

## 2 微生物の探索と単離

### 2.1. メタノール資化性菌の分離（集積培養）とその生育

微生物の中には、C-C 結合を持たない化合物（炭素数が1の化合物）を炭素源として利用するものがあり、これらを総称して  $C_1$  化合物資化性菌（メチロトロフ、methylotroph）と呼んでいる。この場合の代謝開始物質としての  $C_1$  化合物とは、methane、methanol、methyl amine 類などである。地球上では、 $CO_2$  とメタンの間での酸化還元代謝による循環がメチロトロフを介して行われており、その規模は  $CO_2$  量にして 15~20 億 t / year にも及ぶと言われている。メチロトロフには、 $C_1$  化合物のみしか炭素源に利用できない偏性メチロトロフ（細菌）と、 $C_1$  化合物以外の炭素源も利用できる通性メチロトロフ（細菌、酵母）に分類することができる。今回の実験では、methanol を炭素源とする微生物を対象とする。

メタノール資化性菌の代謝はまず、methanol の酸化によって始まる。methanol は細菌では methanol dehydrogenase、酵母では alcohol oxidase により formaldehyde に酸化され、formaldehyde から  $CO_2$  への酸化によりエネルギーの生産、formaldehyde の固定反応により細胞構成物質の生合成がそれぞれ開始する。すなわち、formaldehyde の完全酸化によって NADH が生成し、電子伝達系に渡されることで、ATP が生産される。また、formaldehyde は pentose phosphate や glycine によって固定され、それぞれは glyceraldehyde-3-phosphate へと導かれ、一般の生体と同様の生合成を行う<sup>6,7)</sup>。

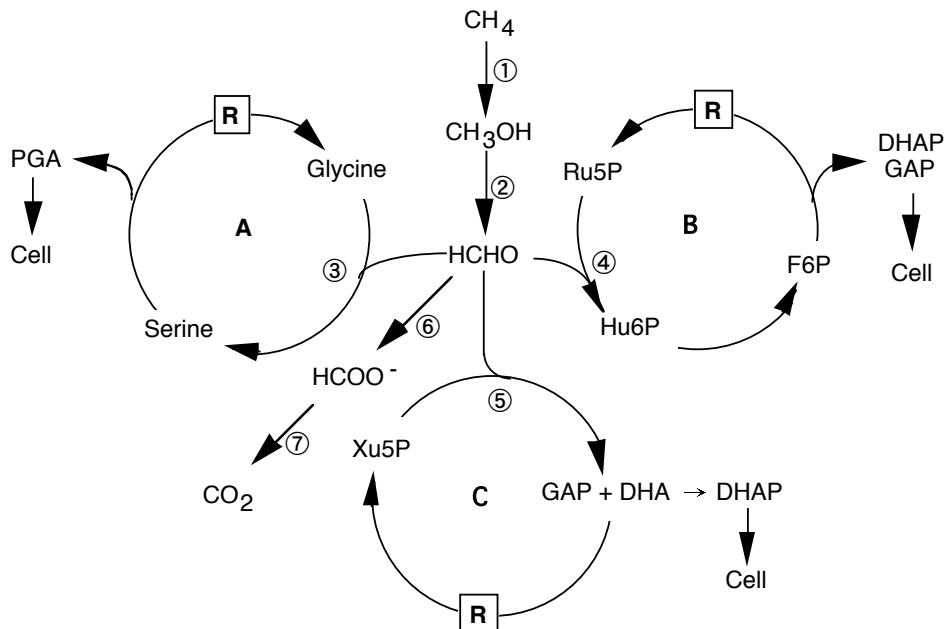


図19 メチロトロフの代謝

A: セリン経路（細菌）

B: リブローズモノリン酸経路（細菌）

C: キシルロースモノリン酸経路（酵母）

【酵素】 ① methane monooxygenase  
 ② methanol dehydrogenase（細菌）  
 alcohol oxidase（酵母）  
 ③ serine hydroxymethyl transferase

