

Acinetobacter calcoaceticusの

糖代謝、表層構造及び抗生物質感受性に
関する研究

諸 星 俊 郎

目次

緒論	-----	1
第1章 <u>Acinetobacter calcoaceticus</u> の各種抗生物質感受性と糖利用能について	-----	3
序	-----	3
1-1 実験材料ならびに方法	-----	3
1-2 <u>A. calcoaceticus</u> の各種抗生物質感受性	-----	9
1-3 グルコース利用能と抗生物質感受性の相関、及び薬剤耐性機構	-----	12
1-4 抗生物質感受性と形態学的特徴、電子顕微鏡観察による考察	---	25
1-5 要約および考察	-----	30
第2章 グルコースによる増殖促進効果	-----	33
序	-----	33
2-1 実験材料ならびに方法	-----	33
2-2 各種炭素源を使用した時の増殖に及ぼす糖の影響と代謝の解析	-----	37
2-3 <u>A. calcoaceticus</u> のグルコースによる増殖促進効果の解析	---	40
2-4 基質の能動輸送のメカニズム	-----	56
2-5 要約および考察	-----	58
第3章 <u>A. calcoaceticus</u> の糖利用能と溶血性について	-----	60
序	-----	60
3-1 実験材料ならびに方法	-----	60
3-2 非溶血株より溶血株の分離	-----	61
3-3 要約および考察	-----	69
第4章 <u>Escherichia coli</u> におけるグルコースによる増殖促進効果について	-----	71
序	-----	71
4-1 実験材料ならびに方法	-----	71
4-2 グルコース非利用株における増殖促進効果	-----	73
4-3 要約および考察	-----	76
総括	-----	78
謝辞	-----	81
文献	-----	82

結 論

近年、医療技術の発展とすぐれた抗生物質の出現により感染症の様相が著しく変貌した。従来非病原性といわれてきた細菌種による感染、すなわち日和見感染症が増加している。このような日和見感染症は、今後の高齢化社会の到来により感染防御能が低下した高齢者の増加に伴い一層深刻化していくものと考えられる。

代表的な日和見感染菌としては、グラム陽性菌では Staphylococcus epidermidis、グラム陰性菌では Pseudomonas aeruginosa、Acinetobacter calcoaceticus^{1, 2)} などが知られている。P. aeruginosa および A. calcoaceticus はともにブドウ糖非発酵菌であり、各種抗生物質に対する感受性が低く、その感染症治療が特に困難な菌種である^{3, 4)}。

P. aeruginosa は遺伝学的にも生理学的にも既に多くの研究がなされているが⁵⁾ A. calcoaceticus についての研究報告は少ない。1976年に K. J. Towner と A. Vivian によってはじめて A. calcoaceticus について遺伝学的な研究が報告されている^{6, 7)}。

A. calcoaceticus は1911年に Beijerinck によって Micrococcus calcoaceticus として報告されて以来、Diplococcus mucosus、Moraxella glucidolytica、Neisseria winogradskyi、Lingelsheimia anitrata、Alcaligenes haemolysans、Mima polymorpha、Herella vaginicolla、Bacterium anitratum、Achromobacter anitratus など数々の学名が付されてきた。その後、1954年に Brisau と Prevot により Acinetobacter 属として記載され、1968年に P. Baumann⁸⁾ により Acinetobacter calcoaceticus と命名された。Bergey's Manual 第8版においては、Neisseria 科に属し、A. calcoaceticus 一種のみが掲載されているが⁹⁾、この分類について異論を唱えている者も少なくない¹⁰⁾。

本菌種の最少定義は非運動性のグラム陰性球桿菌、好気性、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、色素非産生、アルギニンテスト陰性である¹¹⁾。

著者は新規抗生物質のスクリーニングおよび評価実験のため、臨床材料から1,000株の A. calcoaceticus を分離、同定し、各種抗生物質に対する感受性測定試験を行ってきた。その研究過程で本菌がペニシリン剤、セファロsporin 剤

などの β -ラクタム抗生物質に対し特に感受性が低く、高度耐性菌が多く存在していることを見出した¹²⁾。そこで本菌の β -ラクタム抗生物質耐性機構について検討したところ、抗生物質感受性と菌の形態学的特徴との間に密接な相関があることを見出した¹³⁾。また、本菌種はグルコースを唯一の炭素源として増殖可能なものは全分離株のうちわずか4.6%であり、大多数は増殖不可能であった。しかし他の炭素源(アミノ酸、有機酸)を用いた時、その基質濃度の1/10~1/100の濃度比のグルコース添加により増殖の促進が認められた^{14, 15)}。以上の観察結果を契機として著者は日和見感染菌として重要な位置にあるにもかかわらず、その生理学的性質、形態学的性質及び抗生物質耐性機構についてほとんど明らかにされていない本菌種の研究を行った。

本論文は、四章から構成されている。

第一章においてはA. calcoaceticusの各種抗生物質感受性と糖利用能の関係について述べる。グルコース利用能の差異による抗生物質感受性の差異、及びグルコース利用能と形態学的特徴との相関について述べる。

第二章ではグルコースによる増殖促進効果について述べる。

A. calcoaceticusの糖代謝の解析と各種炭素源を使用したときの糖の増殖促進効果について述べる。

第三章においてはA. calcoaceticusの糖利用能と溶血性との関連について述べる。

第四章ではA. calcoaceticusで見い出したグルコースによる増殖促進効果がE. coliのグルコース非利用株においても観察される新知見について述べる。

第 1 章 Acinetobacter calcoaceticus の各種抗生物質感受性と糖利用能について

序

A. calcoaceticusはグラム陰性の球桿菌であり、近年臨床材料より分離される頻度が多い糖非発酵菌である。血液、尿等から396株のA. calcoaceticusを分離、同定した。

本章では、これらのA. calcoaceticus菌株の各種抗生物質に対する感受性、糖、特にグルコース利用能の差異による抗生物質感受性の違い、耐性機構、形態学的特徴の観察結果について述べる。

1 - 1 実験材料ならびに方法

1) 菌株および化合物

A. calcoaceticus 396株はすべて京都微生物研究所より分与されたものである。A. calcoaceticus K-104、K-104G、KY985も同様に京都微生物研究所より分与されたものである。A. calcoaceticus NCTC 7844は英国National Collection of Type Culture (ロンドン) より購入した。A. calcoaceticus LMD79・41、LMD82・3はJ.G.Kennen博士 (Delft University of Technology、Laboratories of Microbiology、The Netherlands) より分与された。ベンジルペニシリン (PC-G)、アンピシリン (AB-PC)、ストレプトマイシン (SM) は、東洋醸造 (株) の製品を使用した。セファロリジン (CER) は鳥居薬品より、セファロゾリン (CEZ) は藤沢薬品より、カナマイシン (KM) は明治製菓より、テトラサイクリン (TC) は武田薬品より、クロラムフェニール (CP) は山之内製薬よりそれぞれ購入した。いずれも力価の明らかなものを使用した。

2) 培地

最少培地は、OrnstonとStanierの培地¹⁰⁾を使用した。組成は以下に示すとおりである。

(a) Concentrated metal solution

EDTA	2.5g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10.95g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0g
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.54g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.392g
Co(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	0.248g
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0.177g
H ₂ O	ad.1,000ml
H ₂ SO ₄	2-3drops.

(b) Concentrated vitamine-free mineral solution

nitrilotriacetic acid	10.0g
MgSO ₄	14.45g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.335g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.0093g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.099g
concentrated metal solution	50ml
KOH or H ₂ SO ₄	at pH6.8

(c) Standard media

0.1M phosphate buffer pH6.8	400ml
Hutners vitamin-free mineral base	20ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0g
H ₂ O	add 1,000ml

(d) Stanier minimum medium

Standard media

Carbon source

(b) の溶液は示された各物質を各々入れた後に (a) 液を添加し、pHを6.8に調製する。さらに、(c) 液は0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) 液を20ml及び、硫酸アンモニウム1.0gを加え、1lとする。上記の(c)液中に各々炭素源として加え最少培地とした。これをStanier minimum medium とよぶ。完全培地は、以下の培地を実験に応じて使用した。

感受性測定用ブイヨン (STB) ; [日水製薬]

カザミノ酸	16.5g
牛心臓浸出液	200ml(3g)
溶性デンプン	1.5g
ブドウ糖	2.0g
L-トリプトファン	0.05g
L-シスチン	5 μ g
ビオチン	5 μ g/ml

1 pH7.4

感受性測定用寒天培地 (STA) ;

(変法ミューラーヒントン培地) [日水製薬]

カザミノ酸	16.5g
ハートエキス	3.0g
溶性デンプン	1.5g
ブドウ糖	2.0g
L-トリプトファン	0.05g
L-シスチン	0.05g
ビオチン	5 μ g
カンテン	15.0g/ml

1 pH7.4

OF培地 [ポアメディア、栄研化学]

ペプトン	2.7g
ブドウ糖	10g
塩化ナトリウム	5g
リン酸一水素カリウム	0.3g
ブロムチモールブルー	0.06g
カンテン	4g/ml pH7.1

3) 薬剤感受性測定法

日本化学療法学会標準法¹⁷⁾に準拠し、以下の方法にて測定した。被検菌を30°C 18時間 S T B 培地で前培養後、菌を新鮮な STB 培地で 10^8 cells/ml まで希釈する。2倍系列に希釈した薬剤を含む STA 平板上に希釈菌液をマイクロプランター（佐久間製作所）で 5 μ l 接種し、30°C 20時間培養後、最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。

4) 酵素活性測定法（ β -ラクタマーゼおよびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性）

β -ラクタマーゼ活性はマイクロヨード法の小此木らによる^{18, 19)}変法により行った。すなわち 50mM リン酸緩衝液（pH7.0）0.8ml に基質試料 0.1ml を添加し、30°C で一定時間反応させ直ちに 0.15M タングステン酸ナトリウム溶液 0.5ml を加え反応を停止し、ヨウ素デンプン試薬 1.5ml を加えた。室温で 20 分間放置後、595nm の吸光度を測定し、その値を O.D sample とした。また酵素試料を タングステン酸ナトリウム溶液を加えた後に加える以外は上記と同様にして測定し、その値を O.D blank とした。さらに次の計算式により、 β -ラクタマーゼ活性を求めた。なお蛋白の定量は、O.H.Lowry 等²⁰⁾の方法により行った。

$$\frac{\Delta 0.D \times \text{係数}}{F} \times \frac{1}{T} \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{P} \quad (\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{per mg of protein})$$

$\Delta 0.D$: $\Delta OD = 0.D_{\text{blank}} - 0.D_{\text{sample}}$

F: 分解基質のヨウ素 (I_2) 消費当量

PC-G: F = 3.80 CEZ: F = 5.02

係数: 0.D = 1 に相当するヨウ素デンプン

試薬液中の I_2 濃度 ($\mu\text{mol}/3\text{ml}$)

T; 反応時間 (min)

V; 反応液に加えた酵素試料液量 (ml)

P; 酵素試料の蛋白質量 (mg protein/ml)

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CATase) の測定は以下のごとく行った。菌体の超音波破碎上清液 0.5ml 中に、50mM トリス塩酸緩衝液で調製した 0.62mM のクロラムフェニコール溶液 0.1ml、1.24mM アセチル-Co A (0.1ml) および トリス塩酸緩衝液 0.3ml を加え、37°C に 3 時間振盪する。その後、10°C、2 分間の加熱処理で反応を停止し、クロラムフェニコールの残存力価を *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を検定菌としたバイオアッセイ法 (ディスク法) で測定した。

5) ペニシリン結合蛋白質 (Penicillin-Binding Proteins, PBPs) の検出

B.G. Spratt²⁰⁾ の方法により行った。菌を STB を用いて 30°C で振盪培養後、対数増殖期 ($0.D_{660\text{nm}} = 0.7$) にて遠心集菌し、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で菌体を一回洗浄し同緩衝液に懸濁した。これを超音波破碎後、低速遠心 (8,000xg、20min) にて未破壊の菌体を除去後、上清の超遠心分離 (105,000xg、60 min) による沈査を膜面分として、10mM $MgCl_2$ を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 10mg protein/ml になるように懸濁した。この膜面分を [^{14}C] -benzylpenicillin (^{14}C -PC-G、54mCi/mole、Amersham、England) と 30°C、10 分間反応させた後、Sarkosyl NL-97 (Sodium lauroyl sarcosinate) と大過剰の PC-G を添加し、[^{14}C] -benzylpenicillin 結合反応の停止と内膜蛋白質の可溶化を行った。反応液の遠心分離後 (15,000xg、30min)、可溶性画分をラウリル硫酸ナトリウム (SDS) に転溶し、その後 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて蛋白成分の分離を行った。PBPs の検出はフルオログラフィーにより行った。

6) 外膜蛋白の検出

PBPs調製と同様にして得た膜画分の1% Sarcosyl不溶性画分を外膜画分として用いた。これをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により蛋白の分離を行い、0.1% Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma) 染色により検出した。

7) 残存薬剤濃度測定

菌をSTBでO.D 660nm=0.7まで培養し、これに最終濃度が50 μ g/mlとなるように抗生物質を添加し、30 $^{\circ}$ Cにて培養した。薬剤添加後、経時的に培養液を一定量とり、等容量のエタノールと混合し、薬剤不活化反応を停止させ、ペーパーディスクに菌培養液を一定量しみ込ませてバイオアッセイ法にて残存薬剤量を測定した。また対照には、新鮮STBを用いて上記と同様の操作を行った。なお測定は、*Bacillus subtilis* ATCC 6633を検定菌として、一夜培養後、阻止円直径から残存薬剤濃度を求めた。

8) 走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡観察のための試料作成法

走査型電顕試料は、STBで振盪培養(30 $^{\circ}$ C)して得た対数増殖期菌体を用いた。菌を1% (final) グルタルアルデヒド溶液にて前固定し、つづいてKellenbergerの方法に従って1% (final) オスミウム酸で本固定後アルコール上昇系列で脱水し、酢酸イソアミルで置換後臨界点乾燥法により乾燥を行った。その後、白金、パラジウム蒸着し、走査型電顕(JSM-880型)で観察した。透過型電子顕微鏡(JEOL 1200EX)による観察は、上記走査型電顕試料作成と同様に、集菌、前固定、本固定をした後、2%寒天に包埋し、0.5%酢酸ウラニールでブロック染色をした。その後、アルコール上昇系列で脱水し、プロピレンオキシドで置換後、Luft等の方法でエポキシ樹脂に包埋した。ミクロトームで超薄切片を作成し、Reynolds等の方法により酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛にて二重染色した²¹⁾。

10) 多糖類の分析

対数増殖期の*A. calcoaceticus* K-104およびK-104Gの菌体を4 $^{\circ}$ Cにて遠心分離後、10mM Tris-HCl緩衝液(30mM NaClを含む)で2回洗い、1gの乾燥菌体を得た。リポポリサッカライドはWestphal²²⁾の方法にて抽出、分離し、1%酢酸と共に酸加水分解後、リポドAを除去した。その後、糖類を凍結乾燥させ、アセチル化後、ガスクロマトグラフィーにより分析した。

1-2 Acinetobacter calcoaceticus の各種抗生物質感受性

臨床材料より分離、同定された396株のA. calcoaceticusを用いて、CM, TC, SM, KM, AB-PC, CERの抗菌力を測定した。その結果を累積分布と感受性分布に示した (Fig. 1-1)。感受性分布及び累積分布の下に示す数字は各々の薬剤を使用した時のMIC値を示したものである。文中のMIC₅₀及びMIC₈₀はそれぞれ50%、80%の菌株の増殖を抑制する薬剤の濃度を表している。

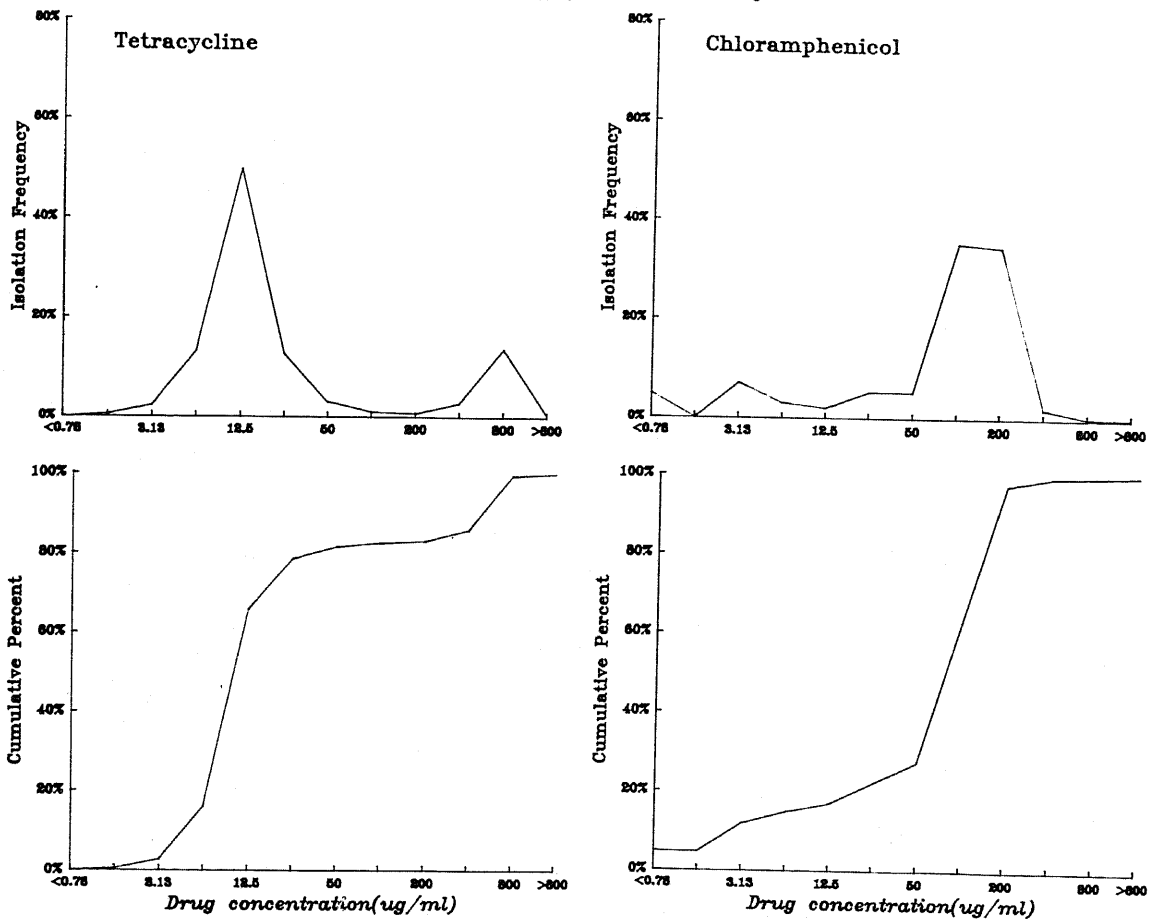


Fig.1-1. Cumulative percentage and isolation frequency of A. calcoaceticus strains.

CERに対しては12.5 μ g/ml以上の最小発育阻止濃度(MIC)を示す株が圧倒的に

多く、全分離株の96%がCER耐性株であった。AB-PCについては中等度耐性菌が多くを占めて、感受性のピークは50 μ g/mlであった。TCについてはFig. 1-1で明らかなように感受性の分布は、2峰性を示し197株が12.5 μ g/mlに1つのピーク値を持ち、他のピーク値は、800 μ g/mlであった。

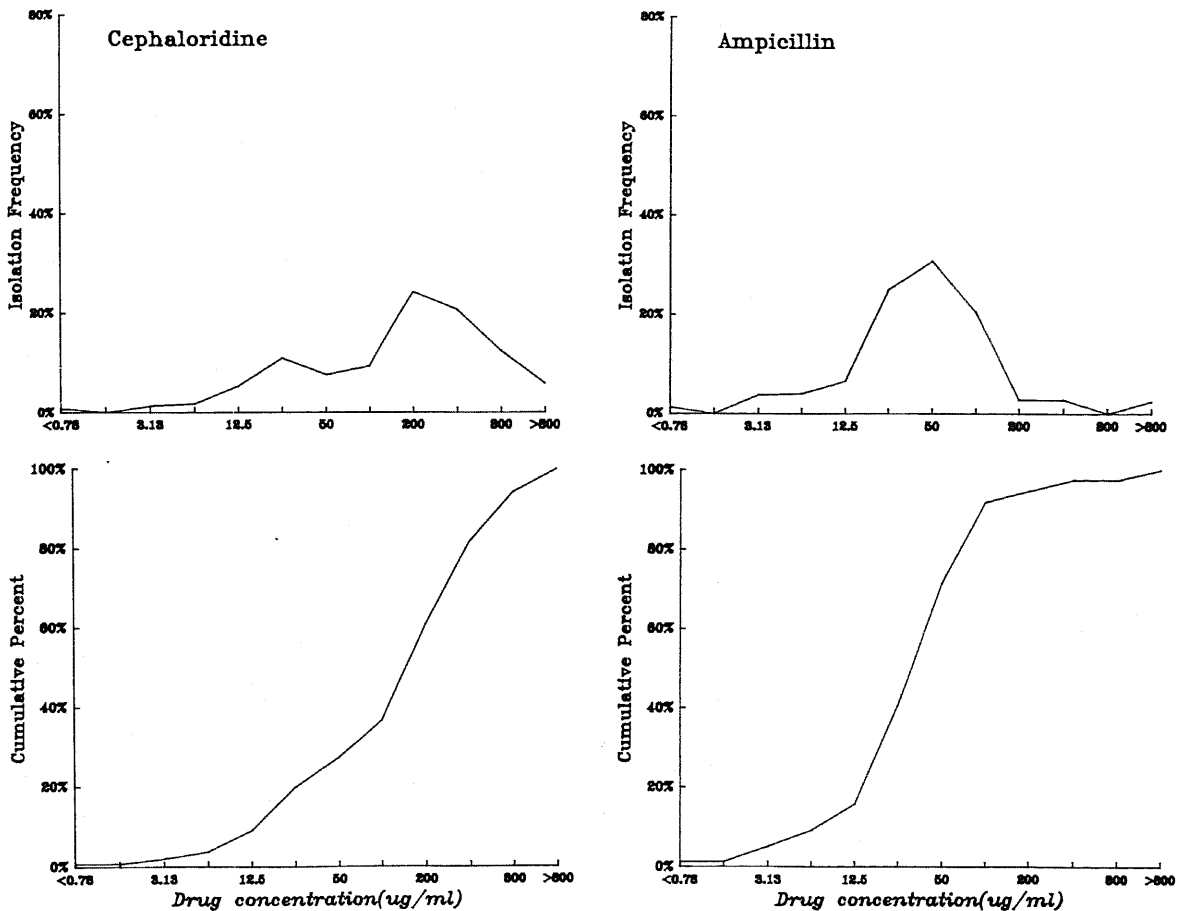


Fig.1-2. Cumulative percentage and isolation frequency of *A. calcoaceticus*.

TCに対しては比較的感受性を示した菌株が多く、MIC₅₀値は9.64 μ g/ml、MIC

LD_{50} 値 $34.38 \mu\text{g/ml}$ を示した。CM については $100 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ に感受性のピークを示し、感受性菌は $\leq 0.78 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ まで幅広く広がっていた。一方、アミノ配糖体抗生物質である KM は $1.56 \mu\text{g/ml}$ にピーク値を示し、検査した抗生物質の中では本菌に最も有効な薬剤であった。また $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性菌も 11.9% と 6 薬剤の中では最も耐性率が低かった。SM については $\leq 0.78 \mu\text{g/ml}$ から $> 800 \mu\text{g/ml}$ 以上まで幅広く、感受性値は $6.25 \mu\text{g/ml}$ と $50 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ に 2 つのピーク値が認められた。

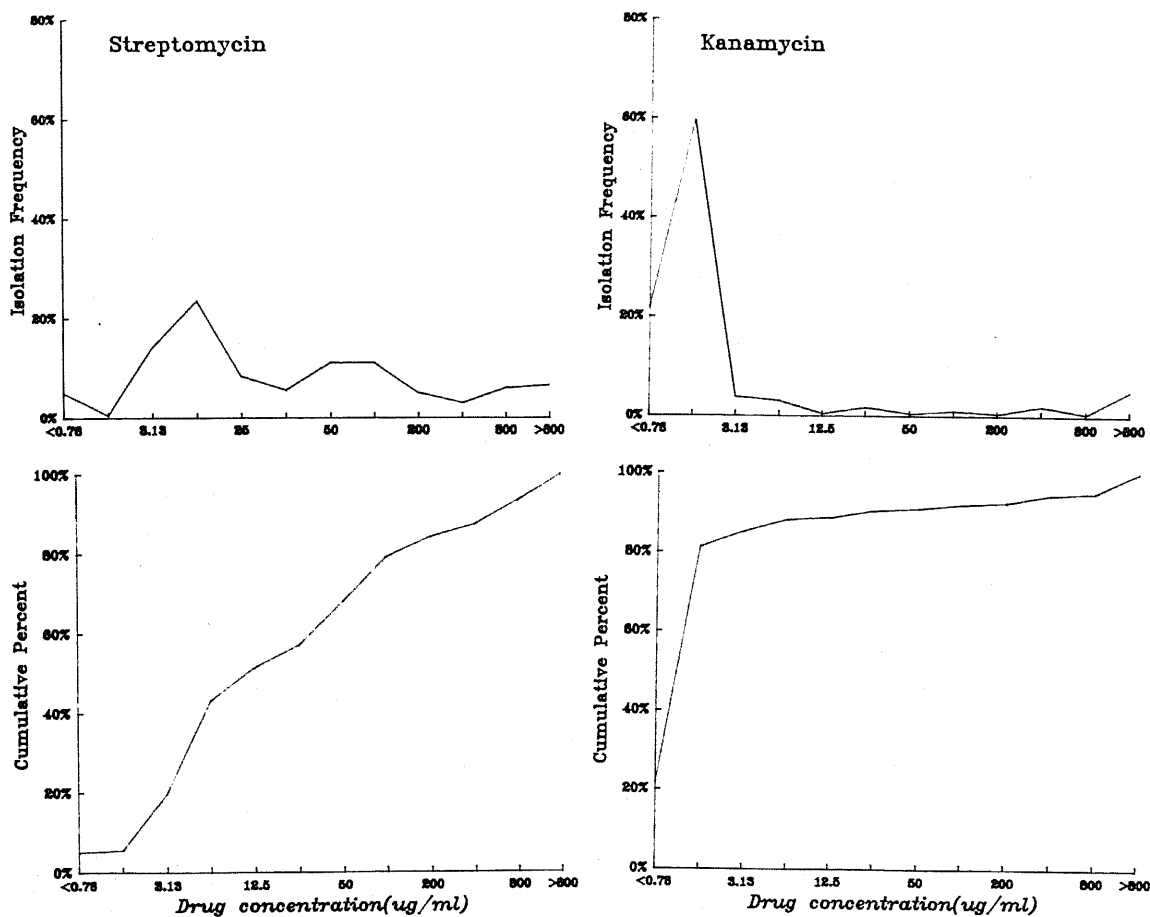


Fig.1-3. Cumulative percentage and isolation frequency of A. calcoaceticus.

