

深海から分離された耐压性微生物 DSS12 株の培養温度、 培養圧力と菌体脂肪酸組成の変化

玉岡 迅^{*1} 柳林 美樹^{*1}
加藤 千明^{*1} 堀越 弘毅^{*1}

深海微生物の耐压機構を明らかにする研究の一環として、常圧でも高圧でも良好に生育する耐压性微生物DSS12株の細胞膜を構成する脂肪酸組成が様々な培養温度、培養圧力においてどのように変化するかを調べた。低温での培養と高圧下の培養ではエイコサペンタエン酸をはじめとする不飽和脂肪酸の含量が増大し、高温、または常圧下の培養ではヘキサデカン酸など飽和脂肪酸の含量が増大した。

これらのことから、この菌株の高圧への適応機構と低温への適応機構が類似していることが示唆された。

キーワード：高度不飽和脂肪酸，耐压機構

Increase of Unsaturated Fatty Acids under High Pressure in a Deep-Sea Bacterium

Jin TAMAOKA^{*2} Miki YANAGIBAYASI^{*2}
Chiaki KATO^{*2} Koki HORIKOSHI^{*2}

A barotolerant starin DSS12 was isolated from a mud sample, which was collected at the bottom of 5,000m depth of Ryukyu Trench, Okinawa. The strain DSS12 was cultured under various pressures (0.1 MPa to 70 MPa) and temperatures (-2C to 16C), and its cellular fatty acid composition was analyzed by gas-chromatography-mass spectroscopy. The main fatty acids of the DSS12 were hexadecanoic acid, hexadecenoic acid, and icosapentanoic acid. At the lower culturing temperature, the contents of hexadecenoic acid and icosapentanoic acid were larger than those at higher culturing temperature. And the content of hexadecanoic acid was larger at higher culturing temperature. Similar patterns were found among cell cultures under higher pressure and lower pressure. Cells cultured under 70 MPa showed higher contents of hexadecenoic acid and icosapentanoic acid than those of cells cultured under lower pressure.

These results indicate that the strain DSS12 uses the same mechanism to adapt to lower temperature and higher pressure, or has similar mechanisms to adapt those different conditions.

Key words : Polyunsaturated fatty acid, Pressure adaptation

* 1 深海環境プログラム

* 2 The DEEPSTAR Group

1 はじめに

深海微生物研究グループでは、センター保有の有人潜水船「しんかい2000」「しんかい6500」によって沖縄の熱水湧水域や日本海溝、マリアナ海溝より採集された深海底泥サンプルから多数の深海微生物を分離し、それらの生理的性質や生化学的性状、遺伝学的特徴などについて研究を続けている。特に深海微生物の耐压機構についてはこれまで遺伝子の解析を中心に研究を進めていたが、今回我々は、耐压遺伝子によって生理的な耐压機構が発現する場であると考えられる細胞膜の研究に着手した。

生物の細胞膜はまず第一に細胞の内容物を保持するという重要な役目があり、さらに生物はこの細胞膜を通して細胞の外にある栄養物を取り込んだり細胞内の老廃物を排出して代謝活動を維持している。細胞膜は一般に脂質二重層からなっており、この脂質二重層に様々な蛋白質が混じってモザイク構造と呼ばれる物が出来ている。このモザイク構造は固体ではなく、半流動性を保っていることで細胞内と外との物質交換が効率よく行われる。環境の温度が高くなりすぎるなどの何らかの原因でモザイク構造の流動性が高くなりすぎると細胞の内容物を保持できなくなって生物は死滅するし、反対に流動性が低くなりすぎても細胞内と外との物質交換の効率が低くなって生命の維持に必要なだけの代謝が行えなくなってしまう。鳥類や哺乳類のように恒温動物では体温が一定なので細胞膜の構造を変化させる必要がないが、微生物では周りの環境条件に合わせて細胞膜の構造を変化させ、モザイク構造の流動性を一定の範囲に収めるようにしなければ生きていけない。この流動性の調節は、一般には脂質の主要な構成成分である脂肪酸の組成を変化させることで行われることが知られている¹⁾。

一般に深海は水温2℃前後で水深に応じた高圧環境で

あるが、深海微生物はそれらの環境に適応しており、高圧環境に対処するために細胞膜の構造を変化させているはずである。そこで我々は常圧でも高圧でも良好に生育できる耐压性微生物DSS12株を選び、この菌株が培養圧力、あるいは培養温度に応じてどのように細胞膜の構造を変化させているかを調べ、深海微生物の高圧への適応機構の一端を明らかにする事を試みた。

2 材料と方法

2.1 耐压性深海微生物DSS12株

沖縄琉球海溝の底泥より分離した好冷性、耐压性微生物DSS12株(表1)を実験に用いた。この菌株はグラム陰性の短桿菌で極鞭毛による運動性を持っていた(図1)。表には示していないがこの菌株の他の性質も合わせて考えると、この菌は海洋細菌として多数の菌株が分離されている*Shewanella*属の一種と思われる。ただし既知の*Shewanella*属とは異なった面もあり、いずれは新種として登録する必要があるであろう²⁾。

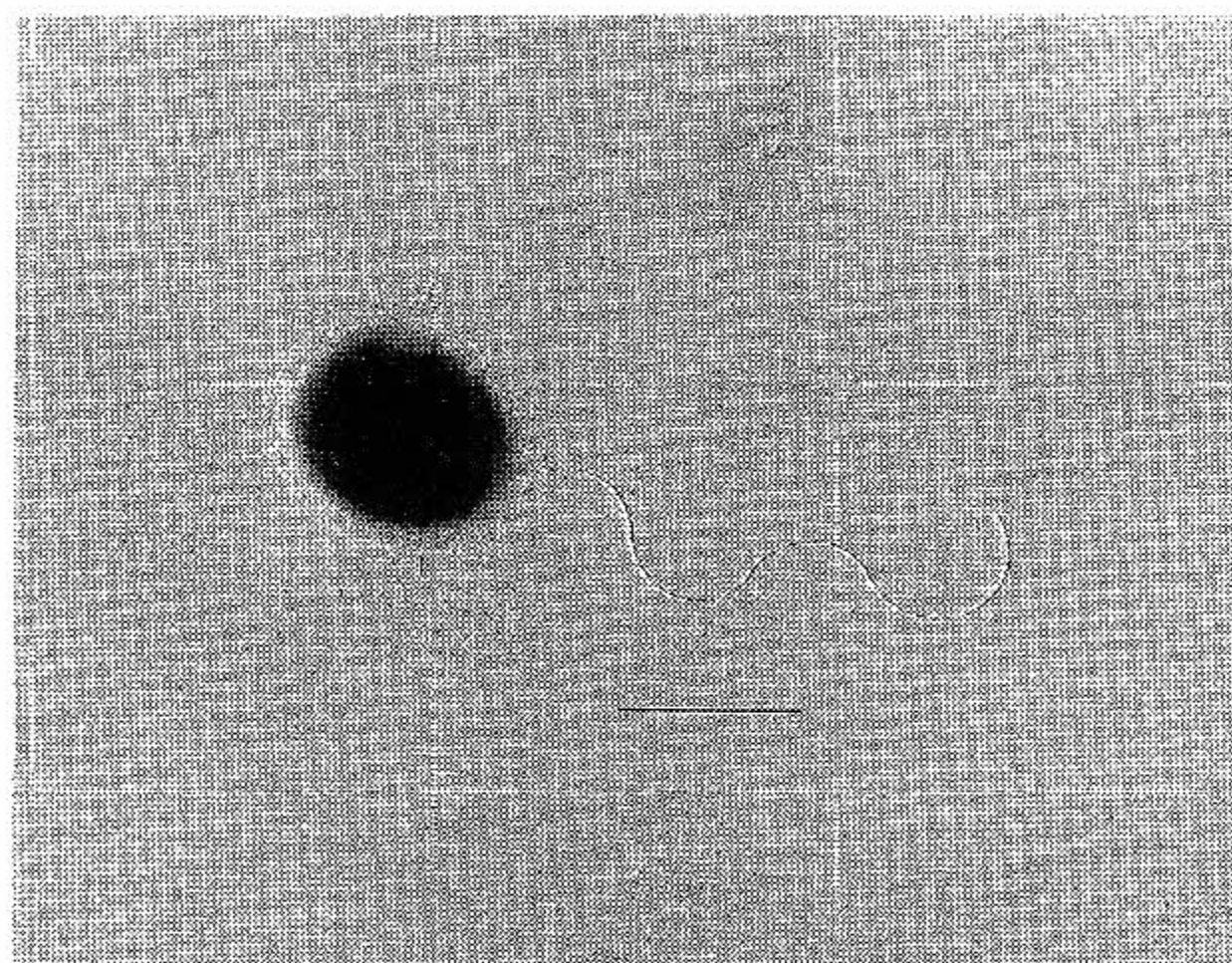


図1 耐压性微生物DSS12株

Fig.1 A barotolerant bacterium DSS12.

Bar=1 μ m

表1 耐压性微生物DSS12株の性質

Table 1 Characteristics of barotolerant bacterium DSS12.

分離源	: 沖縄, 琉球海溝深度5110 mで採取された底泥
グラム染色	: 陰性
形態	: 短桿菌 (0.6-0.8 $\times$ 1-1.5 μ m)
運動性	: あり
鞭毛	: 極鞭毛
生育温度範囲	: -2 $^{\circ}$ C ~ 16 $^{\circ}$ C (最適温度は8 $^{\circ}$ C)
生育圧力範囲	: 0.1 ~ 70 MPa (最適圧力は30 MPa)

2.2 菌体脂肪酸の分析

