

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 (要約)

日本大学大学院 生物資源科学研究科

瀧原 速仁

2014

目次

序論

第一章

第二章

第三章

第四章

總括

参考文献

謝辭

要旨

図表

略号

Glc : グルコース

n-オクタン(和光純薬工業) : C8

n-ドデカン(和光純薬工業) : C12

n-ヘキサデカン(和光純薬工業) : C16

プリスタン(2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane)(ACROS) : C19

(NH₄)₂SO₄ +K₂HPO₄ 培地 : NP 培地

(NH₄)₂SO₄ +K₂HPO₄+CaCl₂+FeCl₂+NaCl₂+MgCl₂ 培地 : MM 培地

NP/C12 培養系 : NP 培地に C12 を 5% (v/v)添加した培養系

DAPI : 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

CTC : 5-Cyano-2,3-ditoly-2*H*-tetrazolium chloride

CFDA : 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate, solution

PI : Propidium iodide

序論

Rhodococcus 属細菌は、土壌や海洋に存在する高 G+C 含量のグラム陽性細菌であり石油・塩素系有機溶媒などの難分解性化合物に対する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を初めとした機能性バイオポリマーなどの生産菌であることが知られている (Bell *et al.* 1998, Whyte *et al.* 1999). それゆえ、産業的に重要な菌群として位置づけられており、低エネルギー化や環境負荷を削減できるバイオプロセスによる環境浄化・物質生産への応用が期待されており、既に *R. rhodochrous* J1 株によるアクリルアミドの生産 (Nagasawa *et al.* 1993)が行われている。

Rhodococcus 属細菌の高い溶媒耐性や高い分解機構を利用した環境浄化技術や物質生産への応用が行われているが、同菌の有機溶媒耐性機構の解明、同菌の基質への親和性の上昇などに関する研究は少ない。同菌の性質を深く理解することは上記の応用の高効率化を目指す上で重要である。中でも有機溶媒に対する耐性に関する機構の解析は重要であり、微生物にとって毒性が高い溶媒を用いることが可能であれば、より広い範囲の基質を分解することが可能となり、物質生産が可能となる範囲も広がると考えられる。

有機溶媒は生物にとって有毒なものが多く、大半の生物が生育に阻害が起こる。生育阻害の理由として、有機溶媒が細胞膜に蓄積し、膜構造を破壊することによることが示唆されている。世界初の有機溶媒耐性菌は、堀越らが発見したトルエン耐性 *Pseudomonas* 属細菌である (Horikoshi *et al.* 1989). それ以降、数多くの有機溶媒耐性菌が報告されており、耐性を持つ有機溶媒の種類も数多く報告されている。バクテリアの有機溶媒耐性機構は *Pseudomonas* 属細菌などのグラム陰性菌で多くの研究がこれまでになされており、Ramos らの研究によって 5 つの有機溶

媒耐性機構が明らかになった (Ramos *et al.* 2009). ストレス応答機構, 分解機構, 細胞表層構造の変化, リン脂質二重膜の異性化, 排出ポンプがあげられる. グラム陽性菌の有機溶媒耐性機構は, 1) σ ファクターなどのストレス応答タンパク質の発現, 2) グラム陰性菌と同様に分解酵素の発現, 3) 細胞表面特性の変化, 4) 排出ポンプの発現が知られている. 近年, オミックス解析などによって有機溶媒に曝された細胞でシャペロンの増加が確認されたが, その詳細についてはわかっていない (Ramos *et al.* 2009). このように, グラム陰性菌の有機溶媒耐性機構については多くの研究がなされているが, グラム陽性菌では炭化水素分解酵素についての研究については進んでいるが, 有機溶媒耐性機構についての研究はグラム陰性菌ほど進んでいない (Torres *et al.* 2011).

当研究室では, 上記の技術開発の一環として, *Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性と相互作用に関する研究を行ってきた. 岩淵らは *R. rhodochrous* S-2 株が高濃度石油耐性石油分解菌であることを見出し, その石油耐性に検討を加えた結果, 同菌の生産する細胞外多糖 (S-2 EPS) が長鎖アルカンなどの難揮発性有機溶媒の耐性に深く関与していることを明らかにした (Iwabuchi *et al.* 2000). さらに, *R. rhodochrous* のコロニー形態と溶媒耐性について検討したところ, EPS 生産量の少ないラフ型菌は溶媒に親和性が高く結果的に溶媒感受性であり, 一方で, EPS 生産量の多いムコイド型菌は耐性を示したことから, 同属細菌においては, コロニー形態と有機溶媒耐性に高い相関があることを明らかにした (Iwabuchi *et al.* 2000 確認).

一方で, *R. erythropolis* PR4 株の有機溶媒耐性機構に関する研究で同菌には, これまでに報告されていた EPS の生産を介した耐性機構とは別の極めて特徴的な耐性機構 (Iwabuchi *et al.* 2009) が存在することが示唆された. それは, PR4 株は添加したアルカンの炭素数によって PR4 株の細

胞との相互作用を変化させることが明らかになっている。同菌は添加したアルカンの炭素数によって細胞のアルカンへの局在性が異なるという性質を持っており、液体培地とアルカンの二相培養において、炭素数 9 以下のアルカンを液体培地に重層した場合はほぼ生育が見られず、炭素数 10~12 のアルカンでは菌体がアルカン粒子の表面に吸着して生育し、炭素数 13 以上になると菌体がアルカン粒子内に転移して生育する。この条件における PR4 株の生育は有機溶媒存在下でありながら非常に活発であり、吸着する条件と比較して約 1000 倍高く、非水系の代謝が活発であることが予想される (Iwabuchi *et. al.* 2009)。多くの炭化水素分解菌が炭化水素粒子の表面に吸着して存在していることは多数報告されているが、同菌のこのような性質は極めて特徴的な性質であることから物質生産や浄化の向上、さらにこの性質を制御することで様々な応用化への期待が持てる。

上述した背景を基に、本研究では PR4 株を中心に *Rhodococcus* 属細菌のアルカン添加条件におけるアルカン耐性機構、アルカンとの相互作用に関して分子遺伝学的手法を用いた解析と、PR4 株の性質を利用したアルカンと細胞との相互作用を制御する方法の構築を試みた。PR4 株は前述した EPS による耐性機構とは異なる耐性機構を有していることが予想されたことから、PR4 株の耐性機構を解析することで、有している耐性機構を他の *Rhodococcus* 属細菌への応用や理解を深めることに利用できると考えられる。また、耐性を検討するだけでなく、基質への親和性の向上や、親和性を調節する技術の開発は、今後の環境浄化や物質生産への効率化が期待できると考えている。

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

1-1 はじめに

これまでの研究において、PR4 株は C19 添加条件における良好な生育を示し、その際の細胞表層の親油性の上昇により、界面ギブスエネルギーの減少によって C19 相内部への転移の維持が示されている。第一章では、これらの現象に対して、細胞表層親油性を上昇させるメカニズムを解明するために、分子遺伝学的手法を用いて、これらの現象に対する裏付けをとることにした。本章では、PR4 株が転移型と吸着型で生育する条件における発現タンパク質を比較し、上記の現象に關与する代謝系や遺伝子の探索を行った。

1-2 材料

1-2-1 使用菌株

Rhodococcus erythropolis PR4 株

1-2-2 使用培地

IB 培地：ミリ Q 水 800 ml に 8 g の glucose (和光純薬工業), 8 g の yeast extract (Becton, Dickison and company), 0.16 g の $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業), 0.08 g の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業), 0.08 g の NaCl (和光純薬工業), 0.016 g の $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業), 0.4 g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (和光純薬工業)を加え, pH 7.2 に調整後, さらに 12 g の agar (和光純薬工業)加え, 121°C で 15 分間オートクレーブした.

1-2-3 使用試薬

0.5 M EDTA : EDTA \cdot 2Na (DOJINDO)を 93.05 g 加え, 10 g の NaOH (和光純薬工業)を加えた後, 3 N NaOH により pH 8.0 に調整し, オートクレーブした.

10% SDS : ミリ Q 水 500 ml に, SDS(和光純薬工業)を 14.42 g 加え溶かした. NaOH で pH 7.2 に調整し, 室温で保存した.

1 M Tris HCl : ミリ Q 水に 121.1 g の TRIZMA base (SIGMA)を溶かし, HCl (和光純薬工業)で pH 8.0 に調整した後, ミリ Q 水で 1000 ml までフィルアップした.

中性フェノール : フェノール (和光純薬工業)を 68°C の温浴に入れて, 結晶を溶かして液状にした. このフェノールに酸化防止剤として 8-ヒド

ロキシキノリン (和光純薬工業)を終濃度 0.1%になるように加えた。フェノールと 1M Tris HCl を混合, 攪拌後, 静置して二層に分離させた後, 上層を除去した。これを繰り返してフェノールを pH 8.0 に調整した。

3 M 酢酸ナトリウム : ミリ Q 水に酢酸ナトリウム (和光純薬工業)を 204.05 g を溶解し, 氷酢酸を加えて pH 5.2 に調整した。ミリ Q 水で 500 ml にフィルアップしてオートクレーブをした。

Solution I : ミリ Q 水に 1 M glucose (和光純薬工業) を 15 ml, 1M Tris HCl (pH 8.0)を 7.5 ml, 0.5M EDTA (pH 8.0)を 6 ml 加え, 300 ml にフィルアップしてオートクレーブをした。

Solution II : ミリ Q 水に NaOH を 0.4 g, SDS を 5 ml を添加し, 溶解した。

TE buffer: ミリ Q 水に 10 ml の 1M Tris HCl (pH 8.0)と 2 ml の 0.5 M EDTA (pH8.0)を加え, ミリ Q 水で 1000 ml までフィルアップした。次にこれをオートクレーブし, 常温まで放冷した。

50×TAE buffer (2 M Tris-HCl, 1M 酢酸, 50 mM EDTA) : ミリ Q 水に TRIZMA base を 242 g, 酢酸を 57.1 ml, 0.5M EDTA を 100 ml 加え, 1000 ml までフィルアップしたのち, オートクレーブをした。

1×TAE buffer : ミリ Q 水に 20 ml の 50×TAE buffer を加え, ミリ Q 水で 1000 ml までフィルアップした。

プロテナーゼ K: プロテナーゼ K (和光純薬工業) をミリ Q 水を用いて 10 mg/ml の濃度に希釈を行い、ろ過滅菌を行った。

リゾチーム溶液: Lysozyme (SIGMA) を 10 mg/ml になるように Solution I に溶解して調製した。

10 mM スクロース: スクロース (和光純薬工業) 1.71 g を 500 ml のミリ Q 水に溶解したものをオートクレーブした。

カナマイシン: カナマイシン硫酸塩 (和光純薬工業) をミリ Q 水を用いて 100 mg/ml の濃度に希釈を行い、ろ過滅菌を行った。

アンピシリン: アンピシリン硫酸塩 (和光純薬工業) をミリ Q 水を用いて 100 mg/ml の濃度に希釈を行い、ろ過滅菌を行った。

SYBR Green I: SYBR Green 試薬 (Takara) を 20 ml を 200 ml の TAE buffer で希釈して使用した。

20% SDS: SDS (和光純薬工業) 1 g を 4 ml のミリ Q 水に溶解した。

Sample buffer: ミリ Q 水を 3.38 ml, 0.5 M Tris-HCl(pH 6.8) を 1.25 ml, Glycerol (和光純薬工業) を 2.5 ml, 20% SDS を 1.9 ml, β -Mercaptoethanol (SIGMA) を 0.47 ml 添加した。

50 mM Tris-HCl (pH 8.0): 30 ml のミリ Q 水に 0.3 g の Tris Base を溶解した。12 N HCl で pH 調整後、50 ml にフィルアップした。

Working Reagent (PIERCE) : 使用直前に Kit の A 液と B 液を 50 : 1 になるように調整した.

Denaturing buffer (0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl) : 0.045 g の SDS を 45 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)に溶解した.

10×Running buffer : ミリ Q 水 500 ml に Tris base を 15.15 g, Glycine (和光純薬工業)を 72 g, SDS を 5 g を添加し溶解した.

1×Running buffer: ミリ Q 水に 100 ml の 10×Running buffer を添加し, 1000 ml にフィルアップした.

1% Bromophenol Blue : ミリ Q 水 4950 μ l に Bromophenol Blue (和光純薬工業) 50 mg を溶解した.

