

学 位 論 文 題 名

Studies on Copper Resistant Fungus : Resistances against
Copper and Heavy Metals, and Characterization of
Its Copper-binding Proteins

（銅耐性菌に関する研究：その銅及び重金属に
対する耐性及び本菌の銅結合蛋白質の性質）

学位論文内容の要旨

銅は、必須微量金属であり、生体において重要な役割を果たしている。その一方、生体への過剰の銅の取り込みは、有害であることも知られている。しかしながら、銅を過剰に摂取したときの生体の反応、防御機構及び金属代謝は未だ不明の点が多い。これら、銅や重金属を研究するには、実験上も多量のサンプルを得やすい微生物を用いるのが、有効であると考えられる。

本研究は、重金属の微生物への影響を調べることを目的とした。申請者は、まず、第一に、自然環境中から高濃度の銅存在下で生育した菌を単離し、この菌を分類学的に調べ、菌種を明らかにした。第二に、銅以外の他の重金属に対しても耐性を有するかどうか、数種の他の菌と比較し、この菌の銅及び重金属に対する耐性評価を行った。また、申請者は、この菌が銅に曝露された際、この菌体内に銅が蓄積することを明らかにしたが、さらに、菌体内のどのような成分と結合しているのかについて興味を持ち、菌体の破碎上清中の銅結合物質、特に低分子量の銅結合蛋白質の存在を明らかにし、その性質を調べた。

【方法】

高濃度の銅存在下で生育した菌の単離、同定、及び耐性評価：

銅（約6mM）を添加した培地中への空中落下菌をサンプリングし、単離した。この単離した菌をSK-1菌と仮称する。高濃度の銅存在下で生育した、SK-1菌の同定は、分類学的方法に基づき形態及び2種の培地上での生育の特徴を調べることにより行った。SK-1菌の銅に対する耐性評価は、種々の銅イオン濃度の液体培地と平板培地を用いて菌の生育を観察することにより行った。SK-1菌の種々の重金属（亜鉛、鉛及びカドミウム）に対する耐性評価については平板培地を用いて菌の生育を観察した。他の真菌類（*Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus nigricans*）についても重金属に対する生育限界の測定を平板培地を用いて菌の生育を観察した。

高濃度の銅存在下で生育した、SK-1菌の菌体内の銅結合物質の精製と性質：

SK-1菌を液体培地で6日間培養後、銅（最終濃度1mM-Cu）を添加し、17時間後に集菌した。菌体を破碎後遠心し上清を得た。その破碎上清をSephadex G-50カラムを用いたゲル濾過法より分画した。更に、銅を含む画分を陰イオン交換体DE-52にて精製した。ゲル濾過及び、イオン交換体クロマトグラフィーによる各画分の銅及び亜鉛量は、原子吸光光度法を用いて測定した。更に、精製標品の吸収スペクトル、アミノ酸分析、マス・スペクトル

