

## 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[2-<sup>3</sup>H] アデニンの取込み

森井 秀昭, 笠間憲太郎

### Incorporation of [2-<sup>3</sup>H] Adenine into Adenosine Phosphates and Nucleic Acids in Psychrotrophic *Pseudomonas* spp.

Hideaki MORII and Kentaro KASAMA

Growth curves of the psychrotrophic *Pseudomonas* isolates show an increased slope throughout growth (in Type 1 strains) or a decreased slope after the stationary phase of growth (in Type 2 strains), and the levels of adenylate concentrations and changes with growth time in the concentrations in the culture are different between Type 1 and 2 strains. In order to study whether the psychrotrophic isolates showing different growth curves are composed of different ecotype and moreover the psychrotrophs and the mesophilic *Escherichia coli* strain show different adenylate metabolisms, the incorporation of [2-<sup>3</sup>H] adenine into adenosine phosphates (AMP, ADP, and ATP) and nucleic acids (DNA and RNA) was determined. The incorporation of [2-<sup>3</sup>H] adenine into adenosine phosphates and nucleic acids and the gradient of a straight line given by kinetics of [<sup>3</sup>H] adenosine phosphate or [<sup>3</sup>H] nucleic acid productions and incubation time varied with culture ages, and the variations were peculiar in each of Type 1 and 2 strains. These results suggested that Type 1 and 2 strains are composed of different ecotype. The levels of adenylate concentrations and changes with growth time in the concentrations in the culture were different between the psychrotrophic *Pseudomonas* isolates and the mesophilic *E. coli* strain, and the incorporation of [2-<sup>3</sup>H] adenine into adenosine phosphates and nucleic acids and the gradient of a straight line given by kinetics of [<sup>3</sup>H] adenosine phosphate or [<sup>3</sup>H] nucleic acid productions and incubation time varied with culture ages, the variations were peculiar in each of the psychrotrophs and the mesophiles. These results suggested that psychrotrophic *Pseudomonas* and mesophilic *E. coli* have different adenylate metabolisms.

**Key Words:** 低温性 *Pseudomonas* 属細菌 psychrotrophic *Pseudomonas* spp., アデノシンリン酸 adenosine phosphates, 核酸 nucleic acids, [2-<sup>3</sup>H] アデニン [2-<sup>3</sup>H] adenine, 取込み incorporation

#### 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℃下に貯蔵したサバから分離した低温性 *Vibrio* 属細菌と低温性 *Pseudomonas* 属細菌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下での生育曲線は生育を通して増加傾向を示す菌株と定常期以降で減少傾向を示す菌株があり、これら異なる生育曲線を示す菌株間ではその基本的生育温度をも異にした。また、これら異なる生育曲線を示す菌株間では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。一方、これら低温性 *Pseudomonas* 属細菌の各アデノシンリン酸濃度のレベルは中温性である *Escherichia coli* のそれとは異なり、従ってエネルギー充足度 (ATP+1/2ADP/ATP+ADP+AMP) もこれら低温細菌と中温細菌とは極めて異なった<sup>1,2)</sup>。

以上のように、異なる生育曲線を示す低温性 *Pseudomonas* 細菌の菌株間で、培養中の各アデノシンリン酸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異なるとすると、これら菌株間でアデノシンリン酸代謝も異なること、つまりこれら菌株間では生態型も異なると考えられた。また、これら低温性 *Pseudomonas* 属細菌と中温性である *E. coli* とでは各アデノシンリン酸濃度のレベルおよびエネルギー充足度が異なるとすると、これら細菌間でアデノシンリン酸代謝も異なると考えられた。そこで今回は、[2-<sup>3</sup>H] アデニンのアデノシンリン酸 (AMP, ADPおよびATP) および核酸 [デオキシリボ核酸 (DNA) とリボ核酸 (RNA)] への取込みについて検討

した。とくに今回は、低温性 *Pseudomonas* 属細菌と *E. coli* について得られた結果について述べる。

#### 材料および方法

##### 供試菌株, 供試培地および培養方法

供試菌としては、低温下に貯蔵したサバから分離した低温性 *Pseudomonas* 属細菌<sup>3)</sup> と *Escherichia coli* K-12 ATCC 19708株を用いた。*Pseudomonas* 属細菌は生育曲線が生育を通して増加傾向を示し (Fig. 1 および 2 を参照), 20 に至適生育温度をもった菌株 (タイプ 1 型菌: PS237株とPS1725株の 2 菌株), および生育曲線が定常期以降に減少傾向を示し (Fig. 5 および 6 を参照), 30 に至適生育温度をもった菌株 (タイプ 2 型菌: PS845株とPS1907株の 2 菌株) の 4 菌株を用いた。なお, これら *Pseudomonas* 属細菌は 0 下でも生育したが, 35 下では生育しなかった。

供試菌株はすべて 0.1% グルコース添加 Nutrient broth [BBL] を 25% 海水に溶解した培地 (pH 7.0) を用い, 至適生育温度下で静置培養した。

##### 生育に伴うアデノシンリン酸の消長試験

培養液の 5 mL を入れた各試験管 (長さ 165 x 直径 15mm) を用いて供試菌を培養し, 試験管のまま生育量 (波長 600nm での吸光度) を測定後, 培養中の各アデノシンリン酸量を測定した。アデノシンリン酸量の測定は, まず Holm-Hansen & Booth の方法<sup>4)</sup> に準じ, 培養の 0.5mL を煮沸したトリス緩衝液 4.5mL 中に加えることで菌体中のアデノシンリン酸を抽出した。次に Karl & Holm-Hansen の方法<sup>5)</sup> に準じ, ATP 量はルシフェリンとルシフェラーゼを含んだホタル抽出液 (Firefly Lantern Extract, Sigma) にマグネシウム存在下で ATP を作用させ, 発せられる蛍光の強度を測定して求めた。ADP 量はマグネシウムとホスホエノールピルビン酸の存在下で, ピルベイトキナーゼにより ADP を ATP に転換し, また AMP 量は ATP とマグネシウムの存在下でミオキナーゼにより AMP を ADP に, さらにこの ADP を ATP に転換し, これらの ATP 量を前記同様に測定することでそれぞれの値を求めた。