2×Sample Buffer (泳動用) : ミリ Q 水 2.725 ml に 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)1.25 ml と Glycerol 2.5 ml のと, β -Mercaptoethanol 0.05 ml と, 1% Bromophenol Blue 0.1 ml と, 20% SDS 0.95 ml を混合した.

固定液 : Methanol (和光純薬工業) 50 ml と酢酸 (和光純薬工業) 5 ml をミリ Q 水 45 ml に溶解した.

洗浄液 : Methanol 50 ml をミリ Q 水 50 ml に溶解した

停止液 : 酢酸 5 ml をミリ Q 水 95 ml に溶解した.

増感液：チオ硫酸ナトリウム (和光純薬工業)10 mg をミリ Q 水 50 ml に溶解した.

硝酸銀液：硝酸銀 (SIGMA)50 mg をミリ Q 水 50 ml に溶解した.

現像液：炭酸ナトリウム (和光純薬工業)1 g をミリ Q 水 50 ml に溶解させた. 使用直前にホルマリン (和光純薬工業)を 50 μ l 添加した.

30 mM フェリシアン化カリウム：ミリ Q 水 50 ml にフェリシアン化カリウム (和光純薬工業) 494 mg を溶解した.

100 mM チオ硫酸ナトリウム：ミリ Q 水 50 ml にチオ硫酸ナトリウム 791 mg を溶解した.

1 M 重炭酸アンモニウム：ミリ Q 水 50 ml に重炭酸アンモニウム 3.95 g を溶解した.

1 M DTT：ミリ Q 水 5 ml にジチオスレイトール (和光純薬工業) 771 mg を溶解した.

トリプシン溶液(ストック)：修飾トリプシン (Promega) 20 μ g を添付の Buffer(50 mM 酢酸) 200 μ l に溶解した.

脱色液：30 mM フェリシアン化カリウム 2 ml と 100 mM チオ硫酸ナトリウム 2 ml を使用直前に混合した.

還元液：ミリ Q 水 4342.5 μ l に 1 M DTT 45 μ l と 1 M 重炭酸アンモニウム 112.5 μ l を溶解した。

洗浄用 buffer：ミリ Q 水 13.5 ml に 1 M 重炭酸アンモニウム 337.5 μ l を溶解した。

アルキル化液：ミリ Q 水 4 ml にヨードアセトアミド (和光純薬工業) 40 mg を溶解した。

脱水液：ミリ Q 水 8550 μ l にアセトニトリル (和光純薬工業) 9 ml と 1 M 重炭酸アンモニウム 450 μ l を溶解した。

トリプシン溶液：トリプシン溶液(ストック) 100 μ l を 50 mM 重炭酸アンモニウム 900 μ l に溶解した。

10% TFA：ミリ Q 水 9 ml に TFA (和光純薬工業) 1 ml を混合した。

抽出液：アセトニトリル 3 ml と 10% TFA 3 ml を混合した。

0.1% ギ酸：ミリ Q 水 1000 ml にギ酸 (和光純薬工業) 1 ml を溶解した。

10×Transfer buffer：ミリ Q 水に Tris (和光純薬工業) 15 g, glycine (和光純薬工業) 75 g を溶解し、500 ml にフィルアップした。

1×Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine pH 8.3, 20% MeOH)：ミ

リ Q 水に 10×Transfer buffer 100 ml にメタノール (和光純薬工業) 200 ml を加え, 1000 ml にフィルアップした.

PBS : ミリ Q 水に NaCl (和光純薬工業) を 8.0 g, KCl (和光純薬工業) を 0.2 g, Na₂HPO₄ (和光純薬工業) を 1.44 g, KH₂PO₄ (和光純薬工業) を 0.24 g を溶解し, pH 7.2 に調製し, 1000 ml にフィルアップした.

1-2-4 使用炭化水素

n-ヘキサン : C6 (和光純薬工業)
n-ヘプタン : C7 (和光純薬工業)
n-オクタン : C8 (和光純薬工業)
n-ノナン : C9 (和光純薬工業)
n-デカン : C10 (和光純薬工業)
n-ウンデカン : C11 (和光純薬工業)
n-ドデカン : C12 (和光純薬工業)
n-トリデカン : C13 (和光純薬工業)
n-テトラデカン : C14 (和光純薬工業)
n-ペンタデカン : C15 (和光純薬工業)
n-ヘキサデカン : C16 (和光純薬工業)
n-ヘプタデカン : C17 (ACROSS)
プリスタン : C19 (ACROSS)

1-2-5 使用プライマー nt

GroEL2-F1 (24 nt) : 5'-ATG GCA AAG ATC ATC GCG TTC GAC-3'

GroEL2-R1 (33 nt) : 5'-TCA GAA GTC CAT GCC GCC CAT GCC GCC GGT CGG-3'

366-F11 (23 nt) : 5'-AAC GGA CAG TTC TGC ATC GCG GG-3'

366-F13 (25 nt) : 5'-AGA AGG TCA TCC AGT CCG GCA AGC C-3'

366aat-1R (24 nt) : 5'-AGC TGC CTG GAG AAG TGC AAC GCC-3'

1-3 操作方法

1-3-1 培養条件，局在性の確認

IB 寒天培地上に保存していた *Rhodococcus* 属細菌の菌体を IB 液体培地 5 ml に植菌し，110 rpm，28°C で 2 日間振盪培養し，定常期まで培養した．この培養液をミリ Q 水で菌体洗浄を行い，同量の滅菌水に置換した．二相培養系は，アルカンを終濃度 5% (v/v) になるように調節して添加し，初期菌数が 10^5 cfu/ml になるように調節し，110 rpm，28°C で培養した．

細胞の局在性は，培養液の有機層と水層を懸濁して 8 μ l をプレパラート (IWAKI) に滴下し，カバーガラス (IWAKI) をのせたものをサンプルとした．位相差顕微鏡 (OLYMPUS DP72) のステージにサンプルを乗せ，スライドガラスにイマージョンオイルを一滴垂らした．対物レンズの倍率を 100 倍にして観察した．

1-3-2 遺伝子操作関連

1-3-3-1 *Rhodococcus* 属細菌からの total DNA 抽出

Rhodococcus 属細菌を IB 寒天培地に塗沫植菌し，30°C で 4~5 日間培養した．S-2 株は 37°C で培養した．菌体を回収し，菌体湿重量 1 g 当たり 5 ml の TE バッファーに懸濁した．この細胞懸濁液に終濃度 4 mg/ml になるようにリゾチームを加え，30°C で菌体に粘度が出るまで反応させた．この溶液に 0.5 M EDTA 溶液 (終濃度 0.1 M)，とプロテナーゼ K (終濃度 50 μ g/ml) を加え，30°C で 10 分間培養した．その後，この溶液に 10%

SDS 溶液を終濃度 1%になるように加え、すぐに転倒攪拌して 37°C で反応させた。次に、等量の Tris-HCl で飽和させた中性フェノール溶液 (pH 8.0) を加え、5 分間ゆっくり転倒攪拌した後、12,000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し、先端を切ったチップを用いて上層をゆっくり吸い上げ、新しい容器に移した。この操作は白い中間層がなくなるまで繰り返し行った。中間層がなくなった後、サンプルと等量のクロロホルム溶液を加え、5 分間ゆっくり転倒攪拌した後、15,000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し、先端を切ったチップを用いて上層をゆっくり吸い上げ、新しい容器に移した。この溶液に RNase A (和光純薬工業) を終濃度 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、37°C で 1 時間反応させた。RNase 処理後の溶液は前述のようにフェノール、クロロホルムで処理し、この溶液に、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液と等量のイソプロパノール溶液を加え、ゆっくり混合した後、サンプル溶液を 15,000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し上清を除去して白い沈殿を回収した。この沈殿に適当量の 70% 冷エタノールを加え、洗浄した後、12,000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し上清を除去して白い沈殿を回収した。この沈殿の入った容器を逆さまにすることで風乾し、適当量の TE バッファーに溶解した。

1-3-3-2 PCR 反応

PCR 反応には Takara EX Taq を用いた。PCR 用チューブに total DNA を 1 μl , dNTP を 4 μl , buffer を 5 μl , EX taq を 0.5 μl , Forward Primer, Reverse Primer をそれぞれ終濃度が 0.5 μM になるように調製して添加し、総量が 50 μl になるように滅菌ミリ Q 水を加えたものを反応液とした。PCR 反応はホットスタートで行い、95°C 10 min, (95°C 1 min→70°C 1 min→72°C 2 min)×30, 72°C 10 min で行った。

1-3-3-3 シークエンス反応

クローニングした DNA を 1.5 ml エッペンチューブに 10 μ l 加え, 100°C で 10 分間恒温した. 次に滅菌ミリ Q 水を 9.8 μ l, buffer を 3 μ l, プライマーを 3.2 μ l, Big Dye を 2 μ l 加え, DNA を 2 μ l 加えた. シークエンス反応は(96°C 30sec→50°C 15sec→60°C 4min)×24 の条件で行った. 反応後のサンプルに 125 mM EDTA を 5 μ l と 99.5% エタノールを 60 μ l 加え軽く攪拌し, 室温で 15 分間置いた. その後 15,000 rpm, 20 分間, 4°C で遠心分離した. 沈殿に 70% エタノールを 60 μ l 加え 15,000 rpm, 10 分間, 4°C で遠心分離した. 沈殿を 60°C で乾固し, 遮光し-20°C で保存した.

1-3-3-4 シークエンス解析

シークエンス解析は日本大学生物資源科学部総合研究所の ABI Prism model 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems)で行った. 得られた DNA 配列の相同性検索はインターネットで, National Center for Biotechnology Information(NCBI)内の BLAST program を使用した.

1-3-4 *Rhodococcus* 属細菌の形質転換

1-3-1 と同様に PR4 株を培養し, この培養液をよく攪拌し, 同じ条件の IB 液体培地 5 ml に植菌し, 110 rpm, 28°C で 18-20 時間振盪培養した. 培養液を 8,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離し, 上清を取り除き氷冷済み 10 mM スクロース溶液で懸濁し, 8,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離する操作を二回繰り返す, 菌体を十分に洗浄した. 菌体を氷冷 10 mM スクロース溶液 40 μ l で懸濁し, DNA サンプル 10 μ l を加え 5 分間氷上に放置した. 菌液と DNA の混合液を氷冷済みのキュベットに移し替え, Gene Pulser (BIO-RAD)を用いて電圧 1.50 kV, 抵抗値 400 Ω , 電気容量 25 μ FD の条件で 1~2 秒間, パルスをかけた. 混合液に IB 液体培地を加えて全

量を 1 ml にした. 110 rpm, 28°C で 2 時間振盪培養し, 全量を IB 寒天培地抗生物質入り (Km : 100 µg/ml) に塗抹植菌して 30°C で培養を行った.

1-3-5 ショットガンプロテオーム

1-3-5-1 菌体からのタンパク質抽出

アルカン無添加条件, C12 添加条件, C19 添加条件で振盪培養を 2 日間行った培養液を 10,000 rpm, 4°C, 10 min で遠心分離した. 上清を除去し, 菌体湿重量を測定した. 湿重量 100 mg あたり, sample buffer を 30 ml 以上入れ, 懸濁した. サンプルを 100°C で 18 min 煮沸した. 煮沸後懸濁をし, 同条件で煮沸した. サンプルを 12,000 rpm, 室温, 15 min で遠心分離した. 上清を回収し, Compat able protein assay kit (PIERCE) 1 液を 5 倍量 (1:5 の割合) 添加し, ボルテックスで混合後, 室温で 5 min 静置した. Compat able protein assay kit 2 液を 1 と同量添加し, 混合した. サンプルを 10,000 rpm, 4°C, 15 min で遠心分離した. 上清を除去後, Compat able protein assay kit 1 から繰り返した. ミリ Q 水を 100 µl 添加し懸濁後, アセトンを 400 µl 重層した. サンプルを -20°C で一晩放置した. サンプルを 10,000 rpm, 4°C, 10 min で遠心分離した. 上清を除去後, エバポレーターで 5 min, 37°C でアセトンを完全に除去した. Denaturing buffer を 100 µl 添加し懸濁した. 超音波洗浄機で sonication 30 sec, 冷却 30 sec を 8~10 セット行った. サンプルを 10,000 rpm, 4°C, 10 min で遠心分離し, 上清を回収した. サンプルは -20°C で保存した. 希釈系列を作製し, 96 ウェルプレートにて 3 連で添加し, working Reagent を 200 µl 添加して 37°C で 30 min インキュベートした. O.D.570 nm を測定してタンパク質濃度を算出した.

