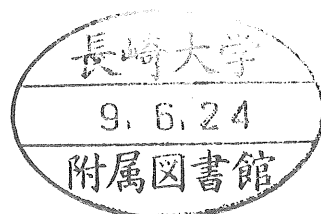


低温性 *Pseudomonas* 属細菌のアデノシンリン酸代謝に関する研究

1996 年 12 月

長崎大学大学院  
海洋生産科学研究科

石本 亮



## 目 次

第1章 緒 論 .....	1
第2章 低温貯蔵したサバにおける細菌フローラの経時的変化と分離菌の性状... 4	
第1節 低温貯蔵したサバにおける細菌フローラの経時的変化 .....	4
第2節 低温貯蔵したサバから分離した低温性 <i>Pseudomonas</i> の性状 .....	15
第3章 低温性 <i>Pseudomonas</i> の生育にともなうアデノシンリン酸の消長 .... 34	
第1節 培養液におけるアデノシンリン酸の分析法の検討 .....	34
第2節 培養液および培養上澄液中のアデノシンリン酸の消長 .....	40
第3節 異なる生育環境におけるアデノシンリン酸の消長 .....	44
第4節 アデニンおよび各アデノシンリン酸添加にともなうアデノシンリン酸 の消長 .....	67
第5節 中温性 <i>Pseudomonas</i> のアデノシンリン酸の消長 .....	78
第4章 [ <sup>3</sup> H] アデニンの核酸および核酸関連物質への取込み .....	84
第5章 総 括 .....	94
第6章 後 記 .....	99
第7章 文 献 .....	100

# 第1章 緒 論

微生物の活動は環境の物理的・化学的要因（温度・pH・浸透圧・光線・放射線・X線・ $\gamma$ 線・水分・酸素・炭酸ガス・塩類）により大きく支配され、このうち温度はその活動に最も重要な影響を与えている。

1) 一方、微生物はその種類により増殖の基本的温度（最低・最適・最高生育温度）を異にし、また微生物はこれら基本的温度により、慣習的に低温・中温・高温性微生物の3つに区分され、さらにこれらは細分化される。

地球の大部分は低温環境である。地球表面の約70%を占める海洋の平均温度は5°Cで、深海温度は1-2°Cである。地球表面の14%を占める北極と南極はほとんど1年中凍結状態にあるが、夏期数週間のみ解凍する場所もある。このような低温環境においても無菌状態の場所は稀で、多くの微生物が液状水の存在する場所に生息し、増殖している。また、人為的につくられた低温環境下でも、それを適所とする微生物が常在している。

低温性微生物の存在については、1887年 Forster<sup>2)</sup> が氷温下で生育する細菌を見出したのが最初である。1902年 Schmidt-Nielsen<sup>3)</sup> は0°Cで生育できる微生物を好冷菌（psychrophiles）と名付けた。1954年 Hucker<sup>4)</sup> は0°Cで生育できる微生物を偏性好冷菌（obligate psychrophiles）と通性好冷菌（facultative psychrophiles）に分け、前者は0°Cで生育できるが32°Cで生育できない微生物とし、後者は0および32°Cで生育可能な微生物とした。1959年 Ingraham & Stokes<sup>5)</sup> は基本的温度とは無関係に2週間以内に0°Cでよい生育をする微生物を好冷菌とし、0°Cで急速に生育し20°Cで最大限に急速に生育する微生物を偏性好冷菌、生育速度とは無関係に0°Cで生育できる微生物を通性好冷菌とした。1962年 Rose<sup>6)</sup> は0°C付近での生育に言及することなしに、25°C以下に至適生育温度をもつ微生物を好冷菌とし、約30°Cに最大生育温度をもつ微生物を偏性好冷菌とした。1963年 Stokes<sup>7)</sup> は0°Cでの生育で1週間以内に肉眼的に判別できる微生物を好冷菌とし、20°C以下に至適生育温度をもつ微生物を偏性好冷菌、20°C以上に

同温度をもつ微生物を通性好冷菌とした。1975年 Morita<sup>8)</sup> は 15°C 以下に最適生育温度、約 20°C に最高生育温度、0°C 以下に最低生育温度をもつ微生物を好冷菌とし、それ以外の微生物を低温菌 (psychrotrophs) とした。現在ではこの定義が広く用いられている。1991年清水<sup>9)</sup> は低温性微生物を好冷菌と低温菌に大別し、最大生育温度が 30°C 以下の微生物を好冷菌とし、このうち最大生育温度が 20°C 以下の微生物を偏性好冷菌、30°C 以下の微生物を通性好冷菌とした。また、40°C 以下で生育し、5°C 以下でも生育できる微生物を低温菌とした。

低温生物が低温下でよく生育できる理由として、少なくとも、低温生物の酵素は低温でより効率よく触媒反応を行うこと、<sup>10)</sup> 低温生物は低温下においても能動的摂取系がよく作用し、必要な栄養素を効率よく細胞内に濃縮すること、<sup>11)</sup> この摂取系の効率よい作用は細胞膜中に不飽和脂肪酸がより多量に存在することで可能ならしめると考えられること、すなわち生体制御機構が低温に順応し、低温に適した細胞膜、酵素を形成すること<sup>12)</sup> が知られている。しかし、この順応が低温で生育するという、特異な形質を遺伝的に有しているか否かについては全く明らかにされていない。

ところで、微生物の基本的温度は遺伝的に有している形質であるという前提は一般的に受け入れられている。しかし、上記の報告を含め、低温性微生物の区分のための研究に関しては、遺伝的根拠は全くみられない。それ故、この区分に関しては現在に至るまで、様々な見解が出される結果となっている。本研究は低温性 *Pseudomonas* の基本的温度に基づく区分と、この区分が遺伝的に有している形質の違いに基づくか否かをアデノシンリン酸代謝の研究を通して明らかにしようとするものである。

とくに、供試菌として *Pseudomonas* を用いたことについては、*Pseudomonas* は海水・淡水・泥およびそれらに含まれる様々な物質、下水、臨床検査で一般的に取り扱われる臨床標本や検体、多種多様な食品や食品工業排水、花、果物、野菜、病気の動物や植物など至るところから分離され、また低温環境から分離される代表的な細菌でもあることに因る。<sup>13)</sup>

本研究は、まず 0°C 下に貯蔵したサバから細菌を経時的に分離し、分離菌の分類学的所属を属段階まで同定し、生育にともなう細菌フローラの経時的変動をしらべた。つぎに、分離菌のうちの *Pseudomonas* のすべてについて至適生育温度をしらべ、さらにこの至適温度での生育傾向（生育曲線）をしらべた。この結果、分離した低温性 *Pseudomonas* は二つの菌群に区分された。そこで、この二つの菌群について生理学的性状、異なる環境下での生育にともなうアデノシンリン酸の消長をしらべた。その結果、この二つの菌群で生理学的性状および生育にともなう各アデノシンリン酸の消長に著しい違いがみられた。そこでさらに、生育にともなう各アデノシンリン酸の消長の違いを <sup>3</sup>H アデニンのアデノシンリン酸および核酸（DNA と RNA）への取込みにより検討した。一方、中温性 *Pseudomonas* の生育にともなうアデノシンリン酸の消長もしらべ、低温性 *Pseudomonas* との違いについても検討した。

## 第2章 低温貯蔵したサバにおける細菌フローラの経時的変化と分離菌の性状

鮮魚を低温貯蔵した場合における細菌フローラについてしらべた研究はすでに多く見られる。<sup>14~17)</sup>しかし近年、細菌の分類には分子生物学的手法<sup>18)</sup>が用いられるようになったこともあって、細菌の種はもちろぬ属段階までの分類学的位置にも大きな変更がみられる。たとえば、従来水産物の主要腐敗細菌とされていた *Achromobacter* については、現在ではその多くは *Moraxella* に属するとされている。したがって、従来の研究結果から、低温貯蔵した魚類の鮮度低下にともなう細菌フローラの変動を知ることは問題がある。そこで、0℃下に貯蔵したサバの表皮、筋肉および腹腔内壁における鮮度低下にともなう細菌フローラの変動をしらべた。

### 第1節 低温貯蔵したサバにおける細菌フローラの経時的変化

#### 材料と方法

**サバの低温貯蔵方法** 供試魚のサバ *Scomber japonicus* は、長崎市内の鮮魚店より購入し、氷蔵して実験室に持ち帰った。その後直ちに外傷のないものを選び出し、氷蔵および氷冷した。なお、氷蔵は魚体を直接氷のなかに、氷冷はサランラップで包装した魚体を氷中に貯蔵した。実験は4日間隔で24日間行い、供試魚は一回の実験に3尾を用い、生菌数と細菌フローラの変動をしらべた。また、購入直後の鮮魚については5尾を供試魚とした。なお、実験は11月と12月に各1回ずつ、計2回行った。

**生菌数の測定および菌株の分離** 生菌数の測定は供試魚の表皮（背部）、背部筋肉（表皮より約5mm以深）および腹腔内壁について行った。表皮と腹腔内壁については、滅菌したコルクボーラーを供試魚の各部の表面に密着させ、その部分を10mlの0.1%ペプトン—リン酸緩衝

液（pH7.0）で十分に洗浄して集菌し、菌数測定用試料とした。背部筋肉については、その約1gに9mlの同緩衝液を加えポリトロン（Kinematica GmbH、Steinhofhald 20、6005 Luzeran CH）を用いてけん濁液とした。つぎに、これらの試料を同緩衝液を用いて10倍段階希釈液とし、PYBG寒天平板培地（グルコース0.1%、ポリペプトン0.5%、牛肉エキス0.25%、酵母エキス0.25%、50%海水、寒天1.5%、pH7.0）に0.2mlずつ接種し、20℃で培養した。総生菌数は5日間培養後に計数した。一方、菌株の分離は生菌数測定後の平板から外観のことなる集落を釣菌し、同平板培地を用いて純粋分離し、供試菌とした。

分離菌株の性状試験および同定 分離菌株は杉田ら<sup>19)</sup>の培地を用い、培養24時間後に形態および運動性を位相差顕微鏡で観察した。なお培養は20℃で行い、以後特記しない限り培養温度は20℃とする。色素の産生、グラム染色、オキシターゼ産生、カタラーゼ産生、O-F試験、ガス産生の各試験は常法により行った。<sup>20)</sup>塩分要求性試験は杉田ら<sup>19)</sup>の培地の、50%海水の代わりに蒸留水を用いた培地で、また0℃と37℃での発育試験は杉田ら<sup>19)</sup>の培地を用い、培養24時間後に肉眼的に判定した。

分離菌株の分類学的所属はBergey's Manual<sup>21,22)</sup>を参考とし、清水の同定形式<sup>23)</sup>に従って属段階までしらべた。

## 結 果

### 1. 氷蔵および氷冷したサバの各部位における総生菌数の経時変化

氷蔵および氷冷したサバの表皮、筋肉（内層）および腹腔内壁における総生菌数の経時変化をTable 1に示す。総生菌数は実験Ⅰ（1回目の貯蔵実験）および実験Ⅱ（2回目の貯蔵実験）とも、表皮と筋肉では氷蔵魚は氷冷魚に比べその値は低く、腹腔内壁では逆に高かった。総生菌数の経時変化は各部位で異なった傾向を示し、とくに筋肉と腹腔内壁では貯蔵4日目に生菌数は一時的に減少した。同じ部位を実験ⅠとⅡおよび氷蔵魚と氷冷魚の間で比べると、いずれの部位ともその

両者では似た傾向を示した。なお、総生菌数は貯蔵前後の供試魚とも表皮では実験 I と II で有意な違いはみられなかったが、筋肉と腹腔内壁では実験 I は II に比べてその値が極めて高かった。

## 2. 氷蔵および氷冷したサバの各部位における全細菌フローラと好塩性細菌フローラの変動

氷蔵および氷冷したサバの表皮、筋肉および腹腔内壁における全細菌フローラと好塩性細菌フローラの経時変化を Fig.1～4 に示す。なお、2回の実験で 1967 菌株を分離した。

貯蔵前（貯蔵 0 日目）の供試魚：実験 I では、全細菌フローラに関しては表皮、筋肉および腹腔内壁のいずれの部位でも *Vibrio* が最も高い割合を占め、その他 *Pseudomonas*、*Photobacterium*、*Bacillus*、*Micrococcus* が主要細菌として認められた。好塩性細菌フローラに関しては、いずれの部位でも *Vibrio* や *Photobacterium* が優占し、*Pseudomonas* や *Moraxella* も主要細菌として認められた。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合はいずれの部位でも 40～50% であった。これに対し、実験 II では、全細菌フローラに関してはいずれの部位でも *Pseudomonas* と *Moraxella* がその大部分を占め、その他 *Vibrio*、*Bacillus*、*Micrococcus* などが認められた。好塩性細菌フローラも、いずれの部位でも *Pseudomonas* と *Moraxella* がその大半を占めた。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合は 30～60% であった。

貯蔵魚の腹腔内壁：実験 I では、全細菌フローラに関しては氷蔵および氷冷魚とも 12 または 16 日目までは *Vibrio* の割合が極めて高く、*Pseudomonas* が通常これに次いだが、12 日目からは *Photobacterium* の増加とともに *Pseudomonas* の割合が増加し、20 日目以降では *Pseudomonas* が最も高い割合を占めた。好塩性細菌フローラに関しては、いずれの貯蔵魚でも 12 日目までは *Vibrio* が大半を占めたがそれ以降では *Vibrio* の割合が減少し、*Photobacterium* の割合が増加した。全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合はいずれの貯蔵魚でも 12 日目で約 50% を占めたが、それ以降では漸減した。これに対し、実験 II の氷蔵および氷冷魚の腹腔内壁では、全細菌フローラに関しては全貯蔵期間を通して *Pseudomonas* や *Moraxella* が優占



し、とくに貯蔵 12 日目以降ではこの両者あるいは *Pseudomonas* によりその大半が占められた。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合は貯蔵期間の増加にともない漸減し、氷蔵では 8 日目、氷冷では 12 日目以降ではその割合は 0% から数% に過ぎなかった。

貯蔵魚の筋肉：実験 I の氷冷魚では 16 日目までは *Vibrio* の割合が最も高く、*Pseudomonas* がこれに次いたが、20 日目以降では *Vibrio* の割合は急減し、*Pseudomonas* がその大半を占めた。また、*Moraxella*、*Bacillus*、*Micrococcus*、コリネ型細菌が認められた。好塩性細菌フローラに関しては 16 日目までは *Vibrio* が最も多かった。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合は表皮や腹腔内壁に比べ低く、またその変動が大きく、0% から 35% の範囲で変動した。また、実験 I の氷蔵魚では氷冷魚に比べフローラ変動が大きく、また 16 日目以前でも *Vibrio* の割合が必ずしも最大値を示さないなどの違いはみられたが、概略的には氷冷魚について述べたこととほぼ同様な結果を示した。これに対し、実験 II の氷蔵魚と氷冷魚の筋肉では、全細菌フローラに関しては貯蔵全期間を通して *Pseudomonas* が最も高い割合を占め、とくに 16 日目以降ではほぼ大半が *Pseudomonas* で占められた。その他 *Vibrio*、*Moraxella*、*Bacillus*、*Micrococcus* などが認められた。また、全細菌フローラに占める好塩性細菌フローラの割合は貯蔵にともない急減し、とくに氷冷魚では 12 日目以降では 0% で、また氷蔵魚でも 0% から数% であった。

貯蔵魚の表皮：実験 I および II とも氷冷魚と氷蔵魚でのフローラの構成およびその経時変化にはほとんど違いがみられず、全細菌フローラ、好塩性細菌フローラ、および全細菌フローラに対する好塩性細菌フローラの割合およびこれらの経時変化は、実験 I および II の場合とも筋肉および腹腔内壁の結果とほぼ似ていた。

## 考 察

供試魚の表皮の生菌数は実験 I と II でほとんど違いがみられなかったが、筋肉と腹腔内壁では著しい違いがみられ、すなわち実験 I と II

の供試魚では鮮度に違いがあった。一方、実験ⅠとⅡの供試魚では細菌フローラの構成も異なった。ところで、海産魚を低温下で貯蔵した場合の細菌フローラについてはすでに多くの報告がみられるが、そのいずれも鮮度低下にともない *Pseudomonas*が増加し、また *Pseudomonas*はフローラの主役を演じるとされている。今回、実験Ⅰの供試魚は実験Ⅱの供試魚よりも著しく鮮度低下が進んでいたと考えられるにもかかわらず、実験Ⅱでは *Pseudomonas*が優占したのとは異なり、実験Ⅰではいずれの部位でも *Vibrio*が優占し、これまでの報告とは異なるものであった。すなわち、低温貯蔵下の細菌フローラは貯蔵前のフローラに大きく左右されると考えられた。

ところで今回、全フローラに占める好塩性フローラの割合は実験Ⅰの供試魚では貯蔵期間の延長にともなう急激な減少は認められなかったが、実験Ⅱの供試魚ではその割合は急減した。そのフローラの構成をみると、前者では *Vibrio*が優占したのに対し、後者では *Pseudomonas*が優占し、すなわち好塩性 *Vibrio*が優占する場合には非好塩性の *Pseudomonas*の発育は抑制されるが、好塩性 *Pseudomonas*が優占する場合は非好塩性の *Pseudomonas*が優占されると考えられた。

## 要 約

氷蔵および氷冷貯蔵したサバの表皮、筋肉および腹腔内壁における生菌数と細菌フローラをしらべ、以下の結果を得た。なお、貯蔵実験は2回行った。

1) 生菌数は表皮では2回の貯蔵実験で著しい違いはなかったが筋肉と腹腔内壁では両実験で著しく異なった。また、生菌数の経時的変化も表皮と筋肉・腹腔内壁とではその傾向を著しく異にした。

2) 氷蔵および氷冷したサバの細菌フローラは表皮、筋肉および腹腔内壁とも *Pseudomonas*が優占する場合と *Vibrio*が優占する場合があり、しかも前者は後者に比べ鮮度は著しく高く、*Pseudomonas*の優占が常に鮮度低下だけに起因するものではなかった。しかし *Vibrio*が優占する

場合でも最終的には *Pseudomonas* が優占した。

3) *Pseudomonas* が優占したフローラでは好塩性細菌フローラとしては *Pseudomonas* が多く、また *Vibrio* が優占したフローラでは好塩性フローラとしては *Vibrio* が優先し、*Pseudomonas* の優占には好塩性フローラの構成が大きく関与すると考えられた。

Table 1. Total viable count (TVC) in the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls of mackerel during storage in ice and at the temperature of ice

Storage time (days)	Number of bacterial counts					
	In ice			At the temperature of ice		
	Skin (cfu/cm <sup>2</sup> )	Muscle (cfu/g)	Abdominal walls (cfu/cm <sup>2</sup> )	Skin (cfu/cm <sup>2</sup> )	Muscle (cfu/g)	Abdominal walls (cfu/cm <sup>2</sup> )
Experiment I						
0	4.3 x 10 <sup>5</sup>	7.2 x 10 <sup>5</sup>	4.2 x 10 <sup>5</sup>	4.3 x 10 <sup>5</sup>	7.2 x 10 <sup>5</sup>	4.2 x 10 <sup>5</sup>
4	3.7 x 10 <sup>5</sup>	3.2 x 10 <sup>4</sup>	1.1 x 10 <sup>4</sup>	3.5 x 10 <sup>5</sup>	8.2 x 10 <sup>4</sup>	2.5 x 10 <sup>3</sup>
8	2.7 x 10 <sup>7</sup>	5.2 x 10 <sup>6</sup>	1.8 x 10 <sup>6</sup>	4.8 x 10 <sup>8</sup>	4.0 x 10 <sup>7</sup>	6.6 x 10 <sup>4</sup>
12	5.7 x 10 <sup>8</sup>	2.4 x 10 <sup>7</sup>	7.1 x 10 <sup>6</sup>	8.5 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>8</sup>	1.5 x 10 <sup>5</sup>
16	1.8 x 10 <sup>9</sup>	4.0 x 10 <sup>7</sup>	1.4 x 10 <sup>7</sup>	2.1 x 10 <sup>9</sup>	3.8 x 10 <sup>8</sup>	2.1 x 10 <sup>6</sup>
20	3.7 x 10 <sup>9</sup>	3.6 x 10 <sup>8</sup>	1.2 x 10 <sup>8</sup>	6.7 x 10 <sup>9</sup>	6.1 x 10 <sup>8</sup>	6.0 x 10 <sup>7</sup>
24	3.8 x 10 <sup>9</sup>	8.5 x 10 <sup>7</sup>	5.0 x 10 <sup>7</sup>	1.4 x 10 <sup>10</sup>	5.2 x 10 <sup>8</sup>	9.2 x 10 <sup>5</sup>
Experiment II						
0	4.3 x 10 <sup>5</sup>	2.3 x 10 <sup>3</sup>	1.6 x 10 <sup>2</sup>	4.3 x 10 <sup>5</sup>	2.3 x 10 <sup>3</sup>	1.6 x 10 <sup>2</sup>
4	1.6 x 10 <sup>5</sup>	1.5 x 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	6.7 x 10 <sup>5</sup>	1.6 x 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>2</sup>
8	1.2 x 10 <sup>7</sup>	1.8 x 10 <sup>4</sup>	2.4 x 10 <sup>3</sup>	1.4 x 10 <sup>8</sup>	3.8 x 10 <sup>5</sup>	1.5 x 10 <sup>2</sup>
12	4.5 x 10 <sup>8</sup>	1.4 x 10 <sup>5</sup>	2.6 x 10 <sup>3</sup>	3.9 x 10 <sup>9</sup>	1.3 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>3</sup>
16	1.3 x 10 <sup>8</sup>	2.4 x 10 <sup>5</sup>	2.5 x 10 <sup>4</sup>	8.5 x 10 <sup>9</sup>	1.6 x 10 <sup>6</sup>	7.7 x 10 <sup>3</sup>
20	1.4 x 10 <sup>8</sup>	1.4 x 10 <sup>5</sup>	4.4 x 10 <sup>6</sup>	1.0 x 10 <sup>10</sup>	1.7 x 10 <sup>6</sup>	4.9 x 10 <sup>5</sup>
24	2.8 x 10 <sup>8</sup>	1.3 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>10</sup>	1.9 x 10 <sup>6</sup>	2.4 x 10 <sup>5</sup>

Mackerel was stored as touched directly (in ice) and indirectly with ice (at the temperature of ice). The inner layer of muscle is deeper 5 mm from the skin. The counts of bacteria were carried out using PYBG medium [polypeptone, 0.5%; beef extract, 0.25%; yeast extract, 0.25%; glucose, 0.1%; and agar, 1.5% in 50% sea water (pH 7.0)] at 20°C.

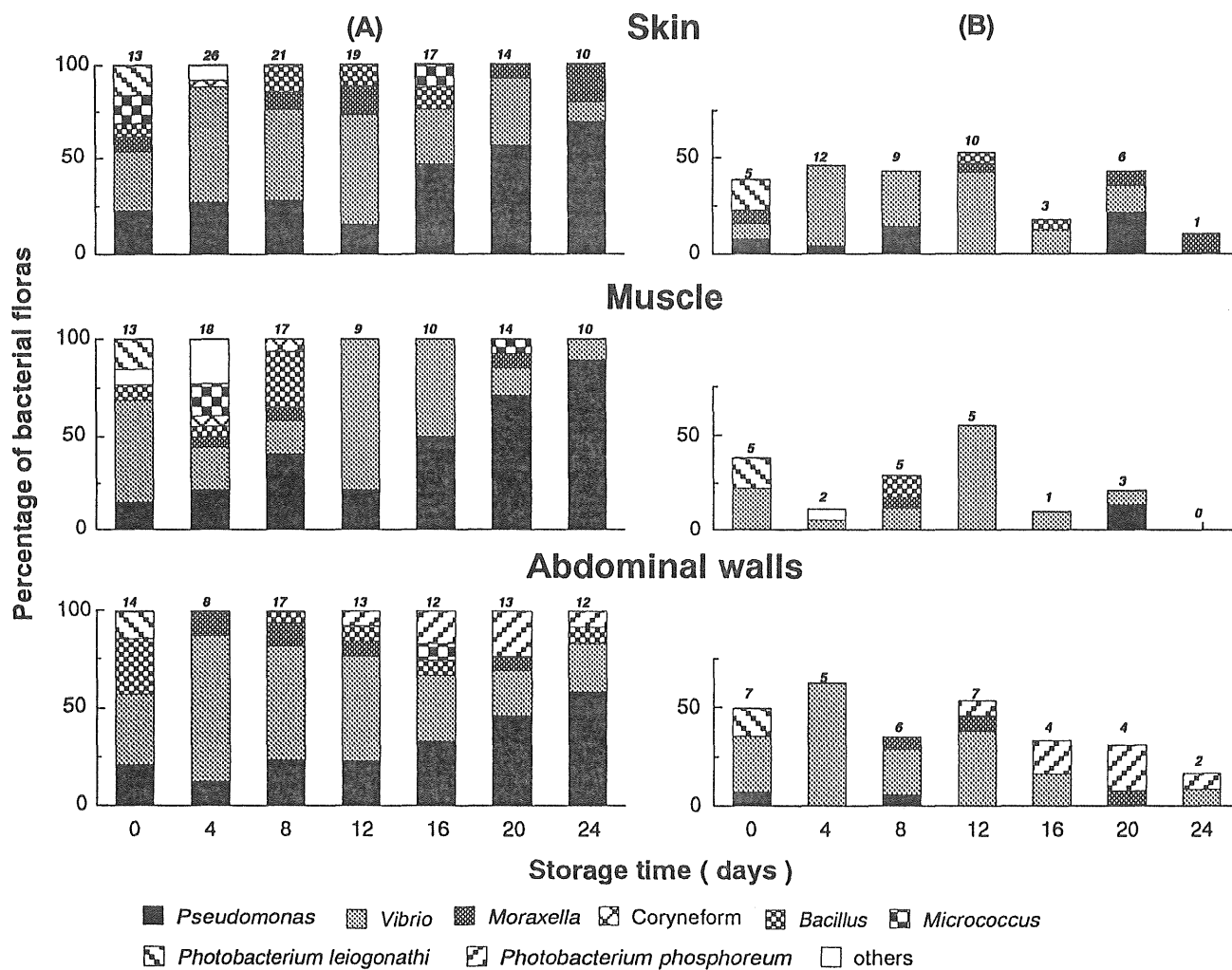


Fig. 1. The floras of the whole (A) and halophilic (B) bacterial strains isolated from the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls of mackerel stored in ice in Experiment I.

Numerals show the number of bacterial strains used in the test.

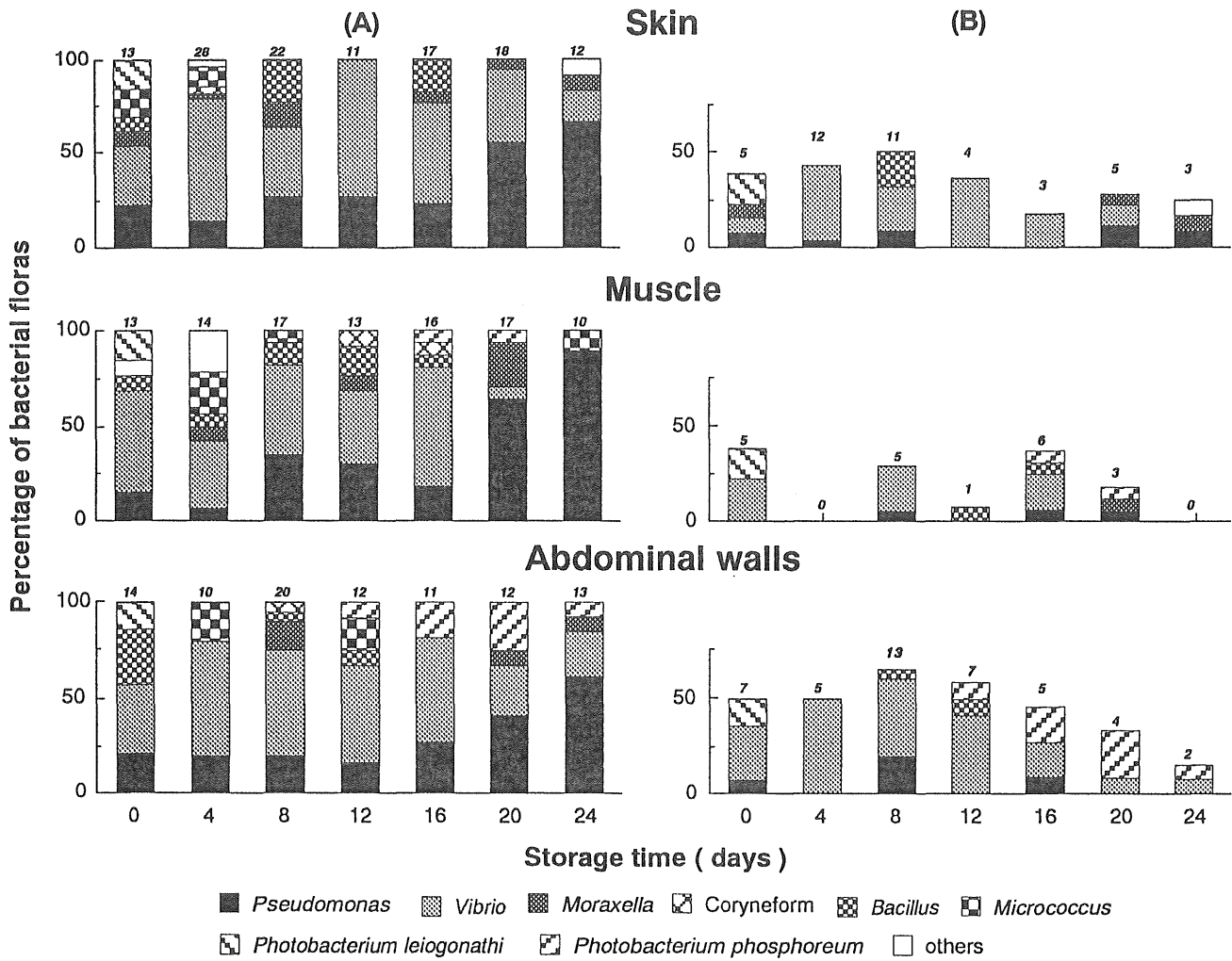


Fig. 2. The floras of the whole (A) and halophilic (B) bacterial strains isolated from the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls of mackerel stored at the temperature of ice in Experiment I.

Numerals show the number of bacterial strains used in the test.

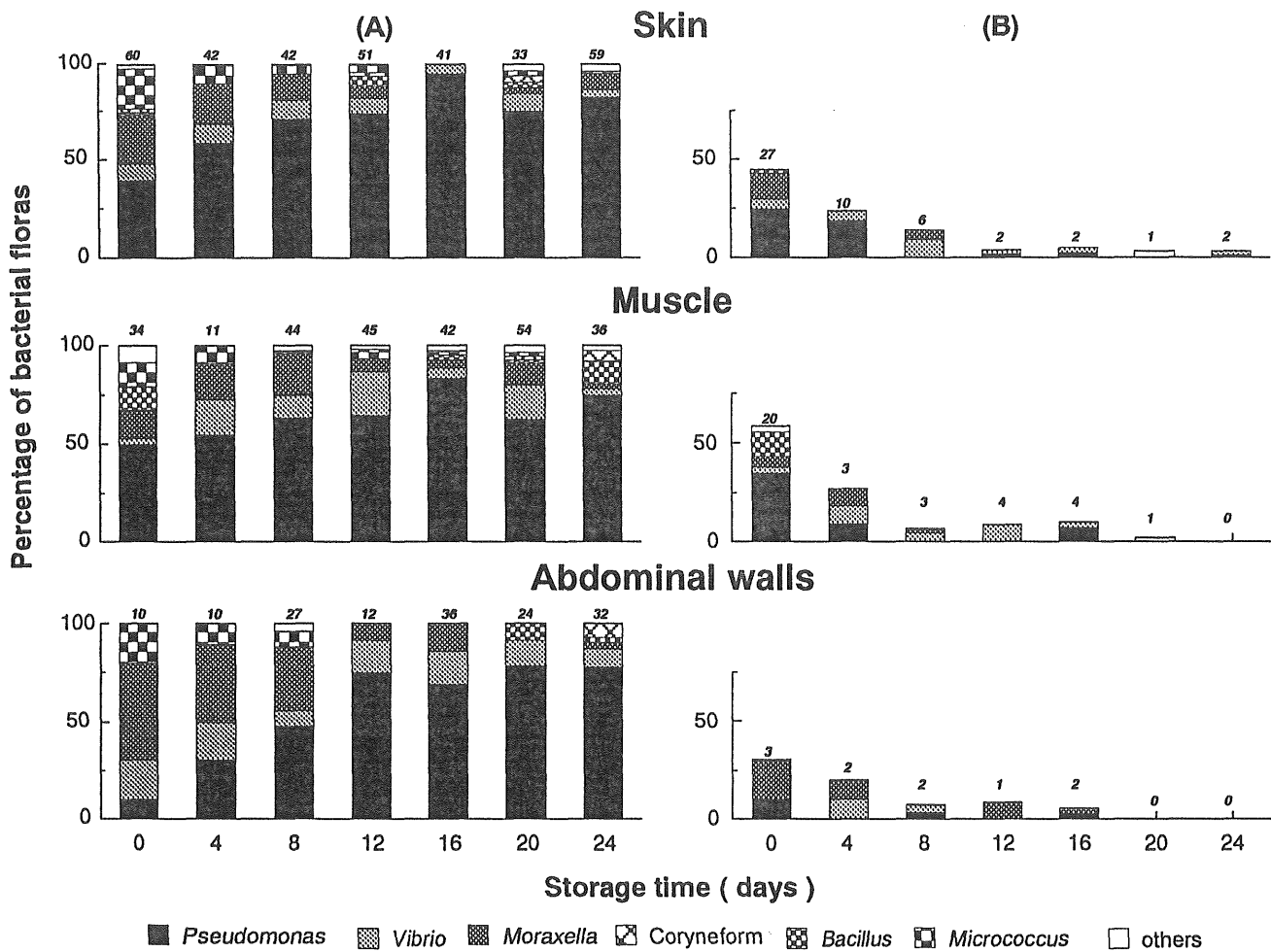


Fig. 3. The floras of the whole (A) and halophilic (B) bacterial strains isolated from the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls of mackerel stored in ice in Experiment II.

