

黄色ブドウ球菌カロチノイド色素の分析化学的 検討と生理的意義について

岡山大学医学部細菌学教室（主任：金政泰弘教授）

篠井 加津子

（昭和54年11月30日受稿）

Key words: 黄色ブドウ球菌, カロチノイド色素分析
Neurosporenoic acid.

緒 言

黄色ブドウ球菌（以下ブ菌と略す）の黄色色素はカロチノイドであり、非病原菌である表皮ブドウ球菌のもつレモン色色素とは色調が異っているため、両菌の鑑別の一指標とされている。本色素に関する多くの報告によると、主成分は δ -Carotene,¹⁾²⁾³⁾ Rubixanthin¹⁾²⁾³⁾とされ、これ以外に Neurosporene,¹⁾ β -Carotene¹⁾ などが微量含まれる。しかしこれらの色素成分は殆んど可視吸収スペクトルによってのみ同定されているにすぎない。

著者はブ菌の有するカロチノイド色素についての生物学的検討を行なっているうちに、 δ -Caroteneと同定されている主成分が弱極性であることを知った。そこで本色素を純化精製して化学的分析や赤外吸収スペクトル、質量分析などによって再検討を加えた結果、自然界では稀なC₃₀カロチノイドの一種で弱極性を有するメチルエステルタイプのものであることを明らかにした。又その他の微量成分についても些かの検討を加えた。

本色素の生理的意義に関しては、経験的に培養時間を延長し定常期に達すると著明に増加し、又高食塩培地中で培養した場合にも色素産生が盛んであることが知られている。更に乾燥条件下では有色色素群ブ菌の生存率が無色色素群ブ菌より高い事実にもみられるように、カロチノイド色素は悪条件にさらされた時に増加することは事実で、確定的ではないが悪環境に抗するための防禦作用を有すると推測されている。

そこで著者は培養諸条件におけるブ菌のカロチノイド色素産生の量的検討を定量分析的に行なうと同時に、本色素の生体膜での機能面の役

割を知る一助として、ブ菌から抽出したリン脂質のリポソーム系でカロチノイドがグリセリン及びグルコース透過能に如何なる影響を及ぼすか検討した。

材料および方法

1) 培養とカロチノイド色素産生量の比較

均一培養を必要とするのでまず液体培養による。S. aureus 209 P株を培養するにあたり普通培養としてはパイオン（日水製薬・東京）を用いた（正常菌と略す）。物質添加を行う場合はこれに最終濃度2%のグリセリン（グリセリン培養菌と略す）、10%のNaCl（食塩培養菌と略す）を加えて振盪培養を行い、late log phaseにて遠心集菌した。培養時間による影響をみるために、正常菌についてのみ middle log phaseにての集菌も行った。更に光の影響を検討する為には振盪培養管をアルミ箔でシールし、又無酸素条件を検討するためにはガスパック法による嫌気性培養を行った。なお1%グリセリンモノアセテート添加液体振盪培養では発育が悪いため、固型の普通寒天平板での培養を行いかきとり集菌した。全カロチノイド含量の定量は non-saponifiable lipids 分画である総色素（抽出操作は次項参照）をクロロホルムにとかし、450nmで吸光度を測定し、 β -Carotene量として計算した⁴⁾

2) 分析用カロチノイド色素の作製

カロチノイド色素構成成分分析用には1%グリセリンモノアセテート加ハートインフュージョン寒天培地に2日間培養して得た菌をかきとり集菌し供試菌体とした。上記の如くして得た菌体を生理的食塩水で2回洗浄し、クロロホルムルーメタノール（2:1, v/v）混合溶媒20倍

量を加え4時間攪拌抽出を行った。その抽出液を Folch 分配透析法により一夜精製し、総脂質分画を得た。次いで5%メタノール性カセイカリで4℃、2時間穏和な加水分解を行った⁵⁾。これに3倍量の石油ベンジンを加え抽出された non-saponifiable lipids を蒸留水で洗滌し、Na₂SO₄で脱水、減圧濃縮して総色素を得た。これを少量の石油エーテルにとかし、まず硅胶カラムクロマトグラフィ (Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis) にかへキサン-アセトン系でアセトンを増量しながら展開した。得られた各分画は更にアルミナカラム (INC Pharmaceuticals GmbH & Co. Eschwege) にかへ、石油エーテル-アセトンの展開系でアセトンを徐々に増やしながらかステップワイズで展開した。得られた各分画についてはシリカゲル薄層クロマトグラフィで純粋な標品であることを確かめた。

3) リン脂質の精製分画

前法においてクロロホルム-メタノールで抽出した総脂質分画を DEAC セルロース及び硅胶カラムクロマトグラフィ法を用いて純粋なフォスファティディルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL) およびリジルフオスファティディルグリセロール (LPG) 分画を得た。

