

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 5月30日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580187

研究課題名（和文） 森林内でのスギ材腐朽過程における木材腐朽菌とバクテリアの相互作用の解明

研究課題名（英文） Analysis of the interaction between wood-rotting fungi and bacteria in wood decay.

研究代表者

目黒 貞利 (MEGURO SADATOSHI)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：50112321

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細菌が木材腐朽に及ぼす影響について解析した。まず、木材腐朽にかかわる細菌を分離するために、腐朽材—パルプ還流法を開発・適用した。本還流法によって細菌が集積されたパルプ表面には、少なくとも10種の細菌が存在し、セルラーゼ生産性細菌が2種分離された。そのうち細菌株 E814-2 は *Paenibacillus* 属細菌であることが 16S rDNA 配列から明らかとなり、セルロソーム生産細菌である *Paenibacillus curdlanolyticus* と近縁であった。木材腐朽菌による木材の腐朽に対する細菌の影響を解析するために、木粉中での細菌と木材腐朽菌の共培養が試みられた。結果、いくつかの細菌株は木材腐朽菌による木粉重量の減少を改善した。これらの結果は、いくつかの細菌は木材腐朽菌による木材の分解を助けることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, influence of bacteria on wood decay was analyzed. To isolate the bacteria involved in wood decay, a decayed wood-pulp perfusion system was developed and applied. An bacterial enrichment surface of pulp in perfusion system contained at least ten bacteria, and then two bacterial strains (E814-1 and E814-2) were isolated as cellulase-producing bacteria. Among them, strain E814-2 was identified as *Paenibacillus* sp. by 16S rDNA sequencing. This strain closely related to *Paenibacillus curdlanolyticus* which was reported recently as cellulosome-producing bacteria. In order to analyze the influence of bacteria on wood decay by wood-rotting fungi, co-cultivation of bacteria with fungus on wood was examined. Some bacterial strains improved the weight-loss of wood by fungus. These results suggested that some bacteria help degrade wood by fungus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：木材腐朽菌・バクテリア・相互作用・木材腐朽試験

1. 研究開始当初の背景

近年、地球温暖化が深刻な問題となっており、木材はその二酸化炭素吸収・貯蔵能力による地球温暖化抑制効果への期待から積極的に利用が推進されており、環境への負荷が少ない素材として関心を集めている。その木材の利用においては、「くるう」「燃える」に加え「腐る」ということが今日まで最大の欠点とされてきたが、枯渇が懸念される石油資源の代替として木質バイオマスの利用に関心が集まるなか、逆に木材を微生物の働きによって、いかに効率よく分解するかが新たな重要な課題となってきた。筆者らは微生物の細胞膜構成成分であるリン脂質脂肪酸をバイオマーカーとした PLFA 分析により、土壌埋設木材中の微生物群集構造を解析してきた結果、広葉樹材は、埋土初期から菌類指標の脂肪酸の割合が高く、腐朽期間が長くなるにつれグラム陽性菌指標の脂肪酸が増加する傾向が見られ、これら微生物グループのバイオマスと木材腐朽率の間には有意な正の相関が見られた。一方、スギ材では、腐朽の進行に伴って菌類と、グラム陽性菌や放線菌などのバクテリア指標脂肪酸の増加が見られたが、その腐朽率と菌類バイオマス間には相関関係が見られず、放線菌などバクテリアとに有意な正の相関関係が見られた。これらの検討により、木材の腐朽は主として担子菌によると一般にいわれてきたが、共存するバクテリアの関与も無視し得ないものと考えられた。このことから、今後の木材腐朽のメカニズム解明のためには、特定の木材腐朽菌のみを対象とするのではなく、バクテリアを含めた微生物群集という総合的な観点が必要と考えられた。

2. 研究の目的

申請者らの微生物群集構造にもとづく森林内での木材腐朽過程の動態分析の結果、森林内でのスギ材の腐朽過程において、その腐朽率と菌類バイオマスには相関が無く、放線菌等のバクテリアバイオマスとの間に相関が認められた。このことから、今後の木材腐朽のメカニズム解明のためには、特定の木材腐朽菌のみを対象とするのではなく、バクテリアを含めた微生物群集とそれぞれの微生物間の相互作用という総合的な観点が必要と思われた。そこで本研究では、①すでにスギ林および広葉樹林内に数年間にわたり埋設しておいたスギの木粉や木杭、から木材腐朽に関与する細菌を分離し、その性質を明らかにすることを目的とした。また、②腐朽材に共存する微生物同士の共培養が木材腐朽に与える影響について検討した。

