

グルコースによる黄色ブドウ球菌細胞内ATPの激減現象の解析

赤木玲子・江見由貴子*・光田香代子**

要 約

黄色ブドウ球菌において細胞外液へのグルコース添加により細胞内ATP濃度が激減することを見出し、この現象の発生機序を解明する研究の一環として、黄色ブドウ球菌における細胞内ATP濃度の調節機構を検討した。

1) 黄色ブドウ球菌における細胞内ATP濃度の激減は、グルコースの代謝産物やグルコシドによっては惹起されないことから、グルコースに特異的なものと考えられる。

2) 細胞外のプロトン濃度を上昇させることにより、細胞内ATP濃度の上昇が見られることから、他の微生物やミトコンドリアと同様に、黄色ブドウ球菌においても、プロトン輸送性ATPaseが存在する可能性が示唆された。

3) グルコースによる細胞内ATP濃度の低下は異なる作用機序の複数のATPase阻害剤によっても完全には抑制されないことから、ATPの生合成機構の抑制とは別に、グルコースによって促進されるATPの消費機構の存在が示唆された。

緒 言

生物はアデノシン-3-リン酸(ATP)の高エネルギーリン酸結合の形でエネルギーを捕捉し、生命活動のために利用していることは周知のとおりである。原核生物においては、呼吸鎖により細胞膜内外にプロトンの濃度勾配が形成され、これが膜内在性のATP合成酵素の駆動力となりATPの生合成が起こると考えられている。¹⁾²⁾このATP合成酵素は、ミトコンドリア、葉緑体、細菌細胞膜等に普遍的に存在しており、プロトン輸送性ATPaseとも呼ばれている。本酵素は試験管内ではATP分解の逆反応をも触媒することが知られている³⁾が、生物体内ではATPの生合成を主として行っていると考えられている。

一方、ある種のエネルギー供与体は、細胞内に取り込まれる際にリン酸化され、その結果、1分子のエネルギー供与体につき1分子の細胞内ATPを消費することが知られている(phosphoenolpyruvate phospho-transferase

system; PTS)。大腸菌においてはグルコースがPTSで取り込まれることが知られている。⁴⁾ブドウ球菌においては、ラクトースがPTSで取り込まれることが報告されているが、グルコースをはじめとするその他の糖質の取り込み機構については不明である。⁵⁾

私たちは、黄色ブドウ球菌におけるタウリン輸送系の研究中に、グルコース添加によって細胞増殖に影響を与えることなく細胞内ATP濃度が激減するという注目すべき現象を発見した。⁶⁾そこで、黄色ブドウ球菌におけるエネルギー生産の仕組みと、グルコース添加が細胞内ATP濃度を減少させる機序を解明する目的で、以下の実験を行なった。

実 験 方 法

1. 黄色ブドウ球菌細胞懸濁液の調整

黄色ブドウ球菌209P株を用いた。3%ブイヨン培地(ニッスイ)中で一晩振とう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時間振とう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、水冷した0.1M Tris-HCl緩衝液(pH7.0)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. ATP濃度の定量

上記細胞懸濁液を0.1M Tris-HCl緩衝液(pH7.0)で最終タンパク濃度が0.1-0.2mg/mlになるように希釈し37℃でインキュベートした。経時的に細胞懸濁液を採取し、10mM Tris-NaOH緩衝液(pH7.0)(40mM MgCl₂を含む)に最終タンパク濃度、約0.03mg/mlになるように加え、沸騰水浴中で6分間加熱した。その後、氷水中で冷却し、遠心分離(6000rpm, 2分間)して得た上清をATP測定用の試料とした。ATP濃度はHEPES緩衝液(50mM HEPES-Tris, 2mM EDTA-2K, 10mM MgCl₂(pH7.75))中で、luciferin-luciferase(ATP bioluminescence CLS; ベーリンガー・マンハイム株式会社)により発生する蛍光強度をLumicounter ATP-237(アドバ

