天日塩の中の微生物

- 愛媛県立今治西高等学校　生物部　細菌班
- 　　２年　寺町茉鈴　奥迫明梨

研究の背景

愛媛県・今治市＝瀬戸内海に面する。人口16万人
・造船業と海運業が盛ん。タオル生産が日本一
・しまなみ海道（西瀬戸自動車道）で広島県尾道市と接続
　⇒橋には自転車道も併設：サイクリングの聖地で有名
・地元に「伯方の塩」で有名な伯方島（伯方塩業）がある

今治西高校・生物部＝部員31人、研究班8つ
・生物実験室に微生物実験に必要な滅菌装置が何もない
⇒滅菌不要な実験が可能な「極限環境微生物」をテーマに
⇒天日塩を試料に好塩性細菌や耐塩性細菌について研究
（好塩性：最適条件が高塩分濃度、耐塩性：最適条件は低塩分だが高塩分耐性）

＜おまけ＞班の代表者の名前が寺町茉鈴（まりん）
海の微生物を研究するのは運命です！

海洋微生物＝「海の宝」を研究する意義

海洋性細菌＝海水と同じ3%食塩水が最適濃度になるものが多いが、高度好塩性細菌や飽和食塩水での耐性細菌もある。

・難培養性の貧栄養性細菌が多く、メタゲノム解析（環境中に存在するDNAの分析）による新種の発見が多い。

・塩分耐性のある海洋性細菌には有用物質の産生菌も多い。
みそ、しょうゆの醸造（好塩性酵母や好塩性乳酸菌の利用）
PHB（ﾎﾟﾘﾋﾄﾞﾛｷｼﾌﾞﾁﾚｰﾄ：生分解性プラスチック）の蓄積菌
新種の抗生物質産生菌や高機能化学物質産生菌など

・高浸透圧耐性遺伝子の導入による作物の耐塩性向上も可能
⇒塩害の防止や防潮林の耐性強化、海岸の緑化促進など

・極限環境耐性の仕組みを調べることで生命の謎に迫る
⇒細胞膜による菌体外極限環境に対する調節機能の解明、
浸透圧調節物質の合成・貯蔵による耐性の仕組み

私たちの研究テーマと天日塩への着目

天日塩

・製造工程で加熱されない天日塩には、飽和食塩水状態でも死滅しない「高度好塩性」や「耐塩性」の微生物が休眠している
・海で海水を採取しなくても、市販の天日塩で試料が得られる
・天日塩の産地によって、世界中の試料を入手できる

海洋微生物の採取方法

・マリンブロス培地（海洋性細菌用の液体培地）に過飽和になるように天日塩を加え（20％以上）、25℃で培養する。
・液体培地が濁ってきたら（1～2週間を要する）、食塩を加えた寒天培地に塗布して25℃で培養し、単離したコロニーを得る。
＜寒天培地は食塩20％では固化しないので15％にした。＞
・・・滅菌しなくても通常の微生物は生育できない環境
⇒滅菌装置がない本校でも実験が可能

私たちが天日塩中から培養できた微生物

・液体培地に過飽和になるように天日塩（下表一覧）を加えて、25℃のインキュベーター内で1～2週間培養する。
・液体培地が濁ってきたら寒天培地に塗布し、コロニーを得る。（得られたシングルコロニーを単離した菌株とする。）
・下表の天日塩19種類のうち、○印の**15種類で微生物の増殖**が見られた。得られた菌株は20種類以上あった。

	産地		産地
天日塩A	オーストラリア	天日塩K ○	東京都伊豆大島
天日塩B ○	メキシコ	天日塩L ○	高知県
天日塩C ○	高知県	天日塩M	オーストラリア
天日塩D ○	高知県	天日塩N ○	フランス
天日塩E ○	北海道	天日塩O ○	高知県
天日塩F ○	兵庫県	天日塩P ○	高知県
天日塩G ○	沖縄県	天日塩Q ○	高知県
天日塩H ○	沖縄県	天日塩R ○	沖縄県
天日塩I	沖縄県	天日塩S ○	インドネシア
天日塩J	キリバス共和国		

▲用意した天日塩と産地

▲天日塩Dから得たコロニー

1種類の天日塩から3種の菌株

原核細胞（細菌）の桿菌、球菌と真核細胞（菌類）が培養できた。

他にも・・・…

同じ天日塩からでも、培地に含まれるイオン組成が変化すると、得られる菌株の種類が異なる。

天日塩の産地によって、出現する菌株の種類や組合せが異なる。

高浸透圧（高塩分）耐性の仕組みを調べる

・菌体内蓄積物質を得るためシャトル培養（濃度を変化させる培養）を用いる。

＜シャトル培養＞
①培地ごと菌体を少量とり、遠心分離にかけ菌体を沈める。
②上澄みの培地を捨て、純水を加えて1日静置する。
⇒浸透圧のしくみによって菌体内の蓄積物質が放出される。
③再び遠心分離にかけ菌体を沈め、純水中に放出された蓄積物質を回収する。

①　②−1　②−2　③

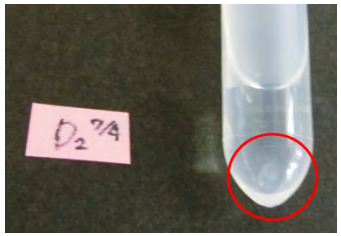
シャトル培養で得た浸透圧調節物質の成分分析は、高校ではできない。研究機関に分析を依頼する予算もない。困った。そこで・・・

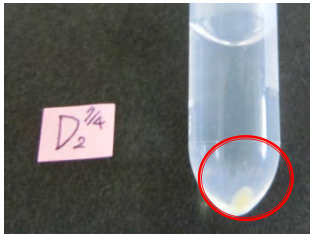
自分たちでもできることは・・・

浸透圧調節物質は栄養分か？

シャトル培養で得た浸透圧調節物質を含む上澄みに少量の菌体を加えて培養し、増殖できるか（上澄みの浸透圧調節物質が栄養分を含んでいるか）を確認する。

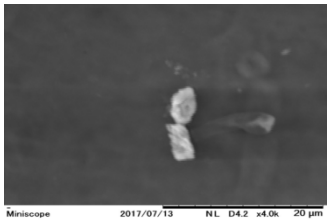
結果





○一部の菌株では培養後に沈殿した菌体の量が増えた＝栄養分を含むのではないか？
⇒塩分を含むだけの浸透圧調節ではない
○一部の菌株では増殖した菌体の沈殿の橙色が濃くなった＝カロテノイド系色素の蓄積に酷似
○沈殿した菌体の中に顆粒状の物質
⇒PHBかも！？（産業的価値あり）

私たちの発見⇒応用研究に発展できるか



菌体の変形：
全体に丸くなる

・**バイオフィルム（バリアー）の形成**
高塩分濃度では液体培地中の菌体が運動性を失って沈殿し、粘性を持った塊になる＜外界との遮断＞

・**菌体が小さく丸くなる**方向に変形する
高塩分濃度で菌体が小型化する＜外界と接する表面積の減少＞

・**塩析しない耐性タンパク質**を持つ（飽和食塩水状態でも増殖）
高塩分濃度でも酵素が働く＜分子シャペロンとしての機能＞

・**細胞膜でイオン濃度を調節**する機能が発達
アンチポーターによるNa^+やK^+の排出とH^+の吸収＜膜輸送＞

・**浸透圧調節物質**の合成と貯蔵
栄養分として利用できる物質が蓄積される＜有用物質の生産＞

・**PHBの蓄積**が推定される菌株の発見
顕微鏡観察で菌体内に顆粒状のPHB（？）が蓄積＜産業化＞

PHB：生分解性プラスチックの材料⇐産業界が注目
・・・バイオテクノロジーで大量生産が可能

将来の可能性＝海洋微生物は「海の宝」

○最近のニュースから

・海洋性細菌を利用して木材リグニンからバイオプラスチックを合成
・海洋性細菌から新種の抗生物質や新しい機能性化学物質を発見
・海洋性酵母のパン作り、環境浄化（バイオレメディエーション）利用

○私たちの研究の目標

・最強の高度好塩性微生物を選抜してその耐性の仕組みを調べる
・PHBや抗生物質など有用物質の産生菌を見つけて特許をとる
・高度好塩性アーキア（古細菌）を見つけてバクテリアと分別する
（バクテリアとの抗生物質の作用の違いを利用して識別する）

○海洋微生物は「海の宝」

・メタゲノム解析でDNAは見つかるが、培養できない微生物が多数
・・・海は特別な環境、ヒトには再現できない条件が多い
⇒だからこそ、それに挑戦していきたい