

学 位 論 文 要 旨

氏名: 阿 部 晃 久

題目: Investigation about organic solvent-tolerant polyaromatic hydrocarbon degraders and cold-induced nonculturable suppression mutants

(有機溶媒耐性多環芳香族分解細菌と低温誘導によって引き起こされるVBNC状態を抑制する突然変異体に関する研究)

有機溶媒は僅かな濃度でさえ細胞毒性が強く、細菌の細胞膜を破壊し、その機能や構造に影響を与えることが知られている。これら毒性を持つ有機溶媒を資化する微生物の存在は知られているが、低濃度の場合に限られている。多量の有機溶媒を含むあらゆる培地は、微生物にとっては極限環境と考えられ、長年にわたって、微生物がそのような厳しい環境に耐えないであろうと考えられていた。有機溶媒耐性の細菌に関する最初の報告は、1989年の井上と掘越によるものであった。彼らは50%(v/v)トルエン存在下で生育可能な*Pseudomonas putida* IH-2000を発見した。この驚くべき発見は他の研究者によって確かめられ、盛んに研究が進められた。

報告された有機溶媒耐性細菌の多くはシュードモナス属(*P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*)等であった。*P. putida* IH-2000は土壌、*P. putida* DOT-T1Eは廃水が分離源である。また、*P. putida* S12に代表されるその他の有機溶媒耐性細菌は研究室内で改変されたものである。大腸菌の有機溶媒耐性の変異株は、有機溶媒感受性の親株から得られたものであった。

森屋と掘越は1993年に土壌サンプルと比較した場合、深海底泥に数多くの有機溶媒耐性微生物が存在することを報告した。森屋と掘越が分離した深海由来の有機溶媒耐性細菌は水(培地)-有機溶媒二相系システムを用いた反応で、硫黄化合物を利用できる優れた特性を有していた。水(培地)-有機溶媒二相系システムを用いた反応系では高濃度の疎水性基質の添加が可能となり、反応の効率化が図れ、プロセスのコスト軽減も期待できる。著者は有機溶媒耐性細菌の産業への応用も念頭におき、深海環境からの探索を行った。

Chapter IIにおいて著者は、相模湾1,168mの深海環境からDS-1051, DS-1902, およびDS-313と名付けた有機溶媒耐性細菌を分離した。これらの菌株はベンゼン、トルエン、*p*-キシレンといった毒性の強い有機溶媒に対して耐性を有しており、形態学および生化学的特徴からDS-1902株はバチルス属、DS-1051株およびDS-313株はシュードモナス属細菌と同定された。DS-1051株およびDS-1902株は有機溶媒に溶解させたナフタレンを分解することが可能であった。同様にDS-313株は水(培地)-有機溶媒二相系システム(9:1)を用いた反応系でビフェニルを良好に分解することができた。これら有機溶媒耐性細菌の多環芳香族炭化水素の分解は水系のみの場合と比べ、親油性基質を多く溶解し、また接触面積を大きくとることのできる、水(培地)-有機溶媒二相系システムがより高い分解性を示した。一般に、グラム陽性菌はグラム陰性菌に比べ有機溶媒に対する感受性が高く、バチルス属に分類されたDS-1902株の分離は大変重要な発見であった。

同様にChapter IIIにおいて著者は、相模湾1,168mの深海環境から有機溶媒耐性細菌を分離することに成功した。分離された菌株はベンゼン等、トルエン以上の疎水性有機溶媒に耐性を有していた。その形態学および生化学的特徴からバチルス属に分類され、DS-1906株と名付けた。DS-1906株は*n*-ヘキサン存在下でナフタレンを分解することが可能であった。更に、DS-1906株は水(培地)-有機溶媒二相系システムで効率良く多環芳香族炭化水素であるフルオレン、フェナントレン、アントラセン、ピレン、クリセンおよび1,2-ベンゾピレンを分解することができた。

培養された菌株と自然界に存在する系統が一致しない根底には、培養過程での微生物の生存競争、飢餓、その他のストレスのため自然界の細胞が休眠状態であること、また優先的な菌種が要求する物理・化学条件や栄養に対する理解が不十分であること考えられる。外洋環境で鍵となる可能性のある微生物が未だに培養として得られていない、ということは、それほど驚くべきことではない。海洋は空間的に広大で、試料を採取する場所も隔たっているし、多くの点で化学的、物理的に異なっており、

飢餓や休眠を促す温度や圧力、貧栄養状態といった極端な条件が特徴となっているからである。

このような海洋で生きている微生物の本当の多様性を直接測定した例は、ほとんどない。最近になって、系統的多様性を評価する目的で、海洋環境の様々な自由生活性の微生物群集からの全サンプルに分子生物学的手法が適用されるようになった。これらより得られた結果やさらに海洋生息域に知られている生物多様性から、他の環境と同様に、海洋環境に住む微生物のごくわずかな部分しか培養として得られてはいなかったことが明らかになった。

*Vibrio vulnificus*は、世界中の温帯水域に住む海洋細菌である。これらは暖かい季節には、容易に海水中から分離することが可能であるが、寒い季節になると、途端に検知できなくなってしまう。細胞は生きているが通常の培養ではコロニーを形成することができなくなっている。そのような細胞は、生きているが培養できない状態(viable but nonculturable, VBNC)であると言われている。一般に、VBNC状態における細菌は、通常細菌学で用いられる培地で培養(生育)することができないが、代謝活性は有していると定義付けされる。低温ストレスは、*V. vulnificus*におけるVBNC状態への導く主要な要因であることが示されているが、現在までにVBNC状態での動態を明らかにした報告は、ほとんど見当たらず、VBNC状態への移行は環境ストレスに対する生存戦略であろうと推察されている。そこで著者は*V. vulnificus*を海洋細菌のモデル生物としてVBNC状態に関する研究に用いた。

研究の目的は*V. vulnificus*からVBNC状態に移行しない変異株を取得し、サブトラクションの変法のひとつであるSuppression Subtractive Hybridization(SSH)を用いてVBNCに関与する遺伝子を確認することであり、著者はSSHを用いてVBNC状態に移行しない変異株特異的cDNAライブラリーを作成することによって低温ストレス下の応答に携わる遺伝子の同定を試みた。

Chapter IVにおいて著者は、NTGで突然変異処理することにより*V. vulnificus*からVBNC状態に移行しない変異株を取得した。得られた変異株にはリパータントは見られず、VBNCに移行することなく培養可能な状態を維持した。SSHを用いて変異株と親株との間で発現量に差のある差次的遺伝子を調べたところ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)が同定され、親株に比べ、変異株において低温ストレス時にGSTが強く発現していることが確認された。また1-chloro-2, 4-dinitrobenzene(CDNB)を基質とした酵素活性の測定においても低温ストレス時に高まっていることを確認した。Viability testsを用いて低温時の酸化的ストレスから細胞を保護するためにGSTが関与しているかどうかを評価するために過酸化水素(H₂O₂)およびCDNBに対する感受性を調べたところ、変異株は親株に比べ強い耐性を示し、H₂O₂等の酸化的ストレスからの保護にGSTが有効な役割を持っていることが示唆された。プロテオバクテリアにおいて、グルタチオンまたグルタチオン系酵素であるGSTは様々な代謝経路と関係し、酸化的ストレスから細胞を保護する働きを持つことが知られており、低温環境下での野生株の*V. vulnificus*に対するグルタチオンの働きを調べたところ、グルタチオンはVBNCへの移行を遅らせる働きがあり、*V. vulnificus*は生存能力を維持していた。これらの結果から、低温時に細胞内に蓄積される過酸化水素のような生育に阻害的に働く物質が*V. vulnificus*のVBNC状態への移行に影響を与えていることが示唆された。

Chapter Vにおいて著者は、同様にNTGで突然変異処理する手法を用いて*V. vulnificus*からVBNC状態に移行しない変異株を取得し、VBNCに関与する遺伝子の検出を試みた。得られた変異株と親株の生育速度を観察したところ変異株は生育が遅く、変異株は低い細胞密度で定常期に移行した。SSHを用いて変異株と親株との間で発現量に差のある差次的遺伝子の検出を試みたところRpoS(σ^S)およびカタラーゼ遺伝子を同定した。対数期、定常期および低温ストレス時のカタラーゼ活性を比較したところ定常期および低温ストレス時に活性の上昇が観察され、同定したカタラーゼ遺伝子はRpoS依存型で定常期以降やストレス対応の転写制御によって活性化され、それら条件下における酸化的ストレスから自らを保護するためにカタラーゼを使ったものと示唆された。さらに過酸化水素に対する感受性試験からも変異株は定常期および低温ストレス時に抵抗性を示した。

これらの結果から*V. vulnificus*におけるVBNC状態は低温ストレスや定常期以降の細胞で蓄積される活性酸素分子種や過酸化水素に対する防御のために休止状態に移行することを示したもので、低温といった不都合な環境要因下で生き抜くためのメカニズムであることを示唆したものである。