1-3-5-2 SDS-PAGE

抽出したサンプルを 10 μg になるように 2×Sample buffer で希釈し、混合、フラッシュ後、95°C で 5 min 反応させた。泳動装置類を洗剤で洗い、新鮮なミリ Q 水でリンスした。1×Running Buffer を用意し、ゲルを挟み、泳動槽にセットした。内側から Running Buffer を加え、内側の液量の方を多くした。泳動槽の泡をできるだけ除き、コームを抜き、smiling 防止用に 1×Sample Buffer をゲルの端にアプライした。マーカースとサンプル同士を並ばないようにアプライし、60 V で泳動した。約 3 hour 後に泳動を止め、ゲルを取り出し、タッパーに新鮮なミリ Q 水と共にに入れて 4°C で保存した。

1-3-5-3 銀染色

この作業は遮光しながら行った。ゲルが入ったタッパーの水を捨て、ゲルが軽く浸る程度の固定液を加え 40 min 振盪した。固定液を捨て、洗浄液を加え、10 min 振盪した。洗浄液を捨て、ミリ Q 水を加え、10 min 振盪した。ミリ Q 水を捨て、増感液を加え、1 min 振盪した。増感液を捨て、ミリ Q 水を加え、1 min 振盪した。これを 3 回繰り返した。ミリ Q 水を捨て、硝酸銀液を加え、20 min 振盪した。硝酸銀液を捨て、ミリ Q 水を加え、1 min 振盪した。これを 3 回繰り返した。ミリ Q 水を捨て、現像液を加え、約 3 min 振盪し、マーカースのバンドが見えるまで振盪した。現像液を捨て、停止液を加え、10 min 振盪した。停止液を捨て、ミリ Q 水を加え、5 min 振盪した。これを 3 回繰り返した。ミリ Q 水を捨て、新しいミリ Q 水に浸した。ゲルを OHP フィルムに挟み、スキャナーに取り込んだ。

1-3-5-4 ゲル内消化およびゲルからのペプチド抽出

あらかじめゲルのレーンを約 6 mm 間隔で 10 等分したものを縦横でバ

ラバラに切断し，サンプルチューブに詰めた．以降の作業は遮光で行った．脱色液を 100 μ l 加え室温，1,300 rpm，10 min 振盪した．脱色液を除去後，ミリ Q を 500 μ l 加え，室温，1300 rpm，15 min 振盪した．この作業を計 3 回行った．ミリ Q 水を除去後，アセトニトリルを 100 μ l 加え，室温，1,300 rpm，5 min 振盪した．アセトニトリルを除去後，エバポレーターで 15 min 遠心し，アセトニトリルを除去した．還元液を 100 μ l 加え，室温，1,300 rpm，5 min 振盪した．その後 56°C で 60 min 反応させた．還元液を除去後，洗浄用 buffer を 100 μ l 加え，室温，1,300 rpm，10 min 振盪した．アルキル化液を 100 μ l 加え，室温，1,300 rpm，45 min 振盪した．洗浄用 buffer とアルキル化液を除去後，洗浄用 buffer を 100 μ l 加え，室温，1,300 rpm，10 min 振盪した．脱水液を 200 μ l 加え，室温，1,300 rpm，10 min 振盪した．洗浄用 buffer と脱水液を除去後，この作業を繰り返した．脱水液を除去後，エバポレーターで脱水液を完全に除去した．トリプシン溶液を 30 μ l 加え，30 min 氷中に放置した．余ったトリプシン溶液を除去し，37°C で一晩インキュベートした．抽出液を 50 μ l 加え，室温，1,300 rpm，30 min 振盪した．フラッシングして液を回収した．抽出液を 25 μ l 加え，室温，1,300 rpm，30 min 振盪した．フラッシングして液を回収した．サンプルを -20°C で保存した．

1-3-5-5 LC-MS/MS 解析

サンプル中の溶液をエバポレーターで完全に除去し，0.1% ギ酸を 13 μ l 加えた．サンプルをボルテックス，フラッシングし，4°C，15,000 rpm，10 min 遠心した．上清 12 μ l を新しいサンプルチューブに移し，氷中保存した．このサンプルを LC-MS/MS にかけるサンプルとした．LC-MS/MS は nano LC-ESI-MS/MS system LCQ Deca XP ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher) を用いて行った．

1-3-6 代謝系解析

PR4 株のゲノム情報とオーソロググループに基づく KEGG Orthology (KO)の機能カテゴリから、検出された遺伝子を機能分類し、それぞれの代謝系ごとに分類した。

1-3-7 Western blotting

メンブラン (GE ヘルスケア)をメタノールに浸し、湿潤させ、ミリ Q 水で 1-3 min 浸し、メタノールを除去した。Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine pH 8.3, 5% MeOH)に 2-3 min 浸した。SDS-PAGE したゲルを Transfer buffer に軽く浸し、Transfer 泳動槽にろ紙を置き、その上にゲルを乗せ、気泡が入らない様にメンブランを上に乗せ、その上にろ紙を乗せてセットした。電極をセットし、重しを乗せて、 0.8 mA/cm^2 の条件で 1 hour 泳動した。Transfer 後、ミリ Q 水にメンブランを浸した後、ブロックエース (DS ファーマメディカル：雪印乳業製造)で浸し、ブロッキングを室温で振盪を 1 hour 行った。一次抗体 (PBS を 30 ml, 抗体 $6 \mu\text{l}$ -1/5000)を室温で 1-2 hour 反応させた。PBS で 5 min 洗浄を 3 回繰り返した。二次抗体を(PBS を 30 ml, Alkaline phosphatase を $30 \mu\text{l}$)を室温で 1-2 hour 反応させた。ミリ Q 水で 1 min 洗浄し、500 mM Tris pH 9.5 と 50 mM MgSO_4 の混合液で 1 min 洗浄した。メンブランを NBT/BCIP Tablet (Roche)を 10 ml のミリ Q 水に溶かした発色液に漬けて発色させた。遮光で、発色を見ながら行いミリ Q 水で停止させた。メンブランを乾燥後、遮光保存した。

1-3-8 MTIL 法による親油性試験

アルカン添加条件で培養した培養液から遠心分離で菌体を回収し、この菌体

に C16 を少しずつ加え、菌体がペースト状になるように十分に懸濁し、最終的に濁度 (A_{660}) が 0.4~0.8 になるように調整した懸濁液を作製した。この懸濁液の OD 値を測定し、 A_0 とした。この操作では、イオン液体として N-Methyl-N-propylpiperidinium bis (trifluoromethanesulfonyl) imide [略称 : PP13 TFSI]を用いた。イオン液体を 800 μ l ずつ加えた試験管に菌懸濁液 800 μ l 静かに加え、ボルテックスを用いて攪拌し、C16 相とイオン液体相が完全に分離したのを確認した後に、10 秒後、20 秒後、30 秒後、40 秒後、50 秒後、60 秒後の C16 相の濁度を測定し、この値を A とした。親油性は以下の計算式で求めた。

$$\text{計算式} \quad \text{MTIL} = \text{Log}(A/A_0 \times 100)$$

求められた 0 秒から 10 秒までの値の一次関数の傾きを、初期濁度の減少率とし、 R_0 とした。

1-4 結果

1-4-1 ショットガンプロテオーム法による *R. erythropolis* PR4 株のアルカン添加培養系の発現タンパク質の網羅的解析

PR4 株が添加したアルカンに対し，転移型で生育するためには細胞表層の親油性の上昇が必要となる．そこで，細胞表層親油性を向上させる代謝系に関連する遺伝子の探索を試みた．PR4 株は全ゲノム配列が決定されているため，ペプチドシーケンス法で得られたペプチドの質量値をゲノム情報のアミノ酸データからタンパク質を同定するショットガンプロテオーム法を用いることによって，転移型と吸着型で発現しているタンパク質を網羅的に解析し，量と種類の差を検討した．転移型の代表としてプリスタン(C19)，吸着型の代表として *n*-ドデカン(C12)を添加して培養した細胞を回収し，タンパク質を抽出，LC-MS/MS による解析による発現プロファイル調べた．

独立 3 回以上行った結果から，平均して 100 から 200 種類のタンパク質が検出された (Table X)．しかし，検出されたタンパク質群を比較したが，検出されたタンパク質の種類は検討ごとに異なっていたため，個々の遺伝子や代謝系に絞ることができなかった．そのため得られた発現プロファイルから，検出されたタンパク質から，再現性良く検出され，検出されたタンパク質の中でも 10%以上と高く検出されたシャペロンである GroEL2 に着目して比較を行うことにした．

GroEL2 は供試した実験全てにおいて高く検出され，特にプリスタン添加条件において最も高く検出された．この際の GroEL2 量の平均は 19.8%であり，常に他のタンパク質より高く検出されていた．アルカン無添加条件，C12 添加条件と比較して検出量が多かったことから，C19 相へ転移して生育した細胞において，GroEL2 量は上昇することが考えられた．GroEL2 のホモログである GroEL1，コシャペロンである GroES

についても GroEL2 と同様に 3 条件で比較した。C19 添加条件において GroEL1, GroES とともに他の 2 条件と比較して多く検出されていた。しかし、GroEL2 と比較すると少なく検出されていた (Fig. X)。

GroEL2 量の比較は western blotting 法を用いても比較した。その結果、C12 添加条件では約 1.7 倍、C19 添加条件では約 4.5 倍増加していた。この結果は上記の結果と一致した。これらのことから C19 相へ転移して生育した PR4 株の細胞で最も高く検出された GroEL2 に着目して以下の検討を行った。

1-4-3 *R. erythropolis* PR4 由来の *groEL2* 遺伝子のクローニングと形質転換体の作製

PR4 株の C19 相への転移の維持が、GroEL2 量の上昇の影響かどうかを検討するために、PR4 株のゲノムからの *groEL2* の脱落株の作製を試みた。しかし、*groEL2* は必須遺伝子である可能性があり、結果として脱落株は得られなかった。次に、*groEL2* 遺伝子強制発現株の作製を試みた。PR4 株の完全な CDS をクローニングし、大腸菌-*Rhodococcus* シャトルベクターである pK4 (Hashimoto *et. al.* 1992) に挿入したプラスミド、pK4-EL2-PR4 と、そのプラスミドの *groEL2* 領域の中央部を制限酵素で脱落させたプラスミド、pK4- Δ EL2-PR4 の二つのプラスミドを作製した。エレクトロポレーション法を用いて PR4 株に導入し、形質転換体を作製した。親株と得られた形質転換体、PR4 (pK4)、PR4 (pK4-EL2-PR4)、PR4 (pK4- Δ EL2-PR4) の 4 株を C12 添加条件で培養し、GroEL2 量を 1-3-1 と同様の方法で検討した。その結果、最も高く GroEL2 量が検出された株は PR4 (pK4-EL2-PR4) であり、GroEL2 量は 18.6% だった (Table X)。この GroEL2 量は親株の C19 添加条件の GroEL2 量に匹敵していた。また同培養条件の PR4 (pK4)、PR4 (pK4- Δ EL2-PR4) の GroEL2 量は同程度で

あった (Table X). このことから pK4-EL2-PR4 の導入により, GroEL2 過剰発現が行われたと考えられた.

1-4-4 *R. erythropolis* PR4 株の強制発現株のアルカン耐性と, アルカン相への細胞の局在性の確認

1-4-3 で得られた形質転換体を用いて, C12 添加条件における GroEL2 過剰発現が PR4 株の細胞の局在性に影響を与えるかどうかを検討した. その結果, 親株が吸着型で生育する C12 添加条件において, PR4 (pK4-EL2-PR4)は C12 相内部で生育している様子が観察され, 細胞の局在性が転移型に変化して生育していた (Fig. X), 他の 3 株は C12 相表面に吸着している様子が観察された (Fig. X). このことから C12 添加条件において, GroEL2 の過剰発現により細胞の局在性の変化がし, 吸着型の生育から転移型の生育に変化したことが示された.

1-4-5 GroEL2 強制発現株の二相培養系におけるアルカン耐性の検討

GroEL2 の過剰発現による細胞の局在性の変化が C12 添加条件に特有であるかどうかを検討するために, 異なる炭素数のアルカンを用いて検討した. その結果, PR4 (pK4-EL2-PR4)の細胞の局在性は親株と異なることが示され (Fig. X), 特に, 転移型を示すアルカンの閾値が変化し, より短い炭素数のアルカンでも転移型で生育している様子が観察され, C10 以上の炭素数のアルカンにおいて転移型を示した (Fig. X). また, より炭素数の短いアルカンにおいて耐性が見られ, C8 添加条件において吸着型で存在している様子が観察された (Fig. X). 一方, 他の 3 株は親株と同様の耐性, 細胞の局在性を示した.

