

微生物による核酸関連物質の生成 (第1報)

酵母類の特殊条件下における核酸関連物質の分泌

今原 広次・岩井 正憲

HIROTSUGU IMAHARA and MASANORI IWAI: Production of nucleic acid related substances by micro-organisms (Part I)
Secretion of nucleic acid related substances by several yeasts in the regulated condition

摘要 微生物を培養条件下においてその培地中へ核酸関連物質を分泌しうる条件を求めべく、研究室保存の酵母類について検討を行なった。正常な培地条件ではいずれの菌株も分泌は殆んど認められなかった。したがって数種の物質を添加して培養を行ない分泌の有無を試験した。すなわち添加物質としては EDTA, クエン酸ソーダ, マロン酸ソーダ, 窒化ソーダ, ジニトロフェノール, ストレプトマイシン計7種を使用した。その結果マロン酸ソーダおよびストレプトマイシン添加培養の場合 *Candida utilis*, *Hansenula anomala* および *Endomycopsis hordei* HDT 7209 の3株が明らかに核酸関連物質の分泌を示した。そのうち比較的分泌量の著しい *Candida utilis* について更に分泌物質の追究を行なったところ、ストレプトマイシン添加培養においてはアデニル酸が約 117/ml, マロン酸ソーダ添加培養においてグアノシン約 77/ml および他に未知核酸関連物質が分泌することを認めた。一方 *Endomycopsis hordei* HDT 7209 の場合もマロン酸ソーダ添加培養においてアデノシンおよびウリシル酸と推定されうるものそれぞれ約 137/ml および約 97/ml 分泌することを認めた。

緒 論

ミコンブミの旨味成分のグルタミン酸, および貝類, 日本酒の旨味成分であるコハク酸はともに重要な呈味性物質として既にその本態が明らかにされ工業化されている。しかしながら第3の呈味性物質すなわちミかつおぶしミの旨味成分については古く小玉によってイノシン酸(IMP)であることが指摘されたのであるが, その工業製品化はようやく近年に至って開発され始めた。すなわち1959年国中¹⁾によって酵母リボ核酸の酵素分解法による5'IMPの生成機構が見出され, 同時に呈味性²⁾の化学的本態が明らかにされるとともに, 急速にこれらヌクレオチド生成に関連する研究が活潑となり, 種々の製法が検討されるに至った。その製法には大別して天然物よりの抽出法³⁾, 酵母核酸の分解法^{4)~7)}, 直接醗酵法⁸⁾, 化学合成法^{11)~12)}の4つが考えられるが前2者は既に工業化され, また最近核酸関連物質の生化学的報告とともに直接醗酵法が急速なテンポにより研究されている現状である。しかしながらヌクレオチドの直接醗酵法^{13)~19)}については多くの試みが発表され, 例えば微生物の核酸関連物質の分泌現象に関して植村^{20)~21)}ら, 杉本²²⁾らにより興味ある現象が

見出されている。

著者らは主として酵母の培養時における数種の試薬の影響を検討中その異常代謝現象を見出した。これらの結果を参考にして試薬添加培養による核酸関連物質分泌菌株の選択およびその条件について主として酵母類について検討を行なったその結果を報告する。

実 験 の 部

I 紫外線吸収物質分泌能の測定

核酸関連物質はその塩基成分の特徴ある紫外線吸収を利用していろいろな測定法が提出されている。また一方プリンおよびピリミジン塩基要求変異株を用いる微生物学的方法もある。多くの試料について核酸関連物質の存在の有無を検討する場合は若干精度は劣るが多くの試料を同時に比較しうる方法が望ましいが、微生物の培養液中の核酸関連物質を検出する場合、培地中の他の紫外線吸収物質が共存するためにそのままでは簡単に定量しえないことが多い。このため著者らは植村らの方法を参考にして培養液を先ず遠心分離し、菌体を除いた上澄液に過塩素酸を最終濃度 0.4N になるように加え、この液を10倍に希釈して Beckman DU 型分光光度計で235~290m μ の吸収を測定し、培

地についての同じ測定値を差し引いて紫外外部吸収曲線
を求め 235~240m μ での最小吸収値と 260~270m μ での
最大吸収値との比を求めた。

また別に培養上澄液 0.01ml を (Carter²³) の方法に
よってペーパークロマトグラフィーを行ない、その展
開によって分離せるスポットを紫外線燈を用いて感光
紙上に焼き付けてその検出を行ない、比較的明瞭な紫
外部吸収スポットを認めたものを陽性と認めた。

