ヒドロキシルアミン化合物のバイラス生成誘導作用

山藤 一雄, 大村 浩久 (九州大學農學部農産製造學研究室)

昭和 24 年 9 月 20 日 受理

Studies on the Provoking Action of Hydroxylamine Derivatives for the Virus Formation

By Kazuo YAMAFUJI and Hirohisa OMURA (Agr. Chem. Inst., Kyushu Univ.)

緒言並びに總括 呼吸並びに家蠶の生化学的研究に關する諸經驗から著者等は生細胞内に於けるバイラス分子の生成には、必ずしも特有病原體の存在が必須のものでは無く、バイラス蛋白は又組織内代謝現象の偏倚に因つても形成され得るものなる事を想定し、且つ此の種の異常代謝としてはバイラスの本體を形成すべき原形質蛋白の變異と、之を誘起すべき過酸化水素の集積とを假定したが⁽¹⁾⁽²⁾、本假説に對する現在の最良なる證明は、ヒドロキシルアミン及び其の誘導體に依る人爲的バイラス新生實驗であると思惟するので、此所には主として之に關する成果のみを摘報する事とし度い。

則ち著者等は核蛋白をバイラス蛋白に轉移せしむる誘導因子中の重要な一つとして、酸素呼吸に於て必然的に生成せられ、生物組織内に普遍的な分布を有すべき過酸化水素を考え、本系列の第一段階に於て實際にバイラス病體のカタラーゼ作用が著しく減弱している事、並びに該酵素力と呼吸強度との比から、それ等の組織内部に過酸化水素の一時的蓄積の可能なことを證明し⁽³⁾⁽⁴⁾、續いてバイラス蛋白が生物の酸素消費を低下せしむる事をも證し得た⁽⁵⁾。次に過酸化水素其の物を作用せしめて、例えば幼植物に所期の酸化變調を惹起せしめ、又其の體内に巨大蛋白分子を形成せしめ得たが⁽⁶⁾、本過酸化物の直接作用に依つてバイラス發病に到らせる事には、その易分解性などのために未だ成功していない。此の結果から實驗的バイラス生成に對しては生活細胞自體の中に過酸化水素の集積を招來せしむべき手段を講ずる事が肝要であるとの推測の下に、ヒドロキシルアミンを適用して遂に家蠶に於て人工的にバイラス病を發現せしめ⁽⁷⁾⁽⁸⁾、又煙草に於てバイラス病徴に類似せる斑紋を現出させる事が出來た⁽⁹⁾。本アミンを適當に施與すれば組織のカタラーゼを著しく抑壓し得るに拘らず、呼吸強度を無影響に保持せしめ得るのであつて、かくて細胞内に過酸化水素の少くとも一時的なる蓄積が惹起される事となるのである。特に家蠶に於てはその飼育環境の不良な際には時として膿病を發生する事は吾々の研究途上に於ても觀察した處であり、實際佐々木⁽¹¹⁾、北島⁽¹¹⁾、勝又⁽¹²⁾、酒井⁽¹³⁾、鈴木⁽¹⁴⁾、石森⁽¹⁵⁾の諸氏は蠶兒を高溫乃至は低溫に接觸せしめて膿病體を發現せしめ得た。併し類似の觀察は其の他にも古くより報告せられており⁽¹⁶⁾、之に對する解釋も種種で相一致する處が無かつたが、著者等が他の生物に於ける實驗結果をも併せ考察し明瞭な代謝異常を招致せしむる簡単な化學藥品に依つて膿病病原蛋白の生體內新生に成功した事實は、一般バイラス發病機構解明に一新據點を與え得たものと考えてよいと思われる。此の方向に於ける假説は更に蠶兒の高低溫處理時に於ける呼吸變異⁽¹⁷⁾及びカタラーゼ添食による膿病發生防止⁽¹⁸⁾に關する實驗によつて更に強く確められた。

