

ミコール酸含有細菌の細胞表面疎水性の評価

静岡県大院 ○遠藤真穂、宮田直幸、正員 岩堀恵祐

1. はじめに

活性汚泥法で発生する高粘性異常発泡物（スカム）には、*Nocardia* 属や *Gordonia* 属、*Rhodococcus* 属のような、細胞壁にミコール酸を有するミコール酸含有細菌が優占化している。ミコール酸は高級脂肪酸であるため、その細胞表面は疎水的であり、この性質がスカムの生成に関与していると考えられている。そこで、本研究では、スカム原因菌と認識されている各種のミコール酸含有細菌を用いて、培養 phase や培養温度、飢餓ストレスといった環境要因の細胞表面疎水性に及ぼす影響とミコール酸炭素鎖長との関連を検討したので、その概要を報告する。

2. 実験材料並びに方法

2.1 供試菌株

ミコール酸含有細菌として、スカムより分離・同定した *Gordonia (Nocardia) amarae* SC1¹⁾, *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, *Rhodococcus ruber* IFO 15591^T, *Corynebacterium variabilis* IFO 15826^T, *Tsukamurella paurometabolum* IFO 12160^T 及び *Mycobacterium smegmatis* IFO 13167 の 6 菌株を用いた。

2.2 培養条件

培養条件として①培養時間、②培養温度、及び③飢餓ストレスを設定し、各々の細胞表面疎水性に与える影響を調べた。①では 28℃で培養し、培養 phase の異なる菌体を得た。②では定常期前期まで培養した菌体を新しい培地に植菌し、15℃または 35℃で培養して経時的に菌体を回収した。③では対数増殖後期または定常期中期まで培養した菌体をリン酸緩衝液に懸濁し、28℃でインキュベートして経時的に菌体を回収した。

2.3 分析方法

細胞表面の疎水性は、BATH (Bacterial adherence to hydrocarbons) 法²⁾により測定した。本法は、濁度を調整した菌体懸濁液を試験管に分注した。そこへヘキサデカンを追加・攪拌し静置した。ヘキサデカンの乳化相を取り除き、水相の濁度を測定した。ヘキサデカン添加前後の濁度からヘキサデカンへの細胞の付着率を算出し、疎水性として評価した。

ミコール酸の抽出及び分析は次の手順で行った。まず凍結乾燥試料をアルカリ性メタノール(10%w/v KOH)で2時間還流した後、n-ヘキサンで抽出し総脂肪酸を得た。次にこれをメチルエステル化した後、TLCにより展開しミコール酸メチルエステルを精製した。精製物はトリメチルシリル誘導体とし、GC 及び GC/MS で分析した。

3. 実験結果並びに考察

3.1 細胞表面疎水性に及ぼす環境要因の影響

ミコール酸含有細菌 6 菌株を上述の培養条件で培養して細胞表面の疎水性を BATH 法で測定し、細胞表面疎水性に及ぼす影響を調査した。

3.1(1) 培養 phase の影響

G. amarae の増殖曲線と疎水性の変化を Fig.1 に示した。*G. amarae* では、培養時間と共に疎水性の減少が認められ、*R. erythropolis*, *R. ruber* でも同様の傾向であった。一方、*C. variabilis*, *T. paurometabolum* 及び *M. smegmatis* では培養時間に関わらず疎水性はほぼ一定であり、特に後者 2 菌株は常に疎水性が高いことが示さ

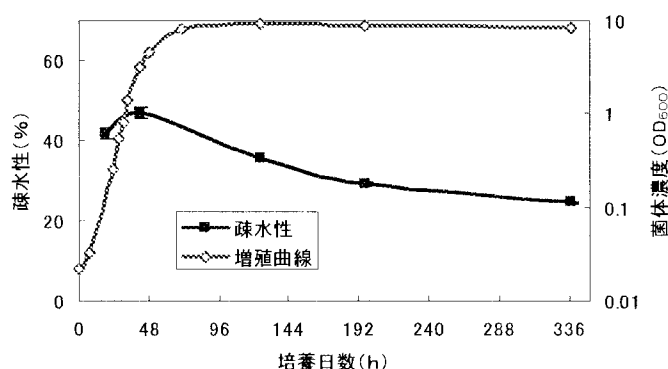


Fig.1 *G. amarae* の疎水性の経時変化

れた。

3.1(2) 培養温度の影響

G. amarae における培養温度による疎水性の変化を Fig.2 に示した。*G. amarae*(Fig.2), *T. paurometabolum* 及び *M. smegmatis* では 35℃において疎水性が低下する傾向にあった。一方 *R. ruber* では各温度で疎水性が上昇する傾向にあった。しかし、培養温度による疎水性の変化は菌株ごとに異なっており、変化の様子に明確な規則性は見い出せなかった。

3.1(3) 飢餓ストレスの影響

G. amarae における飢餓ストレスによる疎水性の変化を Fig.3 に示した。試験開始から 24 時間以内において、*G. amarae* (Fig.3), *R. erythropolis* 及び *R. ruber* では疎水性が低下し、*C. variabilis*, *T. paurometabolum* 及び *M. smegmatis* では上昇した。24 時間以降は全ての菌で、疎水性はほぼ一定になった。

全体的には、各菌株の持つ相対的な疎水性の程度に大きな変化はなかった。

3.2 細胞表面疎水性とミコール酸炭素鎖長の関係

疎水性への培養条件の影響を調べた試験において、相対的に高い疎水性を示していた菌株 *T. paurometabolum* と *M. smegmatis* は、長鎖のミコール酸を保持していることがわかっている。疎水性の程度に影響を与える因子の一つとしてミコール酸炭素鎖長が考えられるため、ミコール酸炭素鎖長(ミコール酸炭素数)と疎水性の関係を検討した。その結果、BATH 法による細胞表面疎水性の値とミコール酸炭素鎖長には相関が認められ ($R^2=0.95$)、ミコール酸含有細菌の細胞表面疎水性にはミコール酸炭素鎖長が関係していることが示唆された。

現在、内分泌攪乱物質等の疎水性化学物質のミコール酸含有細菌細胞への吸着係数を測定し、疎水性物質とミコール酸含有細菌の親和性を検討している。

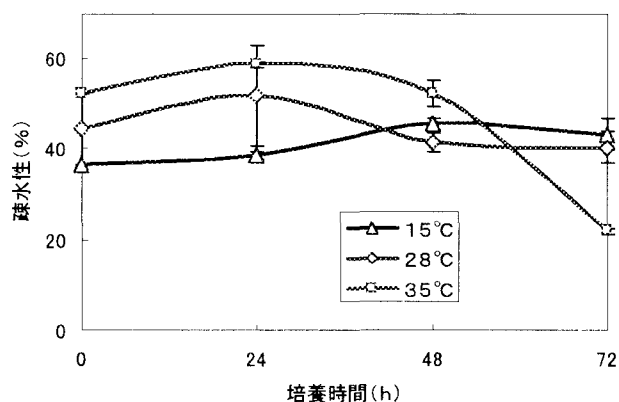


Fig.2 *G. amarae* の疎水性に及ぼす培養温度の影響

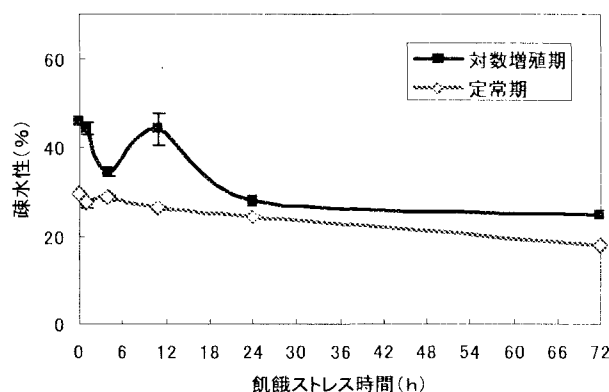


Fig.3 *G. amarae* の疎水性に及ぼす飢餓ストレスの影響

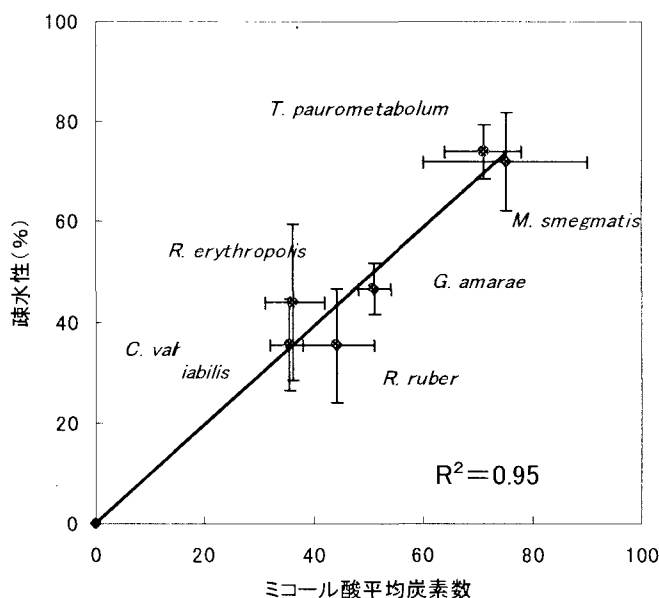


Fig.4 細胞表面疎水性とミコール酸炭素数との関係

参考文献

- 1) Iwahori, K., Tokutomi, T., Miyata, N. and Fujita, M. : Formation of Stable Foam by the Cells and Culture Supernatant of *Gordonia (Nocardia) amarae*, J. Biosci. Bioeng., **92**, 77-79 (2001)
- 2) M. Rosenberg, D. Gutnick and E. Rosenberg : Adherence of Bacteria to Hydrocarbons : A Simple Method for Measuring Cell-Surface Hydrophobicity, FEMS Microbiol. Lett., **9**, 29-33 (1980)