

VB₆ 酵素に対する INAH および その誘導体の阻害機構

第 2 報 Glutamic acid decarboxylase に対する阻害機構

和 知 勤・松 本 徹 二・喜 多 舒 彦

国立大阪療養所

受付昭和34年4月15日

緒 言

著者ら¹⁾は先に INAH のビタミン B₆ (VB₆) 酵素系に対する阻害機構を Tryptophanase を用いて検討した。INAH の作用機構については Lichstein²⁾, Pope³⁾, 米田⁴⁾⁵⁾らは INAH と Pyridoxal (PAL) との構造類似による拮抗作用を考えているが、われわれの成績ではこれに賛成しがたくむしろ INAH の阻害は Pyridoxal phosphate (PALP) の Aldehyde 基と INAH の Hydrazine 基末端のアミノ基とが Schiff base を形成し、VB₆ 酵素を不活性化すること、また INAH が酵素蛋白を場として Metal chelating agent として作用し酵素を不活性化するものであることを示した。さらにまたあわせて IHMS (Isonicotinic acid hydrazide Na-methansulfonate) の阻害機構をも検討し Tryptophanase の反応 pH (8.0) においては IHMS は INAH, Formaldehyde および酸性亜硫酸ソーダに解離してこれが酵素に阻害的に作用することを示唆した。しかもこのさいメタン sulfonate としても、酸性亜硫酸ソーダとしても本酵素に対して若干の阻害作用を有することを認めた。

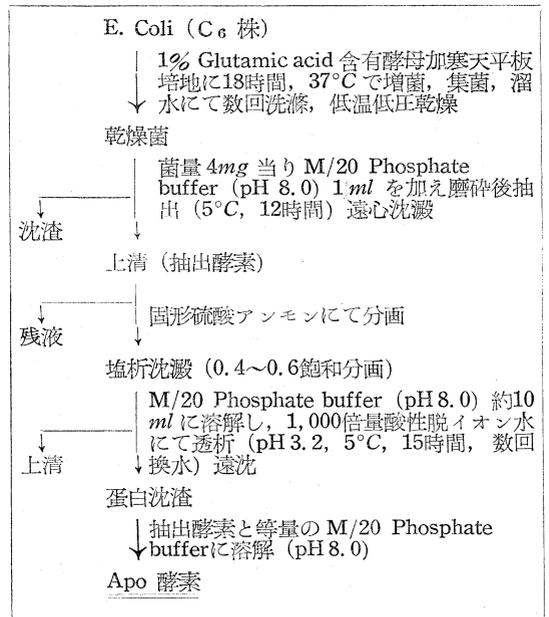
そこで著者らは反応 pH が酸性である Glutamic acid decarboxylase を用いてさらに INAH およびその誘導体の作用機構を検討した。Glutamic acid decarboxylase に対する INAH の阻害作用についてはすでに伊藤⁶⁾, 庄司⁷⁾⁸⁾らの報告があり、これらはいずれも INAH が Aldehyde reagent として阻害するものと考察している。しかしこれらの成績は用いた酵素剤がいずれも粗酵素であるため、反応を結果論的に考察する傾向があり微細反応系を注視することができない。著者らはこの点を重視して最近小泉⁹⁾¹⁰⁾が Glutamic acid decarboxylase のアポ酵素の分離に成功した方法を用いて、INAH およびその誘導体の VB₆ 酵素系に対する阻害機構につき再検討し、さらに鳥型、人型結核菌に対する種々薬剤の制菌作用をもあわせて検討し考察の一助としたので以下報告する。

実験方法および材料

1) 酵素調製法

表 1 に示すごとく小泉¹⁰⁾の方法により E. Coli (C₆ 株) を増菌、凍結乾燥後、等量の高砂で磨砕し M/20 Phosphate buffer (pH 8.0) を加え氷室中で抽出、遠心

表 1 酵素調製法



沈澱し、上清を硫酸アンモンによる塩析、酸性透析、遠心沈澱を行い完全に PALP が resolve したアポ酵素を用いた。

2) 反応条件および活性の測定

特記しない限り次の条件によつた。すなわち Apo-glutamic acid decarboxylase 1 ml (蛋白量 0.44 mg) PALP 5 μg, 醋酸緩衝液 (pH 5.0) 終末濃度 M/10, Glutamic acid 20 μM, その他添加剤を加え全量 3.0 ml として 37°C, 10 分間 Warburg 検圧計にて炭酸ガス発生により活性を測定した。

