

研究タイトル：

地衣類共生藻の分離培養法の確立

氏名： 中嶋 裕之 / NAKASHIMA Hiroyuki E-mail: nakahiro@kurume-nct.ac.jp

職名： 教授 学位： 博士（農学）

所属学会・協会： 日本化学会、日本生物工学会、日本地衣学会

キーワード： 地衣類、共生藻、分離培養法

技術相談： ・藻類の分離・培養

提供可能技術： ・細胞観察



研究内容： 地衣類共生藻の分離培養法の確立

1. 研究の背景

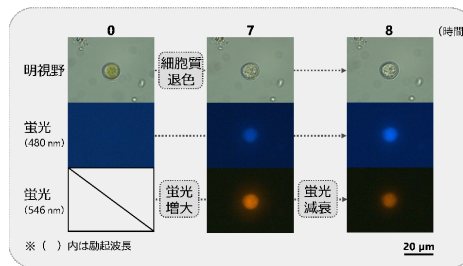
地衣類は、糸状菌である地衣菌と緑藻またはシアノバクテリア等共生藻との共生生物である。その共生藻を分離・培養する方法として、破砕した地衣体小片を培養する地衣組織培養法（山本法）¹⁾がある。しかし、何れの手法においても地衣菌の混入に加えて雑菌混入が多いことが問題であった。そこで、共生藻の単離細胞の効率的な分離及び培養法の確立を目指して本研究を遂行することとした。

2. 研究課題と成果

(1) 地衣体の破砕及び共生藻の分離

バグクラッシャー（タイテック社）を用いてステンレスボールと共に地衣体の破砕を行った。本破砕法により、従来法と比べて地衣菌から独立した共生藻細胞が多数得られた。

供試地衣



藻細胞の蛍光染色

(2) 共生藻独立細胞の培養

(1) で得られた細胞破砕液を 10 倍ずつに段階希釈後、寒天プレートに塗布し、16℃で 2 か月間培養した。その結果、共生藻細胞のみのコロニーが得られた^{2), 3)}。

(3) 藻細胞の顕微鏡観察

(2) で得られたコロニーから藻細胞を一部取り、酢酸オルセイン染色による明視野観察あるいは DAPI による蛍光観察を行った。その結果、一部の細胞塊に 2～4 分裂後の細胞が認められた²⁾。

3. 参考文献

- 山本, 地衣体を用いた地衣類の培養, Lichenology 1, pp57-65 (2002)
- 乗富, 中野, 中嶋, 南極産地衣類 *Umbilicaria aprina* 共生藻の分離・培養条件の検討, 第 26 回九州沖縄地区高専フォーラム (2016)
- 中嶋ら, 南極産地衣類 *Umbilicaria aprina* 共生藻の分離培養条件の検討 - ビーズ破砕と抗菌剤処理 - 久留米高専紀要 32 巻 pp.1-6 (2017)

提供可能な設備・機器：

名称・型番（メーカー）

| | |
|---------------------------------------|--|
| バグクラッシャー・GM-01（タイテック社） | |
| DMLB 蛍光顕微鏡（ライカ社） | |
| エコノミー人工気象器・LH-40CCFL-TMDT（株式会社日本医化器械） | |

研究タイトル：

微生物の分離同定及び抗菌試験



氏名： 中嶋 裕之 / NAKASHIMA Hiroyuki E-mail: nakahiro@kurume-nct.ac.jp

職名： 教授 学位： 博士（農学）

所属学会・協会： 日本化学会、日本生物工学会、日本地衣学会

キーワード： 細菌数及び細菌種調査、糸状菌数及び糸状菌種調査

技術相談： ・各種環境中の微生物数計測及び微生物種同定

提供可能技術： ・抗菌活性測定

研究内容： 微生物の分離同定及び抗菌試験

1. 研究の背景

本研究室では、1998年度に北部九州脊振山において年間のエアロゾル数調査を行ったのを最初に¹⁾、2001年度には南極昭和基地内でのバイオエアロゾル調査を行った^{2), 3)}。また、2020年度は、温泉地で採取した土壌及び淡水から高温細菌をスクリーニングし、菌種を特定した。これらの技術を用いて、環境中に存在する細菌及び糸状菌に関する菌種解析を行っている。

2. 研究課題と成果

(1) 環境中の微生物調査

2011年度から2013年度にかけて、近隣企業工場内のクリーン化を目指した一般細菌及び真菌数調査並びに種の同定を行った。すなわち、RCS サンプラー（HYCON 社）を用いて空中浮遊菌を捕集しその種を決定した。一方、主な作業台あるいは床面については拭き取り法による菌採取後、各培地で培養後に上記と同様の方法を用いてコロニー数測定並びに菌種同定を行った。本調査と室温、湿度等の環境調査とを3年間継続的に行うことにより、菌数増殖要因を追究した。

(2) 抗菌活性試験

2018年度に久留米高専の生物応用化学科並びに材料システム工学科の教員、他大学教員との共同研究で、抗菌活性試験を行った。すなわち、Ag ナノ粒子を添加したセルロースナノファイバーについて、その抗菌効果を調査する目的で、*Escherichia coli* 及び *Aspergillus niger* に対し、前者はペーパーディスク法で抗菌活性試験を行った。その結果、CO₂ 雰囲気下における超臨界状態で乾燥させたナノファイバーの両菌に対してその生育抑制効果が認められた⁴⁾。

3. 今後の対応

上述したように、当研究室ではエアロゾルの研究並びに微生物調査を通じた技術を有している。については、空中浮遊菌や土壌菌等環境中の微生物調査、抗菌活性試験等に関する地域連携を積極的に推進する所存である。

4. 参考文献

- 1) 加藤ら、北部九州脊振山における生物起源エアロゾルの観測、エアロゾル研究第15巻2号、150-154 (2000)
- 2) Nakashima *et. al.*, Airborne microorganisms in the indoor environment of Syowa Station in Antarctica, Polar Meteorol. Glaciol., 17, 61-67 (2003)
- 3) 中嶋、南極昭和基地内の生物起源エアロゾル、南極資料 54 巻、810-818 (2010)
- 4) Antibacterial and antifungal properties of Ag nanoparticle-loaded cellulose nanofiber aerogels prepared by supercritical CO₂ drying. The Journal of supercritical fluids 143, pp.1-7 (2019)

提供可能な設備・機器：

名称・型番（メーカー）

| | |
|----------------------------------|--|
| フェニックス スペック (BD 社) | |
| BBL クリスタルオートリーダー産業用 (BD 社) | |
| ルミテスター PD-20 (キッコーマンバイオケミファ株式会社) | |

研究タイトル：

地衣類の遺伝子解析



氏名： 中嶋 裕之 / NAKASHIMA Hiroyuki E-mail: nakahiro@kurume-nct.ac.jp

職名： 教授 学位： 博士（農学）

所属学会・協会： 日本化学会、日本生物工学会、日本地衣学会

キーワード： 地衣類の系統分類解析・有用遺伝子解析

 技術相談
 提供可能技術：

- ・地衣類の分離培養
- ・DNA抽出・精製
- ・耐性遺伝子・系統分類解析

研究内容： 地衣類の遺伝子解析

1. 研究の背景

本研究室では、2001年及び2004年に採集した南極産地衣 *Umbilicaria aprina* 及び *Usnea sphacelata* の地衣菌及び共生藻について、rRNAコード領域の塩基配列解析による種の同定を行った。また、2017年度からは、日本産アリノタイマツについて国内ハプロタイプ解析を行っている。また、上記南極産地衣における耐凍性遺伝子や国内の海洋沿岸地域に生育する種の耐塩性遺伝子の解析も行った。

2. 研究課題と成果

(1) 南極産地衣の系統解析

1) *Umbilicaria aprina* 及び *Usnea sphacelata* 地衣菌の系統解析

上記地衣菌のrRNAコード領域の塩基配列解析により、同属多種の類縁種と比較し、系統樹を作成した。その結果、ITS領域の配列において、*Umbilicaria aprina* における南極産とアンデス産との系統の違いを示す可能性が示唆された¹⁾。一方、後者はアルゼンチン産及び北極産のものと同系統であると示唆された²⁾。また、ITS1及びrbcL領域の系統解析により、*Usnea* 共生藻は *Trebouxia* であることが示唆された。一方、*Umbilicaria aprina* には *Trebouxia* 以外に *Coccomyxa* が存在した³⁾。

2) *Umbilicaria aprina* の耐凍性関連遺伝子解析

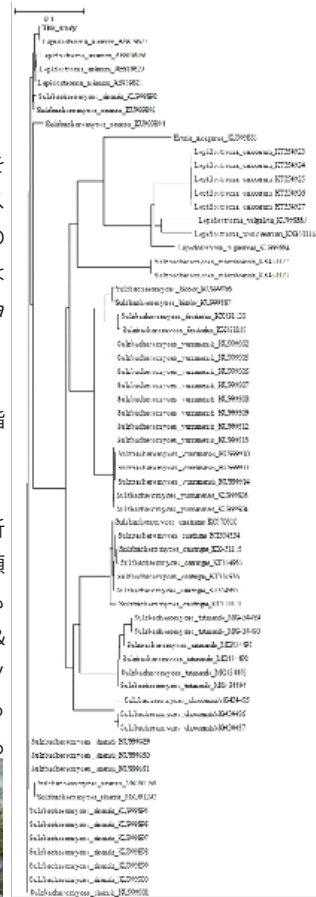
U. aprina 地衣体及び共生藻ゲノムを次世代シーケンサーにより解析した結果、 $\Delta -6$ 、 $\Delta -12$ 脂肪酸デサチュラーゼ (fatty acid desaturase, FAD) 遺伝子の存在を見出した。

(2) 日本産アリノタイマツ地衣菌のrRNAコード領域における分子系統解析

国内6県9か所のアリノタイマツ試料を用いて地衣菌rRNAコード領域について遺伝子系統解析を行った。決定した領域においては9地域全ての塩基配列が一致した。また、18S rRNAコード領域においては、Yanaga *et al.* (2015) による *Lepidostroma asianum* Yanaga & N. Maek. の配列とも100%一致した。*L. asianum* は、Liu *et al.* (2017) より *Sulzbacheromyces sinensis* (R. H. Petersen & M. Zang) D. Liu & Li S. Wang の異名とされており、本研究の解析結果により日本産アリノタイマツは *S. sinensis* であると結論づけた⁴⁾。また、沖縄(石垣市)で採集した試料について同解析を行った結果九州以北のものと同最大6塩基の違いが認められ、遺伝子変異の境界が九州-沖縄間にあると示唆された⁵⁾。また、長崎産について県内地域での数塩基の違いを見出した。



アリノタイマツ (高良山)



アリノタイマツITS1-ITS2領域に基づく系統樹

3. 参考文献

- 1) 田中征矢ら, Lichenology 13, p100 (2015)
- 2) 田中征矢ら, Lichenology 14, p172 (2016)
- 3) 手柴まり子ら, 第27回九州沖縄地区高専フォーラム (2017)
- 4) 中嶋裕之, 山本好和, 久留米工業高等専門学校紀要第36巻, pp11-16 (2021)
- 5) 森田歩, 山本好和, 中嶋裕之, 日本地衣学会第21回大会 (2022)

提供可能な設備・機器：

名称・型番 (メーカー)

PCR サーマルサイクラー・TC-3000 (TECHNE 社)