



## サポニンと真性サポゲニン

大阪大学薬学部教授 吉 岡 一 郎

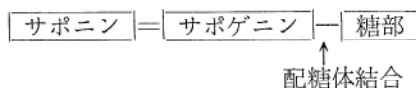
### 1. はじめに

サポニン saponin というのは主に植物成分として植物の種子、根、茎、材、樹皮などに含有されている配糖体でその語源 (<sapo 石鹼) の示すように水と振盪すれば、持続性の泡を生ずる化合物群の総称である。植物分類の立場からサポニンを含有する植物の分布をみると、キキョウ科、ゴマノハグサ科、ナス科、エゴノキ科、サクランウ科、セリ科、ウコギ科、サボテン科、ツバキ科、ムクロジ科、トチノキ科、ヒメハギ科、ニガキ科、マメ科、バラ科、ナデシコ科、アカザ科等の双子葉植物の他にヤマノイモ科、ヒガンバナ科、ユリ科、ヤン科等の単子葉植物におよび非常に広範囲にわたっている。植物生理の点から植物にとってサポニンの持つ意義ということになると植物組織の水分発散防止、防虫、栄養貯蔵などが考えられているが一義的に決めることは未だできないようである。興味深いのは、たとえばモッコク材 (ツバキ科) のサポニンは殺蟻作用を有しておりその材がアリの侵蝕に強い因をなしていることや、蔗糖をとる甜菜 (サトウダイコン、アカザ科) に含有されるサポニンが植物体内にあってグルコースからデンプンが形成されるのを阻害している結果蔗糖が蓄積されるらしいということである。サポニンには上述のような起泡作用の他に赤血球を破壊する溶血作用、魚の鰓呼吸を阻害する魚毒作用 (この性質を利用して魚を獲るのに使われたことがある)、コレステロールと難溶性の分子化合物を形成するなどの顕著な性質がある。また、内服した場合恐らくその難吸収性のために胃腸の内壁に傷のない限り無害であるが、皮下注射すれば組織の壊死を起したり、サポニンの粉末が鼻孔に入るとクサメを催すなどの粘膜刺激作用があって、生理活性としては主としてその毒性面がクローズアップされ永く知られてきた。併し一方、必ずしも不都合な場合ばかりではなく、私共の生活に有用されている面も少なくない。たとえば、サボンソウ (ナデシコ科) の根茎、キラヤ (バラ科) の樹皮、サイカチ (マメ科) の莢、ムクロジ (ムクロジ科) の仮種皮などは起泡剤、洗滌剤として古くから知られ、第二次大戦中石鹼不足の折にはこれらのサポニン含有植物に一方ならぬお世話になったことは

まだ記憶に残っていることで、サポニンの起泡性が利用されている好例であるし、セネガ根、遠志 (オンジ) (ヒメハギ科) やキキョウ根 (キキョウ科) は祛痰薬として古来賞用されている植物薬品 (生薬、ショウヤク) である。また、写真工業ではある種の植物サポニンがフィルムの界面活性剤として現在でも用いられていると聞いている。ここ数年、近代医薬の見地からもサポニンの効用を再検討する動向があって祛痰作用の他に、消炎、抗腫、抗菌、抗ヒスタミン作用を有するサポニンもいくつか見出され、今後この方面での数多くの研究者の努力が期待される。

### 2. サポニンとサポゲニン

サポニンの化学構造は前述のように配糖体の一種であって加水分解によりサポゲニン sapogenin 部と糖部に分れる。サポゲニン部を構成している物質はトリテルペンやステロイド骨格を有しており、糖部としては D-グルコース、D-ガラクトース、D-キシロース、D-フコース、L-アラビノース、L-ラムノース、D-グルクロン酸、D-ガラクトン酸などが知られている。その故にサポニンの化学構造研究にはまずサポゲニンの化学



