

## 結核菌の Purine 生合成と PAS の制菌機作

(第 2 報)

名古屋大学医学部生化学教室 (指導 掘田一雄教授)

国立大府荘研究室 (指導 勝沼六郎荘長)

勝沼信彦・石川栄治・渡会一男

(受付 昭和 30 年 4 月 19 日)

## は し が き

本誌前報<sup>1)</sup>において、PAS で部分阻害した鳥型結核菌の培養液から、Purine の前駆体である 4-amino-5-imidazol carboxamide (AICA) とその riboside を捕捉し得た。さらに増殖を目標にして、PAS への拮抗実験により次の結果を得た。完成した Purine 化合物により、PAS の制菌作用は減弱される。さらに Purine 閉環助酵素の主要成分である葉酸、P-amino benzoyl-glutamate, P-aminobenzoic acid (PABA) で著明に PAS の制菌作用が打消される。それ故 PAS は Purine 閉環助酵素である leucovorin, (tetrahydro-formyl-folic acid) の生合成を PABA との拮抗において阻止する為に Purine の閉環が阻害されるのであることを報告した。

その後、PAS 阻害培地中に蓄積する AICA 系化合物を定量し、さらにこの AICA の蓄積が、増殖で PAS の制菌作用に拮抗した化合物により減少することを測定した。次に、化学合成 leucovorin により非常に有効に PAS の制菌作用が消失すること、leucovorin と ATP を *ra*: liver homogenate で処理すると、非常に PAS への拮抗力の強い新化合物が酵素的に合成されることを明らかにした。これが今日迄 Purine 閉環助酵素といわれる leucovorin よりも一層真の閉環助酵素に近いものであるかどうかは、今後の研究により報告したい。

### [1] PAS による AICA 蓄積および拮抗薬物による AICA 蓄積の減少

#### A) 実験材料および実験法:

鳥型結核菌菌調株の 5~7 日培養菌を 1.25 mg/cc の割合に PAS を含有する arabinose-glycine 培地 (A-G 培地と略称し、次の組成を有する。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g, Mg-Sulfate 0.5 g, Glutamate 2.5 g, L-Arabinose 2.5 g, Glycine 1.0 g, を 1 l の水に溶解しアンモニア水で PH 7.4 にする) に 3~4 日培養する。接種菌量は A-G 培地 100 cc に約菌

室素 22.5 mg % 浮游液 1 cc とする。これは比濁により調製する。

この培養液を nonacetylatable diazotizable amine として AICA 系化合物を定量する。

前報でも詳述した如く、AICA 系化合物の遊離アミノ基は、不活性で、失水醋酸室温 30 分放置ではアセチル化されない。ところが PAS のアミノ基は、この処理で完全にアセチル化される。したがって、その後 bratton-marschall<sup>2)</sup> のチアゾ反応を行えば、AICA のアミノ基のみがチアゾ化され赤色呈色をする。標準には、平田研究室化学合成 AICA を使用した (AICA 100 μM が E = 0.123 に相当する)。他の方法はイオン交換樹脂を PH 9~10 (NaOH) にして、IRA-400, 150~200 メッシュ、h=15 cm のカラムに吸着後、PH 7.0 に調製した蒸留水で洗滌し、0.01 NHCl で 30 cc 以内に完全に elute する。これを 270 mμ の吸収で定量する (AICA 110 μM が E 270=0.80 に相当する)。この方法での回収率は 98~100% である。増殖において PAS に拮抗した薬物による AICA 蓄積の減少は、上記 PAS 含有 A-G 培地に ribonucleic acid (RNA) (酵母より抽出したもので、磷含量 8.4% のものを使用した) を表記濃度に添加した培地を使用した。

#### B) 実験結果:

表 1 の如く A-G 培地では、PAS が含有しない時でも 11.4 μM/cc の AICA 蓄積がある。それが、PAS が 1.25 mg/cc 存在すると 43 μM/cc に増加する。同一量の PAS が共存していても RNA が存在すると著明に減少する。勿論、菌増殖量は顕著に増加する。PAS のこの AICA 蓄積を減少させる作用は非常に著明である。