II 酵母の核酸関連物質分泌能

研究室保存の酵母 4 株について第
1 表のような合成培地 100ml に接種
し 500ml 容振盪フラスコ中で 16~
20時間、30°C で振盪培養の後、
各添加物質を所定量無菌的に加え 30
°C、72 時間振盪培養を行ない、遠
心分離により菌体を除いた培養液
について前項の試験を行なった。添
加物質としては植村および杉本らの
報告もあるが、ここでは予備実験に
よって選択した次の 7 種類を用い
た。すなわち EDTA、マロン酸ソ
ーダ、クエン酸ソーダ、窒化ソ
ーダ、ジニトロフェノール (DNP)、
弗化ソーダ、ストレプトマイシンで
ある。その使用濃度は各菌株の生育
が無添加の場合の約 2/3 までのもの
を限界とした。なお使用酵母は予備
実験において選択して 4 株について
本実験を行なった結果を表に示す。

以上の結果菌株と添加物質の組合
せによって可成り分泌能に差がある
ことが認められたが、酵母の生育度
および核酸関連物質分泌能において
比較的注目される菌株は *Candida*
utilis および *Hansenula anomala* の
2 株であった。またこの場合添加物
質としては EDTA、クエン酸ソ
ーダ、DNP、窒化ソーダは殆んど効
果を示さず、弗化ソーダも *Candida*
tropicaris の場合にのみわずかに分
泌を認めたようであったが、ストレ
プトマイシンではすべての株を通じ
少なくとも若干の分泌を認めること
ができた。そしてマロン酸ソーダ添加において *Cand-*
ida utilis が最も顕著な分泌を示し、*Hansenula ano-*
mala も若干の分泌を示した。

III *Candida utilis* による核酸関連物質の分泌

第 1 表 酵 母 用 培 地

グルコース	20g
カザミノ酸 (ビタミン欠)	0.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.2
KH ₂ PO ₄	1.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
純水にて 1l とする。	

第 2 表 酵母の核酸関連物質分泌能 30°C、72時間培養

菌 株	質 添 加 物	E _{max} /E _{min}	分泌能
<i>Candida utilis</i>	無 添 加	0.23	—
	E D T A M/10000	0.35	—
	クエン酸ソーダ M/50	0.31	—
	マロン酸ソーダ M/50	1.96	+
	窒化ソーダ M/5000	0.51	—
	D N P M/5000	0.73	—
	弗化ソーダ M/50	0.69	—
<i>Candida tropicalis</i>	無 添 加	0.21	—
	E D T A M/10000	0.18	—
	クエン酸ソーダ M/50	0.42	—
	マロン酸ソーダ M/50	1.07	±
	窒化ソーダ M/50	0.47	—
	D N P M/5000	0.36	—
	弗化ソーダ M/50	1.10	±
<i>Trerula delbruckii</i>	無 添 加	0.61	—
	E D T A M/10000	0.23	—
	クエン酸ソーダ M/50	0.51	—
	マロン酸ソーダ M/50	0.47	—
	窒化ソーダ M/5000	0.39	—
	D N P M/5000	0.70	—
	弗化ソーダ M/50	0.45	—
<i>Hansenula anomala</i>	無 添 加	0.36	—
	E D T A M/10000	1.09	±
	クエン酸ソーダ M/50	0.38	—
	マロン酸ソーダ M/50	1.49	+
	窒化ソーダ M/50000	0.51	—
	D N P M/5000	0.45	—
	弗化ソーダ M/50	0.36	—
<i>Candida utilis</i>	ストレプトマイシン 100 γ /ml	1.25	+

