

## 細菌培養液におけるアデノシンリン酸の分析法の検討

Mewengkang Hanny Welly\*<sup>1</sup>, 石本 亮\*<sup>2</sup>

笠間憲太郎, 森井 秀昭

Methodology for Adenosine Phosphate Determinations  
in Bacterial Culture

Mewengkang Hanny Welly, Ryo ISHIMOTO

Kentaro KASAMA, and Hideaki MORII

Method for determination of adenosine phosphates in environmental samples by Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> was reexamined. The results are as follows:

- 1) It is desirable that the sample for ATP determination which is put in proper quantity in a glass vial of the ATP photometer (Labo science, TD-4000) is determined by injecting luciferase reagent from the silinge of the photometer and that the light emitted in ATP determination is assayed by peak light emission.
- 2) It is necessary that commercial pyruvate kinase and myokinase (adenylate kinase) preparations for conversions of ADP and AMP to ATP are dialyzed for 5 h and that the myokinase after dialysis is immediately used because of the lability.
- 3) The conversions of ADP and AMP to ATP needed incubation at 30°C for 30 min.
- 4) It was able to determine AMP in substituting ADP for ATP which needs for AMP determination.
- 5) The light emitted in ATP determination decreased with increase of concentration of sea water in samples but the strength of the light emission was proportional to the concentration of ATP at the same concentration of sea water.
- 6) The conversions of ADP and AMP to ATP were not prevented in sea water samples of adenosine phosphates.
- 7) Some commercial beef extract contained considerable amount of AMP.
- 8) Adenosine phosphate concentrations were not able to determine correctly by using cells in bacterial culture.
- 9) In adenosine phosphate determinations by using the whole of bacterial culture, it is necessary that the analysis is immediately carried out after incubation and that the sampling from the culture define the point of it.
- 10) It was able to exactly and rapidly determine adenosine phosphates by calibration with standard solution of adenosine phosphates.

**Key words:** アデノシンリン酸の測定 adenosine phosphate determinations; 蛍光 luminescence; 細菌培養液 bacterial culture

最近, Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> は, 海水や細菌培養液における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), アデノシン三リン酸 (ATP)] の分析法を公表しているが, 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見られた。これらのことについては分析操作, 分析方法, 試薬の取扱いなどに問題があると考えられた。また, 細菌培養液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, したがってその培養下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。そこで今回は, Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> 法によるアデノシンリン酸の分析法の検討および細菌培養液におけるアデノシンリン酸量の測定法の検討を行った。

## 材料および方法

## 1. アデノシンリン酸の分析法の検討実験

## 1) ATPの分析法の検討実験

ATPの分析操作およびATP分析試薬として市販されているホタルの発光器からの抽出物 (ホタル抽出物, Sigma) の調製 (硫酸マグネシウムおよびヒ酸カリウム緩衝液で調製: ホタル抽出液) 後の安定性を検討した。

## (1) 分析操作の検討実験

ATP量はルシフェリンとルシフェラーゼを含んだホタル

\*<sup>1</sup> Faculty of Fisheries, Sam Ratulangi University, Kampus Unsrat, Manado, Indonesia

\*<sup>2</sup> 長崎大学海洋生産科学研究科 (〒852 長崎市文教町1-14)

抽出液にマグネシウムの存在下でATPを作用させ、発せられる蛍光の強度を測定して求めた。(Fig.1 参照)。Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> 法ではこの測定に際し、ATP 試料を測定機器 (Fig. 2 参照) のシリンジ側に入れるが、むしろキューベット側に入れる方が妥当と考えた。そのため、まずATP 試料をこのどちらに入れるのが妥当かを検討した。すなわち、Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> 法では、キューベット内にホタル抽出液の500 $\mu$ l を入れ、1  $\mu$ M-ATP 溶液の100 $\mu$ l がシリンジを通してキューベット内に注入されているので、これとは逆にキューベット内に1  $\mu$ M-ATP 溶液の100 $\mu$ l を入れ、ホタル抽出液の100 $\mu$ l をシリンジから注入する方法を検討した。

なお、蛍光強度の測定はピークの高さで求める方法と積分値で求める方法があるが、このどちらが正確な値を示すのかも検討した。

なおまた、同測定はシリンジ内の液をキューベット内に注入し、反応させ、発せられる蛍光の強度を測定するものであるが、Fig. 2 に示すように本機器のキューベットは非常に細長く、従ってキューベットに加わる液量によっては、瞬時に両液が混合できず、結果的に測定値にバラツキが生じること

が考えられた。そこで次に、このキューベットに加える液量についても検討した。すなわち、キューベット内に1  $\mu$ M-ATP の20-100 $\mu$ l を入れ、ホタル抽出液の100 $\mu$ l をシリンジから注入した。

