

収曲線の形状はよく一致している。

4) *Cryptococcus* はいずれも培養基中に澱粉様物質を形成する。黄色 *Rhodotorula* では *Rht. peneaus* にこの性質が認められる。また赤色 *Rhodotorula* のなかにもこの性質を示すものが2株報告されている。

5) 両群のビタミン要求性は全く一致している。

すなわちカロチノイド形成性 *Cryptococcus* と黄色 *Rhodotorula* の間には両群を分類学上区別するに足る特徴が認められない。したがってこれら両群菌株はいずれも *Rhodotorula* 属のなかで同一の分類群に含まれる種類だと考えられる。

要 旨

カロチノイド生産性 *Cryptococcus* のビタミン要求性を検討し、これらが thiamine のみを要求しその要求型は黄色 *Rhodotorula* 群菌株のそれと全く一致することを認めた。

終りに、御援助御鞭撻をいただいた武田研究所長桑田智博士、終始御懇篤な御指導を仰いだ醸酵研究所長佐藤喜吉博士、恩師坂口謹一郎博士ならびに東京大学教授有馬啓博士に深甚の謝意を表する。また実施に当り御熱心に御協力をいただいた山内栄、見方洪三郎、上野艶子の諸氏に厚く御礼を申し述べる。

本研究の一部は文部省科学研究費によつた。なおこの報告は大阪醸造学会第11回講演会（昭和34年10月）に発表した。

引 用 文 献

- 1) 長谷川武治, 坂野勲: 本誌, **37**, 174 (1959).
 - 2) MAGER, J. and ASCHNER M.: J. Bact., **53**, 283 (1947).
 - 3) LODDER, J. and KREGER-VAN RIJ N.J.W.: The yeast, a taxonomic study (1952).
 - 4) 長谷川武治, 浅野勇, 見方洪三郎: 真菌と真菌症, **1**, 156 (1960).
- (昭和 35, 9, 29 受理)

細菌による藍の工業的還元に関する研究

(第17報) S—8号菌の生育因子について (その3)

高原 義 昌・高崎 義 幸・田辺 脩 (工業技術院醸酵研究所)

Studies on the Reduction of Indigo in Industrial Fermentation Vat

(XVII) On the Growth Factor of the Strain No. S-8 (3)

Yoshimasa TAKAHARA, Yoshiyuki TAKASAKI and Osamu TANABE

(Fermentation Research Institute, Chiba, Japan)

Isolation, purification and chemical structure of the growth factor of the indigo reducing organism, strain No. S-8, were dealt with.

(1) The factor can be purified by means of dialysis, ion-exchange resin treatment and starch zone-electrophoresis of the alkali hydrolysate of aidama.

(2) In the zone-electrophoretic pattern of the acid hydrolysate, two peaks can be detected by ninhydrin test, but only one of them had the activity of the factor.

(3) The factor is consisted of seven amino acids, lysine, valine, glycine, glutamic acid, alanine, leucine and isoleucine.

(4) According to the D.N.P method, alanine is the N-terminal amino acid, and yb the hydrazinolysis method, glycine is found to be the C-terminal amino acid.

(180)

(高原, 高崎, 田辺) 細菌による藍の工業的還元に関する研究 (第17報)

緒 言

前報¹⁾において、藍還元細菌 S—8 号菌の生育にはペプチッドと推定される因子が要求されるが、この因子は藍玉を一規定の苛性ソーダで 100°C、5 時間程度分解することにより分離し透析性となることを報告した。

細菌の生育因子としてのペプチッドに関しては *Lactobacillus casei* に対する Streptogenin²⁾ およびアラニンペプチッド³⁾、火落菌⁴⁾や醤油醗中の *Pediococcus soyae*⁵⁾に対するペプチッド様物質、*Lact. delbrueckii* に対するヒスチジンペプチッドやセリンペプチッド⁷⁾、*Lact. saké* に対する麴汁および清酒中に存在するペプチッド⁸⁾、*Streptococcus faecalis* に対するチロシンペプチッド⁹⁾および *Step. lactis* に対する Streptogenin 様物質¹⁰⁾¹¹⁾等多数の研究があり、その構造の決定されたものも少なくない。

藍玉中に含有されるペプチッドが、これらのペプチッドと構造上若しくは生育因子としての活性上に関連をもつか否か又、S—8 号菌は藍玉中のペプチッドを特異的に要求するとすれば、このペプチッドは藍玉中にのみに存在するものか又は他の天然物中にも存在するかの否かは、単に該菌の栄養要求に関するばかりでなく人工培地を造成しコストの低下を図り更に生産への応用という工業的な面でも極めて重要である。

