火山熱水系等の特殊環境に生育する微生物が産生する生理活性物質の検索

研究代表者　理工学部　牧野　修
研究共同者　理工学部　笹川　展幸
理工学部　木川田　喜一

研究課題の目的と背景

近年，微生物資源の産業利用が大きく注目され，極限環境に棲む新たな微生物種の発見とその応用が大きく期待されている．そのような極限環境のひとつが火山熱水系である．地球の生命は約40億年前に海底熱水噴出孔で生まれたとの考えは，生命の起源に関する代表的な仮説のひとつであり，また地球の進化（地球環境の変遷）は火山活動と生命活動とに大きく支配されていることからして，生命と火山とにはきわめて密接な関わりがあると言える．火山熱水系では高温，高圧，強酸から強塩基までの幅広い水素イオン濃度など様々な極限環境が形作られており，我々にとって身近な存在である温泉にも，未だ発見されていない，あるいはその詳細が明らかでない微生物が数多く棲息しているはずである．実際，従来は無機化学反応でのみ説明されていた温泉沈殿物（温泉華）の生成機構も，今日では多くの場合，温泉微生物の関与が不可欠であると考えられるようになっている．これは一種のバイオミネラリゼーションであり，地球上の様々な環境で生物が作り出す無機化合物やその化学的合成プロセスが材料科学の一分野として注目されている．また，イタリアを中心に広くヨーロッパで行われているファンゴ療法(温泉泥療法)は，火山熱水系の微生物が人間の生理活性に作用することを示し，将来の医薬品の開発へと繋がる可能性を秘めている．本研究では，火山熱水系の微生物資源を新規に発掘し，その産業利用の可能性を探索することを目的とした．

サンプルの採取（主担当　木川田）

本研究課題では，群馬県の草津白根火山地域の火山熱水系を研究対象とした．草津白根火山はその周辺に多くの火山ガス噴気地帯と源泉群を有し，我が国を代表する火山性温泉群の草津温泉を擁している．また草津白根山の山頂火砕丘には3つの火口湖があり，中でも最大の火口湖である湯釜は，湖底から火山ガスの供給があるためにその湖水は強酸性あり，湖底浅部には溶融硫黄の存在も確認されている世界的に知られた活動的火口湖である．このように草津白根山は浅部熱水系の卓越した火山であり，本研究課題の研究対象として最適と判断した．

下の写真は採取を行った草津白根山火口湖（湯釜）及び源泉の一つ（万代鉱源泉）である。

湯釜

万代鉱源泉

採水試料の水質分析結果

採水番号	地点	気温 ℃	水温 ℃	pH	溶存濃度 (mg/dm^3)											
					Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Al^{3+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Mn^{2+}	Si	Cl^-	SO_4^{2-}	F^-
11100801	湯釜U-2	6.4	18.3	1.39	26.0	14.0	23.1	89.0	141	75.8	0.9	0.93	80.7	2777	1184	793
11100802	水釜	6.4	3.5	3.03	3.5	1.4	1.5	48.1	13.5	4.8	3.9	0.06	16.6	0.40	263	0.4
11100803	湯釜U-1	8.7	18.3	1.36	26.0	14.0	23.9	86.5	140	75.6	0.5	0.94	84.7	2741	1189	827
11100804	涸釜	7.9	10.5	4.10	0.3	0.3	0.1	0.3	0.2	0.2	0.0	0.01	2.3	0.5	5.0	0.8
11100901	草津湯畑	15.2	51.4	2.05	57.3	29.2	38.9	76.3	50.3	17.5	0.2	2.17	91.9	310	797	-
11100902	万代鉱	16.7	95.9	1.70	105	61.5	57.5	96.7	46.0	5.9	0.1	3.37	208	622	1310	-

微生物培養上清の調整（主担当　牧野）

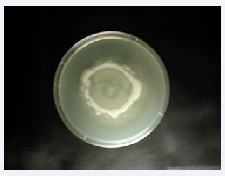
寒天を用いた強酸性の固体培地の簡便な実用は困難であったため、まず強酸性の液体培地と中性の個体培地を用いることとした。

採取した二つの源泉からは微生物の生育はなかった。

一方、湯釜及び水釜から採取した湖水及び土壌（湖底を含む）を液体培養したところ、強酸性の条件下でも10から14日培養すると（30度、37度両者ともに）バクテリアもしくはカビと思われる微生物が生育してきたので、個体培地に接種、分離同定を試みた。固体培地上で観察すると明らかに異なる微生物（カビと思われた）が数種類生育していた。これらから典型的と思われるものを選んで生理活性の測定に向けた培養を続行した。そこで、湯釜から得られた微生物3種類（b1-3）および、水釜由来の2種類（c1、c2）を選び、生理活性の測定に有利と思われる中性培地で培養を行った。

