

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	Pseudomonas属細菌における有機溶媒耐性機構に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	野口加寿美
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第3641号, 授与年月日:1998年2月28日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第3641号, Conferred date:1998/2/28, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

*Pseudomonas*属細菌における
有機溶媒耐性機構に関する研究

東京工業大学大学院生命理工学研究科
バイオテクノロジー専攻
野口加寿美

～*Pseudomonas*属細菌における有機溶媒耐性機構に関する研究～

目次

	頁
第1章 序論	
第1節 有機溶媒耐性菌の発見と耐性機構の解析	1
第2節 有機溶媒耐性菌の応用と問題点	7
第3節 本論文の構成	10
第2章 有機溶媒耐性菌の取得	
第1節 序論	11
第2節 実験材料と方法	12
第3節 結果	14
第4節 考察	19
第3章 有機溶媒存在下における生育の挙動と生育条件の最適化の検討	
第1節 序論	21
第2節 実験材料と方法	22
第3節 結果	26
第4節 考察	36
第4章 有機溶媒存在下での生育と呼吸維持の関連	
第1節 序論	38
第2節 実験材料と方法	40
第3節 結果	44
第4節 考察	55

第5章 有機溶媒耐性に關与する <i>mexABM</i> 遺伝子の解析	
第1節 序論	57
第2節 実験材料と方法	60
第3節 結果	64
第4節 考察	74
第6章 総括	76
参考文献	78
謝辞	87

第1章 序章

第1節 有機溶媒耐性菌の発見と耐性機構の解析

有機溶媒の毒性は、その種類によって多岐に渡っている。例として、ほとんどの微生物に対して生育阻害を示さないパラフィンから、一部の微生物が生育する石油やヘキサン、生物に対して強い殺菌作用を示すトルエンやクロロホルムなどがある。1989年に井上・掘越らによって多量のトルエン存在下においても生育可能なグラム陰性細菌 *Pseudomonas putida* IH-2000株の発見が報告された。この報告によって、有機溶媒に強い耐性を示す細菌が存在することが示された(24)。その際、水とオクタノールの2相系における分配比率である Pow の常用対数として定義される $\log Pow$ 値が、有機溶媒の微生物に対する毒性の指標として提唱された (Fig. 1-1)。 $\log Pow$ は物質の極性度と負に相関したもので、 $\log Pow$ 値が低いほど極性が高いことになる(29, 58)。有機溶媒については $\log Pow$ 値が低いほどその毒性が強くなることが経験的に知られている(22, 25)。極性の高い有機溶媒は親水性度も高く、水-有機溶媒の2相系において微生物が生育する水相に分配される溶媒分子の量が多くなるためと考えられる。トルエンやベンゼンなどの芳香族系有機溶媒は極性が非常に高く、水に対して2相を形成する飽和条件下においても、トルエンの場合0.035g/lしか水に溶解しない。しかし、有機溶媒は疎水性の性質のため、細胞の内外を隔てている細胞の脂質2重膜中に入り込み、その構造の攪乱の結果、細胞に致命的なダメージを与えられていると考えられており、この事を示唆する電子顕微鏡写真も撮影されている(4, 17)。個々の株において耐性を示す有機溶媒のうち、最も $\log Pow$ 値が低い有機溶媒を生育限界有機溶媒とし、その有機溶媒の $\log Pow$ 値よりも大きな値を示す有機溶媒のほとんどに対して耐性を示す。Table 1-1に、生育限

界の有機溶媒とそのlog P_{ow} 値を用いて、いくつかの細菌の有機溶媒耐性レベルを示す。真核微生物やグラム陽性細菌の方がグラム陰性細菌よりも耐性が低い傾向が認められる。毒性が非常に強い芳香族系の有機溶媒である

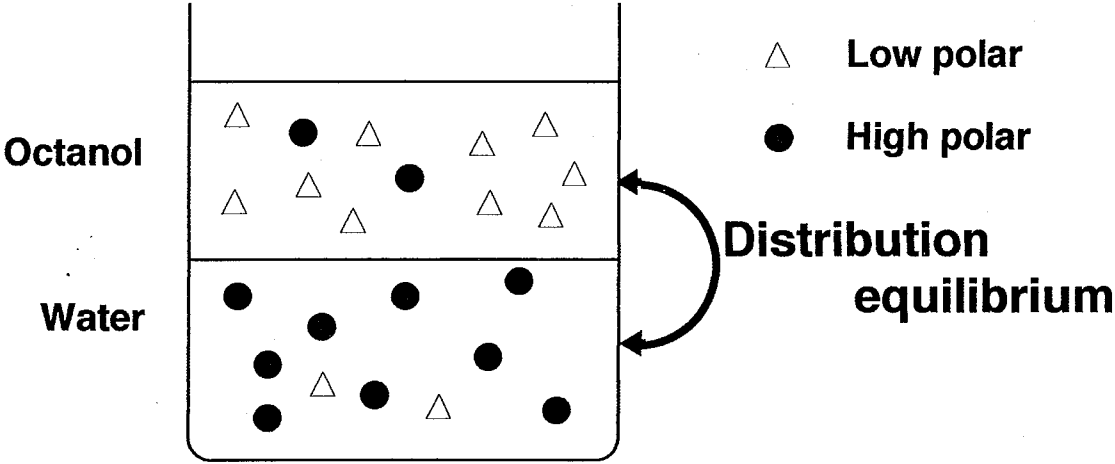
-キシレンやトルエンなどに耐性を示す菌株がこれまでにいくつか分離されているが、そのほとんどが*Pseudomonas*属細菌に分類されている(2, 24, 25)。

有機溶媒耐性菌における耐性機構に関しては、当研究室における大腸菌を用いた一連の研究およびde BondやRamosらの*P. putida*を用いた研究により、様々な知見が得られている。大腸菌K-12 JA300株を親株として、有機溶媒耐性度が逐次的に向上した変異株を作成し、それらの有機溶媒耐性に関連のある生理学的・遺伝学的特徴について検討されている。生理学的には、細胞表層の総合的な疎水性度の違いが、有機溶媒耐性度に関連する可能性が報告されている(28)。遺伝学的には、薬剤などのストレスに応答する遺伝子soxS、robA、marA遺伝子の多コピー化による過剰発現により宿主大腸菌の有機溶媒耐性度が向上することが示されている。これらのストレス応答遺伝子は転写活性化因子であり、Fig. 1-2に示すように、複数の遺伝子（レギュロン）の発現を活性化することが知られている(59)。これらの遺伝子群のうちでも、有機溶媒耐性の向上に寄与する遺伝子の同定に関心が集まっている(7, 38, 39)。また、有機溶媒耐性度が向上した変異株を解析することにより、marAのリプレッサー遺伝子をコードするmarRにミスセンス変異が存在することが見いだされている(7)。これらの耐性変異株においては、marAの過剰発現が起きていると考えられ、marレギュロン (sodA、zwfなど) の発現向上が認められている。そのうち、marA遺伝子の制御下にあるacrAB遺伝子の産物は細胞膜上において薬剤排出のためのポンプを構成し、大腸菌の抗生物質耐性に寄与していることが示されている。しかし、このポンプが直接有機溶媒耐性にも寄与しているかどうかは検討中

であり、未だ明らかにされていない。

*Pseudomonas*属細菌については、病理学的に関心の高い*Pseudomonas aeruginosa*を除いて、その細菌学的・遺伝学的・生化学的な研究が乏しい。このため、耐性機構に関する系統だった研究が未だ成されていない。一部で、*P. putida*のトルエン耐性株について、細胞膜を構成するリン脂質の脂肪酸組成比の違いや有機溶媒分子の能動的排出系が有機溶媒耐性に関与することが示唆されている(26, 56)。

$$\text{Partition coefficient } P_{ow} = \frac{C_o}{C_w}$$



Solvent	log P_{ow}	Polarity	Toxicity
Decane	6.0	Low polar	Low toxic
Octane	4.9		
Hexane	3.9		
Pentane	3.3		
<i>p</i> -xylene	3.2		
Octanol	3.0		
Toluene	2.7		
Benzene	2.1		
Butanol	0.8		
Acetone	-0.2		
Methanol	-0.8	High polar	High toxic

Fig. 1-1 Index of organic solvent polarity

Table 1-1. Solvent tolerance (log P_{ow} value) of bacterial strains.

	log P_{ow}	<i>Pseudomonas putida</i> IH-2000	<i>Pseudomonas putida</i> IF03738	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IF03507	<i>Escherichia coli</i> IF03806	<i>Alcaligenes faecalis</i> JCM1474	<i>Bacillus subtilis</i> AHU1219	<i>Corynebacterium glutamicum</i> JCM1318	<i>Saccharomyces uvarum</i> ATCC26602
Dodecane	7.0	+	+	+	+	+	+	+	+
Decane	6.0	+	+	+	+	+	+	+	-
Nonane	5.5	+	+	+	+	+	+	+	-
Octane	4.9	+	+	+	+	+	+	+	-
Isooctane	4.8	+	+	+	+	+	-	-	-
Cyclooctane	4.5	+	+	+	+	+	-	-	-
Diphenylether	4.2	+	+	+	+	-	-	-	-
n-Hexane	3.9	+	+	+	+	-	-	-	-
Cyclohexane	3.4	+	+	+	-	-	-	-	-
p-Xylene	3.1	+	+	-	-	-	-	-	-
Toluene	2.8	+	-	-	-	-	-	-	-
Benzene	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Limiting log P_{ow} for growth		2.4	3.1	3.4	3.9	4.5	4.9	7.0	7.0

+ : growth - : no growth

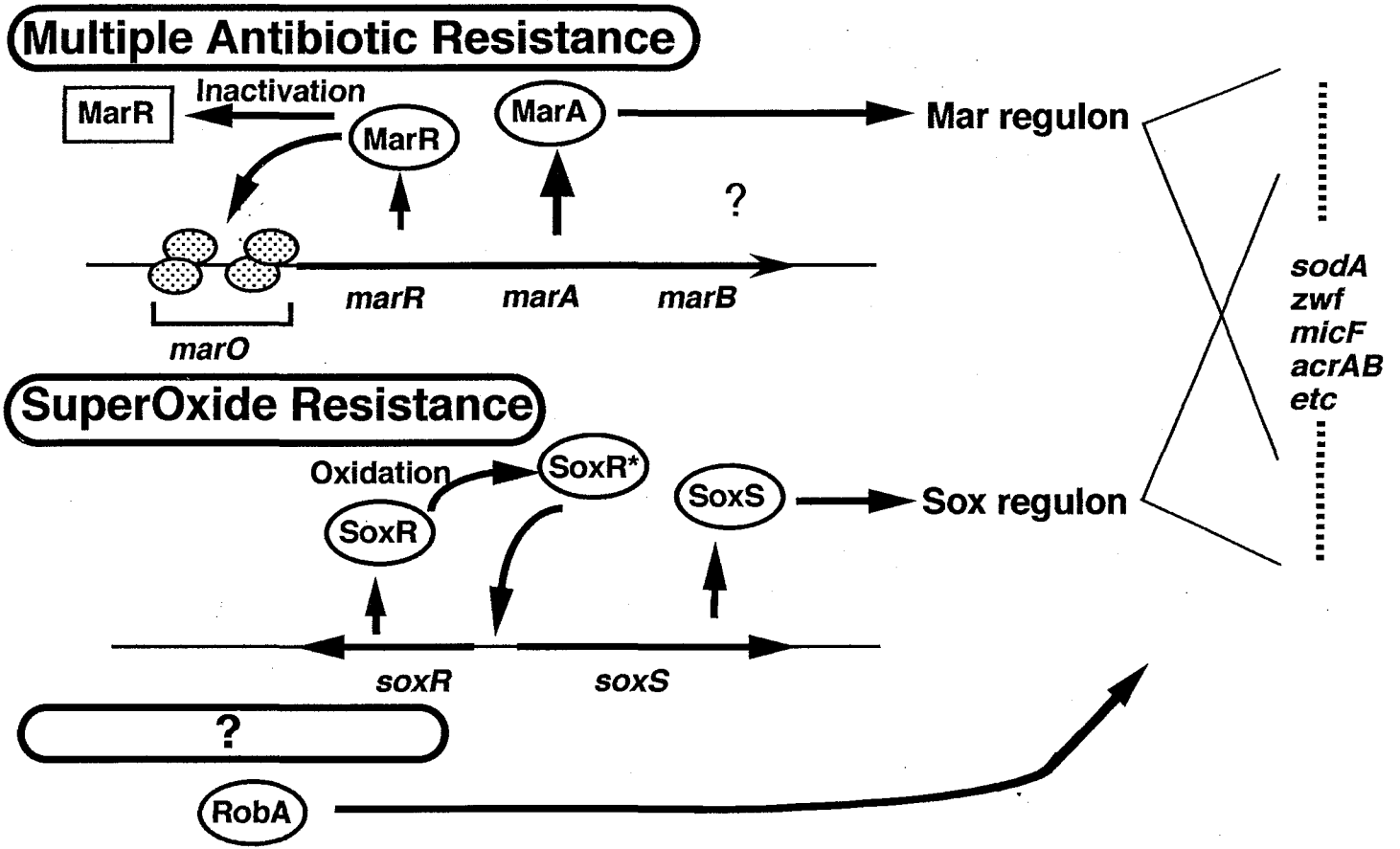


Fig. 1-2 *mar-sox* regulon in *Escherichia coli*

第2節 有機溶媒耐性菌の応用と問題点

有機溶媒耐性菌の発見は、微生物を用いたバイオリアクターの手法に新しい展開をもたらすものと考えられる。従来から、トルエン資化菌などによる有機溶媒を含む微生物反応は行われてきたが、有機溶媒による微生物の生育や酵素反応などへの悪影響を回避するため、その量はごく微量あるいは蒸気として供給せざるを得なかった(16, 20, 52)。しかし、高度の有機溶媒耐性菌の発見は、水と混和しない溶媒を液体培地の10-50%添加し、あるいは固形培地の表面を完全に覆うような系を用いて発見・分離された。このような大量の有機溶媒の存在下においても生育する微生物の存在が認められて以来、反応基質や反応生成物を高濃度に溶解するための溶剤として有機溶媒を利用することが考案された。

Fig. 1-3 にこれらの概要を示す。従来からも、単一の水相のみではなく、水-有機溶媒の2相系のバイオリアクターが利用されていた(17, 50, 51, 57)。これらの系において、反応の主体である細菌は休止細胞として供されている例が多い。それに対して、有機溶媒存在下で有機溶媒耐性菌を生育させつつ、微生物反応を行わせる方法も研究が進められている(5)。前者の場合、休止細胞の反応持続性の限界から数時間しか利用できないが、後者の場合は、有機溶媒耐性菌を用いるため数日に渡る反応時間が期待できる反面、菌体の生存と生育の維持が必要である。

いずれの場合においても、有機溶媒存在下における菌体の生理活性あるいは生育の維持が必須である。これまで有機溶媒耐性を評価する際に液体培地における濁度あるいは菌体タンパク質の増加が指標とされることが多かった。これらは、生菌と死菌を含めた菌体量を観察したものである。しかし、バイオリアクターにおいては、微生物の生育に伴う生理活動の一部を用いて反応に利用する。従って、死菌体を含めた菌体量の増加を観察するだけでバイオリアクターとしての適用性をも判断するこ

とは好ましくなく、微生物の生存・増殖を表す生菌数としてコロニー形成能（CFU）の測定と評価が必要であると考えられる。本研究では生菌数の維持を中心にして、有機溶媒存在下における微生物の生育を検討した。

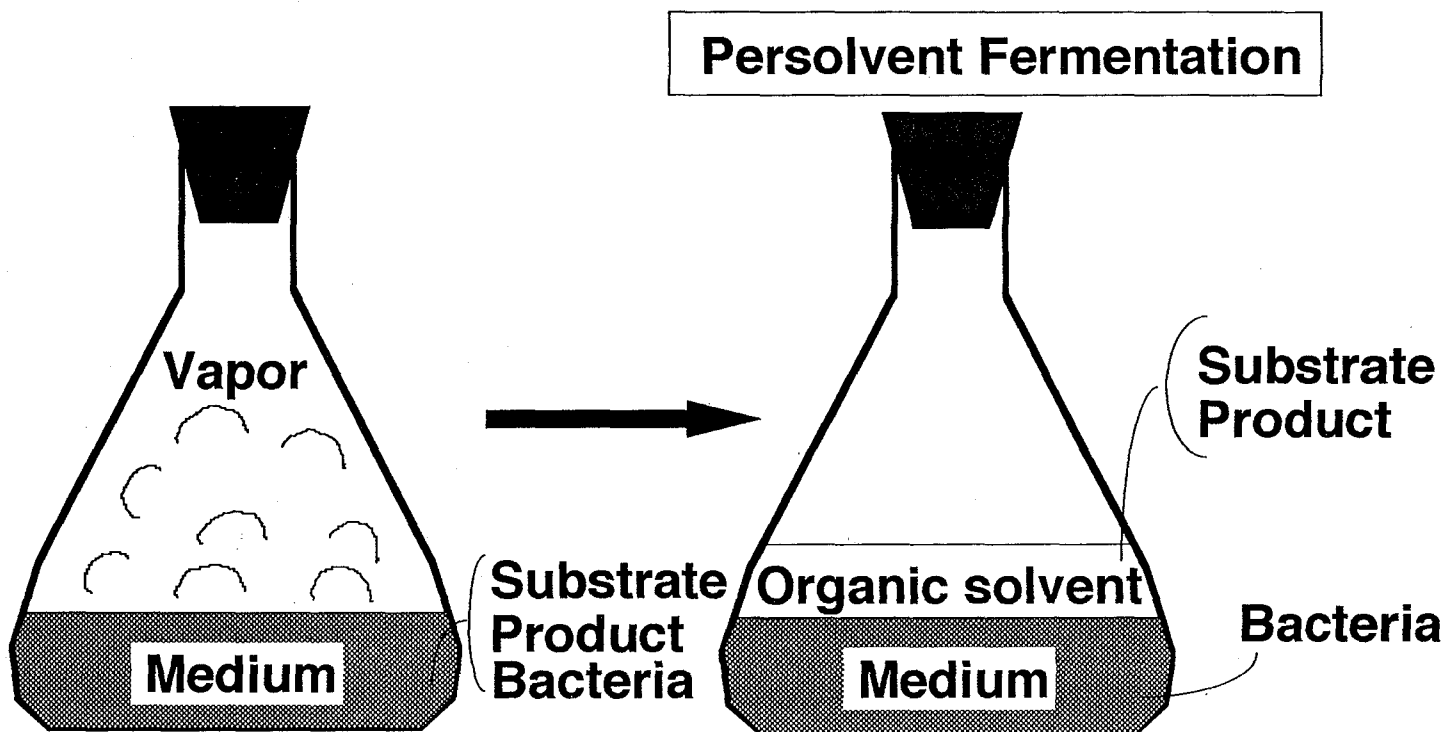


Fig. 1-3 Bioreactor with organic solvent

第3節 本論文の構成

本論文では、有機溶媒存在下における微生物の生菌数の改善を目的とする培養条件の検討により明らかになった知見を元に、微生物の有機溶媒耐性機構を明らかにすることを目的とする。

第1章では、有機溶媒耐性微生物の発見と研究の経緯について概略を述べる。第2章では、毒性の高い有機溶媒であるトルエン存在下で非常に安定に生育する微生物の取得を試みる。自然界の土壌サンプルにおいて、毒性の弱い有機溶媒を用いてまずスクリーニングを行い、これらの耐性菌の中からトルエン耐性菌を選抜することにより、効率的に有機溶媒耐性菌を取得できたことを述べる。第3章では、新たに取得した菌株を用いて、有機溶媒存在下での培養における生育の改善を目的として培養条件を検討する。培養容器内の培養液の占有率を変化させ、気相中の酸素分率の制御を行い、Aerationの良否によってその生育が大きく影響されることを述べる。第4章では、有機溶媒存在下での培養における最適条件から、有機溶媒耐性に寄与する要因として呼吸機能に着目して検討する。嫌気呼吸条件や、各種の呼吸阻害剤を用いた検討結果より、細胞の呼吸機能を十分に維持させることが有機溶媒存在下での生育に必要であることを述べる。第5章では、呼吸によって生産されるエネルギーの $\Delta\mu_{H^+}$ を利用した微生物の薬剤排出系の機能について、有機溶媒耐性機構との関連に着目する。遺伝子工学的手法を用いて*P. aeruginosa*由来の薬剤排出遺伝子*mex*オペロンをクローニングし、*P. putida*に導入して解析した結果、有機溶媒存在下での生育の向上が観察されたことを述べる。第6章では、本研究を総括し、今後の展望について述べる。

第2章 有機溶媒耐性菌の取得

第1節 序論

Tolueneは安価であり工業的な利用頻度も高い。Tolueneのような毒性の高い有機溶媒に耐性を示す菌が生物を利用したバイオリアクター等に応用可能となれば、さらに毒性の低い有機溶媒への利用範囲が広まるものと考えられる。報告されているToluene耐性菌は、そのほとんどが培地の濁度の光学的な測定や、菌体の乾燥重量の増加によりその生育を判定している(12, 17, 50)。実際に分裂し増殖能を有する生菌の存在を測定した報告においては、濁度などから予想される菌数と一致していないことが多く、生菌数が安定で応用に耐えうる高度有機溶媒耐性菌の取得は必ずしも容易ではないことが予想された。

本章では、独自の方法で自然界からの有機溶媒耐性菌の取得を試み、Toluene存在下で良好な生育を示す菌株を分離した。

第2節 実験材料と方法

1) 使用培地

土壌サンプルからのスクリーニングに用いた培地の組成を以下に示す。

第1スクリーニング用培地

0.5% (w/v) Bacto tryptone (Difco社製)

0.05% (w/v) Bacto yeast extract (Difco社製)

第2スクリーニング用培地

第1スクリーニング用培地に土壌抽出液を1.5% (v/v) 添加
土壌抽出液

500 gの赤土質の土壌に水を2l加え、120℃で15分間煮沸
後、濾過して得られた濾液を抽出液とした。

平板固形培地には上述の組成の培地に寒天末 (ナカライテスク社製) を2% (w/v) になるように加えた。いずれの培地も、120℃で15分間オートクレーブ処理を行うことによって、滅菌して用いた。

2) Toluene耐性菌のスクリーニング

土壌サンプルを少量ずつ取り、5 ml の第1スクリーニング用培地と2.5 ml の *p*-Xylene が入った試験管に入れ、ブチルゴム栓で密閉後、室温で5日間振盪培養した。この培養液を50 μ l 取り、5 ml の第2スクリーニング用培地と2 ml のToluene が入った試験管に加え、ブチルゴム栓で密閉後、室温で4日間振盪培養した。この培養液を50 μ l 取り、第2スクリーニング用培地で作成した平板固形培地に塗布し、約2 mm の厚さになるようにToluene を重層した。30℃で3日間培養後、出現したコロニーをToluene 耐性菌として単離した。

3) 細菌の同定

単離した菌株の同定はBergey's Manual (8th edition)にしたがって行った。

4) 濁度の測定

有機溶媒存在下における生育の目安として、660 nmの波長による濁度を測定した。測定には、Spectronic 21 比色計 (Bausch & Lomb社製) を用いた。

5) 有機溶媒耐性度の測定

有機溶媒耐性度の測定には、以下に述べるようなスポット法を用いた。各菌株の単一コロニーから一部を生理食塩水に懸濁し、各々の10倍希釈系列を作製した。各希釈系列より5 μ lずつをガラスシャーレ内のLBGMg寒天培地上に滴下した。滴下した生理食塩水が培地に浸潤したところで30℃ 1時間保温し、Tolueneまたは*p*-Xyleneを2-3 mmの厚さになるように重層した。30℃で20時間培養後、生育したコロニーの頻度から有機溶媒耐性度を測定した。

第3節 結果

1) Toluene耐性菌のスクリーニング

東京周辺の庭土、森林、工場跡地より採取した760個の土壌サンプルを、*p*-Xylene重層下での生育を試験する第1次スクリーニングにまず供した。760個のサンプルのうち、約85%において*p*-Xylene存在下で培地の濁度の上昇が認められた。微生物の生育が観察された培養液から、培養液を採取し、Tolueneを用いた第2次スクリーニングに供した。濁度の上昇が認められた培養液10本それぞれから一部を採取し、平板固形培地に塗布してTolueneを重層し、生育したコロニーより、釣菌することによって、Toluene耐性菌を単離した。コロニー形状の差異に基づいて26株のToluene耐性菌を分離することができた。

分離した各株について、Toluene存在下での液体培地における生育を測定し、生育による濁度が最も高く、生育の再現性や保存性の高い菌株一つを選び、Px51T株と命名した。本菌株を以後の研究に供した。

その他のToluene耐性菌には、Toluene存在下での濁度の上昇が認められたものの、培養液の最終濁度が低いものもあった。また、最終濁度が高い値を示しても、その培養液を新鮮な培地に植菌するとToluene重層下では生育の再現性が見られないものが多かった。

2) Px51T株の有機溶媒存在下での生育

Px51T株の有機溶媒耐性度について、液体培地における有機溶媒存在下での生育をFig. 1-1に、同じく固形培地上における生育をFig. 1-2にそれぞれ示す。対照として、*Pseudomonas putida* PpY101の生育もあわせて示す。液体培地と固形培地において、PpY101株はToluene存在下での生育が認められないのに対し、Px51T株は培養液の濁度の上昇と寒天培地上でのコロニーの形成が認められた。また、*p*-Xyleneの存在

下では、液体培地において両菌株とも濁度の上昇が認められた。しかし、固形培地上においては、PpY101株の*p*-Xyleneに対する耐性頻度が $1/10^2$ に低下するのに対し、Px51T株は有機溶媒を重層しない場合とほとんど差異のない生育を示した。

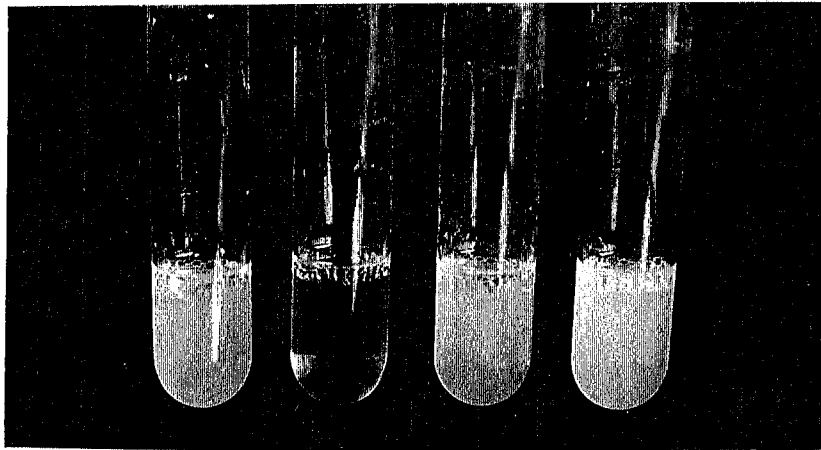
Px51T株は寒天培地上で、 $\log P_{ow}$ 値を基にしてTolueneよりも毒性が低いと考えられている*p*-Xylene、Cyclohexane、*n*-Hexane ($\log P_{ow}$ 値はそれぞれ2.8、3.1、3.4、3.9)を重層した場合でもコロニーを形成した。しかし、Tolueneよりも毒性の強いBenzene ($\log P_{ow}$ 2.1)を重層した場合には生育しなかった。

3) Px51T株の同定

Px51T株の同定試験の結果をTable 1-1に示す。本菌株は、LBGMg寒天培地上で淡黄色のコロニーを形成した。同定実験の結果、グラム陰性で孢子を形成せず、絶対好気性であり、カタラーゼ、オキシダーゼともに陽性であった。顕微鏡観察では、 $1.0 \times 4.0 \mu\text{m}$ の桿菌状であり、鞭毛染色の結果、1-4本の極鞭毛を有していた。これらのことからPx51Tは*Pseudomonas*属細菌であると考えられた。

その他、ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積や硝酸の脱窒作用が観察されないこと、蛍光色素を生産しないこと等から、本菌は*Pseudomonas putida*であると結論した。本菌の栄養要求性を調べたところ、フェニルアラニンの要求性を有していた。

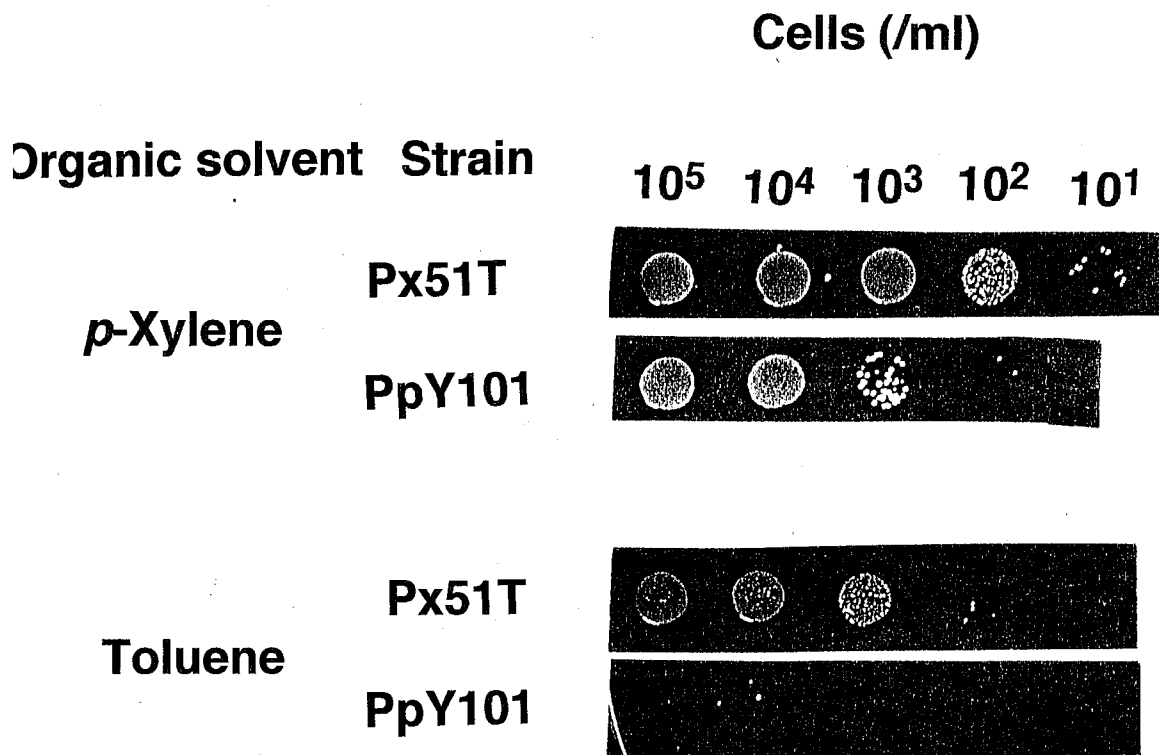
さらに、スクリーニングで得られた26株のToluene耐性菌についても同定を行った結果、すべて*Pseudomonas*属細菌であった。



Solvent	<i>pX</i>	T	<i>pX</i>	T
Strain	PpY101		Px51T	

**ig. 2-1 Growth of *Pseudomonas putida* strains
in the presence of organic solvent.**

***pX* : *p*-Xylene
T : Toluene**



**Fig. 2-2 Organic solvent tolerance
of *Pseudomonas putida* strains**

Table 1-1 Properties of toluene-tolerant strain Px51T

Characteristics	Results
Morphological	
Form	Rod
Cell size (μm)	0.6-1.0 x 1.0-4.0
Gram stain	Negative
Motility	Motile
Flagella	1-4, polar
Cultural	
Restriction to oxygen	Strictly aerobic
OF test	Oxidative
Biochemical	
Oxidase activity	+
Catalase activity	+
Production of fluorescent pigment	+
Reduction of nitrate	-
Liquefaction of gelatin	-
Accumulation of PHB	-
Utilization of:	
Glucose	+
Mannitol	-
Galactose	-
Xylose	-
Sorbitol	-
Trehalose	-
Arginine	+
Tryptophan	-

PHB: Poly - β -hydroxybutyrate

第4節 考察

本章では、目的としたToluene耐性菌の取得方法として、まずTolueneよりも毒性の低い、*p*-Xyleneに耐性を持つ菌株の選択を行った。その後、Toluene存在下での選択により、効率的に目的菌株を取得することが出来た。低濃度の薬剤からまず選択圧をかけ徐々にその選択圧を挙げていく方法は馴養法と呼ばれている。逐次的に有機溶媒耐性が向上した変異株群を取得するために、青野らによって大腸菌(1)、あるいは小松らによって *Pseudomonas aeruginosa*(31)に適用された方法に類似している。これらは、いずれも単一の株を出発材料とし有機溶媒耐性が向上した自然突然変異株を繰り返し分離することを目的としていた。本実験では、自然界に存在する無数の微生物を対象とし、その中から目的の菌株を取得するために馴養法を応用した。この方法においては次の二つの効果が考えられる。一つは、毒性の低い有機溶媒によって、自然界の微生物が元来有している有機溶媒耐性能が誘導されることであり、もう一つは、有機溶媒耐性能を持つ微生物群の集積である。この事が、多数のToluene耐性株を分離可能とした理由であると考えられる。

これまでの有機溶媒耐性菌に関する研究によると、有機溶媒耐性度の高い細菌はグラム陰性に属するものがほとんどである。グラム陰性菌の方が耐性が強いのは、グラム陽性菌にはない外膜による保護のためと考えられる。中でも *Pseudomonas*属細菌には有機溶媒耐性度の高い株が多い(2, 24, 25, 37)。本実験においても、取得されたToluene耐性菌は全て *Pseudomonas*属細菌であり、既往の研究と合致した。土壌をサンプルとして用いたため、腸内細菌科ではなく、*Pseudomonas*属細菌のような土壌細菌が多く単離された。2相系の培養の際、有機溶媒と液体培地とがよく混合するように攪拌または振盪するために、そのAerationの良いことから、*Pseudomonas*属のような絶対好気性細菌の取得が可能

であったと考えられる。

*Pseudomonas*属細菌は非常に多様であり、最近*Pseudomonas*属における再分類が行われつつあるが、*Pseudomonas aeruginosa*を除いて詳細な細菌学的研究がなされているものは少ない。本章で選択したPx51T株は生育にフェニルアラニンを必要とする。この事は、土壌などの自然界から単離される菌としては珍しく、本菌を研究材料として用いる際の重要なマーカーとして用いることが出来る。

第3章 有機溶媒存在下における生育の挙動と生育条件の最適化の検討

第1節 序論

序章で述べたように、バイオリアクター等の微生物変換系においては、その微生物の生理活性の維持が必須であると考えられる。しかし、生物に対する毒性の強い有機溶媒の存在は、細菌にとって過酷な条件である。有機溶媒による致死作用には、顕著な溶菌作用が伴わない。そのため、濁度などの光学的な測定によって測られる菌体数が高濃度であっても、実際には大部分の細胞は死滅しており、細胞分裂および増殖能を有する細胞（生菌）の存在する比率が極めて低いことが多い(12, 17)。本章では、有機溶媒存在下における細菌の生育の挙動から、生育条件の最適化を検討した。

微生物の生育や培養の条件を検討する場合の項目として、培地の組成や培養温度、通気量や攪拌速度などが挙げられる。これまでの研究において、有機溶媒存在下では天然培地のような栄養豊富な培地を用いて至適生育温度で培養したときに、最良の生育が観察されてきた。そのような条件下でも、コロニー形成能を有する細胞の測定を行うと細胞総数に対する生菌の比率が1回の培養期間の間に大きく変動することがしばしば観察された。本章では培養条件の検討項目として、通気や攪拌速度などによって左右されるAerationに注目して検討を行った。その際、直接空気を通気する方法では有機溶媒が揮発してしまい、その回収のために、排気口に冷却装置を備えたトラップが必要となる。本章では、実験室内で簡便にAerationを検討する方法として、密閉培養器内の培地の占有率を変え、その影響を調べることでAerationの検討とした。

第2節 実験材料と方法

1) 使用菌株および培地

使用した菌株を以下に示す。それぞれの表現型と遺伝子型と有機溶媒耐性について、Table 3-1に示す。

Pseudomonas putida Px51T

Pseudomonas aeruginosa PAO3292

Escherichia coli W3110

使用した培地の組成を以下に示す。平板固形培地においては、寒天を2%(w/v)になるように加えた。それぞれ使用する前に120℃で15分間のオートクレーブすることにより滅菌処理を行った。

LBGMg medium:1.0% (w/v) Bacto tryptone (Difco社製)

0.5% Bacto yeast extract (Difco社製)

1.0% NaCl

0.1% Glucose

10 mM MgSO₄

2) 培養方法

1) に示した菌株をLBGMg寒天培地上で画線培養したのちに、24 x 200 mmの大型試験管に入れたLBGMg 10 mlに植菌した。*P. putida* Px51Tを30℃で24時間、*P. aeruginosa* PAO3292と*E. coli* W3110を37℃で18時間前培養した。各前培養液を、500 ml容量のひだ付き三角フラスコに入れた本培養の培地に1%になるように植菌し、20 mlの有機溶媒を添加してブチルゴム栓またはシリコーン栓で密閉した。これらの菌株の有機溶媒耐性度は異なるため、Px51TにはToluene と*p*-Xyleneを、PAO3292にはCyclohexaneを、W3110には*n*-Hexaneを添加し

た。培地の容量はそれぞれ20 mlと100 mlとした。Px51Tは30℃、PAO3292とW3110は37℃で、160 rpmの速度で振盪培養した。

3) 生菌数の測定

容器中の培養液をサンプリングし、生理食塩水に懸濁して希釈し、適当量をLBGMg寒天培地に塗布した。Px51Tは30℃、PAO3292とW3110は37℃で1晩培養し、出現したコロニーの数を計測することにより、生菌数 (Colony forming unit; CFU) を求めた。試料の希釈に用いた生理食塩水は、0.8% NaClにMgSO₄を10 mMになるように加えたものを用いた。

4) 気相中の酸素量の測定と調節

培養容器内の気相における酸素分率を測定するために、ガスタイトシリンジ (ハミルトン社製) をシリコーン栓に刺し通して気相からサンプルを採取した (Fig. 3-2a)。得られたサンプルは直ちに、ガスクロマトグラフィー (GC-9AM: 島津社製) を用いて分析を行った。カラムは、Molecular sieve 5A column (3 mm x 150 cm: 島津社製) を用いた。分画された各成分の検出は、熱伝導度型検出器 (TCD: 島津社製) で行った。カラム、インジェクター、ディテクターの温度は全て80℃に設定した。サンプルと等容量の大気 (室温) を、21% (v/v) の酸素を含む標準試料として使用した。

気相中の酸素量を調節する場合には、まず上述の様にして気相中の酸素分率を測定し、目標酸素分率に合わせて酸素ガスあるいは窒素ガスを培養容器内に適当量吹き込み、よく混合した。その後、再度測定して設定範囲内の酸素分率があることを確認した。

5) 培養液中の溶存酸素濃度の測定

培養容器内における気相中の酸素分率と、液体培地中の溶存酸素濃度との関係を調べるために、次のようにして気相中の酸素分率と培養液中の溶存酸素濃度を測定した。500 ml 容量のひだ付き三角フラスコに、100 ml のLBGMg 培地と20 ml の*p*-Xylene を入れ、シリコーン栓で密閉した。30 °Cで30 分間振盪して恒温となったところで、気相中の気体をサンプリングしガスクロマトグラムによって酸素分率を測定した。また、液体培地の一部を採取してクラーク型酸素電極 (Model 53、Yellow Springs Instrument 社製) により溶存酸素濃度を測定した。*p*-Xylene を添加しない系においても同様の測定を行った。標準試料として30 °Cの純水を用い、大気圧下における酸素溶解度 (7.5 mg/l) を溶存酸素濃度の標準とした(14)。

Table 3-1. Bacterial strains

Strain	Characteristics	Organic solvent tolerance ^a (log ₁₀ Pow)			
		H (3.8)	CH (3.4)	pX (3.1)	T (2.8)
<i>P. putida</i> Px51T	Wild type, Phenylalanin auxotroph	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> PAO3292	Derivative from PAO1	+	+	+	-
<i>E. coli</i> W3110	K-12, F ⁻ , λ ⁻ , IN (<i>rrnD-rrnE</i>)1	+	+	-	-

^aOrganic solvent abbreviations: H, *n*-Hexane; CH, Cyclohexane; pX, *p*-Xylene; T, Toluene.

