

9327 耐塩性菌 *Brevibacterium* sp. の耐塩機構に関する研究

助成研究者：永田 進一(神戸商船大学 商船学部)

共同研究者：足立 恭子(海洋バイオテクノロジー研究所)

白井 勝久(海洋バイオテクノロジー研究所)

佐野 浩(海洋バイオテクノロジー研究所)

研究目的：シフト試薬を用いた ^{23}Na -NMR 法は、細胞内フリー Na^+ 量を直接的に測定できる方法として優れているが、高塩濃度で培養した好塩細菌に適用する場合は、細胞外 Na 量が細胞内 Na 量に対して数百倍多いので大変難しい。本研究では、耐塩性菌 *Brevibacterium* sp. の細胞内フリー Na^+ 量を ^{23}Na -NMR 法によって測定する方法の確立を試みた。さらに、この方法を高度好塩菌 *Halococcus morrhuae* および *Escherichia coli* にも適用し、培養液中の NaCl 濃度を变化させた時の細胞内フリー Na^+ 量を明らかにし、*Brevibacterium* sp. の耐塩機構解明の一助とすることを目的として研究を行った。

研究方法：各菌を種々の塩濃度存在下で定常状態まで増殖させ、遠心分離により 10-20 倍に濃縮して細胞浮遊液とした。それに細胞膜不透過性のシフト試薬 (dysprosium triphosphate) を添加して細胞内外の Na^+ を分離し、500 MHz Varian UNITY 500 により細胞内 Na^+ 量を定量した。

研究結果：*Brevibacterium* sp. を 0.1-2.5 M NaCl を含む複合培地で増殖させると、細胞内フリー Na^+ 濃度は NaCl 濃度とともに緩やかに増加したが、16-172 mM と低かった。一方、*E. coli* のそれは、外部 NaCl 濃度に比例してほぼ直線的に増加し、0.8 M NaCl 存在下では 368 mM と *Brevibacterium* sp. より 8 倍以上も大きい値を示した。NaCl を含む培地に KCl を共存させると、*Brevibacterium* sp. の細胞内フリー Na^+ 濃度は、KCl 濃度に依存して増加した。しかし、全 Na 量にはほとんど変化がなかったことより、この増加は K^+ の存在によって細胞内で結合していた Na^+ がフリー状態に移行したことによるものと結論された。また、高度好塩菌の *Halococcus morrhuae* の細胞内フリー Na^+ 量も同様の手法で求めたところ、上記2種の菌株と同様外部 NaCl 濃度に比べて大変低く保たれていることが明らかとなった。

9327 耐塩性菌 *Brevibacterium* sp. の耐塩機構に関する研究

助成研究者: 永田 進一 (神戸商船大学 商船学部)

共同研究者: 足立 恭子 (海洋バイオテクノロジー研究所)

白井 勝久 (海洋バイオテクノロジー研究所)

佐野 浩 (海洋バイオテクノロジー研究所)

◇研究目的

好塩細菌は、高 NaCl 濃度域に好んで生息しているので、基質の取り込みやエネルギー変換などにそれを有効に利用し生存に供しているものと考えられる。しかし、実際にこれら好塩細菌の細胞内部を調べてみると、増殖に高 NaCl 濃度を要求する古細菌では、Na⁺ よりもむしろ K⁺ を選択的に細胞内に蓄積する事が知られている (1)。また、一般の好塩細菌でも、Na⁺ の取り込みよりもむしろ補償溶質が細胞外の高 NaCl 濃度に対抗するものとして細胞内で合成されている (2)。

海洋細菌 *Brevibacterium* sp. は、幅広い塩濃度域で増殖可能な耐塩性菌である (3)。その細胞内 Na⁺ イオン濃度を種々の外部 NaCl 濃度の関数として原子吸光法で求めたところ、外部 NaCl 量に比例して増加しているとの結果が得られた (4)。同様のことが、数種の好塩細菌においても見いだされているが (1)、いずれも原子吸光法など細胞質内で結合している Na⁺ や細胞外膜に付着している Na⁺ などもトータルとして含まれている可能性のある分析であり、高浸透圧に抗する機構を正しく理解するために必要不可欠な真にフリーな細胞内 Na⁺ 量を求めることができているとは言い難い (5)。

