

非天然型糖質の微生物分解に関する研究

I. 土壤微生物による8種のペントースの分解

何 森 健, 畑 辺 由 治

MICROBIAL DEGRADATION OF UNNATURAL CARBOHYDRATES

I. Degradation of eight pentoses by soil microorganisms

Ken IZUMORI and Yuhji HATABE

Numbers of microbes in the soil that can grow on D-ribose, L-arabinose, D-xylose (natural pentoses), L-ribose, D-arabinose, L-xylose, D-lyxose, or L-lyxose (unnatural pentoses) as a sole carbon source were counted. In 1g of the garden and forest soils, about 10^5 to 10^6 of bacteria that can utilize the individual pentose as a sole source of carbon were found. However in the sea mud in the Inland Sea, about 10^2 to 10^5 of pentose utilizing bacteria were found and no microbe that could grow on L-lyxose or L-ribose was determined.

It seemed generally that natural pentoses were degraded rapidly by soil microorganisms. On the other hand, unnatural ones were utilized more slowly after some mutations.

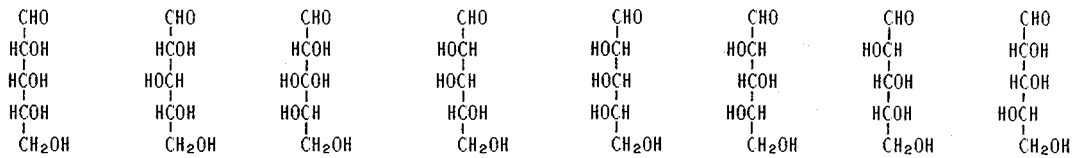
土壤中に存在する、8種のペントースそれぞれについて単一炭素源として生育する微生物の数を測定した。庭や森林の土壌では天然型、非天然型の区別なくほぼ1g土壌あたり 10^5 から 10^6 の細菌が計数された。一方瀬戸内海の内海泥中では天然型のペントースを資化する菌数は土壌1gあたり 10^2 から 10^5 の細菌が計測されたが、非天然型ペントース資化性菌はやや少なく 10^2 から 10^3 であり、L-リキソースおよびL-リボース資化性菌は設定した測定条件では計数されなかった。

各ペントースの土壤微生物による分解速度を測定した結果、一般的に天然型ペントースは速く分解資化され、非天然型ペントースは天然型と比較して緩やかに分解資化されることが明らかとなった。

緒 言

一般に自然界に多量に存在し広く分布している有機物を天然型、特殊な生物に少量極在するものを非天然型と分類することができる。非天然型の有機物の微生物による分解の代謝酵素系を研究することによって、微生物が新しい基質に対して生育能力を獲得する機構を解明する手掛かりを得ることができると期待される。さらに非天然型の基質に対する資化能を持つ微生物の検索は新しい微生物を自然界から得るという意味では重要な課題であり全く新しい酵素の発見につながる可能性を持っている。本研究では非天然型の糖質に注目してその微生物による分解酵素系に関する知見を得ることを目的としている。

8種のペントースの構造と天然型(N)、非天然型(U)の分類をFig. 1に示した。一般に天然型の糖質は微生物によって分解資化され易いが、非天然型のは分解資化されにくいと予想される。このような考え方のもとにMortlock等はL-リボースを除く7種のペントースを資化する*Aerobacter aerogenes* PRL-R3を用いて、天然型および非天然型のペントースの代謝経路について比較検討した⁽¹⁻³⁾。その結果、非天然型のペントースは構造的に類似した天然型の糖質の酵素系を利用することによって分解資化されることを示した。たとえば非天然型のペントースであるD-アラビノースは天然型の糖質であるL-フコースの代謝酵素系を利用して資化されることが明らかになった。これらの研究は微生物が新しい基質に対して生育能力を獲得する機構の研究として興味あるもので「試験管内における進



D-Ribose(N) D-Xylose(N) L-Arabinose(N) D-Lyxose(U) L-Ribose(U) L-Xylose(U) D-Arabinose(U) L-Lyxose(U)

