

栄養環境の変化による低栄養細菌 細胞膜蛋白質の変動

多田 宜文 井上 敬夫

近畿大学生物理工学部生物工学科

抄 録

通性低栄養細菌は極限状態の低栄養環境でも増殖できるが、同時に通常の富栄養状態でも増殖できる細菌群である。これを可能にする要因の1つは栄養分の取り込み、すなわち透過性に関係する膜を構成する蛋白質の質的、量的変化にあると考え、その検討を行った。3株の低栄養細菌を富栄養環境としての Brain Heart Infusion Agar と低栄養環境としての寒天のみの培地にそれぞれ培養し、両者における膜蛋白質を二次元電気泳動法を用いて分析し、泳動パターンの比較検討を行った。低栄養環境で増殖したときの膜蛋白質の数は富栄養環境に比べて減少するが、富栄養環境ではみられない蛋白質の出現が認められた。特に低栄養環境においても活発な増殖を行う菌株ではこの変化が顕著で、環境の変化に即応し得る特性を示唆している。これらの菌株を Brain Heart Infusion Broth の濃度を 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} と希釈して栄養環境を段階的に変化させた培地で培養し、それぞれの環境での膜蛋白質の二次元電気泳動パターンの比較検討を試みた。その結果、BHIBの濃度が 10^{-1} と 10^{-2} の間で新たな蛋白質の発現や特定の蛋白質量の増加がみられた。これは栄養環境が一定のレベルを超えると何らかのメッセージが伝達され、それぞれの環境に適した膜蛋白質が構成されていくことを示唆している。

Key words : oligotrophic bacteria, two-dimensional electrophoresis, membrane proteins

緒 言

高温、高圧、強アルカリ、強酸性など通常の微生物では生息できない極限環境でも増殖できる微生物の存在が近年多数報告され、その一部は我々の生活に利用されている¹⁻⁴。本研究で扱った低栄養細菌 (oligotrophic bacteria) も極限環境微生物の一種であり、極低栄養状態の環境下においても増殖が可能な細菌群である。低栄養細菌の明確な定義は定められていないが、ここでは Nutrient broth (NB) を 10^{-4} 以下の濃度に希釈した場合においても増殖可能な細菌と定義した。低栄養細菌は自然界のあらゆる処例えば土壌⁵⁻⁶、湖⁷、海洋⁸⁻⁹、河川¹⁰、水道水¹¹等に生息している。臨床材料からの分離報告は殆ど無かったが、多田¹²らは多くの種類の臨床材料から多数の低栄養細菌が分離されることを報告した。低栄養細菌と感染症の関連は明確ではないが、分離される低栄養細菌の6割以上に *Pseudomonas* 属がみられることは注目すべきである。低栄養細菌は取り

扱いの困難さや定義の曖昧さにより生化学的、生理的な研究があまり行われておらず、大半は分離などについての研究が占めている。

本研究の目的は、通性低栄養細菌が富栄養環境でも低栄養環境でも増殖できるメカニズムを探ること、まず低栄養細菌の膜を構成する蛋白質の変動性を検討した。低栄養細菌が低栄養環境で増殖するためには細胞外の栄養分を効率よく摂取するために高い膜透過性をもつことが必要になると考えられる。一方、富栄養環境下では通常の膜透過性に落とさないと生理的な不都合が起こるはずである。したがって、低栄養環境、富栄養環境での低栄養細菌の膜蛋白質の一部にそれぞれ質的、量的な変化が生じるはずである。すなわち、富栄養環境では存在しない蛋白質が低栄養状態では膜の透過性を高めるために新たに合成されたり、既存の蛋白質の量が増加する可能性がある。また、その逆もあり得る。そこで富栄養環境と低栄養環境で培養された低栄養細菌の膜蛋白質の変化を二次元電気泳動法で検討した。

