グリシン及び塩化ナトリウムによる大腸菌リン脂質組成の変化^{*1}

(平成元年 6 月 9 日受理)

竜口和恵^{*2} 坂本次郎^{*3}
李在根^{*4} 堤将和^{*5}Effects of Treatments with Glycine and/or Sodium Chloride on Phospholipid Composition of *Escherichia coli*Kazue TATSUGUCHI^{*2}, Jiroh SAKAMOTO^{*3}, Jea-Kyum LEE^{*4} and Masakazu TSUTSUMI^{*5}^{*2}Seinan Jogakuin Junior College: 1-3-2, Ibori, Kokurakita-ku Kitakyushu, Japan;^{*3}Ajinomoto Co Ltd. Central Research Laboratory: 1-1, Suzuki-cho, Kawasaki-ku,Kawasaki, Japan; ^{*4}University of Suncheon: 315, Megok-Dong, Suncheon,Cheonnan, Korea; ^{*5}Department of Agrobiological Resources, Faculty

of Agriculture, Ibaraki University: 3998, Ami, Ami-cho, Inashiki,

Ibaraki, Japan)

The combined antimicrobial effect of glycine and sodium chloride against *Escherichia coli* was studied by examining the effects of glycine and/or sodium chloride on the membrane components, protein and phospholipid. The membrane proteins from the cells treated with glycine and/or sodium chloride were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. No change of membrane protein composition was detected. The cells of *E. coli* were labeled with ¹⁴C-acetate, and were treated with glycine and/or sodium chloride. The labeled membrane phospholipid was analyzed by TLC, and the radioactivities of the respective lipid spots were measured. Cardiolipin (CL) content in phospholipid was increased by treatment with sodium chloride. Glycine had no effect on phospholipid composition, but combined treatment with glycine and sodium chloride further enhanced the increase of CL. In contrast, free fatty acid (FFA) increased instead of CL when cells grown in sodium chloride- or glycine-containing medium were treated with glycine or sodium chloride. CL, diphosphatidylglycerol, is a membrane stabilizer. FFA is a degradation product of membrane phospholipid, and perturbs the membrane.

From the above results and these facts, we concluded that the combined antimicrobial effects of glycine and sodium chloride against *Escherichia coli* resulted from damage to the membrane.

(Received June 9, 1989)

Key words: グリシン glycine; 塩化ナトリウム sodium chloride; 大腸菌 *Escherichia coli*; 抗菌力併用効果 combined antimicrobial effect; カルジオリピン cardiolipin; 遊離脂肪酸 free fatty acid

著者らはグリシンと塩化ナトリウム (NaCl) の抗菌力併用効果の発現に、菌体の膜構造の変化が関係している

ことを認めた¹⁾ので、本報では膜を構成するタンパク質とリン脂質について、その組成の変化と抗菌力発現との関係を検討した。

実験材料及び方法

1. 使用菌株とその培養

前報¹⁾のように、供試菌株としては *Escherichia coli* IFO3301 を用い、培地、培養条件なども同様に行った。

^{*1} グリシンと塩化ナトリウムの抗菌力併用効果 (第2報)

^{*2} 西南女学院短期大学: 北九州市小倉北区井堀 1-3-2

^{*3} 味の素(株)中央研究所: 川崎市川崎区鈴木町 1-1

^{*4} 順天大学: 大韓民国全羅南道順天市梅谷洞 315

^{*5} 茨城大学農学部: 茨城県稲敷郡阿見町阿見 3998

Fig. 1. SDS-polyacrylamidegel electrophoresis of membrane protein from the cells treated with glycine

cm: cytoplasmic membrane; om: outer membrane; c: control; 1~3: concentration of glycine (%); st: standard protein.

