

## 黄色ブドウ球菌における細胞内 ATP 濃度に及ぼす エネルギー供与体の影響

赤木 玲子・宇野 博美・坪田 典子

### 要 約

黄色ブドウ球菌において、グルコース添加により細胞内 ATP が激減することを見い出した。このような現象が、いかなる機序で起こるのかを解明しようと試みた。

1) 細胞懸濁液にグルコースを添加した結果、 $O_2$  の有無にかかわらず、細胞内 ATP 濃度の著しい低下が見られた。

2) エネルギー供与体として、グルコースから乳酸までの代謝物質を添加した結果、グルコースのみ細胞内 ATP 濃度の著しい低下効果が見られた。

3) グルコースと、グルコースから乳酸までの代謝物質のいずれかを混合して添加しても、細胞内 ATP 濃度の変化に対する補足効果が見られなかったことから、黄色ブドウ球菌における ATP 合成と分解が、同一機構で行われる可能性が示唆された。

4) 細胞膜内外の  $H^+$  濃度勾配を負荷することにより、細胞外液の pH の低下に伴い細胞内 ATP 濃度の上昇効果が見られたことから、黄色ブドウ球菌には  $H^+$  輸送性 ATPase が存在している可能性が示唆された。

5) 細胞膜内外の  $H^+$  濃度勾配を負荷することによる ATP 合成が、グルコースの細胞外からの添加により阻害されることから、 $H^+$  輸送性 ATPase 活性がグルコースにより阻害される可能性が強く示唆された。

### 緒 論

栄養素は細胞の構成元素として機能を果たすばかりでなく、ATP 産生のためのエネルギー源として利用されている。生体の生存のためには、あらゆる細胞に常時エネルギーが必要不可欠であり、ATP は高エネルギー化合物として生体が利用可能なエネルギー形である点で最も重要である。ATP 合成の基本的な機構には、電子伝達リン酸化と基質リン酸化の 2 つの系がある。原核生物においては、呼吸鎖により  $H^+$  (プロトン) が細胞外に排出され、その結果生じる細胞膜内

外の  $H^+$  濃度差が駆動力となり、膜内在性の ATP 合成酵素の働きにより細胞内で ATP 合成が行われると考えられている。この  $H^+$  依存性の ATP 合成酵素は *in vitro* では可逆的であり、 $H^+$  の輸送と、ATP の合成もしくは分解を行う<sup>1)</sup> この酵素はミトコンドリア、葉緑体、細菌細胞膜に普遍的に存在し、 $H^+$  輸送性 ATPase とも呼ばれている。細菌細胞膜の内外に  $H^+$  濃度勾配が形成されると、糖やアミノ酸のような代謝物質は輸送タンパクによって 1 個から数個の  $H^+$  と共役して細胞内に取り込まれる。この時、 $Na^+ - H^+$  アンチポート系によって  $Na^+$  が排出され、このようにして形成された  $H^+$  あるいは  $Na^+$  濃度勾配が駆動力となり、栄養物質が細胞内へ輸送されると考えられている。このことは解糖系の阻害剤を添加することにより、物質の細胞内への取り込み活性が阻害される<sup>2)</sup> ことから証明されている。私達は、黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送系の研究中に、グルコースが輸送活性を著明に増大させている<sup>3)</sup> にもかかわらず、細胞内 ATP 濃度が著しく低下するという注目すべき現象を発見した。<sup>4)</sup> また、大腸菌においてはグルコースが細胞内に輸送され、エネルギー源として利用されていることは既に報告されている。<sup>5) 6)</sup> 黄色ブドウ球菌におけるグルコース輸送系は詳細な検討が未だなされていない。そこで黄色ブドウ球菌における、グルコースの添加による細胞内 ATP の激減の機序を解明しようと試みた。グルコースは細胞内で代謝されると考えられるから、このような現象がグルコースによるものか、グルコースの代謝物質によるものかを検討した。また、黄色ブドウ球菌の ATPase は、その詳細な性質、機能が未だ明らかにされていない。そこで黄色ブドウ球菌に存在する ATPase を、 $H^+$  濃度勾配を人工的に負荷することにより駆動させ、その際のグルコース添加による細胞内 ATP 濃度に及ぼす影響の有無を検討した。

