

シンポジウム「資源としての水圏微生物」開催報告

平成11年9月16日(木)～18日(土)の3日間にわたり大阪府吹田市にある関西大学キャンパスで平成11年度日本生物工学会大会が開催されました。夕方には雷鳴が鳴り響いたり、また小雨が降るときもありましたが、最終日9月18日は天気もすっかり良くなり、2年に一度のペースで行っている日本微生物資源学会と日本生物工学会の共催シンポジウムを無事行うことができました。地球の約3分の2は水に覆われており、海洋や湖沼の水圏はわれわれを取り巻く環境としてはこれからますます重要となっていくと予想されます。この水圏に棲息する微生物の生態学的、分類学的、保全学的研究はこれからの資源としての微生物という観点から不可欠なものと思われ、今回は「資源としての水圏微生物」をテーマとしてシンポジウムを企画しました。

シンポジウムは、三共(株)筑波研究所の小玉健太郎先生の講演「海洋性酵母の分離とその利用」をトップバッターに始まり、(財)発酵研究所の中桐 昭先生の「マングローブに棲息する菌類の多様性とその利用」、海洋バイオテクノロジー研究所(清水)の志津里芳一先生の「海洋性細菌のつくる生理活性天然物」、大阪大学大学院薬学研究科の平田収正先生の「微細藻類の保存と利用」、南條特許事務所の南條博道先生による「特許における水圏微生物」と合計5名の先生方の講演が行われ、大阪大学生物工学国際交流センターの川崎(中川)浩子先生と関 達治先生、そして東京大学分子細胞生物学研究所の横田 明先生に座長としてシンポジウムの進行を執り行っていただきました。聴衆は60～90人前後を推移し、会場の教室がゆったりと埋ま

る程度のいい環境で、質疑も活発に行われました。小玉先生の講演は、日本周辺の海岸を中心に行った酵母の分離とその解析、そしてそのなかから実用化されたパン酵母と清酒酵母について紹介されました。房総半島の磯での分離される *Saccharomyces cerevisiae* complex の季節変動についての研究成果についてもふれられ、海洋性酵母の定義は何だろうという討論の種にもなりました。中桐先生はマングローブ環境の特徴、海生菌の定義などの解説から始まり、マングローブに棲息する腐生、寄生、共生の菌類を生態学的視点も取り入れ話題提供されました。また、これらの菌類での有用物質生産(DHAや抗ガン物質、抗ウイルス物質など)の例も紹介されました。志津里先生は、海洋性細菌からの生理活性物質探索の戦略的なことをアスタキサンチン色素生産菌などを例にあげて解説され、特許取得の重要性も強調されました。平田先生は微細藻類の保全に関して、分離培養株の長期保存法の開発を中心に紹介されました。南條先生はPCR特許の例をあげ、今まで以上に特許を意識した研究開発の重要性を強調され、特許庁などの動向についても解説されました。

各講演で質疑がしっかりと行われ、終了予定時間を20分近くオーバーしてしまい参加者の方々に少しご迷惑をかけたかもしれませんが、満足のいくシンポジウムを開催できたのではないかと考えています。なお、シンポジウム講演要旨の転載許可を日本生物工学会からとりまして、この後に掲載しましたのでご一読ください。

(文責 金子嘉信)

海洋性酵母の分離とその利用

三共（株）筑波研究所

小玉健太郎

海洋環境から分離される酵母は、生育に海水を要求しない。したがって、これらの酵母は単に陸から流れ込んだものなのか、それとも海洋で生活を送っていたのかは定かでない。しかし、海洋に豊富に存在する海産多糖を考えると、それらの分解物の利用者としての酵母がクローズアップされてくる。数多い酵母の中で *Saccharomyces cerevisiae* は糖依存性が高く、われわれにとっても利用価値が高い。そこで、海洋での酵母の生活を明らかにするために *S. cerevisiae* を分離し、それらの特性や季節変動を調べた。また、分離株からの新しいパン酵母や清酒醸造用酵母の開発を試みた。

