

結核菌による *l*-チロジンの分解 (続報)

## 結核菌によるチラミンより新物質 N アセチルチラミンの形成

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

(受付 昭和 30 年 6 月 2 日)

先に結核菌を *l*-チロジンを含有する合成培地に培養しチロジン分解産物としてチロゾール<sup>1)</sup>, パラ-オキシフェニール醋酸<sup>2)3)</sup>を証明し, さらに炭素源としてグリセリンを用いた培地ではチラミンからもチロジンからと略々等量のチロゾール<sup>2)</sup>を証明した。しかるにグリセリンの代わりにグルコースを用いた時にはチラミンからチロゾールは得られず, パラ-オキシフェニール醋酸と不明なミロン氏反応陽性の結晶を得た。この物質を純結晶として分析の結果 N-アセチルチラミンと推定したので他方チラミンより化学的に合成したものと比較して同定することが出来た。

## 実 験

## I 培養実験

用いた菌株は鳥型結核菌竹尾株である。培地はソートン合成培地のグリセリンの代わりに 3% にブドウ糖を加え, 塩酸チラミンを 0.1% に含有する培地である。この菌株をこの培地 2ℓ に 20 日間培養した。

培養濾液の処理は前報<sup>1)</sup>の如くであり, N-アセチルチラミンは前報のチロゾール分割に抽出されて来る。これの分割のエーテルを去り, 除湿器中で充分乾燥さす。これにベンゾール 200cc を加え沸水中で 30 分環流冷却の下に加温溶解し, 加温濾過すると冷却するにつれ針状の結晶が析出する。これを繰り返して精製すると融点 130°C なる結晶を得る。ミロン氏反応陽性であつてその元素分析値は次の如くモノアセチルチラミンと推定された。

	H(%)	C(%)	N(%)
実験値	7.18	67.03	7.67
理論値(C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> )	7.26	67.04	7.82
誤差	0.08	0.01	0.15

この物質はペーパークロマトグラムでは前報<sup>1)</sup>のアンモニヤ性ブタノールおよびピリジン溶媒でもチロゾールの R<sub>f</sub> と類似し鑑別は困難である。

この培養濾液中には本物質と共にパラ-オキシフェニール醋酸も証明され, 用いたチラミンはほとんど分解され尽くし僅かしか証明されなかつた。

以上の実験は 5 回繰り返され, その成績は次表のようである。ここに対照とは結核菌を植えずに他の操作は全く同じに行つたものである。

実験番号	I	II	III	IV	V	対照
分解産物						
モノ-アセチルチラミン	0.15g	0.067g	0.1g	0.25g	0.2g	0
パラ-オキシフェニール-醋酸	0.13g	0.034g	0.35g	0.35g	0.4g	0

以上の如く分解産物は量的な差異はあるがいずれも上の二分解産物は得られ, 対照では見られないから結核菌によつて作られたものである。

## II 化学的合成

原理: まず塩酸チラミンを遊離のチラミンとし, これを無水醋酸と醋酸ソーダでチ-アセチルチラミンを作り, これを 2N 苛性ソーダで加水分解することによつて出来る。

方法:

## a) チ-アセチルチラミンの合成

これはすでに B. cloetta Wünsche によつて作られておりその法にしたがつた。

すなわち 1.6g の遊離のチラミンに 1g の無水醋酸ソーダと 3cc の無水醋酸とを加え 150°C で 1 時間半加温し, 冷却を待つて炭酸ソーダで中和しこれをエーテルで抽出し, エーテルを去つてナトロン-カルクを盛る除湿器中に保存すると結晶が出来る。これをエーテルで再結晶するという。

しかし著者はエーテルによる再結晶では成功せずこのエーテル溶液を水で振盪して水に移行さし, この水溶液を蒸発して融点 101°~102°C の結晶を得た。これをさらにエーテルで再結晶して融点 103°C の純結晶となる。

またこれは石油エーテルには不溶性なるためエーテルに溶かし約 5 倍量の石油エーテルを加えて析出させても精製し得る。

本物質のミロン反応は陽性である。それはミロン試薬中の酸によつて加熱中に加水分解され, アセチル基がペ

ラーオキシフェニール基から遊離するためにミロン反応陽性となると考える。

#### b) N-アセチル-チラミンの作成

ヂ-アセチルチロジンからN-アセチル-チロジンの作成は R. R. Sealock によつて報告されているので、これにならつた。すなわち 0.25g のヂ-アセチルチラミンを2N 苛性ソーダ 15cc に溶かし室温で 30 分放置して見た。これによりヂ-アセチルチラミンの一つのアセチル基が部分的加水分解を起して離れ、モノ-アセチルチラミンとなる。これを6N 硫酸で中和し、さらに僅かにリトマス酸性としてエーテル抽出を行う(これにより過剰の加水分解によつて出来たチラミンは除去出来る筈である)。このエーテル抽出液のエーテルを駆逐し、乾燥後ベンツォールで加温溶解し、注意して加温濾過すると冷却するとともに美麗な針状結晶(0.1g)が析出した(加水分解されずに残存するヂ-アセチル-チラミンはベンツォール中に溶存している筈である)。この物質の融点は130°C であつてさきに培養試験から得た物質と一致し混融するも融点の低下を見なかつた。かつミロン反応は陽性でペーパークロマトグラムでも培養試験から得た物質と一致する。

さらにこの合成物の元素分析値は次表のようでモノ-アセチルチラミンの理論値と一致した。

	H(%)	C(%)	N(%)
実験値	7.03	67.10	7.82
理論値	7.26	67.04	7.82
(C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> )			
誤差	0.23	0.06	0

#### Ⅱ 理化学的性質

このモノ-アセチルチラミンはアルコール、温水には容易に溶け、エーテルではかなり溶けるが冷ベンツォールには不溶である。しかし加温することによつて僅かに溶解する。

濃厚苛性ソーダ(20%)では室温で加水分解し遊離のチラミンとなる。すなわち0.1gの培養実験より得たN-アセチルチラミンに100ccの20%苛性ソーダを加え濾過後ベンツォイルクロリド1.5ccを振盪しながら滴下し生じた結晶をアルコールで再結晶したものは融点170°Cでチラミン-ヂ-ベンツォアートによく一致しその元素分析値は次表の如くその理論値と一致する。また別に塩酸チラミンより作ったチラミン-ヂ-ベンツォアートと混融して融点の低下しないことを確めた。

#### (1) 培地より得たN-アセチル-チラミンより

作ったチラミン-ヂ-ベンツォアート

	H(%)	C(%)	N(%)
実験値	5.55	76.74	3.99
理論値	5.50	76.52	4.05
(C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> )			

誤差	0.05	0.22	0.06
----	------	------	------

#### (2) 塩酸チラミンより合成したチラミン-ヂ-ベンツォアート

	H(%)	C(%)	N(%)
実験値	5.65	76.42	4.14
理論値	5.50	76.52	4.05
誤差	0.15	0.10	0.09

以上のショッテン・バウマンのベンツォイル化を弱アルカリすなわち10%炭酸ソーダに溶解して同じようにして施行すると別の結晶が出来た。すなわち融点は147°Cでその元素分析値は次表の如くモノ-アセチル-モノ-ベンツォイルチラミンの理論値と一致した。

	C(%)	H(%)	N(%)
実験値	72.42	5.90	5.14
理論値	72.08	6.00	4.94
(C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> )			
誤差	0.34	0.10	0.20

すなわちこの物質は弱アルカリ溶液の為、モノ-アセチル-チラミンが加水分解を受けずにそのままベンツォイル化されたものである。この物質も前述のチラミン-ヂ-ベンツォアートと共にミロン反応陰性である。

#### 考案

以上の実験成績からこのモノ-アセチル-チラミンと思われる新しい物質について考察する。

まずチラミンのアセチル化したものであることは化学的に塩酸チラミンからアセチル化して合成したものと一致するから明らかであり、元素分析値やヂ-アセチルチラミンからの化学的合成過程からモノ-アセチル-チラミンと決定出来た。

さて次に問題となるのはアセチル基の結合位置はチラミンのO位かN位かである。もしO-アセチルチラミンとすればそのベンツォイル化合物はO-アセチル・N-ベンツォイルチラミンでヂ-アセチル-チラミンがミロン反応陽性であることから考えるとミロン反応陽性でなければならぬが実際は前述のように陰性である。N-アセチルチラミンと考えればそのベンツォイル化合物はO-ベンツォイル・N-アセチルチラミンでチラミン-ヂ-ベンツォアートがミロン反応陰性であることから該反応は陰性である筈で事実と一致する。すなわちチラミンのO位のアセチル化合物はミロン試薬の酸で加熱中に加水分解されてパラ-オキシフェニール基となつてミロン反応陽性となるが、ベンツォイル化合物は結合が確く遊離しないからミロン反応陰性となるのである。

以上によつてこのモノ-アセチル-チラミンはN-アセチル-チラミンと考える。これはまたR. R. Sealock<sup>5)</sup>がヂ-アセチル-チロジンからN-アセチル・チロジンを作つた合成法と類似の方法で作られることから穩当と考

える。

ここで培養実験の成績に戻つて考察して見る。

鳥型結核菌竹尾株をチラミンを含む合成培地(ソートン合成培地のグリセリンの代りにグルコースを含有する)に20日間培養し、その培養濾液からN-アセチルチラミンとパラ-オキシフェニール 醋酸が純結晶として証明された。

これは先に炭素源としてグリセリン<sup>2)</sup>を用いて培養した時はチラミンからチロゾール(パラ-オキシフェニールエチルアルコール)が主として証明された成績とことなる。この炭素源としてグリセリンとグルコースを用いた時の相違はチロジンの分解<sup>1)3)</sup>の時と同様でグリセリンの時は当該アルコールを、グルコースを用いた時は当該醋酸が出来易い傾向がある。そしてこの醋酸を生じ易い傾向がグルコースを用いた時にのみN-アセチルチラミンが出来ることと関係があろう。

そこでこのアミンのアセチル化の機構について考えて見るに、ズルファミン、パラ-アミノ安息香酸、ヒスタミン、グルコサミン、アミノ酸、コクンのアセチル化はクエン酸の合成や脂肪酸の合成に用いられるアセチル助酵素Aによるといわれている(Lipmann)<sup>9)</sup>からこのN-アセチル・チラミンもこの助酵素によるのではなからうか。

とも角ここに結核菌がチラミンをアセチル化する酵素を持つことを知つたのであるが、その生物化学的の意味は興味あることと考える。

## 結 論

結核菌をチラミンを含む合成培地に培養し、その培養

濾液中に分解産物としてパラ-オキシフェニール醋酸と不明のミロン反応陽性の結晶を得た。この結晶は種々検索の結果、モノアセチルチラミンであり、一方合成して作つたものと一致したのでその合成過程および誘導体形成物の性質等からN-アセチルチラミンと決定した。

稿を終るに臨み直接御指導を賜つた長崎大学名誉教授、平井金三郎先生および御校閥、御指導を戴いた日本医科大学学生化学教授、上代皓三先生ならびに当院院長、矢野精太郎博士に深甚の謝意を表します。なお本論文の要旨は、第30回日本結核病学会総会に報告した。

## 文 献

- 1) 白井 裕 : 結核 29 卷, 8 号, 295 頁 (1954)
- 2) " : " 9 号, 352 頁 (1954)
- 3) " : " 12 号, 477 頁 (1954)
- 4) B. Cloetta Wünsche : Archiv für exp. pathol. und pharm. 96, 318, 1923.
- 5) Robert Ridgely Sealock : J. Biol. chem. 166, 1, 1946.
- 6) Bergmann, M. und zeruas, L. : Biochem z., 203, 280, 1928.
- 7) du. Vigneaud, V. and meyer, C. E. : J. Biol. chem. 98, 295, 1932.
- 8) Takenaka, Y. : Acta schol. med. univ. imp. Kioto. 4, 367, 1922.
- 9) T. C. Chou and Fritz lipmann : J. Biol. Chem. 196, 89, 1952,