#### C) 考 察:

PABA の場合は、直接 PAS と拮抗して leucovorin 系よりなる Purine 閉環の助酵素合成を起させるので、閉環がどんどん起り、AICA 系蓄積を起さなくなるのは当然であるが、RNA 減少するのは、意味が異なるものと考えられる。RNA で増殖抑制が取り除かれるのは、PAS

で“de novo”の Purine 合成路 (AICA 経由) は阻害されたままであるにもかかわらず完成した Purine が

表 1 AICA 蓄積と拮抗薬物による AICA 蓄積の減少

PAS 濃度	拮抗薬物および濃度		AICA 蓄積量 $\mu M$
0	0		11.4
1.25 mg/cc	0		43.0
	RNA	0.125 mg/cc	41.0
		0.25 "	31.8
		0.5 "	25.0
1.0 "		18.2	
1.25 mg/cc	PABA	0.25 mM	18.2
		0.5 "	14.1
		1.0 "	9.6

RNA から豊富に供給されるためである。したがって、AICA 蓄積には変えない筈であるのに、実際は表 1 の如く減少する。この結果は、同一化合物生合成の二つの異なった路 (AICA 経由の“de novo”の合成路と完成 Purine 利用路) がある場合には、一方 (Purine 利用路) が活性化すると、他方 (AICA 経由) が不活性化すると解釈することが出来る。これは、生体内酵素系相互の微妙な調和、調節を物語るもので興味深い事実である。

PAS は、AICA 系の蓄積を起させ、Purine 系および閉環助酵素系化合物は、PAS の増殖阻止作用を除くのと平行して、AICA 系の蓄積を減少させることを示し得た。

## (2) Leucovorin 等による拮抗

前報において、PABA, P-aminobenzoyl glutamate, folic acid で、よく拮抗するところから PAS は結局 Purine 閉環の助酵素 formyl co F.(leucovorin, tetra hydro formyl folic acid) の合成を阻止する為であろうと推論した。

今度は、直接化学合成 leucovorin を得て、これで拮抗実験を行ったところ、前 3 者のどれよりも強く PAS に拮抗することがわかった。

### A) 実験法:

PAS-Na 塩を souton 液体培地に倍数希釈したものに一定濃度の leucovorin を加え、3 日~5 日培養の幼若菌を硝子球入ナス型コルベンでよくすり、これを希釈して比濁で一定菌濃度浮遊液を作る (菌室素 5 mg %)。この一白金耳を接種 37°C で 5~7 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 (+) とし、菌室素約 25  $\tau/cc$  以下に相当する。薄菌膜を作ったものを (++) とし、菌  $N$  約 75~25  $\tau/cc$  に、厚菌膜を作ったものを (###) とし、菌  $N$  約 100  $\tau/cc$  以上に相当する。菌  $N$  はすべて、マイクロキエルダール (バルナス型) で測定する。

### B) 実験結果:

拮抗能を定量的に表現する為に、拮抗指数なる値を定める。それは拮抗薬物 1 Mol で PAS 何 Mol を無効ならしめ得るかという値である。

最高の拮抗を呈する  $10.5 \times 10^{-5}$  Mol の leucovorin の拮抗指数は 1100 である。葉酸は最高の拮抗指数が 155 であることから見て約 7 倍の拮抗能を有する。これから見ても leucovorin が結核菌でも purine 閉環の助酵素であり、PAS は leucovorin の生合成を阻止するものであることがわかった。

