九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

アミラーゼ生産菌のデオキシリボ核酸II : アセトン乾燥菌体からの調製試験(2)

大村, 浩久
九州大学農学部

渡辺, 健治
九州大学農学部

https://doi.org/10.15017/21554

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 18 (4), pp.399-410, 1961-07. 九州大學農學部
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 II

アセトン乾燥菌体からの調製試験 (2)

大村浩久・渡辺健治

Deoxyribonucleic acid of amylase-producing bacteria II. Trial of preparation from acetone-dried cells (2)

Hirohisa Omura and Kenji Watanabe

前報[3]で検討した数種の DNA 調製試験の経験からアミラーゼ生産菌の DNA 調製における難点中最も大きいものの一つは細胞の破壊であることが示唆され，これまで試験した若干の方法によつては決して満足出来る結果は得られなかつた．細菌を破壊する手段として考えられるものは他に酵素的或はファージによる溶菌等の生物学的なものがある．この中ファージの溶菌現象については多少の観察を行ない一部は既に報告したが，[5] DNA 調製の観点からすればファージ自体が DNA を含みしかもその性質が寄主細菌のものと同一であるか否かは少なくともアミラーゼ生産菌では明らかでなく，又一方ファージの増殖に伴い寄主 DNA に変化が起るか否かについても知られていないので，ファージ溶菌を利用する DNA 調製については慎重であるを要しそれ等の解明を俟つて検討することとし，取敢ず酵素的溶菌法について試験した．

酵素リゾチームによる溶菌は勿論細菌の感受性に支配されるが少なくとも感受性菌にとつてはかなり容易な細胞の破壊手段である．Vendrely 氏等[4]は数種の細菌について検討した．即ち凍結処理，クロロホルム処理及びリゾチーム処理を組合わせて菌に適用して 70 ないし 90 % の DNA を抽出分離したがその処理のいずれを省略しても効率は低下することを認めた．その中でもリゾチーム処理が最も基本的なものであつて他の操作を省いてもある程度の抽出は可能であるが酵素処理を欠くとほとんど調製し得ないことを報告した．アミラーゼ生産菌は生菌は勿論アセトン乾燥菌体でもリゾチームによつてその細胞膜は分解されるので酵素法の利用は可能であると思われ，以下 2 ～ 3 の検討を試みた．

実　　験

リゾチームは市販鶏卵白から岡田氏[2]の教示及び春名氏[1]の記載に従つて調製，数回再結して使用したがその凍結乾燥標品をも用いた．この場合はリゾチーム結晶を水に溶し 1 ～ 2 昼夜流水，ついで 1 日蒸溜水に対しセロファン嚢を用いて透析後凍結乾燥しデシケーター中に保存したものである．また DNA 調製は前報の場合と同様に特記する外は氷冷下に行ない，得られた標品の測定も前報に従つた．

実験 1　細菌は一般にリゾチーム処理によつてプロトプラストを生じそれがさらに崩解して完全に溶菌する．この場合添加する酵素の活性及び量に支配されることは当然であるが，また作用を受ける細菌の量やリゾチームの作用時間も考慮しなければならない．

アセトン乾燥菌体 10 g を 400 m*l* 0.14 M NaCl–0.01 M クエン酸ソーダ溶液に懸濁，よく攪拌して洗滌後遠心分離する．更に 300 m*l* ずつ2回反復した後洗滌菌体を pH 7.0 の 0.05 M 燐酸緩衝液–0.01M クエン酸ソーダ混液 1 *l* に懸濁，5回再結した湿潤リゾチーム標品 4.5 g を添加し 38° で 2時間攪拌しながら作用させる．リゾチーム処理の効果を試験するために反応液を等分しその一部は 37° の恒温器中にさらに 16時間放置した．

他の半量は直に冷却し 3000 r.p.m. で 30分間遠心分離して上清及び沈澱に分けた．沈澱を 400 m*l* 2 M NaCl–0.01 M クエン酸ソーダで冷所で1晩抽出，3000 r.p.m. で 10分間遠心分離したが，沈澱は崩解してほとんど残ららかつた．NaCl 抽出液を2倍容アルコールに注入し白色糸状沈澱及び不定形沈澱を生じた．前者を硝子棒に捲きつけて分離し，両沈澱をそれぞれ 70 % アルコールで洗滌後 270 m*l* 及び 80 m*l* の 2 M NaCl–0.01M クエン酸ソーダに溶解，除蛋白（糸状沈澱部 30回，不定形沈澱部 12回クロロホルム処理）後アルコールで沈澱し常法通り脱水乾燥した．この場合糸状部からは糸状標品（**標品 IV–1a**）の外に少量の白色粉末（**標品 IV–1a′**）が得られ，不定形部からは白色粉末標品（**IV–1b**）が得られた．収量はそれぞれ 340 mg，65 mg 及び 220 mg であつた．

他方プロトプラストを除いた上清も同じくアルコールに添加し生じた沈澱を分離，170 m*l* NaCl に溶解して蛋白部を解離させ，クロロホルム処理を 40回行なつて蛋白を十分に除いた後同様に沈澱，脱水乾燥して 585 mg の白色粉末標品（**IV–1c**）を得た．

これに対して長時間リゾチームを作用させた試験区はほとんど完全に溶菌し遠心分離しても沈澱物は残らなかつた．同じく2倍容アルコールに注入し，硝子棒で生じた糸状沈澱を集め 70 % アルコールで洗滌後 200 m*l* 2 M NaCl に溶し，36回除蛋白操作を反復してゲル被膜をもはや生じなくなるまで完全に行ない，遠沈上清をアルコールに添加し糸状沈澱だけを集めて脱水乾燥し 395 mg の標品 **IV–1d** を得た．

これら標品の水溶液の吸収スペクトルを第1図，若干の分析値を第1表に示す．

この程度ではとくに無機燐の含量が多いが糸状沈澱では比較的に少ない．いずれにしても核酸の純度は極めて低くまた RNA もかなり含んでいる．他方リゾチーム処理は，短時間作用させてプロトプラストから抽出するよりも完全に溶菌させて糸状沈澱だけを集める方がよいようであることは両糸状標品 IV–1a と IV–1d との比較から推定されるが，リゾチーム作用中菌体 DNase がクエン酸ソーダで完全に阻止されているという保障がないために今後検討を要し，とくに生化学的活性をもつ DNA の調製に際しては注意しなければならない．

実験 2　リゾチームを長時間作用させて完全に溶菌させた液からも DNA 調製の可能性があることが一応示されたので溶菌の可能性の範囲内で酵素量を減じても差支えないと思われた．乾燥菌体 10 g を前回同様に pH 7.0 のクエン酸ソーダ含有燐酸緩衝液に懸濁した．DNase 作用の抑制をさらに十分にするためクエン酸ソーダの量は5倍使用した．これに 60 mg のリゾチーム結晶を加え 30° に 20時間作用させてほとんど完全に溶菌させた．3000 r.p.m. に 20分間遠心分離して淡黄褐色の多少粘稠な溶菌液を得た．これを2倍容のアルコールに注入したが，フェノール法の場合と同様に添加初期は短糸状白色沈澱を生じ注入が進んで全液を添加し終つた時は糸状も崩解して泥状沈澱となつた．遠沈して

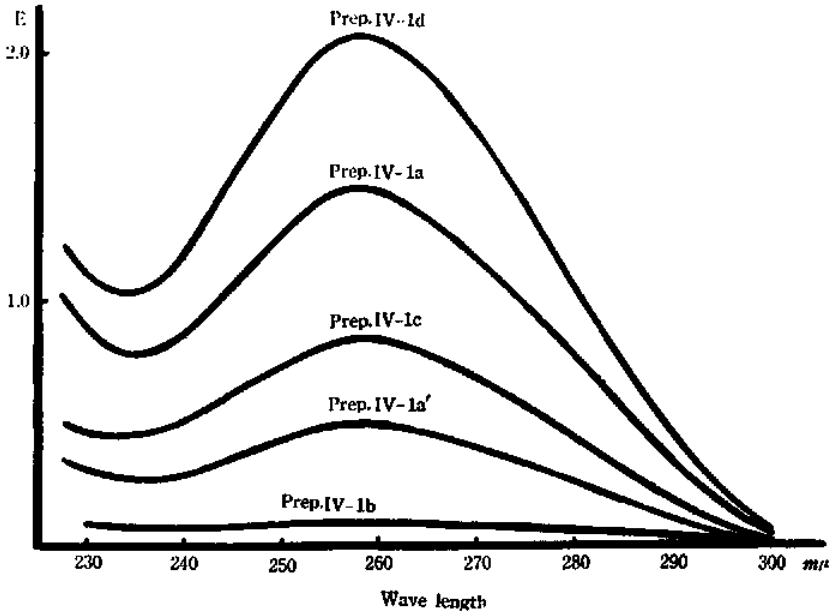

Fig. 1. UV absorption spectra of Prep. IV-1a, Prep. IV-1b, Prep. IV-1c, Prep. IV-1d and Prep. IV-1a'.
Absorptions were estimated on 0.1% solution of the preparations.

Table 1. Preparation by lysozyme procedure (1).

Preparation	Yield %	Wave length Max. mμ	Wave length Min. mμ	E (0.1%) Max.	E (0.1%) Mn.	E (0.1%) Max./Min.	ε(P)* Max.	ε(P)* Min.	P % Inorg.	P % Org.	DNA %	RNA %
IV-1 a	3.4	258	235	1.446	0.772	1.87	1659	886	5.3	2.7	2.9	2.3
IV-1a'	0.65	258	235	0.496	0.273	1.82	3842	2117	6.6	0.4	1.4	0.8
IV-1 b	2.2	259	235	0.095	0.072	1.32	981	744	18.0	0.3	—	0.3
IV-1 c	5.85	260	233	0.844	0.452	1.87	817	438	12.0	3 2	1.4	1.4
IV-1 d	3.95	258	234	2.073	1.035	2.00	1835	916	3.5	3.5	7.1	3.2

* Calculated from organic-P content.

淡黄褐色沈澱を得た.*a) 沈澱を 70% アルコールに懸濁洗滌したが乳濁して1晩静置しても沈澱しなかつたのでさらに等容のアルコールを追加すると直に沈澱した. 遠心分離後 100 ml 無水アルコールで洗滌, ついで 100 ml 0.5% デオキシコール酸ソーダ-0.01M EDTA 混液に懸濁し1晩放置後遠沈して可溶性部を得た. クロロホルム処理 (8回) を行なつて除蛋白後常法に従つてアルコール沈澱, 脱水乾燥して 270 mg の白色粉末 (標品 IV-2a) を得た.

つぎに本標品を Chargaff 氏法に従つて $CaCl_2$ 分別を行なつた. 即ち 100 mg の標品 IV-2a を 50 ml 10% $CaCl_2$ に溶し 10000 r.p.m. で 30 分間遠心分離して不溶物を除き, 上清に 0.3 容アルコールを加えて生じた沈澱を集めた. 残存上清にもさらにアルコールを

*a) 上清は棄てるが, この上清にさらにアルコールを加えると白色沈澱を析出する. しかしこれに核酸が含まれないことは既にフェノール法で確めた通りである.

追加して2倍容とし同様に沈澱を生成させた．すでに前報で観察したように本処理によつて得られた沈澱は濃 NaCl 液中でさらに結合蛋白を解離するので，2 M NaCl に溶しクロロホルム蛋白ゲル被膜が生じなくなるまで前者5回，後者で9回除蛋白操作を行ない，以下アルコール沈澱，脱水乾燥してそれぞれ 15 mg 及び 16.5 mg の白色粉末を得た（標品 IV-2b，標品 IV-2c）．これは第2表に示すようにかなり DNA 含量の高いものであつた．

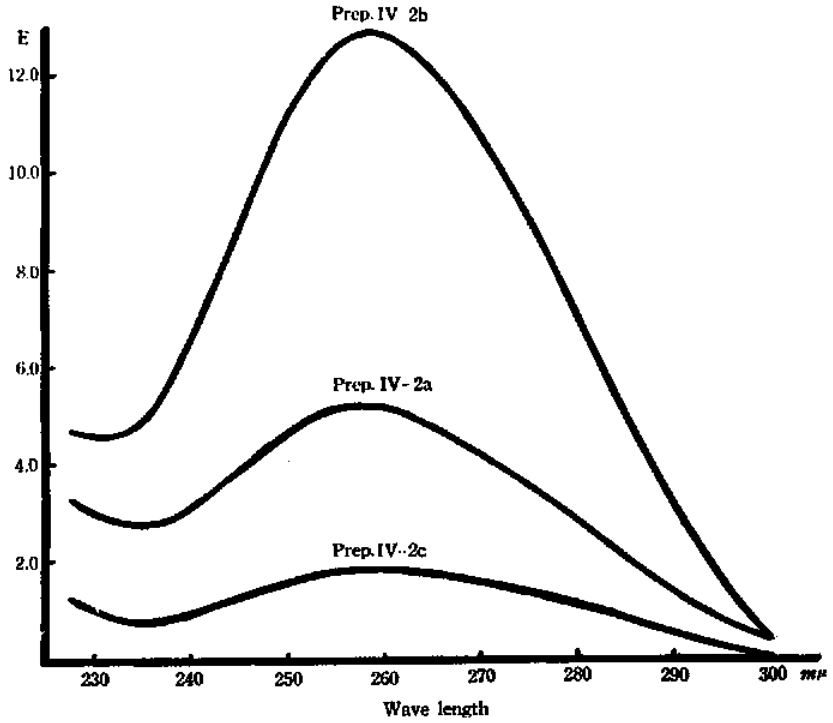

Fig. 2. UV absorption spectra of Prep. IV-2a, Prep. IV-2b and Prep. IV-2c. Absorptions were estimated on 0.1 % solution of the preparations.

Table 2. Preparation by lysozyme procedure (2).

Preparation	Yield %	Wave length Max. mμ	Wave length Min. mμ	E (0.1%) Max.	E (0.1%) Min.	E (0.1%) Max./Min.	ε(P) Max.	ε(P) Min.	P % Inorg.	P % Org.	DNA %
IV-2a	2.7	259	235	5.11	2.78	1.85	3418	1855	0.55	4.07	20.7
IV-2b	0.27	259	231	12.82	4.54	2.82	4421	1566	—	8.98	70.0
IV-2c	0.28	259	235	1.84	0.91	2.05	511	250	—	11.2	18.6

実験 3　リゾチームは数回再結し透析後凍結乾燥すればかなりの期間保存出来る．10 g 乾燥菌体を 0.14 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダで 400 ml ずつ3回洗滌する．この場合 Waring ブレンダーを用い数分間攪拌して均一に懸濁したが，懸濁液は多少粘性を帯びその遠沈上清からアルコールで微量の糸状沈澱も生じた．しかし量的には勿論問題外であつた．

