

3 分解者のキチナーゼ活性に関する研究

1. はじめに

夏にはいろいろなところでセミの抜け殻を見つけることができる。しかし、夏以降になると発見できなくなる。「何がぬけがらを分解しているのだろう。」これが先輩が疑問に思ったことであり、この研究の始まりだった。文献を調べ、セミの抜け殻のキチン質を分解しているのは放線菌であると予想を立て、1年目の研究を始めた。

2. キチンについて

- ① セミの抜け殻はキチンという物質でできている。
- ② 甲殻類、貝類及び昆虫類の殻、酵母、椎茸などの真菌類等、自然界に広く分布している。
- ③ 地球上での生産量はセルロースに次いで多く、年間約1千億トンと推測されている。
- ④ キチンから生成されるキトサンは医療素材、衣類、化粧品、食品などに広く利用できる。
- ⑤ キトサンの生成に大量のアルカリ廃液が発生するため、現在は数千トンしか使われておらず、そのため世界最大の未使用バイオマスともいわれている。

本研究で探索しているキチナーゼの酵素活性をもつ分解者は、キチンのバイオマスとしての安全利用につながる可能性も持っている。

3. 1年目の研究の要約

抜け殻の分解をしているのは放線菌であると予想し、その培養を試みた。温浴の温度や抗生物質の代わりに界面活性剤の添加、植え付け方法等を変えて、高校の実験室で行うことのできる培養条件を探った。その結果、胞子の状態であるものを目覚めさせるため温浴を行い、洗剤を添加した方が一般細菌のコロニーの数が減り、放線菌などの菌類が観察しやすくなることがわかった。放線菌の同定に当たっては国立沼津高等工業専門学校の蓮實文彦教授にご協力いただいた。培地は菌類用の **Yeast-Starch-Agar** 培地を用いた。培地の組成は表1に示す。

表1 **Yeast-Starch-Agar** 培地組成表

・酵母エキス	1g	・可溶性デンプン	5g	・蒸留水	500ml	・寒天	7.5g
Ph7.3 120℃で15分間滅菌							

4. 2年目の研究の要約

2年目はまず培地の改良を行った。**Yeast-Starch-Agar** 培地では養分が多すぎることを教えていただき、腐食酸培地を用いることとした。腐食酸培地の組成を表2に示す。腐食酸としてフミン酸を加えている。腐食酸培地の方が **Yeast-Starch-Agar** 培地よりも細菌が少なく放線菌の観察がしやすいことがわかった。次に、放線菌は常に土の中に多く存在するわけではないと考え、放線菌を増やすために学校の裏に実験区をつくり、図1のAにすり潰した抜け殻を撒き、土の中にキチンが多い状態を作り、Bには何も撒かなかった。A区の土を35℃、100℃で温浴したものから、それぞれ放線菌を培養することができた。このことから実験区に抜け殻を撒くという方法で土の中の放線菌を増やせることがわかった。

図1 実験区の様子

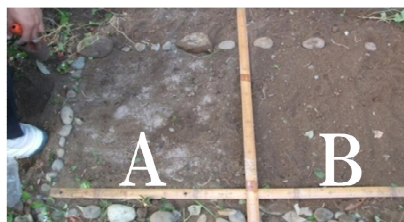


表2 腐食酸培地組成

Ph7.3 120℃で15分間滅菌

・ CaCO_3 0.04g ・ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g ・ KCl 3.42g
 ・ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g ・ Na_2HPO_4 1.0g
 ・ 蒸留水 2ℓ ・ 寒天 36g ・ フミン酸 2.0g
 ・ アリナミン 10ml

5. 今年の研究の目的

昨年までの研究から浮かび上がってきた『放線菌以外にもキチンを分解できる分解者がいるのではないか』という疑問から、放線菌に限らず抜け殻に付着する分解者を探すこととした。また、『培養された放線菌は本当にキチンを分解しているのか』という疑問については、培養された分解者のキチナーゼ活性の強さを調べることにした。

6. 実験Ⅰ 土の中に生息している分解者の培養

(1)目的 放線菌に限らず、抜け殻に付着する分解者を探す。

(2)方法

ア 学校裏の松林に抜け殻を埋め、土の中の分解者に抜け殻を分解させる。

埋めた場所は4か所で、常緑樹の下で薄暗く、地面は一面落ち葉が覆っているところの2地点をA、B地点(図2)、松の下で日当たりがよく、草がたくさん生えているところの2地点をC、D地点(図3)とした。

