

## アミラーゼ生産菌のデオキシリボ核酸I : アセトン 乾燥菌体からの調製試験(1)

大村, 浩久  
九州大学農学部

渡辺, 健治  
九州大学農学部

徳永, 純一  
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21553>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 18 (4), pp.381-398, 1961-07. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :

# アミラーゼ生産菌のデオキシリボ核酸 I

## アセトン乾燥菌体からの調製試験 (1)

大村浩久・渡辺健治・徳永純一\*

### Deoxyribonucleic acid of amylase-producing bacteria

#### I. Trial of preparation from acetone-dried cells (1)

H. Omura, K. Watanabe and J. Tokunaga

アミラーゼ生産菌 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto K-49 はアミラーゼを強力に生産する優良菌株であつて工業的アミラーゼ生産に広く利用されているが、液体培養に於けるファージの被害は特に解決を要する重要な問題である。一般に細菌バイラスの増殖に於て最も重要な役割をなすものは遺伝現象等に於けると同様にデオキシリボ核酸であつて、その性質の解明はファージ対策に不可欠な要素の1つである。我々の研究室では同じ DNA バイラスである家蚕の多角体バイラスについて多年に亘つて研究が続けられ、本核酸の代謝系との関係も追及されて多くの興味ある知見が得られ、これらを含めたバイラス生成に関する機構が提案されている。<sup>13, 14)</sup> 而して家蚕バイラスで明らかにされた知見は細菌バイラスの場合にも有効な示唆を与えるものであつて、これらの関連性を考慮して先ず DNase との関係については既に検討を開始した。<sup>10, 11, 12)</sup> しかし核酸は複雑なものであり各生物に特異的な性質をもつため、唯単に酵素の面からの追及だけでは十分でなく核酸自体の研究と相俟つて初めて完全なものと云ふことが出来る。

一般に細菌の DNA 含量は極めて低く、さらに分離操作中に細菌自体の酵素の作用を受けて部分的な変化を被り易いために、細胞内のままの完全な DNA を調製する事は甚だ難かしい。特にその最初の抽出操作は従来各種細菌についてそれぞれ多種多様の試みがなされたが、菌の種類によつて方法の有効性はそれぞれ異つており、従つてアミラーゼ生産菌についても多くの予備試験を要する事は当然である。

他方、酒その他の味の成分として核酸乃至はその構成成分の価値も報告され、<sup>9)</sup> とくにイノシン酸は新しい呈味物質として最近脚光を浴びつつある。また DNA 原料としては含有量の高い胸腺や脾臓が最も優れている事は論を俟たないがその収集に制限があるので、若しアミラーゼ製造工場で酵素の生産に伴つて多量に培養増殖され然も現在利用される事なく廃棄されている菌体を利用し得るならば好都合であるのは当然であるので、その可能性を検討する事も無意味ではないと思われる。

## 実 験

### A. 生菌細胞内の核酸分布

細菌の核酸含量は培養条件や菌の生理的状态等で多少の変動を免れない事は当然である

\* 現勤務先 徳島ハム株式会社大阪研究所。

が、核酸の調製原料に利用する場合、概略の含量を一応求めておく事は必要であるので、まず生菌について磷酸化合物の分布を Schmidt-Thanhauser 法で求めた。微生物に対する本法の適用にはかなりの論議もあるようであるが茲では Morse 氏等<sup>7)</sup>の報告に従った。使用菌株は大阪市立大学福本研究室から恵譲された K-49 であつて既報<sup>11)</sup>のように大豆粕培地に 30° で振盪培養した。20 時間培養液から 3000 r.p.m. で 15 分間遠心分離して菌体を集め、0.8% NaCl に懸濁、よく攪拌洗滌後遠心分離する。洗滌をさらに 5 回繰り返して最後の遠心分離は 5000 r.p.m. で行なつた。こうして得た湿潤菌体の収量は培養によつてかなり変動した菌の大きさや数も異なつた。

この菌体 600 mg を小遠沈管に秤取し磷酸化合物の分布を測定したが、操作中の分解を避けるために特記する場合の外は氷冷しながら迅速に行なつた。先ず 5% トリクロール醋酸 (以下 TCA と略記) 5 ml を加えガラス棒でよく攪拌し 3000 乃至 4000 r.p.m. で 15 分間遠沈して酸可溶物を抽出する。沈澱に再び 5% TCA 2 ml を加え同様に攪拌抽出後遠心分離する。この抽出操作をさらに 2 回反復し抽出液を合わせて全量を 20 ml としわずかに白濁した酸可溶性区を得た。

酸抽出残渣に 95% エタノール 3.9 ml を加え攪拌抽出後遠心分離する。上澄液は淡黄色を呈し透明であつた。これをさらに 3 回反復し、全量 12 ml のアルコール可溶性区を得た。

残存沈澱に 1 N KOH 2 ml を添加し時々攪拌しながら 37° に 2 時間加温した。速やかに冷却した後 6 N HCl 0.4 ml を加えて中和し、さらに等容の 10% TCA を加えてその濃度を 5% とした。4000 r.p.m. で 15 分間遠沈してかなり白濁した抽出液を得た。さらに沈澱について 5% TCA で 2 ml ずつ 3 回抽出を繰り返して、抽出液を合せ全量 20 ml としリボ核酸区とした。

不溶残渣に 5% TCA 5 ml を添加、90' の熱湯に浸して 30 分間保持する。冷却後遠心分離して白濁上液を得る。同様に 5% TCA で 2 ml 宛 3 回洗滌しデオキシリボ核酸区を得、同じく全量を 10 乃至 20 ml とした。

最終沈澱は濃硫酸 0.5 ml に加温溶解し残渣磷の測定に供した。

このようにして得た各分画の一定量を採り家蚕について報告した江藤氏<sup>9)</sup>の Allen 改良法に従つて、60% HClO<sub>4</sub> 0.705 ml を加えて加熱分解後アミドール及びモリブデン試薬で発色させ、日立光電比色計により赤色フィルターを用いて青色呈色液の吸光度を測定し磷含量を求めた。発色のために用いる試料は磷の含量によつて異なるが、本実験ではそれぞれ酸可溶性区 0.5 ml、アルコール可溶性区 5 ml、RNA 区 0.3~0.5 ml、DNA 区 2 ml が適当であつて、最終沈澱については全量を用いたがほとんど呈色しなかつた。酸可溶性区では無機磷の含量も同時に測定した。この場合試料 1 ml に水を加えて 5 ml とし、同じく江藤氏に従つて 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml を加え分解する事なくアミドール及びモリブデン試薬を加えて発色後測定した。場合によつては H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の代りに HClO<sub>4</sub> 0.705 ml 及び水 0.295 ml を使用した。之等の結果を第 1 表に示す。

細菌の磷含量はさきに述べたように試料によつてかなり変動し特に酸可溶性化合物において顕著であつた。勿論その原因等については多くの推定も可能であるが茲では考慮外とし、一応酸可溶性磷の含量に応じて概略 3 群に大別する事が出来た。第 1 表中各群の數値

Table 1. Phosphorus content in fresh cell.

	Group	Acid-soluble		Alcohol-soluble	RNA	DNA	Rest
		Total	Inorg.				
P content in %	A	0.150	0.124	0.008	0.277	0.018	trace
	B	0.080	0.054	0.010	0.325	0.021	trace
	C	0.038	0.022	0.005	0.307	0.020	trace

はそれぞれ3試料の平均値であつて、各群内の値には著しい差異は認められなかつた。これに対して核酸含量にはたいした変動は認められず、本実験に関する限り DNA-磷含量は生菌の 0.016% より 0.021%, RNA-磷は 0.265% より 0.346% の範囲であつて前者に対する後者の比は 14.8 ないし 18.6 の値を示し、本アミラーゼ生産菌も酵母同様に RNA に富む細菌であつた。

### B. アセトン乾燥菌体内の磷酸分布

我々の研究室では設備の関係で核酸調製に十分な多量の菌体を得る事は出来なかつたので、実際に工場でアミラーゼを製造している上川化学工業株式会社中村康一氏より、同社で増殖した菌のアセトン乾燥標品の恵贈を受け、これを用いて DNA 調製に関する予備実験を行なつたが、それに先立つて乾燥試料に含まれる磷酸化合物の分布を生菌の場合と同様にして測定した。

すなわち乾燥菌体 100 mg から生菌の場合に従つて酸可溶性区 20 ml, アルコール可溶性区 15 ml, RNA 及び DNA 区 20 ml を得、それぞれ 0.5 ml, 5 ml, 0.4 ml 及び 2 ml について全磷含量を、又酸可溶性区についてはその 1.5 ml を用いて無機磷をも測定した。結果を第2表に示す。

Table 2. Phosphorus content in acetone-dried cell.

	Acid-soluble		Alcohol-soluble	RNA	DNA	Rest
	Total	Inorg.				
P content in %	1.064	0.444	0.048	1.672	0.190	trace

細菌の磷酸化合物に及ぼすアセトン脱水処理の影響も明らかではないが、核酸の調製試験に用いた乾燥菌体では RNA と DNA との比は約 8.5 であつた。

### C. DNA 調製試験

核酸原料としては勿論その含量の高いものが好ましいのは当然であつて、一般に DNA 調製には横胸腺や脾臓が主として用いられ RNA は専ら酵母等から抽出されている。アミラーゼ生産菌が核酸原料としてとくに DNA の場合決して好ましいものではなく、その調製はかなり困難である事は第1及び第2表の値からも予測させる。しかし DNA の生理的役割の探究のためにはその調製は必要であるので検討を加えた。核酸は細胞内では通常蛋白質と結合して存在し、調製には核蛋白質の性質をも利用するほか、特に操作中に於ける酵素分解を出来るだけ避けるように努めなければならない。胸腺や脾臓では DNA 蛋白乃至は DNase の性質は一応明らかにされていて調製に際して考慮されているが、アミラーゼ生産菌ではその DNase について最近漸く研究を開始したに過ぎず DNA 乃至は DNA

蛋白については全く知られていない事も隘路の1つをなすが、低温下に操作する事は一般に共通した注意事項であるので特記する以外は水冷しながら行ない、さらに核酸の沈澱、DNA 蛋白の解離、溶解性等もいずれも牛脾臓について行なつた経験を参照し、同時に種々の試験中に之等の事項についても注意して観察する事に努めた。しかして調製方法については緒言でも触れたように種々報告されているが、アミラーゼ生産菌について最も好ましい方法を確立するため若干の方法を検索したのでこれらについて報告するとともに、とくに調製操作中その性質において脾臓の場合と多少の相違も経験したので観察事項をも今後の参考のために記述した。

得られた標品については主として紫外部吸収、磷含量、DNA 及び RNA 含量等を測定して純度を検討するに止め、N/P、塩基組成等は純度がいずれも十分でなかつたので省略した。吸収は通常 0.1% 水溶液を適宜稀釈し日立 EPU-2 型分光光度計によつて測定し、同じ供試液の磷含量から Chargaff 氏等の提案に基づいて  $\epsilon(p) = 30.98/cl$  式で  $\epsilon(p)$  の値も計算した。DNA はシステイン- $H_2SO_4$  反応<sup>9)</sup>により、0.07 ml 5% 塩酸システイン、0.7 ml 核酸水溶液、7 ml 70%  $H_2SO_4$  を順次添加し十分振盪した後約 30 分間放冷し、日立光電比色計フィルター B を用いて色の強さを測定し ( $H_2SO_4$  添加後 30 ないし 60 分間は安定な色を呈する)、精製脾臓 DNA について求めた標準曲線から DNA 含量を計算した。また RNA 測定には Mejdum 氏<sup>4)</sup>のオルシン-HCl 反応を用いた。すなわち  $FeCl_3$ -HCl 溶液 (分析用濃 HCl に 10%  $FeCl_3$  水溶液を 0.01 容添加) 1 ml 当り 10 mg のオルシンを使用直前に溶解して調製した発色試薬 1 ml と被検液 1 ml とを混合し、沸騰水中で 20 分間加熱する。流水で急冷した後水を加えて全量 6 ml とし 10 分後同じく日立光電比色計で R フィルターを用いて緑色の強さを測定、純酵母 RNA で求めた標準曲線から RNA 含量を得た。

### I. 磨碎法

細胞膜を破壊する最も原始的な手段は何等かの助剤を加えて丹念に磨碎する機械的方法であるが、一般に長時間を要し、しかもその効果はとくに細菌ではあまり期待されず、さらにこの間に DNase 等の作用によりかなり変化するおそれもあるため決して好ましい方法であるとは思われなかつた。しかしアセトン脱水処理による細胞膜の変化等から若し本法が有効であれば甚だ好都合でもあるので一応試験した。

実験 1 すでに明らかなように DNA 含量が低いためにまず出来るだけ不純物を除き相対的に DNA 含量を高めてから核酸を抽出する事が望ましい事は、脾臓の場合 DNA に富む細胞核だけを分離ししかる後これから DNA を抽出する事と同様である。細胞内では DNA は蛋白と結合して存在して通常稀 NaCl 溶液には溶けず、またアミラーゼ生産菌の DNase も動物組織のものと同様にクエン酸によつて抑制されるので、まず 0.14 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダ混液で抽出した。すなわち乾燥菌体 5 g を少量ずつ乳鉢でラッピング (日興製紙 KK, WA, 粒度 #500) とともに上記混液を適宜加えて十分に磨碎する。全量 500 ml の磨碎懸濁液とし暫く振盪した後 1 晩氷室に静置、傾瀉して上清を除きさらに 3000 r. p. m. で 20 分間遠心分離した後抽出残渣を再び 400 ml の混液で磨碎抽出する。

牛脾臓の DNA 蛋白質は 1 M NaCl に溶解し DNA と蛋白質とが解離するのでこの状態で除蛋白して DNA を得ているが、組織によつてはより高濃度の NaCl 溶液を用いなければならない事も知られている。本菌についてはこれ等の性質は知られていないので念のため高濃度を用いる事とした。上記稀 NaCl-クエン酸混液で抽出した残渣を 200 ml の 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダで抽出し 8000 r.p.m. で 30 分間遠心分離した。残渣を同じくクエン酸含有の 4 M NaCl で抽出し不溶部を除く。かなり白濁している両抽出液をそれぞれ 2 倍容のエタノールに注入し、生じた沈澱を集め再び 4 M NaCl に Waring ブレンダーで懸濁溶解し 1 晩冷蔵庫に放置して核酸と蛋白質とをよく解離させる。これを Sevag 氏法<sup>9)</sup>によつてクロロホルム-オクテルアルコール (9:1) 混液で除蛋白を繰り返しクロロホルム蛋白ゲル被膜が生じなくなるまで行なう。遠沈して得た透明上清を 2 倍容アルコールに添加、氷室に放置後生成沈澱を集め、再び水に溶しさらに念のため遠心分離して完全に不溶物を除いた後 2 倍アルコールに加えて沈澱する。引続いて 70% エタノールで 3 回、80%、90% 及び 95% と濃度を高めながらそれぞれ 1 回、ついで 100% エタノールで 3 回、沈澱を洗滌すると共に脱水し、最後にエーテルで 3 回洗滌してアルコールを除いた後デシケーター中で減圧下に乾燥し 13.5 mg 及び 3.5 mg の乾燥粉末を得た。前者 (標品 I-1a) は白色であつたが後者 (標品 I-1b) は多少灰色を帯びた。

**実験 2** DNA の抽出調製が甚だ困難な家蚕組織の場合、食塩水の代りに先ず 0.2% クエン酸で細胞核を分離しそれから DNA を抽出して好結果を得、初めて家蚕から DNA の糸状標品を得る事に成功した。<sup>9)</sup> 勿論これが直ちにアミラーゼ生産菌に適用出来るとは考えないが、少なくとも家蚕の場合 DNA 蛋白質は溶解せず、RNA を含む細胞質部は除かれるので、とくに DNA に比べて RNA を多量に含むアミラーゼ生産菌の予備処理にも稀 NaCl に代つてクエン酸を試みた。

5 g の乾燥菌体を前回同様 500 ml の 0.2% クエン酸で磨砕抽出した。実験 1 (第 3 表) から明らかなように DNA は 2 M NaCl で十分抽出されるので、2 回予備処理を行なつた抽出残渣を 400 ml の 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダ混液に Waring ブレンダーで磨砕懸濁し 1 晩氷室で抽出後 8000 r.p.m. で 20 分間遠心分離した。残渣を再び 2 M NaCl で抽出し、両抽出液をそれぞれアルコールに加えて沈澱、再び 150 ml の 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダに溶かし、クロロホルムで除蛋白後アルコール沈澱、以下同様にアルコール及びエーテルで脱水乾燥し 17.5 mg (標品 I-2a) 及び 15 mg (標品 I-2b) の白色粉末を得た。之等標品の水溶液についての値を第 3 表及び第 1 図に示す。

得られた標品はいずれも純度の極めて低いもので RNA の夾雑は免れなかつた。この中標品 I-1b はその吸収スペクトルからも核酸であるとは考えられずシステイン-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 反応及びオルシン-HCl 反応も認められなかつた。従つて、DNA 蛋白質の抽出はアミラーゼ生産菌の場合も 2 M NaCl で十分である事が示された。又予備処理は 0.14 M NaCl よりも 0.2% クエン酸の方が好ましい事は家蚕組織の場合と同様であつたが、これとともに RNA 夾雑量の増加も避けられなかつた。さらにクエン酸処理によつて家蚕の場合その組織塊がやや硬くなる傾向があることを経験したが、アミラーゼ菌においても 2 M NaCl での核蛋白質の抽出は 0.14 M NaCl 予備処理の場合のように 1 回では十分でない傾向も認

Table 3. Preparation by grinding procedure.

Preparation	Yield %	Wave length		E (0.1%)			ε (P)		P %	DNA %	RNA %
		Max. m $\mu$	Min. m $\mu$	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.			
I-1 a	0.26	258	236	1.835	1.325	1.38	2080	1500	2.74	12.1	2.3
I-1 b	0.07	252	245	2.850	2.800	1.02	2930	2880	3.01	—	—
I-2 a	0.35	257	233	3.510	2.240	1.57	5247	3346	2.07	7.1	8.2
I-2 b	0.30	258	232	4.790	2.650	1.81	6666	3688	2.23	7.4	13.6

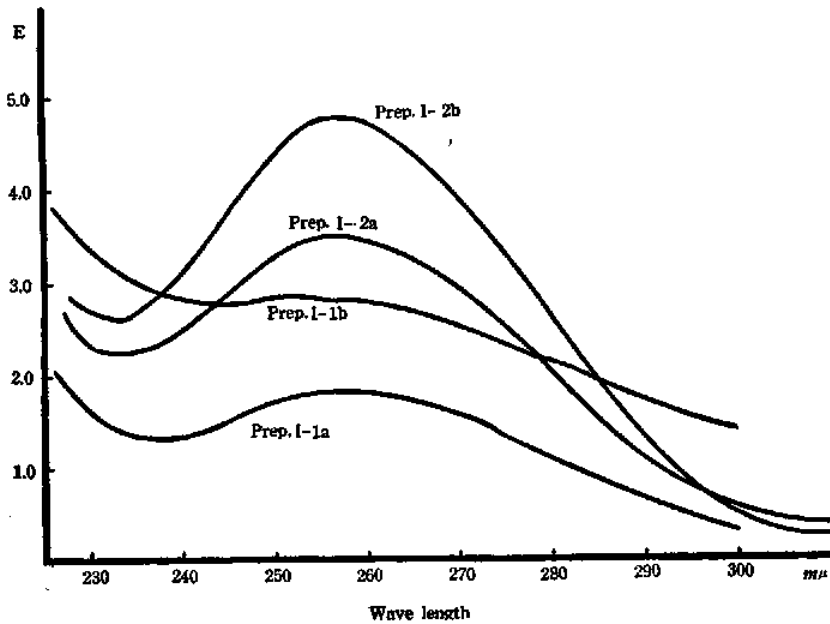


Fig. 1. UV absorption spectra of Prep. I-1a, Prep. I-1b, Prep. I-2a and Prep. I-2b. Absorptions were estimated on 0.1% solution of the preparations.

められる。いずれにしても核蛋白質を溶解しない溶媒で数回磨砕抽出して不純物を予め除いたにも拘らず少量の低純度標品しか得られず、磨砕だけによる DNA の抽出調製は予期したように好ましくない事が示された。

## II. 界面活性剤

Dounce 氏等<sup>9)</sup>は界面活性剤を用いる DNA 調製法を記載し本法は収量も非常に良く生成物の質も優れていて然も操作のステップも少なく甚だ良好な方法であると報告した。岡氏等は Na-dodecylsulfate と Na-alkylsulfate との混合物を含む市販品 Duponol ME を用いているが、我々は入手の点を考慮してエマル OD (花王石鹼 KK) を用いることとし、Duponol 同様に熱エタノールから 2 回再結後数回エーテルで洗滌し、その 5 g を 100 ml 45% エタノールに溶解して使用した。

実験 3 乾燥菌体 5 g を 0.14 M NaCl-0.01 M ケエン酸ソーダで 500 ml ずつ 3 回洗滌後、同混液 500 ml にブレンダーで懸濁する。これに 45 ml エマル OD 溶液を攪拌しながら徐々に加え 25° に 3 時間振盪した。Dounce 氏等によると横胸腺から調製す

る際は活性剤の添加操作中にかなり粘稠なゲル状になり直に次の段階に移っているが、本菌ではこのような顕著な粘性の増加は認められなかつたので振盪時間を延長し且つこの間の DNase 作用の防止を十分にするためにクエン酸ソーダを加えた。次いで 27.5 g の NaCl を加えてその濃度を 1 M とし 1 晩冷蔵した。ここでも原報記載のような粘度の増加はほとんど見られなかつた。菌体 DNA 蛋白の抽出が不十分な事も考えられるので更に NaCl を追加して 2 M とし再び 25° で 3 時間振盪抽出した後 8000 r.p.m. で 30 分間遠心分離した。上清を 2 倍容アルコールに添加して沈澱させ、遠心分離して集め再び 150 ml 2 M NaCl に溶解した。1 晩冷蔵して蛋白との解離を十分に達成させた後クロロホルム処理を行なつた。12 回反復して蛋白質を除き透明溶液から再びアルコールで沈澱させた。

すでに示したようにアミラーゼ生産菌においても DNA に比べて RNA 含量が著しく高く得られた核酸沈澱の中に RNA の顕著な火雑が起る事を免れ得ない事は酵母からの調製の場合と同様である。Chargaff 氏等<sup>2)</sup>は Ca 塩に対する両核酸の溶解度の差を利用して十分ではないがかなりの程度に分別し酵母 DNA を調製した。そこでこれに倣つてアミラーゼ生産菌から得た上記沈澱を 100 ml 10% CaCl<sub>2</sub> 水溶液に溶し、<sup>\*)</sup> 30 ml アルコールを徐々に加えて白濁を生じた<sup>\*)</sup>。冷蔵後 8000 r.p.m. で 20 分間遠心分離し沈澱を 2 M NaCl に溶し冷蔵すると、さきにクロロホルムゲル被膜が生じなくなるまで十分除蛋白しているにも拘らずクロロホルム処理で再び若干の蛋白ゲルを生じた。4 回処理して完全に蛋白を除き、アルコール沈澱、脱水乾燥して 141 mg の白色粉末 (標品 II-1a) を得た。一方 0.3 容アルコール添加で生じた沈澱を除いた CaCl<sub>2</sub>-アルコール上清に更に 170 ml アルコールを追加して添加量を原液の 2 倍として白色沈澱を得た。同様に 2 M NaCl に溶し除蛋白 (2 回で十分であつた) 後、アルコール沈澱、脱水乾燥して 122 mg の白色粉末 (標品 II-1b) を得た。

こうして少なくとも磨砕による場合よりは収量は多く得られたがこれに伴い純度は低かつた。しかし細胞を破壊することなく単にこのような処理だけで (勿論アセトン処理は行なつているので生菌の場合とは異なると思われる) 細菌のように動物組織に比べてかなり強い細胞膜をもつものからも核酸部分が十分に抽出されるか否かを次に試験した。上記エマール OD-2 M NaCl 抽出残渣を次項で述べる方法に従つて 400 ml 0.5% フェノール (0.1 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダに溶解) で重ねて抽出し、アルコール沈澱、2 M NaCl に再び溶し不溶部を 8000 r.p.m. で 20 分間遠心分離して除去した後上清について除蛋白した。蛋白含量は少なくクロロホルム処理 3 回で終つた。再びアルコールで沈澱後 10% CaCl<sub>2</sub> に溶解、0.3 容アルコールを加えたが殆ど沈澱は生成せず少なくとも標品 II-1a に相当する部分は含まれない事を示した。更にアルコールを追加して 2 倍容とし標品 II-1b に相当する部分を得、念のためクロロホルム処理 (蛋白はほとんど含まれず 2 回で十分)、沈澱、脱水乾燥して 133 mg の白色粉末 (標品 II-2) を得た。

\*a) この溶液を 2 倍容アルコールに添加すると糸状沈澱が初めて得られたが、これを再び繰り返すと次には糸状物はもはや生じなかつた。また逆にアルコールをこの溶液に添加すると糸状物は得られず沈澱は泥状であつた。

\*b) 酵母ではここで糸状沈澱が得られている。



しかるにアセトン乾燥菌体を 0.14 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダ混液で3回洗滌後、0.14 M NaCl の代わりに初めから NaCl 濃度を高くして 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダに懸濁し、これにエマール OD を加えて前回同様に振盪抽出したが、遠沈して不溶物を除いた抽出液からは2倍アルコールに添加してもほとんど沈澱を生成せず、初めから NaCl 濃度を高くした場合の本法による核酸の抽出調製は不可能である事を示した。

Table 4. Preparation by detergent procedure.

Preparation	Yield %	Wave length		E (0.1%)			ε (P)		P %	DNA %	RNA %
		Max.	Min.	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.			
II-1a	2.82	257	236-238	0.380	0.271	1.40	6925	4939	0.17	2.85	0.9
II-1b	2.45	—	—	—	—	—	—	—	0.17	—	—
II-2	2.66	—	—	—	—	—	—	—	0.15	—	0.7

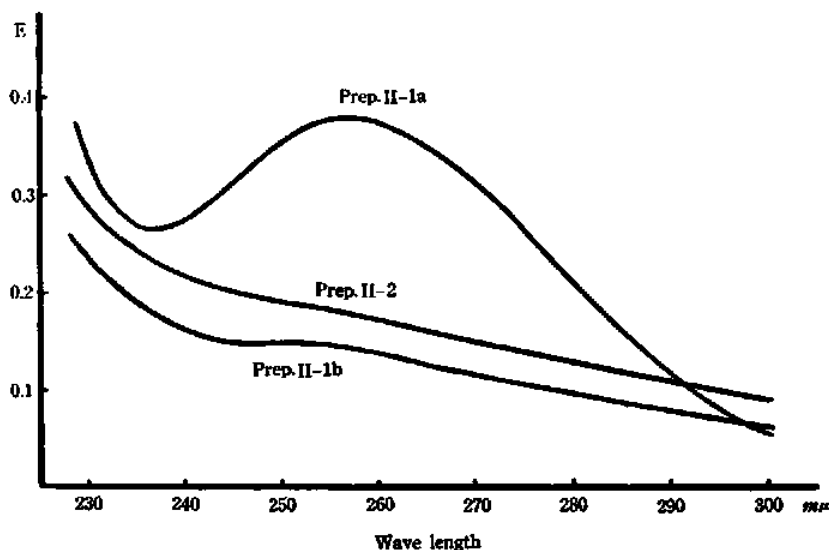


Fig. 2. UV absorption spectra of Prep. II-1a, Prep. II-1b and Prep. II-2. Absorptions were estimated on 0.1% solution of the preparations.

標品 II-1b 及び II-2 は核酸特有の紫外外部吸収を示さない事は第2図から明らかな通りであつて、特に酵母核酸の場合の RNA に相当する II-1b が RNA をもほとんど含まない事が推定される点からも、アミラーゼ生産菌の場合核酸の  $\text{CaCl}_2$  への溶解性はかなり異なるものと思われる。他方標品 II-2 が何等核酸物質を含まない事は少なくとも活性化剤処理によつて一応核酸は抽出される事を示唆する。しかし II-1a も第4表に示すように多少の核酸を含むがその含量は低く、磨碎法に比べて収量の多い事は専ら不純物の増加に基づくに過ぎないことを示すものであつて、本法もまたアミラーゼ生産菌に適用するには好ましいものとは云うことは出来ない。

これに関連して観察された興味ある点はクロロホルムによる除蛋白の問題である。即ち Sevag 氏は現在最も優れた方法として専ら利用されている除蛋白操作であつて、核酸の

変性を避けつつ除蛋白効果も良好であり、動物組織からの核酸調製の場合クロロホルム蛋白ゲル被膜がもはや生じなくなるまで繰り返すと蛋白質は一応完全に除き得たと見做して差支えないと云われていて、我々も脾臓からの DNA 調製をしばしば行なつてこの点を確認した。しかし他方 Braun 氏等<sup>1)</sup>によると *Brucella* 核蛋白の約 25% は除かれずに核酸に結合していると報告されている。アミラーゼ生産菌においても  $\text{CaCl}_2$ -アルコール分別前に核酸標品は既にゲル被膜を生じなくなるまで十分にクロロホルム処理を行なつているがこの段階での標品は常にビューレット反応陽性を示した。しかし  $\text{CaCl}_2$  分別後  $\text{NaCl}$  に溶し引き続き除蛋白操作を行うと再び或る程度のクロロホルム蛋白ゲルを生じ、この操作を経て初めてビューレット反応ないしはフォーリン-銅反応陰性の標品が得られた。勿論この性質については明らかでないが、少なくとも本細菌においてはクロロホルム処理は完全な除蛋白には十分でなく  $\text{CaCl}_2$  分別によつて残存蛋白が解離するに至るものと考えられるので DNA 調製に際して考慮しなければならない。

### III. フェノール法

Braun 氏等<sup>1)</sup>は *Brucella abortus* 細胞から特別に細胞膜破壊操作等の前処理を行なうことなく 0.5% フェノールで抽出して特異的な型質転換能をもつ DNA 含量の高い標品を得たが、更に *Esch. coli*, *Pneumococci*, 鮭精子、廿日鼠の lymphosarcoma ascites 等の細胞からの DNA の分離にも適用した。我々は牛脾臓について本法を試みかなり容易に DNA 糸状物を調製出来たので<sup>\*)</sup>アミラーゼ生産菌にも適用試験した。

**実験 4** 10g のアセトン乾燥菌体を 0.1 M  $\text{NaCl}$ -0.01 M クエン酸ソーダに溶した 0.5% フェノール溶液 400 ml に懸濁し 37° で 48 時間時々振盪しながら抽出した。8000 r.p.m. で 30 分間遠心分離して淡黄褐色の上清を得た。これを 3 倍容のアルコールに加え 1 晩冷蔵後 8000 r.p.m. で 30 分間遠沈してかなり多量の沈澱を得た。再び 200 ml の 2 M  $\text{NaCl}$  に溶し冷蔵後十分にクロロホルム除蛋白を行ない (16 回反復した)、2 倍容アルコールに加えると初めて糸状沈澱を生じた。これを硝子棒に捲きつけて集め 75% アルコールで洗滌後  $\text{CaCl}_2$ -アルコールによる分別を行なつた。この場合沈澱を Waring ブレンダーを用いて 100 ml 10%  $\text{CaCl}_2$  水溶液に溶解し 10000 r.p.m. で 30 分間遠沈した。不溶沈澱を再び 100 ml  $\text{CaCl}_2$  に溶したがなおある程度の不溶物が残つた<sup>\*)</sup>。