1-4-6 GroEL2 過剰発現株の IB/C12 二相培養系におけるコロニー数測定

GroEL2 の過剰発現，細胞の局在性，アルカン添加条件における生育の関連性を調べるために，PR4 (pK4-EL2-PR4)，PR4 (pK4- Δ EL2-PR4)の C12 添加条件におけるコロニー数を測定した．初期菌数を 10^4 cfu/ml に調節し培養を行い，コロニー数を計時的に測定した．親株を C12 添加条件で培養した際， 10^5 cfu/ml のコロニー数を示すが，PR4 (pK4-EL2-PR4) は培養開始 72 時間後に 10^7 cfu/ml まで増殖した (Fig. X)．一方，PR4 (pK4- Δ EL2-PR4) は親株と同等の生育を示した．このことから GroEL2 の過剰発現は C12 添加条件における生育を向上させたことが示唆された．また，GroEL2 の過剰発現によるアルカン添加条件における生育向上の影響が C12 添加条件に限定されるかどうかを検討するために，C8 添加条件におけるコロニー数を測定した．初期菌数を 10^4 cfu/ml に調節し培養を行い，そのコロニー数を計時的に測定した結果，PR4 (pK4-EL2-PR4) は 96 h まで約 10^4 cfu/ml のコロニー数を維持していた (Fig. X)．一方，PR4 (pK4- Δ EL2-PR4) は徐々にコロニー数が減少し，96 h において約 10^3 cfu/ml まで減少した．このことから C8 添加条件における生存率の向上が起こることが示唆された．

1-4-7 *R. erythropolis* PR4 株の強制発現株の細胞表層の親油性

これまでに PR4 株がアルカン相内部に転移して生育する際に，細胞表層の親油性の上昇が重要であることが示されている．岩淵らの研究により PR4 株の親油性を解析する手法としてイオン液体を用いた MTIL 法が構築された．この手法を用いることで従来の MATH 法では検討ができなかった，より高い細胞表面の親油性を測定することが可能となった．PR4 株の各形質転換体を C12 添加条件で培養を行い，それらの細胞表面の親油性を MTIL 法にて測定した．その結果，PR4 (pK4-EL2-PR4) は PR4 (pK4- Δ EL2-PR4) よりも MTIL 値が低く，C16 相からイオン液体相への移行が

ほとんど見られなかった。最終濁度が同じでも、イオン液体を添加した直後の濁度の減少率が異なれば親油性も異なるため、詳細な親油性の測定のために初期濁度減少率(R_0)も求めた。C12 添加条件における PR4 (pK4-EL2-PR4)の R_0 は 0.0 min^{-1} であり、これは C16 相からの移動がほとんどみられないことを示す。一方、PR4 (pK4- Δ EL2-PR4)は親株のと同等であった。このことから PR4 (pK4-EL2-PR4)の細胞表層の親油性は、他の株より高いことが示唆され、アルカン相に転移して生育するのに十分な親油性であったことから、GroEL2 量の上昇が C12 添加条件における細胞表層の親油性を上昇させたことが考えられた。

1-5 考察

第一章ではアルカンとの特殊な相互作用を有する *R. erythropolis* PR4 株の培地/アルカン二相培養系におけるアルカンへの細胞の局在性や耐性に対する GroEL2 の影響を中心に検討を行った。その結果、C19 に転移して生育した細胞は GroEL2 が高く発現していることが示唆された。ベクターを用いた GroEL2 の強制発現により、細胞表面の親油性が上昇し、C12 相への転移の維持、その際の生育の向上がみられた。さらに、生育できるアルカンの炭素数が C10 から C8 へとより短い炭素数のアルカンへの耐性の向上が見られた。PR4 株がアルカン添加条件で良好な生育を示す C19 添加条件を例にした場合、GroEL2 量の上昇、細胞表面の親油性の上昇、転移型の生育、およびその際の生育の向上が見られた。GroEL2 の強制発現の結果、上記のことが示されたことから、PR4 株の GroEL2 の過剰発現はアルカン耐性に正の影響を与えていることが示唆された。

GroEL は Hsp60 のファミリーであり、ストレス応答タンパク質として知られている (Ref)。また、グラム陽性、高 G+C 含量のバクテリアのグループでは、複数の GroEL を有しており、このグループではコシャペロンである GroES と配列上オペロンを形成している GroEL1 と、離れて存在している GroEL2 と呼称されている (Kong *et. al.* 1993)。Lund らによって、約 30% のバクテリアが 2 つ以上のシャペロニンを有していることが報告されている (Lund *et. al.* 2009)。GroEL2 はハウスキーピング遺伝子であると予想されており、一方 GroEL1 は初期ストレス応答シャペロンとして発現しており、非必須遺伝子であると予想されている (Ojha *et. al.* 2005)。

C19 相へ転移して生育した細胞の GroEL2 量は GroEL1 よりも著しく多く検出された。これまでの結果から、転移型で生育する細胞は、自由エ

エネルギーが正のため、一度入った細胞が界面に戻ることができなくなることが示唆されている。C19 相へ転移して生育した細胞は常に C19 で覆われている状態であり、アルカンストレスは吸着して生育した細胞よりも多くなることが考えられた。そのため、転移型で生育した細胞では、より効果的なストレス応答システムが必要であることが予想された。GroEL2 の発現上昇が細胞全体の強化を行い、アルカン相内部に留まって生育することができたと考えられた。対照的に C12 添加条件で吸着型で生育した細胞は、転移型で生育した細胞よりも C12 に接触する頻度は少なくなる。そのため、GroEL2 量が転移型の細胞よりも低かったことが考えられた。これらのことから、GroEL2 の発現とアルカンとの接触に関連性があることが予想され、アルカンへの露出が GroEL2 の発現上昇の誘発につながるということが考えられた。

有機溶媒の毒性は、細胞膜へ浸透することによる膜構造の破壊と、細胞内に侵入した溶媒がタンパク質に接触することによる変性が主に挙げられる。グラム陰性細菌では、有機溶媒存在下においてタンパク質のリフォールディングに関わるタンパク質の発現上昇が報告されている (Ramos *et. al.* 2009)。しかし、複数の GroEL を有するストレス応答に対する使い分けに関する機構は完全に解明されてはいない。大腸菌において、GroEL-GroES 複合体は十四量体を形成して機能し、GroEL と GroES は 1:0.5 であることがわかっている (Braig *et. al.* 1994, Mayhew *et. al.* 1996)。検出量と分子量から、C19 添加条件における GroEL2 と GroES のモル比率を算出した結果 1:0.6 であった。このことから、大腸菌と同様に C19 添加条件においてタンパク質のリフォールディングに関わっていることが予想された。

本研究における発現タンパク質の解析はショットガンプロテオーム法を用いた。この手法により、GroEL1 と GroEL2 の量を明確に比較する

ことができ、GroEL2 が転移型の細胞で上昇することを示した。また、分子量が小さい GroES などのタンパク質も検出ができたことから、分子レベルの網羅的解析に威力を発揮することが示唆された。

微生物の有機溶媒耐性に関して、序論で示したグラム陰性細菌の機構と、グラム陽性細菌の機構があげられる。これらの報告でもストレス応答タンパク質の発現上昇が報告されていることから、本研究で示した PR4 株のアルカン添加条件における GroEL2 量の上昇はこれまでの結果と一致する。

PR4 株の C19 添加条件において、C12 添加条件と比較してゼータ電位が低下していることから疎水性の上昇が示唆され、MTIL 法により細胞表面の親油性の上昇、これらの結果から自由エネルギーの上昇による C19 相内部への転移の維持、それらに付随して GroEL2 量の上昇、またその際の生育も良好であることが示されている。また、C12 添加条件において、C19 添加条件とひかくしてミコール酸の主鎖の炭素数が減少していることが分かっている (data not shown)。ミコール酸の炭素数が減少することによって表層の疎水性が減少することが知られているため、このことから転移型の PR4 株の細胞表層は疎水的であることが示唆される。ここまでをまとめると、PR4 株は C19 粒子に接触した際に、転移するか一旦吸着してから C19 相内部に転移する。転移した細胞は C19 に適応し、ミコール酸などの表層構造を変化させたことによって親油性が上昇し、自由エネルギーの上昇により C19 相内部への転移が維持され、転移型で生育する。その場合、強いアルカンストレスにさらされるため、GroEL2 の発現上昇によるアルカン耐性の向上によって生育が良好であると考えられる。

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

2-1 はじめに

これまでに、PR4 株が培地/アルカン二相培養系において細胞の局在性、アルカン添加条件における生育、添加したアルカンの炭素鎖長に密接な関係性があることが明らかになった (Iwabuchi *et. al.* 2009). 第一章において、GroEL2 の強制発現により、細胞のアルカン相における細胞の局在性が吸着型の生育から転移型の生育に変化したことから、GroEL2 の発現量上昇が PR4 株の細胞の局在性を決定することが示唆された. この GroEL2 の強制発現はアルカン添加条件における生育の向上も見られたことから、*Rhodococcus* 属細菌の耐性向上株の作製に応用できることが予想された.

一般的に有機溶媒は微生物に対して毒性を示すが、その毒性の強弱は $\log P_{o/w}$ で表わされる (Inoue *et. al.* 1989). この $\log P_{o/w}$ が 1 から 4 の範囲にある有機溶媒は特に毒性が高いとされており (Inoue *et. al.* 1989), この範囲にある有機溶媒で生育が可能な微生物は報告が少ない (Patrauchan *et. al.* 2008).

本章では *Rhodococcus* 属細菌全般のアルカン耐性と細胞の局在性の検討と、*Rhodococcus* 属細菌の GroEL2 の強制発現によるアルカン耐性の向上について検討を行った.

2-2 材料

2-2-1 使用菌株

Rhodococcus australis ATCC35215-1 株

Rhodococcus coprophilus ATCC29080 株

Rhodococcus coprophilus JCM3200 株

Rhodococcus equii ATCC33707 株

Rhodococcus equii 103S 株

Rhodococcus erythropolis ATCC27845 株

Rhodococcus erythropolis ATCC47072-1 株

Rhodococcus erythropolis DSM1069 株

Rhodococcus erythropolis JCM3201 株

Rhodococcus erythropolis PR4 株

Rhodococcus erythropolis SK121 株

Rhodococcus erythropolis XP 株

Rhodococcus globerulus ATCC14346 株

Rhodococcus globerulus ATCC15076-1 株

Rhodococcus globerulus ATCC21292 株

Rhodococcus globerulus ATCC25669 株

Rhodococcus globerulus ATCC25688 株

Rhodococcus globerulus ATCC3110 株

Rhodococcus globerulus ATCC14898 株

Rhodococcus imtechensis RKJ300 株

Rhodococcus jostii RHA1 株

Rhodococcus opacus ATCC17039-1 株

Rhodococcus opacus ATCC51881 株

Rhodococcus opacus ATCC51882 株

Rhodococcus opacus B4 株

Rhodococcus opacus JCM9703 株

Rhodococcus opacus M213 株

Rhodococcus opacus PD630 株

Rhodococcus percolates JCM10087 株

Rhodococcus pyridinivorans AK37 株

Rhodococcus rhodnii ATCC35071 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC184 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC271 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC999 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC4001 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC12674 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC13808 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC143348 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC14349 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC15905 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC15906 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC17041 株

Rhodococcus rhodochrous ATCC19150 株

Rhodococcus rhodochrous BKS6-46 株

Rhodococcus rhodochrous JCM2156 株

Rhodococcus rhodochrous JCM2157 株

Rhodococcus rhodochrous R-1 株

Rhodococcus rhodochrous R-2 株

Rhodococcus rhodochrous S-1 株

Rhodococcus rhodochrous S-2 株

Rhodococcus ruber IFO15591 株

Rhodococcus sp. DK17 株

Rhodococcus sp. JCM3376 株

Rhodococcus sp. JCM3391 株

Rhodococcus sp. JVH1 株

Rhodococcus sp. P14 株

Rhodococcus sp. PG7-2 株

Rhodococcus sp. R04 株

Rhodococcus sp. R1101 株

Rhodococcus wratislaviensis IFP2016 株

Rhodococcus zopfii ATCC52349 株

Rhodococcus zopfii JCM9919 株

Nocardia asteroides JCM3384 株

2-2-2 使用培地

IB 培地

1-2-2 使用培地と同様に作製した.