Fig. 1. Structures of eight pentoses. (N; Natural pentoses, U; Unnatural pentoses)

化」とよばれている。我々は *Mycobacterium smegmatis* M7 が 8 種全てのペントースを資化できることを見出し、その代謝経路について検討し、その機構を明らかにした^(4,5)。 *M. smegmatis* の場合は D-アラビノースは新しい酵素であるペントースリダクターゼによって D-アラビトールに代謝され資化される機構が存在していた。このように微生物による 8 種のペントースの代謝経路を詳細に比較検討することにより、資化できない基質を酵素誘導の特異性を変化させるなどの巧妙な機構によって分解資化することが可能になる現象が明らかになってきた。

また我々は上記の「試験管内での進化」の研究とは異なる立場から 8 種のペントースを天然型、非天然型に分けて考察する試みを行った。すなわち 8 種のペントースに作用する各種のペントース・イソメラーゼについて総合的に考察しペントース・イソメラーゼの進化に関する仮説を提出することができた⁽⁶⁾。

このように 8 種の天然型および非天然型のペントースはいろいろな意味から興味深い実験材料といえる。本研究においてはこれらのペントースの自然界での微生物による分解に関して検討した。本実験では特に土壤中に存在する各種ペントース資化性菌の数を計数した結果およびその分解速度等について検討した結果を報告する。

実験方法

1. 還元糖の分析

培養基中の還元糖は Schales 法⁽⁷⁾ により定量し、微生物による分解の有無を測定した。

2. 微生物の生育の測定

微生物の生育は 600 nm における吸光度を測定することにより求めた。日立 101 型分光光度計に試験管アダプターを取り付け、直接培養試験管の吸光度を測定し連続的に生育を追跡した。

3. ペントース資化性菌数の測定

土壤中のペントース資化性菌数の測定には、糖質 0.1% を含む、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.26%, K_2HPO_4 0.56%, KH_2PO_4 0.24%, NaCl 0.1%, MgSO_4 0.001%, CaCl_2 0.002%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%, 酵母エキス 0.01% の組成の培養基を用いて、希釈法⁽⁸⁾ により行った。すなわち土壤を適当に殺菌水で希釈し 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} および 10^{-8} g の土壤を上記液体培地 3 ml に接種し 30°C で静地培養をおこなった。生育の有無および培養基中の糖質の分解量を測定することによりペントース資化性菌数を求めた。

4. 試薬

糖質は全て Sigma 社製を培養基用試薬は和光純薬社製の特級を用いた。

実験結果

1. 土壤微生物の各種ペントースに対する生育の特徴

香川大学農学部構内の庭の土壤を用いて実験をおこなった。殺菌水に土壤を懸濁したのち、各種のペントースを生育炭素源とする培養基に一定量接種し、生育を継続的に測定した。Fig. 2 から Fig. 7 にそれぞれ土壤 10^{-2} から 10^{-7} g を 8 種のペントースを単一炭素源とする培養基に接種した時の生育経過を示した。比較のために D-グルコースについても実験を行った。○—○は天然型のペントースを生育基質とした場合を示し、●—●は非天然型のものを示している。 10^{-8} g 以下の土壤ではいずれの糖質の場合も生育は見られなかった。天然型のペントースに対する生育は、非天然型のものよりも早く生育が始まり生育速度も大きいことが明らかとなった。この天然型のペントースに

対する生育が、非天然型のペントースに対して比較的速いという現象は、結果は示していないが他の土壌においても共通して認められる特徴であった。

培養10日目の培養液を顕微鏡観察および寒天平面培養シコロニーを観察することによって、いずれの培養炭素源を用いた場合にも2から3種類のバクテリアの生育が確認された。この実験条件では主にバクテリアの菌数を計測していることが明らかとなった。

2. 各種土壌中のペントース資化性菌の菌数

(1) 庭の土壌中のペントース資化性菌の数

香川大学構内の庭の土壌中に存在するペントース資化性菌の菌数の測定を行った。上記の Fig. 2 から Fig. 7 で示した8種のペントースに対する生育実験の結果を用いて資化菌数を測定した。すなわち15日後の培養基中のペントースの消費の有無を測定してそれぞれの資化性菌の菌数を求めた。Table 1 にその結果を示した。天然型のペントースである D-リボース, L-アラビノースおよび D-キシロースの資化性菌の菌数はいずれも土壌 1g 中約 10^6 個であった。一方非天然型のペントースである, L-リボース, D-アラビノース, D-リキソース, L-リキソース, および L-

