

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

結合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 堂野前維摩郎教授)

(昭和 32 年 6 月 1 日受付)

緒 言

Candida albicans の菌体内遊離グルタミン酸 (遊グ酸) の消長については、既に第 I 報で報告し、同時に菌体内結内グルタミン酸 (結グ酸) の形成増加にはグ酸の相手として他のアミノ酸を附加する必要があることを報告したが、本報では結グ酸の消長につき、その増加に関する諸条件及びこれに及ぼす各種薬剤の影響について報告する。

実験材料及び実験方法

1. *Candida* 菌浮遊液の調製

当料において汎発性モニリヤ症患者より分離した *Candida albicans* No. 1002 株を用い、第 I 報と同様に菌浮遊液を調製し、その 3 ml を使用した。

2. アミノ酸溶液の調製及び分類

グルタミン酸 (Glu) は L 型を用い、NaOH で中和後反応液 1 ml 中に 10 μ M, 他のアミノ酸は L, DL 型共に夫々 3.3 μ M 含まれる様に調製した。Glu を除く 17 種のアミノ酸を GALE⁽¹⁾ の分類に従い、A, B, C 及び D の 4 群に分ち実験に供した。

A 群: L-アスパラギン酸 (Asp), L-アスパラギン (Asg), DL-フェニルアラニン (Phe), DL-トリプトファン (Try), L-チロシン (Tyr)。

B 群: L-ヒスチジン-HCl (His), L-リジン-HCl (Lys), L-アルギニン-HCl (Arg)。

C 群: DL-セリン (Ser), L-プロリン (Pro), L-メチオニン (Met), DL-スレオニン (Thr), DL- α -アラニン (Ala)。

D 群: グリシン (Gly), L-チスチン-HCl (CySH), L-ロイシン (Leu), DL-ヴァリン (Val)。

3. 葡萄糖は反応液濃度が 4% になる様に調製した。又薬剤はすべて NaOH で中和後直ちに使用した。

以上の諸材料を最終濃度 M/15, pH 6.0 の磷酸緩衝液に加え、好氣的条件下で 37°C 1 時間反応させた。反応液の総量は 18 ml とし、その 6 ml を遊グ酸の定量に、12 ml を結グ酸の定量に供した。

4. Glu の定量及び結グ酸量の決定

Glu の定量は NAJJAR & FISHER⁽²⁾ の法に従い、大腸菌炭酸酵素標本 (アセトン乾燥菌) を用いて WAR-BURG 検圧計により manometrically に行なつた。

結グ酸量の決定は、反応終了後、反応液を可及的速かに 2°C 前後に氷冷し、これを 12 ml と 6 ml に 2 分し、各々を氷冷滅菌生理的食塩水で 2 回づつ洗菌遠沈し、前者より得た菌体を最終 5 N の塩酸水中で 12 時間加水分解し総グ酸量を求め、後者よりの菌体から 30 分煮沸法により遊グ酸量を測定し、両者の差をもつて菌体内結グ酸量とした。この結グ酸量の誤差は $\pm 0.8 \mu$ M 前後である。

なお実験の都度使用した菌液の乾燥重量を測定し、以下の表中においては、乾燥菌体 100 mg 中の遊グ酸及び結グ酸量を μ M に換算して記した。

実験成績

I 菌体内結グ酸の増加に関する諸条件

本実験成績における対照とは、緩衝液だけを含む反応液に菌を incubate した場合の各グ酸量を μ M にて表し、これと葡萄糖及び Glu を含む反応液に種々のアミノ酸を附加した場合を比較し、結グ酸の増加に Glu の相手としてどのアミノ酸が必要であるかを検した。

1. 各群別アミノ酸の影響

GALE⁽¹⁾ の *Staphylococcus* を用いての成績では、結グ酸の増加に対し各群の間に大差なく全群の附加で最大の増加を認めているが、*Candida* ではいささか異なり各群間に明確な差が認められた。即ち、A 又は D 群の附加により結グ酸は夫々増加を示し、常に遊グ酸の減少を伴う。然し B 又は C 群の附加では結グ酸は対照と殆ど差がなく、夫々遊グ酸の増加を伴つた (表 1)。

