

Cycloserine の作用機序に関する実験的研究

第1報 Glutamic acid decarboxylation に及ぼす影響について

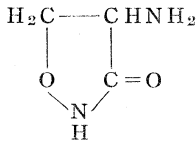
青 木 隆 一

大阪大学医学部第三内科教室 (主任 堂野前維摩郷教授)

受付 昭和 32 年 2 月 20 日

緒 言

Cycloserine は、新たに *Streptomyces* の一種より分離された広スペクトル抗生物質で、広くグラム陽性および陰性菌に有効であることが認められ、結核治療にも使用され始めている。化学的には、D-4-Amino-3-isoxazolidone で次の如き構造式を有している。



本剤の作用機序については、未だ僅かな報告に接するのみである。すなわち、Sutton¹⁾は、*Mycobacterium paratuberculosis* を用い、isoxazole 核を有する発育促進物質とみなされている *Mycobactin*^{2)~4)} と本剤が競合的に拮抗することを報じている。また Sevag⁵⁾は、大腸菌の Purine 依存株を用い、本剤が Serine とグルタミン酸からの 5-Amino-4-imidazole carboxamide の合成を阻害することを認めている。

著者は、今回 Cycloserine が、V. B₆ 酵素系に対し強力な阻害作用を有することを認め、始めに大腸菌、鳥型結核菌、BCG 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マウスの脳ホモジェネイトを酵素材料として、グルタミン酸脱炭酸作用に及ぼす本剤の影響を検討したのでその成績を報告する。

実験材料および実験方法

鳥型結核菌竹尾株およびBCG竹尾株を用いた。鳥型結核菌は、グリセリン・パイオン培地に、4日間培養したものを、BCGは、ソートン培地に10日間培養した菌体をそれぞれ集菌後、生理的食塩水で3回水洗し、法の如くアセトン乾燥菌を作成した。大腸菌は、本学微生物病研究所須田研究室より分与された C₆ 株を用い、Gale⁶⁾ の変法により調整したグルタミン酸定量用のアセトン乾燥菌を使用した。マウス脳ホモジェネイトは、断頭失血せしめたマウスの脳を、Potter-Elvehjem⁷⁾ の方法により、氷冷しながら5倍量の M/50 磷酸緩衝液 (pH 6.3) にて調整した。

緩衝液として、最終 M/15 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を結核菌に、同 (pH 4.6) を大腸菌に用い、脳ホモジェネイトには M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.3) を使用した。基質としては、5~10 μ M グルタミン酸ソーダを使用し、これより発生する炭酸ガス量を Warburg 検圧法により測定した。

ただし、大腸菌アセトン乾燥菌の場合は、空気中に、他はすべて窒素ガス中にて反応を行った。

Cycloserine は、Lilly 社製品 "Remycin" を実験の都度所定の濃度に調整して使用した。なお、反応生成物としての γ -Amino-butylic acid の同定は Paper-chromatography^a によつた。その際の溶媒は、80% フェノール水および酢酸、ブタノール、水 (4:1:2) を用い、濾紙は東洋濾紙 No. 50 を用いた。発色は、0.2% ニンヒドリン、ブタノール溶液を使用した。

実験成績

I 大腸菌アセトン乾燥菌を使用した実験

まず、グルタミン酸定量用大腸菌アセトン乾燥菌を用い、グルタミン酸脱炭酸作用に及ぼす影響を検討した成績を表1に示した。

Cycloserine の終末濃度 10⁻²M で 90%、10⁻³M では 70%、10⁻⁴M で 50%、10⁻⁵M でも約 30% の如き強力な阻害を認めた。

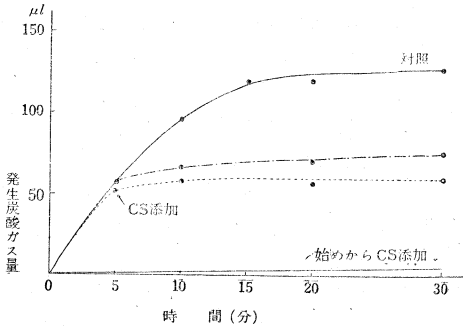
表 1 大腸菌アセトン乾燥菌によるグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine の影響

