

令和元年6月12日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08118

研究課題名(和文) サルのお腹は世界を救う～葉食いザルからの植物バイオマス分解微生物の取得と応用～

研究課題名(英文) Lignocellulose biomass degradation by microbial consortium in a leaf-eating monkey.

研究代表者

相澤 朋子 (AIZAWA, Tomoko)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：60398849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：石油や石炭、天然ガスといった化石エネルギー資源の消費量削減は今や世界的な課題となっている。この消費量削減に役立つと期待されているのが、植物性バイオマスを原料にしたエタノール生産などのエネルギー変換技術である。本研究では、葉食いザル(アカアシドゥクランゲール, Red-shanked Douc Langur)のもつ微生物群集構造を解析することで、新たな木質系バイオマス分解微生物の取得と応用、さらには絶滅危惧種である同サルの健康管理に有益な知見を得ることを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トウモロコシなどに含まれるデンプンと異なり、草本・木本性バイオマスに多く含まれるセルロースやヘミセルロースなどは粉碎などの物理的処理に加え、酸やアルカリなどによる前処理なしでは糖化効率が低く、非食用植物のバイオマスを利用したエタノール生産には糖化工程の高効率化が重要とされている。葉を食べるアカアシドゥクランゲールのもつ腸内微生物を解析することで、新たな木質系バイオマス分解微生物の取得ができた。

研究成果の概要(英文)：The consumption reduction of fossil energy resources including oil, coal, and natural gas, become the global problem. It is expected that the use of lignocellulose biomass material will contribute to combating global warming, saving fossil energy resources, and conserving the natural environment. The lignocellulose biomass material contains cellulose, hemicellulose, lignin, ashes and the extractive materials. In this study, we surveyed Lignocellulose biomass degradation bacteria, and characterized by PCR-DGGE microbial communities from the leaf-eating monkey, red-shanked douc langur.

研究分野：微生物生態学

キーワード：バイオマス 葉 細菌 分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

石油や石炭、天然ガスといった化石エネルギー資源の消費量削減は今や世界的な課題となっている。この消費量削減に役立つと期待されているのが、植物性バイオマスを原料にしたエタノール生産などのエネルギー変換技術である。しかし、トウモロコシなどに含まれるデンプンと異なり、草本・木本性バイオマスに多く含まれるセルロースやヘミセルロースなどは粉碎などの物理的処理に加え、酸やアルカリなどによる前処理なしでは糖化効率が低く、非食用植物のバイオマスを利用したエタノール生産には糖化工程の高効率化が重要とされている。

一方で、原発事故に伴う除染作業で多くの雑草、落ち葉などの大量の植物性バイオマスが蓄積・保存されており、置き場に困る事態が発生している。これらを分解(糖化)できれば、エネルギー資源としての活用と蓄積した除染由来バイオマスの量的減少の両面にも寄与できるが、これらも含め、非食用植物由来のバイオマスは、草本・木本植物が混合していることが多く、セルロースやデンプンなど単一成分に特化した酵素では糖化困難な基質であることが多い。このような非食用・混合植物バイオマスでは、集められたバイオマスの遠距離移動は現実的でないことから、植物種が変化しても適用可能で、可能な限り前処理の少なくすむ、強力かつ多様な糖化酵素が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、葉を主食にしている生物由来の微生物群を解析することで新たな植物バイオマス分解微生物の取得を目指す。対象としたのは、木の葉などを主食としているアカアシドゥクラングール (Red-shanked Douc Langur) である。このサルは、東南アジアに生息しているが、ベトナム戦争で使用された枯葉剤によって生息地の大半を失い、激減したと言われており、現在でもペットや食糧、漢方薬としての使用を目的とした密猟が横行しているため、生存がきわめて危険な状態にある「絶滅危惧種」とされている。日本では神奈川県横浜市の「よこはま動物園ズーラシア」でのみ飼育され、季節に応じた新鮮な葉が与えられている。しかし食餌として与える葉の種類が切り替わる際に時折体調を崩し、1週間以上食餌を取らなくなる個体があることがあり、同サルの飼育上の問題となっている。

葉食いザル(アカアシドゥクラングール, Red-shanked Douc Langur) のもつ微生物群集構造を解析することで、新たな木質系バイオマス分解微生物の取得と応用、さらには絶滅危惧種である同サルの健康管理に有益な知見を得ることを目指している。

