

Ethambutol の作用様式 (続報)

東村道雄・水野松司

国立療養所中部病院

受付 昭和 46 年 2 月 20 日

FURTHER STUDIES ON THE MODE OF ACTION OF ETHAMBUTOL*

Michio TSUKAMURA and Shoji MIZUNO

(Received for publication February 20, 1971)

Gale & McLain (J. Bact., 86: 749, 1963) observed that nuclear zone of *M. smegmatis* disappeared electron-microscopically under the presence of ethambutol, and Forbes et al. (J. Bact., 89: 1299, 1965) reported that the incorporations of phosphate-³²P into nucleic acids and of sulfate-³⁵S into proteins of *M. smegmatis* were suppressed by ethambutol. These findings suggested that ethambutol may affect nucleic acid synthesis. Recently, Tsukamura & Mizuno (Kekkaku, 42: 437, 1967) observed that the incorporations of glycine-1-¹⁴C into nucleic acids and of several radioactive amino acids into proteins of *M. smegmatis* were inhibited by ethambutol. It was also suggested that the formation of glutamic acid from acetate-1-¹⁴C was not inhibited but the incorporation of radioactive glutamic acid into proteins was inhibited by ethambutol. Furthermore, it was shown that the incorporation of methionine-³⁵S into lipids was inhibited by ethambutol. This last finding suggested that ethambutol may affect not only nucleic acid synthesis but also lipid synthesis. The present study has been designed to observe changes appearing primarily under the presence of ethambutol.

The strain used was *Mycobacterium smegmatis* strain Jucho. The methods used were described previously (Tsukamura & Mizuno: Kekkaku, 42: 437, 1967). Fractionation was made according to Schneider (J. Biol. Chem., 161: 293, 1945).

The results obtained are shown in figures 1 to 4, and are summarized in Table.

It was confirmed that the lipid metabolism in *M. smegmatis* is disturbed by ethambutol. The effect was observed as early as 3 hours after contact with the drug, and the incorporation of acetate-1-¹⁴C into lipid fraction was increased significantly. After this change, decrease of incorporation of glycine-1-¹⁴C and acetate-1-¹⁴C into nucleic acid fraction and decrease in incorporation of glycine-1-¹⁴C, acetate-1-¹⁴C, leucine-1-¹⁴C and methionine-³⁵S into protein fraction were observed. The effect of ethambutol on lipid metabolism was observed also as decrease in incorporation of methionine-³⁵S into lipids.

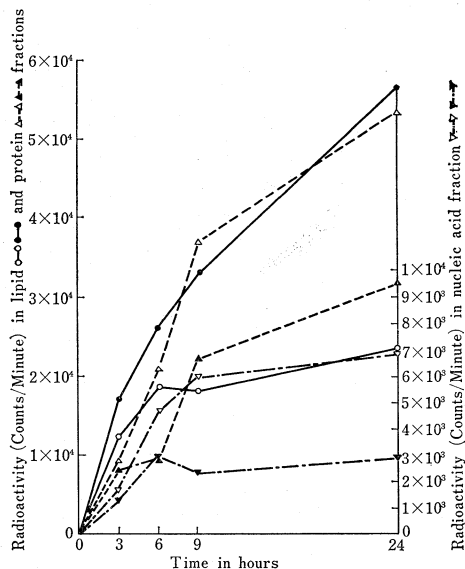
In conclusion: Ethambutol inhibited lipid, nucleic acid and protein metabolisms in *M. smegmatis*. Among these effects, disturbance in lipid metabolism appeared at first, which was observed as an increase in incorporation of acetate-1-¹⁴C into lipids. Inhibition of incorporation of methionine-³⁵S into lipids also was confirmed. It is noteworthy that ethambutol inhibits lipid metabolism in *M. smegmatis*.

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Aichi-ken 474 Japan.

Ethambutol [D-2, 2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol] (EB) の作用機構については次の報告がある。Forbes et al.¹⁾ は ethambutol-¹⁴C が *Mycobacterium smegmatis* に吸蔵されることおよび EB が glycerol 存在下の酸素吸収を抑制することを観察した。次いで Gale and McLain²⁾ は EB の作用によつて *M. smeg-*

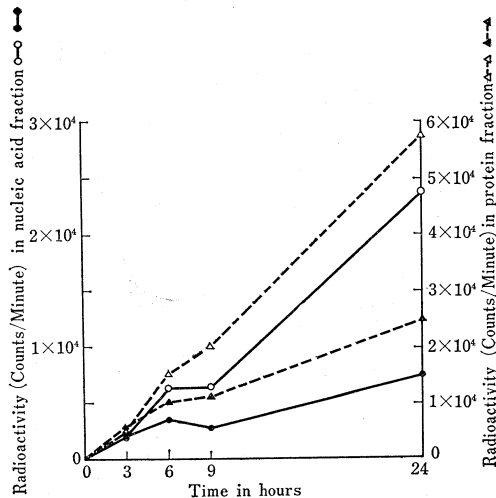
matis の核様物質が消失することを電顕的に観察した。Forbes et al.³⁾ はその後 *M. smegmatis* による phosphate-³²P の核酸へのとりこみが EB によつて阻害されることを観察した。東村・水野⁴⁾ は *M. smegmatis* による glycine-¹⁴C, glutamic acid-¹⁴C, leucine-¹⁴C, acetate-¹⁴C, alpha-ketoglutarate-¹⁴C および methionine-³⁵S のとりこみに対する EB の効果を観察した結果, glycine-¹⁴C の核酸へのとりこみ, および glutamic acid-¹⁴C, leucine-¹⁴C, glycine-¹⁴C,

Fig. 1. Radioactivity from Sodium Acetate-¹⁴C in Lipid, Nucleic Acid and Protein Fractions of *M. smegmatis* under the Presence or Absence of Ethambutol



Two hundreds and sixty milligrams (wet weight) of cells were suspended in 4.0 ml of 0.033 M. phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 μ c/ml sodium acetate-¹⁴C and 0.625 μ g/ml sodium acetate with or without 20 μ g/ml ethambutol. After incubation, the cells were washed once with 0.1% sodium acetate solution and then three times with distilled water and fractionated according to the procedure of Schneider. The figure indicates radioactivity from 52 mg dry weight of cells. Open : Control (without ethambutol). Closed : Ethambutol.

Fig. 2. Radioactivity from Glycine-¹⁴C in Nucleic Acid and Protein Fractions of *M. smegmatis* under the Presence or Absence of Ethambutol



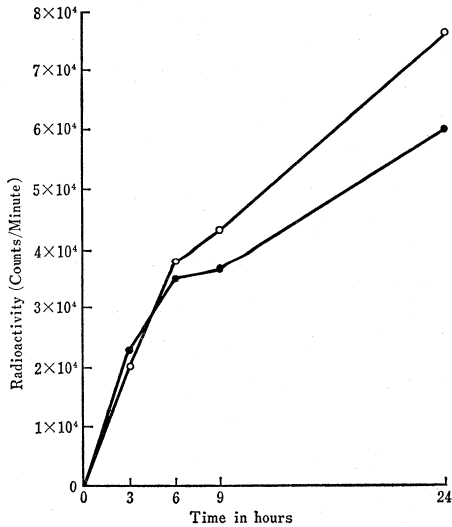
Three hundreds milligrams (wet weight) of washed cells were suspended in 4.0 ml of 0.033 M. phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 μ c/ml glycine-¹⁴C and 0.625 μ g/ml glycine with or without 20 μ g/ml ethambutol. After incubation, the cells were washed once with 0.1% glycine and then three times with distilled water and fractionated according to the procedure of Schneider. The figure indicates radioactivity from 60 mg dry weight of cells. Open: Control (without ethambutol). Closed : Ethambutol.

Table. Time Course of Change in Incorporations of Various Radioactive Compounds

		Increase (+) or decrease (-) in uptake under the presence of ethambutol			
		3 hours	6 hours	9 hours	24 hours
Lipids	Uptake of acetate- ¹⁴ C into lipids	+	+	+	+
	Uptake of methionine- ³⁵ S into lipids	no	no	-	-
Nucleic acids	Uptake of glycine- ¹⁴ C into nucleic acids	no	-	-	-
	Uptake of acetate- ¹⁴ C into nucleic acids	no	-	-	-
Proteins	Uptake of glycine- ¹⁴ C into proteins	no	-	-	-
	Uptake of acetate- ¹⁴ C into proteins	no	-	-	-
	Uptake of leucine- ¹⁴ C into proteins	no	no	-	-
	Uptake of methionine- ³⁵ S into proteins	no	no	-	-

+: Increase in uptake - : Decrease in uptake no: No significant change in uptake

Fig. 3. Radioactivity from L-leucine- ^{14}C in Protein Fraction of *M. smegmatis* under the Presence or Absence of Ethambutol



The cells of 340 milligrams (wet weight) were suspended in 4.0 ml of 0.033 M. phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 $\mu\text{C}/\text{ml}$ L-leucine- ^{14}C and 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-leucine with or without 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethambutol. After incubation, the cells were washed once with 0.1% L-leucine solution and then three times with distilled water and fractionated according to the procedure of Schneider. The figure indicates radioactivity from 68 mg dry weight of cells. Open: Control (without ethambutol). Closed: Ethambutol.

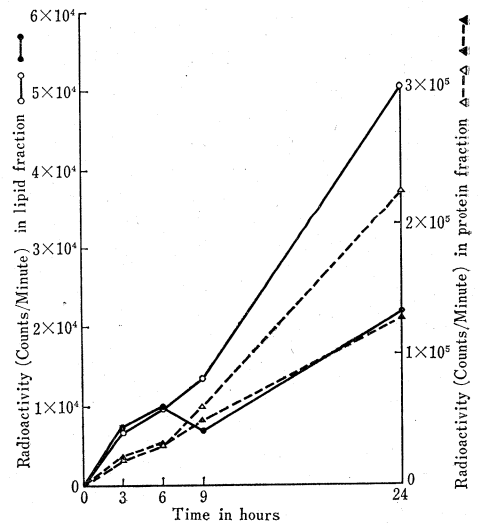
methionine- ^{35}S , acetate- ^{14}C および alpha-ketoglutarate- ^{14}C の蛋白へのとりこみが阻害されることを観察した。この所見は, Forbes et al.³⁾ の所見を支持するものであつたが, 蛋白合成の過程で, acetate からの glutamic acid 形成は阻害されないが, glutamic acid の蛋白へのくみ入れは阻害されることが示唆された。これらの所見のほかにも, methionine- ^{35}S の脂質へのとりこみが阻害されることが注目された。すなわち EB の作用は一義的ではなく多様であることが考えられ, なにが primary effect であるかが問題として残された。そこで今回は, とりこみ阻害が起こる過程を時間的に経過を追つて観察し, いかなる変化が先に惹起されるかをみることにした。

実験方法

被検株として前回と同じく *Mycobacterium smegmatis* 獣調株を用いた。菌液の調製法および実験方法は前報の通りである⁴⁾。今回, 使用した放射性物質は次の通りである。

- Sodium acetate- ^{14}C (specific activity 630 $\mu\text{C}/\text{mg}$);
- Glycine- ^{14}C (specific activity 552 $\mu\text{C}/\text{mg}$);
- L-Leucine- ^{14}C (specific activity 374 $\mu\text{C}/\text{mg}$);
- L-Methionine- ^{35}S (specific activity 956 $\mu\text{C}/\text{mg}$).

Fig. 4. Radioactivity from L-methionine- ^{35}S in Lipid and Protein Fractions of *M. smegmatis* under the Presence or Absence of Ethambutol



Three hundred and twenty milligrams (wet weight) of cells were suspended in 4.0 ml of 0.033 M. phosphate buffer (pH 7.1) containing 2.5 $\mu\text{C}/\text{ml}$ L-methionine- ^{35}S and 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-methionine with or without 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethambutol. After incubation, the cells were washed once with 0.1% L-methionine and then three times with distilled water and fractionated according to the procedure of Schneider. The figure indicates radioactivity from 64 mg dry weight of cells. Open: Control (without ethambutol). Closed: Ethambutol.

いずれも The Radiochemical Centre, Amersham, England 製を用いた。

使用した EB 濃度は 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で, この濃度は殺菌的ではない⁴⁾。分画には Schneider 法⁵⁾を用いた。

実験成績

Acetate- ^{14}C の脂質, 核酸, 蛋白各画分へのとりこみ, glycine- ^{14}C の核酸および蛋白画分へのとりこみ, L-leucine- ^{14}C の蛋白画分へのとりこみ, および L-methionine- ^{35}S の脂質および蛋白画分へのとりこみに対する EB の効果を, それぞれ図 1, 2, 3, 4 に示し, 表に一括した。

EB の存在でのとりこみを, EB なしの対照と比較すると, 最も早期に認められたのは, acetate- ^{14}C の脂質へのとりこみ増加で, 3 時間後にすでに認められた(図 1 および表 1)。この脂質への acetate- ^{14}C のとりこみ増加は 24 時間後でも著明に観察され, EB の存在で脂質代謝の異常が起こることが考えられた。脂質代謝の異常は, 前報にも記載したごとく, methionine- ^{35}S の脂質へのとりこみ低下としても観察されたが, この変化は acetate- ^{14}C のとりこみ亢進よりも後に出現した。

次に出現したのは、glycine-1-¹⁴C および acetate-1-¹⁴C の核酸画分へのとりこみ減少で、6時間後に認められた。また glycine-1-¹⁴C および acetate-1-¹⁴C の蛋白画分へのとりこみ低下も上記の核酸へのとりこみ阻害と同時に認められた。Methionine-³⁵S および leucine-1-¹⁴C の蛋白画分へのとりこみ減少は9時間後に認められた。

考 察

EB の作用機作としては、核酸代謝阻害が注目されているが^{2)~4)}、最近のわれわれの実験では脂質代謝阻害も起こることが分かった⁴⁾。今回の実験では、核酸代謝阻害と脂質代謝阻害のいずれが早く起こるかを比較したが、むしろ脂質代謝阻害のほうが早く起こる成績が得られた。

EB の脂質代謝阻害は、まず acetate-1-¹⁴C の脂質へのとりこみの異常亢進として認められ、次いで methionine-³⁵S の脂質へのとりこみ低下が観察された。

以上の実験成績から、EB の primary effect が脂質阻害であるとただちに結論することはもちろん時期尚早であるが、EB の惹起する作用として脂質代謝阻害も注目されてよいと思われる。EB がまず脂質代謝異常を起こし、これに続いて核酸代謝阻害が起こる可能性も考慮されてよい。

なお前報⁴⁾と今回の結果を比較すると、前報では6時間後と24時間の観察しか行なっていないので、脂質代

謝異常と核酸代謝異常とが同時に観察されている。また前報では、methionine-³⁵S の脂質へのとりこみ阻害と leucine-1-¹⁴C の蛋白へのとりこみ阻害が6時間で観察されているが、本報では9時間後に観察された。本報で作用の発現がやや遅れた原因としては、一般的な実験誤差のほか、今回使用した菌量が前報の約3倍であることが関係しているかもしれない。

結 論

Ethambutol (EB) が、*Mycobacterium smegmatis* の脂質代謝、核酸代謝、蛋白代謝を阻害することが観察された。この中で、むしろ脂質代謝の異常が、核酸代謝の異常よりも早く起こるように思われた。

脂質代謝の異常としては、まず acetate-1-¹⁴C の脂質へのとりこみの異常増加が認められ、次いで methionine-³⁵S の脂質へのとりこみ低下が認められた。

文 献

- 1) Forbes, M., Kuck, N. A. and Peets, E. A. : J. Bacteriol., 84 : 1099, 1962.
- 2) Gale, G. R. and McLain, H. H. : J. Bacteriol., 86 : 749, 1963.
- 3) Forbes, M., Kuck, N. A. and Peets, E. A. : J. Bacteriol., 89 : 1299, 1965.
- 4) 東村道雄・水野松司 : 結核, 42 : 437, 昭 42.
- 5) Schneider, W. C. : J. Biol. Chem., 161 : 293, 1945.