

培養条件によるイソニアジド分解酵素 (Hydrazidase) 活性の変動

(第1報) 金属イオン添加の影響

戸井田 一郎

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎竜郎)

受付 昭和 36 年 11 月 15 日

I 序 言

さきに著者らは、鳥型菌耐性菌がイソニアジド (INH) を分解してヒドラジンを遊離することを発見し、この作用が酵素によることを報告した¹⁾。続いて著者は、この酵素を無細胞抽出液として抽出し²⁾、硫酸分画のくり返しとセルローズ・クロマトグラフィーとによつてかなりの程度に精製し³⁾、この酵素が Acid-hydrazides の C-N 結合をきる加水分解酵素であることを示し、その酵素学的諸性状を報告し、Hydrazidase と命名した。

さらに著者は、この酵素の生物学的意義を追及するために、まず培養条件による酵素活性の変動について実験を行なつた。今回は、培養の経過に伴う酵素活性の変動と、培地に加えた各種金属イオンの影響とについて報告する。

II 材料と方法

Mycobacterium avium AVT 株を用いた。この菌株の INH に対する感受性は、ソートン合成培地に乾燥重量 0.078 mg (生菌数 2.8×10^5) を接種し、37 °C、4 日培養という判定条件では 0.2 γ per ml である。この菌を 100 γ per ml に INH を加えたソートン合成培地に培養し、遅れて発育してきた菌を同培地に戻し継代し、この培地によく発育するようになった菌を耐性菌として用いた。基礎培地としてはソートン合成培地を用いた。すなわち培地 1,000 ml 中にグリセリン 60 ml, アスパラギン 4 g, クエン酸鉄アンモン 0.05 g, クエン酸 2 g, 第二磷酸カリ (K_2HPO_4) 0.5 g, 硫酸マグネシウム ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 g を含み、pH 7.2 に修正したものを基礎培地とし、このものに金属イオンを加えて添加培地をつくり、それに INH を 100 γ per ml に加え、または加えずに、耐性菌を培養

した。培養にさいしては 100 ml 三角コルベンに 40 ml の培地を入れ、1 白金耳 (乾燥重量約 3 mg) を接種した。菌は培養の日を追つて濾紙上に完全に集め、十分に水洗ののち、一部を酵素活性測定用にとり、残りは一定量になるまで乾燥、秤量した。活性測定用にとり分けた菌は一定量の蒸溜水に均等に浮游し、この菌浮游液を酵素液として、前報²⁾の方法に従つて酵素活性を測定した。同時に、この菌浮游液の一定量をとつて一定重量まで乾燥、秤量し、単位重量当り活性と培養基当り菌収獲量とを計算する基礎とした。単位重量当り酵素活性は、標準実験条件²⁾におけるヒドラジン生成量に基づいて、乾燥菌量 1 g 当り 1 時間当りのヒドラジン生成量 μ moles で示した。

III 実験結果

1) 培養経過に伴う酵素活性の変動

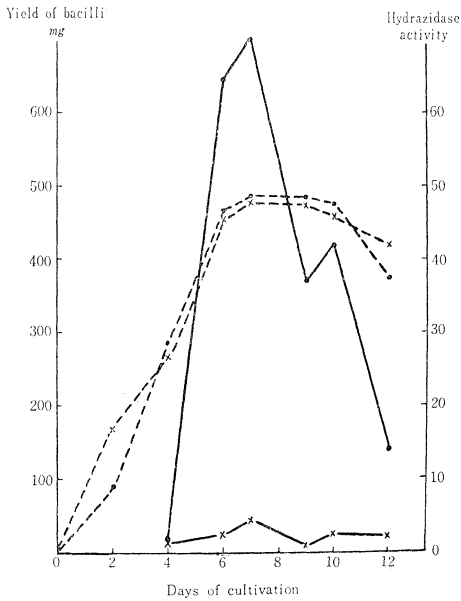
図 1 に典型的な実験結果を示した。INH を加えない培地では、耐性菌は最初からほぼ直線的に成育し、8 日ごろで最高収量に達し、9~10 日以後収量を減じていった。INH を加えた培地では、INH なし培地の場合と比較して、1~2 日の間の成育 (初期成育とよぶ) はやや遅れるが、それ以後はむしろより速い速度で直線的に成育し (この直線の横軸に対する勾配を成育速度とよぶ)、ほとんど同じ時期に同程度の最大収量に達した。