Numerals show the number of bacterial strains used in the test.

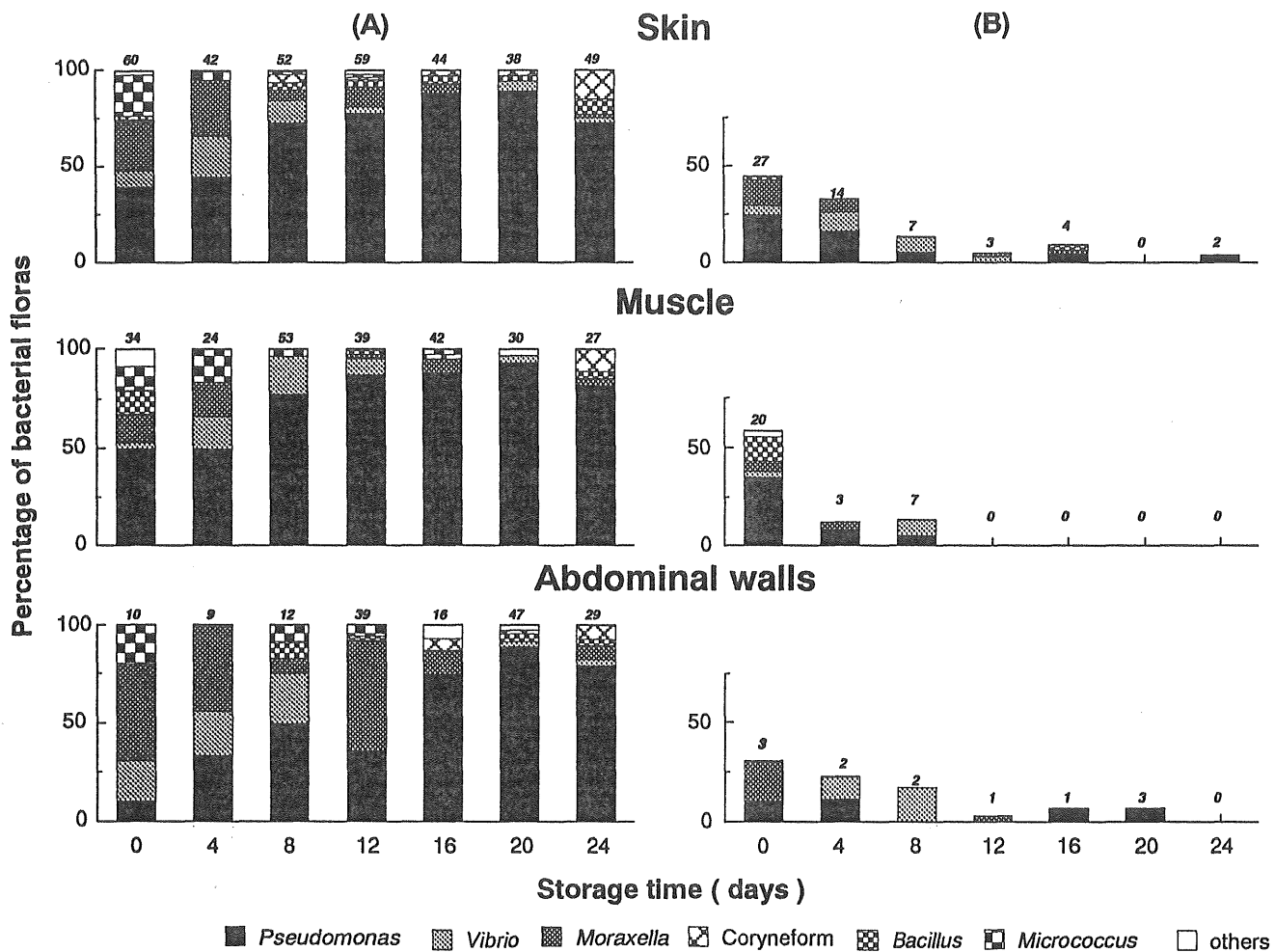


Fig. 4. The floras of the whole (A) and halophilic (B) bacterial strains isolated from the skin, the inner layer of muscle, and the abdominal walls of mackerel stored at the temperature of ice in Experiment II.

Numerals show the number of bacterial strains used in the test.



## 第2節 低温貯蔵したサバから分離した低温性 *Pseudomonas* の性状

前節で述べたように、0°C下に貯蔵したサバでは *Pseudomonas*、*Vibrio*、*Moraxella*、コリネ型細菌、*Bacillus*、*Micrococcus*などが高い割合で認められたが、貯蔵日数の増加にともない *Pseudomonas*が増加し、優占した。そこで、一般的にも低温環境から分離される代表的な細菌としての、この *Pseudomonas*について至適温度、および至適温度とそれ以上・以下の温度での生育傾向をしらべ、同菌の基本的温度（至適温度）の違いによるグループ分けの可否について検討した。その結果、低温性 *Pseudomonas*は2つの菌群に分けられることが分かった。そこで、これらは生理学的性状も異なるのではないかと考え、糖の利用能と培養液のpHとの関連性、生育に及ぼすpHの影響、塩分要求性、単一炭素源の利用能をしらべた。

### 材料と方法

**供試菌株** 0°C下に貯蔵したサバから分離し（本章・第1節参照）、0°C下で1週間以内に生育した *Pseudomonas*（以下低温性 *Pseudomonas*と言う）320菌株を供試菌とした。至適温度および同温度での生育傾向については供試菌のすべてについて試験した。至適温度以上および以下の温度での生育傾向、異なる培地での生育傾向、糖の利用能と培養液のpHとの関連性、生育に及ぼすpHの影響、塩分要求性、単一炭素源の利用能をしらべる実験では、非好塩性で糖を酸化的に分解する菌株をランダムに選定し、供試した。

**試験方法** 培養は特記しない限り至適温度で行った。生育量は600nmの吸光度で測定した。生育温度に関する実験では杉田ら<sup>19)</sup>の培地（ポリペプトン0.5%、牛肉エキス0.25%、酵母エキス0.25%、グルコース0.1%、50%海水、pH7.0）を用いた。至適温度は15~35°Cの温度（5°C間隔）で24時間培養後に、至適温度における生育傾向は12時間間隔で120時間または160時間測定した。至適温度以上および以下の温度での生育

傾向をしらべる実験では、至適温度を 20℃ と 30℃ にもつ菌株について、それぞれ 30 および 25℃ と 20 および 25℃ で試験した。0℃ での生育傾向をしらべる実験では、20 および 25℃ と 25 および 30℃ に至適温度をもつ菌株について、48 時間間隔で 456 時間まで試験した。

異なる培地における生育傾向をしらべる実験は、20 および 30℃ に至適温度をもつ各 5 菌株について、Nutrient Broth (BBL)、0.1% グルコース添加 Nutrient Broth (BBL)、50% 海水 - Nutrient Broth (BBL)、50% 海水 - 0.1% グルコース添加 Nutrient Broth (BBL)、杉田ら<sup>19)</sup> の培地を用い試験した。

糖の利用能と培養液の pH をしらべる実験は、20 および 30℃ に至適温度をもつ各 5 菌株程度について、0.1 および 0.5% グルコースを添加した 50% 海水 - Nutrient Broth (BBL) を用い、生育量と培養液の pH を 12 時間間隔で 120 時間までしらべた。

生育に及ぼす pH の影響試験は、20 および 30℃ に至適温度をもつ各 5 菌株について、0.1% グルコースを添加した 50% 海水 - Nutrient Broth (BBL) を 1N-HCl と 1N-NaOH で pH 4.5-9.0 (0.5 間隔) に調整し、12 時間間隔で 120 時間までの生育量をしらべた。

塩分要求性試験は、20 および 30℃ に至適温度をもつ各 5 菌株について、基本培地として 0.1% グルコース添加 Nutrient Broth (BBL) を用い、濃度の異なる海水、成分の異なる人工海水、濃度の異なる NaCl について試験した。海水は 5、10、25、50% 濃度、NaCl は 1.5、3.0、4.5、6.0 g/l 濃度になるよう調整した。成分の異なる人工海水は、人工海水から目的とする塩類を除去し、調整した。

単一炭素源の利用能は、20 および 30℃ に至適温度をもつ各 22 菌株について、Stanier ら<sup>24)</sup> の基礎培地に糖類 0.2%、その他の炭素源 0.1% を添加した培地で試験した。用いた炭素源は炭水化物および糖類 16 種類、短鎖脂肪酸 8 種類、ジカルボン酸 5 種類、その他の有機酸 2 種類、ポリアルコールおよびグリコール 3 種類、アルコール 3 種類、窒素を含まない芳香および環式化合物 2 種類、アミノ酸 13 種類、その他の炭素源 3 種類、計 55 種類である。

## 結 果

### 1. 至適温度における生育傾向

低温性 *Pseudomonas* の至適温度での生育曲線を Fig.5 に示す。なお同菌は非好塩性（おそらく陸性細菌）および好塩性（おそらく海洋性細菌）の双方が認められたため、これを別々に示した。

低温非好塩性 *Pseudomonas* は 15、20、25 および 30°C に至適温度をもつ菌群より構成された。その生育傾向は至適温度 25°C を境として異なり、すなわち 25°C 以下に至適温度をもつ菌群（I 型菌）の生育傾向は培養時間の延長にともない生育量は増加し、一方 25°C 以上に至適温度をもつ菌群（II 型菌）では培養時間の延長にともない生育量は増加するが、定常期以降急減し、また最大生育量に達する時間が I 型菌に比べて速やかであった。なお、25°C に至適温度をもつ菌群ではこの両タイプが混在していた。

なお低温非好塩性 *Pseudomonas* は 20°C に至適温度をもつ菌が最も多く、またこの菌群は他の菌群に比べ生育量が高かった。

低温好塩性 *Pseudomonas* では 15、20、25°C に至適温度をもつ菌が認められたが、30°C に至適温度をもつ菌株はみられなかった。また、上述の非好塩性菌で認められた、異なる至適温度でのグループ分けはできなかった。そこで、今後は非好塩性菌について研究を進めることにした。

なお、非好塩性 *Pseudomonas* と同様に、好塩性 *Pseudomonas* でも 20°C に至適温度をもつ菌が最も多く、また生育量もこの菌群が最も高い値を示した。

### 2. 至適温度以上および以下の温度における生育傾向

至適温度を 20°C にもつ I 型菌の 20~30°C での生育曲線を Fig.6 に示す。25 および 30°C と温度が上がるにつれて生育量は著しく低下し、また生育傾向は、とくに 25°C 培養では一時的に減少し II 型菌と似た傾向を示すなど、複雑な生育傾向を示す菌株もみられたが、全般的には生育傾向は 20°C 培養と類似した。

至適温度を 30°C にもつ II 型菌の 20~30°C での生育曲線を Fig.7 に示す。

30℃培養でみられた定常期以降の減少傾向は、25および20℃培養ではほぼ認められず、I型菌の生育傾向と類似した。なお、生育量は30℃培養と20℃培養の間であまり違いはみられなかったが、生育速度は30℃培養は25および20℃培養に比べて速かった。

I型菌（20および25℃に至適温度をもつ菌株）とII型菌（25および30℃に至適温度をもつ菌株）の0℃下での生育曲線をFig.8に示す。IおよびII型菌とも培養期間中での減少傾向はみられなかった。なお、I型菌は菌株間で生育量に違いがみられたが、II型菌ではほぼ同じ生育量を示した。

### 3. 異なる培地における生育

I型菌（至適温度20℃）とII型菌（至適温度30℃）における異なる培地で培養した場合の生育曲線をFig.9に示す。IおよびII型菌ともNutrient Broth、0.1%グルコース添加 Nutrient Broth、50%海水 - Nutrient Brothでは生育は良くなかったが、50%海水 - 0.1%グルコース添加 Nutrient Brothおよび杉田ら<sup>19)</sup>の培地では生育は旺盛であった。また生育が旺盛になるにともないI型菌とII型菌でみられた生育傾向も顕著になった。しかし培地成分の違いによる生育傾向の違いはみられなかった。

なお25℃に至適温度をもつIおよびII型菌においても20℃および30℃に至適温度をもつIおよびII型菌と同様の結果を示した。

### 4. 糖の利用能と培養液のpHの変動

I型菌（至適温度20℃）とII型菌（至適温度30℃）におけるグルコース添加にともなう生育量と培養液のpH値の変動をFig.10に示す。I型菌では、0.1%グルコース添加培地ではよい生育を示したが、0.5%グルコース添加培地では生育が抑制され、またその生育傾向も変化し、定常期以降では減少傾向を示した。II型菌では0.5%グルコース添加培地では、0.1%グルコース添加培地より生育は促進された。

一方、培養液のpHは、I型菌では、0.1%グルコース添加培地ではpHは7.4から7.6の間で微増したが、0.5%グルコース添加培地では培養時間の延長にともないpHは7.4から4付近まで漸減した。II型菌では、0.1%

グルコース添加培地では pH は 7.4 から 8 付近まで上昇し、また 0.5% グルコース添加培地では微酸性から微アルカリ性の間を推移していた。

## 5. 生育に及ぼす pH の影響

I 型菌（至適温度 20℃）および II 型菌（至適温度 30℃）を異なる pH で培養した場合の、異なる培養齢における生育量を Fig.11 に示す。I 型菌では pH4.5 でも旺盛な生育を示したが、半面 pH8.5 以上では生育が悪かった。一方、II 型菌は pH4.5 では生育しなかったが pH9.0 ではよい生育を示した。

## 6. 塩分要求性

異なった塩化ナトリウム濃度および海水濃度で培養した I 型菌（至適温度 20℃）と II 型菌（至適温度 30℃）の生育曲線を Fig.12 に示す。なお、I および II 型菌とも各 5 菌株について実験を行ったが、5 菌株ともほぼ似た傾向を示したため、代表的な一菌株の結果を示した。I および II 型菌とも塩分無添加培地に比べ NaCl 添加培地では生育が促進され、海水培地ではいっそう生育が促進された。なお I 型菌では 0.15% NaCl 添加培地、II 型菌では 5 および 50% 海水培地での生育が悪かった。

以上の結果を参考とし、今後の実験用培地には 25% 海水を使用することにした。

I 型菌（至適温度 20℃）および II 型菌（至適温度 30℃）の生育に及ぼす無機塩の影響試験の結果を Fig.13 に示す。なお、I および II 型菌とも各 5 菌株について実験を行ったが、5 菌株ともほぼ似た傾向を示したため、代表的な一菌株の結果を示した。I および II 型菌とも、人工海水から NaCl、CaCl<sub>2</sub> および KCl を除いた培地での生育量は、対照としての人工海水でのそれとほとんど差異はみられなかった。しかし MgCl<sub>2</sub>・MgSO<sub>4</sub> を除いた培地では人工海水培地より生育量は低下した。この傾向は、とくに定常期以降で顕著であった。

## 7. 単一炭素源の利用能

I 型菌（至適温度 20℃）および II 型菌（至適温度 30℃）の単一炭素源の利用能を Table 2 および 3 に示す。I および II 型菌とも、全く同じ

パターンで炭素源を利用した菌株はみられなかった。またイヌリン、吉草酸、コハク酸およびピルビン酸の利用能は、I型菌とII型菌の間で相反する結果を示した。

## 考 察

0°C下に貯蔵したサバから分離した低温非好塩性 *Pseudomonas* では、至適温度を 25°C 以下（I型菌）と以上にもつ菌株（II型菌）を至適温度で培養すると、生育傾向を異にした。ところが、このI型菌を至適温度以上の温度で培養するとその一部がII型菌の、またII型菌を至適温度以下の温度で培養するとそのすべてがI型菌の生育傾向を示した。さらに、IおよびII型菌とも0°C下で培養するとそのすべてがI型菌の生育傾向を示した。さらに0.5%グルコース添加培地で培養すると、I型菌でもII型菌の生育傾向を示した。したがって、I型菌とII型菌でみられた至適温度での生育傾向の違い、とくにII型菌の定常期以降の急速な減少は、単に生体制御機構がその温度に順応した結果に因るとも考えられる。

しかしながら、I型菌とII型菌ではグルコース利用能に明確な違いがみられること、0.5%グルコース添加培地での培養液のpHにも両者で明らかな違いがみられることから糖からの生酸能に違いがあること、生育に及ぼすpH値にも両者で違いがみられることから細胞内のpH値（酵素の至適pH値）にも違いがあると考えられること、ピルビン酸・コハク酸・吉草酸・イヌリンの単一炭素源としての利用能が両者で異なることからこれらの炭素源の物質代謝の経路にも違いがあると考えられることなどから両菌群は生理的に異なる作用をもつと考えられる。なお、これらの両菌群とも、菌株により単一炭素源の利用のパターンが異なり、したがって両菌群とも分類学的に異なる多くの種により構成されていると考えられる。

また、今回分離した低温非好塩性 *Pseudomonas* は 20°C に至適温度をもつ菌が最も多く、増殖量も 20°C に至適温度をもつ菌株で最も高い値を

示した。また、20°Cに至適温度をもつ I 型菌を 30°C で培養するとその生育は著しく抑制され、一方 30°C に至適温度をもつ II 型菌を 20°C で培養しても生育量に違いはみられなかった。さらに I 型菌の生育量は定常期以降でも低下しなかったのに対し、II 型菌のそれは定常期以降では急減し、死が急速におとずれていることを示唆する。すなわち、今回分離した低温非好塩性 *Pseudomonas* は本来 20°C 付近に至適温度をもつ菌群であり、II 型菌については陸上の中温環境に適応した結果と考えられる。それ故、海洋由来と考えられる低温好塩性 *Pseudomonas* では 30°C に至適温度をもつ菌株はみられず、20°C 付近に至適温度をもつ菌群が最も多いこともよく理解される。

## 要 約

0°C 下に貯蔵したサバから分離した低温性 *Pseudomonas* の生理学的性状をしらべ、つぎの結果を得た。

1) 分離した低温性 *Pseudomonas* のうち、非好塩性 *Pseudomonas* では 15~30°C の範囲に至適温度をもち、また好塩性 *Pseudomonas* では 15~25°C の範囲に至適温度をもち、30°C に至適温度をもつ菌株は認められなかった。

2) 低温非好塩性 *Pseudomonas* (糖を酸化的に分解) は至適温度を 25°C 以下 (I 型菌) と以上にもつ菌株 (II 型菌) で生育傾向を異にした。生育傾向は生育温度を変えることや培地に一定量 (0.5%) 以上のグルコースを添加することでも変化した。

3) 一定量 (0.5%) 以上のグルコース添加で、I 型菌の生育は抑制されたが II 型菌では促進された。また、同培養液の pH は I 型菌では培養齢の上昇にともない漸減し、より酸性となったが、II 型菌ではほとんど変化せず、微酸性から微アルカリ性にとどまり、両者は糖からの生酸能に違いがあった。

4) I 型菌は低い pH (pH4.5) でもよい生育を示したが高い pH (pH8.5 以上) では生育は抑制され、II 型菌ではこれとは逆の生育を示し、すなわち I 型菌と II 型菌では細胞内の pH (酵素の至適 pH) に違いがある

ことが示唆された。

5) ピルビン酸・コハク酸・吉草酸・イヌリンなどの単一炭素源としての利用能がⅠ型菌とⅡ型菌で相反し、この両者は異なる物質代謝の機構をもつことが示唆された。

以上3)～5)よりⅠ型菌とⅡ型菌は異なる生理的作用をもつ菌群と判断された。

6) 単一炭素源の利用のパターンがⅠおよびⅡ型菌とも菌株間で異なり、ⅠおよびⅡ型菌とも分類学的に異なる多くの種により構成されると考えられた。

7) 25%海水培地でⅠおよびⅡ型菌とも生育が促進され、また  $Mg^{2+}$  はこの生育促進物質の1つであった。



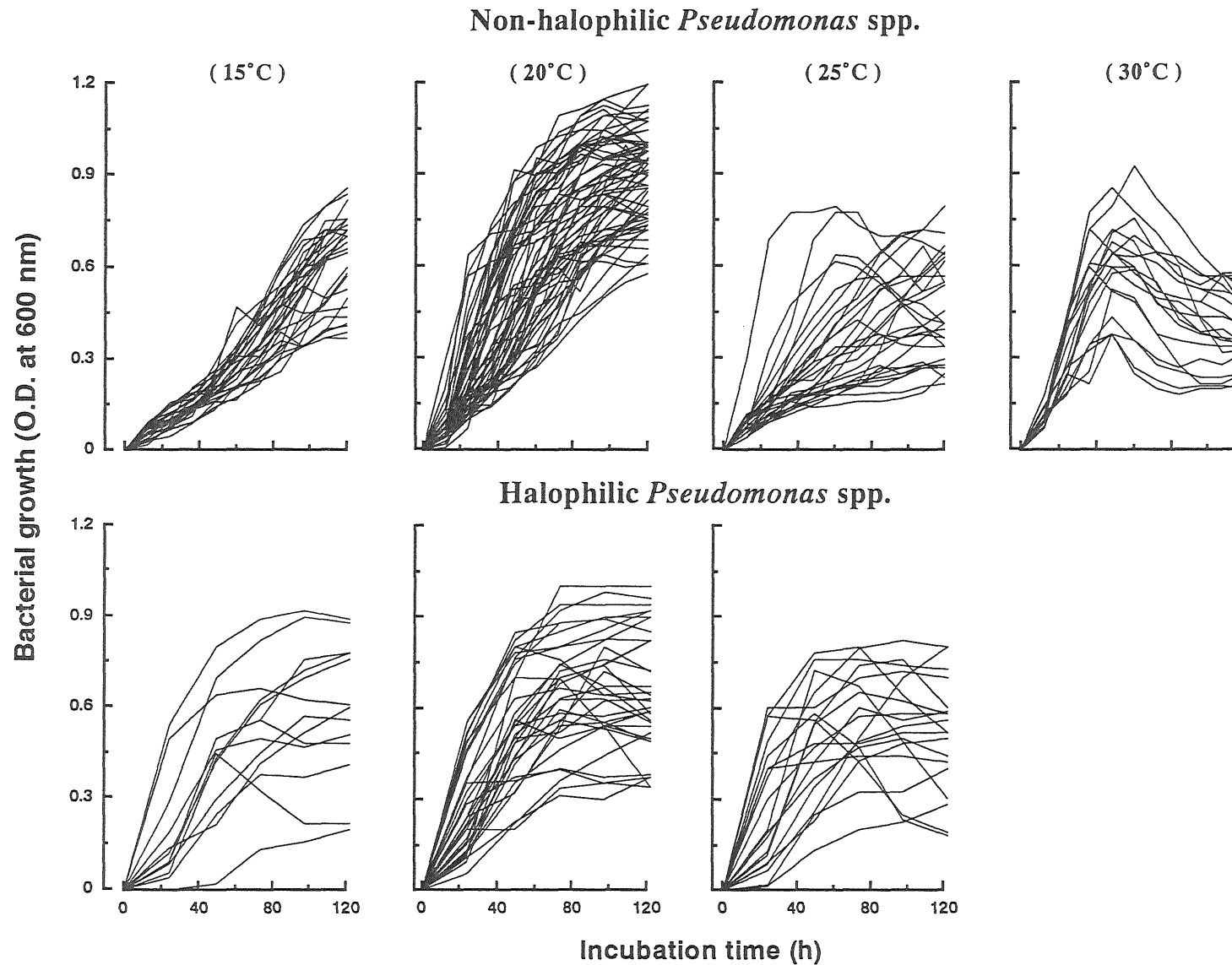


Fig. 5. Growth curves at optimum temperatures in non-halophilic ( the upper) and halophilic ( the lower ) psychrotrophic *Pseudomonas* spp. which grew at 0°C. Each curve show growth of each strain. All strains had an optimum temperature of 15 to 30°C.

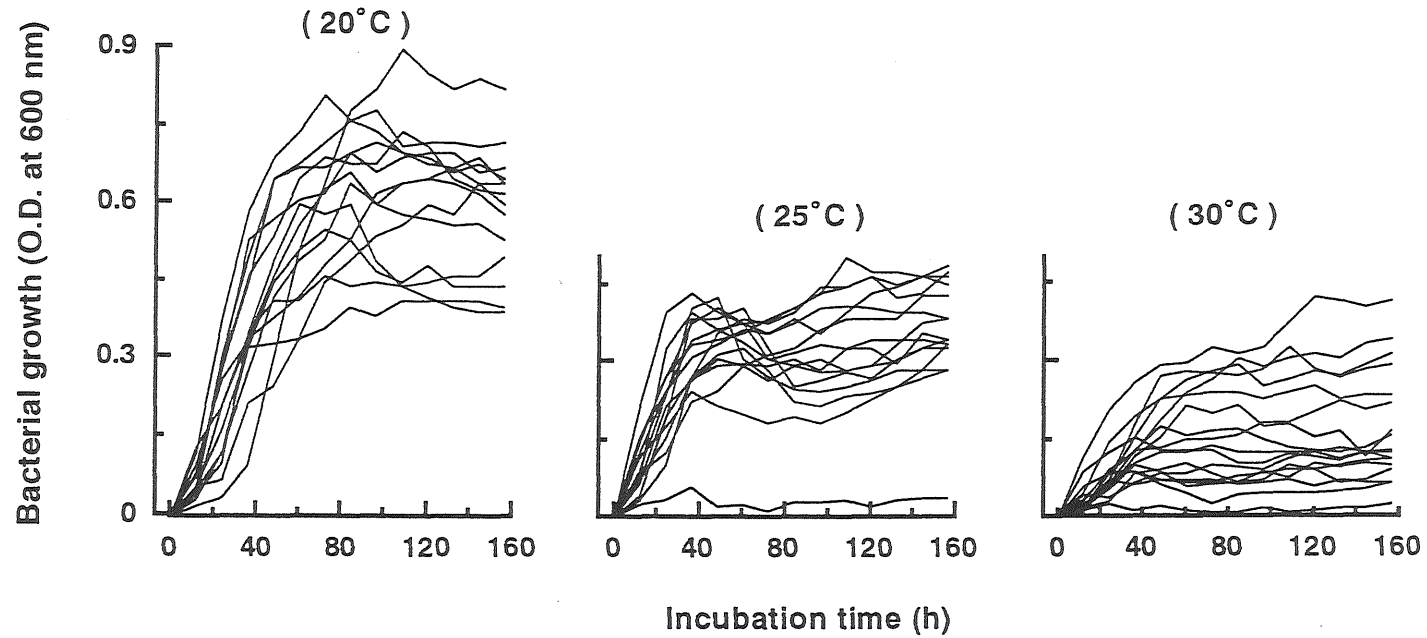


Fig. 6. Growth curves of the non-halophilic psychrotrophic *Pseudomonas* spp. having an optimum temperature of 20°C (Type I strain) in incubation at different growth temperatures. Each curve show growth of each strain.

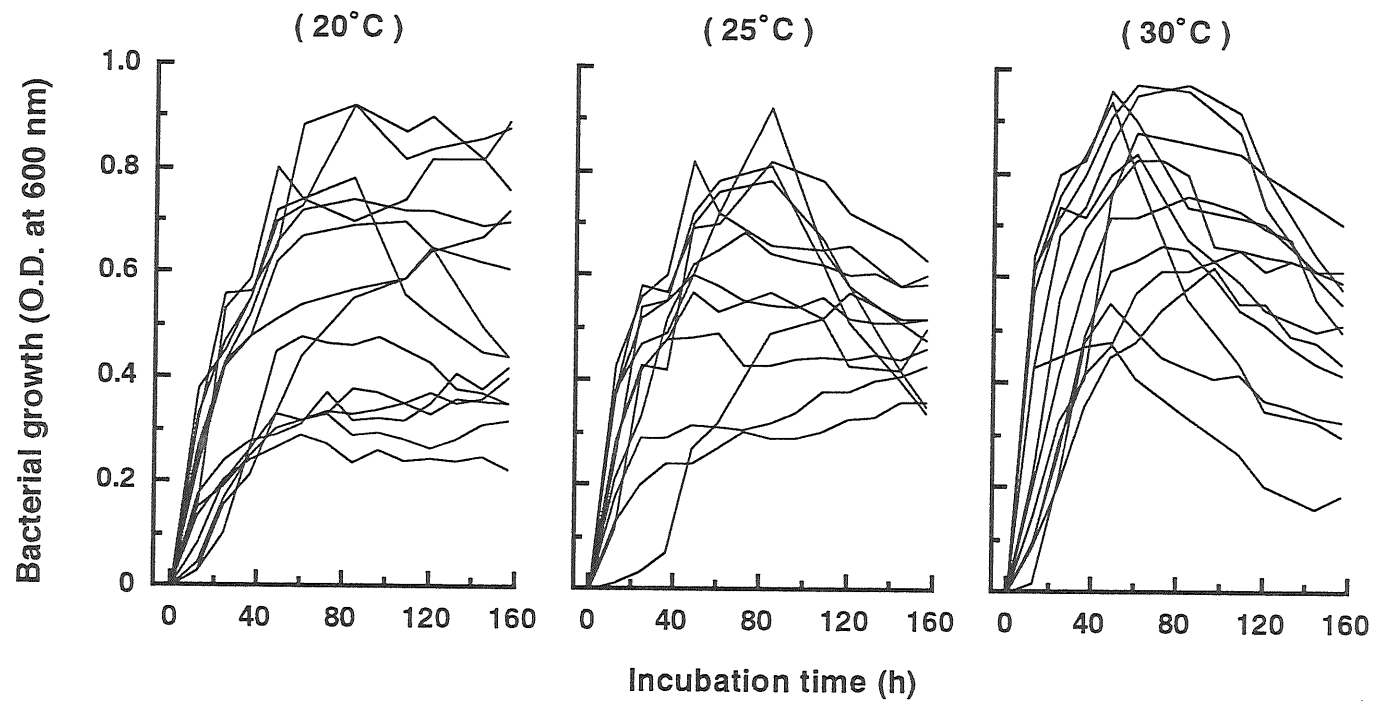


Fig. 7. Growth curves of the non-halophilic psychrotrophic *Pseudomonas* spp. having an optimum temperature of 30°C (Type II strain) in incubation at different growth temperatures. Each curve show growth of each strain.

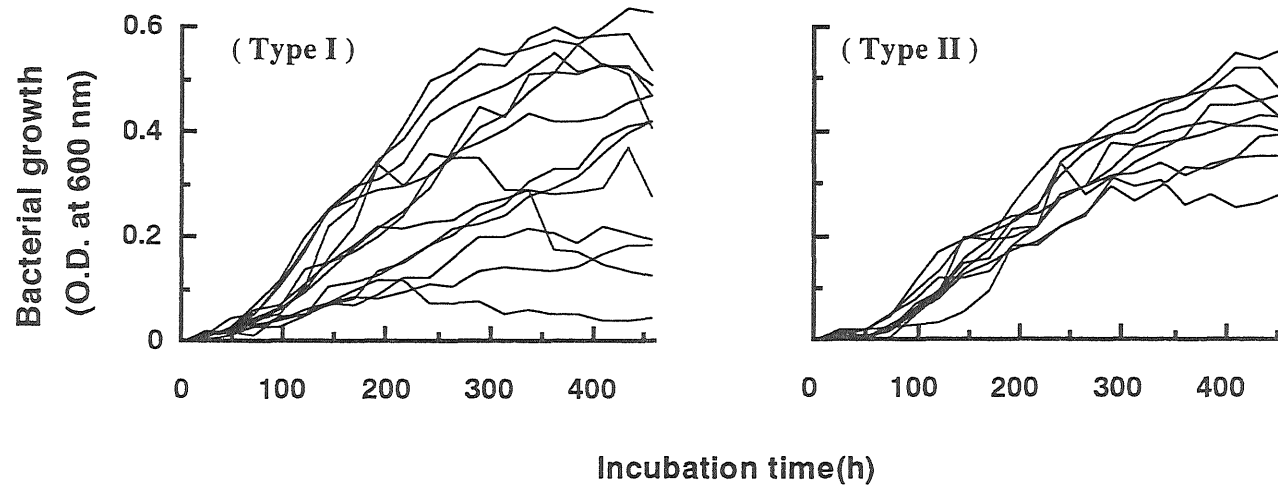


Fig. 8 Growth curves at 0°C in the psychrotrophic *Pseudomonas* spp. having optimum temperatures of below (Type I strain) and above 25°C (Type II strain) . Each curve show growth of each strain.

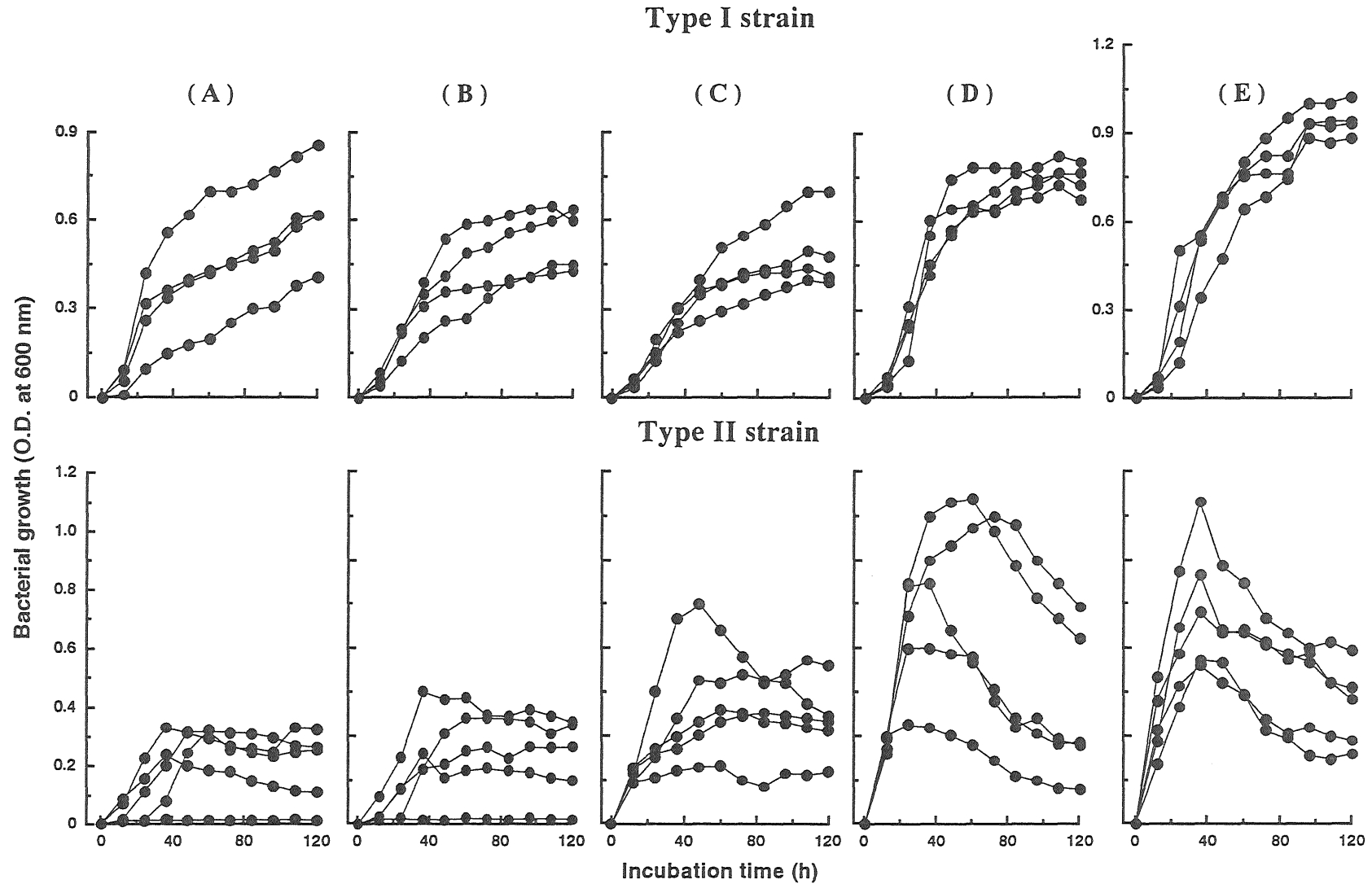


Fig. 9. Growth of Type I and II strains in different media: A, Nutrient Broth (BBL); B, Nutrient Broth (BBL) containing 0.1% glucose; C, Nutrient Broth (BBL) in 50% sea water; D, Nutrient Broth (BBL) containing 0.1% glucose in 50% sea water; E, Sugita's medium.<sup>19)</sup> Each curve shows growth of each strain. The bacteria were incubated at the optimum temperatures.

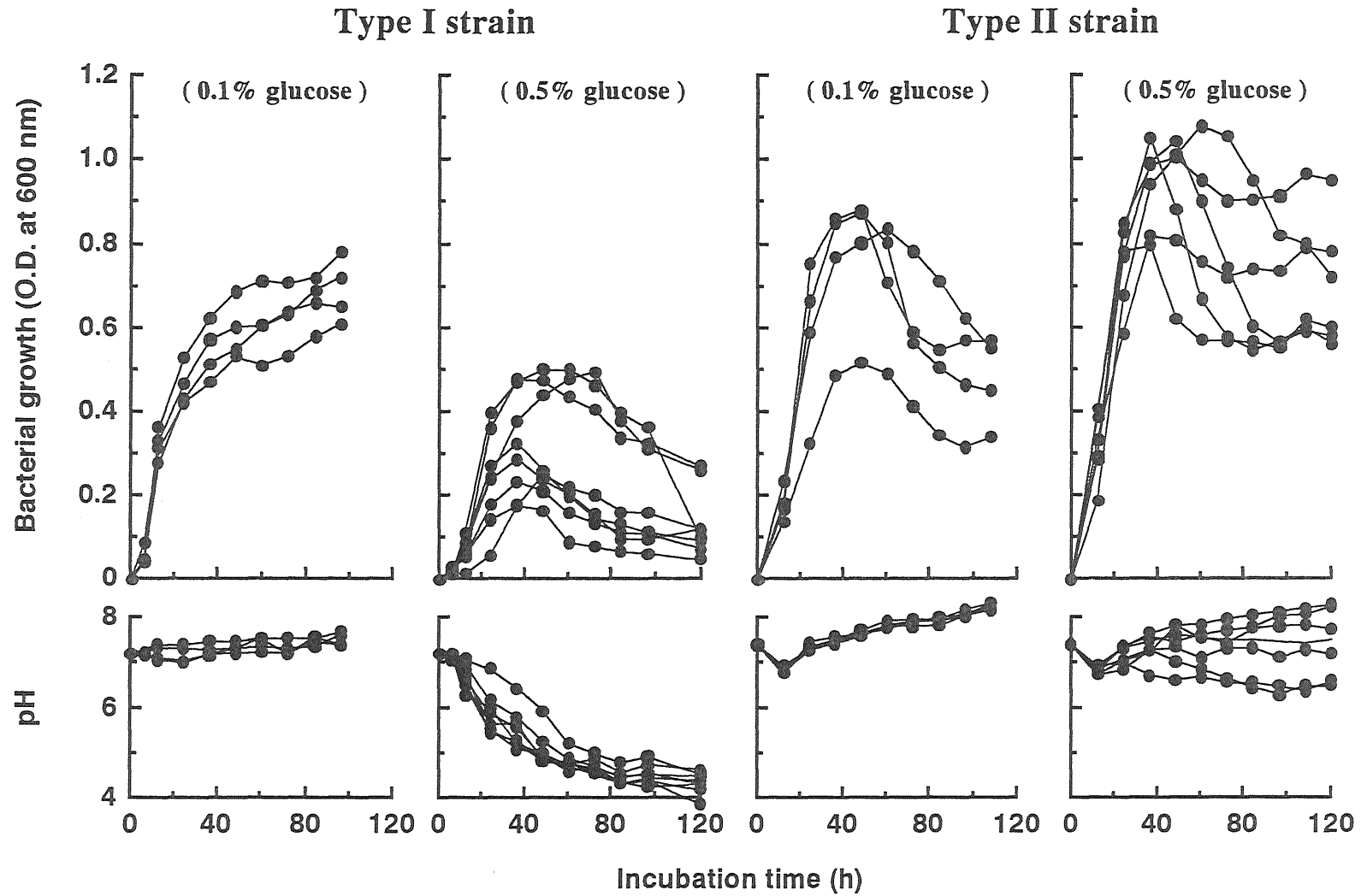


Fig. 10. Effect of glucose on growth and pH of culture of Type I and II strains. Each curve shows growth of each strain. The bacteria were incubated at the optimum temperatures.

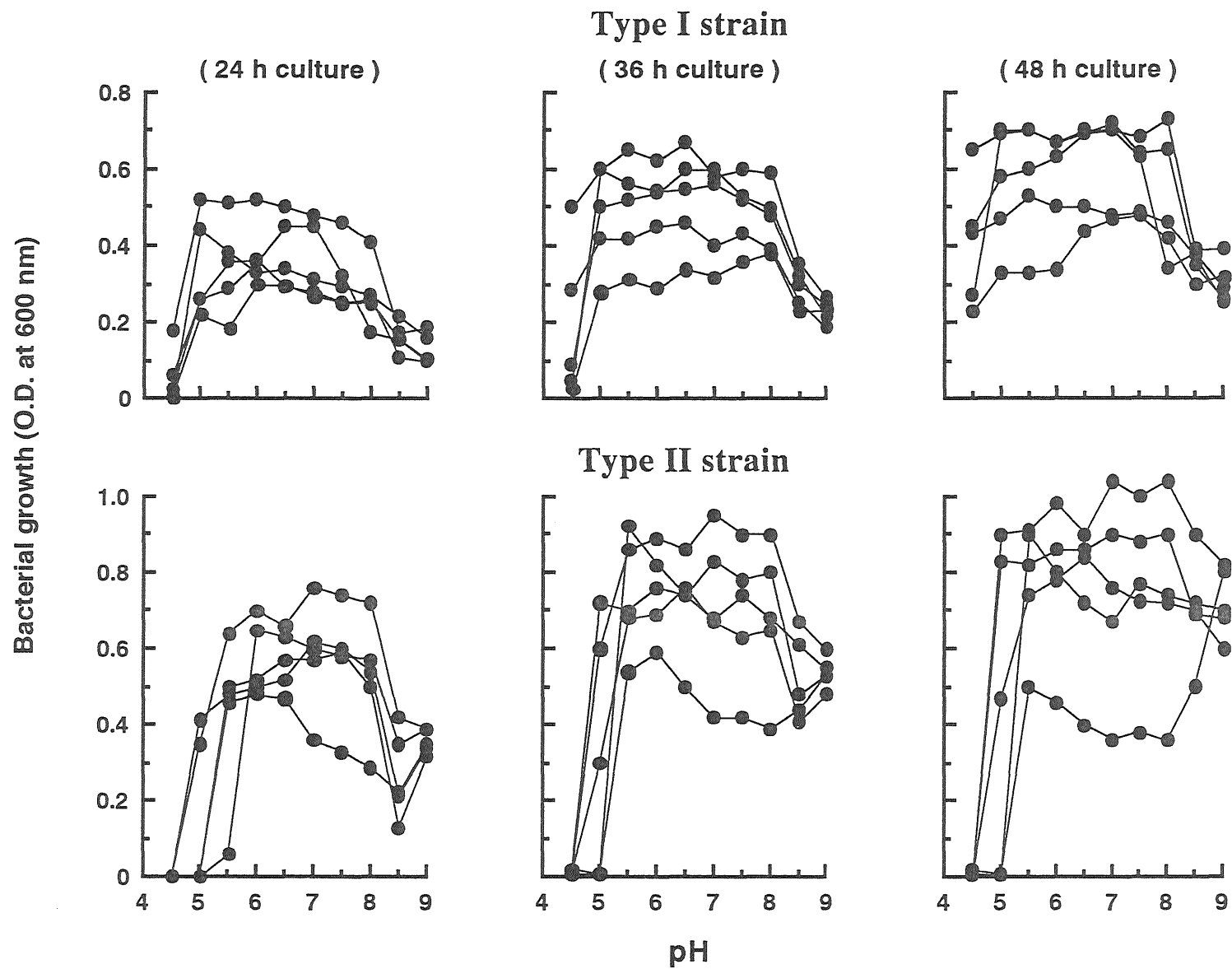


Fig. 11. Effect of pH on growth of Type I and II strains. Each curve shows growth of each strain. The pHs of 24, 36, and 48 h cultures at the optimum temperatures are presented.

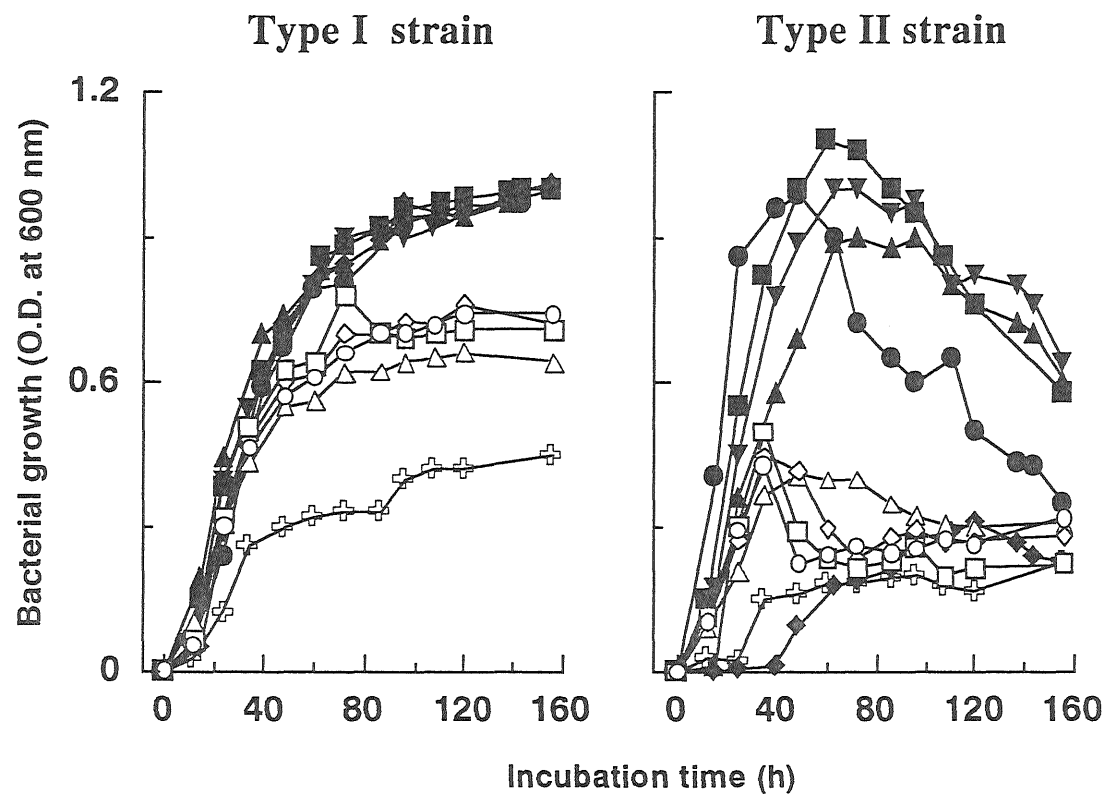


Fig.12. Effect of NaCl and sea water on growth of Type I (Strain 1725) and Type II (Strain 1907) strains. The bacteria were incubated at the optimum temperatures.

Symbols:  $\oplus$ , distilled water;  $\blacklozenge$ , 5% sea water;  $\blacktriangle$ , 10% sea water;  $\blacktriangledown$ , 15% sea water;  $\blacksquare$ , 25% sea water;  $\bullet$ , 50% sea water;  $\triangle$ , 0.15% NaCl aqueous solution;  $\diamond$ , 0.2% NaCl aqueous solution;  $\square$ , 0.45% NaCl aqueous solution;  $\circ$ , 0.5% NaCl aqueous solution.



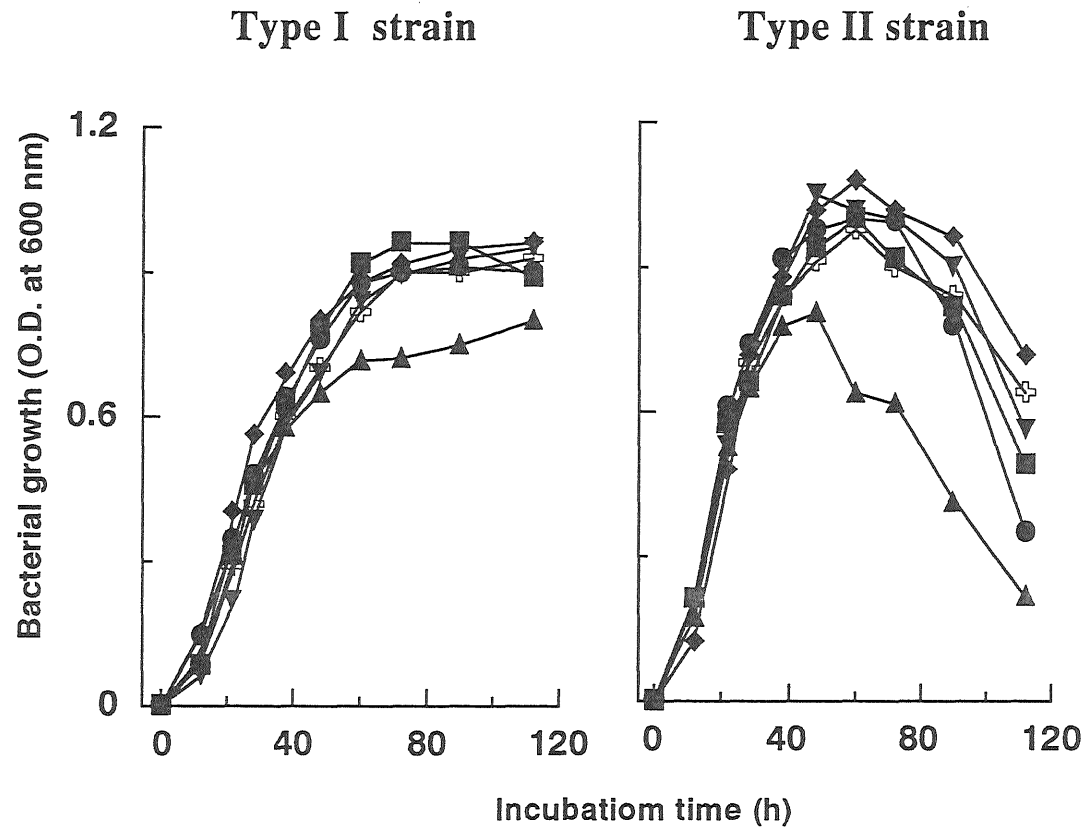


Fig.13. Effect of mineral on growth of Type I (Strain 1725) and Type II (Strain 1907) strains. The effect was determined by removing individual mineral from artificial sea water. The bacteria were incubated at the optimum temperatures.

Symbols:  $\blacklozenge$ , absence of  $\text{Na}^+$  ;  $\blacktriangle$ , absence of  $\text{Mg}^{2+}$  ;  $\blacktriangledown$ , absence of  $\text{Ca}^{2+}$  ;  
 $\blacksquare$ , absence of  $\text{K}^+$  ;  $\oplus$ , 25% artificial sea water ;  $\bullet$ , 25% sea water.

Table 2. Utilization of sole organic source of carbon of Type I strain

Substrate	Strain number																					Number of positive strain	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		22
Ribose	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	12
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
Fructose	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	10
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Tagatose	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	7
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	2
Maltose	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	7
D-Cellobiose	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	7
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	5
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
Starch	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	3
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3
Inulin	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
Propionate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	18
n-Butyrate	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	19
iso-Butyrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
Valerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
iso-Valerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pelargonate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
n-Caprata	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18
Malonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Succinate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Fumarate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Adipate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Malate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pyruvate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Glycerol	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Methanol	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	13
Geraniol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Benzoate	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	15
4-Hydroxybenzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Serine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21
L-Leucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
L-Isoleucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21
DL-Norleucine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Aspartate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Glutamate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
α-Aminovalerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
DL-Methionine	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2
L-Threonine	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	16
L-Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
L-Phenylalanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
Tryptophan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Cystine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Acetamide	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	3
Pectin	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2
Taurine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3

Table 3. Utilization of sole organic source of carbon by Type II strain

Substrate	Strain number																						Number of positive strain
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Ribose	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	19
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
Fructose	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	15
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	9
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	17
D-Cellobiose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	20
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	2
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	18
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Starch	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	8
Glycogen	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	12
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
Propionate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21
<i>n</i> -Butyrate	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	18
<i>iso</i> -Butyrate	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	16
Valerate	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	19
<i>iso</i> -Valerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pelargonate	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	18
<i>n</i> -Caprate	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	9
Malonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	22
Fumarate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Adipate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Malate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pyruvate	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	21
Glycerol	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	11
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Geraniol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Benzoate	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	8
4-Hydroxybenzoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Serine	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20
L-Leucine	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	15
L-Isoleucine	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	20
DL-Norleucine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Aspartate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Glutamate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>α</i> -Aminovalerate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
DL-Methionine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
L-Threonine	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	12
L-Tyrosine	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	14
L-Phenylalanine	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	19
Tryptophan	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	3
L-Cystine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Acetamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pectin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Taurine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

## 第3章 低温性 *Pseudomonas* の生育にともなう アデノシンリン酸の消長

第2章・第2節で述べたように、0°C下に貯蔵したサバより分離した低温非好塩性 *Pseudomonas* は至適温度を25°C以下にもつ菌株（I型菌）とそれ以上にもつ菌株（II型菌）で生育傾向を異にした。しかもこれら両者はグルコース利用能、糖からの生酸能、生育pH、ピルビン酸などの単一炭素源の利用能を異にした。これらのことは両者が生理的に異なる作用をもつこと、とくにエネルギー代謝に違いをもつことを示唆する。そこで、エネルギー代謝に最も重要な役割を演じるアデノシンリン酸について、異なる生育温度およびその他の生育環境での生育にともなう消長、また各アデノシンリン酸およびその前駆物質のアデニンを添加した場合の生育にともなう消長をしらべた。また比較検討のため、中温性 *Pseudomonas* の生育にともなうアデノシンリン酸の消長についてもしらべた。なお、これらアデノシンリン酸の実験を行うに先だち、細菌培養におけるアデノシンリン酸の分析法を検討をした。

### 第1節 培養液におけるアデノシンリン酸の分析法の検討

最近、Karl & Holm-Hansen<sup>25)</sup> は海水や細菌培養における各アデノシンリン酸の分析法を発表しているが、この方法はAMPに関しては100%分析できるものではなく、また実際にこの方法を用いてアデノシンリン酸を分析してみると分析値にバラツキがみられた。これらのことについては分析操作、分析方法、試薬の取り扱いなどに問題があると考えられた。また、細菌培養におけるアデノシンリン酸量を測定するについては、培養機器から培養液を取り出した後の処置、培養液からの分析用試料の採取方法、培地成分が測定結果に与える影響などが検討されておらず、したがって培養液における真のアデノシンリン酸量を知ること、また再現性のある結果を得ることが困難であった。そこで本節では、Karl & Holm-Hansen法によるアデノシンリン酸の分析法<sup>25)</sup> の検討および細菌培養におけるアデノシンリン酸量の測定法の検討を行った。

なお本研究は Mewengkangら<sup>26)</sup>との共同研究であり、したがって本論分では著者が分析を担当した培地成分が測定結果に与える影響について述べる。とくに、本研究では細菌の培養には海水が使用される。海水には種々の無機物質が高濃度で存在し、これら無機物質がアデノシンリン酸量の測定に影響を及ぼすことが考えられた。また、細菌用培地には肉エキスや酵母エキスが用いられ、これらエキス中にはアデノシンリン酸の存在が考えられた。そこで、海水濃度によりアデノシンリン酸の測定値がどのように異なるか、また培養基にどのようなアデノシンリン酸が含まれるかをしらべた。

## 材料と方法

海水濃度が測定値に与える影響については0、25、50、75%海水について試験した。培地に含まれる各アデノシンリン酸量の測定については、通常本研究に用いたPYBG培地 [Bacto-Peptone (Difco) 0.50%、酵母エキス (Difco) 0.25%、牛肉エキス (Difco) 0.25%、グルコース 0.10%、pH 7.0] と普通ブイヨン [Nutrient Broth (BBL)、pH 7.0]、および培養基についてはBacto-Peptone (Difco)、酵母エキス (Difco) および牛肉エキス (Difco) に関してしらべた。アデノシンリン酸量の測定は基本的にはKarl & Holm-Hansen法<sup>24)</sup>に従った。

## 結 果

### 1. 海水濃度が測定値に与える影響

各アデノシンリン酸の一定量(10 $\mu$ M)を濃度の異なる海水培地に溶解した場合の各アデノシンリン酸の測定結果をTable 4に示す。ATP、ADPおよびAMPとも、海水濃度の増加にともない測定値(蛍光強度)は漸減し、また各アデノシンリン酸(濃度一定)とも、同じ海水濃度では同じ値を示した。

また、濃度の異なる各アデノシンリン酸の等モル混合物を、それぞ

れ濃度の異なる海水培地に加えた場合の総アデノシンリン酸の測定結果を Fig.14に示す。各濃度の海水の場合とも、総アデノシンリン酸濃度と測定値は比例した。なお、各々のアデノシンリン酸について測定した場合も、同様な結果を得た。

## 2. 培養基中に含まれるアデノシンリン酸

培地中に含まれる各アデノシンリン酸量を Table5に示す。PYBG培地では ATPと ADPはほとんど含まれなかったが AMPが多量に含まれた。Nutrient Broth (BBL) には ATP、ADP、AMPともほとんど含まれなかった。

PYBG培地の各成分中に含まれる各アデノシンリン酸量を Table6に示す。PYBG培地の牛肉エキスには AMPが多量に含まれ、Bacto-Peptoneと酵母エキスにはいずれのアデノシンリン酸もほとんど含まれなかった。

## 考 察

本研究の培地には海水を用いるが、各アデノシンリン酸の測定値は海水の濃度で異なった。しかし、濃度の等しい各アデノシンリン酸とも、同じ海水濃度では同じ測定値を示した。このことは、用いた海水培地（75%海水以下）では ADPおよび AMPの ATPへの転換は完全に行われ、したがって海水添加にともなう測定値の低下は ATP量の測定に影響を与えていることになる。一方、各海水濃度の場合とも、アデノシンリン酸量と測定値は比例した。したがって、海水培地でのアデノシンリン酸量を測定するについては、同時に既知の濃度の各アデノシンリン酸を同じ条件で分析をすることで定量が可能となる。また培地、とくに培養基の牛肉エキスには AMPが多量に含まれる場合があり、これは単に絶対量に影響を与えるだけでなく、菌体のアデノシンリン酸代謝にも影響を及ぼすことが予想されるので、培地の使用には十分な配慮を必要とする。

なお、Mewengkangら<sup>25)</sup>によると、ATPの分析に際しては、1) ATP試料は測定機器のキューベット側に定量を入れ、蛍光強度はピークの高さから求めることが望ましい、2) ADPおよび AMP量の測定に使用する市

販のピルベイトキナーゼとミオキナーゼは約5時間の透析が必要であり、また透析後のミオキナーゼは活性の低下が速やかで、透析後は直ちに使用する必要がある、3) ADPおよびAMPをATPに転換するには30℃で30分反応する必要がある、4) AMPの分析に必要とされるATPはADPを用いても測定が可能であった、5) 培養液のアデノシンリン酸量を測定するについては菌体を直接使用する測定では正しい値を得ることができなかった、6) 培養液全体を用いる測定でも、培養後に培養温度と異なる温度環境に培養を置くことで測定値が著しく異なるとし、これらの結果と今回の結果を考慮することで、迅速で正確な分析を行うことができた。

## 要 約

海水がアデノシンリン酸の測定に与える影響および培養基に含まれるアデノシンリン酸についてしらべ、つぎの結果を得た。

1) ATPの測定値は海水濃度を変えることで異なったが、同じ海水濃度では同一の値を得た。

2) AMPおよびADPのATPへの転換は海水濃度が異なっても完全に行われた。

3) 培地成分の牛肉エキスにはAMPが多量に含まれた。

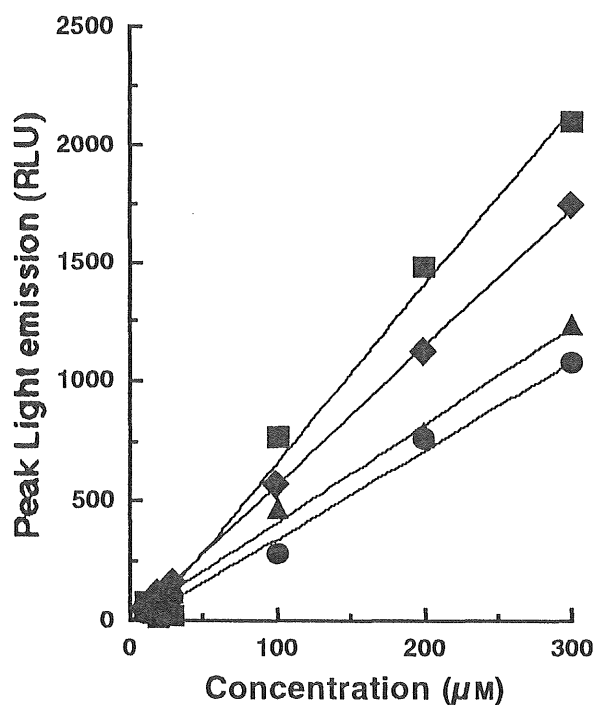
上記の点および共同研究者のMewengkangら<sup>26)</sup>の結果を考慮することで、迅速で正確な分析を行うことができた。

**Table 4. Effect of sea water on adenosine phosphate determinations**

Adenosine phosphate	Peak light emission ( RLU )			
	0 % S.W.	25 % S.W.	50 % S.W.	75 % S.W.
ATP	63.4	55.3	46.0	35.7
ADP	62.3	54.8	45.4	35.7
AMP	64.0	52.5	45.5	35.5

The mixture of ATP, ADP, and AMP (10  $\mu\text{M}$  in total concentrations) was added into 0, 25, 50 and 75 % sea water (S.W.).

RLU,relative light unit.



**Fig. 14 Effect of sea water on adenosine phosphate determinations. The determination were carried out using a equimolar mixture of ATP, ADP, and AMP dissolved in 0 (■), 25 (◆), 50 (▲), and 75% (●) sea water. RLU was presented from the total adenosine phosphate concentration because each adenosine phosphate showed the same light emissions intensity.**



**Table 5. Adenosine phosphates in bacterial media used in this experiment**

Adenosine phosphate	Concentration of adenonsine phosphate (n mol / ml)	
	PYBG medium	Nutient Broth (BBL)
ATP	0.02	0.03
ADP	0.02	0.01
AMP	12.42	0.13

PYBG medium contains 0.50% Bacto-Peptide (Difco), 0.25% yeast extract (Difco), 0.25% beef extract (Difco), 0.10% glucose in 50% sea water.

Nutrient Broth (BBL) was dissolved into 50% sea water as prescribed.

**Table 6. Adenosine phosphates in ingredients of PYBG medium**

Adenosine phosphate	Concentration of adenonsine phosphate (n mol / ml)		
	Bacto-Peptide	Yeast extract	Beef-extract
ATP	0.08	0.07	0.63
ADP	0.05	0.01	0.11
AMP	0.83	0.75	13.30

Ingredients of 0.50 % Bacto-Peptide (Difco), 0.25 % yeast extract (Difco), and 0.25 % beef extract (Difco) were dissolved in 50 % sea water.

