

V B₆ 酵素に対する INAH およびその誘導体の阻害機構

第 1 報 Tryptophanase に対する阻害機構

和田 博・伊藤 欣一・森末 禎一

和知 勤*・松本 徹二*

大阪大学医学部生化学教室

*国立大阪療養所

受付 昭和 35 年 12 月 25 日

緒 言

イソニコチン酸ヒドラジッド (INAH) が抗結核剤として登場してより幾多の研究が発表され、その作用機構についても多岐にわたり報告されている。しかもそれらの相互関係を解明しさらに進んで INAH の抗結核作用の本因を見出すことは現在では至難な状態であるが、そのうちビタミン B₆ (V B₆) 酵素系に関してのみでも諸説があり容易に理解しえない状態である。著者らは INAH の V B₆ 酵素系に対する阻害がただちに INAH の抗結核作用の主因であると考えたものではないが、V B₆ 酵素系に対する阻害機構についての報告を整理し若干の検討を加えることにより、その抗結核作用の一端をのぞきうるとの考えのもとに実験を進めた。

INAH の V B₆ 酵素系についての報告^{1)~16)}を総合すると INAH が V B₆ 酵素系に阻害的に作用することは明らかである。そこでその阻害機構の根拠より大別して次の 3 つの作用を主張しているものと考えられる。

すなわちまず第 1 に米田^{1) 5)}, Lichstein¹⁵⁾, Pope⁴⁾らの報告しているごとく PAL (Pyridoxal) と INAH との構造類似による拮抗に由来する阻害作用、第 2 に酒井⁹⁾, Davison¹⁷⁾, Schaefer¹⁴⁾, Wilde¹⁵⁾, 庄司¹¹⁾ 16)らの報告しているごとく INAH が Carbonyl reagent として PALP (Pyridoxal phosphate) の Aldehyde 基と INAH の Hydrazine 基とで Schiff base を形成し Hydrazone になることに由来する阻害作用、第 3 に近時 Sorkin¹⁸⁾, Albert^{19) 20)}, Cymerman-Craig^{21) 22)}らが報告しているごとく INAH が Metal chelating agent として作用することに由来する阻害作用である。

小池²³⁾ および著者²⁴⁾らは構造上 PAL に INAH より類似の Desoxy pyridoxine, Toxopyrimidine が直接には V B₆ 酵素系に阻害作用を示さず、これらの -CH₂ OH 基を磷酸化してはじめて PALP と拮抗するという成績を報告しているが、この結果よりみて INAH の阻害作用が PAL との構造類似によるという説には賛成し

がたい。

一方その構造からみて Davison¹⁷⁾ がシステインスルフィン酸脱炭酸酵素において示しているごとく、Schiff base 形成による阻害説は容易に想像される。

著者²⁴⁾らは数年来 Tryptophanase の作用機構についての研究を行い、本反応におけるアンモニアイオンの賦活機構、金属イオン関与の可能性、ならびに PALP および基質の結合様式等の諸問題を明らかにしてきた。

また著者¹²⁾らは先に白鼠肝 Kynurenine transaminase, Tyrosine transaminase を用いて INAH およびその誘導体の阻害実験を行ったさい、ヒドラジン基末端に置換体を有する誘導体ではほとんど阻害を示さないにもかかわらずただ IHMS (Isonicotinic acid hydrazide-methansulfonate) のみは INAH とほぼ同等の高率の阻害を示すことを報告した。この作用機構は不明であるのでこの点もあわせて解明するため、本報においては Tryptophanase を用いて INAH およびその誘導体とくに IHMS の阻害機構について検討を加えたので報告する。

実験方法および材料

1) 酵素調製法

表 1 に示すごとく E. Coli (K₁₂ 株) をブイヨン培地に増菌、凍結乾燥後倍量の海砂とともに混和磨砕し、50 ml/g の蒸溜水を加え 2 時間氷水中で抽出、遠心沈澱し上清を等電点処理、硫酸アンモンによる塩析、透析、さらに等電点処理を行って完全に PALP が resolve したアポ酵素を用いた。