表 2 leucovorin による PAS への拮抗

leucovorin Mol	PAS Mol							
	29 $\times 10^{-2}$	11.5 $\times 10^{-2}$	5.8 $\times 10^{-2}$	2.9 $\times 10^{-2}$	1.4 $\times 10^{-2}$	0.7 $\times 10^{-2}$	0.25 $\times 10^{-2}$	0.18 $\times 10^{-2}$
0	-	-	-	-	-	±	++	##
$1.3 \times 10^{-5}$	-	-	-	-	-	+	++	##
$5.25 \times 10^{-5}$	-	-	-	+	+	++	++	##
$10.5 \times 10^{-5}$	-	+	++	##	##	##	##	##
$21 \times 10^{-5}$	-	+	++	##	##	##	##	##
$105 \times 10^{-5}$	-	-	+	++	##	##	##	##

また各種 Purine で拮抗可能なことは前報で述べたが、Purine free base と riboside と ribotide の内でどれが効果がよいかを見た。

表 3 から見ても riboside が一番拮抗能がよい。Guanine 系でも同じである。また高濃度になった時の毒性も最も少ないようである。

表 3 free base, riboside, ribotide による PAS への拮抗

Adenine 系化合物 500 $\tau/cc$	PAS Mol							
	11.5 $\times 10^{-2}$	5.8 $\times 10^{-2}$	2.9 $\times 10^{-2}$	1.4 $\times 10^{-2}$	0.7 $\times 10^{-2}$	0.35 $\times 10^{-2}$	0.18 $\times 10^{-2}$	
0	-	-	-	-	+	++	##	
Adenine	-	-	+	++	##	##	##	
Adenosine	-	-	++	++	##	##	##	
Adenylic acid	-	-	-	+	++	##	##	
RNA (yeast)	-	+	++	##	##	##	##	

free base は濃度が高くなるとそれ自身増殖抑制作用が強い。ribotide はほとんど拮抗能がない。これは隣酸がつくと細胞膜を通りにくくなり Utilisation しにくくなるためではあるまいか、核酸は最も拮抗能よく、又毒性もないようである。これは各種 base が揃っておりしかも量がバランスが取れているためであろう。高濃度の場合にはアミノ酸の単独毒性と同様に base 単独毒性があると考えられる。又 INAH, Tibion, Streptomycin は PABA, 葉酸により拮抗出来ない。

**[3] PAS に著明な拮抗能を呈する新酵素的 Leucovorin 誘導体の補捉**

最近 G. R. Greenberg<sup>3)</sup> が Leucovorin に肝ホモチネートを作用させると Leucovorin より作用の強い Purine 閉環助酵素が得られることを速報中に簡単に述べている。われわれも果してかかるものが存在するか否かを、PAS への拮抗能率を目標として実験してみた。

**A) 酵素的合成および性状**

化学合成 Leucovorin と ATP を基質としラットの肝ホモチネートの上清部分 (cell free) を酵素液とし、Mg イオン存在下に 37°C 30 分間作用させ、90°C 5 分間加熱して除蛋白後、60°C で減圧濃縮し、醋酸: Butanol: 水 = 1: 4: 2 を使用しペーパークロマトグラムで展開すると R<sub>f</sub> が 0.28~0.35 に強い青色蛍光を有する化合物が得られる。未反応の Leucovorin はやはり青緑色蛍光を有するが、これより上で R<sub>f</sub> が 0.35~0.45 に明らかに分離したスポットとして出現する。この部分をそれぞれ水で溶出して紫外吸収を測定すると Leucovorin は極大が 280 mμ で 320~380 に軽い肩が出る。極少は 240 mμ であるが、新誘導体は極大が 255 mμ と 365 mμ にあり極少は 220 mμ と 320 mμ にある特異な吸収を示す化合物である。図 2 にこれを示す。このものは 0.5 N HCl で 100°C 30 分弱い加水分解すると 280 mμ に吸

図 1 Leucovorin の構造式 (tetra hydro formyl folic acid)

