

D-アスパラギン酸を資化する好熱性細菌の特性

押川裕和¹・濱田英介

Characteristics of D-Aspartic Acid Using Thermophilic Bacterium

Hirokazu OSHIKAWA¹, Eisuke HAMADA

(Received September 2, 2009)

Abstract On the earth of the ancient times before life appearing, it is thought the same amount of L- amino acid and the D- amino acid were generated as optical isomer by chemical reactions. However, the D- amino acid comes to be removed by the process of the biological evolution, and proteins of all creatures are composed by L- amino acid now. This research was carried on uptaking and it's metabolism of D-amino acid by bacteria. Two thermophilic bacteria were isolated from hot spring water in Oita and Miyazaki prefectures, Japan. These bacteria were grown in the medium containing D-asparatic acid (D-Asp) as the only carbon and nitrogen source. One of these strains, being gram positive, catalase positive, grew well under 50 degree temperature and identified as *Bacillus licheniformis* with 16SrDNA homology test (99.6%)

Keywords [D-amino acid, Thermophilic bacterium, *Bacillus licheniformis*]

1 緒言^{1,2,3,4)}

アミノ酸はタンパク質の構成や神経伝達など、重要な生理機能を持っている。アミノ酸にはその立体構造の違いからL型とD型が存在するが、細菌や哺乳類の生体内に存在するアミノ酸のほとんどはL型であると考えられてきた。しかし、1937年のIvanovicsらの報告により、細菌内の細胞壁に高濃度のD-グルタミン酸が存在することが知られて以来、生体内のD型アミノ酸の重要性が示唆されるようになってきている。メタン生産菌や超好熱性の細菌などは細胞構成成分や酵素などにD型アミノ酸が含まれていることも見出され、また多細胞生物であるホタルやカイコなどの昆虫にもD型アミノ酸が含まれていることが報告されており、ヒトを含む哺乳類にもD型アミノ酸が含まれているのではないかと考えられてきた。近年、光学分割の技術の進歩により、微量のD型アミノ酸の検出が可能となり、神経伝達やホルモン分泌の制御などに関与する事が明らかになってきた。例えば哺乳類の脳神経系では、D-セリンがグルタミン酸受容体の神経調節物質として働いていると考えられている。ま

た、N-メチル-D-アスパラギン酸は神経系のグルタミン酸受容体のホルモンであり、D-アスパラギン酸(以下D-Asp)は神経内分泌や内分泌系の調節作用を有すると考えられている。今後の研究の進展に伴ってD型アミノ酸を含む各種のタンパク質の発見が期待される。近年では、西川、長沼らの研究により、多くの好熱性細菌がD型アミノ酸を資化することが報告されている。もしこれらのことが事実なら、微生物、特に好熱性細菌や古細菌にとってD型アミノ酸の利用に生物学上の意味があるに違いない。原始地球上に発生したアミノ酸が大気の放電現象等による化学反応で生成されたとすれば、当時の環境下ではアミノ酸はLおよびD型の異性体として存在しており、地球上に出現した初期の原始生物はD型アミノ酸を、活発にあるいは否応なく、吸収・代謝する機構を持っていたと考えられる。

本研究では、九州各地の温泉等、生物にとって高温環境といわれる地点から細菌を分離し、それらを供試菌株として、細菌の種とD型アミノ酸の吸収あるいは代謝の関係を明らかにすることを目的として実験を行った。

2 方法

2.1 好熱性細菌の取得

2.1.1 好熱性細菌の初期培養

宮崎県えびの市および大分県別府市近郊の温泉地帯から平成19年5、7、8月にかけて採取した温泉水(表1)を、DifcoTMNutrient Broth(表2)を含む液体培地(以下、液体培地)に添加し、恒温槽で好氣的に培養した。この際、DifcoTMNutrient Broth濃度を0.8、8g/L(以下、培地濃度0.8、8g/L)の2種類とし、恒温槽温度を50、60℃で振とう培養した。

表1 採取地

採取地	採取温泉
宮崎県えびの市	華の湯温泉
	月見温泉
大分県別府市	山地獄
	かまど地獄(4、5丁目)
	血の池地獄
	白池地獄
	みかさや温泉

表2 DifcoTMNutrient Broth(8g/L)の培地組成

肉エキス	3.0g
ペプトン	5.0g
蒸留水	1000ml
pH7.0	

2.1.2 好熱性細菌の単離

上記液体培地を2%w/w ゲルライト(Wako)で固化させた固体平板培地に各培養液を塗抹してコロニーを形成させ、出現した単コロニーを釣菌して、新しい固体平板培地に画線する作業を繰り返して単離株を得た。