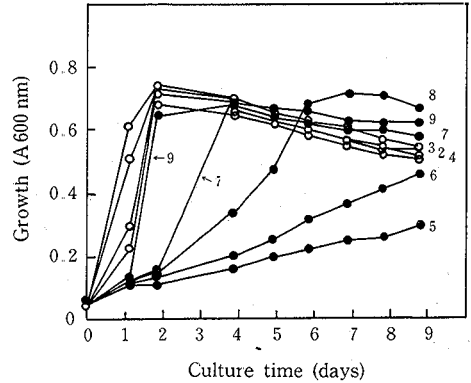
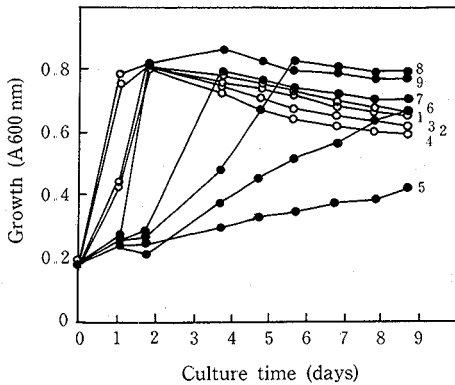


Fig. 2. Growth of soil microorganisms on eight pentoses and D-glucose. (10^{-2} g of garden soil was inoculated. ○; natural, 1 D-glucose, 2 D-ribose, 3 D-xylose, 4 L-arabinose, ●; unnatural, 5 L-ribose, 6 L-xylose, 7 D-arabinose, 8 D-lyxose, 9 L-lyxose)

Fig. 3. Growth of soil microorganisms on eight pentoses and D-glucose (10^{-3} g of garden soil was inoculated. Symbols are the same as Fig. 2)

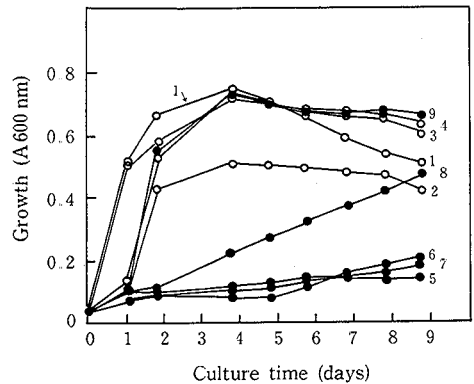
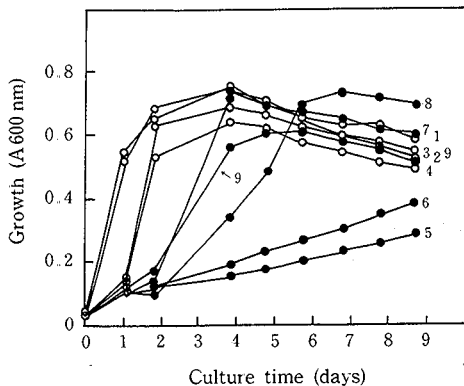


Fig. 4. Growth of soil microorganisms on eight pentoses and D-glucose. (10^{-4} g of garden soil was inoculated. Symbols are the same as Fig. 2)

Fig. 5. Growth of soil microorganisms on eight pentoses and D-glucose. (10^{-5} g of garden soil was inoculated. Symbols are the same as Fig. 2)

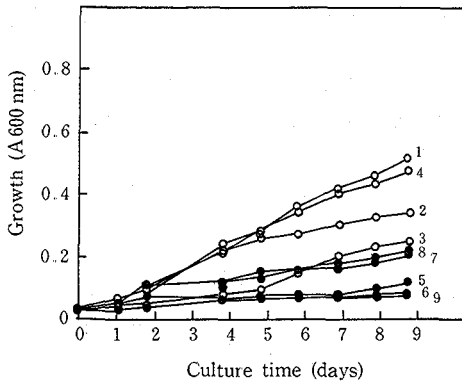


Fig. 6 Growth of soil microorganisms on eight pentoses and D-glucose (10⁻⁶ g of garden soil was inoculated. Symbols are the same as Fig. 2)

