

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640138

研究課題名(和文)イオン強度勾配を利用した新規スクリーニング法の構築

研究課題名(英文)Construction of novel screening method utilizing ionic strength gradient

研究代表者

三浦 健 (Miura, Takeshi)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：20416001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マリアナ海溝底泥コアサンプル(YK09-08)を粉末濾紙カラムを用いて、酸・中・アルカリ性緩衝液、塩濃度6 Mまで段階的に上げて分取した。その分取液をMarine Agar 2216に塗布し、25℃で14日間培養した。その結果、異なるイオン強度で明らかに異なるコロニーが出現し、733株の単離・保存に成功した。また、異なるpHと塩濃度において、同程度のイオン強度で分離した株のコロニー形状が似ていた株の中には、同様の菌体外酵素産生株も見出せた。本研究より、緩衝液の種類や塩濃度の組み合わせの違いで取得できる微生物の違いが見られたことから、イオン強度によって分離できる微生物が異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We obtained 30 cm of sediment cores from Mariana Trench at a water depth of 10,900 m. A column (1×1 cm) of powder filter paper was washed with 100 mM sodium acetate buffer (pH4), Tris-HCl (pH7), CHES buffer (pH9). The core sediments suspension with sterilized buffer was applied to the column. The column was eluted with a continuous linear gradient of 0-6 M NaCl in sodium acetate buffer (pH4), Tris-HCl (pH7), CHES buffer (pH9). A dilution series of all fractions with sterilized beffer was spread onto a Marine Agar 2216 (pH7) plate, and they were incubated at 25℃ for 2 weeks. In the relationship between cultivable cell numbers and pH, the cultivable cell numbers were lower at pH4 in any agar plates than at pH7 and pH9, while the cultivable cell numbers decreased against the increase of NaCl concentration (ionic strength). With this result, many new microorganisms by utilizing the difference in ionization degree showed the potential to be isolated.

研究分野：応用微生物学

キーワード：イオン強度 新規スクリーニング法 マリアナ海溝底泥コアサンプル

1. 研究開始当初の背景

多くの研究で、土壌サンプルなどから DNA 抽出し遺伝的解析 (メタゲノム) により、新規微生物の存在が明らかになったとしても、全ての微生物が分離できていない。また、我々の研究室においても、直接、サンプルから微生物の存在を示す酵素活性と生菌数 (CFU) の算定結果とが一致しないことがあった。さらに、サンプルの前処理の違いで、明らかに異なるコロニーが観察された。これまでに、未知生物圏であるマリアナ海溝底泥コアサンプル (深度 10,900 m、30 cmbsf : cm below seafloor) (YK09-08) を用いて、pH (4, 7, 10) と NaCl 濃度 (0, 1.5, 3.0%) で前処理したものを 30 で寒天培養した結果、前処理の違いで、多数の優占種株のコロニーのみが観察できたものや少数の劣勢種株のコロニーのみ観察されたものがあった。さらに駿河湾沖の地殻内コアサンプルを用いた場合でも同様な結果が観察された。この様な結果により、「**微生物と土壌粒子間に様々な結合力が生じていること**」に着目した (図 1)。

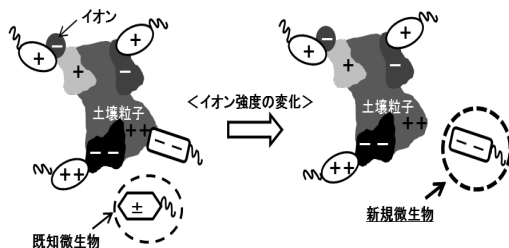


図 1 微生物と土壌粒子との結合仮説図

2. 研究の目的

地球上に存在する未発見な微生物を資源として有効利用する必要がある。現在、99%の微生物が未発見である。その微生物を分離するためには、新規スクリーニング法の開発が不可欠である。従来のスクリーニング法は培養条件だけに着目されてきた。しかし、未知生物圏であるマリアナ海溝底泥コアサンプルや駿河湾地殻内コアサンプルや駿河湾沖地殻内コアサンプルを用いて、前処理条件

の違い (pH や NaCl 濃度) で、異なる微生物が分離された。そこで、詳細な条件下でサンプルを前処理し、イオン強度の違いを利用した新規スクリーニング法を構築し、未知能力を有する新規微生物資源をスクリーニングすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イオン強度の違いにより微生物を分離

低温条件下で、粉末濾紙を用いて、カラム内に目の大きさの異なる 3 種類の層を作製した後、4 種類のマリアナ海溝底泥コアサンプル 0.1 g を人工海水 1 ml に懸濁して粉末濾紙上に重層した。前処理液として、100 mM 酢酸緩衝液 (pH4)、Tris-HCl 緩衝液 (pH7) および CHES 緩衝液 (pH9) を調整し、塩濃度 0~6 M まで徐々に上げて分取した。装置の概要を図 2 に示した。底泥コアサンプルを海底から 10 cm ごとに 4 区画 (Top、Top1cm、Middle、Bottom) に区分した。

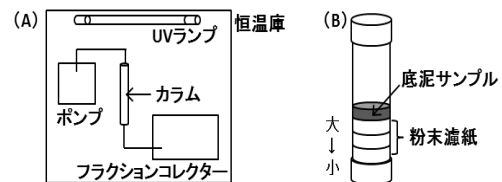


図 2 装置 (A) とカラム (B) の概要

分取した全てのフラクションを用いて、 10^{-1} 倍ずつ 5 段階希釈し、Marine Broth 2216 (Difco) 寒天培地 (pH7) に塗布し、25 で 14 日間培養した。その結果、出現したコロニーの大きさ、色、形を観察し、異なるコロニーを分離・純化した。さらに分取液の伝導率を測定し、同じ電離度 (伝導率) における単離株の比較を行なった。

培養条件を変化させることで、条件に合う優占種株だけが増殖する。そして、これまでのスクリーニングの際、劣勢種株が無視されていたが、1 株を分離せず、数菌株の混系でグリセロール保存をすることで多くの有用微生物資源の保存にもなる。そこで、全て

のフラクションの一部を-80 でグリセロール保存した。

(2) 分離株の諸性質(酵素生産能)の検討

工業的利用を考慮して、セルロース(CMC)・デンプン・スキムミルク等を炭素源とした Marine Broth 2216寒天培地に、分離株を穿刺し、プレートアッセイ法で検出する。コロニーの周りにハロー形成が見られたものを酵素生産(セルラーゼ・アミラーゼ、プロテアーゼ等)微生物とした。

(3) イオン交換担体を用いた菌株が有する

伝導率の比較

カラムに陽イオン交換樹脂 SP-650M(東ソー)または陰イオン交換樹脂 SuperQ-650M(東ソー)を緩衝液により平衡化し充填後、細胞膜の組成が異なるグラム陽性細菌(*Bacillus subtilis* NBRC3134)、グラム陰性細菌(*Escherichia coli* NBRC3972)を添加し、NaCl濃度勾配(0~6 M)において分取した。分取したフラクションを用いて、 10^{-1} 倍ずつ5段階希釈し、NBおよびLB寒天培地に塗布し、コロニーの出現が見られたフラクションより伝導率を測定した。さらに、マリアナ海溝底泥コアサンプル由来の菌株において、伝導率と特徴的なコロニーの色を考慮し、グラム陽性菌である Top pH7 <15>株とグラム陰性菌である Top pH7 <5>株も同様な条件で行った。

4. 研究成果

(1) イオン強度の違いにより微生物を分離

全ての底泥コアサンプルにおいて、前処理液を pH7 と pH9 した場合、多くのコロニーが出現し、pH4 では少なかった。また、pH に関わらず、塩濃度を上昇させると減少した。底泥コアサンプル Top(海底)と Bottom(海底より 30 cm)において、pH7 と pH9 で処理した場合、塩濃度 1.55 mM までは徐々に出現した

コロニー数は減少したが、1.72 mM のみで同一コロニーが大量に出現した。

また、各コアサンプルから様々な色、形状をしたコロニーを選抜し、合計 733 株(pH4: 65 株、pH7: 303 株、pH9: 365 株)の単離に成功した。異なる pH と塩濃度で単離した菌株において、特定の電離度で黄色の極小コロニーや白色の花形コロニーが出現するなど、形態が同じコロニーが、唯一同程度の伝導率でそれぞれ観察できた。

(2) 有用酵素生産能の検出

単離した菌株の酵素生産能を検出した結果、733 株中 385 株が酵素を産生しており、160 株がプロテアーゼ、200 株がアルギン酸リアーゼ、188 株がアミラーゼなどを産生していた。CMCase など他の酵素産生株や、3 種類以上の酵素を産生した菌株も見出すことができた。異なる pH と塩濃度において、同程度の電離度で単離したコロニーの形態が似ていた菌株の中には、同様の酵素を産生している菌株が見出すことができた。このことから、これらの菌株は同一のものである可能性が高いと示唆された。

本研究より、使用する緩衝液の種類や塩濃度の組み合わせの違い(電離度)によって取得できる微生物や酵素生産能に違いが見られたことから、単離できる菌株が異なることが示唆された。

(3) イオン交換担体を用いた菌株が有する

伝導率の比較

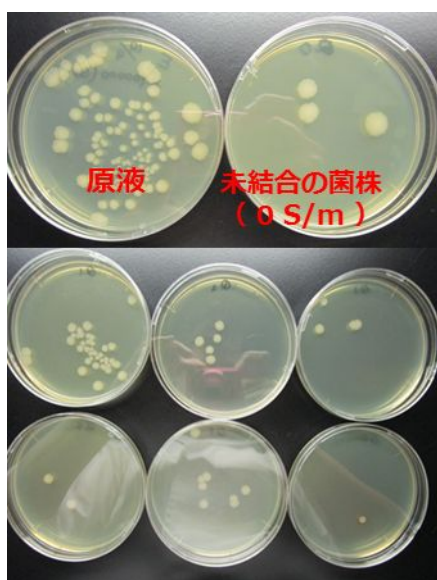
標準菌株での検討

E. coli NBRC3972 においては、陽イオン交換樹脂よりも陰イオン交換樹脂の方が全コロニー数は多かった。しかし、未結合の菌株は陽イオン交換樹脂の方が多かった。この結果より、*E. coli* NBRC3972 は帯電していないか、若干負に帯電している可能性がある(図 3A)。一方、*B. subtilis* NBRC3134 においては、陰イ

オン交換樹脂においては伝導率が 1.92 S/m 未満ではコロニーが出現しなかった (図 3B)。一方、陽イオン交換樹脂では、送液開始直後からコロニーが出現した。よって、*B. subtilis* NBRC3134 は負に帯電している可能性がある。

これらのことから、伝導率によってグラム陰性菌とグラム陽性菌は別々に単離できることが示唆された。

A : *E. coli* NBRC3972



B : *B. subtilis* NBRC3134

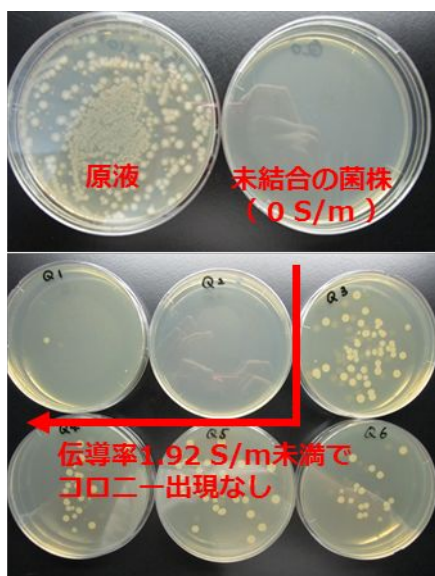


図 3 菌株のイオン交換樹脂との結合

マリアナ海溝由来の菌株での検討

Top pH7 <15> 株においては、全体のコロニー数は陰イオン交換樹脂の方が陽イオン交換樹脂よりも多かった。しかし、未結合の菌株は陽イオン交換樹脂の方が多かった。また、Top pH7 <5> 株においては、陰イオン交換樹脂で伝導率が 2.4 S/m 未満ではコロニーが出現しなかった。よって、Top pH7 <15> 株は若干負に帯電しており、Top pH7 <5> 株は負に帯電している可能性が示唆された。

また、どちらの菌株も陽イオン交換樹脂では伝導率が 5.5 S/m より高くなるとコロニーが出現しなかった。しかし、CHES 緩衝液 (pH9) を送液した結果、コロニーが再度出現するようになった。このことから、この 2 株は一部分のみ正に帯電している可能性が示唆された。これは菌株の膜タンパク質、または細胞表層のタンパク質が pH7 の条件下では正に帯電していたためと示唆された。

本実験より、微生物と土壌粒子の間には電荷が生じ、結合していることが示唆された。さらに同じグラム陰性菌でも結合する力に強弱があることから、電離度を細かく変えることにより、劣勢種の新規微生物の取得が出来ることと示唆された。

10 S/m 以上で取得した Top pH7 <15> 株 (*Williamsia muralis*) (0 S/m) と Top pH7 <5> 株 (*Erythrobacter vulgaris*) (2.4 S/m) の近縁株において、イオン交換樹脂で伝導率を測定したところ、取得した電離度と異なる結果となった。本研究において、微生物によって帯電の違いがあること、微生物が土壌粒子間にタンパク質などを介して結合していることが示唆された。そこで、伝導率を変化させることで、新規微生物をスクリーニングできる可能性が示唆された。

<引用文献>

上田 千尋、渡辺 文寿、小林 徹、三浦 健、マリアナ海溝底泥コアを用いた新規スク

リーニングの構築、第 14 回極限環境生物学会年会、要旨 p.123-124

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

中野 栞、渡邊 彬宏、小林 徹、三浦 健、伝導率の違いを利用した微生物のスクリーニング法の検討、日本農芸化学会 2016 年度大会、平成 28 年 3 月 27 日～3 月 30 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 健 (MIURA, Takeshi)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：20416001

(2) 研究協力者

渡邊 彬宏 (WATANABE, Akihiro)

中野 栞 (NAKANO, Shiori)

小林 徹 (KOBAYASHI, Tohru)