

423. *Azotobacter vinelandii* のエネルギー代謝

(II) ATP 獲得・利用効率のマクロ的検討

○永井 史郎・西沢 義矩・合葉 修一

(東京大学応用微生物研究所)

目 的

グルコースを唯一の炭素源とし、また制限基質とした *A. vinelandii* の連続培養系においては、従来より報告しているごとく希釈率 $D(\text{hr}^{-1})$ の増大とともに収率因子 $Y_{x/s}(=-\Delta X/\Delta S)$ が顕著に増大することが認められていた¹⁾。一方このようなケモスタット系において消費されたグルコースに対する炭素収支は前報のごとく、菌体構成成分として資化される以外は、すべて CO_2 として放出されること、しかも放出 CO_2 量はグルコースに対しほぼ90%にも達し、希釈率 D の増大とともにこの割合が減少することが判明した。本報ではこのようにエネルギー代謝活性の大きいことが予想される本菌を用い、①収率因子が通常の微生物に比べきわめて小さいこと、さらに②希釈率 D の増大とともに収率因子が増大することなどを、種々の定常域における呼吸活性を中心に本菌のエネルギー獲得、利用効率をもとに、上記の特性に対する内在的要因を検討しようとするものである。

方 法

使用菌株、培養方法などは前報と同一である。

1. 呼吸活性 培養系における定常状態では、本実験の場合グルコースが制限因子となっており、きわめて低い濃度 ($1\sim 2\text{ }\mu\text{g/ml}$) で動的定常状態が維持されている。したがって系外に培養液を移し呼吸活性を測定することは、例えば本実験では制限基質が瞬時のうちに消費され、またこれを防ぐためグルコースを添加するなどしてもいずれの場合も非定常状態となり、ケモスタットにおける真の呼吸活性を把握できない。そこでここではケモスタットを維持している醗酵槽について、流入空気および流出空気についての物質収支をとり計算した。測定には Beckman 777型溶存酸素計を用いた。特に注意することは流入空気量を正確に一定に保つことであり、このため流量計の前に定圧装置を配置し調節した。なお計算には入口、出口の温度差

を考慮し、一定時間内で消費された酸素量を求め、この値をもとに Q_{O_2} を計算した。

2. RNA, DNA アセトン・ドライアイスで粉末状にした菌体を S-T-S 法で分別 $260\text{m}\mu$ の吸収より求めた。また DNA は分別後 Webb の方法によっても定量した。

3. 菌体数 各定常状態の菌数測定はコールター・カウンターA型 (COULTER ELECTRONICS, Inc.) で行なった。

結果および考察

増殖活性の支配因子である RNA 含有量については既報^{1,2)}のごとく希釈率 D (=比増殖速度) に対し正の相関があること、さらに細胞当りの DNA 量が希釈率の増大に比例的であることがわかる (Fig. 1)。このような現象について Hmel ら³⁾は希釈率によって核数が約2倍に増大することを本菌について認めている。このように核酸量の増大および収率因子 (=生成菌体量/消費グルコース) の増大現象^{1,4)}は前報にも示すごとく本菌では特に希釈率によって代謝反応の様相が著しく変動する可能性を示唆する。ここでは絶対好

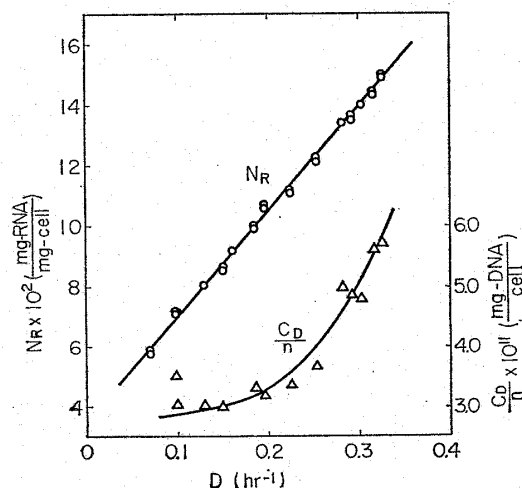


Fig. 1. 各定常値における RNA, DNA 量

(144)

気性菌である本菌の“alternative oxidative mechanism”⁵⁾を中心に ATP 獲得の効率と上記の現象について検討した。

本菌によるグルコースの酸化的交互代謝経路は Wilson ら⁵⁾によって詳細な研究がなされており、その特徴は前報に詳しく述べたが要点は① G-3-P より F-1-6-P, F-6-P への反応が顕著であることであり G-3-P から pyruvate への反応に対し、この両経路への反応比率が TCA 経路への流れを調節していると考えられる。②したがって取り込まれたグルコースの 6-PG を経て R-5-P を生じる過程における放出 CO₂ は全 CO₂ の大部分を占める可能性があり、また同時に生成する NADPH₂ は高エネルギー物質としての主要物質になる可能性を有する。

“ATP 獲得, 利用効率に対する収支”

ATP 合成, 利用に対する物質収支は

$$\Delta C_{ATP} = (\Delta C_{ATP})_{\text{synthesis}} - (\Delta C_{ATP})_{\text{utilization}} \quad \dots\dots\dots(1)$$

合成系については

$$\begin{aligned} (\Delta C_{ATP})_{\text{syn.}} &= (\Delta C_{ATP})_{\text{oxi. phos.}} + (\Delta C_{ATP})_{\text{sub.}} \\ &= (P/O)\Delta O + \{(\Delta C_{ATP})_{\text{sub.}}/\Delta S\}\Delta S \\ &= (P/O)\Delta O + \alpha \cdot \Delta S \quad \dots\dots\dots(2) \end{aligned}$$

利用系については, グルコースのリン酸化とそれ以外の項にわけて,

$$\begin{aligned} (\Delta C_{ATP})_{\text{util.}} &= \frac{(\Delta C_{ATP})'_{\text{util.}}}{\Delta S} \Delta S + \frac{(\Delta C_{ATP})''_{\text{util.}}}{\Delta X} \Delta X \\ &= \Delta S + \frac{1}{Y'_{ATP}} \Delta X \quad \dots\dots\dots(3) \end{aligned}$$

(2), (3)式と(1)式より

$$\Delta C_{ATP} = \left(\frac{P}{O}\right)\Delta O - (1-\alpha)\Delta S - \frac{1}{Y'_{ATP}}\Delta X \quad \dots\dots\dots(4)$$

(4)式両辺を微分形になおし, C_{ATP} で除し定常状態を考えれば

$$\frac{1}{2}\left(\frac{P}{O}\right)Q_{O_2} - (1-\alpha)\nu'_X - \left(\frac{1}{Y'_{ATP}} + N_A\right)D = 0 \quad \dots\dots\dots(5)$$

(5)式中 N_A は cell 中 ATP 含量であり *E. coli.* でおよそ 6×10^{-6} (mM/mg-dry cell)⁶⁾。一方 Y'_{ATP} の“order”については数種の微生物(後述)についてはほぼ 10 (mg-dry cell/mM)⁷⁻⁹⁾。したがって $1/Y'_{ATP} \gg N_A$ が成立し、このように N_A を無視すれば Y'_{ATP} は一般に用いられている Y_{ATP} ⁷⁻⁹⁾ と同一となる。 N_A を無視することは ATP の代謝回転がきわめて速いこと (*E. coli* で 0.5 sec 程度)⁶⁾ を意味する。したがって

$$\frac{P}{O} = \frac{2}{Q_{O_2}} \left\{ \frac{D}{Y_{ATP}} + (1-\alpha)\nu'_X \right\} \quad \dots\dots\dots(6)$$

(6)式で P/O 値を推定する場合, Y_{ATP} , α が問題である。まず Y_{ATP} については *Streptococcus faecalis*,⁷⁾ *Saccharomyces cerevisiae*,⁷⁾ *Pseudomonas lindneri*,⁷⁾ *Propionibacterium pentosaceum*,⁷⁾ *Aerobacter aerogenes*,⁸⁾ と *Gluconobacter liquefaciens*⁹⁾ についてはほぼ一定値 ($Y_{ATP} \approx 10$) を示すことが報告されており, 中でも *G. liquefaciens* については P/O 値をもとに推定されたものである。このような現象はマクロ的に“一般性”をもつものかどうかについてはさらに検討されるべき問題であるが, 一応ここでは一定として用いる。次に α については本菌の glucose の酸化的交互代謝経路に対する Wilson ら⁵⁾の研究から推して, ほぼ $\alpha = 0.8 \pm 0.2$ の範囲をとると考えられる。

