

特別講演

かずさ DNA 研究所におけるゲノム解析とリソースの整備

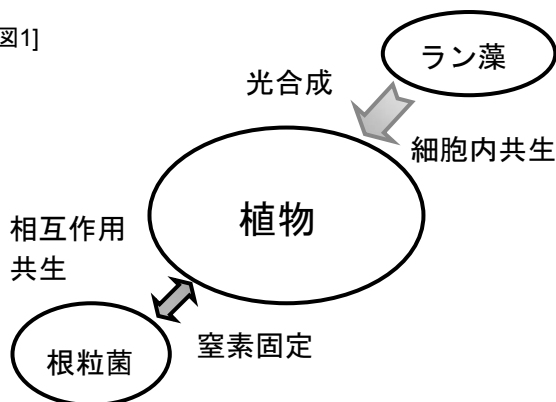
田畑哲之

(財) かずさ DNA 研究所

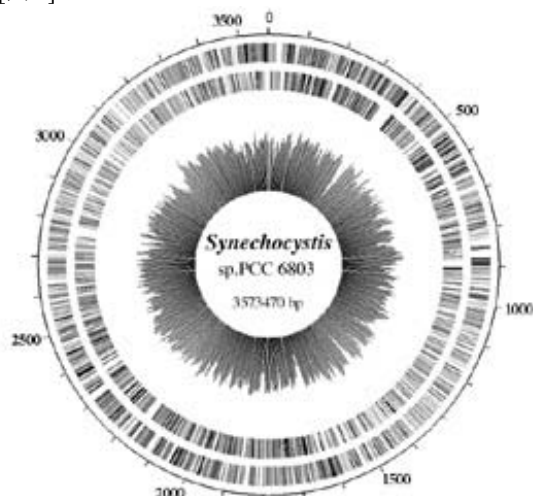
(財) かずさ DNA 研究所は、DNA・ゲノム研究に特化した研究機関として千葉県によって設立された。1994年の開所以来、千葉県のサポートにより微生物、植物、ヒトを研究対象として、主にゲノム構造情報の蓄積と機能解析を進めてきた。われわれ植物ゲノム研究グループは、共生を通じて植物と密接な関係をもつラン藻（藍色細菌）と根粒菌、モデル高等植物シロイヌナズナの全ゲノムを解読するとともに(図1)、大規模な遺伝子機能解析やデータベースによるゲノム情報の公開を行ってきた。そして、現在は、マメ科植物のモデルであるミヤコグサ、産業的な重要性がたかいユウカリとトマトの2種類について、ゲノム塩基配列の解析を進めている。

バーする整列クローンの整備とクローン単位の配列決定の組み合わせで行った。ゲノム塩基配列の確定に約1年半、情報解析を含めると2年近くを要したが、プロジェクトは順調に進行し1996年秋に世界で3番目のバクテリア全ゲノム構造、世界初の独立栄養生物の全ゲノム構造として DNA Research 誌に発表することができた。ゲノムサイズは当時としては最大の3,573,470塩基であった。また、蛋白質の遺伝子として3168個(現時点では3264個)を推定した(図2)。

[図1]



[図2]



<ラン藻のゲノム解読>

ラン藻は植物型（酸素発生型）光合成を行うバクテリアの総称で、細胞内共生によって植物のクロロプラストへと進化したと考えられている。そのため、高等植物が行う光合成と構造、機能的な共通性が高く、植物型光合成研究のモデル系として長い研究の歴史をもつ。

われわれは、ゲノム解読の最初のターゲットとして、単細胞性のラン藻であるシネコシスティス (*Synechocystis* sp. PCC 6803) を選んだ。シネコシスティスは培養が容易で形質転換系が確率していることから、生化学や遺伝解析の材料として国内外で広く利用されていた。ゲノムの解読は、当時のスタンダード的な方法である物理地図作製、全ゲノムをカ

シネコシスティス以降、われわれはユニークな性質をもつ3種類のラン藻のゲノム塩基配列を全ゲノムショットガン法により決定した。*Anabaena* sp. PCC 7120は繊維状のラン藻で、窒素欠乏条件下でヘテロシストという特殊な細胞を分化し窒素固定を行う能力をもつ。単細胞性の *Thermosynechococcus elongatus* BP1は好熱性(最適生育温度 55°C)であることから、光合成に関わる蛋白質複合体などを安定に純化することができる。*Gloeobacter violaceus* PCC 7421は、ラン藻の祖先に近い性質を有しているといわれており、通常光合成の場として細胞内に発達しているチラコイド膜が観察されず、光合成系は細胞膜上に存在していると考えられている。配列分析の結果を表1に

まとめた。4種類のラン藻は、形態や生理学的性質が異なるようにさまざまなサイズのゲノムを持っており GC 含量も大きく異なる。遺伝子数や構成も多様であり、全遺伝子の 15-30%程度が種特異的であることが明らかになった。

<根粒菌のゲノム解読>

根粒菌は、マメ科植物の根に共生し、根粒内で窒素固定を行うことが知られている。光合成産物を与える代わりに窒素固定の産物であるアンモニアを供給されるため、マメ科植物は荒地でも生育することができる。植物と土壌バクテリアの宿主特異性をともなう相互作用、窒素肥料の低減につながる農業上の重要性などから、根粒菌およびその感染機構に関する生理学的、生態学的知見は蓄積していたが、遺伝学的な研究は緒についてばかりであった。

当時われわれはミヤコグサのゲノム解読を開始して間もない時期であったことから、まずその共生パートナーであるミヤコグサ根粒菌 (*Mesorhizobium loti* MAFF 303099) の全ゲノム塩基配列を決定した。また、後に比較ゲノム研究を目的として、農業上の重要性がより高いダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110) のゲノム解読を行った。その

