

Sphingomonas sp.の異種バクテリアに対する増殖因子の探索

○高井 亮吾、Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan、三橋 進也、鎌形 洋一、生方 信（北大院農）

1. はじめに

現在、地球上に存在する微生物のうち、実に90%以上の種がいかなる人工培地を用いても培養ができない難培養微生物である¹⁾。難培養微生物の中には1種のみでは増殖せず、異種微生物が生産する物質を増殖因子として受け取って初めて増殖可能となる種も存在すると考えられている。そのような異種微生物間の共生関係を媒介する物質を探索することは、難培養微生物を培養可能にするために重要である。

本研究で使用した微生物は4種(GF9、AST4、ASTN45、ASN212株)であり、ともに産業技術総合研究所の生物資源情報基盤研究グループにより、活性汚泥から単離されたものである。GF9株が増殖因子を供給し、他の3種はそれぞれ異なった増殖因子を受け取ることで生育することがわかっている(図1)。

上記の異種微生物間でやりとりされる増殖因子を単離・構造決定するために、ジャーファメンターを用いてNPB培地(表1)でGF9株の培養上清を得た。次に、分液、カラムクロマトグラ

フィーを用いて単離を試みた結果、増殖因子が極めて微量であることが示唆された。

よって本研究では、増殖因子生産をより効率良くし、探索のための出発材料を大量に得るために、培地の組成などのGF9株の培養条件(表2)を検討した。

2.材料と方法

2.1 培養装置

培地 600 mL を、1 L 容量のジャーファメンター (ABLE 社 BMJ-01P1) を用いて 48 時間培養した。

2.2 培地成分

本研究において検討した培地成分は、ポリペプトンと酵母エキスである。以下に実験に使用した由来の異なる培地成分を示す。(表3, 表4)

ポリペプトン:

略称	販売会社	商品名	原材料
トリプトン	Difco	Bacto™ Tryptone	カゼイン
カゼイン由来	日本製薬	ハイポリペプトン	カゼイン
大豆由来	日本製薬	ハイポリペプトンS	大豆精製物
脱脂大豆由来	日本製薬	ハイポリペプトンN	脱脂大豆

表3.使用したポリペプトンの情報と略称

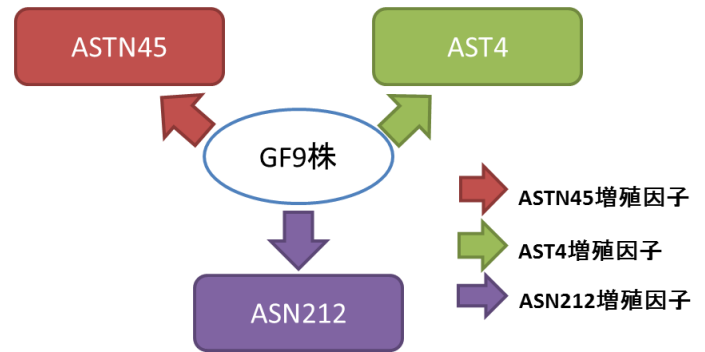


図 1.4 種の微生物の関係

MATERIAL	ratio(%)
Bacto™ Tryptone (Difco社製)	1.0
Bacto™ East extract (Difco社製)	0.2
MgSO ₄ · H ₂ O (和光純薬工業社製)	0.1
K ₂ HPO ₄ (和光純薬工業社製)	0.1
KH ₂ PO ₄ (和光純薬工業社製)	0.05
D-glucose (和光純薬工業社製)	0.5

表 1. NPB 培地の培地成分と組成

medium	NPB medium
time	24 hour
agitation	300rpm
aeration	1 v/v/m
temperature	30 °C

表 2 GF9 株培養条件

酵母エキス：

略称	販売会社	商品名	原材料
Difcoイースト	Difco	Bacto™ Yeast extract	パン酵母エキス
極東 イースト	極東製薬工業	極東 粉末酵母エキス	ビール酵母
パン酵母	オリエンタル酵母	酵母エキスT-514	パン酵母エキス
ビール酵母	オリエンタル酵母	酵母エキスB2	ビール酵母エキス

