

鳥型結核菌のニコチン酸代謝について

石 下 泰 堂・田 中 伸 一
茂 兼 英 寿・泉 桂 三

名古屋大学医学部内科第一講座一主任 日比野進教授

受付 昭和31年2月15日

緒 言

結核菌は他の *Mycobacteria* とともに、広範囲な物質代謝をすることが知られており、各方面から検討が進められている。

著者らは、鳥型結核菌が、ニコチン酸を単一窒素源とせる合成培地に発育可能な事実を見出し、この代謝過程を追試してみた。すでに安息香酸を中心とした、一連の芳香族化合物の代謝に関しては Gale¹⁾²⁾, Bernheim³⁾⁴⁾, 山村⁵⁾⁶⁾ ら多数の学者の報告があるが、ニコチン酸はこれらとは核構造の異なつた異環式化合物でありこれについての研究は未だなされてない。ニコチン酸は DPN として、生体内酸化還元反応に重要な役割を演ずるものであり、Tryptophan より 3-Hydroxyanthranilic acid を経てニコチン酸の合成される過程、また動物排泄物中への Metabolite の排出などに関する成績は数多報告があるが、著者らは、上に見出した事実より、鳥型結核菌がニコチン酸を一旦分解し、さらに菌体蛋白成分に再合成するものであることを知り、その過程を静止菌液を用いた実験により検討し、結果を報告する。

実験材料および実験方法

本実験に使用した菌はすべて鳥型結核菌竹尾株である。本菌を味の素を窒素源とするソートン培地に接種、37°C、4日間培養後ガーゼ濾過により菌体を採集する。

ニコチン酸適応菌は、上記培地中味の素を半量とし、培地1lにつき2gの割合にニコチン酸を加え、pHを中性に補正せるものと同様に培養して既適応菌としてえた。

採取した菌塊は、培地成分を除く目的で、Homogenizer により均等化後蒸溜水にて洗滌、遠沈、本操作を3回繰返して後、pH7.2の0.1M 磷酸緩衝液に、毎ml中菌塊0.05mlを含有するごとく懸濁せしめて休止菌液を調製する。

ワールブルグ検圧計による実験の際には、この菌液1mlを一容器に使用、基質は0.1M中性溶液0.2mlを添加、反応液量2.0ml、中央副室には20%KOH 0.2mlを入れ、恒温水槽温度37°Cにて酸素吸収量を測定した。

基質として使用したのは、ニコチン酸、2-Hydroxynicotinic acid, 6-Hydroxynicotinic acid, および α -

Pyridone であり、このうちニコチン酸のみは市販の製品を使用した。他はすべて研究室内で合成せるものであり、合成法は Philips⁷⁾⁸⁾の記載に基き、概略図示する方法によつた(図1)。えられた Sample についての融点は、2-Hydroxynicotinic acid 245°C, 6 Hydroxynicotinic acid 293°C, α -Pyridone 102~106°Cであつた。

他に100ml容量の Erlenmeyer フラスコに、上記組成と同一割合で液量50mlとせる反応系をつくり、37°C恒温水槽中にて振盪、3~9時間反応後ザイツ濾過器にて濾過、濾液および菌体につき次の実験を行つた。

濾液はこれを時計皿にとり、Vacuum Desiccator 中にて一旦乾燥後、少量の蒸溜水にて溶解し、これを試料としてペーパークロマトグラフを行つた。

菌体は乳鉢にとり1N硫酸を加え、硝子粉とともに充分磨砕しつつ5倍量のアセトンにて抽出、遠沈上清のpHを中性に補正後減圧濃縮し、これをペーパーに展開した。

展開用濾紙としては東洋濾紙 No. 3を使用した。これはクロマトグラム検出のため紫外線の吸光を観察する関係係、濾紙自体の吸光のもつとも少ないものとして選択したのである。

検出法としての紫外線下吸光スポットの観察は、光源としてはマツダの低圧殺菌燈を使用し、これに科学研究所製の紫外線フィルターを併用した。このフィルターは透過範囲2,700Å~2,450Åであり、2,537Åに最大透過度を有するものである。その他ニンヒドリン試薬、ドラージェンドルフ試薬の噴霧⁹⁾、ブロムシアン反応¹⁰⁾等を行つた。

