

ブナ科病木から分離した真菌の酵素活性

静岡県立掛川西高等学校 サリバン乃蒼 大石陸登 川下真矢 高木望緒

1. 研究の背景

近年、殺虫剤が空中散布され長時間滞空することにより、飼育されているミツバチが失踪するなどの被害が発生している¹⁾。殺虫剤に含まれるネオニコチノイドは芳香族化合物であり、浸透性、水溶性が高く、長期間殺虫効果を示す。芳香族化合物を分解する微生物はこの問題の解決に応用できる。また、難分解性の芳香族化合物であるリグニンを分解する微生物は染め物工場における廃液処理やバイオマスで利用されている²⁾³⁾。これらの作り出す酵素の中には基質特異性が緩く、非特異的にアゾ染料などの芳香族化合物を分解する微生物も見つかっている⁴⁾。私たちは、掛川市の小笠山と富士宮市の朝霧アリーナ北駐車場で、4か月という短時間で分解されたナラ枯れ病木を見て、ナラ枯れをもたらすカシノナガキクイムシ(*Platypus quercivorus*)の共生菌もこのような微生物のひとつではないかと考えた(図2)。小笠山のナラ枯れ病木から菌株を分離し、セルラーゼ活性とコンゴレッドの分解能を確認した。そこでベンゼン環化合物であるアゾ染料とネオニコチノイドの分解に関する酵素活性を調べることを本研究の目的とした。

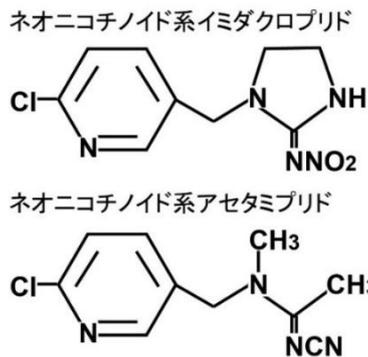


図1 ネオニコチノイドの構造



図2 朝霧アリーナ北駐車場の病木

2. 研究方法

2.1 小笠山での採取

小笠山でナラ枯れの病木から菌叢の異なる3株の真菌を分離し、真菌1、真菌2、真菌3とした(図3)。



真菌1

真菌2

真菌3(図3)

2.2 平面培地のコンゴレッド染色によるセルラーゼ活性

1) 実験方法

分離した真菌のセルラーゼ活性を調べるため、3株の真菌の振盪培養液と蒸留滅菌水をCMC Czapex-Dox平面培地(蒸留滅菌水：39g、CMC：0.08g、ペプトン：0.008g、Czapex：0.38g、寒天：0.60g)に加え、さらに28°Cで4日間培養した。この平面培地を0.1%コンゴレッド水溶液で染色した⁵⁾。

2.3 液体培地のコンゴレッド染色

1) 実験方法

3株の真菌の振盪培養液をCMC Czapex-Dox液体培地(蒸留滅菌水：89g、CMC：0.18g、ペプトン：0.018g、Czapex：0.86g)に加え、5日間常温で振盪培養した。対照には蒸留滅菌水を用いた。培養液を採取しコンゴレッド染色を行った。染色の確認は培養液を採取した翌日に行った。

2) セルロースの滴下

コンゴレッドはアゾ染料の1つとして知られ、水溶液中のセルロースと分子間力、水素結合により結合するベンゼン環を持つ化合物である(図4)。結合した分子では、ベンゼン環が分散力によりコイン状に積み重なり(スタッキング相互作用)、セルロースを赤く発色させることが分かっている。このことから、真菌はコンゴレ

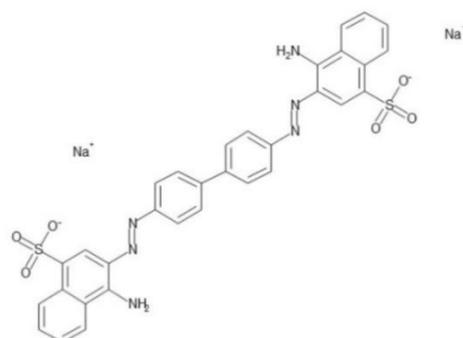


図4 コンゴレッドの構造

ドのスタッキング部分を分解したと考えられる。特に脱色の見られた6つの培養液にコンゴレッドがあるかどうかを確かめるため、セルロースとしてCMC溶液を再び滴下し、色の変化を調べた。

