

スルフォンアミド誘導体によつて撰択される細菌の代謝変異株について

大阪大学微生物病研究所 教授 藤 野 恒 三 郎

I

アミノ酸やビタミン類を与えられなくとも増殖できる prototrophic *Enterobacteriaceae* を、アミノ酸の豊富な培地に、スルフォンアミド誘導体の量をだんだん高めながら継代培養するとき、スルフォンアミド誘導体に対して高い抵抗性をもつと同時に親株とは違つたアミノ酸代謝をいとなむ変異株の集団を分離できる事実について、ここ数年間に行われた藤野・中田・高木・西野・中村・上保・石神・菅・谷川・吉田らの協同研究の成果の概要をまとめて紹介いたします。

DOMAGK⁽¹⁾ (1935) が Prontosil を発表して以来スルフォンアミド誘導体はかなり長い間、医学界の最先端を進んできましたが、今日では抗生物質に首位を奪われた観があります。しかしスルファミンによく似た構造をもつパラアミノ安息香酸が、常数比をもつてスルフォンアミド剤の抗菌力に拮抗する事実に出発して、代謝拮抗物質の考え方—中でも「競争的拮抗」と名附けられる新しい考え方の基盤がつくられました (WOODS⁽²⁾ (1940), FILDES⁽³⁾ (1940))。この意味からスルフォンアミド剤は研究室に於て今日でも興味をもたれる訳であります。

II

Salmonella enteritidis 1891 をスルファビリジンの量を高めながらカゼイン トリプトファン・グルコース培地に継代培養をつづけたとき、第 102 代以後の継代株は親株とは違つてアミノ酸のない培地では増殖できなくなりました。スルファチアツオールを用いた実験では第 42 代以後に於て同じ結果が得られました。この変異株の要求するアミノ酸はメチオニンであり、メチオニン以外のアミノ酸は勿論のこと各種細菌ビタミン類も亦一切無効であります。かくしてスルファビリジンとスルファチアツオールによつてメチオニン要求性変異株 (Methionine-less mutant; Methionine auxotroph) の純粹な集団が撰択されたと言えます⁽⁴⁾。この事実を直面してその生物学的意義について調べているうちに、KOHN and HARRIS⁽⁵⁾ (1942) が、*E. coli* とスルファミンを用いて同様な結果をあげていることを知りました。この KOHN and HARRIS の現象は私達にとつては実に興味ぶかいものではありましたが、何故かわが国の研究者には無視されて、私の知る限りではどの綜説

にもとりあげられなかつたのであります。その後私達はスルファミン スルファダイアジンをうい *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aerobacter aerogenes* と菌種をかえ、培地の窒素源をかえて調べた結果、培地中にメチオニンがふくまれる限り、Methionine auxotroph がどの例からも撰択されることを確認できました⁽⁶⁾。この変異株のスルフォンアミド誘導体抵抗性は、普通寒天培地に継代培養するとき徐々に失われてゆきますが、メチオニン要求性は安定であります。又この変異株の培養条件が単純でありますので、生物材料中のメチオニンの定量にこの変異株が利用されます。

III

以上の実験成績に於てパラアミノ安息香酸が何の関係もなかつたので、カゼイン トリプトファン グルコース培地にパラアミノ安息香酸の少量を加えて、スルファチアツオールの量をたかめながら *S. enteritidis* を継代培養するとき、果してどんな成績がみられるでしょうか⁽⁷⁾。

この継代株の第 73 代以後に於て次の 4 項目が明らかになりました。1) この継代株はメチオニンかパラアミノ安息香酸の何れか一つを要求する変異株の集団である。2) この変異は不安定であるために、培地中にスルファチアツオールがないときこの変異株は親株の性状に復元する。3) メチオニンとスルファチアツオールの存在のもとに、この継代株を継代培養しつづけると、パラアミノ安息香酸を要求する性格は脱落してメチオニンだけを要求する。ただしスルファチアツオールのない培地で継代すると、パラアミノ安息香酸をふくむ培地に増殖でき、次には親株と同じ性状にもどつてしまう。4) この継代株をメチオニンとスルファチアツオールの存在のもとに継代培養すると、この継代株は復元しないメチオニン要求性変異株の集団となる。要するにスルファチアツオールがメチオニン要求性変異株を撰択する順序と、パラアミノ安息香酸の関連を知ることができました。