$\text{CaCl}_2$  溶液について常法通り 0.3 容エタノール沈澱、その上清について 2 倍容アルコール沈澱を行ない、生成沈澱をそれぞれ 150 ml 2 M  $\text{NaCl}$  に溶し、さきに認めたように残存蛋白がさらに解離するので前者で 6 回、後者で 4 回クロロホルム処理を行なつた後ア

\* c) 従来の方法は屠殺後出来るだけ速やかにしかも氷冷下に細胞核を分離した後にこれから 1 M  $\text{NaCl}$  で核蛋白を抽出分離した。そのため少なくとも 10 回以上の洗滌、遠沈操作を反復したが設備の関係で処理量に制限がありしかもかなり長時間を要し非常に多忙であつてこの間の変化のおそれもないとは保障出来ない。これに対してフェノール法では組織を直にフェノールで磨碎抽出ししかもこの間低温に保持する必要もないので極めて簡便であつた。しかし RNA の夾雑が多く RNase 処理等の精製を要した。

\* d) この不溶物を 20 ml  $\text{NaCl}$  に溶し、それでも溶けない部分を 5 ml 水に懸濁し、両者について定性試験を試みたが、システイン- $\text{H}_2\text{SO}_4$  反応は勿論陰性、無機磷反応も陰性であり、全燐は前者で 390 $\mu$ 、後者で 200 $\mu$  であり DNA は含まれなかつた。

アルコールで沈澱した。この場合 Chargaff 氏等による酵母の場合と異なつて 0.3 容アルコール区では白色不定沈澱を生じ一方後者からは糸状物が得られた。常法に従つて脱水乾燥したが後者の糸状沈澱もアルコール濃度を逐次高め脱水が進むに従つて粉末化した。こうしてそれぞれ 22 mg (標品 III-1a) 及び 280.5 mg (標品 III-1b) の白色粉末が得られた。

本操作中最も特徴のあるものは初めのアルコール沈澱であつて、前2法によるもの乃至は牛脾臓の 0.5% フェノール抽出液からの場合と異なつた。すなわちアミラーゼ生産菌の場合抽出液のアルコールへの注入初期(アルコール高濃度)では先づ白色短糸状の沈澱を生ずるが、抽出液の添加(アルコール濃度減少)に伴つて糸状沈澱は泥状となつて液は白濁し、さらに沈澱は溶解を始めて核酸沈澱の標準濃度とも云える抽出液とアルコールとの比 1:2 の場合には沈澱はかなり少なくなり糸状物は消失し泥状沈澱は速やかに沈降して淡黄色透明の上清を生ずる。勿論これにアルコールを加えると沈澱は再び増加する。従つてアルコール濃度の高い程多量の沈澱を得る。50 倍容程度の著しく過剰のアルコールでは添加初期同様に非常に粘稠な白色の短糸状沈澱であつてしかも次に滲け易く、これまで牛脾臓から得た DNA 蛋白ないしは DNA の糸状沈澱とは著しく異なつている。この糸状物は 1 M NaCl に溶せば次には 2 倍容アルコールで再生される。このように 2 倍以上の

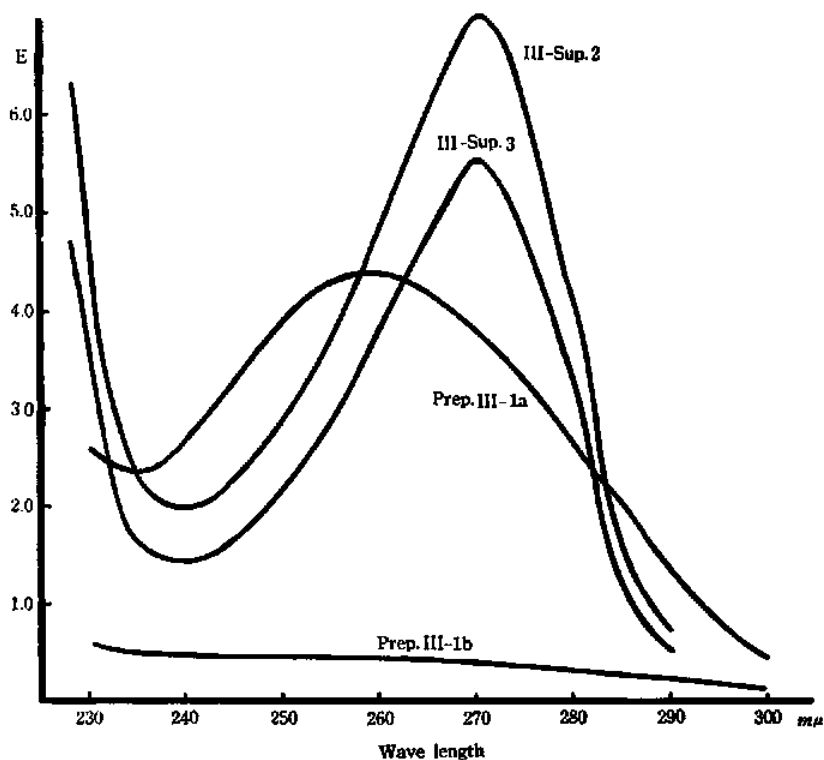


Fig. 3. UV absorption spectra of Prep. III-1a, Prep. III-1b, III-Sup. 2 and III-Sup. 3. Absorptions were estimated on 0.1% solution of the preparations and on the supernatants diluted five times.

アルコールで沈澱量は増加するが、この場合新たに生成してくる沈澱も核酸を含むならば本細菌核蛋白のアルコール沈澱性は他のものと異なるわけである。そこでフェノール抽出液の一部をそれぞれ2倍及び3倍容のアルコールに加え遠沈して生成沈澱を除いた透明上清(III-上清 2, III-上清 3)の吸収スペクトルを求めた。標品 III-1a, III-1b のものと共に記載した第3図は5倍稀釈液についての値であるが、いずれも270 m $\mu$  に極大、239 m $\mu$  に極小値をもち核酸成分が260 m $\mu$  付近にとくに顕著な紫外外部吸収をもっていることを考慮すれば、両上清は核酸を含まないかまたは極めて少量であつて問題とするに要しないと考えられる。従つてアルコール濃度を高めて生成沈澱量を増しても核酸以外の不純物の増加を来すに過ぎず得られる標品は却て純度を低下するだけである。

本法で得られた標品の性質を第5表に示すが III-1a は I 及び II のものに比べてかなり良好な標品であつた。これに対して III-1b はその吸収スペクトルからも大部分が核酸以外の物質である事が推定されたが DNA, RNA の呈色反応も認められなかつた。

Table 5. Preparation by phenol procedure.

Preparation	Yield %	Wave length		E (0.1%)			$\epsilon$ (P)		P %	DNA %	RNA %
		Max. m $\mu$	Min. m $\mu$	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.			
III-1 a	0.22	259	234	4.380	2.400	1.82	3677	2015	3.69	19.3	—
III-1 b	2.81	254	248	0.464	0.457	1.02	—	—	1.56	—	—

**実験 5** フェノール法による DNA 調製は多少可能性のある事を示したがその収量は甚しく低い。これはとくに菌の破壊を予め行なうことにより改良されるのではないかということも考えられるので磨砕法と組合せて試験した。

10 g の菌体を少量宛ラッピングを加えて乳鉢で約 20 分間入念に磨砕しながら 500 ml 0.5% フェノール (0.1 M ケエン酸ソーダ, 0.1 M NaCl 含有) で抽出懸濁し 37° に 45 時間時々振盪しながら放置する。10000 r.p.m. で 30 分遠沈し、残渣を再び 100 ml フェノールで抽出、濁濁抽出液を合わせ 2 倍容アルコールに添加、生じた沈澱を 300 ml 2 M NaCl にブレンダーを用いて溶解する。液は濁濁し 12000 r.p.m. で 30 分間遠心分離しても沈降しないが除蛋白すると透明になつた。クロロホルム処理を 18 回行なつた後アルコールで沈澱したが 1 晩放置すると核酸を含む白色泥状沈澱のほかかなりの量の針状等の結晶が器壁等に析出した。核酸を含む沈澱は 300 ml の 10% CaCl<sub>2</sub> にブレンダーを用いて懸濁し、不溶物を遠沈除去した後 0.3 容アルコールで沈澱、160 ml 2 M NaCl に溶し重ねてクロロホルムで 10 回処理して除蛋白を完了後常法に従いアルコール沈澱、脱水乾燥して 97.5 mg の白色粉末 (標品 III-2a) を得た。CaCl<sub>2</sub> 上清に 2 倍容アルコールを追加すると実験 4 と同様に白色糸状沈澱を生じた。この沈澱が Chargaff 氏等の酵母核酸に於ける RNA に相当するわけであるが、これまで述べたように沈澱は糸状をなして DNA に似ているにも拘らず核酸をほとんど含まない事は明らかであるが念のため今回得られた糸状沈澱についてさらに検討した。本沈澱は水に溶け易くアルカリ性では寒天状に凝固するが HCl を加えると再び溶ける。その水溶液の吸収スペクトルは第 4 図に示すように (標品 III-2 fib) 紫外部に特有の吸収を示さない。CaCl<sub>2</sub> 処理によつて結合蛋白が離れ易

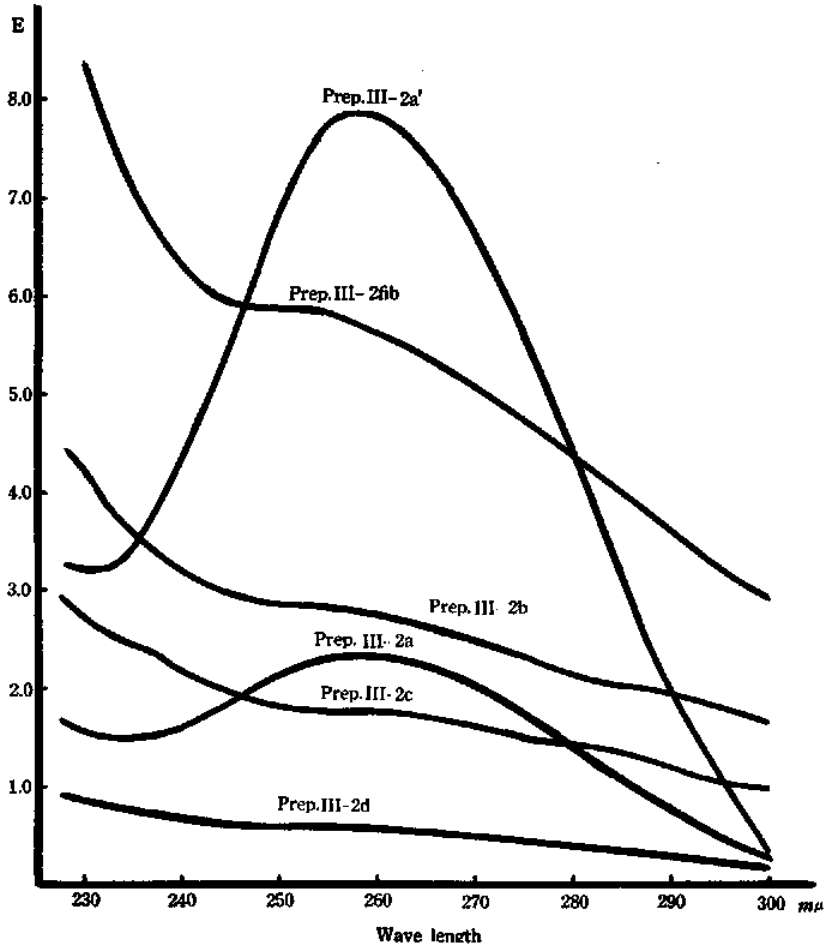


Fig. 4. UV absorption spectra of Prep. III-2a, Prep. III-2b, Prep. III-2c, Prep. III-2d, Prep. III-26b and Prep. III-2a'. Absorptions were estimated on 0.1% solution of the preparations except Prep. III-26b, which was 0.05%.

くなる事は同様であつて全沈澱を 180 ml の 2 M NaCl に溶解しクロホルム処理をさらに7回行なつて除蛋白を終つた。この除蛋白液を2倍容アルコールに直接添加すると再び糸状沈澱を生ずるが逆に少量宛アルコールをこの除蛋白液に加えると泥状沈澱が得られた。そこでこの除蛋白液 170 ml に 85 ml アルコールを加え沈澱させた。遠沈除去した上清にさらに 85 ml アルコールを添加、再び沈澱を除いた後 170 ml アルコールを加えた。こうして半容、等容及び2倍容とアルコール添加量を逐次高めて分別した各沈澱をそれぞれ水に溶し、再びアルコールで沈澱後常法通り脱水乾燥して 233 mg (標品 III-2b, 灰白色), 28 mg (標品 III-2c, 白色) 及び 10 mg (標品 III-2d, 白色) の粉末標品を得た。これ等の吸収スペクトルも第4図に示すが何れも特異的な吸収は認められなかつた。しかしオルシン-HCl 反応はかなり顕著であつた。

Table 6. Preparation by grinding-phenol procedure.

Preparation	Yield %	Wave length		E (0.1%)			ε(P)		P %	DNA* %	RNA* %
		Max. m $\mu$	Min. m $\mu$	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.			
III-2a	0.98	254	234	2.375	1.545	1.54	3458	2249	2.13	9.3	2.25
III-2b	2.33	—	—	—	—	—	—	—	4.48	2.9	3.8
III-2c	0.28	—	—	—	—	—	—	—	4.31	1.4	5.8
III-2d	0.10	—	—	—	—	—	—	—	3.59	—	1.2
III-2a'	0.08	258	230	15.82	6.40	2.47	7505	3036	6.53	72.9	—

\* Some positive color reactions by Cysteine-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and Orcine-HCl were observed in preparations III-2b, III-2c and III-2d, although these contain no nucleic acid as determined by the extinction curves. Therefore, figures in Table are expressed by the amounts of nucleic acids corresponding to the color intensities.

ここでもフェノール抽出に磨砕を組合わせた場合標品 III-1a に比べて III-2a の収量は約 4.5 倍に増加したが、不純物の増加も来して標品の純度は約 1/2 に低下した。従つて絶対量からは得られた DNA 量はほぼ倍加されるわけで、しかしてこの標品をさらに精製すればかなり純度を高める事が出来た。すなわち標品 III-2a 50 mg. を 1 M NaOH 3 ml に溶す。かなり多量の不溶物を遠沈除去後 37° に 2 日間保持した。寒天状に凝固したので更に 2 ml の NaOH を追加して攪拌後遠心分離する。NaOH 溶液を 30% 醋酸で pH 4 に調節し半容のアルコールを加え、生じた沈澱を常法通りアルコール及びエーテルで脱水乾燥し 4 mg の白色粉末 (標品 III-2a') を得た。これは第 6 表に示すようになんかなり純度も高く RNA もほとんど含まれないものであつたが収量は低く原乾燥菌体の約 0.08% に過ぎなかつた。これらの標品に大部分不純物として含まれる NaOH 不溶物は水を加えさらに 1 N HCl で pH を 6 に調節すると殆ど完全に溶解し、極めて顕著な無機磷酸の反応を示した。

器壁等に附着析出した結晶は核酸沈澱部より重いのでアルコール懸濁液の傾瀉によつて分離出来る。水に溶け易いので 25 ml に溶かしこれにアルコールを加えて再び析出したが、約 40 ml 添加して微濁、45 ml で白濁したので更に 5 ml 追加して全添加量を 2 倍とし、冷蔵後吸引濾

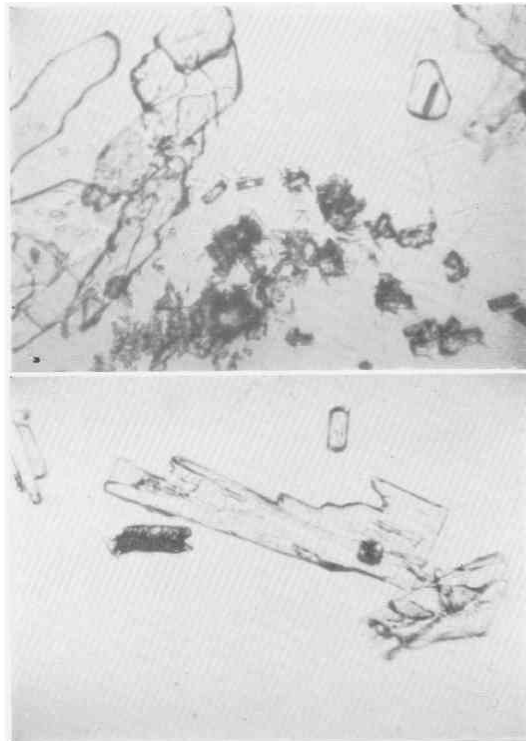


Fig. 5. Crystals contaminated in Preparation. Crystals were precipitated by addition of 2 volumes of alcohol.

