

Hydrazidase (イソニアジド分解酵素) の誘導的形成

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 37 年 4 月 27 日

I 序 言

さきにわれわれは、*Mycobacterium avium* のイソニアジド (INH) 耐性菌が INH を加水分解する酵素をもつことを報告し¹⁾、この酵素を抽出、精製してその酵素学的性状を検討して Hydrazidase と命名した²⁾³⁾。さらに培養条件が耐性菌のこの酵素活性に及ぼす影響について検討を加えた⁴⁾⁵⁾。今回は、いままでに INH と接触したことのない感性菌が、INH と接触する過程で誘導的にこの酵素を形成する現象について報告する。

II 材料および方法

菌株および培養方法：*Mycobacterium avium* (AVT 株) を用いた。培地はすべてソートン合成培地を用い、100 ml の三角コルペンに培地 40 ml を入れ、1 白金耳 (乾燥重量約 3 mg) を接種し、37 °C で培養した。

Hydrazidase 活性測定法：前報²⁾の方法に基づいて、菌浮游液と INH とを in vacuo で incubate し、生成した Hydrazine を p-Dimethylaminobenzaldehyde 法で比色定量し、菌の酵素活性は、菌乾燥重量 1 g 当り 1 時間当りの Hydrazine 生成量 μ mole 数で表現した。

Hydrazidase の誘導：感性菌を INH を含まない培地に培養し、3 日または 5 日の培養ののち、菌膜を壊さぬように注意して INH を培地に加え、そのままさらに培養を続け、一定時間後集菌、洗浄、この菌液について酵素活性を測定した。

III 実 験 結 果

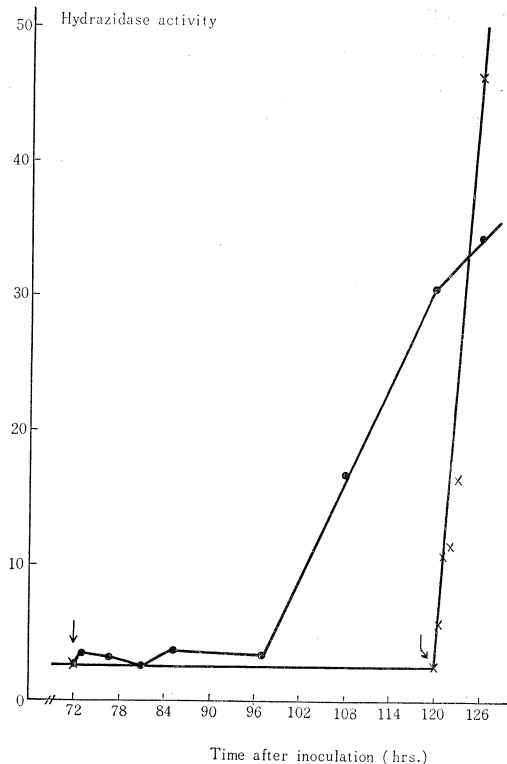
① Hydrazidase の誘導的形成とその時間的経過

図 1 に示したように、培養 3 日で INH を加えた場合はかなり長い lag phase を経たのちに、培養 5 日で加えた場合はほとんど lag phase なしに Hydrazidase 形成が認められた。

② 温度の影響

INH を加えて菌を 4 °C においた場合には、酵素の形成は全く認められなかった。

Fig. 1. Time Course of Induction



Isoniazid was added to the culture media at the points of arrows to give the final concentration of 100 γ per ml.

Hydrazidase activity was expressed as μ moles of hydrazine formed per hour per gm. of dry weight of cells.

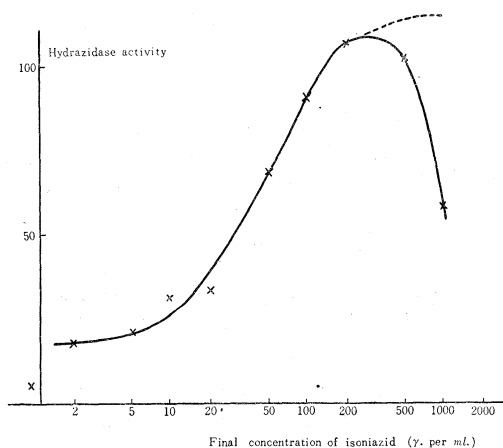
③ Inducer 濃度の影響

加えた INH の濃度が上昇するにつれて酵素形成も著明となったが、200 γ per ml より高濃度ではかえって酵素形成は抑制された。(図 2)

④ 抗結核剤の影響

INH と同時に他の抗結核剤を加えた場合の影響を表 1 に示した。Pyrazinamide は影響を示さず、Sulfaisoxazole はやや抑制的に、PAS はむしろやや促進的に作用したが、とくに SM は強い阻害を示した。表 2 は 3 日培養菌、5 日培養菌のそれぞれについて SM 濃度と阻害の強さとの関係を示した。

Fig. 2. Effect of Inducer-Concentration



Isoniazid was added to the five days culture to give the final concentration indicated and cultivation was continued for another 24 hours.

