

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 津 幡 卓 一

厳しい環境の下で生育する極限環境微生物が取得され、その特徴が分子レベルで明らかとなってきた。しかし、毒性の大きい有機溶媒存在下で生育する微生物の有機溶媒耐性に関わる機構は未だ明確にされていない。毒性の大きい有機溶媒存在下で取得された微生物の特徴を調べても、それが有機溶媒に接触したために生じているのか、耐性を獲得するための機構であるのか明確にできないからである。本研究では *n*-ヘプタノール感受性菌に突然変異を生ぜしめ、*n*-ヘプタノール耐性株を取得し、これらの2株を比較することで *n*-ヘプタノール耐性に関与すると思われる変化を見いだした。

序論では緒言を述べた。

第1章では *n*-ヘプタノール耐性株の取得方法と脂肪酸の変化について述べた。有機溶媒耐性機構を調べるためのひとつのモデルとして、ジベンゾチオフェンを分解する菌株を取得して *n*-ヘプタノール耐性にした。まず窒素置換条件下でジベンゾチオフェンを分解する微生物を土壌から取得し、28日間でのジベンゾチオフェン分解能が大きい8株について同定を行い、ジベンゾチオフェン分解能が大きく（145.3ppm）、生育が良い（光路長1cmのセルでの660nmの濁度が0.241）*Pseudomonas putida*を紫外線照射と *n*-ヘプタノールに接触させることで *n*-ヘプタノール耐性とした。取得した耐性株は50% *n*-ヘプタノール存在下で生育でき、5%デカリン存在下で188.0ppmのジベンゾチオフェンを分解できた。さらに耐性株は10% *n*-ヘプタノール存在下でも21.5ppmのジベンゾチオフェンを分解できた。この耐性株と感受性株の脂肪酸を比較したところ、感受性株に検出された炭素数16と18の脂肪酸に加えて、耐性株には炭素数15と17の脂肪酸を検出した。さらに耐性株には感受性株に比べてどの炭素数の脂肪酸でもトランス型不飽和脂肪酸が増加していた。脂肪酸の経時変化を調べることにより、このトランス型不飽和脂肪酸はシス型不飽和脂肪酸由来であることが示唆された。

第2章ではさまざまな炭素数（7から12）の直鎖飽和脂肪アルコールを用い、これと接触した耐性株の脂肪酸、リポ多糖、菌体表層の疎水性を調べた。10%アルコールと培養すると、炭素数が小さいアルコールと培養するほど生育は悪くなった。炭素数の小さいアルコールと培養すると遊離脂肪酸の割合が大きくなり、脂肪酸により異なるが、*n*-ドデカノール存在下では5.2 – 13.8%であったが、*n*-ヘプタノール存在下では23.5 – 80.2%となった。またリポ多糖の多糖部分O抗原を電気泳動により調べたところ、*n*-ドデカノール存在下では検出した高分子量の3本のバンドが *n*-ヘプタノール存在下では検出できなかった。遊離脂肪酸が増えると親水性であるリン酸基が減り、リポ多糖のO抗原が減ると親水性部分が減ることになる。さらに *n*-ヘキサノールと菌体溶液をよく混合し、水溶液中の濁度を測定することにより菌体表層の疎水性度を調べた。炭素数の小さいアルコールと培養すると水溶液中の濁度が減少し、菌

体表面の疎水性度が大きくなっていることが判明した。

第3章では界面活性剤、特に Triton X-100 の *n*-ヘプタノール耐性菌株の生育への影響を調べた。*n*-ヘプタノール耐性菌株に非イオン性、イオン性界面活性剤を加え、培養したところ、非イオン性界面活性剤の Triton X-100 を 0.01 % (v/v) 添加して培養したときに生育の対数増殖期に濁度の上昇が大きくなった。しかし、どの界面活性剤を加えても定常期の濁度は同じだった。また培養途中で Triton X-100 を 0.01 % (v/v) 添加して生育を調べたところ、添加時期が early log phase のときには濁度の上昇効果を検出したが、mid log phase ではこの効果を検出しなかった。Triton X-100 の添加が *n*-ヘプタノール耐性菌株の菌体表面の疎水性度を減少させたかどうか知るために疎水性度を調べたが、疎水性度の変化を検出しなかった。また Triton X-100 の添加が菌体の凝集を減少させているかどうかを調べるために、培養液を 500g で遠心して上清の濁度を調べた。Triton X-100 を添加して培養した *n*-ヘプタノール耐性菌は Triton X-100 を添加しないで培養した菌体比べて上清の濁度が大きく、凝集度が小さいことが分かった。Triton X-100 の添加による *n*-ヘプタノール耐性菌の対数増殖期における濁度の上昇は *n*-ヘプタノールの添加による菌体表面の疎水性度の上昇により凝集した菌体を Triton X-100 が分散させることによると結論づけた。

結論では *n*-ヘプタノール耐性株の菌体表層のモデルを示した。トランス型不飽和脂肪酸の増加により膜の隙間が小さくなる。また遊離脂肪酸の増加により膜の中の疎水性部分に遊離脂肪酸が結合し、隙間を埋めていく。さらにリン酸基が減少することにより、菌体表面の疎水性度が大きくなる。またリポ多糖の高分子量の親水性多糖部分が減少して疎水性度を大きくする。菌体表面は疎水性度が大きく、膜は隙間がなく、炭素数が小さいために親水性で毒性の大きい直鎖飽和脂肪アルコールの進入を排除する。

本研究では、*n*-ヘプタノール感受性菌と耐性変異株を比較し、毒性の大きい *n*-ヘプタノールと接触したときの変化を調べ、脂肪酸とリポ多糖の寄与による菌体表面の疎水性の変化が耐性に関与していることを示した。この成果は水に不溶な物質の微生物による変換を行っているさまざまな分野に大きな影響を与えると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。