Serratia marcescens におけるトリカルボン酸の膜透過[†] (II)

今 井 紘

(財団法人発酵研究所)

昭和 50 年 12 月 10 日 受理

Transport of Tricarboxylic Acids in *Serratia marcescens* (II)

By Ko IMAI

Institute for Fermentation, Osaka, 17-85 Juso-honmachi 2-chome, Yodogawaku, Osaka

In previous paper it was found that *Serratia marcescens* possesses at least three inducible transport systems for the tricarboxylic acids (citric, isocitric, *cis*-aconitic, and *trans*-aconitic). The first system, induced by citrate, isocitrate, or *cis*-aconitate, transports citric and isocitric acids, the second system, induced by the same acids as in the first system, carries *cis*-aconitic acid, and the third system, induced by *trans*-aconitate or *cis*-aconitate, carries *trans*-aconitic, *cis*-aconitic, citric, and isocitric acids.

In this paper tricarboxylic acid transport-negative mutants were isolated and partially characterized. It was confirmed that *S. marcescens* possesses another transport system in addition to the three systems described above. The fourth system was induced by citrate and carried citric acid.

(Received December 10, 1975)

緒 言

前報⁽¹⁾で, *Serratia marcescens* A-5 は, クエン酸 (cit), イソクエン酸 (iso), *cis*-アコニット酸 (c-a), *trans*-アコニット酸 (t-a) を利用し, これらトリカルボン酸に関して, 少なくとも 3 種類の誘導的な膜透過系を所有することを明らかにした. これら 3 種類のトリカルボン酸膜透過系の存在を遺伝学的に確認するため, 膜透過変異株の分離を試み, 得られた変異株の性質についてしらべた結果を報告する.

実験材料および方法

(1) 供試菌株 *S. marcescens* IFO 12648 の L-プロリン要求株 A-5, および A-5 から N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ニトロソグアニジン) 処理して分離したトリカルボン酸膜透過変異株を用いた.

(2) 培地組成 本実験において用いた nutrient broth (NB), basal medium (BM), およびこれらの寒天培地の組成は, 前報⁽¹⁾に記した.

(3) トリカルボン酸膜透過変異株の分離 2ml の

NB で 16 時間生育させた A-5 の細胞をニトロソグアニジン処理⁽²⁾した後, 0.3% のトリカルボン酸塩と 100 μ g/ml のアンピシリンナトリウムを含む 10 ml の BM に移し, 37°C, 8 時間振盪培養して, 遠心分離によって細胞を洗浄し, 10 ml の NB に懸濁して, 37°C, 16 時間培養してから, NB 寒天平板上にコロニーを形成させ, 各コロニーの有機酸利用性をしらべ, トリカルボン酸利用性を失った変異株を分離した.

(4) アコニターゼ, イソクエン酸脱水素酵素活性の測定 10 ml の NB で, 37°C, 16 時間振盪培養して生育させた菌体を, 遠心分離によって集め, 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) で洗浄し, 4 ml の緩衝液に懸濁して 20 kHz, 5 分間超音波処理した後, 12,000 $\times$ g, 20 分間遠心沈殿した上澄 (cell-free extract) 中のアコニターゼ, イソクエン酸脱水素酵素の活性を, それぞれ Anfinsen の方法⁽³⁾, Konberg の方法⁽⁴⁾によって測定した. 上澄の蛋白量は, Lowry らの方法⁽⁵⁾によって定量した.

その他の方法は, 前報⁽¹⁾に記した.

結 果

(1) トリカルボン酸利用性を欠く変異株の分離

ニトロソグアニジン処理して分離した変異株の有機酸利用性を Table I に示した。1 回のニトロソグアニジン処理によって得られたトリカルボン酸利用性を欠く変異株として, iso 利用性を欠くもの (Sm-16), t-a 利用性を欠くもの (Sm-17, Sm-30) が得られた。しかし, cit, c-a 利用性を失ったものは, 1 回の変異剤の処理によって分離されず, Sm-16, Sm-30 をさらにニトロソグアニジン処理することによって, Sm-30 からは c-a 利用性を欠くもの (Sm-30-ca 3) を, Sm-16 からは cit 利用性を欠くもの (Sm-16-ci 2) を分離することができた。

また, Table II に示したように, これら変異株は, その細胞内に親株 (A-5) と同程度のアコニターゼ, イソクエン酸脱水素酵素活性を有しており, トリカルボン酸膜透過変異株と考えられる。

Table I. Utilization of Organic Acids by the Mutant Strains Isolated

Strain	Utilization of							
	ace	cit	iso	c-a	t-a	suc	fum	mal
A-5	+	+	+	+	+	+	+	+
Sm-16	+	+	—	+	+	+	+	+
Sm-17	+	+	+	+	—	+	+	+
Sm-30	+	+	+	+	—	+	+	+
Sm-30-ca 3	+	+	+	—	—	+	+	+
Sm-16-ci 2	+	—	—	+	+	+	+	+

Utilization of organic acids was examined on the basal agar medium containing one of the organic acids as a sole source of carbon. Abbreviations: ace, acetate; cit, citrate; iso, isocitrate; c-a, *cis*-aconitate; t-a, *trans*-aconitate; suc, succinate; fum, fumarate; and mal, L-malate. + utilized. — not utilized.

Table II. Specific Activities of Aconitase and Isocitric Dehydrogenase in the Mutant Strains Isolated

Strain	Aconitase	Isocitric dehydrogenase
A-5	280	348
Sm-16	266	329
Sm-17	234	350
Sm-30	294	325
Sm-30-ca 3	271	259
Sm-16-ci 2	275	315

Specific activities are calculated as nanomoles of substrate converted per min per mg of protein.

(2) t-a 利用性を欠く変異株の性質

トリカルボン酸サイクル (TCA サイクル) の有機酸の利用性を失った変異株の場合とは異なり, t-a 利用性を失った変異株の中には, t-a の透過系を欠くものと, 細胞内の t-a 代謝酵素を欠くものとが含まれる。この点を区別するために, t-a 利用性を欠く Sm-17 と Sm-30 の t-a 誘導細胞によるトリカルボン酸の酸化についてしらべた。Table III に示したように, Sm-17 の t-a 誘導細胞は, cit, iso, c-a を酸化したが, t-a を酸化しなかった。一方, Sm-30 の t-a 誘導細胞は, これら 4 種類のトリカルボン酸のいずれも酸化しなかった。

(3) iso 利用性を欠く変異株の性質

iso 利用性を欠く Sm-16 のクエン酸膜透過系の性質を明らかにするため, Sm-16 のトリカルボン酸誘導細胞によるクエン酸の酸化 (Table IV) とクエン酸取り込みに及ぼすトリカルボン酸の影響 (Table V) についてしらべた。

Sm-16 のクエン酸酸化 (膜透過) は, iso では誘導されず, また c-a 誘導細胞は, pH 8.6 では, cit を酸化

Table III. Oxidation of Tricarboxylic Acids by *trans*-Aconitate-Induced Cells of Sm-17 and Sm-30

Oxidation of	A-5	Sm-17	Sm-30
Citric acid	+	+	—
Isocitric acid	w+	w+	—
<i>cis</i> -Aconitic acid	+	+	—
<i>trans</i> -Aconitic acid	+	—	—

Oxidation of the tricarboxylic acids by *trans*-aconitate-induced cells were examined in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). + oxidized, w+ weakly oxidized, — did not oxidize.

Table IV. Oxidation of Citric Acid by Tricarboxylate-Induced Cells of A-5 and Sm-16

Cells induced by	Oxidation of citric acid			
	A-5		Sm-16	
	7.0 ^{a)}	8.6 ^{b)}	7.0 ^{a)}	8.6 ^{b)}
Citrate	+	+	+	+
Isocitrate	+	+	—	—
<i>cis</i> -Aconitate	+	+	+	—
<i>trans</i> -Aconitate	+	—	+	—

Oxidation of citric acid by tricarboxylate-induced cells were examined in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0 in ^{a)} or pH 8.6 in ^{b)}). + oxidized, — did not oxidize.

Table V. Influence of Tricarboxylates on Citric Acid Uptake by Citrate-Induced Cells of A-5 and Sm-16

Competitor	Uptake of citric acid during 10 min (dpm/10 ⁸ cells)	
	A-5	Sm-16
None	1673	338
Citrate	166	41
Isocitrate	391	371
cis-Aconitate	1413	361
trans-Aconitate	1481	365

A 50- μ l amount of the induced cells (about 10⁸ cells) was added to 50 μ l of an uptake medium containing 0.2 mM citric acid-1,5-¹⁴C (20,000 dpm), 20 mM the tricarboxylate to be tested and 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.0).

できなかった。Sm-16 の cit で誘導された細胞によるクエン酸取り込みは、親株 (A-5) と異なり、iso で阻害を受けなかった。

考 察

前報⁽¹⁾で、*S. marcescens* A-5 は、cit, iso, c-a, t-a を利用し、これら 4 種類のトリカルボン酸に関して、少なくとも 3 種類の誘導的な膜透過系を所有することを明らかにした。すなわち透過系 1 は、cit, iso または c-a によって誘導され、cit, iso を共通に透過する。透過系 2 は、cit, iso または c-a によって誘導され、c-a を透過する。この系は pH 8.6 で安定で、かつ Mg²⁺ を必要とする。透過系 3 は、t-a または c-a で誘導され、t-a, c-a, cit, iso を共通に透過する。この系は、pH 7.0 では安定で、pH 8.6 では不安定である。

もし、*S. marcescens* A-5 が、上記 3 種類のトリカル

ボン酸膜透過系のみを所有するなら、透過系 1 を欠く変異株は、cit, iso の利用性を欠くものとして、透過系 3 を欠くものは、t-a の利用性を欠くものとして、分離できるはずである。また、c-a で誘導され、c-a を透過する系は 2 種類 (透過系 2, 3) あり、c-a 利用性を欠く変異株は single mutation によっては分離されない。事実、1 回のニトロソグアニジン処理によっては、c-a 利用性を欠く変異株を分離することができず、透過系 3 を欠く Sm-30 からは、もう一度ニトロソグアニジン処理することにより、c-a 利用性も失ったもの (Sm-30-ca 3) を分離することができた。

Sm-30 が、透過系 3 を欠く変異株であることは、次のことから明らかである。透過系 3 は、t-a, c-a, cit, iso を共通に透過するので、t-a 利用性を欠く変異株の中で、その t-a 誘導細胞が cit, iso, c-a を酸化し、t-a を酸化できないものは、細胞内の t-a 代謝酵素を欠く変異株であり、cit, iso, c-a, t-a のいずれをも酸化できないものは、透過系 3 を欠く変異株である。従って、Sm-17 は t-a の代謝酵素を欠く変異株であり、Sm-30 は透過系 3 を欠く変異株である。

1 回のニトロソグアニジン処理により、iso 利用性を欠く変異株 (Sm-16) を分離することができたが、cit 利用性も欠く変異株は得られなかった。この結果は、cit を透過する系が、透過系 1 以外にもう 1 つ存在することを示唆している。この点を確認するため、Sm-16 をもう一度ニトロソグアニジン処理して、cit 利用性を欠く変異株の分離を試み、Sm-16-ci 2 を分離することができた。この第 4 のクエン酸を透過する系の性質を明らかにするため、透過系 1 を欠く Sm-16 の性質についてしら

Table VI. Transport Systems for the Tricarboxylic Acids in *Salmonella typhimurium* and *Serratia marcescens*

Species	System	Inducer				Substrate			
		cit	iso	c-a	tri	cit	iso	c-a	tri
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	*	*	*		+	+		
	2	*	*	*				+	
	3				*	+		+	+
	4	*				+			
<i>Serratia marcescens</i>		cit	iso	c-a	t-a	cit	iso	c-a	t-a
	1	*	*	*		+	+		
	2	*	*	*				+	
	3			*	*	+	+	+	+
	4	*				+			

Abbreviations: cit, citrate; iso, isocitrate; c-a, cis-aconitate, t-a, trans-aconitate; and tri, tricarboxylate. * the tricarboxylate can induce the transport system. + the tricarboxylate is carried into the cell through the transport system.

べた。Sm-16 の cit, c-a, t-a 誘導細胞は cit を酸化したが, iso 誘導細胞は cit を酸化できず, 第4のクエン酸を透過する系は, iso では誘導されないことが明らかになった。また, Sm-16 の c-a 誘導細胞は, pH 8.6 では cit を酸化できないので, Sm-16 の c-a, t-a 誘導細胞による cit の透過は, 透過系3によるものである。また, Sm-16 の cit 誘導細胞によるクエン酸の取り込みは, iso, c-a, t-a によっては阻害を受けなかったので, 第4の透過系は cit で誘導され, cit のみを透過していることが明らかになった。

Serratia marcescens と, 前に報告した^(6,7) *Salmonella typhimurium* のトリカルボン酸膜透過系との比較を Table VI に示した。両種のトリカルボン酸膜透過系のうち, TCA サイクルのメンバーである, cit, iso, c-a の膜透過系と考えられる3種類の透過系 (Table VI の system 1, 2, 4) は, inducer, 基質特異性に関して酷似していることが分った。

要 約

Serratia marcescens のトリカルボン酸膜透過変異株を分離し, その性質についてしらべた。すでに報告した3種類のトリカルボン酸膜透過系の存在が確認された。さらに, クエン酸で誘導され, クエン酸を透過する第4のトリカルボン酸膜透過系の存在が明らかになった。

- (1) 今井 紘: 農化, **50**, 217 (1976).
- (2) E. A. Adelberg, M. Mandel and G. C. C. Chen: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 788 (1965).
- (3) "Methods in Enzymology," Vol. I, ed. by S. P. Colwick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, 1955, p. 695.
- (4) "ibid.," Vol. I, *idem*, 1955, p. 705.
- (5) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (6) K. Imai, T. Iijima and T. Hasegawa: *J. Bacteriol.*, **114**, 961 (1973).
- (7) K. Imai: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **21**, 127 (1975).