IV

バクター・ペプトンを塩酸と過酸化水素を以て処理すると、メチオニン・シスチン・システイン・トリプトファンなどが破壊されるが大部分のアミノ酸は破壊されずに残ると言う LYMAN, et al.⁽⁸⁾ (1946) の報告を基礎にし

て、次のような培地を作つて、スルファチアゾールの量をたかめながら *S. enteritidis* の継代培養をつづけました⁽⁹⁾ (塩酸・過酸化水素処理バクトー・ペプトン、アスパラギン、グルタミン酸ソーダ、ヒスチジン、ロイシン、リジン、トリプトファン、チロジン、バリン、グワニンをグルコース・シモンズ培地に加えたもの)。この継代株を第 110 代に於てペニシリン・スクリーニングを行つてみたところシスチン、グリシン、リジン、ロイシン、グワニンに増殖する集落が多くあつたので、第 120 代以後はこの 5 化合物をスルファチアゾールとともにグルコース・シモンズ培地に加えた培地に継代培養しました。その後この 5 つの化合物の中一つづつ除いてみて、増殖に必要なものだけを残してゆく方法をとつてみました。その結果 6 つの系列の何れからもシスチンを要求する変異株の集団が分離されました。ただしこの変異株はメチオニンかホモシスチンを与えられても増殖でき、又 Na_2S を与えた場合にはかなり程度は低いが増殖できる点で、今までに分離された変異株とは違うものであります。

塩酸・過酸化水素処理ペプトンに 15 種のアミノ酸類とウラシル・グワニンの外にスルファチアゾールを加えた培地に、この第 123 代継代株を植えついでいつたところ、グリシンとシスチンの両方を要求する変異株の集団が分離されました。そしてグリシンは他のアミノ酸によつて代償されないが、シスチンの方はメチオニン・ホモシスチン・硫化ソーダによつて代償されることは前と同じであります。この変異株の利用できる硫黄化合物は HOROWITZ⁽¹⁰⁾ (1947), LAMPEN, *et al.*⁽¹¹⁾ (1947), WORK and WORK⁽¹²⁾ (1948) の提案しているメチオニン生合成系図と一致していることは明かであるが、私達はホモシステインとシスタチオンを調べることはできませんでした。

V

私達が以上の実験をすすめている間に、各種の Auxotrophic mutants を用いて、メチオニン・パラアミノ安息香酸とビタミン B_{12} の関係が、米国の研究者によつて調べられつつありました。その主なものを紹介してみしましょう。

LAMPEN, *et al.*⁽¹³⁾ (1949) は X 線照射によつて得られた *E. coli* のパラアミノ安息香酸を要求する変異株が、アミノ酸の混合物・プリン・チイミンの協同によつて増殖できること、ただしメチオニンだけは必須因子であることを証明しています。DAVIS and MINGIOLLI⁽¹⁴⁾ (1950) は *E. coli* のメチオニン要求性変異株は、 B_{12} を与えられても増殖できることを報告し、DAVIS⁽¹⁵⁾ (16)

(1951~1952) は続いて二つの業績を出しています。チロジン・フェニールアラニン・トリプトファン・パラアミノ安息香酸・パラハイドロキシベンゾイックアシッドの 5 つの要求をもつ *E. coli* の変異株に於て、要求されるパラアミノ安息香酸の量は B_{12} とメチオニンによつて節約される事実に着目して、パラアミノ安息香酸は B_{12} の構成要素であるベンゼン核の素材であること、 B_{12} はメチオニン生合成に関与する、殊にメチレーシヨンに関与するとの推論をたてました。ところがアデニンをふくむ Pseudovitamin B_{12} と B_{12}b が同じ効果をもつことが判明するに及んで、パラアミノ安息香酸を B_{12} のベンゼン核の素材とみることは当たらないことになり、一つの連鎖的に進む生理過程の違つた段階に於て、 B_{12} とパラアミノ安息香酸が作用するのであらうとの推論に改められました。

