

枯草菌のアミラーゼ生産へのスカンジウムの影響

早瀬 伸樹 (新居浜工業高等専門学校 生物応用化学科, n.hayase@niihama-nct.ac.jp)

真鍋 優希 (新居浜工業高等専門学校 専攻科 生物応用化学専攻, c1401432@niihama.kosen-ac.jp)

中山 享 (新居浜工業高等専門学校 生物応用化学科, s.nakayama@niihama-nct.ac.jp)

Effect of scandium on amylase production by *Bacillus subtilis*

Nobuki Hayase (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology (KOSEN), Niihama College, Japan)

Yuuki Manabe (Applied Chemistry and Biotechnology Program, Advanced Engineering Course, KOSEN, Niihama College, Japan)

Susumu Nakayama (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, KOSEN, Niihama College, Japan)

要約

希土類元素の中からスカンジウム、ルテチウム、ガドリニウムを選び、それぞれNG培地に添加した場合に培養上清へ分泌されたアミラーゼ活性に及ぼす影響を調べた。NG培地は、bacto tryptone、meat extract、glucose、NaClを用いて作製した。各希土類元素塩化物を用いて、希土類濃度が2、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように水溶液を調製した。NG培地に各希土類水溶液を添加し*Bacillus subtilis*を植菌した後、培養を行った。培養24、48、72、96時間において、遠心分離にて菌体を除去することで培養上清を得た。無添加に対してアミラーゼ活性向上は、スカンジウムでは2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加で培養96 時間にて3.3倍、ルテチウムでは5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加で培養96 時間にて2.1倍、ガドリニウムでは5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加で培養96 時間にて1.1倍であった。スカンジウムを添加した場合においてアミラーゼ活性向上の顕著な有意性が認められた。

Abstract

Scandium, lutetium, and gadolinium were selected from rare earth elements, and their effects on amylase activity secreted into the culture supernatant were examined when they were added to the NG medium. NG medium was prepared using bacto tryptone, meat extract, glucose, and NaCl. Using each rare earth element chloride, aqueous solutions were prepared so that the rare earth element concentrations were 2, 5, 10, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After adding each rare earth aqueous solution to NG medium and inoculating *Bacillus subtilis*, cultivation was carried out. After 24, 48, 72, and 96 h of cultivation the cells were removed by centrifugation to obtain a culture supernatant. Amylase activity increased 3.3 times after 96 h of cultivation for scandium with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ addition, 2.1 times after 96 h of culture for lutetium with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ addition, and 1.1 times after 96 h of culture for gadolinium with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A significant improvement in amylase activity was observed when scandium was added.

キーワード

Bacillus subtilis, スカンジウムSc, 培養上清, イオン半径, 蛍光X線分析

1. はじめに

希土類元素には、様々な物質に希土類元素を少量添加するだけでその物質の性質を大きく変化させるという性質がある。永久磁石にはネオジム、サマリウム、ジスプロシウムなどが、蛍光体にはユウロピウムやテルビウムなどがそれぞれ添加され、工業分野において幅広く利用されている。また、農業分野ではランタン ($\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を使用) がイネの根の生長を促進するとの報告 (Liu et al., 2013)、土耕栽培によるポット試験の土への塩化スカンジウム ($\text{ScCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) の直接散布による作物生長促進効果も示された報告 (越智, 2017)、スカンジウム ($\text{ScCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を使用) の添加がコマツナの発芽および生長を促進するとの報告 (辻・中山, 2019) などがある。一方、生物分野における希土類元素の影響に関してはあまり研究が進んでおらず未解明な点も多い。理由として、希土類元素は高価であったこと、また希土類元素を必須とする生体内反応が見つかっていないことなどが上げられる。工業分野における希土類元素の需要拡大に伴い、分離方法の研究が進ん

