

黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送系の研究

—細胞膜小胞における特性との比較—

赤木 玲子・中島 伸佳・須見 洋行

緒 言

タウリンは哺乳動物においては含硫化合物の主たる最終代謝産物の一つで、臓器組織中に広く分布しており、また尿中にも大量に排泄されている。含硫化合物のもう一方の最終代謝産物は硫酸で、動物の体外に排泄された後、種々な微生物によって再び含硫化合物に作りかえられることが知られており、ここに自然界における硫黄回路が形成されているが、タウリンについてはその後の動態については不明な点が多い(図1)。

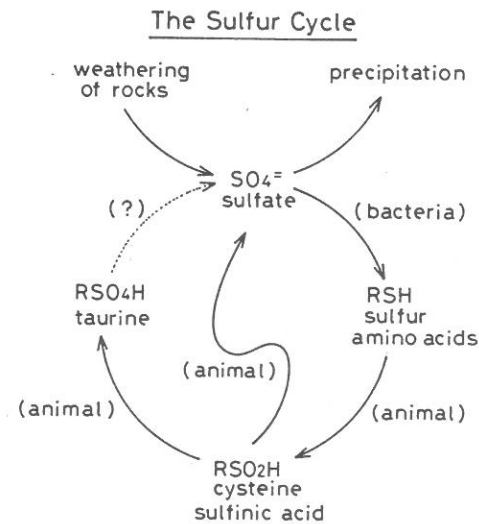


図1 自然環境における硫黄回路

自然環境にタウリンが蓄積していないことから、タウリンが何らかの形で分解されていることは容易に想像できるが、タウリンは化学的に安定な物質であり、その分解過程には哺乳動物以外の生物が関与している可能性が強いと考えられる。Liauらは黄色ブドウ球菌が、培地中のタウリンを取り込むことを報告しており¹⁾更には取り込まれたタウリンが細胞内で未知物質に変化している可能性も示唆されている²⁾³⁾。私たち

は人間生存環境にしばしば見られる数種類の細菌を対象としてタウリンの輸送活性を測定した。その結果、黄色ブドウ球菌にのみ輸送活性が見られた。本研究では、自然界におけるタウリンの動態を調べることを目的として、黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送系の解析を行ったので、以下にその成果を報告する。

実験方法

1. 黄色ブドウ球菌懸濁液の調整

黄色ブドウ球菌209P株を用いた。ブイヨン培地(ニッセイ)中で一晚培養した細胞懸濁液を新しいブイヨン培地に10%になるように接種し、2時間培養した後遠心分離により対数増殖期にある細胞を分離し、0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)で2回洗浄した細胞を同じ緩衝液に懸濁して実験に用いた。

2. タウリン輸送活性の測定

輸送活性の測定はKabackの方法に従って行った⁴⁾。上記で調整した細胞懸濁液を50mM Tris-HCl (pH 7.0), 20mM glucose, 10mM NaCl, 9.9 μ M ¹⁴C-*taurine* (0.02 μ Ci) を含む溶液中に最終濃度が約0.1mg proteinになるように添加し、37°Cで一定時間保温した後、フィルターで急速濾過し、フィルターとともに細胞を液体シンチレーションカウンターにかけて放射活性を測定した。

3. 細胞外ナトリウムイオン濃度変化の測定

0.2M Mops-NMe₃OH(8.0), 0.1mM NaClを含む溶液中に細胞懸濁液を最終濃度が約2-3mg protein/mlになるように加え、37°Cに保温した。タウリンは最終濃度が10mMになるように添加し、その前後の細胞外ナトリウムイオン濃度を電極で測定した。

4. 細胞膜小胞の調整

細胞膜小胞の作成は、Koningsらの方法⁵⁾に準じて

行った。すなわち、黄色ブドウ球菌に高浸透圧条件下で細胞壁溶解酵素 lysopeptase を作用させ、プロトプラストを作成した。次に低浸透圧条件にさらすことによって細胞膜小胞を作成し、遠心分離により集めて 0.1M Tris-HCl (pH 7.0) に懸濁し、輸送活性の測定に用いた。

5. タンパク濃度の定量

タンパク濃度は、牛血清アルブミンを標準として、Lowry法⁶⁾により測定した。

実験結果

1. タウリン輸送活性に及ぼす陽イオンの影響

黄色ブドウ球菌を種々な陽イオン存在下に 10 μ M タウリンとともに 37°C に保温したときの、細胞内へのタウリンの取り込みを経時的に見た結果を図2に示した。10mM ナトリウムイオン存在下にタウリンは効率よく輸送され、リチウムイオン存在下でも約60%の活性が見られた。カリウムイオン、コリン存在下ではタウリンの輸送活性は全く見られなかった。