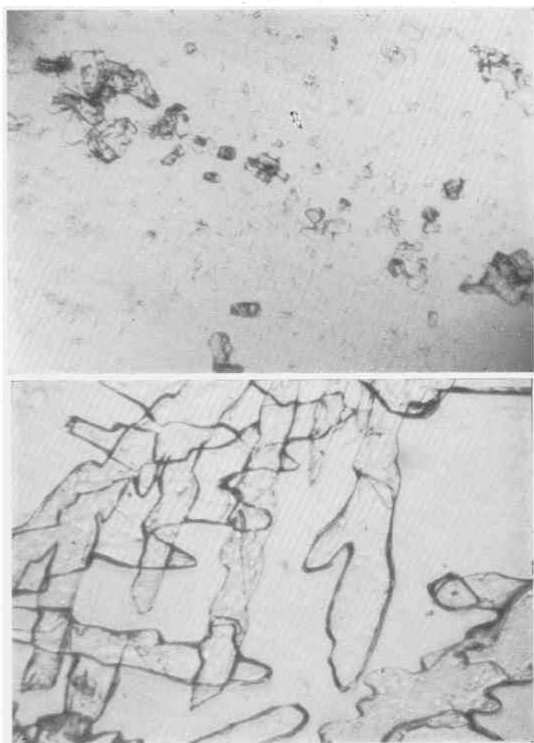


Fig. 6. Crystals contaminated in preparation. Crystals were precipitated between 2 and 4 volumes of alcohol.

過し水から2倍アルコールで重ねて再結した(第5図). また結晶を除いた濾液にさらに等量のアルコールを加えると再び結晶を生じた. これも同じく水から4倍アルコールで再結出来た(第6図). 勿論これらの結晶は核酸とは関係のないものであつて紫外部吸収も認められない. しかし核酸と似たアルコール沈澱性をもつため核酸標品に夾雑する可能性もあるので本法による核酸分離に際しては注意を要する.

**実験 6** 菌体を磨碎してフェノール抽出を行なうと未処理のものに比べて収量を増すが純度の低下を免れないことは実験5に示す通りである. そこで他の菌体破壊手段としてデオキシコール酸による溶菌を併用試験した. この方法は元来 Braun 氏等が初め *Brucella* について試みその途中でフェノール処理だけで有効な事を認めたものである. しかし繰り返し述べるように菌の種類によつて調製法の優劣も異なるので一応本

法も検討した. 5.8 g の乾燥菌体を 0.5% フェノール 500 ml に懸濁しさらに 1 g デオキシコール酸ソーダを加えて 37° に 24 時間振盪抽出した後, 常法に従つてアルコール沈澱, NaCl への溶解, クロロホルム除蛋白, 再沈澱, CaCl<sub>2</sub> 中での分別沈澱, クロロホルム再処理を行ない最後にアルコール沈澱, 脱水乾燥して 118 mg の標品 III-3 を得たが純度はとくに低く却つて好ましくない事は第7表及び第7図に示す通りである.

Table 7. Preparation by phenol-deoxycholate procedure.

Preparation	Yield %	Wave length		E (0.1%)			ε(P)		P %		DNA %	RNA %
		Max. mμ	Min. mμ	Max.	Min.	Max./Min.	Max.	Min.	Inorg.	Org.		
III-3	2.36	258	236	0.380	0.285	1.33	911.1	683.4	0.2	1.29	—	1.3

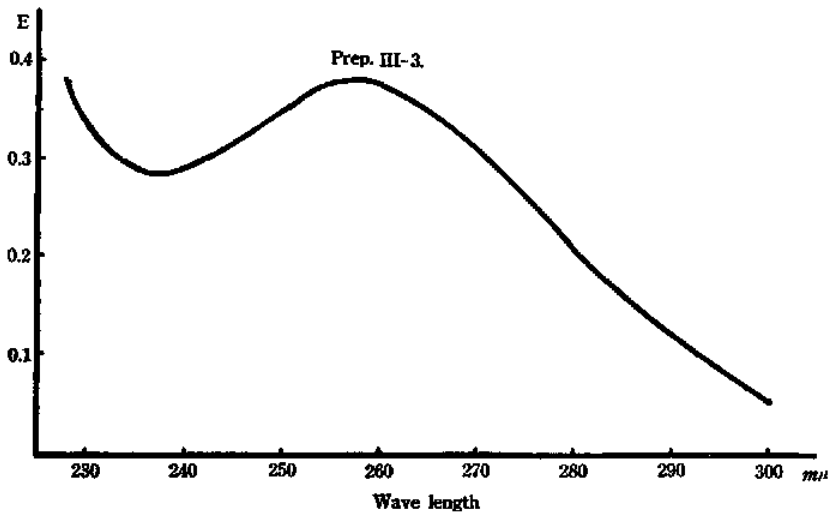


Fig. 7. UV absorption spectrum of Prep. III-3.  
Absorption was estimated on 0.1% solution of the preparation.

## 考 察

核酸調製に際しては他の生物物質の場合と同様に含有量の高いものを原料とするのが常道であつて、とくに支障ない限り DNA には動物の精子、胸腺或は脾臓が専ら用いられ RNA は酵母から抽出されている。アミラーゼ生産菌は生菌ないしアセトン乾燥細胞のいずれにしてもその磷酸分布から検討すれば酵母同様 RNA に富む事は明らかなことであつて、原料の入手し易さから仮令工業的に大量に得られしかも現在利用されることなく廃棄されているものを用いるとしても DNA 源としては決して好ましいものではなく、その調製は酵母からの場合と同様著しい困難を伴うことは明らかに予想される。

さらに DNA 含量の高い胸腺や脾臓の場合でも DNA は細胞核に主として局在しているので、抽出に先立つてまず核を分離して抽出材料の DNA 含量をさらに高め併せて細胞質部を除くことによつて、とくに夾雑物中最も問題となる RNA を予め出来るだけ除く利点をも利用している。これに対して細菌では細胞核を集めるような予備濃縮操作を十分に行なうことも出来ず、DNA に比べて RNA 含量の高い細胞の全成分から出発しなければならぬ不利もある。従つて細菌から DNA の抽出分離は著しく困難であつて得られる標品の純度の低い事は免れない。唯核蛋白質の溶解度を利用して DNase 作用を抑制しながら 0.14 M NaCl 或は 0.2% クエン酸等で磨砕抽出して不純物を予め除くことは或る程度望ましい予備処理である。しかしこれにしても動物組織の細胞核から DNA を抽出する利点には及ばない。しかして予備処理は収量の点から検討すると家蚕組織の場合と同様に NaCl よりも 0.2% クエン酸溶液を用いた方が多少優れているようであるが、この酸性溶液での予備抽出がアミラーゼ生産菌の場合により温和な中性での NaCl 抽出と同様に DNA の性質に全く影響がないか否かという点に若干の危惧が残る。