##### [2-<sup>3</sup>H] アデニンの取込み試験

至適生育温度で培養した *Pseudomonas* 属細菌のタイプ 1 型および 2 型菌, および *E. coli* K-12 の対数期中期, 定常期 (タイプ 1 型菌については生育量が最大に達する時間帯), 死滅期 (タイプ 1 型菌については死滅期とほぼ同じ時間帯) の培養液 1 mL 中に [2-<sup>3</sup>H] アデニンの  $3.7 \times 10^5$  Bq/mL を加え, 一定時間 [2-<sup>3</sup>H] アデニンを取込ませた。取込み終了後, Karl の方法<sup>6)</sup> に準じ, その半量 (0.5mL) を煮沸したトリス塩酸緩衝液 4.5mL 中に入れ取込みを停止し (アデノシンリン酸への取込みを分析するための試料), 残り半量には等量の 10% トリクロル酢酸を加え取込みを停止した (核酸への取込みを分析するための試料)。

##### アデノシンリン酸中に取込まれた [<sup>3</sup>H] の測定

Karl の方法<sup>6)</sup> に準じ, トリス塩酸緩衝液で抽出したアデノ

シンリン酸分析用試料 5 mL 中の 1 mL を減圧乾固させ, これに各アデノシンリン酸を混合した溶液 (ATP, ADP および AMP の各 1 mM を含む) の 100  $\mu$ L を加えよく混合し, その 10  $\mu$ L を薄層クロマトグラフィー分析に供した。薄層クロマトグラフィー分析には 0.25mm の微結晶セルローズの薄層および展開溶媒としては 0.75M-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.4) を用いた。展開後, 紫外線 (235nm) 下で薄層上の各アデノシンリン酸のスポットを確認しマークし, 0.7M-MgCl<sub>2</sub> を薄層に噴霧後にマークした各アデノシンリン酸をかき取り, 測定時まで凍結保存した。測定時に, これらかき取った粉末に 0.7M-MgCl<sub>2</sub> 0.5mL と液体シンチレーター 4.5mL を加え, 液体シンチレーションカウンターで各アデノシンリン酸に取込まれた [<sup>3</sup>H] 量を測定した。

##### 核酸中に取込まれた [<sup>3</sup>H] の測定

Karl の方法<sup>6)</sup> に準じ, トリクロル酢酸を加えた核酸分析用試料の 1 mL に RNA と DNA の各 1 mg を加え, 氷冷下に 2 時間静置した後, 15,300 x g で 5 分間遠心分離し, 上澄を除去した。沈澱に氷冷 5% トリクロル酢酸溶液の 1 mL を加え混合し, 同様に遠心分離し, 上澄を除去した。この操作を 5 回繰り返した。この沈澱に氷冷 95% エタノール 1 mL を加え混合洗浄し, 遠心分離した。この操作を 2 回繰り返した。得られた沈澱に 1N-NaOH の 0.4mL を加え混合し, 37 下に 1 時間静置し, その後氷中で急冷し 15 分間静置した。これに 6N-HCl で調製した 5% トリクロル酢酸の 0.1mL を加え氷中に 15 分間静置し, 同様に遠心分離し, 上澄を RNA 分析試料とした。

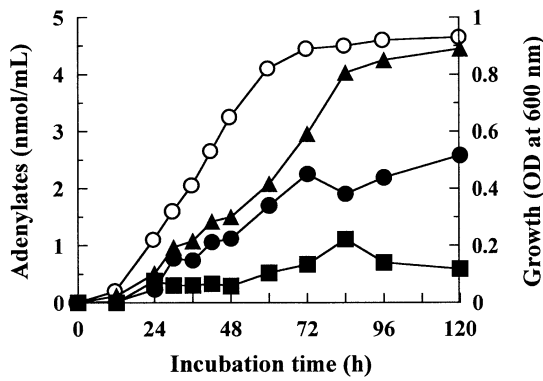
沈澱に 5% トリクロル酢酸の 1 mL を加え混合し, 同様に遠心分離し, 上澄を除去した。この操作を 2 回繰り返した。続いて, 沈澱に氷冷 95% エタノールの 1 mL を加え混合洗浄し, 同様に遠心分離し, 上澄を除去した。この操作を 2 回繰り返した。この沈澱に, 沸騰水中で加熱した 5% トリクロル酢酸の 0.5mL を加え, 沸騰水中で 30 分間 DNA を加熱溶解し, 同様に遠心分離し, その上澄を DNA 分析試料とした。これら試料の 0.5mL に液体シンチレーター 4.5mL を加え, [<sup>3</sup>H] 量を測定した。

## 結 果

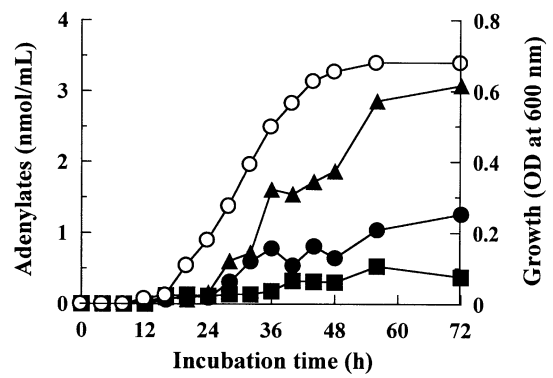
タイプ 1 型 *Pseudomonas* 菌における各アデノシンリン酸および核酸への [2-<sup>3</sup>H] アデニンの取込み

タイプ 1 型菌 (以降 1 型菌という) の生育曲線と生育に伴う各アデノシンリン酸の消長を Fig. 1 および 2 に, また培養年齢の異なる 1 型菌における各アデノシンリン酸および核酸への [2-<sup>3</sup>H] アデニンの取込み結果を Fig. 3 および 4 に示す。

