Micrococcus tweenis による Tween 80 の 代謝について

南 一 守・尾形英三郎

福島医科大学・細菌学教室 (主任 藤原留造教授)

[受付: 3月28日・1959年]

Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) をはじめて結核菌の均等深部培養に導入したのは Dubos¹⁾ であるが, Minami et al²⁾ および Yamane et al³⁾ はこの物質が結核菌によつて利用代謝されることを証明し, さらにその代謝過程をある程度まで追求した^{4), 5)}。最近, Minami^{6), 7)} は土壌中から Tween 80 を唯一の炭素源として発育しうる球菌を分離し, これを *Micrococcus tweenis* と命名し, 尾形⁸⁾ はこの菌の発育に関する研究を行つたが, 今回はこの菌の休止菌および acetone powder による物質代謝, 特に Tween 80 およびそれに関連する物質の代謝について種々の角度から検討した結果を報告する。

実験材料と実験方法

使用菌株: Minami⁷⁾ によつて分離同定された *Micrococcus tweenis* (No. 1株) を主として用いた。この他に, *Staphylococcus aureus* (寺島株), *Escherichia coli* (Kauffmann の分類による No. 1株) を対照実験のために用いた。

培地: 普通寒天の他に, Tween 80 をふくむ培地として Tween 寒天 (ただし原報²⁾ の組成からマラカイトグリーンを除く) と YMY 寒天 (YMY 液体培地⁹⁾ に1%の寒天を加えたもの) を用いた。

洗滌菌液のつくり方: 特に指摘しないかぎり, Tween 寒天培地上に, 37°C で18時間培養した菌を集め, ガーゼで濾過し, 蒸留水で3回洗い, 最後に蒸留水にうかべて1ml あたり約0.2mg の窒素 (Micro Kjeldal 法による) をふくむ菌液をつくり使用した。

検圧法: 普通の型の Warburg の検圧計によつて行つた。酸素吸収の測定の場合は, 主室に $\frac{1}{15}$ M, pH 7.2 のリン酸緩衝液 0.5 ml, 洗滌菌液 0.5 ml, 蒸留水あるいは阻害剤溶液 0.5 ml, 副室には小濾紙片とともに20%の KOH 0.2 ml, 側室には基質溶液 0.5 ml を入れて,

37°C で約10分間振盪 (毎分120回) したのち, 基質溶液を流しこみ測定を開始した。炭酸ガス発生量の測定は直接法¹⁰⁾によつた。

オレイン酸の定量: Davis¹¹⁾ の記載にもとずいたが, 次のように改変した: 検圧法の場合と同様の組成の反応液の5.0 ml を正確にとり, これに0.5 ml の N-HCl を加えて反応を停止させ (pH は約2.0となる), これに無水硫酸ソーダ約2g を加えて飽和させ, 8 ml のエーテル (3, 2, 2, 1 ml ずつ4回) で抽出する。抽出したエーテルを加温蒸発させ, 残渣をアルコール・色素液2.5 ml に完全にうつしとり, これを N/100 NaOH で Cownwey の水平マイクロビュレットにより滴定した。アルコール・色素液は N. R. 0.1%, B. T. B. 0.1% の水溶液を無水エタノールに0.5%にとかし (赤くなる), これを N/10 NaOH で pH 7.0 (黄緑色となる) に調整したもので, アルコールを中性に規正する目的と同時に滴定の指示薬としての作用もかねている。この方法で定量した場合, C₆ 以上の直鎖脂肪酸が抽出され定量されるが, C₄ 以下のものは抽出されない。測定の誤差は比較的大きく, 場合によつては20%に達する。

実験成績

酸素吸収における培養条件の影響と他の菌との比較: *M. tweenis* の Tween 寒天18時間, 普通寒天18時間, YMY 寒天48時間培養と, *Staph. aureus*, *E. coli* の普通寒天18時間培養の洗滌菌を用いて, Tween 80, 脂肪酸, 糖類および TCA サイクル関連物質などを基質として酸素吸収を測定し, QO₂ (N) として計算し, これを

MINAMI Kazumori and OGATA Eizaburo: Studies on the metabolism of Tween 80 by *Micrococcus tweenis*. Department of Bacteriology, Fukushima Medical College, Fukushima, Jap. J. of Bact. 14 (12), 987-992, 1959.

表1 *Micrococcus tweenis*, *Staph. aureus* および *E. coli* の Q_{O_2} (N) の比較

基 質	濃 度	Q_{O_2} (N)/100				
		<i>Micrococcus tweenis</i>			<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>
		Tween-寒天 18 h	YMY-寒天 48 h	普通寒天 18 h	普通寒天 18 h	普通寒天 18 h
Endo. R.	—	4	4	4	2	2
Tween 80	0.5%	37	35	43	5	3
Oleate	10^{-3} M	38	34	53	3	4
Stearate	"	36	37	33	8	3
Linoleate	"	23	19	25	2	3
Palmitate	"	44	24	45	4	3
Acetate	10^{-2} M	14	26	18	2	14
Ethylene glycol	0.5%	5	5	6	2	3
Poly-E. glycol	"	6	5	6	3	2
Triton A-20	"	5	4	6	2	2
Sorbitol	10^{-2} M	6	5	5	3	5
Sorbose	"	5	4	7	3	3
Xylose	"	13	10	10	3	3
Glucose	"	14	5	14	14	18
Fructose	"	6	4	9	9	9
Pyruvate	10^{-2} M	14	12	30	6	16
Oxalacetate	"	11	19	23	11	22
α -Ketoglutarate	"	10	7	9	4	3
Citrate	10^{-2} M	16	13	9	2	2
Succinate	"	45	18	42	25	37
Fumarate	"	35	16	34	24	26
Malate	"	40	26	36	10	27
Lactate	"	19	13	36	25	34
Glycerol	"	9	4	4	15	9
Glutamate	10^{-2} M	42	9	30	10	25
Asparagine	"	40	10	27	3	14
α -Alanine	"	6	9	11	3	18

小数点以下は4捨5入した。基質濃度は終末濃度を示す。

pH: 7.2

表1に示す。

M. tweenis の YMY 寒天上の発育は、Tween 寒天、普通寒天にくらべてわるく、それから得た菌の Q_{O_2} は succinate, fumarate, malate, lactate, glutamate, asparagine, glucose の場合、比較的ひくい、Tween 80, 高級脂肪酸の場合は他の2つの培地に発育した菌と同様に高い値を示す。特に acetate に対する Q_{O_2} は他の培養に比較して高い。普通寒天の場合、 Q_{O_2} は一般に高い値を示し、Tween 80, 高級脂肪酸に対しても高い値を示す。特に lactate は Tween 80 をふくむ培地にくらべて

高い値を示す。全般的にみて、*M. tweenis* は、培地に Tween 80 をふくむとふくまないとにかかわらず、高級脂肪酸、Tween 80 などに対して特徴的に高い Q_{O_2} を示し、TCA サイクル関連物質に対しても比較的高い値を示す。

S. aureus は全般的に Q_{O_2} がひくく、特に高級脂肪酸、Tween 80 に対する酸素吸収は弱い。*E. coli* は acetate その他の終末呼吸に関連する有機酸、アミノ酸に対して比較的高い Q_{O_2} を示すが、Tween 80 と高級脂肪酸に対してはほとんど活性を示さない。

Tween 80 を基質とする酸素吸収: Tween 80 を基質とし、その濃度を 0.05~5.0% まで変えた場合、図 1 に示すように、濃度がうすければ酸素吸収の曲線は比較的早期に endo respiration とほぼ平行になるが、濃度が濃くなるに従つてこの関係はみられなくなる。至適 pH は 7.2 付近にある。

図 1 Tween 80 および Oleate を基質とする酸素吸収

M. tweenis-1, Tween 寒天培地 18 時間培養。菌量: 0.089 mg (N)/flask. pH: 7.2. 図中の T は Tween 80 を次の数字はその%を示し, O は Oleate を示す。

0.5% の Tween 80 を基質とする酸素吸収に対する種々の阻害剤の影響を検討したが、表 2 に示すように、KCN, As_2O_3 , $CH_2 \cdot I \cdot COOH$, 2,4-dinitrophenol, $CuSO_4$, $AgNO_3$ などが高度の阻害を示す。Malonate の阻害は著明でない。NaF は 10^{-2} M 以下では余り阻害はみられないが、 10^{-1} M では Tween 80, oleate, palmitate, acetate, succinate, glutamate による酸素吸収を 60~75% 阻害する。

Tween 80 に関連する物質の酸素吸収および呼吸商: Tween 系の界面活性剤, Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate), Tween 40 (p. s. monopalmitate),

