366. 宮木高明, 林 誠, 山脇 豊, 田中照夫: 腐敗アミンの研究 (第 15 報¹⁾)*Eremothecium ashbyii* の Riboflavin 産生能に及ぼす腐敗アミンの影響

Komei Miyaki, Makoto Hayashi, Yutaka Yamawaki, and Teruo Tanaka :

Effect of Biogenic Amines on Production of Riboflavin

by *Eremothecium ashbyii*.

(Institute for Putrefaction Research, Chiba University*)

著者らは腐敗アミンが微生物の発育或いは代謝に如何なる影響を及ぼすかについて研究している。その一成果として putrescine, cadaverine, γ -aminobutyric acid 及び δ -aminovaleric acid がいずれも *Streptomyces griseus* の streptomycin 産生能に好影響をもたらすことを報告した¹⁾。

著者らは先に riboflavin 生合成の機構を研究するためにベンゼノイド部の構成材料として acetoin, diacetyl, crotonaldehyde をえらび、また他の部分の材料として uracil, 4-aminouracil, 4,5-diaminouracil, allantoine をえらび、これらを添加した培地で、*Eremothecium ashbyii* の riboflavin 産生能がいかに影響されるかを検討した。またこれに伴い各種脂肪酸 (formic, acetic, propionic, butyric, caproic, enanthic, capric, lauric, stearic, palmitic, oleic, fumaric, citric acid) 及び putrescine, agmatine 等の添加影響を調べた。その結果はわずかに putrescine の場合のみに増強効果を見たに過ぎない²⁾。なおこの際に、振盪培養中菌体を均一懸濁せしめるために Tween 80 を添加したのであるが、Tween 80 を加えない培地に比して明らかに riboflavin 産生量の大きいことを知り、Tween 80 の増強効果を推定した。しかしこれは oleic acid 添加の riboflavin 産生量の増強に関連してすでに Hickey³⁾ の観察したところであつて、著者らの新知見ではなかつた。また著者らは Tween 80 添加培地使用のため、oleic acid の増強効果は見出し得なかつたわけである。

さて上記の如く、putrescine の効果を見出したことは、新たに腐敗アミン全般に関する興味を抱かしめる。*E. ashbyii* は一種の腐敗微生物とみなされもするので、腐敗アミン類がこの菌の生理現象殊に riboflavin 産生になんらかの影響をもつのではないかと考えられる。そこで著者らは cadaverine, putrescine, agmatine, ethylenediamine, ethanolamine, histamine, tyramine, choline, γ -aminobutyric acid, 及び δ -aminovaleric acid の 10 種アミンを用い、合成培地における *E. ashbyii* の riboflavin 産生能に及ぼす効果を追及した。

実験方法としては Table I に示す如き合成培地を用い、これに各アミンを夫々単独に 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mol 添加し、28° で振盪培養し、3, 5, 7 日目に全 riboflavin 量を定量した。定量法としては過マンガン酸カリ処理後、Coleman spectrophotometer により 445 m μ における比色法をとつた。

その結果は Table II~XI の如き成績を得た。しかし *E. ashbyii* によるこの種の実験では一般に再現性が少ないとされている。著者らの実験でも常に一定の型の増強を示すとは限らなかつた。これに加えて本研究では培養条件により常に riboflavin 収量は 10%内外の変動があるので効果の制定には 20%以上の増加を以つてした。しかして幾回かの繰返し実験を行い、その結果をまとめると Table XII の如くなる。即ち cadaverine は 10^{-5} ~ 10^{-6} mol 添加したとき最高の riboflavin 産生能の増強を示し、その平均は +72%である。putrescine は 10^{-4} ~ 10^{-5} mol 添加時平均 +21%の増強率を示す。ethylenediamine は 10^{-5} ~ 10^{-6} mol 添加時 +37%を示す。ethanolamine, choline, γ -aminobutyric acid 及び δ -aminovaleric acid は殆んど効果は認められず、agmatine, histamine 及び tyramine は高濃度 10^{-3} mol で明らかに阻害を示す、agmatine, histamine 及び tyramine の如く 10^{-3} mol で明らかに riboflavin 産生能を阻害している場合を除き、いずれのアミンもその無添加の対照と比較して乾燥菌体重には差異は認められなかつた。

* Okubo, Narashino-shi, Chiba.

1) 宮木, 林, 海野: 本誌 75, 1166(1955).

2) 宮木, 林, 宮崎, 田中, 山脇: 日本ビタミン学会年会で発表 (1954 年 7 月).

3) Hickey: J. Bact. 66, 24(1953).

Table I. Basal Medium

Glucose	10 g
Sodium glutamate	5 "
NH ₄ NO ₃	2 "
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	1 "
KCl	0.5 "
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	"
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	5 "
Inositol	30 "
Thiamine-HCl	1.5 "
Biotin	50 γ
Tween 80	0.1 g
per 1,000 cc pH 6.8	

Table II. Cadaverine

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.
Control	6.4	88	7.0	130	7.4	160
10 ⁻³ mol.	6.0	88	7.0	168	7.4	155
10 ⁻⁴ "	6.0	80	7.0	185	7.4	175
10 ⁻⁵ "	6.0	95	7.0	190	7.4	190
10 ⁻⁶ "	6.0	88	7.0	200	7.4	275

Table III. δ-Aminovaleric acid

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.
Control	6.0	74 ₁	7.0	115	7.6	140
10 ⁻³ mol.	6.2	72	7.2	110	7.8	142
10 ⁻⁴ "	6.0	76	7.2	118	7.8	138
10 ⁻⁵ "	6.0	76	7.0	120	7.6	140
10 ⁻⁶ "	6.0	78	7.0	120	7.6	135

Table IV. Putrescine

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.
Control	6.4	88	7.0	130	7.4	160
10 ⁻³ mol.	6.2	113	7.0	173	7.4	160
10 ⁻⁴ "	6.2	108	7.0	195	7.4	203
10 ⁻⁵ "	6.2	95	7.0	195	7.4	190
10 ⁻⁶ "	6.2	91	7.0	173	7.4	160

Table V. γ-Aminobutyric acid

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.
Control	6.0	74	7.0	115	7.6	140
10 ⁻³ mol.	6.0	78	7.0	95	7.4	135
10 ⁻⁴ "	6.0	72	7.0	120	7.6	140
10 ⁻⁵ "	6.0	80	7.0	120	7.6	145
10 ⁻⁶ "	6.0	76	7.0	110	7.6	140

Table VI. Agmatine

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.	pH	γ/cc.
Control	6.8	65	8.4	100	8.4	100
10 ⁻³ mol.	5.8	18	8.2	70	8.2	70
10 ⁻⁴ "	6.6	48	8.2	110	8.2	92
10 ⁻⁵ "	6.8	60	8.2	120	8.2	95
10 ⁻⁶ "	6.8	65	8.2	120	8.2	103

Table VII. Ethylenediamine

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.
Control	6.2	76	7.8	102	7.8	83
10^{-3} mol.	6.4	72	7.6	135	7.8	123
10^{-4} //	6.4	74	7.2	135	7.8	123
10^{-5} //	6.2	78	7.2	141	7.4	132
10^{-6} //	6.2	95	7.4	138	7.4	135

Table VIII. Histamine

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.
Control	6.0	87	6.8	110	7.2	125
10^{-3} mol.	6.0	35	6.8	55	7.8	58
10^{-4} //	6.0	80	6.8	118	7.4	125
10^{-5} //	6.0	83	6.6	125	7.4	130
10^{-6} //	6.0	88	6.6	100	7.4	120

Table IX. Tyramine

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.
Control	6.8	80	8.2	135	8.4	150
10^{-3} mol.	6.0	63	7.6	130	8.4	125
10^{-4} //	6.6	100	8.2	155	8.5	150
10^{-5} //	6.8	113	8.2	145	8.4	150
10^{-6} //	6.8	108	8.2	150	8.4	145

Table X. Choline

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.
Control	6.0	37	7.4	120	8.4	120
10^{-3} mol.	6.0	30	7.6	115	8.4	118
10^{-4} //	6.0	44	7.8	143	8.4	123
10^{-5} //	6.0	39	8.0	120	8.4	115
10^{-6} //	6.0	44	7.8	130	8.4	118

Table XI. Ethanolamine

	3 days		5 days		7 days	
	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.	pH	γ /cc.
Control	6.8	65	8.4	100	8.4	100
10^{-3} mol.	6.8	63	8.2	95	8.2	83
10^{-4} //	6.8	63	8.2	120	8.2	85
10^{-5} //	6.8	63	8.4	120	8.4	92
10^{-6} //	6.8	70	8.4	130	8.4	95

Table XII.

