

好アルカリ性放線菌 TOA-1 株の同定

黒瀬 真美¹、木藤 圭亮²、武 英臣²、満生 慎二²、境 正志²

Identification of an alkaliphilic actinomycetes strain TOA-1.

Mami Kurose,¹ Keisuke Kitou,² Hideomi Kake,² Shinji Mitsuiki², Masashi Sakai²

A novel alkaliphilic actinomycetes strain TOA-1 producing PrP^{Sc}-degrading keratinase was isolated from surface of tile joints in bathroom. The strain produced substrate and aerial mycelis. Growth occurred in the pH range 7.0 – 12.0, with optimal pH at 10.0. Strain TOA-1 contained meso-diaminopimelic acid, no diagnostic sugars, iso-, anteiso-, 10-methyl branched fatty acids with 16-18 carbon atoms. Various organic substrates were used for growth, and various alkaline enzymes were produced. All of these characters and analysis of 16S rDNA indicated that the strain belonged to the genus *Nocardiopsis*, but differed genetically from other *Nocardiopsis* species.

Key words: *Nocardiopsis* sp., Alkaliphilic, identification

1: 緒言

浴室タイル目地より分離した好アルカリ性放線菌 TOA-1 株の生産するアルカリプロテアーゼ (NAPase) は、難分解性のケラチンや異常プリオンタンパク質を強力に分解するなど、産業利用上優位な特性を示している。

本放線菌の 16S rRNA 系統解析を行った結果、属名が *Nocardiopsis* であることまでは明らかにされているが、種レベルの同定にまでは至っていない。16S rRNA の相同性が、最も高かった *N. alba* においても 97.6% だったため、新規種である可能性が残されている。

そこで今回、形態学および生理学的特性の解析、および GC 含量などの分子解析を行い、TOA-1 株が新規種であることを明らかにすることを目的に研究を行った。

2: 実験方法

2-1: TOA-1 株の形態および生理学的特性

(1) 形態学的特性の検討

光学顕微鏡および電子顕微鏡 (SEM) により TOA-1 の形態の観察を行った。試料の調製方法および観察方法は成書^{1,2)}に従った。観察は孢子形成菌糸の分岐法および形態、胞子の形成法、胞子の形態および大きさ、鞭毛の有無、胞子のうの有無等を主に行った。

(2) 生理学的特性の検討

TOA-1 株の生理学的特性 (生育温度、生育 pH 範囲、ゼラチンの液化、スターチの加水

分解、脱脂牛乳の凝固およびペプトン化、メラニン様色素の生産、各種炭素源の資化性) および細胞壁構成成分 (ジアミノピメリン酸及び糖の種類) について成書^{1,2)}に従い検討を行った。

2-2: 菌体脂肪酸分析

菌体脂肪酸組成を細菌の分離・同定に利用するために開発された MIDI システムにより、TOA-1 株の同定を試みた。本システムによる同定は、NCIM Japan に依頼した。

2-3: 酵素生産能検定

各種の誘導基質 (可溶性澱粉、カゼイン、ケラチン、カルボキシメチルセルロース、ペクチン、キチン、Tween20、キシラン、プルラン) を 1% 加えたアルカリ酵素生産能検定培地を作成した。検定培地に TOA-1 株を接種し、30°C にて 2 週間培養した後、検定試薬を用いて、ハロ形成 (リパーゼの検定は脂肪酸カルシウムの結晶) の有無により、アルカリ酵素生産能を検定した。

2-4: TOA-1 株の分子解析

2-4-1: 菌体の大量調製

TOA-1 株, *Brevidacterium linens* (NBRC 12142), *N. listeri* (NBRC 13360), *N. alba* (NBRC 15097), *N. simplex* (NBRC 12069) を坂口フラスコにて培養 (30°C・3day) した菌体を高速冷却遠心機にて回収し、透析後凍結乾燥した。

