ISSN 0919-0023

鹿児島科学研究所研究報告

Bulletin of the Kagoshima Science Scholarship Foundation

No. 20

２０１０

財団法人　鹿児島科学研究所

The Kagoshima Science Scholarship Foundation

ま　え　が　き

当財団法人では、鹿児島県内の産業振興に寄与するための科学的研究で、とくに化学またはバイオに関する研究に対して、毎年助成を行っております。

この「鹿児島科学研究所研究報告」第２０号は、当財団法人が平成２１年度に助成を行った研究の成果を収録したものであります。

平成２２年７月

財団法人　鹿児島科学研究所

理 事 長　福　谷　　明

目　　次

１．*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AtMT)法による
サンセベリア炭疽病菌への遺伝子導入の確立ならびに病原性変異株の作出
・・・・・・・・・・・・・・・・1
鹿児島大学農学部生物生産学科植物病理学研究室
中村　正幸・桑原　秀仁・小野山　佳佑・岩井　久

２．竹のセルロース分離とグルコース化
・・・・・・・・・・・・・・・１１
鹿児島大学大学院理工学研究科
下茂　徹朗

３．奄美大島紬廃液のキノコ栽培への利用
・・・・・・・・・・・・・・・１７
鹿児島大学農学部生物資源化学科
八木　史郎

４．全物質を対象に無限大感度を目指す光干渉化学センサーの開発
・・・・・・・・・・・・・・・２３
鹿児島大学大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻
吉留　俊史

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation（AtMT）法による

サンセベリア炭疽病菌への遺伝子導入の確立ならびに病原性変異株の作出

中村 正幸・桑原 秀仁・小野山 佳佑・岩井　久

鹿児島大学農学部生物生産学科植物病理学研究室
〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24
TEL：099-285-8683

要旨

植物病原菌の病原性因子を特定する際、遺伝子タギング法が用いられる。本実験では、*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AtMT) 法によるサンセベリア炭疽病菌（*Colletotrichum sansevieriae*）への遺伝子導入の確立ならびに病原性破壊株の作出を行った。
まず、pCAMBIA0380 をベースに、T-DNA 領域内にハイグロマイシン耐性遺伝子の挿入を行い、バイナリベクターpCAMBIA-HPH を作成した。*A. tumefaciens* の系統には、LBA4404、GV3101::pMP90、GV2260 を用いた。その結果、サンセベリア炭疽病菌の分生子濃度は、10^6/ml、*A. tumefaciens* の系統は GV2260、同時培養(感染)の温度は、24℃が最適条件であることが分かった。AtMT 法で得た形質転換体 1,048 株をサンセベリア葉に接種したところ、病原性が認められない変異株を 6 株、病原性が低下した株を 3 株得ることができた。破壊された遺伝子を TAIL-PCR で増幅した結果、未知遺伝子 2 つと Epoxide hydrolase および Glycosyltransferase 遺伝子に相同性を示す遺伝子が見出された。

1. 緒言

1996 年に鹿児島県与論町の栽培農家でサンセベリアに炭疽病症状の発生が認められ、枯死する症状を呈し、大きな被害をもたらした。宿主範囲試験や分子系統解析などから、新種の炭疽病菌であることが判明し、サンセベリア炭疽病菌（*Colletotrichum sansevieriae*）と命名された [10)]。本病原菌はサンセベリア属の植物のみに病原性を示し、非常に高い宿主特異性を有している。

近年、いくつかの植物病原糸状菌において病原性因子が決定されており、*Alternaria* 属菌などに見られる宿主特異的毒素(AM、AK 毒素など)はその代表である [4,16)]。その他、侵入器官形成遺伝子(ハイドロフォービン、メラニン合成酵素など)や、解毒酵素遺伝子(ピサンチン脱メチル酵素、アベナシン分解酵素など)、加水分解酵素遺伝子(クチナーゼ、ペクチナーゼなど)などがクローニングされ、病原性に関わっていることが明らかになっている [7,14)]。これら病原性因子の中には、宿主特異的毒素や解毒酵素のように病原性かつ宿主特異性の両方を担っているものと、侵入器官のように病原性発揮（付着器形成から侵入）のみに関わっているものがある。

炭疽病菌の中には多くの種が存在し、宿主特異性の高いものが多く存在する。病原性因子としてすでに炭疽病菌では、侵入器官形成遺伝子である脂肪酸代謝関連遺伝子やメラニン合成関連遺伝子、そのほかに植物防御応答感受性因子などが知られている [3,11)]。侵入器官形成遺伝子は、いもち病菌

（*Magnaporthe grisea*）でも認められており、属を超えて共通の病原性因子であり、これは宿主特異性を決定している因子ではない。また、植物防御応答感受性因子は植物の防御応答因子である PR－タンパクに耐性を示す因子で、宿主特異性を担っている可能性はあるが、まだ明らかになっていない。このように、炭疽病菌の宿主範囲を決定する因子は未だクローニングされていない。

そこで、本研究では、サンセベリア炭疽病菌の宿主特異性決定因子の探索を行うにあたって、遺伝子タギング法である、*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AtMT) 法の確立を目指した。

2. 材料と方法

2.1 菌株およびプラスミド

C. sansevieriae は、当研究室で 1996 年に分離された、Sa-1-2 株を使用した。*A. tumefaciens* は、LBA4404、GV3101::pMP90、GV2260 の 3 系統を用いた。プラスミドは、ハイグロマイシン耐性遺伝子を保持した pAN-Blue [9,13]とバイナリベクターのベースである pCAMBIA0380 を用いた。プラスミドの増幅には、*Epicurian coli* XL1-Blue を用いた。

2.2 *A. tumefaciens* の調整

Mullins et al. (2001) [8]と Flowers and Vaillancourt (2005) [2]の方法を一部改良して行った。

2.3 *C. sansevieriae* Sa-1-2 株の調整

PSA 平面培地で培養して得られた *C. sansevieriae* Sa-1-2 の分生子を滅菌水 1ml に懸濁し、血球計測板を用いて分生子数を 10^6 個/ml に調整した。

2.4 AtMT 法による形質転換

IM 液体培地で培養した *A. tumefaciens* 調整液 5ml と *C. sansevieriae* Sa-1-2 の分生子懸濁液 1ml からなる混合液を、あらかじめ用意しておいたアセトシリンゴン 200μM と MES 40mM を含んだろ紙を乗せた I M 培地に 200μl ずつ塗布し、24℃、3 日間同時培養した。その後、ハイグロマイシン B（50μg/ml）と Cefotaxime Sodium Salt（200μmol）を含む PDA 平面培地にろ紙を移し、さらに 28℃、1 週間培養し、形質転換体の選抜を行った。

2.5 形質転換体の接種試験

形質転換体の接種試験は、ハイグロマイシン B（50μg/ml）と Cefotaxime Sodium Salt（200μmol）を含む PDA 平面培地上に出現したコロニーを、ハイグロマイシン B（50μg/ml）を含む新たな PDA 平面培地に移植し、これをもう一度行い、正常に生育した形質転換体を用いて行った。サンセベリアの切り取り葉を約 3cm 角に切り分け、70％ エタノールで殺菌し、木綿針 10 本束で傷をつけた有傷部位に直径 6mm のコルクボーラーで培地ごと打ち抜いた菌叢片を置床した。接種部位は、滅菌水を含ませた脱脂綿で覆い、25℃で維持した。発病状況は 10 日目に観察し、形質転換体の病原性の有無を調べた。

2.6 Polymerase chain reaction (PCR)

菌体からの DNA 抽出は、常法で行った。形質転換体の遺伝子導入の確認は、ハイグロマイシン耐性遺伝子を基に設計したプライマー5'-HPH（5'-CGTCTGTCGAGAAGTTTCTG-3'）と、3'-HPH（5'-TTGCCGTCAACCAAGCTCTG-3'）を用いて PCR を行った。

Thermal Asymmetric Inter Laced (TAIL)-PCR は、Liu and Whittier (1995)の方法 [6]を一部改良して行った。使用した特異的プライマーと任意プライマーは、Table 1 に示した。

2.7 シークエンシング

PCR 増幅断片は、pT7Blue を用いクローニング後、Big Dye Terminator Ver.3.1（Applied Biosystems）を用いたサイクルシークエンシング反応を行った。サンプルは、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を使用して塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列データは、GENETYX Network version 9.1.0（GENETYX CORP.）を使用して解析を行った。

Table 1　Specific and arbitrarily primers used in TAIL-PCR

Primer	nucleotide sequences
HPH1	5'-CGCGTTTTCGGGTTTACCTCTTC-3'
HPH2	5'-GAGATCAAGCAGATCAACGGTCG-3'
HPH3	5'-CCTGGGTTCGCAAAGATAATTGC-3'
NOS1	5'-CACCACCACCACGTGTGAATTAC-3'
NOS2	5'-CAGGTGACCAGCTCGAATTTCCC-3'
NOS3	5'-ATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATG-3'
AD1	5'-NGTCGASWGANAWGAA-3'
AD2	5'-GTNCGASWCANAWGTT-3'
AD3	5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'

(S=G or C, W=A or T, N=A, T, C or G)

3. 結果

3.1 バイナリベクターの構築

pCAMBIA0380 をベースにバイナリベクターを構築した。まず、pAN-Blue から *hph* 遺伝子を含む *Kpn*I-*Cla*I 断片(3,657 bp)を切り出し、平滑化したものを *Sma*I 処理後、脱リン酸化した pCAMBIA0380 に連結した。得られたプラスミドを pCAMBIA-HPH とした(Fig. 1)。

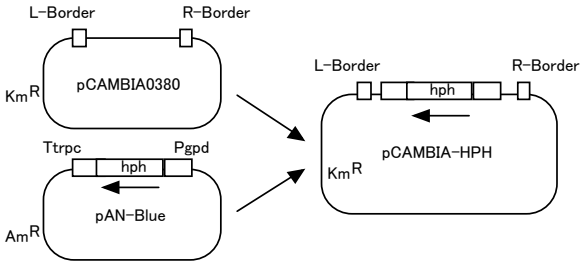


Fig. 1 Construction of pCAMBIA-HPH

3.2 *A. tumefaciens* 系統間における出現した形質転換体数の比較

LBA4404 株、GV3101::pMP90 株、GV2260 株を用いて、*C. sansevieriae* Sa-1-2 の形質転換を試みた。Mullins et al. (2001)の方法で調整した場合、LBA4404 株では形質転換体は得られなかった。しかし、GV3101::pMP90 株と GV2260 株では形質転換体が、それぞれ約 100 株と 300 株得られた(Table 2)。

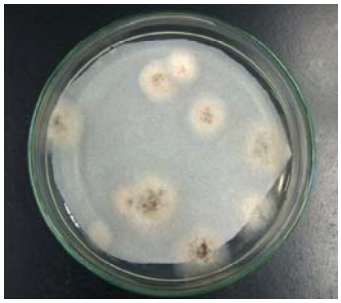


Fig. 2 Transformants grown on selective medium.

またより簡便な調整法である Flowers and Vaillancourt (2005)の方法でも、GV2260 を用いた場合、約 280 株の形質転換体を得ることができ、Mullins et al. (2001)の方法と効率が同程度であった。*A. tumefacien* と *C. sansevieriae* の共培養は、24℃が最適であることが分かった(データは示していない)。形質転換体のコロニーの様子を Fig. 2 に示した。

Table 2　Numbers of transformants produced by different strains of *A. tumefacience*

	Numbers of transformants		
Preparation of *A.tumefaciens*	AL4404	MP90	GV2260
Mullins et al. (2001)	0	100	300
Flowers and Vaillancourt (2005)	N	N	280

N: No experiment is done.

3.3 形質転換体における導入遺伝子の確認

無作為に選んだ形質転換体のゲノム DNA を抽出し、ゲノム DNA 内にハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれているか確認するため、マーカー遺伝子 *hph* 遺伝子に設計したプライマーを用い、PCR を行った。その結果、選んだ形質転換体全てにおいて、ハイグロマイシン耐性遺伝子の組み込みを確認することができた（Fig. 3）。

Fig. 3 Confirmation of *hph*-gene insertion by PCR.
Transformants were randomly chosen (lanes 1~7).

