

## 結核菌の Purine 生合成と PAS の制菌機作

## 第3報 PAS による Glycineamide ribotide の蓄積

名古屋大学医学部生化学教室 (指導 堀田一夫教授)

勝沼 信彦・石川 栄治・渡会 一男

(受付 昭和 30 年 5 月 25 日)

本誌前2報<sup>1)2)</sup>に結核菌の Purine 生合成経路を追求し、これに及ぼす p-aminosalicylic acid (PAS) の影響を報告して来た。すなわち Purine base の前駆体である 4-amino-5-imidazol carboxamide (AICA) 及びその riboside が PAS で部分阻害した培地中に蓄積すること。この蓄積は ribonucleic acid (RNA) や p-Aminobenzoic acid (PABA) で除かれること。さらにこの蓄積を減少させる Purine 系及び leucovorine 系化合物で PAS の増殖阻止作用が著明に減弱することを明らかにした。このような事実から PAS は結核菌において Co-transformylase (Leucovorine を主成分とする) の生合成を阻止するために、その酵素作用の一つである Purine の閉環が阻止されるために以上のような結果になるものと考えている。ところが Purine base 生合成経路中に Transformylase により触媒される部分が AICA 以前に今一つ存在する。これは Buchanan<sup>3)</sup> や Greenberg<sup>4)</sup>が最近酵素学的に明らかにした反応で Glycine amide ribotide (GAR) が transformylase を介して Formyl 基を受け  $\alpha$ -N-formylglycine amide ribotide になる反応である。しかるに PAS は Co-transformylase の生合成を阻止するものであるから当然この反応も阻止されている筈であり、むしろ Purine 生合成経路が GAR, Formyl GAR, AICA ribotide Purine ribotide の順に行われることから考えて、GAR から Formyl GAR への反応の方が第一阻害点である筈である。このような理論的必然性から、PAS 阻害培地中の GAR の蓄積を追求してこの報告の如き結果を得た。なおあらゆる薬物を通じて、その阻害培地に GAR の蓄積を証明している報告は今日迄ない。

## 実験材料および実験法

PAS 部分阻害培養液の調製：—

鳥型結核菌の 5～7 日培養菌を使用して、菌体窒素にして 22.5 mg% (Semimicro kjeldahl 法で測定) に相当する菌浮游液を比濁により調製する。この 10 cc を 1.0 ng/cc に PAS-Na を含む arabinose glycine 培地(第2報に記載<sup>2)</sup>) の 990 cc に接種する。37°C で 3 日培養後、3000 回転 5 分間遠心沈澱して上清を得る。

イオン交換樹脂に吸着させるための前処理：—

上清 1 l 弱に 25% 醋酸 Ba 10cc を加え、pH を NaOH で 8.2 とする。生じた白色沈澱を遠心沈澱で除去することにより、培地中の無機磷酸を除去できる。透明な上清に更に一、二滴の醋酸 Ba を加えて混濁しないことを確かめてから、4 倍容のアルコールを添加し、氷冷下に 60 分間静置する。生じた白色沈澱を遠心沈澱で捕集し、約 50cc の  $\frac{1}{20}$  NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> に溶解し、BaSO<sub>4</sub> の沈澱を除く。この粗抽出物を pH9～10 に NaOH でして樹脂カラムに吸着させる。

イオン交換樹脂による単離：—

この分離条件は Greenberg の方法<sup>4)</sup>に従う。すなわち Formate 型の Dowex-1 (200～400 mesh, h=15cm, d=0.7cm) に吸着させ、PH7.0 に補正した蒸溜水で 24 時間洗滌し、Ninhydrine 反応及び Orcinol 反応が陰性になるのを確かめてから、pH 6.5 にした 0.05M ammoniumformate で溶出する。これを 5 cc ずつ分取し、一部を Orcinol 反応及び Ninhydrine 反応で検し、初めの両反応陽性 Fraction を合せる。この部分が GAR の分割である。

Glycineamide ribotide を Ba 塩として精製：—

GAR 分割に 25% 醋酸 Ba を加えて pH を 8.2 にすると白色沈澱を生ずる。この沈澱を遠心沈澱で除き、上清に 4 倍容のアルコールを加えて氷冷下に 60 分間静置し、生じた白色沈澱を更に 99% アルコールで数回洗滌してデシケーター中で乾燥する。これにより GAR を Ba 塩として単離出来る。(Buchanan の精製法<sup>3)</sup>)