濾液中遊離アンモニア量の測定は Conway の微量拡散定量法¹¹⁾に従い行つた。

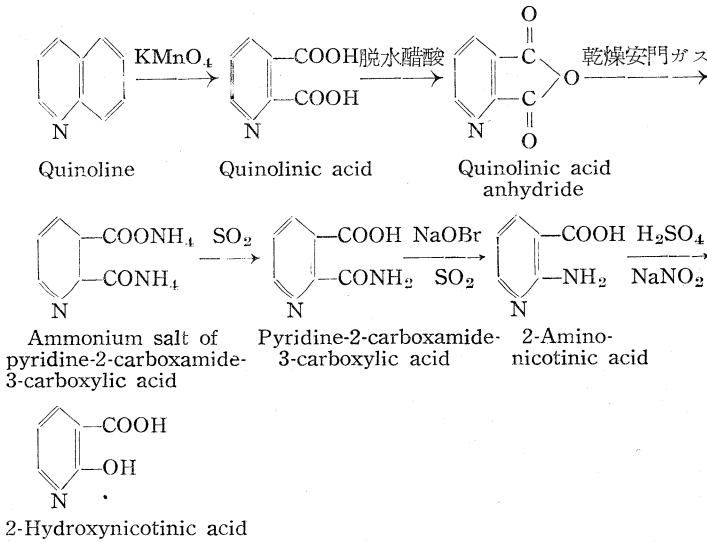
展開溶剤としては主としてフェノール(20%含水)を使用し、他に醋酸ブタノール水(1:4:5)、水飽和n-ブタノール、0.1M磷酸緩衝液飽和ブタノール(pH7.2)、10%アンモニア水飽和ブタノールを用いた。

実験結果

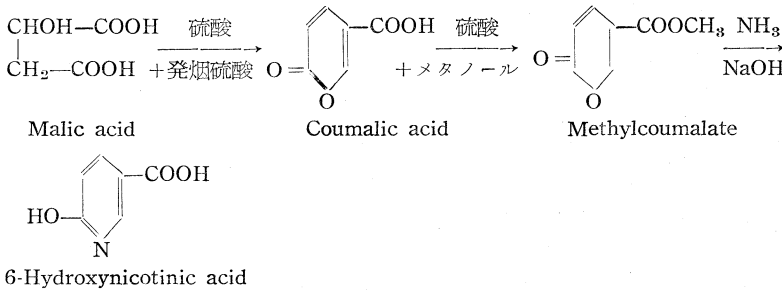
1) 菌浮遊液によるニコチン酸酸化

結核菌生菌に基質を作用させてその酸素吸収を測定する場合、すでに多数の人の指摘しているごとく¹²⁾、内部

図1 2-Hydroxynicotinic acid 合成法



6-Hydroxynicotinic acid 合成法



α -Pyridon 合成法

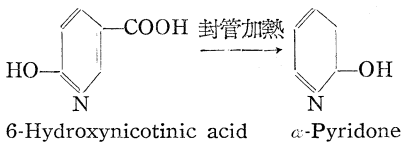
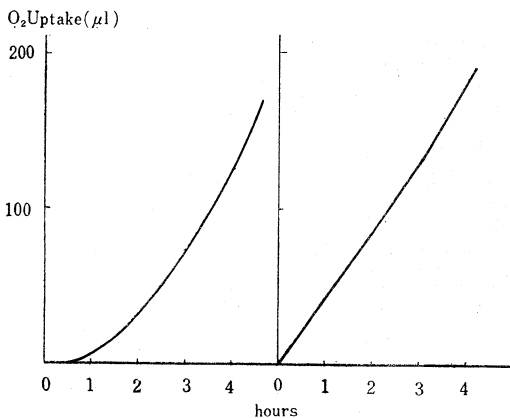


図2 鳥型結核菌によるニコチン酸酸化



a. 非適応菌の場合
b. ニコチン酸適応菌による場合

呼吸が非常に大きいという事実と遭遇する。これは菌液を aerate すること、氷室中に starvate すること等の操作を加え、ある程度は減少せしめるが、これを曇とすることは不可能であり、かつこの間に適応酵素産生能も低下をきたす。従つて実験には新鮮菌液を使用し、基質を加えた場合の酸素消費量から内部呼吸によるそれを差し引いたものを、その基質酸化による酸素消費量としてあらわした。