2. 試 薬

a) スフェロプラスト膜調製用試薬

トリスヒドロキシアミノメタン (Tris), エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) は和光純薬工業 (株) 製, 特級品を, ショ糖は半井化学薬品 (株) 製, 特級品を, 卵白リゾチームはメルク社のものを, デオキシリボヌクレアーゼ (DNase) はシグマ社のものを用いた。

b) 電気泳動用試薬

アクリルアミド, N,N' -メチレンビスアクリルアミド (BIS), 過硫酸アンモニウム, N,N,N',N' -テトラメチルエチレンジアミン, ラウリル硫酸ナトリウム (SDS), 2-メルカプトエタノール, コマージブリリアントブルー R-250 (CBB) は半井化学薬品 (株) 製, 電気泳動用試薬を, 酢酸, イソプロピルアルコール (IPA) は半井化学薬品 (株) 製, 特級品を, グリセリン, ブロムフェノールブルーは和光純薬工業 (株) 製, 特級品を用いた。また, 標準タンパク質としてはファルマシア社の低分子量用キットを用いた。

c) 脂質の放射ラベル及び分析用試薬

{2- 14 C}-酢酸ナトリウム (放射比活性, 1.8 mCi/ml) は New England Nuclear 社のものを非放射性の酢酸ナトリウムで 0.5 mCi/ml に希釈して用いた。トルエン, 2,5-ジフェニルオキサゾール (DPO) は半井化学薬品 (株) 製, 液体シンチレーション用を, クロロホルム, メタノールは半井化学薬品 (株) 製, 特級品を用いた。薄層クロマトグラフィー (TLC) にはメルク社の Kiesel gel H

Fig. 2. SDS-polyacrylamidegel electrophoresis of membrane protein from the cells grown in 2% sodium chloride containing medium

The cells were treated with 0.5%~2% glycine.

Abbreviations are similar as shown in Fig. 1.

60 を用いた。

d) 脂肪酸分析用試薬

脂肪酸のメチル化試薬としては和光純薬工業 (株) 製のナトリウムメチラートを, その他, 抽出用としては半井化学薬品 (株) 製, 特級品の石油エーテル, クロロホルム, メタノールを用いた。また, 脂肪酸標準品としては, シグマ社製のミリスチン酸 (14:0), パルミチン酸 (16:0), パルミトオレイン酸 (16:1), ステアリン酸 (18:0), オレイン酸 (18:1) を用いた。

3. スフェロプラスト膜の調製と精製

対数増殖期後期まで培養した培養液 450 ml を遠心分離 ($7,000 \times g$, 5 分, 4°) により集め, 脱イオン水で 1 回洗浄した後, OD 660 値が 0.4 となるように, 脱イオン水に懸濁した。この菌懸濁液に結晶グリシンや NaCl を加えて, 30° で 1 時間, ゆるやかに振とう後, 集菌し, 脱イオン水 17.8 ml に懸濁して, EDTA-リゾチーム法²⁾により, スフェロプラストを調製した。これを遠心分離 ($20,000 \times g$, 15 分, 4°) により集め, 25 μ g の DNase を含む 5 mM 塩化マグネシウム 50 ml にテフロンホモジナイザーを用いて十分懸濁させた。混入している菌体を, $1,500 \times g$, 10 分間の遠心分離により除いた後, $20,000 \times g$, 20 分の遠心分離により, スフェロプラスト膜を集め, さらに, 0.5 M, 2 M の不連続ショ糖密度勾配遠心 ($74,000 \times g$, 2 時間, 4°) で精製し, タンパク質分析用の試料とした。

Fig. 3. Lipid composition of *E. coli* treated with sodium chloride and/or glycine
(A): treatment with sodium chloride; (B): treatment with glycine; (C): treatment with sodium chloride plus 0.5% glycine; —□—: phosphatidylethanolamine; —□—: phosphatidylglycerol; —▲—: cardiolipin; —■—: free fatty acid; —△—: lysophospholipid

4. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

Lugtenberg の方法³⁾に従い, SDS-PAGE を行った。ただし泳動ゲル組成はアクリルアミド, 11%-BIS, 0.2%, 添加タンパク質量は約 20 μ g とした。泳動後のゲルの染色・固定・脱色は 0.04% CBB-25% IPA-10% 酢酸で 1 夜, 0.004% CBB-10% IPA-10% 酢酸で, 6~7 時間, 10% 酢酸で 48 時間行った。

5. 脂質の放射能ラベル, 抽出及び分析

14 C-酢酸ナトリウムを培地 10 ml につき 20 μ Ci 加えて対数増殖期中期まで培養して菌体をラベルした後, グリシンあるいは NaCl, または併用の処理を 30° で 1 時間行って集菌・洗浄し, 少量の脱イオン水に懸濁した。この菌懸濁液から Bligh と Dyer の方法⁴⁾により脂質抽出を行い, 窒素ガスを吹き付けて濃縮し, TLC の試料とした。TLC プレートにはシリカゲル H を 0.3 mm 厚さ

Fig. 4. Lipid composition of *E. coli* grown in sodium chloride or glycine containing medium (A), (B), (C): treatment with glycine of cells grown in 0.5, 1, 2% sodium chloride containing medium; (D): treatment with sodium chloride of cells grown in 0.5% glycine. Abbreviations are similar as shown in Fig. 3.

に塗布した 5×20 cm のガラス板を用い、脂質試料 10 μ l を添加した後、それに重ねて *E. coli* より抽出した非放射化脂質の濃厚溶液 (約 10 mg/ml), 4 μ l を添加した。展開溶媒としては、クロロホルム:メタノール:酢酸=65:25:10 を用い、約 18 cm 展開後、十分に溶媒を除去し、ヨウ素蒸気で脂質の検出を行った。粉末が飛ばないように水を噴霧した後、各スポットをかきとり、DPO を 4 g/l 含むトルエン 8 ml を加え、各スポットの放射活性を液体シンチレーションカウンター (アロカ LSC-90) で測定した。結果は各脂質のパーセントで示した。

6. 脂肪酸分析

対数増殖期中期まで培養した菌を集菌・洗浄後、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に OD 660 値が 0.4 になるように懸濁してグリシンや NaCl による処理を 30° で 1 時間行った後、常法⁴⁾に従い脂質を抽出した。この脂質画分から溶媒を窒素ガスで除去し、0.1 M ナトリウムメチラートでメチル化を行った。1 時間後、酢酸を加えて反応

を停止させ、脂肪酸メチルエステルを石油エーテルで抽出後、濃縮し、ガスクロマトグラフィーにより分析した。測定条件は次のとおりである。

装置: 島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-4B

カラム: ステンレスカラム (長さ 2 m, 内径 3 mm)

充てん剤: 10% DEGS (Shimalite W)

カラム温度: 180°

検出器: 水素炎イオン化検出器

キャリアガス: 窒素ガス

キャリアガス流速: 45 ml/min

脂肪酸の同定は標準品との保持時間の比較、及び *E. coli* K-12 の脂肪酸組成データ⁵⁾との比較によって行った。

実験結果及び考察

1. 膜タンパク質の組成に及ぼすグリシン及び NaCl の影響

Fig. 1 にグリシン処理菌体から調製したスフェロブ

Table 1. Composition of Fatty Acid of *Escherichia coli* IFO3301

Culture	Treatment	Fatty acid composition (%)						
		14:0	15:0	16:0	16:1	17:0	18:1	19:0
Nutrient broth	None	1.4	0.5	22.4	27.3	5.7	41.6	0.7
0.5% NaCl-nutrient broth	Control	1.2	0.5	22.9	23.4	7.5	43.4	1.1
	Glycine							
	0.5%	1.2	0.5	21.5	23.9	7.3	44.6	1.1
	1.0%	1.2	0.3	22.1	23.8	7.3	44.1	1.3
2.0% NaCl-nutrient broth	2.0%	1.2	0.4	22.8	24.9	6.8	42.3	1.2
	Control	1.2	0.2	27.2	26.5	6.9	37.1	1.0
	Glycine							
	0.5%	1.2	0.5	26.8	27.1	6.1	37.3	1.0
0.5% Glycine nutrient broth	1.0%	1.4	0.7	27.0	26.0	6.6	37.6	1.0
	2.0%	1.4	0.7	24.5	28.0	6.2	38.2	1.1
	Control	1.0	0.6	20.0	22.7	4.9	50.0	1.2
	NaCl							
0.5% Glycine nutrient broth	1.0%	1.0	0.5	20.4	23.2	5.1	48.5	1.3
	2.0%	1.0	0.7	20.0	23.6	4.5	49.0	1.2
	3.0%	1.0	0.3	18.9	24.4	4.4	50.1	1.1

ラスト膜タンパク質の SDS-PAGE の結果を, Fig. 2 に 2% NaCl 含有培地増殖菌のグリシン処理の場合の SDS-PAGE の結果を示した。これらの処理により, 菌体成分の漏出¹⁾や溶菌⁶⁾が観察されたが, 膜タンパク質の組成には全く変化は見いだせなかった。また NaCl 処理菌, グリシンと NaCl の併用処理菌, グリシン含有培地増殖菌の NaCl 処理菌などからもスフェロプラストを調製し膜タンパク質の SDS-PAGE を行ったが, これらにも全く変化がなかったため, 結果は省略した。

2. リン脂質組成に及ぼすグリシン及び NaCl の影響

グリシンあるいは NaCl の単独処理, 及びグリシンと NaCl の併用処理を行った菌体のリン脂質組成を Fig. 3 に示した。菌体を NaCl で処理した場合, 処理濃度が高くなるにつれてホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルグリセロール (PG) の含有率が低下し, 逆にカルジオリピン (CL), 遊離脂肪酸 (FFA) の含有率が上昇した (Fig. 3(A))。しかし, グリシン単独で処理した場合は, リン脂質組成の変化は全く認められなかった (Fig. 3(B))。グリシンと NaCl の併用処理の場合 (Fig. 3 (C)) は, NaCl 単独処理の場合と同様の傾向, すなわち PE, PG 含有率の低下と, CL, FFA 含有率の上昇が認められ, 特に, CL 含有率の上昇が著しかった。

NaCl 含有培地で増殖した菌をグリシンで処理した場合, 及びグリシン添加培地で増殖した菌を NaCl で処理した場合のリン脂質組成の変化を Fig. 4(A)~(D) に示した。NaCl 含有培地で増殖した菌をグリシンで処理した場合, 処理したグリシンの濃度が上がるのに従い, PE

が減少し, FFA が増加したが, CL の増加は認められなかった (Fig. 4(B), (C))。またグリシン添加培地で増殖した菌を NaCl で処理した場合 (Fig. 4(D)) には, PE, PG の減少と FFA の増加が認められた。

大腸菌のリン脂質は 70~80% を占める PE, 10~20% の PG 及び数パーセントの CL から成っており^{7), 8)}, さまざまな条件によりその組成比は変化する^{9), 10)}。また *Staphylococcus aureus* では培地中の NaCl の濃度に応じて CL が増加することが知られており, この菌の強い耐塩性との関連が示唆されている¹¹⁾。グリシン単独で処理した場合, 脂質組成比に変化はなかったが, NaCl 処理の場合, PE と PG が減少し, CL, FFA が増加することが認められ, グリシンと NaCl を併用処理するとその傾向がより顕著になった。ところが, NaCl 添加培地で増殖した菌あるいはグリシン添加培地で増殖した菌を, それぞれグリシンあるいは NaCl で処理すると, CL の増加は全く認められず, FFA のみが増加していた。

環境条件の変化に対応して微生物がそのリン脂質組成を変化させることはよく知られており^{9)~11)}, 一般に PG が減少して CL が増加することが多い。CL は PG2 分子から合成され, その反応にはエネルギーを要しないと考えられている¹²⁾。つまり CL の増加は比較的簡単に微生物が環境に適応する場合に見られる反応であると考えられる。逆に, FFA の増加は膜を構成しているリン脂質の分解を示すものであり, この反応が進めば溶菌など菌体にとって致命的な結果となることが考えられる。

膜の保持の点から考えても、CL の増加は膜を強く安定にし^{11), 13)}、FFA の増加は膜を不安定にする¹⁴⁾。従って、グリシンと NaCl の併用処理 (Fig. 3(C)) においては、FFA の増加という膜の不安定化要因は認められるものの、CL の増加という膜の安定化要因のほうが上回っているため、グリシンによる溶菌や菌体成分の漏出が抑えられるものと推察できる。逆に、NaCl 添加培地増殖菌をグリシンで処理した場合 (Fig. 4(B), (C)) は CL の増加は認められず、FFA のみが増加し、膜が不安定になっていると考えられ、このことが抗菌力の併用効果と関係していることが推察された。また、グリシン添加培地増殖菌を NaCl で処理した場合 (Fig. 4(D)) も、CL は増加せず、FFA が増加していたが、この処理では菌体表層の損傷は起こるが、菌体成分の漏出はほとんど認められないなど矛盾した結果¹⁾であった。