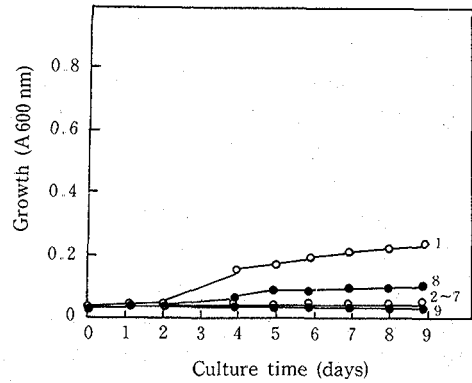


Fig. 7 Growth of soil microorganisms on eight pentoses and D-glucose. (10⁻⁷ g of garden soil was inoculated. Symbols are the same as Fig. 2)

キシロースの場合もほぼ同様に、その資化性菌も土壌 1g 中に約 10⁵ から 10⁶ 個存在した。比較する糖質として最も広く存在する D-グルコース資化性菌についても同時に測定した結果 10⁶ という値を得た。

(2) D-リキソース資化性菌の菌数の測定

非天然型ペントースとして D-リキソースをとりあげ、より詳細に検討した。各種の土壌中 D-リキソースおよび D-グルコースの資化性菌の数を計測した結果を Table 2 に示した。いずれの土壌中においても D-リキソース資化性菌は D-グルコースの資化性菌の数とほぼ同数であった。

より正確に菌数を測定するために庭の土壌中の D-グルコースおよび D-リキソース資化性菌の数を 5 連の試験管を用いて実験した。その結果 1g 中 D-グルコース資化性菌 3.3×10⁷ 個、D-リキソース資化性菌 2.2×10⁷ 個と計測された。

これらの結果は土壌中の D-リキソース資化性菌の数は D-グルコース資化性菌の数と大差ないことを示すものと考えられた。

Table 1. Numbers of pentose utilizing bacteria in the garden soil

Natural pentoses	Numbers/g	Unnatural pentoses	Numbers/g
D-Ribose	10 ⁶	L-Ribose	10 ⁶
L-Arabinose	10 ⁶	D-Arabinose	10 ⁶
D-Xylose	10 ⁶	L-Xylose	10 ⁵
		D-Lyxose	10 ⁶
		L-Lyxose	10 ⁵
		D-Glucose	10 ⁷

Table 2. Numbers of D-glucose and D-lyxose utilizing bacteria in various soils.

Carbohydrate	Soils				
	Forest soil A	Forest soil B	Radish field	Rice field	Garden soil
D-Glucose	10 ⁷ *	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
D-Xylose	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶

* Numbers/g

Table 3. Numbers of pentose utilizing bacteria in the sea mud.

Pentoses	Numbers/g			
	Station*			
	A	B	C	D
Natural				
L-Arabinose	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴
D-Ribose	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁴
D-Xylose	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ²
Unnatural				
D-Arabinose	10 ³	10 ²	10 ²	10 ³
D-Lyxose	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²
L-Lyxose	0	0	0	0
L-Ribose	0	0	0	0
L-Xylose	10 ²	0	10 ²	10 ²
D-Glucose	10 ⁴	10 ³	10 ⁵	10 ⁴

* Sea mud at Harimanada in the Inland Sea.

