微生物と環状AMP

井手 節, 岡林 直

Misao IDE, Tadashi OKABAYASHI

塩野義製薬株式会社研究所

動物で、ホルモン作用の第2のメッセンジャーだとして騒がれている物質が、ホルモンとは縁のないバクテリアでもひょっこり見つかった。最近になって、これが微生物でもなかなか大切な役目を帯びているらしい事実が明るみにできたようである。たまたまこの物質とかかわり合いを持っていたため、この解説を書かされるはめに陥った。この物質の発見から最近の研究成果まで、主に微生物について——ただし動物のデータを参照しながら——記してみることにした。

1. 発見の歴史

1957 年ごろ、Sutherland と Rall は Cori 以来の仕事をはきついで、肝臓のホスホリラーゼの研究をしていた。彼らは、肝臓のホモジェネートを ATP, Mg^{2+} およびアドレナリンまたはグルカゴンとインキュベートすると熱に安定な物質が蓄積し、これがホスホリラーゼを活性化することを認めた。彼らはこの物質をとりだした。ちょうどそのころ、Lipkin らは ATP を $Ba(OH)_2$ で水解したときに副産物として未知のアデニンヌクレオチドが少量できることを認めた。これが Sutherland らの

単離したものと同一物であることがわかり、まもなくこの物質は cyclic 3',5'-AMP (環状 AMP) と決定された (図 1)。

さて、環状 AMP がアドレナリンやグルカゴンといったホルモンの作用を研究に見いだされたことは、その構造がすぐに決められたこととあいまって、その後の研究の進展のために幸いだった。間もなく、この物質が動物の各種のホルモンの作用の伝達を十把ひとからげにひき受けるという、とてつもない役目を持っている事実がつつぎと明らかにされていったのである。

ホルモンと環状 AMP の関係については、以来多くの総説⁽¹⁻⁹⁾ がでている。

2. 動物の 2-メッセンジャー系

微生物の話に入る前に、主として動物での研究で得られた環状 AMP の作用に関する基本的な概念について述べておこう。図 2 を見ていただきたい。よく知られた 2-メッセンジャー系⁽¹⁾である。血流などにのって流れてきた種々のホルモンは、そのおのおのの標的器官の細胞の膜にたどりつき、その膜にくっついているアデニルシクラーゼという酵素に働きかけて、これを活性化する。この酵素は高等動物の各組織に広く分布している。活性化されたアデニルシクラーゼは、細胞内の ATP を材料として環状 AMP をつくりだす。できた環状 AMP は、アデニルシクラーゼを活性化した当のホルモンと同じ生理作用を細胞内で発揮する。すなわち、血糖量を上げ、脂肪を分解し、ステロイド合成を促し、あるいは膀胱膜の透過性を変え、さらにメラニン粒を拡散させて皮膚の色を変えるなど、その作用は組織によりさまざまな現われ方をする。また、これらの生理作用をひき起こす元と

図 1 環状AMP

図 2 2-メッセンジャー系 (Sutherland et al.⁽¹¹⁾)

なると想像される若干の酵素反応への環状AMPの関与が知られている。つまり、環状AMPこそが細胞内で諸諸のホルモン作用をひき起こす物質にはかならないと考えられる。

ホルモンを生体の命令を伝える第1番目の使者 (1st messenger) とすれば、環状AMPはそれからバトンを受けついで走る第2番目の使者 (2nd messenger) といえるだろう。この見解は、現在広く受け入れられているようである。

さて、役目をすませた、あるいは不要な環状AMPは、特異的な分解酵素環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼによって、5'-AMPへと分解される。この酵素も動物の各組織に広く分布している。

微生物で環状AMPが見つかったのは、動物でこのような基本的な大すじがわかったところである。

3. 微生物における環状AMPの生成

環状AMPは2種類の細菌で別々に、またほとんど同時に見つかった。その後の研究で、環状AMPは微生物界にも広く分布することがわかってきたが、その生成条件や合成酵素の性質などにはかなり大きな違いがあるようである。

3-1. *Brevibacterium liquefaciens*

この菌は下水から分離された菌であるが、培地中にいろいろなヌクレオチドをだす性質を持っている⁽¹⁰⁾。5'-モノヌクレオチドからはじまって、細胞壁合成の中間物であるUDP-N-アセチルムラミルペプチドまで、さまざ

まの化合物を培養条件に従ってつくりだす。イオン交換クロマトグラフに見えない山が現われたのは、培養条件を変えてはヌクレオチドのできぐあいを調べていた最中のことであった。これが環状AMPであることは、ペーパークロマト、酸アルカリ分解、Ba(OH)₂水解、分析値、UV、IRなどで確認した⁽¹¹⁾。

ホルモンとは無関係の細菌から環状AMPがでてきたことは、当時としては予想外であったが、その原因は間もなくわかった。培養液中に窒素源としてアラニンを加えたためである⁽¹²⁾。さらに検討の結果、窒素源としてアラニンかアスパラギンをグルコースその他の炭素源とともに加えるとよいことがわかった⁽¹³⁾。このような条件で、動物のセカンドメッセンジャーが1lの培養液当たり1gほどできてきた。非増殖細胞を使っても同様の結果を得た⁽¹⁴⁾が、環状AMPの蓄積にグルコースが要するという点は、次に述べる大腸菌の場合とは少々異なる点である。また、この菌をアミノ酸欠乏下においたり、抗生物質で増殖を止めたりすると、環状AMPの合成が増加する⁽¹⁵⁾が、その原因は不明である。

さて、当時は酵素の研究が目的ではなかったが、上記の結果をうらづけるため、cell free系で簡単に検討した。cell free系でも環状AMPの生成はアラニンで促進されたが、反応液を振盪するとさらに活性があがったので、アラニンの代謝物が関係していることがうかがわれ、その結果、ビルビン酸がこの菌のアデニルシクラーゼを著しく促進することが判明した⁽¹⁴⁾。