4) 可視及び赤外吸収スペクトル分析

可視吸収スペクトルは島津分光光度計 UV200 S で測定した。吸収極大はへキサン、無水メタノール、クロロホルムおよびアセトン溶液中で測定した。赤外吸収スペクトルは日立赤外分光光度計 IR215 を用い液体セル (CS₂) 使用で測定した。

5) 分配係数および官能基の検査

分配係数は Petracek & Zechmeister 法⁶⁾にてへキサン-95%メタノール法にて両溶媒への分配比率により検討した。水酸基の検出のためのアセチル化は Taylor⁷⁾らの方法により、またシリル化は Davies の方法⁸⁾で行った。カルボキシル基の検出のための NaBH₄ による還元は Taylor の方法⁹⁾、および LiBH₄ による還元は Goodwin の方法¹⁰⁾ によりそれぞれの産物について検討した。

6) リポソーム用混合脂質の作製

正常菌から分画した PG, CL および LPG を元の正常菌が有する組成比 PG:CL:LPG=

65:20:15 に混合したものをリポソーム作製の基礎となる純リン脂質とした。これにカロチノイドを加える場合は主成分である分画 No. 3 の純分画を加えた。正常菌が含有するカロチノイド量に相当する量比 カロチノイド/リン脂質 (w/w)= 0.5×10^{-4} に加えたもの (C-1) と、食塩培養菌の有する量比 カロチノイド/リン脂質= 2.5×10^{-4} に加えたもの (C-5) とを作った。それぞれの脂質は 1 mg をクロロホルムに溶解して小試験管に入れエバポレーターで溶媒を除きフィルム状に附着させた。

7) リポソームによるグリセリン透過実験

上記脂質試料に 50mM KCl 溶液 1 ml を加え片山の方法¹¹⁾ にならって vortex mixer でリポソームを作製した。透過実験は De Gier の方法¹²⁾ に準じ 50mM KCl リポソームを 100mM グリセリン溶液に懸濁し、450nm の吸光度変化を測定した。この吸光度の初期の変化 (initial swelling rate) はグリセリンのリポソーム内部への膜透過によるもので透過性を相対的に比較し得る。又実験温度を変化させ温度依存性を検討した。

8) リポソームによるグルコース透過実験

前述の脂質材料に 1 ml の 0.3M グルコース溶液を加えリポソームを作製し、保持されなかった遊離グルコースは Sephadex G-50 で分離した。リポソームから透過流出したグルコースを測定するためには Kinsky の酵素法¹³⁾ に準じて行った。すなわち リポソーム懸濁液 15 μl を Glucose-6-phosphate dehydrogenase (2.27 mg/dl) 15 μl, Hexokinase (4.47 mg/dl) 15 μl, 20mM ATP 0.15 ml, 10mM TPN 0.15 ml, 20mM magnesium acetate 0.3 ml, 0.1M Tris buffer (PH 8.0) 0.84 ml および Tris buffer で作製した 0.15M KCl+0.15M NaCl の混合溶液 1.5 ml 中に加え、340nm の吸光度を経時的に測定した。

9) 質量分析

質量分析は島津質量分析計 LKB 900 を用い直接試料挿入方式によった。

結 果

1. プ菌の培養条件によるカロチノイド含有量 培養時間及び培地組成による比較は 1% グリセリンモノアセテート添加以外はすべて液体培

Table 1 Carotenoid contents in various conditions

Medium	0.85% NaCl					10% NaCl	
	2% glycerin		2% glycerin		1% glycerin-	2% glycerin	2% glycerin
	(-)		(+)		monoacetate	(-)	(+)
Culture phase	middle	late	late	late	late	late	late
Natural light	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
O ₂	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Carotenoid contents/ PL (w/w)	0.2x10 ⁻⁴	trace	0.5x10 ⁻⁴	2.0x10 ⁻⁴	(25-50)x10 ⁻⁴	2.1x10 ⁻⁴	(12-20)x10 ⁻⁴
* (ratio)	(0.4)	(-)	(1)	(4)	(50-100)	(4.2)	(25-40)

* expressed as the ratios of carotenoid contents of *S. aureus* grown in 0.85% NaCl medium.

Table 2. Physical and chemical properties of carotenoid pigments from *S. aureus*

Fr. number (Identification)	eluent from		TLC* Rf (silicic acid)	absorption maxima in hexane	partition hexane/95% methanol	methylation silylation (-OH)	NaBH ₄ (=CO)	LiAlH ₄ (=CO, ester)
	silica column	alumina column grade III						
Fr. 1 yellow (Diapof-carotene)	0.5% acetone in hexane	0.5% acetone in hexane	0.49	376, 398, 423	100:0	-	-	-
Fr. 2 yellow (Diaponeurosporene)			0.42					
Fr. 3 orange (Diaponeurosporenic acid methyl ester)	1% acetone in hexane	1% acetone in hexane	0.56	430, 456, 481	88:12	-	-	+
Fr. 4 pink (Diapolycopenic acid ester)	2% acetone in hexane	1-2% acetone in hexane	0.53	458, 480, 512	82:18	-	-	+
Fr. 5 yellow (Diaponeurosporenic acid ester)			0.47					
Fr. 6 yellow	acetone	4-6% acetone in hexane	0.25	401, 423, 450	20:80	-	+	+
Fr. 7 yellow (Diaponeurosporene derivative)			0.58					