2) 反応条件

特記しないかぎり次の条件によつた。すなわち Apotryptophanase 1 ml (蛋白量 1.3 mg), Pyridoxal phosphate 終末濃度 4×10^{-6} M (0.5 μ g), (NH₄)₂SO₄ 終末濃度 5×10^{-2} M, 磷酸緩衝液 (pH 8.0) 終末濃度 M/50, DL-Tryptophan 2.04 mg, その他添加剤を適宜加え全量を 5 ml とし、37°C, 10 分間反応し三塩化醋酸により除蛋白後上清につき活性を測定した。

表 1 Tryptophanase

Apo 酵素調製法

E. Coli (K₁₂株) プイオン培地に増菌

↓

無細胞抽出液調製

↓

等電点処理 (pH 4.7)

↓

硫酸分割 (40~60%飽和)

↓

透析 (3時間攪拌透析)

↓

等電点処理 (pH 4.0)

↓

沈渣を蒸溜水に溶解 (100ml/1g)

反応条件

Apotryptophanase : 1ml (Protein 1.3 mg)

Pyridoxal phosphate : 終末 4×10⁻⁶M (0.5γ)

(NH₄)₂SO₄ : 終末 5×10⁻²M

Phosphate Buffer (pH 8.0) : 終末 M/50

DL-Tryptophan : 2.04 mg 全量 5 ml

活性の測定

Indol 定量 Ehrlich's aldehyde 試薬

3) 活性の測定

生成したインドールを定量して酵素活性を測定した。すなわち生成インドールを倍量の石油エーテルで抽出し Ehrlich aldehyde 試薬による呈色を光电比色計を用いて波長 530 mμ における吸収を測定して定量した (後藤氏法²⁵⁾)。

実験成績

1) INAH およびその誘導体の Tryptophanase に対する阻害態度

INAH およびその誘導体の阻害率は表 2 に示すごとくで、INAH および IHMS 以外の物質すなわち Marsilid, INH-CBA (N-Isonicotinyl-N'-O-carboxybenzylidene hydrazine), IPN (N-Isonicotinyl-N'-α-carboxyethylidene hydrazine), INHG (Isonicotinic acid hydrazide Na-glucuronate) では阻害は少ない。これは INAH を除く各誘導体はすべてヒドラジン基末端に置換体を有し、PAL と Schiff base を形成しえないと考えれば容易に説明される。ただ IHMS のみが INAH と同等の阻害を有する点は理解しえないのでこれを明らかにするため後記の実験を行った。

2) Tryptophanase に対する Aldehyde reagent, Metal chelating agent の阻害態度および INAH, IHMS の阻害態度との比較

本酵素は Semicarbazide, Hydroxylamin のごとき

表 2 INAH およびその誘導体の Tryptophanase に対する阻害

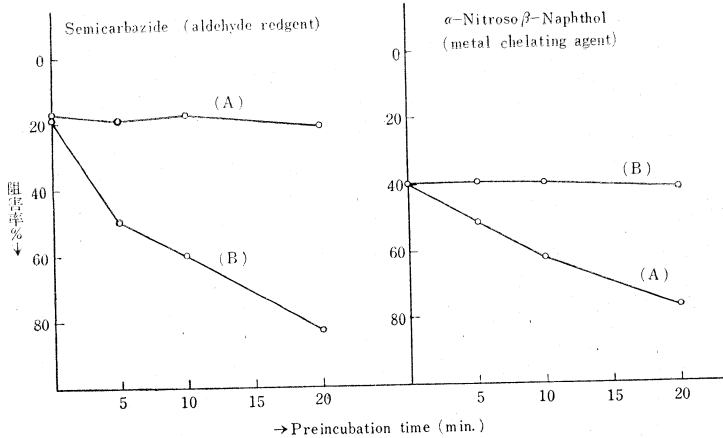
	INAH およびその誘導体	構造式	Indol 形成量 (γ)	阻害率 (%)
1			9.0	
2	INAH	CO-NH-NH_2 	2.5	72
3	IHMS	$\text{CO-NH-NH-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$ 	2.9	67
4	Marsilid	CO-NH-NH-CH-CH_3 	8.8	2
5	INH-CBA	CO-NH-N=CH- 	6.4	29
6	IPN	CO-NH-N=C-CH_3 	8.8	2
7	INHG	CO-NH-N=CH- $-(\text{CHOH})_4$ $-\text{COOH}$ 	9.2	0
* 8			0.4	

(反応条件) INAH およびその誘導体 : 10⁻⁶M, Apo-tryptophanase 1 ml, PALP 以下同前, 37°C 10分間反応
* PALP を添加せず