構造を決定し、ついで構成糖の種類と数とそれらの結合位置様式を決定するのが順序となる。サポゲニンが医薬資源として今日広く用いられている典型的な例の一つは diosgenin (I) である。之は我が国のヤマノイモからも少量得られるがメキシコ産ヤマノイモ科植物から特に豊富に得られるサポゲニンで、副腎皮質ホルモンのコルチゾン系化合物 (たとえば cortisone の構造は(II)式) をはじめ種々ステロイドホルモンの合成原料としてよく知られている。

薬学部の我々の研究室 (生薬学教室、植物成分の化学的研究を専攻) でもこの数年サポニンの化学的研究をテーマの一つに取りあげて種々の植物サポニンの検討を行なってきた。

サポニンの配糖体結合は他の一般配糖体と比較して加水分解に対してかなりの抵抗性を有するので加水分解に

際してしばしば強い反応条件（たとえば強酸性で長時間加熱するなど）を必要とする。このために得られたサポゲニンには往々にして二次的な化学変化を受けていることがあって、所謂、真性サポゲニンではなくっており、サポニンの化学構造研究には好ましくない結果をもたらすのである。ここでいう真性サポゲニンとはサポニンの化学構造を構成しているサポゲニンのありのままの姿のことである。そこでサポニンの配糖体結合切断をできる限り緩和な化学的条件下で行なったり、あるいは酵素を用いるなどして真性サポゲニンを得るための色々な工夫がなされている。併し酵素 エムルシンのように  $\beta$ -グリコシド結合（配糖体結合に最も多い結合様式）を選択的に加水分解する普遍的な酵素分解の例はサポニンの場合には未だ見当らない。（エムルシンはサポニンの配糖体結合を加水分解しない）。サポニン研究に際して我々の興味の一つはサポニンの配糖体結合をサポゲニン部分に何ら二次的な変化をもたらさず加水分解して真性サポゲニンを得ることであった。

### 3. 真性サポゲニンの追求

ここで他の研究者によってこれまで真性サポゲニンを得るのに成功した具体例を二、三示すことにする。サクラソウ科の植物で毎年まだ冬の寒さの厳しい頃から花屋さんのお店先で美しい鉢植がみられるシクラメン（カガリビバナともいう）の根は肥大していて cyclamin というサポニンを含有している。このサポゲニンは cyclamiretin D と考えられその化学構造も (III) 式のごとく決定されていたが、その後加水分解条件を種々検討することにより五環性エーテル結合を有する cyclamiretin A (IV) が実は真性サポゲニンであることが明らかにされた。この研究はさらに類似の部分構造を有する他のサポゲニンについても真性か否かの再検討の必要性を示唆することになってその意義は大きい。

古くから強壯薬としてまた、労咳などの特效薬とも考えられていた薬用人参（朝鮮人参）はウコギ科に属するオタネニンジンがその主な原植物であるが、近年の研究によりその生物活性は含有されているサポニンが主因であると信じられるようになった。薬理作用の精確な評価はさらに今後の研究に俟たねばならないが、化学的研究によるとそのサポニン組成は十種以上の類縁サポニンからなることが判明している。そのうち主サポニンは酸加水分解によって panaxadiol (V) を与えることが明らかにされた。併し 17 位に結合しているテトラヒドロピラン環はかなり特異的であるのでさらに精査したところ、この真性サポゲニンは protopanaxadiol (VI) であってその側鎖が加水分解における酸性条件で閉環してテトラヒドロピラン環を与えることが判明した。以上はいずれも

