[農化 第 51 巻, 第 3 号, R19~R38, 1977]

微生物の新しい機能の開発に関する研究

(昭和 51 年度鈴木賞受賞)

有 馬 啓

(東京大学農学部農芸化学科)

Studies on the Development of Novel Functions of Microorganisms

By Kei ARIMA

Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo, Tokyo

著者は、東京大学農芸化学科発酵学教室において、永年にわたり発酵学の諸分野において、かなり多種類の研究を、教授在職中当教室に在籍された多くの教員諸士とともに進めてきた。研究に対するわれわれの考え方は、できるだけすでに内外の文献に報告のない、オリジナルな未知のテーマをやりたい。基礎的な問題、または当時わが国および世界において解決が求められていた実際上の問題を解決していきたい。以上のことに関連し、微生物の新しい機能、新しい物質を開発し、また新しい生理作用を探索していきたいというものであった。

研究は勢い広範なスクリーニングを伴い、目的とする現象にぶつからないこともあり困難であったが、しかし研究を始めるとき恐れかつ予期した以上に幸いにも多くの新現象、新物質を見出すことができたのは、一に教員諸士の努力、独創性、能力と自然の生み出した微生物の限りなき多彩なる能力のお蔭であった。一度新現象、新物質が発見された場合には、まずその基礎研究を行い、さらに応用研究を行い、可能なる場合には工業化研究を行い、新しい発酵工業を興すべく努めた。新発酵工業となったもの、また今後工業化が期待せられるものが若干にのぼる。

われわれの研究において最も苦心をしたのは、多くの研究を始めるに当り、その研究テーマの選択決定であった。

著者が坂口謹一郎先生のご定年の後をつがせていただいて当発酵学講座の教授に就任した当時(昭和 33 年, 1958)は、わが国の研究者による発酵法によるアミノ酸、

核酸の新製造工業が勃興し、またフランスを主とする欧米においては、いわゆる石油発酵が始められ、わが国の多くの会社、大学の発酵方面においては、これらの研究こそ最大の流れをなしていた。従って著者は、これらのすでにある流れのほかに、その研究テーマを求めることをその方針の 1 つとした。

新しい研究員が入室すると、そのテーマ決定に当っては著者およびその研究員で 10 も 20 ものテーマを考え出し、その中から 1 つを選び出したが、これにかなりの時日と精力を費やすことを常とした。

私とその研究者との強く興味を感じる問題は、世の中の情勢によりかなり変り、また広がったので、研究テーマが雑多であるとの謗りを受けるかも知れないが、私としては、これらの広いテーマの理解、促進には常に苦悩してきたのであるが、今、教授就任以来 18 年の年月が経ち、東大における定年を迎え、発酵学研究室を去る日も近く、現時点で振り返って今まで行ってきた諸研究(印刷論文は 250 以上であるが)をまとめてみると、このたびの鈴木賞受賞の標題“微生物の新しい機能開発に関する研究”のもとに、4 部に分けることができると考える。

- [I] 微生物の生産する新しい酵素に関する研究
- [II] 新抗生物質ならびに新生理活性物質に関する研究
- [III] 微生物による芳香族化合物の酸化とステロイド類の微生物的化學変換に関する研究
- [IV] 微生物の生理に関する研究およびその他

である。

これから上の 4 部について述べていくが、何分にも大部であるので、各々の研究について、どういう目的で行ったのか、および得られた結果の概要についてのみ記する。本文中*は、農芸化学賞、農学賞等を受賞したものである。

〔I〕微生物の生産する新しい酵素

(1) *Mucor rennin**(1~7)

本研究を始めた動機は 1964 年当時より、チーズ製造に必要な rennet (凝乳酵素) の原料である雄の小牛の第 4 胃 (vell) が世界的に品不足となっていたことにある。

チーズ産業は、世界牛乳の年産額 5 億トンのうち、10% 以上を用い、牛乳の 10% が固形物のチーズとなるので、世界の年産約 600 万トン (全年産額約 5 兆円) の一巨大産業である。チーズ製造上の重要工程は凝乳の工程であって、rennet を必須とする。この rennet (純粋結晶酵素は rennin) は、生後 1~2 週の授乳中の小牛の第 4 胃に存在し、雄の子牛を年間 4000 万頭以上も屠殺し(雌牛は乳牛として育てる)、その第 4 胃から抽出して製造してきた。しかるに近年世界的肉不足のため、雄の子牛をも 1~2 年間飼育食肉化する世界情勢となった。小牛が草食等を始めると、第 4 胃に存在した rennet は消失するため、さらに世界のチーズ生産は過去 15 年間に約 2 倍と増加したため、深刻な rennet 不足に悩むに至り、小牛 rennet に代り得る凝乳酵素の問題は、世界の酪農産業において解決を迫られていた最重要問題の 1 つであった。

従って、rennet 代用酵素の探求の研究は、動物、植物また微生物源に求めて世界的に広く競われたが、次に述べる幾多の難条件を克服することができず、不成功であった。

その困難なる諸条件とは、次のごとくである。

i) 凝乳酵素 rennet の本質、すなわち凝乳機構は長い間諸説があり定まらなかったが、rennet は結局蛋白分解酵素であり、この蛋白分解力により、凝乳作用 (milk clotting) が起るのである。しかし、凝乳酵素は protease であるが、その proteolytic activity が強すぎると、いったん固まったチーズが融けて軟らかくなり、また苦味等を生ずる。従って、rennet 代用酵素は protease であるが、その proteolytic activity は弱く、凝乳力のみは非常に強いという、一見矛盾した特徴ある性質を兼

ね備えなければならない。

ii) チーズの種類は世界に数百もあるが、これらのチーズ製造の際に (米国等では Cheddar, Provolon, Swiss, Romano, Rockfort, Gouda の 6 種類に対し試験をする法規がある) 各種のチーズの牛乳からの収量 (蛋白および脂肪含量)、そのチーズの body, flavor が良く、苦味を生じず味が良く、いわゆる厳密な judge より commercially acceptable でなければならない。

iii) いわゆる工業的生産の条件を満足し、さらに厳密なる長期のラット、犬を使用した毒性試験を含む薬理学的試験を満足させなければならない。

われわれは、広範なる微生物菌株のスクリーニングの結果、土壌より分離され、*Mucor pusillus* Lindt と同定されたかびの 1 株が、上の条件を満足することを発見し、その後長年にわたる菌の分類学的培養的研究を行い、本酵素を精製 40% の収量で結晶酵素を得、*Mucor rennin* と命名した (第 1 図)。本酵素の長年の基礎的研究と並行して、本酵素の工業生産化研究、また長年にわたる国内および十数カ国に及ぶ諸外国での多種類のチーズの工業規模における繰返しの製造試験、各国の国立もしくは権威ある酪農専門研究所、大学研究機関の製造試験、2 年間の各国における毒性試験を経て、わが国、米国の FAD (Food and Drug Administration) および各国政府機関の実用の許可を得た。現在わが国より輸出され世界中で用いられるに至っているが、たとえば世界のチーズの約 1/4 を生産する米国においては、*Mucor rennin* は全チーズ生産の 60% 以上にわたり使用され、小牛 rennet は 15% くらいとなり、残りは子牛 rennet と pepsin 混合物等であり、この傾向はますます進行す

第 1 図 *Mucor pusillus* レンニンの異なる結晶型

るであろう。わが国においても、同様な傾向である。

土壌の中より分離した試験管内の 1 菌株より、10 年を経て今日の実用に至ったのであり、思えば長い道程であった。

本酵素は最適 pH 4.0 の酸性 protease で、分子量 30,000, アミノ酸残基 277~281 (histidine 2 残基) であり、Insulin β -chain に対する基質特異性により、子牛 rennin と類似した非常に限られたペプチドの結合のみを分解する。その他の酵素の性質は詳細にしらべられたが、本酵素による凝乳機構は、牛乳カゼイン (α_s , β , γ カゼイン約 90%, κ カゼイン約 10% より成る) 中の κ カゼインが、protective colloid として牛乳中の casein micelle 形成、すなわち牛乳の安定化に対して寄与しているが、この κ カゼイン (112 のアミノ酸連鎖が決定している) の中に 1 個所存在する -phe-met- の間を切断することにより、 κ カゼインの protective colloid としての安定性を失わせ、Ca の存在と相まって凝乳を起すことを明らかにした。

なお、本酵素の active site としては、1 分子の -COOH を有する酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸、すなわち 1 分子の histidine が関与することを明らかにした。本文の始めにおいて、rennet 代用酵素として備えるべき性質として protease であるが、proteolytic activity が強くはならないという矛盾点を持たなければならないということを示したが、一般に酸性プロテアーゼの active site として COOH 基が関与することは良く知られているが、今まで全く知られず、また active site としての存在が、常識外であった塩基性アミノであるヒスチジンが関与しているという知見を得た。一方、ペプシン分子中にヒスチジン残基があるが、これは active site に関与していないことも知られている。このことは、上に述べた本酵素の特徴である矛盾点を解く鍵であると考えられ、将来の酵素学に対し、すなわちレンニンのような酵素の有する活性の特徴と active site アミノ酸の種類

関係に対し、重要な示唆を与えたものといえる。以上、本研究は全く新しい酵素を発見し、その性質を明らかにすることにより、基礎面に貢献し、また世界的大産業であるチーズ産業に大なる貢献をしたが、一方 4000 万頭の雄の子牛の食肉化による世界の食肉生産にも、副次的ではあるが貢献したといえるであろう。

(2) Lipoprotein lipase⁽⁸⁻¹⁰⁾

人の血液中の脂肪のほとんど大部分は、血清蛋白と結合した複合体の形で存在し、lipoprotein (LP) と呼ばれている。この血清 lipoprotein は、その組成の違いにより第 1 表に示すごとく 4 種に分類されている。

すなわち、血液中の LP の重要部分を占める chylomicron (乳糜粒)、very low density LP は脂質が高いのであって、脂質の代謝異常のため、これらの LP 濃度が上昇すると、脂濁血症または高脂血症となり、高血圧、動脈硬化の原因となる。これらの LP に含まれている中性脂肪または cholesterol と脂肪酸のエステル結合は、通常の脾臓リパーゼまたは微生物リパーゼは分解し得ない。これに対して分解力のあるのは、血液中に存在する特殊のリパーゼである lipoprotein lipase (LPL) で、これらの LP の形で存在するトリグリセリド (脂肪) を特異的に分解する。そして、taurocholate, NaCl 等により特異的に阻害される。LPL は、通常は血管壁あるいは脂肪組織に存在し、ヘパリンの血中投与により血中に遊離されてくるが、血中脂質の代謝に重要な役割を果たしていると考えられている。

