

生物科学班勉強会結果報告

～セルラーゼ生産糸状菌の分離～

フィールド科学系部門 生物科学班
川北 龍司

1. はじめに

フィールド科学系部門生物科学班では、年度ごとにメンバーの専門分野を互いに学ぶ勉強会を行っており、平成28年度は私が担当することになった。そこで環境中や生態系における微生物の役割や、分離操作について学ぶ勉強会を、平成28年12月19日に植物管理室をお借りして行った。

2. タイトルおよび目的

勉強会のテーマは「生態系における分解者としての糸状菌」として、環境中に生息している微生物のうち、セルロースを分解する能力を持つ微生物、主に糸状菌の分離について学ぶこととした。そのための目的として「近年、未利用バイオマスの大部分を占めるセルロースの新たな利用法が様々な方面で検討されている。そこで環境中から糸状菌を実際に分離し、セルロース分解酵素の働きを検出することで、糸状菌の生態系における分解者としての役割や、有用微生物の探索の難しさについて理解を深める」と設定した。これにより、今回の勉強会において、微生物によるセルロースの分解が生態系において不可欠であるだけでなく、家畜動物のセルロース利用や、エネルギー資源としての利用、有用物質生産という面で、特に注目されている分野であることや、その重要性についての理解を深めていただければ有意義であると考えた。

3. 参加者(敬称略)

部門長(塩路恒生), 生物科学班 3名(山口信雄, 宇都武司, 川北龍司), 生物生産技術班・西条ステーション 2名(近松一朗, 北村亜紀)。

4. 実験材料

液体培養済みの既知種(セルロース培地とカルボキシメチルセルロース培地の両方で培養済)5株および事前分離株2株。HUT 2363株 *Aspergillus oryzae* (=RIB 40・醸造用麹菌), HUT 2366株 *Aspergillus niger* (ヘミセルラーゼ生産株), HUT 4183株 *Chaetomium* SP.(セルラーゼ生産株), HUT 5212株 *Trichoderma reesei*(セルラーゼ, β -1,3-D-グルカナーゼ生産株), HUT 5132株 *Trichoderma asperellum*(ヘミセルラーゼ生産株), アカマツ-1株(アカマツの朽ち木から分離した糸状菌), 502S-1株(実験室内のセルロース培地に自然発生した糸状菌)。

5. 試薬および使用器具類

カルボキシメチルセルロース(以下 CMC)プレート培地(セルラーゼ活性の検出用), セルロース染色用試薬(0.3%コンゴレッド水溶液, 1M NaCl, 5%酢酸), 培地材料(10x Czapec-Dox Mix, CMC, 粉末セルロース, ペプトン, 粉末寒天), 蒸留水, 滅菌済みプラスチックシャーレ, 乳鉢・乳棒, パスツールピペット, ガスバーナー。

6. 既知種のセルラーゼ活性の検出

既知種を液体培養したセルラーゼを含む培養液をあらかじめ用意した CMC プレートに数回滴下し、暖かい場所において反応させた(図1)。1時間程度において10分反応させたのち、0.3%コンゴレッド溶液を1~2ml滴下し、1分間培地を染色した。蒸留水で培地を洗浄し、1M NaCl水溶液を1~2ml滴下し脱色した。脱色班が見えたら蒸留水で培地を洗浄し、5%酢酸を滴下し、数分後に蒸留水で洗浄し脱色班を観察した(図2)。