耐圧性微生物DSS12株をDifco Marine broth中で -2°C ～ 16°C の温度(0.1MPa), または0.1MPaから70MPa(8°C)の加圧条件下で培養し, 菌体脂肪酸組成の変化を調べた。菌体脂肪酸は塩酸メタノール処理によりメチルエステル化し, ヘキサンで抽出, 精製, 脱水後ヒューレットパッカートのガスクロマトグラフマスマススペクトロメトリーにより分析した。分子種の同定は標準脂肪酸の保持時間, 及びマスフラグメントパターンの比較により行った³⁾。

3 結果と考察

3.1 脂肪酸について

表2に各脂肪酸の略記と系統名, 慣用名, それと各脂肪酸の融点をまとめて示す。耐圧性微生物DSS12株が分離された地点の海水温度は約 2°C であり, そのような低温下でも細胞膜の流動性を保つためには融点が 2°C 以下であるヘキサデセン酸(C16:1)と高度不飽和脂肪酸でもあるイコサペンタエン酸(C20:5)がかなりの割合で含まれる必要がある事は明らかである。

3.2 DSS12株の菌体脂肪酸組成

3.2.1 培養温度と脂肪酸組成

DSS12株にはヘキサデカン酸(C16:0)をはじめとする直鎖飽和脂肪酸, ヘキサデセン酸(C16:1)をはじめとする直鎖不飽和脂肪酸, 及びイソ型, アンテイソ型の分岐脂肪酸が含まれていた(図2)。また, 高度不飽和脂肪酸であるイコサペンタエン酸(C20:5)も20%程度含まれていた。

低温での培養では不飽和脂肪酸のヘキサデセン酸(C

16:1)の割合が増加し, 分岐脂肪酸の割合は減少した。イコサペンタエン酸(C20:5)ヘキサデセン酸(C16:1)などの不飽和脂肪酸の合計が全体に占める割合を見ると -2°C の時は最大で約50%を占め, 培養温度が上がるにつれて割合は減少し, 16°C では40%以下になった。イコサペンタエン酸(C20:5)だけに注目すると特に培養温度が低いときと高いときに高い割合を示した。低い培養温度でイコサペンタエン酸が増大するのは細胞膜の流動性を適度に保つために当然だが, 高い培養温度でも増大するのはおそらく脂肪酸の合成そのものは温度が高い方が活発になるためであろう。高い培養温度ではヘキサデセン酸の割合が急激に減少しているのは, イコサペンタエン酸の割合が高いために細胞膜の流動性が高くなりすぎないように, コントロールするためであろう。