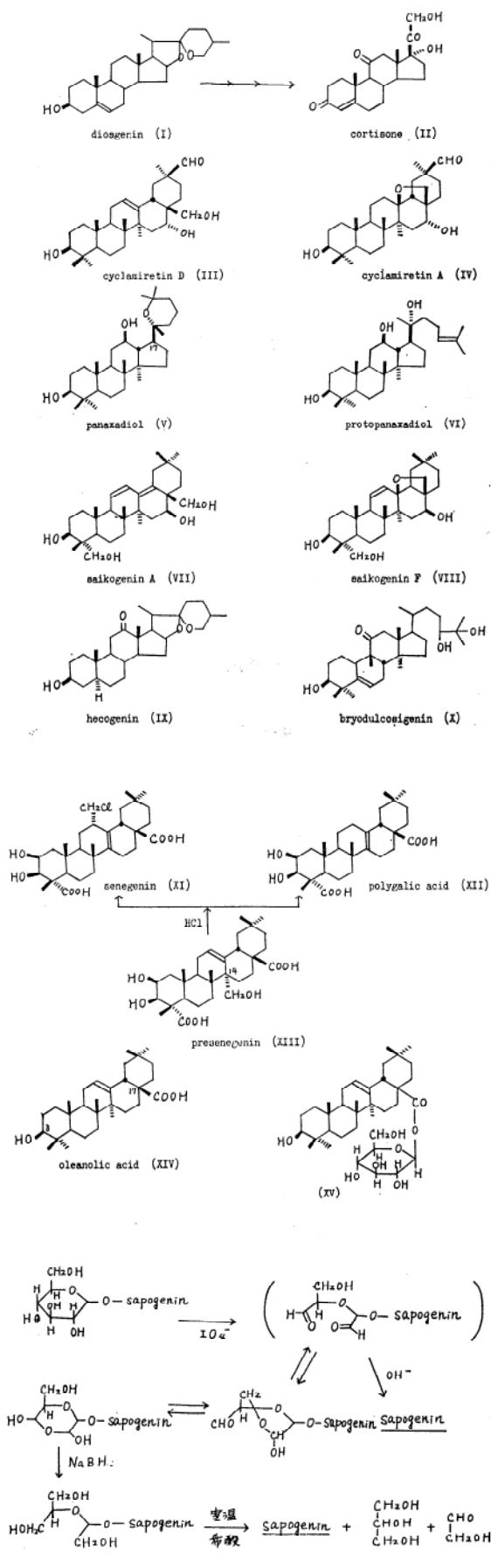


図 1.

反応条件の詳しい検討と加水分解の経時変化を注意深く観察した結果見出されたことである。特に protopanaxadiol (VI) の側鎖は酸性条件下非常に環化し易いのでサポニンから之を収量よく得るために、先づ側鎖の不飽和結合を HCl 附加体としておくなどの工夫がなされている。

第三の例は柴胡(サイコ)のサポゲニンの場合である。柴胡は漢方処方で馴じみ深い小柴胡湯、大柴胡湯などの主薬であってその原植物はセリ科のミシマサイコの根が最上品とされている。近年国内での野生ミシマサイコが品薄となって栽培品や中国からの輸入品が多く使われているがその主成分は永く不明であった。この場合もサポニンが効力を代表するらしいが未だ決定的な解明をみていないのが現状である。併しサポゲニンの化学的研究はかなり進んでいて先づ主サポゲニンとして saikogenin A (VII) の構造が決定された。之は heteroannular diene 構造を持つ珍しいものであるが、恰も cyclamiretin D と A の場合のように真性サポゲニンは saikogenin F (VIII) であって、酸性加水分解条件でエーテル環が容易に開いて heteroannular diene 構造を与える事が明らかにされた。このエーテル環の開環はサポニンを精製する過程でアルミナなどの吸着剤を用いたクロマトグラフィーの操作中にも容易に起り、サポニンを植物体から抽出精製する場合にも相当の注意を払わねばならないという教訓となっている。Saikogenin F をサポニンから加水分解によって得るのに用いられた方法はセネグ根のサポニンの分解に用いられた Smith 法と軌を一にしている。これは図 1 に示すようにサポニンの糖部分を過ヨード酸で分解し最後に水酸化ホウ素ナトリウムもしくはアルカリで処理してサポゲニンを得る方法である。

以上いずれの場合も真性サポゲニンを得るのに相当の手段を踏んでいる。我々の研究室でもツバキ科植物サポニンの研究をはじめ種々の植物サポニンの研究を手がけてきたがいつの場合もサポニンの配糖体結合の切断には頭を悩ましてきた。そして真性サポゲニンを容易に得ることができ、或いは得られたサポゲニンが真性であるか否かを検定し得る方法を求め続けてきた。

#### 4. サポニンの酵素的分解

サポニンの配糖体結合を酵素の働きによって切断することは化学的方法に比べて緩和なので若し成功すれば真性サポゲニンを得るのに理想的な手段と考えられ古くから多くの人によって試みられた。これは、植物体内で生産されるサポニンは共存する酵素の触媒作用でサポゲニンと構成糖とから生合成されるはずで恐らくその逆の酵素反応もあり得るということを根拠にしている。そして逆反応を触媒する酵素系を同種の植物体に限らず他の起源にも求めようというのである。文献を調べてみるとサ

ポゲニン部がステロイド骨格を有するサポニンの酵素加水分解に関していくつかの研究がある。

強心配糖体を含有する故に心臓病の薬として古くから著明なジギタリスやケジギタリス(ゴマノハグサ科)の葉や種子のサポニンにエムルシンや種々の酵素を作用させてサポニン構成糖を部分的に加水分解するのに成功した場合や、これと関連して *Fusarium lini* (かびの一種)の培養によって強心配糖体の  $\beta$ -グルコシド結合部位のみを加水分解するのに成功したことがある。サポニンの糖部をサポゲニンから完全にはずしてステロイド型サポゲニンを得た例としては *Agave sisalana* の葉のサポニンの場合がある。これはヒガンバナ科に属する有名な繊維植物でリュウゼツラン等と同じ属の植物であるがこのサポニンは加水分解により hecogenin (IX) を与える。Hecogenin はステロイド系医薬品の重要な合成原料となるのでこの植物はメキシコや東アフリカ等で大規模に栽培されている。Hecogenin を得るにはサポニンの酸加水分解でもよいがサポニンを Czapek-Dox の合成培地に加えて *Corynespora* 属や *Alternaria* 属のかびを培養すると七日後に hecogenin がほぼ定量的に得られるという。併しこの方法が化学的分解方法に比して特に優れている点は明確ではない。というのは得られるサポゲニンが両法とも同じく hecogenin でその収量も大差がないからである。

トリテルペン骨格をサポゲニンとするサポニンに酵素や微生物による加水分解法を応用した研究にはつぎの二例がある。一つはムラサキウマゴヤシ(マメ科)のサポニンで酸加水分解では五種類のサポゲニンを与えるが *Aspergillus* 属, *Mucor* 属, *Rhizopus* 属のかびをこのサポニン含有培地で培養するとただ一種のサポゲニンしか得られないと報告されている。それが果して真性サポゲニンかという点については詳細な報告がないのでわからない。もう一つの例は *Bryonia dioica* (ウリ科)の根の配糖体 bryodulcoside で酵素 luizyme を用いて加水分解し bryodulcosigenin (X) を収量よく得るのに成功している。

然し乍らサポニンの酵素や微生物による加水分解法の研究は、まだまだ例も少なく今後多くの余地を残している。我々の研究室でも前述のように真性サポゲニンを得る方法を種々検索してきたが、意外な方向から一つの方法を展開させることができるようになった。

#### 5. 土壌菌加水分解法

ステロイドホルモン合成に素晴らしい成功を収めた微生物酸化は、安価で豊富な原料化合物をより有用な化合物に微生物変換する研究分野に急速な発展をもたらしたが、ここで用いられる微生物は今日ではかびに限らず酵母や

バクテリアにまで及んでいる。そこで真性サポゲニンの問題がクローズアップされた例の多いトリテルペン系サポゲニンの解決に之迄試みられたことのないバクテリアを用いたらどうかということになった。このバクテリアを何処に求めるかは次のように解決された。ツバキ科植物のうちでも茶の実にはサポニンを多量に含んでおり、この化学的研究を我々は数年来続けてきた。地上に落ちた茶の実のサポニンの辿る運命を考えると、植物自体の持つ酵素系の作用で自己分解をうけるものが殆どである一方では恐らく土壤中のバクテリアの作用で分解される可能性もあると思われ、土壤菌の応用を試みることになった。変換を行なう微生物をスクリーニングするには数多くの単一菌種を用いて行なうわけで場合によっては何千という夥しい菌種を調査せねばならず、時間と労力とを思い合わせると大変な作業である。若し土の中に土壤菌が種類多く存在すれば、その土を用いてその中から有用な菌種のみを探り当てることが可能であろう。即ち多種類の土壤菌の混合物をサポニンの培地で淘汰培養すればサポニンを栄養源として発育し得る菌種のみが生存して培養が続けられ、その結果サポニンの糖部のみが栄養源として消費される故に、培地にはサポゲニンが残存するだろうと考えた。この方法によれば一度に多種類の土壤菌をスクリーニング出来ることになるばかりでなく、いずれも酵素反応であるのでうまくゆけば培地に残されたサポゲニンは目的とする真性サポゲニンにちがいないと推測したのである。

研究初期の頃は培養条件の検討などこの方面の知識の不足から色々と困難もあったが、幸い蛋白研の佐藤了教授の適切な御助言もあって現在のところ以下に述べるような方法でいくつかの成功を収めることができた。

大阪府下三十数ヶ所で採取した土壤をサポニンを唯一の炭素源とする合成培地 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g.,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.7g.,  $\text{NaCl}$  1g.,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  4g.,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03g., サポニン 3g., 蒸溜水 1ℓ に加え最後に希塩酸で pH を 6.0 に調整したもの) で  $31^\circ\text{C}$  で培養する。その結果土壤菌の発育状況の良いものを更に同様の合成培地で淘汰培養を繰り返してゆく。このようにしてゆくとサポニンを加水分解する土壤菌のみが淘汰されて生存してゆくか、またはその培地に対する適応酵素系を持ち得る菌のみが植え継がれてゆく。この淘汰培養の操作ははじめ培地 3ml を分注した試験管スケールで行ない、何代かの淘汰培養を経たのち大量培養に移す。このようにして見出されサポニンの加水分解に使用された菌種の同定には途中適当な寒天培地での培養など必要な操作を行なうが、これ迄いくつかの真性サポゲニンを得るのに成功した土壤菌の同定は、現在その方面の専門家へ依頼中である。培

養に要する期間は目的とするサポニンによって若干異なるが、培地を逐次有機溶媒で抽出し薄層クロマトグラフィーで調べてサポニンの加水分解状況を検討し決定する。かくして大量培養を行なった後の培地はそのまま適当な有機溶媒 (エーテル、クロロホルム、酢エス、時にはブタノール等) で抽出し、抽出物を分離精製して真性サポゲニンを得る。我々の研究室で以上のようにして得た興味ある結果を二例以下に述べる。

セネガ根のサポニン senegin のサポゲニン研究はいくつかの研究グループによって競って行なわれ、1964年に至り先づ senegenin (XI), polygalic acid (XII) (之は senegenic acid と云う) の二種のサポゲニンの化学構造が明らかにされた。Senegenin は構造中に塩素を有しており polygalic acid は構成炭素数が 29 であるという点でそれぞれこれまでのトリテルペン系サポゲニンとしては化学構造上かなり特異なもので、同時に之等の二種のサポゲニンは恐らくサポニンの塩酸加水分解途上二次的な変化をうけて生成したものであろうと推測された。Senegin の真性サポゲニンはその後も追求され、先に述べた Smith 法を応用することにより presenegenin (XIII) が遂につきとめられるに至った。そして presenegenin をサポニン加水分解と同様条件で処理することにより図に示すように senegenin 及び polygalic acid を与えることも確められ、ここに senegin の真性サポゲニンとして presenegenin が確定した。Presenegenin はサポゲニンに一般的なオレアナン骨格を有するが、14位にカルビノール基を有する故に酸処理により容易に転位反応を起すことも併せて明らかにされた。我々も senegenin, polygalic acid が真性サポゲニンではないと考えて、senegin に土壤菌加水分解法を試みた所、容易に presenegenin を得て我々の方法の有用性に確信を深め得ると共に真性サポゲニンとしての presenegenin に更に確証を与えることができた。土壤菌加水分解法では senegenin, polygalic acid が全く得られないのは当然のこと乍ら興味深い事実である。Smith 法では加水分解物の精製にかなり複雑な実験操作を必要としているのに反して、我々の場合は抽出と再結晶という簡単な操作で目的物を収量良く得ている点で優れている。一般的に考えても Smith 法及びその変法は過ヨード酸開裂に続いて水素化ホウ素ナトリウム又はアルカリ処理という化学的方法である以上、目的とし得る真性サポゲニンにも制約があるわけで、土壤菌加水分解法はこの点でもより広い一般性が期待できる。又 presenegenin は酸性条件でかなり不安定な化合物であるが我々の方法ではその操作中に presenegenin の変化は全く認められなかったので非常に緩和な加水分解法であると考えている。

