

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K20072

研究課題名(和文)有機溶媒中で営まれる生命活動の総合的理解と環境調和型技術への応用

研究課題名(英文)Comprehensive understanding of life activities in organic solvents and application to green sustainable technologies

研究代表者

岩淵 範之(IWABUCHI, Noriyuki)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：90328708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：Rhodococcus属細菌は、その7割以上が有機溶媒中で生育できる極めて特殊な微生物群であり、その性質を明らかにすることは非常に重要である。本研究では、有機溶媒中で生命活動を営むためにはどのような性質が必要なのか?という観点から研究を行った。その結果、アルカン相に移行した細胞は、アルカン相内の溶存酸素を利用して生育していることが示唆され、さらに、この性質は同属細菌にとって一般的であると考えられた。また、アルカン相に移行することで、本来は有していない熱耐性が誘導されることも示された。以上、有機溶媒中で生命活動は非常に希少であると考えられることから、今後の研究が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rhodococcus属細菌は、その7割以上が有機溶媒中で生育できる特殊な微生物群であり、ある種の生命の新しい形態である。もし、「なぜ水相より有機溶媒相での生育を選択し、そこでの生命活動が、著しく低下しないのか?」という疑問を明らかに出来れば、それは、生命の新しい形態の機構の一部の理解に繋がり、学術の形体や方向性を大きく変える基本的な基礎的知見となる。

研究成果の概要(英文)：We examined the utilization of dissolved oxygen by Rhodococcus bacteria in the alkane phase of two-phase cultures in order to clarify bacterial growth mechanisms in the presence of alkanes. The results showed that the dissolved oxygen in the alkane phase remarkably decreased when viable cells were present in the alkane phase, irrespective of the kind of alkane or Rhodococcus strain tested. Thus, our findings indicate that Rhodococcus strains can grow in the alkane phase by utilizing the dissolved oxygen. To the best of our knowledge, this is the first study to experimentally demonstrate that translocated cells in organic solvents utilize the dissolved oxygen in the inorganic solvent for growth.

研究分野：環境微生物学

キーワード：有機溶媒耐性 非水系代謝 石油汚染浄化 Rhodococcus

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

石油代替のエネルギー創成技術や省エネルギー化技術の開発は、将来の循環型社会形成のために、早急に解決されるべき世界的に重要な課題のひとつである。この中で、微生物の物質変換能力、特殊な有機溶媒耐性能力を利用して、生物工場で汎用化学品等を生産するホワイトバイオテクノロジーおよび微生物の難分解性分解能力を利用して環境を浄化するバイオレメデーションは、生きた微生物と毒性の高い有機溶媒等の相互作用の調節が重要である疎水性の高い環境下で利用されるバイオテクノロジーである。それ故、有機溶媒等に対し、特殊な耐性能力を有する微生物が利用されて来た。

この過程で、ある種の微生物が、極めて疎水性が高く含水量の少ない有機溶媒中で生育することは古くから経験的に知られていたが、株特有の性質としての理解に留まっており、微生物の表層構造や機能と合わせて総合的に評価されることはなかった。また、今日、その性質を応用するために必要な研究は進展したが、その生命機構の包括的な理解には未だ至っていない(図 1)。申請者は、これらの分野の中でも、難分解性物質分解・変換に対する多様な活性を有する *Rhodococcus* 属細菌などを主たる材料として、微生物と有機溶媒との相互作用を中心に研究を行ってきており、この過程で、同属細菌の約 7 割以上が有機溶媒中で生育できることを明らかにした。一般的には、有機溶媒中の生命活動は極めて特殊な性質と考えられる一方、上述した結果は、*Rhodococcus* 属細菌においては普遍的な現象であることを意味している。同属細菌は、細胞表層にミコール酸が存在する特徴的な構造を有しており、これと本現象との関係は興味深い。

### 2. 研究の目的

本研究では、有機溶媒中で生命活動を営むためにはどのような性質が必要なのか？という課題に対して、

(1) 常に有機溶媒に暴露されている環境にあるため、その侵入を大幅に防ぎ、細胞を守るためのバリア効果を有する機能が表層構造にある

(2) アルカン相は C 源以外の栄養素の供給先および ATP 合成時のプロトン濃度勾配の相手先としては考えにくい。故に、アルカン相内に水分、空気などが存在する場所がある。例えば、細胞膜と最外層の間の細胞表層構造は水を貯蔵する場所の候補である

という仮説を立て、有機溶媒中で営まれる生命活動を包括的に理解することを試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培地と二相培養

*Rhodococcus* 属細菌の培養には、基本的に IB2 液体培地を用いた(蒸留水 500 ml に 5 g の glucose、5 g のイーストエキストラクト、0.09 g の  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 、0.05 g の  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.05 g の NaCl、0.01 g の  $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.25 g の  $(NH_4)_2SO_4$  を加え、pH7.2 に調整後、121°C で 15 分間オートクレーブした)。培養は、基本的に 28、130 rpm の振とう培養で行い、定常期初期まで培養したものを遠心して菌体を回収した後、各種実験に用いた。

アルカンを添加した二相培養は、上記 IB2 培地に 0.5-1%(w/w)になるように各種アルカンを添加し、上述した条件で培養し、菌体回収を行い、以降の実験に用いた。

#### (2) 顕微鏡観察

細胞の局在性は、培養液の有機相と水相をボルテックスで懸濁して上層の液を 8  $\mu$ l サンプルリ

ングし、プレパラートに滴下した。カバーガラスをのせ、位相差顕微鏡のステージにサンプルをセットし、カバーガラス上にイメージンオイルを一滴垂らした後、対物レンズの倍率を 100 倍にして観察した。

細胞数は、培養液を採取し、必要に応じて希釈系列を作製した後、各々のサンプルに終濃度が 10  $\mu\text{g/ml}$  になるように DAPI 液を添加した。それを 30 分室温で反応させた後、0.22  $\mu\text{m}$  のろ過用フィルターで吸引し、そのフィルターをそのままスライドグラスにのせ、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、1 ml あたりの細胞数を算出した。

ライブデッド染色は、LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、基本的に説明書通りに染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。

### (3) アルカン中の溶存酸素量の測定

空のバイアルの中に測定用のチップを入れ、外側から酸素計 OXY-1 SMA の測定光を当てることで、空気中の酸素の濃度を測定した (A 値)。その後、バイアルにサンプルのアルカンを入れアルカン相内の酸素濃度を測定した (B 値)。B 値を A 値で割り、空気中の酸素を 100% とした場合の相対値を算出し、条件ごとの比較に用いた。コントロールとして微生物無添加の系を用意し、比較検討した。

### (4) 熱耐性試験

研究の方法 (1) で記述した要領で、*R. erythropolis* PR4 株を二相培養し、位相差顕微鏡で細胞の局在性がアルカン内であることを確認した。その後、培養液の一部を IB2 寒天培地に摂取し、コロニー形成を確認した。続いて得られた培養液を 100 °C で 10 分間、熱処理し放冷した後、培養液の一部を採取し、IB2 寒天培地に摂取するとともに、蛍光顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 二相培養条件の検討

これまでの研究では、アルカンを添加した二相培養の場合、細胞の局在性と生育が密接に関与し、生育の良い条件での遺伝子発現情報しか得られなかった。それ故、今回、生育が同等で局在性だけが違う条件を検討した。これまでに使用していた IB2 培地に加え、LB、MB、NB などの完全培地にアルカンを添加し、微生物の生育がそう変わらずに細胞の局在性が変化する培養条件を探索した。その結果、NB 培地に *n*-ドデカン(C12)を添加した条件、および、MB 培地に終濃度 1% でグルコースを添加した条件に C12 を加えた条件において、生育がほぼ変わらずに局在性の違う条件を設定できた。しかしながら、そ

