微生物の浸透圧調節

大和田琢二*
匂坂勝之助

生物細胞の浸透圧調節能力は、細胞内圧をコントロールするために常に必要であるばかりでなく、耐塩性、耐乾燥性あるいは耐凍性の問題とも密接に関わっている。特に浸透圧調節能力の優れた植物細胞の育種は、十分な食糧を確保するためにも非常に重要である。また、大腸菌は研究材料として優れており、この細胞で機能している浸透圧の調節機構を解明することにより、生物の高塩環境への適応機構を把握するのに役立つ。

生物は一般に総重量の 2/3 以上の水を含んでいる。いうまでもなく、水は生命を維持する上で必要不可欠な物質であり、生物は水分含量を常に一定の範囲に維持していかなければならない。私たちが細胞内液の減少をのどの渇きで知って水分を補うように、生物細胞は水分を維持する巧妙な仕組みを持っている。

細胞は選択的に物質を輸送する半透膜で被われている。一般に細胞内には無機イオンや有機物がぎっしりと詰まっているから、外界よりも浸透圧が高く、水が細胞の中に自然に入ってくる仕組みになっている。このように膜を隔てて生じる圧力差（浸透圧；osmotic pressure）は、細胞内水分含量の調節に大きく影響する。大腸菌（*Escherichia coli*）のように、細胞質膜の周りがペプチドグリカン（糖ペプチドのポリマー）のネット（細胞壁）で被われている場合には、水の流入で膨張した膜はこのネットで周りを押さえつけられることになり、この時に圧力が生じる。この圧力を膨圧（turgor pressure）と呼んでいる。大腸菌の細胞内膨圧は 3 から 5 気圧で、これは空気を入れた自転車のタイヤの空気圧に相当する⁽¹⁾。細胞壁は 100 気圧にまで耐えられるという報告がある。このような高い膨圧を維持することは、水分の維持だけでなく細胞の増殖にも必要であると考えられているので⁽¹⁾、細胞の膨圧を一定の範囲に維持できるか否かは生命を維持できるか否かに関わる重

大事である。

細胞は浸透圧を実に巧妙な仕組みで調節しており（osmoregulation という）、常にこれを機能させて生活している。細胞が浸透圧のより高い、あるいはより低い培地に移った時には、高浸透圧ストレス（hyperosmotic stress）あるいは低浸透圧ストレス（hypoosmotic stress）を受ける。研究の大半は前者の場合に集中しており、後者については細胞容積がわずかに増加する程度ของことが知られているにすぎない。これは、細胞にとって水分維持こそが重要なので、水分を維持しにくい高浸透圧の環境のほうがより重要であると考えられてきたことによる。以下、大腸菌が高浸透圧ストレスを受けた時の適応反応について、筆者らの研究結果を交えて紹介する。

浸透圧調節に関わる物質とその輸送系

大腸菌が食塩などで高浸透圧ストレスを受けた時、脱水により細胞質が収縮し、細胞膜が細胞壁から離れる（原形質分離）。この変化は菌液の 600 nm の“読み”が増すことから観察できる⁽²⁾。この時、細胞はイオンや有機物の濃度を増し、浸透圧を上げて脱水を防ごうとする。この時の代表物質にはカリウムイオン（K⁺）、アミノ酸（グルタミン酸、プロリンなど）、グリシンベタイン（以後ベタイン）、糖類などがある。これらは濃度が増加しても細胞に害を与えにくく、浸透圧の調節に加えて酵素活性の保護作用などもあるので、compatible solute と呼ぶことがある。また、プロリンやベタインは細胞内高分子と作用してその

Osmoregulation of Bacteria

* Takuji OHWADA, Shonosuke SAGISAKA, 北海道大学
低温科学研究所

機能の安定性を高めるという考え方から、特に osmoprotectant と表現する場合もある⁽²⁾。これらは水のように細胞の内外を自由に出入りできないので、特別な輸送機構が必要となる。

1. K⁺

K⁺ は細菌の細胞質中に最も普遍的に含まれている主要な陽イオンで、一般に細胞内液は外液に比べ高濃度の K⁺ を維持している。その濃度は大腸菌で 0.3M 前後、高度好塩菌（増殖に 4M の食塩が必要）では 3.8 から 5.5M にも達している。ただし後者では、K⁺ は結合した状態で存在していると考えられている。このように、細胞内の K⁺ 濃度は菌の種類によってかなり差があるが、集菌（洗浄）の過程で漏出しやすいので注意が必要である。最近ではシリコンオイルで遠心分離する方法も用いられている。K⁺ は酵素の活性発現に必須あるいはその促進因子として働き（DNA ポリメラーゼなど）、また蛋白質の合成には 60～120mM の K⁺ が必要なので、細胞内 K⁺ 濃度の低い大腸菌変異株は蛋白質の合成が特異的に阻害される。

K⁺ は膨圧の初期調節に重要である。グルコースを炭素源にした最少培地で増殖している大腸菌 B 株に浸透圧ストレス（終濃度 0.5M の食塩）を与えたところ、細胞内 K⁺ の急激な増加がみられた（図 1）⁽³⁾。添加直後にすでに細胞内の K⁺ が急激に高まっているので、食塩を加えてから集菌

図 1 ■大腸菌の生育と細胞内の K⁺ およびアミノ酸濃度に対する浸透圧ストレスの効果

するまでの 1, 2 分間に細胞は迅速に K⁺ を取り込み、浸透圧ストレスにより減少した膨圧を高めていることがわかる。この時アミノ酸（ペプチドを含む）も増加するが、その増加は K⁺ よりも遅れて始まる（図 1）。Na⁺ と Cl⁻ を合わせて 1.0M の浸透圧ストレスに対して、ストレス後 35 分で細胞内の K⁺ とアミノ酸（ペプチドを含む）の濃度増加量は合わせて 0.7M になるので、膨圧の調節は主に K⁺ とアミノ酸（ペプチドを含む）によって行なわれていると考えられる。また、大豆やカゼインの加水分解物を含んだ培地を用いて十分量のプロリンなどのアミノ酸やペプチンが存在している条件でも、K⁺ の速やかな取り込みが見られた（図 2）。

このように、培地の組成によらず浸透圧ストレスで K⁺ が最初に取り込まれることは、浸透圧の調節における K⁺ の重要性を示している。培地の浸透圧と細胞内の K⁺ 量との関係は Epstein らのグループが詳細に調べており、細胞内 K⁺ 濃度は培地の浸透圧の高まりとともに増加する⁽⁴⁾。

2. トレハロースなど

細胞内 K⁺ の増加は浸透圧ストレスにより増殖

図 2 ■大腸菌の生育と細胞内の K⁺、アミノ酸およびグリシンベタイン濃度に対する浸透圧ストレスの効果

が一時的に停止している期間にだけみられる現象で、増殖の再開とともに K^+ は減少して浸透圧ストレスを受ける以前のレベル近くにまで減少する(図1)。ストレスを加えた後の培地の浸透圧は一定であるから、細胞内の K^+ 量の減少に伴ってこれに代わる物質の蓄積が必要である。実際、細胞内の K^+ の減少とともに二糖類であるトレハロースの蓄積がみられたので、細胞内の K^+ の減少を補う物質の一つであると考えられる。一時的に蓄積した K^+ を放出できない変異株は浸透圧耐性が低下する⁽⁵⁾。一方、培地中にベタインが存在していると、浸透圧ストレスの後増殖が再開された後も細胞内のベタインは増加し続ける(図2)。E. coli B株は最少培地では浸透圧の調節に有効な量のベタインを生合成できないが、培地中にこれが存在すると K^+ の代わりに浸透圧の調節に利用することができる。

以上の結果から、浸透圧の変化に適応する過程には2つの段階があると考えられる。すなわち、浸透圧ストレスにより一時的に増殖が停止している間、すばやく K^+ を取り込んで膨圧のあるレベルにまで高め、新しい浸透圧の環境に適応するまでの準備期間と、その準備が整ったのち過剰の K^+ を排出して代わりにトレハロースやベタインを蓄積して増殖を再開する期間とである。このよ

