高度好塩性細菌のグルコース代謝について

川崎東彦, 高須一重, 大亦正次郎

(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 53 年 3 月 30 日 受理

Metabolism of Glucose in Extremely Halophilic Bacteria

Haruhiko KAWASAKI, Kazushige TAKASU and Shojiro OMATA

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka

Though extremely halophilic bacteria have been thought not to utilize carbohydrates, an extreme halophile strain R 113, isolated from a rock salt, was proved to utilize glucose, galactose and maltose. The pathway of glucose degradation by R 113 was investigated. The following reactions were found to be carried out by cell free extract of R 113 grown on glucose; NADP-linked dehydrogenation of glucose to gluconate, dehydration of gluconate to 2-keto-3-deoxygluconate, and phosphorylation of the keto acid followed by cleavage to yield pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate. In this organism, therefore, glucose was degraded *via* a modified Entner-Doudoroff pathway. Every enzyme involved in the pathway was characterized with respect to the requirements for NaCl and Mg ion.

(Received March 30, 1978)

緒 言

従来より, 高度好塩性細菌はただひとつの例外 *Halobacterium marismortai* を除いて, 糖を資化しえないとされ, 主として蛋白質の加水分解物をエネルギー源および炭素源として利用するとされている⁽¹⁾. したがって高度好塩性細菌の糖代謝についてはほとんど研究がなされていない. しかし近年, グルコースおよびグリセリンが *H. halobium* の生育を促進するという報告⁽²⁾や, 糖資化能のある高度好塩性菌が海水より分離されたという報告⁽³⁾があり, 高度好塩性菌の糖資化性に関して再検討する必要があった.

そこで著者らは, 岩塩より分離した赤色高度好塩性桿菌 R 113 株⁽⁴⁾について糖の資化性を検討した. その結果, この菌株はグルコース, ガラクトース, マルトース, およびグリセリンを資化することが判明した. またグルコースの分解経路について検討した結果, Entner-Doudoroff 経路の変型経路の存在が明らかになった. 本報では R 113 菌の糖資化性およびグルコース分解経路に高度好塩性菌に関する研究 (第 2 報), 文献 (4) 参照.

ついて報告する.

実 験 方 法

1. 使用菌株および培養法 スペイン産岩塩より分離した赤色高度好塩性桿菌 R 113 株⁽⁴⁾を使用した. *Halobacterium halobium*, *H. cutirubrum*, *H. salinarium* は National Research Council of Canada より分譲を受けた. *Halobacterium* 属細菌は Sehgal-Gibbons 培地⁽⁵⁾で, R 113 菌は基本培地 (ポリペプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, NaCl 20%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%, KCl 0.2%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, pH 7.4) および糖培地 (基本培地のポリペプトン, 酵母エキスをそれぞれ 0.3%, 0.1% とし糖 0.5% を加えた培地) で振盪培養 (37°C) した. 菌の生育は 610 nm の O.D. で測定した.

2. 無細胞抽出液の調製 0.5% グルコースを含む糖培地に 3 日間培養した R 113 菌体を 20% 食塩水で洗菌後, 2M 食塩を含む 0.02M トリス塩酸緩衝液 (pH 8) に懸濁し, 超音波破碎後, 遠心分離 (13,000×g, 10 分) して得られる上清を 100 倍容の同緩衝液に対して一