本研究に於て著者等は先づ以上の様な成果が高等動物に對しても適應され得るか否かの検討から始めた。蓋し哺乳類の如きにあつては體制の複雑な事などの關係から、病毒無くして人爲的にバイラス病徴を顯出させる事は殆ど不可能と考えられるので、何等かの方法によつて上記假説に副うような現象を見出し得れば充分とせざるを得ないと惟われる。實驗の結果デング病毒接種のみにては該病徴を發現し能わざる廿日鼠個體に、豫めヒドロキシルアミンを注射して後感染せしむる事により發病させる事が出來た。尙過酸化水素水のみにより膿病を出現せしめ得なかつた前報の試験は、今回過酸化バリウムを添食して其の體内に同物質を徐徐に生成させる如き手段を講ずる事によつて目的を達成し得た。ヒドロキシルアミン注射の鼠組織並びに過酸化バリウム給與の蠶體に於ては過酸化水素蓄積方向の異常代謝が同時に觀察せられ、又蠶兒にヘミン等を、煙草に硫酸鐵を施與する時には、バイラス病の發生が若干抑制される事も認められた。馬鈴薯に於てもヒドロキシルアミン投與は葉中カタラーゼ力を阻害する事も確認したが、廿日鼠に於ては本アミン少量の經口的給與は體組織内同酵素力の認め得べき低下を招致し得ない。

ヒドロキシルアミンの適切なる適用が生活組織の呼吸強度に變化を與える事無くして過酸化水素分解能を甚だ

しく阻害する原因は、チトクロームとカタラーゼとの間に本アミンに対する感受性に著しき差異があるか、或はチトクロームを経由せざる酸化系に代換されるかに基くものと思惟される。此のヒドロキシルアミンの作用機作を究むる事がバイラス生成機轉闡明上必須の事項と推定せられたが故に、従前の之に關聯する報文⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾に引續き本報に於ては最初に光線勵起を受けた酸素が、本アミン含有系内のデアホラーゼを脱水素し得る事を證明し、次にヒドロキシルアミンに依つて處理されたる臓器粉末上に於てもアセトアルデハイドの酸化が行われる事をも認め得た。かくして呼吸過程に於ては既に ROMAN 氏⁽²¹⁾⁽²²⁾竝に著者等⁽²³⁾⁽²⁴⁾の確認した通り生細胞内に於ける活性界面を想定し、酸素呼吸に於て形成される第一次生産物が過酸化水素であるとする假定が少くとも實驗の範圍に於て正常なるものと考えられる。此の様にして生成された過酸化水素が生體内に於て種種の生理作用を営む事は順次明かにされつつあるが、著者等は又之が鐵鹽と共働して纖維素の分解及びキシランの糖化を惹起する事を確め、更にキシランの分解容易なる事實から、此の多糖質が動物榮養上有用なることをも確證した。酸素呼吸を営みつつある細胞中に過酸化水素を證明し得ないのは共存するカタラーゼの著しく強力なるに基くが、好適なる條件下にあつては少くともその一部分が捕獲され得ること、竝に例えば酵母に於てヒドロキシルアミンによるチトクローム活度の減弱が甚しいに拘らず酸素吸入の低下は左程大なるものでない事も觀察された。

ヒドロキシルアミンによるバイラス發病誘起現象の研究に従事しつつある間に VIRTANEN⁽²⁵⁾, WILSON⁽²⁶⁾氏等によつて細菌による窒素固定の中間産物として本アミンの出現する事が主張せられた。かようにして此の毒物が生理的に重要な物質たる事の可能性が生じたので、著者等は之が植物體内に於ける固定窒素中間物としても現れるのではないかと想定した。他方に於て著者等は永年の生體變化に關する研究の結果、現在組織呼吸の最終過程を大略次の如きものと假定した⁽²⁷⁾。

Fig. 1. Schema of Terminal Process of Tissue Respiration.

又綠葉中炭酸同化作用の根幹をなす化學變化を下の通りに要約されるのではないかと推測を持つている⁽²⁷⁾。

Fig. 2. Formula of Carbonic Acid Assimilation.

更に今日迄の實驗成績を綜合すれば生細胞内に於けるバイラス蛋白の形成は次の段階を経て行われるものと推定される⁽²³⁾。

Fig. 3. Schema of Formation of Virus Molecule.

