

9 6 2 7 大腸菌などの非好塩性細菌の耐塩性機能発現と浸透ストレス

助成研究者：石田 昭夫(熊本大学 教養部)
共同研究者：松坂 理夫(熊本大学 理学部)

一般に、細菌は高浸透圧になる高塩分濃度の生育環境では、K イオンやグリシンベタイン、グルタミン酸、トレハロース等の有機物質を細胞内に蓄積することが知られている。これらの補償物質の蓄積は、高塩分濃度に対する耐塩性のために重要な要因であることが示唆されている。しかしながら、非好塩性細菌においてどのような仕組みで耐塩性機能が発現するかについては十分な解明を得ていない。

我々は、大腸菌や枯草菌の耐塩性に興味をもち実験を進行中に、菌体をあらかじめ酵母エキスに懸濁し短時間(30～60分間)の穏和な浸透ストレス処理を行なうと、無処理の菌では増殖が抑制される高塩分培地(1.2M NaCl 含)で著しい菌増殖が見られることを観察した。浸透ストレスに用いる物質は、NaCl でも Sorbitol でも、すなわち、電解質でも非電解質でも、いずれでも効果があった。そこで、高塩分培地での増殖を可能とする耐塩性機能発現を誘導する浸透ストレスに注目し、短時間の浸透ストレス処理により菌体にどのような物質が蓄積するかについてしらべた。NMR 及びイオンメータを用いた測定から、大腸菌では K イオンやグルタミン酸、グリシンベタイン、トレハロースなどの補償物質及びの蓄積がみられた。これらの蓄積量は浸透ストレスの程度に依存したが、誘導に最も効果のある穏和な浸透ストレスで最も顕著な蓄積がみられた。そこで、浸透ストレス処理に、これまで使用していた酵母エキスの代わりに、上記の補償物質を添加して耐塩性発現が誘導されるかどうか検討した。その結果、誘導にはこれら全部の補償物質が必要ではなく、K イオンとグルタミン酸だけで十分な誘導が起こることが判明した。同様の実験結果は枯草菌でも得られた。一方、電子顕微鏡観察から、上記の浸透ストレス処理をした大腸菌及び枯草菌では無処理の細胞では見られない核領域の顕著な凝集が見られた。この形態的变化は耐塩性発現の誘導になんらかの関係があることが予測されるが、その詳細な仕組みを探ることは今後の興味深い課題である。以上の結果から、我々は、大腸菌や枯草菌等の非好塩性細菌に共通する耐塩性発現の誘導機構について考察した。

9627 大腸菌などの非好塩性細菌の耐塩性機能発現と浸透ストレス

助成研究者：石田 昭夫(熊本大学 教養部)

共同研究者：松坂 理夫(熊本大学 理学部)

1. 研究目的

微生物は地球上の様々な環境に生息しており、なかでも、高等動植物では生命維持が不可能である極限環境に生息している微生物も知られている。このように地球環境での生息域の広さから、一般に微生物は外部環境の変化に対して大きい適応能を有しているといわれている。しかしながら、外部環境といえども様々な環境があり、それぞれにおける微生物の適応機構が十分に解明されているとはいえず、不明な点が数多く残っている。我々は、外部環境の一つである塩分環境に興味をもち、非好塩性細菌である大腸菌や枯草菌を実験材料として、十分な解明のなされていないこれらの細菌の耐塩性に関して実験を行ってきた。

今回、我々は、大腸菌と枯草菌を用いて耐塩性発現を短時間で誘導することを試みた。その結果、穏和な浸透ストレス下で菌体を酵母エキスとともに振盪処理を行うと、顕著な耐塩性発現が誘導されることが判明した。そこで、効果的な浸透ストレス処理により菌体内に蓄積する物質および細胞形態変化を追求し、耐塩性機能の発現機構を明らかにする目的で実験を行った。

2. 研究方法

2.1 使用菌株と培養方法

実験には、非好塩性細菌の大腸菌 *Escherichia coli* ATCC-9637 株および枯草菌 *Bacillus subtilis* IFO-3025 株を用いた。培地は、酵母エキス(10g)、ポリペプトン(10g)および NaCl(2g)を純水に溶かし pH7 に調整したものを基本培地 (YP 培地) として使用した。培養は、100ml の培地を含む 500ml 用の坂口振盪フラスコを用い、30℃、120回/分で好氣的振盪培養を行ない、培養12時間の対数増殖期の菌体を収穫し以後の実験に用いた。