夜透析したものを無細胞抽出液として用いた。

3. 分析方法 酸素吸収, 炭酸ガス放出はワールブルグ検圧計により測定した。還元糖の定量は Somogyi-Nelson 法⁽⁹⁾によった。特にグルコースの定量は酵素法も併用した。その測定用反応液は, 50mM ATP 0.1 ml, 0.1M $MgCl_2$ 0.1 ml, 5mM NADP 0.2 ml, 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8) 1.6 ml, hexokinase 3.6 units, glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 units, 試料 1 ml よりなる。グルコン酸は Möllering らの酵素法⁽⁷⁾に準じて定量した。その反応液組成は, 50mM ATP 0.2 ml, 0.1M $MgCl_2$ 0.1 ml, 5mM NADP 0.2 ml, 0.1M トリス緩衝液 (pH 8) 1.5 ml, gluconokinase 1.6 unit, 6-phosphogluconate dehydrogenase 0.4 unit, 試料 1 ml である。2-ケト-3-デオキシグルコン酸の定量は Weissbach らの方法⁽⁸⁾に従い過ヨウ素酸分解後, チオバルビツール酸により発色させ, 549 nm の O.D. で比色定量した。また MacGee らのセミカルバジッド法⁽⁶⁾をも併用した。ピルビン酸定量用反応液は, 試料 0.2 ml, 1mM NADH 0.3 ml, 0.1M トリス緩衝液 (pH 7.5) 2.5 ml, lactate dehydrogenase (LDH) 6 units より成る。グリセルアルデヒド-3-リン酸の定量は, ピルビン酸定量用反応液の LDH を glycerol-3-phosphate dehydrogenase 0.8 unit プラス triosephosphate isomerase 10 unit に置き替えたものを用いて行った。蛋白質は Lowry 法⁽¹⁰⁾により測定した。

4. 酵素活性測定法 a) glucose dehydrogenase: 2M 食塩を含む 0.2M グリシン緩衝液 (pH 10) 1.5 ml, 1mM NADP 0.3 ml, 0.1M $MgCl_2$ 0.3 ml, 0.1M グルコース 0.3 ml, 酵素液 0.1 ml, 水 0.5 ml よりなる反応液 (30°C) で NADP の還元速度を 340 nm の O.D. 変化により測定した。

b) gluconate dehydratase: 2M 食塩を含む 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH 9) 0.5 ml, 0.1M $MgCl_2$ 0.1 ml, 0.1M グルコン酸ソーダ 0.1 ml, 酵素液 0.2 ml, 水 0.1 ml よりなる反応液を 30°C に保温し, 30 分後 10% TCA 1 ml を加えて反応を止め, 生成したケトデオキシ糖酸をチオバルビツール酸法⁽⁸⁾で定量した。

c) その他の酵素活性: glucokinase および gluconokinase 活性は Darrow, Colowick の方法⁽¹¹⁾に従い, fructosediphosphate aldolase 活性は Rutter らの方法⁽¹²⁾に従い, glucose oxidase 活性は Pazur の方法⁽¹³⁾に従い測定した。glucose-6-phosphate dehydrogenase,

phosphogluconate dehydrogenase および 2 (あるいは 5)-ketogluconate reductase 活性は glucose dehydrogenase 測定 (a) に準じ, 適宜 NADP を NAD に代え測定した。6-phosphogluconate dehydratase 活性は gluconate dehydratase 測定 (b) に準じて測定した。いずれの測定も pH および食塩濃度は適宜変えて行なった。

実験結果

1. R113 菌の糖資化性

糖の資化性を糖酸化能および糖の生育促進効果により調べた。Table I にワールブルグ検圧計で測定した糖酸化能を示す。Halobacterium 3 株は 11 種の供試糖をいずれも酸化しなかったが, R113 菌はグルコース, ガラクトース, マルトースをよく酸化した。また, R113 菌をペプトン, 酵母エキスの少ない糖培地に生育させたとき, 上記 3 糖に著しい生育促進効果が認められた。特にグルコース, マルトースは速やかに消費され, 培地 pH は著しく低下した (Fig. 1)。

2. グルコースの酸化的分解

グルコースは好気条件下でのみ分解された。しかし, グルコース分解最終産物として有機酸を検索したが微量の揮発性酸以外は検出できなかった。一方, グルコース

Table I. Oxidation of Sugars by Halophiles

Substrate	O ₂ uptake (μ l/hr·mg wet wt. cells)			R 113
	<i>H. halobium</i>	<i>H. cutirubrum</i>	<i>H. salinarium</i>	
None	1.70	1.68	1.75	1.40
D-Ribose	1.62	1.09	1.33	1.50
D-Xylose	1.65	1.80	1.70	1.70
D-Arabinose	1.52	1.34	1.41	1.40
D-Glucose	1.52	1.85	1.73	3.38
D-Mannose	1.53	1.34	1.47	1.68
D-Galactose	1.61	1.57	1.76	2.71
D-Fructose	1.76	1.63	1.38	1.46
L-Sorbose	1.43	1.08	1.44	1.47
Sucrose	1.43	1.35	1.61	1.37
Maltose	1.34	1.08	1.70	2.94
Lactose	1.55	1.23	1.45	1.72

Cells grown in the media supplemented with 1% glucose were washed and suspended in the nutrients-free media, and were used for manometric assay.

Warburg vessels containing 1 ml of cell suspension (40 mg wet wt. cells), 1.5 ml of 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) containing 25% NaCl, 0.5 ml of 0.1M substrates and 0.2 ml of 20% KOH in center well, were incubated at 37°C.

Table II. O₂ Uptake and CO₂ Evolution with Glucose by Resting Cells of R113

	μmol	
Glucose consumed	5.0	(1)
O ₂ taken up	30.1	(6.02)
CO ₂ evolved	32.7	(6.54)

The vessels contained 60 mg wet wt. cells, 70 μmoles of Tris-HCl buffer (pH 7.6) and 5 μmoles of glucose in 3 ml of the nutrients-free medium. For O₂ uptake 0.2 ml of 20% KOH was placed in center well and for CO₂ evolution 0.2 ml of 4N H₂SO₄ in a side arm. The molar ratios to glucose were designated in parentheses.

Table III. Glucose Dehydrogenase Activities

Reaction mixture	Reduced NADP or NAD ($\mu\text{mol}/\text{min}$ mg protein)
Complete ^a	0.071
—NADP+NAD	0.006
—Glucose	0.001
—NADP	0.000
—Enzyme	0.000
—MgCl ₂	0.017
—MgCl ₂ +EDTA	0.002
—NaCl	0.003
+ATP	0.070

^a Complete reaction mixture (3 ml) contained 30 μmoles of glucose, 0.3 μmole of NADP, 30 μmoles of MgCl₂, 3.3 mmole of NaCl, 0.3 mmole of glycine buffer (pH 10) and 1.5 mg protein of cell free extract. If indicated, 0.3 μmole of NAD, 30 μmoles of EDTA and 10 μmoles of ATP were added. Reduction of NADP was followed by recording O.D. at 340 nm.

Table IV. Stoichiometry of Glucose Dehydrogenase Reaction

	$\mu\text{mol}/\text{ml}$
Glucose consumed	0.324
NADPH produced	0.339
Gluconate produced	0.249

Reaction mixture was the same as in Table III, except that the amounts of NADP and cell free extract were, respectively, 1.5 μmole and 0.95 mg protein. After 20 min incubation, the reaction was stopped by heating in boiling water, and glucose and gluconate were measured by hexokinase-glucosephosphate dehydrogenase-system and gluconokinase-phosphogluconate dehydrogenase system, respectively.

酸化分解に伴うガス収支をワールブルグ検圧計で調べた結果, Table II に示すように 1 モルのグルコースの分解

Fig. 1. Time Course of Utilization of Glucose, Galactose and Maltose during Growth of R113. Culture medium contained 0.3% polypepton, 0.1% yeast extract, 20% NaCl, 2% MgSO₄·7 H₂O, 0.2% KCl, 0.005% FeSO₄·7 H₂O and 0.5 % sugar: glucose (○), galactose (△), maltose (●) and none (×). Residual sugar was measured by Somogyi-Nelson method.

によりほぼ 6 モルの酸素吸収と 6 モルの炭酸ガス放出が認められた。したがって静止菌体ではグルコースは炭酸ガスまで完全酸化分解を受けると考えられた。

R113 菌のグルコース酸化能は無糖の基本培地に生育した菌体では非常に弱い, グルコース添加培地に生育した菌体では 3~5 倍に強くなった。したがってグルコース酸化分解系はグルコースにより誘導的に生成される系と考えられた。そこで, グルコースに生育した R113 菌の無細胞抽出液を用い, Fig. 8 に示すグルコース分解系の種々の酵素活性を調べた結果, glucose kinase, fructosediphosphate aldolase, glucose oxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, gluconokinase, phosphogluconate dehydrogenase, phosphogluconate dehydratase, 2-or 5-ketogluconate reductase の各活性は認められなかった。しかしグルコースを基質にして NADP を還元する活性, およびグルコン酸と ATP よりピルビン酸を生成する活性が認められたことより, glucose dehydrogenase, gluconate dehydratase, 2-keto-3-deoxygluconokinase, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase の存在が推定された。以下これから酵素の確認と若干の性質について述べる。

3. Glucose dehydrogenase

NADP, Mg²⁺ の存在下でグルコースに無細胞抽出液

Fig. 2. Effect of Mg^{2+} on Glucose Dehydrogenase Activity. Assay conditions were the same as in Table III, except that $MgCl_2$ concentration was varied as indicated. (●) represents the activity in the presence of 30 μ moles of EDTA.

Fig. 3. (a) Effect of NaCl on Glucose Dehydrogenase Activity. Enzyme activity was measured under the same conditions as in Table III, except that NaCl concentration was varied as indicated. (b) Effect of NaCl on Stability of Glucose Dehydrogenase. Cell free extract was incubated at 30°C with various concentrations of NaCl in 0.1M glycine buffer (pH 10), and after 90 min the residual activity was measured under the same conditions as in Table III, except that final NaCl concentration was 1.4M.

を作用させると、無細胞抽出液の量および反応時間に比例して NADP の還元が認められた。Table III に示すように NAD の還元は非常に弱く、NADP の約 12 分の 1 であった。また、ATP の添加はこの反応に何ら影響を与えなかった。NADP の還元に伴い、これに相当する量のグルコースの減少、グルコン酸の生成が認められ

Fig. 4. Lineweaver-Burk Plots of Glucose Dehydrogenase. Assay conditions were the same as in Table III, except that glucose concentration (a) or NADP concentration (b) was varied at a fixed concentration of 0.1 mM NADP or 10 mM glucose, respectively.

た (Table IV)。グルコン酸の生成量が若干少ないのは、次の段階に反応が進んだためと思われる。これらの結果よりこの反応を触媒する酵素は NADP-linked glucose dehydrogenase [EC. 1.1.1.47] であると考えられた。ちなみに 2,6-dichlorophenol indophenol を水素受容体とする glucose dehydrogenase [EC. 1.1.99.a] 活性は認められなかった。

本菌の glucose dehydrogenase は強い Mg および食塩要求性を示した。すなわち、酵素を 10mM EDTA で 10 分間処理すると酵素活性はほとんどなくなったが、 $MgCl_2$ の添加によりもとの活性に戻った。Fig. 2 に Mg 濃度の酵素活性に及ぼす影響を示す。3mM 以上の濃度で最高活性を示した。また $MgCl_2$ と同じ効果が $MnCl_2$ にも認められた。Fig. 3 (a) に酵素活性に及ぼす食塩濃度の影響を、また Fig. 3 (b) に食塩の安定化効果を示す。食塩 1M 存在下に最高活性を示し、3M でも約 80% の活性を示したが、無食塩下では活性を示さなかった。また、本酵素は食塩低濃度下では非常に不安定で、安定化には 2M 以上の食塩を必要とした。本酵素は典型的な好塩性酵素であった。

グルコース、NADP に対する見かけの K_m 値を Lineweaver-Burk プロット (Fig. 4) より求めた結果、pH 10 において、グルコース 1.7×10^{-3} M (0.1mM NADP 存在下)、および NADP 1.5×10^{-5} M (10mM グルコース存在下) であった。本酵素の至適 pH は 10 であり、pH 8 以下ではほとんど活性を示さなかった。無糖培地に生育した菌体の glucose dehydrogenase 活性は非常に弱かったが、グルコース培地に生育した菌体では約 23 倍

Table V. Levels of Glucose Dehydrogenase and Gluconate Dehydratase in R 113 Cells Grown in the Medium with or without Glucose

Cells grown on	Activity (unit/mg protein)	
	Glucose dehydrogenase	Gluconate dehydratase
No sugar	0.007	0.0009
Glucose	0.160	0.0027

Both enzyme activities in each cell free extract were assayed under the standard assay conditions. One unit represents the amount of enzyme producing 1 μ mole of NADP or KDG per min.

