

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510025

研究課題名（和文）微生物の代謝熱測定を利用した環境汚染気体のバイオアッセイ

研究課題名（英文）Bioassay of environmental pollution gases using metabolic heat measurement of microbes

研究代表者

田村 勝弘（TAMURA KATSUHIRO）

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：00093873

研究成果の概要（和文）：従来、バイオアッセイが困難であった環境汚染気体について新しい手法を提案し、多くの気体について、定量的かつ系統的に調べることができた。新しい手法とは、微生物の代謝熱をマイクロカロリメータを用いて測定し、気体の毒性が微生物の代謝熱をゼロにする圧力を指標（MIP:最少増殖阻止圧力）として求め、この値で環境汚染気体の毒性を統一的に表す方法である。この方法で、簡便かつ正確に再現性良く気体の毒性を評価するバイオアッセイ確立の目途がついた。

研究成果の概要（英文）：Heretofore, bioassay of environmental pollutant gases was difficult. We proposed a new method which use a new measure: MIP (Minimum Inhibitory Pressure) for evaluating the toxicity of the gas pollutants. The MIP values can be determined by measuring metabolic heat of microbes using microcalorimeter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：バイオアッセイ、代謝熱測定、酵母菌、加圧ガス、石油ガス、一酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

バイオアッセイ（生物評価法）は環境汚染有害物質に対して生物材料を用いてその応答性から有害性を評価する方法である。生物材料としては、げっし類などの哺乳動物、魚介類、藻類、単一細胞などが使用されている。特にバクテリアなどの微生物はライフサイクルが短く、環境の変化に鋭敏に反応し、培養にあたっては、低価格で、安定的に、また容易に維持管理できるという利点をもっており、自然界での毒物の迅速な毒性評価試験に適している。バイオアッセイは水環境の試験法として利用されるのが常で、大気圏の毒

性気体に対する評価法として利用された例はほとんどない

2. 研究の目的

そこで、申請者らは毒性気体に高圧力を加えて強制的に水相に移動、溶解させ、微生物の活性を表す1つの指標である代謝熱測定により、毒性気体が生体及ぼす影響を厳密に定量化する新しい方法を提案してきた。

その過程で、このガス加圧による気体の毒性評価法はいくつかの応用に結びついた。特に、加圧酸素ガスの微生物に対する強い毒性を利用する液状食品の「酸素ガス加圧殺菌」は、現在、殺菌装置の試験機製作の段階に入

っており、「新規非加熱殺菌技術」としてその将来性が期待されている（2件の特許申請、食品関連の学会と業界の双方から論文賞と技術賞を受賞）。このように、微生物の代謝熱測定による毒性気体のバイオアッセイ技術は、応用分野も含め今後さらに利用価値が高まり、発展する可能性が大きいと考えている。そこで、今回はより広範囲の気体について代謝熱測定を行い、データの蓄積に努め、気圏の環境汚染物質の定量化のみならず、他分野への応用・利用も含め、積極的に本プロジェクトを展開いく。

3. 研究の方法

(1) サーモアナライザーを用いた実験

主に石油ガスや希ガス等の化学的に不活性な気体について酵母を用い代謝熱を測定。これまでの実験結果をみると、化学的に不活性な希ガスでも気体の種類により、増殖の程度が著しく異なる結果が得られている。これらの原因を解明するため、これまでのデータに加え更に組織的に蓄積していく。

(2) 毒性気体のバイオアッセイ

毒性気体は液状サンプルに比べ、取り扱いが困難である。特に大学では排気・後処理の施設、設備が不十分な側面もあり、これまで手が出せなかった。万全の準備とまではいかないが、できるかぎりの手を尽くし、慎重に1つひとつの気体についてデータを蓄積していく。これまでの実験結果をみると酸素や窒素などのありふれた気体でも、様々な興味ある微生物の挙動が観察されたので、毒性気体を使用すればさらに予期せぬ成果が得られる可能性がある。期待をこめて実験をおこなう。

