

Shigella flexineriae EWg 8 に対し有効であり proteus OX<sub>19</sub>, 及び Escherichia coli O<sub>55</sub> に対し抗菌力を有するものは皆無であった. またこれらの被検化合物はいずれも対照として用いた4種の化合物 Benzochinon, Toluchinon, Phenylbenzochinon, Methylmercaptobenzochinon の抗菌力にやや劣り特に優れた抗菌力を有する化合物は見出せなかった. かようにしてアルキル置換体の場合側鎖アルキル基の炭素数アリル置換体の場合は phenyl 基中の置換基によって抗菌力が影響されることは化学構造と抗菌作用の関連性についての研究に示唆を与えるものである. 以上の如くキノン核への水酸基の導入によって水に対する溶解度はかなり高められたが抗菌力に関しては予期したような効果は認められなかった. このことはスルホン基導入の場合と同様であり, かように水酸基, スルホン基の如き鍵電子を有する原子団を Chinon 核へ直接導入して Chinon の Carbonyl に隣接せしめる場合には水に対する溶解度は増大しうるが鍵電子が Chinoid 構造に対し影響を与えその結果抗菌力低下の一因となるものと考えられる. 従って今後水溶性を高め抗菌力の増強をはかるためには例えば側鎖に親水基を導入するなど本来の Chinoid 構造に影響を及ぼさない方法を探るべきであろう.

終始御鞭撻激励を賜った本学宮道学長ならびに研究に協力を頂いた衛生化学教室の各位に深謝いたします.

小瀬洋喜, 池田 坦: 蚕児硬化病菌の代謝産物に関する研究(2)

赤彊菌培地およびその菌体中の代謝成分

Yōki Ose and Taira Ikeda: Studies on the Metabolic Products of the Silkworm Muscardines(2).

Metabolic Products of the *Isaria fumoso-rosea* Culture Medium and its Mycelium.

The contents of nitrogen, dextrose and dipicolic acid in *Isaria fumoso-rosea* medium to the lapse of time was examined, Four crystals were isolated from mycelium and three crystals from medium.

(Received September 10, 1961)

緒 言

<sup>1)</sup> 前報において, 筆者らは *Isaria fumoso-rosea* の合成培地からピリジン-2,6-ジカルボン酸(ジピコリン酸)の他に微量のピリジン-2,4-ジカルボン酸(ルチジン酸)を得たことについて報告した.<sup>2)</sup> 嶋は培地の差によって, 蚕児硬化病菌の生成する代謝産物に差のあることを認めているが, 嶋が得たジピコリン酸の他に我々がルチジン酸を得たこともそれに関連あることではないかと推定されたので, 数種の培地について菌の発育状態を観察した. 嶋の用いた培地および我々の用いた培地の組成を Table 1. No. 1~8に示す. その結果炭素源がきわめて少い培地 No. 3, pH が強アルカリ性であるNo. 4には菌の発育が認められず, 2,5-ジクロルキノンを加えた培地 No. 7ではわずかにその発育を認めたにすぎなかった. キノンは酸性水溶液ではきわめて微量しか溶解しないの

1) 小瀬, 池田: 第12回日本薬学大会(1959)で講演.

2) 嶋: 蚕試報告 14, 427 (1955).

で、添加した5gの大部分は結晶のままで沈澱していた。これらの培地中のN量の変化をみると Table 2 のようにどれも一旦減少後増加を示していた。この現象は初期に菌蓋形成に用いられたNが、のちに菌代謝産物としての含N物質となり培地中に排泄されるのではないかと考えられた。この点を明らかにするため、2次元ペーパークロマトグラフィー(以下 P.P.C と略す)によるアミノ酸の変化を調べたところ、物質の確認には至らなかったが6日目、13日目あたりにペプチド様スポットの出現を認めた。また糖量の変化は Table 3 のようで、20日目に極めて顕著な減少を示した。これは培地中の糖量が多い場合にも、少ない場合にも同様の傾向が認められた。

