

結核菌による *l*-チロジンの分解

(第4報)

大阪阿武山赤十字病院研究室 (院長 矢野精太郎博士)

白 井 裕

(昭和 29 年 7 月 24 日受付)

これまでの3編の報告ではすべて培地はグリセリンを含むソートン変法培地を用いてきたが今回は二、三の培地成分を換えてチロジン分解物に興味ある成績を得たので報告する。

第1章 グルコーゼ培地における実験

結核菌の培地として普通に用いられるソートン培地のようなグリセリン培地では菌の発育は良いが、培養終了後グリセリンが全部消費されて了わずに培地中に残存する時、チロジン分解物のエーテル抽出中にこの残存グリセリンも僅かにエーテルに溶けてきてエーテル駆逐後油状分として残り目的のチロジン分解物の結晶析出を妨害すると思われる。この点グリセリンの代りにグルコーゼを含む培地では都合がよく、微量分解物も結晶として得られるかも知れない。

実験方法

培地成分はグリセリンの代りにグルコーゼを加えたのみで前記ソートン変法培地と同じである。しかし人型菌の場合には充分発育さすにはグリセリンも加えた方が良く考え、両者を等分に加えた培地を用いた。前者をグルコーゼ培地と略称し、後者をグルコーゼとグリセリンの両方とも含む培地であるので Dorset 変法培地と略称することにする。

その組成は次のようである。

グルコーゼ培地		Dorset 変法培地	
グルコーゼ	30 g	グルコーゼ	15 g
アスパラギン	4 g	グリセリン	15 cc
硫酸マグネシヤ	0.5 g	アスパラギン	4 g
第二磷酸カリ	0.5 g	硫酸マグネシヤ	0.5 g
クエン酸鉄アンモン	0.05 g	第二磷酸カリ	0.5 g
<i>l</i> -チロジン	1g	クエン酸鉄アンモン	0.05 g
水	1 l	<i>l</i> -チロジン	1 g
		水	1 l

その他の実験方法は第1報¹²⁾と全く同じである。

実験成績

実験1 鳥型菌竹尾株の20日培養実験

(グルコーゼ培地)

菌の発育は良く、チロジンは残存しない。

チロゾール分劃にはミロン氏反応陽性の油状分のみであつた。これをクロマトにかけるとチロゾールのスポッ

トの外に Rf 0.66 (ブタノール溶媒で) のところに別の一つのスポットが分離された。これは先(第2報)に *D*-パラ-オキシフェニール乳酸を *l*-チロジンの代りに培地に加えて鳥型菌竹尾株を働らかした場合にその分解産物としてチロゾール分劃に出てきた不明の物質と同じものである。

酸分劃にはミロン氏反応陽性の多量の針状結晶が得られた。これを陶土板で油状分を去ると 0.65 g もあつた。しかしなお僅かに油状分が含まれているので水に溶解して濾過して再結晶し再び陶土板で油状分を取ると 0.3 g となつて了つた。融点は 139°~141°C (補正なし) であつた。そこでさらに硫酸酸性でエーテル抽出を行い再結晶さすと 0.2 g で融点は 148° C となりパラ-オキシフェニール酢酸の融点と一致した。これを無水磷酸を盛つたデンケイターで乾燥して元素分析を行う。

元素分析値

物質	3.0950 mg	H ₂ O 1.5166 mg	CO ₂ 7.1331 mg
C ₈ H ₈ O ₃		理論値	実験値
H		5.30%	5.477%
C		63.15%	62.86%

すなわちよくパラ-オキシフェニール酢酸に一致することを知つた。

アミン分劃にも極めて微量の短針状結晶を得た。ミロン氏反応陽性である。これを陶土板で油状分を去り融点測定をしたがなお黄褐色に呈色していた結晶の為か 25 0°~256°C で黒くなり融解した。やつと2回融点ができる程の微量であつて再結晶はできなかつた。しかしクロマトではブタノール及びピリジン溶媒でも塩酸チラミンに一致した。

実験2 鳥型菌竹尾株の10日培養実験

(グルコーゼ培地)

やはり菌の発育は良くチロジンは全部消費されていた。

チロゾール分劃にはミロン氏反応陽性の針状結晶が得られた。これを陶土板で油状分を去ると 0.1 g で融点 87°~88° (補正なし) であつた。石油エーテルで再結晶を行い 60 mg の純チロゾールとなつた。