図2は本反応による酸素吸収を示したもので、約60分の誘導期を必要とし、その後漸く直線的となる。ニコチン酸既適応菌を用いた場合は、この誘導期は消失する。すなわちニコチン酸化は適応的に行われる。

1) モルのニコチン酸酸化に要する酸素消費は、理論値 5.5 モルであるが、実測値では 2 モルであった。また反応後の Medium 中の遊離アンモニア量を測定するも、その放出は見られなかつた。

2) 2-Hydroxynicotinic acid, 6-Hydroxynicotinic acid, α -Pyridone の酸化

これらのものはニコチン酸が酸化された場合、第1段階の生成物としてもつとも可能性ありと考えられる 2- および 6- 位の酸化物、

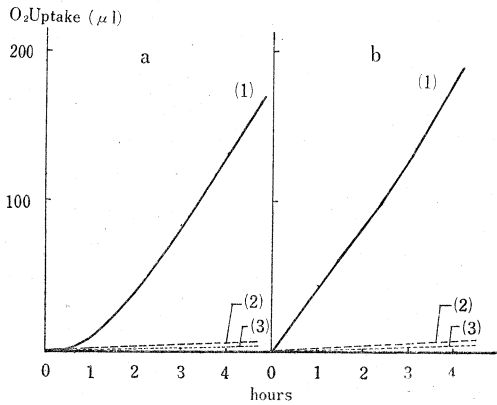
およびそれらの脱炭酸された形の化合物として選んだものである。

結果は図3に示すごとく、2-Hydroxynicotinic acid および α -Pyridone は全然酸化されず、6-Hydroxynicotinic acid は誘導期を以て酸化され、ニコチン酸適応菌によると、この誘導期は著明に短縮し、ニコチン酸適応菌は 6 位の酸化物にも同時に適応していることを示した。

3) ニコチン酸代謝物のメーパークロマトグラフによる分析

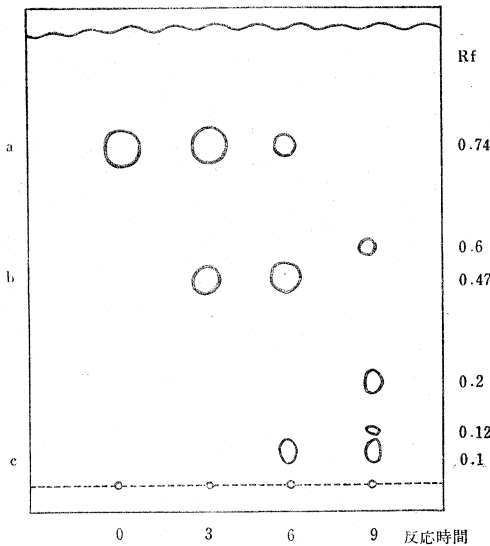
a) 濾液を、フェノールを溶媒とし、反応前、反応後 3, 6, 9 時間後にペーパーに展開したクロマトグラムを、模式化して示すと図4のごとくなる。Rf 0.74 および 0.47 に見られるスポットは、紫外線吸収スポットとして見られるもので、それぞれ a, b と命名した。

図3 鳥型結核菌によるニコチン酸誘導体の酸化



- a. 非適応菌の場合
- b. ニコチン酸適応菌による場合
- (1) 6-Hydroxynicotinic acid
- (2) α-Pyridone
- (3) 2-Hydroxynicotinic acid

図4 ニコチン酸代謝生成物のペーパークロマトグラフ (溶媒フェノール)



このaおよびbの性格を明かにするため、反応3時間の試料を、水飽和ブタノール、0.1M 磷酸緩衝液飽和ブタノール (pH 7.2)、醋酸ブタノール、10%アンモニア水飽和ブタノール、フェノールの各溶媒にて展開し、それぞれのRf値をニコチン酸、上記酸化物とともに比較検討してみた。その結果、表1に示すごとく、いずれの場合もaはニコチン酸と、bは6-Hydroxynicotinic acidと完全にRf値の一致をみた。