われわれは、未だ知られていない微生物源 LPL の探求を開始し、初めは臨床の利用を目的とし、広範なるスクリーニングを行った結果、初めて強力な LPL 生産菌を微生物に見出し、これらは *Pseudomonas* sp. M-12-33 および *Mucor javanicus* IAM 6108 であった。

本菌による LPL の工業的生産培地には、大豆リン脂質を主成分とする油糖を加えて培養すると、顕著な高力価を得る。本酵素は、通常の酵素蛋白が水溶性であるの

第 1 表 Human Serum Lipoprotein

	Density	Composition %					
		neutral lipids	cholesterol		free fatty acid	phospho lipids	protein
			ester	free			
Chylomicron	<1.006	80~90	2	1	<1	6~9	<2
Very low density LP	1.006~1.019	55	15	8	2	20	10
Low density LP	1.019~1.063	14	46	14	1	25	20~25
High density LP	1.063~1.21	5~8	14~23	3~7	3	20~30	40

と異なり、精製を進めるに従って水不溶となり、2～3 年苦勞の後に、単一酵素標品を得たが、LPL 酵素自体が lipoprotein であり、*Pseudomonas* LPL は phosphatidic acid, *Mucor* LPL では phosphatidylinositol を含むリポ蛋白酵素であった。

両 LPL ともに人工 chymomicon (血清とトリグリセリドを攪拌生成した微少 emulsion) や、人の脂濁血から分離した人血中 chymomicon 中の脂肪を特異的に強く分解し、単純グリセリドに対する脂肪分解活性と LPL 活性との比は 1/10 である。

既知の微生物 lipase が血清中で不活性化されたり、LP 中の脂肪をほとんど分解しないことから考えると、われわれの発見した LPL は血中 LPL と同じ活性を有する初めての微生物源 LPL である。また taurocholate, 1 M NaCl により強く阻害されることも、血中 LPL と性質を等しくする。

現在、これら LPL は臨床的には用いられていないが、初期の目的とは異なったのであるが、*Mucor* LPL は血中の脂質、特にトリグリセリド (コレステロールにも用い得る) の定量用酵素として、次式の原理でわが国および諸外国で用いられている。

1. Triglycerides hydrolysis : triglycerides $\xrightarrow{\text{LPL}}$ glycerol + fatty acids
2. Glycerol reaction sequence : glycerol + ATP $\xrightarrow{\text{glycerol kinase}}$ α -glycerophosphate + ADP,
ADP + phosphoenol pyruvate $\xrightarrow{\text{pyruvate kinase}}$ ATP + pyruvate, pyruvate + NADH $\xrightarrow{\text{lactate dehydrogenase}}$ lactate + NAD

すなわち NADH の 340 nm の吸収の全減少は、遊離された glycerol の量と比例関係を示す。

また LPL は、牛乳等に加えると著しく新鮮乳香またはチーズフレーバーを生ずるので、その使用が期待されている。また LPL は、酵素蛋白と脂質の複合体の性質の研究の材料として誠に興味深い。

(3) 麹菌の自己消化およびその主要因をなす nucleace O およびそのインヒビター^{*(11~14)}

i) 自己消化

微生物の生育の logarithmic phase または stationary phase に関する生理的研究は多いが、一方微生物学の基礎知見として重要な微生物の死、これに伴う自己消化 (autolysis) の研究は誠に少ない。実際面から見ても、醸造物中には大量の菌体の自己消化物が移行し、それら

の味に大なる影響を与え、また近年環境汚染の一大原因をなす都市および工場廃液の活性汚泥処理より生ずる甚大な量の菌体、すなわち余剰汚泥 (sludge) を自己消化処理し液体化し、リサイクルさせ、全クローズドシステム化する等の問題等から考えても重要な問題である。

われわれは、わが国の醸造物より見て最も重要な微生物である麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を選び、その自己消化の条件、その際の菌体成分の分解を詳細に研究した。

麹菌は、通気培養して得た菌体を緩衝液に懸濁し、数日間静置する方法により、自己消化の条件および遊離してくる物質について検討を行った。自己消化の最適条件は、40°C, pH 5, 嫌気の状態であり、25°C では pH 8 にも最適点がある。トルエン、クロロフォルム、脂肪酸等の親油性物質が自己消化を促進し、グルコース添加、通気等が自己消化を抑制する。最適条件下では 3 日以内に、菌体内核酸の 90% 以上、蛋白の 75%、糖の 20% が低分子化して菌体外に溶出し、菌糸を空洞化するが、細胞壁は自己消化後も溶解せず、その形を保っている。核酸の分解物は uridine, xanthine, hypoxanthine が主体であり、蛋白はペプチッド (15%) および遊離アミノ酸 (60%) までに分解されている。

ii) Nucleace O およびその inhibitor

以上の研究で明らかになったごとく、自己消化の際最も著しく分解するのは核酸であるので、菌体内核酸の分解および、これが生育期等において分解せずに保たれている機構を追求し、自己消化の際に核酸分解の主因をなすと考えられる新核酸分解酵素 nucleace O およびその特異的阻害蛋白 inhibitor が菌体内に存在することを発見した。生育期の新鮮菌体には inhibitor が多く、nucle-

第 2 図 Nucleace O 結晶

ase O は不活性化されているが、自己消化の過程で inhibitor が菌体内の protease で分解され、菌体内の nucleasase O 活性は数倍に増大する。

麹菌の自己消化液から nucleasase O を精製し、第2図に示すような針状結晶を得た。本酵素は分子量 64,000, 等電点 pH 10, Mg^{2+} あるいは Mn^{2+} を要求し, opt pH 7~8 で RNA および DNA を分解する endonuclease である。RNA および熱変性 DNA を、2本鎖 DNA の20倍の速さで分解する。2本鎖 DNA に対する作用様式は、1本鎖切断である。塩基特異性はなく、RNA および DNA の分解産物は、5'-p-oligo nucleotides であり、di, tri が主体であり、その 3'5' 末端には4種の塩基がすべて検出される。本酵素が新 nucleasase であることは、既知の nucleasase, RNase, DNase との比較により明らかにされた。

ついで、inhibitor の精製と性質は、まず菌体 125 kg の homogenate より inhibitor を 16 万倍に精製し、disc 電気泳動的に単一にした。分子量 23,000, nucleasase O を非拮抗的に阻害し、nucleasase O に対する親和性は既知の蛋白性 inhibitor のいずれよりもきわめて強く ($K_i = 2.2 \times 10^{-12} M$)、*in vitro* で安定な E.I Complex (1分子:1分子)を形成する。本 inhibitor は、この新 nucleasase O に対してのみ特異的に阻害し、麹菌の菌体外酵素として知られる nucleasase S_1 , ribonuclease T_1 , ribonuclease T_2 に対して全く作用しない。さらに、自己消化の主要因である nucleasase O およびその inhibitor の菌種間分布を調べ、*Asp. oryzae* のほかに *Asp. flavus*, *Asp. sojae*, *Asp. tamari* 等、近縁の菌株に普遍的に nucleasase O とその inhibitor が存在することを明らかにし、これらの菌群において同様の核酸量の制御が行われていることを示した。

(4) *Bucillus circulans* の生成する *Asp. oryzae* の細胞壁溶解酵素と細胞壁構造⁽¹⁵⁾

空中より分離された *B. circulans* と同定された1株が、*Asp. oryzae* IAM 2608 の菌糸を強く溶解することを見出し、本酵素を精製し単一蛋白とした。本酵素は β 1, 3 glucanase (laminariase) であり、これが菌糸溶解の主役をなすものであることを明らかにした。また β 1, 3 glucanase と chitinase を協同して作用させることにより、より完全に菌糸が溶けることを見出した。上記両酵素を順次に *Asp. oryzae* の菌糸に作用させ、これに電子顕微鏡、X線回析等の手法を用い、菌糸の構造を

キチン質のファイバーの層を、 β 1, 3 glucan (laminarin) を主成分とする多糖類のファイバーの層でサンドイッチ状にはさま込んだ、各ファイバーのディメンジョンを計算した菌糸細胞壁の微細構造を明らかにした。

(5) ビール安定化酵素^(16,17)

ビールの安定化の問題の1つに、ビールに溶解している蛋白質が、寒冷化により混濁する chill haze があり、現在パバイン (パバイヤ)、プロメライン (パイナップル) を実用し、これを防止しているが、最も多く用いられているパバインによる混濁除去効果は、パバインの蛋白分解力によるものではなく、パバイン蛋白とビール内蛋白の相互間の凝集作用にあると報告されている。しかし、パバインのビールへの添加量を一定以上増加しても、ビールの安定性はそれ以上増加しないので、より安定なビール製造のために、単独またはパバインと併用して、寒冷混濁を除去できる酵素の出現が強く望まれている。近年、微生物起源の酵素の開発が著しく進歩し製造されているので、多種の強力なプロテアーゼ製品を中心としてビール寒冷混濁除去能力の試験を行ったが、目的にかなう酵素製品は得ることができなかった。その理由としては、目的にかなう酵素の備えるべき条件として、温度 $-1 \sim 0^\circ C$, pH 4 において、ビール混濁の原因となる複雑な組成 (大麦から由来する蛋白にタンニン等が付加している) となった蛋白質を分解し得る酵素でなければならない故であろう。

以上の条件を考慮に入れ、パバイン未添加の酒下し若ビールを用いる検定方法を考案し、広範な微生物のスクリーニングを行った。寒冷混濁防止の活性の強い菌株は、culture collection よりも菌株も、自然より分離した菌株も、いずれも *Serratia* に属し、結局 *Serratia marcescens* が最強菌株であり、結晶酵素として得られ、分子量 38,000, 酸性プロテアーゼであり、詳細な酵素的性質が調べられた。本酵素は pH 4, 冷温において、ビールの寒冷混濁 (chill haze) を起す蛋白を含む物質を分解することにより、その chill proofing activity はその蛋白分解力にあると考えられる。キリンビール研究所において、大規模な pilot plant scale で詳細なる安定化試験を行い、単独でパバインと同等または、これに勝る chill proofing effect を有し、パバインと作用機作が異なるため相乗効果を期待し、併用テストを行ったが、かなり顕著な併用効果が認められた。わが国でもまだ実用されていないが、最近米国等のビール会社の注目す