STREHLER⁽¹⁷⁾ (1950) は、パラアミノ安息香酸かメチオニンを要求する変異株が Homocysteine thiolactone·HCl によつて増殖できないことから、この物質からメチル化されてメチオニンが作られる段階にパラアミノ安息香酸が作用するのであらうと推論しています。

DAVIS and MINGIOLLI (1950) の成績を知つて、直ちに当時までにとられていたメチオニン要求性変異株について B_{12} の効果を調べてみましたところ、すべて結果は陰性でありました。しかし、中田⁽¹⁸⁾ (1952) は *S. typhosa* No. 58 をカゼイン・トリプトファン・グルコース・スルファチアゾール培地に継代してメチオニンを要求する変異株を分離し、しかもこの変異株は B_{12} とパラアミノ安息香酸の何れか一つでも増殖できるものであります。

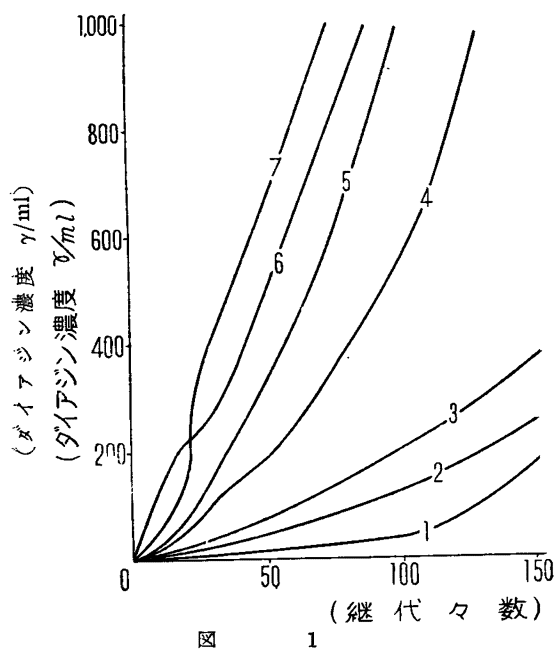
ここに紹介した米国の研究者の実験株は何れもスルファオンアミド誘導体とは無関係なものでありますが、メチオニンかパラアミノ安息香酸か B_{12} の何れか一つを与えられたとき増殖できる変異株の集団がスルファチアゾールによつて撰択分離された事実は、 B_{12} とスルファオンアミド誘導体との関係を知る手がかりとして重くみる可きものと考えられます。

VI

かくして私達は *S. enteritidis* とスルファダイアジンをを用いて、 B_{12} の意義を明かにしようと努めました⁽¹⁹⁾。グルコース・シモンズ培地にダイアジンを加えた場合のダイアジンの抗菌力を規準として、メチオニンの拮抗力を測定し、次にホモシスチン・塩酸コリン・ B_{12} の拮抗力を比較しました。この三つの化合物は単独では弱いが、三つの協同作用はかなり強い拮抗力を示しますが、それでもメチオニンの拮抗力に較べれば非常に弱いものであ

ります。

次にはグルコース・シモンズ (GS) 培地でのスルファダイアジン抵抗性の上昇を規準として、ホモシスチン・ホモシスチンと塩酸コリン・ホモシスチンと B_{12} ・ホモシスチンと塩酸コリンと B_{12} ・メチオニン・メチオニンと B_{12} の 6 つの系列のダイアジン抵抗性の上昇の速さを比較してみました。この *S. enteritidis* のダイアジン抵抗性は割に均一的であつて、ストレプトマイシンやペニシリンに対するような甚しい不均一性がみられないので、このような比較実験の成績は信頼できるものと思います。又ここにかかげた実験例の外にグルコース・シモンズ・塩酸・過酸化水素処理ペプトンを基礎培地とした場合にも、略々これに一致する準位が得られていることをみても、再現性は信頼される可きものと思います。



- 図 1
- 1) グルコース・シモンズ・ダイアジン
 - 2) グルコース・シモンズ・ダイアジン・ホモシスチン
 - 3) グルコース・シモンズ・ダイアジン・ホモシスチン・塩酸コリン
 - 4) グルコース・シモンズ・ダイアジン・ホモシスチン・ B_{12}
 - 5) グルコース・シモンズ・ダイアジン・ホモシスチン・塩酸コリン・ B_{12}
 - 6) グルコース・シモンズ・ダイアジン・メチオニン
 - 7) グルコース・シモンズ・ダイアジン・メチオニン・ B_{12}

ここで B_{12} が培地に加えられるとダイアジン抵抗性の上昇が速くなる事実と、ホモシスチン・塩酸コリン・ B_{12} が協同するとき、メチオニンに余程近づく事実は重くみられてよいと思います。ただしメチオニンをふくむ系列からは、メチオニン要求性変異株の集団が分離された

が、その他の系列から継代 200 代前後に及んでも変異株の集団が分離されませんでした。

VII

塩酸・過酸化水素処理ペプトン・塩酸コリン・ホモシスチン・グリシン アスパラギン グルタミン酸・セリン・ヴァリン・ヒスチジン・チロジン・ヒスチジン・トリプトファン・スルファダイアジン・グルコース・シモンズ培地に *S. enteritidis* を継代培養して、分離される栄養要求変異株を調べてゆきました⁽¹⁹⁾。第 59, 94, 106 代の 3 回にわたつて Penicillin-Screening を試みたが変異株を分離できませんでした。しかし第 222 代以後はアミノ酸要求性変異株の集団が分離され、しかもグリシン・グルタミン酸・シスチン・ホモシスチン・メチオニン・硫化ソーダの何れか一つを与えられればこの変異株は増殖できるものであります。この変異株の性格からみて、硫酸根が存在すればグルタミン酸がグリシンからメチオニンが作られるものと推定されてよいようです。

次には塩酸・過酸化水素処理ペプトン・ホモシスチン・塩酸コリン・トリプトファン・ B_{12} ・スルファダイアジン・グルコース・シモンズ培地に *S. enteritidis* を継代してゆきました。第 226 代目に Penicillin-screening を行つて 14 株の変異株が得られ、それらは 4 つの独立した変異に分類されました。

A) メチオニンか B_{12} か B) メチオニンかパラアミノ安息香酸か B_{12} か C) メチオニンかホモシスチンかパラアミノ安息香酸か D) メチオニンかホモシスチンかパラアミノ安息香酸か B_{12} か何れか一つを要求する変異株でありました。その後この継代培養によつて継代株は第 B 群だけの集団となりました。

このような栄養要求変異株がスルホンアミド誘導体によつて撰択される事実から、メチオニン合成過程とスルホンアミド誘導体の作用点とは密接な関係があるものとするのは一つの方法でありましょう。

VIII

中田⁽²⁰⁾⁽²¹⁾ (1953) はナイトロゼンマスタードを以て処理して *S. enteritidis* のメチオニン要求性変異株を分離して、そのスルファチアツオール抵抗性を測定しましたところ、5 γ /ml のメチオニンの存在のもとで、この変異株は 500 γ /ml のスルファチアツオールに抵抗するものであります。メチオニン要求性変異株がこのように生れながらにして抵抗性の強いものならば、スルホンアミド誘導体によつて撰択されるのは当然でありましょう。即ちメチオニン合成能力を脱落したものが、メチオニン合成能力をもつものより、スルホンアミド剤に対

する抵抗力が強ければこそ、この薬剤によつて撰択されると解すべきでありましょう。

それでは、何が故にメチオニンとスルフォンアミド誘導体とがふくまれる培地に *Prototrophic Enterobacteriaceae* を継代培養するとき、メチオニン要求性変異株が出現し、有機の硫黄化合物をシスチンかホモシスチンに制限した場合にもメチオニンかその関連物質を要求する変異株の集団が分離されるのでしょうか。

