

Ethambutol の作用様式

(*Mycobacterium smegmatis* による種々の放射性物質の脂質、核酸、蛋白へのとりこみに対する Ethambutol の効果)

東村道雄・水野松司

国立療養所中部病院

受付 昭和 42 年 5 月 18 日

MODE OF ACTION OF ETHAMBUTOL*

Effect of Ethambutol on the Incorporations of Several Isotopic Compounds into Lipids, Nucleic Acids and Protein by *Mycobacterium Smegmatis*

Michio TSUKAMURA and Shoji MIZUNO

(Received for publication May 18, 1967)

Forbes et al.¹⁾ observed that ethambutol labelled with ¹⁴C was adsorbed by *Mycobacterium smegmatis*, and the phenomenon was observed also in *M. tuberculosis*²⁾. Gale & McLain³⁾ stated that no nuclear zone was evident electron-microscopically in the cells of *M. smegmatis* treated by ethambutol. Forbes et al.⁴⁾ stated, furthermore, that the incorporations of phosphate-³²P into the DNA and RNA and of sulfate-³⁵S into the protein by *M. smegmatis* were inhibited by ethambutol. Thus, it was suggested that ethambutol acts on the RNA metabolism and inhibits the protein synthesis. The present authors have observed in this study on the effects of ethambutol on the incorporations of two organic acids, acetate-1-¹⁴C and alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C, and of four amino acids, glycine-1-¹⁴C, glutamic acid-1-¹⁴C, leucine-1-¹⁴C and methionine-³⁵S, into lipids, nucleic acids and protein of *M. smegmatis*. The results revealed that ethambutol inhibits the nucleic acid synthesis and the protein synthesis of this organism, and supported the hypothesis of Forbes et al.⁴⁾.

Methods

Mycobacterium smegmatis, strain Jucho, was used throughout. Five-day-old cultures growing in the Sauton medium were collected by centrifugation and washed three times in saline. The washed cells were incubated in 0.033 M phosphate buffer (pH 7.1) containing a radioactive compound without or with 20 μ g/ml ethambutol. Immediately after preparing the reaction mixtures and after incubation at 37°C for 6 hours and for 24 hours, the cells were centrifuged down keeping the temperature at 4 to 5°C, washed five times and fractionated according to the procedure of Schneider⁵⁾.

The radioactivity of trichloroacetic acid (TCA)-soluble, lipid, nucleic acid and protein fractions were measured by a gas flow counter.

The TCA-soluble fraction was extracted with ether to remove the TCA and concentrated to the amount of 1/10 under reduced pressure, and the protein fraction was hydrolyzed in 6 N HCl by heating at 100°C for 24 hours and the concentrated to the amount of 1/10 by heating at 100°C. The concentrates were developed by paper chromatography (Ascending system; solvent

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Chita-gun, Aichi-ken, Japan.

I=tertiary butanol+formic acid+water (75+15+15) and solvent II=n-butanol+acetic acid (4+1); Toyo filter paper, No. 50). The paper chromatograms were measured for their radioactivity by a Nihon-Musen's automatic paper chromatogram scanner, and the location of amino acids was made visible by the ninhydrin reagent.

Results

The results obtained are shown in Tables 1 to 6.

It was demonstrated by paper chromatographic studies that acetate-1-¹⁴C was converted to glutamic acid, which was found in the TCA-soluble fraction, and incorporated into the protein as glutamic acid. Alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C was also converted to glutamic acid, which was found in the TCA-soluble fraction, and then incorporated into the protein as radioactive glutamic acid. Glycine-1-¹⁴C was converted to serine, which was demonstrated in the TCA-soluble fraction, and incorporated into the protein. Glutamic acid-1-¹⁴C and leucine-1-¹⁴C were incorporated into the protein as glutamic acid and leucine themselves, respectively. Methionine-³⁵S was found in the TCA-soluble fraction as methionine sulfone and in the protein fraction as cystine and methionine sulfone.

