

# Cyclic AMP 添加による大腸菌の薬剤感受性変化

## (6) ニトロフラン

春日 徳彦

岩間 まつ子\*

### 材料と方法

主として用いた菌株は Gp1/R<sub>100</sub> rev-1<sup>7)</sup> である。比較のために元株である Gp1/R<sub>100</sub> および Gp1 も使用した。cyclic AMP は第一化学薬品の製品を、またニトロフランは富山化学のパンフラン-S を使用した。各株の耐性度は、薬剤平板希釈法によって作製した薬剤平板と、薬剤を含まない対照平板との上に生じた集落数を比較することによって表現した。液体培地での菌の増殖は、Shimazu Spectromic 20 によって波長 630 nm の吸収で測定した。

パンフラン-S の Intact cell による Reduction の測定は、ほぼ McCalla らの方法<sup>9)</sup> によった。簡単に述べると、十分に増殖した菌液から 10,000 回転 20 分間の遠心によって集菌する。磷酸緩衝液 (0.066 M, pH 7.2) で洗った後、同じ緩衝液に菌を浮遊させ、同時に 0.05 M になるようにグルコースを加える。これを 2 本の容器に分け、一方に 1 mM の濃度になるように cyclic AMP を加える。37°C で 1 時間振盪培養した後、パンフラン-S を加える。振盪培養を続けながら、時間の経過ごとに試料をとる。10,000 回転 20 分の遠心によって菌を除いた後、上澄中に残存するパンフラン-S の濃度を測定した。測定は 406 mμ の吸光度によった。

### 結果と考察

菌の薬剤に対する耐性度を、薬剤平板と対照平板とにそれぞれ生じた集落数の比をとり、LD<sub>50</sub> あたる数値で表現した。表 1 にみられるように、Gp1/R<sub>100</sub> rev-1

表 1

CAMP	No. of colonies appeared (%)							Control
	0.1	0.05	0.025	0.013	0.006	0.003	0.0015	
1 mM	0	0	0	0	168 (14.2)	703 (59.5)	847 (71.7)	1,231 1,151 1,163 (100)
0	0	138 (8.9)	1,189 (77.0)	1,443 (93.5)				1,549 1,717 1,366 (100)

Strain : Gp1/R<sub>100</sub>rev-1

高等動物では種々のホルモンが標的細胞において作用する場合、その細胞内の代謝を制御する役割を、adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) が担っている<sup>1)</sup>。細菌においては、この cyclic AMP が Transcription の段階で Promotor 遺伝子を介して適応酵素の産生を調節することが、近年明らかにされつつある<sup>2)3)</sup>。

cyclic AMP は adenylate cyclase によって ATP から産生されるので、この酵素の産生遺伝子 (*cya*) の欠損変異株は、各種の糖の利用に関して Pleiotropic な表現をとることになる<sup>4)</sup>。*cya* 変異株を用いて cyclic AMP は鞭毛<sup>5)</sup>、λ ファージのレセプター<sup>6)</sup>などの表面構造の生合成にも必要であることが報告されている。

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してい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、その場合薬剤の感受性の変化として表現されるのではないかと考え、この実験を進めている。

*E. coli* K-12 HfrH をニトロソグアニジン処理することによって得られた *cya* 変異株である Gp1<sup>5)</sup> に、宿主菌をサルファ剤、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリンの 4 剤に対して耐性にする R 因子、R<sub>100</sub> を入れた Gp1/R<sub>100</sub> から、cyclic AMP の添加なしに種々の糖を利用できるようになった変異株を得た。ところがこの変異株のうちあるもので、cyclic AMP の添加によって、テトラサイクリンの耐性度が 200 μg/ml から 3.2 μg/ml に低下すること、またマイトマイシン C に対しても感受性が 64 倍増加することが観察された<sup>7)</sup>。テトラサイクリンの蓄積量の検討から<sup>8)</sup>、この変異株、Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 では cyclic AMP の添加によって透過性が増大することが考えられた。しかしテトラサイクリン耐性菌において、その耐性度と蓄積量の低下とがどの程度並行するかは明らかではなく、従って上記の現象も透過性の変化のみで説明できるかどうかは疑問である。

