

## 耐圧性細菌の細胞膜組成に与える静水圧効果と 温度効果の類似性

金子 浩幸\*<sup>1</sup> 井上 明\*<sup>1</sup>  
掘越 弘毅\*<sup>1</sup>

日本海溝深海底土壌より耐圧性 *Pseudomonas* 属細菌が単離された。本細菌の生育可能な圧力領域は温度に依存し、至適圧力は生育温度の上昇に伴い高圧側に移行することが認められた。脂肪酸組成は C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 であった。C16 と C18 の相対量はいかなる生育環境下においてもほぼ一定であり、それぞれ 60%, 40% であった。また生育温度による不飽和/飽和脂肪酸の割合の変化は、C18 において顕著であった。細胞膜リン脂質組成は、ホスファチジルエタノールアミン(PE), カルジオリピン(CL), ホスファチジルグリセロール(PG), ホスファチジルセリン(PS) であった。一定圧力環境下において PE の割合は生育温度の上昇に伴って減少した。CL の相対濃度は、30MPa 以下では温度の上昇に伴った増加が認められたが、逆に 40MPa では温度の上昇に伴って減少した。このように細胞膜組成において加圧と温度低下に依る効果の類似性が認められた。

キーワード：耐圧性細菌，静水圧，温度，細胞膜組成

## The resemble effect of temperature and hydrostatic pressure on the membrane composition of barotolerant bacterium

Hiroyuki KANEKO\*<sup>2</sup> Akira INOUE\*<sup>2</sup>  
Kouki HORIKOSHI\*<sup>2</sup>

A barotolerant member of the genus *Pseudomonas* was isolated from deep-sea sediment obtained at a depth of 4418 m from the Japan Trench. The microorganism isolated from the deep-sea environment was assumed to have special mechanisms, which allowed them to adapt to high pressures and low temperatures. Growth temperature was found to affect the hydrostatic pressure range in which the bacterium could grow; the optimum hydrostatic pressure for growth shifted to a higher pressure with increasing temperature. We examined the lipid composition of the inner membrane of cells grown at various hydrostatic pressures and temperatures. The fatty acid components of the inner membrane lipids were C16:0, C16:1, C18:0 and C18:1. Under all growth conditions employed, the relative concentrations of total C16 (C16:0 + C16:1) and total C18 (C18:0 + C18:1) were approximately 60 % and 40 %, respectively. The change in ratio of C18:1 to C18:0 with varying temperature was larger than that of C16:1 to C16:0. The ratio of total unsaturated fatty acids to total saturated fatty acids changed with varied temperature and hydrostatic pressure. The phospholipid components of the inner membrane were phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin (CL), phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidylserine (PS). The relative proportion of PE decreased with increasing temperature at a constant hydrostatic pressure. The relative proportion of CL increased with increasing temperature at pressures in the range of 0.1 to 30 MPa, but decreased with increasing temperature at 40 MPa. At 10 to 30°C, the CL content did not show significant changes with increasing hydrostatic pressures, except at a hydrostatic pressure near the upper limit for growth where the CL content increased markedly. It is worth noting that the effect of elevated hydrostatic pressure is comparable to the effect of low temperature on both fatty acyl chains and head groups of phospholipids.

Key Words : barotolerant bacterium, hydrostatic pressure, temperature, membrane composition

\* 1 海洋科学技術センター 深海環境フロンティア 深海微生物研究グループ

\* 2 Japan Marine Science and Technology Center

## 1 はじめに

生育温度, pH, 塩濃度, 圧力, 酸素濃度そして培地組成などの環境因子は微生物の生育に大きな影響を与える。1962年にMarrとIngrahamによって初めて*Escherichia coli*の細胞膜脂肪酸組成が生育温度に依存して変化することが報告された<sup>1)</sup>。それ以来生育温度の変化に伴う細胞膜組成の変化に関する研究結果が数多く報告された<sup>2)~10)</sup>; 例えば, 不飽和脂肪酸の含有量の変化や脂肪酸の炭素鎖長の変化, リン脂質の極性部位の変化等である。環境変化に応答した細胞膜組成変化の生理学的意義は「膜脂質の相転移温度を変化させ, 生育環境において適切な膜流動性を保つことにより, 細胞膜の正常な機能を維持する」であると考えられている。このような生育環境に適した細胞膜流動性を維持する機構は 'homeoviscous adaptation' と呼ばれている<sup>11)~13)</sup>。

細胞膜組成変化は環境の温度変化だけでなく, 生育環境の化学的変化或いは物理的変化によっても引き起こされることが報告されている<sup>14)~24)</sup>。

深海底は, 低温かつ高圧力環境という極限環境の一例である; 深海 (1,000~11,000m) における圧力は10~110 MPa (1気圧 =  $1.01325 \times 10^5$  Pa = 0.1MPa) にも及び, 深海底の温度は2~4℃である。脂質膜に対する加圧効果は温度低下の効果に相当すると報告されている<sup>26)</sup>。つまり一定温度の環境において, 生育圧力が上昇すると脂質二重膜の流動性が低下し, 細胞に致命的な影響を及ぼす可能性があると考えられる。DeLongとYayanosは静水圧が高まることにより好圧性細菌の不飽和脂肪酸の割合が高まることを報告した<sup>25)</sup>。

過去20年間に数多くの好/耐圧性細菌が深海環境から単離されている。深海底に生息している微生物は高圧力及び低温の環境に適応するための特別な機構を持っていると考えられている。そして, これら微生物の生理学的及び遺伝学的な研究は最近めざましい進歩を遂げている<sup>27)</sup>。しかし好/耐圧性細菌の研究が数多くなされていながらもかわらず, 圧力変化に伴う '内膜' 組成の変化に関してはほとんど研究がなされていない。