ここに検討した磨砕法、界面活性剤法及びフェノール法による DNA 調製の中、前 2 者は殆ど問題外であつて（但し活性剤の種類を検討すれば可能性の余地があるかとも考えられる）フェノール法に多少の可能性を示唆するに止つた。然も 0.5% フェノールによる核酸の抽出は低温の必要はなく 30~38° の恒温器中で処理出来るためとくに初期の操作が甚だ容易である利点をも持つている。しかしその収量は同様にかなり低く、他の諸法をも含めて繰り返し検討した結果アミラーゼ生産菌の場合細胞膜の破壊が重要な因子の一つである事が推定される。従つてフェノール法の場合適当な助剤での磨砕を組み合わせることは 1 つの手段であるが、デオキシコール酸処理との組み合わせは却つて好ましくなかつた。また磨砕による DNA 抽出の増加とともにその他の不純物の抽出量も増加し得られた標品の純度は低下した。

これらの調製法の検討とともにアミラーゼ生産菌の核蛋白質の性質ないし DNA 調製上の注意等の若干も明らかにする事が出来た。すなわち核蛋白質の抽出は 2 M NaCl で十分であつてそれ以上に NaCl 濃度を高める必要はない。またアルコール沈澱も他の組織のものと同様に 2 倍容アルコールで十分であり、細菌抽出液にはより高い濃度で初めて沈澱する物質も含まれているが核酸以外のものである。

つぎにクロロホルムによる除蛋白は、脾臓等の場合 1 M NaCl 溶液中で蛋白の解離が殆ど完全に行なわれるのでゲル被膜がもはや生じなくなるまで繰り返し処理すれば十分であつて、フォーリン法やビューレット法で陽性反応は認められない。これに対してアミラーゼ生産菌の場合はこれでは十分でなくて、一部の蛋白は解離しないためか、このままでは除かれぬ。しかしこのように十分クロロホルム処理をした核酸沈澱を CaCl<sub>2</sub> に溶してアルコールで再沈澱すれば、NaCl 溶液中で残存蛋白はクロロホルムとゲルを生ずるようになり完全に除去される。これは細菌に共通した特徴であるか否かは明らかでないが、少なくともアミラーゼ生産菌の場合には留意しなければならない問題である。

また酵母核酸の場合 10% CaCl<sub>2</sub> に溶かし 0.2~0.3 容のアルコールを加えると DNA に富む糸状沈澱を生じ、これを除いた上清にさらにアルコールを追加して総添加量を 2 倍にして沈降する分画は RNA に富むことが報告されている。これに対してアミラーゼ生産菌の場合には同様な処理を行い 0.3 容アルコールで DNA だけでなく RNA も沈澱するように思われた。この点も注意を要する事項である。一方種々の方法で得られた DNA 標品の RNA 含量は生菌乃至アセトン乾燥菌体の DNA 含量に対する RNA の量から推測すればかなり低くなつている。これは確証したわけではないが 0.14 M NaCl 或は 0.2% クエン酸による予備抽出が或る程度有効なものであることを推測させる。

終りに臨み貴重な菌株を分与されて使用の許可を賜つた大阪市立大学福本寿一郎教授、種々御助言を与えられた里村幸男、山本武彦両博士及び多量のアセトン乾燥菌を頂戴した上田化学工業株式会社中村康一氏（現新日本化学工業株式会社）に心から御礼申し上げます。

## 総 括

アミラーゼ生産菌の磷酸分布を生菌ならびにアセトン乾燥菌体について測定した。DNA-磷酸含量は極めて低く前者で約 0.02%，後者で約 0.19% であつて DNA 原料としては決して

て好ましいものではなかつた。それに対して RNA は DNA の 10 倍ないしそれ以上の含量を示した。

アセトン乾燥菌体から DNA 調製を検討すると共にこの操作に於ける核酸ないし核蛋白の挙動を観察した。試みた数種の方法の中、助剤を加えて乳鉢中で磨碎する方法は勿論、界面活性剤を用いる方法も本菌には適用出来なかつた。これに対して 0.5% フェノールで抽出する方法は少々可能性のある事を示唆し、とくに乳鉢磨碎との組み合わせが有効であつたが不純物の夾雑は免れなかつた。

CaCl<sub>2</sub>-アルコール分別は酵母と異なつて十分の効果は得られなかつたが、クロロホルム処理によつて除去されない蛋白を離れ易くする効果が認められた。

## 文 献

- 1) Braun, W., Burrous, J. W. and Phillips, J. H. Jr., 1957. *Nature*, **180**: 1356.
- 2) Chargaff, E. and Zamenhof, S., 1948. *J. Biol. Chem.*, **173**: 327.
- 3) 江上不二夫編, 1951. 核酸及び核蛋白質 (共立出版), 上巻, p. 141.
- 4) 江上不二夫編, 1951. 核酸及び核蛋白質 (共立出版), 上巻, p. 142.
- 5) 江藤守穂, 1954. 九大農学芸誌, **14**: 543.
- 6) Kay, E. R. M., Simons, N. S. and Dounce, A. L., 1952. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**: 1724.
- 7) Morse, M. L. and Carter, C. E., 1949. *J. Bact.*, **58**: 317.
- 8) 梶野麻次郎・阿野藤七, 1954. 醸工, **32**: 253.
- 9) Sevag, H. G., Lackman, D. B. and Smolens, J., 1938. *J. Biol. Chem.*, **124**: 425.
- 10) 渡辺健治, 1959. 九大農学芸誌, **17**: 269.
- 11) 渡辺健治・山藤一雄, 1959. 九大農学芸誌, **17**: 253.
- 12) 渡辺健治・山藤一雄, 1960. 農化, **34**: 777.
- 13) 山藤一雄, 1956. *Proc. 10th International Congr. Entomol.*, **4**: 731.
- 14) 山藤一雄, 1960. *Rep. Agr. Biochem. Kyushu Univ.*, **20**: 1.

### Summary

Concerning fresh and acetone-dried cells of amylase-producing bacteria, *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto, phosphorus distribution was determined by Schmidt-Thanhauser method. It was estimated that DNA-P is very low in content amounting to about 0.02 % of fresh cell or about 0.19 % of dried cell, while much more RNA-P is contained by 10 to 15 times of DNA-P. Therefore, it was suggested that this bacterial cell can not be suitable to DNA source in general, even if cells were multiplied manufacturally and discarded without any utilization.

Using acetone-dried cells, several procedures for preparation of bacterial DNA were discussed by testing them. Firstly, cells were disrupted by grinding with some aid in mortar and extracted preliminarily with diluted NaCl solution or 0.2 % citric acid to remove non-DNA substances as far as possible. From cell mass remained, DNA was extracted with 2M NaCl and purified by several steps of treatment. These are mainly consist of Sevag's method to remove proteins by chloroform-protein gel formation in concentrated NaCl solution, and of Chargaff's procedure to separate DNA from RNA by fractionation with alcohol in 10 %  $\text{CaCl}_2$  solution. DNA was finally precipitated by adding it into 2 volumes of alcohol, removed moisture by stepwise treatment with alcohol of increasing concentration, washed with ether and dried in a vacuum desiccator, becoming white powder. However, it was found that this procedure is not satisfactory to preparation of DNA, regarding both purity and yield.

Secondly, Dounce's method using detergent was investigated. In this case, Japanese product, Emal OD, was used instead of original one, Duponol. However, DNA preparation also has much impurities and its yield was very low.

Finally, DNA was extracted with 0.5 % phenol according to Braun except that preliminary treatment with chloroform freezing cells had been omitted. From the extract, white powder of DNA was obtained after similar purification. The method was seemed to fit more or less for the purpose. However, the combination of phenol extraction with grinding in mortar was most suitable among all procedures tested.

In connection with these trials, some properties of bacterial nucleoprotein as well as nucleic acid were observed. Especially, it may be noticed that Sevag's method of removing protein is not complete. However, remaining protein can be eliminated by further treatment with chloroform in concentrated NaCl solution, when DNA precipitate had been fractionated with alcohol in  $\text{CaCl}_2$  solution by Chargaff's method after completion of Sevag's procedure. Furthermore, it must be remembered that, in the procedure of Chargaff, RNA is precipitated together with DNA in  $\text{CaCl}_2$  solution by adding 0.3 volumes of alcohol, in contrast from those of yeast.

At any rate, DNA preparation from amylase-producing bacteria is very difficult and more suitable procedure must be investigated in respect of both purity and yield.