

# 結核菌の脂肪酸代謝に関する研究

## (第1報)

九州大学医学部細菌学教室 (主任 戸田 忠雄 教授)

飯 田 一 郎

(昭和 27 年 3 月 10 日受付)

抗酸性菌がリポイドを多量に含んでいることは周知のことである。なかんずく、人型結核菌は最もリポイド含量多く、このために強い抗酸性・抗アルカリ性・抗アルコール性・抗煮沸性等の性質を示すものと考えられている。リポイドは結核菌々体成分中で、重要な位置を占めているにもかかわらず、その代謝機構に関しては殆んど詳にされていない。動物における脂肪酸々化では、 $\beta$ -酸化・多発交互酸化・ $\omega$ -酸化等の酸化機構が考えられ、その合成過程もほぼ推定されている<sup>1)2)3)</sup>。これらの型式のうち幾つか、又は全部が細菌でも行われているだろうことは容易に考えられることである。しかしながら脂肪酸々化において少量蓄積すると考えられる中間産物を分離同定することや低濃度で酸の分析を行うことは殆んど不可能な程困難である。細菌の行う脂肪酸代謝に関する種々の業績は多いけれども<sup>4)5)6)7)8)</sup> いずれも確証を欠く所以であると考えられる。私は同時適応法<sup>9)</sup>により、結核菌による脂肪酸々化型式を推定し、これをペーパークロマトグラフィー又は他の方法で確認するとともに、脂肪酸合成の径路、炭素代謝、或いは窒素代謝との関連を調べようとして以下の実験を試みた。

### 実験方法

0.02%に各種脂肪酸のナトリウム塩を添加せるソートン培地に人型結核菌青山B株を培養継代する。この3乃至6代目の2乃至3週間培養の菌(この菌はそれぞれの脂肪酸に適応を示している)を用いて、脂肪酸代謝の中間産物と考えられる各種化合物に対する適応状態を検し、結核菌による脂肪酸々化径路を推定した。Warburg単一検圧計を用い、各種中間産物と推定される物質を基質とし、適応菌及び非適応菌による酸素消費を比較した。基質は水に不溶性のものはナトリウム塩として用いた。

容器内液容積は4ccで、その組成は次の如くである。

菌液 (40 mg/cc)	0.5 cc
M/15 燐酸緩衝液	2.5 cc (PH 7.0)
基質	0.01M 0.5 cc
蒸溜水	0.5 cc

基質及び蒸溜水は容器の side arm に入れ、コック開放 15 分間振盪の後、菌液を容れている主室に注ぐ。容

器の center well には 20% KOH 0.2 cc を入れ発生する炭酸ガスを吸着せしめる。恒温槽の温度は 37.5°C とし、振盪は毎分 60 回、酸素吸収の読みは 15 分毎とする。

gas phase は空気である。

### 実験成績

ステアリン酸ソーダ適応菌及びオレイン酸ソーダ適応菌について、各種基質酸化に要する酸素消費量を第1表に示している。この表に示すようにステアリン酸ソーダ適応菌・オレイン酸ソーダ適応菌では、非適応菌に比し

第 1 表

供 試 菌	非 適 応 菌	ステアリン酸ソーダ適応菌		オレイン酸ソーダ適応菌		
		1	2	1	2	
醋 酸	1.1	3.3	8.5	20.0	13.5	22.6
酪 酸	7.2	14.8	18.8	27.5	20.6	28.5
カプロン酸	8.8	21.5	12.9	31.6	23.5	48.2
カプリン酸	45.5	89.7	47.8	97.2	—	—
ソード	17.0	24.0	18.1	39.9	—	—
バルミチン酸	2.9	7.0	21.4	38.0	—	—
ソード	7.8	11.0	—	—	12.0	18.5
ステアリン酸	11.8	23.2	12.0	27.2	—	—
ソード	3.1	4.3	—	—	4.0	8.6
プロピオン酸	4.3	10.1	5.2	9.5	4.5	9.8
ソード	3.6	5.4	4.2	6.0	—	—
n-吉草酸						
ソード						