表 2 Tween 80 を基質とする酸素吸収に対する阻害剤の影響

阻害剤 (10^{-2} M)	阻害度 (%)
KCN	93~99
NaN_3	10~15
NaF	12~19
As_2O_3	83~90
$CH_2 \cdot I \cdot COOH$	90~96
$NH_2 \cdot OH \cdot HCl$	26~30
2, 4, Dinitrophenyl hydrazine	40~60
2, 4, Dinitrophenol	82~87
Malonate (10^{-1} M)	20~35
" (5×10^{-2} M)	16~30
$CuSO_4$ (10^{-5} M)	76~80
$AgNO_3$ (10^{-5} M)	97~100

Micrococcus tweenis-1, Tween 寒天培地 18 時間培養。基質: 0.5% Tween 80. pH: 7.2. 阻害度は 1 時間の酸素吸収から Endo. R. を差引いた値について計算した。

Tween 60 (p. s. monostearate), Tween 85 (p. s. trio- leate) を基質とする場合、Tween 80 と同様にいずれも強い酸素吸収を示す(表 3)。Span 系の物質 (Tween 系の物質から polyoxyethylene の部分を除いた高級脂肪酸の (sorbitan ester) は Tween 系のものに比べて、一

表 3 Tween および Span 系物質とその構成脂肪酸の Q_{O_2} (N) と RQ

基 質	Q_{O_2} (N)/100	RQ	
		実測値	理論値
Tweens (0.5%)	20	39.7	0.65
	40	37.8	0.64
	60	37.3	0.67
	80	37.0	0.65
	85	31.6	0.62
Spans (0.5%)	20	15.6	0.63
	40	19.9	0.69
	60	23.2	0.67
	80	13.3	0.66
	85	22.2	0.69
Laulate (10^{-3} M)	32.5	0.67	0.70
Palmitate (")	43.8	0.65	0.65
Stearate (")	35.5	0.70	0.69
Oleate (")	38.2	0.68	0.70

Micrococcus tweenis-1, Tween 寒天培地 18 時間培養。pH: 7.2

般に Q_{O_2} がひくい。これらの界面活性剤の構成脂肪酸である laurate, palmitate, stearate, oleate に対する酸素吸収はいずれも非常に強い。以上の物質の RQ はいずれも 0.62~0.70 の間にあり、高級脂肪酸の場合は完全酸化の理論値とほぼ一致する(表3)。

図1にみられるように、 10^{-3} M の oleate と 0.5 % の Tween 80、 10^{-4} M の oleate と 0.05 % Tween 80 に対する酸素吸収の速度と量がそれぞれほぼ等しい。 10^{-4} M の oleate の酸素吸収は約 30 分後に、endo respiration と平行になり、その差は約 100 μ l である。 10^{-3} M の場合は、大体 2.5 時間ののち吸収速度がおとろえはじめ、endo respiration との差は 1,000 μ l に近づく。

高濃度 (10^{-1} M) の oleate を基質とする場合、菌量が充分大きければ (0.105 mg (N)/flask)、阻害現象はみられないが、菌量がその半分以下の場合、酸素吸収は 10^{-2} M の oleate を基質とするものよりもわずかに下ま

わる。 10^{-3} M 以下の場合にはこのような現象はみられない。

Oleate の定量による解析：Oleate の微量定量は困難であり、測定値は実験によつて大きく変動するので正確な数値を得ることはできなかったが、図2に示すような結果を得た。 10^{-3} M の oleate を基質として 37°C で振盪した場合、oleate は 2 時間で約 $1/4$ にへり、4 時間で $1/10$ 以下に減少する。この oleate の減少は As_2O_3 、 NaN_3 によつて 90~80 %、NaF によつて約 40 % 阻害されるが、KCN による阻害はわづかである。モノヨード酢酸は滴定に干渉するので測定できなかった。Tween 80 (0.5 %) を基質とした場合、4 時間ののちにも oleate は全く検出できないが、これに NaN_3 、 As_2O_3 、NaF、KCN などの阻害剤を加えると 2~4 時間ののち oleate の蓄積がみられる。

Acetone powder は oleate を消失する能力を失っているが、Tween 80 を基質として与えた場合、著明な oleate の蓄積がみられる。これは NaF、 NaN_3 、 As_2O_3 、KCN などの阻害剤によつてむしろ著明に促進される。