そこで今回, 我々は深海底土壌から単離した耐圧性細菌の生育及び内膜組成に与える静水圧と生育温度の影響に関して報告をする。

## 2 実験方法

### 2.1 菌株と生育環境

本実験では日本海溝深海底土壌中 (深度4,418m) から単離した細菌を使用した。この細菌は一般的な形態的及び生化学的な試験から*Pseudomonas*属細菌であると同定された (Table 1)。使用した培地組成 (1リットルあたり) は, Marine Broth 2216 (Difco, Co.) 37.4 g, glucose 5 g, KNO<sub>3</sub> 5 g。単離した細胞を圧力培養器を用いて, 生育温度10, 20, 30, 37℃, 圧力は0.1~60MPaの範囲で培養した。細胞の生育は定常期における最終濁度 (測定波長660nm) 及び対数増殖期における比増殖速度によって評価した。

Table 1 Taxonomic characteristics of the barotolerant bacterium

Morphology	Rod
Pigmentation	Yellow
Gram stain	-
Motility	+
Flagella	Single & Polar
Oxidase	+
Catalase	+
O/F test	O
Growth in air	+
Nitrate respiration	+
Maximum growth temperature	25 - 30℃

### 2.2 細胞膜の回収

定常期に達した細胞を高速遠心分離 (5,000 g, 10min, 4℃) によって集菌し, 以下に示す緩衝液で洗浄した; 3% NaCl-0.07% KCl-0.53% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O-1.08% MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O-0.1% CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O-50mM Tris-HCl (pH 7.5)。この細胞を50mM Tris-HCl (pH7.5) -5mM Na-EDTA-0.6 M sucrose bufferに再懸濁した後, 菌体を超音波破砕した。未破砕菌体を低速遠心分離 (1,200 g, 20 min, 4℃) によって除去した。細胞膜画分を含む上清の超遠心分離操作 (100,000 g, 1.5 hr, 4℃) を行った。細胞膜沈殿を再度同条件で超遠心分離した後, その沈殿を0.25 M sucrose-50 mM Tris-HCl (pH 7.5) -5 mM Na-EDTA buffer に再懸濁した後, それをシヨ糖密度勾配遠心法 (1, 1.2, 1.6, 1.8, and 2.3 M sucrose, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) -5 mM Na-EDTA; 17hr, 100,000 g, 4℃) により膜画分の分離を行った。内膜画分は, 1.2 M と 1.6 M sucrose 層の間に濃縮された。

### 2.3 脂肪酸とリン脂質の抽出及び解析

内膜脂質の抽出は Bligh & Dyer 法に従った<sup>28)</sup>。脂肪酸は, HCl-methanol (5%, w/v) 中で2時間, 95℃の条件下においてメチルエステル化を行った。生成したメチルエステルを*n*-hexaneによって抽出し, *n*-hexaneを除去した後アセトニトリルに再懸濁して, ガスクロマトグラフィー用のサンプルとした。解析にはキャピラリーガスクロマトグラフィー (model GL-380, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan; capillary column, FFS ULBON HR-SS-10, 0.25 mm × 25 m, Shinwa Chemical Co., Tokyo, Japan) を用いた。カラムの温度は以下のようにプログラムした: 開始から5分間は120℃。その後毎分3℃の割合で120℃から220℃まで上昇させた。そしてその最終温度を10分間続けた。注入及び検出部における温度はそれぞれ, 250℃, 280℃とした。脂肪酸の同定は, 同条件で流した市販の標準サンプル (C<sub>10</sub> から C<sub>24</sub> の直鎖と分枝脂肪酸; Funakoshi Chemicals, Tokyo, Japan) の検出時間と比較することにより行った。リン脂質の抽出は薄層クロマトグラフィー (HPTLC silica gel 60 F254 plates with a concen-

trating zone, MERCK) によって分離した。展開は、以下に溶媒を用いた；(a) chloroform-methanol-water (65:25:4, by vol.)；(b) chloroform-acetone-methanol-acetic-acid-water (10:4:2:2:1, by vol.)。またリン脂質の同定は、同条件において流した標準リン脂質のR<sub>f</sub>値と比較することにより行った。リン脂質の相対濃度は、デンストメータ (The Discovery Series™, pdi Inc., New York) を用いて定量した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 耐圧性細菌のスクリーニングと様々な環境下における生育

微生物を圧力培養器内で培養する場合、酸素供給という難しい問題が存在する。したがって本実験に使用する微生物は必ずしも酸素を必要とすることなく生育出来る好/耐圧性細菌であることが望ましい。数回のスクリーニングの後、日本海溝の深海底土壌 (深度4,418m) から耐圧性細菌が単離された。本細菌は、硝酸呼吸によって生育が可能であり、我々の目的に適した細菌であった。この細菌は標準的な生化学・生理学的な試験から、*Pseudomonas*属細菌であると同定された (Table 1)。この細菌を *Pseudomonas* sp. BT と命名した。

*Pseudomonas* sp. BT の生育可能な静水圧力範囲は生育温度に依存した (Fig. 1)。30℃においては、0.1MPa (大気圧) から40MPaにかけて良好な生育を示し、最終濁度はいずれも1を超えた。しかし50MPaになると生育は悪くなり、最終濁度も約0.5まで低下した。ところが50MPaに加圧されていた細胞を大気圧下に戻すと、細胞は再び増殖を開始することが認められた。すなわち *Pseudomonas* sp. BT はこの圧力環境下においては増殖が抑制されているだけであり、死滅するわけではないことが明らかとなった。*Pseudomonas* sp. BT は60MPaにおいてさらに生育が悪くなり、最終濁度は約0.2であった。生育温度が30℃の場合、最大増殖速度は10MPaにおいて0.23h<sup>-1</sup>で

あった。それ以上の圧力では、圧力の上昇に伴う増殖速度の低下が認められた。

37℃において、*Pseudomonas* sp. BTは0.1から30MPaにかけて良好な生育を示した。しかし40MPaになると生育は非常に悪くなり、最終濁度も約0.1にまで低下した。37℃における最大増殖速度は20MPaにおいて0.21h<sup>-1</sup>であった。

Fig. 1に示されているように、20℃及び10℃においては、最終濁度から判断する限りでは良好な生育を示していた。しかしながら、これらの温度における生育速度は30℃及び37℃のそれと比較すると極めて遅いものだった。20℃及び10℃における最大増殖速度はそれぞれ0.074, 0.033 h<sup>-1</sup>であった。20℃においては0.1～50MPa, 10℃においては0.1～40MPaの圧力領域において生育が認められた。