2.4 吸光度計によるアゾ染料の分解能の活性

1) 実験方法

真菌はベンゼン環を持つ染料を分解するのかを調べるため、4種類の染料(メチルグリーン、メチルバイオレット、メチルオレンジ、インジゴカルミン)の水溶液に共生菌の培養液を加え、吸光度計を用いて吸光度を計測した(図5、図6)。4つの染料を蒸留滅菌

実験は3株の真菌と希釈液、蒸留滅菌水の5つのチューブについて、7日間毎日行い、延べ350匹のダンゴムシを用いた。

ネオニコチノイド系の殺虫剤としてダントツ水溶剤を用いた(図8)。ダントツ水溶剤を2000倍に希釈した希釈液を用いた。希釈液200mlと各真菌の振盪培養液30mlをそれぞれ混合した。これらの溶液と蒸留滅菌水をろ紙にそれぞれ染み込ませて、コニカルチューブに入れ、細かい穴の開いたふたをした(図9)。各チューブにダンゴムシを10匹ずつ入れ、1時間後、チューブ内のダンゴムシを取り出し、生きている個体と死んだ個体を数えた。実験は3株の真菌と希釈液、蒸留滅菌水の5つのチューブについて、7日間毎日行い、延べ350匹のダンゴムシを用いた。



図8 ネオニコチノイドを含む殺虫剤

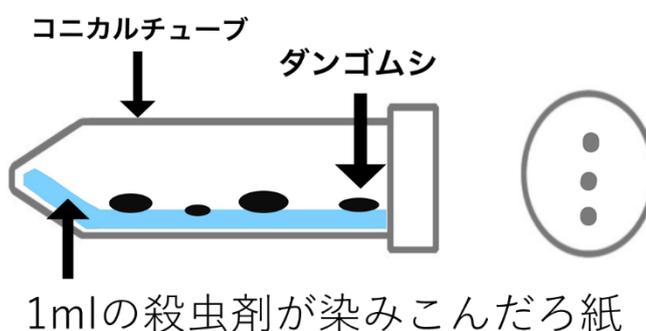


図9 実験で製作した装置

2) 実験結果

培養液と反応させた殺虫剤を含むチューブ内では、反応2日目、4日目、6日目でダンゴムシの死滅率が低下した(表3、図12)。培養液中の真菌は殺虫剤に含まれる殺虫成分のネオニコチノイドを分解し、その効果を妨げたと考えられる。したがって、同じくベンゼン環を持ち、環境汚染物質で除草剤に含まれるダイオキシンなどの化合物を分解する可能性がある。

3. 研究結果

コンゴレッド染色した平面培地が脱色したことから、真菌の持つ酵素のセルラーゼ活性を確認した(図10、表1)。

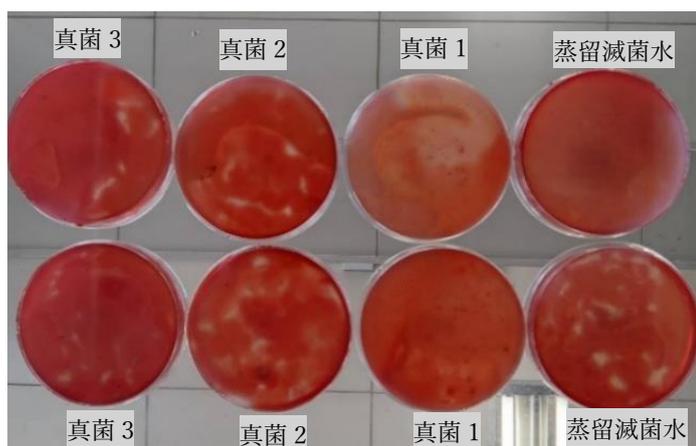


図10 染色後の平面培地

	滅菌水	真菌1	真菌2	真菌3
染色の様子	+++	-	+	++

表1

液体培地のコンゴレッド染色では、培養液1 (Day1 真菌1)、培養液2 (Day2 真菌1)、培養液3 (Day1 真菌2)、培養液4 (Day3 真菌3)、培養液5 (Day4 真菌3)、培養液6 (Day5 真菌3) の6つの培養液で特に脱色が見られた。液体培地は平面培地に比べ、脱色した部分の識別がしにくいものに関わらず、本実験では培養液全体が脱色した(図11)。脱色した培養液にセルロースを滴下しても再び染色されなかった(図12)。

