

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月13日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21580098

研究課題名（和文）海藻類からの新規極限環境微生物の探索とその有用糖質分解能の開発

研究課題名（英文）Isolation and characterization of extremophiles from sea organisms

研究代表者

工藤 俊章（KUDO TOSHIAKI）

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：80109793

研究成果の概要（和文）：

海藻バイオマス資源の有効利用を目指して、新しい糖質分解酵素源として好塩性微生物や好塩、好アルカリ性微生物などの極限環境微生物の探索、解析を進めた。その結果、各種の海藻や海生生物から CMC など各種糖質分解能を持つ極限環境微生物を分離出来た。また、ヘミセルロースのキシランを効率良く分解し、乳酸や酢酸、エタノールを生産する好アルカリ性乳酸菌が分離出来た。本菌は、アオサ等からの乳酸発酵もわずかに認められた。本研究の成果は、これまでとは異なる新しい微生物資源、強力な糖質分解酵素源としての極限環境微生物の可能性を示すものであり今後の成果が期待される。

研究成果の概要（英文）：

For the effective use of marine biomass resource seaweed, we searched for extremophiles such as halophiles and alkaliphiles from various sea organisms. We found new carbohydrate-degrading enzymes from the extremophiles. In addition, alkaliphilic lactic acid bacteria degraded hemicellulose, xylan to produce lactic acid, acetic acid, and ethanol effectively. The extremophiles showed slightly lactic acid fermentation from seaweed, too. These results suggest that extremophiles are new microbial resource and are also resource of new carbohydrate degrading enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：海藻バイオマス、糖質分解菌、極限環境微生物

1. 研究開始当初の背景

今日、膨大に存在する未利用海洋糖質資源の活用が重要な課題に成りつつある。本研究

は、海藻などの水産バイオマス資源の効率的な分解能を持つ極限環境微生物等を海藻などから探索し、それらの有用機能の開発、利用を目指すものである。

水産バイオマス原料としての海藻を見た場合、エネルギー作物としてのサトウキビよりも高い炭酸固定能を有しているとともに、その養殖技術も確立しており将来性に富んだ原料と考えられる。特に、大規模な海藻養殖は、魚介類の増殖、海域浄化、バイオマスエネルギー生産による経済効果に繋がる。しかし、これまで水産バイオマスエネルギーの活用・研究はあまりなされてこなかった。その原因として、付着塩分の問題や当時のエネルギー転換技術が低効率の海藻メタン発酵であったことなどが上げられている。

海藻類の糖質成分としては、アルギン酸、マンニトール、粗繊維などの多糖類であること、また付着塩分への対応として、普通の微生物とは異なる耐塩性微生物およびそれらが生産する糖質分解酵素の利・活用が期待される。即ち、これまでとは異なる新しい微生物資源、強力な糖質分解酵素源として好塩性微生物や好塩、好アルカリ性微生物などの極限環境微生物の探索と活用を目指した。

2. 研究の目的

今日、微生物を利用したエタノール生産に利用される原料の大部分は、食糧用のデンプン系バイオマスである。今後、食糧資源と競合しないリグノセルロース系バイオマス、特に海藻バイオマスなどの未利用バイオマスの利用技術の開発は極めて重要性が高いと言える。例えば、褐藻類の一種であるジャイアントケルプは、その成長の早さから研究がなされてきたが、微生物によって利用可能な糖質源としては全乾燥体中の約 60%を占めるアルギン酸、マンニトール、粗繊維が上げられる。

海藻バイオマス資源の問題点として、変換、分解技術の開発には付着塩分への対応、陸上植物とは異なる成分組成に対する対応が必要となる。特に、耐塩性を持つ微生物、分解酵素の開発、利用が強く求められる。例えば、海藻から分解、糖化されて生成した単糖、オリゴ糖は高機能エタノール生産菌によって代謝、変換され海藻エタノール生産が実現すると考えられる。

魚介類などの消化管、胃や腸を解剖すると多くの微生物と共に小型のイカ、オキアミ、海藻などの消化物が観察される。また、草食性のアイゴなどは体長の 3-4 倍の長さの、形態学的に幾つかの部分から構成される長い腸を持ち、消化物が存在する部位には非常に多数の微生物が観察された。また、シログチ消化管内から多くの糖質資化能を持つ放線菌、グラム陽性細菌、発光細菌や極限環境微生物

として好塩性細菌、好アルカリ性細菌、低温菌が存在すること発見した。しかし、海にはまだ未知の極限環境微生物などの新規微生物が多数存在すると考えられる。

本研究においては、緑藻、褐藻、紅藻等の海藻類や海生生物から糖質分解能を持つ新規極限環境微生物を培養、分離し、それらの有用機能の解明、開発を目指す。

3. 研究の方法

最近の研究から、極限環境微生物は深海、温泉、高濃度の塩水湖、高い pH のアルカリ土壌などの極限環境下に存在するだけでなく、季節風や海流に乗って地球上の各地に広く分布していることが明らかになってきた。