うに、細胞は必要な時に瞬時に K^+ を取り入れ、そして排出する機構を持っている。

3. K^+ の輸送系

大腸菌の K^+ 輸送系については Epstein らのグループが精力的に解明しており、 K^+ に対する親和性の差から Trk と Kdp の2つの輸送系に分けている⁽⁴⁾。Trk は“Transport of K^+ ”を意味しており、 K^+ に対する親和性が低く (K_m : 1.5 mM)、輸送のエネルギーに ATP とプロトン駆動力を必要とする。Kdp は“K-dependent”を意味しており、 K^+ に対する親和性が高く (K_m : 2 μ M)、輸送のエネルギーに ATP を必要とする。Epstein らは、紫外線による変異処理で培地の K^+ 濃度が 0.02 mM では生育できない大腸菌変異株を得て Kdp 系の存在を明確にし、またこの菌株を変異処理して増殖に 0.1~5 mM 程度の K^+ を必要とする変異株を得て Trk 系を決めた。図1と図2の培地の K^+ 濃度は 102 mM および 50 mM と高いので、この条件下では Kdp 系は作動せず、Trk 系のみが機能していると考えられる。

Trk 系のうち、TrkA, TrkD, TrkF の各蛋白質は K^+ の取り込みに機能している。TrkA は TrkE, TrkG, TrkH のサブユニット複合体であると考えられている(図3)⁽⁶⁾。また、TrkD はア

図3 ■ Trk系とKdp系

Epstein ら^(4,7) と Bossemeyer ら⁽⁶⁾から一部変更して引用。GSH: グルタチオン, Omp: 大腸菌外膜タンパク質

ルカリ金属に対する特異性が低く、Cs⁺ も輸送することから TrkA とは異なるので、特に Kup (K⁺-uptake を意味する) とも表現している。TrkF は Kdp, TrkA, TrkD が機能していない時に、緩やかに K⁺ を輸送するシステムと考えられている。TrkB と TrkC 蛋白質は、これらが機能しないと K⁺ を細胞内に維持できなくなることから、K⁺ の流出機構に機能していると考えられている⁽⁴⁾。

一方 Kdp 系は、KdpA, KdpB, KdpC, KdpD, KdpE の各蛋白質から構成されており、*kdpABC* および *kdpDE* オペロンからなる (イタリックはその蛋白質をコードする遺伝子を示す)。KdpA, KdpB, KdpC は複合体を形成して K⁺ 輸送の機能を果たしている⁽⁴⁾。このうち、KdpA には K⁺ が結合し KdpB がリン酸化を受けると考えられている⁽⁷⁾。KdpD はペリプラズム領域に存在し、KdpE は *kdpABC* オペロンのプロモーターに作用して、共に細胞の膨圧の変化を感知してオペロンに情報を伝えるセンサーであると考えられている (図 3)⁽⁴⁾。

trkA あるいは *kdp* オペロンの転写開始領域の下流に *lacZ* 遺伝子 (β -ガラクトシダーゼをコードしている) を挿入してこの酵素活性を測定した結果から、浸透圧ストレスで *kdp* オペロンの転写が促進されることが示されたが、TrkA-LacZ 蛋白質の β -ガラクトシダーゼ活性は非常に低く、培地の浸透圧に影響されない (TrkA は抗体反応でしか検出できないほど微量で、細胞あたりのコピー数は 20 程度と計算されている⁽⁶⁾)。

4. 電荷の調整

大腸菌の膜電位は -120 から -150 mV であり、浸透圧調節のため蓄積された K⁺ の正電荷は負電荷の蓄積もしくは正電荷の排出によりバランスをとる必要がある。浸透圧ストレスとともにアミノ酸濃度が高まるが (図 1, 2), グルタミン酸はその主要アミノ酸の一つなので、電荷を調節する役割を果たしていると考えられる。グルタミン酸は、多くの原核細胞で高浸透圧条件で増加することが認められている⁽²⁾。また、プトレッシンは 2

個の正電荷を伴っており、浸透圧ストレスで排出されることが報告されている⁽²⁾。しかし、細胞内の含有量は極微量もしくは検出感度以下であるとの報告があるので、プトレッシンの生理的意味は明らかではない。筆者らは、高速液体クロマトグラフィーで陰イオンと有機酸を測定したが、浸透圧ストレス直後に一時的な増加がみられた Cl⁻ は直ちに排出されており、特に増減のあるものは認められなかった。なお、Na⁺ も浸透圧ストレス直後に増加したが、直ちに排出されていた。