シフト試薬を用いた ²³Na-NMR 法は、細胞内フリー Na⁺ 量を直接的に測定できる方法として優れているが、高塩濃度で培養した好塩細菌に適用する場合には、細胞外 Na 量が細胞内 Na 量に対して数百倍多いのが通常であり、定量的な測定は大変難しい。そこで本研究では、耐塩性菌 *Brevibacterium* sp. の細胞内フリー Na⁺ 量を ²³Na-NMR 法によって測定する方法の確立を試みた。さらに、この方法を *Escherichia coli* および高度好塩菌 *Halococcus morrhuae* にも適用し、培養液中の NaCl 濃度を变化させた時のこれらの細胞内フリー Na⁺ 量を明らかにし、*Brevibacterium* sp. のそれと比較検討することにより、*Brevibacterium* sp. の耐塩機構解明の一助とすることを目的として研究を行った (6)。

◇研究方法

菌の増殖：供試菌として使用した *Brevibacterium* sp. (JCM 6894), *E. coli* (ATCC 11775), *H. morrhuae* の培養条件は、文献 (3) 及び (7) に与えられている通りである。特記していない限り、各菌体は定常状態まで増殖させた後、培養液を遠心分離等の操作によって 10-20 倍に濃縮し細胞浮遊液とした。

シフト試薬：シフト試薬 (0.025M dysprosium triphosphate ($\text{Dy}(\text{PPP})_2^{7-}$) は、 $\text{DyCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ 溶液 (D_2O) と 1:4 の割合で混合して作成した。

^{23}Na -NMR の測定：Gilboa らの測定方法 (8) を一部修正し、下記に示されている手法により ^{23}Na -NMR 測定を行った。すなわち、上記の細胞浮遊液 2 ml を遠心分離し上澄み液を除去後、得られたペレットに 0.4 ml のシフト試薬を添加した。その混合液を 5 mm チューブに入れ、500 MHz の Varian UNITY 500 により 20°C で測定を行った。典型的な ^{23}Na -NMR のスペクトルが、Fig. 1 に与えられている (*Brevibacterium* sp. を 0.5 M NaCl 存在下で増殖させたもの)。 *Brevibacterium* sp. と *E. coli* の細胞内フリー Na^+ 量は、それぞれの細胞内水分量に基づいて計算された (4, 9)。本測定法の有用性を確かめるために、Gilboa ら (8) が供試菌として用いた *Vibrio costicola* を上述した本方法で測定したところ、両者の間にほとんど差はなかった。

◇研究結果

Brevibacterium sp., *E. coli* および *H. morrhuae* における細胞内フリー Na^+ 量：

Brevibacterium sp. と *E. coli* をそれぞれ 0.1-2.5 と 0.1-0.8 M NaCl 存在下で増殖させた時の細胞内フリー Na^+ 量を ^{23}Na -NMR によって測定した。その結果、前者の菌の細胞内フリー Na^+ 濃度は、0.1-1 M の NaCl 濃度範囲で 50 mM 以下と大変低かった (Fig. 2a)。しかし、1 M から 2 M NaCl へと増加するにしたがい、その値は急激に増加し始め 2.5 M NaCl では 170 mM に達した。しかし、その値は外部 NaCl 濃度の 7% 以下に過ぎず、相対的にみてきわめて低濃度に維持されていることが明らかとなった。また興味深いことに、細胞内フリー Na^+ 量は、最大増殖速度と完全に反比例の関係にあり、細胞収量とも 1 M NaCl 以上では反比例の関係にあることも判った。