斯の如くにして植物葉内部には他の組織に於けるよりも一層より旺盛なる過酸化水素生成が生起するが、若し同葉中にヒドロキシルアミンを形成する事ある場合には、之がカタラーゼ活度を抑止してその生成を更に助長する事となり、綠葉にバイラス病の多發する一原因が説明されるかに想像された。それ故に著者等は先ず ENDRES⁽²⁹⁾, BLOM⁽³⁰⁾, VIRTANEN⁽³¹⁾, LEMOIGERE⁽³²⁾ 諸氏による亜硝酸、ヒドロキシルアミン及びオキシムの定量

法に多少の改良を加え植物界に於けるオキシム態窒素の分布を證明したる後、アセトオキシムを蠶兒に食下せしむる事に依つて多角體バイラス病の發生する事を見出し得た。此の際オキシム施與によつて蠶體カタラーゼは著しく弱化し、同組織に過酸化水素の集積する事を豫想せしむるが、一般に細胞内活性界面上に於ける本過酸化物の形成は、燃焼、酸化現象の普遍性から酸素の特殊活動性も推測せられる處であり、事實 WULF 氏の確認した如き衝突狀態酸素 $O_2 \cdot O_2$ の生成⁽³³⁾⁽³⁴⁾に基くものとも推定せられる。此の集積過酸化水素の特異作用能に基因する上掲バイラス生成過程中組織蛋白の變性は ANSON 氏等に準據してスルフヒドリル基を測定する事⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾に依り、又蛋白分子再編成の可能性はプロテアーゼの増強により、それぞれ其の一部を證明する事が出來た。又加熱等により膿病を發現させる場合には發病以前に既に蠶體內にオキシムの増量が認められるのであつて、かくて此の方面から觀測したバイラス發病時の窒素循環は次の様に表現せられ得ると思われる。

Fig. 4. Nitrogen Cycle in the Course of Virus Formation

以上の諸實驗に依り著者等本教室員が明白なる特異作用を保有し、而も正常生體內に於て出現する化學物質によつてバイラス病を起させ得た事は、該方面の研究上一意義を有するものと考えられる。病毒無くして行われる人爲的バイラス新生に於ては特に易動性にして不安定とも謂うべき蛋白分子の先在が必須の要件と思われ、従つて蠶兒如きに於てのみ確實なる實現が期待される現状であるが、最近細菌等に於ける遺傳、榮養方面の成果が多くの點に高等動植物に於けると同一の共通性を有する事實が判明しつつあることを考察すれば家蠶に於て認められたバイラス分子の新生増殖の機構も少くとも一部の一般的原理を含むものと想定してよいものと思われる。

實驗並びに結果 實驗は上記の思考進展上緊要なる部分の記載に止める。

實驗 1: 廿日鼠はデング熱病毒を腦に接種すれば後肢麻痺などの特有病徴を顯すが、その種類によつては之のみにより發病しないものもあつて、かかるものに於てはヒドロキシルアミンの微量を豫め注射して腦内カタラーゼを減弱せしめたる後、デング熱患者よりの新血清を注入して罹病せしめ得た。又蠶兒に過酸化バリウム液附着葉を給與して膿病を發生させ得たが、酸化バリウム添食に於てはかかる事實が認められなかつた。

Table 1.

	Mice of dengue fever in %	Catalase activity		Virus-diseased worm	Respiration	Catalase
Not treated	0	100	Not treated	0	100	100
Infected with virus	0	83	Fed with BaO_2	60	130	65
Infected with amine and virus	30	72	Fed with BaO	0	103	98

實驗 2: 煙草に稀薄硫酸鐵溶液施與開始數日後トマトリングモザイク病毒を接種したる處發病度を幾分低下

Table 2.