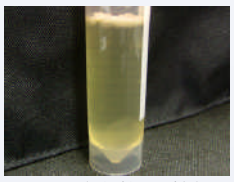
右上へ続く

b1



b3

c1



b3（液体培養）

液体培養は攪拌せず、静置培養とした。写真に見えるように培地表面と底部に細胞の集団が見られる。30度で2週間培養後、培養上清（中間層）を採取し、分子量3,000以下の物質を透過するフィルターを用いて約15倍に濃縮し、生理活性測定用のサンプルとした。対照実験用のサンプルとして、培養前の培地を同様のフィルターで処理したものを用いた。

生理活性の測定（主担当　笹川）

牛副腎髄質クロマフィン細胞を用いたアンペロメトリー法による開口分泌の測定と解析

カテコラミンの開口分泌を微小炭素繊維電極（先端直径 5 m）を作用電極として用いたアンペロメトリー法で測定した。アンペロメトリー法の原理と装置の写真を図1に示した。

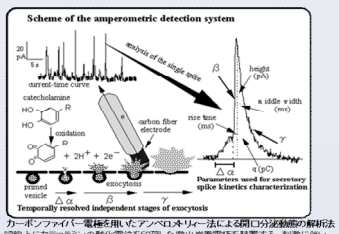
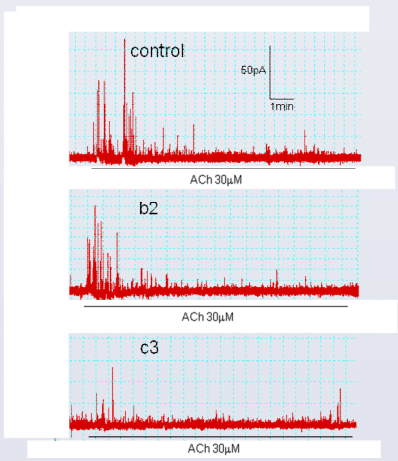
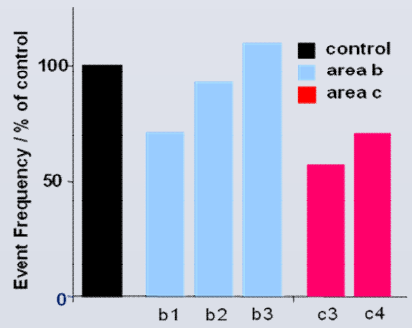


図1 カーボンファイバー電極を用いたアンペロメトリー法による開口分泌動態の解析法
単一細胞上にカテコラミンの酸化電位を印加した微小炭素電極を接置する。刺激に伴い起こる1つの小胞の開口反応が、分泌されたカテコラミンの酸化電流-時間曲線の1つのスパイクとして得られる。従って、スパイク形状の各種パラメーター(rise time, height, area, falling slope 等)を測定することにより、開口分泌の各ステップのキネティクスを解析できる



右図2．アセチルコリン刺激で得られるアンペロメトリックトレースと菌体由来の未知物質の作用
上からcontrol（LB培地前処理）、b2由来物質前処理、c3由来物質前処理時に得られたトレース

下図3．では菌体生息地域b，cから得られた異なった菌体培養液（b1,b2,b3，c3,c4）のアセチルコリン刺激による開口分泌に対する作用を示した。b1，c3，c4培養液の前処理により、抑制傾向が認められた。



結論と考察

現在研究・医療に用いられる薬物の中には、数多くの生物由来物質が存在している。その中でも微生物類由来の物質は抗生物質をはじめとし我々の実生活において、身近で有用な物質も多々ある。一方、病原性大腸菌O-157由来の志賀毒素等、重篤な疾患の原因となる物質も数多い。このような背景において、火山熱水系という極限環境に生育する微生物由来の新規物質を探索し、その生理活性を検討する試みは将来の研究や医療での応用という面において、多くの可能性を生む意義あるものと思われる。研究期間や人員等の問題で十分な成果を得たとは言えないが、少なくとも神経系細胞の重要な生理機能である神経伝達物質の開口分泌反応に影響を与える可能性をもった微生物培養液由来物質の存在（b1，c3，c4）が示唆された事は重要な成果であると思われる。今後の課題としては、①実験例数を増加し、より信頼がおけるデータの蓄積を進める。②培養液由来の候補物質の精製と収率の向上。③神経伝達物質の開口分泌反応を抑制する作用機序の解明。等が挙げられる。特に③において、神経伝達物質の開口分泌反応を抑制する物質の作用機序は少なくとも細胞膜レベルでの受容体やイオンチャネルへの抑制作用、また細胞内での情報伝達に関わるタンパク分子への影響等が考えられる。候補物質の作用機序の解明は新規研究試薬や医薬品への応用に重要な知見となることから、今後特に検討すべき課題であろう。

RESEARCH POSTER PRESENTATION DESIGN © 2012
www.PosterPresentations.com