

深海環境への微生物の適応機構に関する研究

上 村 一 雄

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Study on the Mechanism of Bacterial Adaptation to Deep-Sea Environment

Kazuo Kamimura

(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

The world's oceans cover 70% of the earth's surface, with about 3,800m of average depth. Although the deep-sea environment with its high pressure and low temperatures is too extreme for most terrestrial and marine surface microorganisms, many barotolerant and barophilic bacteria have been found inhabiting the deep-sea. It is extremely important for barophilic or barotolerant deep-sea bacteria to maintain the physiological functions of the cytoplasmic membrane, which serves many vital functions. The fluidity of this cytoplasmic membrane composed of phospholipids and proteins is essential for the physiological functions of cells. As higher hydrostatic pressures raise the melting point of lipids and cause phase transition of lipid under pressures of up to 100MPa, barotolerant and barophilic bacteria under high hydrostatic pressure appear to regulate the composition of their membrane phospholipids. Therefore the characterization of cytoplasmic membrane under high pressure is indispensable to clarify the mechanisms of bacterial adaptation to the deep-sea environment. The effects of pressure and temperature on fatty acid composition of barotolerant deep-sea bacteria were investigated. Deep-sea bacteria maintained their membrane fluidity by increasing the content of unique fatty acid in phospholipids under high hydrostatic pressure. Gene expression seems to be necessary for the synthesis of unique fatty acid under high hydrostatic pressure.

Key words : deep-sea bacteria, barotolerant bacteria, fatty acid, NADH oxidase

1. 緒 言

地球表面の約70%を占める海洋は、深さ方向にも厚みを持っており、海溝部と呼ばれる水深が10,000mを超える場所も存在している。海洋では10m深くなるごとに圧力が0.1MPa ずつ増し、海洋表面の約60%を占める平均水深3,800mの深海では約38MPaの圧力がかかっており、最深部では110MPaにも達する。近年、熱水噴出孔を中心とした特異な生物群

集が深海で発見され、熱水噴出孔生物群と呼ばれる高密度の生物群集の局所的存在が明らかとなった。この生物群集は、海洋表層での光合成による生物群集によってではなく、湧水から供給される硫化水素やメタンなどの還元物質を酸化し得る化学合成細菌が湧水や周辺の基盤表面で増殖したり、群集の生物に共生することによって支えられていることが明らか

Received October 1, 1998

かになってきた¹⁾。しかしながら、一般に大部分の深海環境は、高圧、低温、暗黒の世界であり、光合成によって有機物が生産される海洋の表層からは離れているために、希薄な有機物濃度によって特徴づけられる。深海環境は微生物にとっては過酷な環境であるといえるが²⁾、海洋中で最も高圧の約110MPaの環境にも微生物の生息が認められている。陸上や浅海の細菌は、20~60MPa以上の圧力になると増殖できないが^{3,4)}、それ以上の圧力の深海環境には多くの耐圧性や好圧性の微生物が存在していることが報告されている^{5,6,7,8)}。圧力と生命現象に関する研究は古く、19世紀の終わり頃にさかのぼることができ、これまで生理・生態学的な研究が数多くなされてきた^{9,10,11)}。しかしながら、微生物が高圧環境に適応して生息できる仕組みを深海微生物を用いて分子生物学的に検討した報告はわずかであった¹²⁾。近年、深海微生物についても遺伝子工学の手法が適応され、高圧下における生化学現象が遺伝子レベルで議論されつつある。

生態構成成分に対する圧力の影響に関する研究から、生体膜、タンパク質、核酸への圧力効果に大きな差があることが明らかにされている。核酸は1000MPaまでの圧力でも変成を受けないのに対して、タンパク質は300MPa以上の圧力で変成し、生体膜は100MPaまでの圧力によって液晶状態からゲル状態に変化する。したがって、地球上の生物が遭遇する圧力環境では、生体構成成分のうち生体膜が圧力の影響を受けることとなり、深海微生物が高圧環境下で増殖するためには、細胞膜の機能を高圧環境下でどのように維持するかが最も重要となってくる。本論文では、深海の耐圧性細菌や好圧性細菌の圧力応答を細胞膜の組成や機能との関連で論じる。

2. 細胞膜への圧力の効果

細菌の細胞膜は、リン脂質の二重層を基本構造として、その中にさまざまなタンパク質が主に疎水的な相互作用で組み込まれている¹³⁾。この膜には、エネルギー生成系、物質輸送系などの生命現象に必須な機能がその構造と密接に関連しながら存在しており、それらの機能の発現には細胞膜の流動性が必須である。脂肪酸を側鎖に持つリン脂質は、二重膜構造中で液晶状態とゲル状態との間で相転移を起こす。Table 1には、リン脂質の相転移温度に及ぼす圧力の効果を示しているが、脂質の種類に依存せずほぼ100MPaにつき T_m が20℃程度上昇しており、圧力上昇が温度低下と同じような効果を脂質分子にもたらすことを示している¹⁴⁾。したがって、一般に高圧・低温である深海環境は、生物にとっては極めて過酷な環境であると言え、Moritaは、100MPa、2.5℃の環境は、温度に換算すると-28.8℃に相当するとしている¹⁵⁾。このような極限とも言える深海環境の中でも細菌は増殖する能力を維持している。