今までのところでは、変異株の出現する機構について明言できる実験的根拠がありません。ナイトロゼンマスタートは X 線や紫外線と同じく無方向的な変異株の出現を人工的に誘発します。ところがアクリフラビンやユーフラビンは *Saccharomyces cerevisiae* に於て、特定の変異だけ (Respiration-deficient mutant) を誘発する事実を EPHRUSSI⁽²²⁾ (1949~1952) は報告しています。私達が *Prototrophic Enterobacteriaceae* とスルフォンアミド誘導体の間にあげ得た事実は、一見したところでは、定方向的変異の誘発のようでもあります。それで私達の観察して来た現象を自発性の突然変異 (Spontaneous mutation) と淘汰 (Selection) と簡単に割りきることなく、スルフォンアミド誘導体がこのような変異を誘発する力 (Mutagenic effect) をもつのではないかと疑いつつ、今後の研究を進めたいと思っています。

IX

私達のあげ得たところを要約してみると、まず KOHN and HARRIS の現象の再発見、再確認にはじまり、この現象は *Prototrophic Enterobacteriaceae* に限つて普遍性のある事実であることを確め得ました。そして又培地中にメチオニンを欠く場合には、メチオニンの前駆物質か、さもなくばメチオニンの合成過程に関連すると推定されるパラアミノ安息香酸やビタミン B₁₂ がメチオニンの代役をつとめ得るメチオニン要求性変異株の集団がスルフォンアミド誘導体によつて分離されることを知ることができました。

スルフォンアミド誘導体の生物に対する働き方とし

て、今までは、細菌の増殖を抑制する面と宿主である哺乳動物に対する毒性とが主に研究されてきましたが、この薬品が特殊な代謝変異株の集団を撰択的に分離する能力をもつ実態—第3の生物学的作用—を紹介し得たと思います。

主な参考文献

- 1) DOMAGK, G.: *Klin. Wschr.*, 16: 1412, 1937.
- 2) WOODS, D. D.: *Brit. J. Exper. Path.*, 21: 74-90, 1940.
- 3) FILDES, P.: *Lancet*, 1: 955-957, 1940.
- 4) 藤野・高木・中田・西野: *日本細菌学雑誌*, 5: 299-303, 1950.
- 5) KOHN, H. I., and HARRIS, J. S.: *J. Bact.*, 44: 717-718, 1942.
- 6) 中田・上保・石神・谷川・吉田・藤野: *大阪大学医学雑誌*, 6: 219-221, 1954.
- 7) 藤野・西野・中村・中田: *大阪大学医学雑誌*, 5: 397-405, 1953.
- 8) LYMAN, C. M., MOSELY, O., BUTLER, B., WOOD, S., and HALE, F.: *J. Biol. Chem.*, 166: 161-171, 1946.
- 9) 中村: *大阪大学医学雑誌投稿中*
- 10) HOROWITZ, N. H.: *J. Biol. Chem.*, 171: 255-264, 1947.
- 11) LAMPEN, J. O., ROEPKE, R. R., and TONES, M. T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 13: 55-66, 1947.
- 12) WORK, T. S., and WORK, E., *The basis of chemotherapy*, New York, 1949.
- 13) LAMPEN, J. O., JONES, M. J., and ROEPKE, R. R.: *J. Biol. Chem.*, 180: 423-434, 1949.
- 14) DAVIS, B. D., and MINGIOLLI, E. S.: *J. Bact.*, 60: 17-29, 1950.
- 15) DAVIS, B. D.: *J. Bact.*, 62: 221-230, 1951.
- 16) DAVIS, B. D.: *J. Bact.*, 64: 432-433, 1952.
- 17) STREHLER, B. L.: *J. Bact.*, 59: 105-111, 1950.
- 18) 中田: *科学*, 23: 529-530, 1953.
- 19) 上保: *大阪大学医学雑誌投稿中*
- 20) 中田: *科学*, 23: 472-473, 1953.
- 21) NAKADA, D.: *Med. J. Osaka Univer.*, 4: 305-309, 1953.
- 22) EPHRUSSI, B., *Nucleo-cytoplasmic relation in micro-organisms*. Oxford, 1953.