

イソニコチン酸ヒドラジドの作用 機序に関する実験的研究

第1報 BCG Transaminase に 及ぼす影響に就いて

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前教授)

酒 井 淳 三

(昭和 28 年 12 月 25 日受付)

緒 言

昨年来登場したイソニコチン酸ヒドラジド (INAH) はその強力な抗結核菌作用を示すことは認められたが、その作用機序に関しては未だ全く明らかでない。

現在までに報告された研究をふり返つてみると、海老名等¹⁾は結核菌の呼吸及び Asparaginase 作用を抑制することを報告し、Aronson等²⁾は INAH が BCG の呼吸及び Katalase 作用を阻害する事実を認めた。また米田³⁾は大腸菌の Arginin-脱炭酸酵素, Tryptophanase, Transaminase が INAH により阻害されることを報告した。また最近 Barclay 等⁴⁾が C₁₄ を導入した INAH を含む培地中に結核菌を培養した際には、感受性菌は放射能を有するようになるが、INAH 耐性菌では放射能をもつに到らないことを認めたのは誠に興味深い成績と考える。

当教室⁵⁾においても、逸早く本問題に関する研究に着手し、類似構造による拮抗作用なる考えから出発して、INAH の脱水素酵素及び Vitamin B₆ 系酵素に対する作用を検し、鳥型結核菌のリンゴ酸脱水素作用及び南瓜の表皮より抽出せる Glutamin 酸脱炭酸酵素が INAH により阻害されることを報告した。しかしながら INAH は人型及び牛型結核菌に対して特異的に抗菌力を発揮するので⁶⁾、かかる薬剤の作用機序を考える場合には、その薬剤の最も奏効する菌を選ぶべきであると考え、同じく代謝拮抗物質なる概念より、BCG を酵素材料として同様の実験を行つた。その中脱水素酵素に対する影響に就いては、同僚山本が第2報において報告するので、私は Transaminase に就いて行つた実験成績を報告したいと考える。

ところが結核菌における Vitamin B₆ 系酵素に就いては、その存在についてすら未だ確たる報告に接しない。一方細胞内蛋白合成は Transamination 系と密に共軌する⁷⁾ことも知られているので、この系に就いて最も一般的な Asparagin 酸-蓚醋酸 Transaminase の存在を証明し、これに対する INAH の影響を検討する為以下の実験を試みた。

実験材料及び方法

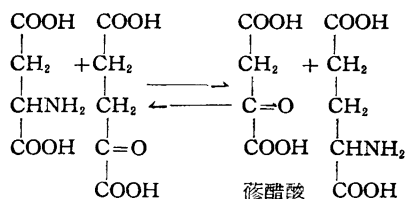
BCG 浮游液の調製: Sauton 培地に7~10日培養せ

る BCG を、集菌秤量の後、ガラス玉と共にフラスコ振盪法にて均等なる菌液とし、蒸溜水にて2回遠心沈澱を行つて洗菌し、M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.4) にて湿菌量 50mg/cc の菌浮游液を作成し実験に供した。

基質溶液の調製: l-Asparagin 酸(和光純薬), α-Ketoglutar 酸(石津製薬)を各々 20μM/0.5cc の割合に蒸溜水に溶解し 2.5N-NaOH にて pH7.4 に調製した後、可及的速かに実験に供した。

蓚醋酸定量法: 以上の BCG 浮游液 1.0cc, l-Asparagin 酸及び α-Ketoglutar 酸溶液各 0.5cc (各20μM)に磷酸緩衝液 (pH7.4) 及び蒸溜水を加えて 4.0cc とし、この反応液を 5mmHg 迄脱気した Thunberg 管中にて 37.5°C 90 分間反応せしめ、反応終了後その 2.5cc を Warburg 検圧計の容器に移し、第1図に示した反応の結果生成した蓚醋酸を Ostern⁸⁾の Anilin-クエン酸法にて検圧法により測定した。

