

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月10日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14884

研究課題名(和文) 高温高アルカリ環境で機能する新規微生物酸化還元・電子伝達機能の探索と開発

研究課題名(英文) Development of novel microbial oxidation-reduction/electron transferring function acting under high temperature and high alkaline conditions

研究代表者

小川 順 (Ogawa, Jun)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70281102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高温・高アルカリの藍染工程から、硝化脱窒や酵素電池などに有用な酸化還元反応に優れた微生物の単離を行い、得られた菌株の酸化還元機能を評価した。新たに構築した定量評価法を用い、154株の藍染工程分離株から10株の高活性菌を選抜した。最も高い活性を示したAlkalibacterium sp. SH2-1株は、既報の微生物よりも高い活性を示し、電子供与体・グルコースの存在下にて、メディエーターに依存しない直接電子移動による活性を示した。また、藍葉に含まれるemodinをはじめ、アントラキノン化合物がメディエーターとして効率的に機能した。また、植物体としての藍を効率よく分解する微生物を取得した。

研究成果の概要(英文)：From indigo dyeing process of high temperature/high alkali, isolation of microorganisms with potential oxidation-reduction reactions useful as tools such as nitrification denitrification and enzyme batteries was carried out. Then, the evaluation and analysis of the selected redox function were performed. The quantification method of indigo reducing activity was constructed and indigo reducing bacteria were screened. Ten indigo reducing bacteria were obtained from 154 strains isolated from indigo dyeing sample. Selected Alkalibacterium sp. SH2-1 strain had higher activity than known indigo reducing bacteria. SH2-1 reduced indigo directly without mediators with the presence of glucose as an electron donor. Some anthraquinone derivatives including emodin, a natural anthraquinone in the leaf of Persicaria tinctoria, were found to act as mediator for the indigo reduction by SH2-1. Some microorganisms with P. tinctoria degrading activity were also isolated.

研究分野：応用微生物学

キーワード：電子伝達 インジゴ 藍染

1. 研究開始当初の背景

持続可能な社会の実現のために、物質循環やエネルギー問題の解決は重要な課題である。物質循環では、炭素循環に続いて窒素循環が注目されつつあるが、高温や高アルカリといった特異な環境においては窒素循環が止まるため、特異な環境でも窒素循環可能な微生物群の取得が求められている。また、エネルギー問題の解決策の一つとして微生物燃料電池が注目されている。作成上アルカリ条件が望ましいことから、アルカリ条件で電極へ電子を伝達できる微生物の取得およびアルカリ条件で電極の電子を酸素へ渡す酸化酵素の取得が求められている。そこで、高温・高アルカリで有機物の無機化、高アルカリでインジゴ還元を行う“藍染め”に着目した。

高温・高アルカリという特異な環境での有機物無機化に関して報告例はない。申請者らは、窒素循環に着目し、有機物から無機窒素への変換(硝化)について微生物叢の機能解析を行ってきた。藍染めに関与する微生物群は、高温・高アルカリ条件下で有機物を無機化することから、特異な環境においても窒素循環する新規な微生物群を取得できると期待できる。また、その微生物群から高温・高アルカリ条件で機能する酸化酵素群(ラッカーゼ等)の取得が期待できる。

インジゴの還元については古くから研究されており、最近では、インジゴ還元菌として *Gracilibacillus* や *Amphibacillus* 等が同定されており、インジゴ還元微生物叢が相補的に作用し、安定的にインジゴを還元できることが明らかにされている。一方、申請者らが色素還元菌として取得した *Shewanella* は、効率的に電子を電極へ渡す菌として広く用いられている。インジゴ還元微生物群は、*Shewanella* と同様に色素を還元することから、安定的に電極へ電子を伝達すると期待される。

2. 研究の目的

藍染めに関与する複合微生物系は、高温・高アルカリ条件下において、電子伝達が関与した酸化反応(有機物の無機化)および還元反応(インジゴの還元)を行うユニークな特性を有している。本研究では、藍染めに関与する複合微生物系を活用し、高温高アルカリで機能する新規な硝化プロセスの構築および微生物燃料電池の構築を目指す。

(1) 硝化プロセスの構築

高温・高アルカリ下で有機物を無機化する微生物叢の機能解析と新規な硝化プロセスの構築に取り組む。高温・高アルカリという特異な環境における菌相変化を、窒素動態と関連付けて明らかにする。また、高温・高アルカリ下の有機物を無機化する微生物群

を取得し、高温高アルカリで機能する新規な硝化プロセスを構築する。

(2) 微生物燃料電池の構築

高アルカリ条件でのインジゴ還元菌の電極への電子伝達能の評価と微生物燃料電池への応用に取り組む。インジゴ還元を行う微生物群やその単離菌を用い、0 mV (vs Ag/AgCl) を印加した時の電流値を測定することで電極への電子伝達能を評価する。さらに、取得した電子伝達能が高い菌や微生物群を用い、高アルカリ微生物燃料電池を作成する。

本研究の特色は、高温高アルカリで機能する微生物の「微生物群」としての機能に着目している点である。高温高アルカリ下でも機能するため、コンタミしにくい硝化プロセスを構築できる。また、高アルカリで機能する微生物燃料電池の報告はないことから、新規な微生物燃料電池を構築できる。さらに、高温高アルカリ環境で機能する酸化還元・電子伝達する酵素群は、様々な環境で活性を保持できることから、電極表面における酸化能を有する固定化酵素としての幅広い応用が可能となる。

3. 研究の方法

藍染めに関与する有機物無機化微生物群・インジゴ還元微生物群を取得する。有機物無機化に伴う窒素動態と微生物叢変化の関係を明らかにし、高温高アルカリ環境で機能する硝化プロセスを構築することで、既存の硝化プロセスとの違いを明らかにする。また、有機物無機化過程の微生物叢変化とインジゴ還元の関係性を明らかにすることで、窒素循環可能な微生物燃料電池として利用できるか検討する。また、インジゴ還元微生物叢の細胞外電子伝達能力を、電極への電子伝達能力として評価し、高活性な菌株を用いた高温高アルカリ環境で機能する微生物燃料電池を作成する。

4. 研究成果

日本の伝統産業である藍染めは、タデアイの葉に含まれる色素を染料とした染色方法で、染色液を作る際に微生物を利用することから本過程は藍の発酵建てと呼ばれる。

藍色成分であるインジゴは、タデアイの葉に含まれるインジカンがβ-グルコシダーゼによりインドキシルへ分解された後、葉の乾燥過程で酸化的にカップリングすることで生成し、乾燥葉中に蓄えられる。乾燥葉中のインジゴはそのままでは水に抽出することができないが、微生物により乾燥葉の植物組織が分解されることで“すくも”という原料になりインジゴの水への抽出が可能となる(図1)。

藍の発酵建てにおいて、藍色成分である不溶性色素のインジゴは、アルカリ条件下で微生物により水溶性のロイコインジゴへと還元され、布に吸着できるようになる。布に吸着したロイコインジゴは空気によってインジゴへ再酸化され、布にインジゴが固定化・染色される (図1)。

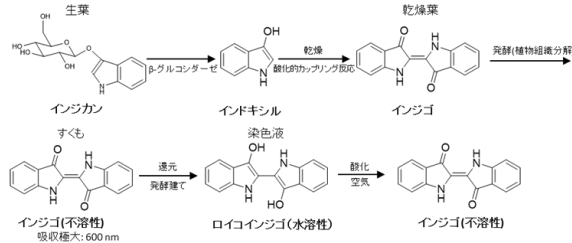


図1. 藍染め色素インジゴの生成経路と染色過程の反応

(1) インジゴ還元菌のスクリーニングとインジゴ還元能の定量法の確立

藍染めの染色液やすくも、乾燥葉などを菌の分離源とし、炭酸ナトリウムで pH10 に調整した標準寒天培地 (顆粒) 「ニッスイ」を用いて 28°C、嫌気条件下で培養し、154 株の微生物を単離した (図2)。

Isolation from materials of Indigo dyeing

Standard Method Agar "Nissui"
 Samples (such as indigo dye, sukumo, etc.)
 Cultivate (room temperature or 28 °C, aerobic or anaerobic, 3-5 days)
 Strain isolation

	aerobic	anaerobic
Standard Method Agar "Nissui"	199	104
Alkali-Standard Method Agar "Nissui"	185	154

Standard Method Agar "Nissui"

Yeast extract	2.5 g
Peptone	5.0 g
Glucose	1.0 g
Agar	15 g
DIW	Up to 1000 mL (pH7)

Alkali-Standard Method Agar "Nissui"

