OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	クロカビの酸性プロテアーゼ優先合成の生理学的および動力学的研究
Author(s)	新名, 惇彦
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1796
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

クロカビの酸性プロテアーゼ優先合成の生理学的および動力学的研究

新名惇彦

まえがき

この研究は大阪大学大学院工学研究科に在学中、醗酵工学教室において、恩師照井堯造先生の御指導のもとに行なったものである。

この20年の間に微生物の増殖、蛋白質合成の機構、および調節メカニズムの研究は、とくに細菌において著るしい発展を遂げ、無細胞系における蛋白質合成の成功も多数報告されている。

しかし、それらを基礎とした酵素生産の速度論研究は未だ不十分である。

一方、この間に微生物の生産するプロテアーゼについても、多数のプロテアーゼの発見、生産性の高い菌株の分離が行なわれ、プロテアーゼ源を従来の動植物よりも、微生物に求める方が、工業的に明らかに有利であることが認識されている。

この研究では誘導酵素である酸性プロテアーゼ生産力の高いクロカビ *Aspergillus niger* のアデニン要求変異株を用い、特徴的な優先合成（*preferential synthesis*）の要因を追求し、また有効な誘導物質（*inducer*）の検索を行ない、酸性プロテアーゼ生産を生理学的、動力学的に解析し、微生物生理の解明、工業的応用への基礎的知見を得ることを目的とした。ここに省みるとき、まだ究められねばならない問題が多数残されており、今後もその解明に努力する所存である。

この研究を行なうにあたり、終始御指導を賜った恩師照井堯造教授、はじめ寺本四郎教授、芝崎勲教授、田口久治教授、岡田弘輔助教授、冨浦久矣衛助教授、岡崎光雄博士、高田信男先生、ならびに教室員の方々に厚く感謝致します。

また、研究の便宜をはかって戴いた宮道慎二、本田建次の両氏に深謝致します。

1969年 12月　　著 者

目　　次　　頁

緒　　論　1

第１章　酸性プロテアーゼの性質　ならびに
単一性　7

第１節　緒　　言　7

第２節　実験材料および方法　8

第３節　実　験　結　果　11

1. 酸性プロテアーゼの性質　11

2. 生産酸性プロテアーゼの単一性　13

第４節　考　　察　17

第５節　要　　約　19

第２章　酸性プロテアーゼ生産の培養条件の
検討　ならびに誘導物質の検索　20

第１節　緒　　言　20

第２節　実験材料および方法　21

第３節　実　験　結　果　23

1. 培地条件および培養経時変化　24

2. 酵素生産期における菌体生理の検討　25

3. 増殖期におけるペプトン存在の意義　27

4. 誘導物質の検索　28

5. 増殖相，酵素生産相に対する環境因　33

子の影響
第４節　考　察　35
第５節　要　約　37

第３章　酸性プロテアーゼ mRNA の安定性ならびに生産の速度論的解析　38
第１節　緒　言　38
第２節　理　論　39
第３節　実験材料および方法　40
第４節　実験結果　41
1. 酵素生産のアクチノマイシンDによる阻害実験　41
2. 酵素生産相におけるRNAのturn-over 合成　44
3. 動力学モデルへの適合性　45
第５節　考　察　47
第６節　要　約　49

第４章　酸性プロテアーゼの induction と repression に関する動力学的検討　50
第１節　緒　言　50
第２節　実験材料および方法　51
第３節　実験結果　52
1. Induction, deinduction におけ

るアデニンの効果 52
2. ペプトンによる induction lag の要因について 54
3. アジピン酸などの inducer による induction pattern 58
第4節 考察 60
第5節 要約 61

第5章 菌糸の活性分布に関するミクロ的解析 63
第1節 緒言 63
第2節 実験材料および方法 64
第3節 実験結果 66
1. Hanging-drop culture による菌糸増殖の顕微鏡観察 66
2. オートラジオグラフィーによる菌糸の核酸取り込み，合成活性の分布 68
第4節 考察 72
第5節 要約 73

総括および結論 74

文献 78

緒　　論

醗酵プロセスは古くGale, Stodolaらによって反応型により分類されたが,[1,2] 工学的，経験的には増殖と目的生産物の蓄積が平行するgrowth-associated型と，生産が増殖と分離しているnongrowth-associated型に分けられ，Gaden[3,4]はこの2型の中間型を加え，3型に分類している。

Nongrowth-associated型に属するものに，多くの菌体外分泌酵素生産，アミノ酸醗酵，抗生物質生産などがあり，この型の生産の研究は，細胞活性の質的変化という，細胞の代謝制御（いわゆる細胞分化）の解明という点において，非常に意義深いものである。またプロセス制御の面からは，培養相により異った制御方式を設定し，生産物の蓄積を最大にすることが，工業的に重要な課題である。

言うまでもなく醗酵生産は，関与する代謝反応が非常に多様かつ複雑である。生命の本質が遺伝子に存在する以上，酵素生産は，既定遺伝子の支配作用系での醗酵生産の研究という観点からは，アミノ酸，有機酸などの生産に比べ，遺伝子のより直接的産物であるという点において，有効な研究対象である。

蛋白質生成に核酸が関与することは，1941年Caspersson ら[5]によって指摘され，その後Gale,[6] Spiegelman,[7]

Zamecnik 一派[8),10)]により具体的，化学的にその関係が明らかにされると共に，1961年のJacob, Monod[9)]によるオペロン説の発表以来，蛋白合成に関する知見は目覚しい発展を遂げた。オペロン説を中心に，Pardeeら[11)]による誘導酵素合成の調節メカニズムによれば，DNA（デオキシリボ核酸）からmRNA（伝達リボ核酸）の転写（transcription）レベルにおいて，調節遺伝子（regurator gene）からつくられたrepressor蛋白は構造遺伝子（structure gene）を支配する作用遺伝子（operator gene）と親和性をもち，対応するmRNAの形成を阻止する。この現象をrepressionと呼ぶ。あるいは調節遺伝子の産物はそれ自身活性のないaporepressorでこれはcorepressorと作用してrepressorをつくる。Inducerはrepressorと結合して不活性化し，あるいはcorepressorと拮抗するためにoperatorの働きを許し，mRNAの合成を行わせしめる。この現象をinductionと呼ぶ。

このようにしてDNA上に組み込まれた情報はmRNAに転写され，mRNAのもつ情報はリボソーム上で解読され，tRNA（transfer RNA）によって運ばれたアミノ酸によりペプチド合成が行なわれる。この一連の蛋白合成の機構は遺伝子解析，無細胞系での多数の実験により支持されており[12,13)]，repressor蛋白の分離，代謝回転の速いmR

NAの存在[14-18]，アミノ酸コードの決定[19-21]，リボゾーム上でのペプチド合成の開始[22,23]と終了[24-27]の機構に関する知見など，多くの実験結果が報告されており，DebrisとZubay[28,29]は無細胞系においてDNAを出発とするβ-ガラクトシダーゼの一部を合成することに成功した。これらはほとんどが細菌に対して得られた知見であるが，かびの無細胞系での蛋白合成も最近報告されている[30-32]。

これらの知見を基礎として，醗酵生産を律速段階を設定して，動力学的に解析することは醗酵動力学の重要な課題であると考えられる。

既述のように，醗酵生産は対象とする生物があまりに複雑性，多様性を有するため，その定量的取り扱いは困難であるが，動力学的アプローチの方法として，1つは系全体に対し，種々のパルスを与え，得られた応答により，経験的に反応系を一般化して捉える方法があり，さらに別の方法としては本論文で述べるように，生物系の反応を詳しく解析し，律速段階によって反応プロセスを体系化することが考えられる。後者の場合，生理学的解析方法はできるだけ変数を少なくし，系を単純化して行なうべきで，無細胞系における解析はよい例である。しかし無細胞系，或いは単純な系で得られた結果が細胞全体として，培養系として有機的に再構成された時に，そのまゝあてはまるか否かは念頭に置かねばならない。

かびのプロテアーゼは我国においては古くより醸造において、経験的に利用されて来たが，本格的に研究が始まったのは20年程前からである。かびのプロテアーゼ生産については従来は麹，大豆粉などを用いる固体培養が採用されていたが，最近は液内培養においても生産性が高いことが認められ，生産性を高めるための培地組成，培養条件の検討は多くの研究者により成されている。しかしプロテアーゼの酵素学的，生化学的研究に比べ，生産の生理学的，動力学的研究は未だ不十分である。

Monod ら[33]は全細胞蛋白の合成に対する酵素生成量の比が一定の場合を differential synthesis，一定でないものを preferential synthesis（優先合成）と定義している。照井ら[34]は酵素生成の律速段階を mRNA 濃度にあるとの仮定のもとに preferential synthesis の速度論的解析を行ない，Aspergillus niger U20-2-5 のグルクアミラーゼ生産[35]，Bacillus subtilis のα-アミラーゼ生産[36,37]について生理学的研究とも合わせ報告している。

本論文においては誘導酵素である酸性プロテアーゼが典型的な preferential synthesis 型を示す Aspergillus niger のアデニン要求株を材料として preferential synthesis の要因について生理学的，動力学的研究を行なうと共に，誘導物質の探索，induction - repression の機構につ

いても動力学的解析を試みた。

第1章では *Aspergillus niger* D20-2-5 の酸性プロテアーゼの *preferential synthesis* の生理学的，動力学的研究の基礎となる酸性プロテアーゼの2,3の性質を調べ，さらに精製を行ない，培養中における安定性，単一性について検討を加えた。

第2章では酸性プロテアーゼ生産培地，とくに窒素源について検討すると共に，有効な誘導物質の検索を行なった。培養経時変化より *nongrowth-associated* 型であることを認め，増殖停止の酵素生産期の菌体生理を解析し，酸性プロテアーゼ生産が酵素蛋白の *de novo* 合成であるか否かについて実験を行なった。さらに *nongrowth-associated* 型を示す培養における環境条件の影響を増殖相，酵素生産相に対して検討した。

第3章では前章で酸性プロテアーゼ生産が *preferential synthesis* 型であることを認めたので，その要因と考えられる *mRNA* の安定性についてアクチノマイシンDによる阻害実験により調べた。さらに非増殖相での *RNA* の *turnover* についても検討を行ない，*mRNA* 濃度を律速段階とする動力学モデルへの適合性について検討した。

第4章では *preferential synthesis* の要因の1つである増殖による *repression* について，菌体の履歴性の点

から 2.3 検討を加えた。またすぐれた誘導効果を示したペプトンによる *induction lag* の要因について解析すると共に，アジピン酸などによる *induction* と比較し速度論的解析を行なった。

第5章では液体培養でパルプ状に発育した菌糸の活性分布について顕微鏡による菌糸増殖の観察と，放射性核酸の取り込みなどをオートラジオグラフィーにより調べ平均令を用いる動力学の妥当性について考察した。

第1章　酸性プロテアーゼの性質ならびに単一性

第1節　緒　　言

自然界にはプロテアーゼはその対象となる基質の種類の多さ故に，多種多様存在し，その系統立った分類は確立しておらず，作用pH，活性中心の性質などにより分類されている。動植物起源のプロテアーゼは古くから研究されて来たが，微生物プロテアーゼの研究が盛んになったのは20年来のことである。

かびのプロテアーゼに関しては1950年Crewtherら[38]がAsp. oryzaeの液体表面培養の沪液から初めてプロテアーゼの結晶化に成功した。その後多くの研究が進み，吉田ら[39-41]は黒コウジ菌の一群が強力な耐酸性プロテアーゼを生産することを発見し，Asp. saitoiの酸性プロテアーゼを結晶化した[42]。篠山，杉田ら[43,44]は米麹中に，中西[45-48]はタカジアスターゼ中に酸性プロテアーゼの存在を認めた。鈴木ら[49-51]，松島[52,53]は至適pHがこれらより少し高い弱酸性プロテアーゼの存在を認め，その後今日に至るまでAspergillus属，Penicillium属，Rhizopus属などによる酸性プロテアーゼの生産が多数報告されている。

吉田[39]はかびのプロテアーゼ生産菌を作用pHに基づいて酸性型，アルカリ性型に2分し，松島[53]は4群に分類

している。Koaze ら[54]，Tomonaga ら[55] は Asp. niger の培養液中に，辻田[56] はタカジアスターゼ中に2種の酸性プロテアーゼの存在を認め，同一菌株でも数種のプロテアーゼを生産し，これらは培地組成，培養条件により変化することが知られている。

本章においては Asp. niger の アデニン要求株 U20-2-5 の液体培養で生産される酸性プロテアーゼの性質を調べると共に，精製を行ない，その種類を異なった培養時間について検討し，今後の生産の生理学的，動力学的研究を行なうための基礎的知見を得ることを目的とした。

第2節　実験材料および方法

使用菌株：　当教室で純粋分離した Aspergillus niger U 20 の紫外線照射により得たアデニン要求性，color mutant (cinnamon) 2-5 株[57] を使用した。本菌株はプリン塩基合成系路の IMP (inosine monophosphate) 以前の段階で欠落していることが知られている。[58] Asp. niger のアデニン要求株は当教室で分離した5

第1-1表　Asp. niger U20-2-5 の AICA-riboside 塩酸加水分解物による増殖

Substances added	Mycelia (ml packed volume/10 ml)
none	0
AICA-riboside (1000 μM)	0
AICA-riboside (1000 μM) hydrolizate	1.6
Adenine (500 μM)	3.2

培地 II (第2章) のアデニンを上記のものに代えた。(100時間培養)

株すべてGMP(guanosine monophosphate)からIMPへの系路を欠いていることから，この段階の酵素の欠落はAsp. niger においてかなり一般的なようである。プリン塩基合成系路のIMPの手前の物質はAICAR(5-amino-4-imidazole carboxamide ribotide)である。本菌株はAICA-riboside では増殖しないが，AICA-riboside の塩酸加水分解物はAICAを含んでおり[59,60]，これを加えると増殖が認められた。(第1-1表) なおAICARはAICAから一段の反応で形成されることが報告されている[61]。したがって最小培地にグアニン単独添加では増殖せず，増殖制限基質としてアデニン，またはIMPを使用した。

培地組成： 酸性プロテアーゼ生産の基本培地組成は第1-2表に示す通りである。胞子接種による培養ではペレット形成を防ぐため，グルコースの代りに馬鈴薯デンプンを使用した。

第1-2表 基本培地組成

グルコース(馬鈴薯デンプン)	15 %
ペプトン	3
酵母エキス	0.7
KH_2PO_4	0.4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01

水道水， 初発 pH 4.6

培養方法： 培養は500 ml容Erlenmeyerフラスコに実容100 mlにて30°Cでロータリーシェーカー(回転速度120 rpm, 回転半径4 cm)により振盪培養を行なった。

酵素活性の測定：　酸性プロテアーゼ活性の測定はAnson-荻原法[62,63]によった。ここで基質はヘモグロビンの代りにHammarstenミルクカゼインを用い，pHは0.1M乳酸-乳酸ナトリウム緩衝液にて2.8に調整した。反応は40°Cで行ない，所定時間反応後0.4Mトリクロル酢酸を添加し反応停止後，生じた沈殿物を東洋沪紙No.5Bで沪過し，沪液をFolin法[64]にて発色させ660mμの吸光度を測定した。酸性プロテアーゼ力価1単位は上記反応条件下にて1分間当り遊離チロシン1μg相当を生じせしめる酵素力価とした。

pHの測定：　pHはガラス電極（TOA electronics Ltd., Japan Type HM5A）で測定した。培養についてはpH試験紙（東洋沪紙）を用いた。

蛋白質量の測定：　蛋白量はBeckman DB spectrophotometerにより280mμの吸光度を測定した。

ゲル沪過：　セファデックスG75，G100，G200による3ゲル沪過のうち，G100が最も分離が良かった。カラムへのゲルの充填は直径2cm，高さ90cmで，操作は全て0.02Mクエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 3.6）中にて4±2°Cで行なった。

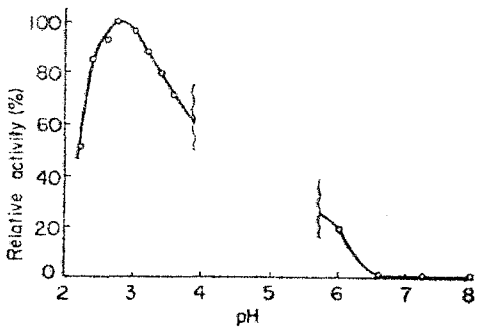
等電点電気泳動：　Ampholineカラム（容量110ml，スウェーデンLKB社）を用い，pH勾配形成はAmpholine carrior ampholites（pH 3～6）を用い，勾配は庶糖濃度の

変化により維持した。陽極液には0.2 mlリン酸，14 ml 蒸留水，12g 庶糖の混合液，陰極液には 0.3 mlエチレンジアミン，10 ml 蒸留水を用いた。泳動はカラム充填後，最初24時間 300 V で pH 勾配を形成し，その後 30分毎に 100 V ずつ 700 V まで電圧を上げ，700 V にて 24時間保ち泳動を行ない，終了後カラム底部より滴下させ 2ml ずつ分画した。操作温度は 2±1°C であった。

第3節 実験結果

1. 酸性プロテアーゼの性質

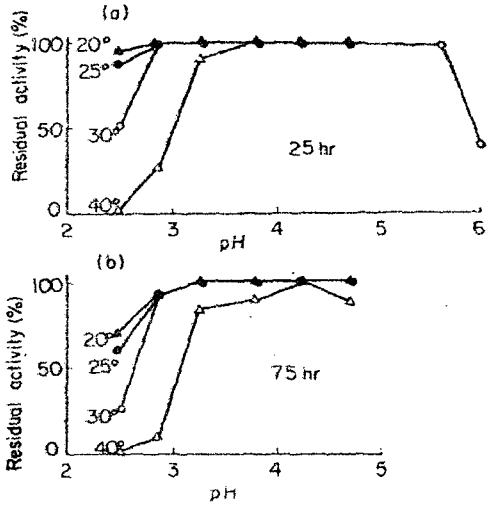
培養，測定など実験操作の面から，基本培地で 96 時間培養した培養沪液についてプロテアーゼの性質を検討した。酵素液の pH は McIlvaine 緩衝液（0.1M クエン酸 - 0.2 M Na_2HPO_4）で調節した。活性と pH の関係は第1-1図に示すように 40°C，30分の反応では pH 2.8 に鋭い最大活性のピークを示す。種々の pH における酵素の安定性は第1-2図に示すが，30°C においては pH 3～5 で長時間安定であること



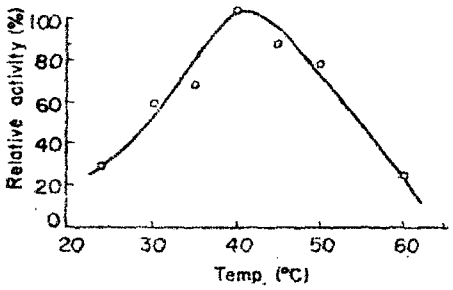
第1-1図. pH に対する酸性プロテアーゼの活性（40°C, 30分）

を示している。この実験においては防腐剤としてトルエンを添加した。

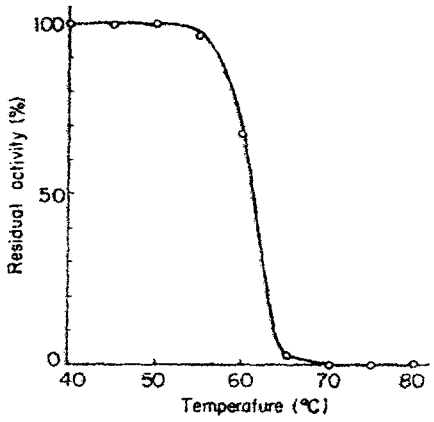
pH 3での各温度における酵素の活性は第1-3図に示すように30分反応では40°C付近に最適温度を有する。



