

結核菌による*l*-チロジンの分解

(第2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6月2日受付)

鳥型結核菌を0.1%に*l*-チロジンを加えたソートン培地に充分発育させて、このチロジンから多量のチロゾールが得られることを第1報¹²⁾に於いて報告したが今回は更に鳥型菌による*l*-チロジンの分解機転について窺つて見た成績を報告する。

第1章 鳥型菌による*l*-チロジン分解物と培養日数との関係

平井金三郎教授¹³⁾は先に普通変型菌を用いて*l*-チロジンの分解を見、12日でパラ-クマール酸、40日でパラ-オキシフェニール醋酸、52日でパラ-オキシベンツアルデヒド、次いで100日でパラ-オキシ安息香酸を得たと興味ある知見を発表されたが鳥型結核菌に就いても培養日数によるチロジン分解物の推移が見られないかと思ひ試みた。

実験材料と実験方法

用いた細菌は主として鳥型結核菌の竹尾株であり実験方法は第1報¹²⁾と全く同じである。

実験成績

結核菌は本実験のようなソートン培地では表層に発育するので沈下すると発育は停止する。

従つて発育状態もチロジン分解に深い関係があるので以下実験成績に発育状態も併記する。

実験1 5日間培養成績(竹尾株)

培養終了後培養液中にグリセリンが残存するとエーテル抽出中にグリセリンが僅かにエーテルに溶けて、エーテル駆逐後のチロジン分解物の結晶析出を妨害すると思われたので此の実験のみは培地1*l*につきグリセリンを15ccに減じた。こうすると5日間培養でも殆んどグリセリンは消費されていた。菌の発育は良好で3日間で培地全面に菌膜を作つた。

用いた*l*-チロジンは1gであるが僅かしか分解されず0.85gも残存していた。

チロゾール分割にミロン氏反応陽性の極めて微量の結晶が得られたのでクロマトにかけチロゾールに一致することを知つた。

酸分割にもミロン氏反応陽性の油状分を得たがクロマトにかけると対照のパラ-オキシフェニール醋酸のRfからパラ-オキシフェニールプロピオン酸のRfに及ぶ広

いスポットを得た。

アミン分割はミロン氏反応陰性である。

実験2 10日間培養成績(竹尾株)

菌の発育は極めて良好であつて菌膜は沈下しない。*l*-チロジンは既に全部消費されていた。

チロゾール分割にはミロン氏反応陽性の針状結晶を得た。陶土板で油状分を去ると0.1gで、石油エーテルで再結晶し純チロゾール結晶0.045gとなつた。

酸分割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パラ-オキシフェニール醋酸に一致するを知つた。

アミン分割はミロン氏反応陰性である。

実験3 20日間培養成績(竹尾株)

第1報¹²⁾に詳述したように用いた*l*-チロジンの60%の粗(15%の純)チロゾールを得、酸性分解物はクロマト上でパラ-オキシフェニール醋酸に一致したが結晶として得られなかつた。アミン分割はミロン氏反応陰性であつた。

実験4 30日間培養成績(竹尾株)

この場合にはどうした訳か初めは菌が非常によく発育したが一週目に菌膜は沈下した。その儘30日間培養すると表層に再び薄膜を作りかけたがそれ以上強く増殖して来なかつた。

l-チロジンは半量(0.5g)だけ消費されていたのみであつた。

チロゾール分割には結晶は出ず、ミロン氏反応陽性の油状分のみであつたのでクロマト上でチロゾールに一致しただけである。

酸分割も結晶は出ず、ミロン氏反応も僅かに陽性かと思われたがクロマトで明瞭なスポットを見なかつた。

アミン分割はミロン氏反応陰性であつた。

実験5 40日間培養成績(AVT株)

是も発育良好であつて20日目頃より僅かに液面より沈下し初めたが薄い液層を菌膜面に戴くといつた状態で沈まずに40日間培養し得た。やはりチロジンは全部消費されていた。

チロゾール分割に融点測定も不能の微量の結晶を得たのでミロン氏反応陽性なるを見てクロマトにかけチロソ

ールに一致するを見た。

それに反して酸分割には多量の帯黄色の針状結晶を得た。是を陶土板で油状分を去ると 0.2 g で融点 141°~143°C (補正なし) であつた。そこで是を塩酸酸性の僅かの水に溶かして濾過し、須藤隈川氏液体浸出器で 72 時間エーテル浸出を行い、エーテル抽出分のエーテルを去つて得た結晶を再び陶土板で油状分を除くと融点 148°C となり、後章で述べる元素分析で確認したパラ-オキシフェニール醋酸の純結晶と混融しても融点の低下を見ない純結晶 0.1 g を得た。

