

# 環境技術開発を基盤とした 持続可能な環境経営システムの構築に向けて 第3報

榎本恵一<sup>1</sup>, 堀澤 栄<sup>2</sup>, 有賀 修<sup>3</sup>, 松元信也<sup>4</sup>, 大濱 武<sup>5</sup>,  
角 克宏<sup>6</sup>, 両角仁夫<sup>7</sup>, 井上喜雄<sup>8</sup>, 富澤 治<sup>9</sup>, 那須清吾<sup>10</sup>,  
平野 真<sup>11</sup>, 草柳俊二<sup>12</sup>, 馬淵 泰<sup>13</sup>

(受領日: 2010年4月27日)

高知工科大学 大学院工学研究科  
〒782-8502 高知県香美市土佐山田町宮ノ口185

E-mail: <sup>1</sup>enomoto.keiichi@kochi-tech.ac.jp, <sup>2</sup>horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>3</sup>ariga.osamu@kochi-tech.ac.jp, <sup>4</sup>matsumoto.nobuya@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>5</sup>ohama.takeshi@kochi-tech.ac.jp, <sup>6</sup>sumi.katsuhiko@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>7</sup>morozumi.yoshio@kochi-tech.ac.jp, <sup>8</sup>inoue.yoshio@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>9</sup>tomisawa.osamu@kochi-tech.ac.jp, <sup>10</sup>nasu.seigo@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>11</sup>hirano.makoto@kochi-tech.ac.jp, <sup>12</sup>kusayanagi.shunji@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>13</sup>mabuchi.yasushi@kochi-tech.ac.jp

**要約:** 森林や海洋の自然環境の保全には、その資源の適切な利用と管理が欠かせない。森林資源である木質バイオマスを利用するために、木材腐朽菌が生産するセルロース分解酵素の遺伝子配列の決定を試みた。他生物で明らかにされているアミノ酸配列などの生物情報を参照し、遺伝子増幅に必要な CODEHOP プログラムを用いて、迅速簡便に標的遺伝子配列を得ることができた。また、殺藻作用をもつ赤色色素であるプロデジオシン類を生産する細菌を用いて赤潮制御技術の研究を行った。この細菌の赤色色素は、赤潮プランクトンを迅速に溶菌させる作用を示した。この細菌を固定化したアルギン酸ゲルビーズは、赤潮プランクトンの増殖を抑制し、プランクトン数を減少させることができた。

## 1. はじめに

地域の自然環境の保全は、そこに居住する人間にとって重大な関心事である。しかし、人間の居住地域の環境は、そのままにまかせるだけでは維持できないことは明らかである。例えば、里山と呼ばれる、人にとっても、また生物にとっても豊かな環境は、古来より人の手が入ることによって維持されてきた。しかし、近年その経済的価値が低下するに従い、放置された里山が見られるようになってきている。このように自然環境は自然と人間との間の多様で複雑な相互作用の上に成立していると言える。ここでは高知県における重要な資源を育む場所である森林と海洋の利用と管理に関す

る要素技術について述べる。森林の木質を分解する木材腐朽菌のセルロース分解酵素の遺伝子、及び海洋から分離した殺藻作用をもつ赤色色素生産細菌を利用する赤潮プランクトンの制御について報告する。

## 2. CODEHOP を用いた木材腐朽菌のセルラーゼ遺伝子配列の決定

### 2.1 はじめに

脱化石燃料利用の一つとしてエネルギー源を再生可能なバイオマスへ変換することが挙げられる。なかでも食糧と競合しない木質バイオマスやソフトバイオマスの利用への注目が高まる。特に