第3節 結果

1) Toluene または*p*-Xylene存在下での*Pseudomonas putida* Px51Tの生育

Pseudomonas putida Px51T株は、第2章においてToluene 耐性株として分離された。本菌はToluene 存在下で、寒天培地上においてコロニーを形成するとともに液体培地中においても生育することが、濁度の上昇等により明瞭に認められた。しかし、Tolueneを重層した液体培地において生育している本菌株の培養液の生菌数を測定すると、総菌数の指標として通常用いられている濁度を基にして推定される細胞数を大幅に下回る傾向がしばしば観察されていた。この傾向は、Toluene よりも若干毒性の弱い*p*-Xylene を用いた場合においても観察された。そこで本章では、密栓をして培養することによる培養容器中の酸素の枯渇の可能性について検討を加えた。

まず、培養液と気相との相互比を変えて生菌数の増加について調べた。同じ容量(500 ml)の培養容器に異なる容積(20 あるいは100 ml)の液体培地を入れた。等量の有機溶媒(20 ml)を加えてブチルゴム栓で密閉し、Px51Tを培養することによって比較検討を行った。Fig. 3-1にTolueneまたは*p*-Xyleneを重層したLBGMg培地におけるPx51T株の培養結果を示す。Toluene 存在下では、培地の体積の違いに関わらず培養初期には生菌数が植菌時よりも低下した。しかし、培養後期においては20 mlの方が100 mlの場合よりも生菌数のレベルが高かった。また培養期間全体を見ると、培地容量が20 mlの方が生菌数のレベルが高い範囲で安定に保たれているのに対し、100 mlの方はサンプリングごとに大きく変動する傾向が観察された。

p-Xylene 存在下においては、培地容量が20 mlの場合において培養初期に生菌数の低下が観察されなかったが、培養期間全体では、培地容

量が100 mlの場合よりも20 mlの方が生菌数のレベルと安定性が優れており、Toluene 存在下での生育と同様の傾向が観察された。

これらの生菌数の変動にも関わらず、目測における培地の濁度は、培地が20 mlの場合と100 mlの場合とで、いずれも培養の経過に従って上昇していった。

2) 気相中の酸素分率を測定・制御した場合の*p*-Xylene 存在下での *Pseudomonas putida* Px51T の生育

上述とほぼ同じ条件でPx51Tを培養し、気相中の酸素分率の測定と制御を行った。1) に述べた実験では、試料採取の際に、栓を開閉することによって培養容器内の気相部分が大気と交換された。酸素分率が生菌数に及ぼす影響を観察するためには、ガス交換を妨げる必要がある。そこで、シリコーン栓を用いて培養容器を密閉し、試料採取時にはシリンジの針部分を突き刺して内部の液相または気相を採取した (Fig. 3-2a)。

Fig. 3-2bに結果を示す。1) とほぼ同様に、20 ml と100 ml の培養液を用いて20 ml の*p*-Xylene 存在下における培養液中の生菌数と気相中の酸素分率の測定を行った。また、有機溶媒非存在下においても同じように測定を行った。気相中の酸素分率は培養液が100 ml の場合の方が20 ml の場合よりも減少した。その減少速度および減少量は有機溶媒の存在の有無とは関連性が認められなかった。培養液1 mlあたりの生菌数は、100 ml の培養液で有機溶媒が存在する場合、培養初期においては培養液が20 ml の場合とほぼ一致していた。この時点での気相中の酸素分率は約10%であった。しかし、その後著しく低下することが観察され、その時点での気相中の酸素分率は約3%であった。

100 ml の培養液を用いた場合でも、気相中の酸素分率を20%から60%に保つように制御した場合には、有機溶媒存在下においても生菌数の低

下は起こらなかった。この場合に認められた生育は、20 ml の培養液を用いて酸素分率の制御をしない場合とほぼ同様の生育を示した。

3) Cyclohexane 存在下での *Pseudomonas aeruginosa* PAO3292 の生育

前述の 2) と同じ方法で、Cyclohexane 存在下での *P. aeruginosa* PAO3292 株の培養において気相中の酸素分率を制御した場合の生菌数について検討を加えた。Fig. 3-3 にその結果を示す。培養液が 20 ml と 100 ml の場合および 100 ml の培養液を用いて酸素分率を制御した場合を比較した。培養初期の 6 時間後においては生菌数に大きな差は認められなかった。しかし、その後は 100 ml の培養液を用いた場合には急激に生菌数が低下した。その低下した時点での気相中の酸素分率は、上述したように約 3% を下回っていた。

4) *n*-Hexane 存在下での *E. coli* W3110 の生育

同様に、*n*-Hexane 存在下での *E. coli* W3110 の培養における生菌数の測定と気相中の酸素分率の測定と制御を行った。Fig. 3-4 にその結果を示す。前述の 2)、3) とほぼ同じ傾向が観察された。培養液が 100 ml の場合、生菌数が急激に低下した時点では気相中の酸素分率は約 5% を下回っていた。

5) 気相中の酸素分率と培地中の溶存酸素濃度との関係

培地と *p*-Xylene あるいは培地のみを培養容器に入れ、気相中の酸素分率を様々に変化させて密閉した。30 分後に、その気相中の酸素分率と培地中の溶存酸素濃度を測定した。Fig. 3-5 にその結果を示す。有機溶媒の存在の有無に関わらず、気相中の酸素分率と培地中の溶存酸素濃度は、ほぼ比例関係にあることが確認された。従って、気相中の酸素分率

をモニターすることによって、培地中の細菌が利用できる溶存酸素濃度を評価できることを確認した。

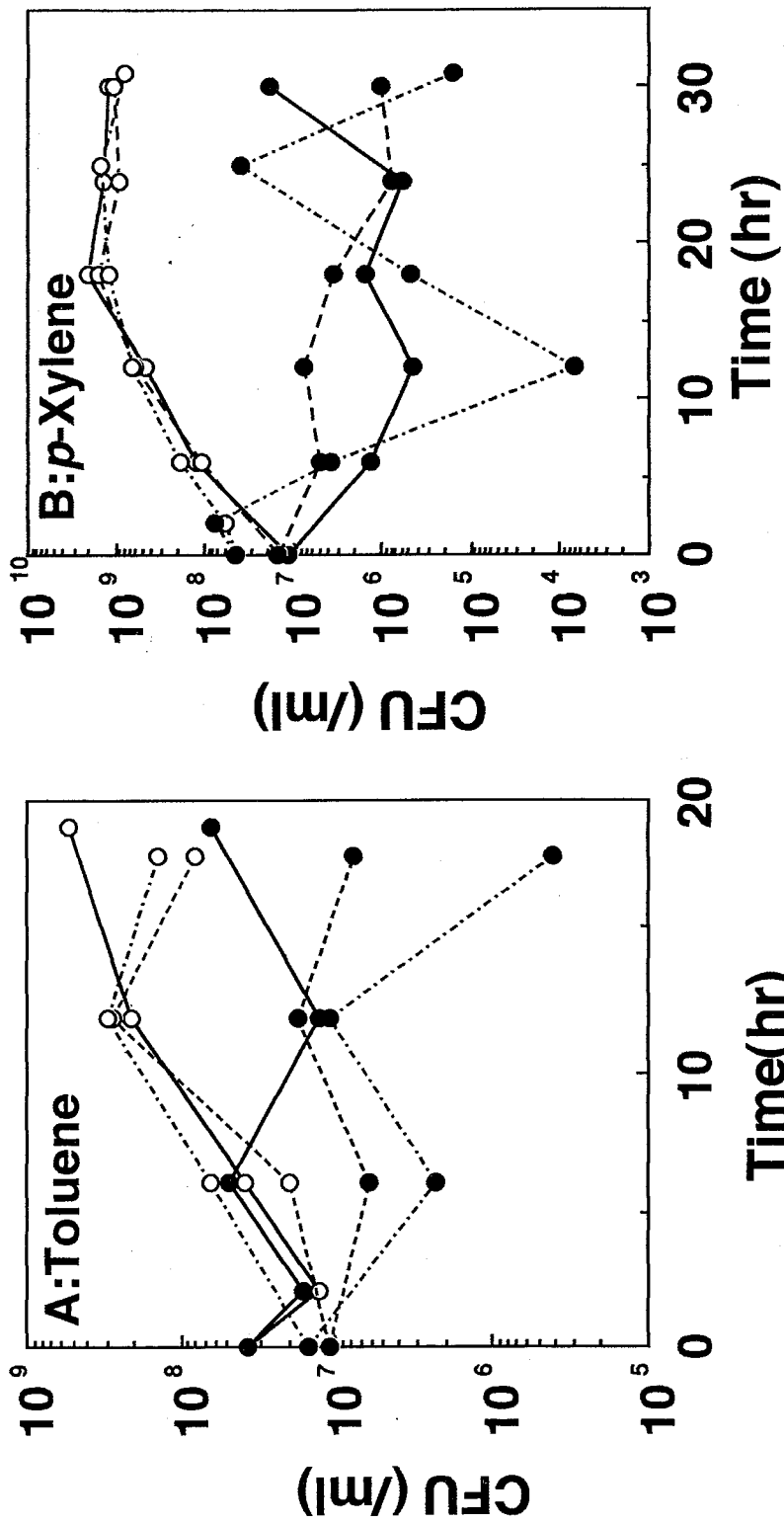


Fig. 3-1. Effect of culture volume on cell viability of *P. putida* Px51T in the presence of organic solvent.

Px51T was grown at 30°C in 20 (o) or 100 ml (●) of LBG Mg medium placed in sealed 500-ml flasks containing 20 ml of toluene (Panel A) or *p*-xylene (Panel B). Experiments were repeated three times. (—), Experiment 1; (---), Experiment 2; (· · · · ·), Experiment 3.

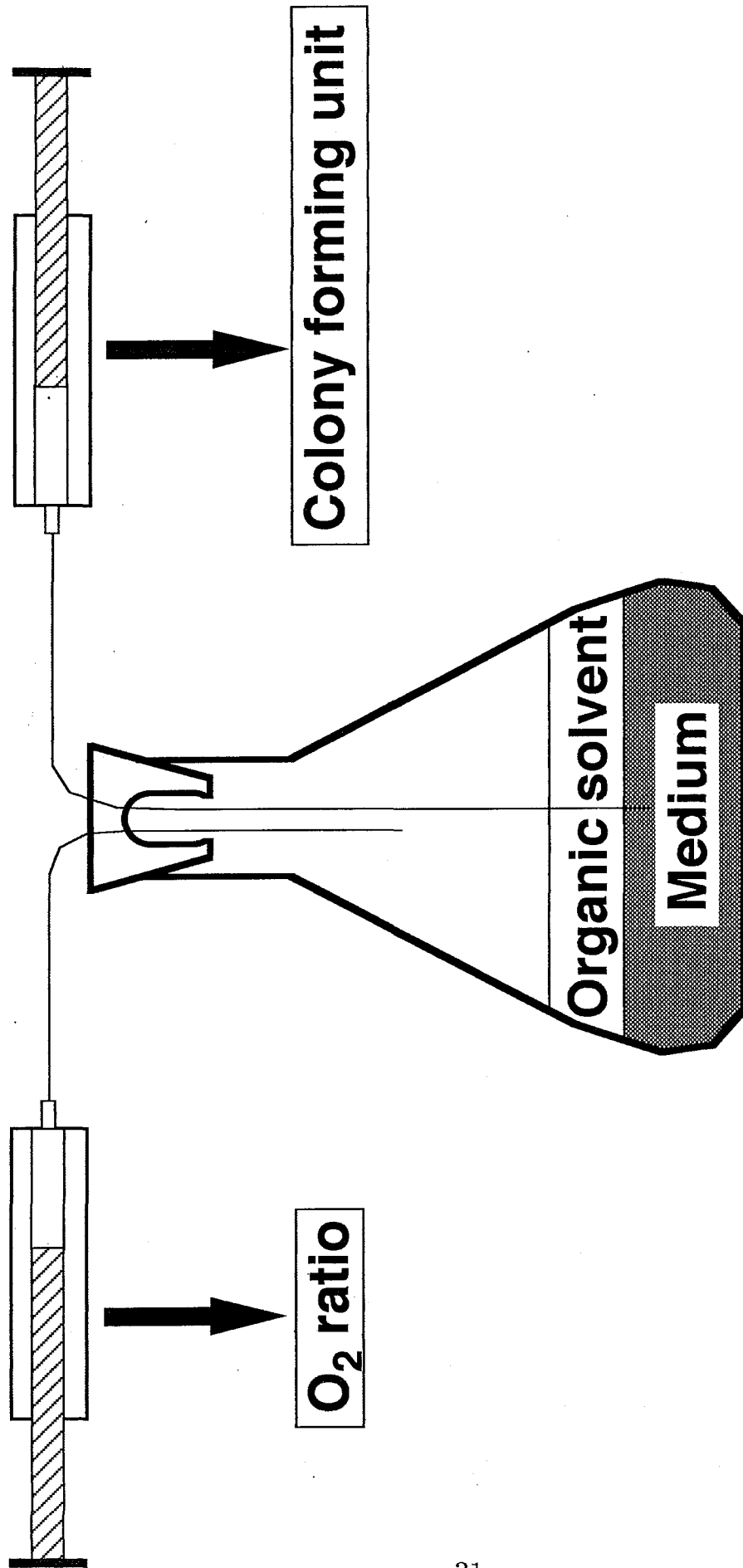


Fig. 3-2a. Sampling of gas phase and liquid medium

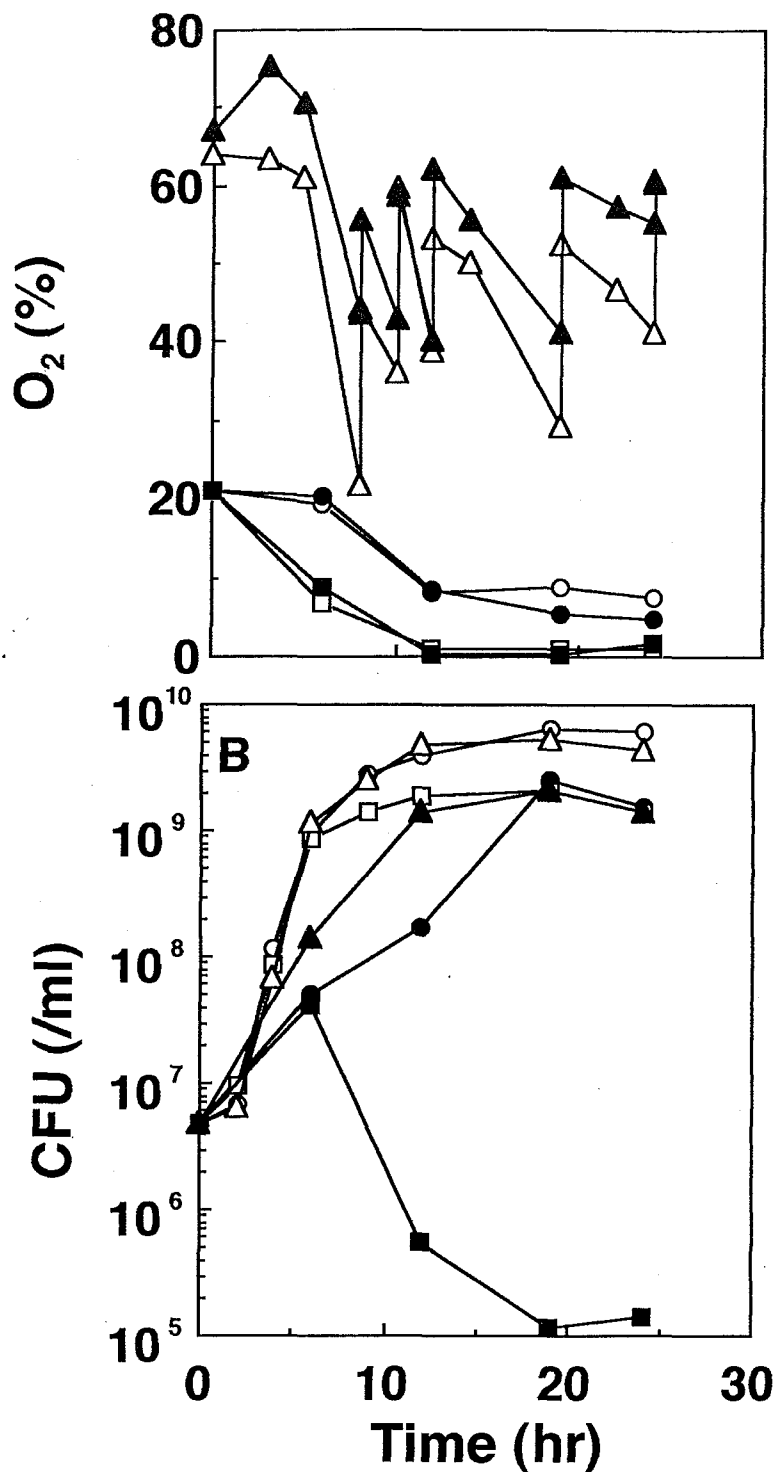


Fig. 3-2b. Effect of O₂ ratio in the gas phase on cell viability of Px51T in the presence of *p*-xylene.

Px51T was grown in 20 (○, ●) or 100 ml (□, ■) of LBGMg medium in 500-ml flasks. The medium was overlaid with 20 ml of *p*-xylene (●, ■, ▲) or not (○, □, △). O₂ ratio in the gas phase of the 100-ml culture was kept at approx. 20-60% (△, ▲) by blowing O₂ gas into the flask. The cultures were incubated at 30°C. The O₂ ratios measured before and after the supplement are indicated with vertical lines in panel A. Panel B shows CFU in each culture.