2.2 増殖曲線の作成

単離株を液体培地で前培養し、その培養液1mlを新しい液体培地10mlに接種し、40、50、60、70℃の各温度で培養し、各株の増殖をOD値として測定した。OD(660nm)は吸光度計(ANA-7 東京光電社)を用いた。

2.3 各株のD-Aspの資化性の検討

蒸留水1LにD-Asp粉末8gのみを添加しpH7.0に調製した液体培地(以後D-Asp培地)に、ゲルライト(2%w/w)を添加しD-Asp固体平板培地を作製した。

これに2.1で得られた単離株をそれぞれ接種して、各株の最適生育温度(以下、Topt)で20日間培養した。

2.4 分類同定試験

2.4.1 グラム染色および形態観察⁵⁾

スライドガラスに単離株を固定し、クリスタルバイオレットおよびルゴール液で染色を行い、水洗後95%エタノールで脱色をした。再度水洗後、サフラニンで染色し、水洗・風乾させ光学顕微鏡で観察した。

2.4.2 生理試験(カタラーゼ活性)⁶⁾

1.0%濃度となるようにスキムミルク(関東化学)を添加した液体培地10ml(カタラーゼ試験培地)に単離株の培養液1mlを接種し、8日間培養後OD値を測定した。カタラーゼ活性がある場合、カゼインが分解されるためブランクのOD値より低い値となる。

2.4.3 16SrDNA解析

16SrDNA解析は、テクノスルガ・ラボ株式会社に依頼した。

2.5 ペプチド性アミノ酸の分析⁷⁾

2.5.1 菌の大量培養

D-Asp液体培地500mlを調製し、D-Asp液体培地で前培養したD-Asp資化性のある株を植菌し、その株のToptで10日間好気培養を行った。

2.5.2 水溶性蛋白質の抽出

培養後、8000rpm、20分、4℃で遠心分離(BECKMAN Model-J2-21M)を行い、上清を廃棄し沈殿物(菌体)を得た。さらに、6000rpm、20分間、4℃で遠心分離(KUBOTA 1700)を行い、上清を除去後、生理食塩水、水、リン酸緩衝溶液(pH7.0)の順で菌体を洗浄した。リン酸緩衝溶液で洗浄後、2mM PMSF入りのリン酸緩衝溶液(pH6.1)を加えた。次に超音波を10分程度かけ、細胞の破碎を行った。再び、6000rpm、20分、4℃で遠心分離を行い、破碎した細胞を除去した。上清に静かに硫酸アンモニウム(70%)を加え、塩析を行った。硫酸アンモニウムを全て加え、1時間程度ゆるやかに攪拌した後、1晩静置した。再び6000rpm、20min、4℃で遠心分離を行い、上清を除去し、70%エタノールで洗浄後、蛋白質試料を得た。

2.5.3 水溶性蛋白質の酸による加水分解

十分乾燥させた容器に、試料、塩酸(試料:塩酸=5mg:1ml)を添加し、これに0.2%濃度となるようフェノールを加えた。脱気後、110℃オイルバスにより24時間加水分解を行った。

2.5.4 イオン交換樹脂による精製

試料をスルホン酸系陽イオン交換樹脂に導入し、クエン酸緩衝溶液(pH 3.0)で通液することでアミノ酸の精製を行った。

2.5.5 アミノ酸分析

溶離液としての2mM 硫酸銅水溶液と光学分割カラム(MCI@GEL CRS10W 三菱化学)を用い、HPLCによりアミノ酸の光学分離を行いクロマトグラフを得た。

3 結果および考察

3.1 好熱性細菌の単離

各温泉水から、培地濃度 8g/L の液体培地で 6 株(TO-2、3、4、7、8、11)、同 0.8g/L の液体培地で 5 株(TO-1、5、6、9、10)、計 11 株の細菌を得ることができた。各株が増殖した培地濃度から、11 株のうち 5 株(TO-1、5、6、9、10)は、低栄養細菌の可能性が示唆された。また、これらは 40℃ではあまり増殖せず 50℃以上の温度でよく増殖したもので、生育温度による細菌の分類基準から⁸⁾、すべて好熱性細菌であると考えられた(表 3)。

表 3 株名および単離時の培地濃度

株名	培地濃度(g/L)	株名	培地濃度(g/L)
TO-1	0.8	TO-7	8
TO-2	8	TO-8	8
TO-3	8	TO-9	0.8
TO-4	8	TO-10	0.8
TO-5	0.8	TO-11	8
TO-6	0.8		

