

大腸菌におけるcAMP合成と catabolite repressionについて : cAMP合成及びadenine nucleotideの作用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8708

大腸菌における cAMP 合成と catabolite repression について

—cAMP 合成及び adenine nucleotide の作用—

金沢大学医学部第二生化学講座 (主任: 久野 滋教授)

浜 井 義 則

(昭和53年3月2日受付)

動物, 微生物界に広く分布している adenosine 3', 5' cyclic phosphate (cAMP) は代謝調節上重要な役割を果たしている。微生物においては, この cAMP は誘導酵素の合成の調節に関与すると思われる¹⁾²⁾。誘導酵素の一つである β -galactosidase は glucose により, いわゆる catabolite repression を受け, この repression は cAMP を培地に加えることにより回復される^{3)~5)}。この回復は β -galactosidase などの誘導酵素の遺伝子の transcription に cAMP が, 関与するためとされている⁶⁾。従って glucose による β -galactosidase 合成の抑制は細胞内 cAMP の減少によるものと推定されてきた⁷⁾⁸⁾。しかしながら glucose 等による catabolite repression が cAMP の添加により回復されることは, どの報告でも一致しているが, 大腸菌での cAMP 合成, あるいは培地中への放出の程度がこれらの repression の程度と完全に平行するか否かについて報告相互に矛盾が見られ^{9)~15)}。最近 cAMP 以外の調節機構の存在も示唆されている¹⁶⁾。誘導酵素は, 一般に catabolism に関与するもので, 従ってエネルギー産生と密接に関連している¹⁷⁾。それ故, 細胞内における energy 保持の主形態である ATP 又はその誘導体も何等かの作用を誘導酵素産生に及ぼしている可能性も推測される¹⁸⁾。

本研究では種々の増殖条件下で cAMP の合成を測定し, β -galactosidase 合成と cAMP 合成速度の間の動的関係を明らかにするとともに, これらの repression における ATP 等の作用機構について検討を行なった。

実験材料及び方法

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), α -methyl-D-glucoside, ATP, CTP, UTP, ADP, AMP はシグマ社より購入し, GTP ヤマサ醤油株式会社, o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), 半井化学薬品株式会社, [2 - 3 H] adenine (20ci/mmmole), [8 - 3 H] cAMP (30ci/mmmole) New England Nuclear Corp, セルロース, Marchery Nagel Corp から購入した。

菌として大腸菌 3,000 (thiamine⁻) の UV 照射から分離した adenine 要求菌を用いた。菌の増殖は, Tris-glycerol 培地¹⁹⁾ (10 μ g adenine, 2 μ g thiamine/ml を含む) を用い 37°C で行なった。増殖の測定は, 660m μ での吸光度の測定により行なった。

β -galactosidase の測定, β -galactosidase の測定は, Pardee らとほぼ同様な方法で行なった²⁰⁾。菌の培養液から時間経過とともに 0.5 ml の標品を取り, 1 drop のトルエンとともに攪拌後 37°C 30 分間静置した。このトルエン処理標品 0.10 ml に 0.05M リン酸緩衝液 pH7.0 に溶かした 2.6mM ONPG 0.9 ml を加え 15 分間 37°C で反応を行なった。反応後 0.4M 炭酸ナトリウム 2 ml を加え, OD₄₂₀m μ で o-nitrophenol の量を測定した。

cAMP 合成の測定, 対数増殖期の菌を集め, 40n mole/ml 3 H-adenine (specific activity 2.7 \times 10⁵ cpm/nmole) を含む TGA 培地 (2 μ g thiamine/ml) に浮遊した (菌の濃度, OD₆₆₀ = 0.1 ~ 0.25)。時間経過とともに 1.0 ml の標品をメンブレンフィルター

Synthesis of cAMP and catabolite repression in *E. coli*. Yoshinori Hamai, The Second Department of Biochemistry. (Director: Prof. S.Kuno.), School of Medicine, Kanazawa University.

(Sartorius 社)で濾過し、5 ml の TGA 培地で洗浄した。このフィルター上の菌体を菌体内 cAMP の測定に使用し、濾液及び洗液は、細胞外 cAMP の測定に用いた。

a) 細胞内 cAMP の測定、上記のメンブレンフィルターに集められた菌体を 80 nmole cAMP を含む 0.1N HCl 1 ml に浮遊させ、10 分間 100°C 加熱した。冷却後、遠心 (10000 rpm × 10 分間) し、上清を定量的に集め凍結乾燥し、残渣を 25 μ l の H₂O に溶解した。この溶液 10 μ l を薄層クロマトに用いた。薄層クロマトはセルロース plate 20 × 20 cm を用い、90 % isopropanol で一度展開した後、二次元展開で cAMP を分離した。一次元は、isopropanol : NH₄OH : H₂O (7 : 1 : 2) で行ない、二次元は、isopropanol : formic acid : H₂O (7 : 1 : 2) の溶媒を使用した。薄層クロマトの展開後 cAMP の位置を UV ランプで確認し、その部分をけずり取り、0.1N NH₄OH 0.5 ml、Triton-toluene

scintillant²¹) 5 ml を加えて放射活性を測定した。なお、凍結乾燥から薄層クロマトまでの回収率は約 96 % で細胞内 cAMP の量は 1.0 ml につき OD₆₆₀m μ の吸光度 1.0 あたりの量で示した (pmole/DU660)。この方法で混入する培養液の量は 0.5 μ l 以下であった。