5. 細胞内グルタチオン (GSH) 合成の促進

前述したように、K⁺ は膨圧を調節する重要な物質の一つであって、一時的に K⁺ の高濃度を維持する機構の存在が考えられる。現在までにグルタチオン (GSH) や *N*-エチルマレイミドが K⁺ の輸送系に影響を与えることが報告されている⁽⁸⁾。細胞内 GSH と K⁺ 濃度との関係を調べるため、次のような実験を行なった。培地には K⁺ が十分量 (186 mM) と制限量 (0.05 mM) の 2 種類のグルコース無機塩培地を用いて、Kdp が抑制され Trk が機能する条件と、Kdp が機能する条件を設定した。食塩ストレス (終濃度 0.5 M) を与えると、両条件下で共に細胞内 GSH が増加することを確かめた後に、ストレス直後の細胞内濃度を次のような方法で変化させて K⁺ の取り込み活性を調べた。

① 酸化剤ジアミド (azodicarboxylic acid bis [dimethylamide]) を食塩と同時に加えた。これは細胞内 GSH を酸化型 (GSSG) にするが、細胞に与える障害が少ない。処理後 15 分間はすべての GSH が酸化型になっていて、その後時間とともに GSH が増加した (図 4)。この条件下でみられる細胞内 K⁺ の濃度変化は、K⁺ が十分量の培地ではジアミド無添加の時とほぼ同じレベルの K⁺ の増加があり、K⁺ が制限量の培地では細胞内 GSH が酸化型になっている 15 分間は K⁺ の増加はみられず、むしろ減少した。その後、GSH の増加に伴い K⁺ が増加した。

② GSH 合成能の異なる変異株 (T 43, T 9, T 53 の 3 株) で、浸透圧ストレス後 GSH が増

図 4 ■大腸菌の K^+ とグルタチオン量に対する浸透圧ストレスの効果

加するまでの時間は、 K^+ 制限培地で T 43 と T 9 は各々 13 分と 30 分であったが、T 53 は 60 分間は増加しなかった。この時、細胞内 K^+ が増加するまでの時間は T 43 と T 9 で各々 13 分と 15 分、T 53 は 60 分間は増加しなかった。さらに、浸透圧ストレス後増殖が再開されるまでの時間は親株の 40 分に対して T 43 は 90 分、T 9 は 132 分、T 53 は 169 分で、GSH 合成が遅れるほど増殖の遅滞期が延長した。

③ トランスポゾンを利用して GSH 合成能が完全に失われた菌株を用いて K^+ 制限量の培地で同様の試みを行なった結果、細胞内の K^+ の増加はみられなかった。しかし、培地に GSH を加えると K^+ が増加した。以上の実験結果から、浸透圧ストレスで合成される GSH は、特に K^+ が制限量の培地で増殖している場合に細胞内の K^+ の

増加に関与していると考えられた。

6. GSH の役割

GSH が機能するのは K^+ の取り込み系なのか、排出系なのか、あるいはこの両方なのかは今後の研究を待たなければならない。ただし、取り込み系では Trk よりも Kdp に対して作用していると考えられる。細胞から K^+ が排出する機構 (TrkB と TrkC) と GSH との関連については Meury らの報告がある⁽⁸⁾。また、細胞に Co^{2+} や抗生物質のような毒物を与えると GSH 合成が促進されるが、浸透圧ストレスの時と異なり、培地中への GSH の排出がみられる。抗生物質による GSH の合成と排出は浸透圧ストレスにより抑制されるが、この機構はまだよくわかっていない。また、GSH がなくても細胞の増殖速度は影響しないが、細胞が増殖期に入る直前の GSH を測定するとその量が著しく増加しているの、増殖開始期との関連が示唆された。