(2) ルシフェラーゼ (ホタル抽出液) 活性の検討実験

市販のホタル抽出物を Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> 法に従い水溶液とし、4  $^{\circ}$ C 下に保存し、経日的に100 nM-ATP 溶液の測定を通して活性の変化をしらべた。

2) ADPおよびAMPの分析法の検討実験

ADP量の測定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量の測定はATPとマグネシウムの存在下でまずAMPをADPに換え、さらに前述のようにしてADPをATPに転換し、それらの量を求めた (Fig. 3 参照)。すなわち、ADPおよびAMPをATPに転換するための市販の酵素の使用方法、転換に要する時間および各アデノシンリン酸を単独または混合使用した場合の転換効果などを検討

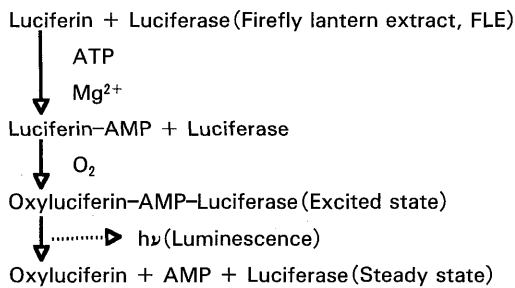


Fig. 1. Reaction system for luminometric ATP determination.

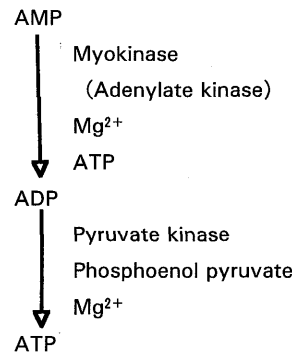


Fig. 3. Reaction system for enzymatic conversion of ADP and AMP to ATP.

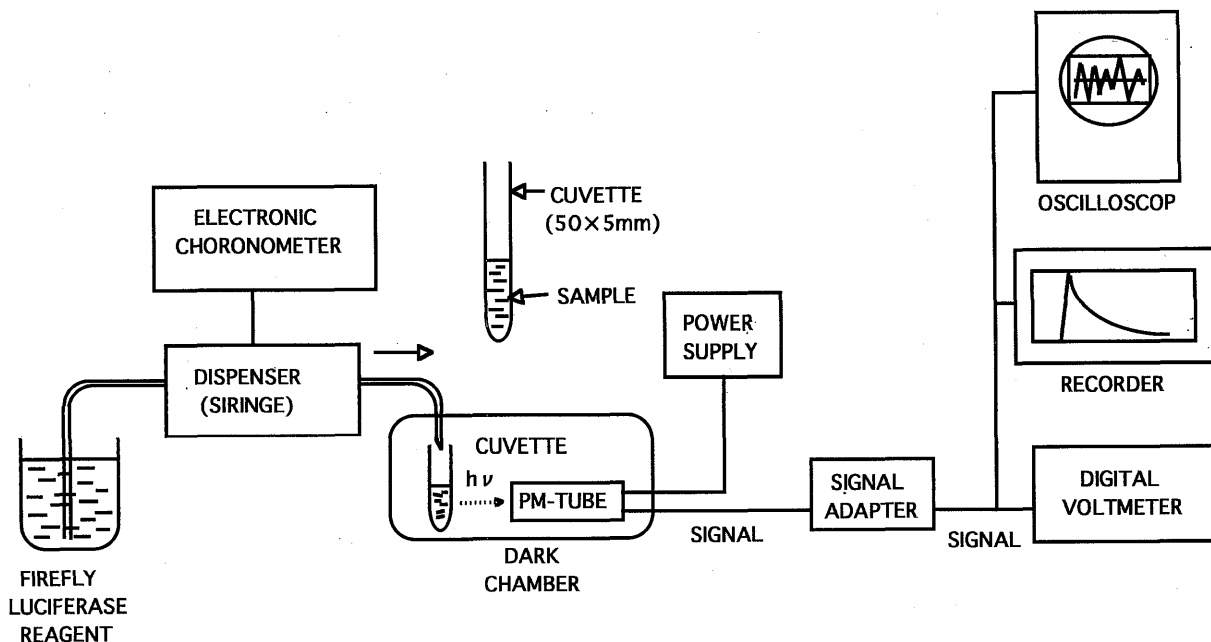


Fig. 2. Diagram for luminometric ATP determination.

した。

(1) 市販のピルベイトキナーゼおよびミオキナーゼの使用  
実験

Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> 法では、AMPの値がADPやATPの値より15%ほど低く測定されている。ところで、市販のピルベイトキナーゼ (Sigma) およびミオキナーゼ (Sigma) には安定剤として硫酸アンモニウムが添加されており、この安定剤がAMPの測定値を低下させる原因と考えた。そこで、市販の各同酵素液の1mlを50mMのリン酸緩衝液 (pH 7.3) 1lで透析し、その酵素活性を検討した。なお、試料にはATP、ATP+ADP (等モル混合液)、およびATP+ADP+AMP (等モル混合液) の100nM溶液を用いた。

また、透析後の各酵素の4℃保存中の活性を、ATP+ADP+AMP (等モル混合液) の100nM溶液を用いて、経時的にしらべた。

(2) AMPおよびADPからATPへの転換時間の検討  
実験

AMPおよびADPからATPへの転換実験は、ATP+ADP+AMP (等モル混合液) の100nM溶液を用い、Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> 法に従って、15分間隔で1時間、転換のための反応を行った。

(3) 各アデノシンリン酸を単独または混合使用した場合の  
測定法の検討実験

AMPからADPへの転換にはATPを必要とすること、またAMPからADP、ADPからATPへの転換は可逆反応であることなどから各アデノシンリン酸の存在状態で測定値が変わることが考えられた。そこで、ATP、ADP、AMP、ATP+ADP、ATP+AMP、ADP+AMP、ATP+ADP+AMPの100nM溶液について測定値を検討した。なお、混合液は等モル混合液とした。

3) アデノシンリン酸の標準曲線の作成法

AMP、ADP、およびATPについて、0-1000nMの範囲で試験した。

## 2. 細菌培養液におけるアデノシンリン酸の分析法の検討 実験

海洋細菌の培養には海水が使用される場合が多い。海水には種々の無機物質が高濃度で存在し、これら無機物質により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変わるか、また培地中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。

Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> は液体培養した細菌のアデノシンリン酸量を測定するについては培養液全体を用いて測定しているが、この他に海水中の微生物や液体培養した微生物についても、集菌した菌体を用いて測定する方法<sup>2-4)</sup> がある。そこでまず、この菌体を用いる方法の是非について検討した。

次に、培養液全体を用いて測定する場合の問題点について

検討した。まず、著者らが用いる培地には海水が使用されるので、測定値に及ぼす海水の影響について試験した。また、培地には牛肉エキスや酵母エキスが使用され、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。そこで次に、培地中のアデノシンリン酸量をしらべた。

また、細菌は閉鎖的な環境では培養にともない終には衰退・死滅し、沈澱する。したがって、同じ培養試験管内でもその部分により細菌数や細菌の活力が異なると考えられた。さらに、培養液は培養機器からそれを取り出すことで培養液の物理的および化学的状态を変え、したがってその状態の変動に伴って細胞の活力も変化すると考えられた。そこで、培養液の部分および培養機器からの培養液の取り出しでアデノシンリン酸の値がどのように変動するかもしらべた。

1) 培地の海水濃度の違いに伴う測定値の変動実験

0, 25, 50, 75%海水に各アデノシンリン酸の濃度が25, 50, 100, 200, 300  $\mu$ Mになるように溶解したアデノシンリン酸の混合液について試験した。

2) 培地中のアデノシンリン酸量の測定実験

通常、本研究に用いる50%海水-PYBG培地 [Bacto-Peptide (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50%海水-普通ブイヨン (BBLのNutrient Broth, pH 7.0) および50%海水にDifcoのBacto-Peptide 0.50%, 酵母エキス0.25%, または牛肉エキス0.25%を加えた溶液 (pH 7.0) のアデノシンリン酸量をしらべた。

3) 培養菌体を用いたアデノシンリン酸量の測定実験

*Escherichia coli* を普通ブイヨン (BBLのNutrient Broth) を用い、37℃で18h培養した培養液の各一定量をエッペンドルフの遠心機で遠心沈澱後、菌体からアデノシンリン酸を抽出するため、トリス緩衝液を加える。次に、この菌体をけん濁するが、このけん濁操作を爪楊枝を用いた場合と振とうした場合について検討した。

4) 培養液全体を用いたアデノシンリン酸量の測定実験

(1) 培養液の異なる部分における測定値の検討実験

*Escherichia coli* を普通ブイヨン (BBLのNutrient Broth) を用い、37℃で48h培養し、培養液の沈澱を除く部分と混合して沈澱を加えた培養について試験した。

(2) 培養液を異なる環境温度に放置した場合の測定値の  
検討実験

*Escherichia coli* を普通ブイヨン (BBLのNutrient Broth) を用い、37℃で24h培養後、培養液 (200ml) を室温 (20℃) に放置し、経時的にその一定量を採取し、各アデノシンリン酸量を測定した。

## 結 果

### 1. アデノシンリン酸の分析法の検討

1) ATPの分析法の検討

(1) 分析操作の検討

1  $\mu$ M-ATPがホタル抽出液と反応し、発せられる蛍光の強度の経時変化を Fig. 4 に示す。蛍光強度は反応直後が最も高く、時間とともに減少し、約4分30秒で蛍光は消滅した。

そこで, ATP量が $1\mu\text{M}$ 以下の蛍光強度を積分値で求めるときの時間は5分とした。

ATP溶液を測定機器のシリンジ側またはキューベット側に入れた場合の蛍光強度を, ピークの高さまたは積分値で求めた値を Table 1 に示す。ATP溶液をシリンジ側に入れた場合 (Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> 法) はキューベット側に入れた場合 (著者らの方法) に比べピークの高さおよび積分値での値ともバラツキが大きく, ATP溶液はキューベット側に入れた方が正確な値が得られた。また, 両操作の場合とも,

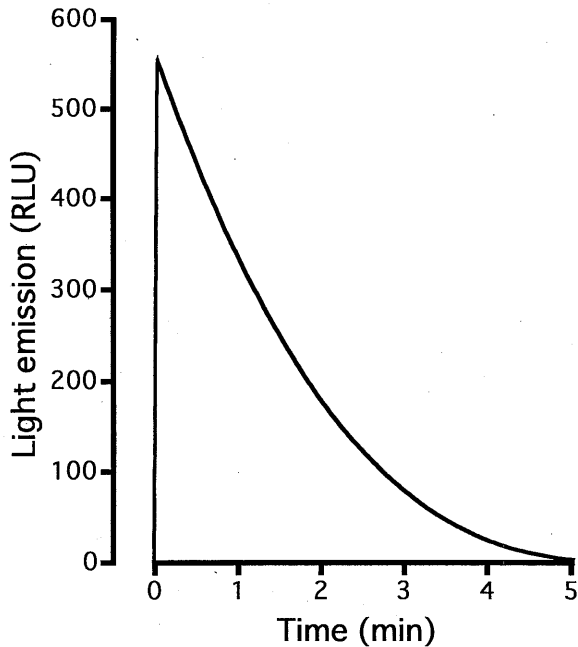


Fig. 4. Time course of light emission from  $1\mu\text{M}$  ATP with firefly luciferase.

Table 1. Comparison of peak light emission and integrated light flux measurement for quantitative ATP determinations by two methods

Procedure	Sample	Light emission (RLU* <sup>1</sup> )	
		Peak height	Integral
Karl & Holm-Hansen's method* <sup>2</sup>	a	545	$3.72 \text{ E}+04$
	b	593	$3.90 \text{ E}+04$
	c	631	$3.93 \text{ E}+04$
	d	655	$4.38 \text{ E}+04$
	e	689	$4.82 \text{ E}+04$
		$M=623\pm72$	$M=(4.15\pm0.55) \text{ E}+04$
Author's method* <sup>3</sup>	a	563	$5.35 \text{ E}+04$
	b	593	$5.63 \text{ E}+04$
	c	622	$5.91 \text{ E}+04$
	d	638	$6.07 \text{ E}+04$
	e	649	$6.15 \text{ E}+04$
		$M=613\pm43$	$M=(5.82\pm0.40) \text{ E}+04$

\*<sup>1</sup> Relative light unit.

\*<sup>2</sup> One micromolar ATP solution ( $100\mu\text{l}$ ) in syringe was injected into luciferase preparation ( $500\mu\text{l}$ ) in cuvette.

\*<sup>3</sup> Luciferase preparation ( $100\mu\text{l}$ ) in syringe was injected into  $1\mu\text{M}$  ATP solution ( $100\mu\text{l}$ ) in cuvette.

ピークの高さによる値と積分値での値は比例して増減した。ピークの高さによる値では, この両操作での値はほぼ一致したが, 積分値での値では著しく相違した。

シリンジから $100\mu\text{l}$ のホタル抽出液を加えた場合の, キューベットに加えるATP溶液量について検討した結果を Table 2 に示す。すなわち, ATP溶液 $20\mu\text{l}$ では $40\mu\text{l}$ 以上に比べ測定した蛍光強度の値が大きく, また $80\mu\text{l}$ 以上では逆にその値は小さく,  $40-60\mu\text{l}$ ではほぼ一定していた。したがって, キューベットに加えるATP溶液量は $50\mu\text{l}$ とした。

(2) ルシフェラーゼ (ホタル抽出液) 水溶液の活性の経時変化

ルシフェラーゼ水溶液の活性の経時変化を Fig. 5 に示す。活性は時間の経過に伴い直線的に減少した。なお, 活性は市販の製品の間でも著しく異なった。

Table 2. Effect of volume of ATP solution in cuvette on luminometric ATP determination

Volume of luciferase preparation ( $\mu\text{l}$ )	Volume of $1\mu\text{M}$ ATP solution ( $\mu\text{l}$ )	Peak light emission (RLU/ $\mu\text{l}$ ATP solution)
100	20	2.08
100	40	2.63
100	50	2.64
100	60	2.62
100	80	2.61
100	100	2.59

Luciferase preparation was injected into  $1\mu\text{M}$  ATP solution. RLU, relative light unit.

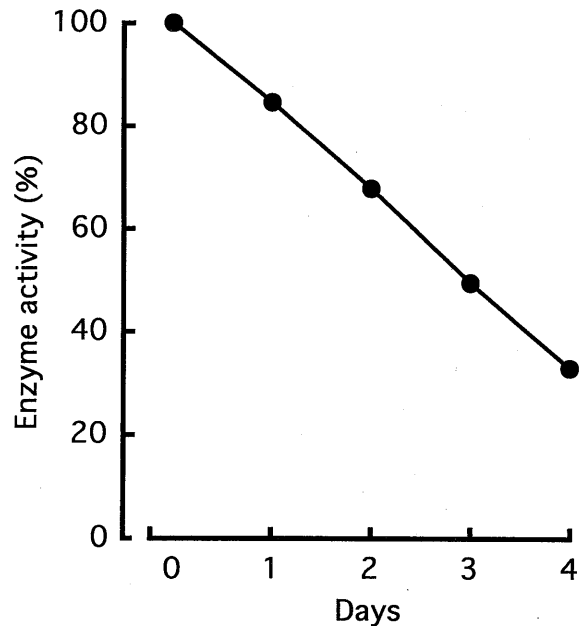


Fig. 5. Stability of firefly luciferase preparation during preservation at  $4^{\circ}\text{C}$  after reconstitution. The enzyme activity was estimated periodically by measuring peak light emission from  $100\text{ nM}$  ATP.

2) ADPおよびAMPの分析法の検討

(1) ピルベイトキナーゼおよびミオキナーゼ活性の検討

ピルベイトキナーゼおよびミオキナーゼを透析した場合の活性を Table 3 に示す。もし、酵素が完全に作用していると ATP, ATP+ADP, ATP+ADP+AMP の蛍光強度は同じ値となるが、透析していない市販品の酵素を用いた場合には、ATP+ADP の蛍光強度は ATP の強度の 77.3% で、すなわちピルベイトキナーゼの活性が不十分であること、また ATP+ADP+AMP の強度は ATP の強度の 35.8% しかなく、すなわちミオキナーゼは活性をほとんど示さなかったばかりか、ミオキナーゼ試薬を加えることでピルベイトキナーゼの活性をも阻害していることがわかる。そこで、これらの酵素を透析した結果、5 時間の透析で完全な活性を示すことがわかった。

透析したピルベイトキナーゼおよびミオキナーゼの 4℃ 保存下での活性の経日変化を Fig. 6 に示す。ピルベイトキナーゼ活性は保存中に変化しなかったが、ミオキナーゼ活性は時間経過に伴い漸減し、特に 2~3 日目にかけて減少傾向が大きかった。

(2) ADP および AMP からの ATP への転換時間

ATP, ADP, および AMP の等モル混合液にピルベイトキナーゼおよびミオキナーゼを加え、30℃ で反応させ、一定時間毎に測定した蛍光強度を Table 4 に示す。すなわち、ADP および AMP とともに反応時間が 30 分以上で値が一定となり、したがって ADP および AMP の ATP への転換には 30 分は必要である。

(3) 各アデノシンリン酸を単独または混合使用した場合の測定値の検討

各アデノシンリン酸を単独または混合使用した場合の、各アデノシンリン酸の測定結果を Table 5 に示す。ATP と ADP については単独でも、これらを混合しても、いずれの分析システム (Fig. 1 および 3 を参照) でも完全に分析がなさ

Table 3. Effect of dialysis on pyruvate kinase and myokinase activities

Adenosine phosphate	Peak light emission (RLU*1)			
	Not dialyzed enzyme	Dialyzed enzyme		
		1 h	3 h	5 h
ATP	14.70 (100*4)	ND	ND	ND
ATP+ADP*2	11.36 (77.3)	12.79 (87.0)	13.75 (93.5)	14.68 (99.9)
ATP+ADP+AMP*3	5.27 (35.0)	12.37 (84.1)	13.26 (90.2)	14.65 (99.7)

The mixture contains equimolecular adenosine phosphates (100 nM).

\*1 Relative light unit.

\*2 Pyruvate kinase was used for ATP plus ADP determination (See Fig. 3).

\*3 Pyruvate kinase and myokinase were used for ATP plus ADP plus AMP determination (See Fig. 3).

\*4 The numeral in parentheses shows percentage against the light emitted in ATP determination.

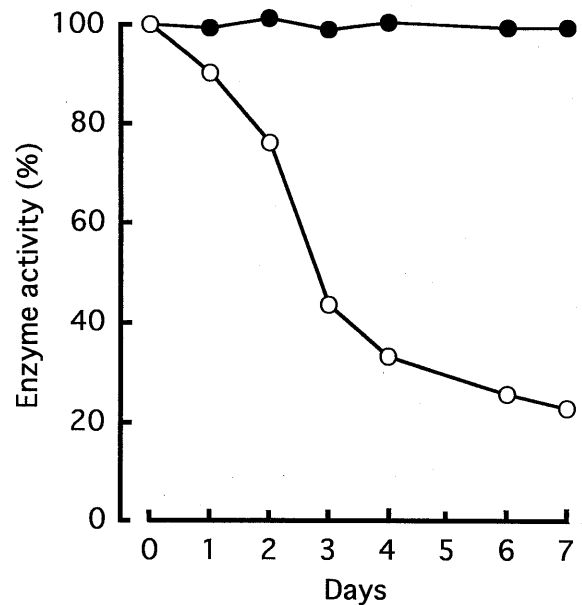


Fig. 6. Stability of pyruvate kinase and myokinase during preservation at 4℃ after dialysis. The relative activities of pyruvate kinase (●) and myokinase (○) were periodically monitored by estimating the conversion of 100 nM standard adenosine phosphates (ATP:ADP:AMP=1:1:1) to ATP.

Table 4. Effect of time during incubation at 30℃ on conversion of ADP and AMP to ATP

Incubation time (min)	Peak light emission (RLU)		
	ATP	ADP	AMP
15	5.97	5.74	5.83
30	5.99	5.99	5.98
45	5.99	5.97	5.99
60	6.01	5.97	5.99

The test for conversion of ADP and AMP to ATP was carried out using the mixtures of equimolecular ATP, ADP, and AMP (100 nM).

RLU, relative light unit.

Table 5. Determination of adenosine phosphates in singles or mixtures

Adenosine phosphate	Peak light emission (RLU)		
	Determination of analytical system of :		
	ATP	ADP	AMP
ATP	14.68	14.65	14.71
ADP	/	14.67	14.71
AMP	/	/	0.00
ATP+ADP	/	14.66	14.67
ATP+AMP	/	/	14.70
ADP+AMP	/	/	14.68
ATP+ADP+AMP	/	/	14.67

The mixtures contains equimolecular adenosine phosphates (100 nM).

RLU, relative light unit.

れた。しかし、AMPについてはATPまたはADPを単独で、またはこれらの混合物を加えることで分析が可能となった。

### 3) アデノシンリン酸の標準曲線

ATP, ADP, およびAMPの標準曲線を Fig. 7 に示す。すなわち、ATP, ADP, およびAMPともに同一直線を示し、AMPも100%の分析が可能となった。

## 2. 細菌培養液におけるアデノシンリン酸の分析法の検討

### 1) 培養液の海水濃度の変化に伴う測定値の変動

各アデノシンリン酸 (10 nM) の一定量を、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値を Table 6 に示す。ATP, ADP, およびAMPとも、海水濃度の増加に伴い測定値 (蛍光強度) は漸減し、とくにAMPは50%海水での減少傾向が大きかった。

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用い、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. 8 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

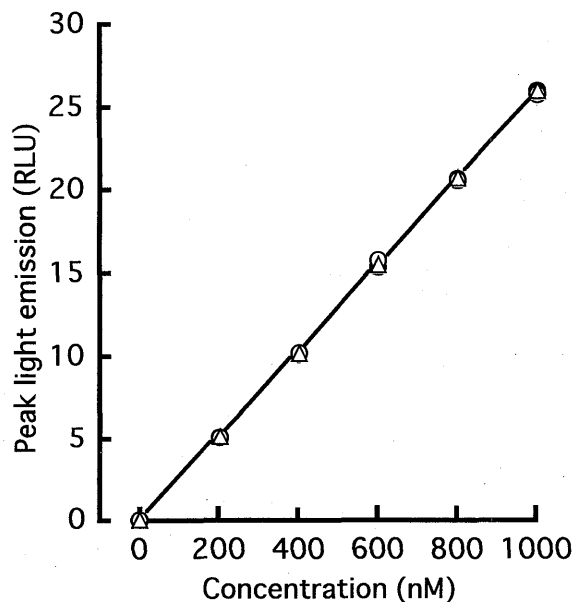


Fig. 7. Representative standard curves of ATP(●), ADP(○), and AMP(△).

Table 6. 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	38.5	35.5

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

お、各アデノシンリン酸についても、同傾向を示した。

### 2) 培地成分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 Table 7 に示す。Nutrient Broth (BBL) には ATP, ADP, および AMP とほとんど含まれなかった。PYBG 培地 (Bacto-Peptide, 酵母エキス, 牛肉エキスは Difco) 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。

培地の各成分中に含まれる各アデノシンリン酸量を Table 8 に示す。PYBG 培地の牛肉エキスに AMP が多量に含まれ、Bacto-Peptide 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。

### 3) 培養菌体を用いる分析法の検討

容積を異にした培養液の遠心沈殿後の菌体を、爪楊枝また

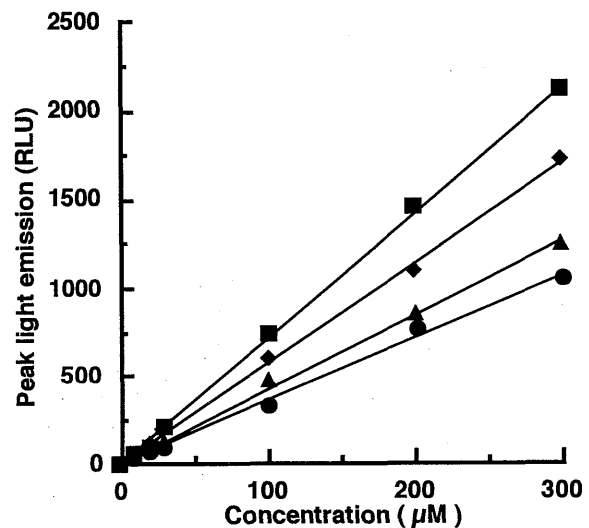


Fig. 8. Effect of sea water on adenosine phosphate determinations. The determinations were carried out using the mixture of equimolar ATP, ADP, and AMP which were dissolved in 0(■), 25(◆), 50(▲), and 75%(●) sea water. The representative curves were lined using the result from the total adenosine phosphate because each of equimolar adenosine phosphates showed the same light emissions. RLU, relative light unit.

Table 7. Adenosine phosphates in bacterial media using in our experiment

Adenosine phosphate	Concentration of adenosine phosphate (n mol/ml)	
	PYBG medium	Nutrient 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 as prescribed into 50% sea water.

Table 8. Adenosine phosphates in ingredients of PYBG medium

Adenosine phosphate	Concentration of adenosine phosphate (n mol/ml)		
	Bacto-Peptone	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-Peptone(Difco), 0.25% yeast extract(Difco), and 0.25% beef extract(Difco) was dissolved in 50% sea water.

Table 9. ATP determination by using the resuspended cells in *Escherichia coli* culture

Culture used (ml)	ATP (nM/ml culture)	
	Resuspended with toothpick	Resuspended by shaking
0.5	9.73	0.59
1.0	4.76	0.52
1.5	10.67	0.63

The culture was incubated with Nutrient Broth (BBL) at 37°C for 18 h.

The cells were collected by centrifugation and then resuspended in Tris buffer (0.02 M, pH 7.75) with toothpick or by shaking.

Table 10. ATP determination by using the whole in *Escherichia coli* culture

Sample	ATP (pM/ml culture)	
	Shaked	Not shaked
a	453.2	86.1
b	405.2	70.1
c	447.8	72.5

The culture was incubated with Nutrient Broth (BBL) at 37°C for 48 h.

Table 11. Change in concentration of adenosine phosphates in *Escherichia coli* culture with standing at room temperature after incubation at 37°C

Time elapsed (min)	Temperature of culture medium (°C)	Adenosine phosphate (pM/ml culture)		
		ATP	ADP	AMP
0	36	49.6	359.7	340.0
5	33	30.0	333.3	327.5
10	30	18.7	271.2	262.8
15	28	9.3	250.5	257.0
20	26	7.5	245.8	202.9
30	25	6.6	247.7	161.4
40	23	5.6	244.8	159.4
60	21	4.6	242.9	157.5

The culture was incubated with Nutrient Broth (BBL) at 37°C for 24 h.

は振とうによりけん濁液とした場合のATP量をTable 9に示す。爪楊枝でけん濁した場合は振とうした場合に比べその値は著しく高く、またいずれの方法でけん濁した場合でも培養液量と測定値の間に比例関係は見られなかった。

#### 4) 培養液全体を用いる分析法の検討

(1) 培養液を振とうした場合と振とうしない場合の測定値 *Escherichia coli* を37°Cで48h 静置培養した培養液を振とうまたは振とうしない場合のATP量をTable 10に示す。すなわち、培養液を振とうした場合はしない場合に比べATP量は著しく高かった。

