示さず, *L. casei* ε に対しても同様の活性を示している。一方 *Leuc.* P-60 に対してはフェニルアラニン, チロシン両活性とも認められない。

これらの事実から考察すると, Factor-P は一般の生合成経路において shikimic acid から prephenic acid までの間にある中間生成物ではなく, またチロシンへの生合成系に存在する物質でもないことは明らかである。したがって prephenic acid からフェニルアラニンまでの間にある物質と推定される。

一方, prephenic acid は Metzenberg らにより, *Neurospora* の培養によって得られているが非常に不安定な物質とされている⁽¹⁰⁾。またこの prephenic acid からフェニルアラニンまでの間で現在までに確認されている物質は, phenylpyruvate のみである⁽⁹⁾。しかるに第2表にみられるように本実験の結果では phenylpyruvate は *L. arabinosus*, *L. fermenti* のいずれの菌株も利用することができるが, この物質はかなり不安定で, 微生物定量の定法により, 115°C, 5分間滅菌するとき強い分解を受ける。この点からみて, 前述のように熱に対して安定な Factor-P は phenylpyruvate と性質を異にしていると考えなければならない。

また植物等において, フェニルアラニンの代謝産物の1つとみられる cinnamic acid にも活性がみられない。乳酸菌のフェニルアラニン要求性とその分解経路中にある物質で代替されるか否か, 種々検討を要すると思われる。

第5図 乳酸菌によるフェニルアラニン, チロシン生合成経路——部分的推定と Factor-P の関係

るが, 少なくとも cinnamic acid にはこのような活性がなく, Factor-P がこの物質とも異なることは明らかである。

以上4種の乳酸菌を用いて, それらのフェニルアラニンおよびチロシンの生合成, 代謝に関連ある物質と Factor-P の関係を検討したが, その結果から各菌のもつ生合成経路を推定してみると第5図のようになる。

4-2. *L. arabinosus* による phenylpyruvate からフェニルアラニンの生成と Factor-P との関係: 前述のように従来知られているフェニルアラニン生合成経路から推定したとき, Factor-P に最も近いと考えられる物質は, 安定性こそ異なるが phenylpyruvate である。

第 6 図 *L. arabinosus* 17-5 菌体懸濁液による phenylpyruvate および Factor-P からフェニルアラニンの生成

そこで *L. arabinosus* の洗浄菌体懸濁液を用いて phenylpyruvate および Factor-P からフェニルアラニンの生成が行なわれるか否かを改めて検討した。

実験方法は第 6 図にみる順序により、まず *L. arabinosus* の約 15 時間培養菌体を取り、phenylpyruvate あるいは Factor-P とグルタミン酸との間に pyridoxal-phosphate を coenzyme としてフェニルアラニンへの transamination が行なわれ得る条件のもとで、37°C において incubation を行なった。一定時間後除蛋白処理によって菌体と蛋白を除き、上澄液中に存在するフェニルアラニンを Leuc. P-60 により定量した結果は第 3 表のようになっている。

このように phenylpyruvate を基質としたとき、*L. arabinosus* はフェニルアラニンを生成するが、Factor-P

第 3 表 生成したフェニルアラニン (µg/ml)

反応時間	基質	Phenylpyruvate	Factor-P	Control (菌体のみ)
0 分		0	0	0
30		40	0	0
60		60	0	0
120		68	0	0

を基質としたときは全くフェニルアラニンの生成を認めることができない。このことから Factor-P は phenylpyruvate と異なる物質と考えなければならない。

4-3. *L. arabinosus* における Factor-P より菌体フェニルアラニンの生成：培養によって菌が生育したとき、その菌体蛋白質の中にはフェニルアラニンも構成アミノ酸の 1 つとして存在するはずである。そこで Factor-P から菌体フェニルアラニンが生成していることを確かめるため合成培地を用いて検討を行なった。

L. arabinosus の培地として、(1) 培地 I の組成すなわちフェニルアラニンを用いた完全合成培地、(2) 同じ組成でフェニルアラニンの代わりに Factor-P を用いた培地、(3) 培地 I のシスチン、トリプトファン以外のアミノ酸を除きカザミノ酸で置き換えたもの、および (4) ペプトン、酵母エキス、ブドウ糖からなる普通乳酸菌培地の 4 種類を用い、生育した菌体中のフェニルアラニン量を Leuc. P-60 を定量薬として測定した。

菌体の処理方法は第 7 図の順序に従い、各培地で 72 時間培養して得られた菌体を遠心分離により集め、生理食塩水で洗浄して培地および付着したアミノ酸類その他を除去したのち、封管中で加圧下約 6N 塩酸で加水分解して定量に供した。

各培養条件ごとにそれぞれ定量した菌体蛋白中のフェニルアラニン量は第 4 表のとおりである。

すなわち、フェニルアラニン添加培養においては、全培養量 (200 ml) より得られた菌体中のフェニルアラニン量は 4.2 mg で、添加した量の 80% 以上が菌体に取り込まれているのが認められた。

また Factor-P を加えて培養した全菌体中には 6.6 mg のフェニルアラニンが定量された。本実験では培地中に Factor-P 以外はフェニルアラニンの生合成に関連する物質が全く加えられていないにもかかわらず、フェニルアラニンなどを添加したときと同様にフェニルアラニンが菌体中に認められる。このことは Factor-P がフェニルアラニン生合成の過程に存在する物質で、本物質からフェニルアラニンがつくられたことを示唆するのである。

ただ添加した Factor-P はフェニルアラニンに換算し

て約5.4mgを培地200mlに加えたが、その量に比べ菌体中から定量されたフェニルアラニンの量はやや多く、単にFactor-Pをフェニルアラニンとして換算することに問題が残るのではないと思われる。

一方、カザミノ酸あるいは普通乳酸菌用培地で培養した菌体からは、約8mg強のフェニルアラニンが定量された。この量は他の2実験に比べて絶対量としては特に大きな開きとは考えられず、いずれの実験においても得られた菌体蛋白の構成フェニルアラニン量としては、その比率に大差はないものと思われる。

4-4. 塩酸加水分解によるFactor-Pの活性の変化：

第5表 塩酸加水分解によるFactor-Pのフェニルアラニン活性の変化

試験菌名	対 照 L-フェニル アラニン	Factor-P	
		加 水 分解前	6N塩酸加水 分解処理後
<i>L. arabinosus</i>	+	+	+
<i>Leuc. P-60</i>	+	—	—

Factor-Pは*L. arabinosus*等に対してはフェニルアラニン活性を示すが、*Leuc. P-60*のみにはほとんどフェニルアラニン活性がない(第1図および第2表)。一般にアミノ酸の微生物定量に用いられる乳酸菌の中で*Leuc. P-60*はペプチドその他の因子の影響を最もうけにくい菌株といわれる。しかし、ペプチド物質の可能性も全くないとはいわれないため抽出、濃縮によって得られたペースト状のFactor-Pを封管中において6N塩酸で120°C、約7時間加水分解した後pHを修正して*L. arabinosus*と*Leuc. P-60*によるフェニルアラニン活性の測定を行なった。

*L. arabinosus*に対してFactor-Pは加水分解後も活性の変化はほとんどなく、かえってやや上昇の傾向がみられる。これに反し、*Leuc. P-60*は加水分解の前後において活性に変化はない。もしFactor-Pがペプチド性の物質であれば加水分解後*Leuc. P-60*に活性を示してくるはずであるが、本実験の結果この想定は否定された。したがってFactor-Pはフェニルアラニンを含むペプチドとは考えられない。

要 約

L. arabinosus 17-5 (ATCC No. 8014)と*Sc. faecalis* R (ATCC No. 8043)の間で認められる栄養共生現象の機構の一部を明らかにするため、*Sc. faecalis*の生成するフェニルアラニン様活性物質(Factor-P)の抽出法およびその性質の一部を検討した。

(1) Factor-Pは*L. arabinosus*, *L. fermenti* 36および*L. casei* εに対してはフェニルアラニンと同様の活

第4表 各種培養による*L. arabinosus* 17-5 菌体中のフェニルアラニン量

培 地 名	組成および添加量	全 菌 体 中 の L-フェニルアラニン含量
L-フェニルアラニン添加培地	L-フェニルアラニン [5mg/200ml]	4.2mg
Factor-P 添加培地	フェニルアラニン換算 [約5.4mg/200ml]	6.6 "
カザミノ酸添加培地	カザミノ酸 ("Difco") [1.0g/200ml]	8.8 "
普通乳酸菌用培地	ペプトン, ブドウ糖, 酵母エキス, 酢酸ナトリウム	8.1 "

性を示すが, *Leuc.* P-60 には活性を示さない。したがって本活性物質はフェニルアラニンではないと考えられる。またこれら各乳酸菌のフェニルアラニン, チロシン生合成経路には相異が認められる。

(2) バイオオートグラフィーの結果, Factor-P はフェニルアラニンおよび shikimic acid と異なることが明らかとなった。

(3) Factor-P は pH 2.0 において酢酸エチルにより抽出される酸性物質で, 減圧濃縮によってペースト状に得られる。

(4) *L. arabinosus* の菌体懸濁液は phenylpyruvate からフェニルアラニンを生成するが, Factor-P からは生成しない。したがって Factor-P は phenylpyruvate とは異なるものである。

(5) Factor-P を唯一のフェニルアラニン源として培養した *L. arabinosus* の菌体中にはフェニルアラニンの存在が証明された。

(6) 塩酸加水分解後の Factor-P も *Leuc.* P-60 に活性を示すようにならないので, フェニルアラニンを含むペプチドと考えることはできない。

(7) 天然物中の真のフェニルアラニンを定量するに

は, 他の活性物質の影響をうけにくい *Leuc.* P-60 を用いる必要があり, その他の菌株を使用することは特別の目的をもつ場合以外避けるべきである。

- (1) 佐橋佳郎, 北原覚雄: 農化, **45**, 351 (1971).
- (2) N. R. Krieg and M. J. Pelczar: *J. Gen. Microbiol.*, **25**, 77 (1961).
- (3) A. Nakagawa and K. Kitahara: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **5**, 95 (1959).
- (4) 田村学造, 角田俊直, 桐村二郎, 宮沢 滋: 農化, **26**, 460, 474 (1952).
- (5) B. D. Davis: "A Symposium on Amino Acid Metabolism," John Hopkins Press, 1955, p. 799.
- (6) E. Umbarger and B. D. Davis: "The Bacteria," Vol. III, Academic Press Inc., 1962, p. 168.
- (7) C. Gilvary: "A Symposium on Amino Acid Metabolism," John Hopkins Press, 1955, p. 812.
- (8) A. Meister: "Biochemistry of the Amino Acids," Vol. II, 2nd ed., Academic Press Inc., 1965, p. 884.
- (9) F. Gibson and J. Pittard: *Bacteriol. Rev.*, **32**, 465 (1968).
- (10) R. L. Metzenberg and H. K. Mitchell: *Biochem. J.*, **68**, 168 (1958).