	Virus-diseased potato		Catalase	Respiration
Not treated	0	Not treated	100	100
Infected with virus	60	Treated with NH_2OH	88	95
Infected with virus and Fe-salt	45			

させ得た。更に馬鈴薯を砂耕栽培しヒドロキシルアミン硫酸鹽稀釋液を撒布すれば煙草葉に於ける如く斑紋を出現しなかつたがカタラーゼの相對的弱화가觀られた。

實驗 3: シリカゲル顆粒に適當なる條件下にヘマトポーフィリン、葉綠素を吸着せしめて増感劑となし、光線によつて勵起せしめたる酸素を、乳酸、同脱水素酵素、コチマーゼ、デアホラーゼ所含系に 1/5 モル濃度にヒドロキシルアミンを添加せる溶液内に通入すると相當量の乳酸分解が結果した。他方に於て活性血液粉末をヒ

ドロキシルアミンを以て處理し、其の上に於てアセトアルデハイドの酸化を行わせるとも、同機酸化阻害は約 1/2 程度であつた。

Table 3.

Sensitizer in cm	1 N NH_2OH in cc	Splitlited lactic acid in mg	Blood powder in cm	NH_2OH in N	Oxidation of CH_3CHO in %
1	1	5.0	6	0.01	40
0	1	3.5	6	0	100

實驗 4:- 過酸化水素は無機鐵鹽との共同作用によつて纖維素を分解するが糖化に迄到らせる事は困難である。併し澱粉、キシランにあつては兩者の作用によつて單糖類を生成する。

Table 4.

Cellulose in g	1N H_2O_2 in cc	0.1N Fe salt in cc	Relative viscosity	Starch in mg	pH of soln.	Glucose in mg	Xylan in mg	pH of soln.	Xylose in mg
0.5	50	5	1.60	200	3.6	14	50	2.3	22
0.5	0	5	2.23	200	5.2	8	50	6.4	17

實驗 5:- 馬血粉を炭化し硫酸、鹽酸、過酸化水素、ヒドロキシルアミン等にて處理せる血炭によつて、ハイドロキノン酸化を施行し、セリウム鹽を捕獲劑として、ヒドロキシルアミン共存下にあつても過酸化水素形成の檢知し得られる事、並に酵母に於て沃度加里を細胞に吸着せしめて生成過酸化水素を迅速に之と反應する如き手段によつて其一部の定量の可能なる事も認められた。

Table 5.

Blood charcoal in mg	0.01 N NH_2OH in cc	H_2O_2 in cc 0.002 N Thiosulfate	Yeast	H_2O_2 in mg
10	1	0.5	<i>Sacch. cerevisiae</i>	0.5
10	0	1.1	<i>Torula utilis</i>	0.3

實驗 6:- 植物體を磨碎し硫酸酸性となしエーテルにて抽出、分解後ヒドロキシルアミンをアセトオキシムに轉じて定量するか、乃至は組織を自己消化せしめアセトンを添加してオキシムとなして測定した。他面蠶體を加熱し一定時間後組織のアセトン製劑を調製して多角體發病に至る間のスルフヒドリル基の定量を行つた。

Table 6.

Plant	Oxime-N in mg per kg plant	Hours after heating of worm	Heated worm SH in mg-%	Normal worm SH in mg-%
Turnip	0.24	48	13	9
Brassica	0.04	96	14	11
Spinach	0.29	Virus diseased	14	8

實驗 7:- 家蠶幼蟲に 1/10 乃至 1 モルのアセトオキシムを添食すれば膿病を發生し、單に加熱するのみにて

Table 7.

	Respiration	Catalase	Virus-diseased worm	Worm	Oxime in mg per kg worm
Not treated	100	100	0	Normal	0.61
Fed with oxime	103	65	17	Heated	1.21
				Virus-diseased	1.93

