

生育パターンの異なる低温性 *Pseudomonas* 属細菌の生育に伴う菌体タンパク質の変動

森井 秀昭, 笠間憲太郎, 高水 智宏, 城島 一将

Changes with Growth in Cellular Proteins of Psychrotrophic *Pseudomonas* spp.  
Having Different Growth Patterns

Hideaki MORII, Kentaro KASAMA, Tomohiro KOUSUI, and Kazumasa JYOJIMA

In order to study whether the psychrotrophic *Pseudomonas* isolates showing different growth curves are composed of different ecotype, cellular proteins of the non-halophilic psychrotrophs during growth were determined by two-dimensional gel electrophoresis using isoelectric focusing in one dimension and sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the second dimension. Growth curves of the psychrotrophs showed an increased slope throughout growth (in Type 1 strains) or a decreased slope after the stationary phase of growth (in Type 2 strains) under optimum temperatures. Protein bands on both isoelectric focusing gels and SDS gels and protein spots on the two-dimensional gels were very clear for Type 1 strains and unclear (become foggy) for Type 2 strains, suggesting that the protein molecules have compact structure in Type 1 strains and deformable structure in Type 2 strains. The number and amounts of the protein spots increased in Type 1 strains during growth and decreased in Type 2 strains during the death phase of growth at the optimum temperatures. That is, the difference of growth curves between Type 1 and 2 strains was considered to be based on the difference of physical and chemical structures for tertiary folding of protein molecules. In other words, it was suggested that the two Type strains of the psychrotrophic *Pseudomonas* isolates are composed of different ecotype. In Type 2 strains, moreover, growth curves showed an increased slope throughout growth under 10 °C, the number and amounts of the protein spots increased during growth at 10 °C, and the protein bands and spots were more clear in the strains grown under 10 °C than those grown under the optimum temperature, suggesting that the molecules have more compact structure in the strains grown under 10 °C. These facts suggest that Type 2 strain have evolved to be adapted to more cold. In addition, the protein spots obtained on the two-dimensional gels were very different between CBB and silver stainings and were more observed in the acidic side in the former and in the neutral side in the latter.

**Key Words:** 低温性 *Pseudomonas* 属細菌 psychrotrophic *Pseudomonas* spp., 生育曲線 growth curve, 菌体タンパク質 cellular protein

## 緒 言

微生物はその種類により基本的生育温度 (最低, 最高および最適温度) を異にし, その違いにより微生物は慣習的に低温, 中温および高温微生物の3つに区分され, さらにこれらは細分化される。これら区分された微生物は遺伝的に異なる形質をもち, これらの形質は微生物により進化的に獲得されたと考えられている。ところで, 0 °C下に貯蔵したサバから分離した低温性 *Pseudomonas* 属細菌<sup>1)</sup> および *Vibrio* 属細菌<sup>2)</sup> は菌株間で基本的生育温度を異にした。その上, これら低温細菌の至適温度での生育曲線は生育を通して増加傾向を示す菌群と定常期以降で減少傾向を示す菌群があり<sup>1-4)</sup>, これら異なる生育曲線を示す菌群間ではその基本的生育温度をも異にした<sup>1,2)</sup>。一方, これら異なる生育曲線を示す低温

性 *Pseudomonas* 属細菌では, 培地中へのグルコース添加に伴う生酸作用および生酸作用に伴う抗酸性能が異なった<sup>1)</sup>。また, 培養中の各アデノシンリン酸 [アデノシン一リン酸 (AMP), アデノシン二リン酸 (ADP) およびアデノシン三リン酸 (ATP)] 濃度のレベルおよび生育に伴う各アデノシンリン酸の消長がこれら菌群間で異なり, これらの違いは培養条件が異なっても同様な傾向を示した<sup>1,2)</sup>。さらに, *Pseudomonas* 属細菌では各アデノシンリン酸および核酸への [<sup>2-3</sup>H] アデニンの取込み傾向が両菌群で異なった<sup>4)</sup>。つまり, 異なる生育パターンをもつ菌群は遺伝的に異なる形質をもち, これらの形質は進化的に獲得されたと考えられた。このため, 細胞を構成するタンパク質も, 異なる生育パターンを示す菌群間で異なると判断された。そこで今回は, 低温性 *Pseudomonas* 属細菌の生育パターンを異にする

菌株の構成タンパク質を, 等電点, SDSおよび等電点 - SDS 二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析により調べた。

#### 材料および方法

##### 供試菌株, 供試培地および培養方法

0 下に貯蔵したサバから分離した低温性 *Pseudomonas* 属細菌<sup>5)</sup>のうち, 至適温度培養での生育曲線が生育を通して増加傾向を示し, 20 に至適生育温度をもった菌株 (タイプ1型菌), および同生育曲線が定常期以降に減少傾向を示し, 30 に至適生育温度をもった菌株 (タイプ2型菌) の各2菌株を用いた。ところで, これまで低温性 *Pseudomonas* 属細菌で認めたタイプ1型菌および2型菌については, 培養温度が異なっても生育パターンに違いが見られないとした<sup>1)</sup>。しかし今回供試したタイプ2型菌は, 特に至適温度培養と10 培養で異なる生育パターンを示した菌株を用いた (考察参照)。培養にはNBG培地 [0.8% nutrient broth (BBL) と0.1% グルコースを50%海水に溶かし, pH 7.4に調整] を用い静置培養した。

##### 供試菌の生育量の測定

タイプ1型菌および2型菌とも, 至適生育温度および10 で144時間まで, 経時的に600nmでの吸光度を測定した。

##### 電気泳動用試料としての菌体タンパク質の調製法

菌体タンパク質の調製はO'Farrellの二次元電気泳動における菌体タンパク質の試料調製法<sup>9)</sup>に準じて行った。まず, 500mL 容三角フラスコにNBC培地300mLを入れ, 至適温度および10 下で静置培養し, 対数期, 定常期および死滅期の培養液を9000回転/分で20分間遠心分離し, 菌体を集めた。この菌体に超音波用試料溶解液 [10mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に5mM塩化マグネシウムとリポヌクレアーゼ (RNアーゼ) 50 μg/mLを添加] の2mLを加え懸濁後, 超音波破壊した。この破壊溶液の一定量 (1.5~2.0mL) を取り, デオキシリボヌクレアーゼ (DNアーゼ) 濃度が50 μg/mL となるようにDNアーゼ 保存液 [10mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に1mM塩化マグネシウムとRNアーゼ 1mg/mLを添加] を加え, 5分間以上氷中に放置した。この一定量 (600 μL) を取り, 尿素を最終濃度9Mとなるように加え, さらにこの溶液と等量の試料溶解液を加え, 遠心分離し, その上清を電気泳動用試料とした。

##### 各試料タンパク質濃度の測定法

本試料には界面活性剤などの夾雑物が多く含まれるため, その影響が少ない比濁法<sup>7)</sup>によりタンパク質濃度を測定した。泳動用試料の一定量 (50~100 μL) に蒸留水を加え1000 μLとし, これを濁度測定用試料とした。これにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) およびトリクロロ酢酸 (TCA) の最終濃度がそれぞれ5%および15%となるように20%SDS溶液および60%TCA溶液を加え混和し, 30分後に600nmで吸光度を測定した。なお標準曲線には牛血清アルブミンを用い, これを

もとに試料の濃度を求めた。泳動は全て一定量のタンパク質で行った。

##### 等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法

等電点ポリアクリルアミド電気泳動はO'Farrellの二次元電気泳動法における等電点電気泳動法<sup>9)</sup>に準じた。試料は陰極側 (塩基性側) より添加し, 5 x 100mmのカラムを用い定電圧 (400V) で12時間泳動後, さらに800Vで1時間の泳動を行い, クーマシー・プリリアント・ブルー (CBB)-G 250で検出を行った。ゲル中に形成されるpH勾配はゲルを1cm間隔に切断し, その各切片を試験管に入れ, 脱気後に蒸留水を加え2時間放置後, pHメーターで水層のpHを測定することで求めた<sup>8)</sup>。

##### SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法

SDSポリアクリルアミド電気泳動はLaemmliの方法<sup>9)</sup>に準じた。ゲル濃度7.5~15%の密度勾配平板ゲル160 x 160 x 1mmを作成し, 定電流 (25mA) で3.5時間泳動を行い, CBB-G 250により検出を行った。なお, 試料と同時に分子量マーカーの泳動も行った。分子量マーカーはプロメガ社のものを用いた。

##### 二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析法

二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動はO'Farrellの二次元電気泳動法<sup>9)</sup>に準じた。一次元は1 x 130mmのカラムで等電点電気泳動, 二次元は160 x 160 x 1mmの平板でSDS電気泳動した。泳動条件, タンパク質スポットの検出および分子質量の測定は前記同様とした。検出されたスポットの量を数値化するため, 泳動像をコンピューターに取り込み, 画像解析ソフト (アトー株式会社) を用い, その面積 (銀染色でのスポット) または体積 (CBBでのスポット) の相対値 (最も低いスポットの面積または体積を1とする) を求めた。

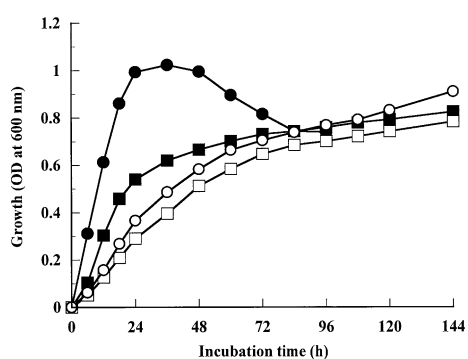
##### 銀染色法

Jamesの方法<sup>10)</sup>に準じた。

## 結 果

### 1. 発育量の経時的変化

本研究に用いた低温性 *Pseudomonas* の至適温度培養および10 培養での生育曲線をFig. 1に示す。至適温度下で培養した低温性 *Pseudomonas* では, 生育曲線が生育を通して増加傾向を示す菌株 (タイプ1型菌) と定常期以降で減少傾向を示す菌株 (タイプ2型菌) を認めた。しかしながら, 10 培養での生育曲線はタイプ1型菌および2型菌とも生育を通して増加傾向を示した。なお, 実験は異なる生育パターンを示した各2菌株について行ったが, これら2菌株の生育パターンは類似したため, 各1菌株の結果を示した。

