

二三細菌の化學的成分

研究囑託 醫學博士 明 石 修 三
助 手 伊 丹 二 三 雄

既に我々は枯草菌¹⁾に就て菌體成分を究明したが今回續いてアルカリゲネス菌 (*B. foecalis alcaligenes*), 螢光菌 (*B. fluorescens liquifaciens*), 納豆菌 (*B. natto*) に就て前同と同様の目的並に方法の下に研究を實施した。これら細菌中納豆菌及び螢光菌は枯草菌と同様に芽胞性細菌に屬しアルカリゲネス菌は無芽胞性桿菌である。何れも普通ブイヨンによく繁殖し液體培養法により比較的容易に大量の菌體を培養獲得することが出来る。

[I] アルカリゲネス菌

1. 菌體の培養並に採集

500 cc の三角コルベンに普通ブイヨン 80 cc を容れ加壓滅菌後殖菌して 37°C 5 日間培養した。強く腐敗臭を放ち、濁濁せるアルカリ性の培養液をそのまま遠心分離せんとしたが容易に菌體が分離せず、そこで鹽酸を加へ pH を約 4.0 に下げた處菌體は忽ち器底に凝集沈下した。この措置は菌體成分の一部が稀酸により溶出する懸念を伴つてゐるが止むを得ない臨機的手段として採用した。勿論鹽酸を加へるに先だち培養液のベルケフェルド濾液か鹽酸添加により何等沈澱物を生じないことを確めた。かくして沈澱した菌體から上清液をサイホンにて除き沈澱に水を加へて攪拌放置後上清液を再び棄てかゝる洗滌操作を 3 回反復した。ついでシャープルス遠心器を用ひて菌體を分離し磁製平皿或は陶土板に薄く塗り 37° の孵卵器内に 2 日間放置すれば菌體は菲膜となつて容易に剝離し之を更に硫酸乾燥器内に乾燥後ボールミルに入れ 2 日間廻轉磨碎し淡褐色の粉末を得た。收得量は平均 100 本の培養瓶より菌體粉末 15 g の割合であり、總計 586 g を採集して研究資料に供した。

2. 中性脂肪及び磷脂體の分離

全菌體粉末を酒精エーテル混液 (1:1) 3 L に浸漬し時々振盪しつゝ日光を遮斷して 1 週間室溫に放置した。かゝる抽出操作を浸漬液を毎回更新して 3 回反復した。浸漬液を集めて減壓蒸溜し蒸溜殘渣を 300 cc のエーテルに溶し 30 cc 宛の水で 3 回洗滌した。水洗液には Molisch 氏糖反應が陰性であつた。エーテル液を蒸溜すれば黒褐色の稍、硬い脂肪塊を残し、これを再びエー

テル 120 cc に溶しアセトン 500 cc を加へ磷脂體を沈澱せしめ氷室に 1 夜放置後遠心分離し粗磷脂體 P 7.7 g (1.3 %) を得た。一方アセトンエーテル可溶部は溶媒を蒸溜し中性脂肪 10.5 g (1.8 %) を分離した。

3. 中性脂肪の検索

1) 中性脂肪の性状

外觀は黒褐色軟固體で融點 27~30°, 酸價 154.5, 沃素價 55.9, 鹼化價 239°, P 0.58 %, N 0.73 % である。

2) 中性脂肪の鹼化

試料 10 g を 5 % 酒精性カリ 150 cc と共に窒素を通じつゝ 5 時間水浴上で加熱した。酒精を減壓溜出後、水 100 cc を加へ一部化生したエステルを分解するため暫時水浴中に熱し、ついでエーテルにて振盪しエーテル層及び水層に分けた。エーテル層より不鹼化物として淡黄褐色の軟固體 0.84 g (8.4 %) を得た。ステリン反應陰性、沃素價 126.7 であり、ベンチン木精と共に振盪すれば色素の大部分はベンチン層に残りカロチノイド色素の存在が豫想せられた。一方水層は稀硫酸を加へ析出浮上する脂酸を分取し更にエーテルで水層に残る脂酸を悉く抽出し、かくして混合脂酸 8.6 g (86 %) を得た。脂酸を分離した硫酸酸性水溶液は炭酸バリウムを加へ硫酸を中和しそのまゝ蒸發乾燥して粉末となし更にソクスレット浸出器を用ひ乾燥アセトンでグリセリンを抽出した。アセトン浸液を蒸發すれば濃蜜液 0.13 g (1.3 %) を得た。これはアクロレイン反應を呈しグリセリンの存在が證明された。一方混合脂酸は鉛鹽エーテル法により固體液體兩酸に分別し各に就て分析した結果を第 1 表に表示す。

第 1 表 中性脂肪に含まれる固體酸並に液體酸

	外 觀	融 體	中和價	沃素價	C 平均數	收 量
固體酸	淡褐固體	58~61°	217.7	4.4	C ₁₆	3.86 g (38.6 %)
液體酸	黒褐液體	—	176.1	57.7	C ₂₀	3.66 g (36.6 %)

4. 磷脂體の検索

粗磷脂體 P をエーテル 100 cc に溶解するにエーテル不溶分として 0.3 g 残つた。これは磷を含まず (0.04 % P), 蠟様物質である。一方エーテル液にはアセトン 200 cc を注加し生じた沈澱 A を濾液 B より分けた。A は 80~40 cc のエーテルに溶解しエーテルと等容のアセトンを加へて沈澱する操作を再三反復して磷脂體 P_I を得た。P_I の濾液を B に合し溶媒を蒸溜し更にエーテル 40~20 cc に溶し等容のアセトンを加へて再沈澱する操作を繰返し行ひ磷脂體 P_{II} を得た。P_{II} の濾液を蒸發して得た残渣を P_{III} とする。次に磷脂體各劃分の分析結果を掲げる。