材料および方法

菌株, 培地

今回の研究において使用した低栄養細菌 3 株は蒸留水に Bact-Agar (DIFCO, USA) のみを溶かした培地において増殖を行ったものを選び出し, 同定を行うためにグラム染色, Triple Sugar-Iron [TSI] (日本製薬株式会社, 東京) 培地を用いたブドウ糖発酵性テスト, ポアメディアオキシダーゼテスト (栄研化学株式会社, 東京) を用いたオキシダーゼテスト, ID テスト (日水製薬株式会社, 東京) を行った。また, これらの低栄養細菌の増殖状態をみるために Nutrient broth (DIFCO, USA) を 10^{-4} の濃度に希釈した低栄養培地で振盪培養 (200 rpm, 30°C) を行った。寒天は Agar Noble, Bcto-agar (DIFCO, USA), Purified Agar (OXOID, USA), Agar Powder (和光純薬, 日本) など各種検討したが, Bacto-agar が最も優れていた。

本研究において使用した培地は富栄養環境としては低栄養状態との差をつけるために Nutrient broth より栄養度の高い Brain Heart Infusion Broth (日水製薬, 東京) に蒸留水と Bacto-agar を加えたもの (BHIA) を用いた。一方, 低栄養環境としては Bacto-agar と蒸留水のみ培地 (Agar) を用いた。

試料調製

多田¹³の方法をもとに修正を加えて行った。富栄養状態である BHIA と低栄養状態である Agar のそれぞれの培地で増殖した菌を回収し, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) で遠心分離機 (2,000 xg, 10°C, 10 min) を用いて 2 度洗浄した。そして再度 10 mM Tris-HCl buffer に溶解した菌液を分光光度計を用いて波長 420 nm (OD420) の吸光度を測定し, 菌液の濃度を OD420=0.5~1.0 になるように調整した。この菌液を超音波破碎機で菌液が透明になるまで処理した後, 遠心 (2,000 xg, 10°C, 30 min) にかけて細胞断片を除去し, 上清を超遠心 (100,000 xg, 10°C, 70 min) にかけた。この時得られた沈査を膜蛋白質として回収し, サンプル緩衝液 (8 M Urea, 0.5% NP40, 2% 2-Mercaptoethanol, 0.8% Pharmalyte 3-10 for IEF, 0.01% BPB) 1 ml に溶解した。そして, 得られた蛋白質量を測定するために, Kalb と Bernlohr¹⁴ の 230 nm と 260 nm における吸光度測定することにより導き出す方法を用いた。しかし, これらの波長においてサンプル緩衝液は強い吸光度を示すため, サンプルとサンプル緩衝液からそれぞれ 100 μ l 取り出し, これらを 100 倍希

釈したものを用いた。Kalb と Bernlohr の式に修正を加えた以下の式に測定値を代入して蛋白質量を求めた。求めた蛋白質濃度からサンプル緩衝液 100 μ l 中 40 μ g になるよう調製し, これを二次元電気泳動用のサンプルとした。

$$\text{Protein } (\mu\text{g/ml}) = 183 (\text{A230-S230})$$

$$- 75.8 (\text{A260-S260})$$

A230: 波長 230 nm における溶液の吸光度

A260: 波長 260 nm における溶液の吸光度

S230: 波長 230 nm におけるサンプル緩衝液の吸光度

S260: 波長 260 nm におけるサンプル緩衝液の吸光度

二次元電気泳動

二次元電気泳動は Multiphor II (Pharmacia Biotech) を使用し, 基本的に Pharmacia の手引書に従って行った。一次元目電気泳動 (等電点電気泳動) においては Immobiline Dry Strip pH 3-10 (Pharmacia Biotech) を膨潤させてからサンプルを 100 μ l アプライし, 泳動を行った。泳動条件は分離能の高かった表 1 に示した条件でグラジエントをかけながら行った。一次元目電気泳動終了後, ゲルの平衡化をし, 二次元目電気泳動 (SDS PAGE) を開始した。二次元目電気泳動に関して Excel Gel SDS gradient 8-18 (Pharmacia Biotech) を用いた。電気泳動終了後, シルベスタステイン PAGE 蛋白質用 (ナカライテスク株式会社, 京都) で銀染色を行い, 二次元電気泳動の蛋白質パターンを比較検討した。

