

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630434

研究課題名(和文) 草食性エビ・カニ類共生細菌群集を用いた高効率バイオマス分解システムの構築

研究課題名(英文) Isolation and properties of biomass degrading bacteria from land crab, *Chiromantes haematocheir*

研究代表者

三宅 克英 (MIYAKE, Katsuhide)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：90252254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：加賀地方や能登地方の水辺林に生息するアカテガニから消化管抽出液を作製し、そのバイオマス分解能力を解析した。セルラーゼ活性やリグニン分解活性を検討したところ、非常に強いグアヤコール酸化活性、つまりリグニン分解活性を検出することができた。またこのアカテガニやヨコエビなどの甲殻類からバイオマス分解能力のあるアカテガニ消化管由来細菌群を単離同定し、そのセルラーゼ活性やリグニン分解活性も検出することができた。単離した細菌群は一つずつでは、消化管抽出液の活性には遠く及ばないが、群集として機能させることで、強い活性を再構成することが可能と考えている。

研究成果の概要(英文)：Land crab, *Chiromantes haematocheir* mainly consume plant material and its detritus. They are expected to have cellulose and lignin degrading activities to digest plant materials. Isolation of biomass degrading bacteria was performed from gut of *C. haematocheir*. Fifteen kinds of bacteria were isolated under aerobic condition and 14 strains showed clear cellulase activities. These cellulase activities were detected in culture supernatants and were able to degrade carboxymethyl cellulose (CMC) to mono sugar units. Among 14 cellulase-producing bacteria, 2 strains (*Bacillus licheniformis* LB1 and *Shewanella xiamensis* LB5) seemed to show activities reacting lignin or lignin derivative compounds. *B. licheniformis* LB1 showed clear halo-forming activity on lignin containing plate and *S. xiamensis* LB5 exhibited high activity to react with guaiacol which is low molecular lignin derivative. Biomass-degrading bacteria might contribute to the ability of the land crab to digest biomass in gut.

研究分野：環境微生物学

キーワード：アカテガニ セルラーゼ リグニン 腸内細菌 グアヤコール ヨコエビ バイオマス

1. 研究開始当初の背景

本研究開始時には陸ガニのバイオマス分解能力に着目する研究者は日本にはおらず、世界でもわずかにほどこしか報告例がない状況であった。本研究を開始することでバイオマス分解生物についての新たな知見を得ることができれば、木質系バイオマス由来のバイオエタノール、バイオガスの生産に大きな寄与をもたらすことが期待された。

石川県に残された貴重な照葉樹天然林である「鹿島の森」とその周辺（河口、湖）に生息する生物（魚類、甲殻類）を調査して、そこに生息する陸ガニ類の生態的な役割が石川県立大学の柳井教授らの研究グループによって解明されてきた。質量分析計を使った安定同位体比分析や赤外線カメラによる草食性陸ガニの一種、アカテガニ (*Chiromantes haematocheir*)類 (図1) の摂餌生態や繁殖生態の観察から、これらのカニ類が森林物質循環と河口域の生態系（特に魚類生産）の上で重要な役割を果たしていることがわかってきた。また同様にヨコエビ類にも類似の役割が推定されている。これらの甲殻類に関しては、明らかにバイオマス分解能力があるにもかかわらず、バイオマス利用のために有効活用が試みられたことはほとんどない。本研究以前に、甲殻類の様々な種類においてセルロースやヘミセルロースを分解できる活性は報告されている(J. Comp. Physiol. B 177, 269-286 (2007))。このうち、内在性のセルラーゼ遺伝子がレッドクロウと呼ばれるオーストラリアのザリガニやインド洋の島などに生息するアカガニで確認されている。またシロアリのような共生細菌によるセルラーゼ活性の報告はない。全体的にあまり研究が進んでおらず、アカテガニやヨコエビのバイオマス分解活性についても知られていない。本研究で甲殻類消化器官由来細菌のバイオマス分解活性を検出できれば、世界初の報告となる。また対象甲殻類の食性から、共生細菌群にはセルロースのみならずリグニンやタンニンを分解できる活性が存在している可能性が高い。本研究を通じてアカテガニバイオマス分解システムの有効性が証明されれば、木質系バイオマスのバイオ燃料への変換に利用できるのではと期待している。