表1 供試菌とプライマー組合せ

	供試菌	プライマーペア	配列(5'-3')
①	<i>P. ostreatus</i> NBRC 30160	1cf1-1gr	1cf1 : TGATCCCTGACCGCCCGAYTGYRMNGC
			1gr1 : CCGATGACGTTGCACCANKYNCC
②	<i>P. ostreatus</i> NBRC 6515	1df4-1hr1	1df4 : CCTGGACGCTGGCCAYGSNGSNTG
			1hr1 : TGGAACCAACGCTCGGAGCNTSNGGNG
③	<i>P. ostreatus</i> NBRC 30160	1df4-1hr3	1df4 : CCTGGACGCTGGCCAYGSNGSNTG
			1hr3 : GGGACCAGCTTCTCGAAGTAGKNCTGRAAKACCA
④	<i>T. versicolor</i> FFPRI 1030	1df4-1hr3	1df4 : CCTGGACGCTGGCCAYGSNGSNTG
			1hr3 : GGGACCAGCTTCTCGAAGTAGKNCTGRAAKACCA
⑤	<i>P. ostreatus</i> NBRC 6515	1df4-2hr3	1df4 : CCTGGACGCTGGCCAYGSNGSNTG
			2hr3 : TGTCGGAGGTGCCGTCNSWYTCNCC
⑥	<i>P. ostreatus</i> NBRC 30160	1df4-2hr3	1df4 : CCTGGACGCTGGCCAYGSNGSNTG
			2hr3 : TGTCGGAGGTGCCGTCNSWYTCNCC
⑦	<i>P. pulmonarius</i> NBRC 30791	1df4-2hr3	1df4 : CCTGGACGCTGGCCAYGSNGSNTG
			2hr3 : TGTCGGAGGTGCCGTCNSWYTCNCC

※①～⑦は図1に対応する。

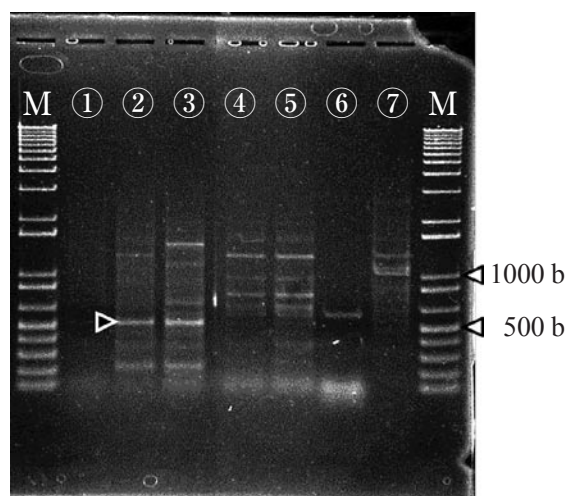


図1 CODEHOPを用いたPCR産物の電気泳動像。Mはマーカーを示す。①～⑦の詳細については、表1を参照。

液体燃料であるエタノール生産においては、木質およびソフトバイオマス中のセルロースを糖化することが必須である。木材腐朽菌は、セルロース分解酵素やリグニン分解酵素を生産し、木材の化学成分であるセルロースやリグニンを分解して生活している。これら酵素を利用することで低コストなバイオマス資源変換法を開発したい。しかしながら木材腐朽菌のセルラーゼ遺伝子配列はまだ解明されていないものが多い。他の糸状菌において、例えば *Aspergillus niger* や *Trichoderma*

*ressei* など、セルラーゼのアミノ酸や遺伝子配列が報告されているものが複数ある。そこで、すでに報告されている複数のセルラーゼのアミノ酸配列の中から共通して保存されているアミノ酸配列を探し出し、この配列に基づいて木材腐朽菌のゲノムDNAをテンプレートとするPCRのためのプライマー、COnsensus -DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP)<sup>1)</sup>を設計し、遺伝子断片を獲得することを試みた。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 供試菌

ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* NBRC 33211, *P. ostreatus* NBRC 30160, *P. ostreatus* NBRC 6515、ウスヒラタケ *P. pulmonarius* NBRC 30791、カワラタケ *Trametes versicolor* FFPRI 1030 の5株の担子菌を試験に供した。