表 1 等電点電気泳動 (IEF) の泳動条件

Phase	V*	mA	W**	Time (h)
1	300	1	5	0:01
2	300	1	5	4
3	3500	1	5	5
4	3500	1	5	7

*電圧, **電力

成 績

低栄養細菌の同定および低栄養培地における増殖状態

グラム染色, ブドウ糖発酵性試験, オキシダーゼテスト, ID テストの結果, 3 株とも *Burkholderia cepacia* であったが, コロニーの形状, 色素, 生化学的性質など色々な面で異なっていた。

NB/10,000 における 3 株の低栄養細菌の増殖曲

線は図1に示されるようになった。培養開始時点での菌数は 10^3 cfu/mlで、I株は最大 10^7 cfu/mlまで増殖した。この株は3株の中で最もよく増殖した株であり、続いて γ 株は 10^6 cfu/ml、 β 株は 10^5 cfu/mlまでの増殖がみられた。一般に低栄養細菌は最大 10^6 cfu/mlの増殖が一般的であるので、I株は低栄養環境でも他の株の数倍の増殖性を示す低栄養細菌である。

富栄養状態と低栄養状態における膜蛋白質二次元電気泳動パターンの比較

富栄養状態であるBHIA、低栄養状態であるAgarのみのそれぞれの培地で培養したときの低栄養細菌膜蛋白質の二次元電気泳動パターンをみると β 株においては膜蛋白質の基本的なパターンはほと

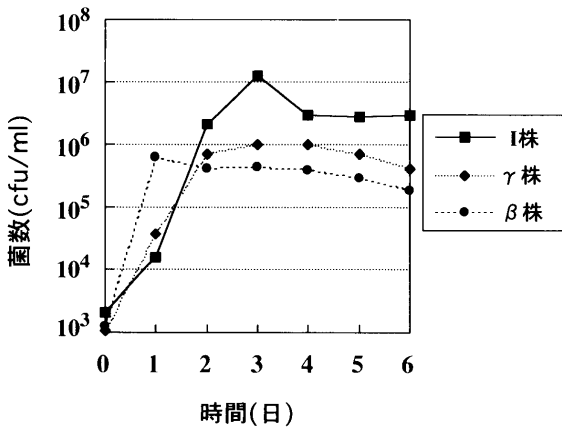


図1 Nutrient broth(NB)/10,000培地における低栄養細菌 (I, γ , β 株) の増殖曲線

んど一致していたが、低栄養状態におかれた場合のみ出現、もしくは量的な増加を示す蛋白質が観察された(図2 a, d)。

I株においても同様の変化がみられたが、その程度は β 株よりも大きく、低栄養状態では新たな蛋白質の出現が顕著であった。(図3 a, d)。

γ 株に関してはデータは示していないが、蛋白質の二次元電気泳動パターンにおいてI株と同様の変化がみられた。

BHIB 濃度変化に対する泳動パターンの検討

富栄養状態と低栄養状態における膜蛋白質の二次元電気泳動パターンに上記のような変化がみられたので、栄養分の減少と膜蛋白質の変化をより詳細に検討するためBHIBの濃度を 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} と変化させた場合におけるそれぞれの膜蛋白質の二次元電気泳動パターンの観察を試みた。

その結果、 β 株においては著しい変化はみられないものの栄養分の減少と共に等電点の低い膜蛋白質が増加してゆくことが観察された(図2 b, c)。

I株においても同様にBHIBの濃度が低下するにつれて膜蛋白質の泳動パターンが徐々に寒天のみの泳動パターンに近づいていくことが観察され、BHIBの濃度が規定濃度の時は膜蛋白質の等電点の範囲が中性付近に集中しているが、BHIBの濃度が低下していくにつれて膜蛋白質の等電点の範囲の幅が広がっていった。すなわち、富栄養環境では縦長であった泳動パターンが低栄養環境へ変化していくにつれて横長の泳動パターンへと変化していった。特にBHIBの濃度が 10^{-1} と 10^{-2} の間でこの変化

