ノート

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 57, No. 4, pp. 329~331, 1983]

ビアラホス生産放線菌の変異株による
ビタミンの B₁₂ 定量

小川 弘, 今井 敏, 清水敏克

佐藤篤行, 鶴岡崇士*, 小嶋道男

(明治製菓株式会社薬品開発研究所, *中央研究所)

昭和 57 年 11 月 25 日 受理

Estimation of Vitamin B₁₂ by Use of
Bialaphos Producing *Streptomyces*
Mutants

Hiroshi OGAWA, Satoshi IMAI,
Toshikatsu SHIMIZU, Atsuyuki SATOH,
Takashi TSURUOKA* and Michio KOJIMA

Pharmaceutical Development Laboratories,
Meiji Seika Kaisha, Horikawa-cho,
Saiwai-ku, Kawasaki 210

*Central Research Laboratories, Meiji
Seika Kaisha, Morooka-cho,
Kohoku-ku, Yokohama 222

Bialaphos (2-amino-4-(hydroxy) (methyl) phosphinoyl-butaryl-alanyl-alanine) is a new herbicide produced by *Streptomyces hygroscopicus*. As this compound has a methyl group in its structure, vitamin B₁₂ may play an important role in its production. We isolated mutants which showed a vitamin B₁₂ requirement in the production of bialaphos. Using these mutants, we found that bialaphos production was proportional to vitamin B₁₂ concentration, and estimation was made utilizing this phenomenon. Although the detectable concentration was relatively high (1 to 5 ng/ml) compared with other assay method, this new method may be useful in estimations of vitamin B₁₂ in commercial preparations or in some samples from natural sources, even in the presence of antibiotics.

(Received November 25, 1982)

ビタミン B₁₂ は抗悪性貧血因子として 1948 年, Riches らによって単離され⁽¹⁾, その構造は 1955 年, Hodgkins らによって決定された⁽²⁾. ビタミン B₁₂ は

医薬用, 飼料用として用途が広く *Propionibacterium shermanii*, *Streptomyces olivaceus*, *Pseudomonas denitrificans* などの微生物を用いた醗酵生産により需要がまかなわれている。

ビタミン B₁₂ が関与する酵素反応としては, メチオニンシンターゼ, メチルマロニルコーエンザイム A ムターゼなど 10 種以上が発見されているが, 最近, 抗生物質など二次代謝産物の生産にビタミン B₁₂ が関与することが報告されている⁽³⁾.

著者らは含リン除草剤ビアラホス (2-アミノ-4-(ハイドロキシ) (メチル) ホスフィノイル-ブチリル-アラニルアラニン) の生合成研究に⁽⁴⁾, ある種の変異株がビアラホスの生産にビタミン B₁₂ を必要とすることを見出した。これら変異株の採取法, 性質および培養液中の蓄積物については別報に述べるが, この変異株 (ビタミン B₁₂ 依存株あるいは単にビタミン B₁₂ 欠損株と称す) を培養しビタミン B₁₂ を添加すると生育には影響を与えず添加量に応じてビアラホスを生産することを見出し生成ビアラホス量を生物検定法により定量することでビタミン B₁₂ の定量が可能であることを発見した。

ビタミン B₁₂ の定量法としては吸光度法のほか, *Lactobacillus leichmannii*, *Euglena gracilis*, *Escherichia coli* 113-3, *Ochromonas malhamensis*, などのビタミン B₁₂ 要求性微生物を用いた微生物的定量法やグリセロールデヒドラーゼを用いる酵素法が知られているが⁽⁵⁾, 二次代謝産物の生産を利用したビタミン B₁₂ の定量法はわれわれの知る限りにおいては, 初めての報告である。

ビタミン B₁₂ 検定菌の調製 ビアラホスの生産菌である *Streptomyces hygroscopicus* ATCC-21705 を変異処理して得たビタミン B₁₂ 依存株を S-1 培地 (Table I) で 28°C, 24 時間振盪培養後 250 ml 三角フラスコに分注殺菌した P-2 培地 (Table I) 30 ml に 2% の割合で植菌し, 28°C 220 回転で 24 時間振盪培養する。菌体を生理食塩水で, 2 回洗浄後, 50 mm-リン酸緩衝液 (pH 6.5) でもとの 1/2 容量にメスアップし洗浄菌体懸濁液とする。

