

培養条件によるイソニアジド分解酵素 (Hydrazidase) 活性の変動

(第2報) 窒素源の影響

戸井田一郎・斉藤千代

結核予防会結核研究所 (所長 岩崎龍郎)

受付 昭和37年4月7日

I 序 言

前報¹⁾に引き続き、今回は培地の窒素源を質的・量的に変えた場合の、hydrazidase 活性の変動を検討した。これは窒素源が一方では蛋白生成の材料として適応酵素である hydrazidase 生産に影響を与えることが予想され、また他方では、「考案」の項に述べるように、INH の作用機作と菌の窒素代謝との間に密接な関連が予想されたために行なつた実験である。

II 材料と方法

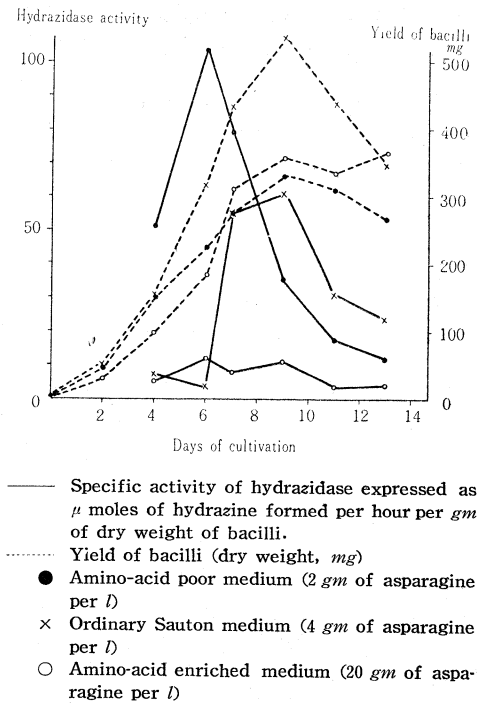
前報¹⁾と同様の材料を用い、同様の方法によつて、培養経過に伴う菌の酵素活性の変動をみた。培地としては、1,000 ml 中にグリセリン 60 ml, クエン酸鉄アンモン 0.05 g, クエン酸 2 g, 第二リン酸カリ (K_2HPO_4) 0.5 g, 硫酸マグネシウム ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 g を含む基礎溶液に、アミノ酸または他の窒素源を加え、さらに INH を 100 γ per ml に加えたものを用いた。

III 実験結果

実験①: アスパラギン添加量の影響

基礎溶液にアスパラギンを 2, 4, 20 g per l の割合に加えた 3 種類の培地に耐性菌を培養し、酵素活性の変動をみた。4 g per l の培地はソートン合成培地に相当する。結果は図 1 に示した。菌の育成についてみると、アスパラギン半量培地では普通ソートン培地に比較して培養初期では菌の育成に差はないが、4 日以後育成速度は遅れ、最大収量は約 60% にとどまつた。アスパラギン 5 倍量培地では菌の育成はかえつて悪く、初期育成も最大収量も普通ソートン培地よりも劣っており、ただ最大収量に達したのちの菌収量の減少がなかな

Fig. 1. Effect of Asparagine-Concentration of Medium



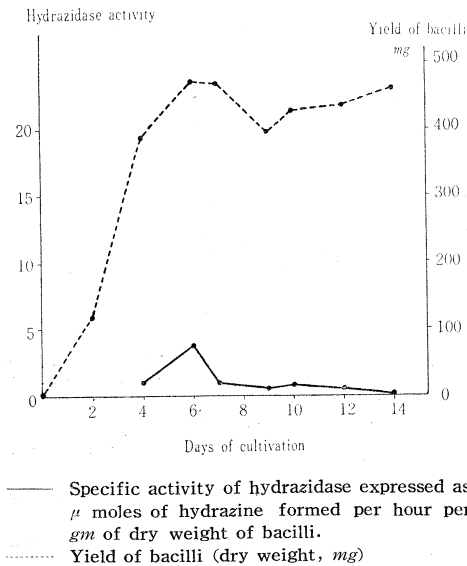
か起こらず plateau 形成期間が著しく延長した。

酵素活性は培地中のアスパラギン量に著しく影響された。すなわち、アスパラギン半量培地における活性は培養初期から非常に高く、その最高活性は普通ソートン培地における場合の 2 倍に近く、さらに最高値に達するまでの期間も早かつた。一方、アスパラギン 5 倍培地では、酵素活性は多少の変動を伴いつつ低い活性に終始した。

