

Candida albicans における菌体内グルタミン酸の消長について 第 I 報

遊離グルタミン酸の消長について

菅野 忠 彰

大阪大学医学部第3内科学教室 (主任 堂野前維摩郷教授)

(昭和 32 年 6 月 1 日受付)

緒 言

生細胞内における遊離グルタミン酸 (遊グ酸) の存在は, KREBS, EGGLESTON & HEMS⁽¹⁾ により哺乳動物の細胞内に, 又 TAYLOR⁽²⁾⁽³⁾ により酵母細胞中に高濃度に見出され, 又 CLAPPER & HEATHERMANN⁽⁴⁾ は *Streptococcus viridans* の Sulfathiazole, Chlortetracycline (Aureomycin), Penicillin の耐性株において遊グ酸の蓄積を認めた。一方 TAYLOR⁽²⁾ は 26 種の細菌の発育時における遊グ酸の蓄積を詳細に検し, グラム染色性と蓄積能力との間に密接な関係が存在する事を示したが, GALE⁽⁵⁾ は高濃度に遊グ酸を保有する *Staphylococcus aureus* と *Streptococcus faecalis* を用いて遊グ酸の蓄積及び結合グルタミン酸 (結グ酸) の形成状況並びにこれ等に及ぼす各種薬剤の影響につき広範な実験成績を報告した。しかし乍ら *Candida albicans* についてこの種の研究報告には未だ接しない。

Candida albicans がグラム陽性菌である点から当然遊グ酸の蓄積及び結グ酸の形成能力を有すると考えられるので, 本菌の菌体内における遊グ酸及び結グ酸の消長を検し, これ等より本菌における蛋白合成の状況を探知し, さらにこれらに及ぼす阻害剤, 抗生物質及び抗カンジダ剤等の影響を検する目的をもって本研究を行なった。本報では遊グ酸の消長に関する成績を報告する。

実験材料及び実験方法

1. *Candida* 菌浮遊液の調製

阪大第3内科にて汎発性モニリヤ症の患者より分離した *Candida albicans* No. 1001 株を SAUBOURAUD の葡萄糖寒天に 37°C で 24 時間培養し, 集菌後滅菌生理的食塩水で 2 回洗菌遠沈を行い, 滅菌生理的食塩水中で pH 6.0 で 37°C, 1 時間振盪した後, 反応液 1 ml 中の湿菌重量が 100 mg になる様に調製し, その 1 ml を使用した。

2. グルタミン酸は L 型を用い, NaOH で中和した後, 反応液 1 ml につき 10 μM になる様, 又葡萄糖は最終濃度が 1% になる様に調製し, 各種薬剤はすべて NaOH で中和した後直ちに使用した。

以上の各材料を最終濃度 M/15, pH 6.0 の磷酸緩衝液に加え, 反応液総量を 6 ml となし, 好氣的条件下で 37°C にて 1 時間反応させた。反応後直ちに 2°C 前後に

水冷し, 水冷滅菌生理的食塩水で 2 回洗菌遠沈を行ない, 洗滌菌体よりグルタミン酸の放出を行なった。

3. グルタミン酸の定量

NAJJAR & FISHER⁽⁶⁾ の方法に従い, 大腸菌のグルタミン酸脱炭酸酵素標本 (アセトン乾燥菌) を用い, WARBURG 検圧計により manometrically に行なった。

実験成績

I 基礎実験

1. 菌体内遊グ酸の放出

滅菌蒸溜水中で 50°C, 24 時間放置する方法と, 30 分間煮沸する方法及びアルミナで 1 時間磨砕する方法を比較した処, 30 分間煮沸法が最も簡単でしかもアルミナ磨砕法に劣らない成績を得たので, 以下の実験では 30 分間煮沸法を用いた (表 1)。なお 30 分以上煮沸しても放出されるグ酸量が増加しない事を予め確認した。又菌洗滌中に菌体内遊グ酸の菌体外への拡散の可能性が考えられるので, 滅菌生理的食塩水中に菌を浮遊させ, 24 時間水室に放置し, 遠沈上澄液中のグ酸量を定量し, 遠沈された菌体内遊グ酸量と比較したが, 前者は後者の僅か 3% に過ぎず, 明らかに誤差範囲内であつて, 菌体内遊グ酸の菌体外への拡散の可能性は本実験条件下では考慮する必要がない。なお実験の都度, 使用した菌液の乾燥重量を測定し, 以下の表においては, 乾燥菌体 100 mg 中のグ酸量を μM に換算して記した。

