

土壌微生物由来の細胞体外高分子の分析

Analysis of Extracellular Polymers from Soil Microorganisms

○ 藤田真宇¹, 小田真弓², 谷川実², 星徹², 村松久司³, 西村克史^{2,4}* Miu Fujita¹, Mayumi Oda², Minoru Tanigawa², Toru Hoshi², Hisashi Muramatsu³, Katsushi Nishimura^{2,4}

In the natural world there are many kinds of biopolymers that have been poorly characterized. We have isolated microorganisms from soils that can assimilate D-aspartate or D-glutamate as solo nitrogen source. It was found that several strains in these microorganisms produced extracellular polymers. We cultivated a microorganism and prepared an extracellular polymer from the organ. The isolated polymer showed a molecular weight of 7600 upon gel filtration through a Superose 12 column. NMR spectra suggested that the polymer contained a sugar unit.

1. 目的

現在自然界には高分子を生産する微生物が多く存在するが、その多くは未利用のままである。先行研究において、土壌から分離した微生物中で、何種類かが菌体外高分子を生産することが分かった。本研究では、土壌微生物が生産する菌体外高分子を抽出し、同定を試みた。

2. 方法

2-1. 培養

野外分離株 (D-Asp6) を D-Asp を唯一の窒素源とした培地 (D-Asp 培地, 固体) で培養 (24 h, 30°C) し、シングルコロニーを D-Asp 培地 (液体) に植え、振蕩培養 (24 h, 30°C) した。

2-2. 細胞外高分子の調製

培養液を遠心分離 (3, 300 g, 20 min, 4°C) に掛け、沈殿した微生物を除き、高分子 (上澄み) を純水に対して 2 回透析 (500 ml, 1 h, 4°C) した後、限外濾過器 (Amicon Ultra-15 10K) を用いて約 4 倍に濃縮し、減圧乾燥 (45°C, 3 h) した。得られた乾燥サンプルを重水に溶かし、重水置換 3 回行った後、減圧乾燥 (45°C, 3 h) した。

2-3. NMR スペクトル測定

フーリエ変換核磁気共鳴装置 (FT-NMR) を用いて重水に溶かした試料の¹H-NMR と¹³C-NMR を測定した。

2-4. UV-VIS 吸収スペクトル測定

重水に溶かしたサンプルを 100 倍に希釈した後、UV-VIS 分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定した。

2-5. ゲル濾過クロマトグラフィー

得られた高分子の分子量を調べるために、サンプルを Superose12 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供した。150 mM NaCl を含む 20 mM リン酸 buffer を 0.4 ml/mol で流し、極大吸収波長 396 nm で検出した。標準タンパク質を用いて作成した検量線より、分子量を算出した。

2-6. 元素分析

恒量まで乾燥させたサンプルを、酸素混合したヘリウム気流下で燃焼させ、CO₂, NO_x, H₂O を定量することによって、それぞれの元素の比率を算出した。

3. 結果及び考察

3-1. NMR スペクトル

¹H-NMR のメインピークは 3.8 ppm 付近であり、¹³C-NMR スペクトルのメインピークは 60-90 ppm 付近であり、100 ppm 付近に大きいピークが出ていることから、D-Asp6 株の高分子成分には糖が含まれていると考えられた (Fig. 1, 2)。

3-2. UV-VIS スペクトル解析

UV-VIS スペクトルを測定した結果、396 nm に極大吸収が見られた (Fig. 3)。この結果からアゾメタン、*p*-ニトロアニリン、アントラセン等が含まれていると考えられるが、詳細は分かっていない。

3-3. ゲル濾過クロマトグラフィー

サンプルの溶出時間は 42.7 min であった (Fig. 4)。作成した検量線 (Fig. 5) から算出した結果、分子量は 7600 であった。

3-4. 元素分析

元素分析の結果、H:3.7%, C:15.1%, N:0.9% となった。モル比を算出すると H:62, C:21, N:1 となった。この結果から D-Asp6 株が生産する高分子の窒素含量は極めて低いことが分かった。