だ結果、現在では希土類元素の価格は以前より低下している。そのため、これからは生物分野の研究においても希土類元素を用いた研究も増えることが期待される。そのような中で、微生物へ与える栄養源に希土類元素を添加し、その栄養源を用いて微生物を培養すると、培養した微生物の生産する酵素の活性が向上するという現象が報告されている (稲岡, 2013; Inaoka and Ochi, 2011)。使用された微生物は、*Bacillus subtilis*である。*Bacillus subtilis*は枯草菌の一種であり、アミラーゼなどの酵素を生産・分泌する。アミラーゼはヒトをはじめとしたさまざまな生物が生成することのできる酵素であり、デンプン中のアミロースやアミロペクチンをグルコース (単糖類)、マルトース (二糖類)、オリゴ糖などに分解する反応を触媒する酵素である (van der Maarel et al., 2002)。工業的用途としては、水あめやアルコール飲料の製造への使用などが挙げられる (Mondal et al., 2022)。食品産業を含む化学産業において酵素を用いた場合、①非触媒反応と比較すると触媒効果により化学反応における活性化エネルギーが下がり反応速度の増加を見込める、②金属触媒などを使用する触媒反応と比較して穏和な条件で反応を起こせる、③基質特異性により副反応が起こり難いなど、製造時の低コスト化が期待できる。化学産業に用いられている酵素の多くは微生物を利用

して製造されていることから、生産される酵素の活性向上は経済的に重要である。

本研究では、微生物に与える栄養源へ希土類元素を添加した場合に微生物によって生産される酵素の活性向上を調べるため、希土類元素の中からスカンジウム 21Sc、ルテチウム 71Lu、ガドリニウム 64Gdの3種類を選び、種々の濃度で添加した液体培地を作製し、そこへ*Bacillus subtilis*を植菌して培養し、*Bacillus subtilis*の生産する酵素の活性へ与える希土類元素の影響を調べた。

2. 実験

2.1 試薬および器具

三塩化スカンジウム(III)六水和物($\text{ScCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、純度：3N)、三塩化ルテチウム(III)六水和物($\text{LuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、純度：3N)、三塩化ガドリニウム(III)六水和物($\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、純度：3N)は、三津和化学薬品株式会社のものを用いた。三塩化アルミニウム(III)六水和物($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、特級試薬)、グルコース(glucose、特級試薬)、塩化ナトリウム(NaCl、特級試薬)、りん酸水素カリウム(K_2HPO_4 、特級試薬)、りん酸二水素カリウム(KH_2PO_4 、特級試薬)、可溶性デンプンは、富士フィルム和光純薬株式会社のものを用いた。バクトトリプトン(bacto tryptone)はDifco社、肉エキス(meat extract)はナカライテスク株式会社、ルゴール液(グラム・ハッカー染色液II)は武藤化学株式会社のものを用いた。シャーレはアズワン株式会社のポリスチレン製滅菌シャーレ(径90 mm、高さ15 mm)、マイクロチューブはアズワン株式会社のポリプロピレン製ナチュラル1.5 mLを用いた。pH計は株式会社堀場製作所のD-51、恒温振とう槽はタイテック株式会社のパーソナル-11、紫外可視分光光度計は株式会社日立ハイテクのU-1900、波長分散型蛍光X線分析装置は株式会社リガクのSupermini200を用いた。

2.2 培養

使用したNG培地の組成を表1に示す。このNG培地を300 mL三角フラスコへ100 mLずつ分注し、そこへスカンジウム、ルテチウム、ガドリニウムの各塩化物水溶液を希土類元素濃度がそれぞれ2、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した。pH7.2に調整し、121 $^{\circ}\text{C}$ にて15分間滅菌した後、*Bacillus subtilis* NBRC13719を植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ にて110 spmで振とう培養を行った。

表1：NG培地の組成

組成	濃度(%)
bacto tryptone	1.0
meat extract	0.5
glucose	1.0
NaCl	0.7

培養24、48、72、96時間で、それぞれ培養液を少量サンプリングし、15,000 rpmで10分間遠心分離を行い、菌体を除去することで培養上清を得た。

2.3 アミラーゼ活性の測定方法

培養上清中へ分泌されたアミラーゼの活性を、以下の方法で測定した。50 mMリン酸緩衝液(pH6.0)に濃度0.5%で可溶性デンプンを溶解させた後、700 μL ずつマイクロチューブへ分注し、これを恒温槽にて37 $^{\circ}\text{C}$ で15分間予温した。そこへ培養上清を50 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。反応0分(培養上清を加えた直後)、10分、20分、30分後に反応溶液を75 μL 採取し、これに50倍希釈したルゴール液を1,000 μL 入れ、各反応時間におけるヨウ素デンプン反応による着色を700 nmの吸光度で測定した(Fuwa, 1954)。アミラーゼ活性は、デンプン分解にともなうヨウ素デンプン反応の着色の減少により測定し、下記の式にて定義した。 t は反応時間(min)、 $A_{700,0}$ は反応開始時の700 nmの吸光度、 $A_{700,t}$ は t 分後の700 nmの吸光度である。