酵素活性は、INH 加培地では 4~5 日をすぎて急激に上昇し、6~7 日目で最高値に達し、その後再び低下した。INH なし培地では、感性菌、耐性菌ともに多少の変動を示しつつ低い活性に終始し、両者の間に著しい差を認めなかつた。

2) Mg⁺⁺ 添加の影響

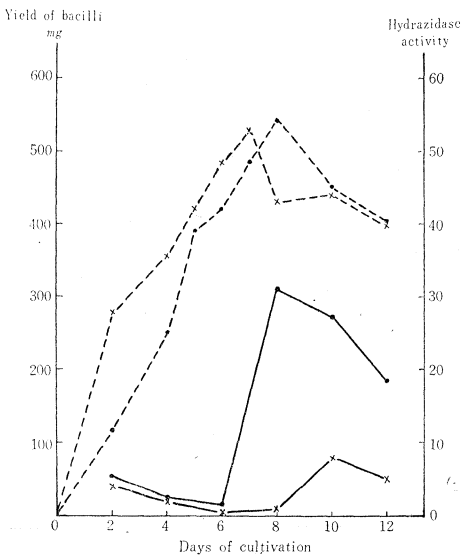
基礎培地に $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を 2.0 g per l の割りに加えた。したがつて Mg として 246.7 γ per ml に含む。Mg⁺⁺ 添加により、INH 添加の有無にかか

Fig. 1. Hydrazidase Activity of Resistant Cells Grown on Sauton Media



..... Hydrazidase activity
 Yield of bacilli
 • Cells grown on the media with 100 γ of isoniazid per ml of medium.
 × Cells grown on the media without isoniazid.
 Hydrazidase activity was expressed by the amounts of hydrazine formed, μ moles, per hour per gm of dried weight of cells.
 Yield of bacilli was expressed by the dried weight of cells harvested from each culture-flask containing 40 ml of medium.

Fig. 2. Effect of Mg⁺⁺ on Hydrazidase Activity



MgSO₄ · 7 H₂O was added to basal medium to give the final concentration of Mg as 246.7 γ per ml. See also footnote for Fig. 1.

わらず、菌の初期成育はやや促進されたが、その後の成育速度は逆にやや遅くなった。最大収量は基礎培地の場合よりもやや多かつた。

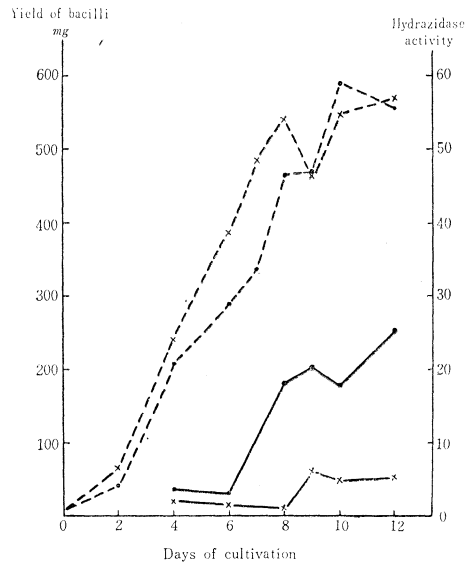
I NH 加培地での酵素活性は、培養 8 日目で最高値に達したが、この値は基礎培地の場合の最高値の 1/2 以下にすぎず、過剰の Mg⁺⁺ は酵素生産を抑制した。I NH なし培地での活性は低かつたが、基礎培地の場合よりはやや高い値を示した。

3) Mn⁺⁺ 添加の影響

基礎培地に MnSO₄ · 4 H₂O を 1.02 g per l の割りに加えた。したがって Mn として 251.2 γ per ml に含む。I NH の存否にかかわらず、Mn⁺⁺ によつて菌の初期成育は抑制され、2 日目の収量は基礎培地のそれぞれの場合の半量以下であつた。それ以後の成育速度は、I NH なし培地では基礎培地の場合とほぼ等しく、I NH 加培地では遅かつた。最大収量は両方の場合とも 10 日ころにみられ、基礎培地の場合よりもや

多かつた。
 I NH 加培地での酵素活性は、6 日をすぎて徐々に上昇し、実験終了の 12 日までには極大を示さなかつたが、このときの値は基礎培地における最高値のおよそ 1/3 にすぎなかつた。I NH なし培地では低い活性を保つた。

Fig. 3. Effect of Mn⁺⁺ on Hydrazidase Activity



MnSO₄ · 4 H₂O was added to basal medium to give the final concentration of Mn as 251.2 γ per ml. See also footnote for Fig. 1.