Aldehyde reagent によつても、O-Phenanthroline, α-Nitroso-β-naphthol のごとき Metal chelating agent によつても強く阻害される。しかも両者の間には図 1 に示すごとく阻害態度に明らかな相違を認める。すなわち Semicarbazide の場合は Apo 酵素と Preincubation しても、その時間によつて阻害率に著明な変化を認めないが、PALP とあらかじめ接触せしめると Preincubation 時間の経過とともに阻害率が增大する。α-Nitroso-β-naphthol では逆に PALP との接触では阻害率に著明な変化は示さず、Apo 酵素との Preincubation 時間の経過とともに阻害が増大し、阻害剤の種類によりその阻害態度におのおの相異なつた傾向を認めた。

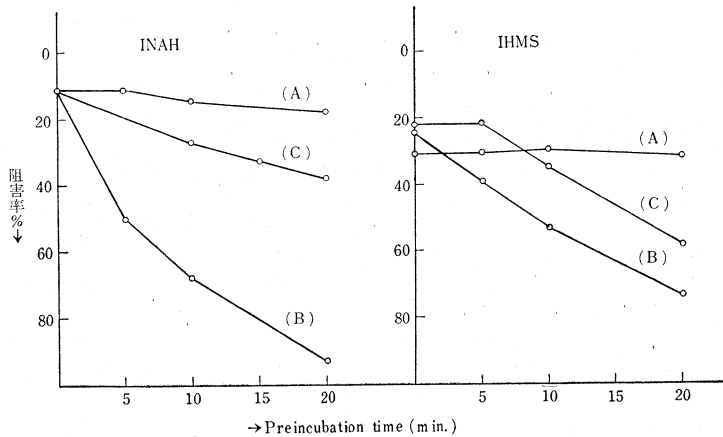
そこで INAH および IHMS の阻害態度を検討したところ図 2のごとき結果を得た。この実験では基質 (Tryptophan) による防禦効果の有無もあわせて実験した。すなわち INAH と PALP との Preincubation 時間の経過とともに阻害率は増大し (曲線 B), 明らかに Aldehyde reagent 型の阻害態度を示し、かつその Schiff base 形成は基質たる Tryptophan の共存により

図1 Semicarbazide, α -Nitroso β -naphthol の Preincubation による影響



反応条件 (A) : Apotryptophanase + Inhibitor と Preincubation
 (B) : PALP + Inhibitor と Preincubation
 Inhibitor : $5 \times 10^{-5}M$ その他同前

図2 INAH, IHMS の Preincubation による影響



反応条件 (A) Apotryptophanase + INAH (または IHMS) と Preincubation
 (B) : PALP + INAH (または IHMS) と Preincubation
 (C) : PALP + INAH (または IHMS) + Tryptophan と Preincubation
 INAH : $5 \times 10^{-5}M$ IHMS : $10^{-4}M$ その他同前

防がれる (曲線C)。また IHMS もやや阻害率は低い INAH と同様な傾向を示し、基質による防禦効果を認められた。

このことより INAH も IHMS も同じような阻害機構により本酵素反応を阻害するものと思われる。

3) 阻害比による INAH, IHMS の阻害機構の検討

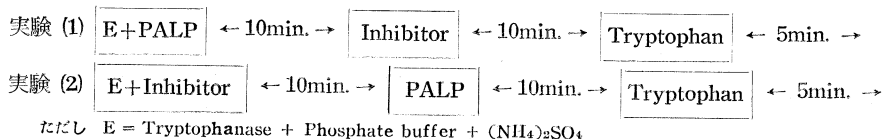
次に INAH および IHMS の阻害が Schiff base 形成のみによるものか否かを検討するために、表3に示すごとくアポ酵素に対する Preincubation を2回に分けて、まず PALP と接触せしめその後阻害剤を作用させ反応を行う場合 (実験1) と、その逆の場合 (実験2) との阻害率を比較すると表3のごとく Aldehyde reagent である Semicarbazide, hydroxylamine では両者に大差ないので比し、Metal chelating agent であ

