

細菌の脂質に関する研究 I

—細菌の脂肪酸組成について—

*上 北 圭 子 **山 元 珠 代

***三 河 比 佐 子 ***中 村 満 江

Studies on the lipid of the microorganism 1

—On fatty acid composition of the microorganisms—

Keiko Uekita, Tamayo Yamamoto

Hisako Mikawa, Mitsue Nakamura

I. 緒 言

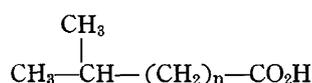
高等動植物や藻菌類, 子囊菌類などの微生物の脂質に含まれている脂肪酸は, ほとんどが炭素数が偶数の直鎖脂肪酸であるが, 分裂菌類には広く分岐炭素鎖をもつものや, Cyclopropane 環をもつ脂肪酸が含有されており, 中にはこれらが全脂肪酸の大半を占めるものもある。また, 細菌の種によってはさらに水酸基を有する脂肪酸が分布しているものもある。また, 細菌脂質を構成している直鎖脂肪酸としては Palmitic acid, 不飽和脂肪酸としては二重結合一個を含む偶数炭素数のものがほとんどを占めているが, 奇数炭素数の飽和脂肪酸の存在も報告されており, また, 二重結合一個のものは, オレイン酸系 ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}_2\text{H}$) の外に細菌の特有のワクセン酸系 ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}_2\text{H}$) のものが含まれているのが特徴である。さらに詳細にこれらの特異構造をもつ脂肪酸の分布を調べると特に, グラム陽性菌は分岐鎖脂肪酸を含み, *Staphylococcus aureus* では総脂肪酸の70%が C-15 と C-17 の分岐鎖脂肪酸で占められ, *Micrococcus lysodeikticus* で80~90%, *Bacillus larval*, *Bacillus popilliae* では54~85%に及んでいる。

これらのグラム陽性菌の分岐鎖脂肪酸は, ほとんどが下記に示す Iso 型, Anteiso 型のものであり,

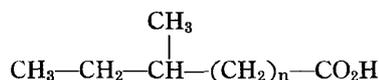
* 本学生物化学研究室 ** 本学44年度卒業生

*** 本学45年度卒業生

B. polymyxa, P. sarcina にも, これらのタイプの脂肪酸の分布が認められている。

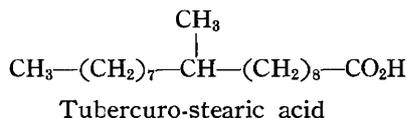


Iso 型脂肪酸

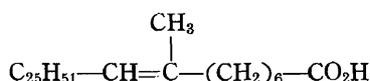


Anteiso 型脂肪酸

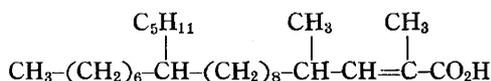
分岐鎖脂肪酸は, Anderson らにより抗酸性菌の *Micobacterium tuberculosis* に発見された Tubercuro-stearic acid⁷⁾ が最初の例であり, その後広く *Micobacterium* や *Corynebacterium* にこのタイプの脂肪酸が分布していることが明らかになったが Diphtheric acid⁸⁾ や Phthioenoic acid⁹⁾ は上記のものと異り, 炭素鎖の中央部に一個, または数個のメチル側鎖のある特異構造をもっている。



Tubercuro-stearic acid



Diphtheric acid



Phthioenoic acid

また、オキシン脂肪酸は、多種の細菌に発見されているが、これらの大部分は3-オキシン酸であり、一般の脂肪酸代謝から推して中間体と考えられるものである。しかし、*Lactobacillus acidophilus* の dihydroxystearic acid¹⁰⁾ や *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* などに分布している β-オキシン酪酸残基が100~110 重合した Poly β-hydroxybutyrate などは特有のものである。

Cyclopropane 環をもつ脂肪酸は、最初乳酸菌に発見されたため *Lactobacillic acid*¹¹⁾ と名付けられた *Lactobacillus arabinosus* の cis. 9. 10-methylene octadecanoic acid のほかに *Esherichia coli*¹²⁾, *Salmonella typhimurium*¹³⁾, *Clostridium bytyrium*¹⁴⁾, *Streptococcus cremoris*¹⁵⁾ などグラム陽性、陰性を問わず多くの細菌に発見され、全脂肪酸の40%がこのタイプの酸で占められているものも知られている。