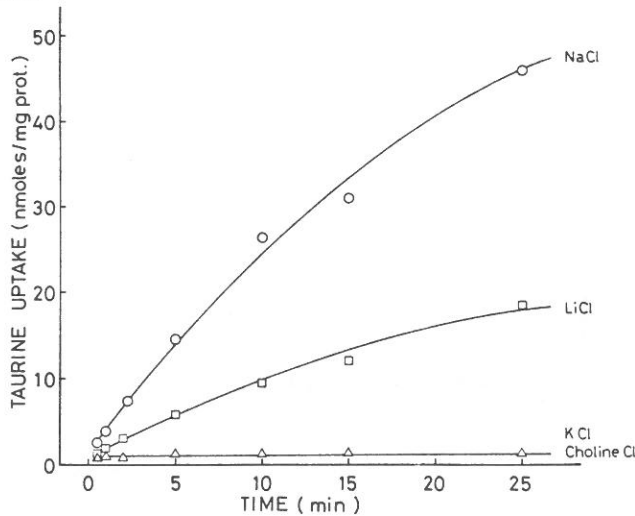


図2 黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送活性に及ぼす陽イオンの影響

2. タウリン輸送活性に及ぼすナトリウムイオノフォアの影響

monensin存在下に黄色ブドウ球菌におけるタウリンの輸送活性を測定したところ、図3に示したように、濃度依存性に阻害効果が見られた。

3. 細胞外ナトリウムイオン濃度に及ぼすタウリンの影響

ナトリウム選択性電極を用いて細胞外のナトリウムイオン濃度の変動を調べたところ、図4に示すように、10mM タウリン添加後わずかに細胞外ナトリウムイ

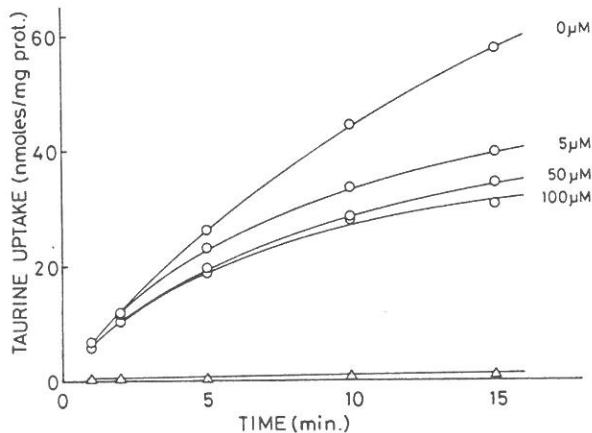


図3 黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送活性に及ぼすナトリウムイオノフォアの影響

オン濃度の減少，すなわち細胞内へのナトリウムイオンの流入が見られた。



図4 黄色ブドウ球菌における細胞外ナトリウムイオン濃度の変動に及ぼすタウリンの影響

4. タウリン輸送活性に及ぼすプロトン濃度勾配の影響

carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) は、プロトンコンダクターとして知られているが、濃度依存性にタウリン輸送活性を強く阻害した(図5)。10 μ M CCCP存在下ではナトリウムイオンに関係なく、黄色ブドウ球菌によるタウリンの取り込みはほとんど見られなかった。

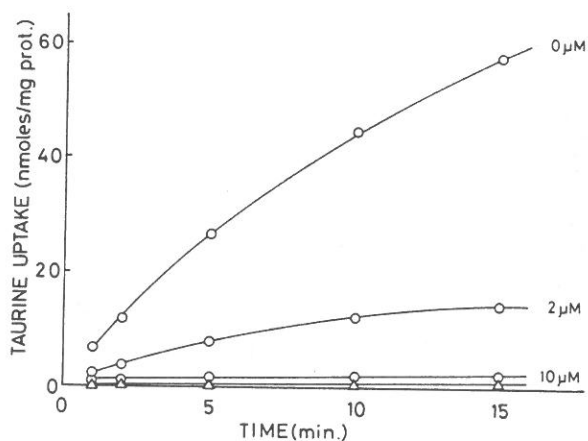


図5 プロトンコンダクターによるタウリン輸送活性の阻害効果

5. タウリン輸送活性に及ぼすタウリン濃度の影響

黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送活性をタウリン添加2分後の細胞内に取り込まれた放射活性を指標として表わし、タウリン濃度との関係を調べた。図6

に示すとおり、タウリンの取り込みは濃度依存性に上昇し、Lineweaver-Burk plotの結果から、本輸送系の K_m 値は42 μ M、 V_{max} は17nmoles/minutes per mg proteinと計算された。

