

## 抗酸菌のニコチン酸代謝

キノリン酸よりナイアシンヌクレオチドの生合成  
および抗酸菌の種による相違

今野 淳・大泉耕太郎・清水洋子  
玉川重徳・千葉ちよせ・岡 捨己

東北大学抗酸菌病研究所

受付 昭和 39 年 10 月 23 日

## NIACIN METABOLISM IN MYCOBACTERIA\*

Quinolinic Acid as a Precursor of Niacin Ribonucleotide and the  
Difference in Niacin Biosynthesis among Various  
Species of Mycobacteria

Kiyoshi KONNO, Kotaro OIZUMI, Yoko SHIMIZU,  
Shigenori TAMAGAWA, Chiyose CHIBA and Sutemi OKA

(Received for publication October 23, 1964)

Niacin biosynthesis of various species of mycobacteria was studied with cell-free extract. 3-Hydroxyanthranilic acid was not decomposed and was not utilized by mycobacteria and tryptophan pathway was excluded in mycobacteria.

In mycobacteria, quinolinic acid was converted to niacin ribonucleotide in the presence of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate. Free niacin was excluded as an intermediate of the pathway and quinolinic acid was established as an intermediate in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide in mycobacteria. Among mycobacteria, human tubercle bacilli revealed remarkably high quinolinate transphosphoribosylase activity which converts quinolinic acid to niacin ribonucleotide. The enzyme activity of human tubercle bacilli was 9 to 20 times more than other mycobacteria except twice of BCG. The enzyme activity was parallel to the niacin production of mycobacteria in the culture media.

\* From The Research Institute for Tuberculosis and Leprosy, Tohoku University, Sendai, Japan.

## I 序 言

抗酸菌は、ビタミンを含まずアスパラギン、グリセリンおよび少量の無機物よりなる合成液体培地によく発育してそのさい培養液中にナイアシンを産生する<sup>1)</sup>。そのナイアシン産生量は抗酸菌のうちとくに人型結核菌が多く、それがナイアシンテストの基礎となつているが<sup>2)3)</sup>抗酸菌のナイアシン生成経路はよく知られていない。

一般的にナイアシンは Niacin ribonucleotide (deamido-NMN) を経て Nicotinic acid adenine dinucleotide (deamido-NAD) となり、さらに Nicotinamide

adenine dinucleotide (NAD) に生合成される。

最近、西塚、早石らは<sup>4)</sup>ラット肝の無細胞抽出液でキノリン酸が deamido-NMN の前駆体となり、ナイアシンはその前駆体とならないことを述べ、Andreoli ら<sup>5)</sup>は E. coli でやはりキノリン酸が NAD の前駆体となることをみている。

中村らはキノリン酸と PRPP の存在下に deamido-NMN を合成する酵素を Quinolinate transphosphoribosylase と名づけた<sup>18)</sup>。この研究は、抗酸菌でもキノリン酸が NAD 生合成の前駆体となるかどうかを観察するとともに、その生合成において抗酸菌の各 species の

間で差違があるか否かをみたものである。

## II 研究材料

### A) 抗酸菌の無細胞抽出液

人型結核菌：H37Rv, H37Ra (Dr. William Steenken, Jr. Trudeau Laboratory, Trudeau, N. Y., USA より供与)。

牛型結核菌：BCG (日本にて BCG vaccine を製造している株)。

鳥型菌：11755 (American Type Culture Collection より分与)。

p-8 (photochromogen) および p-6 (Scotochromogen), (Dr. Ernest Runyon, Veterans Administration Hospital, Salt Lake City, Utah, USA より分与)。  
100616 (Nonphotochromogen) (Battey State Hospital, Battey, Georgia, USA より分与)。

Sato (Rapid-grower) (抗酸菌研究所にてこの菌による肺疾患患者より昭和 38 年分離された)。

M. phlei, M. smegmatis (抗酸菌病研究所保存)。

以上の菌を Sauton 液体培地に表面培養し、菌を濾過し蒸留水で5回洗滌したのち、菌を2倍量の海砂と10倍量の蒸留水を加えながら磨砕し、さらに Norit A を菌量の 15% 加え 12,000 r.p.m. で遠心し、さらに残った Norit A を濾紙で減圧して濾し上清を使用した。

