アスコルビン酸およびトリオースレダクトンの大腸菌および枯草菌の増殖に対する影響

篠原和毅, 前田秀夫, 野中美智子
村上浩紀, 大村浩久
九州大学農学部食糧化学工学科

Effect of Ascorbic Acid and Triose Reductone on the Growth of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

Kazuki SHINOHARA, Hideo MAEDA,
Michiko NONAKA, Hiroki MURAKAMI,
Hirohisa OMURA*

Department of Food Science and Technology,
Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka

Growth of *Esch. coli* K 12 was retarded with 100 mM ascorbic acid or 10 mM triose reductone. The retarding effect was enhanced with Cu^{2+} and the complete retardation was observed with less amount of them, 10 mM ascorbic acid or 1 mM triose reductone, in the presence of 1 mM CuSO_4 . Similar effect was observed for *Esch. coli* C 600, *Esch. coli* B, *Esch. coli* 15 as well as *Bac. subtilis* 168 M. On the other hand, with 1 to 10 mM ascorbyl-3-phosphate the growth of *Bac. subtilis* 168 M was promoted. In addition, contrary to ascorbic acid, the promoting ability was counteracted with Cu^{2+} . However, the effect was seldom observed for *Esch. coli* K 12.

(Received July 21, 1980)

さきにアスコルビン酸 (AsA) やトリオースレダクトン (TR) など種々のレダクトン類は反応性に富み、還元力のほかとくに核酸切断能を有し、これがエンジオールをはじめとするレダクトン構造に基づくことを報告した^{1)~4)}。もしこのような核酸の切断が細胞内でも起こるならば、それに伴って細胞の生理的機能にも種々の影響を及ぼすことが推定される。事実エンジオール基をもつ芳香族レダクトンに属しかつかなりの抗腫瘍性をも示すエビネフリンなどカテコールアミン類は RFL, HeLa あるいは L 細胞など組織培養細胞内でも DNA 切断を起こし、それとともに細胞の増殖をはじめ酵素活性あるい

は白血病ウイルスの感染にともなう巨大多核化などにも影響を及ぼすことを認めた^{5)~7)}。AsA や TR についても抗腫瘍性^{1)~4)}の抗ウイルス性¹¹⁾などがすでに認められ、その原因の一つとして細胞内 DNA の損傷が推定されている。したがって微生物に対しても種々の影響を及ぼすことは考えられる。われわれ¹²⁾はすでに *Salmonella typhimurium* TA 100 に対し突然変異をひき起こすことを明らかにした。一方、鹿田ら¹³⁾も TR が酵母の生育を抑制することを認めたが AsA については観察していない。またその発酵性についても TR は阻害するが AsA やレダクチン酸では認められず、レダクトン類の特徴であるエンジオール基に由来するものではないことを示唆している。しかし、レダクトン類の核酸切断能は Cu^{2+} により高められることが著しい特徴の一つであるが鹿田らは試験を行っていない。そこでこれらの点をも配慮しながら、グラム染色性に基づく2種の代表的細菌、大腸菌ならびに枯草菌の増殖に対する TR, AsA ならびにそのエンジオール基をブロックしたリン酸エステル (AsA-3-P) の影響を観察した。

実験方法

1. 菌の増殖

培地として、 K_2HPO_4 7 g, KH_2PO_4 3 g, クエン酸ナトリウム $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g, グルコース 5 g, ポリペプトン 2 g, 塩酸サイアミン 5 mg を 1 l の水に溶解, pH 7.2 に調整したものをを用い、坂口フラスコ中 30°C で振盪して予備的に培養した。対数増殖期になる前に試験管 (18×1.6 cm) に分注, 対数増殖初期になったとき (約 $2 \times 10^6/\text{ml}$), 無菌の新鮮なレダクトン溶液を添加, 引き続き振盪培養を行ない 660 nm の吸光度を経時的に測定して菌の増殖を追跡した。