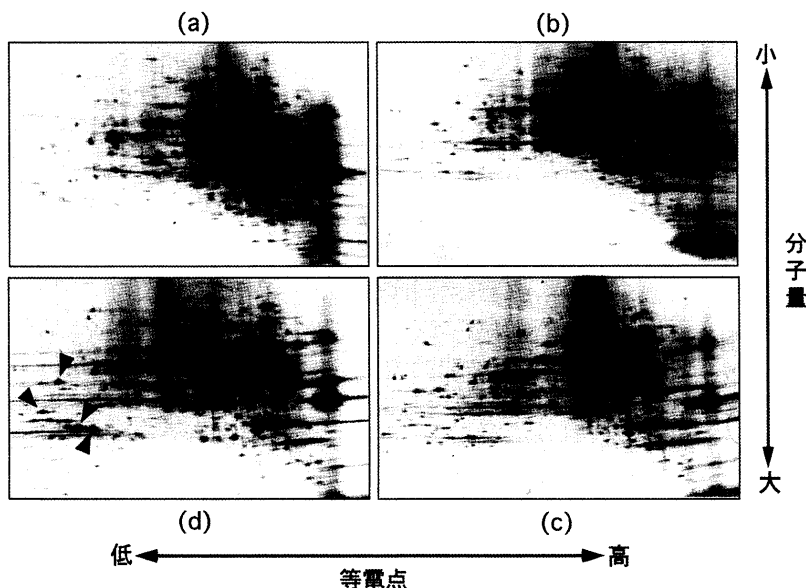


図2 β 株におけるブレインハートインフュージョンブイオン(BHIB)濃度別二次元電気泳動パターン
(a): BHIB 規定濃度+寒天
(b): BHIB/10+寒天
(c): BHIB/100+寒天
(d): 寒天のみ
矢印は低栄養環境で出現または量が増大する主な蛋白質を示す。

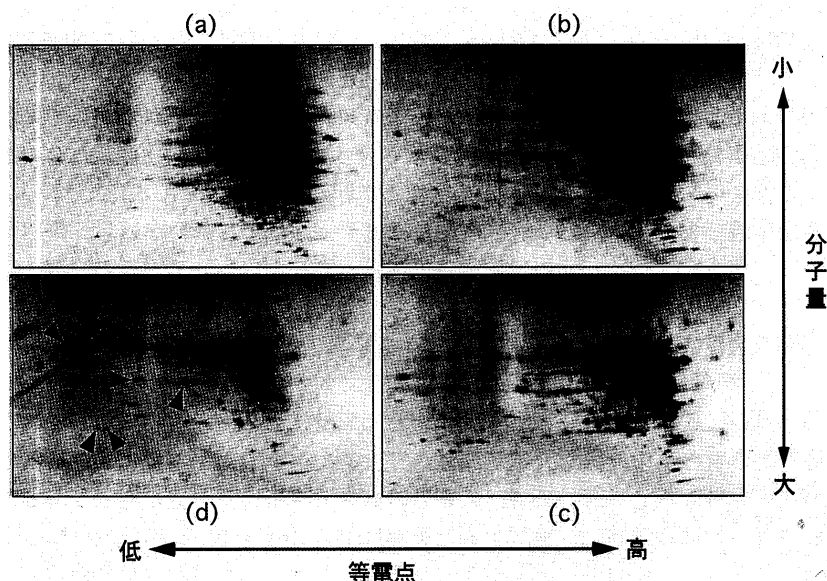


図 3

I株におけるブレインハートイン
フュージョンブイオン (BHIB) 濃
度別二次元電気泳動パターン

(a): BHIB 規定濃度+寒天

(b): BHIB/10+寒天

(c): BHIB/100+寒天

(d): 寒天のみ

矢印は低栄養環境で出現する主
な蛋白質を示す。

がみられた (図 3 b, c)。

γ 株に関しても I株と同様の変化がみられた。3株とも BHIBの濃度が 10^{-1} から 10^{-2} になると等電点の低い蛋白質が増加して膜蛋白質の等電点の範囲の幅が広がり、膜蛋白質の二次元電気泳動パターンが変化したことが観察された。