2-2-3 使用試薬

1-2-3 使用試薬と同様に作製した.

2-2-4 使用炭化水素

C8, C12, C16, C19 を使用した.

2-2-5 使用プライマー

縮重プライマーF (36 nt) : 5'-ATG GCI AAR ATH ATH GCI TTY GAY GAR
GAR GCI MGI-3'

縮重プライマーR (36 nt) : 5'-RAA RTC CAT ICC ICC CAT ICC ICC IGT
IGG RTC ICC-3'

2-3 操作方法

2-3-1 培養条件, 局在性の確認

1-3-1 と同様に行った.

2-3-2 遺伝子操作関連

1-3-2 と同様に行い, *Rhodococcus* 属細菌の *groEL2* のクローニングは縮重プライマーを用いて行った.

2-3-3 *Rhodococcus* 属細菌の形質転換

1-3-4 と同様に行った.

2-3-4 GroEL2 量の測定

1-3-5 と同様に行った.

2-3-5 親油性

1-3-7 と同様に行った.

2-4 結果

2-4-1 *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性と細胞の局在性試験

Rhodococcus 属細菌全般のアルカン耐性と細胞の局在性を検討するため、研究室保存の *Rhodococcus* 属細菌 46 株をアルカン添加条件で培養し、その細胞の局在性を位相差顕微鏡で観察した。使用したアルカンは C8 ($\text{Log } P_{o/w} : 5.2$), C12 ($\text{Log } P_{o/w} : 6.1$), C16 ($\text{Log } P_{o/w} : 8.3$), C19 ($\text{Log } P_{o/w} : 9.3$)を用いた。検討に用いた *Rhodococcus* 属細菌の大半が C12, C16, C19 添加条件で生育し(Fig. X), 85%が C16 相, または C19 相内部に転移して生育している様子が観察され, C12 添加条件においても 60%がアルカン相内部に転移している様子が観察された(Table X)。対照的に C8 添加条件で生育した株はいなかった。これは低い $\text{log } P_{o/w}$ 値の有機溶媒では毒性が高くなることに一致する。

Rhodococcus 属細菌の細胞の局在性を分類した結果, 添加したアルカンの炭素数に関係なく転移型で生育する株が 24 株, アルカンの炭素数が少なくなるにつれて転移型から吸着型に局在性が変化する株が 14 株, アルカンの炭素数に関係なく吸着型で生育する株が 1 株, この 3 つのパターンに当てはまらない株が 7 株あった (表)。

2-4-2 *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性に対する *groEL2* の影響

PR4 株由来の *groEL2* が PR4 株のアルカン耐性を上昇させたが, PR4 株の *groEL2* に限定される機能かどうかの検討を試みた。まず, PR4 株以外の *Rhodococcus* 属細菌 5 種の *groEL2* をクローニングし, それぞれ挿入

したプラスミドを作製した。それらを導入した形質転換体、計 10 株を C8, C12, C16, C19 で培養し、位相差顕微鏡で観察した。その結果、アルカン感受性株 (Iwabuchi *et. al.* 2000)である *R. rhodochrous* R-1 株, R-2 株, ATCC12674 株のアルカン耐性が向上し、生育が見られた (Table X)。特に *R. rhodochrous* ATCC12674 株に PR4 由来の *groEL2* を挿入した pK4-EL2-PR4 を導入した形質転換体は、C8 添加条件において C8 相内部に存在している様子が観察された (Fig. X)。一方、ATCC12674 株由来の *groEL2* を挿入した pK4-EL2-AT を導入した形質転換体は C8 添加条件において生育が観察されなかった (Fig. X)。加えて、pK4, pK4- Δ EL2-PR4 を導入した形質転換体は親株と同様生育が見られなかった。

2-4-3 ATCC12674 株の形質転換体の C8 存在下における耐性

R. rhodochrous ATCC12674 株の pK4-EL2-PR4 導入株における細胞の C8 相への転移と生育の関係性を調べるために C8 添加条件の生育を検討した。初期菌数が約 10^4 cfu/ml になるように調整し、終濃度 5% (v/v) になるように C8 を添加した。2-3-2 で示した ATCC12674 株の形質転換体 4 株を 28°C, 110 rpm で培養し、215 h 後にサンプリングし、生菌数を測定した。初期菌数と 215 h 後の生菌数から各形質転換体の生存率 (培養後菌数/初期菌数 \times 100)を算出した。その結果、pK4-EL2-PR4 導入株が他の 3 株と比較して最も生存率が高かった (Table X)。

2-4-4 ATCC12674 株の形質転換体の GroEL2 量測定

ATCC12674 株の pK4-EL2-PR4 を導入した形質転換体は C8 添加条件において耐性の向上が観察された。この際の GroEL2 量を LC-MS/MS を用いて検討した。方法は第一章と同様に行った。その結果、pK4-EL2-PR4 導入株が他の 3 株と比較して最も GroEL2 量が高かった。

2-4-5 ATCC12674 株の形質転換体の細胞表層親油性試験

ATCC12674 (pK4-EL2-PR4)は MTIL 法を用いて親油性を測定した結果、転移型で生育した PR4 株と同等の値を示した。このことから ATCC12674 (pK4-EL2-PR4)は細胞表層の親油性の上昇により、C8 相内部に転移している様子が観察されたと示唆された。一方、他の形質転換体は親油性測定を行うのに必要な菌数が得られなかったため、測定を行うことができなかった。

2-5 考察

第二章では *Rhodococcus* 属細菌のアルカンへの耐性と細胞の局在性について検討し、さらに PR4 株とその他の菌株由来の *groEL2* 遺伝子がアルカン耐性に与える影響について検討した。最初に、アルカンとの相互作用の変化が PR4 株特有の性質なのかどうかを検討するために、*Rhodococcus* 属細菌 46 株のアルカン相への細胞の局在性を検討した。その結果、大半の株がアルカン相内部に転移して生育したことからアルカン相内部で生育する性質は *Rhodococcus* 属細菌に一般的な性質であることが示唆された。しかし、PR4 株の様なアルカンの炭素数によって吸着や転移を示す株は少数であったことから PR4 株の性質は独特であることも示唆された。これらのアルカン添加条件における生育は、 $\log P_{o/w}$ の毒性評価と一致する。疎水性有機溶媒の毒性は値が 0 に近いほど高いとされており、今回用いたアルカンの中で最も低い $\log P_{o/w}$ の C8 添加条件で生育が見られた株がなかったことは一致する。

次に、GroEL2 の発現上昇が *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性に与える影響を検討した結果、アルカン耐性の向上した株が観察され、中でも ATCC12674 株は、親株では生育不可であった C8 添加条件下において転移型で存在している様子が観察され、コロニー数の向上が見られた。このことから、ATCC12674 株のアルカン耐性の上昇が確認された。

一般的に GroEL2 はストレス応答タンパク質として機能しており、タンパク質のリフォールディングを行うことが知られている。ATCC12674 株が C8 添加条件における耐性向上は、アルカンに暴露された細胞内の

タンパク質をリフォールディングすることで、より高い毒性のアルカン添加条件における耐性の向上が観察されたと考えられた。

微生物機能を利用した物質生産への応用は、高い耐性機構を有する微生物を利用することが主であり、ある特定の微生物の耐性機構を向上させて用いる手法は多くない。本手法では、溶媒の分解を主とした耐性向上ではなく、GroEL2 の発現上昇を用いた微生物の保有している耐性機構全体を向上させる手法であり、今回用いた手法により複数の *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性を向上させることが可能となったことから、基質への親和性や保有している酵素群に応じて宿主を使い分けることが可能であると考えている。

第三章 培地成分による細胞の局在性の制御

3-1 はじめに

水/有機溶媒二相系システムは生きた微生物を用いて、疎水性溶媒を反応の場として用い、疎水性化合物を生産する技術である (Hermann *et. al.* 2007). 微生物が存在する水相と、反応の場となる界面、基質と産物が存在する有機相と反応系を分け、微生物への毒性を下げるができる。しかし、疎水性有機溶媒は水相にはほとんど溶解しないため、反応の効率化を行える技術開発が望まれる。ファインケミカルなどの有機化合物の生産などのホワイトバイオテクノロジーや、有機化合物に汚染された環境のバイオレメディエーションなどに、生きた微生物を効率的に用いるためには、有機溶媒への高い耐性を持ち、かつ高い活性を有する必要がある。そして、これらのことと同様に、基質と宿主の間の空間的位置関係を制御し、宿主が一定して基質と接触できる技術が求められる。

序論において、PR4 株はアルカンへの親和性が非常に高く、添加するアルカンの炭素数によって生育する場所を界面とアルカン相内部と変化させることを示し、第一章において、PR4 株のアルカン相内部で生育する性質に対して、GroEL2 が重要な役割を果たし、その発現量を上昇させることによってアルカン相における PR4 株の細胞の局在性を制御できること、そして生育の向上が見られることを示した。また第二章の結果から、その機構は他の *Rhodococcus* 属細菌でも共通していることが示唆された。

遺伝子操作によって PR4 株の基質に対する細胞の位置を変化させることに成功した。本章ではより簡便に基質に対する細胞の位置を変化させる手法の開発を試み、培地成分を変化させ、細胞の局在性が変化するかどうかを検討した。

3-2 材料と方法

3-2-1 使用菌株

Rhodococcus erythropolis PR4

3-2-2 使用試薬及びその調整

IB 液体培地

1-3-1 と同様に作製した.

NP 培地: 適当量のミリ Q 水に 0.50 g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.50 g の K_2HPO_4 を加え, 1L までメスアップして 121°C で 15 分間オートクレーブした.

MM 培地: 適当量のミリ Q 水に 0.18 g の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業), 0.10 g の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業), 0.10 g の NaCl (和光純薬工業), 0.02 g の $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業), 0.50 g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (和光純薬工業) を加え, 1L までメスアップして 121°C で 15 分間オートクレーブした.

MgCl_2 ・ストック溶液: 適当量のミリ Q 水に 18.4 g の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業) 粉末を溶解した後, ミリ Q 水で 100 ml までフィルアップし, 121°C で 15 min オートクレーブした.

MgSO_4 ・ストック溶液: 適当量のミリ Q 水に 10.85 g の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業) を加え, 100 ml までメスアップして 121°C で 15 分間オートクレーブした.

3-2-4 使用炭化水素

C12, C19 を使用した.

3-3 操作方法

3-3-1 培養条件，局在性の確認

1-3-1 と同様に培養系を作製し，無機塩類の検討の際は NP 培地を用いた．NP 培地を用いた場合は，初期菌数が 10^6 - 10^7 cfu/ml になるように調節し，アルカンを 5% (v/v) になるように調節して添加し，110 rpm, 28°C で培養した．

細胞の局在性は，培養液の有機層と水層を懸濁して 8 μ l をプレパラート (IWAKI) に滴下し，カバーガラス (IWAKI) をのせたものをサンプルとした．位相差顕微鏡 (OLYMPUS DP72) のステージにサンプルを乗せ，スライドガラスにイマージョンオイルを一滴垂らした．対物レンズの倍率を 100 倍にして観察した．無機塩類の検討において，細胞の局在性が複雑化したため，局在性を転移，転移>吸着，吸着>転移，吸の 4 区分に細分化し，各区分の写真数/総写真数で，局在性の割合を算出した．割合の算出に試験管誤差が生じないようにするため，1 本の試験管からは代表写真を 5 枚撮影した．

3-3-2 細胞の水相への遊離と確認

3-3-2-1 局在性の確認，C8 と Glc の添加

NP/C12 二相培養系に $MgSO_4$ を添加したサンプルを顕微鏡観察し，吸着型を示したサンプルに対し，5% (v/v) の C8 および終濃度が 1.0% になるように 20% のグルコース溶液を 500 μ l 添加して 28°C，110 rpm で再度 4 日間振盪培養した．

3-3-2-2 水相の回収

サンプルを全体で 9-10 日間培養した後，コックを装着したシリンジ

内に培養液を直接流し移した。この状態で培養液を 2 時間静置した後、1.5 ml ファルコンチューブに水相部分を 5 ml 滴下した。これを 12,000 rpm, 10 min, 4°C で遠心し、上清を 4 ml 捨て、以降の操作に用いた。

3-3-2-3 遊離の確認

遠心後の水相を IB 寒天培地に 100 μ l ずつ塗抹し、30°C で 4 日間静置培養した後、コロニー数を測定した。また、IB 培地 5 ml および遠心前後の水相を 100 μ l それぞれ加え、28°C, 110 rpm で培養し、経時的に培養液の濁度を測定した。さらに、菌液が無くなったチューブに 2 ml の IB 培地を添加し同様な培養条件で経時的に培養液の濁度を測定した。

試験管に液体 IB 培地 4 ml および遠心前の水相を 1 ml 加え、28°C, 110 rpm で 4-5 日間振盪培養した。さらに、試験管に液体 IB 培地 900 μ l および遠心前の水相を 100 μ l 加えてボルテックスし、そこから採取した 100 μ l を別に用意した 900 μ l の IB 培地が入った試験管に加えた。この操作を繰り返して 10^1 ~ 10^7 倍希釈までを 1 本のファルコンにつき 5 連作製し、上記と同様の条件で培養して限界希釈を行った。培養後、生育の有無を記録し、乱数表を用いて MPN の計算を行い、コロニー数を算出した。

3-4 結果

3-4-1 細胞の局在性に影響を与える因子の探索

PR4 株は C19 添加条件において転移型で生育し，C12 添加条件において吸着型で生育する．ここまで用いている IB 培地はグルコース，Yeast extract，無機塩類で構成されており，この中から細胞の局在性に影響を与える因子を検討した．しかし，Yeast extract とグルコースの濃度変化による細胞の局在性の変化は見られなかった．そのため，転移型生育の代表として C19，吸着型生育の代表として C12 添加条件における無機塩類の影響を検討した．

次に，MM 培地と NP 培地を用いて無機塩類の検討した結果，C19 添加条件では PR4 株の細胞は C19 相に転移している様子が観察された．MM 培地に C12 を添加した条件では，C12 相に吸着型で存在していた．NP 培地に C12 を添加した条件では，C12 相内部に転移して存在している様子が観察された (Fig. X)．このことから，PR4 株はこの条件において転移型で存在していることが示唆された．また，MM 培地に C12 を添加した条件では吸着型で存在していたことから，C12 相への転移の維持を阻害する無機塩があることが予想された．

転移の維持を阻害する無機塩の存在を検討するために，FeCl₂，CaCl₂，MgCl₂，NaCl の細胞の局在性に与える影響を検討した．この結果は TableX にまとめた．その結果，NP 培地に MgCl₂ と C12 を添加した条件において，検討に用いた写真の X% が吸着型を示していたことから，この条件において PR4 株は吸着型で存在していることが示された (Fig.X)．一方，他の無機塩を添加した条件では検討に用いた写真の X% が転移型を示していたことから，この条件において PR4 株は転移型で存在していることが示された (TableX)．これらの結果から，NP 培地中の MgCl₂ が C12 相中の細胞の転移の維持を阻害していることが示された．

3-4-2 細胞の局在性に影響を与える Mg 濃度と MgCl₂ 以外の Mg 化合物の影響

次に、MgCl₂ が PR4 株の C12 相への転移の維持の阻害に影響を与える濃度の検討を行った。この結果は Table X に示した。徐々に MgCl₂ の濃度を減少させた結果、濃度が 0.9 μM の条件において、検討に用いた写真の X% が C12 相に転移して存在している様子が観察された。一方、0.9 μM の条件において、検討に用いた写真の X% が C12 相に吸着して存在している様子が観察された。これらのことから、NP 培地中の MgCl₂ が PR4 株の細胞の局在性を変化させ、その際の最小濃度は 0.9 μM であると示唆された。Mg²⁺ の量が PR4 株の細胞の局在性を変化させると考えられたため、MgCl₂ 以外の Mg 化合物の影響について検討した。Mg(CH₃-CH(OH)-COOH)₂、Mg(NO₃)₂、MgSO₄ を NP 培地に添加した結果、C12 添加条件において転移型から吸着型への局在性の変化が観察された (Table X)。Mg(CH₃COO)₂ は、約 60% が吸着型で観察された。この条件は他の 3 つよりも吸着型を示した割合は低かったが、これは吸着型を示す条件と判断した。これらのことから、Mg²⁺ の量が PR4 株の NP 培地における C12 相への転移の維持を阻害していることが示唆された。

3-4-3 Mg 化合物の添加時期による細胞の局在性への影響

Mg 化合物の添加によって、NP 培地における C12 相への転移の維持を阻害することが示された。一度 NP 培地に C12 を添加した条件で C12 相へ転移している状態に Mg 化合物の添加によって吸着型へ変化するかどうか検討した。一度 NP 培地に C12 を添加し、4-5 日経過後、位相差顕微鏡にて細胞の位置を観察し、C12 相への転移が維持されていることを確認した後に、Mg 化合物を添加した。添加して 2-3 日後、位相差顕微

鏡にて再度細胞の局在性を観察した。 $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OH})\text{-COOH})_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 MgCl_2 、 $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ をそれぞれ水相に添加し、観察した写真を検討した結果、約 40-80%が転移型を示していたことから、この条件において、PR4 株は転移型を示すことが示唆された (Table X)。一方、 MgSO_4 を添加した条件において、PR4 株の細胞は C12 相の界面に吸着して存在している様子が観察された。これは試験した限り全ての試験において観察された (Table X)。このことから、 MgSO_4 の添加が一度 PR4 株の細胞が C12 相に転移している状態の細胞を吸着型に変化させることが示唆された。 MgSO_4 濃度が一定以下の場合、PR4 株の細胞は C12 相内への転移が維持されていた。また、 MgSO_4 濃度が $9.0 \mu\text{M}$ の際に、PR4 株の細胞は C12 相に吸着して存在していた (Table or Fig)。これらのことから、 MgSO_4 の添加による C12 相に転移が維持されている細胞の局在性を吸着型に変化させる濃度は $9.0 \mu\text{M}$ と考えられた。転移が維持されている細胞を吸着型に変化させる濃度は約 10 倍量高いという結果になった。

MgSO_4 以外の Mg 化合物による影響が見られなかったことから、硫化物イオンの影響が考えられたため、 K_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 CaSO_4 、 Na_2SO_4 の添加による細胞の局在性の変化を検討した。しかし、これらの化合物の添加による転移型から吸着型への細胞の局在性の変化は観察されなかった。

3-4-4 MgSO_4 を用いた NP/C12 二相培養系における PR4 株と C12 の空間的位置のデザイン

これまでに、 MgSO_4 を培地中に添加することで、C12 相への転移が維持されている状態の細胞を吸着型へと変化させられることが示された。ここでは Mg 化合物による、より自在な細胞の局在性の制御を試みた。

最初に、C12 相に吸着した細胞を、また転移型にすることを試みた。

まず, NP 培地に MgSO_4 を添加し, C12 相に吸着している条件において, この培養系の水相を除去することで, 出来る限り MgSO_4 を除去した. そこに, 新しい NP 培地を添加した後に培養を行った際の細胞の局在性を観察した. その結果, C12 相に吸着して存在していた細胞が, 新しい NP 培地で培養後, 細胞が C12 相に対して転移型と吸着型の細胞が混在している様子が観察された.

次に, C12 相界面に吸着している細胞をまた, 水相に遊離させることができるかどうか検討した. 本菌に対して C8 は生育不可能であり, Glc は栄養源かつ水相に溶解するため, これらを添加することにより細胞をアルカン相から水相に遊離させることが示唆されるため, C12 相に吸着している培養液に C8 と Glc を添加した. C8 と Glc の添加から 3 日後に水相を採取し, 水相を位相差顕微鏡による観察, MPN 法による試験, プレーティングによるコロニーカウントを行い, MPN 法の結果から, C8 と Glc の添加により 5.6×10^2 cfu/ml の細胞が水相に存在していることが示された. C8 と Glc を添加していない条件の水相からは測定できなかった (検出限界 XX 以下)ことから, 界面にいる PR4 の細胞を一部水相に遊離させることに成功した.

3-5 考察

第三章では、二相培養系における PR4 株の空間的位置を制御することを試み、 MgSO_4 が NP/C12 二相培養系における PR4 株の細胞の位置を変化させる重要な因子であることを見出した。また、 MgSO_4 の濃度や添加時期を調節することによって PR4 株の C12 相における細胞の位置を C12 相、界面、そしてまた NP 相に移動させることに成功した。

有機溶媒存在下における微生物の利用において、耐性を持つだけでなく、高い活性、基質への相互作用を調節する技術が必要となる。PR4 株は高いアルカン耐性を有し、アルカンへの特殊な相互作用を有する微生物であり、アルカン添加条件においても良好な生育を示す。これまでの二相培養系における宿主菌は水相、または界面に存在していることから、基質との反応は界面に限られるが、PR4 株の NP/C12 二相培養系における局在性の制御技術は、有機相や界面での反応を可能にすると考えられる。

今回示した一つの反応容器で基質と細胞の位置を制御できる技術は、同一反応容器において何段階もの反応が可能になり、産物の溶解度などによって使い分けられることが考えられる。またこれらの制御は室温、静置培養で行え、また PR4 株は鞭毛を持たないことから、細胞の運動性は関係なく、外から熱などのエネルギーを加えていないことは非常に有用であると考えられる。この技術は宿主菌を有機相に存在させられることから極性の低い基質でも反応効率を上昇させられることが予想される。そして水相に菌体を遊離させられることは産物の回収を容易にすることも考えられる。

第四章 NP/C12 二相培養系における MgSO_4 による細胞の局在性の変化 の機構の解析

4-1 はじめに

第三章において、NP/C12 二相培養系において、 MgSO_4 の濃度調節や添加時期によって、PR4 株の細胞の位置を C12 相，界面，NP 相と移動させることが可能となった。PR4 株が C12 相内部への転移が維持されるには、細胞表層の親油性の上昇による界面ギブスエネルギーの上昇，もしくは親油性上昇に関与する代謝系への影響が必要だと考えられる。

そのため、本章では NP/C12 二相培養系における PR4 株のコロニー数，および細胞表層の親油性の測定，表層の親油性を上昇する代謝系の探索を試みた。

4-2 材料

4-2-1 使用菌株

Rhodococcus erythropolis PR4

4-2-2. 使用試薬及びその調整

IB 液体培地

1-2-1 と同様に調節した.

NP 液体培地

3-2-1 と同様に調節した.

MgSO₄ ストック溶液

3-2-2 と同様に調節した.

- DAPI 溶液 : DAPI 試薬 (和光純薬工業) を 1 mg/ml になるように DMSO 溶液(和光純薬工業)で溶解した.
- CTC 溶液 : CTC 試薬 (DOJINDO) を 20 mM になるように蒸留水で溶解した.
- CFDA 溶液 : CFDA (DOJINDO) を 10 mg/ml になるように DMSO に溶解した.

4-3 操作

4-3-1 代謝系解析

4-3-1-1 タンパク質抽出および LC-MS/MS 解析

1-3-X と同様に行った。

4-3-1-2 代謝系解析

1-3-X と同様に行った。

4-3-2 蛍光染色および菌数測定

培養液から一部を採取し、希釈系列を作製した。終濃度が 10 mg/ml (DAPI), 0.3 μ M (CTC), 50 μ g/ml (CFDA)になるように蛍光試薬を添加し、それぞれ室温で 30 min (DAPI), 30 min (CTC), 5 min (CFDA)反応させた。この反応液を 0.22 μ m のフィルター (Whatman)に吸引濾過し、そのフィルターをスライドグラスにのせ、その上にカバーグラスをのせ、プレパラートとした。このプレパラートを蛍光顕微鏡 (Olympus DP72)で観察した。対物レンズの倍率は 100 倍を用い、蛍光ランプ照射下でピントを合わせた後、撮影し、その画像の細胞数をカウントし、以下の計算式で 1 ml あたりの細胞数を算出した。

細胞数= 1.68×10^4 × 希釈倍率 × カウント数

4-4 結果

4-4-1 MgSO₄の有無による PR4 株の NP/C12 二相培養系における生育

PR4 株の NP/C12 二相培養系における培養において、MgSO₄の添加による細胞の局在性の変化がコロニー数にどのような影響を与えるかを検討した。

Mg 無添加、Mg²⁺添加、Mg²⁺培養期間中に添加の 3 条件において各時間におけるコロニー数を測定した(Fig)。その結果、Mg 無添加条件では常に転移型の状態で存在しており、Mg²⁺添加条件では常に吸着型、Mg²⁺培養期間中に添加条件では MgSO₄を添加する 120 h 以前は転移型、添加以降は吸着型で存在していた。各条件のコロニー数の変化は、初期コロニー数が 10⁷ cfu/ml に設定した際に、48 時間目までに 10⁴~10⁶ cfu/ml まで減少した。Mg 無添加条件、Mg²⁺培養期間中に添加条件においては 120h まで 10⁵ cfu/ml~10⁶ cfu/ml を推移し、Mg 無添加条件においては 24h で 10⁴ cfu/ml~10⁵ cfu/ml まで減少して以降、培養終了の 264h まで緩やかな減少傾向を示し、最終的には 10⁴ cfu/ml になった。Mg 無添加条件は 120h 以降も 10⁵ cfu/ml~10⁶ cfu/ml を維持していた。Mg²⁺培養期間中に添加条件は、120h における MgSO₄ 添加後はコロニー数の減少を示し、264 時間後には 10³ cfu/ml~10⁴ cfu/ml に減少した。Mg²⁺培養期間中に添加条件では MgSO₄ 添加の 120 時間後までは Mg 無添加条件と同様のコロニー数で推移していたが、MgSO₄ 添加の 120h 以降からコロニー数の減少を示した。一方、Mg²⁺添加条件では、24h の時点で Mg 無添加条件、Mg²⁺培養期間中に添加条件よりもコロニー数が少なく、培養終了の 264h まで Mg 無添加条件のコロニー数を上回ることはなかった MgSO₄ を用いることによる細胞の局在性の変化とコロニー数の変化を検討した。

MgSO₄ 添加により細胞の局在性が転移型から吸着型にシフトし、それに伴いコロニー数が減少したことが示された。このことから、PR4 株の

二相培養系におけるコロニー数は吸着型より、転移型の方が良いことが示唆され、これは IB 培地における転移型生育と吸着型生育の際のコロニー数の結果と一致した。しかし、親油性試験に必要なコロニー数は 10^8 cfu/ml 必要であるため、本結果から親油性試験に必要な菌体が得られなかったことから、親油性の測定を行うことができなかった。

4-4-2 NP/C12 二相培養系における $MgSO_4$ の添加による発現タンパク質の比較

親油性試験が行えなかったため、発現タンパク質から表層構造に影響を与える代謝系について検討することを試みた。主な方法は 1-3-1 で示す方法を用いた。培養条件はこれまでの実験と同様に、初期コロニー数を 10^6 cfu/ml に調整、5 日間、 $28^\circ C$ 、110 rpm で振盪培養を行った。 $MgSO_4$ を添加した培養液と添加していない培養液をそれぞれ作製し、培養液をろ過し、タンパク質を抽出 (10^6 - 10^7 cells 相当)、SDS-PAGE、銀染色、脱色、還元・アルキル化、ゲル内消化、LC-MS/MS によるペプチドシーケンシング、PR4 のゲノム情報とのホモロジーサーチを行った。その結果、検出されたタンパク質は Mg 無添加条件の方が多くタンパク質の種類が検出された。Mg 無添加条件は 4 回の解析で計 191 種類のタンパク質が検出され、 Mg^{2+} 添加条件は 4 回の解析で 306 個のタンパク質が検出された。同一コロニー数におけるタンパク質を比較した結果、NP/C12 培養系における細胞の代謝は Mg 無添加条件の方が代謝系が活発でないことが予想された。Mg 無添加条件と Mg^{2+} 添加条件で検出されたタンパク質の違いとして MgtB (RER_05880) と MgtC (RER_05890) が Mg 無添加条件でのみ検出された。

4-4-3 検出タンパク質の検討および KEGG pathway へのマッピング

検出されたタンパク質を KEGG pathway へのマッピングと、emPAI 指数による反定量解析を行った結果、いくつかの代謝系において差異が見られた。Mg 無添加条件に比べて Mg²⁺添加条件の方が脂肪酸合成関連のタンパク質が多く検出され、他に、TCA サイクル、リボソームに関連するタンパク質が多く検出された。これらのことから PR4 株の代謝は Mg²⁺添加条件と比較して Mg 無添加条件の方が代謝が活発でないことが予想された。しかし、3-3-1 で示したように、Mg 無添加条件の方がコロニー数が多かったことから、Mg 無添加条件の方が代謝が活発でないという結果は 3-3-1 の結果とは矛盾が生じた。

Mg 無添加条件から 191 種類、Mg²⁺添加条件から 306 種類のタンパク質を検出した。そして Mg 無添加条件において、MgtB および MgtC が検出された。そして、添加した培養条件ではどちらも検出されなかった。このことから MgSO₄ による C12 相への細胞の位置の変化において、MgtB および MgtC が関与していることが示唆された。他に Mg 無添加条件のみで検出されたものは probable DASS family transporter であった。これは Na⁺との共輸送による陰イオンの取り込みに関わるタンパク質である。

検出されたタンパク質から PR4 株が両培養条件においてどのような代謝系が働いているかを比較することで、細胞の局在性が変化する機構の予測を行った。検出された PR4 株のタンパク質のリストを PR4 株の KEGG pathway にあてはめ、ある代謝系（例：Fatty acid biosynthesis など）の働いている度合いを比較した。その結果、両者の培養において違いが見られたのは Fatty acid biosynthesis, Citrate cycle, Ribosome の 3 つのパスウェイだった。この 3 つのパスウェイにおいて、Mg 無添加条件はマッピングされた個所が Mg²⁺添加条件より少なかった。このことから PR4 株は Mg 無添加条件は Mg²⁺添加条件よりも代謝が活発でないことが予想された。

これまでの研究において、Mg 無添加条件は約 10^5 - 10^6 cfu/ml のコロニー数を示し、 Mg^{2+} 添加条件は 10^4 - 10^5 cfu/ml のコロニー数を示すことが明らかになっている。しかし、今回の結果ではコロニー数が多いはずの Mg 無添加条件の方が代謝が活発でないことが示されたことからコロニー数のデータと矛盾した。同一コロニー数で MS 解析を行っているため、コロニー数が多い方の検出タンパクが多くなることが予想されていた。これまでの PR4 株のタンパク質の MS 解析はコロニー数が多い培養条件の方が検出タンパク数も多くなっていた。

4-4-4 蛍光染色を用いた Mg 無添加条件、 Mg^{2+} 添加条件のコロニー数測定

コロニー数、発現プロファイルから推測した代謝系解析の結果が合致しなかったことから、コロニー数が多いが、細胞の活性が低い状態であることが予想された。そこで、異なる手法による細胞の活性を測定することを試み、それぞれの条件の細胞の活性を蛍光染色により比較した。

蛍光試薬はコントロールとして DAPI 試薬 (全菌数)、電子伝達系の働きにより蛍光性物質に変換される CTC 試薬 (生菌数)、細胞内のエステラーゼにより蛍光を発する CFDA 試薬、膜構造の破壊による透過性を利用した PI 試薬 (死菌数) を用いた。それと並行して従来の塗抹法によるコロニー数も測定し、それぞれを比較した。PR4 株は IB 液体培地において良好な生育を示すことから、その培養条件を用いて各種蛍光試薬の濃度を決定した。それぞれ $10 \mu\text{g/ml}$ (DAPI), $0.3 \mu\text{mol/ml}$ (CTC), $50 \mu\text{g/ml}$ (CFDA) とした。アルカン添加培養における各種蛍光の阻害等の検討は IB/C16, IB/C12 の培養条件で検討し、それぞれ蛍光が見られたことを観察した。

Mg^{2+} 添加条件において、DAPI, CFDA, CTC による蛍光が観察され、

コロニー数と合わせて 1 ml あたりの細胞数を算出した (Fig. X). Mg 無添加条件において, DAPI, CFDA による蛍光が観察され, コロニー数と合わせて 1 ml あたりの細胞数を算出した. しかし, 結晶化した蛍光性 CTC しか観察されず, CTC によって蛍光した細胞は観察されなかった (Fig. X). Mg 無添加条件は CTC による蛍光が検出されなかったことから, Mg²⁺添加条件と比較して, 呼吸活性が低く, 代謝が活発でないと予想されたパスウェイ比較のデータと一致した. このことから Mg 無添加条件はエステラーゼ活性はあるが, 呼吸活性は低いということが示された.

さらに, それぞれの蛍光試薬による菌数測定, 塗抹法によるコロニー数の測定を比較した. コロニー数測定において, Mg²⁺添加条件は 10⁴ cfu/ml, Mg 無添加条件は 10⁵ cfu/ml と約 10 倍の差が見られた (Table). しかし, DAPI 試薬による全菌数測定の結果, どちらも 10⁷ cells/ml の全菌数を示した. CFDA による菌数測定において, 両条件の菌数は DAPI による全菌数に近い値となった (TableX). CTC による生菌数測定の結果, Mg²⁺添加条件は 10⁶ cells/ml を示したが, Mg 無添加条件は CTC による細胞染色が観察されなかったため, 検出限界以下 (<10² cells/ml) となった. 各菌数あたりの生細胞とコロニー形成率等を算出した結果 (Table), Mg²⁺添加条件では全細胞あたり, 生細胞は 53%であり, 全細胞中コロニーを形成するのは 0.2%だった. また, 生細胞中のコロニーを形成する割合は 0.3%となった. しかし, この Mg 無添加の条件において, 生細胞は検出限界以下であり, 仮に検出限界の最大数の細胞が存在したとしても, 生細胞の割合は 0.00001%しかいないことになる. 一方, 全細胞中 3%がコロニーを形成していることになる. また生細胞が仮に検出限界の最大数存在したとしても, コロニーを形成している割合は 35 万%いることになる. このような値を示すことは微生物が細胞骨格を維持しており, かつ代謝が活発であり, コロニーを形成するという微生物がコロニーを形

成する流れの中に反していることになる。

4-4-5 NP/C12 二相培養系の PR4 株細胞の IB 培地への適応

NP/C12 二相培養系において MgSO_4 の添加による転移型と吸着型の細胞において、吸着型の方が代謝が活発であるが、コロニー数が低いことが示唆された。3-3-3 のコロニー数測定において PR4 株の代謝は Mg 無添加条件の方が活発であることが示唆された。この結果を補足するために、Mg 無添加条件と Mg 無添加条件の条件で 5 日間培養した PR4 株の細胞を回収し、IB 液体培地にコロニー数が 10^4 cfu/ml になるように接種し、24 時間ごとにコロニー数を測定し、Mg 無添加条件と Mg^{2+} 添加条件の増殖にかかる時間を比較した。その結果、Mg 無添加条件の条件の細胞は Mg^{2+} 添加条件の細胞と比較して誘導期が長いことが観察された(図表)。対数増殖期にかかるまでの時間が長かったことから、Mg 無添加条件の条件の細胞は Mg^{2+} 添加条件の条件の細胞と比較して栄養培地への適応が長くかかったこと(細胞の修復・酵素耐性の整備・炭酸の蓄積)が示唆された。

4-5 考察

本章では MgSO_4 による NP/C12 二相培養系における PR4 株の細胞の局在性の制御の機構を解析するため、Mg 無添加条件、 Mg^{2+} 添加条件におけるコロニー数測定、代謝系解析を行った。親油性測定に必要なコロニー数が得られなかったため、具体的な機構の特定には至らなかったが、その過程で、コロニー数と検出代謝系の量と種類に差が見られたため、異なる蛍光試薬を用いた菌数計測を行って比較した。その結果、NP/C12 二相培養系において吸着型を示す Mg^{2+} 添加条件では生細胞が多く、検出されたタンパク質の量と種類は多いが、コロニー形成が低い、VBNC (Viable but nonculturable) 状態で存在していることが予想された。VBNC 状態は環境中の微生物で見られる細胞の状態であり、本来コロニーカウントによるコロニー数測定が可能な微生物が、何らかのストレスによって CTC 染色による呼吸活性は観察されるが、コロニー形成率が著しく減少するような状態である (Daniela *et. al.* 2013)。また、Mg 無添加条件においてコロニー数が多いが呼吸活性が低く、 Mg^{2+} 添加条件においてコロニー数が少ないが呼吸活性が高いという特殊な細胞の状態であることが示唆された。呼吸活性が見られないが、コロニーを形成するという意味で、Not respiration but culturable とし、NP/C12 二相培養系における Mg の濃度制限によりドデカン相内で PR4 株は NRBC 状態になるという新しい細胞の状態の存在を見出した。

生きている微生物の測定は、コロニー形成を示す、CTC 染色による呼吸活性がある、rRNA を標的とする FISH 法、分裂阻害剤による増殖活性測定 (小暮法)、ATP 測定法による活性測定などの手法があげられる。これらの測定法において一つ以上の陽性判定がされれば、生きていとされることが多いが、これらの検討において逆の結果を示す例は非常に稀な結果と考えられる。本結果において両条件ともにコロニー形成能は減

少していたが、完全には失っておらず、Mg 無添加条件において、CTC 染色が観察されなかったことは、微生物が活着していることを示す定義の再確認を必要とすると考えられる。微生物に活性がある状態はコロニー形成<CTC 活性となると考えられるが、自然界の特殊環境においてはこれが当てはまらない状態や微生物の存在が考えられた。

現時点では、PR4 株の NP/C12 二相培養系においてのみ観察されるが、他の微生物でも同様の細胞の状態があった場合、このような細胞の状態は、自然界において炭化水素存在下などの特殊環境における生物の生存戦略と考えられ、微生物にとって毒性を示す物質存在下や、ストレス条件下においてこの状態になると予想される。例えば、油汚染土壌環境下の微生物や、病原性細菌が相当すると考えられる。病原性を示す *Salmonella* 属細菌 (Chmielewski *et. al.* 1995) や *Vibrio* 属細菌 (Barer *et. al.* 1993) は VBNC 状態を示すことが知られていることから、これらの微生物の菌数測定には CTC 染色を用いる場合がある (Morishige *et. al.* 2013)。もし、NRBC 状態が病原性微生物にも当てはまる場合、これまでのコロニー計測、CTC 染色に加え、最終的に活着している細胞を観察することを念頭に置く必要がある。また、油汚染土壌のバイオレメディエーションにおいて、PCR 法による菌数測定が主流であるが、NRBC 状態で存在している場合、菌数が一定以上存在していても分解活性が低くなる可能性が考えられる。現在、NRBC 状態が他の *Rhodococcus* 属細菌、他の微生物へ当てはまるか検討を行っている。

6 総括

Rhodococcus 属細菌は、土壌や海洋に存在する高 G+C 含量のグラム陽性細菌であり、有機溶媒への高い耐性や、分解能力を有していることから、環境浄化技術や物質生産への応用が行われている。しかし、*Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性機構の解明、基質への親和性の上昇などに関する研究は少ない。そこで、同菌の性質を深く理解し、応用技術の高効率化を目指すために、*R. erythropolis* PR4 株の特殊な相互作用に着目した。

本研究では PR4 株を中心に *Rhodococcus* 属細菌のアルカン添加条件におけるアルカン耐性機構、アルカンとの相互作用に関して分子遺伝学的手法を用いた解析と、PR4 株の性質を利用したアルカンと細胞との相互作用を制御する方法の構築を試みた。

その結果、C19 に転移して生育した PR4 株の細胞は GroEL2 が高く発現しており、また GroEL2 の強制発現の結果、細胞表面の親油性が上昇、C12 相への転移の維持、その際の生育の向上がみられ、さらに、生育できるアルカンの炭素数が C10 から C8 へ、より短い炭素数のアルカンの耐性向上が見られた。これらのことから、PR4 株の GroEL2 の発現上昇はアルカン耐性を向上させることが示唆された。

これらのことから、GroEL2 の発現上昇が細胞全体の強化を行い、アルカン相内部に留まって生育することができたと考えられた。また GroEL と GroES の検出量と分子量から、C19 添加条件における GroEL2 と GroES のモル比率を算出した結果 1:0.6 であったことから、大腸菌と同様に C19 添加条件においてタンパク質のリフォールディングに関わっていることが予想された。

PR4 株以外の *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性と局在性、GroEL2 の影響を検討した。その結果、大半の株がアルカン相内部に転移して生育

したことからアルカン相内部で生育する性質は *Rhodococcus* 属細菌に一般的な性質であり、また GroEL2 の強制発現により耐性向上株が作出されたことから、GroEL2 によるアルカン耐性機構は PR4 株以外の *Rhodococcus* 属細菌でも同様であることが示唆された。

本研究で *Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性において、GroEL2 が重要な役割を果たすことを見出し、その際の GroEL2 の機構を明らかにした。これまで微生物の溶媒耐性は *Pseudomonas* 属細菌などのグラム陰性細菌に関しては詳細に示されているが、*Rhodococcus* 属細菌は分解酵素群に関する研究がほとんどであり、分子機構に関しては少ない。*Rhodococcus* 属細菌の溶媒耐性機構として、*R. opacus* B4 の efflux pump の発現、EPS の生産による耐性機構が知られているが (Iwabuchi *et. al.* 2000)、本結果はどちらの機構とは異なることが示されたことから、*Rhodococcus* 属細菌の新たな溶媒耐性機構が示された。

また、細菌の 30%は複数の GroEL を有していることが知られており、その使い分けに関する詳細な機構は明らかになっていない。GroEL の使い分けに関しては *Mycobacterium* 属細菌の Biofilm 形成に GroEL1 が必須であるが、生育必須遺伝子ではないという例が知られている (Ojha *et. al.* 2005)。本研究における PR4 株の溶媒耐性に対して、GroEL1 ではなく GroEL2 が重要であることは興味深い例と考えられ、複数の GroEL の使い分けや詳細な機構に関して新たな知見を提供し、疎水性環境下における生命活動に一石を投じるものと考えている。

本研究の中で、NP/C12 二相培養系において PR4 株は NRBC 状態になることを見出し、この状態は呼吸活性が減少するが、生命活動は失っておらず、コロニー形成能を完全には失っていない状態である。これまで、呼吸活性はあるが、コロニー形成能を失う VBNC 状態は知られていたが、このような細胞の状態は自然環境中でも稀な状態であると考えられる。

この NRBC 状態が自然界中において他の微生物にも適応される場合、微生物が生きていることを示す定義の再確認を必要とすると考えられる。

汚染環境の浄化において、FISH 法やリアルタイム PCR 法による RNA 量の測定を指標に菌数測定をする場合があるが、NRBC や VBNC 状態の細胞は活性を高く、または低く見積もられる場合があると考えられる。また、NRBC 状態が病原性微生物にも当てはまる場合、これまでのコロニー計測、CTC 染色に加え、最終的に生きている細胞を観察することを念頭に置く必要がある。自然界に存在する微生物のうち、わずかしかな単離・確認されていないが、VBNC 状態や本研究で見出された細胞の状態のような特殊な細胞の状態が存在していることが予想される。これらの細胞の状態を調べることで、新規微生物の単離や解析が進むと考えている。

微生物機能を利用した物質生産への応用は、高い耐性機構を有する微生物を利用することが主であり、ある特定の微生物の耐性機構を向上させて用いる手法は多くない。本手法では GroEL2 の発現上昇により、*Rhodococcus* 属細菌のアルカン耐性を向上させることが可能となり、複数の宿主で耐性向上がみられたことから、適合するベクターの開発と、宿主との相性の問題が解決されれば、様々な *Rhodococcus* 属細菌で応用できると考えている。これにより、基質への親和性や保有している酵素群に応じて宿主を使い分けることが可能であると考えている。

そして、今回示した一つの反応容器で基質と細胞の位置を制御できる技術は、二相培養系におけるホワイトバイオテクノロジーにおいて新たな反応系の構築、または既存の系の効率化の向上を目指す上で重要な知見であると考えられる。例えば、水相への溶解度が著しく低い物質であっても新たな基質の対象となることが考えられる。

本研究において、*Rhodococcus* 属細菌の有機溶媒耐性の一端を理解し、

また PR4 株の性質を利用したアルカンとの相互作用を調節する手法を開発した。また、その研究の中で、PR4 株が特殊な細胞の状態を示すことを明らかにした。本研究により、*Rhodococcus* 属細菌の疎水性環境下における生命活動の一端を理解することができた。しかし、 MgSO_4 による細胞表層親油性上昇に関する知見を得ることができなかつたことから、細胞の局在性の変化にどのように影響しているかを明らかにすることは、応用化への細胞と基質の相互作用の最適化に重要な知見となると考えられる。また、本研究で見出された NRBC 状態はその他の *Rhodococcus* 属細菌、または自然界の微生物群に適応されるかどうかは最大の焦点になると考えている。

7 参考文献

- Aizawa T, BA. Neilan, I. Couperwhite, M. Urai, H. Anzai, N. Iwabuchi, M. Nakajima, and M. Sunairi. 2005. Relationship between extracellular polysaccharide and benzene tolerance of *Rhodococcus* sp. 33. *Actinomycetologica* **19**:1-6.
- Andon NL, S. Hollingworth, A. Koller, AJ. Greenland, JR III. Yates, and PA. Haynes. 2002. Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectrometry. *Proteomics* **2**:1156-1168.
- Barer, M.R., L.T. Gribbon, C.R. Harwood, and C. E. Nwoguh. 1993. The viable but non-culturable hypothesis and medical bacteriology. *Rev. Med. Microbiol.* **4**:183–191.
- Bell, K.S., J.C. Philip, D.W.J. Aw, and N. Christofi. 1998. The genus *Rhodococcus*. *J. Appl. Microbiol.* **85**:195-210.
- Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hegde, D.C. Boisvert, A. Joachimiak, A.L. Horwich, and P.B. Sigler. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**:578–586.
- Chmielewski, R.A., and J.F. Frank. 1995. Formation of viable but non-culturable *Salmonella* during starvation in chemically defined solutions. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**:380–384.
- Finnerty, W.R. 1992. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**:193-218.
- Frazzetto, G. 2003. White biotechnology. *EMBO Rep.* **4**:835-837.
- Hashimoto, Y., M. Nishiyama, F. Yu, I. Watanabe, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1992. Development of a host-vector system in a *Rhodococcus* strain and its use for expression of the cloned nitrile hydratase gene cluster. *J. Gen.*

Microbiol. 138:1003-1010.

- Inoue, A., and K. Horikoshi. 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338:264-266.
- Iwabuchi N, M. Sunairi, H. Anzai, M. Nakajima, and S. Harayama. 2000. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochromus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5073-5077.
- Iwabuchi N, M. Sunairi, M. Urai, C. Itoh, H. Anzai, M. Nakajima, and S. Harayama. 2002. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochromus* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2337-2343.
- Iwabuchi, N., P.K. Sharma, M. Sunairi, E. Kishi, K. Sugita, HC. van der Mei, M. Nakajima, and Busscher H.J. 2009. Role of interfacial tensions in the translocation of *Rhodococcus erythropolis* during growth in a two phase culture. *Environ. Sci. Technol.* 43:8290-8294.
- Kong TH, AR. Coates, PD. Butcher, CJ. Hickman, and TM. Shinnick. 1993. *Mycobacterium tuberculosis* expresses two chaperonin-60 homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:2608-2612.
- Lund, PA. 2009. Multiple chaperonins in bacteria – why so many? *FEMS Microbiol. Rev.* **33**:785-800.
- Mayhew M, AC. da Silva, J. Martin, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and FU. Hartl. 1996. Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* **379**:420-6.
- Morishige Y., K. Fujimori, and F. Amano. 2013. Differential Resuscitative Effect of Pyruvate and its Analogues on VBNC (Viable But Non-Culturable) *Salmonella* *Microbes Environ.* 28:180–186.
- Nagasawa *et al.* (1993):The superiority of the third-generation catalyst,

Rhodococcus rhodochrous J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide.

• Ojha A, M. Anand, A. Bhatt, L. Kremer, WR Jr. Jacobs, and GF. Hatfull. 2005. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in Mycobacteria. *Cell* **123**:861-873.

• R. A. Bovill, J. A. Shalloross and B. M. Markey. 1994. Comparison of the Fluorescent Redox Dye 5-Cyano-2,3-ditolyltetrazolium Chloride with p-Iodonitrotetrazolium Violet to Detect Metabolic Activity in Heatstressed *Listeria monocytogenes* Cells, *J. Appl. Bacteriol.* 77:353.

• Segura A, L. Molina, S. Fillet, T. Krell, P. Bernal, J. Muñoz-Rojas, and JL. Ramos. 2012. Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**:415-421.

• Torres S, A. Pandey, and GR. Castro. 2011. Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: applications and biotechnological potentials. *Biotechnol. Adv.* **29**:442-452.

• 明瀬 由美子 (2008) 日本大学応用生物科学科学学位論文

• 明瀬 由美子 (2009) 特願:2009-193018

• 明瀬 由美子 (2010) 日本大学大学院応用生命科学専攻 修士論文

8 謝辭

9 要旨

10 図表