表 1 菌体内遊グ酸の放出

放出法	50°C 24 時間	30分 煮 沸	アルミナ 磨 砕
μM	4.7	5.9	5.8

2. 葡萄糖並びにグルタミン酸の影響

葡萄糖 (1%) を単独添加した反応液中に incubate した時は菌体内遊グ酸はむしろ減少し, グ酸 (10 μM/ml) を単独添加した場合は対照と殆ど変わらず, 葡萄糖とグ酸

表 2 葡萄糖, グルタミン酸の影響

反応液	対 照	葡 萄 糖 単 独 添 加	グルタミン酸 単 独 添 加	葡 萄 糖 + グルタミン酸
μM	5.2	4.4	5.3	7.5

対照 : M/15, pH 6.0 の磷酸緩衝液に incubate した場合

の両者を添加した場合に初めて菌体内グ酸の増加が見られた(表2)。この成績より、菌洗滌によつて菌膜表面のグ酸は完全に洗い落されていると考えられ、又グ酸の菌体内への摂取には、葡萄糖の如き力源が必要であるという GALE⁽⁷⁾ の成績と一致した。

3. 反応液 pH の影響

菌体内遊グ酸の増加に及ぼす pH の影響を、最終 M/15 磷酸緩衝液で pH 7.0, 6.0, 5.0 について検した処、pH 6.0 の場合に遊グ酸の増加が最大であつた(表3)。

以下の実験は pH 6.0 で行なつた。

表3 反応液 pH の影響

pH	7.0		6.0		5.0	
	対照	反応	対照	反応	対照	反応
μM	4.0	5.1	4.5	7.2	4.6	6.9

対照：緩衝液に incubate した場合

反応：緩衝液に葡萄糖(1%)、グルタミン酸(10 μM/ml)を添加した反応液に incubate した場合

4. 反応液中の葡萄糖濃度の影響

10 μM/ml のグ酸を含む最終 M/15, pH 6.0 の磷酸緩衝液に種々の濃度に葡萄糖を加え、菌体内遊グ酸の増加を検した処、葡萄糖濃度が4%の場合にその増加が最大であつた(表4)。

以下の実験は4%の濃度で行なつた。

表4 葡萄糖濃度の影響

対照	葡萄糖濃度 (%)					
	0	0.1	1	2	4	8
5.0	4.7	6.4	6.9	7.4	7.8	7.4

5. 葡萄糖及びグルタミン酸の菌体内結グ酸に及ぼす影響

グ酸を添加した反応液に菌を incubate した場合に、菌体内で glutamyl compound が生成されるか否かを菌体内結グ酸を測定する事により検討した。即ち、グ酸の単独添加では菌体内の遊グ酸及び結グ酸は磷酸緩衝液に菌を浮遊させた対照と殆んど変わらず、又グ酸と葡萄糖の両者を添加した場合には、遊グ酸は明らかに増加するが、結グ酸は変化しなかつた。この事実は結グ酸の生成にはグ酸の相手として他のアミノ酸を反応液に添加する必要があることを示唆するものである(表5)。

結グ酸の定量は、洗滌菌体を最終 5N の塩酸中で加水分解し、これにつき測定した総グ酸量より同時に測定した遊グ酸量を減じて算定した。

以上の基礎実験成績に基づき、次項の各種薬剤の影響に関する実験は、最終 M/15, pH 6.0 の磷酸緩衝液に葡

表5 葡萄糖及びグルタミン酸の菌体内結グ酸に及ぼす影響

対照		グルタミン酸 単独添加		グルタミン酸 + 葡萄糖	
遊グ酸	結グ酸	遊グ酸	結グ酸	遊グ酸	結グ酸
5.3	14.9	5.1	14.0	8.5	13.9

反応 M/1.5 pH 6.0 磷酸緩衝液、グルタミン酸(10 μM/ml)、葡萄糖(4%)

葡萄糖(4%)、グルタミン酸(10 μM/ml)を含む反応液で行なつた。

II 各種薬剤の影響

前記の実験条件下における *Candida albicans* 菌体内遊グ酸の増加に及ぼす各種薬剤の影響を検討した。表中の反応(一)とは菌体を磷酸緩衝液に incubate した場合を指し、反応(+)とは葡萄糖及びグルタミン酸を含む完全反応液に incubate した場合を指す。