3. 脂肪酸組成に及ぼすグリシン及び NaCl の影響

Table 1 に各処理菌の脂肪酸組成比を示した。それぞれの培地条件内では、グリシン処理や NaCl 処理によって脂肪酸組成比はほとんど変わらないが、培地条件が異なった場合、明らかにその組成比は異なっていた。主脂肪酸である 16:0, 16:1, 18:1 について比較すると、0.5% NaCl 添加培地増殖菌が最も対照区の組成比と近く、2% NaCl 添加培地増殖菌では飽和酸、16:0 の含量が高く、不飽和酸、特に 18:1 の含量が低かったが、逆に 0.5% グリシン添加培地増殖菌では 16:0 の含量が低く、18:1 の含有率が上昇していた。

微生物が外界の温度変化に適応して膜リン脂質の脂肪酸組成をすみやかに変化させ、膜の流動性を一定に保つことはよく知られている^{15), 16)}。一般に環境温度が低い場合には、不飽和酸を増大させ、温度が高くなれば、飽和酸を増大させて膜の流動性を一定に保つが、この変化が同一温度で起こるとすると、不飽和酸の多い膜は柔らかく、飽和酸の多い膜は堅くなる。このような脂肪酸組成比から、本実験の結果を見ると、NaCl 添加培地増殖菌では膜は堅く、グリシン添加培地増殖菌では膜は柔らかくなっていると考えられるが、前者のグリシン処理あるいは後者の NaCl 処理によっては、脂肪酸組成は変化せず、抗菌力併用効果発現との関連性は薄いものと判断した。

要 約

グリシンと NaCl の抗菌力併用効果について、菌体表層とくに膜の損傷が示唆されたので、膜構成成分のタン

パク質、脂質の変化を調べ、次のような結果を得た。

1. 菌体成分の漏出や溶菌が観察される条件によっても、膜タンパク質の組成は変化せず、抗菌力併用効果との関連は見いだせなかった。

2. 膜脂質の脂肪酸は NaCl 含有培地での増殖あるいはグリシン含有培地での増殖など培地条件により変化するが、前者のグリシン処理、後者の NaCl 処理などでは全く変化せず、抗菌力発現との関連は薄いと推察した。

3. 膜リン脂質の組成は、グリシンの抗菌力に対して抑制的に働く NaCl との併用処理では、菌体の環境適応の一つである CL の増加が目立ち、グリシンと NaCl の抗菌力併用効果が現れる処理では、膜リン脂質の崩壊を示す FFA が増加し、抗菌力発現との関連が認められた。

文 献

- 1) 竜口和恵, 坂本次郎, 李 在根, 堤 将和: 食衛誌. **30**, 506~511 (1989).
- 2) Miura, T., Mizushima, S.: Biochim. Biophys. Acta **193**, 268~276 (1969).
- 3) Lugtenberg, B., Meijers, J., Perters, R., Hoek, P. van, Alphen, L. van: FEBS Lett. **58**, 254~258 (1975).
- 4) Bligh, E. G., Dyer, W. J.: Can. J. Biochem. Physiol. **37**, 911~917 (1959).
- 5) Silbert, D. F., Ruch, F., Vagelos, P. R.: J. Bacteriol. **95**, 1,658~1,665 (1968).
- 6) 李 在根, 竜口和恵, 堤 将和, 渡辺忠雄: 食衛誌. **26**, 279~284 (1985).
- 7) Ames, G. F.: J. Bacteriol. **95**, 833~843 (1968).
- 8) Chamberlain, B. K., Webster, R. E.: J. Biol. Chem. **251**, 7,739~7,745 (1976).
- 9) Okuyama, H.: Biochim. Biophys. Acta **176**, 125~134 (1969).
- 10) Chiu, T.-H., Hung, S.-A.: *ibid.* **558**, 267~272 (1979).
- 11) Kanemasa, Y., Yoshioka, T., Hayashi, H.: *ibid.* **280**, 444~450 (1972).
- 12) Hirschberg, C. B., Kennedy, E. P.: Proc. Nat. Acad. Sci. **69**, 648~651 (1972).
- 13) Hayami, M., Okabe, A., Kariyama, R., Abe, M., Kanemasa, Y.: Microbiol. Immunol., **23**, 435~442 (1979).
- 14) Gordon, A. S., Wallch, D. F. H., Staraus, J. H.: Biochim. Biophys. Acta **183**, 405~412 (1965).
- 15) Marr, A. G., Ingraham, J. L.: J. Bacteriol. **84**, 1,260~1,267 (1962).
- 16) De Siervo, A. J.: *ibid.* **100**, 1,342~1,349 (1969).