また、高等生物の場合と異り細菌の細胞内では、脂肪酸の多くが遊離の状態で存在しているのも一つの特徴であり、*Corynebacterium diphtheriae* や *Salmonella typhi* の脂肪酸は、ほとんどが遊離脂肪酸である。

上述のようにかなり多種の細菌の脂肪酸の研究があるが、これと細菌の生物学的分類や培養条件、生育過

程などの脂肪酸組成との関係などを明らかにしたものは極めて少ない。

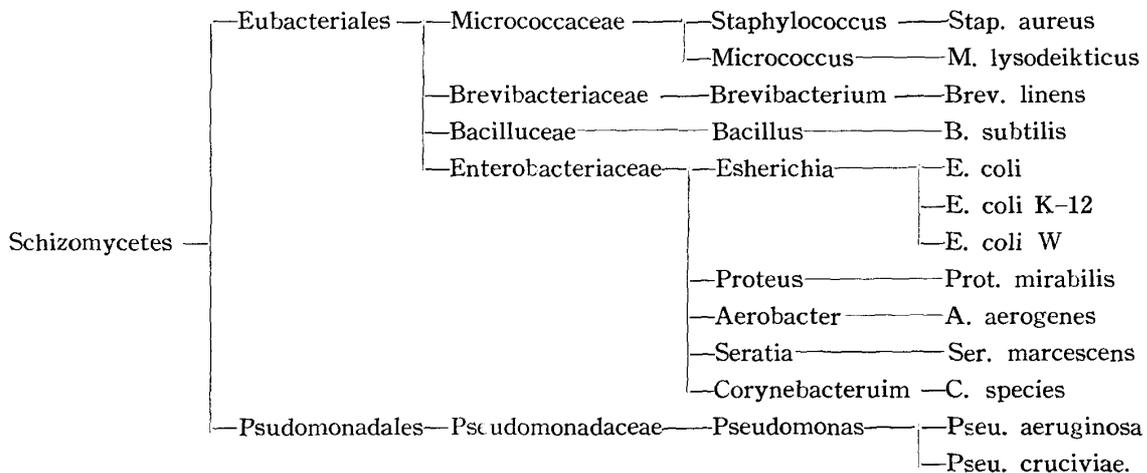
細菌の特異脂肪酸の生合成過程やこれらのもつ生物学的意義を明らかにするためにはさらに多くの菌種について統計的に脂肪酸の分布をしらべることが現段階においては必要である。

この目的のために筆者等は、*Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Enterobacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* 属に属する細菌11種の脂肪酸を主として、ガスクロマトグラフィーを用いて分離確認を行った。

II. 実 験

1. 試料菌種

実験に用いた菌種は、*Micrococcus lysodeikticus*, *Brevibacterium linens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cruciviae*, *Eshelichia coli* (wild strain), *Eshelichia coli* (strain K-12), *Eshelichia coli* (strain W), *Proteus mirabilis*, *Aerobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* で、いずれも分裂菌類 (Schizomycetes)¹⁶⁾ に属し、*Bergey* の分類表によると下記のように位置づけされるものである。



これらの菌の培養は協和醗酵K K東京研究所の好意で同研究所において培養され、凍結乾燥菌体として送られたものである。

細菌の培養条件は、最初の4種は、Glucose 2%, Polypeptone 1%, meat extract 1%, Nacl 0.3%, yeast extract 0.3%, pH 7.0 の培地を用い500ml 容坂口フラスコにいれた 100ml の培地に接種し、往復振盪培養 (130往復/分, 30°C48時間) したのち遠心分離し、0.85% Nacl 水にて1回洗浄したのち凍結乾燥し

たものである。また *Proteus* 以下の3種は Glucose 2% Polypeptone 0.3% pH 7.0 の培地 100ml に接種し往復振盪培養 (130往復/分 30°C 48時間) で培養した。

また、*E. coli* (wild strain) は Polypeptone 2%, K_2HPO_4 0.5%, pH 7.4 の培地を用い、30°C 14時間、静置培養して凍結乾燥したものであり、変異株の培養には、DL-malic acid 8.9g, K_2HPO_4 7.0g, KH_2PO_4 3.0g, $(NH_4)_2HPO_4$ 1.0g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g

を 1ℓ に溶したものをを用いた。

2. 脂肪酸のガスクロマトグラフィー

筆者等が脂肪酸のガスクロマトグラフィー (G.L.C) に用いた装置や実施の諸条件はつぎに示した。

G.L.C 装置 ; GC-4APT 型 (島津製作所)