第1-2図. 酸性プロテアーゼの種々pH, 温度における安定性



第1-3図. 温度に対する酸性プロテアーゼの活性 (pH 3.0, 30分)



第1-4図. 酸性プロテアーゼの熱失活曲線 (pH 5, 10分加熱)

第1-4図にはpH 5.0における熱失活曲線を示す。60°Cを越えると急激な失活が認められた。

以上の結果から培養中の酸性プロテアーゼは非常に安定で, かつ単一酵素しか存在しないことが示唆されたが,

つぎに培養沪液からの酸性プロテアーゼの精製結果について述べる。

2. 生産酸性プロテアーゼの単一性

酸性プロテアーゼの精製手順は第1-3表に示す通りである。

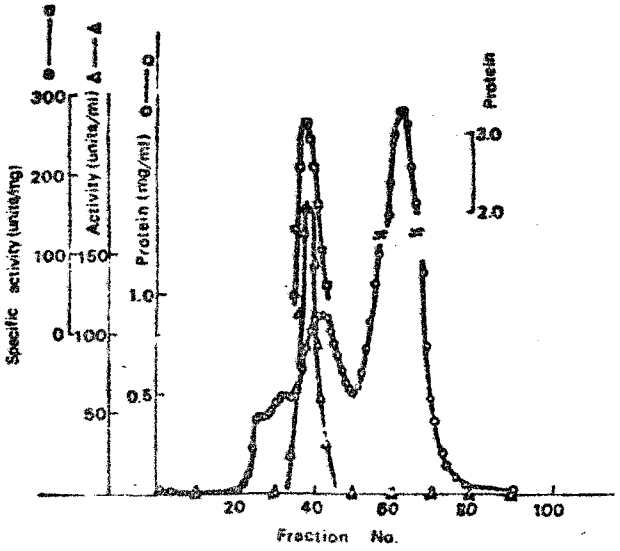
第1-3表　酸性プロテアーゼ精製過程

培養沪液
↓
透　　析（一夜，4°C）
↓
減圧濃縮（< 40°C）
↓
透　　析（一夜　4°C）
↓
アセトン 70% 沈殿
↓ ..... 0.02M クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.6)に溶解
セファデックス G-100 ゲル沪過
↓
等電点電気泳動

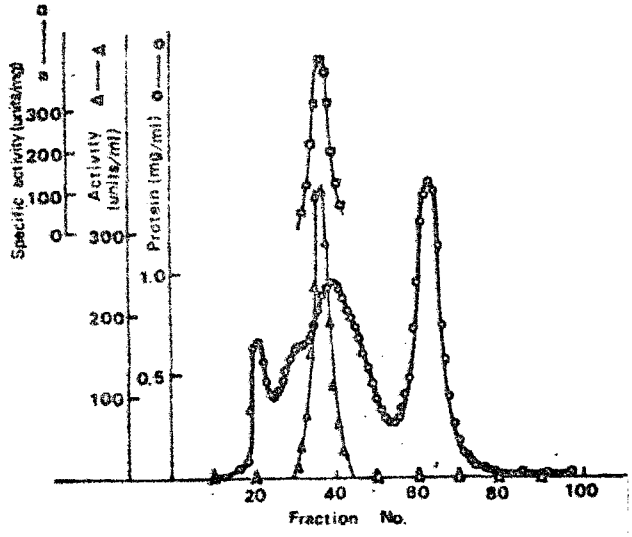
培養時間の経過と共に，生産酵素の質的変化が起る例も報告[65]されており，培養早期（43時間）および後期（96時間）の培養沪液について比較検討を行なった。

アセトン沈殿においては70%（容量）にてプロテアーゼ活性はほぼ完全に沈殿区分に移行し（第1-4表参照），この段階まで培養液中のプロテアーゼ活性は高収率で回収された。

43時間および96時間培養沪液より得た70%アセトン

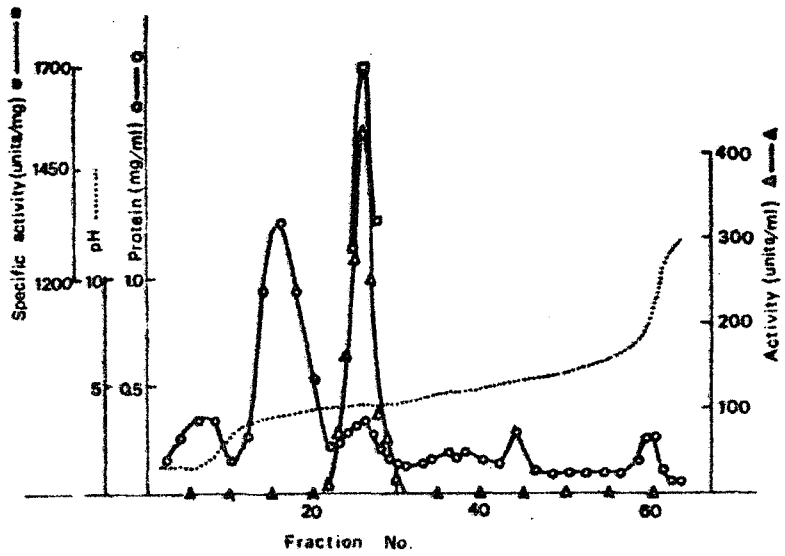


第1-5図. 43時間培養沪液のアセトン沈殿区分のセファデックスG100による分画

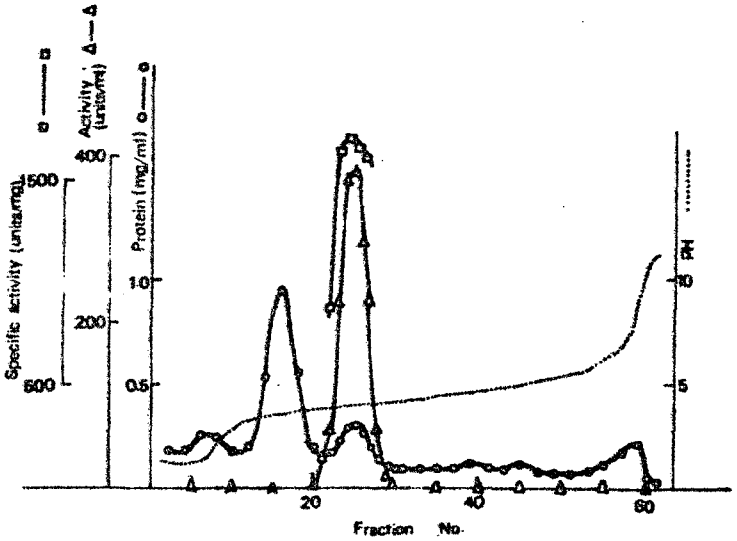


第1-6図. 96時間培養沪液のアセトン沈殿区分のセファデックスG100による分画

沈殿区分のセファデックスG100ゲル沪過の溶出曲線をそれぞれ第1-5図，第1-6図に示す。蛋白質の溶出曲線は両図において少し異なり，分画番号65付近の大きなピークはペプトンであることが確認された。プロテアーゼ活性はいずれの場合も40番付近に単一の鋭いピークを示した。しかしまだ不純な蛋白質が多く混在しているため，この活性区分を集め，減圧濃縮後，等電点電気泳動を行なった結果を第1-7，1-8図に示す。



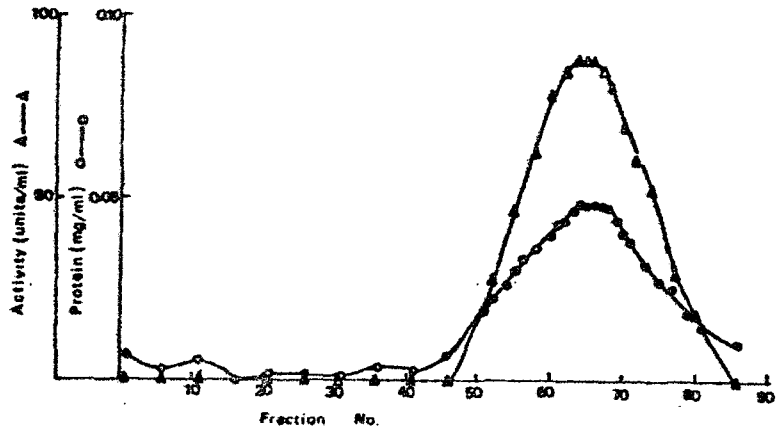
第1-7図. 43時間培養セファデックス分画活性区分の等電点電気泳動パターン(第1-5図の36-41区分)



第1-8図. 96時間培養セファデックス分画活性区分の等電点電気泳動パターン(第1-6図の34-39区分)

両図ともよく類似したパターンを示し, pH 4.0 にていずれ

単一の鋭い活性ピークを示し，かつ蛋白質のピークともよく一致した。この区分のセファデックスG100による再クロマトグラフィーの一例を第1-9図に示す。蛋白質，活性のピークは類似のパターンを示し，比活性は約1700単位/mg蛋白質であった。

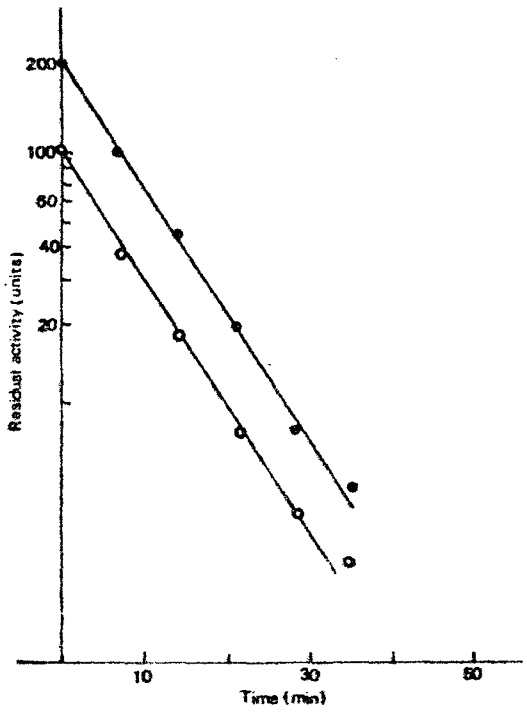


第1-9図　等電点電気泳動活性区分のセファデックスG100による再クロマトグラム

第1-4表　酸性プロテアーゼ精製の要約

Processes	Early phase				Later phase			
	Protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Culture filtrate	23700	54200	2.3	100	20800	175000	8.4	100
Dialysate	4400	43900	10.4	81	4500	173000	38.0	99
Condensed enzyme solution	4100	42000	10.1	78				
Dialysate	2200	43400	19.8	80				
70% acetone ppt.	1760	41700	23.7	77	2600	159000	62.0	91
Seohdex G100 fraction	253	39600	268*	73	175	119000	425*	68
Electrophoresis fraction	34	29300	1700*	54	15	96300	1700*	55

* : Values are datas of maximum points.



第1-10図　部分精製酸性プロテアーゼの熱失活（61°C）
o——o　アセトン70%沈殿区分
●——●　セファデックスG100活性区分

以上の精製段階における活性，蛋白量，収率を第1-4表に要約した。培養早期，後期のもの共に各操作段階で大きな活性の低下は認められず，高収率（55%）で高度に純粋な酸性プロテアーゼが得られた。

アセトン沈殿区分とセファデックスG100ピークの酸性プロテアーゼの61°Cにおける熱失活を第1-10図に示すが，いずれも一分子的失活を示し，勾配もほぼ同じであった。

第4節　考　　察

Asp. niger U20-2-5 の基本培地での培養において培養液中に蓄積される酸性プロテアーゼの安定性，単一性について考察すると，30°Cにおいて pH 3~5 では長時間安定で

あることから，培養中に生産された酵素の失活はないものと考えられる。至適 pH，pH および熱安定性の曲線より培養液中の酸性プロテアーゼは一種類しか存在しないことが示唆された。さらにアセトン沈殿，セファデックス G100 によるゲル沪過，等電点電気泳動などの精製により，この事は実験的に強く支持された。等電点電気泳動により得られた酸性プロテアーゼの比活性は約 1700 単位/mg 蛋白質で，これは既報の　かびの酸性プロテアーゼの精製品の比活性と比べ大差ない値で，高収率で（55%）高度の純品が得られた。なお分子量既知のプロテアーゼと共存下でのセファデックス G100 溶出パターンより本酵素の分子量は約 40,000 と推定された。

培養時間の異る培養沪液からの精製パターンは非常によく類似していることから，用いた培養条件下では培養期間を通じて一種類の酸性プロテアーゼが生産されていると結論される。培養 pH により生産プロテアーゼが変化することが知られているが，本培養の pH の変動は 4.6～3.4 であり，さらに高い pH での培養については今後検討したい。

ここで得られた結果は *Asp. niger* U20-2-5 による酸性プロテアーゼ生産の生理的，動力学的解析において好都合な事実である。

第5節　要　　約

1. *Aspergillus niger* U20-2-5 が基本培地で生産する酸性プロテアーゼの至適 pH は約 2.8，温度は 40°C であり，30°C においては pH 3~5 の間で長時間安定であり，60°C 以上では急速に失活する。

2. 培養沪液のアセトン沈殿，セファデックス G100 ゲル沪過，等電点電気泳動による酵素精製の結果，培養期間を通じて培養沪液中には一種類の酸性プロテアーゼしか認められなかった。精製の結果，比活性は約 1700 単位/mg 蛋白質まで上昇し，ほぼ単一蛋白質まで精製された。

3. 酸性プロテアーゼの等電点は 4.0，分子量は約 4 万であった。

第2章　酸性プロテアーゼ生産の培養条件の検討ならびに誘導物質の検索

第1節　緒　　言

プロテアーゼ生産培地には有機窒素源とくに蛋白質，ペプトンが一般に用いられている。Crewther ら[66]は無機窒素源でも生産される菌株を分離し，Tomonaga ら[55,67,68]は *Asp. niger* がペプトン培地でよく酸性プロテアーゼを生産するが，硫黄源培地から除くと別の酸性プロテアーゼが生産されることを認めている。プロテアーゼの誘導機構に関しては実体はほとんど不明で，系統的な *inducer* の検索も行なわれていない。塩田ら[69,70]は麹体麹のプロテアーゼ生産に対して，福本ら[71,72]は *Bacillus subtilis* のアルカリプロテアーゼ生産に対して酸素呼吸に伴うエネルギーの必要性を認め，グルコースは菌体増殖に有効なため，プロテアーゼ生産には阻害的に働くと報告している。合成培地でのプロテアーゼ生産には亜鉛の必要性が *Asp. oryzae*, *Asp. niger* で認められており[73-75]，安井[75]は生産段階での亜鉛の必要性を報告している。

一般にプロテアーゼ生産は *nongrowth-associated* 型であるが，使用菌株は培地の選択により酸性プロテアーゼ，グルクアミラーゼ[58]，α-アミラーゼ[76]，セルラーゼ[77]，ペクチナーゼなど多くの分泌酵素を誘導的に生産し，いずれも *nongrow-*

th-associated 型を示す。岡崎ら[52,78,79]はグルクアミラーゼの preferential synthesis について詳細な検討を行ない，その要因に増殖期の repression，mRNA の安定性，非増殖期での RNA の turnover があることを認めた。

菌体の増殖に対して分泌酵素の培地中への蓄積が遅れる nongrowth-associated 型の生産において，これが前駆体の活性化，分泌の遅れなどが原因か，真に酵素蛋白質の合成が遅れている preferential synthesis なのかは重要な問題である。このような現象については代謝物質のアナログ，蛋白合成阻害剤などを用いた解析例が多くある。

本章においては酸性プロテアーゼ生産に適する培地組成，とくに窒素源について検討を加え，ついで生産型が nongrowth-associated 型を示すことに注目し，これが酵素蛋白の de novo 合成であるか否かについて実験を行なった。また酸性プロテアーゼは典型的な誘導酵素であるので，inducer についてその作用レベルはともかく，生産に有効な物質の検索を行なった。さらに酸性プロテアーゼ生産に好適な培養条件について若干の検討を行ない，nongrowth-associated 型の培養管理について考察した。

第2節　実験材料および方法

培地組成：　基本培地組成は前章に示したが，合成培地は

主に3種類用い，その組成を第2-1表に示す。

第2-1表　合成培地組成

	培地I	培地II	培地III
グルコース	7 %	7 %	5 %
ペプトン	2	—	—
$NaNO_3$	—	2	0.5
KH_2PO_4	0.4	0.4	0.4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	0.05	0.05
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05	0.05	0.05
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	0.01	0.01
アデニン	0~1mM	0~1mM	100μM

初発 pH 4.6

培養方法：　前章に準じたが，フラスコは100mℓ容のものも用い，実容20mℓで行なった。種々温度における培養は恒温振盪槽を使用した。

酵素活性の測定：　グルクアミラーゼ（E.C. 3.2.1.3 α-1.4-glucan glucohydrolase）活性の測定[80]は酵素液を0.1M乳酸-乳酸ナトリウム緩衝液にてpH 2.8に調整後 40°C，20分間処理により α-アミラーゼを失活させ，その後可溶性デンプンを基質とし pH 5.0（0.1M酢酸緩衝液）40°C で反応後，0.4 N-NaOH で反応を停止させ，生成還元糖量をSomogyi法[81,82]で定量した。グルクアミラーゼ1単位は上記条件下で1時間反応でグルコース1mg相当の還元糖を生ずる酵素力価とした。

菌体量の測定：　菌体量の測定は乾燥法（乾燥条件：105°C

3時間）と充塡容法を併用した。後者は目盛付遠沈管（10 ml容）を用い，1,000×g 1分間で沈降した培養液 10 ml 当りの菌体充塡容で表示した。両者の間には 1 ml 菌体充塡容/10 ml ≒ 10 mg 乾燥菌体量/ml の関係があった。

第3節　実験結果

1. 培地条件および培養経時変化

種々の窒素源の酸性プロテアーゼ生産におよぼす影響を第2-2表に示す。グルコースをトウモロコシデンプンに，窒素源を表に示したものに代えた培地で 96 時間培養したもので，菌体濃度（X）に対する酵素濃度（E）の値をポリペプトン（第五栄養 K.K.）を基準に表示した。96時間での菌体量はいずれも 35±3 mg/ml で増殖は大差なかった。ポリペ

第2-2表　種々窒素源による酸性プロテアーゼの生産（96時間培養）

Nitrogen sources		E/X* (Relative value**)
NH_4NO_3	1.5%	5
$NaNO_3$	2	2
Urea	1	22
Glutamate	3	49
Casamino acid	3	53
Polypepton	3	100
Soy bean protein	3	125
Egg albumin	3	100

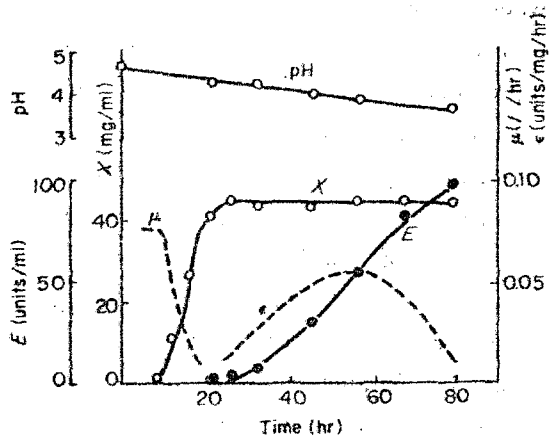
* X=cell concentration mg/ml; E=enzyme concentration units/ml.
** The value expressed as the percentage of polypepton culture as standard (100%).

