海洋細菌の飢餓生残: 有機物の希薄な環境での生き残り*

芝 恒男[†]

Starvation Survival of Marine Bacteria

Tsuneo Shiba[‡]

Abstract

Many marine bacteria can survive long periods of low nutrient stress that exists in ocean. For example, marine psychrophilic *Vibrio* sp. ANT-300 has been reported to survive 2.5 years without nutrient supply. Starving cells utilize endogenous substrate for respiration, and then decrease in cell volume. However, bacteria which utilize cellular RNA cannot survive a long starvation. Bacterial species decreasing respiratory activity can survive a long starvation. Decrease of respiratory activity seems to be prerequisite for saving cellular materials and for long starvation survival. Cellular ATP of starving bacteria seems to remain at relatively higher level. Starving cells can quickly incorporate external materials without any lag periods. Starving cells appear to be not in dormant state. Many of starvation proteins which are not synthesized during growing stages are reported on *Escherichia coli* and marine bacteria. Synthesis of some of the starvation proteins is induced also by many other stresses like heat shock. The role of starvation proteins in long starvation survival has not been elucidated.

沿岸の汚れた所を除いて、海水中の有機物濃度は 0.5 mg C/l ほどであることが報告されている (Menzel and Ryther, 1970). 海洋細菌の培地に用いられる有機物濃度の 5,000 ~ 20,000 mg/l と比べると、海水中有機物濃度はケタ違いに低い。したがって培地上で細菌がみせる増殖生理と、自然海水中での挙動には、大きな違いがあるように思われる。実際ほとんどの細菌は、海藻や魚、さらにはデトリタスの様な、有機物の豊富な環境から放り出されたあとは、自然海水中では増殖出来ず、細胞物質を利用してひたすら生きながらえる (飢餓生残: starvation survival) だけであることが知られている。飢

餓生残中の細菌は、細胞物質を利用するために段々小さくなることが知られ、自然海洋中の細菌のほとんどは直径が 0.4 ~ 0.8 μ m であり (Maeda and Taga, 1983), なかには 0.4 μ m のフィルタ-孔を通過する 300 から 25,000 個もの生菌数が海水 1,000 ml から数えらると報告されている (Anderson and Hefferman, 1965; Oppenheimer, 1953). また Tabor *et al.* (1981) によれば、0.45 μ m のフィルタ-孔を通過する細菌は、全体の 0.1 ~ 77% であり、その割合は、深海 (すなわち有機物濃度の低い所) で高くなるとのことである。このような状態で、海洋細菌は数年もの間生残出来ると報告されている (Novitsky and Morita, 1978). そこで本論では、海洋細菌の有機物の無い環境での生残過程について述べてみたい。

* 1992 年 4 月 16 日受領 ; 1991 年 5 月 6 日受理

[†] 東京大学海洋研究所大槌臨海研究センター ; 〒 028-11 岩手県上閉伊郡大槌町赤浜 2-106-1

[‡] Otsuchi Marine Research Center, University of Tokyo, Aka-hama, Otsuchi, Iwate, 028-11, Japan

1. 海洋細菌は他の細菌よりも長く生残する?

Table 1. 50% starvation survival of different bacterial species

species	50% starvation survival (days)
<i>Sphaerotilus discophorus</i>	0.5
<i>Streptococcus mitis</i>	0.9
<i>Streptococcus lactis</i>	1.3
<i>Escherichia coli</i>	1.5
<i>Aerobacter aerogenes</i>	1.9
<i>Azotobacter agilis</i>	2.1
<i>Sarcina lutea</i>	2.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.5
<i>Micrococcus haldodenitrificans</i>	4.6
<i>Arthrobacter histidinovorans</i>	14.0
<i>Pseudomonas</i> M216 (soil strain)	42.9
<i>Arthrobacter oxydans</i>	45.0
<i>Arthrobacter simplex</i>	65.0
<i>Arthrobacter</i> sp.	70.0
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	100.0

Adapted from Ensign (1970), Nelson and Parkinson (1978), and Boylen and Mulks (1978)

表 1 に様々な細菌種の、無機水中での 50 % 生残時間をまとめた。海洋細菌以外の細菌種では、50 % 生残時間は発酵細菌の 1 日弱から *Arthrobacter crystallopoietes* の 100 日まで様々であるが、これらの値は、海水性低温細菌 *Vibrio* ANT-300 が 2 年半も生残する (Amy and Morita, 1983) ことから比べると、はるかに短い様に思われる。用いた実験条件の違いが、余り飢餓生残に影響しないとしたら、海洋細菌は、他の細菌よりもはるかに長く生残出来ると言えるのかも知れない。

生残時間が分離源によって異なるのは、自然界での飢餓の長短に関係しているとの見方もある。腸内ではせいぜい飢餓が半日程度なのに反し、一旦貧栄養な深海に潜り混んだ海水は、1000 日もの間、海面には浮き上がってこないと言う。 *Vibrio* ANT-300 の生残時間が極端に長いのは、このへんの事と関係あるかも知れない。

2. 飢餓生残中に海洋細菌は濾過減菌出来ないほど小さくなる

海洋細菌の飢餓生残過程での顕著な特徴は、細胞の縮小化である。海洋細菌を無機海水中に懸濁すると、まず分裂縮小化 (reductive division) がおき、つぎに細胞物質消費にともなう細胞の連続的縮小化 (continuous size reduction) がおきる。Humphrey *et al.* (1983) によれば、海水からの分離菌 17 株のうち 14 株までが飢餓生残中に縮小している。連続的縮小化では、原形質の縮小がおき、必然的にペリプラズマが拡大することが知られている (Novitsky and Morita, 1976; Kjelleberg and Hermansson, 1984)。ゆがんだ細胞外膜は、空胞として放出されることも知られている (Marden, *et al.* 1985)。259 日間の飢餓実験では、細胞容積が通常の細胞の 1/10、すなわち $0.046\mu\text{m}^3$ までになることが報告されている (Moyer and Morita, 1989a)。先に述べたフィルターを通過する細菌は、この様にして縮小した細菌ではないだろうか？

一方陸棲細菌については、形態変化や細胞の縮小は余り報告されていない。Ensign(1970) は、*Arthrobacter crystallopoietes* が増殖停止期に入ると分裂縮小をおこして、菌型がかん菌から球菌に変化するにも関わらず、かん菌、球菌、いずれの細胞も無機水中に懸濁培養すると、形・大きさともに変化しないことを報告している。Boylen and Mulks(1978) も、56 日間の飢餓で、細胞内炭素量の 35 ~ 45% を呼吸で消費するにもかかわらず、土壌細菌は、外形・大きさともに変化しないことを報告している。海洋細菌に見られる外形の縮小は、原生動物による捕食を逃れる (Gonzales *et al.*, 1990) とか、相対表面積が大きくなることで栄養吸収効率が良くなる (Matin and Veldkamp, 1978)、と言った合目的的性があるのかもしれない。

海洋細菌では分裂縮小の結果、細胞数が飢餓初期に、多いときで 100 倍にも増えることが知られている (Baker *et al.*, 1983)。この細胞数の増加は接種量による影響が大きく、飢餓開始時の菌量が $10^7/\text{ml}$ 以上だと余り見られない (Hood and Ness, 1982)。恐らく培地中の微量成分が分裂縮小化を左右するのであろう。一方無機水中の分裂縮小は土壌細菌については余り知られていないが、ほとんどの実験が $10^8/\text{ml}$ 以上の細胞密度で行っていることを考慮しなければならない。海洋細菌の分裂縮小では、細胞数の増加に見合うだけの DNA の増加は余り報

告されていない (Marden *et al.*, 1988). 分裂縮小で増えるのは、飢餓開始時の DNA のコピー数に依存するのだ (Novitsky and Morita, 1977), との説明があるが、これでは 100 倍もの増加は説明できない。

3. 生残期間中の栄養源は何か?

無機水中では細菌は細胞物質を分解してエネルギーを得ている。炭水化物や脂質などがよく利用されている (Hood *et al.*, 1986). ポリ- β -ヒドロキシブチレートなどの貯蔵物質は、優先的に分解消費されるが、面白いことにこれらが細菌の生残率を高める、と言う明確なデータはない。脂質では、磷脂質が中性脂質よりも優先的に利用されている (Thomas and Batt, 1969; Oliver and Stringer, 1984; Hood *et al.*, 1986; Malmcrona-Friberg, *et al.*, 1986).

生残時間の短い細菌の生残は、RNA の分解代謝に大きく依存している。Sjorgen and Gibson (1981) は、40 % 生残が 24 時間以下の細菌の RNase 活性は、40 % 生残時間が 24 時間以上の細菌よりも低いことを報告している。しかしながら RNA の分解代謝は死につながる (Postgate, 1976) ので、細胞内の RNA を利用するものは、相対的には余り長くは生残出来ない。したがって海洋細菌などの生残時間の長い細菌では RNA は余り分解されない (Hood *et al.*, 1986; Moyer and Morita, 1989b). Amy *et al.* (1983) は、*Vibrio* ANT-300 の細胞当りの RNA 量は最初の 1 週間で減少するが、その後はむしろ増加することを報告している。細胞内にかなり量の RNA が残っていることは、飢餓 *Vibrio* S14 を新鮮培地に移した時に、蛋白合成活性が、RNA の合成なしにも数倍にも増大する (Albertson *et al.*, 1990a) ことでも解る。これは非常に遅く増殖する *Escherichia coli* が、必要量の数倍の RNA を含んでいる (Koch, 1971) ことと一見似ているが、飢餓の場合には恐らく RNAase が減少するからではなからうか。 *Vibrio* S14 では飢餓にともない mRNA の寿命が延びることが報告されている (Albertson *et al.*, 1990b). mRNA の 1 次, 2 次構造の変化は、考えにくいことなので、mRNA の長寿命化は、やはり RNAase の減少を意味しているのではなからうか?