Hydrazidase activity was expressed as in Fig. 1.

Table 1. Effect of Anti-Tuberculous Drugs

Addition	Enzyme activity	
	Without isoniazid	With isoniazid
None	1.07	54.73
SM 10 γ/ml	0.24	0.77
PAS 500 γ/ml	4.35	87.81
PZA 250 γ/ml	0.91	53.72
SI 100 γ/ml	2.32	33.24

Isoniazid was added to three days culture to the final concentration of 100 γ per ml with or without other anti-tuberculous drugs as indicated. Cultivation was continued for another 72 hrs.

Table 2. Effect of Streptomycin

Conc. of SM γ/ml	Enzyme activity	
	Exp. 1	Exp. 2
0	51.26	65.76
0.01	76.76	—
0.1	2.33	60.88
0.5	—	42.16
1	2.30	25.17
5	—	20.97
10	2.68	15.04
50	—	9.20
100	1.78	—
0, INH (—)	2.14	—

Isoniazid was added to the final concentration of 100 γ per ml with or without streptomycin as indicated to three days culture (Exp. 1) or to five days culture (Exp. 2), and further cultivation was continued for another 72 hrs. (Exp. 1) or for 12 hrs. (Exp. 2) respectively.

Enzyme activity was expressed as in Fig. 1.

⑤ Inducer 特異性

前報²⁾³⁾で報告したように, Hydrazidase は, INH (Isonicotinoyl hydrazide) 以外の酸ヒドラジド (Nicotinoyl, Pyrazinoyl, Benzoyl, Salicyl hydrazides) をも加水分解する。しかし, Hydrazidase の誘導的形成にさいして, INH の代りに, 上記の Hydrazide または Glutamoyl または Oxalic acid hydrazide のうちのいずれかを加えても, 表 3 に示すように Hydrazidase の形成は全く認められず, Inducer としての作用は INH に特異的であった。

Table 3. Inducer Specificity

Hydrazide	Enzyme activity	
	Exp. 1	Exp. 2
None	1.93	4.69
Isonicotinoyl	57.01	72.81
Nicotinoyl	0.99	5.10
Benzoyl	1.52	3.68
Pyrazinoyl	1.95	4.92
Glutamoyl	2.36	5.15
Oxalic acid	—	5.38

Each of hydrazides was added to the final concentration of 100 γ per ml to three days culture (Exp. 1) or to five days culture (Exp. 2), and further cultivation was continued for another 48 hrs. (Exp. 1) or for 12 hrs. (Exp. 2) respectively.

Enzyme activity was expressed as in Fig. 1.

⑥ Hydrazide による誘導の阻害

INH 以外の酸ヒドラジドのいずれかを INH と同時に加えた場合, 3 日培養菌では INH による誘導が阻害を受け, 誘導の lag phase の延長が認められた (表 4)。lag phase なしに誘導の起こる 5 日培養菌の場合では, このような酸ヒドラジドによる誘導の阻害は認められなかったが, Nicotinoyl, Glutamoyl hydrazide で若干の阻害がみられた。

Table 4. Inhibition by Hydrazide (1)

Addition	Enzyme activity after induction for		
	40 hrs	50 hrs	72 hrs
Isoniazid alone	2.41	60.94	70.02
Isoniazid + Benzoyl hyd.	2.36	13.34	84.41
Isoniazid + Nicotinoyl hyd.	3.68	4.90	77.29
Isoniazid + Pyrazinoyl hyd.	2.79	8.67	73.52
Isoniazid + Glutamoyl hyd.	3.03	10.26	81.22

Isoniazid was added to three days culture to give the final concentration of 100 γ per ml with or without one of other hydrazides in the same concentration. Further cultivation was continued as indicated.

Enzyme activity was expressed as in Fig. 1.

Table 5. Inhibition by Hydrazide (2)

Addition	Enzyme activity
None	13.26
Isoniazid alone	123.49
Isoniazid + Nicotinoyl hyd.	89.11
Isoniazid + Oxalic acid hyd.	124.56
Isoniazid + Salicylic hyd.	117.44
Isoniazid + Pyrazinoyl hyd.	107.31
Isoniazid + Benzoyl hyd.	136.94
Isoniazid + Glutamoyl hyd.	74.42

Isoniazid was added to five days culture to the final concentration of 100 γ per ml with or without 100 γ of other hydrazide per ml.

Further cultivation was continued for another 19 hrs. Enzyme activity was expressed as in Fig. 1.

⑦ アミノ酸の影響

多くの他の酵素の場合、酵素の誘導的形成はアミノ酸の添加によつて促進されるが、Hydrazidase の場合は表 6 に示すように、INH と同時にアミノ酸混合溶液を加えることにより、酵素の誘導的形成はかえつて抑制された。しかし、培地のアミノ酸 (アスパラギン 4 g

Table 6. Effect of Amino-acids (1)

Amino-acids mixture ml per 40 ml of medium	Enzyme activity
0	81.55
1	74.32
2	62.90
4	37.56
0, INH (—)	2.39

Isoniazid was added to five days culture to give the final concentration of 100 γ per ml with or without amino-acids mixture, which contained 8.0 mg of *l*-arginine (HCl), 7.8 mg of *l*-isoleucine, 17.5 mg of *l*-leucine, 12.3 mg of *l*-lysine (HCl), 8.7 mg of *l*-phenylalanine, 9.1 mg of *l*-threonine, 1.8 mg of *l*-tryptophane, 6.1 mg of *l*-valine, 10.0 mg of glycine, 6.7 mg of *l*-methionine and 4.0 mg of histidine (HCl-H₂O) per ml.

Enzyme activity was expressed as in Fig. 1.

Table 7. Effect of Amino-acids (2)

Time of induction (hrs)	Enzyme activity	
	Medium A	Medium B
8	32.64	17.15
15	97.50	52.14
24	55.96	53.42

Isoniazid was added to five days culture on medium A or on medium B to give the final concentration of 100 γ per ml. Further cultivation was continued as indicated. Medium A had the same composition with ordinary Sauton synthetic medium and by medium B asparagine concentration was reduced to 2.0 gm per l.

Enzyme activity was expressed as in Fig. 1.

per l) をあらかじめ 2 g per l に減らしておいた培地で生育した菌では、誘導は通常培地で生育した菌の場合よりも劣つていた。(表 7)

⑧ 弗素の影響

Hydrazidase の活性は弗素によつて著しい阻害を受けるが³⁾、酵素の誘導的形成は INH と同時に弗素を添加することによつて、表 8 に示すように阻害を受けた。

Table 8. Inhibition by Fluoride

Sodium fluoride γ per ml	Enzyme activity	Inhibition %
0	65.76	
50	60.56	7.9
100	52.65	19.9
200	45.02	31.5

Isoniazid was added to five days culture to the final concentration of 100 γ per ml with or without sodium fluoride as indicated, and cultivation was further continued for another 12 hrs.

Enzyme activity was expressed as in Fig. 1.

IV 考 案

ここに報告したように、今まで INH と接触したことのない、低い Hydrazidase 活性しかもたない INH 感性菌は、培養経過中に INH と接触することによつてその Hydrazidase 活性の著しい上昇を示した。この現象を、感性菌中にあらかじめごく少数混在していた耐性菌が INH 添加ののち独占的に発育してきたための現象であると説明するためには、培養途中で INH を加えられて成育してきた耐性菌の Hydrazidase 活性が、培養当初から INH の存在下で成育した耐性菌の酵素活性よりも、圧倒的に (おそらく数百倍、数千倍も) 高いと仮定せねばならず、このようなことは事実ありそうもない。したがつて、ここに報告した現象は、Hydrazidase をもつ mutant の selection という genotypical な現象ではなく、phenotypical な次元での酵素の誘導的形成 (適応) であると考えられる。

3 日培養菌と 5 日培養菌とでは、誘導の様相がかなり違っていることが注目される。すなわち、lag phase の有無、SM による阻害の度の違い、他の Hydrazides による阻害の有無などがあげられるが、これらの違いが、菌の環境としての培地条件の変化 (培地成分の減少、菌の生産物の集積、pH の変動など) によるものか、あるいは菌自体の態勢 (透過性、菌体内代謝様式、菌体内窒素源プールなど) の質的、量的な変化によるものか、ここに報告した実験成績からは何も結論的なことはいえない。しかし、exogeneous に加えたアミノ酸と endogeneous にくみこまれたアミノ酸とが、酵素の誘導的形成に逆の影響を与えていることを示唆するような