b) 細胞外 cAMP の測定、洗液を含めた濾液は、Dowex-1-column (× 8, 1 × 2 cm, acetate form) に通し、次で H₂O 30 ml、0.1M ammonium acetate, pH 4.5 60 ml、5M acetic acid 15 ml で溶出した。adenine は H₂O 及び 0.1M ammonium acetate の分画で完全に溶出され、cAMP は 5M acetic acid の分画で溶出した。5M acetic acid の分画を凍結乾燥し、2.3 μ mole/ml cAMP 溶液 0.3 ml を加えて溶解し、その 10 μ l に薄層クロマトに使用した。薄層クロマトはセルロース plate を用い、一次元展開で cAMP を分離した。溶媒は、1M ammonium acetate : Ethyl alcohol (2 : 7) を使用し、展開後 cAMP の位置を UV ランプで確認し、前述と同様に放射活性を測定し

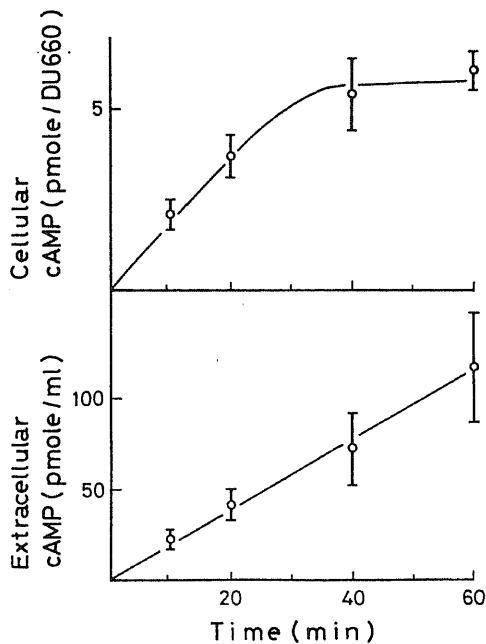


Fig.1. cAMP synthesis in *E. coli* 3000 ad⁻. Cells were grown in Tris-glycerol medium and assayed for cellular and extracellular cAMP as described in Materials and Methods. Each point represents the average of six measurements, and error bars represent the standard deviations of the analysis.

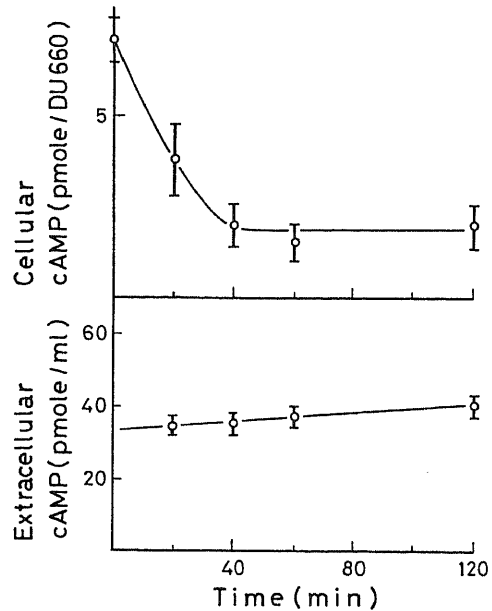


Fig.2. Turnover of cAMP synthesis in *E. coli* 3000 ad⁻. Cells were grown in 5 ml of Tris-glycerol medium for 40 min in the presence of ³H-adenine. At 40 min, cold adenine (final concentration 0.4 mM) was added to culture and samples were taken at intervals for determination of cAMP. Each point represents the mean \pm SD of four measurements.

た。細胞外 cAMP 量は、specific activity から計算し、1.0 ml 培地あたりに放出される量を示している。なお、Dowex-1 column から薄層クロマトまでの回収率は約 90% であった。

大腸菌の EDTA 処理、大腸菌の EDTA 処理は、Hosono 及び Kuno²²⁾ の方法に従った。対数増殖期 ($OD_{660} m\mu 0.15$) の菌を集菌し、1/7 量の 0.1M Tris-HCl pH8 に浮遊させ、1mM EDTA で 37°C 2 分間処理した。処理後、10 倍量の TGA 培地を加えた。

実験結果

大腸菌の cAMP 合成、図 1 は β -galactosidase 合成によく用いられる Tris-glycerol 培地における cAMP 合成である。細胞外 cAMP は、ほぼ直線的に増加し、その速度は $OD_{660} m\mu$ の吸光度 1 あたり $3.5 \sim 7.5 pmole/ml/min$ であった。これに対して細胞内 cAMP の合成は非常にゆるやかで $0.1 \sim 0.2p$

mole/DU660/min で細胞外 cAMP の 1/20 以下の速度であり、また定常状態に達するのに約 40 分も必要とした。あらかじめ大腸菌を 3H -adenine とともに 40 分間 incubation してからこれに非放射性で adenine を加えた(最終濃度 0.4M) 場合の変化を見ると図 2 で示したように、細胞外 cAMP の増加速度は直ちに低下するのに対して細胞内 cAMP は、除々に低下し、約 40 分後に予想レベルに達した。

cAMP 合成におよぼす glucose の効果、glucose による β -galactosidase 合成の抑制は図 3 で示したように glucose 添加後一時的な抑制 (transient repression) と以後長時間にわたる抑制 (catabolite repression あるいは permanent repression) の 2 つのタイプの抑制がある。10mM glucose 存在下での cAMP 合成を検討してみると図 4 で示したように、細胞内 cAMP 合成は、glucose を添加しても添加しなくてもほとんど影響は認められない。しかし cAMP