一方、*E. coli* のそれは、培地中の NaCl 量が増加するとともに直線的に増加したが、その値は *Brevibacterium* sp. のそれに比して大変大きく、0.8 M NaCl での値を比較すると 8 倍以上の 368 mM であった (Fig. 2b)。また、*Brevibacterium* sp. の場合と同様に *E. coli* の細胞内フリー Na^+ 量も、最大増殖速度並びに細胞収量との間に明瞭な反比例の関係が認められた。

また、高度好塩菌 *H. morrhuae* の細胞内フリー Na^+ 量は、上述した条件下で NMR 測定を行うと菌体自身が容易に溶菌するので、3.5 M Glyccrol の共存下で測定を行った。その結果、3.5 M および 4.0 M NaCl 存在下で増殖させた *H. morrhuae* の細胞内フリー

Na⁺量は、それぞれ 384 mM と 588 mM であった。すなわち、*H. morrhuae* の細胞内フリー Na⁺濃度も *Brevibacterium* sp. や *E. coli* と同様、外部 NaCl 量に比べて大変低く保たれていることが示された。同時に、上記2種の菌と同様にそれらが細胞収量と反比例の関係にあることも判明した。

細胞内フリー Na⁺イオン量に与える補償溶質の影響：2 M NaCl を含む培地に 1 mM プロリンを添加した条件下で *Brevibacterium* sp. を増殖させると、細胞内のフリー Na⁺イオン量は無添加の場合の約半分にまで減少した。1 mM グリシンベタイン (GB) や 5 mM γ -アミノ酪酸 (GABA) の添加によっても同様な減少傾向が認められた。しかし、溶質の添加濃度をそれぞれ 10 倍に増加させると、いずれの場合もフリー Na⁺量は無添加の場合とほぼ同じで変化がなく、細胞収量のみ増加した。以上の結果より、補償溶質が高濃度に添加された場合には、それが浸透圧保護剤として外部高浸透圧の緩和に働くというよりむしろ、炭素源として細胞内で代謝されているのではないかと考えられる。

E. coli の場合も、上述した *Brevibacterium* sp. と同様の手法で補償溶質の添加効果を検討したところ、10 mM プロリンを添加した時のみ細胞内フリー Na⁺濃度は 30 mM ほど減少したが、その他の場合すなわち 1-50 mM GB や GABA を添加しても細胞内フリー Na⁺量にはほとんど変化がなかった。

細胞内フリー Na⁺量に及ぼす K⁺イオンの影響：*Brevibacterium* sp. は、NaCl 同様 KCl 存在下でも良好に増殖する (3)。そこで、増殖培地中に Na⁺ と K⁺ が共存した時の *Brevibacterium* sp. における細胞内フリー Na⁺量の解析を試みた。培養液中の NaCl と KCl 濃度の和を 2 M に保ちながら両者の濃度を変化させたところ、それは NaCl 濃度が 1-1.5 M の時に最大を示した。逆に、1.5 M 以上の NaCl が存在するとそれは急激に減少した。すなわち、外部 NaCl 濃度が増加しても KCl が共存していないと、細胞内フリー Na⁺量は増加しなかった。

一方、*Brevibacterium* sp. の全 Na 量は、KCl の存在の有無にかかわらず NaCl 濃度の増加に比例して増加した。ここで、全 Na 量に及ぼす KCl の影響を調べてみると、KCl が共存していた方がむしろ細胞内フリー Na⁺量が大きいたことが認められた。この差は、KCl の共存による細胞内フリー Na⁺量の増加を示していると考えられる。

そこで、K⁺イオンの役割をさらに明確にするために、0.5 M NaCl を含む培養液に KCl を 0-2 M まで添加して *Brevibacterium* sp. を増殖させその細胞内フリー Na⁺量の定量を試みることにした。その結果、Fig. 3 に示されているようにそれらは KCl の増加とともに 1.5 M までほぼ直線的に増加したが、それ以上では一定 (約 180 mM) であった。同時に測定した全 Na 量は 1.5 M KCl までほぼ一定であったが、それ以上の KCl が存在すると大幅な減少が認められた。以上の結果より、NaCl 存在下で KCl 濃度を増加してい

くと細胞質内の Na の存在形態が NMR では検出不可能な結合状態から検出可能なフリー状態へ変換されているものと考えられる。

細胞構造に結合している Na⁺ 量の分析 : *Brevibacterium* sp. は、グラム陽性細菌に特有の大変強固な細胞壁を有しており、蒸留水で数回洗浄を繰り返しても生菌数に大きな変化はない (Table 1)。この特徴を利用して、細胞壁に付着している Na や細胞質内又は細胞膜などで細胞構成物質と結合している Na など ²³Na-NMR 法では検出できない Na 量の評価を試みた。2-3 回の蒸留水による洗浄により、細胞外 Na 量はほぼ一定 (約 1.8 μmole/mg protein) となった。一方、細胞内フリー Na⁺ 量は、0.13 μmole/mg protein すなわち 35 mM と洗浄後も大きな変化は見い出されなかった。この結果より、細胞膜や細胞質内において結合状態にあるいわゆる ²³Na-NMR によって検出できない Na 量は、36-38 % と求められた。この値は、パルス NMR 法において存在する励起と検出の間の過度の不動時間のための限界と考えられる。

◇考察

耐塩性菌 *Brevibacterium* sp. の細胞内フリー Na⁺ イオン量は、外部 NaCl 濃度の 5-7 % に過ぎず大変低く維持されていることが示された。このような結果は、中度好塩細菌 *V. costicola* (8) や耐塩性藻類 *Dunaliella salina* (10) においても認められているものである。また、*Brevibacterium* sp. をはじめとしてこれらの細菌や藻類は、NaCl の幅広い濃度域で増殖可能という共通の特性を有している。これらのことより、好塩性細菌や藻類では、細胞内酵素活性や蛋白合成活性を妨害しないように Na⁺ 量を抑え、一方でイオン濃度勾配を能動輸送などに有効に利用しているのではないかと思われる。このことは、Na⁺ ポンプや Na⁺/H⁺ 逆輸送系などこれらの細胞固有の働きとも矛盾しない。

これとの関連で、*E. coli* の細胞内フリー Na⁺ 量が上述した好塩細菌のそれらよりはるかに大きい値であったことは興味深い。たとえば、0.8 M NaCl 存在下で増殖させた時 *E. coli* の細胞内フリー Na⁺ 量は、*Brevibacterium* sp. の 8 倍以上にも達した。そして、*E. coli* の細胞収量並びに最大増殖速度は、培養液中の NaCl 濃度が増加していくのに反比例して小さくなった。これらの実験結果より、細胞内フリー Na⁺ 濃度をいかに低く保つことができるかが高浸透圧に抗して生き残れるかどうかという耐塩機能と密接に関連していることが強く示唆された。

◇今後の課題

本研究結果より、幅広い塩濃度域で生存できるという耐塩能を保持するための要因の一つとして、細胞内フリー Na⁺ 量を低く保つ必要性が示唆された。すなわち、これら耐塩性菌では、細胞内に陽イオンが少ない分それ以外の物質を合成または取り込むことにより、

外部の浸透圧に抗しているものと考えられる。したがって、細胞内に蓄積されていると考えられるアミノ酸や糖など補償溶質の種類と濃度の特定が、ひきつづいて今後検討されるべき興味ある課題であろう。

また、今回検討した以外の種々の細菌についても、上述した手法を用いて同様の分析を行い、たとえば細菌をグラム陰性菌と陽性菌にグループ分けし、それぞれにおける細胞内フリー Na^+ 量と増殖に対する塩要求性との相関を追跡していくということも考えられる。同時に、 Na^+ イオンの流入流出などの動力的検討を ^{23}Na -NMRによる本法の分析法を適用して行うことも可能と考えられるので、急激な外部のイオンや溶質濃度の変化ならびに脱共役剤などの薬物添加などによる細胞内フリー Na^+ 濃度の時間変化の解析など、エネルギー変換機構と関連した諸事象の解明への新たな展開も期待される。

