Micrococcus glutamicus の細胞学的研究

第3報 極顆粒とリン酸含量の関係

および有機酸酸化能について

板 垣 史 郎*

Shiro ITAGAKI*: Cytological Studies on *Micrococcus glutamicus*.

Part III. On the Relationship between the Polar Granules

and Phosphate Content, and Oxidative Activity of the

Polar Granule on Several Organic Acids.

1959 年 12 月 3 日受付

緒 言

Micrococcus glutamicus の形態的諸性状についてはすでにのべた^{1,2)}。その際、ある培養条件のもとでは、極在性の顆粒が明瞭に形成され、しかも、この顆粒は、いわゆる metachromasy をしめし、菌体構成上特異なものであることを指摘した。

すでにこのような菌体内顆粒については相当多くの菌種について知られている。とくに著明なものとして、*Corynebacterium diphtheriae* について、Ernst³⁾、Neisser⁴⁾ および Babes⁵⁾ が早くから認めている。その他にも Meyer⁶⁾ は Yeast 中にも同様な顆粒をみとめた。このような顆粒は、metachromasy を示すことから、metachromatic granule (以下 m. granule) とよばれているが Babes-Ernst granule, voluting granule などともいわれる。その後、*Aspergillus*⁷⁾、*Mycobacterium*⁸⁾、*Aerobacter*⁹⁾、*Cloaca cloacae*¹⁰⁾、*Salmonella paratyphi B*¹¹⁾ および *Micrococcus lysodeikticus* などをはじめ、多くの菌についても知られるようになった。著者も数種の *Corynebacterium*、*Brevibacterium* および *Micrococcus* などにおいて認めている。この顆粒の本態については、はじめ Piekarski¹²⁾ や Knaysi および Mudd¹³⁾ は、核あるいは核酸と考え、また Mudd¹⁴⁾ はその後 mitochondria であると主張した。

一方、この顆粒は、醋酸鉛染色による phosphate granule と一致し¹⁵⁾、また培養条件によって無機直鎖のポリリン酸量と顆粒の発現が平行関係を示すことが Wiame、Lefebvre^{16,17)} および Mudd^{18,19)} らによって明らかにされた。さらに電子顕微鏡的にも同一菌体について electron dense granule と metachromatic granule が同一のものであることが証明されている^{20,21)}。

このような事実を総合して、今日では metachromatic granule は、ポリリン酸を主成分とすることは、ほとんど確実といってよいであろう。

以上のごとき文献的考察と、*M. glutamicus* の極顆粒に関する既報のごとき観察より、本菌の顆粒もポリリン酸顆粒であろうと想像される。菌体中の、このような無機性のポリリン酸が、一体いかなる生理的意義をもつものであるか、ということについては、未だ完全に明白になっているとはいえないが、吉田氏²²⁾ は第1図および第2図に示すごとく、リン酸代謝経路と菌体分裂の関係をしめしている。

すなわち、菌体内で、ATP、ADP、polyphosphate および orthophosphate は、動的平衡にあり、energy-supplying reaction によって、ortho-P は、ADP と結合して ATP となり、逆に energy-requiring reaction ではこの反対の左の方へ平衡点が移動する。

このように poly-P は ADP にそのリン酸基を移すことによって energy 供給源となり、RNA などのリン酸供給源となる。

かくの如く、リン酸の菌体内における意義はきわめて大きいことより、本 *M. glutamicus* において、

* 協和醸酵工業株式会社東京研究所 Tokyo Research Laboratory, The Kyowa Fermentation Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan.

第1図 菌体内のリン酸代謝経路 (吉田²²⁾) 第2図 菌体の生長とポリリン酸の消長 (吉田²²⁾)

m. granule の発現とポリリン酸量の関係, m. granule をもつ菌体と, しからざる菌体とのリン酸量の比較, および種々の enzymatic activity との関係を追求する目的で実験をおこなった。

実験と結果

使用菌株 *Micrococcus glutamicus* 541

1. Metachromatic granule 形成培地の決定

合成培地において培養初期に m. granule の発現を認めたが, さらに培養を進めると, 菌体が充実し, 不整桿菌形態を呈する時期に一致して消失し, 染色, 電顕共に認められなくなる。ここにおいて m. granule 研究の第一歩として菌体に多数の m. granule を形成させる培養条件を決定しようとした。