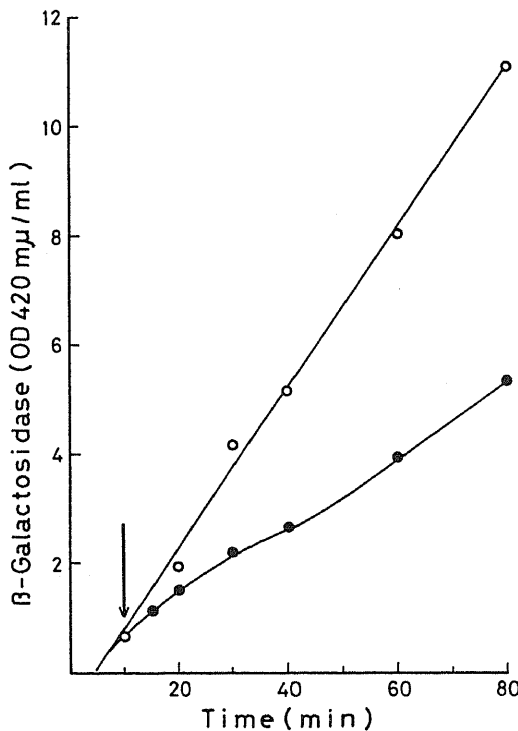


Fig.3. Effect of glucose on β -galactosidase synthesis. Cells were induced with 0.4mM IPTG. At 10 min (arrow), the culture was divided into two parts. One part was served as control (○); and the other received 10mM glucose (●).

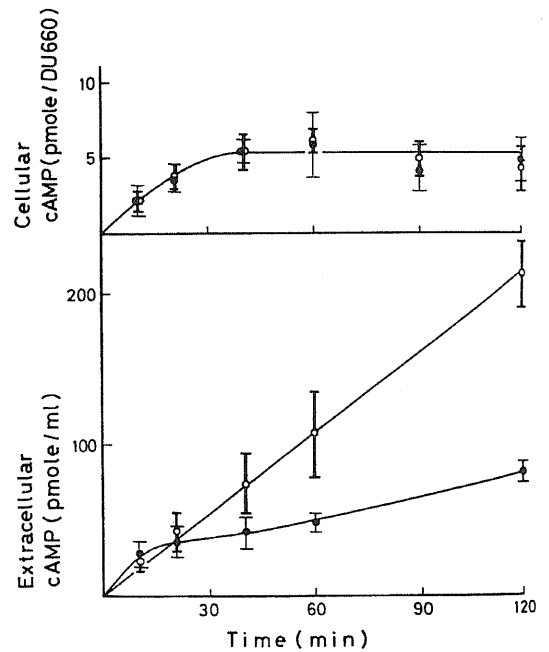


Fig.4. Effect of glucose on cAMP synthesis in *E. coli* 3000 ad-. Cells were grown in Tris-glycerol medium. The culture was divided into two parts. One part was served as control (○); and the other received 10mM glucose (●). 3H -adenine was added to each culture, and samples were taken from each culture for assay of cAMP. Each point represents the mean \pm SD of six measurements.

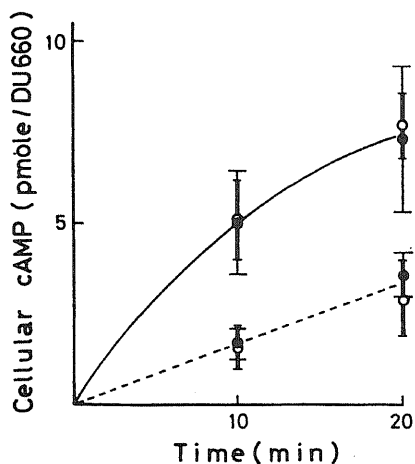


Fig. 5. Effect of washing on measurement of cellular cAMP. Cells were grown in Tris-glycerol medium to logarithmic phase. The culture was divided into two parts. One portion was added ^3H -adenine (\circ), and the other received glucose (10mM) together with ^3H -adenine (\bullet). At intervals samples were withdrawn and measured cellular cAMP. We used two filters per sample point. The one filter was washed once with 5ml of the medium before the assay (\cdots), and the other was assayed without any washing ($-$). Each point represents the mean \pm SD of four measurements.

の細胞外放出は glucose を添加後 10 分位から阻害が見られ、glucose 添加後 20 分でほぼ完全に放出が停止した。この停止は一時的なものであり、glucose 添加後、40 分程で再び cAMP の放出が始まるが、その速度は glycerol 培地での cAMP 放出速度の約 1/3 であった。またこの再開時期は、時間的に少しのずれが認められるが、図 3 で示したように β -galactosidase の permanent repression 開始時期とほぼ一致している。

上記の実験において細胞内 cAMP の測定の際、培地内の cAMP の混入を避けるため、菌をフィルター上に集めた後、更に培養液で洗浄を行なっている。この操作は培地内の cAMP 混入を除くには適当な方法であるが、同時に細胞内の cAMP の一部が流れ出される可能性がある。この可能性を検討するため、集菌後、洗浄操作なしに直ちに cAMP を測定した結果が図 5 に示してある。この際、培地内の ^3H -cAMP 混入度を少なくするため、 ^3H -adenine 添加後 20 分以内でのみ行なった。図で明らかであるが、非洗浄条件では洗浄した

