

氏名・（本籍）	ひぐち まさこ 樋口 允子（宮城県）
学位の種類	農学博士
学位記番号	農博第30号
学位授与年月日	昭和39年7月15日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専門課程	東北大学大学院農学研究科 （博士課程）農芸化学専攻
学位論文題目	ルーメン内セルロース分解菌に関する研究
論文審査委員	教授（主査）志村 愷 助 教授 古坂 澄 石 教授 松本 達 郎

論文内容要旨

ルーメン内微生物の最も主要な作用は牧草や野草の主成分をなしているセルロースの分解である。古くから、このセルロースの分解について微生物学的見地から関心もたれていたが菌の分離が極めて困難なため、研究が進展しなかつた。1950年前後、Hungateにより CO_2 置換によるルーメン内嫌気性菌の分離方法が確立されて以来Hungateをはじめ、Sijpesteijn、Bryant、Huhtanen、Gallらにより、一般嫌気性菌と共にセルロース分解菌の分離がおこなわれ、その分類および生理的諸性質について研究されてきた。今日までに明らかにされたりし主なセルロース分解菌はいずれも偏性嫌気性菌で、黄色あるいは白色のコロニーを形成する球菌 *Ruminococcus* sp.,

分解産物として酢酸以外に著量のコハク酸を生成する桿菌 *Bacteroides Succinogenes*、酪酸の生成を特徴とする彎曲した桿菌 *Butyrivibrio sp.* および *Clostridium sp.* があげられるが、後者の *Clostridium sp.* はいずれも他のセルロース分解菌の存在レベルより 2 オータ程度低く存在し、Hungate、Bryant らは孢子形成をおこなわない前三者を主要なセルロース分解菌としている。わが国の赤司もルーメン内のセルロース分解菌の分離を試み、好気性セルロース分解菌 *Pseudomonas sp.*、*Vibrio sp.* および *Cytophaga sp.* を得ているが、その重要性は不明である。一般に、ルーメン内におけるセルロースの分解は殆んどがバクテリアによつてなされ、与えられたセルロースのおよそ 70~80% が分解されるとされているが、繊維質飼料の利用面からも、その活性を維持する条件、または更に分解を促進する条件を明らかにすることは単に微生物学的のみならず家畜の栄養生理学的にも重要である。しかし現在のところ、ルーメン内セルロース分解菌の諸性質については極めて僅かにしか知られていない。

この研究はルーメン内で主要な位置を占めるとされる偏性嫌気性あるいは通性嫌気性のセルロース分解菌を単離し、その各々について、菌のもつ諸性質を明らかにすると共に、セルロース分解活性がいかなる要因によつて左右されるかを特に化学的要因について解析を深め、ルーメン内におけるセルロース分解菌群の役割の解明に役立てようとしたものである。

まず、ルーメン内の嫌気的環境を考慮して、こゝに生存する菌群の存在レベル及びそこに占めるセルロース分解菌の位置について検討した。その結果、ルーメン内には少くとも 10^9 個/ml の数は存在し、これは他の菌に劣らないレベルであり、特にセロビオース資化菌の活性が高いことが注目された。(表-1、図-1)

嫌気的条件下では 10^{-8} および 10^{-9} 稀釈のルーメン内容物からセルロース分解速度の速い 8 株が分離された。分解菌はいずれも偏性嫌気性菌で孢子を形成せず、既報の Bryant らの成績と対照し、比較検討したところ、8 株のうち 3 株は *Ruminococcus* に属し、うち 2 株は、*Ruminococcus albus* に属するものと同定された。他の 5 株は桿菌で *Bacteroides succinogenes* (1 株)、*Butyrivibrio sp.* (1 株) *Eubacterium prevot* (3 株) と同定された。こゝに、少なくとも population に

いてはルーメン内で主要と目される菌株を分離し得たわけである。しかもこれらの菌株は地理的にかけ離れ、飼養条件を異にした動物ルーメンから分離されたにもかかわらず、Hungate、Bryantらの成績と一致し、この面からもその主要性を認めうるものである。