表 4. 使用した酵母エキスの情報と略称

2.3 活性評価方法

GF9 株由来の増殖因子生産量を評価するために、増殖活性を指標とした。すなわち、調製した GF9 上清をサンプルとして、ASN212 株、AST4 株、ASTN45 株に対して表 5 示した条件³⁾で培養し、次いでそれぞれの微生物の増殖量を、OD₅₉₅を測定して評価した。

この時、GF9 上清は希釈していない濃度 (E.C.) とともに、5 倍希釈濃度(0.2 E.C.)、25 倍希釈濃度(0.04 E.C.)のサンプルを活性評価に供し、濃度依存性も調べた。

bacteria	sample	NPB medium	bacteria (from stock)	time	agitation	temperature
ASN212	100 μL	260 μL	40 μL	48 hour	600 rpm	30 °C
AST4	100 μL	260 μL	40 μL (48時間前培養)	48 hour	600 rpm	37 °C
ASTN45	40 μL	320 μL	40 μL	48 hour	600 rpm	37 °C

表 5. 増殖因子活性評価条件

3.結果

2.1 増殖因子生産に対する攪拌速度の影響

はじめに攪拌速度と増殖因子の関係を調べた。3 種の攪拌速度 (300 rpm, 500 rpm, 700 rpm) で培養した条件における GF9 株培養上清の、ASTN45 株、AST4 株、ASN212 株に対する増殖活性の評価を行った。

結果、ASTN45 株に対する増殖活性が攪拌速度の増加とともに顕著に増加することが判明した (図 2)。

また、AST4 株においても同様に 0.04 E.C.での増殖量は増加した。一方で、ASN212 株に関しては大きな変化は見られなかった。

この結果から、以降の培養条件の検討は、攪拌速度を 700 rpm に設定して行った。

2.2 培地組成比の違いによる増殖活性の変化

次に、NPB 培地の培地組成比の違いによる増殖因子の生産に対する影響を調べることを目的として、以下の実験を行った。

まず、ポリペプトンと酵母エキスの比率を変えた 5 種類の NPB 培地を調製した。(表 6)

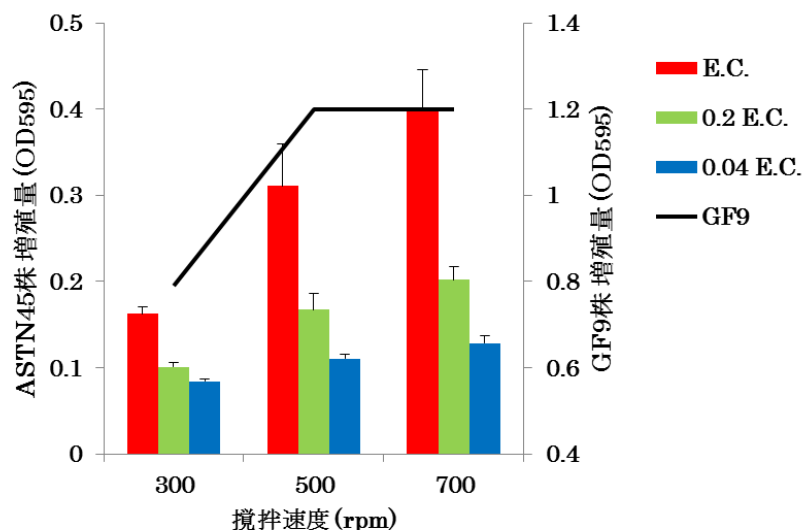
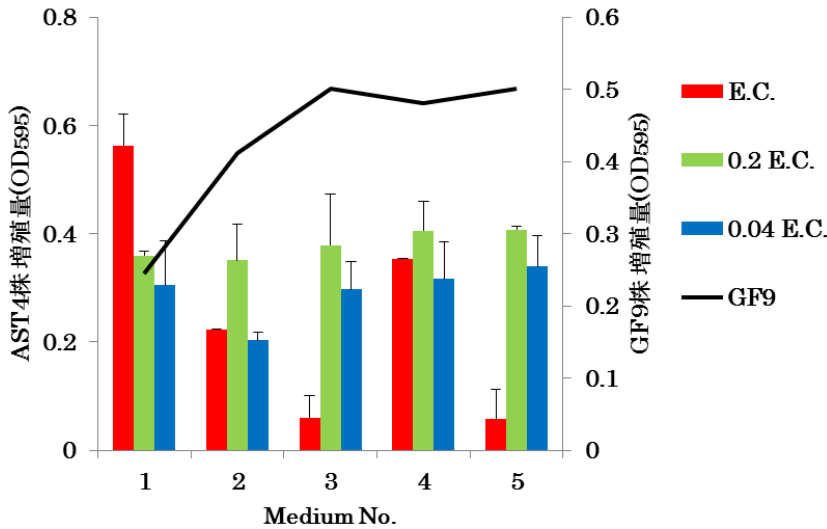