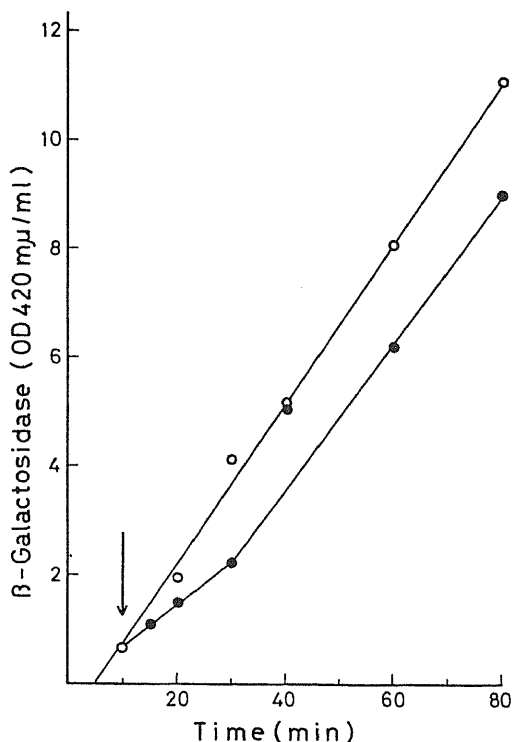


Fig. 6. Effect of α -methyl-D-glucoside on β -galactosidase synthesis. Cells were grown in Tris-glycerol medium. The culture was induced with IPTG (0.4mM) and then divided into two parts. One portion was left unchanged (\circ); and α -methyl-D-glucoside (100mM) was added to the other (\bullet).

場合に比べて 2~4pmole/DU660 程度の高値を示した。この差は非洗浄条件で 20~30 μl の培地がフィルターに保持される場合に予測される値であり、従って細胞内 cAMP が洗浄操作により、一部流出される量は、非常に少ないものと考えられる。又、非洗浄条件においても glycerol 培地と glucose 培地のいずれにおいても細胞内 cAMP 合成は同一の値を示しているので、細胞内 cAMP 合成は、glucose 添加により全く影響されないものと思われる。

cAMP 合成におよぼす α -methyl-D-glucoside の効果、transient repression と cAMP 合成がどのような関係があるかを明らかにするために、transient repression のみを起こすとされている α -methyl-D-glucoside について検討を行なった。 α -methyl-D-glucoside 100mM (菌の増殖には全く影響を与えない量) は図 6 で示したように約 20 分間の transient

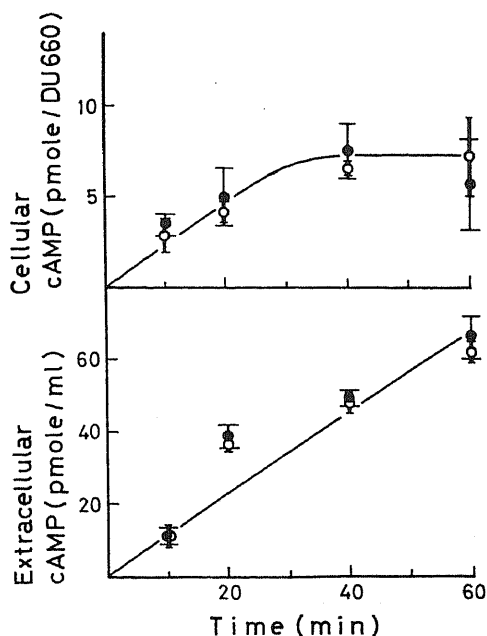


Fig.7. Effect of α -methyl-D-glucoside on cAMP synthesis in *E. coli* 3000 ad^- . Cells were grown in Tris-glycerol medium. The culture was divided into two parts. One part was served as control (\circ); and the other received 100mM α -methyl-D-glucoside (\bullet). ^3H -adenine was added to each culture, and samples were taken from each culture for assay of cAMP. Each point represents the mean \pm SD of four measurements.

repressionのみが見られ、permanent repressionは全く認められない。ところがcAMP合成については図7で示されているように細胞内cAMP合成も細胞外cAMPの増加速度も対照であるglycerol培地と全く差が認められなかった。

EDTA処理大腸菌における β -galactosidase合成、正常な大腸菌はnucleotide等のリン酸エステルは細胞膜を通過して菌体内に入ることには出来ない。菌を短時間EDTAで処理すると、これらのnucleotideは自由に細胞膜を通過し得るようになる。しかしながら、この際、約1時間程タンパク合成能等の代謝活性が著しく低下し、従って増殖能力の低下が見られる。その為EDTA処理後、nucleotide透過能の高まった状態を維持したまま、代謝能力の低下を最少ならしめる条件を検討した。対数増殖期の菌をEDTA処理した場合、図8で示したように非処理菌に比べて β -galactosidase誘導能は1/2以下に低下する。しかし