*岡山大学医学部第二病理学教室 **雪印乳業株式会社

ソテック株式会社)を使用して定量した。⁷⁾尚、検量線は 10^{-8} – 10^{-6} M ATP標準液(ATP-2Na⁺(SIGMA CHEMICAL COMPANY))を用いて同様に作製した。ATPaseの阻害剤の影響を調べる実験では、Na₃N₃を最終濃度5 mMになるように、もしくはDCCDを最終濃度100 μMになるように添加し、37℃で10分間もしくは7分間インキュベートした後、グルコースを最終濃度10 mMもしくは20 mMになるように添加し、この間に細胞懸濁液を経時的に採取しATPを定量した。

特に記載のない試薬は、すべてナカライテスク株式会社より購入した。

3. 人工的プロトン濃度勾配負荷実験

最終タンパク質濃度約0.4mg/mlの細胞懸濁液を37℃でインキュベートし5分後に1N HCl(石津製薬株式会社)を最終濃度17 mMになるように添加した。対照として、HClと同じモル濃度のNaClを添加し経時的に細胞懸濁液を採取してATPを定量した。この間の細胞懸濁液中のpHの変化はpHメーターで測定した。

4. タンパク質濃度の定量

細胞懸濁液にラウリル硫酸ナトリウムを1%になるように添加し、60℃で15分間加熱することにより細胞を可溶化した後、牛血清アルブミン(SIGMA CHEMICAL COMPANY)を標準として、タンパク質濃度をLowry法により定量した。⁸⁾

実験結果

1. 黄色ブドウ球菌の細胞内ATP濃度及ぼすグルコース添加濃度の影響

反応液中に最終濃度0.5–20 mMのグルコースを添加した際の細胞内ATP濃度の経時変化を図1に示した。20 mMのグルコース添加直後より細胞内ATP濃度は、急激な低下を示し、約5分後には一定のレベルに達した。最終濃度2, 3, 4, 5, 10 mMのグルコース添加における細胞内ATP濃度は、添加グルコース濃度に依存した低下を示した。一方、最終濃度0.5–1 mMのグルコース添加においては、細胞内ATP濃度の有意な低下はみられず、むしろわずかに上昇する傾向を示した。

2. 種々な糖が細胞内ATP濃度及ぼす影響

自然界に多く存在する種々の単糖とオリゴ糖を最終

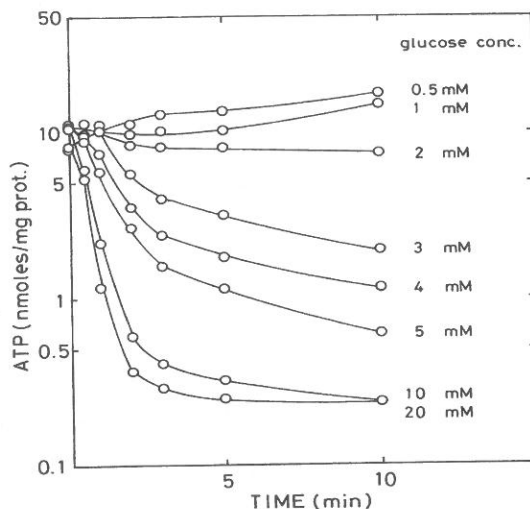


図1 黄色ブドウ球菌における細胞内ATP濃度の変動に及ぼすグルコース添加の影響

グルコースを最終濃度0.5–20 mMになるように細胞懸濁液に添加し、細胞内ATP濃度を経時的に定量した。実験方法の詳細は、本文中に記載した。

表1 黄色ブドウ球菌における種々な糖添加5分後の細胞内ATP濃度

糖	ATP濃度 (%)
グルコース	4.6
ガラクトース	112
フルクトース	116
マンノース	129
マルトース	128
ラクトース	107

糖はいずれも最終濃度20 mMになるように反応液に添加した。表の数値は、対照実験におけるATP濃度を100とした値である。実験方法の詳細については本文中に記載した。

濃度20 mMになるように細胞懸濁液に添加し、インキュベート5分後の細胞内ATP濃度を定量した結果を表1に示した。数値は対照の糖非添加の細胞内ATP濃度を100とした割合で表わした。グルコースにおいては、著しい細胞内ATP濃度の低下が見られた。グルコース以外は、どの糖も細胞内ATP濃度の有意な変動を起こさず、グルコースのような細胞内ATP濃度低下も全く見られなかった。尚、データには示していないが、グルコースの構造類似体であるMethyl-D-glucoside、2-deoxy-D-glucose添加も細胞内ATP濃度の有意な変