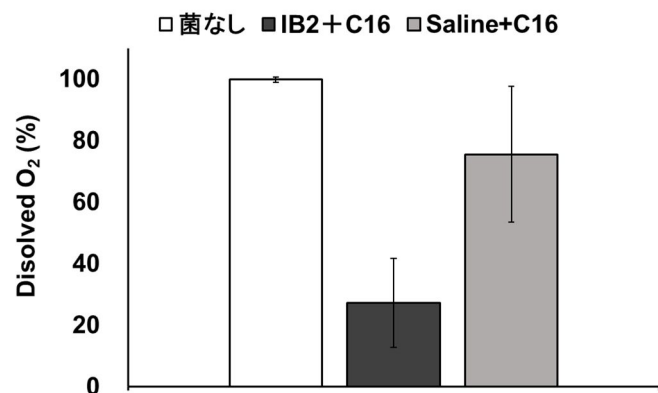


図1. *R. erythropolis* PR4の培地/C16二相培養系におけるC16相中溶存酸素

の後の解析により、これらの培養条件はあまり有用ではないことが示され、この方向性を転換した。

## (2) アルカン相の溶存酸素の検討

細胞がアルカン相内で生育するためには、栄養素、水、空気などがアルカン粒子内に存在している必要がある。

上述した(2)の仮説を検討す

るため、細胞が有機溶媒相に存在する際に、有機溶媒中の溶存酸素を利用し、増殖するか否かを検討した。具体的には、各培二相養条件での有機相の溶存酸素濃度を測定した。

まず、IB2 培地に *n*-ヘキサデカン(C16)を 1 : 1.5 の割合で添加した二相培養系を用いて、そこに *R. erythropolis* PR4 株を摂取し、培養した後、C16 相を抽出し、非接触式酸素濃度計 OXY-1 SMA (Presens) を用いて C16 相中の溶存酸素濃度を測定した。その結果、PR4 株の細胞が C16 相中に存在する場合、溶存酸素濃度は、空気中の酸素濃度を 100%とした時の相対濃度表した場合、約 27.3%まで減少した。一方で、PR4 株を接種しなかった場合の溶存酸素濃度は、99.8%と空気中と同等であったことから、PR4 株の存在により、C16 相中の溶存酸素が減少することが示された。他方、細胞が活発に活動しない静止条件として生理食塩水を用いて二相培養系を作製し、同様に培養した後、アルカン相内の溶存酸素量を測定したところ、約 80%と IB2 培地に比べ高かった。このことは、消費された溶存酸素が IB2 の条件より低く細胞の活動状況に応じて溶存酸素が減少していることが示唆された(図 1)。