洗滌菌体を pH 7.0 の 0.05 M 燐酸塩-0.5 M 蔗糖-0.0001 M PCMB 混液 1 l に懸濁しリゾチーム凍結乾燥標品 0.5 g を添加，37° に 18 時間作用させた．念のために遠心分離して微量の沈澱を除いた粘稠な溶菌液を 2 倍アルコールに加え，生じた沈澱を 400 ml 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダに溶解した．10000 r. p. m. で 30 分間遠心分離して不溶部を除き，上清を再びアルコールで沈澱させた．糸状沈澱を集め 200 ml 1 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダに溶し，4 l の同じ混液に対しセロファン膜で 2 日透析後アルコールで沈澱，再び 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダに溶し常法通りクロロホルム処理（32回）を行なつて蛋白を除いた．アルコールで沈澱し 200 ml の 10% $CaCl_2$ に溶解，10000 r.p.m. で 40 分間遠心分離し，上清 200 ml についてアルコール分別を行なつたがこれまでのものと多少趣が異つた．即ち初めは徐々に白濁したが 35 ないし 37 ml アルコールを添加した時第 3 図に示すように沈澱の一部は糸状となつたので 40 ml で添加を一時止め，糸状沈澱だけを硝子棒に捲き取り 70% アルコールに懸濁した．残存液に更に 20 ml のアルコールを追加して全添加量を 0.3 容としこれまでに生じた不定沈澱を遠心分離した．この両者が Chargaff 氏等による DNA 区である．糸状及び不定沈澱を 70 % アルコールで洗滌後それぞれ 80 ml 2 M NaCl に溶解し重ねて除蛋白した後アルコールに添加した．この場合糸状区からは勿論不定沈澱区からも再び糸状沈澱を生じた．両区からの糸状沈澱を集め常法通り脱水乾燥して 101.5 mg の**標品 IV-3a** を得た．また糸状物を除いた不定沈澱区の残存沈澱も同様に乾燥し 27 mg の白色粉末が得られた（**標品 IV-3b**）．尚糸状区からも上記のように再沈澱して糸状沈澱の外に若干の非糸状沈澱も生じたが量的に少ないので分離しなかつた．

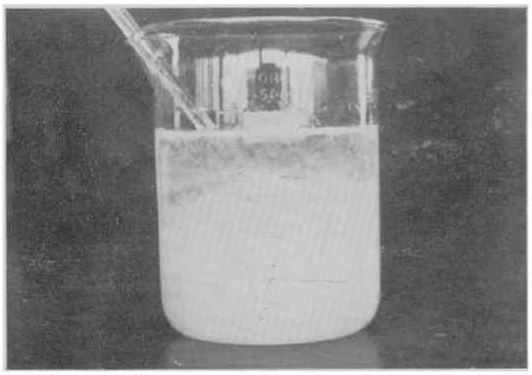

Fig. 3.　Fibrous precipitates of Prep. IV-3a.

0.3 容アルコール沈澱を除いた $CaCl_2$ 溶液残存上清にさらに 340 ml アルコールを追加して生じた沈澱即ち Chargaff 氏等の RNA 区を集めた．これを 130 ml の 2 M NaCl に溶解したがかなり多量の不溶物も含まれた．3000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して不溶物[*b)]を除き，上清について 3 回クロロホルム除蛋白処理後アルコール沈澱，脱水乾燥して白色粉末（**標品 IV-3c**）598 mg が得られた．

このようにして $CaCl_2$ 処理によつてアミラーゼ生産菌からも酵母での場合と同様に糸状標品が初めて得られたが，糸状物が必ずしも純度の高いすぐれた標品であることを示すものではないことは，標品 IV-3a と IV-3b 乃至は IV-2b（第 2 表）との比較からも推定される．

*b）常法に従い脱水乾燥し 198 mg の白色粉末が得られた．

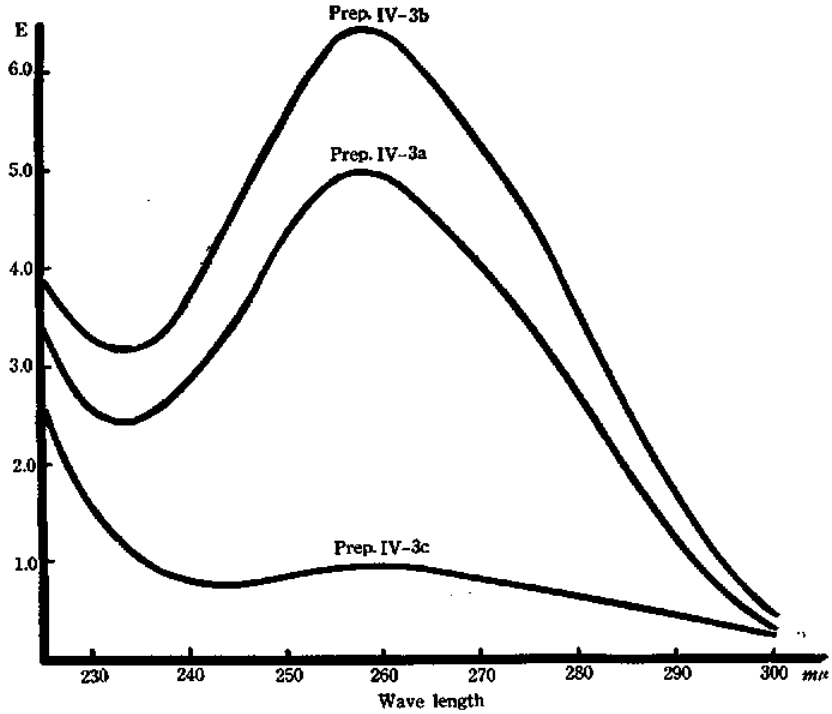

Fig. 4. UV absorption spectra of Prep. IV-3a, Prep. IV-3b and Prep. IV-3c. Absorptions were estimated on 0.1 % solution of Prep. IV-3a and Prep. IV-3b and on 1.0 % solution of Prep. IV-3c.

実 験 4　リゾチーム処理の場合短時間では所謂プロトプラストを生じ，これからもDNA の抽出分離が出来ることは実験1からも明らかであるが収量の点で劣つた．しかし長時間作用させて完全に溶菌させた場合それとともに DNase の作用期間も長く従つてクエン酸ソーダ，PCMB 或は EDTA のような阻害剤を添加してはいるがその完全な阻害効果を期待することは疑問であり，従つて調製された DNA 自体が native のものであるという保障はない．他方短時間処理して得られるプロトプラスト中でファージが増殖し得る事は本菌についても確められたので,[6] 少なくともファージ増殖性に関する限りプロトプラストの DNA は細菌 DNA と完全に同じものではなくても極めて似ていることは推定出来る．そこでとくに生物活性を重視する DNA 調製を目的とする場合は DNA 調製に先立つリゾチーム処理による細菌の破壊は出来るだけ時間を短くして DNase との接触期

Table 3. Preparation by lysozyme procedure (3).

Preparation	Yield %	Wave length Max. mμ	Wave length Min. mμ	E (0.1%) Max.	E (0.1%) Min.	E (0.1%) Max./Min.	ε(P) Max.	ε(P) Min.	P % Inorg.	P % Org.	DNA %	RNA %
IV-3 a	1.02	258.5	233	4.91	2.44	2.03	5883	2894	—	2.61	21.4	4.5
IV-3 b	0.27	258.5	233	6.41	3.20	2.00	4004	1999	—	4.96	27.9	6.5
IV-3 c	5.98	259	243	0.098	0.082	1.20	92	77	0.05	3.30	—	1.7

間を短縮することが望ましいのは当然である．

乾燥菌体 8.5 g を 400 ml ずつ 3 回 0.14 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダで洗滌した後 pH 7.0 の 0.05 M 燐酸緩衝液に懸濁した．燐酸塩には生じたプロトプラストを安定にするために 0.5 M に蔗糖，及び DNase 作用を抑制するために 0.01 M クエン酸ソーダと 5×10^{-5}M PCMB も予め添加したが，少なくとも細胞膜が破壊されていない間にこれらの阻害剤が菌体内の DNase 作用を抑制しているか否かについては明らかでない．懸濁液を 38° に保ちリゾチーム凍結乾燥標品 0.5 g を添加し攪拌しながら 30 分間作用させた．急冷後 3000 r.p.m. で 10 分間遠心分離し得られたプロトプラストを 600 ml 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダで 1 晩抽出した．3000 r.p.m. 10 分間遠沈後，上清を 2 倍容アルコールに加え，生じた不定形沈澱を 200 ml 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダ混液に溶し再び 3000 r,p.m. で 10 分間遠心分離して不溶物を除いた．一方プロトプラストの抽出残渣を 200 ml 0.5 % フェノール (0.14 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダ混液に溶解) で 37° で 1 晩抽出した．両抽出液を 2 倍容アルコールに加え生じた糸状沈澱のみを硝子棒で集め合わせて 220 ml の 2 M NaCl-0.01 M クエン酸ソーダ溶液にブレンダーを用いて懸濁，1 晩抽出後 10000 r.p.m. で 30 分間遠心分離して不溶物を除いた．濃く白濁した上清部についてクロロホルム処理を 50 回行なつてゲル被膜を生じなくなるまで十分に除蛋白すると透明の液が得られた．2 倍アルコールで沈澱し生じた糸状沈澱を集めて 110 ml 10 % $CaCl_2$ に溶解，0.3 容アルコール沈澱部と 2 倍容アルコール沈澱部とに分別，それぞれ 80 ml 2 M NaCl に溶かし重ねて除蛋白（5 回及び 2 回処理）後 2 倍アルコールで沈澱さ