3) Benzoyl hydrazine (BH)

第一製薬より恵与されたものを用いた。

M.P. 111°C, M.W. 136

実験成績

1) INAH その他各種薬剤の Glutamic acid decarboxylase に対する阻害態度

まず酵素液に阻害剤と PALP を加え 5 分間 preincubation してのち、基質を添加して、各種薬剤の阻害態度をしらべたところ表 2 に示すとき結果を得た。

表 2 精製酵素に対する各種薬剤の影響

薬 剤 名	終末濃度	阻 害 率
INAH	$10^{-3}M$	38 %
IHMS	$2 \times 10^{-3}M$	16.5
INHG-Na	$2 \times 10^{-3}M$	7
I P N	$2 \times 10^{-3}M$	3.7
Glucosil-INAH	$2 \times 10^{-3}M$	0
Cycloserine	$10^{-3}M$	41.6
Sulpyrine	$2 \times 10^{-3}M$	17
Aminopyrine	$2 \times 10^{-3}M$	2
Benzoyl hydrazine	$10^{-3}M$	59
Benzoic acid	$10^{-3}M$	0
No. 217 物質	$10^{-3}M$	0

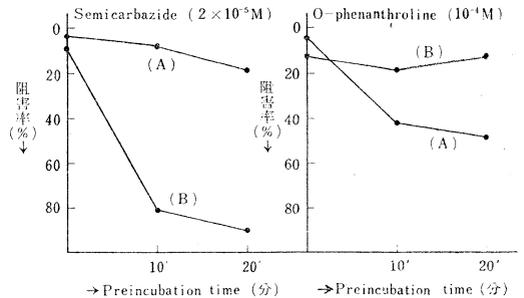
注：1) 酵素液に阻害剤および PALP を加え preincubation 5 分後基質を添加した
 2) 酵素液に PALP を加えた対照の CO₂ 発生量は 5.4 μM で、PALP を添加しない場合の CO₂ の発生は認めなかつた

すなわち、INAH およびその誘導体では INAH のみが著明な阻害率を示し、INHG-Na (Isonicotinic acid hydrazide Na-glucuronate), I P N (N-Isonicotinyl-N'-α-carboxyethylidene hydrazine), Glucosil-INAH では阻害をほとんど認めなかつた。ただ IHMS では約 17% の阻害を認めた。V B₆ 阻害剤である Cycloserine (C S) では相当高率の阻害を認めた。また Aminopyrine, Benzoic acid では阻害を認めないのに反し Sulpyrine, Benzoyl hydrazine (B H) ではやや著明な阻害を示すことは特記しなければならない。INAH 誘導体 No. 217 (α-Isonicotinoyl-ε-carbon-decyloxy hydrazine monohydrochloride) ではほとんど阻害が認められない。

2) Glutamic acid decarboxylase に対する Aldehyde reagent, Metal chelating agent の阻害態度および INAH, IHMS, B H の阻害態度の比較

本酵素に対して Aldehyde reagent として Semicarbazide, Metal chelating agent として O-Phenanthroline を用いてこれらの阻害態度を比較検討したところ、図 1 に示すとき結果を得た。すなわち、Semicarbazide の場合はアポ酵素と preincubation してもその時間によっ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その preincubation 時間の経過とともに阻害率は増大する。

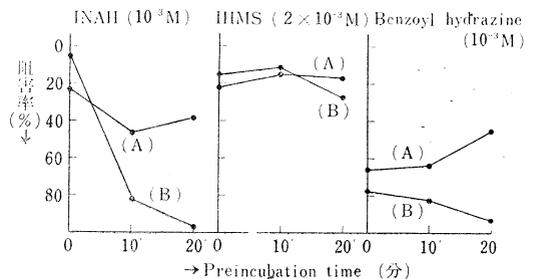
図 1 Aldehyde reagent および Metal chelating agent の阻害態度