Fig. 2 は各希釈率に対する Q_{O_2} , ν'_X , $Y_{X/S}$ を示した。この図をもとに P/O 値を各希釈率に対し推定した一例が Table 1 である。Table 1 で推定された P/O 値に対し, 実際に本菌を破壊した各粒子層について種々の条件で求めた P/O 値が $0.2 \sim 0.8^{10,11)}$ であることが報告されていることは興味深い。以上の結果をもとに目的の項で述べた *A. vinelandii* の特性に対し考察すれば, 収率因子 $Y_{X/S}$ が通常の微生物にくらべ低いのは本菌での P/O 値が低いこともその一原因であり, つまり ATP 合成が“tight coupling”せず熱損失になっている可能性が考えられる。次に希釈率 D の増大に比例的に対糖収率(収率因子)が増大

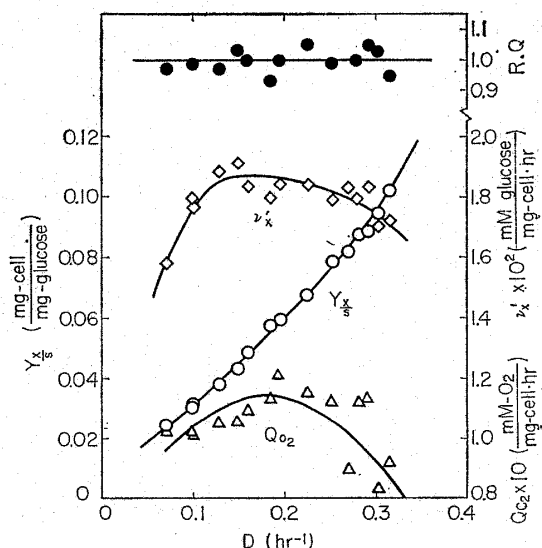


Fig. 2. 各定常における収率因子, 比呼吸速度と比糖消費速度

Table 1. (6)式による P/O 値の推定
 (ただし特性値は第2図, $Y_{ATP}=10$, $\alpha=0.8\pm0.2$)
 (Y_{ATP} はアセトンパウダー量に換算した.)

$D(\text{hr}^{-1})$	$Y_{x/s} \left(\frac{\text{mg-cell}}{\text{mg-glucose}} \right)$	$Q_{O_2} \left(\frac{\text{mM-O}_2}{\text{mg-cell} \cdot \text{hr}} \right)$	$\nu'_x \left(\frac{\text{mM-glucose}}{\text{mg-cell} \cdot \text{hr}} \right)$	$\frac{P}{O} \left(\frac{\text{M-ATP}}{\text{atom-oxygen}} \right)$
0.1	0.032	0.104	0.018	0.16~0.30
0.2	0.060	0.114	0.019	0.30~0.43
0.3	0.095	0.093	0.017	0.55~0.70

すること (Fig. 2) については Table 1 に推定されているごとく, $Y_{x/s}$ に比例的に P/O 値が増大していることが, その主原因とも考えられる。

このように希釈率 D の増大とともに P/O 値が上昇する可能性については, Y_{ATP} の問題を含めて今後さらにミクロ的に検討されるべき課題であろう。

文 献

- 1) Aiba, S., Nagai, S., Nishizawa, Y., Onodera, M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 73 (1967).
- 2) Nagai, S., Nishizawa, Y., Endo, I., Aiba, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **14**, 121 (1968).
- 3) Hmel, I. A., Andreen, N. B.: *Mikrobiol.*, **36**, 438 (1967).
- 4) Nagai, S., Nishizawa, Y., Endo, I., Aiba, S.: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 725 (1968).
- 5) Mortenson, L. E., Hamilton, P. B., Wilson, P. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 238 (1955).
- 6) Lehninger, A. L.: "Bioenergetics" W. A. Benjamin, Inc., New York (1965).
- 7) Bauchop, T., Elsdon, S. R.: *J. gen. Microbiol.*, **23**, 457 (1960).
- 8) Hadjipetrou, L. P., Gerrits, J. P., Teulings, F. A. C., Stouthamer, A. H.: *J. gen. Microbiol.*, **36**, 139 (1964).
- 9) A. H. Stouchamer: *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 19 (1962).
- 10) Tissieres, A., Hovenkamp, H. G., Slater E. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 336 (1957).
- 11) Hovenkamp, H. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 485 (1959).