カラム ; Stainless steel columpacked 3mm×3m

移動相 ; He ガス

充填剤 ; 1.4 Butanediol succinate 10%

Support chromosorb W 60~80 mesh

分析温度 ; 200°C

ガス圧 ; 2kg/cm² ~ 3kg/cm²

また、これによってえられたクロマトグラムによる脂肪酸の固定と定量は常道のように標準試料との保持時間の比較と、それぞれのピークの面積比を付設の記録計で求めて行った。ただ分岐鎖脂肪酸の標準試料は入手が困難であったため、ポリエステル Apiezon の液相では同数の炭素数の直鎖飽和脂肪酸より保持時間が短いという事実をよりどころとし、Woodford, Vangent¹⁷⁾等の炭素数法を用いて定めた。

3. 脂肪酸のメチルエステル化

ガスクロマトグラフィーにかけるために脂肪酸は、まずメチルエステルとするのが普通であるが、試料乾燥菌体量が少量であるため、筆者等は菌体から予め脂質を抽出することなく乾燥菌体 50mg をベンゼン 2ml, 塩酸メタノール 16ml と共に 100ml ナス型フラスコにいれ、還流冷却管の下に、90~95°Cの湯浴で2時間加熱することで脂肪酸のエステル交換を直接行った。冷却後、反応液に冷水 8ml を加えて振盪し、分液漏斗に移して約 60ml の石油エーテルを用いて3回抽出し、石油エーテル抽出液はさらに2倍量の水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム：無水炭酸ナトリウム(4:1)を加えて中和と脱水を行ったのち、石油エーテルを留去し、残留物質をアセトンにとかして G.L.C の試料とした。

III. 結 果

各乾燥菌体よりえられた脂肪酸メチルエステルの G.L.C の結果は Fig 1~3 に示した。

すなわち、*M. lysodeikicus* のものは、主成分は C-15 の Iso 型および Anteiso 型脂肪酸で総脂肪酸の

*脚注 16-n は炭素数16の直鎖脂肪酸 19-i は炭素数16の Iso 型脂肪酸を指し、16-ai は炭素数16の Anteiso 型脂肪酸を指す。以下同様。

**脚注 18-1 18-2 は炭素数18で二重結合 1 ないし 2 を含む直鎖脂肪酸の略号であり 19-Cy は炭素数19のチクロプロパン環をもつ脂肪酸を指す。

50~55%を占めており、このほかには 16-n* 14-n 17-i or ai 脂肪酸、14-i、16-i 19-i の存在が認められた。全体として不飽和脂肪酸の含量は極めて少量であった。

また、*B. subtilis* の主脂肪酸は C-15 と C-17 の Iso 型、Anteiso 型脂肪酸で、両者をあわせると70~75%に達するが、C-15 のもののうちでは Anteiso 型の方が Iso 型より多く、C-17 では逆に Iso 型の割合が多いことがわかった。