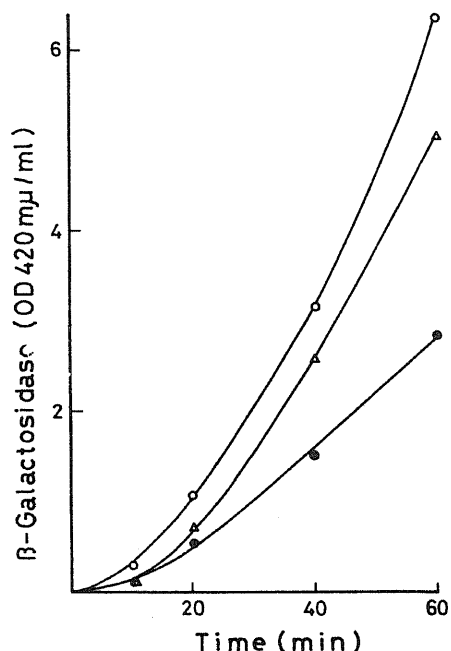


Fig.8. β -Galactosidase synthesis in EDTA-treated cells. EDTA-treated cells, suspended in Tris-glycerol medium containing 1mM MgCl_2 , were induced with 0.4mM IPTG. β -galactosidase was assayed as described in Materials and Methods. EDTA-untreated cell (\circ); EDTA-treated cells (\bullet); EDTA-treated cells plus 1mM MnCl_2 (\triangle).

EDTA処理後、直ちに1mM Mn^{++} を加えると多少のlagが見られるが、非処理菌と同程度の酵素誘導が回復された。この効果は、 Mn イオンに特異的で他の二価金属(Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} 等)は全く無効であった。

EDTA処理大腸菌の β -galactosidase合成におよぼすadenine nucleotideの効果、EDTA処理後 Mn^{++} を添加した条件での β -galactosidase誘導の際、1mM ATPを培地に加えると図9に示されるように、 β -galactosidaseの合成は、約10分間抑制され、典型的なtransient repressorである α -methyl-D-glucosideによる抑制と類似している。この抑制はAMP, ADP等でも同様に認められるが、同一濃度のadenosine等は無効であった。またATPの濃度は、0.35mMから2mMまで高めても抑制の強度にほとんど影響が認められない。しかしながら図10で示したように1mM ATPで抑制後酵素合成能が回復した時、さらにATP 1.5mMを加えても抑制は認められな

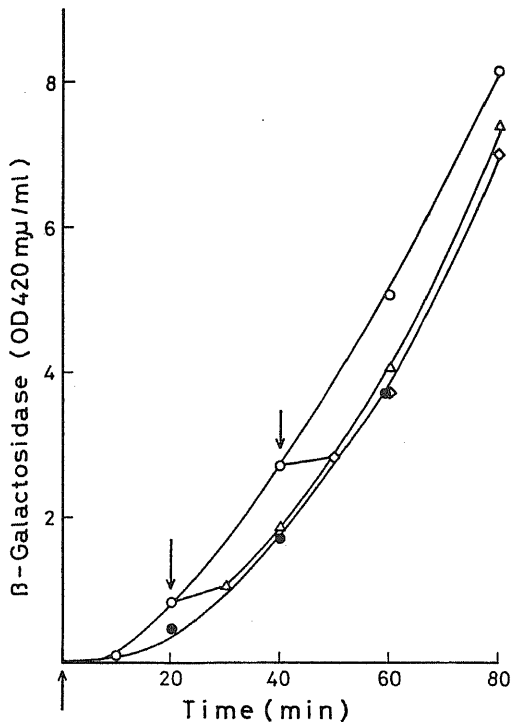


Fig.9. Transient repression of β -galactosidase synthesis by ATP. EDTA-treated cells, suspended in Tris-glycerol medium containing 1mM $MgCl_2$ and 1mM $MnCl_2$, were induced with 0.4mM IPTG. At time indicated by arrow, 1mM ATP was added to the culture. no ATP (\circ); ATP added at time zero (\bullet); ATP added at 20 min (\triangle); ATP added at 40 min (\diamond).

いが 1mM ATP の抑制解除後、 α -methyl-D-glucoside 100mM を添加すると抑制が見られ、また逆に、 α -methyl-D-glucoside による抑制解除後 ATP を加えると抑制が認められ、両者は異なった機構による抑制と思われた。これらの抑制はいずれも cAMP が培地中に添加されていると殆んど認められない。

EDTA 処理大腸菌の β -galactosidase 合成におよぼす各種 nucleotide の影響、ATP 以外の nucleotide、GTP、CTP、UTP について検討を行なったのが図 11 である。ATP 0.35mM で β -galactosidase の合成が抑制されるにもかかわらず、GTP、CTP、UTP では抑制度は極めて弱く、ATP のみに強い抑制が認められた。