DNA は、細菌が生き延びるために必ず保存されなければならない。事実陸棲細菌や腸内細菌などでは、DNA

量は変化しないかむしろ増加することすら報告されている (Ensign, 1970; Brdar *et al.*, 1965; Gronlund and Campbell, 1963). しかしながら、海洋細菌の研究では、生菌数が変化しないかあるいは増えるにももかわらず、DNA が、飢餓生残中に減少することがいくつか報告されている (Amy *et al.*, 1983; Hood *et al.*, 1986). 理論的に理解しにくいことだが、分析法等も含めて検討される必要がある。

4. 生残期間中の呼吸活性

先に述べたように、飢餓生残中の細菌は、細胞内物質を利用してエネルギーを得ている。したがって細菌が長期間にわたって生残するためには、呼吸活性を低下させて、細胞内物質を節約する必要がある。湿地草原から分離された *Bacillus* M153 は、飢餓期間中に呼吸活性が増大し早く死滅するが、*Pseudomonas* M216 は呼吸活性が低下し長く生残すると報告されている (Nelson and Parkinson, 1978). *E. coli* は、呼吸活性が 0.6 ~ 5% 細胞総炭素量 /h にまでしか低下しなかった時には、20 時間で半数が死滅している (Jacobson and Gillespie, 1968). 2 年半以上も生残する *Vibrio* ANT-300 は 1 週間のスターベーション期間中に 1 時間当りの呼吸活性が 0.0071% 総炭素量にまで減少している (Novitsky and Morita, 1977). この値は、*E. coli* などについて計算された細胞維持に必要とされる呼吸量の、0.03% 総炭素量 (Pirt, 1965) よりも小さい。細胞維持エネルギーは、細胞内の浸透圧, pH, イオン組成の維持と細胞内物質の更新に使われている (Stouthamer and Bettenhausen, 1973).

一方細胞表層が親水性の海洋細菌は、飢餓中に界面に付着すると呼吸活性が増大し細胞が急速に縮小することが報告されている (Kjelleberg *et al.*, 1983; Humphrey, *et al.* 1983). 呼吸活性の増大は飢餓に備え飢餓耐性物質を作るためのものであり、急速な細胞縮小は生残機能の増大をとまうと考えられているが、実際に生残期間が延びるかは報告されていない。

5. 生残期間中の細菌は休眠細胞か?

今述べたように、呼吸活性の低下が飢餓生残を助けるようだが、果して飢餓生残中の海洋細菌は呼吸活性を低下

$$\text{Energy Charge} = \frac{[\text{ATP} + \frac{1}{2}(\text{ADP})]}{[\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}]}$$

Fig. 1. Energy charge (Chapman, A. G., Fall, L., and Atkinson, D. E., 1971)

させて、休眠状態にまで至るのであろうか？細菌の生死および休眠状態については、エネルギー・チャージ (energy charge) で示される。下式 (Fig. 1) に見られるように、このエネルギー・チャージ (EC) の増減は、ATP と AMP の量に大きく依存している。一般に増殖中の細菌の EC は 0.8 近辺であるが、*E. coli* については EC が 0.5 以下になると生菌数が急激に減少すること、また一方 *Bacillus* の芽胞の EC が 0.1 であるなどが知られている (Chapman *et al.*, 1971)。海洋細菌については、飢餓にともない菌液全体の ATP 量は急激に減少するが、生菌数当りではむしろ増大し (Amy and Morita, 1983)、(生菌数の 10 倍にも達する) 呼吸活性陽性細胞 (酸化還元色素を呼吸の働きで発色させて染まる細胞) 当りの ATP 量は、余り変化しないことが報告されている (Kurath and Morita, 1983)。したがって生菌数や呼吸活性陽性細胞として数えられる飢餓生残の細菌の EC は、案外高いのかも知れない。

一方飢餓後の細菌に有機物を添加すると、有機物の取り込みや蛋白の合成が、RNA の合成や誘導期 (lag phase) なしに開始され、長い誘導期間をへて分裂が開始する (Albertson *et al.*, 1990a)。即座に有機物が取り込まれることは、膜を介したエネルギー勾配が、飢餓生残中にも形成されていることを示唆し、蛋白合成は、細胞内にこれらの働きを担う代謝系が常に可動な状態で温存されていたことを示す。したがって、生菌数あるいは呼吸活性陽性細胞として数えられる飢餓生残の細菌は、休眠細胞とは言い難い。