本菌のアデニルシクラーゼは、京都大学の早石修教授のもとで詳細に調べられた⁽¹⁶⁻¹⁸⁾。動物酵素と異なり、

本菌の酵素が可溶性であることを利用し100倍ほど精製されたが、これは当時生物界で精製可能な唯一の酵素として注目された。この酵素は、ピルビン酸のほかに2, 3の α -ケト酸で促進されるが、これら α -ケト酸の作用の1つは、 Mg^{2+} の必要量を減少させることにあるという。また、この酵素は deoxy ATP を基質として deoxy 環状 AMP をつくる⁽¹⁹⁾。

最近になって、動物のアデニルシクラーゼの中にも deoxy 環状 AMP をつくるものがあることがわかったが、この物質に生理的な役割があるかどうかは不明である。

3-2. *Escherichia coli*

B. liquefaciens の報告とほとんど同時に、大腸菌 (Crooke's strain) で環状 AMP ができるという報告がでた。Makman と Sutherland^(19,20)は、大腸菌をグルコースの少ない培地で培養すると、環状 AMP が細胞内にたまることを見いだした。グルコースの多い培地では生成量は非常に少ない ($5 \times 10^{-7}M$) が、グルコースを消費しつくしたり、グルコースの少ない培地に移しかえると、環状 AMP が急増した ($10^{-4}M$)。逆に、グルコースの少ない培地で培養し急にグルコースを加えると、細胞内の環状 AMP 量が激減するが、これはグルコースが環状 AMP の合成を阻害し、また細胞外に追いつたためであると推測した。これら一連のグルコースと環状 AMP の関係についての知見が、後で述べるような発見の導き手となったのである。

さて、彼らは大腸菌の cell free 系はうまくいかなかったらしい⁽²⁰⁾。最近になって、大腸菌のアデニルシクラーゼの報告が相ついで3つ別々の研究室から発表された。

私たち⁽²¹⁾は、大腸菌 (Crooke's strain) のアデニルシクラーゼ活性を認めることができたが、その性質は前述の *B. liquefaciens* の酵素とは次のように著しく異なっていた。まず、大腸菌の酵素は3万×gの沈澱にあり、不溶性である。次に、大腸菌の酵素はピルビン酸では促進されない。また、活性が非常に弱い (*B. liquefaciens* の粗酵素の比活性は $2 m\mu moles/min \cdot mg$ であるが、その1,000分の1である)。いろいろ検討したが、 Mg^{2+} を要求すること以外にこの活性を大きく増強するものは見つからなかった。オキザロ酢酸とピリドキサルリン酸が阻害することが見つかったくらいである。Makmanらがアデニルシクラーゼを検出できなかったのは、このように酵素活性が弱かったためかもしれない。微量の環

状 AMP の検出が研究者の悩みの種であり、いろいろの方法が考案されている。

ところが、Braná⁽²²⁾によれば、*E. coli* C 600 K-12 のアデニルシクラーゼ活性は私たちの値の500倍である。菌の破壊法に問題があるかもしれない。ただし、彼の場合も酵素活性はすべて2万×g沈澱にある。促進物質は調べていない。

一方、Tao と Lipmann⁽²³⁾は *E. coli* Crooke's strain, Q-13 および K-12 を用い、アデニルシクラーゼを一部は沈澱部分に認めたが、これを抽出して可溶性とし100倍ほど精製したと報告した。彼らも促進効果のある物質は見つけていない。動物で促進効果を持つ NaF (後述) は、大腸菌の酵素では強い阻害剤となる。

3-3. その他の微生物

その他、微生物での環状 AMP 生成の報告は若干ある。*Streptococcus salivarius* のアデニルシクラーゼ⁽²⁴⁾はすべての解糖反応中間物で阻害されるというが、詳しいことはわからない。yeast の環状 AMP 量を測定した報告⁽²⁵⁾もある。もう1つは変形菌で⁽²⁶⁻²⁸⁾、体外に環状 AMP を放出する。cell free 系は試みられていない。この一風変わった生物での環状 AMP のたいへん面白い役割は後で説明しよう。このように、微生物界においても環状 AMP は広く分布していることがわかってきた。

3-4. 細菌と動物のアデニルシクラーゼの比較

動物のアデニルシクラーゼの特徴は、膜についていてホルモンの制御を受けることである。アデニルシクラーゼ活性に影響を及ぼすホルモンとしては、アドレナリン、ノルアドレナリン、ヒスタミン、セロトニンなどのアミン類、グルカゴン、バソプレシン、副腎皮質刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、生長ホルモン、濾胞刺激ホルモン、色素胞刺激ホルモン、上皮小体ホルモンなどのペプチド類、それにプロスタグランジンも報告されている。さらに最近では、脳下垂体ホルモンの分泌を調節する高次のホルモンともいべき放出促進因子 (releasing factor) の作用も、アデニルシクラーゼ活性化を介して行なわれるという報告がある。また、動物のほとんどのアデニルシクラーゼで、NaF がこれらホルモンの代わりに促進作用を示すことも大きな特徴である。外からおのおの特異的なホルモンという情報を受け、環状 AMP という新たなサインをだすアデニルシクラーゼの系を、通信工学の discriminator-signal generator にたとえる人もある。ただし、ホルモンが

く部分と環状 AMP をつくる部分が構造上どんな関係にあるのかは、現在のところ不明である。

Robison ら⁽³⁾による regulatory subunit と catalytic subunit の考えは、aspartate transcarbamylase からの類推であるが、アデニルシクラーゼの場合、2 つが別別の蛋白であるという証拠はない。アデニルシクラーゼを界面活性剤で可溶化すると、酵素活性と NaF 感受性を残しホルモン感受性はまったく失われ、ホルモン感受性がこのような処理に敏感なことがわかるが、catalytic subunit との関係については何も示唆を与えない。

Marinetti らは、ホルモンがついてから酵素活性発現までに時間のずれを認め、この 2 つの間をつなぐ別の因子を考える。また、脂肪組織のアデニルシクラーゼのように、1 つの酵素を何種類ものホルモンが活性化し、それらの間に相加性がなく、また阻害剤がそれぞれ違うことから、レセプターは各ホルモンのために別々にあるが活性中心は共同利用というものも考えられている。