実験方法

培地は前培養のために glucose bouillon, 本培養には第1報¹⁾に示した合成培地を基本組成とした。

各培地成分, 植菌量, pH などを種々変え, 培養を経時的に観察し m. granule 形成の有無多寡を検討した。

結果

精細な記述は省略するが, 一般に合成培地では

m. granule の形成は不安定な結果を示し, 再現性にとぼしい。しかし, KH_2PO_4 および K_2HPO_4 をおのおの 0.5~1.0 % 程度に増加した場合, 菌形は, 肥大不整桿菌形態を示し, 多細胞菌体となり, 好塩基性が強まるにもかかわらず, m. granule の形成は明瞭である。

一方 *M. glutamicus* 534 においては, glucose bouillon では既報¹⁾のごとく m. granule の形成は比較的まれであったが, 541 株では glucose bouillon においてもかなり良好な m. granule 形成をしめす。しかし, これにさらに KH_2PO_4 および K_2HPO_4 を各 0.25 % ずつ添加することにより形成は, いちじるしく安定になり, 多数しかもかなり大きな m. granule を形成する。このことより, リン酸添加培地を P-GPM 培地〔添加しない培地を GPM (glucose, peptone, meat-ext. の略) 培地と称する〕と呼称し, 後の実験に用いることにした。

2. 菌体のリン酸量について

GPM および P-GPM 培地に培養した菌体内のリン酸化合物の量を分割定量し比較した。この結果, P-GPM 培地で培養した m. granule 形成菌体には acid insoluble polyphosphate が非常に多いことがわかった。

実験法

GPM および P-GPM 培地に2日間 28° に培養した *M. glutamicus* 541 の菌体を遠沈集菌し, 冷生理食塩水にて3回洗滌後リン酸化合物の分割定量をおこなった。分割方法は Mudd, Yoshida および Koike¹⁹⁾ の方法に準じた。第3図にその大要を示した。無機リン酸は高橋法²³⁾, その他のリン酸は Allen 法²⁴⁾, DNA-P は diphenylamine²⁵⁾ 反応, RNA-P は Orcinol²⁶⁾ 反応により定量した。また窒

第3図 リン酸化合物の分劃定量

第1表 リン酸量の比較 (表中の値は, すべて菌体 N 1 mg 中に含まれるリン酸化合物の含量を P の γ 数で示した)

区分 培地	全 P	酸 可 溶 性 P			リピド P	酸 不 溶 性 P		
		オルト P	acid labile P			RNA P	DNA P	ポリ P
			ポリ P	それ以外				
GPM	320.0	19.4	trace	55.7	21.4	115.1	17.4	0.6
P-GPM	251.7	15.0	trace	40.6	22.0	96.8	13.0	18.2

素の分析は滴定法²⁷⁾によった。

結 果

それぞれの分劃処理操作についてあらかじめ充分検討を加えた上で分劃定量を行なった結果を第1表に示した。これによると acid insoluble poly-P を除いた各リン酸量は, GPM および P-GPM 各培地

に培養した菌体間に大きな差はみられないが, 後者は acid insoluble poly-P 量が圧倒的に多い (約 30 倍) ことが知られた。これよりしても m. granule が無機ポリリン酸を主成分とするものであろうことが推定される。

3. 有機酸酸化能の比較

GPM および P-GPM で培養した各菌株間にどの程度酵素活性に差がみられるか、つまり *m. granule* の有機酸々化におよぼす影響を知る目的で数種の有機酸を用いて実験を行なった。

実験方法

培養: GPM 培地にて 24 時間培養した前培養を 10% の割合で、GPM および P-GPM 培地に植菌し (それぞれ 2 l のフラスコに 500 ml の培地を含む) 28° にて振盪培養し、経日的に pH, 菌体量を測定し methylene blue 染色標本により *m. granule* の観察を行なった。

ワールブルグ検圧法: 経日的に菌体を取り冷生理食塩水にて 3 回洗滌し tris buffer (pH 7.0) にて 70~100 mg/ml の濃厚な菌液を調製し、28° にて starvation を行ない、後 tris buffer にて 20 mg/ml の菌液とした。