の測定・解析を行った。

【結果】

- 1) 高濃度の銅存在下で生育した菌を単離、純粋培養することに成功し、SK-1菌とした。このSK-1菌の銅に対する生育能を調べたところ、本菌は、11mMの高濃度まで生育が可能であり、銅に対して強い耐性を持つことが判明した。
- 2) この単離したSK-1菌を分類学的検索を行った結果、真菌類の不完全菌類のひとつであるHyphomycetes類中の*Beauveria bassiana* (Balsamò) Vuillemin と同定した。SK-1菌を以後、*Beauveria bassiana* SK-1株と称する。
- 3) 真菌類である他の4種 (*Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus nigricans*) について銅に対する生育能を調べ、*Beauveria bassiana* SK-1株と比べた。これら4種は、いずれも3mMの銅濃度までの生育しかみられなかった。
- 4) *Beauveria bassiana* SK-1株の他の種々の重金属（亜鉛、鉛及びカドミウム）に対する生育能について調べたところ、亜鉛では70mM、鉛では50mMまで、カドミウムでは10mMまで、生育が可能であることが判明した。それに対し他の4種の真菌類の菌種において、亜鉛、鉛では、20mM以上、カドミウムでは、10mMでこれらの真菌類の生育は全くみられなかった。
- 5) *Beauveria bassiana* SK-1株を銅を含む培地で培養後、菌体内に多量の銅が取り込まれることを確認した。
- 6) 銅を含む培地で培養後の菌体の破碎上清をゲル濾過 Sephadex G-50 に供したところ低分子量領域に銅を含む画分がみられた。
- 7) さらに陰イオン交換体にて精製したところ、銅を含む画分が得られた。
- 8) 精製標品の吸収スペクトルの測定の結果、精製標品は、280nm付近に吸収の肩をもち、また、この肩は、酸性条件下で減少した。この現象は、銅がシステイン残基を介して結合していることを表している。
- 9) 精製標品のアミノ酸分析の結果から、この銅結合物質は、システインを多く含み、芳香族アミノ酸を含まない蛋白質であることが明らかとなった。この銅結合蛋白質の分子量は、アミノ酸分析から算出した値から、約2400と推測された。
- 10) 精製した銅結合蛋白質についてのマス・スペクトルの測定及びその解析の結果からは、その銅結合蛋白質の分子量は約2400であることが確かめられた。

【考察】

Beauveria bassiana SK-1株は、銅のみならず、他の種々の重金属（亜鉛、鉛及びカドミウム）に対しても、*Beauveria bassiana* と同じ綱のHyphomycetes類である分類学的に近い種の3種の真菌類 (*Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma viride*) および1種の分類学的にやや離れた種である真菌類 (*Rhizopus nigricans*) の菌種に比べ、強い耐性をもつことが明らかとなった。また、*Beauveria bassiana* SK-1株が銅に曝露された際に、菌体内に取り込まれた銅が、低分子量銅結合蛋白質として存在していることが明らかとなった。

更に、この銅結合蛋白質は、システインを多く含み、芳香族アミノ酸を含まず、分子量が約2400の蛋白質であり、真菌類 *Neurospora crassa* や *Agaricus bisporus* の銅結合蛋白質、すなわち銅メタロチオネインと同じタイプの低分子量銅結合蛋白質であることが明らかとなった。

【結論】

本論文の結論として次のような知見が得られた。

- 1) 自然環境中から単離した菌 *Beauveria bassiana* SK-1株は銅耐性を持つことが判明した。
- 2) この銅耐性を有する *Beauveria bassiana* SK-1株は他の数種の真菌類に比べ強い耐性をもつことが明らかになり、銅のみならず多重金属耐性を有していることが判明した。
- 3) 更に、*Beauveria bassiana* SK-1株が銅に曝露された際、銅が菌体内に蓄積し、低分子量

蛋白質と結合して存在していることが明らかとなった。

- 4) この蛋白質は、分子量約2400のシステインを多く含み、芳香族アミノ酸を含まないメタロチオネイン様蛋白質であることが明らかとなった。

本研究の独創的な点は、銅耐性を有する菌を自然環境中から単離したこと、この銅耐性菌である *Beauveria bassiana* SK-1株は、銅のみならず多重金属耐性を有していること、及び、菌体内の銅結合蛋白質は、メタロチオネイン様蛋白質であることを明らかにしたこと等が挙げられる。本研究は、重金属の生物への影響の研究に貢献するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 島 豊
副 査 教 授 齋 藤 和 雄 (医学部)
副 査 助 教 授 新 岡 正

学 位 論 文 題 名

Studies on Copper Resistant Fungus : Resistances against Copper and Heavy Metals, and Characterization of Its Copper-binding Proteins

(銅耐性菌に関する研究：その銅及び重金属に
対する耐性及び本菌の銅結合蛋白質の性質)

