

# 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4報 BCG チス테인脱硫化水素酵素に及ぼす影響について

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前教授)

山 本 実

(受付 昭和29年11月24日)

### 緒 言

曩に酒井<sup>1)</sup>は BCG トランスアミナーゼに及ぼすイソニコチン酸ヒドラジド (INAH) の影響について報告したが、今回私はトランスアミナーゼ同様、B<sub>6</sub> 酸素系の一つと考えられるチス테인脱硫化水素酵素に及ぼす INAH を主とする抗結核剤の影響について検討したのでその成績を報告する。

チス테인脱硫化水素酵素は、高等動物や細菌<sup>2)-10)</sup>において発見されているが、その機構に関しては全く明らかになつたとは言得ない。しかしながらピリドキサルリン酸が助酵素として働くことは既に多くの研究者により認められている所である<sup>6)7)8)10)</sup>。私は最近 BCG にチス테인脱硫化水素作用のある事を認めたので、トランスアミナーゼに対する<sup>1)</sup>作用と同様の考えから、BCG のアセトン乾燥菌を酵素材料として、INAH 等抗結核剤の影響を検し、以下述べる如き成績を得た。

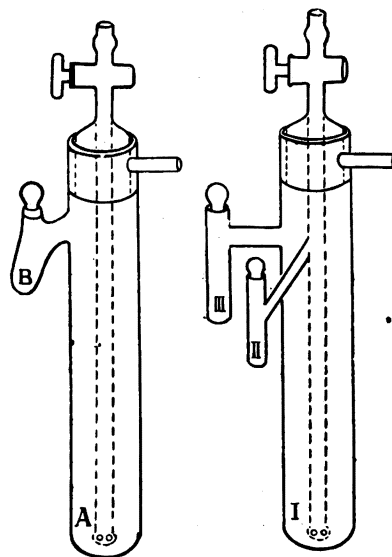
### 実験材料及び方法

**酵 素 材 料:** 酵素材料としては、10 日前後 Sauton 培地に培養せる BCG のアセトン乾燥菌浮游液を使用した。すなわち法の如くにしてつくつたアセトン乾燥菌を乳鉢にて磨砕しつつ、M/10 pH 7.8 のリン酸緩衝液を加えて、100 mg/cc の均等浮游液とし、その 1 cc を用いて供した。

**チス테인溶液:** L-塩酸チス테인 (石津製薬製) を 20 μM/0.5cc の割に蒸留水に溶解、その 0.5cc を使用した。

**実験方法:** 実験方法は概ね須田等の方法に従つた。すなわち第1図の反応管の A に酵素液 1 cc M/10 pH 7.8 のリン酸緩衝液 0.5 cc、蒸留水 2.0 cc、B にチス테인溶液 0.5 cc、蒸留水 0.5 cc を入れ、+5 mm Hg 程度迄脱気後、37.5°C 恒温水槽につけ、約 10 分後、基質を主室に混入せしめ、45 分乃至 60 分反応せしめ、50% 硫酸 0.5 cc を加えて反応を停止せしめて後、直ちに炭酸ガスを約 20 分間通気して、生成している硫化水素を受容管の方へ追いやり、その後受容器の内容 (I: 5% 醋酸亜鉛 5.0 cc, II: 0.05% パラジメチルフェニレンチアミン 5.0 cc, III: 12.5% 硫酸鉄アンモン 1.0 cc) を混合して強く振盪、約 1 時間放置後、生成せるメチレ

第 1 図

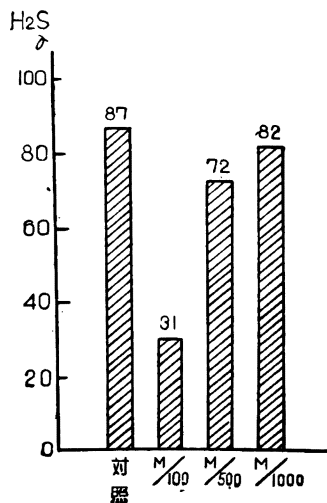


ンブルーを、日光光電比色計 (フィルター 660 mμ) を用いて比色定量した。基準直線は既知量の硫化水素を同様処理する事により予め計測した。なお、INAH その他の薬剤は第1報<sup>1)</sup>

の如くにして調製、上記蒸留水の代りに加えた。

### 実験成績

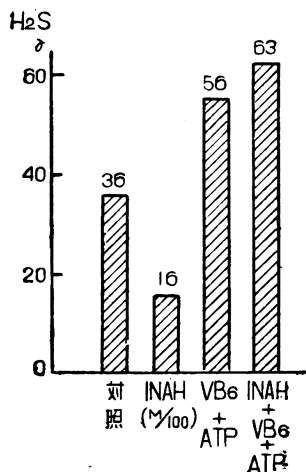
第2図は INAH 感受性 BCG アセトン乾燥菌によるチス테인脱硫化水素作用に対する INAH の影響



