

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成11年度博士課程 入学

氏名 西野智彦
指導教官名 木暮一啓

論文題目

Studies on the physiological state of marine bacteria under stressed conditions.
(ストレス条件下における海洋細菌の生理状態に関する研究)

自然環境中の微生物は常に低栄養、低温、高あるいは低 pH、活性酸素、紫外線、乾燥などのストレス下に置かれている。それらの群集の大部分は顕微鏡では存在が確認されるものの、通常の方法では培養、分離ができない。その中には今だに培養法が見つかっていないものがある一方で、本来培養できる菌でありながら、それができない生理状態 (viable but non-culturable state :VNC 状態)に陥っているものも存在している。

VNC 状態に移行する現象は海洋に存在しているビブリオ属をはじめ、大腸菌、サルモネラ属など多種多様な細菌について報告されている。また、培養可能な細菌が VNC 状態に移行した後、条件に応じて再び培養できる状態になることも報告されている。このような培養能の復帰が認められることから、VNC 状態とは微生物がストレス条件下で種を保存していくための生存戦略の現れと見ることもできる。

環境中で生きている細菌のほとんどが培養できない状態にあることから、自然環境下に存在する細菌の生理状態を知るためには、VNC 状態がどのような性質であるかを理解することが重要である。しかしながら、この生理状態には未知の部分が多い。その解析上の最大の問題点は、VNC 状態への移行時の細胞集団は、死菌体、VNC 状態の菌体、培養可能な菌体の3種類から構成される混合集団となっていることである。VNC 状態の菌を他から分取する方法がない限り、その性質を解明することはできない。

本研究ではこの問題を解決するために、まず VNC 状態の細菌集団を作り出し、菌体集団の分取を行い、それらの菌体の生理状態を明らかにすることを最終目的とした。具体的に

は *Vibrio* 科の海洋細菌を用いて低温、低栄養下での VNC 状態への移行条件の検討を行い、つぎに密度勾配法によって培養能の異なる菌体を分画する方法を確立した。さらに分画された細胞について原子間力顕微鏡を用いた形態観察を行った。

1. *Vibrio* の VNC 移行について

A. *Vibrio parahaemolyticus* の低温、低栄養下における VNC 状態への移行と昇温処理効果

VNC 状態の理解のため、モデル系として有機物無添加の人工海水中で低温下 (4°C) においた *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) を用い、VNC 状態への移行の条件検討、各種高分子の合成阻害剤の添加効果、昇温効果などの影響について調べた。全菌数は DAPI 染色後、蛍光顕微鏡下で、生菌数は 1/5 ZoBell 2216E 寒天培地にて計測した。生理活性を持つ菌数の計測法として、LIVE/DEAD *BacLight* kit (Mol. Probes) を用いた。このモデル条件下で、*V. parahaemolyticus* の生菌数は 3 日間で 2.5×10^5 CFU/mL から 4.3×10^2 CFU/mL へと減少した。この間、*BacLight* kit による菌数は 3.3×10^5 cells/mL から 7.1×10^4 cells/mL と緩やかに減少したが、全菌数は 4.0×10^5 cells/mL のままだった。3 日目の *BacLight* kit による菌数 と生菌数の間に 2 桁の差があったことから、菌は VNC 状態に移行したと判断した。この低温飢餓下に 1 日おかれた菌体を室温に一定時間戻すと、その後たとえ低温下に戻してもその後の生菌数の低下が見られなくなった。すなわち、それ以後の VNC 状態への移行が抑制された。この昇温条件は 30°C、20 分が最適であった。また、この抑制は DNA、RNA、タンパク質合成阻害剤の添加により見られなくなることで、定常期の菌体では見られないことから、VNC 状態への移行には増殖期に依存して発現する遺伝子群の発現が関与していると考えられた。

B. *Vibrio alginolyticus* の VNC 状態への移行にエネルギー獲得系がもたらす役割

前章において VNC 状態への移行には遺伝子の発現が関与していることが示唆された。実際には多くの遺伝子が VNC 状態への移行に関わっていると予想されるが、その解析例はごくわずかである。ここではエネルギー獲得系の遺伝子の関与を見るために、*V. alginolyticus* のナトリウム駆動型呼吸鎖 (以下ナトリウムポンプ) に着目した。ナトリウムポンプとは、*Vibrio* 科を始めとする海洋細菌が持つ呼吸鎖で、低栄養、弱アルカリ性でナトリウムに富む環境でのエネルギー獲得に有利と考えられている。

pH 8.5、Na⁺濃度 10mM の栄養飢餓条件下で、ナトリウムポンプ欠損の変異株 (Nap-2) と野生株 (138-2) とを比較したところ、欠損株は野生株に比べ VNC 状態へ速やかに移行した。また、欠損株は野生株に比べ、活性酸素感受性が高く、低栄養濃度下での増殖も不十分であった。これより、VNC 移行には少なくともエネルギー獲得系が関与していると考えられた。一般に細菌のエネルギー代謝には多数の遺伝子発現が関係しているため、その VNC 状態への移行には多くの道筋があるものと予想される。