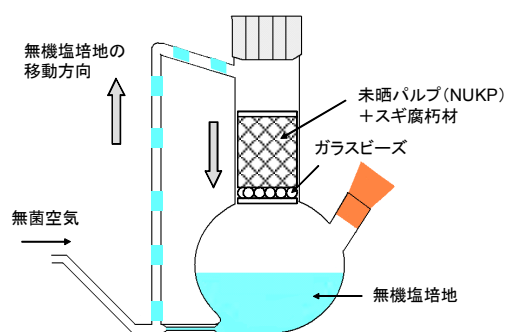
3. 埋設スギ木粉からの木材腐朽に関与す

る細菌の分離と解析

3-1. 研究の方法

3-1-1 腐朽材と集積培養

宮崎演習林広葉樹林及び針葉樹林内の試験区に埋設後、2年経過したスギおよびコナラ木粉を回収した。回収したサンプルはパーコレーター中で針葉樹未晒パルプ (NUKP) と混合し (重量比 1 : 1)、無機塩培地 (1.2g Na₂HPO₄, 0.5 g KH₂PO₄, 20 mg MgSO₄, 100 mg (NH₄)₂SO₄, 10 ml trace element / L) を注いで還流を開始した (25°C、暗所) (図 1)。2 週間ほど培養した後、NUKP-腐朽材混合物を無菌環境下で開封し、NUKP の一部を回収した。回収した NUKP を新しい NUKP と混合し、再度パーコレーターに充填し、25°C 暗所で培養を続けた。2 週間おきに無機塩培地を交換しながら二ヶ月間培養を続けたところ、NUKP の黒色化が観察されたため、培養を終了し、微生物集積パルプを回収した。



3-1-2 PCR-DGGE 法による微生物群集構造解析

図 1 還流法の概略図

還流法により得られた微生物集積パルプから ISOIL (ニッポンジーン) を用いて DNA を抽出した。抽出された DNA を鋳型として 341F-GC/907R (真正細菌用 : 約 600 bp) のプライマーセットを用いて PCR を行い、得られた産物を用いて DGGE 解析に供した。ゲル電気泳動の条件は 8% アクリルアミド、30~70% 変性剤濃度勾配ゲル、0.5% TAE バッファー、200V 定電圧、58°C、4h で行い、検出は EtBr での染色で行った。

3-1-3 集積微生物の単離

微生物集積後のパルプに滅菌水を加え懸濁後、懸濁液を数段階に希釈した。前述した無機塩培地に 100 メッシュパスのスギ木粉を 0.2% となるように炭素源として加えた木粉寒天培地を作成し、希釈液を播種した。1 ~

2日間30°Cで培養し、形成されたコロニーを単離した。

3-1-4 多糖分解酵素の産生

前述した無機塩培地に炭素源としてCMCおよびXylan(Oat)を加えて、寒天培地を作成した。単離されたコロニーをR2A液体培地で一晚培養し、培養液5ulをCMCおよびXylan寒天培地上に塗布し、一晚25°C、30°C、37°C、45°Cで培養した。CMC培地については、培養後のプレートに1mg/mlのCongo Red溶液を10ml流し込み、CMCの染色を行った後1M NaCl溶液で脱色操作を行い、菌体の回り出来るハロを観察した。また、Xylanについては染色操作なしに、ハロの形成を確認した。

3-1-5 細菌種の同定

R2A培地で培養した菌体からDNAを抽出し、PCRによって16S-rRNA geneを増幅し、配列解析を行った。得られた塩基配列はBLAST検索により類似配列の検索を行った。

3-2 研究成果

集積後のパルプからDNAを抽出し、PCR-DGGEによる微生物相の解析を行ったところ、少なくとも10個のバンドが確認された(データ未掲載)。細菌類の単離を試みたところ、3種類の異なる形状を示すコロニーを単離した(E814-1, E814-2, E814-3)。E814-1は黒色のコロニーを形成し、30°C以下の低温で生育しCMCase活性はポジティブであるが、Xylanase活性はネガティブであった(図2)。E814-2は25~37°Cで成育し、特に30°C~37°CでCMCaseおよびXylanase産生能に優れていた(図2)。E814-3はスギ木粉寒天培地、微結晶セルロース寒天培地で生育するが、CMCase, xylanase活性は観察されなかった。以上のことから、腐朽材-未晒パルプ還流法が、セルラーゼ産生細菌のパルプ表面への集積および分離に有効であることが示された。