* TLC: Thin layer chromatography

養によるものである。表1に示す如く、液体培地での middle log phase にて集菌した正常菌は菌体色も淡く有色カロチノイド含量は極めて少量であった。しかし late log phase で集菌すると菌体色も黄色で middle log phase の約 2.5倍量のカロチノイドを含有している。更にグリセリン、10%食塩、グリセリン+10%食塩および1%グリセリンモノアセテート添加により菌体色は黄色の色調を強めそれぞれ10倍、10

倍、60-100倍および125-250倍と各々著増した。嫌気性培養では菌体色は灰白色で有色色素産生がほとんど認められなかった。又自然光を遮断する目的のアルミホイルで培養器を遮光したのみでは色素産生は減少せず、全くカロチノイド生成に及ぼす光線の影響は認められなかった。
2. カロチノイド構成成分の分析化学的検討
硅胶カラム及びアルミナカラムで再クロマト分画して得たカロチノイド色素は表2の様に7

種類に分画出来た。

本色素の90%以上を占める主成分で橙黄色を呈するNo.3について述べる。ヘキサン-95%メタノールで二層性を示し分配係数は88:12であ

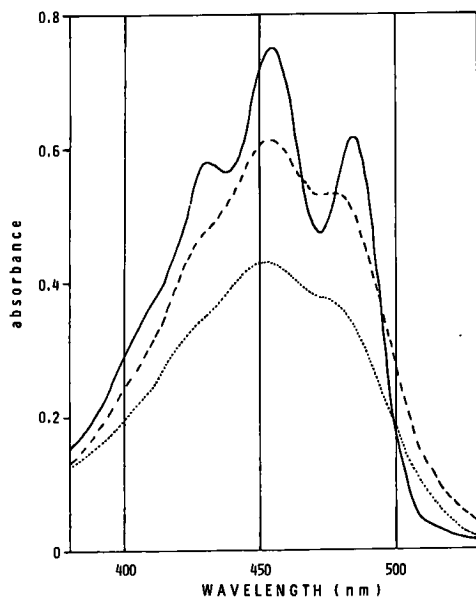


Fig.1. Visible light absorption spectra of NO.3 carotenoid pigment
— hexane, ---- acetone, methanol.

った。200grの湿菌から約100mgを純化精製し得たので可視及び赤外吸収スペクトルを測定した。可視では432, 456及び488nmの吸収を示す(図1)。赤外では1,288及び1,700 cm^{-1} の吸収を示す(図2)。次に官能基テストの化学操作実験の結果を表3に示す。この赤外吸収の結果と表3中の LiAlH_4 の還元産物の吸光値からカロチノイドの共役二重鎖にリンクしたエステル基の存在を認め、又 KOH による強力な加水分解によって極性を増す産物となることから1末端はカルボン酸エステル型のカロチノイド色素であることが確実である。次にこの分画物質の構造を更に詳細にするために質量分析を行った。その結果を図3に示す。親ピークから分子量は446でカロチノイドに特有なM-92(3%), 92(64%)及びM-106(2%), 106(54%)が認められ、⁴⁾M-69(21%)より一方の末端はacyclic構造でiso型構造と考えられる。¹⁵⁾又M-31(2%)の存在はこの色素がメチルエステルであることを示している。この他¹H NMR, ¹³C NMRの測定も行って以上総括検討した結果、4-4'-Diaponeurosporenoic acid methyl esterであると同定した(図4)。