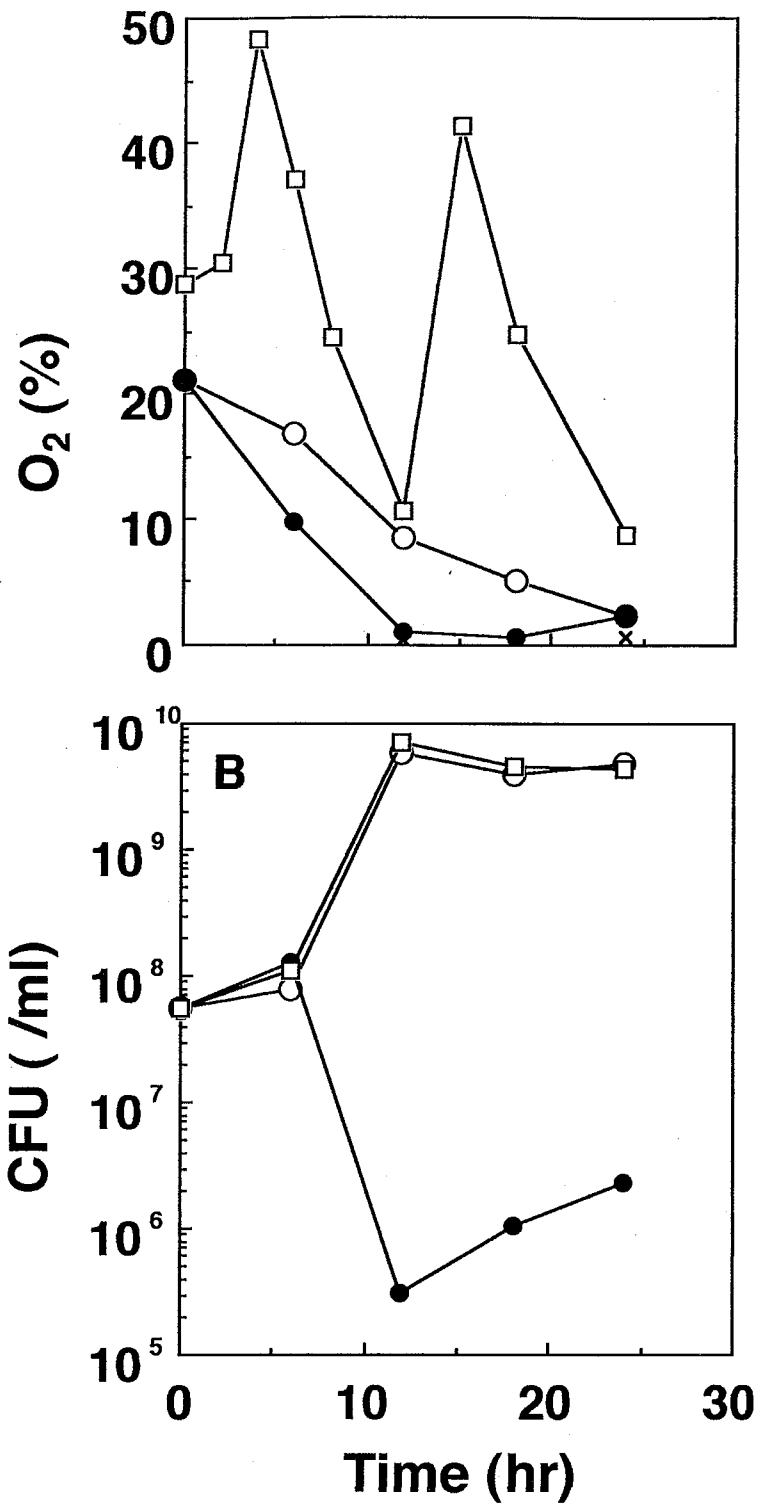


Fig. 3-3. Effect of O₂ ratio in the gas phase on cell viability of *P. aeruginosa* PAO3292 in the presence of cyclohexane.

P. aeruginosa PAO3292 was grown in 20 (○) or 100 ml (●) of LBGMg medium in the presence of cyclohexane (20 ml) in sealed 500-ml flasks at 37°C. O₂ ratio was controlled to approx. 20-40 % (□).

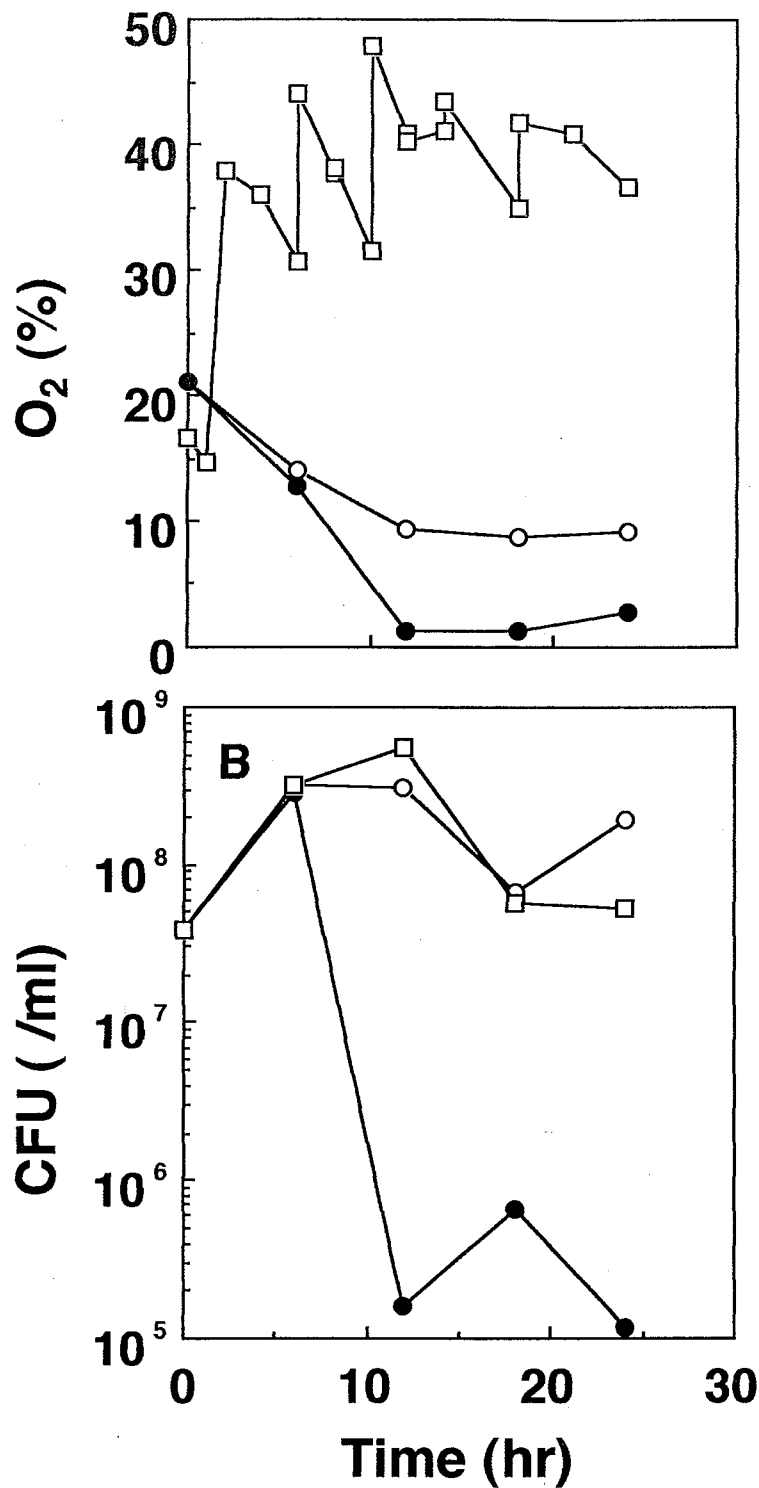


Fig. 3-4. Effect of O₂ ratio in the gas phase on cell viability of *E. coli* W3110 in the presence of *n*-hexane.

E. coli W3110 was grown in 20 (○) or 100 ml (●) of LBGMg medium in the presence of *n*-hexane (20 ml) in sealed 500-ml flasks at 37°C. O₂ ratio was controlled to approx. 20-40 % (□).

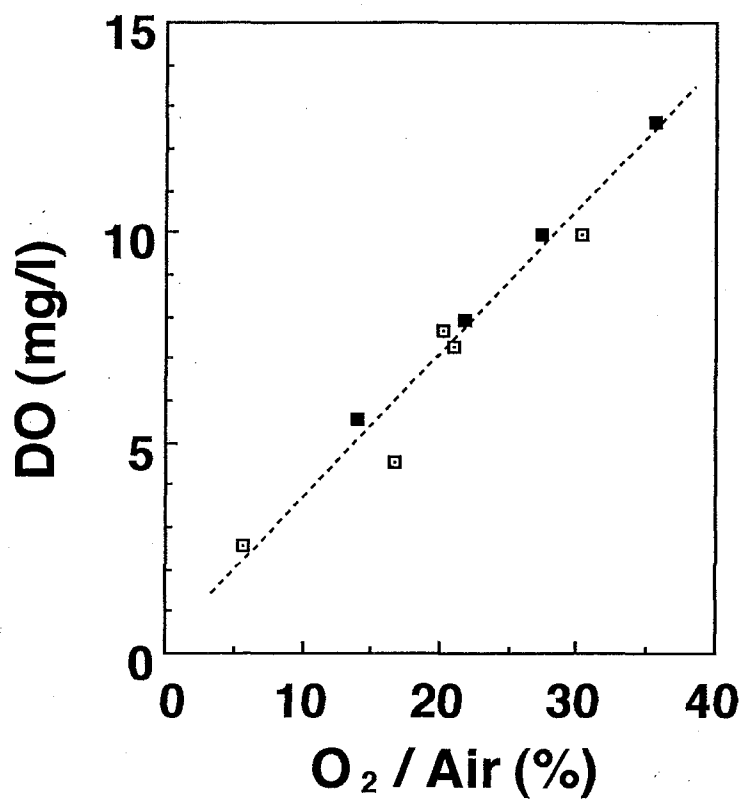


Fig. 3-5. Correlation between DO in liquid medium and O₂ ratio in the gas phase in the two-phase system.

DO in liquid medium and O₂ ratio in the gas phase were measured in the sealed one-phase (LBGMg medium, □) or two-phase (LBGMg medium and *p*-xylene, ■) system.

第4節 考察

本章では、有機溶媒存在下における生育における生菌濃度の向上を目指して、培養液の酸素供給に注目し検討を行った。まず、*P. putida* Px51T株について検討した結果、同一容積の培養器を使用した場合には、有機溶媒存在下では培養液の容量が小さい方が生菌数が安定して高いレベルに保たれることを明らかにした。さらに気相中の酸素分率を計測することにより、ある一定以上の酸素分率が生菌数の安定に必要な可能性が示された。この事は、気相中の酸素分率を通常の大気中のレベル以上に保つよう制御した場合において生菌数が安定化したことから支持される。有機溶媒存在下で生菌数が安定に保たれるために必要な気相中の最低酸素分率は、5%から10%の間であると推定される。

Henryの法則によれば、気体が液体中に溶解するときの濃度はその気体の分圧に比例する。大気圧下では気体の分圧がほぼ体積分率に比例すると考えれば、気体の液体に対する溶解度はその気体が含まれる気相中の体積比率に比例すると推定される。本実験で用いた培養系は、液相に培地と有機溶媒、気相に様々な酸素濃度の気体を用いており、有機溶媒の有無に関わらず、酸素分圧と溶存酸素濃度が比例することを確かめた。これらのことから、有機溶媒存在下での生育の安定性に寄与しているのは培養液中の溶存酸素であり、その為に必要な最低濃度は有機溶媒非存在下で生育可能な最低濃度よりも高いことが推察された。

有機溶媒存在下での生育に余分の溶存酸素が必要である理由として、呼吸の関与が考えられる。有機溶媒が細菌に与える影響の一つに、細胞膜の構造の破壊がある。大腸菌の*n*-Hexane存在下での培養細胞の電子顕微鏡観察によれば、2重の細胞膜のうち、主に内膜が細胞内に大きく陥入するなど、顕著な構造の変化が起こることが観察されている(4)。内膜には、呼吸系や物質輸送系を構成するタンパク質などが存在してお

り、有機溶媒による細胞の致死はこれらの系の機能が低下することによるものと考えられる。溶存酸素は、その呼吸系の機能の低下を補い、生育に必要なエネルギーを獲得するために必要である可能性が考えられる。また、細胞膜には呼吸によって生産されるエネルギー ($\Delta\mu\text{H}^+$ 、ATPなど) を駆動力とする物質輸送系が存在する。この機能によって溶媒分子が排出され、細胞内に蓄積する量が減少することで、膜などの細胞構成成分の構造が安定化されることも考えられる。生物に普遍的に存在する呼吸の機能が有機溶媒存在下での生育に十分に必要であるということは、本章で用いた3種の細菌と有機溶媒について同様の結果が得られたということと矛盾しない。

第4章 有機溶媒存在下での生育と呼吸維持の関連

第1節 序論

前章では、有機溶媒存在下での生育の安定性に、十分な濃度の溶存酸素が必要であることを示した。その原因として、有機溶媒耐性の維持に対する呼吸系の関与が考えられるため、本章では、細菌の呼吸活性に注目して有機溶媒存在下での細菌の生育との関連について検討した。

微生物の呼吸様式は、大きく分けて、好気呼吸と嫌気呼吸の2つに分けられる。呼吸鎖の電子伝達系において、最後の電子受容体として分子状酸素を用いる好気呼吸を行う細菌は、酸素が存在しない環境ではエネルギーを生産することが出来なくなり生育できない。一方、電子受容体として酸素を用いない嫌気呼吸を行う細菌では硝酸イオンなどを用いてエネルギーを生産する(43)。この嫌気呼吸を行う細菌には、好気呼吸も行える通性嫌気性あるいは、分子状酸素の存在下ではその誘導体の毒性により生育できない偏性嫌気性細菌とが存在する。

本研究で用いた菌株のうち、*P. putida* Px51T は好気性呼吸のみを行う細菌であり、*P. aeruginosa* PAO3292 と *E. coli* W3110 は嫌気性呼吸と好気性呼吸とを行う細菌である。*P. aeruginosa* と *E. coli* とは、酸素非存在下において、硝酸イオンや亜硝酸イオンを電子受容体として呼吸を行うことが出来る。本章では、PAO3292 と W3110の2株を用いて、硝酸呼吸と有機溶媒存在下での生育の安定性との関連を観察し、さらに好気性細菌 *P. putida* を用いて、様々な呼吸阻害剤による有機溶媒耐性への影響を検討した。呼吸阻害剤には、呼吸の電子伝達鎖を阻害するもの、膜における電気化学的ポテンシャル差を消失させて共役するATPの合成を停止させるもの（脱共役剤）、ATP合成酵素F₁F₀ATPaseを直接阻害するものが存在する。本章では、電子伝達阻害剤としてNaN₃、

脱共役剤としてCarbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone(CCCP)、ATP合成酵素の阻害剤としてN,N'-Dicyclohexylcarbodiimide(DCCD)とAurovertin、ATP合成酵素やATP駆動性膜輸送系のATP結合部位の阻害剤であるNaVO₃を用いた(9, 36, 48, 53)。

第2節 実験材料と方法

1) 使用菌株および培地

使用した菌株を以下に示す。それぞれの表現型と遺伝子型と有機溶媒耐性については、第3章のTable 3-1に示した。

Pseudomonas putida Px51T

Pseudomonas aeruginosa PAO3292

Escherichia coli W3110

使用した培地のうち、LBGMg 培地は、第3章第2節1) に示したものをを用いた。LBGMg+N 培地は、別にオートクレーブ処理した硝酸ナトリウム水溶液を最終濃度が50mM になるようにLBGMg培地に添加したものをを用いた。MM培地の組成については以下に示す(8)。

MM medium:

2% (v/v) Hutner's solution

40 mM Phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0)

1% (v/v) Metal solution

0.1% Ammonium sulfate

10 mM MgSO_4

0.4% Glucose

0.2% Casamino acid (Difco社製)

Hutner's solution (1lあたり)

10g Nitrilotriacetic acid

14.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3.3g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

9mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

7.3g KOH

Metal solution (100 mlあたり)

250mg EDTA

1095mg ZnSO₄·7H₂O

500mg FeSO₄·7H₂O

154mg MnSO₄·H₂O

39.2mg CuSO₄·5H₂O

24.8mg Co(NO₃)₂·6H₂O

17.7mg Na₂B₄O₇·10H₂O

各々を別個に滅菌し混合して用いた。

2) 有機溶媒存在下での培養方法

好気呼吸条件下における培養方法は第3章第2節2)と同様に行った。

硝酸呼吸条件下における培養の場合、24 x 200 mmの大型試験管に入れたLBGMg 10 mlで前々培養したのちに、同じく24 x 200 mmの大型試験管に入れたLBGMg+N 10 mlに1%(v/v) 植菌した。植菌の直前に試験管内の気相の脱気と窒素置換を3回繰り返して培養容器内を低酸素状態とした。植菌はシリコーン栓をシリンジで突き通して前々培養液を注入することによって植菌し、開栓することなく行った(10, 13, 54)。低酸素状態が維持されていることを確認するために、気相中の酸素分率を第3章第2節4)に示した方法によって測定し、1%以下であることを確認した。37℃で24時間振盪培養を行うことによって嫌気状態として硝酸呼吸系を誘導した培養を前培養とした。20 mlの有機溶媒と新鮮な

LBMg+N培地100 mlを500 ml容量のひだ付き三角フラスコに入れ同様に窒素置換を行い、シリコーン栓で密閉した後、前培養液から1%になるように植菌した。有機溶媒は、PAO3292にはCyclohexaneを、W3110には*n*-Hexaneを用いた。

3) 非生育細胞に対する呼吸阻害剤処理と有機溶媒耐性の測定

P. putida Px51T株を大型試験管内のLBMg培地10 mlで前培養したのち、MM培地に1%植菌した。30℃で振盪培養し、660 nmによる濁度が0.6になったときに集菌し、細胞懸濁液（40 mM リン酸緩衝液、0.4% コハク酸ナトリウム、10 mM MgSO₄, pH6.0）で2回洗浄後、懸濁液1 mlあたりの細胞数が約10⁸個になるように懸濁した。30℃で1時間振盪し、窒素源飢餓状態により非生育細胞とした。非生育状態の確認は、濁度の増加の停止により、また後述するように、この後の実験中もCFUがほとんど変化しなかった。この非生育細胞の懸濁液を、6本の試験管に2 mlずつ分注した。DMSOに溶解したCarbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP)、N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)、NaN₃、NaVO₃、Aurovertinをそれぞれ最終濃度が0.1、5.0、5.0、0.5、0.3 mMになるように添加し、10分ないし15分間30℃で振盪し処理を行った。生菌数を測定後、1 mlずつ2本の試験管に分注し、一方にTolueneまたは*p*-Xyleneを0.5%になるように添加し、その後の生菌数を測定した。他方には、有機溶媒を加えずに生菌数測定の対照とした。

P. aeruginosa PAO3292株と*E. coli* W3110株についても同様の実験を行った。培養温度は37℃、有機溶媒はPAO3292株に対して*p*-XyleneとCyclohexaneを、W3110株に対してはCyclohexaneと*n*-Hexaneを添加した。

4) 生菌数の測定

第3章第2節3)と同様に行った。

5) ATP量の測定

細胞懸濁液の全ATP量の定量には、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を利用した「ルシフェールLUプラス」(キッコーマン社製)を用いた。既知濃度のATPを同様に測定することにより検量線を作成し、各サンプルの測定値から全ATP量を算出した。

6) 亜硝酸イオンの測定

培地中の亜硝酸イオンを定性的に検出するために、培養中の培地の一部を採取し、pH 3の緩衝液中でスルファニル酸と α -ナフチルアミンを加え、室温で10分間静置後に呈色の程度を観察した。

第3節 結果

1) 有機溶媒存在下での硝酸呼吸による生育

嫌気条件下において硝酸呼吸によって生育している細菌の有機溶媒耐性を調べ、酸素を用いない呼吸である硝酸呼吸による生育の安定性を観察した。Fig. 4-1に結果を示す。Fig. 4-1-Aには、好気呼吸および硝酸呼吸によって*P. aeruginosa* PAO3292を培養した際のCyclohexane存在下における生育を示す。硝酸塩の添加及び窒素置換を行わなかった好気呼吸系では、密閉した培養容器のために培養途中から酸素不足となるために、生菌数が低下した（第3章を参照）。しかし、硝酸呼吸系においては、培養初期に生菌数が低下するものの、その後は緩やかに増加し、顕著な低下や不安定性は見られなかった。ただし、培養終期の生菌数の濃度は、酸素を十分に供給して培養した場合に比べて（第3章）若干低かった。また、培養初期の生菌数の低下については、培養容器内に残存した極少量の酸素（1%以下）により硝酸呼吸能が低下し好気呼吸が誘導された結果、酸素不足の状態で行われたためと考えられた。生菌数の経時変化を測定する際、採取した同サンプル中に含まれる亜硝酸イオンを呈色反応により定性的に検出したところ、培養時間が経過するに連れて呈色反応が強くなっていくことを観察した。これより、本実験の条件では、硝酸を亜硝酸に還元して呼吸を行っていると考えられた。従って、酸素の枯渇した嫌気条件下においても、硝酸塩を添加することによって*p*-Xylene存在下において*P. aeruginosa* PAO3292は生育可能であることが示された。すなわち、有機溶媒を添加した培養において、より高濃度の酸素の供給を必要とするのは呼吸系の維持のためであって、何らかの生体成分合成のために必要とするのではないと考えられる。

同様の実験を、*E. coli* W3110 を用いて、*n*-Hexane存在下で行っ

た。Fig. 4-1-Bに示すように、*P. aeruginosa* PAO3292とほぼ同様の傾向を示した。従って、*E. coli* W3110においても硝酸塩の存在によって、有機溶媒耐性が維持されることが示された。

2) 各種呼吸阻害剤の有機溶媒耐性への影響

これまでの結果より、細菌の有機溶媒耐性が呼吸活性の維持に依存することが示された。そこで、細胞に呼吸阻害剤を作用させた際の有機溶媒耐性を調べ、阻害剤の有機溶媒耐性に対する効果をさらに検討した。そして、有機溶媒耐性に対して呼吸鎖のどの素反応が重要であるか推定した。耐性度の評価を明瞭にするために細胞は非生育状態として、実験中の細胞数の増加が起こらないようにした。そして、有機溶媒添加前の生菌数を1として添加後30分の相対値を算出した。

結果をTable 4-1に示す。本研究で用いた呼吸阻害剤のうち、膜の電気化学的ポテンシャル差 ($\Delta\mu\text{H}^+$) を減少または消失させるCCCPや、電子伝達鎖を直接阻害すると考えられている NaN_3 により、有機溶媒耐性度が大幅に減少することが見いだされた。その他の、ATPase阻害剤のDCCDやAurovertin、 NaVO_3 については有機溶媒耐性度の顕著な変化は認められなかった。この結果は、 $\Delta\mu\text{H}^+$ の維持が有機溶媒耐性に必要であることを示唆する。

3) CCCP処理条件の検討

CCCP処理の条件を変化させて有機溶媒耐性に与える影響を検討した。検討項目は、CCCP処理時の時間と濃度の2項目とし、CCCP処理を行った*P. putida* Px51T株の細胞を用いて、Tolueneを添加して30分後の生菌数から有機溶媒耐性度を測定した。Fig. 4-2にその結果を示す。Fig. 4-2-Aに見られるように、0.1mMのCCCPによって処理したと

ころ、2分後にはTolueneに対する耐性度が著しく低下した。その後はほぼ一定の生菌数を維持した。Fig. 4-2-Bの結果からは、CCCPの濃度と有機溶媒耐性度の低下が相関しているのが認められた。そこで以下の実験においては、0.1mMのCCCPにより細胞を10分間以上処理した後に有機溶媒を添加することとした。

4) CCCP処理による有機溶媒耐性度の低下

2) で述べたように、CCCPにより *P. putida* Px51T株の有機溶媒耐性度が減少した。そこで、その変化を経時的に検討した。実験は3) に準じて行った。0.1mMのCCCPにより15分間処理を行った細胞と行わなかった細胞それぞれに対して、Tolueneおよび *p*-Xyleneを添加し、生菌数の経時変化を測定した。

Fig. 4-3にその結果を示す。CCCP処理を行わなかった場合には *p*-XyleneあるいはToluene添加後においても生菌数の低下がほとんど見られないのに対し、CCCP処理を行った場合は有機溶媒添加後に急速な生菌数の低下が観察された。その低下の程度は、Tolueneの方が *p*-Xyleneの方よりも大きく、有機溶媒の毒性のレベルと相関していた。CCCP処理をしても有機溶媒を添加しなかった場合には生菌数はほとんど変化しなかった。

また、*P. aeruginosa* PAO3292株と *E. coli* W3110株についても同様の検討を行った。(Fig. 4-4, 4-5) 前述の *P. putida* Px51T株と同様に、CCCP処理によってCyclohexaneおよび *p*-Xyleneに対する *P. aeruginosa* PAO3292の耐性が低下することが認められた。*E. coli* W3110株においても、CCCP処理後に *n*-Hexaneに対する耐性がわずかではあるが低下した。CCCP処理によってCyclohexaneに対する耐性は著しく低下し、生菌をまったく検出できなかった。

ここで用いた3菌株は、それぞれ有機溶媒耐性度が異なる。しかし、

CCCP処理によって、全ての株においてその耐性が低下した。

5) CCCP処理によるATP量の変化と有機溶媒耐性度との関連

本研究においてCCCP処理により有機溶媒耐性が低下することが示された。CCCP処理により呼吸鎖における $\Delta\mu\text{H}^+$ が消失すると、共役しているATPの生産が停止することが考えられる。有機溶媒耐性の低下に寄与しているのが膜内外の水素イオンの電気化学的ポテンシャル差の消失であるのか細胞内のATP濃度の変化であるのかを検討するために、ATP量の測定を行った。

CCCPと NaN_3 の処理を 30°C で20分間行った後に、ATP量を測定した。無処理のサンプルと比較しその相対値を算出した。その後、同サンプルの有機溶媒耐性度を前述と同様に測定した。また、細胞懸濁液中の呼吸基質であるコハク酸を除いた系においても同様の測定を行った。Fig. 4-6にその結果を示す。各薬剤によって処理することにより、又は呼吸基質を除くことにより、ATP量に大きな変化は見られなかったが、Toluene耐性はCCCP、 NaN_3 処理あるいは呼吸基質を除いた場合に大きく低下していた。生育を停止させた細胞において呼吸基質を除いた場合、電子伝達が行われず、 $\Delta\mu\text{H}^+$ が発生しないものと考えられる。従って、ATPではなく $\Delta\mu\text{H}^+$ の有無が、有機溶媒耐性に関与していることが示された。

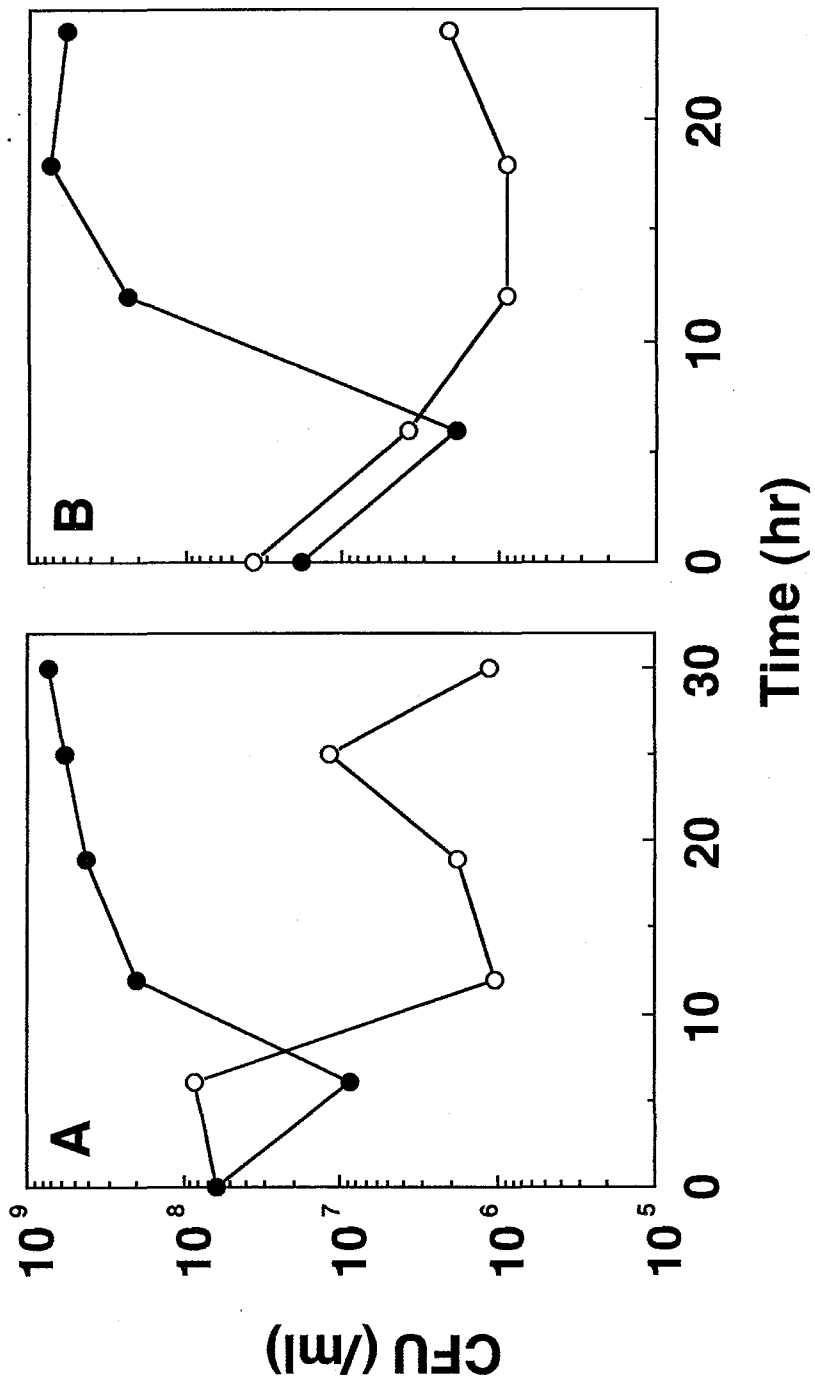


Fig. 4-1. Effect of nitrate respiration on organic solvent tolerance in *P. aeruginosa* PAO3292 and *E. coli* W3110.

P. aeruginosa PAO3292 and *E. coli* W3110 were grown in 100 ml of LBMGMg medium (○) and LBMGMg+N medium (●) in the presence of 20-ml organic solvent. Panel A, *P. aeruginosa* PAO3292 with cyclohexane; Panel B, *E. coli* W3110 with *n*-hexane.

Table 4-1 Toluene tolerance of inhibitor-treated cells

Inhibitor	Concn. (mM)	CFU (/ml)		Ratio $\left(\frac{\text{CFU}_{(30\text{min})}}{\text{CFU}_{(0\text{min})}}\right)$
		0min	30min	
-	-	1.2×10^8	1.2×10^8	1.0
CCCP	0.1	1.2×10^8	8.6×10^3	6.9×10^{-5}
NaN ₃	5.0	1.6×10^8	$< 10^2$	$< 10^{-7}$
DCCD	5.0	1.3×10^8	1.7×10^8	1.4
Aurovertin	0.3	1.2×10^8	1.2×10^8	1.0
NaVO ₃	0.5	1.5×10^8	1.2×10^8	0.8

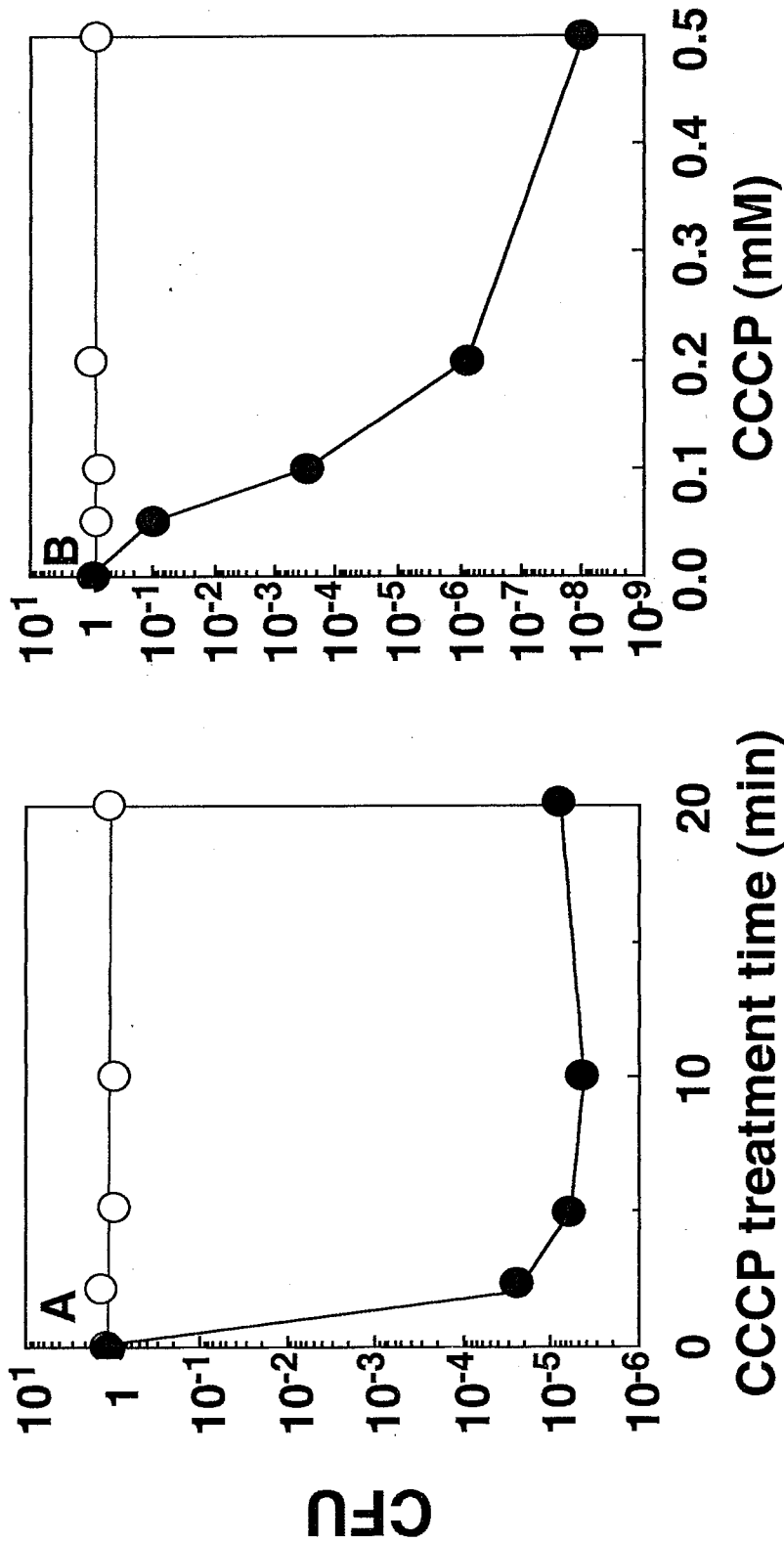


Fig.4-2 Toluene susceptibility in CCCP-treated cells.

A: Toluene was added () or not () to Px51T cell suspension incubated at 30°C with 0.1mM CCCP for the period indicated in the figure. After 30 min incubation with toluene, CFU of the suspension was measured.

B: Px51T cell suspension was incubated at 30°C with CCCP for 10 min at the concentration indicated in the figure. Toluene was added () or not () to the suspension. After 30 min, CFU was measured.

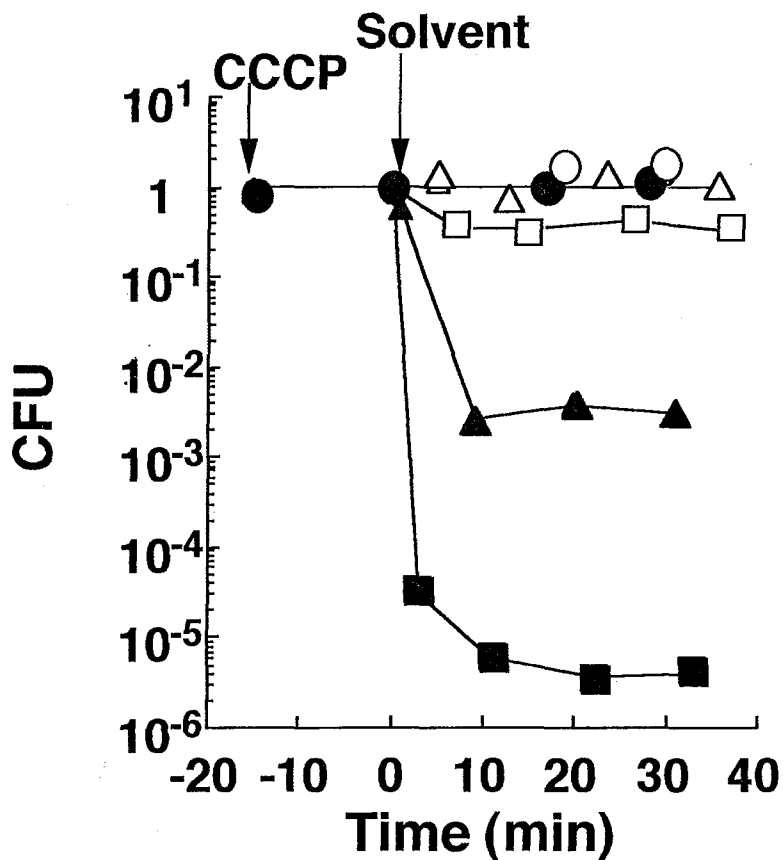


Fig.4-3 Effect of CCCP treatment on viability of *P. putida* Px51T in the presence of organic solvent.

Px51T cell suspension was incubated at 30°C without (O, Δ, □) and with (●, ▲, ■) 0.1mM CCCP. After 15 min, *p*-xylene (Δ, ▲) or toluene (□, ■) was added. CFU was measured during incubation.

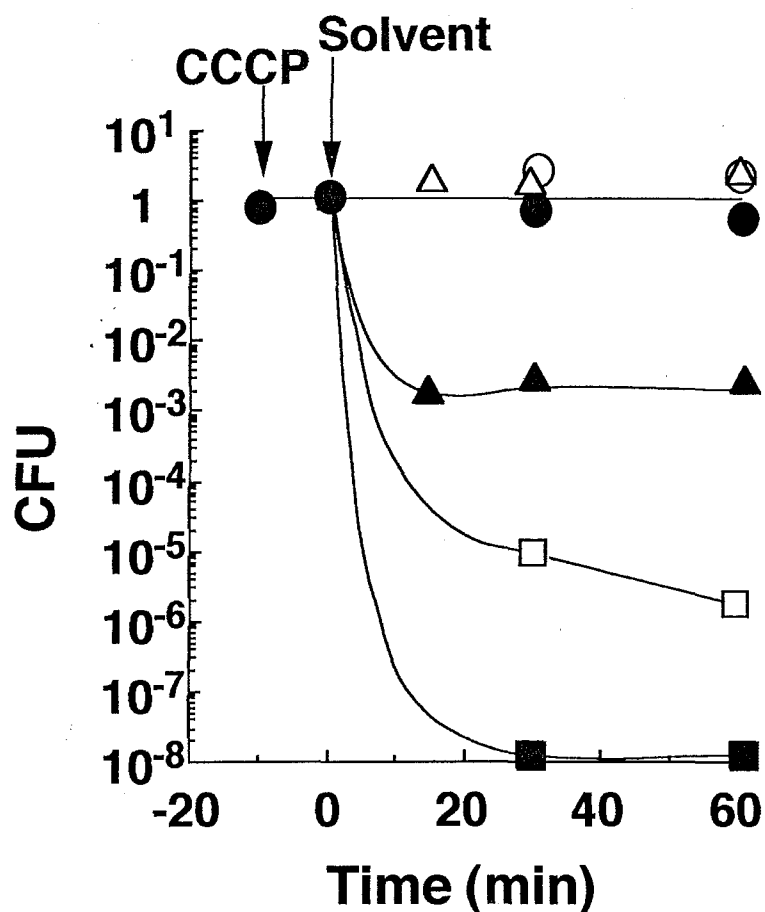


Fig.4-4 Effect of CCCP treatment on viability of *P. aeruginosa* PAO3292 in the presence of organic solvent.

PAO3292 cell suspension was incubated at 37°C without (○, △, □) and with (●, ▲, ■) 0.1mM CCCP. After 10 min, cyclohexane (△, ▲) or *p*-xylene (□, ■) was added. CFU was measured during incubation.

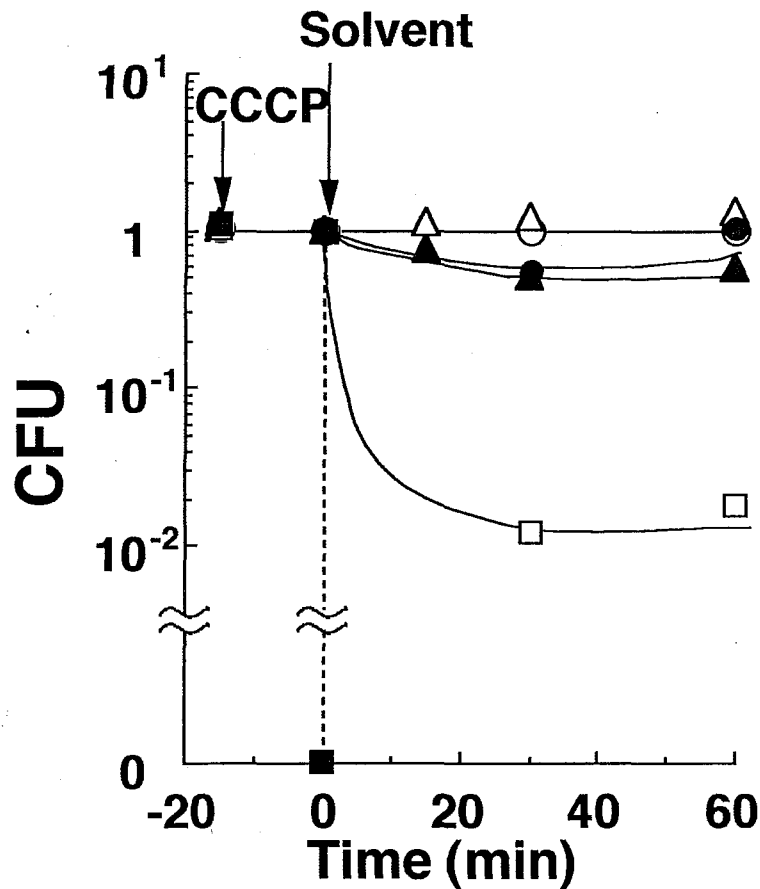


Fig.4-5 Effect of CCCP treatment on viability of *E. coli* W3110 in the presence of organic solvent.

W3110 cell suspension was incubated at 37°C without (○, △, □) and with (●, ▲, ■) 0.1mM CCCP. After 15 min, *n*-hexane (△, ▲) or cyclohexane (□, ■) was added. CFU was measured during incubation.

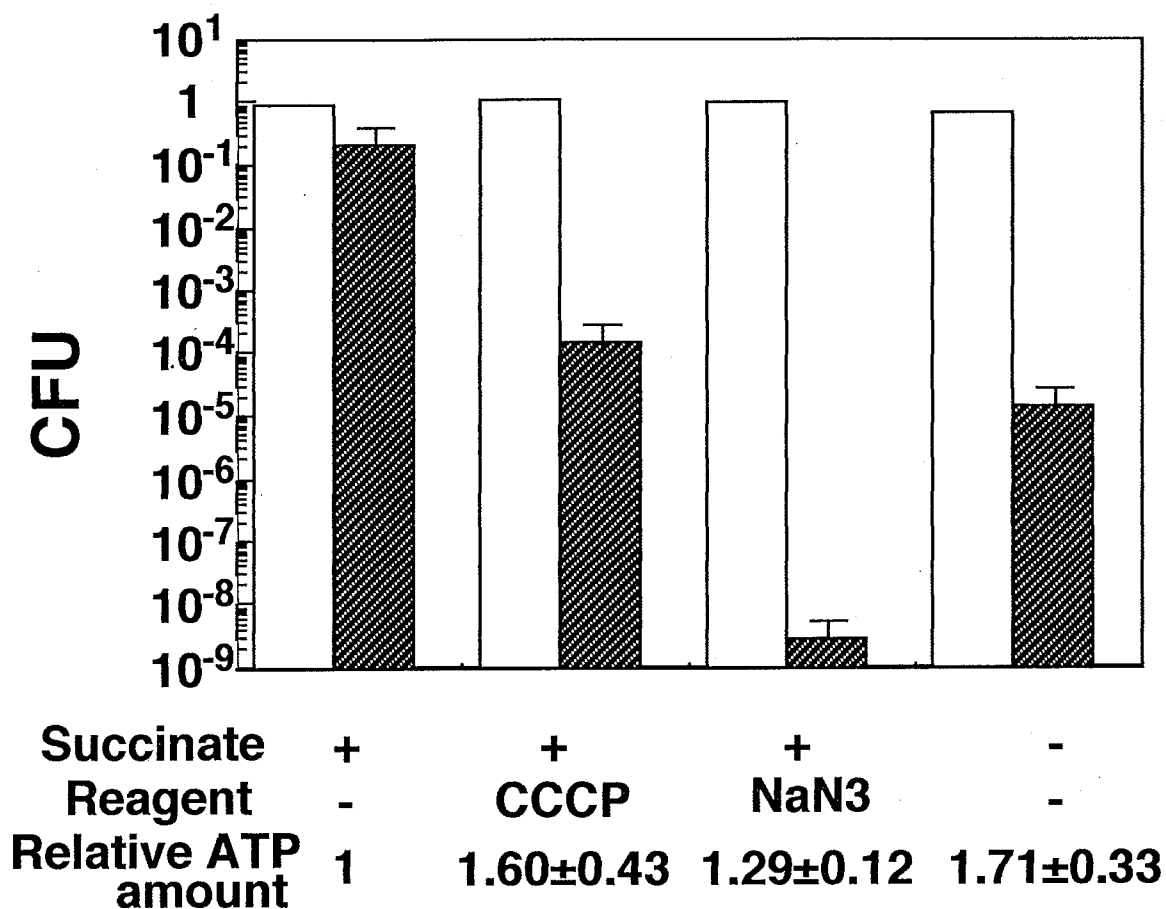


Fig. 4-6 Toluene susceptibility independent of ATP

P. putida Px51T cell suspension was incubated at 30°C with 0.1 mM CCCP and 5.0 mM NaN₃, or without, for 15 min (□, ■). Toluene was added (■) or not (□) and CFU was measured after 30 min.

第4節 考察

前章において有機溶媒存在下での生育の安定性に溶存酸素が必要であることを述べた。好気性細菌にとって溶存酸素は、通常環境においても生育に必須であるが、有機溶媒存在下ではその必要性がさらに高いことが考えられた。本章では、溶存酸素を利用する系として呼吸に着目し、呼吸機能の維持と有機溶媒耐性について検討した。

分子状酸素に依存しない嫌気呼吸においても有機溶媒存在下での生育の安定性が高まるかどうかを観察することにより、分子状酸素非存在下においても、呼吸に必要な基質である硝酸イオンが十分に存在するなど、嫌気呼吸を行う条件が整っていれば、有機溶媒存在下での生育が安定化することが示された。この事より、嫌気あるいは好気条件を問わず、細菌の呼吸機能を十分に維持させることが有機溶媒耐性に必要であることが示唆された。本章で用いた硝酸呼吸条件下では、酸素を十分に供給する系よりも最終的な生菌数が劣っていたが (Fig.3-3、3-4参照)、これは用いた通性嫌気性菌において、嫌気呼吸で生産されるエネルギー量が好気呼吸によって得られるエネルギーよりも少ないためではないかと思われる。

有機溶媒耐性に対する呼吸機能の関与の可能性から、呼吸機能の阻害剤による有機溶媒耐性度への影響を検討した。呼吸系や輸送系のATP-aseの阻害剤として考えられているDCCDやAurovertin、 NaVO_3 で処理を行った場合、無処理のものとはほとんど差異は見られなかった。有機溶媒耐性が顕著に低下したCCCPや NaN_3 のうち、 NaN_3 は細菌の呼吸鎖における電子伝達を主に阻害するとされているが、その他の部分にも効果があり、その作用点が特定できない。CCCPは、脂溶性の脱共役剤としての作用が解明されており、膜におけるプロトンイオンの透過性を増大させ、 $\Delta\mu\text{H}^+$ を消失させる。短時間のCCCP処理で有機溶媒耐性度が低

下することや、CCCPの濃度に比例した有機溶媒耐性度の変化から、CCCPが細胞膜を透過して、直ちにその透過量に応じた膜の内外の $\Delta\mu\text{H}^+$ を減少させ、その結果、有機溶媒耐性度が変化したものと考えられる。そして、この結果は*P. putida*だけでなく、*P. aeruginosa*や*E. coli*において、または、Tolueneだけでなく*p*-Xylene、Cyclohexane、*n*-Hexaneを用いても同様の傾向が観察された。したがって、 $\Delta\mu\text{H}^+$ に依存した溶媒耐性維持機構が、グラム陰性細菌において広く存在しているものと考えられる。

細胞膜における $\Delta\mu\text{H}^+$ は酸化的リン酸化によるATPの生産と共役している。CCCPによりATPの生産が停止することが考えられたため、薬剤処理後のATP量を測定し、その有機溶媒耐性度との関連を検討したところ、ATP量には顕著な差が認められなかった。また、Fig.4-1(A)に示されたように、CCCPによる処理の開始後、急速に有機溶媒耐性度が低下していた。この事からも、 $\Delta\mu\text{H}^+$ が形成されることが有機溶媒耐性に重要な役割を果たしていることは明らかであり、ATPではなく $\Delta\mu\text{H}^+$ によって駆動される有機溶媒耐性機構が存在することが示唆される。

第5章 有機溶媒耐性に関与する *mexABM* 遺伝子の解析

第1節 序論

前章までの結果から、呼吸機能による電気化学的ポテンシャル差 $\Delta\mu\text{H}^+$ の維持が有機溶媒耐性に不可欠であることが明らかになった。この $\Delta\mu\text{H}^+$ は $\text{F}_1\text{F}_0\text{ATPase}$ の駆動力として利用され ATP を生産すると共に、様々な基質に対する輸送・排出系の駆動力としても利用される。有機溶媒耐性と膜における排出系との関連については、*Pseudomonas putida* S12株において、Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazon e (CCCP) によって細胞内に Toluene 分子が多く蓄積されることが報告されている(26)。この事より、有機溶媒耐性への $\Delta\mu\text{H}^+$ を駆動力とする能動的排出系の関与が示唆されている。しかし、その具体的な構造や遺伝子までは言及されていない。

大腸菌を用いた有機溶媒耐性機構の解析によると、有機溶媒耐性変異株では、有機溶媒耐性度の向上に伴って、Ampicillin、Tetracycline、Chloramphenicol、Nalidixic acid 等の抗生物質に対する耐性が高まっている(6)。また、有機溶媒耐性を付与する遺伝子の検討の結果、多剤耐性付与遺伝子 *mar* オペロンの機能と有機溶媒耐性レベルとの関連が明らかとなっている(7)。*mar* オペロン中の *marA* 産物によって、複数の遺伝子の発現が促進される(第1章 Fig. 1-2参照)。その内の一つである *acr* オペロンは細胞の内膜に局在する *acrAB* タンパク質をコードし、これと外膜孔を形成するタンパク質 *tolC* とで排出ポンプを形成して細胞内に侵入してきた薬剤を能動的に排出し薬剤耐性を獲得しているものと考えられている。

Pseudomonas aeruginosa は、緑膿菌とも呼ばれ、日和見感染の病原

菌として関心が深く、その薬剤耐性能の研究が行われている。近年、多種類の抗生物質に対して耐性を向上させる多剤耐性遺伝子*mex*オペロンが同定およびクローニングされた。*mex*オペロンは*mexA*、*mexB* (multiple efflux)、*oprM* (outer membrane protein) の3つの遺伝子からなり、それぞれがコードする3つの膜タンパクからなる排出ポンプの機能を持つことが示唆された(32, 44, 45)。(Fig. 5-1) この排出系の対象はTetracycline、Chloramphenicol、Nalidixic acid、Fluoroquinolone系の抗生物質であり、駆動力は $\Delta\mu\text{H}^+$ であると考えられている。

本章では、薬剤耐性と有機溶媒耐性との関連性および $\Delta\mu\text{H}^+$ の必要性から、*Pseudomonas aeruginosa*の*mex*オペロンに着目し、この遺伝子が有機溶媒耐性に与える影響を検討した。

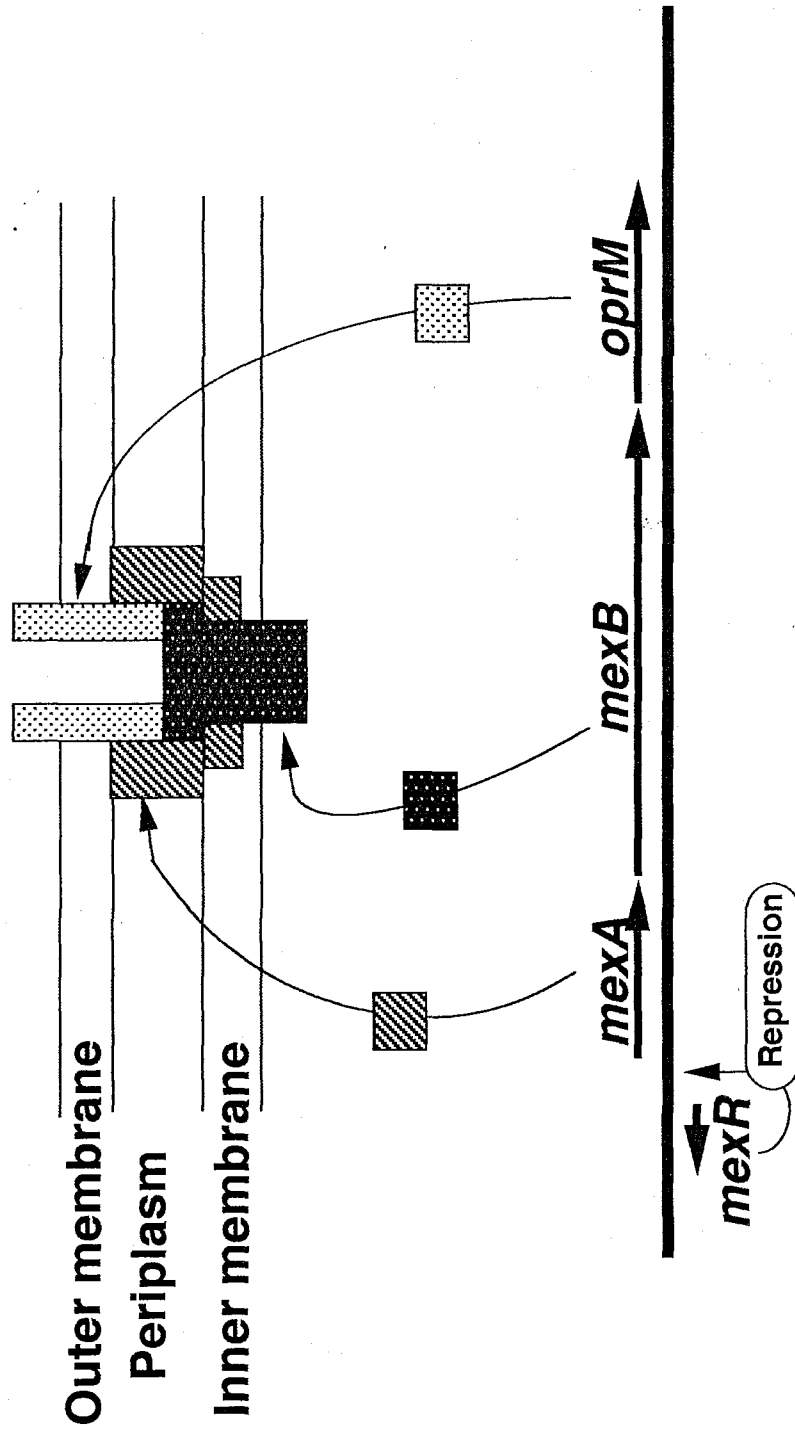


Fig. 5-1. *Pseudomonas aeruginosa* mexABM operon

第2節 実験材料と方法

1) 使用菌株及び培地

使用した菌株を以下に示す。

Pseudomonas aeruginosa PAO3292

(*arg-32*, *his-312*, *str-39*, *chl-2*, *rec-2*)

(第3章第2節1) 参照)

Pseudomonas aeruginosa PAO1161

(*hsdr⁻*, *hsdm⁻*, *leu-38*, FP2)

Pseudomonas putida PpY101

(*alcA*, *Sm^r*, *Nal^r*)

Escherichia coli DH5 α

(*supE44*, Δ *lacU169*(ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*,

endA1, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*)

Escherichia coli JM109

(*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-*

pro)/*F*[*traD36*, *proAB⁺*, *lacI^q*, *lacZ* Δ M15])

培地はLBGMg培地 (第3章第2節1) 参照) を用いた。必要に応じて、寒天末や各種薬剤を加えた。

2) 使用プラスミド

目的の遺伝子を導入するために、グラム陰性菌広宿主域ベクターを用いた。Fig. 5-4に使用プラスミドの構造を示す。pKS13はTetracycline耐性遺伝子とcos領域を有するコスミドベクターであり(27)、16 kbから30 kbの長さのDNAをクローニングすることができる。pMFY42はTetracycline耐性遺伝子とKanamycin耐性遺伝子を有するプラスミドベク

ターであり(19)、上述のコスミドベクターにクローニングされたDNAから目的の領域をサブクローニングするために使用した。

3) DNAの調製と遺伝子操作

Pseudomonas aeruginosa の染色体DNAの調製は、Marmurの方法に従って行った(35)。*Escherichia coli* DH5 α とJM109は、Hanahanらの方法によるコンピテントセル作成に用いた(21)。プラスミドの調製にはアルカリ-SDS法を用い、Tris-酢酸-EDTA緩衝液を用いたアガロースゲル電気泳動により各DNAの確認と分離を行った。その他のDNAの組換えに要する手法は、Molecular Cloning (2nd edition) に従った(34)。

