

メラニン色素産生能を有する好熱性放線菌の探索

西村 基弘*・国田 光嗣**・藤井 一***

Isolation of Thermophilic Tyrosinase-Producing Streptomycetes.

Motohiro NISHIMURA*, Mitsuhide KUNITA** and Hajime FUJII***

Abstract

Thermophilic *Streptomyces* sp. UK001-IS2, which produces tyrosinase, was isolated from a soil sample collected in Yamaguchi Prefecture. The microorganism showed the optimum temperature for growth and melanin production at 50 °C. In this paper, screening for thermophilic tyrosinase-producing streptomycetes and taxonomic characteristics of strain UK001-IS2 were reported.

1. まえがき

バイオテクノロジーの新たな潮流として、ここ数年、耐熱性微生物酵素の研究が盛んに行われるようになった。酵素は現在多くの分野に於いて利用されているが、一般に安定性に乏しく、使用範囲が限定されるうえ、長期の使用あるいは保存に耐えないという欠点を有している。一方、耐熱性の酵素は90°C付近の高温でも十分に活性を示すものも少なくなく、また、熱以外に有機溶媒や酸、アルカリに対しても安定なものが多い。このような特性を有する耐熱性酵素は、臨床検査分析の試薬として、あるいはバイオリクターとしてその適用が期待される。

酵素の耐熱性が注目されるようになって、耐熱性酵素の探索やその適用といった応用研究が盛んに行われたが、それにともなって、耐熱性における分子機構の解明に関わる研究も活発化している。その背景には、酵素の熱物性を支配する要因を明らかにすることによって、酵素を人工的に改変し、既存の酵素に耐熱性を付与することが可能になるからである。酵素の熱物性は、主としてその高次構造の安定性に起因する。そして、分子構造上の安

定性はその一次構造、すなわちアミノ酸配列によって規定される。このような観点から、アミノ酸のいくつかを他のアミノ酸に置換し、耐熱性を付与することに成功した例がいくつか報告されている⁽¹⁾。

現在のところ酵素の耐熱性は、このようにいくつかの構成アミノ酸の違いによるものとする考えが一般的である。最近、好熱菌由来の耐熱性酵素のアミノ酸配列を解析した報告がしばしばみられる⁽²⁾。しかしながら、これらについて高い相同性を持つ近縁種からのタンパク質が見当たらないため、直接相同性を比較して酵素の常温性・耐熱性を論ずるまでには至っていない。

Streptomyces に属する放線菌は通常、最適生育温度が28~37°Cの常温菌であるが、中には70°Cを最適温度とするものも存在する。また、同属には、メラニン色素を産生するものが多く、これまでにその産生を触媒する酵素チロシナーゼの遺伝子がいくつかクローニングされ、そのアミノ酸配列に関する知見も蓄積されている⁽³⁾⁽⁴⁾。

したがって、好熱性 *Streptomyces* 由来のチロシナーゼについて、そのアミノ酸配列が明らかになれば、既存のチロシナーゼとの相同性を比較することによって、常温性の酵素がいかにして耐熱性へと変化したかについて考察することが可能となる。ここでは、メラニン色素産生能を有し、50°Cを最適生育温度とする菌株の取得に成功したので、その分類学的性質も含めて報告する。

* 宇部工業高等専門学校物質工学科

** (株) 明和化成

*** (株) 東レ

2. 実験方法

2.1 培地

好熱性放線菌のスクリーニングには、イースト・麦芽寒天培地（酵母エキス 0.4%, 麦芽エキス 1.0%, グルコース 0.4%, 寒天 2.0%, pH 7.3）及びグリセリン・ツァベック寒天培地（グリセロール 1.0%, NaNO_3 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, KCl 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 寒天 2.0%, pH 7.0）を使用した。菌の形態観察のための培養には、イースト・麦芽寒天培地を使用した。菌体成分の分析及び最適生育温度決定のための培養にはイースト・麦芽培地（酵母エキス 0.4%, 麦芽エキス 1.0%, グルコース 0.4%, pH 7.3）を用いた。チロシナーゼの生産には34%シュクロースを含むMYT培地（トリプトン 1.0%, 酵母エキス 0.4%, 麦芽エキス 1.0%, グルコース 0.4%, チロシン 0.035%, メタルイオン水溶液* 1.0%, pH 7.3）を使用した。

* Composition (per liter) : ZnCl_2 , 40mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200 g; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10mg; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10mg.