イ 2週間後、抜け殻を掘り出す(図4)。

ウ 胞子の状態であるものを目覚めさせるため、抜け殻の温浴を行う。

エ 培地に植えつける。

「培養という方法は、その培地で生育できる微生物しか得られない」という指摘をいただいたので、多くの微生物を得るため、1年目に使用したYeast-Starch-Agar培地と2年目に使用した腐食培地の2種類の培地を用いた。

オ 培養条件は、抜け殻の埋めないもの・埋めたもの、温浴の温度は温浴なし・50℃・100℃、培養温度 37℃とし、恒温器で培養した。埋めた場所周辺の土も同じ条件で培養した。

カ 対照実験として、何も植えていない培地も37℃に保った。



図2 A,B 地点



図3 C,D 地点



図4 掘り出した様子

(3)結果

ア 掘り出した抜け殻の状態

B地点の抜け殻を掘り出したところ、抜け殻は形を残しておらず、黒っぽくなっていた。

C地点の抜け殻は白っぽくなっており、形は残っていたがもろく、ピンセットで摘むとすぐに崩れた。

イ 腐食酸培地で培養されたコロニーの数

培養されたカビ、細菌、放線菌のコロニー数の一例を表3に示す。コロニーとして数を数えられなかったものは、広がりの大きさを+の数で示した。A、B地点は近いので、土

はB地点で採集したものを培養した。C, D地点は埋めた抜け殻を見つけられなかったため結果の記載がない。

埋めてない抜け殻は、カビが+++と多かったが、細菌・放線菌は培養できなかった。埋めた抜け殻からは主にカビと放線菌が培養され、細菌はほとんど培養されなかった。

「温浴なし」の条件では、放線菌のコロニーは「土に埋めた抜け殻」のA地点で12個、B地点で11個、「土」で12個培養されたが、カビは培養されないか、+だった。「100℃温浴」の条件では、放線菌はA地点で5個、他では培養されなかったが、カビは++, +++と多かった。このように、放線菌は温浴しないほうが多く得られ、カビは100℃温浴のほうが多く得られた。

表3 腐食酸培地で培養した分解者のコロニーの数（8月27日植え付け9月16日観察）

	培養したもの	温浴の 温度	培養されたもの								
						A 地点			B 地点		
			カビ	細菌	放線菌	カビ	細菌	放線菌	カビ	細菌	放線菌
1	埋めていない 抜け殻	なし	+++	-	-						
2	土に埋めた 抜け殻	なし				+	-	12	-	+	11
3		50℃				+++	-	-	++	-	10
4		100℃				-	-	5	++	-	-
5	土	なし							-	+	12
6		100℃							+++	+	-

ウ B地点の培養後の培地の様子（図5, 6, 7, 8）。

図5の矢印で示した白くて粉っぽいコロニーが放線菌のコロニーである。図6は腐食酸培地で培養されたカビであり、抜け殻の上や周辺に広がっているのがよく分かる。図7、8は Yeast-Starch-Agar 培地で培養されたもので、図7の円で囲まれたもののよう、カビも培養することができた。図8の抜け殻の周りにある乳白色で、光沢のあるものが細菌である。

以上のように、腐食酸培地では主に放線菌・カビが培養され、Yeast-Starch-Agar 培地では細菌・カビが培養された。



放線菌



図6 腐食酸培地のカビの様子



図7 カビの様子



図8 細菌の様子

図5 放線菌の様子

(4) 考察

「温浴なし」では、抜け殻、土ともにカビは発生せず、放線菌が多く培養できたが、「100℃温浴」ではカビが多く発生し、放線菌は見られなかった。2年目の研究では「100℃温浴」でも放線菌が培養でき、異なる結果となった。

これは培養したものの違いによると考えられる。2年目は抜け殻を撒いた実験区の土を温浴し、その上澄みを培養した。上澄みの中の放線菌は孢子の状態であり、「100℃温浴」によって発芽が促されたため培養できた。一方、今年は松林の土に埋めた抜け殻そのものを培養した。放線菌は菌糸の状態では抜け殻を分解中であり「100℃温浴」では破壊されてしまい培養できなかった。つまり、放線菌は抜け殻を分解していたと考えられる。

また、カビの孢子は熱に強く、完全に死滅させるには 200℃の乾熱滅菌が用いられる。カビは孢子の状態のものがあり、温浴によって発芽が促されて、「100℃温浴」で多くなったと考えられる。