7. プロリンとベタイン

プロリンやベタインは細胞内に蓄積して細胞の浸透圧を調節することが知られている。たとえば、プロリン輸送系が欠損すると浸透圧調節能が低下し、逆にプロリン過剰生産変異株では浸透圧調節能が高まる⁽⁴⁾。カゼインや大豆蛋白質を水解した栄養分を含む培地はベタインやプロリンを含んでいるので、浸透圧ストレスを加えると K^+ の急速な取り込みに続いて、ベタインとプロリンの取り込みがみられる (図 2)。グルコースと無機塩類からなる最少培地ではこれらの蓄積はみられないことから、ベタインとプロリンが培地中にある時のみ浸透圧の調節物質として利用されることが考えられる。したがって、大腸菌 B 株では、浸透圧の調節に必要不可欠ではない。

菌の種類によっては浸透圧ストレスに対するプロリンとベタインの生合成系の寄与が異なっており、一般にグラム陽性菌では自らの代謝経路を使ってプロリンを蓄積できるが、グラム陰性菌では培地からの取り込みに依存する場合が多い⁽²⁾。一方、ベタインはシアノバクテリアと CO_2 固定菌

の中に生合成する菌が知られているが、多くの細菌は生合成できないので、培地からの取り込みに依存している。大腸菌の中にはベタインの前駆体であるコリンからの合成経路を持っているものもある（この経路は培地の浸透圧で調節されている^(2,4)）が、その酵素蛋白質をコードする *bet* 遺伝子は、多くの株で欠損している。培地中にプロリンとベタインが存在する時、大腸菌 B 株ではベタインが浸透圧調節の主要物質となっていて、浸透圧ストレス後 25 分における濃度は 0.6 M に達していた（図 2）。この時、プロリンの濃度は 0.06 M でベタインの 1/10 の濃度であり、K⁺ や他のアミノ酸類と同様に増殖の再開とともにその濃度は減少した。このように、細胞は K⁺ やアミノ酸類、ベタインの濃度を巧みに変えて浸透圧の変化に適応していることがわかる。

8. プロリン（ベタイン）輸送系

大腸菌とサルモネラ菌で解析が進められており、両者は同じ輸送系を持っていると考えられている⁽⁴⁾。3つの輸送系、PutP（PP-I）、ProP（PP-II）、ProU（PP-III）が知られており、各々 *putP*, *proP*, *proU* 遺伝子によりコードされる蛋白質で、2種類のプロリンアナログ、L-azetidine-2-carboxylic acid (AC) と 3,4-dehydro-DL-proline (DHP) に対する抵抗性の違いから同定された。すなわち、AC と DHP を取り込んで増殖が阻害される株（野生株）に対し、AC の取り込み活性を失った結果、AC 存在下で増殖可能になった株（*putP*⁻）、AC も DHP も取り込めなくなり、AC と DHP の存在下で増殖可能な株（*putP*⁻*proP*⁻）、およびこれらの変異株はいずれも 0.3 M の食塩と AC 存在下では増殖できないが、この条件下でも増殖可能な株（*putP*⁻*proP*⁻*proU*⁻）が同定された。

PutP は主要なプロリン輸送系で、プロリンを炭素源や窒素源に利用する時に機能し、浸透圧ストレスの影響は受けない。ProP と ProU の機能はともに浸透圧ストレスによって高まり、*proU* 遺伝子の転写は 100 から 400 倍に促進される⁽⁴⁾。一方、ベタインは ProP と ProU によって輸送

表 1 ■ プロリンとグリシンベタインの効果

菌株名	プロリン	グリシンベタイン
Enterobacteriaceae		
<i>Escherichia coli</i>	+	++
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	++
<i>Serratia marcescens</i>	+	++
Pseudomonadaceae		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	±	++
<i>Pseudomonas mendocina</i>	+	+
<i>Pseudomonas stanieri</i>	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+
Rhizobiaceae		
<i>Rhizobium meliloti</i>	-	+
<i>Rhizobium trifolii</i>	-	-
<i>Rhizobium japonicum</i>	-	-
<i>Hedysarum coronarium</i>	-	+

Csonka⁽²⁾ から一部省略して引用。

浸透圧ストレスを軽減する度合 -：軽減しない，+：軽減する，±：少し軽減する，++：グリシンベタインがプロリンに優って軽減する。

されている。プロリンとベタインに対する K_m を比較してみると、ProP は各々 300 と 44 μ M、ProU は各々 200 と 1.4 μ M で、プロリンというよりもベタインの輸送系と考えたほうが妥当である。プロリンとベタインは、すべての細菌に対して浸透圧ストレスを緩和できるわけではないが、その作用は細菌類に広く及んでいる（表 1）⁽²⁾。