るところとなり、本酵素の生産性も十分に高いので、将来ビールの安定性に貢献することが望まれる。

(6) Thermophilic lipase of *Fumicola langinosa*^(18,19)

高温かつアルカリ性で活性のある lipase はまだ見出されていないので、基礎的方面から興味が深い。さらに油脂の中には牛脂のごとく、既知の lipase の適温である 35°C くらいの温度では個体を保ち、より高温で初めて液状になるものがあり、その分解には今日まで、200°C くらいの高温蒸気加水分解を用いる方法が工業的に実施されてきたが、エネルギー節約の折から、高温 lipase の出現が望まれる。広範なるスクリーニングの結果、土壌より分離された 1 株のかびが、高温リパーゼを生成し、本菌は *Fumicola langinosa* と同定された。本酵素は単一蛋白まで精製され、その酵素的性質は、詳細に研究せられたが、55°C に最適温度、opt pH 8~9 を有する初めての lipase である。

(7) Lipoxxygenase^(20,21)

リポキシゲナーゼは、シスシス 1,4 ペンタジエン構造 $\begin{pmatrix} \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ | & | & | \\ -\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}- \\ | & | & | \\ \text{H} & \text{H} & \text{H} \end{pmatrix}$ を持つ不飽和脂肪酸（天然にはリノール酸、リノレイン酸、アラキドン酸がある）を特異的に酸化し、分子状酸素を吸収して下図に示すような過酸化化物、すなわち 13-ヒドロパーオキシドないし 9-ヒドロパーオキシドを生成する 2 原子酸素添加酵素 (dioxygenase) の一種である。

本酵素は、植物界に広く存在することが知られており、大豆リポキシゲナーゼに関する研究は多く、最近非ヘム鉄の関与することが見出され、その反応機構が解明されつつある。また大豆リポキシゲナーゼは、小麦粉の漂白、製パンの際のドウの物理的性質の改良およびフレーバー強化等に広く利用されている。米国においては従来搾油用の大豆が多く栽培されたが、近年蛋白用の大豆に切り替えられてきたので、大豆からのリポキシゲナ

ーゼは減少してきている。本酵素は、動物界において従来存在しないとされてきたが、最近少数の報告がある。一方微生物界では、その活性を有する菌についての報告はあるが、酵素としての確認はされていない。そこで、薄く大豆油でおおった液体培地上で静置培養を行い、得られた菌体の磨砕抽出液について酵素活性を測定する方法で、多くの土壌よりの分離菌の検索を行い、強い活性を示す不完全菌を分離し、*Fusarium oxysporum* と同定した。苦心の末、本菌の振盪培養による酵素生産が可能となり、これにより得られた菌体から抽出した酵素を精製し、第 3 図に示すような赤色針状結晶酵素を得た。本酵素は分子量 12,000~13,000、プロトヘム X 1 モルを含み、opt pH 12, opt temp. 40°C、リノール酸の 9 および 13 の炭素の位置に -OOH を導入する。その他の物理化学的性質も、詳細にしらべられた。本酵素を用い酸素の活性化機構をしらべ、本フザリウムリポキシゲナーゼがトリプトファンピロラーゼ等とは異なり、活性因子を必要としない新しい型のヘム鉄を含む酸素添加酵素であり本酵素を用いて反応機構の解明を行い、なかでも最近最も先端的問題点である酸素の活性化機構において、スーパーオキシドデスマターゼ等の実験により O_2^- (superoxide anion) が、外部より活性化因子となる

第 3 図 Lipoxxygenase 結晶

物質を加えることなく生成されて、重要な役割を果たしていることを明らかにした。

(8) Pectinase^(22,28)

ペクチナーゼは果汁、特にリンゴ果汁の清澄化剤、ブドウ酒醸造の際の搾汁量増大補助剤、濃縮果汁製造の際のゲル化防止剤として用いられる。当時、リンゴ果汁がペクチナーゼ製剤で清澄化される機構は全くわかっておらず、この機構の解明を目的として本研究を行った。

当時の、ペクチナーゼ製品は数種のペクチン質分解酵素の混合物であった。そこでまず個々のペクチン質分解酵素を単一に精製し、これらの再構成系を用い、リンゴ果汁清澄化機構をしらべようとした。このためには、各ペクチン質分解酵素の各1種を特異的に、かつ多量に生産する菌の検索を行い、endopolygalacturonase (endo-PG, ペクチンの基本骨格であるポリガラクトン酸の α -1,4結合を at random に切断する酵素) 生産菌として *Asp. saitoi*, pectin esterase (PE, ペクチンはポリガラクトン酸の部分的メチルエステルであり、このエステルの水解酵素) 生産菌として *Sclerotinia arachnidis* を選び、両酵素を単一酵素にまで精製した。ついで果汁清澄化機構として、リンゴ果汁の浮遊混濁物質粒子は、果汁の酸性 pH において、内部の芯部は蛋白で陽荷電を有し、外部に陰荷電のペクチンを保護コロイドとして持つコロイド系で、ペクチンが酵素で分解されれば、内部の蛋白の陽荷電が露出し、ペクチンの陰荷電と凝集沈降清澄化をすること、またいわゆるペクチン製剤ではなく、精製した endo PG と PE をリンゴ果汁に加えれば、清澄化が起ることを明らかにした(ただし endo PG, PE で清澄化が起ることの発表は遠藤章氏が先んじた)。

〔II〕微生物の生産する新抗生物質ならびに 新生理活性物質の研究

本題目に対しては、常に新しい探索法を考案し、かなり多くの研究者により多くの研究テーマへのアタックが試みられ、良い結果が得られず苦盃を飲んだことも若干あったが、新物質を得ることができた場合も多く、以下概要を説明する。

第4図 発見した新化合物の構造式およびコレステロールの微生物による転換

(1) Pyrrolnitrin⁽²⁴⁻²⁶⁾

高リン酸培地を用いるスクリーニング法(その強い buffer action により、培養中において酸性、アルカリ性に不安定な物質をも発見し得ることに特徴があると考えられ、その後10年本法により多くの新抗生物質が発見された)により *Pseudomonas pyrocinia*, *Pseudomonas pyrrolnitrica* と同定された菌株より、抗かび物質が菌体内抗生物質として、黄色針状結晶として分離され、その化学構造は 3-chloro-4-(2' nitro-3'-chlorophenyl)-pyrrole (第4図) と決定され、以上の構造は X 線解析法、化学合成により確認された。本物質の作用機作は、細胞膜の主成分の1である phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, cardiolipin と 1:1 の付加化合物をつくることにより、細胞膜透過機構を阻害すること、また cytochrome 系呼吸阻害作用も強いこと等が、われわれおよび米国の研究者により明らかにされた。本物質の生合成機構については、われわれはラベルした δ -amino-levulinic acid からピロール核へ放射能が入ること、米国研究者により tryptophane を経て生合成されると報告さ

れた。毒性が低く, *Tricophyton* によるいわゆる水虫, 頑癬, 汗疱状白癬, その他糸状菌による皮膚疾患に対し, この種の薬品中では, 今日わが国で最も広く用いられ, 十数カ国に輸出されている。

またピロールニトリンは, 既知抗生物質と異なる新しい構造を有する抗生物質である点で, 抗生物質学に貢献することができた。

(2) Protoplast bursting factor (細菌プロトプラスト膜破壊因子, PBF)^{*(27,30)}

細菌細胞の細胞膜構造に関する従来の研究方法は, 電子顕微鏡の構造観察と構成成分を物理的方法で分別し, 化学的分析をすることを主としてきたが, 細胞膜のような微細複雑な構造に対しては, 従来とは多少異なる考え方によるアタックが必要と考え, たとえば細菌 cell wall の構造の解明にリゾチーム類酵素が活用されたごとく, 細胞膜を特異的に溶解する優れた物質があれば, 細菌細胞膜に対し新知見を得ることができると考え, そのような活性を示す物質の検索から出発し, その検索方法は, *B. megaterium* のプロトプラストが溶菌により burst (破壊) する程度を assay する新しい方法を用いた。

まず, 既知の各種酵素薬品, detergent, 抗生物質を広くスクリーニングした結果, 特に強力な活性を有する物質を豚膵臓パンクレアチン内に発見した。本物質は第 5 図に示すように, 精製結晶化され, protoplast bursting factor (PBF) と命名された。分子量 13,000 で, 95°C, 15' の強い耐熱性を有する蛋白で, アミノ酸組成も明らかにされ, いずれも 1 体のグリシン, アラニン, プロリンおよびオキシアミノ酸が多い特異的な組成を有し, N 末端, C 末端はともにスレオニンである。その活性には, Mg^{2+} , Ca^{2+} を必要とする。PBF の著しい作用は, 生菌における膜透過性に著しい変化を与えることであり, 菌体外に添加した glucose-6-phosphate, lactose 等の不透過性物質の菌体内への透過を可能とし, また 50 μ g/ml で *B. megaterium* の細胞膜中の不活性な β -galactosidase 等の酵素が活性化される。ついて新たに考案した方法で, 細胞膜を調製した。この膜は, 蛋白と脂質の比が一定 (大体 2:1) であり, RNA, poly- β -hydroxybutyrate 等を含まず, 電子顕微鏡的知見から見ても, 従来の Weibull の膜のごとく顆粒を含まない, かなり純粋な細胞膜片であると考えられ, 今日細胞膜調製法に多く用いられている。この細胞膜片に PBF (10

第 5 図 プロトプラストバースティングファクター結晶

7/cc) を作用させると, 細胞膜脂質の主要構成脂肪酸の 1 つである 12-methyl tetradecanoic acid が顕著に遊離してくることが明らかとなった。この脂肪酸は, 細胞膜中において 20% は tyrosine ester として存在することが知られており, 一方細胞膜が PBF で処理されると, tyrosine の 280m μ の吸収の増加, また合成 12-methyl-tetradecanoic acid-tyrosine-ester を PBF が加水分解すること等より, PBF は特異性の高いエステラーゼ活性を有する蛋白と考えられている。PBF は多くの哺乳動物の脾臓中に存在し, 他臓器に存在しない臓器特異抗原である。微生物的手法により, 哺乳類組織より特異物質を見出したことは, 今後の研究法に対し示唆するところ少なしとしないであろう。

