

有用酵素をもつ菌を秋田の温泉から探そう

生物資源科学部 応用生物科学科

1年 高橋 一成

1年 梅津 光

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スクリーニングの効率化を図り、D-アミノ酸代謝関連酵素を持つ好熱菌を探索することを目的とした。

実験 I 温泉土壌からの好熱菌の培養

温泉土壌の採取

秋田県南部の 3 つの温泉（小安峡温泉、川原毛温泉、奥小安峡大湯温泉（阿部旅館））を訪れ、各温泉の源泉及びその周辺の 2 カ所から土壌サンプルを保温容器に採取した。温泉土壌サンプルの温度や pH の情報を表 1 に示した。採取した温泉土壌サンプルは当日中に研究室に持ち帰り、プラスチック容器に移した後、50°C の恒温機で保存した。その翌日、温泉土壌サンプルの砂泥をろ紙で除去し、ろ液を 50°C で保存した。

表 1. 温泉土壌サンプルの情報

サンプル番号	採取場所	pH	温度(°C)
①	小安峡温泉	8.27	55.3
②		7.95	60.5
③	川原毛温泉	1.86	40.6
④		1.84	49.2
⑤ ^a	奥小安峡大湯温泉	2.10	—
⑥		7.50	53.0

a: 温泉土壌サンプル⑤は蒸気の噴出口のすぐそばの土壌を採取したため、温度は測定できなかった。

pH は土壌サンプルと同重量の蒸留水を加えよく攪拌した後に測定した。

好熱菌の培養

D-アミノ酸資化性好熱菌を選択的に培養するため、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）を作成した（表 2）。また、表 3 に示すように D-アミノ酸を側鎖の性質により 5 つのグループに分け、培地成分とした。すなわち、本研究では表 3 中に示す 1G~5G 及び 1A~5A の 10 種類の D-AA 培地を好熱菌の培養に用いた。

まず、各培地 5 mL を試験管に分注し、温泉土壌のろ液 0.5 mL を添加した（温泉土壌①~⑥×培地 10 種類=60 組の培養液）。55°C, 180 rpm にて振盪培養を行い、1 日毎に O.D.660 を測定した。O.D.660 値が 0.05 以上になったものを菌が増殖したと判断し、3 週間培養を継続しても O.D.660 値が 0.05 に満たなかったものは菌が増殖しなかったと判断した。菌が増殖した培養液については、O.D.660 値の上昇がなくなった時点で、培養液 0.05 mL を新たな培地 5 mL に添加し、継代培養を行った。3 回の継代培養を経ても菌が増殖した培養液を 25%グリセロールストックとして-80°C で保存した。

表 2. 炭素源または窒素源を D-アミノ酸に限定した培地の基本組成

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
10 mM D-アミノ酸	10 mM D-アミノ酸
10 mM グルコース	10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
5 mg/L 酵母エキス	5 mg/L 酵母エキス
10 mM PPB ^a (pH7.0)	10 mM PPB ^a (pH7.0)
0.2 g/L MgSO ₄	0.2 g/L MgSO ₄
10 mg/L CaCl ₂ ・2H ₂ O	10 mg/L CaCl ₂ ・2H ₂ O
0.5 g/L NaCl	0.5 g/L NaCl
微量金属水溶液	微量金属水溶液

a: potassium phosphate buffer

表 3. 本研究で使用する D-アミノ酸培地

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

結果 I

3 回の継代培養を経ても菌が増殖した温泉土壌と培地の組合せは 11 組だった（表 4）。これら 11 組の培養から得られた継代培養液のグリセロールストックを好熱菌菌叢とし、本報告書において表 4 に示す通り表記する。

表 4. 温泉土壌から培養した好熱菌菌叢

温泉土壌	培地	菌叢表記	温泉土壌	培地	菌叢表記
①	1G	①1G	⑥	1G	⑥1G
①	3G	①3G	⑥	2G	⑥2G
①	5G	①5G	⑥	3G	⑥3G
①	1A	①1A	⑥	5G	⑥5G
②	2G	②2G	⑥	1A	⑥1A
②	5G	②5G			

実験 II. D-アミノ酸を資化する可能性のある菌株の単離

実験 I で得られた 11 種の好熱菌菌叢グリセロールストックから、好熱菌を再度培養した時、菌叢⑥5G 及び⑥3G の濁度 (O.D.660 値) が特に高かった (データ省略)。そこで、本研究では菌叢⑥5G 及び⑥3G から、D-アミノ酸を資化する可能性がある菌を単離することとし、以下の実験操作をそれぞれ行った。

- 1) 菌叢を 5 mL D-AA 培地で 2 日間培養した。
- 2) 培養液の段階希釈 ($10^1 \sim 10^5$ 倍希釈) 液 100 μ L を 2%寒天で固化した D-AA 培地 (以下 D-AA 寒天培地) に塗布し、コロニーが現れるまで 55°C で 2~3 日間インキュベートした。
- 3) 形成されたコロニーから最多で 96 個を任意に選択し、D-AA 寒天培地と D-AA 寒天培地から D-アミノ酸のみを欠いた寒天培地 (以下、D-AA 欠損寒天培地) にそれぞれ植菌した。
- 4) その中から、D-AA 寒天培地で生育するが D-AA 欠損寒天培地では生育しないコロニーを選抜した。
- 5) 選抜したコロニーを 5 mL D-AA 培地で 2 日間培養し、濁度が最も高かった培養液を選抜した。
- 6) 2)~5)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 II

菌叢⑥5G からは、D-AA 寒天培地で生育するが D-AA 欠損寒天培地では生育しないという性質を示すコロニーが得られなかったため、目的の菌株の単離はできなかった。