生残飢餓中の細菌について特筆されるのは、“Viable but non-culturable” (Xu *et al.*, 1982) であろう。これは、寒天平板上で計数される生菌数よりも、Kogure の方法 (1976) による顕微鏡下で計数される生菌数の方が多いことから提唱された。この様な細菌の存在は、寒天平板で計数される細菌数よりも、酸化還元色素染色で確認された呼吸活性をもつ細菌数の方が、10 から 10^6 倍も多い (Kurath and Morita, 1983; Nilsson *et al.*, 1991) こと

でも理解される。

Viable but non-culturable の細菌の存在については、(1)「それらが寒天平板上で計数される細菌よりも生理活性が劣り休眠しているのだ」と言う説明がある。しかしながら、EC の様子からして呼吸活性陽性細胞 (Kurath and Morita, 1983) は休眠とは言いがたい (前述) ので、休眠細胞の存在は確認されていないのではなかろうか。またほかの可能性としては、(2) 培地による中毒も考えられるだろう。飢餓生残中の細菌に、増殖律速因子だったグルコースを加えることで、細胞内の RNA の分解が促進され、その結果細菌の死滅が加速されることが報告されている (Thomas and Batt, 1968)。また Postgate and Hunter (1963) は、律速要因だった基質を無機水中に加えることで細菌が死滅する現象が、有機態の窒素、炭素源、燐酸、イオウなどで起きることを報告し、“substrate induced death” という定義を行っている。(3) また、用いる培地上に発生する活性酸素の影響も無視できない。絵面ら (1992 年春季水産学会) は、飢餓生残中の生菌数測定に際し、カタラーゼなどを培地に加えると、生菌数が数 10 倍にも増えることを報告している。

6. 飢餓生残中における生理・生化学的变化

海洋細菌が飢餓にさらされるにともなういくつかの生理・生化学的变化が報告されている。膜表面が非親水性の海洋細菌 *Pseudomonas* S9 は、飢餓に際し細胞外に高分子の炭水化物を分泌し、これによって表面が親水性となり、非親水性の界面から細菌が剥離する。この炭水化物の生産分泌には新たな蛋白合成が必要である (Wrangstadh *et al.*, 1990)。また *Vibrio* sp. S14 の飢餓初期には、細胞外蛋白分解酵素が増殖細胞よりも多く生産される。この蛋白分解酵素の生産と分泌にはカタボライト抑制が働き、グルコースを添加すると生産・分泌が抑制され、cAMP が加えられるとカタボライト抑制が解除される (Albertson *et al.*, 1990c)。この場合細胞外蛋白分解酵素は、貧栄養な環境で有機物を摂取するのに有効に働くが、利用出来る有機物が全く無い時に細胞外に蛋白を分泌するのは、長期間の飢餓生残にはマイナスに働くのではなかろうか？*Vibrio* ANT-300 を 24 時間飢餓すると、アルギン酸に対する化学走性や、nmol レベルでの取り込み活性が発現される (Geesey and Morita, 1979)。化学走性は長期間の飢

餓過程では失われるが、アルギン酸取り込み活性は維持される。南アフリカ沖合いの海水から分離された *Vibrio* 株のマニトールの構成的 (constitutive) 取り込み系は、菌を 5 週間飢餓させたところ、より低濃度で活性が高い系に変換した。一方 *Pseudomonas* 株のマニトール取り込み系は適応的 (inducible) であったが、6 週間飢餓した菌株に窒素源なしに 11 μ M の基質を加えると、マニトール取り込み系が誘発されている (Davis and Robb, 1985). 面白いところでは、海洋性の *Bdellovibrio* の bdelloplast (BP:餌料細菌の細胞質を食べ尽くし、その抜け殻の内にとどまっている状態) は、Attack-phase cell (AP) よりもはるかに長く生残出来る。AP は有機物の無い環境では、わずか 1 週間で生菌数が 1/10⁴ ほどに減少してしまうが、BP は 180 日経っても 1/10 にまでしか減少しない。陸棲の BP は乾燥に強いが、海洋性の BP は乾燥、温度、界面活性剤、超音波処理にたいして敏感である。海洋性の BP は環境の大きな変化にさらされないの、抵抗性が弱いのであろう。BP 内には貯蔵物質らしき顆粒が見られるが、BP の呼吸活性は、この様な顆粒が見られない AP の 1/3 程である (Sanchez-Amat and Torrela, 1990).

