

機関番号：82706
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580092
 研究課題名（和文） 新規多孔質プレートを用いた深海からの有用微生物及び新規微生物の分離
 研究課題名（英文） Isolation of useful and new microorganism from the deep-sea using new porous quality plate
 研究代表者
 能木 裕一（NOGI YUICHI）
 独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究主幹
 研究者番号：70399559

研究成果の概要（和文）：各種多孔質プレートを使用して新規キチナーゼ生産菌を分離した。分離した新種を *Microbulbifer okinawensis* と *Microbulbifer chitinilyticus* と命名登録した。これらはコロイダルキチンを N-アセチルグルコサミンと 2 糖までに分解した。また、ポリビニルアルコール(PVA)分解菌の 2 新種を分離した。これらは従来報告されている *Sphingopyxis* 属とは全く異なった *Thalassospira* 属と *Steroidobacter* 属に属していることが分かった。これらは PVA 以外の合成高分子も分解している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The new chitinase produce bacteria was isolated by using various porous quality plates. The isolated new strains were named *Microbulbifer okinawensis* and *Microbulbifer chitinilyticus* and these registered. These resolved colloidal chitin to N-acetylglucosamine and disaccharide. Moreover, two new strains of polyvinyl alcohol resolution bacteria were isolated. It was found these are genus *Thalassospira* and *Steroidobacter* quite different from the genus *Sphingopyxis* that had been reported so far.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物分類、多孔質プレート、キチン、*Microbulbifer*,

1. 研究開始当初の背景

従来、微生物培養用固形培地にはその汎用性から寒天が多く用いられてきた。しかし、寒天培地の欠点は高温では溶解してしまうこと、酸性の培地では固化しにくいことなどが挙げられる。その欠点を補うため、Deguchi ら（2007）はセルロースを重合した多孔質支持体を開発し、各種培地成分を後から吸収させて使用する培養法を開発した。この培地上では大腸菌などは寒天培地

と同様に生育し、高度高熱菌や好酸性菌のコロニー形成に成功している。

従来の微生物分離法で分離されてくる新種微生物は既知属のものが多く、現場環境の遺伝子解析から示される微生物の分離は大変困難であった。そこで多孔質セルロースプレートを深海生物生息域に 3 日間設置し回収後、培地成分を特に加えることなく培養を行った結果、寒天培地の上では生育できない新属の新規セルロース分解菌を分離

することに成功した。これは寒天の制菌作用の影響で今まで分離することが出来なかった菌の分離に成功したと考えられる。この様に多孔質セルロースプレートは寒天プレートを併用した微生物分離法では分離できなかった微生物を分離することが出来る。本研究ではこの多孔質セルロース培地以外に同様の重合法で制作した多孔質キチンプレート、多孔質ポリエル乳酸プレートを用いて深海から新規微生物の分離が行えると考えた。

2. 研究の目的

アガロースに代わる微生物分離用培地支持体（多孔質セルロース、多孔質キチン、多孔質ポリエル乳酸）を使用し、今まで分離することが出来なかった微生物の分離を行うことである。目標は、熱水噴出口付近、冷湧水噴出域、深海生物に共生または付着している新規微生物、深海生物生息域の豊かな微生物相から新規有用微生物の分離を目指す。

(1) キチン分解微生物の探索：キチンは蟹やエビの甲羅や貝類に含まれている。キチンは手術用糸や健康食品として、キトサンは化粧品、繊維、医療用器材、重金属補着担体、汚泥凝集剤、健康食品として広く利用されている。現在、キチン・キトサンの製造法は乾燥した紅ズワイガニの甲羅から製造される。蟹の甲羅にはキチン 25%、タンパク質 25%、その他炭酸カルシウムと水分と成っている。キチンを直接抽出する汎用溶剤が無いため、炭酸カルシウムを塩化カルシウムに変え水洗除去後、タンパク質を加熱分解し水洗除去し、キチンを単離する。キトサンはこのキチンを脱アセチル化処理によって製造される。このような手間をかけず、微生物により直接製造する事が出来れば大きなコストダウンになる。また、キトサンを安定大量生産するには微生物による生産が適して居ると言われている。しかし、従来の微生物はキトサンを菌体内に蓄積するため、キトサンの精製コストが化学製造法よりも高価に成るため使われていない。菌体外にキトサンを生産する微生物が発見されれば製造法が一変すると言われている。このような微生物を新規開発したキチンプレートを使用し単離する。