【略語】 DHA: dihydroxyacetone  
 DHAP: dihydroxyacetone phosphate  
 F6P: fructose 6-phosphate  
 GAP: glyceraldehyde 3-phosphate  
 R: formaldehyde 受容体の再生経路

④ hexulosephosphate synthase  
 ⑤ dihydroxyacetone synthase  
 ⑥ formaldehyde dehydrogenase  
 ⑦ formate dehydrogenase  
 PGA: 3-phosphoglycerate  
 Ru5P: ribulose 5-phosphate  
 Xu5P: xylulose 5-phosphate  
 Hu6P: hexulose 6-phosphate

## 2.1.1. メタノール資化性菌の自然界からの分離と集積培養

メタノール資化性菌の分離を土壌から集積培養により分離する。特定の基質を栄養源として利用する微生物をスクリーニングするには、集積培養という方法がとられる<sup>8)</sup>。今回の実験のように、methanol を炭素源として生体の維持を行う微生物を探し出す際に、培地の炭素源に methanol のみを使用することで、目的に適った微生物のみをスクリーニングする方法である。幾度か methanol のみを炭素源として含む培地での培養を繰り返して、すなわち methanol 利用性の選択圧をかけることで、純度の高いメタノール資化性菌を集め、methanol の濃度による増殖の度合を測定する。

### 2.1.1 (1) メタノール資化性菌の分離

【実験方法】

1. 任意の材料約 0.5 g (土壌サンプルなど×2種類)
2. 各々別々の液体培地 (培地\*4 ml、含 1% (v/v) methanol) に添加する。
3. 28°Cで2-4日間振とう培養する。
4. この1次培養液 0.1 mlを新しい液体培地 (4 ml、含 methanol) に植菌する (これ迄、振とう培養してきた1次培養液は、2次培養へ植菌した後は処分してよい。)
5. 28°Cで2日間振とう培養する。
6. この2次培養液を1白金耳だけ平板培地 (15 ml、含 methanol) に画線する。
7. 28°Cで2~5日間静置培養する。
8. 比較的大きく成長したコロニー1個を白金耳で斜面培地 (5 ml、含 methanol) に移植する。
9. 28°Cで2日間静置培養する。
10. 肉眼的・顕微鏡的観察を **6.1. 微生物の形態学実験** に記載の方法と同様に行う。
11. このうちの生育の良好な菌を、2.1.1 (2)の生育度実験に用いる。

\*メタノール資化性菌用培地

methanol (植菌時に添加)	1% (v/v)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3% (w/v)
KCl	0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01
Yeast extract	0.05
(Agar	2)
Tap water (水道水)	
pH 7 (BTB 試験紙によって調整)	

### 2.1.1 (2) 生育に対するメタノール濃度の影響の調査

【実験方法】

1. 生育の良好な1菌株について以下の実験を行う。
2. 斜面培地から3白金耳の菌体を5 mlの滅菌生理食塩水 (0.85% NaCl) に懸濁する。
3. この懸濁液 0.1 mlずつを液体培地 (4 ml:含 methanol) 合計3種類\*に加える。
4. 28°Cで振とう培養する。
5. 培養開始後2 (~3) 日後及び4 (~5) 日後に各培養液から1.5 mlずつサンプリングして、pHを測定する (pH試験紙またはpHメーター使用)。次いで、pH測定後の培養液 (1.5 ml) に1.5 mlの0.1 N HClを加え生育を停止させ、生育度 (OD<sub>610</sub>) を測定して、図20のようなグラフを作成する (参照溶液は未植菌の液体培地を用いる。OD<sub>610</sub>測定まで希釈サンプルは冷蔵庫に入れておいてもよい)。

\*3種類の培地の methanol 濃度は、0, 1.5, 5% (それぞれの methanol 添加量は 0, 0.06, 0.20 ml) のものを準備する。

《注意：methanol は口で吸わないように!! ピペットマンあるいは安全ピペッターで扱うこと》

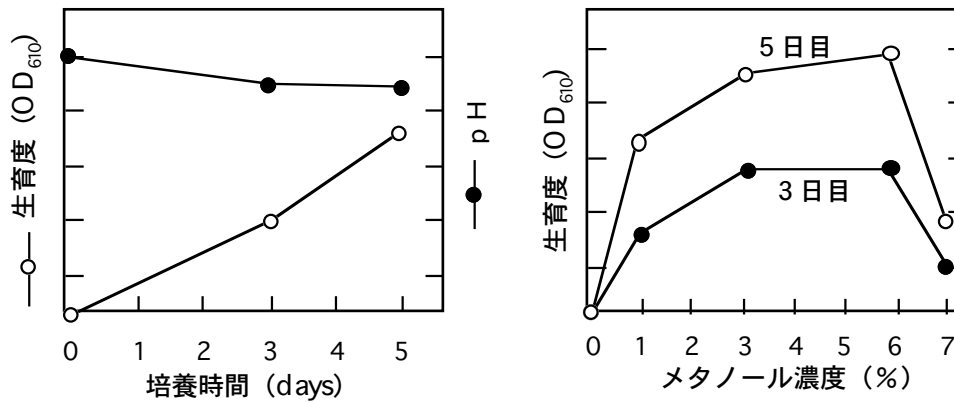


図20 メタノール酸化性微生物の生育

## 2.2. 放線菌による抗生物質生産とバイオアッセイによる抗生物質の定量

抗生物質 (antibiotics) とは、「微生物が生産する物質で、他の細胞の生存・活動を阻害するもの」と定義されているが、その範囲は非常に広大で、抗腫瘍性物質といったものも含まれる。最初に発見されたものは、今回のバイオアッセイの実験でも用いるペニシリン (penicillin) である。この抗生物質は、細菌が増殖する際にその細胞壁の合成を阻害するものである。発見当初は万能薬としてもはやされたが、グラム陰性菌には効果が低いとされている。現在では非常に多くの抗生物質が発見され、また、天然の抗生物質を出発基質として新たな性質を有するものを合成してより役に立つものが造られ、医薬・農業・食品等で用いられている<sup>9)</sup>。

ここでは、1. 微生物の形態学実験で自然界より分離してきた放線菌が抗生物質を生産するか否かを、バイオアッセイという分析法で確認する。

### 2.2.1. バイオアッセイ 1：ペーパーディスクとアッセイプレートを用いた方法

抗菌性を調べるための試験に供する細菌を含んだ寒天培地をガラスプレートに蒔き、放線菌の培養液を染み込ませたペーパーディスクを載せて培養する。通常、細菌は一面に生育し寒天平板培地表面は不透明になるが、その細菌に対して抗菌性を持つ抗生物質が生産されているならば、そのディスクの周辺では細菌の生育が抑制され寒天平板は透明なままとなる（これを生育阻止環という）。こうして、抗生物質の有無を確かめる。また、既知の各種抗生物質 (penicillin 系、cephalosporin 系各2種類。いずれも細胞壁合成阻害の抗生物質<sup>10)</sup>) の溶液を同様に処理して、その抗菌性について確認してみる<sup>11)</sup>。

#### 2.2.1 (1) 分離放線菌の再培養

1. 各自が分離した放線菌2株について、それぞれ斜面培地より1白金耳とり、予め準備した液体培地 (1.1.1. 培地の調製の放線菌用培地、オートクレーブ済、4 ml/16.5×165 mm、シリコセン) に植菌する。
2. 28°Cで4～7日間振とう培養する。
3. 円形ろ紙およびロートを用いて、培養液を濾過する。
4. 得られた培養液を2.2.1 (3) バイオアッセイに供する。

#### 2.2.1 (2) 被検細菌の培養・アッセイプレートの作成

4人1組で2枚のガラスプレートを使用する。1. 微生物の形態学実験で培養したグラム陽性菌及び陰性菌各1株を被検菌として使用する。

##### 【実験方法】

1. 各被検菌の斜面培地より1白金耳とり、予め準備した液体培地 (1.1.1. 培地の調製の細菌用培地、オートクレーブ済、4 ml/16.5×165 mm、シリコセン) に植菌する。
2. 28°Cで1日振とう培養する。