1. 阻害剤の影響

2,4-Dinitrophenol は M/2,000, Sodium azide は M/1,000 の濃度で遊グ酸の増加を完全に阻害するが、KCN (M/600), Quinhydrone (M/2,000) は夫々軽度の阻害しか示さなかつた(表6, 7)。

表6 KCN, 2,4-Dinitrophenol の影響

対照		KCN M/600	Quinhydrone M/2,000	2,4- Dinitrophenol M/2,000
反応(一)	反応(+)			
6.2	9.1	8.0	8.5	6.0

表7 Sodium azide, DHSM の影響

対照		Sodium azide		DHSM		
反応(一)	反応(+)	M/1,000	M/100	10 mcg/ml	50 mcg/ml	100 mcg/ml
6.0	8.1	4.8	3.8	7.4	8.6	11.5

2. 抗生物質の影響

Dihydrostreptomycin (DHSM), Chlortetracycline (AM) 及び Tetracycline (ACM) は夫々 10mcg/ml 以上の濃度で菌体内遊グ酸の増加を促進させるが、Viomycin (VM) 及び Chloramphenicol (CM) は著明な影響を及ぼさなかつた(表7, 8, 9)。

表8 AM, ACM の影響

対照		AM		ACM		
反応(一)	反応(+)	1mcg/ml	10 mcg/ml	1mcg/ml	10 mcg/ml	100 mcg/ml
6.3	9.9	10.7	11.7	9.8	10.1	11.4

表9 VM, CM の影響

対 照		VM			CM	
反応 (-)	反応 (+)	1mcg/ml	10 mcg/ml	100 mcg/ml	1mcg/ml	100 mcg/ml
6.4	11.2	10.0	10.0	7.3	10.7	11.1

3. 抗カンジダ剤の影響

抗カンジダ作用の強い Merzonine 及び Trichomycin は夫々 10mcg/ml の濃度で遊グ酸の増加を完全に抑制するが、抗カンジダ作用の弱い Propylparaben, Vitamin K₃ には夫々中等度ないし軽度の抑制作用を認めた(表10, 11)。

表10 Merzonine, Trichomycin の影響

対 照		Merzonine			Trichomycin		
反応 (-)	反応 (+)	1mcg/ml	10 mcg/ml	100 mcg/ml	1mcg/ml	10mcg/ml	100 mcg/ml
6.4	10.4	10.5	6.5	3.7	9.1	6.6	7.2

表11 Propylparaben, Vitamin K₃ の影響

対 照		Propylparaben			Vitamin K ₃	
反応 (-)	反応 (+)	1mcg/ml	10 mcg/ml	100 mcg/ml	1mcg/ml	100 mcg/ml
6.2	9.6	8.7	7.8	6.2	9.6	8.6

総括及び考察

以上の如く、*Candida albicans* は菌体内に一定量の遊グ酸を有し、菌体を葡萄糖とグルタミン酸の混合液中に置く時にこの遊グ酸が著明に増加する。然し本菌は他の物質からもグルタミン酸を合成し得るので、この増加した遊グ酸の全部が外界より摂取されたグルタミン酸に由来するものとは云い得ないが、その大部は外界よりの摂取、蓄積に因するものと考えて支障がないと思われる。即ち、葡萄糖の如き力源が存する時には、*Candida albicans* は外界のグルタミン酸を菌体内に摂取するが、他のアミノ酸の附加なき時には、グルタミン酸は合成面には利用されないでいるものと考えられる。

この点に関しては結グ酸の消長についての詳細な研究にまたねばならないが、GALE⁽⁶⁾ は、*Staphylococcus* の disrupted cell 内への C¹⁴-glutamate の導入実験で、C¹⁴-glutamate の単独添加ではその導入は一定時間後平衡に達し、以後は exchange reaction により蛋白分子中のグルタミン酸の外界への排泄が行なわれるが、これに多種類のアミノ酸を同時に添加すると、蛋白合成が行なわれ、その結果 C¹⁴-glutamate の導入は時間の経過と共に直線的に増加し、この増加は蛋白窒素の増加と平行であり、同時にある種の酵素活性の上昇を伴うと報じており、上記の見解の妥当性を裏付けるものと考え