注：(A) Inhibitor と Apo E. を preincubation
 (B) Inhibitor と PALP を preincubation

O-Phenanthroline では逆に PALP との接触では阻害率に著明な変化は示さず、アポ酵素との接触時間の経過とともに阻害は増大し、明らかに相異なつた傾向を示した。そこで INAH, IHMS および B H の阻害態度を検討したところ図 2 のごとくいずれも Aldehyde reagent 型の阻害態度を示している。しかもこの 3 者の阻害率は B H がもつとも強く、IHMS がもつとも弱くその阻害態度に若干の相違がみられた。

図 2 INAH, IHMS および Benzoyl hydrazine の阻害態度



注：(A) (B) 図 1 に同じ

3) 阻害比による INAH, IHMS および B H の阻害機構の検討

次に本酵素に対する INAH, IHMS および B H の阻害が Schiff base 形成にのみよるものか否かを検討するため表 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)と逆にアポ酵素と阻害剤をまず接触させのちに PALP を加える場合(実験 2)の阻害率を比較すると、Aldehyde reagent である Semicarbazide では前者の方が、Metal chelating agent である O-Phenanthroline では後者の方が阻害率が大きく全く異なつた傾向を示した。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 型の阻害比は分母が大となるため 1.0 よりはるかに小となるに反し、Metal

表 3 各種阻害剤の阻害比

実験別	薬剤別	Aldehyde reagent	Metal chelating agent	Anti-tbc. drug		Analog. sub.
	Inhibitor	Semicarbazide	O-Phenanthrol.	INAH	IHMS	BH
	終末 Conc.	$2 \times 10^{-5}M$	$10^{-4}M$	$10^{-3}M$	$2 \times 10^{-3}M$	$10^{-3}M$
(1)		46.75 %	16.5 %	56.10 %	15.85 %	84.00 %
(2)		10.00 %	40.50 %	43.50 %	16.70 %	65.00 %
(2)/(1)		0.241	2.46	0.72	1.05	0.75

注： 実験 (1) E+PALP←10min.→Inhibitor←1min.→Glut. A.←10min.→
 実験 (2) E+Inhibitor←10min.→PALP←10min.→Glut. A.←10min.→

chelating agent 型では分子が大となるため 1.0 より大となる。この 2 つの異なつた阻害比傾向に対して INAH, IHMS および BH の阻害比を計算すると、いずれも 1.0 前後の値を示しこれらの阻害が Schiff base 形成のみによるものでないことを示唆している。しかも IHMS では阻害率は低いが阻害比は 1.0 以上を示し、INAH および BH に比べてさらに Metal chelating agent 型阻害態度に傾いている。

そこでもし INAH および BH の阻害が PAL の Aldehyde 基との Schiff base によるものであるならば、PAL と INAH および BH を接触させ、しかるのち PALP とアボ酵素を添加すれば阻害は非常に軽減されるはずである。この想定のもとに PAL (終末 $2 \times 10^{-3}M$) と INAH および BH を 5 分間接触させた後に PALP を添加し、さらに 5 分間後にアボ酵素および基質を加えて反応させた場合と、PAL と接触させない場合との阻害率は、前者が 82~85 %、後者が 55~61 % であつた。これに比し Aldehyde reagent である Semicarbazide の場合は前者が 89 %、後者が 24% であり、Metal chelating agent である O-Phenanthroline の場合は PAL の有無にかかわらず常に 40~50 % の阻害率を示した。この成績より INAH および BH は Semicarbazide と O-Phenanthroline 両者の中間の阻害態度を示すことを想定できる。

4) 各種薬剤による培養実験

そこで INAH, IHMS, BH, 各種スルホン酸およびメタンスルホン酸誘導体について鳥型菌および人型結核菌に対する制菌作用を比較するため培養実験を行った。表 4~6 に示すごとく、まず BH では鳥型菌の場合は終末濃度 $10^{-2}M$ でやや制菌作用を認めるが H₃₇Rv 株では全く認めない。Aminopyrine と Sulpyrine では H₃₇Rv 株、鳥型菌液体培地の場合に前者より後者による制菌作用が強い。

各種スルホン酸ではわずかに制菌作用を示すごとくであるが明らかでない。PABA 添加では H₃₇Rv 株の発育および鳥型菌の液体培地での発育は強く阻止するが鳥型菌の固形培地では対照と同程度発育した。