その蛋白量の測定には Biuret の方法<sup>6)</sup>を用いた。

B) C<sup>14</sup> ナイアシン (-C<sup>14</sup>OOH) (spec. act. 0.65 mc/m. mole) は第一化学薬品より購入。

C<sup>14</sup> キノリン酸 (2.45×10<sup>5</sup> c. p. m./μ. mole) (β-carboxyl carbon を除いて uniform にラベルされたもの) 京都大学医化学教室早石修教授、西塚泰美助教授より供与された。

deamido-NMN および deamido-NAD は西塚、早石らの方法<sup>4)</sup>によつて製造した。NAD(Nicotinamide adenine dinucleotide) および PRPP (5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphate) は Sigma Chemical Co. より購入。

C) Leuconostoc mesenteroides (ATCC 9135, 遊離のナイアシンによつてのみ成長する) は京都大学薬学部生物薬品化学教室鈴木友二教授より供与された。

## III 方 法

1) C<sup>14</sup>-キノリン酸よりの deamido-NMN および放射性 CO<sub>2</sub> の生成

人型結核菌 H37Ra 無細胞抽出液蛋白量 2 mg, C<sup>14</sup>-キノリン酸 162 μ. moles (39,600 c. p. m.), PRPP 600 μ. moles, 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 600 μ. moles, MgCl<sub>2</sub> 100 μ. moles, 全量 3 ml を Thunberg 改良試験管<sup>4)</sup>に入れ 37°C 6 時間 incubate する。その後 5N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 ml を加え発生した放射性 CO<sub>2</sub> を Geiger-Müller

Gasflow counter で測定した。つづいて反応液に Ba(OH)<sub>2</sub> を加えて pH 7 に戻し、次の Carrier を加えた。すなわちナイアシン 2 μ. moles, NAD 4 μ. moles, ピコリン酸 2 μ. moles, deamido-NMN 6 μ. moles, deamido-NAD 2 μ. moles を加え遠心して沈澱を除いた。透明な上清を蟻酸型 Dowex 1×8 カラム (直径 0.8 cm, 長さ 29 cm) に通し吸着させたのち 100 ml の水でカラムを洗滌し次に蟻酸 Concentration Gradient 法<sup>4)7)</sup>により 10 ml 宛の fraction に分画した。分画装置としては東洋科学 Co. 製の Automatic fraction collector T<sub>0</sub> 2 型を用いた。すなわち mixing chamber には 0.01 N 蟻酸を入れ、最初に 0.05 N 300 ml, 次に 0.4 N 300 ml, さらに 2 N 500 ml の蟻酸を mixing chamber 通してカラムから溶出した。10 ml 宛の溶出液は spectrophotometer で 260 mμ の吸光度を測定し、さらに Geiger-Müller Gasflow counter で放射能を測定した。

2) Niacin ribonucleotide の Paper-chromatography による同定

前述の 10 ml 宛の fraction に分画したもののうち、deamido-NMN fraction に相当する部分を集め減圧濃縮し、さらに deamido-NMN を加えて ascending paper-chromatography を行なつた。Whatman, No. 1 paper を用い、1 M ammonium acetate-ethanol (3:7), isobutyric acid-ammonia-H<sub>2</sub>O (66:1.7:33, pH 3.8) を溶媒とした。spot はマナスル紫外ランプ (UV-LSI) (Manaslu 化学工業) を用いて検出した。

さらに spot をそれぞれ溶出して放射能を Geiger-Müller Gasflow counter で測定した。

3) 種々抗酸菌の無細胞抽出液による放射性キノリン酸より放射性 CO<sub>2</sub> の生成

数種の抗酸菌の無細胞抽出液の蛋白量 0.5 mg, 放射性キノリン酸 52.6 μ. moles (14,000 c. p. m.), PRPP 200 μ. moles, MgCl<sub>2</sub> 100 μ. moles, 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 400 μ. moles, 全量 1.5 ml を改良 Thunberg 管に入れ、37°C 6 時間 incubate した。5N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 ml を加えて発生した CO<sub>2</sub> を 0.5N-NaOH でとらえ、Geiger-Müller Gasflow counter で放射能を測定した。

4) Whole cell と無細胞抽出液による放射性キノリン酸より放射性 CO<sub>2</sub> 生成の差

人型菌 H37Ra の無細胞抽出液蛋白量 0.5 mg と Whole cell 6 mg を前述の反応液中で反応させ放射性 CO<sub>2</sub> の生成をみた。