プロリンの作用に関する一つのモデルに、蛋白質表面を被うことによって溶解度を高め、高浸透圧下での蛋白質の変性を防ぐという説がある⁽²⁾。しかし、この効果を示すのは 5 M 以上の濃度なので、生体内（0.1 M 程度）では（図 2）、osmoprotectant としての作用は期待できない。腸内細菌では、ベタインは一般に炭素源や窒素源として使われずに細胞内に蓄積して細胞内の浸透圧を高めるが、その作用機作はよくわかっていない。最近、ベタインが DNA 複製に関与するとの報告がなされ、またベタインと同等の効果のある物に dimethylthetin (S,S-dimethylsulfonium acetate) が見いだされている⁽²⁾。

9. ATP の関与

細胞は浸透圧の変化に適応するために多くの応答系を持っており、これらの駆動にはエネルギーが必要である。K⁺ の取り込みや GSH の生合成

図 5 ■ HPLC による大腸菌のヌクレオチド分析

破線は食塩（終濃度 0.8 M）添加前，実線は添加 10 分後を示す（Asahipak, GS 320 カラム，UV-260 nm）。

などに必要な ATP はそのよい例である。グルコース無機塩培地で増殖している大腸菌 B 株に浸透圧ストレス（終濃度 0.8 M の食塩）を与えると，細胞内 ATP は 10 分後に約 2 倍に増加した⁽⁹⁾。この増加はショ糖やポリエチレングリコールでもみられたので，浸透圧ストレスに依存しており，またアデニンヌクレオチドのみが増加していた（図 5）。この実験により，以下のことが明らかになった。

① 細胞の RNA を ^{14}C -ウラシルでラベルし，浸透圧ストレスを与えて RNA の分解を調べたところ，RNA の分解による供給量はごくわずかで急速に増加するアデニンヌクレオチドの供給源とはなり得ない。

② 蛋白質合成阻害剤で増殖を急に停止させた場合には ATP の増加は緩やかで，浸透圧ストレスでみられる増加速度とはまったく異なる。

③ プリン合成阻害剤（6-メルカプトプリン）の存在下で浸透圧ストレスを与えると，ATP の急激な増加はみられない。

④ 解糖系の反応阻害剤（arsenate など）で ATP の増加が強く阻害されるので，主に基質レベルでリン酸化反応が生じていると考えられる。

⑤ さらに HPLC によるヌクレオチド分析の結果から，ATP だけが特異的に増加していること（図 5），ATP の増加は浸透圧ストレスに特異的であることがわかった。

このように細胞は浸透圧の変化に適応するためのエネルギー生成系を持っている。また，積極的に ATP を生産する一方で消費する系でもあるので，実際には 2 倍量以上の ATP が生産されていることになる。

10. 浸透圧の変化を感知するセンサー

浸透圧の変化を細胞がどのように感知して遺伝子の情報を発現させるかはよくわかっていない。細胞が浸透圧ストレスを受けた時，膜蛋白質などは物理的に大きな力を受けることになる。KdpD 蛋白質は外膜から内膜へ突き抜けており（図 3），この物理的な力を直接受けると考えられるため，それがシグナルとなって KdpE 蛋白質に伝わり，*kdpABC* オペロンの転写を促進するという一つのモデルが提唱されている⁽⁴⁾。

また，KdpD 蛋白質と同じようにセンサーと考えられている蛋白質に，EnvZ 蛋白質がある⁽²⁾。この蛋白質は細胞質膜に位置していて，OmpR 蛋白質を介して *ompC*（高浸透圧下で転写促進）と *ompF*（低浸透圧下で転写促進）遺伝子の転写を調節している。OmpC と OmpF 蛋白質はともに大腸菌の外膜の主要な蛋白質（ポリン）で，直径が各々 1.02~1.13 と 1.13~1.16 nm の細孔を形成している。1976 年にオランダの Lugtenberg らが培地の栄養状態が悪い（炭素源が少ない）か，温度が低いと OmpF 蛋白質が増えて OmpC 蛋白質が減少すること，またこの逆の関係を発見した。翌年，同じグループが高浸透圧の培地でも OmpF 蛋白質量が減少し，OmpC 蛋白質量が増加すること，またこの逆の関係を発見し