好氣的条件下では土壤細菌に用いられる Omelianskii 培地による集積培養で *Cellulomonas* 属菌 3 株が分離された。Bergey の分類表に記載されている *Cellulomonas* はいずれも土壤 Origin でルーメン内から分離されたものは初めてである。(この菌については遠藤、大岡が蛍光色素抗体標識法により、ルーメン内での存在レベルが検討され、 10^8 のオーダーで存在することが確認されている。) 土壤性の *Cellulomonas* はまた、その生育においていずれも $28 \sim 33^\circ\text{C}$ が至適温度とされているが、ルーメンより分離された菌は $37 \sim 40^\circ\text{C}$ が生育およびセルロース分解活性において最適である。この点に土壤細菌との相異が認められた。一般に、これまでルーメン内が嫌氣性であることから偏性嫌氣性菌に主眼がおかれ、ここに分離されたような通性嫌氣性セルロース分解菌については注目されなかつたが、*Cellulomonas* 属菌はルーメン醗酵菌として単にルーメン内における存在レベルのみならず、後述のように、機能面からも、重要性は看過し得ないものである。

単離菌株の一般的性質として、まず、栄養要求性につき検討した。その結果、偏性嫌氣性セルロース分解菌は無機塩類培地では生育せず、また、これにカザミノ酸を添加しても生育しない。しかし、カザミノ酸と同じ N 量の酵母エキス添加によりいずれの菌も生育し、また、ルーメン液の添加でも同様に生育する。*Cellulomonas* 属菌は好氣的培養では無機塩類溶液と濾紙だけで充分生育できるが、嫌氣的培養では偏性嫌氣性菌と同様の要求性を示し、嫌氣的条件下での生育にはビオチン、チアミン、リボフラビン等を要求することが認められた。ルーメン液の効果も、ルーメン内にこれらのビタミンがおよそ $0.02 \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で存在することから、酵母エキスの効果と同様であろうと考えられる。

単離菌株の性質として、特にルーメン内に与えられる主要な炭水化物類の利用性を知ることは、これらの菌のルーメン内での役割を考える上に有効である。ルーメン内の主な多糖類についてその資化性をみると *Bacteroides succinogenes* 912-2 株以

外はいずれの菌株ともでん粉を資化することが認められ、キシランやペクチンもかなりの菌により分解されることが明らかにされた。更に、セルロースと相対する多糖類であるでん粉の利用性をみるため、セルロース分解菌によるセルロースおよびでん粉よりのVFA産生能について無菌ルーメン液を基本培地としてWarner型人工ルーメンを用いて検討したところ、912-2株以外はいずれの菌ともでん粉から著量のVFAを産生することがみられた。また、これらの菌のもつアミラーゼ活性についてみると、ルーメン菌区にみられる活性に劣らない活性が認められた。この結果から、ルーメン内セルロース分解菌としてはセルロース性基質の分解にのみ関与するホモ型セルロース分解菌以外に、アミラーゼ能も強く、でん粉あるいはキシラン等の分解にも併せて関与するヘテロ型セルロース分解菌の重要性とが示唆された。(表-2)

次に、多糖類の分解過程で生成される代謝中間体である少糖類および単糖類について、同様の資化性を検討したところ、グルコース、セロビオース、マルトース、シュークロースは殆んどすべての菌が分解できることが認められたが、一方、グルコースとセロビオースの資化性に差が認められた。両者の基質についてVFAおよびnon-VFA産生能を比較すると、一般にセロビオースの方が酸生成量が多く、各個VFAおよびnon-VFA組成においても量的な差が認められた。その他、基質特異性としてもグルコース、セロビオース以外の基質についても同一条件で検討したところ特に*R. albus* 862-2株および*Cellulomonas fimi* R 2株において顕著な差がみられた。