次いで微量成分について述べる。No.1およびNo.2の色素はいずれも黄色カロチノイド色素で

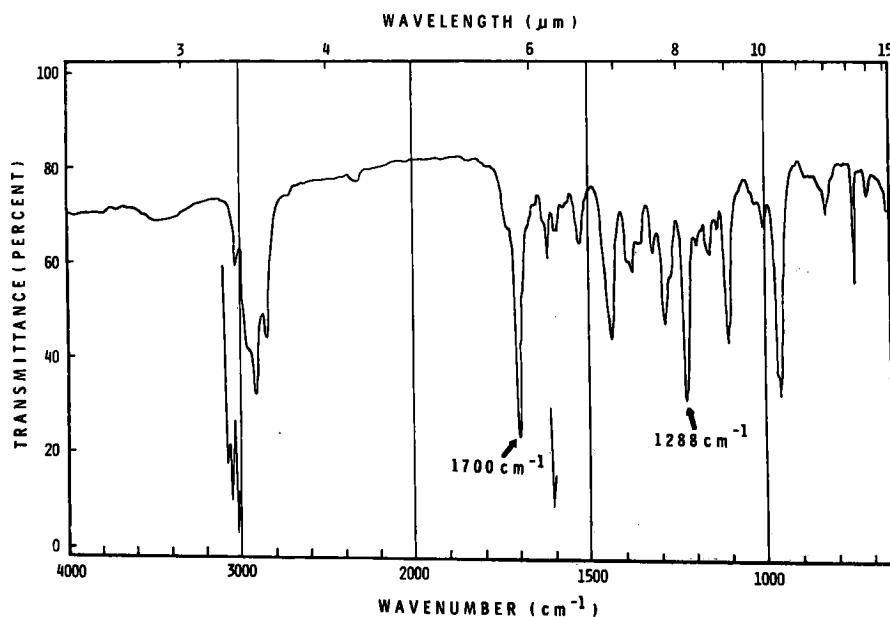
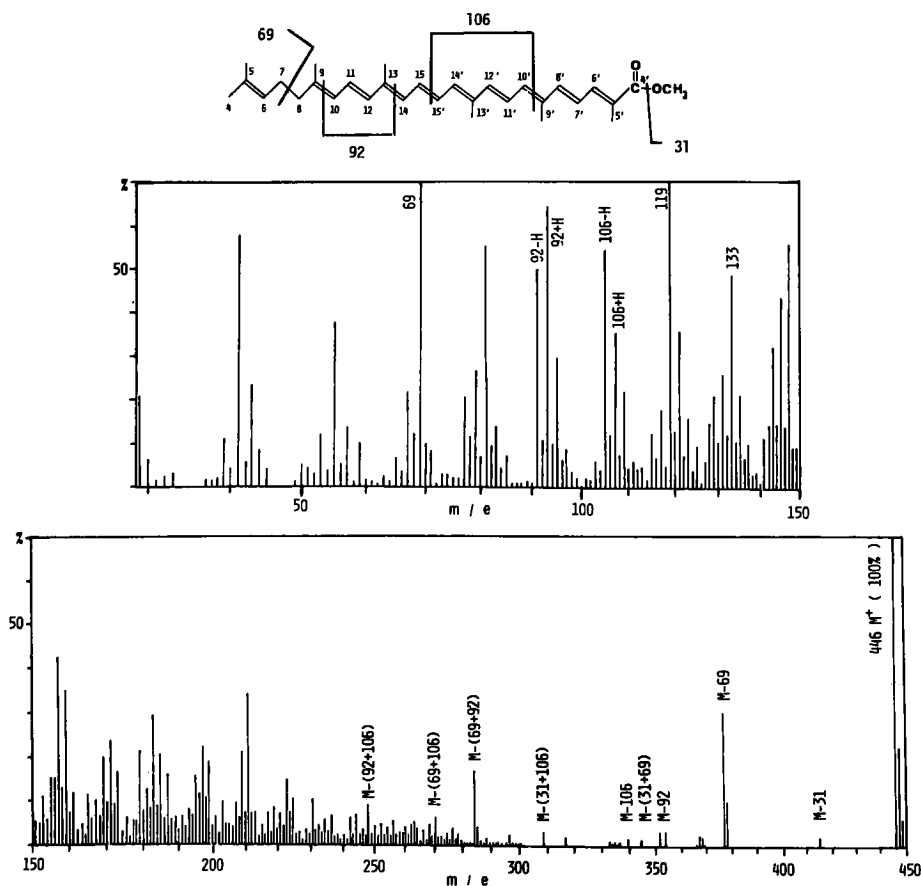


Fig.2. Infrared spectrum of No.3 carotenoid pigment

Table 3. Physical and chemical properties of No. 3 carotenoid pigment

Tests	Results	Comments
Max. in hexane	432, 456 & 488 nm	10 conjugated double bonds
Partition coefficient in hexane-95% MeOH	88 : 12	slight polar
Acetylation	negative	no hydroxyl group
Silylation	negative	no hydroxyl group
Reduction with NaBH ₄	negative	no aldehyde but keto group
LiAlH ₄	reducible	ester
Strong hydrolysis	acid product	ester
IR spectroscopy	1228 & 1700 cm ⁻¹	ester (metyl and carbonyl)
Mass spectroscopy	parent peak at m/e 446	C ₃₀ carotenoid metyl ester and allylic fission