(3) Tomaymycin⁽³¹⁻³³⁾

抗癌剤のスクリーニングの方法の 1 つとして, 抗ファージ物質のスクリーニングが考えられる。また本研究の開始に当り, 既知抗癌性抗生物質の抗ファージ活性を調べたところ, 2~3 の例外を除き, ほとんどすべての物質に強い抗ファージ活性が認められた。枯草菌ファージ SP-10 を用い, プレート上に培養液を含んだパルプディスク法で広くスクリーニングを行い, アクチノマイシン等の既知抗癌性抗生物質も得られたが, 一新物質を得, tomaymycin と命名し, 生産菌は *Streptomyces achromogenes* var. *tomayceticus* と同定され, 0.2M phosphate buffer (pH 6.2) が存在する培地においてのみ生産された。tomaymycin はグラム陽性菌に対し, やや抗菌活性を示し, 大腸菌および枯草菌のファージ (DNA 型), テストされたすべての DNA 型ウイルスに有効であった。

機器分析および分解反応, 部分的合成等により ethyl-

idene-5, 10, 11, 11 a-tetrahydro-8-hydroxy-7, 11-dimethoxy-5-oxo-1 H-pyrrolo-(2, 1-C) (1, 4)-benzodiazepine (第 4 図) と同定された。

Pyrrolo[1, 4]benzodiazepine 骨格を有し、放線菌により産生される抗生物質としては、anthramycin, sibiromycin が知られているが、tomaymycin は両者と異なった構造を持つ新抗生物質である。

Tomaymycin の作用は、ファージ DNA との間の複合体形成が認められ、ファージ DNA の鋳型活性の阻害による、ファージの増殖阻害であると考えられる。

Tomaymycin は移植固形癌のうち、マウスにおける Lewis Lung carcinoma, rat の Rous sarcoma にやや効果があり、特に Leukemia L-1210 に対しては皮下投与で著しい治療効果が認められ、犬を使用しての実験まで進められたが、マウス急性毒性 LD₅₀ 3.0 mg/kg (静脈注射) により、人に対する使用が阻まれている。

(4) Ascochlorin⁽³⁴⁾

われわれは、ニワトリ胚葉磨砕細胞を用いる agar-diffusion plaque-inhibition 法による抗ウイルス抗生物質のスクリーニングにおいて、植物病原菌 *Ascochyta blight* の菌糸より、抗ウイルス (抗 New castle disease virus および Herpes simplex virus) 活性物質 ascochlorin を単離結晶化した。

その化学構造は第 4 図に示すごとく決定され、またその構造は X 線解析法によっても確認決定された。その構造は、従来の天然有機化合物に知られていない新奇なもので、3 位置換-5 クロロオルシルアルデヒドと、2, 3, 4 メチルシクロヘキサノンの両環の間をペンタデエン鎖が結合する構造であり、後にわれわれにより *Sepedonium ampullosporum* により発見されたシリドロクロリン、また同じ菌の培養液中より協同研究者安藤邦雄により発見されたアスコフロノンも類似の構造を有している。

本物質の生物活性は、New castle disease virus, Herpes simplex virus に対し、スクリーニングに用いた agar-diffusion plaque inhibition 法では活性があったが、試験管培養法では全く抗ウイルス活性なく、各種細菌、真菌類に対しても、ほとんど抗菌性を示さなかった。

一方、心筋梗塞および狭心症など心臓の冠動脈硬化病に起因する疾患は、欧米では死亡原因の 1 位、わが国においても 3 位を占める。しかし、わが国では脳動脈硬化症が死亡原因の第 1 位であるので、すべての動脈硬化の

原因による死の観点に立脚すれば、2 位以下の死因を大きく引き離して第 1 位である。一方、上述の動脈硬化の成因については諸説あるが、血清脂質が動脈硬化を促進する因子であり、その高い濃度は動脈硬化の危険を予報する信号として重視することでは、臨床諸家の説は一致している。

以上述べたことでも明らかとなり、血液中の脂質低下作用を有する薬品が要望され、現在では α -クロロフェノキシイソ酪酸エチルエステルが、良好な血清脂質低下剤として用いられている。一方、血圧低下剤としては、インド蛇木のアルカロイド、レセルピンが広く用いられている。また動脈硬化をし、閉塞した血管を拡張し、血流量を増加させる医薬品も、すでに数種類の系統が開発され実用されている。

アスコクロリンの構造において、フェノールに極性の有る側鎖が結合し、側鎖末端に親油性基が置換する構造を有するが、この構造は、血圧降下剤および血管拡張剤に多い。またアスコクロリンは、塩素原子を有し、前記の血清脂質低下剤 (α -クロロフェノキシイソ酪酸エチルエステル) と、多少とも構造の相関を示すとも考えられる。

そこで、アスコクロリンまたは 4-O-メチルアスコクロリン等の生理作用を実験動物で検討したところ、ラット 2 mg/kg 体重を経口投与して、6 時間後に血清脂質濃度を 45% 低下させ、同じくラットに 5 mg/kg 経口投与すると、最大 50 mmHg に及ぶ持続性血圧降下作用を示し、また犬の股大動脈に 1 mg/kg 注入すると、長期にわたる血管拡張作用を示した。従って現在続行中であるが、アスコクロリンは人体においても上記 3 症状に対し良い治療効果が強く期待できるので、現在開発中である。

(5) 枯草菌の生産する新界面活性ペプチドリビド surfactin^{*(35-38)}

生体内外における血液の流動性ないし生理機能を正常に保持している機構として知られているものに、血液凝固系 (blood coagulation) と繊維素溶解系 (fibrinolysis) がある。すなわち、血漿 (fibrinogen) の血液内酵素 thrombin によるゲル化 (血液凝固) と、ゲルの血液内酵素 plasmin による分解可溶化、すなわち繊維素溶解 (fibrinolysis) とは血液の流動性ないし、生理機能の保持にとり、きわめて重要な反応である。

すなわち、凝固系の活性化は血栓、栓塞などの症状を

血液凝固と繊維素溶解系の最終段階

もたらし、他方溶解系の活性化は、血液凝固性の喪失と、溶解反応の結果遊離するペプチド類に起因した種々の病的異常とを招来する。このような意味で、これら両系の力の平衡が、生体の恒常性の維持に不可欠である。

従って、生体の異常に伴って起るこれら両系の活性の変動を調節し得る作用を有する物質が要望されている。そこで、本研究はこのような事実に着目し、plasmin 作用を阻害する物質を微生物界から見出すことを目的として開始された。しかし実験の結果、plasmin 作用を促進する物質を研究することになってしまった。

広範なる検索の結果、枯草菌の培養液中に、fibrin 平板上で、plasmin (一種の protease) による fibrin の溶解円の径を顕著に増大促進、かつ thrombin-fibrinogen 反応による fibrin の形成を強く阻害する作用を持つ物質が生産されることを発見し、本物質を精製、単離、結晶化することに成功した (第 6 図)。

本物質の生産菌は *B. subtilis* IAM 1213 であり、本物質の特徴が、その強力な界面活性にあることから、本物質を surfactin と命名した。surfactin の生産量は、培養 1 トン当りの結晶収量約 50 g である。

化学構造 (第 4 図) は決定され、3 オキシ 13 メチルテトラデカン酸ヒペプチドのラクトン結合したペ

第 6 図 Surfactin 結晶

プタイドリビッドであり、新物質である。

本物質は強力な界面活性作用があり、滴重法による測定の結果、その Na 塩は、水溶液中 50 r/ml の濃度で顕著な表面張力低下能を示し、その強さは、代表的陰イオン界面活性剤の 1 つであるラウリル硫酸ナトリウムより強い。微生物により生産される界面活性物質としては、gramicidin, tyro-

cidin, polymixin 等のペプチド抗生物質が知られているが、本物質はこれらよりはるかに強く、このような強力な界面活性物質が微生物界また生物界から分離されたことは文献上初めてであり、かかる物質が、生産菌 (有胞子菌) の生理上いかなる意義を有するかは、きわめて興味がある。surfactin の線維素 (fibrin) 溶解促進作用、および血液凝固反応阻害作用も解明された。Alcaligenes faecalis は、EDTA との共存でほとんど瞬間的に透明化した。抗炎症剤の一般的性質である蛋白変性阻害作用があり、顕著な血中コレステロール低下作用もあるが、20 r/ml で赤血球を溶解するので医薬として用いることはできないが、今後軟性石ケン製造等に大きな示唆を与える研究である。

(6) S-15, 抗生物質⁽³⁹⁻⁴¹⁾

ニワトリ胎児 fibroblast の組織平板培養法による New castle disease ウイルス阻止、広範の antibacterial spectrum を有すること、細胞毒性の低いこと等を目的として、土壌より分離した約 1000 株の放線菌のスクリーニングを行い、目的にかなうものとして S-15 物質 A・B を純粋物質として分離した。生産菌は、*Streptomyces purpureofuscus* と同定した。

S-15 物質は、いわゆる水溶性、塩基性抗生物質で streptothricin 群に属するものであることは、研究の初期にわかった。streptothricin 群の物質は優れた抗菌性を有するが、長期使用でいわゆる遷延毒性を示すため、今日まで実用とすることのできなかった抗生物質である。streptothricin は 1940 年初め streptomycin 発見直後に発見せられたが、近年までその化学構造が未決定のままで、streptothricin 群物質として lavendulin, actinolubin, streptolin, pleocidine, geomycin, roseothricin, mycothrin, racemomycin, yazumycin, boseimycin が報告された。しかし最近、本物質群がなかなか結晶となりにくい難点をのりこえ、構造が決定され、

第 7 図 S-15 A (streptothricin f) (上), S-15 B (streptothricin e) (下)

a, b, c, d, e, f, g の 7 種に分けられている。われわれの S-15 A, B 物質も物理化学的性質、機器分析（赤外 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 等）および加水分解物の解析を行った結果、S-15-A は streptothricin f (第 7 図), S-15-B は streptothricin e (第 7 図) と同定された。

