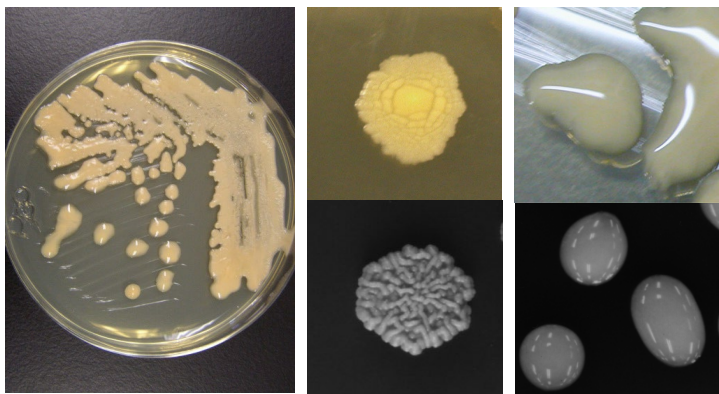


胞子を作らないのに**100℃**で 死なない**微生物**

疎水性環境に暴露されることで誘導される
*Rhodococcus*属細菌の熱耐性とその応用を目指して

日本大学・生物資源科学部・応用生物科学科
准教授 岩淵 範之
2022年12月20日

Rhodococcus 属細菌



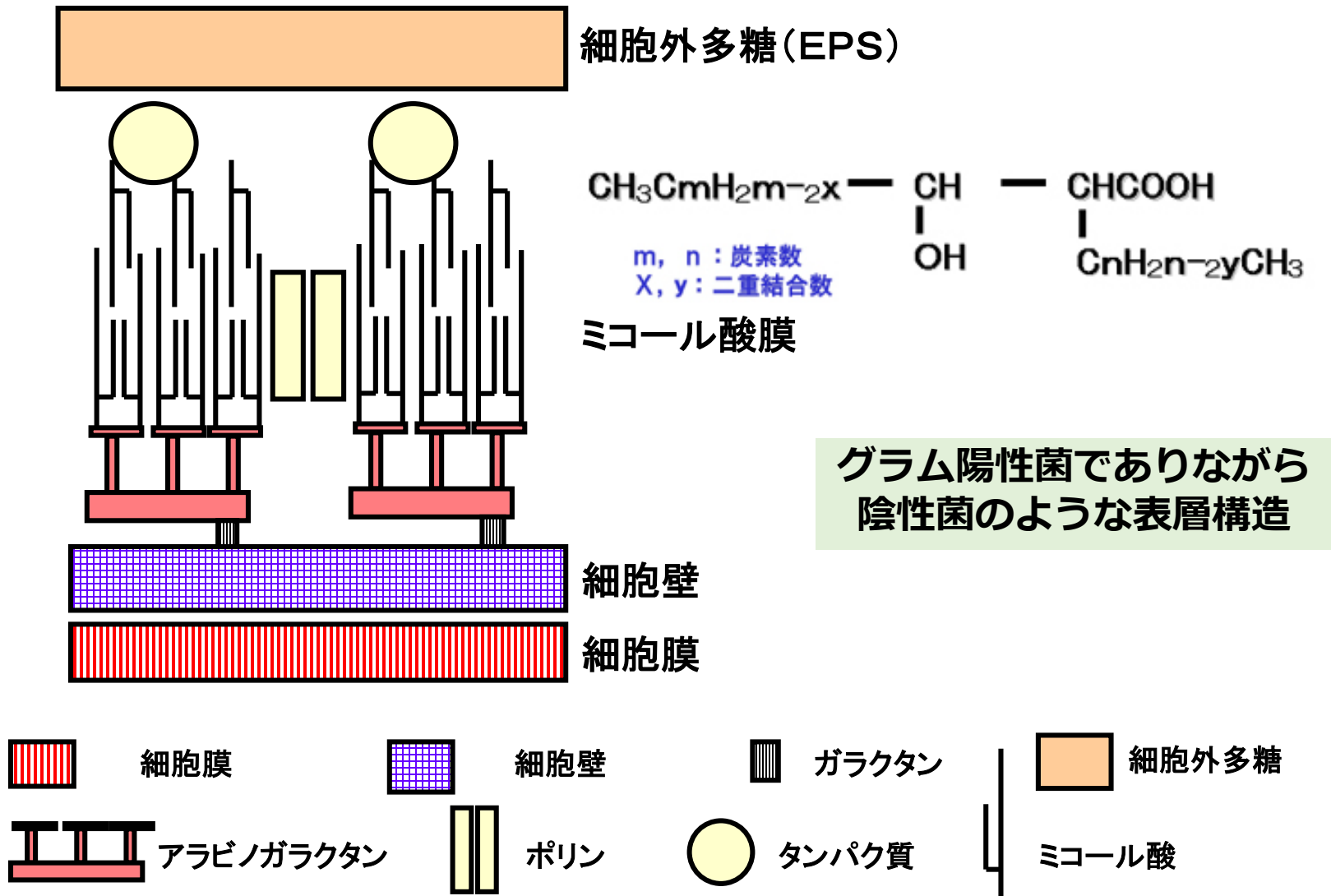
- 高G+C含量, グラム陽性細菌, コリネ型細菌
- 土壌, 海洋など
ごくありふれた環境に生息