Fig. 3. Mass spectrum of No.3 carotenoid pigment



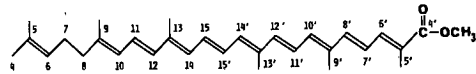


Fig.4. Diaponeurosporenoic acid methyl ester

あり、ヘキサン—95%メタノール分配係数で100:0と完全上層性を呈することから無極性の炭化水素カロチノイドである⁶⁾従って官能基テストとして行った silylation, methylation, LiBH₄ および NaBH₄ reduction により全く変化をうけない。可視吸収スペクトルよりNo.1は共役二重結合を7個有する Diapo-*f*-carotene であり、No.2は共役二重結合を9個有する Diaponeurosporene である。No.4はヘキサン溶液中の吸収極大が458, 480および512nmでブ菌色素では最大の長波長吸収をもつピンク色のカロチノイド色素である。定性試験および分配試験の成績はすべてNo.3の色素に酷似している。すなわち分配試験で82:18と二層性を示し、又官能基テストの化学操作実験の結果よりカルボキシエステルの存在が確実である。ヘキサン溶液中の吸収スペクトルより推測するとNo.3の Diaponeurosporenoic acid methyl ester の炭素鎖が全共役した Diapolycopenoic acid lower alkyl ester と思われる。No.5及びNo.7はいずれも黄色カロチノイド色素で、吸収極大はNo.2の Diaponeurosporene に類似しているが、分配試験で極性を有することが異っている。TLC での R_f 値は表2に示す通りで、分配試験および定性試験よりNo.5はエステル基をもつ弱極性物質、No.7は更にカルボニル基、水酸基を有する中等度極性のカロチノイド色素である。No.6は黄色のカロチノイド色素である。ヘキサン中での吸収極大は Zeacarotene に類似した401, 423および450nmであるが、極性基を持たない Zeacarotene と異なり、分配試験20:80と更に大きな二層性分配を示し、NaBH₄ でも還元されることから少なくとも2個のカルボニル基を持つカロチノイド色素であろうと考えられるが微量産物のため詳細な同定は不能であった。

3. リポソームによるカロチノイド色素の物質透過に及ぼす影響について

初期の容積変化 (initial swelling rate) を測定してカロチノイド添加のためのグリセリン透過性への影響を比較検討した (図5)。コン

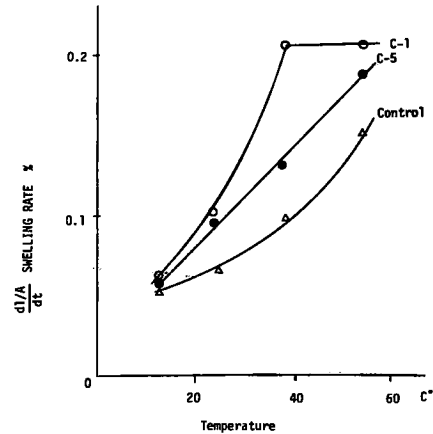


Fig.5. Initial swelling rate causing glycerin permeation of liposomes,

- △— prepared from phospholipid of Normal *S. aureus* (Control).
- prepared from above mentioned phospholipid containing carotenoid (C-1).
- prepared from above mentioned phospholipid containing carotenoid (C-5).

トロールのリン脂質単独のリポソームにくらべると、カロチノイド含有リポソーム、すなわちC-1およびC-5のグリセリン透過率は促進されしかもその何れもが温度上昇にともなって透過は促進される。そして37°Cでは相互の差が最も著明でコントロールに比べC-1は2倍、C-5は1.4倍の透過能を示した。いずれにしてもコントロールと比較すると透過率は高く、一応カロチノイド添加ではグリセリン透過を促進させる傾向があるといえる。なお正常菌が含有するカロチノイド量に相当する量比のカロチノイドをリン脂質に加えたC-1の方が、食塩菌の含有するカロチノイドを加えたC-5より透過が速いことは片山¹¹⁾の正常菌及び食塩菌由来の脂質分画でのグリセリン透過実験とも一致する。

次にグルコース透過実験結果を図6に示した。前述したグリセリン透過実験と同様にカロチノイド添加リポソームの方が、コントロールのリン脂質単独リポソームよりグルコースの透過性の高い結果を得た。以上の二つの透過実験より、リン脂質にNo.3の Diaponeurosporenoic acid methyl ester を添加したリポソームの方がリン脂質リポソームより透過性を促進させる傾向があることが明らかとなった。

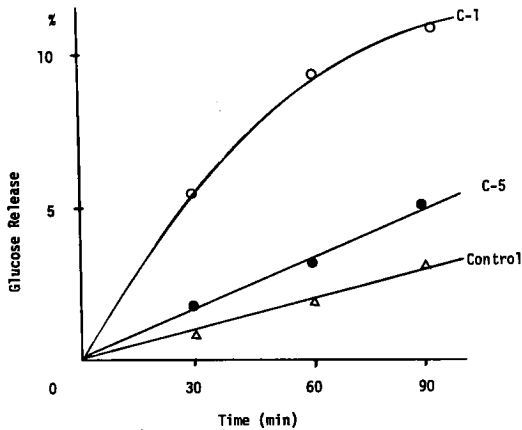


Fig. 6. Time course of glucose diffusion from liposomes,

- △— prepared from phospholipid of Normal *S. aureus* (Control).
- prepared from above mentioned phospholipid containing carotenoid (C-1).
- prepared from above mentioned phospholipid containing carotenoid (C-5).

