

石油資化性細菌 *Brevibacterium* sp. Strain A25R に関する研究 : 菌体内リン酸化合物について

熊, 傑田
九州大学農学部微生物工学教室

上田, 誠之助
九州大学農学部微生物工学教室

<https://doi.org/10.15017/23211>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 30 (4), pp.149-156, 1976-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



石油資化性細菌 *Brevibacterium* sp. Strain A25R に関する研究

菌体内リン酸化合物について

熊 傑 田・上 田 誠之助

九州大学農学部微生物工学教室

(1975年12月1日受理)

Studies on Hydrocarbon-Utilizing Bacteria The Phosphorous Compounds within Cells of a *Brevibacterium* sp. Strain A25R

JAE TIAN SHUNG and SEINOSUKE UEDA

Laboratory of Biochemical Engineering, Faculty of
Agriculture, Kyushu University, Fukuoka

著者らは石油資化性をもつ微生物の菌体内や菌体外(培養液の水相)代謝産物を調べていたところ、菌体内リン含量が乾燥菌体の3.3~3.7%におよぶ細菌を見出した。その中の一株 *Brevibacterium* sp. strain A25R 菌は特に石油資化性が強かったので、その菌体内冷酸可溶、KOH 可溶、脂質、蛋白質と残渣の各画分の有機リン含量について検討した結果、冷酸可溶画分と KOH 可溶画分の中に特徴があることがわかった。本報告では *Brevibacterium* sp. strain A25R 菌の冷酸可溶画分と KOH 可溶画分中の有機リン酸化合物について述べる。

実験方法

1. 培養と菌体定量法 本菌株の前培養を3~5回くりかえした後、12 l の培地を含む 30 l 容量のジャ

Broth 10 ml
-add 10 ml of 0.03% cetyl
benzyl ammonium chloride,
and shake,
-centrifuge (12,280×g, 30 min)
Cells precipitate
-suspend in ether, and pour
into weighed bottle,
-evaporate ether and dry
under 105°C,
Dried cells

Fig. 1. The determination method of cell concentration.

ーファーメンターに5%接種した。培養条件は40°C, 1 vvm 通気量, pH 6.4~7.4とし、攪拌速度は150~200 rpm にした。培地組成は次のとおりである:
(NH₄)₂HPO₄ 0.2%, NH₄H₂PO₄ 0.2%, KCl 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.04%, FeSO₄·7H₂O 0.002%, MnSO₄·2~7H₂O 0.002%, ZnSO₄·7H₂O 0.002%, n-パラフィン100 ml/12 l。菌体定量には Fig. 1 に示す方法を用いた。

2. リン, RNA および蛋白質の定量 無機リンは Irving and Cosgrove (1970) の方法で、有機リンは Allen (1940) の方法で定量した。蛋白質の含量はマイクロケルダール法で定量した窒素量に6.25を乗じて計算した。

3. 菌体内リン酸化合物の分画法 新鮮な細胞に氷冷した10%トリクロル酢酸を加えて2~5分間攪拌し、冷酸可溶画分を得た。残渣から有機溶媒で脂質を抽出した。さらに0.3 N KOH, 37°C, 18時間で菌体内核酸(RNA)とアルカリ可溶のリン酸化合物を分解抽出した。以上の手順で大部分のリン酸化合物が抽出される。冷酸可溶画分と KOH 可溶画分中のリン酸化合物の分画には、200~400メッシュの強塩基性陰イオン交換樹脂 Dowex 1 を使用した。また、得られた各画分中に混在する塩類を除くために Dowex 50 を使用した。

冷酸可溶画分中の核酸関連物質と KOH 可溶画分中

の分解した RNA のモノスクレオチドの定性実験では、日立分光光度計 120 型を用いて紫外部におけるスペクトラム (Bock *et al.*, 1956) と、塩基、糖、リンの 3 者のモル比を調べた。リボース、グルコース、マンノースおよびフラクトースの定性分析はペーパークロマトグラフィーと数種の化学反応で行なつた。ポリリン酸は Kuroiwa and Nakagawa (1962) によるバリウム塩沈澱法で分画した。

定量法は彼らと同じ方法で 4_7P_i を求め、これを細胞内ポリリン酸のリン含量として適用した。ポリリン酸を沈澱させた後、残った上澄液からさらに LePage (1949) の方法で有機リン酸化合物をバリウム塩として分画した。

結果と考察

1. 冷酸可溶画分リン酸化合物

(1) 分画と同定

新しく培養した定常期の *Brevibacterium* sp. strain A25R 菌体から得た冷酸可溶画分、脂質、蛋白質、KOH 可溶画分と残渣のリン含量を Table 1 に示す。これからわかるように冷酸可溶画分と KOH 可溶画分のリン含量は他の画分のそれより高かつた。また冷酸

可溶画分中の無機リン酸も高かつたが、ここでは有機リン酸化合物について研究を進めた。一方、冷酸可溶画分の紫外部 260 nm における吸光度より計算した有機リン含量 [UV(260 nm)-Po] は冷酸可溶画分に存在している有機リンよりも少ないので、UV(260 nm)-Po から計算したモノスクレオチド以外の含リン有機化合物が存在していると推定した。そこでさらに冷酸可溶画分の分画を行なつた。ポリリン酸を分離した後、LePage (1949) の方法でさらに 3 つの画分、すなわち、バリウム塩として水不溶画分、水可溶画分とエタノール可溶画分を得た。Table 2 に示すように水不溶画分の有機リンはほかの 3 者より多く、また UV(260 nm)-Po よりも大きかつた。従つてバリウム塩として水不溶の画分を Cl 型 Dowex 1 によつてさらに分画した(後述)。一方、ポリリン酸の含量は普通の酵母菌のそれに類似しているが、細菌の増殖速度は酵母のそれより大きいので、ポリリン酸の生産にはこの菌を使用するのが有利であろう。水可溶画分には低分子の糖リン酸エステルがバリウム塩として存在しているが、水不溶画分中のそれより少ないので、さらに詳しい追求は行なわなかつた。

LePage (1949) によれば水不溶画分には ADP、

Table 1. Phosphorus contents of the intracellular phosphate compounds of *Brevibacterium* sp. strain A25R.

	Whole cells	Cold TCA soluble substance	Lipid	Protein	KOH soluble substance	Residue
P_i	35.47	18.46	1.07	0.73	16.16	1.83
$^{11}P_o$	24.01	7.00	1.07	0.73	15.52	1.83
Teichoic acid	0.38	—	—	—	—	—
$^{21}UV(260\text{ nm})-P_o$	—	1.88	—	—	6.41	—
$^{31}Non\ UV(260\text{ nm})-P_o$	—	5.12	—	—	9.11	—

unit: $\mu\text{g}/\text{mg}$ cells

$^{11}P_o = P_i - P_i$, 21 Determined by a standard curve of an alkali digested yeast RNA, 31 A difference between P_o and UV (260 nm)- P_o .

Table 2. Phosphorus contents of the phosphate compounds in the cold TCA soluble fraction (as Ba-salt).

	Water insoluble substance	Water soluble substance	Alcohol soluble substance	Polyphosphate
P_i	13.85	2.46	0.07	2.39
P_o	3.80	1.95	0.05	1.52
$^{11}4_7P_i$	2.17	0.14	0	1.00
UV (260 nm)- P_o	1.97	1.16	—	0.18

unit: $\mu\text{g}/\text{mg}$ cells

$^{11}4_7P_i = P_{i\text{HCl}, 100^\circ\text{C}, 7\text{min}} - P_i$.

