研　究　助　成　報　告　書（　中間　・　終了　）　　No.1

整　理　番　号	2023－Ｊ－042	報 告 者 氏 名	Deng Xiao

研究課題名
セルロース分解菌を検出する膜型表面応力センサの開発

<代表研究者>　機関名：物質・材料研究機構　　職名：主任研究員　氏名：Deng Xiao

<共同研究者>　機関名：　　職名：　　氏名：
機関名：　　職名：　　氏名：
機関名：　　職名：　　氏名：
機関名：　　職名：　　氏名：

<研究内容・成果等の要約>

セルロース分解細菌は木造住宅の腐朽と密接に関連するため、本研究は、セルロースを分解する細菌を高感度・簡便に検出することを目的とした。その手法として、分子が感応膜と結合する応力をリアルタイムに検出する膜型表面センサ(Membrane-type Surface stress sensor, MSS)の適用を試みた。これまで、MSS はガス分子の検出に使われてきたが、細菌の検出への応用の報告は皆無であった。MSS をセルロース分解菌あり・なしの電解液に入れたところ、水分子由来のシグナルが非常に大きく出てしまい、検出シグナルに有意な差は見られなかった。セルロース分解菌を懸濁した電解液は酵母抽出物など複雑な成分を含むため、菌体由来シグナルの検出を妨害したと考えられる。当初の目的は達成できなかったものの、MSS を細菌検出に適用する場合には、以下に示すいくつかの課題が見えてきた。（1）シンプルな組成、かつ感応膜との相互作用が極めて低い電解液成分が望ましい。（2）水性電解液を使用するため、疎水性 MSS 感応膜を使用して水由来のシグナルを減らすべきである。（3）感応膜の濡れ性変化に伴う、菌体の感応膜に対する付着特性の変化は要考慮である。（4）MSS センサを溶液に入れて測定することが困難な場合、菌液に入れず、菌体を培養して生じたガス分子を検出するという方法への適用を試すべきである。

＜研究発表（口頭、ポスター、誌上別）＞
該当なし

＜研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）＞

■研究の背景と目的

シロアリは木材の主成分であるセルロースを餌とし、木造建築物の安全性と寿命を大きく損なう害虫である。南極以外すべての大陸に生息しており、世界中で年間 400 億米ドルを超える経済損失を引き起こしている。シロアリは湿度が高く空気の流れが無い床下などの環境に身を隠し、木材を内側から侵食するため、現在一般的に用いられる目視や打音による検査では、被害が深刻化していないと発見が難しい。従って、感度よくシロアリを検出する手法の開発は、建築業界、シロアリ駆除業界で強く求められている。

一方、ここ十数年で急発展してきたメタゲノミクス技術により、シロアリがセルロースを高速で消化する能力の鍵は、シロアリの腸内に共生する極めて特殊な微生物叢にあることが明らかになった。この腸内細菌叢は豊富なセルロース加水分解酵素を有するため、自然界で最も早いセルロース分解速度を持ち、シロアリが摂食するセルロースの 95%を 24 時間以内にグルコース等の可溶性糖質へ変換する。このシロアリ固有の高速セルロース分解菌叢は糞として排出されるため、シロアリの生息場所付近に集積していくと予想される。そこで本研究では、地上にほぼ出ないため発見困難なシロアリ本体ではなく、床下の土や水溜まりなどの環境から高速セルロース分解菌を検出し、これに基づいて新規なシロアリ探知法を構築する。検出方法としては、膜型表面応力センサ（Membrane-type Surface stress Sensor; MSS）を用いる。MSS は、数百 nm 程度のメンブレンに対する分子吸着を、表面応力の変化として感知するシステムであり、高感度かつリアルタイムでの検出が可能である。さらに、MSS の検出素子は小型で持ち運びも容易なため、MSS を利用することで高感度かつ利便性の高いシロアリ検出技術の構築が期待できる。