実験②: アミノ酸混合液添加の影響

実験①に述べたアスパラギン増量による酵素活性の減弱が、アスパラギンに特異的なものか、それとも単に窒素源の増量という非特異的なものかを知るため、普通ソートン培地に、*l*-アルギニン塩酸塩 400 mg, *l*-ヒスチジン塩酸塩 200 mg, *l*-イソロイシン 390 mg, *l*-ロイシン 875 mg, *l*-リジン塩酸塩 615 mg, *l*-メチオニン 385 mg, *l*-フェニールアラニン 435 mg, *l*-スレオニン 455 mg, *l*-トリプトファン 90 mg, *l*-バリン 305 mg, グリシン 500 mg per *l* の割合に添加した培地を作り (アミノ酸 8.6 g per *l* を含む), INH を加えて耐性菌を培養し, 酵素活性をみた。アスパラギン増量の場合と全く同様に, 菌の初期成育抑制, 最大収量の減少, 最大収量に達したのちの plateau 形成期間の延長がみられ, さらにまた, 酵素活性の著しい低下がみられた (図 2)。すなわち, これらの効果はアスパラギンに特異的なものではなかった。

Fig. 2. Effect of Amino-acid Mixture



実験③: 窒素源の種類と酵素活性

窒素源の量的変動の及ぼす影響に続いて, その質的变化の影響を検討した。基準としてアスパラギン半量 (2 g per *l*) 培地をとり, 他の窒素源は化合物中のすべての N-原子が窒素源として利用されうると仮定して, アスパラギン 2 g per *l* と同量の N を含むように添加した。検討した窒素源は, アミノ酸からはアスパラギン・グリシン・グルタミン酸・トリプトファン, 蛋白質として馬血清・牛血清アルブミン分画 V・バクト肉エキス, アンモニウム塩として NH₄Cl を選んだ。

図 3, 4, 5 に示したように, これらの窒素化合物は菌の発育をよく支えず, とくにトリプトファン, 馬血清, 牛血清アルブミンではほとんど発育が認められな

った。グルタミン酸では長い lag phase のちにアスパラギンとほぼ同等の発育がみられた。グリシンでも長い lag phase があり, その後の発育もあまりよくなかった。塩化アンモニウムでは, 菌の発育ははじめのうちはアスパラギンとほとんど劣らないが, 次第に差ができて最大収量は約 1/2 にすぎなかった。ただし, 以上のことは, 今までアスパラギン培地に継代してきた菌をそ

Fig. 3. Ammonium Salt Medium

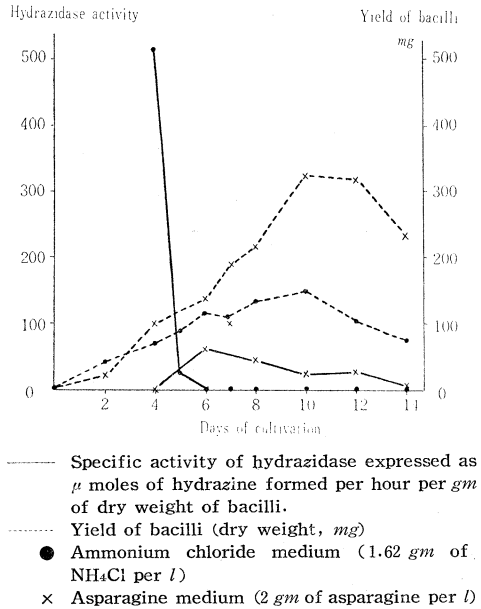


Fig. 4. Amino-acid Media

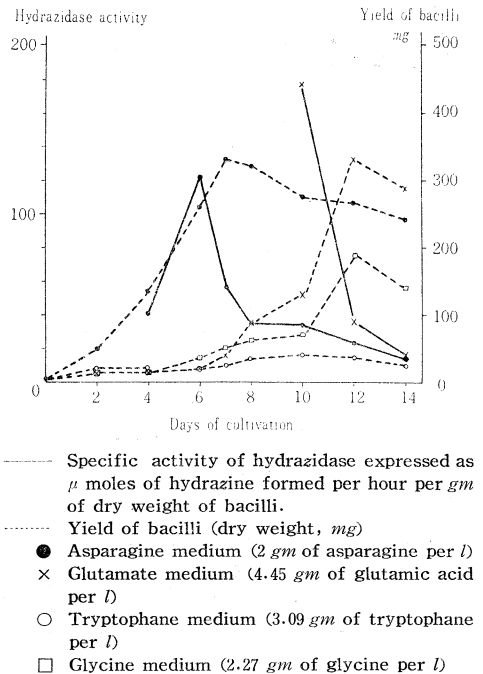
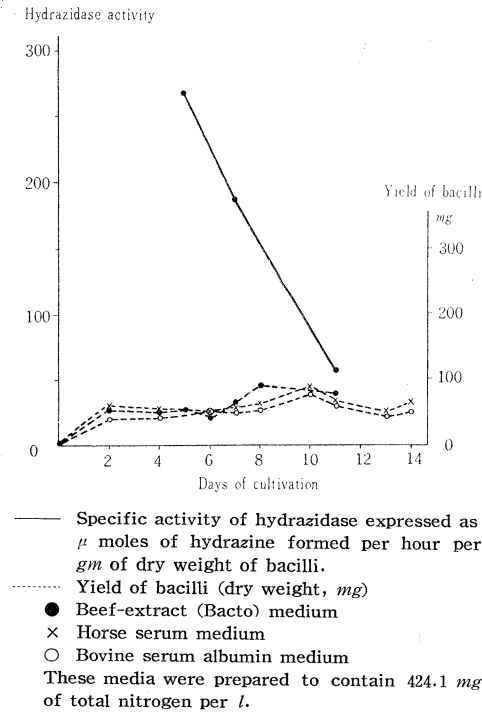


Fig. 5. Protein Media



れぞれの培地に移した初代の場合で、さらに INH 100 γ per ml の存在下の場合についてのみの結果であつて、耐性菌の窒素源としての適不適を一般的に検討したのではない。

hydradiazase 活性は、塩化アンモニウム・グルタミン酸・肉エキスの場合についてのみ測定できた。塩化アンモニウム培地では培養初期に著明に高い活性を示し、その最高値はアスパラギン培地の場合の 5 倍以上に達したが、その後活性は急速に低下した。グルタミン酸培地・肉エキス培地では、収量の関係から培養初期の活性測定はできなかつたが、いずれもアスパラギン培地を上まわる活性がみられた。

IV 考 案

mycobacteria の INH に対する感受性は、感受性を検査する培地の種類によつて違つており、合成培地のように窒素源の制約された培地では感受性が高く、血清や卵黄などを含む培地では一般に感受性が低くすることは、広く認められている。さらに INH を含まぬ培地に成育しつつある菌に INH を添加した場合、成育の停止は SM 添加の場合のように即座には認められず、菌収量がおおよそ 2 倍にふえたのち、あるいは one generation の期間ののちに認められることも知られている²⁾。これらのことは INH がなんらかの点で窒素代謝、しかも、その合成方向への代謝に干渉していること

を暗示するものであり、この点については、最近東村ら³⁾も放射性のリンやイオウを用いて、INH がこれらの核酸・蛋白質へのとりこみを阻害することを観察し、INH が蛋白合成に干渉することを主張している。われわれは、培地の窒素源を質的・量的に変えた場合の hydradiazase 活性に及ぼす影響を検討した。実験①、②より明らかなように、量的に培地の窒素源濃度を減ずるにつれ hydradiazase 活性は著明に上昇した。さらに実験③より、質的には、菌の発育を支える力のより弱い窒素源の場合のほうがかえつて hydradiazase 活性が高いことが認められた。別に報告するように⁴⁾、hydradiazase はいわゆる「適応酵素」であつて、INH が菌の環境に存在し、かつ菌の代謝の環になんらかの形でくみこまれるという条件下においてのみ、「適応的に」生産される。したがつて、ここに報告した実験結果は、INH は質的・量的に菌の利用しうる窒素源の乏しい場合に、耐性菌の代謝機構とより密接なかわりあいをもつことを示すものであるが、このかわりあいのありかたについては、最初に述べた INH が蛋白合成に干渉するという仮説との関連において、次の 2 通りの考え方が成り立つ。すなわち：