実験⑦の成績は、後者の可能性を暗示しており、今後この点についての検討を続けたい。

INHの抗結核作用機作を論ずる場合、

A) INHはなぜ *Mycobacterium* の細菌にのみとくに強力に作用するのか？

B) 構造的に類似した種々の酸ヒドラジドのうちINHのみがなぜとくに強い抗結核作用をもつのか？

という2つの問題点に答えるものでなければならぬ。現在までに提出されたINHの作用機作仮説はいずれもこれらの点を十分に説明できるものではなく、わずかに Tirunarayanan らの Peroxidase 仮説⁶⁾⁷⁾のみがこの2つの問題点のうちA)の点に答えるものであるが、しかも Peroxidase 仮説ではB)の点に答えることは困難である。ここに報告したINH以外の酸ヒドラジドは Hydrazidase 誘導の Inducer になりえないという実験成績は、INHとそれ以外の Hydrazide との生物学的作用の違いを明らかにしたほとんど最初のものであり、B)の問題を解明するための一つの手がかりとなると考えられ、今後この点の研究を続けたい。

別報⁵⁾で考案したように、Hydrazidase が Penicillin 耐性における Penicillinase と同等の役割をINH耐性において演じているかどうかについては、まだ結論的な証拠は得られていない。したがってこの報告は、INH耐性は mutation-selection によつて起こるものか、いわゆる adaptation によつて起こるものか、という問題に

は直接かわるものでないことをとくに言及しておく。

V 結 論

いままでにINHと接触したことがなく、Hydrazidase 活性をほとんど示さぬ感性菌が、培養中にINHと接触して Hydrazidase を誘導的に形成する現象を明らかにし、とくに培養日数による誘導の様相の違い、抗結核剤の影響、Inducer 特異性、アミノ酸の影響などの点について報告した。

この報告の大部分は第37回結核病学会総会(1962)において報告した。

文 献

- 1) 戸井田一郎・斉藤千代：結核，34：545，昭34。
- 2) Toida, I.: Amer. Rev. Resp. Diseases.
- 3) 戸井田一郎：第34回日本生化学会総会，昭36；J. Biochemistry, 印刷中。
- 4) 戸井田一郎：結核，37：85，昭37。
- 5) 戸井田一郎・斉藤千代：結核，37：287，昭37。
- 6) Tirunarayanan, M.O., Vischer, W.A.: Amer. Rev. Tuberc., 75：62，1957。
- 7) Tirunarayanan, M.O., Vischer, W.A.: Naturwissenschaften, 44：11，1957。

Induced Formation of Hydrazidase.

Isoniazid-sensitive cells of *Mycobacterium avium* (strain AVT), which possessed only negligible activity of hydrazidase, were cultivated on Sauton's synthetic media without addition of isoniazid at 37°C for three or five days. Thereafter, isoniazid was added to the culture-media with caution not to damage the pericles. After further cultivation cells were collected, washed, and their hydrazidase activity was assayed by the method reported in the preceding paper. (2)

When isoniazid was added to the three days culture, hydrazidase formation started after rather long period of lag phase, but in the case of five days culture the enzyme was produced without any appreciable lag phase. At 4°C enzyme induction did not occur. Effects of other anti-tuberculous drugs added with isoniazid were summarized in Table 1. Streptomycin inhibited the enzyme formation remarkably, in either case of three days or five days culture, but the degree and the mode of inhibition were somewhat different between these two cases (Table 2). Hydra-

zidase hydrolysed other acid-hydrazides than isoniazid as reported previously (2, 3), but no acid-hydrazides listed in Table 3 could take the place of isoniazid in the hydrazidase induction (Table 3). Not only that, acid-hydrazides other than isoniazid prolonged the lag phase of induction when added with isoniazid to three days culture (Table 4). The correlation between inducer concentration and the degree of induction was shown in Fig. 2. At the higher concentration enzyme-formation was reduced. Amino acids mixture, when added with isoniazid, inhibited the enzyme formation as shown in Table 6. But, at the same time, cells grown on amino acid poor medium could produce less amount of hydrazidase than cells from ordinary medium (Table 7). Hydrazidase activity was inhibited by fluoride as reported previously (2, 3). As shown in Table 8, the induced formation of this enzyme was also inhibited by fluoride.

These experimental results were discussed as phenotypical adaptation.