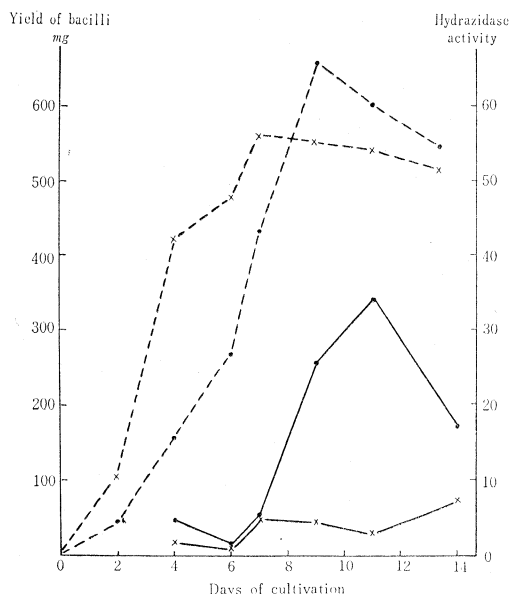
4) Ca⁺⁺ 添加の影響

基礎培地に CaCl₂ · 2H₂O を 1.25 g per l の割りに加えた。したがって Ca として 340.7 γ per ml を

含む。Ca⁺⁺ 添加により、INH の存否どちらの場合も、菌の初期成育は抑制されたが、とくに INH 加培地では 2 日目の収量は基礎培地の場合の約半分にすぎなかつた。その後の成育速度は INH なし培地では基礎培地の場合よりもはるかに速やかであつたが、INH 加培地ではその後の発育も遅く、6 日以後になつてはじめて基礎培地の場合を上まわる成育速度を示した。最大収量は INH 加培地では約 30%、なし培地では約 15% に基礎培地のそれぞれの場合を上まわつた。

INH 加培地での酵素活性は 11 日目に最高値に達したが、この値は基礎培地の最高値の 1/2 にも及ばず、Ca⁺⁺ もまた酵素生産を抑制した。INH なし培地では酵素活性は基礎培地の場合よりはや高いが、低い値を保つた。

Fig. 4. Effect of Ca⁺⁺ on Hydrazidase Activity



CaCl₂ · 2H₂O was added to basal medium to give concentration of Ca as 340.7 γ per ml. See also footnote for Fig. 1.

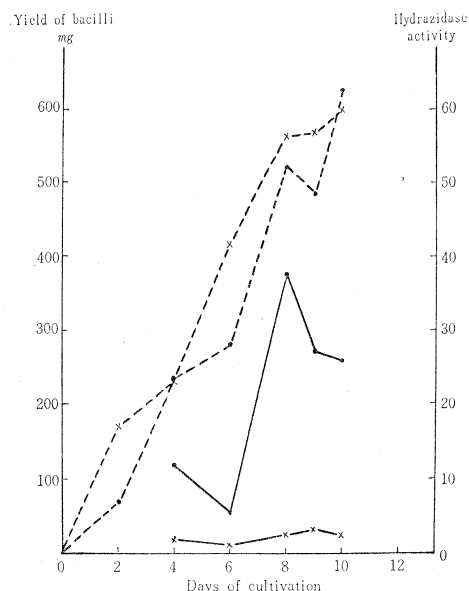
5) Zn⁺⁺ 添加の影響

基礎培地に ZnSO₄ · 7 H₂O 1.086 g per l の割りに加えた。すなわち Zn として 246.9 γ per ml を含む。Zn⁺⁺ の添加は菌の初期成育を INH の存否にかかわらず抑制したが、INH なし培地ではこの抑制の度は軽かつた。その後の成育速度はいずれの場合も基礎培地に比較してわずかに遅れた。実験終了の 10 日ではまだ収量減少は始まらなかつたが、このときの収量は基礎培地のそれぞれの場合の最大収量をおよそ 25% 上まわつていた。