図1 アカテガニ

2. 研究の目的

日本の海岸に面した森林、いわゆる水辺林（魚つき林）では、草食性の陸ガニやエビなどの生息がよく観察される。これらの甲殻類は落ち葉や木片などのバイオマスを食料として利用する。カニやエビは森林物

質循環と河口域の生態系（特に魚類生産）の上で重要な役割を果たしているが、そのバイオマス分解メカニズムはほとんどわかっていない。本研究では草食性のアカテガニあるいはヨコエビを材料として、その未知なるバイオマス分解システムを明らかにし、バイオマス有効利用技術への応用をはかる。これらの甲殻類は木や葉といったバイオマスのみで生育可能であり、強力なバイオマス分解能力を持っている可能性が高い。本研究ではこれらの甲殻類消化管からバイオマス中のセルロースだけでなくリグニンをも分解できるスーパー細菌群の単離を試み、将来的にはカニやエビ自体の分解酵素とあわせて *in vitro* で甲殻類消化管の複合バイオマス分解系を構築するための基盤とする。

3. 研究の方法

アカテガニ消化管由来の培養可能細菌群を単離、同定するために、加賀市鹿島の森で採取したアカテガニ一匹を解剖し、胃と腸からなる消化管を回収した (図2)。通常のリン

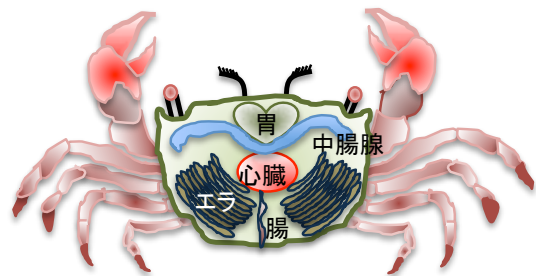


図2 カニの解剖図

酸緩衝液 (PBS) 5 ml に消化管を懸濁し、ダウンズ型ホモゲナイザーを用いて破碎し、LB 寒天培地にプレーティングした。培養は 37°C で行い、コロニーの出現を観察した。得られた細菌群はコロニーの形状により分類し、液体培養して凍結保存を行った。細菌はゲノム DNA を回収し、16S rRNA 遺伝子を 27f と 1492r のユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定して、NCBI のデータベースで細菌種の同定を試みた。単離同定した細菌群のバイオマス分解活性を調べるためにプレート上でのハロ形成実験を行った。セルラーゼ活性のためには CMC-Congo-Red 法を用い、リグニン分解活性のためには LB 寒天プレートに市販リグニン（関東化学）0.5% を添加したものをを用いた。またリグニンに関しては、リグニン添加 LB 液体培地での培養によるリグニン吸光度 (480 nm) の変化の検討も行った。培養菌体から作製した粗酵素抽出液のバイオマス分解活性については、セルラーゼ活性については TLC 解析を行い、リグニン分解活性については、グアヤコール法及びゲル濾過 HPLC 法によるリグニンの低分子化確認の方法を用いた。

4. 研究成果

アカテガニ消化管懸濁液からカニ一匹当たり約1万コロニーの細菌を培養することができた(図3)。今回培養できた細菌は好気培養で観察されたものだけであり、嫌気培養も行えば、もっと多くの細菌が単離される可能性は

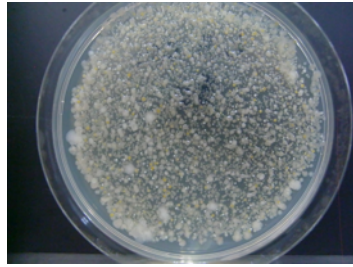


図3 カニ消化管由来コロニー

ある。カニ消化管内部の通気状態は不明であるが、消化管は短く、口腔から直接連結されていることから、完全な嫌気状態ではないと考えている。またリグニン分解は酸素を必要とすることから、消化管内でバイオマス分解に寄与している細菌の多くは好気性、もしくは微好気性の細菌ではないかと推察している。本実験では多くのコロニーが出現したが、コロニーの形状、大きさ、色等の違いで判別したところ、やく15種類に大別できた。通常、環境中の微生物は90%から99%は培養不可能であるとされている。従って、アカテガニ消化管内には少なくとも150種類から1500種類の細菌が存在するのではないかと考えられる。すべての細菌が存在しないと、100%のバイオマス分解活性は得られないかも知れないが、現実的ではないと考えて、今回は得られた細菌の活性をまず評価することとした。細菌の同定結果を図4に示す。

表1 単離菌同定とバイオマス活性

	菌株	CMC	Lignin	同定結果	相同性
アカテガニ	LB1	○	◎	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%
	LB2	○	○	<i>Bacillus sp.</i>	100%
	LB3	×	○	<i>Citrobacter freundii</i>	99%
	LB5	○	○	<i>Shewanella xiamenensis</i>	99%
	LB9	○	○	<i>Bacillus sp.</i>	99%
	LB13	○	○	<i>Shewanella sp.</i>	99%
ヨコエビ	S4	○	○	<i>Pseudomonas koreensis</i>	99%
	S14	×	○	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	98%
	S16	○	○	<i>Bacillus pumilus</i>	89%
	S21	○	○	<i>Shewanella sp</i>	99%
	S26	○	○	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%
	S29	○	○	<i>Bacillus sp.</i>	100%

現在、アカテガニ消化管由来細菌を15株、ヨコエビ由来細菌29株単離することが出来ている。アカテガニ消化管由来細菌をLB1~15、ヨコエビ由来細菌をS1~29と番号をつけた。セルラーゼアッセイの

CMC-congo-Red法ではアカテガニ消化管由来細菌で15株中14株、ヨコエビ由来細菌で29株中5株ハロを形成した。アカテガニ消化管由来細菌のセルラーゼ活性出現率は90%を超えており、特筆すべき結果である。

ハロ形成の代表的結果を図4に示す。一方、リグニンプレートではアカテガニ消化管由来細菌で15株中6株(LB1、2、3、5、9、13)、ヨコエビ由来細菌では29株中6株(S4、14、16、21、26、29)でハロを形成

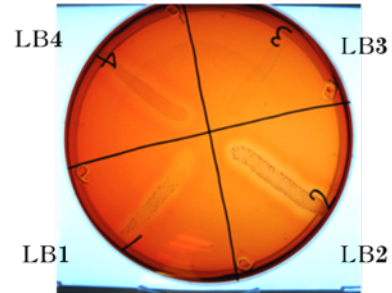


図4 CMC-congo Red法でのハロ形成

した。この際、通常のリグニンプレートではハロの形成がはっきりと視認できなかったため、プレートに1%CMCを含有させたところ、はっきりしたハロの形成を確認できた(図5)。CMCがプレートに物理的な影響を及ぼしている可能性も否定できないが、このことは、CMCはリグニン分解酵素を特異的に誘導もしくは活性化している可能性があることを示唆している。今回の同定結果では、アカテガニからもヨコエビからも

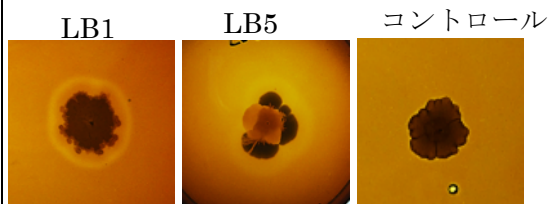


図5 リグニンプレートでのハロ形成

した。この際、通常のリグニンプレートではハロの形成がはっきりと視認できなかったため、プレートに1%CMCを含有させたところ、はっきりしたハロの形成を確認できた(図5)。CMCがプレートに物理的な影響を及ぼしている可能性も否定できないが、このことは、CMCはリグニン分解酵素を特異的に誘導もしくは活性化している可能性があることを示唆している。今回の同定結果では、アカテガニからもヨコエビからも *Shewanella* 属と *Bacillus licheniformis* が単離され、両者ともセルラーゼ活性もリグニン分解活性も示している。これらの細菌は甲殻類の体内で重要な役割を担っている可能性がある。

リグニンに関してはプレートアッセイだけでなく、液体培養についても検証を行ったが、その結果を図6に示す。実験はアカテガニ由来の単離菌で行った。プレートアッセイでハロができたものと結果は一致していない。プレート上でハロの形成がなかったLB11株で最も強い活性が出ている。培養法の違いがこの結果をもたらしたのかも知れない。さらなる解析が必要と思われる。

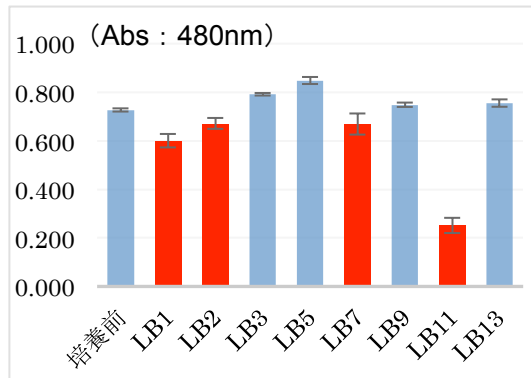


図6 リグニン添加液体培養での分解活性の測定

プレートでのハロ形成が認められた細菌群について、粗酵素液を調製してバイオマス分解酵素活性の解析を行った。まずセルラーゼ活性については各菌株を液体培養し、その上清と菌体抽出液に分離し、CMCと混合して37°Cで一晩反応させた。反応液をTLCで展開し、硫酸エタノールで発色させた。展開溶媒には2-プロパノール：酢酸：水=4：1：1を用いた。結果を図7に示す。左からCMC、セロビオース、グルコースの順にスポットした。サンプルはその左から2つずつ、LB1, 2, 4, 5, 6, 7, 8の順に、サンプル内では右側に菌体上清由来の反応物をおいている。いずれの細菌株もCMCをグルコース（最も上方まで展開されている）にまで分解していることがわかった。また酵素活性はすべて菌体外からのみ検出された。



図7 TLCによるセルラーゼ活性の解析

リグニン分解活性については2種類の反応法で検討を行った。まずグアヤコール法での活性測定を行った。グアヤコール法はリグニン分解活性の測定によく使われる方法であり、リグニン分解酵素のラッカーゼ、リグ

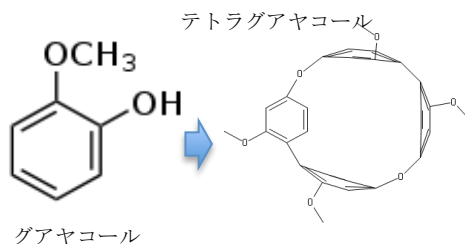


図8 グアヤコール反応

ニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼの活性を検出できる。図8に示すように2-メトキシフェノールの4量体化をみる測定法であり、実際のリグニン分解を検出しているわけではない。グアヤコール反応に関しては、甲殻類に共通に見出されたリグニンハロ形成細菌株について活性を測定した。粗酵素液を調製する際、プレート培養と液体培養からのサンプルを使用した。図9に示すように *Shewanella xiamenensis* LB5株が最も顕著な反応活性を示した。ハロ形成が最も強かったLB1株は非常に低い活性しかしめさなかった。細菌株によって異なるリグニン分解酵素系を有している可能性がある。また興味深いことに、プレート培養からの粗酵素液のみに反応活性が検出されており、細菌の存在形態と活性の関連も示唆される。細菌の接着や相互作用などが考えられるが、今後の解明が待たれるところである。