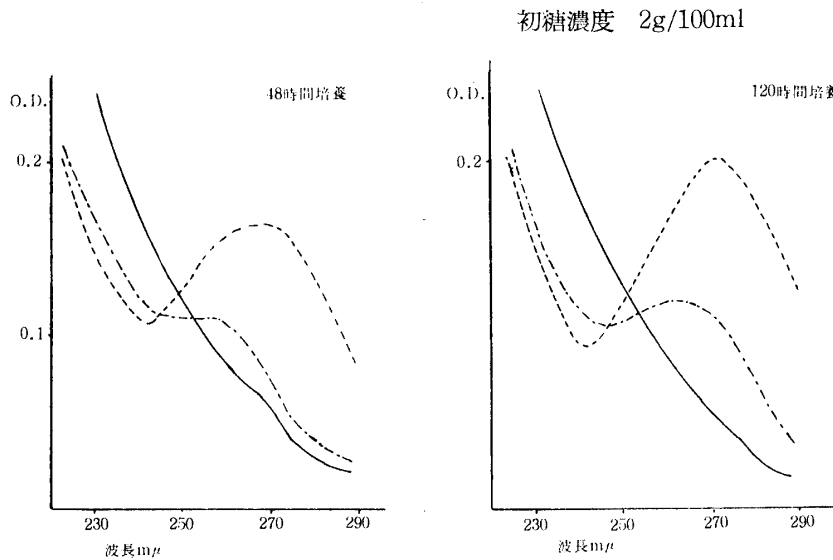
E_{max}; 260~270m μ 間, E_{min}; 235~240m μ 間
分泌能; ペーパークロマトグラフィー紫外外部吸収スポット陽性を+,
微小スポットまたは不鮮明スポット±, 陰性を-で示した。

前項の結果 *Candida utilis* を用いマロン酸ソーダ
添加培養の場合において菌の生育も旺盛であり、また
最も良く紫外外部吸収物質を分泌することが想像された
ので、その醗酵経過および分泌物質の追究を行ない、

その同定を行なうとした。すなわち *Candida utilis* を前項と同様にしてマロン酸ソーダおよびストレプトマイシン添加培養を行ない、48時間後および120時間後の培養液について前項と同様の処理を行なって、培養液の紫外部吸収を測定すると同時に、糖の消費をフェーリング・レーマン・ショール法により測定し、紫外部吸収物質検出は Dorough & Scaton²⁴⁾の方法に従って行なった。

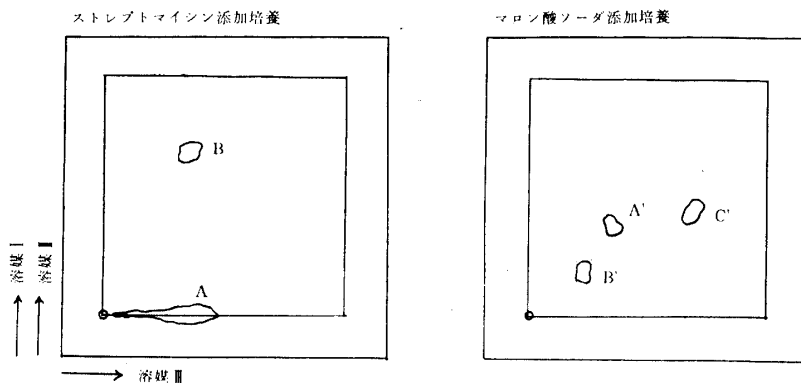
第3表 *Candida utilis* の培養液の分析

添加物質	培養時間	pH	残糖 g/100ml	培養液紫外部吸収 E _{max} /E _{min}
無 添 加	{ 48	2.2	0.31	0.25
	{ 120	2.6	0.20	0.22
マロン酸ソーダ M/50	{ 48	3.0	0.66	1.61
	{ 120	3.4	0.47	2.03
ストレプトマイシン 100γ/ml	{ 48	2.2	0.85	1.31
	{ 120	2.4	0.28	1.31