INH 加培地では酵素活性の最高値は 8 日目にみら

れたが、そのときの値は基礎培地の最高値の約 1/2 にすぎなかつた。INH なし培地の活性は低かつた。

Fig. 5. Effect of Zn⁺⁺ on Hydrazidase Activity



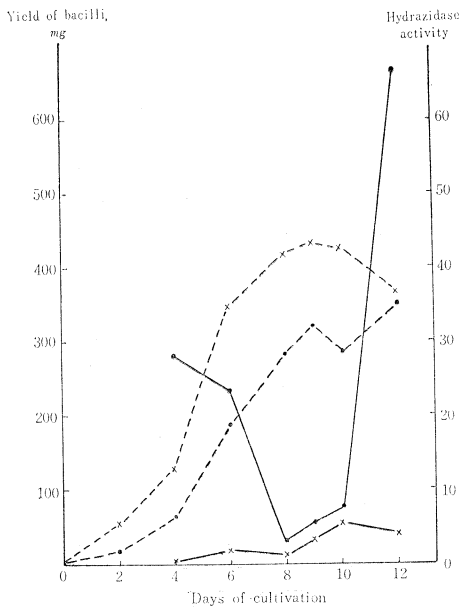
ZnSO₄ · 7 H₂O was added to basal medium to give the final concentration of Zn as 246.9 γ per ml. See also footnote for Fig. 1.

6) Co⁺⁺ 添加の影響

基礎培地に CoCl₂ · 6 H₂O を 0.9979 g per l の割りに加えた。すなわち Co として 247.1 γ per ml に含んでいる。Co⁺⁺ の添加は菌の成育を著しく阻害し、初期成育については、2 日目、4 日目の菌収量は INH 加培地では基礎培地の場合の約 1/5、1/4；INH なし培地では同じく約 1/3、1/2 にすぎなかつた。INH なし培地では、その後は基礎培地を上まわる速度で成育し、9 日目に最大収量（基礎培地の場合の約 90%）を示したのに対し、INH 加培地ではその後の成育速度も基礎培地の場合よりもかなり遅く、実験終了の 12 日までは極大に達しなかつたが、そのときの収量は基礎培地における最大収量の約 70% にすぎなかつた。

酵素活性については、INH なし培地では低い値を保つたが、INH 加培地では興味ある活性変動がみられた。すなわち酵素活性は培養初期に非常に高い値（基礎培地における最高値の約 40%）を示し、以後活性は低下して 8 日目の最低値にいたり、再び上昇して基礎培地における最高値と同等の値に達した。酵素活性が一段高い値から下降して再び上昇するという傾向は、Zn⁺⁺、Ca⁺⁺、Mo、Mg⁺⁺、Fe⁺⁺ 添加のさいにも一応はみられた現象であるが、Co⁺⁺ 添加の場合には非常に顕

Fig. 6. Effect of Co^{++} on Hydrazidase Activity



$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was added to basal medium to give the final concentration of Co as 247.1 γ per ml . See also footnote for Fig. 1.

著に認められた。基礎培地では 2 日目の菌収量が少なくして初期の活性測定ができなかつたが同様のことが起つていのではないかとと思われる。

7) MoO_4^{--} 添加の影響

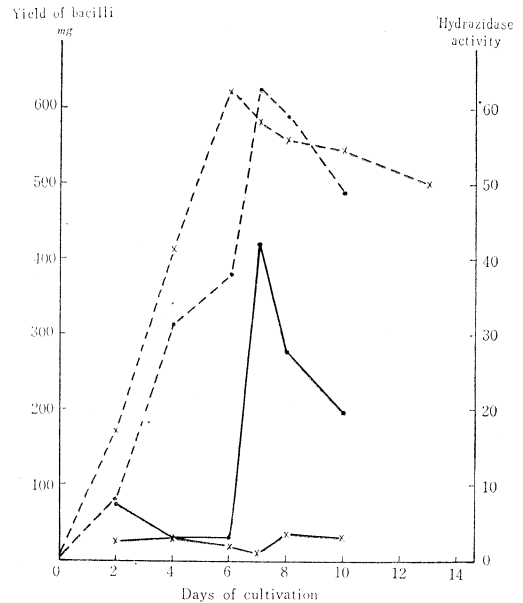
基礎培地に Na_2MoO_4 を 0.5325 g per l の割りに加えた。したがつて Mo としては 248.1 γ per ml に含むこととなる。INH 加培地では Mo 添加は菌の初期成育にはあまり影響せず、その後は基礎培地の場合をやや上まわる成育速度を示した。INH なし培地では、はじめから基礎培地の場合を上まわる成育速度ではほぼ直線的に成育し、どちらの場合も基礎培地の場合の約 25% 以上を上まわる最大収量を示した。