動を示していなかった。更にこれらの構造類似体200 mM添加後に更に20 mMグルコースを添加すると、グルコースのみ添加した際と同等の細胞内ATP濃度の低下がみられた。

3. 人工的プロトン濃度勾配負荷による細胞内ATP濃度の変化

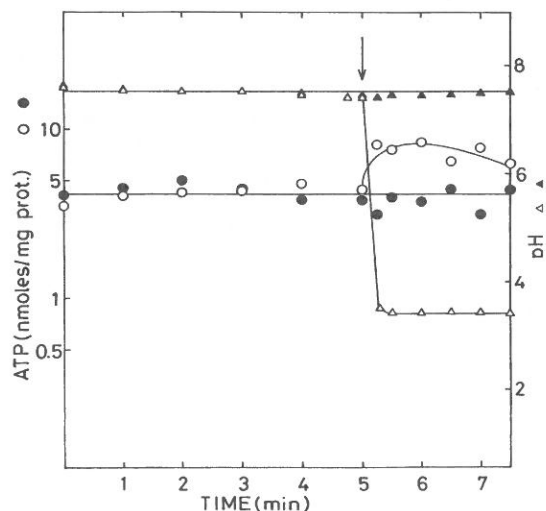


図2 黄色ブドウ球菌における細胞内ATP濃度の変動に及ぼす人工的カチオン濃度勾配負荷の影響

図中 open symbol は矢印のところでHClを最終濃度17mMになるように添加したときの細胞内ATP濃度(○)および細胞外pH(△)の変動を示した。closed symbolは矢印のところでNaClを最終濃度17mMになるように添加したときの細胞内ATP濃度(●)および細胞外pH(▲)の変動を示した。実験方法の詳細については本文中に記載した。

細胞懸濁液中に1N HClを添加することにより、人工的にプロトン濃度勾配を作成し、そのときの細胞外液のpHの変化と細胞内ATP濃度の経時的变化を図2に示した。HCl添加直後、細胞外液のpHの著しい低下(pH 7.6-3.4)が見られ、細胞膜内外に人工的にプロトン濃度勾配が形成され、それと同時に急激な一過性の細胞内ATP濃度の上昇が見られた。一方、同濃度のNaClを添加したところ、細胞外液のpHは変化せず、HClを添加したときのような細胞内ATP濃度の上昇も見られなかった。

4. ATPase 阻害剤が、細胞内ATP濃度変動に及ぼす影響

F₀F₁ATPaseのF₀サブユニットに対する阻害効果を有することが知られているDicyclohexylcarbodiimide(DCCD)を最終濃度が100μMになるように細胞懸濁液に添加し、37℃で20分間インキュベートした後にグルコースを添加したときの細胞内ATP濃度の経時的变化を図4に示した。DCCD添加によって細胞内ATP濃度の緩やかな低下がみられるが、グルコースを添加すると、添加直後から急激な著しい細胞内ATP濃度低下がみられた。DCCD添加の有無にかかわらず、グルコース添加による細胞内ATP濃度の低下は同等のものであった。

一方、F₁サブユニットの阻害剤として知られているNaN₃を最終濃度が5mMになるように細胞懸濁液に添加し、37℃で5分間インキュベートした後にグルコースを添加したときの細胞内ATP濃度の経時的变化を図5に示した。NaN₃添加によって細胞内ATP濃度の緩やかな低下が見られたが、グルコースを添加すると、添加直後から更に細胞内ATP濃度の低下が見られた。グルコース添加による細胞内ATP濃度の低下はコントロールでは約3nmoles/mg proteinであったが、NaN₃添加後は、1/10以下に減弱化された。

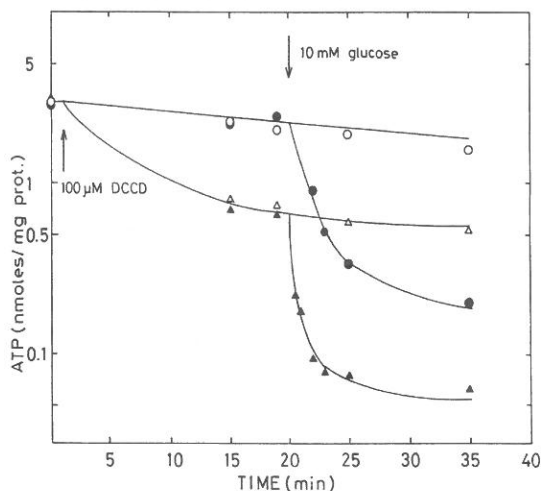


図3 黄色ブドウ球菌における細胞内ATP濃度の変動に及ぼすDCCDの影響

△▲は細胞懸濁液中にDCCDを最終濃度が100μMになるように添加したときの細胞内ATP濃度の変動を表わしたものである。○●は対照としてDCCDの代わりに同量のエタノールを添加したときのものを表わした。closed symbolはそれぞれ20分後にグルコースを最終濃度が10mMになるように添加したときのものを表わした。

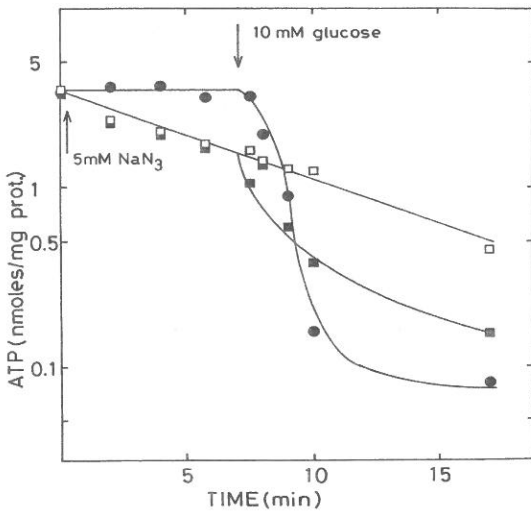


図4 黄色ブドウ球菌における細胞内ATP濃度の変動に及ぼす NaN_3 の影響

□■は細胞懸濁液中に NaN_3 を最終濃度が5 mMになるように添加したときの細胞内ATP濃度の変動を表わしたものである。●は対照実験で、■●は共に、7分後にグルコースを最終濃度が10mMになるように添加したときのものを表わした。

考 察

黄色ブドウ球菌の細胞内ATP濃度は細胞外液へのグルコース添加によりグルコースの濃度依存性に減少した。(図1)このような現象は、その他の天然に存在する糖質には見られない(表1)ことから、グルコースに特有なものと考えられる。我々は既に解糖系によるグルコースの代謝産物が細胞内ATP濃度に変動をもたらさないことを示しており、⁹⁾また今回データには示さなかったが、解糖系の阻害剤であるフッ化カリウムがグルコースによる細胞内ATP減少効果に対して影響を及ぼさなかったことから、グルコース添加によるこのような効果はグルコースの代謝産物によってもたらされるのではなく、グルコースそのものによる可能性が示唆された。

グルコースは、大腸菌においてはPTSで取り込まれることが知られている。黄色ブドウ球菌においてはラクトースがPTSで取り込まれると報告されており、⁹⁾取り込まれたラクトースーリン酸は細胞内でホスホガラクトキナーゼによってグルコースと6-ホスホガラクトースに分解される。¹⁰⁾すなわち、ラクトース1分子が細胞内に取り込まれると、細胞内には1分子のグルコースが生じることになる。ところが、表1に示したように、ラ

クトース添加により細胞内ATPは減少しなかったことから、次の2つの可能性について考察することができる。第一に、グルコースによる細胞内ATP減少が、グルコースがPTSで取り込まれる過程でのATP消費の結果であるとすれば、ラクトースでも同様な結果が得られるはずであり、この現象へPTSが関与しない可能性が示唆された。第二に、ラクトースの取り込みによって細胞内に生じたはずのグルコースは細胞内ATP濃度の変動をもたらさなかったことから、細胞内ATP濃度の低下を誘引するグルコースの作用点は、細胞内ではなく、細胞外に存在する可能性が示唆された。

グルコースによる細胞内ATP激減機構の可能性の一つに、ATP合成系の阻害が考えられる。大腸菌の細胞膜には $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPase}$ と呼ばれる酵素が存在しており、¹¹⁾呼吸鎖により形成されたプロトンの濃度勾配を駆動力としてATP合成を行っていることが知られている。黄色ブドウ球菌におけるATP合成機構は未だ明かにされていないが、人工的なプロトンの濃度勾配を作成すると、pHの低下とともにATP合成が見られること(図2)から、プロトン輸送性のATPaseは存在するものと考えられる。

そこで $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPase}$ に対するグルコースの阻害効果について検討した。まず、大腸菌とミトコンドリアにおいて F_0 阻害効果が知られているDCCDで F_0 を阻害しATP合成を抑制した上でグルコースを添加した。¹²⁾もし、グルコースによる細胞内ATP濃度の低下が $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPase}$ への抑制作用によるものならば、ATPの合成を抑制したものとグルコースのみ添加したものと細胞内ATP濃度の低下は同等のはずである。しかし、結果は図3に示したようにATP合成を抑制した際ATP濃度は徐々に低下したが、ATP合成の阻害による細胞内ATPの低下はグルコースによる低下に及ばないばかりか、ATP合成を抑制した後、グルコースを添加すると細胞内ATP濃度が更に激減した。この結果から、グルコースによる細胞内ATP濃度の低下をATP合成に対する抑制作用のみで説明することは困難と思われる。

次に、 F_1 サブユニットに対する阻害効果が報告されている NaN_3 を用いて同様に検討した¹³⁾¹⁴⁾結果、図5に示すとおりDCCDの場合と同様に、ATP合成を阻害したときの細胞内ATP低下の程度はグルコース添加時のATP減少効果には及ばなかった。しかし、 NaN_3 添加によりATP合成を阻害した後にグルコースを添加すると更に細胞内ATPは減少するが、その程度は1/10以下に減弱化されたことから、グルコースの作用点は F_1

サブユニットかもしくはその近傍である可能性が示唆された。 $F_0F_1ATPase$ は、 Na^+ATP 合成反応の活性中心と分解反応の活性中心が異なっている可能性が示唆されており、¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ しかも、 $DCCD$ あるいは NaN_3 による細胞内 ATP 低下速度に比べて、グルコースによ

る ATP 低下速度が極めて早いことから、このようなグルコースの効果は ATP 合成の阻害のみではなく、むしろ ATP 分解反応が促進された結果もたらされたものである可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) 長田恭明, 大木玲子訳, 善養寺浩監訳: 細胞の代謝, p14-36
- 2) 新家浪雄, 重永道緒: 細胞の構造: 共立出版株式会社, p36
- 3) 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, p601 (1984)
- 4) 木村光: 大腸菌の糖代謝: 蛋白質核酸酵素, 24, p313-317 (1979)
- 5) Simoni, R.D., Nakazawa, T., Hays, J.B. and Roseman, S.: J. Biol. Chem., 248, 932-940, (1973)
- 6) Akagi, R.: Taurine transport in *Staphylococcus aureus*: Bulletin of Okayama Prefectural Junior College, 32(2), p10-13, (1987)
- 7) Stanley, H.E. and Williams, S.G.: Anal. Biochem., 29, 381-392, (1969)
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193, 265-275, (1951)
- 9) 赤木玲子, 宇野博美, 坪田典子: 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, 岡山県立短期大学研究紀要, 34, 82-87, (1991)
- 10) Giehl, T.J., Qoronfleh, M.W. and Wilkinson, B.J.: J. Gen. Microbiol., 133, 849-856, (1987)
- 11) 水上茂樹: pHの影響, 蛋白質核酸酵素, 22, 14, (1977)
- 12) Hermolin, J. and Fillingame, H.: J. Biol. Chem., 264, 3896-3903, (1989)
- 13) Wei, J., Howlett, B. and Jagendorf, A.T.: Biochim. Biophys. Acta, 934, 72-79, (1988)
- 14) Minkov, I.B. and Strotmann, H.: Biochim. Biophys. Acta, 973, 7-12, (1989)
- 15) Pedersen, P.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 64, 610-616, (1975)
- 16) Vasilyeva, E.A., Minkov, I.B., Fitin, A.F. and Vinogradov, A.D.: Biochem. J., 202, 15-23, (1982)
- 17) Kobayashi, H., Maeda, M. and Anraku, Y.: J. Biochem., 81, 1071-1077, (1977)

平成3年7月2日受付

平成3年8月26日受理