3.2 各温度における増殖特性

単離 11 株のうち 50℃で最もよく増殖したのは 5 株(TO-1、2、3、4、6、8)であり、60℃では 3 株(TO-5、7、11)であった。また、2 株(TO-9、10)は、増殖量が少なく、各温度における増殖特性は明らかではなかった(表 4)。50℃で最適生育温度を示した TO-3 株は培養開始直後から増殖を開始し、5 日目には最高 OD を示した。そのときの OD は 0.18 であった(図 1)。

3.3 各株の D-Asp 資化性の検討

D-Asp を唯一の炭素源、窒素源としたとき増殖が確認されたのは 2 株のみだった(図 2)。各株を D-Asp 固

体平板培地上に接種すると上記 2 株のみが増殖し、10 日目には図 2 のようになった。

表 4 各温度の最大 OD 値

株名	OD 値(-)				Topt(℃)
	40℃	50℃	60℃	70℃	
TO-1	0.009	0.05	0.015	0.008	50
TO-2	0.108	0.146	0.025	0.006	50
TO-3	0.114	0.18	0.035	0	50
TO-4	0.024	0.17	0.076	0.01	50
TO-5	0.017	0.029	0.081	0.018	60
TO-6	0.025	0.075	0.039	0.016	50
TO-7	0.07	0.094	0.165	0.01	60
TO-8	0.1	0.242	0.025	0	50
TO-9	0.025	0.052	0.057	0	50-60
TO-10	0.016	0.026	0.042	0.039	50-60
TO-11	0.072	0.14	0.552	0.09	60

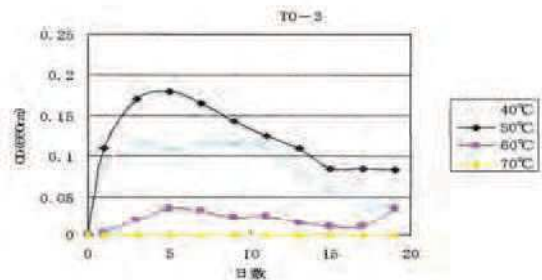


図 1 TO-3 の増殖曲線

このことから TO-2、3 以外の単離株は、D-Asp を資化することはできないことが確認された。D-Asp を資化できなかった株は、D-Asp を L-アミノ酸に変換す



図 2 D-Asp 固体平板培地上の TO-2、TO-3 株

るラセマーゼや D-アミノ酸のアミノ基を α -ケト酸に転移させ、新たな D-アミノ酸を生成する酵素であるアミノ基転移酵素(D-AAT)などの種々の D-Asp を代謝するのに必要な酵素が存在しないか、または存在し

ても機能しなかったために増殖できなかったものと考えられる⁹⁾。しかしながら、今回の実験では他のD-アミノ酸の資化性の検討は行っておらず、D-Aspを資化しなかった他の株が他のD-アミノ酸を資化できる可能性は否定できない。本研究では大量培養を行う必要があるため、増殖特性の高いTO-3株を本研究対象とした。

図3にTO-3株のD-Asp、L-Aspおよび蒸留水培地における増殖の様子を示す。D-Asp、L-Aspとも培養開始から増殖が認められ8日目に定常期に達していた。D-Asp培地での最大ODは0.88、L-Asp培地での最大ODは0.85とほとんど差異はなく、TO-3株はD-AspおよびL-Aspを同程度吸収することが示された。しかしながら、炭素源および窒素源のまったくない蒸留水培地では増殖が確認できなかった。以上の結果よりTO-3株はグルライトおよび蒸留水で増殖する可能性は極めて低く、D-Aspのみを栄養源として利用したと考えられた。

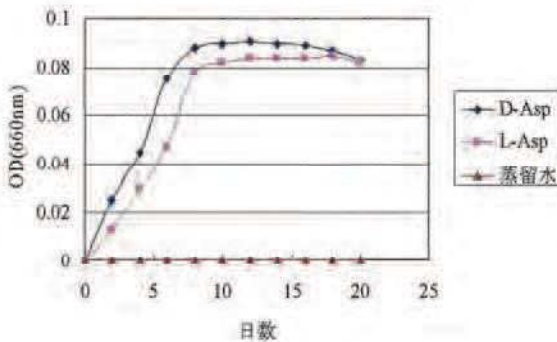


図3 D-, L-Asp および蒸留水培地における TO-3 株の増殖特性

3.3 分類同定

3.3.1 グラム染色および形態観察

グラム染色試験と顕微鏡観察 (x1000) により、



図4 TO-3 のグラム染色性および形態観察

TO-3 株はグラム染色陽性の有芽胞桿菌であることが確認された(図4)。また TO-3 株は、好気条件下でのみ生育を示す絶対好気性細菌であり、形態観察の結果

と併せて当株は*Bacillus*属の細菌である可能性が示唆された。

3.3.2 カタラーゼ活性

TO-3 株をカタラーゼ試験培地で 10 日間培養後、TO-3 株の培養液とブランクの OD 値を比較すると、TO-3 株を培養した液の OD 値はブランクのそれより低かった。このことより TO-3 株は、カタラーゼ活性陽性と考えられた(図5)。



図5 カタラーゼ活性試験
a. TO-3 培養液 b. ブランク

3.3.3 16SrDNA 解析

TO-3 株は *Bacillus licheniformis* (DSM13)、*Bacillus aerius*(23K)、*Bacillus sonorensis*(NRRL B-23154)、*Bacillus aerophilus*(28K)との DNA 相同性(500b)が、それぞれ 99.6、99.4、98.6、98.3%であった。

グラム染色性、形態観察、生理試験および 16SrDNA の結果から、TO-3 株は *B. licheniformis* であると推測された¹⁰⁾。

3.4 ペプチド性アミノ酸分析

ペプチド性 Asp 分析を行った結果、培地成分である D-Asp は D-Asp の形態ではペプチドに組み込まれず、L-Asp として存在していることが示された(図6)。これは、D-Asp を L-Asp に変換するラセマーゼの存在

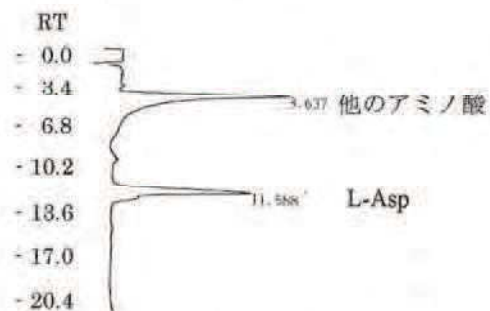


図6 ペプチド性アミノ酸分析

が考えられた。また、図6にみられるように L-Asp 以外のアミノ酸のピークも検出された。これは、D-Asp を分解し種々のアミノ酸へ代謝する D-アミノ酸トランスフェラーゼ(D-AAT)が存在していることを示唆している。

次に、培養前後における培養液中の D-Asp 濃度の増減をクロマトグラフィーのピークとして図 7 に示した。

アミノ酸は、ATP 等のエネルギーを用い細胞内に取り込まれるが、この輸送系では細菌が D-Asp を自らの細胞増殖にとって重要な基質であると認識しなければエネルギーを用いることはない。このことから D-Asp が *B. licheniformis* において必要な物質であると推測される。また、D-Asp を輸送するには、D-Asp

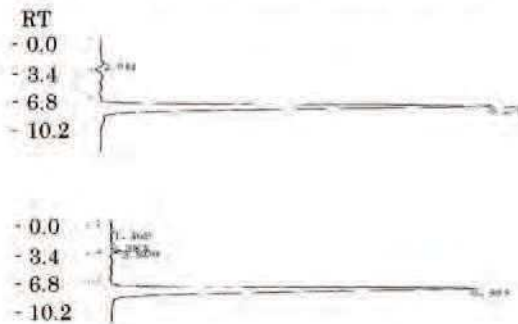


図 7 培養液中における D-Asp
上図:培養 0 日 下図:培養 10 日目

を認識する蛋白が細胞膜に存在していなければならない。図 7 に示すように D-Asp が減少し、さらに培養液中に L-Asp や種々のアミノ酸は確認できなかったことから、細胞外に酵素を放出し細胞外で分解したのではなく、細胞内に取り込んでから分解したと考えられる。このことから *B. licheniformis* の細胞膜には、D-Asp 輸送機能を持つ蛋白があると考えられる¹¹⁾。

以上の結果から、*B. licheniformis* は、D-Asp を細胞内に取り込み、分解し蛋白質などのペプチドに代謝していることが示された。当株において D-Asp の分解や代謝が行われたことは大変興味深い。アミノ酸は細胞に取り込まれた後、トランスフェラーゼ等により分解され、エネルギーや他の物質に利用される⁹⁾。D-Asp も例外ではなく、何らかの形で分解されたと思われる。どのような構造の酵素により分解されたかは定かではないが、D-Asp を分解する経路が当株に内在することを示唆している。