考 察

ブ菌のカロチノイド色素産生能は培地、培養条件により著しく変化することは経験的に知られているが、著者は定量分析してこのことを明らかにした。臨床検査ではブ菌の色素産生を観察するのにマンニト食塩培地が一般に使用されているが、これはブ菌の耐塩性と色素産生能を利用したもので合理的である。従来より色素産生能を検索するのに卵黄培地が使用されて来たが、繁雑さと色素産生能にむらが出来欠点の為、最近ではあまり利用されなくなった。グリセリンモノアセテートに関しては、Willisら¹⁶⁾がハートインフュージョン寒天培地に1%濃度に添加することによって非常に強い色素産生があると報告している。本物質を含有する培地を使用した場合臨床分離株での色素による鑑別は極めて明確に行い得るが、難点として発育が抑制され3-4日を必要とし、迅速性を要する臨床検査にはやゝ不利である。しかし著者が得た結果からは色調も鮮明で産生量も多いので確実な菌同定には是非使用すべきであろう。*Penicillium sclerotium*⁴⁾ などではカロチノイド生成に可視光線を必要とし、同様の菌種も多数あるが、ブ菌に関しては菌の増殖も含めてカロチ

ノイド生成に対する可視光線の必要は認められない。菌の増殖およびカロチノイド産生に及ぼす光線の影響は単色光照射の検討をしなければ充分といえないが、本実験では果せなかった。

ブ菌のカロチノイド色素の分析報告は多数ある。これまでの報告によると、 δ -Carotene^{1), 2)}, Rubixanthin¹²⁾, Sarcinen¹⁷⁾, Sarcinaxanthin¹⁷⁾, Zeaxanthin¹⁸⁾, Phytoene¹⁾, β -Carotene¹⁾, Phytofluene¹⁾, Diaponeurosporene¹⁹⁾, Diapo β -carotene¹⁹⁾, Diaponeurosporene-4-oic acid¹⁹⁾, および C₃₀-Diapophytoene²⁰⁾ などが存在するといわれている。しかしながら Suzue によって同定されている C₃₀ Diapophytoene を除いては可視吸収スペクトルによる同定のみで満足すべき充分な同定は行われていない。今回ブ菌の主成分カロチノイドが弱極性のエステル型カロチノイドであることを報告したが、これまでに微量成分としてもエステル型カロチノイドの報告は見当らない。このことは従来のカロチノイド色素の同定が可視吸収スペクトルのみに頼っていることに起因すると思える。そのために極性のほとんどないエステル型が炭化水素カロチノイドと同定されている可能性は充分ありうる。著者も実験当初はNo.3のこの色素を可視吸収スペクトルのみにより δ -Carotene ではないかと推定していた。これは Suzue が色素産生経路の報告の中で無色カロチノイドである C₃₀ Diapophytone から δ -Carotene が合成される²¹⁾と報告していることにも起因する。

著者は文献上 δ -Carotene と信じられていたブ菌の主成分カロチノイド色素を厳密な分離精製操作及び機器分析と化学的定性試験によって、エステル型 C₃₀ カロチノイドであると同定した。そしてこのNo.3のカロチノイド色素は穏和な加水分解後石油ベンジンで抽出される有色色素の90-95%を占める主成分である。菌体浮遊液、粗総脂質画分および nonsaponifiable lipid にみられる 450 nm の巾広い最大吸収極大は殆どがこのNo.3の色素に由来している。Daviesら¹⁹⁾ はエステル型カロチノイドはメタノール性カセイカリの反応によりカルボン酸型カロチノイドから生成される人工産物ではないかと疑問を投げかけている。しかし著者の実験系ではこのエステル化反応は化学反応理論的にも無理があり、又実際にメタノールを使用しないカセイカリ中

でもエステル型カロチノイドが得られるなどより、No. 3 のエステルは分離精製中に出来た人工産物ではない。

No. 3 以外の色素は微量成分であり、機器分析にかけるだけの充分量の精製カロチノイド色素を得ることが難しいため、すべて吸収スペクトルと化学的定性試験により同定した。No. 1 および No. 2 は学会報告記録のみで詳しい記載がないが Davies¹⁹⁾ のいう C₃₀ Diapo *f*-carotene, C₃₀ Diaponeurosporene に多分間違いない。No. 4 の色素はこれまでの報告にはない長波長吸収を示すピンク色のカロチノイドである。化学定性試験結果が全く Diaponeurosporenic acid methyl ester と一致するので多分 Diapolycopenoic acid methyl ester であろう。No. 5, No. 6 および No. 7 のカロチノイド色素については満足すべき同定が行えなかった。文献的には No. 5 および No. 7 に類似したカロチノイドが *Micrococcus lysodeikticus*²²⁾ に存在し、No. 6 に類似したカロチノイドの報告を *Enterococcus*²³⁾ に見ることが出来るが、いずれの報告も最終的な同定はなされていない。