F-1, 6-P, ATP などがバリウム塩として存在しているという。従つて Khyrn and Cohn (1953) の方法を用い、水不溶性画分の Dowex 1 (Cl 型) によるイオン交換クロマトグラフィーを行なつた結果、5つの画分が得られた (Fig. 2)。無機リン酸発色法 (Irving and Cosgrove, 1970) で Peak 1 を、紫外部 (260 nm) の吸収で Peak 2, 3, 4 を検出した。紫外部における吸収スペクトラム、Dubois *et al.* (1956) のフェノール・硫酸法と五炭糖検出のための Sumner (1923) のオルシノール・塩酸反応などの結果から、Peak 1 は無機リン酸、Peak 2~4 は核酸関連物質であることが分つた。これらについて標準物質の AMP, ADP, ATP との比較のもとで定性ならびに定量分析を行なつた。ペーパークロマトグラフィー (1 N 塩酸、沸とう水中で 1 時間分解後、デシケーターで減圧下塩酸を蒸発させたサンプルを用いた) の R_f 値 (Table 3)、紫外部における吸収スペクトラムの特徴 (Table 4)

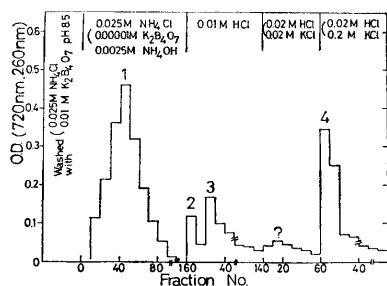


Fig. 2. Separation of the phosphorous compounds existing in water-insoluble fraction (as Ba-salt). Resin: Dowex 1 (chloride form), 200~400 mesh; fraction volume: 10 ml; flow rate: 1 ml/min.

から、Peak 2~4 の物質はアデニン、リボース、リンの 3 者を含んでいることがわかつた。この 3 者のモル比 (Table 4) から Peak 2 は AMP, Peak 3 は ADP, Peak 4 は ATP であることがわかつた。冷酸可溶画分に見出された AMP は、LePage (1949) によれば水可溶画分 (バリウム塩として) に属するはずであるから、分画の際混入してきたものと思われ、量的にも少なかつた。

(2) *Brevibacterium* sp. strain A25R 菌の ADP, ATP 含量および他菌株との比較

ATP の定量法に関する多くの報告では、ホタルの尾部より調製したルシフェラーゼが ATP と反応して生ずる蛍光の強さから ATP 含量を測定しているが、そのほかに紫外部 260 nm における吸光度とリンの定量からも ATP や ADP を定量している。本研究においては紫外部 260 nm の吸光度測定とリンの含量から標準物質との比較のもとで定量を行なつた。ADP, ATP 含量についてすでに報告された菌と比べて見た

Table 3. R_f values of the phosphate compounds in the water insoluble fraction (as Ba-salt).

	N-Base	Saccharide
Peak 1	—	—
Peak 2	0.50	0.50
Peak 3	0.50	0.50
Peak 4	0.50	0.50
Standard AMP	0.50	0.50
Standard ADP	0.50	0.50
Standard ATP	0.50	0.50
Standard A	0.50	—
Standard G	0.13	—
Standard C	0.12	—
Standard U	0.26	—

Table 4. The characteristics of the spectra and the molar ratios of the phosphate compounds in water insoluble fraction.

	Wave-length		E ₂₅₀ E ₂₆₀	E ₂₈₀ E ₂₆₀	Molar ratio ¹⁾		
	Max	Min			A	R	P
Peak 2	256	230	0.98	0.25	1.00	0.76	1.32
Peak 3	256	230	0.97	0.23	1.00	1.11	2.00
Peak 4	256	230	1.03	0.26	1.00	0.96	2.83
Standard AMP	258	228	0.94	0.23	1.00	1.40	1.12
Standard ADP	258	228	0.96	0.25	1.00	1.07	2.03
Standard ATP	258	228	0.94	0.23	1.00	1.15	3.26
Standard A	260	223	0.76	0.38			
Standard G	(248 272)	223	1.36	0.83			
Standard C	280	240	0.47	2.05			
Standard U	260	230	0.77	0.35			

¹⁾ A, adenine; R, ribose; P, phosphorus.

Table 5. ATP and ADP contents of various microorganisms.

Microorganism	ATP content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cells)	ADP content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cells)	Analytical method	Reference
<i>Aspergillus niger</i> (C. M. I. 41873)	2.84	0.81	Luciferase	Smith and Ng, 1972
<i>Escherichia coli</i> strain B	2.96	0.35	{Dowex 1, UV (260 nm)	Franzen and Binkley, 1961
<i>Aerobacter aerogenes</i>	2.0	—	Luciferase	Stranger <i>et al.</i> , 1963
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 4083	6.75 ¹⁾	—	Luciferase	Forrest, 1965
<i>Saccharomyces lactis</i>	0.91	—	³² P	Aldos and Lloyd, 1972
Algae	0.31~1.6	—	Luciferase	Holm-Hansen and Booth, 1966
<i>Brevibacterium</i> sp. strain A25R	3.41	2.4	{Dowex 1, UV (260 nm)	

¹⁾ in lag phase of growth.

ところ、本菌株では1例をのぞいてほかの菌のそれよりも高かった (Table 5).

ATP 含量を菌の増殖サイクルを通して見ると、一般に誘導期に最高で、対数増殖期にはいと減少し始め、定常期で最低になる。Table 5 に示す数値は本菌株の定常期におけるものである。その含量が基質 (n-パラフィンやグルコース) の種類と関係があるか否かは興味のある問題である。

2. KOH 可溶画分リン酸化化合物

(1) 分画

菌体内から氷冷した 10% トリクロル酢酸によって抽出されない有機リンとしては、RNA や DNA のほかに細胞壁〔原形質に存在しているとの報告 (Cummin, 1973) もある〕に存在しているタイコ酸も考えられる。タイコ酸もアルカリによつて抽出される (Archibald *et al.*, 1969) が、菌の種類によつて抽出されたり、されなかつたりする。著者らは Armstrong *et al.* (1960) の方法で得た本菌株からのタイコ酸がアルカリで沈降することを確認した。またアルカリ可溶画分にはペーパークロマトグラフィと Elson and Morgan (1933) の方法でタイコ酸の構成成分であるリピトール、グリセロール、N-アセチルグルコサミンは存在していないことがわかった。そこで RNA を分解して得たモノヌクレオチドの分離によく使われる Dowex 1 (Cl 型) 樹脂をリン酸化化合物の分離に使用した。サンプルを pH 8.5 に調節した後、カラムに流し水洗した。カラムに吸着されたリン酸化化合物は 0.002~0.006 N 塩酸で溶出し、紫外部 (260nm) の吸収で塩基を、フェノール・硫酸法で糖を、Irving and Cosgrove (1970) 法と Allen (1940) 法で無機リンと総リンを追跡した。その結果 Fig. 3 に示すように 6 つのピークが検出された。標準物質として CMP

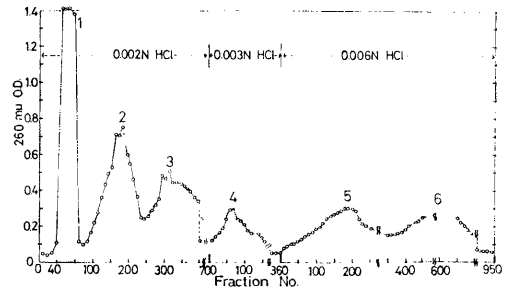


Fig. 3. Separation of the phosphorous compounds existing in KOH-soluble fraction which could be adsorbed on the resin of Dowex 1 (chloride form). Resin: Dowex 1 (chloride form), 200~400 mesh; volume: 10 ml; flow rate: 1 ml/min.

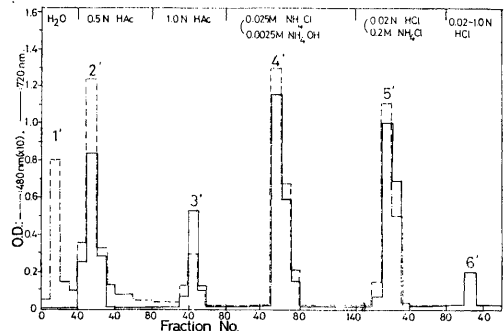


Fig. 4. Separation of the other phosphorous compounds which could not be adsorbed on the resin of Dowex 1 in chloride form. Resin: Dowex 1 (acetate form); volume: 10 ml; flow rate: 1 ml/min.

(2', 3'), AMP (2', 3'), UMP (2', 3') と GMP (2', 3') を用いた。またパン酵母 RNA を 0.3 N KOH, 37°C, 18 時間分解し、60% 過塩素酸で pH 8.5 に調節した後、同様な実験を行なったところ Fig. 3 に類似

した溶出パターンを得た。それぞれの画分の定性ならびに定量分析は(2)同定の項に述べる方法に準じた。

一方, Dowex 1 (Cl 型) 樹脂に吸着されないリン酸化合物は Dowex 1 (酢酸型) 樹脂によつて完全に吸着された。その溶出パターンを Fig. 4 に示す。

(2) 同定

リン酸化合物のうち, Dowex 1 (Cl 型) 樹脂に吸

着されたものは, Fig. 3 の各ピークの紫外部におけるスペクトラムの特徴 (Table 6), ペーパークロマトグラフィーによる塩基と糖の R_f 値 (Table 6) および溶出パターン (Fig. 3) を標準物質のそれらと比較したところ, Fig. 3 に示した各ピークの塩基はそれぞれ C, A, A, U, G, G であることがわかつた。これらのピークの糖成分の存在がトリプトファン・硫酸反応

Table 6. The characteristics of the spectra and the R_f values of the fractions of peak 1, 2, 3, 4, 5 and 6.

	Wave-length		E ₂₅₀ E ₂₆₀	E ₂₈₀ E ₂₆₀	R_f of N-base ¹⁾	R_f of sugar ²⁾
	Max	Min				
Peak 1	280	240	0.46	2.06	0.12	0.50
Peak 2,3	258	230	0.95	0.23	0.44	0.50
Peak 4	260	230	0.77	0.35	0.26	0.50
Peak 5,6	(248 271	223	1.38	0.80	0.13	0.50
Standard AMP (2', 3')	258	228	0.98	0.24	0.44	0.50
Standard CMP (2', 3')	280	240	0.47	2.05	0.12	0.50
Standard UMP (2', 3')	260	230	0.77	0.35	0.26	0.50
Standard GMP (2', 3')	(248 272	223	1.36	0.83	0.13	0.50

¹⁾ n-butanol-acetic acid-water (4: 1: 5). ²⁾ n-butanol-pyridine-water (6: 4: 2.5).

Table 7. The properties of the each fraction obtained from ion exchange chromatography. (part 1)

	Molish reaction	Molybdenum phosphate reaction	Phenol- H ₂ SO ₄ Max nm	Cu-Folin reaction	Ninhydrin reaction	Tryptophane H ₂ SO ₄
Peak 1	+	+	480	—	—	+
Peak 2, 3	+	+	480	—	—	+
Peak 4	+	+	480	—	—	+
Peak 5, 6	+	+	480	—	—	+
Peak 1'	+	—	483	+	±	+
Peak 2'	+	+	483	—	—	+
Peak 3'	+	+	488	—	—	+
Peak 4'	+	+	488	—	—	+
Peak 5'	+	+	488	—	—	+
Peak 6'	—	+	—	—	—	—

Table 8. Properties of the each fraction obtained from ion exchange chromatography. (part 2)

	Cys-H ₂ SO ₄ reac. ¹⁾		Elson- Morgan reac. ²⁾	Orcin- HCl reac. ³⁾	Cys- H ₂ SO ₄ reac. ⁴⁾	Carbazole H ₂ SO ₄ ⁵⁾	6-deoxy hexose	2-deoxy pentose, hexose
	Max wave- length	color						
Peak 1	390	P	—	+	—	—	—	—
Peak 2, 3	390	P	—	+	—	—	—	—
Peak 4	390	P	—	+	—	—	—	—
Peak 5, 6	390	P	—	+	—	—	—	—
Peak 1'	405	YB	—	+	—	—	—	—
Peak 2'	405	YB	—	+	—	—	—	—
Peak 3'	407	Y	—	—	—	—	—	—
Peak 4'	408	Y	—	—	—	—	—	—
Peak 5'	408	Y	—	—	—	—	—	—
Peak 6'	—	—	—	—	—	—	—	—

¹⁾ for detecting aldohexose. ²⁾ for detecting amino sugar. ³⁾ for detecting aldopentose.

⁴⁾ for detecting ketose. ⁵⁾ for detecting uronate. P: pink, Y: yellow, YB: yellowish brown.