この現象は菌蓋の形成が20日目ごろから著しいのと関連して菌体中に炭水化物および脂肪を生成するためブドウ糖が消費されると考えられ、事実60日目の菌蓋中の粗脂肪量は16.4%の多量に達していた。このさい2,5-ジクロルキノンを加えた培地 No. 7 では糖量の消費がややおくれ、菌体の形成もおくれているが、菌発育阻止は完全でなかった。これは *in vitro* および *in vivo* において2,5-ジクロルキノンは強力な硬化病菌発育阻止を示す結果<sup>3)4)</sup> とかなりいちじるしい差を示すが、粉末状態で散布したのと、溶液中に不溶性で懸濁させたのとその条件の差異によるためだろうと考えられる。一方ジピコリン酸の生成状態を一次元 P.P.C. によって追求した結果、Table 4 に示すように27日目には出現し、39日目にはどれもその形成がいちじるしかったが、Fe イオンの多いNo. 2 は生成がわるく、キノンを加えた No. 7 には全く認められなかった。ジピコリン酸が Fe とキレート形成を行う事実<sup>5)</sup> からすると、培地中の Fe が何らかの阻害を行っているのではないかと考えられる。キノンによって発育のおくれた培地 No. 7 ではまだジピコリン酸の形成にいたってはいないものと考えられる。ジピコリン酸は培地中のN源から生成されると推定されるが、ペプトン培地の場合、39日目には、不明のスポット1個を残すだけで、各スポットとも消失してしまった。

以上の実験でジピコリン酸生成がもっともよかった培地 No. 5 を用い、*Isaria fumoso-rosea* の培養をおこない、現在までに数種の物質を分離した。これらはいずれも確認のための実験を続行しており、解決に至っていない。

菌体からはTable 5 に示すように結晶4種を得た。この中結晶 mp 152~153° はステロイドと考えられる。脂肪酸についてはその構成成分の研究を続行している。培地からは Table 6 のように分離して、3種の結晶を得た。このさいジピコリン酸は予期に反しきわめて少量しか得られなかった。またルチジン酸も確認にいたっていない。これは培養に用いた菌の胞子の性質によるものでないかと推定している。今後これらの分離物質について精製確認を進めるとともに、ピリジンカルボン酸類の生成機構についての追求を行う予定である。

## 実 験 の 部

1) 培養方法: Table 1 に示すような種々の培地を内容1Lの三角フラスコに150cc ずつ分注し、滅菌後赤彊菌 *Isaria fumoso-rosea* WIZE を接種して室温に静置培養した。

3) 河北, 小瀬: 渡辺, 岐阜試報, 4, 1 (1960)

4) 河北, 渡辺, 小瀬: 第29回日本蚕糸学会年会 (1959) で講演。

Table 1. Composition of Culture Medium

No. 1		No. 2		No. 4	
Dextrose	40 g	FeSO <sub>4</sub>	0.05 g	Compounds are the same as No.3	
Glutamic acid Na	5 g	The others is the same as No.1		pH 9.0	
KCl	1 g	No. 3		No. 5	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g	Peptone	20 g	Dextrose	40 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	Dextrose	1 g	Glycocoll	3 g
FeSO <sub>4</sub>	0.01 g	ZnSO <sub>4</sub>	0.2 g	KCl	1 g
H <sub>2</sub> O	1L	H <sub>2</sub> O	80cc	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
No. 6		pH	5.2~7.5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
				FeSO <sub>4</sub>	0.01 g
				H <sub>2</sub> O	1L
Dextrose	100 g	MgCl <sub>2</sub>	0.1 g	No. 8	
Peptone	10 g	FeCl <sub>3</sub>	trace	Dextrose	40 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15 g	NaCl	trace	NaNO <sub>3</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15 g	H <sub>2</sub> O	1L	KCl	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g			MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
No. 7				K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
Dextrose	100 g	MgCl <sub>2</sub>	0.1 g	FeSO <sub>4</sub>	0.01 g
Peptone	10 g	FeCl <sub>3</sub>	trace	H <sub>2</sub> O	1L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15 g	NaCl	trace		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15 g	2,3-dichloro-quinone	5 g		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g	H <sub>2</sub> O	1L		

2) 赤蘆菌発育状況：上記培養基中での発育状況を観察したところ次のごとくであった。

接種月日：3月5日

培地 No.	3月12日	3月25日	4月20日 (処理前)
1	菌糸一面に発育	菌糸，孢子一面に発育，培養液の色は橙褐色。	孢子の形成やや弱い。
2	菌糸一面に発育	菌糸，孢子一面に発育 (No.1 と同程度)。培養液の色は赤褐色。	孢子の形成きわめて良好。
3	発育なし	発育なし。	発育なし (雑菌生育)。
4	発育なし	発育なし。	発育なし。
5	菌糸一面に発育	菌糸，孢子一面に発育 (1, 2番にやや劣る) 培養液の色は赤褐色。	孢子の形成やや良好。
6	菌糸やや発育	菌糸斑点状に発育，孢子の形成弱，培養液の色は赤褐色。	菌糸，孢子がコロニー状に発育。
7	発育なし	ごくわずかに発育し，12個中3個にわずかに菌糸を認める。	菌糸，5個にわずかに発育。
8	菌糸一面に発育	菌糸，孢子発育 (No.5 より劣る) 培養液の色は淡い橙色。	孢子の形成良好。