表 4 鳥型菌竹尾株による各種薬剤添加培養実験 (固形培地)

薬剤濃度	10 ⁻² M	10 ⁻³ M
添加薬剤		
Sulpyrine	■	■
Aminopyrine	■	■
α-Naphthol sulfonate	■	■
β-Naphthol sulfonate	■	■
R-acid	■	■
Xylene sulfonate	■	■
INAH	-	-
IHMS	-	-
Benzoyl hydrazine	+	■
PABA	■	■
対 照	■	■

注： 1) [使用菌株] 鳥型菌竹尾株 $5 \times 10^{-4}mg$ 接種
 2) [培養方法] 1% 小川培地に各薬剤を各終末濃度に添加し、37 C 培養
 3) 培養 96 時間における対照培地集落数と同程度ものを ■ とし、約 3/4, 1/2, 1/3 をそれぞれ ■, ■, + とす

考 案

INAH が Aldehyde reagent 型阻害態度を示す成績 (図 1, 2), 阻害比実験 (表 3) および PAL による防禦実験成績より Metal chelating agent 型阻害をも含まれることを示唆する成績を得た。そこで INAH の本酵素に対する阻害機構はまず Aldehyde reagent として PALP の Aldehyde 基と INAH の Hydrazine 基末端とで Schiff base を形成し Hydrazone をつくることによることは否めない。しかし小泉^{9) 10)} が本酵素に金属が関与すると報告していることを考慮すると、一方では INAH が酵素蛋白に対して Metal chelating agent として作用することにより酵素の不活性化を由来することによる阻害も包含しているものと推察される。このことは著者らの前報の成績¹⁾ と全く同様である。

そこで INHG, I P N, Glucosil-INAH および No. 217 物質等が本酵素に阻害的に作用しないことは、著者らの従来^{1) 11)} および他の報告者^{8) 13)} の成績よ

表5 鳥型菌竹尾株による各種薬剤添加培養実験
(液体培地)

添加薬剤	判定時間		
	24時間	48時間	72時間
INAH	-	-	-
IHMS	-	±	±
Benzoyl hydrazine	-	-	±
Sulpyrine	-	±	+
Aminopyrine	+	+	+
α-Naphthol sulfonate	±	+	+
β-Naphthol sulfonate	±	+	+
R-acid	+	+	+
Xylene sulfonate	+	+	+
対 照	+	+	+

- 注: 1) [使用菌株] 鳥型菌竹尾株
 2) [培養方法] Sauton 培地 (グルタミン酸ソーダ使用) に各薬剤を終末濃度 $10^{-2}M$ に添加後 $90^{\circ}C$ 30分滅菌, 1白金耳接種, $37^{\circ}C$, 表面培養
 3) [判定方法]
 ± やや増殖したかみえる程度
 + 軽度ながら明らかに増殖を認めるもの
 ++ 液面の半分くらい増殖したもの
 +++ 液面の大部分まで増殖したもの
 ++++ 液面全体に増殖し, 管壁に上るもの
 ++++ 管壁に上りひだ状発育を認めるもの (最大限)

表6 H₃₇Rv 株による各種薬剤添加培養実験
(固液培地)

添加薬剤	判定 (週)			
	3	4	5	8
Benzoyl hydrazine	44	94	94	100
PABA	0	0	0	0
Sulpyrine	0	0	0	0
Aminopyrine	0	11	40	40
α-Naphthol sulfonate	44	78	100	100
β-Naphthol sulfonate	38	63	100	100
Xylene sulfonate	65	68	100	100
対 照	44	94	94	100

- 注: 1) [使用菌株] H₃₇Rv 株 $5 \times 10^{-5}mg$ 接種
 2) [培地] 1% 小川培地, 各薬剤終末 $10^{-2}M$ 添加
 3) [判定方法] 8週における対照培地集落数を 100 として %を示す

り INAH の Hydrazine 基末端に置換体を有するものでは, PALP との Schiff base 形成および酵素蛋白への侵襲による不活性化が起りえないことによるものと考えられる。