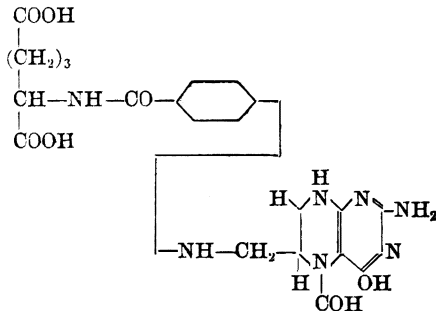
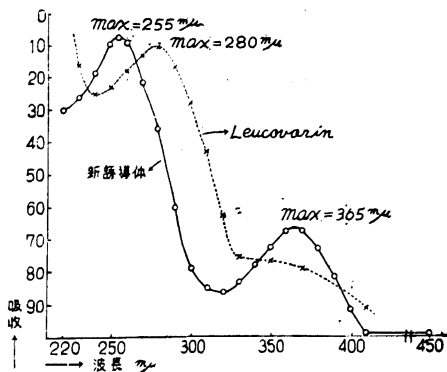


図 2 Leucovorin 新誘導体の吸収曲線



収を有する Leucovorin とほぼ同一性質 (吸収および R<sub>f</sub>) を有する化合物を放出する。したがってこの新誘導体は Leucovorin 誘導体と考える。さらに Orcinol-HCl 反応<sup>4)</sup> で Ribose を、又 Fiske 法<sup>5)</sup> で磷酸を含有することが明らかとなった。

この誘導体の構造および G.R. Greenberg や Peabody 等が F(x) と仮称している化合物との異同はさらに研究を進めて報告したい。

**B) 新誘導体の PAS への拮抗能:**

未だ結晶化しておらず、定量法が定めてないので次の如き方法で PAS への拮抗能の有無をしらべた。前記方法で分離したペーパー 1 枚のそれぞれの R<sub>f</sub> のところを切り、細切して 2cc の水に 90°C 15 分間溶出する。これを順次倍数稀釈したそれぞれ 1cc を 10 mg/cc PAS の 1cc に添加する。これで各管に PAS 5 mg/cc と溶出物を含んだものが出来る。これにそれぞれ菌を接種する。

表 4 新誘導体の PAS への拮抗

各管 PAS 5 mg/cc	溶出物の 稀釈度						
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	0
0.35~0.45 Leucovorin	++	++	+	-	-	-	-
0.28~0.35 新誘導体	###	###	###	++	++	+	-

1 枚のペーパー上の未反応 Leucovorin と新誘導体の量の割合が不明であるため、どちらが強いと比較することは出来ないが、非常に強い PAS への preventing effect があることは確かである。

**[4] 結 論**

1) PAS 阻害鳥型結核菌の培養汚液に蓄積する Purine の前駆体 4-amino-5-imidazol carboxamide を定量し、この蓄積は PAS による増殖抑制に拮抗する RNA や PABA で著明に減少する。

2) Leucovorin は PABA, p-aminobenzoyl glutamate, folic acid, RNA, Purine のどれよりも強い拮抗能を示す。

3) Purine 系化合物の中では riboside > free base > ribotide の順に拮抗する。RNA は riboside よりさらに強い。

4) INAH, Tibion, STM は PABA, 葉酸で拮抗出来ない。

5) Leucovorin と ATP から肝酵素により生合成される新 Leucovorin 誘導体は非常に強い PAS への拮抗能を有する。

山村雄一先生、堀田一雄教授、勝沼六郎所長の御指導に深謝する。敬友杉野幸夫君の御助言に感謝する。国立大府荘研究室加藤水野助手に御礼申上げる。

## 文 献

勝沼信彦: 結核, 29, 413 (1954).

Sevag and Stewart: Arch. Bioche. Biophy, 41, 9 (1952).

G. R. Greenberg: J. Ame. Chem. Soc., 76-(5),

1458 (1954).

4) Kerr, S. E., Seraidarian: J. Bio. Chem., 159, 211 (1945).

5) C. H. Fioke and Y. Subbarow.: J. Bio. Chem., 66, 375 (1925).

6) R. A. Peabody: Fed. Proc. 12, (1953).