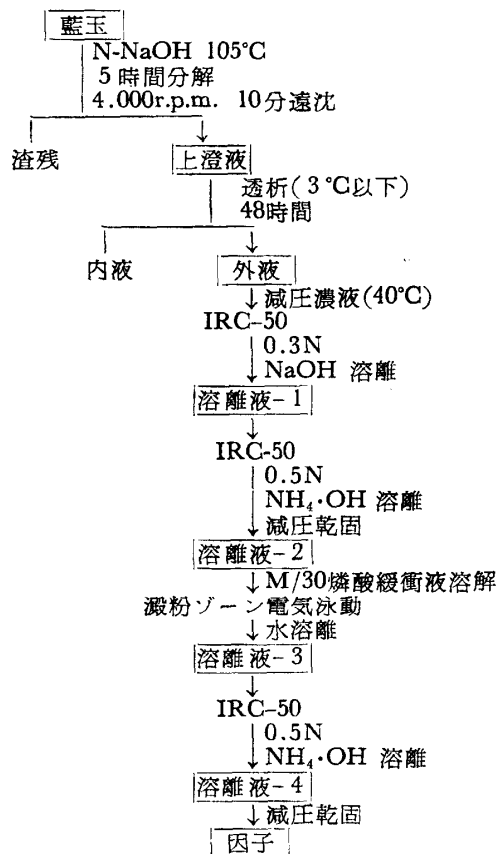
この様な見地から藍玉に含有されるペプチッドを単離精製し、その構造を明らかにするため、藍玉のアルカリ分解液を透析、イオン交換樹脂処理、ゾーン電気泳動等の一連の処理を行なつて精製し、酸分解によつて構成アミノ酸を、D.N.P. 法によつて N 末端アミノ酸を、ヒドラジン分解法によつて C 末端アミノ酸を決定した結果、因子はアラニンを N 末端としグリシンを C 末端とする 7 種のアミノ酸よりなるペプチッドであろうと推定されたのでその結果について報告する。

試 験

〔I〕 因子の分離精製

市販藍玉（分析成分は第10報¹²⁾に示す）を乾燥後、約20メッシュに粉碎し、第1表の如き操作により分離、精製を行なつた。

第1表 因子の精製



〔II〕 透析外液中の物質とその活性

前報¹⁾において藍玉中の生育因子はアルカリ分解により透析性を有する様になることを認めたので、透析外液を 2 次元 Paper Chromatography によつてニンヒドリン呈色物質を検出した。即ち東洋濾紙 No. 50 を用い第 1 次元には n-ブタノール：酢酸：水 (4 : 1 : 2)、第 2 次元には 0.5% アンモニア含水フェノールを溶媒とし上昇法によつた。

結果は第 2 表に示すが、これらのうち原点は極めて微弱なニンヒドリン反応を示したが活性の認められたのは原点溶離物のみであつた。

第2表 アミノ酸組成 *

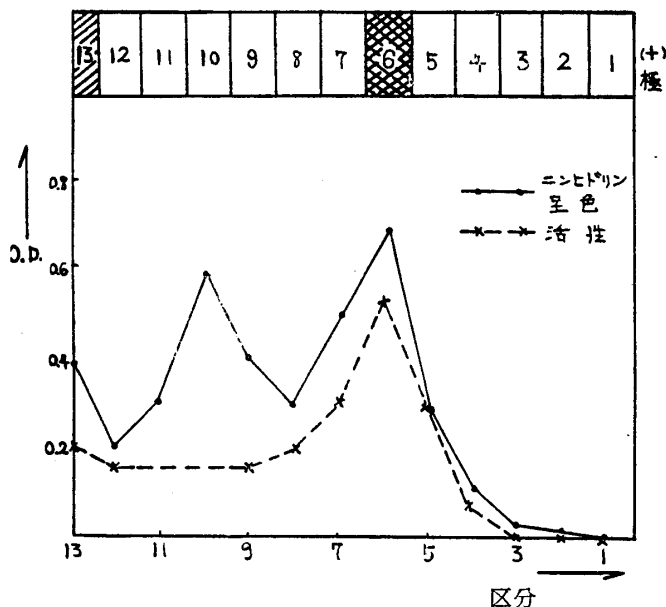
透 析 外 液	因 子
未確認スポット(原点を含めて3ヶ)	—
Lysine	Lysine
Glycine	Glycine
Glutamic acid	Glutamic acid
Alanine	Alanine
Valine	Valine
Isoleucine	Isoleucine
Leucine	Leucine

