U. D. C. 576.851.48.095.18 : 615.778.092.257

245. 西村千昭：大腸菌の呼吸に及ぼすニトロフラン類の作用（第3報）

TCA サイクル上の各基質酸化に及ぼす影響

Chiaki Nishimura : Effect of Nitrofurans on the Respiration of *E. coli*. III.
Inhibitory Effect on the Oxidation of TCA Cycle Members.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

Oxidation of pyruvic, oxalacetic, and acetic acids by the live bacterial suspension of *Escherichia coli* is not inhibited under the conditions by which malic acid oxidation is partially (25%) inhibited. Even under the same conditions, preincubation of the bacterial suspension with Furacin to effect complete inhibition of malic acid oxidation results in the inhibition of the oxidation of pyruvic, oxalacetic, and acetic acids. However, oxidation of succinic and formic acids, even after such preincubation, showed the absorption of oxygen corresponding to 1 atom of oxygen per mole of substrate, indicating that the one-step reaction of succinic to fumaric acid and formic acid to carbon dioxide still remains. The concentration for 50% inhibition, I_{50} , of nitrofurans against malic oxidation by bacterial suspension were: 2-(5-nitro)furfural semicarbazone 10^{-4} M; 5-nitrofurylacrylamide, 3×10^{-5} M; 5-nitrofurfural aminoguanidine, 3×10^{-5} M. The succinic oxidase obtained by extraction after exposure of *E. coli* to supersonic waves was not inhibited by 5×10^{-4} M of 5-nitrofurfural semicarbazone.

(Received June 4, 1956)

前報で著者はニトロフラン類が脱水素反応を伴う基質の酸化を阻害する型式について考察したが、本報では終末呼吸系の6種のカルボン酸の酸化がそれぞれ如何様に阻害されるかをしらべた。*E. coli* の呼吸系に関しては Aji, Werkmann^{1,2)} 等の研究があり、TCA の他に DCA サイクルの共存する可能性ものべられている。また生体代謝系に対するフラシンの作用は Paul 等により報告され肝臓磨砕物によるクエン酸合成が焦性ブドウ酸、オキザロ酢酸の酸化が阻害されないような低濃度 (2 γ /cc) のフラシンでも容易に阻止されている。このことはフラシンが特異的な作用を呈する薬物であることを示している。著者はニトロフラン類の作用機構をしらべるために生菌浮游液のカルボン酸酸化に及ぼす作用を比較検討した。

生菌浮游液のカルボン酸酸化に及ぼす作用

(A) リンゴ酸酸化作用を部分的 (25%) に阻害した場合 *E. coli* の生菌浮游液を用いて基質とフラシンを同時に加え、かつフラシンの濃度を調整してリンゴ酸酸化を約 25% 阻害した条件では他のカルボン酸類の酸化は Fig. 1 に示す如くで、コハク酸酸化はみかけの上では酸素吸収が抑えられているかにみえる (Fig. 1 A)。

Fig. 1. Inhibitory Effect of Nitrofurans on the Oxidation of Various TCA Cycle Members with *E. coli* Suspension

(A) : Inhibitor and substrate added simultaneously

(B) *E. coli* preincubated with nitrofuran, and substrate added later

(B) リンゴ酸酸化を完全阻止する場合 上と同一条件で予じめフラシンと生菌浮游液を37°, 30分 preincubate

1) S. J. Aji : J. Bacteriol. **59**, 499(1950).2) S. J. Aji, M. O. Kamen : J. Biol. Chem. **189**, 845(1950).

