

# 好気性桿菌の核酸産生

岩原章二郎・松本宗人（農産製造学研究室）

Syōjirō IWAHARA and Muneto MATSUMOTO

## On the Production of Nucleic Acids by Aerobic Spore-forming Bacteria.

### 緒 言

著者らは納豆菌の一株が培養液中に多量の核酸類を生産する現象を知ったので、さらに他の納豆菌菌株や類縁菌についても検討したところ、同様な現象が認められ、また、その生産の様相や化学的性状の一部を明らかにすることができたので、その概要を報告する。

菌株を分譲していただいた発酵研究所に対して深謝申し上げる。

### 実験材料および方法

使用菌株： 3種の納豆菌菌株と *Bacillus Group* の菌株3種を使用した。

培地および培養方法： 既報<sup>(1)</sup>に従って行なった。

菌体量の測定方法： 菌体分散液を適当に蒸留水で稀釈して光電分光光度計を用いて615 $m\mu$ における吸収度を測定した。

紫外部吸収の測定： 菌体分散液を遠心分離（16,000 R.P.M. 20分間）してその上澄液を20倍に蒸留水で稀釈して260 $m\mu$ における吸収度を測定して全核酸量とした。紫外部吸収スペクトルは230 $m\mu$ ～300 $m\mu$ の波長で1 $m\mu$ ごとに測定した。

DNAの定量： DNAはDiphenylamine試薬を用いて定量した。培養液中のDNAは次のような前処理を行なって後に定量した。培養液を12,000 R.P.M. で20分間遠心分離し、その上澄液5 $ml$ を氷冷し、これに氷冷した0.75 N HCl 1 $ml$ を徐々に加えて生ずる沈澱を遠心分離し、沈澱を50%エタノールで2回、水で2回遠沈洗滌した後0.1 N NaOH 2 $ml$ を加えて沈澱を溶解した後Diphenylamine 試薬を加えて発色せしめて610 $m\mu$ における吸収度を測定し、純DNAを用いてあらかじめ作成しておいた標準曲線によりDNA量を算出した。

RNAの定量： RNAはOrcin法により純RNAを標準として定量した。

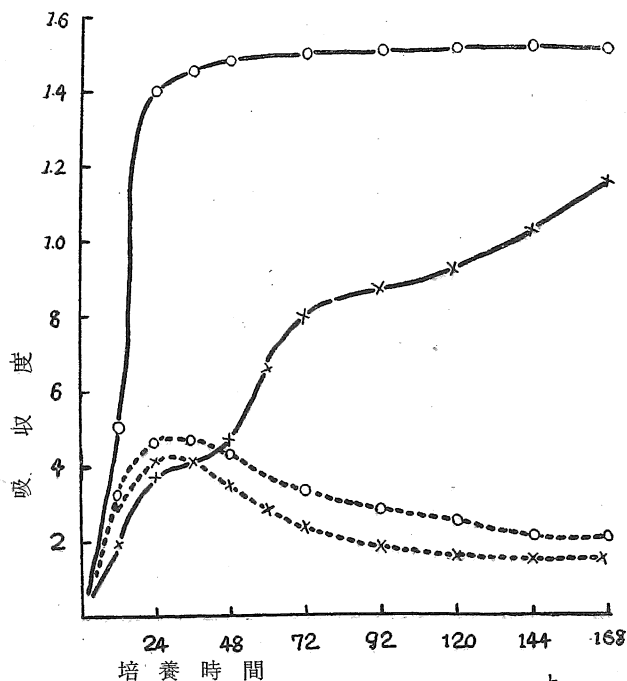
塩酸沈澱性核酸の精製方法： 培養液（3 $l$ ）（37°C

で2日間培養したもの）を16,000 R.P.M. で20分間遠心分離して菌体を除去する。この上澄液を0°Cに氷冷し6 N HCl（-5°Cに冷却）を徐々に加えて最終濃度が0.1 Nになるようにする。この操作により酸不溶性の核酸が沈澱する。これを0°Cで3時間放置した後に遠心分離（5,000 R.P.M. 5分間）して沈澱を集め、この沈澱を0.1 N NaOH（-5°C）に溶解し不溶性の不純物質を遠心分離により除去し、これに6 N HClを加えて再び沈澱せしめる。この溶解—沈澱の操作を3回くりかえして行ない、得られた沈澱を50%エタノールで3回、水で3回、エタノール—エーテル混合液（3：1）で数回洗滌し、更に99%エタノールで数回洗滌し、エーテルで数回洗滌脱水して、硫酸デシケーター中で乾燥して白色粉末約900 $mg$ を得た。これを実験材料として用いた。

