The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	アミノ酸添加培地で増殖させた大腸菌のアミノ酸のとり込みについて
Author(s)	乾, 之治
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29445
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【22】

氏名・(本籍)	乾(いぬい)　之(ゆき)　治(はる)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　1252　号
学位授与の日付	昭和42年6月10日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文名	**アミノ酸添加培地で増殖させた大腸菌のアミノ酸のとり込みについて**
論文審査委員	(主査) 教授　須田　正巳 (副査) 教授　西川　光夫　教授　山村　雄一

論文内容の要旨

〔目　　的〕

1-aminocyclopentane carboxylic acid (cycloleucine) は動物細胞では代謝を受けず，又その膜透過の態度は天然の中性アミノ酸のそれによく類似している。私はアミノ酸の膜透過の機作を解明しようとして，Escherichia coli K10 と cycloleucine を用いて実験を進めていたところ，cycloleucine 前処置によって，このアミノ酸のとり込みが著しく阻害される現象を見つけた。そこでこの阻害現象の発現の機作について追求した。

〔方法ならびに成績〕

方法)

glucose (0.3%) を含む Medium I* で E. coli K10 を培養し (37°) 対数期に入っている菌を遠心，Medium II* で2回洗滌して細菌液とし，アミノ酸のとり込みの測定は Medium II にアミノ酸 (1-^{14}C labeled) を 0.23mM, glucose を 100μg/ml に加えた Medium を用い，これに細菌液を一定の混濁度になるように加え，15° で incubation を行ない一定時間毎に一定量の菌液を採取し millipore filter (pore size=0.45μ) でろ過し Medium II で3回洗滌，filterpaper を乾燥後 gas flow counter で radioactivity を測定した。前処置は 0.23mM にアミノ酸を含む glucose 添加 (0.3%) Medium I 或は Medium II を用い1～3時間37° で incubate して行いその後菌を遠心洗滌してとり込みの測定に用いた。なお α-methylglucoside (α-MG), D-galactose のとり込みを測定する際には炭素源として D-glucose と D-galactose とをそれぞれ用いて菌を増殖させ，uptake medium には D-glucose を加えなかった。 *Medium I : 2.5g $(NH_4)_2SO_4$, 3.0g Na_2HPO_4, 2.0g K_2HPO_4, 1.0g NaCl, 0.1g $MgSO_4$ in IL, *Medium II : 12.6g KH_2PO_4, 5.4g K_2HPO_4, 2.0g Na_2SO_4, 0.4g $MgSO_4$, 0.01g $CaCl_2$ in IL of water。NaOH で pH7.0 に調整。

成績)

1) Cycloleucine がこの菌で代謝されるかどうかの検討：菌をC源として glucose の代りに cycloleucine (0.3%) を加えた Medium I で 37°, 21時間 incubate しても菌の増殖は全くみとめられなかった。又 1-^{14}C-cycloleucine を60分間とり込ませた後で菌体より水で radioactivity を抽出し (100°, 5min) tert. -butanol, formic acid. water (70 : 15 : 15, v/v) を展開溶媒として paper chromatography を行なったところ, authentic 1-^{14}C-cycloleucine の spot に一致してただ一つの radio active spot をみとめた。

2) Cycloleucine 前処置が及ぼすとり込みへの影響：Cycloleucine で前処置された菌は, されなかった菌に比してそのアミノ酸のとり込みは著しく阻害され, この阻害度は前処置時間が1時間では対照の60～70%, 3時間では90%程度となる。1-^{14}C-cycloleucine を non-labeled cycloleucine の代りに使って前処置に用いたと同じ specific activity を持つ 1-^{14}C-cycloleucine のとり込みを調べると, 1-^{14}-C-cycloleucine で前処置後洗滌された菌の細胞内アミノ酸濃度は対照の uptake の plateau level に比して極めて低く且つとり込みは著明に阻害されていた。

3) 菌の増殖を阻止した条件での cycloleucine 前処置が及ぼすとり込みへの影響：菌が増殖出来ない Medium II を Medium I の代りに用いて cycloleucine 前処置してもこのアミノ酸のとり込みは阻害されなかった。更に増殖培地 (glucose 添加 Medium I) に chloramphenicol (100μg/mℓ) を加えて菌の増殖を止めて cycloleucine 前処置すると cycloleucine のとり込みは阻害されなかった。なお uptake medium を Medium II から Medium I (この場合 chloramphenicol を 100μg/mℓ に加えた) に変えてとり込みを調べたが uptake medium の差によってとり込みは影響を受けなかった。