- (1) 海洋からの *S. cerevisiae* の分離：海洋の *S. cerevisiae* の数は非常に少なく、通常の方法では分離される可能性が低いことが予測された。*S. cerevisiae* の生理学的特性のひとつは蔗糖の発酵力が強いことである。そこで、蔗糖を糖源とした嫌気条件下での分離を考案した。この方法で磯で採集した海水や海藻から分離を行い、分離株の同定を形態学的性質、生理学的性質と DNA-DNA の相同性に基き行った。この結果、13 株の *S. cerevisiae* を分離することができた。
- (2) 海洋由来の *S. cerevisiae* の特性：海洋由来の *S. cerevisiae* 13 株と陸上由来の *S. cerevisiae* 11 株のブドウ糖、蔗糖、麦芽糖の発酵力を比較したところ、ブドウ糖と蔗糖の発酵力はともに強く差はなかった。一方、麦芽糖発酵力には大きな差があり、海洋由来株が強く、陸上由来株は極端に弱かった。また、海洋由来株の耐塩性は、陸上由来株より優れていた。

- (3) 海洋での *S. cerevisiae* complex の生活：海水中の *S. cerevisiae* complex の季節変動を房総半島の磯で調査したところ、変動は海藻の消長と密接な関係があることが明らかになった。この結果から、海洋の *S. cerevisiae* は海藻由来の糖を利用して生活をしていることが推察された。
- (4) 海洋性酵母 *S. cerevisiae* からの新しいパン酵母の開発：分離した 13 株を用いて製パン試験を行ったところ、三浦半島で採集した海水から得た SANK 50192 株が市販パン酵母とほぼ同等の生地膨張力を示した。また、この酵母で焼き上げたパンは、風味があっさりしている、爽やかなイメージがするとの評価を得た。
- (5) 海洋性酵母 *S. cerevisiae* での清酒の製造：分離した 13 株を用いて少量仕込みの清酒の製造試験を行った。SANK 50192 株と三浦半島で採集した海藻から分離した SANK 50197 株はモロミからのアルコール生成量も多く、香りも良かった。SANK 50192 株で造った純米酒は香りに深みがありマイルド、SANK 50197 株で造った純米酒はフルーティーな香りがするとの評価を得た。

Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from marine environments and their applications

Kentaro Kodama (Tsukuba Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.)

Key words: marine yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, baker's yeast, sake-brewing

マングローブに棲息する菌類の多様性とその利用

(財)発酵研究所

中桐 昭

マングローブ林は、熱帯・亜熱帯の河川河口域の潮間帯を中心に分布する植生で、その林床は潮汐によって海水と淡水が入り混じる汽水域となっている。ここにはマングローブや陸上さらには海からさまざまな植物遺体が流入し、それを基質として棲息する菌類がいる。このマングローブ汽水域は、潮の干満によって水位、塩分濃度、水温が激しく変動する特殊な環境であるが、このような環境に適応して棲息する、いわばマングローブ菌類ともいべき菌類が存在することが近年明らかになってきた。また、マングローブ汽水域は陸上と海の間中間的な環境であり、陸生菌と海生菌とをつなぐ菌類が存在する可能性も指摘されている。多様なマングローブ菌類の形態、性状、生態など、その特徴を解説するとともに、その利用面の研究についても紹介したい。

1) マングローブ菌類の特徴

(1) マングローブ落葉に棲息する鞭毛菌類

卵菌類 *Halophytophthora* 属菌は、マングローブの落葉が水に浸かるとすぐに遊走子によって定着し、菌糸を侵入させる。無性生殖器官として、水中で遊走子嚢を形成し、その内部で形成された遊走子を放出する。いくつかの菌種の性状を調べたところ、マングローブ汽水環境の塩分濃度、水温に適した生長および生殖特性を持つことがわかった。また、遊走子の分化や放出を誘導する条件として、塩分濃度や水温の急激な変動や一時的な乾燥など、マングローブでみられる自然環境要因に依存して生活史をまわす菌種がいることも明らかになった。そして、これらの性状は菌種ごとに異

なり、しかもその性状に対応した地理的、季節的分布を示すこともわかった。

(2) マングローブ腐朽材や葉に棲息する子囊菌、担子菌および不完全菌

マングローブの枯死した枝、支柱根などは子囊菌などの分解基質となっている。これら菌類の特徴としては、胞子にアペンデッジを備え、水中での分散、定着に適応した菌種がいる一方、空中に胞子を射出する陸生菌型の子嚢を持つ菌種もあり、さらには両者の中間的な性状の菌も存在することである。このなかには、陸上から水生環境への進出途上と考えられるような形質を備える菌が含まれている。

2) マングローブ菌類の応用研究

マングローブ域や他の海域から分離される真菌から見い出された生理活性物質の研究はこれまであまり多くはないものの、マングローブ腐朽材に棲息する子囊菌 *Helicascus kanoloanus* や *Hypoxyylon oceanicum* などから、陸生菌からは知られていない二次代謝産物の報告がある。マングローブ菌類には未だ多くの未知種が存在すると考えられ、新規有用物質の探索資源として注目に値する菌群であると考えられる。

