

Cycloserine の作用機序に関する実験的研究

第2報 Glutamic-Aspartic Transamination に及ぼす影響について

青 木 隆 一

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前維摩郷教授)

受付 昭和32年3月29日

緒 言

さきに著者¹⁾は新抗生物質 Cycloserine (CS と略す) がVB₆酵素系の強力な阻害剤であることを見出し、そのうち結核菌(鳥型, BCG), 大腸菌の各アセトン乾燥菌およびそれらの抽出粗酵素液ならびに白鼠脳ホモジェネイトによる Glutamic Acid Decarboxylation を著明に阻害することを報告した。今回さらに同じくVB₆酵素系の1つである Glutamic-Aspartic Transamination に及ぼす Cycloserine の影響を鳥型結核菌, BCG, 大腸菌の各生菌液およびそれらのアセトン乾燥菌ならびに抽出粗酵素液を用いて検討したので以下その成績を報告する。

実験材料および方法

酵素材料としては、鳥型結核菌竹尾株, BCG 竹尾株ならびに大腸菌K-12株を使用した。鳥型結核菌はグリセリン・フィオン培地に4日間, BCGは Sauton 培地に10日前後培養したものを、大腸菌は普通寒天培地に一昼夜培養したものをそれぞれ集菌, 3回生理的食塩水で洗滌後秤量した上、所定の濃度になるように手振り式コルベン法, あるいは Potter-Elvehjem ホモゲナイザーを用い再浮遊させたものを生菌液とした。またアセトン乾燥菌は法の如く作成し、生理的食塩水に再浮遊させたものを使用した。なお抽出粗酵素液はアセトン乾燥菌を等量の高砂と乳鉢中で充分磨砕した上、M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.8) で一昼夜氷室中で抽出し、4000r.p.m. 15分間遠心した上清(鳥型結核菌)またはM/20磷酸緩衝液 (pH 8.0) で抽出、0°C 12000r.p.m. 30分間遠心した上清(鳥型結核菌, BCG)をそれぞれ粗酵素液として使用した。

基質としてL-アスパラギン酸(石津製薬)およびα-ケトグルタル酸(石津製薬)を溶解 pH 修正後、各50μMを反応系に添加した。緩衝液は最終M/15磷酸緩衝液(pH 7.8)を用いた。反応はすべて Thunberg 管を用い、吸引器で5mmHgまで脱気後、Cycloserine と酵素液を37°C 30分間 Preincubation L. 副室より基質α-ケトグルタル酸を添加して30分間ないし60分間反応せしめ、氷水中に浸して反応を停止せしめた。その遠心上清1.0ccをWarburg 検圧計の容器に移し、生成した蔞酢酸量を Ostern²⁾ のアニリン-クエン酸法を用いて発生

するCO₂量を検圧法で定量し、さらにその残液につき蔞酢酸からアニリン-クエン酸添加より生成した焦性蔞酢酸量を Friedemann³⁾の法により定量した。なおもう一つの生成物であるグルタミン酸の定量は既報¹⁾の如く Cycloserine が大腸菌のグルタミン酸脱炭酸作用を阻害するので特別の場合のみ Gale⁴⁾の変法により定量した。

実験成績

〔I〕 結核菌(BCG, 鳥型結核菌)および大腸菌の各生菌液による実験

まずBCG生菌液を酵素材料として基礎的な予備実験を行った成績を表1に示した。蒸溜水のみあるいは基質のみの場合にもある程度のCO₂量の発生を認めたと、その量はわずかで以下の各反応系におけるCO₂量より酵素材料のみの反応系のそれを差引いたものを生成蔞酢酸による発生CO₂量としてμMに換算した。各反応液における蔞酢酸生成量は表1に記載した如くであり、最終10⁻²MCS添加により94.5%という強力な阻害を認めた。

表1 BCG生菌液による実験〔I〕

反 応 系	発生炭酸 ガス量 μl	生成蔞酢 酸量 μM	阻害率%
蒸 溜 水 の み	19.2	/	/
蒸 溜 水 + CS	18.3	/	/
生 菌 液 の み	46.9	0	/
生菌液+ アスパラギン酸	48.2	0.18	/
生菌液+α-ケ トグルタル酸	69.7	3.0	/
アスパラギン酸+α-ケ トグルタル酸のみ	28.2	/	/
完全 反 応 系	124.7	9.3	0
同上+10 ⁻² M CS	51.2	0.51	94.5

さらにBCG生菌液を用いて同様の実験を行い、生成焦性蔞酢酸量をも併せ定量した成績を表2に示した。最終10⁻²MCS添加により約82%の阻害を認めた。

ついで同条件下で大腸菌生菌液を酵素材料としてCSの影響を検討した成績を表3および表4に示した。最終

表2 BCG生菌液による実験〔II〕

反応系	生成焦性葡萄糖量 (μM)	阻害率(%)
生菌液のみ	0	
完全反応系	11.9	0
同上+10 ⁻² M CS	2.2	82

表3 大腸菌生菌液による実験〔I〕

反応系	発生炭酸ガス量 μl	生成蓚酸量 μM	阻害率%
生菌液のみ	30.9	0	
完全反応系	91.6	7.3	0
同上+10 ⁻² M CS	35.3	0.5	95
同上+10 ⁻³ M CS	65.5	4.2	42

表4 大腸菌生菌液による実験〔II〕

反応系	生成蓚酸量 (μM)	生成焦性葡萄糖量 (μM)
完全反応系	10.7 (0%)	11.30 (0%)
同上+10 ⁻² M CS	2.5 (74.7%)	1.01 (91.1%)
同上+10 ⁻³ M CS	6.7 (37.4%)	7.40 (35.6%)

注()内は阻害率を示す

10⁻² MのCS添加反応系では対照7.3μMに対し0.5μM(93%), 10⁻³Mでは4.2μM(42%)の阻害をそれぞれ認めた。生成蓚酸量を Ostern²⁾のアニリンクエン酸法で定量後, その反応残液を Friedemann^ら⁵⁾の法で生成焦性葡萄糖量を併せ定量し比較検討した表4では, 生成蓚酸量10.7μM, 同生成焦性葡萄糖量11.3μM, 大体以下の実験でもほぼ同様の成績を得た。蓚酸の不安定性による結果と考えられる。焦性葡萄糖値より判定すればCS10⁻²Mで約90%, 10⁻³Mで約35%の阻害を認めた。

〔II〕 BCGアセトン乾燥菌による実験

BCGアセトン乾燥菌を酵素材料としてCSの影響を検討した成績を表5に示した。やはりCS10⁻²Mでは約70%という著明な阻害を認めた。なお生成蓚酸量は, 生成焦性葡萄糖量をやはり下廻る結果を得たのは前回同様であった。

表5 BCGアセトン乾燥菌による実験

反応系	生成蓚酸量 (μM)	生成焦性葡萄糖量 (μM)	阻害率(%)	
			前者	後者
完全反応系	13.11	16.8	0	0
同上+10 ⁻² M CS	4.86	4.7	65.0	72.0

〔III〕 抽出粗酵素液による実験

まず鳥型結核菌より抽出した粗酵素液を用いて実験した成績を表6に示した。同アセトン乾燥菌2gを等量の実験用海砂と共に30分間乳鉢中で充分磨砕した上, 20ccのM/50磷酸緩衝液(pH 7.8)で一昼夜氷室中で抽出し, 4000 r.p.m. 15分間遠心した上清を粗酵素液として使用した。CSの影響を特に10⁻²Mより10⁻⁵Mまで各濃度における阻害率を求めてみた。10⁻²Mで65.9%, 10⁻³Mで41.3%, 10⁻⁴Mで17.1%, 10⁻⁵では有意の阻害を認めなかった。

表6 鳥型結核菌抽出粗酵素液による実験〔I〕

反応系	生成蓚酸量 (μM)	阻害率(%)
蒸溜水のみ	(14.1)	
粗酵素液のみ	0.0 (25.4)	
粗酵素液+ アスパラギン酸	0.04 (28.1)	
粗酵素液+α-ケトー グルタル酸	3.9 (35.2)	
完全反応系	12.07 (100.1)	0
同上+10 ⁻² M CS	4.0 (36.2)	65.9
同上+10 ⁻³ M CS	5.9 (52.6)	41.3
同上+10 ⁻⁴ M CS	9.7 (85.3)	17.1
同上+10 ⁻⁵ M CS	11.5 (91.3)	1.7

注()内は発生炭酸ガス量を示す

次にBCGアセトン乾燥菌より抽出した粗酵素液を用いた成績を表7に示した。BCGアセトン乾燥菌1gを等量の実験用海砂と乳鉢中で30分間充分磨砕した上, M/20磷酸緩衝液(pH 8.0) 20ccを加え氷室中で一昼夜抽出した。0°C12000r.p.m. 30分間遠心した上清を粗酵素液として用い, 同様の実験を行つた。酵素活性は幾分弱いながらも明らかに Transamination による蓚酸の生成を認めた。CS 10⁻²Mで約80%, 10⁻³Mでは約50%の阻害を認めた。

表7 BCG抽出粗酵素液による実験

反応系	発生炭酸ガス量 (μl)	生成蓚酸量 (μM)	阻害率 (%)
粗酵素液のみ	33.9	0	
完全反応系	80.9	5.04	0
同上+10 ⁻² M CS	39.1	0.64	80.8
同上+10 ⁻³ M CS	55.7	2.62	53.6

次いで鳥型結核菌より上述BCGと同様の方法で抽出した粗酵素液を用いて30分間反応させ, 反応液0.5ccを用いてアニリンクエン酸法で生成蓚酸量を, その残

液より生成焦性葡萄糖量を Friedemannらの方法で定量した。別に粗酵素液のみならびに完全反応系のグルタミン酸量を Gale の変法により併せ定量した成績を表8に示した。生成蓚酢酸 $8.70\mu\text{M}$ 、生成焦性葡萄糖量 $9.0\mu\text{M}$ 、生成グルタミン酸量 $9.70\mu\text{M}$ とほぼ等しい値を得た。最終 10^{-2}M のCS添加反応系では蓚酢酸定量法より70.4%、焦性葡萄糖定量法より92.2%と前回同様の阻害率を得た。また、 10^{-3}M CS添加により34.1%および38.8%とこれも前図と同じようなほぼ等しい阻害率を得た。

表8 鳥型結核菌抽出粗酵素液による実験〔II〕

反 応 系	生成グルタミン酸量 (μM)	生成蓚酢酸量 (μM)	生成焦性葡萄糖量 (μM)
完全反応系	9.70	8.70 (0%)	9.0 (0%)
同上+ 10^{-2}M CS		2.58 (70.4%)	0.7 (92.2%)
同上+ 10^{-3}M CS		5.94 (34.1%)	5.5 (38.8%)

注 () 内は阻害率を示す

考 案

以上鳥型結核菌、BCGならびに大腸菌の各生菌液およびBCGアセトン乾燥菌ならびに抽出粗酵素液を酵素材料とした場合の Glutamic-Aspartic Transamination に及ぼすCSの影響を検討した。その結果、上述の如く強力な阻害を認め、前報の Glutamic-Decarboxylation の場合と同様 VB₆ 酵素系に属する、これらの反応系をCSが強力に阻害することは明らかである。また本反応生成物であるグルタミン酸、蓚酢酸ならびに二次的生成物焦性葡萄糖をそれぞれ定量した結果、完全反応系では明らかに Glutamic-Aspartic Transaminationを行う酵素系の存在が確認され、酒井⁵⁾、伊藤ら⁶⁾の成績と一致した。CSは最終 10^{-2}M では約90~70%、 10^{-3}M で約50~30%の阻害をそれぞれの場合に認めた。

著者はINHの作用機構から推定して、CSのかかる強力なVB₆酵素系の阻害が、助酵素である Pyridoxal phosphate のアルデヒド基とCSのアミノ基と反応して Schiff 塩基を形成して不活性化される結果であると想定している。本 Transaminaseの精製は現在困難視され、著者らも試みているが未だ成功に到らない。したがって精製酵素によるCSの阻害機構を検討しえなかつたのは

残念であるが、比較的精製の容易なVB₆酵素の1つである大腸菌 Tryptophanase を用い、助酵素 Pyridoxal phosphate を添加した実験および Pyridoxal, C⁺⁺ の存在下に Tryptophan より Indol の Nonenzymatic に形成するモデル実験に成功し、これらの諸点に関して詳細に検討しえたので第3報において詳述したい。

第1報および本報に報告した成績より菌におけるグルタミン酸を中心としたアミノ酸中間代謝をCSが阻害することは想定に難くない。菌におけるVB₆酵素系の重要性よりアミノ酸中間代謝ならびにこれらに従属する他の代謝系の二次的阻害の結果、広スペクトル抗生物質としてのCSの抗菌作用が、また生体におけるCSの著明な副作用の一端が出現するのではなからうかと考えられる。

なお、結核菌における本 Glutamic-Aspartic Transaminase の精製を試みているので、精製酵素についてのCSの阻害態度は後日改めて検討を試みる予定である。

結 論

1) Cycloserine は、VB₆酵素系の1つである Glutamic-Aspartic Transaminationを著明に阻害する。

2) 鳥型結核菌、BCG、大腸菌各生菌液およびアセトン乾燥菌、ならびに抽出粗酵素液を酵素材料とした場合、Cycloserine は最終 10^{-2}M で約70~90%、 10^{-3}M で30~50%の阻害を認めた。

終りに本研究に当り終始御指導下され、御校閲を賜った恩師堂野前維摩郷教授、河盛勇造助教授、伊藤文雄博士に感謝致します。

(本論文の要旨は、第5回日本化学療法学会総会において発表した。)

文 献

- 1) 青木隆一：結核投稿中。
- 2) Ostern, P.: Zeitschr.physiol. Chem., 218: 160, 1933.
- 3) Friedemann, T.E. & Haugen, G.H.: J. Biol. Chem., 147: 415, 1943.
- 4) Gale, E.F.: Biochem. J., 41, VII, 1947.
- 5) 酒井淳三：結核, 29: 161, 1954.
- 6) 伊藤文雄・菅野忠彰：結核, 29: 368, 1954.