

細菌によるチロジンより, p-オキシ・フェニル・アクリル酸 及び p-オキシ安息香酸を経由するフェノール生成

千葉大学医学部医化学教室 (主任 赤松 茂教授)

加 藤 宏 一

KOICHI KATO

(昭和31年6月7日受付)

尿中にフェノールが, エーテル硫酸又結合グルクロン酸として出現することは, 多数の研究者¹⁾により報告されているが, このフェノールがチロジンから形成される機序が生化学的に問題となつてゐる。E. Baumann²⁾は脾臓を使用した実験で, 腐敗の際チロジンよりフェノールになる経路にチロジン→p-オキシ・フェニル・プロピオン酸→p-オキシ・フェニル醋酸→クレゾール→フェノールがあると述べている。また O. Neubauer³⁾は動物細胞, 酵母, 糸状菌, 細菌によるチロジンの代謝について綜説し, チロジンの代謝物として, p-オキシ・フェニル・エチルアミン, p-オキシ・フェニル乳酸, p-オキシ・フェニル・焦性ブドウ酸, p-オキシ・フェニル・グリオキシル酸, p-オキシ・フェニル・エチルアルコール, p-オキシ・フェニル・アセトアルデヒド, p-オキシ・フェニル・プロピオン酸, p-オキシ・フェニル醋酸をあげている。此等の物質につき, M. Rhein⁴⁾は大便より分離した *Bact. coli phenologenes* を用いてフェノール生成につき検討し, アスパラギン, 乳酸アムモニウム, 第一燐酸カリ, 硫酸マグネシウム, 水よりなる合成液体培地に代謝物と思われる次の各種物質をそれぞれ添加した試験液に細菌を作用させた結果, チロジン及び p-オキシ安息香酸からはフェノールの生成をみたが, p-オキシ・フェニル・プロピオン酸, p-オキシ・フェニル醋酸, p-オキシ・フェニル・焦性ブドウ酸, p-オキシ・フェニル・エチルアミン, p-オキシ・フェニル・エチルアルコール, p-オキシ・フェニル乳酸, p-クレゾールからはフェノールの生成をみなかつたと報じ, チロジン→オキシ安息香酸→フェノールなる代謝経路があることを述べている。ついで市原・柿原⁵⁾は *Bact. coli phenologenes* を分離し, 該菌を用い実験を行い, その結果チロジンからフェノールの生成をみたが, p-オキシ・フェニル乳酸, p-オキシ・フェニル醋酸, p-オキシ・フェニル・プロピオン酸, チロゾール, チラミン, p-オキシ・ベンツアルデヒド, チロジンペタイン, フォルミールチロジン, スルフォ・ベンジルチロジン, p-クレゾールからはフェノールの生成をみなかつたことより, チロジンよりフェノールの生成は, チロジンの核と側鎖とが一時的に, 断裂してフェノールとアラニンが生ずる道のみ存し, 今まで報告されている段階的生成によりフェノールが生ずるという説を否定しているが, 詳細は明らかにされていない。

著者は先に p-オキシ・安息香酸からフェノールを生成する大腸菌を大便より分離し, それについて報告⁶⁾した。今回は, 体内に於けるチロジンよりフェノール生成の機序を研究すべ

く、大便中の菌叢から菌を分離し、新しい事実を確認したが、その内チロジンより一時的断裂により生ずるフェノールとアラニンの生成の詳細は別に述べ、ここでは大便中より p-オキシ・フェニル・アクリル酸及び p-オキシ安息香酸からフェノールを生成する菌を分離し得、新たに段階的にフェノールが生成する経路を確認したので報告する。

実 験 の 部

I) 基質

p-, m-, o-オキシ安息香酸, チロジン, p-オキシ・フェニル・アクリル酸, p-オキシ・フェニル乳酸, p-オキシ・フェニル醋酸, p-クレゾールは前報⁶⁾と同じものを用いた。

II) 菌の分離

前報⁶⁾の菌の分離に於いて述べた合成液体培地の組成のうち p-オキシ・安息香酸の代りに、p-オキシ・フェニル・アクリル酸を添加した pH 6 の合成液体培地を使用し、前回と全く同様に操作し、p-オキシ・フェニル・アクリル酸よりフェノールを生成する菌株を得た。

この菌株は大腸菌である。

菌株はこの液体培地中に増殖させ、そのまま氷室に保存した。

III) 菌浮遊液

普通寒夫平板培地 (pH 7) に保存液体培地中の菌を植継ぎ、37°C, 17 時間増菌させた。以下の操作は前報⁶⁾と同様にして、菌浮遊液を作った。

この菌浮遊液に含まれる乾燥菌量は約 30 mg/ml である。

IV) 定量法

1. フェノールの定量 前報⁶⁾と同様、クロロホルムでフェノールを抽出した後、赤松・穴倉法⁷⁾で呈色した。

2. p-クレゾールの定量 前報⁶⁾と同様、クロロホルムで p-クレゾールを抽出した後、Pauly のジアゾ・ベンゼン・スルホン酸との反応による呈色⁸⁾によつて比色定量した。