(3) 海泥中のペントース資化性菌の数

つぎに瀬戸内海播磨灘の海泥中のペントース資化性菌についても同様の条件で菌数を測定した。海泥は表層から約 1.5 cm までのものを用いた。Table 3 に示す如く 5 地点のいずれの海泥においても、非天然型のペントース資化性菌の数が少ないという庭の土の場合には見られなかった特徴が認められた。すなわち、それぞれの糖資化性菌の数は海泥 1 g 中に、天然型の糖質では D-グルコース $10^3 \sim 10^4$ 個、L-アラビノース $10^3 \sim 10^5$ 個、D-リボース $10^3 \sim 10^4$ 個、D-キシロース $10^2 \sim 10^4$ 個の資化性菌が計測された。一方非天然型のペントース資化性菌の数は天然型と比較して明らかに少なく、D-アラビノース $10^2 \sim 10^3$ 個、D-リキソース 10^2 個、L-キシロース $0 \sim 10^2$ 個となり、L-リキソースと L-リボースの資化性菌は計測されなかった。注目すべき特性は海泥中には L-リキソースおよび L-リボースの資化性菌は計測することはできなかったことであった。

3. D- および L-リキソース資化性菌の分離とその糖資化能の特徴

非天然型ペントースとして D- および L-リキソースをとりあげ資化性菌を分離し、その糖質資化能を調べること

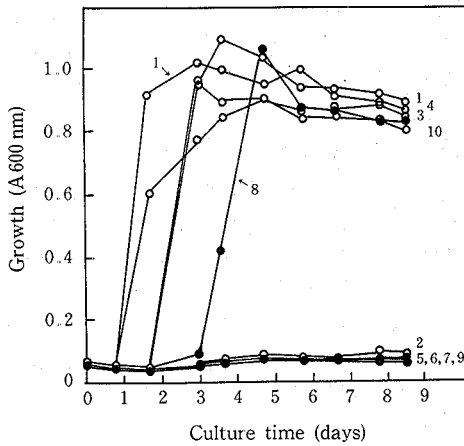


Fig. 8. Growth of D-lyxose utilizing strain D1 on eight pentoses, D-mannose and D-glucose. (Symbols are the same as Fig. 2 except 10 is D-mannose.)

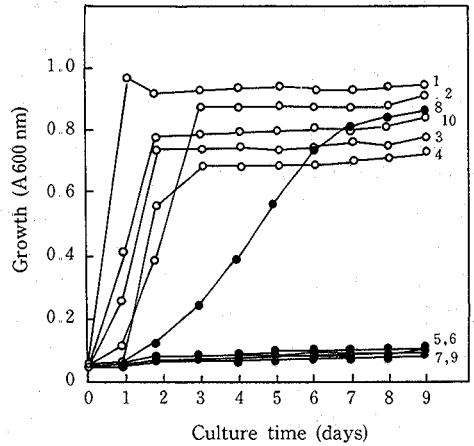


Fig. 9. Growth of D-lyxose utilizing strain D2 on eight pentoses, D-mannose and D-glucose. (Symbols are the same as Fig. 8.)

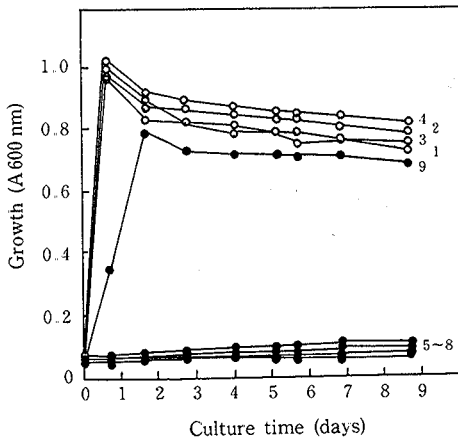


Fig. 10. Growth of L-lyxose utilizing strain L1 on eight pentoses and D-glucose. (Symbols are the same as Fig. 2)

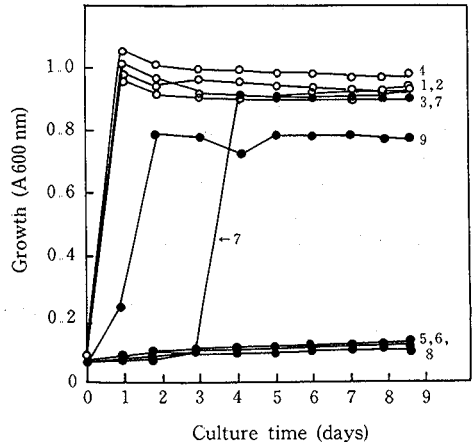


Fig. 11. Growth of L-lyxose utilizing strain L2 on eight pentoses and D-glucose. (Symbols are the same as Fig. 2)