た。この系は、EnvZ 蛋白質が培地の浸透圧の変化を感知して ATP でリン酸化された後、そのリン酸基が OmpR 蛋白質に転移するリン酸化と脱リン酸化反応によって、OmpR 蛋白質が *ompC* と *ompF* 遺伝子の転写を調節するモデルが考えられている⁽¹⁰⁾。詳細は総説を参照されたい⁽²⁾。

KdpD 蛋白質の場合と同様、EnvZ 蛋白質が浸透圧の変化を感知する機構はまだよくわかっていない。OmpR がリン酸化反応を介して *ompC* と *ompF* 遺伝子の転写を制御する機構の解明に大きな期待が寄せられている。残る問題の一つは、OmpC と OmpF の存在比を変えることの生理的な意味であって、今のところ浸透圧調節における役割は不明である。

一方、細胞が浸透圧ストレスで最初に反応するのは K^+ の取り込みであるから (図1, 図2), K^+ 濃度がシグナルとなって機能する系も考えることができる。その例として, *proU* 遺伝子の発現についてみてみよう。 K^+ 制限培地, あるいは Kdp 変異株を用いて細胞内の K^+ 濃度を低くした時に *proU* 遺伝子の発現が抑制されること, あるいは *proU-lacZ* 遺伝子を挿入したプラスミドを用いて *proU* 遺伝子の転写を無細胞抽出液中で調べると, K^+ 濃度に依存して促進されることなどがわかった^(2,11)。*proU* 遺伝子は細胞内の K^+ 濃度が十分量に達してから (浸透圧ストレス後約 10 分) 発現されてくるので, ベタインの取り込みが K^+ の取り込みの後に生じている結果と一致している (図2)。

ところで, 遺伝子の転写調節機構に超らせん DNA (supercoiled DNA) との関連が考えられており, *proU* 遺伝子の発現はこのレベルで制御されているとも考えられている⁽²⁾。Higgin らは *tppB* (tripeptide permease をコードしている遺伝子), *proU* および *ompC* の遺伝子発現は浸透圧ストレスでも嫌気ストレスでも誘導され, その発現は超らせん DNA で調節されることを示している⁽¹²⁾。しかし, 前述のように *proU* 遺伝子の発現は K^+ 濃度に依存していること, また負の超らせん構造をとっても発現しない場合があることなどから *proU* 遺伝子の発現と超らせん DNA

との関係は明確とはいえない。

未知のセンサーとして機能している可能性のあるイオンチャンネルの検索も行なわれている。patch-clamp 法と呼ばれる方法で, イオンチャンネルを含んだ細胞膜の一部をピペットのチップ先端にシールして, 個々のチャンネルについてイオンの輸送を調べる方法で, 10 mmHg 程度の圧力の変化で開閉するイオンチャンネルがあるため, センサーとしての機能が期待されている。また筆者らは, 浸透圧ストレスによる膜電位の変化が蛋白質の SH と SS との間の交換を生じさせ, この変化がセンサーとなる可能性を考えて, SH 試薬と結合する蛋白質の中にセンサーを検索してみた。その結果, 有機水銀の中に大腸菌の浸透圧耐性を著しく低下させる化合物を見いだしている。

今後の課題

生物の浸透圧調節機構には, まだ多くの未解決な課題が残っている。たとえば, ペプチドが浸透圧ストレスで増加する例が根粒菌 (*Rhizobium meliloti*) で報告されているが, 浸透圧調節におけるペプチドの役割は不明である。また, 細胞質の浸透圧はペリプラズム領域の浸透圧の影響を受ける。この領域は総容積の 20~40% を占め, 多くの酵素類とともに多量のオリゴ糖 (membrane-derived oligosaccharides) を含んでいて, その量は細胞乾重量の 7% にも達する。オリゴ糖の分子量は 2,200~2,600 で, 外膜を透過できないのでペリプラズム領域の浸透圧調節に機能していると考えられ, 低浸透圧下で合成が促進され, 逆に高浸透圧下では抑制される⁽²⁾。この理由として, 培地の浸透圧が細胞内の浸透圧 (約 300 mosM ; 約 150 mM の NaCl 溶液の浸透圧に相当する) よりも低いとき, ペリプラズム領域の浸透圧を高めて細胞質の膨張を抑制し, またこの逆の作用を行なう機構が考えられている。特に負の電荷に富んでいるので (平均値は -5), イオンの透過性などに大きく影響すると思われる。また, 浸透圧ストレスで ppGpp (guanosine 5'-diphosphate 3'(2')-diphosphate) が細胞内に蓄積することが見いだされている。ppGpp は転写の調節や酵素

