細菌および肝ミクロゾームのアゾならびにニトロ還元酵素の比較¹⁾

南原精一, 山羽 力

国立衛生試験所²⁾Comparison of Bacterial and Microsomal Azo- and Nitro-Reductases¹⁾

SEIICHI NAMBARA and TSUTOMU YAMAHA

National Institute of Hygienic Sciences²⁾

(Received April 5, 1975)

As a part of studies on the participation of intestinal flora in the metabolism of food additives, some properties of azo- and nitro-reductase systems of intestinal bacteria and liver microsomes were compared. The bacterial reductase was prepared from the lyophilized cells of *E. coli* by ultrasonic disruption. Most of azo- and nitro-reductase activity which required flavin mononucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate was found in the $105000 \times g$ supernatant. The bacterial reductase was much more effective than liver microsomes in the reduction of water-soluble sulfonated azo dyes and *p*-nitrobenzoic acid. However, fat-soluble azo dyes, such as Oil Yellow AB and OB, were not reduced by either of the enzyme systems. Some difference in the substrate specificity for azo dyes, was observed between the two enzyme systems and there was a remarkable difference in the inhibitory effect by CO, KCN, O₂, and chelating agents.

アゾ色素および芳香族ニトロ化合物は生体内において主として肝ミクロゾームの酵素系によって、対応するアミンにまで還元される。一方経口的に投与されたこれら化合物は一部腸内細菌によって還元されることが知られている。われわれは食品添加物の代謝における腸内細菌の関与を明らかにする研究の一環として、細菌および肝ミクロゾームのこれら還元酵素系の性状を比較検討することを試みた。

実験材料および方法

動物 体重 380—450 g の Hartley 系雄性モルモットを用いた。

細菌 *E. coli* B ATCC.11303 の凍結乾燥菌体 (Miles 社) を用いた。

基質 サンセットイエロー, ニューコクシン, オレンジ I, タートラジン, オイルイエロー AB, オイルイエロー OB は国立衛生試験所標準品を, 4-ジメチルアミノアゾベンゼン (DAB) は関東化学, パラニトロ安息香酸 (PNBA) は東京化成の特級品を使用した。

肝ミクロゾームの調製 モルモットを断頭後直ちに肝臓を取り出し、氷水で冷却しながらテフロンホモジナイザーで4倍量の $5 \times 10^{-4}M$ EDTA を含む 1.15% 塩化カリ溶液とともにホモジナイズし、 $10000 \times g$, 20 分間遠心し、上清をさらに $105000 \times g$, 60 分間遠心した。ここに得られたミクロゾーム分画を 1.15% 塩化カリ溶液に再懸濁し $105000 \times g$, 60 分間遠心し、分離したミクロゾーム分画を、肝湿重量 1 g 当り 1 ml の 1.15% 塩化カリ溶液の懸濁液とした。

***E. coli* B Cell-free Extract の調製** *E. coli* B の凍結乾燥菌体を乳鉢にとり、細かい粉末にしてから、0.225% NaCl-0.03% MgCl₂·6H₂O を加え、ガラスホモジナイザーで均一な懸濁液 (50 mg/ml) とし、-20° で一夜凍結し、融解後 20KC の超音波を 20 分間かけ、得られた細胞破碎液を $20000 \times g$ で 15 分間遠心する。この上清をさらに $105000 \times g$ で 60 分間遠心し、ここに得られた上清を、0.225% NaCl-0.03% MgCl₂·6H₂O を透析外液として氷室中で 12 時間透析し、この透析標品を cell-free extract とした。

還元成績体アミンの定量 Bratton-Marshall 法³⁾ を準用した。

還元活性の測定 細菌酵素系および肝ミクロゾーム酵素による反応組成と反応条件を Fig. 1. に示す。それぞれ一定時間インキュベート後、反応液の一定量を分取し、これと同量の 6% トリクロル酢酸を加えて反

1) 日本薬学会第 94 年会で発表, 仙台, 1974 年 4 月。

2) Location: 18-1 Kamiyoga 1-Chome, Setagaya-ku, Tokyo, 158, Japan.

3) A.C. Bratton, E.K. Marshall, *J. Biol. Chem.*, **128**, 537 (1939).

Reaction mixture:			
"Bacterial"		"Microsomal"	
Substrate	2 μ moles	Substrate	2 μ moles
MgCl ₂	1.4 μ moles	NADP	0.5 μ moles
NADP	425 μ moles	Nicotinamide	50 μ moles
FMN	75 μ moles	EDTA	2.5 μ moles
G-6-P	66 μ moles	G-6-P	66 μ moles
G-6-PD	2.1 units	G-6-PD	2.1 units
0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4)	1 ml	0.25 M Phosphate buffer (pH 7.6)	1 ml
Cell-free extract	1 ml	Microsomes susp.	1 ml

Total volume 5 ml, 37°, in N₂ with shaking
(20 min) (2 hr)

Determination of amine concentration produced: Bratton-Marshall method

Fig. 1. Enzyme Assays

応を停止させ、遠心して除蛋白した上清につき還元成績体アミンを定量して求めた。

実験結果

1. *E. coli* B Cell-Free Extract によるアゾおよびニトロ還元酵素系の Cofactor 要求性

ニューコクシンおよびパラニトロ安息香酸を基質とし、Fig. 1. の反応系から flavin mononucleotide (FMN), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), G-6-P, G-6-P dehydrogenase (G-6-PD) をそれぞれ一つずつ除いたものにつき還元活性を調べた結果を Table I に示す。

これによると *E. coli* B cell-free extract におけるアゾおよびニトロ還元酵素系にとって FMN, NADPH (NADP, G-6-P, G-6-PD) が必要であることを示している。

2. 細菌およびモルモット肝ミクロゾームによるアゾおよびニトロ還元酵素系の NADPH および NADH 依存性

Fouts ら⁴⁾ は各種哺乳動物組織によるパラニトロ安息香酸の *in vitro* におけるアミノ体への還元について検討し、各種臓器中、肝ミクロゾーム分画に最高活性を見だし、水素供与体として NADPH または NADH が有効であるが、nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) は NADPH の 1/4 の活性しかないことを見出した。またニトロ基と同じくアゾ基を一級アミンに還元する酵素系は、哺乳動物においては主として肝臓に存在し、NADPH を水素供与体とするフラビン酵素を介する反応と考えられている。⁵⁾ 一方細菌酵素系では *Streptococcus faecalis* の cell-free extract によるアゾの還元で、NADPH より NADH の方が活性が高いという報告がある。⁶⁾

そこで、上記の方法で得た *E. coli* B の cell-free extract とモルモット肝ミクロゾームによるアゾおよびニトロ還元の NADPH または NADH 依存性を調べた。両者のいずれによっても還元反応は進行するが、NADH に比べて NADPH の方が高い活性を示した (Table II)。

3. 細菌および肝ミクロゾーム酵素系の基質特異性

Chart 1 に示すように、水溶性アゾ色素のうちアゾ基の両側の芳香環にスルホン酸基をもつもの (サンセットイエロー, ニューコクシン), 片側のみにスルホン酸基をもつもの (オレンジ I), ピラゾール環を介してスルホン化した芳香環が結合しているもの (タートラジン) と、脂溶性アゾ色素 3 種 (オイルイエロー AB, オイルイエロー OB, DAB) を選び、これらアゾ色素類とパラニトロ安息香酸に対する基質特異性を検討したところ Table III のような結果を得た。

すなわち細菌およびモルモット肝ミクロゾームの両酵素系においてオレンジ I は最も還元されやすい基質であった。それぞれこの還元値を基準とした相対活性で比較してみると、ニューコクシン, DAB, パラニトロ安息

4) J.R. Fouts, B.B. Brodie, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **119**, 197 (1957).

5) J.R. Fouts, J.J. Kamm, B.B. Brodie, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **120**, 291 (1958).

6) R.R. Schelin, R.T. Nygaard, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **8**, 55 (1970).

TABLE I. Requirements of Bacterial Azo and Nitro Reductases

Cofactors	Azo reductase ^{a)}		Nitro reductase ^{b)}	
	Amine formed (μmoles)	Relative activity	Amine formed (μmoles)	Relative activity
Complete system	0.63	100.0	0.73	100.0
Complete system (nondialyzed)	0.79	124.8	—	—
—FMN	0.04	6.5	0.15	20.5
—NADP	0.03	5.0	0.11	15.1
—G-6-P	0.02	2.5	0	0
—G-6-PD	0.48	48.1	0.37	50.7

^{a)} new coccine^{b)} PNBA

TABLE II. Difference in Dependency of Azo and Nitro Reductases on HNADP and NADH

Reductases	Enzyme sources	Amine formed (μmoles)		NADH/NADPH
		NADPH	NADH	
Azo ^{a)}	bacteria	0.81	0.41	0.51
	microsomes	0.79	0.19	0.24
Nitro ^{b)}	bacteria	0.80	0.21	0.26
	microsomes	0.43	0.14	0.33

^{a)} new coccine^{b)} PNBA

Chart 1

香酸は、細菌およびマイクロゾームの両酵素系に対して平行的な相対活性を示した。一方、サンセットイエローおよびタートラジン、細菌では比較的高い相対活性をもつが、マイクロゾームでは逆に低い値を示し、還元活性に顕著な相異を認めた。オイルイエロー AB および OB は細菌および肝マイクロゾームで還元が認められなかった。

TABLE III. Comparison of Substrate Specificity of Bacterial and Microsomal Reductases

Substrate	Bacteria		Microsome	
	Specific activity ^{a)}	Relative activity	Specific activity ^{a)}	Relative activity
Orange I	1055.6	100.0	12.8	100.0
Sunset Yellow	1088.9	103.2	3.1	24.2
Tartrazine	722.2	73.2	2.0	15.6
New Coccine	400.0	37.9	5.1	39.8
DAB	122.2	11.6	1.3	10.2
Oil Yellow AB	0	0	0	0
Oil Yellow OB	0	0	0	0
<i>p</i> -Nitrobenzoic acid	422.2	40.0	4.4	34.4

^{a)} nmoles amine formed/mg protein/20 min

TABLE IV. Effects of Various Inhibitors on Bacterial and Microsomal Reductases

Inhibitors	Concentrations (M)	Inhibition (%)			
		Microsomal		Bacterial	
		Azo ^{a)}	Nitro ^{b)}	Azo ^{a)}	Nitro ^{b)}
Quinacrine	3 × 10 ⁻⁴	57.1	100.0	83.3	60.6
	3 × 10 ⁻⁶	—	56.2	—	—
SKF 525A	1 × 10 ⁻³	7.1	5.1	12.5	33.1
KCN	2 × 10 ⁻³	42.8	100.0	-12.5 ^{c)}	84.8
	2 × 10 ⁻⁵	—	62.8	—	—
CO		85.7	87.4	25.0	75.8
Air		73.8	100.0	41.7	75.8
8-Hydroxyquinoline	2 × 10 ⁻³	69.7	50.0	97.9	100.0
<i>o</i> -Phenanthroline	2 × 10 ⁻³	4.5	0	41.6	63.5
Diethyldithiocarbamate	2 × 10 ⁻³	24.2	38.9	37.7	83.4
Sodium azide	2 × 10 ⁻³	15.2	19.4	35.1	19.8

^{a)} new coccine^{b)} PNBA^{c)} stimulation

なお、細菌および肝ミクロゾームの還元活性を比活性値 (nmoles amine formed/mg protein/20 min) で比較すると、オレンジ I, ニューコクシン, DAB, パラニトロ安息香酸に対しては、細菌酵素系はミクロゾームの約 90 倍、サンセットイエロー, タートラジンでは約 370 倍という高い活性を示した。

4. 細菌および肝ミクロゾーム酵素系に対する各種阻害剤の影響

各種阻害剤による影響を検討した結果、Table IV に示すように、フラビン阻害剤であるキナクリンは、細菌およびモルモット肝ミクロゾームのアゾおよびニトロ還元に対しかなり強い阻害を示した。多くの薬物代謝反応を阻害する非特異的阻害剤である SKF 525A は、細菌では比較的軽度の阻害を示したが、ミクロゾームではほとんど阻害がなかった。ミクロゾーム酵素系によるアゾおよびニトロ還元は、細菌による還元比べ KCN, CO, air により大きく阻害された。KCN による阻害は細菌およびミクロゾームの両者ともアゾよりニトロの還元系に対し強い阻害がみられ、細菌のアゾ還元ではむしろいくらかの促進効果がみられた。キレート剤に対しては細菌酵素系の方が強く阻害されている。

以上のように顆粒結合性酵素と可溶性細菌酵素系では、阻害剤に対してかなり明らかな相違が観察された。

考 察 お よ び 結 論

肝ミクロゾームで芳香族アゾ基やニトロ基が還元される経路には, cytochrome P-450 が関与する CO 感受性で可溶化によって失活する経路, および NADPH-cytochrome c reductase が関与する CO 非感受性で可溶化する経路が知られている.^{7,8)} また cytochrome P-450, NADPH-cytochrome c reductase と異なる 3-methyl-cholanthrene (3-MC) 誘導性のアゾ還元経路の存在が示唆されている.⁹⁾

われわれは *E. coli* B の凍結乾燥菌体を用い cell-free の酵素を抽出し, 乾燥菌体のアゾおよびニトロの還元酵素活性が $105000 \times g$ 上清分画に局在することを確認したが, $105000 \times g$ pellet にはこれら還元活性は認められなかった.

本実験に使用したモルモット肝ミクロゾームの cytochrome P-450 の含量を, Omura と Sato の方法¹⁰⁾ に従い CO 結合差スペクトルを測定して定量したところ, $0.96 \mu\text{mole/mg protein}$ であった.

細菌のアゾおよびニトロ還元酵素系より肝ミクロゾームの酵素系の方が CO により強い阻害を受けているが, これはよく知られているように, 還元における P-450 経路の阻害のためであろう. 細菌の酵素系も CO 阻害を受けているが, この原因は不明である.

細菌の還元酵素系も肝ミクロゾームにおけるものと同様に NADPH 依存性であることがわかったが, 因にこの cell-free extract は肝ミクロゾームと違って, 差スペクトル測定¹⁰⁾ からは cytochrome P-450 および cytochrome b_5 の存在は認め得なかった. 末端酸化酵素としてフラビン酵素により呼吸を行なう機構をもつ細菌では, この呼吸経路がアゾおよびニトロ化合物の還元反応に関与していることが予想される. フラビン阻害剤であるキナクリンにより, 細菌および肝ミクロゾーム酵素系の両方に対し強い阻害がみられたが, これは両酵素系におけるフラビンタンパクの介在を示している. また多くの通性嫌気性菌は酸素のある場合には呼吸を行なえる菌であるが, 酸素のない場合でも水素受容体によって硝酸呼吸あるいは発酵を行なえる代謝機能を具えている. *Str. haemolyticus* の cell-free extract により, nitrate とクロロマイセチンの還元を同一の条件で比較検討し, 同じ酵素により還元がなされていることを示唆した報告¹¹⁾ もある.

ミクロゾームの酵素系に比べて細菌酵素系でのアゾおよびニトロの還元は, はるかに高い活性を示し, 腸管内の嫌気的環境下に生息する腸内細菌の生理的意義は極めて大きいと考える. また細菌酵素系におけるアゾおよびニトロの還元は, 阻害剤に対しかなりの相違を示しているので別個の酵素であることも予想されるが, これら酵素の性質を闡明するためにはさらに酵素の分別精製を進める必要があろう.

7) J.R. Gillette, *Advan. Pharmacol.*, **4**, 219 (1966).

8) P.H. Hernandez, P. Mazel, J.R. Gillette, *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 1859 (1967).

9) P.H. Hernandez, P. Mazel, J.R. Gillette, *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 887 (1967).

10) T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2307 (1964).

11) F. Egami, M. Ebata, R. Sato, *Nature*, **167**, 118 (1951).