

[山梨大醸酵研 No. 13, Nov. 1966]

有孢子乳酸菌によるバイオアッセイ (その1) 発育促進因子群

中山大樹 : 日本農芸化学会大会講演 (1966年4月,
於 京都, 同志社大学)

Ooki NAKAYAMA Studies on the Microbioassay
by Means of Spore Bearing Lactic acid Bacteria.

Part 1. On the Growth Promoting Factors.

アミノ酸, ビタミン等のバイオアッセイのための接種菌として, 保存に便利な有孢子乳酸菌の乾燥孢子を用いる場合, 接種量が少ないと, 通常の乳酸菌用合成培地に菌が生育しにくい。この場合, 培地のオートクレーヴによる加熱生成物やペプトンなどを添加すると発育が促進されるので, アウサノグラフィーにより, 発育促進因子の検索をおこなった。

方法としては, 糖とアミノ酸等を分けて殺菌した合成培地に 10ml 当り約 10^6 個の洗滌孢子を懸濁してシャーレに流し固め, 試料を浸み込ませた濾紙片を置いて培養し, 濾紙紙のまわりに微小集落群が現われた場合, 発育促進効果ありと判定した。

その結果, 次のものが有効であった。(1) ブドウ糖と次のものを水溶液中で強熱した生成

物: グリシン, アラニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, アルギニン*, システイン*, メチオニン, ヒスチジン*, パラアミノ安息香酸。

但し *印は単独でも有効であり, 他のアミノ酸や尿素などは無効であった。(2) グルタミン酸ソーダと次のものを水溶液中で強熱したもの: 各種単糖, オリゴ糖 (ラフィノースを除く), 多糖類。ラムノース, 多価アルコール, オキシ酸などは無効。(3) アスכולビン酸, エリソルビン酸, チオグリコール酸, モール氏塩のそれぞれ単独使用。

培地に 0.25 M 程度の中性塩, 0.5 M 程度の糖などを加えて菌の発育を妨げておくと, 促進物質の効果が顕著に現われる。また, 有効物質はいわゆる "Iron transport factors" と関係があるように思われる。

新種有孢子乳酸菌の分離, 分類

中山大樹, 矢ノ師正義 : 日本農芸化学会関東支部大会講演
(1966年10月, 於東京, 玉川大学)

Ooki NAKAYAMA and Masayoshi YANOSHI : Taxonomic Studies
on the Newly Isolated Spore Bearing Lactic Acid Bacteria

今までに知られていた有孢子乳酸菌は, *Bacillus coagulans* 系統のものと *Sporolactobacillus* 1 株のみであった。前者はカタラーゼ陽性で L(+) 乳酸を作り, 後者はカタラーゼ陰性で D(-) 乳酸を作るものであるが, いずれも培地の pH を 4 台にしか下げ得なかった。この度, 熱淘汰と嫌気培養の組み合わせにより, 植物の根圏 (Rhizosphere) から培地の pH を 3 台に下げる本格的有孢子乳酸菌 13 株を分離し,

次のように命名することを提唱した。

カタラーゼあり

D(-) 乳酸を作る:

Bacillus laevolacticus nov. sp.

ラセミ乳酸を作る:

Bacillus racemilacticus nov. sp.

カタラーゼなし

ラセミ乳酸を作る: *Parabacillus*

racemilacticus nov. gen., nov. sp.

[山梨大醗酵研 No. 13, Nov. 1966]

微生物中のリン脂質

(第1報) 酵母 (*Cryptococcus neoformans* CBS 132) の増殖過程とリン脂質組成

小 松 崇, 金子 弘, 田中健太郎 : 第8回日本脂質生化学研究会講演
(1966年6月, 於広島, 広島大学)

Takashi KOMATSU, Hiroshi KANEKO and Kentaro TANAKA :

Studies on the Phospholipids of Yeasts.

Part 1. A Comparison of the Phospholipid Components in
the Culture Ages of *Cryptococcus neoformans* CBS-132.