ビタミン B₁₂ 添加培養 洗浄菌体懸濁液 1.0 ml を小試験管に入れ, ビタミン B₁₂ 標準液 (シアノコバラミンとして 5~100 ng/ml) および同程度に希釈した試料液各 1.0 ml ずつを添加し 28°C で振盪培養する。約 20 時間培養後, 煮沸することにより反応をとめ, 遠心 (3000

Table I. Composition of Media Used for Determining Vitamin B₁₂

S-1		P-2		D-1	
Soluble starch	2.0%	Glycerin	3.0%	Glucose	1.0%
Peptone	1.0	Yeast extract	3.0	Meat extract	0.5
Meat extract	0.3	KH ₂ PO ₄	0.1	NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.05	CoCl ₂ ·6aq	0.0001	NaCl	0.5
pH 7.0		pH 7.0		MgSO ₄ ·7aq	0.02
				K ₂ HPO ₄	0.3
				Agar	1.5
				pH 7.0	

回転, 5分) して上清を得る。

生成ビアラホスの検定 得られた上清について, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌として Table I に示す特殊な組成の検定培地 (D-1) を用いることにより, 生成ビアラホスの生物検定を行った。

ビタミン B₁₂ の定量 ビタミン B₁₂ の濃度を対数で縦軸に *Bacillus subtilis* の平板上の阻止円径を横軸に表すと Fig. 1 に示すように 5ng/ml~200ng/ml で直線関係となる。この標準曲線はビタミン B₁₂ 検定菌の増殖

Fig. 1 The Relationship between Concentration of Vitamin B₁₂ and Inhibitory Zone. The harvested cells of vitamin B₁₂ deficient mutant were washed twice with saline, suspended in 50mm Na-K-phosphate buffer and pipetted into each small test tube. Samples contained vitamin B₁₂ were added to each test tube. The test tubes were cultivated for 20hr at 28°C, and then boiled and centrifuged at 3000rpm for 5min. The bialaphos formed in supernatant was assayed by use of *Bacillus subtilis*.

Table II. Results of Vitamin B₁₂ Assay

Vitamin B ₁₂ preparations	Calcd. value*	Anal. value*
Mecobalamin (Methycobal, Eisai)	100.9	108
Hydroxocobalamin (Fresmin, Takeda)	100.7	103
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂ , Nihon zoki)	100	101
Cobamamide (Cobamamide, Meiji)	85.8	86
Standard (Cyanocobalamin, Wako)	(100)	(100)

* Content of vitamin B₁₂ converted to relative value to standard (Cyanocobalamin, Wako).

状態やビアラホス検定菌の調製状態により若干変動するので定量ごとにつくる必要がある。Table II に本法で測定した各種ビタミン B₁₂ 製剤の例, Table III にビタミン B₁₂ 定量に及ぼす抗生物質の影響について調べた結果を示す。

考察 本法の検出限界は 1~5ng/ml であり *Lactobacillus* や *Euglena* などを検定菌とする方法に比べ 10⁻²~10⁻³ 程度感度は低いが, 培地や操作法は簡単であり, 大量分析も可能である。またビタミン B₁₂ 要求株を検定菌とする方法では菌の増殖を比濁法で測定するため増殖に影響を与える物質 (メチオニン, 抗生物質など) や着色, 濁りの強い試料では著しく精度が低下する⁽⁶⁾。本法では原理的に濁り着色の影響を受けず, また抗生物質についてもアミノ配糖体では 10μg/ml 程度, β-ラクタム, ホスホマイシン, メデマイシン, ノボビオシンなどでは 100μg/ml 程度までビタミン B₁₂ 定量にほとんど影響を及ぼさないことがわかる (Table III)。