図 2. 攪拌速度の違いによる GF9 株から ASTN45 への増殖活性の変化

Medium No.	1	2	3	4	5
Polypeptone(%)	0.5	0.75	1	1	0.75
Yeast extract(%)	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2

表 6. ポリペプトンと酵母エキスの組成比が異なる NPB 培地



培養後の増殖活性評価の結果、AST4 株に対しては希釈したサンプル (0.2 E.C.、0.04E.C.) で活性が見られたにもかかわらず、E.C.では増殖活性が見られなかった。(図 3 No. 3,5)

また、ポリペプトンについて変更した培養条件において、栄養分が最少の条件で、GF9 株菌体量が減少したにもかかわらず増殖活性の変化は見られなかった。よって、これ以降培地組成は No. 1 の条件で行った。

図 3. 組成比の異なる NPB 培地条件で培養した GF9 株の AST4 に対する増殖活性評価。

2.3 培地成分の違いによる増殖活性の変化

最後に、NPB 培地で用いていたポリペプトン、酵母エキス (medium A) を、由来の異なるものに変更した培地 (medium B~G) を調製した (表 7)。

Medium	A	B	C	D	E	F	G
Polypeptone	トリプトン	トリプトン	大豆由来	大豆由来	トリプトン	トリプトン	脱脂大豆由来
Yeast extract	Difco イースト	極東 イースト	Difco イースト	極東 イースト	ビール酵母	パン酵母	Difco イースト

表 7. 由来の異なる NPB 培地

これら 7 種の培地を用いて GF9 株を培養し、調製した上清をサンプルとして、3 種の微生物に対する増殖活性を評価した。

その結果、ASTN45 株に対して、極東イーストを用いた条件

(medium B) では、GF9 株の菌濃度が低いにもかかわらず、GF9 株の菌濃度が低いにもかかわらず、増殖活性が亢進した (図 4)。しかし、ポリペプトンとして大豆由来のポリペプトン (medium C,D)、及び脱脂大豆由来のポリペプトン

(medium G)を用いた培地条件

で培養された GF9 株上清においては、ASTN45 株の増殖活性が著しく低下することがわかった。ASN212 株に対しても同様に大豆由来のポリペプトン (medium C, D) 及び脱脂大豆由来のポリペプトン (medium