微生物のうち細菌のリン脂質については phosphatidylcholine (PC) を欠くという特異的なリン脂質構成を有するものが多く, 生育条件や生育時期などによってその組成に大きな変動が起る場合があることも知られている。HANAHAN らの報告によると酵母には PC が多く, そのリン脂質構成が多くの細菌と異なることが知られている。酵母に関しては培養条件により, リン脂質の組成がどのように変動するかはほとんど知られていない。われわれは酵母中のリン脂質研究の一環として ^{32}P をトレーサーとして利用し, 一定条件下に培養した *Cryptococcus neoformans* CBS 132 (以下 CBS 132 と略記) の増殖過程中菌体内のリン脂質が定性的, 定量的にどのように変化するかを検討した。

〔実験方法〕 CBS 132 を合成培地〔組成: ブドウ糖10%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5%; KH_2PO_4 , 0.05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%; CaCO_3 , 0.001%; KCl , 0.028%; NaCl , 0.001%; 酵母抽出液 0.1% (W/W)] に接種, 30°C で振盪培養し, 培養10時間 (I) および19時間 (II) の菌体を採取した。菌体中の脂質は FOLCH の方法

に準じて抽出, 洗滌した。窒素気流中で減圧濃縮し一定容に調製した脂質試料については SKIDMORE & ENTENMAN らの方法に従って定量的二次元薄層クロマトグラフィーをおこない, ヨード蒸気にさらして着色した各スポットをけずりとり, その ^{32}P を測定することにより各リン脂質の組成を知った。

〔実験結果〕 CBS 132 では I から II へと進むにつれて, 全脂質に対するリン脂質の割合はわずかに低下を示したが, 単位重量当りの全脂質の割合が著しく増加している (2倍以上) リン脂質の最も倍近く増加している。各リン脂質組成については定性的には PC, Lyso-PC, phosphatidylethanolamine (PE), Lyso-PE と未同定のもの3つ (A, B, C) が存在し, I と II での定性的な変化は認められなかったが, 定量的には Lyso-PC が特に著しい増加を示した。

PC, PE は単位菌体重量に対しては増加しているがリン脂質相互間の割合では今のところはっきりしたことはわからなかった。なお, A, B, C のうち A は緩和な条件のアルカリ水解で水解され, 相互位置から phosphoinositide と考えられるが目下検討中である。

[山梨大醗酵研 No. 13, Nov. 1966]

トリメチレングリコール系脂質の研究

(第7報) ホスホリパーゼAの作用

金子 弘, 原 一郎, : 日本化学会第19年会講演

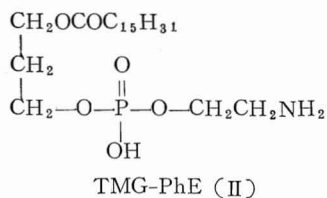
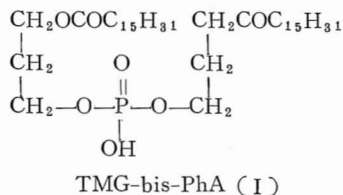
(1966年4月, 於東京, 慶応大学)

Hiroshi KANEKO and Ichiro HARA:

Trimethyleneglycol-phospholipides.

Part 7. Substrate Specificities of Trimethyleneglycol-phospholipides on the Phospholipase A Activities.

前報で報告したトリメチレングリコール (TMG) を有する合成リン脂質のうち TMG ビスホスファチジン酸 (TMG-bis-PhA), TMG ホスファチジルエタノールアミン (TMG-PhE) に対するホスホリパーゼAの作用について調べた。



反応方法は上記両リン脂質をエーテルクロロホルム(19:1)の溶液にとかし I は 2.3mg/ml, II は 2.0mg/ml の濃度にした。蛇毒 (*Naja naja*) の 1mg/0.1ml 0.005M 酢酸カルシウム溶液を作り, リン脂質:蛇毒を 40:1 になるように配合した。反応は両溶液をまぜ 30°C で攪拌しながらおこなった。一方酵素作用の標準としては精製した卵黄レシチン (L) を用いた。反応生成物の検出は常法によるシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) で行った。

まず I では L は酵素の作用で完全にリゾレシ

チン (LL) に変わったが I は全く作用を受けず, [I + L] の系では LL の生成が見られなかった。そこで L に対する I の量をいろいろに変えて反応を行った。L 2.0mg に対し I 2.3, 1.15, 0.92, 0.69, 0.46, 0.23, 0.115mg としたところ, 0.115mg では10分以内に LL の生成が見られたが, 0.23mg では25分でやっと0.115mg と同じようになった。一方 0.46, 0.69mg では少量の LL の生成は見られたが, それ以上に反応は進まず, 0.92mg 以上では全く L が作用されないことがわかった。この結果 I はホスホリパーゼAの L に対する作用を阻害し, L に対し 1/5~1/10 の量 (M比で) でその作用があらわれることがわかった。

次に II について, これも I と同じように [L + 酵素] で L が完全に LL に水解されるのに対し [II + 酵素] では II はホスホリパーゼAの作用を受けない。さらに [L + II + 酵素] では, 等Mでも LL が L 単独の場合と同じように起った。この限りにおいて II はホスホリパーゼAの L に対する作用を阻害しないという結果を得た。