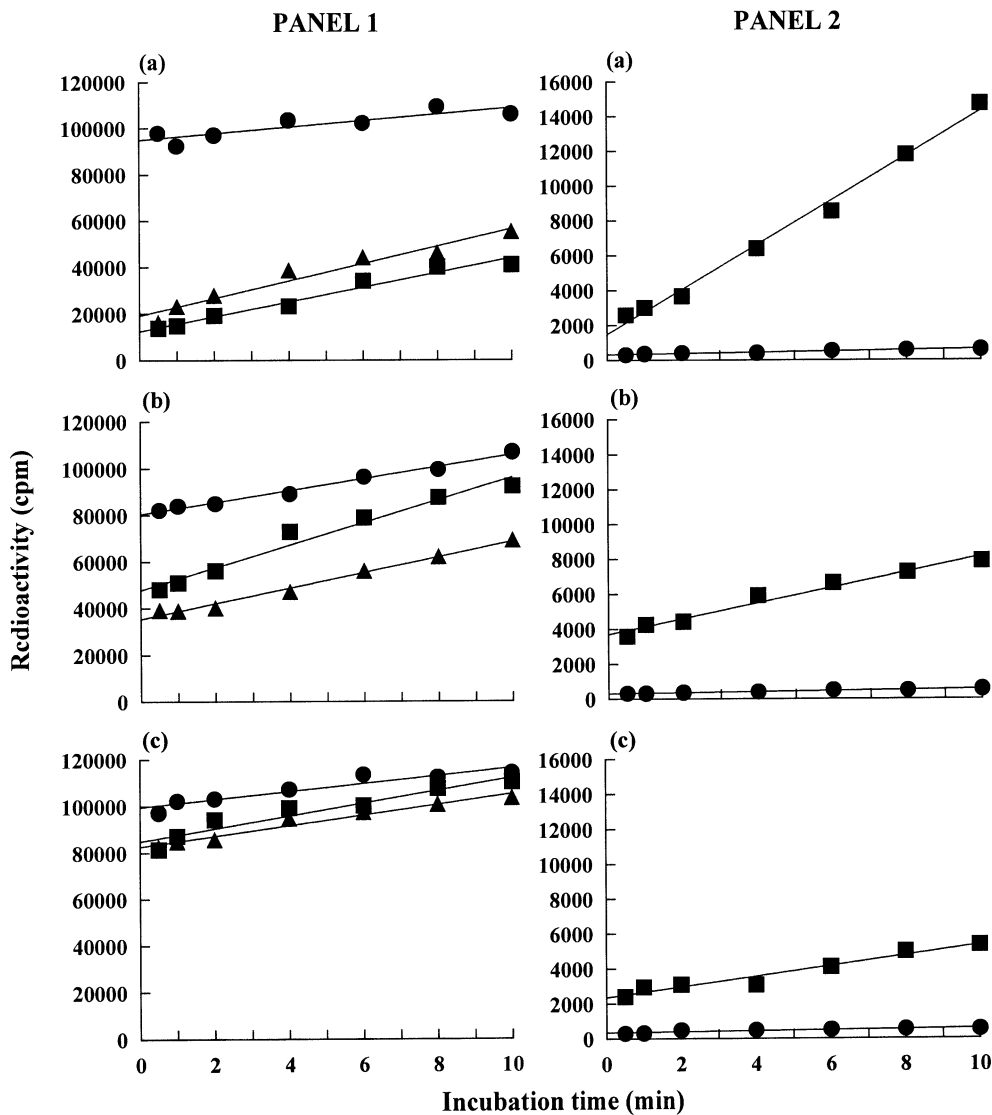
1 型の供試 2 菌株 (PS237 株と PS1725 株) とともに, 生育曲線は生育に伴い上昇し, 定常期以降でも減少しなかった。一方, 生育に伴う培養中の各アデノシンリン酸量も生育曲線と類似の漸増傾向を示した。これらアデノシンリン酸量については, AMP 量が最大値を示し, ADP および ATP の順にその量を減じた。なお, エネルギー充足度は PS237 株では 0.25 ~ 0.35, PS1725 株では 0.21 ~ 0.30 の範囲で変動した。



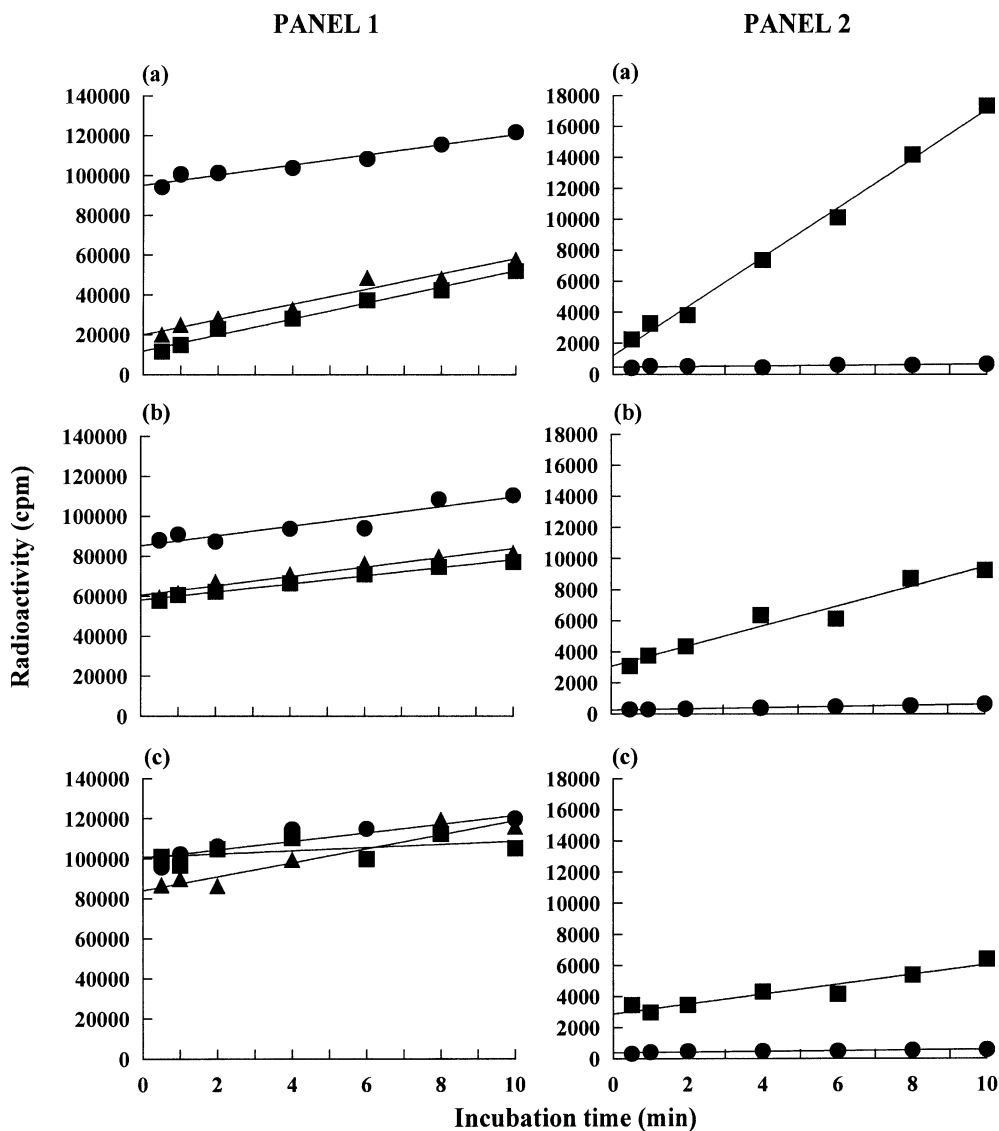
**Fig. 1** The concentration of adenosine phosphates in the culture during growth with nutrient broth (BBL) containing 0.1% glucose at 20 °C in the psychrotrophic *Pseudomonas* isolate PS237 (Type 1 strain). (○), AMP; (△), ADP; (□), ATP; (○), growth.