## 実験方法

### 1) 試薬

Tris, TES,  $\text{MgSO}_4$ , HEPES,  $\text{EDTA-2K}^+$ , ラウリル硫酸ナトリウム,  $\text{MgCl}_2$ , グルコースはナカライテスク株式会社より購入した。牛血清アルブミン, フォスフォエノールピルビン酸 (PEP), グルコース-6-リン酸 (G6P), フルクトース-6-リン酸 (F6P), D(-)3-フォスフォグリセリン酸 (3PG),  $\text{ATP-2Na}^+$  は SIGMA CHEMICAL COMPANY より購入した。乾燥ブイオンは日水製薬株式会社より購入した。乳酸是和光純薬工業株式会社より購入した。Luciferin-Luciferase 混液はベーリンガーマンハイム株式会社より購入した。HCl は石津製薬株式会社より購入した。

### 2) 細胞懸濁液の作成

黄色ブドウ球菌 209 P 株を Nutrient Broth (3% 乾燥ブイオン水溶液) 中で約 12 時間 37℃ で好氣的に培養した。次にその培養液から Nutrient Broth に 10% 接種し, 37℃ で約 2 時間好氣的に培養した後, 遠心分離 (4,500 rpm, 4℃, 15 分間) により集菌した。0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で 2 回菌を洗い, 同じ緩衝液で最終タンパク質濃度約 2 g/ml になるように菌を懸濁した。尚, 実験に用いた菌株は, その都度ブイオン培地の平板培養により黄色ブドウ球菌であることを確認した。

### 3) ATP 濃度の定量

最終タンパク質濃度約 1 g/ml の細胞懸濁液にグルコース及び種々なその代謝物質を添加し, 37℃ で一定時間インキュベートした。100℃ の 10 mM TES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) (40 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む) に最終タンパク質濃度 200 mg/ml になるように上記細胞懸濁液を加え, 6 分間煮沸した。その後水水中で冷却し, 遠心分離 (6,000 rpm, 4℃, 2 分間) して得た上清を ATP 測定用の試料とした。熱抽出した ATP は HEPES 緩衝液 (50 mM HEPES-Tris, 2 mM  $\text{EDTA-2K}^+$ , pH 7.75, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) 中で Luciferin-Luciferase 混液により発生した蛍光強度を Lumiscouter ATP-237 (アドバンティック株式会社) を使用して定量した。尚, 検量線は  $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$  M ATP 標準液を用いて同様の方法で作製した。

### 4) タンパク質濃度の定量

一定量の細胞懸濁液に 20% ラウリル硫酸ナトリウムを添加し, 60℃ で 30 分加熱することにより細胞を可溶化した。その後タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準として Lowry 法により測定した。<sup>7)</sup>

### 5) 黄色ブドウ球菌における細胞内 ATP 濃度に及ぼすエネルギー供与体と通気の影響

細胞懸濁液に窒素ガスを通気しながら, グルコースもしくは乳酸を最終濃度 20 mM になるように加え, 一定時間後に窒素ガスを酸素ガスに切り換えた。この過程において細胞懸濁液を経時的に採取し, 細胞内 ATP 濃度を定量した。

### 6) グルコース及びその代謝物質の細胞内 ATP 濃度に及ぼす影響

最終タンパク質濃度約 1 g/ml の細胞懸濁液にグルコースを最終濃度 20 mM になるように添加した。また代謝物質について検討する実験では, グルコースの代わりに乳酸, PEP, 3PG, G6P, F6P をそれぞれ最終濃度 20 mM になるように添加した。また, グルコースとその代謝物質を最終濃度 20 mM ずつになるように混合して添加した。

### 7) 人工的 $\text{H}^+$ 濃度勾配の負荷実験

最終タンパク質濃度約 1 g/ml の細胞懸濁液に, グルコースを最終濃度 20 mM になるように添加し, 37℃ で 10 分間インキュベートすることにより, 細胞内 ATP 濃度を低下させた。その後 0.1 N HCl を, 最終濃度 30 mM になるように添加した。この過程において細胞懸濁液を経時的に採取し, ATP を定量した。この実験中, 細胞懸濁液中の pH の変化は経時的に pH メーターで測定した。対照としてグルコースを加えないで同様の実験を行った。

## 実験結果

### (A) 細胞内 ATP 濃度に及ぼすエネルギー供与体の影響

黄色ブドウ球菌の細胞懸濁液に, 嫌氣的あるいは好氣的条件下でグルコースあるいは乳酸を添加した際の細胞内 ATP 濃度の変化を図 1 に示した。乳酸を細胞懸濁液に添加すると, 嫌氣的条件下 ( $\text{N}_2$  置換) では細胞内 ATP 濃度には変化は見られなかったが, 細胞懸濁液に  $\text{O}_2$  を通気することにより好氣的条件にすると, 細胞内 ATP 濃度の著しい上昇が見られた。一方, グルコースを細胞懸濁液に添加すると, 細胞内 ATP 濃度の著明な低下が見られ, 嫌氣的でも好氣的でも細胞内 ATP 濃度の上昇は全く見られなかった。

### (B) グルコース及び種々なその代謝物質が細胞内 ATP 濃度に及ぼす影響

グルコース及び種々なその代謝物質を最終濃度 20 mM になるように細胞懸濁液に添加した際の ATP 濃度の変化を比較したものを表 1 に示した。ATP 濃度

の測定値は、それぞれ3～5回実験を行って得られた結果を平均した値である。表の数値は対照のインキュベーション5分後におけるATP濃度を100とした値である。グルコースにより、細胞内ATP濃度は著しく低下した。グルコース以外には、試験した試薬の中ではPEPのみに有意な細胞内ATP濃度の低下が見られた。一方、乳酸は試験した試薬の中では最もATP濃度の上昇効果が高かった。また3PGにも同様な効果が見られた。グルコースによる細胞内ATP濃度の著しい低下が、表1でATP濃度上昇の見られた物質の添加により、阻害されるか否かを調べるために、グルコースとその代謝物質とを20 mMずつ混合して行った実験の結果を表2に示した。表1でATP濃度上昇の見られた物質もグルコースと混合すると、細胞内ATPはいずれも激減した。中でもグルコースと3PGと混合した場合は、グルコース単独の場合に相当する細胞内ATP濃度の低下が見られた。しかし、グルコースとG6PもしくはF6Pを混合した場合、細胞内ATP濃度は経時的に上昇する傾向が見られた。

表1 黄色ブドウ球菌におけるグルコース及び種々なその代謝物質の細胞内ATP濃度に及ぼす影響

	細胞内ATP濃度(%)	
	5 分	10 分
対 照	100.0	134.4
グルコース	3.8	3.0
乳 酸	122.3	295.9
G 6 P	87.4	161.5
F 6 P	103.5	172.9
P E P	48.1	61.1
3 P G	256.1	142.2

表の数値は、対照実験の5分時におけるATP濃度を100とした値である。方法の詳細については「実験方法」の項目に記載した。

表2 黄色ブドウ球菌におけるグルコースと種々なその代謝物質を混合添加した際の細胞内ATP濃度に及ぼす影響

	細胞内ATP濃度(%)	
	5 分	10 分
対 照	100.0	134.4
グルコース+乳 酸	12.7	12.3
グルコース+G 6 P	9.0	15.5
グルコース+F 6 P	18.3	27.2
グルコース+P E P	6.5	7.2
グルコース+3 P G	2.2	2.7

表の数値は、対照実験の5分時におけるATP濃度を100とした値である。方法の詳細については「実験方法」の項目に記載した。

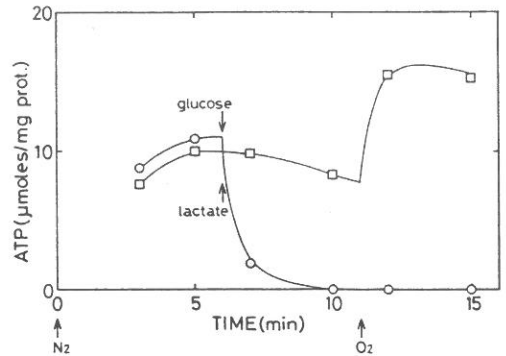


図1 黄色ブドウ球菌におけるグルコースあるいは乳酸添加後の細胞内ATP濃度の変化

グルコース、乳酸は最終濃度20 mMになるようにそれぞれ図の矢印に示した時に細胞懸濁液に加えた。方法の詳細については「実験方法」の項目に記載した。

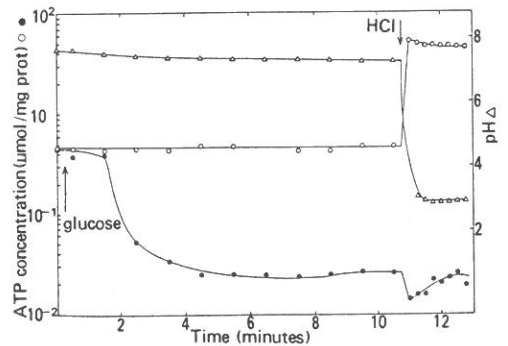


図2 黄色ブドウ球菌における人工的H<sup>+</sup>濃度勾配の負荷による細胞内ATP濃度の変化とグルコース添加による影響

グルコースは最終濃度20 mMになるように、また0.1 N HClは最終濃度30 mMになるように、それぞれ図の矢印に示した時に細胞懸濁液に加えた。方法の詳細については「実験方法」の項目に記載した。

### (C) 人工的H<sup>+</sup>濃度勾配負荷による細胞内ATP濃度の変化とそれに及ぼすグルコースの影響

細胞懸濁液に最終濃度20 mMになるようにグルコースを添加した場合、あるいはグルコース非添加の場合において一定時間インキュベートした後、最終濃度30 mMになるようにHClを1回添加した際の細胞内ATP濃度の経時変化を図2に示した。またグルコース添加時に同様にHClを添加した場合のpH変化も合わせて測定し記録した。図2からグルコースを添加した

2分後に細胞内ATP濃度の著しい低下が見られ、グルコース添加前のATP濃度を100とすると7.4であった。低下した細胞内ATP濃度は、少なくとも10分間は一定を保っていた。一方、グルコース非添加の場合、細胞内ATP濃度は多少の変動はあるものの、10分まではほぼ一定を保っていた。この時最終濃度30 mMになるように0.1 NのHClを添加すると、添加直後より約10倍もの細胞内ATP濃度の著しい上昇が見られ、その後一定を保った。グルコース添加時に、同様にHClを添加すると、細胞内ATP濃度はやや低下傾向を示したが、グルコース非添加時に見られた様な増加は全く見られなかった。この間のpHの変化はHClを添加する前の細胞懸濁液については、グルコース添加による影響は全くなくpH 7.5で一定であったが、HCl添加直後pHの著しい低下が見られ、pH 3.5と酸性を示した。

## 考 察

図1に示すように黄色ブドウ球菌の細胞懸濁液にグルコースを添加することにより、O<sub>2</sub>の有無にかかわらず細胞内ATP濃度の著しい低下が見られた。また、実験結果には示していないが、グルコース存在下において黄色ブドウ球菌を培養したところ、細胞内ATP濃度の低下にもかかわらず良好な増殖を示した。しかし、この間、黄色ブドウ球菌が増殖に利用したエネルギー体については不明である。一方、乳酸を添加すると、他の微生物でも知られているような細胞内ATP濃度の増加が見られた。この結果からはグルコース添加時に見られた細胞内ATP濃度の著しい低下は、グルコースの他にも乳酸以外のグルコース代謝物質が関与している可能性が考えられる。そこで、本来エネルギー供与体であるはずの物質による細胞内ATP濃度の低下効果が、グルコースあるいは、その種々な代謝物質のいずれにより直接的に誘引されるのかを調べることが目的として、細胞外からのこれらの物質の添加による細胞内ATP濃度の変化について検討した。

表1に示すように、それぞれの物質を単独で添加した実験において細胞内ATP濃度の最低値を示したものは、グルコースであった。3PGでは、程度は低いが同様なATPの減少傾向が見られた。私達はグルコース、乳酸、3PGにより、タウリン輸送系が活性化されるという結果を得ており、<sup>8)</sup> それ故これらの物質については、細胞内に輸送され、エネルギー供与体として利用されているのではないかと考えているが、G 6P, F 6P, PEPは細胞内へ輸送されるか否か不

明である。表1の結果からも乳酸及び3PGにより細胞内ATP濃度が上昇することから、これらの物質は細胞内に輸送され、エネルギー供与体として利用されている可能性が考えられる。表2の結果は、細胞内ATP濃度は各代謝物質の単独添加による実験で得られた値よりも、全て低値を示した。特に3PGは表1ではATP濃度の上昇効果を示したにもかかわらず、グルコースと共存させるとこのような効果を全く示さなかった。すなわち、グルコースはむしろ、ATP分解を促している可能性も考えられる。また表1, 2のいずれの結果からも、グルコースの代謝物質においてはグルコース添加時に見られた細胞内ATP濃度の著しい低下は見られなかった。このことから、グルコースによる細胞内ATPの激減の原因は、その代謝物質ではなく、グルコースそのものである可能性が示唆された。

以上表1, 2の結果からは1) グルコースの細胞内への輸送過程でATPが大量に消費されている可能性 2) 細胞内にグルコースを輸送した後、直ぐにはATP合成が出来ない可能性 3) グルコースが、ある種のATPの合成系に何らかの作用を及ぼし、合成を阻害している可能性の3点が考えられる。

通常、細胞が生育していく際に、培地から養分を取り込むために能動輸送あるいはリン酸転移系：phosphate transferase system (PTS)の機構が必要となる。大腸菌においては、この2つの輸送系が共に存在していることが知られており、グルコースはPTSによって細胞内へ輸送されてエネルギー供与体として利用されることが明らかにされている。<sup>5)6)</sup> 最近、PTSによって細胞内へ輸送された糖が、それ以外の系による糖の細胞内への輸送を阻害する可能性が示唆されている。<sup>5)</sup> つまり、細胞外に複数の糖が存在する場合、PTSによって選択的に糖が取り込まれる可能性があり、このことは表2の結果をグルコースがPTSで細胞内に輸送されたと考えるのに好都合である。また、黄色ブドウ球菌に乳糖特異的PTSが存在することも報告されているが、グルコースがPTSによって取り込まれるか否かは不明である。<sup>9)10)11)</sup> グルコースがPTSで取り込まれると仮定すると、グルコースが利用されて出来た糖リン酸が他の糖の取り込みを阻害するため乳酸のようなエネルギー供与体と混合しても細胞内ATP濃度の上昇効果が打ち消され、グルコースのみの影響が表われるのではないかと考えられる。グルコースとG 6PあるいはF 6Pを混合した場合には、有意ではないが、他の代謝物質とグルコースを混合した場合に比較

してややATP減少に対する阻害効果が見られた。これは、いずれも六炭糖で、構造がグルコースと類似していることから、グルコースの作用点における競合的阻害効果が見られた可能性が考えられる。

また、グルコース添加により細胞内ATP濃度が著しく低下することから、細胞内ATPを消費する機構が存在する可能性も考えられる。細胞内ATP濃度を低下させる機構と、上昇させる機構が別々であると仮定すると、表1より上昇機構には乳酸や3PGが促進的に関与しており、低下機構にはグルコースが関与していると考えられる。表2の結果より両者を混合して細胞懸濁液に添加すると、上昇機構による細胞内ATP濃度の補足効果は殆んど認められなかったことから、これらの物質が関与するATPの合成と分解が同一の機構によるものである可能性が考えられる。そこでATPの合成と分解を行う機構として最も一般的なATPaseについて検討した。大腸菌におけるATPaseは、数多くの報告があり、その分布・諸性質が遺伝子レベルで詳細に調べられているが、グルコースによりその活性が変化するという報告はない。大腸菌以外では腸炎ビブリオに存在する $H^+$ 輸送性ATPaseについて

の報告があり、<sup>12)</sup><sup>13)</sup>この菌についてはグルコース添加時にATPase活性が若干低下していると報告されているが、<sup>14)</sup>黄色ブドウ球菌のATPaseについては詳細には知られていない。そこで黄色ブドウ球菌におけるグルコースによる細胞内ATPの激減の原因が、ATPaseにあるか否かを検討する目的でHClを添加することにより、 $H^+$ の人工的濃度勾配を作製し、 $H^+$ 輸送性ATPaseの存在を調べた(図2)。細胞懸濁液中にHClを添加したところpHの低下と同時にATP濃度の上昇が見られたことから、黄色ブドウ球菌における $H^+$ 輸送性ATPaseの存在が強く示唆された。この時、グルコースが存在すると、同一条件下でATP合成が完全に阻害されたことから、グルコースは細胞外もしくは細胞内から、膜内在性のATPaseに対して阻害的に働く可能性が考えられる。一方、カサノリにおいては $Cl^-$ 輸送性ATPaseが存在すると報告されている。<sup>15)</sup><sup>16)</sup><sup>17)</sup>今回の実験から、黄色ブドウ球菌において、 $Cl^-$ 輸送性ATPaseが存在する可能性も考えられるが、ATP合成の主たる場としては、 $H^+$ 輸送性ATPaseを考える方が妥当であると思われる。

## 参 考 文 献

- 1) 吉田賢右, 香川靖雄:  $H^+$ -ATPase ( $F_0F_1$ ) の作用機序: 蛋白質核酸酵素, 24, P. 601 (1984)
- 2) 新家浪雄, 重永道緒: 細胞の構造: 共立出版株式会社, P. 36
- 3) 赤木玲子, 堺 由妃, 赤松由紀子, 土屋友房: 黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送系の解析: 生化学, 59, P. 862 (1987)
- 4) Akagi, R.: Taurine transport in *Staphylococcus aureus*: Bulletin of Okayama Prefectural Junior College, 32(2), P.10-13 (1987)
- 5) 木村 光: 大腸菌の糖代謝: 蛋白質核酸酵素, 24, P. 313-317 (1979)
- 6) 長田恭明, 大木玲子訳, 善養寺浩監訳: 細胞の代謝, P. 14-36
- 7) Lowry, O. H., Roseltoogh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent: J. Biol. Chem., 193, P.265-275 (1951)
- 8) Akagi, R., Sakai, Y., Akamatsu, Y. and Tsuchiya, T.: Taurine transport by *Staphylococcus aureus*: Sulfur Amino Acids, 10, P.323-327 (1987)
- 9) Simoni, R. D., Roseman, S.: Sugar transport VII, Lactose transport in *Staphylococcus aureus*: J. Biol. Chem., P.966-976 (1973)
- 10) Simoni, R. D., Hays, J. B., Nakazawa, T. and Roseman, S.: Sugar transport VI, Phosphoryl transfer in the lactose phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*: J. Biol. Chem., P.957-965 (1973)
- 11) Hays, J. B., Simoni, R. D. and Roseman, S.: Sugar transport V, A trimeric lactose-specific phosphocarrier protein of the *Staphylococcus aureus* phosphotransferase system: J. Biol. Chem., P.941-956 (1973)
- 12) 守谷智恵, 堺 由妃, 津田正明, 土屋友房: 腸炎ビブリオの膜ATPaseの性質: 生化学, 59, P. 685 (1987)
- 13) 堺 由妃, 津田正明, 土屋友房: 腸炎ビブリオにおけるATP合成: 生化学, 59, P. 685 (1987)
- 14) 堺 由妃, 守谷智恵, 金沢 浩, 津田正明, 土屋友房: 腸炎ビブリオの $H^+$ 輸送性ATPaseの活性と発現に対する生育条

黄色ブドウ球菌における細胞内ATP濃度に及ぼすエネルギー供与体の影響

件の影響：生化学，61，P. 1100（1989）

- 15) 佐藤幸子，守谷智恵，大森晋爾，池田己喜子，多賀谷光男，福井俊郎：カサノCF<sub>1</sub>-ATPaseの精製及びその性質-Cl<sup>-</sup>輸送性ATPaseとの比較：生化学，61，P. 809（1989）
- 16) 大橋俊孝，守谷智恵，大森晋爾，池田己喜子，多賀谷光男，福井俊郎：カサノリCl<sup>-</sup>輸送性ATPaseに対するアデノシン三リン酸ピリドキサールの阻害効果及び化学修飾：生化学，61，P. 809（1989）
- 17) 守谷智恵，谷口浩子，大森晋爾，池田己喜子：カサノリに対するCl<sup>-</sup>輸送性ATPaseのmolecular cloning（その2）：生化学，61，P. 809（1989）

平成2年4月1日受付

平成2年12月4日受理