陸上細菌が温度変化に適応する機構は、Homeoviscous adaptation と呼ばれており、大腸菌で最初に報告された¹⁶⁾。この現象は、大腸菌が低温環境にさらされると細胞膜脂質の脂肪酸側鎖に融点の低いものを増加させて、低温環境下で細胞膜の流動性を維持するというものである。Table 2には代表的な脂肪酸の融点を示した。大腸菌は低温下で cisC18:1 の脂肪酸を増加させる。一方、*Thermus thermophilus* では、isoC17:0 の脂肪酸に代わって、低温下で isoC15:0 の脂肪酸を増加させている¹⁷⁾。また、好冷性の海洋細菌では、C16:1 の脂肪酸のシス→トランス変換でトランス型に変わってシス型の脂肪酸を増

Table 1 Effect of pressure on the melting temperatures T_m of phospholipids

Phospholipid	T_m (°C)	dT_m/dP (K/100 MPa)
Dilauroyl phosphatidylcholine	0.5	17
Dimyristoyl phosphatidylcholine	24	20.5
Dipalmitoyl phosphatidylcholine	41.5	21.8
Dilauroyl phosphatidylethanolamine	31	21.5
Dilauroyl phosphatidic acid	28	20
Dimyristoyl phosphatidyl glycerol	23	21
Dipalmitoyl phosphatidyl glycerol	43	22

Table 2 Melting temperatures of fatty acids

Fatty acid		T _m (°C)
tridecylic acid	(C13 : 0)	41.5
myristic acid	(C14 : 0)	53.9
pentadecylic acid	(C15 : 0)	52.3
palmitic acid	(C16 : 0)	63.1
margaric acid	(C17 : 0)	61.3
stearic acid	(C18 : 0)	69.6
myristoleic acid	(C14 : 1)	-4.0
palmitoleic acid	(C16 : 1)	-0.5~0.5
cis-vaccenic acid	(cisC18 : 1)	14.5~15.5
vaccenic acid	(transC18 : 1)	44
isoundecylic acid	(isoC13 : 0)	39.4~40.0
isopentadecylic acid	(isoC15 : 0)	52.5
15-methylhexadecanoic acid	(isoC17 : 0)	60.5
14-methylhexadecanoic acid	(anteisoC17 : 0)	38.0

加させて低温環境に適応する例が報告されている¹⁸⁾。

圧力の上昇は、温度の低下と同じような効果を生体膜に引き起こすと考えられるため、深海微生物は細胞膜の流動性を何らかの手段で維持しなければならない。深海は、低温に加えて高圧という因子が加わるため、単なる低温環境に細菌が適応する場合とは異なる手段で細胞膜の流動性を維持していることも考えられる。

3. 脂肪酸組成と圧力の関係

Belong らは、深海から分離した好圧性細菌の細胞膜の脂肪酸組成と圧力の関係を検討し、圧力の上昇に伴ってC16 : 1とC18 : 1の脂肪酸を増加させることによって、高圧下で不飽和脂肪酸の割合を増加させていることを報告した¹⁹⁾。さらに、深海の好圧性細菌の中には、C20 : 5やC22 : 6という多価不飽和脂肪酸を高圧下で増加させていることが報告された^{20,21)}。しかし、圧力と温度とをこれらの細菌がどのように認識しているのかについては十分な検討がなされていなかった。

耐圧性の高い細菌の高圧下での細胞膜の生化学的特徴を検討することによって、深海微生物の高圧環境への適応機構が明らかになると考えられるため、通常の陸上細菌が増殖できない60 MPa以上の圧力下でも増殖する従属栄養細菌の分離を行った²²⁾。加圧下でコロニーを形成させることのできる装置を開発し²³⁾、1000~8000mの深海の海泥や海水を分離源とし、約

200株の細菌を分離したが、60 MPa以上で増殖可能な耐圧性細菌はわずか10株であった。細菌の分離に用いた試料には、8190mの深海から分離されたものもあり、この試料から32株の細菌を分離したが、80 MPaで増殖できるものはわずかに2株であった。このことは、深海環境には必ずしもその環境に適応したものが存在しているのではなく、浅海からの細菌が休眠状態で存在しているものも含まれていることを示唆している。深海から分離した耐圧性細菌の中で高圧下において比較的増殖速度の速い *Alteromonas* に属する細菌(4033-B株)を用いて、脂肪酸組成に及ぼす圧力と温度の影響を検討した。その結果、4033-B株は細菌には珍しいC17 : 1の脂肪酸を含んでいたが、Fig. 1に示すように圧力の上昇に伴ってC16 : 0とC16 : 1の脂肪酸が減少し、C17 : 1とC18 : 1の脂肪酸が増加することによって、全脂肪酸に占める不飽和脂肪酸の割合を増加させていた。圧力の上昇は、温度低下と同様な効果を細胞に及ぼすと考えられるが、Fig. 2に示したように温度が低下するとC16 : 1の脂肪酸が増加し、全脂肪酸に占める不飽和脂肪酸の割合を増加させていた。加圧下で増加したC17 : 1の脂肪酸は温度変化によって変動しなかった²⁴⁾。このことから、4033-B株は、脂肪酸組成の変動を見る限りでは、圧力と温度とを異なった情報として認識していることが示唆された。

脂肪酸の割合だけでなく、脂質の変動も流動性に関与している。例えば、16 : 0/16 : 0-PG (1,2-

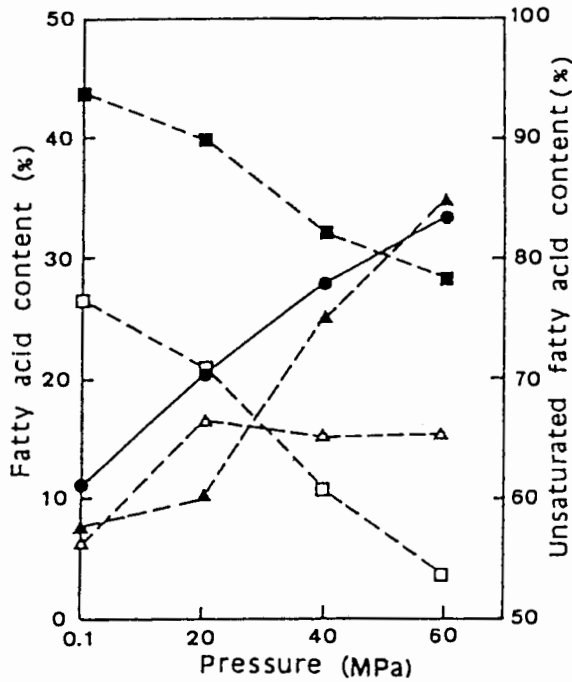


Fig. 1 Effect of pressure on the composition of major fatty acids in a barotolerant deep-sea bacterium, 4033-B.
 □, C16: 0 ; ■, C16: 1 ; ▲, C17: 1 ; △, C18: 1 ; ●, total unsaturated fatty acid

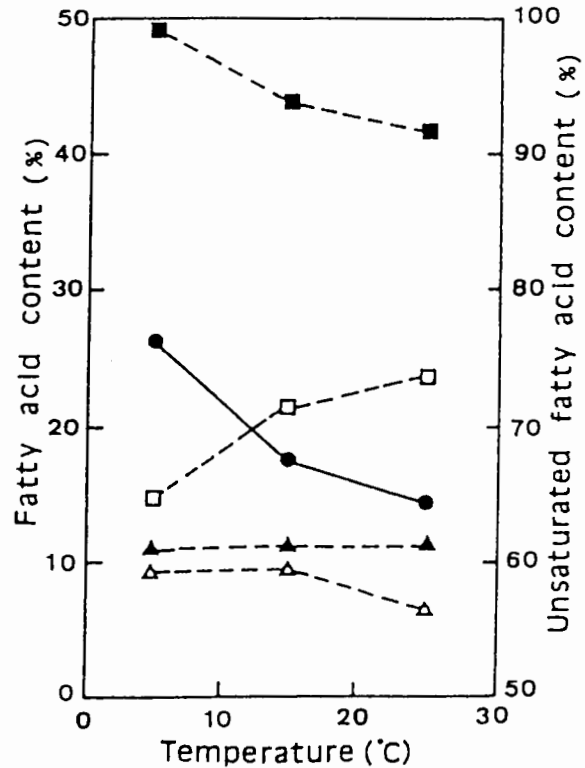


Fig. 2 Effect of temperature on the composition of major fatty acids in 4033-B cells.
 □, C16: 0 ; ■, C16: 1 ; ▲, C17: 1 ; △, C18: 1 ; ●, total unsaturated fatty acid

dihexadecanoyl phosphatidyl glycerol) の相転移温度は、16:0/16:0-PE (1,2-dihexadecanoyl phosphatidyl ethanoamine) よりも約20°C低い。*Bacillus megaterium* では、温度の低下に伴ってPGの割合が増加し、PEの割合は減少する。耐圧性細菌4033-B株で脂質組成が圧力の変化に伴ってどのように変化するかを調べた結果、Table 3に示すように圧力が上昇するにつれてPEの割合が減少し、PGの割合が増加することが認められ、*Bacillus megaterium* が低温環境に適応する場合と同様な脂質組成の変動が観察された。また、圧力の変化に伴って変動したC17:1の脂肪酸はリン脂質の脂肪酸側鎖としてPEおよびPGともに含まれており、その割合は圧力の上昇に伴って増加していた。以上のことより、4033-B株は高圧環境に適応するために細菌には珍しいC17:1の脂肪酸の割合を増加させ、不飽和脂肪酸の割合を増加させるとともに、融点の低いPGの脂質を増加させて細胞膜の流動性を維持していることが明らかとなった。

加圧下での不飽和脂肪酸の増加は、沖縄トラフの熱水噴出孔近辺の海泥から採取した耐圧性細菌 (RS

Table 3 Effect of pressure on the composition of lipids in stain 4033-B cell

Pressure (MPa)	Cellular content (%)		
	PG ^{a)}	PE ^{b)}	other
0.1	23	63	14
10	28	58	14
20	31	51	18
30	34	50	16
40	35	47	18

a) phosphatidyl glycerol

b) phosphatidyl ethanolamine

103株)においても観察された。この細菌の増殖速度と圧力の関係を検討した結果、0.1, 10, 20, 30, および40 MPaにおける倍加時間はそれぞれ36, 36, 27, 45, および47分であり、20 MPa 近辺に最適な増殖圧力を持つ好圧性細菌であった。この菌はグラム陰性の桿菌であり、Table 4に示すように isoC15:0, isoC17:0 および isoC17:1の分岐脂肪酸を脂肪酸側鎖として持つが、分類学的には *Alteromonas* に属するものと考えられた。分岐脂肪酸を主要な脂肪酸