◇文献等

- (1) F. Rodriguez-Valera, *Halophilic Bacteria*, Vol. 1. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- (2) E. A. Galinski, *Experientia*, 49, 487 (1993).
- (3) S. Nagata, *Arch. Microbiol.*, 150, 302 (1988) ; 永田 : 化学と生物、26 巻、553 (1988).
- (4) S. Nagata, Y. Ogawa, and H. Mimura, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 37, 403 (1991) ; S. Nagata, *Proc. Seventh Int. Symp. on Salts*, Vol. I, 671 (1993) ; S. Nagata, *Microbios*, 75, 139 (1993).
- (5) 永田、化学と生物 : 30 巻、748 (1992) ; 永田、足立、白井、佐野 : 日本薬学会第 114 年会講演要旨集 3, pp 202 (1994).
- (6) S. Nagata, K. Adachi, K. Shirai, and H. Sano, submitted ; 足立、永田、白井、佐野 : 第 3 回 海洋バイオテクノロジー研究発表会 (1994)
- (7) S. N. Sehgal and N. E. Gibbons, *Can. J. Microbiol.*, 6, 165 (1960).
- (8) H. Gilboa, M Kogut, S. Chalamish, R. Regev, Y. Avi-dor, and N. J. Russell, *J. Bacteriol.*, 173, 7021 (1991).
- (9) P. I Larsen, L. K. Sydnes, B. Landfald, and A. R. Strom, *Arch. Microbiol.*, 147, 1 (1987).
- (10) M. Bental, H. Degani, and M. Avron, *Plant Physiol.*, 87, 813 (1988).