Conclusion

(1) The incorporation of glycine-1-¹⁴C into nucleic acids of *Mycobacterium smegmatis* was inhibited in the presence of ethambutol.

(2) The incorporations of acetate-1-¹⁴C, alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C, glycine-1-¹⁴C, glutamic acid-1-¹⁴C, leucine-1-¹⁴C and methionine-³⁵S into the protein were inhibited in the presence of ethambutol.

(3) Among the six radioactive compounds tested, the radioactivity of acetate-1-¹⁴C and methionine-³⁵S were found in lipids significantly. The incorporation of acetate-1-¹⁴C was not inhibited in the presence of ethambutol, but the incorporation of methionine-³⁵S into lipids was inhibited.

(4) Under a similar condition, the viability of the cells was not lost significantly after exposure to the same concentration of ethambutol for 24 hours.

Ethambutol [D-2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol] (EB) の作用機構については現在、次のことが知られている。Forbes et al.¹⁾ は *Mycobacterium smegmatis* (No. 607 株) が, ethambutol-¹⁴C を吸蔵することを観察し, 同時に EB が glycerol 存在下での酸素吸収を抑制することから, EB は菌体内にとりいれられて, ある metabolite の合成を阻止するのであると述べた。EB-¹⁴C が菌に吸蔵されることは, Kuck et al.²⁾ により *M. tuberculosis* (H₃₇Rv) でも観察された。その後 Gale & McLain³⁾ は電子顕微鏡による形態観察の結果, EB の作用によつて核様物質が消失することを認めた。ついで Forbes et al.⁴⁾ は, EB の存在で, *M. smegmatis* による phosphate-³²P の DNA および RNA へのとりこみが低下することおよび sulfate-³⁵S の protein へのとりこみが阻害されることを認め, さらに RNA/protein の量比が低下することから, EB は核酸代謝とくに RNA 代謝を阻害するものであろうと報告した。

以上の Forbes およびその共同研究者の報告から,

EB の作用機構には核酸代謝阻害ないし蛋白合成阻害が関係していると想像されるので, 放射性有機酸およびアミノ酸を tracer として, 核酸, 蛋白合成に対する EB の作用を検討することとした。

実験材料および方法

使用菌株は *Mycobacterium smegmatis* 獣調株で, 200 ml Erlenmeyer flask に入れた 50 ml の変法 Sauton 培地 (asparagine の代わりに sodium glutamate 使用) に 37°C 5 日間培養した菌を, ガラス玉コルベンで振盪して均一化したのち, 0.85% NaCl で 3 回洗滌したのち, 0.85% NaCl に浮遊し, これと放射線物質を含む 0.067 M phosphate buffer (pH 7.1) の等量とを混合して使用した (phosphate buffer の終末濃度は 0.033 M)。

生菌数の測定は, 通常の dilution plating method により, 各希釈液ごとに 5 枚の plates を使用して行なつた。各 plate への接種量は 0.1 ml で, 培地は Sauton agar を用いた。集落数は 37°C, 5 日培養後に数えた。生

菌数は3希釈系を用いて測定した平均値として示した。

次の放射性物質を用いた。いずれも The Radiochemical Centre, Amersham, England の製品で、() に specific radioactivity を示した。

- (1) Sodium acetate-1-¹⁴C (0.148 mc/mg)
- (2) Sodium 2-ketoglutarate-5-¹⁴C (0.0161 mc/mg)
- (3) Glycine-1-¹⁴C (0.105 mc/mg)
- (4) DL-Glutamic acid-1-¹⁴C (0.103 mc/mg)
- (5) DL-Leucine-1-¹⁴C (0.055 mc/mg)
- (6) L-Methionine-³⁵S (1.20 mc/mg)

