U.D.C. 545.84 : 537.363 : 577.155.3

147. 萩原武美雄： 沝紙電気泳動法の応用 (第 5 報*)

アミノ酸の酵素的脱炭酸反応生成物の検出

Fumio Hagihara : Application of Paper Micro-ionophoresis. V.
Detection of Enzymatic Decarboxylation Product of Amino Acids.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto**)

It was found that the paper electrophoretic method is useful in the detection of amines formed by the decarboxylation of amino acids. Using *Escherichia coli* No. 1, arginine and its structurally allied compound, canavanine, were decomposed and the products were submitted to electrophoresis. By coloration with the Sakaguchi and nitroprusside reaction, agmatine was detected from arginine, and a new substance, possessing *o*-guanidyl group, with stronger basicity than the parent compound, was obtained from canavanine. Its structure was presumed from the distance of its migration. Decomposition of arginine and canavanine was examined with *Staphylococcus aureus* 209 P, *Lactobacillus* 17-5, and *Streptococcus fecalis* R, and found that the decomposition was effected in all the cases without decarboxylation. The present method was also used in examining the activity of decarboxylase of amino acids with *E. coli* No. 1, and it was found that the decarboxylation was effected with arginine, canavanine, lysine, glutamic acid, histidine, and ornithine, while this bacillus did not have any ability of decarboxylating canarine, tyrosine, tryptophan, phenylalanine, leucine, serine, threonine, aspartic acid, citrulline, diaminobutyric acid, valine, alanine, and DOPA.

(Received December 16, 1955)

生物学的試料について各種の検出反応を試みる場合、予め目的の物質だけを夾雑物から分離する必要にせまられることが多い。この種の要求に際して、特に試料が少量の場合、沝紙電気泳動法を応用して便利なことがしばしばで、これらに関しては数報にわたって既に報告した¹⁾。今回は主としてアミノ酸の酵素的脱炭酸反応生成物の検出に応用した例について報告する。この研究は、アルギニンの代謝拮抗物質カナバニンが *E. coli* No. 1, *E. coli* 7020, *Staph. aureus* 209 P, *Lact. arabinosus* 17-5, *Str. fecalis* R などで分解されるときの機構をしらべたり、*E. coli* における各種アミノ酸の脱炭酸酵素能をしらべる目的で行ったものである。

カナバニン及びアルギニンの脱炭酸反応生成物の検出： 鈴木、村岡²⁾ はさきに *E. coli* No. 1 に対するカナバニンの増殖抑制作用が、培養時間を延長するだけで解かれることを観察し、その後の *E. coli* No. 1 のアセトン乾燥菌での実験で、カナバニンが脱炭酸的に分解されることを認めた。著者はその際の反応生成物を検出するために、カナバニンの分解の際の CO₂ の測定を行つた後の Warburg 検圧計のセルの内容物を遠心分離し、菌体を除いて上澄液を沝紙電気泳動法にかけ、カナバニンより塩基性の強い部分にニトロプルシッド反応陽性の、即ち *o*-guanidyl 基をもつた物質の存在を認めた。この物質は長時間菌体を接触させると更に分解して中性物質へと変化する (Fig. 1)。アルギニンについても上と同じ実験条件で操作して比較した所、Fig. 2 のように全く類似した結果を得た。アルギニンの脱炭酸反応生成物はアグマチンであることは既に知られており、また、アグマチンは更に分解して γ -guanidinobutyric acid となるので³⁾、カナバニンの分解がアルギニンと同様な様式で行われると推定して、カナバニンの分解経路を Fig. 3 のように考えた。なおカナバニンの脱炭酸反応生成物のアミンは当教室の高島⁴⁾ によつてその後ピクレート [mp 212°(decomp)] として結晶状に単離され、元素分析値も (II) 式によく一致した。

* 第4報：本誌 74, 999(1954)。

** Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) 萩原：本誌 74, 486, 488, 490, 999(1954)；鈴木、萩原、高木：本誌 74, 167(1954)。

2) 鈴木、村岡：本誌 74, 540(1954)。

3) 東京大学理学部佐竹氏私信。

4) 鈴木、高島：第 75 回日本薬学会年会 (1955 年 4 月) で発表。

Fig. 1. Ionophoresis of Degradation Products of Canavanine by *E. coli* No. 1

Fig. 2. Ionophoresis of Degradation Products of Arginine by *E. coli* No. 1

E. coli No. 1 acetone powder

Ionophoresis: Veronal buffer; pH 8.6, 600 V, 1 mA/cm., 90 mins.

Fig. 3. Degradation Pathway of Canavanine

微生物のアミノ酸脱炭酸酵素活性の試験とその際生成されるアミンの検出： 上の方法を数種の微生物に応用し、脱炭酸酵素活性を測定しつつ、その際生成するアミンを検出した。従来アミノ酸脱炭酸酵素の検出には一般に Warburg 検圧計を用いて CO_2 の発生を測定しているから、この際のセルの内容物を検体としてアミンを検出してもよいが、生成されるアミンだけを定性的に証明したいときには、小マイヤー試験管の中で脱炭酸酵素を働かせ、この液を検体としてもよく、この方法の方が簡便である。*E. coli* No. 1, *Staph. aureus* 209 P, *Lact. arabinosus* 17-5, *Str. fecalis* R などについてアルギニン及びカナバニンの分解をしらべた結果、*E. coli* No. 1 及び *E. coli* 7020 は先ず脱炭酸による反応を行うが、*Staph. aureus*, *Lact. arabinosus*, *Str. fecalis* では、もとのアミノ酸に対応するアミンは検出されず、脱炭酸を伴わない他の分解経路をもっていることを知った。

***E. coli* No. 1 の各種アミノ酸脱炭酸酵素能：** *E. coli* No. 1 の各種アミノ酸の脱炭酸酵素能をしらべた結果、この菌はリジン、アルギニン、グルタミン酸、ヒスチジン、オルニチンの脱炭酸を行い、著者はこの際リジンからはカダベリンを、アルギニンからはアグマチンを、グルタミン酸からは γ-アミノ酪酸を、ヒスチジンからはヒスタミンを、オルニチンからはブレスシンを、滲紙電気泳動法を応用して検出した。カナリン、チロジン、DOPA、トリプトファン、フェニルアラニン、ロイシン、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、チトルリン、ジアミノ酪酸、パリン及びアラニンに対しては *E. coli* No. 1 は脱炭酸能を示さなかつた。なおアルギニンより C 鎖の数が多いホモアルギニンは、*E. coli* No. 1 で分解され、この際対応するアミンと考えられるスポットを検出することができるが、Gale がリジンの定量に用いた *Bact. cadaveris* 6578 及びアルギニンの定量に用いた *E. coli* 7020 ではホモアルギニンは脱炭酸されなかつた。

終りに臨み終始御指導を賜った京都大学薬学科鈴木友二教授、並びに実験に協力された村岡三郎学士に深謝する。

実 験 の 部

Escherichia coli No. 1 アセトン乾燥菌 カゼイン酸分解物をアミノ酸源, 酵母エキスをビタミン源とする液体培地に 30°, 20 時間培養した *E. coli* No. 1 を集菌後, 2 回水洗, 冷却水中に懸濁. 菌体の懸濁液を, 予め -10° に冷却した約 20 倍量のアセトン中に徐々に加え, 約 5 分間静かに振盪. 沝過後, 少量のアセトン, エーテルで洗い, デシケーター中で減圧乾燥.

検圧計による炭酸ガス発生量の測定 上記アセトン乾燥菌について Gale の条件⁴⁾ にしたがいがアルギニンを分解した結果は, 30 分で 100% の CO₂ を発生したが, カナバニンは同一条件で 76% 分解された. なお何れを基質とした場合も, この時間内では酸素吸収は認められなかった.

カナバニン及びアルギニンの分解産物の検出 *E. coli* No. 1 アセトン乾燥菌 10 mg/cc に基質としてアルギニンまたはカナバニン 250 γ/cc を加え, クエン酸-磷酸ナトリウム緩衝液で pH 5.2 とし, 一定時間毎に反応液をとり出し, 遠心分離して菌体を除いて電気泳動用の試料とした. 各基質の分解はニトロプルシッド・フェリシアンカリ試液を呈色試薬として時間的に追跡した. その結果は Fig. 1, 2 に示す. なお上記の検体についてピリジン, 氷酢酸, ブタノール, 水 (1:1:4:2) 混液を溶媒として一次元ペーパークロマトグラフィーを行つた結果, アルギニン (Rf 0.17) からはアグマチン (Rf 0.29) を生ずることを確認. またカナバニン (Rf 0.19) からの生成物の Rf 値は 0.3 で, ニトロプルシッド反応及びニンヒドリン反応は陽性.

また *E. coli* No. 1 の外, *E. coli* 7020, *Staph. aureus*, *Lact. arabinosus*, *Str. fecalis* についても *E. coli* No. 1 と同様の条件で, アルギニン, カナバニンの分解を検討したが, *E. coli* 7020 を用いた場合には *E. coli* No. 1 と同様に先ず脱炭酸が行われ, アルギニンの場合はアグマチンを, カナバニンの場合はそれに相当するアミンを検出する事が出来た. *Lact. arabinosus*, *Str. fecalis* を作用させた場合には, 沝紙電気泳動でアルギニン, カナバニンを基質とした場合, それぞれアルギニン, カナバニンより塩基性のつよい部分にはスポットは認められず, 原点に近い点にニトロプルシッド, フェリシアンカリ試薬で赤色に呈色するスポットを認めた. *Staph. aureus* をカナバニンに作用させた場合には, 相当するアミンより更に塩基性の強い部分にニトロプルシッド・フェリシアンカリ反応陽性のスポットを認め, 原点に近い点にニンヒドリン反応陽性のスポットを認めた. なお前者はグアニジンの泳動値に相当する泳動値を示すが, 同定するには致つていない.

アミノ酸脱炭酸酵素活性の検出 小マイヤーの中に脱炭酸反応を調べたいと思うアミノ酸を 10⁻⁴ M (dl 型の場合は 1.5×10⁻⁴ M) 入れ, 緩衝液 4 cc に溶かし, これに菌懸濁液 1 cc (乾燥菌量 35 mg) を加え, 30° に調節したフラン器に時々ふり動かしつつ放置. 1 時間, 3 時間, 5 時間, 10 時間後にそれぞれ 1 cc ずつ取出し, 10% トリクロル酢酸 0.3 cc を加えて反応を停止させる. 遠心分離して菌体を除き, 上澄液 0.01~0.02 cc を泳動用試料とし, 沝紙電気泳動は pH 7.2 の磷酸緩衝液 (μ:0.1) を用いて行つた. アルギニン, カナバニンの場合はフェリシアンカリ・ニトロプルシッド試液⁵⁾ で, ヒスチジン, チロジン, DOPA の場合はジアゾ反応⁶⁾ で, チトルリンの場合は *p*-dimethylaminobenzaldehyde 試液で, その他のアミノ酸の場合はニンヒドリン反応⁷⁾ でそれぞれ呈色させ, 基質のアミノ酸に対応するアミンをしらべ, 微生物のアミノ酸脱炭酸能を判定した.

京都大学医学部薬学科

4) E. F. Gale: Biochem. J. (London) 39, 46(1945); Ibid. 41, VII (1947).

5) 牧角: 日化 73, 737(1952).

6) 萩原: 本誌 74, 490(1954).

7) 鈴木, 前川: 本誌 71, 1298(1951).