

抗酸性菌に対する 8-Azaguanine の増殖抑制

作用とその機作

(第1報)

国立療養所刀根山病院 (院長 渡辺三郎)

山村好弘・谷淳吉・寺井武雄

名古屋大学医学部 生化学教室 (教授 堀田一雄)

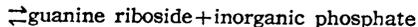
勝沼信彦

愛知県立教員保養所 (所長 勝沼六郎)

坪井作平

(受付 昭和30年7月7日)

一般微生物が営む代謝過程を追跡する方法の一つとして、代謝拮抗物質によつてうける影響とその拮抗条件を解析する手法が従来から行われている。核酸系の代謝を対象としたこの種の研究も広く行われ、今日までに数多くの報告が見られる。そのうちでも guanine の構造類似体である 8-azaguanine は酵母¹⁾、細菌²⁾および腫瘍³⁾の増殖を抑制することが見出されて以来、いろいろの実験材料を用いてその作用に関する研究が行われ、最近では制癌剤として使用されている。その作用機作に関しては、最初 Kidder ら³⁾は 8-azaguanine が核酸合成経路において guanine の代謝拮抗物質として作用して、この化合物の nucleoside あるいは nucleotide を生成するのによるのであらうと提言した。その後 C¹⁴-8-azaguanine が核酸の中に入り込むこと (4,5,6,7) およびこれと同時に投与した guanine, 4-amino-5-imidazolecarboxamide (AICA) の核酸への入り込みに影響を与えないことから⁸⁾、8-azaguanine の作用は単純な guanine の代謝拮抗物質としてではなく、de novo の核酸合成および purine 系化合物の核酸への入り込みとはことなつた経路で核酸の中に入り込んで、これを含む異常な核酸が生成し、核酸としての正常な生物学的機能が行われなくなるためであるとされた⁷⁾。これに対して Friedkin ら^{9,10)}は、馬の肝臓から抽出した nucleoside phosphorylase を用いて実験を行い、8-azaguanine が Kalck ar の反応¹¹⁾すなわち



の基質となつて、8-azaguanine riboside が生成されることかな、この作用機作は細胞内にあつて正常には guanine, 他の purine 化合物、あるいはその前駆物質と反応する ribose-1-phosphate を捕捉することによるのであらうと説明している。

われわれは数種の抗酸性菌でも 8-azaguanine がその

増殖を抑制することを認め、さらにその作用機作に関する実験を行つたので報告する。

実験材料および実験方法

使用した菌は、Sauton 氏培地に継代した人型結核菌 H₃₇Rv 株、鳥型菌竹尾株および獣調株、チモテー菌で、実験には基礎培地として Sauton 氏培地を用いた。大型試験管 (内径 2.5cm) に終末容量 10ml となるように培地を調製し、これに一定量の菌を接種し、37°C 孵卵器の中で培養した。増殖阻害作用および回復作用の判定は便宜上人型結核菌では接種後 14 日目、鳥型菌およびチモテー菌では 3 日目に行つた。増殖程度の判定の基準は

- 全く増殖が認められないもの
- + 明らかに増殖したと認められるもので、しかも次の井におよばないもの
- 井 培地液面の 1/2 以上の広さに菌膜を形成したもの
- 井 培地液面全体に菌膜を形成したもの
- 井 完全に増殖して菌膜が管壁にまでおよんだものの記号で表わした。

8-azaguanine はすべて Na-塩を使用した。

実験結果

1) 8-azaguanine の増殖抑制作用

第1表に示すように、人型結核菌では 200γ/ml (1.3 × 10⁻⁸M)、鳥型菌およびチモテー菌では 400γ/ml (2.7 × 10⁻⁸M) の濃度で菌の増殖は著明に抑制された。しかしさらに長期間観察すると、いずれも増殖相が遅れて対照と同程度にまで増殖するので、この濃度では 8-azaguanine に殺菌作用はないと思われる。

2) 核酸系化合物による回復作用

これらの菌に対する 8-azaguanine の増殖抑制作用は、これと同時に培地中に加えた酵母 ribonucleic acid, 胸腺 desoxyribonucleic acid, 核酸の purine 塩基、それ

第1表 各種抗酸性菌に対する 8-azaguanine の阻害効果

菌株	8-AG 濃度 %/ml	培養日数															
		1	2	3	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
人型 結核菌 H ₃₇ Rv	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+
	25	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	対照	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
鳥型菌 竹尾株 および チモテ 菌	400	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	対照	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

