

原 著

Nocardia rubra におけるミコール酸合成に 対する INH の影響

前 倉 亮 治

国立療養所刀根山病院

受付 昭和 59 年 4 月 2 日

EFFECT OF ISONICOTINIC ACID HYDRAZIDE ON MYCOLIC ACID SYNTHESIS IN *NOCARDIA RUBRA*

Ryoji MAEKURA*

(Received for publication April 2, 1984)

The effect of isonicotinic acid hydrazide (INH) on the synthesis of mycolic acids was studied using *Nocardia rubra*. In the growing cells, the incorporation of [1-¹⁴C]-labelled acetate into mycolic acids was inhibited by INH to a greater extent than the incorporation of [1-¹⁴C]-labelled acetate into non-polar fatty acids. In contrast, the incorporation of [1-¹⁴C]-labelled fatty acids (laurate, myristate and palmitate) into mycolic acids and non-polar fatty acids was inhibited by INH to an equal extent. [1-¹⁴C]-labelled stearate was not incorporated into mycolic acids. Pretreatment of the growing cells with INH reduced the activity of the synthesis of meromycolic acids by the enzyme preparation obtained by 55-80% saturation with ammonium sulfate from the crude extracts. Furthermore, this treatment resulted in the shortening of the carbon numbers of fatty acids synthesized by the enzyme preparation obtained by 35-55% saturation with ammonium sulfate, and in a marked increase in myristate as the product. On the other hand, the addition of INH *in vitro* had no significant effect on the synthesis of meromycolic acids by the enzyme preparation (55-80% saturation with ammonium sulfate) from the crude extracts of untreated cells.

Keyword : *Nocardia*, Mycolic acid, Fatty acid synthetase, INH inhibition

キーワード : *Nocardia*, ミコール酸, 脂肪酸合成酵素, INH 阻害

緒 言

ヒドラジット (INH) は、現在広く抗結核剤として使用されている薬剤で、細胞壁合成阻害剤として分類され¹⁾、その主な作用機序についてはミコール酸合成の阻害とみなされている²⁾。1979年、Takayamaらは *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 株の無細胞抽出液を用いて標識酢酸の取り込みを検討し、INH のミコー

ール酸合成阻害は、直鎖部分の前駆体であるメロミコール酸の生成を阻害するためであると報告している³⁾。今回、*Nocardia rubra* のミコール酸の radio gas-chromatography による分析に初めて成功し、酢酸ならびに脂肪酸 (炭素数12, 14, 16, 18) のミコール酸各分子種への取り込みについて検討した。また、*N. rubra* の無細胞抽出液を更に硫酸分画により de novo 脂肪酸合成酵素と鎖長伸長酵素とに分離し、各酵素系に対

* From Toneyama National Hospital, 5-1-1, Toneyama, Toyonaka, Osaka 560 Japan.

する INH の影響を検討した。

実験材料および方法

Nocardia rubra の培養：

1% グルコース、1% ペプトン、0.5% 酵母エキス（和光純薬）を含む培地（pH7.0に調整）を用い、30℃、1日間振とう培養を行なった。NADPH、NADH、ATP は、オリエンタル酵母社より購入した。〔1-¹⁴C〕酢酸、〔1-¹⁴C〕ラウリン酸、〔1-¹⁴C〕ミリスチン酸、〔1-¹⁴C〕パルミチン酸、〔1-¹⁴C〕ステアリン酸は、New England Nuclear 社より購入した。diazomethane は、ニトロソメチルウレア（ICN Pharmaceutical 社より購入）より調製した。Silica GelH は Merck 社より、INH は Sigma 社より購入した。

生育菌を使用した酢酸などの脂質画分への取り込み：

N. rubra を30℃で24時間培養後、〔1-¹⁴C〕酢酸あるいは〔1-¹⁴C〕各脂肪酸を培地中に加え、30℃で10分間振とうした後、充分量の酢酸ナトリウムまたは各脂肪酸を添加して反応を止め、直ちに3,000rpm×10分間遠心沈澱を行なって菌体を集め、2回蒸留水で洗浄した。その菌体からクロロホルム-メタノール（2：1）で脂質を抽出し、これを Extractable Lipid (EL) とし、抽出されなかった脂質を Bound Lipid (BL) とした。EL は、ベンゼン-メタノール-H₂SO₄（10：20：1）で直接メチル化を行なった。BL は、25%KOH を含む80%メタノールで鹼化後、diazomethane でメチル化を行なった。抽出された脂肪酸メチルエステルは、薄層クロマトグラフィーに負荷し、ヘキサン-エーテル（4：1）の展開溶媒で展開し、極性の異なる画分に分離した。ミコール酸画分をかき取り、ピリジン存在下 N,O-bis (trimethylsilyl) -trifluoroacetamide (BSTFA)（半井社より購入）によりトリメチルシリル化して後、radio gaschromatography で分析した。

粗酵素液の調製：

湿菌量に対し、4容の20mM リン酸カリ緩衝液（pH7.9）を加えて、懸濁した後、Universal Sonifer Cell Disruptur185（Branson 社製）を用いて、1分30秒間照射を計8回行ない、菌体を破壊した。11,000×g 20分の遠心により未破壊の菌体を除去し、上清を更に75,000×g、40分の遠心を行ない、得られた上清を粗酵素標品（S₂₆）とした。S₂₆に35%飽和になるように硫酸を加え、15分間攪拌後、11,000×g、10分の遠心を行ない、得られた上清に55%飽和になるように再び硫酸を加え15分間攪拌後、11,000×g、10分の遠心を行ない得られた沈澱を100mM リン酸カリ緩衝液（pH7.5、1mM DTT、1mM EDTA を含む）に溶解し、As35-55標品とした。残った上清に更に80%飽和になるように硫酸を加え15分間攪拌後、11,000×g、10分の遠心を行ない、得られた沈澱を100mM リン酸カリ緩衝液（PH7.5、

同上を含む）に溶解して As55-80標品とした。これらを同緩衝液で24時間透析した後、実験に供した。

Radio gaschromatography：

hydrogen flame ionization 検出器を装備したガスクロマトグラフ装置（島津製 GC-6A）と gas proportional counter 894型（Packard 製）を連結して用いた。ミコール酸の分析はガラスカラム（50cm×5mm）に、1.5%OV-1-Chromosorb W（クロマト工業社製）を充填し、カラム温度は250-330℃、3℃/min の昇温法で行なった。長鎖脂肪酸の分析はガラスカラム（70cm×5mm）に、1.5%OV-1-Chromosorb W を充填し、カラム温度は160-300℃、2℃/min の昇温法で行なった。

脂肪酸生成成酵素活性測定法：

反応液は、全容0.5ml中、8.9μM（0.5μCi）〔1-¹⁴C〕酢酸、10mM KHCO₃、5mM MgCl₂、3.6mM ATP、300μM NADPH、300μM NADH、0.1M リン酸カリ緩衝液（pH7.5）と As35-55標品2mg 蛋白を含み、37℃で60分間反応後、0.5ml/25%KOH-80%メタノールで反応を停止。80℃で30分間鹼化して後、6NHCl で酸性化し、遊離脂肪酸をヘキサンで抽出した。ヘキサン層に含まれる放射活性を、液体シンチレーションカウンターで計測し、脂肪酸生成成活性とした。また、更にヘキサンを蒸発風乾して後、脂肪酸を、diazomethane でメチル化し、ヘキサン-エーテル（4：1、v/v）で薄層クロマトグラフィーを行なった。non-polar 画分をプレートからかき取り、クロロホルムで溶出し、radio gaschromatography で分析した。

結果

1. *N. rubra* 生育菌による〔1-¹⁴C〕標識酢酸および種々の脂肪酸の脂質画分への取り込み：

Table 1 に示すようにミコール酸への取り込みは、EL（1.4%）と BL（1.1%）両者ともにラウリン酸が最もよく取り込まれた。一方、ステアリン酸は全く取り込まれなかった。BLにおいて、3-ヒドロキシ酸への酢酸および脂肪酸の取り込みは、殆んど認められなかった。次に各脂肪酸の取り込みにより標識された EL 中のミコール酸の分子種組成を、radio gaschromatography により分析した。Fig. 1 に示すようにラウリン酸の取り込みにより標識されたミコール酸の主たる分子種が炭素数40（C40）であるのに対して、ミリスチン酸は C42、パルミチン酸は C44 と2炭素原子ずつ鎖長の長いミコール酸が主成分となることが注目された。酢酸は C44 を主成分とするミコール酸各分子種へ取り込まれた（Fig. 2a）。

2. *N. rubra* 生育菌による〔1-¹⁴C〕標識酢酸またはミリスチン酸の取り込みに対する INH の影響：
N. rubra は、培養開始後24時間で実験に供するが、

その集菌の1時間前にINH (5 μ g/ml)を添加して培養を継続し、10分間標識酢酸またはミリスチン酸の取り込みを行なわせて後に集菌した。Table 2に示すように、このINH処理により、酢酸の全脂肪酸に対する取り込みは50%阻害を受け、ミコール酸への取り込みも73%阻害された。ミコール酸とミコール酸以外の脂肪酸に対する取り込みの比率はINH処理により約半減し、同処理によってミコール酸への酢酸の取り込みが特異的に減じていることが示された。ミリスチン酸を用いると、INH処理により全脂肪酸への取り込みは45%、ミコール酸への取り込みは54%阻害を受けたが、酢酸の場合と異なり、ミコール酸とミコール酸以外の脂肪酸に対する取り込みの比率は、INH処理により変化を受けなかった。次に、酢酸またはミリスチン酸のミコール酸各分子種への取り込みに対するINHの影響を調べると、酢酸の取り込みは、INH処理によって2炭素原子の鎖長の短縮が認められたが(Fig. 2a)、ミリスチン酸の取り込みは、殆んど影響を受けなかった(Fig. 2a)。Fig. 3aに示すように、酢酸のnon polar脂肪酸各分子種への取り込みは、主に炭素数14, 16, 18の脂肪酸であり、炭素数22以上の長鎖脂肪酸への取り込みは殆んど認められなかった。また、菌体内へ取り込まれた標識ミリスチン酸は、6炭素原子長い脂肪酸にまで鎖長伸長をうけた(Fig. 3b)。

3. 未処理の *N. rubra* の粗酵素標品より調製した硫安分画における酢酸の長鎖脂肪酸(メロミコール酸)への取り込みに対するINHの影響:

N. rubra の粗酵素標品より得たAs55-80標品は、de novo脂肪酸生合成酵素活性を殆んど有していない。同

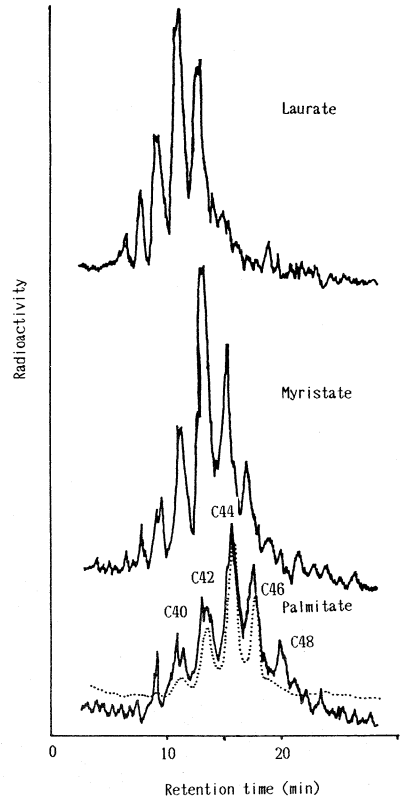


Fig. 1. *N. rubra* 生育菌による〔1-¹⁴C〕標識脂肪酸のミコール酸各分子種への取り込み

Table 1. *N. rubra* 生育菌による〔1-¹⁴C〕標識酢酸ならびに〔1-¹⁴C〕標識脂肪酸の菌体内脂肪酸への取り込み

	Fatty acids from Extractable Lipid			
	Non polar fatty acid	Mycolic acid	Polar fatty acid	Total fatty acid
[1- ¹⁴ C]Acetate	3.2(%)	0.8(%)	0.6(%)	4.6(%)
[1- ¹⁴ C]Laurate	3.9	1.4	1.6	6.9
[1- ¹⁴ C]Myristate	5.5	0.7	0.6	6.8
[1- ¹⁴ C]Palmitate	8.0	0.4	0.5	8.9
[1- ¹⁴ C]Stearate	6.0	0	0.1	6.1

	Fatty acids from Bound Lipid			
	Non polar fatty acid	Mycolic acids	Polar fatty acid	Total fatty acid
[1- ¹⁴ C]Acetate	0.6	0.2	0	0.8
[1- ¹⁴ C]Laurate	1.9	1.1	0.2	3.2
[1- ¹⁴ C]Myristate	1.6	0.2	0	1.8
[1- ¹⁴ C]Palmitate	2.0	0.1	0	2.1
[1- ¹⁴ C]Stearate	0.4	0	0	0.4

標品を用いて NADPH, NADH を補酵素として反応させると、酢酸より炭素数26, 28, 30, 32のミコール酸直鎖部分の前駆体と考えられる長鎖脂肪酸(メロミコール酸)が生成された。反応時に INH (50~200 μ g/ml) を添加しても活性(1.1倍)には殆んど変化なく、反応生成物についても全く影響を認めなかった (Fig. 4)。主に de novo 脂肪酸生合成活性を含む As35-55標品を使用し、INH (50~200 μ g/ml) の存在下で酢酸の取り込みを観察すると、活性には殆んど変化がなかったが、その生成脂肪酸は明らかに鎖長の短縮を受けた (Fig. 5)。

4. INH 処理した *N. rubra* より得た硫安分画標品による酢酸のメロミコール酸への取り込み:

INH 処理した *N. rubra* の As55-80標品における酢酸のメロミコール酸への取り込みは40%阻害を受け、更に、明らかな生成脂肪酸の鎖長の短縮が認められた (Fig. 4b と Fig. 6a)。As35-55標品において、炭素数22以上の脂肪酸への酢酸の取り込みは全く認められず、炭素数14の脂肪酸への取り込みが特に促進された (Fig. 5b と Fig. 6b)。

考 案

生育菌を用いたとき、酢酸とミリスチン酸ではミコール酸への取り込みに対する INH の影響が異なった。即ち、酢酸の取り込みについては、他の脂肪酸よりもミコール酸への取り込みが特異的に阻害された。しかし、ミリスチン酸の取り込みに対して INH は、ミコール酸とそれ以外の脂肪酸と同程度にしかその取り込み

を阻害しなかった。菌体内へ取り込まれた標識脂肪酸が6炭素原子以上鎖長延長を受けないこと、生成されたミコール酸が取り込まれた標識脂肪酸により2炭素原子ずつ鎖長が異なること、また矢野ら⁴⁾の報告した *N. rubra* のミコール酸側鎖部分の炭素数が12, 14, 16であることから、炭素数12, 14, 16の標識脂肪酸はミコール酸の側鎖部分に取り込まれた可能性が示唆され、INH はこの縮合反応には関与しないことが予想された。

ミコール酸の生合成について Takayama ら²⁾³⁾は、無細胞抽出液を用いて INH により長鎖脂肪酸の生成が阻害され、その結果ミコール酸の鎖長が短縮し、生成が阻害されると報告した。そこで、我々は無細胞抽出液