Diversity of mangrove inhabiting fungi and their application

Akira Nakagiri (Institute for Fermentation, Osaka)

Key words : biodiversity, ecology, fungal metabolites, mangrove

海洋性細菌のつくる生理活性天然物

海洋バイオテクノロジー研究所

志津里芳一

目的：海洋生物からの有用物質，特に生理活性物質の探索研究はこれまで底生生物を中心に行われ，約3千種の新規物質が見い出されている。しかしながら，一部のものを除けば，これらの底生生物に含まれる生理活性物質は微量なため，医薬，農薬などの産業分野に活用されている例はきわめて少ない。一方，陸上では植物，微生物からの生理活性物質の探索研究が長年行われ，特に，微生物代謝産物からは約1万種に近い数の新規化合物が発見されている。海洋性細菌の生理活性物質については，培養可能な細菌が陸上に比べ多くないことが要因となり，最近まであまり研究例は多くない。したがって，海洋細菌の効率的な培養法を確立すれば，新規な生理活性物質が得られることが期待される。海洋バイオテクノロジー研究所では，先ず海洋細菌の定義を好塩性であるものとし，陸上から海洋に適応した耐塩性のものを除外し，これら好塩性細菌の培養法を確立することから着手し，多くの生理活性物質を単離することを目的として研究を行ってきた。

方法および結果：海洋細菌から特定の作用機序あるいは特定の構造を狙わず，広く新規な生理活性物質を求める場合には，1個の生物体を用いた評価系を構築するのが有利である。そこで，評価系検定生物には抗菌探索評価系として陸上および海洋細菌を，抗微細藻探索評価系として海洋微細藻類を用いた。進め方としては，①効率良く海洋細菌を分離するために，好塩性試験を導入する。②効率よく海洋性の抗微生物物質生産菌を分離するために，薬剤耐性等の選択圧をかけた分離培地を導入する。③海洋細菌の好塩性の多様性お

よび菌体内イソプレノイドキノン等の微生物の分類学的指標を海洋微生物の分離法に取り入れて，探索全体の効率の改善を図る。④広く海洋微生物の生産する上記評価系を指標とした活性物質の探索を行う。⑤活性物質を海洋微生物培養液から単離する。⑥活性物質の構造決定を行う。といったアプローチをとった。

先ず，細菌の分離については，主に4種類の培地上に，種々の採集場所において海水，海洋生物などから菌を撒き，数日後生じたコロニーを集め，好塩性のあるもののみを採取した。これらの海洋細菌からさまざまな生理活性物質を得ることを行った。

これらを抗微生物活性，抗微細藻活性試験などに加え，活性を示したものについて液体培養を用いて培養し，それぞれの活性を指標に活性物質の単離を行った。これらの方法で単離した多くの生理活性物質について述べる。多くの努力にもかかわらず，培養可能な細菌は全体の1%以下であるといわれており，今後これら培養不可能なものを培養する技術を開発し，さらに多くの新規生理活性物質を開発していくことが望まれる。

Biologically active compounds from marine bacteria

Yoshikazu Shizuri (Marine Biotechnology Institute)

Key words : marine bacteria, natural products, biological activity, culture conditions, isolation, structures

微細藻類の保存と利用

大阪大学大学院薬学研究科

平田 収正, 宮本 和久

緑藻やラン藻などの微細藻類は、地球上の全有機物生産の約3分の1を担い、陸上植物とともに一次生産者として太古から自然生態系の健全な維持に貢献してきた。環境問題が深刻化するなか、最近では、微細藻類の高い光合成能と多様な代謝活性を積極的に環境汚染物質処理や化石燃料代替エネルギー生産に利用するための技術開発が活発に行われるようになった。また、微細藻類は医薬品原料などの生物活性物質の探索源としても注目を集めるようになり、陸上植物にないユニークな構造を有する新規物質が発見されている。今回はこれらのなかから、われわれが行っている以下の研究について紹介する。

- 1) 垂直管型バイオリクターを用いた海産性緑藻 *Dunaliella tertiolecta* の培養系において、燃焼排ガス中の NO_x のほとんどを占める一酸化窒素 (NO) の約 70% が除去され、窒素源として細胞増殖に利用されることを確認した。
- 2) *Tolypothrix tenius* などの淡水性ラン藻が、高濃度の Ca や Mg の存在下においても Cd, Pb, Zn などの重金属を選択的に吸着・除去できることを確認した。
- 3) 乳酸菌などの発酵微生物と有機物を基質として水素生産を行う光合成細菌の混合培養系において、二酸化炭素固定や NO_x 処理に用いた微細藻類バイオマスを化石燃料代替エネルギーとして、有用な水素へ効率良く再資源化できることを示した。
- 4) 淡水性ラン藻 *Nostoc spongiaeforme* が生産し細胞外に放出する紫色素が、動植物細胞から真菌、細菌まで、多くの生物に対して増殖抑制作用を示すことを明らかにした。