第2-3表　種々窒素源，炭素源の置換培養による酸性プロテアーゼ，グルカミラーゼ生産

Carbone, Nitrogen sources*	Acid protease	Glucamylase
G, NO_3^-	<3	<3
G, NH_4^+	<3	<3
G, NO_3^-, Pep.	100	7
G, NH_4^+, Pep.	95	9
S, NO_3^-	<3	67
S, NH_4^+	<3	62
S, NO_3^-, Pep.	50	100
S, NH_4^+, Pep.	51	91

* Notation: G: Glucose 5%, S: Soluble starch 5%, NO_3^-: $NaNO_3$ 0.5%, NH_4^+: $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%. Pep: Polypepton 1%.

プトン，蛋白質が酸性プロテアーゼ生産に非常に有効であるが，無機窒素源はほとんど効果がなかった。カザミノ酸グルタミン酸も蛋白質ほどの効果は認められない。そこで培地II（アデニン 750 μM）で培養した菌体を種々炭素源，窒素源および無機金属塩を含む培地に置換培養し，20時間増殖停止下で酸性プロテアーゼ，グルクアミラーゼの生産を調べた結果を第2-3表に示す。両酵素はそれぞれペプトン，デンプンにより *induction* されることが認められた。本菌株のグルクアミラーゼの *inducer* については周崎ら[57]の報告があるが，ここに得られた結果はペプトンが酸性プロテアーゼを特異的に *induce* することを示している。なおここでは E/x の相対値で表示した。



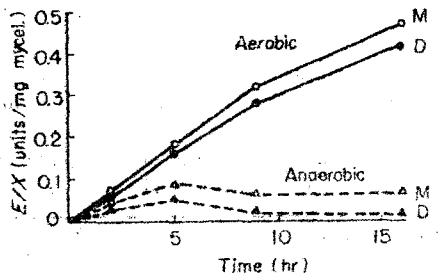
第2-1図. *Asp. niger* D20-2-5 による酸性プロテアーゼ生産の典型的な培養経過（基本培地，肥子接種）.

基本培地での培養による増殖と酸性プロテアーゼ生産の経時変化を第2-1図に示す。酵素の培地中への蓄積はアデニン系物質の消費に伴う増殖停止後，盛んになり，比酵素生産活性（ε）は増殖停止下で最大値（ε_m）を

示す典型的な nongrowth-associated 型である。

2. 酵素生産期における菌体生理の検討

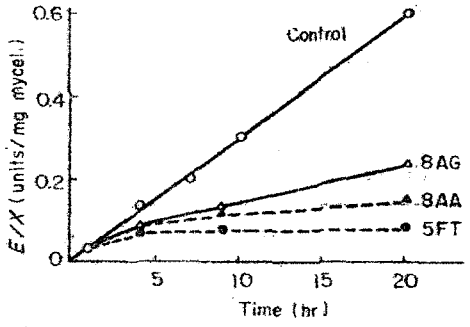
第2-1図で示された増殖停止期での培地中への酸性プロテアーゼの蓄積が酵素蛋白の de novo 合成によるものか否かは重要な問題である。そこで最大比酵素生産期（ε_m）の菌体を嫌気的条件下においた場合，かつ生理食塩水に懸濁した場合の酵素生産を第2-2図に示す。嫌気培養は流動パラフィンで空気を遮断し，静置培養を行なった。嫌気的条件では好気的条件に比べ，酵素生産は顕著に停止し，これは酸性プロテアーゼ生産が代謝エネルギーの欠乏に比較的速やかに応答することを示している。また培地および生理食塩水に懸濁しても16時間まで酵素生産にほとんど差がないことより，ε_m 期の菌体は酵素生産に必要な菌体内栄養源をかなり豊富に蓄積していることを示している。



第2-2図. ε_m 菌体（非増殖期）の懸濁液の酸性プロテアーゼ活性

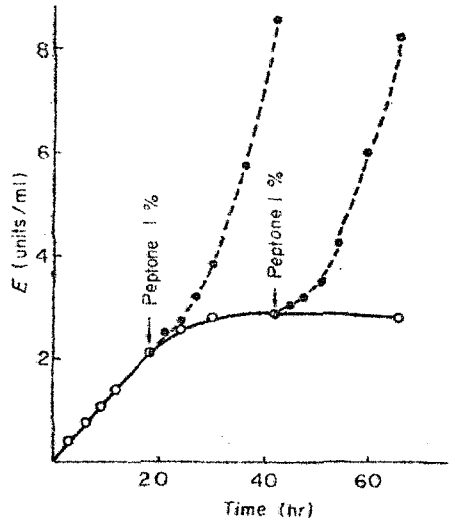
M:	Glucose	5%
	KH_2PO_4	0.4%
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05%
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05%
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01%
D:	NaCl	0.9%
	Distil. water	

培地Iを用いた ε_m 期菌体の同様の置換培養におけるアミノ酸，核酸塩基アナログの影響を第2-3図に示す。



第2-3図. 酸性プロテアーゼ生産に対する代謝アナログの影響（6m菌体使用）

8AG: 8-Azaguanine (1.5 mM)
8AA: 8-Azaadenine (1.5 mM)
5FT: 5-Fluorotryptphan (4 mg/ml)



第2-4図. Deinduction, re-induction の経時変化

o—o deinduction

●---● ペプトン添加（矢印）による re-induction

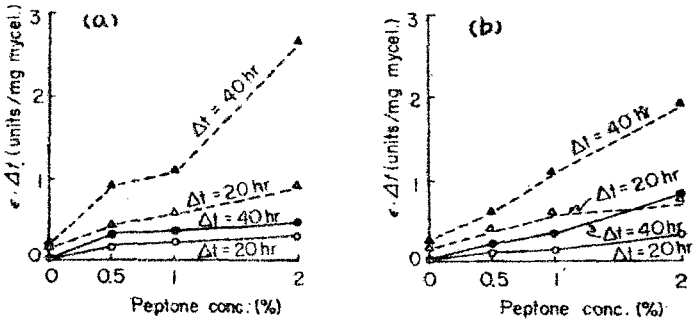
5-フルオロトリプトファン（4mg/ml）は酵素生産を著しく阻害し，4時間ではほぼ完全に生産は停止する。8-アザアデニン，8-アザグアニン（1.5mM）も添加後4時間で著しい酵素生産の阻害を示した。核酸塩基アナログの作用はRNA合成を阻害したのちに現われる間接的な結果である。またこの場合には20時間後にlysisが起り，これは致死合成によるものと考えられる。これらの現象は培地中での酸性プロテアーゼ活性の増加が酵素蛋白のde novo合成によることを強く示唆する。

第2-4図にはペプトンでinduceされた菌体を

洗浄後，培地II（アデニン無添加）に置換培養した時の deinduction の経時変化を示す。酵素生産活性は徐々に低下し30時間で完全に消失する。18時間，42時間にペプトン（終濃度1%）を再添加すれば，酵素生産活性は再び現われ，これはペプトンが inducer 様物質として特異的に作用していることを示す。これら deinduction, re-induction の挙動は培地中での酸性プロテアーゼ活性の増大がやはり酵素蛋白の de novo 合成によることを支持する結果である。

3．増殖期におけるペプトン存在の意義

非増殖期で生産される酸性プロテアーゼは de novo 合成によること が示されたが，inducer 様物質としてのペプト



第2-5図．プロテアーゼ生産に対するペプトン濃度の影響（置換培養）

(a) 30-hr mycelia (max. stationaly phase)
△---△ induced mycelia　▲---▲ induced mycelia
○——○ uninduced mycelia　●——● uninduced mycelia
(b) 50-hr mycelia
△---△ induced mycelia　▲---▲ induced mycelia
○——○ uninduced mycelia　●——● uninduced mycelia

ンが酵素生産相でのみ必要なのか否かを知ることは生理学

的に重要である。そこで培地I（アデニン 750μM）で30時間，50時間培養した induced 菌体，および培地II（アデニン 750 μM）で同様に培養した uninduced 菌体を種々の濃度のペプトンを含む培地に置換し，その後の酵素生産を調べたのが第2-5図である。この結果から増殖停止期の酵素生産には増殖期にもペプトンが存在することが有効であることが認められた。

4. 誘導物質の検索

既述のようにペプトン，蛋白質は有効な酸性プロテアーゼの誘導物質であるが，さらに有効，かつ化学的に明確な inducer の検索は生理学的にも，生産性の面からも重要である。そこで培地IIで増殖させた uninduced 菌体を培地IIIに種々の物質を添加したものに置換して実験を行なった。その結果 L-アミノ酸の中ではアスパラギン酸，グルタミン酸，セリン，ロイシン，イソロイシン，トリ

第2-4表　酸性プロテアーゼ生産に対する単一アミノ酸の効果（36時間培養）

Amino acids (1%)	E/X (relative values*)	amino acids (1%)	E/X (relative values)*
L-Ala	35	DL-Phe	33
L-Arg	20	L-Pro	25
L-Asp N	6	L-Ser	69
L-Asp	49	L-Thr	31
L-Cys SH	14	L-Try	51
L-Glu N	24	L-Tyr	22
L-Glu	39	DL-Val	33
Gly	8		
L-His	18	$NaNO_3$	2
DL-Ileu	41	NH_4NO_3	10
L-Leu	49	Urea	20
DL-nLeu	37	Casamino acid	35
L-Lys	29		
DL-Met	33	Polypepton	100

* The E/X value with peptone was taken as standard (=100).

プトファン等が比較的有効であったがペプトンには及ばない（第2-4表）。第2-5表には2.3のアミノ酸誘導体，D-アミ

第2-5表　酸性プロテアーゼ生産に対するアミノ酸誘導体の効果

Additions (1%)	E/X (relative values in 20-hr culture)
N-Acetyl-DL-glu	46
L-Glu	41
D-Glu	42
N-Acetyl-DL-leu	55
L-Leu	43
D-Leu	43
N-Acetyl-DL-met	41
DL-Met	39
L-Asp	36
D-Asp	39
Polypepton	100

第2-6表　酸性プロテアーゼ生産に対するペプチドの効果

Compounds		E/X (relative value in 20-hr culture)
Glutathione (Red.)	1 %	22
Gly-Gly	1	56
L-Asp-L-Glu	1	37
L-Asp-L-Phe-NH_2	0.5	11
L-Asp	1	36
L-Glu	1	41
Gly	1	8*
L-Asp+L-Glu (1:1)	1	45
L-Asp+L-Phe (1:1)	1	43
Polypepton	1	100

* : 36 hr culture

ノ酸の効果をL-アミノ酸と比較した結果を示すが，これらの間にはいずれも大差は認められない。合成ペプチドの効果は第2-6表に示すが，検索したものでは有効なものはなく，アスパルチルグルタミン酸は構成アミノ酸よりも効果が少ない。カゼインを種々のプロテアーゼで分解したペプチド混液の効果を第2-7表に示す。細菌の中性プロテイナーゼ以外はいずれもかなりの誘導効果を示しており，ペプチドの種類には比較的特異性が少ないことを示している。

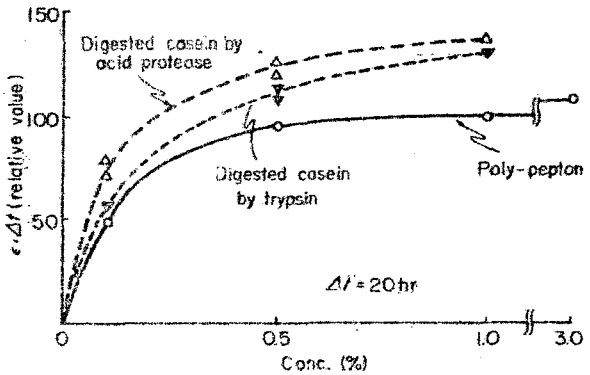
第2-6図にはカゼインの酸性プロテアーゼ，トリプシン分解によるペプチド混合物の濃度と酸性プロテアーゼ誘導効果の関係を示す。これらはいずれもペプトンより幾分有効であり，その効果は20時間の置換培養では0.5%でほ

最大に達した。

第2-7表　酸性プロテアーゼ生産に対するカゼインの酵素分解物の効果

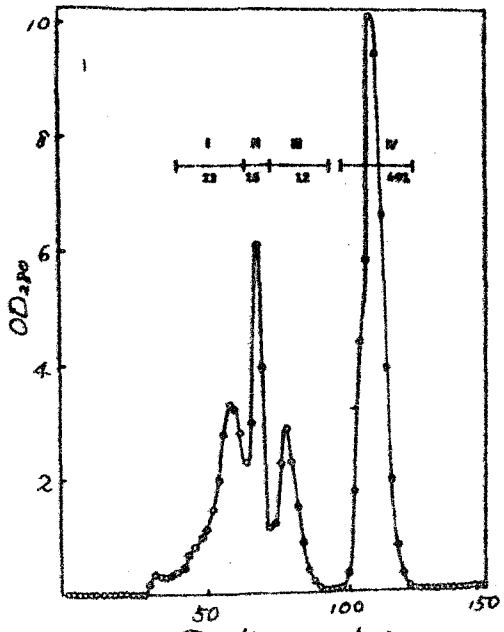
Protease used for digestion	E/x (relative value in 20hr culture)
Bact. Proteinase (neutral and alkaline)	140
Bact. Proteinase (alkaline)	146
Bact. Proteinase (neutral)	56
Bact. Thermostable protease	81
Trypsin	139
Pronase AS	100
Acid protease (Asp. niger)	134

分解条件：40°C, 18時間．防腐剤としてオフラスキンを使用し，分解後ハイポで中和した．
培養は分解物1%（終濃度）添加し，ポリペプトンを100として表わした．



第2-6図．カゼイン酵素分解物，ポリペプトン濃度に対する酸性プロテアーゼの生産．
（実験条件は第2-7表に準ずる）

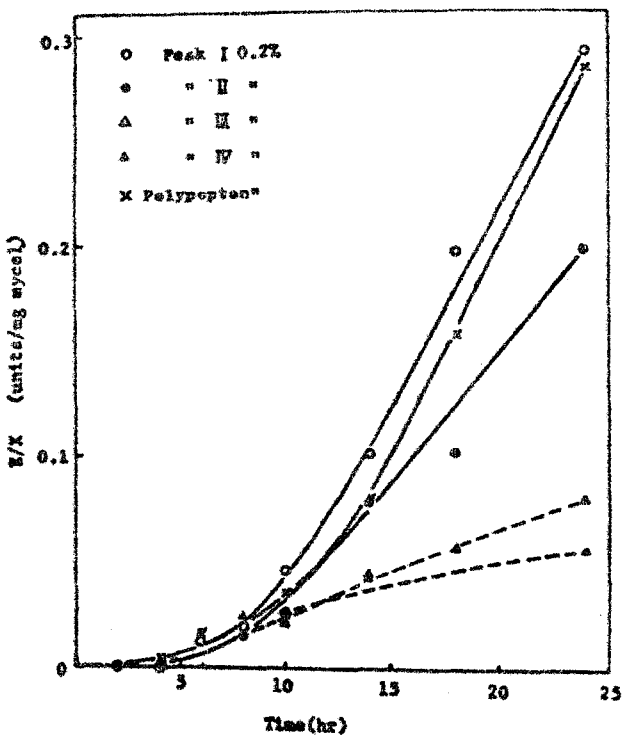
Inducer様物質として有効なポリペプトンはカゼインの膵臓酵素の加水分解物で，種々のペプチドを含んでいる。これをセファデックスG25にて分画した結果が第2-7図である。分子量の差により主に4区分に分画された。それぞれの区分を濃縮後，蛋白質量としてペプトン0.2%相当量に調整し，誘導効果を調べた（第2-8図）。ゲル沪過による溶出の速い区分の順に誘導



第2-7図 ポリペプトンのセファデックスG25による分画

効果は低下しており，
B分画はポリペプトン
と同等の効果を有し，
分子量の大きいペプチ
ドが有効であることを
示している。なおB分
画の分子量は1000～
3000 と推定された。

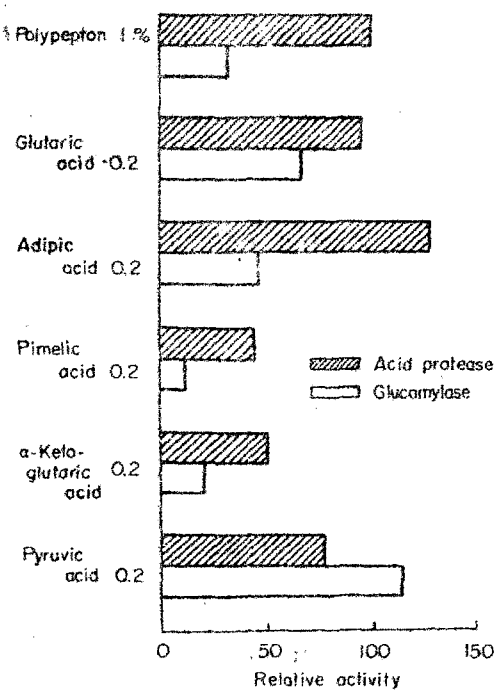
第2-8表には主に
有機酸を含む
単純物質の酸
性プロテアー
ゼ誘導効果を
示す。種々ア
ミノ酸の中で
アスパラギン
酸，グルタミ
ン酸がかなり
有効であった
ことよりジカ
ルボン酸の効
果を調べた



第2-8図 分画ポリペプトンによる酸性プロテアーゼの生産

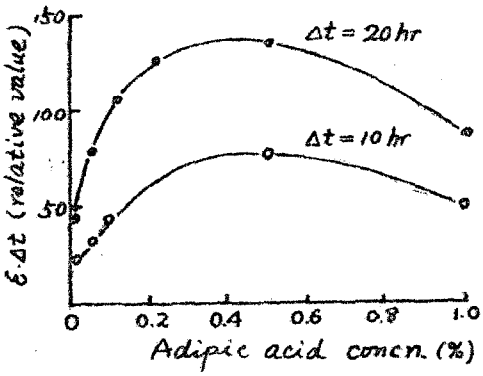
第2-8表 酸性プロテアーゼ生産に対する含窒素化合物，有機酸の効果

Compounds		E/X (relative value in 20 hr culture)
α-Aminobutyric acid	1 %	15
γ-Aminobutyric acid	1	72
n-Butyric acid	0.2	<3
n-Valeric acid	0.2	6
trans, trans-Muconic acid	0.2	40
β-Alanine	1	34
o-Aminobenzoic acid	0.1	9
m-Aminobenzoic acid	0.1	30
p-Aminobenzoic acid	0.1	47
α-ε-Diaminopimelic acid	0.5	19
m-Aminophenol	0.1	<3
p-Aminophenol	0.1	4
Polypepton	1	100



第2-9図 酸性プロテアーゼ，グルクアミラーゼ生産に対する有機酸の効果（20時間培養）

が第2-9図である。これらの中でアジピン酸が最も効果的であり，アジピン酸の濃度効果を調べたのが第2-10図である。高濃度においては阻害が現われ，非増殖期の20時間培養では0.4%付近が最適であった。増殖に対する阻害は酸性プロテアーゼ生産に対するよりも低濃度で現われるがこれについては第4章で述べる。なお