$$\text{アミラーゼ活性} = (A_{700,0} - A_{700,t}) / (A_{700,0} \times t)$$

3. 結果及び考察

3.1 アミラーゼ活性へ及ぼすスカンジウム、ルテチウム、ガドリニウム添加の影響

スカンジウムを添加したNG培地にて*Bacillus subtilis*を培養した際のアミラーゼ活性の結果を図1に示す。培養24時間においてはスカンジウム添加の効果が認められなかったが、培養48、72、96時間においてはスカンジウム添加の効果が確認された。培養96時間においてスカンジウムを2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した場合、無添加の場合と比較して3.3倍アミラーゼ活性が向上した。

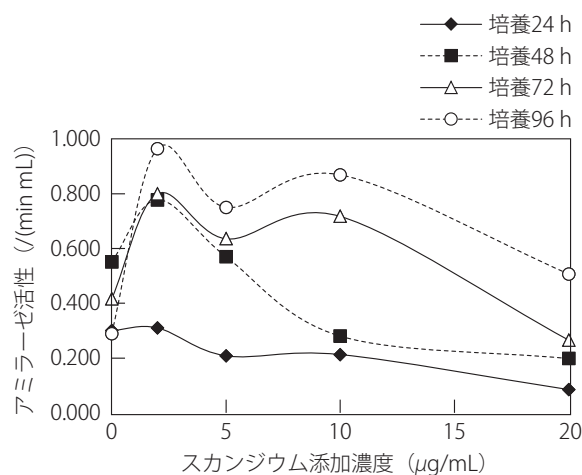


図1：培養上清へ分泌したアミラーゼ活性へのスカンジウムの影響

ルテチウムを添加したNG培地にて*Bacillus subtilis*を培養した際のアミラーゼ活性の結果を図2に示す。培養24、48、72時間においてはルテチウム添加の効果が認められなかった。しかしながら、培養96時間においては5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した場合で若干ルテチウム添加の効果が確認された。そのアミラーゼ活性は無添加の場合と比較して約2.1倍向上したが、スカンジウムを添加した場合よりも低かった。

ガドリニウムを添加したNG培地にて*Bacillus subtilis*を培養

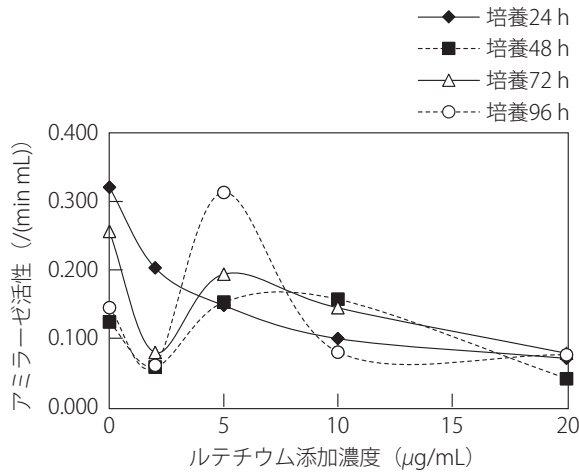


図2：培養上清へ分泌したアミラーゼ活性へのルテチウムの影響

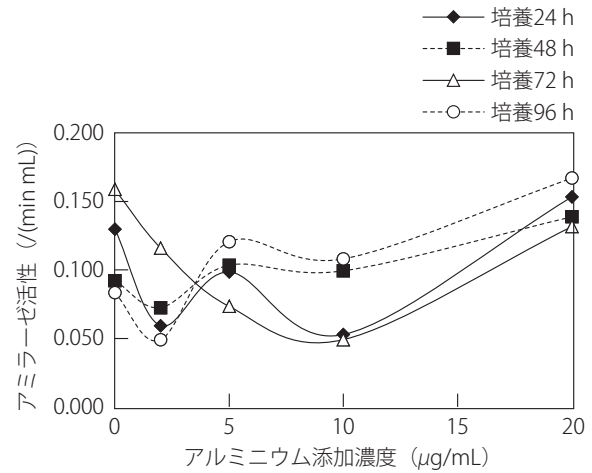


図4：培養上清へ分泌したアミラーゼ活性へのアルミニウムの影響

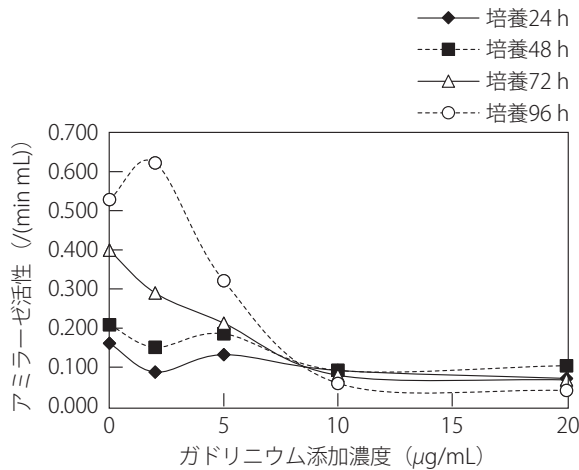


図3：培養上清へ分泌したアミラーゼ活性へのガドリニウムの影響

した際のアミラーゼ活性の結果を図3に示す。培養24、48、72時間においてはガドリニウム添加の効果が認められなかった。培養96時間においては2 µg/mL添加した場合で僅かにガドリニウム添加の効果が確認できたが、そのアミラーゼ活性の向上は無添加の場合と比較して約1.1倍であった。

スカンジウムSc、ルテチウムLu、ガドリニウムGdの添加がアミラーゼ活性向上に及ぼす度合いは Sc^{3+} (3.3倍) > Lu^{3+} (2.1倍) > Gd^{3+} (1.1倍) となった。Shannonのイオン半径(6配位)は、 Sc^{3+} が0.0745 nm、 Lu^{3+} が0.0861 nm、 Gd^{3+} が0.0938 nmであることから、イオン半径の小さいほどアミラーゼ活性が向上するという傾向となった(Shannon and Prewitt, 1969)。

3.2 アミラーゼ活性へ及ぼすアルミニウム添加の影響

3.1の結果を踏まえて、スカンジウムよりもイオン半径が小さく、同じ3価のアルミニウム(Al^{3+} 、Shannonのイオン半径(6配位)：0.0535 nm)をNG培地へ添加し、アミラーゼ活性に対するアルミニウム添加の影響を調べた。アルミニウムを添加したNG培地にて*Bacillus subtilis*を培養した際のアミラーゼ活性の結果を図4に示す。24、48、72、96時間いずれの培養

においてもアルミニウム添加の効果は認められなかった。

アミラーゼ活性は、スカンジウム添加で高い向上が認められたが、ルテチウム、ガドリニウム、アルミニウムを添加した場合には顕著な向上を認められなかった。また、スカンジウム、ルテチウム、ガドリニウムの添加でのイオン半径が小さいほどアミラーゼ活性が向上する傾向は、アルミニウムの添加では得られなかった。しかしながら、アルミニウムは希土類元素ではないため、イオン半径が小さいほどアミラーゼ活性が向上する傾向は、希土類元素のみで認められるものと考えられる。

3.3 アミラーゼ活性向上へのスカンジウム作用機構の検討

3.1と3.2の結果より、NG培地にスカンジウムを添加した場合に顕著なアミラーゼ活性向上が認められることがわかった。そこで、*Bacillus subtilis*のアミラーゼ活性へスカンジウムが作用する機構について、以下の3.3.1～3.3.4の4つの仮説を立て実験を行った。

3.3.1 スカンジウムがアミラーゼ活性を有する可能性

2、5、10、20 µg/mLのスカンジウム水溶液を培養上清の代わりにデンプン溶液へ加え、アミラーゼ活性を測定した。アミラーゼ活性は、まったく認められなかった(データは掲載せず)ことから、スカンジウムはアミラーゼ活性を有していないと考えられる。

3.3.2 スカンジウムが生成されたアミラーゼに作用する可能性

アミラーゼは活性維持のために、カルシウムを必要とすることが報告されている(日本蛋白質構造データバンク)。スカンジウムでも、アミラーゼが生成され、培養上清へ分泌された後に、カルシウムと同様の作用する可能性が考えられる。そこで、スカンジウムを添加していないNG培地で*Bacillus subtilis*を培養して得た培養上清へ、2、5、10、20 µg/mLの濃度でスカンジウムを添加し、アミラーゼ活性を測定した。生成され、培養上清へ分泌された後のアミラーゼへスカンジ