## 第2節 培養液および培養上澄液中のアデノシンリン酸の消長

実験に先立ち、培養液中のアデノシンリン酸が細胞内のものか、細胞外のものかを明らかにするため、培養液全体とその上澄液について生育にともなうアデノシンリン酸の消長をしらべた。

### 材料と方法

**供試菌** I型菌（至適温度 20℃）およびII型菌（至適温度 30℃）のそれぞれについて3菌株を選び供試した。

**実験方法** 培地は25%海水—0.1%グルコース添加 Nutrient Broth（BBL）を用い、培養温度は至適温度（I型菌は20℃、II型菌は30℃）で試験した。各アデノシンリン酸量はKarl & Holm-Hansenの方法<sup>25)</sup>を基本とし、Mewengkangらの方法<sup>26)</sup>および前節での結果を考慮して測定した。とくに、培養上澄液のアデノシンリン酸については、培養液を15300 x gで5分間遠心した上澄液についてしらべた。培養液全体および培養上澄液中の生育にともなうアデノシンリン酸の消長試験はI型菌では12時間間隔で72時間まで、II型菌では4時間間隔に28時間まで、その後40および60時間目についてしらべた。

### 結 果

I型菌の培養液全体とその上澄液中の生育にともなうアデノシンリン酸の消長をFig.15に示す。いずれの供試菌とも培養上澄液中には極めて少ないながらもAMPとADPが認められたが、ATPはほとんど検出されなかった。また、上澄液中のAMPとADPは漸増した。

II型菌の培養液全体とその上澄液中の生育にともなうアデノシンリン酸の消長をFig.16に示す。いずれの供試菌とも、培養上澄液中にはいずれのアデノシンリン酸ともほとんどみられなかった。

## 考 察

I 型菌の培養上澄液中には AMP と ADP が認められたが、その量は培養液全体のそれに比べて極めて少なく、また ATP は上澄液中からはほとんど検出されなかった。したがって、I 型菌の培養液中のアデノシンリン酸については、その大半が細胞内由来であることがわかる。また上澄液中の AMP と ADP については培養齢が進むにつれて増加し、また ATP は検出されなかった。すなわち、上澄液中のアデノシンリン酸については死細胞由来と考えられる。

II 型菌の培養上澄液中にはいずれのアデノシンリン酸ともほとんど検出されず、したがって培養液中のアデノシンリン酸のほぼすべてが菌体内由来であることがわかる。

すなわち、I および II 型菌とも培養液中のアデノシンリン酸の大半が菌体内のアデノシンリン酸と判断された。

## 要 約

異なる至適温度をもつ低温非好塩性 *Pseudomonas* (至適温度を 25°C 以下と以上にもつ I 型菌と II 型菌) の培養液全体と培養上澄液における生育にともなうアデノシンリン酸の消長をしらべ、つぎの結果を得た。

1) I 型菌の培養上澄液中には AMP と ADP が認められたが、培養液全体と比べるとその値は極めて低く、また ATP はほとんど検出されなかった。すなわち、培養液中のアデノシンリン酸は大半が細胞内由来であった。

2) II 型菌の培養上澄液中には、いずれのアデノシンリン酸ともほとんど認められず、すなわち培養液中のアデノシンリン酸についてはそのほぼすべてが細胞内由来であった。

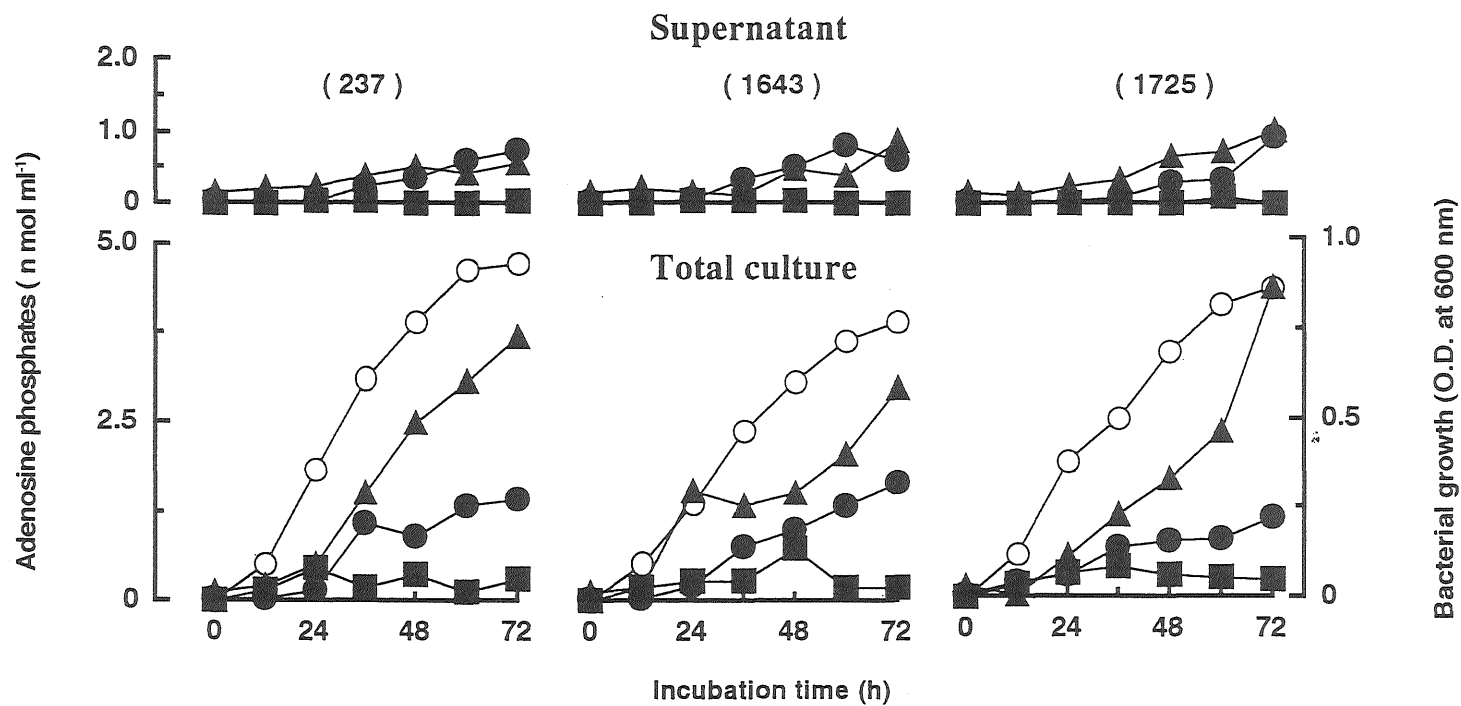


Fig. 15. Change in adenine nucleotide levels in total culture and supernatant from the culture of Type I strains during growth at the optimum temperature. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲ , AMP; ● , ADP; ■ , ATP; ○ , O.D.

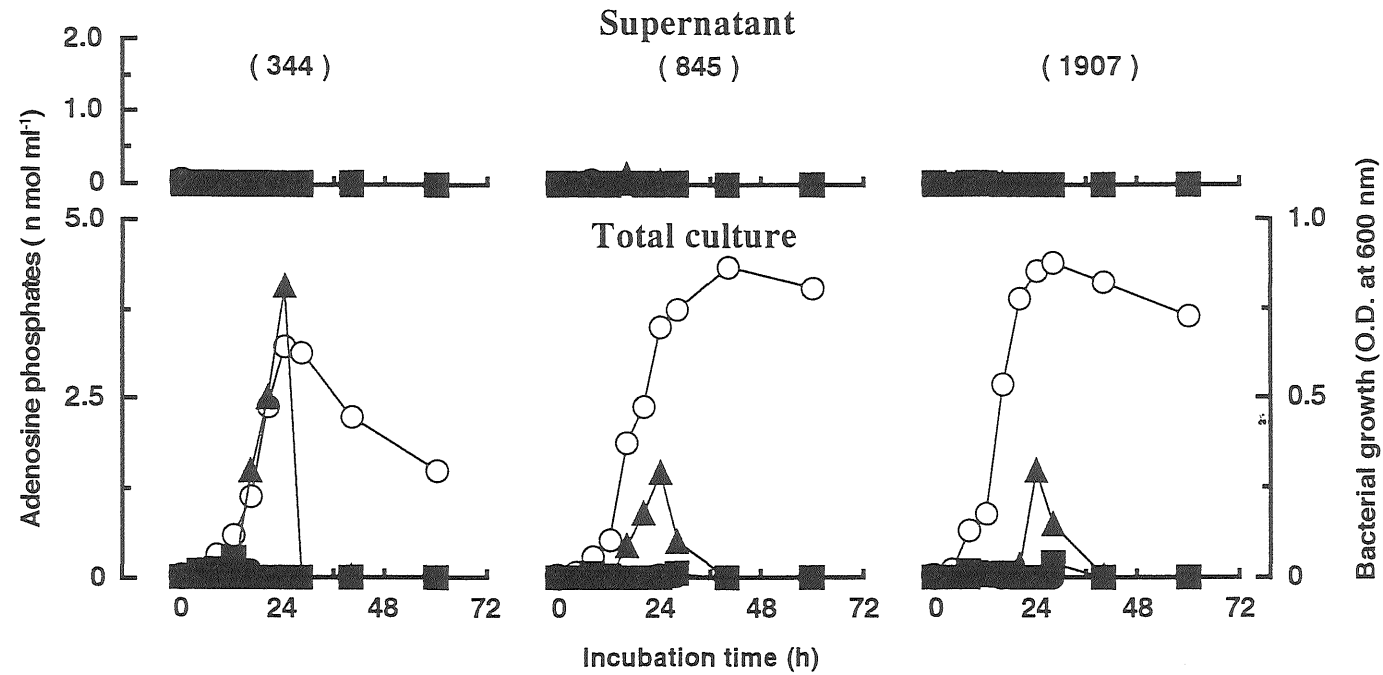


Fig. 16. Change in adenine nucleotide levels in total culture and supernatant from the culture of Type II strains during growth at the optimum temperature. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; ○, O.D.

### 第3節 異なる生育環境におけるアデノシンリン酸の消長

第2章・第2節で述べたように、I型菌とII型菌ではグルコース利用能、糖からの生酸能、およびピルビン酸などの単一炭素源の利用能が異なることから、エネルギー代謝もこの両者で異なることが考えられた。そこで今回はこの両者の生育にともなうアデノシンリン酸の消長（以下アデノシンリン酸の消長と言う）についてしらべることにした。ところで、微生物におけるエネルギー充足度  $[(ATP+1/2ADP)/(ATP+ADP+AMP)]$ <sup>27,28)</sup> は生育温度・pH・酸素圧およびグルコースの存在などの環境要因で異なることが Chapmanら<sup>29)</sup> により報告されている。すなわち、I型菌とII型菌におけるアデノシンリン酸の消長の違いを明らかにするには、異なる生育環境における同消長についてもしらべる必要があった。そこで今回は、生育温度・pH・酸素圧および無機塩（とくにマグネシウム）・有機物（とくにグルコース）の存在でアデノシンリン酸の消長がどのように異なるかをしらべた。

#### 材料と方法

**供試菌** IおよびII型菌のそれぞれについて3~5菌株を選び供試した。なお、通常I型菌は20℃に、II型菌は30℃に至適温度をもつ菌株を供試したが、至適温度でのアデノシンリン酸の消長試験にはこの供試菌に加え、25℃に至適温度をもつIおよびII型菌についても試験した。

**実験方法** 特記しない限り、培地は25%海水—0.1%グルコース添加 Nutrient Broth（BBL）を用い、培養温度は至適温度（I型菌は20℃、II型菌は30℃）で試験した。各アデノシンリン酸量の測定は本章・第2節と同様にして行った。

異なる生育温度におけるアデノシンリン酸の消長試験は30、20、10および2℃について試験した。I型菌の30℃培養では6時間間隔で60時間まで、20℃培養（至適温度）では定常期までは12時間ごとに、そ

れ以降は 24 時間間隔で 144 時間まで、II 型菌の 30°C 培養（至適温度）と 20°C 培養では定常期までは 4 時間間隔、それ以降は 24 または 48 時間間隔で 120 時間まで、I および II 型菌の 10°C 培養では 24 時間間隔で 240 時間まで、2°C 培養は 48 時間間隔で 600 時間までしらべた。

異なる生育 pH におけるアデノシンリン酸の消長試験は、最低および最高生育 pH 付近の pH で試験した。これについては、生育が抑制された環境下でその消長がどのように異なるかを知るためである。第 2 章・第 2 節で得られた結果に基づき、低い pH 域は I 型菌では pH5.0、II 型菌では 6.0、高い pH 域は I および II 型菌とも pH8.5 とした。pH は 1 N-HCl と 1 N-NaOH で調整した。試験は 12 時間間隔で 72 時間まで行った。

異なる酸素分圧におけるアデノシンリン酸の消長試験は、静置培養と比較のために振とう培養（120 rpm）を行い、定常期までは 3 時間間隔、それ以降は 6 時間間隔で 60 時間までしらべた。

アデノシンリン酸の消長に及ぼすマグネシウムの影響試験は、人工海水からマグネシウムイオンを除去した溶液を溶媒として用いた。また、人工海水を溶媒とした培地で対照試験を行った。試験は 48 時間目までは 6 時間間隔で、それ以降は 84 時間まで随時行った。

アデノシンリン酸の消長に及ぼすグルコースの影響試験は、0.5% グルコース添加および無添加培地について行った。試験は 124 時間まで随時行った。

## 結 果

### 1. 生育にともなうアデノシンリン酸の消長

#### 1) 至適温度におけるアデノシンリン酸の消長

至適温度を 20°C にもつ I 型菌の至適温度での培養におけるアデノシンリン酸の消長を Fig.17 に示す。いずれの供試菌とも至適温度での培養では、AMP 量は生育にともない上昇した。ADP 量は対数期では上昇したが定常期以降はほぼ一定となった。ATP 量は対数期では上昇し、

その後減少した。各アデノシンリン酸の割合は、対数期初期では複雑に変化し、一定の傾向を示さなかったが、減速期または定常期以降ではその値はAMPが最も高く、ADPがこれに次ぎ、ATPは最も低かった。またエネルギー充足度は対数期を最大とし、以降では漸減した。その値はほぼ0.5~0.1の範囲にあった。

至適温度を30℃にもつII型菌の至適温度での培養におけるアデノシンリン酸の消長をFig.18に示す（なおADPとATPについては拡大値も示した）。いずれの供試菌とも、全培養期間を通してATPとADPは検出されないか、検出されたとしてもその値は極めて低く、AMPがアデノシンリン酸のほぼすべてを占めた。そのAMP量は対数期では急速に増加し、極大となり、定常期では検出できない値にまで急減した。エネルギー充足度は対数期でも限りなく0に近い値を示した。なお、誘導期付近では極めて高い値を示す場合があった。

至適温度を25℃にもつI型菌とII型菌の至適温度での培養におけるアデノシンリン酸の消長をFig.19に示す（II型菌のADPとATPについては拡大値も示した）。至適温度を25℃にもつIおよびII型菌のアデノシンリン酸の消長は、20および30℃に至適温度をもつIおよびII型菌と同様の消長を示した。

## 2) 至適温度以上および以下の温度での培養におけるアデノシンリン酸の消長

至適温度を20℃にもつI型菌の30、10および2℃での培養におけるアデノシンリン酸の消長をFig.20に示す。なお試験は5菌株について行ったが、5菌株とも同様な結果を示したため、代表的な一菌株の結果を示した。至適温度以下の温度（10および2℃）での培養におけるアデノシンリン酸の消長は至適温度（Fig.17参照）でのそれとほぼ同様の傾向を示した。至適温度以上の温度（30℃）での培養では、各アデノシンリン酸の割合は至適温度での培養（Fig.17参照）の場合と同様の結果を示したが、生育にともなうアデノシンリン酸の消長は至適温度（Fig.17参照）の場合と異なり、減速期から定常期にかけて、いずれのアデノシンリン酸とも減少傾向を示した。エネルギー充足度は、



いずれの培養温度の場合とも、生育にともなうその消長は類似の傾向を示し、またそれは至適温度での培養（Fig.17参照）の場合とも類似した。しかし、その値は培養温度の低下にともない増加した。なお、その最大値は30℃培養では0.25、2℃培養は0.50であった。

至適温度を30℃にもつⅡ型菌の20、10および2℃での培養におけるアデノシンリン酸の消長をFig.21に示す（ATPとADPについては拡大値も示した）。なお、試験は5菌株について行ったが、5菌株とも同様な結果を示したため、代表的な一菌株の結果を示した。至適温度以下の20、10および2℃で培養を行っても、各アデノシンリン酸の割合および生育にともなうアデノシンリン酸の消長は至適温度での培養（Fig.18参照）における結果とほとんど変わりなかった。しかしながら、AMP値が最大に達する時期は至適温度（30℃）では対数期中期であったが（Fig.18参照）、20℃培養では減速期から定常期、10℃培養では定常期付近、2℃では定常期から死滅期のように、培養温度が低下するにつれて最大値に達する時間が遅くなった。また、AMPが消滅する時期も、至適温度では定常期であったが（Fig.18参照）、20℃培養では定常期から死滅期、10℃培養では死滅期初期、2℃培養では死滅期後期のように、培養温度が低下するにつれてその時期が遅れた。また、同様の傾向がADPおよびATPについても確認された。なお、AMPの絶対量は至適温度での培養（Fig.18参照）に比べ至適温度以下の温度（20℃から2℃）での培養ではその値は極めて高かった。エネルギー充足度の生育にともなう消長も、いずれの培養温度の場合とも至適温度での培養（Fig.18参照）の場合と類似の傾向を示した。

なお、至適温度を25℃にもつⅠ型菌とⅡ型菌の至適温度以上および以下の温度での培養における各アデノシンリン酸の消長も20および30℃に至適温度をもつⅠおよびⅡ型菌の場合と同様の結果を示した。

## 2. 異なる生育pHにおけるアデノシンリン酸の消長

Ⅰ型菌（至適温度20℃）における低酸性域および高アルカリ性域でのアデノシンリン酸の消長をFig.22に示す。なお、試験は3菌株につ

いて行ったが、3菌株とも同様な結果を示したため、代表的な一菌株の結果を示した。低酸性域および高アルカリ性域では中性域より生育は抑制されたが、アデノシンリン酸の消長は中性域でのそれと類似した。しかし、各アデノシンリン酸の割合に幾分違いがみられ、低酸性域および高アルカリ性域では、中性域に比べてADPの値が低かった。

Ⅱ型菌（至適温度 30℃）における低酸性域および高アルカリ性域でのアデノシンリン酸の消長を Fig.23 に示す。なお、試験は3菌株について行ったが、3菌株とも同様な結果を示したため、代表的な一菌株の結果を示した。低酸性域および高アルカリ性域で生育は抑制されたが、アデノシンリン酸の消長は中性域でのそれと類似した。しかし、低酸性域および高アルカリ性域では中性域に比べ、培養中のアデノシンリン酸（とくにAMP）が長期間確認された。

### 3. 異なる酸素分圧におけるアデノシンリン酸の消長

Ⅰ型菌（至適温度 20℃）における振とう培養でのアデノシンリン酸の消長を Fig.24 に示す。いずれの供試菌とも、振とう培養では静置培養に比べ生育量は著しく増加した。一方、各アデノシンリン酸の割合は培養時間および菌株間で異なり、またアデノシンリン酸の消長も極めて複雑となった。しかし、菌体中のアデノシンリン酸がAMP、ADPおよびATPから構成されるという、Ⅱ型菌との基本的な違いについては変わりなかった。

Ⅱ型菌（至適温度 30℃）における振とう培養でのアデノシンリン酸の消長を Fig.25 に示す。いずれの供試菌とも、その生育量は振とう培養では静置培養に比べて極めて高く、また定常期以降での生育量の減少もみられなかった。一方、生育にともなうアデノシンリン酸の消長は静置培養での結果と類似したが、AMPの増減傾向が極めて速やかで、344株と1907株ではAMP値は極めて低かった。

### 4. アデノシンリン酸の消長に及ぼすマグネシウムの影響

Ⅰ型菌（至適温度 20℃）を人工海水および人工海水からのマグネシウム除去培地で培養した場合におけるアデノシンリン酸の消長を Fig.

26に示す。I型菌ではマグネシウムを除去することで生育量が低下する菌株もみられたが、いずれの供試菌ともマグネシウムを除去してもアデノシンリン酸の消長に著しい違いはみられなかった。なお、海水培地で培養した場合の結果（Fig.17参照）と比べると、人工海水および人工海水からのマグネシウム除去培地で培養した場合には、一般に生育量は低いが、アデノシンリン酸の消長はADPの割合が幾分低いという違いはみられたが、両者はほぼ似た消長を示した。

II型菌（至適温度 30℃）の人工海水および人工海水からのマグネシウム除去培地で培養した場合におけるアデノシンリン酸の消長を Fig. 27に示す。II型菌ではマグネシウムを除去することでいずれの供試菌とも生育量は低下した。一方、アデノシンリン酸の消長には著しい違いはみられなかったが、マグネシウム除去培地では、より高い培養齢の細胞でもAMPが認められる点で異なった。なお、人工海水および人工海水からのマグネシウム除去培地におけるアデノシンリン酸の消長は、海水培地（Fig.18参照）でのそれと類似の消長を示した。

##### 5. アデノシンリン酸の消長に及ぼすグルコースの影響

I型菌（至適温度 20℃）の0.5%グルコース添加および無添加培地での培養におけるアデノシンリン酸の消長を Fig.28に示す。グルコース無添加培地では、0.1%グルコース添加培地（Fig.17参照）に比べ生育量は低下した。一方、生育にともなうアデノシンリン酸の消長はこの両者で類似した。他方、0.5%グルコース添加培地では、0.1%グルコース添加（Fig.17参照）および無添加培地に比べ生育量が著しく低く、また生育傾向も異なり、むしろII型菌のそれと類似した。一方、培養中のアデノシンリン酸の絶対量も前者で培養した場合は後2者で培養した場合に比べて極めて低かったが、アデノシンリン酸の消長はいずれの培地で培養した場合でも著しい違いはみられなかった。なお、グルコース無添加培地での培養では、グルコース添加培地での培養に比べ、ADPの割合が低く、したがってエネルギー充足度も前者は後者に比べて低かった。

II型菌（至適温度 30℃）の0.5%グルコース添加および無添加培地で

の培養におけるアデノシンリン酸の消長を Fig.29 に示す。グルコース無添加培地では、0.1%グルコース添加培地（Fig.18 参照）に比べて生育量は多少低下した。しかし、アデノシンリン酸の消長にはほとんど違いはみられなかった。0.5%グルコース添加培地では 0.1%グルコース添加（Fig.18 参照）およびグルコース無添加培地に比べて生育量は高かった。一方アデノシンリン酸の絶対量も生育量に比例してその値は高くなったが、アデノシンリン酸の消長は 0.1%グルコース添加（Fig.18 参照）および無添加のそれと変わりなかった。

## 考 察

20°C に至適温度をもつ I 型菌では、いずれの培養温度で培養した場合でも、各アデノシンリン酸の割合は AMP が最も高く、ADP がこれに次ぎ、ATP は最も低かった。アデノシンリン酸の消長については、AMP は生育にともない増加し、ADP は対数期では増加し、定常期以降はほぼ一定となり、ATP は対数期に一時増加し、後減少した。ところで Watson らは、<sup>30)</sup> ATP はリン酸基、ピロリン酸基およびアデノシンーリン酸基を含み、高エネルギー結合を有するリン酸基またはピロリン酸基が加水分解により生じること、多くの物質の合成は高エネルギー結合（とくに ATP）の分解と供役していること、アミノ酸の活性化は ATP からの AMP への転換によりなされること、ペプチドの形成は ATP から AMP への分解と供役していること、さらに ATP（決して ADP ではない）は最初のエネルギー供与者で、ADP は高エネルギーを運搬することができないことを述べている。これらのことは、上述の結果をよく説明する。

30°C に至適温度をもつ II 型菌では、いずれの培養温度で培養した場合でも ATP と ADP はほとんど認められず、そのほぼすべてが AMP であった。第 2 章・第 2 節で述べたように、II 型菌は本来 20°C 付近に至適温度をもつ菌群が、陸上の中温環境でも生育できるよう適応したと考えられ、すなわち低温細菌が 30°C 付近のより高い温度環境にも適応でき

るよう生理的に調節されていると考えられ、したがって不安定な ATP と ADP は直ちに代謝され、安定な AMP は貯蔵されることが考えられる。また、AMP の絶対量は至適温度の 30°C での培養では 20°C およびそれ以下の温度での培養に比べてその値は極めて低く、これについても生理機能がより亢進されているため、安定な AMP も代謝され、貯蔵量が低下したと考えられる。また AMP は 30°C 培養では対数期だけに認められ、定常期以降では認められなかったが、これについては対数期では分解作用が活発なため、生成されるアデノシンリン酸量も多く、それ故に貯蔵され、一方分解作用が低下し活発な同化作用が続く減速期後期以降では、AMP も貯蔵されないと考えられる。すなわち、生育温度を低下することで、AMP の消滅期間が延長されたこともよく理解される。また、20°C に至適温度をもつ I 型菌を 30°C で培養すると、30°C に至適温度をもつ II 型菌と類似のアデノシンリン酸の消長を示したことも、上述の考えをよく説明する。さらに、30°C に至適温度をもつ II 型菌を至適温度以下の温度で培養しても 30°C 培養と全く同様のアデノシンリン酸の消長を示し、II 型菌が特異な形質を遺伝的に有していることを示唆する。

なお、II 型菌を振とう培養した結果、菌株により AMP 値は極めて低い値を示した。ところで、AMP は対数期のごく限られた時期にだけ検出される。今回 II 型菌を振とう培養したところ、増殖速度が著しく促進され、対数期の時間も極めて短かった。したがって、菌株により AMP 値が極めて低い値を示したことについては、たまたま測定時に AMP が検出されなかったためと考えられる。

エネルギー充足度は Atkinson により  $(ATP+1/2ADP) / (ATP+ADP+AMP)$  として定義された。<sup>27,28)</sup> そして、代謝が恒常状態にある場合には充足度は 0.85 の値をとると述べている。Chapman ら<sup>29)</sup> は *Escherichia coli* では、エネルギー充足率は増殖中の細胞では 0.8 で、その後はゆっくりと減少し、定常期以降の生命活動が停止する時期ではその値はさらに減少する。これらの結果から、エネルギー充足率が 0.8 でのみ増殖を行うことができ、0.8 から 0.5 の範囲で生命を維持することができ、それ以下の値

では細胞は生命を維持することができないとしている。その上、種々の微生物細胞や組織に関する研究でも、<sup>31,32)</sup> この考えを支持するとしている。

ところが今回の結果では、供試した低温性 *Pseudomonas* の対数期のエネルギー充足率はいずれの環境下でも通常 I 型菌で 0.1～0.5 の範囲で、II 型菌では限りなく 0 に近い値を示した。この実験を行うに際しては、細胞培養は凍結、濾過および遠心沈殿することをなしに分析され、すなわちこの低いエネルギー充足度は分析方法に問題があるとは考えにくい。一方、*Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィームに関する研究<sup>33)</sup> では、その底層から表層までのバイオフィームのエネルギー充足度は 0.6 から 0.16 の値を示している。そこで、今回の低いエネルギー充足度は細胞特性と考えられる。なお、標準菌株として用いた *Escherichia coli* (ATCC 10798) の 37℃ での 24 時間培養エネルギーの充足率は 0.79 (ATP 2.92、ADP 0.48、AMP 0.60 nmol ml<sup>-1</sup>) であり、したがって分析方法の正しさは明らかである。なお、II 型菌では培養初期 (誘導期付近) で極めて高いエネルギー充足度を示す場合があったが、これについては、培養初期では各アデノシンリン酸量とも極めて低く、分析値が信頼限界を超えているためと考えられる。

## 要 約

異なる至適温度をもつ低温非好塩性 *Pseudomonas* (至適温度を 25℃ 以下と以上にもつ I 型菌と II 型菌) の異なる生育環境下での生育にともなうアデノシンリン酸の消長をしらべ、つぎの結果を得た。

1) 細菌培養中の I 型菌のアデノシンリン酸量は、通常 AMP 量が最も多く、ADP がこれに次ぎ、ATP 量は最も低い値を示した。この傾向は減速期またはそれ以降で顕著で、対数期初期または中期ではこの傾向を示さない場合も多々みられた。この傾向は生育環境が異なっても変わりなかったが、振とう培養下ではこの傾向から異なった。

2) 細菌培養中の II 型菌のアデノシンリン酸量は、通常 ATP および ADP

はほとんど検出されず、検出されたとしてもその量は極めて少なく、そのほぼすべてが AMP により占められた。この AMP も減速期または定常期以降ではほぼ消滅した。この傾向は生育環境が異なっても変わりなかったが、生育が抑制される環境下では高い培養齢の細胞にも AMP が存在し、逆に生育が促進される環境下では AMP の消滅する時期が速かった。

3) 生育にともなうアデノシンリン酸の消長は、いずれの環境下でも、通常 I 型菌では AMP は生育曲線とほぼ同様な消長を示し、ADP は減速期または定常期まで上昇し、以降ほぼ一定となり、ATP は対数期の一時期まで上昇し、以降減少した。しかし、至適温度以上の温度での培養、振とう培養および生育が抑制される環境下ではこれとは異なる消長を示す場合があった。

4) 生育にともなうアデノシンリン酸の消長は、いずれの環境下でも、通常 II 型菌では AMP は対数期に極大を示し、以降減少した。極大となる時期は生育環境で異なり、生育が促進される環境下では極大を示す時期が速くなり、生育が抑制される環境下ではその時期が遅くなった。また、微量に存在した ADP と ATP は、培養初期で認められる場合があっても、対数期では消滅した。

5) 30℃ に至適温度をもつ II 型菌における培養中のアデノシンリン酸は、20℃ 以下での培養に比べ 30℃ 培養ではその値は極めて低かった。

6) エネルギー充足度は、いずれの環境下でも、通常 I 型菌では 0.10 ~ 0.5 の範囲にあったが、振とう培養ではこれより高い値を示す場合もあった。II 型菌では、いずれの環境下でも、対数期およびそれ以降では、その値は限りなく 0 に近い値を示した。

以上の結果より、I 型菌と II 型菌は遺伝学的に異なる菌群と判断された。

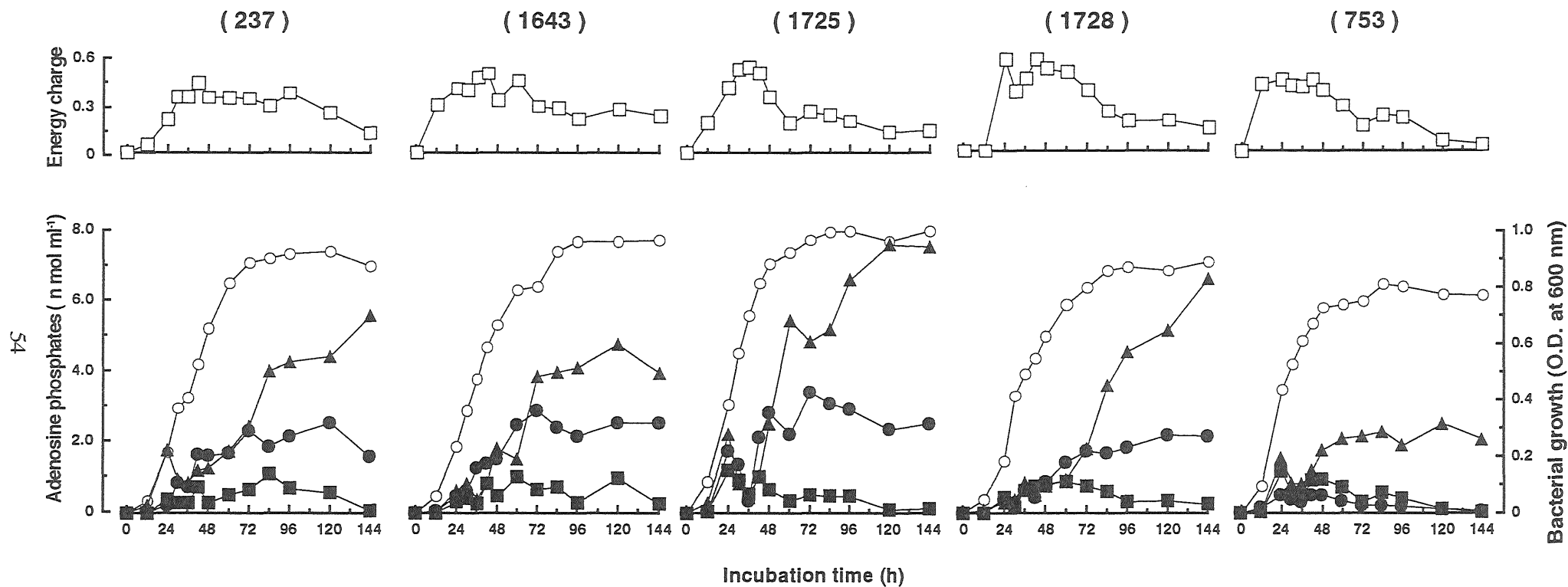


Fig. 17. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) of Type I strains having an optimum temperature of 20 °C during growth at 20°C. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; ○, O.D; □, energy charge.



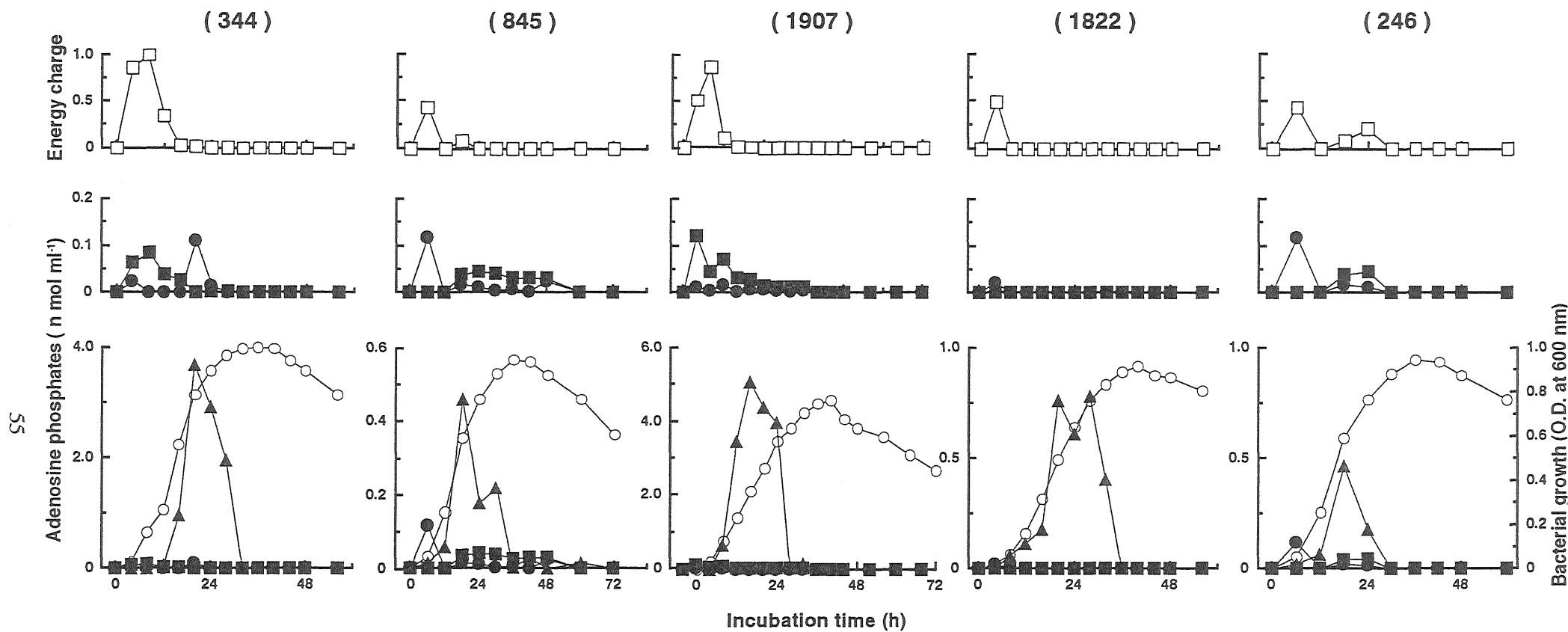


Fig. 18. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) of Type II strains having an optimum temperature of 30 °C during growth at 30 °C. Ordinate of the middle figure indicates the enlarged values of ADP and ATP concentrations shown in the lower. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; O, O.D; □, energy charge.

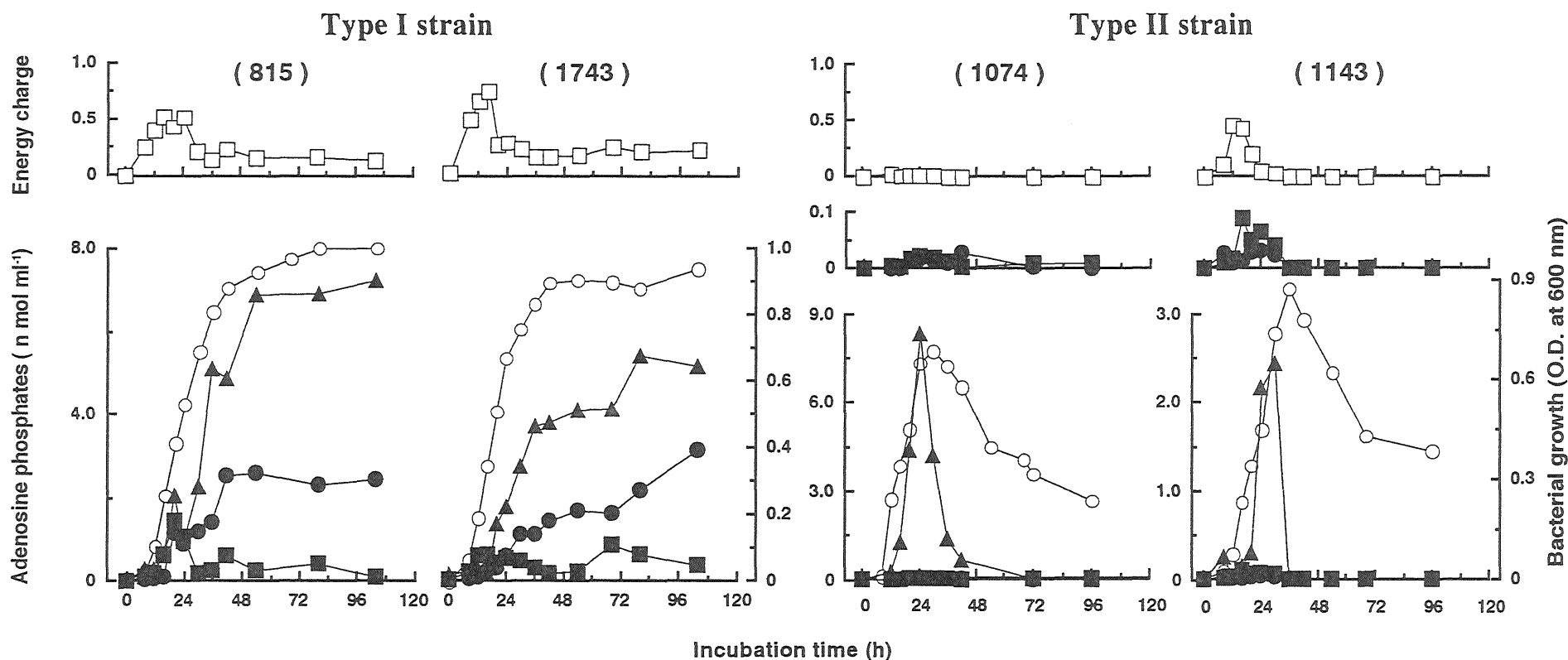


Fig. 19. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) of Type I and II strains having an optimum temperature of 25 °C during growth at 25 °C. In Type II strains, ordinate of the middle figure indicates the enlarged values of ADP and ATP concentrations shown in the lower. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; O, O.D; □, energy charge.

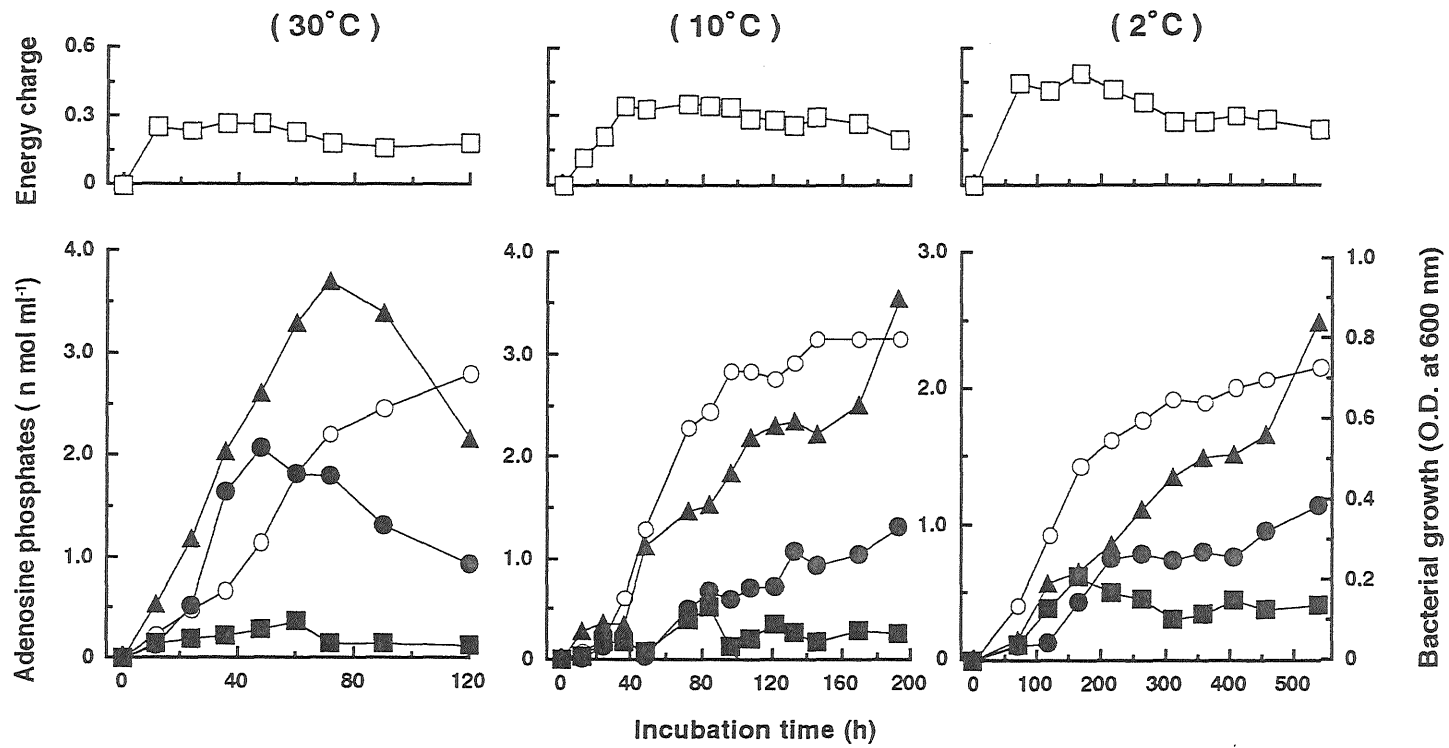


Fig. 20. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) of Type I strain (Strain 1725) having an optimum temperature of 20°C during growth at different growth temperatures.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; O, O.D; □, energy charge.

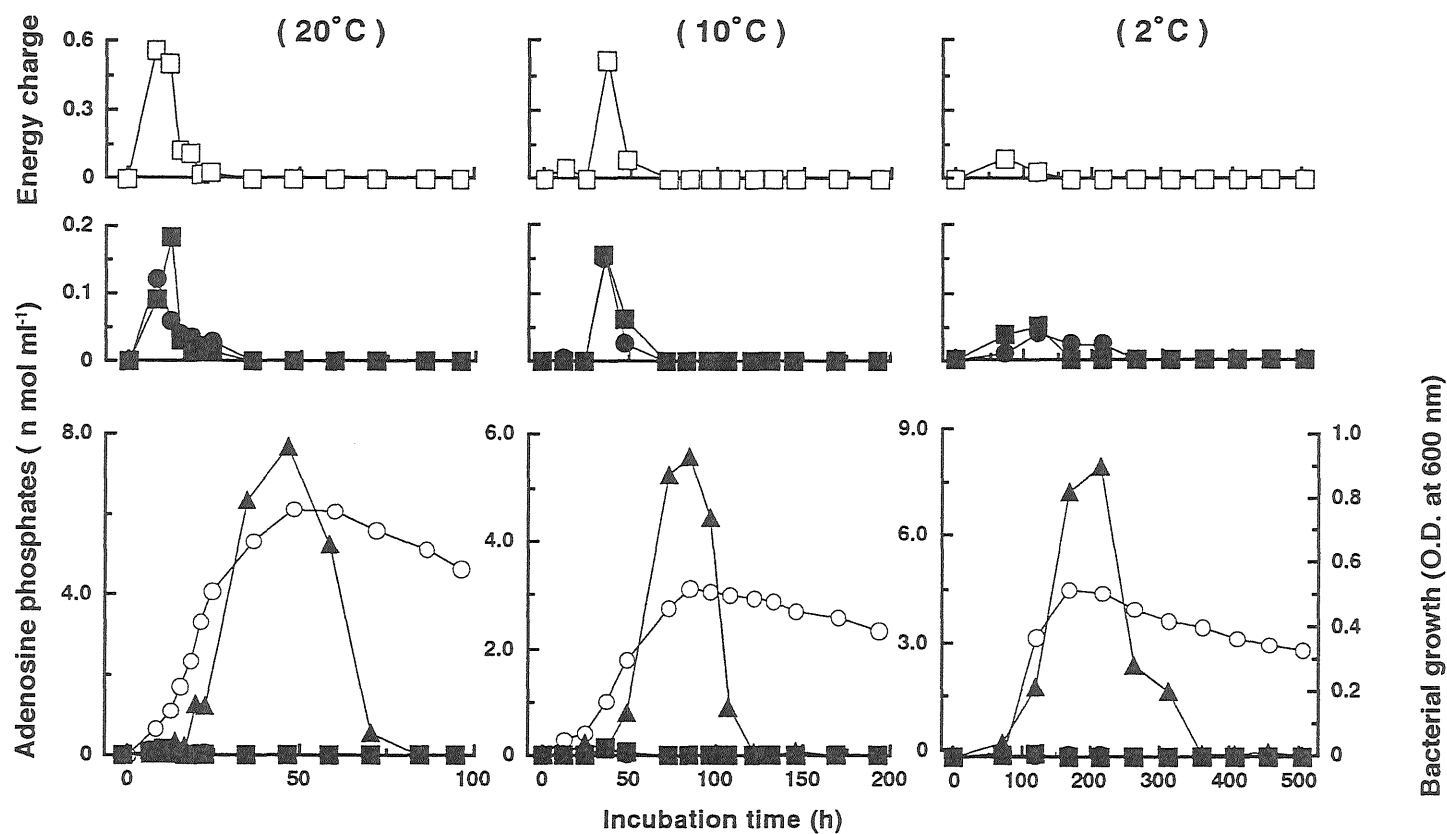


Fig. 21. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) of Type II strain (Strain 1907) having an optimum temperature of 30°C during growth at different growth temperatures. Ordinate of the middle figure indicates the enlarged values of ADP and ATP concentrations shown in the lower.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; O, O.D; □, energy charge.

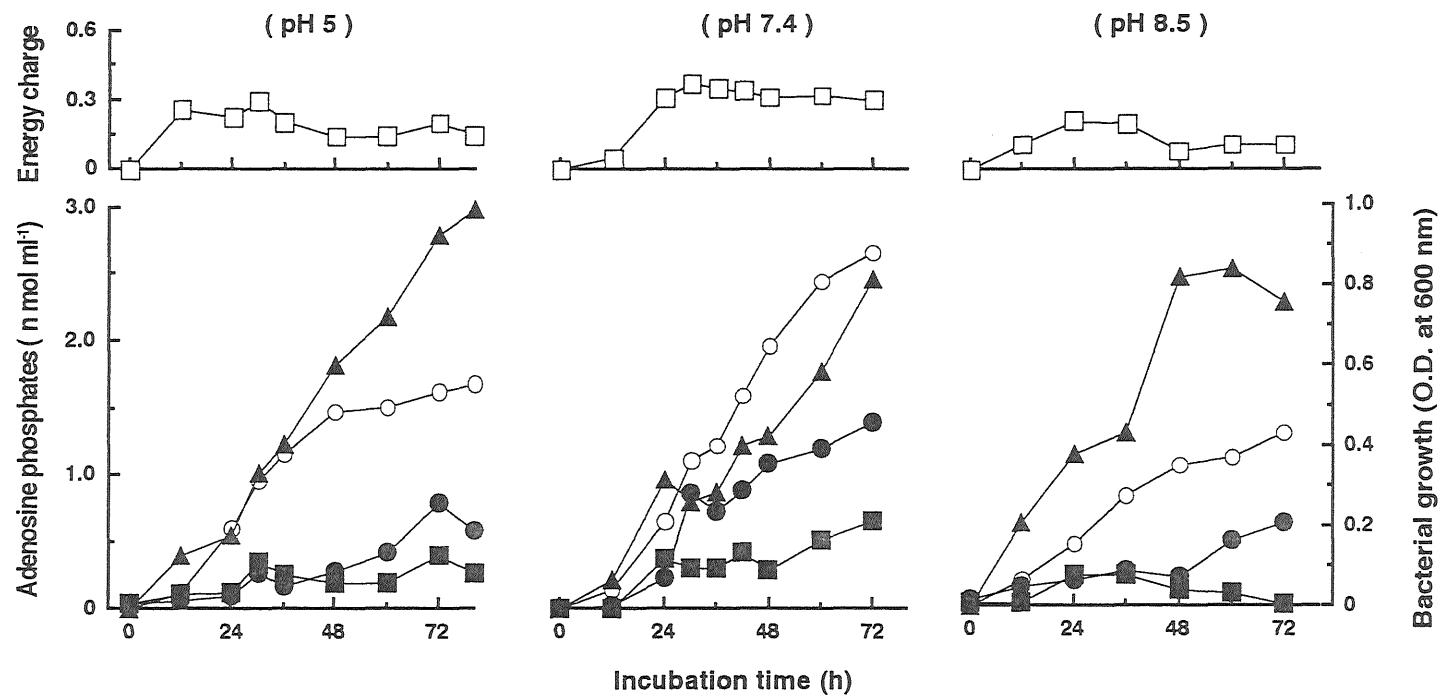


Fig. 22. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) of Type I strain (Strain 1725) during growth at the optimum temperature at different growth pHs.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; ○, O.D; □, energy charge.

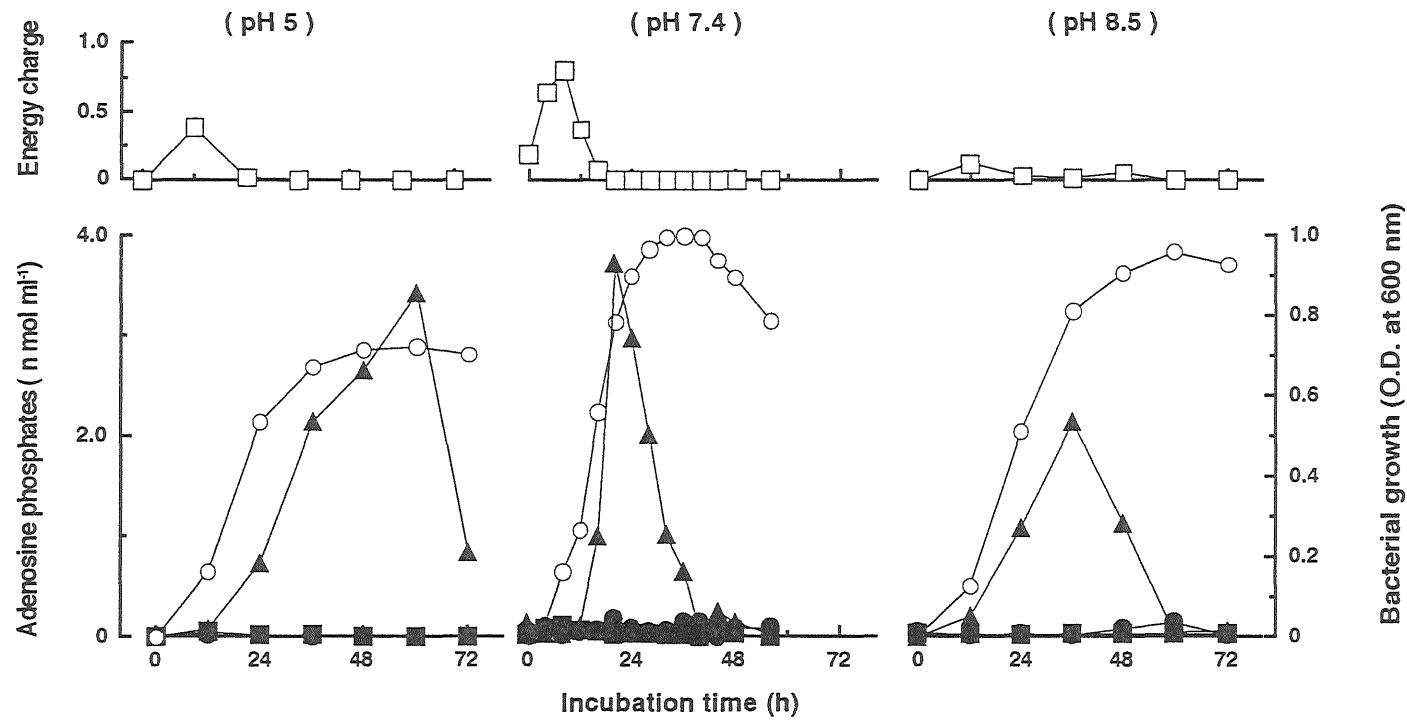


Fig. 23. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) in Type II (Strain 1907) strains during growth at the optimum temperature at different growth pHs.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; O, O.D; □, energy charge.

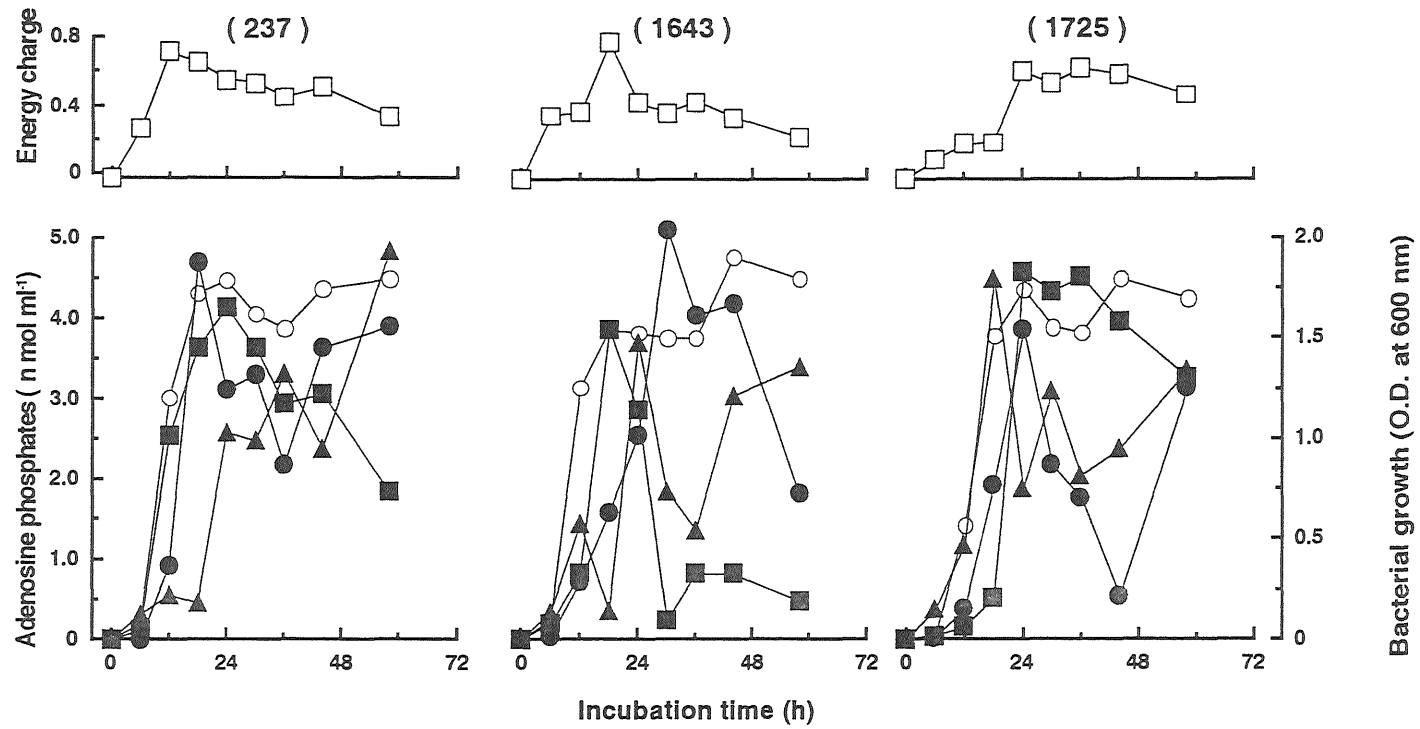


Fig. 24. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) in Type I strains during growth at the optimum temperature under aerobic shaking condition. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; ○, O.D; □, energy charge.

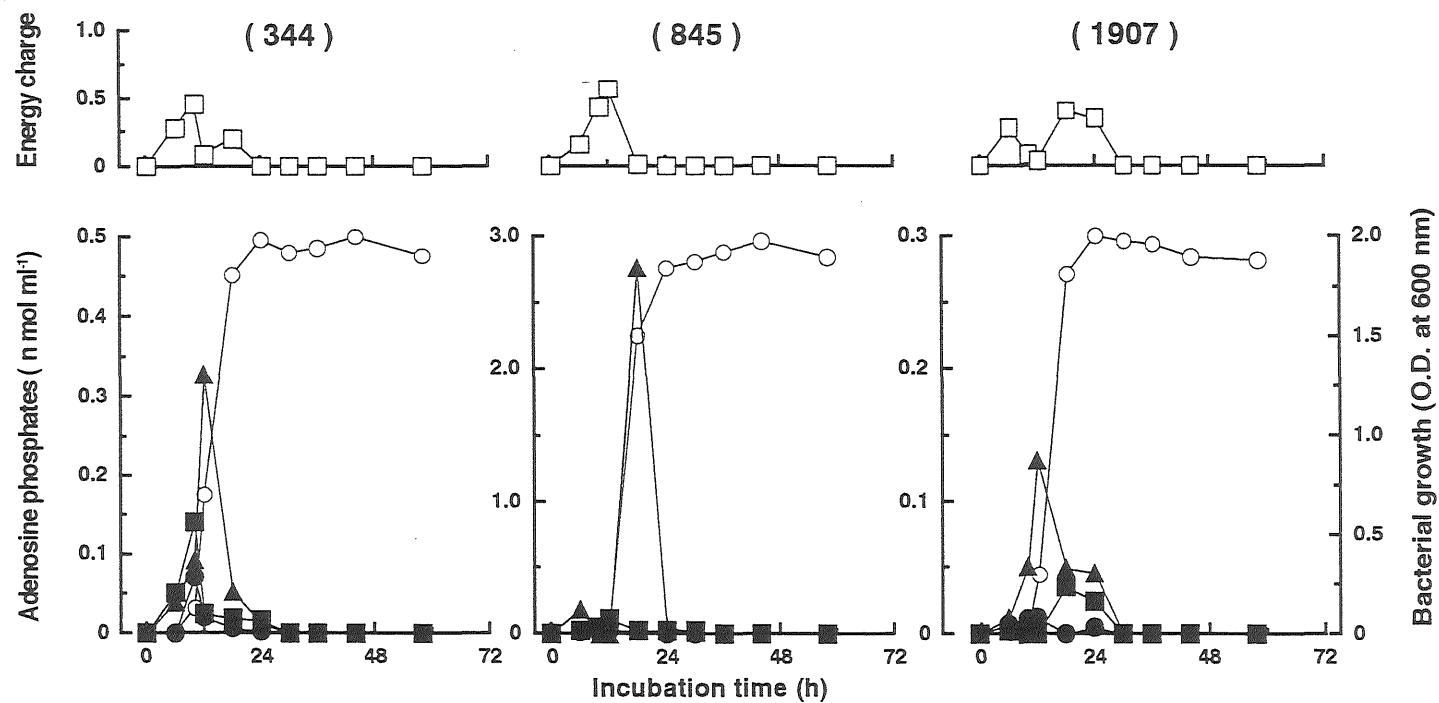


Fig. 25. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) in Type II strains during growth at the optimum temperature under aerobic shaking condition. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; O, O.D; □, energy charge.



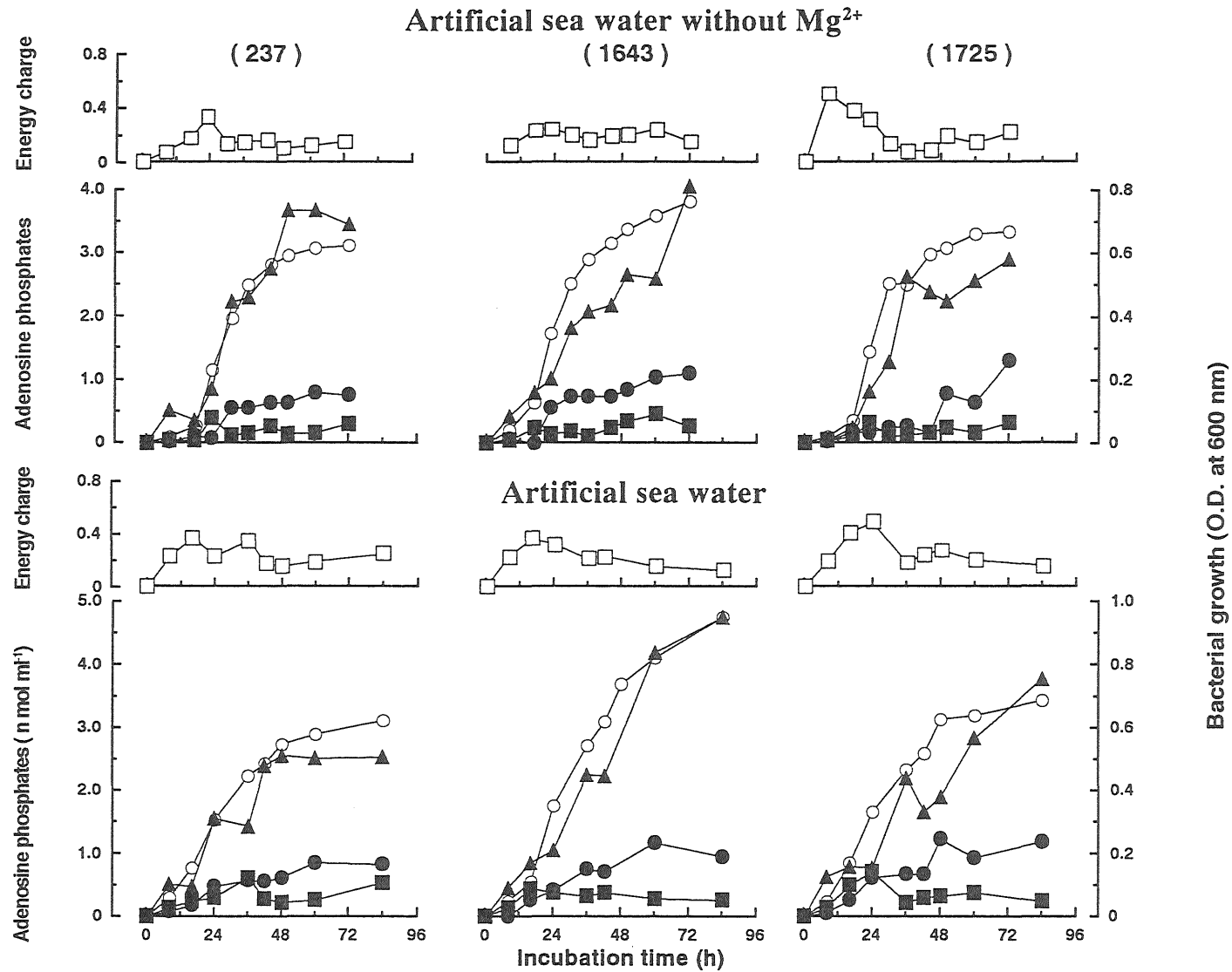


Fig. 26. Adenine nucleotide levels and energy charge of Type I strains during growth at the optimum temperature in media prepared with 25 % artificial sea water (the lower) and the sea water without Mg<sup>2+</sup> ( the upper). Number in parenthesis shows strain number.

Symbols:    ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; ○, O.D; □, energy charge.

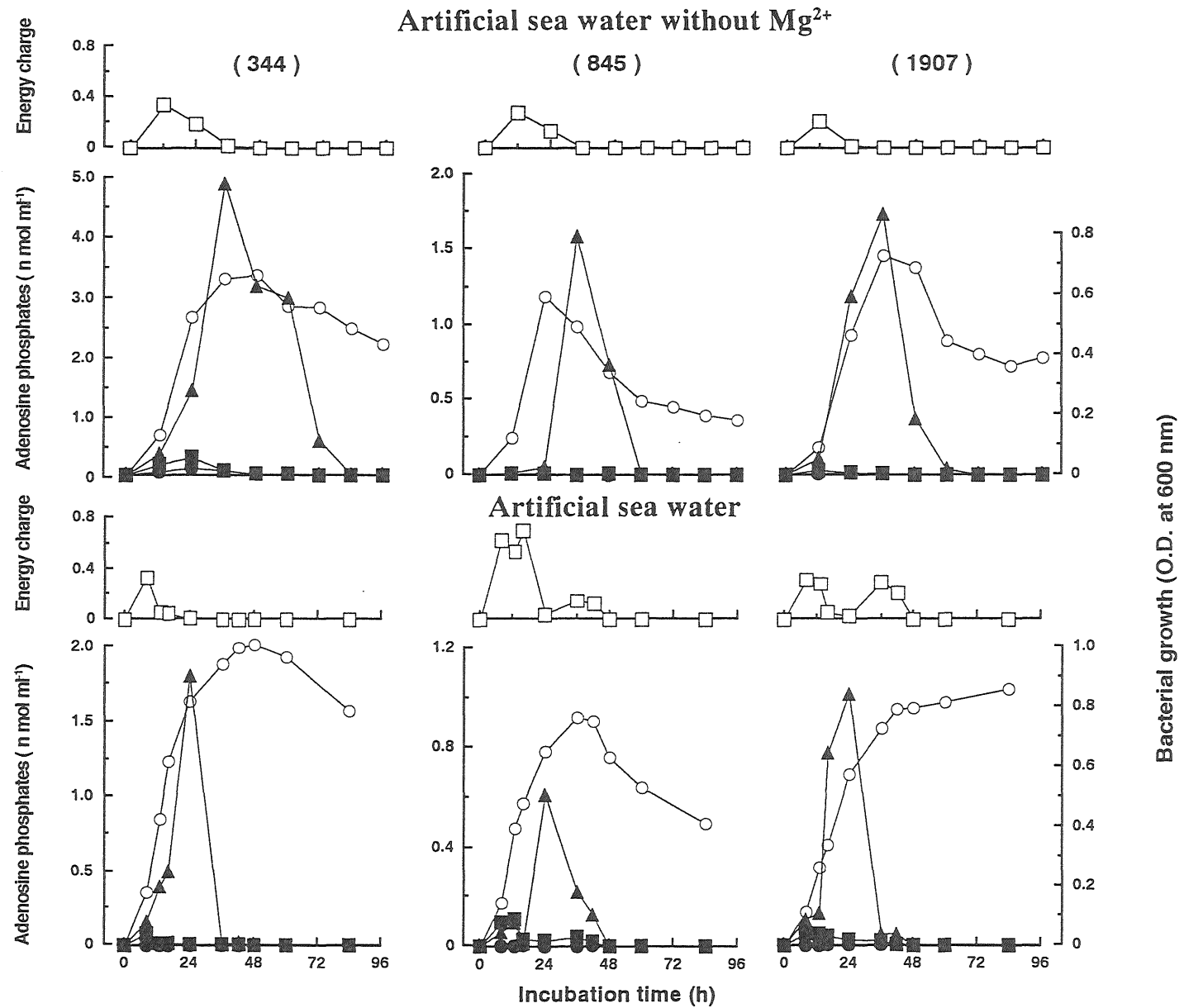


Fig. 27. Adenine nucleotide levels and energy charge of Type II strains during growth at the optimum temperature in media prepared with 25 % artificial sea water (the lower) and the sea water without Mg<sup>2+</sup> ( the upper). Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; O, O.D; □, Energy charge.

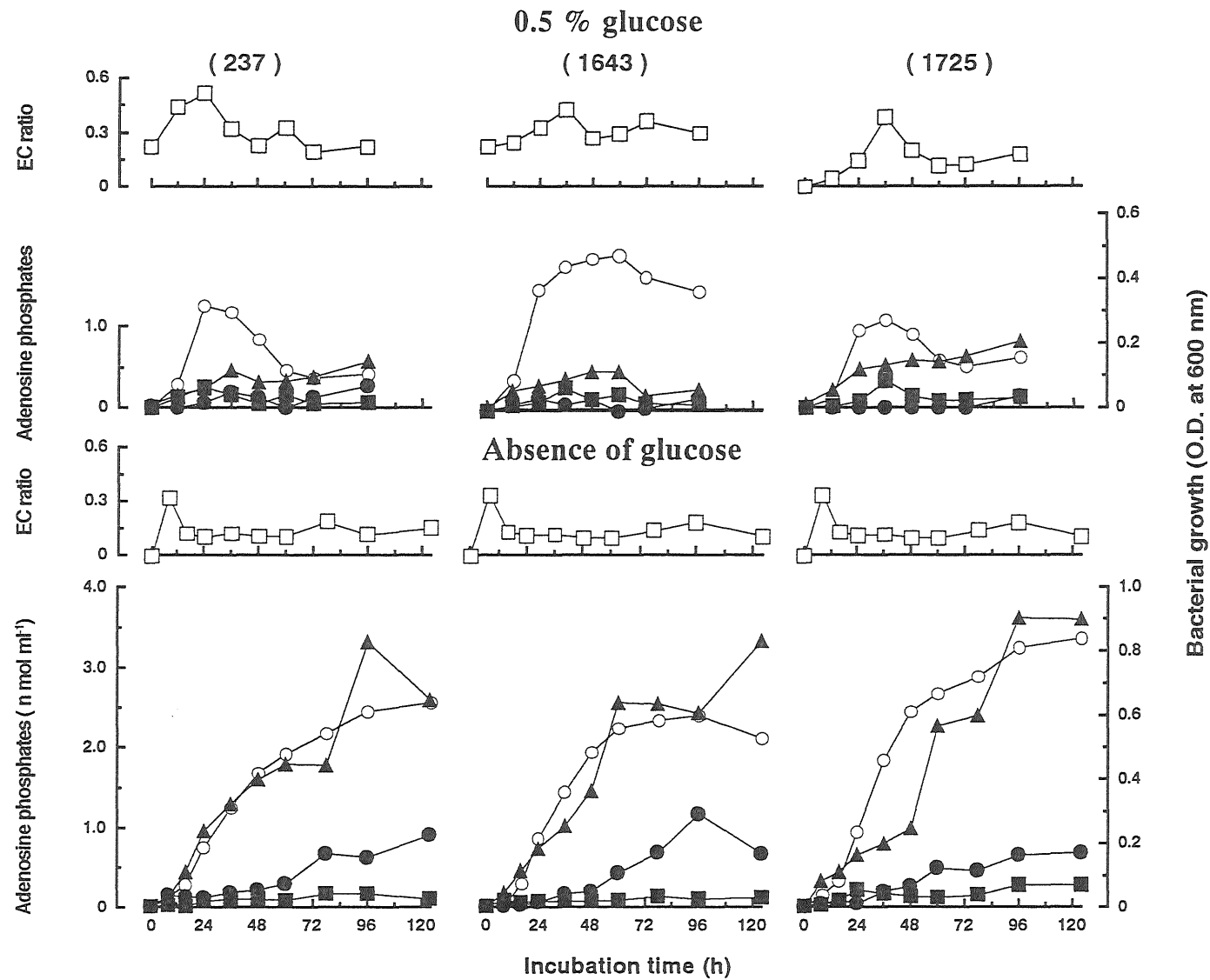


Fig. 28. Adenine nucleotide levels and energy charge in Type I strains during growth at the optimum temperature in media in the absence (the lower) and the presence of glucose (the upper). Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; ○, O.D.; □, energy charge.

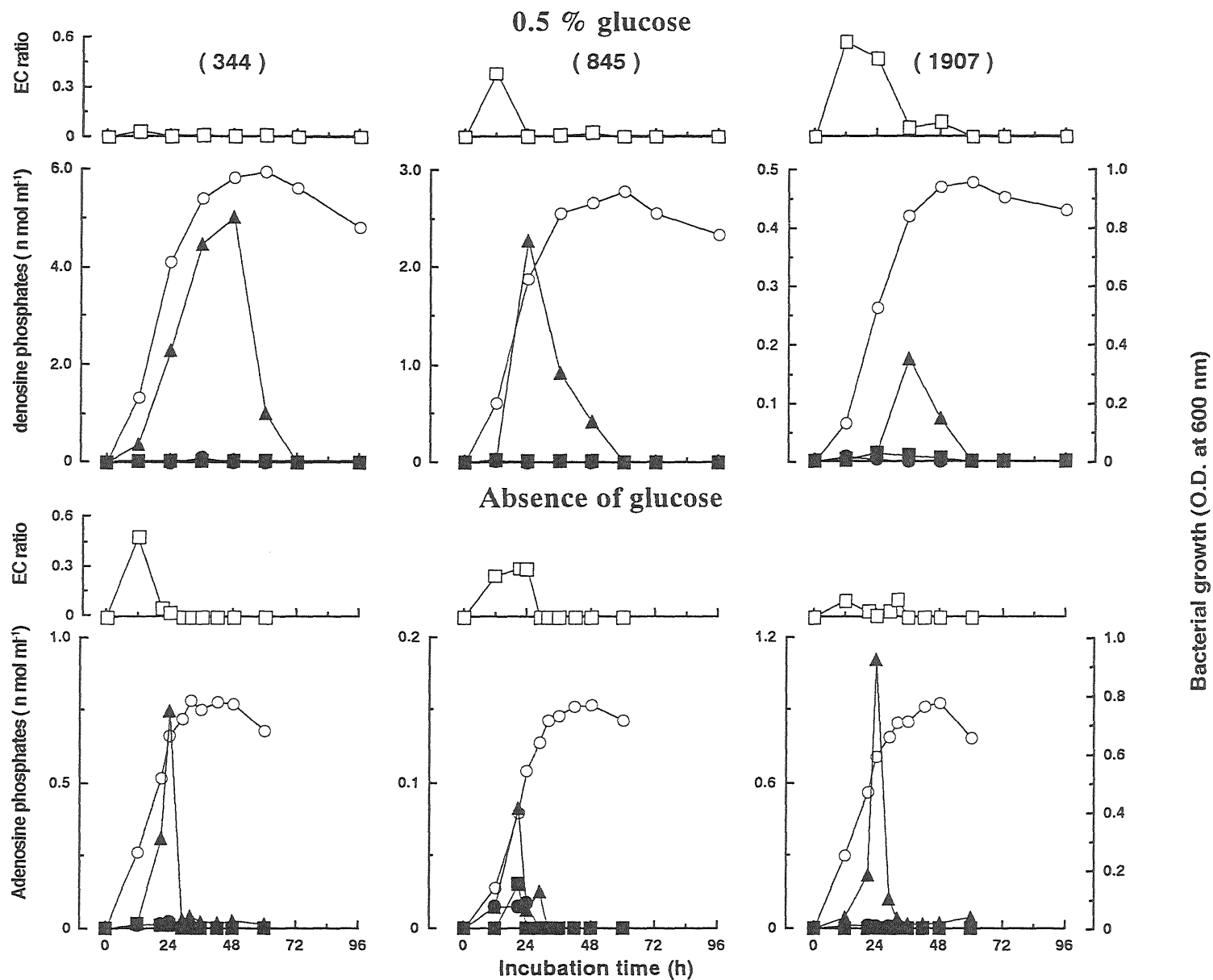


Fig. 29. Adenine nucleotide levels and energy charge of Type II strains during growth at the optimum temperature in media in the absence (the lower) and the presence of glucose (the upper). Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; O, O.D; □, energy charge.

## 第4節 アデニンおよび各アデノシンリン酸添加 にともなうアデノシンリン酸の消長

本章・第3節で述べたように、I型菌とII型菌では培養液中のアデノシンリン酸の構成および生育にともなうアデノシンリン酸の消長に違いがみられた。これらの違いは各アデノシンリン酸の代謝速度および（または）アデノシンリン酸の代謝機構に関連があると考えられた。そこでアデノシンリン酸の前駆物質であるアデニンおよび各アデノシンリン酸がこれら両菌群により利用されるか否か、またどのような速さで利用されるか、またこれらの利用により細胞内のアデノシンリン酸の構成にどのような影響を及ぼすかをしらべ、両菌群間でみられたアデノシンリン酸の構成の違いおよび生育にともなうアデノシンリン酸の消長の違いをアデノシンリン酸の代謝面より検討するものである。なお、AMP添加実験については培養上澄液のアデノシンリン酸についてもしらべた。

### 材料と方法

**供試菌** I型菌（至適温度 20°C）およびII型菌（至適温度 30°C）のそれぞれ3~5菌株を供試した。

**実験方法** アデニンまたは各アデノシンリン酸の  $0.01 \mu \text{mol ml}^{-1}$  を 25% 海水—0.1% グルコース添加 Nutrient Broth (BBL) に添加し、至適温度で培養し、経時的に培養液中のアデノシンリン酸量を測定した。とくに、培養上澄液のアデノシンリン酸の測定については、培養液を  $15300 \times g$  で5分間遠心してしらべた。

アデノシンリン酸量の測定は本章・第2節と同様にして行った。

### 結 果

1. アデニンおよびアデノシンリン酸添加にともなう培養液中のアデノシンリン酸の消長

アデニンおよび各アデノシンリン酸添加にともなう I 型菌（至適温度 20℃）の培養液中のアデノシンリン酸量の経時的変化を Fig.30-1 と 30-2 に示す。I 型菌におけるアデノシンリン酸の消長は、いずれの供試菌とも、アデニンの添加（Fig.30-1）により培養初期（誘導期付近）で AMP の割合が多少増加傾向を示したが、この点を除けばアデニン無添加培養（Fig.17 参照）と著しい違いはみられなかった。

AMP 添加培養（Fig.30-1）では、加えた AMP の減少はみられず、培養液全体の AMP 量は漸増または急増した。しかしその増加傾向は AMP 無添加培養（Fig.17 参照）の場合より顕著で、また AMP 添加培養では ADP 量も AMP 量と比例的に増加する傾向を示した。一方、ATP 量は増加傾向を示さず、その値も低かった。また AMP の添加で生育が抑制された。

ADP 添加培養（Fig.30-2）では、加えた ADP は接種直後より漸減し、この減少にともない培養中の AMP および ADP 量は急増した。また本培養では AMP 量は ADP 量より極めて高い値を示した。

ATP 添加培養（Fig.30-2）では、加えた ATP は対数期中頃より漸減した。ATP の添加で培養中の AMP および ADP 量は漸増した。また本培養では AMP 量は ADP 量より低かった。

アデニンおよび各アデノシンリン酸添加にともなう II 型菌（至適温度 30℃）の培養液中のアデノシンリン酸量の経時的変化を Fig.31-1 と 31-2 に示す。II 型菌におけるアデノシンリン酸の消長は、いずれの供試菌ともアデニンの添加（Fig.31-1）でその消長にはほとんど変化がみられなかった。すなわち、アデノシンリン酸のほぼすべてを AMP が占め、また生育にともなう消長もアデニン無添加培養（Fig.18 参照）と類似した。また、培養中のアデノシンリン酸の絶対量もアデニン無添加培養（Fig.18 参照）と著しい違いはみられなかった。

AMP 添加培養（Fig.31-1）では、加えた AMP は培養 6 時間目ですべて消滅し、以降 AMP 無添加培養（Fig.18 参照）の場合と同様のアデノシンリン酸の消長を示した。すなわち、ATP および ADP については AMP 無添加培養（Fig.18 参照）の場合と同様に、ほとんど検出されなかった。また、AMP 添加で、本来 AMP 量の高い菌株（344 株）ではその値は

低下し、逆に本来 AMP 量の低い菌株（845株と1907株）ではその値が上昇した。

ADP 添加培養（Fig.31-2）では、加えた ADP は培養 6 時間ですべて消滅し、それ以降も ADP を添加したにもかかわらず ADP は確認できなかった。また、ADP の添加で、本来 AMP 量の高い菌株（344株）ではその値が上昇し、逆に本来 AMP 量の低い菌株（845株と1907株）ではその値は低下した。

ATP 添加培養（Fig.31-2）では、加えた ATP は培養 6 時間目までにすべて消滅し、それ以降も ATP は確認できず、ATP 無添加培養（Fig.16 参照）の場合と同様なアデノシンリン酸の消長を示した。また ATP の添加で、いずれの供試菌とも、培養液中の AMP 量は極めて高い値を示した。

## 2. アデノシンリン酸添加にともなう培養上澄液中のアデノシンリン酸の消長

I 型菌を AMP 添加培地で培養した場合の、培養上澄液中のアデノシンリン酸の消長を Fig.32 に示す。培養液全体の AMP は前回の実験と同様の結果を示した（Fig.15 参照）。培養上澄液中の AMP は添加量より減少しその後上昇する場合、添加直後から徐々に増加傾向を示す場合があったが、前回の実験と同様に（Fig.15 参照）、上澄液中の量は培養液全体中の量に比べて極めて少なかった。

## 考 察

I および II 型菌とも、アデニンの添加で、培養中のアデノシンリン酸の構成および生育にともなうアデノシンリン酸の消長にほとんど変化はみられなかった。したがって、アデニンの添加でアデノシンリン酸の代謝には影響を及ぼさないと考えられる。

I 型菌の AMP 添加培養では、AMP を添加しても培養液中の AMP 量は添加量以下とはならず、生育にともない増加した。このことについては、培養上澄液中の AMP 量も通常生育にともない増加傾向を示したことから I 型菌では AMP はほとんど利用されないか、利用されるとしてもその量は少ないと考えられる。また培養上澄液中の AMP 量は、培養

液全体の量に比べその値は極めて低く、したがって培養液中に増加した AMP の大半は細胞内の AMP と考えられる。ところで、AMP 添加培養では、AMP 量は生育にともない増加したが、その増加傾向は AMP 無添加培養に比べて顕著で、しかも ADP 量は AMP 量に比例的に増加した。一方、ATP 量は増加しなかった。すなわち、I 型菌では、培養液中に AMP が添加されることで、AMP および ADP の細胞内での貯蔵が促進され、とくに AMP の貯蔵は顕著で、一方 ATP の貯蔵は抑制されると考えられる。この状況は AMP 無添加培地で培養した場合の減速期または定常期以降のアデノシンリン酸の消長と酷似する。その上、AMP 無添加培地で培養した場合の減速期または定常期以降では生育は抑制されている。一方、AMP 添加培地でも生育は抑制された。つまり、AMP 添加培地では、AMP が存在することで、細胞が減速期または定常期以降の状態と認識し、減速期または定常期以降の生理状態に細胞をシフトしたと考えられる。

I 型菌の ADP 添加培養では、添加した ADP は漸減し、これにともない AMP 量と ATP 量は増加し、とくに AMP 量の増加は著しかった。すなわち、添加した ADP は菌体内に取込まれ、取込まれた ADP は AMP および ATP に転換され、ATP はさらにエネルギー源として、あるいは核酸の合成のために利用されたと考えるとよく理解される。

I 型菌の ATP 添加培養では、添加した ATP は漸減し、これにともない AMP と ADP が同程度増加した。すなわち、添加した ATP は菌体内に取込まれ、取込まれた ATP は AMP と ADP に同程度転換されたと考えられる。

II 型菌の AMP 添加培養では、添加した AMP は急速に消滅し、また本来 AMP 量の高い菌株ではその値は低下し、逆に本来 AMP 量の低い菌株ではその値は高くなった。すなわち、加えた AMP は急速に菌体内に取込まれ、これにより AMP 貯蔵量が多い菌株ではその値を低くする代謝経路が、また AMP 貯蔵量の少ない菌株ではその値を高くする代謝経路が促進されることが示唆される。

ADP 添加培養では、添加した ADP は直ちに消滅し、また本来 AMP 量



の高い菌株ではその値は高くなり、逆に本来 AMP 量の低い菌株ではその値は低くなった。すなわち、加えた ADP は直ちに菌体に取り込まれ、これにより AMP 貯蔵量が多い菌株ではその値を高くする代謝経路が、また AMP 貯蔵量が少ない菌株ではその値を低くする代謝経路が促進されることが示唆される。

ATP 添加培養では、添加した ATP は直ちに消滅し、またいずれの菌株とも AMP 量が著しく増大した。すなわち、加えた ATP は菌体内に取り込まれ、これにより AMP 生成の代謝経路が促進されることが示唆される。

以上のように、I 型菌と II 型菌では添加したアデノシンリン酸の消滅速度が異なり、すなわち両者ではアデノシンリン酸の代謝速度に違いがあることがわかる。なお、本実験の II 型菌の培養温度は 30°C であったが、20°C での培養でも同様の結果が得られた。またアデノシンリン酸の添加は、細胞中の各アデノシンリン酸の構成比に影響を与えたが、この影響の様子が I 型菌と II 型菌で異なり、すなわち両者ではアデノシンリン酸の代謝機構をも異にすることが示唆される。つまり、I 型菌と II 型菌のアデノシンリン酸の構成の違いおよび生育にともなうアデノシンリン酸の消長の違いは、アデノシンリン酸の代謝速度および代謝機構の違いに起因すると判断される。とくに、II 型菌で ADP と ATP がほとんど認められなかったことについては、極めて速い代謝速度に由来すると判断された。

## 要 約

異なる至適温度をもつ低温非好塩性 *Pseudomonas* (至適温度を 25°C 以下と以上にもつ I 型菌と II 型菌) のアデニンおよび各アデノシンリン酸添加にともなうアデノシンリン酸の消長をしらべ、つぎの結果を得た。

1) I 型菌をアデニン添加培地で培養してもアデノシンリン酸の消長にはほとんど違いがなかった。AMP 添加培養では、加えた AMP は利

用されなかったが、培養内の AMP および ADP 量は増加し、とくに AMP 量の増加は顕著で、一方 ATP 量は変化しなかった。ADP 添加培養では、加えた ADP は徐々に利用され、またこの利用にともない AMP および ATP 量が増加し、とくに AMP 量の増加は顕著であった。ATP 添加培養では、加えた ATP は徐々に利用され、またこの利用にともない細胞内の AMP 量と ADP 量がほぼ同じ程度増加した。

2) II 型菌をアデニン添加培地で培養してもアデノシンリン酸の消長にはほとんど違いはみられなかった。また II 型菌では、加えた各アデノシンリン酸はともに急速に利用された。また、いずれのアデノシンリン酸を加えても、培養内に ADP および ATP は認められず、AMP への影響を及ぼした。AMP の添加で、本来 AMP 量の高い菌株ではその量は減少し、逆に本来 AMP 量の低い菌株ではその量は増加した。ADP の添加で、本来 AMP 量の高い菌株ではその量は増加し、逆に AMP 量の低い菌株ではその量を減じた。ATP の添加で、いずれの菌株とも AMP 量は著しく増加した。

以上より、I 型菌と II 型菌ではアデノシンリン酸の代謝速度および代謝機構に違いがあり、またこの違いはアデノシンリン酸の構成の違いおよび生育にともなうアデノシンリン酸の消長の違いをよく説明するもので、したがってアデノシンリン酸の構成の違いおよびアデノシンリン酸の消長の違いはアデノシンリン酸の代謝速度および代謝機構の違いによると判断された。

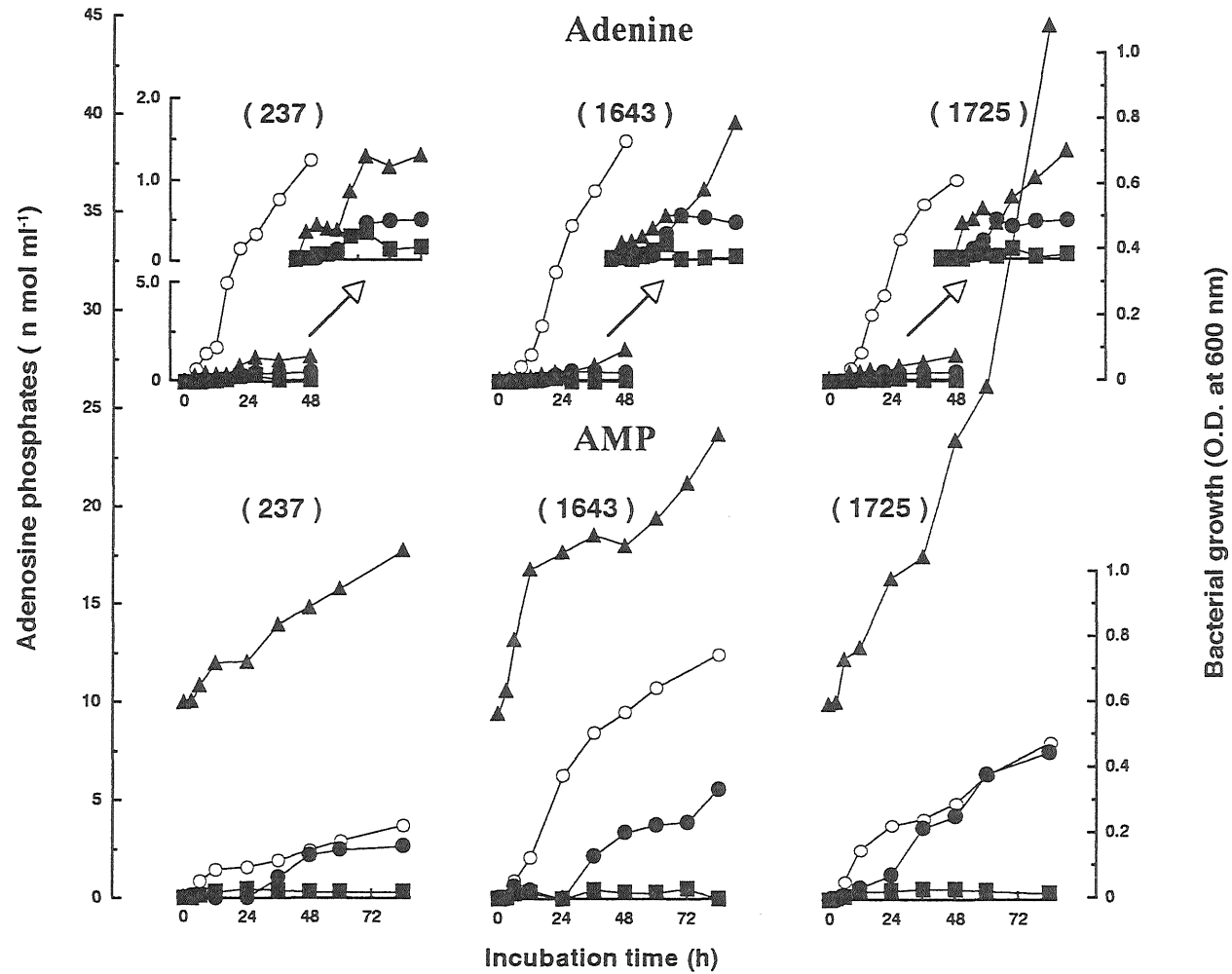


Fig. 30-1. Adenine nucleotide levels of Type I strains during growth at the optimum temperature in medium containing  $0.01 \mu\text{mol ml}^{-1}$  of adenine or AMP. Number in parenthesis shows strain number. The result in the medium with adenine are also presented in a the enlarged values.

Symbols:  $\blacktriangle$ , AMP;  $\bullet$ , ADP;  $\blacksquare$ , ATP;  $\circ$ , O.D.

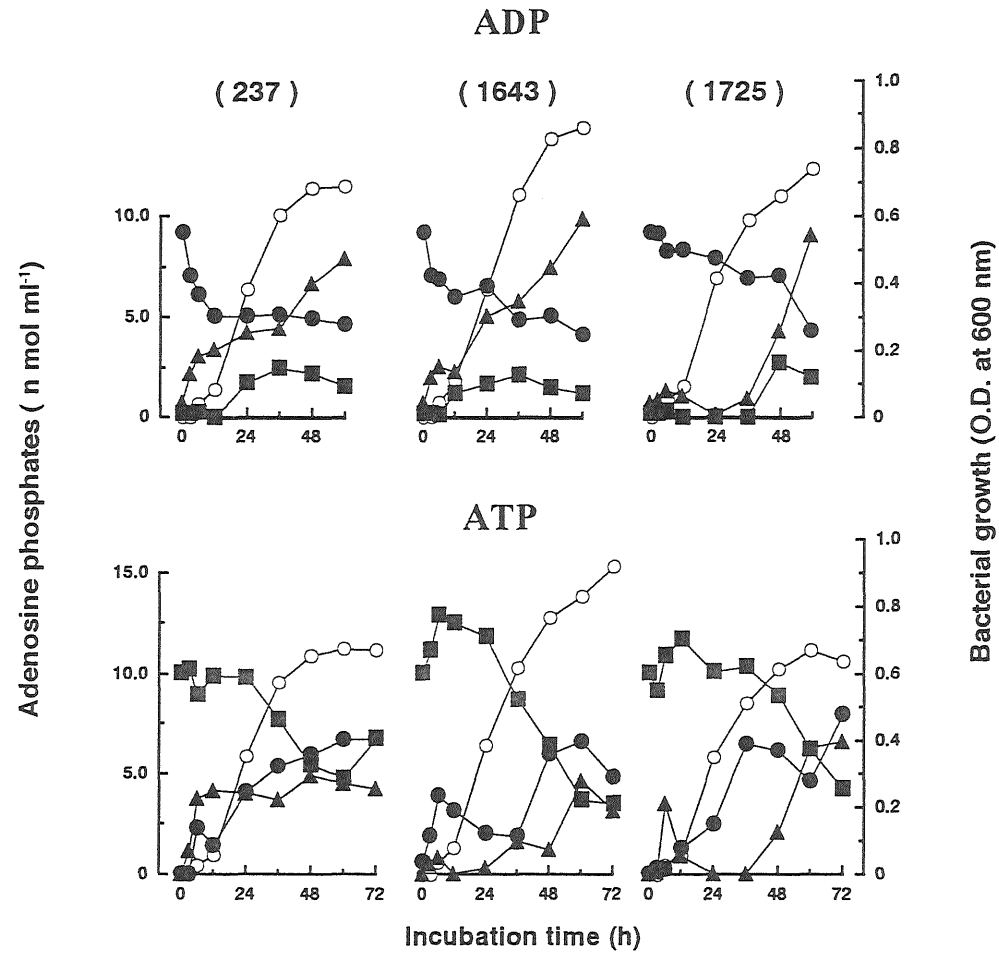


Fig. 30-2. Adenine nucleotide levels of Type I strains during growth at the optimum temperature in medium containing  $0.01 \mu \text{ mol ml}^{-1}$  of ADP or ATP. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols:  $\blacktriangle$ , AMP;  $\bullet$ , ADP;  $\blacksquare$ , ATP;  $\circ$ , O.D.

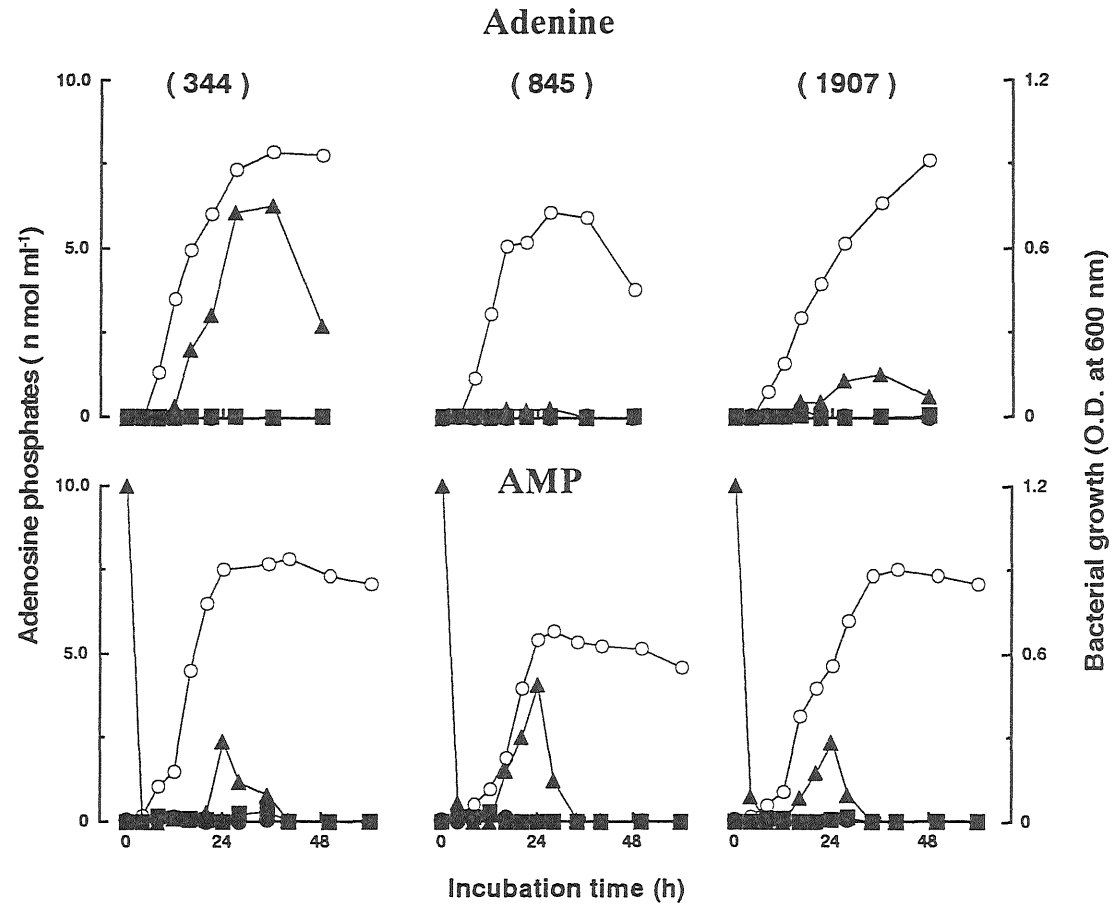


Fig. 31-1. Adenine nucleotide levels of Type II strains during growth at the optimum temperature in medium containing  $0.01 \mu \text{ mol ml}^{-1}$  of adenine or AMP. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols:  $\blacktriangle$ , AMP;  $\bullet$ , ADP;  $\blacksquare$ , ATP;  $\circ$ , O.D.

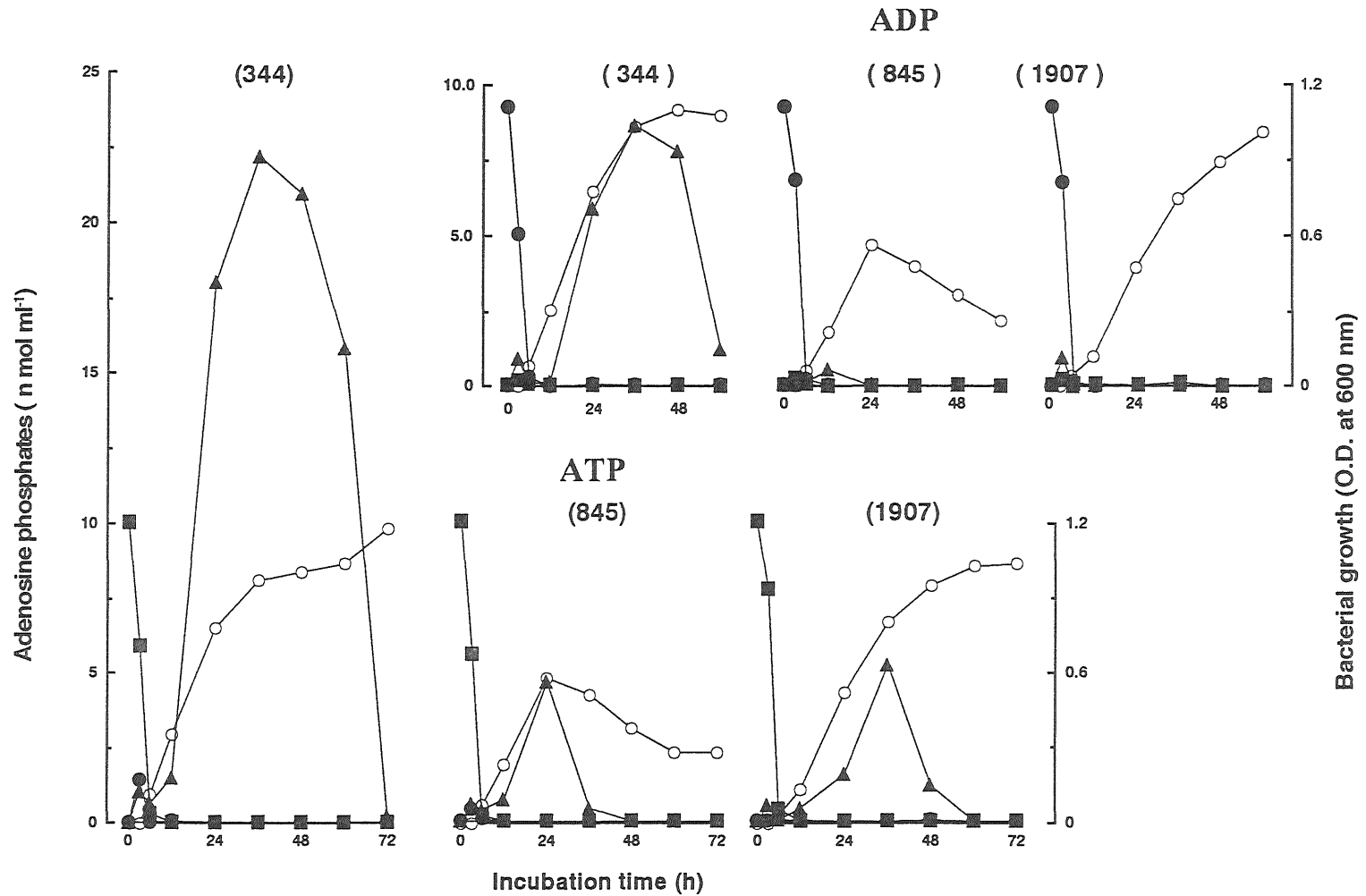


Fig. 31-2. Adenine nucleotide levels of Type II strains during growth at the optimum temperature in medium containing  $0.01 \mu \text{ mol ml}^{-1}$  of ADP or ATP. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; ○, O.D.

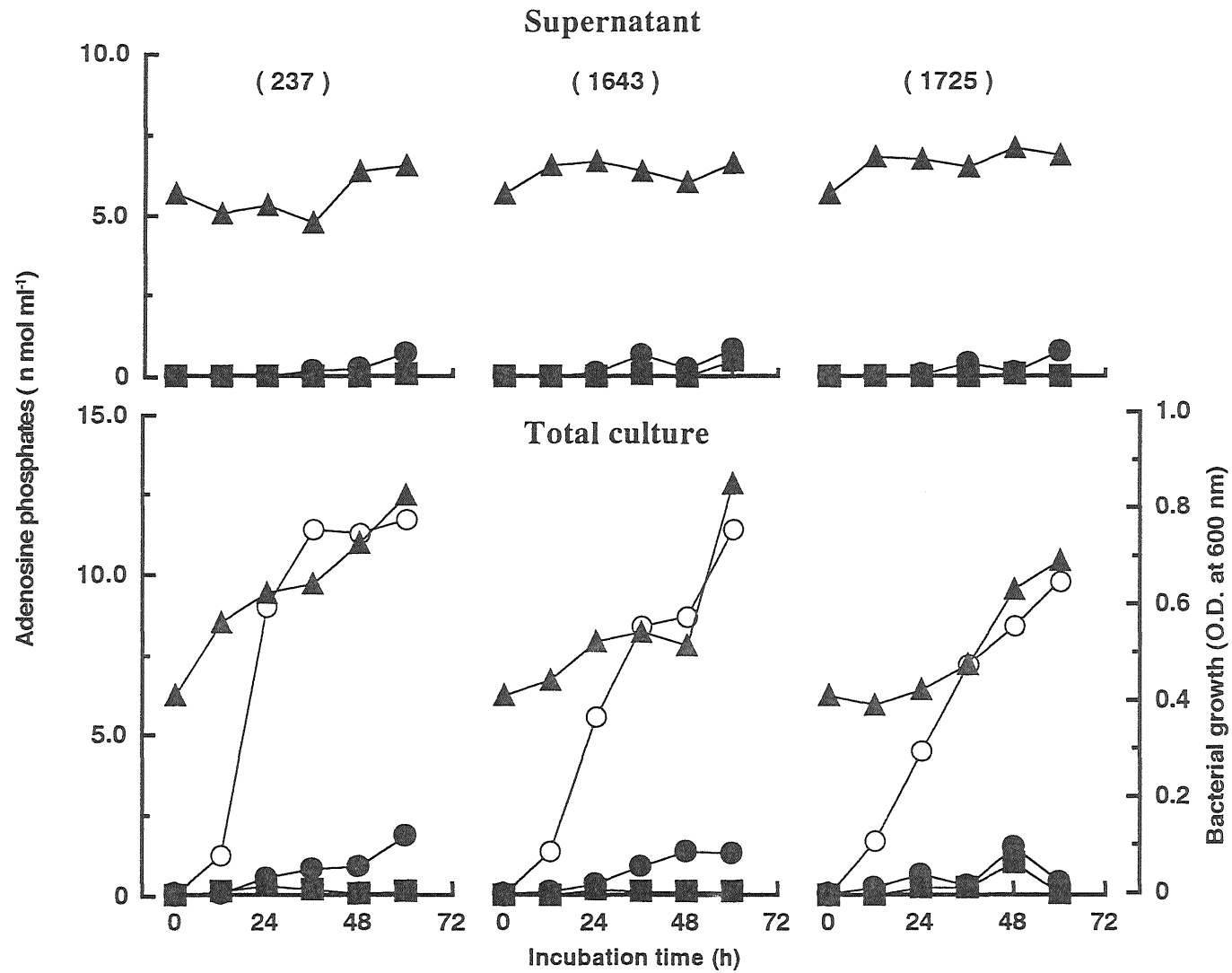


Fig. 32. Adenine nucleotide levels in total culture and in supernatant from the culture of Type I strains during growth at the optimum temperature in medium containing AMP. Number in parenthesis shows strain number.

Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; ○, O.D.

## 第5節 中温性 *Pseudomonas* のアデノシンリン酸の消長

これまで、0°C下に貯蔵したサバから分離した低温非好塩性 *Pseudomonas* は、25°C以下に至適温度をもつ菌株（Ⅰ型菌）とそれ以上に同温度をもつ菌株（Ⅱ型菌）に区別されることを述べた。これらのうち、Ⅱ型菌については、至適温度だけから考えると、むしろ中温性細菌と考えられる。そこで、中温性 *Pseudomonas* についても生育にともなうアデノシンリン酸の消長をしらべ、Ⅱ型菌が中温性細菌から区別されるかどうかを検討した。

### 材料と方法

**供試菌の分離および分離菌の同定** 今回は中温性 *Pseudomonas* の分離が目的であるため、供試魚のサバ *Scomber japonicus* は 37°C の恒温機で貯蔵し、貯蔵後 1、2、4、6、8 日目に貯蔵魚の表皮、筋肉および腹腔内壁から供試菌を分離した。供試魚は一回の実験に 2 尾用いた。供試菌の分離は第 2 章・第 1 節で述べた方法と同様にして行った。

分離菌は常法により性状試験を行ない（第 2 章・第 1 節参照）、0°C では生育せず、非好塩性で糖を酸化的に分解する *Pseudomonas*（40 菌株）を供試菌とした。なお、これらの供試菌を 20、30、37 および 42°C での生育傾向をしらべた結果、30°C に至適温度をもつ菌株が最も多かった。

**生育にともなうアデノシンリン酸の消長試験** 分離した中温性 *Pseudomonas* より 5 菌株をランダムに選出し、アデノシンリン酸の消長試験用の供試菌とした。培地は 25% 海水—0.1% グルコース添加 Nutrient Broth（BBL）を用い、20、30 および 37°C での消長をしらべた。アデノシンリン酸量の測定は第 2 章・第 2 節と同様に行った。

### 結 果

中温非好塩性 *Pseudomonas* を至適温度（30°C）およびそれ以上（37°C）と以下の温度（20°C）で培養した場合の生育にともなうアデノシンリ



ン酸の消長を Fig.33、34 および 35 に示す。中温非好塩性 *Pseudomonas* を至適温度 (Fig.33) およびそれ以下 (Fig.35) と以上の温度 (Fig.34) で培養しても、いずれの菌株ともほぼ似たアデノシンリン酸の消長を示した。すなわち、いずれの菌株とも、培養中の各アデノシンリン酸の割合は AMP が最も高く、ADP または ATP がこれに次いだ。ADP と ATP の割合については、至適温度以下の温度 (20°C) ではこの両者でほとんど差がないか、むしろ ATP の割合が高かったが、至適温度 (30°C) およびそれ以上の温度 (37°C) では ADP の割合が高かった。またエネルギー充足度は、いずれの培養温度で培養した場合でも生育にともない変動したが、いずれの菌株とも通常 0.1 から 0.5 の範囲にあり、すなわち通常対数期初期でその値は最も高く、それ以降では漸減した。また、至適温度以上の温度ではエネルギー充足度は低下した。このような傾向は低温非好塩性 *Pseudomonas* の I 型菌に類似し、II 型菌の傾向からは異なった。

## 考 察

中温性 *Pseudomonas* の生育にともなうアデノシンリン酸の消長は低温性 *Pseudomonas* の I 型菌の消長とほぼ同様な消長を示し、II 型菌の消長とは著しく異なった。すなわち、エネルギー代謝の点から考えると II 型菌は I 型菌および中温性 *Pseudomonas* とは異なる特異な菌群であること、つまり II 型菌は I 型菌または中温性 *Pseudomonas* のいずれかが、高温環境または低温環境に適応した菌群であると推察された。

## 要 約

サバより分離した中温非好塩性 *Pseudomonas* を至適温度 (30°C) およびそれ以下 (20°C) と以上の温度 (37°C) で培養し、生育にともなうアデノシンリン酸の消長をしらべ、つぎの結果を得た。

至適温度およびそれ以下と以上の温度で培養しても、供試菌のすべ

てがほぼ同様のアデノシンリン酸の消長を示した。その消長は低温性 *Pseudomonas* の I 型菌とほぼ同様の消長を示し、II 型菌の消長とは著しく異なった。すなわち、アデノシンリン酸代謝から考えると II 型菌は I 型菌または中温性 *Pseudomonas* が高温環境または低温環境に適応した菌群であると推察された。

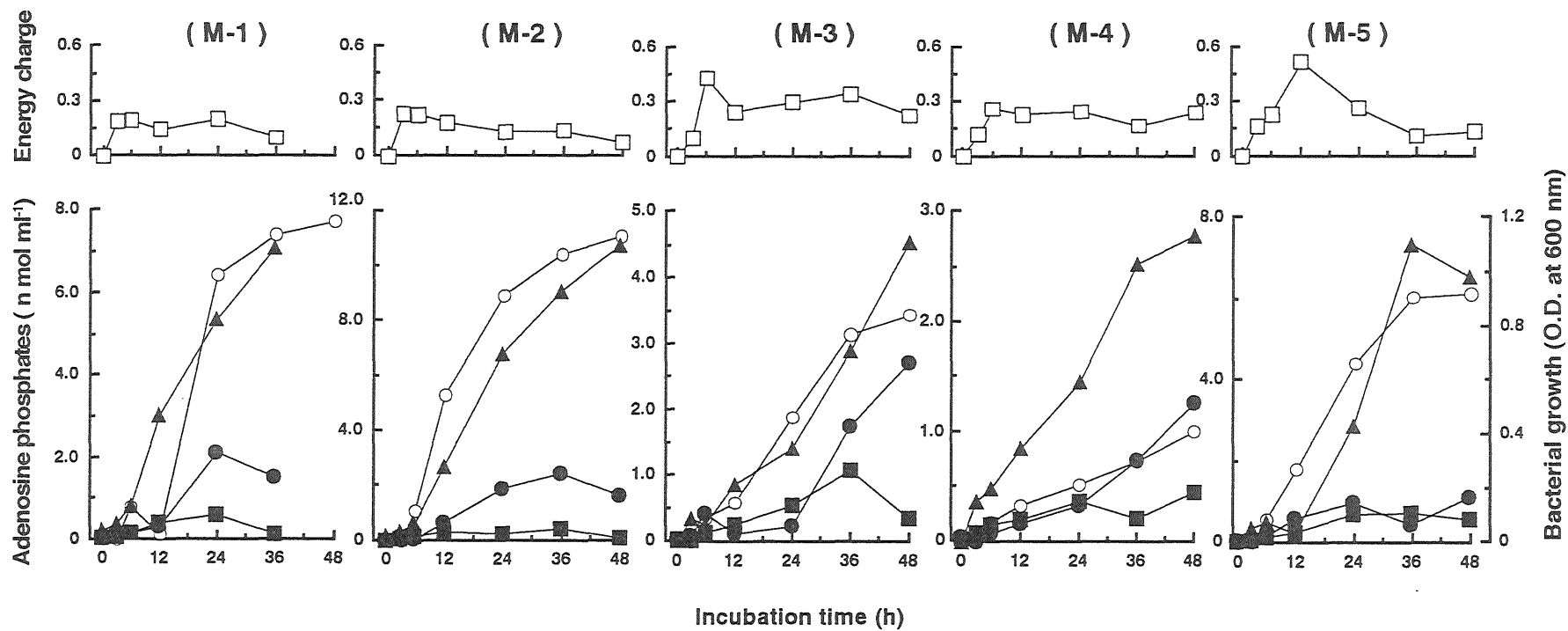


Fig. 33. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) of mesophilic *Pseudomonas* spp. having an optimum temperature of 30 °C during growth at 30 °C. Number in parenthesis shows strain number. Symbols: ▲ , AMP; ● , ADP; ■ , ATP; ○ , O.D.; □ , energy charge.

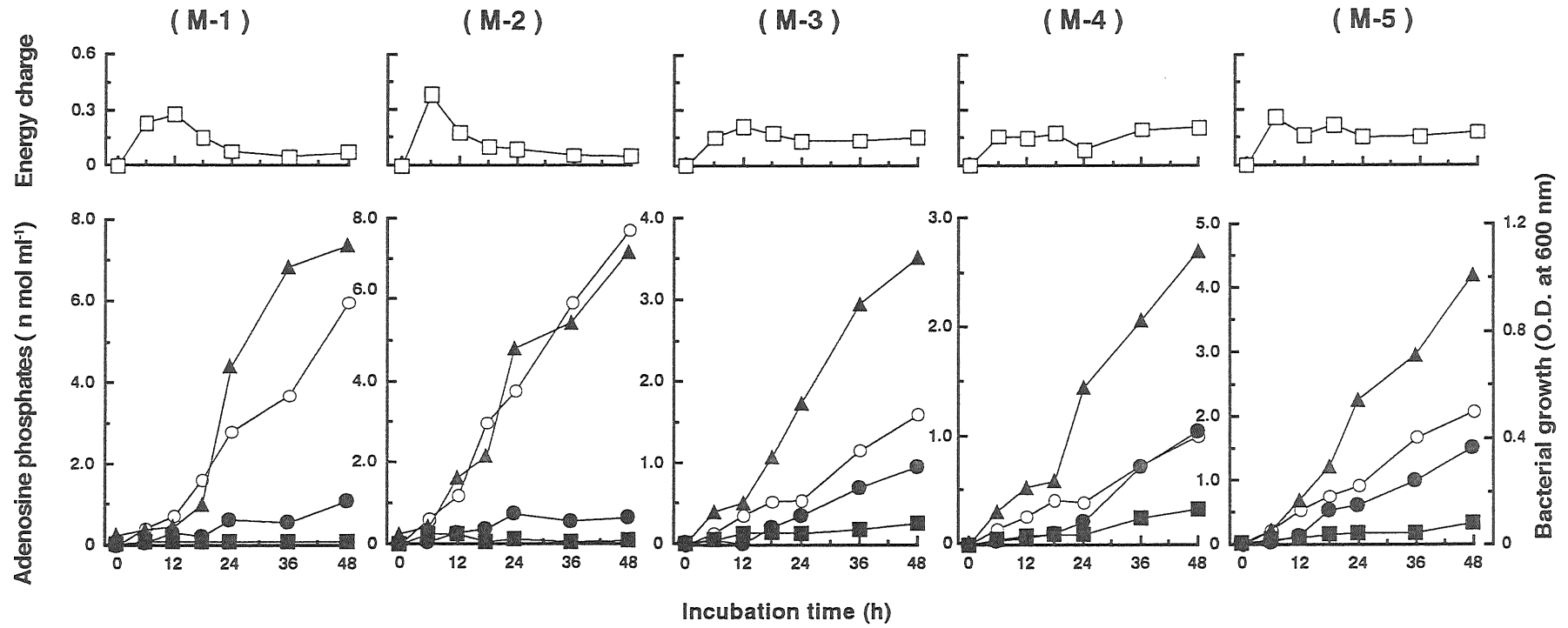


Fig. 34. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) of mesophilic *Pseudomonas* spp. having an optimum temperature of 30 °C during growth at 37 °C. Number in parenthesis shows strain number. Symbols: ▲, AMP; ●, ADP; ■, ATP; ○, O.D.; □, energy charge.

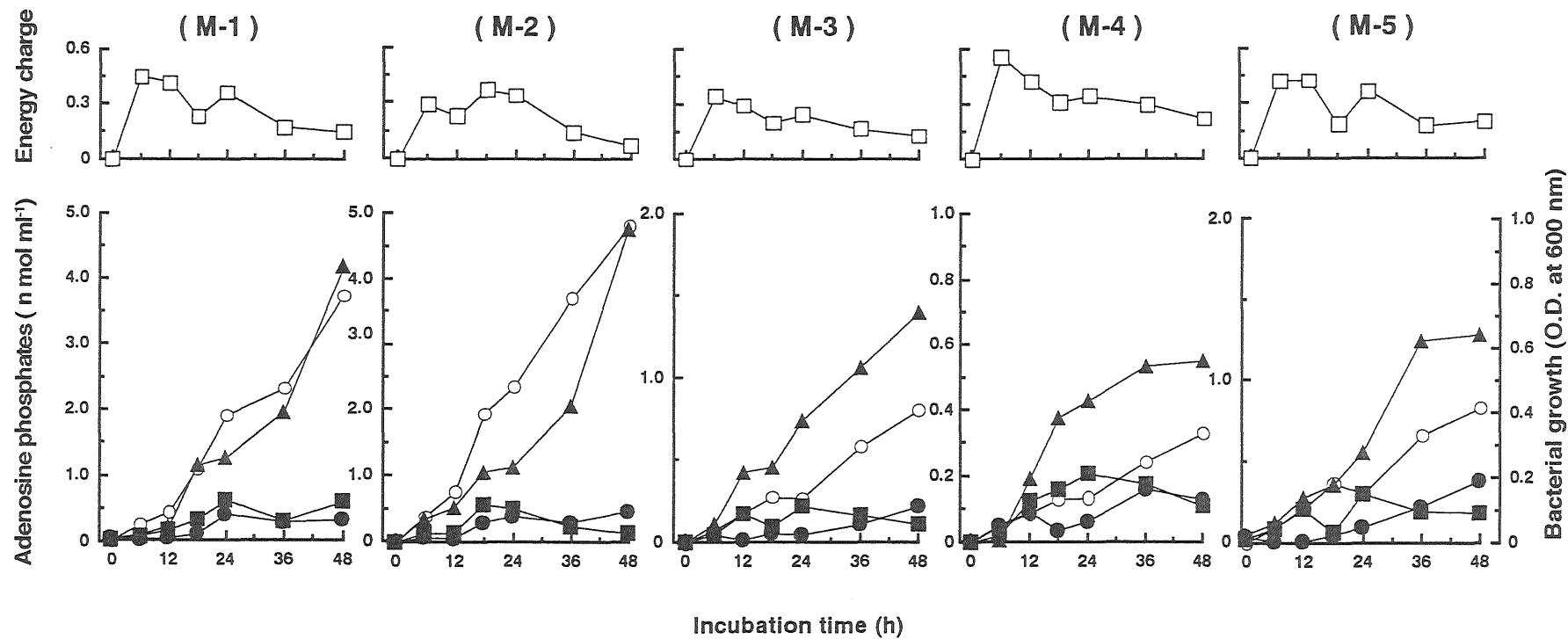


Fig. 35. Adenine nucleotide levels (the lower) and energy charge (the upper) of mesophilic *Pseudomonas* spp. having an optimum temperature of 30 °C during growth at 20 °C. Number in parenthesis shows strain number. Symbols: ▲ , AMP; ● , ADP; ■ , ATP; ○ , O.D.; □ , energy charge.

## 第4章 [<sup>3</sup>H] アデニンの核酸および核酸関連物質への取込み

低温非好塩性 *Pseudomonas* は至適温度および生育傾向の違いにより2つの菌群に分けられた。これらの菌群はアデノシンリン酸の構成および生育にともなうアデノシンリン酸の消長を異にした。これらの違いはアデノシンリン酸代謝の違いに基づくことが、要因の1つとして考えられた。ところでアデノシンリン酸代謝は核酸代謝とも密接に関連する。そこで今回は<sup>3</sup>Hアデニンを用い<sup>3</sup>Hアデニンの各アデノシンリン酸および核酸（DNAとRNA）への取込みを培養齢の異なる細胞を用いてしらべた。

なお、現在知られている、微生物におけるRNAおよびDNAへの細胞外アデニンの一連の代謝経路を次に示す。

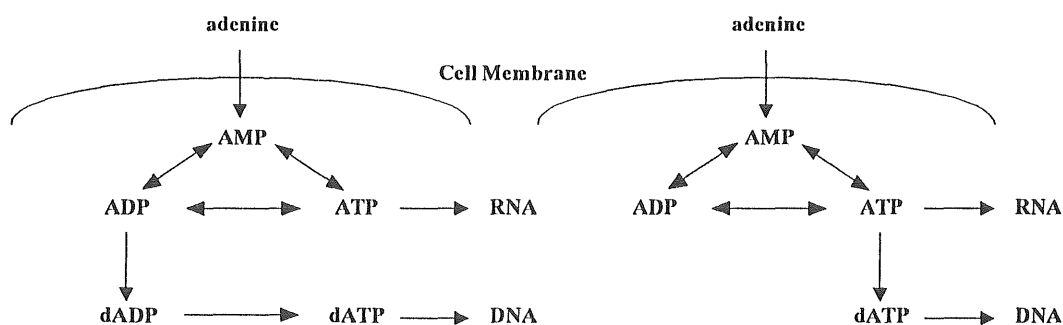


Fig. 36. Known pathways of the exogenous adenine into RNA and DNA of microorganisms.

### 材料と方法

**供試菌** 至適温度を20°CにもつI型菌と30°CにもつII型菌の各1菌株を供試菌とした。

**[<sup>3</sup>H] アデニンの取込み実験** 至適温度で培養したI型菌とII型菌の対数期初期、対数期中期、定常期および死滅期の培養液〔培地として25%海水—0.1%グルコース添加 Nutrient Broth (BBL) を用いた〕中に [<sup>3</sup>H] アデニン (10 $\mu$ Ci ml<sup>-1</sup>) を加え混ぜ合わせ、一定時間<sup>3</sup>Hアデニンを取込ませた。取込み終了後その半量 (0.5 ml) を煮沸したトリス塩酸緩

衝液 (4.5 ml) 中に入れ、取込みを停止し (アデノシンリン酸分析用試料)、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 (核酸分析用試料)。

アデノシンリン酸へ取込まれた [ $^3\text{H}$ ] アデニン量の測定  $^3\text{H}$  アデニンを添加した培養液とトリス塩酸緩衝液の混合液を  $40^\circ\text{C}$  で減圧乾燥し、これに ATP、ADP、AMP の等量混合液 (各 1 mM) を 0.05 ml 添加する。蒸留水の 0.15 ml で再懸濁した溶液を TLC 分析に供した。TLC 分析は 0.25 mm の微結晶セルロースの薄層を用い、0.75 M- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.4) の展開溶媒で行った。展開後、紫外線 (235 nm) で各アデノシンリン酸のスポットを確認し、0.7 M- $\text{MgCl}_2$  溶液を吹き付け、スポットをかき取った。これを 0.5 ml の  $\text{MgCl}_2$  溶液でアデノシンリン酸を溶出し、4.5 ml の液体シンチレーターを加え、シンチレーションカウンターで  $^3\text{H}$  アデニン量を測定した。

核酸に取込まれた [ $^3\text{H}$ ] アデニン量の測定  $^3\text{H}$  アデニンを添加した培養液とトリクロル酢酸との混合液 (1.0 ml) に DNA および RNA の各 1.0 mg を加え  $4^\circ\text{C}$  下に 1 時間放置し、核酸を抽出した。これを 15300 x g で 5 分間遠心沈殿した。得られた沈殿物を 5% の氷冷トリクロル酢酸で洗浄、同様に遠心沈殿し、この操作を 2 回繰り返す。この沈殿物をさらに氷冷 95% エタノールで洗浄、同様に遠心沈殿し、この操作を 2 回繰り返す。これに 1N- $\text{NaOH}$  の 0.4 ml を加え  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間放置し、その後氷中で急冷し 15 分間放置する。6N- $\text{HCl}$  5%-TCA の 0.1 ml を加え 10~15 分放置し、再度同様に遠心分離を行い、この上澄液を RNA 試料とした。沈殿物は氷冷 5% トリクロル酢酸で洗浄、同様に遠心沈殿し、この操作を 2 回繰り返す。氷冷 95% エタノールで洗浄、同様に遠心沈殿し、この操作を 2 回繰り返す。これに沸騰水中で加熱した 5% トリクロル酢酸 0.5 ml を加え、沸騰水中で 30 分間加熱する。再度、同様にして遠心分離を行い、この上澄液を DNA とした。両核酸試料に液体シンチレーターを加え、シンチレーションカウンターで  $^3\text{H}$  アデニン量を測定した。

## 結 果

培養齢の異なる I 型菌における、 $2\text{-}^3\text{H}$ アデニンの各アデノシンリン酸および各核酸への取込み結果を Fig.37 に示す。I 型菌では、 $^3\text{H}$ アデニンのアデノシンリン酸への取込みは、対数期初期 (A) では ADP へのその取込み量は AMP および ATP への取込み量に比べて極めて高く、また AMP と ATP とではその取込み量に著しい違いはみられなかった。また、いずれのアデノシンリン酸への取込み量とも、反応時間の延長にともなう違いはほとんどみられず、反応時間が長くなっても取込み量はほぼ一定であった。対数期中期 (B) では、ADP への取込み量が AMP および ATP への取込み量より高いことについては、対数期初期の場合と同様であったが、反応時間の延長にともない AMP および ATP への取込み量が増加した点で異なった (ADP への取込み量については反応時間が長くなってもその値にはほとんど違いがみられなかった)。定常期 (C) および死滅期 (D) では、各アデノシンリン酸ともその取込み量に著しい違いはみられず、しかもいずれのアデノシンリン酸とも反応時間の延長にともない、その取込み量は増加した。

一方、I 型菌における  $^3\text{H}$ アデニンの核酸への取込みについては、いずれの培養齢の細胞でも、RNA および DNA への取込み量は反応時間の延長にともない増加した。また、RNA への取込みに関しては、培養齢が増すにつれ、細胞数量は増加したが、RNA への取込み量は減少した。DNA への取込み量に関しては、細胞数を考慮に入れると培養齢による違いはないと言えた。なお、RNA への取込み量は DNA への取込み量より著しく高い値を示した。

培養齢の異なる II 型菌における、 $2\text{-}^3\text{H}$ アデニンの各アデノシンリン酸および各核酸への取込み結果を Fig.38 に示す。II 型菌では、 $^3\text{H}$ アデニンのアデノシンリン酸への取込みは、対数期初期 (A) では I 型菌と同様に、ADP への取込み量が AMP および ATP への取込み量に比べ極めて高く、また AMP と ATP の取込み量には著しい違いはみられず、さらにいずれのアデノシンリン酸への取込み量も反応時間の違いによる



差異はみられなかった。また培養齢が対数期中期（B）、定常期（C）および死滅期（D）と進んでも ADP と ATP への取込み量、および反応時間の延長にともなう取込み量にもほとんど違いがみられなかった。しかし、AMP への取込み量に関しては、対数期中期以降の細胞では、反応時間の延長にともない AMP への取込み量は増加し、また定常期以降の細胞では、反応時間の延長にともなう AMP への取込み量の顕著な増加が認められた。

一方、<sup>3</sup>H アデニンの核酸への取込みは、I 型菌と同様に、いずれの培養齢の細胞においても、反応時間の延長にともなう RNA および DNA への取込み量はともに漸増した。また RNA への取込み量は、培養齢が進むにつれて減少した。しかし、DNA の取込み量に関しては、細胞数を考慮すると、培養齢による違いは認められなかった。なお、RNA への取込み量は DNA への取込み量より著しく高い値を示した。

## 考 察

I 型菌では、対数期初期から中期にかけては ADP への取込み量が AMP および ATP への取込み量より極めて高く、したがって取込まれた <sup>3</sup>H アデニンは AMP を経由し、アデノシンリン酸としては主として ADP として保持されると考えられる。

また、I 型菌では対数期初期から中期にかけては、ADP は反応時間が延長されても取込み量はほぼ一定であったことから、これらの時期では ADP は細胞内には貯蔵されず、直ちに代謝されると考えられる。ところが、AMP と ATP に関しては反応時間の延長にともない、取込み量は増加し、したがってこれらのアデノシンリン酸は細胞内に貯蔵されると考えられる。定常期と死滅期ではいずれのアデノシンリン酸とも、取込み量にほとんど違いがみられず、また反応時間の延長にともない取込み量も増加した。これらのことは、この時期では <sup>3</sup>H アデニンが AMP、ADP、ATP に等しく取込まれ、しかも等しく貯蔵されていることを示唆する。すなわち、対数期初期から減速期にかけてはアデノシ

ンリン酸代謝は変動が大きく、それ以降では変動が少ない代謝をしていることを示す。ところで、生育にともなうアデノシンリン酸の消長も、対数期初期から減速期にかけては複雑な消長を示し、それ以降では変動が少なく、この点今回の結果とよく一致する。

ところで、I型菌での減速期以降の生育にともなうアデノシンリン酸の消長では、アデノシンリン酸量はAMP、ADP、ATPの順に高く、今回の取込みの結果ではAMP、ADP、ATPが等しく貯蔵されるとする結果とは異なった。これについては、今回の実験では生成直後は等しく貯蔵されたアデノシンリン酸は生命維持のために、利用率の高いものあるいは安定度の低いものから利用・分解され、利用率の低いものあるいは安定度の高いものが多く貯蔵された結果と考えられる。

一方、I型菌のいずれの培養齢の細胞とも、RNAおよびDNAへのアデノシンリン酸の取込み量は、反応時間の延長にともない増加し、すなわち、アデノシンリン酸として取込まれ、<sup>3</sup>Hアデニン主としてATPを經由してRNAおよびDNAへ保持されていることがわかる。とくに、RNAへの取込みに関しては、培養齢が増すにつれて取込み量は減じ、一方いずれのアデノシンリン酸への取込み量とも培養齢が増すにつれて増加し、したがってこれらのアデノシンリン酸への取込み量の増加についてはRNAの生成量の減少と関連すること、つまり過剰のATPがAMPおよびADPに転換した結果に基づくと考えられる。これについては、第3章・第4節の実験で、細胞内にATPを取り込むことで、AMPおよびADP量が著しく増加すること、またその増加量がほぼ同じであることから支持される。

II型菌については、対数期初期では、ADPへの<sup>3</sup>Hアデニンの取込み量がAMPおよびATPの取込み量より極めて高く、したがって<sup>3</sup>Hアデニンはアデノシンリン酸としては、主としてADPとして保持されると考えられる。また、この時期では反応時間が延長しても取込み量はほとんど変わらず、すなわちこの時期ではアデノシンリン酸はそのほぼすべてが代謝され、細胞内にはほとんど貯蔵されないと考えられる。以

上のことは I 型菌と全く同様で、したがって I 型菌と II 型菌ではアデノシンリン酸は同様にして代謝されると考えられる。

II 型菌では ADP と ATP への取込み量は培養齢が異なっても著しい変化はみられず、またいずれの培養齢の細胞でも反応時間の違いによる取込み量の違いもみられず、したがって ADP および ATP に関しては、培養齢に関係なく、生成されるこれらのアデノシンリン酸は貯蔵されることなく、そのすべてが代謝されると考えられる。それ故、生育にともなうアデノシンリン酸の消長試験でも、ADP および ATP はともに認められなかったと考えられる。なお、本実験で ADP および ATP が認められたことについては、必要量以上のアデニンが添加され、必要以上の ADP および AMP が生成されていることに因ると考えられる。

II 型菌での AMP への取込みは対数期初期を除き、いずれの培養齢の細胞でも反応時間の延長にともなう取込み量の増加傾向が認められた。すなわち、対数期初期を除く細胞では、アデノシンリン酸を AMP として貯蔵することを示す。それ故、生育にともなうアデノシンリン酸の消長試験でも AMP が認められたと考えられる。

一方、II 型菌での RNA および DNA への取込みは、いずれの培養齢の細胞とも反応時間の延長にともない取込み量は増加し、したがってアデノシンリン酸として取込まれた  $^3\text{H}$  アデニンは、主として ATP を経由して RNA および DNA として保持されることがわかる。とくに RNA への取込み量は定常期以降に減少し、一方 AMP への取込み量は定常期以降に激増し、すなわちこれについては活動の衰えた定常期以降に RNA への取込みが減じたことで、過剰の ATP が AMP として貯蔵したことによると考えられる。この考えは、第 3 章・第 4 節で述べたように、細胞中に ATP を取込むことで AMP 量が激増することからも支持される。

なお、II 型菌での生育にともなうアデノシンリン酸の消長試験では、活動が活発な対数期だけに AMP が認められた。これについては、通常の培養では対数期では異化作用が活発で、したがってこの時期では過剰の ATP が生成されることで AMP として貯蔵されたと考えられる。一

方、異化作用が衰え、同化作用が優先する定常期以降では過剰の ATP もなく、直ちに代謝されるため AMP の貯蔵もないと考えられる。

以上のように、I 型菌と II 型菌では、生成されたアデノシンリン酸は同様に代謝されるが、アデノシンリン酸の貯蔵機構は両者で異なると判断された。また両者間の生育にともなうアデノシンリン酸の消長の違いも、この貯蔵機構の違いでよく説明され、したがってこの消長の違いは貯蔵機構の違いがその一因と結論される。

## 要 約

低温性 *Pseudomonas* の I 型菌（至適温度 20℃）と II 型菌（至適温度 30℃）の異なる培養齢の細胞における [2-<sup>3</sup>H] アデニンのアデノシンリン酸への取込みをしらべ、つぎの結果を得た。

1) <sup>3</sup>H アデニンのアデノシンリン酸への取込みは、I および II 型菌とも対数期初期の細胞では、ほぼ同じ傾向を示した。すなわち ADP への取込みが AMP および ATP への取込みに比べて著しく高く、また AMP と ATP への取込み量にはほとんど違いがみられず、また両者とも反応時間による取込み量の違いもみられなかった。これらの結果は、I 型菌と II 型菌では生成されたアデノシンリン酸は同様に代謝されること、またいずれの菌株とも対数期初期では生成されるいずれのアデノシンリン酸とも直ちに代謝されることを示唆する。

2) I 型菌では、培養齢が進むにつれて、<sup>3</sup>H アデニンの各アデノシンリン酸への取込み量に差がなくなり、また反応時間にともなう取込み量は漸増した。これらの結果は、II 型菌では培養齢が進むにつれて、生成されるアデノシンリン酸はそのいずれも等しく貯蔵されるようになることを示唆する。

3) II 型菌では、培養齢が進んでも、ADP と ATP については反応時間による取込み量に違いはみられず、すなわち II 型菌では ADP と ATP は細胞内には貯蔵されず、直ちに代謝されることを示唆する。一方、AMP については培養齢が進むにつれて、反応時間にともなう取込み量は増

加し、したがって AMP については培養齢が進むにつれて細胞内に貯蔵されることを示唆する。

以上 2) と 3) より、I 型菌と II 型菌ではアデノシンリン酸の貯蔵機構に違いがあること、一方生育にともなうアデノシンリン酸の消長がこの貯蔵機構の違いでよく説明され、したがって両者の消長の違いはこの貯蔵機構の違いがその一因と結論された。

4)  $^3\text{H}$  アデニンの RNA および DNA への取込みは、I 型菌と II 型菌で類似の傾向を示した。すなわち、両者のいずれの培養齢の細胞とも、反応時間にともなう取込み量は RNA および DNA の両者とも漸増し、したがって  $^3\text{H}$  アデニンは RNA および DNA として保持されていることが示唆された。なお RNA への取込み量は DNA への取込み量に比べて著しく高かった。

5)  $^3\text{H}$  アデニンの RNA の取込み量は培養齢が進むにつれて低下し、逆にアデノシンリン酸への取込み量は増加し、すなわちこのアデノシンリン酸への取込み量の増加は RNA への取込み量の低下、すなわち過剰の ATP の貯蔵と関連すると考えられた。

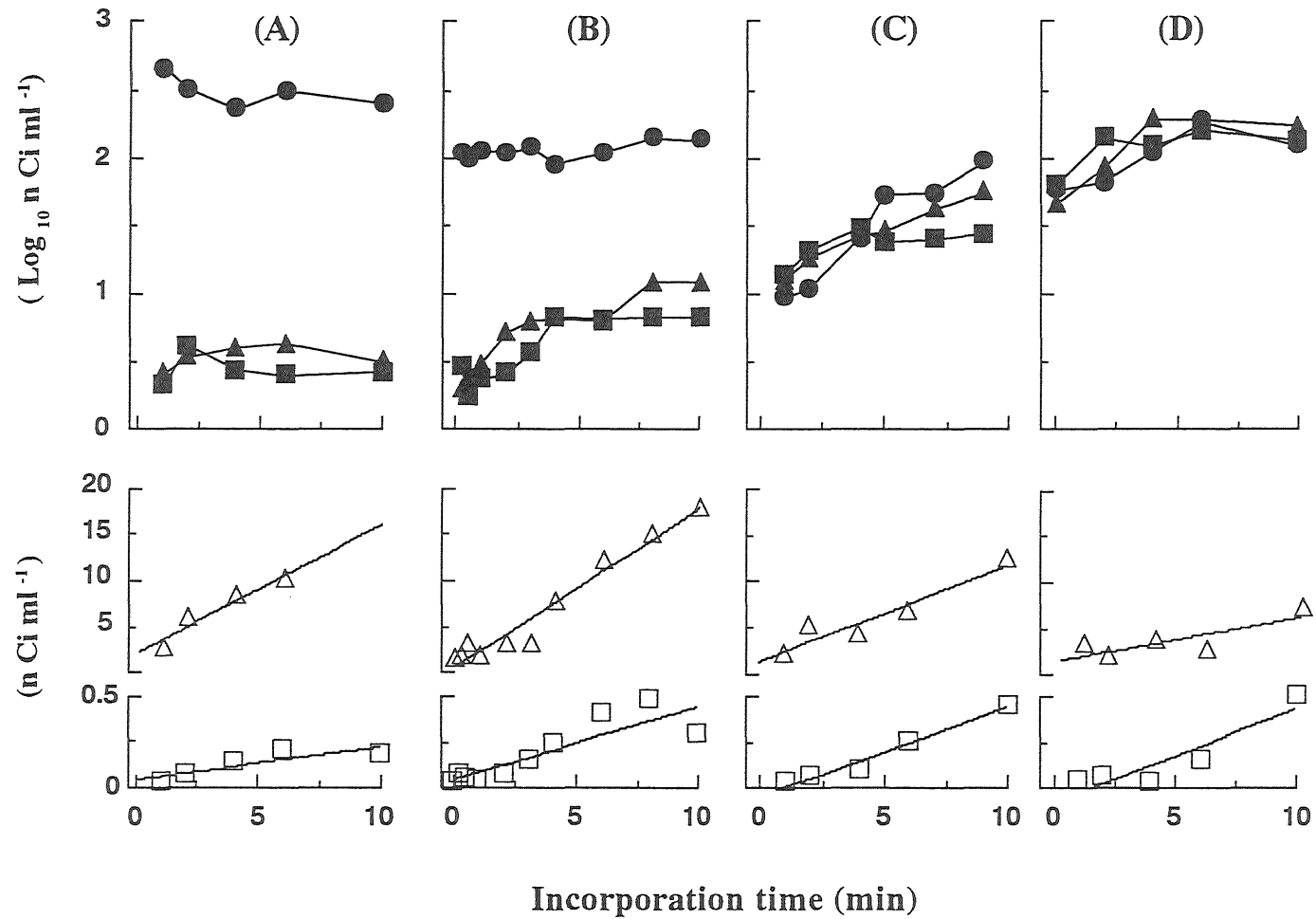


Fig. 37. Incorporation of  $[2\text{-}^3\text{H}]$ -adenine into adenine nucleotides (AMP, ADP, and ATP) and nucleic acid (DNA and RNA) in the cell of different culture ages of Type I strain (Strain 237): A, lag phase; B, logarithmic phase; C, stationary phase; D, death phase.

Symbols: ■, ATP; ●, ADP; ▲, AMP; □, DNA; △, RNA.

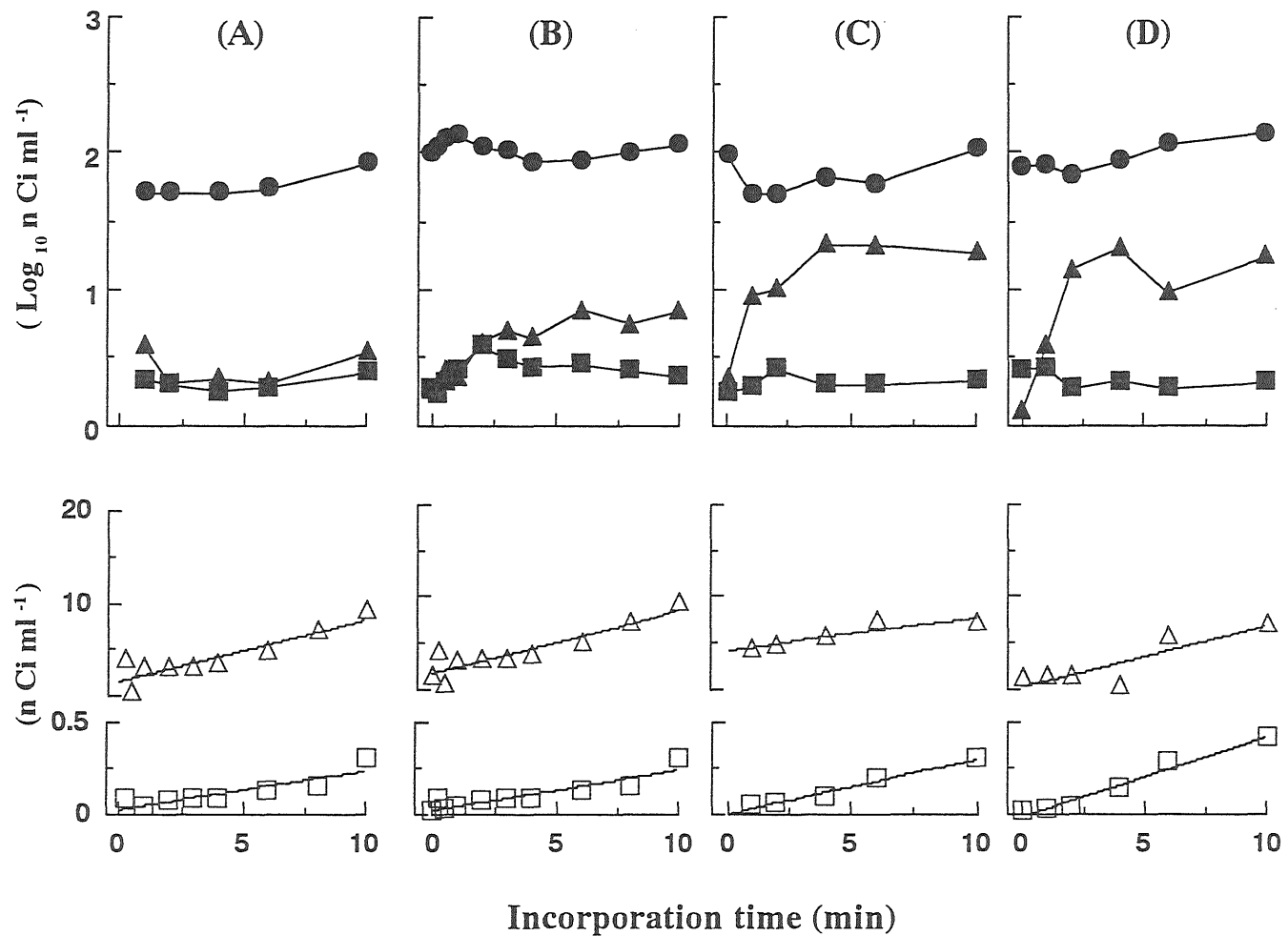


Fig. 38. Incorporation of  $[2-^3\text{H}]$ -adenine into adenine nucleotides (AMP, ADP, and ATP) and nucleic acid (DNA and RNA) in the cell of different culture ages of Type II strain (Strain 845) : A, lag phase; B, logarithmic phase; C, stationary phase; D, death phase. Symbols: ■, ATP; ●, ADP; ▲, AMP; □, DNA; △, RNA.

## 第5章 総括

微生物は基本的温度の違いにより、慣習的に低温・中温・高温微生物の3つに区分され、これらはさらに細分化される。この基本的温度は遺伝的に有している形質であるとの前提は一般に受け入れられている。しかし、低温細菌の細区分に関しては現在に至るまで様々な見解が出されているが、これは遺伝的根拠に基づいていないことにある。本研究は低温性 *Pseudomonas* の基本的温度に基づく区分と、この区分が遺伝的に有している形質の違いに基づくか否かをアデノシンリン酸代謝の研究を通して明らかにしようとするものである。

まず 0°C 下に貯蔵したサバの細菌フローラをしらべたところ、*Pseudomonas* または *Vibrio* が優占する場合があったが、*Vibrio* が優占する場合でも最終的には *Pseudomonas* が優占した。これら *Pseudomonas* のうち、0°C 下で生育できる *Pseudomonas* (以下低温性 *Pseudomonas* とする) の至適生育温度をしらべたところ、非好塩性菌では至適温度は 15~30°C の範囲にあり、好塩性菌では 30°C に同温度をもつ菌株はみられなかった。これら低温性 *Pseudomonas* の至適温度下での生育曲線を求めたところ、非好塩性菌については、至適温度を 25°C 以下と以上にもつ菌群で生育傾向を異にした。そこで、25°C 以下に至適温度をもち、生育傾向を同じくする低温非好塩性 *Pseudomonas* を I 型菌、他方 25°C 以上に至適温度をもち、生育傾向を同じくする同 *Pseudomonas* を II 型菌とし、以下の研究を行った。

まず、I 型菌と II 型菌の生理学的性状をしらべた。その結果、I 型菌と II 型菌ではグルコースの利用能、糖からの生酸能、ピルビン酸・コハク酸・イヌリン・吉草酸などの単一炭素源としての利用能および生育 pH などを異にし、両菌群は異なる物質代謝の機構をもつこと、およびエネルギー代謝の機構にも違いがあることが示唆された。

そこで次に、エネルギー代謝に最も重要な役割を演じるアデノシンリン酸の生育にともなう消長をしらべた。その結果、至適温度での培養中のアデノシンリン酸量は、I 型菌では AMP が最大値を示し、ADP がこれに次ぎ、ATP は最も少なかった。他方、II 型菌では ADP と ATP



はほとんど検出されず、そのほぼすべてが AMP で占められた。また生育にともなうアデノシンリン酸の消長は、I 型菌では AMP は生育曲線と比例的に上昇し、ADP は定常期付近までは上昇し、以降ほぼ一定となり、ATP は対数期のある時期まで上昇し、以降漸減した。他方、II 型菌の AMP は対数期に極大となり以降急減し、定常期には消滅した。以上の傾向は、物理的および化学的環境条件を異にしても根本的な違いはみられなかった。なお、培養上澄液中には各アデノシンリン酸とも少量にしか認められず、したがって培養中のアデノシンリン酸の大半は細胞内のアデノシンリン酸であると判断された。すなわち、I 型菌と II 型菌ではエネルギー代謝を異にし、したがってこの両菌群の異なる形質は遺伝的に有していると判断された。

以上のように、I 型菌と II 型菌ではアデノシンリン酸の構成および生育にともなうその消長に違いがみられた。この違いは両者のアデノシンリン酸の代謝速度および代謝機構の違いに起因すると考えた。そこで次に、アデノシンリン酸の前駆物質であるアデニンおよび各アデノシンリン酸の両者による利用状況と、またこの利用で細胞内のアデノシンリン酸の構成および生育にともなうその消長がどのように異なるかをしらべた。その結果、I および II 型菌ともアデニンの添加ではアデノシンリン酸の構成および生育にともなうその消長にはほとんど影響を及ぼさなかった。一方 I 型菌の AMP 添加培養では、加えた AMP は利用されなかったが AMP および ADP 量は増加し、とくに AMP 量の増加は顕著で、また ATP 量は変化しなかった。I 型菌の ADP 添加培養では、加えた ADP は徐々に利用され、またこの利用にともない AMP および ADP が増加し、とくに AMP の増加は顕著であった。I 型菌の ATP 添加培養では、加えた ATP は徐々に利用され、またこの利用にともない AMP と ADP がほぼ同程度増加した。他方、II 型菌では、加えた各アデノシンリン酸はともに急速に利用された。また、いずれのアデノシンリン酸を添加しても細胞内に ADP および ATP の存在は認められず、AMP の消長にだけ影響を与えた。すなわち II 型菌の AMP 添加培養では、AMP

量が多かった菌株ではその量は減少し、逆に AMP 量が少なかった菌株ではその量は増加した。II 型菌の ADP 添加培養では、AMP 量が多かった菌株ではその量は増加し、逆に AMP 量が少なかった菌株ではその量を減じた。II 型菌の ATP 量添加培養では、いずれの菌株とも AMP 量は著しく増加した。以上より、I 型菌と II 型菌ではアデノシンリン酸の代謝速度および代謝機構に違いがあり、またこの違いは両菌群間のアデノシンリン酸の構成および生育にともなうその消長の違いをよく説明するもので、したがって両菌群間のアデノシンリン酸の構成および生育にともなうその消長の違いはアデノシンリン酸の代謝速度および代謝機構の違いに因ると判断された。

以上のように、I 型菌と II 型菌のアデノシンリン酸の構成および生育にともなうその消長の違いについてはアデノシンリン酸の代謝機構の違いが要因の 1 つと考えられた。そこで次に、両菌群の培養齢の異なる細胞を用い、 $^3\text{H}$ アデニンのアデノシンリン酸および核酸 (RNA および DNA) への取込みを検討した。その結果、I および II 型菌とも対数期初期の細胞では  $^3\text{H}$ アデニンの ADP への取込みが AMP および ATP への取込みに比べて極めて高く、AMP と ATP への取込み量には違いがみられず、またこれらアデノシンリン酸のいずれもこの時期では貯蔵されずに代謝され、両者は生成したアデノシンリン酸を同様にして代謝していると考えられた。

一方、I 型菌では培養齢が進むにつれて、 $^3\text{H}$ アデニンはいずれのアデノシンリン酸にも等しく取り込まれ、これらのいずれも細胞内に貯蔵されたのに対し、II 型菌では培養齢が進んでも ADP および ATP には取込まれるがこれらは貯蔵されず、また AMP へ取込まれた  $^3\text{H}$ アデニンは貯蔵された。これらの結果は、I 型菌と II 型菌のアデノシンリン酸の構成および生育にともなうその消長の違いをよく説明した。したがって、両菌群間でみられたアデノシンリン酸の構成および生育にともなうその消長の違いは生成されたアデノシンリン酸の貯蔵機構の違いがその一因と判断された。

$^3\text{H}$ アデニンの RNA および DNA への取込みは、I 型菌と II 型菌で類似の傾向を示した。すなわち、両者のいずれの培養齢の細胞とも、 $^3\text{H}$ アデニンは RNA および DNA として取込まれたが、その取込み量は DNA に比べ RNA の方が極めて高かった。また、両菌株とも RNA への取込み量は培養齢が増すにつれて低下し、反面アデノシンリン酸への取込み量は増加し、すなわちこのアデノシンリン酸への取込み量の増加は RNA への取込み量の低下、すなわち過剰の ATP の貯蔵と関連すると考えられた。

ところで、微生物進化的には、まず高温細菌が発生し、続いて中温細菌、そして低温細菌が発生してきたものと考えられている。<sup>34)</sup> 今回、中温性 *Pseudomonas* の生育にともなうアデノシンリン酸の消長をしらべたところ、中温性 *Pseudomonas* のその消長は低温性 *Pseudomonas* の I 型菌とほぼ同様の消長を示した。したがって、II 型菌は中温性 *Pseudomonas* が低温環境に適応した菌群と考えられる。ところが、II 型菌では構成されるアデノシンリン酸のほぼすべてが安定度の高い AMP であること、I 型菌に比べ II 型菌のアデノシンリン酸の代謝速度は極めて速いこと、20°C に至適温度をもつ I 型菌を 30°C で培養すると II 型菌と類似のアデノシンリン酸の消長を示すこと、30°C に至適温度をもつ II 型菌を至適温度以下の温度で培養するとアデノシンリン酸量 (AMP 量) は増加すること、30°C に至適温度をもつ II 型菌を 20°C で培養しても生育量に違いがみられないこと、逆に 20°C に至適温度をもつ I 型菌を 30°C で培養すると生育量は著しく減少すること、好塩性 (おそらく海洋性) *Pseudomonas* では 30°C に至適温度をもつ菌群は認められないことなどから考えると、II 型菌はむしろ低温性 *Pseudomonas* が高温環境に適応した菌群であると考えた方が妥当である。

以上、I 型菌と II 型菌で異なる基本的温度 (至適生育温度) は遺伝的に有している形質であると結論した。また、II 型菌は低温菌が高温環境に適応した菌群であると推察された。

ところで、エネルギー充足度は、生育中の細胞では 0.8 で、0.5 以下では生命維持ができないとする考えが一般的に受け入れられているが、

今回の結果では、Ⅰ型菌については生育中の細胞で0.1~0.5の範囲にあり、またⅡ型菌については限りなく0に近い値を示し、従来の結果からは極めて異なった。

## 第6章 後 記

本研究の遂行にあたり、ご懇切なご指導とご鞭撻を賜りました長崎大学海洋生産科学研究科教授 森井秀昭博士に厚く御礼申し上げます。また、本論分の執筆にあたり、ご懇切なご助言をいただきました長崎大学海洋生産科学研究科教授 村松毅博士、同藤田雄二博士、同青柳東彦博士に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、貴重な御意見と多大なるご支援をいただきました長崎大学水産学部講師 笠間憲太郎先生に厚く御礼申し上げます。

## 第 7 章 文 献

- 1) D. A. Ratkowsky, J. Olley, T. A. Mcmeekin and A. Ball : Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.*, **149**, 1-5 (1982) .
- 2) J. Forster : Ueber einige Eigenschaften lechtender Bakterien. *Centralbl. bakteriolog. parasit.*, **2**, 337-342 (1887) .
- 3) S. Schmidt-Nielsen : Ueber einige psychrophile Mikroorganismen und ihr Vorkommen. *Eentr. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionsk. Hyg. Abt II.*, **9**, 145-147 (1902) .
- 4) G. J. Hucker : Low temperature organisms in frozen vegetable. *Food Technol.*, **8**, 79-108 (1954) .
- 5) J. L. Ingraham and J. L. Stokes : Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **23**, 97-108 (1959) .
- 6) A. H. Rose : Temperature relationships among microorganisms. *Wallerstein Lab. Commn.*, **25**, 5-18 (1962) .
- 7) J. L. Stokes : General biology and nomenclature of psychrophilic microorganisms, in " Recent Progress in Microbiology" (ed. by N. E. Gibbons) , Univ. Toronto Press, Tronto, 1963, pp.187-192.
- 8) R. Y. Morita : Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **39**, 144-167 (1975) .
- 9) 清水 潮 : 海洋微生物の生理 , 「海洋微生物とバイオテクノロジー」 , 技報堂出版 , 東京 , 1991, pp.51-67.
- 10) B. A. Law : Reviw of the progress of dairy science : Enzyme of psychrotrophic bacteria and their effect in milk and milk products. *J. Dairy Res.*, **46**, 573-588 (1979) .
- 11) W. H. Jeffrey and J. H. Paul : Activity of an attached and free-living *Vibrio* sp. as measured by thymidine incorporation, *p*-iodonitrotetrazolium reduction, and ATP / DNA ratio. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 150-156 (1986) .
- 12) C.O. Wirsén, H. Jannasch, S. Wakeham and E.A. Canuel : Membrane lipids of a psychrophilic and barophilic deep-sea bacterium. *Curr. Microbiol.*, **14**, 319-322 (1987) .
- 13) D. C. Arny, S. E. Lindow and C. D. Upper : Frost sensitivity in *Zea mays* increase by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature*, **262**, 283-284 (1976) .

- 14) 堀江進, 奥積昌世, 木村正幸, 堀江正光, 川前政幸 : 冷蔵海産魚の腐敗細菌 . 食衛誌 , 13, 410-417 (1972) .
- 15) N. Dyrset, G. Bentzen, T. Arnesen and H. Larsen : A marine psychrophilic bacterium of the Bacteroidaceae type. *Arch. Microbiol.*, 139, 415-420 (1984) .
- 16) J. M. Shewan, G. Hobbs and W. Hodgkiss : The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 463-468 (1960) .
- 17) G. H. Hansen and J. A. Olafsen : Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*hippoglossus hippoglossus*) eggs In marine aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1435-1446 (1989) .
- 18) M. Mandel, L. Lgambi, J. Bengendahl, M. L. J. Dodson and E. Scheltgen : Correlation of melting temperature and cesium chlorid buoyant density of Bacterial Deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 101, 333-338 (1970) .
- 19) 杉田治男, 店網秀男, 小橋二夫, 出口吉昭 : 沿岸二枚貝の細菌相 . 日水誌 , 47, 655 (1981) .
- 20) P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood and N. R. Krieg : Manual of Methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1981, pp. 1-524.
- 21) N.R. Krieg and J. G. Holt : Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore • London, 1984.
- 22) P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt : Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore • London • Los Angeles • Sydney, 1986.
- 23) 清水潮 : 海洋生物資源の探索と利用 , 「海洋細菌」 (内藤敦編) , シーエムシー , 東京 , 1986, pp. 69-82 .
- 24) R. Y. Stanier, N. J. Palleroni and M. Doudoroff : The Aerobic *Pseudomonas* : a Taxonomic Study. *J. Gen. Microbiol.*, 43, 159-271 (1966) .
- 25) D. M. Karl and Holm-Hansen : Methodology and measurement of adenylate energy charge ratios in environmental samples. *Mar. Biol.*, 48, 185-195 (1978) .

- 26) W. H. Mewengkang, 石本 亮, 笠間憲太郎, 森井秀昭 : 細菌培養液におけるアデノシンリン酸の分析法の検討, 長崎大水研報, 76, 7-14 (1995) .
- 27) D. E. Atkinson : The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochem.*, 7, 4030-4034 (1968) .
- 28) D. E. Atkinson : Regulation of enzyme functions. *Annu. Rev. Microbiol.*, 23, 47-49 (1969)
- 29) A. G. Chapman, L. Fall and D. E. Atkinson : Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.*, 108, 1072-1086 (1971) .
- 30) J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz and A. M. Weiner : Molecular biology of the gene, in " Coupled Reactions and Group Transfers", The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park • California • Reading • Massachusetts • Don Mills • Ontario Wokingham • U.K. • Amsterdam • Sydney • Singapore • Tokyo • Madrid • Bogota • Santiago • San Juan, 1987, pp. 163-174.
- 31) N. Nazly, I. S. Carter and C. J. Knowles : Adenine nucleotide pools during starvation of *Beneckea natriegens*. *J. Gen. Microbiol.*, 116, 295-303 (1980) .
- 32) D. F. Niven, P. A. Collins and C. J. Knowles : Adenylate energy charge during batch culture of *Beneckea natriegens*. *J. Gen. Microbiol.*, 98, 95-108 (1977) .
- 33) S. L. Kinniment and J. W. T. Wimpenny : Measurement of the distribution of adenylate concentration and adenylate energy charge across *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1629-1635 (1992) .
- 34) T. D. Brock : Life at high temperature. *Science*, 158, 1012-1019 (1967) .