

# Mycobacteria の Nicotinamide adenine dinucleotide nucleosidase

## 第1報：酵 素 の 分 布

戸 井 田 一 郎 ・ 山 本 節 子

財団法人結核予防会結核研究所 (所長 岩崎竜郎)

受 付 昭 和 38 年 9 月 15 日

### 1. 序 言

Zatman らによつて nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) の nicotinamide 部分が isoniazid によつて置きかえられ、NAD の isoniazid-analogue が形成されることが報告されて以来<sup>1)~3)</sup>、この反応によつて isoniazid の抗結核菌作用を説明しようとする仮説が、2, 3 の研究者によつて提出された<sup>4)~6)</sup>。すなわち結核菌体内に侵入した isoniazid は、結核菌の NAD と反応してその nicotinamide 部分と置きかえられて、酵素学的に不活性な isoniazid-analogue をつくり、その結果、結核菌の pyridine nucleotide coenzymes dependent の脱水素酵素系が作動しなくなり、結核菌の代謝が停止する、というのがこの仮説である。

ところで、NAD の nicotinamide と isoniazid とを置きかえる反応を触媒する酵素は nicotinamide adenine dinucleotide nucleosidase (NAD-ase) であるが、mycobacteria のこの酵素については、それほどよく研究されていない。Kern と Natale は、Mycobacterium butyricum は熱に安定な NAD-ase と熱に不安定な NA-ase 阻害物とを同時にもつていること、Mycob. 607 は加熱処理後もこの酵素の活性を示さないことを報告している<sup>7)</sup>。Zatman らは、BCG を用いて5株のうち4株は NAD-ase をもたなかつたと報告している<sup>2)</sup>。Bekierkunst と Artman は、H<sub>37</sub>Rv はこの酵素をもたないが、動物の肺の中で in vivo で生育した H<sub>37</sub>Rv は酵素活性を示し、これは多分宿主組織の酵素を吸着しているためだろうと報告している<sup>8)</sup>。これらが mycobacteria の NAD-ase に関する報告のほとんどすべてであり、人型菌についてはこの酵素の存在を報告したものはみられない。

われわれは isoniazid の作用機序との関連においてこ

の酵素に注目し、まず mycobacteria のいろいろの株におけるこの酵素の分布を検討したので報告する。

### 2. 材料と方法

NAD は Sigma Chemicals Co. の β-NAD で、純度 98% のもの。

使用した Mycobacteria の菌株は表 1 に示した。実験に用いた菌は Sauton 合成培地に 37°C で培養し、菌体を濾紙で分けとり、蒸溜水で洗滌して菌浮游液または無細胞抽出液を調製した。isoniazid 耐性株の場合は 50~100 r per ml に isoniazid を加えた Sauton 培地に培養し、同様に処理した。菌浮游液は菌を少量の蒸溜水とともに乳鉢で軽く磨砕して均等にし、適当に蒸溜水を加えて稀釈して調製した。無細胞抽出液は菌を sonic oscillator で 60 分間破碎し、10,000 r. p. m. 30 分遠沈した上澄で、その蛋白質含量は 260 μu と 280 μu の吸光度から、蛋白質 mg per ml = 1.45 × E<sub>280</sub> - 0.74 × E<sub>260</sub> として計算した。

精製 NAD-ase は、Mycob. butyricum または Mycob. avium Kirchberg 株より別に報告した方法<sup>9)</sup>によつて調製した。

NAD-ase 活性は Kaplan の方法<sup>10)</sup>に準じて測定した。反応液は 0.4 ml の M/15 リン酸バッファー (pH 7.2)、0.5 ml の菌浮游液または無細胞抽出液、0.1 ml の 10<sup>-2</sup> M NAD 水溶液よりなり、37°C で 30~60 分 incubate したのち、5.0 ml の 1.0 M potassium cyanide 水溶液を加えて反応を停止させ、325 μu で吸光度を測定する。control tube には zero time で potassium cyanide を加え、325 μu で吸光度を測定する。吸光度の減少より、反応時間中に加水分解された NAD の量を求める。それぞれの標品の NAD-ase 比活性は、菌浮游液の乾燥重量 1g あたり、または無細胞抽出液の蛋白質

Table 1. NAD-ase and its Inhibitor

Type	Strain	Growth***	NAD-ase activity				Inhibition of	
			Cell-suspension		Cell-free extract		Butyricum NAD-ase	Kirchberg NAD-ase
			Before heat-treatment	After heat-treatment	Before heat-treatment	After heat-treatment		
<i>Mycob. tuberculosis var. hominis</i>	H <sub>37</sub> Rv	s	-	-	-	-	-	-
	H <sub>37</sub> Rv-R**	s	-	-	-	-	-	-
	Aoyama	s	-	-	-	-	-	-
<i>Mycob. tuberculosis var. bovis</i>	Ravenel	s	-	-	-	-	-	-
	BCG	s	-	-	-	-	-	-
<i>Mycob. avium</i>	Kirchberg	s	-	+	-	+	-	+
	Kirchberg-R*	s	-	-	-	+	-	+
	Flamingo	s	-	+	-	+	-	-
	AVT	r	-	-	-	-	-	-
	AVT-R*	r	-	-	-	-	-	-
	Hosoya	r	-	+	-	+	-	-
	F	r	-	-	-	-	-	-
<i>Mycob. smegmatis</i>		r	-	-	-	-	-	-
	-R*	r	-	-	-	-	-	-
<i>Mycob. butyricum</i>		r	-	+	-	+	+	-
	-R*	r	-	-	-	+	+	-
<i>Mycob. phlei</i>		r	-	-	-	-	-	-
Unclassified mycobacteria	Cole	s	-	-	-	-	-	-
	Coffey	s	-	-	-	-	-	-
	Brownell	s	-	-	-	-	-	-

-R\* : Resistant to 100 µg of isoniazid per ml.  
 -R\*\* : Resistant to 50 µg of isoniazid per ml.

\*\*\*s : Slowly growing strain.  
 r : Rapidly growing strain.

1gあたりの1時間あたりに加水分解されたNAD量 (µ moles per g per hour) で示す。

3. 実験結果

A) 菌浮游液のNAD-ase活性

成長の速やかな菌株では培養3~15日の菌について、成長の遅い菌株では培養7~40日の菌について、菌浮游液のNAD-ase活性を測定した。表1に示した菌株のいずれも、どの培養時期においても、酵素活性を示さなかった。

次いで、同様の菌浮游液を沸騰水浴中で5分間加熱し、ただちに室温まで冷却し、振盪して再び均等菌液としたものを用いて、NAD-ase活性を測定した。表1に示したように、酵素活性は *Mycob. butyricum* と *Mycob. avium* の Kirchberg 株, Flamingo 株, 細谷株の isoniazid 感性株に認められた。他の菌株では *Mycob. butyricum* と *Mycob. avium* Kirchberg 株との isoniazid 耐性株をも含めて、加熱処理後にも NAD-ase 活性は認められなかった。(図1~4)

B) 無細胞抽出液のNAD-ase活性  
 成長の速やかな菌株では7~10日培養の菌から、成長

Fig. 1. NAD-ase Activity of Mycobacterium Butyricum

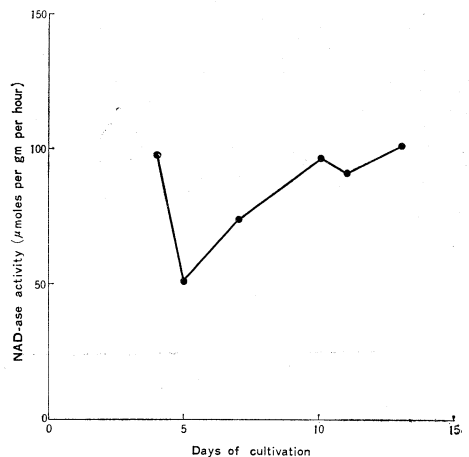
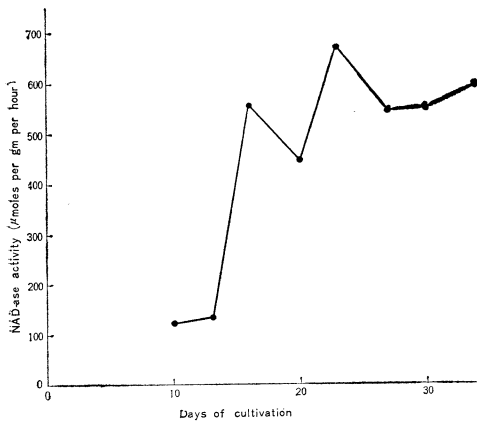
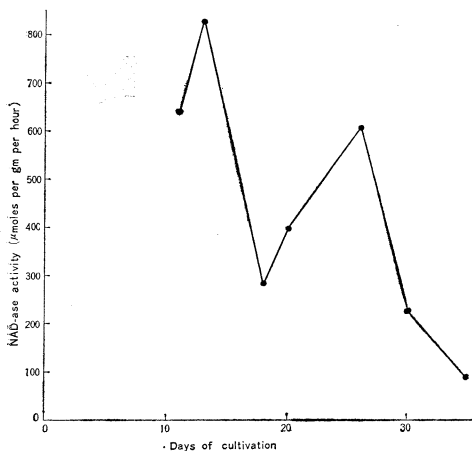
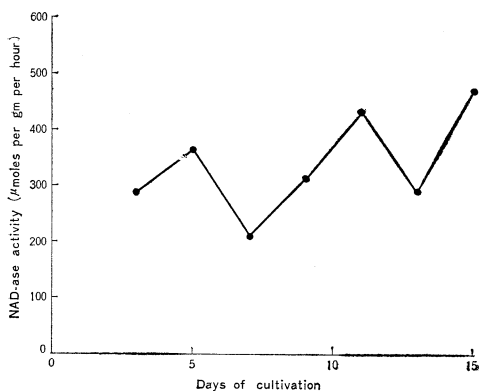


Fig. 2. NAD-ase Activity of *Mycobacterium Avium* KirchbergFig. 3. NAD-ase Activity of *Mycobacterium Avium* FlamingoFig. 4. NAD-ase Activity of *Mycobacterium Avium* Hosoya

の遅い菌株では15~20日培養の菌から、無細胞抽出液を調製し、これら無細胞抽出液のNAD-ase活性をそのまま、または沸騰水浴中で3分間加熱し、ただちに冷却

したものを用いて測定した。(表1)

加熱処理をしない場合には、どの菌株についても酵素活性は認められなかつた。加熱処理後には、加熱処理菌浮游液でNAD-ase活性が認められた *Mycob. butyricum* と *Mycob. avium* の Kirchberg 株, Flamingo 株, 細谷株の isoniazid 感性株に酵素活性が認められたほか、加熱処理菌浮游液では活性の認められなかつた *Mycob. butyricum* と *Mycob. avium* の Kirchberg 株との isoniazid 耐性株にも酵素活性が認められた。(表2)

Table 2. NAD-ase of Isoniazid-Resistant Strain

Preparation	NAD-ase Activity of <i>Mycob. butyricum</i> ( $\Delta E$ 325 $m\mu$ per hour)	
	Sensitive strain	Resistant strain
Cell-suspension		
Before Heat-Treatment	-0.0274*	-0.0331*
After Heat-Treatment	0.2562	-0.0969*
Cell-free extract		
Before Heat-Treatment	0.0095*	0.0020*
After Heat-Treatment	0.8580	0.1240

Cell suspension and cell-free extract were prepared from isoniazid-sensitive or -resistant strain of *Mycob. butyricum* grown for ten days at 37°C on Sauton synthetic media without or with 100  $\mu g$  of isoniazid per ml. Reaction mixtures consisted as stated in the text, and contained 3.51 or 4.38 mg. of isoniazid-sensitive or -resistant cells respectively by the cell suspension experiments, or 12.38 or 6.66 mg. of protein by the cell-free extract from isoniazid-sensitive or -resistant cells respectively.

\* Because of rather high blank values, the changes of extinction values at 325  $m\mu$  less than 5% of the initial values were regarded as insignificant.

### C) NAD-ase とNAD-ase 阻害物

*Mycob. butyricum* と *Mycob. avium* Kirchberg 株

Table 3. NAD-ase and Inhibitor

Extract	Purified NAD-ase	
	<i>Mycob. butyricum</i>	<i>Mycob. avium</i> Kirchberg
<i>Mycob. butyricum</i>	10.9	108.6
<i>Mycob. butyricum</i> R	65.9	
<i>Mycob. avium</i> Kirchberg	100.4	15.7
<i>Mycob. avium</i> Flamingo	99.8	103.8
<i>Mycob. avium</i> Hosoya	101.2	98.9
None	100	100

Reaction mixture consisted of 0.2 ml. of the purified enzyme preparation (0.013 mg. of protein by the butyricum enzyme, or 0.021 mg. of protein by the Kirchberg enzyme), 0.3 ml. of the extract, 0.4 ml. of M/15 phosphate buffer at pH 7.2, 0.1 ml. of 10<sup>-2</sup> M NAD solution. Incubated at 37°C for 30 minutes.

NAD-ase activity in the presence of the extract was expressed by the ratio to the activity in the absence of the extract.

とから調製した精製 NAD-ase を酵素標品として用い、これらの酵素の活性に対する無細胞抽出液の阻害作用を、表1の各菌株から調製した無細胞抽出液について検討した。表1および表3に示すように、*Mycob. butyricum* の NAD-ase は *Mycob. butyricum* の抽出液によつてのみ、*Mycob. avium* Kirchberg 株の NAD-ase は Kirchberg 株の抽出液によつてのみ阻害され、酵素と阻害物との関係は厳密に特異的であつた。

阻害物は熱に不安定で、沸騰水浴3分間の加熱で阻害作用を完全に失つた。

#### 4. 考 案

*Mycobacteria* について、NAD-ase とその阻害物との分布を検討した。NAD-ase は *Mycob. butyricum* と *Mycob. avium* のある菌株とに存在していたが、その活性は加熱処理を行なつたのちにはじめて認められた。すなわち、これらの菌株では熱に安定な酵素と熱に不安定な阻害物とが共存している。Kern と Natale が指摘しているように<sup>7)</sup>、「加熱活性化」という操作では、酵素も阻害物もともに熱に安定な場合や酵素自体が熱に不安定な場合には、阻害剤と共存している酵素の存在が発見できない可能性はあるけれども、NAD-ase は *Mycobacteria* のうちでは狭い分布を示し、上述の菌株にのみ認められると考えてよいだろう。NAD-ase 活性を示すこれらの菌株は、いずれも Sauton 培地では非常に薄く沈みやすい菌膜をつくるという共通性をもつていた。

注目に値することは、人型菌と牛型菌では酵素活性を示さなかつたことである。isoniazid の抗結核作用は、これらの菌株に対してもつとも著しく発揮されるのであるから、「NAD の isoniazid-analogue」形成が isoniazid の抗結核作用の本態であるとするならば、これらの菌株でこそ analogue 形成がもつとも著しいはずであるが、これらの菌株には analogue 形成を触媒する NAD-ase の活性は認められず、さらに、現在までには NAD-ase による交換反応以外の analogue 形成経路は証明されていない。「NAD の isoniazid-analogue 形成」仮説の根拠としてあげられている実験的事実は、結核菌と carboxyl-C<sup>14</sup>-isoniazid とを incubate したとき、2, 3 の溶媒系による菌抽出液の paper-chromatography で R<sub>f</sub> が NAD と一致する spot に放射能が蓄積しているということのみであつて<sup>4)~6)</sup>、PPC の marker として NAD が用いられていて NAD の isoniazid-analogue そのものが用いられていないこと、放射能をもつ spot から溶出した物質の化学的性状がほとんど検討されていないこと、などの難点のために結論的な論拠とは言いにくい。NAD の isoniazid-analogue 形成を触媒する NAD-ase が人型菌、牛型菌では認められないのであるから、analogue 形成の別の経路が証明されるか、iso-

niazid と接触した菌から isoniazid-analogue が純粋の物質として単離、同定されるかしないかぎり、「NAD の isoniazid-analogue 形成」仮説は実証された事実としてではなく、魅力ある仮説として留まらねばならないであろう。

*Mycob. butyricum* の isoniazid 耐性株では、菌浮遊液では加熱処理後も NAD-ase 活性が認められなかつたが、無細胞抽出液では加熱処理によつて酵素活性が認められた。*Mycob. avium* Kirchberg 株でも同様の現象がみられた。このことは isoniazid 耐性株では NAD に対する透過性が低下しているためであろうと考えられる。

NAD-ase と NAD-ase 阻害物との関係は非常に厳密に特異的であつた。Kern と Natale<sup>7)</sup> は、*Mycob. butyricum* の NAD-ase 阻害物は豚の脳、*Neurospora crassa*, *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus subtilis* から調製した NAD-ase を阻害しないと報告しているが、酵素-阻害物の特異性はさらに厳密で、同じ *Mycobacterium* に属していても、*Mycob. butyricum* の阻害物は *Mycob. avium* Kirchberg 株の酵素を阻害せず、逆に Kirchberg 株の阻害物は *butyricum* の酵素を阻害しなかつた。さらに Kirchberg 株の酵素は *Mycob. avium* の他の株の抽出液によつても阻害されなかつた。同一細胞のなかに酵素とその阻害物とが共存していることの生物学的意義は明らかでないが、予備的な実験の結果では阻害物は酵素よりも抽出されやすく、菌体の破壊が不十分なときには酵素はほとんど抽出できず阻害物のみが抽出されてきて、両者が菌体内部で別々の sub-cellular units に分布していることが予想される。動物組織では酵素は顆粒分画中存在していることが知られているが、*mycobacteria* でも酵素は顆粒分画中に、阻害物は可溶性分画中に存在し、両者はそれぞれの部位の NAD 含量をコントロールすることによつて、それぞれの部位の脱水素酵素系の活性をコントロールする調節機構として作用しているのであろう。

*Mycob. butyricum* は、Gordon と Smith による細菌学的研究によつて *Mycob. smegmatis* の1菌株と分類され<sup>11)</sup>、Boenicke によつてもその amidases pattern によつて *Mycob. smegmatis* として分類されているが<sup>12)</sup>、NAD-ase に関しては *Mycob. butyricum* は *Mycob. smegmatis* と態度を異にし、*Mycob. avium* のある株とともに酵素活性を示した。*Mycob. avium* とされているものの中には NAD-ase 活性を示すものと示さぬものがあり、Sauton 培地での菌膜の性状との間に一定の関連が認められた。

#### 5. 結 論

*Mycobacteria* における NAD-ase の分布を検討し

た。加熱によつて「活性化」される酵素が, *Mycob. butyricum* と *Mycob. avium* の Kirchberg 株, Flamingo 株, 細谷株と認められた。すなわちこれらの菌株には熱に安定な NAD-ase と熱に不安定な NAD-ase 阻害物とが共存している。

*Mycob. butyricum* と *Mycob. avium* Kirchberg 株との isoniazid 耐性株では, 菌浮游液では加熱処理後も酵素活性は認められず, 無細胞抽出液にして加熱処理することによつて, はじめて酵素活性が認められた。耐性株では NAD に対する透過性が低下していると考えられる。

NAD-ase と NAD-ase 阻害物との間の関係は厳密に特異的であつて, 同じ *Mycobacterium* に属するもの間にも相互間の作用は認められなかつた。

人型菌には NAD-ase 活性は認められず, したがつて isoniazid が結核菌の NAD の nicotinamide 部分に置き代わるることによつて抗結核菌作用を発揮するという仮説は, NAD-ase によらない analogue 形成経路が証明されないかぎり, 成立しないものと考えられる。

#### 文 献

- 1) Zatman, L.J., Colowick, S.P., Kaplan, N.O. and Ciotti, M.M.: Bull. Johns Hopkins Hospital, 91: 211, 1952.
- 2) Zatman, L.J., Kaplan, N.O., Colowick, S.P., and Ciotti, M.M.: J. Biol. Chem., 209: 453, 1954.
- 3) Zatman, L.J., Kaplan, N.O., Colowick, S.P., and Ciotti, M.M.: J. Biol. Chem., 209: 467, 1954.
- 4) 岡捨己・今野淳・長山宏: 第36回結核病学会総会, 結核, 36: 552, 昭36.
- 5) 江田享・横田健・秋葉朝一郎: 第37回結核病学会総会, 結核, 37: 440, 昭37.
- 6) 江田享: 結核, 投稿中.
- 7) Kern, M. and Natale, R.: J. Biol. Chem., 231: 41, 1958.
- 8) Bekierkunst, A. and Artman, M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 105: 605, 1960.
- 9) Toida, I.: Acta Chem. Scand., 17, Suppl. No. 1: 161, 1963.
- 10) Kaplan, N.O.: in "Method in Enzymology" 2: 660, 1955. Academic Press (Baltimore).
- 11) Gordon, R.E. and Smith, M.M.: J. Bact., 66: 41, 1953.
- 12) Boenicke, R.: Bull. International Union against Tuberc., 32: 13, 1962.

#### Nicotinamide Adenine Dinucleotide Nucleosidase in *Mycobacteria* (Report I: Distribution of the Enzyme).

Distribution of NAD-ase and its inhibitor in mycobacteria was studied. "Heat-activated" NAD-ase was found only in *Mycob. butyricum* and *Mycob. avium*. Heat-labile NAD-ase inhibitor had the same distribution pattern in mycobacteria.

In the case of the isoniazid-resistant variants of

the above strains, the enzyme-activity was revealed only in the heat-treated cell-free extract, and not in the heat-treated cell-suspension.

The enzyme-inhibitor relationship was absolutely specific.

Isoniazid-analogue formation hypothesis for the action mechanism of isoniazid was discussed as having some difficulties.