ホスホリパーゼAのリン脂質に対する作用を阻害する基質としては ROSENTHAL & GAYER の DL-3-ジメチルアミノ-1, 2-プロパンジオールジステアレートのみが知られており, I の阻害作用はホスホリパーゼAの性質を調べる上に非常に興味あるものと思われる。

[山梨大醗酵研 No. 13, Nov. 1966]

ベンジリデングリセリンの4異性体に関する研究

(第1報) 4異性体の分離精製

金子 弘, 安藤 進, 原 一郎: 日本化学会第19年会講演
(1966年4月, 於東京, 慶応大学)

Hiroshi KANEKO, Susumu ANDO and Ichiro HARA:
Studies on Four Isomers of Benzyldene Glycerols.

Part 1. Isolation of the Four Isomers.

ベンジリデングリセリン (BG) には6種の異性体の存在が予想されているが、これまでに $m.p. 83^{\circ}C$ の1,3-BG (trans または cis 型) と1,2-BG (cis および trans 型) については、それらの純品が得られておらず、立体構造は不明のまゝである。われわれは脂質の化学合成の中間体として種々のグリセリン誘導体を合成し、それらの物理化学的性質を明らかにして来たが、更にグリセリン誘導体に関する立体化学上の手掛りを得るために上述の4異性体を単離しその諸性質を調べた。

〔結果〕 Fig. 1 に図示する方法によって2つの1,3-BG (I, II) と2つの1,2-BG (III, IV共に光学不活性) とを得た。

〔実験〕 各異性体の分析手段としては主に TLC を用いた (展開溶媒: エーテル-石油エーテル系)。TLC 上の I と II は III および IV から区別され夫々 one spot を示すが、III と IV は全く等しい Rf 値を有し区別されなかった。III と IV はアセチル化あるいはメチル化しても TLC

上で分れないが、ベンジル化、ベンゾイル化、パラニトロベンゾイル化およびパルミトイル化するとわずかに分離することがわかった ($\Delta R_f 0.07 \sim 0.09$)。III と IV は I.R. でもほとんど区別されないが、NMR スペクトル (TMS を内部基準とし、無水クロロホルム中にて測定) の4~5 ppm 領域で各異性体のメチンの吸収位置が異なることが見出されたのでそれらの純度検定に用いた。

グリセリンとベンズアルデヒドをパラトルエンスルホン酸の存在下に反応させると各異性体のほぼ等量混合物が得られるが、中性下に縮合させると1,2-BGの収量が著しく高くなることがわかった。I は II, III, IV を異性化させ結晶化させることによって多量に得られた。II は粗製品から分別結晶法とカラムクロマト法によって単離された。III と IV はそれら混合物をベンゾイル化し、カラムクロマト法によって各々の安息香酸塩 (A と B) を分離後アルカリ水解によって再生して得られた。

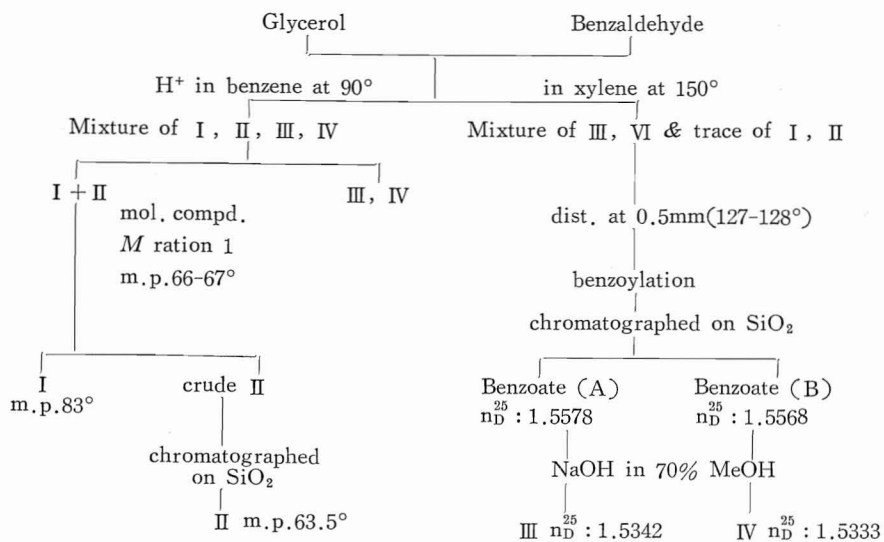


Fig. 1. Preparation of 1,3-BG (I, II) and 1,2-BG (III, IV)