表 1 各群の影響

| | 対 照 | A 群 | B 群 | C 群 | D 群 |
|-----|------|------|------|------|------|
| 結グ酸 | 15.8 | 20.0 | 15.8 | 16.6 | 20.4 |
| 遊グ酸 | 6.4 | 5.2 | 8.0 | 6.6 | 5.1 |

又 4 群中で最も良く結グ酸の増加を認めた D 群と全群附加の場合を比較すると、表 2 の如く、両者間に殆ど差が認められない。この結果から、D 群のアミノ酸が結グ酸の増加に主役を演ずると考えられたので、D 群を A, B, C の各群に附加した場合の影響を検した。

2. A + D 群の影響

A 群単独, A + D 群及び D 群単独の附加により 3 者共

表2 全群とD群の比較

| | 対 照 | 全 群 | D 群 |
|-----|------|------|------|
| 結グ酸 | 15.4 | 21.9 | 22.4 |
| 遊グ酸 | 8.1 | 5.4 | 5.7 |

それぞれ結グ酸の著明な増加が認められたが、3者の間には殆ど差がなく *Candida albicans* の菌体内結グ酸の増加には、A群中のアミノ酸又はD群中のアミノ酸の関与する2つの場合が考えられる(表3)。

表3 A+D群の影響

| | 対 照 | A 群 | A+D群 | D 群 |
|-----|------|------|------|------|
| 結グ酸 | 15.6 | 22.2 | 22.5 | 23.2 |
| 遊グ酸 | 7.7 | 6.7 | 6.0 | 7.1 |

3. B+D群, C+D群の影響

B群又はC群の単独附加では、遊グ酸は夫々増加するが結グ酸は殆ど増加しない。しかしこれにD群を加えると遊グ酸の減少と共に結グ酸が増加するが、この増加はD群単独附加に及ばない。この結果、B及びC群中のアミノ酸は結グ酸の増加に対し直接には関与しないものと考えられる(表4, 5)。

表4 B+D群の影響

| | 対 照 | B 群 | B+D群 | D 群 |
|-----|------|------|------|------|
| 結グ酸 | 16.4 | 16.4 | 21.2 | 22.0 |
| 遊グ酸 | 7.2 | 10.1 | 6.7 | 7.0 |

表5 C+D群の影響

| | 対 照 | C 群 | C+D群 | D 群 |
|-----|------|------|------|------|
| 結グ酸 | 15.6 | 16.1 | 19.3 | 22.2 |
| 遊グ酸 | 6.1 | 6.7 | 6.4 | 6.0 |

4. A群及びD群の分析

上述の成績よりA群及びD群中のアミノ酸が結グ酸増加に関与する事が判明したので、両群中のどのアミノ酸が主役を演ずるかを知る目的で両群を分析し結グ酸の増加を検した。

まずA群を Asp 及び Asp の群と、Tyr, Try 及び Phe の2群に分ち検した処、前者の附加で結グ酸が著明に増加し、この増加はA群を附加した場合より一層大であり同時に遊グ酸の減少を伴っている。しかし後者の附加では遊グ酸は増加するが結グ酸は殆ど対照と変らなかつた(表6)。

次に Asp と Asp の各々単独の影響をみると、Asp 単独でもある程度の結グ酸の増加がみられたが、Asp 単

表6 A群の分類

| | 対 照 | Asp Asg | Tyr Try Phe | A 群 |
|-----|------|------------|-------------------|------|
| 結グ酸 | 15.5 | 22.5 | 16.0 | 18.9 |
| 遊グ酸 | 8.5 | 6.1 | 10.0 | 7.4 |

独の方が遙かに増加大であり、然も両者を同時に附加した場合と比肩し得る成績を得た(表7)。

表7 Asp, Asp の影響

| | 対 照 | Asp Asg | Asp | Asp |
|-----|------|------------|------|------|
| 結グ酸 | 16.4 | 22.3 | 20.2 | 22.2 |
| 遊グ酸 | 7.8 | 5.0 | 6.7 | 5.0 |

