

## 宮道悦男, 小瀬洋喜: 有機化合物の生化学還元 (第3報)

変色細菌に存在する色素還元酵素\*

Etsuo Miyamichi and Yoki Ose:

Biochemical Reduction of Organic Compounds. III

Studies on the Dyestuff-Reductase in Discoloring Bacteria.

## 1. 緒言

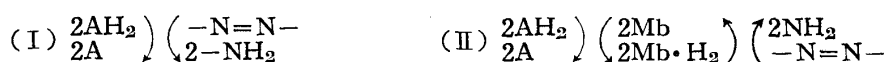
色素が細菌によつて変褪色する原因を知るために前報<sup>1)</sup>までに約100種類の色素について変褪色の状況と化学構造との関連について考察した結果, 被還元性基をもつものに変褪色が著しく認められることからこの変褪色の原因は還元によるものであろうとの推定を下し, その還元に関与する酵素が与つていようとの予測をなした。

有機化合物がこのように生化学的に還元される現象についてはすでに2, 3のものについて知られている。たとえば芳香族ニトロ化合物のニトロ基が多くの微生物および動物組織などによつて還元されることはかなり古くから知られていたことであり, 最近江上等はそれが亜硝酸還元酵素の作用によるものであることを見出し, *p*-ニトロ安息香酸, クロラムフェニコール等のニトロ基を亜硝酸還元酵素によつて還元したと報告している<sup>2)</sup>。またジアゾ化合物の生化学的還元についても *Prontosil* が抗菌作用を示すのはこれが体内で分解されて生ずる *p*-*Aminobensensulfonamid* によつて有効な作用をするのであろうとした *Tréfouel* 等の考えが, 今日輝かしいサルファ剤の出現をもたらすに至つた歴史的考察があるがその還元機構についての詳しい報告はない。最近 *Bray* 等<sup>4)</sup> は家兎体内での *Azobenzene* の代謝についての研究を行つてゐるがその詳しい報告には接することができない。

食品衛生法の公布によつて染料色素の使用に制限を受ける様になつて有毒色素の使用が禁止されたのは喜ばしいことであるが, 法定色素の体内での変化については必ずしも明らかではない。殊によく知られているようにアゾ化合物には抗菌作用を有するものが少なくなく, またバターイエローの如くに発癌作用を有するものも知られている。

筆者等は前報で色素の変褪色が酵素の作用によるものであろうとの推定を下したが, 上述の見地から特にアゾ化合物の変褪色について検討を行いその還元に関与する酵素の存在を認めることができたので報告する。

ジアゾ基が還元される場合には次の二つの場合が考えられる。



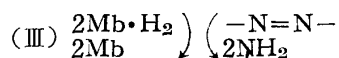
\* 日本薬学会東海支部例会 (昭31.2) 発表

- 1) (第2報) 宮道, 小瀬, 大竹: 本誌, 27, 6 (昭31)
- 2) 江上, 江幡, 佐藤: 農化, 25, 347 (昭26); *Natur* 167, 118. (1951); 酵素化学シンポジウム6, 41. (1951); 佐藤: 酵素化学の進歩第四集102
- 3) *Trefouel, Nitti, Bovet*: *Compt. rend. Soc. de. biol.* 120, 756. (1936)
- 4) *Bray, Clowes, Thorpe*: *Biochem. J.* 49, Ixv (1931). The 299th Meeting of the Biological Society.

すなわちその一つは基質Aから直接に水素を受容する場合である。勿論この際基質Aの脱水素酵素は純粋な状態では基質から奪った水素を助酵素に与えるのみであつて受容体としてのジアゾ基を直接に還元する能力はもたず、ジアフオラーゼなどの作用が必要であり第二の中間水素伝達体を経る場合にも同様であるが、現在の研究では無細胞標品を得るまでに至っていないので考慮しないこととする。

この(I), (II)の何れによつて行われるとしても酵素的に行われるならば水素供与体として何等かの物質が必要なことは当然である。そこで変色細菌中で変色作用の最も強力であつたB株に存在する脱水素酵素の検索を行った結果、ブドウ糖、エタノールに対して極めて強力な脱水素酵素が存在することを認め、また乳酸、ギ酸、酢酸、メタノールの脱水素酵素の存在をも認めることができた。(Table 1.)そこで溶媒としての作用をも考えてエタノールを基質に用いることにした。エタノールを基質としM/15リン酸緩衝液を用いた際の至適pHは6.8であつた。(Table 2, Fig 2)