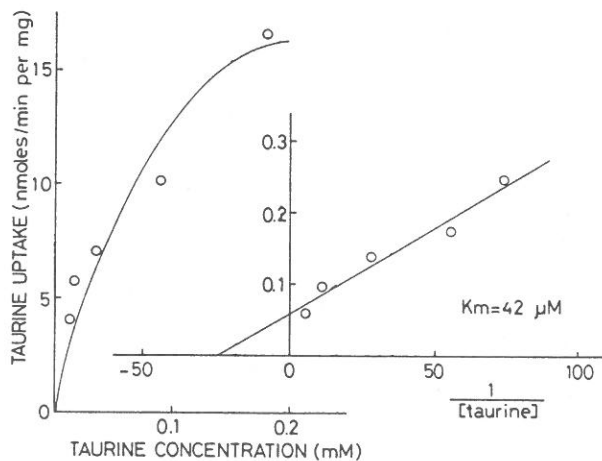


図6 黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送活性に及ぼすタウリン濃度の影響

6. タウリン輸送活性に及ぼす構造類似体の影響

表1に、種々な構造類似体による黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送活性の阻害効果を表した。構造類似体は真核生物の生存環境にしばしば見られるものであり、それぞれタウリンの10倍量の濃度を添加した。輸送活性は、タウリン添加後2分間に取り込まれたタウリンの放射活性を100として表わした。いずれの物質も弱い阻害効果しか示さなかった。

表1 黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送活性に及ぼす種々な構造類似体の効果

構造類似体	阻害率(%)
none	0
hypotaurine	17
β -alanine	4
GABA	4
GES	7
taurine	75

10 μ Mの放射活性をもったタウリンに対して、0.1mMの放射活性をもたない構造類似体を加えて、輸送活性を測定した。

7. 細胞膜小胞におけるタウリン輸送

高浸透圧条件下に細胞壁溶解酵素を作用させて作成したプロトプラストを低浸透圧条件にさらすこと

より膜小胞を作成した。このようにして作成した膜小胞をネガティブ染色した電子顕微鏡写真を図7に示した。図のaは黄色ブドウ球菌を同様に染色した像で、両者を比較すると、bでは細胞壁が消失し、細胞膜構造が観察できる。全体として、元の細胞よりやや大きめの膜小胞が形成されていることが示された。尚、この細胞膜小胞は、Kaback法により作成したので、right side outである可能性が強いと考えられる。この細胞膜小胞を用いてタウリンの輸送活性を調べたところ、図8に示すようにナトリウム依存性の活性が見られた。

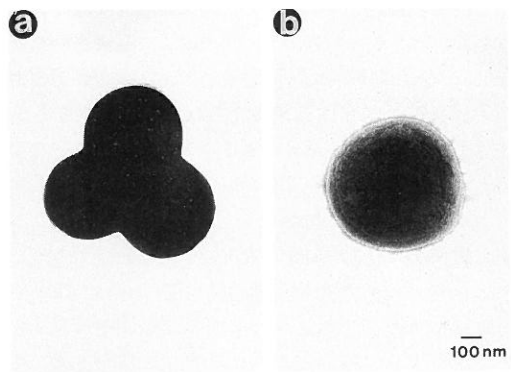


図7 黄色ブドウ球菌(a)とその細胞膜小胞(b)の電子顕微鏡像

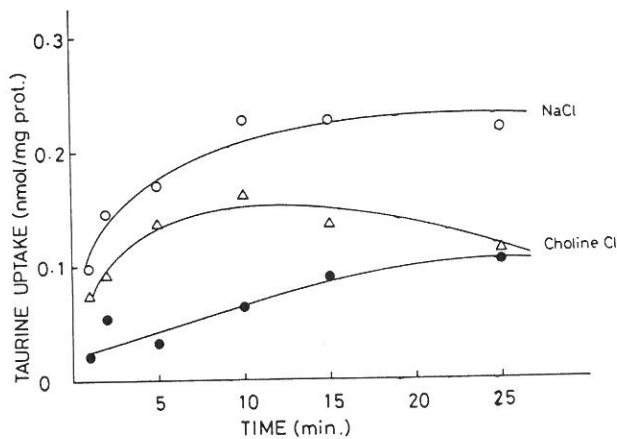


図8 黄色ブドウ球菌より調整した細胞膜小胞におけるタウリン輸送活性

考 察

黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送系は、ナトリウムイオン存在下において活性を示すこと(図2)や、ナトリウムイオンフォアである monensinによって阻

害される(図3)ことから、ナトリウムイオン依存性であると考えられる。ナトリウム依存性の代謝物輸送系は種々な微生物において報告されているが、タウリン輸送系は現在のところ原核生物の中では黄色ブドウ

球菌において報告されているのみである⁷⁾⁸⁾。10mMタウリンを細胞懸濁液に添加すると細胞外ナトリウムイオン濃度が若干低下する(図3)ことから、タウリンはナトリウムイオンと共に輸送される可能性が示唆される。しかしながら、黄色ブドウ球菌は2-3Mという高濃度のNaCl存在下でも成育できる性質から、ナトリウムイオンの細胞外への排泄が活発な微生物であると考えられる。すなわちこのために細胞外ナトリウムイオンの変動は見かけ上微小である可能性が考えられる。

プロトンコンダクターが濃度依存性に黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送を抑制する(図5)ことから、この輸送系には呼吸鎖が関与することが考えられる。すなわち、黄色ブドウ球菌に大腸菌と同様な機構が存在していると仮定すれば、呼吸鎖により形成されたプロトンの濃度勾配が Na^+/H^+ 逆輸送系によってナトリウムイオン濃度勾配に置き換えられ、これが駆動力となってナトリウムイオンとタウリンが共輸送されるものと考えられる。しかしながら、黄色ブドウ球菌におけるエネルギー産生機構や、ナトリウムイオンのくみ出し機構はほとんど研究が進んでいない状況である。

本輸送系は哺乳動物の細胞膜小胞において報告されているタウリン輸送系と類似した K_m 値を有している⁹⁾ことから、輸送担体のタウリンに対する親和性が類似しているものと考えられる(図6)。一方、hypotaurine, β -alanine, guanidinoethane sulfonate (GES) は、哺乳動物においてはタウリン輸送系に対し

て強い阻害効果をもつことが報告されているが、黄色ブドウ球菌においては阻害効果は小さいことから、タウリンに対してより強い特異性を有しているものと考えられる(表1)。

細胞壁溶解酵素を用いて浸透圧ショックをかけて作成した細胞膜小胞がナトリウム依存性のタウリン輸送活性を示したことから、この輸送担体は細胞膜に存在しているものと考えられる(図6)。

本研究によって、自然環境においてタウリンが蓄積されることなく、微生物によって取り込まれていることが明らかになった。次の段階として、タウリンが如何に代謝され、硫黄源として自然界に利用されているかは重要な問題であり、今後研究を進めていく予定である。

謝 辞

本研究は一部、両備禮園記念財団、第11回生物学研究助成金(平成元年度)の贈呈を受けて行なったものである。近く、同財団、研究レポート(第6号)に、本研究結果を報告する予定である。

本研究に、終始ご助言を頂いた岡山大学薬学部微生物薬品化学教室、土屋友房博士に、また、電子顕微鏡写真撮影にご協力頂いた徳島文理大学薬学部、赤木正明博士に感謝致します。終りに本研究を遂行するにあたり、数々のご指導とご援助を賜りました、岡山県立短期大学学長、新見嘉兵衛博士に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Liao, D.F., Melly, M.A. and Hash, J.H.: Surface polysaccharide from *Staphylococcus aureus* M that contains taurine, D-aminogalacturonic acid, and D-fucosamine. *J. Bacteriol.*, 119:913-922, 1974
- 2) Smiley, D.W. and Wilkinson, B.J.: Survey of taurine uptake and metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 129:2421-2428, 1983
- 3) Bieber, E.J. and Wilkinson, B.J.: Sodium-dependent uptake of taurine in encapsulated *Staphylococcus aureus* strain M. *Biochim. Biophys. Acta*, 770:127-135, 1984
- 4) Kaback, H.R.: Bacterial membranes. *Methods Enzymol.*, 22:99-131, 1971
- 5) Konings, W.N., Barnes, E.M. and Kaback, H.R.: Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, 246:5857-5861, 1971
- 6) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951
- 7) Giehl, T.J., Qoronfle, M.W. and Wilkinson, B.J.: Transport, Nutritional and metabolic studies of taurine in staphylococci. *J. Gen. Microbiol.*, 133:849-856, 1987
- 8) Akagi, R., Sakai, Y., Akamatsu, Y. and Tsuchiya, T.: Taurine transport by *Staphylococcus aureus*. *Sulfur Amino Acids*, 10:323-327, 1987
- 9) Bahl, J., Frangakis, C.J., Larsen, B., Chang, S., Grosso, D. and Bressler, R.: Accumulation of taurine by

黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送系の研究

isolated rat heart cells and rat heart slices. *In* the effect of taurine on excitable tissues, *ed. by* Schaffer, S.W., Baskin, S.I. and Kocsis, J.J., Spectrum Press, Lancaster, pp 247-259, 1981

平成2年10月31日受付

平成2年11月18日受理