### 3. 研究の方法

アカアシドゥクラングールが最も活発に葉を摂食する5-7月に採取する糞便試料を主な単離源として用い、同サルが食べている葉(サクラ・トウネズミモチ・マサキ・ヤナギ)を凍結乾燥後に粉碎し、炭素源として用いた。さらに草本、木本系植物混合バイオマスを炭素源として加えた培地も用いて単離を試みた結果、約500株が得られている。これらのなかから、バイオマス分解酵素活性をもつ微生物を効率的に選抜するために、以下に示す色素結合セルロース、色素結合ヘミセルロースを炭素源として用いてセルラーゼ、ヘミセルラーゼ活性の有無を判定し、一次選抜を行った。

色素標識された基質である AZCL-Arabinoxylan、AZCL-β-Glucan、AZCL-HE (2-Hydroxyethyl)-Cellulose、AZCL-Xylan、AZCL-Galactomannan、AZCL-Xyloglucan の6種類をそれぞれ基質として5 mg / L、栄養素として yeast extract、bacto soytone および MgSO<sub>4</sub> を 0.5 g / L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> および K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 0.1 g / L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 3.0 g / L、CaCl<sub>2</sub> を 0.05 g / L 加えた培地を作成した。この培地をディープウェルプレートに分注し、アカアシドゥクラング

ール由来の単離菌株を加えて 35 で 48 時間反応させた。反応後に、基質の分解によってその上清に遊離生成した青色の色素を指標に、セルラーゼあるいはヘミセルラーゼ活性の有無の判定を行った。

#### 4 . 研究成果

サルが普段与えられているソメイヨシノ、ヤナギ、マサキ、トウネズミモチの木の葉と、サルは食べていないが草本性の植物としてシログワイの葉それぞれの粉末を炭素源とした最少培地で集積培養を行い、その後平板培地で単離した。

その結果、ソメイヨシノ培地から155株、ヤナギ培地から138株、マサキ培地から169株、トウネズミモチ培地から82株、シログワイ培地から321株、合計865株が得られた。次に、これらの菌株からセルロースやヘミセルロース分解活性のある菌を選抜した。まず、青色色素のアズリンが結合したブナ由来キシラン、小麦由来アラビノキシラン、タマリンド由来キシログルカン、大麦由来 グルカン、イナゴマメ由来ガラクトマンナン、ヒドロキシエチルセルロース、デンプンなど9種の多糖を利用した一次スクリーニングを行った。菌の多糖の分解活性の有無は、培養液上清中のアズリンの遊離度を590 nmの吸光度の測定により判定した。その結果、ソメイヨシノ122株、ヤナギ29株、マサキ91株、トウネズミモチ39株、シログワイ108株、合計389株に高い分解活性があった。さらに、2 次スクリーニングとして単離源と同じ葉を炭素源とした液体培地を用いて、3日間の培養後に増加する還元糖量をDNS法（ジニトロサリチル酸）で測定した。その結果、ソメイヨシノ45株、ヤナギ10株、マサキ24株、トウネズミモチ6株、シログワイ10株の合計95株に高い分解活性があった。1次スクリーニング、2次スクリーニングの結果を統合すると、ほとんどの菌株がヘミセルロースを分解できることが示された。

牛と異なり単胃であるサルは、テングザルなど一部を除き反芻は確認されていない。アカアシドゥクラングールが反芻なしで十分な栄養を吸収するためにも、腸管内に強力な木質系バイオマス分解菌が存在し、葉の消化を補助している可能性がある。体調不良の原因については、食餌の葉の変化と消化管内の微生物の種類が適合するのに時間がかかるため、適切なバイオマス分解酵素が腸管内で生産されないことによる「胃腸のもたれ」である可能性もあるが、サルの腸管内微生物群集構造（菌相）と体調変化に関する報告は殆どない。現在単離、選抜している微生物の種類を検討することにより、アカアシドゥクラングールは多様な葉に適応して菌相を変化させる事が出来るのか、多様な糖化酵素をもつ微生物群をもっているか否かが判ってくるだろう。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：浦井 誠

ローマ字氏名：URAI, Makoto  
所属研究機関名：東京農業大学  
部局名：生命科学部  
職名：准教授  
研究者番号(8桁): 20398853

研究分担者氏名：金澤 朋子  
ローマ字氏名：KANAZAWA, Tomoko  
所属研究機関名：日本大学  
部局名：生物資源科学部  
職名：助手  
研究者番号(8桁): 20748470

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。