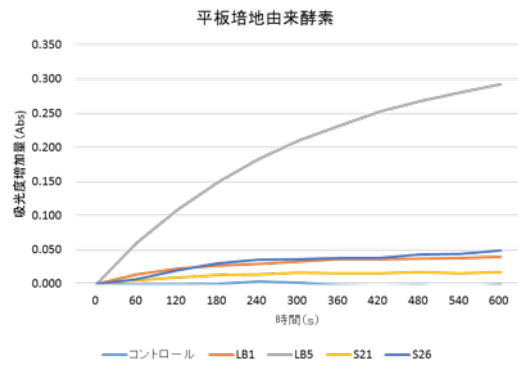


図9 グアヤコール活性

グアヤコール反応だけではリグニン分解は評価できないので、市販のリグニンを低分子化するかどうかの検証を行った。まず、TLC解析によって分解を調べた。粗酵素液としてはプレート培養したものを用い、展開溶媒には酢酸エチル：ヘキサン = 4:1のものを用い、検出はUV照射によって行った。結果としていずれの菌株も低分子化を観察することができた(図10)。

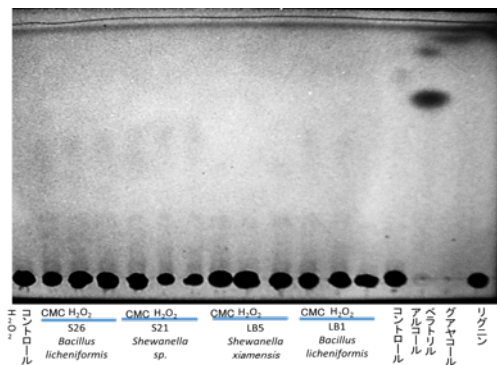


図10 TLCによる市販リグニン低分子化の解析

さらに引き続いて、同じ反応サンプルについてゲル濾過 HPLC による分析を試みた。HPLC

装置は Agilent 1200 Infinity LC、カラムは Asahipak GF-310HQ (Shodex、排除限界分子量 40000) を用いて解析した。検出波長は 280 nm で行った。代表的な結果を図 1 1 に示す。やはり、ゲル濾過解析でも明らかにリグニンピークが低分子側にシフトしていることがわかる。完全な分解とはいえないが、リグニンに対する反応性は観察されている。反応条件の検討やさらなる単離菌株の取得を行えば、もっと強い活性の検出が期待できるのではないかと考えている。

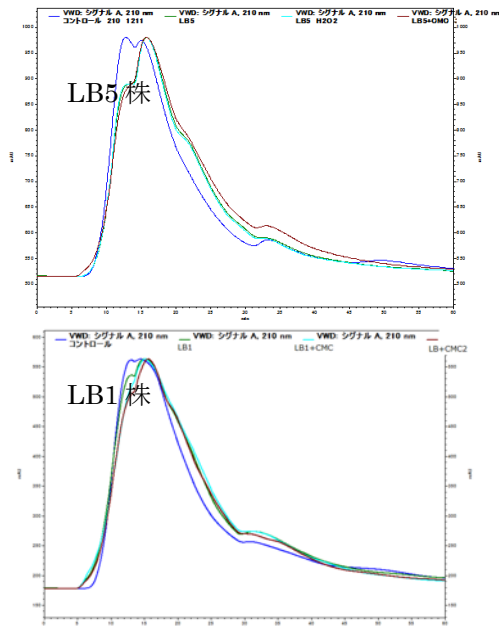


図 1 1 ゲル濾過 HPLC による市販リグニン低分子化の解析

本研究で得られた細菌株を応用するためには、上記の活性増強の工夫が必要と思われるが、最後にアカテガニ消化管由来粗酵素液の活性の強さを確認し、基準とするためにグアヤコール反応を行ってみた。粗酵素液の調製は細菌単離の際と同じように PBS で行った。また抗生物質を飲料水に添加した飼育水槽由来のサンプルも作製した。結果を図 1 2 に示す。