さらに、これらセルロース分解菌のセルロース分解活性におよぼす諸要因を明らかにするために、まず、分解される前の自然系の菌群、即ち、ルーメン内容物のガーゼ濾液菌区分のセルロース分解活性におよぼす栄養的環境—特にN源—の影響につき検討した。この結果、ルーメン液からなる培地およびこれとほぼ同量のNを含むTY(トリプティカーゼ、酵母エキス)培地では 10^{-8} 稀釈部までかなり高いセルロース分解活性がみられたが、高濃度TY培地では全く分解が抑えられた。次に、単離菌株についても同様の実験をおこない、ルーメンガーゼ濾液菌区分でみられた結果と同様にTY濃度が高いと分解がみられなかつた。更に、培地のN濃度とセルロース分解活性との関係を見ると、およそ全N濃度が0.02~0.04%で最も分解活性が高く、高濃度になると活性が低下することが確かめられた。その際、ルーメン液添加により、セル

ロース分解活性が高まる傾向がみられたが、特に *Cellulomonas* 属菌において顕著であつた。*Cellulomonas* 属菌は既述のように好氣的条件下では最も栄養的に簡単な組成の培地でも生育し、セルロース分解能を左右する条件の検討として、種々の影響をみる場合、基本培地が単純な程解析しやすいので、活性も比較的高く、扱い易い点からも、以後の研究には主として *Cellulomonas* 属菌を用いて検討をすゝめ、特にセルロース分解能検討の際の基本培地には常にセルロースを含む無機塩類溶液を用いた。

セルロース分解におよぼす N 源の影響として、N 源の種類について検討したところ 0.02% の N 量で、最も高い生育度を示した酵母エキスとペプトンは生育に比して分解度が低下する結果を得たが、カザミノ酸と尿素は対照である硫酸より分解度は高く特に、ルーメン液は顕著に分解促進を示した。また、同じ無機の N でも硝酸ナトリウムでは生育は硫酸と大差ないが、分解度は著しく抑えられた。この結果から、セルロース分解に対して、一般に、ルーメン液のようにアンモニア態 N を含むか、または分解してアンモニアを生じうるカザミノ酸や尿素等が N 源の種類としては有効であると示唆された。ルーメン液には諸種の有機酸類が含まれており、特にルーメン液が他の N 源と異つた顕著な促進効果を示したので、ルーメン液内に存在する各種有機酸および TCA 回路上にある主な有機酸について、セルロース分解におよぼす添加効果をみた結果、コハク酸が顕著な促進効果を示した。このコハク酸の効果は濾紙の切断においても、Carboxyl methyl cellulose (CMC) 分解においても同様に認められたが、特に重合度の高い CMC の方の分解が促進された。

コハク酸によるセルロース分解促進効果についてはまず、コハク酸がセルラーゼ活性の賦活作用を有するか否かを検討し、この作用のないことを認めた。次に、菌の増殖過程におけるコハク酸のセルロース分解促進効果についてしらべ、コハク酸が確かに代謝されていること、また、コハク酸があると log phase が長びき、且つ、還元糖の蓄積が大であることが認められた。更に、コハク酸添加培養時の log phase の菌体のセルラーゼ活性はコハク酸無添加培養菌体のそれよりも高く、したがつて、コハク酸がセルラーゼ生成を促進すると帰結された。また、嫌氣的培養においてもコハク酸のセルラーゼ生成促進効果は認められ、むしろ、好氣的培養菌体のセルラーゼ生成の場合よりも高い。この菌のコハク酸酸化能は TCA 系の特異的な阻害剤であるフロロ

酢酸で完全に阻害されるが、フロロ酢酸と菌体とを前処理し、無機塩類培地に好氣的に培養すると、全く菌の生育がみられず、フロロ酢酸の阻害の程度を緩和すると程度に応じて生育がおこり、セルロース分解活性もフロロ酢酸の阻害度に左右される結果が得られた。しかし、最少の栄養源を補い嫌氣的にも充分生育できる培地で好氣的に培養すると、菌の生育は全く抑えられず、フロロ酢酸の阻害効果は著しく減少した。これらの実験結果から、コハク酸のセルラーゼ生成促進効果は単にコハク酸の酸化によるエネルギー生成系の賦活にのみ帰因するとはみられない、むしろ、他のかたちでセルラーゼ生成系に影響を与えることが示唆された。(表-3)

供試の *Cellulomonas* 属菌株ではグルコースおよびでん粉培地ではセルラーゼ生成がみられないが、これらの基質と共にコハク酸を共存させると、セルラーゼ生成が誘導されることを見出した。よつて、グルコース培養菌体の菌懸濁液を用いてセルラーゼ生成に対するコハク酸の誘導効果について検討した結果、コハク酸を含む無機塩類溶液に incubate した場合のみ、グルコースの有無にかかわらずセルラーゼ活性が認められた。

また、コハク酸がセルラーゼ生成の誘導に関与することは蛋白合成の阻害剤である Chloramphenicol (CM) あるいは核酸合成の阻害剤である 8-Aza-guanine の存在の下で、このセルラーゼ合成が阻害されることから認められた。即ち、これら阻害剤の存在下でコハク酸によるセルラーゼ生成の誘導効果を見ると、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の CM 添加でセルラーゼ生成は全く抑えられ、8-Aza-guanine もかなり抑制することが認められた。これらの結果から、コハク酸が確かにセルラーゼ合成を誘導し、net の蛋白合成を伴つてセルラーゼ活性があらわれたことが明らかにされたが、また、この incubation の過程で、コハク酸が存在するとグルコースの菌体内とり込みが抑えられ、コハク酸とグルコースの拮抗性も認められた。(表-4)

ルーメン内におけるセルロースの分解がコハク酸添加により促進されることも古坂らの成績と同様にルーメンガーゼ濾液菌区において認められた。この促進はガーゼ濾液菌区分のどの希釈部においても顕著であることはルーメン内セルロース分解菌一般についてセルラーゼ生成がコハク酸によつて促進された結果を示すものとする。

(表-5)

また、このコハク酸によるセルロース分解促進効果が一般のセルロース分解菌に共通したものか、それともルーメン菌の特異性を明らかにするために、仙台市内木材堆積腐植土および農学部内圃場より単離されたセルロース分解菌については同様の効果をしらべたところ、ルーメン菌にのみ、むしろ特異的である結果を得た。

これらの成績からみると、一般にルーメン内のセルロース分解能は強いにもかかわらず、単離された個々の菌の活性は弱いとされているが、この矛盾した事実も上のコハク酸のセルラーゼ生成に対する促進効果の面から十分に理解することができる。即ち、通常ルーメン内容物中には $0.01 \sim 0.3 \text{ mMoles/dl}$ のコハク酸が含まれており、この濃度は上述の効果を与えるに十分な量であるからである。またこの結果よりみてルーメン内にはセルロース分解菌（例えば *Ruminococcus flavefaciens* あるいは *Bacteroides succinogenes*）をも含めてコハク酸生成菌が多種類にわたって存在する事実も大いに注目される。そしてコハク酸が単にプロピオン酸の前駆物質としてのみならず、このセルラーゼ生成促進効果の面からもルーメン醗酵には重要な物質であることを特に指摘したい。

以上を要約すると本研究ではルーメン内容物より多種類の主要な偏性嫌気性セルロース分解菌を単離したほか、新しく通性嫌気性セルロース分解菌として *Cellulomonas* 属菌を単離し、特にこれらの菌のセルロース分解能と生育について炭水化物あるいは窒素源のおよぼす影響をしらべ、更に有機酸類のうちコハク酸がこれらのルーメン内セルロース分解菌のセルラーゼ生成に対して特異的に促進する効果のあることが見出された。これらの結果から、ルーメン醗酵におけるコハク酸の重要性について新知見を導いたほか、でん粉あるいはグルコース、その他たん白質等のいわゆる濃厚飼料より主として導かれる物質のセルロース分解能に対する拮抗的效果についてもこれを微生物学的に裏付けることに成功し、また、これらの成績にもとずいて新しく単離された *Cellulomonas* 属菌のルーメン醗酵菌としての重要性が指摘された。

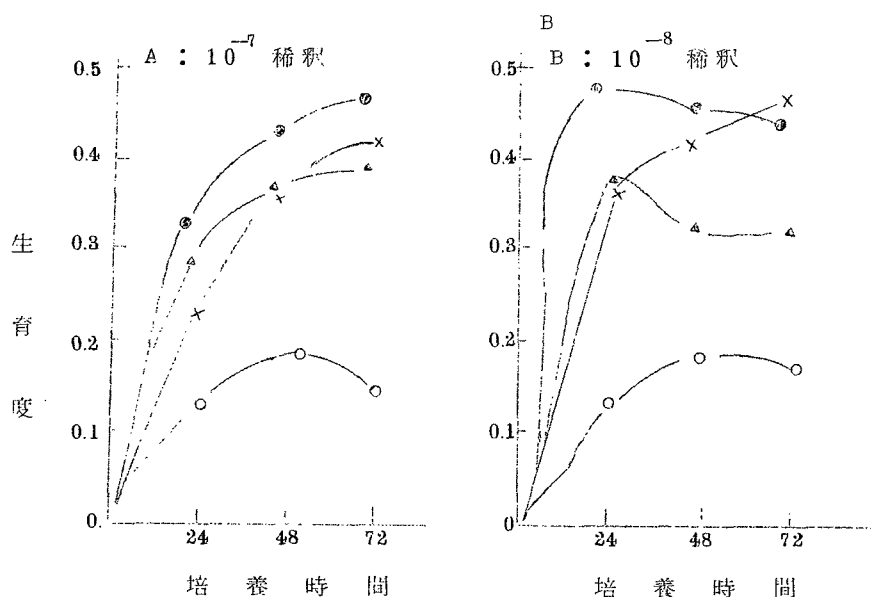
表-1 ルーメン内容物 10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9}
各希釈部の菌群のセルロース分解能*

稀 釈 ガス層	10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	対 照
	空 気	10	—	—	—	—
窒素ガス	7	7	8	8	—	—
炭酸ガス	I 7	8	8	8	—	—
	II 7	7	8	10	—	—

*：セルロースの分解は $1.0 \times 8.0\text{cm}$ の濾紙片を切断するに要した
日数で表わした。

培地はルーメン液 30% 無機塩類溶液 30% に基質として濾紙
片を加えた。

図-1 ルーメン内容物 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9}
希釈部における菌群の生育*



C : 10^{-9} 希釈では菌の生育なし

*培地はルーメン汁 30%、無機塩類溶液 30%、に各基質 0.2%、

添加、 37°C で培養、 CO_2 でガス置換。

—○—セルビオース —△—でん粉 —×—グルコース —○—基質なし

表 - 2 セルロース分解菌の多糖類利用性

	セルロース	キシラン	ペクチン	デキストリン	でん粉	イヌリン
Ruminococcus albus st. 862-2	+	+	+	+	+	-
" " st. 861	+	-	-	+	+	-
Bacteroides succinogenes st. 912-2	+	-	-	±	-	-
Butyrivibrio st. 85-1	+	+	-	+	+	-
Eubacterium prevotii st. 922-3	+	+	+	+	+	-
" st. 864	+	+	+	+	+	-
" st. N204	+	+	-	+	+	-
Cellulomonas st. sh	+			+	+	-
Cellulomonas rimi sp. R2	+			+	+	-
Cellulomonas sp. R3	+			+	+	-

表一 3 好気的および嫌気的条件下で生育した菌体のセルラーゼ生成に対するコハク酸の影響

培地	酵素区分	好気的培養		嫌气的培養	
		生育 OD(-log T) 比活性	セルラーゼ活性	生育 OD(-log T) 比活性	セルラーゼ活性
TYR GMC	培養液	0.680	184	0.198	2454
	菌体	55	899	151	500
	培養源液	166	2700	2070	6900
TYR GMC+S*	培養液	0.805	375	0.268	5184
	菌体	85	1700	520	1300
	培養源液	360	7200	4320	10800
TYR GMC+S+FA**	培養液	0.825	262	0.277	1500
	菌体	52	1200	196	902
	培養源液	157	3600	652	3000