また、*B. licheniformis* は D-Asp を代謝する機構を先天的に保有していた可能性が高い。現在では地球上のアミノ酸は圧倒的に L-アミノ酸が多いとされているが、そうであれば D-アミノ酸をわざわざ分解する酵素を生成する機構は必要がないはずである。真正細菌である *B. licheniformis* がそれを保有している理由は、生物史上初期の生物、例えば古細菌などがその機能を保有しており、その機能の遺伝的継承によるものと考えられる¹²⁾。おそらく、太古の地球では D-アミノ酸

も重要なエネルギー源であり、その影響で DNA 上にその機能情報が残っており、種を超えて D-アミノ酸を代謝する機能が継承されているものと考えられる。

4 結言

本研究では、D-Asp 資化性のある株を 2 株単離できたが、そのうち 1 株 (TO-3 株) について分類同定を行った結果、*B. licheniformis* かその極近縁種と推測された。また、当株のペプチド性 Asp 分析を行った結果、D-Asp が他のアミノ酸に変換され、アスパラギン酸は L-Asp のみが検出された。さらに、D-Asp 培地で細胞増殖が確認されたことから、D-Asp を分解代謝し、細胞構成成分やエネルギー基質などに代謝できることが明らかになった(図 8)。これは、当株が D-アミノ酸を代謝するのに不可欠なラセマーゼや D-AAT 等の種々の酵素を保有する可能性を示唆している。しかしながら、細胞内タンパクに D-Asp が検出されなかったことから、D-Asp をそのままペプチド内に取り込む経路の存在は確認できなかった。

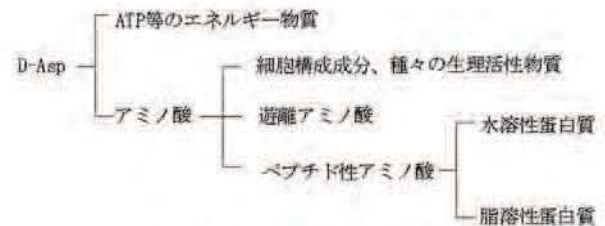


図 8 D-Asp の代謝産物

5 展望

今後は、グルタミン酸やセリン、アラニン等の他の D-アミノ酸にも焦点をあてて研究を試みる必要がある。より多くの生物、原核生物から真核生物の D-アミノ酸の資化や同化を検討することで、少しずつではあるがキラリティ問題の解決につながるのではないかと考えられる。

参考文献

- 1)G.Ivanovics, V.Brunkner: Z. Immunitaets: forsh, **90**, 304, 1937; **91**, 175, 1937
- 2)金子武夫・芝哲夫; タンパク質以外から分離されたアミノ酸: タンパク質化学 1. アミノ酸・ペプチド(赤堀四郎・金子武夫・成田耕造編), 共立出版, p.249, 1990
- 3)H.Hiroshi: D-ASPARTATE IN THE MAMMALIAN

BODY, *Viva Origino*, **30(4)**, 204-216, 2002

- 4) 西川佳宏・長沼毅:平成16年度温泉泥(ファンゴ)のD型アミノ酸微生物に関する研究(平成16年報告書), 2004
- 5) 安藤昭一:微生物実験法の基本操作,微生物実験マニュアル(安藤昭一編), 技報堂,東京,pp.37-39,1992
- 6) 門田元・多賀信夫:好気性従属栄養細菌,海洋微生物研究法(門田元・多賀信夫編), 学会出版センター, p.77, 1990
- 7) 成田耕造:分析試料の調整法,蛋白質工学(赤堀四郎ら編), 共立出版,pp.208-215, 1978
- 8) Alan H.Varnam・Malcolm G.Evans,Environmental: Microbiology, Manson Publishing Ltd,p.132(UK), 2000
- 9) T.A.Larue・J.F.T.Spencer:The Utilization Of D-amino Acids By Yeasts *Canadian Journal of Microbiology*,**13**, 777-788, 1966
- 10) C.M.Williams・C.S.Richter・J.M.Mackenzie,JR.・JasonC.・H.Shin:Isolation,Identification and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, **56(6)**, 1509-1515, 1990
- 11) 中尾眞:膜をこえての能動輸送,生化学下(中尾眞ら編), 共立出版, pp.571-572, 1974
- 12) 村尾澤夫・荒井基夫:微生物の種類と特徴,応用微生物学(村尾澤夫ら編), 培風館, pp.13-39, 2005