(Badin *et al.*, 1953) によつて確認された (Table 7). さらにこれら糖成分はペーパークロマトグラフィーでは標準物質の CMP, AMP, UMP, GMP の糖と同一 Rf 値を示し (Table 6), フェノール・硫酸反応ではアルドペントースの特徴である最大吸収波長 480 nm を示し (Table 7), またシステイン・硫酸反応 (Dische, 1949) ではアルドペントースの特徴である最大吸収波長 390 nm とピンク色を示し, オルシノール・塩酸反応 (Sumner, 1923) も陽性 (Table 8) であつた. これらの結果から Peak 1~6 の構成糖はリボースであることがわかつた. これらのピークの以上の性質, カラムクロマトグラフィーの溶出パターン (Fig. 3) と塩基, リボース, リンのモル比の計算 (Table 11) から Peak 1~6 はそれぞれ CMP, 2'-AMP, 3'-AMP, UMP, 2'-GMP と 3'-GMP であることがわかつた.

一方, Dowex 1 (Cl 型) 樹脂に吸着されず, 酢酸型樹脂に吸着されたものは, Fig. 4 に示した6つのピークに紫外外部吸収がなく, 核酸関連物質ではないことがわかつたので, これらの画分についてさらに種々の定性実験を行なつた. モリブデン・リン酸反応 (Allen, 1940) フェノール・硫酸反応, 銅-Folin 反応 (Folin and Ciocalteu, 1927), Yemm and Cocking (1955) のニンヒドリン反応などの結果

(Table 7) から Peak 1' は少量の蛋白質がまじつてゐる糖質であり, Peak 2'~5' は糖リン酸エステルであり, Peak 6' は無機リン酸であることがわかつた. また Table 8 に示すように, 各種糖の呈色反応の結果から Peak 1'~5' の糖はアミノ糖, ケトース, ウロン酸, 6-デオキシ糖, 2-デオキシ糖ではないことが知られ, 一方 Dische (1949) のシステイン・硫酸反応 (アルドヘキソース定性定量法) の最大吸収波長が 407~411 nm を示したことからアルドヘキソースを含んでいることがわかつた. これらの画分に新鮮なパン酵母懸濁液をそれぞれ添加して 30°C, 2時間振とうし

Table 9. The utilization of the sugar component in each fraction by yeast cells.

	(Part 1)		(Part 2)	
	OD ¹⁾ (660 nm)		OD ¹⁾ (660 nm)	
	0 hour	2 hours	0 hour	2 hours
Peak 1' (sugar)	0.10	0.09	0.12	0.03
Peak 2'	0.05	0.03	0.07	0.01
Peak 3'	0.03	0.03	0.05	0.01
Peak 4'	0.26	0.27	0.70	0.32
Peak 5'	0.53	0.48	0.52	0.32

Part 1: Before hydrolyzing by 1 N HCl (100°C, 1 hr). Part 2: After hydrolyzing by 1 N HCl (100°C, 1 hr). ¹⁾ By using Somogyi-Nelson's method.

Table 10. Comparison of the sugar of each fraction obtained from ion exchange chromatography with the standard materials.

	Cysteine-H ₂ SO ₄ reaction				Phenol-H ₂ SO ₄ Max wave-length	R _f of PPC ²⁾	
	Max wave-length	Color ¹⁾	Max wave-length	Color		(1)	(2)
Glucose	411	Y	411	YG	487	0.36	0.37
Mannose	408	Y	407	Y	488	0.38	0.45
Fructose	411	YB	411	YB	483	0.36	0.47
Galactose	408	Y	(388 455)	G	488	0.31	0.46
Arabinose	390	P	390	P	480	0.39	0.56
Xylose	390	P	390	P	480	0.46	0.51
Ribose	390	P	390	P	480	0.50	0.61
Sorbitol Inositol Adonitol Mannitol	No reaction				—	—	—
Peak 1'	405	YB	405	YB	483	0.38	(0.54 0.45)
Peak 2'	405	YB	405	YB	483	0.38	(0.54 0.45)
Peak 3'	407	Y	406	Y	487	0.38	0.45
Peak 4'	408	Y	407	Y	487	0.38	0.45
Peak 5'	408	Y	407	Y	487	0.38	0.45

¹⁾ over a night, ²⁾ paper chromatography, samples were obtained after hydrolyzing by 1 N HCl at 100°C for 1 hour. (1): n-butanol-pyridine-water (6:4:2.5), (2): phenol-water (4:1). Y: yellow, P: pink, YB: yellowish brown, YG: yellowish green, G: green.