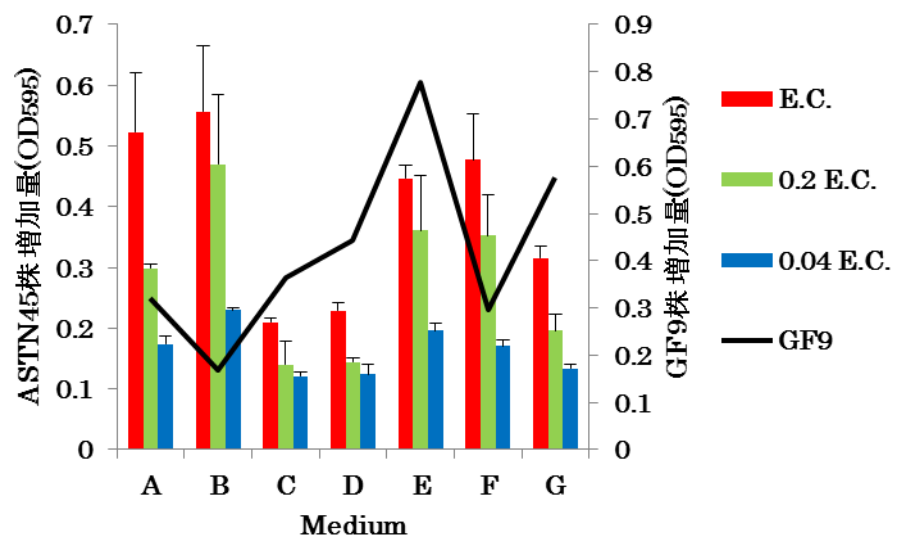


図 4. 素材の異なる NPB 培地で培養した GF9 株の ASTN45 に対する増殖活性評価

G) を用いた条件で増殖活性の低下がみられた。一方で、AST4 に対しては大豆由来のポリペプトン使用培地 (medium C, G) において増殖活性が増加した。

4. 考察

本研究では、GF9 株が生産する ASTN45 株、AST4 株、ASN212 株に対する増殖因子の同定にむけて、それぞれの増殖促進因子を生産する GF9 株の最適培養条件を模索し、以下の結果を得た。

- ・培養時における攪拌速度が高ければ、ASTN45 株及び AST4 株に対する増殖因子生産が活性化される (図 2)。

これは、培養液の攪拌効率と それに伴う溶存酸素の増加が影響しているものと考えられる。

- ・培地組成においてポリペプトンの量を半分にしても、GF9 株の菌体量は減少するが AST4 株及び ASTN45 株に対する増殖活性は変化しない。(図 3)

この結果は、AST4 株及び ASTN45 株に対する増殖因子の単離・精製にむけて、夾雑物になりうる物質を減らせるので有利である。

- ・GF9 株の菌体量とそれぞれの増殖活性には相関性は見られなかった (図 2、図 3、図 4)。

- ・AST4 株は、特定の培地組成において希釈したサンプル (0.2 E.C.、0.04E.C.) においては活性が見られたにもかかわらず、E.C.のみに増殖活性が見られないことがあった。(図 3)。

上記の原因として二つの可能性があり、まず培養の条件によっては、増殖阻害物質も生産されるという可能性、または、増殖促進因子の濃度が高すぎると、逆に増殖が抑制されるという可能性である。

- ・ASTN45 株に対する増殖促進因子は大豆由来のポリペプトン使用条件において生産が低下する。(図 4)

その一方で AST4 株の増殖量は、大豆由来のポリペプトン使用条件においてむしろ促進されていた。この結果は、GF9 株は自然環境において周囲の環境が変化にあわせ、3 種の増殖因子の生産をそれぞれ個別に変化させている可能性を示唆している。

今後、上記の結果をふまえ、GF9 株の大量培養を行い、ASTN45 株及び AST4 株に対する増殖因子の単離・精製を目指す。

5.参考文献

1) R. I. Amann W. Ludwig, and K.H.Schleifer *Micribiol. Rev.* **59(1)**, 143-146 (1995)

2)村上 能寿,微生物間相互作用に關与する未知機能物質の分離精製および同定, 早稲田大学大学院理工学研究所
究科応用化学専攻 2006 年度修士論文

3) Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan,Growth promoting compound for bacterial strain ASTN45
produced by *Sphingomonas* sp., 北海道大学応用生命化学専攻 2012 年度修士課程論文