最近、地球温暖化の原因物質である二酸化炭素の使用削減がマスコミ等で話題になることが多い。二酸化炭素は炭酸飲料等にも使用されている身近な気体であるが、加圧により微生物がどのような挙動を示すか興味がつきない。その有効利用の検討も含め、毒性気体の実験と並行してデータを集積していく。天然ガスなどの炭化水素ガスも温暖化の原因であることはよく知られている。これらの一連の気体についても測定を行う。さらに、ガス中毒のなかで最も実害の多い、一酸化炭素についても実験を行う。

(3) ガス加圧した酵母のSEM撮影

微生物に対するガス加圧の影響を詳しく調べるため、電子顕微鏡写真を利用する。これまでの結果をみると、細胞形態に及ぼすガス加圧の影響は極めて大きく、気体のバイオアッセイを調べる上で貴重なデータとなりうる。

4. 研究成果

(1) 炭化水素ガス加圧下における酵母増殖サーモグラム

Fig.1はメタンおよび *n*-ブタン加圧下における酵母増殖サーモグラム（熱 -培養時間曲線）である。本実験において圧力表示はゲージ圧とする（すなわち、大気圧を 0 MPaとする）。発熱が観測されている期間は酵母が増殖中であり、サーモグラムがベースラインに戻ることは増殖の停止を意味する。いずれのガスにおいても圧力の増加とともにサーモグラムのピークが長時間側に移動し、高さも低下している。このことから、炭化水素ガス加圧により酵母の増殖は阻害されたといえる。培養時間が約 70 時間後にピークを迎えるサーモグラムの圧力は、メタンでは 13.5 MPa であるのに対し、*n*-ブタンでは 0.0656 MPa であった。このように、炭化水素ガスの種類によって増殖阻害効果を生む圧力の影響は全く異なり、細胞毒性は *n*-ブタンの方がメタンよりもはるかに大きいといえる。

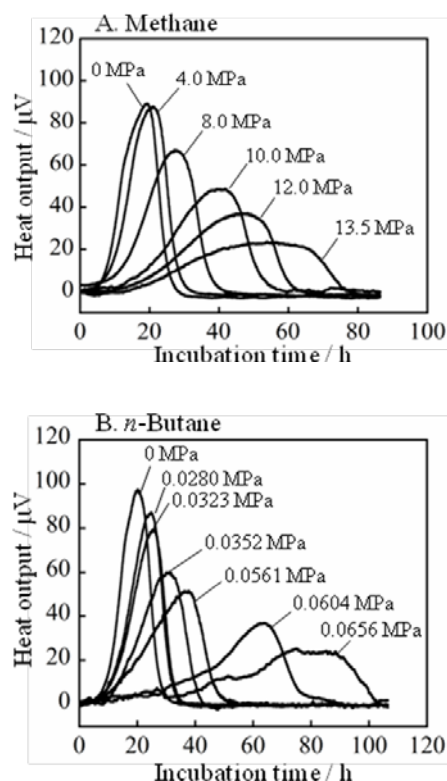


Fig.1 メタンおよび *n*-ブタン加圧下における酵母増殖サーモグラム

(2) 加圧気体による酵母増殖阻害効果の
定量化

気体の各圧力下における増殖阻害を定量化するために、増殖速度定数、増殖遅延時間のパラメーターを決定した。さらに、常圧と各圧力の増殖速度定数比ならびに増殖遅延時間比を算出し、このパラメーターを比増殖活性とした。比増殖活性は 0 から 1 の範囲内にあり、比増殖活性が 1 を示す場合は増殖が全く阻害されていないことを示す。一方、比増殖活性が 0 である場合は、ガス圧力により増殖が完全に停止していることを示している。これらの比増殖活性の算出手順については、文献を参照頂きたい。

Fig.2は比増殖活性と気体圧力との関係を示している。比増殖活性の低下が、気体圧力 P の m 乗に比例すると仮定して曲線を描いた。この曲線から、各気体の毒性指標である 50% 増殖阻止圧力 (IP50: Inhibitory pressure 50) および最小増殖阻止圧力 (MIP: Minimum inhibitory pressure) を決定した。IP50は比増殖活性が 0.5である圧力であり、酵母の増殖を 50%阻害する圧力を示す。一方、MIPは比増殖活性が 0である圧力であり、酵母の増殖を完全に阻害する圧力を示す。IP50と MIPは値が小さいほど、毒性が強いことを意味する。