図 2 生菌および acetone powder による oleate の産生および消失

基質は Tween 80 (0.5 %), あるいは Oleate (1 μ M/ml)。反応の pH は 7.2。阻害剤の終末濃度は 10^{-2} M。太い線は生菌によるものを示し、細い線は acetone powder (10 mg/ml) によるものを示す。

考 察

Tween 80 は polyoxyethylene sorbitan monooleate の商品名で、ethyleneoxyde 基約 20 をふくむ分子量約 1250¹¹⁾ の非解離性界面活性剤である。Tween 80 は人間の場合、膀胱リパーゼによつて加水分解され、oleic acid と polyoxyethylene sorbitan 部分とに分れ、前者は体内で消失し、後者は大部分が糞便中に、わずかが尿中に排泄されるといわれている¹²⁾。結核菌の場合は Tween 80 を唯一の炭素源として発育し³⁾、またこれを好気的に代謝し還元性の物質を培地中に産生する²⁾が、その中間代謝物質として oleate, sorbitol, acetate が考えられている^{4,5)}。また、*Aspergillus niger* では Tween 80 と類似の物質である Emasol 1112 (12-hydroxyethylene sorbitan monolaurate) を分解し、その構成脂肪酸である lauric acid の結晶を培地上に析出すると報告されている¹³⁾。

Micrococcus tweenis はすでに報告^{6,7,8)}したように、Tween 80 を唯一の炭素源とする培地によく発育し、この物質を energy 源として利用している。*E. coli* や *S. aureus* は Tween 80 を利用し得ないが、これらの菌を *M. tweenis* の Q_{O_2} を比較すると、後者は Tween 系の界面活性剤およびそれらの構成々分である高級脂肪酸に対して極めて強い酸素吸収を示す。しかも、これらの基質に対する Q_{O_2} の値は、たとえ Tween 80 をふくまな

い培地に発育した場合でも極めて高い。それ故、この菌は Tween および 高級脂肪酸 に対して “adaptive” ではなく、“constitive” に利用系をもっているものと考えられる。

M. tweenis は TCA サイクルに関連する物質に対する酸素吸収が強く、Tween 80 を基質とする酸素吸収は KCN によつて強く阻害されることから、Tween 80 は TCA サイクル、Cytochrom 系を経て酸素につながるものと考えられる。SH 基の阻害剤である As_2O_3 、モノヨード酢酸、2,4-dinitrophenol、 $CuSO_4$ 、 $AgNO_3$ などによつて、Tween 80 による酸素吸収は強く阻害されるもので、Tween 80 の中間代謝過程には SH-酵素あるいは oxidative phosphorylation が考えられるが、whole cell で実験を行っているので、これらの SH-酵素の正確な位置づけはできない。しかし、acetone powder の実験によれば、これらの阻害剤は Tween 80 から oleate を遊離すること、すなわちエステラーゼ作用に対しては阻害的でない。従つて、その後の過程、その中でも、脂肪酸の代謝過程に最も重要と考えられる Coenzyme A の active SH-group に対する阻害と考えるのが適当である。

Tween 80 および oleate を基質とする RQ はそれぞれ後者の理論値 0.70 に近く (表 3)、また、ある濃度における Tween 80 と oleate との酸素吸収速度がほぼ等しい (図 1)。一方、この菌はエステラーゼ作用により Tween 80 から oleate を遊離する (図 2)。これらのことから Tween 80 は、主として oleate の部分が利用されているものと考えられる。しかし、Tween 80 と Oleate を同一モル濃度にして比較してみると次のような矛盾がでてくる：oleate 1 M の完全酸化には 22.5 M の酸素を要する。実測値では、 10^{-4} M の oleate を基質とする場合約 100 μ l の酸素吸収を示すが、2.0 ml の反応系で実験しているので $100/22.4/0.2=22.3 \mu$ M (O_2) となり、ほぼ理論値に一致する。これに反して、Tween 80 の場合は、その分子量¹¹⁾を 1250 として計算すると 0.05 %は 4×10^{-4} M に相当し、これと 10^{-4} M の oleate の酸素吸収量がほぼ等しいのであるから、Tween 80 は同一モル濃度の oleate に対して約 $1/4$ の酸素吸収しか示さないことになる。残余のものについてどのようになるかは全く不明であるが、Tween 80 の場合は、oleate と異なり、酸素吸収はその速度がおとろえはじめても、特に濃度が高くなるに従つて、決して endo. respiration と平行にならずに、ある角度で増加を続けること (図 1) は、そこに何らかの反応系のあることを示していると考えら