考 察

低栄養環境と富栄養環境における膜蛋白質の二次元電気泳動パターンを比較する際において注目される蛋白質は、富栄養環境では存在しないが低栄養環境において存在するもの、両者に存在するが低栄養環境の方が濃度が高いものである。なぜなら低栄養環境では細菌は極限環境におかれるために生命の維持に必要な蛋白質の確保が優先するから必ずしも必要でない蛋白質は作られなくなる。しかし、低栄養環境で生命を維持するための新たな蛋白質が合成されている可能性があるからである。そして、この新たに作り出された蛋白質は膜透過性に非常に重要な役割を果たしていると考えられるが、それ以外に何らかの生理活性を向上させる機能を持つものなのかもしれない。

細菌が栄養の極限状態で増殖するために必要と考えられることは、まず極めて少量の栄養分をいかにして効率よく体内に取り込むかということである。細菌の場合の栄養分を取り込みはすべて細胞膜を介するわけであるから効率よく栄養分を取り込むために膜の透過性の亢進が必要であり、このためには膜の構成変化が当然起こると考えられる。今回、栄養環境の全く異なる状態で生育する細菌の膜蛋白質の

泳動パターンに著しい差が認められたことは膜の透過性の亢進に必要な膜蛋白質の再構成が起こっていることを示すものと考えられる。I株は低栄養環境でもかなり活発な増殖を示し、培養開始時より 10^4 倍の菌数の増加が認められた。しかし β 株はわずかに 10^2 倍の増加がみられるだけであった。両者の膜蛋白質の泳動パターンの違いを比較してみるとI株では低栄養環境になると富栄養環境の場合と著しく異なる泳動パターンを示している。低栄養環境では少量の栄養物を効率よく取り込むために膜蛋白質にかなりの質的量的変化が起こると考えられる。従ってI株の場合は膜蛋白質を大きく変化させて低栄養環境により適応することができ、その結果 β 株よりも高い増殖性を示すことができると考えられる。一方、 β 株ではI株ほどの変化が認められず低栄養環境への適応が充分でなく、その結果増殖能がI株に比べて劣る結果につながっているものと推測される。

BHIBの濃度が 10^{-2} 以下になると等電点の低い蛋白質が増加していることから、これらの蛋白質が栄養分の貧困状態での低栄養細菌の生育に関係している可能性があるが、等電点の低い蛋白質と膜透過性の関係はまだ明らかにされていない。またBHIBの濃度が 10^{-1} と 10^{-2} の間で膜蛋白質の二次元電気泳動パターンが大きく変化していることから、この濃度の間で外界からの栄養物の著しい減少によって生じる浸透圧の変化などを契機に遺伝子に何らかの情報が伝達され、膜蛋白質に関する遺伝子の発現に変化が起きてる可能性が考えられる。

本研究においては、画像解析による泳動パターン

の定量的な解析を行うことによって、より客観的な結果が得られると考えられる。従って、この研究をさらに進めるにあたっては画像解析による分析が必須であると考えている。

低栄養細菌が何らかの感染症を惹起したという報告は極めて少ない。しかし低栄養細菌の中でも偏性低栄養細菌と呼ばれるものは、富栄養培地では増殖できない特性を持っており¹⁵⁻¹⁶、通常の細菌検査法では検出することは不可能である。また通性低栄養細菌の多くは富栄養環境では増殖能が低下する傾向がみられる¹⁷⁻¹⁸。これらの細菌が富栄養培地で増殖できない原因はアミノ酸などの有機物質が増殖の阻止因子となるからであり、これらの因子が除去されれば富栄養環境でも増殖できる。従って基本的には偏性低栄養細菌も通性低栄養細菌と同じように低栄養環境ではその膜蛋白質の二次元電気泳動パターンに同様の変化が生じていると考えられる。低栄養細菌の多くはその特性からみて生体の多くの部位に生息することが可能で、かつ富栄養化した検査培地を使用した細菌検査の網をくぐり抜けていると考えられる。