### 2.2.2 CODEHOPの設計

GenBank/DDBJ/EMBLに登録されている異種生物のセルラーゼのアミノ酸配列を取得し、ClustalW<sup>2)</sup>を用いてアライメントをとり、セルラーゼのアミノ酸配列の相同性の高い配列ごとにグループ分けした。各グループをBlock makerによりブロック化し、このブロックマップをCODEHOP programによりCODEHOPを作成した。

### 2.2.3 セルラーゼ遺伝子の増幅

供試菌よりゲノム DNA を抽出し、これをテンプレート DNA として、セルラーゼを目的とした CODEHOP を用いて PCR を行った。PCR 試薬に Takara Ex Taq™、サーマルサイクラー ABl 9700 を用い、94℃ で 5 分の DNA 解離の後、94℃ で 30 sec、62℃ で 40 sec、72℃ で 60 sec を 13 サイクル繰り返した後、94℃ で 30 sec、55℃ で 40 sec、72℃ で 60 sec を 16 サイクル繰り返し、72℃ で 5 分間十分な合成を促した後 4℃ で保存するプログラムとした。PCR 終了後、電気泳動により PCR 産物を可視化した。

### 2.2.4 セルラーゼ遺伝子の配列決定

2.3 で可視化されたメインバンドを採取し、PCR 産物を回収、クローニングに供した。pGEM T Vector System I (Promega) および Takara *E. coli* JM109 Competent Cells (Takara) を用いてサブクローニングし、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) および ABI PRISM® 3700 DNA アナライザー (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を解析した。解析結果を生物情報データベース DDBJ/EMBL/GenBank に対する BLAST 検索によって高い相同性を検索した。

### 2.3 結果および考察

CODEHOP を用いた PCR で、増幅産物の得られた供試菌とプライマーペアの組合せを表 1 に、泳動像を図 1 に示した。多くのバンドが出現しており、その中の強度の高いバンドをゲルより切り出し、クローニングおよびシークエンスを行った。そのうち、*P. ostreatus* NBRC 6515 に対し、cbh1df4-cbh1hr1 のプライマーペアを使用した PCR 産物のフラグメント約 600bp の断片(図 1、白線・黒色の△)の配列は、生物情報データベースに登録されている *P. sajor-caju* の Cellobio hydrolase II (CBH II, Accession No. AY050518) と 98% の高い相同性を示した。その起源生物である *P. sajor-caju* は供試菌と同属であることから、本研究で得られた DNA 断片も非常に類似性の高い CBH II の遺伝子であると断定した。そこで *P. sajor-caju* の配列を参照して、約 4500 bp と想定される *P. ostreatus* NBRC 6515 の CBH II の遺伝子全配列の決定を試み、その 3015 bp を決定することが出来た。また、この時設計された CBH II の遺伝子全長の増幅を目標としたプライマー CBH-F-F4, CBH-B-R7 を *T.*

*versicolor* FFPRI 1030 に適用したところ、約 4000 bp の PCR 産物を得ることができた。この PCR 産物は CBH II の遺伝子である可能性が高いと考えられる。

CBH は、exo グルカナーゼの酵素活性をもつ部分と結晶性セルロースに結合する cellulose binding domain (CBD) から構成されるセルラーゼである。したがって、結晶性のセルロースを含む原料を処理する際、有効に働く酵素であると考えられる。

今後は *P. ostreatus* NBRC 6515 の CBH II の遺伝子の完全な全長配列を明らかにするとともに、*T. versicolor* FFPRI 1030 の CBH II 遺伝子も解明していく予定である。さらには、CBH の安定生産法を開発することで、効率的な生物資源変換に貢献できると考えられる。

## 3. 海洋深層水由来の細菌が生産する赤色色素による赤潮制御

### 3.1 はじめに

家庭排水中の窒素、リンによる富栄養化は年々顕著になってきており、それが原因となって発生する赤潮、アオコによる漁業被害もその頻度や規模が大きくなってきている。排水中の栄養塩類を取り除くことは現在普及している活性汚泥法では難しく、高度処理法の普及を待たなければならず、赤潮・アオコの原因を元から断つことは不可能である。したがって、赤潮・アオコを完全に抑制することも不可能であり、赤潮対策の全てが応急処置的な手法にならざるを得ない。