微細藻類のなかには、生理、生態が明らかになっていないものも数多くあり、広範な探索によってさらに優れた機能を有する株が得られる可能性も大きい。また、遺伝子操作による代謝制御などによって、このような微細藻類の有用な機能をさらに強化することも可能であろう。しかし、光独立栄養生物である微細藻類は一般に株の維持・管理が難しく、研究材料としては他の微生物と比較して非常に扱いにくい。特に液体室

素中での超低温保存が普遍的に適用できないことから、個々の研究室での株の維持は専ら継代培養によって行われており、多大なコストと保存スペースを必要とするばかりか、常に雑菌汚染などのトラブルの危険にさらされている。したがって、今後微細藻類を利用した生物的環境修復や新規有用物質生産に関する研究をさらに発展させるためには、上記のような有用な機能を持つ株を研究室レベルで簡便かつ普遍的に超低温保存できる技術の確立が不可欠である。

われわれは、これまで藻類の保存に用いられてきた DMSO などを凍害防御剤として用いる緩速予備凍結法に代え、高等植物材料の超低温保存法として開発され、最近多くの成功例が報告されるようになったビーズ乾燥法を微細藻類に適用すべく、種々の検討を行った。この結果、0.5 M のスクロースを加えたアルギン酸ビーズに固定化した細胞を空気乾燥により脱水後、直接液体窒素中に保存する操作により、海産性真核微細藻類およびラン藻の数株について超低温保存に成功した。また、グリセロールをスクロースと組み合わせることにより生存率が上昇すること、さらに乾燥に弱い淡水性真核微細藻類には高等植物のストレスホルモンであるアブシジン酸による処理が有効であることも明らかにした。この方法は、凍結時の厳密な温度制御や融解時の凍害防御剤の洗浄を必要としないこと、さらに固定化することで微細な細胞の取り扱いが容易になるなど、従来法に比べて非常に操作が簡便であり、今後多くの株に適用できることが確認できれば、研究室レベルで容易に行える微細藻類の保存方法として期待できる。

Cryopreservation of microalgae and application of their functions to bioremediation and production of useful compounds

Kazumasa Hirata, Kazuhisa Miyamoto (Grad. School Pharm. Sci., Osaka Univ.)

Key words : microalgae, cryopreservation, bioremediation, bioactive compound

特許における水圏微生物

南條特許事務所・弁理士

南條 博道

今日のアメリカの隆盛は、1980年代からの特許重視政策（プロパテント）に負うところが大きい。アメリカの研究者は、研究成果を強力な独占排他権である特許という武器に変え、新たな事業を起こすため、そして企業のビジネス戦略のために利用し、その結果、アメリカの技術貿易収支は、1986年～1995年の10年間で約16兆円の黒字であるといわれている。

わが国もようやくプロパテントの時代に入り、特許の重要さが認識されつつある。しかし、国の制度にも問題があるが、わが国の研究者、特に大学の研究者は特許に対する認識が低いのが現状である。

ところで、21世紀はバイオテクノロジーとコンピュータの時代といわれており、バイオテクノロジーが果たす役割は大きい。特に、医療、環境保全、農業（食料）等の分野において、さらに発展する可能性を秘めている。このバイオテクノロジーの分野においては、現在、圧倒的にアメリカがリードしている。そこで、

技術立国日本で重要なことは、わが国の研究者がバイオテクノロジー研究の成果をどのように評価し、権利とするのかである。特に、大学の独立行政法人化等の問題が控えており、大学研究者の特許に対する意識を変えていくことが重要な課題である。研究成果の発表だけでは、激動の時期を迎えた時代に生き残ることはできない。

そこで、なぜ、研究成果を特許とする必要があるのか、また、研究成果をどのように特許と結び付けて考えればよいのかを、水圏微生物、例えば深海微生物、極限環境に生育する微生物等を例に、紹介する。

Patents on aqueous micro-organisms

Hiromichi Nanjo (Patent attorney, Nanjo Patent Office)

Key words : patent, aqueous, micro-organism, extremophiles