第 1 図



Asparagin酸 α-Ketoglutar酸 Glutamin酸

すなわち 2.5cc を容器の主室に取り、これに側室より 0.5cc の Anilin-クエン酸混合液 (精製 Anilin と 50% クエン酸溶液を等量混合せるもの) を添加して、発生する炭酸ガス量を検圧法により測定した。なお BCG 浮游液のみのもの及び BCG 浮游液に Asparagin 酸のみを加えたものを同様に処理して対照とした。

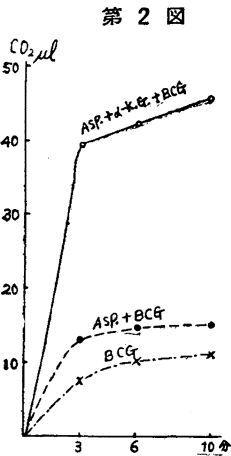
この Anilin-クエン酸法は蓚醋酸に特異的な反応ではなく、β-Keto 酸一般に対する反応ではあるが、かかる条件で生成される β-Keto 酸は蓚醋酸と考えて支障はないと考える。

以上は BCG における Transamination 反応の証明実験の方法であるが、該反応に対し INAH その他の物質を添加して阻害或いは促進の影響を検討した。添加物質の濃度等に関しては実験成績の項に詳述する。

実験成績

(1) BCG の Asparagin 酸-脛醋酸 Transamination 反応 (Asp.-Oxal. Trans. R.) の証明実験

第2図は縦軸に発生炭酸ガス量(μl)をとり、横軸に測定時間(分)をとつた。炭酸ガス発生は Anilin-クエン酸混合液を添加後 10 分にして大体平衡に達する。B-



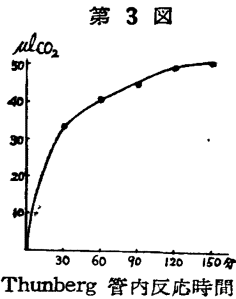
第 2 図
 ASP.....Asparagin酸
 α-K.G.....α-Ketoglutar酸
 BCG.....BCG浮游液
 磷酸緩衝液 pH7.4,
 M/10.
 温度 37.5°C
 側室.....Anilin-クエン酸
 混合液

CG 浮游液と Asparagin 酸及び α-Ketoglutar 酸の混合反応液より発生した炭酸ガス量は 46μl であり、BCG 浮游液のみのものからも 11μl の炭酸ガス発生を認める。後者は BCG 中に含まれる β-Keto 酸に由来するものであろうと推定している。故にこの両者の差が BCG 浮游液によつて Asparagin 酸と α-Ketoglutar 酸の間につつた Transamination の結果生じた脛醋酸に由来するものと考ええる。そして実際以下の実験を通じて認められた炭酸ガス発生量は理論値の約 10~20% であつた。

なお、Thunberg 管内における反応終了後、反応混液に Nessler 試薬を加えて見たが、アンモニヤによる呈色は認められなかつた。故にこの条件においては他の脱 Amino 反応は起らず、Transamination 反応のみが行われていると考える。

(2) 反応時間

次に Thunberg 管内での反応時間を変化せしめた実験を行い、その結果を第3図に示した。反応2時間にして漸く平衡に達した。なお炭酸ガス発生量は Anilin-クエン酸を加えて 10 分後に測定した値である。



第 3 図
 Thunberg 管内反応時間

て漸く平衡に達した。なお炭酸ガス発生量は Anilin-クエン酸を加えて 10 分後に測定した値である。

(3) 至適 pH

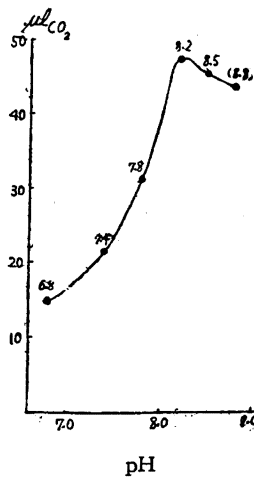
Thunberg 管内における反応時の pH を 6.8 より 8.8 まで種々に変えて実験を行つた。第4図に示した