これらの isotopic compounds のおのおのを、前記の phosphate buffer に加え、EB なしまたは EB 終末濃度 20 μg/ml の条件で 37°C に培養した。isotopic compound の添加直後、6時間後および 24 時間後に、反応混液 (4.0 ml) をただちに冷やして、以後 4~5°C の温度で遠心、洗滌を 4 回繰返した。洗滌液の種類は各表に示した。洗滌後の菌体は Schneider 法で分画した。得られた TCA 可溶分、脂質分、核酸分、蛋白分の 4 分画から、0.2 ml の samples をとつて、放射能を 2π gas flow counter (神戸電気製、乾燥装置つき automatic sample changer) で測定した。得られた counts/minute (cpm) に、{各画分の容量 (ml) × 5} を乗じて、各画分の total counts/minute を算出し、これから time 0 の samples で得られた値を減じて表に示した。

以上の測定に使用した残りの TCA 画分は、ether で 5 回抽出して TCA を除き、減圧濃縮して約 1/10 量とした。また蛋白画分は、6N HCl で 100°C 24 時間水解したのち、100°C で加熱濃縮して約 1/10 量とした。これらの濃縮液を東洋濾紙 No. 50 の paper strips にのせて、次の 2 種の溶媒を用いて、上昇法で paper chromatography を行なつた。

(溶媒 I) = (tertiary butanol + formic acid + water)
= (75 + 15 + 15)

(溶媒 II) = (n-butanol + acetic acid) = (4 + 1)

得られた paper chromatograms の放射能は、日本無線製 automatic paper chromatogram scanner (slit 3 mm; recording size 1/4; recording 300 mm/hour; range 1,000 counts/5 seconds) で記録した。その後、paper chromatograms に ninhydrin 液を噴霧して、amino acid spots を呈色させ、先の放射能 peak の scanning から得られた Rf と対比した。authentic amino acids はそのまま paper chromatography にかけて、Rf を測定した。

実験結果

1. Acetate-1-¹⁴C のとりこみに対する EB の効果
Acetate-1-¹⁴C の脂質へのとりこみは、EB によつて阻害されることなく、かえつて増加した。一方核酸およ

び蛋白へのとりこみは、EB 添加によつて阻害され、24 時間後には対照を 100% とすると、EB 添加時のとりこみはそれぞれ 68% および 64% となつた。(表 1)

Table 1. Effect of Ethambutol on the Incorporation of Acetate-1-¹⁴C by *Mycobacterium smegmatis* (strain Jucho)

Reaction mixture*	Time of incubation	Radioactivity in fraction (c. p. m.)			
		Fraction			
		TCA-soluble	Lipid	Nucleic acid	Protein
Control	6 hours	17,640	16,250	3,580	8,800
Ethambutol	6 hours	14,820	22,146	2,840	7,480
Control	24 hours	27,790	29,095	5,300	35,600
Ethambutol	24 hours	15,720	44,632	3,600	22,830

* One hundred milligrams (wet weight) of washed cells were suspended in 4.0 ml. of 0.033 M phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 μc./ml. sodium acetate-1-¹⁴C and 1.25 μg./ml. sodium acetate without or with 20 μg./ml. ethambutol. After incubation, the cells were centrifuged down and washed four times with 0.1% sodium acetate solution.

2. Alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C のとりこみに対する EB の効果

Alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C の脂質へのとりこみは僅少であつた。このとりこみも EB によつて阻害されない。しかし核酸および蛋白へのとりこみは EB によつて阻害され、とりこみ量は 24 時後に対照の 54% および 40% であつた。(表 2)

Table 2. Effect of Ethambutol on the Incorporation of Alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C by *Mycobacterium smegmatis* (strain Jucho)

Reaction mixture*	Time of incubation	Radioactivity in fraction (c. p. m.)			
		Fraction			
		TCA-soluble	Lipid	Nucleic acid	Protein
Control	6 hours	59,000	2,117	3,940	4,440
Ethambutol	6 hours	51,580	2,255	3,540	3,680
Control	24 hours	72,660	4,372	12,520	52,970
Ethambutol	24 hours	59,540	3,987	6,800	21,500

* One hundred milligrams (wet weight) of washed cells were suspended in 4.0 ml. of 0.033 M phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 μc./ml. sodium 2-ketoglutarate-5-¹⁴C without or with 20 μg./ml. ethambutol. After incubation, the cells were washed with distilled water four times.

3. Glycine-1-¹⁴C のとりこみに対する EB の効果

Glycine-1-¹⁴C の核酸へのとりこみは、EB との接触 6 時間後には阻害されなかつたが、24 時間後には著明に阻害され、対照の 35% におちた。蛋白へのとりこみも、ほぼ同一経過をとり、24 時間後に対照の 51% となつた。(表 3)

4. Glutamate-1-¹⁴C のとりこみに対する EB の効果

Table 3. Effect of Ethambutol on the Incorporation of Glycine-1-¹⁴C by *Mycobacterium smegmatis* (strain Jucho)

Reaction mixture*	Time of incubation	Radioactivity in fraction (c. p. m.)			
		Fraction			
		TCA-soluble	Lipid	Nucleic acid	Protein
Control	6 hours	4,060	578	3,460	6,650
Ethambutol	6 hours	6,080	770	5,340	8,960
Control	24 hours	4,060	1,127	27,700	57,230
Ethambutol	24 hours	1,780	950	9,320	29,390

* Ninety milligrams (wet weight) of washed cells were suspended in 4.0 ml. of 0.033 M phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ glycine-1-¹⁴C and 1.25 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ glycine without or with 20 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ ethambutol. After incubation, the cells were washed with 0.1% glycine four times.

Glutamic acid-1-¹⁴C は主として蛋白にとりこまれるが、このとりこみは EB との接触 6 時間後にはあまり阻害されないが、24 時間後には著明に阻害された。24 時間後の EB 存在下での蛋白へのとりこみ量は、対照の 71% であった。(表 4)

Table 4. Effect of Ethambutol on the Incorporation of Glutamic Acid-1-¹⁴C by *Mycobacterium smegmatis* (strain Jucho)

Reaction mixture*	Time of incubation	Radioactivity in fraction (c. p. m.)			
		Fraction			
		TCA-soluble	Lipid	Nucleic acid	Protein
Control	6 hours	17,540	1,265	1,160	5,070
Ethambutol	6 hours	19,640	632	740	4,360
Control	24 hours	13,640	2,642	2,540	18,580
Ethambutol	24 hours	12,020	1,705	1,360	13,210

* One hundred milligrams (wet weight) of washed cells were suspended in 4.0 ml. of 0.033 M phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ DL-glutamic acid-1-¹⁴C and 1.25 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ sodium DL-glutamate without or with 20 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ ethambutol. After incubation, the cells were washed four times with 0.1% sodium DL-glutamate.

5. Leucine-1-¹⁴C のとりこみに対する EB の効果

Leucine-1-¹⁴C のとりこみに対する EB の効果は、前の glutamic acid-1-¹⁴C の場合とよく似ている。Leucine-1-¹⁴C の蛋白へのとりこみに対する阻害も 24 時間後に著明となり、とりこみ量は対照の 61% であった。核酸にも僅少ながらとりこまれ、これも EB によつて阻害を受けた。(表 5)

6. Methionine-³⁵S のとりこみに対する EB の効果

Methionine-³⁵S は主として TCA 可溶分、脂質分、蛋白分の 3 画分にとりこまれた。脂質および蛋白へのとりこみに対する阻害は、すでに 6 時間後に著明で、24 時間後にはさらに著明となった。EB との接触 24 時間後

Table 5. Effect of Ethambutol on the Incorporation of DL-leucine-1-¹⁴C by *Mycobacterium smegmatis* (strain Jucho)

Reaction mixture*	Time of incubation	Radioactivity in fraction (c. p. m.)			
		Fraction			
		TCA-soluble	Lipid	Nucleic acid	Protein
Control	6 hours	780	1,209	660	9,210
Ethambutol	6 hours	1,100	632	660	7,330
Control	24 hours	1,312	2,319	3,780	50,090
Ethambutol	24 hours	980	2,892	1,900	30,430

* Ninety milligrams (wet weight) of washed cells were suspended in 4.0 ml. of 0.033 M phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ DL-leucine-1-¹⁴C and 1.25 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ L-leucine without or with 20 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ ethambutol. After incubation, the cells were washed four times with 0.1% L-leucine.

のとりこみ量は、脂質および蛋白でおのおの対照の 7% および 30% となった。(表 6)

Table 6. Effect of Ethambutol on the Incorporation of Methionine-³⁵S by *Mycobacterium smegmatis* (strain Jucho)

Reaction mixture*	Time of incubation	Radioactivity in fraction (c. p. m.)			
		Fraction			
		TCA-soluble	Lipid	Nucleic acid	Protein
Control	6 hours	23,600	9,900	3,400	10,990
Ethambutol	6 hours	21,440	1,352	1,600	7,910
Control	24 hours	59,840	25,520	8,000	81,910
Ethambutol	24 hours	33,960	1,705	1,580	25,000

* One hundred milligrams (wet weight) of washed cells were suspended in 4.0 ml. of 0.033 M phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ L-methionine-³⁵S and 1.25 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ L-methionine without or with 20 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ ethambutol. After incubation, the cells were washed four times with 0.1% L-methionine.

Table 7. Viability of Nonproliferating Cells of *Mycobacterium smegmatis* (strain Jucho) Exposed to Ethambutol

Medium*	Time of incubation	Number of viable units/0.1 ml #
Control	0 hours	(95.5 \pm 9.4) $\times 10^5$
Ethambutol	0 hours	(94.0 \pm 8.5) $\times 10^5$
Control	24 hours	(131.0 \pm 44.4) $\times 10^5$
Ethambutol	24 hours	(86.8 \pm 15.1) $\times 10^5$

* Ninety milligrams (wet weight) of washed cells were suspended in 4.0 ml. of 0.033 M phosphate buffer (pH 7.1) containing 5.0 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ sodium DL-glutamate with or without added ethambutol (final concentration: 20 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$) and incubated at 37°C.

Based on triplicate plate counts (Medium used for counting was Sauton agar medium).

7. 菌の発育能力に対する EB の効果

上記のとりこみ実験とほぼ同じ条件で、同濃度の EB

に接触させた場合に、EB が菌の発育能力をうばうかどうかをみるために、表7の実験を行なった。EB 接触 24 時間後に 0.85% NaCl で 1 回洗滌して生菌単位を測定してみると (対照も同じ操作)、表7に示すごとく、24 時間後にも菌は発育能力を保持し、対照との間に有意差は認められなかつた。したがって上記の条件では、菌はなお発育能力を保持しており、少なくとも発育能力に関するかぎり、菌はまだ可逆的な段階にあるといえる。したがって、上記の実験で観察された種々の放射能物質のとりこみ阻害は菌の死滅によるものではないといえる。

8. Paper chromatographic studies

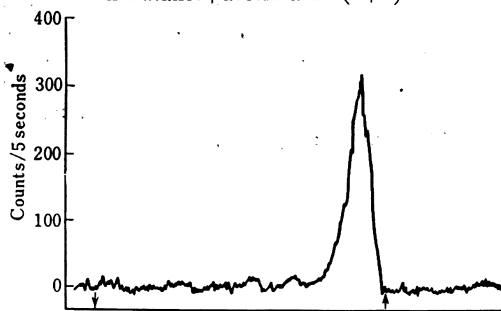
(1) Acetate-1-¹⁴C とりこみ

TCA 可溶分でも、蛋白分でも、放射能の主要 peak は一つで、Rf は溶媒 I で 0.48~0.50、溶媒 II で 0.09 で、glutamic acid に一致した。したがって acetate-1-¹⁴C は alpha-ketoglutarate を経て glutamic acid にかえられ、蛋白にとりこまれるものと思われる。

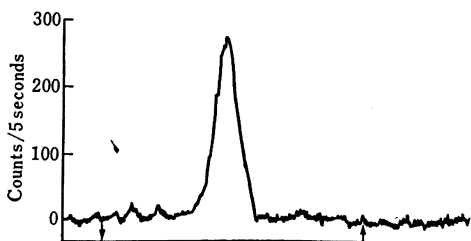
(2) Alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C とりこみ

TCA 可溶分でも蛋白分でも放射能の主要 peak は一つで、Rf は溶媒 I で 0.50~0.52、溶媒 II で 0.09~0.11 で、glutamic acid に一致した。alpha-ketoglutarate は glutamic acid にかえられて、蛋白にとりこまれると思われる。(図1)

Fig. 1. Radioactivity in Paper Chromatograms of the Trichloro-acetic Acid-soluble Fraction of the Cells Incubated with Sodium Alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C for 6 Hours n-butanol+acetic acid (4+1)



tertiary butanol+formic acid+water (75+15+15)



(3) Glycine-1-¹⁴C とりこみ

TCA 可溶分および蛋白分ともに放射能の主要 peak

は一つで、Rf は溶媒 I で 0.35~0.36、溶媒 II で 0.08 で serine に一致する。glycine は serine にかえられて、蛋白にとりこまれるものと思われる。

(4) Glutamic acid-1-¹⁴C とりこみ

TCA 可溶分および蛋白分ともに放射能の主要 peak は一つで、Rf は溶媒 I で 0.48~0.50、溶媒 II で 0.10 で、glutamic acid に一致した。glutamic acid は大部分そのままの形で蛋白にとりこまれると思われる。

(5) Leucine-1-¹⁴C とりこみ

TCA 可溶分および蛋白分ともに放射能の主要 peak は一つで、Rf は溶媒 I で 0.82~0.84、溶媒 II で 0.24 で、leucine に一致した。leucine はそのままの形で蛋白にとりこまれると思われる。

(6) Methionine-³⁵S とりこみ

TCA 可溶分の主要 peak は一つで、Rf は溶媒 I で 0.35~0.36、溶媒 II で 0.05、この peak は methionine sulfone に一致する。蛋白分の主要 peak は 2 つで、Rf は溶媒 I でそれぞれ 0.095~0.10 および 0.35~0.36、溶媒 II では両者合して one peak となり原点から Rf 0.05 の付近の太い山となつた。この 2 つの放射能の peaks (溶媒 I) はそれぞれ cystine および methionine sulfone と一致する。methionine は cystine および methionine として蛋白にとりこまれると思われる。

考 察

本報での観察時間は、6 時間と 24 時間で、一般細菌の実験時間と比較すると長いが、被検菌の generation time は至適条件で 3.0~3.5 時間であるから、実験時間はそれぞれ 2 および 8 generation time に相当し、とくに長いとはいえない。とくに 24 時間 EB と接触したのちでも、菌はなお viability を保持しているのだから、観察された放射性物質のとりこみ阻害が、菌の死滅による菌の全般的機能停止によるものでないことは明らかである。

Forbes et al.⁴⁾ は前に *M. smegmatis* を用いて、EB が ortho-phosphate-³²P の RNA および DNA 画分へのとりこみを阻害すること、および sulfate-³⁵S の蛋白画分へのとりこみを阻害することを観察し、かつ EB 接触により RNA/protein 量比が減少することを認めた。彼らは以上の所見から EB が RNA 代謝を阻害することを想像した。われわれの今回の実験では、glycine-1-¹⁴C の核酸画分へのとりこみが EB によつて阻害されることが示されたので、核酸合成過程に阻害の起こることが想像される。また glutamic acid-1-¹⁴C, leucine-1-¹⁴C, methionine-³⁵S などのアミノ酸の蛋白へのくみこみも EB によつて阻害されることが示された。すなわち EB は菌の核酸および蛋白合成過程を阻害することが示された。

また *M. smegmatis* は acetate-1-¹⁴C および methionine-³⁵S をよく脂質画分にとりこむ。しかし alpha-ketoglutarate はあまりとりこまれない。このことは、われわれの前の観察結果⁶⁾と一致する。acetate-1-¹⁴C の脂質へのとりこみは阻害されないが、methionine-³⁵S のとりこみは阻害される。

なお acetate-1-¹⁴C または alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C を添加したさいには、TCA 可溶分に見出される放射能の主要 peak は glutamate であることは実験成績に示したとおりである。そして蛋白画分の主要放射性 peak も glutamate であるから (paper chromatography の実験), acetate-1-¹⁴C または alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C は、まず glutamate-¹⁴C に変わったあとで蛋白画分にとりこまれるものと思われる。したがって EB がこれらの放射性物質の蛋白へのとりこみを阻害する点としては次の3つの可能性が考えられる。すなわち (1) acetate → glutamic acid または alpha-ketoglutarate → glutamic acid の過程, (2) glutamic acid の蛋白へのとりこみの過程, または (3) この両方の過程。われわれの paper chromatography の実験は厳密に定量的に行なわれたものではないが、control と EB との両方の samples の濃縮比が可及的同じになるようにして、同量の sample 量を paper chromatograms にかけて。その結果得られた TCA 可溶分の glutamic acid の放射性 peak は、6時間後、EB の存在下でも判然と認められ、Control と大差がなかつた。一方蛋白画分の glutamic acid の peak は、6時間後は両者ともに小さく、24時間後には EB の存在で著明に低かつた。この結果は表1および2に示された定量的実験の結果と一致するものであつた。以上の所見を参照すると、acetate-1-¹⁴C または alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C の蛋白へのとりこみ阻害は、おそらく glutamic acid 形成の過程で起こるものではな

く、glutamic acid が蛋白にとりこまれる過程で起こるものと思われる。glutamic acid-1-¹⁴C 自体を用いる実験でも、glutamic acid-1-¹⁴C の蛋白へのとりこみが阻害されるので、この結果も上述の考えと一致する。

Glycine-1-¹⁴C のとりこみについても、glycine-1-¹⁴C から serine-¹⁴C への変換過程は阻害されず、serine-¹⁴C の蛋白へのとりこみが阻害されるものと想像される。

結 論

Ethambutol は、*Mycobacterium smegmatis* (獣調株) による glycine-1-¹⁴C の核酸へのとりこみを阻害した。

Ethambutol は glutamic acid-1-¹⁴C, leucine-1-¹⁴C, methionine-³⁵S, glycine-1-¹⁴C, acetate-1-¹⁴C および alpha-ketoglutarate-5-¹⁴C の蛋白へのとりこみを阻害した。

Ethambutol は methionine-³⁵S の脂質へのとりこみを阻害したが、acetate-1-¹⁴C の脂質へのとりこみを阻害しなかつた。

上記のとりこみ阻害は、菌が発育能力を失わない段階で観察された。

文 献

- 1) Forbes, M., Kuck, N. A. & Peets, E. A. : J. Bacteriol., 84 : 1099, 1962.
- 2) Kuck, N. A., Peets, E. A. & Forbes, M. : Amer. Rev. Resp. Dis., 87 : 905, 1963.
- 3) Gale, G. R. & McLain, H. H. : J. Bacteriol., 86 : 749, 1963.
- 4) Forbes, M., Kuck, N. A. & Peets, E. A. : J. Bacteriol., 89 : 1299, 1965.
- 5) Schneider, W. C. : J. Biol. Chem., 161 : 293, 1945.
- 6) Tsukamura, M. & Tsukamura, S. : Jap. J. Tuberc., 11 : 14, 1963.