Table 2. *N. rubra* 生育菌による [1-¹⁴C] 標識酢酸ならびに [1-¹⁴C] 標識ミリスチン酸の菌体内脂肪酸への取り込みに対する INH 処理の影響

	Incorporation of radioactivity	
	Non treated cells	INH treated cells
[1- ¹⁴ C] Acetate	(cpm)	(cpm)
Total fatty acid	23.4 \times 10 ⁴	11.7 \times 10 ⁴
Mycolic acid	4.3 \times 10 ⁴	1.2 \times 10 ⁴
MA/non MA	0.43	0.20
[1- ¹⁴ C] Myristate		
Total fatty acid	37.8 \times 10 ⁴	20.8 \times 10 ⁴
Mycolic acid	4.0 \times 10 ⁴	1.8 \times 10 ⁴
MA/non MA	0.14	0.11

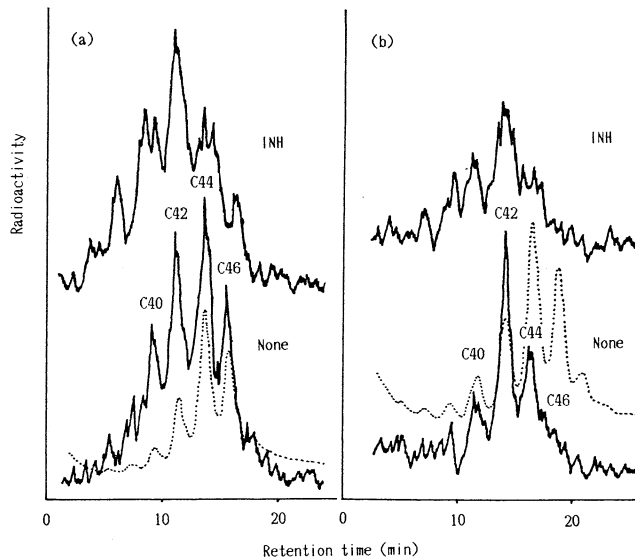


Fig. 2. *N. rubra* 生育菌による [1-¹⁴C] 標識酢酸(a)ならびに [1-¹⁴C] 標識ミリスチン酸(b)のミコール酸各分子種への取り込みに対する INH 処理の影響

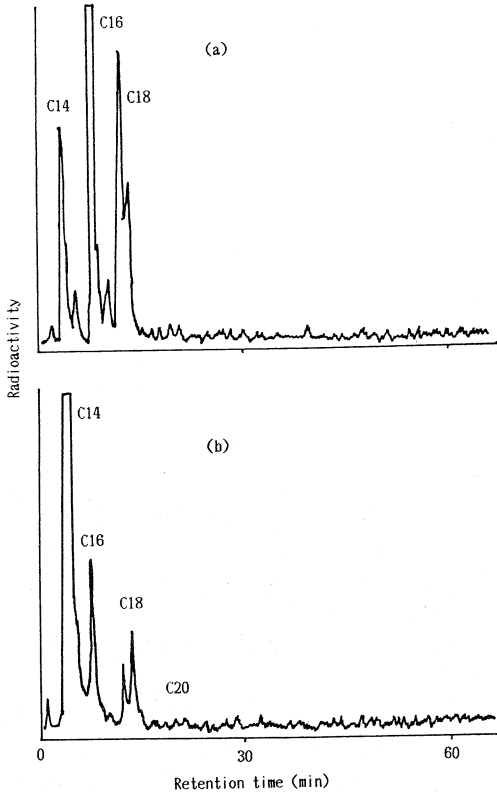


Fig. 3. *N. rubra* 生育菌による〔1-¹⁴C〕標識酢酸 (a)ならびに〔1-¹⁴C〕標識ミスチン酸(b)の nonpolar 脂肪酸各分子種への取り込み