3.4 非病原性株のスクリーニング

ハイグロマイシン B を含む選択培地上に出現したコロニーを、新たな PDA 平面培地に移植し、正常に生育した形質転換体を接種試験に用いた。形質転換体 1,048 株の接種試験を 2 回反復し、病原性を消失した株を 6 株(M109、M154、M687、M850、M875、M877)、病原性が低下した株を 3 株(M919、M920、M923)得た。

3.5 TAIL-PCR による破壊遺伝子の増幅

特異的プライマーと任意プライマーを使用し(Table 1)、病原性変異株のゲノム DNA 内に挿入された T-DNA 領域に隣接する未知 DNA 配列の増幅を行った。その結果、M109、M154、M687、M850 株から、増幅産物が得られた。それ以外の株からは、明瞭な増幅産物は得られなかった(データは示していない)。

3.6 破壊遺伝子のシークエンシング

TAIL-PCR により増幅さられた断片のシークエンシングを行った。その結果、未知遺伝子 2 つと Epoxide hydrolase（EH）および Glycosyltransferase（GT）と相同性を示す遺伝子が見出された。EH は、*Aspergillus niger* の EH（Q1KTB5）と相同性を示し（Fig. 4）、GT は、*A. fumigatus* の alpha-1,3-glucan synthase Ags2（Q4X143）と相同性を示した（Fig. 5）。

```
Sa  CRRCLWQIVQDQIHLSILRLSAKPYALPIILLHGCPGSAVEFIPVLGLIRQQVSPTTSSFL
An  FPQFTYGIEGQTIHFVAL-FSEKKDAIPIVLLHGWPGSFLEFLPVLTSIRDKYSPETLPYH
         *    **   *  * *  * ** **** ****  ** ***  **   ** *
Sa  ISLDSDTRHACRTTWTSTTKITPESCPRCTVASPPKMAAIAKVVTLAR
An  IVVPSLPGYTFSSGPPLDVNFNGEDTARVINKVMLNLGFEDGYVAQGG
    *   *                  *   *
```

Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of Epoxide hydrolases from *Aspergillus niger* (An) and *C. sansevieriae* (Sa).

```
Sa  QANVKMDCDAFKNVITFXSDXDDKSVPSIDENSIKCSDISERVSDLTGALPSVWSWKANL
Af  YFSAEMDCDSVTKSITLNSTTESGKTPSVDSKSASCRKIPATDTQWTGQLPNVWVWTGKL
         ****     **  *      ** *  *  *  *      ** ** ** *   *

Sa  VNVKHGVHRVSVTNATVDSGNTTTAAADHFLFRIGARNNPLIFSATANYSTTLLSRSDDG
Af  TGVYNGIHRLTVTNASDSAGTSATNAIDHFLFRVGQSDNPMVF-TSANYSSSLLHEHENG
      *  * **  ****   *   * * ****** *   **  *   ****  **    *

Sa  TLKIKHSAAGATKFRYSTNFQSSWSDWADY-ETETVVKKQPWSGTKEQAWKGEHIIVQYW
Af  TLFIQHHAAGADKYRYSTNWGSSFSDWMDYKGGNETIEELPWSGTEKQKWQGKHVRVEYW
    ** * * **** * *****  ** *** **         *****  * * * *  * **

Sa  SKLLGSSAYMAHGDVDYDI--PRRIPHMFAVGKFNEFGYDSGLTKSLKHTGPSMWEWHYM
Af  SKLTGSSDYVQEGDSGWDSNRPRRFPHLFFNGPYNQYGYDAGLDNAVQLGDDGLWRFRFV
    *** *** *   **   *   *** ** *  *  *  *** **          *

Sa  DEWPNYFKFNVWGMNPDKMPDHSFVYGDVDGDSVAERLPPSSLYTNAINITMQVAPKKPY
Af  AEWPAQGQFNVWGINPDGQPDQSFVFGDADMDGVLDRMPPSSLSTTLINITDH--PPAPH
     ***    ***** ***  ** *** ** * * *  * ***** *  ****    *  *
```

Fig. 5 Alignment of amino acid sequences of Glycosyltranferases from *A. fumigatus* (Af) and *C. sansevieriae* (Sa).

4. 考察

本研究では、元来植物の形質転換に用いられる AtMT 法によるサンセベリア炭疽病菌への遺伝子導入の確立ならびに病原性変異株の作出を行った。

共培養する際の *A. tumefaciens* は、LBA4404 株を使用した場合、形質転換体は全く得られなかった。これは、LBA4404 株が植物においても元々感染力が弱く、本菌に感染出来なかったことが原因だと考えられる。そこで、新たな系統 GV3101::pMP90 株と GV2260 株を使用して AtMT 法に行ったところ、一度の形質転換で大量の形質転換体が得られた。この結果から、形質転換に用いる *A. tumefaciens* の系統や Ti プラスミドの違いが形質転換効率に深く関わっていることが示唆された。今回の実験では、*A. tumefaciens* GV2260 株がサンセベリア炭疽病菌の形質転換に最も適していることが分かった。

A. tumefaciens GV2260 株の調整法においては、Mullins *et al*.(2001)の方法を一部改変した方法で調整をした場合、調整に 3 日間必要であり、また、MM 液体培地などの調整に使用する培地の量が多いなど問題点があった。そこで、Flowers and Vaillancourt(2005)の方法を試みた。この方法は、2 日間で *A. tumefaciens* の調整が可能となり、使用する培地の量も少なく効率的かつ経済的な方法である。この 2 つの方法を比較した結果、後者は前者とほぼ同数の形質転換体を一度の形質転換で得られ、作業もより簡便であった。

次に、共培養の条件では、GV2260 株の濃度を OD_{660}=0.28~0.35 にし、サンセベリア炭疽病菌の分生子を 10^6 個/ml 使用することで多くの形質転換体を得ることができた。さらに、培養温度に関しては、24℃を上回っても下回っても形質転換効率が落ちる傾向にあった。

今回確立した AtMT 法で得られた 1,048 株の形質転換体において、すべて接種試験を行った結果、病原性が認められない変異株を 6 株、病原性が低下した株を 3 株得た。病原性変異株のゲノム DNA 内にハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることを確認し、挿入された T-DNA 領域に隣接する未知 DNA 配列を TAIL-PCR で増幅し、塩基配列を決定したところ、未知遺伝子 2 つと epoxide hydrolase（EH）および glycosyltransferase（GT）と相同性を示す遺伝子が見出された。EH は、加水分解酵素の一種で、エポキシドを開環し、ジオール体を生成する酵素であり、加水分解の際に触媒作用を示し、薬物代謝の過程で解毒作用として機能する働きがある。*Sansevieria ehrenbergii* の抽出物には高い抗真菌性を示すという報告や [1)]、*S. ehrenbergii* から数種類のサポニンが分離され、これらは *Cryptococcus neoformans* などの人間に感染する真菌に対して抗菌性を示すという報告がある [12)]。これらの報告から、*S. trifasciata* にも何らかの抗真菌性化合物がある可能性が考えられる。サンセベリア炭疽病菌は、サンセベリアが有する抗菌性化合物を本菌の EH が加水分解し、解毒化することによりサンセベリアに感染可能となるのかもしれない。

一方、GT は糖転移酵素の一種で、生体内における糖鎖の生合成に重要な働きを有する酵素で、糖タンパク質のグリコシル結合に関わっている。Kim *et al*.（2002）は、*Saccharomyces cerevisiae* などの sterol glycosyl transferase と相同性を示す、*C. gloeosporioides* のタンパク質 CHIP6（AF001285）をコードしている *chip6* 遺伝子を破壊すると著しく病原力が低下することを報告している [5)]。また、Sweigard *et al*.（1998）は、*Magnaporthe grisea* の機能が明らかになっていない *pth8* 遺伝子に挿入突然変異を起こすと病原性が低下し、この *pth8* 遺伝子がコードしているタンパク質（AF370013）は酵母や *C. gloeosporioides*、および他の糸状菌由来の sterol glycosyl transferase と相同性を示すと報告

している[15]。これらの報告は、sterol glycosyl transferase が病原性に関連しているタンパク質であることを強く示唆している。したがって、本菌も GT が破壊されたことで病原性を失ったことが考えられる。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究費助成をしていただいた財団法人鹿児島科学研究所に厚く御礼申し上げる。また、鹿児島大学農学部清水圭一博士より、pCAMBIA0380 と *A. tumefaciens* LBA4404 株を、Gent 大学 Inze 博士より、GV2260 株および GV3101::pMP90 株を分譲していただいた。

6. 引用文献

1. Al-Fatimi M, Wurster M, Schrder G, Lindquist U（2007）Antioxidant, antimicrobial and cytotoxicactivities of selected medicinal plants from Yemen. J Ethnopharm 111: 657-666
2. Flowers JL, Vaillancourt LJ（2005）Parameters affecting the efficiency of Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Colletotrichum graminicola. Curr Genet 48: 380-388
3. Foster AJ, Jenkinson JM, Talbot NJ (2003) Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by Magnaporthe grisea. EMBO J 22:225-235
4. Johnson RD, Johnson L, Itoh Y, et al (2000) Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from Alternaria alternata apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. Mol Plant Microb Interact 13:724-753
5. Kim YK, Wang Y, Liu Z, Kolattukudy PE（2002）Identification of a hard surface contact-induced gene in Colletotrichum gloeosporioides conidia as a sterol glycosyl transferase a novel fungal virulence factor. The Plant J 30:177-187
6. Liu YG, Whittier RF（1995）Thermal Asymmetric Interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insertend fragment from P1 and YAC clones for chromosome walking. Genomics 25: 674-681
7. Miyari K, Okuno T, Sawai K (1985) Purification and properties of endpolygalacturonase I from Stereum purpureum, a factor inducing silver-leaf symptom on apple trees. Agric Biol Chem 49:1111-1118
8. Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S（2001）Agrobacterium-mediated transformation of Fusarium oxysporum: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. Phytopathology 91:173-180.
9. Nakamura M, Iwai H, Arai K (2003) Polygalacturonase S31PG1 from Geotrichum candidum citrus race S31 expressed in Schizosaccharomyces pombe versus S31PG2 regarding soft rot on lemon fruit. J Gen Plant Pathol 69:283-291
10. Nakamura M, Ohzono M, Iwai H, Arai K （2006） Anthracnose of Sansevieria trifasciata caused by Colletotrichum sansevieriae sp. nov. J GenPlant Pathol 72: 253-256
11. Perpetua NS, Kubo Y, Takano Y, et al (1996) Cloning and characterization of a melanin biosynthetic THR1 reductase gene essential for appressorial penetration of Colletotrichum

lagenarium. Mol Plant Microb Interact 9:323-329

12. Pettit GR, Zhang QW, Pinilla V, Hoffmann H, Knight JC, Doubek DL, Chapuis JC, Pettit RK, Schmidt JM（2005）Antineoplastic Agents. 534. Isolation and Structure of Sansevistatins 1 and 2 from the African Sansevieria ehrenbergii. J Natural Products 68:729-733
13. Punt PJ, Oliver RP, Dingemanse MA, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ（1987）. Transformation of Aspergillus based on the hygromycin B resistance marker from Escherichia coli. Gene 56: 117-124
14. Shieh M, Brown RL, Whitehead MP, et al (1997) Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of Aspergillus flavus in cotton bolls. Appl Environ Microbiol 63:3548-3552
15. Sweigard JA, Carroll AM, Farrall L, Chumley FG, Valent B（1998）Magnaporthe grisea pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. Mol Plant Microb Interact 11: 404-412
16. Tanaka A, Shiotani H, Yamamoto M, et al (1999) Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of Alternaria alternata. Mol Plant Microb Interact 12:691-702

An optimized *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AtMT) method for *Colletotrichum sansevieriae*

Masayuki Nakamura・Hidehito Kuwahara・Keiskuke Onoyama・Hisashi Iwai
Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

Abstract

In the era of functional genomics, the need for tools to perform large-scale targeted and random mutagenesis is increasing. A potential tool is *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AtMT) method. In this work, we established an optimized AtMT method for *Colletotrichum sansevieriae* that causes anthracnose specifically on sansevieria plants. Optimized co-cultivation was performed at 24℃ in a medium containing 200 Mμ acetosyringone. The most compatible strain of *A. tumefaciens* was GV2260. Out of 1,048 transformants, we obtained 6 isolates that lost full virulence and 3 isolates that reduced virulence. Disrupted genes were sequenced and two of them showed homology to epoxide hydrolase and glycosyltransferase genes, respectively. These results indicate that the AtMT method is well suited to perform insertional mutagenesis in *C. sansevieriae*.