さらにこのbスポットの部分をかき取り、蒸留水にて溶離し、塩酸酸性として沈澱結晶化させたものを再溶解し、その紫外外部吸収スペクトルを測定、ニコチン酸、その酸化物溶液と比較してみた。結果は表2、図5に示す

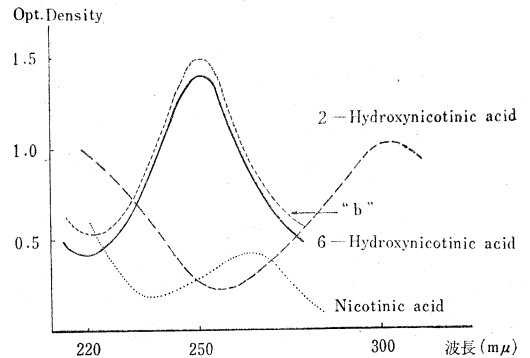
表1 各種溶媒を用いたペーパークロマトグラフのRf値

試料	溶媒	水飽和ブタノール	M/10磷酸緩衝液飽和ブタノール	醋酸ブタノール	10%アンモニア水飽和ブタノール	フェノール
Nicotinic acid		0.12	0.14	0.73	0.24	0.74
a			0.15	0.73		0.74
b		0.05	0.05	0.66	0.08	0.47
6-Hydroxynicotinic acid		0.05	0.05	0.67	0.08	0.48
2-Hydroxynicotinic acid		0.04		0.69	0.11	0.54

表2 紫外外部吸収スペクトルの比較

試料	λ (pH 7.2)	max (mμ)	min (mμ)
Nicotinic acid		263	256
6-Hydroxynicotinic acid		251	222
b		251	223
2-Hydroxynicotinic acid		306	256

図5 紫外外部吸収スペクトル



如くで、やはり吸収スペクトルの上からも、bは6-Hydroxynicotinic acidと一致した像を示した。

さらにRf 0.1には、cスポットを検出した。これはドラージェンドルフ試薬噴霧により、陽性の著色を呈した部分であり、プロムシアン反応では、a、bいずれも呈色するが、cは陰性であった。

反応後9時間のものでは、以上の他にニンヒドリン試薬により3つのアミノ酸を検出した。Rfはそれぞれ0.6、0.2、0.12であり、これらはおのおのアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸に一致する。このうちグルタミン酸が顕著で、他は極く微量であった。

b) 菌体内抽出物の場合、このクロマトグラフはやや複雑であり、対照の基質添加なきものについても菌体内アミノ酸が存在する。われわれの行つたものについて

も、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンと同定し、反応5時間後の試料では、アミノ酸の種類には変化なく、ただグルタミン酸の著明な増量が観察された。なおRf 0.1にはやはりドラージェンドルフ反応陽性のcスポットの存在をみた。

考案および総括

以上の諸成績より検討を加えてみると、鳥型結核菌はニコチン酸を適応的に酸化利用する。しかしてその利用は緒言に述べた如く、これを単一窒素源として発育可能なことより考えれば、単にエネルギー源として分解するのみならず、これをアミノ酸、菌体蛋白へと合成同化するのではなくてはならない。実験結果においても反応終止時の酸素消費が理論値に達せず、かつアンモニアの遊離を認めないことは、これを裏書きすると思われる。

しかして第1段階の生成物が、6の位置の Monohydroxy Derivative たる 6-Hydroxynicotinic acid たることは、Adaptive Pattern, ペーパークロマトグラフにおけるRf値、吸収スペクトルの合致せるスポットとして把握されたことより、確定的である。さらに本反応を触媒する cell free な酵素抽出も試みたが、ニコチン酸酸化酵素の抽出は不可能に終つた。しかし、6-Hydroxynicotinic 酸化酵素は、一応次の手段で粗酵素状態に抽出しうることを観察した。すなわち