われわれが長年にわたり、本物質が streptothricin 郡物質と知りつつ、放棄せず研究を続行してきた理由は、1 つには新物質であるとの期待と、次に薬理評価を依頼した内外の会社の中で、米国 Squibb 社より条虫（真田虫）駆除に著効を有するという結果が出たからである。特に犬、猫の条虫駆除効果は顕著で、矮小条虫、小豆条虫および 2 孔条虫の駆除には、S-15 (70% 純度製品) をミルクに溶かし投与 (10~20 mg/kg) すると、人工、自然両感染に対し、駆除率 100% であり、羊では 100 mg/kg で 100%, 50 mg では 50% であり、現在用いられている合成品ニトロサミド、ブナミジンに比し、きわめて勝れており、近く実用化が期待できる。従来、用いることのできなかった streptothricin の実用化は、抗生物質の分野において世界的難問題の 1 つであったが、本研究によりその扉が開かれ、今後その他の使用例も開かれるであろう。

(7) Baciphelacin^(42~45)

微生物の表層構造の変化によって、その微生物に種々の生理的性質、ひいては生産性変化が誘起されることは良く知られているが、抗生物質の生成と細胞膜組成との関係の知見はほとんど得られていない。本研究では、脂肪酸を添加した培地でのみ抗生物質を生成する微生物を

広く検索し、*Bacillus thiaminolyticus* により生産される新抗生物質を結晶として分離し、その化学構造を同定した (第 4 図)。本物質は、*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* 等には 5 γ /ml で有効、New castle disease ウイルスに 2 γ /ml で強い抗ウイルス作用を示した。また抗腫瘍作用として、リンパ由来のマウス腫瘍細胞 P 388 を CDF₁ 系マウスの腹腔内に投与し、白血病を誘発させたものに対し、毎日 5~10 mg/kg/day で 50% の延命効果があり、抗ウイルス作用を主として、内外の会社において検討がつづけられている。

その他、牧草の伸長性物質をねらい screening を行い、corn steep liquor より分離した植物生長に対する新活性物質の構造も同定され (第 5 図) zeanic acid⁽⁴⁶⁾ と命名され、ミカンの果実落下防止作用が報告された。

他に planaria 運動の stimulant として *trans*-methythioacrylic acid、魚毒物質として *Streptomyces* の生産する teleocidine⁽⁴⁷⁾, *Dichotomomyces albus* の生成する *St. aureus*, *Shigella flexneri* に有効な xanthocillin monomethylether⁽⁴⁸⁾ 等の報告があるが頁数のため略す。

(8) ペニシリン生産菌の変異に関する研究^{*(49~51)}

昭和 20 年、戦後直ちに米国 Texas 大学教授 Jackson Foster を迎えて、わが国でペニシリンの研究が開始され、各大学研究者の協力組織である Central Laboratory of Penicillin of Japan が組織され、培養タンク、培養条件、精製、検定、菌株、臨床の各部に分けられ、菌株すなわちペニシリン生産の microbiological aspects を坂口謹一郎先生が分担された。当時 Foster 教授から与えられた *Pen. chrysogenum* Q 176 株を、わが国の雨後の筍のように 40 社以上もあったペニシリン工場が用いており、まだ半数くらいはガラスのルウフラスコを使用していたが、それらのタンク培養、ガラスビン培養の工場における最大の問題の 1 つは、この Q 176 株の生産性が、菌株を培養しつづけている間に、著しく退化減少してしまう問題であった。われわれは、この問題に取り組み、このかびが継続培養の間に今まで全く知られていなかった広範な形態のなびに力価生産上の変異を起すことを明らかにし、いわゆる mono spore culture 法を確立し、変異流転をつづけていく菌株の中から変じざる菌を継続的に選ぶ努力をつづける必要のあることを報告し、全国のペニシリン工場の力価の安定化に貢献した。

今日から考えると、わが国の抗生物質等の発酵工業の菌の取り扱い法の先例を築いたといえるであろう。さらに人工変異も行い、高単位生産株の造成を行っているうちに、偶然 Q 176 の生成する黄色色素 (sorbicillin, penitric acid) を全く生ぜず、ペニシリンのみを生成する *Pen. chrysogenum* Q 176, pigmentless saltant Arima et Ogasawara を世界にさががけて発見分離した。当時のペニシリン商品は、茶色から黄色を呈して注射すると発熱したり、なかには腕が折れるほど痛い等ということがあり、純粋ペニシリンを製造することは、収量も低くかつ困難であったので、わが国の純粋ペニシリン生産は一躍数倍となったものであった。白色ペニシリンを会社からもらって病気の知人の宅へ夜道を急いだときの充実感が思い起される。さらに, penitric acid の構造を研究し, sorbicillin との構造の類似性があり, 色なし菌において両者同時に消失することより, 両色素の共通の precursor の生合成の gene が変異消失したと考察した。

〔III〕 微生物による芳香属化合物の酸化と 微生物による化学転換

1952 年頃、自分のペニシリン関係の仕事も一段落したので、microbial metabolism の勉強をしたいと思い、当時糖類、有機酸類、アミノ酸類の分解代謝の研究は十分あったので、水にとけな芳香属化合物の研究は少数例を除いてはなかったので始めた。石油発酵は、欧米ではもう始められていたかも知れないが、わが国ではまだ始っていなかった。

(1) ゲンチジン酸代謝系の発見と確立⁽⁵²⁻⁵⁵⁾

今日微生物による数多くの芳香環を持つ化合物の酸化開環系路が知られ、誠に複雑な metabolic map を示しているが、これらは 3 主要系路に分類することができる、すなわち

i) メタ開環の α -ヒドロキ酸系路

ii) オルト開環の β -ケトアデピン酸系路

iii) ゲンチジン酸系路

われわれは、*m*-hydroxy-benzoic acid の *Pseudomonas* 菌株による酸化の代謝系を研究中、1つの経路は protocatechuic acid を経るオルト開環の β ケトアデピン酸系路があるが、このほかにゲンチジン酸系路を初めて見出し、中間代謝物質ならびにこれに関与する各々の酵素系を明らかにした。当時は一新系路であるとのみ考えていたが、その後の外国の研究によってもゲンチジン酸系路に属するものが報告され、今日では微生物による芳香環化合物の 3 主要経路の 1 つを発見確立したことになる。

(2) P-OH-benzoic acid hydroxylose の 研究^{*(57-65)}

Gentisic acid 代謝経路の確立の研究を終えて、次の目標は、当時芳香環化合物の微生物による代謝において、いまだに世界的に不成功であった難問題は、これらの化合物が空中の酸素によりベンゼン環が酸化される第 1 のステップ、すなわち OH 化をする酵素 hydroxylase の性質の解明の問題で、全く研究がなかった。ベンゼン環がまず OH 化され、さらに酸素が 2 原子入り、ベンゼン環の核解裂が起る、たとえばカテコールからシスシス ムコン酸への、いわゆるベンゼン核開裂酵素 pyrocatechase 等は早石らにより cell free 化され精製され、その非ヘムの鉄要求性も報告されていた。

当時 hydroxylase が研究されなかった第 1 の原因は、菌体内酵素である hydroxylase を cell free 化するのが非常に困難であろうと考えられていたためである。今

日でも、ステロール核化合物の OH 化は良く知られているが、その hydroxylase は、過去 20 年余にわたる世界中の研究者のアタックにもかかわらず、安定酵素として得られていない。

そこで、いかなる基質を選ぶかが問題であったが、*o*, *m*, *p* 体の hydroxybenzoic acids を考えたが、*o* 体はカテコールとなり、脱 CO₂ を経て OH 化されるので、やや複雑であるので敬遠し、*m* および *p* 体を用いた。

われわれは、まずこれらの基質を唯一の炭素源として生育することができ、しかも安定な hydroxylase を cell free 化できる *Pseudomonas* 菌株を自然界に広く検索することにより、好適菌株を分離し、*m* および *p*-hydroxy benzoic acid hydroxylase の cell free 化に初めて成功した。

ついで、*m* 体は当時高価であったので、*p* 体に主力を注ぎ、*Pseudomonas desmolitica* 株より、*p*-hydroxy benzoic acid hydroxylase (P-OH-BAHase) の holloenzyme, すなわち Eox (酵素蛋白と cofactor の FAD の酸化型が結合している) の結晶酵素と、さらに enzyme kinetics の大家 Michaelis がその存在を推定していたが、ついに実証するには至らなかった基質である *p*-hydroxy benzoic acid (P-OH-BA) と holloenzyme Eox との結合体、すなわち酵素基質複合体 (Eox·S) の結晶を初めて安定な黄色結晶として大量、好収率 (細菌蛋白の 1.5%, 400l 培養で 3g) で分離し得た (第 8 図)。本酵素は分子量 68,000, FAD-分子が結合し、詳細な本酵素の物理化学的研究も行われたが、次の反応を行う。

第 8 図 *p*-Hydroxy benzoic acid hydroxylase
左: holloenzyme(E), 右: ES complex 各結晶

第 9 図 *p*-HBA-hydroxylase の反応模式図

本酵素は、上の図式のごとく基質として P-HO-BA と、さらに 2 種類の基質、すなわち NADPH+H⁺, O₂ を必須とするという特性を有するため、たとえば反応系より NADPH+H⁺ を除くことにより、空気中、常温でも反応が終点まで進まないという利点を有するため、世界で初めて、前述のごとく酵素反応の中間体である、いわゆる ES complex を安定な形で得、これを用い実験を行うことに成功した。これまでにも、他の酵素において ES complex が分離された報告もあるが、生成した ES complex は当然反応が進行してしまい、これを止めることができないので、真の基質の代りに、酵素反応の進まないその基質のアナログ、または基質であっても反応速度のきわめて遅い基質等を用いたり、または非常に低温または酸素除去気中による酵素反応を行って得られた実験データしかなかった。

本酵素の有する以上の特性を利用し、ストップフロー法、ラピッドスキャンストップフロー法を駆使し、第 9 図のごとく、前述の over all の酵素反応を 12 以上の素反応に分解し、その各々の素反応の kinetics を明らかにした P-OH-BA hydroxylase 反応模式図 (第 9 図) が得られた。Eox は酵素蛋白に酸化型の FAD が結合し、Ered はその FAD が還元型になったことを示す。