竹のセルロース分離とグルコース化

下茂 徹朗

鹿児島大学大学院理工学研究科
〒890-0065　鹿児島市郡元 1-21-40
TEL：099-285-8331

要旨

本研究は、バイオマス資源として注目を集めている竹の有効利用を目的として竹のグルコース化を検討した。まず、竹の主成分のうちリグニン(約 25%)とヘミセルロース(約 25%)をアルカリ処理によって溶解、除去し、セルロース(約 50%)を抽出した。抽出したセルロースの加水分解反応では、セルロースはほとんど分解しなかった。そこで、抽出したセルロースを酢酸セルロースに誘導して、加水分解反応を検討した結果、穏和な条件で選択的にグルコースを得ることができた。

1. 緒言

近年、バイオマスを含めた再生可能な資源とエネルギーに係る技術開発、産業化が推進されており、特にバイオマスの総合的な利活用が課題となっている。バイオマスとは、生物資源（bio）の量（mass）を表す概念であり、再生可能な、生物由来の有機性資源で化石資源を除いたものと定義付けられている。バイオマスは、化石資源由来のエネルギーや原料の代替として利用可能なため、化石資源の枯渇抑制や化石資源利用によって発生する温室効果ガスの抑制にも期待されている。

現在はバイオマスの利用の一つとしてトウモロコシやサトウキビのような食用可能な植物原料からのグルコースの製造が実用化されている。しかし、人口増加による食糧不足への危惧から、草・木・古紙等の食用としない植物原料からの有効利用が求められている。

バイオマス資源には、林業系廃棄物、農業副産物、畜産廃棄物、生物資源由来の廃棄物、そして植物、樹木が挙げられる。樹木は数多くの化学成分が集まってできており、この中の「セルロース」「ヘミセルロース」「リグニン」は主要化学成分と呼ばれ、樹木の幹部分では、この 3 つが全成分の約 95%を占めている。セルロースは樹木に約 50%程含まれており、ヘミセルロースは 20～30%リグニンは 20～30%含まれている [1-3]。

鹿児島県は全国一の竹材面積を有しており、荒れた竹林が問題視されている。一方で竹を木質系バイオマスとして捉え、積極的に有効利用しようという試みも活発化している。竹の乾燥重量の約 50%はグルコースポリマーであるセルロースからなり [4,5]、これ

をグルコースに分解することによってバイオエタノール等の有用な物質に転換することが可能になる [6,7]。ただし、セルロースは、グルコースが β-1,4 結合した結晶性の繊維を形成するため、同じグルコースポリマーである α-1,4 結合のデンプンと比較すると、極めて安定なポリマーであり、その分解が困難である。したがって、竹をバイオエタノール等に有効利用するためには、セルロースの効率的なグルコース化が大きな課題となっている。本研究では竹の有効利用を目的として竹からグルコースの生成を検討した。

2. 実験

2.1 竹粉のアルカリ処理

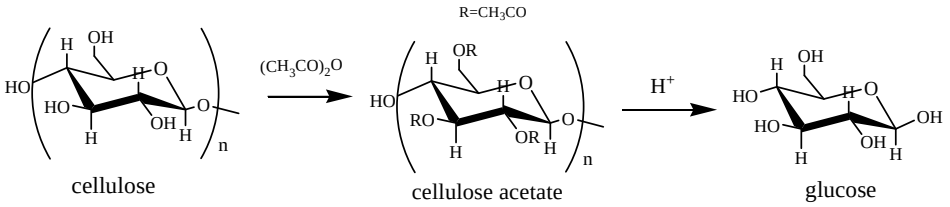
リグニン、ヘミセルロースを除去しセルロースを抽出するためにアルカリ処理を検討した。アルカリには、灰汁、1, 3, 4%NaOH 溶液を用いて比較実験を行った。さらに竹の粉砕条件をより厳しいものにし、反応表面積を大きくすることでアルカリ処理効果の増大を狙った。セルロースの生成は X 線回折、FT-IR によって確認した。

2.2. 竹セルロースの酸加水分解

3%NaOH 処理後の竹粉 0.50 g にトリフルオロ酢酸 5.0g,蒸留水 45.0g を加え窒素雰囲 100℃、48h 還流を行った。その後濾過によって沈殿物側と濾液側に分け濾液側を減圧濃縮、生成物を ^{1}H-NMR によって構造解析を行った。

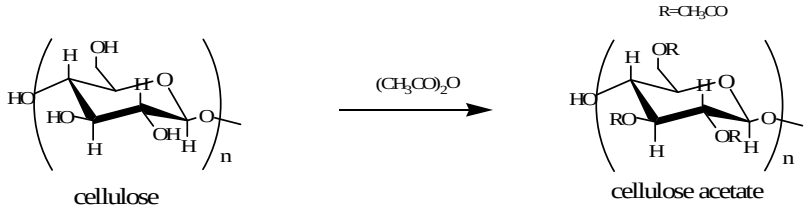
2.3 竹セルロースから酢酸セルロースを経た加水分解

反応式を下式に示す。次に各反応ごとに述べる。



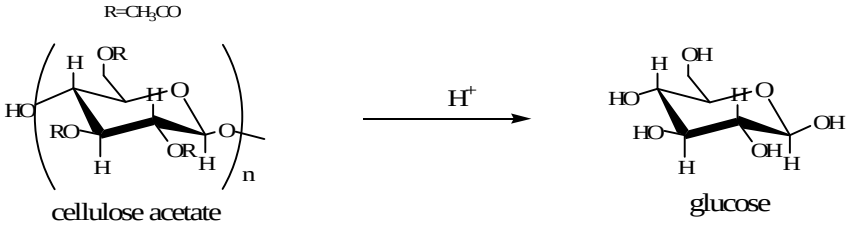
2.3.1 酢酸セルロースの調製

竹セルロース 2.0g にエステル化誘導試薬として無水酢酸 10.0g、溶媒として酢酸 36.0g、触媒として硫酸 0.42g を加えバス温度 80℃で 1.5h 撹拌を行った。反応終了後、この溶液に大量の蒸留水を投入し再沈殿を行い、吸引ろ過により回収した生成物を十分に洗浄、減圧乾燥し灰白色固体 2.9g を得た。得られた生成物の構造解析は ^{1}H-NMR により行った。



2.3.2 酢酸セルロースの酸加水分解

2.3.1 で調製した酢酸セルロース 0.50g にトリフルオロ酢酸 5.0g,蒸留水 45.0g を加え窒囲気下で 100℃、48h 還流を行った。その後濾過によって沈殿物側と濾液側に分け濾液側を減圧濃縮、生成物を ^{1}H-NMR によって構造解析を行った。



3. 結果と考察

3.1 竹のアルカリ処理

灰汁および 1～4%NaOH 溶液を用いた各アルカリ処理の重量減少の結果を Table1 に示す。なお、NaOH 処理は 3 回行い、重量減少量はその平均値を用いた。

Table1　Weight decrease by alkali treatment

Alkali condition	Lye	1%NaOH	3%NaOH	4%NaOH
Weight decrease	8%	22.8%	34.0%	35.5%

NaOH によるアルカリ処理は 1%溶液ではリグニン、ヘミセルロースの除去は不十分であった。また 3%と 4%溶液の処理による重量減少の差はあまり見られなかった。
一方、灰汁によるアルカリ処理の効果は低かった。その原因としては、灰汁は有機酸、ポリフェノール類、タンパク質など様々な成分を含んでいるためだと考えられる。
次に、粉砕条件をさらに厳しい条件にし、アルカリ処理を行った。重量減少の結果を Table2 に示す。

Table2　Weight decrease by alkali treatment

Alkali condition	3%NaOH (0.350mm<bamboo<1.41mm)	3%NaOH (bamboo<0.250mm)
Weight decrease	32.0%	43%

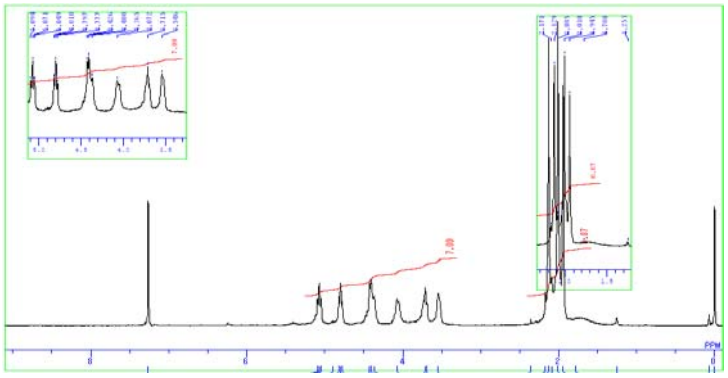
3.2. 竹セルロースの酸加水分解

竹セルロースを比較的低濃度のトリフルオロ酢酸によって酸加水分解を検討したが、セルロースはほとんど分解せず、グルコースの生成は確認されなかった。

3.3 竹セルロースから酢酸セルロースを経た酸加水分解

3.3.1 酢酸セルロース調製

竹セルロースを穏和な条件で糖化するために、酢酸セルロースを経た酸加水分解を検討した。まず、セルロース 2.0g を無水酢酸 10.0g、酢酸 36.0g、硫酸 0.42g を用いてアセチル化することによって置換度約 3 の酢酸セルロース 2.9g を得た(収率 86%)。^{1}H-NMR による結果を Fig.1 に示す。^{1}H-NMR 結果より、アセチル基由来の 3 つのメチルプロトンと AGU の 7 つのメチンプロトンがみられ、酢酸セルロースの生成が確認できた。



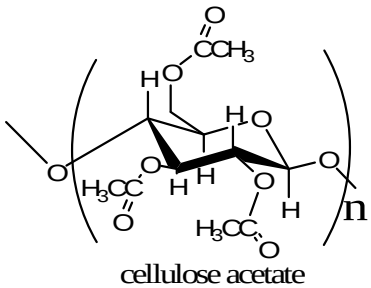
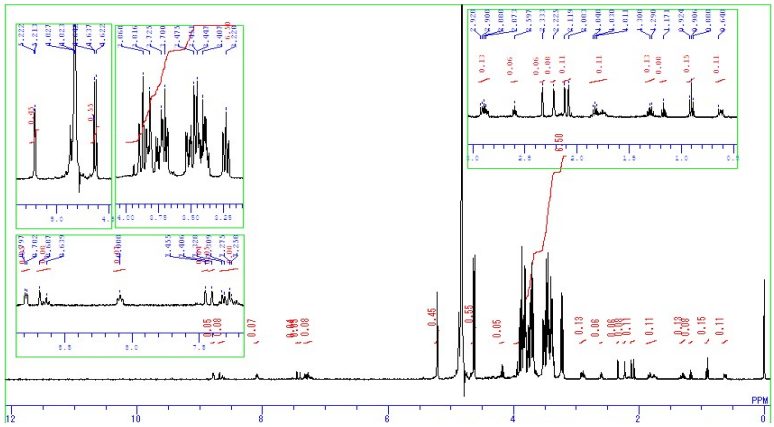


Fig.1 ^{1}H-NMR spectrum of cellulose acetate obtained from bamboo($CDCl_3$)

3.3.2 酢酸セルロースの酸加水分解

調製した酢酸セルロース 0.5g をトリフルオロ酢酸(5.0g)を用いて酸加水分解を行い、グルコース 0.3g を得た(収率 85%)。 ^{1}H-NMR による結果を Fig.2 に示す。