Fig. 5. Production of 2-Keto-3-deoxygluconate (KDG) from Gluconate by Cell Free Extract of R 113. Reaction mixture (5 ml) containing 15 μ moles of Na-gluconate, 50 μ moles of $MgCl_2$, 500 μ moles of Tris-HCl buffer (pH 9), 7.5 mmoles of NaCl and cell free extract (24 mg protein), was incubated at 30°C, and at intervals indicated, aliquots of reaction mixture were withdrawn, heated in boiling water for 3 min and subjected to assays for gluconate and KDG. Gluconate (●) was assayed by an enzymatic method of Wöllering *et al.*, and KDG (○) was assayed by the thiobarbituric method of Weisbach *et al.* and also by the semicarbazide method of MacGee *et al.*

の活性を示した (Table V). したがって本酵素は誘導酵素と考えられる。

4. Gluconate dehydratase

グルコン酸に無細胞抽出液を作用させると、時間とともにグルコン酸が減少し、それに相応してセミカルバジ

Fig. 6. Effects of NaCl and Mg^{2+} on Gluconate Dehydratase Activity. Reaction mixture (1 ml) contained 10 μ moles of Na-gluconate, 100 μ moles of Tris-HCl buffer (pH 9), 10 μ moles of $MgCl_2$, 1.2 mmole of NaCl and cell free extract (1.0 mg protein). Either NaCl or $MgCl_2$ concentration was varied as indicated. After 30 min incubation, the reaction was stopped by addition of 1 ml of 10% TCA and a deproteinized aliquot was subjected to assay for KDG by the thiobarbituric method.

Table VI. Effect of SH Compounds on Gluconate Dehydratase Activity

SH compound	KDG formed (μ mol/30 min)
None	0.089
L-Cysteine	0.294
Glutathione	0.308
Na-thioglycollate	0.300
2-Mercaptoethanol	0.203

Assay conditions were the same as in Fig. 6, except that 10 μ moles of SH-compounds were added.

ッドやチオバルビツール酸と反応性のある物質ケトデオキシ糖酸が生成された (Fig. 5). この物質は、過ヨウ素酸-チオバルビツール酸との反応により生ずるクロモーゲンの吸収スペクトル ($\lambda_{max}=549\text{ nm}$)⁽⁸⁾およびペーパークロマトグラフィーにおける R_f 値⁽¹⁴⁾ などより 2-ケト-3-デオキシグルコン酸 (KDG) と考えられた。したがってこの酵素反応は gluconate dehydratase [EC. 4.2.1.39] によると考えられる。

本酵素も食塩, Mg を要求し, Fig. 6 に食塩濃度および Mg 濃度の酵素活性に及ぼす影響を示す。食塩 0.5 M, Mg 10 mM 以上で最高活性を示した。Mg は Mn で代替されえなかった。本酵素反応の至適 pH は 9 にあ

た. また, 本酵素反応は SH 化合物により活性化され, Table VI に示すようにシステイン, グルタチオンおよびチオグリコール酸ソーダにより活性は 3 倍強に強められた. しかしメルカプトエタノールの効果は他に比べ小さかった. 本菌の gluconate dehydratase 活性は非常に弱く, グルコース培地に生育させても glucose dehydrogenase は強く誘導されなかった (Table V).

5. KDG よりビルビン酸の生成

前述のグルコン酸から KDG を生成する反応液に ATP を加えると KDG はほとんどたまたず, グリセルアルデヒド-3-リン酸とビルビン酸が生成した (Fig. 7). 図中ビルビン酸に比べ, グリセルアルデヒド-3-リン酸の蓄積量が少ないのは, 次の段階に反応が進むためと思われる. 6-フォスホグルコン酸に無細胞抽出液を作用させてもビルビン酸の生成が認められなかったことより, グルコン酸は KDG を経てリン酸化され, 続いて aldolase によりグリセルアルデヒド-3-リン酸とビルビン酸に分解されると考えられた.