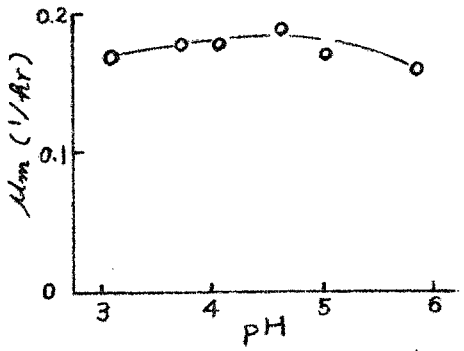
第2-10図 種々アジピン酸濃度と酸性プロテアーゼ生産

TCAサイクルの中間体はいずれも顕著な誘導効果を示さなかった。

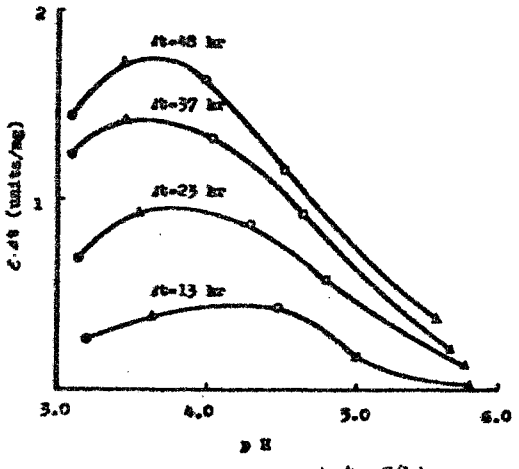
5. 増殖相，酵素生産相における環境条件の影響

Nongrowth-associated 型の醗酵生産においては増殖相，酵素生産相にそれぞれ最適の培養条件を与える必要がある。醗酵生産に影響を及ぼす外的因子として栄養条件，pH，温度，浸透圧，酸素濃度などがある。*Asp. niger U20* のα-アミラーゼ生産における対酸素挙動については金野ら[76]がくわしく解析し増殖相には多量の酸素が必要であるが，酵素生産相ではあまり必要でないことを報告している。ここではpHと温度について増殖相と酵素生産相に対する影響を検討した結果について述べる。

第2-11，2-12図にそれぞれ増殖，酵素生産（非増殖）に対するpHの影響を示す。

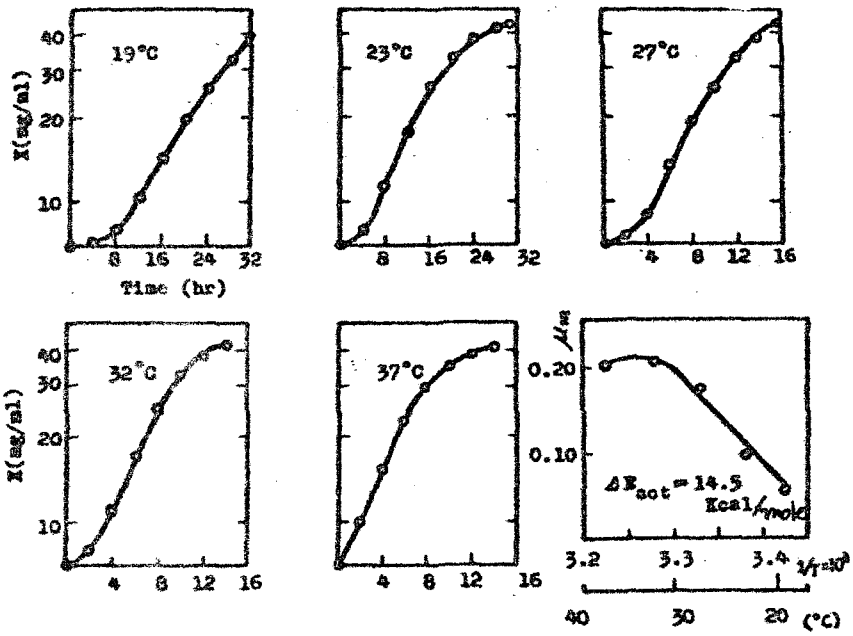


第2-11図　pHに対する増殖



第2-12図　pHに対する酸性プロテアーゼの生産

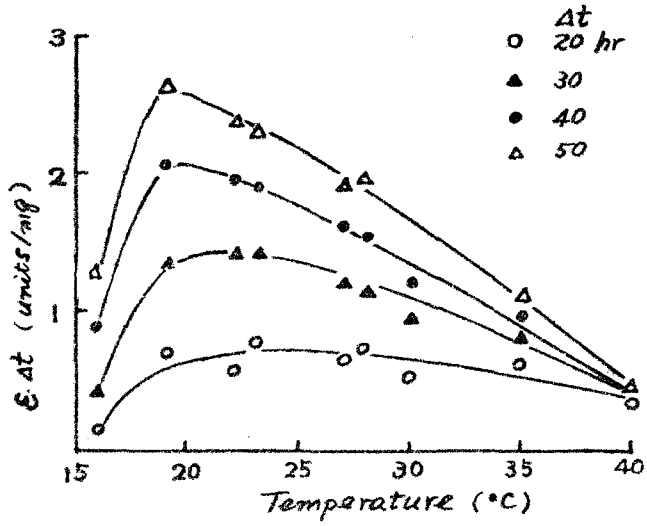
最大比増殖率（μ_m）は広範囲のpHにわたり同様の値を示すが，酵素生産はpH 3.5～4付近に最適値を示す。pHの制御はMcIlvaine緩衝液を培地I（第2-11図ではアデニン750μM添加）に加え行なった。



第2-13図　温度に対する増殖（培地I）

温度に対する菌体増殖の経時変化を第2-13図に示す。最適温度は30～35°Cであり，μ_mに対する活性化エネルギーは14.5 kcal/moleであった。増殖停止期の酵素生産に対する温度効果を第2-14図に示す。培養時間の経過と共に最適温度は低温側に移行し，50時間では20°C付近にあり，増殖とは約10°C以上の差があり増殖相と酵素生産相には培養温度を変化させることが生産性の面から重要であることを

示している。



第2-14図　温度に対する酸性プロテアーゼの生産

第4節　考　　察

酸性プロテアーゼ生産の経時変化は典型的な nongrowth-associated 型を示し，アナログを含む置換培養により，酸性プロテアーゼ活性の増加は酵素蛋白質の de novo 合成であり，合成活性は非増殖相で長時間維持されることが明らかになった。したがってこの現象は preferential synthesis 型に相当するものである。なお菌体内プロテアーゼに関しても，酵素生産期，および induction 前後の破砕菌体抽出液中に活性がほとんど存在しないことと認めた。

酵素合成の induction は種々の物質により起こることが示された。ペプトンの誘導物質としての効果は酵素生産が repress されている増殖期にも存在することが非増殖期に

のみ存在するより顕著であることを認めた。これは増殖期に菌体内にペプトンから真の，あるいはより有効な *inducer* が蓄積することに関係しているかも知れない。生理的に直接の *inducer* が何であるかは興味ある問題であり，アジピン酸より有効で，工業的に利用できる *inducer* の検索は重要であり，この問題は化学構造と生理活性の関係を通して検討されねばならない。*induction* と *repression* に関する挙動は生理学的に意義深いだけでなくプロセス制御の面からも重要である。

環境因子のうち温度は酸性プロテアーゼ生産に興味深い効果を与えた。すなわち酵素生産相の最適温度は増殖に対するよりも 10°C 以上低いことが認められた。岡崎ら[35]は本菌株のグルクアミラーゼ生産には 30～35°C が最適であることを認め，一方 Maxwell[83]，山本[74-76]はプロテアーゼ生産に低温が有効なことを報告し，山本はそれを酵素の安定性に帰結している。しかし第1章で示したように 30°C では本酵素の失活は認められず，酵素生成系の安定性に要因があると考えられ，それについては次章で述べる。

酸性プロテアーゼ生産の培養管理の面では，増殖相は 30°C 付近で培養し，酵素生産相では 20°C 付近に温度を下げ酵素生成活性を長時間維持することが必要であると考えられる。

第5節　要　　約

1. *Asp. niger* のアデニン要求株 U20-2-5 はペプトン，蛋白質の存在下で酸性プロテアーゼを多く生産し，無機窒素源ではほとんど生産しない。

2. 酸性プロテアーゼ生産は典型的な *nongrowth-associated* 型を示す。この酵素生産は嫌気培養，アナログの添加により速やかに阻害された。*induction*，*deinduction* の現象が顕著なことから，酵素蛋白は *de novo* 合成であることが明らかになり，*preferential synthesis* 型に属するものである。

3. ペプトンは増殖相に加えることにより非増殖相での生産性をより有効にする。

4. *Induction* 作用をもつ単純な化学物質の探索の結果，アジピン酸，グルタル酸がかなり有効であった。多くのアミノ酸，2.3のジペプチドはいずれも効果が少なく，ペプトンには及ばなかった。カゼインの種々プロテアーゼによる分解物はいずれも有効であった。またポリペプトン中の分子量の大きいペプチドが有効成分であった。

5. 増殖に対する至適 pH は広範囲にわたるが，酵素生産に対しては 3.5～4 が最適であった。増殖の最適温度は 30～35°C であり，酵素生産に対してはそれより約 10°C 程低く，かつ培養時間の経過と共に低温側に移行した。

第3章　酸性プロテアーゼmRNAの安定性ならびに生産の速度論的解析

第1節　緒　　言

Messenger RNAはribosomal RNA, transfer RNAに比し一般に多くのものはturnoverの速い短寿命のRNAである。[14-17] しかし高等生物においては寿命が数日～数ヶ月に及ぶ例が報告[87]されており，これはinformosome蛋白に保護されていることが示唆されている。岡崎ら[88]は本菌のRNAは増殖期には膜非結合型として存在し，mRNAのturnoverは速いが，非増殖期では多く膜結合型として存在し長時間安定であることをパルスラベルしたRNAのMAKカラムクロマトで認めた。

本章では前章において酸性プロテアーゼがpreferential synthesis型を示すこと.を認めたのでその要因と考えられるmRNAの安定性，非増殖期でのRNAのturnover合成について検討を加えた結果を述べる。DNA依存RNA合成の特異的阻害剤として知られているアクチノマイシンD[89-92]の阻害実験により酸性プロテアーゼのmRNAの安定性を調べ，かつ前章で酸性プロテアーゼ生産に低温が有効であることが示されたので，mRNAの安定化に対する温度効果をも検討した。非増殖期での^{14}C-グアニンの添加によりRNAのturnoverを調べ，これらの結果をもとに酸性プロテアーゼ生産を

照井ら　の水解酵素優先合成の動力学モデルにより解析した。

第2節　理　論

水解酵素優先合成の速度論的解析は照井ら[34]によりmRNA濃度が酵素合成の律速段階にあるとの仮定のもとに定式化され，*Asp. niger* のグルクアミラーゼ生産，[35] *B. subtilis* のα-アミラーゼ生産[36,37]によく適合することが示され，生理学的研究とともにそのモデルの妥当性が支持されている。本節では使用菌株の酸性プロテアーゼ生産がこのモデルによく適合することを示すが，ここで用いる速度式は以下のものである。

増殖相においては

$$\frac{dr}{dt} = a'\mu - b'\frac{d\mu}{dt} - k_d r \quad \cdots\cdots (1)$$

r：酵素に特異的なmRNA濃度（mg/ml）
μ：比増殖速度（1/hr）
k_d：mRNAの分解速度定数（1/hr）
t：時間（hr）
a', b'：定数

$\varepsilon \propto r$ であるとして

$$\frac{d\varepsilon}{dt} = a\mu - b\frac{d\mu}{dt} - k_d\varepsilon \quad \cdots\cdots (2)$$

ε：比酵素生産率（units/mg/hr）
a, b：定数

(2)式を $t_0 \sim t$ で積分して

$$\varepsilon = e^{-k_d(t-t_0)}\left\{a\int_{t_0}^{t}\mu e^{k_d(t-t_0)}dt + b\left|\int_{t_0}^{t}\left(-\frac{d\mu}{dt}\right)e^{k_d(t-t_0)}dt\right| + \varepsilon_0\right\} \quad \cdots\cdots (3)$$

$$E = \int_{t_0}^{t} \varepsilon X \, dt + E_0 \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (4)$$

E, E_0 : t 及び t_0 における酵素濃度 (units/ml)
X : 菌体濃度 (mg/ml)
ε_0 : t_0 における ε (units/mg/hr)

非増殖相では次式を用いる。

$$\varepsilon = \varepsilon_m e^{-\beta(t-t_m)} + K_1 \left(e^{-\lambda(t-t_m)} - e^{-\beta(t-t_m)} \right) \cdots\cdots\cdots (5)$$

λ : 菌体RNAの分解速度定数 (1/hr)
ε_m : $t = t_m$ における ε (units/mg/hr)
K_1 : 定数

第3節　実験材料および方法

アクチノマイシンDによる阻害実験：　1mMアデニンを含む培地Iに同じ培地にて24時間前培養した菌体を10% (容量) 接種し，30°C，22°Cでそれぞれ13時間，20時間培養後，培地Iにて2倍に稀釈し，同時に 8-^{14}C-アデニン (500μM，比活性 0.2μc/μmole)，アクチノマイシンD (150μg/ml) を添加し，測定を開始した。

酵素活性の測定：　酸性フォスファターゼ活性の測定[93]は *p*-nitrophenylphosphate を基質とした。反応混液は 1mM 基質溶液 0.5ml，0.1M酢酸緩衝液 (pH 3.6) 1.0ml，酵素液 0.5ml を含み，40°C で反応させ，0.4M炭酸ナトリウム溶液 20ml を添加し，反応停止後，生じた *p*-nitrophenol を 420mμ による吸光度 (10mm セル) を測定した。酸性フォスファターゼ1単位は上記条件下

で1時間当り 420 mμ の OD を 1.0 上昇させる酵素力価とした。

核酸の分画，定量： 核酸の分画は Schmidt-Thanhauser-Schneider 法[94,95]により，核酸の定量は Beckman DB spectrophotometer にて 260 mμ の吸光度によった。放射能活性の測定は液体シンチレーションカウンター（Nuclear-Chicago Co., Type 6801）によった。

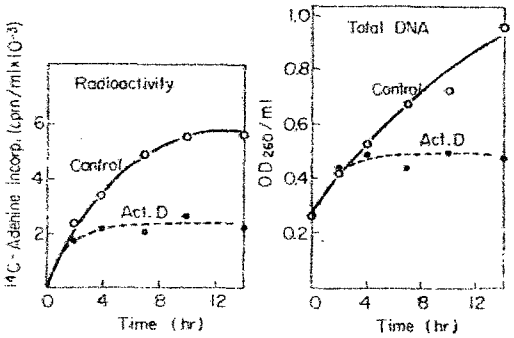
試薬： アクチノマイシンDは Merck Sharp and Dohme Research Laboratory より付与された。p-nitrophenylphosphate は生化学工業K.K.，8-^{14}C-アデニン，8-^{14}C-グアニンは第一化学K.K.のものを使用した。

第4節 実験結果

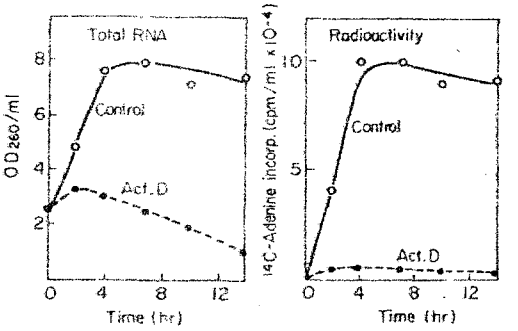
1. 酵素生産のアクチノマイシンDによる阻害実験とmRNAの安定性

前章第2-1図に示したように Asp. niger U20-2-5 の酸性プロテアーゼ生産は典型的な nongrowth-associated 型を示し，種々の面から検討した結果，培地中への酸性プロテアーゼの蓄積は de novo 合成によるもので preferential synthesis 型であることを示した。

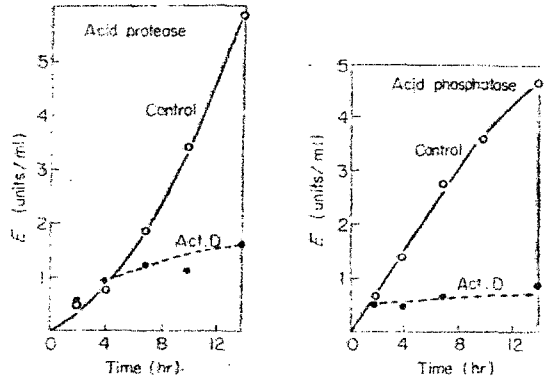
30°C における増殖期でのアクチノマイシンD（150μg/ml）の核酸合成に及ぼす影響を第3-1，3-2図に示した。DNA合成は4時間の遅れの後ほぼ完全に停止するが，一方 RNA



第3-1図. 30°C でのアクチノマイシンDのDNA合成に対する影響（アクチノマイシンD 150μg/ml と 14C-アデニン 500μM，比活性 0.2μc/μmole を0時間に添加した。）



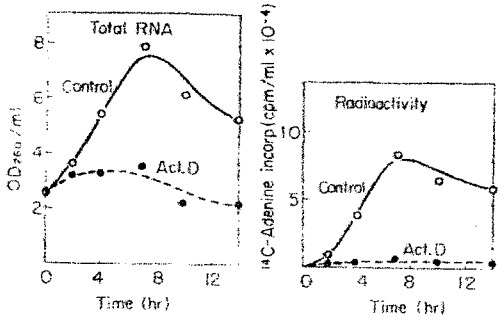
第3-2図 30°C でのアクチノマイシンDのRNA合成に対する影響



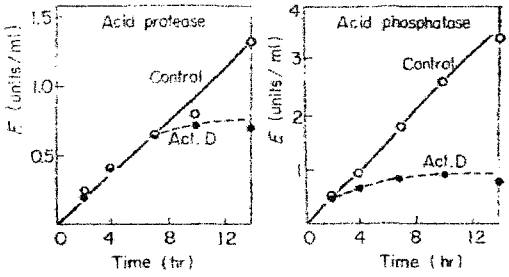
第3-3図 30°C でのアクチノマイシンDの酵素合成に対する影響

合成は速やかに停止し，その後RNAの分解が促進される。この条件下ではgrowth-associated型を示す酸性フォスファターゼは約2時間後に生産が止り，これに対して酸性プロテアーゼは4時間後まで生産速度は低下せず，その後は低下するが，長時間低い傾斜で生産される（第3-3図）。

前培養，阻害実験ともに22°Cで行なった場合も同様な結果が得られた（第3-4，3-5図）。酸性プロテアーゼ生産活性は7時間後まで低下せずに続くが，酸性フォスファターゼ生産は4時間以内に著るしく低下

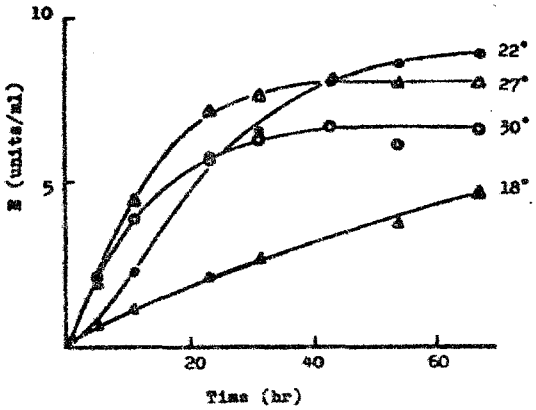


第3-4図　22°C でのアクチノマイシンDの RNA合成に対する影響

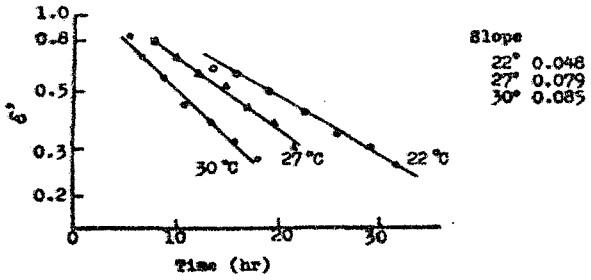


第3-5図　22°C でのアクチノマイシン Dの酵素合成に対する影響

した。これらの結果は酸性プロテアーゼの mRNA がかなり長寿命であることを示唆している。また mRNA の安定性が 22°C においてかなり上昇することをも示している。