## 実験結果

ペーパークロマトグラムによる単一性：—

東洋濾紙 No.50 を使用し、上昇法を使用した。2NH Cl-isopropanol (35:65) で 0.60～0.64 を示し Glycine は 0.46～0.50 を示す。Ninhydrine で violet の呈色をする。Ninhydrine 反応を呈するためには 2 位のアミノ基が遊離でなければならず、Formyl GAR は従って Ninhydrine 反応を呈しない<sup>3)4)</sup>。又 Formyl GAR は Greenberg<sup>4)</sup>によると pH5.0 の 0.05M ammoniumformate で Formate form の Dowex-1 から溶出されると報じられている。この二つの事実からわれわれの分離したものは Formyl 基の結合していない GAR である

ことを知り得た。

構成成分の分析：—

2.5NHCl で 100°C 1 時間加水分解し、ペーパークロマトグラムにより、水解により出現するアミノ酸が Glycine であることを Rf から決定する。次にこの Glycine の定量は水解後に Alexander<sup>5)</sup>等の方法により定量した。Ribose は Mejboum の Orcin-HCl 反応<sup>6)</sup>で、結合磷酸は 60% 過塩素酸分解後 Fiske & Subbarow<sup>7)</sup>の方法で定量した。この単離物は無機磷酸を含んでいない。分析組成は表 1 の如く、Glycine と Ribose と結合磷酸はほぼ等モルに結合している。

次にこの結合磷酸の結合位置であるが、この磷酸は Acid stable であり、又次の実験により Ribose の 5' 位に結合した磷酸であることが明らかとなった。

表 1  
Glycine-amide ribotide の分析組成

実験 No.	グリシン	リボース	結合磷酸
No. 1	1.04	1.00	1.09
No. 2	1.08	1.00	1.22
No. 3	1.03	1.00	0.97

Glycine-2.5 NHCl 100°C 1hr. 水解後 Alexander et al の方法

Ribose: -Mejboum の Orcin-HCl 法

結合磷酸: —60% 過塩素酸分解後 Fiske 法

1/10M メタ過沃素酸処理を行つてペーパークロマトグラムにかけると、もし 2' か 3' 位に磷酸が結合していれば Rf に変化なく、2' 及び 3' が遊離であれば過沃素酸分解を受けるために Rf は著明に変化する。われわれの GAR は著明な Rf の減少を来す為、2' 及び 3' 位は遊離しており、従つて 5' 位に磷酸が結合していることを知り得た。

### 総合考察

PAS は結核菌において p-Aminobenzoic acid との拮抗により Co-transformylase の生合成を阻害し、その結果として Purine base の生合成の場合には、2 位

と 8 位の Formyl 化が障害されて Glycineamide ribotide と 4-amino-5-imidazolcarboxamide ribotide の蓄積を来す。

Greenberg および Buchanan により酵素学的に明らかにされた Purine base の生合成経路は図 1 の如く、GAR, Formyl GAR, AICA ribotide, inosinic acid の順であるから、PAS は結核菌の Purine base 生合成を二個所で阻害する。しかもまず GAR の Formyl 化を阻害し、これを逃れた一部が AICA ribotide まで行き、ここで再び Formyl 化が阻害されるものと考え得る。従つて、むしろ主作用点は GAR の方にあると見るべきであるが、Sulfonamide の作用点においても AICA 系のところのみが報告されており未だ、GAR について記載がない。しかし Sulfonamide の時もわれわれの PAS の場合と同じく Cotransformylase 阻害である以上 GAR の所が第一作用点なのであろう。

### 結論

PAS は Co-transformylase の生合成を阻止する結果として、Purine base 生合成途上を次の二個所で阻害する。すなわちまず、Glycineamide ribotide が  $\alpha$ -N-formyl-glycineamide ribotide になる反応、この阻害点を逃がれた一部が 4-amino-5-imidazol carboxamide ribotide まで合成され、再びこの Formylation が阻害される。(1)阻害機作として PAS はこのように Purine 生合成を二点で阻害することを明らかにし得た。これと同時に(2)結核菌の Purine 生合成経路が上記経路を通ることも合せて明らかになし得た。

堀田一雄教授、山村雄一先生の御指導を深謝し、敬友杉野幸夫君の御助言に感謝する。

### 文献

- 1) 勝沼信彦：結核，29，413 (1954)
- 2) 勝沼信彦，石川榮次，渡会一男：結核，30，印刷中 (1955)
- 3) Buchanan J.M.：J. Ame. Che. Soc., 77 (2) 501 (1955)
- 4) Greenberg G.R.：J. Ame. Che. Soc., 76 (26) 5259 (1954)
- 5) Alexander B. et al：J. Bio. Chem., 160, 51 (1945)
- 6) Mejboum et al：Z. Physiol. Chem., 258, 117 (1939)
- 7) Fiske and Subbarow：J. Bio. Chem., 66, 375 (1925)

図 1 Purine base の生合成経路と PAS の阻害点

