

続・有用酵素をもつ菌を温泉から探そう

生物資源科学部 応用生物科学科 2年 高橋 一成
2年 伊藤 愛
指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科 助教 牟田口 祐太

背景・目的

好熱菌は海洋の熱水噴出口や大陸の温泉等の高温環境に生息する微生物である。好熱菌が持つ酵素は一般的に熱や pH に対する安定性が高いため、分析技術・製薬・工業的物質生産等に広く利用されている。秋田県には多くの温泉があるが、生物資源としての利用がほとんど進んでおらず、新たな有用酵素を持つ好熱菌を見出せる可能性が高い。

一方、近年 D-アミノ酸がヒトを含む様々な生物で、生命維持のための重要な生理機能を持つことが明らかになり、D-アミノ酸研究が医療や食品等のあらゆる分野に展開している。その中で、簡便かつ迅速な D-アミノ酸分析方法として、D-アミノ酸代謝関連酵素を利用した酵素分析方法の開発が期待されている。

以上のことから、私たちは秋田県の温泉に生息する好熱菌から D-アミノ酸代謝関連酵素を見つけることができれば、その酵素は安定性が高く、D-アミノ酸酵素分析法への応用が期待できると考えた。そこで、D-アミノ酸を栄養源として利用できる能力（資化性）を指標とすることで D-アミノ酸代謝関連酵素を持つ好熱菌を効率的に探索することができると考え、平成 30 年度に学生自主研究「有用酵素を持つ好熱菌を秋田の温泉から探そう」を実施した。平成 30 年度の研究では、秋田県内の温泉地から土壌を採取し、炭素源または窒素源を D-アミノ酸に限定した培地（以下 D-AA 培地）を用いて、11 種の好熱菌菌叢を得た。さらに、その内の 1 種から D-Met 資化能を有することが示唆された好熱菌株 AB1 を単離することに成功した。

本研究では、平成 30 年度に得た好熱菌菌叢の残りの 10 種から D-アミノ酸資化性好熱菌を単離する事を目的とした。さらに、AB1 および本研究で新たに単離される菌株の 16S rDNA 塩基配列を解析し、それら菌株を分類学的に同定することを目的とした。

実験 I D-アミノ酸を資化する可能性のある菌株の単離

平成 30 年度の研究で得た 11 種の好熱菌菌叢とそれらのスターターとなった土壌の採取場所の情報を表 1 に示す。各菌叢の表記のうち、左の番号は土壌の採取場所を示し、中央の数字と右のアルファベットは菌叢

の培養に用いた D-AA 地の種類を示している。加えて、D-AA 培地の種類と含有 D-アミノ酸の特徴を表 2 にまとめた。尚、D-AA 培地の組成の詳細は平成 30 年度自主研究報告書に示しており、本報告書では割愛した。

菌叢表記	土壌採取場所	菌叢表記	土壌採取場所
①1G		⑥1G	
①3G	小安峡温泉	⑥2G	奥小安峡
①5G	(pH 8.27, 55.3°C)	⑥3G	大湯温泉
①1A		⑥5G	(pH 7.5, 53.0°C)
②2G	小安峡温泉	⑥1A	
②5G	(pH 7.95, 60.5°C)		

表 2. 使用した D-AA 培地の種類と含有 D-アミノ酸

側鎖による D-アミノ酸の分類	加えた D-アミノ酸	培地の名称	
		D-アミノ酸を 窒素源とする培地	D-アミノ酸を 炭素源とする培地
分岐鎖アミノ酸	D-Val, D-Leu, D-Ile, D- <i>allo</i> Ile	1G	1A
ヒドロキシアミノ酸	D-Thr, D- <i>allo</i> Thr	2G	2A*
含硫アミノ酸	D-Met	3G	3A*
芳香族アミノ酸	D-Phe, D-Tyr, D-Trp	4G*	4A*
塩基性アミノ酸	D-His	5G	5A*

* 平成 30 年度の研究でのみ使用した培地であり、本研究では使用しなかった培地

昨年度得られた 11 種の好熱菌菌叢のうち、既に菌株 (AB1) の単離が終了している⑥3G 以外の 10 種から、以下の実験操作により D-アミノ酸を資化する可能性がある菌の単離を試みた。

- 1) -80°C で凍結保存しておいた菌叢の一部を 5 mL D-AA 培地に植菌し、55°C で 5~8 日間培養した。
- 2) 培養液の段階希釈 (原液~10⁶倍希釈) 液 100 μL を 2%寒天で固化した D-アミノ酸培地に塗布し、コロニーが現れるまで 55°C で 4~3 日間インキュベートした。
- 3) 形成されたコロニーからそれぞれ 5 個を任意に選択し、D-AA 培地と D-AA 培地から D-アミノ酸のみを欠いた培地 (以下、D-AA 欠損培地) にそれぞれ植菌した。
- 4) それらの中から、D-AA 培地で生育するが D-AA 欠損培地では生育せず、且つ最も濁度 (O.D.660) が高くなった培養液を選抜した。
- 5) 2)~4)の操作をさらに 2 回行い、得られた培養液を 25%グリセロールストックとして-80°C で保存した。

