

広瀬一雄, 小瀬洋喜: キノン系化合物の抗菌性作用機序に関する研究 (第6報)\*

酵素に対するキノンの影響 (その1) 脱水素酵素に対する影響

Kazuo Hirase and Yōki Ose: Studies on the Mechanism of Antibacterial Action by Quinones VI. Effects on Enzymes 1. Effects on Dehydrogenase.

For the purpose of studying on the mechanism of antibacterial activity by quinones, we examined the effects on dehydrogenase. We have found a close relationship between antibacterial activity and interference against dehydrogenase by quinones. These results are shown in Tables 1~3

1. 緒 言

キノンが抗菌作用を示すのはこれがアミノ酸とかSH化合物と結合して細菌の発育に必要な何等かの物質を不活性化するのであろうとの考えは広く行われ、この結合によつて酵素がその活性に影響を受けるであろうとの予想の下に各種の酵素に対する影響が試験された。そしてカタラーゼ<sup>1)~4)</sup>、ウレアーゼ<sup>4)~6)</sup>、<sup>7)</sup> パパイン、酵母のプロテイナーゼ<sup>8)</sup> およびカルボキシラーゼ<sup>9)</sup>、ヒアルロニダーゼ<sup>10)</sup>などが各種のキノンによつて阻害されることが報告されたが、一方グルコオキシダーゼ<sup>11)</sup>、<sup>12)</sup> hypertensinase の作用を賦活し、またデスオキシリボヌクレアーゼ<sup>13)</sup>のようベンゾキノン類によつては活性化されるのにナフトキノン類では阻害されるものや、<sup>14)</sup> フツ化フチオコールのように酵母醗酵にもフォスファターゼにも作用を示さぬものもあることが報告おれた。O. Hoffmann-Ostenhof<sup>3)~7), 15)</sup>は強い抗菌力を有するキノンがウレアーゼ、カタラーゼ、パパインに対しては弱い酵素抑制力しか示さず、逆に弱い抗菌力のものに強い酵素抑制力が認められたことから抗菌力と酵素抑制作用との間には関係はあるまいと述べている。しかしこれらの結果はキノンの酵素抑制力と抗菌力との関係を直ちに否定するものではな

\*) 第5報: 本誌 5, 24 (1955).

- 1) O. Hoffman-Ostenhof, L. Bertalanffy, O. Schreier: *Monatsh.* **79**, 61 (1948); *C. A.* **44**, 2159 (1950).
- 2) A. I. Alekseer, K. I. Rusinova: *Bull. inst. recherches biol. sta. biol Univ. Perm.*, **6**, 425 (1929); *C. A.* **24**, 5772 (1930).
- 3) O. Hoffmann-Ostenhof, W. H. Lee: *Monatsh* **76**.180, 319(1946); *C. A.* **41**. 5172, 6923(1947).
- 4) O. Hoffmann-Ostenhof, E. Biach: *ibid* **78**, 273 (1948); *C. A.* **43**, 8413 (1948).
- 5) W. M. Grant, V. E. Kinsey: *J. Biol. Chem.*, **165**, 485 (1946); *C. A.* **41**, 1720 (1947).
- 6) W. H. Schopfer, E. C. Grob: *Helv. chim. Acta.* **32**, 829 (1949).
- 7) O. Hoffmann-Ostenhof, E. Bsach: *Experimentia* **2**, 405 (1946); *C. A.* **41**, 3495 (1947).
- 8) A. V. Blagoueshchenskii, J.A. Sorokina: *Bull. biol. med. exptl. U.S.S.R.* **4**, 176 (1937); *C. A.* **33**, 6358 (1939).
- 9) R. Kuhn, H. Beinert.: *Chem. Ber.* **80**, 101 (1947).
- 10) S. Rosemann, A. Dorfmann: *J. Biol. Chem.* **199**, 345 (1952).
- 11) I. W. Flanke, F. Lorenz: *Ann.* **532**, 1 (1937).
- 12) H. Croxatto, H. Gutiérrez: *Rev. med. y. alimentación.* **6**, 68 (1943~44); *C. A.* **38**, 5009 (1944).
- 13) O. Hoffmann-Ostenhof, W.F. Niggemeyer: *Monatsh.* **83**, 1175 (1952). *C. A.* **47**, 4956 (1953).
- 14) O. Fisher et al: *Arch. exptle. Path. Pharmak.* **206**, 83 (1949); *C. A.* **43**, 6253 (1949).

い。このことは Ostenhof 自身も認めているところで<sup>15)</sup>、キノンは細菌の呼吸酵素を阻害して必要な細胞成分の合成を阻害するのであろうと推測している。Wendel<sup>16)</sup> は典型的な ヒドロキシアリキルナフトキノンは炭水化物代謝を阻害し、有機体中に乳酸の蓄積を行つて呼吸系を阻害することを述べ、O. Meyerhof<sup>17)</sup> は *Trypanosoma equiperdum* の呼吸、糖分解、運動性が好氣的にも嫌氣的にもキノンによつて阻害おれるのはヘキソキナーゼおよびフオスフォヘキソキナーゼが阻害を受けるからであるとしている。R. Khhn<sup>9)</sup> 等は酵母カルボキシラーゼに対する阻害を、上原等<sup>18)</sup> はグルコン酸-6-リン酸に対する阻害をそれぞれ CO<sub>2</sub> 発生阻害値から求めて化学構造との関係についても考察を行つている。Fieser 等<sup>19)</sup> はナフトキノンの呼吸抑制作用の測定にたつて *Plasmodium* に有効な物質を探求することができることを述べ、Foote 等<sup>20)</sup> も *Molinia fructicola* の芽生抑制とカルボキシラーゼ阻害との関係が密接なことを認めてカルボキシラーゼ阻害値から有効物質をさがすのがよいとしている。脱水素酵素についても乳酸<sup>21)</sup>、ピルビン酸<sup>22)</sup>、クエン酸<sup>22)</sup>、コハク酸<sup>22)</sup>、ブドー糖<sup>10)</sup> がそれぞれ阻害されることが認められているが、抗菌作用との関連は明らかでない。

筆者はキノンの代謝酵素系に及ぼす影響を調べるために、筆者等が先に福神漬から分離した食用色素の変色細菌<sup>23)</sup>のうちで強力なブドー糖脱水素酵素、エタノール脱水素酵素を有するB株<sup>24)</sup> (分類学的位置は未確定)を用いて脱水素酵素に対する影響と抗菌力との関係を試験した。

試験に供した化合物は次の6種である。

(1) ベンゾキノン, (2) 2-メチルベンゾキノン, (3) 2-チオメチルベンゾキノン, (4) 2-チオブチルベンゾキノン, (5) 2-フェニルベンゾキノン, (6) 1, 4-ナフトキノン。

これら6種の化合物のB株に対する発育阻止最低濃度およびB株を平面培養後集菌洗滌したホモゲネートに存在するブドー糖脱水素酵素およびエタノール脱水素酵素に対する阻害度を求めたところ両者の間には極めて密接な関係が存在することが認められた。従つて抗菌作用機序の一部に脱水素酵素が与かるのでいなかとの推論はかなり有力に下し得るものと考えられる。

## 2. 実験方法および実験材料

### (1) 抗菌力試験

既報<sup>25)</sup>の方法によつて行つた。用いた菌は福神漬から分離した変色細菌B株<sup>23)</sup>で、試験に際してはブイヨン中で3回継代培養を繰返して行つた。

### (2) 粗酵素液 (菌懸濁液) の作成

菌を普通寒天培地に24時間37°Cに培養し、集菌後緩衝液で5回遠心沈澱を繰返しながら洗滌し、ポッター

15) O. Hoffmann Ostenhof: *Science*, **105**, 549 (1947).

16) Wendel: *Federation Proc.*, **5**, 406 (1946).

17) O. Meyerhof, L. O. Randatt: *Arch. Biochem.*, **17**, 171 (1948); *C. A.*, **42**, 7799 (1948).

18) 上原, 村松, 蒔田: 酵素化学シンポジウム **9**, 69 (1954).

19) L. F. Fieser et al: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3151 (1948).

20) M. W. Foote, J. E. Little, J. J. Sproston: *J. Biol. Chem.*, **181**, 481 (1949).

21) 北村: 抗酸病研 **6**, 191 (1950.)

22) A. Herz: *Biochem. Z.*, **325**, 83 (1954).

23) 広瀬, 小瀬, 北村, 山中: 本誌, **5**, 26 (1955).

24) 宮道, 小瀬: 本誌 **6**, 31 (1956).

25) 赤木, 広瀬, 渡辺, 小瀬: 本誌 **4**, 35 (1954)

のホモゲナイザーで均一液とする。これは使用に当つて作成する。

(3) 脱水素酵素の阻害度試験

ツンベルグ管を用いて常法<sup>26)</sup>に従つて行つた。

3. 実験成績

(1) 抗菌力試験

各化合物の最低発育阻止濃度を Table 1. に示す。

Table 1. Antibacterial Activity by Quinones to B-Stam<sup>23)</sup>

Compounds	Benzoquinone	2-Methylbenzoquinone	2-Thiomethylbenzoquinone	2-Thiobutylbenzoquinone	2-Phenylbenzoquinone	1,4-Naphthoquinone
M.I.D $\times 10^{-3}$	5	10	40	20	10	40

(2) 脱水素酵素の阻害度

ブドウ糖脱水素酵素に対する阻害度を Table 2. に、エタノール脱水素酵素に対する阻害度を Table 3. に示す。

Table 2. Interference against Glucose-dehydrogenase by Quinones.

No.	1	2	3	4	5	6	7
Bacteria Suspension 9.8mg/cc 1cc	○	○	○	○	○	○	○
M/10 Glucose 1cc	○	○	○	○	○	○	○
pH7.0 Buffer(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - NaOH) 2cc	○	○	○	○	○	○	○
Aq. Dest. 1 : 10,000 Mb 0.2cc	0.5cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○
10 <sup>-5</sup> mol Quinone 0.2cc	none	Benzo- quinone	2-Methyl- benzo- quinone	2-Thio- methyl- benzo- quinone	2-Thio- butyl- benzo- quinone	2-Phenyl- benzo- quinone	1, 4- Naphtho- quinone
Discoloring time (min)	2.10	3.30	5.10	20.30	9.40	5.20	22.30

Table 3. Interference against Ethanol-dehydrogenase by Quinones.

No.	1	2	3	4	5	6	7
Bacteria suspension 9.8mg/cc 1cc	○	○	○	○	○	○	○
M/10 Ethanol 1cc	○	○	○	○	○	○	○
pH7.0 Buffer(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - NaOH) 2cc	○	○	○	○	○	○	○
Aq. Dest. 1 : 10,000 Mb 0.2cc	0.5cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○	0.3cc ○
10 <sup>-5</sup> mol Quinone 0.2cc	none	benzo- quinone	2-Methyl- benzo- quinone	2-Thio- methyl- benzo- quinone	2-Thio- butyl- benzo- quinone	2-Phenyl- benzo- quinone	1, 4- Naphtho- quinone
Discoloring time (min)	3.30	5.40	8.30	23.40	13.50	8.20	23.10

26) 赤堀四郎編 “酵素研究法 I” 606 (朝倉書店) (1955).

#### 4. 総括

キノンの抗菌性作用機序に関する研究の一環として酵素に対する影響を検討するために、先ず脱水素酵素に対する影響を検討した。その結果キノン抗菌力と脱水素酵素に対する阻害度との間には極めて密接な関連にあることを認めた。従つて、キノンの抗菌性作用機序の一部として脱水素酵素の阻害があるのではないかと考えられる。

本研究に対し終始御鞭撻を賜つた学長宮道悦男博士に深謝申上げる。

### 石黒伊三雄, 加藤好夫, 杉浦 衛: ビタミンB<sub>2</sub>の光分解機構とその安定性に関する検討

#### Isao Ishiguro, Yoshio Katō and Mamoru Sugiura: Studies on the Mechanism of Riboflavin Photolysis and its Stability

It is well-known that riboflavin is converted into lumiflavin by the irradiation in alkaline solution. We have found that 6,7-dimethyl-2-keto-1-D-ribityl-3-quinoline carboxylic acid and its related compounds were not photolysed in this condition. The results obtained by our studies suggest that the important radicals for the formation of lumiflavin are to be found in 2' carbon of side chain and nitrogen double bond in the isoalloxazin ring of riboflavin.

The photolysis of the riboflavin was hindered by phenol, hydroquinone, phloroglucin and thiourea.

ビタミン B<sub>2</sub> は光に対して極めて鋭敏でアルカリ性では Lumiflavin (Lf), 酸性では Lumichrome (Lm) を生ずるが、このような光分解産物はその生成が単一反応によるのではなく、複雑な数種の反応過程を経て生成するもので、これに関していろいろと光分解機構が推察されている。

B<sub>2</sub> の光に対する安定性は液性その他種々の条件によつて相異し、その光化学反応と安定性に関する研究は製剤上の見地からも光分解機構の解明の上からも重要で、実に多数の研究報告<sup>1)~7)</sup>がみられる。さて曝光時の B<sub>2</sub> が光分解を受けにくい条件としては還元型 B<sub>2</sub> である Leucoflavin の場合、<sup>2,8)</sup>側鎖の水酸基がアセチル化された場合<sup>4)</sup>、および光分解条件が嫌気性の場合等が<sup>3,9)</sup>挙げられ、これらは光に対して極めて安定で、光分解を受けにくいことが知られている。

一方光分解における B<sub>2</sub> の側鎖部分の生成物については Brudicka<sup>7)</sup> がホルムアルデヒドをポーラログラム上に

1) M. Halwer: J. Am. Chem. Sci, **73**, 4870 (1951).

2) 清水: ビタミン, **6**, 688, 757, 761 (1953).

3) 和田, 桜井: 栄養と食糧, **5**, 44, 97, 208 (1953).

4) R. Kuhn, H. Rudy, T. Wagner-Jauregy.: Ber., **66**, 1950 (1933).

5) R. Kuhn, F. Bär.: Ber., **67**, 898 (1934).

6) P. Karrer, H. Salomon, K. Schöpp, E. Schitter.: Helv. Chem. Acta, **17**, 1165 (1934).

7) R. Brudicka.: Coll. Czechoslov. Chem. Comun.: **14**, 130 (1947).

8) C. M. O'Malley, C. W. Sievevt.: Ind. Eng. Chem, **34**, 1117 (1942).

9) H. Theorell.: Biochem. Z, **279**, 186 (1935).