

## 氷楔単離細菌の休眠及び覚醒と休眠細胞の特徴

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 微生物新機能開発学 不野 健太郎

### 1. 背景と目的

自然環境中での細菌の多様性や機能解明の研究に比べて、それらの細菌がどのような生理状態で生存しているのかを明らかにした研究は少ない。永久凍土中の氷楔(ひょうせつ)は零下の温度で水分活性が低く、また栄養や酸素などの供給が非常に制限されているため、細菌の成長や分裂には不都合な環境である。一方、当研究室の先行研究で 25,000 年前の氷楔からそのほとんどが無孢子形成のバクテリア(約  $10^{3-5}$  CFU/ml)が平板培養で得られることが明らかとなった。そこで我々は、無孢子形成のバクテリアは非分裂性の休眠状態(生きてはいるが分裂などを行わずエネルギー消費を抑えた状態)になることで外部ストレスに耐え、氷楔という厳しい環境下で長期にわたって生存してきたのではないかと仮説を立てた。本研究では、① 氷楔環境(*in situ*)に休眠細胞が存在するのか、存在するのであれば他の環境サンプルと比べてその存在比率が多いのか ② 氷楔単離株 *Arthrobacter* sp. AHU 1770 と *Glaciibacter superstes* AHU 1791<sup>T</sup>を用いて休眠状態への誘導が人工的に可能か、そして一定条件下で再び増殖(覚醒)するのか ③ 休眠状態の細胞はさまざまな環境ストレスに対して耐性を有するのか を明らかにすることを目的とした。なお、本発表では時間の都合上 *Arthrobacter* sp. AHU 1770 株の結果に絞って説明する。

### 2. 方法・結果

① シベリア・アラスカの氷楔環境サンプルを対象に、4 種の平板培地で可培養微生物(%)を算出したところ、本氷楔環境は土壌・海水・活性汚泥など 10 種類の代表的な環境サンプルと比べて 1-3 オーダー低い可培養率を示し、本環境における休眠細胞の多さを反映しているのではないかと考えられた。② AHU 1770 株を対象に 3 つの休眠誘導条件を設定して 40~150 日間培養し、経時的に Live/Dead 染色法と平板上でのコロニー数を計測し休眠細胞の割合の変化を調査した。その結果、本菌株は酸素制限または高温条件で休眠状態へと誘導される、また低温条件(-5℃)では休眠状態に誘導されない、ことが示された。また AHU 1770 株の休眠細胞は、自身の培養上清タンパクで処理すること、同氷楔環境から単離された *Tomitella biformata* AHU 1821<sup>T</sup>由来の休眠覚醒タンパク質(resuscitation promoting factor [Rpf])を添加することにより、再び分裂可能な状態に戻る(覚醒する)ことが明らかになった。③ 対数増殖期の細胞を比較対象に休眠細胞のストレス耐性を調べた。酸素制限条件で休眠状態に入った AHU 1770 細胞(休眠細胞)が対数増殖期の細胞(非休眠細胞)に比べ、浸透圧ストレスである凍結融解と、DNA 損傷ストレスである UV 照射に対して高い耐性を示すことがわかった。さらに、TEM 観察より細胞形態・サイズの変化、細胞壁ペプチドグリカン層の肥厚など高いストレス耐性を裏付ける休眠細胞の生理的特徴がいくつか明らかになった。

### 3. まとめ

AHU 1770 株について、実験的に休眠細胞に誘導し、それに自身・他者由来の覚醒因子を添加することで再び分裂可能な状態に戻すことに成功した。また、その休眠細胞は分裂できる細胞と大きく性質が異なり、細胞表面が硬い構造体に変化するなど、高いストレス耐性を獲得している事が明らかになった。これらの結果は、無孢子形成タイプのバクテリアが非分裂性の休眠状態へ変化することで環境ストレスに適応し、氷楔環境で長期にわたって生存し得ることを強く示す物であった。