8-AG: 8-azaguanine

第2表 8-azaguanine 阻害の核酸およびプリン系化合物による増殖回復

濃度 %/ml	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.7	0
R N A	+	+	+	+	+	±	-	-	-
D N A	+	+	+	+	±	-	-	-	-
濃度 moles/l	$\frac{1}{2} \times 10^{-2}$	10^{-3}	$\frac{1}{2} \times 10^{-3}$	10^{-4}	$\frac{1}{2} \times 10^{-4}$	10^{-5}	$\frac{1}{2} \times 10^{-5}$	10^{-6}	0
adenosine 5'-phosphate		+	+	+	+	+	±	-	-
guanosine 5'-phosphate		+	+	+	+	+	±	-	-
adenosine	+	+	+	+	+	±	-	-	-
guanosine	+	+	+	+	+	±	-	-	-
adenine			±	+	+	+	+	-	-
guanine			±	+	+	+	+	-	-
hypoxanthine			+	+	+	+	+	-	-

使用菌: 鳥型菌 調株 8-azaguanine 濃度: すべて 400%/ml 添加 判定: 接種後 3 日目

RNA: ribonucleic acid(酵母) DNA: desoxyri-bonucleic acid(胸腺)

第3表 8-azaguanine 阻害のプリン生合成関連物質による増殖回復

濃度 %/ml	200	100	50	25	12.5	6.2	3.1	1.6	0.8	0.4	0
glycine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
AICA	-	-	-	+	+	+	+	+	+	±	-
PABA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
folic acid	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CoF	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-

使用菌: 鳥型菌 調株 8-azaguanine 濃度: すべて 400%/ml 添加

AICA: 4-amino-5-imidazolecarboxamide PABA: p-aminobenzoic acid

らの riboside, および ribotide によつて回復された。回復の程度は使用した範囲ではその濃度に比例したが, adenine と guanine の場合だけは高濃度になると, 回復作用の低下が見られるばかりでなく, 8-azaguanineを

加えない培地における菌の増殖も抑制された。それらの回復作用は $10^{-6}M$ に至適の濃度が存在する(第2表)。

このように purine 系の化合物は明らかに 8-azaguanine の阻害を回復する作用を有するが核酸塩基でも pyrimidine 系の化合物, すなわち cytosine, uracil, thymine にはこのような作用は全く認められなかつた。

3) purine の前駆物質および purine 核の閉環に関与する物質による影響

以上の実験でわれわれは既成の purine, それぞれの riboside および ribotide, 酵母 ribonucleic acid, 胸腺 desoxyribonucleic acid による回復作用を認めたが, さらに核酸 purine の de novo の生合成に関与する化合物, すなわちその前駆物質といわれている glycine⁽²⁻¹⁷⁾, AICA⁽¹⁸⁻²²⁾, およびその閉環に関与する folic acid⁽²³⁾, citrovorum factor (formyl CoF)^(13,22), さらに folic acid の前駆物質である p-aminobenzoic acid (PABA)⁽²⁴⁾ について実験を行った。その結果は第3表に示すよ

うに, de novo の purine 生合成を容易にする化合物は 8-azaguanine の増殖抑制を回復することを認めた。その中で glycine, AICA, PABA では高濃度になると, かえつて回復力の低下が見られ, それぞれ至適の濃

度があることが認められた。

4) その他の化合物による影響

Friedkin らによつて 8-azaguanine の阻害は菌体内の ribose-1-phosphate の捕捉によるのであろうといわれているので、培地に ribose を加えて阻害の回復の有無をしらべたが、ribose の効果は認められなかつた。また glycine が著しい回復作用を示すので、この作用が特異的なものであるかどうかを知るために他のアミノ酸、すなわち DL-glutamic acid, L-arginine, L-leucine, L-isoleucine, DL-phenylalanine, DL-valine, DL-methionine, L-tyrosine についてしらべたが、これらのアミノ酸に回復作用は認められなかつた。その中で methionine, valine ではかえつて増殖の阻害が見られた。そこで glycine の作用はかなり特異的なものであると思われる。

大腸菌の purine 要求株を用いた実験で、培地に glycine を加えると AICA の蓄積量が増加するが、methionine および valine ではその量が減少することが報告されているが²⁵⁾、この結果とわれわれの成績とを比較すると興味深い。

5) 抗結核剤との関係

p-aminosalicylate(PAS) と 8-azaguanine とを共存させると、菌の増殖抑制に著しい協力作用が認められた(第4表)。

これに反して streptomycin あるいは isonicotinic acid hydrazide (INAH) と 8-azaguanine との間には

第4表 鳥型菌における増殖抑制に対する 8-azaguanine と PAS との協力作用

PAS 濃度 γ/ml	8-azaguanine 濃度 γ/ml											
	0	0.85	1.9	3.9	7.8	15.6	31.2	62.5	125	250	500	
0	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	+	+	±	-
125	卍	卍	卍	卍	+	+	±	-	-	-	-	-
250	卍	卍	卍	+	±	±	-	-	-	-	-	-
500	卍	卍	卍	+	±	-	-	-	-	-	-	-
1000	卍	卍	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