1-3 グルコース利用能の差異と抗生物質感受性の相関、および薬剤耐性機構

Table 1 に 1 章 2 節 で用いた A. calcoaceticus の臨床分離株 396 株の糖利用能による型別、すなわち、グルコース、ペントース糖を共に利用できない菌を A 型、グルコースは利用できるがペントース糖は利用できない菌を B 型、グルコースは利用できないがペントース糖は利用できる菌を C 型とそれぞれ分類した。さらに OF 試験結果、溶血性の有無、色素産生性の有無、硝酸から亜硝酸への還元能及び各種抗生物質感受性値 (MIC 値) を示した。溶血性試験については、トリプトソイ寒天培地 (BBL) に 5% の割合に家兎血液を加えた血液寒天培地で、 β 溶血を示したものを “+” とした。また色素産生試験は、トリプトソイ寒天培地に 0.1% の割合で D-マンニットおよびイーストエキス (Difco) を加えた「色素産生培地」に菌を接種し、30°C 1 週間培養後、茶褐色の色素を認めたものを “+” とした。硝酸還元能テストは、“アピキット” を用いて判定した。

これらの試験結果から A. calcoaceticus は 396 株中、359 株は唯一の炭素源としてグルコースを利用することはできず、利用可能株はわずか 37 株であった。

Table 1 396株の糖利用能の集計結果

糖利用型	グルコース利用	ペントース利用	株数 (%)
A	-	-	85 (21.5%)
B	+	-	37 (9.3%)
C	-	+	274 (69.2%)

O F 培地でのグルコースからの酸産生能の集計結果

糖利用型	O F 培地 (%)	
	-	+
A	29 (34.1%)	56 (65.9%)
B	0 (0%)	37 (100%)
C	0 (0%)	274 (100%)

色素産生能の集計結果

糖利用型	色素産生 (%)	
	-	+
A	10 (11.8%)	75 (88.2%)
B	0 (0%)	37 (100%)
C	0 (0%)	274 (100%)

Table 2 抗生物質に対する感受性結果と糖利用能の型別比較

糖利用型	薬剤名	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 判定 (%)	
		$\leq 0.78 \sim 6.25 \mu\text{g/ml} \leq$	$\leq 12.5 \sim 800 \mu\text{g/ml} <$
A	CM	18 (21.2%)	67 (78.8%)
	TC	30 (35.3%)	55 (64.7%)
	SM	45 (52.9%)	41 (47.1%)
	KM	66 (77.0%)	19 (22.4%)
	AB-PC	25 (29.4%)	60 (70.6%)
	CER	2 (2.4%)	83 (97.6%)
B	CM	37 (100%)	0 (0%)
	TC	7 (18.9%)	30 (81.1%)
	SM	34 (91.9%)	3 (8.1%)
	KM	35 (94.6%)	2 (5.4%)
	AB-PC	18 (48.6%)	19 (51.4%)
	CER	6 (16.2%)	31 (83.8%)
C	CM	4 (1.5%)	270 (98.5%)
	TC	34 (12.4%)	240 (87.6%)
	SM	92 (33.6%)	182 (66.4%)
	KM	251 (91.6%)	23 (8.4%)
	AB-PC	1 (0.4%)	273 (99.6%)
	CER	0 (0%)	274 (100%)

グルコース、ペントース糖ともに利用できないA型の菌は、85株、グルコースは利用できないがペントース糖を利用できる株、C型は274株であった。またグルコースからの酸産生能についてみると、OF培地での所見では29株が陰性であり、他はすべて陽性を示した。また5%家兎血液を加えた寒天平板上にて

溶血性を示した株は、37株存在しすべてA型分類に属した。また色素産生株は10株あり、すべてA型に分類される株であった。さらに硝酸塩の還元能試験では、21株に陽性が認められC型に属する菌が多く見られた。

一方、糖利用による型別と抗生物質感受性との関係をまとめたものがTable 2である。

更に糖利用の特徴で分類したA、C型（グルコース非利用株）とB型（グルコース利用株）間の抗生物質感受性の比較検討を行った。Fig. 2に示すように37株のグルコース利用株と359株のグルコース非利用株の各種抗生物質の感受性のピーク分布、累積分布を比較すると、両菌株間で明らかに感受性分布に差が認められた。

CMではグルコース非利用株（以下Glc⁻と略す）の感受性は低くピーク値は100~200 $\mu\text{g/ml}$ を示した。一方、グルコース利用株（以下Glc⁺と略す）はすべての株が6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下のMIC値を示した。Glc⁺株にはCM耐性菌は1株も存在しなかった（Fig. 2-1）。

CERでは総じて感受性は低く、特にGlc⁻株の感受性ピーク値は、200 $\mu\text{g/ml}$ を示し、高いMIC値に分布していたが、Glc⁺株においてはすべて50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の高い感受性を示し、MICのピーク値は25 $\mu\text{g/ml}$ であった（Fig. 2-1）。

AB-PCではCER同様に総じて感受性が悪く、Glc⁻株ではそのMIC値が50 $\mu\text{g/ml}$ をピークに幅広く分布していた。一方、Glc⁺株は6.25 $\mu\text{g/ml}$ をピーク値にもち、Glc⁻株と比べて高感受性であった（Fig. 2-2）。

TCではFig. 2-2にみられるように特徴的な傾向が認められた。上記の薬剤と同様に、Glc⁻株はGlc⁺株よりもTCに対してもその感受性は低く、耐性菌も認められたが、感受性のピークはGlc⁻、Glc⁺両株群で一致した。Glc⁻株においては2峰性のピークを示し、800 $\mu\text{g/ml}$ の高度耐性株が認められた。

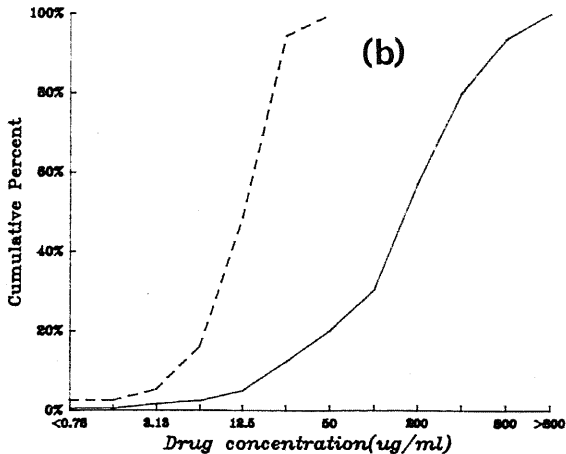
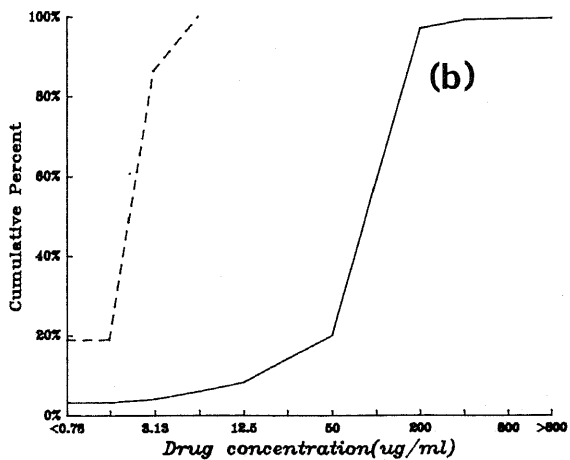
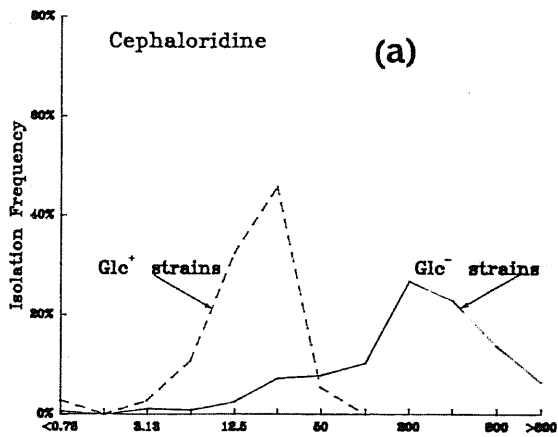
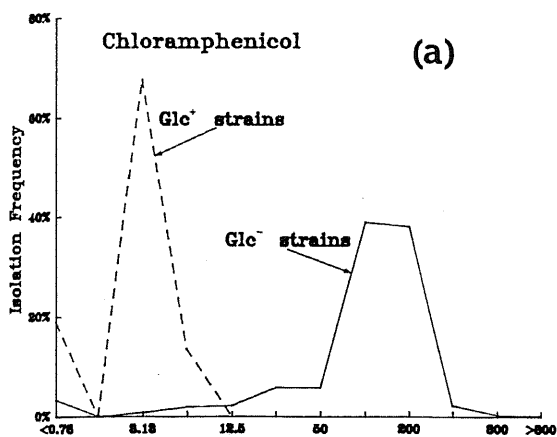


Fig.2-1. Isolation frequency (a) and cumulative percent (b) of Glc⁻ and Glc⁺ strains of *A.calcoaceticus* versus the MICs of chloramphenicol and cephaloridine.

KMに対する感受性パターンにもGlc⁺,Glc⁻両菌株間で特徴が認められた。Glc⁻株は幅広くMIC値が分布するにもかかわらず、感受性ピーク値はGlc⁺株と同じく1.56 μ g/mlを示した。またGlc⁺株においてはMIC値は200 μ g/mlを示す耐性菌が1株認められた。(Fig.2-3)

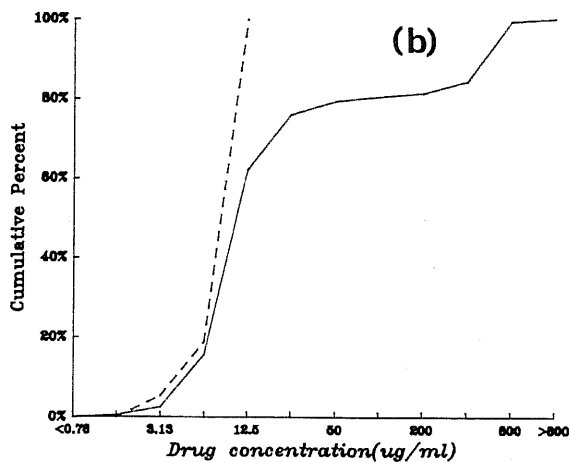
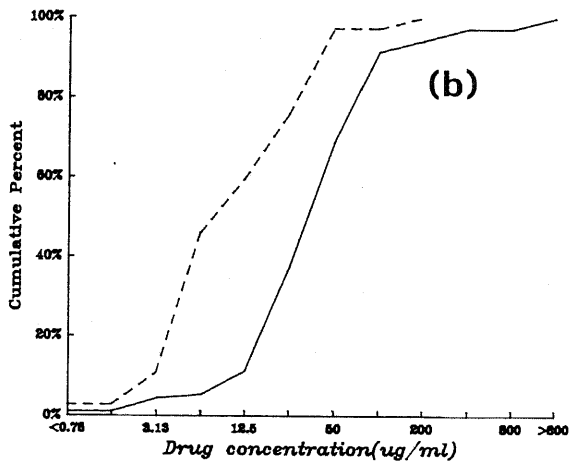
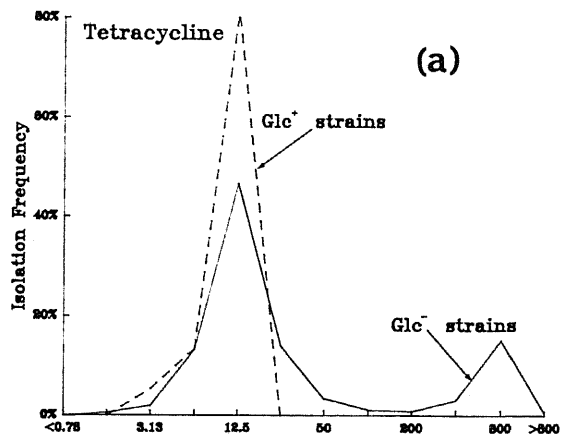
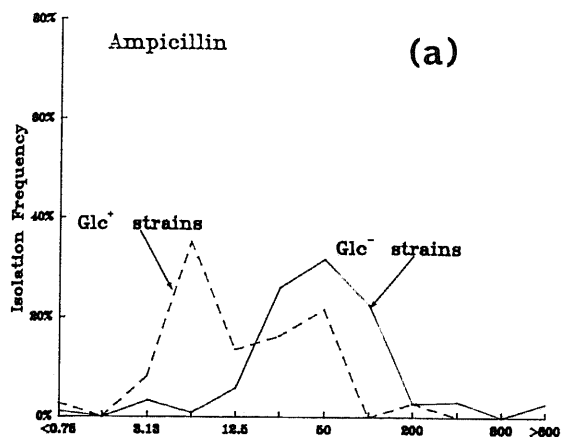


Fig.2-2. Isolation frequency (a) and cumulative percent (b) of Glc⁻ and Glc⁺ strains of A.calcoaceticus versus the MICs of ampicillin and tetracycline.

KMと同様にアミノ配糖体抗生物質であるSMについても同様の比較検討を行った。Glc⁻株は幅広くMIC値が分布し、耐性菌も多数認められた。一方、Glc⁺株では3.13 $\mu\text{g/ml}$ にその感受性のピークを示し、800 $\mu\text{g/ml}$ 以上のMIC値を示したのはわずか3株のみであった。(Fig. 2-3)

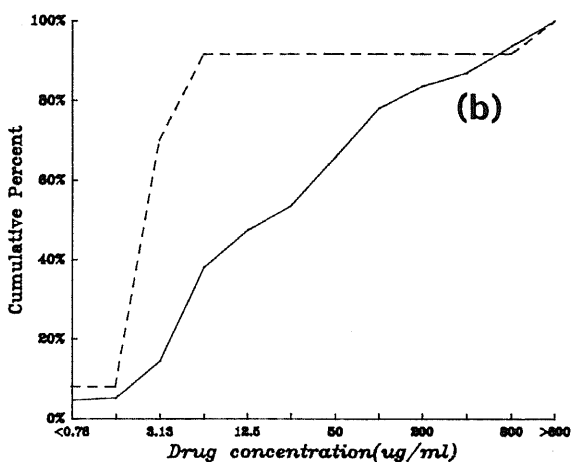
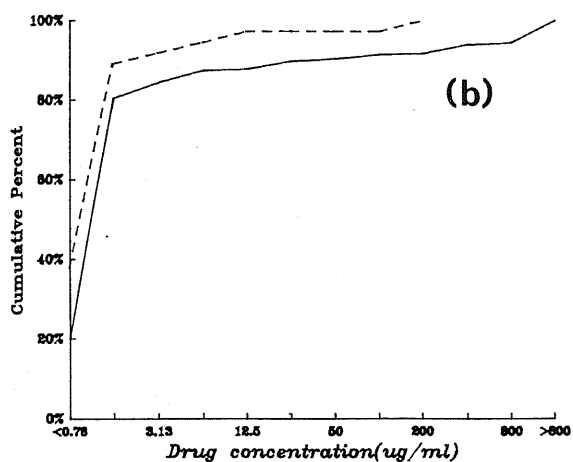
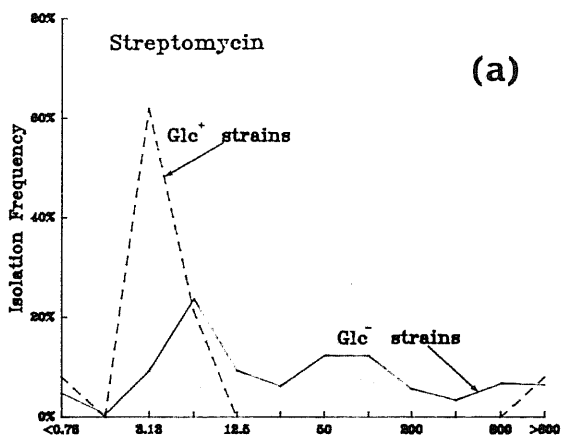
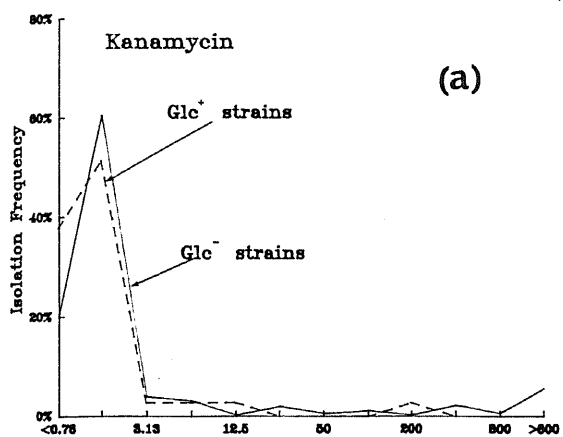


Fig.2-3. Isolation frequency (a) and cumulative percent (b) of Glc^- and Glc^+ strains of *A.calcoaceticus* versus the MICs of kanamycin and streptomycin.

以上は臨床材料由来の*A.calcoaceticus* 396株の主要な抗生物質に対する感受性と糖利用能、とりわけグルコース利用との関連を検討した結果である。本菌は β -ラクタム抗生物質にはとりわけ感受性は低かった。一方、アミノ配糖体抗生物質やテトラサイクリンなどには感受性菌が多く認められた。クロラムフェニコールに対しては高度耐性菌と感受性菌の二つの菌群がみられた。更

にβ-ラクタム抗生物質とクロラムフェニコールに対する感受性は本菌のグルコース代謝利用と相関することが明らかとなった。即ち、Glc⁻株はβ-ラクタム、クロラムフェニコールに対し共に高度耐性を示し、Glc⁺株は両抗生剤に感受性であった。特に本菌がペニシリン、セファロスポリンなどのβ-ラクタム抗生物質耐性菌が多いのは、臨床上で大量でかつ多種類の本抗生物質の使用により選択されて来たものと考えられる。

次に実験室内で用いている本菌種の標準菌株および代表的臨床材料由来株とその変異株を使用してグルコースの利用能と抗生物質感受性の相関について薬剤の種類を拡大してさらに検討した。

Table 3 に示したのは10種類の抗生物質の、A. calcoaceticus 6株に対するMICの測定結果である。

Susceptibility to antibiotics of A. calcoaceticus.
Table 3.

Antibiotics	MIC (ug/ml)					
	Glc ⁻			Glc ⁺		
	NCTC 7844	K-104	LMD.79.41	K-104G	KY 985	LMD 82.3
penicillin G	1600	50	200	3.13	6.25	12.5
cephazolin	3200	400	1600	50	100	100
cephoperazone	800	50	100	6.25	12.5	12.5
tetracycline	3.13	3.13	6.25	1.56	3.13	6.25
minocycline	0.19	0.19	0.19	0.10	0.10	0.19
gentamicin	0.78	0.78	1.56	0.39	0.19	0.78
kanamycin	3.13	3.13	6.25	1.56	0.78	3.13
tobramycin	1.56	1.56	3.13	0.78	0.78	3.13
chloramphenicol	400	200	400	6.25	3.13	25
polymyxin B	0.39	0.39	0.39	0.39	0.19	0.39

A. calcoaceticus NCTC 7844、K-104、LMD 79.41はGlc⁻株であり、一方、K-104G、KY-985、LMD82.3はGlc⁺株である。このTable 3の結果から明らかなようにGlc⁻株はいずれもβ-ラクタム抗生物質であるPC-G、CEZ、CPZに対して高いMIC値を示し、同時にCMに対しても低感受性であった。一方、Glc⁺株であるK-104G、KY-985、LMD 82.3株はβ-ラクタム抗生物質にはCEZをのぞいて比較的

感受性はよく、CMでも感受性は良好であった。

またGlc⁺、Glc⁻株を通じてTCは1.56~6.25 μg/mlと抗菌活性は強く、ミノサイクリン (MINO) も同様であった。アミノ配糖体抗生物質であるゲンタマイシン (GM)、KM、トブラマイシン (TOB) もGlc⁺、Glc⁻株共に良好な抗菌活性を示した。ポリミキシン (PX-B) も両菌群に高い抗菌性を示した。

以上、実験室標準株においても先に396株の臨床分離株で認められたような抗生物質に対する感受性の特徴が認められた。

次にTable 3に示した6菌株につき、β-ラクタマーゼ活性を測定した。一般にβ-ラクタム系抗生物質高度耐性株においてはβ-ラクタム抗生物質を加水分解するβ-ラクタマーゼが寄与することが広く知られている¹²⁾。

各菌株とも1/4MIC濃度のPC-Gで3時間誘導後、酵素活性をマイクロヨード法により測定した。A. calcoaceticus NCTC 7844株を除いて、その活性値は10⁻³~10⁻⁴ units/mg proteinであり、低い値を示した。従ってNCTC 7844株以外は、β-ラクタマーゼは耐性にほとんど寄与していないことが明らかとなった (Table 4)。

Table 4. β-Lactamase activity in A. calcoaceticus

Strain	Rate of hydrolysis (u mol/min/mg protein)	
	Penicillin G	Cephazolin
NCTC 7844	2.15 × 10 ⁻²	7.04 × 10 ⁻²
K-104	8.87 × 10 ⁻⁴	3.87 × 10 ⁻⁴
LMD 79.41	7.18 × 10 ⁻⁴	1.73 × 10 ⁻³
K-104G	2.59 × 10 ⁻⁴	1.43 × 10 ⁻⁴
KY985	8.87 × 10 ⁻⁴	9.29 × 10 ⁻⁴
LMD 82.3	2.04 × 10 ⁻⁴	2.36 × 10 ⁻⁴

また培養菌液中でのβ-ラクタム剤の安定性を確認するため薬物残存活性を測定し、結果をTable 5に示した。NCTC 7844株の培養液中では、PC-G、CEZともに急速に分解され、1分以内に検出限界以下 (PC-G; 0.78 μg/ml、CEZ: 1.56 μg/ml) に低下した。他の5菌株については、分解がまったく認められないか、もしくは5~30%の分解が認められた程度であり、本酵素がβ-ラクタム系抗生物質の耐性の主たる要因であるとは考えにくいものであった。

β-ラクタマーゼ産生が殆ど見られないにもかかわらずペニシリン、セファ

ロスポリン系抗生物質に高度耐性を示した菌株の耐性機構を解明すべく β -ラクタム抗生物質のターゲットと考えられているペニシリン結合蛋白 (PBPs) に対する結合性の比較を行った。Fig. 3 にPBPsのパターンを示した。グルコース非利用株とグルコース利用株とにおける結合の差異がPBP AおよびEで主として観察された。

Table 5. Residual activities of penicillin G and cephalosporin

Strain	Antibiotic	Residual activity (ug/ml)			
		0 hr	0.5 hr	1 hr	3 hr
NCTC 7844	PC-G ^a	50	>0.78	>0.78	>0.78
NCTC 7844	CEZ ^b	50	>1.56	>1.56	>1.56
K-104	PC-G	50	50	50	33.2
K-104	CEZ	50	41.6	34.5	36.0
LMD 79.41	PC-G	50	50	50	50
LMD 79.41	CEZ	50	38	35.2	32.7
K-104G	PC-G	50	50	50	50
K-104G	CEZ	50	42	43.6	38.5
KY985	PC-G	50	50	50	39.2
KY985	CEZ	50	50	47.2	40.7
LMD 82.3	PC-G	50	50	50	50
LMD 82.3	CEZ	50	44	48	42.5

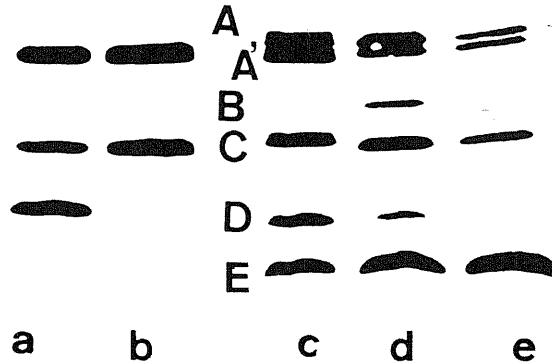
a: penicillin G

b: cephalosporin

すなわちGlc⁻株では、PBPのA、Eともに存在せずGlc⁺株ではいずれもA、Eが認められた。またNCTC 7844株では膜分画に強い β -ラクタマーゼ活性が含まれ、¹⁴C-ペニシリンとPBPsの結合が妨げられるため、¹⁴C-ペニシリンで標識されたPBPsの明確なバンドは検出できなかった。

E. coli ZSC 112LのPBPsを基準にしてA. calcoaceticusのPBPsの分子量を求め、Table 6に示した。

Fig. 3.



SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of penicillin binding proteins (PBPs) of *A. calcoaceticus*.
a: K-104 b: LMD 79.41 c: K-104G d: KY-985 e: LMD 82.3

PBPsの結合パターン結果から、Glc⁻株とGlc⁺株のβ-ラクタム抗生物質に対する感受性の差はPBPのA、Eへの結合の有無に関連することが考えられる。すなわち、β-ラクタム剤に対して感受性の低いGlc⁻株(K-104、LMD79.41)はPBPs AおよびEの欠失により耐性化した可能性が考えられる。

次に先に述べた6株の*A. calcoaceticus*の中からGlc⁻ (K-104)、Glc⁺ (K-104G)、Glc⁺ (KY985) の3菌株についてその外膜蛋白質を検討した。一般にグラム陰性菌の外膜には物質の透過に影響を与えるporin蛋白質が存在し、pore (孔)を形成し、溶質の分子量により、その透過効率が大きく変化することが知られている。β-ラクタム系抗生物質の中でもとりわけセファロsporin類はこのpore透過孔を効率よく通過することが多くの研究者から報告されている^{25, 26, 27})。さらに菌種の違いにより透過孔の大きさも異なり、通過できる溶質の分子量の限度を規定している^{28, 29, 30, 31})。中江等は*P. aeruginosa*の透過孔はdisaccharide (分子量 342) 以上は通過できず、それ以下の分子量の糖類は通過可能であり、プラス (+) の電荷をもった物質の方がOmpC (porin孔) を通りやすいと報告している³²)。

また、*E. coli*、*S. marcescens*、*Salmonella*等は分子量600程度の糖類はporeを通過できるとも報告している。一方、*H. influenzae*はさらに大きな分子量800程度の糖類までも通過できるporeを形成しているとも報告している³³)。

Fig. 4にKY-985、K-104G、K-104の外膜蛋白質のSDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) を示した。

Table 6.

Apparent molecular weight of PBPs of
A. calcoaceticus K-104.

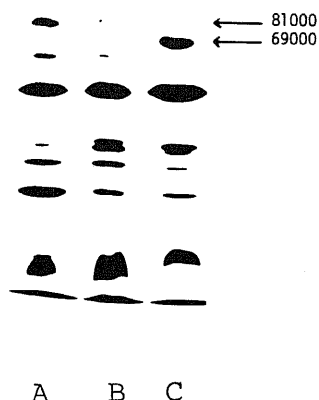
Band	Molecular weight	Molecular weight(24) ^a
A	93,000	102,000
A'	89,000	94,000
B	72,000	(83,000)
C	62,000	(78,000)
D	48,000	62,000
E	41,000	36,000

a: molecular weight was reported by
Georgopapadakou, N.H., and F.Y.Liu. (24)

K-104 (Glc⁻) では分子量 69,000 (69K) の蛋白バンドが検出されたが、Glc⁺株であるKY985、K-104Gにおいては認められなかった。一方、Glc⁺株においては分子量81,000 (81K) の蛋白バンドが検出され、Glc⁻株にはこのバンドが検出されなかった。他の主要バンドについてはほぼ両者の菌で同様のパターンを示した。中江等によればアミノ配糖体抗生物質も外膜に存在するporin孔を通過すると報告しているが、先にTable 3において*A. calcoaceticus*の感受性試験測定の結果からもGM、TOB、KMの上記3株に対するMIC値はほとんど変化していない事実から、外膜蛋白質の電気泳動パターンの結果は、Glc⁺、Glc⁻菌株の間で69K、81Kのバンドに差は認められたもののアミノ配糖体抗生物質はporeの透過に関してはほとんど影響はないものと推察された。

一方、Glc⁻株であるK-104、Glc⁺株であるK-104Gの外膜多糖類の分析を行ったところ、Table 7に示したように菌体当りの多糖類の量は、K-104で乾燥菌体当り1.52%、K-104G 0.28%であり、2-Keto-3-deoxyoctonateの量は、大きな差は認められなかった。またラムノース、ヘキソース、グルコースの含量は、2-Keto-3-deoxyoctonateを100としたモル比で比較するとK-104G株はいずれの糖の比においてもK-104G株よりも含量は少なかった。

Fig.4.



SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of outer membrane proteins of A.calcoaceticus.

Proteins of samples were separated by SDS 10% polyacrylamide slab gel electrophoresis and the protein bands were visualized by 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 staining.

A: KY985 (Glc⁺) B: K-104G (Glc⁺) C: K-104 (Glc⁻)

Table 7.

Analysis of polysaccharide sugars of strains

K-104 and K-104G

Strain	Yield of polysaccharide (mg/g dry cells)	2-Keto-3-deoxyoctonate (mol/mg cellular protein)	Molar ratio ^a			
			Rhamnose	Hexosamine	Glucose	2-Keto-3-deoxyoctonate
K-104	15.2	3.4	252	203	485	100
K-104G	2.8	2.7	47	36	88	100

^aValues for rhamnose, hexosamine and glucose are expressed as the molar ratio relative to 2-keto-3-deoxyoctonate.

1-4 抗生物質感受性と形態学的特徴

先に述べたように、Fig. 2-1~Fig. 2-3 および Table 3 に示した実験結果から抗生物質感受性とグルコースの利用能との間で相関性が示唆された。特に β -ラクタム抗生物質、CMではGlc⁺株は感受性を示し、Glc⁻株は高度耐性を示す株がほとんどであった。一方、TCおよびアミノ配糖体抗生物質であるGM、KM、TOBは伝達性薬剤耐性因子（R因子）を保有する株以外は、Glc⁺、Glc⁻両菌株ともに感受性を示し、両菌株間で差異は認められなかった。

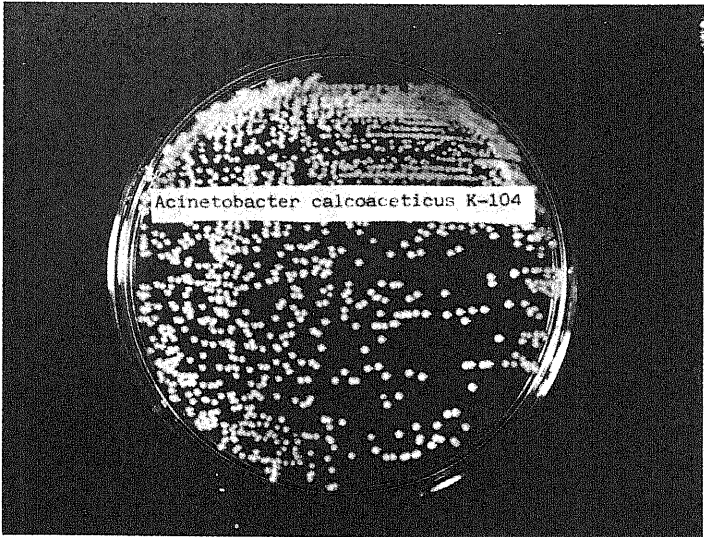
一方、Glc⁻およびGlc⁺株を感受性測定用寒天培地トリプトケース寒天培地、Stanierの最少培地（炭素源、コハク酸）に塗布し、20時間後、コロニーを観察すると、写真1-(a)、(b)に示したようにGlc⁻株であるK-104株はsmoothでconvex型形態を示した一方、K-104G (Glc⁺) は、flatでroughなコロニーを示した。この結果は46株のGlc⁺および954株のGlc⁻について観察し確認された。A. calcoaceticusは菌の形態が球桿菌を示すことはすでに述べたが、Glc⁻、Glc⁺株ともに形態は球桿菌であり、対数増殖期から定常期にかけては球状の形態を多く示した。走査型電子顕微鏡によるGlc⁺株の観察では細菌細胞表面に皺状の形態が観察された。透過型電子顕微鏡による超薄切片像からは、本菌の膜構造はグラム陰性菌特有の内膜、ペプチドグリカン層および外膜の3層構造が観察された。しかし、ペプチドグリカン層は、他のグラム陰性菌³⁴⁾ (E. coliなど) と比べると厚くりゾチーム、EDTA法による細胞壁溶解に必要なリゾチームの量はE. coliのそれと比べると約10倍量必要であった。

Glc⁺とGlc⁻の間では外膜構造に差異が認められた。透過型電子顕微鏡観察によると写真2-(a)、(b)に見られるようにGlc⁻株の外膜は振幅が小さく、且つ規則正しい波状構造を示しており、また波状構造の谷の部分においてペプチドグリカン層と接触しており、そのためにペリプラズム空間が内膜とペプチドグリカン層との間に存在しているのが観察される。

一方、Glc⁺株においては波状構造が不規則であり、且つ振幅も一定しない。ところによっては波状構造が観察されず、外膜とペプチドグリカン層との接触もほとんど見られなくなり、ペプチドグリカン層は内膜側へ近づいており、ペリプラズム空間がペプチドグリカン層と外膜の間に観察された。

Photo.1.

(a)



(b)

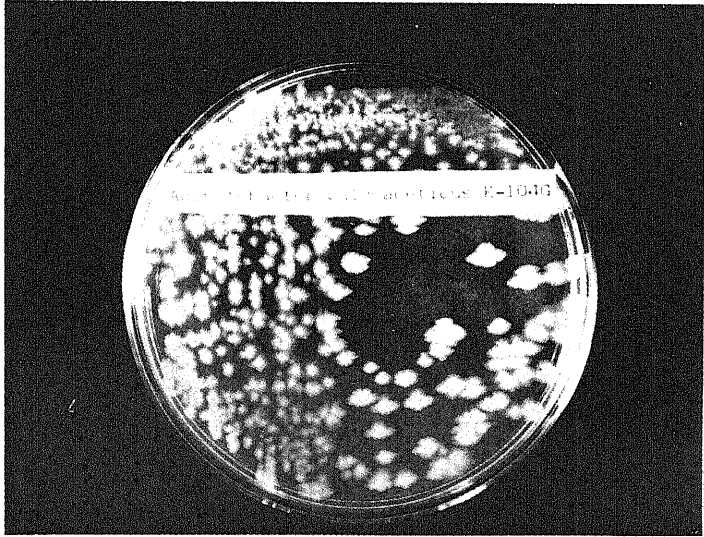
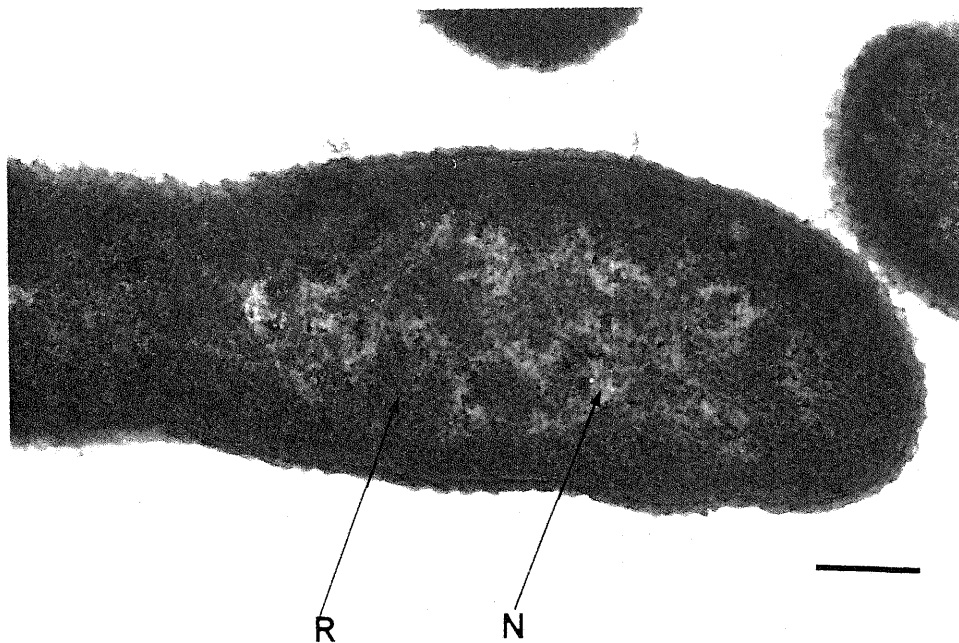
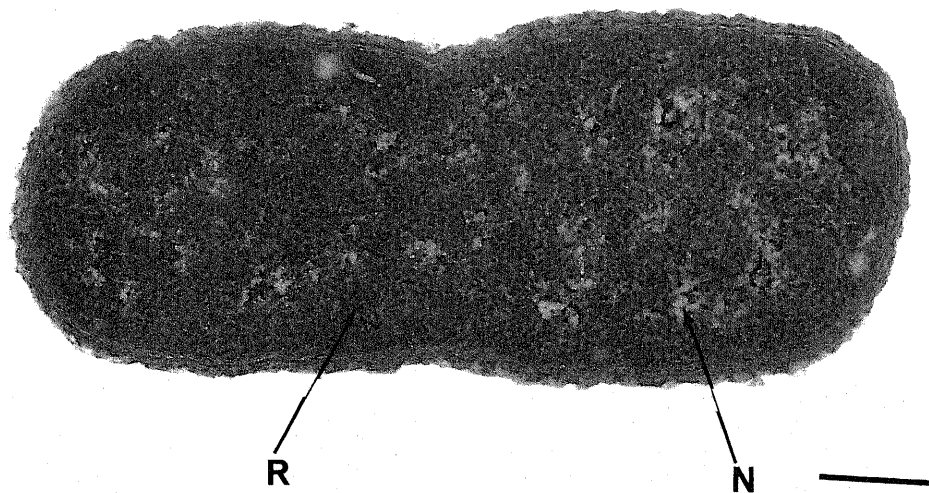


Photo.2.

(A)



(B)

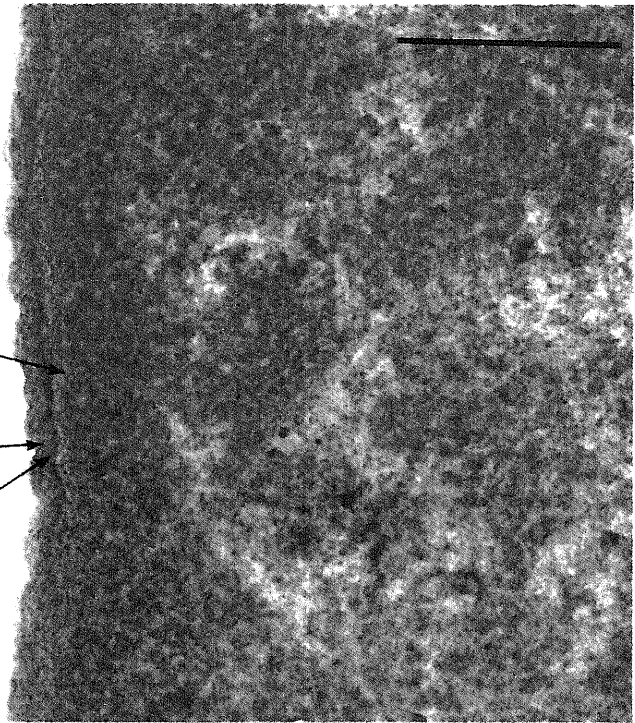


Transmission electron micrographs of *A. calcoaceticus* K-104 (A) and K-104G (B) grown exponentially in TSB at 30°C. Bars represent 200nm. R:ribosomes N:nucleic acid.

Photo.2.(continuance)

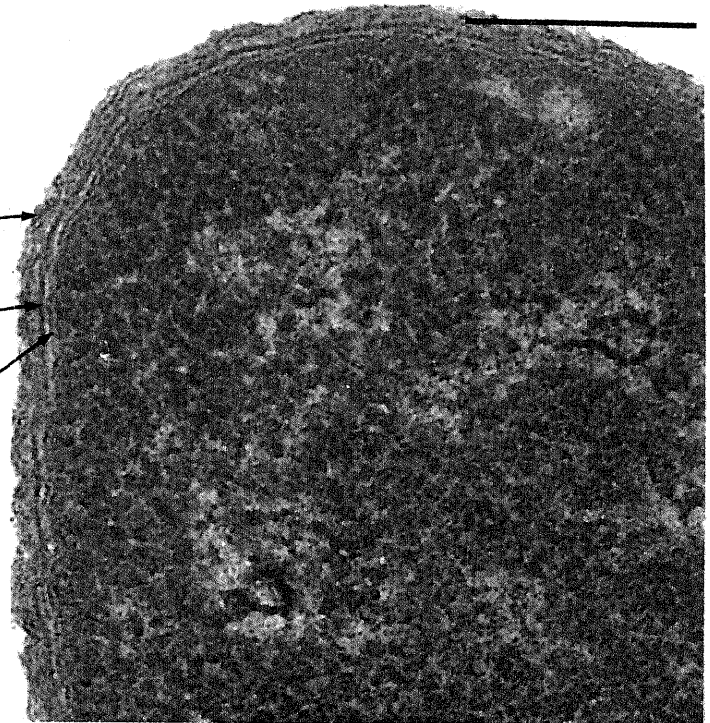
(A)

IM
OM
PG

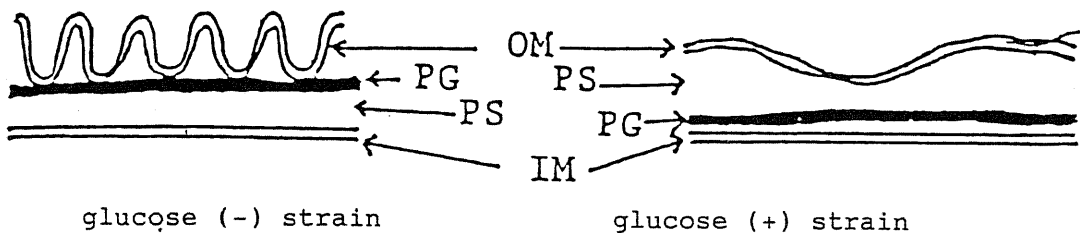


(B)

OM
PG
IM



Transmission electron micrographs of *A. calcoaceticus* K-104 (A) and k-104G (B) grown exponentially in TSB at 30°C. Bars represent 200nm. (A) and (B) show higher magnification of the cells respectively. OM;outer membrane PG:peptideglycan IM:inner membrane.



The representations of membrane structure in A. calcoaceticus.
 OM: outer membrane PG: peptidoglycan PS: periplasmic space
 IM: inner membrane

1-5 要約および考察

(要約)

臨床分離の A. calcoaceticus 396株を用いて、各種抗生物質に対する感受性を測定した結果、本菌種はβ-ラクタム抗生物質に対する高度耐性菌が多く存在し、アミノ配糖体系抗生物質およびテトラサイクリン系抗生物質には感受性菌が多く認められた。クロラムフェニコールは高度耐性菌と感受性菌の2つの菌株分布が認められた。β-ラクタム抗生物質高度耐性菌に関してその産生するβ-ラクタマーゼを検討した結果、一部の高度耐性菌を除いてβ-ラクタマーゼ活性の産生量は低く、菌のβ-ラクタム高度耐性への寄与は低いものと考えられた。しかし、A. calcoaceticus NCTC7844株のβ-ラクタム剤高度耐性はβ-ラクタマーゼによると考えられる。この菌株では酵素産生量も多く、典型的なセファロスポリナーゼ型酵素であり、PC-G、6-APA等で誘導された。

また代表的な臨床分離株および実験室内標準株の糖利用能（特にグルコース）と抗生物質感受性との関係を更に詳細に検討した結果、Glc⁻株とGlc⁺株との間には次のような相関性が見いだされた。すなわち、β-ラクタム系抗生物質、クロラムフェニコールに対しGlc⁻株は感受性が低い。一方、Glc⁺株は上記の両抗生物質に高感受性を示した。

テトラサイクリン、アミノ配糖体系抗生物質は、Glc⁺、Glc⁻株の間で感受性の差異は見られなかった。このβ-ラクタム抗生物質のGlc⁺、Glc⁻両株におけるβ-ラクタマーゼに依存しない感受性の差異の原因をさぐるためにβ-ラクタム抗生物質の作用標的であるPBPsを比較検討した。その結果、Glc⁻株ではPBPのA (E. coliのPBP 1Aにあたりと考えられるバンド)、E (E. coliのPBP 5,6に相当すると考えられるバンド)に¹⁴C-PC-G結合蛋白が検出されず、Glc⁺ではLMD82・3株を除き、A、A'、B、C、D、EのすべてのPBPsが検出された。また外膜に存在するporin蛋白質のGlc⁺、Glc⁻両株での差異をみると、81K、69Kに差が認められた。さらにGlc⁻株であるK-104、Glc⁺株であるK-104G株の外膜多糖類の分析を行ったところ、菌体あたりの量はGlc⁻株で1.52%、Glc⁺株で0.28%で、2-keto-3-deoxyoctonateの量は両菌株とも差はなかった。またラムノース、ヘキソース、グルコースの含量はGlc⁺株はGlc⁻株よりもいずれも少ない結果であっ

た。

次にGlc⁺、Glc⁻株の電子顕微鏡観察による形態学的特徴を調べた結果、両株ともグラム陰性菌特有の内膜、ペプチドグリカン層および外膜の3層構造が観察された。しかし、両株の間で外膜構造で顕著な差異が見られた。Glc⁻株はその外膜は振幅が小さく、且つ規則正しい波状構造を示しており、また波状構造の谷の部分でペプチドグリカン層と接触している像が観察された。一方、Glc⁺株においては波状構造が不規則であり、ペプチドグリカン層は内膜側へ近づいておりペリプラズム空間がペプチドグリカン層と外膜の間に存在するように観察された。

A. calcoaceticusはグルコース利用能により分類した場合、コロニー形態、外膜構造、抗生物質に対する感受性、ペニシリン結合蛋白(PBPs)パターン、および外膜蛋白に両グループ間で差異があることが観察された。外膜蛋白の変化により外膜の規則的な波打ち構造が乱れ、その結果抗生物質に対する感受性の変化が現れたものと推察される。

グラム陰性菌の外膜は、リン脂質、リポ多糖体および蛋白から構成されており、物質透過の障壁としての役割を担っている。E. coliにおいては外膜蛋白としてOmpF、OmpC、LamBとPhoEが存在しており³⁵⁾、透過孔を形成している。このうち、LamBとPhoEは特殊な条件下でのみ誘導発現されており³⁶⁾、栄養素や多くの抗生物質は、OmpF、OmpC、porinを通して外膜を通過する²⁰⁾。OmpF蛋白を欠損した変異株は、CMやTCなどの抗生物質に耐性となる。又、カルベニシリン(CB-PC)耐性変異株を分離したところ、OmpF蛋白の量が減少していたとの報告がある³⁷⁾。またOmpF porin蛋白質のみ、もしくはOmpFとOmpC porin蛋白両方の生産量が減少するとβ-ラクタム抗生物質に対する耐性度が上昇することも報告されている。例えばE. coli K-12において、OmpF蛋白欠損変異株は親株と比べて、カルベニシリンおよびPC-GのMIC値が16倍および4倍にそれぞれ上昇する。S. typhimuriumやP. aeruginosaにおいてもporin欠損変異株を用いてE. coliと同様な結果が報告されており^{28, 29, 30)}、外膜の透過性が抗生物質の感受性に影響を及ぼしていることがわかる。著者の得た結果は、Glc⁺、Glc⁻両株で感受性に変化が見られたのはβ-ラクタム抗生物質とCMであった。β-ラクタム抗生物質の主な耐性機序は、透過障害、β-ラクタマーゼによる加水分解、標的蛋白質であるP

BP_sの変化、の3つである。一方、CMは透過障害、特異酵素（CATase、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）である。尚、Table 3の6株のCATase活性は測定した結果、まったく活性は認められず両菌株間に差は認められなかった。CMとβ-ラクタム剤の両者に共通している耐性原因として外膜透過の障害が最も考えられる。

β-ラクタマーゼ活性に関してはNCTC 7844株が他の5株および臨床分離株の7株と比べて非常に強く、また残存薬剤濃度測定からもβ-ラクタム系抗生剤の分解が確認された。NCTC 7844株は外膜透過性の低下とβ-ラクタマーゼの双方による高度耐性であり、K-104、LMD79・41は透過性低下による耐性獲得と推察される。

一方、PBP_sパターンもGlc⁺、Glc⁻両株で変化が認められ、蛋白質バンドE（M.W 41,000）は、E. coliのPBP5,6と分子量で類似している。PBP5, 6はβ-ラクタマーゼ活性を示すことが報告されているので、A. calcoaceticusの持つ弱いβ-ラクタマーゼ活性との関連が推測される。Glc⁻株はPBP_s A, Eが欠失している事が示されたが、増殖は正常に行われているという事実は、PBP A'がAの代替酵素の機能を果たしていることが推察される。このことはE. coliにおいてもPBP1B（トランスペプチダーゼ、トランスグリコシダーゼ活性を示す蛋白質）の欠損はPBP 1Aがその変わりを果たすという事からも推察される。一方、PBP Eの欠損は（a）K-104に関してはEの変わりをDが代替していることが推定されるがLMD79.41についてはD、Eともに欠損していることより、上に述べた可能性は否定される。しかし、この¹⁴C-ベンジルペニシリンを用いた実験系においてD, Eのわずかな蛋白質の存在のために検出されなかった可能性も考えられ、本実験の検出感度について検討の余地があるものと考えられる。

また、E. coliにおいてはPBP_sは非常に詳細に研究され^{30, 31)}、PBP1A、1B、2、3、4、5および6の機能蛋白質が検出されており、種々のβ-ラクタム抗生物質の親和性についても研究されている。しかしA. calcoaceticusのPBP_sについてはほとんど明らかでない²⁴⁾。今後詳しく追求されねばならない課題である。

第2章 グルコースによる増進促進効果 序

第1章において A. calcoaceticus がグルコースを利用能の有無により形態的特徴、抗生物質感受性等に明らかな差異のあることを述べた。本章ではさらに被験菌株を臨床分離株1,000株を増やして、炭素源利用能、グルコースからの酸産生試験、溶血性等を検討した。

また本菌種の約90%の菌株がグルコースを唯一の炭素源として利用できない原因と他の炭素源（アミノ酸、有機酸）を含む最少培地に、グルコースを添加した時に増殖促進が起こる原因の解析結果を述べる。この研究によりグルコースが炭素源として利用されないにもかかわらず、エネルギー源として利用されるという従来の微生物代謝の常識からは類推し難い新知見が得られた。

2-1 実験材料ならびに方法

1) 菌株および化合物

臨床分離株 A. calcoaceticus 1,000株はすべて京都微生物研究所の由来株である。

2) 炭素源試験

基質は糖類として ribose、arabinose、xylose、glucose、galactose、fructose、mannose、rhamnose、saccharose、maltose、lactose、gluconic acid を使用し、アルコール類、アルデヒド、有機酸は38ページに示した種類のものを使用した。基質濃度は0.1%、Stanierの最少培地に添加し、37°C 20時間培養を行った。なお、培地のpHは糖類添加培地では6.80、その他は8.5に調整した。

3) 各種酵素活性測定法⁴⁰⁾

Glucokinase、G6P-dehydrogenase、Gluconokinaseの酵素活性はTable 8に示したA、B、Cの反応溶液をそれぞれ用いて行った。Aではグルコース、Bではグルコース-6-リン酸、Cではグルコン酸 (Na salt) をそれぞれ除いて全て混合し、5分間保温後、これら反応基質を入れて反応を開始し、以後10分間の吸光度変化 (340nm) を測定した。

Glucose dehydrogenase (GDH) の測定⁴⁴⁾ は3mlの50mMリン酸緩衝液 (pH6.8) に10mMグルコース、200 μ M 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP)

および酵素試料を加え、30°C 10分間におけるDCIPの吸光度減少(605nm)により行った。

Table 8.

A. Glucokinase (Hexokinase) assay	
0.2M Triethanolamine buffer (pH 8.0)	1.0ml
0.1M MgCl ₂	0.2ml
10mg/ml NADP ⁺ (Na salt)	0.2ml
100mg/ml glucose	1.2ml
50mg/ml ATP (Na salt)	0.1ml
1mg/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase	0.01ml
sample (crude enzyme)	0.05ml
B. Glucose-6-phosphate dehydrogenase	
0.2M Triethanolamine buffer (pH 8.0)	2.0ml
0.1M MgCl ₂	0.2ml
10mg/ml NADP ⁺ (Na salt)	0.1ml
10mg/ml glucose-6-phosphate (Na salt)	0.1ml
sample (crude enzyme)	0.01ml
C. Gluconokinase	
0.1M Glycylglycin buffer (pH 8.0)	2.0ml
0.1M MgCl ₂	0.1ml
10mg/ml NADP ⁺ (Na salt)	0.1ml
60mg/ml ATP (Na salt)	0.1ml
20mg/ml gluconate (Na salt)	0.1ml
10mg/ml phosphogluconate dehydrogenase	0.01ml
sample (crude enzyme)	0.01ml

4) 浸透圧ショック法⁴¹⁾による膜分画の調製

菌体を対数増殖期において集菌し、氷冷した10mMリン酸緩衝液 (pH7.2) で2回洗浄する。菌体1g (湿重量) あたり40% (W/V) ショ糖リン酸緩衝液 (pH7.2) 10mlを室温で添加し、攪拌し直ちにEDTA溶液 (0.3M Na塩) を加え、最終濃度0.1mMとして10分間回転攪拌する。遠心後、氷冷した0.5mM MgCl₂を添加し懸濁する。膜分画は山登、安楽等の方法⁴²⁾に従って行った。

5) ¹⁴C-プロリン、¹⁴C-コハク酸のとり込み試験

¹⁴C-プロリン、¹⁴C-コハク酸 (New England Co.製) を使用した。菌体を0.1Mリン酸緩衝液に懸濁後、100μg/mlのクロラムフェニコールを添加し、3分間22°Cで振盪後¹⁴C-基質を加えた。サンプリングは、経時的に行った。菌体採取はミリポア・メンブランフィルターで行った。菌体を0°Cの緩衝液で洗浄後、乾燥し液体シンチレーションカウンターで菌体内に取り込まれ¹⁴C-基質量を測定した。

6) 飢餓細胞の調製

洗浄菌体を33mM Tris-HCl (pH7.2) 緩衝液 (5mM MgCl₂含有) に懸濁し、 1×10^{10} cells/mlにした。ヒ酸塩添加後、30°Cで60分間ゆっくりと振盪後、遠心で集菌した。

7) ATPの測定法^{43, 44)}

菌懸濁液にグルコース、グルコン酸を添加し、15分間保温後、細菌細胞内ATP量を測定した。ATPの産生反応は氷冷20%過塩素酸1ml添加して停止した。4°C30分放置後、変性蛋白質を遠心除去した。上清に1mlの1.5N KOH、1mlのKHCO₃を加えて混合後、KClO₄の沈殿をフィルター濾過で除き、ATP量をluciferin-luciferase法でアッセイした。2mlの50mMヒ酸塩、5mM リン酸カリウム、0.5mM MgCl₂液 (pH7.0) に0.5mlの上記の過塩素酸抽出試料を加え、1mlのfirefly lantern extract (Sigma) を添加後、シンチレーションカウンターで0.2分間測定した。結果はn mol of ATP/mg proteinで表した。

8) 細胞膜小胞の調製と膜電位、pHの測定^{45, 46)}

菌体を10mMリン酸緩衝液 (pH7.2) 10mlに懸濁後、同量の40% (W/V) ショ糖リン酸緩衝液を加え、5分間氷冷後リゾチーム (10mg/ml) と0.1M EDTA-20% ショ糖リン酸緩衝液12mlを添加する。菌体を30分間氷冷後、集菌する。ソニケー

ターで菌体を破碎後、80,000xg 90分間遠心する。沈殿を5mM EDTA-10%ショ糖リン酸緩衝液30mlに懸濁し、2,000xg 15分遠心し、上清をとる。上清を80,000xg, 60分間遠心後、沈殿を3mM EDTA(pH7.2)6mlに懸濁して、44%ショ糖リン酸緩衝液で80,000xg、12時間遠心し、上層を集める。

膜pHは、BCP (ブロムクレゾールパープル) 5 μ Mを使用し、グルコース 10⁻³Mを添加し二波長吸光度の差スペクトル (590nm~629nm) で測定した。膜電位は、Ethidium bromide(EB) 50 μ M、8-anilino-1-naphtalenesulfonic acid(ANS) 50 μ Mにし、グルコース10⁻³M添加して、Ex 530nmEm 590nmで測定した。

9) GDHの精製はFig. 15の手順で行った。

CoQ₉補酵素の抽出は、90%メタノールにより抽出後、Amberlyst A-21で精製した。アポ酵素の調製は0.1M酢酸緩衝液 (pH4.5) に3M KBrを加え、4°C 72時間透析しさらに0.02Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で12時間透析した。CoQ₉再結合は、0.01Mリン酸緩衝液 (pH6.0) にMgCl₂ 5mM添加し、25°Cで1時間放置した^{47, 48)}。

10) CoQ₉の精製とGDHとの反応⁴⁹⁾

集菌後、クロロホルム：メタノール (2:1) でN₂ガス下、CoQ₉抽出する。ケイ酸カラムに添加後、最初に石油エーテル：ジエチルエーテル (98:2) で、wax ester、hydrocarbonを溶出させ、次に石油エーテル：ジエチルエーテル (95:5) でtriglyceride、CoQ₉を溶出させる。各溶出分画を薄層クロマトグラフィ（展開溶媒；クロロホルム：イソオクタン=2:1) で展開する。コントロールは市販のCoQ₉を使用し、同時に展開した。1% KBH₄ (エタノール：水=1:1) を噴霧し、3分間乾燥後、0.2%ネオテトラゾリウムを噴霧し、100°C 5分間乾燥させるとCoQ₉Rf値0.4付近に赤色のスポットとして検出される。この分画をクロロホルム：メタノール (2:1) で抽出後、減圧濃縮した。

2-2 各種炭素源を使用した時の増殖に及ぼす糖の影響と代謝の解析

臨床材料より分離、同定された *A. calcoaceticus* 1,000株について炭素源利用能、溶血性、グルコースからの酸産生試験（OF試験）等を検討し結果を、Table 9に示した。

Table 9. Biotypes of *A. calcoaceticus*.

Type	OF test	Carbon source		Hemolysis	No. of strain
		Glucose	Pentose		
1	+	-	+	-	476
2	+	-	-	-	101
3	+	-	-	+	54
4	-	-	-	+	41
5	-	-	-	-	282
6	+	+	-	-	41
7	+	+	+	-	5

Stanierの最少培地にグルコースまたはペントース炭素源として加え、増殖の有無を判定した。OF試験陽性（グルコースを酸化的に分解する株）は677株で、炭素源としてグルコースを利用可能な株はわずか46株認められたにすぎなかった。大多数（約95%）の株はグルコースは利用できなかった。またGlc⁻の中でも476株はペントースであるリボース、アラビノース、キシロースを利用し、増殖可能であった。しかしグルコースもペントースもともに利用できない菌株が478株存在した。

一方、Glc⁺の46株中わずか5株であるが、グルコースもペントース糖も利用し増殖できた株が認められた。また羊血液を5%含む血液寒天平板上（トリプトソイ寒天培地）で、1,000株中95株が溶血性を示した。これらの溶血株はいずれもグルコース、ペントース糖も利用することはできなかった。

さらに1,000株中に92株をランダムにとりあげて、有機化合物利用能を調べた。

エタノール利用株はすべてn-プロパノール、n-ブタノール、イソブタノールを同時に利用することができた。しかし、メタノール、イソプロパノール、sec-ブタノール、tert-ブタノール、n-アミルアルコール、iso-アミルアルコール、sec-アミルアルコール、tert-アミルアルコール、n-ヘキシルアルコール、sec-ヘキシルアルコール、n-ヘキシルアルコール、sec-ヘキシルアルコール、2-ヘキシルアルコール、3-ヘキシルアルコール、n-ヘプチルアルコール、2-ヘプチルアルコール、3-ヘプチルアルコール、4-ヘプチルアルコール、n-オクチルアルコール、2-オクチルアルコール、n-ノニルアルコール、n-デシルアルコール、グリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコールは92株すべてが利用できなかった。また、Glc⁺においてもガラクトース、フルクトース、マンノース、ラムノース、マルトース、ラクトースは利用できなかった。

Table 9は第1章で述べた糖利用能のBiotype A、B、Cをさらに詳細に炭素源利用能等で分類し、1から7までに分けたものである。臨床分離株の1,000株による分類表である。Aタイプは2~4までの分類に属し、Bタイプは6と7、Cタイプは1に分類されるものである。

本菌は一般にグルコースを代謝利用できないという報告と本研究の結果に基づき^{50, 51)}、その原因を明らかにするためまず関連代謝酵素活性を測定した。Table 9のType 1に属するGlc⁻株を用いてグルコースキナーゼ（ヘキソキナーゼ、glucosekinase）、グルコノキナーゼ（gluconokinase）、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（glucose-6-phosphate dehydrogenase）を測定した。その結果、glucosekinase活性が全く認められない株は45株、わずかに活性を示した株（0.089units/mg protein）が4株認められた。しかし、*E. coli* W3623のそれと比較すると約1/60の活性であった。（6.1units/mg protein、*E. coli*の活性値）また、gluconokinaseおよびglucose-6-phosphate dehydrogenase活性は全く認められなかった。しかし、Type 6に属するGlc⁺株であるK-104G、KY985、LMD82・3ではglucosekinase、gluconokinaseともに活性は認められた。しかし、glucose-6-phosphate dehydrogenaseは認められなかった。またGlc⁻株は、グルコン酸を炭素源にすることもできなかったが、Glc⁺株はグルコースとともにグルコン酸も利用可能であった。コハク酸についてはいずれの菌株も全て増殖可能であり、TCAサイクルに機能しているものと考えられた。

Fig. 5は、Glc⁻であるK-104およびグルコース利用可能となったK-104の変異株であるK-104Gを用いた時のglucosekinaseおよびgluconokinaseの活性測定結果である。340nmにおけるNAD(P)⁺の還元を測定したものであり、K-104は両酵素ともに全く活性を認めなかった。一方、K-104Gは両酵素活性が認められた。なお、glucosekinaseはK-104G株をグルコース存在下で培養した場合には存在するが、アミノ酸、有機酸で培養した場合にはほとんど認められなかった。

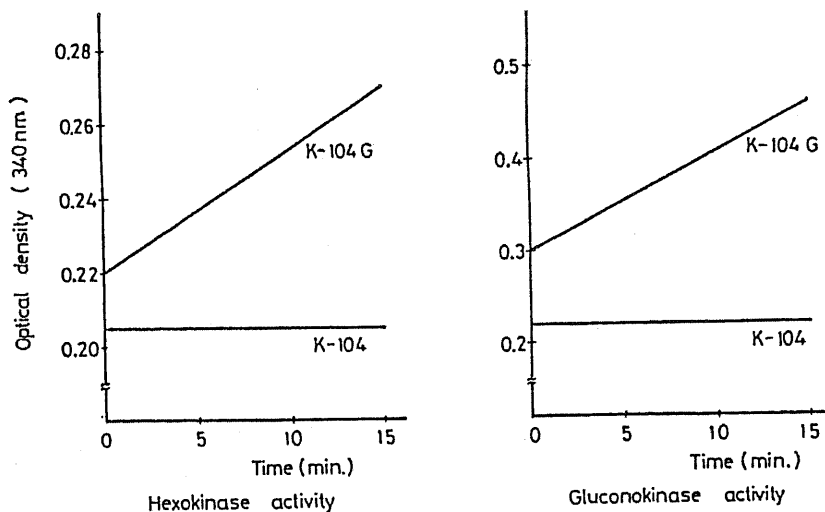


Fig.5. Hexokinase and gluconokinase activities of A.calcoaceticus.

また、K-104株とK-104G株を用いて解糖経路における8種類の炭素源についてその利用能の試験を行い結果をTable 10に示した。両株ともグルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、フルクトース-1,6-ジリン酸、6-フォスフォグルコン酸を炭素源にすることができたが、K-104株はグルコース、グルコン酸を炭素源にできなかった。なお、両株とも2-ケトグルコン酸および2-ケト-6-フォスフォグルコン酸は利用できなかった。

Table 10. Growth of A. calcoaceticus in the presence of various carbon and energy sources.

Substrate	Strain	
	K-104	K-104G
Glucose	0.01	0.30
Gluconate	0.02	0.35
2-Ketogluconate	0.01	0.01
2-Keto-6-P-gluconate	0.02	0.01
Glucose-6-P	0.10	0.10
Fructose-6-P	0.20	0.20
Fructose-1,6-DP	0.45	0.35
6-P-Gluconate	0.08	0.07

Absorbance at 500nm of the cell culture after 20 hr of incubation

2-3 A. calcoaceticus のグルコースによる増殖促進効果の解析

Fig. 6~Fig. 9はGlc⁻株の増殖に及ぼすグルコースの影響をK-104株を使用し、濁度を経時的に測定したものである。炭素源をプロリン、アラニン、アルギニン、グルタミン酸を用いた時、炭素源濃度と同一か1/10の濃度のグルコースの添加によって増殖は著しく促進された⁵⁴⁾。Fig. 6で用いたLMD79.41もGlc⁻株である。

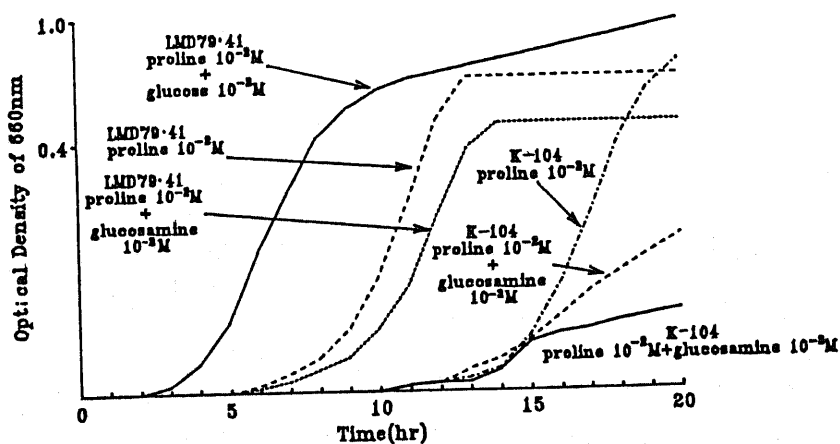


Fig. 6.

Effect of glucosamine and glucose on the growth of A. calcoaceticus K-104 and LMD79.41.

Fig. 7.

Effect of glucose on the growth of *A. calcoaceticus* K-104
(Carbon source, alanine)

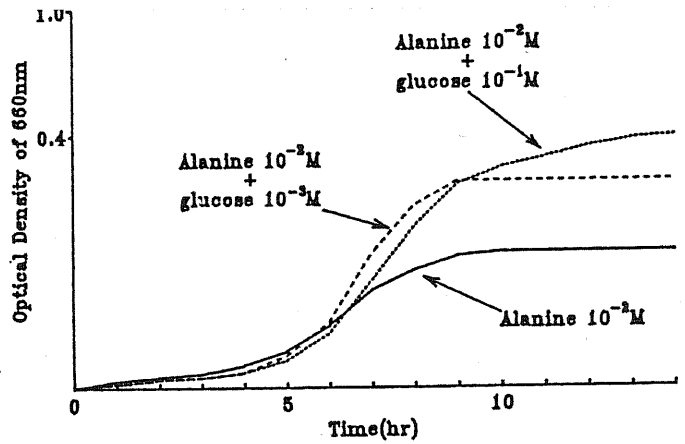


Fig. 8.

Effect of glucose on the growth of *A. calcoaceticus* K-104
(Carbon source, arginine)

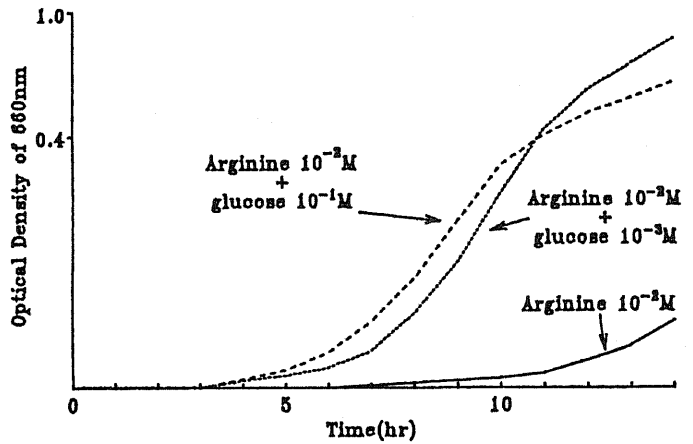
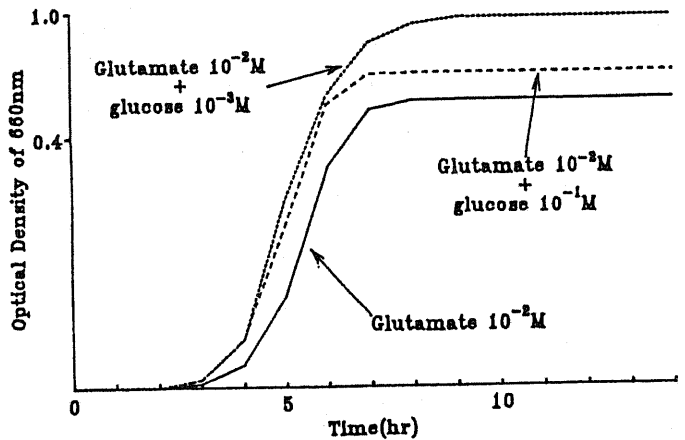


Fig. 9.

Effect of glucose on the growth of *A. calcoaceticus* K-104
(Carbon source, glutamate)



なお、コハク酸を炭素源として同様の実験を行った場合にもグルコースをコハク酸の1/10~1/100濃度を添加することによって著しい増殖促進効果が認められた。一方、K-104はGlc⁻であるので 10^{-1} ~ 10^{-5} Mのグルコースのみを炭素源とする培地では増殖は全く認められない。

またFig. 10にグルコース添加による生菌数の変化を経時的に測定した結果

を示した。グルコース濃度が炭素源のプロリンの1/10でも著しく菌数の増加が観察され、逆にプロリンの10倍濃度のグルコース添加ではプロリン単独での培養よりも増殖の低下が認められた。

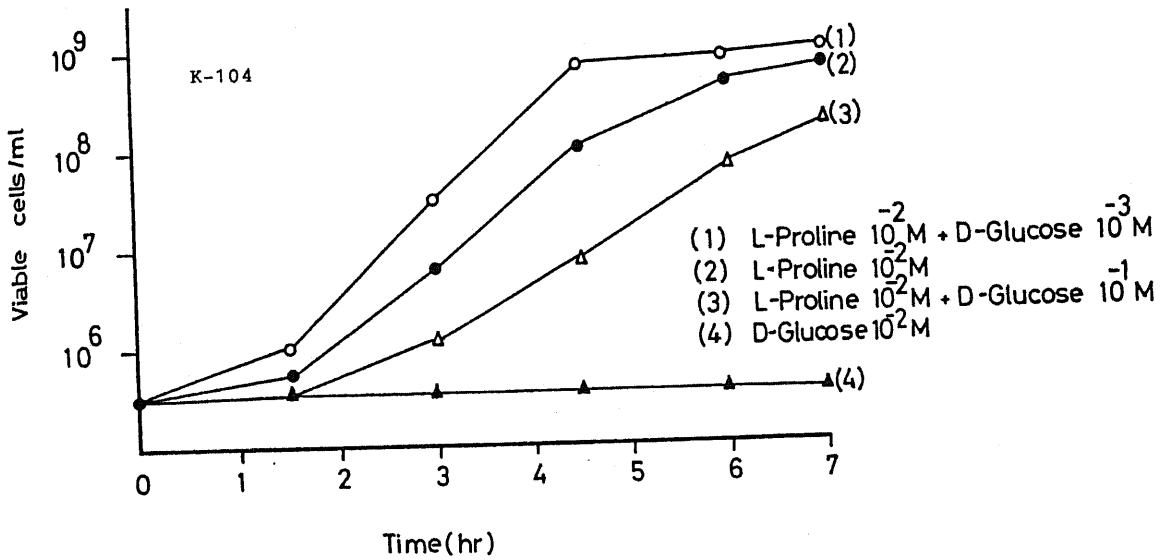


Fig.10.

Effects of the glucose supplement on growth of A.calcoaceticus K-104.

一方、ペントースを炭素源にできない菌株でも、ペントース添加により増殖が促進された。特に培養温度30°Cにおいてもこの現象が顕著であった。しかし、グルコン酸、グルコサミンの添加の場合には増殖は逆に抑制された (Fig. 6)。一方、K-104株より変異剤処理により分離したグルコースデヒドロゲナーゼ (glucose dehydrogenase、以下GDH) の欠損株K-104M株、および臨床材料由来株のOF-株 (グルコースを酸化的に分解できない株、GDH活性の低い株) ではK-104株で見られた増殖促進効果は認められなかった¹⁴⁾ (Fig. 11)。

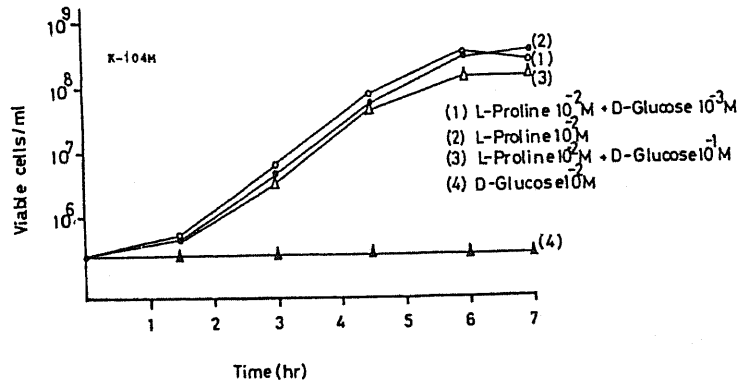


Fig. 11.

Effects of the glucose supplement on growth of A. calcoaceticus.

そこで放射性同位元素で標識された炭素源¹⁴C-プロリンのとり込みに及ぼすグルコースとグルコン酸の影響を調べた。Fig. 12はK-104株とK-104M (GDH欠損株) の¹⁴C-プロリンのとり込みに及ぼすグルコースの影響を示したものである。

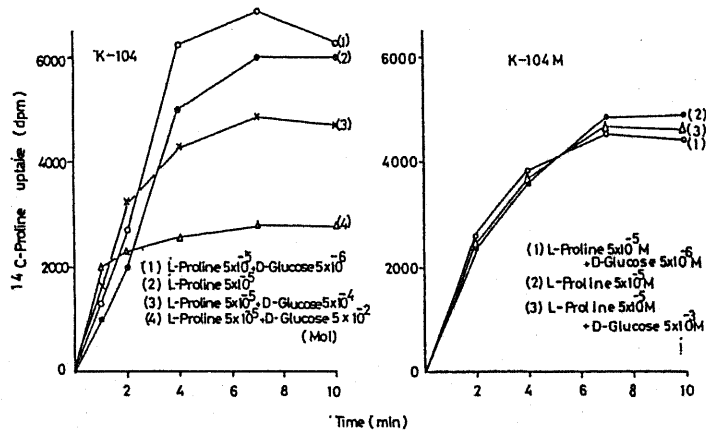


Fig. 12.

Effects of the glucose supplement on growth of A. calcoaceticus.

K-104株の場合、とり込み開始1分までは添加したグルコースの濃度に比例し

てとり込み速度およびとり込み量が増大した。3分以後は、プロリン濃度がグルコース濃度の10倍の時のみ（即ちグルコースは ^{14}C -プロリンの1/10濃度）とり込み量が増大したが、グルコースの濃度がプロリンよりも上回ると逆にとり込み量は抑制された。一方、K-104M株はプロリンのとり込みが添加したグルコース濃度に影響されなかった。しかし、両株とも添加したグルコン酸の濃度に比例して ^{14}C -プロリンのとり込み速度、とり込み量の減少が観察された（Fig. 13）。

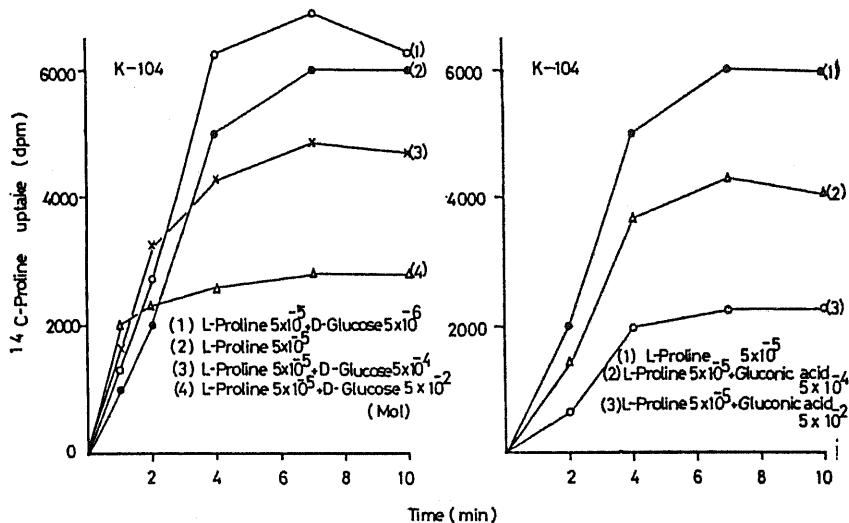


Fig. 13. Effects of the glucose or gluconic acid supplement on the labelled-proline uptake into A. calcoaceticus.

以上の現象は ^{14}C -プロリンだけに限らず、 ^{14}C -コハク酸、 ^{14}C -グルコース-6-リン酸、 ^{14}C -フェニルアラニンを炭素源としたときでも観察された。最大とり込み速度は（ V_{\max} ）プロリン、コハク酸、グルコース、グルコン酸ではそれぞれ $8\mu\text{M}/10^\circ\text{cells}/30\text{sec}$ 、 $15\mu\text{M}/10^\circ\text{cells}/30\text{sec}$ 、 $1\mu\text{M}/10^\circ\text{cells}/30\text{sec}$ 、 $50\mu\text{M}/10^\circ\text{cells}/30\text{sec}$ であった。なお、グルコン酸、グルコース-6-リン酸は、逆に炭素源の排出効果が観察された。Lineweaver-Burk plotで解析した結果の一部をFig. 14に示した。

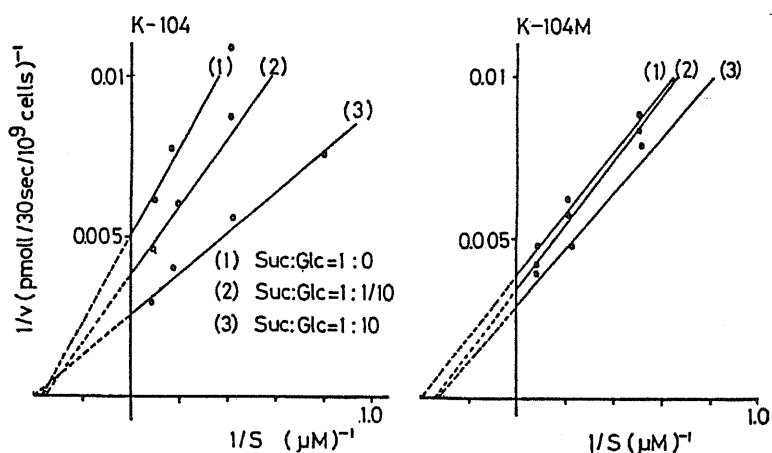


Fig.14. Lineweaver-Burk plot for succinate uptake in the presence of glucose.

K-104株の場合、添加したグルコースの濃度に比例してコハク酸取り込みの V_{max} の増大はみられるが、 K_m 値は一定である。K-104M株では V_{max} 、 K_m 値はグルコースによってほとんど影響を受けていない。グルコン酸を添加した場合には、両株ともに V_{max} が減少したが、 K_m 値は不変であった。これらパラメーターをTable 11に示した。

Table 11. K_m and V_{max} for the uptake of various substrates into A.calcoaceticus K-104.

strain K-104

A \ B	Pro 1	Pro 1 Glc 1000	Pro 1 Glc $\frac{1}{10}$	Pro 1 G acid 1000	Pro 1 G acid 10
V_{max}	1.00	2.00	1.35	0.33	0.48
K_m	2.86	2.50	3.00	3.13	2.60

strain K-104M

A \ B	Pro 1	Pro 1 Glc 100	Pro 1 Glc $\frac{1}{10}$
V_{max}	1.50	1.75	1.56
K_m	2.50	3.33	3.20

V_{max} : $\mu\text{g}/10^{10}\text{cells}/10\text{sec}$

K_m : μM

A : Relative concentration

B : V_{max} and K_m value

次にK-104, K-104Mの持つGDH活性とその局在部位を調べた。GDH活性は605nmにおける2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) の吸光度の減少を10分間追跡することによって測定した。酵素反応は10mMグルコース、200 μM

DCIP、酵素試料を含む3ml50mMリン酸緩衝液中 (pH6.8) で行った。

Hauge等の報告によれば *A. calcoaceticus* のGDHは可溶性のものと膜結合性のものである。そこで Futai⁵⁵⁾、Yamato等⁴²⁾の方法に従い *A. calcoaceticus* K-104 および K-104M株から膜分画1の場合はグリセロールの添加なし、膜分画2の場合はグリセロール添加を行って膜を調製した。その結果、K-104株はwhole cellの場合には4.41units/mg proteinの活性を示し、一方、K-104Mは0.20units/mg proteinでありK-104株の約20分の1に比活性は低下していた (Table 12)。尚、膜の反転を抑えた調製法の膜分画2においては膜分画1よりも高い活性を示し、内膜の外葉にGDHが存在することが推察できた。

Table 12.

GLUCOSE DEHYDROGENASE ACTIVITIES IN WHOLE CELLS AND MEMBRANE FRACTIONS OF *A. calcoaceticus* K-104 AND K-104M

Strains	Fractions		
	Whole cells (units/mg protein)	Membrane fraction 1 (units/mg protein)	Membrane fraction 2 (units/mg protein)
K-104	4.41	0.13	3.83
K-104M	0.20	0.05	0.11

前述のようにGDH活性の低下した変異株や、OF⁻株ではグルコースの増殖促進効果が認められないことからグルコース添加による増殖促進効果とGDHが密接な関連をもつことが考えられた。 *Pseudomonas*属や *Acetobacter*属の多くは、細胞膜の外表層にNAD(P)やフラビンに依存しない脱水素酵素をもっており、アルドース糖を対応する酸に酸化する。これらの酵素はDuine等^{46, 49)}により prosthetic groupを持ち、ピロールキノリンキノン (PQQ) である事が証明されている。そこで彼等の方法に従い、K-104株からGDHを分離精製し、prosthetic groupの検討およびグルコースとの相互作用を調べた。精製過程において膜への結合度と等電点の差異から3種のGDHの存在が認められた。Table 13に酵素Iの精製ステップを示した。Triton X-100抽出後、Sephadex G-75分画までの精製で9倍の比活性の上昇が認められた。

Table 13.

Purification of D-Glucose Dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*

Purification step	Total Protein(mg)	Total activity(units)	Specific activity(units/mg)	Yield(%)
Triton X-100 extract	283.4	15814.8	55.80	100
DEAE-Sephacel elute	33.25	4685.1	140.91	29.6
CM-Sephadex elute	3.125	966.0	309.12	6.1
Sephadex G-75 Elute	0.504	248.4	492.86	1.6

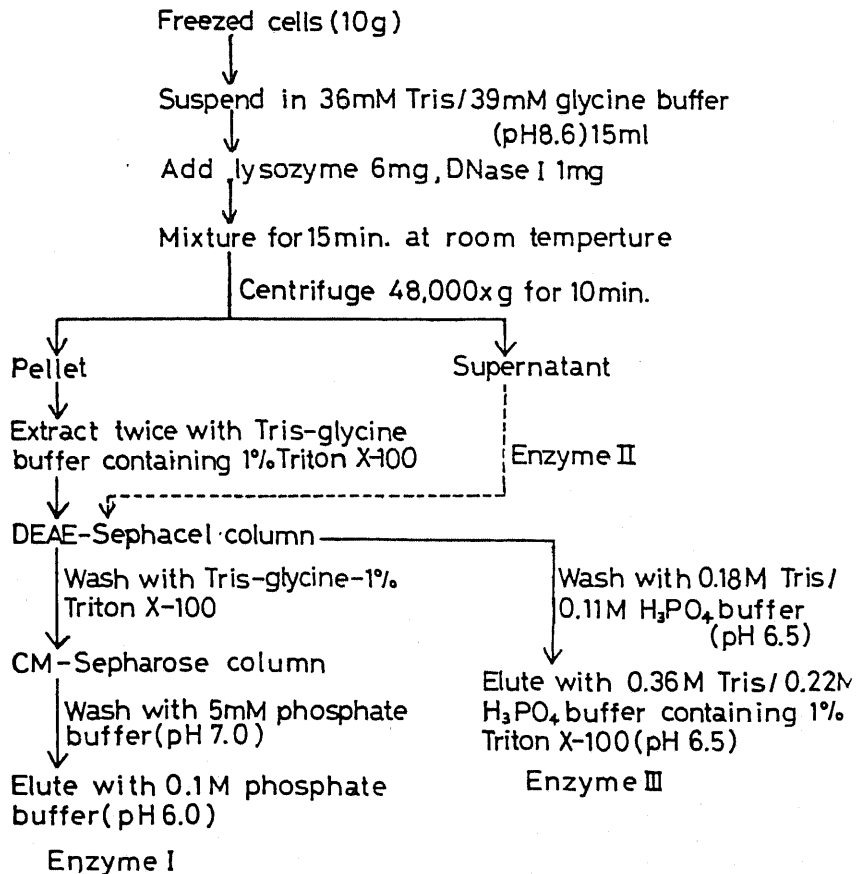


Fig.15. Purification of glucose dehydrogenase from *A. calcoaceticus* K-104.

Duine等の方法に従い、Fig. 15に示したように菌体よりGDHを抽出後、DEAE-Sephacelカラム通過後、CM-セファロースカラムに吸着させ、0.1Mリン酸緩衝液で溶出した。(Fig. 16、17)

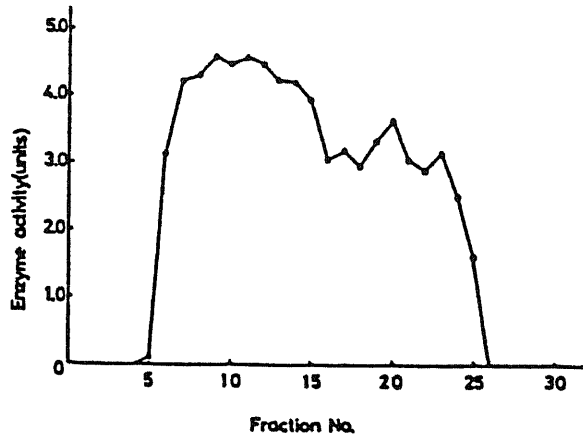


Fig.16. Purification of glucose dehydrogenase from A. calcoaceticus K-104 on DEAE-Sephacel column.

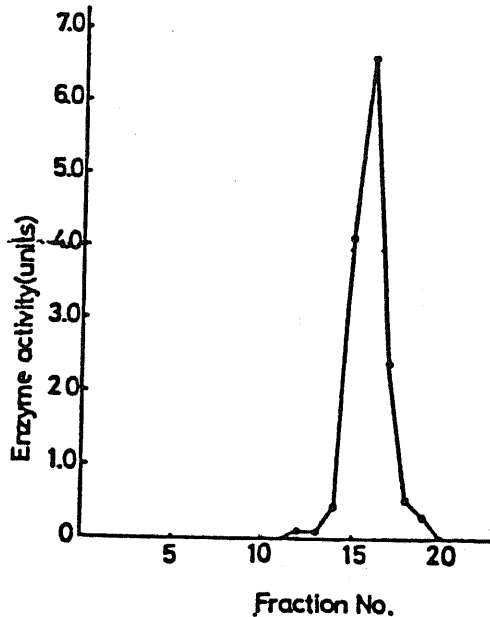


Fig.17. Purification of glucose dehydrogenase from A. calcoaceticus K-104 on CM-Sephadex column.

A. calcoaceticus由来のGDHは広くアルドース糖を非特異的に脱水素し、グルコースに対する活性が最も高く、2種のGDH (Enzyme I及びEnzyme II)の間で基質特異性に若干の差異がみられた (Table 14)。図示していないが、酵素

Ⅲの特異性は酵素Ⅰに類似していた。

Table 14.

Substrate	Substrate specificity Relative activity(%)	
	Enzyme I	Enzyme II
D-glucose	100	100
D-galactose	83	70
D-mannose	40	50
D-ribose	8	4
L-arabinose	56	60
D-xylose	36	32
Maltose	79	70
Lactose	53	26

分子量はSephadex G-75ゲル濾過法により酵素Ⅰは83,000、酵素Ⅱは57,000、酵素Ⅲは90,000と推定され、至適pHは酵素Ⅰ、ⅡともpH6.0~6.5であり、ⅢはpH5.5-6.0であった。pH安定性については、アルカリ側で安定であった (Fig. 18)。

至適温度はⅠが30℃、ⅡおよびⅢが35℃であった。

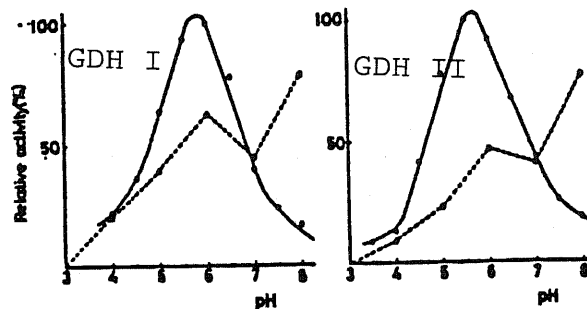


Fig.18. Effect of pH on enzyme activity and enzyme stability. Optimum pH (--), enzyme stability (...)

この酵素は膜結合酵素であるため、界面活性剤の活性への影響を検討した。GDH Iの酵素反応液にTritonX-100を0.0001~0.1%添加しても活性はほとんど変化しなかった (Fig. 19)。カルジオリピン (CL)、フォスファチジルグリセロール (PG)、フォスファチジルコリン (PC) 等の添加によっても活性に大きな変化は見られなかった (Fig. 20)。

Treatment	Relative activity(%)
Control	100
Triton X-100 0.1%	97
Triton X-100 0.01%	110
Triton X-100 0.001%	107
Triton X-100 0.0001%	100
Triton X-100 0.1% + Sonic	93
Triton X-100 0.01% + Sonic	111
Triton X-100 0.001% + Sonic	107
Triton X-100 0.0001% + Sonic	106

Fig.19 Effect of Triton X-100 On the activity of GDH I.

Treatment	Relative activity(%)
Control	100
CL	104
PG	109
PC + Sonic	111
CL + Sonic	102
PG + Sonic	102
PC + Triton X-100 0.01%	108
CL + Triton X-100 0.01%	117
PG + Triton X-100 0.01%	102
PC + Triton X-100 0.01%	110
CL + Triton X-100 0.01% + Sonic	104
PG + Triton X-100 0.01% + Sonic	102
PC + Triton X-100 0.01% + Sonic	110

CL:Cardiolipin,PG:Phosphatidylglycerol
PC:Phosphatidylcholine

Fig.20. Effect of phospholipids on the activity of GDH I.

またGDH活性は、グルコースの濃度が $1.0 \times 10^{-2} M$ を越えると次第に減少し、グルコース濃度が $1 M$ では最大活性の7%になった (Fig. 21)。またグルコースの濃度とGDHの速度の逆数プロットをとり解析すると、GDHのグルコースによる基質阻害の $-K_s$ 値は $5.8 \times 10^{-2} M$ であった (Fig. 22)。

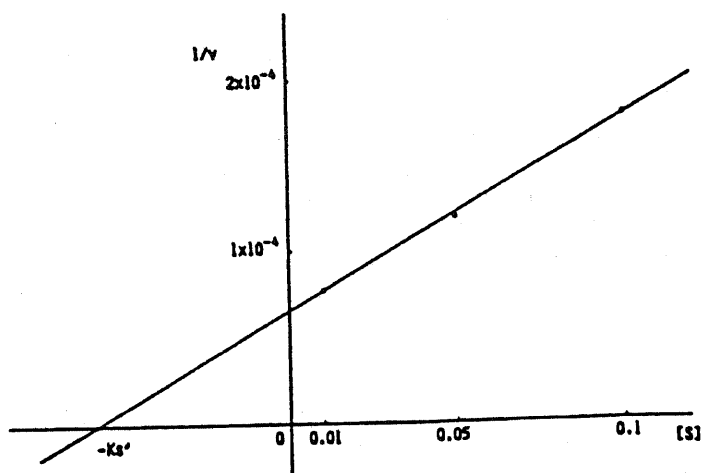


Fig.22. Substrate inhibition by glucose.

Table 15はGDHの反応生成物であるgluconateによる活性阻害をみたものである。Gluconate濃度が、 $5.0 \times 10^{-3} M$ を越えると酵素活性阻害がみられたが、グルコースによる基質阻害より弱く、 $1 M$ 添加時においても56%の阻害であった。

Fig.21. Effect of glucose concentration on GDH activity.

Glucose(M)	Enzyme activity(units)
1.0×10^{-4}	9.32
5.0×10^{-4}	44.51
1.0×10^{-3}	86.94
5.0×10^{-3}	130.41
1.0×10^{-2}	130.41
5.0×10^{-2}	83.84
1.0×10^{-1}	55.89
5.0×10^{-1}	7.30
1.0	6.21

Table 15.

Gluconate conc.	Relative activity
0	100
$1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	91.7
$5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	93.3
$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$	88.3
$5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$	91.7
$1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$	90.8
$5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$	85.8
$1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$	80.0
$5.0 \times 10^{-2} \text{ M}$	73.3
$1.0 \times 10^{-1} \text{ M}$	70.8
$5.0 \times 10^{-1} \text{ M}$	64.2
1 M	44.2

Table 16はグルコース濃度が $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ の時に、GDH阻害剤の1,4-ベンゾキノン(1,4-benzoquinone)を添加し、酵素活性を比較したものである。 $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 添加時で約90%、 $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ で100%の阻害が認められた。なお、EDTAおよび NaN_3 では $1.0 \times 10^{-1} \text{ M}$ でも阻害は見られなかった。

Table 16.

Effect of benzoquinone on GDH activity

1,4-Benzoquinone(M)	Enzyme activity(units)
0	55.27
1.0×10^{-6}	48.85
5.0×10^{-6}	40.57
1.0×10^{-5}	33.33
5.0×10^{-5}	5.80
1.0×10^{-4}	1.45
5.0×10^{-4}	0
1.0×10^{-3}	0

Glucose : $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$

横軸に $1/[S]$ 、縦軸に $1/[V]$ をとり、Lineweaver-Burkのプロットをとると (Fig. 23) X軸上で一点に交わり、1,4ベンゾキノンによる阻害は非拮抗型であった。

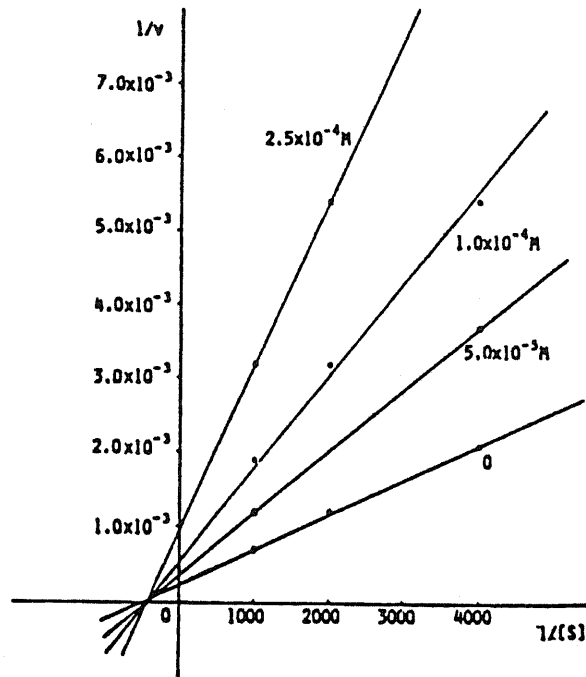


Fig.23. Effect of benzoquinone on GDH activity.

更に1,4ベンゾキノンによりグルコースの増殖促進効果が抑制される事が確認された (Fig.24)。

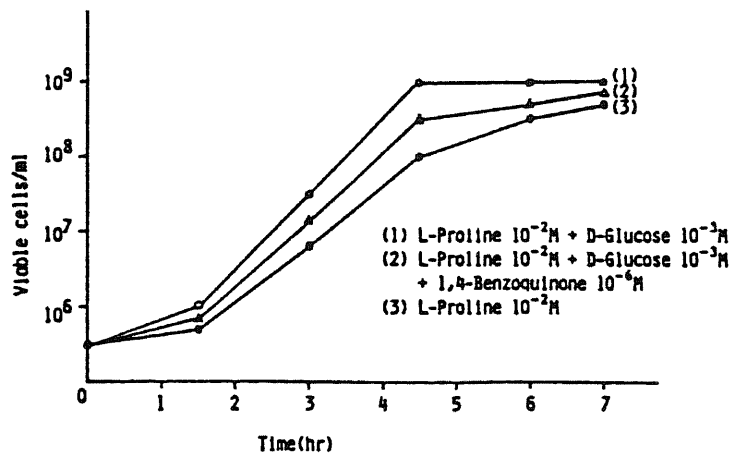


Fig.24. Effect of benzoquinone on glucose supplement.

以上の結果より、グルコースによる増殖促進効果にはGDHが重要な役割をはたしていることが明らかとなった。GDHはすでに述べたように3種類が存在していた。Fig. 25は酵素IIの紫外外部吸収スペクトラムである。酸化型、還元型ともに275nmに吸光があり、還元型はさらに340nmに吸光が生ずるために、補酵素ピロールキノリンキノン (PQQ) の存在が示唆された^{47, 48)}。PQQの酸化型は246nmに特異的な吸光があり、還元型は324nmに吸光が存在する。GDHをアポ化しPQQ分画を添加すると活性は回復した。また、GDH活性欠損株(K-104M)にPQQ分画を添加するとGDH活性の回復が見られた。

またFig. 26には精製したCoQ₀の紫外外部吸収スペクトラムを示し、酸化型は275nmに、還元型は290nmに特異的な吸光が生じた。グルコースの添加でGDHにより脱水素された水素は、人工水素受容体、PMS (フェナチンメタスルフェート), DCIPさらにCoQ₀を還元した。しかし、FAD, FMN, NAD⁺, NADP⁺は水素受容体にはなりえなかった。3種類のGDHともにCoQ₀を還元するが、酵素IとCoQ₀の還元相対速度を1とした時、酵素IIとCoQ₀は0.15、酵素IIIとCoQ₀は0.25と差異が認められた。

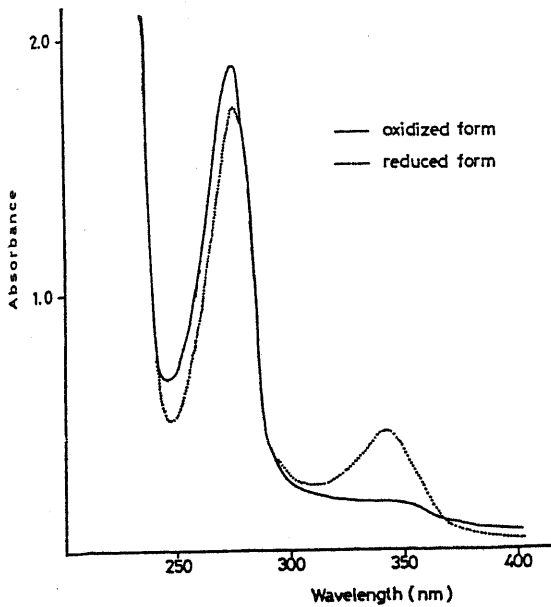


Fig.25. Absorption spectrum for GDH II.