る O-Phenanthroline, α -Nitroso- β -naphthol では前者の阻害が少なく、明らかに異なった傾向を示す。この実験(2)阻害率/実験(1)阻害率の値を阻害比として比較すると、Aldehyde reagent では1前後の数値となり Metal chelating agent では3~4の数値を示す。この2つの異なった傾向に対して INAH および IHMS の阻害比はそれぞれ2.3および2.6であり、これらの阻害が Schiff base 形成のみによるものでないことを示唆している。

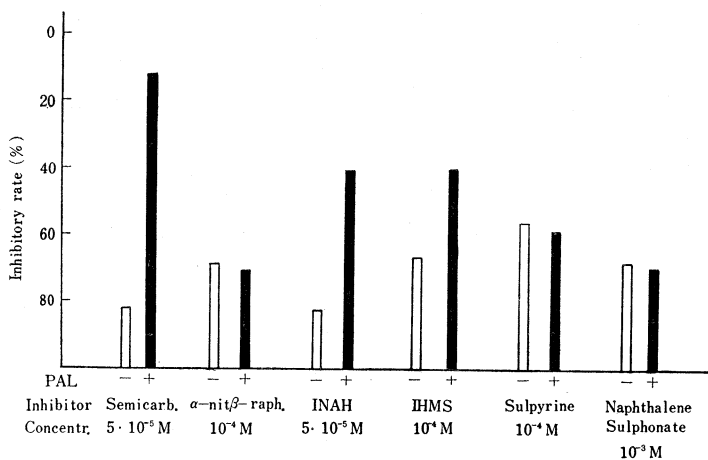
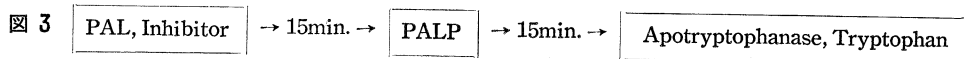
4) PAL 添加防禦実験による阻害機構の検討

そこで PAL と阻害剤をまず Preincubation してのち PALP と接触せしめ、さらに Apotryptophanase および基質を加えて反応を行つたときの阻害率と、PAL と Preincubation しないときの阻害率を比較すると図3の

表 3



	Aldehyde reagent		Metal chelating agent		Anti-tbc. drug	
	Semicarbazide	Hydroxylamine	O-Phenanthroline	α -Nitroso- β -naphthol	INAH	IHMS
Conc.	$5 \times 10^{-5}M$	$5 \times 10^{-5}M$	$10^{-4}M$	$5 \times 10^{-5}M$	$5 \times 10^{-5}M$	$10^{-4}M$
実験 (1)	31 %	81 %	14 %	16 %	20 %	17 %
実験 (2)	42 %	73 %	59 %	53 %	48 %	46 %
(2)/(1)	1.4	0.9	4.2	3.3	2.3	2.6



ごとくで、PAL と Schiff base を形成する Semicarbazide では PAL とあらかじめ接触することにより、次に添加する PALP の Aldehyde 基を阻害することができないので基質分解に対する阻害率は非常に低くなって、PAL を添加しない場合と比べてその阻害率との差が非常に大となった。これに反してアポ蛋白の活性基を阻害する α -Nitroso- β -naphthol では PAL の有無にかかわらず常にほとんど同率に基質分解を阻害した。これらに対して INAH および IHMS の阻害態度は PAL と接触しても阻害率の低下の程度は Semicarbazide の場合ほど甚しくなかつた。なお Sulpyrine, Naphthalene sulfonate の場合の阻害は Metal chelating agent の場合と同様アポ蛋白に対する阻害の傾向を示した。

5) 各種スルホン酸による阻害

IHMS の阻害機構をさらに検討するため各種のスルホン酸の本酵素に対する阻害実験を行った。その結果は表 4 および 図 4 に示す通りであつて、Aminopyrine では全く阻害は認められないが、これにメタンスルフォ

ン酸基を結合させた Sulpyrine では著明な阻害を示した。さらに Naphthalene sulfonate, Xylenesulfonate, R-Acid のようなスルホン酸によつても本酵素は阻害をうけた。またこれらはアポ蛋白に対する阻害傾向を示した。