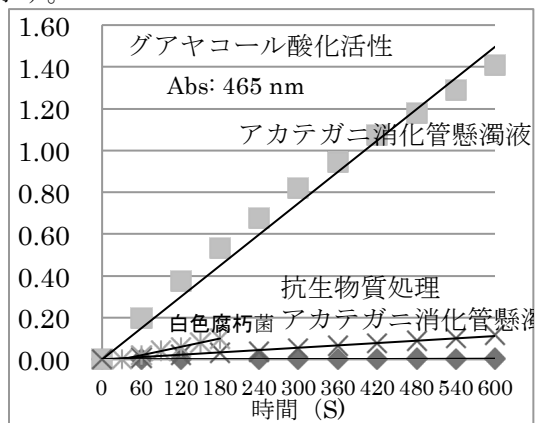


図 1 2 アカテガニのリグニン分解活性

図 1 2 を見ると、アカテガニ消化管由来粗酵素液が非常に強いグアヤコール活性を持っていることがわかる。よく知られている白色腐朽菌を数倍も上回る活性である。他の活性をまだ調べていないので、確かなことはいえないが、相当期待の持てる活性である。また、抗生物質で処理したアカテガニ由来の活性は激減しており、消化管内の細菌の重要性が示唆される結果となっている。従って、今後さらなる細菌の単離や単離菌株の混合など条件検討を重ねることで、本来の強力な消化管酵素活性の再構成も可能ではないかと考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

① 裏佳織・北原隆志・柳井清治・三宅克英. アカテガニ消化管からのバイオマス分解細菌の単離. 第 66 回日本生物工学会大会. 2014 年 9 月 11 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市).

② 三宅克英・裏佳織・北原隆志・柳井清治. アカテガニ消化管からのバイオマス分解細菌の単離. 環境微生物系学会合同大会 2014. 2014 年 10 月 22 日. アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市).

③ 裏佳織・北原隆志・柳井清治・三宅克英. アカテガニ消化管からのバイオマス分解細菌の単離. 第 7 回北陸合同バイオシンポジウム in 越中八尾. 2014 年 11 月 28 日. 八尾ゆめの森ゆうゆう館 (富山県・富山市).

④ 裏佳織・北原隆志・柳井清治・三宅克英. アカテガニ消化管からのバイオマス分解細菌の単離. 日本農芸化学会 2015 年度大会. 2015 年 3 月 28 日. 岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市).

⑤ 裏佳織・大口果林・井上馨・北原隆志・柳井清治・三宅克英. 2015. 草食性甲殻類消化管からのバイオマス分解細菌の単離. 環境バイオテクノロジー学会 2015 年度大会. 2015 年 6 月 29 日. 東京大学弥生講堂 (東京都・文京区).

⑥ 大口果林・北原隆志・柳井清治・三宅克英. 海岸林領域に生息するイソメ、フナクイムシ類からのバイオマス分解細菌の単離と解析. 第 67 回日本生物工学会大会. 2015 年 10 月 27 日. 城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市).

⑦ 裏佳織・柳井清治・三宅克英. 草食性甲殻類消化管からのバイオマス分解細菌の単離. 第 67 回日本生物工学会大会. 2015 年 10 月 28 日. 城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市).

⑧ 裏佳織・柳井清治・三宅克英. 草食性甲殻類消化管からのバイオマス分解細菌の単離.

第8回北陸合同バイオシンポジウム. 2015年10月30日. 山中温泉「山中座」(石川県・加賀市).

⑨大口果林・裏佳織・北原隆志・柳井清治・三宅克英. 海岸林領域に生息するイソメ、フナクイムシ類からのバイオマス分解細菌の単離と解析. 第8回北陸合同バイオシンポジウム. 2015年10月30日. 山中温泉「山中座」(石川県・加賀市).

⑩裏佳織・柳井清治・三宅克英. 2016. 草食性甲殻類からのバイオマス分解細菌群の単離. 2016年度日本農芸化学会大会. 2016年3月29日. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

[図書](計 1 件)

①三宅克英. 2016. 2-5 落ち葉を食べる海岸林の生きものたちと微生物. 石川の自然まるかじり(石川県立大学自然まるかじり編集委員会編). pp.49-54. 東海大学出版部

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: アカテガニ消化管由来バイオマス分解細菌群

発明者: 三宅克英、柳井清治

権利者: 石川県公立大学法人

種類: 特許

番号: 特願 2014-164345

出願年月日: 2014年8月12日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 克英 (MIYAKE, Katsuhide)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号: 90252254