

氏名	かわもと じゅん 川 本 純
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1670 号
学位授与の日付	平 成 20 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies of cold-adaptation mechanism of a psychrotrophic bacterium, <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 (低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 の低温適応機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 江 崎 信 芳 教 授 清 水 昌 教 授 阪 井 康 能

### 論 文 内 容 の 要 旨

地球上の生命圏の約80%は極地や深海など年間を通して低温環境下にあり、このような環境を好む特徴的な低温菌が生息する。低温菌を利用することにより、熱安定性の低い化合物の変換系の構築や、寒冷期あるいは寒冷地における環境浄化など、新しいバイオプロセスの開発が可能になると期待される。化学反応速度や拡散速度が低下し、生体膜の流動性が低下する低温条件下において、低温菌がいかにして異化・同化代謝をつつがなく進行させ、効率的に増殖するのか明らかにすることは、生物学的に重要な課題であるだけでなく、低温菌の産業応用のための基盤的知見になると期待される。このような観点から本研究は低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の低温適応機構を解析したものであり、その成果は以下のように要約される。

1. *S. livingstonensis* Ac10 を 4℃あるいは18℃で培養し、各菌体のプロテオームを解析して比較することで、低温で生産量が顕著に増加するタンパク質を52種見いだした。これらをペプチドマスフィンガープリンティング法で解析することにより、26種の可溶性タンパク質と2種の膜タンパク質を同定した。RNAの合成・立体構造形成に関与するタンパク質 (RpoA, GreA, CspA), タンパク質の合成・立体構造形成に関与するタンパク質 (TufB, Efp, LysU, Tig), 膜輸送に関与するタンパク質 (OmpA, OmpC), 運動に関与するタンパク質 (FlgE, FlgL) のホモログが低温誘導されることを示した。
2. *S. livingstonensis* Ac10 の遺伝子を相同組み換えによって部位特異的に破壊する方法を確立した。この方法を用いて、低温で誘導生産される外膜タンパク質 Omp\_C176 の遺伝子を破壊した。omp\_C176破壊株の生育速度は、22℃では野生株の場合とほぼ同等であったが、6℃では野生株のそれに比べはるかに低いことを見いだし、Omp\_C176は本菌の低温での生育に重要な機能を果たしていることを示した。一方、野生株、Omp\_C176 遺伝子破壊株、Omp\_C176 高発現株の外膜透過性を *p*-ニトロフェニルリン酸を用いて比較し、Omp\_C176 の生産量が多いほど低温生育時の外膜透過性が増大することを示した。これにより、Omp\_C176 が低温で機能するポーリンタンパク質であることを明らかにした。低温では水の粘性上昇によって溶質の拡散性が低下するが、本菌は Omp\_C176 を誘導生産することで外膜透過性を高め、可溶性分子の取り込みを促進していることが示された。
3. *S. livingstonensis* Ac10 はエイコサペンタエン酸 (EPA) を低温で誘導生産し、リン脂質のアシル鎖として膜中に含有することを示した。EPA 生合成遺伝子を相同組み換えによって破壊し、EPA 非生産株を作製した。EPA 非生産株の生育速度は、野生株の場合に比べ18℃ではほとんど差がないのに対し、4℃では野生株のそれよりもはるかに低いことを見いだした。EPA をアシル鎖として含むリン脂質を培地に添加すると EPA 非生産株の生育速度は野生株の場合と同じレベルに回復したが、EPA の代わりにオレイン酸をアシル鎖として含むリン脂質を添加しても EPA 非生産株の生育速度は回復しなかった。以上の結果、EPA が本菌の低温適応に重要な役割を担うことが示された。蛍光試薬であるピレンを用いて物理化学的手法により解析したところ、野生株と EPA 非生産株の膜流動性に顕著な差は見られず、EPA は膜流動性保持以外に何らかの重要な機能を果たしていることが示唆された。細胞の形態観察を行ったところ、野生株は 4℃では長さ 1~2 μm の桿状

の菌体を形成するのに対し、EPA非生産株の場合は培養時間の経過にともなって伸長し、10 $\mu$ m以上の長さをもつ糸状の菌体を形成することを見いだした。伸長したEPA非生産株細胞内の2本鎖DNAをDAPI染色したところ、複製したDNAの分離を示唆する蛍光顕微鏡像が得られた。以上のことからEPAは細胞分裂におけるDNAの分配以降の過程に関与することが示された。一方、野生株とEPA非生産株が生産する膜タンパク質を二次元電気泳動で比較した結果、低温での外膜透過を担うOmp\_C176など4種の外膜タンパク質の量が減少していることを見だし、EPAはこれら特定のタンパク質の膜への導入や膜における安定性向上に寄与する可能性を示した。

## 論文審査の結果の要旨

近年、低温での物質生産や環境浄化を行う新しいバイオプロセスが注目され、そのようなプロセスに利用可能な低温菌やその低温活性酵素の開発に関心が寄せられている。低温菌が低温環境で円滑に増殖する仕組みを明らかにすることは、生物学的に重要な課題であるだけでなく、産業利用に適した低温菌を開発する上でも重要な知見となる。このような観点から本研究は低温菌 *S. livingstonensis* Ac10の低温適応に関与するタンパク質と脂質を同定し、その機能解析を行ったものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. *S. livingstonensis* Ac10のゲノム情報に基づいてプロテオーム解析を行い、本菌の低温誘導性タンパク質を網羅的に解析した。その結果、26種の可溶性タンパク質と2種の膜タンパク質の同定に成功した。低温誘導性のタンパク質は低温環境への適応に重要な役割を担っていると考えられ、本研究成果は低温菌の低温適応機構を明らかにするための重要な手がかりを与えるものとして高く評価できる。

2. *S. livingstonensis* Ac10のゲノム上の遺伝子を相同組み換えによって部位特異的に改変する技術を確立した。本菌は全ゲノム情報が得られている数少ない低温菌の一つであり、本菌の遺伝子破壊法を確立したことは、ゲノム情報に基づく遺伝子の機能解析を可能にする成果として特筆できる。

3. *S. livingstonensis* Ac10の低温での生育に外膜ポーリンであるOmp\_C176が重要であることを示した。低温環境では水の粘性上昇に伴って溶質の拡散速度が低下するため、低温菌には栄養素などを効率的に外界から取り込むための特異的な仕組みが存在すると予想されていたが、本研究はその実体の一つを明らかにしたものであり、評価に値する。またこの成果は、微生物が外界と物質交換するプロセスの効率化を図る上でも重要な知見といえ、応用微生物学的にも意義深い。

4. *S. livingstonensis* Ac10の低温適応にEPAは重要な機能を果たすことを明らかにし、EPAは細胞分裂におけるDNA分配以降の何らかの過程に関与することを示した。これはEPAの新しい生理機能の発見に繋がる成果といえ、細胞生物学的観点からも評価できる。また、EPAと特定の膜タンパク質が相互作用することを示唆する結果も提示しており、生体膜研究の分野に新たな展開をもたらしたといえる。

以上のように本論文は、低温菌の低温適応に関わるタンパク質と脂質を同定し、その機能を解析することによって、低温適応というユニークな生物現象の仕組みを明らかにしたものであり、分子微生物学、応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年11月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。