3) 赤蘆菌培地中の成分変化

No. 8の培地について行った。

1) 培地中の糖およびN量の変化

糖はフェーリング法によりブドウ糖として, またN量はフェノール硫酸を添加してセミマイクロケルダール法で測定した. その結果を Table 2, 3 およびFig. 1, 2 に示す.

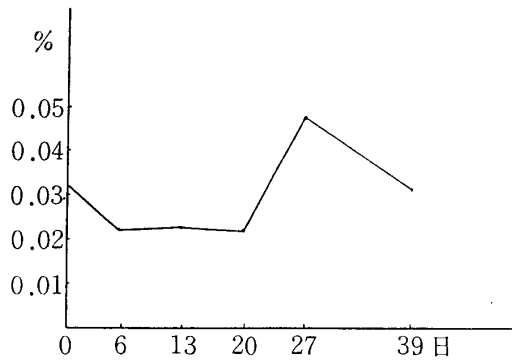


Fig. 1 Total N contents

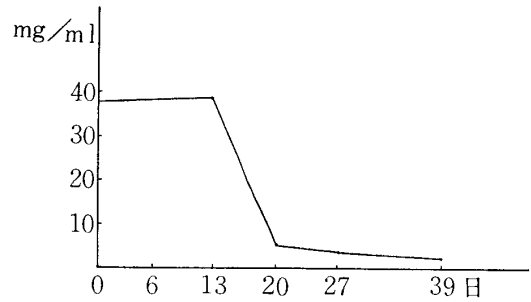


Fig. 2 Dextrose contents

Table 2. Variation of Total N-Contents(%) by Culture

No.	before cultivate	6 days	13 days	20 days	27 days	39 days
1	0.050	0.101	0.035	0.017	0.031	0.035
2	—	0.055	0.008	0.017	0.054	0.052
3	3.665	1.967	2.544	2.337	3.923	4.050
4	—	3.239	3.172	2.751	3.923	4.113
5	0.065	0.013	0.046	0.047	0.039	0.027
6	0.159	0.153	0.124	0.117	0.164	0.122
7	0.153	0.113	0.099	0.117	0.151	0.158
8	0.032	0.022	0.023	0.022	0.048	0.032

Table 3. Variation of Dextrose Contents (mg/ml) by Culture

No.	before culture	6 days	13 days	20 days	27 days	39 days
1	36	37.5	35	4.3	2.5	2.5
2	—	38.5	36.5	3.8	3.1	2.8
5	37	37.5	36	4.5	3.8	2.8
6	97.5	100	80	3.5	2.3	2.8
7	95	95	102.5	25	3.5	2.5
8	38	38.5	39	5	3.3	2.0

2) 二次元 P.P.C. による培地中のアミノ酸の変化検出

一次元溶媒は水飽和フェノール, 二次元溶媒は酢酸-n-ブタノール-水を用い, 培養前, 6日目, 13日目, 20日目, 27日目, 39日目の各培地について試験した. ペプチド様スポットの出現は6日~13日目から認められた.

3) 一次元 P.P.C. による培地中の ジピコリン酸 の検出

溶媒には iso-ブタノール:ギ酸:水=75:15:10 を使用した. その結果 27 日目に出現し, 39日目には極めて明瞭に現われた. この結果を Table 4 に示す.

4) 赤彊菌代謝産物の分離

培地 No. 5 に赤彊菌を接種し、40 日後に菌蓋を濾別し濾液 12 L を得た。濾液の pH は 3.5 であった。この濾液を Table 5 のような過程を経て処理した。分離した菌体は全部白紙上に置いて、これを天日乾燥し、十分乾燥した菌体を大きな乳鉢で粉末としてから、Table 6 にしたがって処理した。

Table 4. Variation of Dipicolic Acid

No.	6 days	13days	20days	27days	39days
1	—	—	—	+	+
2	—	—	±	±	+
5	—	—	±	±	+
6	—	—	—	—	+
7	—	—	—	—	—
8	—	—	—	±	+

Table 5. 赤彊菌培養濾液よりの分離