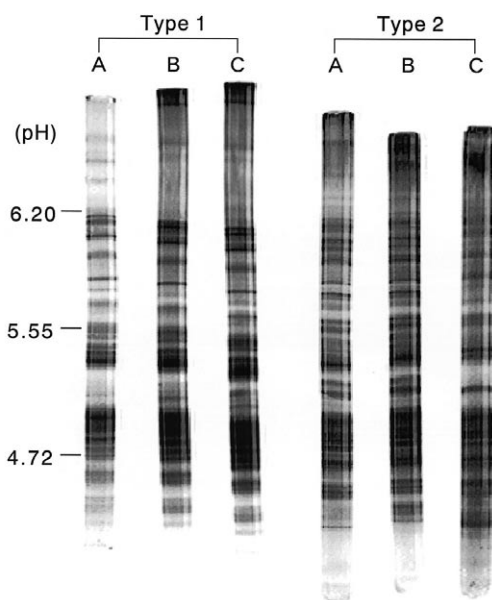


**Fig. 1** Growth curves of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) grown at an optimum temperature (20 °C) and 10 °C, and *Pseudomonas* strain PS344 (Type 2 strain) grown at an optimum temperature (30 °C) and at 10 °C.

2. 至適温度培養における生育に伴う菌体タンパク質の消長

1) 菌体タンパク質の等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動

至適温度培養での対数期、定常期および死滅期におけるタイプ1型菌および2型菌（以降1型菌および2型菌という）の菌体タンパク質の等電点電気泳動図をFig. 2に示す。なお、両タイプの菌とも各2菌株について実験を行ったが、これら2菌株の結果は類似したため、代表的な1菌株の結果を示した。以下の電気泳動結果についても同様とする。1型菌ではいずれの培養期の細胞でも中性側から酸性側までタンパク質のバンド（以下バンドという）が平均的に分布し、しかもバンドは鮮明であった。バンド数および濃度は対数期の細胞に比べ定常期・



**Fig. 2** Isoelectric focusing gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strains PS237 (Type 1 strain) and PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at optimum temperatures (20 °C and 30 °C in Type 1 and 2 strains, respectively).

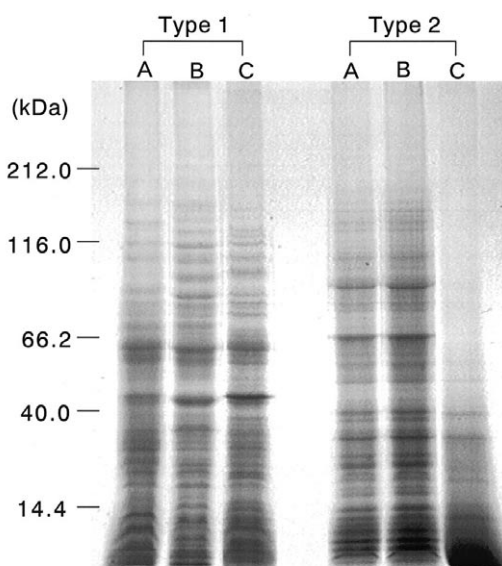
死滅期の細胞で高い値を示した。2型菌でも1型菌と類似したバンドの分布を認めたが、1型菌よりもバンドがやや不鮮明で、この傾向は死滅期の細胞でより明らかであった。

2) 菌体タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

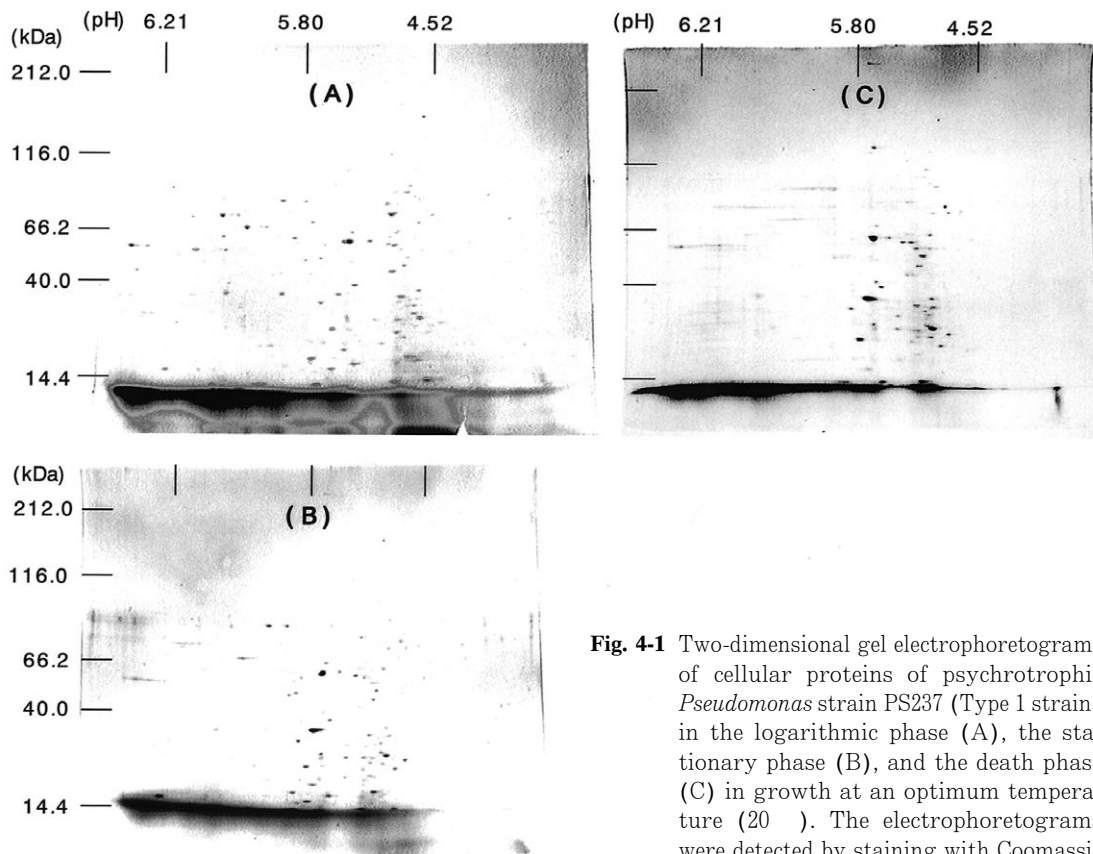
至適温度培養での対数期、定常期および死滅期における1型菌および2型菌の菌体タンパク質のSDS電気泳動図をFig. 3に示す。1型菌ではいずれの培養期の細胞とも高分子側から低分子側まで鮮明なバンドが平均的に分布し、また培養期での違いでバンドの顕著な違いを認めなかった。2型菌では対数期の細胞よりも定常期の細胞でバンドの濃度が高くなり、死滅期の細胞ではバンドの数および濃度も急減した。特に、死滅期の細胞では40kDa以上ではバンドはほぼ確認できず、またそれ以下でもバンドは極めて少なく不鮮明であった。

3) 1型菌の菌体タンパク質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動

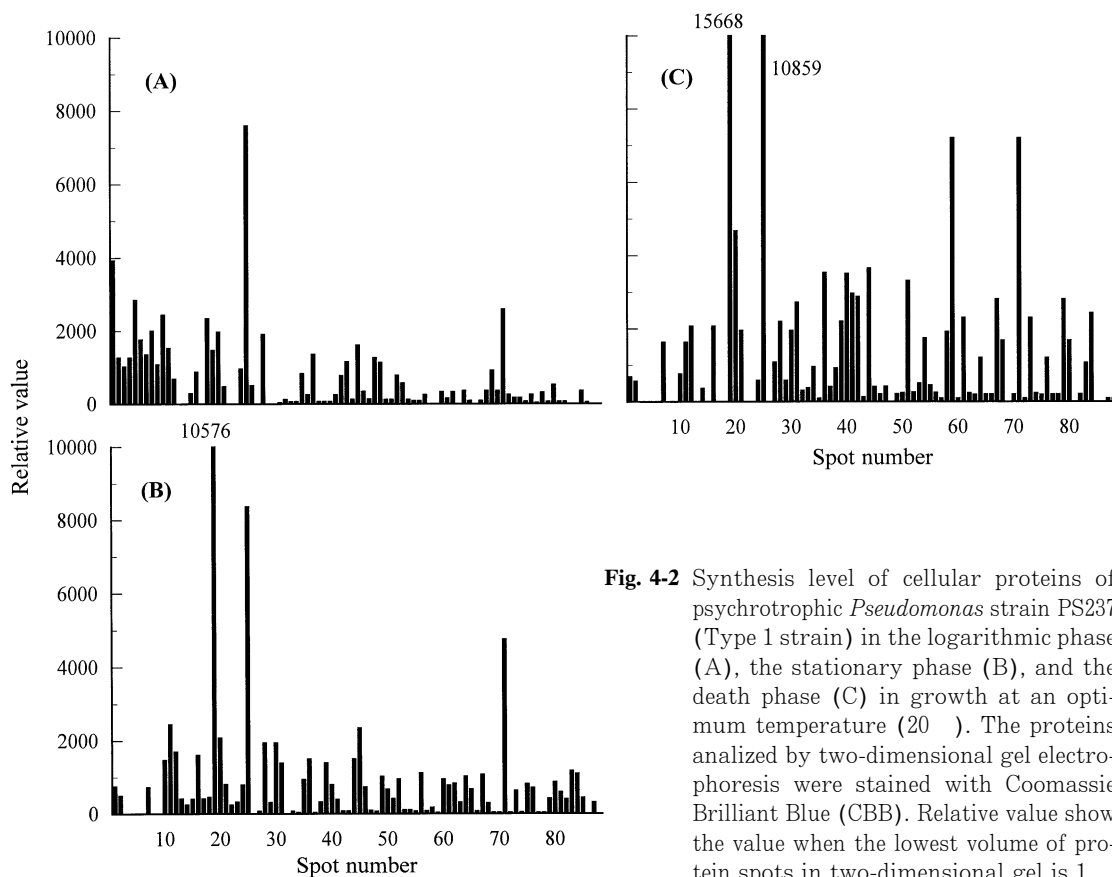
至適温度培養での対数期、定常期および死滅期における1型菌の菌体タンパク質のCBB染色による二次元電気泳動図をFig. 4 - 1およびそのコンピューター解析の結果をFig. 4 - 2に示す。1型菌ではタンパク質のスポット（以下スポットという）は鮮明で、タンパク質レベルは生育に伴い高くなり、特に死滅期の細胞では極めて高かった（特にFig. 4 - 2参照）。またスポットは対数期の細胞では主にpH 4.52~6.21に分布したが、定常期・死滅期の細胞ではpH 4.52~5.80に、また分子量はいずれの培養期の細胞とも14.4~100kDaの範囲に平均的に分布した。



**Fig. 3** Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strains PS237 (Type 1 strain) and PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at optimum temperatures (20 °C and 30 °C in Type 1 and 2 strains, respectively).