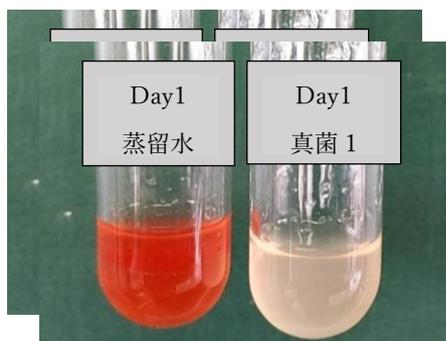


図11 液体培地の脱色

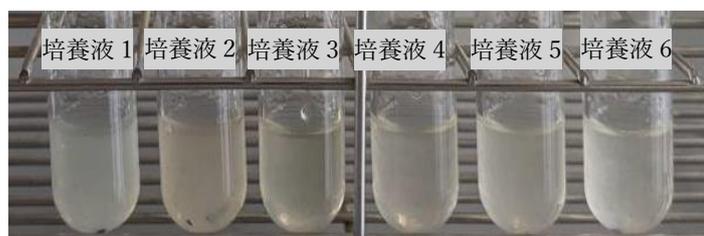


図12 セルロース滴下後の培養液

吸光度計によるアゾ染料の分解能の活性では、メチルオレンジ、メチルグリーンの2種類の吸光度の測定の結果、培養液と反応させた染料液の濃度の低下が見られた(表2、図13)。

	相当する濃度(mg/ml)
滅菌水	0.62
真菌1	0.43
真菌2	0.32
真菌3	0.29

メチルオレンジ

	相当する濃度(mg/ml)
滅菌水	0.62
真菌1	0.41
真菌2	0.32
真菌3	0.33

メチルグリーン

	相当する濃度(mg/ml)
滅菌水	0.54
真菌1	0.69
真菌2	0.79
真菌3	0.68

インジゴカルミン

	相当する濃度(mg/ml)
滅菌水	0.44
真菌1	0.66
真菌2	0.65
真菌3	0.37

メチルバイオレット

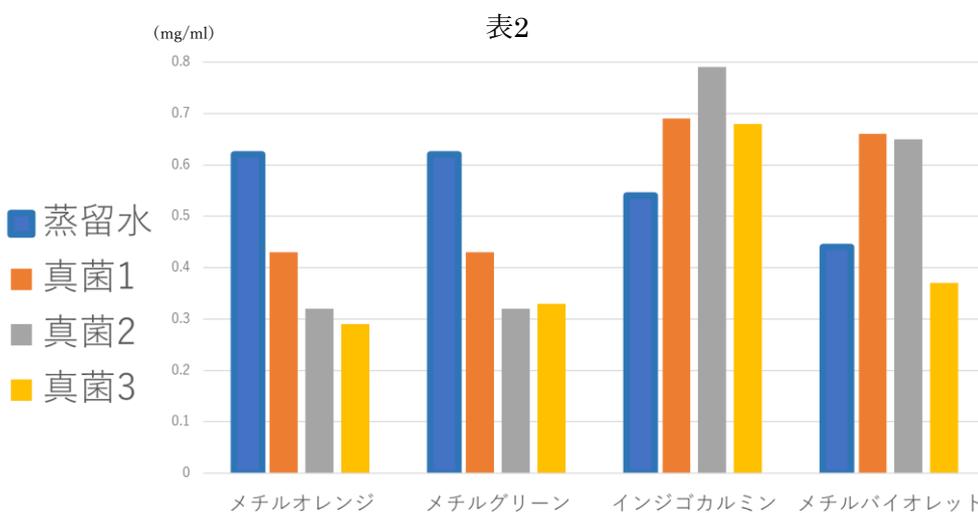


図13 反応前に対する反応後の染料の相当する濃度

ダンゴムシを用いた真菌のネオニコチノイド系殺虫剤の分解活性では、希釈液に対し、真菌1の死滅率が特に低かった(図14、表3)。真菌1はネオニコチノイドを分解すると考えられる。10月2日に3株の真菌でダンゴムシの死滅率が大きく低下した。

図14

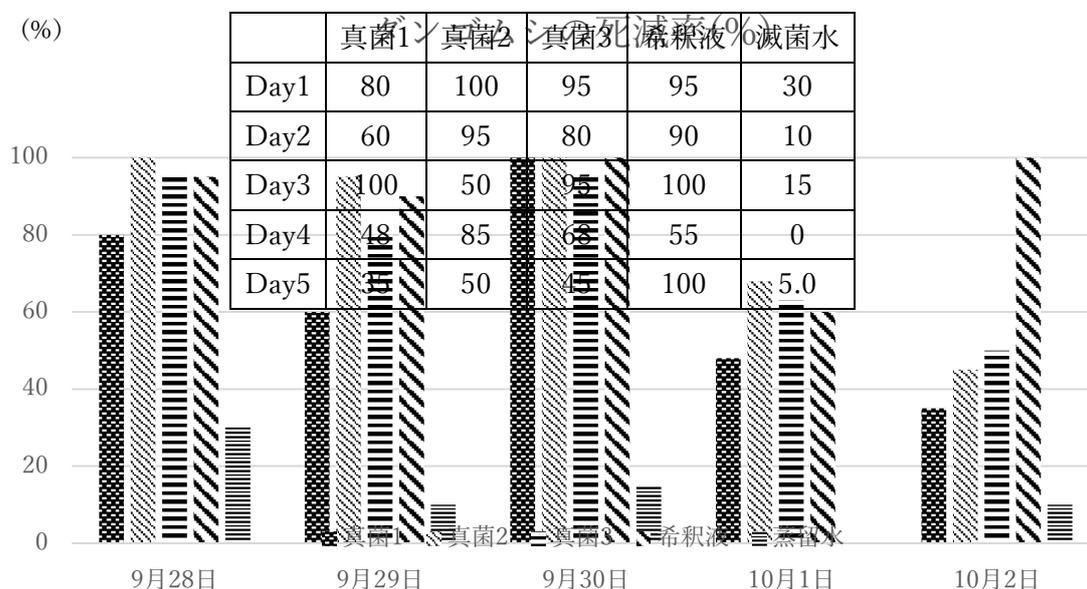


表3

4. 考察

平面培地でコンゴレッド脱色したことから、真菌の持つ酵素はセルラーゼ活性を持つ。コンゴレッドが脱色した培養液にセルロースを滴下しても染色されなかったことから、真菌の持つ酵素はコンゴレッドを分解したと考えられる。吸光度計によるアゾ染料の分解能の活性により、真菌の持つ酵素はベンゼン環を持つメチルグリーンやメチルオレンジを分解したと考えられる。真菌の持つ酵素のネオニコチノイド系殺虫剤の殺虫能力が低下したことから、酵素は殺虫剤に含まれる殺虫成分のネオニコチノイドを分解し、その効果を妨げたと考えられる。したがって、同じくベンゼン環を持ち、環境汚染物質であるダイオキシンなどの化合物を分解する可能性がある。

5. 今後の展望

ネオニコチノイドの分解活性の実験で得た染料の分解産物を分離する方法を検討していきたい。ネオニコチノイドの分解活性は実験途中であるため、今後データ数を増やしていくとともに実験対象の生物を増やしていきたい。カシノナガキクイムシの生態に興味を持ち、始まった実験ではあるが、酵素反応に関する生物学的検定に比重がおかれた。今後、分離する菌を増やすとともに、カシノナガキクイムシと真菌の共生関係にも発展させることで、短時間に成木が病木になり腐朽する仕組みを解明したい。

6. 謝辞

今回この研究を進めるにおいて、静岡大学農学部応用生命科学科の森智夫先生にご指

導ご鞭撻を賜りました。この場を借りて心よりお礼申し上げます。

7. 参考文献

- 1) 長野県県民ホットライン『殺虫剤の空中散布による健康被害について』
- 2) 尾崎博明、呉楓、今田敏弘、寺島泰(1995) リグニン分解酵素の活性に影響を及ぼす因子と粗酵素によるアゾ染料の脱色
- 3) 科学技術振興機構報第507号『微生物による着色排水の脱色処理システムの開発に成功』
- 4) 早瀬伸樹、金丸健司、堤主計、中川克彦(2012) 白色腐朽菌による合成染料の脱色
- 5) 川北龍司(2016)生物科学班勉強会結果報告～セルラーゼ生産糸状菌の分離～