アミン分割はミロン氏反応陰性であつた。

実験 6 50 日間培養成績(竹尾株)

菌の発育は良好であつたが 20 日目頃に沈下し再び表層に比較的厚い菌膜を形成するに至つた。用いた *l*-チロジンは全部消費されている。

チロゾール分割には僅かの針状結晶を得たが融点測定も出来ぬ程微量であつたのでミロン氏反応陽性なるを確かめてクロマトにかけるとチロゾールに一致するスポットを得た。

酸分割には花環状に並ぶ針状結晶を得たので是を陶土板で油状分を去ると 50 mg であり融点は 143°~146°C (補正なし) であつた。そこで塩酸酸性でエーテル抽出を行い、再結晶したが融点は殆んど変らなかつた。次いで炭末で精製しようとしたが炭末にその結晶そのものが吸着されて只極めて少量の融点測定不能の量となつた。

是を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スポットを得た。

アミン分割はミロン氏反応陰性である。

実験 7 100 日間培養成績(竹尾株)

以上の実験で鳥型菌は 20~30 日間培養で沈下する傾

向があるので沈ませないようにと考えパラフィンを液面に浮かべその上に菌を載せるようにして培養して見た。しかしやはり 30 日目に沈下した。そのまま 100 日間培養すると再び液面に薄い菌膜を作つた。チロジンは残存せず勿論全部消費されていた。

チロゾール分割には粗チロゾール 0.1 g を得、融点 82°~88°C (補正なし) であつた。是を再結晶し純チロゾール 0.065 g となつた。

酸分割にも針状結晶を得たので陶土板で油状分を去り融点 135°~139°C の結晶 35 mg を得た。是を再結晶したが純結晶とし得なかつた。しかしクロマトでパラ-オキシフェニール醋酸に一致するを知つた。

アミン分割はミロン氏反応陰性である。

以上の 7 実験を綜括して表示すると第 1 表の如くなる。

小括及び考按

ソートン培地では結核菌は沈下すると発育は停止したようになる。従つて以上の培養日数では必ずしも規則正しく行かないが大体次の事は云える。即ち 5 日培養ではまだ *l*-チロジンの分解は乏しく、10 日培養で全部分解され、20 日培養でチロゾール産生が最高となり、漸次パラ-オキシフェニール醋酸へと分解されて行くと考えられる。此の関係は後報で更に検討され明瞭となる。

第 2 章 鳥型菌によるチロジン誘導体の分解

前章で鳥型菌によつて *l*-チロジン→チロゾール→パラ-オキシフェニール醋酸の分解過程を見たが本章ではどうして *l*-チロジンが脱アミン及び脱炭酸されてチロゾールなるアルコールとなるのか、その機転を見る為にチロジンから脱炭酸されたチラミンと脱アミノされたパラ-オキシフェニールプロピオン酸及びパラ-オキシフェニール乳酸の三種のチロジン誘導体に鳥型菌を働かしその分解物を見た。

実験材料と実験方法

菌株は専ら竹尾株を用い、3 種のチロジン誘導体を *l*-チロジンの代りに 0.1 % に培地に加えて培養した。外は全く第 1 報¹²⁾ に同じである。

実験成績

実験 1 チラミンの分解

塩酸チラミン 1.2 g を前記ソートン変法培地に加えて 20 日間培養した。竹尾菌接種後 3, 4 日は発育は稍々悪いように思われたが

1 表 鳥型菌による *l*-チロジン分解物と培養日数との関係

菌 株	竹尾	竹尾	竹尾	竹尾	竹尾	竹尾	竹尾**	AVT	AVT
供試チロジン	1 g	1 g	1.5 g	1 g	1 g	1 g	0.8 g	1 g	
培養日数	5 日	10 日	20 日	30 日	50 日	100 日	20 日	40 日	
培養源液 PH	6.4	5.4	5.0	5.0	5.6	5.8	5.6	5.6	
乾燥菌量	5.6 g	8.4 g	13.4 g	2.3 g	7.0 g	4.3 g	5.2 g	6.6 g	
粗チロゾール	*①	0.1 g	0.92 g	②	②	0.1 g	0.114 g	③	
純チロゾール	0	0.045 g	0.24 g	0	0	0.065 g	0.114 g	0	
粗パラ-オキシフェニール醋酸	④ +	⑤	⑥	0	0.05 g	0.035 g	0.095 g	0.2 g	
純パラ-オキシフェニール醋酸	0	0	0	0	0	0	0	0.1 g	
アミ ン	0	0	0	0	0	0	0	0	
残存チロジン	0.85 g	0	0	0.5 g	0	0	0	0	