本報では Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 株を用い、他の種々の薬剤について同様な実験を試みたいところ、cyclic AMP 添加によってパンフラン-S に対する感受性が低下する現象が観察されたので、その結果について報告する。

\* 消費生活センター

表 2

Strains	cAMP	No. of colonies (%)		
		0.025	0.006	0
Gp1	+	0	0.4	100
	-	0	1.2	100
Gp1/R <sub>100</sub>	+	66.4	85.8	100
	-	83.5	83.0	100
rev-1	+	0	14.2	100
	-	77.0	93.5	100

のそれは、cyclic AMP を加えた場合はほぼ 0.003 $\mu$ g/ml であり、加えない場合は 0.025~0.5  $\mu$ g/ml であった。即ち Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 では、cyclic AMP を加えることにより、パンフラン-S に対する感受性が約10倍増大する。このような現象はこの株に特異的なものであり、元株の Gp1/R<sub>100</sub>、あるいは Gp1 では認められなかった(表2)。Gp1 はもともとパンフラン-S に対して感受性が高いのだが、cyclic AMP 添加によってそれが変動することはない。

薬剤平板上で Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 にみられたこの現象は、液体培養においても再現された(図1)。この変異株は 1 mM cyclic AMP のみの添加によってもやや増殖が抑制されるのだが、同時に 0.05  $\mu$ g/ml の濃度でパンフラン-S を加えると、更に強く増殖が阻止されることがわかる。Gp1/R<sub>100</sub> ではむしろ cyclic AMP を加えた場合の方が増殖はよく、この傾向は特に増殖の初期において顕著である(図2)。