銅は、必須微量元素であり、生体において重要な役割を果たしている。その一方、生体への過剰の銅の取り込みは、有害であることも知られている。しかしながら、銅を過剰に摂取したときの生体の反応、防御機構及び金属代謝は未だ不明の点が多い。これら、銅や重金属を研究するには、実験上も多量のサンプルを得やすい微生物を用いるのが、有効であると考えられる。本研究は、重金属の微生物への影響を調べることを目的とした。申請者は、まず、第一に、自然環境中から高濃度の銅存在下で生育した菌を単離し、この菌を分類学的に調べ、菌種を明らかにした。第二に、銅以外の他の重金属に対しても耐性を有するかどうか、この菌の銅及び重金属に対する耐性評価を行った。第三に、この菌が銅に曝露された際、この菌体内に銅が蓄積することを明らかにしたが、さらに、菌体内のどのような成分と結合しているのかについて興味を持ち、菌体の破碎上清中の銅結合物質を精製し、その性質を調べた。

申請者は、銅（約 6mM）を添加した培地中への空中落下菌をサンプリングし、純粋培養することに成功し、この単離菌を形態及び 2 種の培地上での生育の特徴を調べ分類学的検索を行った結果、真菌類の不完全菌類のひとつである Hyphomycetes 類中の *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin と同定した。

単離菌 (*Beauveria bassiana* SK-1 株) の銅に対する耐性評価は、種々の銅イオン濃度の液体培地と平板培地を用いて、種々の重金属（亜鉛、鉛及びカドミウム）に対する耐性評価については平板培地を用いて菌の生育を観察した。比較菌として、次の 4 種の真菌類、*Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus nigricans* を用いた。

Beauveria bassiana SK-1株は、11mMの銅濃度まで生育が可能であったが、他の4種の真菌類の菌種は、いずれも3mMの銅濃度までしか生育しなかった。*Beauveria bassiana* SK-1株は、銅に対して強い耐性を持つことが判明した。本菌の他の種々の重金属（亜鉛、鉛及びカドミウム）に対する耐性評価の結果、亜鉛では70mM、鉛では50mMまで、カドミウムでは10mMまで、生育が可能であった。それに対し比較菌は、亜鉛、鉛では、20mM以上、カドミウムでは、10mM以上で、生育はみられなかった。

更に、菌体内の銅結合物質を精製した。単離菌を液体培地で6日間培養後、銅(最終濃度1mM-Cu)を添加し、17時間後に集菌した。菌体を破碎後遠心し破碎上清を得、Sephadex G-50カラムを用いたゲル濾過法、更に、銅を含む画分を陰イオン交換体 DE-52にて精製した。精製した銅結合物質の性質を調べるため、その吸収スペクトル、アミノ酸分析、マス・スペクトルの測定・解析を行った。

本菌を銅を含む培地で培養後、菌体内に多量の銅が取り込まれることを確認した。菌体の破碎上清中の精製した銅結合物質は、280nm付近に吸収の肩をもち、また、酸性条件下で減少した。この現象は、銅がシステイン残基を介して結合していることを表している。アミノ酸分析の結果から、この銅結合物質は、システインを多く含み、芳香族アミノ酸を含まない蛋白質であり、アミノ酸分析、及びマス・スペクトルの測定及びその解析の結果から分子量は、約2400であることが確かめられた。

結論として、1) 自然環境中から単離した本菌は、銅のみならず、他の種々の重金属（亜鉛、鉛及びカドミウム）に対しても、*Beauveria bassiana*と同じ綱のHyphomycetes類である分類学的に近い種の3種の真菌類 および1種の分類学的にやや離れた菌種に比べ、強い耐性をもつこと、2) 更に、本菌が銅に曝露された際、銅が菌体内に蓄積し、低分子量蛋白質等と結合して存在していること。3) この銅結合蛋白質が、システインを多く含み、芳香族アミノ酸を含まず、分子量が約2400の蛋白質であることから、真菌類 *Neurospora crassa* や *Agaricus bisporus* の銅結合蛋白質、すなわち銅メタロチオネインと同じタイプの低分子量銅結合蛋白質であるとの知見が得られた。

本論文において、単離した*Beauveria bassiana* SK-1株は、銅のみならず多重金属耐性を有していること、菌体内の銅結合蛋白質は、メタロチオネイン様蛋白質であることを明かにしたことに本研究の特色がある。本研究は、重金属の生物への影響の研究に貢献するものと思われる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また、研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（環境科学）の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。