

結核菌のパラニトロ安息香酸 還元作用に就いて

国立療養所大府荘(指導 勝沼六郎博士)

東 村 道 雄

(昭和 29 年 6 月 15 日受付)

緒 言

パラアミノ安息香酸 (P-Aminobenzoic acid, 以下 PABA) が微生物の代謝に重要な意義を有することは広く知られている。生体特に微生物は強力な還元作用を有し、パラニトロ安息香酸 (P-Nitrobenzoic acid, 以下 PNBA) が PABA に還元される可能性は容易に考え得る。芳香族ニトロ化合物 (Aromatic Nitrocompounds) の還元については古くから酵母による Nitrobenzol の Aniline への還元が知られている¹⁾²⁾³⁾。上述の PNBA の PABA への還元については Kohl and Flynn⁴⁾(1941) によつて肝及び腎がその作用を有することが報告された。然しながらこの現象は何れも一種の解毒作用として了解されたものであつて、生体における生理作用の一つとして考えられたのではなかつた。

江上・佐藤・江幡⁵⁾(1951) は PABA が PNBA を通じて生成されることを想像して、PNBA の PABA への還元について研究し、Streptococcus hemolytic. による PNBA の還元を認め、この作用を catalyze する酵素を亜硝酸還元酵素と同一と考えた。更に、佐藤・江幡⁶⁾(1952) は酵母によつて P-Hydroxybenzoic acid (POBA) と NaNO_2 とから PNBA が生成されることを示して、 $\text{POBA} + \text{NaNO}_2 \rightarrow \text{PNBA} \rightarrow \text{PABA}$ の経路を暗示した。従つて PNBA は PABA の Precursor として重要な意義を有するものと考えられる。

結核菌は PABA を含まない簡単な合成培地によく生育するのであるから、当然 PABA を合成し得るものと考えられ、従つて上述の意味から芳香族ニトロ化合物特に PNBA の還元機構は注目すべき現象と考えられる。結核菌による芳香族ニトロ化合物の還元作用については、東村⁷⁾(1950)がはじめてピクリン酸(2,4,6-Trinitrophenol) の還元について報告したが上述のような意義を考えていたわけではなかつた。そこで再び芳香族ニトロ化合物の結核菌による還元を、その生理的意義を考慮しつつとりあげてみたが、上述のように PNBA の重要性にかんがみて、まず PNBA 還元作用について検討し、以下に述べる成績を得た。この報告は結核菌による PNBA の PABA への還元の最初の具体的証明と考える。

実験成績

この実験にはすべて鳥型結核菌調株を使用した。菌液の調整はグリセリンブイヨン又は Sauton 培地に 5 日

間 37°C に培養した菌を遠心して集め、蒸留水で 3 回洗浄と遠心を繰返して最後に蒸留水に浮遊させた。浮遊液は一夜氷室に保存して使用した。すなわち所謂 Resting cells に近いとみなされるこの生菌浮遊液(以下単に菌液と呼ぶ)を一応酵素液として取扱つて以下の実験を行った。

1) P-Nitrobenzoic acid が P-Aminobenzoic acid に還元されることの証明

PABA の証明は芳香族アミンが塩酸酸性のもとで P-Dimethylaminobenzaldehyde によつて黄色を呈色する反応を用いた⁸⁾。

反応系としては、

M/15 Phosphate Buffer, pH 7.8	1.0 ml
生菌浮遊液 (20~40mg/ml)	1.0 ml
0.05% PNBA 液	1.5 ml
M/10 基質液又は蒸留水	0.5 ml
蒸留水又は酵素阻害剤	1.0 ml

合計: 5.0 ml を使用した。菌液は通常湿菌量 20~40 mg/ml のものを使用した。乾燥菌量は湿菌量の約 20% であつた。

上の系を 37°C で反応させて、任意の時間後に等量すなわち 5 ml のアセトン及び 10% 塩酸 1.0 ml を加えて振盪し、濾紙で濾過すると無色透明の濾液を得る。この濾液に、P-Dimethylaminobenzaldehyde を 2% の割合に 10% 塩酸に溶解した液すなわち Ehrlich 氏 Aldehyde 試薬(以下 Ehrlich 液)を 0.2 ml 添加し、室温に 10~15 分放置した後測定に供した。対照は上述の系で PNBA 液を除いたものを同様に操作して使用に供した。例えば上述の系で基質液及び阻害剤なしで 37°C 5 時間反応させた濾液に Ehrlich 液を加えると肉眼で黄色を呈し、日立の Photo-Electric Spectrophotometer で吸光曲線をとると、波長 400~600 mμ の範囲では、吸光の極大は 460 mμ の附近に存在する。PABA 溶液を同様に操作したものも肉眼で黄色を呈し、吸光曲線は

FIG. 1.

