

Streptococcus faecalis におけるピルビン酸代謝の研究

山 岡 邦 雄*

Studies on Pyruvate Metabolism in Streptococcus faecalis

Kunio YAMAOKA

Abstract

It has been known that streptococcus faecalis requires lipoate or acetate for its growth in the presence of propionate. The author found the following facts: (1) some lipid substances, such as palmitate, oleate and behenate or lecithin, showed lipoate or acetate replacing effect on the growth of the organism; (2) biotin and bicarbonate stimulated the lipoate activity for the growth; (3) 2-¹⁴C-acetate added to the medium was mainly incorporated into the lipid fraction of the cells.

The results obtained would suggest that pyruvate oxidation takes an important role in lipid synthesis of S. faecalis under the cultural conditions.

1. ま え が き

アミノ酸, 核酸塩基, ビタミン, 塩類などを含み, 脂質を欠く培地で Streptococcus faecalis はグルコースをエネルギー源とするが, その増殖は, プロピオン酸 (Prop.A.) により著しく阻害され, 酢酸またはリポ酸の添加により回復されることが知られている。この培地条件下でピルビン酸の酸化によるアセチル CoA の生成が本菌の増殖に強い影響を与えると考えられるが, このアセチル CoA の代謝, すなわちピルビン酸の酸化は興味のあることである。アセチル CoA の代謝経路としては主には TCA サイクルと脂質合成系が考えられる。著者は PropA でピルビン酸からのアセチル CoA 生成を阻害した状態で脂質のある種が, リポ酸や酢酸の効果の代替作用を示すことを見出すと共にリポ酸活性がビオチン, 重炭酸塩の添加で著しく増大することを認めた。また酢酸で増殖させた場合, 菌体にとり込まれたうちの大部分は脂質画分に存在すること, 及び酢酸からの脱炭酸が殆んどおこらないことを認めた。このようなことから, アセチル CoA は脂質合成にその目的があると考えられる。

(2) 実 験 法

1. 試 薬

2-¹⁴C酢酸 (比活性6.0 μ c/ μ mole), は第一化学薬品株式会社より購入し, DL-リポ酸は藤沢薬品工業株式会社より購入した。

2. 使 用 菌 株

S. faecalis 1 OC 1

3. 増殖度測定法

上原ら¹⁾のリポ酸定量法に準じ, 適当量 PropA, 酢酸などを添加してその効果を調べた。

なお, 脂質はクロロホルム溶液の一定量を濾紙に塗布し, その濾紙を無菌的に培地に加えて対照との比較からその効果を調べた。

4. 酢酸代謝産物の検討

1 L の容器に PropA 6.5 μ moles, 2-¹⁴C-酢酸 1.2 μ moles (5 μ c) を含む500ml の培地を入れ二酸化炭素捕捉のため20%水酸化カリウム液を口に付ける。37°C, 19時間培養後, 濃硫酸 1.5ml を加えて pH 2 以下とし, 振盪後発生する二酸化炭素を水酸化カリウムに捕捉し, 過剰の塩化バリウムを加えて炭酸バリウムとして沈澱させ, Packard Tricarb 液体シンチレーションスペクトロメーターにより放射能を測定した。

一方培養物は PH 7 に調整し, 遠心分離後菌体を分け, 菌体を0.033M 磷酸カリ緩衝液 (PH 7.0) 16ml に懸濁し卵白リゾチーム20mgを加え37°Cで6時間温置後, 超音波細胞破砕器を用いて20KCで40分間処理後, 減圧乾固し, クロロホルム-メタノール (2:1) 50ml を加え16時間還流抽出を行なった。抽出液を遠心分離して上清と沈澱とに分けた。

* 宇都工業高等専門学校工業化学科

以上の操作各段階で得られた試料の一定量を採り常法により、ガスフローカウンターで放射能を測定し各画面の放射能を算出した。

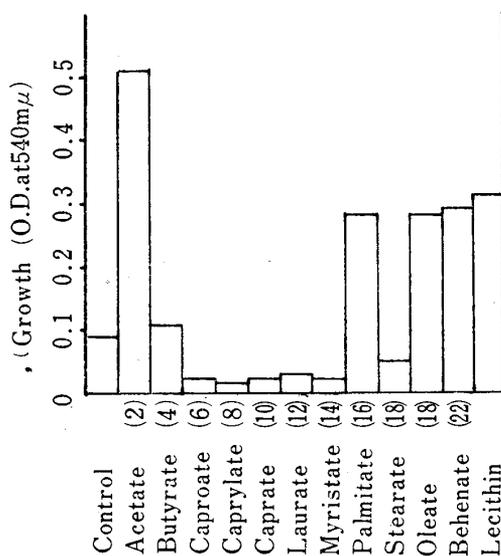
(3) 結 果

1. 脂質のリポ酸代替作用

S. faecalis 10C1 は PropA により PyA からアセチル CoA の生成を阻害した状態では増殖できないが、リポ酸添加により増殖可能となる。このような状態でリポ酸に代わり得る物質を調べる目的で、各種脂肪酸、及び磷脂質を調べた。脂肪酸としては炭素数2から18までの偶数炭素数のもの、及び22のペヘン酸、別に炭素数18の不飽和酸であるオレイン酸を用い、磷脂質としては大豆レシチンを用いた。

結果は Fig. 1 に示すように脂肪酸では炭素数2の酢酸の他に炭素数4の酪酸がやや有効であり、他には炭素数16のパルミチン酸、18のオレイン酸、22のペヘン酸がはっきりと増殖効果を示した。またレシチンも有効であった。効果を示した脂質について考えれば本菌の育成にとって必須である PyA からアセチル CoA の生成が、これらの脂質によっておきかえられることは必ずしも一つの原因に帰せられるべきものではないかも知れないが、一つの考えとし有効脂質は菌体脂質形成の素材となると推定することができる。

Fig.1. *S. faecalis* 10C1 の増殖に及ぼす脂肪酸の効果



() 内は炭素数を示す。

2. ビオチン及び重炭酸の増殖に及ぼす効果

アセチル CoA からの脂質合成を考える時、炭酸固定

の段階が含まれる。そこで PropA 共存下でリポ酸により PyA からアセチル CoA 生成を促した状態におけるビオチンと炭酸水素ナトリウムの添加効果を調べた。結果は Table. 1. に示すようにビオチン単独で2倍近く、炭酸水素ナトリウムで約1.3倍、両者合わせて約2倍の増殖促進が認められた。このような効果は酢酸の場合も認められた。また、この効果はリポ酸や酢酸が添加されない場合は効果は認められなかった。

Table. 1. プロピオン酸添加状態における *S. faecalis* 10C1 の増殖に対する、ビオチン、NaHCO₃ の効果。

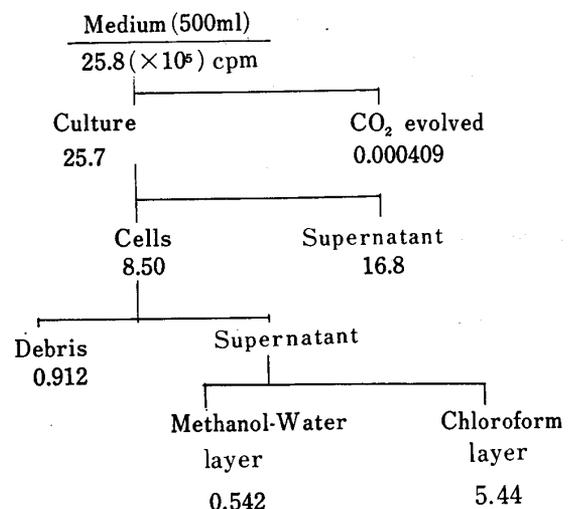
添加物	増殖度
無添加	100
ビオチン	190
NaHCO ₃	130
ビオチン+NaHCO ₃	200

ビオチン (1.0mμmole)
NaHCO₃ (120μmole)

3. 酢酸の代謝

上記培養条件で 2-¹⁴C-酢酸を加えて菌を増殖せしめ、その際の代謝産物について検討した。結果は Fig. 2. に示す。25.8×10⁵cpm の放射能を示す 2-¹⁴C-酢酸を加えた場合、37°C、19時間の培養で菌の増殖がほぼ定常状態に達するまでの¹⁴CO₂の発生量はきわめてわずかで 0.000409×10⁵cpmにすぎず放射能のほとんどすべては培養物中に残存していた。このことは酢酸の酸化的分解が少くとも活発には行なわれていないことを示すと考えられる。菌体中には 8.50×10⁵cpm の放射活性が残存

Fig.2. *S. faecalis* への 2-¹⁴C-酢酸のとり込み。



し、さらに脂質画分に 5.44×10^5 cpm の活性が認められた。これらのことは菌体にとりこまれた $2\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸の大部分が脂質に変化したことを示すと考えられる。

4. 考 察

ホモ乳酸菌の一つである *S. faecalis* は増殖にあたってグルコースを定量的に乳酸に変化すると考えられる。本報で得られた実験結果から、PyA 酸化の生理的意義が脂質合成にあると推論した。その最も大きい根拠は PyA 酸化が要求される上記条件で脂肪酸や磷脂質がリポ酸の代替作用を示したということと、PyA と同じくアセチル CoA を供給する酢酸を与えるとかなりの量が菌体内にとり込まれて、その大部分が脂質画分に存在し、一方培養中に酢酸に基づき脱炭酸が認められないという事実である。しかし、培地に加えられた脂肪酸が細胞内脂質の構成成分になったという直接の証拠はまだ得られていない。また PyA からの酸化と酢酸からの脂質合成との一致も検討せねばなるまい。また脂肪酸の種類により、増殖効果に著しい差のあることは基質のとりこみの

問題とも合わせ考えてみる必要がある。また、脂肪酸で増殖した菌体の脂肪酸成分との関係も検討せねばなるまい。しかし以上の実験結果から *S. faecalis* の代謝をエネルギー獲得の面から考察すれば、酢酸からの脱 CO_2 が認められないことを考えると、TCA サイクルの作用よりも解糖系によっていると推定できよう。このことは、この菌が通性嫌気性菌であり、解糖系の嫌気性と考え合わせると理解しやすいと思われる。

5. む す び

リポ酸定量用培地における各種脂肪酸の増殖効果及び酢酸の菌体脂質画分へのとり込み、などから考えて、*S. faecalis* 10C1 の PyA 酸化の生理的意義は脂質合成にあると推定した。

また、エネルギー代謝とも考え合わせると、解糖系の働きとの関連が推定できよう。

なお、この研究に当り終始御指導頂いた京都大学工学部上原助手に深謝する。

1) 上原悌次郎：ビタミン，22，298 (1961)。

(昭和46年5月1日受理)