これらの結果から、深海海底土壌より単離された *Pseudomonas* sp. BTは、単離された環境 (深度4418m) では休眠状態かあるいはかなり遅い増殖をしているものと推測された；10℃, 40MPaにおけるデータから、単離された環境 (約40MPa, 4℃) における増殖速度は0.010h<sup>-1</sup>より遅いと推定された。これは実験室内での実験結果であるが、深海底に生息する細菌の増殖速度は深度に比例して長くなることも報告されている<sup>29)</sup>。

生育の至適圧力は生育温度の上昇に伴って高圧側に移行することが認められた (Fig. 1)。10℃及び20℃における至適生育圧は0.1MPa (大気圧) であったが、30℃, 37℃においてはそれぞれ10MPa, 20MPaであった。このような現象は既にいくつかの報告がなされており<sup>30)~34)</sup>、一般に細胞膜脂質に対する加圧効果は温度を下げる効果に相当すると解釈されている<sup>26)</sup>；高静水圧は脂質二重膜をゲル状態に転移させる原因となりうる。仮に細胞膜の流動性が直接 *Pseudomonas* sp. BT の生育速度に影響を及ぼすと考えると生育温度の上昇に伴う至適生育圧の高圧側への移行は、予想される現象であった。

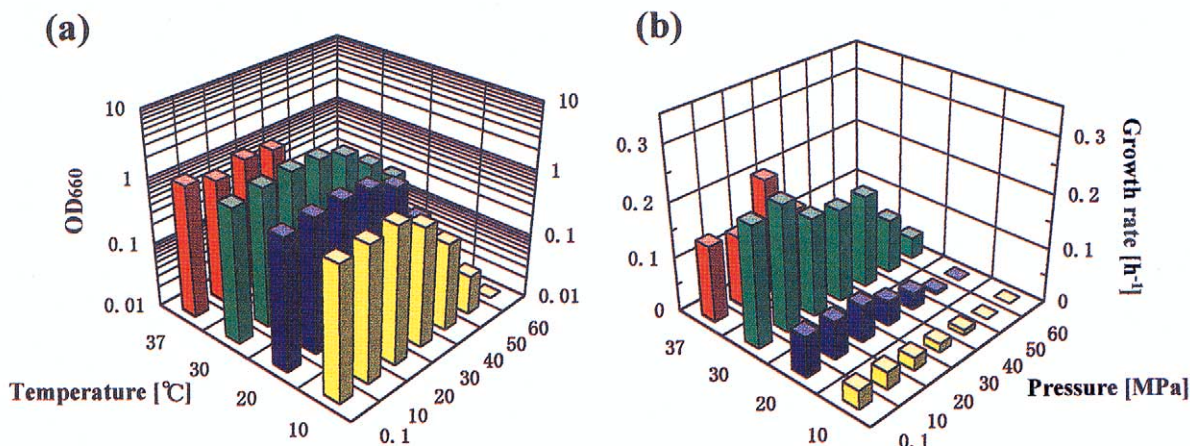


Fig. 1 Effect of temperature and hydrostatic pressure on the growth of *Pseudomonas* sp. BT. (a) Final optical density at 660 nm (OD<sub>660</sub>). (b) Specific growth rate, determined by measuring the OD<sub>660</sub> in the mid-log phase of growth. The values shown are the average of at least independent experiments.

### 3.2 様々な環境下における耐圧性細菌

#### *Pseudomonas* sp. BT の内膜脂肪酸組成

グラム陰性細菌の様々な生体エネルギー変換系、例えば呼吸鎖の酵素群やイオンポンプ、ATP合成酵素等は内膜に局在し、細胞の生命活動においてとても重要な役割を担っている。

種々の環境下で培養した *Pseudomonas* sp. BT から脂肪酸を抽出した。細胞膜脂肪酸組成は、細胞の生育時期や環境によって大きく変化することが既に報告されている<sup>35), 36)</sup>。したがって生育時期による脂肪酸組成変化の影響を除くため、今後の実験においては定常状態まで培養した *Pseudomonas* sp. BT の内膜を実験標品として使用した。

*Pseudomonas* sp. BT の内膜脂肪酸組成はいかなる生育環境においても C16:0, C16:1, C18:0 及び C18:1 であった (Table 2)。この細胞膜脂肪酸組成は、全菌体から抽出した脂肪酸組成とほぼ同等であったが、本研究の目的は生育環境の変化に伴う '内膜組成' の変化であるので、敢えて内膜画分を回収し、そこから脂肪酸を抽出し、分析した。

Fig. 2 に示されているように、総 C16 (C16:0 + C16:1) と総 C18 (C18:0 + C18:1) の相対濃度は生育環境に依存せず、ほぼ一定であり、それぞれ 60, 40% であった。一般に短い炭素鎖の脂肪酸を持つ脂質は長い炭素鎖の脂肪酸を持つ脂質よりも低い相転移温度を示すことが知られている。しかしながら *Pseudomonas* sp. BT の場合、生育温度や圧力変化による脂肪酸の炭素鎖長の変化は認められなかった。これは *Pseudomonas* sp. BT においては適切な膜流動性を保つためには炭素鎖長を変化させる必要が

ないことを示唆していた。これとは異なり、*Micrococcus cryophilus* の場合、生育温度の低下に伴い脂肪酸の炭素鎖長が短くなることが報告されている<sup>37)</sup>。しかし *M. cryophilus* においては、脂肪酸の不飽和/飽和度の変化は認められていない。

*Pseudomonas* sp. BT において、生育温度及び圧力の変化に伴った C16 や C18 の不飽和度の変化が認められた (Fig. 3)。総 C16 及び総 C18 の相対量には変化が認められなかったことから、不飽和度の変化は等しい炭素鎖長の脂肪酸間で行われているのではないかと考えられた。

20MPa における C16 の不飽和度は、37°C で 1.5, 10°C では 5.6 であった。一方 C18 の不飽和度は、C16 の場合と比較して温度変化に対して顕著な変化を示した。例えば

20MPa における不飽和度は 37°C で 1.8 であり、10°C では 22.8 であった。すなわち *Pseudomonas* sp. BT の場合、不飽和 (飽和) 脂肪酸から飽和 (不飽和) 脂肪酸への変換は C16 の場合よりも C18 の方がより起こりやすいのではないかと考えられた。