■研究の経過

(1)目的：本研究は、物理、化学反応などによって生じる微小な表面応力を検出する膜型表面応力センサ MSS を用いて、セルロース分解菌の検出を目指した。

(2)モデル菌株と培養:シロアリの腸内細菌叢に存在する高速セルロース分解細菌のモデル菌株として、シロアリの後腸から単離された厳格嫌気性の Ruminiclostridium cellobioparum subsp. termitidis CT1112 株（DSM No. 5398)を用いた。CT1112 株はセルロース粉末、可溶性セルロース、セロビオースを基質として増殖し、セロビオースを用いた場合に増殖が最も速い。このため、まずセロビオースを基質とした栄養培地(DSM Medium 539)を用いて、CT1112 株を 48 時間嫌気培養し、指数増加フェーズの細胞を得た（**図1**）。

その後、厳格な嫌気性細菌である CT1112 の代謝活性を保つため、菌体懸濁液を 100%窒素が充満した嫌気チャンバー内へ移し、以降すべての操作を嫌気チャンバー内で実施した。

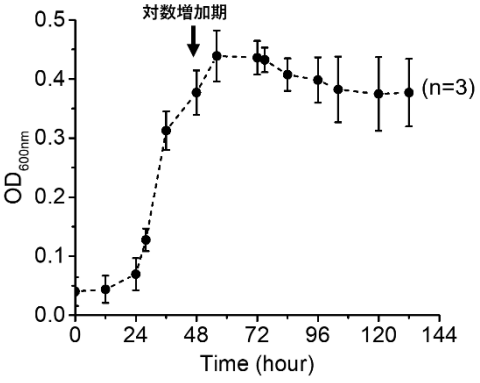

図 1. セロビオースを基質として使用する場合の CT1112 株の増殖曲線。48 時間培養した菌体を実験に使用した。

(3)MSS センサでの測定:MSS チップを嫌気チャンバー内へ移し、温度の変動に敏感な MSS センサのベースライン安定化を図るため、96 ウェルプレート内で菌体を含まない無菌培地(DSM Medium 539, 150 μL)に、MSS チップの感応膜(分子吸着が生じる部分)を浸漬した。その後 1 時間以上測定を行い、温度の平衡化により安定したベースラインシグナルが得られた後、指数増加フェーズの CT1112 株の細胞懸濁液(50 μL)または無菌培地(50 μL)を各ウェル内へ添加し、MSS 感応膜上で生じる応力変化を測定した。

親水性の電極（酸化インジウム錫、ITO）を用いて CT1112 株を検出する実験結果から、CT1112 は固体表面上に添加した後数分以内に固体表面に付着する能力を持つことが分かっている（**図2**)。そのため、同じように親水性を持つ MSS の感応膜上にも数分以内に菌体が付着すると予想していた。

しかし、菌体の添加に伴うシグナル変動はわずかであり、無菌培地を添加した場合と比較しても有意な差は見られなかった（**図3**）。

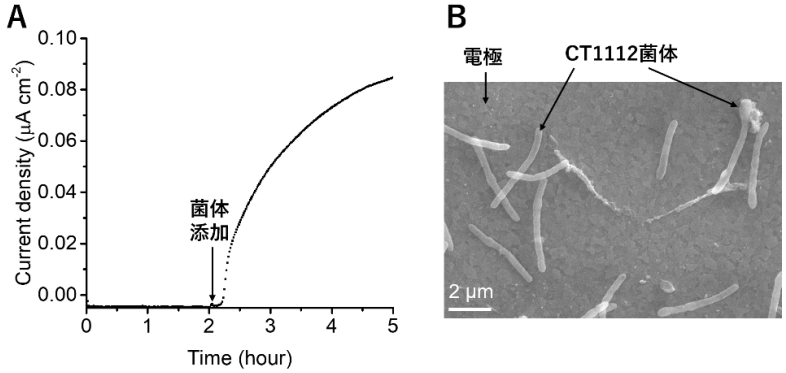

図 2. (A) CT1112 株を ITO 電極上へ添加した際に生じた電気シグナル。電流密度を測定する間隔は１分間隔。(B)電気シグナルが検出された電極表面に付着した CT1112 の走査電子顕微鏡図。

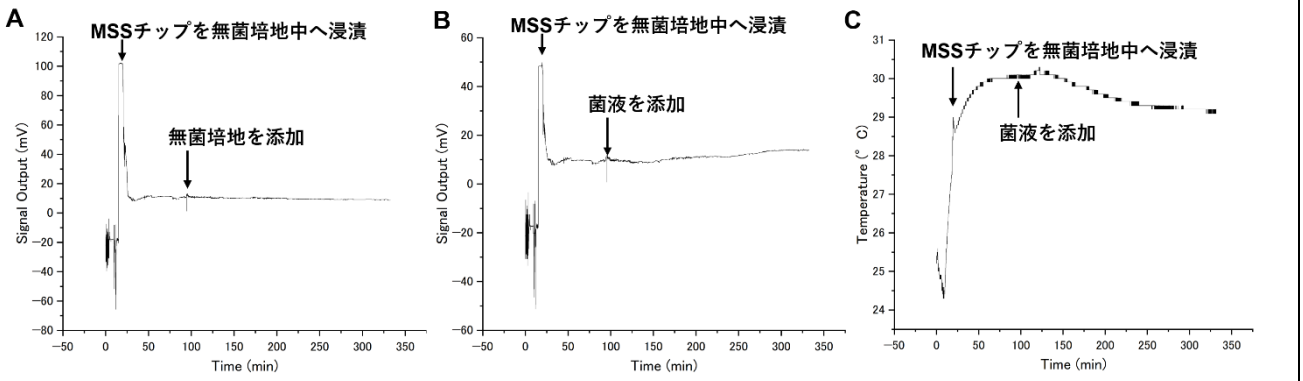

図 3. 電解液添加（A）または菌液添加（B）による MSS センサで生じるシグナルの差。嫌気チャンバー内で測定開始後、及び最初に MSS チップを無菌培地へ入れる際は温度の変動（C）の影響を受けるため、シグナルに大きなノイズが入っている。

(4)考察:菌体は MSS 感応膜上で複雑な機械的、化学的、生物的、電気化学的応力を生じると予想されるが、実際は菌体を添加してもシグナルに有意な差が見られなかった。様々な原因が考えられるが、最大の原因としては、無菌培地中の水分子に由来する応力、及び複雑な培地成分により生じる応力を、感応膜が圧倒的に強く拾っていたことが考えられる。従って、現状の MSS センサは、菌体懸濁液中へ浸して使用するには適していないという結論となった。

(5)展望:MSS を液体に浸して使用する場合、感応膜に超疎水性コーティングを行う検討は必須である。しかし、その場合菌体が感応膜へ付着しづらくなると予想されるため、検出感度に不利な影響を与える可能性がある。また、CT1112 を含む細菌の培養液には酵母抽出物など複雑な成分が含まれているため、MSS 感応膜上で複雑な相互作用が生じてしまい、細菌由来のシグナルの検出を妨害していると予想される。従って、菌体懸濁液成分をできるだけシンプルにする必要がある。ただし、環境水・土壌などの実サンプルには遥かに複雑な成分が含まれており、それらの除去不可能なため、それらを含む液体内へ MSS センサを入れて利用するのは困難だと予想される。一方で、セルロース分解細菌はセルロースを含む基質を体外でグルコースへ加水分解した後、グルコースを体内へ取り込み、乳酸、ギ酸、水素、二酸化炭素などへ発酵する。従って、セルロースを基質として提供する場合、セルロース分解菌を含む場合は、含まない場合と比較して、特殊な揮発性成分を作り出す速度と割合は、セルロース分解菌が存在しない場合と差が生じる可能性がある。従って、菌液サンプルまたは環境サンプルの場合は、MSS センサをサンプル中へ直接浸たすのではなく、培養容器のヘッドスペースに設置し、ガスフェーズを測定することで、非セルロース分解菌を培養した場合との差を比較する検討を試みるべきである。