

令和元年5月15日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07868

研究課題名(和文) アルカリ化酵母とその酵素系による強酸性水圏中和の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of neutralization of acid environments by alkalization yeasts and their enzymes

研究代表者

浦野 直人 (Urano, Naoto)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：90262336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルカリ化酵母はアンモニウムを生成することで強酸性水を中和する能力を持つ。酵母を酸性・中性・塩基性水で培養したが、細胞内タンパク質の合成に大きな変化は無かった。また各pH下でアンモニウムを生成していた。中性～塩基性水になると、有機酸の生成能が高まった。酵母はアンモニウムと有機酸の生成量を変化させて、pHを調節していることがわかった。

アルカリ化酵母は酸性・中性・塩基性いずれの自然水圏にも生息していた。これらの酵母は酵母種がほぼ同一であり、酸性～塩基性のいずれの環境でも増殖可能な、広域pH耐性を持っていた。

固定化酵母により強酸性水を中和してアンモニウムを吸着するバイオリアクタを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本にはpH1-3の強酸性の第1級河川が幾つか存在する。こうした河川では魚介類が生息せず、農業用水や養殖水にも使用できない死の川と言われてきた。石灰投与による中和事業が進み、中和工場に下流からは、河川に中和水が流れるようになった。一方で石灰による2次汚染も発生して、あるレベルでの石灰耐性を持つ魚介類しか生息できない水圏環境となっている。

アルカリ化酵母は、アンモニウムイオンを生成することで強酸性水を中和する能力を持つ。当該酵母により強酸性水を中和して、過剰な窒素もアンモニウムイオンを吸着除去することで、環境に優しい中和が実現できる。本研究成果は生活水や農業用水の製造に利用可能と考えている。

研究成果の概要(英文)：Alkalinization yeasts have neutralizing activities of strongly acidified water by producing ammonium ions. The yeasts were cultivated in acid, neutral, or basic water and their protein biosynthesis in the cells changed little. The yeasts produced ammonium ions in each water. Production of organic acids by the yeasts increased in both neutral and basic water. Therefore, they were found to regulate pH by changing the productions of ammonium ions and organic acids according to environmental pH.

Alkalinization yeasts were found to live in natural acid, neutral or basic environments. The yeast species were almost same, had broad range of pH tolerance, and lived in the environments from acid to basic.

Continuous neutralization of strongly acidified water and removal of surplus ammonium ions were attained by a bioreactor with immobilized yeasts and zeolite.

研究分野：環境微生物化学

キーワード：酵母 強酸性水 中和 pH耐性 分子機構 酵素

1. 研究開始当初の背景

日本は火山が多いため強酸性泉が各地に点在している。例えば秋田県の玉川温泉(pH 1.2)や群馬県の草津温泉(pH 2.1)があり、玉川温泉が流入する玉川上流域は塩酸性河川、草津温泉と白根山の鉦山廃水が流入する吾妻川上流は硫酸性河川が形成されている。これらの強酸性水圏では魚介類や水棲植物などの生息が見られず、周辺住民が河川水を農業用水や生活用水として使用することが難しい上、鉄やコンクリートまでもが短期間で劣化するなどの諸問題が生じる。1940年、玉川水を田沢湖に流入させたため、湖全体が酸性化して漁獲高や農作高が激減し、とりわけ天然記念物のクニマスが絶滅するなど、酸性水による負の影響が拡大した。戦後、秋田県や群馬県では酸性水の改善策として、河川上流域に石灰の投入工場を建設して、河川水の中和事業を開始した。その結果、中和地点より下流ではpHが上昇して、一部の魚介類の生息が認められるようになったが、クニマスなど石灰に対して敏感な生き物の田沢湖での回帰は、今日まで報告されていない。

筆者は河川の中和地点前後の微生物調査を中心に環境モニタリングを試みた。中和地点上流の強酸性河川中では酵母群が主たる微生物相を形成していること、中和地点下流の中和水の主たる微生物相は一般河川と同様に細菌群であることがわかった。また、中和点前後から単離した酵母は全て酸性培地(pH1-3)で増殖し、耐酸性能を持つことが確認された。これらの耐酸性酵母中からアルカリ化酵母(アンモニウムイオン NH_4^+ を放出して強酸性水を中和する活性を持つ酵母)を発見した。また、強酸性河川水は当然のこと、石灰による中和河川水も、飲料水や生活水、農業・養殖などの産業水としての使用は困難である。そこで、筆者は強酸性水の有効利用を目指して、アルカリ化酵母による環境に優しい中和水の製造を試みた。

2. 研究の目的

強酸性水圏由来の耐酸性酵母の中に存在するアルカリ化酵母は、酸性環境下でバイオフィーム等を形成し自らの細胞周囲を中和する生存戦略を持っている可能性が高い。アルカリ化酵母はアミノ酸のアミノ基を切断して NH_4^+ を生成することで酸性水を中和しているが、その機構の詳細は不明である。特に、強酸性環境をもたらす酸は硫酸、塩酸など異なっているため、酵母の中和活性に及ぼす酸種の影響を解析する。また、酵母が酸性水中で誘導させるタンパク質やアミノ酸を解析して、アルカリ化酵母の中和機構を分子レベルから解明することを目的とする。

次に、アルカリ化酵母は強酸性水圏にて発見されたが、中性水圏や塩基性水圏に生息するか否かは不明であった。そこでアルカリ化酵母の中性及び塩基性水圏での生態を解明して、当該酵母が中和活性を持つことの意義を解明する。

最後に、アルカリ化酵母を利用した強酸性水の中和を試みる。草津地方など強酸性水が存在する環境はアルミニウムイオン等が高濃度に含有していて、微生物活性を阻害している。そこで、アルミニウムイオンの影響を最小限にて、アルカリ化酵母が生成する NH_4^+ が環境にとって有害でないレベルに低減しつつ、中和水を連続生産するバイオリアクターの構築を試みる。

3. 研究の方法

- (1) 中和活性に及ぼす酸種の影響
無機酸(硫酸、塩酸、硝酸、リン酸)や有機酸(酢酸、乳酸、クエン酸、プロピオン酸、ギ酸)でpH3.0~4.5下におけるアルカリ化酵母による中和活性を解析した。
- (2) 培養pHによる細胞内タンパク質・アミノ酸の変化
アルカリ化酵母を酸性(pH3.0)、中性(pH6.5)の環境下で培養した際に、細胞内で誘導されるタンパク質とアミノ酸の変化を解析した。
- (3) 水圏環境からのアルカリ化酵母の単離
酸性水圏から単離されたアルカリ化酵母の生態を調べるため、中性水圏と塩基性水圏において、アルカリ化酵母の単離を行った。
- (4) 中和リアクターの構築
アルカリ化酵母を固定化してカラム充填し、酸性水の連続中和バイオリアクターシステムを構築した。

4. 研究成果

- (1) 中和活性に及ぼす酸種の影響
無機酸(硫酸、塩酸、硝酸、リン酸)や有機酸(酢酸、乳酸、クエン酸、プロピオン酸、ギ酸)で、pH3.0~4.5下におけるアルカリ化酵母による中和活性を解析した。硫酸・硝酸・リン酸(図1)及び塩酸などの無機酸では、アルカリ化酵母の中和活性に及ぼす酸種の影響は無かった。クエン酸(図2)・乳酸(図3)・酢酸(図4)及びプロピオン酸・ギ酸で、pH3.0~4.5下におけるアルカリ化酵母の中和活性は酸種により大きく影響を受けた。
細胞外で有機酸のカルボキシル基が解離して、カルボキシルイオンが細胞膜に吸着して、細

