

# 疎水性有機溶媒に対する大腸菌の耐性機構

道久 則之

トルエンによる滅菌やエタノール消毒に利用されていることなどから分かるように、多くの有機溶媒は生物に対して毒性を示す。多量の有機溶媒が存在する環境は、生物の生育に適さない極限環境の一つである。1960年ごろから、当時人類にとって供給不足が予想されたタンパク質資源の確保という目的で、石油系炭化水素を原料として、酵母や細菌のタンパク質を製造し、食糧として利用する試みがなされ、有機溶媒を唯一炭素源として生育する微生物が数多く分離された。これらの微生物を培養する際には、炭素源として供給する有機溶媒による生育阻害を回避するために低濃度の有機溶媒が培養系に供給されていた。これらの研究を通じて、トルエンやキシレンなどの有機溶媒は微生物にとって猛毒であると考えられてきた。ところが、1989年に井上と掘越により、培地と等量のトルエンが存在する環境でも良好な生育を示す *Pseudomonas putida* IH-2000株が報告された<sup>1)</sup>。この発見以降、トルエン耐性菌などの微生物が多数分離され、従来考えられなかった毒性の強い有機溶媒存在下で生育可能な有機溶媒耐性菌の存在が明らかとなった。

大腸菌は *Pseudomonas* 属細菌に準じて有機溶媒耐性度が高く、また、遺伝学や生化学の知見が豊富であるため、細菌の有機溶媒耐性機構を調べるためのモデルとして用いられている。これまでに、有機溶媒耐性化した大腸菌変異株などを用いて有機溶媒耐性機構が解析されている<sup>2)</sup>。

また、有機溶媒耐性菌を用いた有機溶媒存在下における有用物質生産が期待されており、ステロイド合成や光学活性なエポキシド生産などのさまざまな応用研究がなされている。また、石油分解や石油中の有機硫黄の分解、環境汚染物質の除去などバイオレメディエーションへの応用も期待されている。

## 微生物に対する有機溶媒の毒性

抗生物質などの薬剤の微生物に対する増殖抑制効果は、致死濃度や最小生育阻止濃度などによって測定される。疎水性有機溶媒はほとんど水に溶解しないため、最小生育阻止濃度のような概念は適用できない。種々の疎水性有機溶媒を重層した寒天培地上で、さまざまな微生物のコロニー生育能が調べられ、有機溶媒による微生物のコロニー形成能は、有機溶媒の  $\log P_{ow}$  と負に相関することが示されている。 $\log P_{ow}$  とは、水と *n*-オクタノールとの2相間における任意の物質の分配係数  $P_{ow}$  の常用

対数であり、物質の極性を示すパラメーターの一つである。極性が高い有機溶媒、つまり疎水性が低い有機溶媒ほど  $\log P_{ow}$  は小さい値となる。 $\log P_{ow}$  の値が小さい有機溶媒、すなわち極性の大きい有機溶媒ほど微生物の生育を強く阻害する<sup>3)</sup>。一般的に、 $\log P_{ow}$  値が2から4の有機溶媒が微生物に対して毒性が強いとされている。微生物の疎水性有機溶媒に対する耐性は、微生物の種類によって大きく異なる。個々の微生物は、ある値以上の  $\log P_{ow}$  を示す有機溶媒存在下においてコロニー形成が可能である。この生育阻害- $\log P_{ow}$  の相関則は経験則であり、例外も存在する。たとえば、著者らが分離した *Acinetobacter* sp. ST-550株は、シクロオクタン ( $\log P_{ow}$  4.5) やジフェニルメタン ( $\log P_{ow}$  4.2) 存在下では生育可能であるが、これらの溶媒よりも  $\log P_{ow}$  の値が大きいノナン ( $\log P_{ow}$  5.5) やオクタン ( $\log P_{ow}$  4.9) 存在下では著しく生育が阻害された<sup>3)</sup>。このように、生育阻害- $\log P_{ow}$  の相関則は常に成立するとは限らない。

有機溶媒に曝露された大腸菌の透過型電子顕微鏡観察の結果から、広範囲にわたって内膜が外膜から遊離した構造が認められている<sup>4)</sup>。有機溶媒が内膜に多量に蓄積すると膜構造の破壊により、菌体内成分の漏出やプロトン濃度勾配の減少が起これ、細胞は生命活動を維持できなくなることが考えられる。