**Fig. 4-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (20 °C). The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB).



**Fig. 4-2** Synthesis level of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (20 °C). The proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). Relative value show the value when the lowest volume of protein spots in two-dimensional gel is 1.

至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における1型菌の菌体タンパク質の銀染色による二次元電気泳動図をFig. 5 - 1およびそのコンピューター解析の結果をFig. 5 - 2に示す。1型菌ではスポットは鮮明で, また培養齢が増すにつれてスポットの数および濃度とも増加した (特にFig. 5 - 2参照)。

なお, CBB染色では確認できない塩基性側のスポットが銀染色で, 逆に銀染色では確認できない酸性側のスポットがCBB染色で多く確認できた。また, 両染色法で検出されるスポットの数および同一スポットではその濃度が異なった。

#### 4) 2型菌の菌体タンパク質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動

至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における2型菌の菌体タンパク質のCBB染色による二次元電気泳動図をFig. 6 - 1およびそのコンピューター解析の結果Fig. 6 - 2に示す。2型菌では1型菌に比べスポットは不鮮明であった。対数期の細胞ではスポットはpH 4.80~5.50, 分子量30.0~116.0kDaの範囲に分布した。定常期の細胞ではスポットの数および濃度とも急増し, その増加はpH 5.50以上で顕著であった。死滅期の細胞ではスポットの数および濃度とも急減し, その減少は塩基性側および高分子側で顕著で, つまりより酸性側 (pH 4.80~5.70) およびより低分子側 (14.4~105.0kDa) にスポットは分布した。

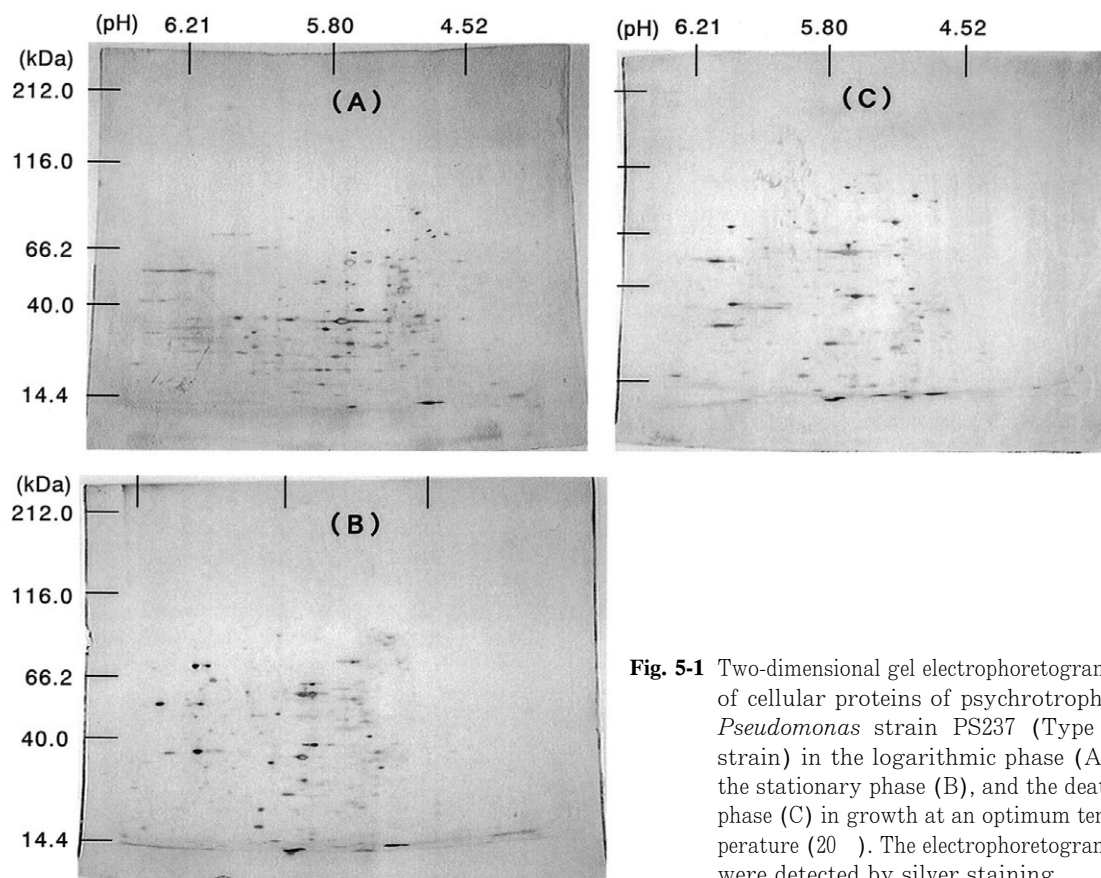
至適温度培養での対数期, 定常期および死滅期における2型菌の菌体タンパク質の銀染色による二次元電気泳動図をFig. 7 - 1およびそのコンピューター解析の結果をFig. 7 - 2に示す。2型菌ではスポット数および濃度とも対数期から定常期にかけて急増し, 死滅期では急減した (特にFig. 7 - 2参照)。

なお, 銀染色とCBB染色で検出されるスポットに著しい違いがあり, また同じスポットでも両染色法でその濃度が異なった。また1型菌と同様に, CBB染色では酸性側のスポット, 銀染色では塩基性側のスポットを多く認めた。