また、このほかに 16-n、18-n、14-i、16-i が存在するが、分岐鎖脂肪酸の割合が圧倒的に多いのがこの細菌の特徴である。

B. linens の脂肪酸組成は、*B. subtilis* の場合と類似しており、主成分は C-15、C-17 の Iso および Anteiso 型脂肪酸で、全体の75~80%を占めている。し

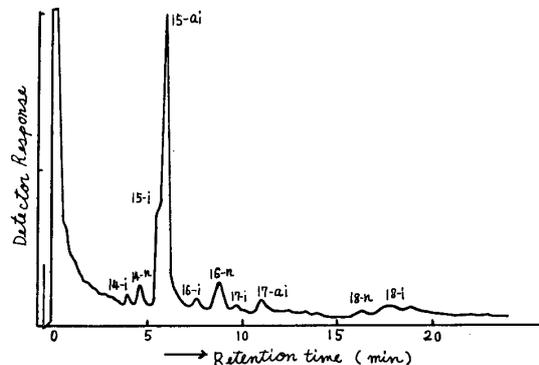


Fig. 1 *Micrococcus lysodeikticus*

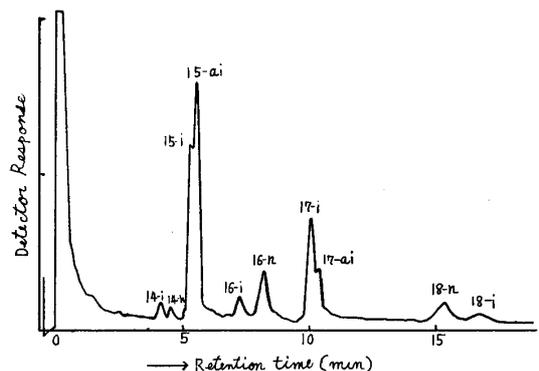


Fig. 2 *Bacillus subtilis*

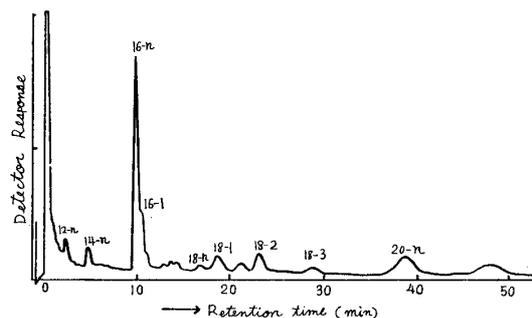


Fig. 3 *Pseudomonas aeruginosa*

かし、*B. subtilis* と異なる点は、C-15、C-17 のいずれも Iso 型に比して Anteiso 型の脂肪酸が断然多く含まれていることである。

P. Aeruginosa の脂肪酸組成は、前述の三種の細菌のものとはかなりの差異があり、分岐鎖脂肪酸含量が極めて少なく、主成分は 16-n で全脂肪酸の45~50%を占め、ほかに 12-n, 14-n, 18-n, 18-1**, 18-2, 20-n の存在が認められ、さらに C-20 以上の脂肪酸も見られる。また、同じ *Pseudomonas* に属する *P. cruciviae* のものも *P. aeruginosa* と酷似した組成をもち、分岐鎖脂肪酸が極めて少なく、45~50%は 16-n で、ほかに 12-n, 14-n, 18-n, 16-1, 18-1, 18-2, 19-Cy が見られる。

この二種の *Pseudomonadales* 目に属する細菌の脂肪酸組成が *Eubacteriales* 目の細菌のものと顕著な差異を示すことは形態分類のみならず代謝に関連した生理学的な点においても著しく相異するところがあることを示唆するもので、さらに詳細な生化学的研究によって新しい事実の発見が期待されよう。

同じ *Eubacteriales* 目に属する *E. coli* では他の3種の細菌のものと必ずしも共通点がみられぬが、主成分は 16-n であり、これが全脂肪酸の30~35%を占める点は類似しているが、特に大腸菌の特徴として 17-Cy, 19-Cy 脂肪酸がかなり多量含まれていることである。このほか、12-n, 14-n, 16-1, 18-n, 18-1, 18-2, 20-n の存在が見られる。

E. coli の原株と変異株である strain K-12, strain W との間には著しい差異がなく、みな主成分は 16-n であり、C-15, C-17 の分岐鎖脂肪酸を含んでいるが strain W のものは 17-Cy が26%の大量を占めていることが特徴といえよう。

IV. 結 論

これらの実験結果から、分裂細菌の脂肪酸の特徴についてまとめると Table 1 に示すとおりである。

①Bergay の分類表による *Eubacteriales* 目と *Pseudomonadales* 目の細菌の間には顕著な差異が認められる。すなわち、後者の脂肪酸は、高等生物のものと同様

Table I. 各種菌体の脂肪酸組成 (%)

脂肪酸	菌種	M. lyso-	B. subti-	B. linens	P. aeru-	P. cruci-	E. coli	E. coli	E. coli	A. aero-	S. marc-	P. mira-
		deiktus	lis		ginosa	viae	(wild strain)	K-12	W	genes	escens	bilsi
直鎖飽和脂肪酸	C-12		+	+	4	5	3	4	4			+
	C-14	6	1	2	3	1	5	5	4	+	7	9
	C-16	6	9	5	46	46	33	33	37	13	65	58
	C-18	2	3	2	4	2	+			+	+	+
	C-20				9		3				+	3
	C-22											
真鎖不飽和脂肪酸	C ₁₆ =1					1						
	C ₁₈ =1	+	1	+	6	10	10	18	24			13
	C ₁₈ =2	+	+	+	7	15	5	5	5		7	6
	C ₁₈ =3				+	+	+					
	C ₂₀ -1				+		+					
	C ₂₂ -1											
分岐鎖脂肪酸	C ₁₄ -i	4	2	+				5				
	C ₁₅ -i	} 55	} 40	} 44				10		} 38		
	C ₁₅ -ant							9				
	C ₁₆ -i				5	6	4		1			+
	C ₁₇ -i	2	} 33	} 34	1	3.2				} 25		
	C ₁₇ -ant	5			3							
	C ₁₈ -i	+	+	+	3							
	C ₁₉ -i	4	+	+	4						+	
バンク脂肪プロ	C ₁₇ -Cy				+	+	11	12	26		+	10
	C ₁₉ -Cy				+	2	3	+	+		7	3