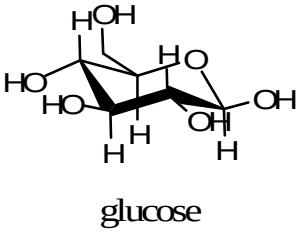


Fig.2 ^{1}H-NMR spectrum of glucose obtained from bamboo(D_2O)

竹から抽出したセルロースを酢酸セルロースに誘導して加水分解反応を行うことにより、糖化率は大幅に上昇した。またセルロースの二次分解物である、フルフラール類やレブリン酸などもほとんど生成せず、選択的にグルコースを得ることができた。このことからアセチル基が分子間水素結合を切り離す働きに加え、反応終盤まで保護基としても働いたことが示唆された。つまり、アセチル化することによってグルコースの脱水、開環による分解反応を抑えることができたと考えられる。

4. 結論

本研究は、バイオマス資源として注目を集めている竹の有効利用を目的として、竹のセルロース抽出、そしてグルコース化について研究を行ったものである。本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

(1)NaOH を用いた加熱アルカリ処理によって、リグニン、ヘミセルロースを除去し、セルロースを抽出することができた。3%NaOH 溶液が適当であった。

(2)竹から抽出したセルロースから商業的に価値の高い酢酸セルロースを容易に調製することができた。

(3)竹から抽出したセルロースを酢酸セルロースに誘導したことで、穏和な条件の下、高い収率でグルコースを得ることができた。以下に詳細な量関係を示す。

竹→セルロース(57%)→酢酸セルロース(86%)→グルコース(85%)

抽出したセルロースから 73%の収率でグルコースを得ることができた。

5. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究助成をして頂いた財団法人鹿児島科学研究所に厚くお礼を申し上げます。本実験に携わった鹿児島大学大学院理工学研究科応用化学工学専攻の早田智紀氏、研究に関して示唆を頂いた染川賢一名誉教授に深謝申し上げます。

6. 引用文献

1) G.Spigno, T. Pizzorno, D.Marco, *Bioresourse Technology,* **99,** 4329-4337(2008)

2) S.Zhu, Y.Wu, Z.Yu, Q.Chen, G.Wu, *Biosystems Engineering,* **94**, 437-442(2006)

3) M.Sasaki,T.Adschiri,K.Arai, *Bioresource Technology,* **86**, 301-304(2003)

4) 磯貝明,セルロースの科学（朝倉書店）(2007)

5) 越島哲夫,機能性セルロース（シーエムシー出版）

6) H.Chen,S.Jin, *Enzyme and Microbial Technology* , **39**, 1430-1432(2006)

7)K.-K. Chang, B.-Y. Cai, J.-A. Zhang, *Biochemical Engineering,* **38**, 105-109(2008)

Separation of cellulose and production of glucose from bamboo

Tetsuro Shimo

Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

Korimoto 1-21-40, Kagoshima 890-0065, Japan

This paper reports about the extraction of cellulose included in bamboo and the generation of glucose from cellulose by way of cellulose acetate. Bamboo powder was treated with 3%NaOH aqueous solution at 100℃ for 1h to give about 40% weight decrease. This result shows the removal of lignin and hemicelluloses in bamboo. It was found that alkali pre-treatment is effective to obtain cellulose from bamboo powder. So the treatments of bamboo powder to obtain glucose were carried out as follows. Bamboo powder was treated with 3%NaOH aqueous solution followed by acetylated by using acetic anhydride to give cellulose acetate in 86% yield. Acid hydrolysis of cellulose acetate using trifluoroacetic acid at 100℃ afford glucose in 85% yield.

奄美大島紬廃液のキノコ栽培への利用

八木 史郎

鹿児島大学農学部生物資源化学科
〒890-0065　鹿児島市郡元 1-21-24
TEL：099-285-8631

紬の廃液および黒糖焼酎残渣を用いてヒラタケおよびヤナギマツタケ菌糸の生育を調べ、キノコ生産の可能性を検討した。紬廃液は、紬廃液原液と鹿児島県大島紬技術指導センターで調製された高圧処理廃液をもちいて菌糸の成長過程を比較した。その結果ヒラタケでは特にポテトデキストロースをもちいた標準培地に比較して、黒糖焼酎粕培地では菌糸の成長が良好であり、また紬廃液原液を用いても十分に成長する事が観察された。ヤナギマツタケではいずれの培地においても生育の差はそれ程認められなかった。紬廃液は単独でもキノコの生育には使用可能であると推察された。

１．緒言

多くの素材がキノコの栽培用に用いられているが、環境問題を考慮し、食品廃棄物をもちいてキノコの栽培を行い食品廃棄物の量を軽減する試みや付加価値のあるキノコを生産してコスト削減を諮る試み、またキノコをもちいたバイオ燃料の生産などが国の内外で増加している[1-4]。鹿児島県[5]においては環境と調和した農業の取り組み方針が検討されていて、そのうちの一つはイモ焼酎粕[6、7]の海洋投棄が禁止された事による焼酎粕の利用である。これまで粕の利用としてはメタン醗酵、家畜飼料、肥料、クエン酸醗酵などが知られていた。最近、山内ら[8-10]は焼酎粕を培地に用いるいくつかのキノコ生産を試みている。

大島紬廃液は、豊富なタンパク質を含み、そのタンパク質の利用も行われている[11、12]。そのうちセリシンを化粧品など利用する方法も企業化されている。しかし、イモ焼酎粕廃液でも多くの利用側面があることを考えれば、紬廃液でも他の利用法を多面的に考える必要がある。また黒糖焼酎粕もイモ焼酎粕とは異なる栄養価をもち同様の事が考えられる[13]。

本研究では大島紬廃液の利用拡大のために行ったもので、そのうちの一つとしてキノコ栽培を検討した。ここではキノコ菌糸の成長を大島紬廃液と併せて奄美大島で生じる黒糖焼酎粕ももちいて検討した。

２．実験

大島紬廃液（未処理廃液、180℃, 60 分高圧分解液）は鹿児島県工業技術センター（大島紬技術指導センター）より供与されたものを使用した。他にキノコ菌糸成長試験の試料として乾燥黒糖廃液粕を奄美大島開運酒造株式会社よりいただいた。キノコのうちヒラタケは日本農林種菌 KK（静岡）

よりオガクズ種菌を購入した。ヤナギマツタケは、鹿児島県森林技術総合センターより供与して頂いた。その他の試薬、材料は市販のものを使用した。

高速液体クロマトグラフによる高圧分解液ペプチドの分子量分布測定は、TSKgelG2000 SWXL カラムを用い、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0 を移動相として流速 0.5ml/min、220nm の吸収を測定し調べた。SDS 電気泳動[14)]は、紬廃液原液、高圧分解液をスペクトラポア 6（MW1000 cut off）で水に対して透析後、凍結乾燥して SDS 存在下で行なった。

キノコ菌糸の成長測定[15、16)]はペトリ皿をもちいた寒天培地とオガクズを用いた試験管培地で行った。寒天培地は、寒天濃度 1.5%で、ジャガイモブドウ糖培地（PDA 培地）、黒糖粕培地、紬廃液培地を用いた、各培地の pH は 6.0 に調整した。いずれも菌糸生育の相対面積比は PDA 培地の菌糸生育面積を 100 として計算し、結果は３回の平均±標準偏差とした。オガクズ試験管培地はオガクズ 85%に、15%の黒糖粕または紬廃液乾燥物に、60%の水を注入して培地とした。菌糸の生育はいずれも 25℃暗所で行なった。

３．結果および考察

１）紬廃液のきのこ栽培への利用について

紬廃液および黒糖焼酎廃液粕を用いた培地では、いずれの菌糸も生育した。ヒラタケでは Table1 に示すようにコントロールの PDA 培地と比較すると 3%原液培地、それにグルコースを添加した培地、

Table 1. Comparison of mycelial growth of *Pleurotus osteraceae*（Silk industry waste and PDA）
Culture at 25℃ for 7days in the dark. Area for PDA, 4.0cm^2

medium	3% Silk Waste (SW)	SW+ 0.75%glucose	3% Hydrolyzate	3%Hydrolyzate +0.75%glucose	PDA
Relative growth area	80±15	65±38	68±25	114±32	100±7

Table 2. Comparison of mycelial growth of *Pleurotus osteraceae* (Kokuto distillery waste and PDA）
Culture at 25℃ for 7days in the dark. Area for PDA, 4.0cm^2

medium	Distillery Waste 2%	Distillery Waste 1%	Distillery Waste 0.5%	PDA
Relative growth area	332±83	260±27	393±17	100±10

Table 3. Comparison of mycelial growth of *Agrocybe cylindaracea*
Culture at 25℃ for 11 days in the dark. Area for PDA, 16.7 cm^2

medium	3% Silk Waste	3% Hydrolyzate	Distillery Waste 0.5%	PDA
Relative growth area	95±4	91±11	152±2	100±6

紬廃液を高圧分解した培地のいずれでも菌糸の生育は良好であった。しかしTable2に示すように黒糖焼酎粕培地においては特に生育が良好であった。またヤナギマツタケの結果をTable3に示した。ヤナギマツタケはいずれの培地でも生育するがヒラタケ程の差は認められなかった。今回、紬廃液量の関係で発茸試験までは行っていないが、廃液をもちいて十分きのこが生産されることが見込まれる。紬廃液と高圧分解液を比較した時には分解液では有機酸としてクエン酸以外にもアミノ酸が分解されて生じるフマル酸等が多く含まれ、分解液を特別な処理をせず単に中和するのみで良好な生育をもたらすことが予想される。ヒラタケでは、黒糖焼酎粕を少量添加することで生育が良好となると予想される。

Figure1,2にはヒラタケおよびヤナギマツタケの各培地での菌糸の生育状態を示した。ヒラタケでは黒糖焼酎粕培地で良く生育している事が分かる。

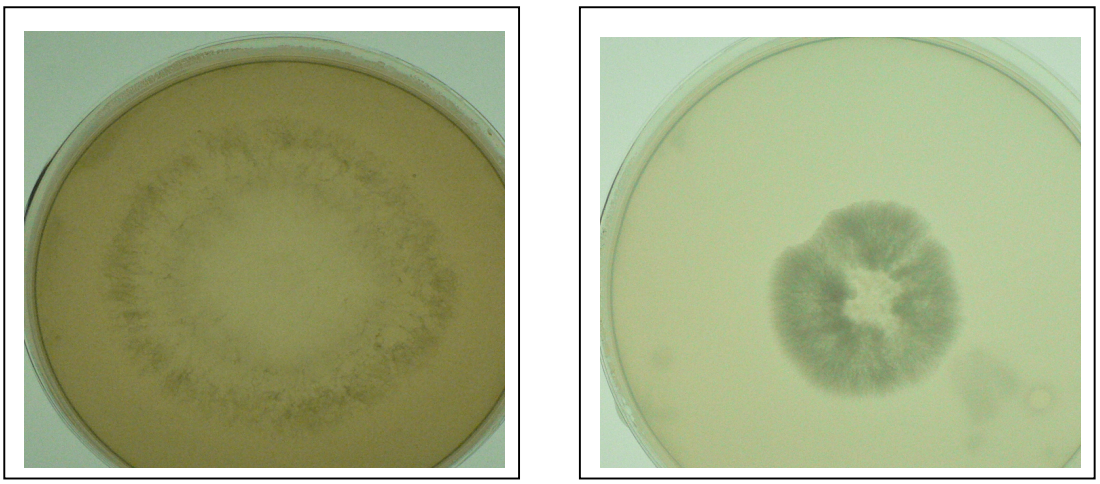


Fig.1.　Growth of mycelium of *Pleurotus osteraceae* (Culture at 25℃ for 11days in the dark.)
Left, 1%Kokuto distillery waste ; Right, PDA