2.2 メラニン色素産生好熱性放線菌の分離

採取した土壌 0.5 g に滅菌生理食塩水 10 ml を加え、菌懸濁液とし、5 分間静置したのち、その上清 0.1 ml を上記の寒天培地に塗布した。培養は 55 °C で行い、出現したコロニーより放線菌を分離した。メラニン色素産生株の確認は、培地にイースト・麦芽寒天培地を用い、生育したコロニーの周辺が茶褐色に染まることで行った。

2.3 分離菌株の形態観察

分離株の形態観察は、光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡により行った。光学顕微鏡では、基生菌糸分断の有無、気菌糸の形状、孢子囊あるいは菌核の有無、孢子連鎖の形状等について観察した。電子顕微鏡では、主として孢子及び孢子連鎖の観察を行った。

光学顕微鏡：オリンパス製 Model CHT
Model BH-2

走査型電子顕微鏡：日立製作所製 S-2300

試料前処理 単純乾燥法

Au 蒸着… 6 mA, 8 min

2.4 細胞壁タイプの決定

Streptomyces 属は、細胞壁成分であるジアミノピメリン酸について、LL-体は存在するが、meso-体が存在しないことから細胞壁タイプ I に分類される。本研究では、このことに着目して、ジアミノピメリン酸異性体の分析に限定した。全菌体試料からのジアミノピメリン酸の分析は Becker らの方法⁽⁵⁾に従った。すなわち、イースト・麦芽培地で増殖させた菌体を滅菌生理食塩水で洗浄後、エタノールで処理し乾燥菌体とする。乾燥菌体 100 mg に 6N 塩酸 2ml を加え、105 °C で 18 時間加水分解したのち固形分を遠心除去し分析試料とした。分析は下記の展開溶媒を用いたペーパークロマトグラフ法 (ADVANTEC No.51B) により行った。

メタノール：水：10 N 塩酸：ピリジン

= 80 : 17.5 : 2.5 : 10 (下降法)

展開後の検出は、0.5% ニンヒドリンの n-ブタノール溶液を噴霧し、100 °C で加熱することにより行った。なお、本分析においては *Streptomyces lavendulae* H646-SY2 株を対照として用いた。

2.5 最適生育温度及び最適メラニン色素産生温度

本スクリーニングで取得したメラニン色素産生株 (UK001-IS2) 1 白金耳をイースト・麦芽培地に植え、50 °C で 2 日間培養した。この培養液 0.5 ml を別の同培地 (8.0 ml) に植菌後、20, 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60 °C においてそれぞれ 5 日間振とう培養し、生育及びメラニン色素の産生状況を観察した。

2.6 チロシナーゼ生産のための培養

前項と同様に、まず UK001-IS2 株をイースト・麦芽培地にて前培養を行い、次いでその培養液 2.0 ml を MYT 培地 (100 ml) に接種した。培養は 50 °C で 3 日間振とうした。

2.7 培養菌体からの無細胞抽出液の調製

無細胞抽出液の調製は杉山らの方法⁽⁶⁾に準じた。すなわち、菌体を培養液から集菌後、buffer I* 次いで buffer II** により洗浄し、菌体と同量の石英砂を加えて破碎した。破碎菌体に少量の buffer II を加えて懸濁し、これを 30000 × g, 20 分間遠心分離した。得られた上清は無細胞抽出液として酵素活性の測定に供した。

BufferI: 10 mM Tris-HCl (pH 7.65), 10 mM 酢酸マグネシウム, 1 M 塩化カリウム, 6 mM 2-メルカプトエタノール, 5 mM EDTA-2 カリウム.

