

# チアミン資化性微生物コンソーシアが有するチアミン代謝経路の解明

熊野 匠人  
筑波大学 生命環境系

## 研究の目的

ビタミン B1 であるチアミン(図 1)が植物・微生物等が有するチアミナーゼにより分解されることは有名である。一方、チアミンと土壌を混合しインキュベートすると多様なチアミン分解産物が生じることが報告されている [J. Biol. Chem, 245, 2599-2604(1969)]。この分解反応には微生物が関与することが示唆されているものの、現在までその経路によるチアミン分解に関与する微生物の報告はない。我々はスクリーニングにより、この分解反応に関与する微生物(以下 A 株)を見出した。その後 A 株には 3 種の微生物が含まれていることがわかり、これらを混合培養しチアミンとインキュベートすると、チアミン分解産物と予想される化合物が複数検出できた。本研究ではこの 3 種の土壌細菌によるチアミン代謝の機序を酵素・遺伝子レベルで明らかにすることを目的とする。

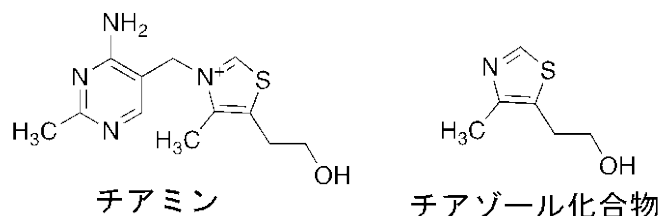


図1. チアミンおよびチアゾール化合物の構造

## 方法

### 1. チアミン資化微生物のスクリーニング

筑波大学周辺および新潟県各所より採取した土壌約 0.5 g をチアミン単一炭素源液体培地 (チアミン 0.025%、硫酸アンモニウム 1%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.0005%、水道水 20%、pH 7.0) と単一窒素源培地 (上記単一炭素源培地にグルコース 1%を加え、硫酸アンモニウムを除く) に添加し 28°C で 1 週間、振盪培養を行った。微生物の生育がみられた試験官の培養液は同組成の培地に 1% 植え継いだ。これを 3 回繰り返して、10<sup>4</sup> 倍に希釈し同組成の寒天培地 (上記単一炭素源培地に寒天 1.5% を添加) に 100 μl 塗布した。生育したコロニーを新しい培地に植え継ぎ単離すると同時に再度チアミン単一炭素源液体培地で培養し、休止菌体反応 (チアミン 5 mM、100 mM リン酸バッファー (KPB) (pH 7.0)、菌体懸濁液 10 μl、28°C で 16 時間) および、無細胞抽出液 (CFE) 反応 (100 mM チアミン 5 μl、CFE 95 μl (CFE は 100 mM KPB (pH 7.0) で調製)、28°C で 16 時間) を試み、等量のアセトニトリルで反応停止後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

## 2. チアミン代謝産物の分析

チアミンとともにインキュベートした反応溶液は、反応停止後 HPLC (島津) および LC/MS (島津) で分析した。[HPLC 分析条件: A: 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 7.73)、B: 100% アセトニトリル、グラジエント 0-5 分 0%B、5-12 分 0-15%B、12-15 分 100%B、15-20 分 0%B、カラム COSMOSIL 5C18-AR-II 4.6×150 mm (ナカライ)、流速 1 ml/min]

## 3. チアミン代謝酵素の精製・同定

A 株を培養後、超音波破碎し、50%硫酸で沈殿後、疎水カラムやイオン交換カラム等を用いてチアミン代謝酵素の精製を行った。各段階において、酵素活性測定および、SDS-PAGE により各フラクションを精査し精製を進めた。単一に精製した目的酵素については、N 末端アミノ酸配列を解析し、微生物のゲノム中より翻訳後 N 末端アミノ酸配列が一致する遺伝子を同定した。

## 結果

### 1. チアミン資化微生物のスクリーニング

チアミン単一炭素源液体培地を用いた集積培養により、合計 166 個のチアミン資化微生物のコロニーを単離した。それぞれのチアミン代謝活性を HPLC で分析した結果、A 株で良好なチアミンの分解および複数の代謝産物が見られた (図 2)。A 株を栄養培地で培養すると 3 種の微生物が混ざっていることが判明した。16S rRNA 解析の結果、3 種はそれぞれアクロモバクター、シュードモナス、ノカルディオイデス属であることが判明した。この 3 種を共培養した時にチアミン分解活性が最も高かったのでこの 3 種の集合を A 株として以降の実験に用いた。

### 2. チアミン代謝産物の同定

A 株の CFE とチアミンをインキュベートしたところ、図 2 に示すような複数の反応産物と考えられるピークが見られた。LC/MS の結果から、ピーク 1 はチアミンがチアミナーゼによって加水分解された産物の一つであるチアゾール化合物(4-メチル-5-ヒドロキシエチルチアゾール)であると推定された。また、チアゾール化合物と共に生じると予想されるピリミジン化合物の 2-メチル-4-アミノ-5-ヒドロキシメチルピリミジンについてはこの条件では検出されなかった。その他の化合物については今後解析していく予定である。

### 3. チアミン代謝酵素の同定

まず、チアミン代謝の初発酵素の精製について試みた。A 株の CFE を硫酸分画し、

その後各種カラムクロマトグラフィーに供したところ、収率 0.44%、比活性 120 倍まで精製することができた。この精製酵素の N 末端アミノ酸配列を決定後、A 株のゲノムより遺伝子を同定した。

相同性検索を行った結果、このチアミン代謝の初発反応を触媒する酵素はチアミナーゼ II と相同性を示した。また、このチアミナーゼ II は A 株の 3 種の菌のうちノカルディア属細菌に由来することがわかった。

したがって、チアミン代謝の最初の反応は A 株の中のノカルディア属細菌が担っていることが明らかになった。

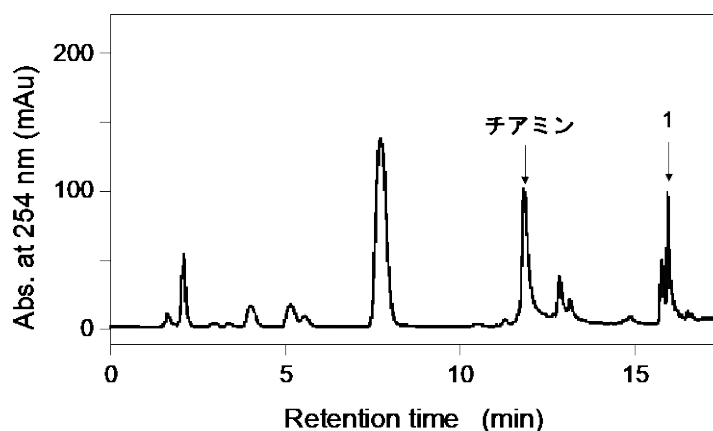


図 2. A 株の CFE とチアミン反応溶液の HPLC クロマトグラム

1 はチアミンの加水分解によって生じたチアゾール化合物のピークを表す。

## 結論

これまで不明であったチアミンを分解する微生物を土壤中より取得し、環境中での分解経路の一端を明らかにすることができ、基礎科学的に意義深い研究成果が得られた。さらに A 株のチアミン代謝経路を研究することで、より詳細なチアミン代謝経路が明らかになることが期待される。