4) Cycloleucine 前処置によるとり込みの阻害の可逆性：前処置によってとり込みが阻害されている菌を cycloleucine を含まない増殖培地に移して一晩菌を増殖させ, その菌で cycloleucine のとり込みを調べるとその阻害は全く消失し再度 cycloleucine 前処置を行なうと第一回目の阻害程度とほぼ等しいとり込みの阻害がおこった。

5) 天然アミノ酸による前処置：Cycloleucine の代りに L-leucine で前処置すると L-leucine のとり込み, 或は cycloleucine のとり込みは共に阻害されるが, しかし chloramphenicol を 100μg/ml に加えて L-leucine で前処置するととり込みは阻害されなかった。

6) Cycloleucine 前処置菌で, cycloleucine のとり込みに及ぼす 2, 4-dinitrophenol (DNP) の影響：前処置された菌, されなかった菌いずれも 10^{-3}MDNP によってとり込みは阻害された。

7) Cycloleucine で前処置した菌の α-MG と D-galactose のとり込み：α-MG と D-galactose のとり込みはアミノ酸前処置によって全く影響を受けなかった。

8) Cyclolecine 前処置中の菌の増殖：Cycloleucine が存在すると (0.23mM) 菌の doubling time (90分) は, 存在しない菌のそれに (60分) 比して最初の90分頃迄は明らかに長いが増殖の速度は次第に対照のそれに近づき180分を過ぎる頃から両者の doubling time は等しくなった。

〔総　　括〕

1) アミノ酸存在下で増殖した菌が示すアミノ酸のとり込みの阻害発現の機作を主として非代謝性

アミノ酸 cycloleucine を用いて調べた。2) L-leucine 前処置によっても L-leucine のとり込みの阻害がおこり，chloramphenicol を添加或は培地からN源を除いて増殖を止めると，たとえ cycloleucine 或は L-leucine が培地に存在していてもその阻害は発現しない。3) この阻害は菌を cycloleucine のない培地で増殖させると消失する。4)前処置した菌，しなかった菌も 2, 4-dinitrophenol でとり込みは阻害される。5) α-methylglucoside, D-galactose のとり込みは前処置によっては影響を受けない。5) この阻害は transport level での control mechanism の発現として理解される。

論文の審査結果の要旨

本論文は大腸菌を用い非代謝性アミノ酸として cycloleucine を利用してアミノ酸膜透過の研究を行なったものである。その結果得られた成績は次のようである。1) cycloleucine を加えた培地で菌を増殖させると，このアミノ酸のとり込みは著しく阻害される。2) L-leucine 前処置によっても，L-leucine のとり込みの阻害がおこり chloramphenicol を培地に添加，或は培地から窒素源を除いて増殖を止めると，たとえ cycloleucine 或は L-leucine が培地に存在していてもその阻害は発現しない。3) この阻害は菌を cycloleucine のない培地で増殖させると消失する。4) 前処置した菌，しなかった菌も 2, 4-dinitrophenol でとり込みは阻害される。5) α-methylglucoside, D-galactose のとり込みは前処置によって影響を受けない。6) cycloleucine 前処置中の菌の増殖速度は最初の90分頃迄は cycloleucine が存在しない対照の増殖速度に比して遅いが，次第に対照のそれに近ずき，180分を過ぎると両者は全く等しくなる。

以上の結果は一旦膜内にとり込まれたアミノ酸は，ある濃度に達すると輸送系に対して negative feedback の機作を通じて抑制作用を及ぼし，それ以上のアミノ酸のとり込みを阻止するアミノ酸調節機構の存在を示す。この輸送系の透導には蛋白合成系が共軛していることが明らかになった。cycloleucine を前処置に用いた場合，α-methylglucoside, D-galactose のとり込みには影響がない点から考えて，この現象はアミノ酸輸送に直接関係があるものと考えられる。

以上著者の研究はアミノ酸輸送系の調節機作について新知見をもたらし，学位論文として推薦する次第である。