BufferII: 10 mM Tris-HCl(pH 7.65), 10 mM 酢酸マグネシウム, 30 mM 塩化アンモニウム, 6 mM 2-メルカプトエタノール, 5 mM EDTA-2 カリウム, 0.2 mM DFP, 3.45 mM PMSF.

2・8 チロシナーゼの活性測定法

チロシナーゼ活性の測定は以下の方法により行った。すなわち, 10 mM L-DOPA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.2) 3.0 ml をあらかじめ50 °Cに保温しておき, これに0.5 mM 硫酸銅を含む同緩衝液30 μ l, 次いで酵素溶液 \cdots 300 μ lを加えた。これを50 °C, 10 分間インキュベーションしたのち, 直ちに475 nmでの吸光度を測定した。なお, 本酵素1ユニットは, 50 °Cにおいて1分間に1 μ molのドーパクロムを産生する酵素量と定義した。

3. 実験結果および考察

3・1 メラニン色素産生好熱性放線菌のスクリーニングについて

本研究の目的はメラニン色素産生能を有する好熱性の *Streptomyces* を取得することである。しかしながら, 他の放線菌と *Streptomyces* をスクリーニングの段階でふり分けることはほとんど不可能であり, また, *Thermus* や *Bacillus* に代表される属には, 比較的高温条件を好む菌が多いうえ, 生育速度が放線菌より高いため, しばしば分離の障害となる。従って, スクリーニングの効率化を図るために以下のことに留意した。(1) 分離用培地はできるだけ放線菌に対する選択性の高いものを使用する, (2) 試料となる土壌はなるべく高温条件下の乾燥した場所から採取する, (3) メラニン色素産生能の有無が直接培地上で判別できるような培地を使用する。

今回のスクリーニングでは, 山口県内及び山陰地方の主として高温環境, 例えば, 焼却跡や温泉周辺部の土壌を中心に採取を行った。こうして, 約300種類の土壌を採取し, その中から63株の好熱性放線菌を分離した。そのうちメラニン色素を産生するコロニーはわずか1株 (UK001-IS2と命名, 写真1)のみであった。また, 取得した菌の多くは, コロニーの形状及び光学顕微鏡での

観察から *Streptomyces* 以外の放線菌であった。

3・2 分離株の分類学的性状

形態観察 イースト-麦芽寒天培地 (ISP-2) 上で生育させた UK001-IS2株のコロニーは, 肉眼では典型的な放線菌の形態を示し, 灰色の豊富な孢子を着生した。可溶性色素としてメラニンを産生した。

光学顕微鏡による同コロニーの観察結果を写真2に示す。基生菌糸の分断はみられず, 気菌糸は互生に分岐し, 菌核や孢子嚢もみられなかった。また, 孢子には運動性はなかった。

写真3は, ISP-2寒天培地上に形成したコロニーの一部を切り出し, 過剰の寒天をそぎ落として薄片とし, 一夜デシケーター内で乾燥したものを金属蒸着後, 走査型電子顕微鏡にて観察したものである。本菌株は, 表面が平滑で卵型の孢子 (0.7-0.8 \times 1.0-1.4 μ m) 50個以上からなる比較的長い孢子鎖を着生していた。

細胞壁ジアミノピメリン酸の分析 図1は全菌体試料からジアミノピメリン酸を分析した際のクロマトグラムである。ここでは, 試料の他, ジアミノピメリン酸標準品及びポジティブコントロールとして *Streptomyces lavendulae* H646-SY2 株の全菌体酸加水分解液を分析に供した。この結果, 本菌体細胞壁には LL-ジアミノピメリン酸は存在するが, meso- 体は含まれないことから, ポジティブコントロールと同様, 細胞壁タイプIに属することが判明した。