3.2.2 培養圧力と脂肪酸組成

また高圧下の培養では低温での培養と同様に不飽和脂肪酸の合計でも, またイコサペンタエン酸だけを見ても脂肪酸全体に占める割合が増大した(図3)。とくに70MPaでの培養では不飽和脂肪酸の割合は全体の55%以上に達し, また, イコサペンタエン酸の含量も約25%と全体の1/4を占めるまで増大した。

低温, または高圧下では分子活動が不活発になるために細胞膜の流動性が低下する。好冷, 耐圧性のDSS12株は融点がより低い不飽和脂肪酸の割合を増大させることで細胞膜の流動性を保っているようだ。ただし, 分岐脂肪酸は低温培養と加圧培養での変化が同じではなかった。これは, DSS12株の低温と高圧への適応機構が完全に同じではないことを示している。

表2 脂肪酸一覧
Table 2 Fatty acids.

分子式	略記	系統名	慣用名	融点 ($^{\circ}\text{C}$)
$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$	C12:0*	ドデカン酸	ラウリル酸	44.2
$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	C14:0	テトラデカン酸	ミスチリン酸	53.9
$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	C16:0	ヘキサデカン酸	パルミチン酸	63.1
$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	C18:0	オクタデカン酸	ステアリン酸	69.6
$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$	C16:1	ヘキサデセン酸	パルミトオレイン酸	$-0.5 \sim 0.5$
$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	C18:1	オクタデセン酸	オレイン酸	$14.5 \sim 15.5$
$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$	C20:5	イコサペンタエン酸	IPA	$-54.4 \sim -53.8$

* コロンの前の数字が炭素数, コロンの後の数字が二重結合の数を表す。

* A figure between "C" and ":" is a number of carbon of the fatty acid, and a figure after ":" is a number of double bond of the fatty acid.

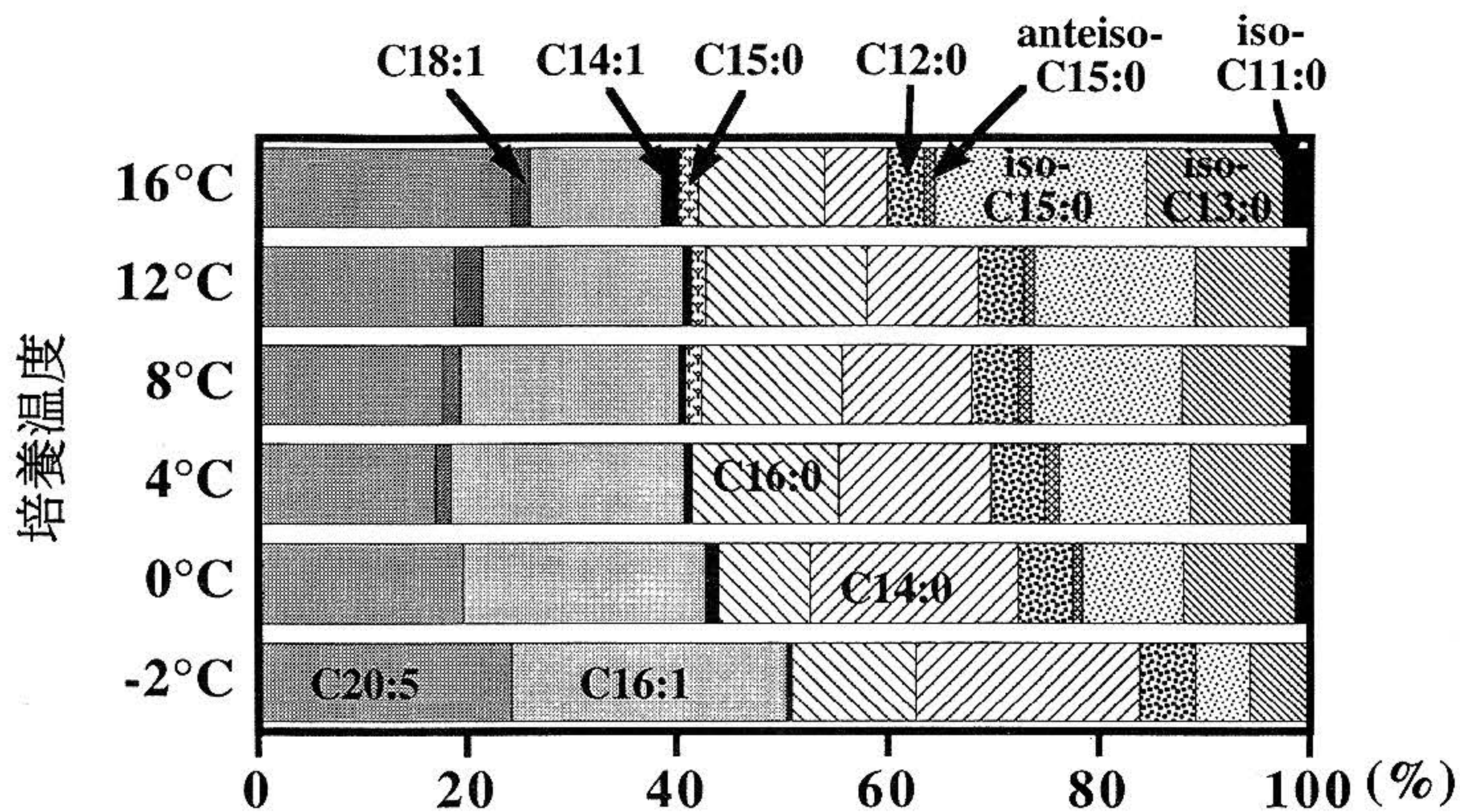


図2 培養温度と脂肪酸組成の比較

Fig.2 Fatty acid compositions of DSS12 at various temperatures.

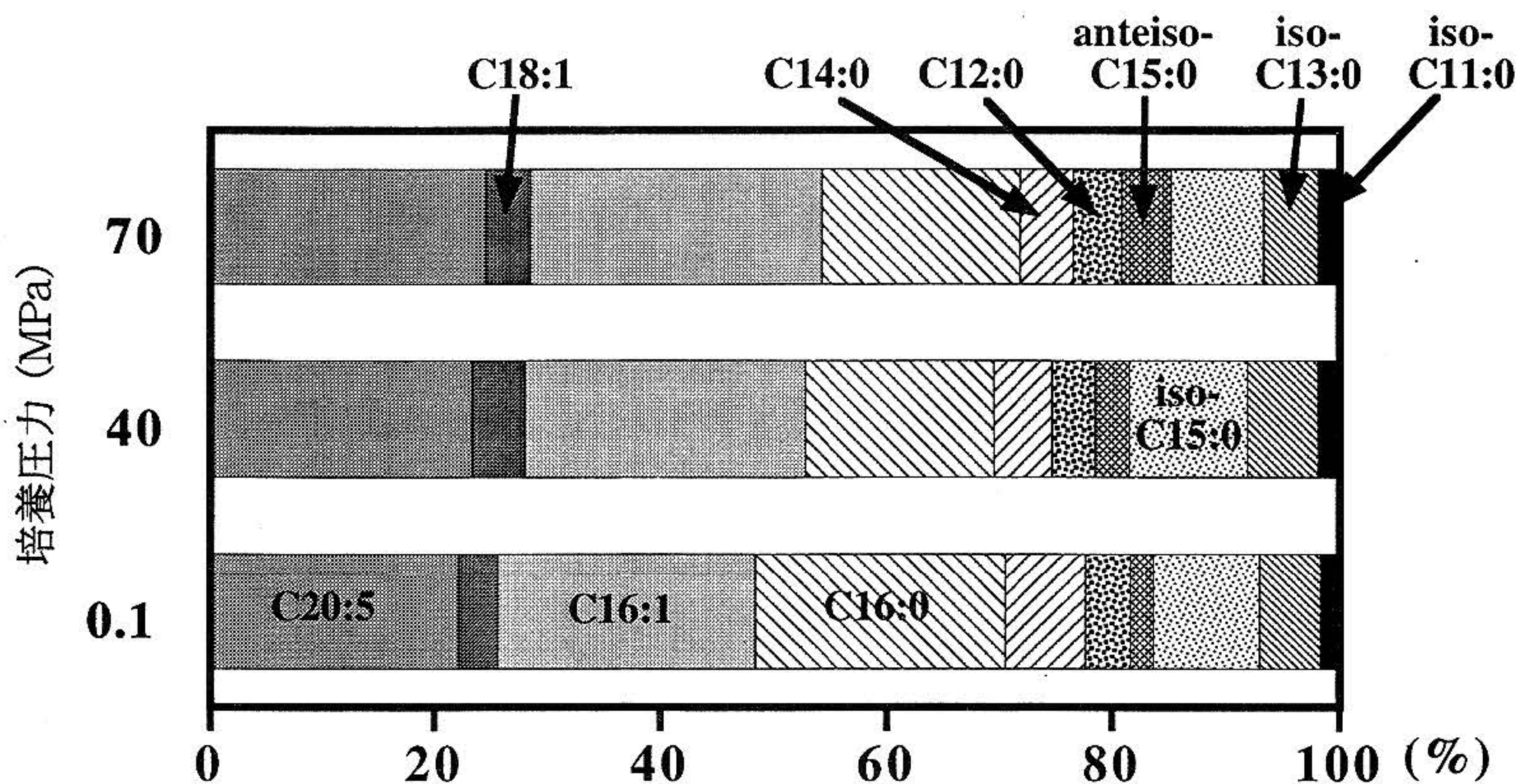


図3 培養圧力と脂肪酸組成の比較

Fig.3 Fatty acid compositions of DSS12 under various pressures.

4 おわりに

以上、耐圧性微生物DSS12株の菌体脂肪酸組成の変化を調べ、細胞膜におけるこの菌体の耐圧機構が低温への適応機構と類似していることを示した。50–100MPaもの高圧は物理化学的には分子の活動を抑制するという意味で微生物の生理活動に対して低温と同じ様な影響を与えられているが、今回の実験結果は深海微生物が現実的に高圧環境下での細胞膜の流動性を適度に保つために不飽和脂肪酸の割合を増大していることを明確に示している。

この菌が生産するイコサペンタエン酸や他の海洋性細

菌が生産することが知られているドコサヘキサエン酸(C22:6)などの高度不飽和脂肪酸は医薬品や化粧品、機能性食品などとして広く使われはじめている。今回の研究では低温、高圧下で深海微生物を培養することにより、高度不飽和脂肪酸の収量を上げることが可能であることを示した。この結果は将来の深海微生物による高度不飽和脂肪酸の生産につながるもの言えよう。

これらの研究結果に続く次の研究課題として、この適応機構が圧力応答遺伝子とどのように関係しているか、実際の耐圧機構の発現はどのような仕組みになっているのか、などが考えられ、さらに詳しく研究していきたい。

参考文献

- 1) Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J.: Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall, London, 986pp. (1997)
- 2) Kato, C., T. Sato, and K. Horikoshi: Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples. Biodiversity and Conservation, **4**, 1-9. (1995)
- 3) Tamaoka, J., Ha, D.-M. and K. Komagata:

Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. Int. J. Syst. Bacteriol., **37**, 52-59. (1987)

(原稿受理: 1996年12月20日)