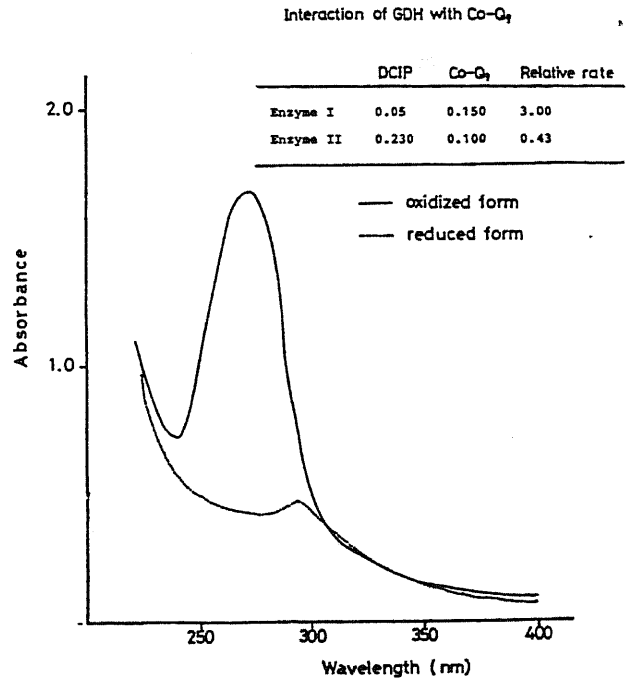


Fig.26. Absorption spectrum for CoQ₉.

GDHとグルコースとの相互作用が増殖の促進に影響している事から次の仮説を立てた。すなわち、内膜結合酵素は、エネルギー産生系の最初の段階であり、NAD⁺脱水素酵素、アスコルビン酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素およびアミノ酸脱水素酵素はすべてFADやFMNを補酵素とする内膜結合酵素である。*A. calcoacet*icusのGDHも上記の酵素類と同様に、エネルギー産生の初期段階に関与していると考えられる。そこでFig. 27に示したように安楽等の開発した浸透圧ショック法⁴¹⁾により調製した菌(shocked cells)と、膜小胞体(membrane vesicle)における、グルコース添加による膜電位、膜内外の Δ pHの変化を測定した。グルコース添加で膜電位、膜内外の Δ pHが形成されたが、グラミシジン(Gramicidin)の添加により消失した。一方、グラミシジンで前処理をした場合、グルコースを添加しても膜電位、膜内外の Δ pHの形成は認められなかった。以上の結果は、グルコースが初発の脱水素酵素により酸化され、チトクローム系を介して高エネルギー産生が行われていることを示し、膜の電位の変化をもたらしたことを示している。Table 17はグルコース、グルコン酸の添加に伴い生成されるATPの量の測定結果である。飢餓細胞ではK-104の場合グルコース添加によ

りATPが約8倍生成される。一方GDH欠損株であるK-104Mではグルコース無添加と比べてわずか1.4倍の生成量であった。

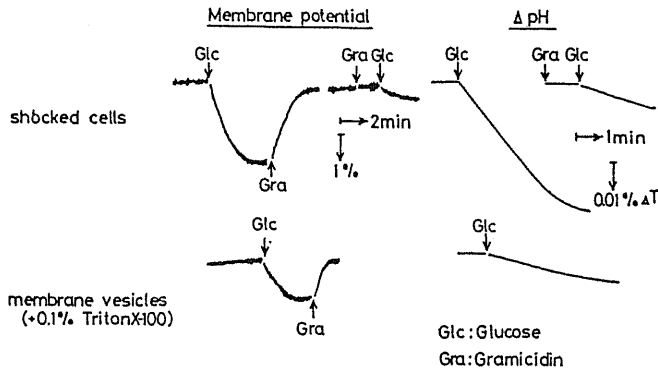


Fig.27. Membrane potential and Δ pH assays.

一方グルコン酸を基質としてATPの産生量を検討したところ、非飢餓、飢餓の両細胞を用いてもATP産生の上昇は認められなかった¹⁴⁾。

更に¹⁴C-プロリン、¹⁴C-コハク酸を用いてK-104、K-104Mの基質とり込み速度に及ぼすグルコース、グルコン酸の影響を調べた。これらの基質が細胞質膜を通過し、能動的にとり込まれるためには、プロトン駆動力を必要とすることが知られている。プロリン、コハク酸のとり込みはグルコース添加でK-104においては約2倍の増加が認められたが、K-104Mではほとんど変化がなかった(Table 18)。また飢餓細胞ではK-104はグルコース添加で約4倍のとり込み増加が認められ、グルコン酸の添加では大きな変化はなかった¹⁴⁾。これらの結果は、グルコース添加によりプロトン駆動力が起り、プロリン、コハク酸が能動的に取り込まれたことを強く示唆している。

Table 17. THE CONCENTRATIONS OF ATP IN STARVED AND UNSTARVED CELLS ON THE ADDITION OF GLUCOSE AND GLUCONATE IN *A. calcoaceticus* K-104 AND K-104M

Condition of cells	Addition	Cellular ATP concentration (nmol/mg protein)	
		K-104	K-104M
Unstarved	None	1.57	1.32
	Glucose (10 mM)	2.25	1.46
	Gluconate (10 mM)	1.46	1.32
Starved	None	0.18	0.28
	Glucose (10 mM)	1.49	0.41
	Gluconate (10 mM)	0.16	0.26

Table 18. INITIAL RATES OF PROLINE AND SUCCINATE UPTAKE WITH THE ADDITION OF GLUCOSE AND GLUCONATE IN *A. calcoaceticus* K-104 AND K-104M

Condition of cells	Addition	Proline uptake (pmol/20 sec/5 × 10 ⁸ cells)		Succinate uptake (pmol/20 sec/5 × 10 ⁸ cells)	
		K-104	K-104M	K-104	K-104M
Unstarved	None	12.5	13.2	25.0	20.1
	Glucose (0.1 μM)	23.4	13.9	41.1	20.3
	Glucuronate (0.1 μM)	11.6	12.1	20.3	18.3
Starved	None	3.4	4.2	6.8	6.1
	Glucose (0.1 μM)	14.4	4.8	23.6	6.5
	Glucuronate (0.1 μM)	2.8	3.9	5.9	5.0

2-4 基質の能動輸送のメカニズム

A. calcoaceticus K-104を用いてプロリンの取り込みに及ぼす呼吸阻害剤、脱共役剤、エネルギー転換阻害剤、イオノフォア等の影響を検討した。菌体を0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁後、¹⁴C-プロリンを5 × 10⁻⁵M添加し、10 μMのCCCP (cyanide m-chlorophenylhydrazine) を0, 2, 5分後に各々の懸濁菌体中に添加した。CCCPの添加により基質の取り込みはストップした (Fig. 28)。

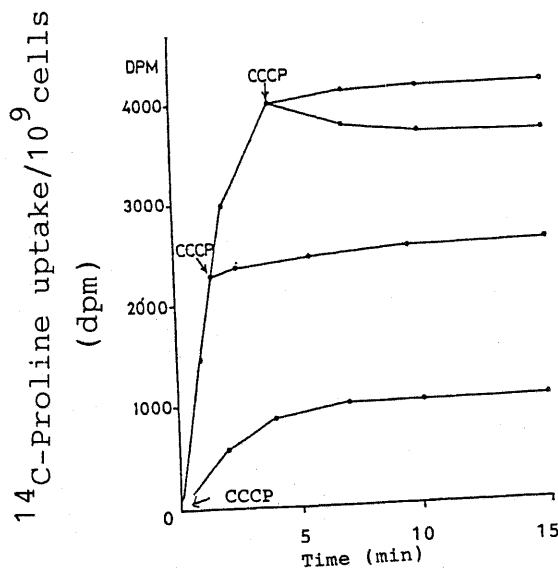


Fig.28. Inhibition of proline uptake by CCCP.

一方、基質により取り込み様式の差異がみられた(Fig. 29)。 ^{14}C -プロリン、 ^{14}C -コハク酸の取り込み時のLineweaver-Burk plotより明らかなように、プロリンの見かけの K_m 値は $2.1\ \mu\text{M}$ 、 $28.6\ \mu\text{M}$ と2種が存在するが、コハク酸は $18.5\ \mu\text{M}$ であった。また、浸透圧ショック法で処理した菌株の場合、プロリンの取り込みにおいては V_{max} の減少であり、 K_m 値は一定であった。コハク酸の取り込みは、ほとんど影響をうけなかった(Fig.30)。

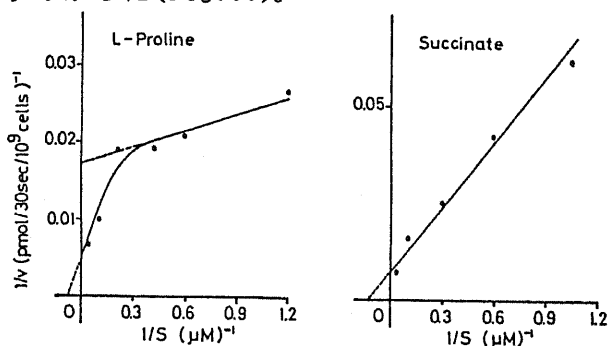


Fig.29. Lineweaver-Burk plot for proline or succinate uptake in *A. calcoaceticus* K-104.

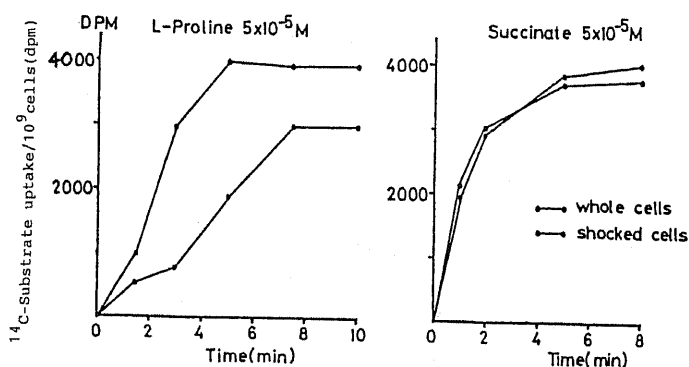


Fig.30. Proline or succinate uptake into whole cells and shocked cells.

トリブチルチン (Tributyltin) 耐性株として分離したK-104の ATPase欠損株 (K-104A)では、プロリンの細胞内取り込みは低下するが、コハク酸の取り込みはほとんど変化を受けなかった。Table 19には親株K-104、変異株K-104Aのグルコース添加時および非添加時における呼吸活性、細胞内外のpH変化、細胞内ATPの生成量を示す。尚、K-104、K-104AのGDH活性は各々4.40、4.65unit/mg p proteinであり、飢餓状態の細胞にグルコースを添加すると両株で酸素消費、pH変化が同程度で起った。グルコース添加によりK-104ではATP合成の増加がみら

れたが、K-104Aではグルコース添加によってもATP産生は変化しなかった。以上の結果から、プロリン、コハク酸は能動輸送の系を介して菌体内に取り込まれることを強く示唆している。

Table 19. RESPIRATION ACTIVITY, pH CHANGE AND GENERATION OF CELLULAR ATP IN THE PRESENCE OF GLUCOSE

Addition	Respiration ^a		pH change ^b		Cellular ATP ^c concentration	
	K-104	K-104A	K-104	K-104A	K-104	K-104A
None	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.18	0.26
Glucose	203	236	12.4	14.0	1.49	0.37

N.D., not detectable.

^a Glucose (1 mM) was added in this experiment. Data are expressed as μg of O atoms per mg protein.

^b Glucose (10 μM) was added in this experiment. Data are expressed as nmol of H⁺ per mg protein per min.

^c Glucose (100 nM) was added in this experiment. Data are expressed as nmol of ATP per mg protein.

2-5 要約および考察

第2章においては、本菌がグルコースを唯一の炭素源として利用できない原因と炭素源（アミノ酸、有機酸）等を含む最少培地に、グルコースを少量加えた時に増殖の大幅な増強が認められた原因を解析した。第1章に続き、被験菌株数を臨床分離株1,000株に増加して炭素源利用能の調査を行った。1,000株中、唯一の炭素源としてグルコースを利用でき、増殖可能な菌株はわずか46株（4.6%）であり、大多数の菌株はグルコースを炭素源とすることができなかった。この原因は、hexokinaseおよびgluconokinaseの低活性または活性がないことによるものであった^{14, 53}。このことはグルコース代謝経路の中間代謝物であるグルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、フルクトース-1,6-ジリン酸を唯一の炭素源とする最少培地では増殖できる事と矛盾しない。一方、Glc⁻株から変異剤処理により得られたGlc⁺（K-104G）は上記の両酵素活性を示した。この事実は両酵素の遺伝子はGlc⁻株においては存在しているが、発現されていないことを示している。このような性質は多くのA. calcoaceticusに共通のものと考えられる。一方、唯一の炭素源としてアミノ酸、有機酸等をStanierの最少培地に添加し、その1/10~1/100濃度のグルコースを添加すると基質のみの時の増

殖に比べて増殖促進（生菌数、濁度とも）が認められた。この結果はグルコースを炭素源と出来ないにもかかわらずグルコースが何らかのエネルギー代謝に影響を与えることが考えられた。1つの可能性として、グルコースが脱水素され、糖質電子伝達系が活動することを予測した。しかし、グルコースの濃度が基質のアミノ酸の10~100倍濃度の場合には、逆に増殖抑制的に働いた。この結果の解釈としてグルコースの酸化により多量のグルコン酸が生成し、基質の細胞内への輸送の障害が考えられた（Fig. 14、Table 11）。一方、グルコースの代わりにグルコサミンを等量あるいは1/10量加えた場合には増殖促進は認められず、むしろ抑制的に働いた（Fig. 6）。従って、グルコースが脱水素（酸化）されていく過程が、本菌のエネルギー獲得の重要な第一歩であることが推察できる。K-104株から突然変異により分離したGDH欠損株（K-104M）ではグルコースによる増殖促進効果は起こらなかったことから上記の推察が支持される。さらにFig. 12に示した¹⁴C-プロリンの細胞内取り込み結果もこの推察を支持する¹⁴⁾。

K-104株からGDHを分離し、その酵素活性を測定したところ、内膜画分の外葉に存在し、物理化学的性質の異なる3種のGDHの存在が判明した。また、これらのGDHにより脱水素された水素は、人工水素受容体PMS、DCIP等を還元したが、FAD、FMN、NAD⁺、NADP⁺は水素受容体とはなり得なかった。GDH酵素の阻害剤として知られている1,4-ベンゾキノンを用いてin vitroでの酵素阻害を検討したところ、グルコース（基質）が $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ の場合、1,4-ベンゾキノン $5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ で90%、 $5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ で100%の活性阻害が認められた。その阻害機構は、非拮抗型であった⁵⁴⁾。生菌体レベルではグルコース 10^{-3}M およびプロリン 10^{-2}M を炭素源とする増殖促進に 10^{-6}M の1,4-ベンゾキノンを添加すると、このグルコースによる促進傾向が抑制された⁵⁴⁾。

GDHは、グルコースを脱水素し、電子はCoQ₀に渡されチトクローム系へ入り、ATPを産生する（Fig. 27、Table 17）。本菌種のこのような性質がグルコースはエネルギー源として利用されるが、炭素源とはなり得ない理由と考えられる。

第3章 Acinetobacter calcoaceticus の糖利用能と溶血性について

序

前章のTable 9に示したように臨床材料由来のA. calcoaceticus 1,000株のうち95株は羊血液寒天培地で溶血性を認めた。この中で54株はOF⁺（グルコースの酸化がoxydative かfermentiveか）の性質を示し、41株はOF⁻の株であった。トリプトソイ寒天培地（5%羊血液を含む）上での溶血は、 β -溶血を示すものが圧倒的 majority であり、30°Cよりは37°Cでの溶血が鮮明であった。溶血性は菌の病原性発現とも関連が考えられるため、本章では溶血性菌株の糖利用能と溶血性との関連および溶血の本体の解析を行った。同時に溶血株のグルコースによる増殖促進効果についても検討を行った。さらに非溶血株から溶血株の変異株の分離を行い、糖利用能、増殖促進効果等との関連を調べた。

3-1 実験材料ならびに方法

1) 変異株の分離法

非溶血性のA. calcoaceticus 2001よりNalidixic acid(nal)およびrifampicin(rif)耐性株を分離した。この両耐性マーカーを持つ2001(nal^r, rif^r, Hemo lysis⁻)を親株としてNTG処理(100 μ g/ml, 30分 37°C)により溶血性変異株の分離を行った。NTG処理菌をグルコース 10^{-2} M, キシロース 10^{-2} MおよびAB-PC 200 μ g/ml含むStanierの培養液中で、72時間ゆっくりと振盪培養した。これを5%羊血液を含むトリプトソイ寒天培地上に塗布し、37°C 20時間培養を行い、溶血環を示すコロニーを選択した。

2) 放射性グルコース-6-リン酸のとり込み試験

100mlの菌培養液（Stanierの最少培地に 10^{-2} Mプロリン添加）を3,500rpmで冷却遠心分離し、菌体を0.1Mリン酸緩衝液（pH6.8）で2回洗浄後、同緩衝液で0. D_{500nm} 3.0になるように懸濁した。菌液にCMを150 μ g/mlになるように添加した。菌液を2分し、その1分にグルコース 5×10^{-6} Mと¹⁴C-グルコース-6-リン酸 5×10^{-6} Mを加え、他には¹⁴C-グルコース-6-リン酸 5×10^{-6} Mのみを加えた。これらの

菌液を30°Cでインキュベートし、一定時間毎に100 μ lずつサンプリングし、0.45 μ m pore sizeのミリポアフィルターに菌体を集め、冷却リン酸緩衝液で洗浄、乾燥後、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

3) 膜面分の調製

A. calcoaceticus237を1 lの普通ブロスで37°C6時間培養後、4°Cにて集菌し、50mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.8) で2回洗浄した。この菌懸濁液を超音波処理し、4°Cにて10,000xgで冷却遠心分離後、上清を105,000xgで超遠心分離した。この沈査面分を55% (W/W), 41.7%, 24%, 15%のDiscontinuos gradient (sucrose) さらに55~25%のSucrose densify gradientで51,000xg18時間の超遠心分離を行い、内膜と外膜を分離した。溶血活性は、50 μ moleのp-ニトロフェニルフォスフォルコリンを基質とし、遊離するp-ニトロフェノールを410nmの吸光度で測定した^{59, 60)}。SDS-PAGEは常法に従って行い蛋白質の定量はLowry法⁶¹⁾を用いた。

4) 電顕試料作成法は、第1章の項で述べた方法で行った。

3-2 非溶血株より溶血株の分離

Fig. 31に示した方法に従いA. calcoaceticus 2001(nal^r, rif^r, Hemolysis⁻)をニトロソグアニジン処理 (100 μ g/ml) し、ペニシリンスクリーニング法により溶血変異株の分離を試みた。AB-PC 200 μ g/ml含有最少培地にグルコース10⁻²M、キシロース10⁻²Mを添加し、72時間振盪培養した。菌液を5%羊血液を含むトリプトソイ寒天培地に塗布し、37°C 20時間培養後、溶血性のコロニーを選別した。

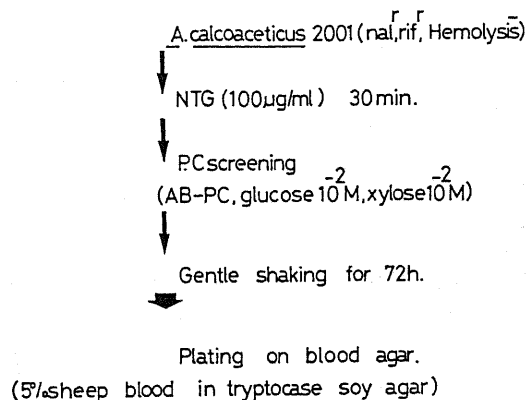


Fig.31. Screening method for mutant strain.

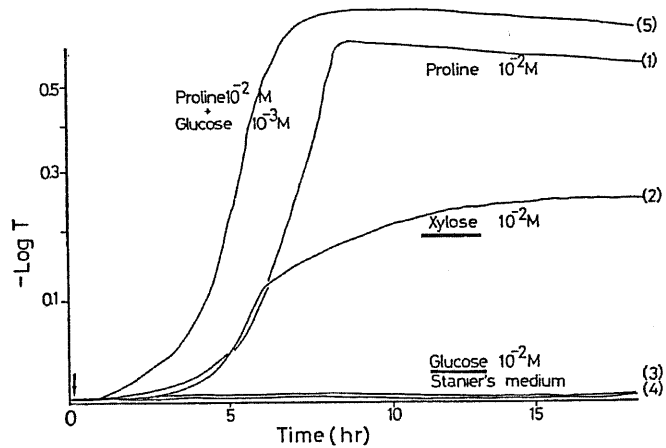


Fig.32. Growth of *A.calcoaceticus* 2001.

Fig. 3 2 は親株2001株の増殖を示したものである。この菌株は、グルコース利用不能株であり、グルコース 10^{-2} M存在下で約20時間培養を続けても増殖は見られない。しかしキシロース 10^{-2} M存在下では増殖可能であった。前章で詳述の様に、プロリンを唯一の栄養源とした時にグルコースによる増殖促進は、2001株でも認められた。キシロース 10^{-2} Mを唯一の炭素源として増殖させた時には、その最大増殖レベルは、プロリンの場合の約60%であり、それ以上の増殖は認められなかった。グルコースを炭素源とした場合および炭素源を含まないStanierの最少培地の場合 (Fig. 3 2、(3)(4)) 全く増殖は認められなかった。以上の結果よりグルコースを炭素源とできない非溶血株でも、グルコースによる増殖促進効果が認められ、キシロースのような五炭糖は炭素源として利用可能であった。

一方、*A.calcoaceticus* 2001より変異剤処理により分離された溶血性変異株2001H⁺について同様の検討を行ったところ、Fig. 3 3 に示す結果が得られた。

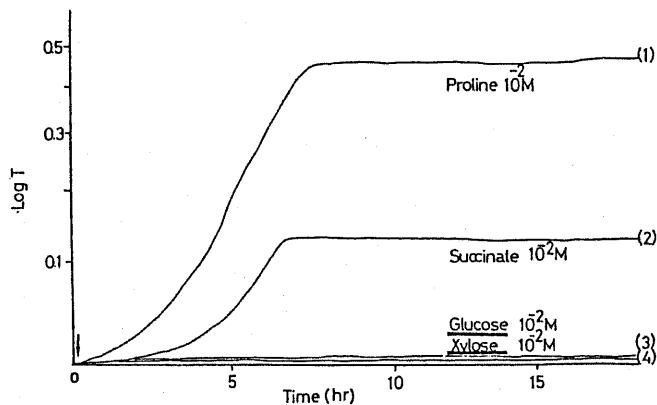


Fig.33. Growth of *A.calcoaceticus* 2001 H⁺.

すなわち溶血株2001H⁺はグルコースだけでなく、キシロースも炭素源として利用できなくなった。しかし、親株同様プロリン、コハク酸等は唯一の炭素源として利用できる。また、グルコースによる増殖促進効果も認められた。

以上の溶血性変異株の性質は、第2章Table 9に示した溶血性臨床分離株(95株)がグルコースもペントースもともに利用できない事実とよく一致する。即ち非溶血株が溶血性変異した場合、グルコース、ペントースともに炭素源として利用不能となる。またL-アラビノース、D-リボース等も利用不能となることも確認した。

次に溶血株95株(OF⁺ 54株、OF⁻ 41株)のグルコース-6-リン酸のとり込み試験を行った。方法は、Fig. 34に示すように行い、安楽等⁴¹⁾の方法に準じて行った。

その結果、1017(OF⁺)では、¹⁴C-グルコース-6-リン酸(以下¹⁴C-G-6-Pと略す)5×10⁻⁶M存在下で、2、5、10、15、20分後のとり込みを測定したが取り込み量は低く、15分後には逆に排出効果が見られた。この系にG-6-Pの1/100濃度比のグルコースを添加した時には、¹⁴C-G-6-Pのとり込みが増加し、10分後の比較では、グルコース非存在下の約3倍以上の¹⁴C-G-6-Pのとり込みが認められた(Fig. 35)。一方、1017から得た変異株1017 OF⁻(GDH変異株)を用いて同様

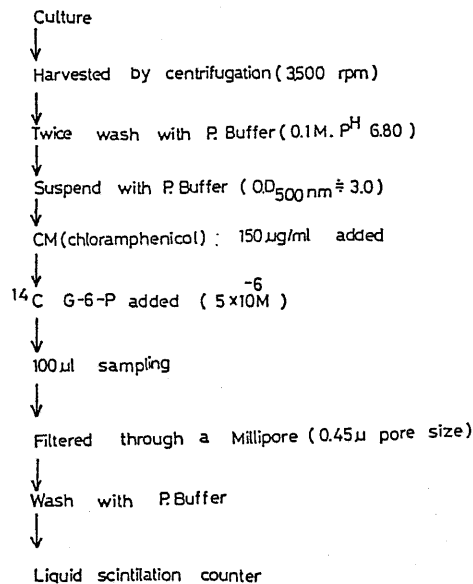


Fig. 34. ¹⁴C-Glucose-6-phosphate uptake method.

の測定を行ったところ、Fig. 36に示すように¹⁴C-G-6-Pのとり込みは、グルコースの存在下、非存在下で大きな差異は認められなかった。

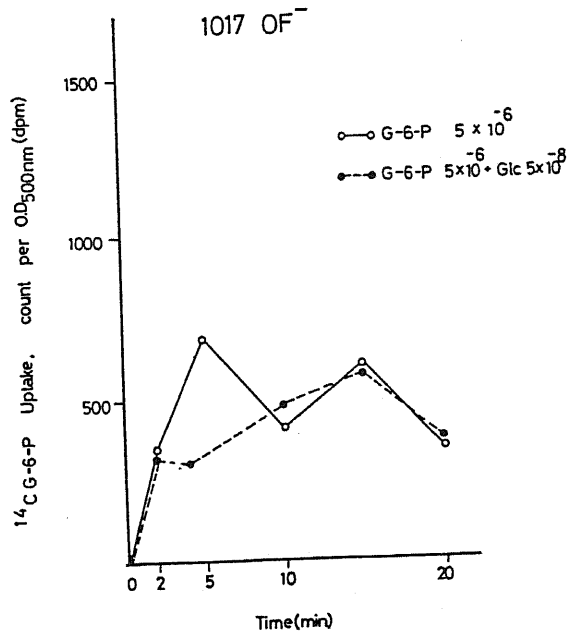


Fig.35. Effect of glucose supplement on G-6-P uptake in strain 1017.

以上の結果は溶血株においてもグルコースによる能動輸送系の促進が起ることを示唆している。

1017 OF⁺、1017 OF⁻の両菌株を用いてStanierの最少培地中にG-6-P (10^{-2} M)を唯一の炭素源として、増殖を測定した。Fig. 37、38に示すように1017 OF⁺ではG-6-Pに対しグルコースを1/10濃度添加した場合、その増殖は促進され、増殖の立ち上がりの短縮が観察された。

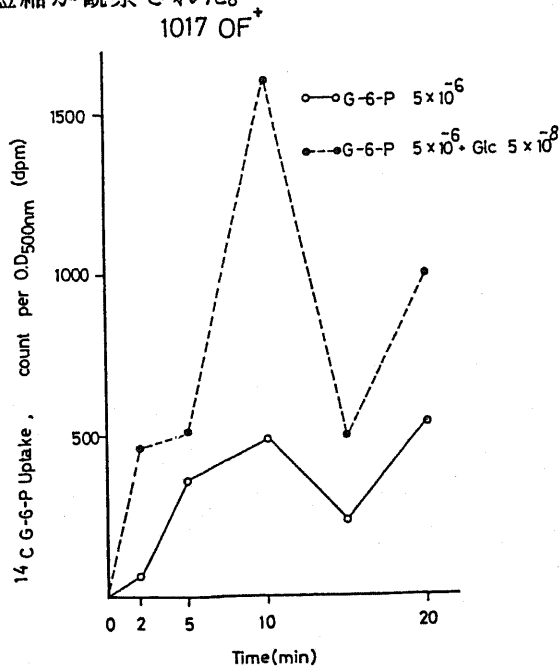


Fig.36. Effect of glucose supplement on G-6-P uptake in strain 1017.

次に非溶血性の *A. calcoaceticus* 2001株および、2001由来の変異株である2001H⁺の形態的特徴を電子顕微鏡により検討した。写真3(a)(b), 写真4(a)(b)に示すように、超薄切片像から本菌のグラム陰性菌の特徴が観察され、両株とも厚いペプチドグリカン層で覆われており、溶血株(写真3)は外膜の外側に突起様のものが多数観察された。一方、非溶血株はペプチドグリカンと内膜との間が大きく空間を保ち、第1章で観察されたGlc⁻株の特色をよく示していた。また外膜はいずれも波状を示していた。

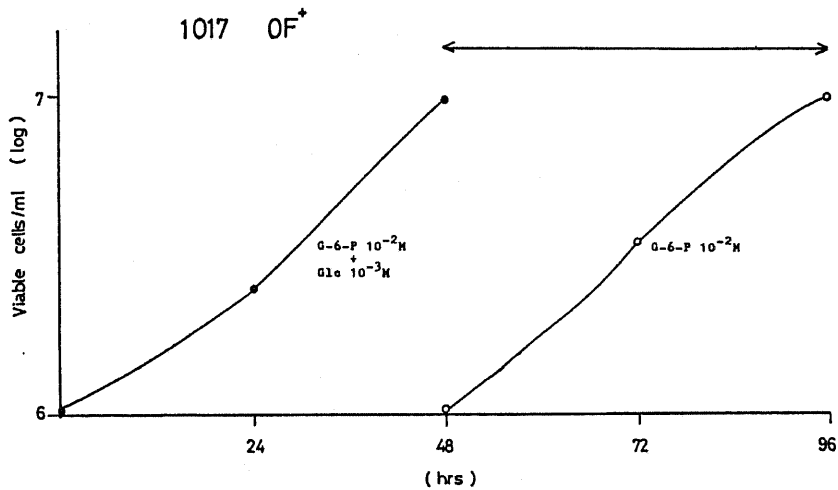


Fig.37. Effect of glucose on growth of *A. calcoaceticus* 1017 OF⁺.

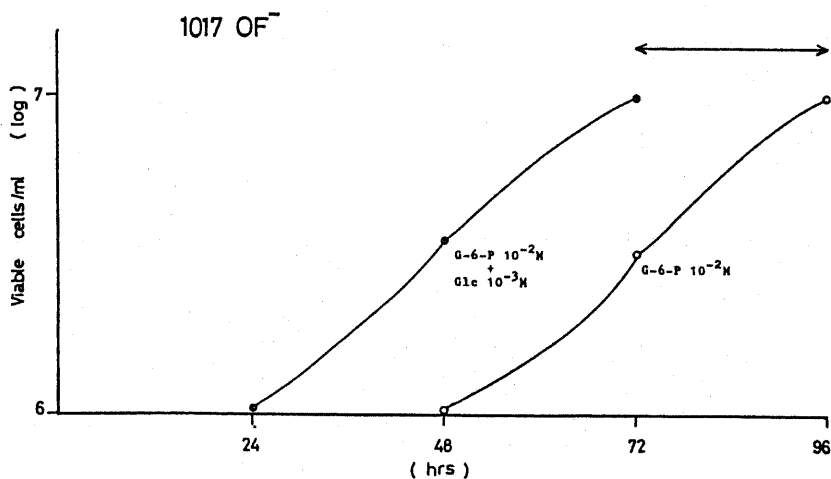
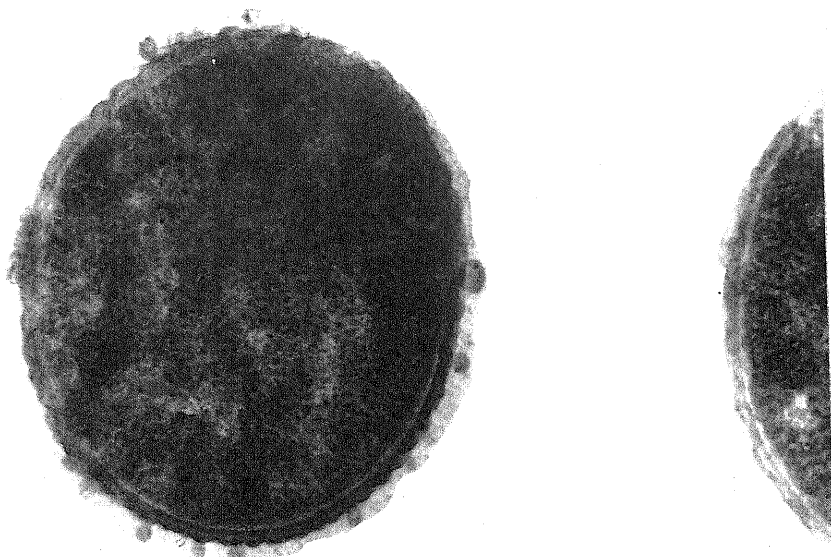


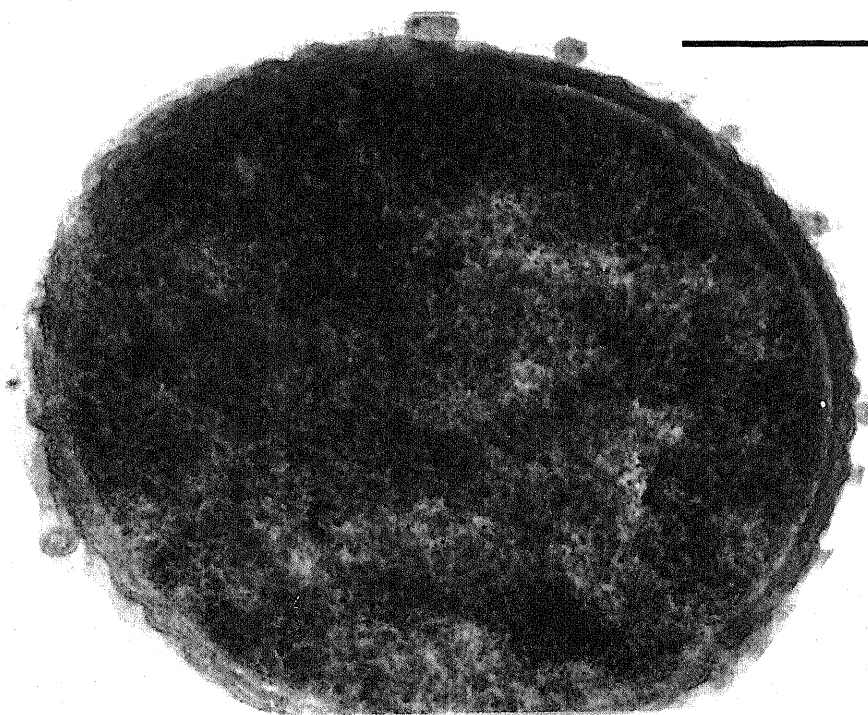
Fig.38. Effect of glucose on growth of *A. calcoaceticus* 1017 OF⁻.

oto.3.

(a)



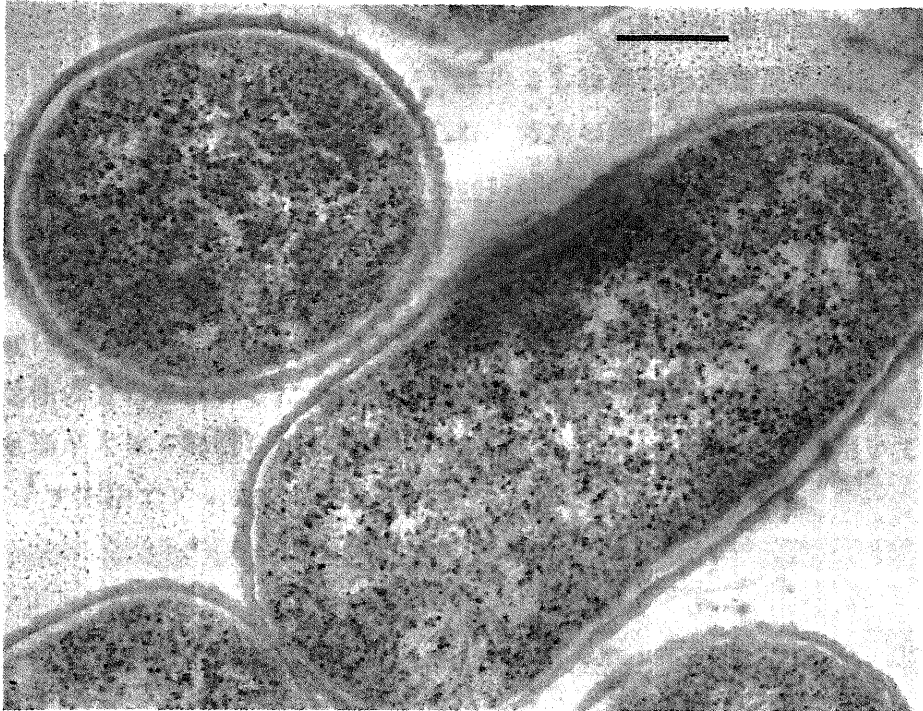
(b)



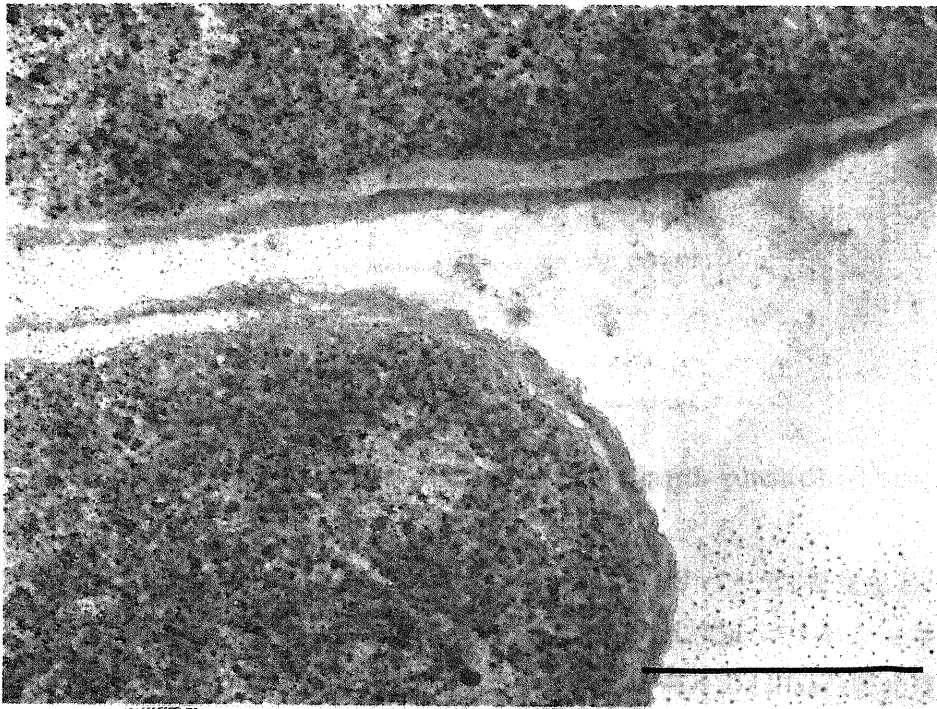
Transmission electron micrographs of A.calcoaceticus 2001 H⁺ strain (a) ,(b). Bars represent 200 nm.

photo.4.

(a)



(b)



Transmission electron micrographs of A. calcoaceticus 2001 H⁻ strain (a),(b). Bars represent 200 nm.

A. calcoaceticusの溶血株の多くは羊血液寒天培地上で、典型的な β -溶血反応を示すが、この溶血の機構を検討した。緑膿菌や多くの腸内細菌では溶血反応を呈する菌種が多数報告されている^{62, 63}。中でも緑膿菌の溶血反応は、その病原性との関連において多くの報告がみられ、溶血の原因がフォスホリパーゼであるが明らかにされている。A. calcoaceticusによる溶血の原因として1977年にFinnerty等^{67, 68, 69}が、フォスホリパーゼAを報告している。彼らはA. calcoaceticusの外膜画分に本酵素活性が存在することを観察している。著者は、Finnerty等の方法にならって菌体外、外膜、内膜、菌体内部の各分画における溶血活性の分布を検討した。溶血株95株中、寒天平板上（血液寒天培地）で最も溶血環が大きく鮮明な溶血斑を形成したA. calcoaceticus 237を用いてFig. 39に示す方法でフォスホリパーゼ活性を測定した。

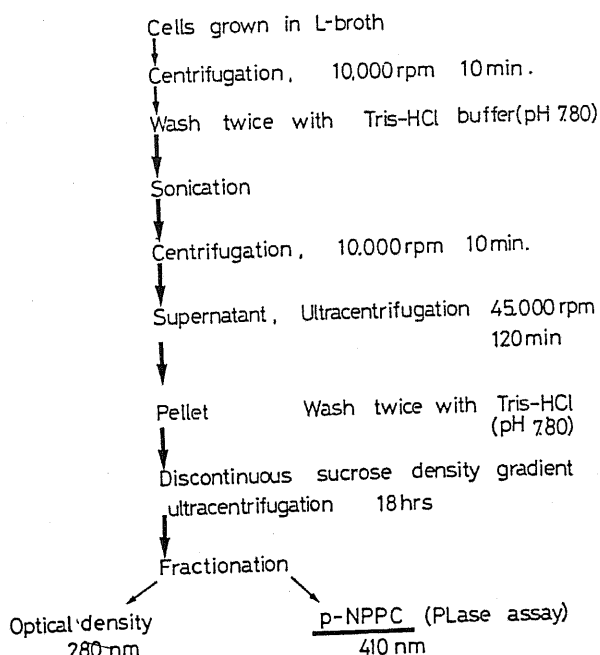


Fig.39. Methods for membrane isolation and phospholipase assay.

その結果、本菌はFinnertyの報告とは異なり、フォスホリパーゼCを産生し、その活性は主に外膜画分に存在した (Fig. 40)。基質としてp-ニトロフェニルフォスホリルコリンを用いて遊離するp-ニトロフェノールの410nmの吸光度の上昇を観察することにより各フラクションの活性を検討した。その結果、Fi

g. 40 に示すように外膜画分に主要な活性が認められ、菌体外にはごくわずかしか認められなかった。

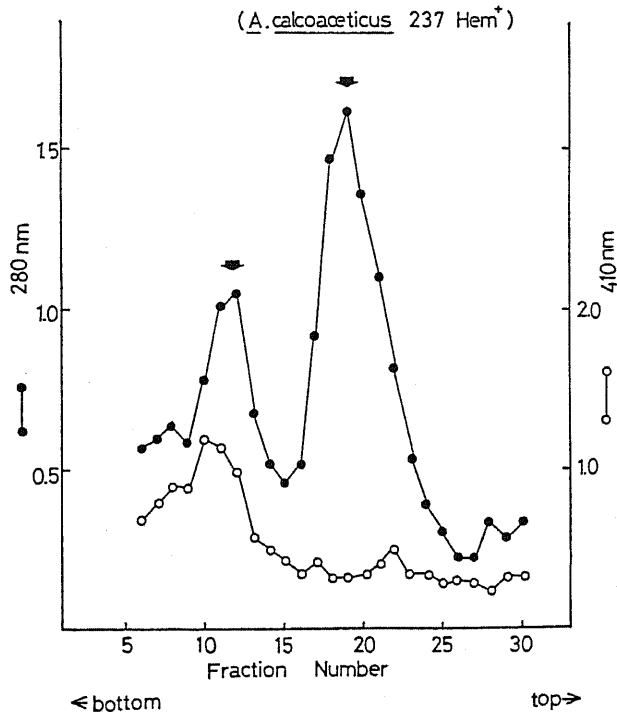


Fig.40. Discontinuous sucrose gradient centrifugation of membranes and phospholipase C activity.

3-3 要約および考察

臨床分離 *A. calcoaceticus* 1,000株の中に5%羊血液寒天培地上で溶血性を示す菌株が95株存在した。これらの菌株は37°Cにおいてβ溶血を示し、グルコース、キシロースのいずれも利用できなかった。またL-アラビノース、D-リボース等も利用できなかった。

また溶血性を示さない菌株からニトロソグアニジン処理により得た溶血性変異株はグルコース、キシロースのいずれも利用することはできなかった。しかし、この変異株はプロリン、コハク酸などを唯一の炭素源として増殖した時、その1/10~1/100濃度比のグルコースの添加で増殖促進効果が認められた。このことはさらに¹⁴C-G-6-Pのとり込み実験によっても確認された。すなわち、¹⁴C-G-6-P 5×10⁻⁶M存在下に1/100濃度比のグルコースを添加した時、グルコース

非添加と比べて ^{14}C -G-6-Pのとり込み促進がみられた。さらにG-6-Pを唯一の炭素源とした時に、溶血株(1017, OF⁺)の増殖に及ぼすグルコースの影響を検討した結果、グルコースの添加により著しい増殖の促進が認められた⁷⁰⁾。

これらの結果は、溶血株(OE⁺)においても第2章で述べたようなグルコースによる促進効果が働き、能動輸送の活性を高めているものと推察できる。

一方、溶血株は、電子顕微鏡による超薄切片像で観察すると以下のような特徴がみられた。グラム陰性菌特有の3層構造(内膜、ペプチドグリカン、外膜)が観察され、厚いペプチドグリカン層で覆われており、外膜の外側にbleb(突起)様構造が多数観察された。これに対し、非溶血株では突起様構造のものはほとんど認められず、ペプチドグリカンと内膜に空間が観察された。さらに外膜面分にフォスホリパーゼC活性が認められ、溶血性はこの酵素の作用と推察された。電顕観察においてみられたbleb様構造は溶血株に特異的に観察され、このフォスホリパーゼCの局在部位との関連が考えられる

第4章 Escherichia coli におけるグルコースによる増殖促進効果

序

前章までの研究により、A. calcoaceticusの多くの菌株が唯一の炭素源としてグルコースを代謝利用できず、その原因はglucosekinase、gluconokinaseの著しい低活性による事を明らかにした。しかし、グルコース非利用株より突然変異により利用株が容易に出現する事実より、両酵素を支配する遺伝子は非利用株でも存在しているが、発現が抑制されていることが考えられた。一方、唯一の炭素源としてアミノ酸、有機酸を用いた場合、少量のグルコース添加により非利用株で著しい増殖促進効果が認められる。本章ではこのような現象がA. calcoaceticusのみではなく E. coliにおいても存在するか検討した。

4-1 実験材料ならびに方法

1) 使用菌株

臨床材料により分離されたグルコース非利用株E. coli KY02を使用した。E. coli ZSC 112L (gpt-2、mpt-1、glk-7、strA、Lac⁺)はChicago大学Curtis博士より分与されたものを用いた⁷¹⁾。この菌株はglucosephosphotransferase(gpt)、mannosephosphotransferase(mpt)、glucokinase(glk)の欠損変異株である。

2) 培地

最少培地としてStanierの最少培地を用い、生菌数の測定にはHeart Infusin Agar (ニッスイ)を用いた。膜面分調製時の菌の培養には、ペプトン-グリセロール培地を使用した。

ペプトン-グリセロール培地

ペプトン 10g

グリセロール 3g

KH₂PO₄ 3.2g

NaCl 3g

MgCl₂·6H₂O 0.2g

(pH7.2)

3) 各種酵素活性は第2章で述べた方法で測定した。

4) 増殖測定

最終濃度 $0, 10^{-1} \sim 10^{-4} \text{M}$ のグルコースおよびプロリンの種々の組み合わせを含む培養液に、 $2.3 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ の菌量を接種し(全量5ml) 37°C 12時間振盪培養後、生菌数を測定した。同様にしてプロリン 10^{-2}M の場合の生菌数を経時的に測定した。

5) ^{14}C -プロリンのとり込み実験

10^8 cells/ml の細胞を懸濁したStanierの最少培地に、 $\text{CM } 40 \mu\text{g/ml}$ を添加し、 25°C で3分間のプレインキュベーション後、 ^{14}C -プロリンを添加した。以後、経時的に菌液をサンプリングし、液体シンチレーションカウンターで菌体内への ^{14}C -プロリンの取り込みを測定した。なお、グルコースは ^{14}C -プロリンと同時に添加した。

6) 膜面分におけるGDH活性測定

膜面分 I および II の作成方法は、以下に示した方法で行った。下記組成の反応液3.0mlを、 25°C 3分間プレインキュベーション後、20mMグルコース0.5mlを添加し、試料ともに全量5mlとして、DCIPの還元に伴う波長605nmの吸光度変化を経時的に測定した。

50mM Tris-HCl pH8.0

4mM KCN

0.04mM DCIP

0.2mM PMS

4-2 グルコース非利用株における増殖促進効果

Fig. 4 1 に *E. coli* KY02 および対照とした *E. coli* K-12 の glucosekinase、gluconokinase 活性測定の結果を示した。

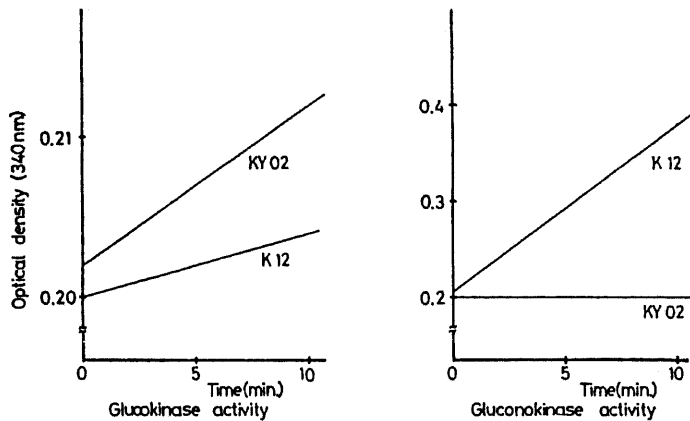


Fig.41. Glucosekinase and gluconokinase activities of *E. coli* strains.

結果はKY02株はgluconokinaseが欠損しており、そのためにグルコン酸を利用することができないことを示している。KY02はStanierの最少培地に唯一の炭素源としてグルコースを添加した時には増殖できず、グルコース-6-リン酸では増殖可能である⁷²⁾。次にプロリンとグルコースの各濃度組合せにおけるKY02株の増殖をFig. 4 2に示した。この結果からグルコースの濃度に依存して増殖が促進されていることが確認された。プロリン 10^{-2} Mの条件下でグルコース濃度を 10^{-1} Mより 10^{-4} Mまで変化させた時の増殖曲線をFig. 4 3に示す。

Proline (M) \ Glucose (M)	10^1	10^2	10^3	10^4	0
10^{-1}	+++	+++	+++	+++	—
10^{-2}	+++	+++	+++	++	—
10^{-3}	++	++	++	++	—
10^{-4}	+	+	+	+	—
0	—	—	—	—	—

KY 02

— 10^6 cells/ml ↓
 + 10^7 cells/ml
 ++ 10^8 cells/ml
 +++ 10^9 cells/ml

(8 hrs after incubation)

Fig.42. Supplement effect of glucose on growth of E.coli KY 02.

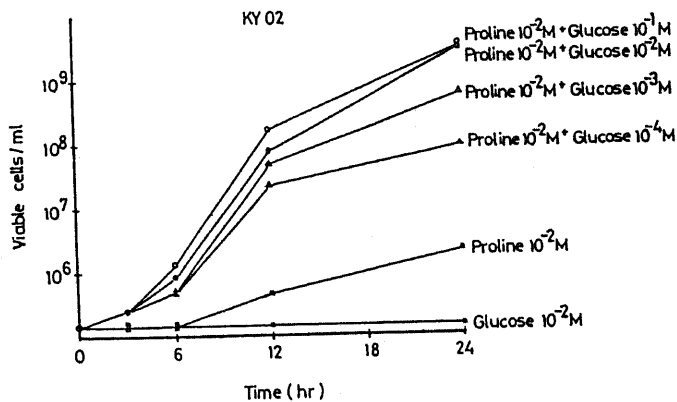


Fig.43. Supplement effect of glucose on growth of E.coli KY 02.

グルコース 10^{-2} M のみ添加では KY02 の増殖は、24 時間後も全く認められなかった。 A. calcoaceticus においては多くの場合、グルコースの濃度が炭素源となる基質の $1/10 \sim 1/100$ で増殖促進が認められ、グルコース濃度が基質より高い場合には逆に阻害効果が認められた。しかし E. coli KY02 においてはこのような阻害効果は見られずグルコースの濃度に依存して増殖促進が観察された。

次に ^{14}C -プロリンを用いて E. coli KY02 へのプロリンのとり込みに及ぼすグルコースの影響を調べた。グルコース添加により ^{14}C -プロリンの取り込みの顕著な増加が観察された。(Fig. 4 4)

この促進現象は4分後より加速度的に観察され、A. calcoaceticusで証明されたように初発の脱水素酵素によりグルコースが酸化されて、糖質酸化電子伝達系によりエネルギーの産生が予想された。そこでE. coli KY02からGDHを抽出し、その酵素活性を測定した。まず全菌体およびショック細胞の両者を用いてDCIPを還元する活性測定を行ったところ、その活性が認められた。方法の部で述べた調製法により得た膜分画 I、IIを用いてGDHの活性を測定した。Table 20に示すように膜分画 I と II ではDCIP還元能では約3倍の差異が認められ、膜の反転を抑えたIIの調製法の膜分画がより高い酵素活性を示した。

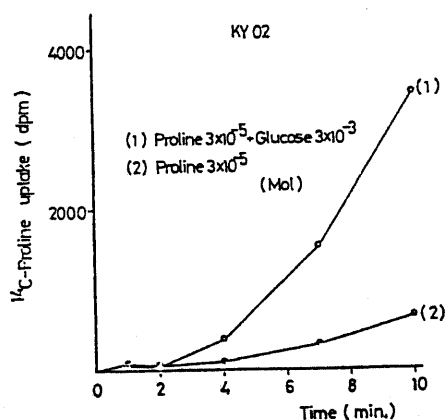


Fig.44. Supplement effect of glucose on ¹⁴C-proline uptake in E. coli KY 02.

以上の結果はA. calcoaceticusでは、内膜のペリプラズム側に向けて、GDHの存在することと一致している。

次にE. coli ZSC 112L (gpt-2、mpt-1、glk-7、strA、Lac⁺)株を用いて、グルコース添加による増殖促進効果について検討を行った (Table 21)。

Table 20. Reduction of DCIP of membrane fractions

Strain	membrane fraction I	membrane fraction II
KY 02	0.016	0.042

Decrease of OD/1mg protein/1min.

Table 21. Supplement effect of glucose in E.coli strains
KY 02 and ZSC 112L.

E.coli KY 02

基質濃度(M)	proline 10^{-2} + glucose 10^{-1}	proline 10^{-2} + glucose 10^{-2}	proline 10^{-2} + glucose 10^{-3}	proline 10^{-2}
吸光度(550nm)	1.636	1.585	0.669	0.011

E.coli ZSC 112L

基質濃度(M)	proline 10^{-2} + glucose 10^{-1}	proline 10^{-2} + glucose 10^{-2}	proline 10^{-2} + glucose 10^{-3}	proline 10^{-2}
吸光度(550nm)	1.875	1.136	0.538	0.135

ZSC 112L株はglk-7マーカを持つglucosekinase低活性株である。グルコースを代謝利用できるが、唯一の炭素源としてグルコースを添加した時の増殖はwild株より劣る変異株である。グルコース非利用株E.coli KY02とE.coli ZSC112Lについて、種々の濃度のプロリンとグルコースの組み合わせによる増殖速度を測定した。Table 21に示したように、いずれの菌株もプロリン単独で培養した時よりもグルコース添加で増殖は著しく促進されており、A.calcoaceticusにみられたと同様のエネルギー獲得系の存在が示唆された。

4-3 要約および考察

E.coli臨床材料由来株からグルコースを炭素源として利用できない菌株をスクリーニングし、KY02を得た。この菌株は、glucosekinase活性を持つが、gluconokinase活性は検出されなかった。一方、グルコース-6-リン酸は炭素源として利用できることから、PTS経路の変異株と推測された。KY02とE.coli ZSC 112L株について、唯一の炭素源としてプロリンを使用し、グルコース添加による増殖促進を測定したところ、A.calcoaceticusで観察されたと同様の促進効果が確認された。一方、E.coli KY02について、 ^{14}C -プロリンのとり込みに及ぼすグルコースの影響をみたところ、グルコースにより促進がみられた。A.calcoaceticusと同様に脱水素酵素によりグルコースが脱水素され、糖質酸化電子伝達系によりエネルギー産生されることが推測された。

さらにE.coli KY02では、内膜の外葉にGDHが局在することが確認された。し

かし、A. calcoaceticusのGDH活性と比較して弱いものであった⁷³⁾。なほ、GDHの補酵素としてPQQの存在が考えられるが、著者はE. coliのGDHからPQQを分離することができなかった。しかし最近オランダの研究者⁷⁴⁾、及びわが国^{75, 76)}の研究者グループからE. coliよりPQQの分離の報告が相次いで出されており、本研究で用いたE. coli菌株のGDHもPQQを補酵素とすると考えられる。

又、glucosekinase欠失変異株であるE. coli ZSC 112L (gpt-2, mpt-1, glk-7, strA, Lac⁺) においても上述した促進効果が観察されたことより、炭素源としては利用できないグルコースをエネルギー源として利用する機構はE. coliにも普遍的に存在すると考えられる。E. coliにおける糖質電子伝達系によるエネルギー産生のschemeをFig. 45に示す。

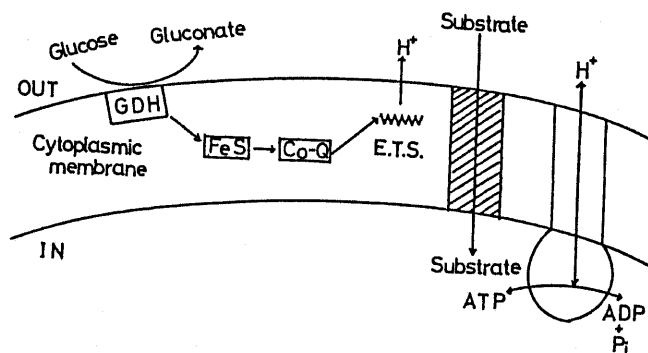


Fig.45. Scheme of energy producing mechanism in E. coli.

総 括

過去半世紀の間の多種類の抗生物質の発見により細菌感染症の多くの症例は治療が可能となった。しかし一方で薬剤耐性菌が増加しており、近年はその菌種にも変化が見られる。抗生物質剤、キノロン系化学療法剤の大量使用に伴い感染症起因菌が薬剤に自然抵抗性の高い菌種に変わりつつあり、いわゆる日和見感染菌として臨床の場で猛威をふるうようになっている。

グラム陰性菌では、*P.aeruginosa*, *A.calcoaceticus*、グラム陽性菌では *S.epidermidis* 等が主要な日和見感染菌種である。とくに *A.calcoaceticus* は本来土壤中、水中に分布しているといわれていたが、現在では臨床において日和見感染の原因菌として注目されている。

本研究は、日和見感染菌として重要な位置にあるにもかかわらず、その生理学的性質、形態学的性質及び抗生物質耐性機構についてほとんど明らかにされていない本菌種を対象として行なわれた。以下に本研究結果を総括する。

本菌はβ-ラクタム抗生物質にはとりわけ感受性が低かった。一方、アミノ配糖体抗生物質やテトラサイクリン等には感受性菌が多く認められた。クロラムフェニコールは高度耐性菌と感受性菌の二つ菌群が見られた。β-ラクタム抗生物質耐性菌においては、他の多くのグラム陰性菌種の場合と異なりその耐性の主な原因はβ-ラクタマーゼによるものではなかった。またクロラムフェニコールの耐性機序に関しても、一般に耐性菌の産生する不活化酵素として知られているCATaseは検出されなかった。更にβ-ラクタム抗生物質とクロラムフェニコールに対する感受性は本菌のグルコース代謝利用と相関することが明らかとなった。即ち、Glc⁻株はβ-ラクタム、クロラムフェニコールに対し共に高度耐性を示し、Glc⁺株は両抗生剤に感受性であった。

β-ラクタマーゼによらないβ-ラクタム抗生物質耐性の機構を探るためβ-ラクタム抗生物質の標的酵素であるPBPsに対する、¹⁴C-ベンジルペニシリンの結合様式を調べた。本菌の持つ6種のPBPsの中、Glc⁻株ではPBP A、Eへの¹⁴C-ベンジルペニシリンの結合が検出されず、Glc⁺株ではA、A', B, C, D, Eの全てのPBPsへの結合が検出された。

したがって本菌種の多数のGlc⁻株のβ-ラクタム抗生物質に対する耐性機構

は第一に、 β -ラクタム標的酵素の2つの欠損又は β -ラクタム抗生物質に対する親和性の著しい低下であり、第二には外膜の透過性の低下が推察された。クロラムフェニコールにおいては不活化酵素が検出されなかったことより外膜透過の障害が主な耐性要因と推察された。

細菌表面の多糖類の分析結果からGlc⁺株はラムノース、ヘキソース、グルコースの含量がGlc⁻株よりも少ない事が明らかとなった。更に電子顕微鏡による形態学的観察により、Glc⁻株は外膜が規則正しく波状構造を示すのに対し、Glc⁺株は外膜構造が不規則でペプチドグリカン層も外膜から分離している事が明らかとなった。これらの外膜の組成、構造の差異が抗生物質の外膜透過性に差異をもたらすことが考えられる。一方、テトラサイクリン、アミノ配糖体抗生物質はGlc⁺,Glc⁻両菌株に対し共に強い抗菌力を示した。この結果は本菌種による日和見感染症治療においてこれらの薬剤による治療の有効性を示している。

テトラサイクリン、アミノ配糖体抗生物質はエネルギー依存的に菌体内に取り込まれると考えられている。本菌において、Glc⁻,Glc⁺両株にテトラサイクリン、アミノ配糖体抗生物質が高い抗菌力を発現したことは、第2章において述べたようにGlc⁻,Glc⁺株の多数が細胞質膜外葉にGDHを保有し、補酵素PQQ及び糖質電子伝達系によりATPを生成し、このエネルギーを利用して菌体内に取り込んだ可能性が考えられる(第1章)。

本菌はglucosekinase,およびgluconokinaseを産生しないかまたは活性が著しく低いためにグルコースを代謝利用できないことを明らかにした。しかし、アミノ酸や有機酸を唯一の炭素源とした場合、グルコースを一定量添加すると著しい増殖促進が認められた。一方、Glc⁻株から変異剤処理により、Glc⁺株が得られた。したがってGlc⁻株ではglucosekinase, gluconokinase 両酵素の遺伝子は持つにもかかわらずその発現が抑制されていると推察された。本菌種のGlc⁻株では、グルコースは炭素源として利用できないが、エネルギー源として使うことができるという独特のエネルギー獲得系を有することが明らかとなった。このエネルギー獲得系で産生されたATPがアミノ酸、有機酸、アミノ配糖体抗生物質などの能動輸送活性を維持するものと推定される(第2章)。

一方、病原細菌がその感染を成立させる因子として、細菌の産生する毒素、溶血素などの因子が知られている。本菌は日和見感染菌であり、宿主が正常な

免疫機構をそなえていれば一般に感染は成立しない。しかし、ひとたび免疫不全状態に陥った場合には病原性を発現する。感染成立に關与する代表的な因子の一つである溶血性について臨床分離株1,000株を調べたところ、 β -溶血を示す株が約1割検出された。溶血株はグルコース、キシロース、アラビノース、リボースを利用できなかった。しかし、溶血性を示さない菌株より変異剤処理により溶血性変異株が分離された。したがって溶血素遺伝子は持つにもかかわらず負の制御機構により本菌種の大部分の菌株では溶血素産生が抑制されている事が明らかにされた(第3章)。

以上の本研究で得られた新知見は、本来貧栄養下の水中、土壤中など生息しており従来の多くの病原細菌とその生物進化の背景の著しく異なる本菌種による日和見感染症の治療にあたり、抗生剤の選択、併用効果による治療などの応用の基礎となるものと考えられる。

更に、A. calcoaceticus がPQQを介した糖質酸化電子伝達系によりグルコースからエネルギーを獲得することを明らかにしただけでなく、E. coliにおいてもこの様な機構の存在を明らかにした。細菌において普遍的に存在するエネルギー獲得系と考えられる(第4章)。このようなエネルギー獲得系はA. calcoaceticus を対象とした研究で初めて発見の糸口が得られたものである。本研究のこれらの成果は細菌の基本的な代謝機構の理解にも貢献したものとする。

謝辞

本研究を行うにあたり御指導御校閲を賜りました千葉大学薬学部、澤井哲夫教授、並びに元京都薬科大学教授、谷野輝雄先生に心より御礼申し上げます。

また貴重な菌株を分与していただき、共に研究を進めてきた京都微生物研究所、臼井通氏に深謝いたします。

更に、本研究の機会を与えて下さいました東洋醸造医薬開発センター長取締役、村瀬潤一博士に感謝いたします。

終りにあたり、本論文作成にご支援頂きました医薬品研究所、山路真也修士、並びに塩見秀子氏に厚く御礼申し上げます。

References

- 1) Herinksen, S.D. *Bacteriol. Rev.* 37:522-561, 1973
- 2) Juni, E. *Ann. Rev. Microbiol.* 32:349-371, 1978
- 3) 島田馨. *ファルマシア*. 16:745~749, 1980
- 4) 藪内英子. *医学のあゆみ*. 111:833~837, 1979
- 5) Holloway, B.W. Genetic organization of *Pseudomonas* sp.133-161, In P.H.Clark and M.H.Richmond (ed), *Genetic and Biochemistry of Pseudomonas aeruginosa*, Wiley, London.
- 6) Towner, K.J & A.Vivian. *J.Gen.Microbiol.* 93:355-360, 1976
- 7) Vivian, A., D.Vakeria & M.Divers. *Genetic Maps*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.200-201, 1984
- 8) Baumann, P., M.Doudoroff & R.Y.Stanier. *J.Bacteriol.* 95:1520-1541, 1968
- 9) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 436-438, 1974
- 10) 那須勝. *臨床病理*. 25:186~195, 1979
- 11) Cowan, S.T & K.J.Steel. *Manual for the identification of medical bacteria*. 2nd.ed. p.116-117, 1974
- 12) Morohoshi, T & T.Saito. *J.Antibiot.* 30:969-973, 1977
- 13) Morohoshi, T., K.Yamanaka, T.Usui & T.Tanino. *J.Antibiot.* 42(1):138-140, 1989
- 14) Kitagawa, K., A.Tateishi, F.Nakano, T.Matsumoto, T.Morohoshi, T.Usui & T.Tanino. *Agric.Biol.Chem.* 50:1453-1457, 1986
- 15) Kitagawa, K., A.Tateishi, F.Nakano, T.Matsumoto, T.Morohoshi, T.Usui & T.Tanino. *Agric.Biol.Chem.* 50:2939-2940, 1986
- 16) R.T.Stanier., N.J.Palleroni & M.Doudoroff. *J.Gen.Microbiol.* 43:159-271, 1966
- 17) 日本化学療法学会:最小発育阻止濃度(MIC)測定法再改訂について. *Chemotherapy*. 29:76~79, 1981
- 18) 小此木研二, 木田誠, 土屋莞司, 米田雅彦. *Chemotherapy*. 25:94~99, 1977

- 19) 澤井哲夫, 高橋郁子. 蛋白質.核酸.酵素. 23:391~400,1978
- 20) Spratt,B.G & A.B.Pardee. Nature(London) 254: 516-517,1975
- 21) Luft,J.H. Biophys.Biochem.Cytol. 9:409-414,1961
- 22) Galanos,C., Ludevitz.O & O.Westphal. Eur.J.Biochem. 9:245-249,1969
- 23) Mizoguchi,J., T.Morohoshi & H.Suginaka. J.Antibiot. 33(7):731-736, 1980
- 24) Georgopapadakou,N.H & F.Y.Liu. Antimicrob.Agents Chemoth. 18:148-157,1980
- 25) Yamaguchi,A., M.Yanai, N.Tomiyama & T.Sawai. FEBS Lett. 280(1):43-47,1986
- 26) Nikaido,H., E.Y.Rosenberg & J.Foulds. J.Bacteriol. 153:232-240,1983
- 27) Jaffe,A., Y.A.Chabbert & O.Semonin. Antimicrob.Agents Chemoth. 22: 942-948,1982
- 28) Nikaido,H., S.A.Song, L.Shaltial & M.Nurminen. Biochem.Biophys.Res Commun. 76:342-330,1977
- 29) Hancock,R.E.W., G.M.Decad & H.Nikaido. Biochem.Biophys.Acta. 554:323-331,1979
- 30) Nicas,T.I & R.E.W.Hancock. J.Bacteriol. 153: 281-285,1983
- 31) Angus,B.L., A.M.Carey, D.A.Carson, A.M.B.Kropinski & R.E.W.Hancock . Antimicrob.Agents Chemoth. 21:299-309,1982
- 32) Nakae,R & T.Nakae. Antimicrob.Agents Chemoth. 22,554-559, 1982
- 33) Kobayashi,Y & T.Nakae. Jap.J.Bacteriol. 41(1):219-221,1986
- 34) 細菌の解剖—分子レベルからみた図譜. P.24 図.3.1, 水島昭二, 三浦謹一郎編集. 講談社,東京.
- 35) Benson,S.A & A.Decloux. J.Bacteriol. 161: 361-367, 1985
- 36) Lugtenberg,B & L.van.Alphen. Biochem.Biophys.Acta. 737:51-115, 1983
- 37) Harder,K.J., H.Nikaido & M.Matsubishi. Antimicrob.Agents Chemoth.

20:549-552, 1981

- 38) Spratt, B.G. *Eur. J. Biochem.* 72:341-352, 1977
- 39) Spratt, B.G. *J. Gen. Microbiol.* 129:1247-1260, 1983
- 40) 水上茂樹, 浜崎直孝, 西村純二. エネルギー代謝と生体酸化(上) 生化学実験講座 12, 日本生化学会編, P.101~125. 東京化学同人.
- 41) Anraku, Y & L.A. Heppel. *J. Biol. Chem.* 242:2561-2569, 1967
- 42) Yamato, I., Y. Anraku & K. Hirosawa. *J. Biochem.* 77:705-718, 1974
- 43) Bagnara, A.S & L.R. Fich. *Anal. Biochem.* 45:24-34, 1972
- 44) Stanley, P.E & S.G. Williams. *Anal. Biochem.* 29:381-392, 1969
- 45) Jackson, J.B & A.R. Crafts. *Eur. J. Biochem.* 10:226-237, 1969
- 46) Tedeschi, H. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71:583-585, 1974
- 47) Duine, J.A., J. Frank & J.K. van Zeeland. *FEBS Lett.* 108:443-446, 1979
- 48) Duine, J.A., J. Frank & R. van der Meer. *Arch. Microbiol.* 131:27-31, 1982
- 49) Makula, R.A & W.R. Finnerty. *J. Bacteriol.* 121:250-258, 1975
- 50) Bell, E.J & A. Marus. *J. Bacteriol.* 91:2223-2228, 1966
- 51) Marus, A & E.J. Bell. *J. Bacteriol.* 91:2229-2236, 1966
- 52) Van Schie, B.J., J.P. van Dijken & J.K. Kuennen. *FEMS Microbiol Lett.* 24:133-138, 1984
- 53) Morohoshi, T., K. Kitagawa, A. Tateishi, F. Nakano, T. Matsumoto, T. Usui & T. Tanino. *Agric. Biol. Chem.* in press
- 54) Morohoshi, T., K. Kitagawa, T. Usui & T. Tanino. *Agric. Biol. Chem.* in press
- 55) Futai, M. *J. Membr. Biol.* 15:15-28, 1974
- 56) Salisbury, S.A., H.S. Forrest, W.B.T. Cruse & O. Kennard. *Nature.* 280:843-844, 1979
- 57) Ito, E & Y. Onishi. *FEBS Lett.* 136:225-230, 1981
- 58) Lockwood, L.B., B. Tabenkin & G.E. Ward. *J. Bacteriol.* 42:51-61, 1941
- 59) Kurioka, S & M. Matsuda. *Anal. Biochem.* 75:281-289, 1976
- 60) Stinson, M.W & C. Hayden. *Infect. Immun.* 25:558-564, 1979

- 61) Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr & R.J. Randall. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951
- 62) Haque, R. *J. Bacteriol.* 93:525-530, 1967
- 63) Torregrossa, R.E., R.A. Makula & W.R. Finnerty. *J. Bacteriol.* 131:493-498, 1977
- 64) Berk, R.S. *J. Bacteriol.* 88:559-565, 1964
- 65) Kurioka, S & P.V. Liu. *J. Bacteriol.* 93: 670-674, 1967
- 66) Tsukagoshi, N., M.N. Kania & R.M. Franklin. *Biochem. Biophys. Acta.* 450 :131-136, 1976
- 67) Makula, R.A., R.E. Torregrossa & H. Belleisle. *J. Bacteriol.* 133:1530-1532, 1978
- 68) Torregrossa, R.E., R.A. Makula & W.R. Finnerty. *J. Bacteriol.* 131:493-498, 1977
- 69) Christina, C.L. Scott., R.A. Makula & W.R. Finnerty. *J. Bacteriol.* 127: 469-480, 1976
- 70) Morohoshi, T., T. Usui, K. Yamanaka, M. Mori, T. Tanino, K. Kitagawa & M. Nakai. *Jap. J. Bacteriol.* 39(3):648-648, 1984
- 71) Curtis, S.J & W. Epstein. *J. Bacteriol.* 122:1189-1199, 1975
- 72) Postma, P.W. *Eur. J. Biochem.* 123:113-119, 1982
- 73) Yamanaka, K., T. Morohoshi, T. Usui & T. Tanino. *Jap. J. Bacteriol.* :1983
- 74) Van Schie, B.J., K.J. Hellingwerf, J.P. Dijken, M.G.L. Elferink, J.M. van Dijk, J.G. Kuennen & W.N. Konings. *J. Bacteriol.* 163:493-499, 1985
- 75) Ameyama, M., M. Nonobe, M. Hayashi, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi. *Agric. Biol. Chem.* 49(4):1227-1231, 1985
- 76) Ameyama, M., M. Nonobe, E. Shinagawa, K. Matsushita, K. Takimoto & O. Adachi. *Agric. Biol. Chem.* 50(1):49-57, 1986
- 77) Morohoshi, T., M. Toriya, S. Yokoiyama, K. Fujimoto & K. Hayano. *J. Antibiot.* 37(12):1687-1691, 1984