産業的有用性

- 1) 難分解性物質の分解・資化
PCB
石油など
- 2) 有用物質の生産
アクリルアミド
EPSなど

微生物学的特徴

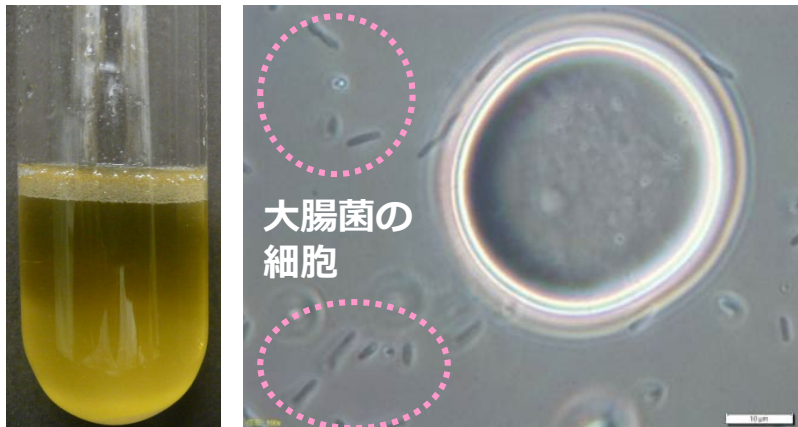
- 1) 高い細胞表面の疎水性
ミコール酸
- 2) コロニー形態変化
EPS



ミコール酸含有菌の細胞表層構造モデル

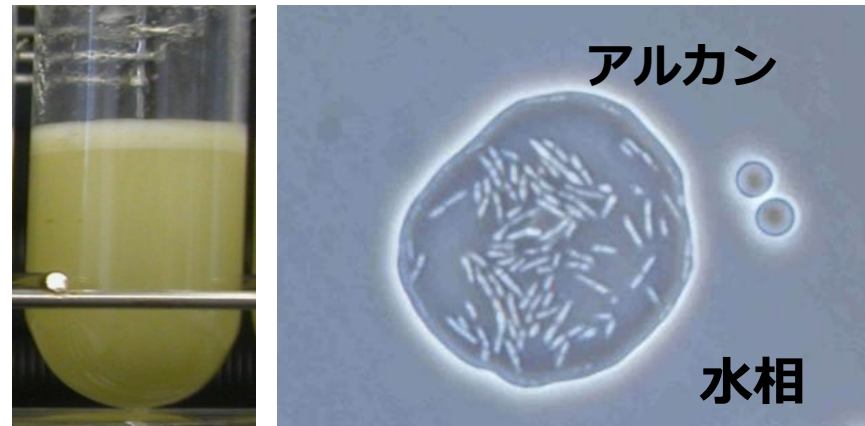
多くの*Rhodococcus*細菌は、
培地／アルカン二相培養系で、アルカン相に移行して増殖する。