えられる。

この菌体内遊グ酸の増加に及ぼす各種阻害剤の影響は前述の如く、KCN, Quinhydrone, 2,4-Dinitrophenol 及び Sodium azide 共に阻害を認めた。すでに SPIEGEL-MAN⁽⁹⁾ は Sodium azide が Glyceraldehyde の酸化的燐酸化を、又 LOOMIS⁽¹⁰⁾ は 2,4-Dinitrophenol が Mitochondria における酸化的燐酸化を uncouple する事を報じ、GALE^{5,a)} は *Staphylococcus* において Crystalviolet は菌体内遊グ酸の代謝を抑制する結果、遊グ酸の蓄積を招来し、8-Hydroxyquinoline はグルタミン酸の菌膜通過を阻害して菌体内遊グ酸を減少せしめ、又 Sodium azide, Arsenate 及び 2,4-Dinitrophenol も夫々遊グ酸の減少を招来すると報じている。しかし *Candida* における遊グ酸の増加に及ぼす上記阻害剤の阻害が上述の如き機構によるものか否かは未だ言及し得ない処である。

抗生物質の影響についても、GALE^{5,a)} は *Staphylococcus aureus* を用いて、葡萄糖の醗酵を阻害しない濃度で、AM, CM, SM が遊グ酸の蓄積をある程度抑制すると報じているが、*Candida* における私の成績は全く相反し、殊に SM, AM, ACM においては促進的影響を認めた。

この事実は抗生物質の使用が Candidiasis の発症を促す事実と考え合せ真に興味深く思われる。

抗カンジダ剤である Merzonine, Trichomycin, Propylparaben 及び Vitamin K₃ は夫々遊グ酸の蓄積を抑制し、抗カンジダ作用の強い前2者の抑制制度が強く、抗カンジダ作用の弱い後2者の抑制制度の弱い点は興味があるが、本現象がこれ等物質の抗カンジダ作用において如以なる地位を占めるかについては尙今後の研究に俟たねばならない。

結 論

1. *Candida albicans* は菌体内に一定量の遊グ酸を保有し、この遊グ酸は本菌をグルタミン酸溶液の中に置いても変化せず、葡萄糖とグルタミン酸の混合液中に置く事により始めて著明に増加する。この場合の至適 pH は 6.0 であるが、斯る条件下では菌体内結グ酸は不変である。

2. KCN, Quinhydrone, 2,4-Dinitrophenol, Sodium azide 等の阻害剤は夫々菌体内遊グ酸の増加を阻害する。

3. 抗生物質では、DHSM, AM 及び ACM は夫々 10 mcg/ml の濃度で菌体内遊グ酸の増加を促進させるが、VM はこれを抑制し、CM は殆んど影響を認めない。

4. 抗カンジダ剤のうち Merzonine, Trichomycin は菌体内遊グ酸の増加を著明に、Propylparaben, Vita-

mine K₃ もある程度抑制する。

本論文の要旨は昭和 30 年 11 月日本化学療法学会近畿支部第 3 回総会において発表した。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った大阪大学 堂野前教授、熊本大学 河盛教授、大阪大学 第 3 内科 伊藤博士、並びに大阪大学微生物研究所 直野博士に深く感謝する。

文 献

1. KREBS, H. A., EGGLESTON, L. V. & HEMS, R. *Biochem. J.*, **44**, 159, 1949.
2. TAYLOR, E. S. : *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 86, 1947.
3. TAYLOR, E. S. : *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 211, 1949.
4. CLAPPER, W. E. & HEATHERMANN, M. E. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **75**, 458, 1950.
5. (a) GALE, E. F. : *Biochem. J.*, **48**, 286, 1951.
(b) GALE, E. F. : *Biochem. J.*, **48**, 290, 1951.
(c) GALE, E. F. & PAINE, T. E. : *Biochem. J.*, **48**, 298, 1951.
6. NAJJAR, V. A. & FISHER, J. : *J. Biol. Chem.*, **206**, 215, 1954.
7. GALE, E. F. : *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 53, 1947.
8. GALE, E. F. & FOLKES, J. P. : *Nature*, **173**, No. 2, 1223, 1954.
9. SPIEGELMAN, S., KAMEN, M. D. & SUSSMAN, M. : *Arch. Biochem.*, **18**, 409, 1948.
10. LOOMIS, W. F. & LIPMANN, F. : *J. Biol. Chem.*, **173**, 807, 1948.