5) ビタミン活性による Bioassay

Leuconostoc mesenteroides (ATCC 9135) は遊離のナイアシンのみ反応し、キノリン酸, Nicotinamide, deamido-NMN, NMN, deamido-NAD, NAD などは反応しない<sup>8)</sup>。

Deamido-NMN を 0.1 N-NaOH で 100°C 30 分加水

分解すると遊離のナイアシンが分解されてで Leuconostoc mesenteroides の発育を促進する。種々抗酸菌の無細胞抽出液, 蛋白量 2 mg, キノリン酸 2  $\mu$ . moles, PRPP 4  $\mu$ . moles, MgCl<sub>2</sub> 100 m $\mu$ . moles, 燐酸緩衝液 4  $\mu$ . moles, 計 3 ml を 37°C 6 時間 incubate し加水分解する前の Leuconostoc mesenteroides に対する発育促進作用と加水分解後の促進作用から生成された deamido-NMN の量を定量した。

6) 3-Hydroxyanthranilic acid (3 HOAA) よりのナイアシン生成の有無

3 HOAA 2  $\mu$ . moles に, 上記のキノリン酸よりの deamido-NAD 生成と同じ条件で PRPP, MgCl<sub>2</sub> を加え, さらに ATP 5  $\mu$ . moles を加えて, 37°C 6 時間 incubate し, 0.1 N-NaOH で 100°C 30 分加水分解し Leuconostoc mesenteroides で定量した。

7) 合成液体培地に発育した抗酸菌のナイアシン産生 Sauton 液体培地に種々の抗酸菌をうえ (Slow growers は3週間, rapid growers は1週間) 培地中に産生されたナイアシンを Leuconostoc mesenteroides を使用して定量した。

8) C<sup>14</sup>-ナイアシンより deamido-NMN の生成の有無 C<sup>14</sup>-ナイアシン 100 m $\mu$ . moles を, C<sup>14</sup>-キノリン酸からの deamido-NMN の生成と同じく, 菌の無細胞抽出液蛋白量 2 mg, PRPP 600 m $\mu$ . moles, 燐酸緩衝液 600 m $\mu$ . mole, MgCl<sub>2</sub> 100 m $\mu$ . mole, 全量 3 ml を Thunberg 改良試験管に入れ, 37°C 6 時間 incubate した。その後 C<sup>14</sup>-キノリン酸より deamido-NMN の生成の操作と同じく, Dowex 1 カラムに吸着させさらに蟻酸 concentration gradient 法により溶出し fraction に分画し deamido-NMN の同定を行なった。

さらに非放射性のナイアシンを C<sup>14</sup>-キノリンより deamido-NMN 生成のさいに加えて放射性 CO<sub>2</sub> の生成が阻害されるか否かをみた。

#### IV 結果

1) C<sup>14</sup>-キノリン酸より deamido-NMN および放射性 CO<sub>2</sub> の生成

表 1, 図 1 にみられるごとく, C<sup>14</sup>-キノリン酸 162 m $\mu$ . moles (39,600 c. p. m.) を人型結核菌 H37Ra の無細胞抽出液と 37°C で incubate し, Dowex 1 蟻酸型に吸着させ, さらに蟻酸 concentration gradient 法で溶出すると, 放射能を示す物質は, carrier として加えたキノリン酸および deamido-NMN と一致した。ピコリン酸, NAD, Niacin, deamido-NAD の場所には放射能は検出されなかつた。また C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> は 1,320 c. p. m. で, 32.2 m $\mu$ . moles 生成された。生成された deamido-NMN は 5,100 c. p. m. すなわち 24.9 m $\mu$ . moles であつた。

さらに deamido-NMN の分画部を減圧濃縮して pa-

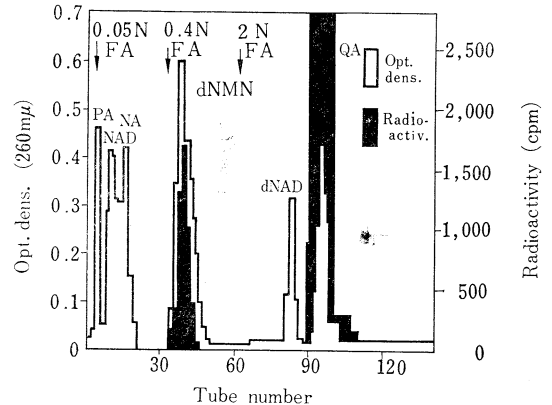
Table 1. Distribution of Radioactivity of Enzymic Products from Quinolinic Acid-C<sup>14</sup> by Human Tubercle Bacilli H37Ra  
The details of the experimental conditions were described in the text