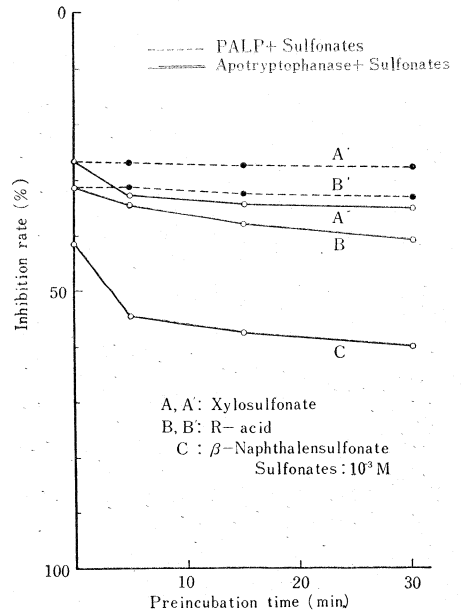
6) INAH および IHMS と PALP との混合液の吸収曲線

そこで INAH および IHMS を PALP と混合して Beckman spectrophotometer を用いその吸収曲線につき検討した。その結果は図 5, 6 に示す通りであつて、INAH と PALP とを混合した場合、PALP 特有の吸収は INAH との Schiff base 形成のためただちに消失するが、IHMS と PALP を混合したものは混合直後では PALP の吸収曲線を示すが $37^{\circ}C$ に保つと時間とともに変化し、遂に 60 分後では INAH に PALP を混合したものと同一吸収曲線を得た。

表4 各種 Sulfon 酸による阻害作用

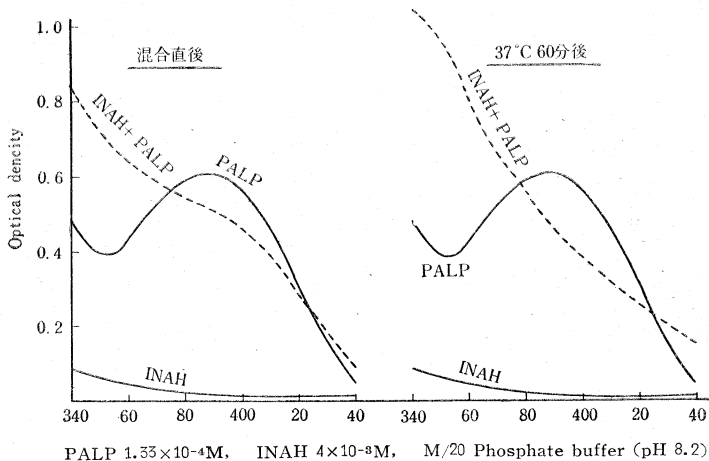
	構造式	終末濃度 mol	阻害率 %
Sulpyrine	<chem>CN(C)C(=C)C1=CC=C(C=C1)C(=O)OS(=O)(=O)[Na]</chem>	10^{-4}	66
Aminopyrine	<chem>CN(C)C(=C)C1=CC=C(C=C1)N</chem>	10^{-3}	0
		10^{-4}	0
β -Naphthol sulfonate	<chem>O=S(=O)(O)C1=CC=C2C=CC=CC2=C1</chem>	10^{-3}	61
R-Acid	<chem>O=S(=O)(O)C1=CC=C2C(O)=CC=C2=C1</chem>	10^{-3}	38
Xylene sulfonate	<chem>Cc1ccc(cc1)S(=O)(=O)O</chem>	10^{-3}	34
Toluene sulfonate	<chem>Cc1ccc(cc1)S(=O)(=O)O</chem>	10^{-3}	19
重亜硫酸ソーダ	<chem>NaHSO3</chem>	10^{-3}	26

図4 Inhibitory action of various sulfonates



INAH の VB₆ 酵素系に対する阻害機構の重要な因子は、PAL の Aldehyde 基と INAH のヒドラジン基との間に Schiff base を形成し、Hydrazone をつくり阻害する Aldehyde reagent としての作用であることは、ヒドラジン基末端に置換体を有する IHMS を除く INAH 誘導体の阻害率が低いこと、および Aldehyde reagent の阻害態度の傾向を示すこと (図 1, 2) より*

図5 吸収曲線 (INAH, PALP, INAH+PALP)

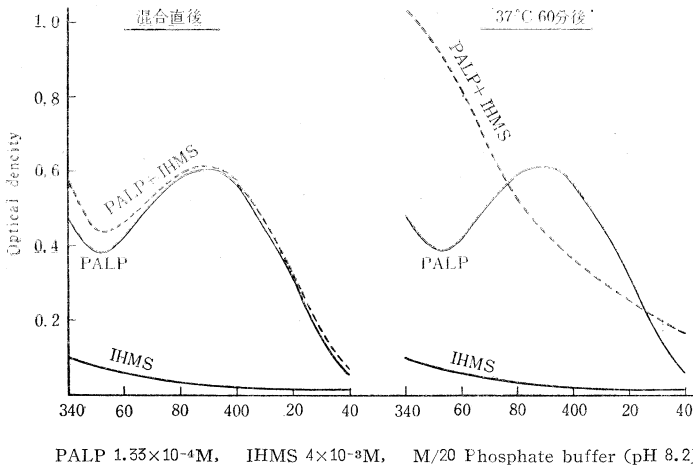


*明らかであり、この点については酒井⁹⁾、庄司¹⁴⁾、¹⁶⁾らの主張と一致するものである。また図2のごとく PALP, INAH (または IHMS) および Tryptophan を同時に接触させた場合は、PALP と INAH (または IHMS) を接触させた場合に比べ阻害率は低下し、基質の防禦効果を認めたことより実際の酵素反応においても Trypto-

phan のアミノ基と PALP の Aldehyde 基との結合が起っていることを示唆するもので、この点著者²⁴⁾らが先に発表した Tryptophanase 模式図の構想に一致するものであり、INAH の侵襲点 Aldehyde 基にあることも示すものである。

しかしながら阻害比の実験で Aldehyde reagent と

図6 吸収曲線 (IHMS, PALP, IHMS+PALP)



PALP $1.35 \times 10^{-4} M$, IHMS $4 \times 10^{-3} M$, M/20 Phosphate buffer (pH 8.2)

Metal chelating agent の阻害比の中間に INAH および IHMS の阻害比があること (表 3), さらに PAL 添加防禦実験にて INAH および IHMS が同じく両者の中間の阻害傾向を認めたことは INAH および IHMS が Aldehyde reagent として阻害的に作用する以外に Metal chelating agent としての作用機作も包含していることを暗示するものと考えられる。

さて IHMS の場合, ヒドラジン基の末端に置換体を有するにもかかわらず他の誘導体と異なり, INAH と同様な阻害態度を有することは理解しがたい問題である。そこでまず図 2 に示すごとく IHMS も INAH と同様に Aldehyde reagent 様の態度を示し, かつ程度は弱いながらもその阻害は基質により防がれた。したがって IHMS の場合も PALP の Aldehyde 基との直接の関与を考慮しなければならない。とすると本反応条件で IHMS は次式(2)のごとく解離しているか, またはいわゆるメタン

にメタン sulfon 酸基を結合させた Sulpyrine も表 4 に示すごとく, 前者が全く阻害を示さないのに比し著明な阻害作用を示し, さらに Sulpyrine の阻害態度は図 3 からアポ蛋白に関与する傾向を示しているので, IHMS の阻害機構の一部はその側鎖末端のメタン sulfon 酸基によるアポ蛋白侵襲によるものであることが考えられる。しかし, 図 7 に示すごとく IHMS と PALP を接触させ 37°C, pH 8.2 に保つときは時間とともに INAH と同じ吸収曲線を示すにいたることより, IHMS は少なくとも INAH を遊離しているはずであるのでこのさいの阻害機構は当然 PALP との Schiff base 形成によるものである。ゆえにこれらの条件を満足するものは前記分子式(2)であり, IHMS の阻害機構はアポ酵素に対するメタン sulfon 酸基による阻害に, さらに解離して INAH としての PALP に対する阻害が加わつたものと考察できる。

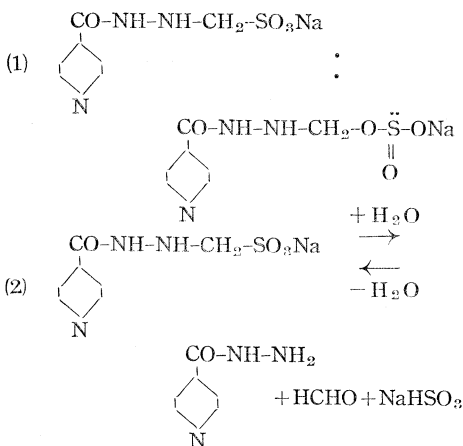
なお表 4 および図 4 に示すように Naphthalen-sulfonate, Xylenesulfonate および R-Acid のような sulfon 酸によつても阻害が認められるのであるが, この場合はアポ蛋白に対する影響が著明で非特異的に作用しているためと考えられ, いわゆるメタン sulfon 酸誘導体の場合とは全く別ようである。

以上のように著者らは INAH およびその誘導体主として IHMS の Tryptophanase に対する阻害機構を通じてその作用機作について検討を加えたが, ピリジン核の窒素原子についてその役割を解明すべく安息香酸ヒドラジドを合成し, 酵素反応に対する態度および抗結核性について実験を行つているので追つて報告する。

結 論

1) Tryptophanase を用いて INAH およびその誘導体の VB₆ 酵素に対する阻害機構を検討した。

各種 INAH 誘導体のうちでは IHMS のみが高度の



阻害を示した。

2) INAH および IHMS の阻害態度は両者ともによく似ており, Aldehyde reagent としても, また Metal chelating agent としても作用していることが明らかとなった。

3) INAH および IHMS と PALP との混合液の吸収曲線を測定した結果, IHMS も INAH と同様の Schiff base を形成することがわかった。したがって IHMS は容易に INAH を解離するものと考えられる。

4) メタンスルホン酸誘導体としては IHMS 以外に Sulpyrine にも強い阻害作用があった。したがって IHMS の場合そのメタンスルホン基にも阻害作用があるものと思われる。

各種のスルホン酸誘導体にも Tryptophanase に対する阻害作用があったが, これらはアポ蛋白に対する非特異的な作用と考えられる。

稿を終るに臨み御指導, 御校閲を賜りました阪大生化学市原硬教授および坂本幸哉助教授に対し深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨は昭和 32 年 11 月第 16 回日本結核病学会近畿地方会において発表した。

文 献

- 1) Yoneda, M., Kato, N., & Okajima, J. : Nature, 170 : 803, 1952.
- 2) 堂野前維摩郷・河盛勇造・伊藤文雄 他 : 最新医学, 7 : 643, 昭27.
- 3) Boone, I.U., & Woodward, K.J. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 84 : 292, 1953.
- 4) Pope, H. : Am. Rev. Tbc., 68 : 938, 1953.
- 5) Yoneda, M., & Asano, N. : Science, 117 : 277, 1953.
- 6) 堂野前維摩郷・河盛勇造・伊藤文雄 他 : 最新医学, 8 : 235, 昭28.
- 7) 堀本清次郎・伊藤文雄 他 : 結核, 29 : 166, 昭29.
- 8) Unger, J., Tomich, E.G., Parkin, K.R., & Muggleton, P.W. : Lancet, No. 6831, 220, 1954.
- 9) 酒井淳三 : 結核, 29 : 161, 昭29.
- 10) 山本実 : 結核, 29 : 195, 昭29.
- 11) 庄司宏・山上朗 : 結核 (増刊号) : 121, 昭29.
- 12) 松本徹二 : 結核, 33 : 283, 昭33.
- 13) Lichstein, H. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 88 : 519, 1955.
- 14) Schaefer, W.B. : Am. Rev. Tbc., 68 : 273, 1953.
- 15) Wilde, W. : Z. Hyg. Infektionskrankh., 139 : 524, 1954.
- 16) 庄司宏・山上朗・森龍男 : 昭和29年11月日本結核病学会近畿地方会.
- 17) Davison, A.N. : Biochem. et Biophys. Acta, 19 : 131, 1956.
- 18) Sorkin, E., Roth, W., & Erlenmeyer, H. : Helv. Chem. Acta, 35 : 1736, 1952.
- 19) Albert, A. : Experimentia, 9 : 370, 1953.
- 20) Albert, A. : Nature, 177 : 525, 1956.
- 21) Cymerman-Craig, J., Rubbo, S.D., Willis, D., & Edgar, J. : Nature, 176 : 35, 1955.
- 22) Cymerman-Craig, J., Vanghan, G.N., & Willis, D. : Nature, 177 : 480, 1956.
- 23) 小池正彦 : 生化学, 26 : 528, 昭29.
- 24) Wada, H., Yoshimatsu, H. et al. : Proceeding of the International Symposium on Enzyme Chemistry. Tokyo and Kyoto, 148, 1957.
- 25) 後藤貞光 : 大阪医学会雑誌, 37 : 2413, 昭13.