酸分劃はミロン氏反応陽性の油状分のみであつたのでクロマトにかけるとパラ-オキシフェニール酢酸からパラ-オキシフェニールプロピオンにわたる薄いスポット

を見た。

アミン分割にはやはりミロン氏反応陽性の呈褐色の泥状物の微量を得たが結晶ではなかつた。それでクロマトにかけてとブタノール溶媒でもピリジン溶媒でも塩酸チラミンに一致するスポットを得た。

実 験 3 鳥型菌 AVT 株の 20 日培養実験

(グルコーゼ培地)

この菌も発育は良好であつてチロジンは全部消費されていた。

チロゾール分割に少量のミロン氏反応陽性の針状結晶を得たので陶土板で油状分を去ると 30 mg であつた。これを石油エーテルで再結晶すると針状結晶ができたが油状分がこれに附着していたためなお融点は 87°~90°C (補正なし) であつて 9.5 mg となつて了つた。しかしクロマトではチロゾールに一致しているからチロゾール結晶であろう。

酸分割にはやはり多量のミロン氏反応陽性の針状結晶を得たのでこれを陶土板で油状分を去ると 0.5 g であつて融点は 145.5°~147.5°C であつた。これを硫酸酸性でエーテル抽出を行い再結晶を行うと 0.3 g となり融点は 148°C であつた。先に元素分析で確認したパラ-オキシフェニール醋酸と混澱するも融点の低下を見なかつた。

アミン分割はミロン氏反応も陰性でクロマトでも何等証明されなかつた。

実 験 4 鳥型菌竹尾株の 60 日培養実験

(グルコーゼ培地)

菌を長期間培養するとパラ-オキシフェニール 醋酸がさらに何か外の物質に分解されはしないかと考えた。グリセリン培地の場合菌膜が沈下し易い傾向があつたが、グルコーゼ培地ではその傾向はなく 60 日間表層に良く生えていた。チロジンは全部消費されていた。

チロゾール分割には粗チロゾール 55 mg (融点 83°~90°) を得、再結晶して純チロゾール 15 mg となる。酸分割にはミロン氏反応陽性で融点 120°~139°C (補正なし) の針状結晶 0.3 g を得た。これを水及び硫酸酸性でエーテル抽出を行い、再結晶を行うと、パラ-オキシフェニール醋酸に一致する融点 148°C の純結晶 0.1 g となつた。アミン分割はミロン氏反応も陰性であつた。

実 験 5 人型菌 H₂ 株の 70 日培養実験

(グルコーゼ培地)

菌の発育は良く 40 日目より強く増殖し培地は黒くなつていた。チロジンは 1 g 用いて 0.2 g が残存していた。

チロゾール分割にはミロン氏反応陽性の油状分を得たのでクロマトにかけてとチロゾールに一致した。少量のエーテルで再結晶して微量の針状結晶を得たので陶土板で油状分を去ると 2 mg で融点は 87°~89°C (補正なし)

し) であつた。

チロゾール結晶であろう。

酸やアミンは証明されなかつた。

実 験 6 人型菌 H₃₇株の 60 日培養実験

(Dorset 変法培地)

菌の発育は比較的よいが H₂ 株程ではなく培養液はやはり黒く呈色する。チロジンは残存するようであつてミロン氏反応は陽性であるが少ないためか結晶として出なかつた。

チロゾール分割にはミロン氏反応陽性の油状分を得て、クロマトでチロゾールに一致した。

これを少量のエーテルで再結晶して針状結晶を得たので陶土板で油状分を去ると 9.5 mg で融点は 87°~89°C (補正なし) であつた。チロゾール結晶であろう。酸やアミンは証明されなかつた。

実 験 7 人型菌 H₂ 株の 30 日培養実験

(Dorset 変法培地)

菌の発育は極めて良く 30 日で沈下して了つた。培養液はやはり黒く呈色しチロジンは残存するようであるが結晶として得られなかつた。

チロゾール分割にはミロン氏反応陽性の油状分を得たが、クロマトでチロゾールに一致するスポットを見たのみでエーテルで再結晶しても結晶として得られなかつた。酸やアミンはやはり得られなかつた。

以上の 7 実験を綜括すると次頁表のようである。

小 括 及 び 考 按

鳥型結核菌の場合、グリセリン培地の時では 20 日培養でチロゾールが最も多く得られたのに反して、グルコーゼ培地ではチロゾールは少量で、それに対しパラ-オキシフェニール醋酸が用いた *l*-チロジンの実に 50% も粗結晶として得られたことは興味深い。

又アミン分割には塩酸チラミンと思われる微量の結晶を得た。従来グリセリン培地では一度も見られなかつたのである。これはグリセリン培地ではグリセリンがこのアミン分割に溶けてくるのか、多くの油状分が出てくるからチラミンの結晶析出が妨げられるに反して、グルコーゼではかような油状分が殆んど出ないためとも考えられる。

さらに長期間培養した実験でもパラ-オキシフェニール醋酸がやはり多量得られたのみで新しい分解物は見られなかつた。

人型結核菌をグルコーゼ培地に培養した時は培養液は漸次黒くなるが分解産物としてはグリセリン培地での成績と殆んど変わらずやはり微量のチロゾールが得られたのみであつた。

第 2 章 特殊培地における鳥型菌に

よる *l*-チロジンの分解

第 1 節 Tween 80 培地における実験

表

菌 株	鳥 型 菌				人 型 菌			
	竹 尾 株	竹 尾 株	A V T 株	竹 尾 株	H ₂ 株	H37 株	H ₂ 株	
培 地	グルコーゼ 培地	〃	〃	〃	〃	Dorset 変法培地	Dorset 変法培地	
供試 チロジン	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	
培 養 日 数	20日	10日	20日	60日	70日	60日	30日	
培 養 濾 液 pH	5.8	6.2	6.6	6.0	5.8	6.0	5.8	
乾 燥 菌 量	4.3 g	5.8 g	4.9 g	3 g	5.4 g	2.8 g	7.7 g	
チロゾール	* ① + ** x	*** 粗 0.1 g **** 純 60 mg	粗 30 mg	粗 55 mg 純 15 mg	粗 2 mg	粗 9.5 mg	①	
粗パラ-オキシフ フェニール醋酸	0.65 g	①+x	0.5 g	0.3 g	0	0	0	
純パラ-オキシフ フェニール醋酸	0.2 g	0	0.3 g	0.1 g	0	0	0	
ア ミ ン	①	①	0	0	0	0	0	
残 存 チロジン	0	0	0	0	0.2 g	微 量	微 量	

*①とは結晶に得られずクロマトでのみ証明されたもの **+xとに別にクロマトで得られた不明物質の
スポットを示す ***粗とは粗結晶 ****純とは純結晶

有毒結核菌は cord (索) 形成として菌が索状をなして集団的に発育するものであるが Tween 80¹⁷⁾ を加えて発育させると菌はばらばらに分散して単孤菌として発育する。又こうすると cord factor が菌体から培養液中に溶け出て菌の毒性¹⁸⁾が弱くなるといわれている。

そこでこの培地でも *l*-チロジンからチロゾールがでるかを試験した。

実験方法は前記ソートン変法培地 11 に Tween 80 を 0.5 cc 加えた外は第 1 報と全く同じである。

実 験 1 鳥型竹尾株の 20 日培養実験

Tween 80 を加えると深部培養も可能となるので毎日 1 回培地を振盪して深部発育をさすようにして培養した。従つて菌量は少なく乾燥菌量として 1.6 g であつて、用いた 1 g の *l*-チロジンは 0.5 g 残存していた。

チロゾール分割及び酸分割は僅かにミロン氏反応陽性であつたが何等結晶は得られなかつた。アミン分割はミロン氏反応陰性である。

この実験ではクロマトを施行しなかつた。

実 験 2 鳥型東大株の 30 日培養実験

初め表層にも菌膜を形成したので 3 日目には培養器を振盪して洗めて深部増殖をさしたが 15 日目頃から又表層に薄い菌膜を作つた。乾燥菌量は 2.8 g で前者より多いが用いた 1 g の *l*-チロジンは殆んど残存し 0.9 g を回収した。

チロゾール分割はミロン氏反応が微かに陽性であつたのでクロマトにかけると不分明なスポットを見たがチロ

ゾールに一致しなかつた。酸及びアミン分割はミロン氏反応陰性でクロマトでも何等認むべきスポットを見なかつた。

第 2 節 グリセリン除去培地での実験

石橋氏¹⁹⁾は *l*-チロジンからチラミンを作る好気性乳酸菌をグリセリンや含水炭素源を除いた培地に植えると、もはや *l*-チロジンからチラミンができなくなることを報告している。そこで前記ソートン変法培地からグリセリンを除去して鳥型菌竹尾株を植えてみた。しかし殆んど菌は増殖しないので 60 日間培養してみた。それでも僅かに増殖したかと思われる程度であつた。*l*-チロジンは 1 g 用いて 0.4 g 残存していた。