Table 4 Fatty acid compositions in strain RS103 cells grown under atmospheric pressure at 30°C

Fatty acid	Composition (%)
C15 : 0	4.0
C15 : 1	ND ^{a)}
isoC15 : 0	32.5
C16 : 0	5.7
C16 : 1	12.2
C17 : 0	3.2
C17 : 1	3.7
isoC17 : 0	15.5
isoC17 : 1	12.2
C18 : 0	3.4
C18 : 1	7.8

a) not determined

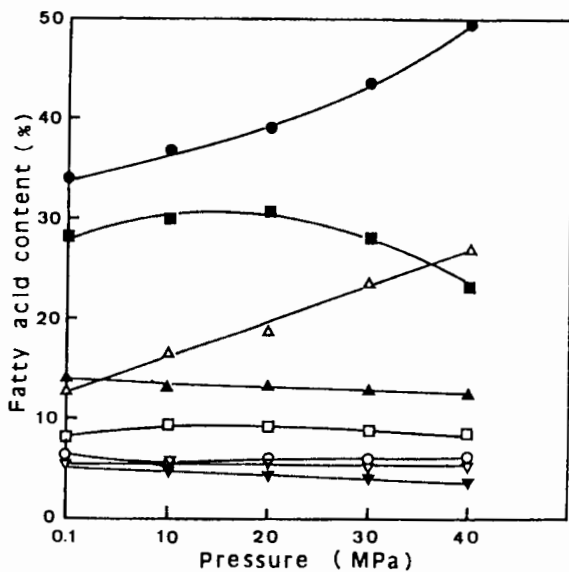


Fig. 3 Effect of pressure on fatty acid composition in strain RS103.

■, isoC15 : 0 ; ▼, C16 : 0 ; □, C16 : 1 ; ▲, isoC17 : 0 ; ▽, C17 : 1 ; △, isoC17 : 1 ; ○, C18 : 1 ; ●, total unsaturated fatty acid

として含むことから、同じく分岐脂肪酸を含む *Thermus thermophilus* の細菌の温度への適応と比較する意味で興味を持たれた。圧力が増加すると *Thermus* 属の細菌が低温環境に適応するときのように、isoC15 : 0 の脂肪酸を増加させることが期待されたが、RS 103株は、Fig. 3 に示すように加圧下では isoC17 : 1 の脂肪酸の特異的増加によって、全脂肪酸に占める不飽和脂肪酸の割合を増加させていた。C16 : 1, C17 : 1 および C18 : 1 の脂肪酸は圧力の変化によって変動しなかった。RS 103株では、高圧

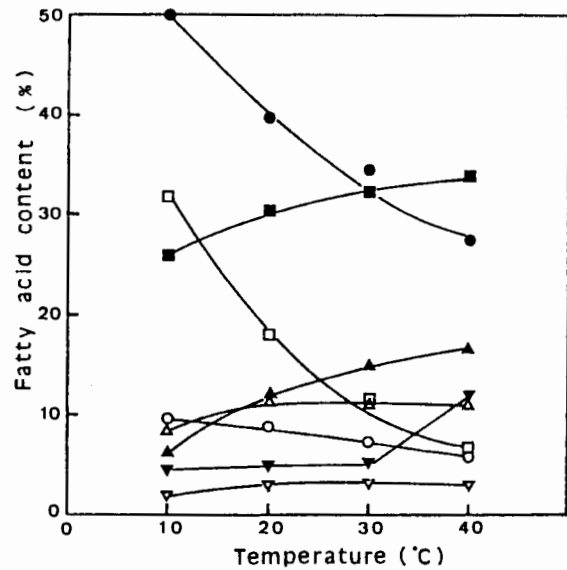


Fig. 4 Effect of temperature on fatty acid composition in strain RS103.

■, isoC15 : 0 ; ▼, C16 : 0 ; □, C16 : 1 ; ▲, isoC17 : 0 ; ▽, C17 : 1 ; △, isoC17 : 1 ; ○, C18 : 1 ; ●, total unsaturated fatty acid

下では isoC17 : 1 の脂肪酸を増加させて細胞膜の流動性を維持しているものと考えられた²⁵⁾。

Nordstom と Laakso は、*Thermus* 属の細菌において、anteisoC15 : 0, anteisoC17 : 0 および anteisoC17 : 1 の脂肪酸が低温下で増加することを報告している²⁶⁾。RS 103株の脂肪酸組成の変化に対する温度の影響を検討した結果、Fig. 4 に示すように培養温度が40度から10°Cに低下するにつれて、C16 : 1 の脂肪酸の著しい増加によって、細胞内の不飽和脂肪酸の割合が増加した。isoC15 : 0 と isoC17 : 0 の脂肪酸の相対的割合は温度の低下に伴って低下し、培養圧力の上昇に伴って増加した isoC17 : 1 の脂肪酸は温度の低下に伴ってわずかに減少しただけであった。RS 103株では、C16 : 1 の脂肪酸が温度の低下に伴って増加し、低温下での不飽和脂肪酸の割合の増加を引き起こしていることから、C16 : 1 の脂肪酸が低温下での細胞膜の流動性の維持に寄与しているものと考えられた。また、RS 103株の脂肪酸組成の圧力および温度に対する変動を観ると、4033-B株において観察された現象と同様に、圧力と温度とを異なった情報として認識しているものと考えられた。

4033-B株や RS 103株を加圧下で変動した C17 : 1 や isoC17 : 1 の脂肪酸は微生物に珍しい脂肪酸で

Table 5 Effect of pressure on compositions of major fatty acids in barotolerant strains

Fatty acid	Composition of cellular fatty acid (%)										
	4033-D				A8190-11				P. bathycetes		
	10 ^{a)}	20	30	40	0.1	20	40	60	0.1	10	40
C16:0	21.2	13.7	5.1	6.2	19.1	14.8	10.3	7.7	11.4	7.8	3.4
C16:1	43.0	45.9	35.0	23.0	30.6	36.5	38.8	37.4	51.6	53.9	37.6
C17:1	5.1	7.4	13.9	27.0	1.9	2.2	3.8	4.4	5.3	8.5	25.1
C18:1	17.6	18.1	27.0	30.0	24.2	28.1	36.6	43.3	20.3	15.2	20.2
TUFA ^{b)}	65.6	71.4	75.9	80.0	56.7	66.8	79.2	85.1	77.2	77.6	82.9

Cells were grown at 10°C for 48h at indicated pressure.

a) Growth pressure, MPa

b) Total unsaturated fatty acid

あるが、C17:1の脂肪酸の加圧下での増加は、Table 5に示すように深海から分離した4033-D株や耐圧性菌 *Pseudomonas bathycetes* でも観察されたことから、4033-B株に特異的な現象ではないことが示唆された。なお、C17:1の脂肪酸の加圧下での増加は、好圧性細菌でも報告されていたが、最適増殖圧力を超えた60MPaという高圧下の細胞のみに認められることから、異常な反応であると考えられ、耐圧性との関連は議論されていなかった²¹⁾。

細菌によって変動する脂肪酸の種類は異なっているが、深海の細菌が高圧環境に適応する戦略の一つとして、細胞膜の不飽和脂肪酸の割合を増加させることは、一般的な現象として考えてもよいものと思われる。

4. 膜酵素活性への圧力の影響

既に述べたように生体内の諸反応は細胞膜と密接に関連しており、生体膜と酵素系の双方に対する圧力の影響が、細菌の高圧環境への適応を考えると非常に興味深いものとなる。細胞膜の酵素活性に及ぼす圧力の効果については、Macdonald や Heremans の総説にまとめられているように^{14,27)}、既に *Azotobacter vinelandii* からのニトロゲナーゼ、筋小胞体のCa²⁺-ATPase、ブタ腎臓の(Na⁺+K⁺)-ATPase、*Acholeplasma laidlawii* の(Na⁺+K⁺)-ATPase 活性に対する圧力の影響が調べられている。これらのATPase活性は、いずれも圧力の上昇に伴って屈曲点を持って低下している。ATPase活性の圧力の上昇に伴う低下は、加圧による酵素活性そのものの阻害というよりも、加圧による細胞膜の流動

性の低下が酵素活性の低下を引き起こしていると考えられている^{28,29)}。

これまでの研究はいずれも陸上の生物を用いてなされたもので、深海の微生物を材料に用いた報告はなかった。既に述べたように耐圧性4033-B株は培養圧力が上昇するにつれて主にC17:1の脂肪酸を増加させることによって、細胞膜の不飽和脂肪酸の割合を増加させていた。そこで、その変動が細胞膜に存在するエネルギー代謝系の酵素である NADH oxidize 活性に及ぼす影響を検討した³⁰⁾。

Na⁺を生育のために必要とする海洋細菌には、アルカリ側に最適pHを持つNADH oxidizeが存在する³¹⁾。耐圧性菌4033-B株のNADH oxidize活性を調べた結果、pH8付近に最適pHを持ち、0.1MのNaClの添加によって最大の活性が得られたことから、Na⁺駆動型の酵素であると考えられる。酵素活性の温度およびpH依存性を0.1、20および40MPaで増殖した細胞の細胞膜で調べた。その結果、最大活性に与えるpHには変化が見られなかったが、Fig. 5に示すように最大活性を与える温度は、0.1および20MPaのものが25°C付近にあったのに対して、40MPaのものでは20°C付近にあり、最大活性を示す温度は、高圧下で培養した細胞の細胞膜の方が低温側にシフトする傾向が認められた。40MPaで増殖した細胞は、不飽和脂肪酸の割合が大気圧下より高く、細胞膜の流動性がより高くなっていると考えられる。また、温度が上昇することは細胞膜の流動性を上昇させる方向に働くため、40MPa、10°Cで増殖した細胞膜の流動性は、活性の測定を行った大気圧下では相当高くなっていると考えられる。したがって、高圧下で増