第3-6図　種々温度における酸性プロテアーゼの deinduction



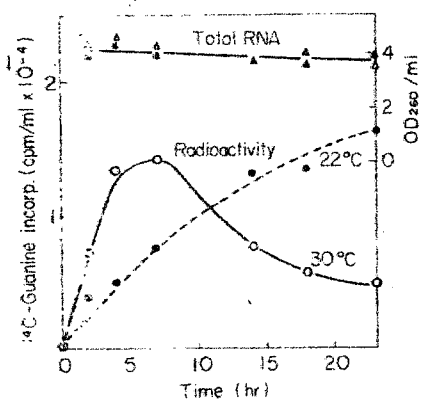
第3-7図　Deinduction における E の経時変化

前章においてペプトン培地から無機窒素培地へ置換すると deinduction が起ることを述べたが，基本培地で培養した Em 菌体を洗浄後，培地Ⅱ（アデニン無添加）に再懸濁し，種々の温度で deinduction 実

験を行なった結果を第3-6図，第3-7図に示す。酵素生産活性の低下は低温になる程遅く，Eは18°C以外はいずれも一分子的に減少した。これはmRNAが一分子的に分解し，かつ低温になる程，安定化することを示唆している。18°Cにおいては通常の温度に比べ，代謝の質的変化が起っているものと思われる。

2. 酵素生産相におけるRNAのturnover合成

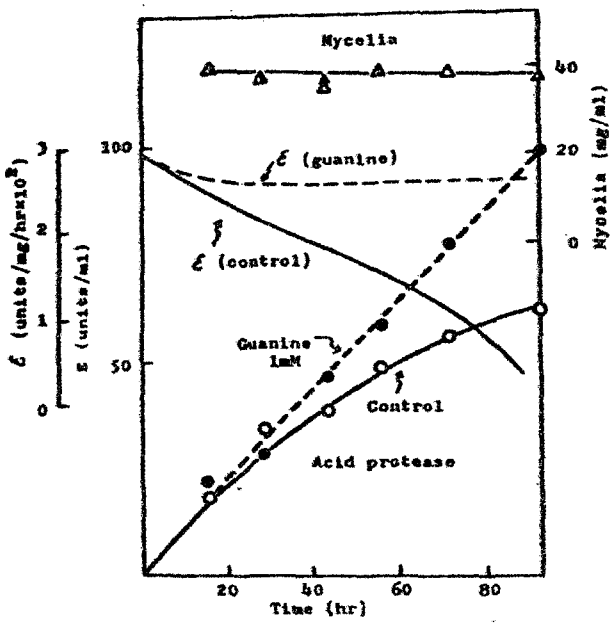
基本培地で前培養1にEm期の菌体を培地IIに1%グルタミン酸を加えた培地（アデニン無添加）に置換し，22°Cおよび30°Cで12時間培養後，^{14}C-アデニンを添加し，RNA区分への取り込みを調べた（第3-8図）。22°CではRNAの合成も分解も30°Cよりかなり遅いことを示している。非増殖期では図に示すようにRNAのturnover合成が起っていることが認められたが，DNAはturnoverしていないことを岡崎ら[88]はMAKカラムでDNA区分を分画して調べている。



第3-8図. 非増殖期における^{14}C-アデニンのRNA区分への取り込み。

RNAのturnoverのため，非増殖期では培養経過と共にアデニン系物質のレベルは低下すると考えられる。この時期にアデニンを添加し（アデニ

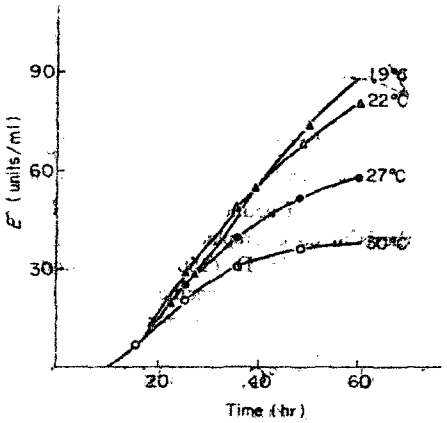
ン単独では増殖せずDNAへの取り込みもない）εの維持に及ぼす効果を調べたのが第3-9図である。グアニン（1mM）を添加すればεは長時間維持されAMP（adenosine monophosphate）→GMPの反応によるアデニン系物質の減少を補ういわゆる sparing action[96,97,98]を示すものと考えられる。



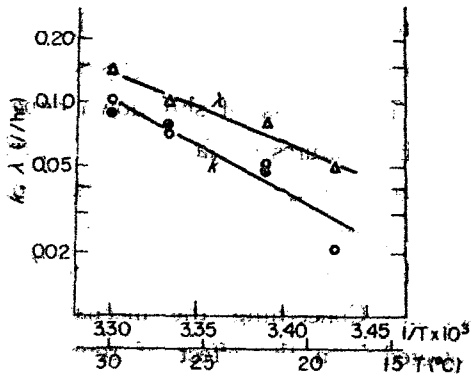
第3-9図 非増殖期におけるグアニン添加の酸性プロテアーゼ生産に対する効果

3. 動力学モデルへの適合性

酸性プロテアーゼのmRNAは安定であり，非増殖期ではRNAのturnoverが起っていることが認められたので，これをもとに前章第2-14図に示した酸性プロテアーゼの種々温度における生産の動力学的解析を行なった。速度定数 k_d および λ の温度依存性を ε_m 菌体の培地I（アデニン無添加）



第3-10図　種々温度における酸性プロテアーゼ生産の(5)式への適合性。曲線は理論式より求めたもの。プロットは実測値。k_1, k_2 は第3-11図参照。

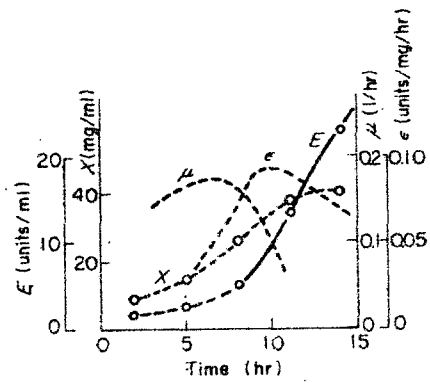


第3-11図　k_1, k_2 の Arrhenius plots.
△, ○ は第3-10図に示した結果から得たもの
● は第3-7図の結果から得た。

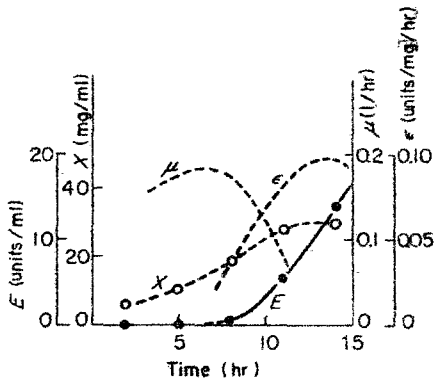
での回分培養により検討し，結果を(5)式を用いて解析した。得られた k_1, k_2 の値を用いて経時変化を表わしたのが第3-10図である。これら定数の Arrhenius plots は直線を示し，傾斜に相当する活性化エネルギーは k_1 および k_2 についてそれぞれ 19, 15 kcal/mole であった（第3-11図）。

第3-12図には完全に derepress された菌体を培地Ⅰ（アデニン 750 μM）に shift-up した時の経時変化を示す。(3)および(4)式による速度論的解析の結果 b の値が0であった。これは完全に derepress された菌体の shift-up は増殖期を通じて完全に derepress されていることを示す。第3-13図には uninduced 菌体の同様の shift-up の結果を示す。この経時変化は第2-1図の胞子接種による培養とよく類似

しており，(2)式あるいは(3)式における b がかなり高い値を示していることから，derepress が酵素生産活性の増大に重要な役割を果していることを示している。理論的な E の経時変化と実験値は derepression が起っている場合も，そうでない場合も，よく一致することが認められた。



第3-12図　完全に derepress された菌体の shift-up における酸性プロテアーゼ生産の経時変化
E の実線は理論曲線
$a=0.10$, $b=0$, $\mu=0.09$



第3-13図　Repress (uninduce) された菌体の shift-up における酸性プロテアーゼ生産の経時変化
E の実線は理論曲線
$a=0.11$, $b=0.14$, $\mu=0.06$

第5節　考　　察

アクチノマイシンDによる阻害実験の結果，酸性プロテアーゼの mRNA は数時間安定であることが示唆された。これは growth-associated 型の酸性フォスファターゼとは好対照な結果である。Deinduction，速度論的解析から得た酸性プロテアーゼの mRNA の 30°C における半減期は約8時間であるが，アクチノマイシンDによる阻害実験では，それ程長くは酵

素生産は持続しなかった。これはアクチノマイシンDの阻害の2次効果が現われたものと考えられる。

前章で述べた低温培養による酵素生産活性の維持はmRNAの安定化に起因していることが示唆された。

酸性プロテアーゼ生産に関し，derepressされた菌体のshift-upではbの値が0になりrepressed菌体の場合と異ることは酸性プロテアーゼ生産活性のderepressionは非可逆性をかなり有していることを示す。これは容易に可逆性を示す同じ菌株のグルクアミラーゼ生産系[96]とは対照的である。Uninduced (repressed)菌体を用いたshift-down実験はグルクアミラーゼ生産培養と同様の挙動をとり，アデニンの欠乏によるμの減少は酸性プロテアーゼ生産活性の増大をもたらす。一方derepressed菌体を用いたshift-up実験ではrepressionは起らず，growth-associated型の様相を呈する。酸性プロテアーゼ生産系がrepressionから保護される機構については，さらに検討が必要であるが，これに関しては次章で若干検討した。

酸性プロテアーゼの生産を向上させるには完全にderepressされた菌体を接種し，非増殖相では培養温度を低下させ，かつグアニンなどの添加によりRNAプールを強化することが非常に有効な方法であることが示唆された。

Catabolite repressionがない場合でも酵素生成系が安

定な培養では *preferential synthesis* の特徴的な形が認められた。

第6節　要　　約

1. 増殖期でアクチノマイシンD（150 μg/ml）の添加によりRNA合成は22°C, 30°Cの場合とも2時間以内に完全に停止するが，酸性プロテアーゼ活性は22°Cでは7時間以上，30°Cでは4時間以上持続した。一方，酸性フォスファターゼは22°C, 30°Cの場合ともに約2時間で生産が停止した。

2. 非増殖期ではRNAの *turnover* が起っており，22°Cでは30°Cよりも RNAの合成，分解ともに速度は遅かった。グアニン添加により酵素生産活性は長時間維持された。

3. 種々温度における非増殖期の酸性プロテアーゼ生産は動力学モデルによく一致し，k_e, λ とも *Arrhenius plot* により直線を示した。なお，これは *deinduction* 実験ともよく一致した。

4. *Derepress*, *repress* された菌体の *shift-up* による増殖期の酵素生産はいずれも動力学モデルによく適合し，前者の場合は *repression* の項（b）が0で *growth-associated* 型の傾向を示した。

第4章　酸性プロテアーゼの Induction と Repression に関する動力学的検討

第1節　緒　　言

誘導酵素の概念は古く，既に1882年 Wartmann[99] はある種の細菌はデンプンを炭素源とした時のみ α-アミラーゼを生産することを発見している。現在まで多くの酵素が基質を培地に添加すると生成が起ることが知られている。Pollock[100-102] はペニシリナーゼについて inducer-receptor 説を提唱した。Monod ら[103] は大腸菌の β-ガラクトシダーゼは基質に限らず，その類似物質によっても誘導されるという現象を認め1961年にはオペロン説[9] が発表され，これをもとに誘導酵素合成の調節機構は inducer, repressor, operator 遺伝子の3者の関係において明解に把握されるようになった。Inducer はさらに translation レベルにおいても mRNA を安定化させるとの報告[104] もある。

一方，種々の酵素合成は培地にグルコースを添加することにより repress される。この現象はグルコース効果[105,106] とか，catabolite repression[107] と表現されている。E. coli において catabolite repression は mRNA の合成速度を低下させることが認められた[108] が，Pardee ら[11] により定義された repressor との関係は不明であり，catabolite repression の作用部分は調節遺伝子の産物とは独立しているらしいとの報告も多い[109-113]。

使用菌株の酸性プロテアーゼ生産は uninduced 菌体を用いると増殖期には repression を受けるが，岡崎ら[50]はグルクアミラーゼ生産にはグルコース効果がないことを認めており，これは anabolite repression であるとも考えられる。

前章までに酸性プロテアーゼの preferential synthesis の要因として (1) 増殖期の repression (2) 非増殖相での RNA の turnover (3) mRNA の高度な安定性 が認められたが，本章ではまずアデニン添加による repression について菌体の履歴性の点から 2, 3 検討を加え，ついで優れた誘導効果を示したペプトンによる induction，とくに induction lag について検討を行なった。さらにアジピン酸についても同様の比較検討を行ない，同時にアデニン添加による repression に対する挙動をも調べ，プロテアーゼの induction の機構についての指針を得ることを目的とした。

第2節　実験材料および方法

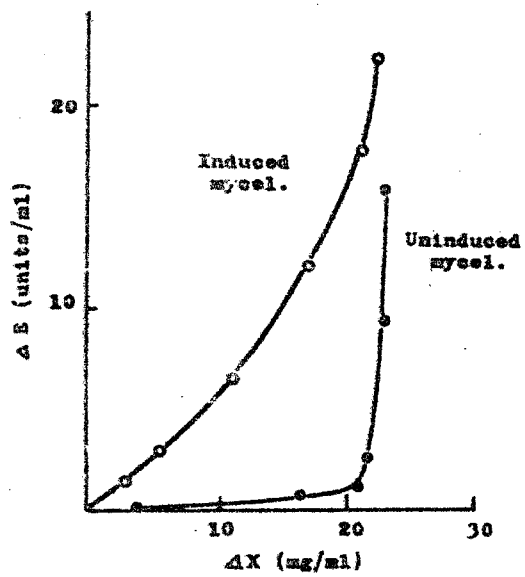
アクチノマイシンDによる誘導期での阻害実験：　ペプトンによる induction 実験（非増殖）の開始後，種々の時間にアクチノマイシンD（150 μg/ml）と ^{14}C-ウラシル（0.1 mM, 比活性 0.9 μc/μmole）を添加し，その後の経時変化を追った。^{14}C-ウラシルの RNA 区分への取り込み，放射能活性の測定などは前章の方法に準じた。

誘導実験：　とくに明記しない限り，培地IIのグルコースを馬鈴薯デンプンに置き換えた培地（アデニン 750μM）で胞子接種により40時間前培養した uninduced 菌体を含む培養液 50 ml を誘導物質を含む溶液 50 ml と混ぜ実験を開始した。pH は実験開始時に 4.2 付近になるよう調節し，実験中 pH は 3.2 以下にならないよう McIlvaine 緩衝液を培地に添加した。

第3節　実験結果

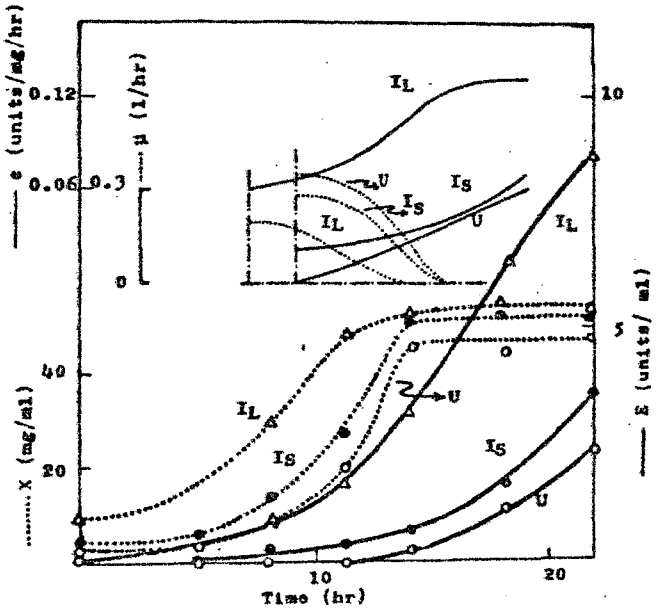
1. Induction, Deinduction におけるアデニンの効果

前節で述べたように induced 菌体の shift-up は growth-associated 型の様相を呈し、(3)式の $b=0$ となり、uninduced 菌体のそれは増殖に伴う repression を受け顕著な non growth-associated 型を示した。第4-1図にその典型を differential rate により示す。induced 菌体は増殖期においても酵素生産が行なわれる。傾斜が漸次増大するのは mRNA の安定性を示している。



第4-1図　Induced 菌体および uninduced 菌体の shift-up（ペプトン存在下）における differential rate

一方 uninduced 菌体は増殖停止の頃から酵素生産が始まる。induced 菌体の shift-up（ペプトン含有）の際のこの傾向は接種菌体量により異ることを第4-2図に示す。induced 菌体でも接種量が5%（容量）の時は20%の



第4-2図 Induced 菌体の shift-up における植菌量の影響

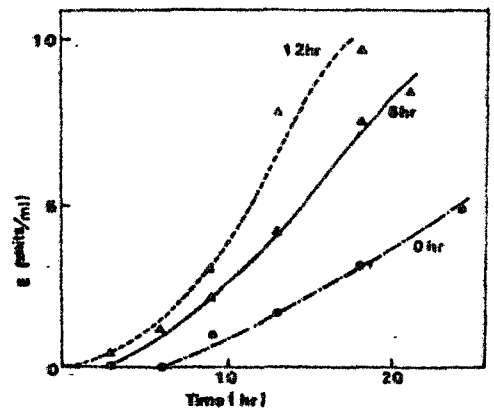
------ : X および μ

—— : E および ε

I_L : 20% induced 菌体植菌

Is : 5% 〃

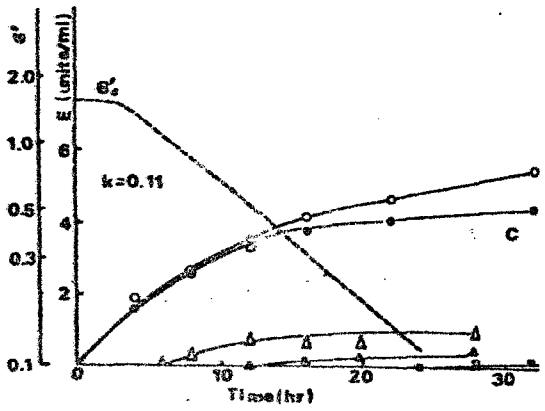
U : 5% uninduced 菌体植菌



第4-3図 ペプトンによる induction の種々時間（0, 6, 12 時間）におけるアデニン添加の影響

時に比しεの増加は遅れ、uninduced 菌体の場合に接近することが認められた。これは接種菌体量が少ないときは、増殖に伴い、repression に抵抗性を有する菌体内物質が稀釈され、系全体として uninduced 菌体の場合に類似してくることを示唆している。第4-3図には uninduced 菌体のペプトン

による induction (非増殖) の 0, 6, 12 時間目にアデニン 500μM を添加した時の酵素生産をアデニン添加時を 0 時間として示す。ペプトンによる induction が進んでいるもの程、アデニン添加による repression を受けにくくなること、つまり induced 菌体の shift-up に近づくことを示している。アデニン添加によるこのような遅れが mRNA 合成以前に作用しているのか translation の段階で作用しているのかを検討したのが第4-4図である。Deinduction の過程、すなわち E が一分子的に減少している過程ではアデニン添加による増殖が起っても E の経時変化は増殖の起らない場合と殆ど相違なく、既存の mRNA から酵素生産の段階にはアデニンの影響は現われないことを示している。同時にこれはアデニン添加による菌体の活性増大にもかゝわらず酵素生産量が変化しないことより、mRNA 濃度が酵素生産の律速段階になっていることを示唆している。