また CS が本酵素に対し著明な阻害作用を示したことはその作用機構として, 青木¹⁴⁾~¹⁶⁾, 著者¹²⁾らおよび Neiland¹⁷⁾らの報告より, INAH におけると同じく PALP と Schiff base 形成によるものおよびその Metal chelating agent としての作用による不活性化が考えられるが, これらの点についてはさらに精しく検討されねばならない。

IHMS では前報¹⁾の Tryptophanase による実験および著者ら¹¹⁾の白鼠肝 Kynurenine transaminase, Tyrosine transaminase の場合に比し阻害率が非常に低いがその理由についてはまず反応条件が考えられる。すなわちこれらの高い阻害率を示した実験での反応 pH がいずれも弱アルカリ性であった。また本酵素において Aminopyrine にメタンスルホン酸基を結合させた Sulpyrine では約 15% の阻害率の上昇を示したこと (表 2) より, IHMS は本酵素における反応 pH では前報に報告したごとく, INAH, Formaldehyde および酸性亜硫酸ソーダに解離しがたく, IHMS の示した阻害は主としてメタンスルホン酸基によるものと考えられ, したがってこの場合 IHMS は Hydrazine 基末端のアミノ基に置換体を有する他の INAH 誘導体と同様な態度を示すものであろう。そして表 6 に示すごとく H₃₇Rv 株に対して Aminopyrine より Sulpyrine の方が制菌作用が強いことは前報¹⁾に報告したごとく, 弱アルカリ性反応ではメタンスルホン酸基による阻害が幾分含まれるであろうという主張に一致し, 各スルホン酸ではほとんど制菌作用を認めていない点, これらはメタンスルホン酸基の阻害態度と異なるものであるとの前報の考察を支持するものである。

次に BH は図 2 および表 3 より INAH とほとんど同様な阻害態度を示している。これは BH が本酵素に対して INAH と同様な阻害機構を示すもので, Aldehyde reagent および Metal chelating agent として両面の阻害形式を包含していることを示唆するものである。一方表 4~6 に示すごとく, BH が鳥型菌に対しては制菌作用を示すにもかかわらず H₃₇Rv 株に対してはほとんど影響を認めていない。この差異については明らかでないが, ともかく得た成績については Bernstein¹⁸⁾, 内田¹⁹⁾, Albert²¹⁾らの報告と一致する。Albert²¹⁾, Scheu²²⁾によると Cyanacetic hydrazide はその制菌作用は INAH に比べて弱いけれども, 同様な金属親和性を示すと報告している。しかもその Hydrazine 基末端で PALP と Schiff base 形成の可能性は十分考えられるので, VB₆ 酵素系に対しても INAH と同様な阻害態度を示すものと思われる。一方 PABA は H₃₇Rv 株に対し制菌作用を示した (表 6) が, 内田²⁰⁾らは Benzoic acid および PABA が INAH と交叉耐性を示さないと報告しているので, 本酵素に対し Benzoic acid が阻害作用を示さなかつたこと (表 2) と相まって PABA の結核菌に対する制菌作用機構は, INAH の場合とはむしろ異なっているものと考えられる。また INAH の Pyridine 核の N を酸化することによりその抗結核作用が減弱するという Bernstein の報告²³⁾, Cyanacetic hydrazide が INAH と交叉耐性を示すという Barnett²⁴⁾, Kirshner²⁵⁾らの報告, さらにまた INAH

の基本骨格を有するものはすべて INAH と交叉耐性を示すという内田²⁰⁾らの説より、INAH および BH はともに V B₆ 系酵素に対し同じ傾向の阻害形式を示すにもかかわらず、抗結核作用では全く異なった態度を示す事実の所以をそれらの分子構造上の差異に求めなければならぬことになる。

INAH の抗菌作用の機構あるいは INAH 耐性の発現の機構については多くの報告^{26)~30)}がみられるが、INAH の抗結核菌作用が菌体内物質と INAH との結合によるものとするならば、著者らの成績を総括して考察すると INAH の立体構造ことに Pyridine 核の N, Keto 基, Hydrazine 基の立体的なつながりとその間隔が INAH の菌体内への incorporation に重大な役割を演じていることを示唆するものと思われる。

結 論

1) E. Coli (C₆ 株) より精製した Glutamic acid decarboxylase に対する INAH およびその誘導体の阻害は INAH に著明でその誘導体では低率である。BH, CS では著明な阻害を認めた。

