

自然界からのアラニンラセマーゼ阻害物質生産微生物の探索

Search for alanine racemase inhibitor producing microorganisms from natural environments

○和田晴樹¹, 宮内勇樹², 小池美弥³, 谷川実³, 西村克史^{3,4}*Haruki Wada¹, Yuki Miyauchi², Miya Koike³, Minoru Tanigawa³, Katsushi Nishimura^{3,4}

Abstract: This research aimed to search for novel antibiotics from microorganisms in the soil and in the hydrosphere. We isolated 235 microorganisms from 6 locations in Japan. Sample 1-a which inhibited alanine racemase was identified as genus *Pseudomonas*, and Sample 11-b which also inhibited alanine racemase was identified as genus *Trichoderma*.

1. 目的

近年、薬剤耐性菌の増加や感染症の複雑化、抗生物質耐性菌感染の増加に伴い様々な環境由来の試料からの新薬発見に関心が集まっており、微生物由来の有用物質の探索が盛んに行われている。そこで、有機合成で作られた物質群に比べ、多様性に富んでいる微生物由来の抗生物質に着目した。

本研究では、反応機構が詳細に研究されているアラニンラセマーゼをターゲットした。本酵素は L-Ala と D-Ala を相互変換する酵素であり、細菌の細胞壁中のペプチドグリカン構成成分である D-Ala の生合成に関与し、細菌の増殖には必須であり、抗生物質のターゲットとして注目されている。そこで、アラニンラセマーゼの阻害活性を持つ新奇抗生物質の探索をした。

2. 方法

2.1 野外サンプル採取

関東の 5 公園と式根島より 96 個の土壌および水サンプルを採取した。

2.2 野外微生物の単離

2.1 で採取した試料サンプルを滅菌水で 1000 倍に希釈し、検体中の酵母や糸状菌の分離を行うためアンピシリンを含むポテトグルコース寒天培地に植菌した。その後、生育した細菌およびカビのシングルコロニーを別のポテトグルコース寒天培地に植え継いだ。

2.3 固液界面培養法

20 ml スクリュー管にポテトグルコース寒天培地を作成し、単離した微生物を植菌して 3 日間培養したのち、適量のジメチルシリコンオイルを重層して 7 日間静置培養を行った。その後、寒天表面上の有機相をマ

イクロテストチューブに回収しジメチルシリコンオイルを自然乾燥させ、100 μ l のジメチルスルホキシドに再懸濁してアラニンラセマーゼ阻害活性試験に供した。

2.4 アラニンラセマーゼ阻害活性試験

96 穴プレートに大腸菌無細胞抽出液 20 μ l, 基質 L-Ala 80 μ l, 2.3 で作製した試料溶液 1 μ l を添加し 25°C で 20 分間インキュベートした。その後 DAO (20 U/ml) 1 μ l, Peroxidase 発色液 30 μ l を添加し 10 分間静置後、0.1 M Sodium borate buffer (pH 10) を添加して 492 nm における吸光度を測定し、アラニンラセマーゼの阻害率を算出した。

2.5 アラニンラセマーゼ阻害活性のある抗生物質生産微生物の同定

アラニンラセマーゼの阻害率が高かった微生物から Dneasy Blood & Tissue Kit を用いてゲノム DNA を抽出し、ゲノム上の 16S rDNA (細菌) あるいは 18S rDNA (糸状菌) を PCR を用いて増幅した。得られた 16S rDNA と 18S rDNA 増幅産物を精製しシーケンス解析に供した。得られた配列と相同性の高い配列を DDBJ と NCBI の web サービスを用いて検索した。

2.6 グラム染色と光学顕微鏡による観察

液体培養した微生物をスライドガラス上に熱固定し、クリスタルバイオレット液とサフラニン液で順に染色した (グラム染色)。染色後の微生物を光学顕微鏡で観察した。

2.7 ペーパーディスク法による抗菌試験

検定シャーレ上に同定された微生物の培養液を浸み

1 : 日大理工・学部・応化 2 : 日大理工・院(前)・応化 3 : 日大理工・教員・応化 4 : 日大短大・教員・応化

込ませた濾紙 (Paper disk: 直径 0.55 cm) を置き, 3 つの検定菌 (大腸菌, 枯草菌, 酵母) をそれぞれ培養した. 培養後, 生育阻止円の有無を調べた.

3. 結果と考察

3.1 アラニンラセマーゼ阻害活性試験

アラニンラセマーゼの阻害率が高かった抗生物質を生産した微生物は, 単離した 235 微生物中 10 であった (Table 1). 同じ場所から採取した微生物で抗生物質は異なることが確認された.

Table 1. アラニンラセマーゼ阻害活性試験

サンプル	阻害率 [%]	サンプル	阻害率 [%]
1-a	112	10-b	101
1-d	23	10-d	52
1-f	46	11-b	132
2-a	127	12-a	127
2-d	112	12-c	90
3-a	106	14-c	60
4-a	19	14-d	127
4-b	118	15-a	92
5-c	121	16-c	94
5-d	55	17-a	48
6-b	60	20-a	82
8-a	35	20-c	55

3.2 アラニンラセマーゼ阻害活性のある抗生物質生産微生物の同定

DNA 抽出に成功した微生物は, 単離した 235 株中 1-a と 11-b の 2 つであった. それぞれをシーケンス解析に供した結果, 1-a はグラム陰性好気性桿菌である *Pseudomonas* sp. Strain B31 と, 11-b は糸状菌トリコデルマの 1 種でセルラーゼ高生産菌として有名な *Trichoderma reesei* との相同性が 99% であった.

3.3 グラム染色と光学顕微鏡での観察

グラム染色を行った結果, 1-a と 11-b は共にグラム陰性菌であることがわかった (Fig. 1, 2).

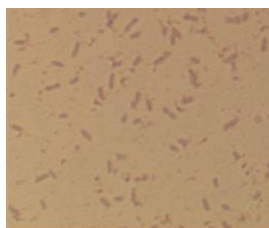


Fig. 1. 1-a のグラム染色

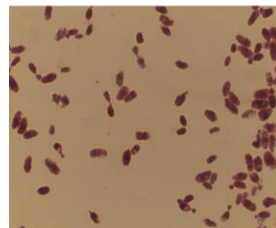
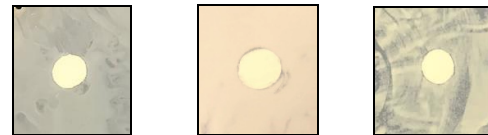


Fig. 2. 11-b のグラム染色

3.4 ペーパーディスク法による抗菌試験

1-a 株生産物質はアラニンラセマーゼを阻害したが検定菌に対して抗菌活性を示さなかった. これは抗生物質生産物が検定菌の中に取り込まれない阻害物質であるためと考えられる. 11-b 株生産微生物は大腸菌と枯草菌に対して抗菌活性を示した (Fig. 2).

1-a



大腸菌

枯草菌

酵母

11-b



大腸菌

枯草菌

酵母

Fig. 3. 抗菌試験

4. まとめ

単離した 235 種の微生物から, アラニンラセマーゼの阻害活性を持つ微生物を 2 株発見した (1-a, 11-b). 11-b は大腸菌と枯草菌に対して抗菌活性を示した. 16S rDNA と 18S rDNA 配列の解析より, 1-a はグラム陰性好気性桿菌である *Pseudomonas* 属の細菌, 11-b は糸状菌トリコデルマの 1 種でセルラーゼ高生産菌として有名な *Trichoderma* 属の糸状菌であることがわかった.