(2) ポリエル乳酸分解菌の探索：ポリ乳酸は乳酸のエステル結合による重合体で、生分解性プラスチックであるポリ乳酸樹脂につかわれる。生分解性プラスチックは市販のリパーゼ等によっても分解されるが、その分解性は極めて低く、常識外の大量の酵素が必要となる。一方、これまで報告されている生分解性プラスチック分解菌のほとんどは、エマルジョンは分解可能であるが、フィルムやペレツ

ト状の固体を直接分解できない。生分解性プラスチックを効率よく分解し、基質の再利用の観点から高分解能を持った微生物を探索する。このため、新規開発したポリ乳酸プレートを利用し分解菌を単離する。

(3) 新規難培養微生物の分離：近年、従来の寒天を使用した培地では生育出来ない微生物が分離され始めている。寒天は微生物培養基として非常に優れているが、温度や pH によっては固化出来ない。それ以外に、寒天自体が微生物に生育阻害を与える場合も有る。このような微生物も通常の微生物も、同様に分離培養出来る寒天を一切使用していない、多孔質セルロースプレート、多孔質キチンプレート、多孔質ポリエル乳酸プレートを開発した。既に、これらの多孔質セルロースプレートを使用し鹿児島湾から、寒天培地では生育できない新属新種の微生物分離に成功している。また、鯨骨生物群集のように微生物分離が始まったばかりの地点では Marine Agar を使った好気的な分離法で、分離株の約 30%が新種で有った。この事から今回これらのプレートを用い、新規分離法により遺伝子解析により存在は示されているが、従来法では分離出来なかった微生物も含め多くの新属新種を分離する。

3. 研究の方法

(1) 海洋研究開発機構所有の深海調査機器（しんかい 6500、ハイパードルフィン）を使用し、潜航地点は千島海溝冷湧水化学合成生物群集地点（4,300m）、釧路海底谷（3,500m）、南西諸島熱水噴出域（1,400m）、相模湾冷湧水化学合成生物群集（1,100m）、相模湾鯨骨生物群集（1,100m）、鹿児島野間岬沖鯨骨生物群集（200m）から堆積物、深海性アナゴ、ナマコ・貝類などの底生深海生物を採取し、エラ、消化管などを微生物分離源として使用した。また、セルロース、キチンの各多孔質プレートを熱水噴出口付近、冷湧水噴出域、鯨骨生物群集域など生物が多く棲息している場所に 3 日間設置回収した。他の地点では、調査機器にプレートを固定し深海底に暴露させることによりプレート表面に微生物を吸着させる方法も試みた。深海に設置したプレート及び深海環境に暴露したプレートは乾燥しないようにビニール袋に入れ、その現場環境の温度で 2 週間まで培養を行った。菌の生育により穴や凹みが出来たが、コロニーが確認できない場合は更に 2 週間培養を行った。コロニーが確認できた物については、寒天培地と多孔質プレートの両方に植菌し、多孔質プレートの方に生育する菌、分解能の強い菌、16S rRNA 遺伝子解析を行い新種と推定される菌の分

離を試みた。

(2) 深海生物や底泥など各種採取サンプルは培地を染みこませた各種プレートに塗布し、サンプル採取地点の温度と20℃で、2週間まで培養を行った。生育微生物株は寒天培地と多孔質プレートとの両方に植菌し、多孔質プレートのみには生育する菌、分解能の強い菌、16S rRNA 遺伝子解析を行い新種と推定される菌の分離を試みた。

4. 研究成果

(1) キチンプレート

多孔質キチンプレートを使用してキチン分解菌の分離を行った。

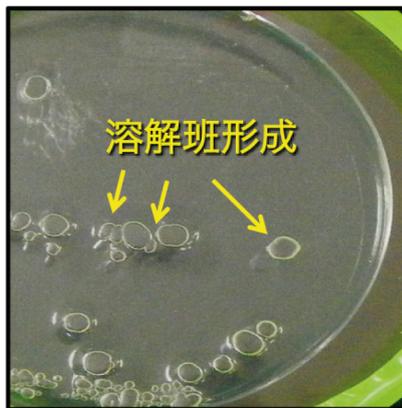


図1 キチンプレートに生育した菌により出来た溶解班

図1のように微生物によりキチン分解が行われ溶解班が形成されるが、コロニーは観察出来ない場合が多かった。そのため凹みの溶解液を寒天プレートに塗布する事により菌の分離を行った。寒天プレートでは生育出来ずにキチンプレートのみで生育するような菌は分離出来なかった。溶解班から寒天プレートで分離した株の多くは、キチンプレートで溶解班を形成した。キチナーゼ生産菌の分離には非常に有効な方法であることが確認できた。

(2) セルロースプレート

多孔質セルロースプレートを使用しセルロース分解菌の分離を行った。セルロースプレートを深海に設置した物からセルロース分解菌による物と思われる溶解班が観察出来た。顕微鏡的にはバクテリアが観察出来たが、人工海水などを用いたプレートでの継代やそこからの菌の分離は成功しなかった。分離にはさらなるファクターが必要と考えられる。

(3) 多孔質ポリ乳酸プレート

ポリ乳酸プレートは柔軟性や剛性に問題があり、非常にもろく崩れやすいのでプレートとして深海に設置することは出来なかった。培地を染みこませて採取サンプルを塗布

した場合も微生物による分解は観察されなかった。また、生育した菌も既存種のみであった。

(4) キチナーゼ生産菌の分類

キチナーゼ生産菌は図2の様な属の菌が分離出来た。属の種類はおよそ25属に渡っており、プロテオバクテリアから放線菌まで広く多岐に渡っていた。その中で一番多いのは *Vibrio* 属で、全体の1/4を締め、次いで *Pseudoalteromonas* 属も全体のほぼ1/4を締めていた。その次に多く分離出来た *Pseudomonas* 属までで全体の6割であった。

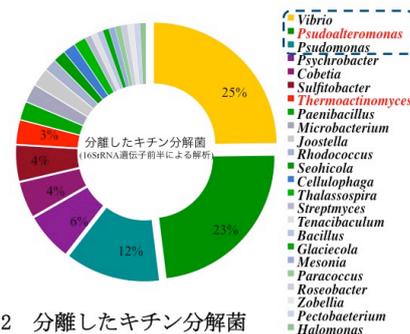


図2 分離したキチン分解菌

しかし、その多くは16S rRNA 遺伝子解析から既存の種と思われる物が多く、新種と推定される物は少数であった。

また、これらの内、酵素活性の強い株が多く含まれていたのは多くの有用酵素を生産する事で知られていて、海洋からよく分離される *Pseudoalteromonas* 属と *Microbulbifer* 属に属する株であった。

これらの内、酵素活性が高く新種と推定される *Microbulbifer* 属に属する ABABA211、ABABA212、ABABA23 株の3株に付いて同定試験を行った。

3株ともグラム陰性絶対好気性桿菌で16S rRNA 遺伝子全長の解析とDNA-DNA ハイブリダイゼーションから3株は2新種に分類された。分離株 ABABA211 株と ABABA23 株を *Microbulbifer okinawensis* と、ABABA212 株を *Microbulbifer chitinilyticus* と命名し新種登録した。*M. chitinilyticus* は運動性があり10~43℃まで増殖し、至適増殖温度が37℃、塩要求性が有り至適塩濃度は約2%で13%まで生育する。エスクリン、キシラン、カゼイン、デンプン、ツイン 20, 40, 80 を加水分解する。GC含量は60.2モル%であった。*M. okinawensis* は運動性が無く、10~45℃まで増殖し、至適増殖温度が37℃、塩要求性が有り至適塩濃度は約3%で15%まで生育する。エスクリン、ゼラチン、デンプン、ツイン 20, 40, 80 を加水分解する。GC含量は57.8モル%であった。両種とも至適 pH は7.5~8で、pH5.5~9.5の範囲で生育する。

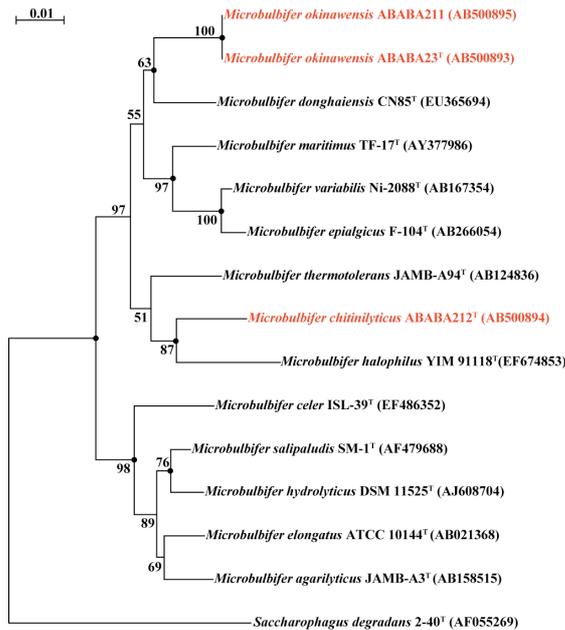


図3 16S rRNA遺伝子による新規キチナーゼ生産 *Microbulbifer*属細菌のNJ系統樹。ブートストラップ値は50%以上を表示。最大節約法で計算した場合同じ分岐をした物を●で示した。

分離株の粗酵素はコロイダルキチンを N-アセチルグルコサミンと二糖まで分解した。しかし、エビのキチンを直接は殆ど分解する事はなかった。

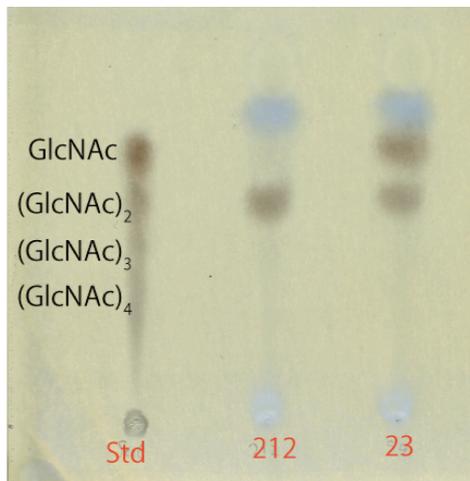


図4 *Microbulbifer*属分離株の粗酵素によるキチン分解産物のTLC分析 0.1%コロイダルキチンを37°C、24時間反応 リンモリブデン酸で検出

Pseudoalteromonas 属のキチナーゼ生産 4 分離株は全て 16S rRNA 遺伝子の全長解析から *Pseudoalteromonas lipolytica* と 98.4~98.6%の相同性を示したため、新種である可能性は有ったが、エビのキチンを直接は殆ど

分解する事はなかったため、同定試験までは行わなかった。

(5)ポリビニルアルコール分解菌

多孔質ポリ乳酸プレートでの菌の分離が不調であったため、生分解プラスチック原料分解菌として、他の合成高分子を対象とした。用いた物はポリブチレンサクシネート (PBS), ポリビニルアルコール (PVA) を培地に添加し各種深海サンプルを使用し、スクリーニングを行った。その結果、PVA 分解菌の2株を分離した。従来報告されている分解菌は殆どが *Sphingopyxis* 属であったが、16S rRNA 遺伝子の全長解析から分離株は既存種とは全く異なった属に属する菌であった。95-5 株は *Sphingopyxis* 属と同じαプロテオバクテリアに含まれるが系統的にはかなり離れた位置の *Thalassospira* 属の新種であった。また、R37-36 株は殆ど PVA 分解菌の報告例の無いγプロテオバクテリアの *Steroidobacter* 属に属していることが分かった。