Yeast extract	2.5 g
Peptone	5.0 g
Glucose	1.0 g
Agar	15 g
10% Na ₂ CO ₃	100 mL
DIW	Up to 1000 mL (pH10)



図2. 藍染め工程からの微生物の分離

単離した微生物について、0.03%インジゴを含むアルカリ標準培地で3日間培養を行い、インジゴ還元能を評価した。

評価方法としては、遠心後の培養液上清に溶けているロイコインジゴを空気に晒すことでインジゴへ酸化し、600 nm の吸光度を測定することでインジゴ還元能を定量的に評価した (図3)。

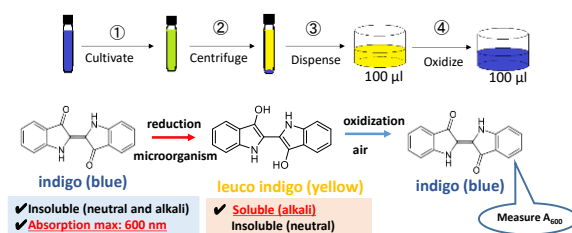
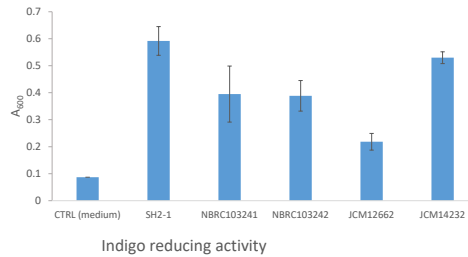


図3. 定量的インジゴ還元活性評価法

その結果、インジゴ還元能の高い 10 株の菌株の取得に成功した。最もインジゴ還元能の高い SH2-1 株について、16S rRNA 解析を行ったところ、*Alkalibacterium pelagium* との 99% の相同性が見出された。(図4)



Indigo reducing activity

16S rRNA analysis

SH2-1 = *Alkalibacterium pelagium*; 99%
Alkalibacterium thalassium; 99%

NBRC103241 = *Alkalibacterium pelagium*
 NBRC103242 = *Alkalibacterium thalassium*
 JCM12662 = *Alkalibacterium iburiense*
 JCM14232 = *Alkalibacterium indicireduence*

図4. 選抜菌 (SH2-1) 株と既報活性菌とのインジゴ還元活性比較

さらに、得られたインジゴ還元菌についてインジゴ還元条件検討を行ったところ、グルコースやフルクトースがインジゴ還元有効であることを明らかにした (図5)。

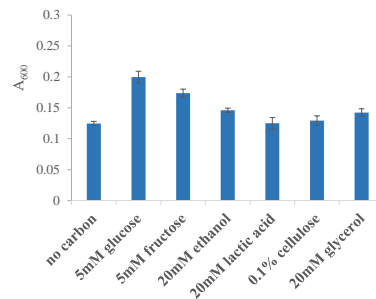


図5. 選抜菌 (SH2-1) 株のインジゴ還元に対する電子供与体の効果

また、インジゴの還元はメディエーターを介さない直接還元である可能性が示唆された (図6)。

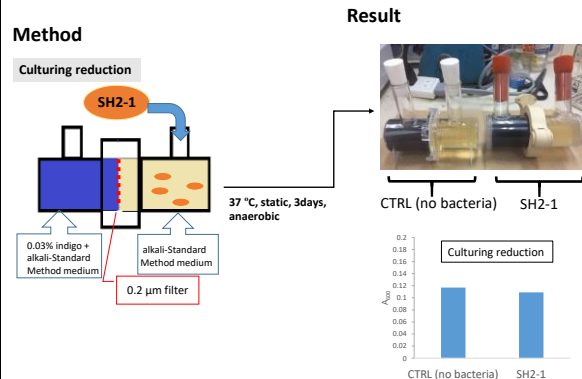


図6. 選抜菌 (SH2-1) 株のインジゴ還元における低分子メディエーター関与の検証

(2) 乾燥葉からのインジゴ抽出効率の向上に有用な微生物の探索

(1) で得られたインジゴ還元菌 10 株について、乾燥葉中のインジゴを直接還元できるか評価を行った。乾燥葉を 1% 含むアルカリ標準培地で 7 日間培養し、上記同様に吸光度により培養液上清中のロイコインジゴ量を測定した。その結果、SH2-1 株において、ロイコインジゴの生成が認められたことから、本菌は乾燥葉中のインジゴを還元できる可能性が示唆された。また、インジゴ還元菌 EK2-4 株については、ロイコインジゴの生成は認められなかったことから、本菌は乾燥葉中のインジゴを還元できないことがわかった。