活性に影響を与えることが知られているが、浸透圧調節機構との関係はよくわかっていない。

β -ガラクトシダーゼやアルカリホスファターゼをコードする遺伝子を挿入する方法で、浸透圧ストレスで転写が促進あるいは抑制される遺伝子は20種程度存在していると考えられている⁽²⁾。

また、電気泳動分析の結果から浸透圧ストレスで誘導合成される未知の蛋白質も認められており、先に述べたATPやGSH合成に関する遺伝子の調節も含めて、未知の機能が隠されていると考えられる。

文献

1) A. L. Koch : *Trends Biochem. Sci.*, 10, 11 (1985).

- 2) L. N. Csonka : *Microbiol. Rev.*, 53, 121 (1989).
- 3) T. Ohwada & S. Sagisaka : *Agric. Biol. Chem.*, 52, 313 (1988).
- 4) W. Epstein : *FEMS Microbiol. Rev.*, 39, 73 (1986).
- 5) U. Dinnbier, E. Limpinsel, R. Schmid & E. P. Bakker : *Arch. Microbiol.*, 150, 348 (1988).
- 6) D. Bossemeyer, A. Borchard, D. C. Dosch, G. C. Helmer, W. Epstein, I. R. Booth & E. P. Bakker : *J. Biol. Chem.*, 264, 16403 (1989).
- 7) W. Epstein & L. Laimins : *Trends Biochem. Sci.*, 5, 21 (1980).
- 8) J. Meury & A. Kepes : *EMBO J.*, 1, 339 (1982).
- 9) T. Ohwada & S. Sagisaka : *Arch. Biochem. Biophys.*, 259, 157 (1987).
- 10) H. Aiba, F. Nakasai, S. Mizushima & T. Mizuno : *J. Biol. Chem.*, 264, 14090 (1989).
- 11) S. B. Jovanovich, M. T. Record, Jr. & R. R. Burgess : *J. Biol. Chem.*, 264, 7821 (1989).
- 12) N. N. Bhriain, C. J. Dorman & C. F. Higgins : *Mol. Microbiol.*, 3, 933 (1989).

食 品 機 能

——機能性食品創製の基盤——

藤巻正生 監修 荒井綜一他 編

B 5 判 / 530頁 / 10,000円

機能性食品の創製に向け、また未来の食品のあり方を考える面から、その基盤を総合的にまとめる。

I. 食品の一次機能

栄養的側面から：アミノ酸、ペプチド、ビタミン、ミネラル摂取のメカニズムと栄養機能の発現……、など。

II. 食品の二次機能

嗜好的側面から：味覚・嗅覚の神経機構、呈味成分、臭い、色の形成機構……、など。

III. 食品の三次機能

生体調節機能の面から：食品アレルギーと免疫、食品中の生理活性物質による体調節…… など。

IV. 病態と食品機能

食品と老化・糖尿病・血栓症との関わり、ス

テロール、食物繊維の生体に及ぼす影響……、など。

V. 食品の劣化抑制

過酸化脂質、発癌物質、抗酸化物質、抗変異原物質、フグ毒などの解析……、など。

VI. 食品の品質変換操作

エクストルージョンによる食品品質の改善、エマルジョンの食品への利用、食品素材の機能的変換の様々な操作……、など。

VII. 機能性食品の設計基盤

造血機能、血糖調節機能、制癌機能をもつ食品、フェニルケトン尿症用食品の開発……、など。

学会出版センター

113 東京都文京区本郷6-2-10 電 03(814)2001