

Hydrazidase (Isoniazid 加水分解酵素) の 誘導的 形成 (第 2 報)

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 38 年 2 月 5 日

I 序 言

前報¹⁾において著者は、今まで Isoniazid と接触したことがなく、低い水準の Hydrazidase 活性を示す *Mycobacterium avium* AVT 株の Isoniazid 感性菌を Sauton 培地に培養し、培養途中で培地に Isoniazid を加えると、Hydrazidase が誘導的に形成されてくることを報告した。このさい、3日培養の菌(以下「3日菌」と略す)では Isoniazid の添加ののち Hydrazidase の形成が始まるまでに長い lag phase が存在するが、5日培養の菌(以下「5日菌」と略す)では Isoniazid 添加によつて間もなく酵素の誘導が始まる。3日菌と5日菌とでは、その他の点でも、Hydrazidase の誘導的 形成の様相が異なつており、前報ではこのような差異は、培養期間に応じて菌の生理的機能または形態的構造に差が生じるためであるか、あるいは培養期間に応じて菌の環境、すなわち培地成分や培地 pH が変化したためであるかのどちらかによるものであらうと考案した。本報では、この点の検討のために計画された実験結果について報告する。

II 方法および材料

Hydrazidase 活性測定は前報¹⁾と同じ方法によつた。

Hydrazidase の誘導も基本的には前報と同じ方法で、各実験ごとの誘導方法の変更については各実験結果の項目ごとに述べる。

使用した菌株は *Mycobacterium avium* AVT 株の Isoniazid 感性株で、100 ml 三角コルペン中に 40 ml の Sauton 合成培地をいれ、37°C で培養した。

III 実 験 結 果

① 3日菌と5日菌との培地の交換

菌膜をできるだけ破壊しないように取り除き、濾過して菌の混在を取り去つたのち、5日菌の培地液を3日菌

に、3日菌の培地液を5日菌に各コルペンあたり 40 ml に添加、さらに Isoniazid を 100 γ per ml に加えて、Hydrazidase の誘導をみた。結果は表 1 に示す。

Table 1. Exchange of the Culture-Media

Culture-media exchanged with	Cells cultured for	
	3 Days	5 Days
Filtrate of 3-days cells' culture-media	1.73	1.68
Filtrate of 5-days cells' culture-media	12.71	22.22

Culture-media were taken off with caution not to damage the pericelles after three or five days cultivation and exchanged with the filtrate of culture-media as indicated. Isoniazid was added to the new media to the final concentration of 100 γ per ml. Induction was carried out at 37°C for 21 hours.

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

② 5日菌培地液の検討

実験①の結果から、5日菌培地液中に誘導を促進する物質が存在しているのではないかと予想のもとに、5日菌培地液、5日菌培地液を 4°C で 24 時間蒸留水に対して透折したもの、5日菌培地液を 100°C、30 分加熱したもので、3日菌の培地液をそれぞれ交換し、Isoniazid を加えて誘導を行なつた。結果は表 2 に示す。

③ 5日菌菌体抽出液の影響

実験②の結果から、5日菌培地液中には非透折性で熱に破壊されやすい誘導促進物質が存在しているのではないかと予想のもとに、5日菌を海砂と磨砕、5倍容の蒸留水で 1 夜抽出、10,000 rpm 30 分遠沈した上澄を、3日菌の培地に 2.5~10% の割合に添加し、Isoniazid を加えて誘導を行なつた。結果は予想に反して誘導促進は認められなかつた(表 3)。

3日菌培地に RNA (イースト)、栄研培地用アルブミン、牛血清をそれぞれ添加した場合も、誘導促進は全く認められなかつた。

Table 2. Effect of Five-Days Cells' Media

Media exchanged with	Time of induction	
	11 hrs	26.5 hrs
Filtrate of 3-days cells' media	5.02	2.21
Filtrate of 5-days cells' media	17.45	15.08
Filtrate of 5-days cells' media, heated at 100°C for 30 minutes	2.16	6.81
Filtrate of 5-days cells' media, dialysed at 4°C for 24 hours	51.71	116.07

Culture-medium of three-days cells was exchanged with the filtrate of five days cells as indicated. Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1. for indicated time interval.

Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

Table 3. Effect of Cell-Extract

Amount of extract added ml. per 40 ml. of medium	Time of induction	
	8 hrs	46 hrs
0	3.40	5.46
1	2.40	2.26
2	2.81	4.82
4	2.40	5.68

Five-days cells were ruptured by grinding with sea-sand for 30 minutes, extracted with three volumes of water over-night, and centrifuged at 10,000 rpm for 30 minutes. Cell-free extract thus obtained was added to three-days cells media as indicated. Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1. for indicated time interval.

Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

④ 培地液中の阻害物質の存在

5日菌菌体抽出液は誘導促進を示さず、5日菌培地液になんらかの誘導促進物質が存在するという仮説は一応放棄し、培地液中に誘導を阻害する物質が存在し、その量が3日菌培地液中には5日菌培地液中よりも多いという仮説を検討した。3日菌の培地液を蒸留水または新鮮な Sauton 培地液で交換し、Isoniazid を加えて誘導を行なった。結果は表4に示す。すなわち、培地液中には誘導を阻害する物質が存在し、それは菌によつて生産されて培地液中にできたものではなく、Sauton 培地中に初めから存在している物質であることが明らかとなった。

Table 4. Exchange with Water or Fresh Medium

Time of induction (hrs)	Exchanged with	
	Water	Fresh Sauton medium
6.5	8.00	2.92
18	62.40	2.86
42	60.38	4.08

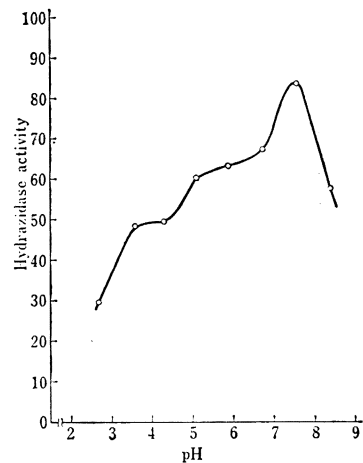
Media of three-days cells were exchanged with distilled water or fresh Sauton-medium. Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1. for indicated time interval.

Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

⑤ 誘導に及ぼす pH の影響

3日菌の培地液を 1/10 N-HCl または 1/10 N-NaOH で種々の pH に調整した蒸留水で交換し、Isoniazid を加えて誘導を行なった。結果は図1に示した。至適 pH は 7.5 付近にある。

Fig. 1. Effect of pH



Media of three-days cells were exchanged with distilled water adjusted to pH indicated. Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1. for 22 hrs.

Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

⑥ Sauton 培地の各成分の影響

Sauton 培地の各成分を Sauton 培地におけると同濃度になるように水溶液とし、pH を 7.5 に調整して、3日菌の培地液と交換し、Isoniazid を加えて誘導を行なった。結果は表5に示した。すなわち誘導阻害物質の本体は Asparagine である。さらに硫酸マグネシウムによつて誘導促進が認められた。

Table 5. Effect of the Components of Sauton Medium

Solution	Concentration	Hydrazidase activity
Water		58.70
KH ₂ PO ₄	0.5 g per l	37.48
MgSO ₄	0.5 g per l	125.22
Asparagine	4.0 g per l	2.23
Citric acid	2.0 g per l	68.22
Ferrous ammonium citrate	0.05 g per l	26.96
Glycerol	60 ml per l	87.59

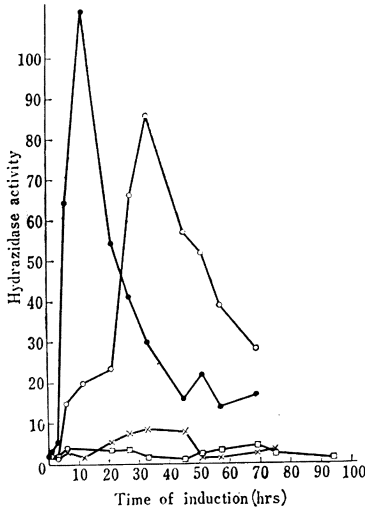
Media of three-days cells were exchanged with the solutions listed in the table. Every solution was adjusted to pH 7.5. Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1. for 6 hrs.

Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

⑦ Asparagine による誘導阻害

Isoniazid 100 γ per ml に対しモル比で 1:1, 3:1, 10:1 になるように Asparagine を加えた Isoniazid-Asparagine 混液 (pH 7.5) で, 3日菌培地液を交換し誘導を行なった。結果は図2に示す。すなわち Aspara-

Fig. 2. Effect of Asparagine



Media of three-days cells were exchanged with water (●-●-●) or 0.729 mM (○-○-○), 2.187 mM (-x-x-) or 7.29 mM (□-□-) solution of asparagine (pH 7.5). Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1.

Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

gine の濃度が増大するにつれ, lag phase の延長・誘導初期速度の減少・最大活性値の低下が次第に著しくなり, Asparagine : Isoniazid のモル比が 10:1 になると誘導は完全に抑制された。

⑧ アミノ酸による誘導の抑制

Isoniazid 100 γ per ml に対しモル比で Isoniazid : Amino acid 1:3 になるようにアミノ酸を加え, pH 7.5

に調整して3日菌培地液と交換して誘導を行なった。結果は表6に示す。Arginine, Glutamine, Histidine では Asparagine に匹敵する抑制効果を認めたが, L-Aspartic acid などのアミノ酸は軽い抑制を示すのみであり, さらに D-Aspartic acid, L-Glutamic acid などではほとんど抑制がみられなかった。

⑨ アミドによる誘導の抑制

実験⑧の結果は, Asparagine の抑制作用は, そのアミノ酸としての性質よりもむしろアミドとしての性質に基づくものではないかということを目撃させる。Isoniazid 100 γ per ml に対しモル比で Isoniazid : Amide 1:3 になるようにアミドを加え, pH 7.5 に調整して3日菌培地液と交換して誘導を行なった。結果は表7に示すように, いずれも強い抑制作用を示した。

Table 7. Effect of Amides

Amide	Hydrazidase activity
Asparagine	2.93
Nicotinamide	2.58
Isonicotinamide	1.38
Benzamide	12.64
Pyrazinamide	2.07
Succinamide	10.25
Acetamide	15.38
none	50.70

Media of three-days cells were exchanged with 2.187 mM solution of amide (pH 7.5). Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1. for 19 hours.

Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

⑩ Hydrazidase 反応生成物による抑制

Isoniazid 100 γ per ml に対し, Isonicotinic acid または Hydrazine をモル比でその3倍になるように加え, pH 7.5 に調整して誘導を行なった。同時に Ammonia についても検討した。結果は表8に示すように, Hy-

Table 6. Effect of Amino acids

Expt. 1		Expt. 2		Expt. 3	
Amino acid	Hydrazidase activity	Amino acid	Hydrazidase activity	Amino acid	Hydrazidase activity
L-Asparagine	0.90	L-Alanine	33.53	L-Glutamine	2.26
L-Aspartic acid	59.62	L-Serine	44.46	L-Threonine	45.47
D-Aspartic acid	74.66	L-Methionine	42.32	L-Leucine	26.09
L-Glutamic acid	64.39	L-Histidine	7.19	L-Hydroxyproline	49.06
L-Cysteine	20.76	L-Tyrosine	73.22	none	44.76
L-Tryptophan	86.72	L-Arginine	6.36		
L-Glycine	38.08	L-Valine	79.24		
none	84.35	none	76.76		

Media of three-days cells were exchanged with 2.187 mM solution of amino acid (pH 7.5). Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1. for 19 hours (Expt. 1), for 21 hours (Expt. 2), or for 9 hours (Expt. 3).

Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

drazine および Ammonia によつて強い抑制がみられた。

Table 8. Effect of Reaction-Products

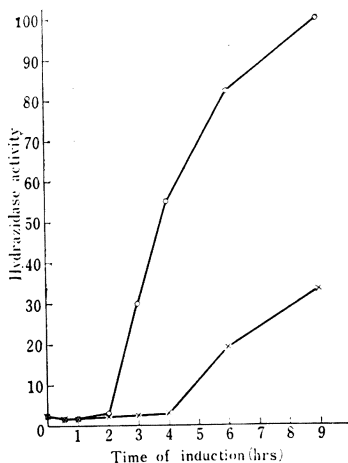
Expt.	Compound	Hydrazidase activity
Expt. 1.	Hydrazine	5.02
	Isonicotinic acid	57.82
	none	76.76
Expt. 2.	Ammonium chloride	0.81
	none	50.70