これ等より、A群附加による結グ酸の増加が Asp の附加によるものと判明したので、Asp を中心として反応液の内容を変えて結グ酸の消長をみた処、Asp, Glu 及び葡萄糖の3者を含む反応液において初めて結グ酸の増加が見られた(表8)。

表8 Asp を中心とした実験成績

| | 対 照 | Asp Glu | Asp 葡萄糖 | Asp Glu 葡萄糖 |
|-----|------|------------|------------|-------------------|
| 結グ酸 | 16.1 | 16.7 | 16.1 | 22.4 |
| 遊グ酸 | 7.6 | 7.3 | 5.6 | 6.4 |

一方D群の分析をA群と同様に行なつた結果、D群附加による結グ酸の増加は CySH の附加によるものである事が判明した(表9, 10, 11)。

表9 D群の分類

| | 対 照 | CySH Gly | Val Leu | D 群 |
|-----|------|-------------|------------|------|
| 結グ酸 | 16.8 | 22.8 | 18.0 | 23.4 |
| 遊グ酸 | 7.8 | 7.6 | 9.5 | 7.3 |

表10 CySH, Gly の影響

| | 対 照 | CySH Gly | Gly | CySH |
|-----|------|-------------|------|------|
| 結グ酸 | 17.2 | 22.4 | 17.3 | 22.6 |
| 遊グ酸 | 7.3 | 7.1 | 9.6 | 6.5 |

表11 CySH を中心とした実験成績

| | 対 照 | CySH Glu | CySH 葡萄糖 | CySH Glu 葡萄糖 |
|-----|------|-------------|-------------|--------------------|
| 結グ酸 | 15.5 | 19.2 | 18.9 | 23.3 |
| 遊グ酸 | 8.7 | 6.9 | 5.7 | 6.5 |

以上の如く、*Candida albicans* の菌体内結グ酸は、外

界に力源としての葡萄糖と Glu 及びその相手として Asg 又は CySH を附加した場合に増加することが判明したが、この結グ酸の増加の本態を知る目的で増殖に及ぼす両アミノ酸の影響をみた。濁濁度は Coleman Junior Spectrophotometer を使用し 550 m μ で測定した。

図 1 に示す如く、葡萄糖、Glu 及び Asg を含む完全反応液に incubate した時に典型的な増殖が見られるが、この反応液より葡萄糖を除くと増殖は全然認められなかつた。この結果 Asg 附加時の結グ酸の増加は蛋白合成を意味するものと考えられる。一方、CySH 附加時には完全反応液中でも極く軽度の増殖が認められるに過ぎず、CySH 附加時の結グ酸の増加は蛋白合成を示すものと思われず、むしろ生細胞内に普遍的に存在する Tripeptide (Glutathione) の様な特殊な Glutamyl compound の合成を意味するものと考えられる。

II 結グ酸の増加に対する各種薬剤の影響

結グ酸の増加に対する薬剤の影響を、Asg 附加時と CySH 附加時の 2 つの場合につき上述と同じ反応条件下において比較実験した。

以下の表中に記載した対照とは菌を燐酸緩衝液のみを含む反応液中に、反応対照とは薬剤以外のすべての材料(葡萄糖、Glu 及び Asg 又は CySH)を含む反応液中に incubate した場合の結グ酸の実測値を μ M にて表わした。

1. 阻害剤の影響

Sodium fluoride (NaF), Sodium azide (NaN₂), 8-Hydroxyquinoline (8-HQ), 2,4-Dinitrophenol (DNP), Monojodoacetic acid (JA) 及び KCN につき夫々 M/100 濃度の影響をみた。

Asg 附加時の結グ酸の増加に対して、JA はこれを完全に阻害し、8-HQ は中等度に、又 NaF, NaN₂ 及び DNP は夫々軽度に阻害するが、KCN は殆ど影響しなかつた。

CySH 附加時の増加に対しては、JA は Asg 附加時に対すると同様に結グ酸の増加を完全に阻害するが NaF, 8-HQ 及び KCN は夫々軽度に阻害し、NaN₂ 及び DNP は殆ど影響しなかつた(表12)。