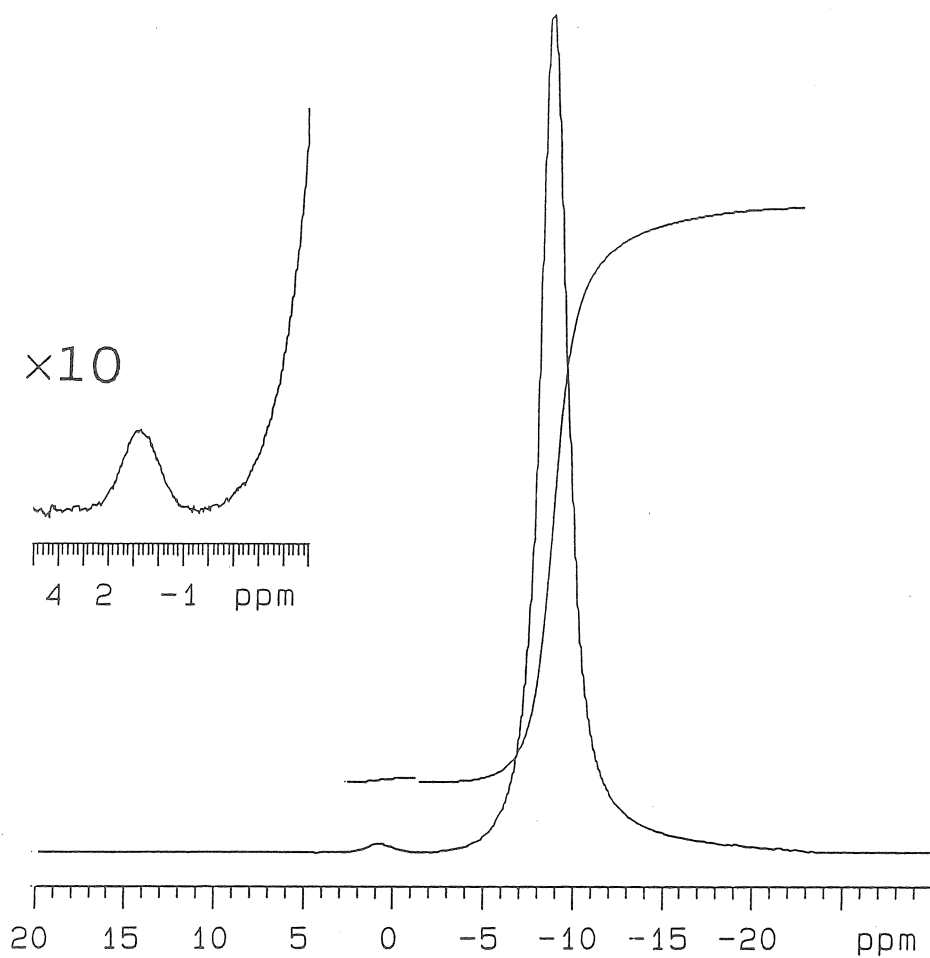


Fig. 1. ^{23}Na NMR spectrum of *Brevibacterium* sp. grown in the complex medium containing 0.5 M NaCl. The measurement was carried out in the solution containing 0.5 M Na^+ and 0.017 M $\text{Dy}(\text{PPP})_2^{7-}$. The chemical shift was referenced to 0.005 M NaCl solution.

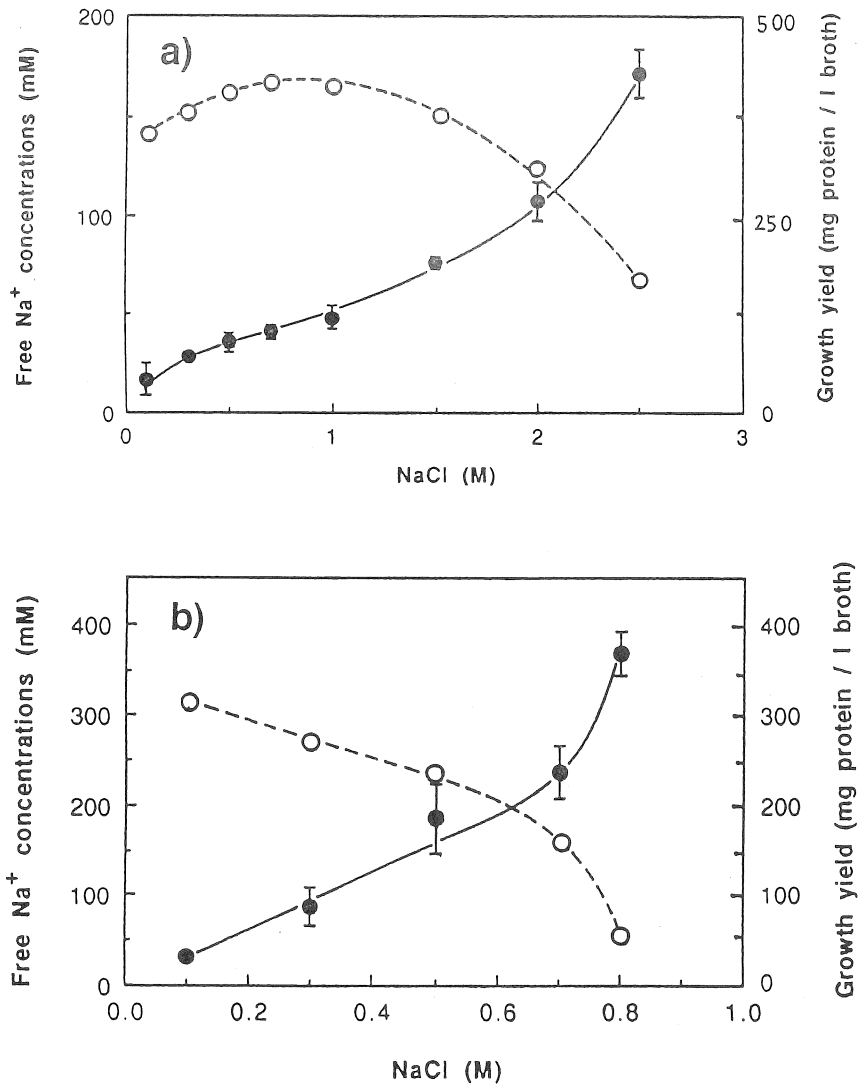


Fig. 2. Intracellular free Na⁺ concentrations in *Brevibacterium* sp. (a) and *Escherichia coli* (b) as functions of external NaCl concentrations. Both strains were grown in the complex medium containing various concentrations of NaCl. The concentrated cell suspensions after harvesting at the stationary phases of growth were provided for the determination of intracellular free Na⁺ concentrations (closed circle) by ²³Na NMR measurements. Cell growth yields (open circle) were also plotted as dotted lines.

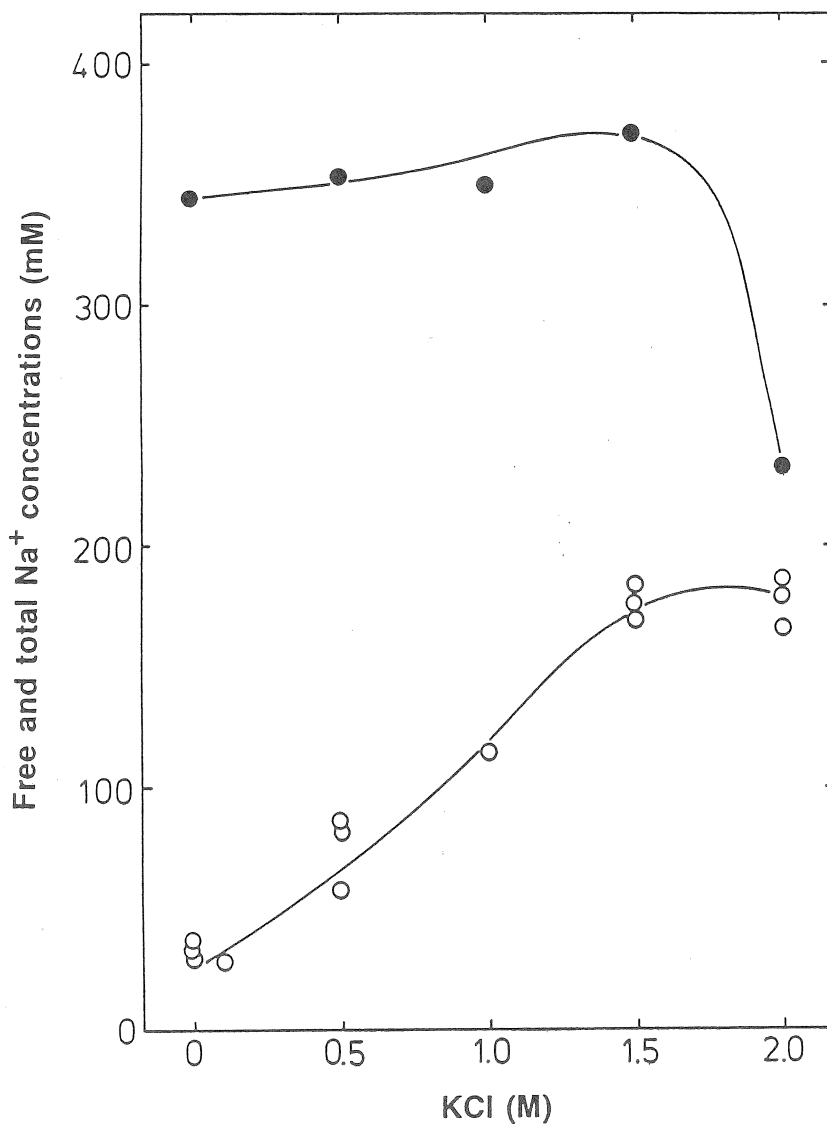


Fig. 3. Total and free sodium ion concentrations in *Brevibacterium* sp. grown in the presence of 0.5 M NaCl together with various concentrations of KCl. Analyses of total (●) and free (○) sodium concentrations were carried out by the same method as given in the legend of Fig. 2.