Media of three-days cells were exchanged with 2.187 mM solution of the compound listed (pH 7.5). Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1. for 21 hours (Expt 1) or for 19 hours (Expt 2). Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

⑪ 3日菌と5日菌との比較

3日菌と5日菌との培地液を pH 7.5 に調整した蒸留水で交換し, Isoniazid 100 γ per ml を加えて誘導を行ない, 両者の間に差がみられるかどうかを検討した。結果は図3に示すように, 前報に報告したのとは逆に3日菌は5日菌に比して lag phase も短く, 誘導の初期速度も大であつた。

Fig. 3. Comparison of 3-days and 5-days Cells



Media of three-days or five-days cells were exchanged with distilled water of pH 7.5. Induction was carried out as stated in the foot-note for Table 1.

Hydrazidase activity was expressed as in Table 1.

IV 考 案

前報¹⁾において Hydrazidase が基質 Isoniazid によつて誘導的に形成されること, そのさい5日培養の菌に比較して3日培養の菌では長い lag phase が必要であ

ることを報告した。このように培養日数によつて酵素の誘導の様相に差が生ずるのは, 菌そのものの機能的, 構造的な差によるためか, 培地成分や培地 pH などの菌の環境の差によるためかのどちらかであるが, Hydrazidase の場合は本報で示したように培地条件の差異が主要な原因であつた。そしてこの場合, 培地 pH の変動はあまり大きい要因ではないので, 培地条件の差異としては3日菌培地液中に誘導を抑制する物質が存在するか, 5日菌培地液中に誘導を促進する物質が存在するか, あるいはその両方であるかのいずれかであるが, 本報の実験結果は5日菌培地液中に誘導促進物質が存在する可能性を排除するものではないが, 3日菌培地液中に誘導を抑制する物質が存在することを明白に示している。さらにこの抑制物質の本態が Asparagine であることも証明された。すなわち前報で報告した3日菌と5日菌との誘導の様相の差は, 培地液中にちがった濃度で残存している Asparagine によつてちがった程度に抑制をうけている3日菌と5日菌とのみせかけの差異であつて, 両者の net の差異は本報に示したように, 3日菌のほうが5日菌よりも lag phase も短く, 誘導初期速度も大であつた。

酵素の誘導阻害については多くの報告があり, 蛋白合成阻害や核酸合成阻害による非特異的な阻害のほか, 特異的な阻害についても報告されている。アミノ酸が誘導阻害をおこす例も多く, Tryptophan synthetase が Tryptophan で²⁾, Methionine synthetase が Methionine で³⁾⁴⁾, Acetylornithase, Ornithine transcarbamylase, Arginosuccinase が Arginine で^{5)~7)}, それぞれ形成を抑制されることが知られている。すなわち誘導されるべき酵素の働きによつて作られるはずの生産物が, 特異的にその酵素の誘導の形成を妨げるのであつて, 同様の阻害はこの他にも, Purine⁸⁾⁹⁾, Pyrimidine¹⁰⁾, Valine¹¹⁾, Histidine¹²⁾, Isocitrate¹³⁾, Phenylpyruvate¹⁴⁾ などの合成に関与する酵素の誘導の形成のさいにも認められている。本報で報告した Asparagine による Hydrazidase 誘導の抑制は, これら合成酵素の場合とちがって特異性は厳密ではなく, いくつかのアミノ酸, 多くのアミド, ヒドラジン, アンモニアによつても同様に抑制をうける。しかし E. coli の β -Galactosidase 形成がアミノ酸で抑制される場合のように, アミノ酸が単なる Energy source として働いて, いわゆる Catabolite-effect を発揮する¹⁵⁾と考えるほどには非特異的ではない。すなわち強い抑制を示す物質はすべて菌によつて多少とも容易に Ammonia を生成するものであり, また Ammonia 自体も強い抑制作用を示す。一方, Hydrazidase の酵素作用は Hydrazide \rightarrow Acid + Hydrazine であり¹⁶⁾, Hydrazine は続いて Ammonia に変化すると考えられる。したがつて Asparagine などによる誘導抑制は, 実際には Ammonia

による抑制と考えられる。このような例は、 β -Galactosides による *E. coli* の β -Galactosidase 生産の抑制は実際は β -Galactosides の加水分解物である Galactose による抑制として説明されている例¹⁷⁾をあげることができる。このようにして、特異性の点では、さきにあげた合成酵素が単一の物質によつて抑制されるのに対し、Hydrazidase は菌によつて容易に Ammonia にかえられるような一群の物質によつて抑制されるという差はあるが、いずれの場合も誘導されるべき酵素の反応生成物によつてその酵素の誘導が抑制されるという点では、本質的に同じメカニズムが働いていると考えられる。

Hydrazides, とくに γ -Glutamoyl hydrazide は酵素 (一般に蛋白質) 合成の阻害剤としてよく用いられており、その阻害の機作は Amino acid analogue として対応するアミノ酸の蛋白質へのとりこみを拮抗的に阻害することにあるとされている¹⁸⁾。このような場合、Hydrazide 自体が菌によつて代謝される可能性については全く考慮が払われていない。しかし Hydrazidase を構成的にもつているか、誘導的に形成する菌株では、Hydrazide 濃度が実験中に変化すること、Hydrazide が窒素源として利用されること、Hydrazide の加水分解産物が Hydrazide とは別の働きをすること、Hydrazide の誘導的形成のために窒素源やエネルギーが流用されることなどによつて実験が乱される可能性を考慮しなければならぬ。

Hydrazidase は培地を蒸留水と交換した場合によく認められるのであるが、集菌洗滌して蒸留水に浮游液とした状態で Isoniazid と接触させたのでは誘導はおこらない。このさい、Glycerol, リン酸バッファー, ATP などの添加は無効である。菌浮游液の状態では誘導を可能にする条件については、目下検討中である。

V 結 論

Hydrazidase の Isoniazid による誘導的形成は Asparagine によつて抑制される。この抑制は Asparagine が菌によつて分解されて生ずる Ammonia によるものと考えられる。

文 献

- 1) 戸井田一郎: 結核, 37: 582, 昭 37.
- 2) Monod, J., Cohen-Bazire, G.: Compt. rend., 236: 530, 1953.
- 3) Cohn, M., Cohen, G.N., Monod, J.: Compt. rend., 236: 746, 1953.
- 4) Wijesundera, S., Woods, D.D.: Biochem. J., 55: viii, 1953.
- 5) Vogel, H.J.: in "The Chemical Basis of Heredity", p. 276, John Hopkins Press, Baltimore, 1957.
- 6) Gorini, L., Maas, W.K.: Biochim. et Biophys. Acta: 25, 208, 1957.
- 7) Gorini, L., Maas, W.K.: in "The Chemical Basis of Heredity", p. 469, John Hopkins Press, Baltimore, 1957.
- 8) Magasanik, B.: Ann. Rev. Microbiol., 11: 221, 1957.
- 9) Wyngaarden, J.B., Ashton, D.: Nature, 183: 747, 1959.
- 10) Yates, R.A., Pardee, A.B.: J.B.C., 227: 677, 1957.
- 11) Adelberg, E.A., Umbarger, H.E.: J.B.C., 205: 475, 1953.
- 12) Ames, B.N., Garry, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 45: 1453, 1959.
- 13) Kornberg, H.L., Gotto, A.M., Lund, P.: Nature, 182: 1430, 1958.
- 14) Schwinck, I., Adams, E.: Biochim. et Biophys. Acta, 36: 102, 1959.
- 15) Nakada, D.: Nature, 195: 1303, 1962.
- 16) Toida, I.: J. Biochemistry, (Tokyo), 53: 14, 1963.
- 17) Cohn, M., Monod, J.: Symposium Soc. Gen. Microbiol. 3rd, 132, 1953.
- 18) 直野司郎・須田正己: 酵素化学シンポジウム 第 9 集, p. 88, 1954.

Repression of Hydrazidase-Induction by Asparagine.

Induced formation of hydrazidase (hydrazides hydrolase) by *Mycobacterium avium* (Strain AVT) was repressed by asparagine in the medium, when induction was carried out with cells growing on the Sauton medium. The repression of hydrazidase-

induction was not specific for asparagine, but some of amino acids (Table 6), amides (Table 7), hydrazine and ammonia (Table 8) also repressed the induction. Therefrom, the mechanism of the repression by asparagine and other nitrogen containing compounds was postulated to be due to ammonia produced from these compounds by the bacteria.