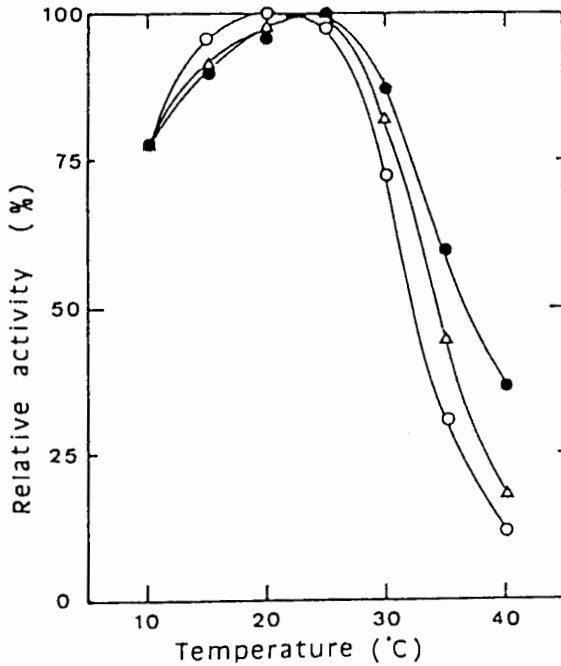


Fig. 5 Effect of temperature on NADH oxidase of 4033-B membranes. Membranes were prepared from cells grown at 10°C, 0.1 (●), 20 (△) and 40 (○) MPa.

殖した細菌の細胞膜の NADH oxidize 活性の最大活性を示す温度が低温側へシフトした理由として、細胞膜の酵素が最適に機能するためには、最適の細胞膜の流動性が必要であることを示しており、反応温度が低下したときに最適な細胞膜の流動性が獲得できたものと考えられる。

0.1MPa と 40MPa で増殖し、脂肪酸組成の異なる細胞膜の NADH oxidize への圧力の影響を検討した。その結果、Fig. 6 に示すように、0.1MPa の細胞膜の酵素活性の圧力の上昇に伴う減少は、40 MPa の細胞膜の酵素活性よりも大きく、0.1MPa の細胞膜の酵素活性は圧力の上昇に伴って直線的に減少するのに対して、40 MPa の細胞膜の酵素活性は、35MPa 付近に屈曲点をもって減少した。このことは 40 MPa の細胞膜では培養圧力に近い 35MPa 付近で細胞膜内の脂質の相転移が起こっており、培養圧力に近い圧力までは細胞膜内に液晶状態が存在していることを示唆している。NADH oxidize の比活性は、0.1MPa のものと 40MPa のものとの大きな差が認められないことから、40MPa の細胞膜の NADH oxidize 活性が 0.1MPa のものより耐圧性であったことは、酵素そのものが耐圧性であるというよりも、

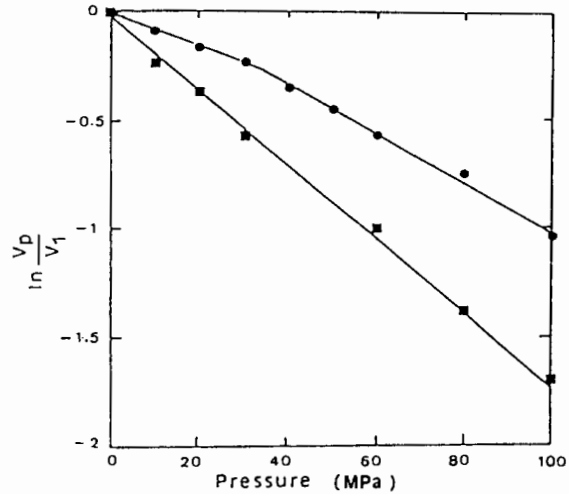


Fig. 6 Effect of pressure on NADH oxidase of 4033-B membranes. Membranes were prepared from cells grown at 10°C, 0.1 (■) and 40 (●) MPa.

40 MPa で増殖した細胞の細胞膜の流動性が加圧下でも維持されていることによるものだと考えられる。このように、4033-B 株は加圧下で培養すると細胞膜の不飽和脂肪酸の割合を調節して、細胞膜の NADH oxidize の活性を加圧下でも発揮できるようにしている。4033-B 株では C17:1 の脂肪酸がその調節に重要な役割を演じているものと考えられる。

5. 圧力による遺伝子発現の調節

細菌が低温環境に適応する際の脂肪酸の変動に関する生化学的・遺伝学的機構は、大腸菌を用いて詳細に検討されている。大腸菌では、培養温度の低下に伴って C16:0 の脂肪酸が減少し、C18:1 の脂肪酸の増加が起こることによって、細胞膜内の不飽和脂肪酸の増加が起こることが報告されている。この変化を引き起こす酵素は、細胞内に常に存在しており、低温環境下でこの酵素が活性化され、C18:1 の脂肪酸の合成を行う³²⁾。一方、*Bacillus* 属の細菌では、脂肪酸の不飽和化酵素タンパク質が低温下で誘導的に合成されて、不飽和脂肪酸の割合を増加させている³³⁾。そこで、4033-B 株を用いて、加圧に伴う C17:1 の脂肪酸増加に新たな遺伝子の発現が必要かどうかについて検討した。Table 6 に示すように 40 MPa で培養した細胞では C17:1 の脂肪酸の増加が起こっているが、遺伝子の転写阻害剤、リファンピシンを加えて 24 時間培養した細胞では、C17:1 の

Table 6 Effect of inhibitor of RNA synthesis on pressure-induced alteration of fatty acid composition in strain 4033-B

Fatty acid	Composition of fatty acid (%)			
	Cells were incubated at			
	0.1MPa	0.1MPa+Rf	40MPa	40MPa+Rf
C14:0	1.7	1.5	1.1	2.5
C14:1	1.3	1.5	1.7	1.9
C15:0	2.2	2.4	2.7	2.4
C15:1	3.9	4.1	4.7	2.5
C16:0	26.7	27.2	8.4	27.6
C16:1	46.4	47.6	46.4	47.5
C17:0	2.8	2.5	2.1	1.6
C17:1	7.7	7.8	24.0	6.4
C18:0	1.5	2.1	0.8	1.6
C18:1	6.0	6.3	7.9	4.9

Cells were cultured at atmospheric pressure and divided into four equal portions. Two portions were retained at 0.1 MPa with or without Rifampicin (Rf), while the remaining two portions were incubated at 40 MPa with or without Rf.

脂肪酸の増加は起こっていない。さらに、リファンピシン無添加の細胞のC16:0の減少およびC17:1の脂肪酸の増加は、加圧後2時間の細胞では顕著ではなく、24時間培養した細胞では観察されたことから、加圧によるC17:1の脂肪酸の増加は、加圧後速やかに起こる現象ではないことが明らかとなった。一方、低温環境下でのC16:1およびC18:1の脂肪酸の増加に及ぼすタンパク質合成阻害剤の影響を検討した結果、低温下での脂肪酸組成の変化は阻害剤の存在下でも観察された。これらのことは、4033-B株が低温環境に適応するとき、細胞内に既に存在している酵素によって脂肪酸の相対的割合を調節しているが、加圧下においてC17:1の脂肪酸を増加させるためには、新たなタンパク質合成が必要であり、加圧下でのC17:1の脂肪酸の割合の調節には、加圧によって活性化される遺伝子が関与していることを示唆している。

6. 要 約

細菌は、外界の刺激に応答する機構を備えており、既に温度変化、浸透圧変化、放射線などの物理的刺激に応答した遺伝子発現調節機構が分子レベルで明らかにされている。深海から分離した耐圧性菌の耐圧機構を明らかにするため、細胞膜の脂肪酸組成と圧力の関係を検討した結果、加圧下で特異的な不飽和脂肪酸を増加させていることが明らかとなった。また、加圧下で培養した耐圧性細菌の細胞膜の酵素

活性が大気圧下で培養したものよりも耐圧性になっていることを明らかにした。筆者らの単離した耐圧性細菌の高圧下での特異的な脂肪酸の増加は、RNA合成阻害剤によって阻害されることから、細胞が圧力という刺激を感知し、その情報によって特異的な遺伝子の発現が引き起こされているものと推測された。この応答機構の分子的レベルでの解析によって、細菌の高圧環境への適応機構を明らかにする糸口が得られることが期待される。

高圧環境下で細菌が生息するためには、細胞膜の機能だけでなくさまざまな酵素タンパク質や高分子合成系等の生化学的機能が、高圧環境下でも維持されていることが必要である。各種酵素タンパク質やタンパク質合成系の耐圧機構に関しては、一連の研究がなされているが、核酸合成系や細胞壁合成系に関しては十分な生化学的解析がなされているとは言いがたく、今後の研究課題として残されている。

著者らは、加圧下での特異的な脂肪酸の増加に、圧力に関連した遺伝子の発現が関与していることを示唆したが、既に加圧下で特異的に発現する遺伝子の存在が報告され、加圧下で特異的に発現する遺伝子が分離されている^{34,35)}。また、圧力によって制御されるプロモーター部位も同定されている³⁶⁾。

圧力は、我々陸上環境に適応した生物にはなじみづらいが、海洋では極めて普遍的な物理的因子であり、その物理的因子を細菌がどのように認識し適応しているかを分子レベルで知ることは、海洋微生物

資源の有効利用を図るとき非常に重要であると考えられる。今後、耐圧性細菌や好圧性細菌の加圧下における生理・生化学的な研究の進展によって、耐圧機構が分子レベルで明らかにされることが期待される。