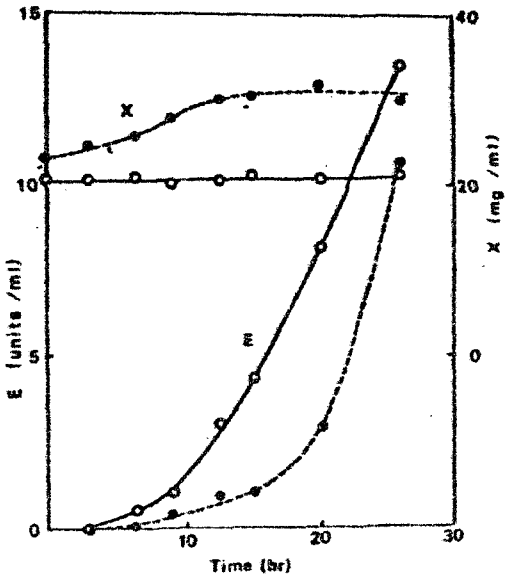
第4-4図 Deinduction の過程におけるアデニンの影響

●——● control
○——○ アデニン 500μM 添加 0時間
△——△ 〃 6 〃
▲——▲ 〃 12 〃

2. ペプトンによる induction lag の要因について

ペプトンによる induction はアデニン添加により repression を受

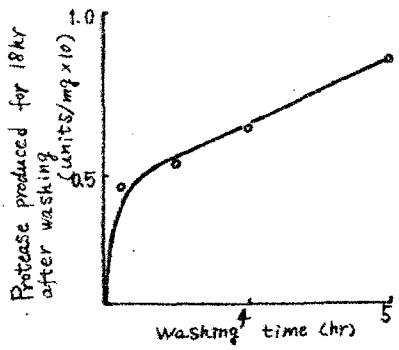
けることを示したが、非増殖期においても induction lag が約10時間存在する。(第4-5図) この lag の原因について以下検討を加えた結果を示す。



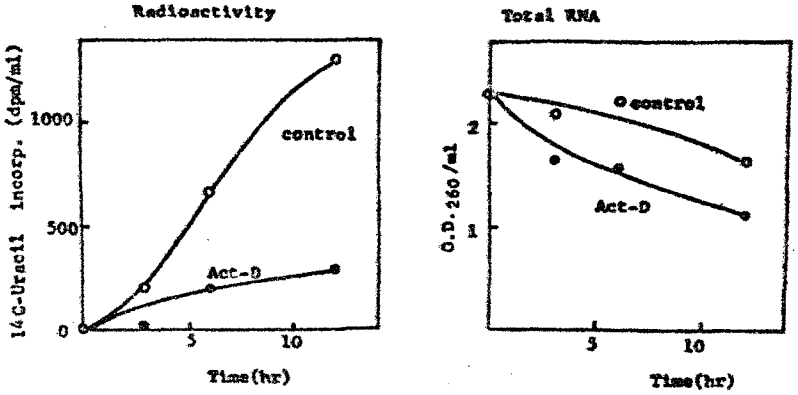
第4-5図 ペプトン1%による酸性プロテアーゼ induction の経時変化
o——o アデニン無添加
●——● アデニン500μM添加

第4-6図はuninduced菌体をペプトン培地に懸濁後、種々時間に洗浄し再び培地II(アデニン無添加)で18時間後の酵素生産量を調べたものである。30分間ペプトンとの接触により、その後かなりの量の酸性プロテアーゼが生産されることから、ペプトンの菌体内とり込みは lag の時間に比し、かなり速く起っていることを示唆している。

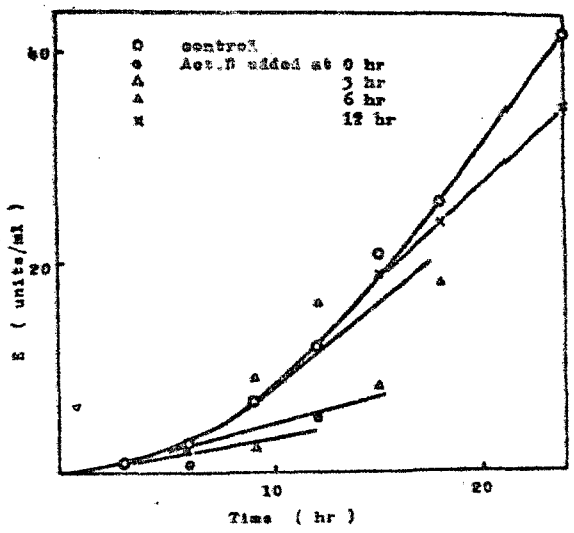
つぎに非増殖下での induction の種々の時間にアクチノマイシンD(150μg/ml)を添加し、その後の酵素生産を調べた(第4-7図, 第4-8図)。モーウラシルのRNA区分へのとり込みは、アクチノマイシンD(150μg/ml)添加後3時間で著るしい阻害が認められた。酸性プロテアーゼはアクチノマイシン添加後約3時間における対照の傾斜で生産され、その後この



第4-6図 ペプトンによる induction の過程におけるペプトンの菌体内とり込み



第4-7図 非増殖期でのアクチノマイシンDのRNA合成に及ぼす影響

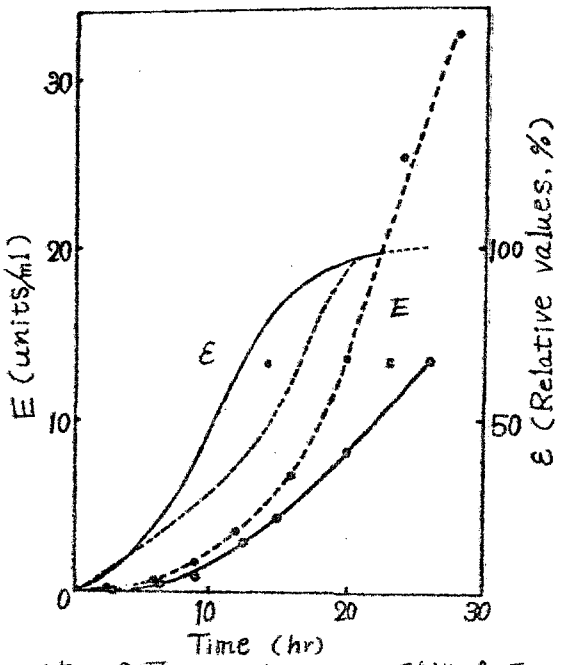


第4-8図 ペプトンによる酸性プロテアーゼ induction の過程におけるアクチノマイシンDの影響

傾斜はかなり長時間維持された。これはinduction lagはmRNAの合成以前に原因があることを示唆している。また前章で述べた増殖期でアクチノマイシンDを添加した場合よりも非増殖期で添加した時の方が酵素活性が長時間維持された。

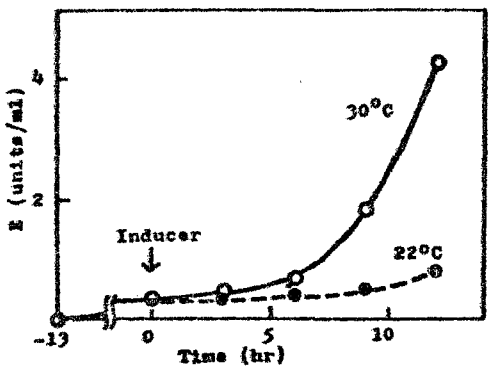
非増殖期ではアデニン系分質の欠乏のためRNAプールが減少していることは既に示したが、これがinduction lagの原因ではないことを第4-9図から示唆された。induction開始時にア

デニン100μM, グアニン, ウラシル, シトシンをそれぞれ500μM添加すると15時間後の酵素生産は著るしく増大するが, lagの期間は無添加のものと差がなかった。これはRNAプールの減少がlagの原因でないことを示唆している。



第4-9図. ペプトンによる酸性プロテアーゼinductionにおける核酸塩基の添加効果

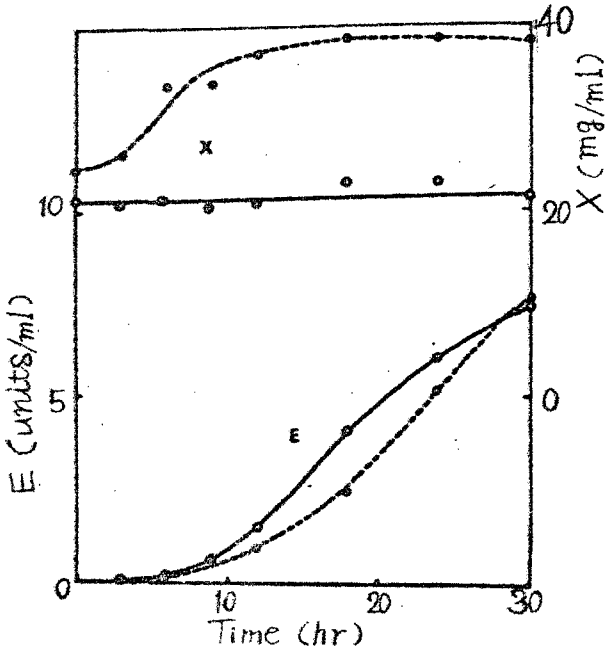
前章において培養温度の低下は酸性プロテアーゼ生産活性の維持に有効で, mRNAを安定化することを述べたが, mRNAの合成には低温は好適でなくinduction lagを著るしくすることを第4-10図に示した。培地Ⅱ(アデニン750μM含有)で前培養した培養液を-13時間に30℃, 22℃に移し, 0時間にペプトンを添加したものである。



第4-10図. Induction patternに対する温度の効果

3. アジピン酸などの inducer による induction pattern

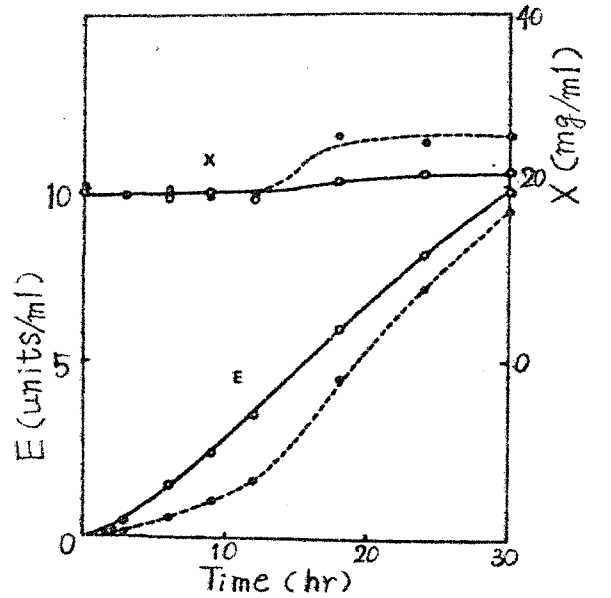
カザミノ酸、アジピン酸について、第4-5図と同様の induction 実験を行なった結果を第4-11図，第4-12図に示す。



第4-11図 カザミノ酸(1%)による酸性プロテアーゼの induction pattern

○——○ アデニン無添加

●——● アデニン500μM添加

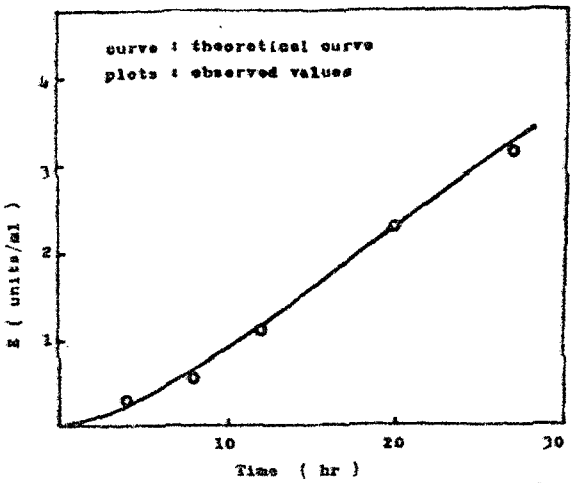


第4-12図 アジピン酸(0.5%)による酸性プロテアーゼの induction pattern

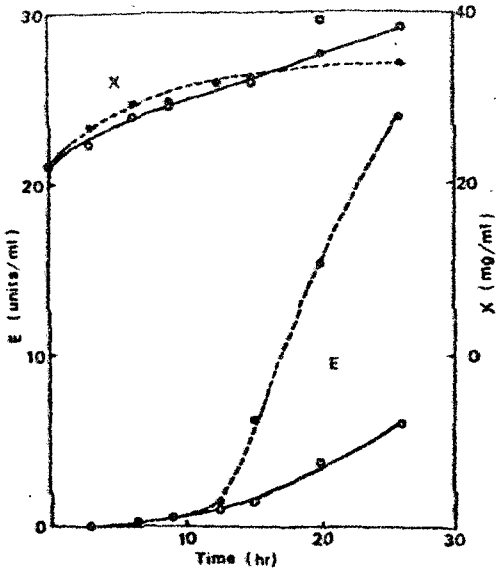
○——○ アデニン無添加

●——● アデニン500μM添加

カザミノ酸はペプトンほど有効でないが，経時変化はペプトンと同様のパターンを示し，アデニン（500 μM）を添加し増殖させればrepressionが認められた。アジピン酸の場合は，これらと対照的に添加と同時に酵素が偕まり，lagは認められなかった。アデニン（500 μM）を添加すると増殖は阻害されているが，酵素生産はやはりrepressされるという興味ある結果を得た。第4-13図にはアジピン酸によるinductionの前章（5）式への適合性を示す。ペプトンの場合はlagがあるためinductionの開始時からは（5）式には適合しないが，アジピン酸の場合は0時間よりよく適合し，inductionは初期に定常化していることが示唆された。



第4-13図 アジピン酸によるinduction（非増殖）の(5)式への適合性
$k=0.09$, $\lambda=0.06$, $E_0=0$



第4-14図 Derepressed菌体（•……•），repressed菌体（o—o）の熱水抽出物によるアルカリ性プロテアーゼのinduction pattern

Derepressed菌体，およびrepressed菌体の

熱水抽出物による induction pattern を第4-14図に示す。Folin-Ciocalteu 法[143]によりペプトン 0.2% 相当に蛋白量を合わせたものであり，アデニン系分質を含んでいるため増殖が認められた。Derepressed 菌体では 12 時間後に著しく酵素生産量は増大し，repressed 菌体の抽出物とは顕著な差が認められた。しかし増殖期での repression がやはり認められた。

第4節　考　　察

ペプトンで完全に derepress された菌体の shift-up は増殖に伴う repression に抵抗性を有するが，shift-up の際，植菌量を減ずると repression を受けるようになった。これは derepressed 菌体中に存在すると見られる，増殖に伴い生ずる co-repressor (anabolite) に拮抗する物質が培養系全体として稀釈されたものと考えられる。アデニンを deinduction の時期に加えて増殖させても，培養液当りの酵素生産量は変化しないことから，増殖による repression はやはり mRNA 合成の以前で起っていること，および増殖停止期において酵素生産は mRNA の translation の段階は律速になっていないと考えられる。なぜならば，アデニン添加により増殖が起るとリボゾーム，tRNA，アミノ酸プールなどは増大することが考えられ，それにも拘らず酵素生産には差が生じなかったからである。

ペプトンにより induction は約 10 時間の lag が認められるが，ペプトンの菌体内への取り込みは速く，初期にアクチノマイシンDで阻害すれば，その後の酵素生産は少ないこと，induction の際に核酸塩基を添加

しても lag に変化を与えないこと，などより lag の原因は菌体内にペプトンが取り込まれてから，mRNA が生成するまで，の間に存在すると考えられる。一方アジピン酸による induction は lag がほとんどないことより，結局ペプトンの場合の lag はペプトンから直接の，あるいは真の inducer に変換するのに要する lag であることが強く示唆された。アジピン酸で induce した場合と，ペプトンの場合との真の inducer の関係，作用機作などについては興味が持たれ，今後詳細な検討が必要である。

アジピン酸による induction は 0 時間ひう第3章 (5)式によく適合し，inducer のレベルは定常に達しているとの示唆を得た。さらにアデニン添加により菌濃度で調べた増殖が，アジピン酸による阻害のために行なわれていない場合でも repression が認められた。マノメーターで測定した呼吸，^{14}C-アミノ酸の蛋白区分への取り込みはアジピン酸添加により阻害されないという結果も得ており，増殖が認められない場合でも，アデニン添加により菌体内の repressor (あるいは co-repressor) レベルの増大が起っていることが示唆された。

第5節　要　　約

1. 完全に derepress された菌体の shift-up において，持種量が減少すれば uninduced 菌体の場合に接近すること，つまり repression を受けるようになることが認められた。Deinduction の過程でアデニンを加えても酵素生産（培養液当り）に差は認められなかった。

2. ペプトンによる induction は約 10 時間の遅れがあったが，induction 開始後 30 分でペプトンを培地中から除いても，かなりの酵素

生産が認められた。さらに induction 初期にアクチノマイシンDを添加すると，その後わずかの酵素生産しか認められなかった。なお非増殖期における アクチノマイシンDの添加は増殖期の場合に比べ，かなり長時間酸性プロテアーゼ生産活性が維持された。

3. ペプトンと同時に核酸塩基を添加しても lag は変らず，その後の酵素生産量が増大した。

4. アジピン酸による induction は lag がなく，非増殖期の速度式によく適合した。しかしアデニンを添加すると repression が認められた。

第5章　菌糸の活性分布に関するミクロ的解析

第1節　緒　　言

微生物のうちでも高等植物に近いかびは，とくに固体表面培養において気菌糸，基中菌糸，胞子形成など種々の細胞分化が起る。この場合コロニーの場所により菌糸内組織や酵素活性などに分布が生ずることは多くの研究者により認められ，Zalokar[115-118]は *Neurospora crassa* の菌糸内の核，ミトコンドリア，ミクロゾームの分布，種々の酵素活性の分布について詳細な研究を行ない，菌糸の先端と末端ではかなり異ることを示した。Yanagitaら[119-122]はやはり電子顕微鏡，オートラジオグラフィーにより *Asp. niger* について同様の結果，および ^{35}S，^{32}P，^{14}C などの取り込みが先端，末端で差があること，Nagasaki[123,124]も酵素の分布があることを認めた。最近，木下[125]は *Asp. niger* の分泌酵素生産の菌糸内分布を細胞 age の面から解析している。Liebs[126]は液内培養のペレットについて ^{14}C-蔗糖の取り込みがペレットの表面，内部で異なることをオートラジオグラフィーで認めた。

微生物培養が歴史性をもった系であるが上（とくに回分培養）その培養系を構成する細胞 age，細胞集団 age，培養 age などの面が考慮されねばならない。前章までに行なった速度論的解析は，かびの液内培養でペレット状に発育した菌糸は各々の時点において均一なものであり，培養全体として履歴性を有するとの仮定の

もとに行なった。パルプ状菌糸の培養では外見上，菌糸の分化を認めないが，種々の生理活性が一様に分布しているか否か，とくに細胞のage分布を考慮せずに，平均値を採用するのが妥当か否かは重要な問題である。

本章ではまず液内培養でパルプ状に発育した菌糸をhanging-drop培養により環境条件一定のもとにその増殖過程を顕微鏡下で追跡した。ついで ^{14}C-アデニン，^{14}C-グアノシンの菌糸内へのとり込み，および核酸合成活性の分布をオートラジオグラフィーで観察し，上述の課題に対する検討を行なった。