### 実験結果

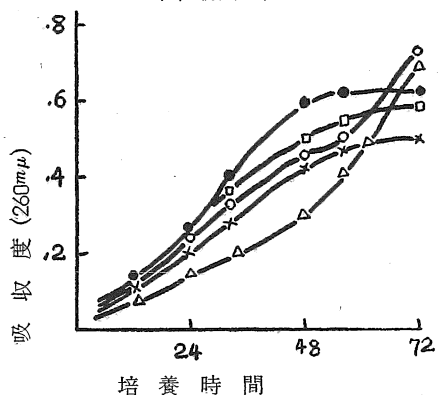
培養液中への紫外部吸収性物質の放出と蓄積： 納豆菌を合成培地で培養すると菌の発育にともなって多量の紫外部吸収性物質が蓄積してくる。この様相の一例は第1図に示す通りである。またこの現象は納豆菌以外の *Bacillus group* の菌株についても認められる。その結果は第2図に示す通りである。これらの図から明らかのように、静置条件で培養した場合にもしんとう条件で培養した場合のいずれの場合にも菌の発育に従って紫外部吸収性物質が多量に放出されて来る。しんとう培養の方が静置培養の方よりも放出される紫外部吸収性物質が多く、放出される時期も早い。次にこれら放出される紫外部吸収性物質の化学的性状を追求するために、培養液の紫外部吸収スペクトルを測定してみた。その結果は第3図に示す通りで、これは静置培養についての結果であるが、しんとう培養の場合にもほぼ同様の結果が得られる。この図から明らかのように培養時間とともに波長全域の吸収が高まり260～270 $m\mu$  辺りにピークが認められる。これは核酸が存在し、その他に溶存する蛋白質やジピコリン酸などが影響して核酸に特徴的なスペクトルを

第1図 培養ろ液の紫外外部吸収性物質と菌体量の消長



- ：振とう培養・紫外吸収 (260 mμ)
- ×—×：静置培養・同上 (同上)
- ……○：振とう培養菌体量 (615 mμ)
- ×……×：静置培養同上 (同上)

第2図 供試菌類の培養ろ液の紫外外部吸収性物質の消長



- ：“千鳥納豆” (市販) より分離した菌株
- △—△：IFO *Bacillus natto* Sawamura
- ×—×：“強化納豆” (市販) より分離した菌株
- ：IFO *Bacillus subtilis* cohn emend prazmowski No. 3007
- ：IFO *Bacillus subtilis* niger (Migula) Smith Gordon et Clark No. 3214 および IFO *Bacillus mesentericus* vulgatus Flügge No. 3035

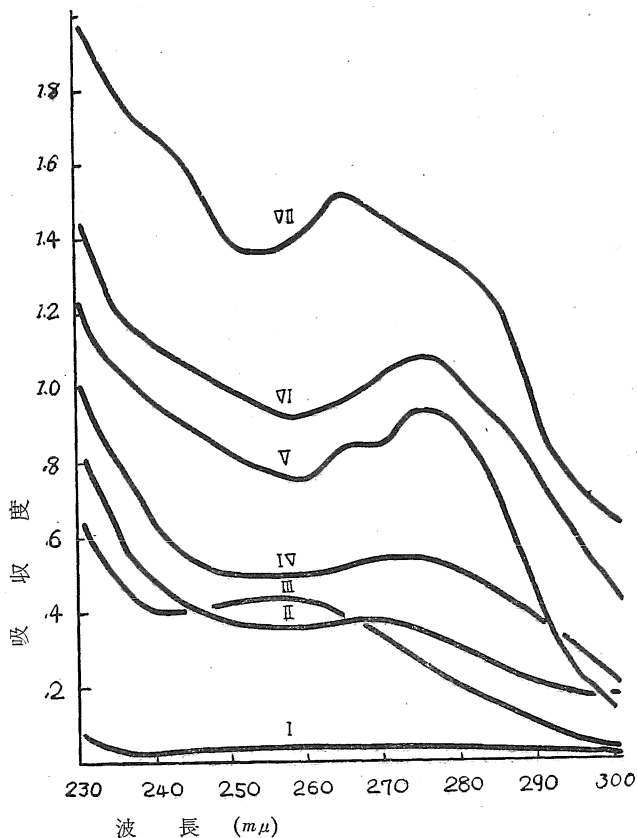
示さないものと考えられる。このスペクトルは後述するように精製すれば核酸に特徴的なスペクトルを示すようになる。