(2) 培養液を培養温度と異なる温度に放置した場合のアデノシンリン酸量の変動

*Escherichia coli* を37°Cで24h 静置培養後、培養液を室温に放置した場合の、放置時間に伴う各アデノシンリン酸量の変動をTable 11に示す。すなわち、放置した初めの15分間に各アデノシンリン酸ともその値は急減し、以降漸減した。

## 考 察

ATPを分析する場合、ATP試料はシリンジ側より反応容器としてのキューベット側に入れた方が良い結果が得られたが、分析操作から考え当然の結果と思われる。なお、この場合、積分値で求めた値に大きな違いが認められたが、この理由は明かでない。また、ATP溶液をキューベットに入れる量が40-60  $\mu$ l でほぼ一定の値が得られ、それ以下でも以上でも良好な結果が得られなかった。これについては、特に以上の場合には容量が多過ぎて混合が不十分であったことに因ると考える。

ルシフェラーゼ水溶液の活性は経過時間とともに減衰し、また市販の製品ではその活性は著しく異なった。すなわち、本分析を行うについては、必ずATP標準物質を使用し、またできるだけ短時間に分析を行う必要がある。また、その分析は前記のことを考慮に入れると、測定時間を1秒間とし、ピークの高さにより測定することが望ましい。

Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> のアデノシンリン酸の分析法ではAMPについては100%測定できない。この理由については明かでないが、今回の著者らの実験では、特にAMPをADPに転換するためのミオキナーゼが、市販品のままでの使用では活性をほとんど示さず、またこのミオキナーゼ試薬を加えることでピルベートキナーゼ活性をも阻害させたこと、また透析することで本酵素の活性が得られたが、透析にはかなり長時間を要したことなどから考えると、硫酸アンモニウムのみならず、ミオキナーゼの純度が一因とも考えられる。なお、透析後のミオキナーゼ活性は低温下でも急減し、したがって透析後はできるだけ速やかに使用する必要がある。

Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> はAMP量の測定には一定量のATPを加えているが、ADPでもその効果には違いがないこと、また生物ではATPおよびADPのどちらをも欠くことは考えられないことなどから、生物試料を測定するについてはこれらの添加は必要ないものと考えられ、事実これまで数多くの培養試料の測定で、AMPが測定できなかったことはなかった。

海洋性細菌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伴う測定値の低下はATP量の測定に影響を与えていることになる。なお、50%海水ではAMPの値がATPおよびADPの値に比べて低かったが、この理由は明かでない。一方、各濃度海水の場合とも、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、同時に標準物質をも測定することで定量が可能となる。また、培地には特に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、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、使用培地には十分な配慮を必要とする。

海水中の微生物や液体培養した微生物のアデノシンリン酸量を測定するについては、菌体を用いて測定した報告<sup>2-4)</sup>もあるが、今回の結果からは菌体を用いた測定では培養の真の状態を知ることは出来ないことが分かった。また、培養液全体を用いて分析する場合でも、培養機器から培養液を取り出すと値は変動し、したがって培養液を取り出した後では直ちに分析する必要がある。また、培養液は沈査を含む場合と含まない場合で測定値が著しく変わることから、試料の採取は厳密に規定して行う必要がある。

#### 要 約

Karl & Holm-Hansen<sup>1)</sup> によるアデノシンリン酸の分析法と細菌培養液における同物質の測定法を検討し、次の結果を得た。

- 1) ATPの分析に際しては、ATP試料は測定機器のキューベット側に適量を入れ、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) 培地の海水濃度の増加に伴い、ATP測定に伴う蛍光の強度は低下したが、同濃度の海水ではアデノシンリン酸量と測定値は正の相関を示した。
- 6) ADPおよびAMPからATPへの転換は海水試料でも影響はないと考えられた。
- 7) 培地成分の牛肉エキスには、特にAMPが多く含まれるものがあった。
- 8) 培養液のアデノシンリン酸量を測定するについては、菌体を用いる測定では正しい値を得ることができなかった。
- 9) 培養液全体を用いる測定でも、培養液の部分、培養後に培養温度と異なる温度環境に置くことで測定値が著しく異なった。
- 10) 以上の点を考慮し、また測定に際しては各アデノシンリン酸の標準物質を用いることで、迅速に正確に分析することができる。

#### 文 献

- 1) D. M. Karl and O. Holm-Hansen : Methodology and measurement of adenylate energy charge ratios in environmental samples. *Mar. Biol.*, **48**, 185-197 (1978).
- 2) O. Holm-Hansen and C. R. Brooth : The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.*, **11**, 510-519 (1966).
- 3) O. Holm-Hansen : Determination of microbial biomass in ocean profiles. *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 740-747 (1969).
- 4) O. Holm-Hansen, C. R. Goldman, R. Richards, and P. M. Williams : Chemical and biological characteristics of a water column in lake Tahoe. *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 548-562 (1976).