

Cycloserine の抗菌作用に対する DL- α -Alanine の拮抗について第2報 Cycloserine の大腸菌 Indole 生成阻害に及ぼす DL- α -Alanine の影響

溝 端 久 夫

大阪大学医学部第三内科学教室 (主任 堂野前維摩郷教授)
大阪府立 羽曳野病院 (院長 堂野前維摩郷博士)

受付 昭和 32 年 10 月 4 日

緒 言

著者¹⁾は培養実験において、Cycloserine (以下CSと略)の抗菌作用がDL- α -Alanineの添加によつて拮抗されることを見出しすでに発表した。一方青木^{2)~4)}および山田ら⁵⁾はCSがVB₆酵素系を阻害することを見出し、ことに青木はCSが大腸菌よりの精製 Tryptophanaseをも著明に阻害し、さらにTryptophanよりの非酵素化学的 Indole 形成をも阻害することを報告し、他方 Hoppold ら⁶⁾は Atabrine の大腸菌による Indole 生成阻害が α -Alanine により消滅されることを報じている。

ここにおいて著者はCSとDL- α -Alanineとの拮抗現象を解明するため、青木の方法を用いてCSのIndole生成阻害に対するDL- α -Alanineの態度について検討し、大腸菌生菌液を酵素材料とした場合には、CSのIndole生成阻害がDL- α -Alanineにより減弱ないし消失せしめられることを見出したので、以下その成績を報告する。

実験材料および方法

大腸菌は大阪大学医学部生化学教室より分与された Escherichia coli K-12株を用い、普通寒天平板培地に一昼夜培養したものを集菌し、法の如く洗菌した後、Potter-Elvehjem の硝子ホモジナイザーを用いて生理的食塩水に湿菌量 10mg/ml になるように再浮遊させたものを生菌液とした。

反応系は次の如くに調製した。

| | | | |
|-----|---|-------------------------------------|-------|
| (1) | { | 大腸菌生菌浮遊液 | 1.0ml |
| | | C S (Lilly 社製 Remycine) 10^{-1} M | 0.4ml |
| | | M/5 磷酸緩衝液 (pH8.0) | 1.0ml |
| | | DL- α -Alanineあるいはその他のアミノ酸 | 0.4ml |
| | | 蒸溜水 | 0.2ml |

(2) L-Tryptophan (石津製薬, 特級) 10^{-2} M, 1.0ml 以上の反応液の(1)(2)をそれぞれ別々に 37.5°Cの恒温槽中に30分間 preincubate した後、両者を合し60分間反応させた後、25%三塩化酢酸1.0mlを加えて反応を停止し生成 Indole の定量を行った。すなわち後藤⁷⁾の変法

により次の如く実施した。

反応液に石油エーテルを7.0ml次いで3.0mlと2回に分けて加え、Indoleを抽出した後 Ethanol 1滴を滴下して石油エーテル層を採り、Ehrlich のアルデヒド試薬 5.0mlを加えて振盪し、10分間放置した後にフィルター 530 μ により光電比色定量した。

Tryptophanase の抽出精製は市原ら⁸⁾の方法にしたがった。本抽出酵素液を用い Pyridoxal 磷酸 5 γ (本学生化学教室より分与), NH₄Cl 500 μ M およびそれぞれ所定濃度のCSとDL- α -Alanineとを、最終M/5磷酸 K. K. 緩衝液 (pH8.2) 中で一定時間 preincubate した後、基質として 100 μ M の L-Tryptophan を添加し 5 分間反応させて生成された Indole 量を前述の如く定量した。

また非酵素化学的 Indole 形成に関する実験も市原らの方法にしたがい次の如く実施した。すなわち Pyridoxal 10 μ M, CuSO₄ 5 μ M, 最終濃度 5% の NaOH および最終 10^{-2} M の CS と, DL- α -Alanine とを 37.5°C, 15 分間 preincubate した後, L-Tryptophan 10 μ M を添加して煮沸重湯煎 中で 30 分間反応せしめ, 上記と同様にして Indole 量を定量した。

実験成績

I] 大腸菌生菌液による実験

生菌液においては表1に示す如く、完全反応系では 9.4 γ の Indole 生成があり、これに最終 10^{-2} M の CS を添加すれば 88.3% の阻害率を認めた。また最終 10^{-2} M DL- α -Alanine のみを添加した反応系では生成 Indole 量 7.2 γ で 23.4% の阻害率を示した。次に 10^{-2} M CS と 10^{-2} M DL- α -Alanine の両者を加えた時には 25.5% の阻害率を示し、CS の影響が全く消失した如き結果を得た。

ついで同様の反応系で各種濃度における DL- α -Alanine が、CS の Indole 生成阻害に及ぼす態度を比較検討した成績を表2に示した。最終 10^{-2} M CS を加えることにより 70.6% の阻害を認め、これに最終それぞれ 2×10^{-2} M, 10^{-2} M および $\frac{1}{2} \times 10^{-2}$ M の DL- α -Alanine を添加すると、いずれも実験誤差の範囲内で、DL- α -Alanine $\frac{1}{2}$

表1 CSの大腸菌生菌液による Indole 形成阻害に及ぼす DL- α -Alanine の影響 (I)

| 反 応 系 | 生成 Indole 量 (γ) | 阻害率(%) |
|--|--------------------------|--------|
| 生 菌 液 の み | 0 | / |
| 完 全 反 応 系 | 9.4 | / |
| 完全反応系 + CS 10^{-2} M (最終) | 1.1 | 88.3 |
| 完全反応系 + DL- α -Alanine 10^{-2} M (最終) | 7.2 | 23.4 |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + DL- α -Alanine 10^{-2} M (最終) | 7.0 | 25.5 |

表3 CSの大腸菌生菌液による Indole 形成阻害に及ぼす DL- α -Alanine の影響 (III)

| 反 応 系 | 生成 Indole 量 (γ) | 阻害率 (%) | 復元率 (%) |
|--|--------------------------|---------|---------|
| 生 菌 液 の み | 0 | / | / |
| 完 全 反 応 系 | 12.9 | / | / |
| 完全反応系 + CS 10^{-2} M (最終) | 2.8 | 78.3 | / |
| 完全反応系 + DL- α -Alanine 10^{-2} M (最終) | 10.5 | 18.6 | / |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + DL- α -Alanine 10^{-2} M (最終) | 10.7 | 17.0 | 102 |
| 完全反応系 + DL- α -Alanine 10^{-3} M (最終) | 10.0 | 22.5 | / |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + DL- α -Alanine 10^{-3} M (最終) | 10.5 | 18.6 | 105 |
| 完全反応系 + DL- α -Alanine 10^{-4} M (最終) | 9.9 | 23.2 | / |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + DL- α -Alanine 10^{-4} M (最終) | 9.8 | 24.0 | 99 |

表2 CSの大腸菌生菌液による Indole 形成阻害に及ぼす DL- α -Alanine の影響 (II)

| 反 応 系 | 生成 Indole 量 (γ) | 阻害率(%) |
|---|--------------------------|--------|
| 生 菌 液 の み | 0 | / |
| 完 全 反 応 系 | 8.8 | / |
| 完全反応系 + CS 10^{-2} M (最終) | 2.0 | 70.6 |
| 完全反応系 + DL- α -Alanine $\frac{1}{2} \times 10^{-2}$ M (最終) | 7.9 | 10.3 |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + DL- α -Alanine 2×10^{-2} M (最終) | 7.7 | 13.7 |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + DL- α -Alanine 1×10^{-2} M (最終) | 7.6 | 13.6 |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + DL- α -Alanine $\frac{1}{2} \times 10^{-2}$ M (最終) | 7.9 | 10.3 |

$\times 10^{-2}$ Mのみを加えた場合と同程度の阻害を示すにすぎなかった。すなわち DL- α -Alanine の添加により CS の阻害が完全に消失する如き成績を得た。

次に CS 濃度を一定 (最終 10^{-2} M) とし, DL- α -Alanine の濃度をそれぞれ最終 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M とし て加え両者の量的関係を検討した。その成績は表3に示した如く, DL- α -Alanine の最終 10^{-4} M までほとんど同程度の作用を認めた。すなわちいずれの場合もほとんど完全に CS 阻害が消失した。

そこで DL- α -Alanine 以外のアミノ酸の態度について実験を行った。DL-Serine および Glycine について実施

した成績を表4に示したが, DL-Serine および Glycine は CS の阻害作用に対して何等の影響も示さなかつた。

表4 CSの大腸菌生菌液による Indole 形成阻害に及ぼす DL-Serine および Glycine の影響

| 反 応 系 | 生成 Indole 量 (γ) | 阻害率 (%) |
|--|--------------------------|---------|
| 生 菌 液 の み | 0 | / |
| 完 全 反 応 系 | 5.63 | / |
| 完全反応系 + CS 10^{-2} M (最終) | 0.81 | 85.6 |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + DL-Serine 10^{-2} M (最終) | 0.80 | 85.7 |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + DL-Serine 10^{-3} M (最終) | 0.83 | 85.5 |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + Glycine 10^{-2} M (最終) | 0.90 | 84.1 |
| CS 10^{-2} M (最終) 完全反応系 + Glycine 10^{-3} M (最終) | 0.85 | 85.5 |

以上の成績より培養実験と同様に DL- α -Alanine のみが CS の Indole 生成阻害に影響を与えることを認めた。

II) 大腸菌抽出酵素液による実験

上述の如く大腸菌生菌液においては、CSのIndole生成阻害に対し、DL- α -Alanineがその阻害を消失せしめることを知つたので、既述の大腸菌K-12株より抽出した精製酵素液を用いて以下の実験を行った。

まずアポ酵素である抽出酵素液とCS, DL- α -Alanineを単独にあるいは両者を合せ添加したものをそれぞれ10

分間反応せしめ、次に補酵素 Pyridoxal 磷酸 (PALP) を加え、さらに10分間 incubate した後、基質として L-Tryptophan を加え、5分間反応させて生成された Indole 量を定量した。

その成績は表5に示した如く酵素液と L-Tryptophan のみの反応系では全く Indole の生成を認めず、完全反応系では3.2 γ のIndoleの生成を認めた。この完全反応系

表5 CSの大腸菌抽出酵素液による Indole 形成阻害に及ぼすDL- α -Alanineの影響

| 添加順序 反応系 | 1 | 10分間 incubate | 2 | 10分間 incubate | 3 | 5分間 反応 | 生成Indole量(γ) | 阻害率(%) |
|-------------|----------------------|------------------|------|------------------|-------|-----------|-----------------------|--------|
| A | Apo | | | | Trypt | | | 0 |
| B | Apo | | PALP | | Trypt | | 3.2 | |
| C | Apo CS | | PALP | | Trypt | | 0.24 | 92.6 |
| D | Apo Alanine | | PALP | | Trypt | | 2.0 | 38.5 |
| E | Apo CS Alanine | | PALP | | Trypt | | 0.18 | 94.4 |

注. Apo : Apoenzyme, PALP : Pyridoxal phosphate, 基質 (Trypt) : L-Tryptophan.

にCSを添加した場合には92.6%の Indole 生成阻害を示したが、CSとDL- α -Alanineの両者を添加した反応系においても94.4%の阻害率を示し、生菌液の場合の如くDL- α -Alanineによる阻害の減弱は全くみとめられなかつた。なおDL- α -Alanineのみにても38.5%の阻害を認めた。

III) CSの非酵素化学的 Indole 形成阻害に及ぼすDL- α -Alanineの影響

本実験においては表6に示した如く、L-Tryptophanのみでは Indole の形成がなく、完全反応系では8.3 γ の Indole 形成を認めた。これに対し最終 10^{-2} MCSの添加系では70%の阻害が認められ、さらにこの反応系にDL-

表6 CSの非酵素化学的 Indole 形成阻害に及ぼす DL- α -Alanine の影響

| 反応系 | Pyridoxal | Cu ⁺⁺ | CS | DL- α -Alanine | Tryptophan | 形成Indole量(γ) | 阻害率(%) |
|-----|-----------|------------------|----|-----------------------|------------|-----------------------|--------|
| A | | | | | ○ | 0 | |
| B | ○ | ○ | | | ○ | 8.3 | |
| C | ○ | ○ | ○ | | ○ | 2.5 | 70.0 |
| D | ○ | ○ | | ○ | ○ | 6.8 | 18.0 |
| E | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 1.2 | 85.5 |

注. ○印は反応系に上段記載物質を添加せることを示す
 Pyridoxal 10 μ M, CuSO₄ (C₁⁺⁺) 5 μ M, CS 10⁻²M 終濃度, DL- α -Alanine 10⁻²M 終濃度, NaOH 5% 終濃度, Tryptophan 10 μ M, 総量 4.0 ml 15分間 preincubate 後重湯煎中で煮沸30分間反応。

α -Alanineを添加しても阻害の減弱は、みられず、かえってDL- α -Alanineによる阻害と相加されている如き結果を得た。

すなわち非酵素化学的Indole形成の場合にも、大腸菌より抽出した精製酵素液の場合と同様に、DL- α -AlanineはCS阻害作用を減弱せしめることはできなかつた。

考 案

以上の実験成績の如くDL- α -Alanineは、大腸菌生菌液を酵素材料とした際にL-TryptophanからのIndole生成に対するCSの阻害作用をほとんど完全に消失せしめうる。かかる作用はDL-SerineやGlycineには認められない。この成績は大腸菌の発育に対するCSとDL- α -Alanineとの拮抗現象に参照してまことに興味深いものがある。

しかし一方大腸菌より抽出した精製Tryptophanaseを用いた実験や、非酵素化学的Indole形成の場合のCS阻害に対しては、 α -Alanineはかかる作用を示さず、生菌液の場合と全く異なつた態度を示した。

かくの如き一連の現象の本態については現在のところ全く不明であるが、CSの作用機序に何等かの関連性があるものと想像される。

結 論

1) CSの大腸菌生菌液によるIndole生成阻害はDL- α -Alanineの添加により消滅されるが、DL-Serine,

Glycineにはかかる現象が認められない。

2) CSの精製Tryptophanaseおよび非酵素化学的Indole形成の阻害に対しては、DL- α -Alanineは阻害減弱作用を示さない。

稿を終るに臨み終始御懇切なる御指導と御校閲を賜つた恩師堂野前教授ならびに、伊藤文雄博士に深く感謝の意を表しますとともに、本研究にあたり御便宜と御協力を賜つた阪大医学部生化学教室の御厚意に対し、また直接御指導を受けた青木隆一学士に衷心より感謝する。

本論文の要旨は第15回日本結核病学会近畿地方会において発表した。

文 献

- 1) 溝端：結核，33：274，1958.
- 2) 青木：結核，32：418，1957.
- 3) 青木：結核，32：544，1957.
- 4) 青木：結核，32：605，1957.
- 5) K. Yamada, S. Sawaki & S. Hayami :
J. Vitaminol., 3 : 68, 1957.
- 6) E.A. Dawes, J. Dauson & F.C. Hoppold :
Biochem. J., 40 : XIV, 1946.
- 7) 後藤：大阪医学会雑誌，37：2413，1938.
- 8) 市原・坂本・和田・吉松・森野：第9回酵素化学シンポジウム講演集，II：219，1956.