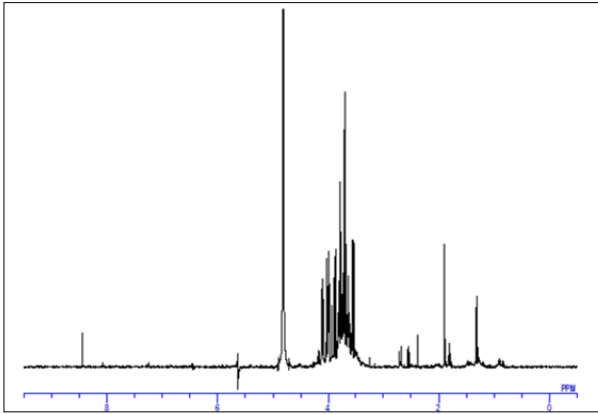


Fig. 1. ¹H-NMR

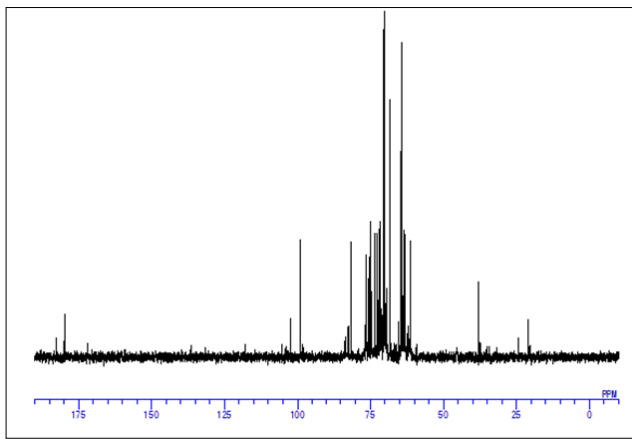


Fig. 2. ¹³C-NMR

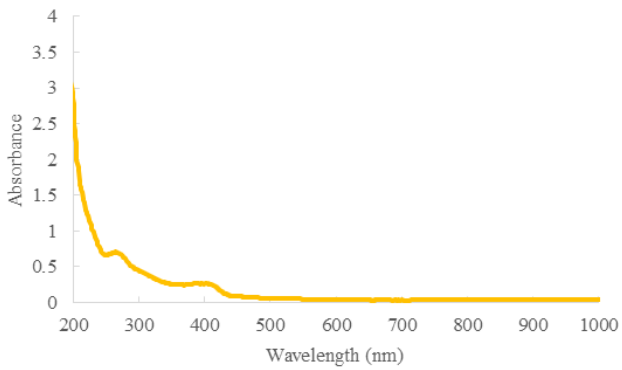


Fig. 3. UV-VIS スペクトル

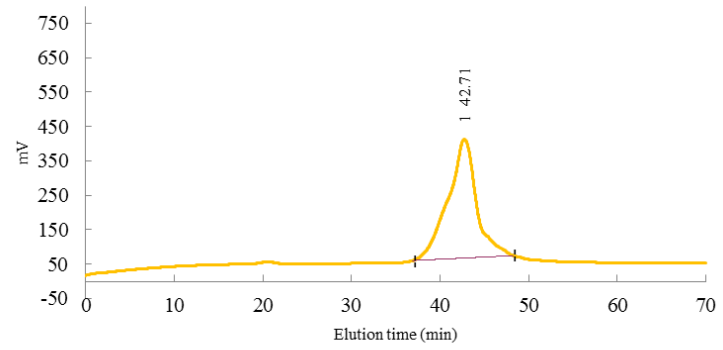


Fig. 4. ゲル濾過クロマトグラフィー

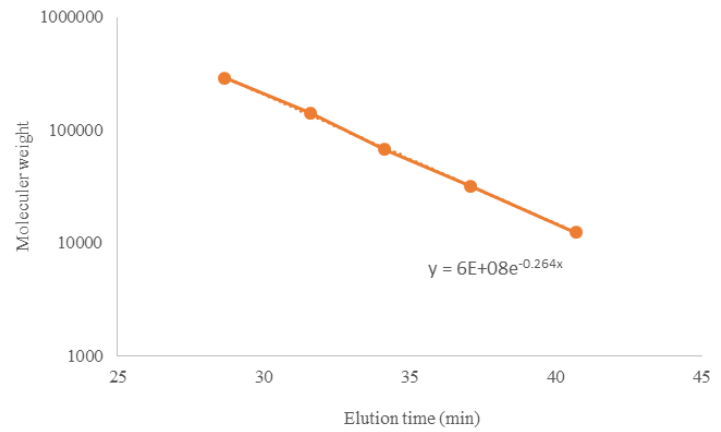


Fig. 5. ゲル濾過クロマトグラフィー検量線