7. 腸内細菌についての飢餓関連遺伝子の研究

飢餓生残には蛋白の分解と合成が不可欠だ、という意見がある。飢餓初期の数時間に起きる反応を抗生物質で阻害すると、細菌は生残できないことが報告されている (Reeve *et al.*, 1984; Nystrom *et al.*, 1990a). *E. coli* では増殖停止にともなう、増殖中には見られない新たな飢餓蛋白が生産されることが報告されている。増殖停止にともなうこの代謝転換により、飢餓以外の熱や pH、過酸化水素さらには浸透圧などのストレスに対する抵抗性が增大する (Jenkins *et al.*, 1988; McCann *et al.*, 1991). 飢餓蛋白として報告された物のうち、2/3 は cAMP-CRP 系の制御をうける (cst protein : carbon starvation protein). この cst protein は炭素源飢餓のみによって誘発され、他のストレスには直接関係しない。一方 cAMP-CRP の制御を受けない残りの 1/3 の蛋白 (pex protein : post exponential protein) は、ストレス抵抗性に寄与し、これらの多くは炭素、窒素、燐いずれの飢餓でも誘導される (Schultz *et al.*, 1977).

増殖停止にともなう *E. coli* の代謝転換では、新たな

遺伝子のプロモーター (gear box promoter) が活発化するが、それらには増殖生理のほとんどを制御しているシグマファクター- σ^{70} に特有な mRNA ポリメラーゼ結合部位の共通配列が見られないものがある (Bohannon *et al.*, 1991). Matin のグループは (Jenkins *et al.*, 1991), 増殖停止にともなう、熱ショックに応答するシグマファクター- σ^{32} の発現が増大することを報告している。 σ^{32} の遺伝子を欠いた変異株は、熱ショック応答蛋白 (heat shock protein) DnaK や FroEL, HtpG が合成出来ず、かつ増殖停止期の蛋白合成能が低下し、飢餓および熱などのストレスに対する抵抗性が低下する。またシグマファクターと思われる *KatF* 遺伝子を欠いた変異株は、pex protein が合成出来ず、飢餓や熱、過酸化水素、浸透圧などのストレスに対する抵抗性が低下すると報告されている (McCann *et al.*, 1991). *E. coli* 以外では、ニコチン酸合成能を欠いた *Salmonella typhimurium* から、ニコチン酸飢餓で誘発される遺伝子 *stiA* ~ *H* が報告されている。このうち *stiC* はグルコース飢餓でも強く誘発され、これが欠損すると増殖停止期に細菌が急激に死滅することが報告されている (Spector *et al.*, 1988).

飢餓によって様々なストレスに対する抵抗性が增大することは、飢餓を感知するセンサー部分が、これらストレスに共通であることを示すのかも知れない。Young らは近年 (Young *et al.*, 1990; Young and Bernlohr, 1991) 炭素源や窒素源さらには燐源の不足によって、膜上の蛋白がメチル化するが、この蛋白がペプチド鎖伸長因子 Tu (Ef-Tu) であったと報告している。Ef-Tu のメチル化は 2~5 分で倍数化し、40 分で最大となる。EF-Tu のメチル化は制限因子を培地に加えることで停止し、以後漸減することから、飢餓のセンサー蛋白として働いている可能性が強い。

8. これからの研究課題

海洋細菌も *E. coli* と同じように、飢餓にともなう大規模な代謝転換が起きようである。飢餓にともなう合成される蛋白には、増殖中には合成されない物質 (飢餓蛋白: starvation protein) が多くみられる。*Vibrio* sp. S14 では飢餓蛋白としてペリプラズマ蛋白 6, 外膜蛋白 9, 原形質膜蛋白 4 が生産される (Nystrom *et al.*, 1988). また Nystrom *et al.* (1990a) は 61 種の飢餓蛋白を報告、

Fig. 2. Starvation proteins. MS: multiple starvation protein, induced exclusively by multiple starvation; GS: general starvation protein, induced by either of carbon, nitrogen or phosphorous source; CS, carbon starvation protein, induced by carbon starvation; NS, nitrogen starvation protein; PS, phosphorous starvation protein. SC: starvation protein under stringent control. (Adapted from Nystrom *et al.*, 1990b)

これらが飢餓要因によって Fig. 2 のように分類されることを報告している (Nystrom *et al.*, 1990b). 緊縮制御 [stringent regulation: 飢餓時に ppGpp (guanosine 3'5'-biphosphate) が増えて遺伝子の転写が抑制される] を受けるのが、炭素源飢餓蛋白だと言うのが注目される。また飢餓蛋白の特徴は、飢餓以外の熱ショックやアルコールショック, CdCl₂, ナリジキシン酸などのストレスでも誘発されることである。なかでも炭素源飢餓で誘発される飢餓蛋白に、他のストレスでも生産されるものが最も多い。

しかしながら飢餓や熱, アルコールなどの様々なストレ

Fig. 3. Change of starved cell volume at different respiratory activity. Maintenance energy of bacterial cell (*Escherichia coli*) is supplied at respiratory activity of 0.03% total cell carbon/h. Bacterial cells indicate the cell volumes observed during starvation experiment of Moyer and Morita, (1989).