2.2 耐塩性発現を誘導するための浸透ストレス実験系

誘導実験には、基本培地で12時間培養した菌体を、遠心分離器で集菌し滅菌した純水

で洗浄を2回繰り返す、同純水に懸濁した菌体を用いた。この菌懸濁液を、浸透圧を高める物質を添加した1%酵母エキス溶液に加え、30℃で一定時間の振盪処理を行った。また、必要に応じて、酵母エキス溶液の代わりにグルタミン酸溶液等を用いた。この浸透ストレス処理中に菌の増殖を起こさせないため、処理液中の菌濃度が波長660nmでの濁度が10になるように濃く懸濁した。

上記の誘導実験系により誘導した耐塩性の有無を観察するために、我々は、次のような方法を用いた。すなわち、振盪ストレス処理をした菌体を、通常の培養では菌増殖の抑制される高塩分培地(1.2M NaCl添加の基本培地)に植菌し、12時間の好氣的振盪培養中の菌増殖の有無により確認した。培養中の菌増殖は、分光光度計により濁度(660nm)を測定することにより追跡した。また、必要に応じて、ストレス処理をした菌体を高塩分培地である平板培地に塗布し、2日間30℃で培養した。培養後の出現するコロニー数を測定し、生残率をコロニー形成率(CFU)として求めた。

2.3 細胞内の補償溶質及びNa, Kイオン含量の測定

浸透ストレス処理後の菌体中に含まれる補償溶質を同定するために、我々は、¹H核磁気共鳴(NMR)分析を行った。測定用の試料調整は以下のように行った。菌体を1M NaCl溶液で2回洗浄し、80%(v/v)エタノール溶液に懸濁し1時間室温で攪拌しながら放置後、遠心により上清液を集めた。上清液のエタノールを減圧除去後、凍結乾燥した試料をD₂O溶液に溶解しNMR分析に用いた。NMR分析は、試料を半径5-mmの分析用チューブに入れ、NMR装置(UNITY500型, Varian社製)を使用した。各溶質の同定と定量は既知の試料との比較から求めた。各溶質の含量は1g菌乾燥重量あたりのμmolで表した。

菌体の全NaイオンおよびKイオン含量の測定は、コンパクトイオンメーター(堀場製作所製)のC-122型およびC-131型をそれぞれ使用した。ストレス処理後の菌体を、処理液とほぼ等張のソルビトール溶液で1回遠心洗浄し、純水に懸濁した。この菌懸濁液を、5分間沸騰水中に静置した後に、遠心により得られた上清液を全イオン量測定のための試料とした。各イオン含量は1g菌乾燥重量あたりのμmolで表した。

なお、細胞に取り込まれているが結合していない細胞内遊離Naイオン含量は、²³Na NMR分析法を用いて求めた。²³Na NMR分析は上記の装置を用い、シフト試薬(0.025M dysprosium triphosphate)に懸濁した菌体から得られたスペクトルにより遊離Naイオン量を測定し、1g菌乾燥重量あたりのμmolで表した。

2.4 電子顕微鏡による観察

浸透ストレス処理後の菌体を、処理液と等張のNaClを含む2.5% glutaraldehyde溶液で1時間室温で固定し、処理液と等張のNaCl溶液で2回洗浄後、2% OsO₄溶液で1時間室温で後固定した。固定した菌体を、一連の濃度を変えたエタノール溶液で脱水し、Quetol

651で包埋した。包埋試料を Reichert Ultracut E 超マイクロトームで、超薄切片を作成し、uranyl acetate と lead citrate で2重染色し、電子顕微鏡 (JEM-1210, 日本電子製) で観察した。

3. 研究結果と考察

3. 1 浸透ストレスにより誘導される大腸菌細胞の耐塩性発現

大腸菌は基本培地では活発な増殖をするが、基本培地に添加する NaCl 量の増加と共に増殖は抑制された。基本培地に 1.2M 以上の NaCl を添加した場合には、培養 12 時間のあいだにはほとんど増殖は認められなかった。この抑制パターンに注目すると、培地に添加した NaCl 量の増加と共に増殖開始までの誘導期が顕著に増加し、この誘導期のあいだに高塩分培地での増殖のための耐塩性が誘導されると考えられる。

このような耐塩性を顕著に誘導する実験系として、我々は「研究方法」で述べた方法を開発した。すなわち、大腸菌を 0.5M NaCl を添加した 1% 酵母エキス溶液に懸濁し、一定時間振盪処理した後、1.2M NaCl を含む基本培地 (高塩分培地) に少量植菌し、培養 12 時間の菌増殖を観察した。図 1 に示すように、菌懸濁液を 30 分間振盪処理した場合、高塩分培地で顕著な増殖がみられた。菌懸濁液に添加する NaCl 濃度は、図 2 に示すように、0.5M 付近の濃度が最も効果的であった。また、NaCl のかわりに非電解質の Sorbitol でも効果はあり、NaCl の浸透圧とほぼ等しい 0.8M 付近の Sorbitol 濃度が最も効果的であった。

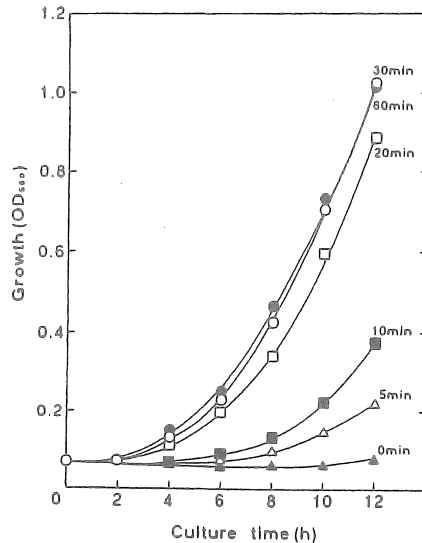


Fig. 1. Effect of exposure time to osmotic stress on the growth of *E. coli* in hyper-salinity medium.

After the cells suspended with 1% yeast extract containing 0.5M NaCl were incubated for the time indicated, a small portion of each suspension were inoculated into the hyper-salinity medium containing 1.2M NaCl, and the cell growth during each culture was followed photometrically at 660nm.

同様の結果は、枯草菌でも観察された。これらの結果は、酵母エキスと共に穏和な浸透ストレスで菌体を処理すると、顕著な耐塩性発現が誘導されることを示している。

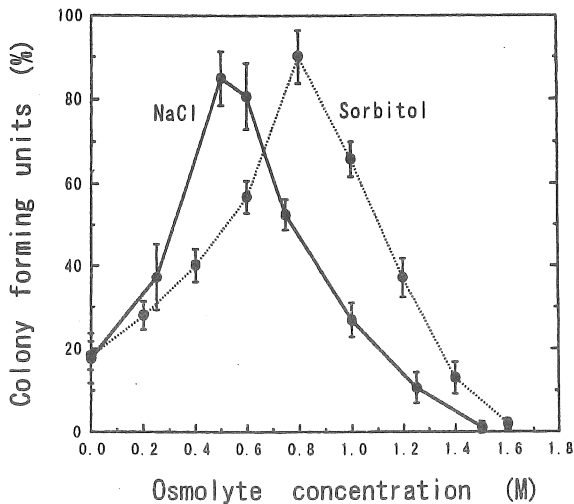


Fig. 2. Effect of osmolyte concentration used for osmotic stress on the induction of salt-tolerance expression in *E. coli*.

Cells were stressed with 1% yeast extract containing various concentration of NaCl or sorbitol for 30 min. After the stress treatment, the appropriate dilutions were spread on the agar plate of hyper-salinity medium containing 1.2M NaCl, incubated for 2 days, and the number of colonies per plate was determined. Colony forming units are expressed as a percentage of the number of colonies formed on the agar medium without NaCl.

3. 2 浸透ストレス処理により大腸菌細胞内に蓄積する補償溶質及びKイオン

耐塩性発現を誘導する30分間のNaClによる浸透ストレス処理により菌体内にどのような物質の蓄積があるかを、「研究方法」で述べたように、¹H NMR およびイオンメーターを用いて検討した。NaClによる穏和な浸透ストレスによる主要な細胞内蓄積物質として、図3に示すように、グリシンベタイン、グルタミン酸、トレハロースおよびKイオンを検出した。これらの物質は浸透圧耐性に関わる補償物質として知られており、また、耐塩性発現の誘導に効果的な浸透ストレスにより著しく蓄積が促進されることから、これら補償物質は耐塩性発現の誘導に深く関連していることが示唆された。

一方、NaClによる浸透ストレス処理によって菌体内にNaイオンがどのように取り込まれるかについても検討した。図4に示すように、浸透ストレスに用いたNaClの濃度が増加するに従って細胞内全Naイオン量は増加したが、²³Na NMRで測定した細胞内の遊離Naイオン量の増加は極めてわずかしか認められなかった。これらの結果から、耐塩性発現を誘導する塩ストレスにおいては細胞内で遊離Naイオン量が極めて低いレベルに維持されることが重要であることが示唆された。結果には表していないが、高塩分培地で増殖した菌体中の遊離Naイオン量も低いレベルに維持されていた。地球環境での生存戦略の一つとして、高濃度の塩分(NaCl等)に遭遇した場合、菌体は耐塩性を誘導すると共に細胞

内の遊離 Na イオンを出来るだけ減少させ、その有害性を除去する機構が存在することは興味深い。

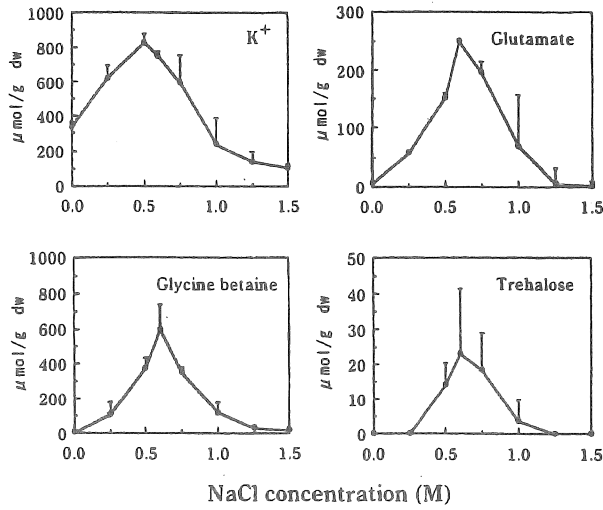


Fig. 3. Effect of NaCl concentration used for osmotic stress on the accumulation of K⁺, glutamate, glycine betaine, and trehalose in *E. coli* cells.

Cells were stressed with 1% yeast extract containing various concentration of NaCl for 30 min. The stressed cells were used for the determination of the solute contents as described in the text.

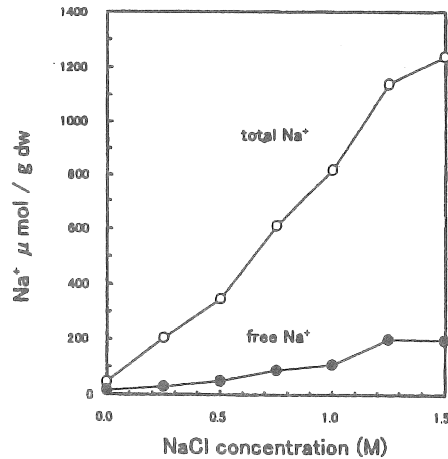


Fig. 4. Effect of NaCl concentration used for osmotic stress on the accumulation of total Na⁺ and intracellular free Na⁺ in *E. coli* cells.

Cells were stressed with 1% yeast extract containing various concentration of NaCl for 30 min. The stressed cells were used for the determination of total Na⁺ and intracellular free Na⁺ content as described in the text.

3. 3 耐塩性発現を誘導するグルタミン酸などの補償溶質の検討

すでに述べたように、耐塩性発現を誘導する浸透ストレス処理によりグリシンベタインなどの補償溶質が蓄積することが判明したことから、酵母エキスの代わりに浸透ストレス

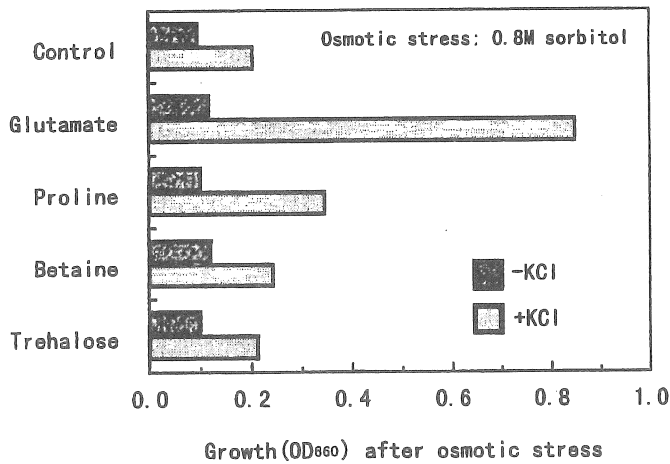


Fig. 5. Effect of compatible solutes and KCl during osmotic stress treatment on the induction of salt-tolerance expression in *E. coli*.

After the cells suspended with 10mM compatible solute indicated in the figure and 30mM KCl containing 0.8M sorbitol were incubated for 30 min, a small portion of each suspension was inoculated into the hyper-salinity medium with 1.2M NaCl, and the cell growth was followed photometrically at 660nm for 12 hr.

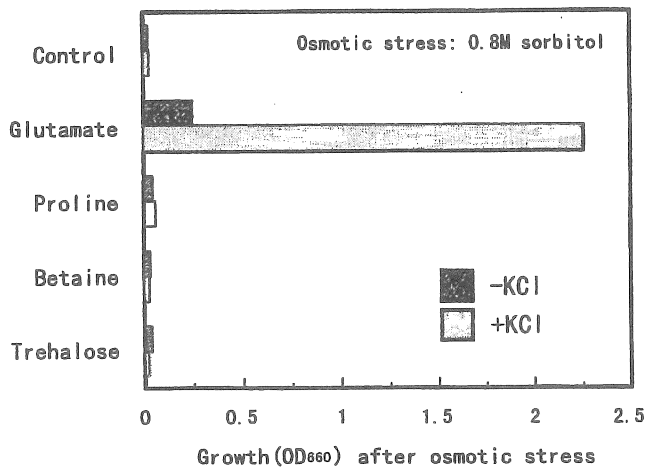


Fig. 6. Effect of compatible solutes and KCl during osmotic stress on the induction of salt-tolerance expression in *B. subtilis*.

After the cells suspended with 10mM compatible solute indicated in the figure and 30mM KCl containing 0.8M sorbitol were incubated for 30 min, a small portion of each suspension was inoculated into the hyper-salinity medium with 1.2M NaCl, and the cell growth was followed photometrically at 660nm for 12 hr.

処理にこれら補償物質の効果を検討した。図5に示すように、大腸菌では KCl とともに補償物質として用いたグルタミン酸、プロリン、グリシンベタイン、トレハロースの中で、グルタミン酸のみに顕著な耐塩性発現の誘導効果がみられた。しかしながら、KCl を添加せずに浸透ストレス処理を行うと誘導効果は全く認められなかった。上述したように、酵母エキスを用いた浸透ストレス処理では、処理後の菌体に K イオン及びグルタミン酸以外にグリシンベタインやトレハロースなどの蓄積がみられたが、これら後者の両物質は耐塩性発現の誘導に直接的関係はないものと推察される。K イオンとグルタミン酸の誘導効果は、図6に示すように、枯草菌においても同様に観察された。以上の結果から、大腸菌や枯草菌などの非好塩性細菌において、耐塩性発現の誘導には K イオンとグルタミン酸が重要に役割を演じていることが示唆された。

3. 4 浸透ストレス処理細胞の電子顕微鏡観察

耐塩性発現を誘導する浸透ストレス処理により、枯草菌細胞の形態がどのように変化するかを電子顕微鏡を用いて観察した。図7に示すように、処理した細胞では核領域が顕著に凝集した。同様の結果は、図には示していないが、大腸菌でも観察されたことから、このような細胞の形態変化は耐塩性発現の誘導となんらかの関係を有していると思われる。

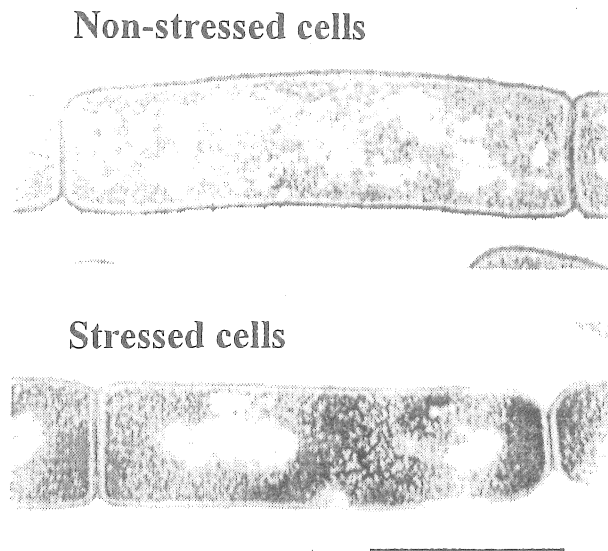


Fig. 7. Electron micrographs of *B. subtilis* cells showing non-stressed cells and osmotic stressed cells.

Cells were incubated with 5mM glutamate and 2.5mM KCl containing 0.5M NaCl for 60 min. Bar indicates 1 μ m

4. 今後の課題

我々は、短時間で耐塩性発現を誘導する極めてシンプルな実験系を開発した。本研究はこの実験系を用いて耐塩性発現の誘導に関わるグルタミン酸及び K⁺ イオンを特定する事ができた。しかしながら、用いた他の補償物質には誘導効果は認められなかったものの、種々の生体低分子物質の効果については未知であり、今後系統的な研究を遂行する必要がある。また、耐塩性発現の誘導には穏和な浸透ストレスが効果的であるが、このこととグルタミン酸などの誘導物質がどのような関係にあるかは不明であり、細胞内の形態変化と関連してさらに検討する必要がある。

5. 文献等

- 1) Ishida, A., Otsuka, N., Tajiri, M., Matsusaka, T., Adachi, K., Sano, H. and Nagata, S.: Role of glutamate and K⁺ on the induction of osmo-tolerance in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Proceedings of First International Congress on Extremophilies, Portugal, p252, 1996
- 2) Ishida, A., Otsuka, N., Adachi, K., Sano, H. and Nagata, S.: The effect of salinity stress on the accumulation of compatible solutes related to the induction of salt-tolerance in *Escherichia coli*. J. Gen. Appl. Microbiol., 42; 321-326, 1996
- 3) 石田昭夫、上野友美：海水環境における大腸菌の増殖と耐塩性誘導. *Microbes and Environments*, 11; 67-72, 1996
- 4) 石田昭夫、大塚尚美、永田進一、足立恭子、佐野浩：大腸菌の増殖と細胞内遊離 Na⁺ イオン量に及ぼす NaCl の影響. 熊本大学教養部紀要、32 巻；1-8 頁、1997

**Expression of salt-tolerance induced by osmotic stress in non-halophilic bacteria,
Escherichia coli and *Bacillus subtilis***

Akio Ishida and Tadao Matsusaka*

Dept. Biol., Fac. Gen. Ed., Kumamoto Univ.

*Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Kumamoto Univ.

Summary

Most bacteria are known to accumulate K^+ and/or organic solutes such as glycine betaine, glutamate, and trehalose in their cells when cells are grown in the medium with hyper-salinity. The accumulation of these compatible solutes in their cells is suggested to be very important for the salt-tolerance against hyper-salinity. However, little is known of the mechanism for the expression of salt-tolerance in non-halophilic bacteria. In the course of our study, we found that the salt-tolerance of *E. coli* and *B. subtilis* against hyper-salinity could be induced easily by prior exposure to moderate osmotic stress using NaCl or sorbitol containing 1% yeast extract for a short time (30-60 min). Therefore, we attempted to clarify the accumulation mode of compatible solutes in related to the salt-tolerance expression induced by the stress treatment. NMR and ion meter analysis revealed the accumulation of glycine betaine, glutamate, trehalose and K^+ in *E. coli* cells during the stress treatment, although the content of intracellular free Na^+ was not significantly changed by such stress treatment. The experiments using the defined stress medium suggested that not all of these solutes accumulated was required for inducing the expression of the salt-tolerance expression, and that among the solutes the combination of glutamate and K^+ was found to be very effective for the induction. Similar results were obtained from the experiments in *B. subtilis*. Ultrastructural observation revealed pronounced condensation of the nuclear area after treatment with osmotic stress. From these results, we discussed the role of compatible solutes on the induction of salt-tolerance expression in non-halophilic bacteria, *E. coli* and *B. subtilis*.