Table 1. Variations of internal free, extracellular and bound sodium concentrations ($\mu\text{mole}/\text{mg}$ protein) associated with *Brevibacterium* sp. cells during washing procedures^a

Number of washing	Free		Extracellular		Bound ^b		Visibility ^c (%)	Viability (cfu/ml)
	Na ⁺	Na ⁺	Na ⁺	Na ⁺	Na ⁺	Na ⁺		
0	0.13	6.85	-	-	-	-	-	5.91×10^9
1	0.13 (0.04)	1.86 (0.89)	0.26 (-)	36.1 (-)	36.1 (-)	36.1 (-)	36.1 (-)	5.73×10^9 (5.90×10^9)
3	0.14 (0.01)	1.77 (0.14)	0.23 (0.02)	37.8 (-)	37.8 (-)	37.8 (-)	37.8 (-)	4.98×10^9 (5.33×10^9)

^a The culture of *Brevibacterium* sp. grown in the presence of 0.5 M NaCl was harvested at the stationary phase of growth and washed by distilled water, and then mixed with the shift reagent of 0.0125 M DyCl_3 -0.05 M $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$. The same was true for the values in parentheses, except for the washing by 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.5 M KCl.

^b Amount of bound Na⁺ was calculated from the difference between total Na, measured after cell disruption by 25 % TCA treatment, and sum of intracellular and extracellular Na concentrations obtained from the ordinary method using shift reagent.

^c Visibility (%) = $\{ \text{Intracellular free Na}^+ / (\text{Intracellular free Na}^+ + \text{Bound Na}^+) \} \times 100$

Studies on the halotolerant mechanism of the halotolerant bacterium
Brevibacterium sp.

Shinichi NAGATA (Kobe University of Mercantile Marine)

Kyoko ADACHI, Katsuhisa SHIRAI, Hiroshi SANO (Marine Biotechnology Institute)

Summary

^{23}Na nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was employed for the determination of free sodium ion contents in a halotolerant bacterium *Brevibacterium* sp., extremely halophilic *Halococcus morrhuae*, and *Escherichia coli*. Those of *Brevibacterium* sp. at the stationary phases of growth gradually increased with the increase of NaCl concentrations from 0.1 to 2.5 M. Non-halophilic *E. coli*, on the other hand, accumulated higher concentrations of free sodium ions in the cells than those of *Brevibacterium* sp., e.g., grown in the presence of 0.8 M NaCl, they were 368 and 43 mM for the former and the latter, respectively. Intracellular free Na^+ contents were also analyzed for both strains grown in the presence of osmolyte (proline, glycine betaine, or γ -aminobutyrate) together with NaCl. As a result, those of *Brevibacterium* sp. and *E. coli* were reduced to 40–70 % and unchanged by the addition of osmoprotectants, respectively. In turn, addition of KCl in the medium containing NaCl led to the increase of not total but free sodium contents in the cells, indicating that the sodium ions bound or attached were converted to be free in the cytosol. Internal Na concentrations bound to the cellular structures, invisible fraction by ^{23}Na NMR, in *Brevibacterium* sp. grown in the presence of 0.5 M NaCl were estimated to be 0.23 $\mu\text{mole/mg}$ protein, which were equivalent with 38 % visibility. Internal free Na^+ contents in *H. morrhuae* also increased with the increase of external NaCl concentrations, i.e., they were 384 and 588 mM when it was grown in the presence of 3.5 and 4.0 M NaCl, respectively.