スによって、共通なストレス抵抗蛋白が合成されることは、海洋細菌の飢餓生残にどんな意義があるのだろうか？ ストレス蛋白によって、*E. coli* でも確かに数日間の生残能が高まるとの報告はあるが、100 日あるいは数年間にわたる海洋細菌の飢餓生残に、果して重要な意義があるかは不明である。一方これまでに長期間の飢餓生残後でも、海洋細菌は有機物取り込み活性や蛋白合成能、さらには分裂能を、増殖細菌に劣らないほどのレベルで維持している場合があることを報告してきた。取り込み活性は、海洋細菌が飢餓生残期間中も細胞膜を介したエネルギーのポテンシャルを維持していることを示唆している。Fig. 3 は細胞維持エネルギーに見合うだけの呼吸を、細胞内物質を使って行った場合の細胞の (増殖期を 1 とした) 相対的大きさの変化と、実際に測定された飢餓後の細菌の相対的大きさが図示されている。図に見られるように、実際に観測される飢餓後の海洋細菌の相対的大きさは、細胞維持に必要なエネルギー代謝を行った場合

の理論値に近い。休眠中以外の細菌は、細胞維持エネルギーが供給されなくなると死滅するが (Dawes, 1984), 図は休眠せずとも長期間にわたり細胞維持エネルギーを確保した状態で細菌が生残出来ることを示している。また *Bdellovibrio* の長期間生残の BP が、短期間しか生残出来ない AP よりも、細胞内物質が豊かにもかかわらず呼吸活性が低い (Sanchez-Amat and Torrela, 1990) ことから解るように、長期間の飢餓生残には呼吸活性を低下させることが重要なのではなかろうか?

このことで注目されるのは好気性光合成細菌である (Shiba and Harashima, 1986)。有機物の無いところでは、好気性光合成細菌は光エネルギーを利用出来るので、暗下よりも明下で長く生残出来る (Shiba, 1984)。

近年の飢餓蛋白および遺伝子の仕事の興隆は、データの出易いところで研究を行った結果のようである。熱ショックやアルコール、浸透圧、pH、いずれのストレスも海洋環境では考えにくい。これまでに述べた RNA や取り込み活性の維持、さらには呼吸活性の低下など、海洋細菌の飢餓生残に特徴的な現象にもとづいた実体論的研究が必要ではないだろうか。大腸菌らの仕事は、増殖停止後、すなわち有機培地中での生残過程についての仕事である。*Vibrio alginolyticus* の細胞内 RNA のレベルは、無機培地中の方が、有機培地中での生残よりも、はるかに高く維持されている (Kramer and Singleton, 1992)。有機培地中と、無機培地中とでは、生理状態が異なるのである。また理解に苦しむことだが、飢餓生残実験に用いられている細菌の多くが、分類学的および遺伝学的データが余り無い。演繹法を行うのに不便ではなかろうか。また形質転換微生物の海洋への放流の安全性について最近関心がもたれているが、これまでは *Vibrio* や *Pseudomonas* についての実験がほとんどであり、これらの問題に答えるためには広範囲な細菌種について、飢餓生残実験を行う必要があると思われる。

References

- Albertson, N.H., T. Nystrom and S. Kjelleberg (1990a): Macromolecular synthesis during recovery of the marine *Vibrio* sp. S14 from starvation. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2201-2207.
- Albertson, N.H., T. Nystrom and S. Kjelleberg (1990b): Functional mRNA half-lives in the marine *Vibrio* sp. S14 during starvation and recovery. *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2195-2199.
- Albertson, N.H., T. Nystrom and S. Kjelleberg (1990c): Exoprotease activity of two marine bacteria during starvation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 218-223.
- Amy, P.S., C. Pauling and R.Y. Morita (1983): Starvation-survival processes of a marine vibrio. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1041-1048.
- Anderson, J.I.W., and W.P. Hefferman (1965): Isolation and characterization of filterable marine bacteria. *J. Bacteriol.*, **90**, 1713-1718.
- Baker, R.M., F.L. Singleton and M.A. Hood (1983): Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **6**, 930-940.
- Bohannon, D.E., N. Connell, J. Kenner, A. Tormo, M. Espinosa-Urgel, M.M. Zambrang and R. Kolter (1991): Stationary-phase-inducible "gearbox" promoters: differential effects of KatF mutations and role of σ_{70} . *J. Bacteriol.*, **173**, 4482-4492.
- Boylan, C.W. and M.H. Mulks (1978): The survival of coryneform bacteria during periods of prolonged nutrient starvation. *J. Gen. Microbiol.*, **105**, 323-334.
- Brdar, B., E. Kos and M. Drakulic (1965): Metabolism of nucleic acids and protein in surviving bacteria. *Nature*, London, **208**, 303-304.
- Chapman, A.G., L. Fall and D.E. Atkinson (1971): Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.*, **108**, 1072-1086.
- Davis, C.L. and F.T. Robb (1985): Maintenance of different mannitol uptake systems during starvation in oxidative and fermentative marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 743-748.
- Dawes, E.A. (1984): Stress of unbalanced growth and starvation in micro-organisms. P. 19-43. *In*: The revival of injured microbes, ed. by M.H.E. Andrew and A.D. Russell, Academic Press, New York.
- Ensign, J.C. (1970): Long-term starvation of rod and spherical cells of *Arthrobacter crystallopoietes*. *J. Bacteriol.*, **103**, 569-577.
- Geesey, G.G. and R. Morita (1979): Capture of arginine at low concentrations by a marine psychrophilic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 1092-1097.
- Gonzalez, J.M., E.B. Sherr and B.F. Sherr (1990): Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 583-589.
- Gronlund, A.F., and J.J.R. Campbell (1963): Nitrogenous substrates of endogenous respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **86**, 58-66.

- Hood, M.A., and G.E. Ness (1982): Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 578-584.
- Hood, M.A., J.B. Guckert, D.C. White and F. Deck (1986): Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA, and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 788-793.
- Humphrey, B., S. Kjelleberg and K.C. Marshall (1983): Responses of marine bacteria under starvation conditions at solid-water interface. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 43-47.
- Jacobson, A. and D. Gillespie (1968): Metabolic events occurring during recovery from prolonged glucose starvation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **95**, 1030-1039.
- Jenkins, D.E., J.E. Schultz and A. Matin (1988): Starvation-induced protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3910-3914.
- Jenkins, D.E., E.A. Auger and A. Matin (1991): Role of RpoH, a heat shock regulator protein synthesis and survival. *J. Bacteriol.*, **173**, 1992-1996.
- Kjelleberg, S. and M. Hermansson (1984): Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 497-503.
- Kjelleberg, S., B.A. Humphrey and K.C. Marshall (1983): Initial phases of starvation and activity of bacteria at surfaces. *Appl. Environ. microbiol.*, **46**, 978-984.
- Koch, A.L. and C.S. Deppe (1971): *In vivo* assay of protein synthesizing capacity of *Escherichia coli* from slowly growing chemostat cultures. *J. Mol. Biol.*, **55**, 549-562.
- Kogure, K., U. Simidu and N. Taga (1979): A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415-420.
- Kramer, J.G., and F.L. Singleton (1992): Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 201-207.
- Kurath, G., and R. Y. Morita (1983): Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1206-1211.
- Maeda, M. and N. Taga (1983): Comparison of cell size of bacteria from four marine localities. *La Mer*, **21**, 207-210.
- Malmcrona-Friberg, K., A. Tunlid, P. Marden, S. Kjelleberg and G. Odham (1986): Chemical changes in cell envelope and poly- β -hydroxybutyrate during short term starvation of a marine bacterial isolate. *Arch. Microbiol.* **144**, 340-345.
- Marden, P., A. Tunlid, K. Malmcrona-Friberg, G. Odham and S. Kjelleberg (1985): Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **142**, 326-332.
- Marden, P., M. Hermansson and S. Kjelleberg (1988): Incorporation of tritiated thymidine by marine bacterial isolates when undergoing a starvation survival process. *Arch. Microbiol.*, **149**, 427-432.
- Mach, H., M. Hecker, I. Hill, A. Schroeter and F. Mach (1989): Stringent control and starvation survival in *Escherichia coli*. *Z. Naturforsch.* **44c**, 838-844.
- Matin, A. and H. Veldkamp (1978): Physiological bases of the selective advantage of *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. *J. Gen. Microbiol.* **105**, 187-197.
- McCann, M.P., J.P. Kidwell and A. Matin (1991): The putative σ factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **173**, 4188-4194.
- Menzel, D.W. and J.H. Ryther (1970): Distribution and cycling of organic matter in the oceans, p31-54. *In: Organic matter in natural waters*, ed. by D.W. Hood, Institute of Marine Science Publication, College, Alaska.
- Moyer, C.L. and R.Y. Morita (1989a): Effect of growth rate and starvation-survival on the viability and stability of psychrophilic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1122-1127.
- Moyer, C.L. and R.Y. Morita (1989b): Effect of growth rate and starvation-survival on cellular DNA, RNA, and protein of a psychrophilic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2710-2716.
- Nelson, L.M., and D. Parkinson (1978): Effect of starvation on survival of three bacterial isolates from an arctic soil. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 1460-1467.
- Nilsson, L., J.D. Oliver and S. Kjelleberg (1991): Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.*, **173**, 5054-5059.
- Novitsky, J.A. and R.Y. Morita (1976): Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 617-622.
- Novitsky, J.A. and R.Y. Morita (1977): Survival of psychrophilic marine vibrio under long term nutrient starvation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 635-641.
- Novitsky, J.A. and R.Y. Morita (1978): Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Mar. Biol.*, **48**, 289-295.
- Nystrom, T., N. Albertson and S. Kjelleberg (1988): Synthesis of membrane and periplasmic proteins during star-