註: 数値は基質酸化に要する O<sub>2</sub> 消費量 (endogenous respiration は差し引いてある) 以下の表も同様

〔附〕 第 1 表

供 試 菌	非 適 応 菌			n-吉草酸適応菌		
	1	2	3	1	2	3
時間(hrs)						
基質						
プロピオン酸	4.3	10.1	18.1	5.7	18.7	28.8
ソード	3.6	5.4	—	5.0	13.0	—
n-吉草酸						
ソード						

て醋酸・酪酸・カプロン酸・カプリン酸・パルミチン酸・ステアリン酸、又はオレイン酸等の酸化酵素が甚だ賦活されているが、プロピオン酸・吉草酸等のそれは殆んど賦活されていない。すなわち、炭素数の2個宛少ない偶数炭素数を有する脂肪酸には適応しているけれども、奇数炭素数の脂肪酸への適応は見られない。これに反して、*n*-吉草酸ソーダ適応菌は同時にプロピオン酸ソーダにも適応している。従つて、結核菌の脂肪酸々化には、β位が酸化されて炭素数の2個宛少ない脂肪酸を生ずるβ酸化という一つの径路が存在すると考えられる。次にステアリン酸ソーダ適応菌について第2表に示す如きデカルボン酸に対する適応状態をしらべた。すなわち、非適応菌に比べていずれも2倍、アディピン酸を基

第 2 表

基 質 菌	セバシン酸 ソーダ		アディピン酸		琥珀酸		ステアリン 酸ソーダ	
	1	2	1	2	1	2	1	2
非 適 応 菌	5.1	9.2	3.1	4.4	2.5	3.0	11.8	23.2
ステアリン酸 ソーダ適応菌	9.3	14.4	17.6	28.9	5.7	8.5	12.0	27.2

質とせる場合は6倍もの酸素消費が見られ、強い適応を示している。すなわち、ω位の -CH<sub>3</sub> が酸化されて COOH となりデカルボン酸を生ずるω酸化の存在を思わしめる。第3表はプロピオン酸ソーダ適応菌について奇数炭素数の脂肪酸もやはりω酸化を受け得ると考えられる。

第 3 表

基 質 菌	マ ロ ン 酸			プロピオン酸 ソーダ		
	1	2	3	1	2	3
非 適 応 菌	3.1	4.1	5.0	4.3	10.1	18.1
プロピオン酸 ソーダ適応菌	8.6	8.9	9.7	9.3	16.5	24.7

又、第4表、第5表に示す如くカプリン酸ソーダ適応菌はセバシン酸ソーダ、及びアディピン酸にも適応し、カプロン酸ソーダ適応菌はアディピン酸に適応している。

第 4 表

基 質 菌	セバシン酸 ソーダ		アディピン 酸		カプリン酸 ソーダ	
	1	2	1	2	1	2
非 適 応 菌	5.1	9.2	3.1	4.4	45.5	89.2
カプリン酸ソ ーダ適応菌	6.5	17.2	10.7	12.8	77.8	161.7

これは同様にω酸化を受ける結果、それぞれのデカルボン酸に適応したものと考える。次にプロピオン酸は如

第 5 表

基 質 菌	アディピン酸			カプロン酸ソーダ		
	1	2	3	1	2	3
非 適 応 菌	3.1	4.4	4.4	18.8	38.5	—
カプロン酸 ソーダ菌	7.3	8.4	9.4	45.7	112.4	—

何なる酸化を受けるかという点、第6表に示す如く、プロピオン酸ソーダ適応菌の乳酸及び焦性ブドウ酸に対する同時適応より見て、プロピオン酸はまず脱水素を受けてアクリル酸となり、ついで加水されて乳酸を生じ更に乳酸の脱水素によつて焦性ブドウ酸を生ずるものと考えられる。次に、イソ吉草酸適応菌について見ると、これはアセトンに同時適応を示す。これは第3級炭素原子における酸化が起つて、イソ吉草酸よりアセトンを生ずる酸化径路を経るためと考えられる。