各基質有機酸は Na-salt の形で用い、100 μM/ml の濃度になるように調製した。

ワープルグ容器にはつぎのように添加した。

Main:	基質 (100 μM/ml)	1.0 ml
	M/15 Sodium phosphate buffer (pH 7.0)	1.0 ml
	M/15 KCl	1.0
	tris buffer (pH 7.0)	1.0
	deionized water	0.3
Center well:	20% KOH	0.2
Side arm:	cell susp. (20 mg/ml)	0.5

結 果

pH, 細胞生長および *m. granule* の形成: (第 2 表) および (第 4 図) に明らかなごとく P-GPM では生長がややおとるが *m. granule* の形成は GPM より良好である。P-GPM において生長がおとることは、第 1 図および第 2 図より明らかなごとく、リ

第 4 図 菌体量, pH, metachromatic granule の変動
1, 2: 生育, 3, 4: pH, 5, 6: *m. granule*
—— GPM 培地, —●— 培地を示す。

ン酸量が多量に存在するため、平衡点は energy-supplying reaction の方へ傾くため、細胞分裂 (energy-requiring reaction) がややよくせいされるためと解釈できる。

有機酸酸化能について: 培養経日的菌体の有する有機酸酸化能を一括して QO_2 値として第 3 表に示した。

これによると新しい培養程活性が強く、漸次弱まる傾向にあるといえよう。この間の関係をさらに明瞭にするために第 5 図, A および B を載せた。要約すると

- 最も強く酸化を受ける基質……Acetate, Lactate
- 中等度……Pyruvate
- 弱いもの……L-Malate, Succinate, Fumarate.
- Formate, Citrate

また GPM, P-GPM において根本的な酵素活性の差は認められない。

第 2 表 菌体量, pH, metachromatic granule の変動の比較

Incub. Day	P-GPM			GPM		
	菌 体 量 mg/ml	pH	<i>m. granule</i>	菌 体 量 mg/ml	pH	<i>m. granule</i>
1	2.8	6.9	卅	4.2	6.8	卅
2	4.8	6.8	卅±	6.6	6.8	卅±
3	4.7	6.8	卅±	6.6	6.2	卅±
4	3.9	6.8	卅	5.7	6.2	卅±
5	2.7	6.8	卅	4.7	6.0	卅±

第3表 経日的 Q_{O_2} 値の変化 (菌体,
10 mg, 2時間測定値より換算)

Substrate	incub. day med.	1	2	3	4
Fumarate	GPM	14.5	8.5	6.2	3.3
	P-GPM	12.0	—	3.1	1.3
L-Malate	GPM	17.0	5.7	4.1	1.3
	P-GPM	8.8	—	4.7	0.9
Pyruvate	GPM	—	25.5	27.2	25.0
	P-GPM	24.5	24.0	22.5	21.7
Lactate	GPM	30.0	49.0	39.0	38.5
	P-GPM	44.5	35.5	32.5	35.0
Formate	GPM	12.7	10.7	8.5	4.7
	P-GPM	10.7	9.7	3.7	1.5
Succinate	GPM	16.6	—	7.8	4.3
	P-GPM	13.3	10.7	5.9	1.2
Citrate	GPM	2.0	1.4	1.1	0.7
	P-GPM	2.6	1.3	—	—
Acetate	GPM	40.7	35.5	—	27.7
	P-GPM	53.2	46.0	34.5	35.2

考 察

1. Metachromatic granule 形成培地の決定

M. glutamicus 534 は, glucose bouillon 培地ではほとんど m. granule を形成せず, biotin を添加した合成培地においてのみ良く形成する. しかも, この m. granule は培養の初期にのみ認められ, 菌体が肥大, 充実するにつれて認められなくなることはすでに述べたが, *M. glutamicus* 数株のうち, 本実験に供した 541 株は最も m. granule を形成しがたく, 合成培地では, ほとんど形成しないにもかかわらず, glucose bouillon 中に無機リン酸を添加したところ, 推測のようにきわめて良い結果を得た. 合成培地ではなく glucose bouillon でよく形成するということの原因については明かでないが, 結局菌の生理の問題であり, このような点についてはさらに検討したい.