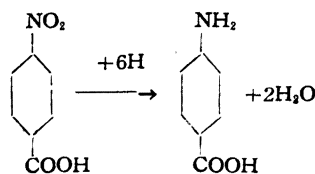
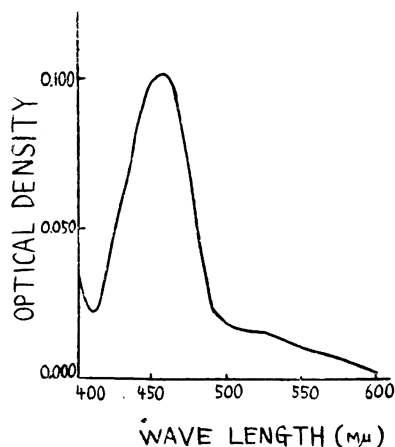


FIG. 2. PABA と P-Dimethylaminobenzaldehyde の HCl 液とにより生じた黄色化合物の吸光曲線

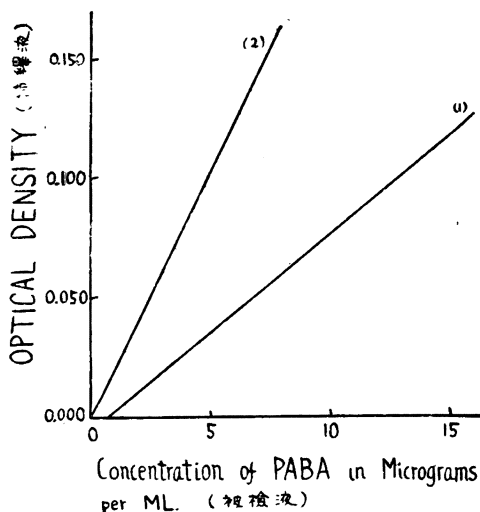
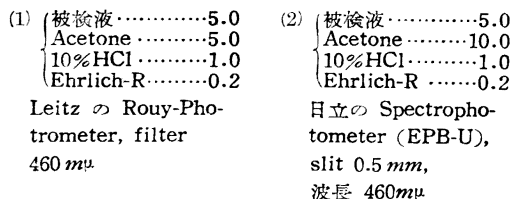


同じく 460 $m\mu$ の附近に吸光の極大を示した。従つて結核菌のいわゆる Resting cells によつて PNBA が PABA に変化されたものと考ええる。(Figure 1 及び Figure 2 参照) (なお Naphthylethylenediamine 法でも定性的に PABA を証明した)

2) PNBA 還元作用の定量法, すなわち PABA の定量法

結核菌によつて PNBA が還元されて生じた PABA を定量するために, 既知濃度の PABA 溶液の倍数稀釈列をつくつて, 前述の被検液と同様に操作して, Leitz

FIG. 3.



の Rouy-Photometer で filter 460 $m\mu$ を使用して吸光度を測定し標準曲線を作ると, 原液の PABA 濃度が 1—32 $\mu\text{g/ml}$ の間で吸光度と PABA 濃度の間に直線的関係が成立した。又被検液 2.0 ml, アセトン 4.0 ml 及び 10% 塩酸 1.0 ml の濾液に Ehrlich 液 0.2 ml を加えて発色させて, 日立的 Spectrophotometer (EPB-U) 波長 460 $m\mu$, Slit 幅 0.5 ml で測定すると原液の PABA 濃度が 0—8 $\mu\text{g/ml}$ の間で, PABA 濃度と吸光度との間に直線的関係が成立した。以上から, 上述の反応系で 37°C で好氣的条件下に反応をさせて, 此にアセトン及び塩酸を加えて濾過した濾液に Ehrlich 液を加えて発色させて 460 $m\mu$ の吸光度を測定し, Figure 3 の標準曲線によつて PABA 濃度を測定した。通常は Leitz の Rouy-Photometer filter 460 $m\mu$ を使用する方法で充分目的を達した。本報に述べる成績はすべて等量アセトンと 10% 塩酸 1 ml 添加による濾液を Ehrlich 液で発色させて Leitz 比色計で測定する方法によつた。

注1 この PNBA 還元反応は比較的緩徐であるので長時間の観察が必要な場合には反応系の汚染を防ぐために 10—20 $\mu\text{g/ml}$ の割合に Streptomycin を添加した。この反応は此の濃度の Streptomycin の添加によつて全く影響を受けない。

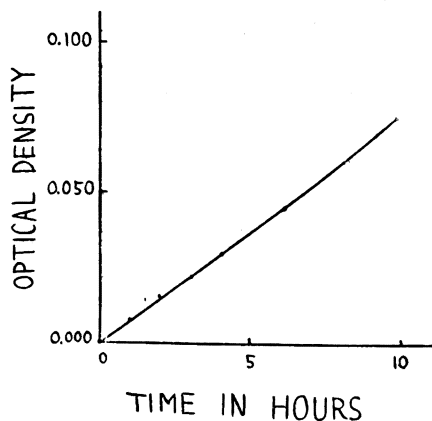
注2 この反応では亜硝酸(吸光極大は 440 $m\mu$ 附近)及び他の芳香族アミンも発色するから, 斯様な物質を反応系に含ませないように注意を要する。従つて硝酸塩の添加も禁忌である。

3) 反応曲線

M/15 Phosphate Buffer, pH 7.8.....	2.0
菌液, 48 mg/ml.....	1.0
PNB, 0.05%.....	1.5
M/10 Sodium Succinate.....	0.5

の反応系で 37°C 好氣的条件下での PNBA 還元反応すなわち PABA 生成の時間的経過は Figure 4 に示す通

FIG. 4. PNBA 還元反応の時間的経過



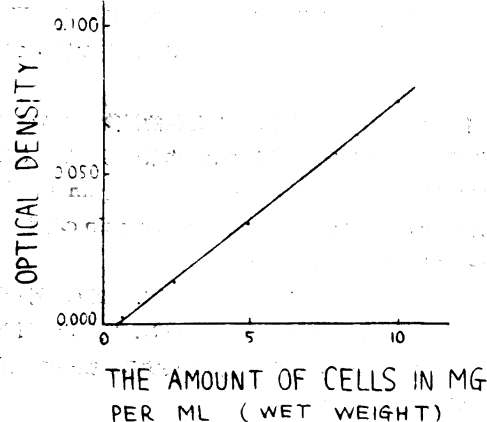
りであつて、時間と吸光度は 10 時間以上直線的關係を示して、恒常期は 24 時間以後に著明となつた。

4) 酵素濃度(菌量)と PNBA 還元量との關係

M/15 Phosphate Buffer, pH 7.8	1.5 ml
菌液	1.0 ml
M/10 Sodium succinate	0.5 ml
PNBA, 0.05%	1.5 ml
Dihydrostreptomycin, 100 γ /ml	0.5 ml

以上の系で菌液を 50 mg/ml から 倍数稀釈して加えて、37°C 10 時間後に前述の方法で PABA を測定すると、上述の系の終末濃度で 0.3 mg/ml 以上の濃度では吸光度 (PABA 生成量)と菌量(酵素濃度とみなした)の間に直線的關係が成立した。

FIG. 5. 酵素濃度(菌量)と PNBA 還元量(吸光度)との關係



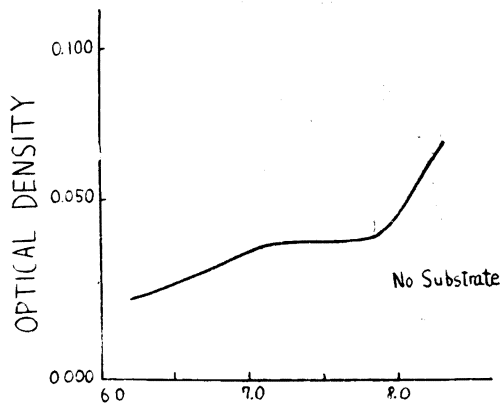
5) 水素供与体(基質)添加の影響

この PNBA 還元作用は、Phosphate buffer, 菌液, PNBA の 3 者があれば特に水素供与体を添加しなくてもよく PNBA の還元が行われる。水素供与体として d- 及び l-glutamic acid, d- 及び l-alanine, asparagin, glycocoll, lactic acid, pyruvic acid, succinic acid, formic acid, malic acid, acetic acid, citric acid, glycerine, dextrose 等を Na 塩として終末濃度 M/100 の割合に添加してみたが、非添加時と比較して著明な促進は認められなかつた。然し succinate, lactate, pyruvate, formate, glutamate, dextrose, glycerine の添加によつて還元作用の増加が認められることもあつたが、その還元増加の程度は不定であり、例えば succinate の添加では還元増加は 0~16% であつた。これは恐らくは PNBA の還元反応がこれ等水素供与体と直接的關係をもたぬためと、菌体内に水素供与体が存在するためではないかと考えている。