第2表 磷 脂 體

劃分	外 觀	融 點	P(%)	N(%)	N:P	收量(g)
P _I	淡褐固體	170~175°	3.61	2.03	1:0.80	4.5
P _{II}	褐 固 體	165~168°	3.43	1.97	1:0.78	2.7
P _{III}	赤褐軟固體	65~70°	1.45	1.57	1:0.92	0.5

上表によれば各磷脂體はモノアミノ、モノ磷脂體と考へられる。又何れの劃分に就ても Molisch 氏糖反應陰性なれば糖脂肪の存在は否定せられる。

5. 蠟

酒精エーテル液で脂肪磷脂體を抽出除去した菌體抽出残渣をクロ、ホルムで處理したが抽出物僅かに 0.2 g に過ぎず検索を省略した。

6. 酸性水浸液より分離される菌體成分(特に糖)

本浸液には主として糖、鹽基成分、稀酸可溶性蛋白、無機成分等が含まれてゐるが各成分の純粹分離は含量が多いか或は分離さた易いものを除いては一般に困難である。先づ脱脂菌體をボールミルに納め約 10 日間延時間約 80 時間廻轉磨碎し、染色鏡檢により細菌體の悉く破壊せられたことを確めた後抽出操作を施した。菌體を 10 L の醋酸水で處理し液の pH を 4.0 に保ち電動攪拌器をかけて數時間激しく攪拌する。次に吸引濾過して得た黄褐色液體を低温にて水浴上に蒸發し濃縮液に三鹽化醋酸を加へ除蛋白し濾液は石油エーテルを以て殘留せる三鹽化醋酸を抽出除去した後濃縮し無水酒精を加へて分割沈澱を行つた。かかる操作により分離したものは磷酸石灰を主體とする無機質が殆んど大部分で他に糖と覺しき物質少量を得た。本物質は α -ナフトール反應陽性、ペンソーゼ反應陰性であり、加水分解により始めて還元力を呈するものである。微量なるため精査を斷念した。

7. 粗核蛋白の分離

上述の抽出残渣を pH 6.6 の磷酸鹽緩衝液 10 L 中に浸漬し 4 時間機械的に激しく攪拌後シャープルス遠心器により抽出液を分取し、液に膠狀鐵液を加へ濾過すれば透明の濾液が得られた。之に氷醋酸を加へ核蛋白を沈澱せしめんとしたが他の菌の場合とは異り pH を遙かに下げ 2.4~2.6 にした時完全に析出した。核蛋白の沈澱は分離後再び水に分散して重曹を添加して溶解し更に醋酸を加へて析出せしめた。收量は 65 g であつた。

8. 粗核蛋白の濾液より遊離核酸並に糖の分離

1) 糖の分離

粗核蛋白を濾別した濾液は全部合せて水浴上に約 1/4 に迄濃縮し冷飽和硫酸銅液を加へて銅鹽を析出せしめた。遠心分離した沈澱を 5% 鹽酸含有木精で銅が完全に除去され白色となる迄

洗滌を反復しついで 10 % 醋酸ソーダ液を細く分散し、よく攪拌したる後遠心分離する。かゝる醋酸ソーダ液による抽出を更に 2 回反復續行し最後に沈澱を 2 % 苛性ソーダ液に溶し少量の不溶物を濾去し木精を注加して生成する沈澱を脱水後粉末化し 2.5 g を得た。本物質は N 6.4 % P を含まず、ペントーゼ反應陰性、グルコサミン反應は微弱であつた。還元力はそのまゝでは現さない。加水分解し難く 10 n 鹽酸を以て 4 時間加熱分解した時最高還元値葡萄糖として 41.8 % を示した。

6) 遊離核酸

一方糖の洗滌に醋酸ソーダ液を集め鹽酸及び木精を加へると核酸が析出した。收量 1 g, 分析値は p 6.7 % N 14.5 % であつた。

9. 粗核蛋白の檢索(粗核蛋白劃分より糖、核酸及び蛋白の分別)

前掲の粗核蛋白は N 14.42 %, P 3.97 % であり一見純度の高い製品の如く認められるが、以下に述べる分離操作を施した結果核蛋白中に前記の糖が相當多量に含有されてゐることが判明した。本操作の要領は粗核蛋白を苛性ソーダ液に溶解しついで醋酸添加により蛋白を再沈澱せしむるに際し液中に化生する醋酸ソーダの濃度が小なる場合には核酸が蛋白と共に沈澱して糖のみ濾液に移り、又もし醋酸ソーダの濃度が 5~10 % に増加すれば蛋白のみ析出し大部分の核酸が液中に溶存する性質に基いたものである。

1) 糖の分離

先づ粗核蛋白 15 g を 2 % 苛性ソーダ液と共に捏ね軟泥狀となし水約 180 cc を加へて溶液とした。30 % 醋酸を加へ pH 4.2 になし析出した沈澱を遠心分離すれば可成濁つた上層液が得られた。沈澱は上述の稀アルカリに溶解醋酸添下による沈澱操作を尙 3 回反復して行ひ 4 回の操作により得られた分離液を合した。之を水浴上に蒸發すれば溶存する蛋白は液が濃厚となるに従ひ次第に菲膜となり液面に出現するから之を濾別し沈澱は前記不溶主蛋白に合した一方濾液の方は約 80 cc に濃縮した後クロ、ホルム振盪法による除蛋白を 4 回反復施行し最後の除蛋白濾液を 30 cc 迄濃縮して 4 % 鹽酸含有木精を 4 倍量加へると糖が析出した。淡褐色粉末で收量 2.0 g である。P 0.3 %, N 7.9 % でビウレット反應は陰性であるがペントーゼ反應微陽性で核酸の微量混在が豫想された。本糖が如何なる物質であり又如何なる形態で菌體に含まれてゐるかに就ては勿論豫斷は出来ないが一種のヘテロポリウーロン酸として核酸と同様に蛋白と複化合物を形成してゐるか或は又糖が核蛋白と偶然溶解並に沈澱性を等しくしてゐるために兩者が同一劃分に出現したかの二つの解釋が可能であるが實際には恐らく糖蛋白複合體を推定する方が正しい見解ではなからうかと思ふ。

2) 核酸の分離

上述の醋酸不溶沈澱に 4%苛性ソーダ液約 50 cc 及び 5%醋酸ソーダ液 150 cc を加へて溶解し更に氷醋酸を加へて pH 4.2 にすれば沈澱を生じた。乾燥粉末として収量 10.0 g であつた。これは N 14.30%, P 0.73% を含み即ち脱核酸蛋白である。一方蛋白を分離した濾液はこれを水浴上で蒸發すれば少量の蛋白が凝固析出するから濾別し、更に蒸發をつゞけて約 60 cc となし pH を 5.6 に調整しクロ、ホルム振盪除蛋白法を 3 回反復施行した。最後の除蛋白濾液を水浴上で約 20 cc 迄濃縮しこれに鹽酸含有木精を 5 倍量加へると核酸が析出した。収量は無色粉末として 1.3 g であつた。分析の結果次の通りである。

第 3 表 核 酸					
P(%)	N(%)	P:N	リボーゼ(%)	リボーゼ核酸(%)	チミノーゼ核酸(%)
8.01	15.52	1:1.94	8.39	34.1	51.7

上表中リボーゼ即ちペントーゼの定量は角倉氏法²⁾に従つて行つた。又リボーゼ核酸量は酵母核酸のリボーゼ含量の計算値を 24.6%³⁾とし又本核酸中に含まれるリボーゼ核酸を酵母核酸と假定して上記のリボーゼ含量實測値より算出した。チミノーゼ核酸量はチミノーゼ即ちデスオキシリボーゼの呈色反應に立脚する Dische 氏チミノーゼ核酸定量法⁴⁾に倣つて定量した。以上の成績が示す通り本核酸は可成り高純度のものであり且つ鼠チフス菌核酸⁵⁾枯草菌核酸⁶⁾と種類を同じくしてリボーゼ核酸、チミノーゼ核酸の混合體であることが判つた。

10. 菌體蛋白の分離 (n-NaOH 抽出蛋白)

核蛋白抽出残渣を n-NaOH 5 L に浸漬し約 4 時間激しく攪拌したる後一夜氷室に放置すれば全菌體が全く溶解せることを認めた。微量の不溶物を遠心分離し透明液に氷冷しつゝ濃鹽酸を加へ pH 4.2 となせば完全に蛋白が沈澱した。この沈澱についてアルカリに溶解醋酸にて沈澱する操作を 3 回反復し最後の沈澱浮游液を牛膀胱に納めて 4 日間流水中にて透析し木精エーテルにて處理し 134 g の粉末を得た。N 13.71% であつた。

11. 菌體の灰分組成

乾燥菌體を 100° 減壓で恆量に達するまで乾燥した試料を分析した 6.17% の灰分量を見出した。灰分中の各成分を定量し% で表せば次の通りである。

第 4 表 灰 分 組 成 (%)						
Na ₂ O	K ₂ O	CaO	MgO	P ₂ O ₅	SO ₃	SiO ₂
6.80	4.74	12.6	3.13	49.6	3.51	3.30

Na: 焦性アンチモン酸鹽として沈澱し沃素滴定した。

K: 亞硝酸コバルト、カリ、ソーダとして沈澱し沈澱を過マンガン酸カリ液で滴定した。

Ca: 磷酸鹽として沈澱し過マンガン酸カリ液を以て滴定した。

Mg: 磷酸マグネシウム、アンモンとして沈澱しその中の磷酸を比色定量した。

P₂O₅: 磷モリブデン酸鹽を化生せしめ、アミドールを還元劑として作用し發現する青色色素を比色定量した。

[II] 螢 光 菌

1. 菌體の培養並に採集

前回と略同様に施行したが採集時に多少前回と異つた所見は稀鹽酸を加へて pH 4.0 にした際菌體がゴム塊狀に凝集し器底に沈降せず反つて液面に浮上したことである。そこでこれを金網で抄ひ、布巾を用ひて吸引濾過し、よく水洗して充分培養液を除いた後磁製平皿に薄く塗布し 2 晝夜孵卵器内に放置乾燥し、最後にボールミルを用ひ粉末とした。採集菌體は乾燥量として 595 g であつた。

2. 中性脂肪及び磷脂體の分離

菌體の酒精エーテル浸液を蒸溜しエーテル可溶の混合脂肪を分離した。エーテル液の水洗液は黄色を呈したが蒸發殘渣微量なため檢索しなかつた。混合脂肪はエーテル・アセトン處理によりアセトン可溶の中性脂肪とアセトン不溶の磷脂體とに分別した。この際濃褐色の色素はアセトン不溶部に移行した。收量は中性脂肪 45.7 g (7.7 %) 磷脂體 5.3 g であつた。

3. 中性脂肪の檢索

1) 中性脂肪の性状

褐色軟固體で融點 25~29°, 酸價 71.0, 沃素價 47.0, 鹼化價 188.1, P 0.07 %, N 0.28 % である。

2) 中性脂肪の鹼化

試料 32 g を 5 % 酒精性カリ 300 cc と共に 5 時間窒素氣流中にて水浴上に加熱分解した。エーテル可溶の鹼化產物として混合脂肪酸 28.8 g (90.0 %), 不鹼化物 1.35 g (4.2 %) を得た又水溶性鹼化產物としてアセトン可溶の濃蜜液 0.23 g (0.7 %) を分離し、これは點滴反應によりグリセリンなることを證明した。尙鹼化產物中に糖の存否を Molisch 氏反應及び還元反應により檢査したが説明出來なかつた。従つて本中性脂肪は悉くグリセリッドであり糖脂肪の如きは含まれないことが推斷せられた。不鹼化物は黄褐色の半固體であつて沃素價 84.0, ステリン反應陰性、ベンチン木精を以て處理すれば色素はベンチン層に残り褐色に染めた。混合脂肪酸は鉛鹽エーテル法により褐色の液體酸と淡褐色の固體酸とに分別せられた。その性状は次掲の表の示す通りである。

第5表 中性脂肪に含まれる固體酸並に液體酸

	外 觀	融 點	中和價	沃素價	C 平均數	收 量
固體酸	淡褐固體	56—58	192.7	15.5	C ₁₈	14.45 g (45.1%)
液體酸	褐液體	—	216.9	84.0	C ₁₆	13.75 g (42.9%)

4. 磷脂體の検索

前記の粗磷脂體を分割精製するために 70 cc のエーテルに溶解し、アセトン 100 cc を注加し生じた沈澱と濾液とを分ち沈澱は毎回溶媒量を減じつゝ 7 回再沈澱を反復し、最後に 50 cc のエーテルに溶解し、溶液を 150 cc の氷冷アセトンに滴下して沈澱 P_I を得た。又 P_I を得るために出来た濾液洗液を全部合して溶媒を蒸溜し P_{II} を得た。脂肪中の色素は大部分 P_{II} 劃分に移行した。P_I P_{II} の性状は次に掲げる通りである。

第6表 磷 脂 體

劃分	外 觀	融 點	P(%)	N(%)	N:P	收量 g
P _I	淡褐固體	187~190°	4.11	2.15	1:0.86	4.1
P _{II}	濃褐半固體	42~44	2.02	0.81	1:1.12	1.2

5. 蠟 の 検 索

酒精エーテルを以て抽出した菌體殘渣はこれをクロ、ホルム 2 L 宛を以て 2 回抽出した。分取したクロ、ホルム浸液を蒸溜し蒸溜殘渣を 25 cc のエーテルに溶解し微量の不溶分を除きアセトン 200 cc 中に注加し一夜放置後遠心分離して沈澱 W_I を分離し上清液は溶媒を蒸溜して殘渣 W_{II} を得た W_I は冷エーテルに稍、難溶であるが温めると易溶である。次に W_I W_{II} の性状を表示する。

第7表 クロ、ホルム抽出成分

劃分	外 觀	融 點	P(%)	N(%)	N:P	收量 g
W _I	褐固體	182~185°	3.76	2.18	1:0.76	1.68
W _{II}	褐半固體	—	0.98	—	—	0.72

W_I は冷エーテルに稍、難溶なるため酒精エーテルに溶けずクロ、ホルム抽出成分として現れたものであるが本物質は P, N の含量から推して蠟とするよりも寧ろ磷脂體と見做すのが妥當と思はれる。よつて後出の菌體成分一覽表には磷脂體收量の中に算入することにした。

6. 酸性水浸液より分離される菌體成分(糖)

アルカリゲネス菌の場合と同様に處理したが糖或はそれに類似する物質を酒精分割沈澱法並にアムモニア鉛鹽法の何れによつても分離することに成功しなかつた。最初菌體を採集するにあたり便宜的手段として鹽酸を以て處置したが若し菌體成分の或部分が菌體から溶出する懸念ありとすれば、それは酸性水浸液に現れる成分特に糖及び無機質であることは論ずるまでもな

い。然し果して糖を菌體採集時に喪失したか或は元來本菌の糖含有量が微量なるため單離出來なかつたかに就ては實證を俟たねば斷言出來ない。

7. 核蛋白の検索

1) 核蛋白の分離

分離法は前同と全く同一である。總收量 40 g 淡褐色粉末で N 13.1 %, P 2.9 %である。

2) 核蛋白より核酸の分離

21 g の核蛋白を乳鉢にとり n-HaOH 100 cc を加へよく捏ねて粘稠液となしこれに 5 %醋酸ソーダ液を 200 cc 加へついで 50 %醋酸を注加し pH 4.4 にすれば大量の蛋白が析出した。之を遠心分離し沈澱は醋酸水を以て 2 回洗滌し分離液に洗液を合し水浴上に濃縮した。この時熱凝固蛋白が少量析出したから之を濾別し濾液に苛性ソーダ液を加へて pH 5.6 になし、濃縮を續けた。液量を 120 cc となしこれに 1/4 容のクロ、ホルムと 1/10 容のアミールアルコールとを加へ 1 時間激しく振盪攪拌し、ついで遠心分離しクロ、ホルム蛋白ゲルの沈澱と上層液とに分け上層液は更に 3 回同様のクロ、ホルム振盪法を繰返し實施した。かくして除蛋白された上層液はこれを水浴上に濃縮して約 30 cc にして 5 倍量の 4 %鹽酸含有木精を加へると核酸が析出した。收量 3.0 g であつた。