本研究により、初めて安定な ES complex を用いて酵素の反応解析を行うことができ、酵素学上に述べる

ような重要な新知見が得られた。

i) 反応模式図中の素反応の 1 つである, ES complex が形成されることにより, 次の段階, すなわち ES complex の反応段階, $\text{Eox-S} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{Ered-S} + \text{NADP}$ の還元反応速度が, holloenzyme の反応段階, すなわち $\text{Eox} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{Ered} + \text{NADP}$ の還元反応速度よりも, S が holloenzyme 蛋白への付着したことにより, 1 万倍も速くなるというきわめて顕著な事実を初めて見出した。

ii) S と複合体を形成することにより, 酵素の蛋白構造変化が誘起され, その変化はややほどけた (unfold) 状態から, より密な (rigid) な状態への変化であることが, 次の諸実験から明らかとなった。すなわち, 遠紫外領域における円二色性スペクトル, 旋光分散スペクトル, 精密な差超遠心分析値, 化学修飾剤による酵素分子中の修飾される特定アミノ酸残基数が複合体形成により大きく減少すること, トリプシン消化に対し安定化されること, 示差走査熱量計による測定は変性に必要とされる変性熱, 変性温度の上昇を示したこと。さらに, いわゆる active site として, アルギニン, ヒスチジン, システイン, リジン等があり, アルギニン残基は基質の結合部位に, また他の 3 残基は $\text{NADPH} + \text{H}^+$ の結合部位に, それぞれ含まれていることを明らかにした。酸素の活性化についてのスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の関与については, スーパーオキシドアニオンディスマターゼ (SOD) による阻害等もなく, O_2^- 関与は示されなかった。

iii) 反応模式図に示すごとく, 本酵素は基質が存在しないと, H_2O_2 を生成するので, 基質の存在は, この基質を唯一の炭素源として生育する微生物に対する生理的害作用を防ぎ, かつ O_2 および $\text{NADPH} + \text{H}^+$ の有効な利用 (1 万倍もの) を可能にする高効率でエネルギー生成を可能にする S の regulator としての役割を初めて明らかにした。従って P-OHBA は, 菌の炭素源, 酵素の inducer, 酵素の真の effector, 代謝の regulator としての 4 つの役割を行うものである。

結局, 当初芳香属化合物の代謝系を研究する目的であったこの研究は, すでに 20 年にならんとし, 最初は考えていなかった, ES complex の研究, 基質が酵素の真の effector となること, $\text{NADPH} + \text{H}^+$, O_2 等の利用の regulator 等, 酵素学における最も重要な基礎的知見を加える研究に発展し, 酵素学に貢献し得た。ただ残念な

のは, X線解析法を行わんとして, Eox, Eox S 結晶の大きく好適なものを得んとする 2 年間に及ぶ試みが成功せず, この面からの知見が得られていないことである。

(3) Cholesterol 類似化合物の ADD (androsta 1,4 diene 3,17 dione) への微生物による転換 (1967~1976)*^(66,67)

ステロイド系ホルモン生産は年産 7000 億円に及ぶ世界の一大医薬産業であり, 多くの重要な医療用ステロイド薬品を含むが, 今日までその原料は主として, メキシコ等の山野に自生する山芋 (dioscorea または yam) から抽出される diosgenine に仰いできたが, 長年にわたる乱獲と, 今日では山中深く分け入らなければ収穫できないための労賃の急上昇等のため, 近年深刻な資源の不足に悩むに至った。

農場における yam の栽培は, 今日までメキシコ政府を初めとして努力されたが, 栽培に数年の長年月を要し, しかも diosgenine の収量も天然物に比して低く, 不成功であった。今までは, 年約 1 万トンの yam から, 500 トンの diosgenine, それから約 50 トンのホルモンが生産された。

他方ステロイドホルモン原料としては, ステロイド核を有するコレステロール, シトステロール等の動植物ステロール類は大量に生産せられており, これらを化学的または微生物的に特異的に側鎖の炭素鎖を切断することができさえすれば, diosgenine に代り, 各種ステロイドホルモンの原料として用いることができるので広く行われたが, 化学的方法是は反応特異性がなく側鎖のみではなく, ステロイド骨核をも酸化分解してしまう。1950 年代においては, ステロイド化合物を微生物の有する化学転換反応を利用して, コーチゾン如初め多くのホルモンを工業的に製造する輝かしい業績があったので, 世界の研究者は, 競ってこの微生物によるコレステロール等の側鎖切断の研究を行ったのであるが, いずれも不成功であり, この問題は世界的に重要であるが, 難問題として未解決のまま残されていた。

われわれの研究も 1964 年頃着手以来, 初め 3 年ばかりは世界の他の研究者と同じ経過をたどり, コレステロールの側鎖を特異的に切断する能力を有する微生物のスクリーニングを行ったが, 不成功であった。しかし, ここでわれわれは, 研究戦略の転換を行ったのである。すなわち, スクリーニングの間に, コレステロールを 0~100% までの各段階で酸化分解する微生物を得てい

たので、ほとんど 100% 分解する菌、すなわちコレステロールの炭素 27 個の $-C-C-$ の結合をほとんど完全に酸化切断する菌株に目をつけ、このよう菌株を集めた。これらの菌は、目的とする側鎖を切断する能力は立派に有するのであるが、酸化酵素の種類を十分に備えず、ステロイド核をも分解してしまうのである。そこで、これらの菌を用い、われわれの必要とする側鎖切断能力のみを発揮させ、ステロイド核の切断能力の方で阻止させることができないであろうかと考えた。そこで、これらの菌をコレステロールを含む培養液に培養し、これに約 200 種の酵素および代謝阻害剤を各々添加し、スクリーニングすることにより、*Arthrobacter simplex* 等、かなり多種の菌株において、 α, α' dipyridyl 等の金属ケレータを微量 ($10^{-4} \sim 10^{-3} / l$) 培養中添加する方法により、cholesterol のみならず、 β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, ergosterol, lithocholic acid, pregnenolone 等の側鎖を特異的に切断し、原料の 90% に

も及ぶ好収率で ADD を生成する発酵方法を世界で初めて発見確立し得たのである (第 4 図)。ADD は図 (第 10 図) に示すごとく、多種類のステロイドホルモンの出発物質として用い得る。

これにより、現在人口急増下において用いられている避妊ホルモン (ピル) およびその他のホルモンの製造を可能とし、世界のステロイドホルモン製造の不安の大問題を解決した。

また、本発酵法を活用することにより、在来未知であった微生物によるコレステロールの好気下の分解の代謝系路を初めて明らかにした。さらに、これらの基礎的知見のうに、ADD 大量蓄積機構を明らかにした。

在来のアミノ酸発酵等が好例である、いわゆる代謝制御発酵は、フィードバック阻害を変異株造成等により解除する方法によるものであったが、本研究は、発酵培地に代謝インヒビターを加えることにより発酵を転換させ、発酵生産物を工業的に蓄積するという全く新しい 1

第 10 図 ADD 誘導体の合成経路および用途

発酵型式を創出開発した意義があり、将来多くの新しい発酵を産み出すことに影響を与えることが期待せられる。今日 41 億となり、後 38 年で確実に倍増すると計算されている世界の人口、この世界最大の難問題に対し、もちろん厳重な医学的チェックの後に経口避妊ホルモンが用いられ、本発明が世界の人口問題に寄与することのできる日のくることを、発明者としてわれわれは深く望むものであるが、これもすべての発明とその工業化の関係のごとく、色即是空、空即是色、すなわち将来内外の多くの要因に左右せられるであろう。幸い、三菱化成の大きな努力により、すでに新工場建設が行われつつあり、今年から世界の数分の一種々ステロイドホルモンが生産されようとしている。

〔IV〕 微生物生理の研究

(1) コリシンの作用機構⁽⁶⁸⁻⁷³⁾

コリシンは、プラスミッドの一種であるコリシン因子を持つ大腸菌が生成する蛋白であり、コリシン感受性の大腸菌のみを殺す、きわめて作用範囲の狭い蛋白性抗生物質である。細胞当たり 1~数分子のコリシンが表面に吸着するだけで、その細胞が殺菌されるのは、おそらくコリシンによって細胞膜の異常が起るからと考えられ、細菌の細胞膜の構造と機能の関係を解明する手がかりとなると思われた。われわれは、種々知られているコリシンの中で、細胞中の DNA 崩壊を起すことが報告されているコリシン E₂ を用い、その作用機構を細胞膜との関連において解明しようとした。

まず E₂ を大腸菌液に加えると、細胞内の DNA が最初に endo 型分解を受け、ついで低分子化する。ショ糖、食塩による高浸透圧下では、コリシンによる細胞死は抑えられ、この原因は細胞膜構造が変るため、コリシン作用の第 1 段階に細胞膜が関与している証拠の 1 つと考えられた。ついで、E₂ が吸着しても DNA 崩壊は起らず、細胞分裂が完全に阻止される性質を有する変異株を見出し、E₂ の阻害作用の他の一面を見出した。さらに E₂ は、細胞を穏かな条件で溶菌させて得られる細胞膜-DNA 複合体に *in vitro* で作用し、DNA を遊離させる能力を有することを認めた。

このように、E₂ 分子自体に酵素活性も見出されるようになったが、一方 E₂ が、βガラクトシド、K⁺ イオン、L-プロリン等の大腸菌細胞の膜透過能を強く阻害するので、E₂ により細胞膜の構造変化が起ることが明

らかとなり、この透過阻害作用が、細胞にあらかじめ λ プロファージの特定遺伝子 (*rex*) 由来の蛋白が存在する場合に著しく促進されることを見出した。この予想しなかった新しい現象は、最近いくつか見出されるようになったファージ感染と、特定のプラスミッド遺伝子の関係ときわめて良く似ている。以上 E₂ の作用には、DNA 崩壊と細胞膜傷害の 2 面性があることを示すことができた。

(2) AFS (antifilamentous phage substance)^(74,75)

大腸菌の性繊毛に特異的に吸着する繊維状ファージ f₁ は、その増殖様式が通常のバクテリオファージとかけはなれており、宿主細胞を溶菌させることなしに増殖するなどの特徴は、動物ウイルスとも類似性が認められる。このような特徴あるファージに対する抗ファージ物質をスクリーニングし、*Streptomyces lavendulae* が生産する蛋白性抗ファージ物質 AFS が見出された。分子量約 6000 の塩基性単純蛋白で、ファージ f₁ に感染した大腸菌細胞のみを低濃度で選択的に殺すことにより、この作用機構はやはり前述のコリシン E₂ と λ ファージの関係にきわめて似ており、ファージ感染現象解明の新しい手がかりと考えられる。