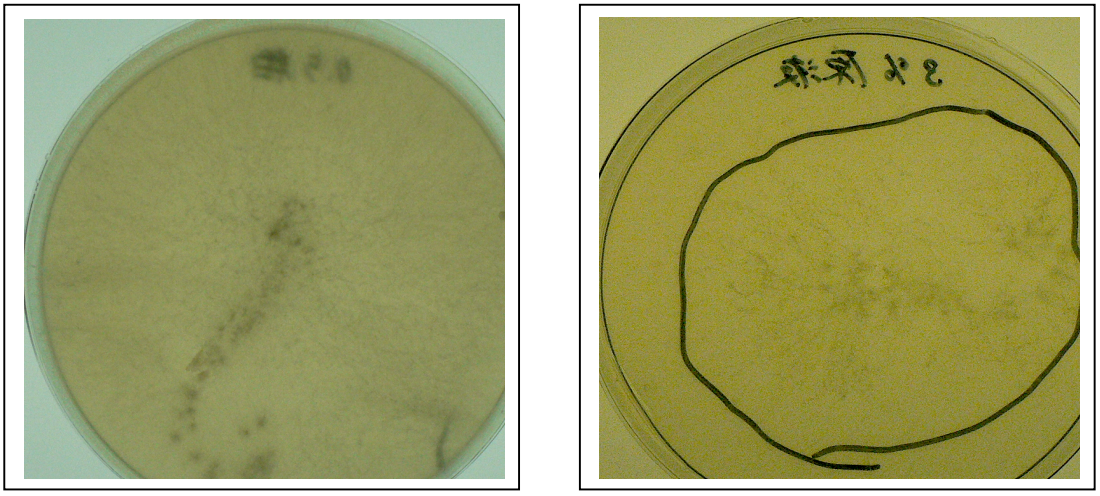


Fig. 2 . Growth of mycelium of *Agrocybe cylindrcea* (Culture at 25℃ for 11days in the dark.)
Left, 0.5%Kokuto distillery waste ; Right, PDA

今回、試験管培地を用いた実験も行なったが、試験管による菌糸生育では、培地間での菌糸の生育に明確な差を見いだす事が出来なかった。さらに発茸の実験も必要であるが、もっと多くの廃液が必要である。

奄美大島では、製材業やキノコの生産は、昭和５５年に比較すると平成１９年では、どちらも７割以上も衰退しているが[17]、新しい材料を用いる事で、産業の復活や活性化につながることを期待したい。キノコ培地にリュウキュウマツやイタジイのオガクズをキノコ培地に用いる検討も必要である。

２）紬廃液の高圧分解による低分子化について

高圧分解液を透析後、SDS 電気泳動を行ったが明確なバンドは見られず、2−3 万の分子量の位置にブロードなバンドが見られるだけであった。HPLC によるゲルろ過では、Fig.3 に示すように二つの明確なピークが存在した。しかし、変性剤である塩酸グアニジンや尿素の存在下でゲルろ過を行っている訳ではないのでペプチドの正確な分子量は不明である。アミノ酸組成はここでは示さないが、Ser、Gly、Asp が多く、ムチン型糖鎖の生合成研究やムチンのモデル化合物のペプチド骨格として使用等も考えられる。

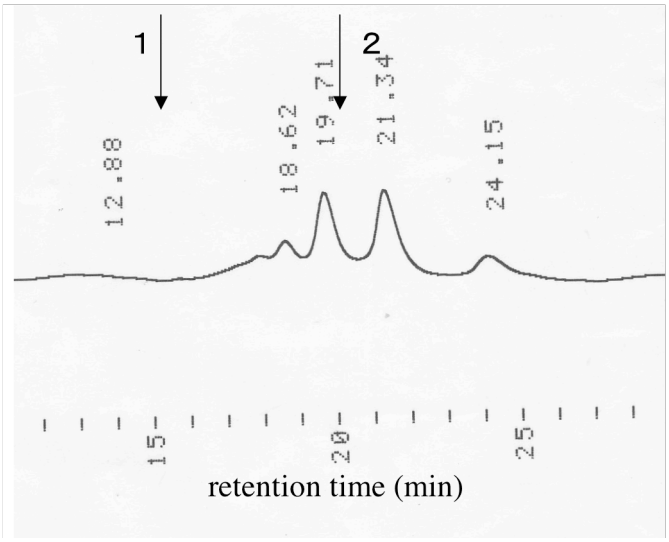


Fig. 3 HPLC gel filtration of hydoryzate of silk industry waste

The arrows 1, 2 shows the elution positions of alcohol dehydrogenase(15.6kDa) and carbonic anhydrase (2.9kDa)

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり助成をいだたいた財団法人鹿児島科学研究所に深く御礼申し上げます。

5．引用文献

1) Sanchez C：Cultivation of Pleurotus ostreatus and other edible mushrooms, Applied Microbiol. Biotechnol. 85, 1321-1337 (2010).

2) Hayes DJ, Hayes MHB：The role that lignocellulosic feedstocks and various biorefining technologies can play in meeting Ireland's biofuel targets. Biofuels Bioprod. Biorefining-BioFPR 3, 500-520 (2009).

3) Cohen R, Persky L, Hadar Y：Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus Pleurotus. Applied Microbiol. Biotechnol. 58, 582-594 (2002).

4) Williams BC, McMullan JT, McCahey S : An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. Bioresource Technol. 79, 227-230 (2001).

5) 鹿児島県：平成20年度環境と調和した農業の取組方針及び平成19年度取組状況. http://www.pref.kagoshima.jp/sangyo-rodo/nogyo/gizyutu/kankyo/taisei/torikumihousinn.html,2008

6) 藤井力：焼酎粕の機能性及び焼酎粕利用処理技術の現状と課題. 醸協 102, 111-118 (2009).

7) 鮫島吉廣：焼酎副産物資源化システムの構築. 醸協 98, 481-490 (2003).

8) 山内正仁、今屋竜一、増田純雄、山田真義、木原正人、米山兼二郎、原田秀樹：甘藷焼酎粕乾燥物を利用したきのこ栽培技術の開発に関する研究. 土木学会環境工学論文集 42, 545-553 (2005).

9) 山内正仁、今屋竜一、山田真義、増田純雄、木原正人、米山兼二郎、原田秀樹：甘藷焼酎粕乾燥物を利用した高付加価値きのこ（エリンギ）の実用化に関する研究、土木学会環境工学論文 44, 481-490 (2007).

10) 山内正仁、山田真義、八木史郎、増田純雄、山口隆司：食品廃棄物（焼酎粕・でん粉粕）を用いたヤマブシタケの栽培条件の確立とその成分特性. 土木学会環境工学研究論文集 46, 117-127 (2009).

11) Wu JH, Zhang W, Xu SY：Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. Food Chem. 103, 1255–1262 (2007).

12) Wu JH, Zhang W, Xu SY：Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater, Process Biochem. 43, 480-487 (2008).

13) 遠矢かおり、保　正明、下玉利勉、北野良夫：未利用資源である黒糖焼酎粕の肉用牛飼料化に向けた検討. 畜産の研究 64, 426-432 (2010).

14) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970).

15) 最新バイオテクノロジ−全書編集委員会編 : きのこの増殖と育種、最新バイオテクノロジー全書 7, 1992, 農業図書.

16) 善如寺厚、渡辺直明：きのこ実験マニュアル1987、講談社サイエンティフィク.

17) 鹿児島県：www.pref.kagoshima.jp/__filemst__/20739/amami18-8.pdf.

Effect of silk industry waste and Kokuto shochu distillery waste on growth of mushrooms

Fumio Yagi

Department of Biochemical Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

For producing fruitbodies of oyster mushroom (*Pleurotus osteraceae*) and *Agrocybe cylindracea*, silk industry waste and dry Kokuto shochu distillery waste were used for culture media. Silk industry waste was effective for the growth of mycelia of both mushrooms irrespective of degradation at high pressure. Kokutoshochu waste was also effective for the growth of both mycelials.

全物質を対象に無限大感度を目指す光干渉化学センサーの開発

吉留 俊史

鹿児島大学大学院理工学研究科化学生命･化学工学専攻
〒890-0065　鹿児島市郡元 1-21-40
TEL：099-285-8341

要 旨

光の干渉現象を利用して屈折率をモニターすることで全ての化学物質を対象とする無限大感度を目指す化学計測法を構築し、更に移動現象を利用することで成分分析能力を有する汎用の化学センサーを構築することを目的とする（光干渉化学センサー)。信号の計算法を確立するとともに、装置を実際に試作した。まず試作した光干渉化学センサーで様々な濃度の炭酸水素ナトリウム水溶液を試料として測定した。その結果は計算によるシミュレーションと一致し、試作した装置の動作が確認され、高感度化の可能性が示唆された。次に本センサーの大きな課題の一つである強度の多価関数性を克服する方法の一つとして多段階試料セルを考案し、シミュレーションを行った結果、実用性、有用性が示唆された。また成分分析能力の付与という課題に、寒天膜による拡散現象の利用を提案し、寒天膜存在下での信号応答を測定し、成分分析の可能性が示唆された。高感度、高精度かつ定性分析を行える装置へと発展すること期待される。

1.　緒　言

化学物質はその分子量や濃度などで決まる固有の屈折率を持ち、これをモニターすることで全ての物質を計測することが可能となる。一方、光の干渉を利用した計測法は非常に高感度である。本研究は、光の干渉現象を利用して屈折率をモニターすることで、全ての物質を対象とする無限大感度を目指す化学計測法を構築すること、更に構築したこの計測法に移動現象を利用する成分分離能力を付与すること、を目的とする（光干渉化学センサー）。

干渉とは、波の位相が等しいときには強め合い、逆のときには弱め合う現象である。この光の干渉によって生じた干渉縞を観察する装置として干渉計があり、その高感度性から様々な計測法に応用されている。例えば膜厚測定、面精度測定、波長測定、流体の可視化、気体の屈折率測定、等である[1-4]。化学物質にも固有の屈折率があるので、干渉を屈折率計へと応用し化学計測に利用することが期待される。光干渉化学センサーでは試料セルの厚さを大きくすれば、理論上無限大の感度が得られることが期待される。

ところが、光干渉法で屈折率をモニターしようとする時、「屈折率を一意に決められない」という大きな課題がある。本研究ではこの問題点に対して多段階測定を提案し検討した。また、汎用の屈折率計は試料全体の屈折率のみに応答し、混合溶液中の成分分析に用いることはできない。しかしながら分離機能や選択性をもつ高分子膜等を光干渉化学センサーに組み込めれば、混合溶液中の成分分析にも応用できる可能性がある。我々は取り込み型と透過型の二つのセルを考案して検討した。

現在、屈折率モニターによる化学計測法は、たとえばクロマトグラフィーの検出器として用いられているが、干渉法でないので感度が十分でない。アッベ屈折率計は屈折率計として多用されているが、光の干渉を利用しておらず感度が十分でなく、また使用性に乏しい。また、表面プラズモン共鳴(SPR)センサーは、表面近傍の試料の屈折率に応答するもので、全ての物質が計測対象となり、特にバイオ化学の分野で必需品となっている[5]。しかし SPR センサーも感度が十分でない。高感度化のために感応部を工夫して成功した例もあるが、その場合、全物質を対象にできるという特性が損なわれる。

本申請では、溶液の屈折率（濃度）の測定を目的としてマイケルソン干渉計を実際に試作し、その性能の評価を行って高感度性・高精度性の可能性を評価した。また、様々なパラメーターでのシュミュレーションを行い、上記の課題の一つ、「屈折率を一意に決められない」を克服する実用モデルのデザインを検討した。更に、もう一つの課題、「成分分析に用いることはできない」に関する研究の第一歩として、感応素子を含まない寒天膜による応答を確認し検討を行った。

２．理　論

２．１　マイケル干渉計の動作原理

マイケルソン干渉計（Fig. 1）では光源から出た光がハーフミラー（BS）で二分され、50%は鏡 M_1 へ、残り 50%が鏡 M_2 へ向かう。鏡 M_1 へ向かう光波 E_1、鏡 M_2 へ向かう光波 E_2 はそれぞれ、鏡 M_1、M_2 で反射され BS に戻り、それぞれ反射または透過して検出器に向かう。このとき光波 E_1 と E_2 は互いに干渉し干渉縞を形成する。我々は溶液の屈折率（濃度）の測定を目的とするため光波 E_2 中に試料セルを設置した。これにより試料溶液内で溶液の屈折率

によって位相が変化し干渉縞の位置、強度が変わる。今回、鏡 M_2 の角度を微調整することにより光波 E_1 と E_2 を完全に重ね合わせ、明か暗のみの一つの干渉縞を形成し、その干渉強度をフォトダイオードによって検出した。さらに鏡 M_1 にピエゾ素子を取り付け、電圧印加により鏡 M_1 を光軸方向に移動させ、光波 E_1 の位相を自由に変化できるようにした。

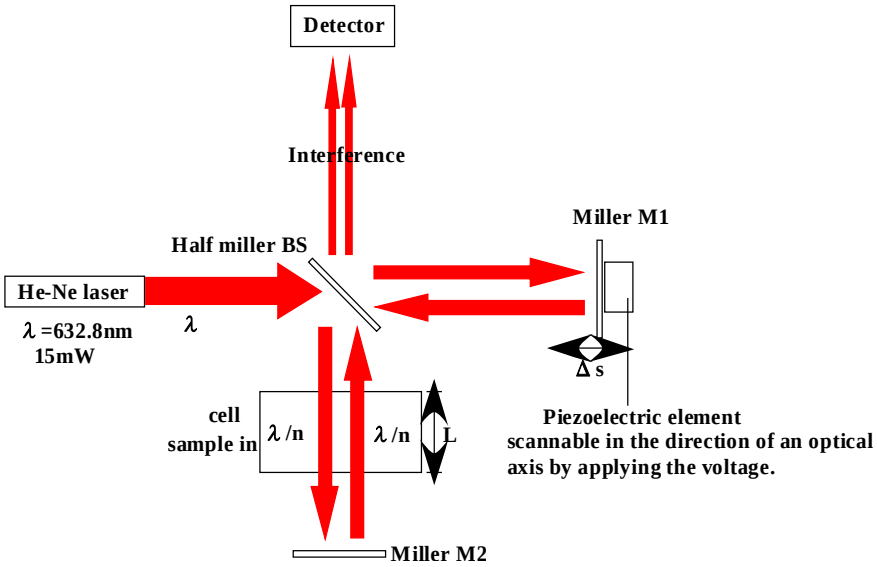


Fig. 1 Michelson interference refractmeter.

２．２　信号の計算[6)]

光の干渉は、本質的に電磁波の重ね合わせの原理で理解することができる。重ね合わせの原理とは、空間のある点に複数の電場 E_1、E_2、E_3、・・・が作用している場合、そこの電場 E はこれら複数の電場の和、すなわち $E = E_1 + E_2 + E_3 + \cdots$、で表されるというものである。今、位置 r を進む二つの光波の重ね合わせを考える。二つの光波の振動数、偏光面は同じとすると、二つの光波の電場は、

$$E_1 = E_{10}\exp[i(\mathbf{k}_1 \cdot \mathbf{r} - \omega t + \phi)]$$

$$E_2 = E_{20}\exp[i(\mathbf{k}_2 \cdot \mathbf{r} - \omega t)]$$

となる。ここで $\mathbf{k}_i$ は光波 i の波数ベクトル、ω は角振動、ϕ は位相差である。

二つの光波を重ね合わせたとき、光強度は電気ベクトルの振幅の 2 乗に比例するため、ある点での干渉強度 I は

$$I = |E|^2 = E \cdot E^* = (E_1 + E_2) \cdot (E_1^* + E_2^*) = |E_{10}|^2 + |E_{20}|^2 + E_1 \cdot E_2^* + E_1^* \cdot E_2$$

$$= |E_{10}|^2 + |E_{20}|^2 + E_{10}E_{20}\exp[i(\mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_2) \cdot \mathbf{r} + \phi] + E_{10}E_{20}\exp[-i(\mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_2) \cdot \mathbf{r} + \phi]$$

$$= |E_{10}|^2 + |E_{20}|^2 + 2E_{10} \cdot E_{20}\cos[(\mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_2) \cdot \mathbf{r} + \phi] \cdots (1)$$

と表される。

式（1）をマイケルソン干渉計に適用すると、光の波数ベクトル $\mathbf{k}_1$、$\mathbf{k}_2$ は同じであるため $(\mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_2) = 0$ となり、2 本のアームからの光波 E_1、E_2 の光路差を Δ とすると $\phi = 2\pi\Delta/\lambda$、また両者の振幅が等しい場合($E_{10} = E_{20} = E$)では、式（1）は定常項 $|E_{10}|^2 + |E_{20}|^2$ を省略して、

$$I = 2|E|^2(1 + \cos 2\pi\Delta/\lambda) \cdots (2)$$

となる。

さらに式（2）を試作した干渉センサーに適用する。一光路上に試料セルを設置しているので、セルの厚さを L とすると、試料通過距離は 2L となる。よって屈折率 n 試料があると、光の位相は $2\pi/(\lambda/n) \cdot 2L = 2\pi n/\lambda \cdot 2L$ だけ変化し、試料がないと位相変化は $2\pi/\lambda \cdot 2L$ であるため、試料があるときと無いときの位相差は、

$$(2\pi/\lambda \cdot 2L)-(2\pi n/\lambda \cdot 2L)=2\pi 2L(n-1)/\lambda = 4\pi L(n-1)/\lambda \quad \cdots (3)$$

となる。よって式（3）を式（2）に代入し、ピエゾ素子による位相変化ΔＳを組み込むと

$$I = 2|E|^2(1+\cos 2\pi 2L(n-1)/\lambda + \Delta S) \quad \cdots (4)$$

となる。

今後の問題として、

①実際には二分割された光の強度は同じではないこと。

②セルにスライドガラスや石英セル等を使用しているため、これらのセル壁を含むこと。

③セル壁との界面の位相変化の有無を考慮すること。

があり、以上の３点を考慮してより正確にする必要がある。

２．３　光干渉化学センサーにおける感度と精度の向上の原理 [7, 8]

２．３．１　光干渉化学センサーにおける感度向上の原理

Fig. 2 に干渉センサーの計算式による二つのセルの強度変化を示した。セル 2（厚さ 4μm）はセル 1(厚さ 1μm)より厚い。ここでセル 2 がセル 1 より高感度であることを確認するために、同じ屈折率範囲($n_2-n_1=\alpha$)を示した。 ある未知試料が二つ（n_1、n_2）あるときセル 1 で測定を行うと測定値 I_1 と I_2 が得られる。同様にセル 2 でも同じ二つの未知試料（n_1、n_2）で測定を行うと I'_1 と I'_2 が得られる。ここで測定値の変化量 a(=$|I_2-I_1|$)と b(=$|I_2'-I'_1|$)を比較すると、b＞a となっている。よって二つの未知試料に対して厚いセル 2 の信号強度差が大きいためより高感度といえる。

２．３．２　光干渉化学センサーにおける測定精度向上の原理

Fig. 3 に干渉センサーの計算式による二つのセルの強度変化を示した。セル 2(厚さ 4μm)はセル 1(厚さ 1μm)より厚いセルである。ここでセル 2 がセル 1 より高精度であることを確認する。ある屈折率 n_0 をもつ試料を 2 つのセルで測ったとき得られた測定値の平均値を I_1、I_2、その標準偏差を Δ_1、Δ_2 とする。ここでセルの厚さにより標準偏差は変わらないと考えられるので、$\Delta_1=\Delta_2=\Delta$ である。測定値の標準偏差は同じでも、求める値の標準偏差はセル 2

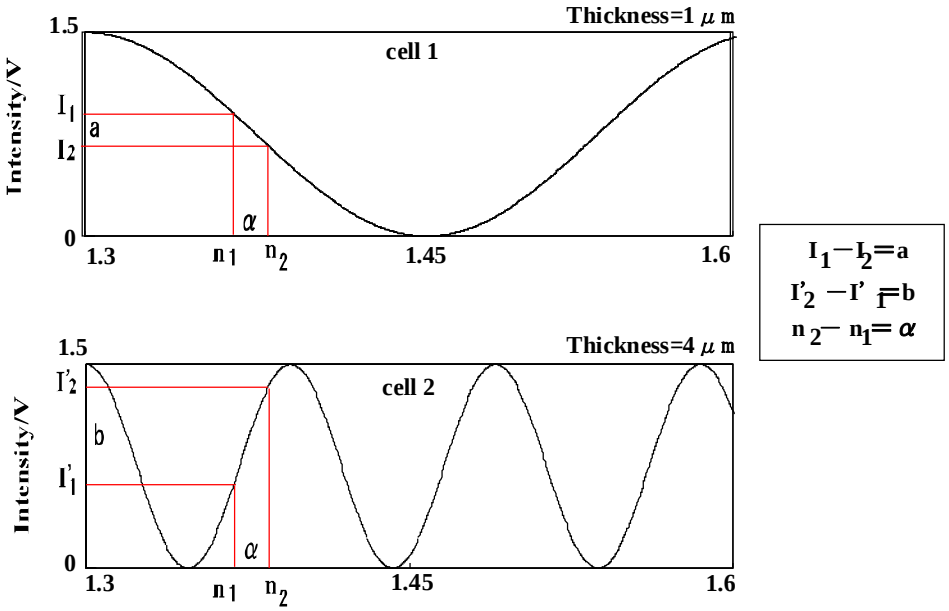


Fig. 2　Simulation of sensitivity.

の方が小さく高精度であることがわかる。

３　装置の試作

３．１　試作した光干渉化学センサーの全体構成

試作した光干渉化学センサーの装置全体構成を Fig. 4 に示す。

３．２　試作した構成機器部品の詳細

試作した光干渉化学センサー構成機器部品の詳細を以下に示す。

・He-Ne レーザー：波長 632.8nm、出力 15mW（Mellesgriot,V05LHR151）。

・光検出器：フォトダイオード（SLR-738A40AB、浜松フォトニクス S2386-8K）、オペアンプ（LF-356N）を用いて作成した。

・ミラー、ハーフミラー：スライドガラスに Al を真空蒸着し作製した。ハーフミラーは膜厚 11.5nm、蒸着時間 45 秒で作製した。

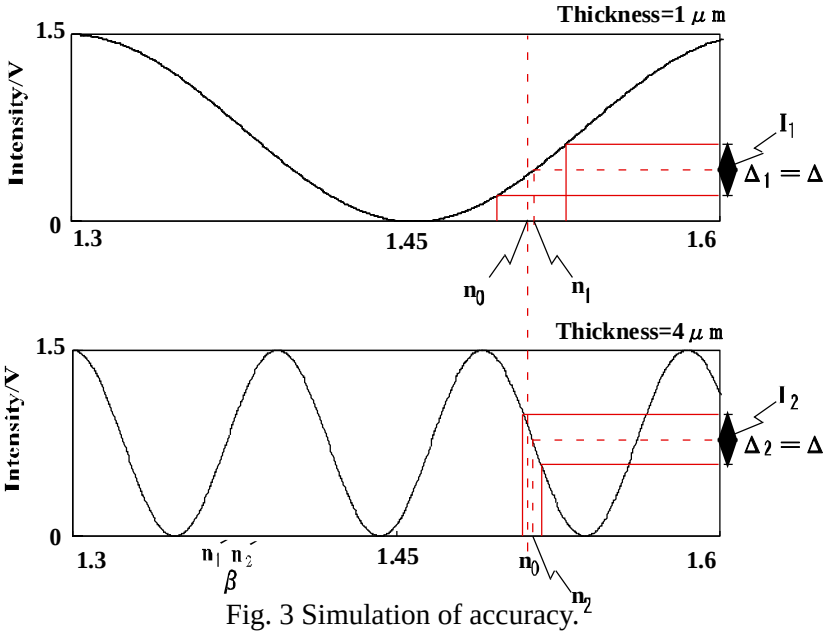


Fig. 3 Simulation of accuracy.

・0.5mm 長セル：スライドガラス上に穴をあけたシリコンパッキン（厚さ 0.5mm）を置き、その上に傷がついていないアクリル板をのせた。またこのアクリル板に二箇所穴をあけチューブを差し込んだ。

・4mm 長セル：穴をあけた真鍮に上下に穴をあけチューブを差し込み、両側を穴のあいたシリコンパッキンで挟みこんだ。さらにその両側をエタロン板で挟んだ。最後に 0.5mm セルと同様に二枚のアクリル板（ネジ付）で挟み固定した。

・10mm 長セル： UV 用のガラスセルの口に、切り取ったゴム栓を蓋として取り付け、ゴム管に二箇所穴をあけチューブを二本差し込んだ。

・除振台：30×90×2.5cm の鉄板。

・デジタルマルチメーター： ILX Light wave OMM-6819B,OMH-6722

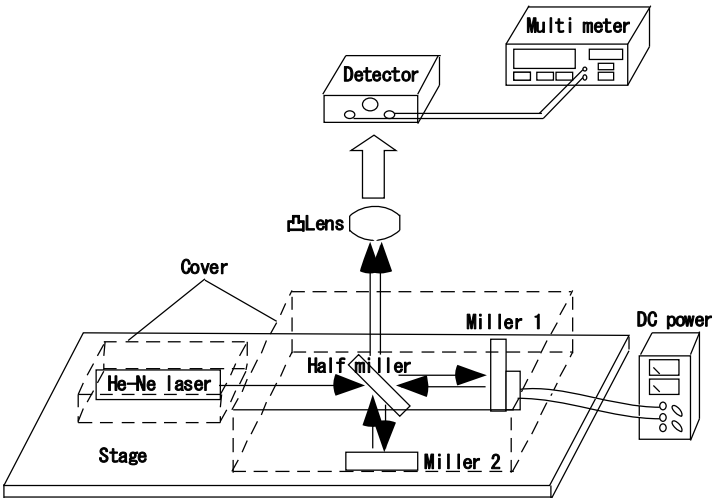


Fig. 4 Experimental setup constructed.

・AD コンバータ：CONTEC,ADI12-8(USB)GY
・ピエゾ素子：市販のブザーを応用した。

３．３　取り込み型セルの試作

厚さ 5mm のセルの内壁に寒天を塗布し、測定部である寒天に直接光を通す(Fig. ５)。

感応素子を含む高分子と含まない高分子（寒天）を用いた場合の予想される結果を以下に示す。まずＡでは水がセル内に入っているため時間経過による強度変化はない。Ｂでは試料溶液を注入したことにより物質が膜に浸透していき強度が浸透とともにゆっくりと変化する。浸透が終了すると一定の値を示す。Ｃで溶液を排出し再び水を注入すると、膜内の物質が追い出され強度が変化し、物質の排除が終了すると一定の値を示す。このとき感応素子を含まない高分子（寒天）を用いると点線で示したようにＡと同じ位置に戻る。しかし感応素子を含む高分子を用いると、Ｃで物質を排除したときキャッチした目的物質だけは膜内に残留するため、実線で示したようにキャッチした分だけ一定値が下がりきらない。したがって矢印で示した値がキャッチした目的物質の信号強度となる。

３．４　透過型セルの試作

寒天の囲いの中に水をいれ、その周りを試料溶液で満たし、内部水にレーザー光を通す(Fig. 6)。

期待される結果を以下に示す。Ａではサンプルをいれてない状態（水を満たしている状態）で物質の移動がないため一定の値を示す。Ｂで試料溶液を注入すると高分子（寒天）に物質が浸透し、さらに濃度拡散で内部の水に物質が透過するため強度がゆっくりと変化する。透過が終了すると一定値を示す。このとき選択性を有する高分子を用いれば目的物質だけが透過する。図中の矢印で示した値が目的物質の信号強度となる。

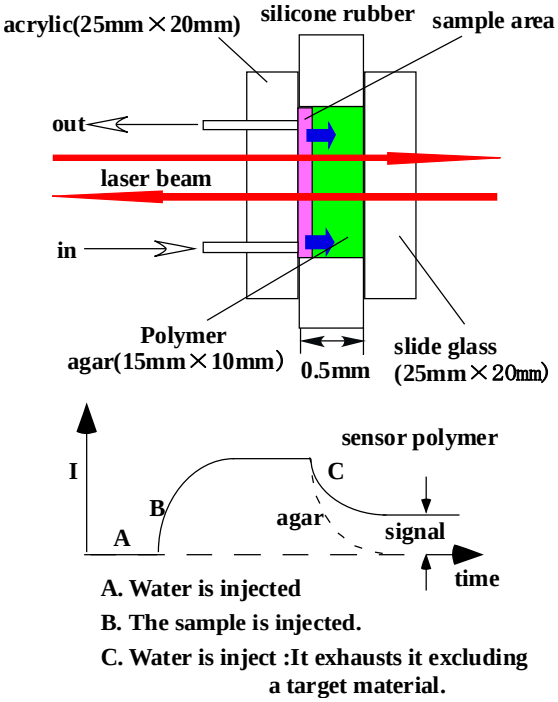


Fig. 5 A cross section of catching type cell designed and expected result.

４　実　験

４．１　溶液セルでの測定法

① 試料溶液は炭酸水素ナトリウム水溶液。濃度は 0.5mm 長セル用に、1、5、10、15、20mM、4mm 長セル用に 0.2、0.5、1、2、3.5、4、4.5、5、5.5、6、7、8、9、10mM、10mm 長セル用に 0.2、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4mM を用意した。
② 試料セルをセットし水を注入し、光軸を調整する。
③ ピエゾ素子にて、干渉光強度を最大値に合わせる。
④ 最大値を記録した後、水を排出して試料溶液（炭酸水素ナトリウム水溶液）を注入する。
⑤ 試料溶液の干渉光強度を記録する。

⑥ 試料溶液を排出し水を注入して干渉光強度を記録する。最大値からずれていた場合ピエゾ素子にて最大値にセットしその値を記録する。
⑦ 水を排出して試料溶液を注入し、干渉光強度を記録する。
⑧ ③～⑦の操作を繰り返し、水-試料-水+(set max)-試料-水+(set max)-試料・・・と行う。

４．２　取り込み型セルでの測定法

① セルに水を注入して、光軸を調整する。
② 水を排出する。
③ 試料溶液（炭酸水素ナトリウム水溶液）を注入する。
④ セルに試料が満ちたらこの時点を時刻０とし、ピエゾ素子に電圧を加えて干渉光強度を最大値に合わせてその値を記録する。
⑤ 1 分後の値を記録し、更に 10 秒後にピエゾ素子にて最大値に合わせてその値を記録する。
⑥ ２分後の値を記録し、更に 10 秒後にピエゾ素子にて最大値に合わせてその値を記録する。
⑦ ⑤～⑥の操作を繰り返し 10 分間行う。
⑧ 最大値と最小値を記録したのち溶液を排出する。

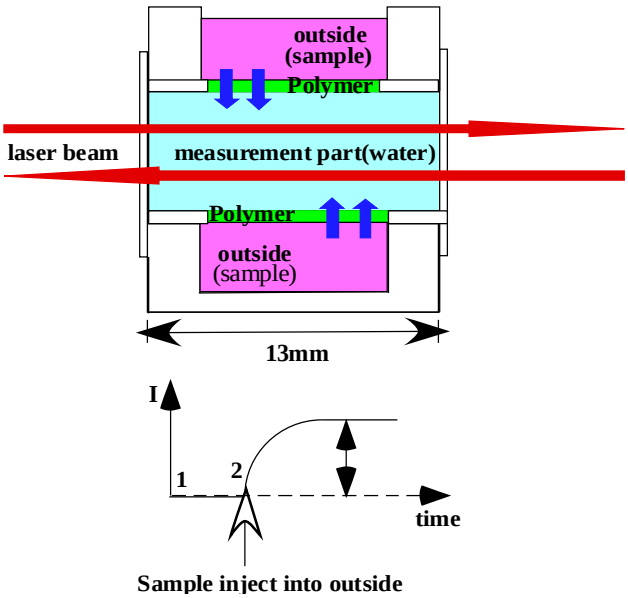


Fig. 6 A cross section of penetration type cell designed and expected result.

⑨ 水を注入し、④～⑦の操作を行う。
⑩ ③からの操作を繰り返し、0.1M-水-0.15M-水-0.2M-水の手順で測定を行う。
⑪ 測定結果の 0 分と 1 分の値の差、1 分 10 秒と 2 分の値の差・・・、9 分 10 秒と 10 分の値の差を求め変化量とした。
⑫ 変化量を測定時の最大値と最小値の差で割り、変化量比とした。
⑬ 試料溶液の値は積算し水の値は引いてプロットした。

４．３　透過型セルでの測定法

① 周りの水をポンプで排出し、試料溶液（炭酸水素ナトリウム水溶液 0.1M）を注入する。
② 溶液でほぼ満たしたら、ピエゾ素子にて干渉強度を最大値にあわせてその値を記録し、この時点を時刻 0 とする。
③ 1 分後の値を記録し、更に 10 秒後にピエゾ素子にて最大値に合わせてその値を記録する。
④ ２分後の値を記録し、更に 10 秒後にピエゾ素子にて最大値に合わせてその値を記録する。
⑤ ③～④の操作を繰り返し、計 60 分間測定を行う。
⑥ 測定結果の 0 分と 1 分の値の差、1 分 10 秒と 2 分の値の差・・・、59 分 10 秒と 60 分の値の差を求め変化量とした。

⑦ 変化量が測定誤差範囲だったので積算せずに、変化量をそのままプロットした。

５　結果と考察

５．１　試作した光干渉化学センサーによる基本的測定とシュミレーションとの比較

５．１．１　温湯での測定

厚さ 10mm のガラスセルに約 60℃のお湯をいれ、温度変化による屈折率変化を測定した。測定終了の約 1 時間後の温度は 18℃であった。

測定開始から約 1000 秒までは、強度が短い周期で振動したが、時間経過とともに周期が長くなった。これは、60℃では急速に温度が下がるため屈折率変化も激しく、常温に近づくにつれ温度変化が緩やかになるため、屈折率変化も緩やかになり周期が長くなったためと考えられる。以上より試作した光干渉化学センサーが温度変化すなわち屈折率に応答していることが示唆された。

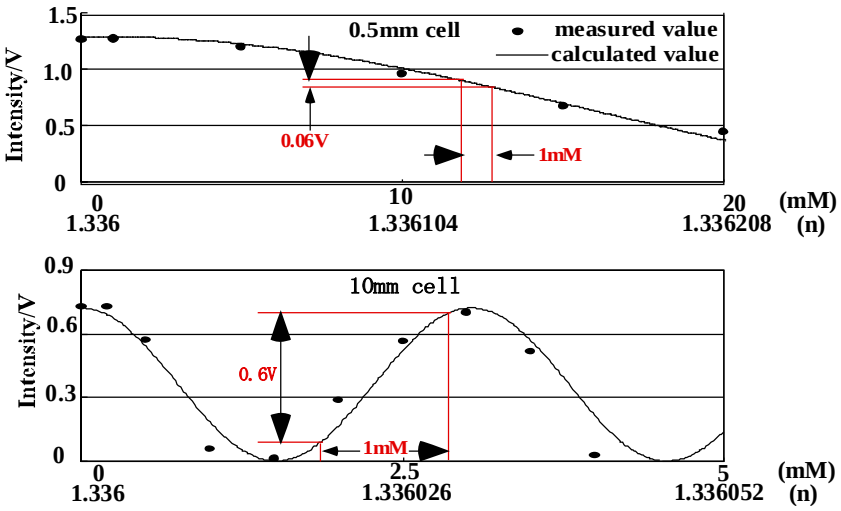


Fig. 7　Measured values and calculated curves.

５．１．２　炭酸水素ナトリウム水溶液での測定

炭酸水素ナトリウム水溶液を試料とし、その濃度を変えることで屈折率を変化させて、その時々の信号強度を 0.5 mm、4 mm、10 mm 長セルで測定した。Fig. 7 に 0.5 mm、10 mm 長セルでの測定結果を示す。黒丸は測定値、実線はシミュレーション結果である。測定値は濃度（屈折率）に依存して変化し、特に 4 mm 長セル、10 mm

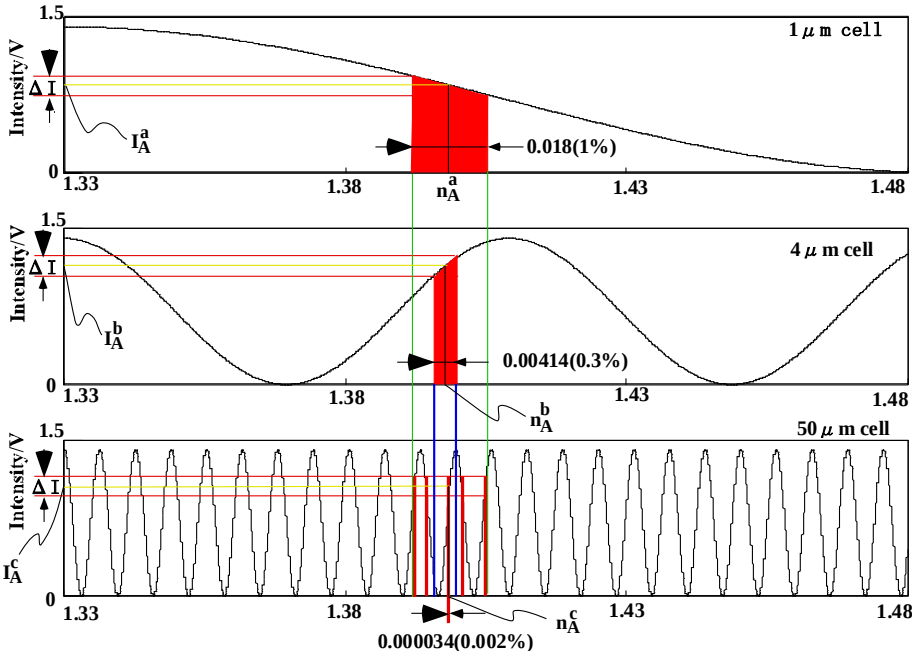


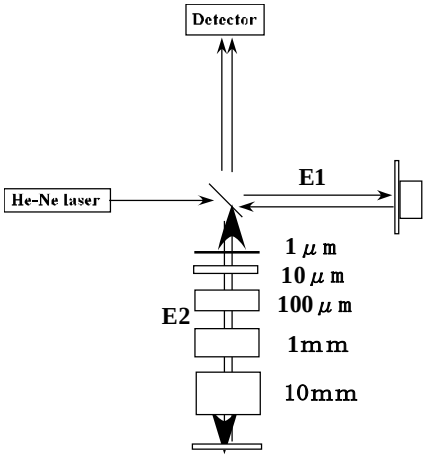
Fig. 8 Simulations for fundamental design.

長セルでは三角関数的に振動した。測定結果はシミュレーションとほぼ一致し、設計どおり光の干渉が観測されていることが確認された。これより試作した干渉型屈折率計が正しく動作していることが明らかとなった。セルが厚くなるにつれて狭い屈折率（濃度）領域で強度変化が起きており、セルが厚くなることで感度が増大することを明示している。たとえば同じ 1mM の濃度範囲で比較すると、0.5mm 長セルでは 0.06V、4mm 長セルでは 0.5V、10mm 長セルでは 0.6V と信号強度が増大している。これより屈折率の高感度計測の可能性が示された。

５．１．３　屈折率を高感度・高精度かつユニークに求めるアイデア

実際に未知試料の測定を行う際、感度のよい厚いセルだけを用いて測定を行えればよいが、この干渉センサーの強度変化は一価関数ではないため、未知試料に対してある値が得られても、それがどの点に相当するかがわからない。これが光干渉化学センサーでも最大の問題点である。これに対して、測定を薄いセルから厚いセルまで段階的に行い、荒い測定値から次第に高感度化する、というアイデアを考案し、そのシミュレーションを行った（Fig. 8)。

まず 1μm のセルを使用すれば、屈折率 1.33 から 1.48 の範囲までは一価関数として多くの化学物質を網羅することができる。我々の測定値のばらつきが約 0.2V であったため、測定値の標準偏差ΔＩを 0.2V と仮定する。この 1μm セルで、ある未知試料を測定し、0.8～1.0V の測定値が得られた場合、屈折率の標準偏差は 0.018 という値を示す。さらに厚い 4μセルでは 0.00414 となり、さらに厚い 50μでは 0.000034 と、より高精度な値が求められる。ここで 1μセルから感度のよい 50μセルで測定を行った場合、0.018 の標準偏差では 5 つの点を示すために特定ができない。そこで 4μのセルで測定を行うことで、標準偏差をしぼり 50μセルの一つの値を特定することができる。この操作により、徐々に小さい値を求めることができる。ΔI＝0.2V で 10mm セルまで測定を行えば約 1.4×10^{-6} の標準偏差を得ることが可能となる。



	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
1μm	water	sample	sample	sample	sample	sample
10μm	water	water	sample	sample	sample	sample
100μm	water	water	water	sample	sample	sample
1mm	water	water	water	water	sample	sample
10mm	water	water	water	water	water	sample

Fig. 9 Design of practical model.

このアイデアを具体的に実現するために一つの干渉計で一連の測定ができるように測定方法を検討した（Fig. 9)。今まで試料セルを置いていた光路に、測定に用いるセルを薄い順から並べたものである。測定はまず全てのセルに溶媒が水の場合、水を注入し測定する。次に薄いセルから順次サンプルを入れて測定を行うことによって、先程の理論に基づいた測定が

可能と思われる。

５．２　取り込み型セルでの信号応答

実験は 40 分間にわたり、10 分ごとに 0.1 M、水、0.15 M、水の順序で測定を行った（Fig. 10）。プロットは 1 分間の値を示している。今回は感応素子を含まない寒天膜による測定ではあるが、試料が寒天に浸透しているとき、ゆっくりと強度が変化し、逆に水によって試料が排出されるときもゆっくりと強度が変化し、予想された応答が得られた。しかし水の一定値のラインが毎回異なっていた。これは寒天が酸に対して抵抗力が弱いため、膜が変形しそれが影響したのではないかと考えられる。

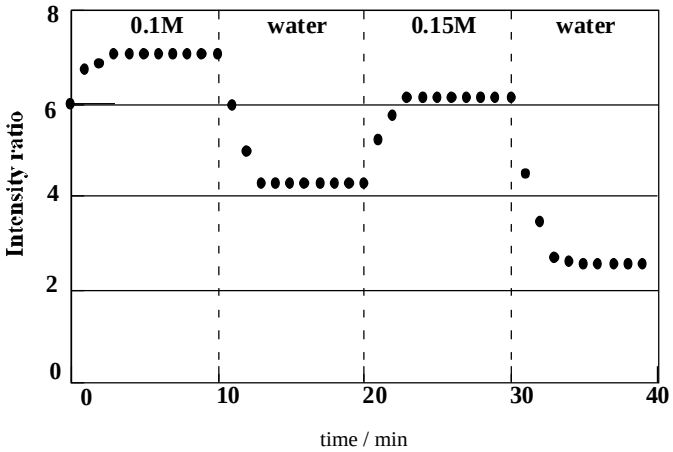


Fig. 10 Intensity cnange on infiltration to

５．３　透過型セルでの信号応答

40 分間測定を行ったが、ほとんど応答がみられなかった（Fig. 11）。原因として、寒天膜が厚すぎて透過できなかった、または濃度勾配だけでは透過できなかったことが考えられる。寒天膜の透過の特性を調べて改良する必要がある。

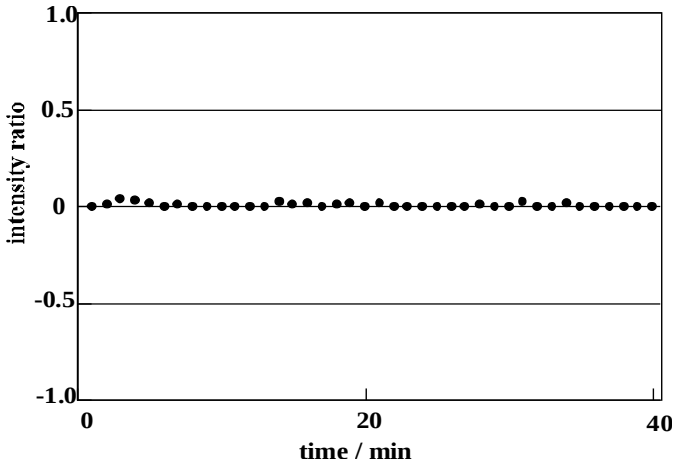


Fig. 11 Intensity ratio change on gar penetration per minute.

６　結　言

試作した干渉屈折率計は様々な濃度の炭酸水素ナトリウム水溶液を試料とする測定シミュレーションによってその動作および性能が確認された。またシュミュレーションにより、干渉センサーの強度変化の多価関数性という問題を克服する方法のヒントが得られた。実用モデルは理論計算とデザインの段階ではあるが、今後検証実験を行い、プログラム作成して、制御することによって、実用性、有用性が高まることが期待される。

また、干渉センサーの選択性がないという問題には、寒天膜による拡散現象の利用を提案し、寒天膜使用下での応答の確認ができたため、選択的分析の可能性が示唆された。高性能の分離機能をもった高分子を応用することが期待され、今後、高感度、高精度かつ定性分析を行える装置へと発展すること期待される。

謝　辞

本研究は、本「鹿児島科学研究所」の研究助成により行われた。また、本研究の一部を遂

行してくれた Brian John SARUNO 君はフィリピンからの日本国の国費による留学生である。

引用文献

1) H. M. Shabana, *Poymer Testing*, **23**, 695-702 (2004).

2) K. Ishikawa, H. Yamano, K. Kagawa, et al. *Optics and Lasers in Engineering*, **41**, 19-29 (2004).

3) V.K.Chhaniwa1, A.Anand, C.S.Narayanamurthy, *Optics and Lasers in Engineering*, **42**, 9-20 (2004).

4) N.Rashidnia, R.Balasubramaniam, J.Kuang, et a1., *lntemationa1 Joumal of Thermophysics*, **22, (**2001).

5) S. Busche, F. Dieterle, B. Kieser, and G. Gauglitz, *Sensors and Actuators B*, **89**, 192-198 (2003).

6）新井敏弘，平井正光　著，「*光工学入門*」，講談社.

7）玉虫文一　他　編，「*理化学辞典*」，岩波書店.

8) R.A.デイ.Jr.，A.L.アンダーウッド　著，鳥居泰男，康　智三　訳，「*定量分析化学*」，培風館.

Development of Chemical Sensor Measuring Refractive Index of Substance Using Interference Phenomena

Dr. Toshifumi YOSHIDOME, Associate Professor

Department of Chemistry, Biotechnology, and Chemical Engineering,
Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University
1-21-40, Korimoto, Kagoshima 890-0065, JAPAN
tel/fax: +81-99-285-8341; e-mail: tome@apc.kagoshima-u.ac.jp

Chemical sensors have been used today for environmental and industrial monitoring, food processing, perfume, beverage and other chemical products. Many applications need sensor systems that are smaller, high sensitivity, more portable, cheaper and even disposable. All chemicals have their own refractive index depending on kinds and concentration. Chemical sensor could be constructive using detection of refractive index. A model chemical sensor was developed to measure the refractive index of substance in a wide range with high accuracy and sensitivity using interferometer for general purpose such as the detector of HPLC. The sensor constructed was further tried to have an ability of components analysis using diffusion phenomena. The measurements on this sensor were performed using $NaHCO_3$ aqueous solutions with various concentrations, whose results were compared with computer simulations to give same results between them, which showed the construction of the apparatus and possibility of highly-accurate and sensitive measurement. To realize unique measurement with both wide range and high accuracy and sensitivity, an arrayed sample cell type was devised and attached to an interferometer. These cells are designed with various thicknesses to vary focal lengths and interlinked to each other. Through the use of this cell, analysis of the specific refractive index of substance was carried out for some model chemicals to show the possibility of the unique measurement of refractive index. In Michelson interferometer system, refractive index of substance could be measured with wide range, high accuracy and sensitivity.

平成２２年７月３０日　発行

鹿児島市南栄二丁目９番地
（サンケイ化学株式会社内）
電話　099-268-7588
財団法人　鹿児島科学研究所