結果 I

菌叢②2G および⑥2G の培養液は濁度が 0.05 に満たなかったため、菌が増殖しなかったと判断した。菌叢①5G、①1A では寒天培地上でコロニーが形成されず、目的とする菌株は単離できなかった。菌叢①3G、⑥1A から得られたコロニーは全て D-AA 欠損培地でも生育したため、目的の菌株は単離できなかった。

一方、菌叢①1G、⑥1G、②5G、⑥5G は上記の単離操作を進めることができ、これらの菌叢から目的とする菌株を単離することができた。

実験 II 単離菌株における D-アミノ酸資化性の検討

菌叢①1G、⑥1G、②5G、⑥5G から単離した菌株のうち、培養時に濁度が特に高くなった①1G および⑥1G からの単離菌株を対象として、D-アミノ酸の資化性を調べた。尚、菌叢①1G、⑥1G から単離された菌株をそれぞれ OY1、AB2 とした。

II-① D-アミノ酸が単離菌株の生育に与える影響

単離菌株 OY1 および AB1 を、窒素源が D-Val と D-Leu、D-Ile、D-*allo*Ile (以下 D-BCAAs) である 1G 培地、および 1G 培地から D-BCAAs のみを欠いた培地 (以下 D-BCAAs 欠損培地) にて培養し、生育を比較した。寒天培地上のコロニーから、5 mL の各液体培地に植菌し、1 日毎に濁度 (O.D.660) を測定しつつ、55°C で 4~5 日間培養した。

結果 II-①

結果をまとめたものを図 1 に示す。OY1、AB2 とともに 1G 培地では濁度が上昇し、菌の生育が観察された。一方、D-BCAAs 欠損培地では濁度は上昇せず、菌の生育は観察されなかった。

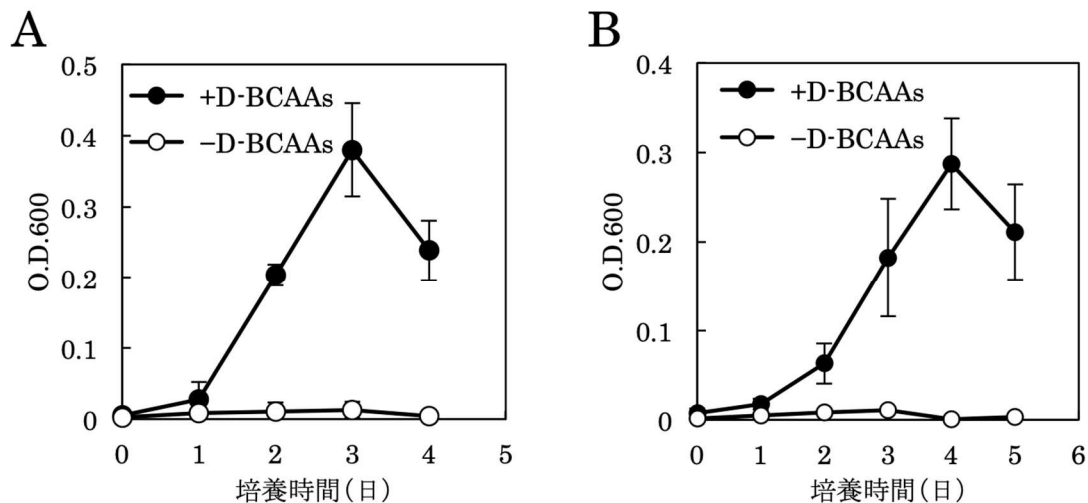


図 1. D-BCAAs が OY1 (A) および AB2 (B) の生育に与える影響 (n=4)

II-② 単離菌株培養液中の D-アミノ酸濃度変化

OY1 および AB2 を 1G 培地で培養し、D-BCAAs の濃度変化を調べた。寒天培地上のコロニーから 1G 液体培地 (5 mL) に植菌し、55°C で 4~5 日間培養した。その後、培養液中の D-BCAAs 濃度を UHPLC にて分析した。

結果 II-②

結果を図 2 に示す。D-BCAAs 濃度を培養前 (Control 1) と培養後で比較すると、OY1、AB2 とともに培養後の D-BCAAs が有意に減少した。また、OY1、AB2 の植菌を行わずに、OY1、AB2 の培養と同様の条件でインキュベートした 1G 培地 (Control 2) では、インキュベート前 (Control 1) と比べて D-BCAAs の減少は殆ど無く、OY1、AB2 を培養した場合の方が有意に D-BCAAs 濃度が低かった。