*Pseudomonas* sp. BT の不飽和脂肪酸の割合はいかなる環境下においても比較的高い値を示していた (Fig. 4); 例えば 20MPa においては 37°C で 61.5%, 10°C で 89.7% であった。一般に不飽和脂肪酸を持つ脂質は、飽和脂肪酸を持つ脂質よりも相転移温度が低いことが知られている。したがって *Pseudomonas* sp. BT は内膜の不飽和脂肪酸の割合が比較的高いため、高圧力環境下においても比較的容易に適応が可能なのではないかと考えられた。不飽和脂肪酸の含有量が高い例として絶対好冷性細菌及び耐冷性菌の細胞膜組成に関する報告がある<sup>38), 39)</sup>。

Table 2 Effects of temperature and hydrostatic pressure on the fatty acid composition of the innermembrane lipids of *Pseudomonas* sp. BT cells harvested in the stationary phase of growth. Relative concentration of (a) C 16:0, (b) C 16:1, (c) C18:0 and (d) C 18:1.

(a)		16:0							
MPa	10°C	20°C		30°C		37°C		SE	
		%	SE	%	SE	%	SE		
0.1	10.2	0.26	17.8	0.32	19.7	1.02	24.6	0.08	
10	9.1	0.03	15.2	0.02	18.0	1.12	23.8	0.05	
20	8.5	0.00	12.7	0.01	18.5	0.34	25.1	0.00	
30	9.0	0.01	12.6	0.03	16.1	0.90	29.0	0.05	
40	17.5	0.15	14.9	0.07	19.7	0.66	NT	NT	
50	NT	NT	NT	NT	18.8	3.74	NT	NT	

(b)		16:1							
MPa	10°C	20°C		30°C		37°C		SE	
		%	SE	%	SE	%	SE		
0.1	43.9	0.06	44.4	0.68	31.5	1.78	32.6	0.12	
10	46.2	0.21	41.7	0.03	31.4	2.61	35.2	0.03	
20	47.3	0.06	42.3	0.06	35.7	0.98	36.9	0.11	
30	45.6	0.13	43.2	0.03	33.5	2.93	34.6	0.16	
40	40.5	0.10	37.3	0.20	36.5	1.52	NT	NT	
50	NT	NT	NT	NT	14.0	3.82	NT	NT	

(c)		18:0							
MPa	10°C	20°C		30°C		37°C		SE	
		%	SE	%	SE	%	SE		
0.1	4.0	0.38	5.3	0.05	4.0	0.51	13.3	0.09	
10	2.7	0.02	4.5	0.01	3.7	0.36	13.1	0.05	
20	1.9	0.01	3.9	0.01	2.6	0.22	13.4	0.12	
30	3.2	0.01	3.3	0.08	4.0	0.24	17.2	0.15	
40	9.3	0.07	8.3	0.01	5.9	0.64	NT	NT	
50	NT	NT	NT	NT	43.1	5.72	NT	NT	

(d)		18:1							
MPa	10°C	20°C		30°C		37°C		SE	
		%	SE	%	SE	%	SE		
0.1	41.9	0.16	32.5	0.94	44.8	3.06	29.5	0.02	
10	42.0	0.21	38.7	0.04	47.0	3.90	27.9	0.03	
20	42.4	0.06	41.2	0.06	43.2	1.38	24.7	0.07	
30	42.3	0.12	41.0	0.07	46.4	3.99	19.2	0.04	
40	32.7	0.09	39.5	0.28	38.0	2.17	NT	NT	
50	NT	NT	NT	NT	24.1	3.87	NT	NT	

The values shown are the average of at least three independent experiments. NT: no test.

総飽和脂肪酸に対する総不飽和脂肪酸の割合 (UFA/SFA) において生育温度に依存した変化が認められた。例えばFig.4に示されているように、20MPaにおけるUFA/SFAは、37℃で1.6、10℃で8.7であった。DeLongとYayanosは、生育環境の圧力の上昇に伴い好圧性細菌CNPT3の総不飽和脂肪酸の割合が高まることを報告している<sup>25)</sup>。*Pseudomonas* sp. BTにおいても圧力の変化に伴うUFA/SFAの変化が認められた。例えば0.1MPaにおいて10℃では6.1であり、37℃においては1.6であった。また20MPaにおいては10℃で8.7であった。ChongとCossinsは100MPaの圧力変化が与える膜脂質への効果は、温度変化に換算すると13~19℃の低下に相当すると報告している<sup>26)</sup>。この見解からすると、*Pseudomonas* sp. BTの生育に対する圧力の効果はほんの7~10℃でしかない。したがって我々の実験結果から加圧の効果は温度効果と全く

同等というわけではないことも明らかにされた(Fig. 3, 4)。

Fig. 4に示されているように、圧力の生育上限においてUFA/SFAは低下する傾向にあることが認められた。これはこの領域において細胞膜脂質合成系の何らかの異常が原因ではないかと考えられた。

また *E.coli* に関して次のような報告がある；細胞が通常生育している状態においては、膜脂質はせいぜい20%がゲル状態にあるだけである。しかしながらゲル状態にある膜脂質が55%を超えると、細胞はもはや生育することが出来なくなる<sup>40), 41)</sup>。この報告は細胞の生命活動を維持するためには、細胞膜流動性が非常に重要な因子となることを示している。様々な環境下において *Pseudomonas* sp. BTで観察された脂肪酸組成の変化は、*E.coli* において観察された現象と生理学的な意味においてとても関係の深い現象ではないかと考えられる。

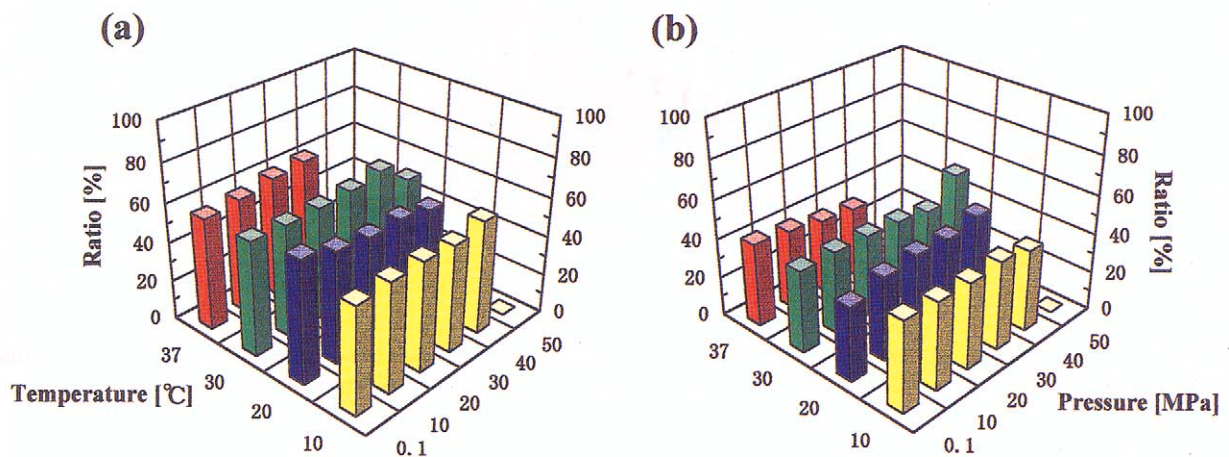


Fig. 2 Effect of temperature and hydrostatic pressure on the chain length of fatty acids in the inner membrane lipids of *Pseudomonas* sp. BT. Relative concentration of (a) C16 and (b) C18.

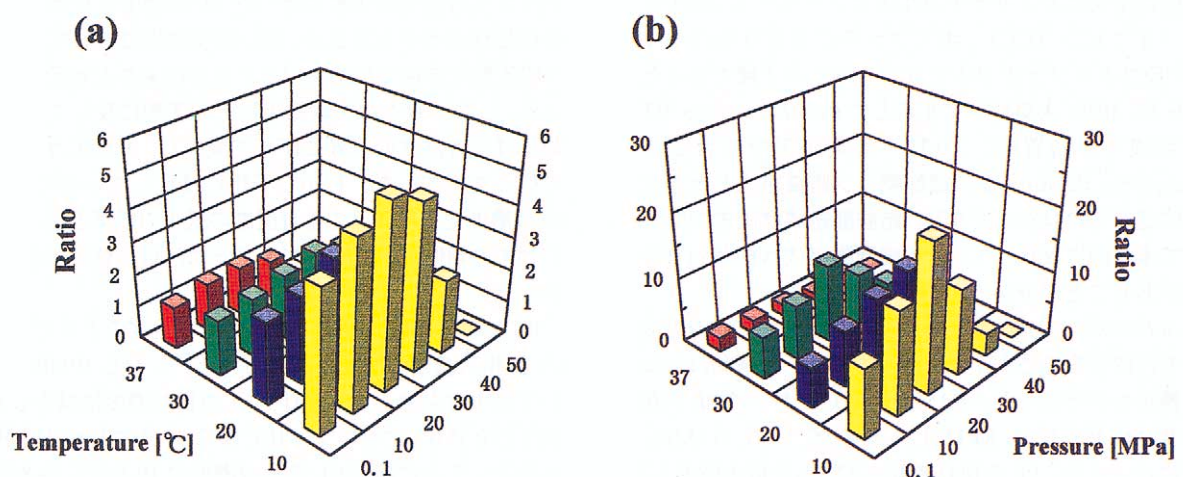


Fig. 3 Effect of temperature and hydrostatic pressure on the ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids (UFA/SFA) in the inner membrane lipids of *Pseudomonas* sp. BT. Relative concentration of (a) UFA/SFA in C16 and (b) UFA/SFA in C18.

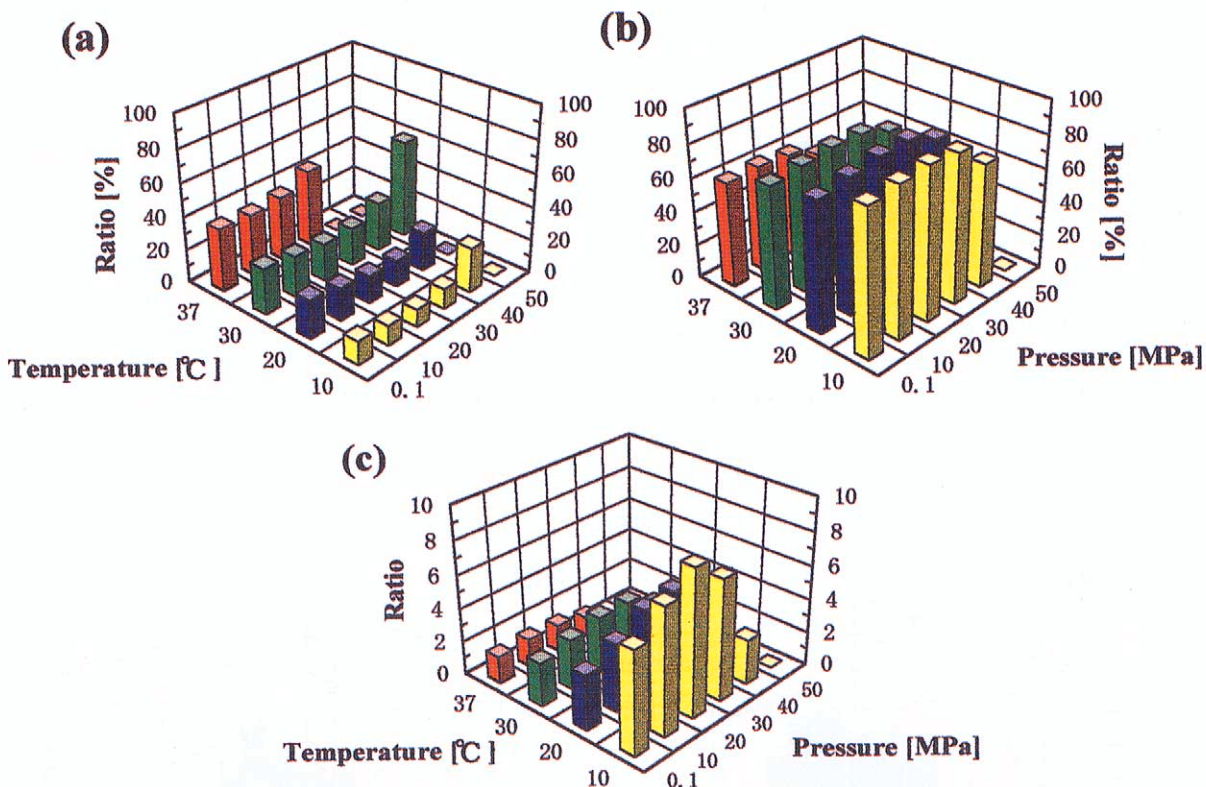


Fig. 4 Effect of temperature and hydrostatic pressure on the ratio of total acids to total saturated fatty acids in the inner membrane lipids of *pseudomonas* sp. BT. Relative concentration of (a) total saturated fatty acids, (b) total unsaturated fatty acids. (c) Ratio of total unsaturated fatty acids to saturated fatty acids.

### 3.3 様々な環境下における耐圧性細菌

#### *Pseudomonas* sp. BT の内膜リン脂質組成

不飽和脂肪酸の割合や脂肪酸の炭素鎖長と同様に細胞膜リン脂質の極性部位も細胞膜流動性に大きな影響を与える。いかなる環境下においても *Pseudomonas* sp. BT のリン脂質組成はホスファチジルエタノールアミン (PE), カルジオリピン (CL), ホスファチジルグリセロール (PG) 及びホスファチジルセリン (PS) の 4 種であった (Table 3)。30℃, 大気圧下で生育した *Pseudomonas* sp. BT の細胞膜リン脂質は, 30℃, 大気圧下で生育した *Pseudomonas fluorescens* の細胞膜リン脂質組成と大きな違いは認められなかったが<sup>33)</sup>, 脂肪酸組成は両者の間において本質的に異なっていた: 細胞膜組成は細菌固有の特徴があることが分かる。

*Pseudomonas* sp. BT の PE の相対濃度は圧力と生育温度の双方に依存することが認められたが, その挙動はかなり複雑なものであった。0.1MPa, 20℃において PE の相対濃度は最大となり, 84.1%にも及んだ。一方, 0.1MPa, 37℃においては, PE の相対濃度は 27.8%と最大時の 1/3 しか存在しなかった。10℃では圧力によらず, ほぼ一定の値を示していた (65.4~69.3%)。20℃においては圧力の上昇に伴い, PE の濃度低下が認められた (84.1~62.4%)。30℃及び 37℃では *Pseudomonas* sp. BT が良好に生

育している条件下においては, 圧力の上昇に伴い PE の濃度は増加した (30℃においては 56.6 から 72.7%, 37℃においては 27.8 から 64.7%)。

脂肪酸組成が等しい場合, PE の相転移温度は PG と比較してかなり高いことが一般に知られている<sup>42)</sup>。したがって生育温度の上昇に伴った PE の濃度上昇は細胞膜の相転移温度を上昇させ, 高い温度環境においても適切な膜流動性を保つ役割を担うことが出来ると考えられている。しかし我々の実験結果はその予想に反して, PE の割合は生育温度の上昇に伴って減少し, また圧力の上昇に伴って増加した。しかし予想には反しているにせよ, PE の濃度変化において生育温度の低下の効果と圧力上昇の効果の類似性が認められることは注目に値する事実であった。

0.1 から 30MPa の領域において生育温度の上昇に伴い, CL の相対濃度の増加が認められた。しかし 40MPa においては生育温度の上昇に伴い CL の相対濃度は減少した。例えば 0.1MPa において, 10℃から 37℃に生育温度が高まると, それに伴い CL の相対濃度は 10.3 から 53.8%へと増加した。しかし 40MPa においては生育温度が 10℃から 30℃に上昇するに伴い, 相対濃度は 19.7 から 8.8%まで減少した。10℃及び 20℃においては, 生育上限の圧力領域を除いて, CL の濃度には顕著な変化は認められな

Table 3 Effects of temperature and hydrostatic pressure on the phospholipid composition of the inner membrane of *Pseudomonas* sp. BT. Relative concentration of (a) phosphatidylserine (PS), (b) phosphatidylglycerol (PG), (c) cardiolipin (CL), and (d) phosphatidylethanolamine (PE).

(a) PS									(b) PG								
MPa	10°C		20°C		30°C		37°C		MPa	10°C		20°C		30°C		37°C	
	%	SE	%	SE	%	SE	%	SE		%	SE	%	SE	%	SE	%	SE
0.1	5.9	0.6	0.5	0.1	8.5	0.7	5.2	0.9	0.1	15.4	0.4	8.1	0.5	17.1	2.6	13.3	2.7
10	6.9	0.8	1.7	0.4	7.5	1.0	5.5	1.2	10	15.2	0.4	9.5	0.2	14.6	1.7	19.7	2.7
20	8.6	0.8	7.1	0.2	3.4	0.8	15.1	1.2	20	15.0	0.6	12.5	0.0	19.3	0.7	16.0	1.2
30	6.0	0.8	7.5	0.1	4.6	1.0	3.1	0.5	30	17.2	0.8	14.0	0.0	18.6	2.0	10.4	1.4
40	3.9	2.1	5.8	0.3	1.4	0.6	NT	NT	40	10.9	2.5	18.2	0.7	17.1	3.2	NT	NT
50	NT	NT	NT	NT	2.3	1.3	NT	NT	50	NT	NT	NT	NT	3.2	1.5	NT	NT