大腸菌



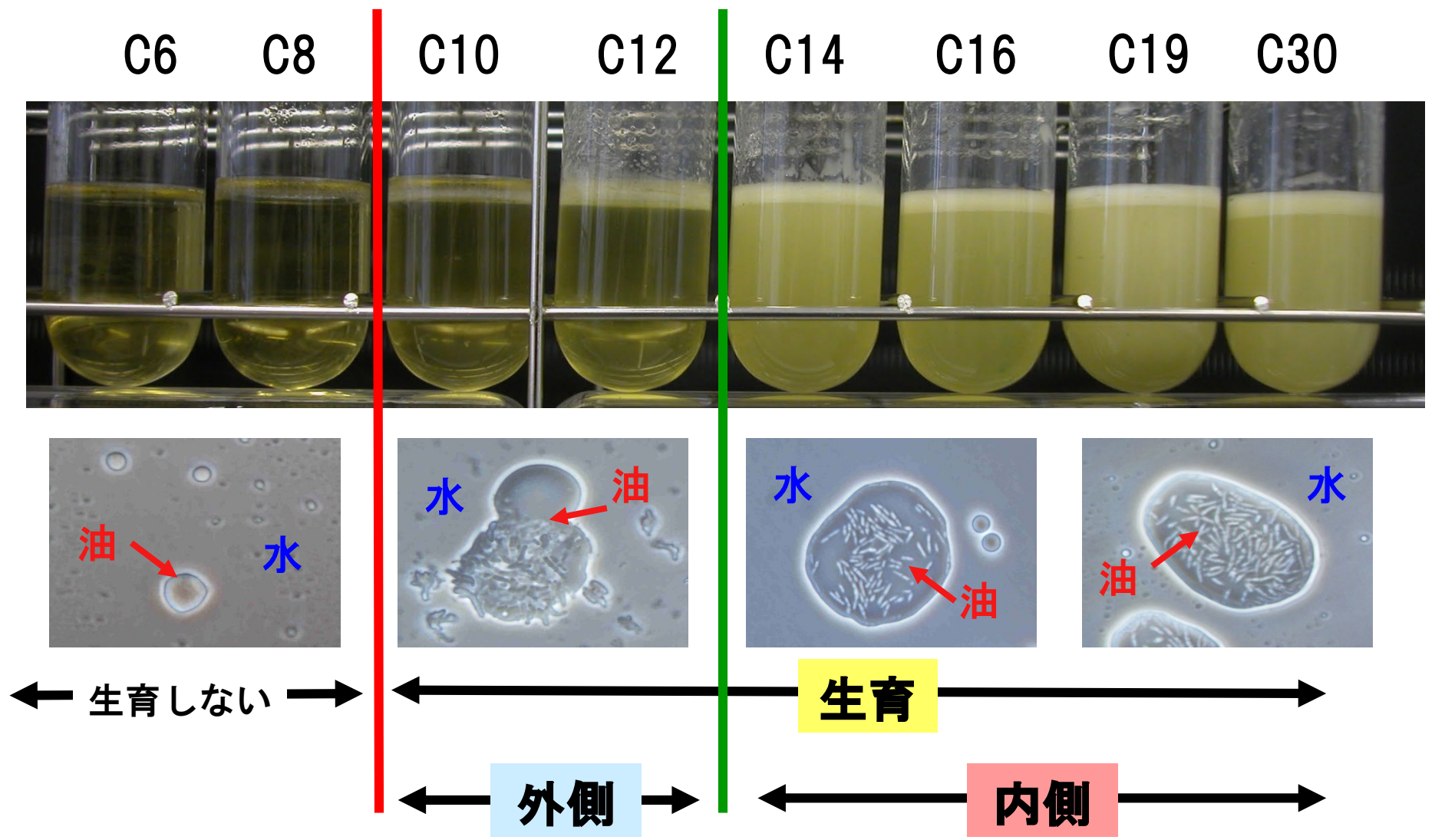
- 水相に菌体を摂取
- 水相で増殖する
- アルカンにより一部生育阻害

*Rhodococcus*細菌



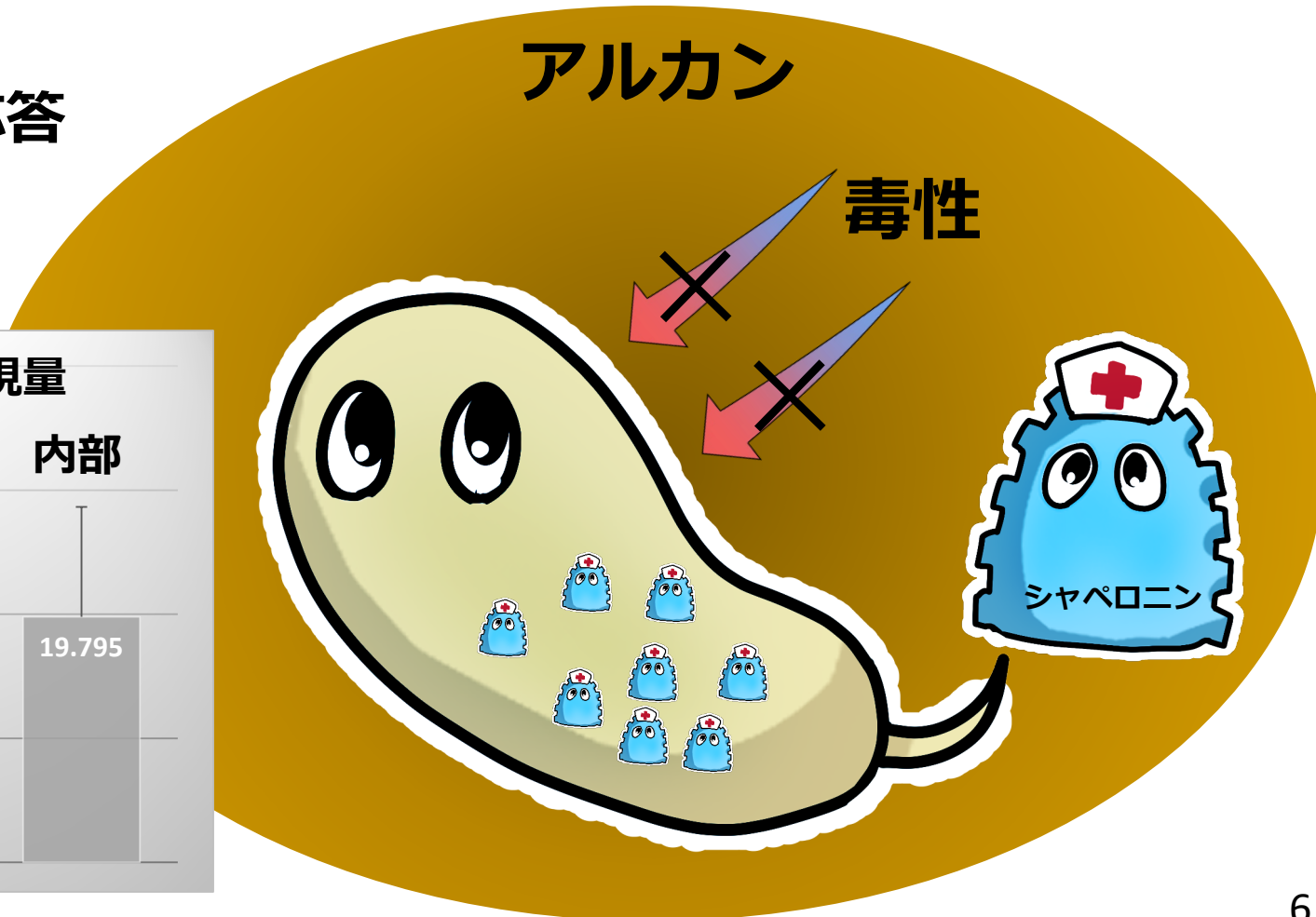
- 水相に菌体を摂取
- アルカン相へ移行→増殖する
- 疎水性環境下で生育できる極めて特徴的な細菌

炭素数により、細胞の存在位置を変える



アルカン中の*Rhodococcus*細菌の細胞は、
シャペロニンを高発現して、アルカン耐性を獲得している。

- 毒性緩和
- ストレス応答



孢子を作らないのに100℃で死なない微生物

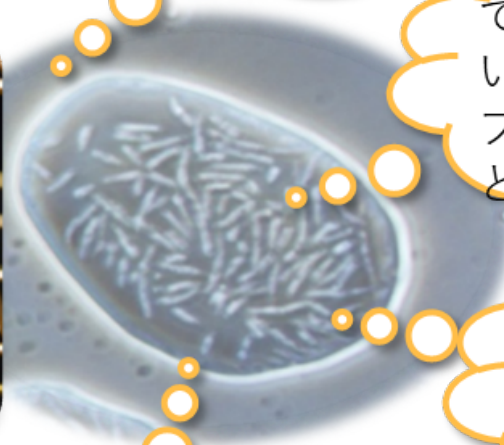
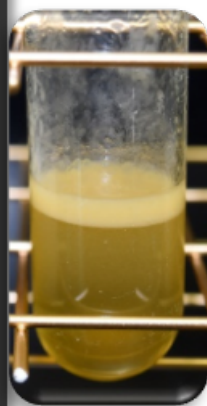
一般に高い耐熱性を有する微生物は超好熱菌と呼ばれており、*Methanopyrus*属などの古細菌や*Thermus*属などの真性細菌が知られています。また、*Bacillus*属などの孢子を有する場合も高い耐熱性を有することが知られています。

しかし、孢子も作らず、普段は25℃程度で生育する細菌が、突然100℃に耐えきれぬ耐熱性を獲得することはありません。もしあったら、それは微生物学界の常識を変える大発見です・・・ですが、それがあったんです。しかも、それは研究室での何気ない会話から生まれました。ここでは、この発見とその経緯をご覧ください。

研究の始まりはこんな感じでした



世の中SDGsなので、有機溶媒をなるべく使わないで試験管を洗おう



でもアルカンが入っているのでオートクレーブかけられないし、どうしよう？

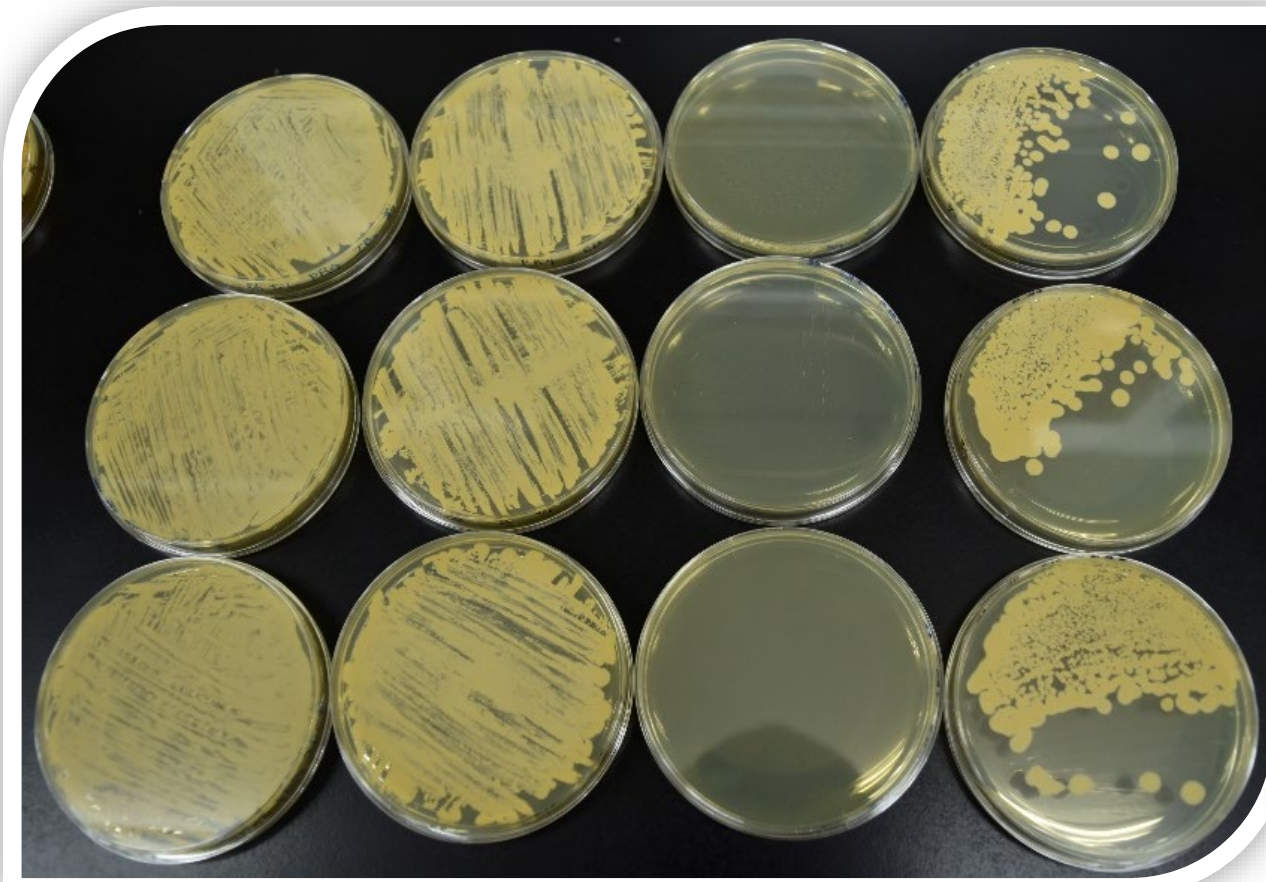


煮沸すればいいんじゃない？ほら、バチルスと違って孢子無いし。

そうだね。孢子作らないし、煮沸すればきっと殺菌されているよね。



実際に**100℃**で10分間**煮沸**してみると・・・



栄養培地 +アルカン

栄養培地 +アルカン

熱処理前

熱処理後



熱処理の
+アルカンが
生えている
これじゃあ試験管
洗えない・・・