16S-rRNA geneの配列を元にE814-2およびE814-3の系統解析を行った結果、E814-2は*Klebsiella*属細菌、E814-3は*Paenibacillus*属細菌であることが明らかとなった。特にE814-3に近縁の*Paenibacillus cellulosilyticus*は多酵素複合体セルロソームを産生する通性嫌気性菌であることが近年報告されており、E814-3が同様のセルロソームを産生する可能性がある。針葉樹腐朽材から高い多糖分解酵素活性を示す細菌が分離されたことは、過去の筆者らの研究から得られた「針葉樹の腐朽率とバクテリアバイオマス間に相関関係があることから、針葉樹腐朽に細菌がかかわる」という仮説を支持するといえる。すなわち、針葉樹細胞壁の主要成分であるセルロース分解に、細菌がかかわっていると言えよう。

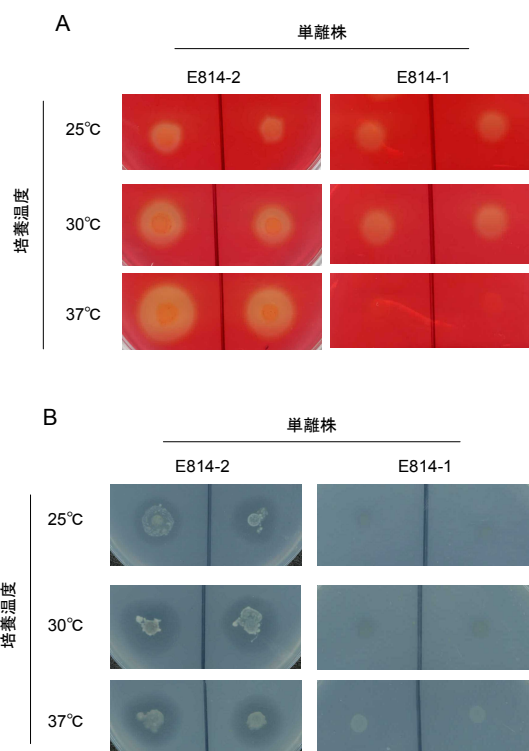


図2 単離されたE814-1およびE814-2株のCMCase活性(A)およびキシラナーゼ活性(B)

4. 腐朽材に共存する微生物同士の共培養が木材腐朽に与える影響

4-1 研究の方法

4-1-1 使用菌株

田野演習林より採取したスギの腐朽材より白色腐朽菌*Phlebia brevispora* TN3Fと共存細菌16株を分離した。また、別の広葉樹腐朽材から*Trametes versicolor* TN6Fと共存細菌8株を分離した。それぞれの細菌は3-1-3に従い、CMCアーゼ活性の有無について調べた。

4-1-2 腐朽試験

50 mL Erlenmeyer Flaskにコナラ木粉(アルコールベンゼン脱脂済)を0.5g入れ、木粉の含水率が約80%となるように蒸留水を加えた。その後121°C・1.2 atm・15分のオートクレーブによる滅菌処理を行った。それぞれの腐朽菌はPDA培地・25°C・暗所で前培養を行ったものを直径5mmのコルクボーラーで打ち抜き、1ディスクを木粉上の中央部に接種した。細菌についてはPD液体培地

で25°C・120 rpm で3日間の前培養後、1.5 mL エッペンドルフチューブに移し、3,500 rpm・5分の遠心分離で細菌を集菌し、滅菌蒸留水で2回洗いこみを行い、滅菌蒸留水に細菌を拡散させ、OD₆₀₀=約1となるようにし0.1 mLの細菌懸濁液を培地に円を描くように滴下した。また、腐朽菌のみと木粉のみのコントロールにも同量の蒸留水を滴下した。接種したフラスコは25°C・暗所で30日間の培養後、105°C乾熱乾燥機で乾燥し、恒量を取り、重量減少率を求めた。その後、既報に従いリグニン量、構成糖の含有率を求めた。