〔III〕 澱粉ゾーン電気泳動におけるペプチッドと活性

(1) 装置および泳動法

装置は三田村理研工業製, 水平式で泳動槽は $4.5\text{cm} \times 30\text{cm} \times 2\text{cm}$ の合成樹脂製を用いた。

この泳動槽に予め充分水洗し, 更に M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.0) にて洗滌した局方馬鈴薯澱粉を厚さ約 1 cm になる様に流し, 余剰の緩衝液が両端から流れおちて澱粉ブロックが成型されたのち, 中央部を 0.5 cm の巾で摘出し溶離液—2 (第 1 表参照) 100 mg と少量の緩衝液とを充分混和し再び中央部に充填し, M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.0) にて 300V, 7 時間通電する。



第 1 図 澱粉ゾーン電気泳動における呈色と活性

Paper Chromatography によりアミノ酸を検出した結果は第 2 表に示す。

(V) N-末端アミノ酸

蛋白質の N 末端アミノ酸の決定は古くから行なわれている¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾が, SANGER は 2,4-Dinitrofluorobenzene (D.N.F.B.) を用いる優れた方法を見出し, インシュリンの N 末端アミノ酸を決定した¹⁶⁾。N 末端のアミノ酸の決定には, D.N.F.B. の代りに Dinitrodifluorobenzene¹⁷⁾, Ethyl-3-nitro-4-fluorobenzoate¹⁸⁾を用いる方法も報じられておるが, 最近では殆んど SANGER の方法に準じて N 末端を決定しておるので, 著者等も因子ペプチッドの N

末端決定に SANGER の方法を用いた。

(1) D.N.P.-ペプチッドの合成および D.N.P. アミノ酸の分離

第 3 表にその大略を示す。

(2) D.N.P. アミノ酸の同定

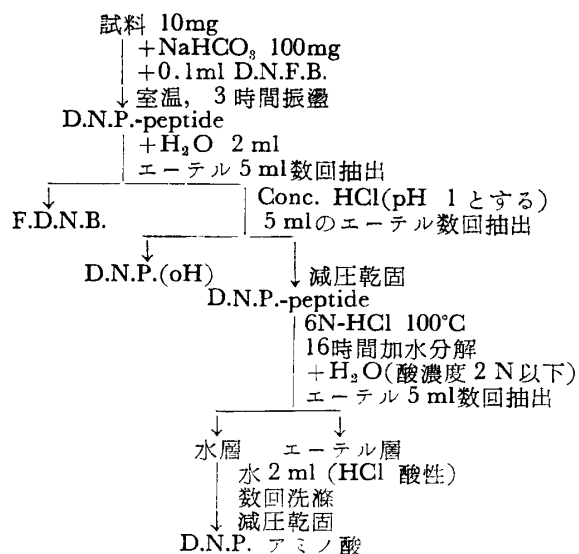
D.N.P. アミノ酸の同定は Paper Chromatography によつた。

即ち東洋濾紙 No. 51 を用い, 1 次元には 2N-アンモニア水飽和ブタノールを, 2 次元には 1.5M 磷酸塩緩衝液を用い遮光下に展開し, 対照として標準 D.N.P. アミノ酸を同条件で展開した。この結果因子ペプチッドの N 末端はアラニンであることを認めた。

〔VI〕 C 末端アミノ酸

蛋白質の C 末端アミノ酸に関しては種々の蛋白について研究されその報告も多い¹⁹⁾²⁰⁾以前は HSCN を用いる Tiohydantoin 法²¹⁾が多く用いられたが, 赤堀等により

第 3 表 D.N.P. アミノ酸の分離



(182)

(高原, 高崎, 田辺) 細菌による藍の工業的還元に関する研究 (第17報)

所謂ヒドラジン分解法²²⁾行なわれて以来, 優れた方法として応用されておる。ヒドラジッドの分解を少なくするため本報では BRADBURY²³⁾の提唱した硫酸ヒドラジンを触媒として低温度で分解する方法を採用した。

