

Cycloserine の作用機序に関する実験的研究

第3報 Indole 形成に及ぼす CS の影響について

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 5 月 29 日

緒 言

著者はさきに Cycloserine (CS) が VB₆ 酵素を強力に阻害することを見出し, そのうち Glutamic acid Decarboxylation および Glutamic-Aspartic Transamination に及ぼす CS の影響については第1報¹⁾ および第2報²⁾ としてそれぞれ発表した。周知の如くこれらの酵素の精製は現在困難視され, 著者らも種々試みたが未だ成功に到らない。そこで VB₆ 酵素系のうち比較的精製の容易な大腸菌 Tryptophanase の精製酵素を用いる一方, Tryptophan から非酵素化学的に Indole を生成させるモデル実験を併せ行い, これらに及ぼす CS の態度を検討し, 本剤の VB₆ 酵素系に対する阻害機序の一端を明らかにしえたのでその成績を報告する。

実験材料および実験方法

大腸菌は本学生化学教室より分与された大腸菌 K-12 株を普通寒天培地に一昼夜培養したものを集菌洗菌後, Potter-Elvehjem のホモゲナイザーを用い, 生理的食塩水に再浮遊させたものを生菌液として予備実験に用いた。Tryptophanase の精製は市原ら³⁾の方法にしたがった。すなわちペプトン 10g, 肉エキス 10g, 培地用食塩 0.2g を蒸留水 1 l と共に 30 分間加熱溶解した後, 吸引濾過し pH を中性に修正し, これをコルベンに約 300cc ずつ分注し Autoclave にて滅菌したものをピジョン液体培地とした。大腸菌 K-12 株を 48 時間これに培養し, Indole 反応陽性を確認したものを種として 70 本の上記培地に分注接種し 48~72 時間恒温室で培養したものをシャープレス遠心機にて集菌, Indole 反応陰性になるまで蒸留水で充分洗菌を繰り返した。この菌体をガラス板に伸して氷室中デシケータに入れて 24 時間乾燥させた。

酵素抽出は次の如く行つた。上記乾燥菌体 2g と等量の海砂を乳鉢中で充分磨砕した後, 蒸留水 100cc を加え氷室中で 2 時間抽出, 9000r.p.m. 10 分間遠心した上清を 1 規定酢酸にて pH 4.7 に修正した上, さらに 9000r.p.m. 10 分間遠心分離した。その洗渣を約 100cc の蒸留水に再び溶かし氷室中で 12 時間蒸留水に対して透析を行つたものを酵素液とした。この酵素液は助酵素 Pyridoxal ph-

osphate なしでは Indole 形成を認めないことを確認した上使用した。

生菌液の予備実験は次の如く行つた。上述の大腸菌生菌液と所定の最終濃度を有する CS とを最終 M/15 磷酸緩衝液 (pH 8.0) 中で 30 分間 Preincubate した後, 基質として 50μM の L-Tryptophan を添加し, 60 分間 37°C で反応せしめた後, 最終 5% の三塩化酢酸で反応停止せしめ石油エーテル 7.0cc さらに 3.0cc で後藤氏⁴⁾法にしたがつて抽出を行つた。この石油エーテル層を採りエールリッヒ氏アルデヒド試薬 5.0cc を加えて発色させ光電比色して生成インドール量を定量した。

酵素液を用いた本実験は次の如く行つた。上述抽出酵素液を Pyridoxal phosphate (本学生化学教室分与) 5γ, NH₄Cl 500μM, さらに所定最終濃度の CS とを磷酸 K・K 緩衝液 (pH 8.2) 中で一定時間 Preincubate した後, 基質として 10μM の L-Tryptophan を添加し 2 分ないし 5 分間反応させて生成される Indole 量を上述の法で定量した。

実験成績

〔I〕 生菌液による予備実験

予備実験として生菌液を行つた成績を表1および表2

表1 大腸菌生菌液による予備実験〔I〕

反 応 系	生成インドール量 (γ)	阻害率 (%)
トリプトファンのみ	0	
大腸菌液のみ	0	
完全反応系	11.1	0
同上 + 10 ⁻² M CS	2.8	75

表2 大腸菌生菌液による予備実験〔II〕

反 応 系	生成インドール量 (γ)	阻害率 (%)
生菌液のみ	0	
完全反応系	9.5	0
10 ⁻² M CS	2.1	76.9
10 ⁻³ M CS	4.7	50.0
10 ⁻⁴ M CS	6.7	28.8
10 ⁻⁵ M CS	7.3	13.5

に示した。最終 $10^{-2}M$ C S添加した反応系では75%の阻害を認めた。さらに各濃度におけるC Sの影響を検討した成績は表2の如く $10^{-2}M$ で76.9%、 $10^{-3}M$ で50%、 $10^{-4}M$ で28.8%、 $10^{-5}M$ で13.5%の阻害を認めた。