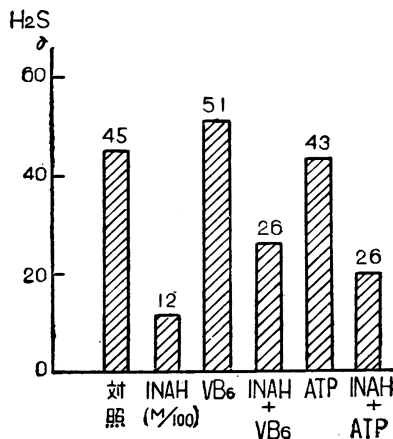
チス테인脱硫化水素作用に対する INAH の影響を各濃度において検した成績であるが、対照においては 87 r の硫化水素を証明したに対し、M/100 INAH を添加したものは 31 r、M/500 では 72 r、M/1000 では 82 r で、M/1000 では殆んど阻害を見なかつた。

次にトランスアミネーション反

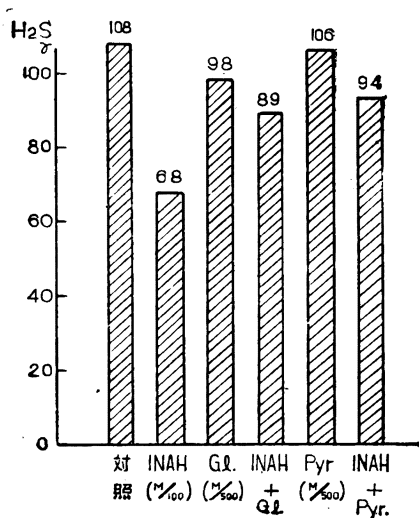
第3図 INAH のチス테인脱硫化水素作用阻害に及ぼす VB<sub>6</sub> 及び ATP の影響



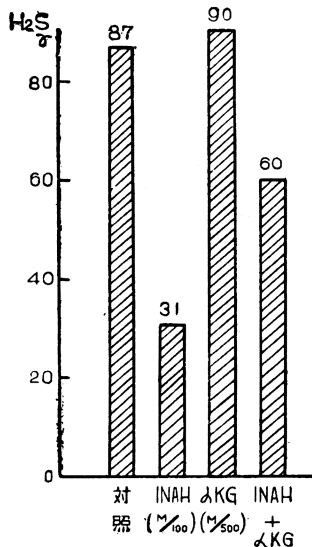
第4図 INAH のチス테인脱硫化水素作用阻害に及ぼす VB<sub>6</sub>, ATP 各単独の影響



第5図 INAH のチス테인脱硫化水素作用阻害に及ぼす葡萄糖 (GL) 及び焦性葡萄糖ソーダ (Pyr.) の影響

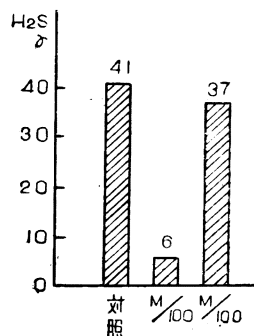


第6図 INAH のチス테인脱硫化水素作用阻害に及ぼす α-ケトグルタル酸 (αKG) の影響



阻害に及ぼすカルボニール物質の影響について検してみた。第5図は M/100 INAH の本反応阻害に及ぼす葡萄糖及び焦性葡萄糖ソーダ (各 M/500) の影響をみた成績であり、第6図は α-ケトグルタル酸 (M/500) の影響である。いずれの場合にも INAH による反応阻害が相当程度減弱されるのを認めた。第7図は 100 r/cc INAH 耐性 BCG のアセトン乾燥菌を酵素材料とした際の INAH の影響を検した成績であるが、その阻害度は感受性菌との間に差を見出し得なかつた。

第7図 100 r/cc INAH 耐性 BCG によるチス테인脱硫化水素作用に及ぼす INAH の影響



応りの場合と同様、INAH の本反応阻害に及ぼすピリドキシン (VB<sub>6</sub>) 及びアデノシン三リン酸 (ATP) の影響について検した。VB<sub>6</sub> は塩酸塩、ATP は Ba 塩で各 500 r を添加した。その成績は第3図の如くで、この両者の添加により本反応は著明に促進され、又 M/100 INAH による阻害は完全に排除されるのを認めた。

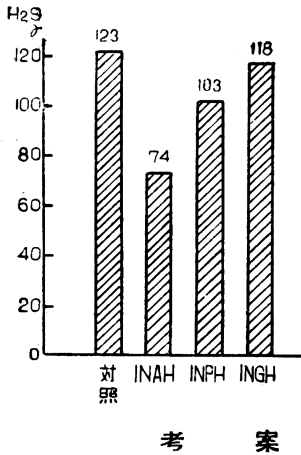
第4図は VB<sub>6</sub> 及び ATP 各単独の INAH 阻害に及ぼす影響について検した成績である。これ等物質各単独の添加では本反応は促進されないが、M/100 INAH による反応阻害は幾分減弱されるのが認められた。

この ATP による INAH 阻害の減弱に対する解釈の一つとして、第1報におけると同様の考えから、INAH

次に INAH の誘導体である N-イソニコチル-N'-イソプロピルヒドラチン (INPH) 及び N-イソニコチル-N'-グルコシルヒドラチン (INGH) の作用を各 M/100 において INAH と比較した。その成績は第8図の如くで、阻害の強さは INAH, INPH, INGH の順であり、INGH では殆んど阻害を認めなかつた。