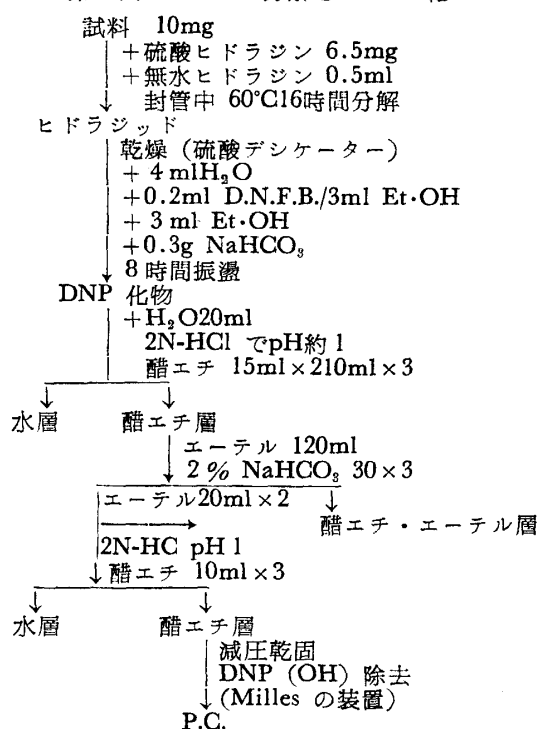
(1) 無水ヒドラジンの製法

ヒドラジンは5%程度の水を含んでいても, アミノ酸の副分解とヒドラジッドの分解を起しやすいので²⁴⁾, 高純度のヒドラジンをを用いる必要がある。

本報では CaO を脱水剤²⁵⁾として, トルエンとの共沸蒸溜法²⁶⁾によつて無水ヒドラジンを調製した。

すなわち全割合せフラスコに80%ヒドラジン水和物50gとトルエン500g, CaO 500gとを混合, 栓をして一夜放置したのち, 還流冷却器に苛性ソーダ管をつけ, 3時間加熱したのち蒸溜し, 溜出した93~94°Cの共沸混合物の下層を無水ヒドラジン (98.5%) として用いた。

第4表ヒドラジン分解と D.N.P.化



(2) ヒドラジン分解

第4表にその大略を示す。

(3) C-末端 D.N.P. アミノ酸の同定

減圧乾固したものを MILLS²⁷⁾の装置を用いて, 減圧下50°Cの温水溶中にて, パラニトロフェノールを昇華させることを繰り返し可及的に除去する。残渣を少量の酢エチにとかし Paper に Spot し[V]と同様の溶媒で展開する。

この結果因子ペプチッドのC末端はグリシンであることを認めた。

考 察

因子の精製には当初アルコール分割を行なつたが良好な結果が得られず, 処理量に著しい制限を受けるが適確な澱粉ゾーン電気泳動法を採用した。

澱粉ゾーン電気泳動において, 溶離液の酸加水分解物が呈するニンヒドリン呈色によると, 2つの Peak がみられるが因子としての活性は泳動値の大きい方のみに認められた。

この2つの Peak のアミノ酸残基は余り差異がないと思われる。これはアミノ酸の結合様式に差異があるのか, 又は1コ程度の少数のアミノ酸残基の差異によるものかは未

定であるが, 今回は活性を有する Peak のみについては検討を加えた。

又試料に附随する黄褐色の色素は泳動によつて移動し略々活性曲線と一致するので, 泳動状態が肉眼的に観察できるのはよいとしても, 泳動によつても因子が黄褐色を帯びるのを避けることができない。因子のアミノ酸組成には特に変つたものはみられないが, 塩基性アミノ酸であるリジンの存在は注目すべきことで, その構成順位や ε-NH₂ 基が遊離しておるか否かは, このペプチッドの特性を左右する大きな点と考えられるので次報にて更に検討することとする。

ヒドラジン分解法はC末端アミノ酸確認法としては優れた方法であるが, これらのアミノ酸が末端に位置する場合は採用することができないこと, ヒドラジッドは分解され易い等の欠点があるので, 前者の場合はカルボキシペプチダーゼを²⁸⁾²⁹⁾, 後者には本報の如く硫酸ヒドラジンを触媒とする方法を適用すれば解決しうる。

要 約

S-8号菌の生育因子を市販藍玉中より分離, 精製してその構造につき検討を加え次のことを明らかにした。

1. 因子は藍玉をアルカリ分解したのち透析, イオン交換樹脂処理, 澱粉ゾーン電気泳動等一連の操作により分離, 精製することができる。
2. 澱粉ゾーン電気泳動においては, 溶離液の酸加水分解物のニンヒドリン呈色には2個の Peak がみられるが, この内因子活性を示すものは1個だけである。

3. 因子の構成アミノ酸はアラニン, イソロイシン, ロイシン, バリン, リジン, グルタミン酸, グリシンの7個である.

4. D.N.P. 法によりN-末端アミノ酸はアラニン, ヒドラジン分解法によりC-末端アミノ酸はグリシンであること, 従つて因子は次の如きヘプタペプチッドであろうと推定される.

Ala-(Lys, Glu, Val, Ileu, Leu)-Gly.

終りに臨み御指導, 御校閲を賜つた阪大照井教授に深甚なる謝意を表します.

尚本報の要旨は第11回および第12回大阪醸造学会にて発表済.

文 献

- 1) 高原他: 本誌, **39**, 123 (1961).
- 2) WOOLEY, D.W. et al.: J.A.C.S., **76**, 316 (1954), WOOLEY, D.W. et al.: *ibid.*, **78**, 358, 4646 (1956). WOOLEY, D.W. et al.: Arch. Biochem. Biophys., **56**, 265 (1955).
- 3) KIHARA, H. and SNELL, E.E.: J.B.C., **197**, 971 (1952).
- 4) 田村, 鈴木: 農化, **32**, 778 (1958).
- 5) SAKAGUCHI, K.: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **22**, 353 (1958).
- 6) PETER, V.J. et al.: J.B.C., **202**, 521 (1953).
- 7) PRSECOTT, J.M. et al.: *Ibid.*, **202**, 533 (1953).
- 8) 大林, 北原: 農化, **33**, 832 (1959).
- 9) KIHARA, H. et al.: J.B.C., **197**, 801 (1952).
- 10) SMITH, E.R.: J. Bact., **46**, 369 (1943).
- 11) WRIGHT, L.D. and SKEGGS, H.R.: J. Bact., **48**, 117 (1944). WRIGHT, L.D. and SKEGGS, H.R.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **56**, 95 (1944).
- 12) 高原他: 本誌, **38**, 445 (1960).
- 13) ABDERHALDEN, E. and BLOMBERG, P.: Z. Physiol. Chem., **65**, 318 (1910).
- 14) ABDERHALDEN, E. and STIX, W.: *Ibid.*, **129**, 143 (1923).
- 15) CONSDEN, R. et al.: Biochem. J., **41**, 596 (1947).
- 16) SANGER, F.: *Ibid.*, **39**, 507 (1945). SANGER, F.: *Ibid.*, **49**, 463 (1951).
- 17) ZAHN, H. et al.: Koll. Z., **121**, 39 (1951).
- 18) HOLLEY, R.W. and HOLLEY, A.D.: J.A.C.S., **74**, 5445 (1952).
- 19) CHIBNALL, A.C.: Biochem. J., **48**, XI, XII (1951).
- 20) FROMAGEOT, C.: Biochem. Biophys. Acta, **6**, 283 (1950).
- 21) SCHLACK, P. and KUMPF, W.: Z. Physiol. Chem., **154**, 125 (1926). WBAPTIST, K. H. and BULL, H.B.: J. A.C.S., **75**, 1725 (1953).
- 22) 赤堀, 成田 J. Chem. Soc. Japan, **25**, 214 (1952).
- 23) BRADBURY: Nature, **178**, 912 (1956).
- 24) AKABORI, S. et al.: Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 507 (1956).
- 25) STAHLEY: Ber., **42**, 3018 (1909).
- 26) KUSAMA, K.: J. Biochem., **44**, 375 (1957).
- 27) OHNO, K.: J. Biochem., **41**, 345 (1954).
- 28) LENS, J.: Biochem. Biophys. Acta, **3**, 367 (1949).
- 29) 飛田享: 蛋白質; 核酸; 酵素, **4**, 125, 204, 279, 360 (1959).

(昭和 35, 11, 21 受付, 経費著者負担)

細菌による藍の工業的還元に関する研究

(第18報) S—8号菌の生育因子について (その4)

高原義昌, 高崎義幸, 田辺 脩 (工業技術院醸酵研究所)

Studies on the Reduction of Indigo in Industrial Fermentation Vat (XVIII)

On the Growth Factor of the Strain No. S-8 (4)

Yoshimasa TAKAHARA, Yoshiyuki TAKASAKI and Osamu TANABE

(Fermentation Research Institute, Chiba, Japan)

The growth factor of the strain No. S-8 reported previously has been studied to determine the structure, the distribution in nature and whether or not it can be replaced by a substance having streptogenin activity.

The results obtained are as follows.