ブ菌の構成カロチノイドは自然界に多い C₄₀ カロチノイドではなく、C₃₀ カロチノイドのようである。つまり充分に同定出来ているのは著者の報告した C₃₀ エステル型カロチノイドと No. 3 の前駆体である C₃₀ Diapophytoene のみであるが、更に Davies の報告もあわせて考えるとブ菌のカロチノイド色素は全て C₃₀ カロチノイドである可能性がある。ちなみにグラム陽性球菌の C₃₀ カロチノイド色素について詳細な同定報告は *Streptococcus faecium* UNH 564 P について見られ、Diapo *f*-Carotene^{?)}, Diaponeurosporene^{?)}, 4-D-Glucopyranosyloxy-4, 4'-diaponeurosporene²⁴⁾ および 4, 4'-Diapolycopen-4-al¹⁹⁾ などの存在が確認されている。今後細菌のカロチノイド色素については吸収スペクトルによるだけでなく詳細な同定実験より再検討されなければならないであろう。

細菌の細胞は細長いイソプレノイド重合体は作れるが、これを還状のステロイドに変えられないのでステロールを全く含まない。マイコプラズマではあるが、コレステロールを含まない *Acholeplasma laidlawi* においてはカロチノイド色素がコレステロールの役割をなし²⁵⁾、膜を

rigid にするという報告が Huang らにより述べられている。ブ菌カロチノイドにおいて、この様な役割の有無を検討するためにカロチノイド添加リポソームでの透過実験を行ったが、C₃₀ Diaponeurosporenic acid methyl ester にはグリセリンおよびグルコースの透過性をむしろ亢進させ、rigid にする作用は認められなかった。Huang らの実験系とはカロチノイド成分も濃度も異なるため直ちに比較は困難であるが、ブ菌中にあるこの黄金色色素は *Acholeplasma* とは逆に膜の透過性を促進させているのは事実である。尚カロチノイドを Huang らの実験と同程度の大量を添加した場合、凝集をおこしリポソーム作製が出来なかった。この理由は弱極性のエステル型カロチノイドのみを使用しリポソームを作製したためであり、極性の強い No. 5, No. 6 および No. 7 の様なカロチノイド等を混合するとききれいなリポソームが出来、更にグリセリンおよび糖の透過の態度も異なるかも知れない。ブ菌カロチノイドの生理的機能については今后更に物性論的な検討が必要であろう。

結 論

黄色ブドウ球菌カロチノイド色素の色素産生に及ぼす諸条件について検討し、更に各成分の化学分析を行った。生理的意義を検討する一助としてリポソームによる透過実験を行い、カロチノイド色素のリポソームの透過におよぼす影響をみた。

1) 有色色素産生は late log phase になると急激に増強され、又グリセリン、食塩、1% グリセロールモノアセテート添加により更に増強した。嫌気性条件下では有色色素産生が認められず、色素産生には酸素が必要であった。更に光による影響は認めなかった。

2) 有色カロチノイド色素の主成分は C₃₀ Diaponeurosporenic acid methyl ester であった。他に微量成分として Diaponeurosporene, Diapo *f*-carotene, Diapolycopenoic acid methyl ester, Diaponeurosporene ester, Diaponeurosporene 誘導体で水酸基を有するカロチノイドなどが同定された。ブ菌カロチノイド色素は C₃₀ カロチノイドであると思われる。

3) カロチノイド添加リポソームにおいてのグリセリン及びグルコースの透過実験では、添

加により透過亢進が認められた。まだ意義は不明だが適応現象の一現象であると考えられる。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜った金政泰弘教授に深く感謝いたします。

又種々の御教示と御援助をいただいた片山健博士、速水正明博士に謝意を表し、あわせて質量分析を行っていただいた岩藤章正氏および本実験をお手伝い頂いた荒木暢子氏に感謝の意を表します。