本研究においては、各種海藻や海生生物等から強力な糖質分解能を持つ極限環境微生物を分離し、それらの有用機能の解明、開発を目指す。即ち、色々な海藻試料等を好塩性、好アルカリ性等の培養条件で、炭素源としては、アルギン酸、セルロース、キシラン等を用いて培養し、生育してきた極限環境微生物の分離、純化を進める。更に、単離された菌株の有用糖質分解酵素の解析、乳酸発酵の解析を目指した。

4. 研究成果

長崎近海で収集した各種海藻等に付着する微生物を分離するため、有用糖質(デンプン、セルロース、アルギン酸等)を炭素源として海藻断片を集積培養し、懸濁してきた培養液をそれぞれの寒天培地に塗布、培養した。培養後、増殖してきたコロニーを純化し、単離したコロニーをスラントに移し、保存、解析を進めた。その結果、pH 10、塩濃度 10%のデンプン含有培地から 39 株、pH 10、塩濃度 3.5%のデンプン含有培地から 26 株、pH 10、塩濃度 10%のセルロース含有培地から 21 株、pH 10、塩濃度 3.5%のセルロース含有培地から 18 株、pH 10、塩濃度 10%のアルギン酸含有培地から 20 株、pH 10、塩濃度 3.5%のアルギン酸含有培地から 12 株が得られた。得られた菌株を各種の糖質分解能確認用寒天培地で増殖させた後、コロニー周囲におけるハロー形成の有無を指標に分解能を持つ菌株の選択を行った結果、多くの糖質分解能を保有する分離株が得られた。また、pH 10、塩濃度 3.5%のデンプン含有培地においてアガラーゼ活性を示す菌株も 2 株確認された。更に、海藻以外の試料も含め各種試料から、有用糖質(デンプン、セルロース、アルギン酸等)を炭素源として合計 221

株を分離した。得られた菌株をそれぞれの糖質分解能確認用寒天培地で増殖させた後、コロニー周囲におけるハロー形成の有無を指標に分解能を持つ菌株の選択を進めた。その結果、デンプン分解能を示す株 119 株、CMC 分解能を示す株 117 株、アルギン酸分解能を示す株 39 株、キシラン分解能を示す株 10 株、寒天分解能を示す株数株が得られた。

この内、143 株について分子系統解析を行った。CMC 分解菌は *Bacillus* sp. や *Exiguobacterium* sp.、*Halomonas* sp. 等の細菌 14 属 36 種に分けられ、大きく分類してファーミキューテス門に属する細菌が多かった。特に、*Oceanobacillus iheyensis* や *Halolactibacillus miurensis*、*Halomonas variabilis* の近縁菌が強い分解能を持つことが明らかになった。また、アルギン酸分解菌は *Halomonas* sp.、*Vibrio* sp. や *Bacillus* sp. 等の細菌 8 属 22 種に分けられ、大きく分類してプロテオバクテリア門に属する細菌が多かった。特に、*Halomonas venusta* や *Halomonas aquamarina* の近縁菌が強い分解能を有すると示唆された。

次に、藻食性魚類の腸内から分離した各種菌株の糖質分解能、分子系統を明らかにし、それらの海藻バイオマス利用における役割の解明を目指した。実験試料(藻食性魚類)としてアイゴやテンジクイサキを用いた。

上記個体から好アルカリ性や好塩性を示す菌株を中心に約600株分離した。そのうち、デンプン、セルロース、アルギン酸、キシラン等の分解能を示す菌株は約300株あった。また、複数の分解能を示す菌株が約120株分離できた。アイゴから分離した菌株とテンジクイサキから分離した菌株の分解能を比較すると、アイゴ分離菌からはアルギン酸分解能を示す菌株が多く、テンジクイサキ分離菌からはセルロース分解能を示す菌株が多かった。一部の分離株を分子系統解析した結果、アイゴから分離した菌株は、*Vivrio*属、*Halomonas* 属、*Bacillus*属が多く見られた。特に、10 月アイゴから分離した菌株については、放線菌門の *Streptomyces* 属や *Isoptericola* 属細菌も多く分離された。テンジクイサキから分離した菌株では、*Vivrio* 属、*Photobacterium* 属、*Bacillus*属が多かった。ジニトロサリチル酸法によるセルロースの還元糖の定量の結果では、*Isoptericola variabilis*と *Bacillus licheniformis*近縁菌が酵素活性を示した。更に、これらの粗酵素を混合することにより相加効果を示した。また、これらの細菌はゲノム配列が報告されており、いくつかのセルラーゼ遺伝子を持つことが知られており、そ

