

結核菌によるL-チロジンの分解

(第 1 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 3 月 24 日受付)

酵母或いは細菌による L-チロジンの分解に関する内外の報告は多い。そしてその分解産物としては是に相当する酸、オキシ酸アミン、アルデヒド、アルコール等が報告されている。エールリツヒは酵母醗酵によりヒスチジンより¹⁾ ベーター・イミダツオールエチルアルコール、トリプトファンより²⁾ ベーター・インドリールエチルアルコールの産成されるを見、同じく又チロジンよりも³⁾ 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の形成されるを初めて見、しかもこの変化はよ⁴⁾ 取得量すなわち用いたチロジンの 60~80% の純粋のチロゾール結晶を得ると云う。更に酵母の場合には何等含窒素化合物を加えることなくただ糖類のみを加えた培地で菌体蛋白を構成するチロジンよりもチロゾールを産成すると云っている。又エールリツヒはチロジン誘導体すなわち⁴⁾ チラミンより⁵⁾ ノイバウエル及びフロムヘルツはパラオキシフェニール焦性葡萄糖よりもチロゾールを酵母醗酵によつて得ている。しかし細菌によつては⁶⁾ 平井教授が初めて好気性乳酸菌の中のある一菌株によつて L-チロジンからチロゾールの結晶を分離確認されたがその量は少なく 30 日間培養で粗チロゾール 3.9% の収量に過ぎない。次いで⁷⁾ 宮路は醋酸菌を以つて 90 日間培養し、その中 *B. rancens* 株では 6.7% の粗チロゾールと 7.2% の粗パラオキシフェニール乳酸を得、*B. xylinoides* 株では 5.2% の粗チロゾールと 2.4% の純パラオキシフェニール乳酸を得たと云う。上述のように酵母に比較して細菌ではチロジンよりチロゾールが形成されることは稀であつてしかも得られたとしても微量である。それに反してチロジンに相当する酸やアミンが多量に形成されたという報告は多い。

一方結核菌によるアミノ酸の分解に関しては例えばヒスチジンは⁸⁾ イミダツオールプロピオン酸、同乳酸、同焦性葡萄糖を経て分解されると云う人もあり、⁹⁾ 同醋酸を経て分解されるとも云われているがヒスタミンは証明されていない。一般に結核菌によつては酸ができるがアミンができないと云われている。

チロジンについては¹⁰⁾ 奥田, Courmont, Bernheim 等の如く多くは分解されないと云っているが ¹¹⁾ 山村は鳥型菌では菌浮遊液にチロジンを加えてワールブルグ氏検圧計で酸素消費のされるのを見て分解されるのではな

いかとも云っている。是等の間接法やチロジンを唯一の窒素源として結核菌を培養する方法によらず著者は結核菌を充分発育させるためにソートン変法培地(なるべく簡略にするためクエン酸を除く)に 0.1% に L-チロジンを加えて培養しその培養濾液中にチロジン分解産物を結晶として確認しようと努めた。そして結晶の得られない時はペーパー・クロマトグラフィー(以下クロマトと略す)によつて分離した。

その結果鳥型菌では L-チロジンの 40% の粗チロゾール(30%の純チロゾール)結晶を得、培養日数の倍加とともに 10% のパラオキシフェニール醋酸の結晶を得た。又牛型菌や人型菌でも明らかに L-チロジンは分解されており分解産物として微量のチロゾールが見られる。

次に培地の組成を変えると興味ある分解産物の変化を起す。すなわちグリセリンの代りにブドウ糖を用いるとチロゾールの産成は少量となり、多量のパラオキシフェニール醋酸(用いた L-チロジンの 50~60%)が早く形成され更に興味あることは微量のチラミンが得られたことである。又培地に Tween 80 を加えて深部均等培養をしたり、グリセリンを除いて培養するとチロゾールが全然得られないのである。

その他種々のチロジン誘導体を用いて分解物を研索しチロゾール形成機転を見んとして塩酸チラミン、パラオキシフェニール乳酸、パラオキシフェニール・プロピオン酸の 3 種を用いた。その結果チラミンからもやはり 20% の純チロゾールが形成されることを知つた。

実験方法

結核菌は、鳥型菌 4 株、ストレプトマイシン耐性鳥型菌 1 株、牛型菌 3 株、人型菌 5 株、*Mycobacterium* 607 株及びチモテー菌、スメグマ菌の総計 16 種の保存株(その出所は各章で述べる)とストレプトマイシン及びイソニコチン酸ヒドラジド耐性となつていると思われる患者喀痰より分離した結核菌の 3 種である。このように同一菌でも種々の株を用いたのは菌株を異にするとして分解物が全く異なるという先人の成績による。是等菌は 1 カ月毎に鶏卵培地(小川氏)に植え継いで保存した。

培地はソートン変法培地でソートン培地よりクエン酸を除去したものであつて組成はアスパラギン 4 g, 硫酸マグネシヤ 0.5 g, 第二磷酸カリ 0.5 g, クエン酸鉄ア

ンモン 0.05g, グリセリン 40cc に蒸留水を加えて1lとしたものである。是に *l*-チロジンを 1g 加えて加熱溶解しアンモニヤで pH 7.2 とし 200 cc ずつ 5 本或いは 500cc ずつ 2 本培養コルベンに分注し型の如く高圧滅菌してチロジンの結晶の析出しない前に孵卵器に保存して各菌株を表層に浮かすように植えて表層培養をした。毎日集落の性質を観察し結核菌特有の表層集落の状態と液の透明なることに注意し、培養終了後は各コルベンより鈎菌してチール・ネールゼン氏染色とグラム染色とを施行して検鏡し細菌学的に純粹なることを確めた。これを濾過し菌膜は乾燥後秤量して増殖の程度を見、濾液についてはその pH を調べて酸性なるを確めて後次の抽出操作に移つた。

抽出操作：培養濾液を蒸発皿の上に集めて重湯煎上で蒸発さし舎別別状になるまでなるべく水分を除き無水アルコールで加温して抽出して濾過し、濾液がミロン氏反応陰性になる迄充分反覆抽出し、残渣よりはチロジンの回収を行い、浸出液よりはアルコールを蒸溜除去し是を水に溶解し酸性なるを確めて隈川・須藤氏液体抽出器で72時間エーテル抽出を行つた。

エーテル抽出物を分液漏斗に移し約 50 cc の 10% 炭酸ソーダを以つて 3・4 回振盪するとエーテル層より炭酸ソーダ液層の方が呈色が弱くなる。このエーテル層よりもエーテルを駆逐して僅かのチロゾールを得るが炭酸ソーダアルカリ性溶液を隈川・須藤氏液体抽出器で 72 時間エーテル抽出を行い、エーテル溶液よりエーテルを駆逐して残つた結晶がすなわちチロゾールである。

炭酸ソーダ液を塩酸性とし更に隈川・須藤氏液体抽出

器で 72 時間エーテル抽出を行い、エーテル溶液よりエーテルを駆逐して得た結晶は酸であることを確めた。抽出残渣はミロン氏反応陰性であることを確めた。

初めのエーテル抽出を行つた残渣液を苛性ソーダで中和し、更に炭酸ソーダアルカリ性にして隈川・須藤氏液体抽出器で 72 時間エーテル抽出し、エーテル溶液を分液漏斗で稀塩酸を約 40cc ずつ 3 回加えて充分振盪抽出し、塩酸溶液とし是より更に塩酸を蒸発させて得た結晶が塩酸チラミンである。抽出残渣のミロン氏反応は陰性であることを確めた。これ等を表示すると I 表の如くなる。

ペーパークロマトグラフィー：上述のようにして各分割ともミロン氏反応陽性であるが結晶が得られなく油状液のみか結晶が得られても融点測定不能か再結晶のできない程微量の場合にはこれをクロマトにかけた。すなわち溶媒を種々変えて一次元上昇法によるクロマトを施行して次のものが分離が良いことを知つた（呈色はミロン氏反応液では不明となるのでチアゾ呈色液を用いるが後で噴霧するアルカリ液は 10% 苛性ソーダが最も鮮明な赤色を呈する）チロゾールは 2.5 N のアンモニヤ水 1 とブタノール 4 の混合液がよく、酸の場合には 2.52N のアンモニヤ水 1 とピリジン 4 の方が分離確認がよい。それはブタノール溶媒を用いると II 表の如くに対照培養液中に酸に近い Rf を持つチアゾ呈色物があつて紛わしくなるからである。チラミンはいずれでもよい。常に対照のチロジン誘導体結晶を用いて被検液と比較した。

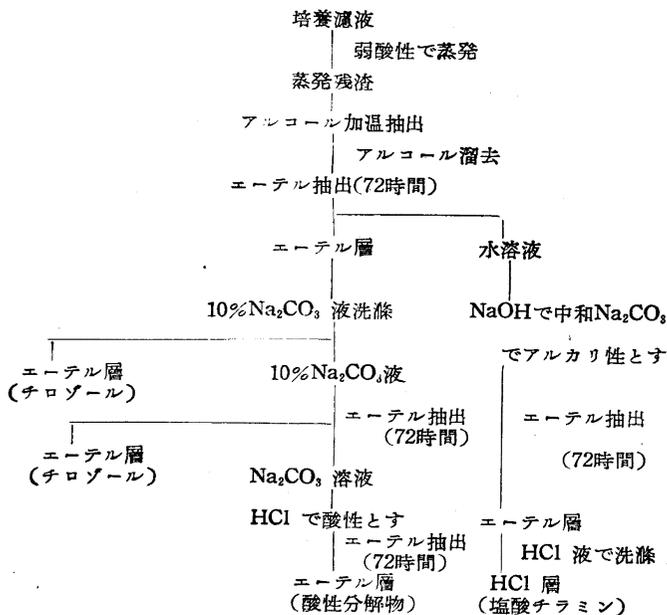
またパラオキシフェニール乳酸とパラオキシフェニール醋酸とは上述の溶媒でも種々溶媒を変えても大体的見当はつくが確実に分別することは困難であつた。主なチロジン誘導体の Rf は II 表のようである。

鳥型菌による *l*-チロジンよりチロゾールの形成

実験材料：菌株は竹尾株、東大株、AVT 株、A₇₁ 株の 4 株であり竹尾株・東大株は大阪微生物研究所より分譲を受け AVT 株、A₇₁ 株は日本医大細菌学教室より分譲を受けたものである。前 3 株は發育は極めて良好であつて鶏卵培地でも 3 日間で培地一面に集落を形成するが A₇₁ 株は 2 週間を要する。

更に AVT 株についてストレプトマイシン耐性を得さしめた。すなわちゾートン培地にストレプトマイシンを無菌的に培地 1 cc につき 0.1γ, 1γ, 10γ, 100γ, 1 mg, 10 mg, 100 mg となるように加え、小試験管で表層液体培養をして 2 週

I 表 抽出操作



II 表 ペーパークロマトグラム(チアゾ呈色)

溶媒	2.5N NH ₄ OH(1) Butanol(4)	2.5N NH ₄ OH(1) Pyridin(4)
試料		
Tyrosol	Rf 0.86	Rf 1.00
HCl-tyramin	" 0.80	" 0.87
Tyramin	" 0.76	" 0.91
P-Oxy-phenyl- -propionsäure	" 0.20	" 0.75
"-essigsäure	" 0.14	" 0.69
"-milchsäure	" 0.09	" 0.71
対照竹尾抽出物	" 0 0.12	" 0
対照 H ₃₇ 抽出物	" 0 0.09 0.3(紫)	" 0.13(紫)

対照とはチロゲン及びチロゲン誘導体を含みぬソートン変法培地に鳥型竹尾株を20日間人型H₃₇株を60日間培養した培養濾液をI表のように処理したものである

間孵卵器中に収め、この中最高濃度のストレプトマイシン培地に生えたものを新しく作成したストレプトマイシン加培地に植える。このようにして3回繰り返すと10mg濃度で生えるものを得た。

この菌も発育は極めて良好であつて集落の性質も変りなく勿論染色上抗酸性でありムツ氏顆粒も有する。

実験成績

実験1 東大株鳥型菌による実験

菌の発育極めて良好で3日間の培養で全面に菌膜を作り20日間には厚い菌膜となる。エーテル抽出によるチロゾール分割はそのエーテルを蒸発して放置すると、花環状に並ぶ芳香性の黄色を帯びる針状結晶を得た。是を陶土板に置き油状分を去つたものは0.18gでミロン氏反応陽性である。その融点は87°~88°C(補正なし)である。すなわち粗チロゾールと考え再結晶する為エーテルに溶かし約10倍量の石油エーテルを加えて氷室に一昼夜放置すると棒状乃至針状の結晶が出た。これを秤量すると、0.085gであつた(この際注意すべきはエーテルも石油エーテルも無水炭酸ソーダで充分脱水して置かないとチロゾールは極めて水に溶け易いから結晶は出て来ない)。この再結晶物は融点は91°Cで鋭敏に融ける。更に無水燐酸を入れた真空除湿器で乾燥して元素分析を行うとIII表のようにチロゾールの理論値とよく一致する。

III 表

物質	2.860 mg	HO ₂	1.8275 mg	CO ₂	7.2715 mg
C ₈ H ₁₀ O ₂		理論値		実験値	
H		7.230		7.152	
C		69.50		69.34	

酸分割にも僅かの結晶を得たが精製し得る量ではなかつたのでミロン氏反応陽性なるを見てクロマトにかけパラオキシフェニール醋酸に一致するを見た。

アミン分割は結晶が出ずミロン氏反応も陰性であつた。

実験2 AVT 株鳥型菌による実験

東大株と同じく発育極めて良好であつた。用いたチロゾンは0.8gであつてチロゾール分割より0.12gの融点91°Cの純白結晶を得た。元素分析で確認した結晶と混融するも融点の低下を見ない。勿論ミロン氏反応陽性で純チロゾールである。更に是を確かめるためこの50mgよりチロゾール・チ・ベンツアート(融点111°C)を作つた。すなわちショットテンバウマンの方法に従つて約20ccの20%苛性ソーダに溶かしベンツオイル・クロリドを約2cc振盪しながら滴下し20分間強く振盪すると粗大な結晶が析出するに至る。

これを濾過し溜水でよく洗い、アルコールに溶かし溜水を加えて再結晶すると微細な美しい針状結晶を得た。融点は109°~110°C(補正なし)であつた。これを更にエーテルに溶かし水を加えてエーテルを溜去して行くと水面に花環状に並ぶ針状結晶を得る。これは融点111°Cで鋭敏に溶ける。チロゾール・チ・ベンツアートとよく一致しその収量82mgであつた。これにより更に本物質はチロゾールなることが確定された訳である。

酸分割にも黄色の針状結晶でミロン氏反応陽性の物質を得たのでこれを陶土板上で油状分を去るに0.095gであつた。融点は143°~145°C(補正なし)である。これを再結晶の為塩酸酸性で再び隈川・須藤氏液体浸出器で72時間抽出してエーテル層を蒸発して得た結晶も融点が変わらない。そこで炭末で不純物を吸着しようとしたが試料微量で本酸も炭末に吸着されたか濾液中に結晶が出ない。再びエーテルでその炭末を抽出して微量の結晶物を得たが反つて融点が低下してつた。すなわち148°Cの融点を持つパラオキシフェニール醋酸と思われるが純結晶とすることができなかつた。そこでクロマトにかけるとパラオキシフェニール醋酸に一致した。アミンの分割はミロン氏反応陰性であつた。

実験3 竹尾株鳥型菌による第1実験

これも菌の発育は良好であつた。用いたチロゾン1gからチロゾール分割にやはり粗チロゾール0.2gを得た。融点89°~90.5°Cでミロン氏反応陽性である。再結晶で融点91°Cの0.12gを得た。元素分析で確めたチロゾールと混融するも融点の低下を見ない。この者もまたベンツオイル・チレンすると融点111°Cでよくチロゾール・チ・ベンツアートに一致することを知つた。

酸分割はミロン氏反応陽性であるが結晶物を得なかつた。クロマトでパラオキシフェニール醋酸によく一致した。

アミン分割は結晶も出ないし、ミロン氏反応も陰性であつた。

実験4 竹尾株鳥型菌による第2実験

更にチロゾールの収量を多くしたいと思い 1.5 g のチロジン入培地 1.5 l を用いた。チロゾール分割の結晶を陶土板上で油状分を去ると 0.92 g を得た。用いたチロジンの 60% であつて酵母の場合に近い。しかし融点は 81°~85°C (補正なし) で少し低く再結晶の際脱水が不充分であつた為か結晶が仲々出ないので融点 91°C とするために 2~3 回再結晶を繰り返さねばならなかつた。そのため収量悪く 0.24 g に減じた。これもベンツオイレーンすると融点 111°C のチロゾール・ヂ・ベンツアートとなることを確認した。

酸分割はミロン氏反応陽性で極めて微量の結晶を得たが再結晶し得る量ではなかつた。クロマトにかけるとパラオキシフェニール醋酸に一致することを知つた。

アミン分割はミロン氏反応陰性で結晶も勿論得られなかつた。

実験5・A₇₁ 株鳥型菌による 60 日間培養実験

前述のように鳥型菌としては発育が悪くあたかも牛型菌のように 30 日で培地全面に薄膜を形成し、それから漸次厚く盛り上つてくる。しかし前 3 株の鳥型菌程の厚膜とならないしまた沈む傾向はない。

チロゾール分割には帯黄色の針状結晶を得、陶土板上で油状分を去ると既に融点 91°C の 0.17 g 純白結晶を得た。先に確認した純チロゾールと混融しても融点の低下を見ない。勿論ミロン氏反応は陽性である。

酸分割には結晶は得られず油状分のみであつたがミロン氏反応は陽性であつたのでクロマトにかけるとやはりパラオキシフェニール酸に一致した。

アミン分割はミロン氏反応陰性の油状分のみでクロマ

トにも何のスポットも見なかつた。

実験6 A₇₁ 株鳥型菌による 100 日間培養実験

更に培養日数を増加して見てチロゾールの変動を見んとした。発育は同様で表層に厚い菌膜を形成し沈下しなかつた。

チロゾール分割に結晶を得たので陶土板上に油状分を去ると 0.4 g であつて 60 日間培養の時の 2 倍以上であり融点は 88°~89°C であつた。これを再結晶すると融点 91°C の純白結晶 0.3 g を得た。先に確認した純チロゾールと混融するも融点の低下を見ない。ミロン氏反応陽性である。

酸分割は結晶が出なかつたがミロン氏反応は陽性であつたのでクロマトにかけるとやはりパラオキシフェニール醋酸に一致した。

アミン分割はミロン氏反応陰性の油状分のみでクロマトにも何のスポットも得なかつた。

実験7 ストレプトマイシン耐性 AVT 株鳥型菌による実験

非耐性菌に優る程良好な発育を示し 15 日目より僅かに液面より沈下し始める程厚い菌膜となつた。

チロゾール分割に帯黄色の針状結晶を多量に得た。融点は 84°~86°C であつて 0.3 g であつた。これを再結晶して融点 91°C の純結晶 0.2 g を得た。先に確認したチロゾールと混融しても融点の低下を見ず勿論ミロン氏反応陽性である。

酸分割にも少量の美しい結晶を見たが再結晶し得る量でなかつたのでミロン氏反応陽性なるを見てクロマトにかけるとパラオキシフェニール醋酸とよく一致した。

アミン分割はミロン氏反応陰性の油状分のみでクロマト上にも何のスポットも得られなかつた。

以上 7 実験とも l-チロジンは全部消費されていて残存

IV 表

菌 株	東 大	AVT	竹尾 I	竹尾 II	A ₇₁ I	A ₇₁ II	ストマイ耐性AVT	対 照 (竹尾)
供 試 チ ロ ジ ン	1 g	0.8 g	1 g	1.5 g	1 g	1 g	1 g	0 g
培 養 日 数	20日	20日	20日	20日	60日	100日	20日	20日
培 養 濾 液 pH	5.8	5.6		5.0	5.4	5.0	6.6	6.4
乾 燥 菌 量	9.9 g	5.2 g	8.8 g	13.4 g	4.0 g	5.0 g	7.5 g	7.2 g
粗 チ ロ ゾ ー ル	0.18 g	0.114 g	0.2 g	0.92 g	0.17 g	0.4 g	0.3 g	0
純 チ ロ ゾ ー ル	0.085 g	0.114 g	0.12 g	0.24 g	0.17 g	0.3 g	0.2 g	0
酸 性 分 解 物	Ⓟ	0.095 g	Ⓟ	Ⓟ	Ⓟ	Ⓟ	Ⓟ	0
ア ミ ン	0	0	0	0	0	0	0	0
残 存 チ ロ ジ ン	0	0	0	0	0	0	0	0

Ⓟ とは融点測定不能な程微量でクロマトでのみ分離されたものである

チロジンは少しも回収されなかつた。

実験 8 竹尾株鳥型菌による対照実験

上記ソートン変法培地のみで *L*-チロジンを含まない培地に竹尾株を植えた。発育は良好でグリセリンは殆んど消費されていた。各分割とも結晶は得られずミロン氏反応は陰性であつた。

以上実験 5, 実験 6 を除いた 6 実験とも培養日数は等しく 20 日である。これ等の成績を表示すると IV 表のようである。

本編の総括

一般に結核菌によつて *L*-チロジンは分解されないと云われ鳥型結核菌によつても *L*-チロジンは分解されないとするものが多いが著者の如き方法で菌を充分発育させ直接培養液中の *L*-チロジンの消費を見その分解物を結晶として取り出すように努めることによつて鳥型菌 4 株とも

皆試験した 0.8~1.5 g の *L*-チロジンを分解し尽し、分解物として多量のチロゾールの結晶を得た。時には用いた *L*-チロジンの 60% のチロゾール結晶を得ることがあつて酵母による成績に近接する程多量であるが大体は 4 菌株とも粗チロゾールとしては 20~40%, 純チロゾールとしては 10~30% の収量であつて細菌ではあるが酵母に似た発育形式も取る結核菌の細菌学的性質を考える時誠に興味深い。

又 4 株とも微量であるがパラオキシフェニール醋酸と思われる酸性分解物を得た。

更にストレプトマイシン耐性の性質がこのチロジンの分解機転に何等かの變化を及ぼすのではないかと思つて実験したがむしろチロゾールの産成が増量した程であつてやはり是でもアミンは得られなかつた。

(文献は末章に一括する)