2. 菌体のリン酸量について

第1表に示したように, m. granule を多数有する菌体は, acid insol. poly-P が多量に存在する. このことは, m. granule は, オルトリン酸が, 直鎖に縮合したポリリン酸よりなることをしさずる.

菌体内のポリリン酸は, 培地中のリン酸からよう

第5図 有機酸々化能の経日的変化: Q_{O_2} 値による表示.
A: GPM 培地生育菌体 B: P-GPM 培地生育菌体
1, fumarate 2, L-malate 3, pyruvate 4, lactate
5, formate 6, succinate 7, citrate 8, acetate

いにつくられることは P^{32} を用いた実験により明らかにされている²⁸⁾。本実験に示したように、リン酸添加培地においてよく *m. granule* を形成し、しかしそのような菌体中には、いちじるしく、ポリリン酸が蓄積されていることよりしても、本菌の *m. granule* もリン酸顆粒であることは間違いないところであろう。

3. 有機酸酸化能について

前述したように、菌体内のリン酸というものは、菌の生理・代謝に非常に重要な役割をもっているものである。したがって、このリン酸を蓄積した菌体では当然いろいろの酵素活性に差ができてくるものと予想される。そこで、種々の有機酸を基質として、これらの有機酸を酸化する力にいちじるしい差を生ずるかどうかを調べてみた。しかし、結果は第3表および第5図に示したように大きな差異をみとめることはできなかった。もちろん検討を加えた基質は、ごくかぎられたものだけであり、これのみでうんぬんするのは早計であるが、顆粒を形成しているポリリン酸は、少なくとも TCA cycle に対しては、大きい影響を与えないものと考えられる。

本菌は Lactate, Acetate に対する酸化能が特に強いが、Lactate 酸化能についてみると、GPM 培養菌体では、2日目が特に強くなり、その後やや弱まるに反し、P-GPM 培養菌体では1日目が最も強

く、以後弱まるが、4日目にまたやや強くなる (Acetate 酸化能も同様な傾向にある) 点が異なる。その他に関してはほとんど一致している。

要 約

1. *M. glutamicus* において、metachromatic granule を形成させる培地を検討し、glucose bouillon に、 KH_2PO_4 および K_2HPO_4 を添加した P-GPM 培地を決定した。

2. P-GPM 培地にて培養され、いちじるしく *m. granule* を形成した菌体は、acid insoluble polyphosphate を多量に含む。その含量は単なる glucose bouillon 培地にて培養された菌体の含量の約 30 倍にもおよぶ。

3. *M. glutamicus* は、Acetate, Lactate を強く酸化する。このような有機酸酸化能は metachromatic granule が存在するか否かには無関係である。

有機酸酸化能は日を追って漸減する傾向にある。

種々御指導を頂いた東大教授湯浅明博士、いろいろと御教示をいただいた東大助教授吉田博士に深く感謝する。また御鞭撻をいただいた当社研究所長木下祝郎博士、および実験に協力をいただいた所員古川稔、森田皓暉両氏に深謝する。

文 献

- 1) 板垣史郎・木下祝郎, 植雑 **72**: 52 (1959).
- 2) —, —, 同 **72**: 114 (1959).
- 3) Ernst, P., Z. Hyg. **4**: 24 (1888).
- 4) Neisser, A., ibid. **4**: 165 (1888).
- 5) Babes, U., ibid. **5**: 173 (1889).
- 6) Meyer, A., Bot. Zentr. **62**: 113 (1904).
- 7) Mann, Y., Biochem. J. **38**: 339, 345 (1844).
- 8) Mudd, S., Winterscheid, L. C., DeLamater, E. D., and Henderson, H. J., J. Bact. **62**: 45 (1951).
- 9) Smith, I. W., Wilkinson, J. E., and Duguid, J. P., ibid. **68**: 450 (1945).
- 10) 武谷健二, 第30回細菌学会総会講演 (1957).
- 11) —, 医学のあゆみ **24**: 325 (1957).
- 12) Piekarski, G., Z. Bakt. Parasitenk. Ab, Ib, Org. **144**: 140 (1939).
- 13) Knaysi, G., and Mudd, S., J. Bact. **45**: 349 (1943).
- 14) Mudd, S., Ann. Rev. Microbiol. **8**: 1 (1954).
- 15) —, and Winterscheid, L. C., Exp. cell Res. **5**: 25 (1953).
- 16) Wiame, J. H., Biochem. Biophys. Acta **1**: 234 (1947).
- 17) —, and Lefebvre, P. H., Comp. rend Soc. Biol. **140**: 921 (1946).
- 18) Sall, J., Mudd, S., and Davis, J. C., Arch. Biochem. Biophys. **60**: 131 (1956).
- 19) Mudd, S., Yoshida, A., and Koike, K., J. Bact. **75**: 224 (1958).
- 20) Winkler, A., Symp. 6th Congr. Int. Microbiol. (1953).
- 21) Glauert, A. M., and Breger, E. M., J. Gen. Microbiol. **13**: 310 (1955).
- 22) 吉田昭, 蛋白質核酸酵素 **4**: 39 (1959).
- 23) 高橋泰常, 生化学 **26**: 690 (1955).
- 24) Allen, R. J. L., Biochem. J. **34**: 858 (1940).
- 25) Dische, Z., The Nucleic Acids. Vol. I. 287, Academic Press (1955).
- 26) Mejbaum, W., Z. Physiol. Chem. **58**: 117 (1939).
- 27) 八木康夫, 核酸および蛋白質上巻 p. 156 共立出版社 (1951).
- 28) Wiame, J. M., J. Biol. Chem. **178**: 919 (1949).

Summary

1. *Micrococcus glutamicus* strain 541 formed many metachromatic granules when it grew in glucose-bouillon medium with KH_2PO_4 and K_2HPO_4 (P-GPM medium).

2. Cells which formed many metachromatic granules during their growth in P-GPM medium contained considerable amounts of acid-insoluble polyphosphate. The content of such polyphosphate in the above mentioned cells was about 30 times higher than that of the cells which grew in glucose-bouillon medium without KH_2PO_4 and K_2HPO_4 (GPM medium).

3. Oxidation of several organic acids by *M. glutamicus* was studied.

Among these organic acids, acetate and lactate were strongly oxidized by the organism. It seems that there is no relation between the oxidation activity on these organic acids and the existence of metachromatic granules in the cells.

The oxidation activity of *M. glutamicus* on these organic acids decreased gradually after the first day of the culture.

雑 録

日本植物学集報について

日本学術会議編集の日本植物学集報 (Jap. Journ. Bot.) 第 17 巻, 第 2 号が刊行され, 次の 8 論文が掲載されています。

1. Nakajima, G. Cytogenetical studies on the intergeneric F_1 hybrids between *Triticum macha* and four species of *Secale*.
2. Sharma, A. K., and Bhattacharyya, N. K. An investigation on the scope of a number of pre-treatment chemicals for chromosome studies in different groups of plants.
3. Sutô, T., and Sugiyama, S. Sex expression and determination in spinach. I. Growth habit and its sex-limited inheritance.
4. Tsuchiya, T. Cytogenetic studies of trisomics in barley.
5. Hotta, Y. The role of protein and ribonucleic acid in the differentiation of fern gametophyte.
6. Shibata, M., and Ishikura, N. Paper chro-

matographic survey of anthocyanin in tulip-flowers, I.

7. Tazaki, T. On the growth of pine yearlings in coastal dune regions with special reference to their drought resistance.
8. Hogetsu, K., Oshima, Y., Midorikawa, B., Tezuka, Y., Sakamoto, M., Mototani, I., and Kimura, M. Growth analytical studies on the artificial communities of *Helianthus tuberosus* with different densities.

なお第 18 巻, 第 1 号の原稿しめきりは, きたる 8 月 15 日です。原稿は日本植物学集報編集委員会に書留郵便でお送りください。原稿の体裁は最新号を参照してください。なお, 原則として校正では文章を訂正することはできません。

日本植物学集報編集委員会:

原 寛, 服部静夫(委員長), 木村有香, 松浦一, 前川文夫, 門司正三, 大槻虎男, 田中信徳, 亙理俊次