* ①とは融点測定も不能な程微量でクロマトでのみ分離されたものである

**は第 1 報で詳述した

その後は極めて発育は良く対照のソートン変法培地のみの場合と変らない程である。

チロゾール分割に多量の結晶を得たので是を陶土板で油状分を去ると収量 0.25 g であつた。

融点は既に 91°C であり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かつた。

勿論ミロン氏反応は陽性である。

酸分割にもミロン氏反応陽性の油状分を得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するスポットを得た。

アミン分割にはなお結晶は残つて出て来たので是を陶土板で油状分を去ると 0.2 g であつた。

即ち 1.2 g の塩酸チラミンから出発して 0.2 g の塩酸チラミンを残存したのである。

実験2 パラ-オキシフェニールプロピオン酸の分解 (20日間培養)

菌の発育はやはり極めて良好であつた。

チロゾール分割には微量のミロン氏反応陽性の結晶を得たが融点測定の出来る量でなかつたので是をクロマトにかけるとチロゾールに一致するスポットを得た。

酸分割にはミロン氏反応陽性の油状分を得たのみであつて結晶は出て来なかつた。クロマトにかけたが広い帯状のスポットを得たのみであつたので再びエーテル抽出を行つたが結晶は出なかつた。クロマトでも同じようであつた。即ち用いたパラ-オキシフェニールプロピオン酸は殆んど分解されているらしい。

アミン分割は勿論ミロン氏反応陰性の油状分のみであつてクロマトでも何のスポットも得なかつた。

実験3 パラ-オキシフェニールプロピオン酸の分解 (7日間培養)

先に *l*-チロジンの分解を種々培養日数を変えて実験して見た時 10 日間で既にチロジンは全部分解されており 5 日間では多量のチロジンが残存しているという成績を得たのでチロジンの脱アミノされたパラ-オキシフェニールプロピオン酸では 7 日間培養すれば幾分かは残存し分解物も結晶として得られるかも知れないと思ひ実験したが前実験 (実験2) と殆んど同じ成績であつた。只酸分割は初めミロン氏反応陽性の油状分だけであつたが是を少量のエーテルに溶かして濾過し、エーテルを駆逐すると僅かに油状分もエーテルに溶けて出るが針状結晶が現れて来た。是を陶土板で油状分を去ると融点 120°~122°C (補正なし) で収量 38 mg であつた。(パラ-オキシフェニールプロピオン酸の融点は 128°~129°C である)

是をクロマトにかけるとパラ-オキシフェニールプロピオン酸に一致した。即ち 7 日間培養でも該酸は殆んど分解されているようであるがなお少量は残つていた。

実験4 *d*-パラ-オキシフェニール乳酸の分解

(20日間培養)

菌の発育はやはり極めて良好であつた。

チロゾール分割には結晶が出ないでミロン氏反応陽性の油状分のみであつた。*クロマトにかけるとやはりチロゾールに一致するスポットと更に一つ別の Rf 0.66 (アモニヤ性ブタノール溶媒)の部分にスポットを得た。そこでこの油状分を少量のエーテルに溶かし、濾過後エーテルを駆逐して冷却すると針状結晶を得た。是を陶土板で油状分を去ると 11 mg となり融点は 65°~70°C (補正なし) で低い。クロマトにかけるとやはりチロゾールの外に明瞭に分離された別の Rf 0.66 のスポットが出た。即ちチロゾールの結晶の外に此の不明物質が混在する為に融点が低いと考えられる。

酸分割には結晶が得られなかつたがミロン氏反応陽性であつたのでクロマトにかけるとパラ-オキシフェニール乳酸と思われるスポットを得た。即ち該酸も殆んど分解されていて微量が残存するのみである。

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見ない。

実験5 *d*-パラ-オキシフェニール乳酸の分解 (7日間培養)

菌の発育は良好であるがグリセリンは多量分解され残さずに残っている。

分解物としては実験4と殆んど等しいがチロゾール分割に僅かの結晶を得たので是を陶土板で油状分を去ると約 20 mg であり融点は 66°~70°C (補正なし) である。ミロン氏反応は強く陽性であるのでクロマトにかけるとチロゾールのスポットと更に別のやはり Rf 0.66 の所にスポットが現われた。この結晶はチロゾールと同じく塩化鉄反応は帯緑黒色である。そこで更にクロマトにかけ二つのスポットの何れがどんな塩化鉄反応を呈するかを見ようとしたが何れも呈色しない。是はデアゾ試液呈色のように敏感でない為であろう。