Cycloserine 最終濃度	対 照 C S (—)	C S 10 ⁻² M	C S 10 ⁻³ M	C S 10 ⁻⁴ M	C S 10 ⁻⁵ M
分解グルタミン酸量 μ M	5.1	0.5	1.5	2.6	3.6
阻 害 率%	0	90.1	70.6	49.1	29.5

次にグルタミン酸 10 μ M を基質として同条件で30分間反応せしめた後、25%三塩化酢酸で反応を停止せしめ、その濾液につき、前述の Paper-chromatography を行った。 γ -Amino-butylic acid は、本学竹尾結核研究所堀研究室より分与されたものを用い、反応生成物が同物質であることを確認した。

図1は、大腸菌アセトン乾燥菌による本反応進行途上

図1 大腸菌アセトン乾燥菌によるグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine の影響(途中添加の場合)



で、Cycloserine を添加した場合の成績である。最初から Cycloserine を入れておくとほとんど完全に近い阻害を示すが、反応開始後5分で添加すると間もなく強力な阻害が起り、10分後にはグルタミン酸脱炭酸反応はほとんど停止する成績を得た。

次いで Cycloserine を最終2規定塩酸および苛性ソーダならびに蒸溜水中でそれぞれ10分間重湯煎上で加水分解後中和し、最終濃度 $10^{-2}M$ におけるそれらの阻害状況を検し、その成績を表2に示した。三者ともほとんど完全に近い阻害を認めた。

表2 大腸菌アセトン乾燥菌のグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine 分解物の影響

	対 照 CS (-)	水分解 CS $10^{-2}M$	塩酸分解 CS $10^{-2}M$	苛性ソー ダ分解 CS $10^{-2}M$
分解グルタミ ン酸量 μM	5.1	0.15	0.03	0.13
阻 害 率 %	0	96.8	99.5	98.0

Harned ら⁸⁾は、Cycloserine 分解物中にD(-)Serine とHydroxylamineを見出し、山本ら⁹⁾もHydroxylamineの生成を認めている。そこで上述の Cycloserine の酸水分解物の高度の阻害が、加水分解により生じた Hydroxylamine によるものか否かを検討した成績を表3に示した。

表3 大腸菌アセトン乾燥菌のグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Hydroxylamine と Cycloserine の影響

	分解グルタ ミン酸量 μM	阻 害 率 %
対 照	4.9	0
Hydroxylamine $10^{-2}M$	1.5	69
Hydroxylamine $10^{-3}M$	4.0	18
Cycloserine $10^{-2}M$	0.3	94
Cycloserine $10^{-3}M$	1.1	79

Cycloserine は、 $10^{-3}M$ で79%の阻害を示したが、Hydroxylamine は $10^{-3}M$ では18%という弱い阻害率し

かえられなかった。山本ら⁹⁾による生成 Hydroxylamine 量の定量成績によれば、本条件での生成 Hydroxylamine 量は5%以下であると考えられる。したがって Cycloserine は、そのままの形で強力な阻害物質として働いているように思われ、また塩酸等の水解物による強力な阻害も生成 Hydroxylamine のみでは充分に説明できない。

II 結核菌アセトン乾燥菌を使用した実験

結核菌によるグルタミン酸脱炭酸機構は、庄司ら¹⁰⁾により明らかにされたが、著者ら¹¹⁾もまた、反応系に添加されたグルタミン酸は、エネルギー代謝を伴わなければ、細胞膜を通過して菌体内に入り難く、Galeらのいう結合型グルタミン酸 (Combined Glutamate) を形成しないことを認めている。故に、以下の実験においては、すべて結核菌アセトン乾燥菌を用い、窒素ガス中で反応させ、基質としてのグルタミン酸は $10\mu M$ とした。