① hydradiazase は菌の耐性に本質的な意義をもつと考えた場合、すなわち hydradiazase によつて INH を抗菌力の劣る hydradiazine と isonicotinic acid とに分解することが菌の耐性化の機構であると考える場合——INH は acid hydradiazide であるのでアミノ酸アナログとして作用し、アミノ酸の代りに蛋白質にとりこまれる。INH を正規のアミノ酸の代りにとりこんだ蛋白質は正規の生理的機能に変調をきたし、これが INH の抗菌作用の本態と考えられる。INH とアミノ酸のどちらが蛋白質の構成分子としてとりこまれるかは、両者の量的関係であり、菌の容易に利用しうる窒素源が圧倒的に多い場合は、基質濃度の十分高い場合の酵素の拮抗的阻害剤のように、INH はほとんど抗菌力を発揮できず、単に indifferent なものとして存在するにとどまり、菌はあえて hydradiazase を生産する必要がないのである。

② hydradiazase は菌の耐性に一次的な意義をもたず、耐性化に伴う二次的現象と考えた場合——菌は何か不明の機構で耐性となり、その結果、INH はもはや抗菌物質としてではなく、一つの含窒素化合物として存在するにすぎず、菌がこれを窒素源として利用するかどうかは、他により利用しやすい窒素源が十分に存在するかどうかによつて支配されるのである。すなわち、他に適当な窒素源が十分あれば、INH は害にもならず利用されもしない物質としてとどまり、菌は hydradiazase を生産しないのである。

以上、2 通りの説明は、さしあたりいずれも成立可能

であり、ここに報告した実験によつては、なお hydrazidase の生物学的意義、とくに INH に対する耐性化における役割を明らかにすることができなかつた。しかし、INH は菌の利用しうる窒素源の質と量とが異なると、違つたふうに菌の代謝に干渉することは推定しうると思われる。

V 結 論

培地中の窒素源の質的・量的な変化が、hydrazidase 活性に及ぼす影響を検討した。量的には窒素源濃度が低いほど hydrazidase 活性は高く、質的には菌の成育を

支える力の弱い窒素源の場合に hydrazidase 活性は高かつた。この結果に基づいて、INH の作用機作と関連して hydrazidase の生物学的意義を考案した。

文 献

- 1) 戸井田一郎：結核，37：85，昭37。
- 2) Barclay, W. R., Ebert, R. H., & Koch-Weser, D.: Amer. Rev. Tuberc., 67: 490, 1953.
- 3) 東村道雄・水野松司：結核，37：29，昭37。
- 4) 戸井田一郎：第37回結核病学会総会にて発表，昭37。

Effect of Nitrogen-Source on Hydrazidase Activity.

Hydrazidase activity of isoniazid-resistant cells of *Mycobacterium avium* (strain AVT) was studied, when the nitrogen source had been modified quantitatively or qualitatively.

Fig. 1 shows the effects of amount of asparagine in media. Growth of the resistant cells on the asparagine-poor medium (2 gm. per l.) was not poorer than that on the ordinary Sauton medium (4 gm. per l.) at the early stages, but became gradually slower, and the maximal yield was almost 60% of that from ordinary Sauton medium. Growth was poor on the asparagine-enriched medium (20 gm. per l.).

Hydrazidase activity was remarkably high by the asparagine-poor medium and, on the contrary, almost no activity was observed by the enriched medium.

These effects on hydrazidase activity and on cell-growth were not specific for asparagine, but was observed by the addition of amino-acids mixture, consisting of l-arginine, l-histidine, l-isoleucine, l-leucine, l-lysine, l-methionine, l-phenylalanine, l-threonine, l-tryptophane, l-valine and glycine. (Fig. 2)

When ammonium salt was used as sole nitrogen source, growth of bacilli was as well as on the asparagine medium at the early stages, but

became poorer gradually and the maximal yield was about half of that from asparagine medium. Hydrazidase activity was remarkably high at the early stage and reached as five times higher as the maximal activity by asparagine medium.

The experimental results, where the nitrogen source was one of amino-acids other than asparagine or of proteins, were summarized in Figs. 4 and 5, respectively. Amino-acids, such as glutamic acid, glycine, and tryptophane, and proteins, such as bovine serum albumine fraction, horse serum, and beef-extract, did not support the growth of resistant cells, which have been subcultured on asparagine media, when used as sole nitrogen source. Hydrazidase activity was assayed only by glutamic acid medium and by beef extract medium, and in either cases activity was higher than in the case of asparagine medium.

These experimental results reported in this paper suggested that hydrazidase activity of the resistant cells was higher when cultured on the media, which contained smaller amount of nitrogen source quantitatively or poorer nitrogen source for cell-growth qualitatively.

The provable mode of action of isoniazid and mechanism of resistance against isoniazid and, in this connection, biological significance of hydrazidase were discussed.