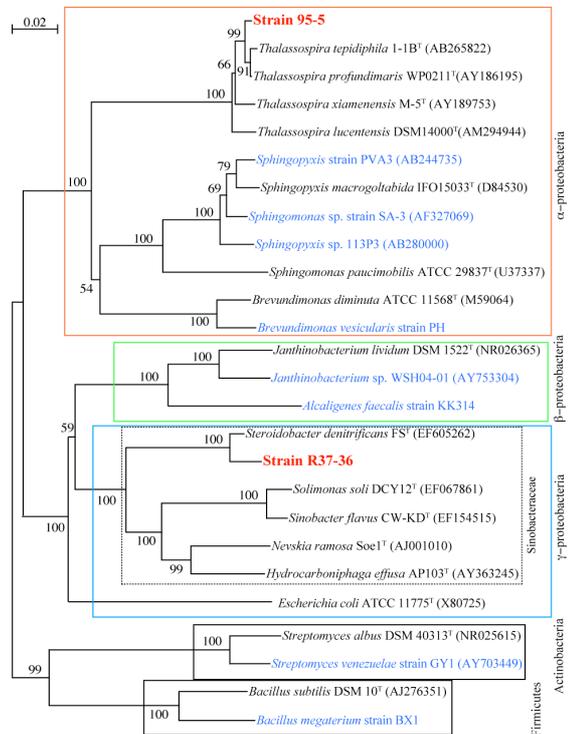


図5 16S rRNA遺伝子によるPVA分解菌及び近縁種のNJ系統樹。赤字:新規分離PVA分解菌、青字:既知のPVA分解菌。各囲みはクラス(又はファミリー)の違いを示す。

Steroidobacter 属に属する近縁種は環境ホルモンとして知られる3つのベンゼン環が結合したフェナントレンやアントラセンの分解菌として知られている。今回 PVA 分解菌として分離した R37-36 株も PVA の分解酵素群を考えると、このようなベンゼン環が複数ある多環芳香族炭化水素を分解する可能性が示唆された。

また、95-5 株も R37-36 株も PVA 分解能は

既知の分解菌に同等の PVA 分解能力を示している。R37-36 株は 13~33℃で増殖し、至適温度は 29℃、95 株は 10~40℃で増殖し、至適温度は 25℃であった。生育 pH も 6~9 であり、95-5 は塩要求性が強く、4%を至適とし、R37-36 は低く 0.1%を至適としていた。この事から環境によって両株を使い分けて合成高分子物質を分解するのに使用できる。

現在、両株の基本的性質は分かっているが他にどのような合成高分子を分解するか、代謝経路などに付いては今後の検討により明らかにしたい。

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 1 件)

- ① Atsushi Baba, Masayuki Miyazaki, Takahiko Nagahama, and Yuichi Nogi, 2011. *Microbulbifer chitinilyticus* sp. nov. and *Microbulbifer okinawensis* sp. nov., chitin-degrading bacteria isolated from mangrove forests. Int J Syst Evol Microbiol. *In press.* (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

- ①吉住允貴「海洋由来ポリビニルアルコール分解菌の探索と産生酵素の機能解析」極限環境微生物学会 2009 年度年会、明治大学駿河台校舎 東京 2009 年 10 月 28-29 日
- ②馬場淳「キチンゲルを用いた微生物固体培地の開発とその応用」. 日本農芸化学会 2009 年度大会, マリンメッセ福岡, 福岡, 2009 年 3 月 27~29 日
- ③馬場淳「キチンゲルを用いた微生物固体培地の開発とその応用」極限環境微生物学会 2008 年度年会, 立教大学, 東京, 2008 年 11 月 4~5 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能木 裕一 (NOGI YUICHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究主幹

研究者番号：70399559

(2) 研究分担者

出口 茂 (DEGUCHI SHIGERU)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー

研究者番号：40344296

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

馬場 淳 (BABA ATSUSHI)

横浜市立大学国際総合科学研究科・環境生命・大学院生

吉住 允貴 (YOSHIKAZUMI MASAKI)

横浜市立大学国際総合科学研究科・環境生命・大学院生