我々の土壤菌加水分解法のより一般的な評価を得る目的で行なったチクセツニンジン(ウコギ科)のサポニンへの応用例を次に述べる。というのはこのサポニンは酸加水分解によってオレアノール酸 oleanolic acid (XIV) を与えるが、この酸はトリテルペン基本骨格の一つであるオレアナン骨格を有しサポゲニンとして広く植物界に分布しているからである。チクセツニンジンの根茎から得たサポニンに前述のような方法で土壤菌の淘汰培養を行ない、その加水分解経過を薄層クロマトグラフィーで追跡すると培養後一週間ではオレアノール酸の他に少し極性の高い分解物を与えるが、二週間培養を続けた後ではサポニンは殆どオレアノール酸まで加水分解される事が判明した。そこで培養を一週間で止め培地の抽出物からオレアノール酸の他に一配糖体を得た。この物質は酸やアルカリ処理によりオレアノール酸と D-グルコースを与えることや、そのアセチル誘導体の赤外線吸収及び核磁気共鳴スペクトルによる解析、その他種々の分析結果から (XV) 式の化学構造を有することが明らかになった。これらから考えて、チクセツニンジン(ウコギ科)の糖の結合部位はオレアノール酸の3位の水酸基だけではなく17位のカルボキシル基にもエステル型で結合していることがわかる。更に又、3位の配糖体結合は酵素

glycosidase によって容易に切断され、17位のエステル型配糖体結合の加水分解速度はかなり遅いことも判明した。この事実は培養期間の調節によりサポニンの糖部を部分的に加水分解できる可能性を示して興味深い。

## 6. むすび

我々の研究室で開発した土壤菌加水分解法による真性サポゲニンの研究は以上に述べたようにいくつかの可能性を持っている。この他にも、我々の研究室で種々の植物から単離したサポニンについての成果があるがここでは紙面の都合で省略する。この方法はしかしながらまだ研究の緒についたばかりというのが実際の姿で今後更に検討を続けてゆく予定である。いずれにしても、この方法は真性サポゲニンを得るのに優れているばかりでなく、小規模の実験も可能で既に他の方法で得られたサポゲニンが真性か否かを検定するのに利用できるし、培養期間の検討によりサポニンの部分的加水分解が可能で、従来かなり困難を伴ったサポニンの化学構造研究にも充分一役買えるはずでこの方面も現在研究中である。そしてでき得れば専門の生化学者の御協力を得て酵素のレベルまで仕事を発展させたいと思っている。

(1967年3月8日記)

(18頁より続く)