使用菌：鳥型菌獸調株；判定：接種後3日目

第5表 8-azaguanine 耐性菌の各濃度 8-azaguanine 添加培養時の発育度(判定：接種後3日目)

8-azaguanine 濃度 γ/ml	2000	1000	500	250	125	63	31.5	16
増殖度	±	±	+	+	卍	卍	卍	卍

使用菌：8-azaguanine (2mg/ml) 添加 Sauton 氏培地に発育した鳥型菌竹尾株

このような協力作用は見られなかつた。

6) 8-azaguanine に対する耐性

抗酸性菌を漸進的に濃度の高い 8-azaguanine を含む Sauton 氏培地に継代培養することによつて容易に耐性菌を得ることが出来た。すなわち鳥型菌竹尾株では最初 400 γ/ml で増殖が抑制されていたものが、3回継代すると 2mg/ml でも増殖出来るようになった。しかしこの耐性菌を種々の濃度の 8-azaguanine 含有 Sauton 氏培地に接種すると、この濃度の低いほど増殖が速かであるので、耐性菌は 8-azaguanine に対して依存性はないと思われる(第5表)。

考 察

8-azaguanine の作用機作に関しては、in vitro の酵素反応としてこの riboside 化合物が得られたこと、および riboside 化合物の Tetrahymena geleii に対する増殖抑制力が 8-azaguanine のその 1/2 に過ぎないという結果から、後者の阻害作用が 8-azaguanine の入り込んだ異常な核酸の生成によるのではなく、細胞内の ribose-1-phosphate に対する正常な purine あるいはその前駆物質と 8-azaguanine の競合であろうと言われている。

しかし purine 塩基がその nucleoside を経て核酸の中へ入り込むのはむしろ副産物と考えられている²⁶⁾、またわれわれの得た成績、すなわち adenine, guanine, および hypoxanthine でこの制菌作用が回復され、これに反して ribose によつて回復されないということは ribose-1-phosphate に対する競合とは考えにくい。一方、もし 8-azaguanine の入り込みによつて生物学的作用の変化した核酸が生成されるならば、核酸の物理化学的性状およびその核酸中の塩基成分の分子比にも変化を来すのではないかと考えられる。われわれは 8-azaguanine 添加培地に増殖させた菌から抽出、精製した核酸について物理化学的に検討中である。最近 adenine, guanine, hypoxanthine, xanthine が riboflavin の産生を促進するという報告があるので²⁷⁾、核酸系物質による 8-azaguanine 阻害の回復は単にこれらの物質と 8-azaguanine との拮抗ではなくて、riboflavin を介する間接的なものであるとも考えられるが、riboflavin との関係については目下実験中である。しかし PAS との間に著しい協力作用のあることは、PAS の制菌作用が purine 核の閉環の阻害に基くと考えられ

るので²⁸⁾, PAS で核酸の *de novo* の合成が抑えられるとその代償として既成の塩基の利用路が活潑になり^{29,30,31,32)}, したがって 8-azaguanine の菌体核酸への入り込みが多くなり阻害作用がつよく現われると考えると説明しやすい。もし *de novo* の核酸合成と既成の purine の利用, さらに purine 塩基と purine 類似化合物が拮抗しているとしても, どの段階で拮抗しているかは未だ明らかではない。

また hypoxanthine で 8-azaguanine の阻害が回復されることは, 抗酸性菌においても hypoxanthine から他の purine 塩基への転換, あるいは核酸合成に hypoxanthine の利用路があるものと想像される。

PAS との間に著しい協力作用の見られることは臨牀的にも興味のあることであるけれども, 容易に 8-azaguanine に対する耐性の出現することで臨牀的に利用するには, かなり検討の余地がある。

結 論

1) 8-azaguanine は人型結核菌 *H₃₇Rv* 株の増殖を 200%/ml, 鳥型菌竹尾株, 獣調株およびチモテー菌を 400%/ml で抑制する。しかしこの濃度では殺菌作用は認められない。

2) 8-azaguanine の増殖抑制作用は adenine, guanine, hypoxanthine およびそれらの nucleoside, nucleotide, 酵母 ribonucleic acid, 胸腺 desoxyribonucleic acid で回復されるが, pyrimidine 塩基, すなわち cytosine, uracil および thymine では回復されない。