適応菌
↓
アセトン乾燥粉末
↓
硝子粉とともに磨砕、水にて抽出
↓
一夜氷室放置後遠沈
↓
硫酸分割

しかし未だ Activity の低いこと、不安定なことから、さらに吟味を重ね発表する予定である。

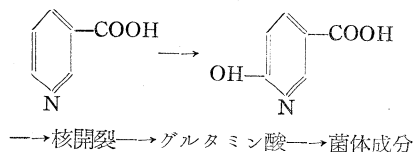
スポットcとして見られた物質は、おそらくさらに反応の進んだものであり、核開裂せるもの、または核構造の変化した物質ではないかと考えられる。またグルタミン酸がニコチン酸代謝過程に出現するを思わせる事実は、興味深いところであり、ピリジン核の動態がここで問題とならう。

ニコチン酸が生体内でトリプトファンより合成せられる過程中、3-Hydroxyanthranilic acid→ニコチン酸の過程は、ベンゼン核よりピリジン核への転移ケースとして、最近生化学的興味の中心問題として取り上げられ、多数の学者の研究対象となり^{13)~15)}、Henderson¹⁶⁾、Bonner¹⁷⁾らはさらにこの間の中間体を2,3提唱している。この際3-Hydroxyanthranilic acidのアミノ基中のNが、ピリジン核Nに至ることは、N¹⁵でlabelした実験で確かめられており、逆にピリジン核中のNが、核開裂後アミノ化し、Transaminationによりグルタミン酸

を生成することも、ありうることであろうが、いまだ推論の域を出ず、今後の研究問題である。

また Roth¹⁸⁾はC¹⁴で Carboxyl 基を label したニコチン酸を、マウスに接種し、その呼吸中にCO₂としてC¹⁴の放出を見ることから、Decarboxylation がニコチン酸代謝中に起ることを観察しているが、著者の実験ではα-Pyridone は酸化されなかつた。

以上論旨を要約模式化すれば次の如くなる。



結 論

鳥型結核菌がニコチン酸を単一窒素源とする合成培地に発育可能なことより、その代謝過程を明かにするため、該菌竹尾株静止菌液を用いた実験を行い、次の結果をえた。

- 1) 本菌はニコチン酸を適応的に酸化する。
- 2) 6-Hydroxynicotinic acid はニコチン酸に Successive Adaptation を受ける。
- 3) 菌液ニコチン酸反応系をペーパーで分割し、6-Hydroxynicotinic acid と Rf 値および吸収スペクトルの一致するスポットを認め、その代謝生成物なることを確認した。
- 4) 他にグルタミン酸および一未知物質を認めた。

本論文の要旨は昭和29年4月第29回日本結核病学会総会にて報告した。

文 献

- 1) Gale, G.R. : J. Bact., 63 : 273, 1952.
- 2) Gale, G.R. : J. Bact., 64 : 131, 1952.
- 3) Bernheim, F. : J. Bact., 43 : 385, 1942.
- 4) Eadie, G.S., Bernheim, F. and Fitzgerald, R.J. : J. Biol. Chem., 176 : 857, 1948.
- 5) 山村・笹川・安立 : 医療, 3 : 17, 昭24.
- 6) 山村 : 酵素化学の進歩, 第2集, 昭25.
- 7) Philips, A. : Ann. Chem., 288 : 253, 1898.
- 8) Philips, A. : Ann. Chem., 288 : 264, 1898.
- 9) 刈米, 橋本 : 薬誌, 71 : 436, 昭26.
- 10) Huebner, C.F. : Nature, 167 : 119, 1951.
- 11) Conway, E.J. : Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 1940.
- 12) Edson, N.L. : Bact. Rev., 15 : 147, 1951.
- 13) Heidelberger, C., Gullberg, M.E., Morgan A. F. and Lepkovsky, S. : J. Biol. Chem., 175 : 471, 1948.

- 14) Makino, K., Itoh, F. and Nishi, K. : Nature, 167 : 115, 1951.
- 15) Schweigert, B.S. and Marquette, M.M. : J. Biol. Chem., 181 : 199, 1949.
- 16) Henderson, L.M. : J. Biol. Chem., 181 : 677, 1949.
- 17) Bonner, D.M. and Yanofsky, C. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 35 : 576, 1949.
- 18) Roth, L. J., Leifer, E., Hogness, J. R. and Langham, W.H. : J. Biol. Chem., 176 : 249, 1948.