第2節　実験材料および方法

菌糸増殖の顕微鏡観察：　胞子，増殖期菌糸，非増殖期菌糸をそれぞれ培地Iを用いたhanging-drop法により顕微鏡下で培養した。培養温度は30°Cで，菌糸が直接空気に触れていないことを確認し，液内培養条件下で行なった。

放射性核酸のとり込み：　増殖期での^{14}C-アデニンの取り込み実験は50ml容Erlenmeyerフラスコに培地I（アデニン750μM添加）で6時間培養した増殖期の培養液0.5mlに0.02N-NaOHに溶かした8-^{14}C-アデニン（3mM，比活性22μc/μmole）液を0.5ml添加し，pH 4.2に調整後，試験管で30°Cにて振盪培養を行なった。非増殖期での^{14}C-グアノシンのとり込み実験は，培地I（アデニン750μM添加）で48時間培養した培養液0.6mlに^{14}C-グアノシン（U）（190μM，比活性518μc/

μmole）溶液 0.4 ml を添加し，同様に試験管にて振盪培養を行なった。

オートラジオグラフィー[127]：　^{14}C-アデニン，^{14}C-グアノシンでラベルした菌糸をグラスファイバーフィルター上で冷水で洗浄後，99% エタノールで脱水した。低濃度エタノールから順次濃度を上げ脱水を行なうと，その間に 260mμ 吸収物質の溶出がかなり認められた。一部分はその菌糸をスライドグラスに固定し，残りはアセトン乾燥後，Schmidt-Thanhauser-Schneider 法[94,95]により核酸を除き，99% エタノールで脱水後スライドグラスに固定した。菌糸標本を固定したスライドグラスをセロイジン 1% のエーテル・アルコール（1:1）溶剤中に浸漬し，セロイジン膜を貼布した。感光乳剤はサクラ NR-M2 を用い，ディッピング法をとり，乾燥後，暗箱中で 5°C にて露出した。現像はレントゲン現像液コニドール X（小西六写真工業 KK）で現像後，コニフィックスで定着し，水洗，乾燥後顕微鏡観察を行なった。

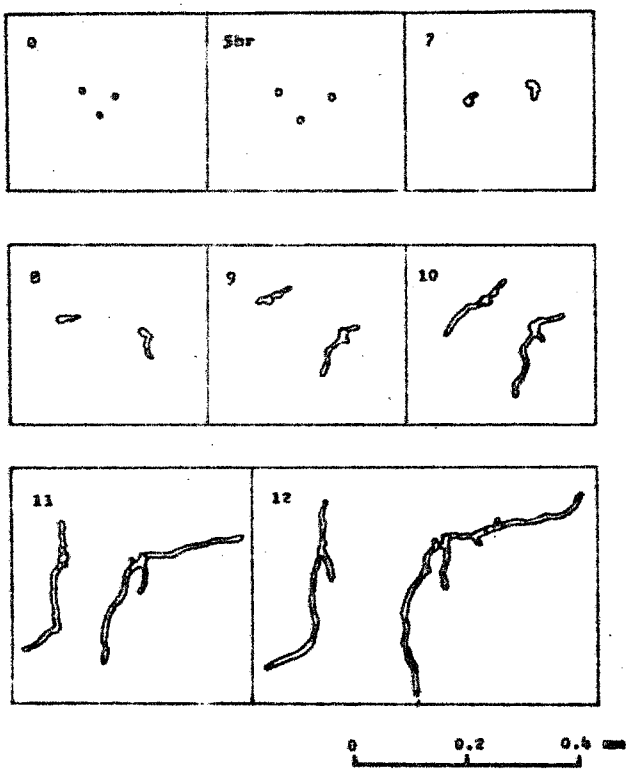
^{14}C-アデニン取り込み菌糸の ^{12}C-アデニン培地での増殖：　培地 I. 0.5 ml，8-^{14}C-アデニン（570 μM，比活性 22.8 μc/μmole）溶液 0.5 ml にグルコース 35 mg を添加した培地に菌糸を1白金耳接種し，12時間培養した。菌糸を無菌水で洗浄後，培地 I（^{12}C-アデニン 1mM 含有）に再懸濁し，10時間増殖させた。^{12}C-アデニン培地で再増殖の際，対照として ^{12}C-ア

デニン培地で増殖した菌糸をも等量添加した。

ペレットの形成は同様にして ^{14}C-アデニン培地で培養したミクロペレットを ^{12}C-アデニン培地で48時間増殖させ，平均径3mmのペレットと形成させ，これを洗浄後 厚さ約0.3mmの切片を作成し，洗浄後，脱水，固定し オートラジオグラフィー 試料とした。

第3節　実験結果

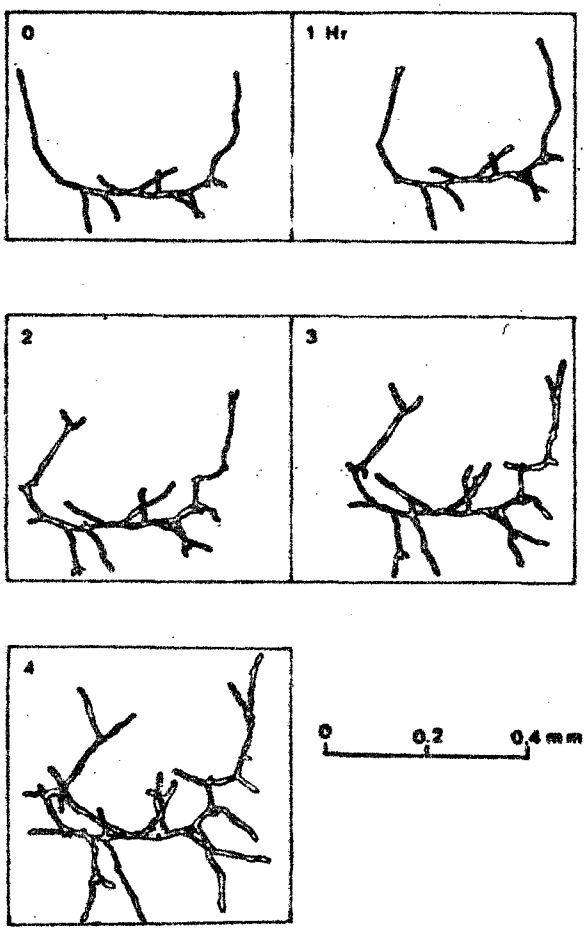
1. *Hanging-drop culture* による菌糸増殖の顕微鏡観察



第5-1図. *Asp. niger* 胞子の発芽，菌糸発育の経時変化（*hanging-drop culture*）.

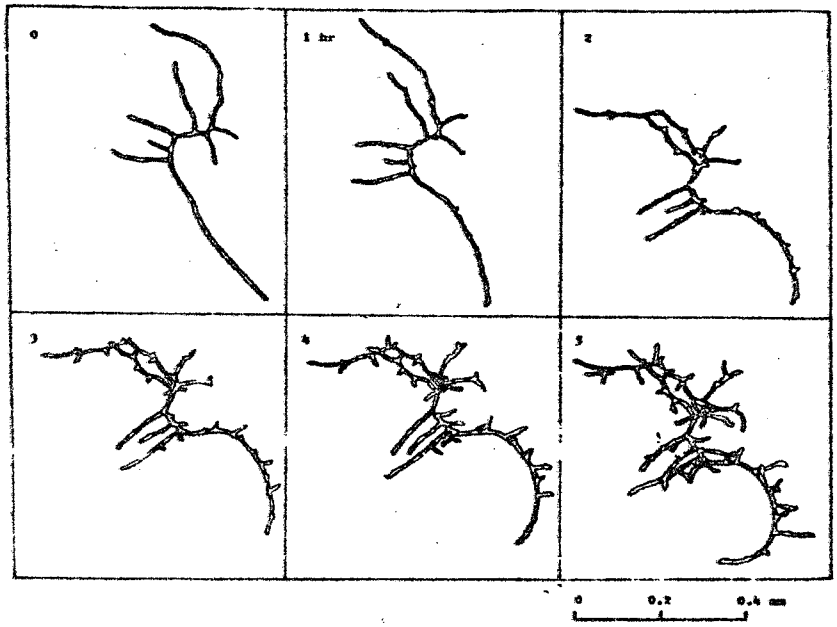
第5-1図に *hanging-drop culture* での胞子の発芽の状況の典型的な例を示す。胞子接種後膨潤し，約7時間で発芽し始める。菌糸は胞子1個当り複数本生じ，伸長すると *septa* が出来，12時間で分岐が認められた。第5-2図には増殖期菌糸の伸長の

状態の一例を示す。septa間の伸びは認められず，菌糸先端部が伸びるが，菌糸の中間部においても各所に分岐が生じてこれが伸長していくことが認められた。第5-3図には非増殖菌糸の培養に0時間にアデニン1mMを添加し，その後の発育の過程を調べたものを示す。アデニン添加後，2時間で菌糸のあらゆる部分に1 septa間当り1～2の分岐が生じ始める。5時間後には伸長した分岐に新たなseptaが生じ，その間にも新たな分岐が出来始めるのが認められた。



第5-2図 Asp. niger の増殖期菌糸の発育経時変化 (hanging-drop culture)

以上の結果から増殖に関しては活性は菌糸内にほぼ一様に分布しており非増殖期の菌糸で



第5-3図. Asp. niger 非増殖期菌糸のアデニン添加後の発芽経時変化 (hanging-drop culture)

も，アデニン添加により増殖する活性が一様に存在することが示された．

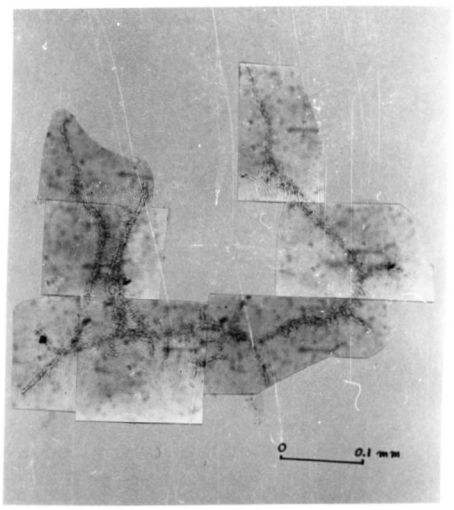
2. オートラジオグラフィーによる菌糸の核酸取り込み，合成活性の分布

液内培養のパルプ状菌糸の増殖期，非増殖期での ^{14}C-アデニン，^{14}C-グアノシンの菌糸内への取り込み，核酸合成のオートラジオグラフィーによる結果を示す。第5-4図は増殖期に30分間 ^{14}C-アデニンでラベルしたもの，第5-5図はその冷PCA不溶区分のオートラジオグラムである。いずれも菌糸内に一様に銀粒子が認められる。

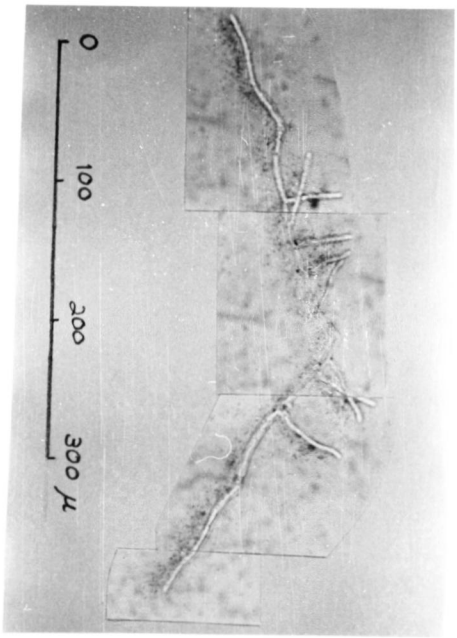
第5-6図，第5-7図には非増殖期に1時間 ^{14}C-グアノシンでラベルしたもの，および，その冷PCA不溶区分のオートラジオグラムを示す。増殖期のアデニンの場合と同様の結果が認められる。

つぎに ^{14}C-アデニンを含む培地で培養し，増殖停止期に入った直後の菌糸を ^{12}C-アデニン培地で再増殖させた結果を示す。第5-8図は ^{12}C-アデニン培地での培養0時間のものである。^{12}C-アデニン培地での再増殖の際，^{14}C-アデニン培地で増殖した菌糸をほぼ等量混合し，5，10時間後のオートラジオグラムを第5-9，5-10図に示した。露出時間はいずれも同じであるが，銀粒子の認められる菌糸は，菌糸内にほぼ一様に銀粒子が存在し，培養時間の経過と共に一様に稀釈されていることがわかる。さらに5，10時間後にも全く銀粒子が認められない菌糸が存在し，これは ^{14}C-アデニン培地増殖菌糸から，^{14}C-アデニンが放出され，他の菌糸に再吸収されることがないことを示している。

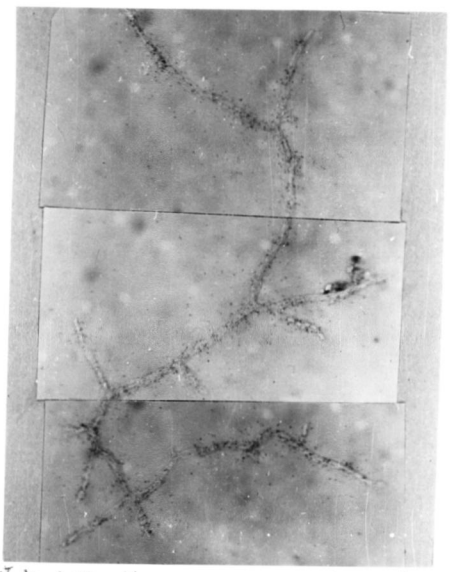
同様の実験をペレットについて行なった結果を第5-11図に示す。^{14}C-アデニン培地で形成したミクロペレットを ^{12}C-アデニン培地で48時間増殖させたペレット切片のオートラジオグラムである。銀粒子はペレットの中心部に認められ，周辺部には，ほとんど認められない。これはパルプ状に発育した菌糸とは対照的であり，ペレット周辺が培地から ^{12}C-アデニンを吸収し，中心部に比べ盛んに増殖していることを示唆する。



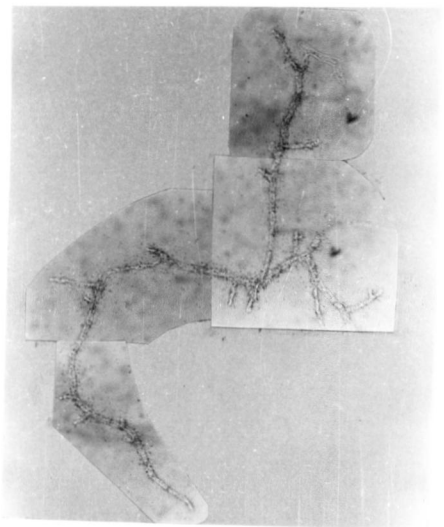
第5-4図 ^{14}C-アデニンで30分間ラベルした増殖期菌糸のオートラジオグラム



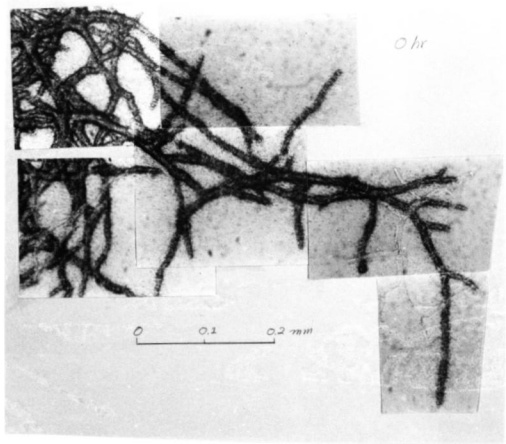
第5-5図 ^{14}C-アデニンで30分間ラベルした増殖期菌糸の冷PCA不溶区分のオートラジオグラム



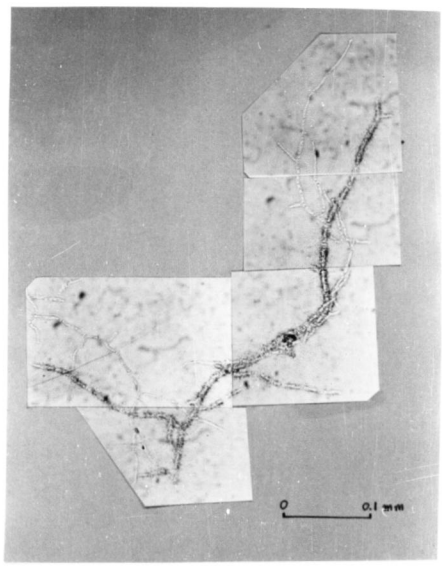
第5-6図 ^{14}C-グアニンで1時間ラベルした非増殖期菌糸のオートラジオグラム



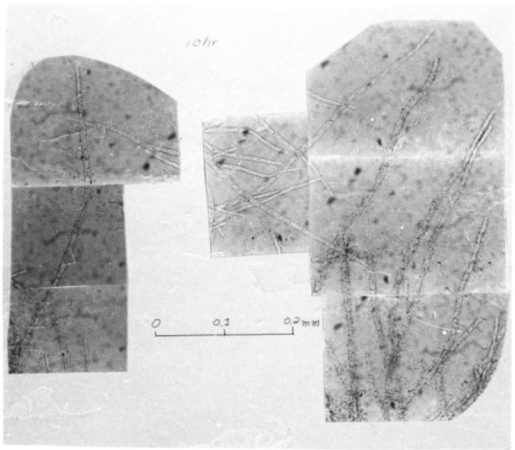
第5-7図 ^{14}C-グアニンで1時間ラベルした非増殖期菌糸の冷PCA不溶区分のオートラジオグラム



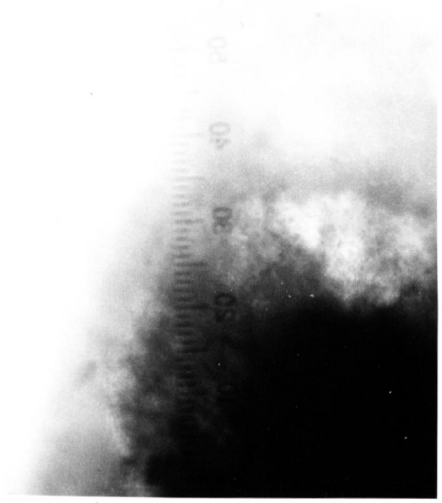
第5-8図　^{14}C-アデニン，^{12}C-アデニン培地で12時間増殖した菌糸混合のオートラジオグラム



第5-9図　前図に示した菌糸混合体を^{12}C-アデニン培地で5時間増殖させたもののオートラジオグラム



第5-10図　^{14}C，^{12}C-アデニン培地増殖菌糸の^{12}C-アデニン培地での10時間培養菌糸のオートラジオグラム



第5-11図　^{14}C-アデニン培地で増殖後^{12}C-アデニン培地で48時間増殖させたペレット切片のオートラジオグラム

第4節　考　　察

かびの表面培養，液内培養のペレット増殖の場合には種々の分化が起ることが一般に認められているが，液内培養のパルプ状増殖菌糸の場合は hanging-drop culture による顕微鏡観察の結果，菌糸の伸長は先端で起り，septa 間の伸長は認められなかったが，septa 間からは新たな分岐が次々と生じた。非増殖期の菌糸にアデニンを添加し，再増殖させた時も分岐は全ゆる個所で生じた。これは増殖活性の菌糸内分布が一様であること，さらに非増殖期での長時間の培養においても特定の菌糸部分が，いわゆる老化現象を起しているのではないことが認められた。