総括 孢子嚢を持たない放線菌で細胞壁タイプIに属するものとして, *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*, *Actinosporangium* など約9種類の属が知られている。これらのうち, UK001-IS2株は菌核や分生子殻, 偽似孢子嚢を持たず, 基生菌糸の分断もみられないことから *Streptomyces* に属すると考えられる。

3・3 最適生育温度及び最適メラニン色素産生温度

各温度での菌の生育及びメラニン色素産生状況について, 大きな差が認められたのは培養開始後3日目からであった。培養開始4日目の観察結果を表1に示す。これより, 本菌株の最適生育温度及び最適メラニン色素産生温度はおよそ50°Cであることが判明した。

3・4 チロシナーゼの至適反応温度

2・6に基づいて, チロシナーゼの生産培養を行ない, 本菌株の無細胞抽出液を調製した。これを粗酵素液とし

て、活性測定に供した。表2は、あらかじめ37℃、50℃および60℃に保温した反応液に粗酵素液(0.04 units)を加え、活性を測定した結果である。これより、UK001-IS2株が産生するチロシナーゼの至適反応温度は50℃付近であり、本酵素は中程度の耐熱性を示すことが明らかになった。

4. 今後の課題

今回分離した好熱性放線菌が産生するチロシナーゼは中程度ながら耐熱性を示すことが判明した。現在、本菌株の染色体DNAよりチロシナーゼ遺伝子のクローニングを行っている。

参考文献

- 1) 桐野裕美, 山岸明彦, 大島泰郎: 酵素の耐熱化設計, 蛋白質核酸酵素, Vol.37, No.3, 335-345 (1992).
- 2) Harumi TAKADA, Tohru YOSHIMURA, Toshihisa OHSHIMA, Nobuyoshi ESAKI and Kenji SODA: Thermostable phenylalanine dehydrogenase of *Thermoactinomyces intermedius*: Cloning, expression, and sequencing of its gene, J.Biochem., Vol.109, No.3, 371-376 (1991).
- 3) Valerie BERNAN, David FILPULA, Wayne HERBER, Mervyn BIBB and Edward KATZ: The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product., Gene, Vol.37, 101-110 (1985).
- 4) Shinichi KAWAMOTO, Mitinobu NAKAMURA and Shigetaka YASHIMA: Cloning, sequence and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces lavendulae* MA406 A-1., J. Ferment. Bioeng., Vol.76, No.5, 345-355 (1993).
- 5) B.Becker, M.P.Lечеvalier, R.E.Gordon and H.A. Lechevalier: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. Appl. Microbiol., Vol.12, 421-423 (1964).
- 6) Masanori SUGIYAMA, Akinori TAKEDA, Soon-Young PAIK, Osamu NIMI and Ryosaku NOMI: Acetylation of blasticidin S by its

producing actinomycetes J. Antibiotics, Vol.39, No.6, 827-832 (1986).

(平成7年9月20日受理)

表1 UK001-IS2株の生育とメラニン色素産生に及ぼす温度の影響

培養温度 (°C)	生育	色素産生
20	-	-
30	-	-
37	±	-
40	±	±
45	+	+
50	+++	+++
55	++	+++
60	-	-

- : Negative ± : Doubtful
 + : Weakly positive ++ : Positive
 +++ : Strongly positive

