

## 6. Cyclic AMP 添加による *cya* 株の薬剤感受性変化

春日 徳彦 金子 通治 金丸 佳郎

Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (Cyclic AMP) は、高等動物においては種々のホルモンが標的細胞で作用を発揮する際の細胞内代謝変化指令物質であり<sup>1)</sup>、細菌では多くの適応酵素産生時にその mRNA 合成の開始に制御物質として関与する<sup>2)3)</sup>ほか、鞭毛の生合成<sup>4)</sup>、*S. typhimurium* における 0-12 抗原物質の産生、*E. coli* における  $\lambda$  ファージのレセプター産生<sup>5)</sup>等の表面構造の生合成に必要であることが報告されている。

Cyclic AMP は Adenyl cyclase によって ATP より産生されるが、Adenyl cyclase 産生遺伝子 (*cya*) の欠損変異株は糖の利用に関して Pleiotropic な表現をとる<sup>6)</sup>。上記の事実から Cyclic AMP は糖の利用を通して細菌の表面構造の構成に関与することが考えられる。表面構造の変化は透過性に影響をおよぼす可能性があり、その場合薬剤に対する感受性の変化として表現できると考えこの実験を計画した。

### 材料と方法

*cya* 変異株は横田より分与を受けた Gp 1 を用いた。これは *E. coli* HfrH よりニトログアニジン処理によって得られたもので、*cya* 遺伝子の他に *thi*、*metE*、*ilvA* などのマーカーを持つ。対照として Gp 1 より得た Cyclic AMP の添加なしに糖を利用できるようになった変異株 (Gp 1 rev)、必要に応じて W 3630 も用いた。R 因子としてサルファ剤 (SA)、テトラサイクリン (TC)、ストレプトマイシン (SM)、クロラムフェニコール (CM) の 4 剤耐性を宿主菌に与える R<sub>100</sub> を用いた。Gp 1/R<sub>100</sub> からも Cyclic AMP の添加なしに糖を利用できる変異株を得たが、これには性状の異なった 2 種類があり、Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1、rev-2 と略記した。

各株の耐性は薬剤平板希釈法によって、薬剤平板と薬剤を含まない平板とに生じた集落数の比をとり、LD<sub>50</sub> にあたる薬剤濃度で表現した。

培地は L-broth、L-agar および MacConkey agar (栄研) を、Cyclic AMP は第一化学薬品株式会社の製品を使用した。菌の増殖は主として Shimazu Spectronic 20 による 630nm の吸収で測定した。

### 結果と考察

薬剤平板中に Cyclic AMP を添加した場合としない場合とで、薬剤に対する感受性が変化するかどうかをみ

た。テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CM)、ストレプトマイシン (SM) の他に R<sub>100</sub> による耐性と関係のない薬剤として Mitomycin-C、Acridine orange も同時に使用した (図 1-1)。菌株、薬剤にかゝりなく、一般に Cyclic AMP を添加した方が薬剤感受性が高くなる傾向がみられるが、*cya* 変異株である Gp 1 と Gp 1 rev、w3630 とで相違は認められないから、これは培地中に Cyclic AMP を添加したことによって生ずる一般の現象であろう。R<sub>100</sub> をもつ菌株についての結果を図 1-2 に示した。Acridine orange についてはいずれの株でも図 1-1 と同様であったので省略した。Gp 1/R<sub>100</sub>、W3630/R<sub>100</sub> については R<sub>100</sub> をもたない場合と同様に、Cyclic AMP を添加した方が感受性が増強される傾向があった。Gp 1/R<sub>100</sub> rev-2 も同様であった。ところが Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 は Cyclic AMP 添加によって TC と Mitomycin-C に対してのみ著しい感受性を示した。図 1-1、2 より得られた LD<sub>50</sub> にあたる濃度を表にまとめた。Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 が TC と Mitomycin-C に対して感受性になる程度は両者ともほぼ同等で 64 倍とみることができる。

この実験に際して Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 は 1 mM Cyclic AMP のみを含む対照平板において集落が小さく、発育のおそいことが認められたので、L-broth を用いて Cyclic AMP による発育の阻害を観察した。一夜培養して十分に増殖した菌液を L-broth で 1,000 倍に希釈し、L 字管による振盪培養で増殖をみた (図 2)。0.1 mM でやゝ増殖が阻害され 1 mM では著しく阻害されることがわかる。