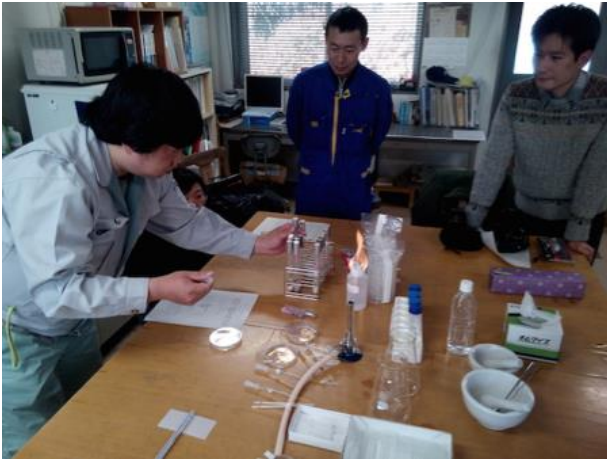


図1 既知種の培養液を培地に滴下している様子

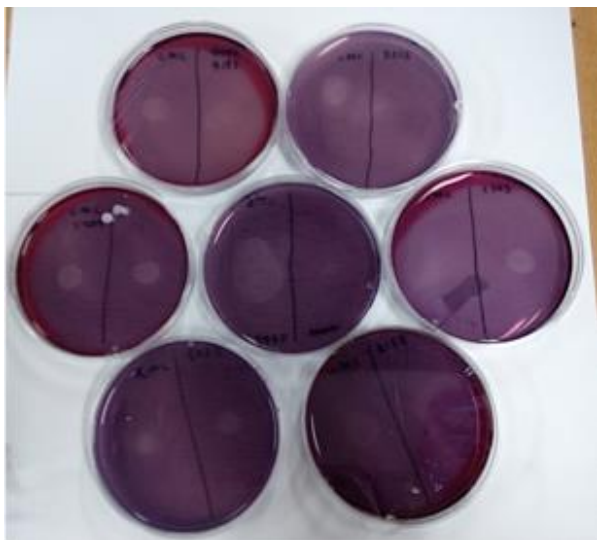


図2 コンゴレッド染色によるセルラーゼ活性の検出。培地に滴下した培養液中のセルラーゼによってCMCが分解された部分が脱色斑として検出された。

7. 培地作成

炭素源を CMC もしくは粉末セルロースとした、ツアペックドックス平板培地をそれぞれ作成し、オートクレーブ後によく混ぜながら、滅菌済みディスポシャーレにガスバーナーの火炎の傍で分注した。培地組成は次のとおりである。10x Czapec-Dox Mixture (3.2% NaNO_3 , 4.1% K_2HPO_4 , 0.5% MgSO_4 , 0.5% KCl) 100ml, CMC 2g, または粉末セルロース 30g, ペプトン 0.2g, 寒天 15g, 蒸留水 900ml.

8. 環境中のセルラーゼ生産糸状菌株の探索

セルラーゼを生産する糸状菌が存在していそうな植物片などを植物管理室周辺で探して拾い集め、乳鉢などで米粒くらいまで小さく破碎して CMC または粉末セルロースプレートに少量接種した。当日の日程は以上で終了とし、接種したプレートは研究室へ持ち帰り、28°Cで培養した。

9. 接種プレートの培養結果および考察

研究室に持ち帰った勉強会で接種したプレートを28°Cで2週間培養し、写真撮影を行った(図3から図17)。糸状菌が発生していた分離源からは何かしらの糸状菌を得ることができた。それ以外の分離源からは細菌の発生も見られた。予想に反して、堆肥を接種したプレートからはほとんど何も生育しなかった。これは堆肥が発酵するとき高温になるため、糸状菌や細菌が死滅したためだと考えられた。