2. 密度勾配遠心分離による生理状態の異なる菌体の分画

VNC 状態への移行期の細胞集団には、少なくとも死菌体、VNC 菌体、培養できる菌体が含まれる。VNC 状態の菌のみを分取して解析することはその理解に必須のステップである。そこで、*V. parahaemolyticus* を用い、密度勾配遠心分離法の検討を行った。

人工海水培地で室温（25℃）にて静地培養された菌に対し、Percoll による密度勾配遠心分離を行い、密度の差による分画を行なった。それぞれの分画について培養能、ストレス耐性を比較した。培養能は生菌数を全菌数で除することにより求めた。ストレス耐性は4℃の低温、飢餓条件下に3日置いた後の生菌数を初日の生菌数で除した値を用いた。定常期の純粋培養菌液について分画をおこなったところ、密度の異なる多くの画分が得られた。それぞれについて培養能とストレス耐性を測定したところ差が見られ、この分画法によってそれぞれの性質が異なる細胞集団に分けられることが明らかになった。一般に、密度が高い菌体集団の培養能は高かったが、ストレス耐性は低かった。逆に密度が低い菌体集団の培養能は低かったが、この中で培養可能な菌体のストレス耐性は高かった。現在得られた条件ではVNC状態の菌はまだ他の菌との混合状態にあるが、今後条件検討によってその分取は可能と判断している。今回の検討により、Percoll を用いた密度勾配遠心分離法は生理的に異なる集団を分けるための新たな手法として有用であることが明らかになった。

3. 原子間力顕微鏡（AFM: Atomic Force Microscopy）を用いた形態観察

形態は細菌の生理状態を示す最も基本的な性質である。密度の差に応じて生理状態の異なる菌体集団が分画されたことから、密度の異なる集団の形態観察を試みた。形態観察には電子顕微鏡に比べ、試料調製が容易で高倍率の画像を得ることができる AFM を用いた。AFM は微小物体の表面とプローブとの間に働く原子間力を検出し、目的物体の表面形状、サイズ、表面特性を高倍率に測定することができる。AFM がこの目的で使われた例はないため、まず方法論的な検討を行ない、次いで密度勾配法で分画した菌の観察を行った。

A. AFM の海洋細菌観察への応用

AFM の海洋細菌の観察への応用を目的として、培養細胞、天然海水の群集を用いて検討を行った。ガラス表面に付着させた菌、フィルター上に濃縮した菌についてその全体あるいは断面の形状観察、サイズ測定などを行った。フィルター表面は平滑である必要があり、検討の結果、Isopore filter が最適であった。細菌は一般に上下方向に圧縮されていた。さらに桿菌は中央が凹む形状を示した。断面の形状を確認することにより海水中の細菌と非生物体粒子とを分別することが可能で、こうした求められた細菌数は蛍光顕微鏡による測定値と一致した。これらの結果から、AFM が海洋細菌の観察に応用できることが確認された。

B. 密度の異なる細胞の形態観察

密度の差によって分画された菌体について AFM を用いた形態観察を行った。典型的な例として、Percoll による密度勾配遠心分離により分画した二つの集団について検討を行った。密度の高いフラクションには、培養能が高く、ストレス耐性が低い群集が含まれ、密度の低いフラクションには培養能が低いものの、その中で培養できる菌のストレス耐性は高い群集が含まれていた。前者を観察したところ、主に球状の菌からなっていた。一方後者には桿状の菌が多かったが、他の様々な形態の菌も含まれていた。菌の“質感”にも違いが認められたことから、培養能、ストレス耐性がそれぞれの細胞の形態と関連しているのではないかと考えられる。

本研究では VNC 状態への移行が短時間で抑制されること、さらにその抑制には遺伝子の発現が伴っていることを示した。また、これまで指摘されていなかった生命活動に必須なエネルギー獲得に関する遺伝子発現の重要性を示した。さらに、VNC 状態の細胞の解析時に問題とされていた菌体集団の不均一性の問題を解決するために、密度の差に応じた細胞分取法を確立した。この細胞分取法によって分別された細胞集団は培養能、ストレス耐性が異なっていた。また、これらの細胞集団は形態的にも異なることを AFM による観察を行って明らかにした。