Product	Radioactivity c. p. m.	Amount of product m $\mu$ . moles	Amount recovered %
CO <sub>2</sub>	1,320	32.2*	19.9
Niacin	0	0	0
Niacin-ribonucleotide	5,100	24.9	15.4
Deamido-NAD	0	0	0
NAD	0	0	0
Quinolinic acid	30,160	123.1	75.9
Total	36,580		92.5

\* The value was calculated from the specific activity of 1 carbon which was one-sixth of that of original substrate.

\*\* The value was calculated from the specific activity per 5 carbons. Five carbons out of the original C<sup>14</sup>-carbons should remain in the products.

Fig. 1. Column Chromatography of the Reaction Products of Quinolinic Acid-C<sup>14</sup> With Extract of Human Tubercle Bacilli H37Ra



The mixing chamber contained 300 ml of 0.01 N formic acid, followed by 300 ml of 0.05 N, 300 ml of 0.4 N and 500 ml of 2 N formic acid.

PA; picolinic acid, NA; niacin, dNMN; niacin ribonucleotide, dNAD; deamido-NAD, QA; quinolinic acid.

per-chromatography を行なうと, 表 2 に示すごとく放射能を示す物質は deamido-NMN と一致して, C<sup>14</sup>-キノリン酸から生成された deamido-NMN であることが確認された。

2) ビタミン活性によるキノリン酸より deamido-NMN の生成の定量

H37Raの無細胞抽出液とキノリン酸とより生成されるものは deamido-NMN のみで他の niacin nucleotides は生成されない。したがってキノリン酸より生成された deamido-NMN を加水分解してナイアシンを遊離させたのち Leuconostoc mesenteroides で遊離のナイアシンを定量すると等モルで deamido-NMN が定量される。

この方法で完全系と完全系から PRPP, キノリン酸を

Table 2. Identification of Reaction Products by Paperchromatography

Samples	Rf values (paperchromatography)	
	IM ammonium acetate-ethanol (3:7)	Isobutyric acid-ammonia-H <sub>2</sub> O(66:1.7:33 pH 3.8)
Product	0.23	0.38
Product after alkaline hydrolysis	0.75	0.89
Niacin ribonucleotide	0.23	0.38
Nicotinamide ribonucleotide	0.27	0.55
Deamido-NAD	0.11	0.34
NAD	0.13	0.48
Niacin	0.75	0.89
Nicotinamide	0.80	0.94
Quinolinic acid	0.41	0.53
Picolinic acid	0.67	0.83

Table 3. Niacin Ribonucleotide Formation from Quinolinic Acid by Human Tubercle Bacilli H37Ra

Reaction system	Niacin ribonucleotide formed (m $\mu$ moles)	
	Before hydrolysis	After hydrolysis
Complete	3	91
Complete minus PRPP	2	3
Complete minus quinolinic acid	1	2
Complete with boiled enzyme	0	0

The reaction mixture contained same as Fig. 2 (phosphate buffer, pH 7.0)

除去した系および加熱した抽出液で反応を起こさせると、表3に示すごとく、キノリン酸 2  $\mu$ . moles より完全系では加水分解後は、遊離のナイアシンは 91 m $\mu$ . moles 生成されるが、PRPP を除いた系では 3 m $\mu$ . moles、キノリン酸を欠いた系では 1 m $\mu$ . moles、加熱した Extract を用いた系では全然生成されない。すなわち H37Ra の無細胞抽出液がキノリン酸より deamido-NMN を生成する反応は PRPP dependent であつた。

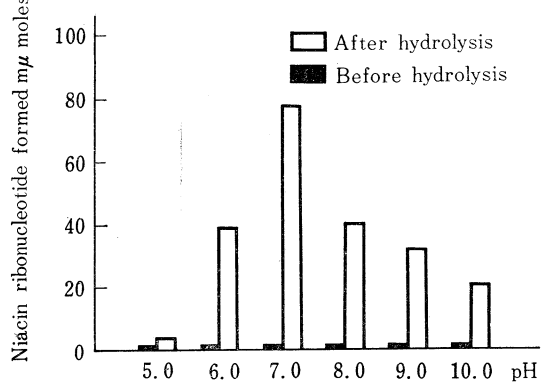
3) キノリン酸より deamido-NMN 生成のさいの pH, 温度および isoniazid の影響

図2に示すごとく酸性よりもむしろアルカリ性側でキノリン酸からの deamido-NMN の生成が多いが、もつとも多いのは pH 7.0 であつた。次に表4に示すごとく加熱すると 60°C 5 分では非加熱に比べ 21.8% に落ち 100°C 1 分加熱すると活性は 0 となつた。

isoniazid の影響をみるために 0.1  $\mu$ . mole および 1.0  $\mu$ . mole を加えてキノリン酸からの deamido-NMN 生成をみたが全然影響されなかつた。

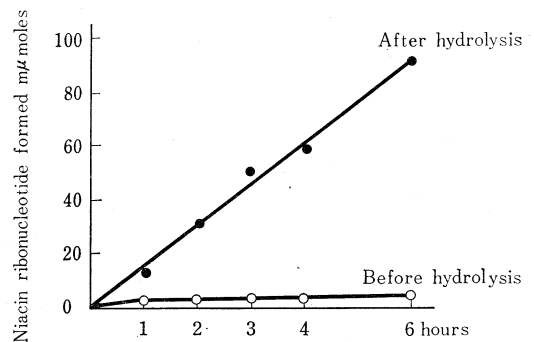
時間ごとにキノリン酸からの deamido-NMN 生成をみると、図3に示すごとく、6時間 incubate しても遊

Fig. 2. Influence of pH on Niacin Ribonucleotide Formation from Quinolinic Acid by Human Tubercle Bacilli H37Ra



The reaction mixture contained 2  $\mu$ . moles of quinolinic acid, 4  $\mu$ . moles of PRPP, 100 m $\mu$ . moles of MgCl<sub>2</sub>, 4  $\mu$ . moles of buffer (pH 5.0 to pH 10.0) and 2 mg of charcoal treated extract in a total volume of 3.0 ml. Incubated at 37°C for 6 hours. Free niacin was determined using *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 9135) before and after hydrolysis (0.1N NaOH, 100°C 30 min.) of the reaction product.

Fig. 3. Niacin Ribonucleotide Formation from Quinolinic Acid by Human Tubercle Bacilli H37Ra



The reaction mixture contained same as Fig. 2 (phosphate buffer, pH 7.0)

Table 4. Influence of Heat on Niacin Ribonucleotide Formation from Quinolinic Acid by Human Tubercle Bacilli H37Ra

Temperature of heat	Time of heat	Niacin ribonucleotide formed (m $\mu$ moles)
Not heated		89.5(100%)
60°C	5 min.	19.5(21.8%)
100°C	1 min.	0(0%)

The reaction mixture contained same as Fig. 2 (phosphate buffer, pH 7.0).

離のナイアシンはほとんど生成されなかつたが deamido-NMN は直線的に生成が多くなつた。

4) 種々の抗酸菌の無細胞抽出液によるキノリン酸からの deamido-NMN の生成

種々の抗酸菌の無細胞抽出液を用いてキノリン酸から

Table 5. Evolution of Radioactive CO<sub>2</sub> from Quinolinic Acid-C<sup>14</sup>

Species	Strains	C <sup>14</sup> O <sub>2</sub> evolved	
		c. p. m.	μμ moles
M. tuberculosis	H37Rv	506	12.5
	H37Ra	432	10.5
M. avium	11755	46	1.0
Photochromogen	p-8	48	1.0
Scotochromogen	p-6	30	0.7
Nonphotochromogen	100616	30	0.7

The reaction mixture contained 57.2 mμ moles of quinolinic acid-C<sup>14</sup> (14,000 c. p. m.), 200 mμ moles of PRPP, 100 mμ moles of MgCl<sub>2</sub>, 400 mμ moles of Phosphate buffer (pH7.0) and 0.5 mg of charcoal treated bacterial extract in a total volume of 1.5 ml. Incubated at 37° for 6 hours.

Table 6. Niacin Ribonucleotide Formation from Quinolinic Acid by Mycobacteria

Species	Strains	Niacin ribonucleotide formed (mμ moles)	
		Before hydrolysis	After hydrolysis
M. tuberculosis	H37Rv	3	94
	H37Ra	3	91
M. bovis	BCG	1	42
M. avium	11755	0	6
Photochromogen	p-8	0	4
Scotochromogen	p-6	0	10
Nonphotochromogen	100616	0	8
Rapid grower	Sato	0	0
Nonpathogenic mycobacteria	M. phlei	0	4
	M. smegmatis	0	4

The reaction mixture contained 2 μ moles of quinolinic acid, 4 μ moles of PRPP, 100 mμ moles of MgCl<sub>2</sub>, 4 μ moles of phosphate buffer, pH 7.0, and 2 mg of charcoal treated bacterial extract in a total volume of 3.0 ml. Incubated at 37° for 6 hours. Free niacin was determined using *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 9135) before and after hydrolysis (0.1 N NaOH, 100° 30 min.) of the reaction mixture.

の deamido-NMN の生成をみた。すなわち C<sup>14</sup>-キノリン酸よりの放射性 CO<sub>2</sub> の生成を測定し、また *Leuconostoc mesenteroides* で生成された deamido-NMN を加水分解して遊離したナイアシンを測定したところ、表5にみられるごとく C<sup>14</sup>-キノリン酸 57.2 mμ moles からの放射性 CO<sub>2</sub> の生成は、人型結核菌がもつとも多く 12.5 mμ moles および 10.5 mμ moles であつたが、鳥型菌および非定型抗酸菌では少なく 1 mμ moles 以下で、人型菌の約 1/10 以下であつた。Whole cell と無細胞抽出液のキノリン酸よりの deamido-NMN の生成を H37Ra でみると、無細胞抽出液はキノリン酸の脱炭酸を行なつて放射性 CO<sub>2</sub> を生成したが Whole cell では全然放射性 CO<sub>2</sub> が生成されなかつた。すなわちキノリン酸は抗酸菌の細胞膜を通過できないものと考えられる。

Table 7. Free Niacin Production by Mycobacteria in Liquid Culture Medium (Sutton's medium)

	Strains	Free niacin (μg/mg of wet bacilli)
M. tuberculosis	H37Rv	17.6
	H37Ra	16.8
M. bovis	BCG	3.2
M. avium	11755	0.7
Photochromogen	p-8	0.6
Scotochromogen	p-6	0.8
Nonphotochromogen	100616	0.4
Rapid growers	Sato	0.2
Nonpathogenic mycobacteria	M. phlei	0.2
	M. smegmatis	0.3

Determined by bioassay using *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 9135)

*Leuconostoc mesenteroides* で測定したキノリン酸からの deamido-NMN の生成は、表6にみられるごとく、やはり人型菌 H37Rv がもつとも多く 2 μ moles のキノリン酸より 94 mμ moles の deamido-NMN が生成された。BCG は 42 mμ moles で人型菌の次に多く、鳥型菌、非定型抗酸菌および非病原抗酸菌は非常に少なく、10 mμ moles 以下で人型結核菌の 1/9 以下であつた。

5) 合成液体培地における抗酸菌のナイアシンの産生  
表7にみられるごとく人型結核菌 H37Rv がもつとも多く菌湿量 1 mg 当り 17.6 μg で、BCG は 3.2 μg で、他の抗酸菌は 1 μg 以下であつた。

6) 3-Hydroxyanthranilic acid よりの deamido-NMN 生成の有無

deamido-NMN の生成はキノリン酸からの生成と同じように反応液を加水分解し *Leuconostoc mesenteroides* を使用する方法で測定し、また 3-HOAA oxidase をも測定した。菌の無細胞抽出液では *Leuconostoc mesenteroides* を用いる方法でも deamido-NMN は全然みられず、また 3-HOAA oxidase 活性<sup>9)</sup>も H37Ra には観察されなかつた。

7) C<sup>14</sup>-ナイアシンより deamido-NMN 生成の有無

H37Ra の無細胞抽出液で C<sup>14</sup>-キノリン酸から deamido-NMN を生成する場合と同じ処理で、C<sup>14</sup>-ナイアシンを H37Ra の無細胞抽出液と incubate し、Dowex 1 で吸着させ、蟻酸 Concentration gradient で分画溶出したが、C<sup>14</sup>-deamido-NMN の生成はみられなかつた。また H37Ra の無細胞抽出液と C<sup>14</sup>-キノリン酸を反応させたさい非放射性ナイアシンを加えても生ずる放射性 CO<sub>2</sub> の量には関係なかつた。