2. 試薬

TR は常法どおりグルコースから合成, AsA は市販特級品 (和光純薬), AsA-3-P は武田薬品工業株式会社より恵贈されたものを使用した。

結果および考察

Fig. 1 に *Esch. coli* K 12 の増殖に対する AsA および TR の影響を示す。

両レダクトンともに菌の増殖を抑制することが認められた。しかしその効果にはかなりの差があり, AsA は 10 mM では影響なく 100 mM で多少の抑制効果を示すのに対し, TR の活性は強く 1 mM では効果はないが 10 mM でほとんど完全に増殖を抑制した。レダクトン類による DNA 切断機構はまだ完全には解明されていないが, 少なくともそのおもなものとして, とくに Cu^{2+}

Fig. 1. Effect of ascorbic acid (AsA) and triose reductone (TR) on the growth of *Esch. coli* K 12.

Esch. coli K 12 was incubated by shaking at 30°C in the following medium; K_2HPO_4 7g, KH_2PO_4 3g, Na -citrate·2H₂O 0.5g, $MgSO_4$ ·7H₂O 0.1g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1g, glucose 5g, poly-peptone 2g and thiamin·HCl 5mg in 1 litre H₂O, pH 7.2.

At the beginning of the log phase (about 2×10^8 cells/ml), AsA, TR and $CuSO_4$ were added and the incubation was continued. The growth was estimated by determining the absorbancy at 660 nm. ×Control; ○ 1 mM $CuSO_4$; ● 100 mM AsA; ● 10 mM AsA or TR; ▲ 1 mM TR; ○ 10 mM AsA+1 mM $CuSO_4$; △ 1 mM TR+1 mM $CuSO_4$. Similar results were observed for *Esch. coli* C 600, *Esch. coli* B, *Esch. coli* 15 as well as *Bac. subtilis* 168 M too.

によるレダクトン類の酸化に伴って生ずるフリーラジカルの関与^{14)~16)},あるいはレダクトン- Cu^{2+} -核酸塩基三者混合錯体の中間的生成^{15)~17)}などが考えられる。事実,レダクトン類のDNA切断作用は Cu^{2+} により著しく促進されることが確かめられている。そこで1 mMの Cu^{2+} をAsAまたはTRと同時に添加したところ,それぞれ単独では効果が見られなかった10 mMあるいは1 mMでもほとんど完全に菌の増殖を抑制した。なお Cu^{2+} 単独でももちろん影響はほとんど認められなかった。

大腸菌の他の菌株 *Esch. coli* C 600, *Esch. coli* B, *Esch. coli* 15 (*thy*⁻, *ura*⁻, *his*⁻, *col*⁺ (φX 174⁺)),さらには枯草菌 *Bac. subtilis* 168 M (*trp*⁻)についてもまったく同様の傾向が認められた。

エンジオール類はリン酸エステル化されることにより安定化されるとともにその核酸切断能も著しく弱められる¹⁸⁾。そこで次にAsA-3-Pの影響を試験しFig. 2に示す。

AsA-3-PはAsAの場合とは逆に枯草菌の増殖を促進した。しかもAsAの抑制効果は10 mMではほとん

Fig. 2. Effect of ascorbyl-3-phosphate (AsA-3-P) on the growth of *Esch. coli* K 12 and *Bac. subtilis* 168 M.

Estimation was carried out as in Fig. 1.

×Control; ■ 0.1 mM AsA-3-P; ▲ 1 mM AsA-3-P; ● 10 mM AsA-3-P; ○ 10 mM AsA-3-P+1 mM $CuSO_4$.

ど認められないが Cu^{2+} により増強されるのに対し,AsA-3-Pの促進効果は1 mMないし10 mMでも濃度に依って明らかであり,さらに Cu^{2+} によって逆に低下した。一方,大腸菌に対するAsA-3-Pの影響は枯草菌の場合よりも著しく弱く同一条件ではきわめて微弱であった。

このようなレダクトン類の効果については種々の条件あるいは多くの菌種についてさらに詳細に試験しなければならないことはいうまでもない。しかしDNA切断の面から考察するとき次のような可能性も考えられる。DNAの切断は作用条件によって異なり,低濃度のような温和な場合には多少の一本鎖切断しか起らないが高濃度あるいは Cu^{2+} を加えるなど作用力が強くなると二本鎖切断も起こりまたその切断箇所も増加するなどその程度が増強される³⁾。またDNAに二本鎖切断などかなりきびしい切断が起こるとDNAおよびRNAポリメラーゼに対するプライマー活性を低下するが一本鎖切断のような軽度のものでかえってその活性を高めることが認められ¹⁹⁾²⁰⁾,したがって,DNAの切断はその程度によりDNAの複製,mRNAへの転写,たん白質への翻訳などになんらかの影響を及ぼすことも推定される²¹⁾。生体内での機能は決して単純なものではないが,AsAやTRによるDNAの切断作用ならびに Cu^{2+} によるその増強が菌体内でも起こるならば,これらレダクトン類による菌の増殖抑制効果は理解できると思われる。他方AsA-3-Pの場合,そのDNA切断作用はAsAに比べて著しく弱いので³⁾,DNAないしRNAポリメラーゼのプライマー活性を高めるに適切な一本鎖切断だけを起こし,核酸合成系を経て最終的には菌の増殖を促進するが, Cu^{2+} を加えるとDNAの切断度を増すために増殖

促進効果はかえって低下することになるとも考えられる。枯草菌と大腸菌とに対する AsA-3-P の効果の顕著な差異の原因も明らかではないが、たとえばポリリン酸化合物の静菌作用が²²⁾大腸菌のようなグラム陰性菌よりも枯草菌をはじめとする多くの陽性菌において顕著なように、菌のグラム染色性ないし菌体内への AsA-3-P の透過性に基づくこと、あるいはこのようなレダクトンのリン酸エステルもホスファターゼの基質となりうるので²³⁾菌体内における代謝ないし安定性の相異によることなども推定される。大腸菌および枯草菌に対する AsA と TR との増殖抑制効果の差についてもまた類似の理由などが考えられる。

いずれにしても AsA や TR がとくに Cu^{2+} 共存下において酵母¹³⁾だけでなくある種の細菌の増殖を抑制し、AsA-3-P が適宜の条件で促進することは明白である。この菌の増殖に対する影響と核酸切断能との関係が認められるならば、エンジオールだけでなく他のレダクトン類についても増殖に影響する可能性が考えられる。池田²⁴⁾は糖のアルカリ処理液が抗菌性を示すことを認め、生成するレダクトン類に基づくことを推定している。また、とくに AsA-3-P の効果はレダクトン類のリン酸エステル化がそれらの安定化だけでなくその積極的な利用の可能性を示唆することにおいても興味深い。

他方、このような AsA や TR などにより細菌内での切断が起こるならば、さらに代謝あるいは量的考察なども必要であることはいうまでもないが、高等動物、最終的にはヒトにおいても DNA の損傷をきたす可能性が考えられ、それにとまって種々の生理的変動とくに癌や奇形の発現などにつながるおそれをいなくとも否定できない。しかし DNA の損傷能を示すものが必ず発癌や奇形をきたすというものでもないようである。山藤²⁵⁾²⁶⁾は細胞の分化や突然変異、発癌、制癌などの諸現象をひき起こす始発要因は染色体 DNA の適切な切断であろうと推定し、われわれも¹³⁾これを支持する若干の実験結果を観察している。また上述のように、DNA はそのヌクレオチド鎖の切断の程度により DNA ないし RNA ポリメラーゼに対するプライマー活性を促進または抑制し、発癌や制癌との関連が推定される。さらに、プレオマイシン²⁷⁾やマイトマイシン C¹⁹⁾²⁸⁾のような抗癌剤も DNA 切断能を示すことはよく知られている。AsA についても少なくとも現状においては核酸切断能のほか Ames 系による突然変異能も確認されているが¹²⁾²⁹⁾発癌能は認められておらず、むしろ腫瘍細胞の増殖を抑制することが報告されている¹³⁾。これらのことについてはもちろんさらに詳細な研究解明を必要とすることはいうまでもない。

要 約

Esch. coli および *Bac. subtilis* の増殖が 100 mM AsA あるいは 10 mM TR によって抑制された。この効果は Cu^{2+} によって増強され、1 mM Cu^{2+} の共存下では 10 mM AsA あるいは 1 mM TR でも認められた。一方、AsA-3-P は 1 mM ないし 10 mM で *Bac. subtilis* の増殖を促進し、 Cu^{2+} によりその効果はかえって低下された。しかし *Esch. coli* に対する影響はほとんど認められなかった。

本研究の一部は未発表結果として本誌総説¹⁵⁾に引用した。研究に用いた AsA-3-P を恵贈された武田薬品工業株式会社に感謝申し上げる。また研究費の一部は文部省科学研究費によった。

文 献

- 1) Yamafuji, K., Nakamura, Y., Omura, H., Soeda, T. and Gytoku, K.: *Z. Krebsforsch.*, 76, 1 (1971)
- 2) 篠原和毅, 福元裕二, 曾 耀崑, 井上 譲, 大村浩久: 農化誌, 48, 499 (1974)
- 3) Omura, H., Iiyama, S., Tomita, Y., Narazaki, Y., Shinohara, K. and Murakami, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 21, 237 (1975)
- 4) Omura, H., Tomita, Y., Fujiki, H., Shinohara, K. and Murakami, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 24, 263 (1978)
- 5) Murakami, H., Miyoshi, T., Koga, M., Yamada, K. and Omura, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 39, 795 (1975)
- 6) Yamada, K., Murakami, H., Nishiguchi, H., Shirahata, S., Shinohara, K. and Omura, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 901 (1979)
- 7) Murakami, H., Shirahata, S., Yamada, K., Hori, C., Yoshii, E., Shinohara, K. and Omura, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1619 (1979)
- 8) Cameron, E. and Pauling, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 3685 (1976)
- 9) Morishige, F. and Murata, A.: *J. Internat. Acad. Prev. Med.*, 5, 23 (1978)
- 10) 篠原和毅, 曾 耀崑, 富田純史, 井上 譲, 塚田民喜, 村上浩紀, 大村浩久: 九大農芸誌, 34, 59 (1979)
- 11) Murata, A., Kitagawa, K. and Saruno, R.: *Agric. Biol. Chem.*, 35, 294 (1971)
- 12) Omura, H., Shinohara, K., Maeda, H., Nonaka, M. and Murakami, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 24, 185 (1978)
- 13) 鹿田幸治, 小幡 斉, 徳山 泰: 食工誌, 25, 374 (1978)
- 14) 村田 晃: 蛋白質・核酸・酵素, 20, 593 (1975)
- 15) 大村浩久: 栄養と食糧, 31, 9 (1978)
- 16) 大村浩久: 食品成分の相互作用 (並木満夫, 松下雪郎編), p.272 (1980), 講談社 (東京)
- 17) 村上浩紀, 白畑実隆, 山田耕路, 大村浩久: 農化誌, 49, 475 (1975)