Table 1に、各炭化水素ガスの IP50及び

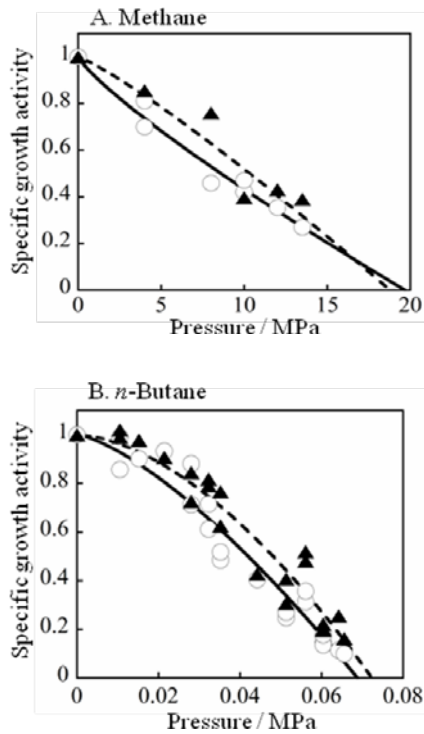


Fig.2 ガス圧力と酵母比増殖活性の関係 (○: 比増殖速度定数, ▲: 比増殖遅延時間)

MIPについて示した。炭化水素ガスの種類、異性体によって毒性が異なることがわかる。また、その毒性は n -ブタン > i -ブタン > プロパン > エタン > メタンの順に大きいことが明らかになった。

さらに、気体の疎水性を表す指標であるオ

Table 1 炭化水素ガスの IP₅₀及び MIP

Gas	Growth rate constant		Growth duration time	
	IP ₅₀ / MPa	MIP / MPa	IP ₅₀ / MPa	MIP / MPa
Methane	8.50	19.6	10.3	18.6
Ethane	0.776	1.75	0.856	1.80
Propane	0.265	0.430	0.275	0.450
<i>i</i> -Butane	0.0874	0.132	0.101	0.161
<i>n</i> -Butane	0.0420	0.0687	0.0481	0.0723

クタノール・水分配係数と MIPとの関係について調べたところ、Fig.3より、炭化水素ガスの疎水性が増せば増すほどその毒性が強くなり、疎水性と毒性には強い相関関係があることが明らかとなった。これは、炭化水素ガスが酵母の細胞膜といった疎水性領域に作用し、生体膜などの働きに影響を与えることにより、酵母の増殖阻害が生じていると考えられる。

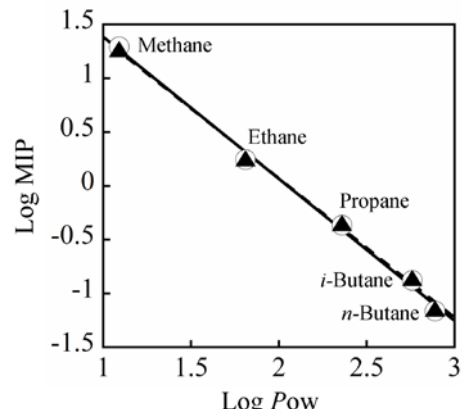


Fig.3 オクタノール・水分配係数と MIP との関係 (○: 増殖速度定数, ▲: 増殖遅延時間)

(3) 炭化水素ガス加圧による細胞内漏出物質の吸収スペクトル

Fig.4 に、 n -ブタン加圧処理による酵母から漏出した紫外吸収スペクトルを示す。炭化水素ガス加圧処理した場合、260 nm 付近に吸収極大が現れ核酸関連物質に特異的な吸収スペクトルを示している。また、圧力を増加させると 260 nm 吸収物質の漏出量も増加した。

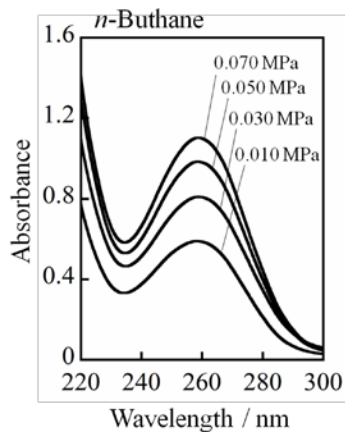


Fig.4 *n*-ブタン加圧による細胞内漏出物質の吸収スペクトル

(4) 走査電子顕微鏡による炭化水素ガス加圧処理後の酵母観察

炭化水素ガス圧下における酵母の形態変化を走査電子顕微鏡により観察した。常圧下で生育させた酵母は、表面が滑らかであり円形である (Fig.5 (A))。一方、*n*-ブタン加圧条件下では、細胞が変形や陥没している様子が認められた (Fig.5 (B-D))。圧力の上昇、すなわち *n*-ブタン濃度の増加にともない細胞に対する損傷も増大することがわかる。ここでは示していないが、MIPに近い圧力下では、1つの細胞に複数の陥没が生じている様子も観察された。

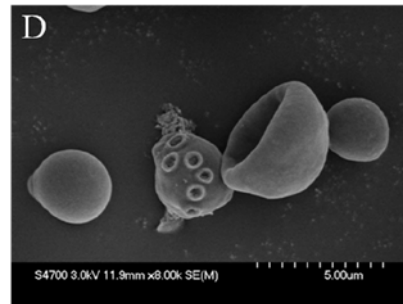
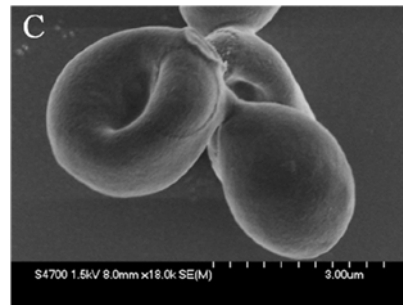
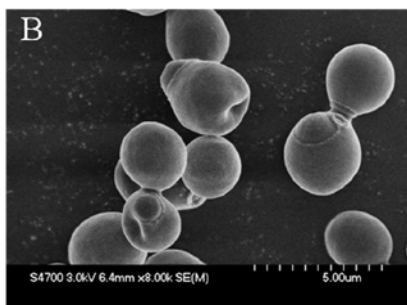
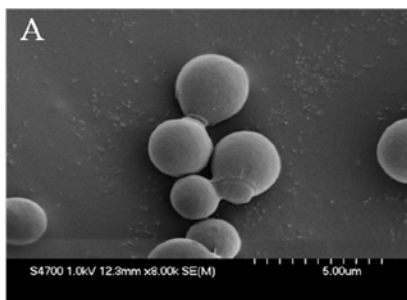


Fig.5 *n*-ブタン加圧下で生育させた酵母 SEM 像
A. 常圧, B. 0.030 MPa, C. 0.045 MPa, D. 0.060 MPa

(5) 考察

代謝熱測定法により炭化水素ガス加圧下の酵母の増殖挙動を解析し、気体の毒性指標であるIP₅₀ 及びMIPを用いて炭化水素ガスの毒性を決定した。液圧のみで酵母の増殖を停止するのに必要な圧力は、約50 MPaであることが報告されている。一方、本研究で使用した炭化水素ガスの中で最も増殖阻害効果が小さいメタンのMIPは18.6 ~19.6 MPaであることから、これらの増殖阻害は炭化水素ガスによる影響が大きいことがわかる。また、炭化水素ガスの毒性は*n*-ブタン>*i*-ブタン>プロパン>エタン>メタンの順に毒性が大きいことがわかった。この毒性順位は、Rodeらの実験結果と一致している。炭化水素ガスの微生物に対する影響は、ほとんど知られていない。一般的に炭化水素溶媒に関しては、細胞膜やその構成成分に作用し膜の透過性に影響を示すことが知られている。我々の実験結果により、炭化水素ガスの毒性はその疎水性と密接な関係にあることが明らかになった。また、炭化水素ガスによる細胞内容物の漏出が認められた。これらの結果は、炭化水素ガスが酵母の細胞膜などの疎水性領域に作用し、その構造や機能に何らかの影響を及ぼすことを示唆するものである。特に、核酸関連物質の漏出現象は核膜の損傷も裏付けており、これにより炭化水素ガス加圧下における酵母の

増殖阻害が生じた可能性が考えられる。また、走査電子顕微鏡による観察からは、炭化水素ガス加圧下の酵母が変形、陥没している様子が認められた。液圧のみでは300 MPaの高圧処理によっても、酵母に形態変化は現れない。加えて、本研究で観察された酵母の損傷は、トルエンやヘキサデカンといった炭化水素溶媒による微生物の構造的損傷とも全く異なるものである。炭化水素ガスがこのような形態変化をもたらしたメカニズムに関しては未解明であり、今後さらに検討する必要があるが、炭化水素ガスによる増殖阻害機構の一端を示す結果といえる。

(6) まとめ

一連の炭化水素ガス (C1~C4) 加圧下で代謝熱測定法により酵母の増殖挙動をモニタリング・解析し、その毒性を調べた。各気体ごとに毒性指標である IP50 と MIP を決定した。炭化水素ガスの毒性を調べたところ、*n*-ブタン > *i*-ブタン > プロパン > エタン > メタンの順に毒性が大きいことが明らかになった。また、炭化水素の毒性はその疎水性との間に強い相関関係があることがわかった。さらに、炭化水素ガス加圧下では核酸関連物質の漏出、細胞形態の損傷が認められた。代謝熱測定法は、各種気体の毒性を評価することができ、環境汚染気体のバイオアッセイを行う手段として有効であり十分期待できる。本研究で決定した IP50 及び MIP は、構造活性相関による毒性予測のための情報としても重要であろう。また、深海や地下油田中の微生物は高圧の炭化水素ガスに暴露されていることから、本研究がこのような微生物の耐ストレス機構の解明に役立つかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Satoshi Kawachi, Toshiaki Arai, Yoshio Hara and Katsuhiro Tamura, Effects of compression with ethane, ethylene and their fluorinated derivatives on yeast growth, J. Phys: Conference Series 215 (2010) 012168. 査読有

(2) Satoshi Kawachi, Toshiaki Arai, Yoshihisa Suzuki, Katsuhiro Tamura, Effects of compressed unsaturated hydrocarbon gases on yeast growth, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1189. 121-126 (2010). 査読有

(3) 河内哲史、原好男、荒尾俊明、鈴木良尚、田村勝弘、代謝熱測定法による炭化水素ガス加圧下の酵母の増殖挙動解析、代謝熱測定法による炭化水素ガス加圧下の酵母の増殖挙動解析、高圧バイオサイエンスとバイ

オテクノロジー Vol.2, 2008, pp.88-95. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

(1) 河内哲史, 原好男, 荒尾俊明, 鈴木良尚, 田村勝弘, ガス加圧酵母細胞 (*Saccharomyces cerevisiae*) の電子顕微鏡観察, 生物関連高圧研究会、7月30日(2009)、東京.

(2) S. Kawachi, T. Arai, Y. Hara, Y. Suzuki and K. Tamura, Effects of Compression with Ethane, Ethylene and Their Fluorinated Derivatives on Yeast Growth, AIRAPT 2009, Jul. 27(2009), Tokyo.

(3) Satoshi Kawachi, Toshiaki Arai, Yoshihisa Suzuki, and Katsuhiro Tamura. Effects of some compressed unsaturated hydrocarbon gases on yeast growth, HPBB2008, Sep. 15 (2008), San Diego (USA).

[図書] (計 1 件)

(1) Satoshi Kawachi, Katsuhiro Tamura, Effects of compressed unsaturated hydrocarbon gases on yeast growth, High Pressure Bioscience and Biotechnology, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121-126 (2010).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 勝弘(TAMURA KATSUHIRO)
徳島大学・大学院バイオサイエンス研究部・
教授
研究者番号：00093873

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：