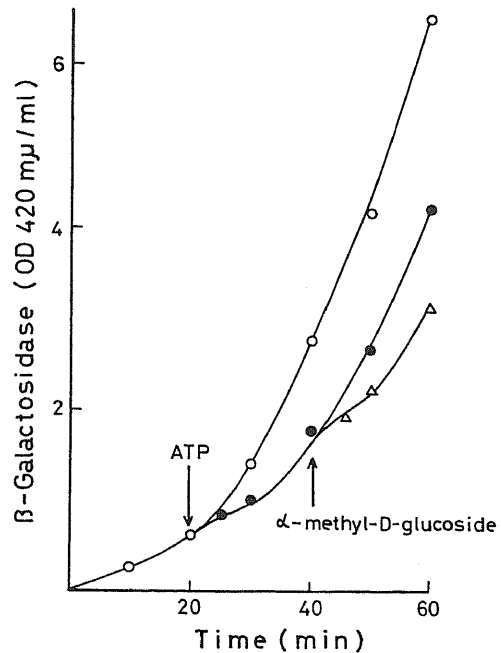


Fig.10. Effect of α -methyl-D-glucoside and ATP on β -galactosidase synthesis. EDTA-treated cells, suspended in Tris-glycerol medium containing 1mM $MgCl_2$ and 1mM $MnCl_2$, were induced with 0.4mM IPTG. At 20 min, the induced culture was divided into two parts. One part was incubated without any addition (\circ), and the other received 1mM ATP. At 40 min, the ATP-added culture was further divided into two parts, which received no addition (\bullet) and 100mM α -methyl-D-glucoside (\triangle). Samples were taken at intervals from each culture for assay of β -galactosidase.

考 察

微生物における cAMP の存在は、Makman 及び Sutherland⁷⁾ の発見以来、誘導酵素系の合成調節に関与しているものと信じられている¹²⁾。大腸菌で誘導酵素の産生が培地中に glucose を加えることにより抑制される。いわゆる catabolite repression の現象が古くから知られているが²³⁾、この repression は、培地中に cAMP を加える事により完全に解除されることから³¹⁻⁵⁾、cAMP は誘導酵素系の調節因子の一つであることが推定された。また in vitro のタンパク合成系を用いて cAMP が transcription level で positive regulation を行なっていることが示された²⁴⁾。従って catabolite repression は細胞内 cAMP 量の低下が

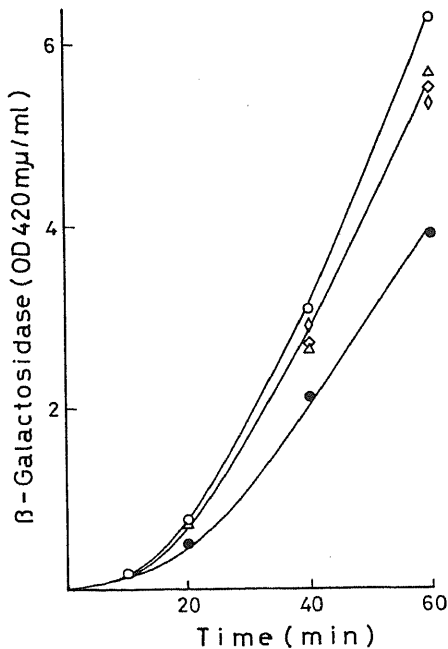


Fig.11. Effect of nucleoside triphosphate on β -galactosidase synthesis. EDTA-treated cells, suspended in Tris-glycerol medium containing 1mM $MgCl_2$ and 1mM $MnCl_2$, were induced with 0.4mM IPTG in the presence of 0.35mM one nucleoside triphosphates. β -Galactosidase was assayed as described in Materials and Methods. control, EDTA-treated cells plus 1mM $MnCl_2$ (○); ATP (●); GTP (△); CTP (◇); UTP (◇).

主因であると考えられ、事実いくつかの報告^{9)~15)}で大腸菌の β -galactosidase 合成系を用いて細胞内 cAMP レベルと β -galactosidase 合成能との平行関係の存在が述べられている。しかしながら、これ等の報告相互の間に細部における矛盾が見られ、また細胞内 cAMP と catabolite repression 相互間の平行関係を否定する報告も見られる¹⁴⁾。このような矛盾の一原因として、大腸菌の細胞内 cAMP 量の正確な測定の高難度がある。大腸菌では合成された cAMP の相当量が培地内に放出される。この培地内に放出蓄積された cAMP 量がかなりの高濃度となるため、細胞内 cAMP の定量に当って培地の混入を完全に除去出来ない限り、正確な決定は難しい。

本研究では常法として集めた菌を一回培養液で洗浄後、細胞内 cAMP を測定した。図 5 に示されるように非洗浄の場合よりも 3~4 pmole/DU660 低い値とな

る。³H-adenine 添加 20 分後の培地内に蓄積された ³H-cAMP は約 40 pmole/ml 程度であり、もし両方法の差が培地中の cAMP 混入によるものとすれば、約 20 μ l の培地がフィルターに保持されることになり、Wayne ら¹¹⁾の 50 μ l と近い値を示すので、上記の差は大部分培地内 cAMP 混入に由来するものであり、洗浄により、細胞内 cAMP が流出する危険は少なく、実態に近い値が得られるものと思われる。

本研究に用いた E. coli 3000 (ad⁻) の cAMP 合成系は極めて特徴的である。対数増殖期に培地中に ³H-adenine を加えた場合、もし菌の cAMP 合成系が単一のものであれば、³H-adenine より合成された ³H-cAMP は細胞内で急速に stationary phase に達し、培地中には多少の lag の後、ほぼ一定速度で放出されるはずである。しかし本菌では、逆に培地中には殆んど lag なく、一定速度で放出されるのに対し、細胞内での上昇は緩やかで、約 40 分で漸く stationary level に達する。従って細胞内と放出される cAMP の合成系は別のものであり、細胞内合成系 (A 系) では cAMP は、非常に低速度で合成され、且つ、ゆるやかに放出又は分解されるのに対し、他 (B 系) は合成速度が速やかで、且つ培地中に容易に放出されるものと考えるのが妥当である。この様な 2 種の cAMP 合成系については未だ報告はなく、本 strain に特異的なものか否かについては明らかでない。