オタマジャクシがカエルになるとき、アデニルシクラーゼのホルモン感受性が変わることも、レセプターと酵素が別々のユニットであることの証拠にされたりしている。

さて、細菌のアデニルシクラーゼの制御に関してはほとんど何もわかっていない。*B. liquefaciens* の酵素は可溶性でありピルビン酸で促進されるが、これがどういう生理的意義を持っているか不明である。catalytic site と regulatory site はいまのところ別の蛋白としては分離されていない。一方、大腸菌のアデニルシクラーゼは、少なくとも一部は動物と同じく膜に存在するが、この場合ホルモンに相当する促進物質が見つからない。阻害剤は 2, 3 あるが、生理的に意味のあるものかどうか不明である。ただし、できた環状 AMP の作用について

は 2 年ほど前から重要な報告が現われはじめた。それに移る前に、環状 AMP を分解する酵素についてもふれておこう。

4. 環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ

微生物で環状 AMP が何らかの役割を果たしているならば、その量は、合成と分解および体外への放出という 3 種の過程で調節を受けるだろう。環状 AMP を分解する酵素(環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ)は、動物では脊椎動物をはじめ、ウニ、カタツムリ、ナマコ、イソギンチャクなど種々の動物の多くの組織に分布している。微生物にもホスホジエステラーゼは存在し、私たちが環状 AMP をつくらせるのに用いた菌 *B. liquefaciens* にも活性が認められたが、詳しい報告のあるのは大腸菌⁽²⁹⁾と変形菌 (*Dictyostereum discoideum*)⁽³⁰⁾である。最近、私たち⁽³¹⁾は *Serratia marcescens* が強いホスホジエステラーゼ活性を持っていることを認めてその性質を調べた。いずれも生成物は 5'-AMP であり、動物の場合と同じである。動物の代表的な酵素とともに一覧表にして示す (表 1)。

動物のホスホジエステラーゼは、膜についているものと可溶性のものと両方あるが、微生物の酵素はどれも可溶性酵素として得られている。動物のホスホジエステラーゼを通じてほぼ共通なことは、1) 3', 5'-環状ヌクレオチドは環状 CMP を除いて全部基質になること、2) Mg^{2+} とイミダゾールで促進されること、3) メチルキサンチン類で阻害されること、であろう。微生物の酵素は必ずしも足並みがそろわない。*S. marcescens* の酵素は環状 CMP をも分解する。ただし、 K_m は環状 AMP の場合の 40 倍ほどになる。*S. marcescens* と同じく *Streptococcus salivarius* の酵素もメチルキサンチンで

表 1 3', 5'-環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼの性質

材 料	比 活 性*		至適 pH	K_m (mm)	Mg^{2+}	メチルキサンチン	イミダゾール	分子量	文 献
	initial	final							
ウサギ脳		0.04	≥7.5		促進				Drummond <i>et al.</i> (1961)
ウシ心臓	0.093	8.5	7~8	0.06~0.1	促進	阻害	促進		Butcher <i>et al.</i> (1962)
イヌ心臓	0.0055	0.95	8.5~9.2	0.49	促進	阻害	促進		Nair (1966)
ラット脳		0.07	8	0.1~0.3	促進	阻害	促進		Cheung (1967)
ラット肝臓	0.0063	0.41	7~7.5	0.062	促進	阻害	促進	>20万	Menahan <i>et al.</i> (1969)
マス(魚)脳	0.007	0.056	9	0.08~0.1	促進	阻害	促進		Yamamoto <i>et al.</i> (1969) ⁽⁵⁸⁾
<i>D. discoideum</i>	0.16	0.8	7.5	2	促進	無効	無効	約 30万	Chang (1962) ⁽³⁰⁾
<i>E. coli</i>		0.03	8.5	0.77		無効		>20万	Braná <i>et al.</i> (1966) ⁽²⁹⁾ Monard <i>et al.</i> (1969) ⁽³²⁾
<i>S. marcescens</i>	0.24	268	7.5~8.5	0.52	無効	阻害	無効	5.1万	Okabayashi <i>et al.</i> ⁽³¹⁾

* AMP μ moles/min·mg

阻害される⁽²⁴⁾というが、詳細は不明である。もう1つ面白いのは分子量である。分子量 20 万以上というのが3つあるが、私たちの *S. marcescens* の酵素は分子量約 5 万である。20 万以上というのは、5 万前後のサブユニットが集まったものであるかもしれない。

さて、環状 AMP を合成する酵素のほうはホルモンなどの制御を受けて華々しいが（もっとも、大腸菌など制御物質のわからないものもあるが、またそれだけに）、分解酵素のほうも何かコントロールする仕組みはないだろうか。若干の報告はあるが未確定のものが多い。簡単に述べよう。

1) 大腸菌⁽³²⁾ ホスホジエステラーゼの活性発現に3つの成分（分子量 20 万以上の物質、分子量 10 万以下で非透析性の物質、および透析性低分子）が必要であり、ある種の変異株（catabolite repression resistant, 後述）の中にはこの成分のどれかが欠けているものがあり、これが catabolite repression のかからない原因ではないかと考えている。また、グルコース 6-リン酸、フラクトース 6-リン酸、3-ホスホ-グリセルアルデヒドが反応を促進し、2-ホスホ- および 3-ホスホ-グリセリン酸が逆に阻害するという。

2) 不活性型のホスホジエステラーゼ 牛の脳皮質より部分精製したホスホジエステラーゼは不活性型で、蛇毒の作用によって活性がでてくる。蛇毒と同じ作用を持つ activator が同じ材料から分離された。蛋白分解酵素も同様の作用を持つことから、トリプシノーゲン、プロインシュリンなどと類似の機構で活性化を受けることが推測される。

3) ホルモンの作用 ホスホジエステラーゼをトリヨードクロニンが阻害するという報告や、インシュリンが促進するという報告があり、ホスホジエステラーゼをもホルモンが制御する可能性が考えられているが、インシュリンについては追試の結果は否定的のようである。

4) 向精神薬の作用 通常の生理作用ではないが、薬理作用を有する若干の薬剤がホスホジエステラーゼ活性に影響を与えることが報告されている。前述のメチルキサンチン類やトランキライザー（フェノチアジン、レセルピン誘導体など）によって脳のホスホジエステラーゼが阻害されることは、これらの薬物の作用機構との関連で興味ある現象と思われる。