INH 加培地では、酵素活性の最高値は 7 日目にみられたが、そのときの値は基礎培地の場合の最高値の約 60% にすぎなかつた。INH なし培地では低い活性を示した。

8) Fe^{++} 添加の影響

基礎培地に $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を 1.196 g per l の割りに加えた。すなわち Fe として 247.0 γ per ml に含む。 Fe^{++} 添加は菌の初期成育に著しい阻害を示し、2 日目の収量は基礎培地の場合の 10% 前後にすぎず、その後の成育も遅れて 4~6 日目以後にはほぼ直線的成育の時期に入ったが、その速度も基礎培地の場合よりも小であつた。INH の存否にかかわらず、実験終了の 13 日までには極大値を示さなかつたが、そのときの

Fig. 7. Effect of MoO_4^{--} on Hydrazidase Activity



Na_2MoO_4 was added to basal medium to give the final concentration of Mo as 248.1 γ per ml . See also footnote for Fig. 1.

値はいずれも基礎培地の場合の最大収量を若干上まわつていた。

INH 加培地での酵素活性は、初期のやや高い値から一たん低下し、途中動揺を示したが上昇して 9 日目に最高値に達し、このときの値は基礎培地の場合の最高値の約 60% にすぎなかつた。INH なし培地での活性は低かつた。

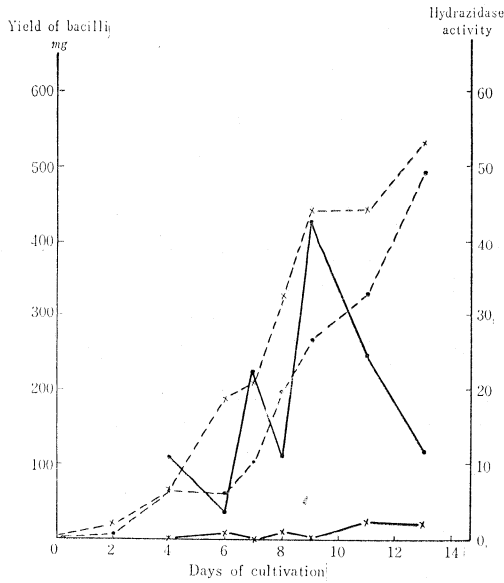
9) Fe^{++} 添加の影響

基礎培地に $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 1.23 g per l の割りに加えた。したがつてもともと含まれていた分と合計して 263.1 γ per ml の Fe を含む。菌の初期成育は Fe^{++} 添加により著しく抑制され、INH の存否にかかわらず、2 日目の菌収量は基礎培地の場合の約 1/3 にすぎなかつた。その後の成育速度は基礎培地の場合をやや上まわり、最大収量はいずれの場合も基礎培地での最大収量を約 20% 上まわつた。

INH なし培地での酵素活性は低かつた。INH 加培地での活性変動は特異的で、成育初期に著しい高い活性（基礎培地の場合の最高値の約 75%）を示し、以後徐々に活性低下を続け、実験終了の 13 日目には最初の値の 1/3 にまで低下した。 Co^{++} 添加の場合のように活性の再上昇はみられなかつたが、より遅れて再び上昇する可能性は否定できない。

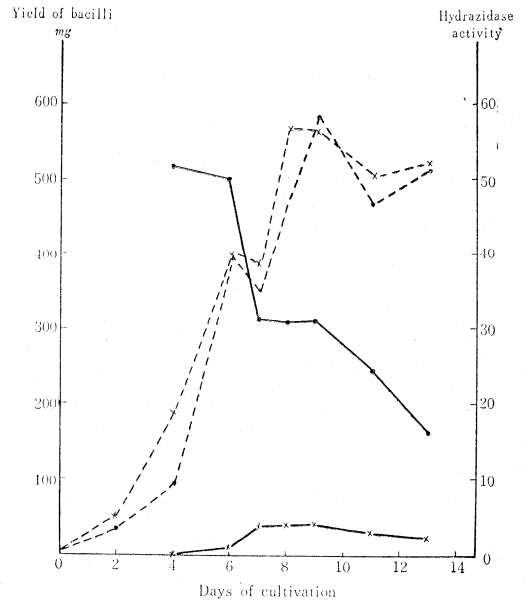
IV 討論と総括

Fig. 8. Effect of Fe^{##} on Hydrazidase Activity



FeCl₃ · 6H₂O was added to basal medium to give the final concentration of Fe as 247.0 γ per ml. See also footnote for Fig. 1.