4-2 研究成果

合計23通りの木材腐朽菌-細菌間の組み合わせで30日間、木粉培地上で共培養したところ、*Phlebia brevispora* TN3Fとその共存細菌であるTN3W-8, TN3W-5, TN3W-10のそれぞれを共培養した際に、*Phlebia brevispora* TN3F単独で培養した場合と比較して木粉の重量減少率が有意に高かった(表1)。また、*Trametes versicolor* TN6Fとその共存細菌であるTN6W-10, TN6W-12, TN6W-13, TN6W-14, TN6W-15のそれぞれを共培養した際に、*Trametes versicolor* TN6F単独で培養した場合と比較して木粉の重量減少率が有意に高かった(表2)。この結果は、木材の腐朽に対して、腐朽菌だけではなく細菌が関わっていることを強く示唆している。それぞれの細菌のみを接種した木粉では、培養期間中の重量減少が観察されないことから、腐朽菌と協調的に木材腐朽を進めている可能性が高い。一方で、培養終了後の木粉の主成分分析を行った結果、リグニンの減少率やグルカンの減少率が、腐朽菌単独の場合と異なる組み合わせも観察された(データ未掲載)。これらの結果は、細菌の共存が木材の腐朽様式に影響を与えている可能性を示唆する。

まとめ

本研究では土壌埋設スギ木粉からセルラーゼ産生細菌を分離した。また、木材腐朽菌とある種の細菌との共培養が木材の腐朽を促進することを見出した。いずれも木材腐朽への細菌の関与を強く示唆する。今後はさらに、現象のメカニズム等を詳細に検討することで、木材腐朽に対する細菌の関与が明らかになると考える。

表1 木粉重量減少率 (*Phlebia brevispora* TN3F と共存細菌株)

腐朽菌株	細菌株	重量減少率	
TN3F	—	5.8±0.1	
	TN3W-7	7.0±0.8	
	TN3W-8	6.4±0.2	*
	TN3W-14	6.6±0.5	
	TN3W-21	4.0±0.2	*
TN3F	—	8.0±0.3	
	TN3W-1	8.5±0.2	
	TN3W-3	8.5±0.3	
	TN3W-4	7.8±0.6	
	TN3W-5	9.0±0.8	*
	TN3W-6	8.5±0.4	
	TN3W-9	8.2±1.7	
	TN3W-10	9.5±0.1	*
	TN3W-11	8.7±0.3	
	TN3W-12	8.2±0.6	

*は5%危険率で有意差があることを示す。

表2 木粉重量減少率 (*Trametes versicolor* TN6F と共存細菌株)

腐朽菌株	細菌株	重量減少率	
TN6F	—	15.6±0.7	
	TN6W-4	11.2±4.0	
	TN6W-11	14.3±2.1	
	TN6W-27	17.5±1.8	
TN6F	—	19.5±0.5	
	TN3W-7	19.7±0.5	
	TN3W-9	21.0±1.5	
	TN3W-10	22.8±0.4	*
	TN3W-12	23.3±0.2	*
	TN3W-13	23.1±0.1	*
	TN3W-14	22.5±0.7	*
	TN3W-15	22.5±0.4	*
	TN3W-16	20.6±0.5	

*は5%危険率で有意差があることを示す。

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1件)

- ① Ichiro Kamei, Takehiro Yoshida, Daisuke Enami, Sadatoshi Meguro. Coexisting *Curtobacterium bacterium* promotes growth of white-rot fungus *Stereum* sp. *Current Microbiology*, 査読有、Vol. 64, No. 2, pp. 173-178

[学会発表] (計4件)

- ① 木材腐朽菌と細菌との相互作用～細菌と担子菌との共培養が木材腐朽に与える影響～；第62回日本木材学会大会；2012年03月；○榎並大輔、亀井一郎、目黒貞利
- ② 白色腐朽菌 *Stereum* sp. の生育を促進する *Curtobacterium* 属細菌；第18回日本木材学会九州支部大会；2011年8月；○亀井一郎、目黒貞利
- ③ 木材腐朽菌と細菌との微生物間相互作用～腐朽菌菌糸伸張を促進するヘルパーバクテリア～；第61回日本木材学会大会；2011年3月；吉田健洋、○亀井一郎、目黒貞利
- ④ 還流法を用いたスギ腐朽材由来の細菌類の集積とセルラーゼ産生細菌の単離；第17回日本木材学会九州支部大会；2010年8月；○亀井一郎、目黒貞利
- ⑤

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/kamei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目黒 貞利 (MEGURO SADATOSHI)
宮崎大学・農学部・教授
研究者番号：50112321

(2) 研究分担者

雉子谷 佳男 (KIJIDANI YOSHIO)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号：10295199
亀井 一郎 (KAMEI ICHIRO)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号：90526526

(3) 連携研究者

なし