表2 チロシナーゼ活性に及ぼす温度の影響

反応温度 (°C)	相対酵素活性 (%)
37	14
50	100
60	89

*50℃における酵素活性を100%とした。

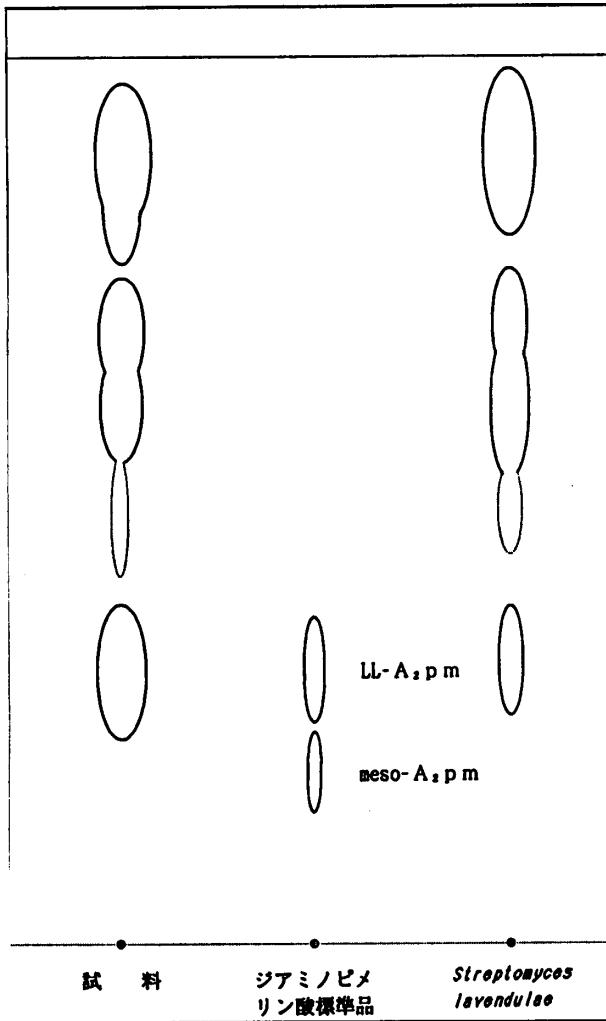


図1 ペーパークロマトグラフィーによるジアミノピメリン酸の分析

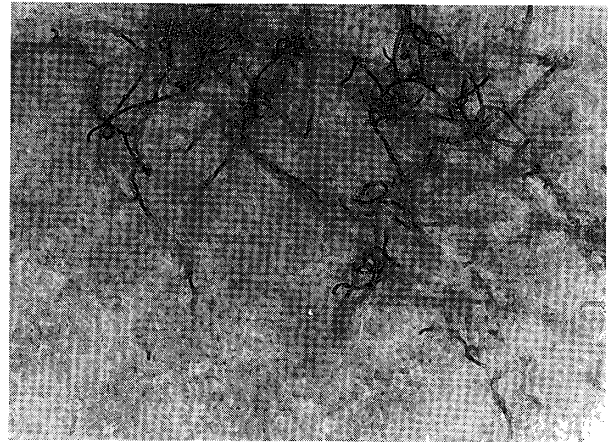


写真2 光学顕微鏡による UK001-IS2株の観察 (×400)



写真3 走査型電子顕微鏡による UK001-IS2株の観察

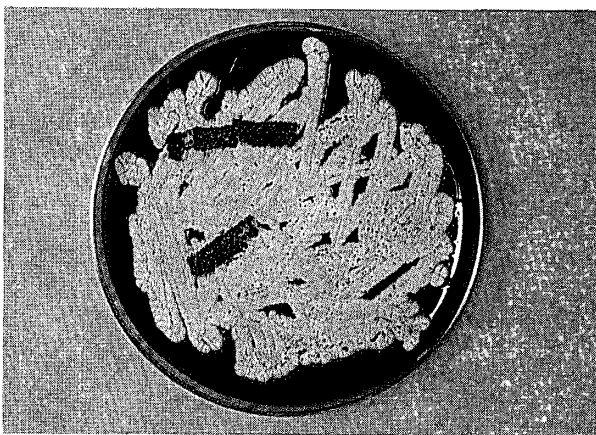


写真1 UK001-IS2株によるメラニン色素の産生