**Fig. 2** The concentration of adenosine phosphates in the culture during growth with nutrient broth (BBL) containing 0.1% glucose at 20 °C in the psychrotrophic *Pseudomonas* isolate PS1725 (Type 1 strain). (○), AMP; (△), ADP; (□), ATP; (○), growth.



**Fig. 3** Kinetics of [<sup>3</sup>H] adenosine phosphate (panel 1) and [<sup>3</sup>H] nucleic acid (panel 2) productions and incubation time after the addition of [2-<sup>3</sup>H] adenine (3.7 × 10<sup>5</sup> Bq/mL) to the middle logarithmic phase (a), stationary phase (b), and death phase (c) cultures of the psychrotrophic *Pseudomonas* isolate PS237 (see Fig. 1). Radioactivity of the [2-<sup>3</sup>H] adenine incorporated into adenosine phosphates [(○), AMP; (△), ADP; (□), ATP] and nucleic acids [(○), DNA; (□), RNA] in 0.25 mL each of the cultures is expressed by cpm.



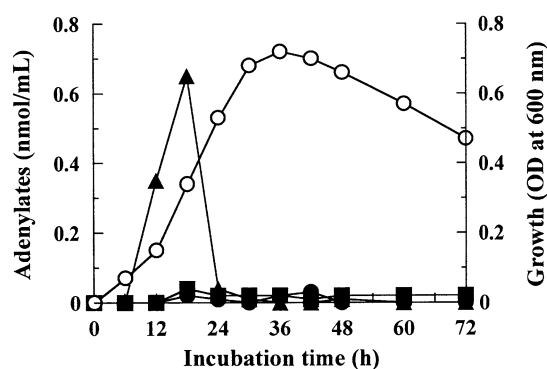
**Fig. 4** Kinetics of [ $^3\text{H}$ ] adenosine phosphate (panel 1) and [ $^3\text{H}$ ] nucleic acid (panel 2) productions and incubation time after the addition of [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] adenine ( $3.7 \times 10^5$  Bq/mL) to the middle logarithmic phase (a), stationary phase (b), and death phase (c) cultures of the psychrotrophic *Pseudomonas* isolate PS1725 (see Fig. 2). Radioactivity of the [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] adenine incorporated into adenosine phosphates [( ), AMP; ( ), ADP; ( ), ATP] and nucleic acids [( ), DNA; ( ), RNA] in 0.25 mL each of the cultures is expressed by cpm.

1型の供試2菌株における各アデノシンリン酸および核酸への [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの取込み結果は類似した。 [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの各アデノシンリン酸への取込みについては、対数期ではADPへの取込み量はAMPおよびATPへのそれに比べて極めて高い値を示し、またAMPとATPへの取込み量には著しい違いは見られなかった。定常期と死滅期ではADPへの取込み量は対数期とほぼ同程度であったが、AMPとATPへの取込み量は定常期および死滅期（定常期以降）と培養年齢が増すにつれて増加し、とくに死滅期ではADPとAMPおよびATPとの取込み量にはほとんど違いは見られなかった。なお、PS237株の定常期ではATPへの取込み量はAMPへのそれよりも有意に高い値を示した。一方、 [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの取込み時間と取込み量との間で得られる直線の傾斜は、各アデノシンリン酸とも培養年齢による違いはほとんど見られなかった。

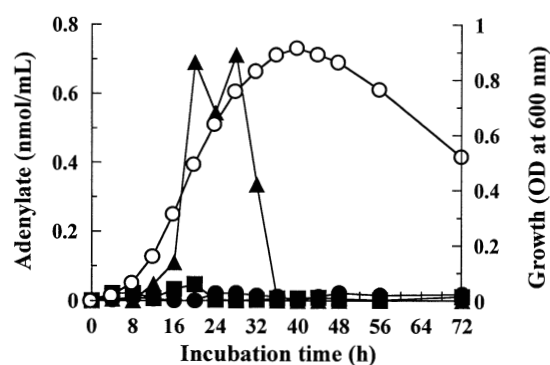
[ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの核酸への取込みについては、いずれの培養年齢でもRNAへの取込み量はDNAへのそれよりも極めて高い値を示した。またRNAへの取込み量は培養年齢が増すにつれて低下し、しかも取込み時間と取込み量との間で得られる直線の傾斜も低下した。しかし、DNAへの取込み量は培養年齢による違いは見られず、また取込み時間による取込み量の違いもあまり見られなかった。

タイプ2型 *Pseudomonas* 菌における各アデノシンリン酸および核酸への [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの取込み