平板上で観察された TC および Mitomycin-C と、Cyclic AMP との相乗作用にあたる現象を解析するため、液体培地に実験を移した。以後の実験では Cyclic AMP 1 mM を L-broth に添加すると発育がおそいので出発の菌量を図 2 の実験の 10 倍にした。図 3-1 に示したように Cyclic AMP 1 mM と TC 50  $\mu$ g/ml を加えると 10 時間振盪培養後も殆んど菌の増殖は認められない。TC 12.5  $\mu$ g/ml でもかなり増殖は阻害されている。この場合 Cyclic AMP、TC それぞれ単独でも菌の発育を阻害するのでそれを切り離すために、各時間ごとの Optical density の測定値を対照の Cyclic AMP のみを含む管と何も含まない管との OD の比で補正した (図 3-2)。これで計算上 Cyclic AMP の効果が除かれたことになり、補正された実線と、TC のみを含む場合の点

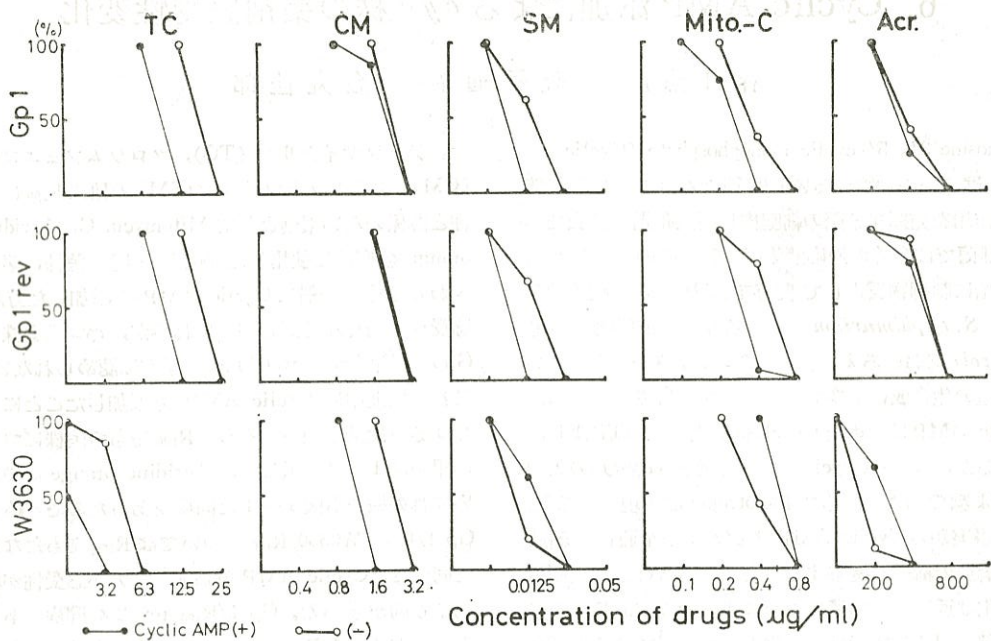


图 1-1

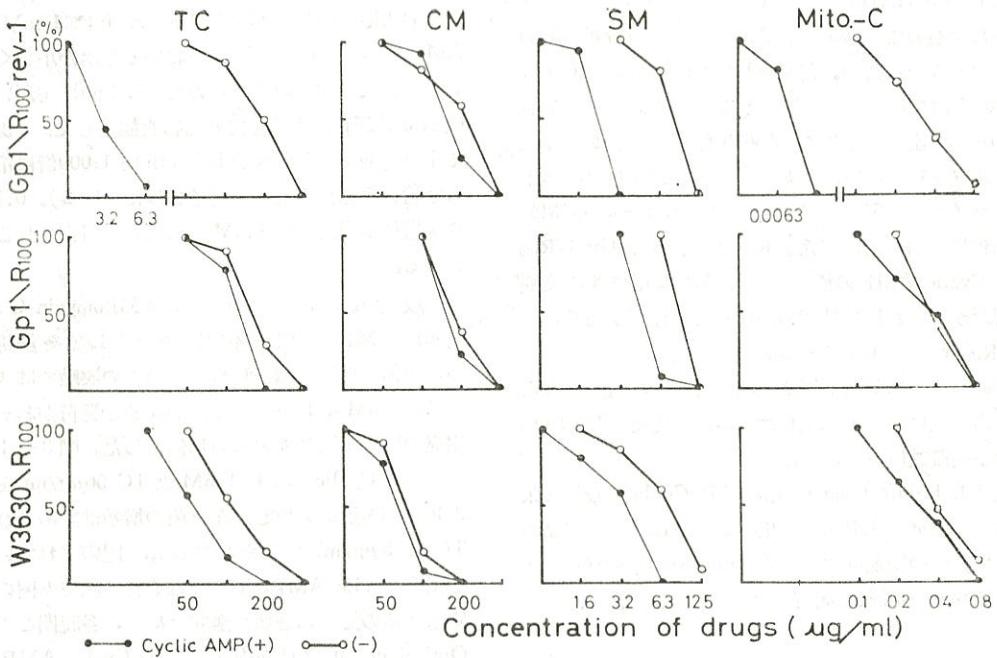


图 1-2



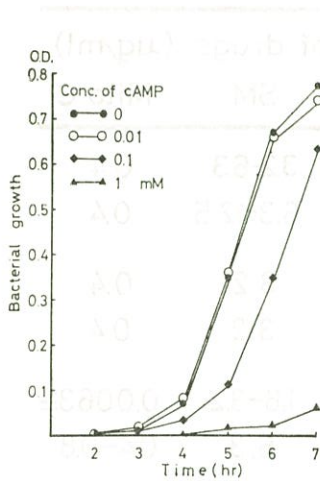


图 2

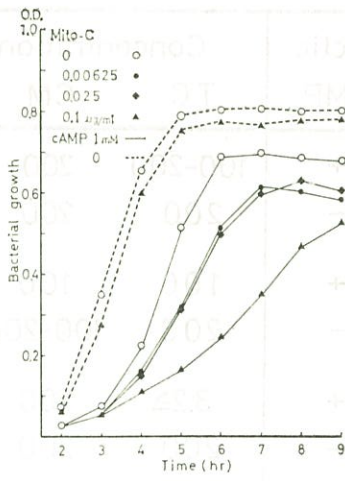


图 4-1

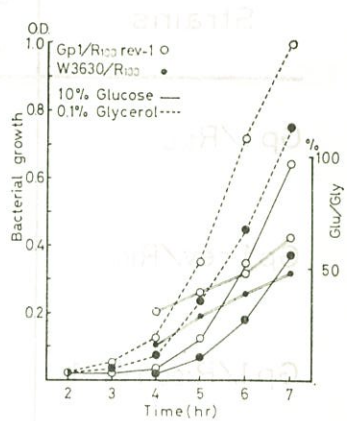


图 6

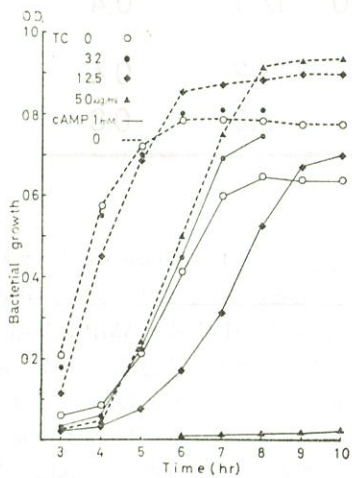


图 3-1

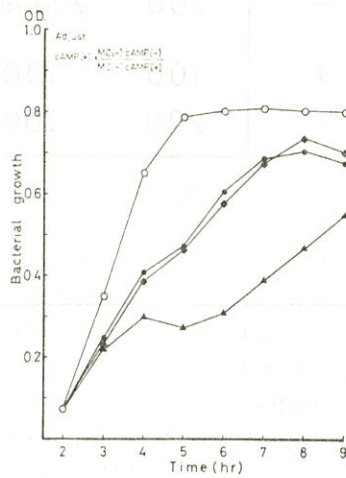


图 4-2

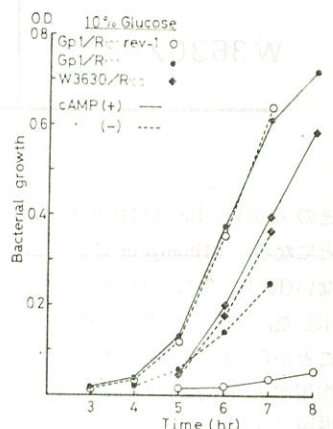


图 7

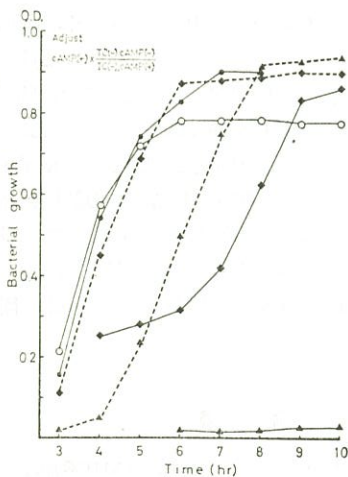


图 3-2

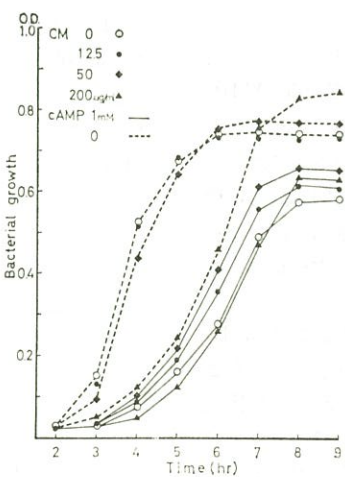


图 5

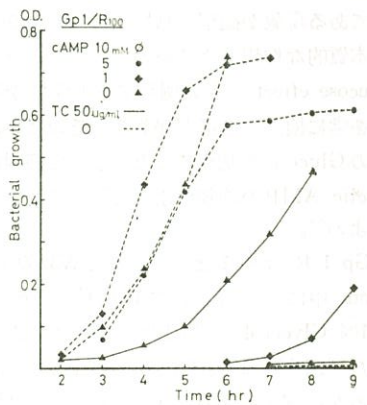


图 8