なおビアラホスの構成成分である 2-アミノ-4-(ヒドロキシ) (メチル) ホスフィノイル酪酸は, 本法で使用するビタミン B₁₂ 欠損株によりアラニルアラニンの付加を受けてビアラホスに変換される。したがって本物質が存在する可能性のある試料についてはビタミン B₁₂ を添加しない対照区をとる必要がある。しかし現在知られ

Table III. Effect of Antibiotics on Estimation of Vitamin B₁₂

Concentration of antibiotics ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory zone (mm)			Concentration of antibiotics ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory zone (mm)		
	(A)	(B)	(C)		(A)	(B)	(C)
Control	28.0	0	0				
Kanamycin				Penicillin			
1	28.2	0	0	1	27.8	0	20.3
10	26.2	0	17.2	10	28.0	0	25.5
100	19.0	19.0	23.5	100	28.0	0	30.5
Gentamicin				Cephalexin			
1	28.0	0	13.2	1	28.0	0	0
10	28.0	0	20.0	10	28.0	0	18.0
100	26.5	16.0	25.0	100	28.0	0	38.5
Streptomycin				Tetracycline			
1	28.0	0	0	1	28.0	0	14.0
10	28.0	0	16.0	10	28.0	0	22.5
100	25.2	19.0	22.0	100	26.5	26.0	28.0
Dibecacin				Medemycin			
1	27.6	0	12.5	1	28.0	0	0
10	27.6	0	19.5	10	28.2	0	17.5
100	26.0	14.0	24.5	100	28.2	0	25.5
Kasugamycin				Novobiocin			
1	28.0	0	0	1	28.3	0	12.0
10	27.6	0	0	10	28.0	0	25.0
100	27.2	0	0	100	26.0	0	33.0
Destomycin				Gramicidin			
1	28.0	0	0	1	28.0	0	0
10	28.3	0	0	10	28.0	0	12.3
100	26.0	0	0	100	28.3	18.0	19.0
Fosfomycin				Cycloserine			
1	28.0	0	14.0	1	27.8	12.5	0
10	27.3	0	14.0	10	27.8	13.5	0
100	27.5	0	15.5	100	26.8	30.0	31.5

Vitamin B₁₂ standard solution (10 ng/ml) mixed with each antibiotics was used. (A), inhibitory zone after cultivation with vitamin B₁₂; (B), inhibitory zone after cultivation without vitamin B₁₂; (C), inhibitory zone of antibiotic alone diluted twice with the buffer.

ているその他の生合成中間体⁽⁴⁾は、まったく影響を与えない。

生産にビタミン B₁₂ が関与すると考えられる抗生物質としてホスホマイシン、ゲンタミシン、ホーチミシンなどが知られており、それら抗生物質生産菌のビタミン B₁₂ 依存株を採取すれば、本法と同様な原理でビタミン B₁₂ の定量が可能になるものと考えられる。

以上述べたように本法は感度面では現在用いられている微生物法に劣るが、測定原理が異なるため、定量阻害物質が異なり、また、操作も簡単であることから研究目的によっては十分に使い分けあるいは併用することが可能であろう。

終りに、本研究を遂行するにあたり終始ご指導いただいた東京大学応用微生物研究所大矢望教授、瀬戸治男助

教授に深謝いたします。

- (1) E. L. Rickes, N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood and K. Folkers.: *Science*, **107**, 396 (1948).
- (2) D. C. Hodgkins, J. Pickworth, J. H. Robertson, K. N. Trneblood, P. J. Prosen and J. G. White.: *Nature*, **176**, 328 (1955).
- (3) S. Okumura, T. Deguchi and H. Marumo : *J. Antibiot.*, **34**, 1360 (1981).
- (4) H. Seto, S. Imai, T. Tsuruoka, A. Satoh, M. Kojima, S. Inoue, T. Sasaki and N. Ōtake : *J. Antibiot.*, **35**, 1719 (1982).
- (5) J. Pawelkiewicz : "Method in Enzymology," Vol. 18C, ed. by D. B. McCormick and L. D. Wright, Academic Press, New York, 1971, p. 32.
- (6) 上久保 正 : 「ビタミンと補酵素・下」(生化学実験講座 13), 日本生化学会編, 東京化学同人, 1975, p. 446.