

# 結核菌類縁種由来ヒドラジド分解酵素の同定と解析

老沼 研一

大阪市立大学大学院 医学研究科

## 研究の目的

ヒドラジン( $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$ )とその類縁体は、塗料、接着剤などの化成品のほか、農薬、医薬品に用いられる産業的に重要な化合物群である。これらの化合物は、自然界においても微生物の二次代謝産物などとして存在しているが、生合成・分解経路はほとんど解明されていない。ヒドラジン類縁体のうち、ヒドラジンとカルボン酸が脱水縮合した構造を有する化合物をヒドラジドと呼ぶ。ヒドラジド化合物の分解酵素に関しては、これまでにいくつかの報告がなされている。例えば、非結核性抗酸菌である *Mycobacterium avium* が、抗結核薬であるイソニアジド(INH)に作用するある種のヒドラジダーゼを産生することが、1960年代に報告されている<sup>1)</sup>(図1)。また、*Mycobacterium smegmatis* の INH 分解活性に関する報告も1970年代になされている<sup>2)</sup>。これらの酵素は、結核菌や非結核性抗酸菌の INH 耐性機構に関与している可能性がある点において医学的に重要であるが、物質生産や環境浄化等への利用価値を有しており、農学的にも極めて重要な研究対象である。しかしながら、研究はその後ほとんど進展しておらず、酵素の素性は未だ明らかとなっていない。本研究では、*Mycobacterium* 属に分布する INH 分解酵素を特定し、その諸性質や自然界における分布を明らかにすることを目的とした。

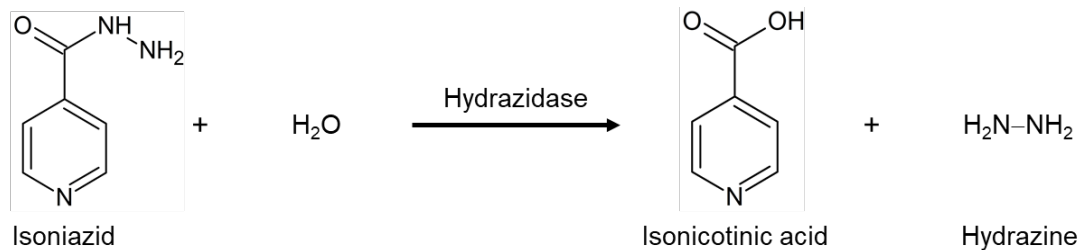


図1 INH 加水分解酵素 (ヒドラジダーゼ) によるイソニアジドの分解反応

## 方法

抗酸菌研究のモデル生物として頻用される *M. smegmatis* MC<sup>2</sup>155 を、主な研究対象とした。その他、抗酸菌における INH 分解活性の分布の調査のため、本学附属病院で分離された *M. avium* 株と *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 株を使用した。菌の培養は、Middlebrook 7H9 液体培地、または、M9 培地をベースとした合成液体培地を使用し、37°C で振盪させながら行った。INH 分解活性は、反応産物であるイソニコチン酸を超高速液体クロマトグラフィーで定量することにより測定した。分析用カ

ラムとして、ACQUITY UPLC BEH Amide Colum (2.1 × 100 mm) (Waters)を使用した。酵素精製のため、GE Healthcare 社製の各種カラムを使用した。精製タンパク質の同定は、トリプシン消化後の matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry 解析に基づく peptide mass fingerprinting により行った。

## 結果

まず、休止菌体反応により、7H9 培地で培養した *M. smegmatis* MC<sup>2</sup>155 が INH 分解活性を示すことを確認した。次に、INH 分解酵素の産生に対する培地成分の影響を検討した。7H9 培地で培養した菌体の INH 分解活性は微弱であったが、7H9 培地で培養後の菌体を、INH を含む合成培地に植え替え、8 時間培養を継続することにより、活性が大幅に上昇することを発見した (図 2)。植え継ぎ後の培地にグリセロールと硫酸マグネシウムを添加することにより、活性の更なる上昇がみられた。次に、最適酵素産生条件で培養した菌体からの酵素精製を試みた。硫酸分画と各種カラムクロマトグラフィーを組み合わせることにより、目的の酵素を菌体由来の粗抽出液から SDS-PAGE で単一バンドを示す程度にまで精製することに成功した (図 3)。タンパク質同定の結果、本酵素はピラジナミドとニコチンアミドに作用するアミダーゼ(PzaA)<sup>3)</sup>であることが判明した。これにより、PzaA が INH の分解に関与することが初めて明らかとなった。