直鎖偶数炭素数の脂肪酸がほとんどで Eubacteriales 目のものにみられる分岐鎖や Cyclopropane 脂肪酸が極めて少ない。

②Eubacteriales 目のもののうち, Bacillaceae 科と Brevibacteriaceae 科の細菌は脂肪酸組成が類似しており, 主成分は C-15 の Iso 型 Anteiso 型の脂肪酸と C-17 の Iso 型, Anteiso 型の脂肪酸であり, これらが全脂肪酸中70~80%を占めている。

③分岐鎖脂肪酸含量は, Eubacteriales 目のものの中で特にグラム陽性菌では分岐鎖のものが少く, 直鎖の飽和, 不飽和脂肪酸が多く, 特に炭素数の多いものが含まれている。

④Eubacteriales 目の内, Enterobacteriaceae 科のグラム陰性菌には Cyclopropane 脂肪酸の存在が認められるが, 陽性菌にはこの種の脂肪酸はほとんど発見されない。

⑤E. Coli の原株と変異株との間では, 脂肪酸組成に著しい差異はない。すなわち, 生物種によって脂肪酸組成は余り変化しないことが推定できる。

⑥E. coli にみられるように培地の組成の変化は余り脂肪酸には影響があらわれない。培地のアミノ酸の代謝で生成する中間代謝産物の有機酸が脂肪酸合成に際して素材として利用される可能性を考えると, この問題にはなお多くの研究の余地を残しており, 研究続行中である。

尚, 最後に, 本実験に際し, 御懇切な御指導を下さいました田中正三教授, 並びに, 試料菌体の調製に御協力下さいました協和醸酵工業株式会社東京研究所の田中正生, 木村一雄両博士に心から感謝致します。

参 考 文 献

- 1) William, M. O'Leary; *The chemistry and metabolism of microbial lipids* 40 (1967) W.P.C.
- 2) O'Leary, W.M., *Bacteriol. Rev.*, **26** 421 (1962)
- 3) Macfarlane, M.G., *Biochem. J.*, **82** 40 (1962)
- 4) Macfarlane, M. G., *Biochem. J.*, **79** 4 (1961)
- 5) H.K.D., *J. Bacteriol.*, **101** 145 (1970)
- 6) W. M. O; *The chemistry and metabolism of microbial lipids* 49 (1967) W.P.C.
- 7) Anderson. R. J., Chargaff. E., *J.B.C.*, **85** 77 (1929)
- 8) Chargaff. E., *Z. physiol. chem.*, **218** 223 (1933)
- 9) Anderson. R. J., *J.B.C.*, **83** 169 (1929)
Cason. J., Tavs. P, Weiss. A., *Tetrahedron* **18** 437 (1962)
- 10) Jeam. A., ; *The Bacterial lipids*
- 11) Hofmann. K., Lucas. R. A., *J. A. C. S.*, **72** 4328 (1950)
- 12) Chalk. K.J.I., Kodicek. E., *B.B.A.*, **50** 579 (1961)
Kaneskiro. T., Marr. G., *J.B.C.*, **236** 2615 (1961)
- 13) Gray. G. M., *B.B.A.*, **65** 135 (1962)
- 14) Goldfine. H., Bloch. K., *J.B.C.*, **85** 1056 (1963)
- 15) Cason. J., Lange. G. L., Urscheler. H. R.,
Tetrahedron **20** 1955 (1964)
- 16) Breed. R. S., Murry. E. G. D., Smith. N. R.,
"Bergay's manual of determinative bacteriology"
(1957)
- 17) F. P. Woodford., C. M. van Gant., ; *J. Lipid Research.*, **I** 188 (1960)