Table VII はグルコース, グルコン酸, KDG からビ

Fig. 7. Production of Pyruvate and Glyceraldehyde-3-phosphate from Gluconate by Cell Free Extract of R113. Reaction mixture was the same as in Fig. 6, except for addition of 10 μ moles of ATP. Aliquots of reaction mixture were withdrawn at intervals, heated in boiling water for 1 min and subjected to assays for pyruvate (○) and glyceraldehyde-3-phosphate (●). The assay mixture (3 ml) contained 0.2 ml of sample, 0.3 μ mole of NADH, 250 μ moles of Tris-HCl buffer (pH 7.5) and 6.25 units of lactic dehydrogenase for assay of pyruvate or 0.8 unit of glycerol-3-phosphate dehydrogenase plus 10 units of triosephosphate isomerase for assay of glyceraldehyde-3-phosphate.

Table VII. Pyruvate Production from Glucose, Gluconate and KDG.

Reaction mixture	Pyruvate (μ mol/min mg protein) formed from		
	Glucose	Gluconate	KDG ^b
Complete ^a	7.7	12.4	12.5
—NADP	1.2	12.9	12.5
—ATP	0.3	0.8	2.3
—Mg ²⁺	0.1	0.3	6.0 ^c (2.5)

^a Complete reaction mixture (1 ml) contained 80 μ moles of Tris-HCl buffer (pH 9), 0.5 μ mole of NADP, 10 μ moles of ATP, 10 μ moles of MgCl₂, 1.4 mmole of NaCl, cell free extract (2 mg protein) and 10 μ moles of glucose or gluconate or 1.5 μ mole of KDG.

^b KDG was prepared enzymatically from gluconate under the same conditions as in Fig. 5 except for the presence of 10 μ moles of gluconate per ml. After completion of the reaction, the reaction mixture was deproteinized with perchloric acid and neutralized. This solution was used for KDG preparation (7.5 μ moles KDG/ml).

^c Containing 2 μ moles of MgCl₂ originated from KDG preparation. Data designated in parenthesis represents the reaction in the presence of 10 μ moles of EDTA.

ルビン酸の生成を比較したものである. NADP, ATP 存在下ではグルコースからもビルビン酸は生成したが, その速度はグルコン酸からの場合の約 60% であった. グルコン酸および KDG からビルビン酸の生成には NADP は不要であったが ATP を必要とした. またいずれの基質の場合も Mg, 食塩を必要とした. KDG 標品には少量の MgCl₂ (2 μ moles/ μ mole KDG) が含まれていたため, Mg 無添加反応液にもビルビン酸の生成が認められたが, EDTA 添加によりその生成量は減少した.

考 察

R113 菌は高度好塩性の赤色桿菌で, その菌学的特徴⁽⁴⁾より *Halobacterium* に属すると思われるが, 既知菌株とは性質を若干異にしている. *Halobacterium* は酸化的リン酸化のほかに光リン酸化反応も行なうことが最近報告⁽¹⁵⁻¹⁷⁾されたが, R113 菌も両リン酸化反応を行なうことが認められており⁽¹⁸⁾, 本菌のエネルギー代謝に興味が持たれる.

Halobacterium は, 従来の報告⁽¹⁹⁾や Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第 8 版⁽¹⁾によれば, 糖を含む培地に生育しても酸やガスを生成せず, 糖

Fig. 8. Tentative Pathway for Glucose Metabolism in Strain R113. ⇌, Entner-Doudoroff pathway; ➡, Modified Entner-Doudoroff pathway. (1) glucose kinase, (2) fructosediphosphate aldolase, (3) glucose dehydrogenase or glucose oxidase, (4) glucose-6-phosphate dehydrogenase, (5) gluconokinase, (6) phosphogluconate dehydrogenase, (7) gluconate dehydratase, (8) phosphogluconate dehydratase, (9) 2-keto-3-deoxygluconokinase, (10) 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase, (11) 2-or-5 ketogluconate reductase.

をエネルギー源、炭素源として利用しないとされている。ただひとつの例外として *H. marismortui* (1940 年 Elazari-Volcani により分離されたが、現在保存されていない) はグルコース、フラクトース、マンノース、グリセリンより酸を生成すると報告⁽²⁰⁾されている。そこで R113 菌の糖質化性を調べた結果、本菌はグルコース、ガラクトース、マルトースをよく酸化分解し、特に蛋白質加水分解物の少ない培地では、これらの糖の添加によりその生育は顕著に促進された。グルコース、マルトース培地では糖の消費に伴い、培地 pH は著しく低下した。このように R113 菌は糖を質化することが明らかとなったが、最近、Gochner ら⁽²⁾は *Halobacterium* の生育をグルコース、グリセリンが促進することを報告し、また Tomlinson ら⁽³⁾が糖質化能を有する高度好塩性菌を数株分離したことを合わせ考えると、糖質化能なしと永らく考えられていた高度好塩性菌にも、糖を質化するものが少なからず存在すると思われる。

R113 菌のグルコース分解能は基本培地(無糖)に生育した菌体では非常に弱かったが、グルコース培地に生育させると誘導的に生成された。洗浄菌体によりグルコース 1 モルが酸化分解される際、6 モルの酸素が吸収され、同時に 6 モルの炭酸ガスが放出された。このことより R113 菌には、グルコースを完全に炭酸ガスにまで酸化する系があることが推定された。本菌の無細胞抽出液には glucose dehydrogenase, gluconate dehydratase,

および 2-keto-3-deoxygluconate よりピルビン酸と glyceraldehyde-3-phosphate を生成する酵素活性が認められたことより、本菌のグルコース分解経路として Fig. 8 の矢印(➡)で示される経路が推定された。この経路はグルコースがリン酸化されてから酸化される Entner-Doudoroff 経路 (Fig. 8 の ⇌ で示される経路) の変型と考えられた。この代謝経路は *Achromobacter-Alcaligenes* 属細菌⁽²¹⁾, *Clostridium* 属細菌^(14,22) および *Rhodopseudomonas spheroides*⁽²³⁾ にも存在することが報告されている。また Tomlinson らの分離した好塩性菌 M6 株もこの経路でグルコースを分解すると報告⁽²⁴⁾されている。

ピリジンスクレオチドを水素受容体とする glucose dehydrogenase は哺乳動物や微生物に広く存在する。多くの酵素は NAD, NADP どちらにも活性を示す⁽²⁵⁾が、NADP のみに活性を示す酵素も報告^(26~28)されている。R113 菌の酵素は NADP に強い活性を示したが、NAD に対しては非常に弱かった。この酵素は 10^{-3} M の Mg^{2+} , Mn^{2+} を要求したが、一般に細菌の glucose dehydrogenase は *Bacillus cereus* の酵素⁽²⁹⁾のように 2 価金属イオンを必要とするものと、*Gluconobacter cerinus* の酵素⁽²⁸⁾のように必要としないものが報告されている。

Gluconate dehydratase はその発見が比較的新しい酵素であり、前述の変型 Entner-Doudoroff 経路を有する菌にのみその存在が報告されている⁽³⁰⁾。*Clostridium* 属細菌のこの酵素は二価金属イオン (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) および SH 化合物を要求する⁽¹⁴⁾が、*Achromobacter* 属細菌の酵素はそれらを必要としない⁽³⁰⁾。R113 菌の酵素は Mg^{2+} を必要とし、また SH 化合物で著しく活性化された。

高度好塩性菌の酵素は、2, 3 の例外を除いてすべてその活性および安定性に高濃度の食塩を必要とする好塩性酵素である⁽³¹⁾が、R113 菌のグルコース分解系の酵素も同様に好塩性を示した。ただし、glucose dehydrogenase, および gluconate dehydratase が食塩の存在しない反応条件下でほとんど活性を示さなかった (Fig. 3(a), 6(a)) のは、これら酵素が食塩の存在しない状態では非常に不安定なので、活性測定の際に大部分の酵素が失活したためと思われる。いずれの酵素も至適 pH はアルカリ性側にあり、特に glucose dehydrogenase は酸性側ではほとんど活性を示さなかった。R113 菌のグ

ルコース分解系はグルコースにより誘導されることは既に述べたが, 中でも glucose dehydrogenase の誘導は著しかった。しかし gluconate dehydratase はあまり誘導されず, 活性は非常に弱かった。Clostridium 属細菌でもグルコースに生育した菌では gluconate dehydratase 活性は非常に弱く, グルコン酸で著しく誘導されることが報告⁽²²⁾されている。

要 約

(1) 高度好塩性菌は 1, 2 の例を除き糖を資化しないとされていたが, われわれの分離した赤色高度好塩性菌 R113 はグルコース, ガラクトースおよびマルトースをよく資化した。

(2) この細菌のグルコース分解経路を検討した結果, グルコースは変型 Entner-Doudoroff 経路で分解されることがわかった。この経路に関与する酵素はいずれも好塩性酵素であり, またいずれも 3~10mM の Mg を要求した。

カナダ NRC より Halobacterium 属細菌の分譲に際し, ご便宜を計っていただいた大阪府立放射線中央研究所, 上野照雄博士, および本稿作成に当り, 種々ご教示いただきました外村健三教授に深謝いたします。

- (1) N. E. Gibbons : "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," 8th ed., ed. by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974, p.269.
- (2) M. B. Gochbauer and D. J. Kushner : *Can. J. Microbiol.*, **15**, 1157 (1969).
- (3) G. A. Tomlinson and L. I. Hochstein : *ibid.*, **18**, 698, 1973 (1972).
- (4) 大亦正次郎, 小山昭宏, 田中亀八郎 : 醸酵協会誌, **26**, 375 (1969).
- (5) S. N. Sehgal and N. E. Gibbons : *Can. J. Microbiol.*, **6**, 165 (1960).
- (6) M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- (7) H. Möllering and H. U. Bergmeyer : "Methods of Enzymatic Analysis," ed. by H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie Weinheim, Academic Press, Inc., New York and London, 1974, p.1243.
- (8) A. Weissbach and J. Hurwitz : *J. Biol. Chem.*, **234**, 705 (1959).
- (9) J. MacGee and M. Doudoroff : *ibid.*, **210**, 617 (1954).
- (10) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *ibid.*, **193**, 265 (1951).

- (11) R. A. Darrow and S. P. Colowick : "Methods in Enzymology," Vol. V, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, 1962, p.226.
- (12) W. J. Rutter and J. R. Hansley : "Methods in Enzymology," Vol. IX, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, 1966, p.480.
- (13) J. H. Pazur : "Methods in Enzymology," Vol. IX, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, 1966, p.82.
- (14) J. R. Andreesen and G. Gottschalk : *Arch. Mikrobiol.*, **69**, 160 (1969).
- (15) D. Oesterhelt and W. Stoeckenius : *Nature New Biol.*, **233**, 149 (1971).
- (16) *idem* : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2853 (1973).
- (17) A. Danon and W. Stoeckenius : *ibid.*, **71**, 1234 (1974).
- (18) 川崎東彦, 外村健三, 大亦正次郎 : 昭和52年度日本醸酵工学会大会要旨集, p.148.
- (19) H. Larsen : "The Bacteria," Vol. IV, ed. by I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, Academic Press Inc., New York, 1962, p.297.
- (20) B. Elazari-Volcani : "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," 7th ed., ed. by R. S. Breed, E. G. D. Murray and N. R. Smith, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1957, p.210.
- (21) K. Kersters, J. K. Matsubara, L. Nelen and J. DeLey : *Antonie van Leeuwenhoek ; J. Microbiol. Serol.*, **37**, 233 (1971).
- (22) R. Bender, J. R. Andreesen and G. Gottschalk : *J. Bacteriol.*, **107**, 570 (1971).
- (23) M. Szymona and M. Doudoroff : *J. Gen. Microbiol.*, **22**, 167 (1960).
- (24) G. A. Tomlinson and T. K. Koch : *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1085 (1974).
- (25) 真野嘉長 : 酵素ハンドブック, 赤堀四郎監修, 朝倉書店, 1966, p.39.
- (26) K. Okamoto : *J. Biochem.*, **53**, 348 (1963).
- (27) C. K. Lee and W. J. Dobrogosz : *J. Bacteriol.*, **90**, 653 (1965).
- (28) G. Avigad, Y. Alroy and S. Englard : *J. Biol. Chem.*, **243**, 1936 (1968).
- (29) H. L. Sadoff : "Methods in Enzymology," Vol. IX, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, 1966, p.103.
- (30) W. A. Wood : "The Enzymes," Vol. V, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, Inc., New York, 1971, p.575.
- (31) J. Lanyi : *Bacteriol. Rev.*, **38**, 272 (1974).