*P. aeruginosa*由来の*mex*オペロンの取得において、染色体DNAを鋳型としたPCR法を行った。Primerは、以下の2本を設計し使用した。

Sense primer 5'—CCCTCCAGCTCGCGGATCTTCCGGG—3'

Antisense primer 5'—GTCCGCGAGAGTGGGTCCT———3'

Colony hybridizationにおいて、ジゴキシゲニン標識プローブを用いた酵素免疫測定法 (DIG-ELISA法; ベーリンガー・マンハイム社製) により、目的の遺伝子の検出を行った。

*Pseudomonas*属細菌に対するプラスミドDNAの形質転換には、Electroporation法を用いた(15, 18)。*Pseudomonas putida*を用いる際の培養温度は30℃、その他の株の場合は37℃とした。

4) 抗生物質の最小生育阻止濃度の測定

*mexABM*オペロンの薬剤排出機能の確認のために、各株に対する抗生物質の最小生育阻止濃度を測定した。抗生物質にはFluoroquinolone系のOfloxacinとNorfloxacinを用いた。LBGMg液体培地において各抗生物質の2倍希釈系列を作製し、37℃で18時間培養した前培養液から1%

になるように植菌し、37℃で24時間後に生育の有無を判定した。

5) 有機溶媒耐性度の測定

有機溶媒耐性度の測定には以下の2つの方法を用いた。

スポット法は以下に述べるようにして行った。各菌株の単一コロニーから一部を釣菌して生理食塩水に懸濁し、各々の10倍希釈系列を作製した。各希釈系列より5 μ lずつをサンプリングしてガラスシャーレ内のLBGMg寒天培地上に滴下した。滴下した生理食塩水が培地に浸潤したところで30℃1時間保温し、*p*-Xyleneを2-3 mmの厚さになるように重層した。30℃で20時間培養後、生育したコロニーの頻度から有機溶媒耐性度を観察した。

液体培地中での生菌数の測定は以下のようにして行った。30℃で24時間の培養を行った前培養液から、500 ml容量のひだ付三角フラスコにおけるLBGMg培地 50 mlに、1%になるように植菌後、30℃で160 rpmの速度で振盪培養した。経時的に660 nmの波長による濁度を測定し、0.1から0.2になったところで*p*-Xyleneを20 ml添加した。ブチルゴム栓で密閉した後、振盪培養を継続した。経時的にサンプリングを行い、濁度と生菌数の測定を行った。生菌数の測定は、第3章第2節3) に準じて行った。

6) 菌体の外膜画分の調製と電気泳動

P. aeruginosa PAO1161株の各形質転換体を、テトラサイクリンを添加したLBGMg培地において、37℃24時間で前培養を行った。500 ml容量のひだ付き三角フラスコ中のLBGMg培地100 mlに1%植菌し、37℃160 rpmで振盪培養を行った。660 nmの波長によって測定した濁度が0.6に達した時に、培養液を5,000 x g、5分間、4℃の条件で遠心分離し、集菌を行った。湿菌体重量を測定し、1 gあたり3 mlの氷冷した

10 mM HEPES-NaOH緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した。氷冷下で菌体を超音波破碎 (200 W (20 kHz)、1 分間 x 3 回) した後、未破碎菌体を上述の条件と同様の遠心分離により除いた。その上清を超遠心分離し、(120,000 x g、45 分間、4 °C)、沈殿物を同緩衝液で洗浄後、膜画分として取得した。

取得した膜画分は、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (和光純薬社製) を 2 % になるように加え、37 度で一晩放置した。上述と同条件の超遠心分離を行い、沈殿物を 2 % N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム溶液で洗浄後、外膜タンパク質画分として取得した(60)。

タンパク質の定量は、ウシ血清アルブミン (SIGMA社製) を基準として、Lowry法により定量した(61)。電気泳動はLaemmliの方法に準じて行った(62)。0.1% SDS-9% アクリルアミドゲルを用いて泳動を行い、Coomassie Brilliant Blue R-250 (ナカライテスク社製) にて染色し検出した。

第3節 結果

1) *mexABM* オペロンの取得

薬剤排出系による有機溶媒耐性への影響を検討するため、*P. aeruginosa*の染色体DNAから*mex*オペロンのクローニングを試みた。*mex*オペロンの塩基配列はPooleらにより既に報告されている(45, 46)。その塩基配列から*mexA*を含む領域を選び、第2節に記載のプライマーの設計を行った。まず、*P. aeruginosa* PAO3292株の染色体DNAを調製し、これを鋳型としてPCR法により、*mexA*領域の取得を行った。Fig. 5-2に、オペロンの構造と制限酵素切断部位、PCRによる増幅領域を示す。報告されている塩基配列から推定されるPCR産物の長さは約2.2 kbであり、PCR反応後の試料を一部採取して電気泳動で確認したところ、同程度の移動度を持つDNA断片が増幅されていることが認められた(Fig. 5-3)。このPCR産物を精製後、制限酵素*Hind* IIIと*Bam* H Iによる処理を行って1.9 kbのDNA断片とし、プラスミドベクターpUC118に連結した。この組換えプラスミドを大腸菌JM109株に形質転換し、プラスミドの大量調製を行った。これより、1.9 Kbの*Hind* III-*Bam* H I DNA断片を調製し、ジゴキシゲニンによる標識を行ってColony hybridizationによる*mex*オペロン選択の為のプローブとして用いた。

*mex*オペロンを取得するため、中江らの報告から(33)制限酵素*Eco*R Iによる切断部位を選択し、グラム陰性菌広宿主域コスミドベクターpKS13を用いて*P. aeruginosa*の染色体ライブラリーを作成した。その際、オペロン中にも*Eco*R I部位が存在するため、染色体DNAが部分的に切断されるように制限酵素反応の条件を設定した。約3,000個のコロニーから、上述のプローブに対して陽性反応を示した2つのコロニーを選択し、そのプラスミド中の遺伝子をFig. 5-2に示す制限酵素切断部位により確認したところ、1つに完全な*mex*オペロンが含まれていることが明らかとなった。そのクローンをpECO2と名付けた(Fig. 5-2)。

pECO2 プラスミド中に含まれる*mexABM*オペロンを広宿主域ベクターpMFY42にサブクローンした。その構築過程をFig. 5-4に示す。構築したプラスミドはKanamycin耐性遺伝子を残しており、このプラスミドをpME16と名付けた。また、pMFY42とpME16とにChloramphenicol耐性遺伝子を連結したプラスミドを作製し、各々をpMFY42CmとpME16Cmと名付けた(Fig. 5-4)。

2) *mexABM*オペロンの発現の確認

プラスミド上で導入した*mexABM*オペロンの発現を確認するため、外膜画分のタンパク質の電気泳動により、オペロン中の*oprM*遺伝子の産物の確認を行った。

電気泳動の結果をFig. 5-5に示す。ベクターのみを導入した株に比べて、*mex*オペロンを導入した株の外膜タンパク質画分には、分子量約50 kDaに相当するタンパク質が増加しているのが認められた。*mex*オペロン中の*oprM*遺伝子の産物の推定分子量は50 kDaであることから、プラスミド上の*mex*オペロンが正常に発現していることが示された。

3) *mexABM*オペロンによる薬剤耐性向上の確認

クローニングした*mex*オペロンは、制限酵素切断部位が既に報告されている塩基配列のものと一致していることを確認した。さらに、クローニングした*mex*オペロンが薬剤耐性遺伝子として正常に機能するかどうかを確認するため、各プラスミドを導入した*P. aeruginosa* PAO1161株に対する抗生物質の最小生育阻止濃度を測定した。Table 5-1にその結果を示す。*mexABM*オペロンをプラスミド上で導入した株は、ベクターのみを導入した株に比べて最小生育阻止濃度がいずれも2倍上昇していた。以上より、クローン化した*mexABM*オペロンが抗生物質の排出ポンプとして機能していることが示された。

4) *mexABM*オペロンによる有機溶媒耐性への影響

プラスミドを導入した各菌株の有機溶媒存在下におけるViabilityを確認するため、寒天培地上でのスポット法と、液体培地中での生菌数の測定による有機溶媒耐性度の確認を行った。

プラスミドを導入する株は、*Pseudomonas aeruginosa* PAO3292、*P. aeruginosa* PAO1161、*P. putida* PpY101を宿主として用いた。このうち、*P. aeruginosa* PAO3292株はKanamycin耐性度が高く選択マーカーとして用いることができなかったため、プラスミドはChloramphenicol耐性遺伝子を組み込んだpME16Cmを用い、その他の2株にはKanamycin耐性遺伝子をマーカーとするプラスミドpME16を用いた。有機溶媒耐性度を検討したスポット法の結果をFig. 5-6に示す。*P. aeruginosa*の2株においては*mexABM*オペロンによる有機溶媒耐性度の向上は認められなかった。一方、*P. putida* PpY101株においては、プラスミドベクターのみを導入した株の*p*-Xylene存在下における生育頻度が*P. aeruginosa*に比べて $1/10^3$ 程度であったが、*mexABM*オペロンの導入により生育頻度が 10^2 倍程度上昇していることが観察された。

液体培地における有機溶媒耐性度の測定を*P. putida* PpY101について行った。濁度と生菌数の経時変化の測定結果をFig. 5-7に示す。プラスミドベクターのみを導入した株では、*p*-Xyleneを添加した後から濁度の上昇速度が低下し、0.6付近で停止した。PpY101(pMFY42)の生菌数は*p*-Xylene添加直後に $1/10^2$ に減少し、その後の増殖速度が低下しているのが観察された。しかし、*mexABM*オペロンを導入した株では有機溶媒添加後も濁度は上昇を続けた。PpY101(pME16)の生菌数はいったん増加が停止したものの、再び増加し、約 10^9 個/mlまで増殖した。これより、寒天培地上での結果と同様に、液体培地においても、*mexABM*オペロンが有機溶媒耐性の向上に寄与することが認められた。

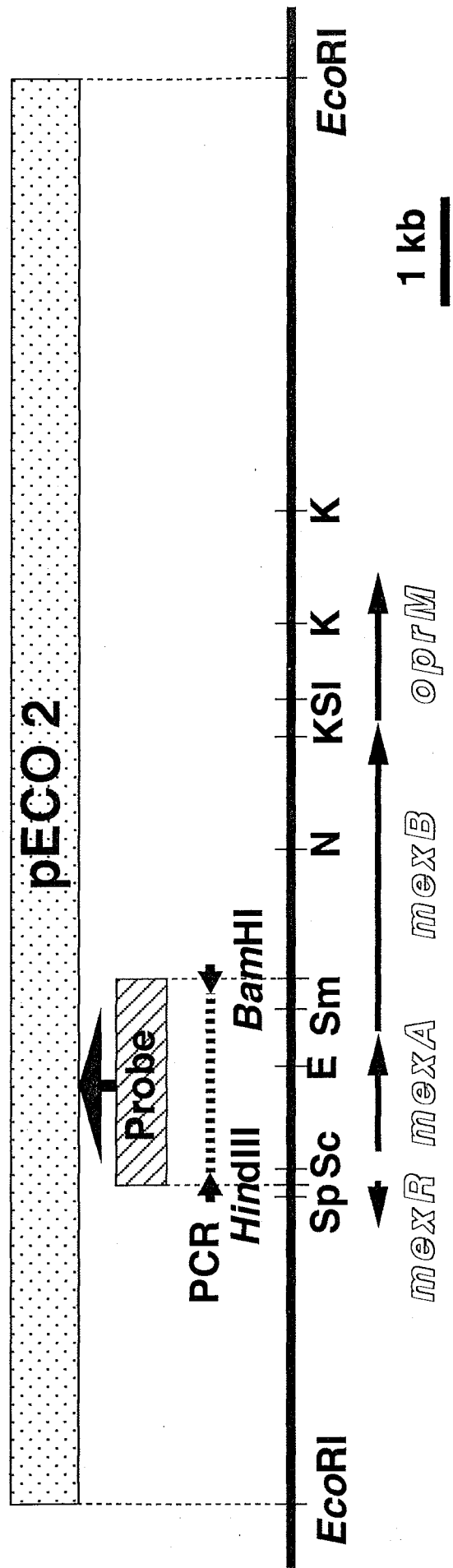


Fig. 5-2. Restriction enzyme sites and cloning strategy of *Pseudomonas aeruginosa mexABM* operon

- E : EcoRI
- K : KpnI
- Sc : SacI
- Sl : SalI
- Sm : SmaI
- Sp : SphI

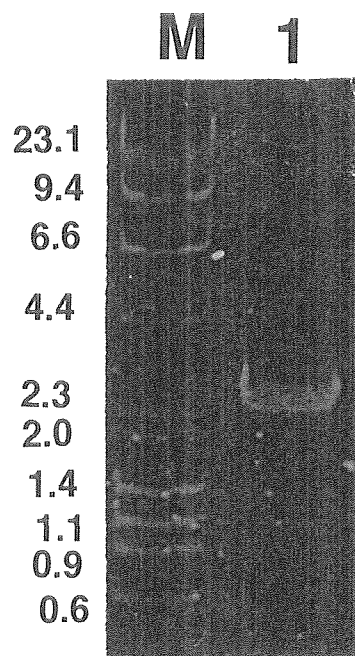


Fig. 5-3 PCR amplification of *mexA* region on *Pseudomonas aeruginosa* chromosome
M:Size marker (kb)
Lane 1:PCR Product

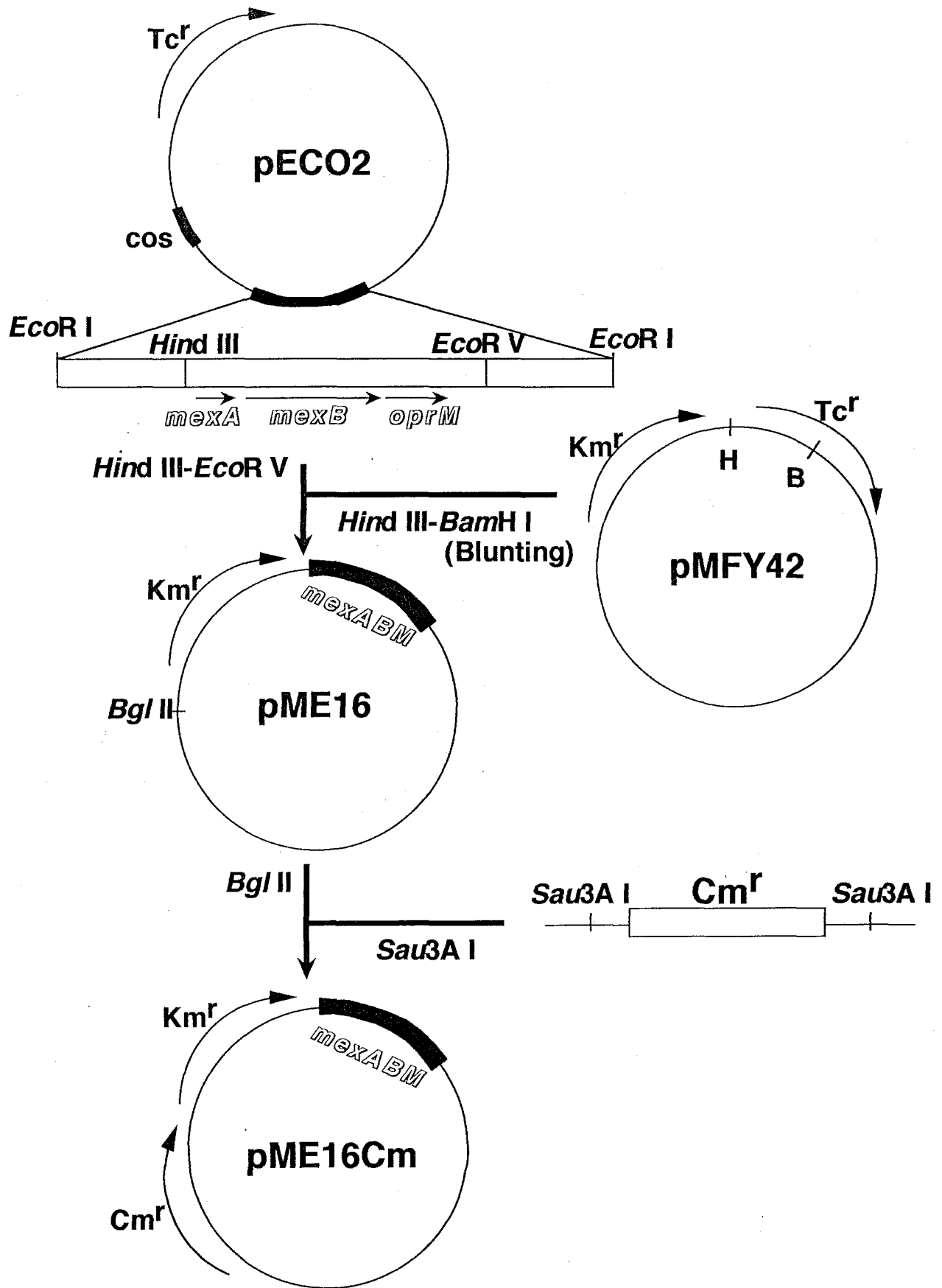


Fig. 5-4 Construction of plasmids containing *mex* operon

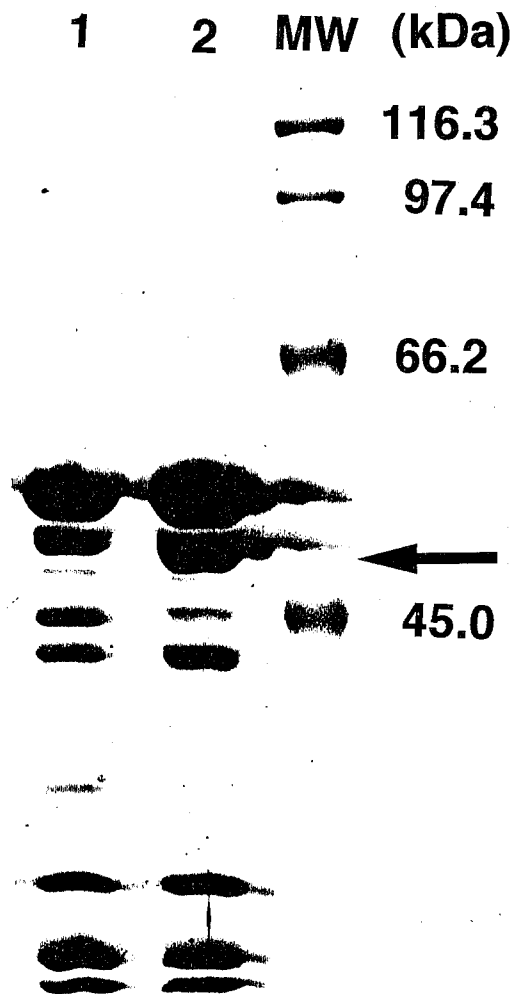


Fig. 5-5 Outer membrane protein of *P. aeruginosa* PAO1161

Outer membrane proteins of PAO1161(pMFY42) (Lane1) and PAO1161(pME3)(Lane2) were separated by SDS-PAGE on a 9% acrylamid gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane MW indicates molecular mass markers. 50 kDa protein is indicated with an arrow.