これら薬剤の結グ酸の増加に対する阻害率を一括図示すると図2の如くであつて、Asg 附加時と CySH 附加

図 1 増殖曲線

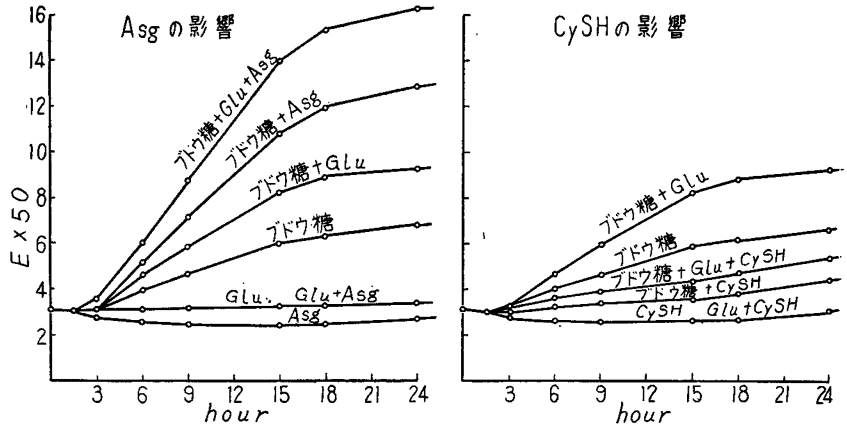


表 12 各種阻害剤の影響

| | 対照 | 反応対照 | NaF | NaN ₂ | 8-HQ | DNP | JA | KCN |
|---------|------|------|------|------------------|------|------|------|------|
| Asg 附加 | 16.0 | 23.0 | 20.6 | 20.7 | 18.4 | 21.7 | 16.0 | 22.6 |
| CySH 附加 | 15.5 | 22.8 | 21.7 | 19.1 | 21.5 | 22.5 | 15.5 | 19.3 |

時の 2 者の間には大差が認められない。

2. 抗生物質の影響

Chlortetracycline (AM), Tetracycline (ACM), Dihydrostreptomycin (DHSM) 及び Chloramphenicol (CM) につき夫々 100 mcg, 10 mcg, 1 mcg/ml のに濃度で結グ酸の増加に対する影響をみた。

AM 及び ACM 等の Tetracycline 系の薬剤は Asg 附加時の結グ酸の増加に対し、前者は 10 mcg/ml 及び 1 mcg/ml で後者は 1 mcg/ml で促進的に働くが、CySH 附加時の増加に対しては両者とも夫々抑制的に働くのが認められた(表 13, 14)。

表 13 AM の影響

| | 対照 | 反応対照 | A M | | |
|---------|------|------|------------|-----------|---------|
| | | | 100 mcg/ml | 10 mcg/ml | 1mcg/ml |
| Asg 附加 | 15.8 | 22.1 | 22.4 | 26.5 | 28.4 |
| CySH 附加 | 16.2 | 21.1 | 17.4 | 17.8 | 21.1 |

表 14 ACM の影響

| | 対照 | 反応対照 | A C M | | |
|---------|------|------|------------|-----------|---------|
| | | | 100 mcg/ml | 10 mcg/ml | 1mcg/ml |
| Asg 附加 | 15.2 | 21.7 | 18.5 | 20.3 | 24.8 |
| CySH 附加 | 14.6 | 19.7 | 16.8 | 18.2 | 19.0 |

DHSM は Asg 附加時の増加に対しこれを強く抑制するが CySH 附加時の増加には殆ど影響を及ぼさない

(表 15)。又 CM は A_{sg} 附加時の増加には殆ど影響しないが、CySH 附加時の増加を強く抑制するのが認められた (表 16)。

以上の成績を百分率にて一括図示すると図 3 の如くで、A_{sg} 附加時と CySH 附加時の結グ酸の増加に対する抗

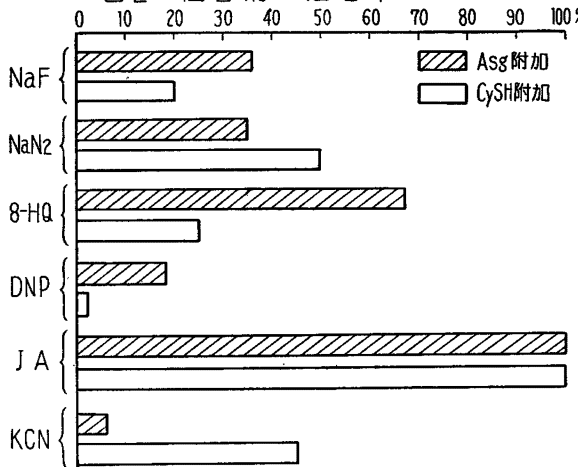
表 15 DHSM の影響

| | 対 照 | 反 応 対 照 | D H S M | | |
|------------------------|------|------------|---------------|--------------|---------|
| | | | 100 mcg/ml | 10 mcg/ml | 1mcg/ml |
| A _{sg} 附 加 | 14.8 | 22.1 | 13.8 | 17.8 | 21.7 |
| CySH 附 加 | 14.0 | 19.8 | 21.0 | 18.8 | 20.6 |

表 16 CM の影響

| | 対 照 | 反 応 対 照 | C M | | |
|------------------------|------|------------|---------------|--------------|---------|
| | | | 100 mcg/ml | 10 mcg/ml | 1mcg/ml |
| A _{sg} 附 加 | 15.2 | 23.0 | 23.0 | 21.3 | 22.9 |
| CySH 附 加 | 14.5 | 19.4 | 14.9 | 14.5 | 19.4 |

図 2 阻害剤の阻害率



生物質の影響の間には大差が認められた。

3. 抗カンジダ剤の影響

Merzonine, Trichomycin, Propylparaben 及び Vitamin K₃ 重亜硫酸塩につき夫々 100 mcg, 10 mcg, 1 mcg/ml の各濃度で結グ酸の増加に及ぼす影響をみた。

表 17 Merzonine の影響

| | 対 照 | 反 応 対 照 | Merzonine | | |
|------------------------|------|------------|---------------|--------------|---------|
| | | | 100 mcg/ml | 10 mcg/ml | 1mcg/ml |
| A _{sg} 附 加 | 15.0 | 22.5 | 18.9 | 21.5 | 21.2 |
| CySH 附 加 | 15.4 | 23.1 | 15.6 | 17.7 | 18.1 |

表 18 Trichomycin の影響

| | 対 照 | 反 応 対 照 | Trichomycin | | |
|------------------------|------|------------|---------------|--------------|---------|
| | | | 100 mcg/ml | 10 mcg/ml | 1mcg/ml |
| A _{sg} 附 加 | 15.6 | 22.6 | 19.8 | 21.4 | 20.8 |
| CySH 附 加 | 14.8 | 22.3 | 14.2 | 15.4 | 18.7 |

Merzonine 及び Trichomycin は夫々 A_{sg} 附加時の結グ酸の増加を軽度抑制するにすぎないが、CySH 附加時の増加に対しては強度の抑制を示した (表 17, 18)。

Propylparaben は A_{sg} 及び CySH 附加時の夫々に対し強い抑制を示し、Vitamin K₃ は Merzonine 及び Trichomycin と同様に A_{sg} 附加時の結グ酸の増加に対し軽度に、一方 CySH 附加時の増加に対して強度の抑制を示した (表 19, 20)。

表 19 Propylparaben の影響

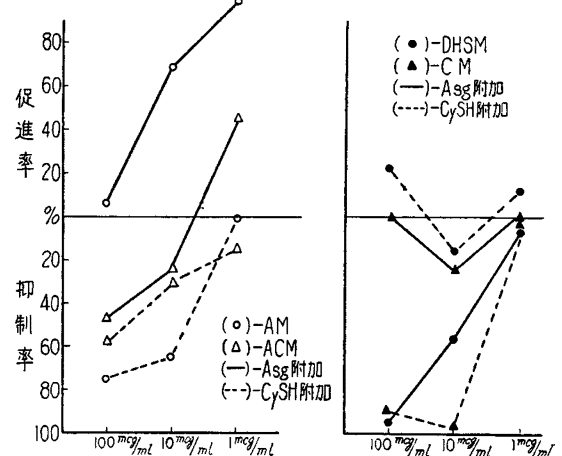
| | 対 照 | 反 応 対 照 | Propylparaben | | |
|------------------------|------|------------|---------------|--------------|---------|
| | | | 100 mcg/ml | 10 mcg/ml | 1mcg/ml |
| A _{sg} 附 加 | 14.3 | 20.1 | 14.3 | 17.1 | 17.6 |
| CySH 附 加 | 14.6 | 21.9 | 14.9 | 15.8 | 15.2 |

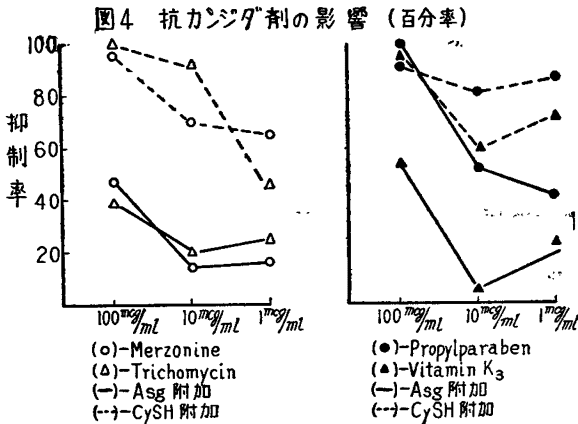
表 20 Vitamin K₃ 重亜硫酸塩の影響

| | 対 照 | 反 応 対 照 | Vitamin K ₃ | | |
|------------------------|------|------------|------------------------|--------------|---------|
| | | | 100 mcg/ml | 10 mcg/ml | 1mcg/ml |
| A _{sg} 附 加 | 14.0 | 22.4 | 17.9 | 21.8 | 20.3 |
| CySH 附 加 | 14.8 | 22.9 | 15.1 | 17.9 | 17.1 |

これら薬剤の結グ酸の増加に対する抑制率を一括図示すると図 4 の如くで、A_{sg} 附加時の増加が CySH 附加

図 3 抗生物質の影響 (百分率)





時のそれに較べて一層強く抑制されることが認められた。

総括及び考察

Candida albicans の菌体内結グ酸は菌体を葡萄糖と Glu のみを含む反応液に incubate しても増加せず、これに Glu の相手として他のアミノ酸を附加して始めてその増加が見られ、本実験に供した 17 種のアミノ酸のうち Asg 及び CySH が夫々結グ酸の増加において主役を演ずる事が判明した。そして、Asg 附加時にみられる典型的な増殖曲線より Asg 附加時の結グ酸の増加の本態は蛋白合成であると考えられる。GALE⁽¹⁾ はすでに *Staphylococcus aureus* の生菌を用い、結グ酸の増加には Glu の他に種々のアミノ酸の附加が必要であると報じ、又同菌の disrupted cell⁽⁹⁾ を用いて蛋白分子内への C¹⁴-Glu の導入及び酵素活性の測定実験で、外界に C¹⁴-Glu の他にアミノ酸を附加する事により C¹⁴-Glu 導入の直線的な増加と蛋白窒素の平行的増加及びある種の酵素活性の上昇を認め、これらの事実は蛋白合成を示すと報じている。これらの報告からも本実験における Asg 附加時の結グ酸の増加は蛋白合成を示すものと考えて支障がないと思われる。

一方 CySH 附加時には極く軽度の増殖が認められるに過ぎない点から、CySH 附加時の結グ酸の増加は蛋白合成を示すものと思われず、むしろ生細胞内に普遍的に存在する Tripeptide (Glutathione) の如き glutamyl Compound の合成が考えられる。γ-glutamylcysteine の合成について MANDELES & BLOCH⁽⁴⁾ は hog liver enzyme を用いて、又 WEBSTER⁽⁵⁾ は bean seedling において認めており、YANARI, SNOKE & BLOCH⁽⁶⁾ はこの Peptide の合成に Glycolysis が力源として必要であると報告しているが、*Candida* においてもかかる合成機転の存在が充分察知される。