たところ各画分は酵母によつて消費されなかつた。しかし、各画分を1N塩酸で100°C, 1時間加水分解して遊離してきた糖は酵母によつて消費された (Table 9)。これらの各画分の構成糖は既知のアルドヘキソースであることがわかつた。ここで Peak 1'~5' の画分と標準物質との比較実験を行なつた。その結果を Table 10 に示す。Peak 2' の糖はオルシノール・塩酸反応が陽性で (Table 8)、ペーパークロマトグラフィーで2つのスポット (Table 10) があることからマンノースとアルドペントースが含まれていることがわかつた。Peak 3'~5' の糖はマンノースのみであつた (Table 10)。Peak 2'~5' のマンノースはリン1モルについてそれぞれ 3.1, 2.1, 1.5, 0.6 モルであつた (Table 11)。これらの糖リン酸は氷冷した10%トリクロロ酢酸で抽出できないばかりでなく、ドライアイス中で一夜菌体を処理した後も水によつては抽出できないことから菌体内低分子として存在するのではなく、マンノース系ポリサッカライドのリン酸エステル形で存在し、アルカリで部分分解をうけつつ抽出されるのではないかと推定される。また、このリン酸エステルは pH 4.0 以下で長時間 5°C の冷所に放置すると無機リン酸を放出した。Table 11 からわかるように本菌体内のリン酸化合物のうち、RNA について多いのはこのリン酸エステルであつた (Table 1 も参照)。また、このエステル含量は増殖サイクルにおける時期によつて異なつており、このエステルは一つの生理的活性のあるリン酸化合物と思われる。

Table 11. Molar ratios and phosphorus contents of each fraction obtained from ion exchange chromatography.

Fraction	Molar ratio				P content μg/mg cells
	UV (260 nm)	Phosphorus	Pentose	Manose	
Peak 1 (CMP)	1.0	1.0	0.9	—	1.89
Peak 2, 3 (AMP)	1.0	1.0	0.77	—	3.23
Peak 4 (UMP)	1.0	1.0	1.1	—	1.15
Peak 5, 6 (GMP)	1.1	1.0	1.0	—	3.05
Peak 1' (sugar)	—	—	—	—	—
Peak 2'	—	1.0	1.0	3.1	1.06
Peak 3'	—	1.0	—	2.1	0.56
Peak 4'	—	1.0	—	1.5	1.47
Peak 5'	—	1.0	—	0.6	1.35
Peak 6' (P _i)	—	1.0	—	—	0.15

要 約

Brevibacterium sp. strain A25R 菌の菌体内の冷酸可溶と KOH 可溶画分中に存在しているリン酸化合物について分画、同定した。冷酸可溶画分中に多く存在しているのは ATP (3.4 μg/mg cells) と ADP (2.4 μg/mg cells) であり、その含量はこれまで報告された菌のそれよりも高かつた。

KOH 可溶画分中には、RNA の分解に由来したモノヌクレオチド (CMP, AMP, UMP と GMP) のほかに、糖リン酸が存在していた。菌体内 RNA の含量はリンとして 9.32 μg/mg cells であつた。糖リン酸の含量はリンとして 4.4 μg/mg cells で RNA につぐ含量の多い菌体内リン酸化合物であつた。この糖リン酸は氷冷した 10%トリクロロ酢酸で抽出できないが、アルカリによつて分解を受けつつ抽出されるような生理的活性のあるマンノース系ポリサッカライドのリン酸エステルではないかと推定した。