通り pH 8.2 付近で反応させたものが炭酸ガスの発生量最大である。すなわち BCG Transaminase の至適 pH は 8.2 付近のアルカリ側にあることが認められた。

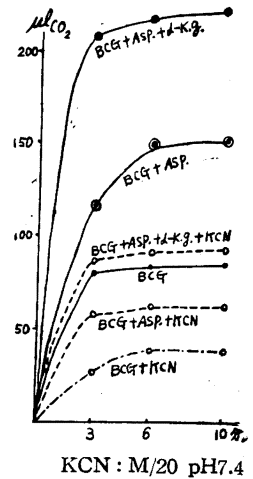
(4) 青酸カリ (KCN) による阻害実験

Transamination 反応は M/20 青酸カリによつて

第 4 図



第 5 図



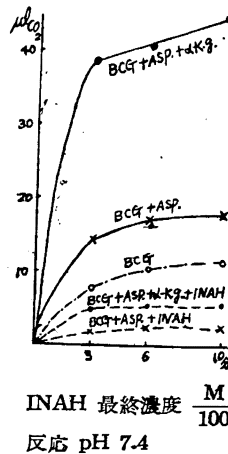
約80%阻害されることが知られている⁹⁾。そこで青酸カリによる阻害を見るため最終濃度が M/20 濃度になるように加えて反応させた実験の結果は第5図に示した通りである。すなわち M/20 濃度の青酸カリによつて殆んど 100% の阻害を認めた。

(5) BCG Transamination 反応に対する抗結核剤の影響に関する実験

イ) INAH の影響に関する実験

邦製 INAH を蒸留水に溶解し、最終濃度が M/100 濃度になるように BCG 浮游液及び基質と混合し、上述の如く Thunberg 管内で 90 分、37.5°C で反応させた反応混液を Warburg 検圧計にて、Anilin-クエン酸混合液を添加して発生する炭酸ガス量より阻害度を検した。その実験成績は第6

第 6 図

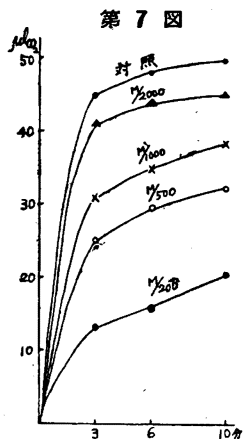


図に示した通りである。すなわち M/100 濃度の INAH は著明に BCG の Asp.-Oxal. Trans. R. を阻害し、数回の実験を通じて阻害度は約 90~100% であつた (反応 pH 7.4)。

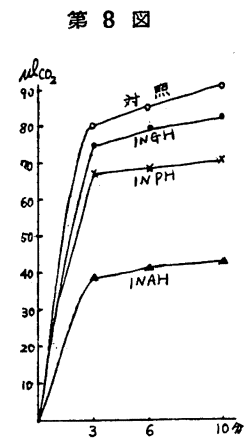
次に INAH の濃度を最終 M/200, M/500, M/1000, M/2000 の種々の濃度に変えて添加して、INAH がどの濃度まで阻害し得るかを実験した。

第7図はその成績であるが M/1000 濃度までかなり抑制し得るが M/2000 濃度になるとその程度は僅かである。

次に INAH とその誘導体である N-Isonicotinyl-N'-isopropyl hydrazine(INPH) 及び N-Isonicotinyl-N'-



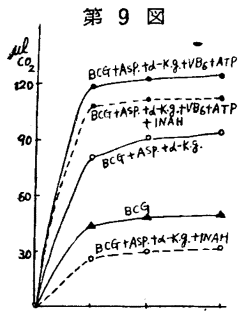
反応 pH 7.4



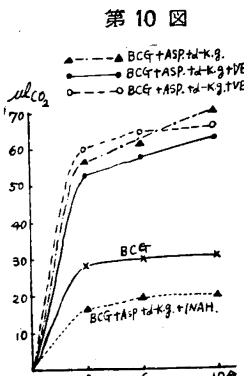
INAH, INPH, INGH
は各々最終濃度 M/500
反応 pH 7.4

glucosyl hydrazine (INGH) の阻害作用を比較するため、各々の最終濃度が M/500 になるように添加した実験成績が第 8 図である。INAH の阻害度が最も強く、次いで INPH, INGH の順であることを認めた。

次いで Transamination 反応の補欠分子族 (Prosthetic groups) は Vitamin B₆ (V B₆) 群の Rridoxal 磷酸であることが認められているので、VB₆ 及び ATP の添加により INAH の該反応阻害が如何なる影響を受けるかについて実験を行った。すなわち BCG 浮遊液に INAH を M/100 濃度になるように加え、更に VB₆ と ATP を各々 500 γ宛添加して実験した。その結果は第 9 図に示した通り BCG の Asp.-Oxal. T-



ASP., α-K.g. : 20μM
VB₆ : 500γ
ATP : 500γ
INAH : M/100
反応 pH 7.4

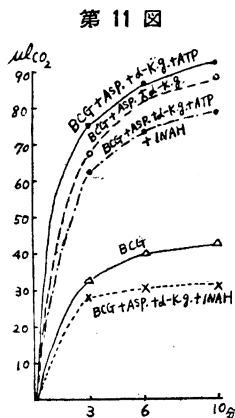


INAH : M/100
VB₆ : 500γ
反応 pH 7.4

rans. R. は M/100 INAH 添加により約 100% 阻害されたが、VB₆ と ATP の添加により完全に復元するのを認めた。また VB₆ と ATP の添加により Asp.-Oxal. T-rans. R. が促進される事実も確認した。なお V-B₆ はその硫酸塩を用い、ATP は Barium 塩を用いた。ATP-Barium 塩は 2N-H₂SO₄ を加えて

Barium を沈澱させたのち濾過して 2N-NaOH にて中和して使用した。なおこの事実は別報予定の BCG より抽出した酵素液を用いた実験においても確認し得た。

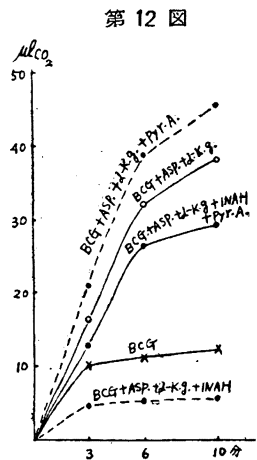
次いで VB₆ 硫酸塩 500γ のみを加えて実験した。第 10 図にみられるように VB₆ の添加によつて本反応の促進は認められないが、M/100 INAH による阻害は完全に恢復した。



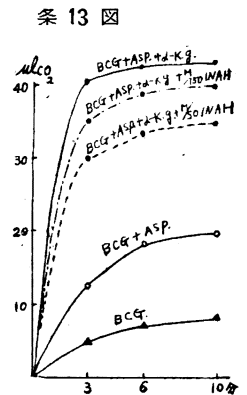
ATP : 500γ
INAH : M/100
反応 pH 7.4

更に ATP のみの添加によつても、同じく M/100 INAH による阻害作用が約 85% まで恢復するのを認めた (第 11 図)。この事実は前述の拮抗作用を以つてしては説明し得ない。又 ATP と INAH の直接反応であるとは両者の濃度比からも考え難い。そこで私は ATP により何らかの代謝系が促進されて生じて来る物質と INAH との反応の為ではないかと

考え、その 1 例として INAH 阻害に対する焦性葡萄糖の影響を検してみた。その成績は第 12 図に示した如く、焦性葡萄糖 (Na 塩) (Pyr. A.) M/500 の添加により Transamination 反応は約 10% 促進され且つ M/100 INAH による阻害は約 75% 恢復するのを認めた。



Pyr.A. : M/500
INAH : M/100
反応 pH 7.4



BCG : 100γ/cc INAH 耐性株, 湿菌量 50mg/cc
反応 pH 7.4

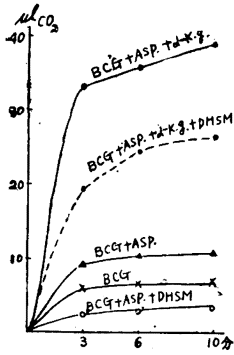
以上の実験は INAH 感受性 BCG 浮遊液を用いて行つたものであるが、INAH 耐性 BCG の本反応に対しては INAH は如何なる影響を及ぼすかについて、10γ/cc 及び 100γ/cc INAH 耐性 BCG 浮遊液を酵素液として実験を行つた。10γ/cc INAH 耐

性 BCG 浮游液を用いた場合は感受性菌の場合と著明な差違を認め得なかつた。これに対して 100Y/cc INAH 耐性 BCG 浮游液を用いた場合は第13図に示した通り M/100 INAH が殆んど阻害を示さないことを認めた。

ロ) ダイハイドロストレプトマイシン (DHSM) の影響に関する実験

邦製 DHSM を蒸留水に溶解し、最終濃度が M/100 になるように添加して実験した。その成績は第 14 図に

第 14 図



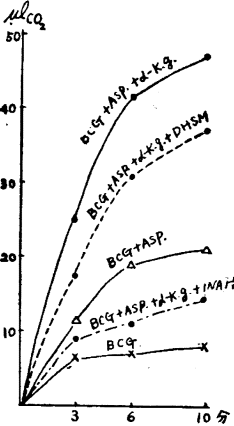
DHSM : M/100
反応 pH 7.4

示した通りである。すなわち DHSM の M/100 の添加は該反応を約 30% 阻害する事実を認めた。

次にストレプトマイシン 100Y/cc 耐性 BCG 浮游液を用いて実験を行い、それに M/100 INAH 及び M/100 DHSM を添加してその影響を検してみた。その実験成績は第15図に示した如く、M/100 INAH 及び M/100 DHSM は感受性菌

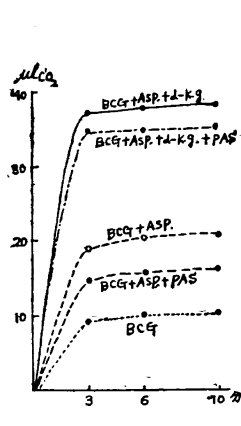
を用いた場合と同程度の阻害を及ぼす事実を認めた。

第 15 図



BCG : 100Y/cc SM
耐性株、湿菌
量50mg/cc
DHSM : M/100
INAH : M/100
反応 pH 7.4

第 16 図



PAS (Na塩) : M/100
反応 pH 7.4

ハ) パラアミノサルチル酸ソーダ(PAS)の影響に関する実験

邦製 PAS (Na塩) を蒸留水に溶解し、最終濃度が M/100 濃度になるように添加して実験した。その成績は第 16 図に示した通りで M/100 濃度の PAS では該反応は殆んど阻害されないことを認めた。

考 按

以上の実験成績より BCG において Asp.-Oxal. Tra-

ns. 反応系の存在すること及び同系が INAH により著明に阻害されることは確実であるが、問題はその阻害の様式如何ということである。この問題について一通り検討を試みたい。

第1の問題は本反応の INAH による阻害は、INAH と α -Ketoglutar 酸との結合によるものではないかということである。私達は以前より INAH が何かとの結合型となつて尿中に排泄されることを唱えていたのであるが⁵⁾¹¹⁾¹², 最近小沢¹³⁾等は INAH 投与家兔の尿中に、葡萄糖との結合物及び焦性葡萄糖或いは α -Ketoglutar 酸との結合物らしいものを認めたことを報じている。しかしながら私が Pridoxine 或いは Pyridoxine 及び ATP によつて INAH の阻害が排除される事実を認めている点は、INAH の作用点が d-Ketoglutar 酸との結合によるものでないことを明らかに示している。すなわち INAH による酵素の不活化は酵素活性基である Carbonyl 基と INAH の hydrazid 型との結合に因するもので、この際 Pyridoxine 或いはこれと ATP の添加により Broquist 等¹⁴⁾¹⁵⁾の認めている如く、Pyridoxine 第4位Cの Carbonyl 化を生じて、同酵素活性基の還元を招来し、従つて INAH 阻害が排除されるものと解される。