一方、⑥3G からは D-AA 寒天培地でのみ生育するコロニーが得られ、目的菌株の単離操作を行うことができた。得られた菌株は AB1 とした。

実験 III. 単離菌株における D-アミノ酸資化性の検討

III-① D-アミノ酸が単離菌株の生育に与える影響

単離菌株 AB1 を、窒素源が D-Met である 3G 培地及び 3G 培地から D-Met のみを欠いた培地 (以下 D-Met 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 日間培養した。

結果 III-①

結果をまとめたものを図 1 に示す。3G 培地では濁度が上昇し、菌の生育が観察された。一方、D-Met 欠損培地では 4 日間濁度は上昇せず、菌の生育は観察されなかった。

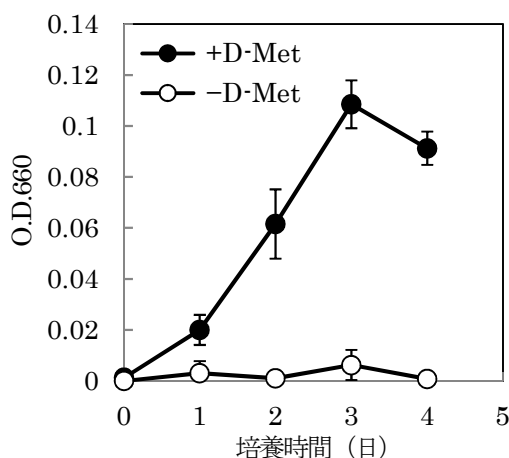


図 1. D-Met が AB1 の生育に与える影響 (n=4)

III-② 単離菌株培養液中の D-アミノ酸濃度変化

単離菌株 AB1 を 3G 培地で培養し、D-Met の濃度変化を調べた。寒天培地上のコロニーから 3G 液体培地 (5 mL) に植菌し、55°C で 4 日間培養した。その後、培養液中の D-Met 濃度を UHPLC にて分析した。

結果 III-②

結果を図 2 に示す。D-Met 濃度を AB1 培養前 (Control 1) と AB1 培養後と比較すると、AB1 の培養後に D-Met が有意に減少した。また、AB1 の植菌を行わずに、AB1 の培養と同様の条件 (55°C・4 日間) でインキュベートした 3G 培地 (Control 2) では、インキュベート前 (Control 1) と比べて D-Met の減少は殆ど無く、AB1 を培養した場合の方が有意に D-Met 濃度が低かった。

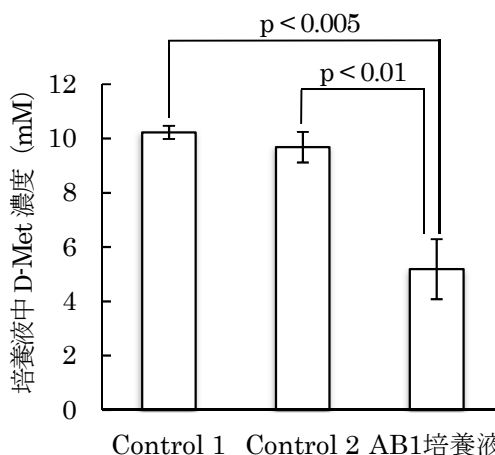


図 2. AB1 培養液中の D-Met 濃度変化 (n=4)

考察

実験 I では 6 種類の温泉土壌と 10 種類の D-AA 培地の計 60 種類の組合せで好熱菌の培養を試み、11 組の組合せで好熱菌菌叢を得ることに成功した。続いて実験 II では、奥小安峡大湯温泉の温泉土壌 (温泉土壌⑥) と D-Met を窒素源とする培地 (3G 培地) の組合せで培養に成功した菌叢⑥3G から、D-Met を資化している可能性が高い菌株 (AB1) を単離した。実験 III では、AB1 の D-Met 資化性について詳細に検討した。実験 III-①の結果から、本研究で用いた培養条件において AB1 の生育に D-Met が必要である事が示唆された。また、実験 III-②の結果から、AB1 が D-Met を異化している事が示唆された。これら 2 点から、AB1 が D-Met 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-Met 代謝関連酵素を有していることが強く示された。

これまでに、D-Met 代謝関連酵素として以下の 2 例が報告されている。1 つ目は、D-メチオニン-ピルビン酸アミノ基転移酵素であり、落花生とアブラナから見出されている。2 つ目は、緑膿菌から見出されたメチオニンラセマーゼであるが、これは細胞内での活性のみが報告されており、その活性を担う酵素は同定されていない。D-Met 代謝関連酵素の報告は上記したもののみであり、非常に少ない。本研究で見出した好熱菌 AB1 が D-Met 資化に利用している酵素は未だ不明であるが、今後同定されれば、学術的な価値の高い知見となる。また、好熱菌由来の D-Met 代謝関連酵素としては世界初の知見となる。さらに、D-Met を唯一の窒素源として生育できる微生物もこれまでに報告例が無く、AB1 の分類学的知見も非常に興味深い。

本研究では、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を見出すことを目的としていた。結果として、D-Met を資化する可能性が高い好熱菌株 AB1 を分離することに成功した。前述した通り、AB1 の分類学的同定、及び D-Met 代謝関連酵素の同定は、今後の興味深い課題である。また、培養に成功した好熱菌菌叢が⑥3G の他にも 10 組あり、これらの菌叢からも D-アミノ酸代謝関連酵素を有した好熱菌を単離できる可能性がある。以上のことから、本研究で得られた成果は今後の研究展開が多いに期待できるものであるといえる。