そこで、EK2-4 株を利用し、乾燥葉の植物組織を分解し効率的なインジゴ抽出を可能とする微生物の探索を行った。菌の分離源として、すくもや発酵過程中的すくもを用いた。EK2-4 株とスクリーニング対象株をそれぞれ培養し、遠心して得られた菌体を 1% の乾燥葉を含むアルカリ緩衝液に懸濁し、7 日間嫌気条件下でインキュベートした。反応後の反応液上清中のロイコインジゴ量を上記と同様に定量した。単離株 94 株を対象に探索した結果、9 株においてロイコインジゴの生成が認められた。したがって、本 9 株は乾燥葉の植物組織を分解することができ、効率的なインジゴの抽出に有用であると考えられる。今後、得られた選抜菌に対して、さらなる機能解析を行う予定である。

(3) インジゴを還元する乳酸菌の探索

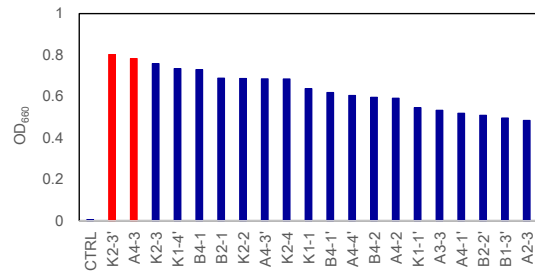
インジゴを主成分とする漢方薬の青黛が潰瘍性大腸炎の治療に有効であることが最近の研究で明らかになってきているが、その作用メカニズムについては詳しくわかっていない。また、インジゴは不溶性であるため、そのままでは細胞に取り込まれにくいと考えられる。そこで、腸内でインジゴが還元され水溶性のロイコインジゴとなり、細胞に取り込まれているのではないかと予測し、本研究では、インジゴを還元することができる乳酸菌を探索した。MRS 培地を用いて対象菌を培養し、遠心して得られた菌体を 0.03% インジゴを含む中性緩衝液に懸濁し、1 日間嫌気条件下でインキュベートした。反応後 5N NaOH にて反応液をアルカリ性にし、反応液上清中のロイコインジゴ量を上記と同様に定量した。研究室保存の乳酸菌 70 株を対象に探索した結果、8 株についてロイコインジゴの生成が認められた。今後、得られた選抜菌に対して、さらなる機能解析を行う予定である。

(4) さらなるインジゴ還元菌のスクリーニングとインジゴ還元能に関与するメディエーターの解析

藍染めの染色液や染料の素であるすくも、タデアイの乾燥葉などを菌の分離源とし、ア

ルカリ・嫌気条件下で微生物の単離を行った。得られた微生物について、ふすまを含む培地での培養に伴う還元能や、休止菌体反応における還元能を評価した。評価方法としては、遠沈後の培養液上清に溶けているロイコインジゴを空気に晒すことでインジゴへと酸化させ、スペクトルを測定することでインジゴ還元能を定量的に評価した。

それにより得られたインジゴ還元能の高い菌株について 16S rDNA 解析による菌の同定を行い、*Alkalibacterium* 属、*Clostridium* 属、*Paraclostridium* 属であることを明らかにした (図 7)。



16S rDNA analysis

K2-3: *Paraclostridium bifermentans* HYN0063 (98 %)
 P. benzoelyticum JC272 (98 %)

A4-3: Uncultured bacterium clone PB1 aai28c09 (94 %)
 Clostridium bifermentans strain E059 (93 %)

図 7. 藍染め工程からの微生物の分離とインジゴ還元活性の評価

さらに、これらの菌株を用いて インジゴ還元反応における還元力供給系やメディエーターの影響等の条件について検討を行った。メディエーター非存在下でも一定の還元反応が認められ、直接電子移動の可能性も示されたが、アントラキノン存在下で、ロイコインジゴ量の増加が確認された (図 8)。

