

PAS の 制 菌 機 作

名古屋大学医学部生化学教室 (主任 堀田一雄)
国立大府荘研究室 (荘長 勝沼六郎)

勝 沼 信 彦

(昭和 29 年 7 月 16 日受付)

Bernheim¹⁾は p-Aminobenzoic acid (PABA) 添加により結核菌の呼吸が促進されることを明らかにした。Lehman²⁾等は PABA のこの作用への拮抗という考えから、PABA 類似化合物を多く合成し、各化合物に就き直接制菌力を検定し、PAS が最も制菌力あり、しかも毒性少なき化合物である事を知った。このようにして抗結核菌剤としての PAS は誕生したのである。

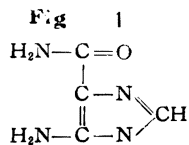
然しその後、確かに制菌力のある PAS が、その作用機作として、呼吸において PABA と拮抗するや否やを多くの研究者が実験したが、制菌濃度附近では皆否定的結果しか得られなかつた。恩師山村は芳香族化合物核開裂酵素に関し、広汎な研究³⁾を行い、その中で PAS は制菌濃度域においては全然呼吸阻害なく、又呼吸において PABA と拮抗もしない事を明らかにしている。私は PAS 作用下に蓄積する特有な中間化合物を追跡して、PAS は核酸 Purine の Purine 環完成を 4-amino 5-imidazoicarboxamide の所で阻止する事を明らかにし得た。しかもその作用点は Purine 環閉鎖の助酵素である葉酸系化合物の生合成を阻止するによる事を証明し得た。この阻害機作を利用し今日まで全く不明であつた葉酸の生合成経路を決定し、同時に結核菌の核酸生合成に関し、かなりの新知見を得たので報告する。この一部は第 29 回日本結核病学会総会にて報告した。

1 PAS 阻害培地中の中間産物の捕捉

A) 実験材料及び実験法：

鳥型結核菌調株を 0.5 mg/cc の割合に PAS-Na 塩を含有する Glucose-pyruvate 培地 (G. P. 培地と称し次の組成を有する。Na₂HPO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 2.0 g, Mg-Sulfate 0.5 g, Glutamic acid 2.5 g, Glucose 2.5 g, Pyruvate 2.5 cc を 1 l の水に溶解、アンモニア水で pH 7.4 とする) に培養し、3~5 日の Young culture の中に濾液を 100 cc 取り、5 cc 程に凍結乾燥し濃縮する。これを 0.01 cc 再蒸留した 80% n-propanol を展開剤とし濾紙クロマトグラムを行なう。この濾紙につき次の諸反応を行ない物質の確認決定を行なう。

ここに出現する特有な化合物は Fig 1 の Fox and Stetten⁸⁾により 1945 年初めて決定された AICA 系化合物である。



4-amino 5-imidazol
Carboxamide
(AICA)

B) 実験結果

(1) Non acetylatable Diazo 反応：

Table 1 の如く、Rf 0.40 と 0.57 のみが陽性である。AICA の遊離アミノ基は無水醋酸処理でアセチル化されない為、この前処理後 Diazo 反応を行なえば、PAS 等のアミノ基と特異的に区別出き、簡単に AICA を特異的に定量可能である。方法は Moacety's Diazo 反応の Sevag⁴⁾変法を使用した。

(2) Mineral light：

260~270 mμ の紫外線のみを出す科研製フィルターを使用した。これで PAS は 0.26 に蛍光スポットを示すが、AICA 系化合物は 0.40, 0.57 に吸収スポットを示す。これは AICA 系化合物における Greenberg⁵⁾記載と一致する。

(3) Hg 塩反応：

昇昇-エオジン法⁶⁾により AICA 系、Purine 系化合物は紫色スポットになる。又硝酸第二 Hg-硫化アンモン法⁷⁾も使用出来る。

Table 1

Rf 値	ジレノ アイン ゾタフ 反ブセ ルチ 応	ミネ ラ ライ ルト	Hg 塩 反 応	ス吸 べ取 ク トル	オ 塩 酸 シ ン 応	磷酸 の 反 応
0.26 (PAS)	—	螢 光	+	PAS と 同一	—	—
0.40	+	吸 収	+	AICA 形 max. 267 mμ	+	—
0.57	+	吸 収	+	AICA 形 max. 267 mμ	—	—

(4) 吸収スペクトル：

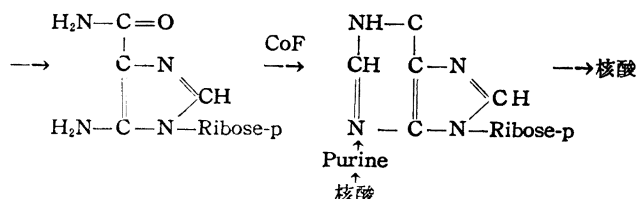
Mineral light で見て吸収の存在する部分を切除溶出し、Beckman type Spectrophotometer で Spector を取ると、Fox 等及び Greenberg⁵⁾文献記載の AICA と Max, 267 mμ で全く一致する。0.40, 0.57 の二つは同形。

(5) Orcin HCl 反応：

0.40 のみ陽性なので、これは Riboside であらう。

従つて 0.57 は AICA free base, 0.40 は AICA Riboside。以上の結果及び後述する Purine 化合物で PAS の制菌作用が無効化する事から考えて, PAS は Purine の生合成を AICA 系化合物に One carbone を導入して閉環する所で阻止するものと推定出来る。

Fig 2



2 各種 Purine による拮抗

PAS が Purine 閉環を阻止するのならば, 完成した Purine 化合物を与えれば PAS の作用は無効になる筈である。又如何なる Purine が核酸 Purine として利用可能であるかを結核菌に関して知る事が出来る。

A) 実験方法

PAS-Na 塩を Sauton 培地に倍数希釈したものに, 一定菌量浮游液 (鳥型菌調株) を作り, 一白金耳ずつ接種 3 日~5 日培養で判定する, 接種菌量より明らかに増加したものを (+), 薄菌膜を作つたものを (±), の判定法を使用した。

各種 Purine 化合物は各管に同一濃度を添加してある。

B) 実験結果

Table 2

PAS $\times 10^{-2}$ Mol	16	8	4	2	1	0.5	0
None	—	—	—	—	+	±	±
Adenine (500 γ /cc)	—	—	+	±	±	±	±
Guanosine (〃)	—	—	±	±	±	±	±
Hypoxanthin (〃)	—	—	+	±	±	±	±
Xanthin (〃)	—	—	—	—	±	±	±
Uric acid (〃)	—	—	—	—	+	±	±
RNA (〃)	—	±	±	±	±	±	±

明らかに或種 Purine により PAS は拮抗可能である。従つてこれからも Purine 迄の生合成を阻害する事を知り得る。Adenine, Guanine, Hypoxanthine は拮抗可能である所から, これ等 3 種の Purine は核酸生合成に利用可能な Purine であるが, Xanthin, Uric acid は利用不可能な Purine である事を知る。RNA (from yeast) は効果がよいが, これは当然である。

3 Purine 閉環酵素との関係

E. Coli 対 Suffon amide において, Citrovorum factor と称する葉酸の Formyl 誘導体が AICA に one carbone を入れる時の助酵素である事が最近明らかになりつつある。PAS とこの Coenzym F との関係は調

べるべく, 葉酸およびこの生合成の中間体と思考可能な化合物を得て, これらにつき PAS との拮抗の存否及び拮抗態度を詳細に実験した。実験法は前節(2)に同じ。実験結果:

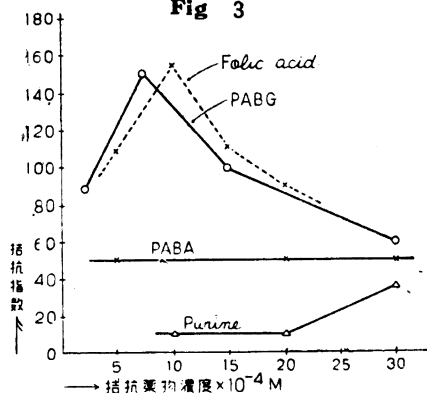
拮抗能力を定量的に表現する為に, 次の如き, 拮抗指数により示す事とした。各種濃度の拮抗薬物で拮抗可能な最高濃度の PAS 濃度を定め次の計算によつた。

$$\text{拮抗指数} = \frac{\text{拮抗し得る PAS Mol 数}}{\text{拮抗薬物 Mol 数}}$$

すなわち拮抗薬物 1 Mol で何 Mol の PAS に拮抗可能であるかを示す値である。

Fig 3 の如く, Folic acid, p-Aminobenzoyl-Glutamic acid (PABG) が最強で次に PABA で, Pteric acid は全然効果がない。

Fig 3



Folic acid と PABG とは拮抗能率が最強で, しかも $5 \times 10^{-4} \sim 10 \times 10^{-4}$ Mol に拮抗能の最も良い山を有する。重要な事は, Folic acid, PABG 共に同一の拮抗様式を有し, しかも PABA よりもはるかに拮抗能率の良い事である。これは, PAS は PABG から Folic acid 迄の生合成には何ら影響を有していない事を意味し, しかも, Folic acid の生合成経路は PABG 経由である事を知り得る。PABA が横軸に平行なる事は PABA と PAS が Competitive なる事を示す。

PABG に Pterine が結合して Folic acid の出きる事は Table 3 からも推察可能である。

Table 3

4-Amino pterine 濃度	4-Amino pterine γ /cc			
	0	50	100	200
PAS (4/100M)	—	—	—	—
PAS (4/100M) + Folic acid (10×10^{-4} M)	±	±	±	+
PAS (4/100M) + p-Aminobenzoyl-Glutamate (10×10^{-4} M)	±	—	—	—

4-Amino pterin は Folic acid 自身とは拮抗能力ないが、p-Aminobenzoyl Glutamate (PABG) には非常に強い拮抗能力を示す。これは 4-Amino pterin は PABG に Xanthopterin が結合して Folic acid になる所を Competitive に阻害する事を示し、従つて Folic acid 生合成は PABG 経由なる事を示している。

Purine での拮抗の場合は、purine を投与しても、“de novo” 合成路は依然閉じられたままなので核酸 Purine を合成するに充分量の purine を給与された時、始めて拮抗作用を呈するので拮抗指数は低い。以上より、PAS は、Purine 閉環の助酵素たる葉酸の生合成を PABA と Glutamate の結合において Competitive に阻害すると結論する。

4 細菌学的制菌様式

実験方法：

倍数希釈した PAS 含量 Sauton 液体培地に一白金耳の菌を接種し、5 日培養後各管の菌を一本ずつの PAS 無含有 Sauton 斜面に還元培養し菌の生死を検査すると次の事がわかる。

実験結果及び考察：

PAS による制菌作用は二つの部分に分れている事が明らかとなつた。すなわち接種菌は死滅してはいないが、増殖のみ抑制されている静菌濃度域（増殖阻止濃度域）と殺菌濃度域とに分け得る事である。PAS はこの静菌域がかなり広く、 0.5×10^{-2} Mol から 16×10^{-2} Mol が本株においてはこの範囲に入る。しかも重要な事は Folic acid, PABG, PABA, Purine での拮抗はこの静菌域内に限られ、殺菌域に及ぶ事はない事である。すなわち PAS による静菌域は核酸の生合成が阻止されているために、細胞分裂が行い難くなっている状態と考えている。殺菌域は別の機作が主導的役割を演じているのであろう。非常に高濃度では呼吸拮抗が存在するとは山村も附記しているので殺菌域はこれが主役をなしているのではなからうか³⁾。

5 人型結核菌での実験

人型 Frankflut 株を使用すると、PAS は非常に低濃度で作用し、 8×10^{-6} Mol で増殖を阻止するが Folic acid, RNA (from yeast), PABA 共存時には 1×10^{-4} Mol 迄は増殖可能になる。すなわち拮抗能力も著明である。〔4〕節までの実験は鳥型菌を使用したか、人型も行つた上で著明ではないが充分 Model 実験として使用可能である事を知つたので使用した。

6 結 論

- 1) PAS 作用下においては結核菌は 4-amino, 5 imidazol Carboramide の所で Purine 生合成が阻止される。
- 2) PAS の Purine 生合成阻害は、その助酵素成分たる Folic acid 合成を PABA と Glutamate の結合において Competitive に阻害されるに由る。
- 3) PAS の作用は増殖阻止濃度と殺菌濃度域の両者に分け得、上記作用機作が主役を演じているのは増殖阻止濃度域においてである。
- 4) 結核菌における Purine の利用、核酸生合成路, Co-enzym F 生合成路を明らかにし得た。

堀田教授・勝沼六郎荘長の御指導に感謝する。又終始直接御教導下さつた山村雄一先生に深謝する。

文 献

- 1) Bernhein : J.B.C. 143, 383, 1942.
- 2) Lehman : Lancet, 1, 15, 1946.
- 3) 山村雄一：結核の化学的療法, P.148, 1953.
結核, 26, 227, 1951.
- 4) Sevag and Stewart : Anch. Bioche. Biophy. 41, 9, 1952.
- 5) Greenberg : J. Am. Che. Soc. 74, 6307, 1952.
- 6) ビタミン Vol. 7, No.1, 1954.
- 7) 江上不二夫：核酸及び核蛋白質, 上巻, P.155.
- 8) Fox and Stetten : J.B.C. 161, 333, 1945.
- 9) Greenberg : Fed. Proc. Vol. 12, 692, 1953.