文 献

- Aldos, B. and R. F. Lloyd 1972 Quantitative extraction and estimation of intracellular nucleoside triphosphate of *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.*, **45**: 24-32
- Allen, R. J. L. 1940 The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, **34**: 858-865
- Archibald, A. R., H. E. Coapes and G. H. Stafford 1969 The action of dilute alkali on bacterial cell walls. *Biochem. J.*, **113**: 899-900
- Armstrong, J. J., J. Baddiley and J. G. Buchanan 1960 Structure of the ribitol teichoic acid from the walls of *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.*, **76**: 610-621
- Badin, J., J. Clifford and M. Schubert 1953 Improved method for determination of plasma polysaccharides with tryptophan. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **84**: 288-291
- Bock, R. M., N. S. Ling, S. A. Morell and S. H. Lipton 1956 Ultraviolet absorption spectra of adenosine-5'-triphosphate and related 5'-ribonucleotides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **62**: 253-264
- Cummin, C. S. 1973 Bacterial cell wall structure. In "Microbial Composition," ed. by A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, CRC Press, New Jersey, pp. 167-200
- Dische, Z. 1944 Two characteristic and sensitive color reaction between sulfhydryl compounds and thymonucleic acid. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **55**: 217-218

- Dische, Z. 1949 Spectrophotometric method for the determination of free pentose and pentose in nucleotides. *J. Biol. Chem.*, **181**: 379-392
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robert and F. Smith 1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356
- Elson, L. A. and W. J. J. Morgan 1933 A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.*, **27**: 1824-1828
- Folin, O. and V. Ciocalteu 1927 On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, **73**: 627-650
- Forrest, W. W. 1965 Adenosine triphosphate pool during the growth cycle in *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*, **90**: 1013-1018
- Franzen, J. S. and S. B. Binkley 1961 Comparison of the acid-soluble nucleotides in *Escherichia coli* at different growth rates. *J. Biol. Chem.*, **236**: 515-519
- Holm-Hansen, O. and C. R. Booth 1966 The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.*, **11**: 510-519
- Irving, G. C. J. and D. J. Cosgrove 1970 Interference by myoinositol hexaphosphate in inorganic orthophosphate determinations. *Anal. Biochem.*, **36**: 381-388
- Khym, J. X. and W. E. Cohn 1953 The separation of sugar phosphates by ion exchange with use of the borate complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**: 1153-1156
- Kuroiwa, Y. and K. Nakagawa 1962 Determination of polyphosphate and nucleic acids in yeast. *Rep. Kirin Brew. Co.* (5): 41-48
- LePage, G. A. 1949 Methods for the analysis of phosphorylated intermediates. In "Manometric Techniques and Tissue Metabolism", 2nd ed., ed. by W. W. Umbreit *et al.*, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, pp. 185-197
- Smith, J. E. and W. S. Ng 1972 Fluorometric determination of glycolytic intermediates and adenylates during sequential changes in replacement culture of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*, **18**: 1657-1664
- Stranger, R. E., H. E. Wade and F. A. Dark 1963 Effect of starvation on adenosine triphosphate concentration in *Aerobacter aerogenes*. *Nature*, **199**: 55-57
- Sumner, J. B. 1923 The detection of pentose, formaldehyde and methyl alcohol. *J. Am. Chem. Soc.*, **45**: 2378-2380
- Yemm, E. W. and E. C. Cocking 1955 The determination of amino acid. *Analyst*, **80**: 209-213

Summary

A newly isolated *Brevibacterium* sp. strain A25R, contained about 3.3~3.7% of phosphorous compounds within cells which were significantly high as compared with those of common bacteria. Especially, the phosphorus contents of the cold acid-soluble fraction and the KOH-soluble fraction were found to be higher than those of ordinary bacteria. In the cold acid-soluble fraction, the contents of ATP and ADP were about 3.4 and 2.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ -cells, respectively. A kind of phosphate ester of polysaccharide, phosphomannan, which could not be extracted by cold trichloroacetic acid (10%), was the main phosphorous compounds existing in the KOH-soluble fraction except for the mononucleotides originated from the decomposition of ribonucleic acid by KOH. The content of the phosphate ester was about 4.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ -cells (as phosphorus), while the content of ribonucleic acid was about 9.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ -cells.