れらとの関連についても解析を進めている。

海藻から分離された好アルカリ性乳酸菌の生成物の定量した結果、好アルカリ性乳酸菌 (*A. kapii* の近縁菌、*H. miurensis* の近縁菌)は L-乳酸の生産を主体とした DL 体のヘテロ乳酸発酵菌であることが確認された。これらは主にグルコースやデンプンを効率良く分解し、乳酸発酵を行っていた。特に、*H. miurensis* の近縁菌についてはヘミセルロースのキシランも効率良く分解し、基質をデンプンにした時と同程度の乳酸や酢酸、エタノールを生産することが明らかになった。また、CMC やアルギン酸、アオサの分解もわずかに認められた。培養条件により代謝の変化が起こり、発酵形式は変化するため、今後はこれらの分解に適した乳酸発酵条件の検討を行う。

次に、海藻などを含むデトリタス食性海産動物ナマコの腸内から分離した各種分離株の糖質分解能、分子系統を明らかにし、それらの海藻バイオマス利用における役割の解明を目指した。

ナマコの消化管から多くの好アルカリ性や好塩性を示す菌株を得た。分子系統解析の結果、これらの分離株は、主に Firmicutes 門(主に *Bacillus* 属)、Protobacteria 門(主に *Vibrio* 属)、放線菌門などの近縁種であることが明らかになった。即ち、分離株の多くは、デンプン、セルロース、アルギン酸、キシラン等の分解能を示した。また、また、通性嫌気性細菌や耐嫌気性細菌が好気性細菌より多く検出された。これらの結果から、ナマコは宿主として、腸内微生物に餌と棲息場所を与えており、上記の細菌群が腸内において糖質等の有機物を分解し、その代謝産物や微量成分を宿主へ供給するという重要な役割を果たしていると考えられた。即ち、宿主ナマコと腸内細菌の間には緩やかな共生関係が存在していることが示唆された。また、生育環境の菌相に及ぼす影響についても考察した。これらの成果は、今後、ナマコとその腸内微生物の相互作用による海底物質循環及び水産バイオマス(デトリタス)資源の微生物分解、利用に関する重要な手掛りを与えると考えられる。

水産バイオマス原料としての海藻は、高い炭酸固定能を有しているとともに、その養殖技術も確立しており将来性に富んだバイオマス原料と考えられる。しかし、これまで水産バイオマスエネルギーの活用・研究はあまりなされてこなかったのは、付着塩分の問題や

当時のエネルギー転換技術が低効率の海藻メタン発酵であったことなどが上げられている。付着塩分への対応として、耐塩性微生物を含む好アルカリ性微生物などの極限環境微生物およびそれらが生産する糖質分解酵素の利活用や好アルカリ性乳酸菌の乳酸発酵が期待される。本研究の成果は、これまでとは異なる新しい微生物資源、強力な糖質分解酵素源としての極限環境微生物の可能性を示すものであり今後の成果が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Xiaochi Zhang, Tomomi Nakahara, Shinji Murase, Hideaki Nakata, Tetsushi Inoue, Toshiaki Kudo : Physiological characterization of aerobic culturable bacteria in the intestine of the sea cucumber *Apostichopus japonicas*, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 査読有、in press 2013

2. Xiaochi Zhang, Tomomi Nakahara, Nozomi Ochiai, Ayumi Kawauchi, Jun Hashimoto, Tetsushi Inoue, Toshiaki Kudo : Diversity and function of aerobic culturable bacteria in the intestine of deep-sea holothurian, *Journal of Japanese Society for Extremophiles*, 査読有 11巻2号 2012 49-58

3. Xiaochi Zhang, Tomomi Nakahara, Masayuki Miyazaki, Yuichi Nogi, Shigeto Taniyama, Osamu Arakawa, Tetsushi Inoue, Toshiaki Kudo : Diversity and function of aerobic culturable bacteria in the intestine of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 査読有 58巻6号 2012 447-456

4. 守屋繁春、工藤俊章 : 生態系サービスを読み解くという文脈におけるバイオマス糖化研究バイオエタノール通信 査読無 7号 2011 28-32

[学会発表] (計3件)

1. 木田宗明、工藤俊章 : 藻食性魚類消化管からの各種糖質分解菌の単離と機能解析、第12回極限環境生物学会年会、2011年11月27日、長崎

2. 木田宗明、工藤俊章 : 藻食性魚類消化管からの糖質分解菌の単離と解析、平成23年度日本水産学会秋季大会、2011年09月30日、長崎

3. 工藤俊章 : 海は極限環境微生物の宝庫? 海洋研究開発機構第7回海と地球の研究所セミナー、平成22年7月24日、長崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 俊章 (KUDO TOSHIAKI)
長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・教授
研究者番号 : 80109793

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし