〔農化　第36巻，第8号，p. 696～699，1962〕

微生物の生産するフォスフォジエステラーゼに関する研究（第3報）*

糸状菌による核酸関連物質分泌に及ぼす弗化物の影響（その2）

杉本　洋，岩浅　孝，石山二郎，横塚　保　（野田醤油株式会社中央研究所）

昭和37年1月5日受理

緒　　言

NaF が糸状菌の液内培養過程において核酸関連物質の分泌を促進する現象に関しては，先にペニシリウムの1菌株について報告したとおりであるが[1]，その原因に関して細胞内 RNA の代謝回転に関係する酵素群の挙動とは別個に細胞質膜（*Cytoplasmic membrane*）のいわゆる“透過性”（permeability）が関係していることの可能性についてプリン要求変異株を用いた実験の結果，一応の示唆を得たので報告する．

実験の方法

実験に用いた菌株は東京大学植物学教室石川辰夫氏より分譲を受けた *Neurospora crassa* ad-8（E 12 A）である．この変異株は Partridge 等[2]によって人工的に取得され ad-E 変異株として報告されている菌株で，後に Giles 等[3]によっていっそう詳細に検討され，そのブロック位置は IMP と AMPS の間にあり，したがってアデニロサクシネートシンセターゼを欠き，アデニンを特異的に要求し，通常の培養では細胞外培地中にヒポキサンチンを蓄積する．

ad-8 変異株及びその原株である *N. crassa*（76 A）をポリペプトン-グルコース培地（グルコース 3.0%，ポリペプトン 1.0%，KH_2PO_4 0.05%，K_2HPO_4 0.05%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%，pH 6.4）100 ml に接種，30° で6日間振盪培養を行い，その際培地にアデニン及び NaF を種々の量で添加して，その蓄積物に及ぼす影響を検討した．

吸光度測定には日立 EPU-2A 型光電光度計を用いた．さらに蓄積核酸関連物質の定性，定量には培養濾液を直接2種の濾紙ペーパークロマトグラフィー[4,5]で展開し，R_F 値の標品との比較，燐酸基の検出[6]，過ヨード酸酸化[7]及び紫外部吸収スポットを常法により，0.1 N-HCl，または 0.5 N-NH_4OH で溶出し，溶出物の紫外部吸光曲線により同定を行った．なお，培養濾液を直接試料として，スポッティングすることの是非についても若干の検討を試みたが，本実験方法に関する限り，原培地を同じ溶媒で展開し，種々の R_F 値について紫外部吸光性を測定したが，いずれもブランク値との間に有意差は認められず，蓄積物の定量にはだいたい支障は無いものと考える．

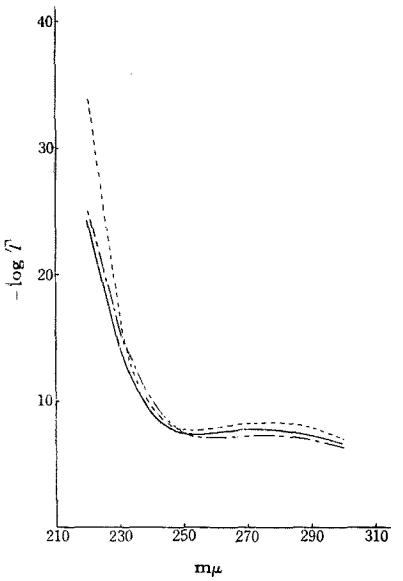
結果及び考察

N. crassa（76 A），すなわち原株においては NaF の核酸関連物分泌に対する促進効果は全く認められない（第1図）．

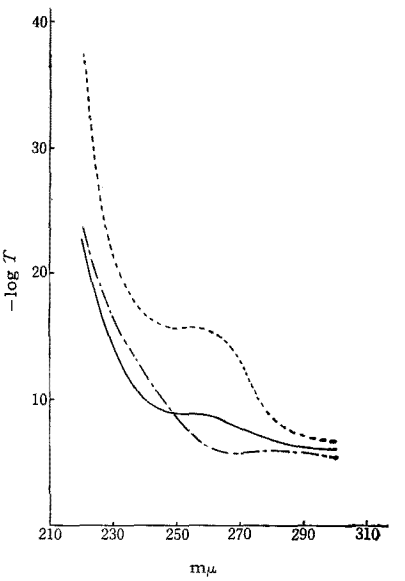
すなわち NaF の添加量を 0，M/100，M/50 と変化させて培養を行っても NaF による生育阻害現象は当然現われるが，いずれの場合も培養濾液の紫外部吸光曲線は原培地とほとんど同様であってペニシリウム属の如き菌株とは異なり，一般にノイロスポラ属では NaF の添加，無添加の如何にかかわらず，培地中に核酸関連物質を分泌することはほとんど無いように思われる．とにかく，これらの物質の分泌が行われるというからには細胞内におけるこれらの物質の生成と蓄積とが前提となるわけであって，後者では正常な条件下では RNA の代謝回転は円滑であって分解生成物が蓄積されることは無いように思われる．すなわち，ad-8 変異株に関しては，他の要因による核酸関連物質の分泌に患らわされ混乱を招くことなくして，ある程度純粋に変異による蓄積物質の質及び量に関する検討，及びそれらに及ぼす NaF の影響の解析が可能となる．このことが実験に本株を選択した理由である．

---

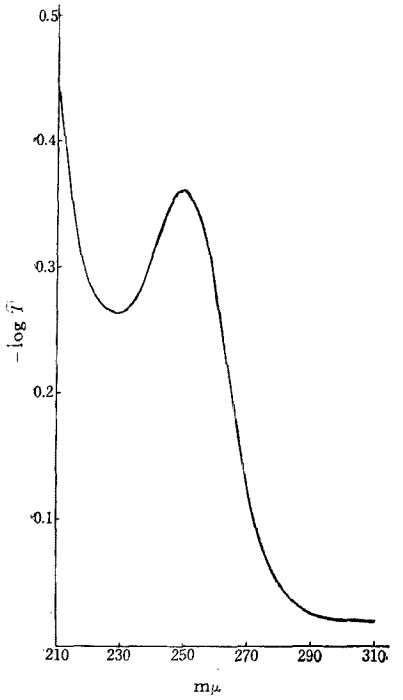
* Studies on Phosphodiesterases produced by Microorganisms. Part III. The Influence of Fluoride on the Excretion of Nucleic Acid Derivatives by Fungi. (2)
By Hiroshi SUGIMOTO, Takeshi IWASA, Jiro ISHIYAMA and Tamotsu YOKOTSUKA (Central Research Institute of Noda Shôyu & Co., Ltd.)



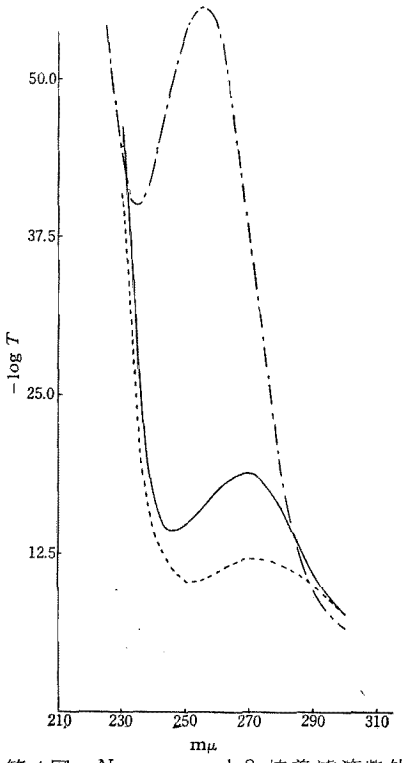
第 1 図　*Neurospora crassa* 野生型培養濾液紫外部吸収スペクトラム
30°，7 日間
…… 培　地　—— NaF M/100
—·— NaF 0



第 2 図　*N. crassa* ad-8 培養濾液紫外部吸収スペクトラム
（アデニン硫酸塩 100γ/ml）
30°，7 日間
…… 培　地　—— NaF M/100
—·— NaF 0



第 3 図　ad-8 蓄積物紫外部吸収スペクトラム

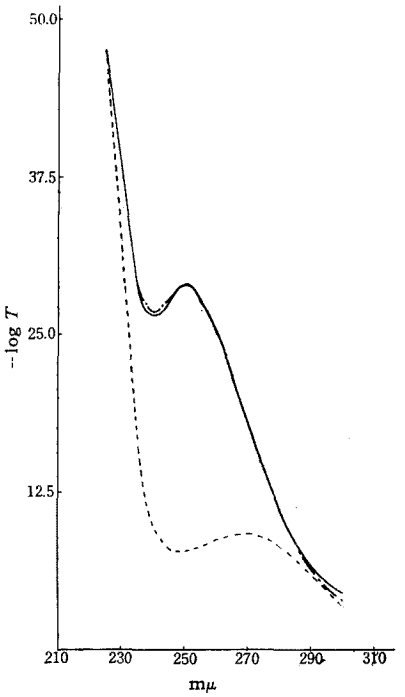


第 4 図　*N. crassa* ad-8 培養濾液紫外部吸収スペクトラム
（アデニン硫酸塩 30γ/ml）
30°，7 日間
…… 培　地　—— NaF M/100
—·— NaF 0

ad-8 変異株はその変異の性質上，その生育に当然のことながらアデニンを要求するが，培地に添加するアデニン量はまた，ヒポキサンチンの蓄積量に大きな影響を与える．すなわち充分量のアデニン硫酸塩（100 γ/ml）を添加した場合もまた，アデニンの消費による培養濾液紫外部吸光曲線の低下が見られるのみで，関連物質の蓄積現象はほとんど観察されない（第 2 図）．

本株に関する限り，生育曲線を検討した結果，そのアデニン硫酸塩の制限濃度は 30 γ/ml 付近にあり，以下の濃度では著しい生育制限を受けるが，一方 NaF 無添加で本株を 30°，6 日間振盪培養を行った場合，培養濾液の 250～260mμ 付近の吸光度はこの濃度の近辺で最大となる．これはウラシル要求性の *Micrococcus glutamicus* 変異株によるオロチン酸蓄積の場合[8]や *E. coli* の非特異的プリン要求性変異株による AICA リボシドの蓄積の場合[9]と類似した現象であって，プリンの "de novo" 合成における "Potential feed back control[10]" の結果であると推定される．

この吸光性物質を前記ペーパークロマトグラフィーで展開した結果，蓄積物質は単一であってこのスポットを溶出し吸光曲線を R_F 値，及びその他の検出反応と合せ検討した結果，ヒポキサンチンに他ならないことが判明した（第 3 図）．



第5図　*N. crassa* ad-8 培養濾液紫外部吸収スペクトラム
(アデニン硫酸塩 10 γ/ml)
30°，7日間
…… 培　地　—— NaF M/100
—·— NaF 0

第1表　ヒポキサンチン分泌量

アデニン硫酸塩 (γ/ml)	NaF (mol)	ヒポキサンチン (mg/l)	乾燥菌体量 (mg/l)	単位菌体当りヒポキサンチン (mg/mg)
100	0	—	—	—
	1/100	—	—	—
30	0	459	5030	0.091
	1/100	—	1850	—
10	0	234	1370	0.171
	1/100	238	860	0.272

この場合においても M/100 濃度の NaF を添加した方はアデニン硫酸塩 100 r/ml の場合と同様に核酸関連物質の蓄積は微弱であった．このことは NaF によって生育量が 36.8% (乾燥菌体重量比) に制限される結果，このアデニン量では相対的に制限濃度を遙かに上回りいぜんとして "feed back" 制御機構が働く結果であろうと推考される (第4図)．

NaF の添加，無添加に関係なく培養濾液の紫外部吸光度が一致するアデニン硫酸塩の濃度は，以上の濃度よりもさらに低い 10 γ/ml 付近にあってこの場合，培養濾液の吸光曲線はほとんど両者一致を見る (第5図)．

この場合には両者とも明らかに 250 mμ 付近にピーク (pH 5.6) を持つ物質の蓄積が観察される．この物についても同様な方法で同定及び定量を試みた結果，蓄積物は両者ともヒポキサンチンであってそのヌクレオシド，ヌクレオチドの分泌は見られなかった．

一方，この場合も M/100 濃度の NaF の添加により，アデニン量による生育制限に加えて明らかに生育阻害効果が見られ，そのため生育量は無添加の場合に比較して 62.8% (乾燥菌体重量比) となる．すなわち，単位菌体量当りの分泌ヒポキサンチン量は 1.59 倍となり，明らかに NaF による分泌促進効果が見られるのである (第1表)．

いずれにせよ，このように蓄積物がヒポキサンチンに限られ，キサンチン，グアニン等の蓄積が見られないのは，Magasanik 等[11]の報告の如く IMP デヒドロゲナーゼの生成に，GMP がレプレッサーとして働く効果によるものであろう．

この分泌されたヒポキサンチンは，本株の性質よりして明らかに RNA 以外に起因するものであり，したがって NaF の分泌促進効果の一因としての細胞質膜の透過性に与える影響を示唆するものである．すなわち透過性の増加の結果として "feed back" 制御機構の機能低下をきたしていると考えるのが自然であろう．

他に考えられる原因として NaF がプリン生合成に全く阻害を与えないか，あるいは逆に促進しているという可能性であるが，他の菌株，たとえばペニシリウム属における既報のデータからもその可能性は少なく，やや無理があるような感がある．

要　　約

NaF が糸状菌の液内培養の過程において核酸関連物質の分泌を促進する現象の原因に関して，*Neurospora crassa* のアデニン特異的要求性変異株 (ad-8) を用いて解明を試み，菌体内 RNA 代謝回転関係の挙動とは別個に，細胞質膜のこれら物質に対するいわゆる "透過性" が関係している可能性を見出し，いわゆる "feed back" 制御機構と関連づけて考察を行った．

本報告の終了に当り御懇篤な御指導を賜わりました東大坂口謹一郎名誉教授，有馬啓教授，池田庸之助教授，当研究所所長茂木正利氏，貴重な変異株を御恵与いただきました東大理学部石川辰夫氏，本報告の発表を許可されました本社首脳部の各位，並びに本実験の一部を担当していただきました同室の竹内啓幸氏，石川道子嬢初め所内の各位に厚く御礼申上げます．

(1) 杉本 洋, 岩浅 孝, 石山二郎, 横塚 保: 本誌, **36**, 690 (1962).
(2) C. W. H. Partridge, N. H. Giles: *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 237 (1957).
(3) N. H. Giles, C. W. H. Partridge, N. J. Nelson: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **43**, 305 (1957).
(4) R. Markham, J. D. Smith: *Biochem. J.*, **49**, 401 (1951).
(5) B. Magasanik, E. Vischer, R. Doniger, D. Elson, E. Chargaff: *J. Biol. Chem.*, **186**, 37 (1950).
(6) P. Boulanger, J. Montreuil: *Bull. soc. chim. biol.*, **33**, 784 (1951).
(7) J. G. Buchanan, C. A. Dekker, A. G. Long: *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3162.
(8) 田中勝宣, 中嶋由美, 木下祝郎: 昭和36年度日農化大会シンポジウム講演 (1961).
(9) J. S. Gots: *J. Biol. Chem.*, **228**, 57 (1957).
(10) J. B. Wngaarden, D. M. Ashton: *ibid.*, **234**, 1492 (1959).
(11) A. P. Levin, B. Magasanik: *ibid.*, **236**, 184 (1961).

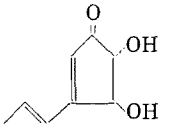
〔農化 第 36 巻, 第 8 号, p. 699～703, 1962〕

Aspergillus fischeri Wehmer による terrein の生成*

三沢正愛, 奈良 高, 中山 清, 木下祝郎 (協和醗酵工業株式会社東京研究所)

昭和 37 年 1 月 9 日 受 理

Terrein, $C_8H_{10}O_3$ は Raistrick 及び Smith[1] により, 糸状菌 *Aspergillus terreus* の代謝生産物の一つとして発見, 分離された物質で, 後に Grove[2] は *Penicillium raistrickii* もこの物質を生産することを報告している. この化学構造の決定については, 種々論議されているが[2,3], 1955 年 Barton[4] らによって次式が提唱され, 現在に至っている.



Terrein の化学構造式

著者らは糸状菌の代謝産物を検討中, *Aspergillus fischeri* Wehmer が培地中に著量の紫外部吸収物質を蓄積することを認め, これを分離, 同定した結果, terrein であることを確認した. さらに若干の生産培地の検討を行ったところ, 培養条件によっては約 5 mg/ml 程度生産することが明らかになったので, これらの実験結果を報告する.

実 験 方 法

菌株: われわれの研究所保存の *Aspergillus fischeri* Wehmer A-7-11 株を用いた.

培養: 大型試験管及び 250 ml 容三角コルベンを使用し, 下記の培地をそれぞれ 10 ml 及び 30 ml 入れ, 4～6 日間 30° で振盪培養を行った. 培地組成はグルコース 5%, $(NH_4)_2SO_4$ 1.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, K_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, 酵母エキス 1.0% 及び $CaCO_3$ 1.0% で, グルコースは別に殺菌し, 植菌前添加した. 試験管培養の場合は, 斜面培養した菌の胞子を直接移植し, フラスコ培養では斜面培養した菌に滅菌水を加えて作った胞子懸濁液を各フラスコに 1 ml ずつ移植した. 植菌時の pH は 7.0 付近である.

定量: Terrein には紫外部吸収が認められるので, これを利用して定量した. すなわち培養終了後菌体を濾別し, その 0.05 ml (試料濃度により増減) を東洋濾紙 No. 50 にスポットし, イソ酪酸: 1 N-アンモニア=10: 3 の溶媒系を用い, 上昇法によりペーパークロマトグラフィーを行った. 上昇後風乾し, UV-detector (マナスル化学工業製 UV-LS-2 型) を用いて terrein の R_F ほぼ 0.70 付近のスポットを確認した. 次にこの部分を切

* Formation of Terrein by *Aspergillus fischeri* Wehmer.
By Masanaru MISAWA, Takashi NARA, Kiyoshi NAKAYAMA and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)