- 18) 篠原和毅, 江藤正義, 曾 耀崑, 朱 光枝, 富田純史, 大村浩久: 農化誌, 49, 223 (1975)
- 19) 飯山 悟, 村上浩紀, 久良木倫生, 大村浩久: 農化誌, 47, 455 (1973)
- 20) Tomita, Y., Shinohara, K., Fujiki, H., Murakami, H. and Omura, H.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 24, 21 (1979)
- 21) Tomita, Y., Shinohara, K., Fujiki, H., Murakami, H. and Omura, H.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 24, 37 (1979)
- 22) 堤 将和, 西村和代, 安井紀久代, 松岡麻男, 渡辺忠雄: 食衛誌, 17, 273 (1976)
- 23) 篠原和毅, 内野文弘, 江藤正義, 曾 耀崑, 大村浩久: 栄養と食糧, 30, 230 (1977)
- 24) 池田庸之助: 私信 (1968)
- 25) 山藤一雄: 食物・癌・分化(1970), 秀巧社(福岡)
- 26) 山藤一雄: 生命化学 (1974), 内田老鶴園新社(東京)
- 27) Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N. and Umezawa, H.: *J. Antibiotics*, 22, 446 (1969)
- 28) Yamafuji, K. and Uchida, Y.: *Enzymologia*, 35, 131 (1968)
- 29) Stich, H. F., Karim, J., Koropatnic, J. and Lo, L.: *Nature*, 260, 722 (1976)

(昭和55年7月21日受理)

集団給食施設および家庭における 食用油の使用実態に関する調査

下志万千鶴子*, 赤井英子*, 坪野郁子*
橋野泰子*, 橋本和恵*, 古野律子*
矢野恭子*, 原 節子**, 戸谷洋一郎**
松尾 登**

* 武庫川女子大学家政学部食物学科

** 成蹊大学工学部工業化学教室

Survey about the Actual Condition of Utilization of Edible Oils at Homes and Mass Feeding Facilities

Chizuko SHIMOSHIMA,* Eiko AKAI,*
Ikuko Tsubono,* Yasuko HASHINO,*
Kazue HASHIMOTO,* Ritsuko FURUNO,*
Kyoko YANO,* Setsuko HARA,**
Yōichirō TOTANI,** Noboru MATSUO**
* Faculty of Home Science, Mukogawa Women's
University, Nishinomiya, Hyogo
** Department of Industrial Chemistry, College
of Technology, Seikei University,
Musashino, Tokyo

The inquiry about the utilization of edible oil and the limitation of its use was directed by the questionnaire method. Also the properties of deteriorated oil considered to be unusable and oil in use were determined.

The questionnaire was recovered from 299 homes in Kansai district, 248 homes in Kanto district and 175 mass feeding facilities. As for used oil, 74 samples from homes and 116 samples

from mass feeding facilities were collected. In regard to oils in use, the number of samples collected from home was 74 and from mass feeding facility was 116.

The criteria for changing the oil to new one at mass feeding facilities were in the order of color, number of times used, forming property, condition of fried foods and viscosity. Two or three of these factors mentioned above were taken into account. The home also used the same criteria and one or two of them were taken into account.

The properties of oils in use and also those out of use were measured with a few variables.

Over 90% of used oils were found to be their peroxide values below 10, either those collected from mass feeding facilities or those from homes, nevertheless these were in use or out of use.

Within oils of the same peroxide value, the color varied greatly. Even when the color was dark, its peroxide value was found to be not always high.

There were not many samples which showed high acid value or viscosity.

It should be concluded, from these results, that there is no significant correlation between acid value and color, or viscosity and color.

(Received July 30, 1980)

近年, 日本人の食生活の内容は, 嗜好の変化や諸外国の食材料, 調理法の取り入れもあり多様化された。食生活のパターンの変化のうち, 脂質を多く含む食品の摂取が著しく増加し, 摂取脂質のうち 30% が食用油として摂取されている¹⁾。このような食用油の消費増加により新たな問題が注目されはじめた。

その一つは油脂の酸化および加熱による変化である。油脂の自動酸化および加熱による性状の変化については古くから知られていたが, わが国では 1950 年ごろから, 金田²⁾, 松尾³⁾によって酸化, 加熱による栄養価の低

* 〒663 西宮市池開町 6-46

** 〒180 東京都武蔵野市吉祥寺北町 3-3-1