Fig. 9. Effect of Fe^{##} on Hydrazidase Activity



FeSO₄ · 7H₂O was added to basal medium to give the final concentration of Fe as 263.1 γ per ml. See also footnote for Fig. 1.

A) ソートン合成培地を基礎培地として、金属イオンを加えた場合の耐性菌の育成に及ぼす影響を表1に総括した。表の前半は菌の育成に及ぼす金属添加の影響をINHの存在下と不在下に分けて示し、表の後半は

耐性菌の育成に対するINHの作用に及ぼす金属添加の影響を示した。すなわち、

1) 金属添加はMg, Moを除き菌の初期育成を阻害した。この抑制の度はINHの存在下でとくに強くみら

Table 1. Effect of Metal Ions

Addition	On cell growth						On INH activity		
	In the absence of INH			In the presence of INH			Initial growth	Growth rate	Max. yield
	Initial growth	Growth rate	Max. yield	Initial growth	Growth rate	Max. yield			
None							63.3	126.7	100.0
Mg ^{##}	3+	1-	±	1+	1-	1+	51.6	125.0	101.9
Mn ^{##}	3-	1+	±	3-	2-	1+	65.4	70.6	103.8
Ca ^{##}	1-	3+	1+	3-	3+	2+	40.5	130.4	115.8
Zn ^{##}	±	±	1+	2-	1-	1+	43.6	100.0	104.2
Co ^{##}	3-	2+	1-	4-	2-	1-	33.3	50.0	80.5
MoO ₄ ⁻⁻	2+	2+	1+	1-	1+	1+	39.0	104.8	98.4
Fe ^{##}	3-	1+	1+	3-	±	1+	66.6	117.6	102.6
Fe ^{##}	4-	1-	1+	5-	2-	±	42.9	109.1	92.6

"Initial growth" was expressed by dried weight (mg) of cells harvested on the second day of cultivation.

"Growth rate" was expressed by the increase of dried weight (mg) of cells per day during the phase of constant cell-growth.

On the first half of the Table, each value was compared with the correspondent value obtained from basal medium and expressed as followed; less than 10% of the value from basal medium as 5-, 10~30% as 4-, 30~50% as 3-, 50~70% as 2-, 70~90% as 1-, 90~110% as ±, 110~130% as 1+, 130~150% as 2+, 150~170% as 3+.

On the second half of the Table, the value from isoniazid-containing medium was compared with the correspondent value from the same medium without isoniazid and expressed by per cent.

れた。

2) 直線的成育期の菌の成育速度は、INH 不在下では Mg, Fe^{##} を除き金属添加によつて促進されたが、INH 存在下では Ca, Mo を除いて抑制された。

3) 最大収量は INH の存否にかかわらず、Co を除き金属添加により多少とも増大した。

4) 基礎培地での菌の初期成育は耐性菌であるにもかかわらず、INH の存在により 2/3 程度に抑制された。INH のこの作用は Mg, Zn, Fe^{##}, Ca, Mo, Co によつてさらに加重された。Mn, Fe^{##} の添加は影響しなかつた。

5) 直線的成育期における耐性菌の成育速度は基礎培地および Mg, Ca, Fe^{##} 各添加培地では INH 添加によりかえつてかなりの程度に促進され、Zn, Mo, Fe^{##} 添加培地ではほとんど影響なく、Mn, Co 添加培地では著しく抑制された。

6) 耐性菌の最大収量は、INH の存否によつてどの培地でもほとんど影響されず、ただ Co 添加培地では最大収量に達する日が遅れたのみであつた。

B) 前報^{2) 3)}で Hydrazidase 活性が Fluoride, 8-Hydroxyquinoline, Borate, o-Phenanthroline などのいわゆる金属酵素阻害剤によつて阻害されることを報じた。このことは Hydraxidase 活性になんらかの金属が関与していることを予想させるので、培地にいろいろの金属を加えて酵素活性に及ぼす影響を検討した。このような実験は、基礎培地そのものにおける活性も実験ご