V) 実験方法

実験に用いた緩衝液は pH 6 の $M/10$ 磷酸塩混液である。この菌の作用を考えると酸化が行われているに相違ないので、トルオールを重畳しないで実験した。

実験温度は 37°C である。試験液組成は下記の如く盲検としては基質液の代りに水を加えた。

基 質 液	2.0 ml
菌 浮 遊 液	1.0 ml
緩 衝 液	1.0 ml

実 験 成 績

1. 種々の pH に於ける p-オキシ・フェニル・アクリル酸よりフェノールの生成率。

第 1 表に示す如く pH 6 でフェノール生成率最大であつた。

表 1 各 pH に於ける p-オキシ・フェニル・アクリル酸よりのフェノール生成率

pH	フェノール生成率
5.0	26.2%
6.0	30.0%
6.5	28.1%
7.0	27.4%
8.0	25.6%

基質終濃度 $M/2000$, 実験時間 4 時間, トルオール重畳せず。

2. 各時間に於ける p-オキシ・フェニル・アクリル酸より、フェノールの生成率。

p-オキシ・フェニル・アクリル酸より、6, 17, 32 各時間に於けるフェノール生成率は、28%, 78%, 100% であつた。このフェノール生成率が 100% 証明されたことは、p-クレゾールが混在していないことを示している。

3. 菌浮遊液によるチロジン, p-オキシ・フェニル・アクリル酸, p-, m-, 及び o-オキシ安息香酸, p-オキシ・フェニル乳酸, p-オキシ・フェニル醋酸, p-クレゾールよりフェノール及び p-クレゾール生成の有無。

第 2 表に示す如く、この菌は p-オキシ・フェニル

表 2 諸種物質よりのフェノール及び p-クレゾール生成の有無

	フェノール生成率	p-クレゾール生成率
チ ロ ジ ン	0%	0%
p-オキシ・フェニル・アクリル酸	69%	0%
p-オキシ安息香酸	75%	0%
m-オキシ安息香酸	0%	0%
o-オキシ安息香酸	0%	0%
p-オキシ・フェニル乳酸	0%	0%
p-オキシ・フェニル醋酸	0%	0%
p-クレゾール	0%	0%

基質終濃度 $M/2000$, 実験時間 7 時間。

ル・アクリル酸及び p-オキシ安息香酸からフェノールを生成するが、他の物質からは、フェノールもクレゾールも生成しない。

またこの実験で、チロジン、p-オキシ・フェニル乳酸、p-オキシ・フェニル醋酸は1日、2日、3日放置後もフェノール及び p-クレゾールの生成をみなかった。また m-及び o-オキシ安息香酸、p-クレゾールからはフェノールの生成をみなかった。

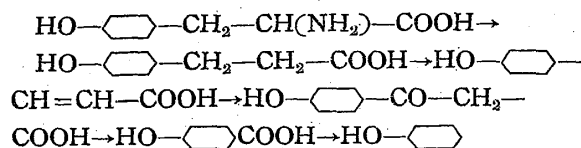
考 按

前報⁹⁾に於いて著者が報告した大便中より分離した大腸菌は、p-オキシ安息香酸を単純に脱 CO₂ して、フェノールを生ずるが、チロジン、m-及び o-オキシ安息香酸、p-オキシ・フェニル・アクリル酸、p-オキシ・フェニル乳酸、p-オキシ・フェニル醋酸、p-クレゾールからはフェノールを生成しない。即ち該菌は p-オキシ安息香酸からフェノールを生成する酵素を持つてゐることを述べた。一方 Baumann は腐敗実験で膀胱を用いて、チロジンよりフェノール生成の経路を、チロジン→p-オキシ・フェニル・プロピオン酸→p-オキシ・フェニル醋酸→p-クレゾール→フェノールと述べている。然るに Rhein は大便中より分離した *Bact. coli phenologenes* を用いて、チロジンよりフェノールになる中間体と思われる物質に該菌を作用させ、フェノールの生成を検べ、その菌はチロジン及び p-オキシ・安息香酸からフェノールを生成するが、p-オキシ・フェニル・プロピオン酸、p-オキシ・フェニル醋酸、p-オキシ・フェニル焦性ブドウ酸、p-オキシ・フェニル・エチルアミン、p-オキシ・フェニル・エチル・アルコール、p-オキシ・フェニル乳酸、p-クレゾールからはフェノールを生成しなかったことより、チロジンは、p-オキシ安息香酸を経てフェノールになると述べている。ここで著者が前報で報告した菌は、p-オキシ安息香酸からフェノールを生成するが、チロジンからは生成しないこと、及び今回報告した大腸菌は p-オキシ・フェニル・アクリル酸、p-オキシ安息香酸からフェノールを生成するが、チロジンからはフェノールを生成しないので、Rhein の分離した *Bact. coli phenologenes* は著者が今回報告した大腸菌とは別個のものと考えられる。また未発表であるが著者は更にチロジンからのみフェノールを生成する大腸菌を大便から分離し得た。このことと、前回の報告と考え合せると、Rhein の分離した *Bact. coli phenologenes* は著者の分離した p-オキシ安息香

酸からフェノールを生ずる酵素と、チロジンからフェノールを生ずる酵素と2つの酵素系を持つてゐるものとも考えられる。

今回著者が報告した大便中より分離した大腸菌は、p-オキシ・フェニル・アクリル酸、p-オキシ・安息香酸からフェノールを生成するが、チロジン、p-オキシ・フェニル乳酸、p-オキシ・フェニル醋酸、m-及び o-オキシ安息香酸、p-クレゾールからはフェノールを生じない。そこで p-オキシ・フェニル・アクリル酸→p-オキシ安息香酸→フェノールなる経路があることは明らかであるが、この p-オキシ・フェニル・アクリル酸がチロジンより如何にして出来るかであるが、1921年に平井⁹⁾は腐敗膀胱より分離した菌 *Proteus vulgaris* を用いて、チロジンを含有した合成液体培地より p-オキシ・フェニル醋酸、p-オキシ・フェニル・アクリル酸、p-オキシ・フェニル乳酸を結晶として分離し、更に1923年平井¹⁰⁾は同様 *Proteus vulgaris* を用いて、メラニン生成に関する実験に於いてチロジンを含有した合成液体培地より p-オキシ・ベンツ・アルデヒド及び p-オキシ安息香酸を得て、メラニン生成を次の様な経路によると推考している。即ちチロジン→p-オキシ・フェニル・アクリル酸→p-オキシ・フェニル醋酸→p-オキシ・ベンツ・アルデヒド→メラニン。ここで他の経路として、p-オキシ・ベンツ・アルデヒド→p-オキシ安息香酸の経路を推定している。

平井の実験により、チロジンより、p-オキシ・フェニル・アクリル酸及び p-オキシ安息香酸が生ずることは明らかであるが、いままで報告された文献を参考にすると、チロジンより、p-オキシ・フェニル・アクリル酸が生ずる経路は、チロジン→p-オキシ・フェニル乳酸→p-オキシ・フェニル・プロピオン酸→p-オキシ・フェニル・アクリル酸の経路が考えられる。しかし著者が分離した菌は p-オキシ・フェニル乳酸からはフェノールの生成はみられなかった。このことよりチロジンよりフェノールの生成には、チロジンがおそらく還元的に脱アミノ化されて生ずる p-オキシ・フェニル・プロピオン酸をβ酸化して、p-オキシ安息香酸を経て、これから単純な脱 CO₂ により、フェノールを生ずる次の如き経路があるといひ得る。



総 括

- 1) p- オキシ・フェニル・アクリル酸及び p- オキシ安息香酸よりフェノールを生成する大腸菌を大便より分離した。
- 2) 該菌はチロジン, p- オキシ・フェニル乳酸, p- オキシ・フェニル醋酸, m- 及び o- オキシ安息香酸よりフェノールを生成しない。
- 3) 以上のことよりチロジンよりフェノール生成には, チロジン→p- オキシ・フェニル・プロピオン酸→p- オキシ・フェニル・アクリル酸→p- オキシ安息香酸→フェノールなる経路があると言い得る。

本研究は, 文部省から赤松教授に与えられた科学研究費により, 赤松教授指導の下に行われた。
ここに深く感謝する。

文 献

- 1) Neuberg, C.: Der Harn, 465, Berlin (1911)
- 2) Baumann, E.: Z. physiol. Chem., 1, 60 (1877): ibid. 4, 304 (1880)
- 3) Neubauer, O.: Biochem. Handlexikon Bd. 4, 360, Berlin (1911)
- 4) Rhein, M.: Biochem. Z. 84, 246 (1917): ibid. 87, 123 (1918)
- 5) Kakiyama, Y. & Ichihara, K.: Med. J. Osaka Univ. 3, 497 (1953): ibid. 3, 509 (1953)
- 6) 加藤宏一: 千葉医会誌 32, 2 (1956)
- 7) Akamatsu, S. & Shishikura, Y.: J. Biochem. 39, 203 (1952) 矢倉保之: 日生化 19, 145 (1947): 同 20, 27 (1948): 同 21, 31 (1949)
- 8) Pauly, H.: Z. physiol. Chem., 42, 508 (1904)
Koessler, K. K. & Hanke, M. T.: J. Biol. Chem., 50, 235 (1922)
- 9) Hirai, K.: Biochem. Z. 114, 71 (1921)
- 10) Hirai, K.: Biochem. Z. 135, 299 (1923)