れる。

一方、Tween 80 を基質として、oleate の産生を観察すると、Tween 80 と菌のみからは検出しよう量の oleate の産生はみられないが、これに NaN_3 、 As_2O_3 、NaF、KCN などの阻害剤を加えることによつて酸の蓄積がみられる。oleate を基質とした場合、約 4 時間で基質は著明に減少するが、これは As_2O_3 、 NaN_3 によつて効果的におさえられ、NaF、KCN によつてもある程度おさえられる。Acetone powder は oleate を消失する能力を失っているが、Tween 80 から oleate を形成する作用 (エステラーゼ作用) は非常に強い。しかも、この作用は、NaF、 NaN_3 、 As_2O_3 、KCN などの阻害剤により、逆に促進される。

以上のことから、本菌による Tween 80 の代謝過程を綜括してみると次のように考えられる：

(1) : この過程は acetone powder でも行い得る。

As_2O_3 、 NaN_3 、NaF、KCN などの阻害をうけない。

(2) : まだ証明はしていないが、SH 阻害剤の影響をうけることから Co-A の関与が想像される。Acetone powder にはこれ以下の反応能力がない。

(3) : Polyoxyethylene sorbitan 部分の運命については全く不明である。

要 約

Tween 80 を唯一の炭素源として発育しうる土壌球菌 *Micrococcus tweenis* の休止菌および acetone powder により Tween 80 およびこれに関連する物質の代謝過程を追求めて次のような成績を得た：

1. *M. tweenis* は *S. aureus* や *E. coli* にくらべて、Tween 系物質およびそれに関連する高級脂肪酸に対して強い酸素吸収を示す。しかも、これは Tween 80 をふくまない培地に発育した場合も同様である。TCA サイクルに関連した物質の酸素吸収も強い。

2. Tween 80 を基質とする酸素吸収は KCN、 As_2O_3 、モノヨード酢酸、2,4-dinitrophenol、重金属イオンなどによつて著明に阻害される。Malonate の阻害は著明でない。

3. Tween 系物質と高級脂肪酸の RQ は大体 6.0~7.0 で、後者は完全酸化の場合の理論値とほぼ一致する。

4. Tween 80 を基質とし、これに NaN_3 , AS_2O_3 , その他の阻害剤を加えると oleate の蓄積がみられる。oleate を基質とした場合は、4 時間で基質は $\frac{1}{10}$ 以下に減少するが、この減少は AS_2O_3 , NaN_3 などによつて著明におさえられる。

5. Acetone powder は Tween 80 から oleate を遊離する作用を有するが、この作用は NaF , NaN_3 , AS_2O_3 , KCN などの添加によつて促進される。

以上の成績について考察を加えた。

本実験を遂行するために与えられた紺野謙治氏の技術的援助に対して謝意を表する。

文 献

- 1) Dubos, R., J.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **58**, 361-362, 1945.
- 2) Minami, K., Yamane, I., and Yasui, T.: Fukushima J. Med. Sci., **1**, 95-103, 1954.

- 3) Yamane, I., Minami, K., and Yasui, T.: Fukushima J. Med. Sci., **1**, 105-112, 1954.
- 4) 南一守, 山根績: 酵素化学シンポジウム, **10**, 93-102, 1954.
- 5) Minami, K., and Yamane, I.: Fukushima J. Med. Sci., **2**, 13-17, 1955.
- 6) Minami, K.: Nature, **181**, 430-431, 1958.
- 7) Minami, K.: 発表予定.
- 8) 尾形英三郎: 日本細菌学雑誌, 14(10), - , 1959.
- 9) Yamane, I., Hyodo, S., Honda, T., and Kadoya, K.: Fukushima J. Med. Sci., **2**, 35-37, 1955.
- 10) 酵素研究法, (朝倉書店), 第1巻, 551頁, 1955.
- 11) Davis, B. D.: Arch. Biochem., **15**, 359-364, 1947.
- 12) Krantz, J. C., Culver P. J., Carr, C. J., and Jones, C. M.: Bulletin of School of Med. University of Maryland., **36**, 48-56, 1951.
- 13) 岡林直: 醸酵工学雑誌, **32**, 482-484, 1954.