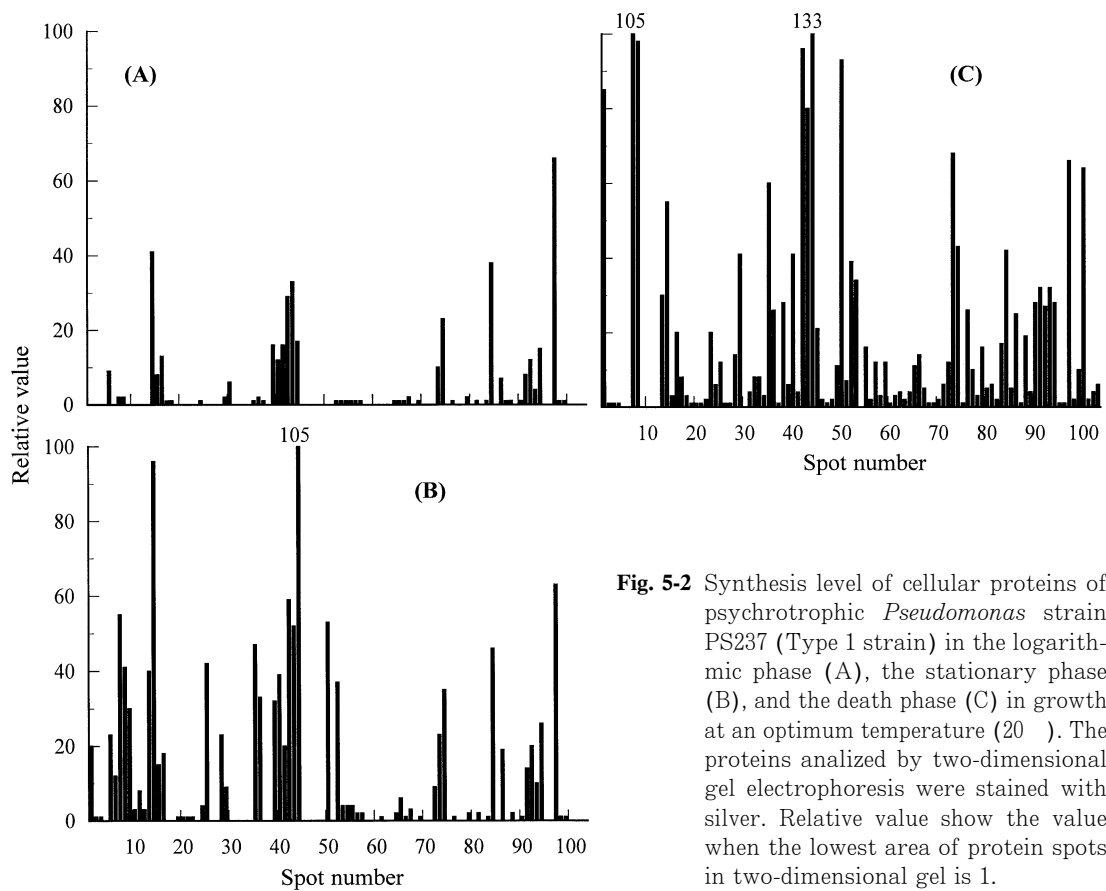
#### 3. 10°C培養における生育に伴う菌体タンパク質の消長

##### 1) 菌体タンパク質の等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動

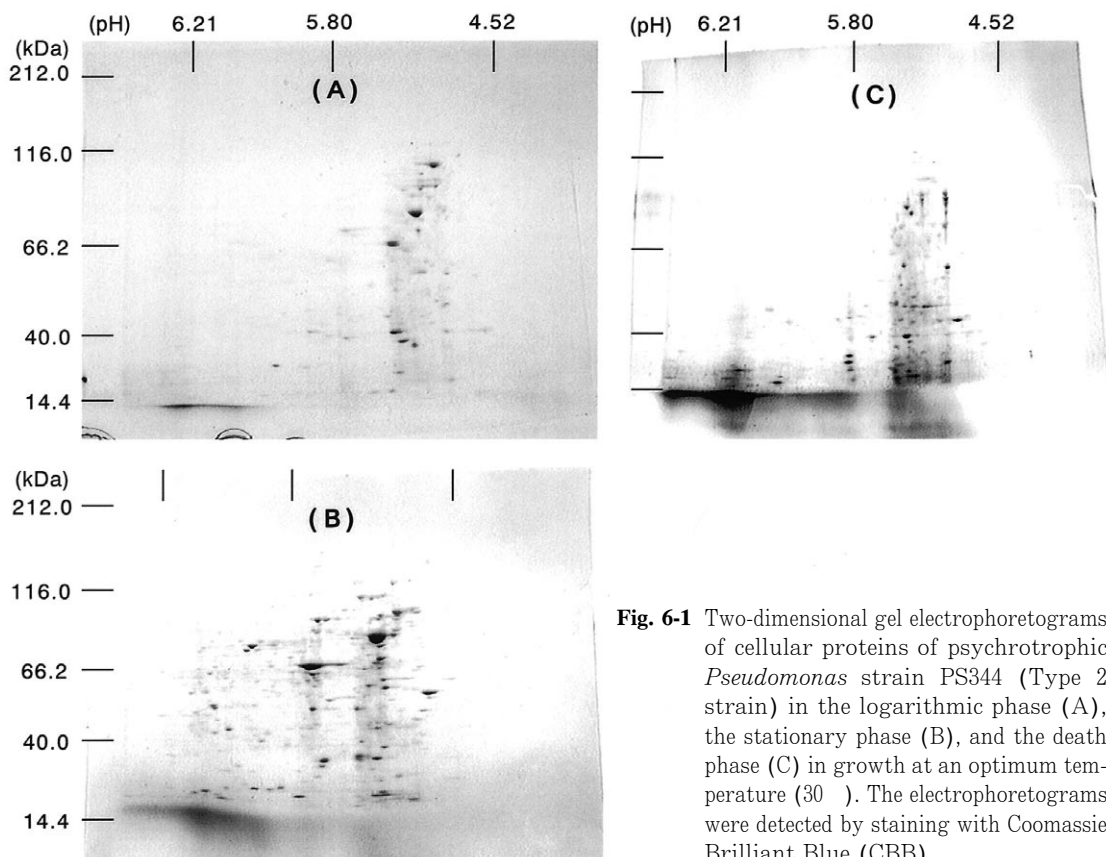
10°C培養での対数期, 定常期および死滅期における1型菌および2型菌の菌体タンパク質の等電点電気泳動図をFig. 8に示す。なお, 供試菌は至適温度培養実験と同じ菌株を用いた。以下も同様である。1型菌では, バンドが鮮明で中性側から酸性側まで分布したが, 特にpH 5.0, 5.5および6.2付近のバンドの濃度が高かった。またその濃度は対数期で極めて低く, 定常期および死滅期と培養齢が進むにつれてバンドの濃度は高くなった。2型菌では, バンドはより不鮮明で, 中性側から酸性側まで平均的に分布したが, その濃度は培養齢が進むにつれて若干高くなった。



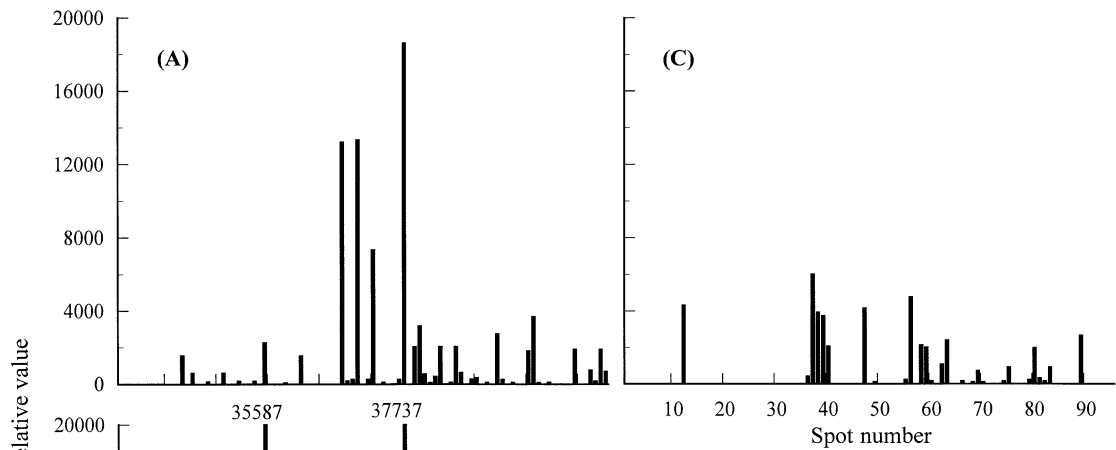
**Fig. 5-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (20°C). The electrophoretograms were detected by silver staining.



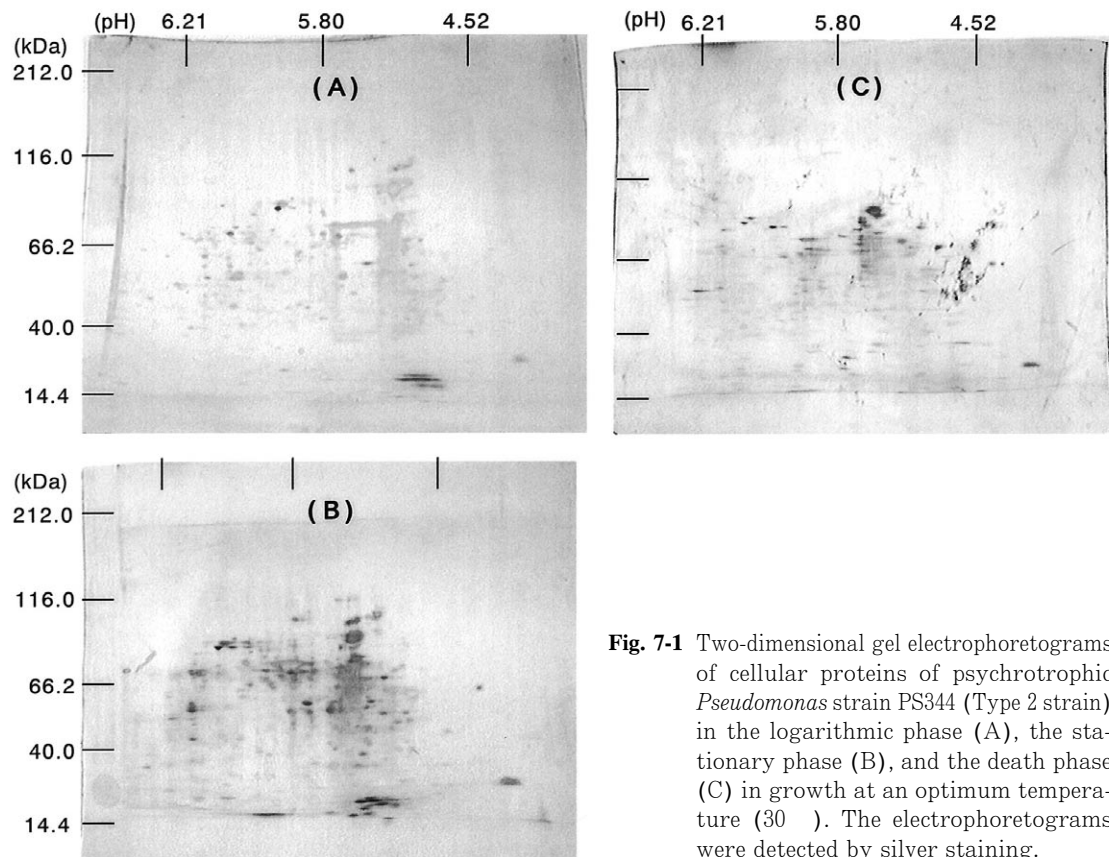
**Fig. 5-2** Synthesis level of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (20 °C). The proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis were stained with silver. Relative value show the value when the lowest area of protein spots in two-dimensional gel is 1.