2) INAH の本酵素に対する阻害機構は Aldehyde reagent として PALP との Schiff base 形成によることおよび Metal chelating agent として酵素蛋白への侵襲による不活性化によるものと思われる。なお BH の阻害態度も同様な傾向を示した。

3) IHMS の本酵素に対する阻害は低率で、その阻害は主としてメタンスルホン酸基によるもので、反応条件が酸性の場合は INAH, Formaldehyde および酸性亜硫酸ソーダに解離しがたいものと思われる。

4) 各種薬剤添加鳥型、人型結核菌の培養実験をも総括して INAH の Pyridine 核 N, Keto 基および Hydrazine 基の立体的なつながりとその間隔が INAH の菌体内への incorporation に重大な役割を演ずることを考察した。

稿を終るに臨み御助言戴きました阪大生化学坂本幸哉助教授、同微研堀三津夫教授、大阪府立病院小泉隆祺博士に深甚な謝意を表します。なお実験に協力された故中島清君に謝意を表します。

本論文の要旨は昭和 33 年 5 月第 33 回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) 和田博・伊藤欣一・森末禎一・和知勤・松本徹二：結核，34：417，昭34。
- 2) Lichstein, H. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 88 : 519, 1955.
- 3) Pope, H. : Am. Rev. Tbc., 68 : 938, 1953.

- 4) Yoneda, M., Kato, N, & Okajima, J. : Nature, 170 : 803, 1952.
- 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，7 : 643, 昭27.
- 7) 庄司宏・山上朗：結核，29 (増刊号) : 121, 昭29.
- 8) 庄司宏・山上朗・森龍男：結核，30 (増刊号) : 70, 昭30.
- 9) Wada, H., Yoshimatsu, H., Koizumi, T. et al. : Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto, 1957.
- 10) 小泉隆祺・井上文男・吉松久雄：大阪大学医学雑誌，10 : 141, 昭33.
- 11) 松本徹二：結核，33 : 283, 昭33.
- 12) 松本徹二：結核，33 : 338, 昭33.
- 13) 酒井淳三：結核，29 : 161, 昭29.
- 14) 青木隆一：結核，32 : 418, 昭32.
- 15) 青木隆一：結核，32 : 544, 昭32.
- 16) 青木隆一：結核，32 : 605, 昭32.
- 17) Neiland, T.B. : Arch. Biochem. & Biophys., 62 : 151, 1956.
- 18) Bernstein, J., Lott, W.A., Steinberg, B.A., & Yale, H.L. : Am. Rev. Tbc., 65 : 357, 1952.
- 19) 内田馨：未発表。
- 20) 内田馨・奥田良雄 他：昭和31年10月厚生省医務局総合医学会，結核菌薬剤耐性協同研究班報告。
- 21) Albert, A. : Nature, 177 : 525, 1956.
- 22) Scheu, H. : Schweiz. Ztschr. Tuberk., 11 : 77, 1954.
- 23) Bernstein, J., Jamber, W., Lott, W.A., Pansy, F., Steinberg, B.A., & Yale, H.L. : Am. Rev. Tbc., 67 : 354, 1953.
- 24) Barnett, M., Bushboy, S., Goulding, R., Knox, R., & Robson, J.M. : Brit. Med. J., No. 4940, 647, 1955.
- 25) Kirshner, J.J. : Dis. Chest, 32 : 413, 1957.
- 26) Pättilä, J. : Am. Rev. Tbc., 70 : 453, 1954.
- 27) Zatman, L.J., Kaplan, N.O., Colowick, S.P., & Ciotti, M.M. : J. Biol. Chem., 209 : 453, 1954.
- 28) Zatman, L.J., Kaplan, N.O., Colowick, S.P., & Ciotti, M.M. : J. Biol. Chem., 209 : 467, 1954.
- 29) 堀三津夫：日本結核全書，金原出版，第2巻，p53, 昭32.
- 30) Machev, J.R., Speyer, J.F., & Levine, M. : Am. Rev. Tbc., 75 : 517, 1957.
- 31) Krüger-Thiemer, E. : Am. Rev. Tbc., 77 : 364, 1958.