

## 論文の内容の要旨

氏名：瀧原 速 仁

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：培地/アルカン二相培養系における *Rhodococcus* 属細菌細胞の局在性の制御に関する研究

### 【序論】

現在、地球温暖化、化石燃料の枯渇、さらには最近の原子力発電所の事故によるエネルギー政策の見直し等が叫ばれる中、石油代替等のエネルギー創成技術や省エネルギー型の物質生産技術の開発は、現在の日本において、早急に解決されるべき重要な課題のひとつである。ホワイトバイオテクノロジー (WB) は、省エネルギー型の物質生産技術のひとつとして期待されており、疎水性化合物の生産には水/有機溶媒での物質反応が想定されているため、宿主となる微生物は特殊な有機溶媒耐性を有することが望まれる。*Rhodococcus* 属細菌は、石油、塩素系有機溶媒などの難分解性化合物に対する高い耐性・資化能力を持つことに加え、アクリルアミドや有用酵素群、あるいは細胞外多糖 (EPS) を始めとした機能性バイオポリマーなどの生産菌であるなど多様な能力を有することが知られている。それゆえ WB の宿主菌として有用であることから、同菌の細胞と有機溶媒との相互作用を理解することは、上述した技術を支える上で重要である。

当研究室では、これまでに *Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒との相互作用に関する研究が行われており、EPS が同菌の有機溶媒耐性の上昇に深く関与していることを明らかにし、また、*R. erythropolis* PR4 株が極めて特徴的な有機溶媒耐性を有していることを見出した。すなわち、培地/アルカン二相培養系において、加えるアルカンの炭素数によって「アルカン相表面に吸着して水相/アルカン相の界面に存在する吸着型」あるいは「アルカン相内に転移して存在する転移型」の二つの局在性を示す極めて特徴的な挙動を示す微生物であることを明らかにした (図 1)。続いて各種アルカン存在下での生育を検討したところ、転移型を示すアルカン存在下での生育は吸着型を示すアルカン存在下での生育に比べて約 1,000 倍高かったことから、PR4 株は、アルカン相内の極めて含水量が少ない環境下で活発な代謝が行われていることが示唆された (図 2)。また、各種細胞表層解析によりアルカン相への転移機構を検討したところ、吸着型では、一度油滴内に転移した細胞がアルカン相/水相の界面に露呈され吸着型の局在性を示すが、転移型では、細胞表面の親油性の上昇によりアルカン相/水相の界面ギブスエネルギーが上昇したことにより細胞がアルカン相内に留まるため転移型を示すものと示唆された。上述したような PR4 株の極めて特徴的な性質は、疎水性

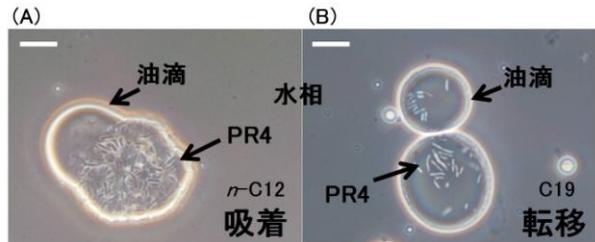


図1. 二相培養系における *R. erythropolis* PR4 株の細胞のアルカン相への局在性

(A) 完全培地に C12 を添加して培養した際の位相差顕微鏡による観察。アルカン相表面に付着している様子が観察された。

(B) 完全培地に C19 を添加して培養した際の位相差顕微鏡による観察。アルカン相内部に入り込んでいる様子が観察された。Bar: 10  $\mu$ m.

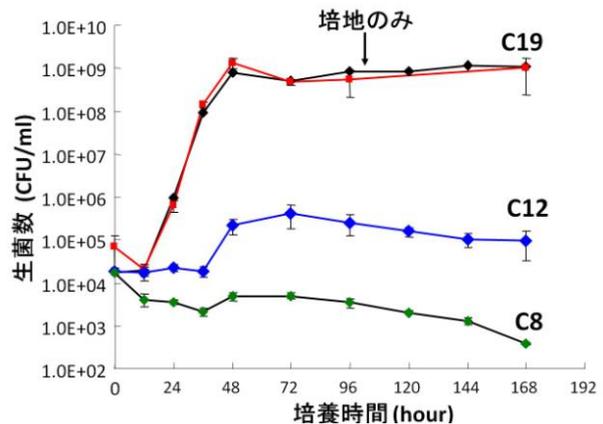


図2. PR4 株の二相培養系における生育

環境下での WB 開発のための根幹である微生物の有機溶媒中での生命活動を理解する上で格好の材料である。それ故、本研究では、PR4 株のアルカン相内での生育機構を中心に *Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性について総合的に検討した。