図2 BCGアセトン乾燥菌によるグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine ($10^{-2}M$)の影響

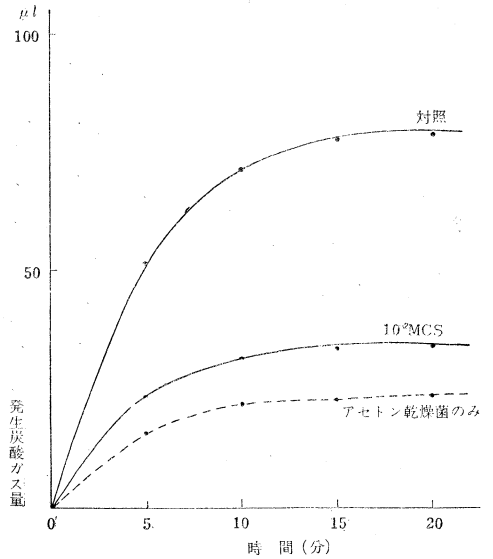
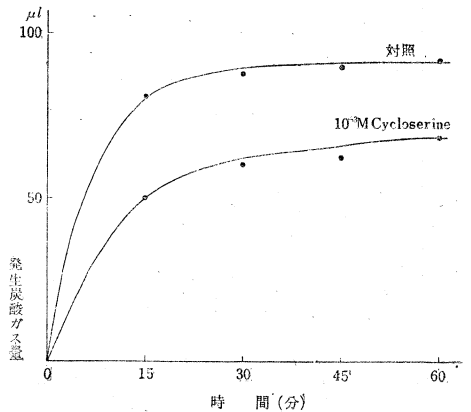


図3 BCGアセトン乾燥菌のグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine ($10^{-3}M$)の影響

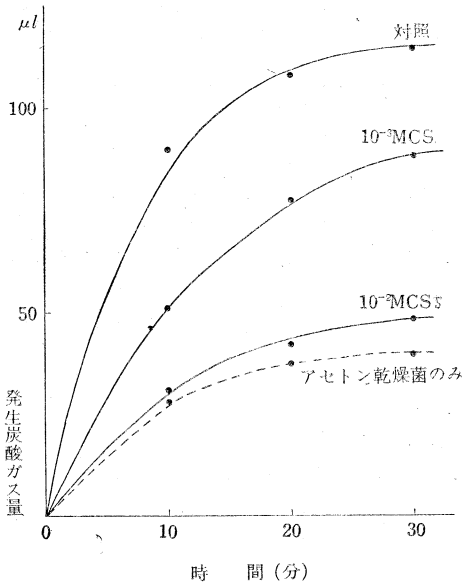


まずBCG竹尾株アセトン乾燥菌を用い、最終濃度 10^{-2} Mの Cycloserine の影響を検討した成績を図2に示した。酵素活性は低いが20分で添加グルタミン酸の約4分の1を脱炭酸し、Cycloserineの添加で約55%の阻害を認めた。

次に図3に示す如く、 10^{-3} M Cycloserineでも、同じくBCGアセトン乾燥菌による本反応を約40%阻害したが、自家呼吸に対してはほとんど影響を示さなかつた。

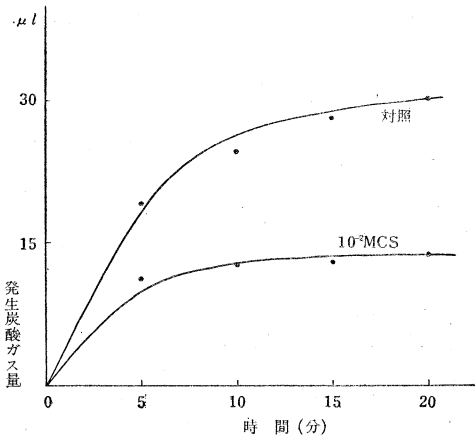
次に、鳥型結核菌アセトン乾燥菌を用いた成績を示すと図4の如く、酵素活性はやはり低いが、Cycloserine最終濃度 10^{-2} Mで約50%、 10^{-3} Mでは約35%の阻害を示した。