## 大腸菌の有機溶媒耐性

大腸菌の有機溶媒耐性度は、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$  などのアルカリ土類金属イオンを5~10 mM添加することによって向上する。 $Mg^{2+}$  を含むLBGMg培地（トリプトン1%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム1%、グルコース0.1%、硫酸マグネシウム10 mM）を用いて、K-12株由来の大腸菌JA300株の有機溶媒耐性が青野らによって調べられている<sup>2,5)</sup>（表1）。JA300株は、溶媒無添加の場合と比べて生育頻度は低下するものの、*n*-ヘキサン ( $\log P_{ow}$  3.9) を重層したLBGMg寒天培地上で生育可能である。またシクロオクタン、オクタン、ノナン、デカンなどの  $\log P_{ow}$  値が3.9以上の溶媒を重層した寒天培地上では、生育頻度の低下は認められない。一方、シクロヘキサン ( $\log P_{ow}$  3.4) を重層した寒天培地上では生育頻度は著しく低下し、約  $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$  の低頻度の生育を示す。さらに、*p*-キシレンやトルエン重層下では生育できない。また、JA300株と同様にK-12株由来の大腸菌であるW3110株やMG1665株は、JA300株よりも有機溶媒耐

## 特 集

表1. 大腸菌の有機溶媒耐性度

	重層した有機溶媒						
	Dec (6.0)	Non (5.5)	Oct (4.9)	Hep (4.4)	Hex (3.9)	Cyc (3.4)	Xyl (3.1)
JA300 $\Delta$ tolC	+	-	-	-	-	-	-
JA300 $\Delta$ acrAB	+	-	-	-	-	-	-
JA300	+	+	+	+	+	-	-
OST3408	+	+	+	+	+	+	-
OST3121	+	+	+	+	+	+	+

各有機溶媒を重層したLBGMg寒天培地上で生育した場合を+, 生育しなかった場合を-で示した。( )内の数値は $\log P_{ow}$ 値を示す。Dec, デカン; Non, ノナン; Oct, オクタン; Hep, ヘプタン; Hex, ヘキサン; Cyc, シクロヘキサン; Xyl, p-キシレン。

性度が高く, *n*-ヘキサン:シクロヘキサン (1:1, v/v) の混合溶媒存在下においても低頻度であるが生育を示す。

JA300株から有機溶媒耐性化した大腸菌変異株が取得されている。自然突然変異により, シクロヘキサン存在下でも高い頻度で生育できるOST3408株などの変異株が取得されている。また, 変異剤処理により, *p*-キシレン存在下でも生育可能なOST3121株も取得されている。これらの変異株を用いた解析により, 大腸菌の有機溶媒耐性は遺伝学的支配を受けていることが示されている。

## 大腸菌の有機溶媒耐性機構

これまでに大腸菌の有機溶媒耐性に関与するさまざまな遺伝子が同定されている。これらのうち, いくつかについて表2にまとめた<sup>9)</sup>。

**排出ポンプ** 上記のJA300株由来のシクロヘキサン耐性変異株の耐性付与遺伝子は, ミスセンス変異した*marR*遺伝子であった<sup>2)</sup>。*marR*変異によって*marRAB*発現が脱抑制され, *marA*にコードされるMarAタンパクが高発現される。MarAは*mar-sox*レギュロンと呼ばれる遺伝子群の転写を活性化する。この遺伝子群のなかでAcrAB-TolC薬剤排出ポンプをコードする*acrAB*, *tolC*が溶媒耐性化に関わることが知られている。AcrAB-TolCはRNDファミリーに属し, 内膜に存在するトランスポーターAcrB, 外膜に存在してチャンネルを形成するTolC, AcrBとTolCとを連結するペリプラズムタンパク質AcrAの3種類のタンパク質によって構成され, 膜貫通型の薬剤排出ポンプを形成する(図1)。*mar-sox*レギュロン発現はMarAだけでなくSoxS, Robによっても活性化される。したがって*marA*, *soxS*, *robA*遺伝子を高発現させることでも*acrAB*, *tolC*の発現が活性化され, 大腸菌はシクロヘキサン耐性を獲得する<sup>2)</sup>。AcrAB-TolC排出ポンプは両親媒性の抗生物質などを排出し, これらに対する耐性を付与するが, シクロヘキサン, *n*-ヘキサン, ヘプタンなどの疎水性有機溶媒を排出するこ

表2. 大腸菌の有機溶媒耐性に関与する遺伝子

遺伝子	機能	文献
<i>marA</i>	Multiple antibiotic resistance	7)
<i>rob</i>	Right oriC binding protein	7)
<i>soxS</i>	Superoxide resistance	7)
<i>acrAB</i>	Efflux pump (RND family)	5)
<i>tolC</i>	Outer membrane channel	5)
<i>acrEF</i>	Efflux pump (RND family)	8)
<i>yhiUV</i>	Putative efflux pump (RND family)	5)
<i>emrAB</i>	Efflux pump (MFS family)	5)
<i>pspA</i>	Phage shock protein A	9)
<i>ostA</i>	LPS transport	10)
<i>glpC</i>	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit	11)
<i>purR</i>	Purine nucleotide synthesis repressor	12)
<i>manXYZ</i>	Mannose PTS permease	13)
<i>crp</i>	Catabolite repression	14)
<i>cyoA</i>	cAMP biosynthetic process	14)

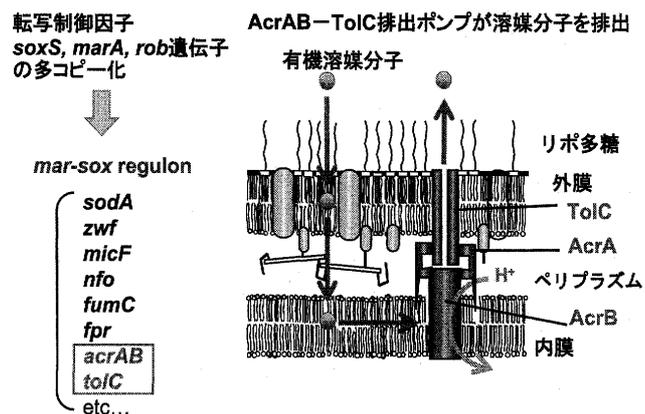


図1. AcrAB-TolCによる有機溶媒分子の排出

とによって有機溶媒耐性にも寄与する。また, *acrAB*あるいは*tolC*が欠損すると大腸菌の有機溶媒耐性は著しく低下し, *n*-ヘキサン ( $\log P_{ow}$  3.9), オクタン ( $\log P_{ow}$  4.9), ノナン ( $\log P_{ow}$  5.5) などに感受性となる<sup>5)</sup>(表1)。したがって, AcrAB-TolC排出ポンプは, 大腸菌の疎水性有機溶媒耐性に寄与する主要な機構であると考えられる。

また, *acrB*がIS30の挿入により欠損することにより, 溶媒に感受性となった変異株から, 有機溶媒耐性が向上した変異株が取得された<sup>8)</sup>。この菌株の発現するタンパク質が解析された結果, AcrEFの高発現化が認められた。これらの結果から, AcrAB-TolCポンプ以外に, AcrEF-TolCポンプによっても溶媒耐性化することが示された。AcrEとAcrFはそれぞれAcrAとAcrBに顕著な相同性を示す。*acrEF*オペロンのプロモーターは低活性のため, 通常AcrEFの発現量は著しく低い。また, AcrABと相同性を示すYhiUVをコードする遺伝子をJA300株由来

でありノナン ( $\log P_{ow}$  5.5) 感受性の *acrAB* 欠損株に導入し発現させたところ、ノナンに耐性を示した<sup>9)</sup>。しかし、本菌株はオクタン ( $\log P_{ow}$  4.9) には感受性であり、著しい耐性の向上は認められなかった。MFファミリーに属する *EmrAB*-*TolC* 排出ポンプもさまざまな薬剤を排出することが知られている。*emrAB* 遺伝子を *acrAB* 欠損株で高発現化させたところ、オクタン耐性となったが、ヘプタン ( $\log P_{ow}$  4.2) には感受性であった。

**ostA/imp** JA300株とヘキサシ感受性の OST4251株との接合解析およびPI形質導入実験によって、JA300株のヘキサシ耐性を支配する遺伝子の1つが染色体1.1分の座位に存在することが明らかとなっていた<sup>2)</sup>。本遺伝子はクローニングされて *ostA* と命名されたが、後に *imp* (increased membrane permeability) 遺伝子と同一であることが分かった。*ostA* を導入した OST4251株はヘキサシ耐性となった。OST4251株の *ostA* 領域の遺伝子配列が解析された結果、*ostA* 遺伝子上流に挿入配列 IS2 が挿入され、*ostA* 遺伝子の発現が抑制されていることが示された。OstA はリポ多糖の輸送に関わるタンパク質であり、生育に必須である。

**炭素代謝に関与する遺伝子** 本多らは、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析によって大腸菌の有機溶媒耐性に関与する遺伝子を調べた<sup>11-14)</sup>。この結果、炭素代謝に関与する複数の遺伝子が同定されている。Glycerol-3-phosphate dehydrogenase をコードする *glpC* や糖の輸送に関与する *manXYZ* などの遺伝子を高発現化した JA300株は、ヘキサシ存在下における生育頻度が100倍程度向上した。また、炭素代謝に関わる転写制御因子の有機溶媒耐性への関与が調べられた結果、*crp* や *cyaA* などのカタボライト制御に関わる転写制御因子の溶媒耐性への関与が明らかとなっている。

**その他** 有機溶媒耐性変異株では細胞表層の疎水性度が低下しており、この疎水性度の低下はリポ多糖の増加によることが報告されている。また、有機溶媒耐性変異株では *OmpF* ポーリタンパク質の減少が認められた。*OmpF* は疎水性のβ-ラクタム系抗生物質の透過に関与するため、*OmpF* が有機溶媒分子の透過にも関与することが考えられた。しかし、*ompF* 欠損株を用いた実験結果などから、*OmpF* は有機溶媒耐性に関与しないことが示されている<sup>15)</sup>。この他にも、有機溶媒であるテトラリンに対して耐性化した大腸菌変異株のテトラリン耐性化機構が調べられており、alkylhydroperoxide reductase オペロンをコードする *ahpCF* 遺伝子が関与することが報告されている<sup>16)</sup>。テトラリンが細胞内に侵入すると、アルキルペルオキシドとなり、これが細胞に対して強い毒性を示すが、*AhpCF* によってアルキルペルオキシドが還元されることにより、その毒性が低下するという機構が考えられている。取得された変異株では *ahpC* 遺伝子

に生じた変異により *AhpCF* の触媒効率が向上して、テトラリンに対する耐性を獲得したことが示唆されている。

### 有機溶媒耐性大腸菌の利用

化学製品の製造プロセスに生体触媒を導入すると、多数の反応工程を必要とする製造プロセスが簡略化されるため、省資源・省エネルギー化が図れる。しかし、水に難溶性の化学製品原料を用いる場合には、原料を有機溶媒に溶解して反応系に添加する方法が考えられるが、用いる有機溶媒の種類によっては微生物に対して強い毒性を示すという欠点がある。特に、補酵素の再生を必要とするような生菌体を用いた生体触媒反応を、有機溶媒存在下で実施すると、有機溶媒の毒性により菌株の生育が阻害され補酵素が再生されなくなることから、反応効率は著しく低下する。有機溶媒存在下で効率よく変換反応を行うためには、有機溶媒存在下でも生育可能な有機溶媒耐性の微生物が必要となる。有機溶媒存在下における効率的な有用物質生産法を確立するために、有機溶媒耐性微生物を目的とする難溶性基質の変換酵素遺伝子を発現させるための宿主として用いる方法が考えられる。筆者らは、*Acinetobacter* 属細菌由来のフェノールヒドラーゼ遺伝子を導入した有機溶媒耐性大腸菌変異株を用いて、有機溶媒存在下におけるインドールからインジゴの生産の効率化を行った<sup>17)</sup>。大腸菌の有機溶媒耐性機構がさらに解明されれば、このような応用にとって有用な知見となることが期待される。

### 文 献

- 1) Inoue, A. and Horikoshi, K.: *Nature*, **388**, 264 (1989).
- 2) Aono, R.: *Extremophiles*, **2**, 239 (1998).
- 3) Doukyu, N. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 543 (2002).
- 4) Aono, R. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2009 (1994).
- 5) Tsukagoshi, N. and Aono, R.: *J. Bacteriol.*, **182**, 4803 (2000).
- 6) Doukyu, N.: *Extremophiles Handbook*, **8.4.**, p.991 (2010).
- 7) Asako, H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1428 (1997).
- 8) Kobayashi, K. et al.: *J. Bacteriol.*, **183**, 2646 (2003).
- 9) Kobayashi, H. et al.: *Microbiology*, **144**, 353 (1998).
- 10) Ohtsu, I. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68**, 458 (2004).
- 11) Shimizu, K. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 72 (2005).
- 12) Shimizu, K. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1093 (2003).
- 13) Okochi, M. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 1394 (2007).
- 14) Okochi, M. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 389 (2008).
- 15) Asako, H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 294 (1999).
- 16) Ferrante, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7617 (1995).
- 17) Doukyu, N. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 720 (2003).