チロゾール及びアミン分割はミロン氏反応陰性でクロマトでも何も証明できなかつた。

酸分割はミロン氏反応陽性でクロマトでパラ-オキシフェニール醋酸に近似するスポットを得た。

小 括 及 び 考 按

Tween 80 を加えたために鳥型結核菌の Cord formation が消失し、毒性も減弱するといわれるような変化と共に酵素系にも異常を来して *l*-チロジンよりチロゾール産生の能力も失うらしい。またグリセリンを除いた培地でもチロゾールは得られていないがこれは殆んど菌が増殖していない程度なので確言はさける。

全 編 の 綜 括

結核菌によるアミノ酸代謝の正しい観察は独り生化学上の興味のみならず臨床的には結核菌によつて組織蛋白

が破壊されて何等かの有毒物質が産成されるかどうかの問題に関し、又結核菌発育阻止剤の究明乃至その機構に関し、細菌学的には菌種の鑑別、菌体毒素、培地の問題等に関して重要な問題と考える。

従つてこれについての研究報告は種々あつて Campbell⁹⁾ はアラニンから醋酸が、ヒスチジンすなわち β イミダツオールアラニンから β イミダツオール醋酸が形成されるといつているが、ヒスチジンからは β イミダツオールプロピオン酸、同乳酸、同焦性ブドウ酸を経て分解されるとするもの⁸⁾もある。

しかしチロジンに関しては結核菌によつて分解されないとするもの¹⁰⁾が多い。

著者は結核菌を l -チロジン含有の無蛋白培地に充分発育させ、その培養濾液中からチロジン分解物を抽出して結晶として確認するように努めた。

そしてまず発育の早い鳥型結核菌を用いて、チロジンすなわちパラ-オキシフェニールアラニンからパラ-オキシフェニール醋酸ができることを見、この点より考えると Campbell のアラニンから醋酸、 β イミダツオールアラニンから β イミダツオール醋酸ができるアミノ酸の分解形式と一致するようであるが、その他にパラ-オキシフェニール・エチルアルコールなるアルコールを多量に得たのである。

培養日数の経過を追つてチロジン分解物を見て行くと、まず該アルコールができてこれが該醋酸に移行して行くようである。その他のチロジン分解物としては一部に極く微量のチラミンが証明されただけである。

そして別にチラミンをチロジンの代りに培地に加えて培養してチロジンからの場合とはほぼ等量のチロゾールが形成されることを知つた。それでチロジンの分解形式としてチロジン \rightarrow チラミン \rightarrow チロゾール \rightarrow パラ・オキシフェニール醋酸への道が考えられる。

これ等の点は酵母⁴⁾によるチロジンの分解に非常によく似ている。酵母の場合にはパラ-オキシフェニール焦性ブドウ酸⁷⁾からもチロゾールを得ているが著者の鳥型結核菌の実験では培養日数を順次追つてチロジン分解物の推移を見ても該焦性ブドウ酸を証明できなかつたからこの酸を用いての実験を行つていない。

さらに鳥型菌でパラ-オキシフェニール乳酸からも微量のチロゾールが得られた。これは又、Neubauer u. Fromherz⁵⁾の酵母による実験とよく似ている。

他方一般細菌では平井教授⁶⁾、宮路⁷⁾等の二、三の報告はあるがチロゾールのようなアルコールを形成することは稀であつて、この点結核菌は *Mycobacterium* に属しておつて酵母と細菌の中間の位置にある細菌学的性質から考えると誠に興味深い。

しかしながらグルコゼ培地ではグリセリン培地におけるような多量のチロゾールが得られずして約 10 %に

過ぎなかつた。それに反してパラ-オキシフェニール醋酸が 50 %も多量得られている。この点酵母とは大分性質が異なるようである。

次に菌の性質を多少変えてみてこの代謝形式に変化を起すかどうかを見てみた。すなわちストレプトマイシン耐性という性質はこの代謝形式に変化を起さないが Tween 80 を加えて培養して菌の cord factor を取り単菌発育すなわち均等培養を行うとチロゾールが全然証明されなくなることは面白い。

以上は鳥型菌での成績であるが人型結核菌や牛型結核菌では発育は鳥型菌に比べて遙かに緩慢であつて 2 カ月から 3 カ月間充分発育させても l -チロジンの分解能力は悪い。しかし分解産物としては同じようにチロゾールが微量 (0.5%内外) ではあるが結晶として得られ、一部では微量の酸性分解物をクロマト上で見た (恐らくパラ-オキシフェニール醋酸であろう)。

人型菌から由来しているが無毒で性質上雑菌だといわれている *Mycobacterium tuberculosis* No. 60715) は鳥型菌には及ばぬが人型菌よりは遙かに多いチロゾールが得られた。しかしスメグマ菌のように全然チロゾール等のチロジン分解物が得られない性質とも異つていた。

すなわちこの l -チロジンよりチロゾール形成の性質は抗酸性菌一般の性質ではなく、結核菌一般の性質のようであるが毒性の有無とは関係がないようである。

結 論

1) 鳥型結核菌 (4 株とも) を 0.1% に l -チロジンを含む無蛋白ソートン変法培地に充分発育させて大体 20 日培養で用いたチロジンの約 10~30% 量のパラ-オキシフェニールエチルアルコールすなわちチロゾールを純結晶として取り出し得た。そしてこれはストレプトマイシン耐性菌で行つても同様であつた。

2) さらに上の実験で培養日数を倍加すると用いたチロジンの約 10% のパラ-オキシフェニール醋酸がやはり純結晶として証明された。

3) 上の実験で l -チロジンの代りにチロジン誘導体を用いて見た。すなわち塩酸チラミンからやはり 20% のチロゾールを得、 d -パラ-オキシフェニール乳酸からも微量のチロゾール結晶を得た。

4) 上の実験で Tween 80 を加えたり、グリセリンを除くとチロジンからチロゾールは得られなかつた。

5) 上の実験の培地成分のグリセリンの代りにグルコゼを用いると l -チロジンからチロゾールの産生が少なくなり、早くパラ-オキシフェニール醋酸となるのか、20 日培養で用いたチロジンの約 50% 量の粗結晶 (約 30% 純結晶) のパラ-オキシフェニール醋酸を得た。さらに竹尾株では極く微量の塩酸チラミンを得た。

6) 人型及び牛型結核菌では l -チロジンの分解能力は乏しいがやはり微量 (0.5%内外) のチロゾール結晶が

得られ、一部ではペーパークロマトグラフィーでパラオキシフェニール醋酸と思われるスポットを得た。

7) *Mycobacterium tuberculosis* No.607 では用いたチロジンの4%の純チロゾールを得た。

8) スメグマ菌, チモテー菌では何等のチロジン分解物も得なかつた。

(本論文の要旨は第7回日本結核病学会近畿地方学会, 日本医科大学50周年記念講演会及び第29回日本結核病学会総会に報告した)

摺筆するに当り終始直接御指導を賜わり、貴重なるチロジン誘導体を御分与下さつた長崎大学名誉教授平井金三郎先生及び御校閩、御指導を戴いた日本医科大学生化学教授上代皓三先生並びに当院院長矢野精太郎博士に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) F. Ehrlich: Breslauer Chem. Ges. 11, Febr, 1910. zitiert nach K. Hirai: Acta scholae med. univer. imper. in Kioto 11, 425, 1917~1918.
- 2) F. Ehrlich: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. 45, 883, 1912.
- 3) derselbe: ebenda 44, 139, 1911.
- 4) derselbe: ebenda 45, 1006, 1912.
- 5) Neubauer u. Fromherz: Ztschr. f. physiol. Chem. 70, 326, 1910.
- 6) K. Hirai: Acta scholae med. univer. imper. in Kioto 11, 425, 1917~1918.
- 7) 宮路憲二: 日本化学会誌 45, 391, 大 13.
- 8) Hanke & Koessler: J. Biol. Chem. 50, 131, 1922.
- 9) Campbell: Amer. Rev. Tuberc. 11, 458, 1925.
- 10), 11) 山村雄一: 酵素化学の進歩, 第2集, 304頁, (1950)
- 12) 白井裕: 結核 29 卷, 8号, 295頁(1954)
- 13) K. Hirai: Biochem. Ztschr. 114, 71, 1921.
- 14) 市原硬: 蛋白質及びアミノ酸の生化学 368.
- 15) Walter c. Tobie: Amer. Rev. Tuberc. 58, 693, 1948.
- 16) 山村雄一: 酵素化学の進歩, 第2集, 288頁(1950)
- 17) Middlebroock G., Dubos R.T. and Pierce C.: J. Exp. Med. 76, 175, 1947.
- 18) Bloch, Hubert and Noll: J. Exp. Med. 97, 1, 1953.
- 19) 石橋守雄: 長崎医学会雑誌 20, 274, 昭 17.