上記から cyclic AMP を添加することによって生ずる。パンフラン-S に対する感受性の増大は、Gp1/R<sub>100</sub>

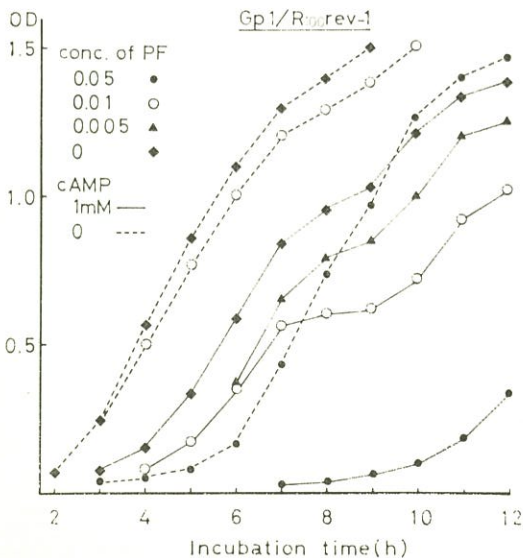


図 1

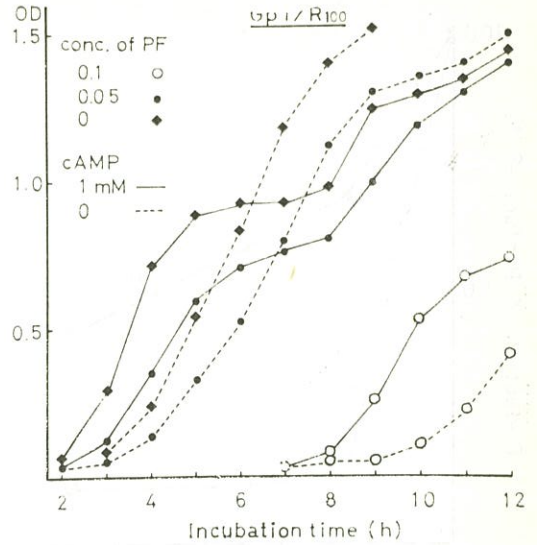


図 2

rev-1 株においてみられる特異的な現象にあることがわかる。その原因について解析を進めた。

ニトロフランの作用機作については、すでに McCalla らの報告<sup>9)</sup>がある。彼らは大腸菌を用いて、ニトロフランを加えた培地が継代培養することによって感受性の低下した変異株を得た。それらが獲得した耐性度には、元株の3倍のものと、6~7倍のものとがあった。ところが変異株における耐性度の上昇は、Reductase 活性の低下と並行していた。即ち3倍の耐性を獲得した変異株では Reductase 活性が 1/3 に低下していたという。したがって、培養液中にニトロフランを加えて菌体全体によるニトロフラン量の低下をみると、感受性株がもっともよくニトロフランを減少させ、耐性の上昇している変異株を用いたときほど、ニトロフランの残存量が多いことになる。これらの事実からニトロフランの作用機作を考えると、この系統の薬剤では、薬剤そのものが直接細菌に作用して抗菌作用をあらわすのではなく、細胞内にとり込まれたニトロフランが、代謝の第一段階としてニトロ基の Reduction をうける。その代謝過程が、あるいはその代謝中間産物が抗菌作用を示すと考えることができる。

今回 Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 株で得られた結果を上記に対応させて考えると、cyclic AMP を加えた場合のパンフラン-S に対する感受性の増加は、Reductase 活性の上昇と対応することになる。したがって、cyclic AMP を加えたときに、*cya* 株における  $\beta$ -galactosidase と同様に Reductase が誘導され、酵素活性が上昇するならば、この現象を説明することができる。ところが、Gp1/R<sub>100</sub> rev-1 を用い、1 mM の cyclic AMP を加えた



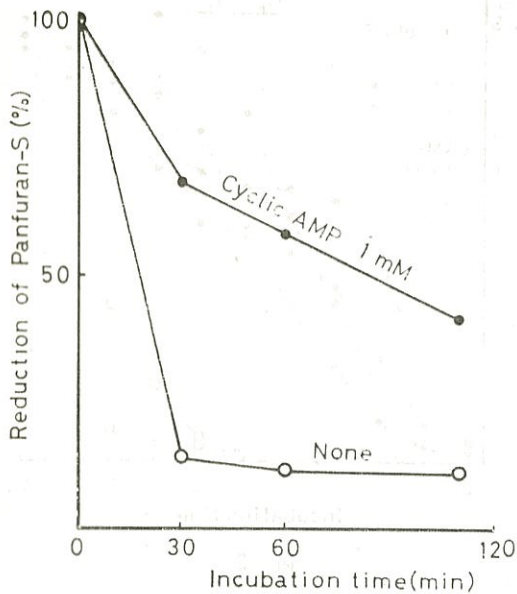


図 3

場合と加えない場合について、パンフラン-SのReductionを測定したところ、cyclic AMPを加えるとむしろReductionがおこり難くなるという結果が得られた(図3)。

Gp 1/R<sub>100</sub> rev-1でcyclic AMPを添加したときのみみられるパンフラン-Sに対する感受性の増大は、Redutase活性の増減と無関係であり、他の機構の存在を示唆するものである。その機構が既に報告したテトラサイクリンの場合<sup>8)</sup>と同様に、cyclic AMP添加による菌の透過性の増大である可能性は極めて大きいと考える。

## 引用文献

- 1) Robinson, G. A., R. W. Butcher, and E. W. Sutherland.  
Ann. Rev. Biochem., **37**, 149 (1968)
- 2) Pastan, I., and R. L. Perlman.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **61**, 1336 (1968)
- 3) Chambers, D. A., and C. Zubay.  
*ibid.*, **63**, 118 (1969)
- 4) Perlman, R. L., and I. Pastan.  
Biochem. Biophys. Res. Comm., **37**, 151 (1969)
- 5) Yokota, T., and J. S. Gots.  
J. Bacteriol., **103**, 513 (1970)
- 6) Yokota, T., and T. Kasuga.  
*ibid.*, **109**, 1304 (1972)
- 7) Kaneko, M., Y. Kanemaru, and T. Kasuga.  
Japan. J. Bacteriol., **27**, 206 (1972) (in Japanese)
- 8) Kaneko, M., M. Iwama, and T. Kasuga.  
*ibid.*, **28**, 300 (1973) (in Japanese)
- 9) McCalla, D. R., A. Reuvers, and C. Kaiser.  
J. Bacteriol., **104**, 1126 (1970)
- 10) Kaneko, M., and T. Kasuga.  
Japan. J. Bacteriol., **27**, 839 (1972) (in Japanese)