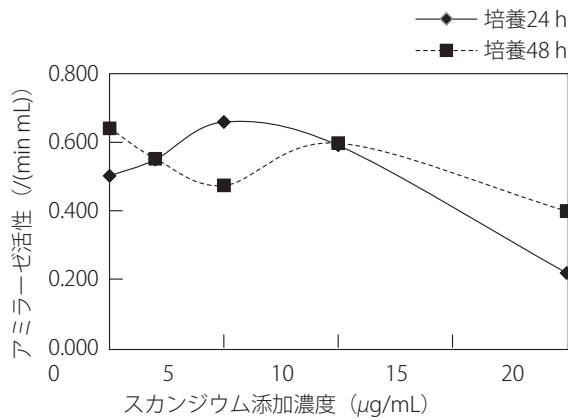


図5：生成・分泌された後のアミラーゼへのスカンジウム添加の影響

ウムを添加した場合のアミラーゼ活性の結果を図5に示す。培養24および48時間のどちらにおいてもスカンジウム添加の効果は認められず、スカンジウムが生成されたアミラーゼに作用していないと考えられる。

3.3.3 スカンジウムが菌体の細胞壁や細胞膜に作用してアミラーゼ分泌を促進させる可能性

スカンジウムが菌体からのアミラーゼ分泌作用を促進させる可能性がある場合、アミラーゼ合成量が変化しないにも関わらず、菌体からのアミラーゼ分泌量が増加するため、菌体中に残っているアミラーゼ量は減少することが考えられる。そこで、培養液から培養上清を除去して得られる菌体を破碎することより、培養上清へ分泌されず菌体中に残っているアミラーゼ量を測定した。アミラーゼ量はアミラーゼ活性に比例するとして、アミラーゼ活性を調べた。

スカンジウムを添加したNG培地を用いて *Bacillus subtilis* の培養を行い、培養24、48、72時間で培養液を30 mL サンプルングした。これを6,000 rpmで20分間遠心分離を行い、培養上清を除去することで菌体を得た。この菌体を蒸留水10 mLへ懸濁し、そこへガラスビーズを3 g 加え、1分間隔で12分間攪拌することで菌体を破碎した。菌体破碎後、もう一度6,000

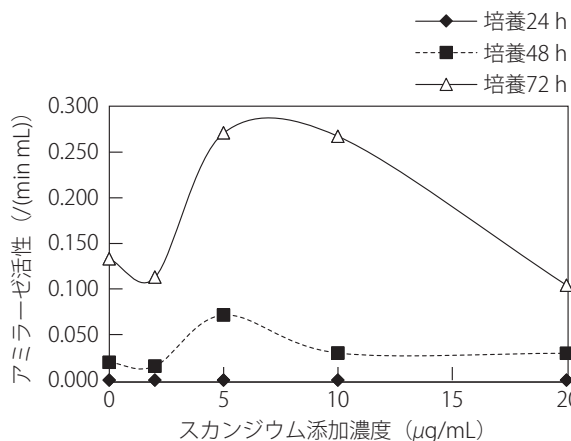


図6：菌体中に含まれていたアミラーゼ活性へのスカンジウム添加の影響

rpmで20分間遠心分離を行なうことで菌体残渣を除去し、菌体中に含まれていたアミラーゼ活性を測定した。スカンジウムを添加したNG培地を用いて培養した場合の菌体中に含まれていたアミラーゼ活性の測定結果を図6に示す。培養24時間ではスカンジウムを添加した効果は見られなかったが、培養48、72時間では無添加のものと比較して、5、10 µg/mLの添加でアミラーゼ活性が向上することが認められた。しかしながら、20 µg/mLの添加では菌体中に含まれるアミラーゼ活性は減少した。この結果は、培養上清のアミラーゼ活性へのスカンジウムの影響と同じであることから、スカンジウムが菌体の細胞壁や細胞膜に作用してアミラーゼ分泌を促進させていないと考えられる。

3.3.4 スカンジウムが菌体内部に作用してアミラーゼの転写および翻訳を促進させる可能性

3.3.1、3.3.2、3.3.3の結果より、スカンジウムはアミラーゼ活性を有していない、スカンジウムは合成されたアミラーゼに作用していない、菌体の細胞壁や細胞膜に作用してアミラーゼの分泌を促進していないことがわかった。さらに、菌体中のアミラーゼ活性もスカンジウム無添加の場合に比較して向上し、培養上清のアミラーゼ活性へのスカンジウムの影響と同じであることが認められた。したがって、スカンジウムは菌体内部に取り込まれ、アミラーゼ遺伝子の転写や翻訳などの反応を促進させる可能性が考えられる。この仮説を検討するためには、①スカンジウムを添加したNG培地にて培養した *Bacillus subtilis* の菌体内にスカンジウムが存在することを蛍光X線分析によって確認する、②スカンジウムを添加してアミラーゼをコードする遺伝子の転写が促進されるか確認する、③アミラーゼの遺伝情報をコードしているmRNAを人工的に作製した後リボソームなどの翻訳に使用するタンパク質とスカンジウムを加え翻訳反応が促進されるかを確認するなどの実験を行う必要があると考えられる。本報告では、①のみについて調べてみた。スカンジウムを添加した菌体および無添加の菌体を、フッ化リチウムLiF(200)分光結晶とシンチレーションカウンター検出器に用いた波長分散型蛍光X線分析した結果を図7に示す。スカンジウムを添加した菌体では、 $2\theta = 87^\circ$ 付近にScに帰属される回折ピークが観測される。一方、スカンジウム無添加の菌体ではScに帰属される回折ピークが観測されなかったことから、添加したスカンジウムは菌体内に存在していることがわかった。

DNAからRNAへの転写反応を触媒する酵素であるリボヌクレアーゼH (RNase H) はマグネシウムイオン Mg^{2+} (Shannonイオン半径 (6配位) : 0.067 nm) やマンガンイオン Mn^{2+} (Shannonイオン半径 (6配位) : 0.072 nm) などの2価金属イオン存在下でのみ活性を示すことが報告されている (金谷、1994)。3.1でアミラーゼ活性向上が認められたスカンジウムイオン Sc^{3+} のShannonイオン半径 (6配位) は0.0745 nmであり Mg^{2+} や Mn^{2+} と近く、マグネシウムやマンガンと同様の作用し、RNaseHを活性化させた可能性も考えられる。しかしながら、スカンジウムは3価で安定に存在していると思われるため、2価金属イオン存在下でのみ活性を示す条件と異なる。