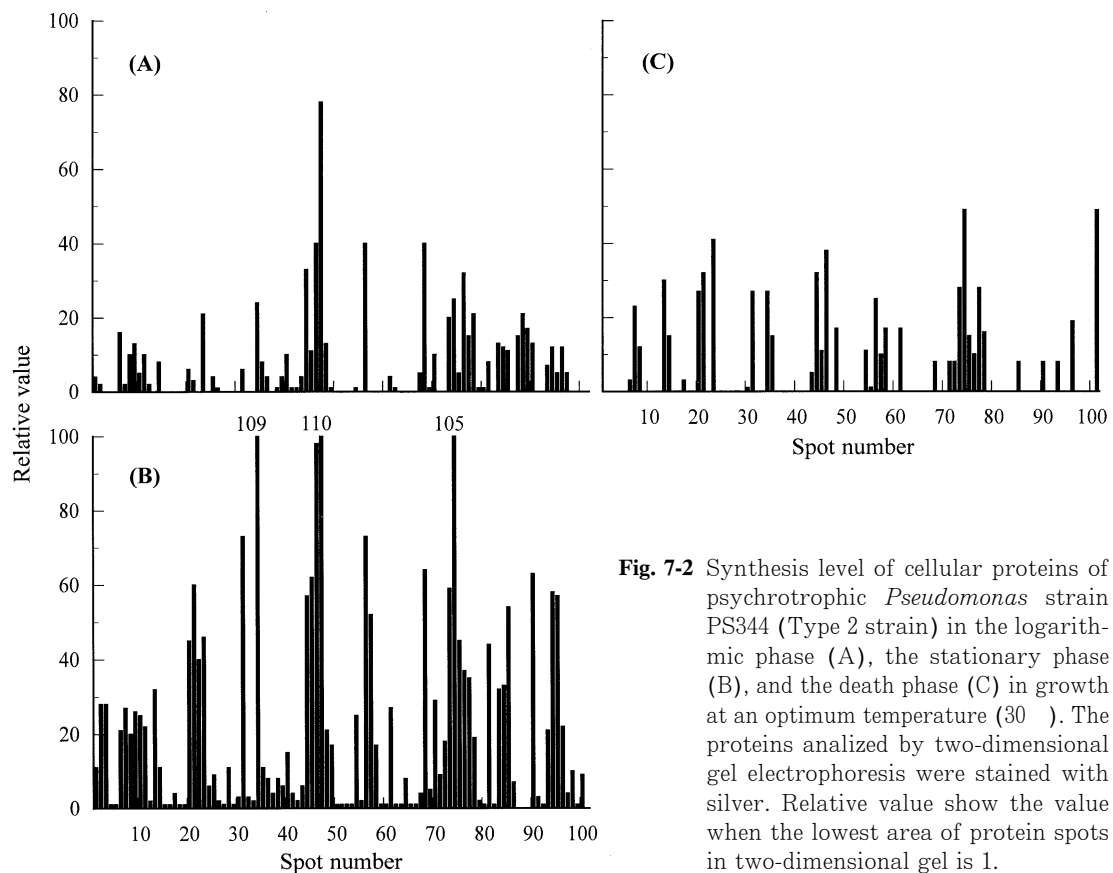
**Fig. 6-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (30 °C). The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB).



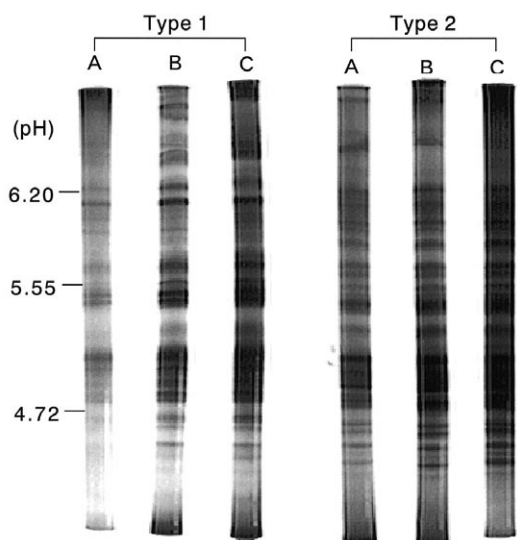
**Fig. 6-2** Synthesis level of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (30 °C). The proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). Relative value show the value when the lowest volume of protein spots in two-dimensional gel is 1.



**Fig. 7-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (30 °C). The electrophoretograms were detected by silver staining.



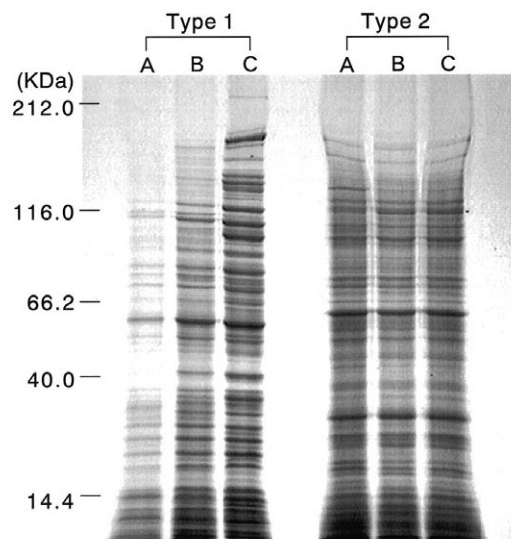
**Fig. 7-2** Synthesis level of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at an optimum temperature (30 °C). The proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis were stained with silver. Relative value show the value when the lowest area of protein spots in two-dimensional gel is 1.



**Fig. 8** Isoelectric focusing gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strains PS237 (Type 1 strain) and PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10 °C.

2) 菌体タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動  
 10 培養での対数期, 定常期および死滅期における 1 型菌  
 および 2 型菌の菌体タンパク質の SDS 電気泳動図を Fig. 9 に  
 示す。1 型菌では, 鮮明なバンドが低分子側から高分子側ま

で広範囲に分布したが, 対数期ではバンドの数および濃度とも極端に低く, 定常期および死滅期と培養年齢が増すにつれてその数および濃度とも増加した。2 型菌では, いずれの培養



**Fig. 9** Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strains PS234 (Type 1 strain) and PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10 °C.



齢の細胞ともやや不鮮明なバンドが低分子側から高分子側まで分布した。また、バンドの構成およびその濃度とも、培養齢による違いをほとんど認めなかった。なお、10 培養菌体は至適温度培養菌体に比べ、菌体タンパク質のSDS電気泳動でのバンドがより鮮明で、その濃度も高かった。

### 3) 1型菌の菌体タンパク質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10 培養での対数期、定常期および死滅期における1型菌の菌体タンパク質のCBB染色による二次元電気泳動図をFig.10-1およびそのコンピューター解析の結果Fig.10-2に示す。1型菌では、対数期でスポットの数および濃度とも極めて低く、定常期および死滅期へ進むにつれてその数および濃度とも増加した。

10 培養での対数期、定常期および死滅期における1型菌の菌体タンパク質の銀染色による二次元電気泳動図をFig.11-1およびそのコンピューター解析の結果をFig.11-2に示す。1型菌では、CBB染色での場合と同様に、対数期でスポット数および濃度とも極めて少なく、定常期および死滅期へ進むにつれてそれらは増加した。

CBB染色と比べると、定常期および死滅期におけるスポット数が銀染色で著しく多く、特にCBB染色で認めない塩基性側のタンパク質を銀染色で認めた。

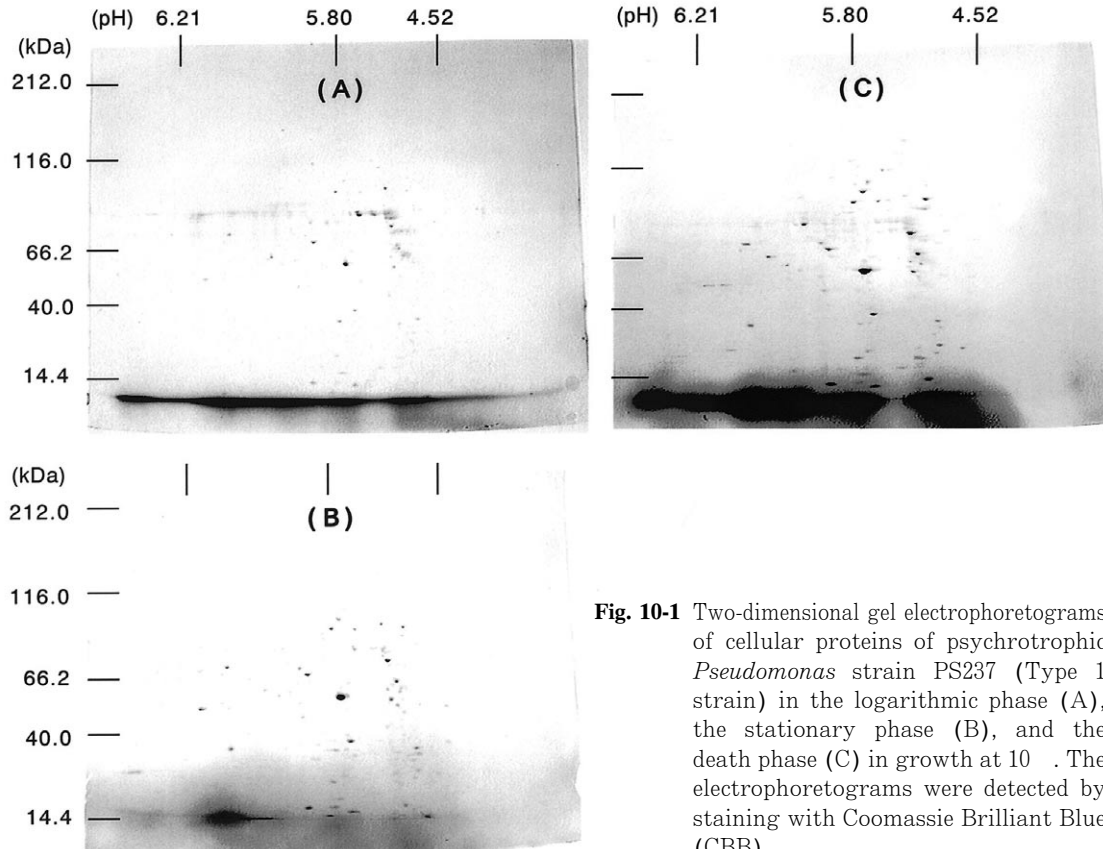
### 4) 2型菌の菌体タンパク質の二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10 培養での対数期、定常期および死滅期における1型菌の菌体タンパク質のCBB染色による二次元電気泳動図をFig.12-1およびそのコンピューター解析の結果Fig.12-2に示す。2型菌では、スポットの数は対数期、定常期および死滅期の細胞でほとんど違いを認めなかったが、その濃度は細胞齢が増すにつれて増加し、特に死滅期の細胞では極めて高い値を示した(特にFig.12-2参照)。

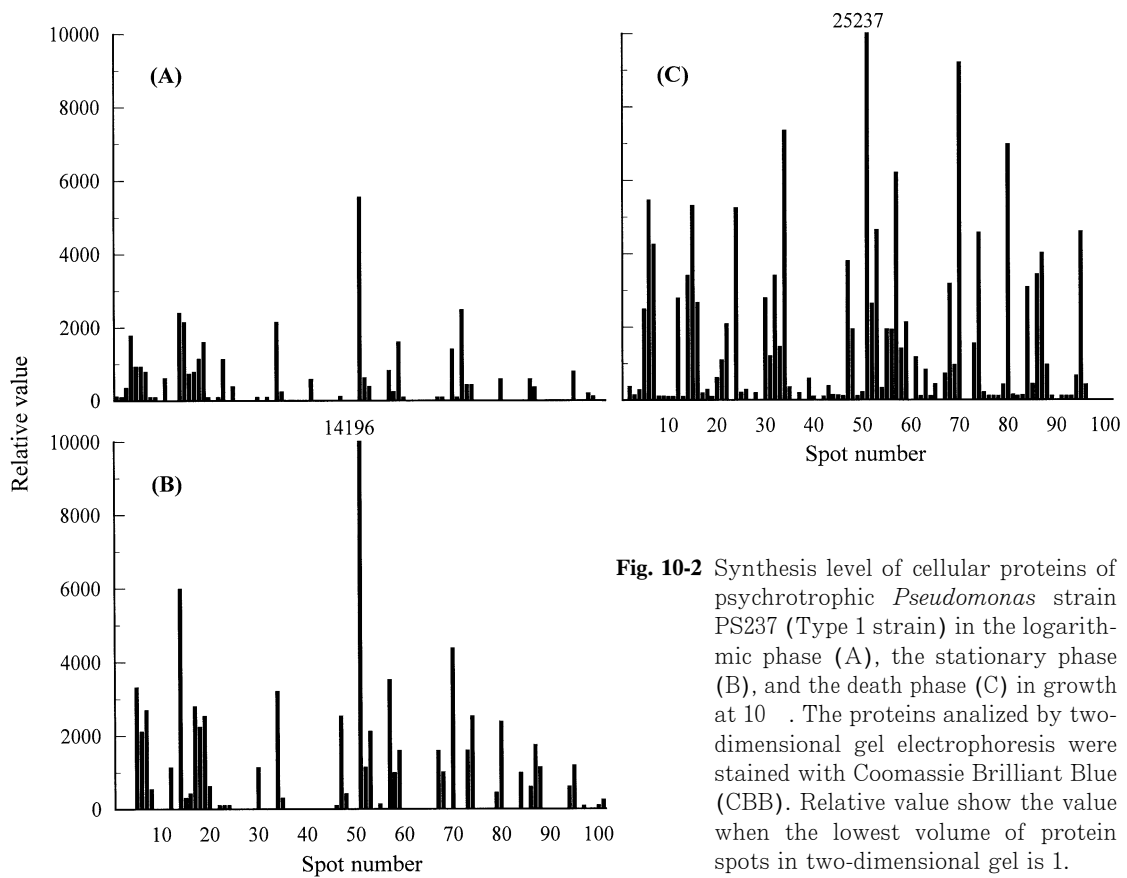
10 培養での対数期、定常期および死滅期における2型菌の菌体タンパク質の銀染色による二次元電気泳動図をFig.13-1およびそのコンピューター解析の結果をFig.13-2に示す。2型菌では、スポットの数および濃度が培養齢が増すにつれて漸増した(特にFig.13-2参照)。

CBB染色と比べると、スポットの種類および数に著しい違いを認め、特にその数はCBB染色で著しく多く検出された(コンピューター解析の結果を参照)。また、CBB染色では認めない塩基性側のタンパク質が銀染色で多く認められた。

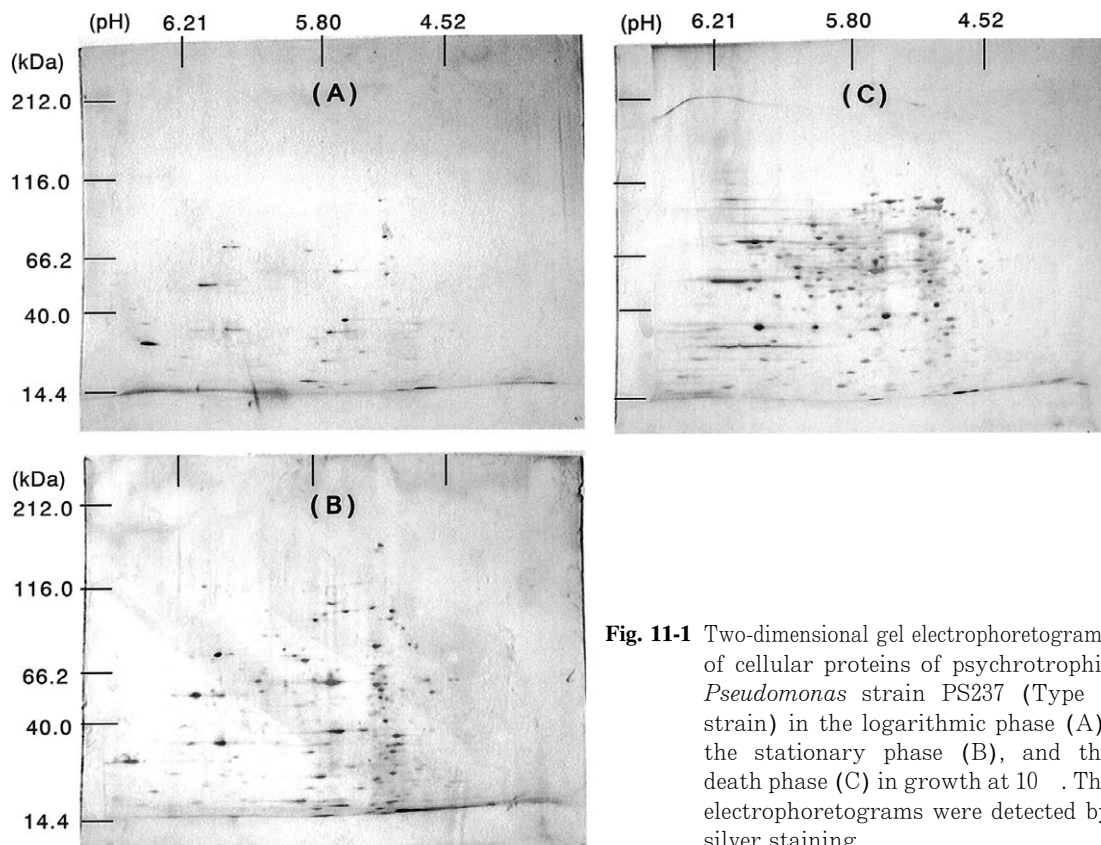
なお、CBB染色および銀染色による二次元電気泳動の結果とも、生育に伴う菌体タンパク質の消長が10 培養菌体と至適温度培養菌体では極めて異なり、またスポットも10 培養菌体は至適温度培養菌体に比べ極めて鮮明であった。



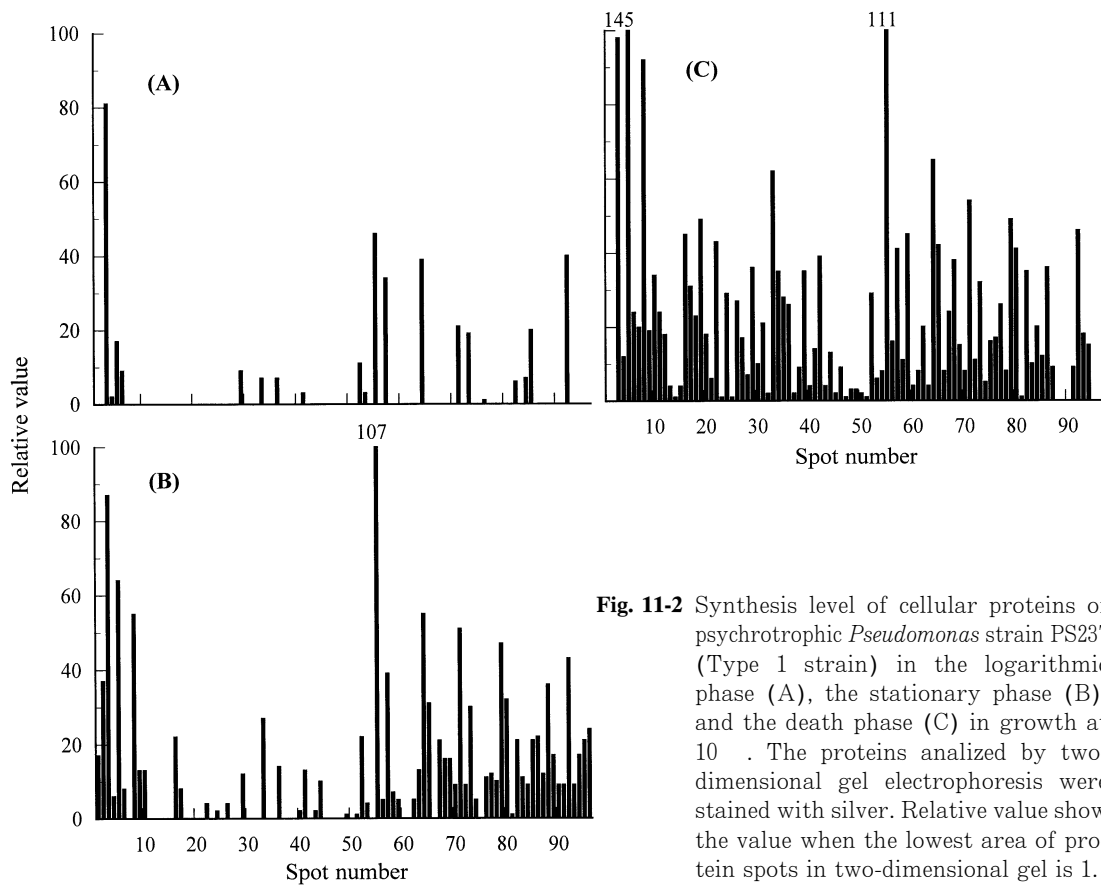
**Fig. 10-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10°C. The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB).



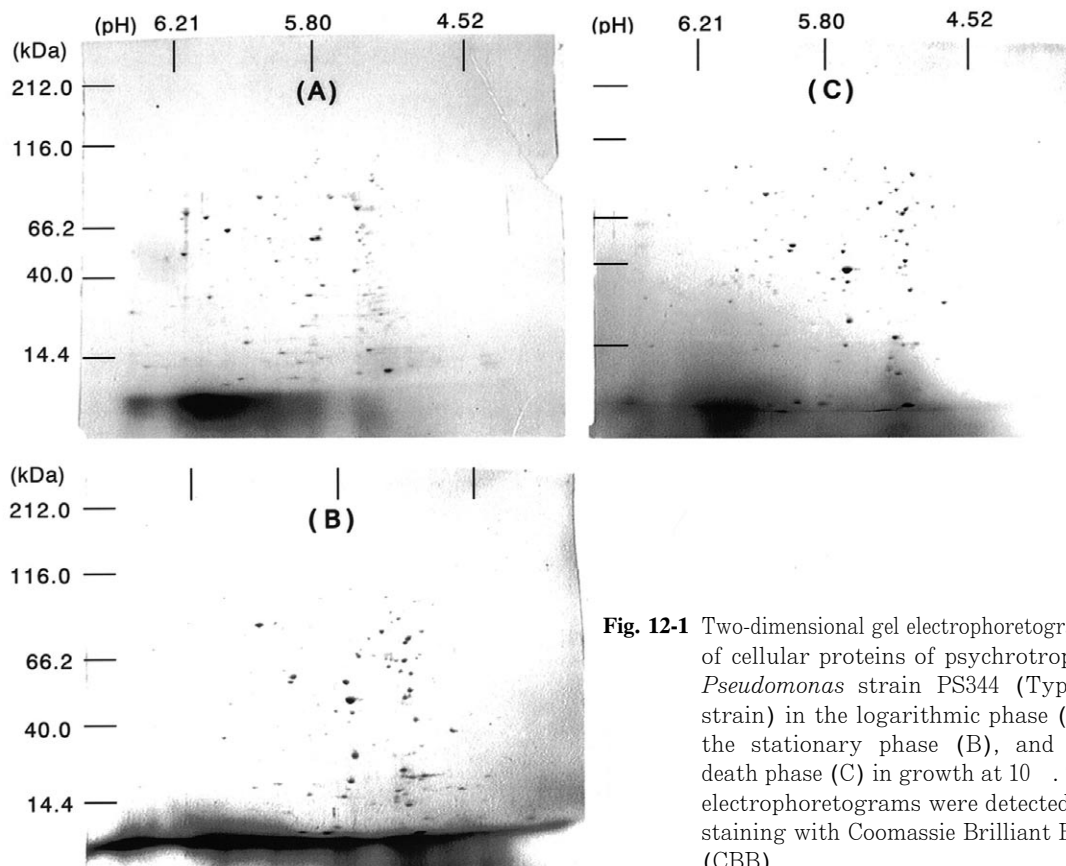
**Fig. 10-2** Synthesis level of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10 °C. The proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). Relative value show the value when the lowest volume of protein spots in two-dimensional gel is 1.



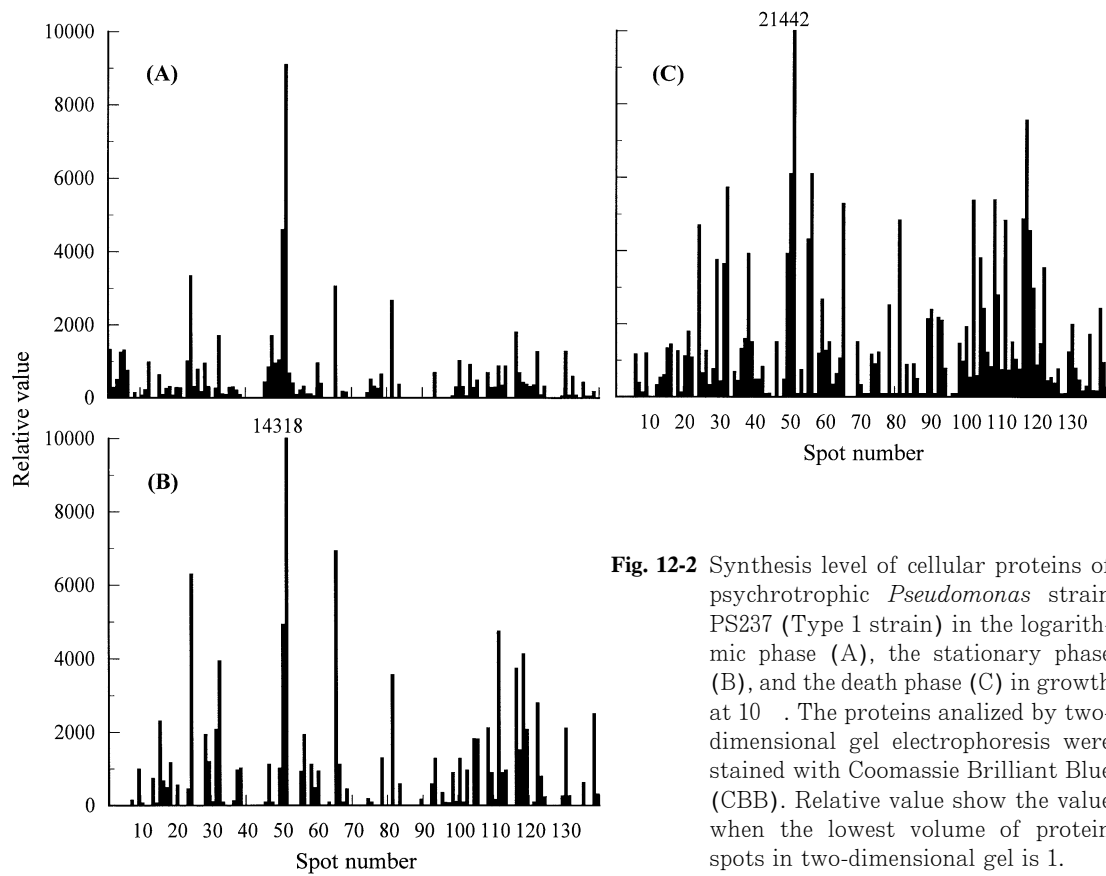
**Fig. 11-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10 °C. The electrophoretograms were detected by silver staining.



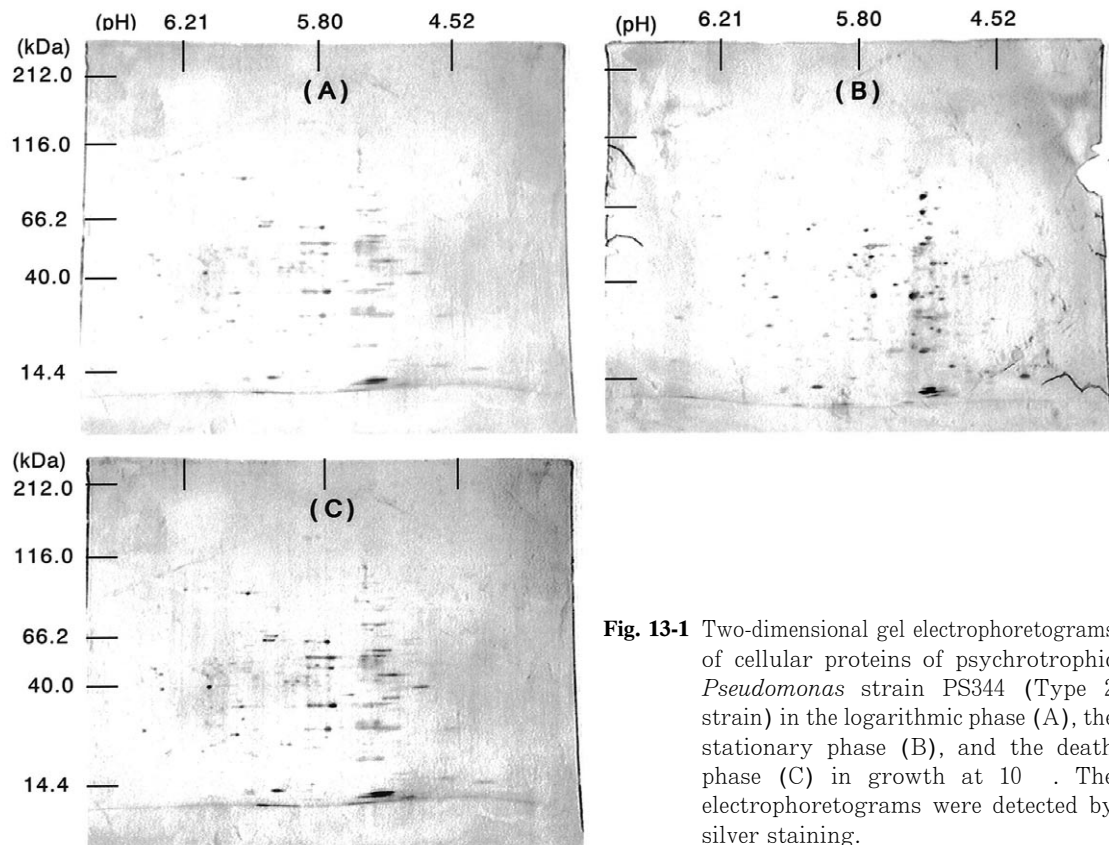
**Fig. 11-2** Synthesis level of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10 °C. The proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis were stained with silver. Relative value show the value when the lowest area of protein spots in two-dimensional gel is 1.



