

研究成果

サブテーマ名:ウロン酸含有多糖類の栄養学的高度利用 小テーマ名:ウロン酸含有多糖類の栄養学的高度利用
サブテマリーダー:県立長崎シーボルト大・院・教授、研究科長、奥 恒行 研究従事者:県立長崎シーボルト大・院・教授、四童子好廣、 県立長崎シーボルト大・院・教授、上田成一、 県立長崎シーボルト大・院・教授、田中一成
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>1)研究の概要 長崎県海洋領域からアルギン酸分解微生物を選択し、その微生物によるアルギン酸分解培養法を検討すると共に、アルギン酸分解物を作成し、その機能性を検討した。その結果、ビブリオ属SUN53菌によるアルギン酸低分子分解物が、二糖類水解酵素阻害活性、虫歯菌による不溶性グルカン生成の阻害活性、耐熱性カビに対する防カビ効果をもっていることが明らかになった。</p> <p>2)研究の独自性・新規性 ビブリオ属SUN53菌によるアルギン酸低分子分解物が、二糖類水解酵素阻害活性、虫歯菌による不溶性グルカン生成の阻害活性、耐熱性カビに対する防カビ効果をもっていることを明らかにしたことは新しい知見である。および に関しては特許出願をしているところである。</p> <p>3)研究の目標(フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に) ビブリオ属SUN53菌によるアルギン酸低分子分解物を大量に作成するための培養条件を検討した。 ビブリオ属SUN53菌によるアルギン酸低分子分解物を工業的に生産するために、連続培養条件を検討した。 ビブリオ属SUN53菌によるアルギン酸低分子分解物を大量に作成するための単離・精製法を検討すると共に、その物理化学的性状を検討した。 アルギン酸低分子分解物の機能性を検討するために、二糖類水解酵素活性に対する阻害効果および虫歯菌による不溶性グルカン生成に対する阻害効果を観察した。虫歯抑制効果を観察するために、虫歯菌 <i>S.sobrinus</i> から GTase を部分精製し、不溶性グルカン生成阻害測定法の確立を試みた。 SUN53菌によるアルギン酸分解物の機能性を比較するために、低分子化アルギン酸、ポリグルロン酸、ポリリマンヌロン酸などを基質に用いて異なった分解物を作成した。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況(目標と対比して)</p> <p>1.アルギン酸分解細菌の海環境からの分離 従来から報告されているアルギン酸分解細菌の分離法は、「コロニー周辺の分解帯の有無」を判定基準としており、効率的な分離法とは言えない。そこで、本研究ではまず新規のアルギン酸分解細菌の分離法に着手した。すなわち、アルギン酸Caをベイト(釣り餌)に用いたベイトトラップ法(釣り餌法)を行った。アルギン酸分解細菌をトラップに集積し、ベイトの粘質化あるいは消失により肉眼的判定が可能となり、効率のよいアルギン酸分解細菌分離法として確立した。 長崎市近郊の海環境から採取した海岸砂 17 試料、汽水泥 2 試料、貝 2 試料、海藻 7 試料の合計 28 試料からベイトトラップで 66 株の細菌を分離した。アルギン酸分解活性については、アルギン酸がアルギン酸分解酵素の作用を受けた後に生ずる還元糖を Somogyi-Nelson 法で定量することにより測定した。66 株の分離株のうち約半数の 34 株が分解活性を示した。その中で 19 株は分解活性が高く、これらの菌株については、グラム染色、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、糖の発酵性試験など常法により属レベルで同定し、<i>Acinetobacter</i> 属 1 株、<i>Alteromyces</i> 属 1 株、<i>Flavobacterium</i> 属 2 株、<i>Moraxcella</i> 属 2 株、<i>Vibrio</i> 属 12 株、<i>Staphylococcus</i> 属 1 株を得た。</p> <p>2.アルギン酸分解細菌の分子生物学的同定と生理学的性質 <i>Vibrio</i> 属 12 株のうち、還元糖生成量の高かった 6 株について、酵素活性と粘度低下試験を行い総合的な結果から 3 株(Sun 53, 98, 103)を選択し、16SrRNA 遺伝子による種の同定を行った。菌体から抽出した DNA を常法に従って PCR で増幅し、塩基配列を決定した。その塩基配列をゲノムデータバンク DDBJ のデータベース BLAST でホモロジー検索を行った結果、Sun53 は <i>Vibrio alginolyticus</i> strain SRI、SUN98 と SUN103 は <i>Vibrio alginolyticus</i> strain zouA と 100%相同性をそれぞれ示し、3 株が <i>Vibrio alginolyticus</i> であることを確定した。また、これら 3 株を用いて培養温度、NaCl 濃度、pH について調べたところ、生育温度は 10 ~ 40、NaCl 濃度は 1~10%、pH は 6~9.5 の範囲で生育した。なお、高い分解活性を示した SUN53 株は独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託(受託番号 NITE P-14)した。</p> <p>3.アルギン酸低分子分解物を得るための培養条件の検討 SUN53 株を供試菌とし、培地の栄養条件(ペプトン濃度、NaCl 濃度、アルギン酸 Na 濃度)と培養条件(静</p>