5. 環状 AMP の役割

動物では、ホルモンの作用でできた環状 AMP がホルモンの意を継いでその生理作用を発揮すること、また若

表 2 環状 AMP の作用*

〔微生物〕	
酵 素(系):	DPNH oscillation (yeast)
	phosphofructokinase 活性化(?) (yeast)
	malic enzyme 阻害 (<i>E. coli</i>)
	protein kinase 促進 (<i>E. coli</i>)
そ の 他:	粘液アムニオ誘引, 分化促進 (<i>D. discoideum</i>), catabolite repression 解除 (<i>E. coli</i> ほか)
〔動物〕	
酵素反応促進:	phosphorylase, phosphofructokinase, lipase, releasing enzyme, pyruvate kinase, protein kinase, amino acid activation and polymerization
酵素反応阻害:	glycogen synthetase, fructose 1,6-diphosphatase, Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase
酵素合成促進:	tyrosine aminotransferase, serine dehydratase, glucose 6-phosphatase
代謝系促進:	ステロイド合成, 脂肪分解, グルコース酸化, 糖新生, 尿素生成, ケトン体生成
代謝系抑制:	脂肪酸合成
分泌促進:	amylase, insulin, HCl, TSH, FSH, GH, acetylcholine
そ の 他:	DNA 合成促進, 細胞分裂促進, cell growth 阻害, 膜透過性変化, メラニン粒拡散, 血小板凝集阻止, 筋収縮, 神経興奮伝達

* 作用の確立されたものだけでなく、かなり不確実なものも含む。

干の酵素の活性化ないし不活性化をもたらすことを述べた。動物における環状 AMP の作用の研究では、細胞膜を通過しにくい環状 AMP の代わりに、その誘導体 N^6, O^2 -ジブチリル環状 AMP がよく用いられることもつけ加えておこう。この化合物はホスホジエステラーゼの作用を受けにくい点も好都合である。その他の誘導体についての研究も報告されているが、現在のところ微生物と直接関係がないので詳しくは文献を参照していただきたい。

さて、ステロイドや膀胱膜や肌の色合いとは無縁な細菌あるいはその他の微生物で、環状 AMP がいかなる役割を担っているのか、現在までに得られている知見を、動物と比較しながら概観してみよう（表 2）。

5-1. 若干の酵素

表 2 に見られるように、動物ではいくつかの解糖系の酵素に対する環状 AMP の作用が検討されている。おのおの解析の度は異なるが、一般的に環状 AMP は、グリコゲン分解に働く酵素反応を促進し、グリコゲン合成の方向に働く反応は阻害する。一方、微生物の酵素に対する環状 AMP の作用については、散発的な報告しか得られていない。

1) DPNH oscillation Chance ら⁽³³⁾は yeast の cell free 系で、環状 AMP が DPNH を酸化型にかえ、

また oscillation の振幅と振動数を増加させることを認め、環状 AMP が解糖系の 1, 3-ジホスホグリセリン酸キナーゼとアルコール脱水素酵素の間のどこかを活性化するのではないかと推測した。追試した Cheung⁽²⁵⁾ は同様の効果を認めながらも、使った環状 AMP の量が濃すぎるとして、その生理的意義に懐疑的である。

2) **Yeast** のホスホフルクトキナーゼ Viñuela ら⁽³⁴⁾は、パン酵母のホスホフルクトキナーゼが環状 AMP によって ATP 阻害を受ける状態から受けない状態に変化する、と報告した。しかし、Atkinson ら⁽³⁵⁾の追試ではネガティブだった。また、最近 Atzpodien ら⁽³⁶⁾は、ATP 感受性の状態から非感受性の状態への変化は確認したが、この際、環状 AMP は何の作用も有しないと述べている。*E. coli*, *Arthrobacter crystallopoietes* および変形菌 *D. discoideum* のホスホフルクトキナーゼも、環状 AMP の作用を受けない⁽⁷⁾。*B. liquefaciens* の酵素も同様であった(未発表)。

3) 大腸菌の malic enzyme Sanwal ら⁽³⁷⁾は、*E. coli* B の malic enzyme の活性を環状 AMP が阻害することを認め、環状 AMP は、エネルギー源が乏しいときに TCA サイクルからリンゴ酸がとりあげられるのを阻止する役目を持つと考えた。グルコースの少ないとき、環状 AMP ができてくるという Makman ら⁽²⁰⁾の報告とつじつまが合うわけである。Makman らのデータを参考にして、新しい事実を見つけたもう 1 つの例は後に述べる。

4) プロテインキナーゼ Kuo ら⁽³⁸⁾は、*E. coli* から約 80 倍部分精製したプロテインキナーゼの活性が、環状 AMP によって促進されることを見いだした。基質はヒストンを用いたが、大腸菌の中で実際にリン酸化を受ける基質が何かはわかっていない。同様のプロテインキナーゼは動物に広く分布している。この酵素の意義については後述する。

5-2. 粘液アメーバのアクラシン

変形菌の生活環の中にアメーバ状の時期があり、粘液アメーバ (myxamoeba) と呼ばれるが、栄養がなくなるとこれが何匹も集まってひとかたまりになり、最後に子実体となって胞子と柄細胞に分化する。このアメーバが互いに引かれるメカニズムは、半世紀も前から論議の種だったらしく、アメーバに対する誘引物質があるとして、アクラシンと名づけられていたが、その本体が最近明らかにされた⁽³⁹⁾。これが環状 AMP である。発見のいきさつを詳しく記した面白い解説⁽⁴⁰⁾があるので参照

されたい。

要するに、アメーバは環状 AMP をつくって外にだし、互いの出した環状 AMP に引かれ引かれて一箇所に集まるのである。ただし、ついでに分解酵素も外にだし、環状 AMP は AMP に分解される。分解してできた AMP が次の段階である変形菌の分化を促進するという、都合のよいことを Chassy ら⁽⁴¹⁾は考えているが、Bonner⁽⁴²⁾によれば、これも環状 AMP 自身の作用だという。環状 AMP の代わりに他の環状スクレオチドも高濃度で誘引作用を示す⁽⁴¹⁾。動物では、環状 AMP は細胞内で働き、細胞外の働きはホルモンであると考えられているのに対し、変形菌では環状 AMP が細胞外で働くことから、この生物では環状 AMP は primary messenger だと Konijn ら⁽²⁶⁾は考える。

環状 AMP が粘液アメーバのどのような酵素系に作用してこのような作用をひき起こすかは、今後解明すべき問題である。

5-3. Catabolite repression

大腸菌をグルコースの多い培地からグルコースのない培地に移すと、環状 AMP ができてくるという Makman ら⁽²⁰⁾の報告と、同様の条件で β -ガラクトシダーゼやトリプトファナーゼの合成が促進されるという Rickenberg らおよび Magasanik の報告をくっつけると、環状 AMP がふえれば β -ガラクトシダーゼなどの合成が盛んになるということがいえるかもしれない。これを実際に確かめ、蛋白合成機構という華やかな舞台に環状 AMP をひき込んだ Perlman と Pastan のグループの仕事⁽⁴³⁻⁵⁰⁾を、ここで順を追って紹介しよう。

Catabolite repression (glucose effect) という細菌の生理で著名な現象がある。グルコースまたはその catabolite が存在する場合、一群の酵素の合成の誘導が阻止される現象である。 β -ガラクトシダーゼ、トリプトファナーゼ、ガラクトキナーゼ、グリセロキナーゼ、D-セリン脱水素酵素など、多くの酵素がこの catabolite repression を受ける。いずれもその基質によって合成が誘導され、基質はその酵素によって解糖系に導かれる。グルコースのようなエネルギー源があるときに、他に大切な役目のある物質がむだに解糖系に送り込んでくるのを防ぐ合目的な機構だと考えられている。しかし、その詳しいメカニズムはわかっていない。

グルコースまたはその catabolite のどれ(とどれ)が、どこにどう働いて repression を起こすかがわかっていない。このグルコースと catabolite repression の

間に, Perlman と Pastan は環状 AMP という飛び石を放り込んだ。広義の glucose effect と呼ばれるものに 3 つの現象があるという。1 つは, いま述べた catabolite repression である。もう 1 つは, transient repression で, グルコースのない環境で増殖している菌に突然グルコースを加えると酵素誘導が一時極度に repress される。この場合は, 間もなく元よりやや低い速度で誘導酵素の合成が開始される。最後の 1 つは, グルコースが誘導酵素の基質となる inducer の細胞内へのとり込みを阻害する現象である。

Perlman と Pastan は, まず inducer による大腸菌の β -ガラクトシダーゼ誘導^(43,44)に対するグルコースの transient repression を, 外から加えた環状 AMP が打ち消すことを示し, 同様の効果をトリプトファナーゼ^(43,45)についても認めた。また, グルコースの影響を受けない酵素や全蛋白の合成は, 環状 AMP の影響を受けないことから, catabolite repression を受ける酵素が特異的に環状 AMP の作用を受けると推論した。同様の結果を Ullman と Monod⁽⁵¹⁾も発表している。その後の Perlman と Pastan のグループの追跡は, おおよそ次のようになる。

1) Inducer 除去や抗生物質使用による実験から, 環状 AMP の作用部位は遺伝子のレベルであると推定した⁽⁴⁴⁾。同様の結論は, Jacquet ら⁽⁵²⁾が pulse induction と阻害剤の実験でだした。

2) β -ガラクトシダーゼを constitutive につくる変異株でも環状 AMP の効果があることから, 環状 AMP は inducer uptake に関与するのではないと推定した⁽⁴⁴⁾。

3) また, これらの変異株はおのおの *i* gene (repressor をつくる gene) と operator region の壊れた変異株であるから, 環状 AMP は repressor-operator の interaction に関与するのではないだろう⁽⁴⁴⁾。

4) lac promotor の変異株の β -ガラクトシダーゼは transient repression を受けず, また環状 AMP による合成促進も認められない。この変異株の revertant は transient repression を受け, 環状 AMP でこ

れが解除される。故に, transient repression と環状 AMP によるその解除は, promotor のところで行なわれるのであろう⁽⁴⁶⁾。

5) Transient のみならず, catabolite repression も環状 AMP で解除された。2 つの現象はともに細胞内の環状 AMP 濃度の低下によって起こる関連した現象であろう⁽⁴⁷⁾。

6) グルコースは細胞内の環状 AMP 濃度を下げる (Makman らの報告の確認)。故に, catabolite repression は環状 AMP の濃度を下げることによって介して発揮されるのだらう⁽⁴⁷⁾。

7) グルコースなど, わずかの糖以外の糖を利用できない変異株には, アデニルシクラーゼ活性がない。この菌に環状 AMP を与えると, これらの糖を利用するようになる。故に, 環状 AMP は種々の糖を利用するために本来必要な物質⁽⁴⁸⁾である。

8) Cell free 系で, lac m-RNA 合成を環状 AMP が促進する⁽⁴⁹⁾。これは少し前に Chambers ら⁽⁵³⁾が同じ結果を得ている。

図 3 Catabolite repression と環状 AMP の作用 (暫定的模式図)

→ 物質代謝, 移動; ⇒ 促進; ➡ 阻害

① β -ガラクトシダーゼの場合, ② トリプトファナーゼの場合

* Catabolite repression を受ける酵素の基質となる炭素源のことである。グルコース以外のすべての炭素源ではない。

以上は、すべて大腸菌の β -ガラクトシダーゼについての実験であるが、大腸菌では、前述のトリプトファナーゼ、 β -ガラクトシド透過酵素、ガラクトキナーゼ、グリセロキナーゼ、グリセロリン酸透過酵素、enzyme II、アラビノース透過酵素、D-セリン脱アミノ酵素、チミジンホスホリラーゼなど、一連の酵素のグルコースによる repression が環状 AMP で解除され⁽⁵⁰⁾、また大腸菌以外の菌でも同様の結果を得た⁽⁵⁰⁾。以上が Perlman, Pastan のグループの成果である (図 3)。