## V 考 案

動物では犬、ネズミなどはトリプトファンを利用できるが、細菌では *Neurospora crassa* および *Xantho-*

nas pruni がトリプトファンを利用することが知られている。

ことに *Neurospora crassa* ではその変異菌を使つて Tryptphan-niacin pathway が明らかにされており、*Xanthomonas pruni* では最近 Wilson and Henderson ら<sup>10</sup>が放射性 Tryptphan, 3 HOAA, キノリン酸, ナイアシンを使用して Tryptphan-niacin pathway を追求し、放射性 Tryptphan, 3 HOAA, ナイアシンが菌体内によく取り入れられていることを報告している。

一方 *E. coli* では Yanofsky<sup>11</sup>は Tryptphan がナイアシンの前駆体にならないことを報告し、Ortega and Brown ら<sup>12</sup>は *E. coli* においてナイアシンの産生は Glycerol, 4-carbon dicarboxylic acid, ribose および adenine の存在下にもつとも多かつたといっている。

さらに Imsande<sup>13</sup>, Imsande and Pardee<sup>14</sup>らは *E. coli* においてナイアシンより NAD にいたる pathway を酵素学的に追求している。すなわちナイアシンより deamido-NMN, deamido-NAD を経て NAD にいたる経路を確かめかつその生成は Nicotinic acid mononucleotide pyrophosphorylase によつて regulate されることを認めている。

その他一般の細菌でもナイアシンを発育に必要とする種が多く、ナイアシンは NAD の前駆体と考えられていたが、最近西塚、早石<sup>4</sup>はラットの肝細胞抽出液でキノリン酸が deamido-NAD の前駆体であることを証明し、つづいて Andreoli ら<sup>5</sup>は *E. coli* でもキノリン酸が deamido-NMN の前駆体であることを追試している。

抗酸菌はその栄養源としてトリプトファン、ナイアシンを利用しないまたはナイアシンを加えても発育がより良好となることはない。アスパラギン、グリセリンおよび少量の無機物よりなる簡単な培地によく発育してナイアシンを培地中に産生する。ナイアシンテストはそのナイアシン産生に関して抗酸菌のうち人型結核菌がもつともナイアシン産生が多いことを利用したものである。結核菌のナイアシン産生については Mothes<sup>15</sup>は DL-aspartic acid-4-C<sup>14</sup> を用いて培地をつくり、それに BCG を植えてラベルされた DL-aspartic acid の carboxyl 基がナイアシンの carboxyl 基に入ることをみている。また Rio-Estrada ら<sup>16</sup>は結核菌の浮遊液にアスパラギン、グルタミン酸などのアミノ酸またはグリセリン、コハク酸などを加えてナイアシンの生成をみている。

山根<sup>16</sup>および宮川<sup>17</sup>は人型菌、牛型菌、鳥型菌を合成液体培地に表面培養し培養濾液および菌体のナイアシン、ニコチンアミドおよび NAD を Bioautogram によつて分別定量している。最近、西塚、早石<sup>4</sup>はラットの肝 homogenate 上清で C<sup>14</sup>-3-Hydroxyanthranilic acid を加えたところ deamido-NMN が産生されたが、その中間代謝産物としてキノリン酸生成が認められ、ナ

イアシンは生成されなかつた。deamido-NMN はその後 deamido-NAD, NAD に合成されるので NAD の前駆物質はキノリン酸でありナイアシンではないことを報告している。われわれの実験によつても、抗酸菌ことにナイアシンを多量に培地中に産生する人型結核菌は、キノリン酸から deamido-NMN を産生する能力が大きいことが証明された。この現象は抗酸菌のうち人型菌のみがとくに多くナイアシンを産生するという事実と平行する。ナイアシンは抗酸菌においてはラット肝と同じく deamido-NMN の前駆体となりえない。Moat ら<sup>20</sup>はキノリン酸はナイアシンの前駆体とならないと報告している。しかしこの実験は Whole cell で行なっているが、キノリン酸はわれわれの実験によると抗酸菌の菌体内に入らないので必ず無細胞抽出液を用いねばならない。