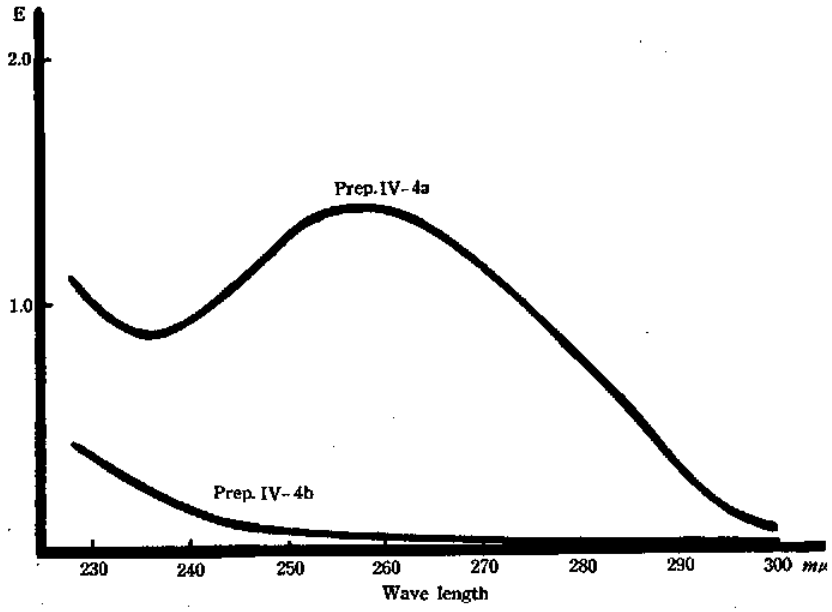

Fig. 5. UV absorption spectra of Prep. IV-4a and Prep. IV-4b.
Absorptions were estimated on 0.1% solution of the preparations.

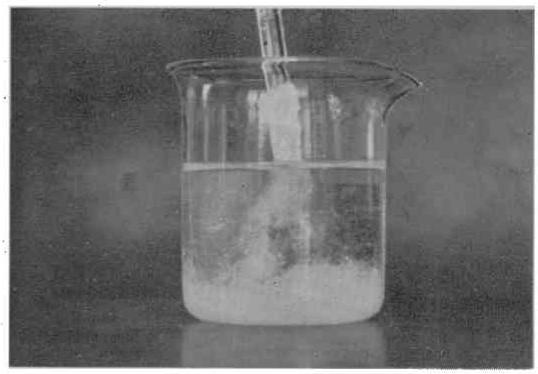

Fig. 6. Fibrous precipitates of Prep. IV-4a.

せると，特に前者からは第6図に示すような短糸状の沈澱を生じた．常法通り脱水乾燥して 210 mg（**標品 IV-4a**）及び 130 mg（**標品 IV-4b**）の白色標品が得られた．

Table 4. preparation from protoplast.

Preparation	Yield %	Wave length Max. mμ	Wave length Min. mμ	E (0.1%) Max.	E (0.1%) Min.	E (0.1%) Max./Min.	ε(P) Max.	ε(P) Min.	P % Inorg.	P % Org.	DNA %	RNA %
IV-4 a	2.47	258	235	1.402	0.880	1.59	3878	2434	—	1.12	4.3	1.0
IV-4 b	1.53	—	—	—	—	—	—	—	—	1.66	—	—

実 験 5　これまでの実験は少なくともアミラーゼ生産菌の場合リゾチーム法が他の方法に比べて比較的に好ましいことを示すが，得られた核酸標品は糸状であるにも拘らず依然として純度も低いために引続いて精製しなければならない．しかし時々観察したように，アミラーゼ生産菌の場合脾臓或は酵母の核酸乃至は核蛋白の性質を利用しての DNA 調製操作が必ずしもそのままには適用されないために本菌自体についての予備試験を要した．本実験もその1例であつて精製に際しての参考となるものであろう．

標品 IV-2a 60 mg を 1 N NaOH に溶し 37° に 20時間放置すると液は黄色を呈した．氷冷し 6 N HCl で中和，さらに等量の 10 %トリクロール醋酸を加えた．3000 r.p.m. で 10 分間遠心分離し沈澱を常法によりアルコール及びエーテルで脱水洗滌後減圧乾燥し微かに淡褐色を帯びた粉末 0.8 mg（**標品 IV-2′a**）を得た．一方トリクロール醋酸沈澱を除いた上清は白濁しているが，これからも同じく2倍アルコールで沈澱し，3000 r.p.m. で 10 分間遠心分離すると上清は黄褐色を呈した．沈澱について同様にアルコール及びエーテルで脱水乾燥し 12 mg の白色粉末（**標品 IV-2′b**）を得た．この両標品は何れも水に完全には溶けないが 1 N NaOH を1滴加えてアルカリ性にすると直に溶解した．

アルカリ処理によつて不純物もかなり除かれることを示唆するが，システイン-H_2SO_4 反応は高重合 DNA の呈色反応ではなくデオキシリボースに基づくものであるので分解物も呈色することに注意しなければならない．標品 IV-2′a の DNA 含量として表わした数値はそのため過大になつたもので，その燐含量も考慮すれば低分子の核酸関連物質であると思われる．

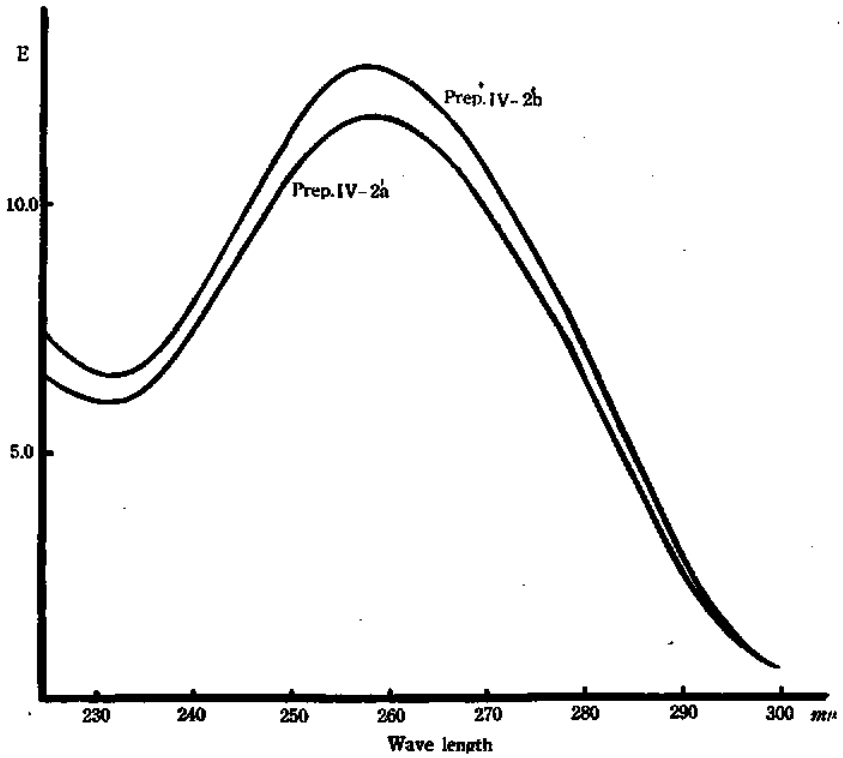

Fig. 7. UV absorption spectra of Prep. IV-2'a and Prep. IV-2'b. Absorptions were estimated on 0.02 % of Prep. IV-2'a and on 0.1 % solution of Prep. IV-2'b.

Table 5. Treatment of alkali and trichloroacetic acid on Prep. IV-2a.

Preparation	Yield %	Wave length Max. mμ	Wave length Min. mμ	E (0.1%) Max.	E (0.1%) Min.	E (0.1%) Max./Min.	ε(P) Max.	ε(P) Min.	P %	DNA* %	RNA* %
IV-2' a	1.3	258	231	59.1	30.0	1.97	8322	4225	22.0	160.7	22.9
IV-2' b	20.0	258	231	12.82	6.54	1.96	8024	4093	4.95	57.9	9.05

* The figures are expressed by the amounts of nucleic acids corresponding to the color intensities developed by Cysteine-H_2SO_4 and Orcine-HCl reaction.

考　　察

アミラーゼ生産菌は生菌だけでなくアセトン乾燥細胞でもリゾチームによつて容易に溶菌されるので核酸の抽出調製にリゾチーム処理を利用することはかなりの希望を与えたが，事実本報の結果は少なくとも磨砕法や界面活性剤を利用する方法は勿論，フェノール抽出法よりも好ましい方法である事を示した．この場合とくに検討すべきものはリゾチーム処理であるが，生理的意義を考慮しなければ長時間作用させて細胞を完全に崩解させた溶菌液から DNA を得るか，短時間処理してまずプロトプラストを調製しこれから DNA

を抽出精製するかのいずれでも差支えない．収量或は純度の点からすれば前者が多少優れているように思われるが，生理的活性をもつたDNA調製のためにはむしろ後者によるべきである．いずれにしても調製目的の外に材料菌体の量，それに対する使用し得るリゾチーム標品の活性及び量，その他実験設備の処理能力等に基づいて決定すべきものであるが，この間低温での操作や適当なDNase抑制剤の使用等によつて調製中でのDNAの変化を出来るだけ避けるように十分注意しなければならないことは当然である．勿論得られたDNA標品の性質については今後仔細に検討すべきものであつてとくに完全溶菌の場合には留意しなければならない．若干の実験を通じての経験からはプロトプラストの場合，質及び量的に活性の強いリゾチームで処理して溶菌時間を出来るだけ短縮することが望ましく，リゾチーム標品は数回の再結から分離した湿潤品，或はそれから調製した凍結乾燥品のいずれでも差支えない．

リゾチーム法の場合前報で検討した他の方法による場合よりもとくに除蛋白操作に念を入れる必要があり40回以上に及ぶクロロホルム処理を反復しなければならない．しかもこの場合にも，ゲル被膜がもはや生じなくなるまで最初の処理を十分に行なつても蛋白の一部は除去されないが $CaCl_2$-アルコール分別により解離するようになり再度の除蛋白によつてほぼ完全に除かれることは前報で認めた通りである．

$CaCl_2$ 処理は既報のようにChargaff氏等が酵母のDNAとRNAとを大別するために用いた操作であるが，リゾチーム法でも10％ $CaCl_2$ 溶液中0.3容エタノールでDNAだけでなくRNAも沈澱し両者を分別する目的には十分副い得ないが，少なくとも0.3容ないし2倍容アルコールで沈澱するかなりの不純物を除き得る初果は無視出来ず，上記残存結合蛋白の解離のためとあわせてアミラーゼ生産菌からのDNA調製における有効な精製操作の1つである．

動物組織の場合DNA蛋白ないしDNAの沈澱は一般に糸状を呈するので調製に際しては通常糸状物を硝子棒に捲きつけて集め他の不純物からの分離もかなり容易に行なつている．しかして除蛋白，RNA分別等の精製操作を経て脱水乾燥した最終的のDNA標品も勿論白色糸状物である．従つてこの糸状標品は粉末状のものに比べて純度も高くよりすぐれたDNA標品であると見做され易い．この点においてもリゾチーム法はアミラーゼ生産菌からDNAを糸状に分離調製することが出来た方法であつて，標品の純度，収量等も考慮し試験した方法の中では最も優れたものであるということが出来る．しかしここで注意しなければならないのは糸状標品が必ずしも純度の高いものであるとは限らないことである．例えば糸状標品IV-3aは同一分画で得られた粉末標品IV-3bよりも若干劣ることは否定出来ないし，標品IV-2bやIV-2′bと前報に示したアルカリ処理標品III-2a′等との比較は明らかにこれを示している．

いずれにしてもDNA含量の少ないアミラーゼ生産菌からのDNA調製においては，まず酵素リゾチームで溶菌しこれからDNAを分離精製することが，少くも試験した方法の中では最も適当なものと思われ，さらに0.5％フェノールでの抽出も多少の可能性を示唆した．

終りに貴重な菌株を分与され使用の許可を賜つた大阪市立大学福木寿一郎教授，種々御

助言を与えられた里村幸男，山本武彦及び岡田茂孝の諸博士及び多量のアセトン乾燥菌体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）に心から御礼申上げます．

総　　括

アミラーゼ生産菌のアセトン乾燥菌体から DNA の調製について，リゾチームによる溶菌作用を利用する方法の検討をした．菌体懸濁液に卵白リゾチーム結晶を作用させて調製分離したプロトプラストの NaCl 抽出液若くは完全に溶菌した細菌溶菌液からアルコール沈澱，除蛋白，$CaCl_2$溶液中でのアルコール分別等によつて DNA 標品を白色糸状に得ることが出来た．本法はこれまで検討した磨砕抽出法，界面活性剤による法，或はフェノール法等に比べてアミラーゼ生産菌の場合にはすぐれていることが明らかにされた．

文　　献

1) 春名一郎，1957．蛋白質・核酸・酵素，**2**：135.
2) 岡田茂孝，1958．私信．
3) 大村浩久・渡辺健治・徳永純一，1961．九大農学芸誌，**18**：381.
4) Vendrely, R., Palmade, C. and Vendrely, C. 1956. Nature, **178**: 1044.
5) 渡辺健治・山藤一雄，1959．九大農学芸誌，**17**：253.
6) 渡辺健治・山藤一雄，Enzymologia, in press.

Summary

The method including the treatment of lysozyme was investigated for the preparation of DNA from amylase-producing bacteria, *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto. By discussing the procedure tested, it was demonstrated that the method outlined as follows was most suitable for this strain of bacteria.

Acetone-dried cells of bacteria were lysed by the action of egg-white lysozyme, either fresh crystals or freeze-dried powder *in vacuo*, at 37° overnight in the presence of some DNase inhibitor such as Na-citrate or PCMB. Lysate was poured into 2 volumes of ethanol and the precipitate produced was collected. The precipitate was dissolved in 2 M NaCl, treated with chloroform according to Sevag and DNA fraction was again precipitated with alcohol from deproteinized clear solution. The precipitate was then dissolved in 10 % $CaCl_2$ solution. The fibrous precipitate was produced by adding 0.3 volumes of ethanol into $CaCl_2$ solution and dissolved in 2 M NaCl. Since protein which could not be removed by first procedure of deproteinization became to be dissociated, it was treated repeatedly with chloroform. Finally, DNA fiber and powder were deposited with alcohol and dried *in vacuo* after stepwise washing them with alcohol of increasing concentration and finally several times with ether.

Alternatively, protoplast of amylase-producing bacteria was made from dried-cell by the action of lysozyme at 37° for 30 min. and extracted with 2 M NaCl. White fiber or powder of DNA could be prepared by the same procedure.

Similar properties of nucleoprotein and nucleic acids of the bacteria, reported in the foregoing paper, were observed and turned to account in this case too.