第8表は脂肪酸(酪酸)と林檎酸との同時酸化の状態を示している。すなわち150~180分後を見ると、両者一緒に酸化せしめた方が、各单独の場合より遙かに酸素消費

第 6 表

基 質 菌	乳 酸		焦 性 ブ ー 酸		プロピオン 酸ソーダ	
	1	2	1	2	1	2
非 適 応 菌	10.3	24.8	10.8	16.3	4.3	10.1
プロピオン酸 ソーダ適応菌	16.0	31.9	14.4	28.8	9.3	16.5

第 7 表

基 質 菌	アセトン			イソ吉草酸ソーダ		
	1	2	3	1	2	3
非 適 応 菌	0.9	1.3	1.9	2.0	4.3	10.9
イソ吉草酸 ソーダ適応菌	8.2	10.3	12.4	5.4	9.7	20.8

第 8 表

基質	時間(min)					
	30	60	90	120	150	180
酪 酸	5.2	11.7	19.8	22.1	30.8	41.1
林 檎 酸						
酪 酸	4.1	10.2	14.0	18.0	22.7	25.8
林 檎 酸	0.5	0.8	1.5	2.3	3.5	6.1

が大になつている。第9表も同様に酪酸とアスパラギン酸との同時酸化の方が180分以後、急に大となつている。これは恐らく脂肪酸の酸化により生じたケトン酸が、林檎酸の脱水素により生ずるオキザル醋酸、又はアス

第 9 表

時間(min)	30	60	90	120	150	180
酪酸 アスパラギン酸	5.4	11.5	15.5	23.2	29.0	39.5
酪酸	4.1	10.2	14.0	18.0	22.7	25.8
アスパラギン酸	1.0	1.0	1.2	4.8	5.6	7.0

第 8, 9 表註: 基質添加量

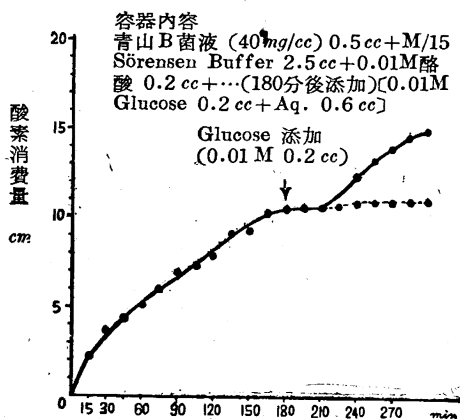
{ 脂肪酸は 0.025 M 0.5 cc  
林檎酸・アスパラギン酸は 0.025 M 0.1 cc

ラギン酸の酸化的アミノ基脱により生ずるオキザル酪酸と縮合して Krebs のクエン酸廻路に入るためであると考えられる。マロン酸は脂肪酸単独の酸化は阻害しないが、同時酸化の場合の上述の如き急激な酸素消費の増加を阻害する。すなわち、この縮合反応を阻害すると考えられる。

ステアリン酸と林檎酸、オレイン酸とアスパラギン酸、ステアリン酸とアスパラギン酸、等の同時酸化の場合も、同様に 120~180 分で急激な酸素消費の増大が見られ、マロン酸によつて阻害を受ける。

次に脂肪酸(酪酸)酸化と、含水炭素(ブドウ糖)酸化との関係を示している。0.01M 0.2cc の酪

第 1 図



酸々化は大体 180 分位で最高になるが、この時 0.01M 0.2cc のブドウ糖を添加すると(矢印)約 30 分を経て、更に酪酸々化の曲線が上昇してくる。勿論この場合、同量のブドウ糖単独の場合の酸素消費をも測定しており、図に示す曲線は全てその値、及び内呼吸(endogenous respiration)による酸素消費量を差引いた酪酸々化のみによる酸素消費量を示す。

すなわち上の結果は脂肪酸単独では完全酸化が起り難く、ある種の間産物(おそらくケトン酸)が蓄積するが含水炭素の同時酸化により、含水炭素酸化中間産物との何等かの関連において、更に脂肪酸々化中間産物の酸化

が進み得るのではないかと考えられる。

#### 考按並びに総括

Knoop<sup>10)</sup>の古典的な説によると脂肪酸は主鎖から炭素二原子が逐次的に切断することによつて崩壊する。すなわち彼は脂肪酸の $\omega$ 位を抵抗の大なるフェニル基で置換し、これらを動物に与えて原脂肪酸の炭素数の奇数のものは、いずれも安息香酸、偶数なるものはいずれもフェニル酪酸となり、グリシンと結合して尿中に排泄されることを見ている。Flaschenträger<sup>11)</sup>によると、動物に脂肪酸を与える時は、尿よりそれに相当するDicarbon酸を分離することができ、 $\omega$ 位のCが酸化を受けるといふ $\omega$ -酸化が存在することを述べている。これらはいずれも動物を用いた実験であり、細菌においても、同じ機構により行われると直に結論することはできない。一方細菌においては分解生成物は極めて微量であり、分解生成物を直接に分離同定することは不可能にちかい。

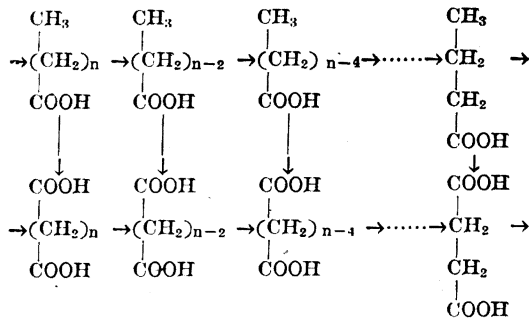
Randle<sup>12)</sup>は *Neisseria catarrhalis* による炭素数 2 乃至 12 の偶数及び奇数炭素数の脂肪酸々化を検圧計による酸素消費曲線にて検し、偶数炭素数の脂肪酸々化の酸化率及び酸化の限度の類似性はその酸化機構の類似性を示すとして、それら共通の機構として $\beta$ -酸化を考えている。又炭素数の 7 及び 5 なる脂肪酸の酸化曲線の後の部分が炭素数 3 なる脂肪酸の酸化曲線に類似している点から奇数炭素数の脂肪酸々化も $\beta$ -酸化によることを推定している。

又 Atchley<sup>13)</sup>は家兎腎の脂肪酸々化酵素系を用い Countercurrent distribution によつて、吉草酸はプロピオン酸に、イソカブロン酸はイソ酪酸にそれぞれ分解されることを検して、脂肪酸が $\beta$ -酸化を受けると述べている。

私は培地に脂肪酸を加えてこれに結核菌を培養して、それぞれの脂肪酸に対する適応結核菌を作り、これと非適応結核菌とで、各種基質に対する酸素消費を検し、Stanier<sup>9)</sup>の同時適応の概念に基いて脂肪酸々化回路を推定した。すなわち、

1) 偶数炭素数の脂肪酸はもとより、奇数炭素数の脂肪酸も $\beta$ -酸化を受ける。

2) 同時に $\omega$ 位が酸化されてDicarbon酸を生ずる $\omega$ -酸化も受けて、原脂肪酸が偶数炭素数のものならば琥珀酸を生ずる。この $\beta$ -酸化と $\omega$ -酸化との関係は次式に示す如きものと考えられる。すなわち $\beta$ -酸化と $\omega$ -酸化は共存し、 $\beta$ -酸化の各段階において、 $\omega$ -酸化を受け得る。かくして生じたDicarbon酸は又、 $\beta$ -酸化により炭素 2 原子を失つてゆく。かくして生じた琥珀酸は、いわゆる Szent-Györgyi の  $C_4$ -ヂカルボン酸系に入つて  $CO_2$  と  $H_2O$  に酸化されると考えられる。酪酸は $\beta$ -酸化によつて 2 分子の酪酸となり Slade 及び Werkman<sup>14)</sup>



がアイソトープを用いて *Aerobacter indologenes* について示した如く2分子の酪酸は縮合して琥珀酸を生じついで  $C_4$ -チカルボン酸系に入るのであろう。酪酸が $\omega$ -酸化を受けて直接に琥珀酸を生ずる可能性も考えられる。