酸分割には多量の油状分の中に長期間放置すると少量の長い針状結晶が出たので是をエーテル次いで水で再結晶しようと思つたが成功しなかつた。この油状分はミロン氏反応陽性であつたのでクロマトにかけるとパラ-オキシフェニール乳酸に一致するを知つた。即ちやはり大部分の該酸は分解されていて少量残存するのみである。

アミン分割はミロン氏反応陰性でクロマトにも何のスポットも得ない。

以上の5実験を綜括するとⅡ表のようである。

小括及び考按

エールリッヒ⁴⁾は酵母によつてチラミンからチロゾールを得た。平井教授⁶⁾は好気性乳酸菌によつて *l*-チロジンからチロゾールを得たがチラミンからはチロゾールを得られなかつたと報告されている。著者はチラミンから

II表 鳥型菌(竹尾株)によるチロジン誘導体の分解

供試品	塩チラミン	P-O-P* プロピオン酸	P-O-P プロピオン酸	P-O-P 乳酸	P-O-P 乳酸
供試量	1.2 g	1 g	1 g	1 g	1 g
培養日数	20日	20日	7日	20日	7日
培養液PH	5.4	5.4	6.4	5.4	6.5
乾燥菌量	10.6 g	11.0 g	8.0 g	8.8 g	6.5 g
粗チロゾール	0.25 g	**Ⓟ	Ⓟ	Ⓟ 0.011 g + 不明物質	Ⓟ 0.02 g + 不明物質
純チロゾール	0.25 g	(-)	(-)	(-)	(-)
酸性分解物	Ⓟ **P-O-P 酢酸	Ⓟ P-O-P プロピオン酸	Ⓟ 0.038 g P-O-P プロピオン酸	Ⓟ P-O-P 乳酸	Ⓟ P-O-P 乳酸
アミン	0.2 g	(-)	(-)	(-)	(-)

* P-O-P とはパラ-オキシフェニール基

**Ⓟとはクロマトでのみ証明されたもの

やはり *l*-チロジンからの場合と略々等量のチロゾールを得た。即ち鳥型竹尾株を 1.2 g の塩酸チラミン入ソートン変法培地 1 l に 20 日間培養し 0.25 g の純チロゾールを得た。是より *l*-チロジンからチラミンを経てチロゾールへ分解される道も考えられる。

パラ-オキシフェニールプロピオン酸の実験では 1 週間で既に大半は分解されているようであるがその分解産物として結晶は何等得られずクロマト上にチロゾールに一致するミロン氏反応陽性の物質を得たのみであった。

パラ-オキシフェニール乳酸の実験でも 1 週間で殆んど分解されているようであり、チロゾール分割に微量のチロゾール結晶と微量の恐らく該酸から誘導されたと思われる不明の物質を得た。エールリツヒ¹⁴⁾はチロゾールのようなアルコールがパラ-オキシフェニール乳酸のようなアルコール酸の脱炭酸で生じることを仮定したが現在では否定されている。併し鳥型菌の実験では本道ではないがこのようなことも僅かに起るのではないかと思わ

れる成績を得た。

両チロジン誘導体の酸は速やかに分解されるがそれに相当すべき分解物が立派な結晶として得られないのはどういう訳か。速やかに核崩壊にまで進むのであろうか。要するに *l*-チロジンからチロゾールへの本道の中間物質ではなからう。

本編の総括

無蛋白培地(ソートン変法培地)に *l*-チロジンを加えて鳥型菌を充分発育させそのチロジンの分解機転について考察した。即ち培養日数を増加して行つて *l*-チロジンの分解物の推移を見

て行くと共に他方ではチロジンから脱炭酸或いは脱アミノされたチロジン誘導体を同様にして鳥型菌に働かしてその分解物を検した。

その結果 *l*-チロジンはチロゾールを経てパラ-オキシフェニール酢酸へと分解されて行くと考えられるがチロジンからチロゾールへの中間物質は証明されなかつた。併しチロジン誘導体の実験ではチラミンからも *l*-チロジンからと略々等量(20%)のチロゾールが得られたから *l*-チロジン→チラミン→チロゾールという関係も考えられる。それは後述するがグリセリンの代りに *d*-グルコースを用いた培地ではクロマト上のみではあるが *l*-チロジン分解物としてチラミンも得ているからである。是等の点に就いては又後報で再び述べる。

(文献は末章で一括する)