赤潮の抑制に関して、超音波によるプランクトンの液胞の破壊による除去<sup>3)</sup>、オゾンによる酸化分解<sup>4)</sup>、超伝導磁気分離など様々な手法が研究されてきたが、それぞれに一長一短があり、最善の方法とは言えない。生物学的手法も研究されており、ウイルスを用いる方法はウイルスが特異的に特定の宿主微生物に感染する点で選択性が高く、優れた手法ではあるが、未知のウイルスを環境に拡散し、それがどのように環境に影響を及ぼすかが全く未知であり、より深く、広範な調査研究が必要とされる。近年、海洋細菌が赤潮の抑制に関与しているとの研究報告が発表され、藻類を溶菌させる殺藻性細菌の研究が進んでいる。殺藻効果は幾つかのメカニズムに分類されており、藻類への直接的接触による溶菌と間接的溶菌ではそのメカニズムが異なっている。間接的溶菌では細菌が生産する溶菌物質について種々の報告があり、セリンプロテアーゼのような溶菌酵素を生産する細菌

や抗生物質のような化学物質を生産する細菌などが研究されている。我々はこれまで海洋深層水から単離した細菌の色素生産について研究を行い、生産された赤色色素が *Serratia marcescens* が生産するプロデジオシンと類似していることを見出した。Kim ら<sup>5)</sup>や他の研究者ら<sup>6)</sup>はこれとは別の細菌において、同種の色素が赤潮プランクトンに対して溶菌効果を持つことを報告しており、我々もこれまで赤色色素が極めて低濃度で赤潮原因藻である *Heterosigma akashiwo* 他3種の藻類を溶菌することを確認した。

赤潮抑制のため、色素を海中に添加しても、拡散してしまうため、その溶菌効果は持続しない。そこで、効果を持続させることを目的に色素および色素生産菌の固定化を試みた。すなわち、固定化微生物の場合、担体内の微生物を活性化させるために数日間の培養を必要とする。そこで予め色素を固定化し、固定化担体から徐放させることにより、溶菌効果を持続させ、一時的にプランクトン細胞数を減少させ、その後、活性化された固定化色素細菌を使うという方法である。また、赤潮・アオコを抑える方法が別の環境破壊になってはならない。そこで、生物由来の固定化担体の使用を検討した。

### 3.2 実験方法

室戸海洋深層水から分離した *Pseudoalteromonas* sp. 1020R 株<sup>7)</sup> を色素の抽出及び細菌の固定化に用いた。1020 R 株よりエタノールを用いて抽出した色素はクロロホルム-メタノールを移動相とするシリカゲルクロマトグラフィー並びにアセトニトリル-水を移動相とする ODS クロマトグラフィーによって精製した。精製した4種類の赤色色素を質量分析し、分子量を決定した。色素の細胞毒性は、色素を白血病細胞 U937 に添加することにより測定した。細胞の生存率はトリパンブルー染色法で計測した。

細菌の固定化は、1020 R 株とアルギン酸の混合液をゲル化させることによって行った。抽出した赤色色素及び固定化ゲルの効果は赤潮プランクトン *Heterosigma akashiwo* の溶菌を検鏡することにより行った。

### 3.3 結果および考察

#### 3.3.1 赤色色素の解析

*Pseudoalteromonas* sp. 1020R 株は室戸海洋深層水から分離された海洋細菌であり、寒天培地上で

赤色のコロニーを形成する。本株を液体培養し、エタノールで赤色色素を抽出後、クロマトグラフィーで精製することにより4種の互いに類似する赤色色素を得た。535nm に極大をもつ色素の吸収スペクトルから、これらの色素はプロデジオシン類であると考えられた。

4種の色素を質量分析したところ、Pigment 2 の m/z 値はプロデジオシン(図2)の値と一致した。

Pigment 1、Pigment 2、Pigment 3 及び Pigment 4 は、m/z 値がそれぞれ14ずつ異なる誘導体と推定された(表2)。メチレン基(-CH<sub>2</sub>-)の数が一つずつ異なる誘導体と考えられる。

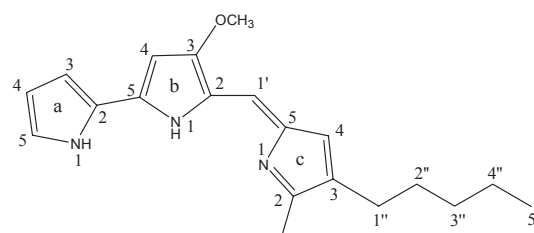


図2 プロデジオシンの化学構造

これらの色素を白血病細胞 U937 に添加したところ、細胞毒性を示し、白血病細胞はアポトーシスにより死滅した。4種の色素の50%致死濃度(IC<sub>50</sub>)はm/zが小さい誘導体ほど低い、すなわち細胞毒性が強い傾向があった(表2)。

表2 単離された赤色色素の性質

Red pigments	m/z [M+H] <sup>+</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) for U937 cells
Pigment 1	310.08	1.5
Pigment 2	324.15	3
Pigment 3	338.13	7
Pigment 4	352.12	10

#### 3.3.2 色素生産細菌の固定化

色素生産細菌培養後、エタノールにより色素を抽出し、赤潮プランクトン懸濁液に添加すると、非常に低濃度でプランクトンが溶菌することが観察され、色素の特別な精製なしで利用できることが明らかとなった。しかし、色素を蛍光灯下に長時間置くと、赤色色素は光により退色し、同時に溶菌効果が低下することが分かった。退色による溶菌活性の変化を調べたところ、照射時間の増加とともに溶菌活性が低下し、24時間照射した赤

色色素は溶菌活性を全く示さないことが明らかとなった。この事は色素を担体に固定化する場合、光の影響を抑えることが必要であることを示唆する。

種々の固定化法および担体を検討したが、赤色色素および色素生産細菌の固定化にアルギン酸ゲルビーズ (図3) が有用であることが分かった。アルギン酸ゲル中に色素を固定化し、*Heterosigma akashiwo* 培養液に添加したところ、細胞数の減少が見られた。



図3 固定化前のアルギン酸ゲルビーズ

繰り返し利用可能な赤潮抑制材を目的に色素生産細菌を固定化したところ、数日間の培養の後、色素生産が確認された (図4、ゲルビーズが赤色に着色した) が、赤潮プランクトン懸濁液に添加したところ、プランクトンの増殖抑制は十分ではなかった。そこで、色素細菌の培養の際、セルロースを添加し、セルロースが混合された状態で固定化したビーズ (図5) を作製した。このビーズではより多くの色素が生産されていると考えられ、プ



図4 色素細菌固定化アルギン酸ゲルビーズ (セルロース添加なし)



図5 色素細菌固定化アルギン酸ゲルビーズ (セルロース添加あり)

ランクトンの増殖が抑制され、プランクトン細胞数は減少した。

色素に対する光の影響を抑制するため、活性炭を混合し固定化したが、溶菌効果は低下した。これは色素が活性炭に吸着されたためではないかと考えられ、添加剤をさらに検討する必要がある。

このように固定化ビーズは赤潮プランクトンに対して溶菌効果が見られたが、今後、他の生物に対する影響を調べるとともに、最適添加条件、より強度の高い固定化担体の選択等、さらに検討する予定である。