前述のごとく誘導酵素の一つである β -galactosidase 産生は、glucose により catabolite repression を受ける。この catabolite repression は、短時間一時的 transient repression と長時間継続する permanent repression の 2 状態が存在する⁹⁾。この repression 時の cAMP 合成の様相を見ると、菌体内 cAMP 合成 (A 系) は glucose の添加の有無により変化は全くない。これに対して菌体外の cAMP 放出 (B 系) は、glucose 添加後約 10 分で徐々に低下し、約 20 分後にほぼ停止する。しかしこの停止は永続的でなく、約 40 分後に再び放出が始まるが、その速度は glucose の無い場合の約 1/3 である。transient repression は glucose 添加後約 20~30 分の間継続するものと見られるので、これらの実験結果は、本菌では transient repression と cAMP 合成の間には、直接的な平行関係が存在しないことを示している。これに対して permanent repression は glucose 添加後 30 分以降に始まり、 β -galactosidase 合成速度は、glucose を加えない場合の約 40% であるので、glucose 添加 40 分以後の cAMP 放出速度とほぼ平行している様に思われる。即

ち、permanent repression は B 系の cAMP 合成が関与するものと思われるが、transient repression は、A 及び B 系の cAMP 合成とは外見的に全く関係ないように考えられる。事実、transient repression のみを起こす α -methyl-D-glucoside によっては、A 及び B 系の cAMP 合成は全く影響を受けなかった。B 系で合成された cAMP は、測定時の洗浄操作によって大部分が流出されるが、実際にはかなりの量が細胞内に残っており、transient repression 時に、この保持されている cAMP 量の減少に起因するとの可能性はあるが、図 5 で見られるように非洗浄条件で測定した場合にも glucose 添加と無添加で細胞内 cAMP 量に変化なく、この可能性も乏しいと考えられる。

catabolite repression の機構を更に検討を行なうため、主として各種 nucleotide の影響を調べた。nucleotide は一般に、細胞膜を通過し得ないため、菌をあらかじめ EDTA 処理を行ない、通過可能な状態で実験を行なった。処理後、Mn イオンの添加により、通過能を維持したまゝ、正常に近い状態の代謝能を得ることが出来たため、詳細な検討が可能となった。 β -galactosidase の誘導時に各種の nucleotide を加えると、adenine nucleotide の場合に一時的な酵素産生の抑制が見られる。他の nucleotide は殆んど無影響であり、また抑制の様相は典型的な transient repression を起こす α -methyl-D-glucoside を加えた場合と区別し難く、同様に cAMP の同時添加により回復される。しかしながら adenine nucleotide による repression は、既に α -methyl-D-glucoside で抑制が起こされた後でも見られる点から、明らかに α -methyl-D-glucoside と異なった作用機構に起因する。また AMP, ADP, ATP のいずれによっても同程度の抑制が見られるが、菌体内でのこれら nucleotide の相互転換が容易なことを考慮すれば、実際には上記いずれか一種の nucleotide の一時的上昇によるものか、あるいは energy charge ($ATP + 1/2 ADP/ATP + ADP + AMP$)²⁵⁾ の変化によるものと考えられる。glucose のように生体内で極めて代謝され易い栄養源を与えた場合、細胞内の adenine nucleotide 量の変化は非常に速やかに起こることを考慮すれば、transient repression の原因として細胞膜における transport system の関与²⁶⁾²⁷⁾ (α -methyl-D-glucoside 等の非代謝性物質による repression) 以外に細胞内 adenine nucleotide 量の急速な変化を考える必要がある。Transient repression が細胞内の cAMP 低下に起因するものと

考えれば、cAMP を低下せしめる原因として 2 つ以上の機構を考慮しなければならない。本研究の結果では誘導酵素系の調節には cAMP 以外にも他の因子が関与していることを示唆している。即ち、細胞内で cAMP の作用に対して拮抗する因子がある様に思われ、この因子と cAMP の両者によって複雑な調節が出来るのではないかと考えられる。この点に関し、最近 Ullmann ら¹⁶⁾ によって報告された catabolite modulation factor は cAMP 以外の誘導酵素産生の調節として興味あるものであるが、本研究の結果との関連については、更に検討を要する。

結 論

大腸菌 3000 (the⁻) から分離した adenine 要求菌を用いて、³H-adenine より ³H-cAMP 生成速度から細胞内での cAMP 合成速度及び培地中への放出速度を調べた所、この菌株では、二つの cAMP 合成系 (A 系、B 系) の存在を示唆した。glycerol 培地中では、A 合成系の cAMP 合成速度は遅く、合成された cAMP は除々に分解又は培地中に放出されるが、B 合成系では cAMP 合成は速かで、合成された cAMP は速かに培地中へ放出される。この cAMP 合成系に対する glucose の影響を検討した所、A 合成系は glucose 添加により全く影響されませんが、B 合成系では glucose 添加後、約 20 分で完全に合成が停止し、40 分後、glycerol 培地での 1/3 の速度で合成が再開された。この事実と β -galactosidase 誘導における catabolite repression の様相と比較すると、A 合成系は catabolite repression とは関係なく、B 合成系は permanent repression に関与するものと考えられた。