第8図はダイハイドロストレプトマイシン硫酸塩 (SM) 及びパラアミノサリチル酸ソーダ (PAS) の作用を同じく各 M/100 において INAH と比較した成績である。その作用は INAH 最も強く、SM にても約 40% の阻害を認めるが、PAS には殆んど阻害作用のないのが認められた。

第8図 チス테인脱硫化水素作用に及ぼす IANH 及び誘導体の影響



### 考案

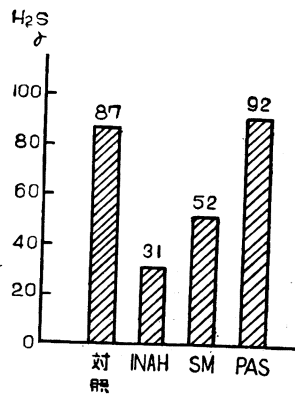
上述した如く、BCG のアセトン乾燥菌はチス테인より硫化水素を放出せしめる能力をもっている。しかも本作用が VB<sub>3</sub> 及び ATP の添加により著明に促進されることより、本酵素は B<sub>3</sub> 酵素系に属するものと想像せられる。従つて IANH の脱硫化水素作用阻害は、トランスアミナーゼの場合と同様、酵素活性基であるカルボニール基と、IANH のヒドラジド型との結合に因するものと考えている。又 VB<sub>3</sub> 或いは VB<sub>3</sub> 加 ATP による IANH 阻害の減弱乃至排除される現象もトランスアミナーゼにおける場合と全く同様に解釈し得る。

一方 ATP 単独添加による IANH 阻害の減弱も同様に無気的条件下において細胞内に生ずるカルボニール型解糖中間物質に因すると考えているが、前述の如くカルボニール化合物は一般に IANH 阻害を減弱せしめ得るので、ATP による阻害減弱の機構についてはなお確言の域に達しない。

IANH 耐性 BCG による本反応も、IANH により感受性菌の場合と同様に阻害されるが、これは本実験がアセトン乾燥菌を使用したことによる為であろうと思われるが、この点、なお今後の研究に俟ちたい。

以上 IANH が BCG によるチス테인脱硫化水素作用を阻害することは事実であるが、過去第3報<sup>11)12)</sup>迄に報告した如く、IANH, INPH, INGH による本反応阻害の程度が、培養実験における此等薬剤の抗菌力と平行しないこと、或いは結核菌発育阻止濃度よりも遙かに高い濃度においてのみ本反応を阻害すること等より、本反応の阻害が IANH の作用の本質的部分であるとは言いがたいが、何らかの役割は果しているものと推察する。

第9図 チス테인脱硫化水素作用に及ぼすチハイドロストレプトマイシン (SM) 及びパラアミノサリチル酸ソーダ (PAS) の作用比較



### 結 論

- 1) BCG のアセトン乾燥菌は、チス테인脱硫化水素作用を持つている。
- 2) 本反応は VB<sub>3</sub> 及び ATP の添加により著明に促進せられる。
- 3) IANH はこの反応を阻害する。
- 4) IANH のこの阻害は VB<sub>3</sub> 或いは VB<sub>3</sub> 加 ATP により減弱乃至排除される。
- 5) IANH のこの阻害は、又、葡萄糖、焦性葡萄糖ソーダ及び α-ケトグルタル酸により相当程度減弱される。
- 6) IANH 耐性 BCG のアセトン乾燥菌による本反応は、IANH により阻害され、感受性菌との間に差異を認め得ない。

乾燥菌による本反応は、IANH により阻害され、感受性菌との間に差異を認め得ない。

7) INPH も本反応を阻害するが、その阻害度は IANH に比して弱い。INGH には阻害作用を認めない。

8) SM も本反応を阻害するが、その阻害度は IANH に比して弱い。PAS には殆んど阻害作用を認め得ない。

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。

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) 酒井：結核，29，161，1954。
- 2) C. Fromageot, E. Wookey and P. Chaix: *Enzymologia*, 9, 193, 1940.
- 3) C. V. Smythe and D. Halliday: *J. Biol. Chem.*, 144, 237, 1942.
- 4) C. Fromageot: *The Enzyme*, 1, 1237, 1951.
- 5) M. Suda, Y. Kizu, T. Saigo and A. Ichihara: *Med. J. Osaka Univ.*, 3, 469, 1953.
- 6) K. Ohigashi, A. Tsunetoshi, M. Uchida and K. Ichihara: *J. Biochem.*, 39, 211, 1952.
- 7) P. Desnuelle and L. Grand: (4) より引用。
- 8) R. E. Kallio: *J. Biol. Chem.*, 192, 371, 1952.
- 9) E. A. Delwiche: *J. Bact.*, 62, 717, 1951.
- 10) M. Suda, T. Saigo and A. Ichihara: *Med. J. Osaka Univ.*, 5, 127, 1954.
- 11) 山本：結核，29，193，1954。
- 12) 酒井・伊藤：結核，29，237，1954。