

納豆菌の菌体内核酸[※]

松本宗人・岩原章二郎^{※※}・安部章蔵^{※※※} (農産製造学研究室)

Muneto MATSUMOTO, Shōjirō IWAHARA and Shōzō ABE

On the Polynucleotides in the Cell of Nattō-bacteria

緒 言

著者らは、納豆菌の分類的位置や生理的性質や利用性などについて、より深い知見をうる目的で該菌の性状に関する検討を行なっているが、さきに該菌の合成培地や半合成培地の培養液中に核酸ないし核蛋白が現われることを知り、これらは主として、溶菌によって菌体から放出されるものであろうと推論した。⁽²⁾⁽⁵⁾その後この考えをたしかめるための一法として、菌体の核蛋白を、菌を磨碎して弱アルカリで抽出して採り出し、その性状をしらべたところ、このものが培養液中に現われるものと酷似していることを知り、さきの考え方がより確からしいことを認めた。以下にその実験の概要を報告する。

実 験 と 考 察

使用菌株 市販納豆より分離した保存株で既報⁽²⁾に使用したものを納豆を通して再分離して用いた。その菌学的性状は第1表のようで、沢村⁽⁶⁾の記載に類似している。

培地 下記のA液：B液＝5：1の混合液（半合成培地）を用いた。

A液（合成培地）：NaH—Glutamate 10g, Glycerin 20g, Glucose 5g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.5mg, Biotin 0.01mg, 水道水 1l, 10%アンモニヤ水でpH7.2～7.4に調整。

B液（大豆煮熟汁）：大豆60gを300mlの水道水に1夜浸漬し、液をすて、新しい300mlの水道水を注ぎ静かに3時間煮熟、その間蒸留水で蒸発を補う。煮熟後煮汁を傾斜して採り、60～70mlの蒸留水を加えて煮熟10分後煮汁を去ることをくり返して煮汁合計300mlをうる。これを10%アンモニヤ水でpH 7.2～7.4に調整してろ過。

培養 1l容三角フラスコに上述の培地100mlずつを分注し（表面積：液容量＝1.5強）、37°Cに静置培養して、菌が溶菌を起すよりも前の時期（28時間培養）

の菌体を試料とした。培地は菌の繁殖に伴ない数時間後に一度酸性側に動いてからアルカリ性に向う。静置条件は、菌体を集める操作が容易なので採用した。

核蛋白の抽出 上述のように培養して繁殖生成した菌膜を、培養液を傾斜し去り、氷冷蒸留水を注いで（以下の処理はすべて氷冷状態で操作）洗いつゝとり出して蒸留水に懸濁し、これを高速遠沈し蒸留水を加えて懸濁遠沈洗浄を2回反復してのち、沈澱菌体を1G4ガラスフィルター上に移し、アセトンで3回、エーテルで2回洗浄し、真空デシケーターで乾燥して乾燥菌体をえた。この乾燥菌体5gを乳鉢中に0.1N—NaOH50mlに分散懸濁し、ガラス粉末3gを加え約1時間磨碎し、さらに50mlの0.1N—NaOHを加えて分散溶出し、これを高速遠沈（12,000r. p. m., 10分間）して上澄液を採り、沈澱は0.1N—NaOH20mlに分散懸濁遠沈することを2回くり返して溶出上澄液を採り、上澄液を合わせて、これに1N—HClを加えて0.25N濃度にし、生ずる白色沈澱を高速遠沈（12,000r. p. m., 10分間）して集め、この沈澱を0.1N—NaOHに一たん溶解して、わずかの不溶物を高速遠沈除去し、溶液を再び1N—HClで0.25N—HCl濃度として生ずる白濁沈澱を高速遠沈して採り、蒸留水で1回、50%酒精で3回、酒精—エーテル（3：1）で3回、エーテルで2回それぞれ遠沈洗浄してのち真空デシケーターで乾燥して白色粉末の調製品をえた。この抽出物を以下の分析に供した。収量は培地1lより乾燥菌体約5gを、これから白色粉末約150mgを得た。

抽出試料（菌体内核蛋白）の性状 上述のようにして得た抽出白色粉末試料についての実験結果をまとめ、さきに検討した培養ろ液にあらわれる核蛋白⁽⁸⁾と比較すると第2表のようである。すなわち、

紫外吸収スペクトル：試料の5mg%—0.1N—NaOH溶液の紫外吸収は第1図のようであった。この測定は1m μ ごとに行ない、比較としてN. B. C.製のRNA標品の2.5mg%—0.1N—NaOH溶液を測定した。スペクトルは260m μ に最大を持ち典型的な核酸の吸収特性を示していて、ろ液の核蛋白とほぼ同様な様相を表わしている。

※日農化関西支部第190回講演会（1962, 6月）で発表、経費の一部を昭和36年度文部省科研費（各個）によつた、納豆菌に関する生化学的研究XI ※※現在京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士課程 ※※※現在広島県食品工業試験場三次分室

核酸組成：DNAは試料の0.1N-NaOH溶液（100mg %付近）をジフェニールアミン試薬により、発色10分後の610m μ の吸収度を測りN. B. C. 製のDNA標品について作製した検量曲線から算出し、RNAは同じく0.1N-NaOH溶液（20mg %付近）をオルシン—塩化第二鉄法で675m μ の吸収度を測りN. B. C. 製のRNA標品について作製した検量曲線から算出した。結果は抽出試料によって多少の差異がありDNA 13.25~15.38%、RNA 10.02~12.50%でDNAの多いことが特徴的である。これらの値を培養液の核蛋白と比べると菌体の抽出試料はDNA含量がやや少なくRNA含量が多い。菌体の核蛋白のRNA含量は菌の生育時期によってかなり変化するといわれ⁽⁴⁾、値がつかみ難いが、上の結果から、菌体抽出試料と培養液の核酸組成は類似しており、菌体核蛋白が菌の溶菌の頃に、やや分解してRNA含量のかなり少ないものとなって培養液中に現われてくるものと

解釈する。

塩基組成：試料50.2mgを6N-HCl 5ml（約1%溶液）中で120°Cに20時間水解し中和後活性炭で脱色して東洋ろ紙No.52にn-ButOH:Formic:H₂O=4:1:1volで展開してしらべた。展開ろ紙の濃度分布を260m μ の吸収度で測定（分光光度計ろ紙泳動付属装置で移動距離2mmごとに）した結果は第2図のようである。グアニン（Rf 0.13）、シトシン（0.26）、アデニン（0.33）、ウラシル（0.39）、チミン（0.56）を検出した。チミンは水解中に分解して低い値を示しているものと考えられるが、この菌体内核蛋白の塩基組成は培養液の核蛋白のその様相と一致している。

アミノ酸組成：上記水解液を東洋ろ紙No. 52に展開してニンヒドリンで発色して定性定量した。展開剤は一次元にn-ButOH:Formic:H₂O=4:1:1volを、二次元にPhenol:H₂O=17:2vol（NH₃ 1%）を用

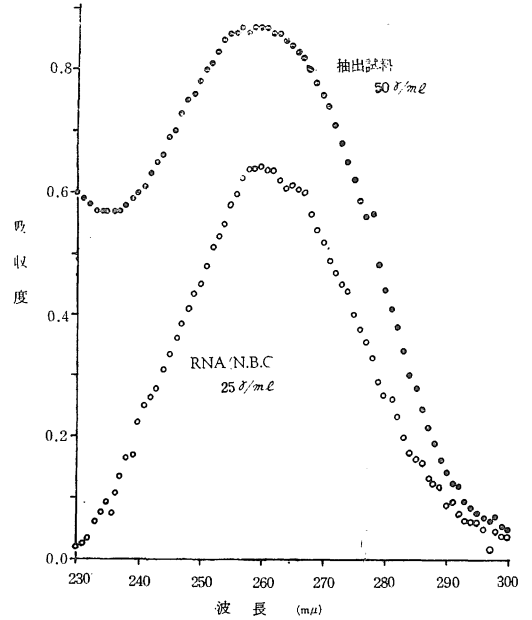
第1表 使用菌株の微生物学的性状

	使 用 菌 株	<i>Bac. natto</i> SAWAMURA
形態（肉汁）	0.8~1.0×1.8~2.6 μ 、桿状、両端部円、糸状連鎖多い	1×3~4 μ 、ほか同左
運動性	ある、活ばつ	あ る
胞 子	だ円形、主として端部的	だ円形、主として中央的
染色性	グラム陽性	同 左
分子状酸素	通性好気性	同 左
肉 汁	白（帯淡黄褐）色の乾燥粉状の小皺ある強固な被膜を形成、はじめ濁、被膜形成後は膜直下のみやや濁でほかは清澄	ほゞ同左
ペプトン水	被膜の色は白色に近い。ほか同上	ほゞ同左
肉汁膠扁平	はじめに粘性滑面光沢性小滴状の集落を生じ、これがやがて表面の光沢を失い白色の小皺膜を生じうすくひろがる。この表面は白色（帯淡黄褐）乾燥粉状小皺。液化。縁羽毛。	ほゞ同左
肉汁膠斜面	粘質透明隆起の集落を生じてのち、扁平にひろがった被膜となり表面は白色（帯淡黄褐）乾燥粉状。唇裂縁辺不劃然。液化。	扁平、唇裂、淡褐色乾燥粉状組織。中央に小点多。生長速
肉汁膠穿刺	接種線に沿い繁殖しすみやかにろう斗状に液化、のち層状に液化し表面に被膜。	接種線に沿いすみやかに液化
肉汁寒天扁平および同斜面	それぞれ膠扁平、膠斜面に類似。十分繁殖ののち、乾燥粉状小皺の被膜が湿潤光沢性を帯び菌苔液化の様相を呈する。	—
馬れいしょ	白色（帯淡褐）有皺、表面やや光沢あり、菌苔裏面粘質強い。培地軟化やや水解。	灰白、有皺
牛 乳	凝固してのちペプトン化、アルカリ性化	凝固後アルカリ性を呈し溶解
硫化水素	発生しない	同 左
インドール	形成しない	同 左
アセトイン	生成する	同 左
ガ ス	発生しない	同 左
アンモニヤ	生成する	同 左
硝酸塩還元	す る	—
澱粉水解	す る	同 左
マンナン分解	す る	—
脂肪水解	す る	—

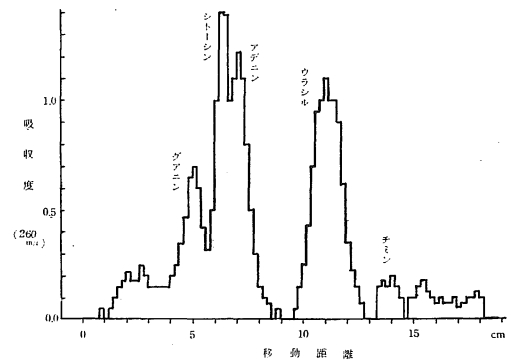
第2表 納豆菌の菌体内核蛋白の性状

	菌体内の核蛋白試料	培養ろ液の核蛋白 (比較)
定性反応	ニンヒドリン反応・弱陽性；ピ ューレット反応・強陽性；ザン トプロテイン反応，アダムキー ビツ氏反応，坂口氏反応・極 弱陽性；エールリッヒ氏反応・ 弱陽性；ミロン氏反応，ジフェ ニールアミン反応，オルシン反 応・極強陽性	同 左
溶解性	水，弱酸，有機溶媒類に不溶； 弱アルカリに可溶，無機または 有機の弱酸性 (pH 3~2) で沈 澱	同 左
吸収スペ クトル	λ_{max} 260 $m\mu$ ， λ_{min} 233~237 $m\mu$	260 235~24
DNA	13.25~15.38%	16.67%
RNA	10.02~12.50%	6.94%
全P	7.8%	8.5%
塩基	アデニン，シトーシン，グアニ ン，チミン，ウラシル	同 左
アミノ酸	グリシン (0.83%) ，アラニン (1.25) ，バリン※ (メチオニン) (1.08) ，ロイシン (1.17) ，セリ ン (0.53) ，アスパラギン酸 (0.87) ，スレオニン※ (0.33) ， グルタミン酸 (2.00) ，プロリン (0.93) ，フェニールアラニン (0.80) ，リジン (0.92) ，ヒステ ジン (+) ，シスチン (ジアミノ ピメリン酸) (+) ，アルギニン※ (0.23) ，チロシン※ (+) 。	同左ただ し，※印 は欠

いた。定量は該当発色スポット部を切って75%酒精で溶出し715 $m\mu$ の吸収度をグルタミン酸の検量曲線で算出した。グリシンほか14種のアミノ酸を検出定量したが、培養ろ液の核蛋白のアミノ酸組成と比べると、菌体内試料で検出したバリン (またはメチオニン)、スレオニン、アルギニン、チロシンなどは培養ろ液の核蛋白では検出されていない。したがって、菌体内の核蛋白は蛋白部分も、培養ろ液中に溶出する際にはやゝ分解されて、あるいは液中に放出された後にやゝ分解されて、アミノ酸組成のやゝ少ないものとなって行くものと観察される。このことは、試料の全燐量が菌体内試料の値よりも培養ろ



第1図 抽出試料とRNA標品との紫外吸収スペクトル



第2図 納豆菌体内核蛋白の塩基組成

液試料の値のほうが高いことからもうなずかれる。

以上のように納豆菌の菌体内核蛋白は、一般定性反応をはじめ核酸成分の組成や塩基組成やアミノ酸組成等の諸点で、培養ろ液に見いだされた核蛋白ときわめて類似した性状を示しており、核酸組成やアミノ酸組成などからみて、菌体内核蛋白のわずかに分解したものが培養ろ液中に放出されて存在しているものと考えられる。

この菌の溶菌やそれに伴う核蛋白の溶出現象をさらに解明するために、菌体内核蛋白の生育中における量的質的变化を今後検討したい。

摘 要

納豆菌の菌体内核蛋白を、菌を磨砕しアルカリで抽出して調製し、核酸組成、塩基組成、アミノ酸組成その他の化学的性状を検討した。

抽出試料は、核酸特有の紫外吸収スペクトルを示し、DNA 13~15%、RNA 10~12%を含み、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシル等を塩基組成とし、グリシンほか14種のアミノ酸を生ずる核蛋白であった。

この菌体内核蛋白と、さきに検討したこの菌の培養液に存在する核蛋白とはきわめて類似した性状を有し、菌体内核蛋白がわずかに分解した状態で培養液中に存在しているものと認めた。

引用文献

1. BOVIN, A. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12 : 7, 1947
2. 松本宗人・岩原章二郎：日農化関西支部 第176回講演会 No. 9, 1961
3. 松本宗人・岩原章二郎：日農化関西支部 第176回講演会No. 10, 1961
4. 松本宗人・岩原章二郎・垣内典夫：日農化関西支部 第177回講演会No. 4, 1961
5. 松本宗人・岩原章二郎：日農化関西支部 第177回講演会No. 5, 1961
6. 沢村 真：農学会報67：1-9, 1905

Summary

The present paper deals with the chemical properties of the polynucleotide in the vegetative cell of natto-bacteria as well as their relation to the previously investigated polynucleotide in the cultural filtrate of the same organism.

The preparative procedure of the polynucleotide was as follows. The dried vegetative cells from cultural fluids were homogenized and extracted in a mortar in the presence of glass powder and 0.1 N-NaOH soln. The centrifuged extracts were acidified by the addition of 1N-HCl to 0.25N concentration yielding white precipitate. The precipitate were then centrifuged and washed with solvents and dried in vacuum desiccator. 1 litre of cultural fluids yielded about 5g of dried cells and about 150mg of dried preparation.

The preparation was white amorphous powder and gave the ultra-violet spectrum characteristic to nucleic acids and contained 13-15% of DNA and 10-12% of RNA.

The hydrolysate of the preparation was observed to contain five kinds of bases and fifteen kinds of amino acids.

The polynucleotide in the cultural fluids of natto-bacteria seems to be slightly decomposed polynucleotide in the vegetative cells at the growth stage prior to the phase of lysis.