置培養、振とう培養)について検討した。ペプトンの濃度については 0.025、0.05、0.1%の3濃度で行ったところ、0.05%が最も適していた。また、NaCl濃度については0.5~6%、アルギン酸ナトリウム濃度は0.25~2%の範囲でそれぞれ検討したところ、アルギン酸オリゴ糖を多量に効率よく得るには3%NaCl、2%アルギン酸Naで25、7~10日間の振とう培養が適していることが明らかとなった。

4. バイオリクターによるアルギン酸オリゴ糖生産のための連続培養

回分式培養の培養条件は確立したので、次いでバイオリクターによるアルギン酸オリゴ糖の工業的生産につながる基礎研究を目的とし、SUN53株を固定化させる担持体、消泡剤、エアレーション量、滞留時間等の検討を行った。その結果、担持体は気孔口60~300μmの特殊ガラス担持体が最も適しており、消泡剤はポリエーテル系PE-Lが消泡効果は高く、エアレーション量は20ml/minが適しており、滞留時間は7日間必要であることが明らかとなった。これらの知見を基に最終的に4L容培養瓶を用いて、バイオリクターによるアルギン酸オリゴ糖生産のための連続培養を27日間試みたところ、定常期を迎えた5日目を100%とすると、連続培養に切り替えた後は平均して50%強のアルギン酸オリゴ糖が連続して得られた。

主な成果

具体的な成果内容: ビブリオ属SUN53菌によるアルギン酸分解物を75%エタノール分画した上清は、二糖類水解酵素阻害活性を示した。この阻害効果はスクラーゼに対して最も強く、次がマルターゼとイソマルターゼであった。この阻害は拮抗的であった。また、この低分子分解物はS.mutansならびにS.sobrinusの不溶性グルカン生成を阻害した。さらに、この低分子分解物は耐熱性カビNeosartorya pseudofischeri UDA-01株とTalaromyces macrosporus MIT-01株に対して1/8倍濃度で発芽阻害を示した。また、一般カビのAspergillus niger, Aureobasidium pullulans, Penicillium funiculosum, Rhizopus oryzaeに対しても1/2倍濃度まで生育を抑制した。これらの結果より、得られたアルギン酸オリゴ糖は一般カビよりも耐熱性カビに対して抑制効果があることが明らかとなった。

特許件数: 2 論文数: 1 口頭発表件数: 7

研究成果に関する評価

1) 国内外における水準との対比

ビブリオ属SUN53菌によるアルギン酸低分子分解物が二糖類水解酵素阻害活性を持っていることならびに虫歯菌による不溶性グルカン生成に対して阻害効果を示すことを明らかにしたのは、当研究成果がはじめてである。また、当アルギン酸低分子分解物が一般カビよりも耐熱性カビに対して抑制効果があることを明らかにしたのも当研究成果がはじめてである。

2) 実用化に向けた波及効果

まだ、その段階に達していない。アルギン酸分解物の機能性食品や生活用品への応用が確立されれば、海洋県である長崎の地域貢献に寄与できるものと確信している。

残された課題と対応方針について

実用化するには、当低分子分解物の物理化学的性状を明らかにすると共に、効果的な培養条件、単離・精製法を確立する必要がある。さらに、他の類似した機能を持った物質を比較して遜色ないことなどを明らかにする必要がある。現在、それに取り組んでいるところである。

	JST負担分(千円)							地域負担分(千円)							合計
	H13	H14	H15	H16	H17	H18	小計	H13	H14	H15	H16	H17	H18	小計	
人件費	0	0	0	0	0	0	0	0	7,000	14,000	14,000	7,000	4,200	46,200	46,200
設備費	0	0	2,057	0	0	0	2,057	0	0	0	0	0	0	0	2,057
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	0	0	3,985	6,000	4,000	1,000	14,985	0	0	0	0	0	0	0	14,985
旅費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小計	0	0	6,042	6,000	4,000	1,000	17,042	0	7,000	14,000	14,000	7,000	4,200	46,200	63,242

代表的な設備名と仕様[既存(事業開始前)の設備含む]

JST負担による設備: バイオシェーカー

地域負担による設備: 高速液体クロマト、冷却遠心機、電子走査顕微鏡、光学顕微鏡、クリーンベンチ

複数の研究課題に共通した経費については按分する。