(c) CL									(d) PE								
MPa	10°C		20°C		30°C		37°C		MPa	10°C		20°C		30°C		37°C	
	%	SE	%	SE	%	SE	%	SE		%	SE	%	SE	%	SE	%	SE
0.1	10.3	0.3	7.3	1.1	17.8	2.2	53.8	0.7	0.1	68.3	0.2	84.1	0.8	56.6	4.1	27.8	1.7
10	8.7	0.8	11.0	0.4	14.5	1.9	38.4	2.6	10	69.3	0.8	77.9	0.3	63.4	3.0	36.3	2.1
20	9.1	0.7	9.4	1.1	11.6	0.1	33.5	1.8	20	67.3	0.6	71.1	0.9	65.7	0.3	35.4	0.5
30	8.7	0.6	7.8	0.4	9.9	2.0	21.9	2.2	30	68.1	0.7	70.8	0.4	66.9	2.7	64.7	3.0
40	19.7	11.5	13.5	0.3	8.8	2.6	NT	NT	40	65.4	8.7	62.4	0.8	72.7	4.2	NT	NT
50	NT	NT	NT	NT	33.6	3.0	NT	NT	50	NT	NT	NT	NT	63.1	1.8	NT	NT

The values shown are the average of at least three independent experiments. NT: no test

かった。これらの現象は生育上限の圧力環境下ではリン脂質の合成経路に何らかの異常が起こるためではないかと考えられた。またCLの濃度変化において生育温度低下の効果と圧力上昇の効果との間に類似性が認められたことは注目に値する事実であった。

PEと同様にCLにおいても脂肪酸組成が等しい場合、CLの相転移温度はPGと比較してかなり高いことが一般に知られている<sup>42)</sup>。したがって、上述した生育環境の変化に伴うPEの相対濃度の変化とは異なり、CLの相対濃度の変化は膜全体の相転移温度から説明できる現象であると考えられた。脂肪酸の組成が同じならばPEとCLの相転移温度は両者においてほとんど等しいことも報告されている。*Pseudomonas* sp. BTの場合、生育温度の上昇に伴って実際にはPEの相対濃度は減少してしまうが、CLの相対濃度の上昇によって膜全体の熱力学的な特徴は相補され、適切な細胞膜の状態が維持されているのではないかと考えられた。

Table 3に示されているように、PSの相対濃度は0.5% (20°C, 0.1MPa) から15.1% (37°C, 20MPa) 程度であり、PGにおいては8.1% (20°C, 0.1MPa) から19.7% (37°C, 10MPa) であり、生育環境によって大きくその相対濃度に変化するという事は認められなかった。

#### 4 おわりに

温度及び圧力の細胞膜組成に与える効果に関する今回の報告は、ある特定の耐圧性細菌に対して行った実験結果に過ぎない。しかしながらここで得られた情報には、細胞膜組成に与える生育温度及び圧力効果の一般的事実が含まれているはずである。残念ながら、今回の実験結果だけでは生育と細胞膜組成との関係についてははっきりした結論を導き出すことは出来なかった：ある結果は既に報告されていたものと類似していたり、またある結果は過去の報告からは容易に説明がつかないものであった。1962年以来、様々な環境因子の細胞膜組成に与える影響に関する研究は続いているが、実験結果の解釈に関して混乱している部分があることも事実である。つまり 'homeoviscous adaptation' ですら本質的な説明がなされているとは言えず、いまだ作業仮説の域を脱していないと思われる。現在「細胞膜の流動性を保つために」という合目的的表現を用いて説明されているこの現象を物理学や数学的な考え方・手法を用いて客観的に表現しなければならないと筆者は考えている。それによって初めてこの現象が真の自然の姿として解釈され得るのだと思う。

## 参考文献

- 1) A. G. Marr, and J. L. Ingraham, "Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*," J. Bacteriol, 84, 1260-1267. (1962)
- 2) C. A. Abbas, and G. L. Card, "The relationships between growth temperature, fatty acid composition and the physical state and fluidity of membrane lipids in *Yersinia enterocolitica*," Biochim. Biophys. Acta, 602, 469-476. (1980)
- 3) C. O. Gill, and J.R.Suisted, "The effects of temperature and growth rate on the proportion of unsaturated fatty acids in bacterial lipids," J. Gen. Microbiol, 104, 31-36. (1978)
- 4) Y. Hasegawa, N. Kawada, and Y. Nosoh, "Change in chemical composition of membrane of *Bacillus caldotenax* after shifting the growth temperature," Arch. Microbiol. 126, 103-108. (1980)
- 5) A. M. B. Kropinski, V. Lewis and D. Berry, "Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO," J. Bacteriol, 169, 1960-1966. (1987)
- 6) J. Reizer, N. Grossowicz and Y. Barenholz, "The effect of growth temperature on the thermotropic behavior of the membranes of a thermophilic *Bacillus*. Composition-structure-function relationships," Biochim. Biophys. Acta, 815, 268-280. (1985)
- 7) L. Rilfors, A. Wieslander and S. Stahl, "Lipid and protein composition of membranes of *Bacillus megaterium* variants in the temperature range 5 to 70°C," J. Bacteriol, 135, 1043-1052. (1978)
- 8) C. Senault, J. Yazbeck, M. Gubern, R. Portet, M. Vincent, and J. Gallay, "Relation between membrane phospholipid composition, fluidity and function in mitochondria of rat brown adipose tissue. Effect of thermal adaptation and essential fatty acid deficiency," Biochim. Biophys. Acta, 1023, 283-289. (1990)
- 9) M. Suutari, and S. Laakso, "Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Mycobacterium phlei*," Arch. Microbiol, 159, 119-123. (1993)
- 10) A. Weerkamp, and W. Heinen, "Effect of temperature on the fatty acid composition of the extreme thermophiles, *Bacillus caldolyticus* and *Bacillus caldotenax*," J. Bacteriol, 109, 443-446. (1972)
- 11) M. K. Behan, A. G. Macdonald, G. R. Jones, and A.R.Cossins, "Homeoviscous adaptation under pressure : the pressure dependence of membrane order in brain myelin membranes of deep-sea fish," Biochim. Biophys. Acta, 1103, 317-323. (1992)
- 12) A. G. Macdonald, "The homeoviscous theory of adaptation applied to excitable membranes : A critical evaluation," Biochim. Biophys. Acta. 1031, 291-310. (1990)
- 13) M. Sinensky, "Homeoviscous adaptation a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 522-525. (1974)
- 14) R.L.Adams, and N.J.Russell, "Interactive effects of salt concentration and temperature on growth and lipid composition in the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola*," Can. J. Microbiol, 38, 823-827. (1992)
- 15) S. Clejan, T. A. Krulwich, K. R. Mondrus, and D. Seto-Yong, "Membrane lipid composition of obligately and facultatively alkaliphilic strains of *Bacillus* spp.," J. Bacteriol, 168, 334-340. (1986)
- 16) K. Hanna, C. Bengis-Garber, D. J. Kushner, M. Kogut, and M. Kates, "The effect of salt concentration on the phospholipid and fatty acid composition of the moderate halophile *Vibrio costicola*," Can. J. Microbiol, 30, 669-675. (1984)
- 17) M. Kogut, and N. J. Russell, "The growth and phospholipid composition of a moderately halophilic bacterium during adaptation to changes in salinity," Curr. Microbiol, 10, 95-98. (1984)
- 18) D. J. Kushner, and H. Onishi, "Contribution of protein and lipid components to the salt response of envelopes of an extremely halophilic bacterium," J. Bacteriol. 91, 653-660. (1966)
- 19) L. O. Martins, A. S. Jurado, and V. M. C. Madeira, "Composition of polar lipid acyl chains of *Bacillus stearothermophilus* as affected by temperature and calcium," Biochim. Biophys. Acta, 1045, 17-20. (1990)
- 20) J. T. McGarrity, and J. B. Armstrong, "The effect of temperature and other growth conditions on the fatty acid composition of *Escherichia coli*," Can. J. Microbiol, 27, 835-840. (1981)
- 21) K. J. Miller, "Effects of temperature and sodium chloride concentration on the phospholipid and fatty acid compositions of a halotolerant *Planococcus* sp.," J. Bacteriol, 162, 263-270. (1985)
- 22) M. Monteoliva-Sanchez, and A. Ramos-Cormenzana, "Effect of growth temperature and salt concentration on the fatty acid composition of *Flavobacterium halmephilum* CCM2831," FEMS Microbiol. Lett, 33, 51-54. (1986)
- 23) Y. Ohno, I. Yano, T. Hiramatsu, and M. Masui, "Lipids and fatty acids of a moderately halophilic bacterium, No. 101," Biochim. Biophys. Acta, 424, 337-350. (1976)
- 24) Y. Ohno, I. Yano, and M. Masui, "Effect of NaCl concentration and temperature on the phospholipid and fatty acid compositions of a moderately halophilic bacterium, *Pseudomonas halosaccharolytica*," J. Biochem, 85, 413-421. (1979)
- 25) E. F. DeLong, and A. A. Yayanos, "Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure," Science, 228, 1101-1103. (1985)



- 26) P. L-G. Chong, and A. R. Cossins, "A differential polarized phase fluorometric study of the effects of high hydrostatic pressure upon the fluidity of cellular membranes," *Biochemistry*, 22, 409-415. (1983)
- 27) C. Kato, A. Inoue, and K. Horikoshi, "Characteristics of deep-sea microorganisms adapted to extreme environments," In *Recent Advances in MARINE BIOTECHNOLOGY*, vol. 2. pp. 33-61. Edited by Fingerman, M., R. Nagabhusanam, and M. -F. Tompson. New Delhi : OXFORD, and IBH PUBLISHING PVT. LTD. (1998)
- 28) E. G. Bligh, and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Can. J. Biochem. Physiol*, 37, 911-917. (1959)
- 29) E. F. DeLong, "High-pressure habitats," In *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 2, 405-417. Edited by Lederberg, J. San Diego, Tokyo : Academic Press. (1992)
- 30) F. Canganella, J. M. Gonzalez, M. Yanagibayashi, C. Kato, and K. Horikoshi, "Pressure and temperature effects on growth and viability of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus peptonophilus*," *Arch. Microbiol*, 168, 1-7. (1997)
- 31) G. Erauso, A. -L. Reysenbach, A. Godfroy, J. -R. Meunier, B. Crump, F. Partensky, J. A. Baross, V. Marteinsson, G. Barbier, N. R. Pace, and D. Prieur, "*Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent," *Arch. Microbiol*, 160, 338-349. (1993)
- 32) J. F. Holden, and J. A. Baross, "Enhanced thermotolerance by hydrostatic pressure in the deep-sea hyperthermophile *Pyrococcus* strain ES4," *FEMS Microbiol. Ecol*, 18, 27-34. (1995)
- 33) R. J. Pledger, B. C. Crump, and J. A. Baross, "A barophilic response by two hyperthermophilic, hydrothermal vent *Archaea* : an upward shift in the optimal temperature and acceleration of growth rate at supra-optimal temperatures by elevated pressure," *FEMS Microbiol. Ecol*, 14, 233-242. (1994)
- 34) A. A. Yayanos, "Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9542-9546. (1986)
- 35) C. O. Gill, "Effect of growth temperature on the lipids of *Pseudomonas fluorescens*," *J. Gen. Microbiol*, 89, 293-298. (1975)
- 36) T. Hamamoto, N. Takata, T. Kudo, and K. Horikoshi, "Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710," *FEMS Microbiol. Lett*, 119, 77-82. (1994)
- 37) N. J. Russell, "Alteration in fatty acid chain length in *Micrococcus cryophilus* grown at different temperatures," *Biochim. Biophys. Acta*, 231, 254-256. (1971)
- 38) M. Bhakoo, and R. A. Herbert, "The effects of temperature on the fatty acid and phospholipid composition of four obligately psychrophilic *Vibrio* spp.," *Arch. Microbiol*, 121, 121-127. (1979)
- 39) M. Bhakoo, and R. A. Herbert, "Fatty acid and phospholipid composition of five psychrotrophic *Pseudomonas* spp. grown at different temperatures," *Arch. Microbiol*, 126, 51-55. (1980)
- 40) J. E. Jr. Cronan, and E. P. Gelmann, "An estimate of the minimum amount of unsaturated fatty acid required for growth of *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem*, 248, 1188-1195. (1973)
- 41) M. B. Jackson, and J. E. Jr. Cronan, "An estimate of the minimum amount of fluid lipid required for the growth of *Escherichia coli*," *Biochim. Biophys. Acta*, 512, 472-479. (1978)
- 42) G. Pluschke, and P. Overath, "Function of phospholipids in *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem*, 256, 3207-3212. (1981)

(原稿受理：1999年8月4日)