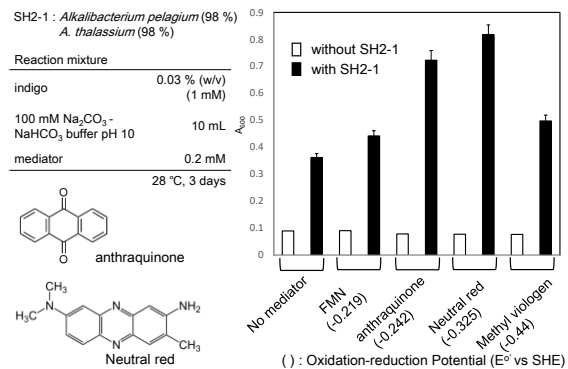


図 8. インジゴ還元菌のインジゴ還元活性に対するメディエーターの影響

アントラキノン類について幅広く検討を行った結果、sodium anthraquinone-β-sulfonate に高い活性を認めた (図 9)。また、タデアイ葉に含まれるアントラキノン誘導体である emodin にも高い活性を認めた (図 10)。

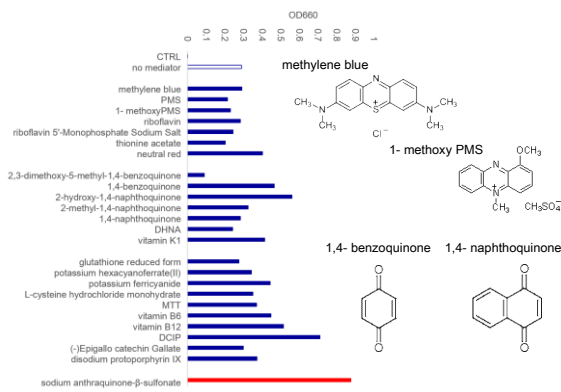


図9. インジゴ還元菌のインジゴ還元活性に対するアントラキノン類のメディエーター活性

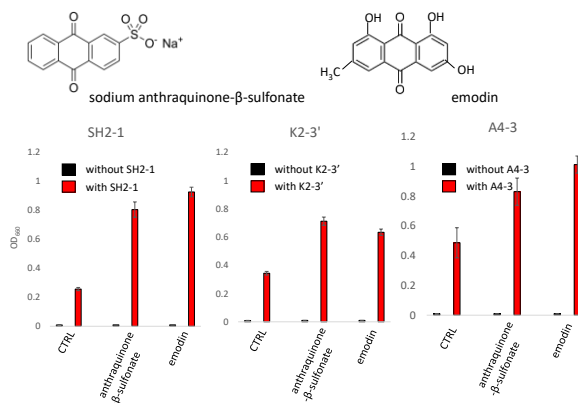


図10. インジゴ還元菌のインジゴ還元活性に対する emodin のメディエーター活性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 5 件)

- 四方田和弥、阪本鷹行、尾下竜次、久郷将見、竹内道樹、小川順、櫻谷英治、インジゴ還元に関わる微生物の探索及び機能性評価. 第3回日本生物工学会西日本支部講演会, 2016年, 徳島
- 久郷将見、竹内道樹、四方田和哉、阪本鷹行、櫻谷英治、小川順、インジゴ還元菌の探索及び定量的評価法を用いる機能解析, 日本農芸化学会 2017年度大会, 2017年, 京都
- 清藤鈴奈、竹内道樹、久郷将見、四方田和哉、阪本鷹行、櫻谷英治、小川順、インジゴ還元能の定量的評価法を用いたインジゴ還元菌の探索及び機能解析, 日本農芸化学会中四国支部第48回講演

会, 2017年, 徳島

- ④ 櫻谷英治, 藍染工程のインジゴ還元に関わる微生物群について, Visionary 農芸化学 100 シンポジウム 「微生物・バイオマス利用研究領域 第1回」, 2017年, 徳島
- ⑤ 清藤鈴奈、竹内道樹、久郷将見、多田真奈巳、阪本鷹行、櫻谷英治、小川順、インジゴ還元菌におけるメディエーターの影響とその機能解析, 日本農芸化学会 2018年度大会, 名古屋

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hakko.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 順 (OGAWA, Jun)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 70281102

(2) 研究分担者

安藤 晃規 (ANDO, Akinori)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 10537765

日比 慎 (HIBI, Makoto)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 30423247

(2017年3月まで。2017年4月1日にて富山県立大学へ異動。新勤務地での業務に専念する必要が生じたため。)

櫻谷 英治 (SSAKURADANI, Eiji)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究所・教授

研究者番号: 10362427

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし