

ブドウ球菌における耐塩機構

—浸透圧調節に寄与するプロリンの動態—

岡山大学医学部細菌学教室

長町 榮子・友近 健一・平井 義一

丸山 隆司・岡部 昭延*・金政 泰弘

(昭和60年8月27日受稿)

Key words : *Staphylococcus aureus*,
salt-tolerance,
osmoregulation,
proline

緒 言

黄色ブドウ球菌が高濃度食塩の存在下で生育できることは周知の特性である¹⁾。この高塩適応現象には、二つの機構のあることが明らかとなっている。

一つは、高塩環境下でのNa⁺透過への障壁性増強のための膜構成リン脂質の組成変化である。すなわち、生理的食塩環境下では大部分がホスファチジルグリセロール、リジルホスファチジルグリセロール、そして数%のカルジオリピンであるのに対し、高塩環境下で培養するとカルジオリピンが著明に増加して数10%となり^{2),3)}、Na⁺透過への障壁として働き、菌体内一価陽イオンの恒常性を保持しているということである^{2),4),5)}。

他の一つは、外界高浸透圧に対する浸透圧調節機構である。すなわち、黄色ブドウ球菌を生理的環境から高塩環境下に移すと、まず菌は収縮をとまなう脱水により細胞内の浸透圧を上昇させ、その後急激にプロリンを取り込み蓄積し、水を菌体内に再流入させる。逆に、高塩環境下で生育した菌を低塩環境に移すと、菌体内に蓄積していたプロリンを直ちに放出する。これらプロリンが浸透圧調節に主要な役割を演じていること、そしてこの調節機構は膜適応変化に先行する初期反応として極めて重要であること

を、ブイオン培地での生育実験によってわれわれが明らかにした^{6),7)}。

このたび、このような浸透圧調節を果たす時のプロリンの動態を更に詳細に把握するために、完全合成培地および半合成培地を用いて検討した。その結果、ブドウ球菌増殖に必須のアミノ酸であるプロリンが、浸透圧調節のためにはいかなる量が必要か、そしていかなる動態を演ずるかに関して更に詳細な知見を得たので報告する。

材料および方法

I. 供試菌と培養

菌は *Staphylococcus aureus* 209P (FDA) 株を供試した。液体培地は無機塩類、ビタミンおよびアミノ酸混液よりなる完全合成培地⁸⁾ (Table 1) を用い、一部無機塩類、yeast extract (0.1%) およびアミノ酸混液⁹⁾よりなる半合成培地を用いた。培養は37°Cで振盪培養を行い、光電比色法により増殖測定を行った。

プロリンを制限する実験は、所定のプロリン制限添加培地に馴化させた中期対数増殖期の菌を用いた。

II. アミノ酸分析

アミノ酸分析のための菌は次のようにして得た。合成培地に馴化させた菌を等張のリン酸緩衝液にて洗浄後、各プロリン添加の培地200mlに

Table 1 Composition of complete synthetic medium for *S.aureus*

glucose	5	g	glycine	50mg
			L-alanine	60
K ₂ HPO ₄	7	g	L-leucine	90
KH ₂ PO ₄	2		L.valine	80
Na-citrate·2H ₂ O	0.4		L-isoleucine	30
MgSO ₄	0.05		L-serine	30
(NH ₄) ₂ SO ₄	1		L-threonine	30
			L-methionine	3
thiamine	1	mg	L-cystine	20
nicotinic acid	1.2		L-tryptophan	10
biotin	0.005		L-tyrosine	50
Ca-pantothenate	0.25		L-phenylalanine	40
			L-aspartic acid	90
adenine	5	mg	L-glutamic acid	100
guanine	1		L-lysine	50
cytosine	5		L-arginine	50
uracil	5		L-histidine	20
thymine	20		L-proline	80
Deionized water	1000	ml		
	(pH 7.2)			