図4 鳥型結核菌アセトン乾燥菌によるグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine の影響



次いで粗酵素の抽出を試みた成績を次に示す。鳥型結核菌アセトン乾燥菌を、等量の海砂と共に乳鉢

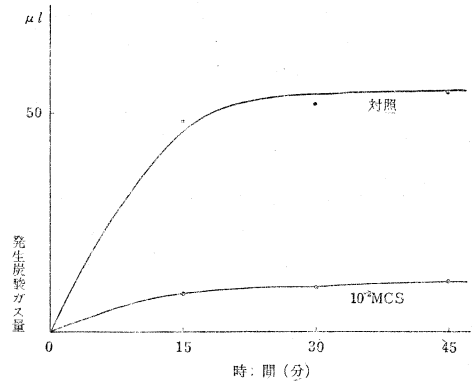
図5 粗酵素液Iによるグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine の影響



中で30分間磨砕し、5倍量のM/50磷酸緩衝液 (pH 5.0) で抽出、4000r.p.m. 15分間遠心した上清を粗酵素液Iとしてまず使用した。図5の如く酵素活性は低いが、明らかに炭酸ガスの発生を認め、Cycloserineは最終濃度 10^{-2} Mで著明な阻害を示した。

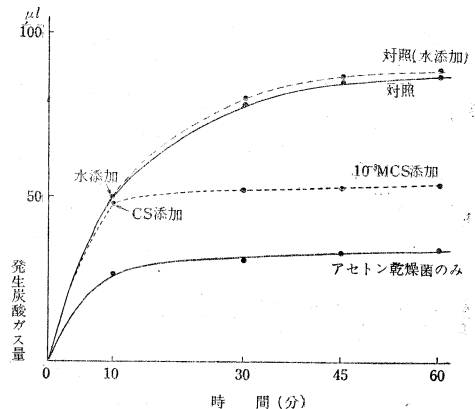
さらに抽出粗酵素を用いた実験を行った。鳥型結核菌アセトン乾燥菌を等量の海砂と共に30分間磨砕し、5倍量のM/50磷酸緩衝液 (pH 5.0) で一昼夜氷室で抽出後、1時間室温放置し、 -0°C で 15,000r.p.m. 30分間遠心した上清を粗酵素液IIとして使用した成績を図6に示した。本酵素液はほとんど自家呼吸を示さず、また炭酸ガスの発生も非常に僅かであつた。酵素活性は低いが明らかにグルタミン酸脱炭酸作用を示したのは、庄司ら¹⁰⁾の報告に一致した。この場合 Cycloserine 最終濃度 10^{-2} Mで約70%の阻害を認めた。

図6 抽出粗酵素液IIによるグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine の影響



なお、鳥型結核菌アセトン乾燥菌を用いて反応進行途中に Cycloserine を添加した場合の成績を図7に示した。この場合反応開始後10分で最終濃度 10^{-3} M Cycloserine および対照として蒸溜水を添加した。大腸菌アセトン乾

図7 鳥型結核菌アセトン乾燥菌によるグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine の影響 (反応進行途中に添加の場合)