文 献

1. Hammond, R.K. and White, D.C.: Carotenoid formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **103**, 191—198, 1970.
2. Suzue, G.: Studies of carotogenesis by *Micrococcus pyogenes var aureus*. *J. Biochem.* **46**, 1497—1504, 1959.
3. Sobin, B. and Stahly, G.D.: The isolation and absorption maxima of bacterial carotenoid pigments. *J. Bacteriol.* **44**, 265—276, 1942.
4. 間瀬泰男: カロチノイドの生合成に関する研究 (II) *Penicillium sclerotiorum* によるカロチン産生。ビタミン, **13**, 407—412, 1957.
5. Aasen, A.J., Francis, G.W. and Liaaen-Jensen, S.: The carotenoids of two yellow Halophilic cocci — Including a new Glycosidic methyl apo-lycopenoate. *Acta Chem. Scand.* **23**, 2605—2615, 1969.
6. Petracek, F.J. and Zechmeister, L.: Determination of partition coefficients of carotenoids as a tool in pigment analysis. *Anal. Chem.* **28**, 1484—1485, 1956.
7. Taylor, R.F. and Davies, B.H.: Triterpenoid carotenoids and related lipids.—The triterpenoid carotenes of *Streptococcus faecium* UNH 564P. *Biochem. J.* **139**, 751—761, 1974.
8. Davies, B.H.: Alternative pathways of Spirilloxanthin biosynthesis in *Rhodospirillum*. *Biochem. J.* **116**, 101—110, 1970.
9. Taylor, R.F. and Davies, B.H.: Triterpenoid carotenoid aldehydes from *Streptococcus faecium* UNH 564. *Biochem. J.* **153**, 233—239, 1976.
10. Goodwin, T.W.: Studies in carotenogenesis. *Biochem. J.* **63**, 481—484, 1956.
11. 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.
12. De Gier, J., Mandersloot, J.G. and Van Deenen, L.L.M.: Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **150**, 666—675, 1968.
13. Kinsky, S.C., Haxby, J., Kinsky, C.B., Demel, R.A. and Van Deenen, L.L.M.: Effect of cholesterol incorporation on the sensitivity of liposomes to the polyene antibiotic, Filipin. *Biochim. Biophys. Acta.* **152**, 174—185, 1968.
14. Enzell, C.R., Francis, G.W. and Liaaen-Jensen, S.: Mass spectrometric studies of carotenoids. I. Occurrence and intensity ratios of M-92 and M-106 peaks. *Acta Chem. Scand.* **22**, 1054—1055, 1968.
15. Enzell, C.R., Francis, G.W. and Liaaen-Jensen, S.: Mass spectrometric studies of carotenoids. II. A survey of fragmentation reactions. *Acta Chem. Scand.* **23**, 727—750, 1969.
16. Willis, A.T. and Turner, G.C.: Staphylococcal lipolysis and pigmentation. *J. Pathol. Bact.* **84**, 337—347, 1962.
17. Douglas, R.J. and Parisi, J.T.: Chromogenesis by variants of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **92**, 1578—1579, 1966.
18. Chargaff, E.: Sur les carotenoides des bacteries. *Compt. Rend.* **197**, 946—948, 1933.
19. Davies, B.H. and Taylor, R.F.: Carotenoid biosynthesis—The early steps. *Pure Appl. Chem.* **47**, 211—222, 1976.
20. Suzue, G., Tsukada, K. and Tanaka, S.: Occurrence of Dehydrosqualen₉ (C₃₀ Phytoene) in *Staph.*

- lococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **164**, 88—93, 1968.
21. Suzue, G.: Enzymic conversion of bacterial phytoene into δ -Carotene. *Biochim. Biophys. Acta.* **50**, 593—594, 1961.
 22. Rothblat, G.H., Ellis, D.S. and Kritchevsky, D.: The carotenoid pigments of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **84**, 340—347, 1964.
 23. Taylor, R.F., Miyoshi, I. and William, C.: Carotenoids in yellow-pigmented Enterococci. *J. Bacteriol.* **105**, 676—678, 1971.
 24. Taylor, R.F. and Davies, B.H.: Triterpenoid carotenoids and related lipids. —Triterpenoid monohydroxy- and monoglucosyloxy-carotenoids from *Streptococcus faecium* UNH 564P. *Biochem. J.* **139**, 761—769, 1974.
 25. Huang, L. and Haug, A.: Regulation of membrane lipid fluidity in *Acholeplasma laidlawii*: effect of carotenoid pigment content. *Biochim. Biophys. Acta.* **352**, 361—370, 1974.

**Characterization of carotenoid from *Staphylococcus aureus*
and its physiological role**

Katsuko SASAI

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

Although carotenoid is one of the typical pigments in *Staphylococcus aureus*, its properties and physiological role have not been well characterized. This paper examined carotenoid of *S. aureus* in regard to (1) factors affecting its production, (2) chemical properties and (3) its effect on liposomal permeability.

(1) Carotenoid content increased during the late logarithmic growth phase. Production was potently accelerated by the addition of 10%NaCl (10 fold), 2% glycerin (10 fold) and 1% glycerolmonoacetate (250 fold). Oxygen was necessary but visible light did not effect the production.

(2) The major component of carotenoid was C₃₀Diaponeurosporenoic acid methyl ester. Minor components were Diaponeurosporene, Diapo- β -carotene, Diapolycopenoic acid methyl ester, Diaponeurosporene ester and a hydroxyl derivative of Diaponeurosporene. Staphylococcal carotenoids were all C₃₀.

(3) The addition of carotenoid to liposomes (made of staphylococcal phospholipids) increased the permeability for glycerol and glucose. This indicates that production of carotenoid may be an adaptational response of the bacteria.