これまで具体的な報告はないが、低栄養細菌が何らかの感染症を惹起していることは考えられる。あるいは低栄養細菌単独では何も起こさなくとも他の細菌と共同して何らかの感染症を起していることも考えられる¹⁹。低栄養細菌は生体からも高い頻度で分離され、自然界にも多数存在しているうえ、蒸留水の中でも増殖できるものがある²⁰。極限環境微生物の一種といっても低栄養細菌は極く少数に限られた属のものではなく、多くの種類の細菌を含んでいる。従って、今後低栄養細菌の増殖、病原性、生理等に関する更なる基礎的研究を行う必要があると考えている。

本論文は1997年度日本農芸化学会大会（東京）で発表した。また、本研究は平成7、8年度文部省科学研究費補助金（基礎研究C）第07807033によって行われた。

文 献

- 堀越弘毅. 極限微生物. 東京：学会出版センター, 1993
- 稲垣賢二 (1997) 好酸性菌の機能開発と利用に関する研究. 日本農芸化学会誌 71 : 1-8
- 堀越弘毅, 秋葉暁彦. 好アルカリ性微生物. 東京：学会出版センター, 1993
- 微生物生態研究会編. 微生物の生態 8 極限環境の微生物. 東京：学会センター, 1980
- Hattori R, Hattori T (1980) Sensitivity to salts and organic compounds of soil bacteria isolated on diluted media. J. Gen. Appl. Microbiol 26 : 1-14
- Hattori T (1984) Physiology of soil oligotrophic bacteria. Microbiol. Sci 1 : 102-104
- Lango Z (1988) Ring-forming oligotrophic Microcycloclous organisms in the water and mud of Lake Balaton. Acta Microbiol. Hungary 35 : 277-282
- Deming J. W (1986) Ecological strategies of barophilic bacteria in the deep ocean. Microbiol. Sci 3 : 205-211
- Stahl D. A, Key R, Flesher B, Smit J (1992) The phylogeny of marine and fresh water caulobacters reflect their habit. J. Bacteriol 174 : 2193-2198
- Yanagita T, Ichikawa T, Tsuji T, (1978) Two trophic groups of bacteria, oligotrophs and eutrophs. J. Gen. Appl. Microbiol 24 : 59-99
- Jaeggi N, E, Schmidt-Lorenz (1990) Bacterial regrowth in drinking water. Zentralbl Hyg, Umweltmed 190 : 217-235
- Tada Y, Ihmori M, Yamaguchi J (1995) Oligotrophic bacteria isolated from clinical materials. J Clin Microbiol 55 : 493-494
- Tada Y, Yamaguchi J (1994) A function of 40kDa outer membrane protein in *Serratia marcescens*. Microbiol Immunol 38 : 171-175
- Kalb VF, Bernlohr RW (1977) A new spectrophotometric assay for protein in cell extract. Anal Biochem 82 : 362-371 Tan TL, Reinke M, Ruger HJ (1996) New dilution method in microtiter-plate for enumeration and enrichment of copiotrophic and oligotrophic bacteria. Archiv fur Hydrobiologie 137 : 511-521
- Fry J. C (1990) Oligotrophs. In: Edwards C (ed) : Microbiology of extreme environments. Milton Keynes, Open University Press pp93-116
- Ishida Y, Kadota H (1981) Growth and substrates requirements of naturally occurring obligate oligotrophs. Microbiol. Ecol 7 : 123-130 p4-450
- Suwa Y, Hattori T (1984) Effect of nutrient concentration on the growth of soil bacteria. Soil. Sci. Plant Nutr 30 : 397-403
- 多田宜文 (1995) 臨床材料から分離された低栄養細菌のアミノ酸による増殖阻害. 感染症学雑誌 69 : 846-847
- Favero MS, Carson LA, Bond WW, Petersen NJ (1971) *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. Science 173 : 836-838
- Geller A (1983) Growth of bacteria in inorganic medium at different levels of airborne organic substances. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 1258-1262