

## 文 献

- \*1 第12報: 薬誌投稿中  
\*2 Part 8: 薬誌投稿中  
1) T. Takahashi, Y. Maki: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **6**, 369 (1958).  
2) 米田 et al: Chem pharm. Bull (Tokyo), **11**, 957(1963)  
A. phillips et al: J. Org. Chem, **28**, 1488 (1963).  
3) 牧, 佐藤, 山根: 薬誌, **85**. 429 (1965).  
4) O. Rodig. et al: J. Org. Chem. **29**, 2652 (1964).

杉浦 衛, 田中英郎, 古武よし子: 抗結核剤の薬剤学的研究 (第7報)

Tryptophanase による Pyridoxal Phosphate 定量法の検討

**Mamoru Sugiura, Hidero Tanaka, Yoshiko Kotake:**

Pharmaceutical Studies of the Antituberculous Drugs (8)

On the Study of Pyridoxal Phosphate Determination by Tryptophanase.

As the result of this study, the preparation of apo-tryptophanase, the isoelectric point treatment (pH 4.5) was better than dialysis treatment and then PAL-P was almost completely dissociated. As to the formation of Ehrlich reagents, reagent B (*P*-dimethylamino-benzaldehyde 20g, conc, HCl 10ml, alcohol 40ml) was adopted for colorization of indol in toluene extract. In order to prevent the reactional inhibition by indol formed and to complete the extract of indol, the addition of toluene 0.3ml, to reaction system had a good result in toluene extract. As the extractive solvent of indol, toluene was used in the case of high quantity of PAL-P in sample and it was desirable to use the petroleum ether in low quantity as the PAL-P in serum.

pyridoxal phosphate (以下PAL-P) が, アミノ酸代謝に関与する多くの酵素の補酵素として作用することは周知の事実であるが, B<sub>6</sub> 酵素は一般的に apo-protein と PAL-P の結合が強く, apo-protein のみを得ることは容易ではない,

すでに鶴沢らは,<sup>1)</sup> 大腸菌のトリプトファン研究のさい, 大腸菌抽出液を, PH 5.0 で処理したところ完全に apo-protein と補酵素に分離するを知り, 次いで Umbreit<sup>2)</sup> はその補酵素が PAL-P であることを証明している. これらの報告をもとに坂本らが PAL-P を添加すると一定範囲内で添加 PAL-P 量に比例してトリプトファンよりインドールが形成され, その生成インドールを比色するという PAL-P の定量法を確立した.<sup>3)</sup>

先に著者らは, トリプトファン代謝に及ぼす PAS の影響としてトリプトファン代謝酵素の活性変化を観察したところ, kynureninase 活性において異常な活性低下を, kynurenine transaminase 活性においては変化のないことを認めた. この両酵素の補酵素には PAL-P が関与しているため, 肝, 腎における kynureninase, kynurenine transaminase 活性と PAL-P 量との相関性を知る目的で, 坂本の方法にて PAL-P の定量を行ったが満足すべき結果が得られなかった.

第6報: 杉浦 衛, 田中英郎, 加藤精宏, 道家三季, 本誌 1451(1964)

坂本の方法は各臓器，すなわち肝，腎，また血清に応用されているが，血清中にはときに PAL-P 量が少ないため，形成インドールの抽出能力ならびに発色試薬の呈色感度の増大が望まれていたが，最近佐藤<sup>4)</sup>は，発色試薬として P-dimethylaminocinnamaldehyde を用い発色感度を約 3 倍にしたと報告している。

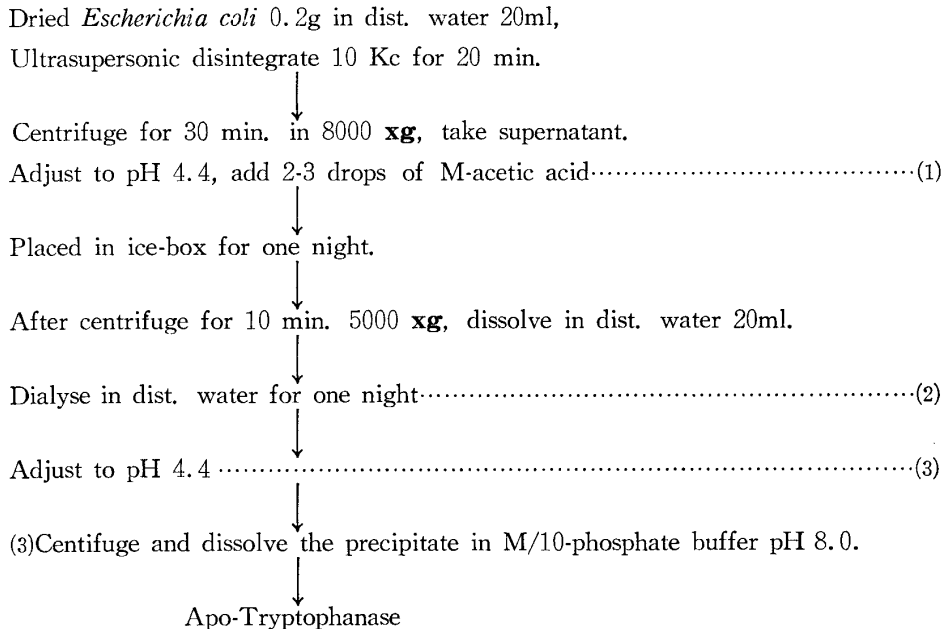
そこで定量法の検討として，apo-tryptophanase の安定性ならびに等電点処理，およびインドール抽出方法とそれに伴う発色試薬の組成，感度等につき，坂本の方法に種々検討を加えてみたので，その詳細について報告する。