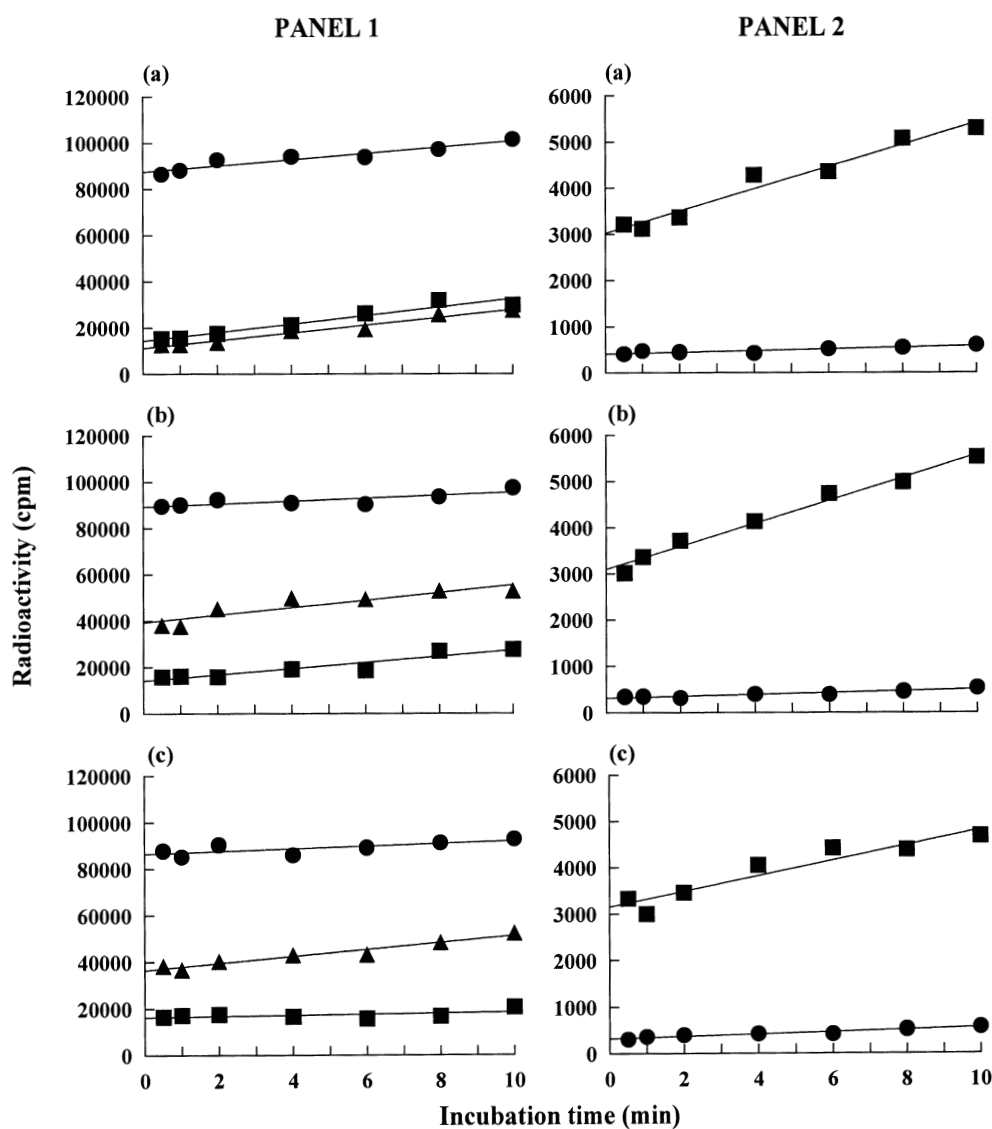
タイプ2型菌（以降2型菌という）の生育曲線と生育に伴う各アデノシンリン酸の消長をFig. 5および6に、また培養年齢の異なる2型菌における各アデノシンリン酸および核酸への [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの取込み結果をFig. 7および8に示す。



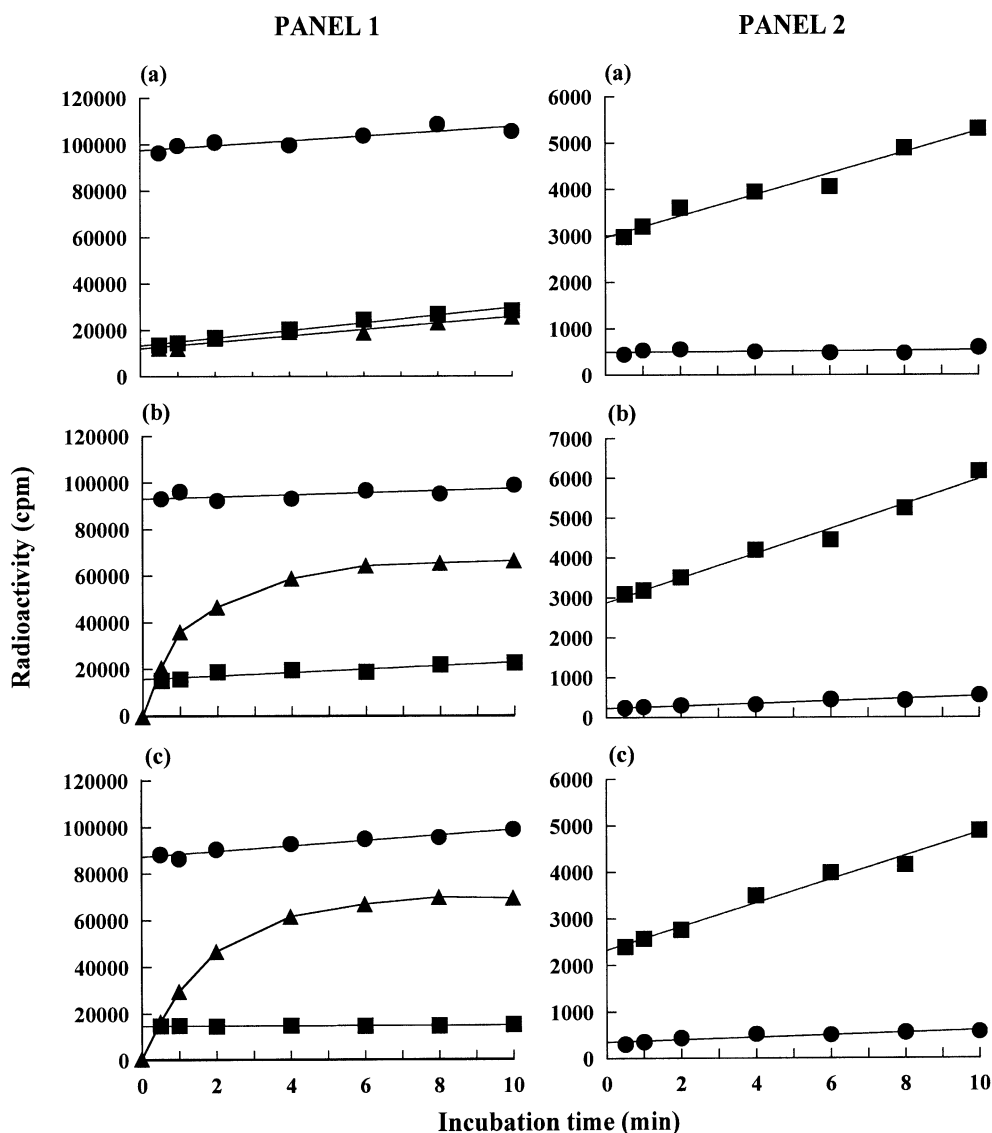
**Fig. 5** The concentration of adenosine phosphates in the culture during growth with nutrient broth (BBL) containing 0.1% glucose at 30 °C in the psychrotrophic *Pseudomonas* isolate PS845 (Type 2 strain). (○), AMP; (△), ADP; (□), ATP; (○), growth.



**Fig. 6** The concentration of adenosine phosphates in the culture during growth with nutrient broth (BBL) containing 0.1% glucose at 30 °C in the psychrotrophic *Pseudomonas* isolate PS1907 (Type 2 strain). (○), AMP; (△), ADP; (□), ATP; (○), growth.



**Fig. 7** Kinetics of [<sup>3</sup>H] adenosine phosphate (panel 1) and [<sup>3</sup>H] nucleic acid (panel 2) productions and incubation time after the addition of [2-<sup>3</sup>H] adenine ( $3.7 \times 10^5$  Bq/mL) to the middle logarithmic phase (a), stationary phase (b), and death phase (c) cultures of the psychrotrophic *Pseudomonas* isolate PS845 (see Fig. 5). Radioactivity of the [2-<sup>3</sup>H] adenine incorporated into adenosine phosphates [(○), AMP; (△), ADP; (□), ATP] and nucleic acids [(○), DNA; (△), RNA] in 0.25 mL each of the cultures is expressed by cpm.



**Fig. 8** Kinetics of [ $^3\text{H}$ ] adenosine phosphate (panel 1) and [ $^3\text{H}$ ] nucleic acid (panel 2) productions and incubation time after the addition of [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] adenine ( $3.7 \times 10^5$  Bq/mL) to the middle logarithmic phase (a), stationary phase (b), and death phase (c) cultures of the psychrotrophic *Pseudomonas* isolate PS1907 (see Fig. 6). Radioactivity of the [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] adenine incorporated into adenosine phosphates [( ), AMP; ( ), ADP; ( ), ATP] and nucleic acids [( ), DNA; ( ), RNA] in 0.25 mL each of the cultures is expressed by cpm.

2型の供試2菌株(PS845株とPS1907株)とも、生育曲線は生育に伴い上昇し、定常期以降では急に減少した。一方、生育に伴う培養中のアデノシンリン酸は主にAMPだけを認め、またその量は少なかった。なお、エネルギー充足度はPS845では0~0.07、PS1907では0~0.06の範囲で変動し、つまりタイプ1型菌より極めて低い値を示した。

2型の供試2菌株における各アデノシンリン酸および核酸への [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの取込み結果は類似した。 [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの各アデノシンリン酸への取込みは、対数期ではADPへの取込み量はAMPおよびATPへのそれに比べて極めて高い値を示し、またAMPとATPへの取込み量には著しい違いは見られなかった。定常期および死滅期ではADPおよびATPへの取込み量は対数期でのそれとあまり違いが見ら

れなかったが、AMPへの取込み量は対数期のそれよりも極めて高い値を示した。なお、定常期および死滅期におけるAMPへの取込み傾向がPS845株とPS1907株で異なった。

[ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの核酸への取込みについては、いずれの培養齢でもRNAへの取込み量はDNAへのそれよりも極めて高い値を示し、また培養齢が増してもRNAおよびDNAへの取込み量、取込み時間と取込み量との間で得られる直線の傾斜にもほとんど違いが見られなかった。なおDNAへの取込みについては、取込み時間による取込み量の違いはあまり見られなかった。

以上のように、2型菌における各アデノシンリン酸および核酸への [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] アデニンの取込み傾向は1型菌における取込み傾向とは異なった。

*E. coli* K-12における各アデノシンリン酸および核酸への [2-<sup>3</sup>H] アデニンの取込み

*E. coli* K-12 の生育曲線と生育に伴う各アデノシンリン酸の消長をFig. 9に、また培養齢の異なる*E. coli* K-12における各アデノシンリン酸および核酸への [2-<sup>3</sup>H] アデニンの取込み結果をFig.10に示す。

*E. coli*の生育曲線は生育に伴い急上昇し、定常期以降では徐々に減少した。一方、生育に伴う培養中のアデノシンリン酸量はATP, ADPおよびAMPとともに類似の増減傾向を示し、対数期では急激に増加したが、定常期以降では急激に減少し、死滅期では基底部にまで達した。その量はATPとADPはAMPよりも高い値を示したが、ATPとADPの間の違いはほとんど見られなかった。なお、エネルギー充足度は0.53~0.69の範囲で変動し、つまり低温性 *Pseudomonas* 属細菌よりも極めて高い値を示した。

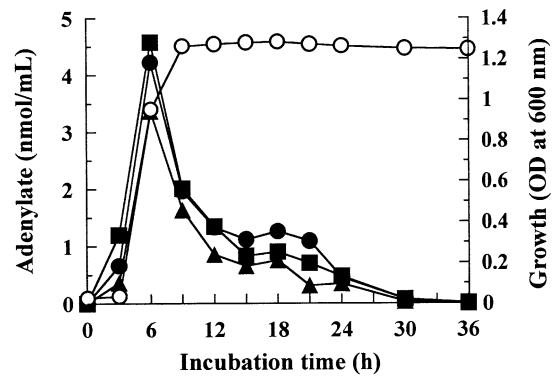


Fig. 9 The concentration of adenosine phosphates in the culture during growth with nutrient broth (BBL) containing 0.1% glucose at 37 °C in *Escherichia coli* K-12 ATCC19708. (○), AMP; (□), ADP; (△), ATP; (○), growth.

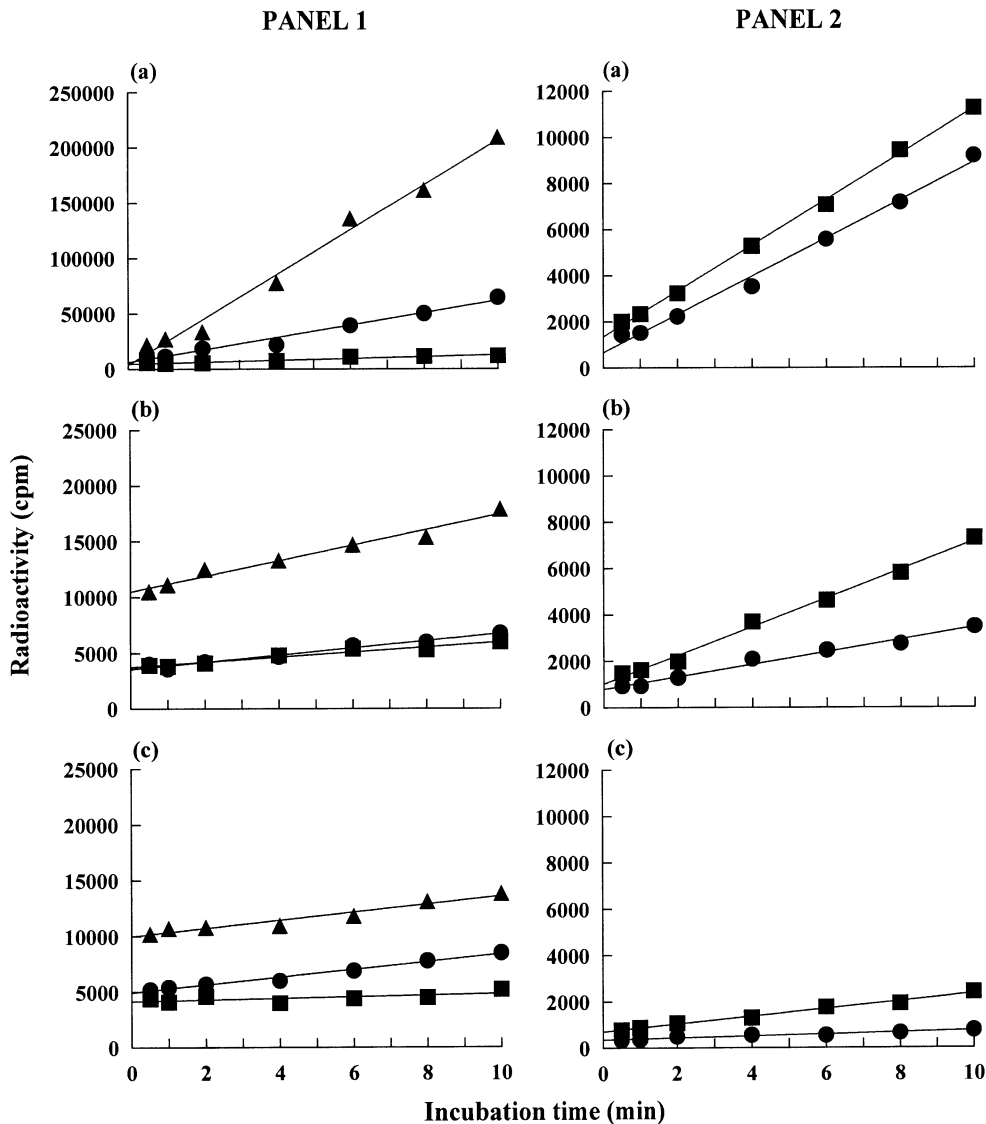


Fig. 10 Kinetics of [<sup>3</sup>H] adenosine phosphate (panel 1) and [<sup>3</sup>H] nucleic acid (panel 2) productions and incubation time after the addition of [2-<sup>3</sup>H] adenine (3.7 × 10<sup>5</sup> Bq/mL) to the middle logarithmic phase (a), stationary phase (b), and death phase (c) cultures of *Escherichia coli* K-12 ATCC19708 (see Fig. 9). Radioactivity of the [2-<sup>3</sup>H] adenine incorporated into adenosine phosphates [(○), AMP; (□), ADP; (△), ATP] and nucleic acids [(○), DNA; (□), RNA] in 0.25 mL each of the cultures is expressed by cpm.

*E. coli* における  $[2\text{-}^3\text{H}]$  アデニンのアデノシンリン酸への取込みは *Pseudomonas* 属細菌のそれとは異なり, AMP への取込み量が最大となり, ADPおよびATPの順にその量を減じたが, 定常期ではADPとATPへの取込み量の違いはほとんど見られなかった。また各アデノシンリン酸とも, 対数期では定常期および死滅期に比べその取込み量は極めて高い値を示した。

$[2\text{-}^3\text{H}]$  アデニンの核酸への取込みは, RNAおよびDNAとも対数期, 定常期および死滅期と培養齢が増すにつれ, それらへの取込み量および取込み時間と取込み量との間で得られる直線の傾斜が減少した。その取り込み量はRNAの方がDNAよりも高かった。

以上のように, *E. coli* における各アデノシンリン酸および核酸への  $[2\text{-}^3\text{H}]$  アデニンの取込み傾向は1型および2型 *Pseudomonas* 菌とも異なる取込み傾向を示し, つまり中温性の *E. coli* は低温性の *Pseudomonas* 属細菌とも異なる特異な取込み傾向を示した。

### 考 察

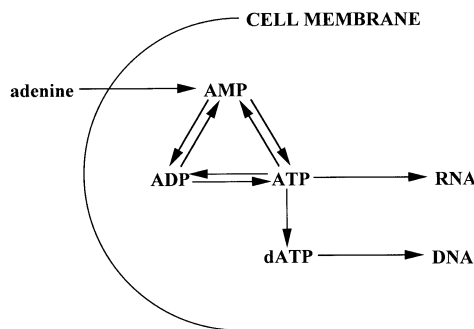
デオキシリボ核酸 (DNA) におけるアデニンの細胞内前駆物質はデオシアデノシン三リン酸 (dATP) であり, このdATPの生合成には2つの代謝経路 [ヌクレオシド三リン酸 (NTP) およびヌクレオシド二リン酸 (NDP) 還元酵素による代謝経路] が知られている (Fig.11)<sup>9</sup>。今回, 低温性 *Pseudomonas* 属細菌では1型および2型菌とも  $[2\text{-}^3\text{H}]$  アデニンのADPへの取込み量がATPおよびAMPへのそれより, 他方 *E. coli* ではAMPへの取込み量がADPおよびATPへのそれより高い値を示した。これらの違いはdATP合成のための代謝経路が異なることを示唆し, 低温性 *Pseudomonas* 属細菌ではADPへの取込み量が最大値を示したことからNDP代謝経路でdATPが生合成されていること, それ故 *E. coli* ではNTP代謝経路での生合成が推察された。しかし, これらの詳細は明らかでない。他方, 低温性 *Pseudomonas* 属細菌では培養中のAMP量がATPおよびADP量よりも, *E. coli* ではATP またはADP量がAMP量よりも高い値を示し, これ

らの違いも代謝経路が異なることに因る考えられる。

1型菌では, 培養齢が増すことによるDNAへの取込み量には違いがほとんど見られなかったが, RNAへの取込み量および取込み時間と取込み量から得られる直線の傾斜が低下した。これらの結果は, 1型菌では培養齢が増すにつれて代謝量および代謝速度が低下することを示唆する。一方, アデノシンリン酸への取込みについては, 対数期ではADPへの取込み量がATPおよびAMPへのそれに比べて極めて高い値を示し, 定常期および死滅期 (定常期以降) と培養齢が増すにつれてADPへの取込み量には違いが見られなかったが, ATPおよびAMPへの取込み量が増加し, とくに死滅期ではこれら3者間の取込み量にはほとんど違いが見られなかった。これらの結果は, それぞれの培養齢における代謝を維持するためのdADPの前駆物質であるADPのレベルはほぼ一定に維持されること, またADPレベルを維持するためのATPおよびAMPの消費量が代謝活性の低下で減少し, 結果的に細胞内でATPおよびAMPの蓄積量が増加したと考えられる。ところで, 1型菌では生育曲線は定常期以降でも漸増していた。つまり, 上述の結果から考えると, 代謝活性を低くすることで生命活動を維持していると考えられる。それ故, 培養中のアデノシンリン酸のレベルは利用率の低いおよび安定度の高いAMP量が最大値を示し, 利用率の高いおよび安定度の低いADPおよびATPの順にその量を低下し, それ故培養齢が増すにつれてそれぞれの値が漸増したこともよく理解される。

2型菌では, 培養齢が増してもRNAおよびDNAへの取込み量, およびこれら核酸への取込み時間と取込み量から得られる直線の傾斜もあまり変化が見られなかった。これらの結果は, 培養齢が増しても代謝量および代謝速度にあまり違いがないことを示唆する。それ故, 高エネルギーをもつATPおよびADPへの取込み量および取込み時間と取込み量との間で得られる直線の傾斜は培養齢が増してもあまり違いが見られなかった。ところが, AMPへの取込み量は定常期と死滅期で高い値を示した。これについては, 低いレベルでの代謝活性の衰えで利用率の低いおよび安定度の高いAMP量が増加したこと因ると考える。ところで, 2型菌の生育曲線

A. NTP REDUCTASE PATHWAY (ATP→dATP)



B. NDP REDUCTASE PATHWAY (ADP→dADP→dATP)

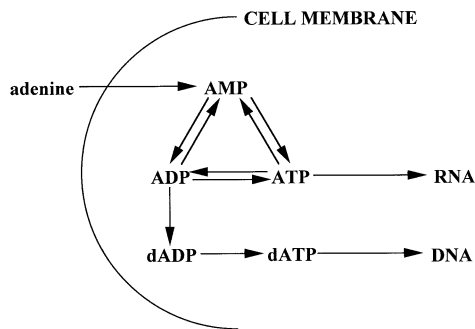


Fig. 11 Known pathways for the flow of exogenous adenine into RNA and DNA of microorganisms.



は定常期以降で急減し、これは死滅する細胞が定常期以降で急増していることを示唆する。しかしながら、上記のように2型菌では定常期以降でも代謝活性は対数期とあまり違いが見られなかった。つまり、2型菌では培養齢が増すことで死滅細胞が増加するが、一方生細胞はなお高い代謝活性は保持していることを示している。これについては今後さらに研究が必要である。2型菌の培養中のアデノシンリン酸については、対数期に、しかもAMP以外にはほとんど認められず、またその濃度も1型菌よりも極めて低かった。これについては、利用率の低いおよび安定度の高いAMPだけが、対数期にだけ少量残存したと考えられる。これは、2型菌では定常期および死滅期でAMPへの取込み量が増加したことと関連すると考えられるが、どのように関連するかについては明らかでない。

*E. coli* では、RNAおよびDNAへの取込み量およびこれら核酸への取込み時間と取込み量で得られる直線の傾斜とも、定常期以降で急激に減少した。これらの結果は、*E. coli* は定常期以降に代謝活性が急速に衰えることを示唆する。加えて、ATP、ADPおよびAMPへの取込み量およびこれらアデノシンリン酸への取込み時間と取込み量で得られる直線の傾斜とも、定常期以降で急激に減少した。つまり、*E. coli* では定常期以降で生命維持活動が急速に衰えることを示唆する。それ故、培養中のいずれのアデノシンリン酸とも対数期後期以降から急減し、定常期以降には基底レベルまで達した。ところで、*E. coli* では培養中のアデノシンリン酸量は低温性 *Pseudomonas* 属細菌とは異なり、AMP量よりもATPおよびADP量の方が高かった。他方、各アデノシンリン酸への取込み傾向も中温性の *E. coli* と低温性の *Pseudomonas* 属細菌とは異なった。つまり、中温性の *E. coli* ではAMP、低温性の *Pseudomonas* 属細菌ではADPへの取込みが最も高かった。しかし、この違いが培養中のアデノシンリン酸レベルとどのように関連するかについては明らかでない。

低温性 *Pseudomonas* 属細菌のタイプ1型菌と2型菌では生育曲線のパターンが異なること、培養中の各アデノシンリン酸量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異なること、さらに [2-<sup>3</sup>H] アデニンの各アデノシンリン酸およ

び核酸への取込み傾向が異なることから、これら2つの菌群は生態型(同一種が異なる環境に生育するために環境条件に適応した形質が分化し、遺伝的に固定して生じた生物の形)が異なると判断された。また、低温性の *Pseudomonas* 属細菌と中温性の *E. coli* では培養中の各アデノシンリン酸量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異なること、また [2-<sup>3</sup>H] アデニンの各アデノシンリン酸および核酸への取込み傾向が異なることから、これら低温細菌と中温細菌ではアデノシンリン酸代謝が異なると判断された。

## 文 献

- 1) H. Morii, and S. Sarukawa: Growth pattern and adenosine phosphates in psychrotrophic *Vibrio* spp. at different growth temperatures. *Fish. Sci.*, **66**, 826-833 (2000).
- 2) 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).
- 3) 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について. *日水誌*, **60**, 763-771 (1994).
- 4) O. Holm-Hansen, and C. R. Booth: The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.* **11**, 510-519 (1966).
- 5) D. M. Karl, and O. Holm-Hansen: Methodology and Measurement of adenylate energy charge ratios in environmental samples. *Mar. Biol.*, **48**, 185-197 (1978).
- 6) D. M. Karl: Measurement of microbial activity and growth in the ocean by rates of stable ribonucleic acid synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 850-860 (1979).
- 7) D. M. Karl: Simultaneous rates of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid syntheses for estimating growth and cell division of aquatic microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 802-810 (1981).