- vation of a marine *Vibrio* sp. J. Gen. Microbiol., **134**, 1645-1651.
- Nystrom, T. and S. Kjelleberg (1989): Role of protein synthesis in the cell division and starvation induced resistance to autolysis of a marine *Vibrio* during the initial phase of starvation. J. Gen. Microbiol., **135**, 1599-1606.
- Nystrom, T., K. Flardh and S. Kjelleberg (1990a): Responses to multiple-nutrient starvation in marine *Vibrio* sp. strain CCUG 15956. J. Bacteriol. **172**, 7085-7097.
- Nystrom, T., N.H. Albertson, K. Flardh and S. Kjelleberg (1990b): Physiological and molecular adaptation to starvation and recovery from starvation of the marine *Vibrio* sp. S14. FEBS Microbiol. Ecol., **74**, 129-140.
- Oliver, J.D. and W.F. Stringer (1984): Lipid composition of a psychrophilic marine *Vibrio* sp. during starvation-induced morphogenesis. Appl. Environ. Microbiol., **47**, 461-466.
- Oppenheimer, C.H. (1952): The membrane filter in marine microbiology. J. Bacteriol., **64**, 783-786.
- Pirt, S.J. (1965): The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proc. Roy. Soc., Ser. B, **163**, 224-231.
- Postgate, J.R. (1976): Death in macrobes and microbes. p. 1-18. In: The survival of vegetative microbes. ed by T.G.R. Gray and J.R. Postgate, Cambridge Press, London.
- Postgate, J.R. and J.R. Hunter (1963): Acceleration of bacterial death by growth substrates. Nature, **4877**, 273.
- Reeve, C.A., P.S. Amy and A. Matina (1984): Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., **160**, 1041-1046.
- Sanchez-Amat, A. and F. Torrella (1990): Formation of stable bdelloplasts as a starvation-survival strategy of marine *Bdellovibrio*. Appl. Environ. Microbiol., **56**, 2717-2725.
- Schultz, J.E., G.I. Latter and A. Matin (1988): Differential regulation by cyclic AMP of starvation protein synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **170**, 3903-3909.
- Shiba, T. (1984): Utilization of light energy by the strictly aerobic bacterium *Erythrobacter* sp. OCh114. J. Gen. Appl. Microbiol., **30**, 239-244.
- Shiba, T. and K. Harashima (1986): Aerobic photosynthetic bacteria. Microb. Sci., **3**, 376-378.
- Sjorgen, R.E., and M.J. Gibson (1981): Bacterial survival in dilute environment. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 1331-1336.
- Spector, M.P., Y.G. Park, S. Tirgari, T. Gonzalez and J.W. Foster (1986): Identification and characterization of starvation-regulated genetic loci in *Salmonella typhimurium* by using Mu d-directed *lacZ* operon fusion. J. Bacteriol., **170**, 345-351.
- Stouthamer, A.H. and C. Bettenhausen (1973): Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. A reevaluation of the method for determination of ATP production by measuring molar growth yields. Biochim. Biophys. Acta, **301**, 53-70.
- Tabor, P.S., K. Ohwada and R.R. Colwell (1981): Filterable marine bacteria found in the deep sea: distribution, taxonomy, and response to starvation. Microb. Ecol., **7**, 67-83.
- Thomas, T.D. and R.D. Batt (1968): Survival of *Streptococcus lactis* in starvation conditions. J. Gen. Microbiol., **50**, 367-382.
- Thomas, T.D. and R.D. Batt (1969): Metabolism of exogenous arginine and glucose by starved *Streptococcus lactis* in relation to survival. J. Gen. Microbiol., **58**, 371-380.
- Wrangstadh, M., U. Szewzyk, J. Ostling and S. Kjelleberg (1990): Starvation specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine *Pseudomonas* sp. strain S9. Appl. Environ. Microbiol., **56**, 2065-2072.
- Xu, H., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes and R.R. Colwell (1982): Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microb. Ecol., **8**, 313-323.
- Young, C.C., J.D. Alvarez and R.W. Bernlohr (1990): Nutrient-dependent methylation of a membrane associated protein of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **172**, 5147-5153.
- Young, C.C., and R.W. Bernlohr (1991): Elongation factor Tu is methylated in response to nutrient deprivation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **173**, 3096-3100.