抗酸菌のナイアシン生合成はアスパラギン、4C-カルボン酸よりキノリン酸を生じ、deamido-NMN を経て deamido-NAD, さらに NAD にいたるものと考えられる。結核菌 H37Rv の菌体内 NAD は菌湿量 1g 当り 252  $\mu$ g であり<sup>21</sup>, *M. phlei* の NAD は 123  $\mu$ g である<sup>22</sup>。ところが結核菌のキノリン酸からの deamido-NMN の合成は *M. phlei* の 20 倍も活性が強く、培地中に産生される遊離のナイアシンも 20 倍以上あるのでナイアシンの生合成のどこかの経路で分解が行なわれているものと推定されるが、分解経路についてはただいま実験中である。

## 結 論

抗酸菌の Nicotinamide adenine dinucleotide 生成の経路を種々の抗酸菌の無細胞抽出液を使用して実験した結果、

1) 抗酸菌には Tryptphan pathway はなく、また 3-Hydroxyanthranilic acid は抗酸菌によつて分解利用されない。

2) 抗酸菌ではキノリン酸から Niacin ribonucleotide が生成される。その反応には 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate が必要である。

3) ナイアシンは Niacin ribonucleotide 生成のさいの中間体とはならない。

4) キノリン酸からの Niacin ribonucleotide の生成は抗酸菌のうち人型結核菌がもつとも多く、次が牛型結核菌でその他の非定型抗酸菌、非病原抗酸菌は非常に少なく、抗酸菌のナイアシン産生量に比例していた。

C<sup>14</sup>-キノリン酸を供与された京都大学医学部医化学教室早石修教授、西塚泰美助教授に深甚な感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) Konno, K., Kurzmann, R. and Bird, K. T.: Amer. Rev. Tuberc., 75 : 529, 1957.
- 2) Konno, K.: Science, 124 : 985, 1956.
- 3) Konno, K., Kurzmann, R., Bird, K. T. and Sbarra, A.: Amer. Rev. Tuberc., 77 : 669, 675, 1958 : 79 : 810, 1959.
- 4) Nishizuka, Y. and Hayaishi, O.: J. Biol. Chem., 238 : 3369, 1963.
- 5) Andreoli, A. J., Ikeda, M., Nishizuka, Y. and Hayaishi, O.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 12 : 92, 1963.
- 6) Methods in Enzymology, Vol. III, p. 450, Academic Press Inc., New York, 1957.
- 7) Preiss, J. and Handler, P.: J. Biol. Chem., 233, 488, 1958.
- 8) The Biochemistry of B. Vitamins, Reinhold Publishing Co., New York, U. S. A., p. 606, 1950.
- 9) Stevens, C. O. and Henderson, C. M.: J. Biol. Chem., 234 : 1188, 1959.
- 10) Wilson, R. G. and Henderson, L. M.: J. Bact., 85 : 221, 1963.
- 11) Yanofsky, C.: J. Bact., 68 : 577, 1954.
- 12) Ortega, M. V. and Brown, G. M.: J. Biol. Chem., 235 : 2939, 1960.
- 13) Imsande, J.: J. Biol. Chem., 236 : 1494, 1961.
- 14) Imsande, J. and Pardee, A. B.: J. Biol. Chem., 237 : 1305, 1962.
- 15) Mothes, E., Gross, D., Schütte, H. R. and Mothes, K.: Naturwissenschaften, 48 : 623, 1961.
- 16) 山根績・宮川コウ・松谷豊: 抗酸菌病研究雑誌, 14 : 164 ; 170, 1959.
- 17) 宮川コウ: 抗酸菌病研究雑誌, 14 : 313, 1960.
- 18) Nakamura, S., Ikeda, M., Tsuji, H., Nishizuka, Y. and Hayaishi, O.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 13 : 285, 1963.
- 19) Rio-Estrada, C. del. and Patino, Humberto : J. Bact., 84 : 871, 1962.
- 20) Moat, A. G. and Albertson, J. N.: Federation Proc., 23 : 528, 1964.
- 21) Gopinathan, K. P., Sirsi, M. and Ramakrishnan, J.: Biochem. J., 87 : 444, 1963.
- 22) Weber, M. M. and Swarts, M. N.: Arch. Biochem. Biophys., 86 : 233, 1960.