増殖期，非増殖期での短時間のアデニン，グアノシンの菌糸内とり込み量，冷PCA不溶性区分へのとり込み量はオートラジオグラフィーの結果から菌糸内に一様であり，液内培養のパルプ状菌糸についてはこれらの活性，例えば酵素生産活性なども一様分布していることが推定されるが，これについては今後の検討が必要である。

ペレット増殖の場合には，菌体増殖，アデニンのとり込みは不均一に起っており，パルプ状増殖とは対照的な結果が得られた。ペレット増殖の場合にこのような不均一性を生ずる要因の解析は興味ある課題である。

以上本章で得た結果から液内振盪培養におけるパルプ

状菌糸を扱う場合には、培養系全体としての平均値により解析しても大過ないことが示唆された。

第5節　要　　約

1. 液内培養でのパルプ状菌糸は顕微鏡観察の結果菌糸の伸長は先端で起り、一度形成された *septa* 間は伸長しない。*septa* 間の増殖は分岐を生ずることにより起る。また非増殖期の培養にアデニンを添加すると、菌糸の全ゆる個所で分岐が生じた。これらのことより増殖の活性は菌糸内に一様にほぼ分布していることが示唆された。

2. 増殖期での ^{14}C-アデニン 30分間、非増殖期での ^{14}C-グアノシン1時間のとり込み、核酸合成は、オートラジオグラフィーの結果菌糸内で一様に認められた。

3. ^{14}C-アデニン培地で増殖したパルプ状菌糸の ^{12}C-アデニン培地での再増殖の結果は、菌糸内に一様に放射能活性の稀釈が認められたが、ペレットの場合は不均一であった。また ^{14}C-アデニン培地増殖菌糸から他の菌糸への放射能活性の移動は認められなかった。

総括および結論

かびの生産する多くの分泌酵素は non-growth-associated 型を示し、Aspergillus niger のアデニン要求株 D 20-2-5 の酸性プロテアーゼは preferential synthesis 型をとる。この様な例の生理的研究には、直接生産物の材料とならない物質の要求株を用い、増殖を制限して行なうのが培養制御の面からも適当である。使用菌株はアデニン欠乏による増殖停止期が非常に長く、かつその時期に酸性プロテアーゼを多量に培地中に蓄積するという特徴を有し、かつ本菌株は当研究室で長く扱われており、その性質がよくわかっているとの利点を生かして、酸性プロテアーゼ優先合成の生理学的、動力学的研究を行なったのが本論文である。

ここで得られた結果は、次の様に総括、結論される。

第1章では、生産される酸性プロテアーゼの性質を調べ、最適 pH を 2.8 付近に有し、30°C では pH 3 ～ 5 の範囲内で長時間安定である。培養沪液から、酸性プロテアーゼのゲル沪過、電気泳動などによる精製を行ない、培養液中には唯一種類しか酸性プロテアーゼが存在しないこと、これは培養の前期、後期においても同一物しか認められず生産される酸性プロテアーゼは、培養期間を通じて単一蛋白質でかつ、失活も起らないとの結論を得た。

第2章では、酸性プロテアーゼ生産には、有機窒素源とくにペプトン蛋白質が良好で、無機窒素源では殆ど生産されないことを認め、ペプトンの添加により、酵素生産は誘導され、ペプトンの除去により、deinduce されることから、ペプトンは特異的に酸性プロテアーゼの inducer 或

いは *inducer* の前駆体であると結論された。

培養の経時変化は、アデニン欠乏による増殖停止期で生産が盛んになり、長時間生産活性が持続される *non growth-associated* 型を示した。置換培養において、アミノ酸、核酸塩基アナログの添加、嫌気的培養により酵素生産は速やかに停止すること、菌体内には、殆んど酵素は存在しないことより *preferential synthesis* 型であると結論した。

inducer としての有効物質の検索をアミノ酸、合成ペプチド、天然のペプチド、ジカルボン酸、およびその窒素含有物質について、広く検討した結果、ポリペプトンをも含めカゼインの酵素分解物が最も有効であるが、有効ペプチドは、分子量がかなり大きなものであるとの結果を得た。またジカルボン酸のうち、アジピン酸がかなり有効であったが、高濃度になると阻害効果が認められた。

ペプトンは増殖相において存在することが増殖停止期の酵素生産に有効であり、ペプトンが直接 *inducer* となるのでなくて、*inducer* の前駆体あるいは *inducer* 生成系に有効に働いているとの示唆を得、これは第4章において更にくわしく検討した。

増殖、酵素生産に対する外的因子の影響のうち、pHを3～4に保てば、いずれにも好適であるが、温度は増殖に対しては、30～32℃が良好であるとの結果を得、これは、第3章 第4章において酵素生産活性の維持、とくに *mRNA* の安定化に役立っているとの結論を得た。

第3章では、DNA依存性RNA合成の阻害剤アクチノマイシンDを添加しても、酵素生産は、数時間続くことにより、酸性プロテアーゼの *mRNA*

は高度に安定であり、これが preferential synthesis の大きな要因であると結論され、培養温度の低下によりさらに顕著になるとの結論を得た。増殖停止期での ^{14}C-グアニンの添加実験から、RNA の turnover 合成を認め、これは培養温度 22°C より 30°C の方が盛んであり、これも優先合成を行なうための要因であった。また、deinduction の実験から mRNA の分解は一分子的であるとの示唆を得、動力学モデルへの適合性を試みた結果、増殖期、非増殖期の生産共によくこのモデルに従うことを認め mRNA の分解定数 k_1、全 RNA の分解定数 k ともに Arrhenius plot に従うことを認めた。また、derepress された菌体の shift-up は repression (metabolite repression) を受けずペプトンによる derepress は repression に対して非可逆的に作用するという興味ある結果を得た。

第4章では、ペプトンにより derepress された菌体の shift-up の際、植菌量の減少に伴い、repress を受け易くなることを認め、repression に抵抗性のある物質が培養系全体として、稀釈されるものと考えた。またこのアデニン添加の影響は、mRNA の translation のレベルには現われないことが deinduction の実験におけるアデニンの添加により認められた。第2、3章で酸性プロテアーゼ生産に有効であったペプトンは、添加後約10時間の induction lag を有することより、その lag の要因について検討を加えた結果 ペプトンの菌体内とり込みは速やかに起るが、mRNA 合成以前に lag があることが認められ、ここでもペプトンは一度菌体内にとり込まれてから真の inducer に変換されるものと

考えられ、その変換の段階にlagの要因が存在していることが結論された。これに対し、アジピン酸は、添加後lagなしに速やかに酵素生産が始まることが認められた。derepressされていない菌体のいずれのinducerを用いた場合もinductionの際アデニン添加によりrepressionを受けた。

第5章では、菌糸の増殖、核酸とり込み、合成活性をミクロな面から追求し、液内培養でパルプ状に発育した菌糸の増殖は、先端で起るとともにseptaを形成している先端以外のところからも次々と分岐が生じ、全体的に増殖の活性は、菌糸内一様に分布しているとの結論を得た。また^{14}C-アデニン、^{14}C-グアノシンのそれぞれ増殖期、非増殖期でのとり込み、核酸合成はオートラジオグラムの結果、菌糸内でほぼ一様に起っており、顕微鏡観察ともよく一致した。このことはかびの固体表面培養、液内培養のペレット増殖で一般に分化が認められている事実と異り、環境条件が一様であると考えられる。液内培養のパルプ状増殖では、菌糸の活性はほぼ一様で平均令を用いて解析しても大過ないものと結論された。

文　　献

1) Aiba, S., Humphrey, A.E., Mills, N.F. : Biochemical Engineering, p95 (1965) Tokyo Univ. Press

2) 照井：工業化学雑誌, 67, 714 (1964)

3) Gaden, E.L. Jr : Chem. & Ind., p154 (1955) London

4) Gaden, E.L. Jr : J. Biochem. Microbial. Tech. Eng., 1, 413 (1959)

5) Caspersson, T., Landström-Hyden, H., Aquilonius, L.: Chromosoma, 2, 111 (1941)

6) Gale, E.F., Folkes, J.P. : Biochem. J., 59, 675 (1955)

7) Spiegelman, S., Halvorson, H.O., Ben-Ishai, R. : A Symposium on Amino Acid Metabolism, p.124 (1955)

8) Hoagland, M.B., Zamecnik, P.C., Stephenson. M.L. : J. Biol. Chem., 231, 241 (1958)

9) Jacob, F., Monod, J. : J. Mol. Biol., 3, 318 (1961)

10) Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L., Hecht, L.I. : Proc. N.A.S., 44, 73 (1958)

11) Pardee, A.B., Jacob, F., Monod, J. : J. Mol. Biol, 1, 165 (1959)

12) Gilbert, W., Müller-Hill, B. : Proc. N.A.S., 56, 1891 (1966)

13) Zubay, G., Lederman, M. : Proc. N.A.S., 62, 350 (1969)

14) Keps, A. : Biochim. Biophys. Acta, 76, 293 (1963)

15) Nakada, D., Magasanik, B. : J. Mol. Biol., 8, 105 (1964)

16) Hartwell, L.H., Magasanik, B. : J. Mol. Biol., I, 401 (1963)

17) Hartwell, L.H., Magasanik, B. : J. Mol. Biol., 10, 196 (1964)

18) Fan, D.P. : J. Mol. Biol., 16, 174 (1966)

19) Nirenberg, M.W., Jones, O.W., Leder, P., Clark, B.F.C., Sly, W.S., Pestka, S. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 549 (1963)

20) Nirenberg, M.W., Leder, P. : Science, 145, 1399 (1964)

21) Nirenberg, M., et. al. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol, 31, 11 (1966)

22) Adams, J.M., Capecchi, M.R. : Proc. N.A.S., 55, 147 (1966)

23) Nakamoto, C.T., Kolakofsky, D. : Proc. N.A.S., 55, 606 (1966)

24) Capecchi, M.R. : Proc. N.A.S., 58, 1144 (1967)

25) Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., Nirenberg, M. : Proc. N.A.S., 61, 768 (1968)

26) Ertel, R., Brot, N., Redfield, B., Allende, J.E., Weissbach, H: Proc. N.A.S., 59, 861 (1968)

27) Milman, G., Goldstein, J, Scalnik, E., Caskey, T. : Proc. N.A. S., 63, 189 (1969)

28) De Vries, J.K., Zubay, G. : Proc. N.A.S., 57, 1010 (1967)

29) Chambers, D.A., Zubay, G. : Proc. N.A.S., 63, 118 (1969)

30) Horikoshi, K., Ikeda, Y. : J. Bacteriol., 91, 1883 (1966)

31) Horikoshi, K., Ikeda, Y. : Biochim. Biophys. Acta, 166, 501 (1968)

32) Horikoshi, K., Ohtaka, Y., Ikeda, Y. : J. Agr. Biol. Chem. Japan, 29, 734 (1965)

33) Monod, J., Pappenheimer, A.M., Cohen-Bazire, G. : Biochim. Biophys. Acta, 9, 648 (1952)

34) Terui, G., Okazaki, M., Kinoshita, S. : J. Ferm. Tech., 45, 497 (1967)

35) Okazaki, M., Terui, G. : J. Ferm. Tech., 45, 1147 (1967)

36) Kinoshita, S., Okada, H., Terui, G. : J. Ferm. Tech., 45, 504 (1967)

37) Kinoshita, S., Okada, H., Terui, G. : J. Ferm. Tech., 46, 427 (1968)

38) Crewther, W.G., Lennox, F.G. : Nature, 165, 680 (1950)

39) 吉田：日農化誌 28, 66 (1954)

40) Yoshida, F. : Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 20, 252 (1956)

41) Yoshida, F., Nagasawa, M. : Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 20, 261, 257 (1956)

42) Yoshida, F., Nagasawa, M. : Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 22, 32 (1958)

43) 蔭山：醗工誌, 33, 53 (1956)

44) 蔭山, 杉田：醗工誌, 33, 109 (1956)

45) 中西 : J. Biochem. (Japan), 46, 1263 (1959)

46) 中西 : J. Biochem. (Japan), 46, 1411 (1959)

47) 中西 : J. Biochem. (Japan), 46, 1553 (1959)

48) 中西 : J. Biochem. (Japan), 47, 16 (1960)

49) 熊本, 布川, 馬場, 佐々木, 広島：醸協会誌, 52, 225 (1957)

50) 鈴木, 布川, 馬場, 佐々木, 広島：醸協会誌, 52, 477 (1957)

51) 茂木：醗工誌, 35, 150 (1957)

52) 松島：日農化誌, 32, 215 (1958), 33, 116 (1959)

53) 松島：醸協会誌, 16, 280 (1958)

54) Koaze, Y., Goi, H., Esawa, K., Yamada, Y., Hara, T. : Agr. Biol. Chem., 28, 216 (1964)

55) Tomonaga, G., Ohama, H., Yanagita, T. : J. Gen. Appl. Microbiol, 10, 373 (1964)

56) 辻田：日農化大会発表 (1968. 4. 名古屋)

57) 黒田, 照井：醗工誌, 38, 366 (1960)

58) 岡崎, 照井, 金野：醗工誌, 41, 266 (1963)

59) Kuramitsu, H. K., Udaka, S., Moyed, H. S. : J. Biol. Chem., 239, 3425 (1964)

60) Greenberg, G. R. : J. Biol. Chem., 219, 423 (1956)

61) Hartman, S. C., Buchanan, J. M. : Annual Review of Biochem., 28, 365 (1959)

62) Anson, M. L. : J. Gen. Physiol., 22, 79 (1938)

63) Hagihara, B. : Ann. Rept. of Scie. Workers, Facul. Sci. Osaka Univ., 2, 35 (1958)

64) Methods in Enzymology vol 2. p3

65) 駒野, 長崎, 柳田：日農化大会発表 (1968. 4. 名古屋)

66) Crewther, W. G., Lennox, F. G. : Australian J. of Biol. Sci., 6, 410, 428 (1953)

67) Tomonaga, G. : J. Gen. Appl. Microbial., 12, 267 (1966)

68) Tomonaga, G., Yanagita, T. : J. Gen. Appl. Microbiol., 14, 321 (1968)

69) 塩田, 峯 : 日農化誌, 30, 724 (1956)

70) 塩田, 峯 : 日農化誌, 31, 173 (1957)

71) 福本, 山本, 鶴 : 日農化誌, 31, 429 (1957)

72) 福本, 山本, 鶴 : 日農化誌, 31, 510 (1957)

73) Gorbach, G., Koch, D.G. : Arch. für Mikrobial, 23, 265 (1955)

74) Gorbach, G., Koch, D.G. : Arch. für Mikrobial., 23, 284 (1955)

75) 安井 : 日農化関東支部会 (昭31.11)

76) 金野, 照井 : 醸工誌, 39, 375 (1961)

77) 小川, 照井 : 日本醸工大会発表 (1968.11. 大阪)

78) 岡崎, 照井 : 醸工誌, 44, 276 (1966)

79) 岡崎, 照井 : 醸工誌, 44, 287 (1966)

80) 上山, 富金原, 照井 : 醸工誌, 43, 481 (1965)

81) Somogyi, M. : J. Biol. Chem., 100, 61 (1945)

82) Somogyi, M. : J. Biol. Chem., 195, 19 (1952)

83) Maxwell, S. : Australian J. of Sci. Research Ser-B, 5, 42 (1952)

84) Yamamoto, K. : Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 21, 308 (1957)

85) Yamamoto, K. : Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 21, 313 (1957)

86) Yamamoto, K. : Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 21, 319 (1957)

87) Spirin, A. S., Nemer, M : Science, 150, 214 (1965)

88) Okazaki, M., Shinmyo, A., Terui, G. : J. Ferm. Tech., 48 (1970) (in press)

89) Reich, E. : Science, 143, 684 (1964)

90) Goldberg, I.H., Rabinawitz, M., Reich, E. : Proc. N.A.S., 48, 2094 (1962)

91) Kahan, E., Kahan, F., Hurwitz, S. J. : J. Biol. Chem, 238, 2491 (1963)

92) Goldberg, I.H., Reich, E. : Federation Proceedings, 23, 940 (1964)

93) Malamy, M., Horecker, B. L. : Methods in Enzymology, vol. 9. p 639

94) Schmidt, G., Thannhauser, S. J. : J. Biol. Chem., 161, 83 (1945)

95) Schneider, W. C. : J. Biol. Chem, 164, 747 (1946)

96) 岡崎. 新名. 照井 : 醗工誌, 43, 581 (1965)

97) Broquist, H. P., Snell, E. E. : J. Biol, Chem., 180, 59 (1949)

98) Magasanik, B., Snell, E. E. : J. Am. Chem. Soc., 78, 5110 (1956)

99) Wartmann, J. : Z. Physiol. Chem, 6, 287 (1882)

100) Pollok, M.R. : Brit. J. Exp. Path., 31, 739 (1950)

101) Pollok, M.R. : Brit. J. Exp. Path., 32, 387 (1951)

102) Pollok, M. R. : Brit. J. Exp. Path., 33, 587 (1952)

103) Monod, J., Cohen-Bajire, G., Cohn, M. : Biochim. Biophys. Acta, I, 585 (1951)

104) Ben-Hamida, F., Schlessinger, D. : J. Bacteriol., 90, 1611 (1965)

105) Epps, H. M. R., Gale, E. F. : Biochem. J., 36, 619 (1942)

106) Monod, J. : Growth, 11, 223 (1947)

107) Magasanik, B. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 249 (1961)

108) Nakada, D., Magasanik, B. : J. Mol. Biol., 1, 165 (1959)

109) Kohn, M., Horibata, K. : J. Bacteriol, 78, 624 (1959)

110) Clark, D. J., Marr, A. G. : Biochim, Biophys. Acta, 93, 85 (1964)

111) Mandelstam, J. : Biochem. J., 82, 489 (1962)

112) Loomis, W. F., Magasanik, B. : J. Mol. Biol., 8, 417 (1964)

113) Palmer, J., Moses, V. : Biochem. J., 103, 358 (1967)

114) Folin, O., Chiocalteu, V. : J. Biol. Chem., 73, 627 (1927)

115) Zalokar, M. : Am. J. of Botany, 46, 555 (1959)

116) Zalokar, M. : Am, J. of Botany, 46, 602 (1959)

117) Zalokar, M. : Expt. Cell Research, 12, 114 (1960)

118) Zalokar, M. : J. of Biophys. Biochem. Cytol., 9, 609 (1961)

119) Yanagita, T., Kogane, F. : J. Gen. Appl. Microbial., 2,

101 (1963)

120) Yanagita, T., Kogane, F. : J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 179 (1963)

121) Yanagita, T., Kogane, F. : J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 189 (1963)

122) Yanagita, T., Kogane, F. : J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 313 (1963)

123) Nagasaki, S. : J. Gen. Appl. Microbiol., 14, 147 (1968)

124) Nagasaki, S. : J. Gen. Appl. Microbiol., 14, 263 (1968)

125) 木下 : 私信

126) Liebs, P. : Archiv. für Mikrobiol., 61, 103 (1968)

127) 菊池 : 日本原子力研究所 講義テキスト p421 (1965)

本論文に関係ある主な報告

Kinetic Studies on Enzyme Production by Microbes
(Ⅳ) Some Physiological Basis for Kinetic Studies on
Acid Protease Production by Aspergillus niger
Journal of Fermentation Technology, 46, 733 (1968)

Kinetic Studies on Enzyme Production by Microbes
(Ⅴ) Process Kinetics of Acid Protease Production
by Aspergillus niger
Journal of Fermentation Technology, 46, 1000 (1968)

Kinetic Studies on Enzyme Production by Microbes
(Ⅵ) Biological Activity of pulpy mycelia
Journal of Fermentation Technology, 48. (1970)
(in press)