3) プロピオン酸は $\alpha$ -酸化を受け、アクリル酸、乳酸を経て焦性葡萄糖に酸化されると推定される。焦性葡萄糖は Aji<sup>15)</sup> が *E. coli* について述べているように  $C_4$ -チカルボン酸系に入つて酸化されるのであろう。焦性葡萄糖がオキザル酪酸と縮合して Krebs のいわゆる citric acid cycle に入る可能性は既に示した(代居・飯田)<sup>16)</sup>。

4) イソ-吉草酸は第3級炭素原子( $\beta$ -位)において酸化を受けアセトンを生ずる。もつともその酸素消費の少ない点からこの脂肪酸は、正常の結核菌によつては利用され難く、従つてこの酸化経路は適応により強化されるものと考えられる。アセトンが更に酸化される経路は明らかでない。

5) 林檎酸及びアスパラギン酸はいずれも酪酸々化を賦活する。この現象は Knox, Noyce & Auerbach<sup>17)</sup> が家兎腎から作つた脂肪酸々化酵素系について、酪酸々化がフマル酸又はその他の Citric acid cycle を構成するメムバアの一つの添加によつて“spark”されるのを観察したのと同じ現象と考えられる。おそらく酪酸々化により生じたアセト酪酸と林檎酸又はアスパラギン酸に由来するオキザル酪酸との縮合により citric acid cycle に入るためであらう。

ステアリン酸と林檎酸、オレイン酸とアスパラギン酸、ステアリン酸とアスパラギン酸等の組合せによる同時酸化の場合も同様な酸素消費の増加が見られる。マロン酸は脂肪酸単独の酸化は阻害しないが、上述の如き同時酸化の場合の酸素消費の増加を阻害する。すなわちアセト酪酸とオキザル酪酸の縮合を阻害するように見える。

6) 酪酸単独では完全酸化され難い。少量の葡萄糖の同時酸化により、一旦停止した如く見える酪酸々化が更

に進んでゆく。これは酪酸々化の中間産物と葡萄糖酸化のそれとが何等かの関連をもっているためであらう。例えば、葡萄糖の分解により生じた焦性葡萄糖が Wood-Werkman 反応の如きものによつて、炭酸ガスを固定されてオキザル酪酸となり、これと酪酸に由来するアセト酪酸との縮合も考えられることである。

以上同時適応法により結核菌による種々の脂肪酸々化経路を推定した。今後、ペーパークロマトグラフィー又は他の方法により確認してゆくつもりである。

摺筆に当り、御指導御校閲を賜つた戸田忠雄教授に深謝する。

#### 主要文献

- 1) Breusch, F. L.: *Advances in Enzymol.*, 8, 343, 1948.
- 2) Leloir, L. F.: *Enzymologia*, 12, 263, 1946.
- 3) Stadie, W. C.: *Physiol. Rev.*, 25, 395, 1945.
- 4) Oginsky, E. L., Smith, P. H. & Solotorovsky, M.: *J. Bact.*, 59, 29, 1950.
- 5) Loebel, R. O., Shorr, E. & Richardson, H. B.: *J. Bact.*, 26, 139, 1933.
- 6) Franke, W. Schillinger, A.: *Bioch. Z.*, 316, 313, 1944.
- 7) Silliker, J. H. & Rittenberg, S. C.: *J. Bact.*, 61, 653, 1951.
- 8) Silliker, J. H. & Rittenberg, S. C.: *J. Bact.*, 61, 661, 1951.
- 9) Stanier, R. Y.: *J. Bact.*, 54, 339, 1947.
- 10) Knoop, F.: *Beitr. chem. Physiol. u. Path.*, 6, 150, 1904.
- 11) Flaschenträger, B.: *H.*, 238, 221, 1936.
- 12) Randle, C. I.: *J. Bact.*, 60, 627, 1950.
- 13) Atchley, W. A.: *J. Biol. Chem.*, 176, 123, 1948.
- 14) Slade, H. D. & Werkman, C. H.: *Arch. Bioch.*, 2, 97, 1943.
- 15) Aji, S. J.: *J. Bact.*, 57, 499, 1950.
- 16) 代居康敬・飯田一郎: 日本細菌学雑誌 (印刷中).
- 17) Knox, W. E., Noyce, B. N. & Auerbach, V. H.: *J. Biol. Chem.*, 176, 117, 1948.