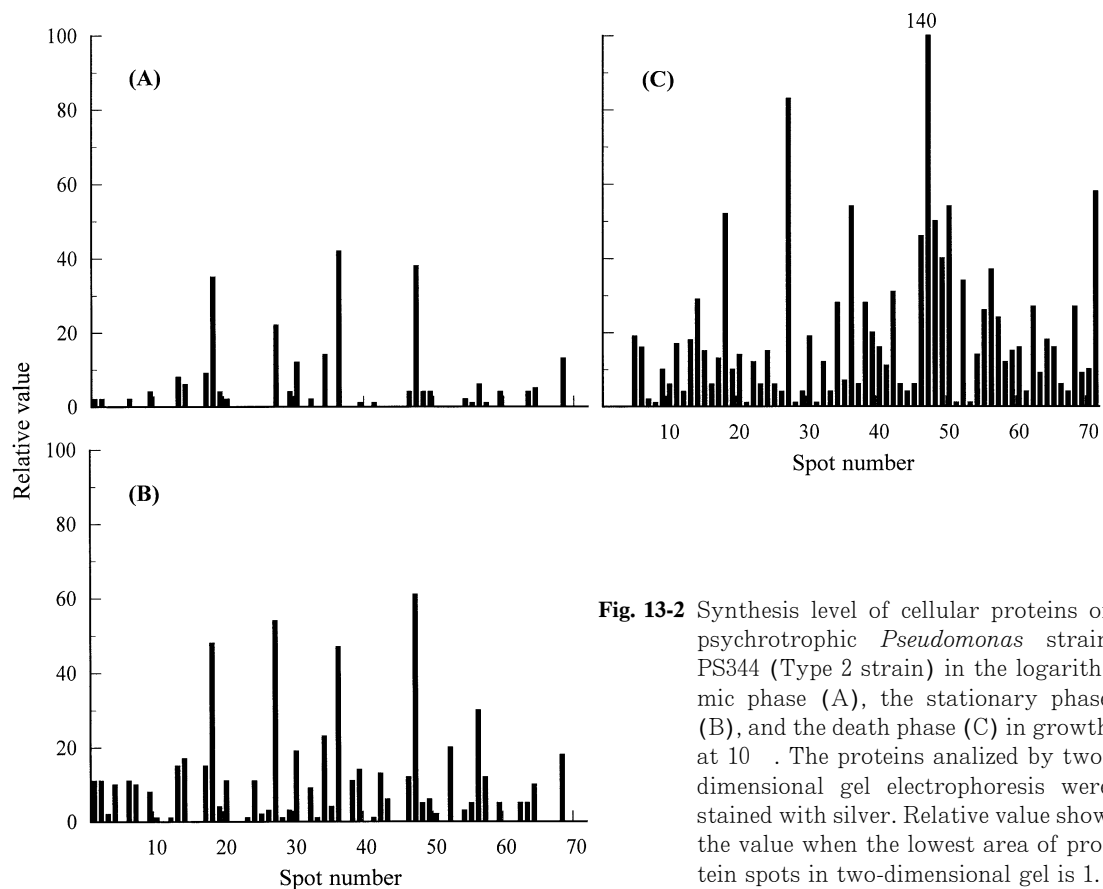
**Fig. 12-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10 °C. The electrophoretograms were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB).



**Fig. 12-2** Synthesis level of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS237 (Type 1 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10 °C. The proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). Relative value show the value when the lowest volume of protein spots in two-dimensional gel is 1.



**Fig. 13-1** Two-dimensional gel electrophoretograms of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10 °C. The electrophoretograms were detected by silver staining.



**Fig. 13-2** Synthesis level of cellular proteins of psychrotrophic *Pseudomonas* strain PS344 (Type 2 strain) in the logarithmic phase (A), the stationary phase (B), and the death phase (C) in growth at 10 °C. The proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis were stained with silver. Relative value show the value when the lowest area of protein spots in two-dimensional gel is 1.

### 考 察

前報<sup>1)</sup>の低温性 *Pseudomonas* 属細菌の2型菌では、培養温度が変わってもその生育曲線は定常期以降で減少する生育パターンを示した<sup>1)</sup>。これら2型菌の生育に伴う菌体タンパク質の変動試験の結果は、後報<sup>2)</sup>のタイプ2型の低温性 *Vibrio* 属細菌の結果と類似した。ところが2型菌の中には、至適温度培養と10 °C培養で生育パターンを異にする菌株が認められた。そこで今回は、特に至適温度培養と10 °C培養で生育パターンを異にする菌株の、生育に伴う菌体タンパク質の変動試験の結果を報告した。

供試低温性 *Pseudomonas* 属細菌の1型菌では、至適温度培養および10 °C培養ともその生育曲線は生育を通して増加傾向を示した。一方、生育に伴う菌体タンパク質の消長(対数期、定常期および死滅期における菌体タンパク質の等電点、SDSおよび二次元電気泳動での結果)も、1型菌では至適温度培養菌体と10 °C培養菌体で顕著な違いを認めなかった。ところが、至適温度培養と10 °C培養での生育パターンを異にした2型菌では、生育に伴う菌体タンパク質の消長も至適温度培養菌体と10 °C培養菌体で顕著な違いを認めた。つまり、定常期以降の生育パターンが減少傾向を示した至適温度培養の菌体では、死滅期で菌体タンパク質の数と量が急減したのに対し、定常期以降の生育パターンが増加傾向を示した10 °C培養の菌体では、死滅期での菌体タンパク質の数と量は逆に増加した。つまり、生育曲線と構成タンパク質とは密接に

関連した。

供試 *Pseudomonas* 属細菌 は至適温度培養菌体および10 °C培養菌体とも、等電点、SDSおよび二次元電気泳動はどれも1型菌では鮮明なバンドあるいはスポットを認めたのに対し、2型菌ではこれらはより不鮮明であった。このことは、2型菌のタンパク質の構成が構造的に不安定(三次構造が堅固ではない)であること、したがって分解も速やかであると考えられた。また至適温度培養では、1型菌の菌体タンパク質は生育に伴い漸増したのに対し、2型菌のそれは定常期で急増し死滅期では急減し、つまり2型菌は1型菌に比べタンパク質を合成する速度が速いといえた。以上のように、2型菌は1型菌に比べ代謝速度が速く、また分解も速やかで、したがって2型菌の至適温度培養での生育曲線は死滅期で急減したと判断される。加えて、2型菌では10 °C培養菌体は至適温度培養菌体に比べ、等電点、SDSおよび二次元電気泳動電気泳動でのバンドあるいはスポットがより鮮明で、つまり供試2型菌ではより低温で培養することで、細胞構成タンパク質はより安定化すると考えられた。

ところで、CBB染色では銀染色で検出できないより酸性側のタンパク質が、また銀染色ではCBB染色で検出されないより中性側のタンパク質が多く検出され、CBB染色と銀染色では化学的に異なるタンパク質が染色されると考えられた。一方、1型菌と2型菌の生育に伴う菌体タンパク質の消長が、CBB染色と銀染色で検出されるタンパク質が異なった。加えて、1型菌と2型菌では培地中へのグルコース添加

に伴う生酸作用および生酸作用に伴う抗酸性能が異なり<sup>1)</sup>, 両タイプの菌の構成タンパク質の違いを推測させた。すなわち, 1型菌と2型菌では化学的に異なるタンパク質から構成されると考えられた。それ故, 1型菌と2型菌では異なる至適生育温度をもち, また同温度下での生育傾向を異にしたことについては, 異なる形質を遺伝的に有しているためと考えられた。加えて, 2型菌の至適生育温度は中温細菌とほぼ同じで, また低温細菌と同様に0℃下でもよく生育する。また前述のように, 2型菌ではより低温で培養することで, 構成タンパク質はより安定化すると考えられた。つまり, 2型菌は中温細菌から低温細菌へ進化する過渡期の菌群であると推察された。ところで, これまでに報告した2型菌は生育温度に関係なくその生育曲線は定常期以降で減少するとした<sup>1)</sup>。ところが, 今回供試した2型菌の生育曲線は至適温度下では定常期以降で減少傾向を示したが, 10℃培養では定常期以降でも増加傾向を示し, つまり今回供試した菌株はこれまでに供試した菌株よりも, より低温での生育に適するように進化した菌株と考えられた。

#### 文 献

- 1) H. Morii, R. Ishimoto, and Y. Utaida: Growth pattern and adenosine phosphates in psychrotrophic *Pseudomonas* spp. grown under different conditions. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* **88**, 61-70, (2007).
- 2) H. Morii, and H. Sarukawa: Growth pattern and adenosine phosphates in psychrotrophic *Vibrio* spp. at different growth temperatures. *Fish. Sci.*, **60**, 826-833 (2000).
- 3) 森井秀昭, 笠間憲太郎, 中川栄治: 生育パターンの異なる低温性 *Vibrio* 属細菌の生育に伴う菌体タンパク質の変動. *長崎大水産研報*, **88**, 95-107, (2007).
- 4) 森井秀昭, 笠間憲太郎: 低温性 *Pseudomonas* 属細菌におけるアデノシンリン酸および核酸への [<sup>3</sup>H] アデニンの取込み. *長崎大水産研報*, **88**, 71-79, (2007).
- 5) 石本 亮, 笠間憲太郎, 森井秀昭: 氷蔵および氷冷下のサバにおけるヒスタミン生成と細菌フローラ. *日水誌*, **60**, 763-771 (1994).
- 6) P. H. O'Farrell: High resolution two-dimensional electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (1975).
- 7) J. C. Vera: Measurement of microgram quantities of protein by a generally applicable turbidimetric procedure. *Anal. Biochem.*, **174**, 187-196 (1988).
- 8) W. Diezel, G. Kopperschlager, and E. Hofmann: An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of coomassie brilliant blue. *Anal. Biochem.*, **48**, 617-620 (1972).
- 9) U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 10) J. H. Morrissey: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **117**, 307-310 (1981).