Catabolite と repression の間に環状 AMP が介入するとすれば、catabolite がどのようにして環状 AMP 量を調節し、環状 AMP がいかにして特定酵素の合成を促進するかが解明すべき問題となろう。catabolite による環状 AMP 量の調節機構として、Perlman ら⁽⁴⁷⁾はまず環状 AMP の放出を考える。Monard ら⁽³²⁾は、前述のようにホスホジエステラーゼ活性化を考える。オキザロ酢酸やピリドキサルリン酸によるアデニルシクラーゼ阻害⁽²¹⁾は、ただちには catabolite repression と結びつけにくい。いずれも、今後の検討が必要である。環状 AMP による酵素合成の促進も *in vitro* の実験が始まったばかりであり、また β -ガラクトシダーゼでは m-RNA 合成のレベルである⁽⁴⁸⁾のに対し、トリプトファナーゼについては translation のレベル⁽⁵⁰⁾が推測されており、他の酵素との区別、作用部位など検討すべき問題が多い。

動物の特定の酵素ないし蛋白の合成が環状 AMP によって促進される例もいくつかあり、セリン脱水素酵素、チロシンアミノトランスフェラーゼ、グルコース 6-ホスファターゼなど、やはりグルコースによって合成が阻害されるという酵素群である。また、動物における *in vitro* の実験では、Pitot らはラット肝の polysome から蛋白がはなれる段階を環状 AMP が促進すると述べ、Lissitzky らはヒツジの甲状腺の polysome で環状 AMP が蛋白合成を促進したと述べている。また、最近 Malkin らは、網状赤血球で環状 AMP がアミノ酸の activation および polymerization を促進するらしいという報告をだしている。以上のように、環状 AMP の蛋白合成への関与を示すデータは、動物、微生物を通じいくつかあるが、その作用部位は種々推測されかねない。どのような展開をみせるか今後にかかっている。

5-4. 環状 AMP の作用機構に関する仮説

環状 AMP のホスホリラーゼに対する作用のみが知られていたところ、ある種のホルモンの作用をこの酵素の活性化で説明し去ろうという試みも行なわれた。複雑多岐

図 4 ホスホリラーゼ活性化の機構

にわたってしまった環状 AMP の作用を、最近また統一的に説明してみようという試みがある。

1) 膜と Ca^{2+} ⁽⁵⁴⁾ 環状 AMP は Ca^{2+} の膜透過または膜への結合を調節することによって、その種々の生理作用を発現するという見解である。環状 AMP の関与する種々の内分泌や神経分泌、さらに筋の収縮などに Ca^{2+} がやはり関与している例の多いことがその根拠であり、 Ca^{2+} をキレートしている膜上の ATP がアデニルシクラーゼによって環状 AMP になるとともにそのキレート作用を失い、 Ca^{2+} が release され、この Ca^{2+} が細胞内で酵素活性 (ホスホリラーゼキナーゼ、ピルベートカルボキシラーゼ、ピルベートキナーゼ、イソクエン酸脱水素酵素など) を調節するという考えである。無細胞系で得られている環状 AMP の作用に対しては、説明に無理があると思われるが、とくに動物で指摘されているように、環状 AMP と Ca^{2+} の関係は今後検討する必要があるだろう。

2) プロテインキナーゼ 動物では環状 AMP がホスホリラーゼを活性化するが、環状 AMP の直接の作用は実はホスホリラーゼキナーゼキナーゼの反応を促進することにある (図 4)。このキナーゼキナーゼはカゼインやプロタミンをもリン酸化し、この反応を環状 AMP がやはり促進する。その後、この種の酵素——環状 AMP で促進されるプロテインキナーゼ——は続々と発見されている⁽⁵⁵⁾ (表 3)。いずれも half maximal activation に要する環状 AMP 濃度が 10^{-8} ~ 10^{-7}M と非常に低い。

表 3 環状 AMP で促進されるプロテインキナーゼ

ウサギ筋肉 [phosphorylase kinase, protamine, casein]	Walsh <i>et al.</i> (1968)
コウシ肝臓 [histone, protamine]	Langan (1968)
ウサギ脳 [histone, protamine, phosphitin]	Miyamoto <i>et al.</i> (1969)
大腸菌 [histone]	Kuo <i>et al.</i> (1969)
ウサギ肝臓 (<i>in vivo</i>) [flhistone]	Langan (1969)
ウシ脳 [histone, protamine, casein, albumin]	Miyamoto <i>et al.</i> (1969)
ラット脂肪組織 [histone, casein, phosphorylase kinase]	Corbin <i>et al.</i> (1969)
コイ, ヒトデ, エビ, イカ, カイ, ゴカイ, ホシムシ, クラゲ, カイメン, ソウリムシ [histone, casein]	Kuo <i>et al.</i> (1969)
オウシ脳 [membrane bound protein]	Weller <i>et al.</i> (1970)
マス精巣 [protamine, histone]	Jergil <i>et al.</i> (1970)

[] 内は使用した基質.

Miyamoto らは、この酵素をウシ脳皮質より約 300 倍精製し、その性質を詳しく検討した。環状 dTMP を除いたほとんどの 3',5'-環状ヌクレオチドが、環状 AMP より 10~100 倍高い濃度で同様の促進作用を示す。また、プロテインキナーゼに対する蛋白性のインヒビターも報告されている。

さて、Kuo と Greengard⁽³⁸⁾は、プロテインキナーゼの活性化こそ多岐にわたる環状 AMP の作用の基本的な作用機構ではないだろうか考える。この酵素が高等動物に止まらず、無脊椎動物、微生物にも存在することはこの見解を支持するものとしている。また、彼らは *B. liquefaciens* の酵素を用いて、アデニルシクラーゼ反応が可逆的であることを示し、その平衡定数より、環状 AMP の 3' 位のリン酸エステル水解の際の標準自由エネルギーを 11~12 kcal/mole と算出した。そこで、プロテインキナーゼ反応促進の機構として、彼らは環状 AMP がプロテインキナーゼを AMP 化する可能性を推測している。こうした推測が正しいとすれば、環状 AMP の作用の多様性の一部はプロテインキナーゼの基質の相違によって説明できるかもしれない。現在、確認または推定されている若干の例を述べよう。

動物のホスホリラーゼについては、この項の最初に述べた。一連の活性化反応をカスケード反応と呼ぶことがある。これは、微量のホルモンの刺激を増幅する仕組みと考えられる。血液凝固や眼の細胞の光による興奮もこのようなカスケード反応による刺激の増幅が行なわれていると考え、生体にとって基本的な機構ではないかという推測がある。他の解糖系（および逆反応）の酵素についても、活性化（および不活性化）がキナーゼによって起こることが推定されているが、詳しい解析は進んでいな