一方クロ、ホルム蛋白ゲルは全部集めて 1/4 容の木精を加へて解膠し分離した蛋白を最初に醋酸で析出せしめた大量の蛋白に合し之を核酸脱蛋白とした。該蛋白は P 0.64 %, N 14.53 %, 收量 17 g であつた。

3) 核酸の分析

第8表 核 酸					
P(%)	N(%)	P:N	リボ-ゼ(%)	リボ-ゼ核酸(%)	チミノ-ゼ核酸(%)
9.30	14.55	1:1.56	7.69	31.2	39.6

8. 菌體蛋白の分離

1) pH 5.0 抽出蛋白

核蛋白抽出残渣を水 5 L に分散し n-NaOH を加へて pH 9.0 とし 4 時間攪拌後遠心分離した。暗褐色稍、不透明な上層液に氷醋酸を加へて pH 4.0 にすれば蛋白が多量沈澱した。沈澱は醋酸水で洗液に燐反應がなくなるまで洗滌したる後 3 回再沈澱を反復し最後にアルカリに溶解し膀胱内にて 3 日間透析を行ひしかる後粉末とした N 14.0 %, 收量 253 g。

2) 2.5 n-NaOH 抽出蛋白

上記蛋白の抽出残渣は尙少量存しこれを 10 % NaOH に浸漬すれば悉く溶解した。即ちアル

カリ不溶の菌體成分が存しないことが判つた。浸液を氷冷下に濃鹽酸で中和し更に pH 2.8 にすれば沈澱を析出した。3 回再沈澱を行つてから乾燥粉末とした。N 12.9 %, 收量 20 g.

9. 菌體の灰分組成

菌體の灰分含量は 5.02 % でありその組成を次に表記す。

第 9 表 灰 分 組 成 (%)						
Na ₂ O	K ₂ O	CaO	MgO	P ₂ O ₅	SO ₃	SiO ₂
5.37	3.22	8.10	4.74	54.4	3.07	10.2

[III] 納 豆 菌

1. 菌體の培養並に採集

培養條件は全く前者と同様である細菌の繁殖したる培養液は特有の芳香を有し若し僅かでも惡臭を放つものがあれば雑菌の混入を指示する證左であつて遺棄した。菌體の遠心分離はそのまゝでは思はしくないので鹽酸を加へ pH 4.0 となし凝集沈下せしめて採集した。收獲した菌體總量は乾燥粉末として 504 g であつた。

2. 中性脂肪及び磷脂體の分離

菌體の酒精エーテル抽出成分として 14.6 g を得た。その中 9.0 g (2.0 %) は中性脂肪であり残り 5.6 g (1.1 %) は粗磷脂體であつた。尙これら脂肪を分離した水溶液及び洗滌液に就ては糖反應が陰性であつた。

3. 中性脂肪の檢索

1) 中性脂肪の性状

他の細菌脂肪と異り濃褐色液體である。酸價 90.2, 鹼化價 221.9, 沃素價 57.4 である。

2) 中性脂肪の鹼化

試料 8 g を 5 % 酒精性カリ 100 cc と共に窒素を通じつゝ 5 時間加熱して鹼化した。分解產物として混合脂肪酸 5.85 g (73.1 %), 不鹼化物 1.05 g (13.1 %) 及びグリセリンを主體とする無水アセトン可溶の濃蜜液 0.53 g (6.6 %) を得た。尙鹼化產物中には糖を證明出來なかつた。不鹼化物含量は他菌に比し著しく多い。濃褐色軟固體で沃素價 126, ステリン反應陰性であつた。これをベンチン木精と共に振盪すればベンチン層は濃褐色に染つた。

3) 混合脂肪酸を固體酸液體酸に分別

本混合脂肪酸は枯草菌に於て經驗した如く鉛鹽エーテル法を單獨に適用出來なかつた。何となれば鉛鹽の加温エーテル溶液を冷却すれば鉛鹽の一部はゲル狀に析出し且つこの沈澱は多少

冷エーテルに溶解する性状を示した。よつて枯草菌に於て述べた通り酒精法、エーテル法を併用して次の四種の鉛鹽を分けた。即ち、

A) エーテル及び酒精に不溶の鉛鹽、 B) 酒精不溶冷エーテル難溶温エーテル可溶にして冷却すればゲル狀に析出する鉛鹽、 C) 酒精不溶、冷エーテル易溶の鉛鹽、 D) 冷エーテル、冷酒精何れにも易溶の鉛鹽、これら各鉛鹽より得た遊離脂酸の性状を次表に掲げる。

第 10 表 中性脂肪に含まれる固體酸並に液體酸

劃分	外 觀	融 點	中和價	沃素價	C 平均數	收量 g
A	黃白固點	27~29°	251	3.47	C ₁₄	0.64
B	褐 固 體	24~25	274	18.40	C ₁₂	0.65
C	褐半固點	—	262	28.63	C ₁₂₋₁₄	1.78
D	褐 液 體	—	272	38.32	C ₁₂	1.90

上表より明かな通り脂酸の大半が液體或は低融點のものであり、このことは本菌の中性脂肪が液狀を呈してゐることに一致してゐる。

3. 磷脂體の檢索

磷脂體は分別沈澱により 3 劃分に別けた。先づエーテル 15 cc に溶解しアセトン 30 cc を注加する分別法を 3 回反復して沈澱と可溶部分とに別け後者より得た磷脂體を P_{III} とした。又沈澱の方は 25 cc 宛の無水酒精で 2 回加温冷却處理を施して得た酒精不溶劃分を P_I とし酒精可溶劃分を P_{II} とした。各磷脂體の性状を次表に示す。