続いて、細胞の増殖と溶存酸素との関係を検討した。細胞の増殖は DAPI 染色により、溶存酸

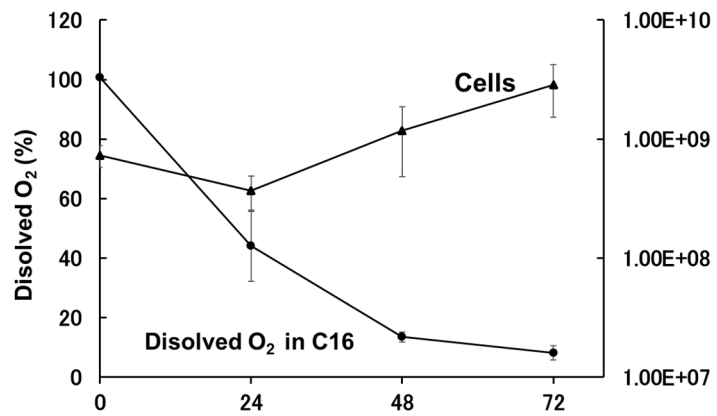


図2. *R. erythropolis* PR4による経時的な酸素の減少と細胞の増殖との関係

表1. *Rhodococcus*属細菌10株のIB2/アルカン二相系におけるアルカン相中溶存酸素の変化

Strain	C16	C16	C14	C15	C19	C30
	(inactivated cells)					
<i>R. erythropolis</i> PR4	16.1 (±9.6)	96.0 (±6.2)	24.0 (±10.3)	27.0 (±13.5)	14.5 (±3.8)	25.4 (±23.6)
<i>R. erythropolis</i> ATCC47072	6.7 (±8.6)	97.2 (±3.5)	0.3 (±0.7)	0.0 (±0.0)	11.4 (±11.4)	11.1 (±19.2)
<i>R. erythropolis</i> NBRC15567	2.9 (±5.1)	96.7 (±0.6)	8.1 (±10.6)	0.2 (±0.3)	8.1 (±13.9)	0.9 (±1.7)
<i>R. globerulus</i> ATCC25669	-0.1 (±0.2)	98.5 (±0.7)	21.9 (±19.9)	2.0 (±4.5)	31.6 (±27.4)	18.0 (±24.6)
<i>R. globerulus</i> NBRC14531	1.0 (±2.3)	96.5 (±0.7)	0.1 (±0.0)	3.9 (±6.9)	7.1 (±11.9)	7.8 (±11.0)
<i>R. opacus</i> ATCC51882	-0.3 (±0.3)	96.9 (±1.7)	6.3 (±10.9)	0.9 (±1.5)	9.7 (±5.0)	0.0 (±0.0)
<i>R. opacus</i> JCM9703	10.3 (±8.5)	96.4 (±1.2)	4.6 (±8.0)	0.0 (±0.1)	10.9 (±9.5)	0.0 (±0.0)
<i>R. rhodochrous</i> ATCC271	15.0 (±3.5)	95.2 (±4.9)	26.2 (±22.2)	14.4 (±2.3)	17.0 (±5.5)	8.3 (±0.7)
<i>R. rhodochorus</i> ATCC12674	4.4 (±8.1)	97.2 (±1.5)	7.1 (±12.4)	3.6 (±6.2)	28.4 (±10.5)	0.0 (±0.0)
<i>R. zopfii</i> ATCC51349	11.2 (±3.0)	96.6 (±1.2)	16.3 (±1.5)	18.8 (±8.4)	53.2 (±11.2)	20.2 (±30.6)
No bacteria	99.8 (±0.9)	Not tested	98.1 (±0.3)	97.6 (±0.4)	94.2 (±1.7)	96.1 (±1.5)

素は OXY-1 SMA により測定した。その結果、細胞が増殖するに伴い溶存酸素の減少が確認され

た。ここから、アルカン相内に入った細胞は、そこの溶存酸素を利用して生育していることが示唆された（図2）。一方で、本現象が *R. erythropolis* PR4 株だけにとどまるのかどうかを確認するため、各種アルカン、各種 *Rhodococcus* 属細菌を用いて、二相培養中の生育時の溶存酸素濃度を検討した。その結果、供試した 10 菌株、5 種類のアルカン、どの組み合わせにおいても、一部例外も含まれるが、概ね同様の傾向が確認された（表1）。ここから、*Rhodococcus* 属細菌が培地 / アルカン二相培養において、水相からアルカン相に移行し、アルカン相内の溶存酸素を利用して生育していることが示唆された。

### （3）*Rhodococcus* 属細菌の熱耐性の発見

一方で、これらの研究過程で、アルカン相に転移した細胞が高度の耐熱性を有することを見出した。具体的には、培地 / アルカン二相培養系で培養した培養液を 100 で 10 分以上加熱しても一部生き残る菌が存在した。各条件での生存率を検討すると概ね 0.1% 程度であ