文 献

- 1) Jannasch, H. W. : Microbial processes at deep sea hydrothermal vents. *In* Hydrothermal processes at seafloor spreading centers, NATO Conference Series IV, Marine Science (Rona P. A. et al. eds.), pp. 677-709, Plenum (1991)
- 2) Morit, R. Y. : Pressure as an extreme environment. *In* Microbes in the Extreme environments (Herbert R. A et al. eds.), pp. 172-185, Academic Press (1986)
- 3) Zobell, C. E. and F. H. Johnson : The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *J. Bacteriol*, **57**, 179-186 (1994)
- 4) Oppenheimer, C. H. and Zobell C. E. : The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res*, **11**, 10-18 (1952)
- 5) Zobell, C. E. and Morita, R. Y. : Barophilic bacteria in some deep-sea sediments. *J. Bacteriol*, **73**, 563-568 (1957)
- 6) Yayanos, A. A., A. S. Dietz and R. Van Boxtel : Dependence of reproduction rate on pressure as a hallmark of deep-sea bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, **44**, 1356-1361 (1982)
- 7) Deming, J. W. and R. R. Colwell : Barophilic bacteria associated with digestive tracts of abyssal holothurians. *Appl. Environ. Microbiol*, **44**, 1222-1230 (1982)
- 8) Jannasch, H. W. and C. O. Wirsen : Viability of pressure adaptation in deep-sea bacteria. *Arch. Microbiol*, **139**, 281-288 (1984)
- 9) Morita, R. Y. : Effects of hydrostatic pressure on marine bacteria. *Oceangr. Mar. Biol. Annu. Rev*, **5**, 187-203 (1967)
- 10) Zobell, C. E. : Pressure effects on morphology and life processes of bacteria. *In* High pressure effects on cellular process (Zimmerman, A. M. eds.) pp. 85-130 (1970)
- 11) Jannasch, H. W. and C. G. Taylor : Deep sea microbiology. *Ann. Rev. Microbiol*, **38**, 487-514 (1984)
- 12) Landou, J. V. and Pope D. H. : Recent advances in the area of barotolerant protein synthesis in bacteria and implications concerning barotolerant and barophilic growth. *In* Recent Advances in Aquatic Microbiology, vol 2 (Droop M. R. et al. eds.), pp. 49-76, Academic Press (1980)
- 13) Singer, S. J. and G. L. Nicolson : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731 (1972)
- 14) Heremans, K. : High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng*, **11**, 1-21 (1982)
- 15) Morita, R. Y. : Survival of bacteria in cold and moderate hydrostatic pressure environments with special references to psychrophilic and barophilic bacteria. *In* The survival of vegetative microbes (Gray T. G. R. et al. eds.), pp. 279-298, Cambridge University Press, Cambridge (1976)
- 16) Sinensky, M. : Homeoviscous adaptation; A homeostatic process that regulates the viscosity of the membrane lipids in *Escherichia coil*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 522-526 (1974)
- 17) Oshima, M. and A. Miyagawa : Comparative studies on the fatty acid composition of moderately and extremely thermophilic bacteria. *Lipid*, **9**, 476-480 (1974)
- 18) Okuyama, H., N. Fukunaga and S. Sasaki : Homeoviscous adaptation in a psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. ABE-1. *J. Gen. Appl. Microbiol*, **32**, 473-482 (1986)
- 19) Delong, E. F. and A. A. Yayanos. : Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to change in hydrostatic pressure. *Science*, **228**, 1101-1102 (1985)
- 20) Delong, E. F. and A. A. Yayanos. : Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol*, **51**, 730-737 (1986)
- 21) Wirsen, C. O., H. W. Jannasch, S. G. Wakeman and E. A. Canuel : Membrane lipids of a psychrophilic and barophilic deep-sea bacterium. *Current Microbiol*, **14**, 319-322 (1987)
- 22) 上村一雄・布施博之・山岡到保 : 深海の耐圧性菌のスクリーニング. 中国工業技術試験所報告, **33**, 15-24 (1989)
- 23) 上村一雄・布施博之・山岡到保 : 高圧下における微生物単離装置の試作, **31**, 73-80 (1988)
- 24) Kamimura, K., H. Fuse, O. Takimura, Y. Yamaoka, K. Ohwada and J. Hashimoto : Pressure-induced alteration in fatty acid composition of barotolerant

- deep-sea bacterium. *J. Oceanog*, **48**, 93-104 (1992)
- 25) Kamimura, K., H. Fuse, O. Takimura, Y. Yamaoka : Effect of growth pressure and temperature on fatty acid composition of a barotolerant deep-sea bacterium. *Appl. Environ. Microbiol*, **59**, 924-926 (1993)
- 26) Nordstrom, K. M. and S. V. Laakso : Effect of growth temperature on fatty acid composition of ten *thermus* strains. *Appl. Environ. Microbiol*, **58**, 1656-1660 (1992)
- 27) Macdonald, A. G. : The effects of pressure on the molecular structure and physiological functions of cell membrane. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*, **B302**, 47-68 (1984)
- 28) De Smedt, H., R. Borghgraff, F. Ceuterick and K. Heremans : Pressure effects on lipid-protein interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATP-ase}$. *Biochem. Biophys. Acta*, **556**, 479-489 (1979)
- 29) Heremans, K. and F. Wuytack : Pressure effect on the arrhenius discontinuity in $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP-ase}$ from sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, **117**, 161-163 (1980)
- 30) 上村一雄・布施博之・滝村 修・山岡到保 : 耐圧性深海細菌の NADH oxidize への圧力の影響, 中国工業技術試験所報告, **36**, 11-20 (1991)
- 31) Udagawa, T., T. Unemoto and H. Tokuda : Generation of Na^+ electrochemical potential by the Na^+ -motive NADH oxidize and Na^+/H^+ antiport system of a moderately halophilic *Vibrio costicola*. *J. Biol. Chem*, **261**, 2616-2622 (1986)
- 32) Fulco, A. J. : Fatty acid metabolism in bacteria. *Prog. Lipid Res*, **22**, 133-160 (1983)
- 33) Fujii, J. K. and A. J. Fulco : Biosynthesis of unsaturated fatty acids by Bacilli. *J. Biol. Chem*, **252**, 3660-3670 (1977)
- 34) Jaenicke, R., G. Bernhardt, H. D. Ludemann and K. O. Stetter : Pressure-induced alterations in the protein pattern of the thermophilic archaeobacterium *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol*, **54**, 2375-2381 (1988)
- 35) Bartlett, D., M. Wright, A. A. Yayanos and M. Silverman : Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium. *Nature*, **342**, 572-574 (1989)
- 36) Kato, C., M. Smorawinska, T. Sato and K. Horikoshi : Cloning and expression in *Escherichia coli* of a pressure-regulated promoter region from a barophilic bacterium, strain DB6705. *J. Mar. Biotechnol*, **2**, 125-129 (1995)