7. 実験Ⅱ 分解者のキチナーゼ活性の測定

(1) 目的 培養された分解者のキチナーゼ活性の強さを調べる。

(2) 方法

ア グリコールキチンがコンゴレッドでどの程度染色されるのかを確認するためグリコールキチン 0.05%、0.01%、寒天のみの培地を作り、コンゴレッド 0.1% 溶液で染色した (図 9)。グリコールキチンはキチンを水溶性にした物質であり、培地に混ぜることができる。

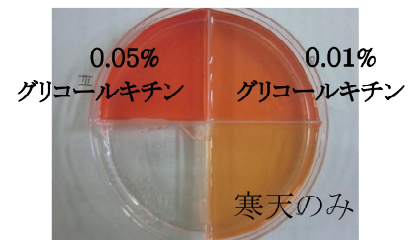


図 9 染色の様子

イ グリコールキチンを滅菌水に溶かし (図 10)、グリコールキチンを 0.01%濃度で含む Yeast-Starch-Agar 培地を作る。

ウ 培養された分解者をディスポールプですくい取り、作成した培地上に塗布する (図 11)。

エ 37℃で 1 日培養する。保温期間終了時には、細菌のコロニーができる (図 12)。

オ 培地をコンゴレッドの 0.1%溶液で 15 分染色し、0.1%塩化ナトリウム水溶液で洗い流す。

カ コロニー周辺のハローを探す。細菌の作ったキチナーゼが培地のキチンを分解すると、そこは染色されず色が薄くなる。この色の薄い所をハローという。ハローの大きさを測定し、キチナーゼ活性の強さを測る。



図 10 グリコールキチン水溶液



図 11 コロニーから塗布する様子



図 12 1 日培養後

(3)結果

図 13 は C 地点に埋めた抜け殻から得られた細菌であり、細菌のコロニーを縁取るように色が薄くなっており、ハローがよく分かる。図 14 は A 地点と図 15 は D 地点に埋めた抜け殻から培養された細菌で、やはりハローが観察できる。濃く染まっているところが細菌のコロニーである。

図 13 染色した培地の様子

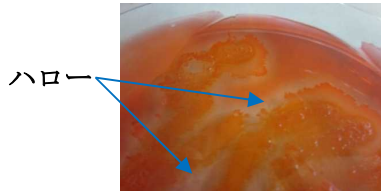


図 14 A 地点



図 15 D 地点細菌



(4)考察

今回培養によって得られた細菌と放線菌は、いずれもキチナーゼ活性を持っていることが確認できた。

8. まとめ

- (1)抜け殻は、室内に置いておいたときは、その形を保っているが、土に埋めるとやわらかくぼろぼろになった。このことから、抜け殻がなくなるのは単なる風化ではなく土の中の分解者によると予想された。
- (2)土に埋めた抜け殻から腐食酸培地では放線菌とカビが、Yeast-Starch-Agar 培地では細菌とカビが培養され、放線菌以外にも抜け殻に付着する分解者を発見することができた。
- (3)「温浴なし」で放線菌が多く培養され、逆に「100℃温浴」では放線菌が少なかったことから、放線菌は菌糸の状態で活動中であり、抜け殻を分解していると考えられる。
- (4)コンゴレッドによる染色でハローを見つけることで、培養できた分解者のキチナーゼ活性を調べられることが分かった。この方法により、培養された放線菌と細菌はキチナーゼ活性をもつことを確認した。
- (5)以上のことから抜け殻に付着している放線菌や細菌は抜け殻を実際に分解していることが確かめられた。

9. 今後の課題

キチナーゼ活性を示す細菌、放線菌を発見することができたので、さらに一つ一つ分離したコロニーを作成し、ハローの大きさからキチナーゼ活性の強さを比較したい。また、今回調べたカビはキチナーゼ活性を持っていなかった所以他のカビについてもキチナーゼ活性を持つのか調べたい。さらに乳酸菌、酵母菌等、他の細菌類についても調べていきたい。

10. 謝辞

放線菌の同定に当たっては国立沼津高等工業専門学校の蓮實文彦教授にご協力いただいた。改めてお礼申し上げます。

11. 参考文献

- 1,飯村研-放線菌- [http://www.ab11.yamanashi.ac.jp/ABF/NO1/index a.html](http://www.ab11.yamanashi.ac.jp/ABF/NO1/index%20a.html)
- 2,日本キチン・キトサン学会 <http://www.jicc.jp/index.html>
- 3.キチナーゼをコードするDNA及びキチナーゼの製造方法 味の素株式会社