Table 5-1. Minimum inhibitory concentration of antibiotics for *P. aeruginosa* PAO1161

Plasmid	Ofloxacin ($\mu\text{g/ml}$)				Norfloxacin ($\mu\text{g/ml}$)			
	1.6	0.8	0.4	0.2	1.6	0.8	0.4	0.2
pKS13	-	-	+	+	-	-	-	+
pECO2	-	+	+	+	-	-	+	+
pMFY42	-	-	+	+	-	-	+	+
pME16	-	+	+	+	-	+	+	+

+:growth -:no growth


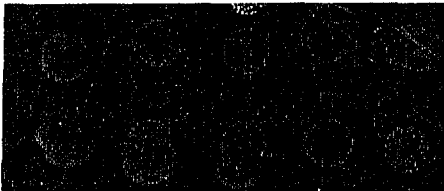

Strain	Plasmid	Cells (/ml)				
		10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
<i>P. aeruginosa</i> PAO3292	pMFY42					
	pME16Cm					
<i>P. aeruginosa</i> PAO1161	pMFY42					
	pME16					
<i>P. putida</i> PpY101	pMFY42					
	pME16					

Fig. 5-6 *p*-Xylene tolerance of *Pseudomonas* strains

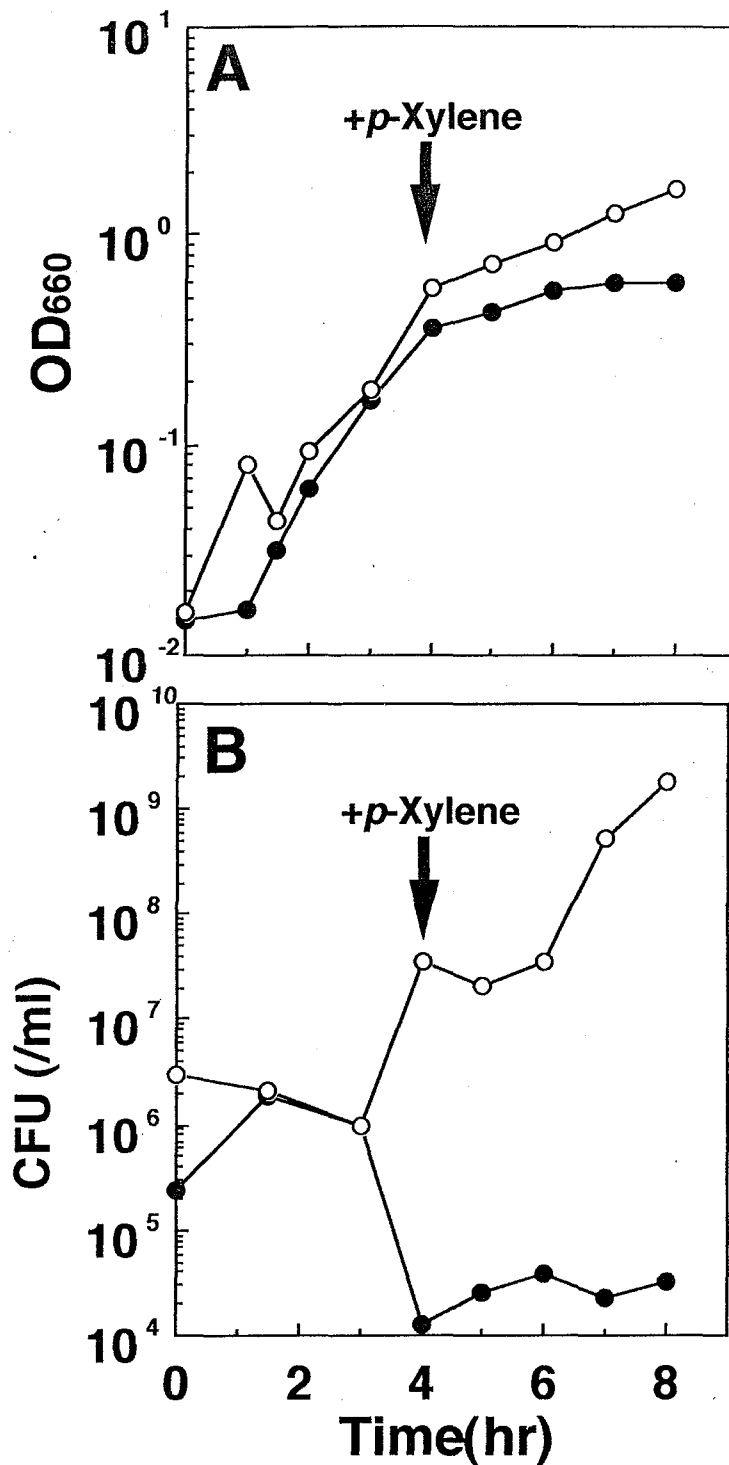


Fig. 5-7. Growth of *P. putida* PpY101 in the presence of *p*-Xylene.

P. putida PpY101 carrying pMFY42(●) or pME16 (○) was grown in 50 ml of LBGMg medium in the presence of *p*-xylene (20 ml) in sealed 500-ml flasks at 30°C. Panel A; OD₆₆₀ Panel B; Colony forming unit(/ml).

第4節 考察

前章までにおいて認められた有機溶媒耐性と $\Delta\mu_{H^+}$ との相関関係から、本章においては細胞膜における薬剤排出系の有機溶媒耐性に対する寄与を検討した。多剤耐性遺伝子の研究はこれまでに多数の菌種に対して行われている。同じ菌種において複数の多剤耐性遺伝子が存在する場合もあり、その基質特異性は一部重複している場合が多い(30, 40, 41)。細胞にとって有害な物質は本来不特定であり、それらに幅広く対応して生存していくために、このような低い基質特異性を有する排出系が備わったと考えられている。このような広い基質特異性をもたらしているのは基質の構造的な特徴ではなく、基質の持つ電荷や疎水性、両親媒性などの物理化学的な性質に由来するとされている(30, 40, 41)。有機溶媒は極めて疎水性の高い物質であり、細菌における薬剤排出系の対象であるTetracyclineやChloramphenicolなども疎水性が高いとされている。また、本来の排出系の生理的な役割が薬剤を対象としておらず、環境の変化に対応して排出系を利用することにより、多剤耐性を獲得したとする説がある(42)。*mex*をはじめとするいくつかの多剤耐性遺伝子は当初、鉄キレート分子や色素やナトリウムイオンなど、薬剤とはまったく別の物質の分泌や輸送に関与するとされていたものであり(44)、その後多剤耐性に対する関与が確認されている。本章では、そのような特性を持つと考えられる多剤排出系の基質として、有機溶媒分子が対象となり得るかどうかを検討した。その結果、1株のみではあるが、*mex*オペロンの存在により有機溶媒耐性が向上し得ることを確認した。この*P. putida* PpY101株は、*P. aeruginosa* PAO3292等よりも有機溶媒耐性度が低く、*P. aeruginosa* 由来の*mex* 遺伝子により*P. aeruginosa*と同等の有機溶媒耐性度を獲得したのと考えられる。また、*P. aeruginosa* において*mexABM*の多コピー化による有機溶媒耐性の向上を検討した

が、明確な向上は認められなかった。*p*-Xyleneだけが*mex*オペロンの基質となりうるのか、あるいは、更なる耐性度の向上に別の要因が必要なのかは不明である。しかし、大腸菌JA300株由来の有機溶媒耐性変異株において膜局在性の排出系と思われるタンパクをコードする*ostBC*遺伝子が有機溶媒耐性遺伝子としてクローニングされている。本結果と合わせて、有機溶媒耐性機構の一部に膜に局在する輸送系が関与していることが推察される。

第6章 総括

本研究の結果を以下に要約する。

第2章では、毒性の高い有機溶媒であるTolueneの存在下で安定に生育する微生物の検索を行った。自然界からのスクリーニング法として毒性の低い有機溶媒を前段階に用いた2段階選抜法により、高い頻度でToluene耐性菌を選択・分離することが出来た。これらの菌株は全て*Pseudomonas*属細菌であった。これらのうち、最も安定に生育する1株を選んで*P. putida*と同定した。本菌株をPx51Tと命名し以後の実験に用いた。

第3章では、Px51T株をはじめとする菌株を有機溶媒存在下で安定に生育させるための培養法の検討を行った。有機溶媒の揮発を防ぐための密閉容器内で、培地の容量を減らすかまたは気相中の酸素分率を多くすることにより、生菌数が高いレベルで安定に保たれることを見出した。

第4章では、酸素を用いない硝酸呼吸によって有機溶媒存在下での生育が安定化されることから、酸素分子そのものではなく、呼吸機能の維持が必要であると推察した。さらに、呼吸阻害剤CCCPまたは NaN_3 処理を施した細胞は有機溶媒耐性度が著しく低下することより、呼吸によって得られるエネルギーのうち、 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ が有機溶媒耐性に関与していることが示唆された。

第5章では、 $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ を駆動力とする薬剤排出系が有機溶媒耐性に与える影響について検討した。*P. aeruginosa*由来の多剤耐性遺伝子*mex*オペロンをクローニングし、プラスミドに組み換えて各種の菌株に導入し有機溶媒耐性度を観察したところ、*P. putida* PpY101株において*p*-Xylene存在下での生育が向上していた。これより、細胞膜における排

出系が有機溶媒耐性機構の一部として機能している可能性が考えられた。

今後の展望として、有機溶媒耐性と $\Delta\mu\text{H}^+$ との関わりについて、更なる解析が要求される。本研究では $\Delta\mu\text{H}^+$ をエネルギーとする機能から膜排出系と有機溶媒耐性について検討したが、膜タンパク質は本来その発現が厳密に制御されるものであり、ただ単にその構造遺伝子を増幅しただけでは逆に菌に対して悪影響を及ぼす可能性もある。他にも細胞内において $\Delta\mu\text{H}^+$ を利用する機能は存在することから、他の機能と有機溶媒耐性との関連を検討すると共にそれらとの相乗作用を考慮する必要がある。

本研究において、有機溶媒存在下での生育に必要な要因として、呼吸の維持が明らかになった。有機溶媒の混在する系に酸素を多量に供給することは防災上の観点からあまり好ましくないと考えられる。最終的な生菌濃度は過剰量の酸素を供給して好気呼吸を行わせた場合に認められた生菌数にはおよばなかったが、嫌気呼吸条件下でも生育の安定性が確認された。防災上の安全性を最優先しなければならないような条件での応用が期待される。

参考文献

- 1:Aono, R., K. Aibe, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1991. Preparation of organic solvent-tolerant mutants from *Escherichia coli* K-12. *Agric. Biol. Chem.* 55:1935-1938.
- 2:Aono, R., M. Ito, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1992. Isolation of novel toluene-tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:145-146.
- 3:Aono, R., T. Negishi, K. Aibe, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1994. Mapping of organic solvent tolerance gene *ostA* in *Escherichia coli* K-12. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58:1231-1235.
- 4:Aono, R., H. Kobayashi, K. N. Joblin, and K. Horikoshi. 1994. Effects of organic solvents on growth of *Escherichia coli* K-12. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58:2009-2014.
- 5:Aono, R., N. Doukyu, H. Kobayashi, N. Nakajima, and K. Horikoshi. 1994. Oxidative bioconversion of cholesterol by *Pseudomonas* sp. strain ST-200 in a water-organic solvent two phase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2518-2523.
- 6:Aono, R., M. Kobayashi, H. Nakajima, and H. Kobayashi. 1995. A close correlation between improvement of organic solvent tolerance levels of multiple antibiotics in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:213-218.
- 7:Asako, H., H. Nakajima, K. Kobayashi, M. Kobayashi, and R. Aono. 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by Overexpression of *marA* in *Escherichia*

coli. Appl. Environ. Microbiol. 63:1428-1433.

8:Atlas, R. M. and L. C. Parks. Handbook of Microbiological Media. CRC Press.

9:Barrette, Jr., W. C. B., D. M. Hannum, W. D. Wheeler, and J. K. Hurst. 1988. Viability and metabolic capability are maintained by *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus lactis* at very low adenylate energy charge. J. Bacteriol. 170:3655-3659.

10:Carlson, C. and J. L. Ingraham. 1983. Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. Appl. Environ. Microbiol. 45:1247-1253.

11:Chen, Q., A. Nijenhuis, H. Preusting, J. Dolging, D. B. Janssen, and B. Witholt. 1995. Effects of octane on the fatty acid composition and transition temperature of *Pseudomonas oleovorans* membrane lipid during growth in two-liquid-phase continuous cultures. Enzyme Microb. Technol. 17:647-652.

12:Cruden, D. L., J. H. Wolfram, R. D. Rogers, and D. T. Gibson. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase(organic-aqueous) medium. Appl. Environ. Microbiol. 58:2723-2329.

13:Davis, K. J. P., D. Lloyd, and L. Boddy. 1989. The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 135:2445-2451.

- 14:Dean, J. A. LANGE's Handbook of Chemistry. (eleventh ed.)
- 15:Bio-Rad Laboratories, Gene Pulser Electroprotocol.
- 16:Dolfing, J., P. E. Binder, and R. P. Schwarzenbach. 1990. Isolation and characterization of bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* 154:336-341.
- 17:Favre-bulle, O., T. Schouten, J. Kingma, and B. Witholt. 1991. Bioconversion of *n*-octane to octanoic acid by a recombinant *Escherichia coli* cultured in a two-liquid phase bioreactor. *Bio/Technology.* 9:367-371.
- 18:Figurski, S. and R. Wirth. 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.* 170:38.
- 19:Fukuda, M. and K. Yano. 1985. Construction of broad host range cloning vectors for gram-negative bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 49:2719.
- 20:Grbic, G. D. and T. M. Vogel. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:254-260.
- 21:Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- 22:Hansch, C., M. R. Muir, T. Fujita, P. P. Maloney, F. Griger, and M. Streich. 1963. The Correlation of biological activity of plant growth regulators and chloromycetin derivatives with

- Hammett constants and partition coefficients. J. Americ. Chem. Soc. 85:2817-2824.
- 23:Heipieper, H. J., F. J. Weber, J. Sikkema, H. Keweloh, and J. A. M de Bond. 1994 Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. TIBTECH. 12:409-415.
- 24:Inoue, A. and K. Horikoshi. 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentration of toluene. Nature(London). 338:264-265.
- 25:Inoue, A. and K. Horikoshi. 1991. Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter Log P. J. Ferment. Bioengin. 71:194-196.
- 26:Isken, S. and J. A. M. de Bont. 1996. Active efflux of toluene in a solvent resistant bacterium. J. Bacteriol. 178:6056-6058.
- 27:Kimbara, K., T. Hashimoto, M. Fukuda, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi, and K. Yano. 1989. Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degradating soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. J. Bacteriol. 171:2740.
- 28:小林英城. 1995年度東京工業大学博士論文
- 29:Leo, A. J. 1983. Calculating log P_{oct} from structures. Chemical Reviews. 93:1281-1306.
- 30:Lewis, K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. TIBS. 19-March:119-123.

- 31:Li, L., T. Komatsu, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1995. A toluene-tolerant mutant of *Pseudomonas aeruginosa* lacking the outer membrane protein F. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:2358-2359.
- 32:Li, X. Z., H. Nikaido, and K. Poole. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1948-1953.
- 33:Morshed, S. R. Md., Y. Lei, H. Yoneyama, and T. Nakae. 1995. Expression of genes associated with antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210:356-362.
- 34:Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 35:Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3:208-218.
- 36:Molenaar, D., H. Bolhuis, T. Abee, B. Poolman, and W. N. Konings. 1992. The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 174:3118-3124.
- 37:Nakajima, H., H. Kobayashi, R. Aono, and K. Horikoshi. 1992. Effective Isolation and Identification of toluene-tolerant *Pseudomonas* strains. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:1872-1873.

- 38:Nakajima, H., M. Kobayashi, T. Negishi, and R. Aono. 1995. *soxRS* gene increased the level of organic solvent tolerance in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1323-1325.
- 39:Nakajima, H., K. Kobayashi, M. Kobayashi, H. Asako, and R. Aono. 1995. Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2302-2307.
- 40:Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 264:382-388.
- 41:Nikaido, H. 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178:
- 42:Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60:575-608.
- 43:Payne, W., J. 1981. Denitrification. Wiley-Interscience Publication.
- 44:Poole, K., D. E. Heinrichs, and S. Nashat. 1993. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* 10:529-544.
- 45:Poole, K., K. Krebs, C. McNally, and S. Neshat. 1993. Multiple

- antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175:7363-7372.
- 46:Poole, K., K. Tetro, Q. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs, and N. Bianco. 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2021-2028.
- 47:Ramos, J. L., E. Duque, J. Rodriguez-Herva, P. Godoy, A. Haidour, F. Reyes, and A. Fernandez-Barrero. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* 272:3887-3890.
- 48:Satre, M., G. Klein, and P. V. Vignais. 1979. Isolation of aurovertin-resistant mutants from *Escherichia coli*. *Methods in enzymology*. Vol.LVI.
- 49:Sikkema, J., J. A. M. de Bont, and B. Poolman. 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59:201-222.
- 50:de Smet, M., J. Kingma, H. Wynberg, and B. Witholt. 1983. *Pseudomonas oleovorans* as a tool in bioconversions of hydrocarbons: growth, morphology and conversion characteristics in different two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.* 5:352-360.
- 51:van Sonsbeek, H. M., H. H. Beeftink, and J. Tramper. 1993. Two-liquid-phase bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* 15:722-729.

- 52: Tan, H. M. and J. R. Mason. 1990. Cloning and expression of the plasmid-encoded benzene dioxygenase genes from *Pseudomonas putida* ML2. FEMS Microbiol. Lett. 60:259-264.
- 53: Thayer, J. R. and M. L. Wheelis. 1982. Active transport of benzoate in *Pseudomonas putida*. J. Gen. Microbiol. 128:1749-1753.
- 54: Thomas, K. L., D. Lloyd, and L. Boddy. 1994. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. FEMS Microbiol. Lett. 118:181-186.
- 55: Uribe, S., P. Rangel, G. Espinola, and G. Aguirre. 1990. Effects of cyclohexane, an industrial solvent, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and on isolated yeast mitochondria. Appl. Environ. Microbiol. 56:2114-2119.
- 56: Weber, F. J., S. Isken, J. A. M. de Bond. 1994. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. Microbiology. 140:2013-2017.
- 57: Witholt, B., O. Favre-Bulle, R. Lageveen, J. Kingma, J. B. von Beilen, H. Marvin, and H. Preusting. 1992. Synthesis of apolar organic compounds by *Pseudomonas* spp. and *Escherichia coli* in two-liquid-phase fermentations. In: E. Galli, S. Silver, B. Witholt. (eds) *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 301-314.

- 58:Leo, A., C. Hansch, and D. Elkins. 1971. Partition Coefficients and their uses. *Chem. Rev.* 71:525-616.
- 59:Jair, K.-W., R. G. Martin, J. L. Rosner, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf, Jr. 1995. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotics resistance and superoxide resistance promoter. *J. Bacteriol.* 177:7100-7104.
- 60:Celesk, R. A., and N. J. Robillard. 1989. Factors influencing the accumulation of ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agent Chemother.* 33:1921-1926.
- 61:Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 62:Leammli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature(London)*. 227:680-685.

謝辞

本研究を行うにあたって終始に渡って御指導を戴きました東京工業大学遺伝子工学講座助教授の青野力三先生に深く御礼申し上げます。

さらに、適切な御助言と励ましの御言葉を賜りました東京工業大学名誉教授・東洋大学教授の掘越弘毅先生に深く感謝申し上げます。

重ねて、実験を進めるにあたり、数々の細かな御助言と御指導を戴きました東京工業大学遺伝子工学講座助教授の中村聡先生と同講座助手の中島春紫先生、同講座技官の山本まみ氏に御礼申し上げます。

実験と論文執筆を進めるにあたり、過分の御援助を戴きました、海洋科学技術センター深海環境プログラムの皆様、群馬県警察科学捜査研究所の皆様に御礼申し上げます。

最後に、研究室で共に生活し、議論を重ねた東京工業大学遺伝子工学講座の学生・卒業生の皆様に深く感謝いたします。