INAH の hydrazid 型の結合性に就いては、上述の同剤投与尿中に認められた Carbonyl 物質との結合からも窺われるが、また同時に私の実験成績において INGH 及び INPH の Transamination 反応系に対する阻害能が INAH に比し極めて低い事実は、本剤の作用点としての hydrazid 型の反応性に対する証左と考えられる。

次いで INAH 阻害が ATP 単独の添加により恢復する点は、無氣的条件において細胞内に生ずる Carbonyl 型解糖中間物質に因するものと解される。更に INAH 阻害が焦性葡萄糖により除かれる点は上述の INAH 焦性葡萄糖結合物の尿中排泄の事実及び Semicarbazid による VB₆ 酵素系の阻害が焦性葡萄糖により排除される事実¹⁶⁾ からみて、INAH の酵素活性基に対する阻害が焦性葡萄糖の Carbonyl 基により相競的に排除されたものと考えられる。

なお INAH 耐性 BCG による本反応は INAH により阻害されない事実も、この考え方を阻げるものではなく、寧ろ私の行つた実験が INAH の作用機序の本質的な部分と考える示唆となり得るように思える。

しかしながら本実験に認められる INAH, INGH 及び INPH の阻害度が、培養実験におけるこれ等の抗菌力と平行しないこと、或いは結核菌の発育を阻止する濃度よりも遙かに高濃度においてのみかかる阻害の認められる事実より、本反応の阻害のみが INAH の作用機序の全部であるとはいひきれないが、実験成績の如く、この阻害が VB₆ 酵素系の活性基に係ることは明らかであ

り、また蛋白合成と本反応系との関連から見て、その作用機序の主要な部分を占め得るものと考えて差支えない。

結 論

1) INAH は BCG の Asparagin 酸-脛醋酸 Transamination 反応を阻害する。

2) INAH のこの阻害は Pyridoxine 或いは Pyridoxine 及び ATP の添加により消殺される。

3) INAH 耐性菌による本反応は INAH によつて阻害されない。

4) BCG による本反応は DHSM によつて僅かながら阻害されるが、PAS によつては影響をうけない。

(稿を終るに臨み、終始御懇切な御指導御校閲を賜つた堂野前教授及び河盛助教授に深く感謝し、直接御指導を賜つた伊藤文雄博士に深謝する。また種々御教示にあずかつた本学生化学教室内田助教授に厚く感謝する。

なお、本研究費の一部は文部省科学研究費によつた。記して謝意を表す)

文 献

- 1) 海老名・遠藤他：日本医事新報，No. 1459, 18, 1952.
- 2) J.D. Aronson, S.L. Ehrlich and W. Flagg.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 80, 259, 1952.
- 3) 米田：生体の科学，4, 176, 1953.

- 4) W.R. Barclay, R.H. Ebert and D. Koch-Weser : Am. Rev. Tbc., 67, 490, 1953.
- 5) 堂野前・河盛・伊藤・山本・酒井・青木・岩山：最新医学，7, 643, 1952.
- 6) 堂野前・河盛・岩崎・島津・高橋・堀本他：最新医学，7, 950, 1952.
- 7) H.G. Albaum and P.P. Cohen : J. Biol. Chem., 149, 19, 1943.
- 8) P. Ostern : Zeitschr. Physiol. Chem., 218, 160, 1933.
- 9) P.P. Cohen : The Enzymes, 1, 1053, 1951.
- 10) P.P. Cohen : J. Biol. Chem., 131, 565, 585, 1940.
- 11) 堂野前・河盛・伊藤・山本・青木・岩山：最新医学，7, 955, 1952
- 12) 堂野前・河盛・伊藤・山本・酒井：最新医学，8, 105, 1953.
- 13) 小沢・清本：医学と生物学，27, 110, 1953.
- 14) H.Q. Broquist and E.E. Snell : J. Biol. Chem., 167, 59, 1949.
- 15) P. D. Bartlett and O.H. Gaebler : J. Nutrition, 37, 93, 1946
- 16) 小橋：未発表