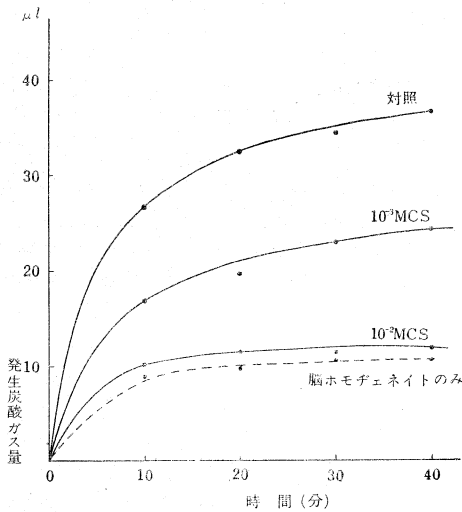


燥菌の場合と同様、添加後まもなく本反応はほとんど停止して炭酸ガス発生は認められなくなつた。

III マウス脳ホモジェネイトを使用した実験

臨床上 Cycloserine の副作用としてテンカン様発作、精神錯乱等の精神神経症状があげられており、これらからも、本剤が中枢神経系の代謝障害を惹起することが考えられるので、マウスの脳ホモジェネイトによるグルタミン酸脱炭酸反応に対する Cycloserine の影響を検討した。図8に示す如く、この場合にも明らかに炭酸ガスの発生を認め、Cycloserine $10^{-2}M$ では約55%、 $10^{-3}M$ で約25%の阻害を認めた。

図8 マウス脳ホモジェネイトによるグルタミン酸脱炭酸反応に及ぼす Cycloserine の影響



考案

以上の如く Cycloserine は、大腸菌、鳥型結核菌、BCG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グルタミン酸脱炭酸作用を著明に阻害することが認められた。本酵素は、精製が容易でないので、この阻害機構については明らかにしえなかつた。そこで同じく V. B₆ 酵素系の1つで比較的精製容易とされている大腸菌の Tryptophanase を用い、その阻害機構につき検討したがその成績は追つて報告する。

また、Cycloserine の酸分解物は、強力な阻害を現わすことが明らかになつたが、Cycloserine の酸分解物中には D(-) Serine と共に Hydroxylamine の生成することが認められており、さらに山本⁹⁾も Cycloserine 水溶液を放置することにより、わずかながら Hydroxylamine が生成されることを見出している。周知の如く、

Hydroxylamine は V. B₆ 酵素系の阻害剤であるが、著者の実験では、これらの阻害は Hydroxylamine によるものでなく、Cycloserine 自身あるいは他の分解産物によるものと考えられる。

Cycloserine の副作用の1つとして、精神神経症状の発現が報ぜられているが、本現象が脳ホモジェネイトによるグルタミン酸脱炭酸作用の阻害と関係があるか、否かは未だ明らかでなく、なお研究を続ける予定である。

結論

(1) Cycloserine (D-4-Amino-3-Isoxazolidone) は、大腸菌、結核菌(鳥型およびBCG)の各アセトン乾燥菌およびそれらの抽出粗酵素液、ならびに二十日鼠の脳ホモジェネイトによるグルタミン酸脱炭酸作用を著明に阻害する。

(2) この強力な阻害は、Cycloserine 分解産物である Hydroxylamine のみの作用とは認められない。

終りに臨み終始御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜つた恩師堂野前維摩郷教授、河盛勇造助教、伊藤文雄博士に心から感謝致します。なお、大腸菌 C₆ 株を分与下さつた本学微生物病研究所須田研究室ならびに γ -Amino-butylic acid を分与下さつた同竹尾結核研究所堀研究室の御厚意に深謝致します。

(本論文の要旨は、昭和31年11月25日第14回日本結核病学会近畿地方会において発表した。)

文献

- 1) W.B. Sutton, & L. V. Stanfield : *Antib. & Chemo.*, 5: 582, 1956.
- 2) J. Francis et al.: *Biochem. J.*, 55: 596, 1953.
- 3) G.A. Snow : *J. Chem. Soc. London*, II, 2588, 1954.
- 4) G.A. Snow : *J. Chem. Soc. London*, IV, 4080, 1954.
- 5) K. Ishii, & M.G. Sevag : *Antib. & Chem.*, 6: 500, 1956.
- 6) E.F. Gale : *Bioch. J.*, 41, VII, 1947.
- 7) W.R. Potter, & C. Elvehjem : *J. Biol. Chem.*, 114: 495, 1936.
- 8) R.L. Harned : *Antib. & Chem.*, 5: 204, 1955.
- 9) 山本・溝端: 第14回日本結核病学会近畿地方会発表.
- 10) 庄司・山上: *結核*, 29, 増刊号, 121, 1954.