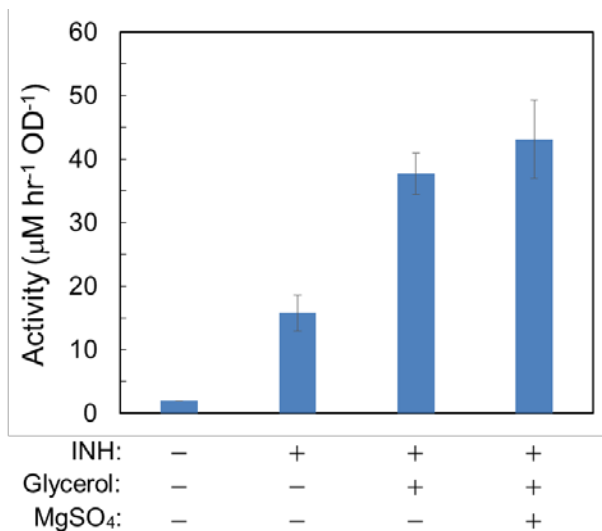


図 2 培地成分が *M. smegmatis* の INH 分解活性に与える影響

*M. smegmatis* MC<sup>2</sup>155 を 7H9 培地で培養後、各成分を含む合成培地に植え継ぎ、8 時間培養を継続した。休止菌体の INH 分解活性を、菌体濁度当りの比活性として算出した。エラーバーは標準偏差を示す(n = 3)。

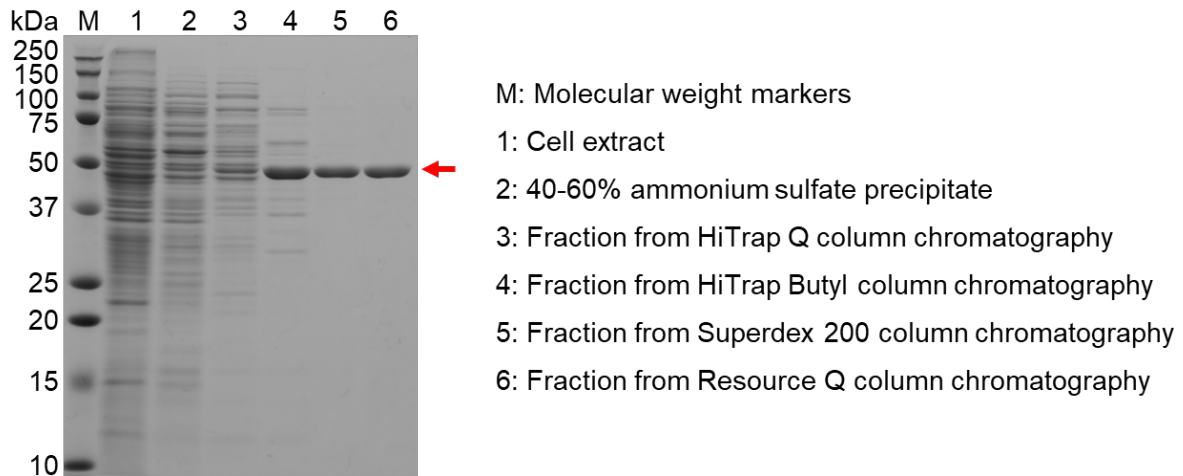


図3 *M. smegmatis* MC<sup>2</sup>155 からの INH 分解酵素の精製  
 各精製段階サンプルの SDS-PAGE (CBB 染色)。矢印は目的の酵素を示す。

抗酸菌における INH 分解活性の分布の調査のため、*M. bovis* BCG Pasteur および *M. avium* 臨床分離株に対し、休止菌体を用いた INH 分解活性測定を行った。両株とも、*M. smegmatis* と同程度の活性を示した。これらの菌種の INH 分解酵素を特定すべく、PzaA 配列を query とした BLAST 検索を行ったが、30%程度の配列の一致を示すアミダーゼ様配列は多数確認されたものの、突出して高い相同性を示す配列は検出されず、酵素の特定には至らなかった。

## 結論

今回、*M. smegmatis* の INH 分解酵素が PzaA と同定され、本酵素のヒドラジダーゼとしての機能が初めて明らかとなった。本研究は、抗酸菌に分布するヒドラジダーゼの素性を初めて特定できた点において、極めて有意義であったと考える。同様の酵素が他の抗酸菌種にも分布していると考えられるが、ゲノム配列から当該酵素遺伝子を特定することはできなかった。今後は、医療や発酵産業への応用を見据え、PzaA の諸性質の解析と、他菌種のヒドラジダーゼの特定を進めていきたい。

## 文献

- 1) Toida, I. (1962) Isoniazid-hydrolyzing enzyme of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **85**: 720-726.
- 2) Fishbain, D., Ling, G., and Kushner, D. J. (1972) Isoniazid metabolism and binding by sensitive and resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. *Can. J. Microbiol.* **18**: 783-792.
- 3) Boshoff, H. I. M. and Mizrahi, V. (1998) Purification, gene cloning, targeted knockout, overexpression, and biochemical characterization of the major pyrazinamidase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **180**: 5809-5814.