大腸菌に EDTA 処理した場合、本来非透過性物質の細胞膜透過性が高まるが、同時に代謝活性の減少のため、 β -galactosidase の合成は、著しく低下する。この際、Mn⁺⁺ を加えることにより透過能を維持したまま酵素誘導能を高めることが出来た。この効果は、Mn⁺⁺ 以外の Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺ 等では認められない。この条件で adenine nucleotide (ATP, ADP, AMP) を加えると、 β -galactosidase 合成に対して transient repression を起こした。この repression は cAMP 添加により回復され、典型的な transient repression である α -methyl-D-glucoside と類似しているが、機構的に異なっていた。他の nucleoside triphosphate GTP, CTP, UTP は抑制効果が認められなかった。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました久野滋教授に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) **Rickenberg, H. V.** : Annu. Rev. Microbiol., **28**, 353 (1974).
- 2) **Pastan, I. and Adhya, S.** : Bacteriol. Rev., **40**, 527 (1976).
- 3) **Perlman, R. L. and Pastan, I.** : Biochem. Biophys. Res. Commun., **30**, 656 (1968).
- 4) **Perlman, R. L. and Pastan, I.** : J. Biol. Chem., **243**, 5420 (1968).
- 5) **Ullmann, A. and Monod, J.** : FEBS. Lett., **2**, 57 (1968).
- 6) **Pastan, I. and Perlman, R. L.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **61**, 1336 (1968).
- 7) **Makman, R. S. and Sutherland, E. W.** : J. Biol. Chem., **240**, 1309 (1965).
- 8) **Pastan, I. and Perlman, R. L.** : Science., **169**, 339 (1970).
- 9) **Buettner, M. J., Spitz, E. and Rickenberg, H. V.** : J. Bacteriol., **114**, 1068 (1973).
- 10) **Peterkofsky, A. and Gazdar, C.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 2324 (1974).
- 11) **Wayne, P. K. and Rosen, O. M.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 1436 (1974).
- 12) **Saier, M. H., Feucht, B. U. Jr. and McCaman, M. T.** : J. Biol. Chem., **250**, 7593 (1975).
- 13) **Wayne, P. K., Fetell, J. and Rosen, O. M.** : Biochem. Biophys. Res. Commun., **64**, 81 (1975).
- 14) **Naprstek, J., Janecek, J., Spizek, J. and Dobrova, Z.** : Biochem. Biophys. Res. Commun., **64**, 845 (1975).
- 15) **Epstein, W., Rothman-Denes, L. B. and Hesse, J.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **72**, 2300 (1975).
- 16) **Ullmann, A., Tillier, F. and Monod, J.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 3476 (1976).
- 17) **Magasanik, B.** : Cold. Spring. Harb. Symp. Quantit. Biol., **26**, 249 (1961).
- 18) **Aboud, M. and Burger, M.** : Biochem. Biophys. Res. Commun., **45**, 190 (1971).
- 19) **Kaempfer, R. O. R. and Magasanik, B.** : J. Mol. Biol., **27**, 453 (1967).
- 20) **Pardee, A. B., Jacob, F. and Monod, J.** : J. Mol. Biol., **1**, 165 (1959).
- 21) **Patterson, M. S. and Green, R. C.** : Anal. Chem., **37**, 854 (1965).
- 22) **Hosono, R., and Kuno, S.** : J. Biochem., **75**, 215 (1974).
- 23) **Monod, J.** : Growth., **11**, 223 (1947).
- 24) **Zubay, G., Schwartz, D. and Beckwith, J.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **66**, 104 (1970).
- 25) **Atkinson, D. E.** : Annu. Rev. Microbiol., **23**, 47 (1969).
- 26) **Tyler, B., Loomis, W. F. Jr. and Magasanik, B.** : J. Bacteriol., **94**, 2001 (1967).
- 27) **Pastan, I. and Perlman, R. L.** : J. Biol. Chem., **244**, 5836 (1969).

A b s t r a c t

Rates of cAMP synthesis and release of synthesized cAMP into medium were investigated in an adenine-requiring mutant of *Escherichia coli* 3000. The rate of synthesis was measured by incorporation of ^3H -adenine into cAMP. In glycerol-grown cells, the release of cAMP into medium occurred at a much higher rate than the accumulation of intracellular cAMP and showed no measurable lag period. On the other hand, the accumulation of intracellular cAMP reached to a steady state level in about 40 m. The results suggest strongly that two systems for cAMP synthesis exist in this strain. One system (A) has lower synthetic activity and the synthesized cAMP is slowly excreted outside of cells or degraded. The other (B) has a high synthetic activity, but the synthesized cAMP is rapidly excreted. An addition of glucose giving rise to repression of synthesis of β -galactosidase in IPTG-induced *E. coli*, showed no effect on cAMP synthesis by A system. Whereas, cAMP synthesis by B system was severely

repressed 10–40m. after the addition of glucose, and then restored to an intermediate rate. Possible role of adenine nucleotide on a catabolite repression, especially on a transient repression of β -galactosidase synthesis was found. An addition of ATP, ADP, or AMP to IPTG-induced *E. coli* made permeable by treatment with EDTA, brought about transient repression of synthesis of β -galactosidase. The repression was apparently indistinguishable, but different in mechanism, with that triggered with α -methyl-D-glucoside, a typical transient repressor. Other nucleotides, such as GTP, CTP, and UTP, were not or less inhibitory for the enzyme synthesis.