第 11 表 磷 脂 體

劃分	外 觀	融 點	P(%)	N(%)	N:P	收量 g
P _I	淡褐固體	186—189	5.02	2.81	1:0.82	1.4
P _{II}	褐軟固體	165—168	4.39	2.55	1:0.77	2.8
P _{III}	濃褐固體	150—154	4.71	2.31	1:0.92	1.3

4. 蠟

クロ、ホルム浸液より分離された物質は 0.1 g の僅少に過ぎず檢索を省略した。

5. 酸性水浸液より分離される菌體成分(糖)

脱脂菌體を再びボールミルに移し約 80 時間廻轉磨碎したる後醋酸水 10 L に浸漬しその pH を 4.0 となし電動攪拌後濾過し淡黄色の濾液を低温蒸發した。濃縮の進むに従ひ次第に液面に蛋白膜の生成せられるのを認めた蒸發乾固したる後少量の水にて數回抽出し抽出液を濃縮後木精を液量の 3 倍加へた。生成した沈澱は蛋白、無機質主として磷酸石灰であり之を濾別した濾液を濃縮後再び木精を 3 倍量注加濾過しかゝる木精による沈澱を 5 回反復して行ひ 75 % 木精に不溶性の物質を可及的に除き最後に 10 倍量の無水酒精を加へて生じたる沈澱を集め少量の

水に溶し 10 倍量の酒精注加による再沈澱を數回反復して精製した。收量 2.0 g 本物質は酸性反應を呈し、水に易溶、N 7.6 %還元性はそのまゝでは微弱であるが、5 %硫酸による 2 時間加熱により最高還元値葡萄糖として 32.7 %、を示した。ペントーゼ反應グルコサミン反應は共に陰性であつた。

6. 核蛋白の檢索

1) 核蛋白の分離

既述の方法に従ひ抽出分離した。收量は 15 g で前記兩細菌に比較すれば著しく少かつた。分析の結果 P 2.31 %, N 15.7 %であつた。

2) 核蛋白より核酸の分離

螢光菌の場合と全く同様に施行した。10 g 核蛋白より核酸 1.3 g 核酸脱蛋白 8.0 g を分離した。核酸を分析した結果を示すと次表の通りである。

第 12 表 核 酸					
P(%)	N(%)	P:N	リボ一ゼ(%)	リボ一ゼ核酸(%)	チミノ一ゼ核酸(%)
8.6	15.35	1:1.74	19.56	79.5	27.36

7. 菌體蛋白の分離

1) n-NaOH 抽出蛋白

n-NaOH 5 L に菌體を浸漬攪拌し、分離したる浸液に氷冷下に濃鹽酸を加へ pH 4.0 にて析出する沈澱を集め更に 3 回再沈澱を繰返したる後乾燥粉末とした。N 13.8 %, 收量 92 g.

2) 2.5 n-NaOH 抽出蛋白

上記の抽出残渣を 2.5 n-NaOH 2 L に浸漬攪拌した。そのまゝでは殘存する不溶物が膠狀化して遠心分離が不能であつたが氷冷下に氷醋酸を弱アルカリ性となる迄加へると分離が容易となつた。そこで遠心分離し透明濾液に醋酸を追加して蛋白を沈澱せしめた。N 13.7 %, 收量 13 g.

3) 80 %醋酸抽出蛋白.

上記の抽出残渣を 80 %醋酸に浸漬し遠心分離して得たる浸液に水を大量加へると蛋白を析出した。N 12.0 %, 收量 10 g.

8. 菌體抽出残渣

以上述べ來つた各抽出操作を施すも尙不溶部分として残つた菌體成分を抽出残渣とした。N 10.25 %, 收量 51 g, ビウレット反應を行へば不溶の物質のみが紫色に染ることを認めた。本物質は濃アルカリには不溶であるが濃硫酸には室温にて溶解し水にて稀釋すれば再び析出し

この點キチン質の性狀に類似してゐる。

9. 菌體の灰分組成

菌體灰分含量は 5.78 %で、灰分組成を檢査した結果は次の通りである。

第 13 表 灰 分 組 成 (%)

Na ₂ O	K ₂ O	CaO	MgO	P ₂ O ₅	SO ₃	SiO ₂
10.1	2.30	20.7	3.64	41.6	2.58	3.56

[IV] 菌體成分の綜括的考察

以上叙述した三種細菌の各成分はこれを次に掲げる一覽表に綜括して通覽することが出来る。數字は何れも收量を%數で表したものである。尙比較参考のために既に發表した枯草菌の成績を併記する。

第 13 表 菌體成分一覽表

成 分	アルカリゲネス菌	螢光菌	納豆菌	枯草菌
中 性 脂 肪	1.8	7.7	2.0	2.0
磷 脂 體	1.3	1.2	1.1	0.8
蠟	0.0	0.1	0.0	3.3
糖	僅微	僅微	0.4	1.0
核 蛋 白	11.1(但糖含有)	6.7	3.0	2.0
遊 離 核 酸	0.4(但糖含有)	0	0	0.5
菌 體 蛋 白	22.9	47.2	22.8	26.3
菌體抽出殘渣	0	0	10.1	7.9
灰 分	6.2	5.0	5.8	4.5
計	43.7	67.9	45.5	48.3

上表を通覽考按するならば、中性脂肪は螢光菌の約 8 %を例外として他は何れも約 2 %である。細菌の脂肪含有量は培養基の組成により少なからず影響されることは既知の事實であるが若し同一條件下に培養された菌相互間に含有量に著しい差違が存する場合には菌の特性に基く差違と判斷して間違はなからうと思ふ。ステリンは何れの場合にも見出せなかつた。磷脂體は各菌を通じて 1 %内外であつて大差を認めない。蠟に関しては特記すべきものはなくたゞさきに枯草菌より多量に分離せられた特異な蠟物質が或は芽胞の特有成分ではなからうかとの想定の下に枯草菌と同様に芽胞を有する螢光菌及び納豆菌を檢索するにあたり類似物質に遭遇しはしまいかとの期待がかけられたのであるが結果は全くこれに反した。然し反面これによつて問題の蠟が枯草菌特有の物質であることが立證されたのである。糖に就ては醋酸水浸液より得られる糖はたゞ納豆菌に於て少量分離されたのみである既述の通り本劃分成分を獲得するには菌