Amines	Number of experiments	Yields of riboflavin (%)			Concentration (mol.)
		minimum	maximum	average	
Cadaverine	7	+10	+155	+72	$10^5 \sim 10^6$
δ -Aminovaleric acid	2	0		0	
Putrescine	10	+ 8	+ 40	+21	$10^4 \sim 10^5$
γ -Aminobutyric acid	3	0	+ 4	+ 2	
Agmatine	5	0	+ 20	+13	
Ethylenediamine	4	+25	+ 57	+37	$10^5 \sim 10^6$
Histamine	4	0	+ 4	+ 2	
Tyramine	4	+ 7	+ 15	+11	
Choline	3	+ 4	+ 20	+10	
Ethanolamine	7	0	+ 30	+10	

なお、定量に用いた液のペーパークロマトグラムは riboflavin 以外黄色物質も蛍光物質も認められなかった。以上の如く、cadaverine, putrescine 及び ethylenediamine の 10^{-5} mol 添加で *E. ashbyii* の riboflavin

産生能の増強が認められたが, これら増強機構を考察するには未だ根拠とする知見は得られていない. しかし量的にみて precursor としてではないことは推定し得る. Goodwin⁴⁾ らは著者らと同じしく *E. ashbyii* の riboflavin 産生に対する各種アミノ酸, プリン, ピリミジン類などの影響を調べている. このうちアミノ酸では L-threonine, L-serine が最も増強, 次いで L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-asparagine が増強することを認めた. L-tyrosine も促進型であるが弱い. Goodwin らの研究はそれ迄のいくつかの研究で認められたところと多少の異同がある. 例えば, Chin⁵⁾, Hickey⁶⁾ は asparagine, aspartate, glutamate が riboflavin 産生へ好影響をもたらすというのに対し, Schopfer⁷⁾ らはこれを否定している. しかし実験条件の差を考慮すればまず Goodwin らの知見は肯定すべきものであろう. しかし彼らはその実験成績に立脚して Plaut⁷⁾ が ^{14}C -labelled formate, CO_2 で行つた成果と比較しつつ riboflavin 生合成に一つの仮説を提示している. そこでは threonine, serine (tyrosine は serine を分解生成) が riboflavin のベンゼノイド形成に用いられるのであろうとされている. この知見は著者らのアミンに関して得られた成果と比較してみた場合, 直接には関連するところを認め得ないが, *E. ashbyii* のアミン代謝などの機構が明らかになるまでは結論を差し控えるべきであらう. また, このアミンによる増強効果は使用菌株によりかなり差異のあることが認められる. これに関しては今後の検討を要するところである.

終りに臨み, 菌株の分与など種々の御援助を得た東京栄養化学工業株式会社研究部, アミンを分与された三菱化成研究所に深謝する.

実 験 の 部

培養 基礎培地は Table I の如き合成培地を用い, これにそれぞれのアミンを 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mol 添加し, 坂口コルベンに 100 cc ずつ分注し, 予じめ基礎培地で 2 日間振盪培養した *Eremothecium ashbyii* を 5 cc ずつ接種し, 28° の恒温室内で水平往復式振盪機 (振巾 5 cm, 130 往復/分) で培養した.

全 riboflavin 定量法 培養液をよくふりまぜながら培養菌体ごと 1~2 cc を大試験管にとり, 80%エタノールを加え約 10 cc とし, 90%酢酸 1 cc を加え, 10° 以下に保ちながら 4% KMnO_4 液 1 cc を加えふりまぜる. 5 分後, 3% H_2O_2 を滴下し, KMnO_4 を脱色したる後, 80%エタノールをもつて正確に 25~50 cc に定容する. 定容後濾過し, 濾液約 10 cc を検体となし, Coleman spectrophotometer により 445 m μ で吸光係数を測定し, 1~10 γ/cc の範囲内において定量する.

用いたアミン類 cadaverine, putrescine, agmatine, tyramine, choline, ethanolamine, ethylenediamine (著者らにより合成された), histamine (宝製薬製の市販品), γ -aminobutyric acid, δ -aminovaleric acid (三菱化成研究所より分与された).

千葉大学腐敗研究所

Summary

Effect of cadaverine, putrescine, agmatine, ethylenediamine, ethanolamine, histamine, tyramine, choline, γ -aminobutyric acid, and δ -aminovaleric acid on the riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* was examined with synthetic medium. Addition of 10^{-5} mole of cadaverine, putrescine, and ethylenediamine effected 72%, 21%, and 37% respective increase in riboflavin production, compared to the control without any addition. Agmatine, histamine, and tyramine in 10^{-3} mole concentration clearly injured riboflavin production but other amines were ineffective (cf. Tables II to XII).

(Received August 8, 1955)

4) Goodwin: Biochem. J. (London) **57**, 631(1954).

5) Chin: J. Fermentation Technol. (Japan) **25**, 10(1947).

6) Schopfer et al.: Schweiz. Z. Pathol. v. Bakteriologie, **8**, 521(1945).

7) Plaut: Federation. Proc. **12**, 254(1953).