い。最近、グリコゲン合成酵素のキナーゼが分離された。これらの酵素が何段のカスケード（滝）を形成するかは、今後のみものであろう。

Corbin らは、脂肪組織ではリパーゼのリン酸化が環状 AMP の脂肪分解作用の第 1 段階ではないかと推測する。

Langan は、肝臓のプロテインキナーゼによるヒストンのリン酸化を、環状 AMP が *in vitro* および *in vivo* で促進することを認め、環状 AMP の RNA 合成への関与を考える。前述の環状 AMP による酵素合成とからんで、今後の検討が待たれる。ただし、ヒストンのないバクテリアではどうなるであろうか。

Weller らは、膜のミクロゾーム蛋白を膜に付着したキナーゼがリン酸化しこれを環状 AMP が促進することから、電気的なパルス→膜の脱分極→環状 AMP 遊離→膜蛋白リン酸化→カチオン輸送、という機構を推測している。脳にはとくに多量のアデニルシクラーゼ、ホスホジエステラーゼがあり、環状 AMP が活発に働いていることが想像されている。微生物とは縁遠いが、関心の持たれるところである。

ところで、環状 AMP で促進される微生物のプロテインキナーゼは、いったい何をリン酸化し、リン酸化された蛋白は何をしているのだろうか。それはすべて今後の課題である。

6. 生物とホルモンと環状 AMP

6-1. ホルモン感受性の獲得

微生物屋のホルモン談義であるから笑って読みとばしていただきたい。前にちょっと述べたが、オタマジャクシとカエルの赤血球のアデニルシクラーゼを比較した実験がある⁽⁵⁶⁾。オタマジャクシの酵素はカテコールアミンの作用を受けないのに、カエルの酵素はカテコールアミンで促進される。詳しく調べた結果、オタマジャクシの前肢が完成し尾が消えるときに、このカテコールアミン感受性がでてくるという。ただし、同じ細胞の酵素が変化したのか、新しい cell clone の出現によるのかは不明である。

もう 1 つの例をあげよう。動物のある種の酵素の合成が環状 AMP で促進されることを先に述べたが、Green-gard⁽⁵⁷⁾ はラット肝の実験から、図 5 (p. 396 参照) のような scheme を考えている。この scheme 自身が今後どれほど検証に耐えるかはともかくとして、生物の個体発生および進化の過程で、環状 AMP とホルモンがいつから生体の制御機構にかかわりを持つようになったのか、

図5 発生に伴う酵素調節の変化

(ラット肝チロシンアミノトランスフェラーゼ, O. Greengard⁽⁵⁷⁾)
CAMP=環状AMP, cort.=glucocorticoids, ⇨ 促進, → 阻害

環状AMPとホルモンの関係がどのようにして生じるようになったのかを考えさせられる図である。

現存のホルモンは、環状AMPを中心とする既存の調節機構の上にうまく乗ったのではないかという考え⁽⁷⁾にも耳を傾けたい(逆に、環状AMPの研究は既存の内分泌学に乗かって進められた)。変形菌の環状AMPを、primary messengerとする考え⁽²⁶⁾もこの点で興味がある。ホルモン、神経ホルモン、releasing factorと、ホルモンから神経に至る一連の高等動物の中心的制御機構の全面にわたってその関与が推測されるに至っている環状AMPの作用機構の解明に、ホルモン制御のない生物での研究が役立つことを期待する理由もこのあたりにある。

6-2. 環状AMP以外の環状ヌクレオチド

最近、環状GMPやグアニルシクラーゼの報告が相ついでいる。グアニルシクラーゼが可溶性であることから、細胞内におけるステロイドホルモンのmediatorの可能性も憶測されているが、環状GMPの作用の多くはいまのところ環状AMPと同じようである。

また、環状UMPをかなり特異的に分解する酵素が、ウシ心臓で見つけられている。これら環状AMP以外の環状ヌクレオチドが、各生物でどのような役割を果たしているか、環状AMPやホルモンとの関係はどうかなど、興味ある今後の問題である。なお、微生物ではまだ環状AMP以外の環状ヌクレオチドの報告はない。

6-3. 環状ヌクレオチド支配の限界

環状AMPは、脊椎動物においてはホルモン作用のセカンドメッセンジャーとして脚光をあびている。無脊椎動物でも、アデニルシクラーゼの存在(ウニ、肝蛭、ハエなど)および環状AMPの作用する酵素(プロテインキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼなど)が知られている(ただし、セロトニン以外のホルモンの関与は未知)。微生物でも述べてきたように、環状AMPの役割が解明されつつある。

では、いったい植物はどうだろうか。ホスホフルクトキナーゼは環状AMPの作用を受けない⁽⁷⁾し、環状AMPで促進されるプロテインキナーゼもみあたらない⁽⁵⁵⁾。分解酵素もないという⁽⁵⁸⁾。環状AMPが植物でジベレリン様の作用を有するという報告⁽⁵⁹⁾があるが、人を首肯させるデータではない。植物ホルモンは環状AMPとは無縁のホルモンかもしれないが、早急な結論は禁物である。オーキシンとセロトニンの構造の類似はまったくの偶然であろうか。さらに、粘液アメーバで見られたように、個体間の連絡の機構に環状AMPが一枚かんでいる例が他の生物ではないだろうか。昆虫のフェロモンなどがすぐ頭に浮かぶが、そろそろ妄想の部類に入るのでこのあたりで筆をおくことにしよう。

あとがき

微生物に関しての研究はまだたりないことばかりであ

り、一方、動物の環状 AMP のほうは毎日いくつもの報告がでるほどの繁盛ぶりである。微生物の話のほすがたいぶ動物に侵入したのもそのためで、ご容赦を乞いたい。環状 AMP の作用をすべて明らかにし、その機構を明快に説明するにはまだ多くの事実の蓄積が必要である。まともりに欠ける文章になった点ご了承願いたい。

文 献

- 1) E. W. Sutherland, I. Φye and R. W. Butcher : *Recent Progr. Hormone Res.*, 21, 623 (1965).
- 2) E. W. Sutherland and G. A. Robison : *Pharmacol. Rev.*, 18, 145 (1966).
- 3) G. A. Robison, R. W. Butcher and E. W. Sutherland : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 139, 703 (1967).
- 4) G. A. Robison, R. W. Butcher and E. W. Sutherland : *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 149 (1968).
- 5) 垣内史朗 : 蛋白質 核酸 酵素, 12, 324 (1967).
- 6) 上田一作 : 医学のあゆみ, 64, 565, 621 (1968).
- 7) 垂井清一郎 : 医学のあゆみ, 71, 410 (1969).
- 8) 垣内史朗 : 蛋白質 核酸 酵素, 14, 336 (1969).
- 9) 平田扶桑生, 早石修 : 統現代の生化学 (下) (化学同人), 1970, p. 185.
- 10) T. Okabayashi : *J. Bacteriol.*, 84, 1 (1962).
- 11) T. Okabayashi, M. Ide and A. Yoshimoto : *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 158 (1963).
- 12) T. Okabayashi, A. Yoshimoto and M. Ide : *J. Bacteriol.*, 86, 930 (1963).
- 13) T. Okabayashi, M. Ide and A. Yoshimoto : *Amino Acid and Nucleic Acid—発酵と代謝*, 10, 117 (1964).
- 14) M. Ide, A. Yoshimoto and T. Okabayashi : *J. Bacteriol.*, 94, 317 (1967).
- 15) T. Okabayashi and M. Ide : *J. Bacteriol.*, 投稿中.
- 16) M. Hirata and O. Hayaishi : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 21, 361 (1965).
- 17) M. Hirata and O. Hayaishi : *Biochim. Biophys. Acta*, 149, 1 (1967).
- 18) M. Hirata and O. Hayaishi : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 360 (1966).
- 19) R. S. Makman and E. W. Sutherland : *Federation Proc.*, 22, 470 (1963).
- 20) R. S. Makman and E. W. Sutherland : *J. Biol. Chem.*, 240, 1309 (1965).
- 21) M. Ide : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36, 42 (1969).
- 22) H. Braná : *Folia Microbiol.*, 14, 185 (1969).
- 23) M. Tao and F. Lipmann : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 63, 86 (1969).
- 24) R. L. Khandelwal and I. R. Hamilton : *Bacteriol. Proc.*, American Society for Microbiology, 1969, p. 117.
- 25) W. Y. Cheung : *Biochim. Biophys. Acta*, 115, 235 (1966).
- 26) T. M. Konijn, D. S. Barkley, Y. Y. Chang and J. T. Bonner : *Amer. Naturalist*, 102, 225 (1968).
- 27) D. S. Barkley : *Science*, 165, 1133 (1969).
- 28) T. M. Konijn, Y. Y. Chang and J. T. Bonner : *Nature*, 224, 1211 (1969).
- 29) H. Braná and F. Chytil : *Folia Microbiol.*, 11, 43 (1966).
- 30) Y. Y. Chang : *Science*, 161, 57 (1968).
- 31) T. Okabayashi and M. Ide : *Biochim. Biophys. Acta*, 印刷中.
- 32) D. Monard, J. Janeček and H. V. Rickenberg : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 584 (1969).
- 33) B. Chance and B. Schoener : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17, 416 (1964).
- 34) E. Viñuela, M. L. Salas, M. Salas and A. Sols : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 243 (1964).
- 35) D. E. Atkinson : *Ann. Rev. Biochem.*, 35, 85 (1966).
- 36) W. Atzpodien, J. M. Gancedo, V. Hagmaier and H. Holzer : *Eur. J. Biochem.*, 12, 6 (1970).
- 37) B. D. Sanwal and R. Smando : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 486 (1969).
- 38) J. F. Kuo and P. Greengard : *J. Biol. Chem.*, 244, 3417 (1969).
- 39) T. M. Konijn, J. G. C. van de Meene, Y. Y. Chang, D. S. Barkley and J. T. Bonner : *J. Bacteriol.*, 99, 510 (1969).
- 40) J. T. Bonner : *Sci. Am.*, 220(6), 78 (1969).
- 41) B. M. Chassy, L. L. Love and M. I. Krichevsky : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 64, 296 (1969).
- 42) J. T. Bonner : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 65, 110 (1970).
- 43) R. Perlman and I. Pastan : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30, 656 (1968).
- 44) R. L. Perlman and I. Pastan : *J. Biol. Chem.*, 243, 5420 (1968).
- 45) I. Pastan and R. L. Perlman : *J. Biol. Chem.*, 244, 2226 (1968).
- 46) I. Pastan and R. L. Perlman : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 61, 1336 (1968).
- 47) R. L. Perlman, B. de Crombrughe and I. Pastan : *Nature*, 223, 810 (1969).
- 48) R. L. Perlman and I. Pastan : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 151 (1969).
- 49) B. de Crombrughe, H. E. Varmus, R. L. Perlman and I. H. Pastan : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 894 (1970).
- 50) B. de Crombrughe, R. L. Perlman, H. E. Varmus and I. Pastan : *J. Biol. Chem.*, 244, 5828 (1969).
- 51) A. Ullman and J. Monod : *FEBS letters*, 2, 57 (1968).
- 52) M. Jacquet and A. Kepes : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36, 84 (1969).
- 53) D. A. Chambers and G. Zubay : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 63, 118 (1969).
- 54) H. Rasmussen and A. Tenenhouse : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 59, 1364 (1968).
- 55) J. F. Kuo and P. Greengard : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 64, 1349 (1969).
- 56) O. M. Rosen and J. Erlichman : *Arch. Biochem. Biophys.*, 133, 171 (1969).
- 57) O. Greengard : *Biochem. J.*, 115, 19 (1969).
- 58) M. Yamamoto and K. L. Massey : *Comp. Biochem. Physiol.*, 30, 941 (1969).
- 59) C. M. Duffus and J. H. Duffus : *Experimentia*, 25, 581 (1969).

動物の文献はあまりに莫大で誌面の都合上割愛せざるをえないので、他の解説などを参照していただきたい。