體採集にあたり可及的に酸處理を避ける必要があるのではないかと思ふ。尤もアルカリゲネス菌に於ては中性磷酸鹽水浸液に糖が核蛋白及び核酸等と共に見出されたのは特別な例であつた。アルカリゲネス菌の核蛋白含有量はたとひ混在する糖を差引いても各菌中最大であり螢光菌はこれについて多い。所謂遊離核酸即ち核蛋白濾液より銅鹽として得られる核酸は枯草菌では多量見出されたが本回ではたゞアルカリゲネス菌に少量しかも糖を伴つて分離されたに過ぎぬ。菌體蛋白は螢光菌に特に多く他の菌では大差がない。アルカリ可溶のこれらの蛋白の他に醋酸水浸液に移行した醋酸可溶の蛋白が存したがあまり大量でないため蛋白收量に算入しなかつた。菌體の主體をなす蛋白含量の動搖は菌體試料の乾燥狀態即ち水分の多寡により大いに左右されることは論を俟たないが螢光菌と他菌との間に認められる差違が單にかような理由のみによつて説明し難く他に原因があるものと思ふ。抽出残渣として納豆菌より可成り大量分離されたがこれは枯草菌より得たものと略類似の物質であらう。これに關聯してアルカリゲネス菌、螢光菌、は枯草菌納豆菌等とことなりその脱脂菌體がアルカリに悉く溶解する菌種であると云ひ得る。灰分に就ては含量は略等しいが各成分は相當差違が認められる、然し無機質の過半量の磷酸石灰である點に於ては何れも一致した成績を示してゐる。

[V] 菌體蛋白アミノ酸の檢索

近來惡性腫瘍蛋白に d-アミノ酸が構成成分として含まれてゐることが Kögl¹⁷⁾ により主張せられ又それに引續いて d-ペプチッドを分解する d-ペプチダーゼが瘍腫患者血清及び或種細菌體に見出されるに及び蛋白アミノ酸の所屬系が注目を惹く所となつた。これらの事實に鑑み菌體蛋白アミノ酸の所屬系決定は當然檢討せらるべき問題である。我々はアルカリゲネス菌及び螢光菌より分離したる蛋白を用ひ酸加水分解によりアミノ酸を單離し精製品に就て比旋光を測定した。アミノ酸の單離並に精製操作は可成り煩雜であり且つ定量的分離に至つては尙更熟練を必要とする。我々は簡單のため各アミノ酸の收量を度外視し専ら純品を得て本研究の趣旨に副ふことに努めた。單離にはブタノール抽出法及び銅鹽法を併用した。以下實驗操作の大要及び實驗成績を略述するに止める。

1) 蛋白の加水分解及びブタノール抽出

螢光菌蛋白 60 g アルカリゲネス菌蛋白 80 g を夫々別個に 4 倍量の 25% 硫酸と共に 60 時間煮沸分解した(加熱時間 30 時間では不充分であつた)。化生したフミン質(2.5~6 g)を濾別し液の硫酸をバリットを以て定量的に除き、減壓下に適量にまで濃縮し一夜放置すればチロゲンが析出した。チロゲンの濾液は尙 1 回濃縮後放置してチロゲンを充分に析出せしめた。次で濾液

を自働循環浸出装置に移してブタノールを以て 50 時間連続抽出し、抽出液と抽出残液とに二大別した。

2) ブタノール抽出残液の處理

燐タングステン酸を以てデアミノ酸劃分(沈澱)とデカルボン酸劃分(濾液)とに分別した。

a) デアミノ酸劃分： 沈澱を常法によりバリットを以て處理して遊離アミノ酸液となし次に硝酸銀バリット法により pH 7.0~7.4 に於て生成するヒスチジン銀の沈澱を分離して沈澱を硫化水素で分解し更に硫酸水銀を加へてヒスチジンを再沈澱し夫より遊離ヒスチジンを得た。さきにヒスチジン銀沈澱を濾別した濾液はバリットを追加して pH 13~14 に於てアルギニン銀を沈澱せしめた。この沈澱を硫化水素で分解し、更にフラビアン酸を加へてアルギニンフラビアナートに變化し後より遊離アルギニンを得た。リジンの分離はアルギニン銀沈澱の濾液に硫化水素を通じ更に硫酸を加へて過剰の銀及びバリットを除き次に燐タングステン酸を加へてリジンを再沈澱し後者をリジニピクラートに變じそれより遊離リジンを取得した。

b) デカルボン酸劃分： 先づ液中の硫酸及び燐タングステン酸をバリットを以て除き次にバリウム鹽酒精法によりデカルボン酸を分離しそれから得た遊離デカルボン酸の濃厚水溶液に鹽酸ガスを飽和し氷室に放置して析出したグルタミン酸鹽の結晶を分離した。濾液は水酸化鉛を以て鹽酸の大部分を除き炭酸銅と共に煮沸してアスパラギン酸を銅鹽として析出せしめ銅鹽を硫化水素で分解して遊離アスパラギン酸を得た。