第1図 *Candida utilis* 培養液の紫外部吸収曲線

— 無 添 加
 マロン酸ソーダ
 - - - - - ストレプトマイシン



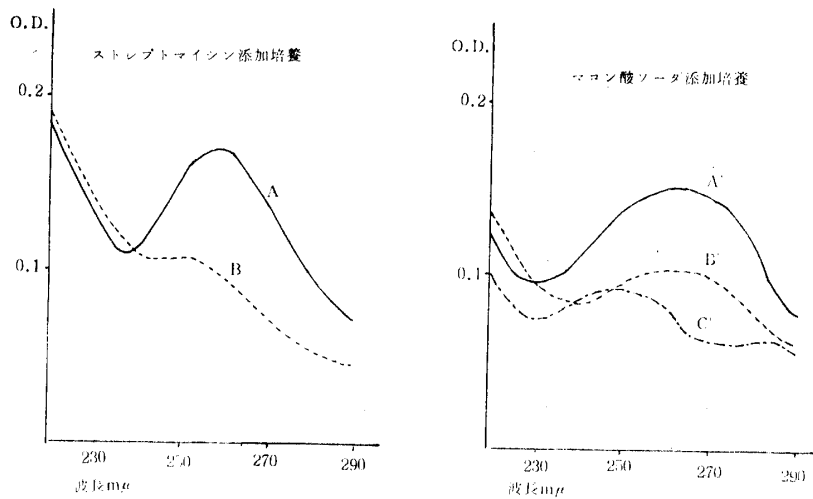
第2図 *Candida utilis* 培養液のペーパークロマトグラム

溶媒Ⅰ：n-ブタノール：酢酸：水=4:1:1
 溶媒Ⅱ：アセトン：n-ブタノール：水=8:1:1
 溶媒Ⅲ：飽和硫酸液：イソプロパノール：水=7.9:0.2:1.9

第3表の結果より糖消費はマロン酸ソーダおよびストレプトマイシン添加の場合いずれも無添加よりやや少ない程度であって、いずれもかなりの菌の生育が推察される。また E_{max}/E_{min} 値よりみるとマロン酸ソーダ添加の120時間培養の場合が最も良好な結果を示している。次に各培養液についてのペーパークロマトグラムを観察すると、ストレプトマイシン添加の場合2つのスポットを認めた。すなわち第2図のとおりであり、Bスポットはやや不鮮明であるが、Aスポットは標準品と比較した結果アデニル酸と推定した。次にマロン酸ソーダ添加の場合は第2図に示すとおりであり、標準品のスポットとの相対位置より A' スポットはグアノシン又はキサントシン、B' スポットはグアニル酸、C' スポットはシトシン又はシチジンと推定されたが、次に各スポットを0.1N-HClで70°C、30分抽出し、その抽出液の紫外部吸収を測定したところ第3図のようになった。この結果Aスポットは5'-アデニル酸と同定されまたA' スポットはグアノシンと同定しえたが、他のスポットはその吸収スペクトルが文献値と一致せず同定が困難であった。なお分子吸光係数より培養液中の5'-アデニル酸の量を計算すると、約11γ/mlとなり、グアノシンについて同様に計算すると約7γ/mlであった。

IV *Endomyces* 属および *Endomycopsis* 属の核酸関連物質分泌能

Endomyces 属および *Endomycopsis* 属は菌糸状細胞と出芽細胞の両者を有し、真性酵母類とはやや異なった生育状況を示すものである。これらについて第4表のような培地組成を用いて研究室保存の9株について前項と同様な試験を行なった。添加物質としてEDTA、クエン酸ソーダ、窒化ソーダ、ジニトロフェノールの4種についてはいずれの菌株も殆んど効果が認められなかったので、弗化ソーダ、マロン酸ソーダ、ストレプトマイシンの3種の場合について試験の結果を第5表に示す。



第3図 *Candida utilis* 分泌物質の紫外外部吸収曲線

展開試料：0.2ml (5倍濃縮培養濾液)
紫外線吸収スポットの抽出：0.1N-HCl 5ml, 70°C, 50分。

第4表 *Endomyces* 属及び *Endomycopsis* 属用培地

グルコース	20g
カザミノ酸 (ビタミン欠)	0.6
酵母エキス (オリエンタル酵母KK製)	1.0
KH ₂ PO ₄	1.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5
純水で1lとする。	

を加えるべきと思われる。一方 *Endomycopsis Hordei* HDT 7209 のマロン酸ソーダ添加培養の場合の培養液を *Candida utilis* の場合と同様にペーパークロマトグラフィーを行ない、クロマトグラムの抽出液の紫外外部吸収を求めると第4図のようになり、スポットAはアデノシン、スポットBはウリシル酸と推定しえた。またそれらの分子吸光係数より計算するとアデノシン約 13γ/ml, ウリシル酸約 9γ/ml であった。すなわち以上の結果を総合して考察すれば酵母の場合、

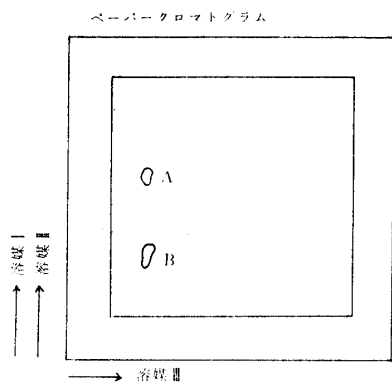
以上の結果 *Endomycopsis Hordei* HDT 7209 のマロン酸ソーダ添加培養および *Endomyces vernalis* sp. の弗化ソーダあるいはマロン酸ソーダ添加培養の場合にかなりの分泌が認められた。この際の分泌物質の追究を前項に述べたような方法で行なった所、*Endomyces vernalis* sp. においては紫外線吸収スポットは認められるが、その抽出液の紫外外部吸収曲線あるいはスポットの位置より考えて標準物質あるいは文献値と一致する物質を見出しえなかった。この点については更に検討

第5表 *Endomyces* 属及び *Endomycopsis* 属の核酸関連物質分泌能

菌	株	添加物質	E _{max} /E _{min}	分泌能
<i>Endomyces Lindneri</i> Saito 1008		無添加	0.46	-
		弗化ソーダ M/50	0.51	-
		マロン酸ソーダ M/50	1.46	+
		ストレプトマイシン 100γ/ml	0.78	-
<i>Endomyces Lindneri</i> Saito 1006		無添加	0.35	-
		弗化ソーダ M/50	0.47	-
		マロン酸ソーダ M/50	0.62	-
		ストレプトマイシン 100γ/ml	0.29	-
<i>Endomyces Hordei</i> E 1010		無添加	0.61	-
		弗化ソーダ M/50	0.34	-
		マロン酸ソーダ M/50	0.48	-
		ストレプトマイシン 100γ/ml	0.75	-
<i>Endomyces Hordei</i> D 1009		無添加	0.52	-
		弗化ソーダ M/50	0.34	-
		マロン酸ソーダ M/50	0.46	-
		ストレプトマイシン 100γ/ml	0.59	-
<i>Endomycopsis Hordei</i> HDT 7209		無添加	0.49	-
		弗化ソーダ M/50	0.81	-
		マロン酸ソーダ M/50	1.94	+
		ストレプトマイシン 100γ/ml	0.78	-

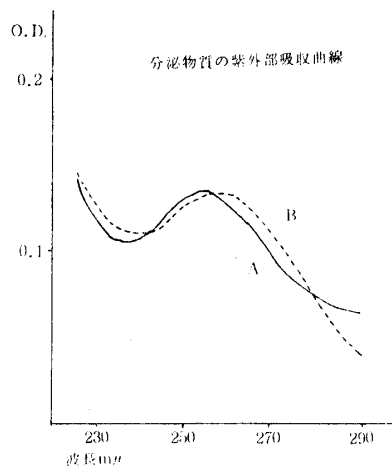
菌 株	添 加 物 質	Emax/Emin	分泌能
<i>Endomyces fibuliger</i> Y-25	無 添 加	0.37	—
	弗 化 ソ ー ダ M/50	0.48	—
	マ ロ ン 酸 ソ ー ダ M/50	1.12	±
	ス ト レ プ ト マ イ シ ン 100γ/ml	0.94	—
<i>Endomyces capsulari</i>	無 添 加	0.54	—
	弗 化 ソ ー ダ M/50	0.48	—
	マ ロ ン 酸 ソ ー ダ M/50	0.73	—
	ス ト レ プ ト マ イ シ ン 100γ/ml	0.64	—
<i>Endomyces Lindneri</i> 7210	無 添 加	0.49	—
	弗 化 ソ ー ダ M/50	0.61	—
	マ ロ ン 酸 ソ ー ダ M/50	0.54	—
	ス ト レ プ ト マ イ シ ン 100γ/ml	0.39	—
<i>Endomyces Hordei</i> Saito 1005	無 添 加	0.48	—
	弗 化 ソ ー ダ M/50	0.37	—
	マ ロ ン 酸 ソ ー ダ M/50	0.52	—
	ス ト レ プ ト マ イ シ ン 100γ/ml	0.34	—
<i>Endomyces vernalis</i> sp.	無 添 加	0.75	—
	弗 化 ソ ー ダ M/50	1.04	—
	マ ロ ン 酸 ソ ー ダ M/50	1.66	+
	ス ト レ プ ト マ イ シ ン 100γ/ml	1.12	±

Emax : Emin : + ; ± ; — は前項に同じ。



展開試料：0.2ml (5倍濃縮培養液)
 溶媒Ⅰ：n-ブタノール：酢酸：水=4:1:1
 溶媒Ⅱ：アセトン：n-ブタノール：水=8:1:1
 溶媒Ⅲ：飽和硫酸液：イソプロパノール：水=7.9:0.2:1.9

第4図 *Endomyces Hordei* HDT 7209 の分泌物質
 M/50 マロン酸ソーダ添加, 30°C, 72時間培養



培地におけるマロン酸ソーダの添加は核酸関連物質の分泌に対して効果的であると推察される。またストレプトマイシンもわずかに有効な場合も見出さる。そして著者らの試験した範囲内においては *Candida utilis* がマロン酸ソーダおよびストレプトマイシン添加時に明らかに核酸関連物質の分泌を示し、また一方 *Endomyces Hordei* HDT 7209 はマロン酸ソーダにおいてやや異った核酸関連物質を分泌することが判明した。

終りに臨み終始ご懇篤なご指導を賜った中浜敏雄教授に深謝の意を表す。

文 献

- 1) Kuninaka, A, S. Otsuka, Y. Kobayashi & K. Sakaguchi (1959) : Bull. Arg. Chem. Soc., **23** 239.
- 2) 国中明 (1960) : 日農化, **34** : 849.
- 3) 齊藤恒行 (1960) : 化学, **15** : 101.
- 4) 坂口謙一郎 (1959) : 食品工業, **2**(12) : 29.
- 5) 国中明 (1961) : 食品工業, **4**(11) : 72.
- 6) 国中明 (1961) : 蛋, 核, 酵, **6** : 403.
- 7) 緒方浩一 (1963) : 化学と生物, **1**(11).
- 8) 緒方浩一 (1963) : Amino acid and Nucleic acid, **8** : 1.
- 9) 川崎式 (1961) : New Food Ind., **3**(1) : 31.
- 10) 木下祝郎 (1961) : 食品工業, **4**(11) : 15.
- 11) 橋爪斌 (1960) : 化学の領域, **14** : 702.

- 12) 浮田忠之進 (1961) : 食品工業, **5**(11) : 24.
- 13) Stetten, M.R., & C. L. Fox, Jr. (1945) : J. Biol. Chem., **161** : 333.
- 14) Shive, W., & W. W. Ackermann (1947) : J. Am. Chem. Soc., **69** : 725.
- 15) Greenberg, G. R., & E. L. Spilman (1956) : J. Biol. Chem., **219** : 411.
- 16) Slechta, S. (1960) : Biochem. Pharmacol., **5** : 96.
- 17) Tomisek, A. J., H. Kelly & H. E. Skipper (1957) : Arch. Biochem. Biophys., **64** : 437.
- 18) Mitchell, P. & J. Moyle (1951) : J. Gen. Microbiol., **5** : 421.
- 19) Rosano, C.L., R.A. Peabody & C. Hurwitz (1951) : Biochem. Biophys. Acta, **37** : 380.
- 20) 樋口, 植村 (1958) : 日農化., **33** : 304.
- 21) 樋口, 植村 (1958) : 日農化., **33** : 821.
- 22) 杉本, 岩浅, 石山, 横塚 (1962) : 日農化., **36** : 690.
- 23) Carter, C. A. (1950) : J. Am. Chem. Soc., **72** : 1466.
- 24) Dorugh, G.D. & D.L. Seaton (1954) : J. Am. Chem. Soc. **76** : 2873.

Summary

We would find the effective conditions of secretion of the substances related nucleic acid in the culture fluid growing of some strains of yeasts. We couldnt recognize the secretion of these substances on most strain in normal condition except some of theme in the cases of the regulated media including the special substances. *Candida utilis*, *Hansenula anomala* and *Endomycopsis hordei* HDT 7209 secreted these substances in

the regulated medium including the Na-malonate or Streptomycin. On further studies, we found that *Candida utilis* secreted about 11 γ /ml of adenylic acid by adding of Streptomycin in its medium and about 7 γ /ml of guanosin by Na-malonate, and *Endomycopsis hordei* HDT 7209 secreted about 13 γ /ml of adenosin and 9 γ /ml of uridylic acid by Na-malonate.