### 実験方法

#### 1) apo-tryptophanase の調製<sup>3)</sup>

Table I に示すような apo-tryptophanase の調製法を用いた。調製過程中，pH 4.4 等電点処理，透析処理のところで PAL-P の解離度を比較した。

Table. I Preparation of Apo-Tryptophanase.



#### 2) 検液の調製

##### I. 組織

組織 1 g を 10% メタリン酸 1 ml とホモジネートし，精製水 9 ml を添加し，その 1 ml を蛋白量測定に保存する。残りを 80°C 15 分間加温し，冷却後 3000 × g，30 分遠沈し，上清を得た。沈渣は 5 ml の精製水にて洗滌し 3000 × g，30 分遠沈し，上清を得，これを上記の上清と混合する。20% KOH 溶液 2 ~ 3 滴にて中和し，その 0.25 ml を試料とした。

##### II. 血清

spitzglass に 2% メタリン酸 2 ml と血清 2 ml を混和し，80°C，15 分間加温後，遠沈し，上清 0.25 ml を試料として使用した。<sup>3)</sup>

##### III 反応測定

Table II に示すように，本反応には NH<sub>4</sub><sup>+</sup>，または K<sup>+</sup> の存在が不可欠であるから，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 μM を加え，また L-トリプトファン 10 μM 相当を用い，37°C，15 分反応を行ない，30% T. C. A. 1 ml にて停止させた。<sup>5)</sup>

生成インドールを石油エーテル, またはトルエンにて抽出し, Ehrlich 試薬で呈色し, 530m $\mu$ にて比色定量を行った。<sup>3)</sup>

Table. II Reaction System

	Enzyme Activity (+PAL-P)	Enzyme Activity (-PAL-P)
Phosphate Buffer (pH8.0)	1.00ml	1.00ml
Ammonium Sulfate	0.25	0.25
PAL-P	0.25	—
Dist. Water	2.30	2.55
Apo-Enzyme	1.00	1.00
Tryptophane	0.20	0.20
Total	5.00ml	5.00ml

#### 検討および考察

1) apo-tryptophanase 調製における PAL-P の解離とその酵素活性について.

**Table III**, Fig1 に示したように透析(2)により酵素活性の低下が著しく, 等電点処理(1)のように酵素活性大なるときは PAL-P の解離も悪いが, (3)における等電点処理では活性の低下はわずかでありしかも PAL-P の解離も十分に行なわれている.

Table. III Enzyme Activity and PAL-P Dissociation  
in pH 4.4 Treatment. (-Log T)

	Enzyme Activity	PAL-P Dissociation
Isoelectric point. Treatment in pH 4.4	0.915	0.366
Dialysis	0.521	0.050
Isoelectric point. Treatment in pH 4.4	0.472	0.020

これよりしても, apo-tryptophanase の調製は透析処理よりも, pH 4.4 等電点処理の方がより望ましいと考えられる.

2) 形成インドールの抽出溶媒と Ehrlich 試薬の組成について

インドール抽出溶媒として従来石油エーテル, トルエンが使用されているが, <sup>6)</sup>トルエン抽出能力は石油エーテルの約3倍で, このことは本定量法においてトルエン4mlに対し, 石油エーテル10mlと5mlで2回抽出するのとはほぼ同じ能力を有していることから推察できる.

また Ehrlich 試薬 (DAB) の組成については, トルエン抽出した場合, 試薬中の HCl : C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH を 1 : 4 にすれば比色液が一層となり, 比色操作において好都合となるが, 石油エーテルでは二層となり, しかも呈色液が透明となるのに約15分も要するという欠点がある.

そこで, **Table IV**に示すごとく試薬A, B, Cの三種を調製した. 試薬Aは, DAB 濃度 20%, HCl : C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH は 1 : 4, 試薬Bは DAB を最高に溶解し同じく HCl : C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH は 1 : 4, 試薬Cは <sup>6)</sup>後藤法における組成で DAB 濃度は試薬Bとほぼ同じくらいである.

次いで, これら3種の試薬を使用し, トルエン, 石油エーテル抽出を試みた場合のインドール曲線を検討した,

すなわち, Table V, Fig, 2, に表わすごとく, 抽出感度はインドール量の増加に伴ない試薬A, B, Cの順に増大していることがわかり, なかでも石油エーテル抽出で試薬Cを使用した方がトルエン抽出で試薬Aの場合より, 形成インドールの抽出において良好なる結果を得た.

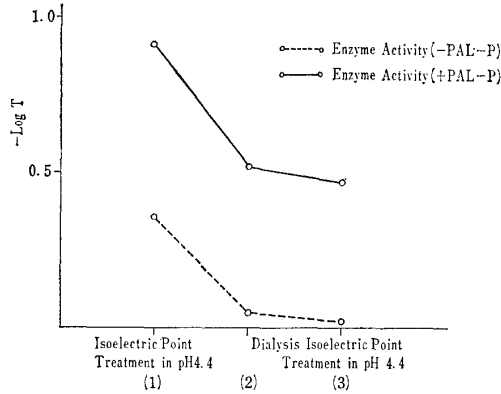


Fig 1. Enzyme Activity and PAL-P Dissociation in pH 4.4 Treatment.

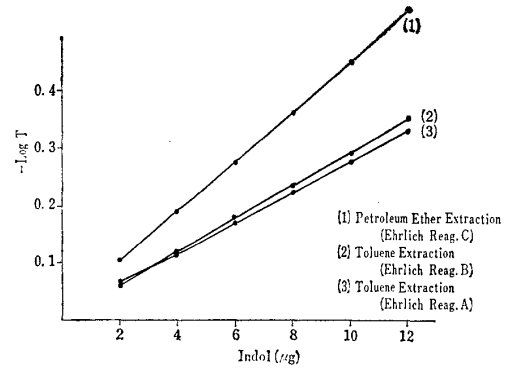


Fig 2. Comparison of Petroleum ether and Toluene in Indol extraction.

Table. IV Formation of Ehrlich Reagents.

Extract solvents Ehrlich reagents Components.	Toluene		Petroleum ether
	A	B	C
D. A. B.	25 g	20 g	20 g
Conc-HCl	25 ml	10 ml	40 ml
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ·OH	100 ml	40 ml	16 ml

D. A. B. ; P-Dimethylaminobenzaldehyde

Table. V Comparison of Petroleum Ether and Toluene in Indol Extraction (-LogT)

Indol (μg) Ehrlich Reag. Ext. solv.							
		2	4	6	8	10	12
Toluene	A	0.060	0.115	0.170	0.223	0.275	0.330
	B	0.065	0.120	0.180	0.235	0.293	0.350
Petroleum ether	C	0.103	0.190	0.275	0.365	0.453	0.540

3) インドール形成に伴う反応阻害とその抽出について.

既述のごとくインドール抽出溶媒として, トルエンが非常に操作上簡便であるため, いかにしてトルエン使用によるインドール抽出感度を, 石油エーテルのそれに近づけるか検討をこころみた.

形成インドールが自から反応経過を阻害するという Wood<sup>2)</sup>の報告をもとにして, 反応系トルエンを添加することによりインドール抽出感度の増大をはかったが, その添加トルエン自身も反応系阻害を示すという大島<sup>5)</sup>らの説もあるため, それら相互間の量的関係について行った.

結果はTable IV, Fig. 3 に示すようである. すなわち, インドール抽出能力において差異の著しい試薬Aを使

用したトルエン抽出と, 試薬Cを使用した石油エーテル抽出につき, トルエン抽出時に反応系に表示のトルエンを添加, PAL-P活性曲線を作製したところ, PAL-P 0.01 $\mu$ g においてトルエン 0.5ml 添加が 0.3ml 添加に比し反応阻害の大なることを示している. [曲線(1), (3)]

Table. VI Comparison of PAL-P Activity in Addition and Extraction of Toluene. (-LogT)

Ehrlich Reag.	Add. Toluene	Ext. Solv.	PAL-P( $\mu$ g)						
			0.01	0.03	0.05	0.08	0.10	0.12	0.14
A	0.30ml	Toluene	0.180	0.238	0.295	0.380	0.438	0.490	0.510
	0.50ml	Toluene	0.108	0.260	0.405	0.510	0.545	0.560	0.570
	—	Toluene	0.113	0.168	0.223	0.310	0.345	0.370	0.380
C	—	Pet. ether	0.195	0.280	0.368	0.445	0.480	0.505	0.525

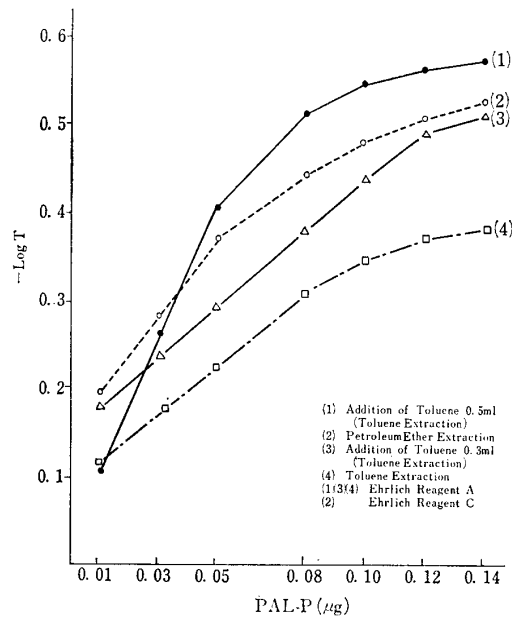


Fig 3. Comparison of PAL-P Activity in Addition and Extraction of Toluene.

PAL-P 0.01~0.03 $\mu$ g の範囲では, 試薬Cを使用した石油エーテル抽出が比較的感度が高いので, 血清中 PAL-P の定量に望ましいと考えられる. [曲線(2)]

Table. VII PAL-P Activity in Rats Liver and Human Serum.

Expl. No.	PAL-P $\mu$ g/g Liver	PAL-P $\mu$ g/ml Serum
1	2.863	0.025
2	2.681	0.028
3	3.234	0.018
4	3.605	0.023
5	3.654	0.016
Average	3.207	0.020

また、rat liver 中の PAL-P のごとき含有量大なる場合は抽出能力のすぐれた、測定範囲の広い、且つ簡便なるトルエン 0.3ml 添加したトルエン抽出を試みるのが適当と思われる。〔曲線(3)〕

#### 4) 実験例

rat liver 1g, human serum 1ml について、その PAL-P 量をトルエン抽出にて前記測定法により定量した。PAL-P $\mu$ g/rat liver gを、平均して3.2であった。(Table VII)

また、PAL-P $\mu$ g/human serum ml は、平均0.020であった。

#### 結 論

(1) apo-tryphanase の調製は、透析処理よりも pH 4.5 等電点処理を繰返すことにより、PAL-P を解離させるべきである。

(2) Ehrlich 試薬の組成は、インドール抽出にトルエン溶媒を使用する際試薬 B (DAB20g, conc-HCl10ml, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 40ml) を用いるのが望ましいと考えられる。

(3) 生成インドールによる反応系阻害を防ぐために、また形成インドールの抽出を完全にするため、特にトルエン抽出の場合反応系にトルエン 0.3ml の添加が良好な結果を示した。

(4) インドール抽出溶媒として、検体に PAL-P 量多きと考えられる場合は、トルエン溶媒を使用し、血清のごとき PAL-P 量小なる時は、石油エーテル抽出をこころみるのが適切と思われる。

終りに本研究に際し、菌を恵与頂きました大阪大学医学部和田助教授、また実験の便宜を御計らい願った名古屋大学医学部細菌学教室、第2生化学教室に深く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 鶴沢：大阪医学会誌 **42**, 1637 (1943)
- 2) Wood, W, A. Gunsalus, I, C, Umbreit, W: J, Biol, Chem **170**, 313 (1947)
- 3) 坂本：ビタミン **24**, 223 (1961)
- 4) 佐藤：ビタミン **29**, 516 (1964)
- 5) 大島, 市原：阪大医誌 **39**, 1507 (1940)
- 6) 後藤：阪大医誌 **37**, 2413 (1938)

---

杉浦 衛, 伊藤万蔵, 浅野 弘：酵素剤の研究 (第11報)

糸状菌の生産するリパーゼについて

Mamoru Sugiura, Manzo Ito, Hiroshi Asano:

Studies on Enzyme preparations. (11) On the Lipase produced by Filamentous Fungi.

As a result of inspection of bacillus which produces lipase it was found that a strain of *Aspergillus* genus had ability to produce a powerful lipase. Continuously, culture conditions off the strain were inspected. In consequence, culture temperature 35°C, culture time 72 hours, moisture in medium