### 第一章 *R. erythropolis* PR4 株のアルカン相内での生育に関するタンパク質の探索

PR4 株のアルカン相内での生育に関するタンパク質を探索するため、ショットガンプロテオーム (SP) 解析を行った。転移型のアルカンとしてプリスタン (C19)、吸着型 のアルカンとして *n*-ドデカン (C12) を用い、アルカン無添加条件と共に発現プロファイルを比較検討した。その結果、合計 342 種類のタンパク質が検出され、再現性良く検出されたタンパク質はストレス応答タンパク質群などであった。この中で、転移型の細胞で特に検出量が高かったシャペロニン的一种である GroEL2 に注目して以降の解析を行った (図 3A)。各種遺伝子操作株を作製し、GroEL2 のアルカン相内での生育や局在性に与える影響を検討したところ、GroEL2 の強制発現により、野生株が吸着型を示すアルカン添加条件において、転移型に変化した (図 4)、さらにその生育は約 10-100 倍に増大した。また、野生株が生育できない *n*-オクタン (C8) 添加条件での生存率の向上が認められた。これらのことから、GroEL2 の高発現は PR4 株の有機溶媒耐性に深く関与していることが示唆された。

続いて、PR4 株の有機溶媒耐性における GroEL2 の機能を検討するため、SP 解析の結果から GroEL1、GroES および GroEL2 の検出量を検討したところ、転移型の条件で GroES の検出量が 6.3 倍上昇していた (図 3B)。GroEL が複数存在する微生物においては GroEL2 が GroES との複合体を形成しシャペロンとして機能していることが指摘されており、また GroEL/ES 複合体は 2:1 の複合体を形成していることから、転移型細胞での GroEL2:GroES の検出量から組成比を算出したところ、2:1.2 であったことから、転移型細胞では GroEL2 はシャペロンとして機能していることが予想された。一方で、GroEL が複数存在する微生物においては、通常、GroEL1 が初期のストレス応答タンパクとして考えられているが、供試した条件では、その検出量に有意差が見られなかったことから、転移型細胞では GroEL2 が初期ストレス応答タンパクとして機能していることが推測された。

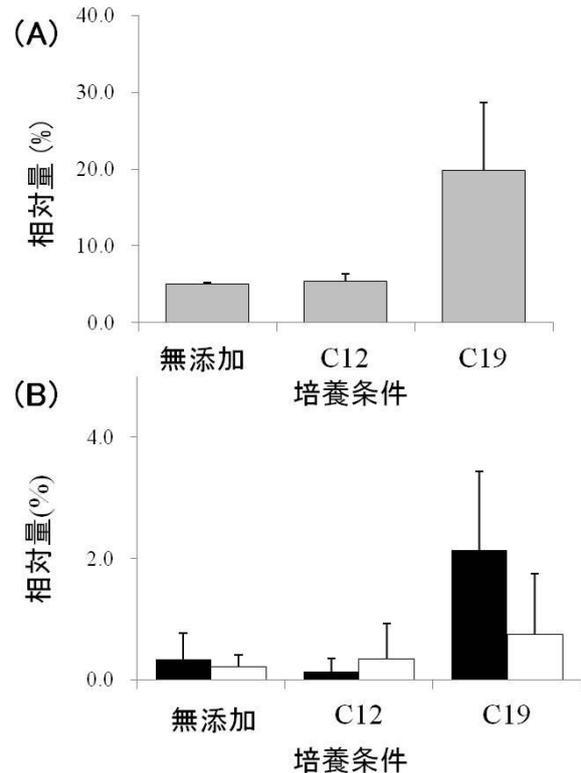


図3. ショットガンプロテオーム法によるアルカン添加条件における PR4 株の GroEL 相対量 (A) GroEL2. (B) GroES (黒), GroEL1 (白)

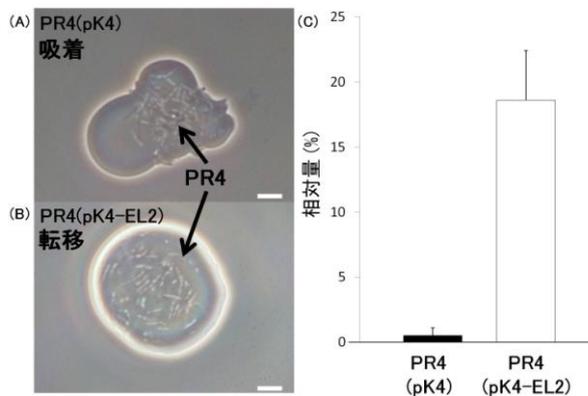


図4. PR4 株の C12 相への細胞の局在性に対する GroEL2 の影響 (A) PR4 (pK4): vector のみ導入した株. (B) PR4 (pK4-EL2) PR4 株の *groEL2* 遺伝子を強制発現させた株. (C) 形質転換体の GroEL2 相対量. 写真 Bar: 5  $\mu$ m.