一方で、見方を変えると、この現象は・・・



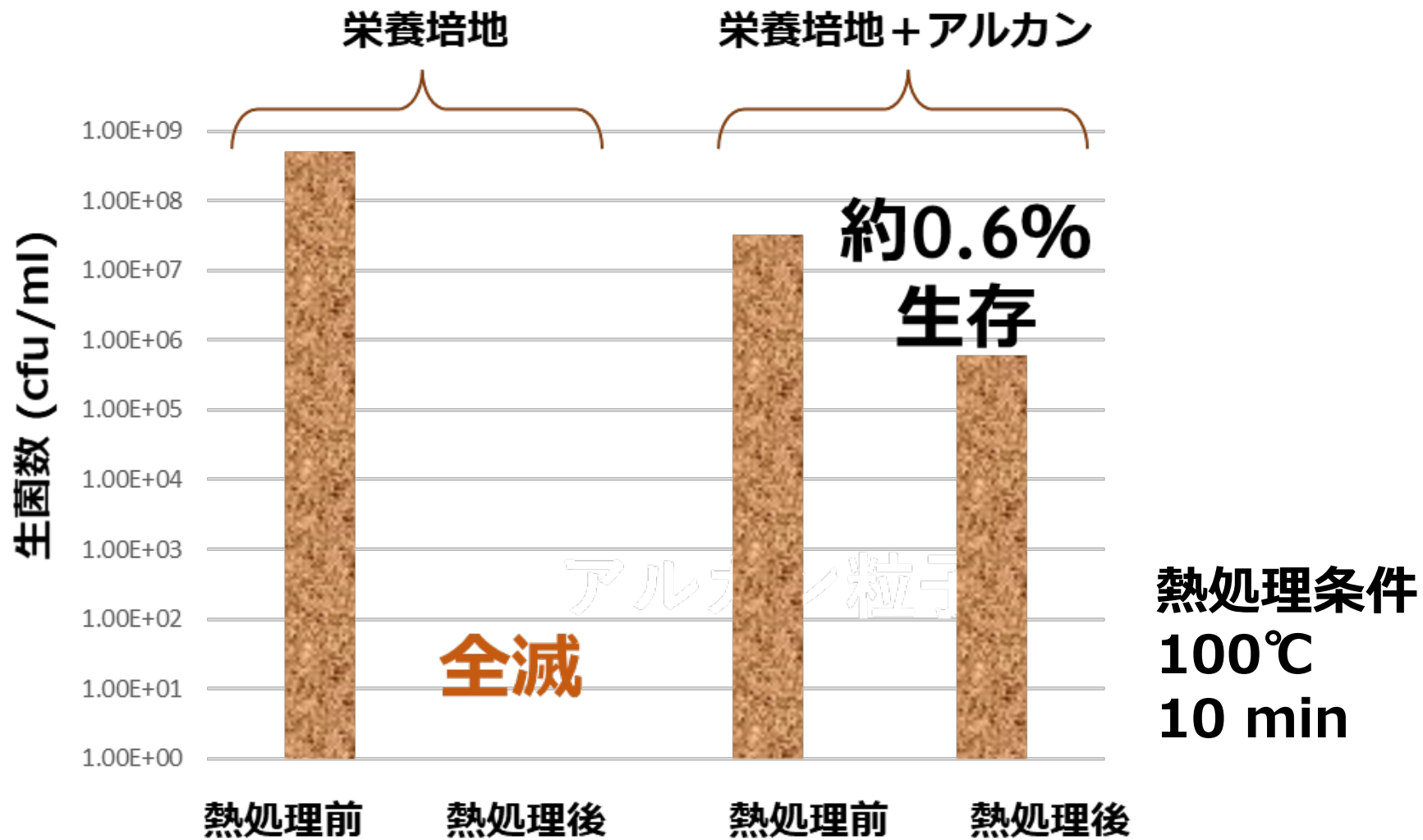
アルカン無添加

添加



アルカンの**中**に**細胞**が**入り込む**ことによって、通常では発現しない「**熱耐性**」の能力が**誘導**された、とも考えられる。

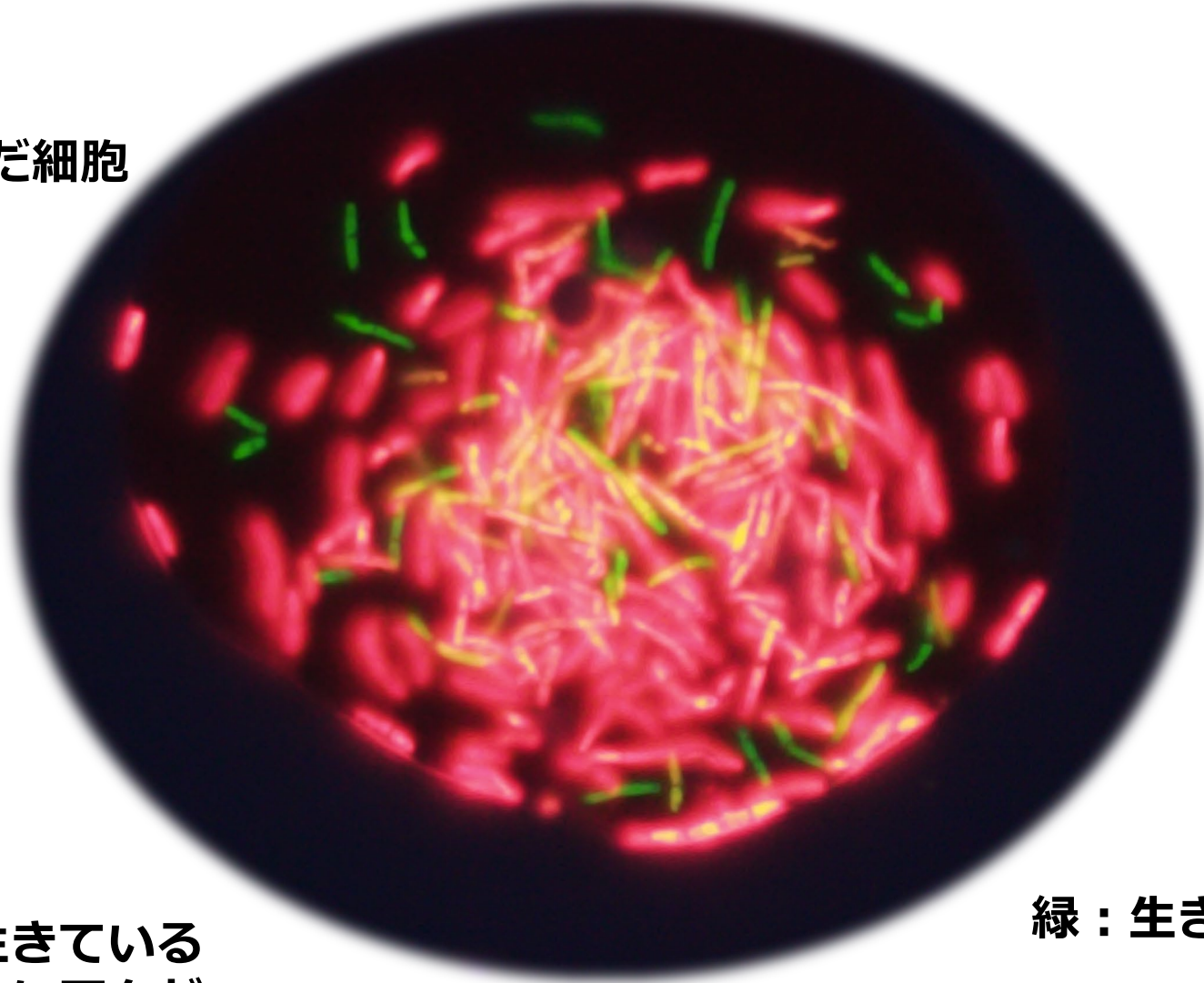
より定量的な実験で確認



アルカン内の細胞は、加熱しても死滅しない

実際にLIVE/DEAD染色をしてみると・・・

赤：死んだ細胞



黄色：生きている
細胞の上に死んだ
細胞がある状態