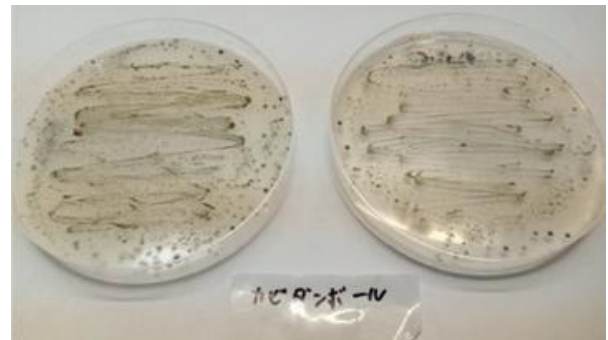


図3 ダンボール箱に発生したカビを植菌したプレート

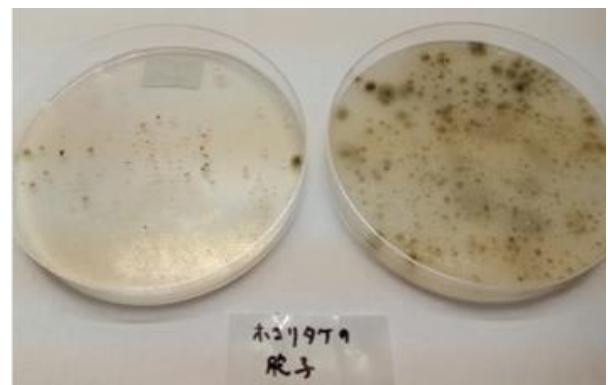


図4 ホコリタケの胞子を植菌したプレート

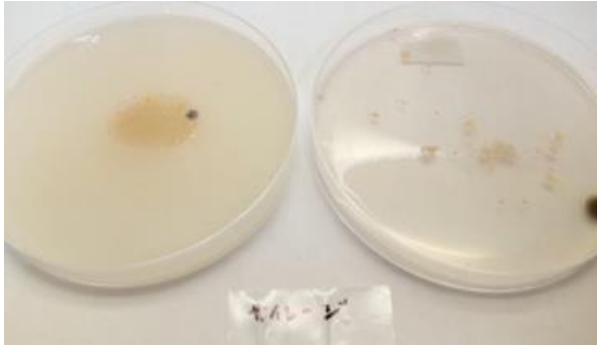


図5 ウシ飼料サイレージを植菌したプレート

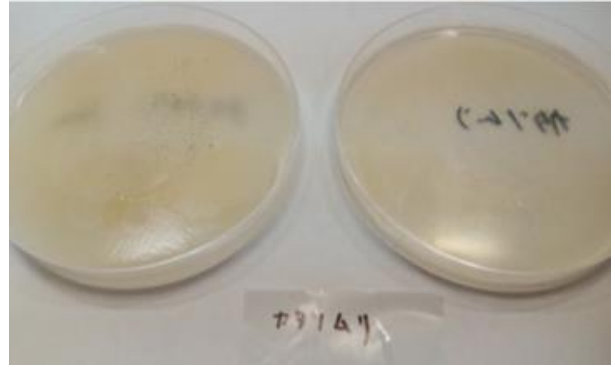


図9 カタツムリの粘液を植菌したプレート

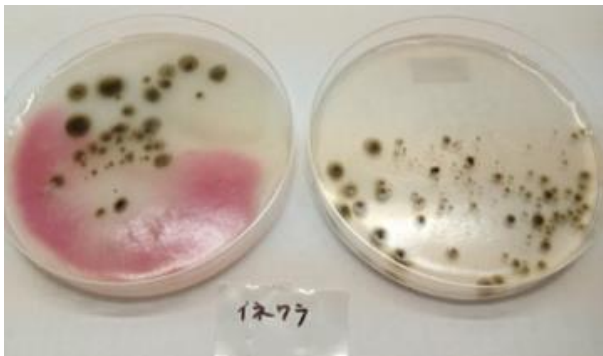


図6 カビが発生した稲藁を植菌したプレート

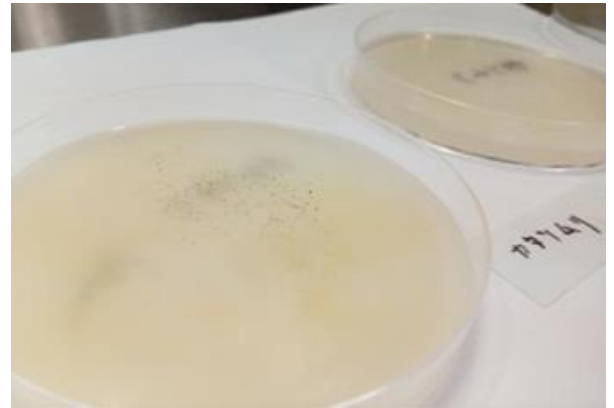


図10 図9の拡大図

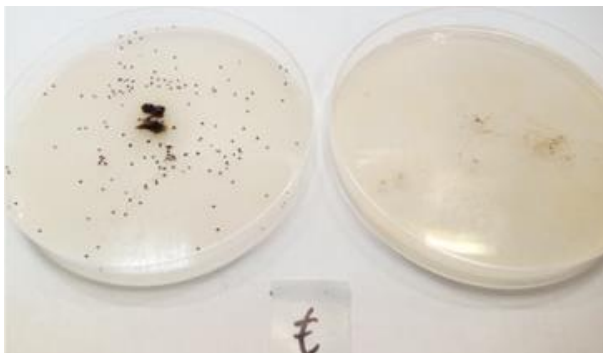


図7 藻類とみられる植物片を植菌したプレート



図11 コオロギの飼育マットに使用したバーミキュライトを植菌したプレート

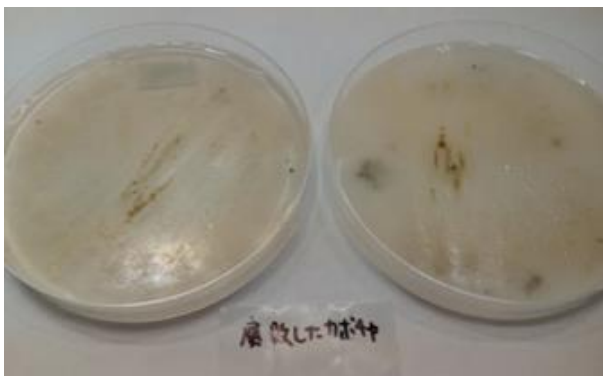


図8 腐敗したカボチャを植菌したプレート

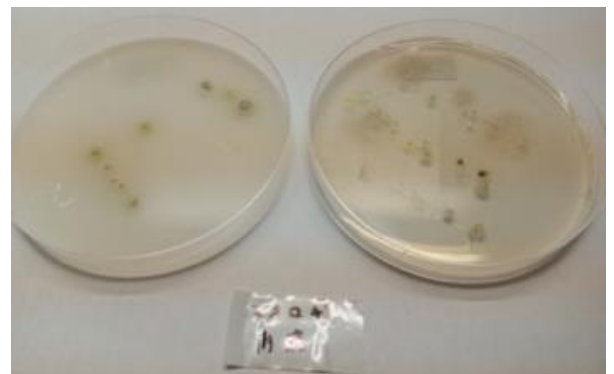


図12 コオロギの内蔵を植菌したプレート

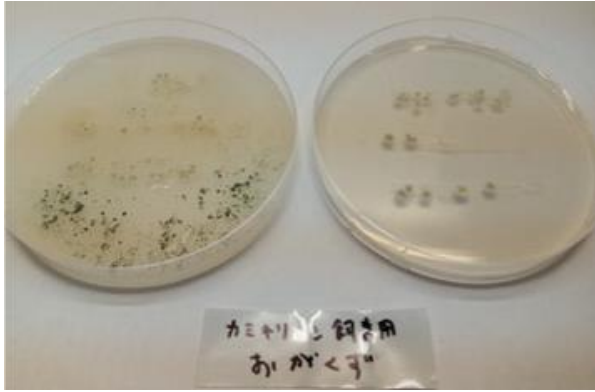


図 13 カミキリムシの飼育マットに使用したおがくずを植菌したプレート

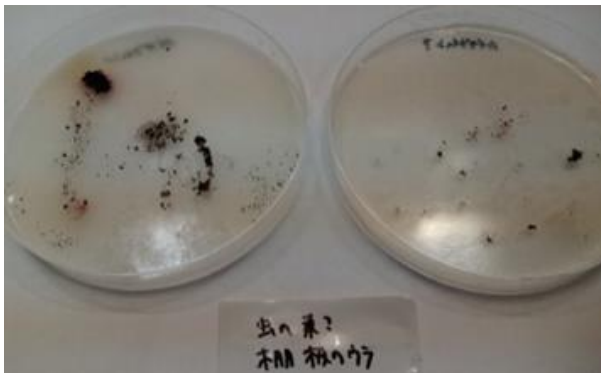


図 14 植木鉢の棚板の裏にあった虫の巣を植菌したプレート

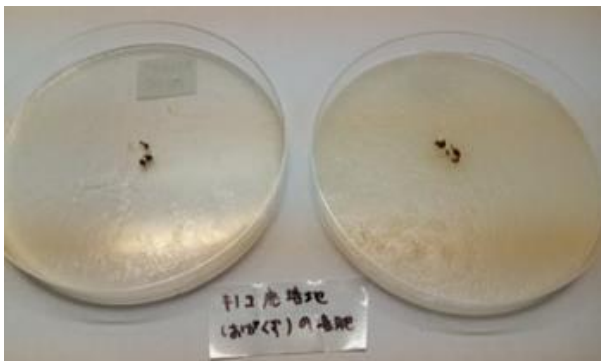


図 15 堆肥化したきのこ廃培地(おがくず)を植菌したプレート

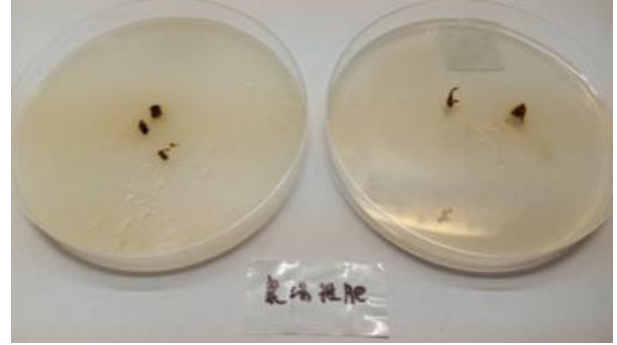


図 16 西条ステーション(農場)で製造している堆肥を植菌したプレート

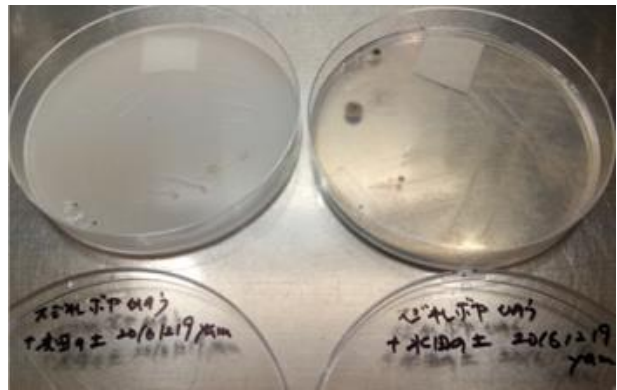


図 17 水田に埋めたホヤを植菌したプレート

10. 糸状菌の選抜と単離

生育の良い糸状菌を目視にて選抜し、継代培養を行い単離した。事前実験で取得したNo.1, No.2を含めて合計 12 株が取得された(表 1)。なお、No.2 は 502S 実験室で No.1 を培養中にコンタミしたもので、生育が良かったためにサンプルとしたものである。

表 1 勉強会にて取得した株の一覧

No.	分離源	No.	分離源
1	アカマツ	7	藻?
2	実験室(502S)	8	カボチャ
3	ダンボール	9	カタツムリ
4	ホコリタケ	10	コオロギマット
5	サイレージ	11	コオロギ内蔵
6	稲藁	12	カミキリムシマット

11. 取得株のセルラーゼ活性の検出

今回取得された 12 株についてコンゴレッド染色法によりセルラーゼ活性の検出を行った。各菌株を粉末セルロースもしくは CMC を炭素源としたツアペックドックス液体培地でそれぞれ 1 週間以上培養し、ツアペックドックス-CMC 平板培地に培養液を滴下し、数時間おいたのちにコンゴレッド染色を行った(図 18)。その結果、いずれの株においても脱色班が検出され、培養液にセルラーゼ活性があることがわかった。

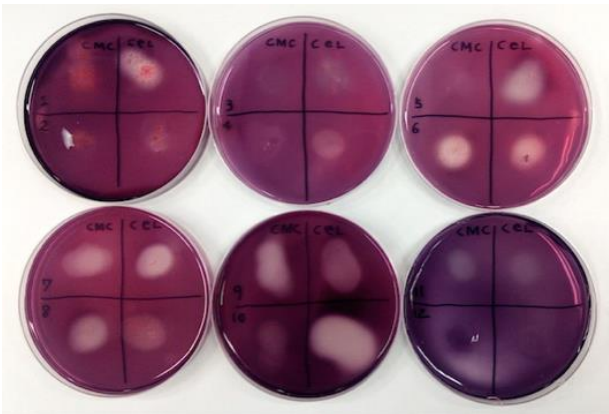


図 18 取得された 12 株のセルラーゼ活性の検出。プレート右側がセルロース培地, 左側が CMC 培地。

次にセルラーゼ活性を定量化するために、フェノール硫酸法によって検出を試みた。定常状態になるまで各菌株を炭素源が粉末セルロースおよび CMC としたツアペックドックス液体培地でそれぞれ培養したのち、培養液上清をエッペンドルフチューブにとり、5%フェノール溶液を等量加え、さらに 5 倍量の濃硫酸を加えて攪拌、冷却したのち、吸光度計を用いてオレンジ色の色素の濃度を波長 490nm の吸光度にて測定した(図 19, 図 20)。

その結果、セルロースが炭素源の培地で培養した場合において、一部の株で培養前の培地に含まれていた遊離糖よりも多くの遊離糖が検出されたが、CMC が炭素源の培地ではあまり差が見られなかった。このことから培地中の遊離糖を測る方法では、元々培地に含まれる遊離糖がかなり多いために、正しく分解能のみを測定するのが難しいこともわかった。

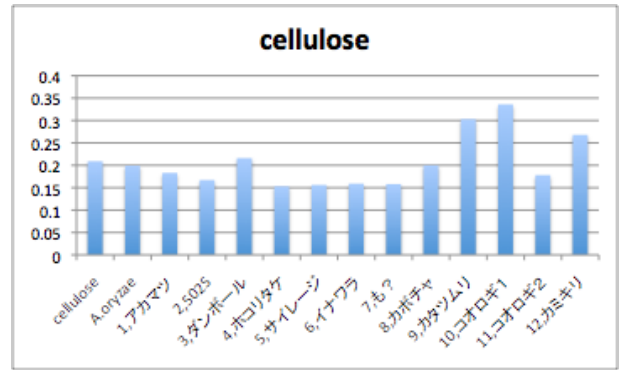


図 19 ツアペックドックス・セルロース培地で各菌株を培養した培養液の 490nm 吸光度

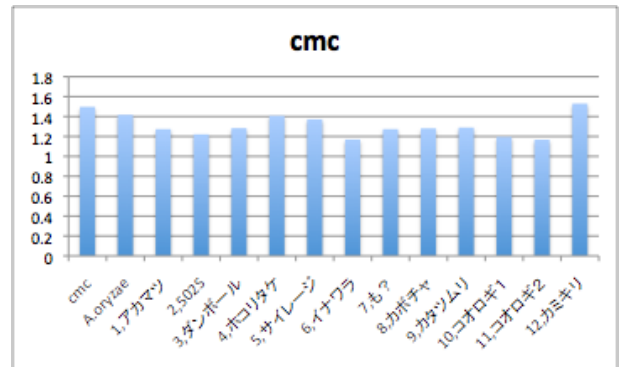


図 20 ツアペックドックス・CMC 培地で各菌株を培養した培養液の 490nm 吸光度。

12. 28S リボゾーム DNA 塩基配列の相同性比較による簡易同定

取得した菌株の 28S リボゾーム DNA を PCR 法で増幅し、簡易カラム精製を行ったのちに N-BARD へ DNA 塩基配列決定を依頼した。得られた配列を国立遺伝学研究所のデータベースに照会 (DDBJ) し、配列が類似している種を探索した。4 株については塩基配列決定に失敗したため同定できなかったが、その他の株については塩基配列の相同性が高い種が見つかった(表 2)。

28S リボゾーム DNA の塩基配列が判明した株のうち、No.2 (502S の室内空気中から取得)と相同性の高い *Cladosporium cladosporioides* は学生実験で使用している HUT5088 と同種であり、同室でも扱っていたため、室内に残留していた同株の胞子から発生した可能性が高いと考えられた。同じく No.3 (低温室のダボールに発生したカビ)は *Penicillium chrysogenum* と相同性が高く、同種の保有株である

HUT4019, 4046, 4135 のうちのいずれかの孢子が低温室内に残留して、同室内にあったダンボールに発生した可能性があると思われた。他の株については、環境中から取得した分離源を植物管理室で接種したため、保有株ではない株が得られたと考えられる。

表 2 分離株の 28S リボゾーム DNA 塩基配列の相同性比較による簡易同定結果

No.	分離源	配列が類似している種
1	アカマツ	ND ¹
2	502S	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
3	ダンボール	<i>Penicillium chrysogenum</i>
4	ホコリタケ	<i>Fusarium heterosporum</i>
5	サイレージ	<i>Aspergillus versicolor</i>
6	稲藁	ND ¹
7	藻?	<i>Acremonium nepalense</i>
8	カボチャ	ND ¹
9	カタツムリ	<i>Fusarium solani</i>
10	コオロギマット	ND ²
11	コオロギ内蔵	<i>Aspergillus flavipes</i>
12	カミキリムシマット	<i>Trichoderma sp.</i>

ND¹: シークエンサーの波形が乱れて解読できず。

ND²: 状菌特有の 28Sr-DNA の増幅断片が得られなかったため、細菌であると思われる。

13. まとめ

今回の生物科学班の勉強会において実際に本学内に生息する多様なセルロース分解菌を分離することができ、技術センターではあまり取り上げられない微生物について、メンバーの見識を深めることに貢献できたことは有意義であったと思う。

今回の勉強会で取得できた菌株うち、No.4(ホコリタケ)の *Fusarium heterosporum* および、No.7(藻?)の *Acremonium nepalense*, No.11(コオロギ内蔵)の *Aspergillus flavipes* と推定された 3 種は、現在 HUT コレクションで保有していない種であり、同定が確定

できればコレクション登録株にしたいと考えている。というも、HUT カルチャーコレクション業務としては、菌株の評価よりも同定と研究者への供給が本分であるので、今後は各菌株のセルロース分解能に関する詳細な解析よりも同定に注力し、この 3 種以外の株も含めてこれらの菌株を研究者へ供給し、研究に役立てることができるようにしたいと考えている。

謝辞

植物管理室をお貸しくださった塩路部門長ならびに理学部、テーマについてアドバイスをいただいた山口様、多忙のおり勉強会に参加いただいた参加者各位、発表の場を設けていただいた技術発表会運営メンバー各位にお礼申し上げます。

参考文献等

- ・盛合 浩司(富山県立富山中部高等学校)
コウシカビ(*Aspergillus* 属)のセルロース分解条件の解明と利用 —酒造りの技術を応用したハイオクタノール生産の可能性を探る—
平成 27 年度中谷医工計測技術振興財団科学教育振興助成実績報告
- ・Ramesh Chand Kasana, Richa Salwan, Hena Dhar, Som Dutt, Arvind Gulati,
A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine.
Curr Microbiol (2008) 57:503–507
- ・株式会社 J-オイルミルズ
フェノール硫酸法による糖鎖検出
<http://www.j-oil.com/images/product/gyoumu/lectin/pdf/pdf07.pdf>
- ・北村 進一・中屋 慎
糖の定量法 生物工学基礎講座—バイオよもやま話
生物工学会誌—90 巻 12 号