(3) 微生物によるアロイソクエン酸代謝⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾

L-アロイソクエン酸は、通常の TCA 回路中間体である D-イソクエン酸とは α 位の炭素の立体配置が逆転している光学異性体であり、1957 年われわれによりペニシリウム属かびの代謝産物として初めて発見された。その生産量は、いわゆるクエン酸発酵が酸性で行われるのと異なり、中性の pH の培養液で対糖 70% 以上で、ペニシリウム属かびには広くその生産能が分布しており、アロイソクエン酸発酵と呼ぶべきものである。この生合成反応を無細胞抽出液で行わせる試みには、数年間のアタックにもかかわらず不成功であったが、最近、高濃度のクエン酸の共存で、D-イソクエン酸→L-アロイソクエン酸の経路が、トレーサ実験により明らかになった。また L-アロイソクエン酸分解反応については、分解菌から特異的な L-アロイソクエン酸脱水素酵素が見出され、定量に用い得る。

まだ書きつづけたいのであるが、紙数の制限がきて残念であるが、われわれの教室として等しく重要性のある研究であるが、題目のみ挙げることを許していただきたい。

Blood coagulating enzyme of *Cephalosporium* (佐藤敏生, 1974)⁽⁷⁹⁾, Thermophilic enzymes of *Thermus flavus* (斎木 隆, 1973)^(80,81), Uricase of *Arthrobacter* (能勢圭之助, 1967)⁽⁸²⁾, Exocellular *l*-asparaginase of *Candida utilis* (坂本 匡, 1975)⁽⁸³⁾, Inositol, its physiological significans in yeast (土肥道夫, 1970~1975)⁽⁸⁴⁾, Mode of action of tomaymycin, pyrrolnitrin, angustmycin and antimycin (西岡 豊, 能勢征子, 別府輝彦, 佐藤英次, 1967~1975)^(85~87), Bacterial resistances and their mechanisms against cyanide, arsenite, tetracycline (水島昭二, 岡 徹夫, 別府道子, 伊崎和夫, 1970~1976)^(88~92), Flavor of vinegar (山口玄示, 1970)⁽⁹³⁾, Bacteriophage induced lytic enzyme of *Pseudomonas* (矢内 顕, 1975)^(94,95), Citrate transport enhancing factors for *E. coli* (渡辺浩二, 1974)⁽⁹⁶⁾, Cell wall structure of *Streptomyces* (中村輝也, 1977)^(97,98), Transformation of DNA of eucaryote into bacteria (魚住武司, 三輪清志, 内山裕夫, 堀之内末治, 星野貴行, 1976). この最後の題目, すなわち gene engineering は, かいこフィブロイン, 牛のレンニン, 等々をバクテリアに造らせようという問題で, かなりの人数で遂行しており, たとえばエベレストの山上のアタックにベースキャンプを次々に押し上げて行くような研究で, ベースキャンプの設置も大分進み, 近い将来に山頂に立ち目的を達することを深く望むものである.

最後に過去3年間の“微生物による環境浄化の研究”の文部省の特定研究であるが, 全国の大学で約300名が参加しているが, 今年度より“環境科学”特別研究の重要な柱として, 今後5~10年継続になったので, われわれも参加研究中であり, 今後この微生物グループの研究が, わが国および世界の環境浄化に貢献できるという悲願の達成が深く望まれる.

昨年鈴木賞をいただいたので, 18年間在職した東大, 農化, 発酵学教室の教授の定年退職を2カ月後にひかえる今, ちょうどこの間の発酵学教室で行ってきた研究を概括する, このうえなきありがたい機会を与えられたことは感謝に耐えない. 今, 農芸化学科また発酵学教室を去らんとするに当り, 自分の経験した研究生活を顧みて, わずかの感想を述べることを許していただきたい.

それは, おのずから人, 研究, そして自然についてである.

自分は若い頃から, “衆生本来仏也”という語に深い関心と疑問を持ち, いささか探求を続けてきたのであるが, 40歳を過ぎる頃から, 自分が毎日接している微生物のおかげさまで, この最下等生物ですら限りない深遠さ, 利用価値を有することがようやくわかってきたのであるが, そうなると, 木の葉1枚でも微生物よりは, はるかに高級なものであり, それより高級の昆虫, 鳥, けだものと, だんだん上ってきて人間, すなわち衆生に行きつくのであるが, 人間1人の価値は誠に大変なもので, 金で計ることはできないが, 一応1兆円というのは, 1つのかなりの価値と考えると, 身分能力の上下にかかわらず誰でも, たとえば1兆円以上の価値があるであると深く自らうなづくようになった. それで, 大学の人はもちろんであるが, 会社の方々にも研究費等はいらないから, 人を送ってくれ, これが1兆円もらうのと同じだとお願ひし, 実にたくさんの方に教室に在籍し研究していただくことになった. そして, すべての方々が後ろ姿を拝みたくなるほど, 実に熱心に研究をしてくださったのである.

しかし次の問題は, 人間, 特に研究者というものは, 勝れた頭脳を持ち, 知識を重要視し, priority を重んじ, 他人より先んじ勝れることを望むもので, 大体において利己的かつ煩惱の深いものであるとの自覚も深まった. そのようなことを考えて, 教室員には, 良く勉強せよと頼んだことは一度もない. また, その必要もなかった. ただただ, 皆で仲良くして教え合い助け合ってくれと, 馬鹿の1つ覚えのように願いつづけてきた. 従って, 教室員は皆仲良くやってくれて, 上をいえば限りはないが, 研究室の中は, 確かに小極楽, 小浄土を現前することができたと考え, 深い喜びを感じている. 人間同志が仲良くし, 他人の成長を互いに願いつづ, 助け合う職場をつくること, これこそ何ものにもまして, 人生の第1義の目的でなくして何であろうか.

次は研究についてであるが, 1番困りつづけたのはやはり, 研究テーマの選択であった. しかし, 未知のものを探し, そんなものはないかも知れぬリスクを犯すということは, かなりやってきたと思う. 研究室員にも大変な苦勞をかけたが, なにしろう出した研究テーマの成否は, 若い人達の一生を左右することにもなるので, そのようなテーマを決めるのが誠に心配で, かつ怖かったが, 多くの場合, 初めからは予想もできなかったような結果もたくさん出て, 今にして思うと良くまあこのよう

な新物質, 新酵素, 新菌等が実在してくれたものだと, ホットしているというか, 真に幸運であったと思っている。

われわれのような分野の研究をする者は, 目に見えない, 存在するかどうか全くわからないものに対する, 心の中に生じ“信”を持つことが誠に大切であると思う。まだ見えざるものを真感をもって信じ, リスクを敢然とおかしていく, 仮説と真理を同価値とし両者の間を実行, 実験でつなぐプラグマティズムの精神で, ひたすら実験をしていくこと, ここにこそ若い生命をかけた研究者のロマンティズムがあるのではないだろうか。

最後に自然についてであるが, 今 30 年の研究生活の後をたどって, 自分なりに思うことは, 人を含めて動物, 植物, 微生物, 鉱物, つまり自然というものが, 学問が進歩すればするほどなんと深遠, 興味深く, ありがたいものであるかということにつきるので, 特に生命に関係の深い農芸化学にたずさわったことは, 幸福であったと思う。

地球上に現われてから 30 億年, 生命のあらゆる可能性を探索して, 進化生存をつづけてきた微生物, その中に蓄積された代謝の茫大な情報である DNA は, 今日の分子生物学の枠内では想像もできない複雑多岐なものであろう。恩師坂口謹一郎先生がいわれた「自分は微生物に願ってまだ裏切られたことはない」の真なることを今ますます深く実感させていただいている。また私と同年代の人であり, 昨年 9 月逝去された, なつかしき畏友京大農芸化学科発酵生理および醸造学教室緒方浩一教授が平素より教室員にいわれた「自分ほもしこの世に生き返ってくることができても, 微生物学学者となって研究が続けたい」という美しい言葉を挙げて本稿を閉じたい。

長年にわたり, ご高教を賜った恩師坂口謹一郎先生のご高恩に対し, 謹しんで深い感謝を捧げる。故朝井勇宣先生, 山田浩一先生, 田村学造教授, 矢野圭司教授, 別府輝彦助教授, 山崎真狩助教授, また一々お名前をあげないが, 発酵学教室に在籍された多くの方々, さらに協同研究をし種々お世話様になり, ご援助を賜った会社の方々に, 謹しんで深くお礼を申し上げる。

- (1) K. Arima, S. Iwasaki and G. Tamura: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 540 (1967).
- (2) S. Iwasaki, T. Yasui, G. Tamura and K. Arima: *ibid.*, **31**, 1421 (1967).
- (3) J. Yu, G. Tamura and K. Arima: *ibid.*, **32**, 1048 (1968).
- (4) J. Yu, S. Iwasaki, G. Tamura and K. Arima: *Appl. Microbiol.*, **16**, 1727 (1968).
- (5) J. Yu, G. Tamura and K. Arima: *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 138 (1969).
- (6) *idem*: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1194, 1398 (1971).
- (7) T. Tsugo, K. Taniguchi, U. Yoshino, A. Ozawa and K. Arima: *Japan. J. Zotech. Sci.*, **30**, 221, 515 (1966).
- (8) K. Arima, T. Narasaki, Y. Nakamura and G. Tamura: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 515 (1966); **36**, 924 (1967).
- (9) T. Narasaki, T. Saiki, G. Tamura and K. Arima: *ibid.*, **31**, 993 (1967).
- (10) T. Saiki, T. Narasaki, K. Aramaki, Y. Takagi, G. Tamura and K. Arima: *ibid.*, **33**, 414, 1101 (1969).
- (11) K. Arima, T. Uozumi and M. Takahashi: *ibid.*, **29**, 1033 (1965).
- (12) T. Uozumi, G. Tamura and K. Arima: *ibid.*, **32**, 963, 969, 1409 (1968); **32**, 25, 636, 645 (1967).
- (13) T. Uozumi, T. Hino, G. Tamura and K. Arima: *ibid.*, **35**, 1109 (1971); **36**, 434 (1972); **38**, 1739 (1974).
- (14) T. Uozumi, K. Ishino, T. Beppu and K. Arima: *J. Biol. Chem.*, **251**, 2808 (1976).
- (15) K. Horikoshi, H. Koffler and K. Arima: *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 268 (1963).
- (16) K. Arima, R. Takahashi, K. Oda and K. Okada: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2351 (1973).
- (17) R. Takahashi, K. Oda, K. Okada and K. Arima: *ibid.*, **37**, 2359; **38**, 1685, 1693 (1974).
- (18) K. Arima, Wen-Hsiung Liu and T. Beppu: *ibid.*, **36**, 1913 (1972).
- (19) Wen-Hsiung Liu, T. Beppu and K. Arima: *ibid.*, **36**, 1919 (1972); **37**, 157 (1973); **41**, 131 (1977).
- (20) T. Satoh, Y. Matsuda, M. Takashio, K. Satoh, T. Beppu and K. Arima: *ibid.*, **40**, 953 (1976).
- (21) Y. Matsuda, T. Satoh, T. Beppu and K. Arima: *ibid.*, **40**, 963 (1976) and in press (1977).
- (22) K. Arima, M. Yamazaki and T. Yasui: *ibid.*, **28**, 248, 779 (1964).
- (23) M. Yamazaki, T. Yasui, A. Kato, S. Chu and K. Arima: *ibid.*, **30**, 142, 1119 (1964); **31**, 552 (1967).
- (24) K. Arima, H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuda and G. Tamura: *J. Antibiotics. Ser. A.*, **18**, 201 (1965).
- (25) H. Imanaka, M. Kousaka, G. Tamura and K. Arima: *ibid.*, **18**, 205, 207 (1965).
- (26) H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuda, G.

- Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 575 (1965).
- (27) T. Yamaguchi, K. Horikoshi, G. Tamura and K. Arima : *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 500 (1963) ; **124**, 413 ; **130**, 102 (1966) ; **113**, 134 (1967).
- (28) T. Yamaguchi and K. Arima : *J. Ferment. Technol.*, **44**, 375 (1966).
- (29) T. Yamaguchi, N. Tsukagoshi, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 475, 1302 (1967).
- (30) T. Yamaguchi, G. Tamura and K. Arima : *J. Bacteriol.*, **93**, 483 (1967).
- (31) K. Arima, M. Kousaka, G. Tamura, H. Imanaka and H. Sakai : *J. Antibiotics.*, **25**, 437 (1972).
- (32) K. Kariyone, H. Yazawa and M. Kousaka : *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 2289 (1971).
- (33) Y. Nishioka, T. Beppu, M. Kousaka and K. Arima : *J. Antibiotics.*, **25**, 660 (1972).
- (34) G. Tamura, S. Suzuki, A. Takahashi, K. Ando and K. Arima : *ibid.*, **121**, 539 (1968).
- (35) K. Arima, A. Kakinuma and G. Tamura : *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **31**, 488 (1968).
- (36) A. Kakinuma, G. Tamura and K. Arima : *Experientia*, **24**, 1120 (1968).
- (37) A. Kakinuma, M. Hori, M. Isono, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 971, 973, 1523, 1669 (1969).
- (38) N. Tsukagoshi, G. Tamura and K. Arima : *Biochim Biophys. Acta*, **196**, 204, 211 (1970).
- (39) K. Arima, T. Kawamura, T. Beppu : *J. Antibiotics.*, **25**, 387 (1972).
- (40) T. Kawamura, T. Beppu, K. Arima : *ibid.*, **25**, 471 (1972) ; **29**, 242, 844 (1976).
- (41) W. E. Brown, J. Sandoz, E. Meyer, T. Kawamura and K. Arima : 16th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1976).
- (42) K. Arima, H. Okazaki, H. Ono, K. Yamada and T. Beppu : *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2313 (1973).
- (43) H. Okazaki, H. Ono, K. Yamada, T. Beppu and K. Arima : *ibid.*, 2319 (1973) ; **38**, 1455 (1974).
- (44) H. Okazaki, T. Beppu, K. Arima : Proceedings of the 1st International Congress of IAMS, Vol. 5, 566 (1975).
- (45) H. Okazaki, T. Kishi, T. Beppu and K. Arima : *J. Antibiotics.*, **28**, 717 (1975).
- (46) H. Matsushima, T. Fukami, H. Fukami, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **34**, No. 9 (1970) ; **37**, 1873 (1973).
- (47) M. Takashima, H. Sakai and K. Arima : *ibid.*, **26**, 660, 669 (1962).
- (48) A. Takatsuki, S. Suzuki, K. Ando, G. Tamura and K. Arima : *J. Antibiotics.*, **21**, 12, 671, 676 (1968) ; **22**, 151 (1969).
- (49) K. Arima, H. Nakamura, K. Otani, K. Tanaka, K. Masuda, N. Ogasawara, S. Abe and K. Komagata : *J. Antibiotics.*, **3**, 285, 347, 353, 451, 439 (1950) ; **4**, 232, 278, 281, 342 (1951).
- (50) K. Arima, K. Komagata and H. Nakamura : *J. Agr. Chem. Soc. Jap.*, **27**, 339, 345, 383, 389, 565 (1953).
- (51) K. Arima, N. Ogasawara : *ibid.*, **27**, 537 (1953).
- (52) 有馬 啓, 駒形和男, 養田成彦, 杉山普一, 風間政二 : 農化, **28**, 629, 635 (1954).
- (53) K. Arima, K. Komagata, S. Sugiyama, M. Kazama and K. Yano : *Bull. Agr. Chem. Soc.*, **19**, 51, 61 (1955).
- (54) H. Tanaka, S. Sugiyama, K. Yano and K. Arima : *ibid.*, **21**, 67 (1957).
- (55) S. Sugiyama, K. Yano, K. Komagata, M. Kazama and K. Arima : *ibid.*, **24**, 211, 243, 249, 255 (1960).
- (56) S. Sugiyama, K. Yano, H. Tanaka, K. Komagata and K. Arima : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 233 (1958).
- (57) K. Yano and K. Arima : *ibid.*, **4**, 241 (1958).
- (58) K. Yano, M. Morimoto and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 91, 689 (1969).
- (59) K. Yano, N. Higashi and K. Arima : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 1, 277 (1969).
- (60) K. Yano, N. Higashi, S. Nakamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1363 (1969).
- (61) N. Higashi, H. Shoun, K. Yano, S. Nakamura and K. Arima : *ibid.*, **34**, 964 (1970).
- (62) S. Nakamura, Y. Ogura, K. Yano, N. Higashi and K. Arima : *Biochemistry*, **9**, 3235 (1970).
- (63) N. Higashi, H. Shoun, K. Yano, K. Hiromi and K. Arima : *J. Biochem.*, **67**, 759 (1970).
- (64) N. Higashi, H. Shoun, K. Yano, K. Hiromi and K. Arima : *Zeit. Naturforsch.*, **27**, 1172 (1972).
- (65) H. Shoun, N. Higashi, T. Beppu and K. Arima : *EEBS-Lett.*, **49**, 13 (1974).
- (66) K. Arima, M. Nagasawa, M. Bae and G. Tamura : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1636 (1969).
- (67) M. Nagasawa, M. Bae, G. Tamura, N. Watanabe, H. Hashiba, M. Murakami and K. Arima : *ibid.*, **33**, 1644 (1967) ; **34**, 798, 801, 838 (1970).
- (68) T. Beppu and K. Arima : *J. Biochem.*, **70**, 263 (1971).
- (69) A. Yanai, T. Beppu and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 149 (1970).

- (70) T. Beppu and K. Arima : *Bact.*, **93**, 80 (1967).
 (71) *idem* : *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 453 (1972).
 (72) T. Beppu, K. Kawabata and K. Arima : *J. Bact.*, **110**, 485 (1972).
 (73) T. Beppu, H. Yamamoto and K. Arima : *Anti-microb. Ag. Chemoth.*, **8**, 617 (1975).
 (74) T. Beppu, T. Uchida, Y. Nozaki and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1129 (1975).
 (75) T. Uchida, T. Beppu and K. Arima : *ibid.*, **39**, 1137 (1975).
 (76) T. Beppu, K. Arima and K. Sakaguchi : *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 17 (1961).
 (77) T. Beppu and K. Arima : *J. Biochem.*, **48**, 557.
 (78) 別府輝彦, 国本 裕, 有馬 啓 : 日農化大会講演要旨, p.129 (1975).
 (79) T. Satoh, T. Beppu and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1565 (1975).
 (80) T. Saiki, R. Kimura and K. Arima : *ibid.*, **34**, 1762 (1970) ; **36**, 2357 (1972).
 (81) T. Saiki, H. Shinshi and K. Arima : *J. Biochem.*, **1973**, 1239.
 (82) K. Nose and K. Arima : *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 54, 63 (1967).
 (83) T. Sakamoto, C. Araki, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 356 (1972) ; inpress (1977).
 (84) M. Dohi, K. Nagaoka, G. Tamura and K. Arima : *ibid.*, **34**, 1 (1970) ; **35**, 10 (1971).
 (85) M. Nose and K. Arima : *J. of Antibiotics*, **22**, 135 (1969).
 (86) T. Beppu, M. Nose and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 197 (1968).
 (87) E. Sato and K. Arima : *ibid.*, **34**, 739 (1970).
 (88) S. Mizushima and K. Arima : *J. Biochem.*, **47**, 351, 600, 837 (1960) ; **48**, 205 (1961).
 (89) T. Oka and K. Arima : *J. Bact.*, **90**, 734, 744 (1965) ; *J. Biochem.*, **58**, 320 (1965).
 (90) M. Beppu and K. Arima : *J. Bact.*, **83**, 143, 151 (1964).
 (91) K. Izaki and K. Arima : *American Society for Microbiol.*, **89**, 1335 (1965) ; *J. Bact.*, **91**, 628 (1966).
 (92) K. Izaki and K. Arima : *Nature*, **200**, 192, 384 (1965).
 (93) 山口玄示, 田村学造, 有馬 啓 : 農化, **41**, 659, 667 (1967).
 (94) A. Yanai, T. Beppu and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1301, 1307, 1505 (1976).
 (95) A. Yanai, K. Kato, T. Beppu and K. Arima : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 1164 (1976).
 (96) K. Watanabe, T. Beppu and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2105, 2113 (1972).
 (97) T. Nakamura, G. Tamura and K. Arima : *J. Ferment. Technol.*, **45**, 869 (1967).
 (98) T. Nakamura, G. Tamura and K. Arima : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 530 (1968) ; in press (1977).

(昭和 52 年 2 月 14 日受理)