## 第二章 *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性における GroEL2 の影響

第一章において、GroEL2 が有機溶媒耐性の上昇に深く関与していることが示唆されたことから、本機能が PR4 株以外の *Rhodococcus* 属細菌にも有効であるか否か、より毒性の高いアルカン存在下での生育を強化できるかを検討した。その結果、供試した中でいくつかの株において、強制発現株は野生株が生育出来ないアルカン存在下で生育できるようになった。このことから本機能は PR4 株以外の *Rhodococcus* 属細菌でも有効であることが示された。特に、*R. rhodochrous* ATCC12674 株に PR4 株由来の *groEL2* を導入した形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC12674 は、供試した他の野生株および形質転換体が生育できなかったアルカンの中でも毒性の高い C8 添加条件において、細胞がアルカン相内部に転移して存在している様子が観察された (図 5AB)。本条件下での GroEL2 の相対量を検討したところ、コントロールに比べ約 72 倍上昇していた (図 5C)。これらの結果は、*groEL2* の強制発現が *Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性を上昇させるための有用な手法であることを示唆している。

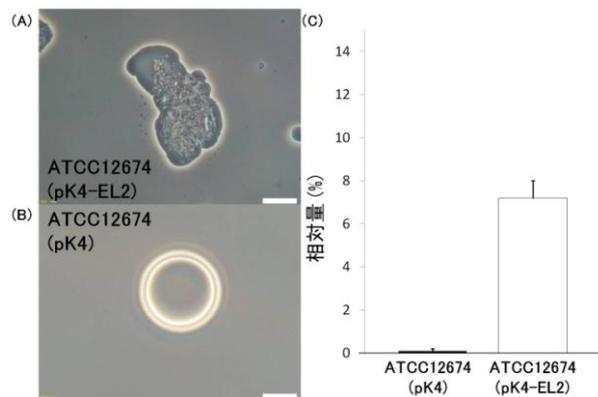


図5. *R. rhodochrous* ATCC12674株のC8への耐性とGroEL2の相対量 (A) PR4株の *groEL2* を強制発現させた形質転換体. (B) vectorのみ導入した株. (C) 形質転換体のGroEL2量. Bar: 10 μm.

## 第三章 培地成分による細胞の局在性の制御

これまでの研究で、*Rhodococcus* 属細菌では有機溶媒耐性の上昇と細胞の局在性とに深い関連があることから、細胞の局在性を別の形、すなわち培養条件のような外部因子によって制御することが可能であれば、WB の可能性をさらに広げることができると考えた。そこで本章では、培地成分の影響を、特に無機塩類に着目して検討した。その結果、無機塩培地に C12 を添加した二相培養系において、 $MgSO_4$  の初期添加量、培養期間内での添加時期を調節することにより、PR4 株の細胞の局在性を転移型から吸着型、吸着型から転移型へと制御できることを見出した。また同培養系で、一度吸着型を示した細胞に対し、アルカン相に C8、水相にグルコースを添加することで、C12 相表面に存在する細胞を一部水相側に遊離させることに成功した。以上の結果は、培地/有機溶媒の二相培養系において、培地成分の調節により細胞の局在性を自由に制御できる可能性を示しており、これらの培養制御技術は WB を効率化する上で重要であると考えられた。現在、これらの条件でのタンパク質発現プロファイルなどを検討している。

### 【総括】

1989年にトルエン耐性 *Pseudomonas* 属細菌が有機溶媒耐性菌として報告されて以来、これまでに多くの有機溶媒耐性菌の報告およびその耐性機構の推定がなされてきた。しかしながら、その多くはグラム陰性菌であり、また、その細胞の局在性は水相または界面に存在する微生物群を用いた研究によるものが主であった。

このような経緯の下、本研究では、グラム陽性菌であり、かつ極めて特徴的な有機溶媒との相互作用を示す *R. erythropolis* PR4 株を用いて有機溶媒耐性に関与するタンパク質群を検討したところ、GroEL2 の重要性を見出し、細胞の局在性との関係から細胞内での機能を考察した。その結果、転移型細胞内での GroEL2 は、初期ストレス応答タンパクとして GroES との複合体を形成し、主としてシャペロンとして機能しているものと推測され、また、各種解析からアルカンに暴露される頻度と発現上昇に関係があるものと考えら

れた。これまでにゲノム解析がなされた細菌のうち約30%が複数の *groEL* 遺伝子を有することが報告されており、複数の *groEL* 遺伝子の各種ストレス応答に対する使い分けなどが注目されている中で、本研究が示した GroEL2 の機能は、今後のより詳細な解析が必要ではあるが、現段階での疎水性の環境下で生育する微生物の理解に一石と投じるものと考えられた。

一方で、WB の効率化を目指し、本研究では、有機溶媒耐性の高度化および局在性制御の簡便化にも取り組んだ。その結果、*groEL* 遺伝子の導入が有機溶媒耐性を上昇させる手法として有用であることを見出し、また  $\text{MgSO}_4$  の濃度調節などで細胞の局在性を自由に制御できることを見出した。今後、これらの要素を組み合わせた技術開発に上述した耐性機構の理解を加えることにより、疎水性環境下で、生きた細胞を使ったバイオプロセスによる物質生産技術の発展に大きく貢献できるものと考えられた。