6) Optimal pH

Phosphate buffer 中で pH 6.2~8.3 の範囲を検討したが、水素供与体非添加では pH 6.2 が最低、pH 8.3 が最高の還元を示した(Figure 6 参照)。Sod. succinate

FIG. 6. pH と PNBA 還元作用との關係



添加で反応が促進した例では pH 6.8~7.1 及び pH 7.8~8.0 の附近に至適 pH 域が認められた。

7) 酵素阻害剤の影響

述前の系で Sod. lactate を M/100 となるように添加した系で阻害剤の影響を検した結果を表 1 に示した。水素供与体非添加の際は Monoiodoacetic acid の阻害度が若干減少(約 50%) するようと思われる他は全く同様であつた。

阻害度は次のように算出した。

$$\text{阻害度} = \left(1 - \frac{E}{E_0}\right) \times 100\%$$

E: 阻害剤添加時の吸光度

E₀: 阻害剤非添加時の吸光度

表 1 阻害剤の影響

INHIBITOR	FINAL CONCENTRATION	THE INHIBITION RATE
No Inhibitor	—	0%
KCN	2 × 10 ⁻³ M.	— 20%
Urethane	2 × 10 ⁻³ M.	— 10%
NaF	2 × 10 ⁻³ M.	0%
Sod. Arseniate	2 × 10 ⁻³ M.	0%
Malonic Acid	2 × 10 ⁻³ M.	0%
Monoiodoacetic Acid	2 × 10 ⁻³ M.	70%
Sod. Azide	2 × 10 ⁻³ M.	20%
Sod. Benzoate	2 × 10 ⁻³ M.	15%
Chinin.Hydrochloric.	2 × 10 ⁻³ M.	100%
AgNO ₃	2 × 10 ⁻³ M.	100%
AgNO ₃	2 × 10 ⁻⁴ M.	80%
HgCl ₂	2 × 10 ⁻³ M.	100%
HgCl ₂	2 × 10 ⁻⁴ M.	100%
CuSO ₄	2 × 10 ⁻³ M.	100%
CuSO ₄	2 × 10 ⁻⁴ M.	100%

その結果は表に示すように AgNO₃, HgCl₂, CuSO₄, 硫酸キニーネの作用が最も強く、次いで Monoiodoacetic acid, Sodium azide, Sodium benzoate 等も若干の阻

止作用を示した。KCN 及び Urethane は逆に若干の促進作用を示した。

8) Michaelis 恒数

PNBA の濃度を種々に変えた系で PNBA 還元作用を検し作図によつて Michaelis 恒数を算出した (Figure 7 及び Figure 8 参照)。

Michaelis 恒数 $K_m = 1/9780 \text{ g/ml}$ すなわち 6.1×10^{-4} モルと算定された (反応系は菌液終末濃度 6 mg/ml 水素供与体非添加, Streptomycin 添加, 37°C 16 時間による)。

FIG. 7. Michaelis 恒数 (1)

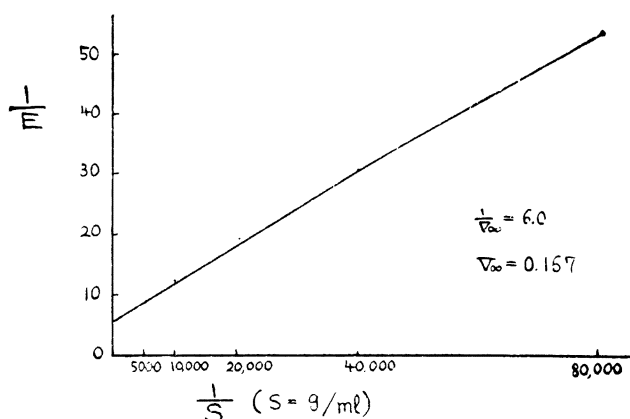
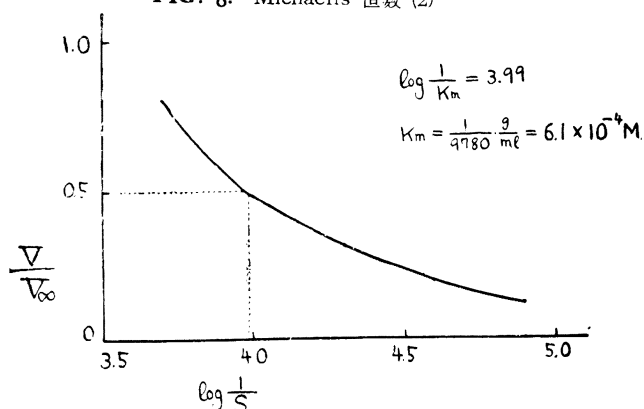