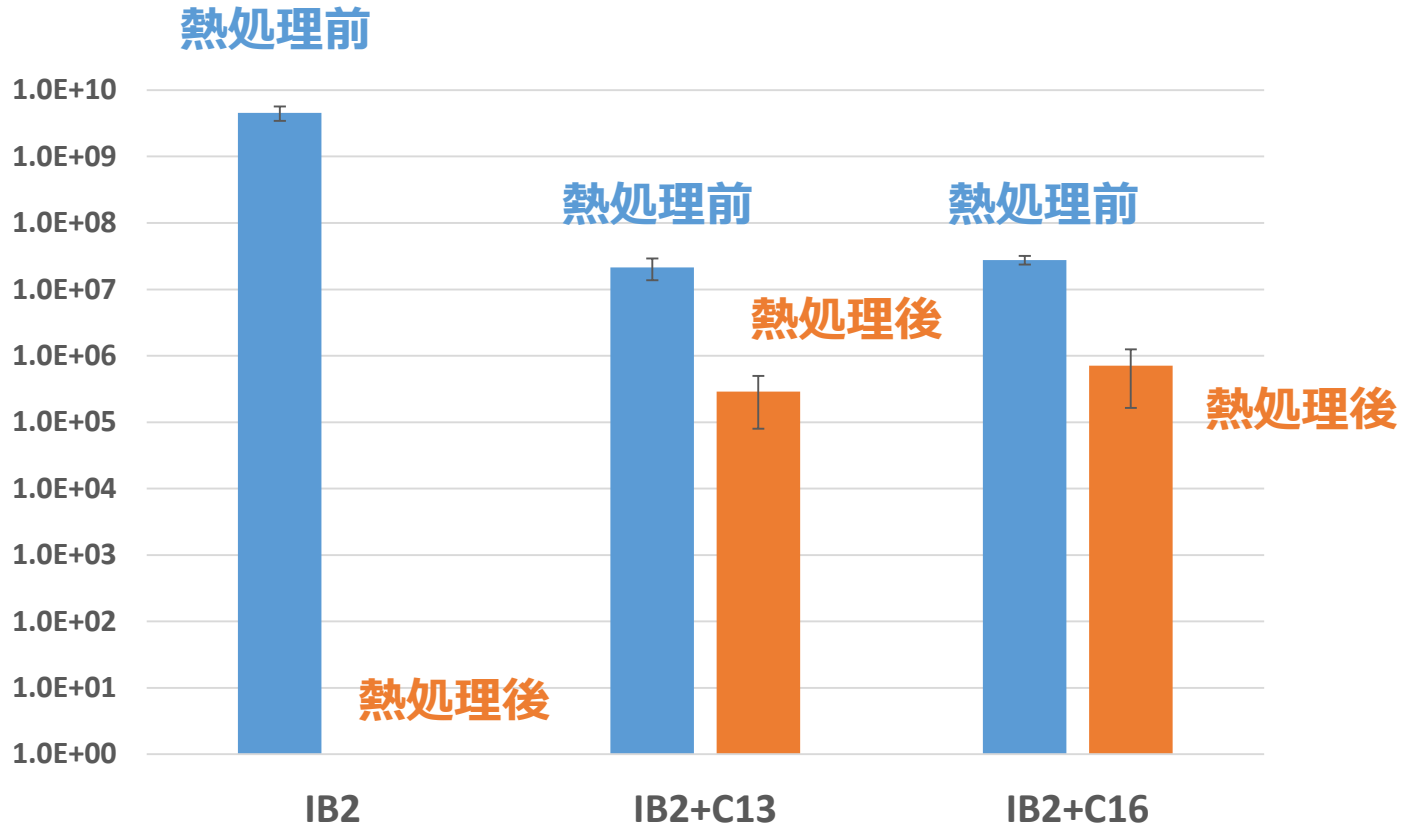
緑：生きている細胞

生きている細胞が観察された₁₂

ロドコッカス属細菌の培養方法及び高温耐性を有するロドコッカス属細菌の製造方法 (特願2021-132730)

- ***Rhodococcus* 属細菌の約70%が、水/疎水性液体の二相培養系において、細胞が水相から有機相に移行して、有機相で増殖する。**
- **有機相で増殖した*Rhodococcus* 属細菌の細胞は、100℃で10 min以上加熱しても死滅しない。**
- **水/疎水性液体の二相培養系は、耐熱性の向上した*Rhodococcus* 属細菌を製造するために有効である。**

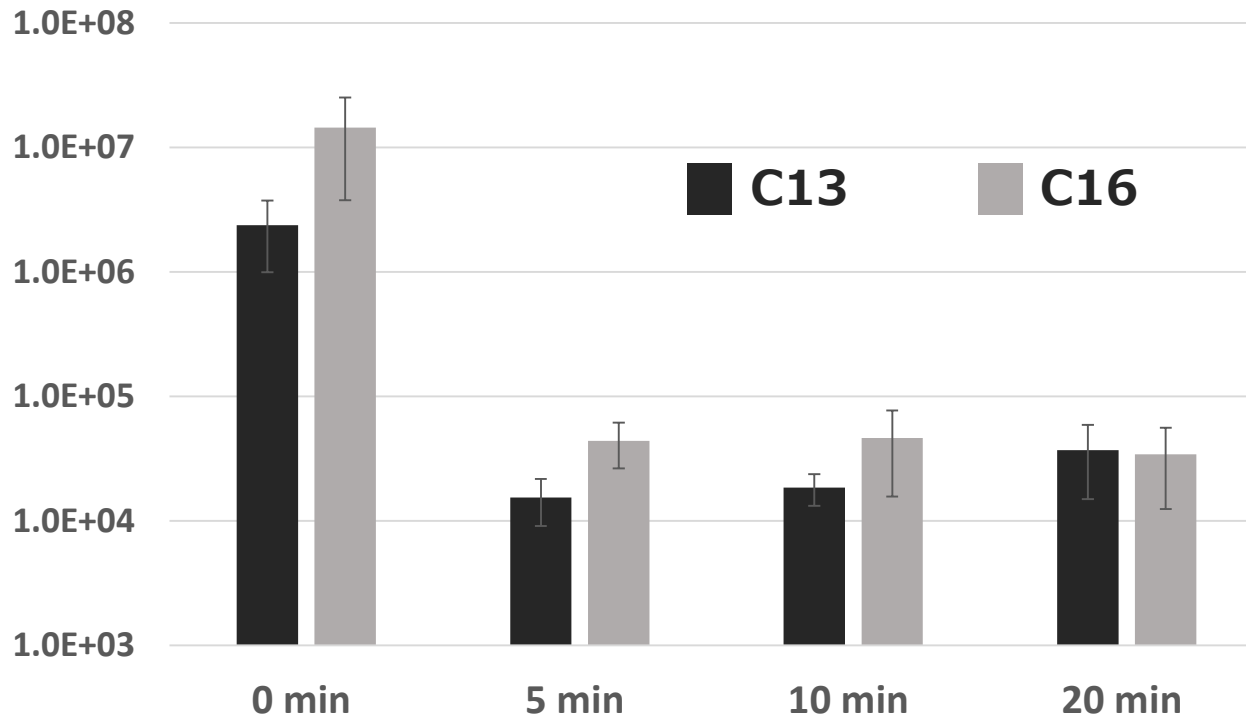
他のアルカンでの効果



IB2培地にC13、C16を含む二相培養系で培養された*R. erythropolis* NBRC100887株の細胞を用いた、熱処理の生菌数への影響

👉 他のアルカンでも同様の効果が見られた。

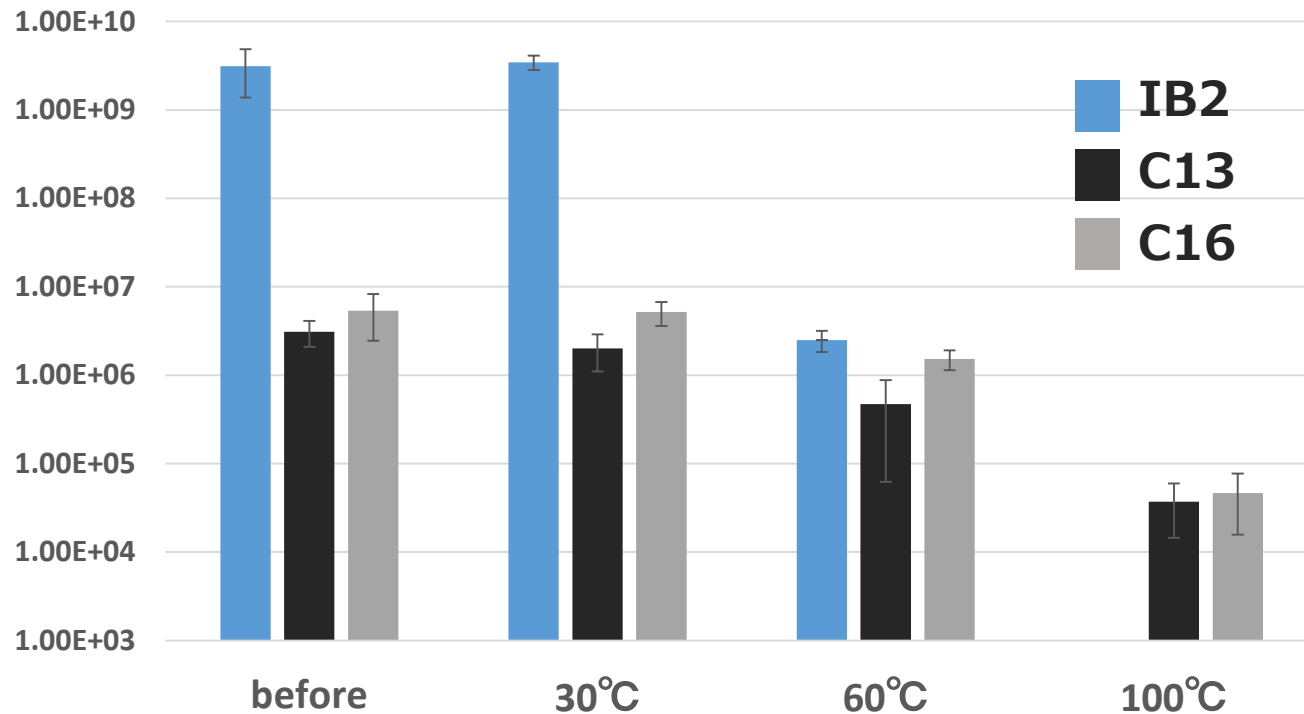
加熱時間の影響



IB2培地およびそれにC13、C16を含む二相培養系で培養された*R. erythropolis* NBRC100887株の生菌数に対する加熱時間の影響

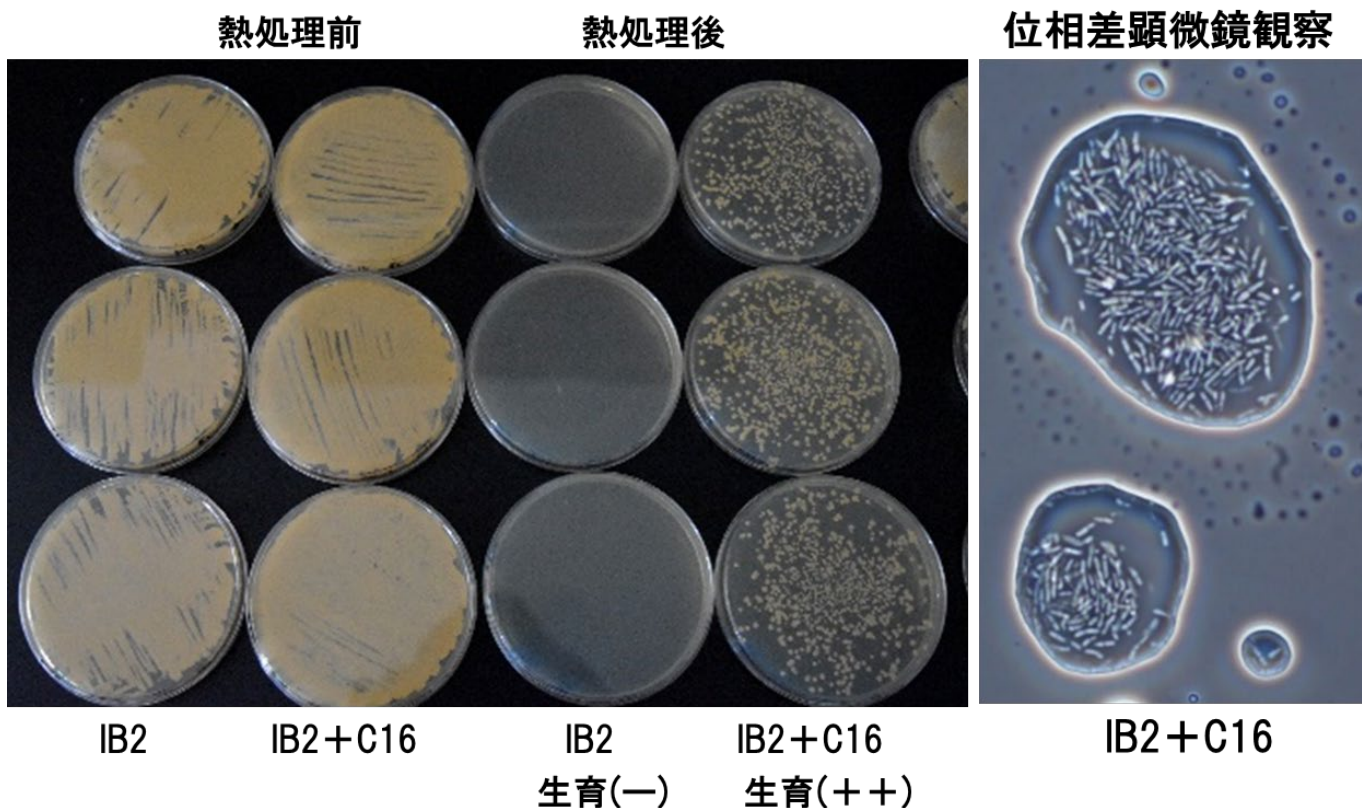
👉 影響はほぼなかった。

温度に対する影響



IB2培地およびそれにC13、C16を含む二相培養系で培養された*R. erythropolis* NBRC100887株の生菌数に対する加熱温度の影響
👉 60°C以上で大きな効果が見られた。

各種*Rhodococcus*属細菌の他の 疎水性溶媒に対する効果を見るための実験手順



IB2培地(+疎水性溶媒)で定常期まで培養。100℃で10加熱した後、プレートに植菌。位相差顕微鏡で細胞の位置を確認。生育は++、+、±、-の4段階で定性的に評価。

他の疎水性溶媒の効果

		C13	C16	サラダ油	コーン油	オリーブ油	米油	紅花油	綿実油
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ATCC47072	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NBRC100887 (PR4株)	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Rhodococcus globerulus</i>	ATCC15076	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Rhodococcus opacus</i>	ATCC170391	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	ATCC12674	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	S-1	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	R-2	++	++	++	++	++	++	++	++

供試した限り、菌株、アルカンや油の種類に**関係なく**、**油の中**（アルカン、食用油など）存在することで**熱耐性を獲得**した。

👉 多くの *Rhodococcus* 属細菌に共通した性質

競合技術との比較

	本発明	競合1 特願平6-10996	競合2 特願2004-74370
構成	疎水性液体を含む培地でロドコッカス属細菌を培養後、疎水性液体を含む培地で80℃以上の温度条件下でロドコッカス属を培養	40℃程度の環境下で石油を分解可能な新菌株ロドコッカス sp. I-7-2株	ロドコッカス エリスロポリス M-13株(受託番号FERM P-19716)