Strains	Cyclic AMP	Concentration of drugs ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		TC	CM	SM	Mito C
Gp1/R <sub>100</sub>	+	100-200	200	3.2-6.3	0.4
	-	200	200	6.3-12.5	0.4
Gp1 rev/R <sub>100</sub>	+	100	100	3.2	0.4
	-	200	100-200	3.2	0.4
Gp1/R <sub>100</sub> rev-1	+	3.2 $\geq$	200	1.6-3.2	0.0063 $\geq$
	-	200	200	6.3	0.4-0.8
rev-2	+	100	200	6.3	0.4
	-	200	200-400	12.5	0.4
W3630/R <sub>100</sub>	+	100	100	3.2	0.4
	-	200	100	6.3	0.8

表 1

線との差が Cyclic AMP と TC との相乗作用にあたることになる。Mitomycin-C についても同様の実験をおこなない(図4-1), 同じように補正した結果を図4-2に示した。TC の場合と同様補正されない大きな差が残ることから, 両薬剤には明らかな Cyclic AMP との相乗作用が認められ, 平板上で観察された事実が液体培地で再現できた。

平板上で Cyclic AMP との相乗作用の認められなかった CM についての結果を図5に示した。補正してみるまでもなく, 相乗作用は認められない。

さて, このように Cyclic AMP を添加したことによってある現象が観察された場合, それが Cyclic AMP の本質的な作用によるものであるかどうか, 例えば Glucose effect<sup>7), 8)</sup> の関与するような現象であるかどうかを常に検討する必要がある。そのためには培地中に10%の Glucose を加えることによって抑制された現象が, Cyclic AMP の添加によって解除されるかどうかをみればよい<sup>9)</sup>。

Gp 1/R<sub>100</sub>rev-1 と対照として W3630/R<sub>100</sub> を用い, L-broth 中に炭素源として10% Glucose を加えた場合と0.1% Glycerol を加えた場合について増殖速度を比較した(図6)。10% Glucose によって菌の増殖は抑制されるが, それの0.1% Glycerol での増殖に対する比をとり, 縦軸右側に示した。この図から Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1

は W3630/R<sub>100</sub> に比較して, 10% Glucose によって増殖の抑制を受けにくいことがわかる。ついで10% Glucose による増殖の抑制が, 1mM Cyclic AMP の添加によって解除されるかどうかについて検討した。図7に示したように, Gp 1/R<sub>100</sub> において解除は顕著に認められた。Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 では前述したように1mM Cyclic AMP 添加によって増殖は抑制されるが, Cyclic AMP 無添加の場合の増殖速度が, Gp 1/R<sub>100</sub> に Cyclic AMP を添加した場合のそれと一致した。これは Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 では細胞内の Cyclic AMP 濃度が高く, いわゆる Catabolite repression<sup>10)</sup> がかりにくいと考えることができる。もしこの仮定が正しいとすると, Gp 1/R<sub>100</sub> においても添加する Cyclic AMP を高くすれば Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 で観察されたと同様に TC と Cyclic AMP の相乗作用が生ずることが期待される。その結果を図8に示した。5mM の Cyclic AMP 添加によって, Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 において1mM Cyclic AMP を添加した場合に対応する TC と Cyclic AMP の相乗作用が観察された。

## 論 議

*cya* 変異株 Gp 1/R<sub>100</sub> より, Cyclic AMP 添加なしに糖を利用できるような株を得たところ, その殆んどは



*cya*<sup>+</sup> revertant (Gp 1/R<sub>100</sub> rev-2) であったが、それらとは性質の異なる株 Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 が得られた。この株は 1mM Cyclic AMP 添加によって増殖が著しく阻害され、しかも Cyclic AMP 存在下で TC と Mitomycin-C に対して約64倍感受性になる。CM, SM, Acridine orange では耐性度に変化はない。10% Glucose の添加によって増殖の抑制がおこりにくいことから、この株では細胞内の Cyclic AMP 濃度が高いため、Catabolite repression がかゝりにくいことを予想した。事実添加する Cyclic AMP 濃度を 5mM にすると、元株 Gp 1/R<sub>100</sub> でも増殖の阻害、Cyclic AMP と TC、Mitomycin-C との相乗作用が観察され、この現象は一般性のあることがわかる。従ってこの現象は Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 の細胞内 Cyclic AMP 濃度が高いため、培地に加えられる Cyclic AMP によって過剰な Cyclic AMP の影響が出現し易いためと考えることができる。

Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 における TC, Mitomycin-C の場合を除き、一般に 1mM Cyclic AMP 添加によって薬剤感受性がや、高くなることから、培地中に添加した Cyclic AMP の一次作用点は菌の透過性の変化であると想定すると、種々の現象を説明することができる。R 因子による耐性機構は、CM と SM では不活化酵素の産生によることが報告されている<sup>11), 12)</sup>。TC については透過性の変化によるとされているが、その発現は誘導される<sup>13)</sup>。即ち R 因子による TC の耐性度は 3.2μg/ml 程度であるが、0.5μg/ml のような低濃度の TC で前処理することによって 200μg/ml の高い耐性が発現する。前処理せずに高濃度の TC 中で培養した場合は、最初は増殖が阻害されるが徐々に誘導がおこり、結果として高濃度 TC 中でも十分に増殖すると考えられる。上記の事実から Cyclic AMP 添加によって Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 でみられた現象を説明すると次のようになる。CM, SM に関しては透過性が増加して菌体内に入っても、不活化酵素の産生によって CM, SM が不活化されるので殆んど耐性度に変化はない。ところが TC には不活化機構がないので、透過性の増加によって最初に多量の細胞内蓄積がおこってしまうと、耐性の誘導がおこる時間的余剰がなく、菌の増殖が阻害されてしまう。Mitomycin-C については不明である。

最後に、Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 では細胞内 Cyclic AMP 濃度が高いと仮定したが、これについては今後実証しなければならないし、またどのような変異によってこの株が

得られたかも明らかにしなければならない。この株の細胞内 Cyclic AMP 濃度が高いとするとその原因は、*cya* 遺伝子の復帰変異によって産生量が増加したのであれば Gp 1/R<sub>100</sub> rev-2 になる筈であるから、*cya* 遺伝子に変異が生じたためではないと考えられる。Cyclic AMP の分解酵素である Phosphodiesterase 産生の欠損株である可能性もあるが、Mutagen を作用させて得た株ではないので変異率からみて考えにくい。細胞内 Cyclic AMP は Glucose repression がかゝった時、培地中に排出されることが知られているが<sup>14)</sup>、この排出機構に欠陥の生じた株が Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 であると考えたい。

## 引用文献

- 1) Robinson, G.A., R.W. Butcher, and E. W. Sutherland. *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 149 (1968)
- 2) Chambers, D.A., and C. 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) Perlman, R.L., and I. Pastan. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **37**, 151 (1969)
- 7) Epps, H.M.R., and E.F. Gale. *Biochem. J.*, **36**, 619 (1942)
- 8) Monod, J. *Growth*, **11**, 223 (1947)
- 9) Ullman, A., and J. Monod. *FEBS Letters*, **2**, 57 (1968)
- 10) Magasanik, B. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**, 249 (1961)
- 11) Okamoto, S., and D. Mizuno. *J. Gen. Microbiol.*, **35**, 125 (1964)
- 12) Okamoto, S., and Y. Suzuki. *Nature*, **208**, 1301 (1965)
- 13) Izaki, K., K. Kiuchi, and K. Arima. *J. Bacteriol.*, **91**, 628 (1966)
- 14) Makman, R.S., and E.W. Sutherland. *J. Biol. Chem.*, **240**, 1309 (1965)