

## 7. R 因子による TC 耐性の発現に及ぼす cyclic AMP の影響

金子 通 治      春日 徳 彦

adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) が大腸菌にも存在し、しかもその細胞内濃度は、培養液中のグルコース濃度と反比例の関係にあることが実証されて<sup>1)</sup>以来 cyclic AMP は、細菌における glucose repression に関与するという多くの報告がなされ<sup>2, 3)</sup>最終的には適応酵素産生の調節機構におけるその役割が明らかにされ<sup>4, 5)</sup>てきたが、しかし生理的な作用については未知の点が多い。

*E. coli*, *S. typhimurium* の *cya* 変異株を用いての実験から、cyclic AMP は鞭毛の生合成<sup>7)</sup>, O 抗原の産生<sup>8)</sup> ラムダフェージのレセプター産生<sup>9)</sup>等に必須であることが明らかになったが、これらはいずれも糖代謝との関連において理解されるものであろう。このような表面構造の構成におよぼす cyclic AMP の作用から透過性との関連を推測して行なった実験の結果を前報に報告した。これによれば、*E. coli* Hfr H の *cya* 変異株 Gp1 に R<sub>100</sub> を伝達させ、それより得た cyclic AMP の添加なしに糖を利用できるようになった変異株のうちのあるもの (Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1) は、cyclic AMP の添加によってテトラサイクリン (TC) と、マイトマイシン C に対してのみ 50~100 倍も感受性の増加を示す。ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、アクリジンオレンジに対しては、cyclic AMP 添加、無添加で感受性値にほとんど差はない。マイトマイシン C の細菌への作用点は明らかにされていないが、TC に関しては R 因子による耐性機構は透過性の減少であって、しかもその耐性発現は誘導されることが知られている<sup>9)</sup>。そこで本報では Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 株において観察された cyclic AMP 添加による TC 耐性の減少を、TC 耐性の発現における cyclic AMP の作用という観点から追求したので報告する。

### 材 料 と 方 法

使用菌株は前報に述べた *E. coli* Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 である。cyclic AMP は第一化学薬品 K.K 製、テトラサイクリンは日本レダリー K.K のオーレオマイシン (クロルテトラサイクリン) を使用した。培養液はこの実験を通してすべて L-broth であって、菌の増殖は Shimazu Spectronic 20 による波長 630nm での吸収によって測定した。培養液からの cyclic AMP の除去は、37°C で振盪培養した菌液 10ml を 4°C、10,000 回転で 25 分間遠心し、沈

渣を新鮮な L-broth 10ml に浮遊することにより行なった。TC 耐性の誘導は 5mcg/ml の TC で 1.5 時間前処理する方法によった。

### 結 果

前報で述べたように Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 は 1mM cyclic AMP の存在下で増殖が抑制される。そこでまず、経時的に培養液に cyclic AMP を添加することによって、その増殖抑制効果が現われるまでの時間を確認した。図 1 に示したように対数増殖期の途中で cyclic AMP を加えた場合も増殖抑制は観察される。ついで TC 50mcg/ml を含む L-broth 中で菌を振盪培養し、図 1 の実験と同様に 3, 4, 5, 6 時間の各時間ごとに 1mM cyclic AMP を添加した (図 2)。最初から TC 50mcg/ml と cyclic AMP 1mM を培養液に加えてある場合は 10 時間後も菌の増殖はみられないが、後に cyclic AMP を加えると図 2 にみられるようにその増殖抑制の効果は、やや遅れて現われてくる。ところが、1mM cyclic AMP を含む L-broth で振盪培養し経時的に TC 50mcg/ml を添加した場合は、その効果は急速に現われ添加直後から完全に増殖が抑制される (図 3)。

次に cyclic AMP または TC を培養の途中から除去する実験を行なった。まず cyclic AMP 1mM のみを含む L-broth で菌を振盪培養し、時間ごとに材料と方法で述べたように遠心によって菌を集め、新鮮な L-broth に suspend することで cyclic AMP を除去すると増殖抑制の解除は比較的速やかに起ることがわかる (図 4)。

cyclic AMP と TC の両者を含む培養液から経時的に cyclic AMP を除去 (図 5) または TC を除去 (図 6) した。図 5 に示したように cyclic AMP の除去によって遅れて増殖抑制は解除されるが、その遅れは図中の TC only の曲線と 2 時間後または 4 時間後の cyclic AMP deprivation との増殖曲線と比較することによってほぼ 5 時間とみることができる。同様に図 6 から TC 除去の効果もほぼ 5 時間後に現われてくる。最後に 5mcg/ml の TC で 1.5 時間前処理した後、TC 12.5 または 50mcg/ml、cyclic AMP 1mM を含む L-broth に菌を移して振盪培養することによって、TC 耐性誘導の増殖に及ぼす影響を観察した (図 7)。

5mcg/ml TC での前処理をした場合としない場合と

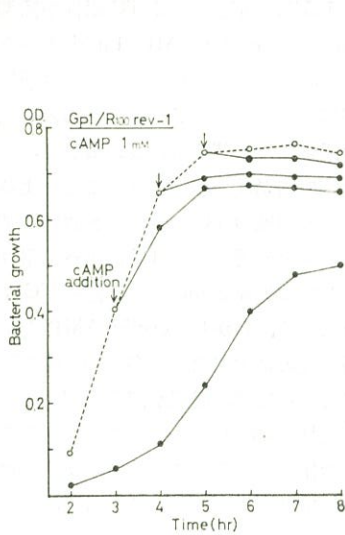


图 1

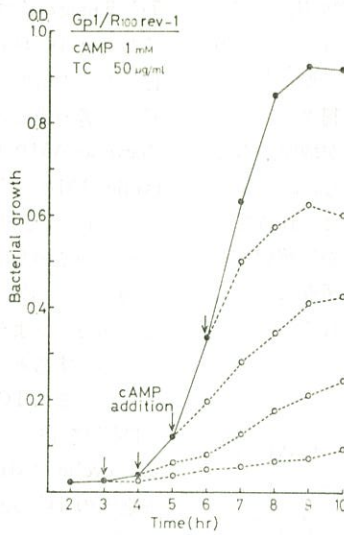


图 2

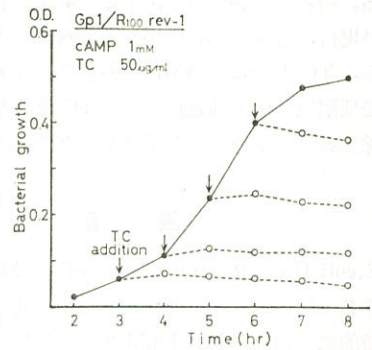


图 3

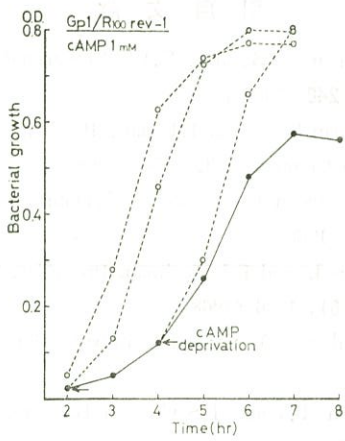


图 4

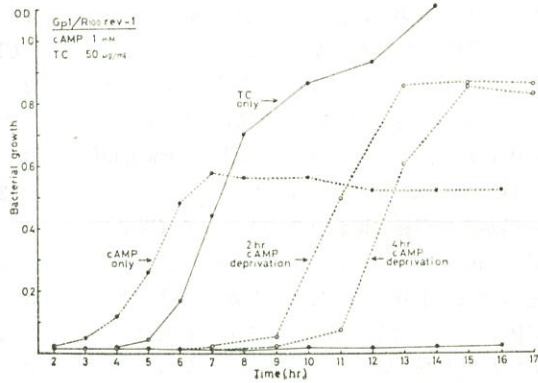


图 5

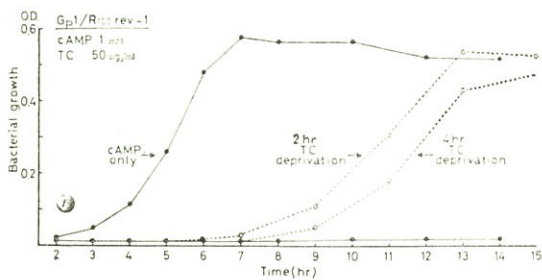


图 6

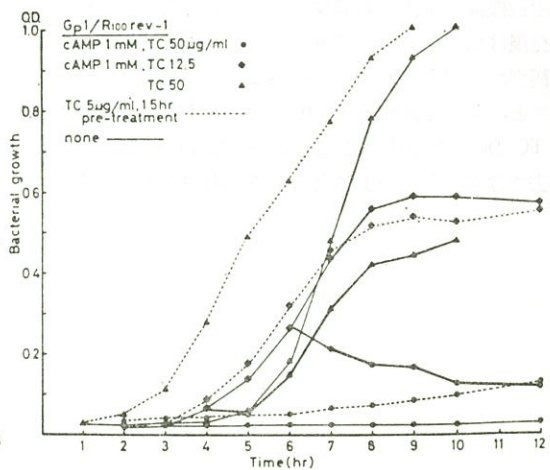


图 7

でその後の TC 50mcg/ml 中での増殖速度の比較から、TC 耐性の誘導が起っていることがわかる。また、50 mcg/ml TC, 1 mM cyclic AMP を含む培養液中では TC 前処理をしないと菌の増殖は完全に抑制されているが、前処理をしておく、緩やかではあるが増殖がみられる。両者の比をとって図中に二重線で示した。比が小さい場合、耐性誘導の効果が大きであると考えられることから、TC と cyclic AMP との相乗的な菌の増殖抑制効果を低濃度 TC の前処理による TC 耐性の誘導によって解除することができた結果であると考えられる。

## 論 議

E.coli Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1 に cyclic AMP 1 mM を添加すると菌の増殖が抑制されることを前報に報告したが経時的に cyclic AMP 1 mM を添加した時の増殖抑制効果は1時間後に現われ、cyclic AMP の菌に対する増殖阻害が確認された。TC 50mcg/ml を含む培養液に cyclic AMP 1 mM を3, 4, 5, 6時間の後に添加した場合の増殖抑制の効果は、前述したとほぼ同様に現われることから、TC 耐性の発現が起っていると思われる菌では cyclic AMP 添加による増殖抑制効果は現われにくくなっていると考えられる。従って、逆の場合の cyclic AMP 1 mM を含んだ培養液への TC 50mcg/ml の添加は、TC の耐性の発現が行なわれていないため増殖の抑制効果が添加直後に現われることになる(図3)。cyclic AMP 1 mM の除去の効果は1時間後に速やかに起り、その効果は十分に現われる。しかし、TC と cyclic AMP の両者を含んだ培養液からの経時的な cyclic AMP の除去の効果は、5時間後に増殖の抑制解除として現われる。同様に TC を除去した場合もその効果は5時間後に現われて両者に差は認められない。TC の耐性機構は透過性の減少であるとされており、その耐性発現は低濃度の TC 前処理によって誘導される<sup>9)</sup>。この観点から図5, 6の実験結果に差がないことを考えてみると、TC と cyclic AMP の両者の存在下では速やかな TC の細胞内蓄積がおこり、それは1回の遠心操作で除去できないためであると考えられることができる。そこで

TC 5 mcg/ml で1.5時間前処理して TC 耐性を誘導しておけば TC 50mcg/ml, cyclic AMP 1 mM という条件でも菌の増殖が起こると考えられるが、結果は予想通りで誘導の効果が観察された(図7)。これらの事実から cyclic AMP の添加による TC 耐性度の減少は、cyclic AMP が TC の透過性を増加させることによると考えられる。即ち、高濃度の TC のみが培養液に加えられている場合は、徐々に透過する TC によって耐性が誘導され、結果として200mcg/ml もの高濃度 TC 中でも増殖できるようになる。しかし、cyclic AMP が最初から存在すると透過性の増大によって多量の TC 蓄積がおこり、その TC によって菌の機能が完全に抑制され、長時間培養しても耐性の誘導が起らないと考えられる。cyclic AMP の作用を解明する一つの手がかりは、細胞内の TC の蓄積量を知ることであると考え、実験を計画している。

## 引用文献

- 1) Makman, R.S. and E.W. Sutherland, J.Biol. Chem., **240**, 1309 (1965)
- 2) Perlman, R.L., and I. Pastan. Biochem. Biophys. Research Commun., **30**, 656 (1968)
- 3) Goldenbaum, P.E., and W.J. Dobrogosz. *ibid.*, **33**, 828 (1968)
- 4) Pastan, I., and R.L. Perlman. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **61**, 1336 (1968)
- 5) Chambers, D.A., and C. Zubay. *ibid.*, **63**, 118 (1969)
- 6) Yokota, T., and J.S. Gots. J. Bacteriol., **103**, 513 (1970)
- 7) Yokota, T., and T. Kasuga. Jap. J. Bacteriol. **26**, 583 (1971) in Japanese
- 8) Yokota, T., and T. Kasuga. J. Bacteriol. **109**, 1304 (1972)
- 9) Izaki, K., K. Kiuchi, and K. Arima. J. Bacteriol., **91**, 628 (1966)