* S : コハク酸 0.5 mM

** FA : フロロ酢酸 1 mM、菌接種に際し、まず菌液に FA を加え 30 分 37°C に保ち、後培養に移つた。

表-4 セルラーゼ生成に対するコハク酸の効果 (2)

基質	添加物	λ O D	コハク酸の消失 cFM/ml μ g/ml μ mol/ml	グルコースの消失 μ g/ml μ mol/ml	セルラーゼ活性 菌体区分	(比活性) 濾液区分
グルコース	-	-0.060		267.2 (98.4%)	0	0
	-	-0.070	3880 (11.6%)	4480 2.32	1500	0
コハク酸	CM (10 μ g/ml)	-0.110	2785 (9.6%)	3705 1.92	0	0
	8-AG (1 μ mol/ml)	-0.100	4620 (13.9%)	5360 2.78	230	0
	-	-0.070	1685 (8.1%)	8130 1.62	970	400
グルコース	CM (10 μ g/ml)	-0.040	425 (1.4%)	541 0.28	0	0
コハク酸	8-AG (1 μ mol/ml)	-0.050	4540 (13.3%)	5140 2.66	700	0

表 - 5 ルーメンガーゼ濾液菌区における菌群のセルロース分解に対するコハク酸の促進作用

日数	10 ⁻¹		10 ⁻³		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷	
	コハク酸	-	コハク酸	-	コハク酸	-	コハク酸	-	コハク酸	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3		++	+++	+	-	-	-	-	-	-
4		++		+	+	-	-	-	-	-
5		++		++	++	-	-	-	-	-
6		+++		+++	+++	-	-	-	-	-
7						+	+++	-	-	-
8						++		+	++	-
9						+++		+	+++	-
10								++		+
11								+++		+
12										++
13										+++
14										

* コハク酸添加量 0.5 mM

** 培地はトリブテイカーゼ 0.1%、酵母エキス 0.1%、無機塩類溶液 30%
にして 1.0 × 8.0 cm² の濾紙片を加え、濾紙切断にてセルロース分解状態を
示した。

*** + は分解の開始

++ 濾紙の切断

審 査 結 果 の 要 旨

従来ルーメン内のセルロース分解菌は、ルーメン内では活潑にセルロースを分解しているにもかかわらずこれをルーメン外にとり出すと活性が極めて微弱となり、これらの研究に対して大きい障壁となつていた。

本研究は、ルーメン内で主要な位置を占めると考えられるセルロース分解菌をルーメンより単離し、その各々について単菌のレベルで菌の有する諸性質を明らかにすると共に、セルロース分解活性がいかなる要因によつて影響されるかを特に化学的因子について解析し、もつてルーメン内におけるセルロース分解菌群の役割を明らかにしようとして行はれたものである。

著者は、ルーメン内容物よりセルロース分解速度の速やかな 8 株の偏性嫌気性菌を単離同定したほかに、従来全く注目されていなかつた通性嫌気性セルロース分解 *Cellulomonas* 属菌 3 株をはじめて単離した。ついでこれらの菌のセルロース分解能と生育に対する栄養要求性、特に炭水化物および窒素化合物の影響について詳細に比較検討したが中でも有機酸類の影響を比較した実験において、コハク酸がセルロース分解活性に重要な関係を有する事実を認められたのは極めて興味ある新知見である。さらに単離した *Cellulomonas* 属菌をコハク酸の存在下で培養することによつて顕著なセルラーゼの生成が行われることを明らかにし、このコハク酸の促進作用がグルコースと拮抗する性質のものであることを確かめた点もコハク酸の作用を考察する上に重要な知見である。

上のようなコハク酸の効果はルーメン菌に特異的に見られ著者はルーメン内のセルロース分解に対し、本研究により新しく分離された *Cellulomonas* 属菌が重要な役割を有するものと推定した。

以上の如く本論文は微生物生理学に対し重要な新知見を加えたのみならず、家畜栄養生理学に対しても寄与する所が多く農学博士の学位を授与する価値あるものと認定する。