そこでジアゾ基の還元が(I), (II)の何れによつて起るかを知るために中間水素伝達体としてメチレン青を加えたもの、および加えないものの両系を組立ててツンベルグ管中での脱色を試験した。試験に供した5種の色素は何れも前報での成績においてB株による変褪色の著しかつたアゾ色素である。その結果メチレン青を中間水素伝達体として添加した系では極めて速かな脱色が認められたが添加しない系では120分でも脱色を認めることができなかった。したがつてジアゾ基の還元にも亜硝酸還元酵素によるニトロ化合物の還元と同じく中間水素伝達体を必要とすることを認めることができた。(Table 3.)このことを更に確認するためにロイコメチレン青を作り次のⅢ系を組立てた。



ロイコメチレン青を用いる実験では着色が起るため強さの測定は行い得ぬので二時間後の着色のみを見たが、この系の成立することを認めることができた。

以上の結果から変褪色を起したジアゾ色素はある種の還元酵素の作用によつて(II)式によつて還元されたものと考えられる。もつともジアゾ基の還元生成物がアミノ化合物かそれに至る中間階程化合物かについては確認していないので今後検討を行う予定である。

## 2. 実験方法及び実験材料

### (1) 粗酵素液(菌懸濁液)の作成

菌を普通寒天培地に24時間37°Cに培養し、集菌後緩衝液で5回遠心沈殿を繰返し乍ら洗滌し、ポッターのホモゲナイザーで均一液とする。冷蔵庫に貯蔵しておく。

### (2) ロイコメチレン青の製造

Pd-BaSO<sub>4</sub> 解媒の製法<sup>5)</sup> 熱溶液から沈殿させて作つた硫酸バリウム1gを水20cc中に浮遊させ、これに塩化パラジウム0.085gを2.5ccの熱水に溶かしたものおよび40%フォルムアルデヒド0.05gを加え苛性ソーダでアルカリ性となし、加熱して暫時沸騰させる。上澄が澄明になり色がなくなつたら濾過し、濾液が中性になるまで熱水で洗う。真空中で苛性カリ上に乾燥し細く砕き密栓して保存する。100ccのメチオン青溶液に対して0.5g加える。

5) E. Schmidt: B. 52, 409. (1919)

5) 接触還元の方法: Fig 1の接触還元装置を用いた。Aからアルカリ性ピロガロールで良く洗った水素気流を通じ装置内を充分水素で置換する。B, Cの活栓を閉じEを開放してメチレン青液 (M/100) 中に水素を吹きこむ。この時反応容器を振盪してやると速かに還元される。還元後もしばらく水素を通じ溶液を水素で飽和させる。この装作中グラスフィルターを溶液内に浸さぬ様に反応容器を少し傾けて操作する。溶液を水素で飽和させたらA, Eを閉じFをポンプに連結しBをポンプとの連通にして、グラスフィルターを溶液内に浸してビュレット内に吸引する。容器内に上昇させたらBを閉じる。

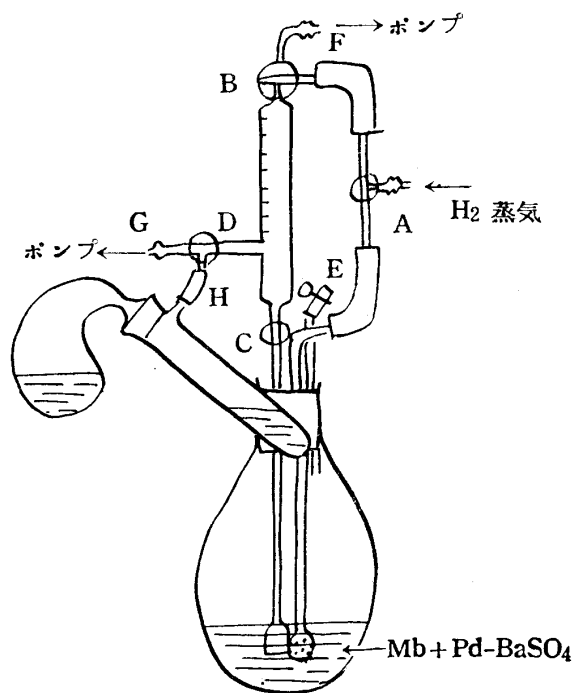


Fig 1. 接触還元装置

Hを経てツンベルグ管をつなぎCをG-H連通としてツンベルグ管内を真空とする。ビュレット-Hを連通として一定量づつツンベルグ管内に流入させる。

### 3. 実験成績

1) B株の脱水素酵素 ツンベルグ管を用い35°C, 120分で行った。実験結果は Table 1 のようであった。

2) B株エタノール脱水素酵素の至適 pH ツンベルグ管を用いて37°Cで測定した。菌濃度は4.3 mg/cc, M/15リン酸緩衝液2 cc M/10エタノール1 cc, 1:10,000メチレン青0.2ccを用いた。実験結果を Table 2に示す。

Table 1. Dehydrogenase in Discoloring Bacteria Stem B. (37°C Thumberg-Tube)

No.	Substrate	○	○	○	○	×	×	Discoloring time (min)
1	Glucose	○	○	○	○	○	○	—
1'	Glucose	○	○	○	○	×	×	at once
2	Ethanol	○	○	○	○	○	○	—
2'	Ethanol	○	○	○	○	×	×	at once
3	Methanol	○	○	○	○	×	×	0.50
4	Lactic acid	○	○	○	○	×	×	1
5	Succinic acid	○	○	○	○	×	×	—
6	Citric acid	○	○	○	○	×	×	—
7	Acetic acid	○	○	○	○	×	×	1
8	Fumaric acid	○	○	○	○	×	×	—
9	Formic acid	○	○	○	○	×	×	2

5) 赤堀四郎 “酵素化学研究法” 614 朝倉書店 (昭30)

Table 2. Opt-pH of Ethanol-dehydrogenase in DiscoloringBacteria Stem B.

Bacteria Suspension 4.3mg/cc. 1 cc : M/10Ethanol 1 cc :  
M/15 Phosphoric acid Buffer 2.0cc ; Mb(1 : 10,000)0.2cc ; 37°C ; Thumberg Tube

pH	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2
Discoloring time	4 <sup>min</sup> . 50 <sup>sec</sup>	4.40	3.40	4.10	5.00

$$\text{酸化比率} = \frac{1}{\text{脱色時間(分)}} \times 10$$

またその酸化比率を求めると Fig 2 のようになる。

(3) 中間水素伝達体としてのメチレン青の必要性 ツンベルグ管を用い 37°C で測定した。菌濃度は 13mg/cc, 1 cc, M/15 リン酸緩衝液 pH6.8 2 cc M/10 エタノール 1 cc, 0.005% のジアゾ色素液 0.2cc を用い 1 : 10,000 のメチレン青 0.3cc を添加したものと、添加しないものについて測定し

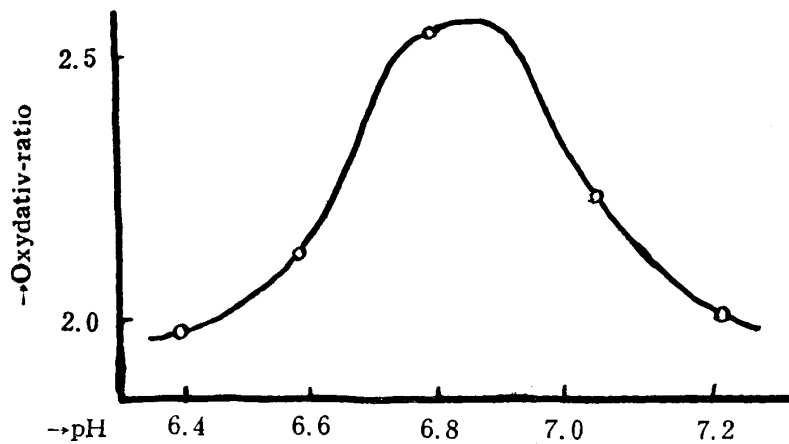


Fig 2. Oxydative-ratio of Ethanol-dehydrogenase

た。使用した色素は Fast Red BT, Sunchromin Black F conc, Solar Rubin extra, Fast Scalet B, Ponceau 6RB で何れも B株による変褪色の著しかつたものである。結果を Table 3 に示す。

Table 3. Diazo-radical Redukting Enzyme System 37°C. Thumberg Tube

No.	1		2		3		4		5	
Bacteria Suspension 13.0mg/cc 1 cc	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
M/10 Ethanol 1 cc	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
M/15 Phosphoric acid Buffer pH6.8 2 cc	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0.005% Dyestuff 0.2cc	Fast Red BT		Sunchromin Black F conc		Solar Rubin extra		Fast Scalet B		Ponceau 6RB	
1 : 10,000 Mb 0.3cc	×	○	×	○	×	○	×	○	×	○
H <sub>2</sub> O cc	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2
Discoloring Time (min)	—	at once	—	at once	—	at once	—	at once	—	at cnce

4. 総括

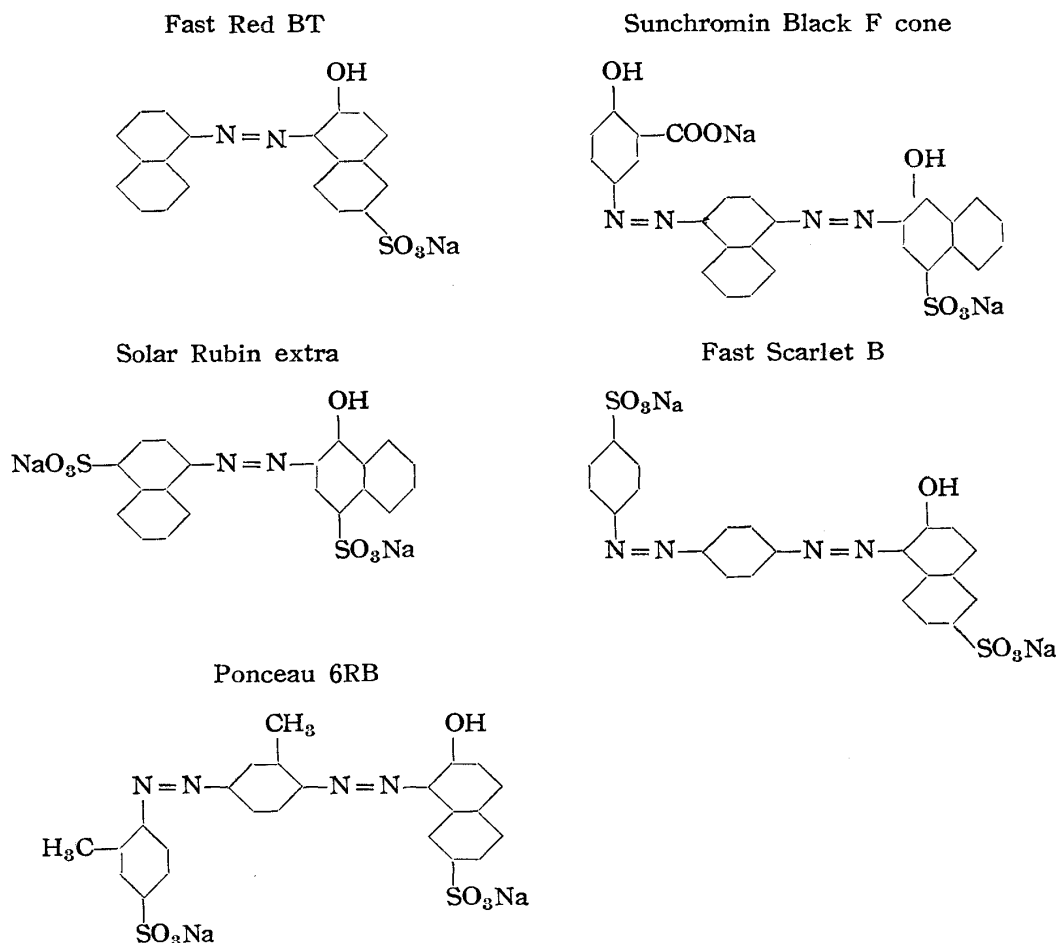
1. 変色細菌による色素の変褪色が酵素の作用によるものであることを、変色の著しかつたジアゾ色素について確認した。

2. 変色細菌 B株はブドウ糖、エタノールに対して極めて強力な脱水素酵素が存在し、また乳酸、ギ酸、酢

酸, メタノールの脱水酵素も存在することを認めた. コハク酸, クエン酸, フマル酸の脱水酵素系は認め得なかつた.

3. エタノール脱水酵素の至適 pH は 37°C で 6.8 (リン酸緩衝液) であつた.

4. ギャゾ基の還元は(II)式の如く水間水素伝達体を必要とし, 基質の脱水酵素系と, ギャゾ基の還元系の両系から組立てられていることを知つた.



嶋野武, 水野瑞夫, 井上純男: トリテルペノイドの研究 (第5, 6報)<sup>1)</sup>

濾紙微量電気泳動法によるトリテルペノイドの検討 (II, III)<sup>3) 2)</sup>

Takeshi Shimano Mizuo Mizuno and Sumio Inoue: Studies on Triterpenoids (V, VI)

Examinations of the Triterpenoids by paper Electrophoresis (II, III)

植物中の Sapogenin 及び Triterpenoids は構造未定のものを入れて 80 数種に達する。<sup>4)</sup> 薬用植物を始めとし一般植物中の Triterpenoids を微量化学的方法により検出する目的で ペーパー・パーティション・クロマトグラフィー<sup>5) 6)</sup> 並びに濾紙微量電気泳動法<sup>1) 7)</sup> による研究が行われた. 著者等は自製の定電圧, 定電流発生装置を用