## 謝辞

本稿は、大学院生及び卒業研究生との共同研究に基づくものである。協力頂いた学生諸氏に感謝する。また、質量分析をして頂いた関西大学の荒川隆一教授に謝意を表したい。

## 文献

- 1) T. M. Rose, E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrovski, C. M. McCallum and S. Henikoff, "Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences", *Nucleic Acid Res.* Vol. 26, pp. 1628-1635, 1998.
- 2) J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acid Res.* Vol. 22, pp. 4673-4680, 1994.
- 3) E. R. Holm, D. M. Stamper, R. A. Brizzolara, L. Barnes, N. Deamer and J. M. Burkholder, "Sonication of bacteria, phytoplankton and zooplankton: Application to treatment of ballast water", *Marine Pollution Bulletin* Vol. 56, pp. 1201-1208, 2008.
- 4) Y.-S. Yun, S. R. Lim, K.-K. Cho and J. M. Park, "Variations of photosynthetic activity and growth of freshwater algae according to ozone contact time in ozone treatment", *Biotechnol. Lett.*, Vol. 19, pp. 831-833, 1997.
- 5) D. Kim, J. F. Kim, J. H. Yim, S. K. Kwon, C. H. Lee and H. K. Lee, "Red to red - the marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal

blooms”, J. Microbiol. Biotechnol., Vol. 18, pp. 1621-1629, 2008.

- 6) T. Nakashima, Y. Miyazaki, Y. Matsuyama, W. Muraoka, K. Yamaguchi and T. Oda, “Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium gamma-

proteobacterium”, Appl. Microbiol. Biotechnol. , Vol. 73, pp. 684-690, 2006. Epub 2006 Jul 19.

- 7) 矢田修一、大場雅行、榎本恵一、“「室戸海洋深層水」中の細菌種の分析”、海洋深層水研究、Vol. 4, pp. 47-56, 2003.

# Construction of a sustainable environmental management system based on the development of environmental technologies

## The third report

Keiichi Enomoto<sup>1</sup>, Sakae Horisawa<sup>2</sup>, Osamu Ariga<sup>3</sup>, Nobuya Matsumoto<sup>4</sup>,  
Takeshi Ohama<sup>5</sup>, Katsuhiko Sumi<sup>6</sup>, Yoshio Morozumi<sup>7</sup>, Yoshio Inoue<sup>8</sup>,  
Osamu Tomisawa<sup>9</sup>, Seigo Nasu<sup>10</sup>, Makoto Hirano<sup>11</sup>,  
Shunji Kusayanagi<sup>12</sup>, Yasushi Mabuchi<sup>13</sup>

(Received : April 27th, 2010)

Graduate School of Engineering  
Kochi University of Technology  
Tosayamada, Kami-city, Kochi 782-8502 JAPAN

E-mail: <sup>1</sup>enomoto.keiichi@kochi-tech.ac.jp, <sup>2</sup>horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>3</sup>ariga.osamu@kochi-tech.ac.jp, <sup>4</sup>matsumoto.nobuya@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>5</sup>ohama.takeshi@kochi-tech.ac.jp, <sup>6</sup>sumi.katsuhiko@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>7</sup>morozumi.yoshio@kochi-tech.ac.jp, <sup>8</sup>inoue.yoshio@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>9</sup>tomisawa.osamu@kochi-tech.ac.jp, <sup>10</sup>nasu.seigo@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>11</sup>hirano.makoto@kochi-tech.ac.jp, <sup>12</sup>kusayanagi.shunji@kochi-tech.ac.jp,  
<sup>13</sup>mabuchi.yasushi@kochi-tech.ac.jp

**Abstract:** For the conservation of forests and marine natural environment, the proper use and management of their resources are essential. In order to use woody biomass of forests, genetic sequences of cellulases produced by wood-rotting fungi were determined. Based on the biological information, including amino acid sequences, revealed in other organisms, target gene sequences could be easily and quickly obtained by the CODEHOP program for gene amplification. Technologies to control red tide were also studied, employing bacteria that produce algicidal red pigments, a family of prodigiosin. The red pigments from the bacteria showed quick lytic action to red tide plankton. Alginate gel beads containing immobilized bacteria inhibited the growth of red tide plankton and could reduce the number of plankton.