

氏名	もりしげ ゆうた 森重 雄太
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博薬科第27号
学位授与の日付	平成27年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	The mechanisms underlying induction and resuscitation of viable but non-culturable <i>Salmonella</i> VBNC(生きているが培養出来ない)状態のサルモネラの誘導及び増殖可能な状態への復帰機構
論文審査委員	(主査) 教授 辻坊 裕 (副査) 教授 福永 理己郎 (副査) 教授 天野 富美夫

論文内容の要旨

環境中の細菌は、その大多数が VBNC (Viable But Non-Culturable) 状態にあると考えられている。また、培養条件下であっても、様々な方法でストレスを負荷すると、細菌の一部は VBNC 状態へ移行すると考えられる。VBNC 状態へ移行した細菌は一般的な培養条件下では増殖しないことから、培養によって存在を検出するという従来の微生物検査法では検出することが出来ず、衛生試験上の問題となる。また、これらの細菌の中には、そのまま死に至るものもあるが、条件を整えば分裂し、増殖可能な状態へ復帰するものが存在する。本論文で取り扱う *Salmonella* Enteritidis (SE) も、培養可能な状態から VBNC 状態への移行、及びそこからの分裂・増殖状態への復帰が知られている。しかし、これらいずれの細菌種においても、VBNC 状態への誘導及びそこからの復帰に関する機構は不明である。本研究では、生化学的手法を用いてこれらを明らかにすることを目的とする。

実験では、SE を M9 最少培地で培養する際に、グルコースの濃度を 0.8%(通常の 2

倍)にして長時間培養すると、一度増加した生菌数が大幅に低下することを見出した。また、その培養上清(0.8-Spent-M9)中には、SE の生菌数を急速に低下させる因子が存在することを明らかにした。さらに、これらの生菌数の低下が VBNC 状態への移行であることを、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いた解析によって示した。

また、HPLC による培養上清の分析により、0.8-Spent-M9 には、通常の M9 培養上清と同様に、グルコース代謝産物であるギ酸及び酢酸が検出された。これらのうち、ギ酸は培養開始 24 時間で最大濃度(9 mM)となり、72 時間で 4 mM へ減少したが、酢酸は培養開始 18 時間で 8 mM に達し、以後大幅な増減は見られなかった。ところが、通常の M9 培養上清には検出されないピルビン酸が、0.8-Spent-M9 中には 17 mM と大量に検出された。一方、培地の pH は、培養開始 18 時間で pH 4.7 まで大幅に低下した。次に、検出された有機酸のうち、ギ酸及びピルビン酸の細胞毒性を、SE の生残性を指標として調べた。その結果、ピルビン酸は影響を及ぼさず、ギ酸は 0.8-Spent-M9 が示す低 pH 条件下で 24 時間処理した場合のみ、培養上清中に検出された濃度において、SE の生残性を大幅に低下させた。

以上の結果から、通常の培養条件の 2 倍のグルコース添加により、これらが代謝されて生じる炭酸ガスや有機酸による pH の大幅な低下に伴い、産生されたギ酸の膜透過性が上昇することによって細胞内への移行が促進された結果、ギ酸細胞毒性が現れ、SE を VBNC 状態へ移行、さらには死に至らしめたことが示唆された。

次に、上記の細胞毒性の発現と同時に SE から大量のピルビン酸が放出されたことから、ピルビン酸はストレスを受けた細菌に対して何らかの保護作用を持つのではないかと考えた。そこで、過酸化水素 (H_2O_2) 処理によって SE を迅速に VBNC 状態へ移行させる実験系を確立し、こうして誘導された VBNC 状態の SE に対するピルビン酸の作用を検討した。その結果、ピルビン酸添加によって、VBNC 状態の SE の一部が分裂・増殖状態へ復帰することを示した。また、ピルビン酸の構造活性相関に基づく検討により、この回復効果はピルビン酸に 1 炭素を増した α -ケト酪酸によっても観察されることが明らかとなった。

さらに、ピルビン酸は、VBNC 状態の SE において生体高分子(DNA、タンパク)の生合成活性を回復させることを、蛍光色素及び放射性同位元素を用いた標識化合物に

よる代謝活性の解析によって示し、SE の VBNC 状態から増殖状態への復帰の過程におけるピルビン酸の作用機構を示唆した。

最後に、本研究を通じ、新たにマルチカラーフローサイトメトリーの応用による VBNC 状態の検出系を確立した。これは細菌が持つ種々の代謝活性を迅速かつ簡便に解析する、定量性に優れた高感度な手法である。実際に、 H_2O_2 処理によって VBNC 化した SE の代謝活性の変化を、呼吸活性、グルコース取り込み能、及び DNA 合成能を指標として解析することに成功した。また、これらの指標の変動には H_2O_2 に対する濃度依存性が見られたことから、環境から受けるストレスの強さ及び種類によって、VBNC 状態を異なるステージに分類出来るという可能性を示唆した。

以上より、本研究は、VBNC 状態の細菌の代謝に着目した解析を行い、未だその機構が明確でないサルモネラの VBNC 状態への移行ならびに VBNC 状態からの復帰の機構の一部を解明した。この成果は、細菌の生存戦略の解明につながる事が期待される。さらに、VBNC 細菌の利用と調節機構の応用は、病原細菌に対する感染制御や、土壌や海洋などの環境中における有用な微生物資源の維持・活用などの様々な面において、大きな貢献をすると考えられる。