得られる特性	<u>ロドコッカス属に高温耐性が付与される。</u>	直射日光下での海岸等の高温環境下でも、石油の効率的な分解除去が可能になる。	直鎖状アルカン及び生分解されにくい分岐鎖状アルカンであるプリスタンとフィタンを分化する能力がある。
適用分野	石油汚染浄化 高温発酵 シャペロニンによるDDS 油分を含む污水处理	石油汚染浄化	石油汚染浄化

多くの競合技術は、石油分解に特化した*Rhodococcus*属細菌の性質を規定しているものであるが、本発明は対象の株に高温耐性を付与する技術であるため、基本的に異なり、また付加的要素として、**従来技術の高度化**も期待できる。

想定される用途

- **高温発酵への利用**：細胞を転移させ培養させる油の種類が広範囲であること、熱耐性を誘導可能な*Rhodococcus*属細菌の種類が広いことから、これまで 高温下では難しい／効率の悪い発酵生産や環境浄化の実現、効率化が可能になる。例えば、**高温における発酵生産**は、冷却設備費や冷却のためのランニングコストの削減、雑菌混入の抑制などのメリットがある。
- **微生物製剤への利用**：中小規模の食堂等のグリーストラップは、その運用の仕方で問題となっている場合が多い。*Rhodococcus*属細菌が食用として使われる油に対しても、転移して増殖した後、熱耐性が誘導されることから、これらの性質を利用すれば（温度をかけて運用することが可能なので）、**グリーストラップを対象とした有効な微生物製剤**が開発できる可能性が高い。

想定される用途 続き

- **耐熱性の高いシャペロニンの利用**：シャペロニン^①は、変性したタンパク質のリフォールディングに関与するタンパク質であるが、薬剤、遺伝子などを目的地（医療用の場合は疾患のある場所）まで包み込んで運ぶためのカプセルとしての利用が期待されている（**ドラッグデリバリーシステム、DDS**）。油と熱は、菌にとって同様のストレスである。これまでの*Rhodococcus*属細菌の対溶媒性、耐熱性はこのシャペロニンの高発現によるものであり、同菌の性質からPR4株の（あるいは*Rhodococcus*属細菌の）シャペロニンは、他の細菌のものよりも熱耐性が高いことが期待される。DDSでは、運ぶだけでなく、**放出の場所、時期等も制御する必要があり、その調節に温度は重要な因子となっている**。DDSでは様々なタイプの運搬装置が求められていることから、本シャペロニンは有効な素材であると考えられる。

企業の皆様への要望

ここまで話したように、本技術開発では、

- 高温下での発酵生産
- 高温であっても油分分解が可能な微生物製剤（バイオレメデーション、グリーストラップなどへの適用）
- 新たな特徴を持つシャペロニンタンパクの発見及びドラッグデリバリーシステムのキャリアとしての利用

などの可能性を模索しております。この方向性と一緒に研究して頂ける方々を求めています。

また社会実装に向け、本性質の用途探索(従来技術の高度化含む)と一緒にして頂ける方々を求めています。

お問い合わせ先

**日本大学産官学連携知財センター
(NUBIC)**

TEL : 03 – 5275 – 8139

FAX : 03 – 5275 – 8328

e-mail : nubic@nihon-u.ac.jp