結グ酸の増加に対する各種薬剤の影響につき上述の如

き成績を得たが、すでに LOOMIS⁽⁷⁾ は、AM は Mitochondria における酸化的磷酸化を阻害し、DNP や NaN₂ 等の阻害剤と同一作用機序を有すると報告し、GALE⁽⁸⁾ は *Staphylococcus aureus* の結グ酸の増加に対し AM その他の抗生物質は各種阻害剤と同様に抑制的に働くとして報じている。*Candida albicans* においては *Staphylococcus* の場合と異なり阻害剤は一般に結グ酸の増加を阻害するが、抗生物質のうち Tetracycline 系の薬剤は Asg 附加時の結グ酸の増加を促進させる成績を得た。この点は抗生物質の使用が Candidiasis の発症を促す事実と考え合せ興味ある点と思われる。

抗カンジダ剤は一般に結グ酸の増加を抑制するが、特に CySH 附加時の増加に対しその抑制が高度であつた。この抑制作用はこれら薬剤の抗カンジダ作用の一端を示すものと考えられる。

また Asg 附加時の結グ酸の増加と CySH 附加時の増加に対する各薬剤の阻害の間に差異が認められたが、これらの差異は Asg 附加時と CySH 附加時の結グ酸の増加の本態の相違によると考えると理解される。

しかし、菌体内の結グ酸量は外界よりのアミノ酸の摂取、結グ酸の形成及びこれらの代謝等の複雑な機序の総括的結果と考えられるので、本実験成績より各種薬剤がどのような作用機序に基き上述の如き影響を示すかは、未だ言及し得ない処である。

結 論

1. *Candida albicans* の菌体内結グ酸は葡萄糖、Glu の他にアミノ酸を附加して始めて増加するが、このアミノ酸として Asg 又は CySH が必要であると考えられる。
2. 阻害剤の影響：JA は Asg 附加時及び CySH 附加時の結グ酸の増加を共に完全に阻害するが、NaF, NaN₂, 8-HQ, DNP 及び KCN は夫々軽度の阻害か或は殆ど影響がなく、Asg 附加時と CySH 附加時の間に大差が認められなかつた。
3. 抗生物質の影響：Tetracycline 系の AM 及び ACM は夫々 Asg 附加時の結グ酸の増加を促進させるが、CySH 附加時の増加を抑制する。DHSM は Asg 附加時の増加には無影響であるに対し、CySH 附加時の増加を強く抑制する。CM は Asg 附加時の増加を強く抑制するが、CySH 附加時の増加には無影響であつた。
4. 抗カンジダ剤の影響：Merzonine, Trichomycin, Propylparaben 及び Vitamin K₃ は夫々結グ酸の増加を抑制するが、特に CySH 附加時の増加を一層顕著に抑制する。

本論文の要旨は昭和 31 年 5 月第 4 回日本化学療法学会総会及び昭和 32 年 5 月第 5 回日本化学療法学会総会

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. GALE, E. F. *Biochem. J.*, 48, 290, 1951.
2. NAJJAR, V. A. & FISHER, J. : *J. Biol. Chem.*, 206, 215, 1954
3. GALE, E. F. & FOLKES, J. P. : *Nature*, 173, No. 2, 1223, 1954.
4. MANDELES, S. & BLOCH, K. *J. Biol. Chem.*, 214, 639, 1955.
5. WEBSTER, G. C. : *Plant Physiol.*, 28, 728, 1953.
6. YANARI, S., SNOKE, J. E. & BLOCH, K. *J. Biol. Chem.*, 201, 561, 1953.
7. LOOMIS, W. F. : *Science*, 111, 474, 1950.
8. GALE, E. F. & PAINE, T. F. *Biochem. J.*, 48, 298, 1951.