によって非天然型ペントースの代謝酵素系に関する知見を得ようと試みた。D- および L-リキソース資化性菌の菌数測定を行った実験で生育の見られた試験管から平面培養によってコロニー分離を行いそれぞれを単一炭素源として生育できるバクテリア数株を簡単に分離することができた。

D-リキソース資化性菌 D1 および D2 株の各種ペントースに対する生育曲線を Fig. 8, 9 に、同様に L-リキソース資化性菌として L1 株および L2 株について Fig. 10, 11 に示した。これらの分離菌はそれぞれの非天然型ペントースに特異的に資化能を有しており、新たに資化能を獲得した変異株である特徴が認められた。

考 察

本実験では硫酸を窒素源としそれぞれ8種のペントースを単一炭素源として生育する微生物のうち特に土壌細菌によるペントースの分解に関して検討した。その結果天然型のペントース資化性菌の菌数は森林や庭の土壌中では、非天然型のものとほぼ同じ計数値が得られた。8種のペントース間でその資化性菌の数には大きな差が認められないことは、予想外の結果であった。一方 Fig. 2 から Fig. 7 の生育曲線が示しているように、明らかに天然型のペントースでは非天然型に比べて速く生育している。すなわち資化性菌の数はほぼ同数であったが生育速度に関しては、天然型のペントースが大きいことを示している。海泥を用いた実験では、森林や庭の土壌とは異なる結果が得られた。海泥中の菌数は相対的に少なく、特徴として天然型のペントース資化性菌の数が非天然型のものより多かった。特に L-リキソースと L-リボースの資化性菌は本実験に用いた条件では計測することができなかった。

本実験結果から土壌中には天然、非天然ともにペントースを資化できる細菌は比較的多数存在したが、その分解される速度は天然型のものが非天然型のものに比べて大きいことが明らかとなった。また海泥においてはその特徴が顕著になり L-リキソース、L-リボースについては菌数計測することができない程に分解速度は非常に小さかった。Mortlock 等の研究結果では *Aerobacter aerogenes* における非天然型のペントースの代謝系は天然型の代謝酵素系を利用することが明らかとなっている⁽¹⁻³⁾。菌数の少ない海泥中では非天然型資化性菌の数が少ないことは、いわゆる「試験管内の進化」に時間を要することを考慮すれば自然界での非天然型のペントースの分解においても天然型の酵素系が利用されていると考えてよいかもしれない。このことは単離した D- および L-リキソース資化性菌の各種ペントースに対する資化性の特異性を示す事実からも推測される。このように自然界においては新しい基質に適応し資化分解能を持つ変異株が容易に出現していると想像できるのである。

謝 辞

海泥を採取していただいた門谷茂博士に感謝いたします。また実験手法に関し貴重なご意見をいただいた木村龍介博士に感謝いたします。

引用文献

- | | |
|---|---|
| (1) E. J. OLIVER and R. P. MORTLOCK: <i>J. Bacteriol.</i> 108: 287 (1971). | (5) K. IZUMORI, K. YAMANAMA and A. D. ELBEIN: <i>J. Bacteriol.</i> 128: 587 (1976). |
| (2) E. J. ST. MARTIN and R. P. MORTLOCK: <i>J. Bacteriol.</i> 127: 91 (1976). | (6) 何森 健: 生物科学, 29: 169 (1977). |
| (3) E. J. ST. MARTIN and R. P. MORTLOCK: <i>J. Mol. Evol.</i> 10: 111 (1977). | (7) O. SCHALES and S. S. SCHALES: <i>Arch. Biochem.</i> 8: 285 (1945). |
| (4) K. IZUMORI, Y. WATANABE and S. SUGIMOTO: <i>Agric. Biol. Chem.</i> 44: 1443 (1980). | (8) J. R. POSTGATE: <i>Methods in Microbiology</i> 1: 611 (1969). |

(1986年5月31日 受理)