とにかなりの幅で変動すること、金属添加の濃度によつては反対の効果が起こりうることなどの困難な点をもつており、さらに添加物質は、あるいは直接的に酵素材料として用いられたり、酵素生産系に影響したり、あるいは間接的に菌の成育に対する影響や他の酵素系に対する影響を通じたりなど、多様なメカニズムによつて酵素生産に影響しうることを考慮しなければならないが、酵素活性における金属の役割について一定の予想を得るために有用な実験と考えられる。Hydrazidase については、Fe^{##} と Co^{##} が酵素活性に著明な影響を与え、とくに培養初期において活性を著しく高めた。Fe と Co とがともに周期律表第 VIII 族第 4 周期に属する三つ組元素であることを考えた場合、この事実は一定の意義をもつものと考えられる。これら金属の役割については、精製酵素標品について別の面から追及することにより明らかにしたい。

生化学研究室齊藤、内山、松沢諸氏の御助力を感謝いたします。

文 献

- 1) 戸井田一郎・齊藤千代：結核，34：545，昭34。
- 2) I. Toida：Amer. Rev. Resp. Dis. 印刷中。
- 3) 戸井田一郎：第34回日本生化学会総会発表，昭36年11月（抄録；生化学，33：620，昭36）

Hydrazidase Activity of Isoniazid-resistant Cells of Mycobacteria Grown on Metal-supplemented Media.

Avian mycobacteria (Strain AVT) was made resistant to isoniazid by successive transfers on Sauton synthetic media containing 100 micrograms of this drug per ml. Resistant cells thus obtained were cultured on metal-enriched Sauton media with or without isoniazid, and hydrazidase activity of these cells was followed in the course of cultivation. Enzyme assay method was reported in the preceding paper (Amer. Rev. Resp. Dis. in press) and specific activity was calculated as micromoles of hydrazine formed per hour per gm. of dried weight of cells harvested. Bacillary yield was also measured and expressed by mg. of dried weight of cells harvested from each culture-flask containing 40 ml. of the medium.

Effects of metals on the growth of isoniazid-resistant cells were summarized as follows: (See also Table 1)

- 1) The addition of metal, with exception of Mg^{##} and Mo, inhibited the initial growth of the cells, especially in the presence of isoniazid.
- 2) Growth rate of the cells during constant growth phase was increased by the addition of metal, with exception of Mg^{##} and Fe^{##}, in the absence of isoniazid, but in the presence of isoniazid, the addition of metal, except Ca^{##} and Mo, decreased the growth rate.
- 3) Maximal yield of the cells was increased by the addition of metal either with or without of isoniazid.

The action of isoniazid on the growth of the resistant cells was affected by the addition of metal as follows and these results were also summarized on the second half of Table 1.

1) Initial growth on the basal medium was inhibited to about two-thirds by the addition of isoniazid, though the cells used were resistant to the drug. The action of isoniazid was enhanced by the addition of Mg^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} , Mo , and Co^{++} , but not by Mn^{++} and Fe^{++} .

2) Growth rates of the resistant cells grown on the basal medium and Mg -, Ca -, Fe^{++} -supplemented media were accelerated by the addition of isoniazid, but on the contrary, isoniazid depressed growth rates of the cells grown on Mn - and Co -supplemented media.

3) Maximal yield was not affected by the addition of isoniazid in any case of media.

In the preceding paper, the inhibition of hydrazidase by fluoride, borate, 8-hydroxyquinoline and o-phenanthroline, which were known as metal-enzyme inhibitors, was reported. As the results of this inhibition-experiment suggested

the possibility that some metal might have an essential roll in enzyme action, several metals were tested as for their effects on hydrazidase production. Results were shown on Figs 1~9. Most of the metals tested were inhibitory on the enzyme production, when added in excess. But Fe^{++} and Co^{++} affected on hydrazidase production in a special way as shown in Figs. 9 and 6, respectively. Especially, it must be noticed that hydrazidase activities were very high at the initial stage of cell growth when they were cultured on the Fe^{++} -or Co^{++} -supplemented medium. As for the significance of these metals on the enzyme-production or on the enzyme-action, it is not possible to say something conclusive from such type of experiments, though they are very suggestive, and the problem will be studied further with purified enzyme preparation from other sides.