

# cyclic AMP 添加による温度感受性の発現と 塩類による回復

金子 通 治

春日 徳 彦

1965年に E. W. Sutherland と R. Makman によって、大腸菌の菌体内に adenosine 3'5' -cyclic mono-phosphate (cyclic AMP) が存在している<sup>1)</sup>ことが発見されて以来、cyclic AMP の細菌における様々な研究がなされている。その主なものには cyclic AMP は repressor と協同して遺伝子の transcription を促進したり、停止させたりすることが適応酵素の産生を調節していること<sup>2)3)</sup>。cya 変異株では鞭毛の生合成、ラムダファージの receptor 産生に cyclic AMP が必須であること<sup>4)5)</sup>、また、コレラにおける毒素の産生と cyclic AMP の関係<sup>6)</sup>などがある。これらの報告から、cyclic AMP は細菌の表面構造の構成に関与すること、さらに透過性にも影響を及ぼすことが考えられる。大腸菌 cya 変異株 Gp1 に R 因子、R<sub>100</sub> (SM, SA, CP, TC) を伝達させた Gp1/R<sub>100</sub> より得られた変異株 Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 株は、cyclic AMP の添加によってテトラサイクリン (TC) に対する感受性が 64 倍増加する<sup>7)</sup>。このとき Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 株の細胞内 TC を測定したところ、cyclic AMP を添加した場合には無添加の場合よりも TC 蓄積量が 3 倍多いことも観察された<sup>8)</sup>。これらの事実からこの変異株では、cyclic AMP の添加による膜に障害を生じ、その結果透過性が変化するのではないかと強く考えることができる。

そこで、osmotic shock や培養温度の相違により、cyclic AMP 添加の影響が現われると考えられたのでこの実験をおこなった。その結果、cyclic AMP 添加によって温度感受性が発現し、その温度感受性の発現は塩類の添加により阻止される現象が認められた。また、同じ実験系で temperature shift (37°C から 42°C) によっても温度感受性が発現した。今回、この温度感受性の発現と塩類による回復効果を検討したので報告する。

## 材 料 と 方 法

使用菌数は E. coli Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 である。この株は E. coli Gp1/R<sub>100</sub> から spontaneous mutation で得られた変異株で、cyclic AMP を添加しなくても種々の糖を利用できるようになった株である。また、対照として元株の Gp1/R<sub>100</sub> 株も使用した。培養液には L-broth (NaCl を 0.5% 含む) を使い、菌は L 字管で振盪培養した。時間毎に Shimazu Spectronic 20 を用いて波長

630 nm の吸光度を測定し、OD 値を求めて増殖曲線とした。cyclic AMP (第一化学薬品 K. K. 製) は 1 mM の濃度で、塩化ナトリウム (NaCl)、塩化カリウム (KCl)、塩化マグネシウム (MgCl<sub>2</sub>)、(いずれも和光純薬 K. K. 製) はいずれも 1~4% の範囲で実験を行なった。

## 結 果

cyclic AMP を 1 mM 添加し、さらに NaCl を 1, 2, 4% 添加した場合の Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 株の 42°C における増殖をみたのが図 1 である。図 1 図にみられるよ

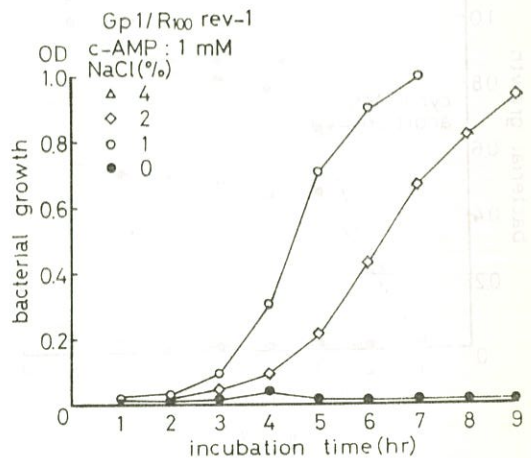


図 1

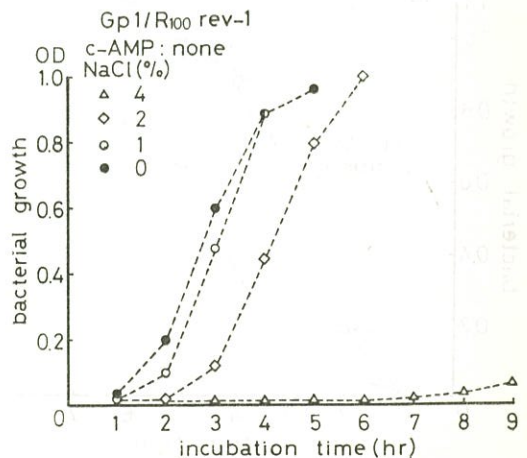


図 2

うに NaCl が 0% の場合 (L-broth に含まれる NaCl 0.5% のみ) には, 9 時間経過しても菌の増殖が全くみられず温度感受性の発現が観察された。NaCl を 4% 添加した場合も菌の増殖はみられず図には増殖曲線を省略した。ところが, NaCl を 1% または 2% 添加した場合には温度感受性の発現が抑制され現象がみられた。同じ実験系で 37°C の場合には, 菌の増殖は NaCl 濃度の低いほどよかった。cyclic AMP を添加せず NaCl のみを添加して 42°C で培養した場合の増殖曲線が図 2 である。

cyclic AMP を添加しない場合には NaCl の濃度が低いほど増殖はよかった。NaCl 4% の場合には, やはり増殖はほぼ完全に抑制された。図には示してないが, この温度感受性の回復の現象は KCl でも同様に観察されたことから, 温度感受性の回復は NaCl にのみ依存す

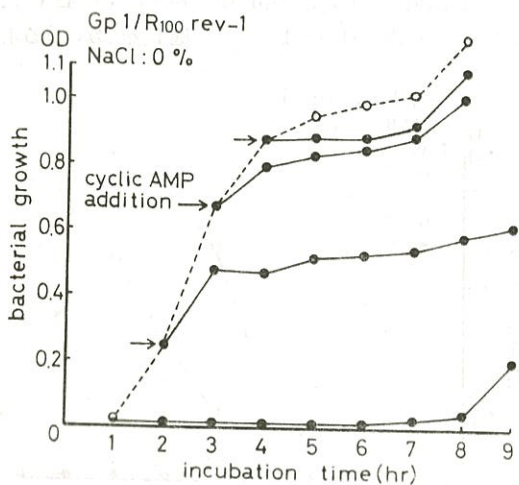


図 3

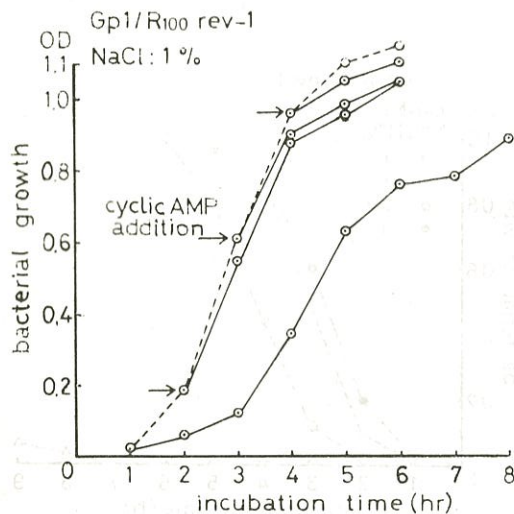


図 4

るのではないことは明らかである。ついで cyclic AMP を菌の増殖の途中で添加する実験をおこなった。NaCl 0%, 42°C で菌を培養し, 2, 3, 4 時間目に cyclic AMP を添加してその後の増殖を検討した (図 3)。

2 時間目に添加したとすると添加後 1 時間で効果があらわれ以後の菌の増殖は強く抑制され, 温度感受性が発現していることがわかる。点線で示した増殖曲線は cyclic AMP 無添加, 一番下の実線で示した増殖曲線は最初から cyclic AMP を添加した時の対照である。このように cyclic AMP を菌の増殖の途中で添加しても温度感受性が発現することが観察された。NaCl が 1% の場合, 同様に cyclic AMP を時間毎に添加してその後の増殖をみたのが図 4 である。NaCl 0% の場合と異なり, cyclic AMP 無添加 (点線の増殖曲線) の対照とほとんど変わらず cyclic AMP の増殖抑制の効果はみられなかった。NaCl を 0% または 1% 含有する場合, その各々について cyclic AMP 添加, 無添加の条件下で, 培養温度を 3 時間目に 37°C から 42°C に shift する実験を試みた。図 5 が NaCl 1% の場合, 図 6 は NaCl 0% の場合の shift 実験である。それぞれ点線は cyclic AMP 無添加, 実線で示してあるのが cyclic AMP 添