Table 2 Requirement of amino acid for growth of *S.aureus* 209P

Eliminated amino acid	Growth (% of OD)
control	100
aspartic acid	105
lysine	104
threonine	102
alanine	99
histidine	99
serine	94
tryptophan	83
glycine	75
methionine	63
leucine	50
tyrosine	48
isoleucine	17
proline	6
glutamic acid	2
arginine	2
phenylalanine	2
cystine	1
valine	0

加え、OD 0.25 から OD 0.75 (中期対数増殖期) まで培養した。このうち半量を菌体内遊離アミノ酸分析用、半量を湿菌および乾燥菌重量の測定に供した。

100mlの増殖菌体は10,000×g 10分で集菌し、ただちに6%冷トリクロル酢酸(TCA) 5mlを加え、2時間攪拌しながら遊離アミノ酸の抽出を行った。抽出後12,000×g 20分間遠沈で菌体を除き分析に供試した。なお集菌上清は終濃度6%になるよう冷トリクロル酢酸を加え残存アミノ酸分析に用いた。アミノ酸分析は全自動アミノ酸分析機(日本電子)にて行った。

結 果

I. アミノ酸要求性

完全合成培地を用いて、各アミノ酸単一抜き取り法により、アミノ酸要求性を検討した。Table 2は、完全組成の場合の定常期発育時(12時間培養)の濁度を100とし、単一アミノ酸抜き取り培地で同時間培養した時の濁度を%で表わ

した。その結果、イソロイシン抜き取りではわずかながら増殖するものの、プロリン、グルタミン酸、アルギニン、フェニルアラニン、シスチン、バリンなしではほとんど増殖せず、これらのアミノ酸は黄色ブドウ球菌の生育に必須であることが明らかである。

II. 生理的塩濃度および高食塩下での *S. aureus* 増殖に及ぼすプロリン添加量の影響

Fig. 1に、添加プロリン量を段階的に変えた完全合成培地での菌の増殖曲線を示した。添加プロリン量を、10, 15, 20, 100, 700μMと増加するにしたがって増殖極大は高くなる。しかしこの増殖パターンからみると、菌体構成に必要かつ充分な量は20μM程度であることがわかる。

Fig. 2は、10%食塩添加の完全合成培地で、添加プロリン量を変化させた場合の菌の増殖曲線を示した。菌を1%量接種にしたため遅滞期が長くなっているが、プロリンの添加量増加にともなって増殖は促進される。増殖極大から判断す

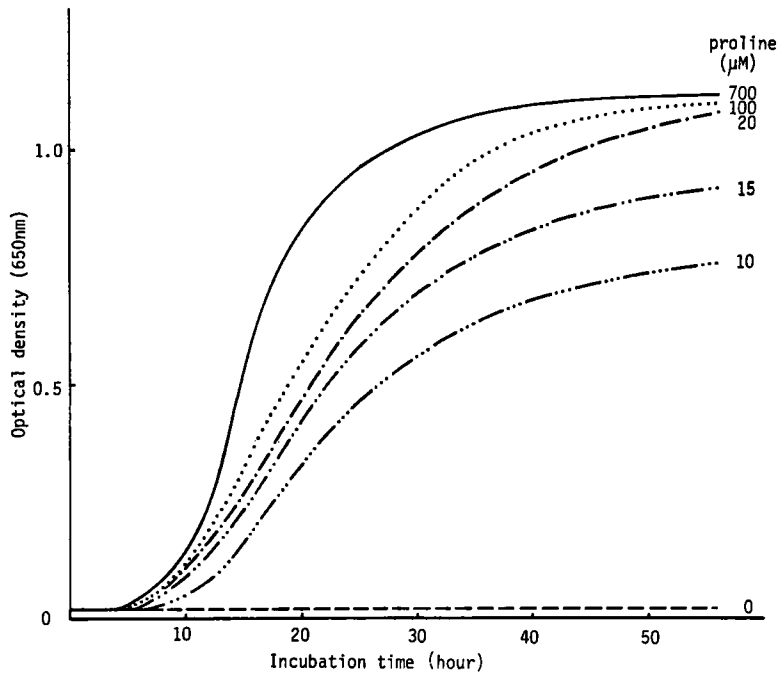


Fig. 1 Growth curve of *S. aureus* in proline defined complete synthetic media

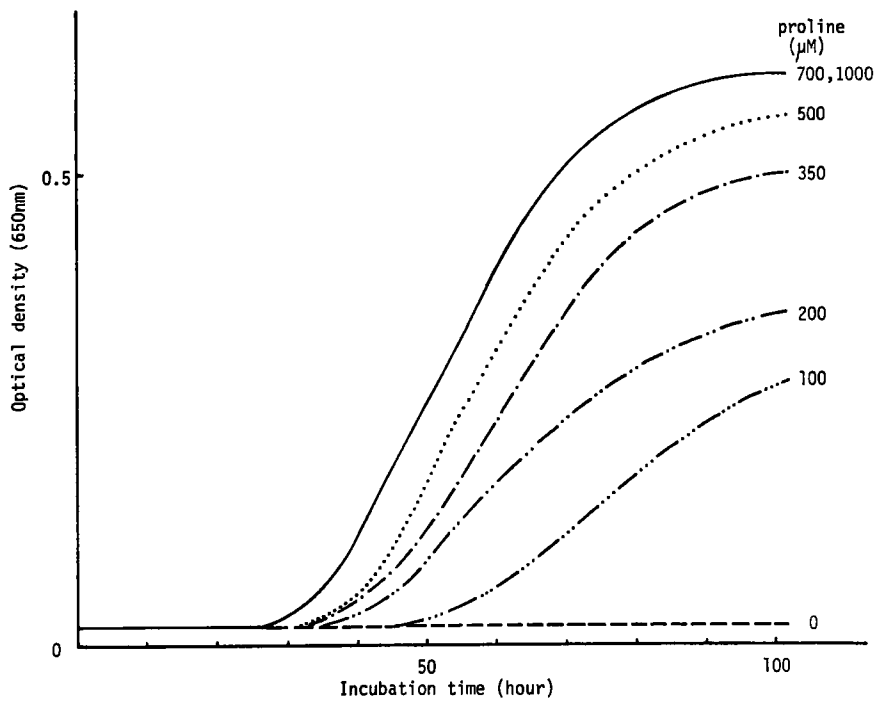


Fig. 2 Growth curve of *S. aureus* in proline defined complete synthetic media containing 10% NaCl

ると10%食塩が存在する場合は、700 μ M程度のプロリンが充分量と思われる。

III. 生理的塩濃度および高食塩半合成培地での増殖菌体内および培地内残存アミノ酸の解析予備的実験の意味で、増殖がスムーズに行われる半合成培地（プロリンは yeast extract に含有されるもののみに制限）で、一定ODまで増殖させた場合の菌体内遊離アミノ酸および培地内残存アミノ酸量を分析してみた。分析結果は Table 3 に100ml 培養系での絶対量で示した。プロリン非添加の半合成培地内の初期プロリンは yeast extract 由来の8.45 μ molesであり、生理的塩濃度増殖菌（以下 Normal 菌と略称）の場合は、菌体内遊離プロリンは0.57 μ moles にすぎず、培地内には6.56 μ moles のプロリンが残存していた。これに対し10%食塩濃度増殖菌（以下10% NaCl 菌と略称）では、培地内の8.45 μ moles の全プロリンが消費されて培地内にプロリンは残存せず、菌体内には4.86 μ moles の遊離プロリンが蓄積され、しかもこれ以外に9.31 μ moles のグルタミンを蓄積していた。

次に、10%食塩含有の半合成培地にプロリンを添加した場合の増殖実験でのアミノ酸分析結果を Table 3 下部に示した。培地に64 μ moles のプロリンを添加し全量72.45 μ moles にすると、10% NaCl 菌体内遊離プロリンは26.03 μ moles に著増し、Normal 菌の場合の0.57 μ moles に比べ40倍以上の蓄積を認めた。この場合グルタミンの菌体内蓄積は1.01 μ moles を認めるのみであり、しかも培地内には31.85 μ moles のプロリンが残存していた。さらにプロリン量を増加して128 μ moles を添加し全量136.45 μ moles にした場合、菌体内遊離プロリンは23.70 μ moles であり、培地内残存プロリンは87.30 μ moles であった。このように培地内にプロリンが充分量存在する場合は、必要とされるプロリンを摂取蓄積するのみで余分は培地中に残存し、しかもグルタミンはほとんど蓄積されなかった。

IV. 生理的塩濃度および高食塩完全合成培地での増殖時の菌体内および培地内アミノ酸の解析

完全合成培地の場合は増殖に長時間を要するのでいささか問題はあるものの、起始プロリン量70 μ moles 条件での生理的塩濃度と10%食塩含有培地での実験を行った。Table 4 に示すように10%食塩含有培地の場合は添加プロリン量を通減する実験も行ってみた。

いずれの場合もほぼ同程度に菌増殖した時の菌体内遊離アミノ酸、および培地内残存アミノ酸を分析し、100ml 培養系での絶対量で示した。生理的塩濃度の培地、すなわち Normal 菌では、外界に70 μ moles のプロリンが存在していても菌体内には1.86 μ moles のプロリンしか取り込んでいない。これに対し、10%食塩含有培地にプロリンを70 μ moles 添加してある場合、菌体内遊離プロリンは18.99 μ moles に増加し、培地内には25.80 μ moles のプロリンが残存していた。同じく10%食塩培地へのプロリン添加を50 μ moles に減少すると、菌体内遊離プロリンは15.75 μ moles となり、培地内には15.75 μ moles のプロリンが残存していた。さらに、添加するプロリンを制限し20 μ moles にすると、菌体内遊離プロリンは7.86 μ moles で、培地内には4.20 μ moles のプロリンが残存するのみであった。なお、菌体内の遊離グルタミンが、生理的塩濃度増殖では0.60 μ moles であるのに対し、10%食塩添加では4~5 μ moles となっていた。さらに添加するプロリンを制限して実験を行う必要があると考えたが、10%食塩存在下でプロリンを20 μ moles 未満に制限すると増殖がほとんど認められず分析実験に供することができなかった。

考 察

黄色ブドウ球菌は、高食塩の外部環境にさらされて発育する場合、好塩菌とは異なり、細胞内一価カチオンの恒常性を保ちつつ発育しようとする細胞膜の適応現象がある。しかしその場合、生じた内外浸透圧差差に対処するための機構が考えられなくてはならない。大部分の細菌はかなり高い内部浸透圧を有するとはいうものの、急激な外部浸透圧上昇に対しては、巧妙な浸透圧調節を行って発育する必要がある。

国府島ら^{6),7)}は、黄色ブドウ球菌における塩濃

Table 3 Major free amino acid contents in cells and in semisynthetic media after cultivation

Medium condition and added proline	Initial proline in 100ml medium (μ moles)	Growth OD 650nm (incubation time)	Wet weight of cells (mg)	Free amino acid content (μ moles in cells or supernatant of 100ml culture system)					
				Asp	Asn	Glu	Gln	Pro	
non NaCl	8.45	0.750 (1.5 h)	128.1	cell 1.21 sup 20.11	1.48 2.59	3.84 1.88	0 3.54	0.57 6.56	
10% NaCl	8.45	0.750 (4.0 h)	96.1	cell 0.70 sup 20.27	0.97 4.29	2.66 15.04	9.31 7.79	4.86 0	
10% NaCl + 0.64mM Proline	72.45	0.745 (2.5 h)	86.0	cell 0.54 sup 19.44	0.69 3.75	2.31 19.18	1.01 2.99	26.03 31.85	
10% NaCl + 1.28mM Proline	136.45	0.680 (2.2 h)	87.0	cell 0.35 sup 20.91	0.63 4.66	1.65 22.89	0.82 3.61	23.70 87.30	
Initial amino acid content				46.78	8.09	54.87	0	8.45-136.45	
Yeast extract				6.78	8.09	14.87	0	8.45	
Amino acid added				40.00	0	40.00	0	0-128	

Table 4 Major free amino acid contents in cells and in complete synthetic media after cultivation

NaCl added into medium	Proline added (μ moles)	Growth OD 650nm (incubation time)	Wet weight of cells (mg)	Free amino acid content (μ moles in cells or supernatant of 100ml culture system)					
				Asp	Asn	Glu	Gln	Pro	
non NaCl	70	0.770 (13.0 h)	178.9	cell 0.54	0.57	1.74	0.60	1.86	
				sup 22.65	0.60	54.15	1.05	37.05	
10%NaCl	70	0.700 (14.0 h)	148.6	cell 0.42	0.30	2.43	4.20	18.99	
				sup 9.00	0	40.50	7.20	25.80	
10% NaCl	50	0.700 (14.5 h)	147.4	cell 0.30	0.30	2.07	4.02	15.75	
				sup 12.00	0	40.50	6.15	15.75	
10% NaCl	20	0.630 (17.0 h)	127.4	cell 0.21	0.12	1.50	5.04	7.86	
				sup 12.00	0	43.50	5.40	4.20	
Initial amino acids in complete media				70.00	0	70.00	0	70.00	

度変換時の経時的な浸透圧調節機構の解析を行い、黄色ブドウ球菌は高塩環境下に移されると、まず菌の収縮をとまなう脱水により細胞内の浸透圧を上昇させ、その後、急激に培地中のプロリンを取り込み蓄積しつつ水を菌体内に再流入させている、と報告している。また Anderson と Witter¹⁸⁾は、高塩環境下に黄色ブドウ球菌を移すと、プロリンとグルタミンが菌体内遊離アミノ酸として大量に蓄積され、しかもグルタミンの増加率はプロリンよりも大きく、グルタミンが浸透圧調節において大きな役割を担っていると述べている。しかし、完全合成培地などを用いての両アミノ酸の必要量や相補性などについての詳細な解析は行われていない。

これら特殊アミノ酸の浸透圧調節寄与の動態ならびに必要充分量などを正確に把握するために、半合成培地および完全合成培地で実験を行ったわけである。その結果、生理的塩濃度における増殖ではその生育に必要なプロリン量は、菌体構築に必要と思われる $2 \mu\text{ moles}/100 \text{ ml}$ ($20 \mu\text{ M}$) 程度であるが、10%食塩濃度における増殖では、菌体構築に必要なプロリン以外に浸透圧調節にプロリンを必要とすることから $70 \mu\text{ moles}/100 \text{ ml}$ ($700 \mu\text{ M}$) 程度が必要充分量であることが明らかとなった。これらのことは、プロリンを制限した完全合成培地での増殖曲線の結果でもよく示されている。

この Normal 菌と10% NaCl 菌の菌体内遊離プロリンは浸透圧調節のためには濃度として働くわけであるので、含水量と菌体容積を国府島ら^{6),7)}の実験データから借りて試算した。その結果菌体内プロリン濃度は Normal 菌では 0.05 M であったが、これに対し、10% NaCl 菌では、プロリンが 0.2 mM 添加された場合は 0.85 M 、 0.5 mM の添加では 1.0 M 、 0.7 mM の添加では 1.6 M であった。外界塩濃度が、生理的塩濃度から10%食塩濃度へと増加すると、菌体内に蓄積されなければならないプロリン濃度は 1.59 M であるので^{6),7)}、プロリンを 0.7 mM 添加したときの蓄積量 1.6 M は極めて妥当であり理想的な状態といえよう。

また、高塩環境下で生育した黄色ブドウ球菌の遊離アミノ酸の蓄積はプロリンが圧倒的に多

いが、外界にプロリンが不足している場合にはグルタミンが合成されその不足分を補っていることが明らかとなった。しかし、プロリンが充分量ある場合はグルタミンはほとんど蓄積されず、浸透圧調節にはあくまで補助的に寄与していることは明らかである。

細菌と水・溶質などとの関係は、Scott¹⁰⁾が水分活性 water activity (Aw) という概念を導入したことにより統一的な理解ができるようになった。溶質量が増すにつれ Aw は低下するが、食塩は特に Aw に及ぼす効果が大きく、10%食塩の存在で Aw=0.935である。環境の Aw の方が低い状態にある細菌は、生存発育に必要な水分確保のために、自らも溶質量を増加してさらに低い Aw の獲得を計る必要がある。このことがすなわち生存発育に必要な水分確保につながるのである。

ところで高塩下で発育できる好塩菌は、むしろ能動的に外界の塩を取り込みこれを溶質として菌体内の Aw の低下を計るが、これに対して非好塩菌は、高塩下でも菌体内の Na^+ や K^+ の恒常性が保たれているので^{2),11),12)}、菌体内の低い Aw の獲得に努めるためには無機塩以外の遊離アミノ酸などを蓄積することにより菌体内の溶質量を増加させなければならない。このような外界高塩ストレスに対する適応現象の報告は、いくつかの細菌について散見され¹³⁾⁻¹⁷⁾、菌体内遊離アミノ酸蓄積による浸透圧調節機構は、各々の菌によってアミノ酸の種類はそれぞれ異なる。非好塩性のグラム陰性菌はグルタミン酸、プロリンを、グラム陽性菌はプロリンを菌体内に蓄積して外界の Aw の減少に対処していることが知られている。

本研究では、耐塩菌である黄色ブドウ球菌の浸透圧調節機構を更に詳細に検討し、プロリンは菌体構築のための必須アミノ酸であると同時に、高塩環境下での浸透圧調節に多量を必要とする溶質であることが明らかとなった。したがって、高濃度食塩培地での培養の際には、プロリン添加量を増加するにつれて高塩環境適応のための遅滞期を短くすることができ、発育がスムーズに行われる。なお、プロリンが特異的に蓄積されるのは、他のアミノ酸に比べて非常に溶

解度の高いこと (37°Cの水において1.9M) と、2級アミンを持っているが非極性の態度を示し、過剰の荷電をもたらさないで生理的に最適であるという理由があげられる^{7),17)}。

結 語

黄色ブドウ球菌は強い耐塩性を有して高濃度食塩中でよく発育する。その際環境の高浸透圧に対する調節機構が必要であり、プロリンを菌体内に蓄積することによってそれを行う。この浸透圧調節に果たすプロリンの動態を、半合成培地および完全合成培地で詳細に検討した。プロリンは黄色ブドウ球菌では合成されない必須アミノ酸であり、その菌体構築に必要なプロリン量としては極めて少量の20 μ M程度で充分である

が、高塩環境に対処するいわゆる浸透圧調節のためにはプロリンを大量に取り込む必要がある。そのため、高濃度食塩培地たとえば10%食塩含有培地では大量のプロリン700 μ M程度を添加することが必要である。なおプロリンが不足している状態ではグルタミンが代償することも明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、種々御協力をいただきました細菌学教室各位に深謝いたします。また、アミノ酸分析をお引受け下さいました、共同実験室黒田教官に厚く御礼申し上げます。

なお本論文の要旨は、第55回日本細菌学会総会、第26回ブドウ球菌研究会において発表した。

文 献

1. Baird-Parker, A.C.: A classification of *micrococci* and *staphylococci* based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.* **30**, 409—427, 1963.
2. Kanemasa, Y., Katayama, T., Hayashi, H., Takatsu, T., Tomochika, K. and Okabe, A.: The barrier role of cytoplasmic membrane in salt tolerance mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Suppl.* **5**, 189—201, 1976.
3. Takatsu, T.: Adaptive changes in cardiolipin content of *Staphylococcus aureus* grown in different salt concentrations. *Acta Med. Okayama* **29**, 413—420, 1975.
4. 片山 健: ブドウ球菌の耐塩機構に関する物性論的研究。岡山医学会雑誌, **87**, 259—270, 1975.
5. 片山 健, 友近健一, 高津智子, 金政泰弘, 俵寿太郎: 細菌細胞中のカチオン測定法に関する検討。岡山医学会雑誌, **85**, 481—486, 1973.
6. Koujima, I., Hayashi, H., Tomochika, K., Okabe, A. and Kanemasa, Y.: Adaptational change in proline and water content of *Staphylococcus aureus* after alteration of environmental salt concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 467—470, 1978.
7. 国府島泉: ブドウ球菌の耐塩機構の解析—プロリン含量と含水量変化による浸透圧調節。日本細菌学雑誌, **33**, 643—649, 1978.
8. Pattee, P.A. and Neveln, D.S.: Transformation analysis of three linkage group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **124**, 201—211, 1975.
9. Inoue, M., Oshima, H., Okubo, T. and Mitsuhashi, S.: Isolation of the rec mutants in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **112**, 1169—1176, 1972.
10. Scott, W.: Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food. Res.* **7**, 83—127, 1957.
11. Kanemasa, Y., Yoshioka, T. and Hayashi, H.: Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl. *Biochim. Biophys. Acta* **280**, 444—450, 1972.
12. Christian, J.H.B. and Waltho, J.A.: The sodium and potassium content of non-halophilic bacteria

- in relation to salt tolerance. *J. Gen. Microbiol.* **25**, 97—102, 1961.
13. Christian, J.H.B. and Waltho, J.A.: Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 506—508, 1962.
 14. Christian, J.H.B. and Waltho, J.A.: The composition of *Staphylococcus aureus* in relation to the water activity of the growth medium. *J. Gen. Microbiol.* **35**, 205—213, 1964.
 15. Christian, J.H.B. and Hall, J.M.: Water relations of *Salmonella oranienberg*: Accumulation of potassium and amino acids during respiration. *J. Gen. Microbiol.* **70**, 497—506, 1972.
 16. Tempest, D.W. and Meers, J.L.: Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools. *J. Gen. Microbiol.* **64**, 171—185, 1970.
 17. Measures, J.C.: Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**, 398—400, 1975.
 18. Anderson C.B. and Witter L.D.: Glutamine and proline accumulation by *Staphylococcus aureus* with reduction in water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1501—1503, 1982.

Salt-tolerance mechanism of *Staphylococcus aureus*

—Dynamic aspects on proline contributing in osmoregulation.

**Eiko NAGAMACHI, Ken-ichi TOMOCHIKA, Yoshikazu HIRAI,
Takashi MARUYAMA, Akinobu OKABE* and Yasuhiro KANEMASA**

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

*** Present address: Department of Microbiology, Kagawa Medical College**

S. aureus can grow in high salinity condition by a salt-tolerance mechanism. We have shown that *S. aureus* accumulated a large amount of proline in cytoplasm for the osmoregulation in high osmotic condition.

In this study, we tried to elucidate the dynamics of proline by altering the salt concentration and supplementing proline in semisynthetic or synthetic media. *S. aureus* required only 20 μ M of proline as an essential amino acid under the normal condition, but 700 μ M to accumulate proline as an osmoregulator under the 10% NaCl condition. When the supplementary proline was not enough, *S. aureus* accumulated glutamine to compensate the osmoregulation by proline.