も其の體內に於けるオキシム含量は増大する。

本研究に要した費用の一部は文部省科學研究費により支辨された。

文献 著者關係の引用文献は 1942 年以降のものに限定した。

- (1) 山藤一雄, 武岡進次, 藤木虎次郎: 農化, 19 225 (昭 18)
- (2) 山藤一雄, 張貞鉉 農化, 20, 411 (昭19)
- (3) 山藤一雄, 蘇共進, 曾鉉: *Biochem. Z.*, 311, 203 (1942)
- (4) 山藤一雄, 蘇共進 永野勝次郎: *Biochem. Z.*, 315, 411 (1943)
- (5) 山藤一雄, 蘇共進, 北野忠雄: *Biochem. Z.*, 315, 415 (1943)
- (6) 山藤一雄, 吉原典子 *Biochem. Z.*, 317, 87 (1944)
- (7) 山藤一雄, 白水康弘: *Biochem. Z.*, 317, 94 (1944)
- (8) 山藤一雄, 張貞鉉: *Biochem. Z.*, 318, 95 (1947)
- (9) 山藤一雄, 藤木虎次郎: *Biochem. Z.*, 318, 101 (1947)
- (10) 佐々木忠次郎 *J. Coll. Agr. Tokyo Univ.*, 2; 2 (1910)
- (11) 北島鉞雄 蠶業新報, 392 (1926)
- (12) 勝又藤夫: 中央蠶絲報, 139 (1928)
- (13) 酒井 績 蠶絲學報, 17, 1 (1935)
- (14) 鈴木健弘 日本蠶絲學講演集, 5 (1938)
- (15) 石森直人: 植物動物, 8, 23 (昭 15)
- (16) 塚田, 佐々木, HABERLANDT, BOLLE, VERNON, MAILLOT: 石川, 蠶病(本昭11)
- (17) 山藤一雄, 小佐嘉博: *Biochem. Z.*, 317, 81 (1944)
- (18) 山藤一雄, 結城貞鉉 *Biochem. Z.*, 318, 107 (1947)
- (19) 山藤一雄, 藤井 實, 富田 直: *Biochem. Z.*, 315, 419 (1943)
- (20) 山藤一雄, 吉原典子: *Biochem. Z.*, 315, 70 (1943)
- (21) W. ROMAN II. *Congr. Internat. Lumin.*, 1 (1932)
- (22) W. ROMAN: *Biochem. Z.*, 225, 447 (1932)
- (23) 山藤一雄, 藤木虎次郎 *Biochem. Z.*, 317, 99 (1944)
- (24) 山藤一雄, 白水桂太郎: *Biochem. Z.*, 317, 107 (1944)
- (25) A. VIRTANEN and R. LAINE *Biochem. Z.*, 33, 412 (1939)
- (26) C. BURRIS and J.B. WILSON: *J. Bact.* 47, 410 (1944)
- (27) 山藤一雄 *Enzymologia*, 13, 223 (1949)
- (28) 山藤一雄 *Enzymologia*, 13, 223 (1949)
- (29) G. ENDRES: *Ann. Chem.*, 518, 107 (1935)
- (30) J. BLOM: *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 59, 121 (1926)
- (31) A. VIRTANEN: *Biochem. Z.*, 258, 107 (1933)
- (32) M. LEMOIGERE, P. MONGUILLON et R. DESVEAUX *Compt. rend. Sci. Acad.*, 201, 1069 (1935)
- (33) O. R. WULF: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 14, 356 (1928)
- (34) O. R. WULF: *J. Amer. Chem. Soc.*, 50, 2596 (1928)
- (35) M. L. ANSON and A. E. MIRSKY *J. Gen. Physiol.*, 15, 341 (1932)
- (36) M. L. ANSON and A. E. MIRSKY: *J. Gen. Physiol.*, 18, 307 (1935)

Summary

In our laboratory it has been established that hydrogen peroxide exerts specific actions upon the formation of virus molecules in living cells. According to our studies hydrogen peroxide is formed always as a result of tissue respiration. We have found that under the suitable conditions hydroxylamine causes a remarkable decrease of catalase activity in living tissues. But in such a case the respiration does not suffer changes in its intensity. It is supposed that accumulation of hydrogen peroxide takes place in the bodies fed with this amine. Indeed hydroxylamine brings about the formation of virus molecules in the cells. As it is possible that hydroxylamine occurs in organisms in the form of oximes, we fed silk-worms with acetoxime. Then we could ascertain that by this treatment the virus formation is provoked in worm bodies.