〔II〕抽出酵素液による実験

以上の如きC Sの Indole 形成阻害の機序を明らかにするため精製 Tryptophanase を用い以下の実験を行った。

まず助酵素 Pyridoxal phosphate と最終 $10^{-2}M$ C S とを20分間 Preincubateした後、アポ酵素である酵素液を添加し15分間さらに incubate してから基質を加え、2分間だけ反応させた。表3に示した如く、91.2%という著明な阻害を認めた。

表3 抽出酵素液による実験〔I〕

Apo.	Apo.	PAL P.	PAL P. + C S
20分間 incubation			
PAL P.	(-)	Apo.	Apo.
15分間 incubation			
基質	基質	基質	基質
2分間反応			

生成インドール量 (γ)	6.0	0	5.8	0.5
阻害率 (%)	0	—	0	91.2

Apo. は Apoenzyme, PAL P. は Pyridoxal phosphate

ついでアポ酵素、助酵素、基質の順に加えそれぞれにC Sを添加した場合の成績を表4に示した。Preincubation は15分間ずつ、基質添加後の反応時間は5分間とした。助酵素とC Sとを Preincubateした反応系では91.5%という著明な阻害を認めた。

表4 抽出酵素液による実験〔II〕

Apo.	Apo.	Apo. + C S	Apo.	Apo.
15分間 incubation				
(-)	PAL P.	PAL P.	PAL P. + C S	PAL P.
15分間 incubation				
基質	基質	基質	基質	基質 + C S
5分間反応				

生成インドール量 (γ)	0	14.9	4.1	1.5	11.1
阻害率 (%)	—	0	70.2	91.5	25.5

以上の実験成績からC Sは主として助酵素を侵襲することにより Indole 形成を阻害するとの示唆をえたので

C S と Pyridoxal phosphate との Preincubation の時間を13分間と一定にし他方アポ酵素との Preincubation を13分と2倍の26分間とした実験成績を表5に示した。アポ酵素とC Sとの接触時間が2倍になっても阻害率は全く同じであった。以上の成績よりCSはアポ酵素および基質に関係なく主として助酵素である Pyridoxal phosphate を侵襲してかかる強力な阻害を現わすものと考えられる。

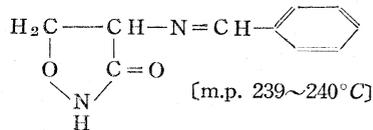
表5 抽出酵素液による実験〔III〕

	Apo. + C S	Apo.	Apo.	Apo.	Apo.
↑ 13分 ↓ 26分 ↓ 10分 ↓ 3分 ↓	(13分間)				
	PAL P.	PAL P. + C S	PAL P.	PAL P.	(-)
	(10分間)				
	基質	基質	基質 + C S	基質	基質
	(3分間)				
生成インドール量 (γ)	3.5	3.6	0.81	10.7	0
阻害率 (%)	67.0	66.5	24.4	0	—

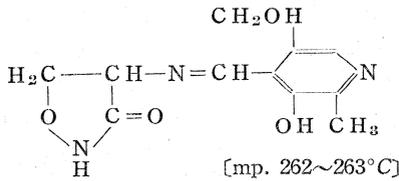
〔III〕C S と Pyridoxal による Schiff 塩基の生成に関する実験

これらの実験成績よりC Sは助酵素 Pyridoxal phosphate をなんらかの形により侵襲してかかる強力なVB₆酵素系の阻害を現わすものと考えられ、その可能性として Pyridoxal とC Sとの間に Schiff 塩基生成を予測して以下の実験を行った。

まず予備実験としてC Sと Benzaldehyde との間の Schiff 塩基形成を検討した。両物質 (0.5gずつ) を水浴上で加熱後冷却し、Dioxane で再結晶を行い融点 239~240°C の白色結晶を得た。本物質は元素分析および赤外線吸収試験の結果、予期した如く次図の如き物質であることを確認した。



ついでC Sと Pyridoxal·HCl とを同様に処置し、融点 262~263°C の白色結晶少量を得た。本物質は少量のため残念ながら元素分析は行いえなかつたが、赤外線分析の成績を前者の Schiff 塩基のそれと比較した結果、本物質はC Sと Pyridoxal との Schiff 塩基であるとの結論を得た。以上の成績よりC Sは助酵素 Pyridoxal Phosphate との間にも Schiff 塩基を形成する可能性は充分あると結論せざるをえない。



[IV] Tryptophan, Pyridoxal およびCu⁺によるモデル実験

上述の如く Indole 形成におけるCSの阻害はアポ酵素に関係なく助酵素 Pyridoxal phosphateを侵襲して阻害を現わすことを認めたので、アポ酵素なしのモデル実験を市原ら³⁾の方法にしたがって行った。L-Tryptophan 10μM, CuSO₄ 5μM, Pyridoxal 10μM, 終末5%NaOH および最終濃度M/100CSを添加し全量4.0ccとして15分間37°CでPreincubation後、煮沸重湯煎中で30分間反応させた。Tryptophan とCu⁺のみでも僅か Indole 生成を認められたが、Pyridoxal と Tryptophan だけでは全く Indole 生成がなかった。完全反応系では市原ら³⁾の報告の如く明らかに Indole 生成を認め、最終10⁻²M CS添加反応系では70%という著しい阻害を認めた。

表6 モデル実験

Pyridoxal 10μM	Cu ⁺ 5μM	Tryptophan 10μM	CS 最終 10 ⁻² M	生成イン ドール量 (γ)	阻害率 (%)
-	-	+	-	0	
+	-	+	-	0	
-	+	+	-	2.0	
+	+	+	-	8.3	0
+	+	+	+	2.5	70.0

NaOH終末5%全量4.0cc, 15分間 Preincubate 後, 30分間煮沸重湯煎中で反応

考 案

CSがアミノ酸脱炭酸酵素, アミノ基転位酵素, Tryptophanase等のVB₆酵素系を強力に阻害することを3報にわたって報告してきたが, その阻害機序を明らかにすべく精製 Tryptophanaseを使用する一方, Tryptophan からCu⁺および Pyridoxalの共存のもとに非酵素化学的に Indole を形成する反応を利用し, これらに及ぼすCSの影響を分析して検討した。

その結果上述の如くCSの Tryptophanase 阻害はアポ酵素および基質に関係なく助酵素である Pyridoxal phosphate, あるいは, Cofactor を侵襲することにより発現すると思われる成績を得た。さらに非酵素化学的 Indole形成反応においても, CSは強力な阻害を示したことは, この考えを裏づけるものと推察している。

一方INHのVB₆酵素系阻害の機序として, INHがPyridoxal phosphate と Schiff 塩基を形成すること

が推定されているが, 著者はCSの本阻害も Pyridoxal phosphateとCSとの間に Schiff 塩基形成によるものではないかとの考えのもとに実験を行い, CSが比較的容易に Pyridoxal と Schiff 塩基をつくることを実証した。かくの如きCSとPyridoxalとの関係が, Pyridoxal phosphateとの間にも存在するならば, 広スペクトル抗生物質としてのCSの抗菌作用ならびに本剤による副作用の発現になんらかの役割を果しているものと著者は解釈している。

さらに本阻害におけるCo-factorの1つ, 金属イオンとの関係も見逃しえない。Neilandsら⁵⁾の報告にも, CSはCu⁺, Co⁺等とMetal Complexの形成を想定している。かかるMetal CatcherとしてのCSの反応阻害の可能性もありうるのでこの点に関しては実験を継続する予定である。

結 論

- (1) CSはVB₆酵素系の1つである大腸菌 Tryptophanaseを侵して Indole形成を強力に阻害する。
- (2) 大腸菌生菌液による予備実験において最終10⁻²M CSにより91%の阻害を, 抽出酵素液による本実験において70~90%の強力な阻害を認めた。
- (3) Tryptophan, Cu⁺, Pyridoxalによる非酵素化学的に Indoleを形成させるモデル実験においても10⁻²M CSは70%という強力な阻害を認めた。
- (4) CSはPyridoxal, HCl および Benzaldehydeとの間にそれぞれ Schiff 塩基を形成することを確認した。
- (5) CSはアポ酵素に関係なく, 助酵素である Pyridoxal phosphateまたはCo-factorを侵襲して阻害を発現する。恐らくPyridoxal phosphateとCSとの間に Schiff 塩基を形成してかかる阻害を現わす可能性がある。

本研究に当り終始御指導, 御校閲を賜った恩師堂野前教授, 河盛助教授, 伊藤文雄博士ならびに貴重な Pyridoxal phosphate および大腸菌株を分与され, 実験に御協力, 御援助を賜った本学生化学教室, 坂本助教授, 和田, 森末両学士に深謝致します。なおCSの提供およびSchiff 塩基の合成分析に御協力下さった塩野義製薬研究所, 加納, 西村両博士に感謝します。

(本論文の要旨は, 第32回日本結核病学会総会において発表した。)

文 献

- 1) 青木隆一: 結核, 32: 418, 1957.
- 2) 青木隆一: 結核, 32: 544, 1957.
- 3) 市原 硬・坂本幸哉・和田 博・吉松久雄・森

- 野能昌：第9回酵素化学シンポジウム講演集，
II, 219, 1956.
- 4) 後藤貞光：大阪医学会雑誌, 37: 2413, 1938.
- 5) Neilands, T.B.: Arch. Biochem. & Biophys.,
62: 151, 1956.