3) 8-azaguanine の阻害作用は purine の前駆物質, すなわち glycine, 4-amino-5-imidazole-carboxamide, およびその他 purine 生合成に関与する化合物である folic acid, citrovorum factor, p-aminobenzoic acid で回復されるが, glycine 以外の 9 種のアミノ酸や ribose では回復されない。

4) 8-azaguanine と PAS との間に著しい協力作用が認められる。

本論文の要旨は, 昭和 30 年 6 月, 日本結核病学会近畿地方会 (第 11 回) において発表した。

稿を終るに際し, 終始御懇篤なる御指導を頂いた大阪市立大学刀根山結核研究所 山村雄一博士に衷心より感謝する。

なお, 実験に供した 8-azaguanine は武田薬工および田辺製薬の御好意により頂いたものである。こゝに改めて謝意を表す。

文 献

1) Kidder, G.W., and Dewey, V.C.: *J. Biol. Chem.*, 179: 181, 1949.
2) Roblin, R.O., Jr., Lampen, J.O., English, J.P.,

Cole, Q.P., and Vaughan, J.R., Jr.: *J. Am. Chem. Soc.*, 67: 290, 1945.
3) Kidder, G.W., Dewey, V. C., and Parks, R.E., Jr.: *Science*, 109: 511, 1949.
4) Heinrich, M.R., Dewey, V.C., Parks, R.E., Jr., and Kidder, G. W.: *J. Biol. Chem.*, 197: 199, 1952.
5) Mitchell, J. H., Skipper, H. E., and Bennet, L., L.: *Cancer R.*, 10: 647, 1950.
6) Bennett, L. L., Jr., Skipper, H. E., and Law, L. W.: *Federation Proc.*, 12: 300, 1953.
7) Mandel, H. G., Carló, P. E., and Smith, P.K., : *J. Biol. Chem.*, 206: 181, 1954.
8) Carló, P.E., and Mandel, H. G.: *J. Biol. Chem.*, 203: 343, 1953.
9) Friedkin, M.: *J. Biol. Chem.*, 209: 295, 1954.
10) Kalckar, H.M.: *Biochim. et Biophys. Acta*, 12: 250, 1953.
11) Kalckar, H.M.: *J. Biol. Chem.*, 177: 477, 1947.
12) Edmonds, M.E., Delluva, A.M., and Wilson, D. W., : *J. Biol. Chem.*, 197: 251, 1952.
13) Greenberg, G. R.: *Federation Proc.*, 10: 192, 1951.
14) Schulman, M.P., and Buchanan, J.M.: *Federation Proc.*, 10: 244, 1951.
15) Sonne, J.C., and Lin, J.: *Federation Proc.*, 11: 290, 1952.
16) Doly, M.M., Allfrey, V.G., and Mirsky, A.E.: *J. Gen. Physiol.*, 36: 173, 1952.
17) Schulman, M.P., and Buchanan, J.M.: *J. Biol. Chem.*, 196: 499, 1952.
18) Miller, C. S., Gurin, S., and Wilson, D. W.: *Science*, 112: 654, 1950.
19) William, W. J.: *Federation Proc.*, 10: 270, 1951.
20) Conzelman, G. M., Jr., Mandel, H. G., and Smith, P. K.: *Federation Proc.*, 11: 199, 1952.
21) Schulman, M.P., and Buchanan, J.M.: *J. Biol. Chem.*, 196: 513, 1952.
22) Buchanan, J.M., and Schulman, M.P.: *J. Biol. Chem.*, 202: 241, 1953.
23) Woolley, D. D., and Pringle, R. B.: *J. Am. Chem. Soc.*, 72: 624, 1950.
24) Woods, D.D.: *Bull. soc. chim. biol.*, 30: 730, 1948.
25) Gots, J. S., and Love, S.H.: *J. Biol. Chem.*, 210: 395, 1954.
26) Balis, M.E., Levin, D.H., and Brown, G.B.:

J. Biol. Chem., 199: 227, 1952.

Biol. Chem., 196: 729, 1952.

27) Mc Nutt, W. S.: J. Biol. Chem., 210: 511, 1954.

30) Miller, C.S.: J. Biol. Chem., 205: 331, 1953.

31) Mitchell, J.H.: Cancer Res., 11: 145, 1951.

28) 勝沼信彦: 結核, 29: 413, 昭 29.

32) Gots, J.S.: Federation Proc., 14: 711, 1955.

29) Balis, M.E., Levin, D.H., and Brown, G.B.: J.