- 6) I. Tanabe, J. Okada, H. Ono, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1175 (1965).
- 7) 高橋, 小林, 今田, 山田, *アミノ酸, 核酸*, **10**, 1 (1964).
- 8) T. Iguchi, I. Takeda, S. Seno, *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 589 (1965).
- 9) 井口, 早川, 武田, *農化*, **40**, 26 (1966).
- 10) 木下, 田中, 大嶋, 木村, 木下, 特公, 昭41-5911.
- 11) T. Tsunoda, I. Shiio, K. Mitsugi, *J. Gen. Appl. Microb.*, **7**, 18 (1961).
- 12) 青木, 近藤, 角田, 小川, *農化*, **34**, 536 (1960).
- 13) 那須, 小林, 布子, 佐藤, 特公, 昭38-26947.
- 14) 宮地, 松井, 北井, 力根, 角田, 昭37-9298.
- 15) 佐々木, 植村, 藤井, 特公, 昭40-15954.
- 16) D. A. Kita, H. T. Huang, 特公, 昭35-10696.
- 17) 勾坂, 志村, *農化*, **31**, 110 (1957).
- 18) 林, 渡辺, 藤井, 志村, *アミノ酸*, **1**, 89 (1959).
- 19) T. Tsunoda, I. Shiio, *J. Biochem.*, **46**, 1011 (1959).
- 20) 江夏, 清井, 松島, 照井, *アミノ酸, 核酸*, **8**, 68 (1963).
- 21) 武末, 樽井, 和田, 特公, 昭39-19150.
- 22) 原田, 室岡, *醸工*, **44**, 192 (1966).
- 23) T. Tsuboi, C. Sekijo, O. Shoji, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1238 (1966).
- 24) 藤井, 清水, 福井, *醸工*, **44**, 185 (1966).
- 25) T. Iguchi, I. Takeda, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 709 (1966).
- 26) A. S. Kester, J. W. Foster, *Bact.*, **85**, 859 (1963).
- 27) S. Ogino, K. Yano, G. Tamura, K. Arima, *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 1009 (1965).
- 28) 山田, 鳥越, *農化*, **40**, 364 (1966).
- 29) J. E. Stewart, R. E. Kallio, D. P. Stevenson, A. C. Jones, D. O. Shissler, *J. Bact.*, **78**, 441 (1959).
- 30) J. E. Stewart, R. E. Kallio, *J. Bact.*, **78**, 726 (1959).
- 31) D. P. Stevenson, W. R. Finnerty, R. E. Kallio, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **9**, 426 (1962).
- 32) R. L. Raymond, J. B. Davis, *Appl. Microb.*, **8**, 329 (1960).
- 33) J. B. Davis, *Appl. Microb.*, **12**, 210 (1964).
- 34) 原田, 吉村, *醸工*, **42**, 615 (1964).
- 35) T. Harada, *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 37 (1965).
- 36) T. Harada, K. Fujimori, S. Hirose, M. Masada, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 764 (1966).
- 37) 原田, 正田, 日高, 高田, *醸工*, **44**, 20 (1966).
- 38) 室岡, 原田, 日本醸酵工学会 昭41大会講演
- 39) P. H. Hodson, W. A. Darlington, *J. Bact.*, **88**, 803 (1964).
- 40) M. H. Rogoff, I. Wender, *J. Bact.*, **73**, 264 (1957).
- 41) 大森, 堀口, 山田, 日本農芸化学会 昭41大会講演
- 42) K. Yamada, S. Hoiguchi, J. Takahashi, *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 943 (1965).
- 43) B. Imelik, *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **226**, 2082 (1948).
- 44) Y. Yugari, *Biken's Journal*, **4**, 197 (1961).
- 45) C. Colla, V. Treccani, *Ann. Microbiol.*, **10**, 77 (1960).
- 46) R. D. Swisher, *Water Pollution Control Federation*, **35**, 877 (1963).
- 47) W. J. Payne, V. E. Feisal, *Appl. Microb.*, **11**, 339 (1963).
- 48) E. L. Fincher, W. J. Payne, *Appl. Microb.*, **10**, 542 (1962).
- 49) I. C. Macrae, M. Alexander, A. D. Rovira, *J. Gen. Microbiol.*, **32**, 69 (1963).
- 50) 堀内, *農化*, **35**, 870 (1961).