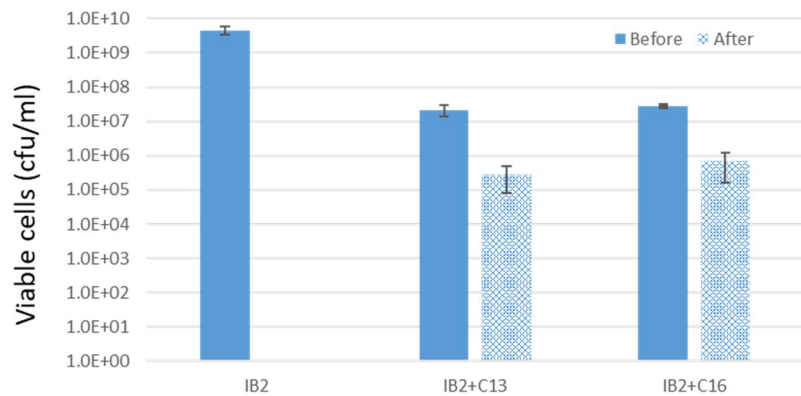


図3. *R. erythropolis* PR4株の熱耐性

り、この結果は、アルカンの種類に関係なく確認されたことから、*Rhodococcus* 属細菌はアルカンに転移することで耐熱性を獲得することが示された（図3）。これは当初計画にはなかった新しい事象であり、今後の研究の新たな核になるものと考えられた。

### （4）まとめ

本研究では、有機溶媒中で生命活動を営むためにはどのような性質が必要なのか？という課題に対してある種の仮説を立てて取り組んだ。その結果、アルカン相に移行した *Rhodococcus* 属細菌は、アルカン相内の溶存酸素を利用して生育していることが示唆され、さらに、この性質は *Rhodococcus* 属にとって一般的であると考えられた。また、*Rhodococcus* 属の一部は、アルカン相に移行することで、本来は有していない耐熱性が誘導されることが示された。以上のことから、有機溶媒中で生命活動は非常に希少であると考えられることから、今後のさらなる研究が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 岩淵 範之	4. 巻 29
2. 論文標題 含細胞ミセル液の水環境浄化への応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 クリーンテクノロジー	6. 最初と最後の頁 31-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩淵範之、田淵大樹、瀧原速仁、砂入道夫
2. 発表標題 Rhodococcus 属細菌の有機溶媒中での生育 - アルカン相内での溶存酸素の利用について -
3. 学会等名 2019年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田淵大樹、瀧原速仁、岩淵範之、砂入道夫
2. 発表標題 アルカン培地二相系におけるRhodococcus erythropolis PR4の細胞局在性と酸素消費について
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田淵 大樹、瀧原 速仁、岩淵 範之、砂入 道夫
2. 発表標題 Rhodococcus属細菌の有機溶媒中での生育 - アルカン相での溶存酸素の利用について -
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田淵 大樹、瀧原 速仁、砂入 道夫、岩淵 範之
2. 発表標題 Rhodococcus erythropolis PR4 のアルカンとの相互作用に対するMgSO4の影響
3. 学会等名 環境微生物系合同会議2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田上 晃二、砂入 道夫、岩淵 範之
2. 発表標題 Rhodococcus erythropolis PR4株を用いた微生物細胞入り有機溶媒ミセル液の炭化水素の分解への有用性
3. 学会等名 環境微生物系合同会議2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田上 晃二、牧 紘平、岩淵 範之、砂入 道夫
2. 発表標題 Rhodococcus erythropolis PR4株を用いた微生物細胞入り有機溶媒ミセル液の炭化水素の分解への有用性
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田淵 大樹、瀧原 速仁、岩淵 範之、砂入 道夫
2. 発表標題 Rhodococcus erythropolis PR4 のアルカンとの相互作用に対するMgSO4の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ロドコッカス属細菌の培養方法及び高温耐性を有するロドコッカス属細菌 の製造方法	発明者 岩淵範之他	権利者 日本大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-122031	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 炭化水素処理剤、炭化水素の処理方法、及び炭化水素処理剤の製造方法	発明者 岩淵範之、砂入道夫、田上晃二	権利者 日本大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-247431	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------