胞内 pH を低下させて酵母を死滅させる、そして各有機酸の解離度は pH により異なるため、アルカリ化酵母の中和活性に影響を及ぼすと考えられた。

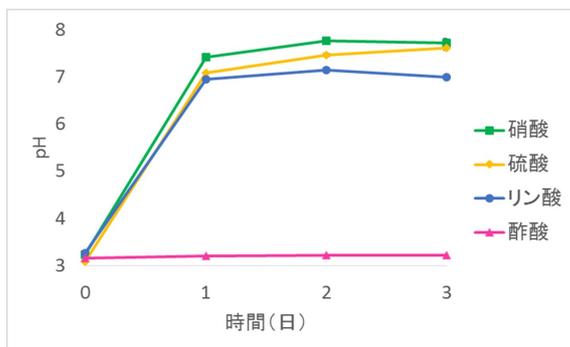


図 1 各種酸(pH3.0)の中和試験

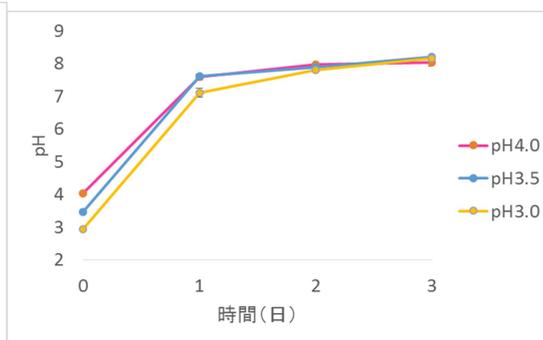


図 2 クエン酸の中和試験

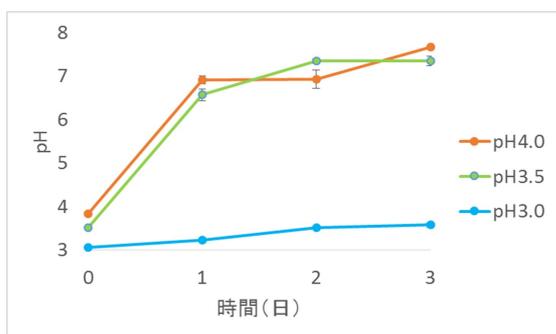


図 3 乳酸の中和試験

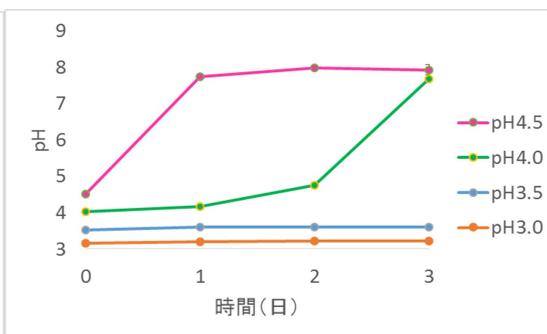


図 4 酢酸の中和試験

(2) 培養 pH による細胞内タンパク質・アミノ酸の変化

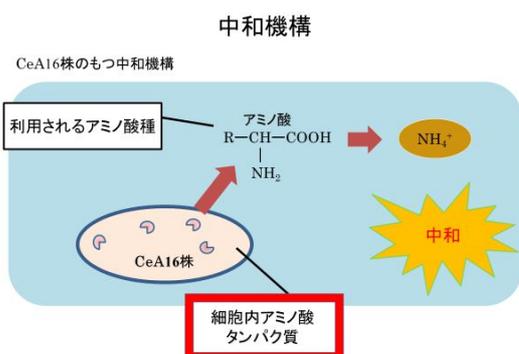


図 5 アルカリ化酵母による中和機構

カザミノ酸溶液の pH 変化

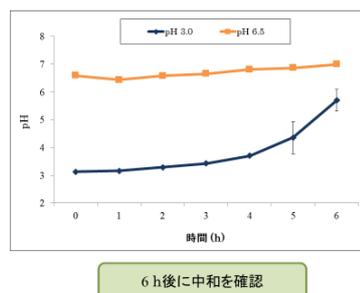


図 6 カザミノ酸溶液の中和

細胞内アミノ酸濃度の変動

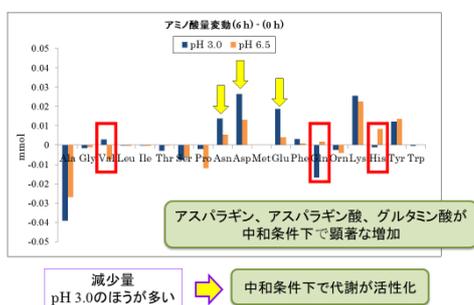


図 7 細胞内タンパク質に及ぼす pH の影響

細胞内タンパク質の SDS-PAGE

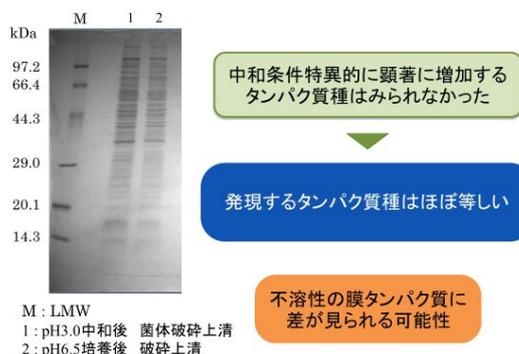


図 8 細胞内アミノ酸に及ぼす pH の影響

アルカリ化酵母はカザミノ酸 (アミノ酸) のアミノ基を切断して、 NH_4^+ を生成することで酸性水を中和する (図 5)、pH 3.0 下でのカザミノ酸液は 6 時間後の pH が 6 近傍まで上昇したが、pH 6.5 下では pH 上昇がほとんど無かった (図 6)。

pH3.0 と pH6.5 のカザミノ酸溶液で培養後の細胞内タンパク質を電気泳動解析した (図 7)。2つの泳動パターンに差が無く、pH3.0 下でも特殊なタンパク質が発現して、pH の上昇に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

次に各培養液下における細胞内アミノ酸の変動を調べた (図 8)。特に pH6.5 下でアスパラギン酸 Asp とグルタミン酸 Glu の蓄積が顕著であった (図 9)。そこで Asp と Glu を添加して培養したところ、pH6.5 液の pH 上昇が抑制されることがわかった。

以上の結果から、アルカリ化酵母は酸性下で特定タンパク質を誘導して、NH₄⁺を生成するのでは無く、酸性下~中性下のいずれでも NH₄⁺を生成するが、中性下では Asp/Glu を細胞内に蓄積することで、pH 上昇を抑制している可能性が高いと考えられる (図 10)。

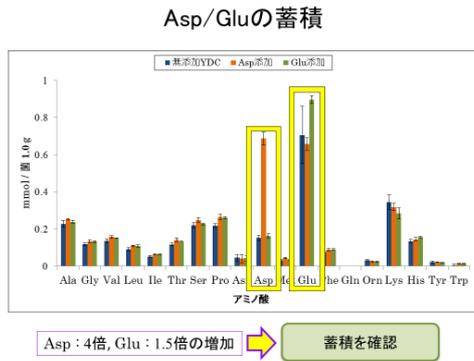


図 9 pH6.5 における Asp/Glu の蓄積

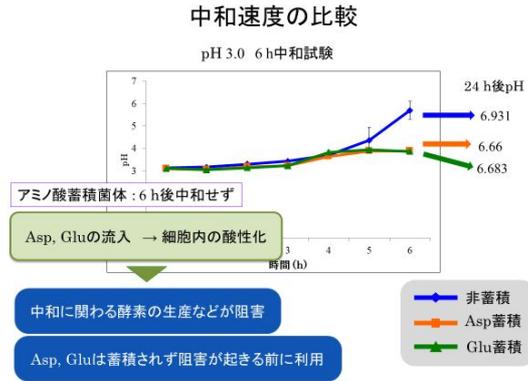


図 10 Asp/Glu 添加が pH 上昇に及ぼす影響

(3) 水圏環境からのアルカリ化酵母の単離

株名	種名	相同性(%)
r-w2,3,4, fi-m10	<i>Aureobasidium pullulans</i> 7R-1-F01など	100
om-w41	<i>Auriculibuller</i> sp. BI111	99
ks-w31	<i>Bullera alba</i> MUT-CITA>5528など	100
h-m7	<i>Candida parapsilosis</i> CBS:11059など	100
n-w33	<i>Candida oleophila</i> MBI410	100
so-w34	<i>Candida cylindracea</i> VTT C-04529など	100
h-m8	<i>Candida</i> sp. ELP19	100
om-w46	<i>Candida</i> sp. BG02-5-30-009A-1	100
ko-w20	<i>Cryptococcus</i> sp. T1	100
om-w42	<i>Cryptococcus</i> sp. CBS 8369	100
m-m25, n-w28	<i>Cryptococcus flavescens</i> ATCC MYA-4951など	100

株名	種名	相同性(%)
mi-w16	<i>Filobasidium magnum</i> CBS:140など	100
sm-w38	<i>Hannaella coprosmae</i> JS00600	100
mi-w17	<i>Hannaella pagnoccae</i> LC077など	100
mr-w1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CBS:2077など	100
sm-w40	<i>Microbotryozyma collariae</i> ATCC MYA-4666	100
sm-w37	<i>Pseudozyma antarctica</i> ATCC 28323など	100
sm-w39	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> CBS:6389	100
om-w44	<i>Papiliotrema flavescens</i> JCM 28610など	100
si-w12,13	<i>Rhodotorula</i> sp. KCTC 17091	100
	<i>Leucosporidium golubevii</i> PYCC 5759T	100
n-w29	<i>Rhodotorula</i> sp. GY23L16	100

表3 塩基性水圏由来のアルカリ化酵母の菌種同定①

株番号	種名	相同性
N1~N6、N9、K1、K3~K19	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%、99%
N7	<i>Rhodospiridium fluviale</i>	100%
N8	<i>Scheffersomyces spartinae</i>	100%
N10、N13	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100%
N11	<i>Cyberlindnera saturnus</i>	100%
S1	<i>Candida</i> sp.	100%
S2、S4	<i>Candida intermedia</i>	100%
S3	<i>Candida quercuum</i>	99%
K6	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	100%

表4 塩基性水圏由来のアルカリ化酵母の菌種同定②

株番号	種名	相同性
N1~N6、N9、K1、K3~K19	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%、99%
N7	<i>Rhodospiridium fluviale</i>	100%
N8	<i>Scheffersomyces spartinae</i>	100%
N10、N13	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100%
N11	<i>Cyberlindnera saturnus</i>	100%
S1	<i>Candida</i> sp.	100%
S2、S4	<i>Candida intermedia</i>	100%
S3	<i>Candida quercuum</i>	99%
K6	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	100%

横浜市周辺の中性水圏からアルカリ化酵母を単離することができた。それらの菌種同定を行ったところ、多様性に富んでいた (表 1, 2)。黄色の細菌は以前に私が強酸性水圏から単離した株であり、酸性水圏と中性水圏で同一種が生息していた。

中性水圏由来のアルカリ化酵母の中和活性は、酸性水圏由来の酵母のそれと大きな差がなかった。よって、アルカリ化酵母は酸性~中性環境に生息している。中性条件下では大きな特徴を示さないが、酸性条件下に置かれると中和活性を発揮して、自らの細胞を保護して生存しているものと推定された。

塩基性水圏由来にアルカリ化酵母の菌種は、酸性水圏や中性水圏由来のそれと類似していた (表 3, 4)。よって、アルカリ化酵母は酸性~中性~塩基性の水圏にまたがって広く生息していることがわかった。次にアルカリ化酵母の増殖に及ぼす pH の影響を解析したところ、アルカリ化酵母は広域 pH 耐性を持っていることがわかった (図 11)。またアルカリ化酵母は塩基性下では、

リンゴ酸やクエン酸を細胞外へ放出して、pHの増大を抑制していることがわかった(図12)。

アルカリ化酵母pH依存性試験

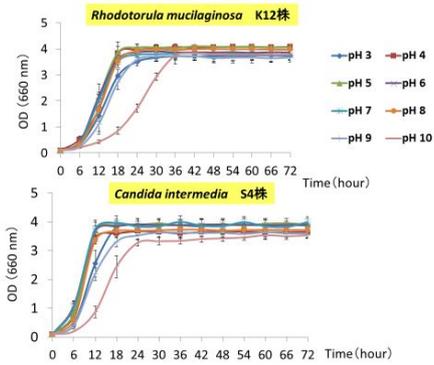


図11 アルカリ化酵母の増殖に及ぼすpHの影響

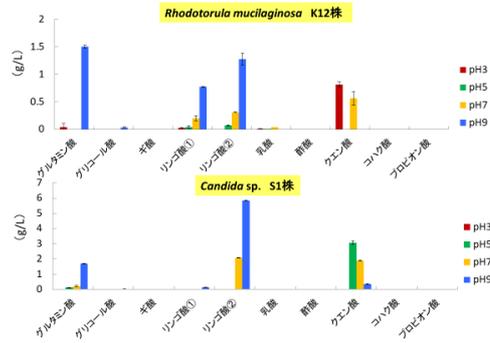


図12 有機酸生成に及ぼすpHの影響

(4) 中和リアクターの構築

酸性水中用バイオリアクターを構築した。特に吾妻川流域はアルミニウムイオン濃度が高いため、第1リアクター(ゼオライト)によりアルミニウムイオンを低減化した。中和後の第3リアクター(ゼオライト)により、NH₄⁺を低減化した(図13)。アルカリ化酵母は生菌体だけでなく、菌体酵素系でも強酸性水の中和バイオリアクターを構築することができた(図14)。

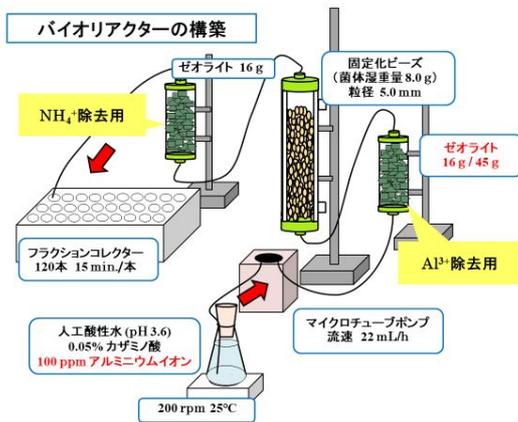


図13 強酸性水中用バイオリアクター

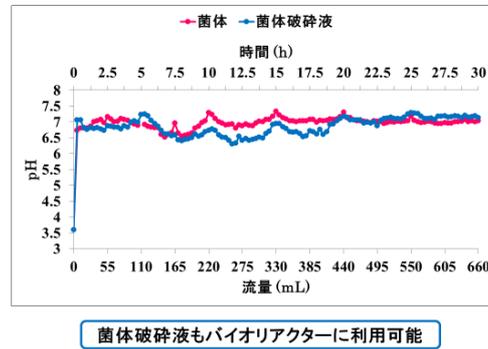


図14 菌体酵素系バイオリアクター

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件) 注: 1-5 は査読有り、6 は査読無し

1. D. Mitsuya, T. Hayashi, Y. Wang, M. Tanaka, M. Okai, M. Ishida, N. Urano, Isolation of Aquatic Yeasts with the Ability to Neutralize Acidic Media, from an Extremely Acidic River near Japan's Kusatsu-Shirane Volcano. Journal of Bioscience and Bioengineering, 124(1), 43-46 (2017.7)
2. M. Okai, C. Suwa, S. Nagaoka, N. Obara, D. Mitsuya, A. Kurihara, M. Ishida, N. Urano, Neutralization of Acidic Drainage by *Cryptococcus* sp. T1 Immobilized in Alginate Beads. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 81(11), 2216-2224 (2017.12)
3. S. Nagaoka, T. Kobayashi, Y. Kajiwar, M. Okai, M. Ishida, N. Urano, Characterization of Yeasts Capable of Neutralizing Acidic Media from Natural Environment. Advances in Microbiology, 7, 887-897 (2017.12)
4. N. Urano, A. Shirao, T. Naito, M. Okai, M. Ishida, Molecular Phylogeny and Phenotypic Characterization of Yeasts with a Broad Range of pH Tolerance Isolated from Natural Aquatic Environments. Advances in Microbiology, 9, 56-73 (2019. 1)
5. S. Nagaoka, Y. Kajiwar, S. Toyama, M. Okai, M. Ishida, N. Urano, Effect of Acid Species on *Cryptococcus* sp. T1 and Construction of Its Bioreactor System for Continuous Neutralization of Acidic Media. Advances in Microbiology, 9, 74-86 (2019. 1)
6. 浦野直人, 長岡真太郎, 岡井公彦, 強酸性環境を中和する酵母, 科学・技術研究, 7(1), 27-33(2018.6)

[学会発表](計 3 件)

1. 長岡真太郎, 白尾文香, 石田真巳, 浦野直人, 鈴木耕太郎, 武井俊憲, 森本雅志, 高塩

- 仁愛、ストレス耐性酵母に関する研究 4：水圏由来の pH 耐性酵母の単離解析
平成 30 年度日本水産学会春期大会講演要旨集、p74(2018.3)
2. 梶原優子、長岡真太郎、岡井公彦、石田真巳、浦野直人、強酸性水圏由来微生物に関する研究 12：アルカリ化酵母による強酸性水中和システムに及ぼすアルミニウムイオンの影響、平成 30 年度日本水産学会春期大会講演要旨集、p147(2018.3)
 3. 長岡真太郎、梶原優子、岡井公彦、石田真巳、浦野直人、強酸性水圏由来微生物に関する研究 11：アルカリ化酵母による酸性水中和の分子機構解析、平成 30 年度日本水産学会春期大会講演要旨集、p148(2018.3)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：石田 真巳

ローマ字氏名：Ishida Masami

所属研究機関名：国立大学法人 東京海洋大学

部局名：海洋環境科学部門

職名：教授

研究者番号(8桁)：80223006

研究分担者氏名：岡井 公彦

ローマ字氏名：Okai Masahiko

所属研究機関名：国立大学法人 東京海洋大学

部局名：海洋環境科学部門

職名：助教

研究者番号(8桁)：00596562

(2)研究協力者 無し

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。