すれば Fig. 1 B に示す如く、コハク酸及び義酸の完全酸化は1/2分子（理論酸素吸収量 112 μ L）に相当する酸素の吸収を示すが、他のカルボン酸の酸化は殆んど完全に阻止される。これらの事実を考察すれば A の場合コハク酸生菌浮游液におけるみかけの阻害はリンゴ酸の部分的阻害により一連の酸化反応の一部が阻害されたためにみられるもので B に示す（1/2分子酸素）/（1分子基質）に相当する酸素吸収はコハク酸→フマル酸及び義酸→炭酸ガス+水の二段階の酸化機能が残存することを示すものであろう。TCA サイクル中のカルボン酸の酸化系のうち、コハク酸→フマル酸系と義酸→炭酸ガスの酸化系が特に異なっており、チトクローム酸化還元系に直接つながっている^{3,4)}。他のカルボン酸、即ちオキサロ酢酸、酢酸、焦性ブドウ酸、リンゴ酸などの酸化はフラシンの添加で比較的容易に阻害される（Fig. 1 B）。

Fig. 2. Oxidation of Various Substrates by *E. coli* preincubated with Nitrofurantoin

I : Control (without nitrofurantoin).

II~VII : Substrates added after incubation with nitrofurantoin

(II : Malate, III : Pyruvate, IV : Oxalacetate, V : Acetate, VI : Succinate, VII : Formate.)

三つのニトロフラン誘導体についての作用の比較 著者はフラシン (F), 5-ニトロフリルアクリルアミド (ZF) 及び 5-ニトロフルフルアミノグアニジン (GF) の、生菌浮游液のリンゴ酸酸化に対する阻害作用（薬物と基質を同時添加）を比較した結果、リンゴ酸酸化に対して 50% 阻害を示すに要する薬物濃度は $F=10^{-4} M$, $ZF=3 \times 10^{-5} M$, $GF=3 \times 10^{-5} M$ であった。F, ZF 及び GF の三つの薬物に共通する点は義酸酸化に全く影響を与えないことである。

抽出コハク酸酸化酵素に及ぼすフラシンの作用 すでに (B) でのべた如く無基質菌体浮游液をフラシン $5 \times 10^{-4} M$ と preincubate してリンゴ酸酸化を完全に阻害し、しかるのちコハク酸 $10 \mu M$ を基質として加えると（1/2分子酸素）/（1分子コハク酸）に相当する酸素吸収がみられ、著者はフラシンはコハク酸酸化酵素に作用しないと推定した。これを確かめるために超音波破壊法により抽出したコハク酸酸化酵素に対する作用を調べたが、フラシン $5 \times 10^{-4} M$ で殆んど阻害作用のないことを認めた。

本研究は著者が京大大学院でおこなったもので、終始懇篤な御指導を賜わった京大薬学科鈴木友二先生に謝意を表する。また本研究の発表を許可された国立衛生試験所長刈米達夫博士に感謝する。

実 験 の 部

酸素吸収の測定 ワールブルグ検圧計で酸素吸収を測定。ニトロフラン類の終末濃度はいずれも $5 \times 10^{-4} M$ として比較。すなわち $M/15$ 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 1.2 cc, 生菌浮游液 0.2 cc, 及び薬物を主室に加え、側室には六種のカルボン酸 $10 \mu M$ を加える。基質酸化により発生する炭酸ガスは主室中央部の 20% KOH 液 0.2cc に吸収させた。すなわち生菌浮游液と薬物を 37° で1時間 preincubate し、しかるのち側室より基質を添加。

阻害度の算出 薬物の阻害作用を比較するために阻害度を用いた。これは対照の酸素吸収量（1時間値）と薬物添加時の酸素吸収量の比に 100 を乗じた値である。

抽出コハク酸酸化酵素⁵⁾ *E. coli* の生菌浮游液に超音波を曝射して菌体を破壊。曝射後の懸濁液は 10,000 rpm で遠心分離。

京都大学医学部薬学科

3) E. Yakushiji, K. Okunuki: Proc. Imp. Acad. (Tokyo) **16**, 299 (1940).

4) H. D. Hobermann, D. Rittenberg: J. Biol. Chem. **147**, 211 (1943).

5) 西村：本誌, **76**, 1020 (1956).