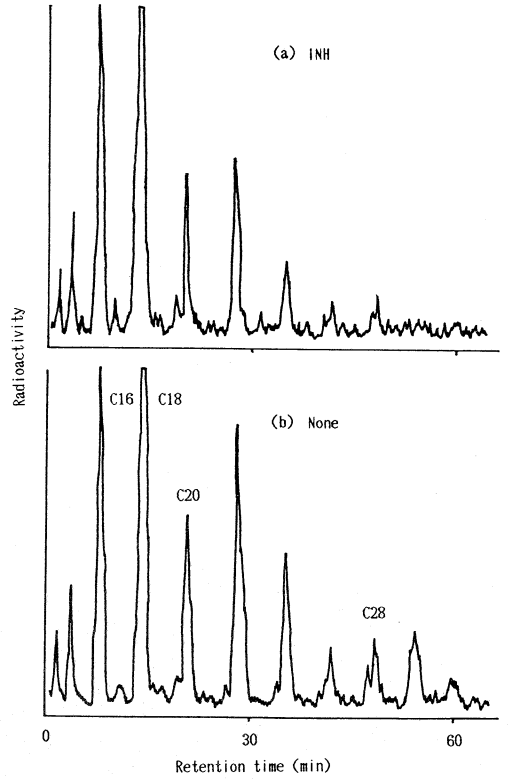


Fig. 5. *N. rubra* 未処理生育菌より調製した As35-55標品による〔1-¹⁴C〕標識酢酸から長鎖脂肪酸合成に対する INH 添加の影響

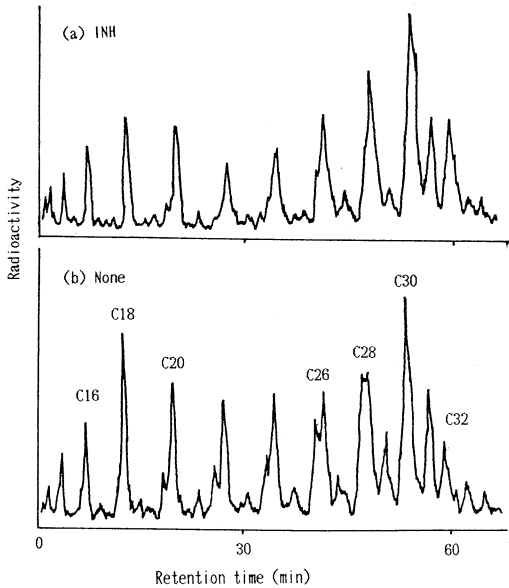


Fig. 4. *N. rubra* 未処理生育菌より調製した As55-80標品による〔1-¹⁴C〕標識酢酸から長鎖脂肪酸合成に対する INH 添加の影響

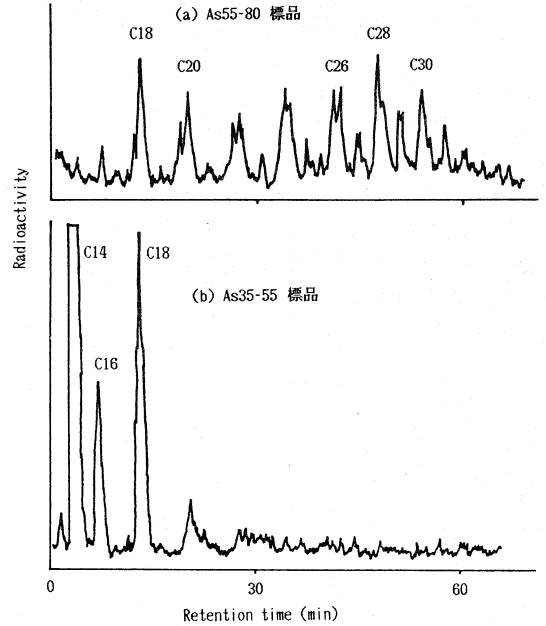


Fig. 6. *N. rubra* INH 処理菌より調製した As55-80 ならびに As35-55標品による〔1-¹⁴C〕標識酢酸から長鎖脂肪酸の合成

を更に分画し、INHの影響を検討した。*N. rubra*の無細胞抽出液より、硫酸分画を用いて鎖長伸長酵素を *de novo* 脂肪酸合成酵素から分離した。鎖長伸長酵素活性のみを含有する As55-80標品を使用して酢酸からメロミコール酸と考えられる長鎖脂肪酸が生成されることを明らかにしたが、この系においてINHの添加は全く無影響であった。しかし、主に *de novo* 脂肪酸合成酵素を含む As35-55標品を用いた系では、INH添加により炭素数26, 28, 30の長鎖脂肪酸生成が阻害を受けた。Takayamaらによれば、ミコール酸の側鎖部分を形成する脂肪酸生成はINHにより促進され、直鎖部分(メロミコール酸)の脂肪酸がINHにより阻害を受けると報告しているが、我々の結果では、メロミコール酸を生成する鎖長伸長系 As55-80標品に対するINHの直接添加効果は全く無影響であった。そこで、INH処理をした *N. rubra* より調製した鎖長伸長系のみを含む As55-80標品を用いたところ、ミコール酸の直鎖部分となる炭素数26, 28, 30, 32のメロミコール酸の生成が抑制(28%)された。一方、主に *de novo* 合成系を含む As35-55標品でも鎖長の短縮が起こり、ミリスチン酸への取り込みが特異的に促進され、炭素数22以上の長鎖脂肪酸は殆んど生成されなかった。細胞レベルにおいてINH処理を行なうことにより、As55-80標品のメロミコール酸生成が抑制を受けたことについて、①INHにより脂肪酸合成酵素の合成が阻害され、その結果としてメロミコール酸の生成が抑制される、②細胞内へ取り込まれたINHの代謝物によりメロミコール酸合成が阻害を受ける、③鎖長伸長系には全く無影響であっても、*de novo* 合成が促進されて、鎖長の短い脂肪酸が数多く生成されたために、鎖長伸長系が primer として利用する脂肪酸の鎖長が短くなり、結果として鎖長伸長系により生成される長鎖脂肪酸の鎖長が短くなる、このためにミコール酸の直鎖部分として利用される炭素数26以上の脂肪酸(メロミコール酸)の生成が抑制を受け、結果的にミコール酸の生成も阻害を受ける、などが考察された。

結 語

Nocardia rubra を用いて、INHのミコール酸生成に対する影響を検討した。菌体への〔1-¹⁴C〕標識酢酸の取り込みは、INH処理によりミコール酸の生成が特異的に阻害されたが、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸のミコール酸への取り込みは、他の脂肪酸への取り込みと同程度の阻害しか受けなかった。また、ステアリン酸はミコール酸には取り込まれなかった。INH処理をした菌体から調製した硫酸55-80%飽和画分によるメロミコール酸の生成は阻害を受けた。また、同じくINH処理した菌体より調製した硫酸35-55%飽和画分を用いると、生成脂肪酸の鎖長が短縮し、特にミリスチン酸の生成が促進された。一方、未処理の菌体から調製された硫酸55-80%飽和画分を用いた場合、メロミコール酸の生成は、INHの添加により全く影響を受けなかった。

文 献

- 1) 戸井田一郎：抗結核薬の作用機序，臨床医，7，7，1981.
- 2) Kuni Takayama 他：Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*, J. Lipid Research, 16, 308, 1975.
- 3) Davidson LA and Takayama K: Isoniazid inhibition of the synthesis of mono unsaturated long-chain fatty acids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, Antimicrob Agents Chemother, 16, 1979.
- 4) Ikuya Yano 他：Separation and analysis of molecular species of mycolic acids in *Nocardia* and related taxa by gas chromatography mass spectrometry, Biomedical Mass Spectrometry, 5. 1. 1978.