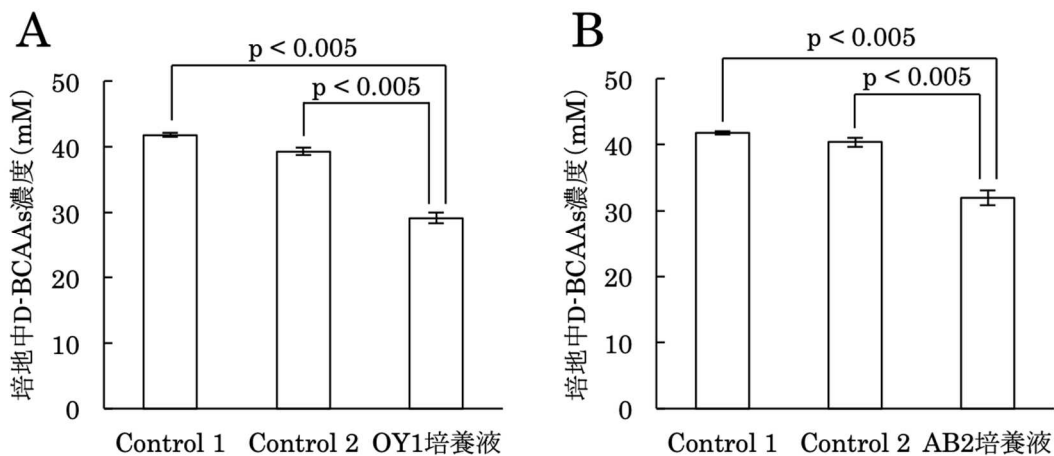


図 2. OY1 (A) および AB2 (B) 培養液中の D-BCAAs 濃度変化 (n=4)

実験 III 単離菌株の 16S rDNA 解析

平成 30 年度の研究で得た AB1、本研究で得た OY1 および AB2 を分類学的に同定するために、それぞれの 16S rRNA をコードする遺伝子の塩基配列を解析した。各菌株の菌体からフェノール・クロロホルム抽出法で染色体 DNA を抽出し、それぞれの染色体 DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を試みた。そして、得られた PCR 産物の塩基配列解析をバイオテクノロジーセンターに依頼した。

結果 III

細菌の 16S rRNA 遺伝子の共通配列から設計されたプライマーである 27f と 1492r [参考文献]を使用した時、AB1、OY1、AB2 のそれぞれの染色体 DNA から 1.0~1.5 kbp の大きさの DNA を PCR 増幅することに成功した。各 PCR 産物の塩基配列解析の結果、AB1、OY1、AB2 由来の PCR 産物からそれぞれ 1,276 bp、1,324 bp、1,320 bp の塩基配列情報を得た。これらの配列情報を基に Blast による相同性検索を行った結果、AB1 の場合は *Brevibacillus thermoruber* UICC の 16S rRNA 遺伝子と高い相同性 (99.22%) を示した。また、OY1 と AB2 の場合は、それぞれ *Geobacillus stearothermophilus* D2-3-3-1 と *Geobacillus mahadia* Geo-05 の 16S rRNA 遺伝子と高い相同性 (いずれの場合も 98.79%) を示した。

考察

実験 I では、菌叢①1G と⑥1G から D-BCAAs を資化している可能性が高い菌株 2 株をそれぞれ単離した。また、菌叢②5G と⑥5G から D-His を資化している可能性が高い菌株 2 株をそれぞれ単離した。実験 II では、菌叢①1G と⑥1G からそれぞれ単離した菌株 OY1 と AB1 の D-BCAAs 資化性について詳細に検討した。実験 II-①の結果から、本研究で用いた培養条件において OY1 および AB2 の生育に D-BCAAs が必要である事が示唆された。また、実験 II-②の結果から、OY1 および AB2 が D-BCAAs を異化している事が示唆された。これらの結果から、これら 2 菌株が D-BCAAs を異化して栄養源とし、生育に利用する (資化すること、及びその異化に必要な D-BCAAs 代謝関連酵素を有していることが強く示された。実験 III では、平成 30 年度に単離した AB1、本研究で得た OY1 および AB2 の 16S rRNA の塩基配列を解析し、AB1 は *Brevibacillus* 属細菌、OY1 および AB2 は *Geobacillus* 属細菌であることが示唆された。

平成 30 年度と今年度の 2 年間、安定性の高い D-アミノ酸代謝関連酵素を有用酵素として位置づけ、これを持つ生物として D-アミノ酸資化性を示す好熱菌の分離を目指して研究を行った。結果として、D-Met を資化する好熱性 *Brevibacillus* 属細菌 AB1、及び D-BCAAs を資化する好熱性 *Geobacillus* 属細菌 OY1 と AB1 を分離することに成功した。*Brevibacillus* 属細菌および *Geobacillus* 属細菌から D-Met 又は D-BCAAs の代謝関連酵素は報告されておらず、今後新規酵素を見出せる可能性が高い。また、D-His を資化する可能性が高い好熱菌 2 株を単離しており、これらの分類学的な同定、代謝関連酵素の特定も学術的価値の高い知見になると期待できる。以上のことから、本研究で得られた成果は安定性の高い D-アミノ酸代謝関連酵素の探索、そして、その酵素を利用した酵素分析方法の開発への展開が期待できるものであるといえる。

参考文献

鈴木健一郎、平石明、横田明=編、“微生物の分類・同定実験法”、p50、丸善出版 (2012)