次に紫外外部吸収性物質が高分子のものであるか低分子のものであるかどうかということについて実験を行ない、第4図に示すような結果を得た。この図から明らかのように酸で沈澱する高分子のものと同様に酸に可溶性の低分子のもの割合は培養の時間により変化し、培養後2〜3日目頃が最も高分子のものが多いようで、その後は時間とともに減少する。

培養液中の紫外外部吸収性物質の化学的性質：培養液中の紫外外部吸収性物質の種類と化学的性質については一部はすでに報告した<sup>(3)</sup>し、詳細については別に報告の予定であるのでここでは結果の概略を述べる。

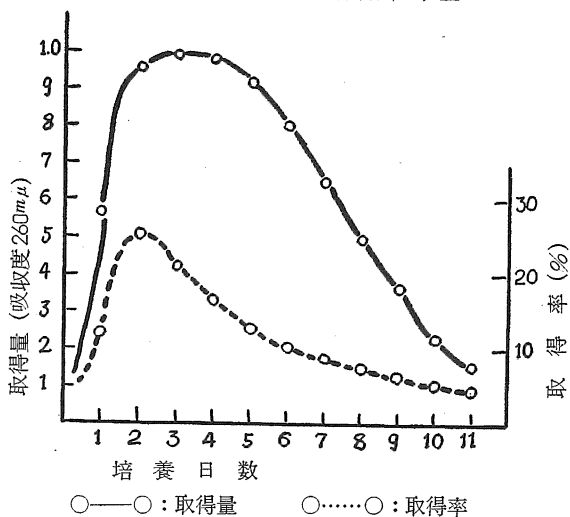
まず紫外外部吸収性物質の中で塩酸で沈澱する部分の精製したものについて、紫外外部吸収スペクト

第3図 培養ろ液の紫外外部吸収スペクトル



I : 0, II : 40, III : 20, IV : 50, V : 64, VI : 114, VII : 240 各時間培養

第4図 培養ろ液の核蛋白様物質の収量

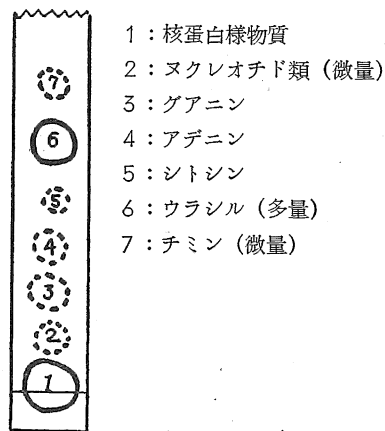


第1表 酸不溶性核蛋白質の核酸及びアミノ酸含有量

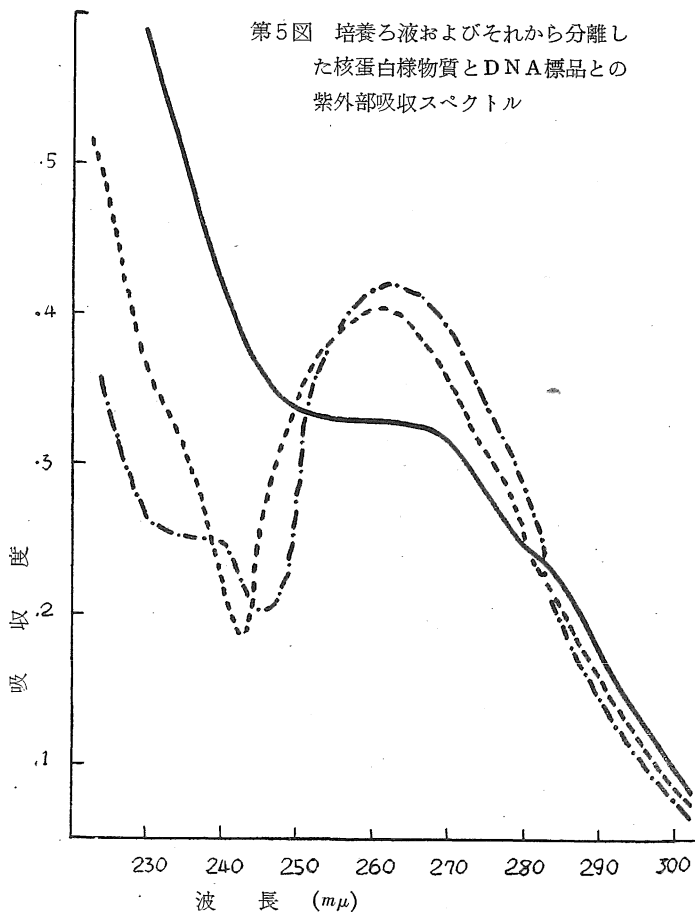
DNA (%)	RNA (%)	全核酸 (%)	全アミノ酸* (%)
16.67	6.94	23.61	50.05

\*：加水分解物をフォルモール滴定により定量した値

第6図 培養ろ液の核酸類のPPCグラム



第5図 培養ろ液およびそれから分離した核蛋白様物質とDNA標品との紫外吸収スペクトル

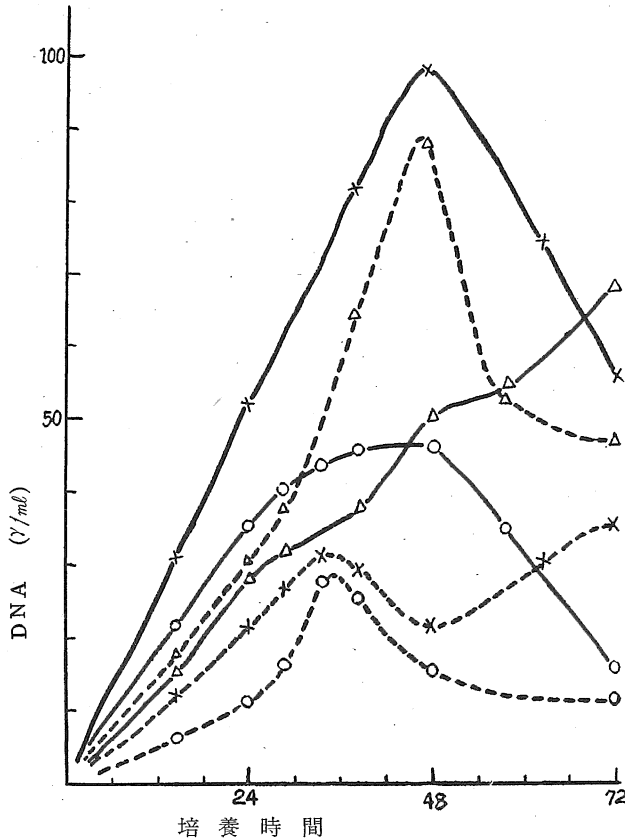


— : 培養 (40時間) ろ液  
 ..... : 精製品 (90%*ml*, 0.1*N*-NaOH溶液)  
 - · - : DNA標品 (N.B.C.) (25%*ml*, 同上)

ルを測定してみると第5図に示すような核酸に特徴的なスペクトルを示している。また第1表に示すようにDNA約17%、RNA6%とアミノ酸約50%を含有している一種の核蛋白質であることが明らかとなった。次に酸可溶性区分の方であるが、ペーパークロマトグラフィーで調べた結果、第6図に示すようにウラシルを主体とした核酸塩基類の混合物であることが明らかとなった。

培養液中へのDNAの放出： 前述したように培養液中に放出される酸不溶性物質の主体がDNAを含有する一種の核蛋白質であることが明らかとなったので、納豆菌及び *Bacillus group* の菌株について培養液中に放出するDNAを調べてみると第7図に示す通りである。この図から明らかかなようにいずれの菌株でも、菌株によりかなりの相異はあるが、培養液中にDNAを放出する。このDNAは培養後2日目頃に最高に達し以後は減少する。

第7図 供試菌類の培養液のDNAの消長



- △……△: 納豆菌“強化納豆”より分離した菌株 No. 1
- ……○: *Bacillus natto* Sawamura (発酵研究所)
- △——△: “千鳥納豆”(市販)より分離した菌株
- ×——×: IFO *Bacillus subtilis niger* (Migula) Smith Gordon et Clark No. 3214
- ×……×: IFO *Bacillus mesentericus vulgatus* Flügge No. 3035
- : IFO *Bacillus subtilis cohn emend prazmowski* No. 3007

考 察

以上の実験結果から、納豆菌及びその類縁菌は培養液中に多量の核酸類を放出し蓄積することが明らかとなった。低分子の核酸類(ヌクレオチド、ヌクレオシド等)が微生物の培養液中に放出蓄積される現象については多くの研究が報告されている。納豆菌およびその類縁菌の場合にも本実験の結果から培養液中に多量の核酸塩基類を蓄積することが明らかとなったが、この蓄積の原因についてはまだ明らかでない。これはおそらく、納豆菌の培養液中および菌体内には核酸分解酵素が存在しているので、納豆菌および類縁菌の菌体内または菌体外の高分子の核酸類(DNAおよびRNA)が核酸分解酵素によ

り分解を受けて培養液中に蓄積するものと考えられる。すなわち、一種の自己消化により高分子の核酸が分解を受けて核酸塩基類が蓄積するものであろうと考えられるが、この蓄積現象は菌がまだ自己消化を起していない段階すなわち、菌が盛んに発育している段階においても認められるので、この現象は必ずしも単なる菌の自己消化によるものでなく、菌の生理と何らかの関係の有しているものと考えられるが、この問題については今後の研究にまたなければならぬ。

次に酸に不溶性の核蛋白様物質の放出であるが、この現象も大体納豆菌およびその類縁菌に共通して認められる現象であることが明らかとなった。ある耐塩菌をある条件で培養すると菌体表面および培養液中に多量のDNAを蓄積する現象が報告されている。この現象はその菌の細胞壁が物理的な変化を受けて菌体内のDNAが菌体外に放出されてくるものであることが明らかにされている。納豆菌の場合には電子顕微鏡による観察からは上に述べたような細胞壁の物理的な変化は認めたいので今のところこの菌の培養液中へのDNAの放出の原因やその生理的意義は全く不明である。

次に培養液中へ放出された酸不溶性の核酸が培養日数が進むにつれて減少してくるのは、放出された核酸が酵素により分解を受けて酸に可溶性になるためだと考えられる。

要 約

納豆菌および類縁菌について培養液中への核酸類の蓄積現象について実験を行ない、次のような結果を得た。

1. 納豆菌および類縁菌は菌の発育にともなって紫外部吸収性物質を多量に蓄積する。蓄積量は菌株によりかなり差がある。
2. これら紫外部吸収性物質の20%程度は酸に不溶性のDNA(16%)、RNA(6%)及びアミノ酸(50%)を含有する一種の核蛋白質である。一方低分子の核酸類も多量に含有されており、その主体はウラシルである。
3. 塩酸沈澱性物質の収量は培養後2日目ごろが最も多く、それ以後は減少する。この塩酸沈澱性物質の消長と平行的に培養液中の酸不溶性DNA量も変化する。

文 献

1) 松本・岩原: 島根農大研 9: 172—174, 1961

- 2) 松本・岩原：日本農化会第 167 回関西支部例会, 1961 *microbiol.* 1 : 614—621, 1955  
3) 松本・岩原：未発表 5) TAKAHASHI, I. and GIBBONS, N. E. : *ibid.* 5 : 25—35, 1959  
4) SMITHIES, W. R. and GIBBONS, N. E. : *Can. J.*

### Summary

The paper deals with the production of the nucleic acids in the cultural filtrates of the nattō bacteria and other strains of Bacillus group, and with the purification method of the nucleoprotein in the cultural filtrates.

When the organisms were grown on the synthetic medium, remarkable amounts of ultra-violet absorbing substances were produced in the cultural filtrates and increased with the growth of the organisms.

These ultraviolet absorbing substances contain about 20 per cent of acid insoluble nucleoprotein containing 16.67 per cent of DNA, 6.94 per cent of RNA and about 50 per cent of amino acids, and contain uracil as the main base of nucleic acid.

The changes of the amounts of DNA in the cultural filtrates of the organisms were also investigated.