FIG. 8. Michaelis 恒数 (2)



9) 加熱の影響

70°C 10 分の加熱で PNBA 還元作用は完全に消失する。

考 按

上述のように結核菌 *Mycobacterium avium* は PNBA を還元した PABA を生成する作用を有している。この還元反応が酵素作用によるものであることは上述の成績から明かである。

別報するように著者は鳥型結核菌にたいする Sulfathiazole の試験管内発育阻止作用が, PNBA でよく拮抗されることを認め (PABA より若干劣る), 又勝沼 (信彦)⁹⁾ (1954) は大府荘において PAS の作用機作を研究

し, PAS の鳥型結核菌にたいする発育阻止作用が PNBA 並びに PABA で拮抗されることを認めた。これらの現象は本報で述べる PNBA の PABA への還元作用によつて説明し得る。佐藤・江幡⁶⁾が酵母で POBA と NaNO_2 とから PNBA が形成されることを示したが, かような経路が結核菌でも存在するかどうかは分らないが, ここに示すように著明な PNBA 還元作用が認められることは, PABA 形成の過程に一つの暗示を示すものではなからうかと考えている。

PNBA 還元反応に対する影響では銀イオン, 水銀イオン等が強力な阻害作用を示し, シアン阻害がないことを考慮すると, フラビン酵素が密接な関係を有する可能性が想像されるように思われる。

総 括

結核菌による芳香族ニトロ化合物の還元作用の研究の一環として本報では鳥型結核菌調株による PNBA の還元について報告した。

1) 結核菌が p-Nitrobenzoic acid を p-Aminobenzoic acid に酵素的に還元することを はじめて証明した。

2) この反応は好気的条件下で行われ, 嫌気的条件下にすることを必要としない。

3) 生菌浮游液による反応曲線は最初の 10 時間以上直線的である。反応に対して水素供与体の添加の影響は直接的ではないようである。

4) Optimal pH は $6.2 \sim 8.3$ の間では $7.8 \sim 8.3$ の附近にある。

5) 阻害剤では銀イオン, 水銀イオン, 塩酸キニーネ, 銅イオン等の作用が著明で, モノヨード醋酸がこれに次ぎ, その他 Azide 及び Benzoate も若干の阻害を示した。CN の阻害は全くない。

6) Michaelis 恒数は 6.1×10^{-4} モルと算出された。

7) PNBA 還元作用の定量の基礎的成績を示した。

御指導を賜った勝沼二郎院長並びに日比野進教授に感謝の意を表します。勝沼信彦学士 (名大生化学) の御援助に感謝の意を表します。又大府荘研究室の水野松司, 加藤千代子両氏の御協力に感謝します。

文 献

- 1) C. Neuberg, u. E. Welde, Biochem. Z., 60: 472, 1914; 67: 18, 1914; 62: 470, 1914.
- 2) C. Neuberg, u. E. Reinfurth., Biochem. Z., 138: 561, 1923. (1)及び(2)は(3)より.
- 3) 化学実験学 (第2部) 第4巻, 河出書房, 東京,

- 1944, p. 577~616. (金子武夫, 生化学的酸化及び還元).
- 4) Kohl, M.F.F., and Flynn, L.M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 47: 470~473, 1941 (Ann. Rev. of Biochem., 14; 617~642, 1945 より).
- 5) 江上不二夫・江幡光雄・佐藤了 : Nature, 167, 168, 1951; 佐藤了・江幡光雄・酵素化学シンポジウム, 6: 40~41, 1951.
- 6) 佐藤了・江幡光雄: 同上, 7: 57~59, 1952.
- 7) 東村道雄: 結核, 25: 655~661, 1950.
- 8) 高畑哲五郎: 生物化学分析, 克誠堂, 東京, 1927. p. 128.
- 9) 勝沼信彦: 第29回結核病学会総会演説.