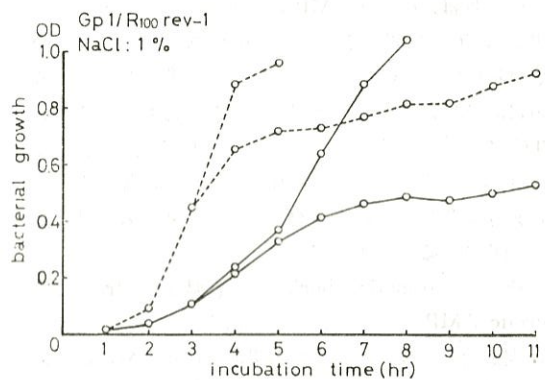


図 5

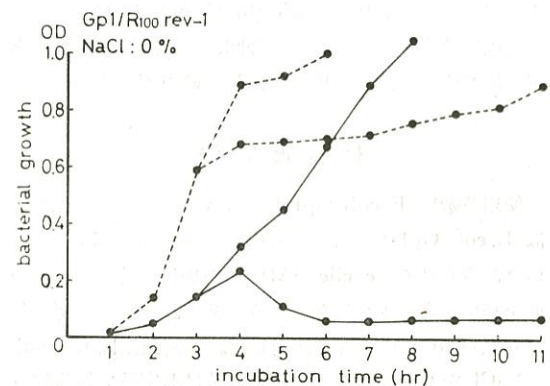


図 6

加の場合の増殖曲線である。NaCl 1%の場合には temperature shift すると, cyclic AMP 添加, 無添加にかかわらず, 同じパターンで菌の増殖は抑制されることがわかる。図は省略したが, NaCl 2%の場合の temperature shift 実験も NaCl 1%と同様なパターンで抑制された。ところが, NaCl が 0% の条件では cyclic AMP が添加してあると, temperature shift の結果, 温度感受性が発現し, 菌の増殖は強く抑制される(図6)。しかもその効果は菌に殺菌的に作用していると考えられる。

MgCl<sub>2</sub> では上記のような現象はみられなかった。また, Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 の元株である Gp1/R<sub>100</sub> についても同様な実験を行なったが, 温度感受性は発現せず, これは Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 株のみにみられる特異的な現象であることがわかった。

## 考 察

E. coli Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 株に cyclic AMP を添加して, 42°C 培養すると温度感受性が発現し, この温度感受性は NaCl, KCl 添加によって回復することが観察された。temperature shift 後の培養液を平板培養してみたところ, コロニーは slime 状の形をとった。A. Z. Bilsky と J. B. Armstrong はニトロソグアニジン処理によって, E. coli K-12 の温度感受性変異株をとった。これらの変異株のいくつかは NaCl 等を加えることによって 42°C でも増殖することを観察し, これらは envelope に欠陥があるのではないかと報告している<sup>9)</sup>。われわれの実験系では cyclic AMP 添加で温度感受性が発現する

が, この温度感受性の発現に関し cyclic AMP がどのような役割を担っているのが興味深い。おそらく, cyclic AMP と高温培養による膜形成の阻害ではないかと考える。また, この温度感受性の発現の現象が Gp1/R<sub>100</sub> ではみられないことから Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 株の変異がどのような変異であるのかも知ることが重要である。特に細胞内の cyclic AMP 濃度, および Phosphodiesterase を測定することが必要であろう。

## 引用文献

- 1) Makman, R. S., and E. W. Sutherland. J. Biol. Chem., **240**, 1309 (1965)
- 2) Chambers, D. A., and G. Zubay. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **63**, 118 (1969)
- 3) Pastan, I., and R. L. Perlman. ibid., **61**, 1336 (1968)
- 4) Yokota, T., and J. S. Gots. J. Bacteriol., **103**, 513 (1970)
- 5) Yokota, T., and T. Kasuga. ibid., **109**, 1304 (1972)
- 6) Ohashi, M., T. Shimada, H. Fukumi, and T. Yokota. Japan. J. Bacteriol., **29**, 203 (1974)
- 7) 春日徳彦, 金子通治, 金丸佳郎 山梨県立衛生研究所年報 **15**, 55 (1971)
- 8) 金子通治, 岩間まつ子, 春日徳彦 同上, **16**, 44 (1972)
- 9) Bilsky, A. Z., and J. B. Armstrong. J. Bacteriol., **113**, 76 (1973)