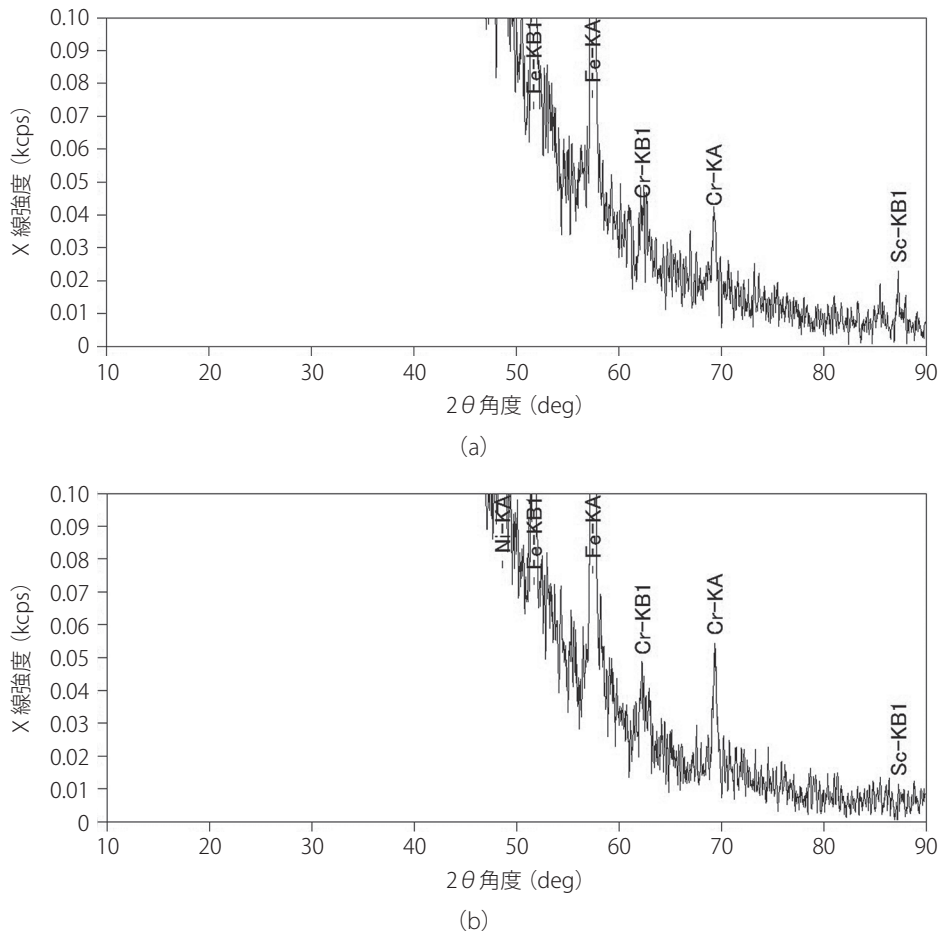


図7：スカンジウム添加した菌体(a)および無添加の菌体(b)の波長分散型蛍光X線分析チャート

4. まとめ

3種類の希土類元素（スカンジウムSc、ルテチウムLu、ガドリニウムGd）をそれぞれNG培地に添加した場合に、培養上清へ分泌されたアミラーゼの活性に及ぼす影響を調べた。希土類元素の添加がアミラーゼ活性向上に及ぼす割合は、Sc (3.3倍) > Lu (2.1倍) > Gd (1.1倍) であり、スカンジウムを添加した場合でアミラーゼ活性向上の顕著な有意性が認められた。Shannonイオン半径（6配位）は、 Sc^{3+} が0.0745 nm、 Lu^{3+} が0.0861 nm、 Gd^{3+} が0.0938 nmであることから、イオン半径の小さいほどアミラーゼ活性が向上することがわかった。また、スカンジウムを添加した場合、菌体内に含まれるアミラーゼ活性も向上した。一方、スカンジウムと同じく3価が安定でイオン半径が小さいアルミニウム（ Al^{3+} ）のShannonイオン半径（6配位）：0.0535 nm）をNG培地に添加した場合にはアミラーゼ活性の向上は認められなかった。アミラーゼ活性へスカンジウムが作用する機構について調べたところ、スカンジウムはアミラーゼ活性を有していないこと、スカンジウムは生成されたアミラーゼに作用していないこと、スカンジウムが菌体の細胞壁や細胞膜に作用してアミラーゼの分泌を促進していないことがわかった。さらに、蛍光X線分析によりスカンジウムは菌体内部に取り込まれていることが確認できた。このことから、菌体内部に取り込まれたスカンジウムは、アミラーゼ遺伝子の転写および翻訳など

の反応を促進させる可能性が示唆された。今後は、スカンジウムのアミラーゼ遺伝子の転写および翻訳への作用機構の解明を進めたい。

引用文献

- 稲岡隆史 (2013). 枯草菌における希土類元素スカンジウムの効果. 食総研ニュース, No. 30, 5-7.
- Inaoka, T. and Ochi, K. (2011). Scandium stimulates the production of amylase and bacilysin in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77, No. 22, 8181-8183.
- 越智幸三 (2017). バイオテクノロジー研究の戦略的高度化と産業発展への貢献. 平成26年度～平成28年度私立大学戦略的基盤形成支援事業研究成果報告書, 10-13.
- 金谷茂則 (1994). リボヌクレアーゼH. 蛋白質核酸酵素, Vol. 39, 1121-1132.
- Shannon, R. D. and Prewitt, C. T. (1969). Effective ionic radii in oxides and fluorides. *Acta Cryst. B*, Vol. 25, 925-946.
- 辻久巳・中山享 (2019). スカンジウムのコマツナの発芽と生長へ及ぼす影響. 科学・技術研究, Vol. 8, No. 2, 196-200.
- Van der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, Vol. 94, No.2, 137-155.

日本蛋白質構造データバンク (n.a.). α -アミラーゼ. No. 74.
<https://numon.pdbj.org/mom/74?l=ja>. (閲覧日：2023年4月20日)

Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *Journal of Biotechnology*, Vol. 41, No. 5, 583-603.

Mondal, S., Mondal, K., Halder, S. K., Thakur, N., and Mondal, K. C. (2022). Microbial Amylase: Old but still at the forefront of all major industrial enzymes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Vol. 45, 102509.

Liu, D., Wang, X., Zhang, X., and Gao, Z. (2013). Effects of lanthanum on growth and accumulation in roots of rice seedlings. *Plant, Soil and Environment*, Vol. 59, No. 5, 196-200.

(受稿：2023年4月21日 受理：2023年5月10日)