3) ブタノール抽出液の處理

ブタノールを蒸留し残渣を無水酒精で抽出し酒精可溶のプロリン劃分を分離した。酒精不溶のアミノ酸混合物はこれを炭酸銅と共に煮沸して銅鹽に變じ、蒸發乾固後再びその水抽出液に炭酸銅を加へて煮沸しかゝる操作を反復してアミノ酸を完全に銅鹽に變ぜしめ、最後に水溶性銅鹽及び水不溶性銅鹽に別けた。

a) 水不溶性銅鹽： 銅鹽を硫化水素で分解して得た液を蒸發し先づ析出するロイチン、イソロイチン結晶の混合物を分取した。濾液は水酸化亞鉛と共に反復煮沸して完全に亞鉛鹽に變じ蒸發乾固後水にて抽出し水溶性並に水不溶性亞鉛鹽を得た。水不溶性亞鉛鹽より遊離したアミノ酸はロイチン、イソロイチン結晶に合せそれを再び銅鹽に誘き木精不溶性並に可溶性銅鹽に分ち前者より得たアミノ酸をロイチン後より得たものをイソロイチンとした。又一方水溶性亞鉛鹽より得たアミノ酸をフェニールアラニンとした。

b) 水溶性銅鹽： 充分加熱乾燥したる銅鹽を木精を以て抽出し木精不溶性並に可溶性銅鹽に分別した。

i) 木精不溶性銅鹽：遊離アミノ酸とした後カーバメート法によりグリチンを分離し濾液は再び銅鹽となし分別結晶法により最も水に易溶の銅鹽劃分よりアラニンを取得した。

ii) 木精可溶性銅鹽：遊離アミノ酸となし更に亜鉛鹽に變じ加熱乾燥後無水酒精にて抽出した。酒精可溶のものは極微量で殆んど全部酒精不溶性亜鉛鹽であつた従つてオキシバリンは存しないものと見做した。酒精不溶性鹽は遊離アミノ酸となしバリンを得た。

c) プロリン劃分：本劃分は水易溶性の濃蜜液として得られた。これに就てピクラート生成によるプロリンの單離を再三方法を變へて試みたが遂に特有のピクラートを分離することに成功しなかつた。

4) アミノ酸の比旋光測定

以上の如くして單離した各種アミノ酸は夫々適當な溶媒より反復再結晶して純化した。最も純度の高い結晶を用ひ次表に掲げた條件の下に換言すれば液の濃度並に溶媒の種類を文献値に記載されたものと同一にして比旋光を測定し文献値と比較した。

第 14 表 菌體蛋白のアミノ酸の比旋光

アミノ酸の種類	比旋光測定 溶媒	比旋光測定 濃度(%)	$[\alpha]_D$ 觀測 アルカリゲネス菌	値 螢光菌	$[\alpha]_D$ 文献値
アラニン	水	9	+ 2.7	+ 2.5	+ 2.7
バリン	20%鹽酸	3	+26.6	+27.1	+28.8
ロイチン	〃	3	+15.3	+15.3	+15.4
イソロイチン	〃	4	+30.1	+31.8	+37.4
アスパラギン酸	10%鹽酸	4	+24.3	+24.8	+25.7
グルタミン酸	9%鹽酸	5	+30.7	+30.5	+31.7
チロジン	21%鹽酸	4	-8.15	-8.05	-8.48
フェニールアラニン	水	2.5	-14.6	-13.4	-35.1
ヒスチジン	水	3	-37.5	-38.3	-39.7
アルギニン	20%鹽酸	3	+25.5	+25.6	+25.7
リジン	水	3	+14.4	+14.2	+14.6
グリチン	—	—	—	—	—

上表を通觀すればフェニールアラニン、イソロイチンを除く他のアミノ酸は何れも實測値と文献値とがよく一致し明かに天然系の 1 アミノ酸であることが判る。この兩アミノ酸は再三異なる方法で精製を試みたがその都度多少値の動搖することを認めたが上記の値以上に文献値に接近せしめることが出来なかつた。一方 N の分析を行ひその純度を検査して見るとフェニールアラニンは N 10.23 % (理論値 N 8.49 %), イソロイチンは N 11.10 % (理論値 N 10.69 %) を與へ明かに N 含有量の異なるアミノ酸との混合物であることが指摘された。既述の如くこの兩

アミノ酸は共に水不溶性銅鹽としてロイチンと同一劃分に現れたのであるがもしこの劃分からバリンが完全に除去されてゐないと夫がフェニールアラニン及びイソロイチンに混入してその純粹單離を困難ならしめる可能性が充分にありこの兩アミノ酸の比旋光が文献値に背違する原因となるであらうことが容易に察知せられる。かゝる理由に基きフェニールアラニン及びイソロイチンも他のアミノ酸と同様に 1 系に屬するものと推論して間違なからうと考へる。グルタミン酸は悪性腫瘍蛋白に於て問題の中心點となつたアミノ酸であり本研究に於ても特に興味を以て注意して探索したが全く 1 系に屬することが確認された。

本研究業績は過去一ケ年に亘り前田研究室に於て擧げられたものであり、之に對し文部省科學研究費が下附せられた。

(昭和十六年十二月六日 京大化學研究所講演會に於て發表)

文 献

- 1) 明石, 伊丹: 化學研究所講演集 12, 195 (1941).
- 2) K. Suminokura: J. Biochem., 14, 343 (1931).
- 3) S. Akasi: 同誌 29, 28 (1934).
- 4) Dische: Mikrochem, 2, 26 (1930).
- 5) S. Akasi: J. Biochem, 28, 355 (1938).
- 6) 明石, 伊丹: 前掲
- 7) F. Kögl u. H. Erxleben: Z. physiol. Chem., 258, 283 (1939).