2-4-2: ゲノム DNA の分離

成書^{1,2)}に従い TOA-1 株のゲノム DNA 抽出を行った。

¹九州産業大学工学研究科

²九州産業大学工学部

2-4-3: GC 含量の測定

2-4-2 で調製した TOA-1 株のゲノム DNA 5 μg を含む溶液に熱を加えて (100 $^{\circ}\text{C}$, 2 min) DNA を完全に溶解した後に急冷し、40 mM Acetate Buffer + 2 mM ZnSO_4 と Nuclease P_1 を加え加熱し、ヌクレオチドサンプルを作製し、C-18 カラム (HPLC) を用いて GC 含量の測定を行った。

2-4-4: 分子系統樹解析

先に明らかになった TOA-1 株の 16S rDNA の塩基配列および相同性解析の結果より、TOA-1 株を含めた *Nocardiopsis* 属細菌の分子系統樹を作製した。

3: 考察および考察

TOA-1 株は、至適 pH が 10.0 (生育可能範囲は pH 7.0-12.0) の好アルカリ性放線菌であった。電子顕微鏡の写真を Fig. 1 に示す。気中菌糸は単純鎖の直線状で、菌糸が分断して 10-50 の胞子を形成していた。基底菌糸にも分断が認められ、胞子は俵状、表面は滑らかで大きさは約 $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$ であった。



Fig. 1 TOA-1 株の走査電子顕微鏡写真

細胞壁構成成分のジアミノピメリン酸は meso-タイプのスプレットを認め、ガラクトース、グルコース、マンノース、アラビノース、リボース及びキシロースのスプレットは全く認められなかった。

TOA-1 株の菌体脂肪酸組成は、炭素数 16-18 のイソ・アンティソ ($\cdot 10$ -メチル) 分岐型であり、脂肪酸プロファイルの解析結果を MIDI のデータで照合したところ、*N. dassonvillei* が近縁菌群として示唆されたが、相同性は 0.041 と低かった。

プレート法によりアルカリ酵素産生能の検定結果、TOA-1 株はアルカリペクチナーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、キチナーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼなどの種々のアルカリ菌体外加水分解酵素生産能を有することが明らかとなった。

GC 含量は 61.37%mol であり *Nocardiopsis* の GC 含量 (60~70%) と一致した。

16S rDNA の BLAST 解析の結果より TOA-1 株は *N. alba* に対して最も相同性が高いことが明らかになっているが、相同性は 97.6% および 93.0% と種レベルの同定を行えるレベルではなかった。

TOA-1 株の系統分類学的位置を明らかにするため、得られた 16S rDNA の塩基配列をもとに行った分子系統樹解析結果を Fig. 2 に示す。分子系統樹の解析結果では最も近縁の *N. alba* や *N. listeri* とは別のクラスターを形成していることが明らかとなった。

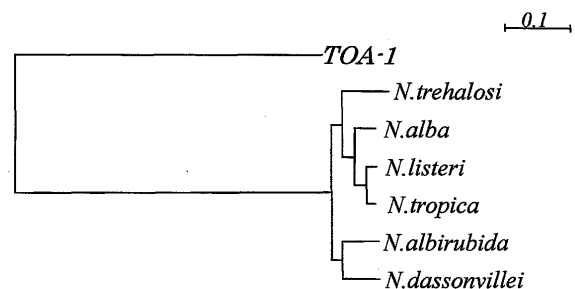


Fig. 2 TOA-1 株の分子系統樹解析

浴室タイル目地より分離した好アルカリ性放線菌 TOA-1 株の形態および生理学的特性の解析結果、脂肪酸の解析結果、GC 含量、および 16S rDNA のホモロジー解析結果より、本菌は *Nocardiopsis* 属細菌に属する新規種である可能性が高いことが示唆された。今後は、DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる相同性解析を行い、TOA-1 が新規種であることを明らかにする必要がある。

参考文献

- 1) 日本放線菌学会編；「放線菌の分類と同定 Identification Manual of actinomycetes」財団法人日本学会事務センター (2001 年)
- 2) 鈴木 健一郎 / 平石 明 / 横田 明 編；「微生物の分類・同定実験法—分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に—」シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社 (2001 年)