結果、ミヤコグサ根粒菌は約 7.6 Mb、ダイズ根粒菌は約 9.1 Mb と、両者とも比較的大型のゲノムをもつことが明らかになった。推定蛋白質遺伝子数は各々 7281 個、8317 個であった(表 1)。共生窒素固定に関わると考えられる多数の遺伝子も同定された。

<ゲノムリソースとデータベース>

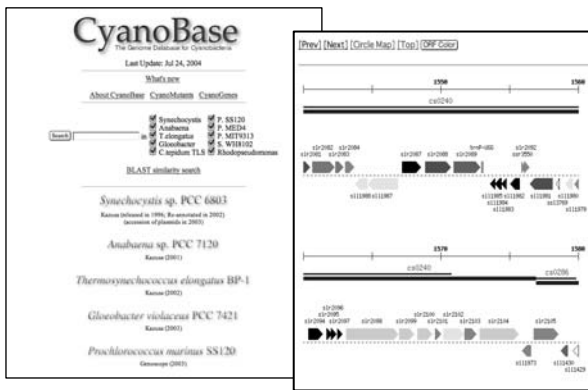
ゲノムの全構造が明らかになった後、個々の遺伝子の機能解析を進める上で、ライブラリー等のゲノムリソースは大きな価値をもつ。塩基配列を決定する際には、全ゲノムをカバーする BAC ライブラリー、コスミドライブラリー、プラスミドライブラリー、M13 ファージライブラリーを作製したが、われわれはこれらを全て保存しており必要に応じてコミュニティに提供してきた。具体的な用途としては、人為的に変異を導入した後に細胞内に導入するためのシードクローン、アレイ作製の鋳型などがあげられる。

ゲノムデータベースは、ゲノム解読の結果をコミュニティに提供しその成果を広く知らしめるために重要な役割を果たす。決定したゲノム配列と遺伝子情報を公的データベースに登録するだけでなく、利用者が望む情報をわかりやすい形に加工して提供することが成果の価値を高める。われわれは、ラン藻と根粒菌の解読結果を提供するため、CyanoBase(図3)とRhizoBase(図4)を作成し維持している。両データベースとも、遺伝子のグラフィカル地図、遺伝子情報、機能分類など多彩な情報を適切なリンクで結合しており、国内外の研究者から高い評価を得ている。また、他の研究機関で決定されたラン藻、根粒菌ゲノムの全情報、部分情報を適宜取り込むことで、両研究領域の中心的なデータベースとしての役割を果たしている。データベースを更新しながら維持し続けることは労力と費用を要するが、時々必要とされる情報を保持、提供することは、ゲノム解読と等しく重要な活動である。

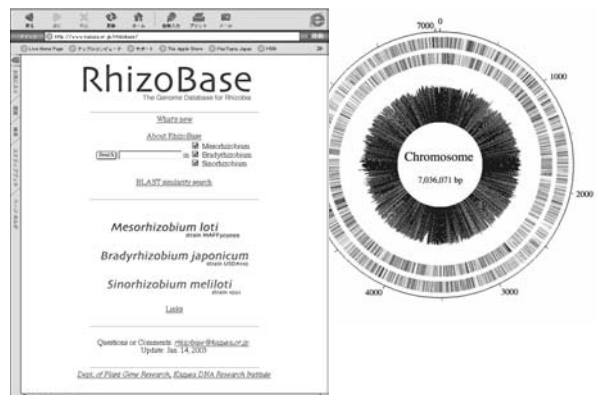
[表 1]

	ゲノムサイズ (bp)	推定 遺伝子数	発表年
<b>ラン藻</b>			
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	3573470	3264	1996
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	6413771	5368	2001
<i>T. elongatus</i> BP1	2593857	2475	2002
<i>G. violaceus</i> PCC 7421	4659004	4430	2003
<b>根粒菌</b>			
<i>M. loti</i> MAFF 303099	7596297	7281	2000
<i>B. japonicum</i> USDA 110	9105828	8317	2002

[図 3] CyanoBase <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>



[図 4] RhizoBase <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>



**技術賞受賞講演**

**微細藻類の系統保存に携わって**

恵良田真由美

(財)地球・人間環境フォーラム/国立環境研究所・NIES

国立環境研究所微生物系統保存施設（以下NIESと略す）は発足以来20年以上にわたって環境問題・環境研究に関わる微細藻類を主体とした収集・維持・分譲を行ってきた、わが国のカルチャーコレクションとしてはユニークな存在である。演者は1995年よりNIESにおいて藻株の継代培養による保存・分譲業務を手がけてきたので、この機会に本施設における保存株の日常的な維持管理および分譲取り扱いの現状を報告し、微細藻類の系統保存業務上の特色について紹介したい。

**NIESにおける微細藻株の継代培養の現状**

最近原生動物や大型藻の受け入れがしだいに増えてきてはいるが、依然としてNIESにおける保有株（総数1,855）の大部分は微細藻類であり、このうち現在1,200株余りが継代培養、約400株が凍結保存により維持されている。

保存機関に課せられた最低限の義務はいうまでもなく株を絶やさないことであるが、継代培養においては植え継ぎ忘れや生育状態の見落とし、設備不調の発見遅れ等、不注意で株を失ってしまう機会には事欠かない。しかも株数の増加にしたがってその危険性は増大する。NIESではこれらの不安材料を少しでも排除し、保存業務担当者の負担を軽減するため、以下のようなシステムを採っている。

**①植え継ぎ忘れの防止**

微細藻類は株により植え継ぎの間隔がまちまちであり、しかも温度・光条件によって異なる保存室・インキュベータに置かれているため、記憶だけに頼って漏れなく植え継ぎを行なうのは事実上不可能である。NIESは「MCCシステム」と名づけられた保存株データベースを有しているが、その中には個々の株の履歴のみならずメンテナンスに必要な情報（植え継ぎの間隔、培地の種類、保存スペース内でのラックの所在、等）も納められている。MCCシステムはデータベースの中からある特定の日に植え継ぎを行なうべき株を全てリストアップしこれらの情報とともに出力する機能を備えており、担当者は毎日このリストにしたがって植え継ぎ業務を行なっている。

**②生育状態の確認**

他の微生物に比べて一般に増殖速度の遅い微細藻類では、次の植え継ぎまでの期間中の生育状態を常に把握しておくことが重要である。NIESでは全ての継

代株において、最低毎週1回生育状況を検査している。通常は肉眼で行なうが、植え継ぎ後間もないために細胞密度が非常に低い場合は実体顕微鏡による確認を行なう。その結果不良であった株については植え継ぎのやり直しや場合によっては単離等の対策を施した上で2~3日後に再度チェックを行ない、研究スタッフとのミーティングにおいて結果を報告する。その際必要があればさらに新たな対策を検討し施す。

この毎週のチェックでは生育状況のみならず植え継ぎ忘れや培地の誤り等がないかどうかの確認も併せて行なっており、不注意によるミスが発見や不良株のケアについて二重三重にカバーする体制となっている。

**分譲に際しての微細藻株の取り扱い**

NIESでは所内への提供分も合わせて毎年平均400~600程度の藻株を研究材料として分譲している。依頼者自身による持ち帰りを除けば、基本的に分譲は海外向けも含めて培養サンプルの郵便による送付となる。凍結株の場合も解凍後再培養したサンプルを送付する。大部分の株では郵送による株へのダメージもさほど心配ないので、硬化ガラス製のねじ口試験管に細胞懸濁液をほぼ一杯に満たしてシールしたものをクッション材で梱包し、速達郵便として送付している。

一部の藻群（ラフィド藻や渦鞭毛藻等、細胞が大きい、細胞壁をもたない、等の特徴をもつ株が多い）は輸送中の温度上昇や振動による液相の攪乱にたいへん弱いため、株データ中でも“Untransportable”（=輸送困難）と表示して依頼者の注意を促すと同時に、必要に応じて①断熱性のケースに保冷剤とともに入れる、②輸送中もサンプルの入った試験管を立たせた状態に保つ、③懸濁液の細胞密度を低めにする、等の対策を施し、できるだけ株のダメージを少なくする努力を払っている。特に送付サンプルの温度管理は比較的丈夫な株にとっても、これから夏にかけての期間中郵送での分譲を成功させるキーポイントである。

NIESはNBRP藻類部門の中核機関として、今後さらに多くの藻株を受け入れてゆくことが求められている。たいへんな労力を払って確立された株をひとつでも多く、少しでも良好な状態で保存し提供し続けることを目標に、演者も微力ながら力を尽くしてゆく所存である。

## シンポジウム

### 1. NITE-DOB における微生物収集戦略

宮崎正浩

独立行政法人製品評価技術基盤機構

今後のバイオテクノロジーの発展の鍵は、新規な微生物をできるだけ多く収集して解析することである。そのためには、生物多様性条約を考慮し、地理的条件を生かしてアジア諸国と共同で微生物遺伝資源を探索・収集し、利益を共有する協力関係を構築することが我が国の戦略として極めて重要であると考えられる。

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部(NITE-DOB)は、バイオテクノロジーの発展とその産業化に不可欠な知的基盤である微生物資源を整備することを目的として2003年4月に設立されたものである。

NITE-DOBは、経済産業省が定めるNITE第1期中期目標(2001~2005年)に基づき、戦略的意義のある微生物資源を国内外から収集するとともに、我が国の中核機関として国内諸機関と連携し、微生物資源の保存・供給体制を整備することを目標として、下記の微生物収集戦略により、収集事業を展開している。

#### 1. 標準株

標準株に関する研究論文を発表する著者から株の寄託を受けるために関連学会に協力を要請するとともに、個々の論文の著者に対し寄託を働きかける。また、国内の他の生物資源機関と連携し、国全体としての微生物資源の保存・提供体制の整備を目指す。

#### 2. 新規微生物

下記の微生物を中心として自ら微生物の探索・収集を行い、スクリーニング材料としての利用を可能とする大量提供を含めて、民間企業等が利用しやすい形で提供する。

- (1) 産業への応用の可能性の高い多様な2次代謝産物を生産することが知られている放線菌や糸状菌類
- (2) 民間企業や大学の研究室等ではアクセスすることの困難な極限環境や特殊環境あるいは熱帯などの環境(下記、「海外微生物」の項を参照)に生息する微生物

#### 3. 海外微生物

NITE-DOBは、海外微生物へのアクセスを改善するために、アジア諸国を中心として、生物多様性の豊かな資源国と交渉して覚書(MOU)を締結し、各国の微生物資源を収集し、我が国の企業や大学の研究者が海外資源を利用できるような仕組みを整える。アジア諸国の生物遺伝資源の収集保存体制や生物多様性条約に対する取り組みの現状は多様であるので、下記のように対応することとする。

- (1) 既に収集保存体制をある程度整備している国につ

いては、保存されている微生物を交換あるいは個別の共同研究等によって入手する(タイ等)。

- (2) 微生物の収集保存体制が十分できていない国々については、共同で新規微生物を収集・分離することにより入手する。同時に、これらの国々が独自で微生物を探索・収集・保存できるようにするために、積極的に技術移転を行うとともに人材の育成に協力する(インドネシア、ベトナム、ミャンマー等)。

#### 4. アジアコンソーシアム

NITE-DOBは上記の二国間の協力に加え、アジア地域における生物資源の共同での探索と産業利用の促進を図るためNITE-DOBが主導して2004年に設立した「微生物資源の保存と持続可能な利用のためのアジアコンソーシアム」(アジア12カ国が参加)の活動を通じ、アジアのBRCネットワークの形成や人材育成協力等を推進していく。これらの活動を通じ、生物多様性条約の枠組みの下でアジア諸国の多様な微生物資源を互いに有効に利用し、産業利用の成果につなげていける体制を整備する。

NITE-DOBは、上記の事業の実施の過程で得た情報、経験、人脈等を活用して、アジア諸国の微生物遺伝資源へのアクセスに関して民間企業を支援するとともに、生物多様性条約締約国会合や専門家会合に出席し、我が国の海外生物資源へのアクセス改善に向けて国内外の政府関係者等へ積極的に働きかける。

また、NITE-DOBは、収集した微生物資源の産業利用を促進するために、産官学の研究機関との共同研究を実施するとともに、産業応用上のみならず学術的に重要な微生物のゲノムの構造と機能を解析し、知的財産権を確保し、その産業利用を促進する。さらに、産業有用性がある微生物の知的財産権の保護に資するため、2004年から開始した特許微生物寄託事業を一層充実したものとしていく。

現在、経済産業省においてNITEの第2期中期目標(2006~2010年)が検討中であるが、NITE-DOBは、2010年までに世界最高レベルの生物遺伝資源機関(BRC)としての体制を整備することを目指し、産官学による微生物資源の利用を促進するため、新規で多様な微生物資源を着実に収集し、バイオテクノロジーの知的基盤を整備していく。

## 2. 多様化するバイオプロセス開発研究とゲノム情報の利用

木野邦器

早稲田大学理工学部応用化学科

石油など化石資源の変換技術に依存した20世紀の文明は、私たちに豊かな生活を提供してきたが、一方で、温暖化や地球規模での環境汚染問題、同時に資源枯渇や食料不足など社会基盤の崩壊の危機を招いている。持続型社会の構築がこの21世紀に課せられた重要課題であるが、地球環境を維持しつつ、人類の持続的な発展を実現するための生産システムを目指すバイオプロセスに大きな期待が寄せられている。安価な原料からの高付加価値製品創出を可能にするバイオプロセスは、生物の多様性に基づく多種多様な機能を活用する物質変換プロセス(バイオコンバージョン)であり、生物機能の多様性にあわせてそのプロセスならびに生産物も多様化してきた。とくに微生物機能を利用した工業プロセスは、遺伝子組換え技術やバイオリアクター開発の進展もあり、従来の発酵・醸造で培われてきた技術を基盤としながら大きく展開してきた。

微生物は、この地球上に原始生命体が誕生した約35億年前からそれぞれの環境に適応しながら進化・多様化してきた。微生物の営みは生育環境に適応するだけでなく、地球環境の形成にも大きく関わり、我々人類を含む全ての生物の営みに影響を与えている。新しい有用な微生物機能を求めて広く自然界からのスクリーニングが実施されてきたが、地球上に存在する微生物の99%以上が培養困難または培養不能な未知の新規かつ多様な微生物から成り立っていると考えられており、近年、これら難培養微生物を対象としたハンドリング技術の確立や、有用酵素や生理活性物質などの探索研究が検討されている。その一環として環境中より目的酵素遺伝子を直接取得するメタゲノムと呼ばれる研究も盛んに実施されるようになってきた。メタゲノム研究はタンパク質やゲノム解析研究の成果に基づくものであるが、タンパク質機能との関連性を明らかにするゲノム情報は、有用遺伝子の探索や微生物ゲノムからのクローニングにも効果的に活用されている。

本発表では、持続型社会実現に向けて実施されている各種バイオプロセス開発研究を、主に我々の最近の研究を例に紹介する。とくに微生物の多様性に基づく有用酵素の探索や、ゲノム情報を活用した目的酵素遺伝子のクローニング、解析研究に基づく遺伝子改変による有用酵素の創製などについてもふれる。

タンパク質の構成成分で、単独でも生体内において重要な活性を有するL-アミノ酸に対して、D-アミノ酸は生理的に不活性な非天然物化合物と考えられていた。ところが、近年、D-アミノ酸残基を持った抗菌性ペプチドが

いくつか単離され、その生理活性にD-体の立体配置が必須であること、またヒトを含めた哺乳類体内にもD-アスパラギン酸やD-セリンなど遊離型のD-アミノ酸が見い出されるなど、その由来や役割に関心が寄せられるようになってきた。生物がL-アミノ酸を主として利用するように進化してきた一方で、D-アミノ酸も利用しているとすれば、それは大変巧みで効率的なことだと思われる。今後、D-アミノ酸は、医薬、農薬合成におけるキラルブロックとしての需要が見込まれるが、その効率的な合成法は確立されていない。そこで、効率的なD-アミノ酸合成プロセスの確立を目的として、*Pseudomonas putida* IFO 12996由来低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ(Bar)に着目した。Barは塩基性、中性アミノ酸に対して広く基質特異性を有する工業的に有用な酵素である。

ゲノム情報を利用する新規手法による*P. putida* IFO 12996由来の低基質特異性アミノ酸ラセマーゼの遺伝子クローニングに成功した。最近公開された*P. putida* KT2440の全ゲノム塩基配列と既に報告されている活性中心のアミノ酸配列(9残基)の情報から、相同性比較とORF検索を行ない、目的酵素遺伝子を予測した。開始コドンから終止コドンまでの1,230bpを増幅して得たPCR産物はIFO 12996株と同様の低基質特異性を示し、LysineやMethionineに対しては約40%の転換活性を有することが明らかとなった。部分的な遺伝情報(活性中心の一部分のアミノ酸配列)に基づいて目的とする酵素遺伝子を取得する本手法は、当該タンパク質の精製ステップの必要がなく極めて効率的である。

さらに、当該酵素の基質認識機構の解明と活性の弱い芳香族アミノ酸へのラセミ化活性の向上を目指し改変酵素の取得を検討した。Barは立体構造が既知のアラニンラセマーゼと相同性を示すものの活性に直接関与する残基は補酵素であるPLPが結合するLys残基しか特定されていない。そのためBarの改変には立体構造の情報を必要とせず改変酵素の取得が可能なError-Prone PCR法によるランダム変異導入法が有効であると考えた。Trpのラセミ化活性が向上した改変酵素の取得にあたり、L-Trp要求性*E. coli* JM101の栄養要求性相補を指標としたプレート上でのスクリーニング系を確立した。スクリーニング培地上で生育した陽性クローンについて比色分析によるBar活性測定を行い、野生型Barよりも顕著にTrpに対する活性の向上した改変Barの取得に成功した。

この改変Barの有効変異部位はBarの活性中心近傍に存在しており、Barの基質特異性が触媒残基のLysを

含むループ状構造の自由度に大きく影響されることが示唆された。このことは極めて広範な基質特異性を示す Bar の基質認識機構解明に貢献するものと考えられる。

また、我々は D-アミノ酸を含む非天然型アミノ酸合成法の確立を目的に、人為的にデザインしたケト酸からの非天然型アミノ酸への酵素的変換反応を触媒する各種アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(AAT)の探索を実施した。新規 D-AAT の取得に加え、特殊環境に生育する高度好熱菌や超好熱始原菌を対象に L-AAT の探索を検討した。*Aeropyrum pernix* K1, *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Sulfolobus tokodaii* 7 からゲノム情報に基づいて得られた複数の遺伝子を大腸菌で高発現させたところ、それぞれから基質特異性の異なる目的活性を有する酵素を得た。100°Cでも安定な当該酵素は工業的利用価値も高く、現在、詳細な酵素特性を解析と非天然型アミノ酸合成を検討中である。

D-アミノ酸を含む非天然型アミノ酸単体に加え、さまざまな生理活性が期待できるペプチドの新規合成法を検討した。微生物のペプチドグリカン合成関連酵素である D-alanine-D-alanine ligase (D-Ala-D-Ala ligase: Ddl) に着目した。バンコマイシン耐性菌(VRE)の一部に D-serine (D-Ser) を基質として D-Ala-D-Ser を合成する活性のあることが報告されており、微生物の多様性を期待して、我々は基質特異性の異なる新規 Ddl の探索を実施した。

Ddl の進化系統樹の結果を踏まえて、ゲノムが公開されている微生物から *Escherichia coli* K12 (EcDdlB), *Oceanobacillus iheyensis* JCM11309 (OiDdl), *Synechocystis* sp. PCC6803 (SsDdl), *Thermotoga maritima* ATCC43589 (TmDdl) の 4 種類の微生物を選択し、その *ddl* をクローニングの対象とした。

4 種類の Ddl についてグリシンを含む 20 種類の D-アミノ酸をそれぞれ基質とした場合のリン酸遊離量を示した。OiDdl では D-Ala を基質とした場合にのみリン酸が遊離するのに対して、EcDdlB, SsDdl, TmDdl においては、D-Ala に加え、D-Ser, D-Thr, D-Cys, Gly を基質とした場合にも活性に差はあるもののリン酸の遊離が認められ、D-alanyl-D-alanine, D-seryl-D-serine, D-threonyl-D-threonine, D-cysteinyl-D-cystein, Glycyl-glycine がそれぞれ生成していることが示唆された。実際に、これらの反応生成物の構造を HPLC, NMR, MS により決定し、それぞれ対応するアミノ酸から D-アミノ酸ホモジペプチドやヘテロジペプチドが生成していることを確認した。VRE の変異型 Ddl が C 末端側に D-Ala ではなく D-Ser を連結することは上述のように既に報告されているが、VRE 以外の微生物の Ddl が C 末端側だけではなく N 末端側にも D-Ser, D-Thr, D-Cys, Gly が挿入される基質特異性のあることを初めて明らかにした。

さらに、基質特異性が最も広がった好熱性細菌由来

TmDdl の酵素特性を検討した。本酵素は高温域での反応温度が比較的自由に設定できることから物質生産には有利であるほか、反応条件を変えることで基質特異性が広がる可能性も示唆された。

EcDdlB を用いた D-アミノ酸からの D-アミノ酸ジペプチド生産では 70% を越える収率を達成した。*P. putida* IFO 12996 由来の低基質特異性アミノ酸ラセマーゼをアミノ酸リガーゼに共役させて L-アミノ酸からの D-アミノ酸ジペプチド生産にも成功した。本プロセスは産業上有用なペプチドの新規合成法を提供するものである。

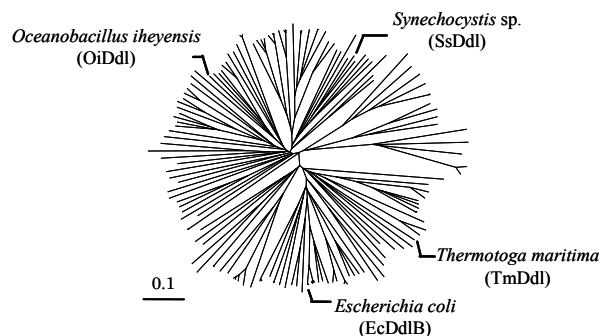


図1 Ddlの進化系統樹とクローニングした4種類のDdlの位置

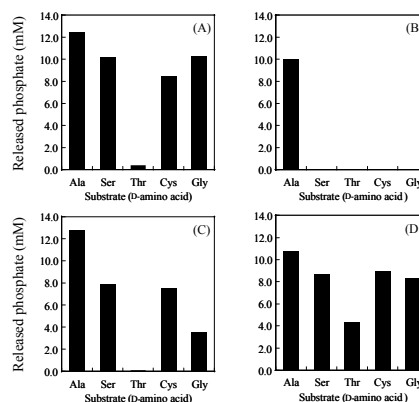


図2 微生物起源の異なる4種類のDdlの基質特異性比較 (A); EcDdl, (B); OiDdl, (C); SsDdl, (D); TmDdl

## 3. ロンザの微生物培養技術とその事業化例

伊井 一夫, 王堂 哲

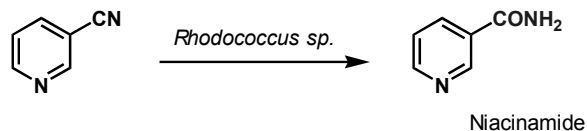
ロンザジャパン株式会社

ロンザ(Lonza)は、年間売上げ約2千億円のスイスに本拠を置くライフサイエンス志向の化学会社である。本社はバーゼル(Basel)にあり、主力の研究開発、製造は、マッターホルンの麓にあるフィスプ(Visp)工場で行っている。世界8カ国に18の生産、開発拠点をもっている世界企業である。製薬、食品、化粧品、殺菌剤、農薬向けの有機反応中間体、有効成分のカタログ品を持つとともに、製薬、食品、化粧品の受託製造を行い、先進的な製品開発を製造開発、cGMP生産の面でサポートする。ロンザの受託製造の特徴は、有機合成、微生物工学技術、動物細胞工学技術のすべての技術ベースをもち、目的とする化合物を化学合成とバイオ技術を統合した最適の方法で製造できることである。1984年に受託化学合成のための多目的プラントを世界で始めて稼働させ、1992年には、チェコの微生物培養の国有工場を買収し、大量生産に備え、さらに1996年には、英国、米国のセルテック社の動物細胞培養部門を買収し、特にヒト化抗体医薬の需要に対応し製造能力を拡大している。このようにロンザは近年特に、バイオ技術を用いる製造開発、製造能力増強に力を入れているが、そのなかで、微生物培養技術とその事業化例について以下概略を紹介する。

1. 微生物培養プロセスの流れ
  - (ア) 菌株のデザイン、開発 (高発現システム)
  - (イ) 培養技術 (高密度、高生産)
  - (ウ) ダウンストリーム (高収量)
2. 微生物バイオ技術とプロセス、プロダクト例
  - (エ) バイオ変換反応によるファイン化合物製造
    - ① 光学活性中間体、原薬、食品
    - ② ヌクレオシド
    - ③ 不活性ステロイド
  - (オ) バイオ合成反応によるファイン化合物製造
    - ① 2次代謝産物 (抗癌剤)
    - ② 多糖類、ペプチド、酵素
  - (カ) 治療用タンパク (遺伝子工学)
    - ① PEG化断片化抗体、単鎖抗体
    - ② 治療用ペプチド、タンパク

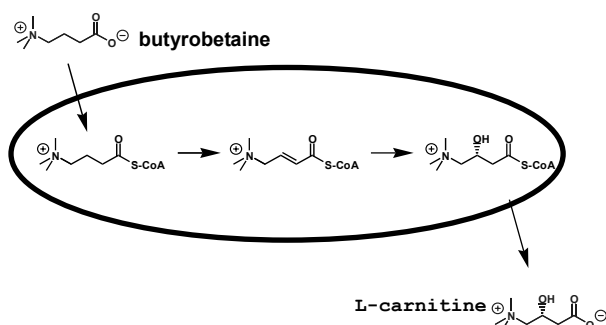
多くのバイオ技術を用いた製品があるが、事業化例として、世界シェア No. 1であるナイアシンアミド(Niacinamide)とL-カルニチン(L-Carnitine)の例を紹介する。

A. ナイアシンアミドの工程は下図の通りである



固定化菌体 J1-strain (T. Nagasawa, H. Yamada) を使用し、中国 広州工場 で製造している。

B. L-カルニチンの工程は下図の通りである。



ロンザの開発したバイオ工程で、高酵素活性の根粒菌によるバイオ変換反応により、D体をまったく含まないL-カルニチンを製造できる。また、化学工程と比べて廃棄物も少ないメリットもある。

その他、受託製造品にも多くのバイオ技術の使用例がある。

このように、ロンザは実用的なバイオ製造技術の開発、応用に先進的な役割を果たしてきたが、さらにゲノム情報やタンパク構造情報をベースにして絞り込まれる今後の医薬品の候補化合物、ペプチド、オリゴヌクレオチド等の受託製造に、微生物工学技術も含めた最適の製造方法と cGMP 製造を提供する役割を常に担いたい。

#### 4. 創薬のタネ探しにおける微生物機能の利用

永井浩二

アステラス製薬株式会社醗酵研究所

天然物の医薬への利用の歴史は非常に古いが、20世紀初頭のペニシリンの発見以来、微生物が創薬研究において大きな役割を果たすようになった。これまでに創製された多くの医薬品が微生物の生産する二次代謝物質あるいはその誘導体であり、またそれらの持つ強力な代謝能力は天然の生物反応器として医薬品母核の構造変換に用いられてきた。現在でも二次代謝物質は、依然としてその化学構造の多様さから医薬などの有用機能物質探索の資源として重用されている。一方で、これまでの多くの研究機関による探索活動の結果、既に数多くの有用機能が見出されているため、新規化合物や新規活性の発見が困難になってきているのも事実である。しかし、これまでに利用されてきた微生物は、地球上に生息するもののほんの一部に過ぎないとも言われており、従来対象とされてこなかった資源の開発によって新たな可能性を見出すことができると期待される。また、新たなスクリーニング系や反応系を構築することで、未知の生理活性物質や有用酵素をまだまだ発掘できるかもしれない。このような観点から当社において実施した探索研究の事例を取り上げ、創薬への微生物機能の利用について紹介する。

##### 1. 細菌由来の創薬リード化合物探索

細菌は一般に放線菌や真菌に比べて二次代謝物質の生産性が低く、報告されている生産物は全体の1割程度に過ぎない。そこで、未開拓で有用性の高いサンプルライブラリーの構築を目指して、*Pseudomonas* 属及びその類縁細菌を対象に、分類情報と二次代謝物質生産能を指標にした菌株選択とサンプル評価を行った。

国内各地で採取した各種土壌試料から運動性の好気性グラム陰性細菌を分離し、分類情報、生理的性状及びコロニー性状に基づきグルーピングした。代表株について16S rDNA塩基配列情報に基づき分類し、既知菌種と98%以下の相同性を示す菌株群を選択した後、二次代謝をコードする遺伝子情報を指標に新規で有用性の高い菌株をスクリーニングした。陽性株を複数の条件で培養し、HPLCによる評価を通じて構築したサンプルライブラリーを用いて各種アッセイを行った。その結果、*Chromobacterium* 属の新種と推定される菌株から抗血小板凝固作用を示す新規環状ペプチド YM-254890 が、また *Pseudomonas* 属や *Burkholderia* 属の菌株から癌細胞増殖阻害活性を示す新規 Benzolactone enamide 化合物

が発見された。

##### 2. 真菌株を用いた感染症治療薬スクリーニング

分生子果不完全菌類は、土壌、植物、海洋など多様な環境に生息する真菌の分類群である。一部の属からは比較的多数の代謝物が報告されているが、未探索の菌株が数多く残されているグループと考えられている。そこで、各種の試料からそれらに属する菌株を分離し、培養抽出物を主に感染症治療薬のスクリーニング系で評価した。その結果、落葉から分離した *Phoma* 属菌より真菌のゲラニルゲラニル転移酵素 I (GGTase I) 阻害剤 YM-215343 が、海綿から分離した *Phoma* 属菌より真菌の GPI アンカータンパク阻害剤 YM-202204 が、植物の枯れ枝から分離した未同定分生子果不完全菌類より抗ウイルス剤を標的にしたノイラミニダーゼ阻害剤の系で YM-92447 (spinosulfate A) が単離された。

##### 3. 放線菌株によるバイオコンバージョン

微生物の産生する酵素は、医薬品の合成・修飾研究に用いられる。特に放線菌は種々の反応を行う能力があることが知られ、産業上でも高脂血症治療剤メバロチン (ML-236B からの水酸化反応) や抗真菌剤ミカファンギン (側鎖のアシラーゼ反応) の製造において、*Streptomyces* 属菌が醗酵原体の修飾反応に利用されている。

そこで、化合物変換菌ライブラリーの構築を目的に、モデル化合物として brefeldin A を用いて変換菌スクリーニングを行った。その結果、*Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Dactylosporangium*, *Nocardia* 属等の 10 株の放線菌から、新規化合物を含む 12 個の化学合成困難な誘導体が見出され、変換菌としての放線菌の有用性が確認された。これらの菌株は、今後他の化合物の変換反応に応用していく予定である。

自然界にはまだまだ数多くの未知の微生物が生息するとともに、潜在的な有用機能が見出されておらず未利用の微生物も存在すると思われる。それらの有効活用を図るためには、新規分離法や培養法の開発を通じた資源の拡大、微生物ゲノム情報を利用した二次代謝物質の発現制御、及び新規標的分子探索や工夫されたアッセイ系の構築などによるスクリーニング手法の向上が不可欠である。今後、それらのアプローチにおいて新たな発想や技術の革新が生まれ、創薬研究における微生物の価値がより一層高まるものと確信している。



## 5. 産業用酵素における微生物資源の有効利用

高木 忍

### ノボザイムズジャパン株式会社研究開発部

産業用酵素は微生物から

産業用酵素の始まりは、1874年子牛の胃から抽出されたキモシンをチーズ製造用に利用したのが最初といわれている。当社の産業用酵素は、1941年豚のすい臓から抽出したトリプシンを皮のなめし加工用として販売したのが始まりである。その後、当社は1952年微生物由来の酵素を深部培養により大量生産することに成功し、1962年洗剤用のプロテアーゼを発酵生産するに至った。現在も一部の産業用酵素は動植物組織からの抽出により製造されるが、大量生産が容易なことから、微生物由来の酵素を発酵生産する製造方法が、今では圧倒的に主流となっている。

産業用酵素は、どのような基質に対してどのような反応を触媒するかによりその一義的な価値が決定するが、多くの場合、実際の利用における環境に適した反応 pH の適性や至適温度など、酵素学的性質においても特徴的であることが要求される。例えば、洗剤用酵素は洗濯環境であるアルカリ性で働くことが要求され、さらに洗剤に含まれる界面活性剤や酸化剤の存在下で活性を失わないことも必要である。加えて近年はエネルギー節約のため 20 度付近の低温で働くのが望ましいとされている。一方、澱粉加工用の酵素は、しばしば澱粉が糊化する 70 度付近で活性があることが必要で、また、加工処理中の雑菌汚染を防ぐため、高温あるいは酸性条件下で働くのが望ましい。このように、産業用酵素の多くがその応用の環境に応じた酵素学的特徴を満たさなければならない。

酵素の本質はタンパク質からなる生体物質である。本来は生物体内の穏和な条件で働くのが特徴であるが、微生物由来の酵素は、微生物が生育する環境で働くという特色を持つ。すなわち、高温やアルカリ条件下で生育する、いわゆる極限微生物が生産する酵素は、耐熱性やアルカリ性である事が多い。例えば、PCR 反応に利用される耐熱性の DNA ポリメラーゼ、*Taq* ポリメラーゼは、80°C で生育する超高温菌 *Thermus aquaticus* 由来の酵素である<sup>1)</sup>。新たな産業用酵素の探索はこの微生物の特色を大いに利用している。好アルカリ性 *Bacillus* 菌から多くの洗剤用酵素が発見されているのは、その好例といえよう<sup>2)</sup>。

微生物資源からの産業用酵素の探索

当社における新たな産業用酵素の探索は、まず、自然界より多様な微生物を収集し、これを菌株コレクションとし

て保存することから始まる。これまでに、糸状菌をはじめ酵母、細菌、放線菌など 6 万株以上の微生物を収集した。これらのコレクションから選抜した菌株を、適当な培地を用いて液体培養あるいは固体培養し、目的の酵素活性を探索する。一例を示すと、当社が開発した飼料用酵素に担子菌 *Peniophora lycii* 由来のフィターゼ<sup>3)</sup>があるが、これは当社の菌株コレクションから、耐熱性と耐酸性を指標に探索し選ばれた酵素である。*Aspergillus* 由来の従来品よりも、タンパク質あたりの活性が高い酵素が得られた。

当社は 1993 年に提案された生物多様性条約を早くから尊重することを決定し、1997 年、当該国からの菌株採集は書面による合意のもとで行うことを社内規として明確にした。現在、タイ国の研究機関 BIOTECH と提携し、当国の微生物資源を有用物質の探索に利用している。

遺伝子組換え技術が実用化されて久しいが、当社は早くからこの技術を工業レベルで取り入れた会社のひとつである。もともと初期の応用は、目的の酵素遺伝子をタンパク質生産性の高い宿主菌に導入し、酵素生産性を向上させるもので、1980 年代半ばから実用化している。以来当社では、主要な酵素生産は、遺伝子組換え微生物による発酵により行っている。したがって、酵素の探索も遺伝子レベルで行うようになった。

遺伝子レベルの酵素の探索の手法の一つに PCR スクリーニング法がある。これは、各種酵素のアミノ酸保存領域の配列を基にオリゴプライマーを設計し、種々の微生物の染色体を鋳型として PCR 反応を行うことにより、目的の酵素遺伝子の探索を行うもので、得られた酵素遺伝子からはクローニングを経て酵素試料が調製され、その性質を評価される。この手法により、好熱菌 *Rhodothermus obamensis* から耐熱性の枝付け酵素が得られた<sup>4)</sup>。他の手法の例としては、既存の酵素遺伝子をプローブとしてゲノムハイブリダイゼーションを行うことにより、高温菌 *Myceliophthora thermophila* から耐熱性ラッカーゼが得られた<sup>5)</sup>。これらの手法は、目的とする酵素に関連した遺伝子情報があれば、どのような微生物資源に対しても適用できる。このほか、ホモロジー検索により他起源の酵素遺伝子をデータベースから探しだすデータマイニングも行うが、これは対象とする微生物の遺伝子情報があらかじめデータベースに存在している必要がある。

### 進化学による酵素の改変

自然界に存在する生物、あるいは酵素の多様性は、進化の過程で生み出されたものといえる。このような進化を人工的に再現しようというのが進化学で、本質は蛋白質工学である。例えば、担子菌 *Coprinus cinereus* 由来のペルオキシダーゼを、洗剤用酵素としての適正を向上させる目的で、進化学により改良した<sup>6)</sup>。様々な手法で酵素遺伝子に繰り返し変異を施すことによって、最終的に7箇所アミノ酸残基が置換され、酸化剤耐性並びに耐熱性が著しく向上した酵素を得ることができた。立体構造の情報が充分にあれば、部位特異的変異による改変も可能である。既存の澱粉液化酵素 *Bacillus licheniformis* 由来の $\alpha$ -アミラーゼから、部位特異的変異により、カルシウム依存性の低い改良型アミラーゼが開発され、商品化された<sup>7)</sup>。現在は、蛋白質工学、進化学の手法がさらに発達しており、当社では、新たな酵素の多くが進化学により開発されている。

このような進化学によって得られる改良型酵素と類似の酵素が、実際に自然界から単離された例がある。これは、好アルカリ性 *Bacillus* 菌由来のアミラーゼで、洗剤用酵素に適した、酸化剤及びキレート剤に対して安定な酵素として発見された<sup>8)</sup>。アミノ酸配列を他の *Bacillus* 由来のアミラーゼと比較したところ、酸化剤に不安定な要因とされるMet残基がLeuに置換されていたほか、活性部位近傍のカルシウム結合部位に多くのアミノ酸置換が見られた。これらのアミノ酸置換が安定化に寄与していると考えられた。スクリーニング方法を工夫すれば、自然界に存在する多様性を充分に引き出すことができる好例といえる。

おわりに

遺伝子組換え技術の発達によって、種の壁を超えたタンパク質の発現生産が容易になり、動植物由来の酵素を産業用酵素として、遺伝子組換え微生物で生産することも可能になってきた。しかしながら、多様な微生物資源は、今後も産業用酵素の供給源としてその価値を失わないであろう。新たな酵素の探索において、人工的な進化を選ぶか、既存の進化の結果としての多様性を利用するかは、研究者の好みといえる。どちらが効率が良いかの判断は、今後の結果を見る必要があろう。

### 謝辞

今回の内容に関して尽力くださった、ノボザイムズ本社の佐々美賀子さん、Lene Lange, Søren F. Lassen 各氏 その他の同僚の方々に感謝します。

- 1) Chien, A. *et al.*: *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557 (1976)
- 2) Ito, S. *et al.*: *Extremophiles*, **2**, 185-190 (1998)
- 3) Lassen, S.F. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4701-4707 (2001)
- 4) Shinohara, M. L. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 653-659 (2001)
- 5) Berka, R. M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3151-3157 (1997)
- 6) Cherry, J. R. *et al.*: *Nature Biotechnology*, **17**, 279-384 (1999)
- 7) Frantzen, H. B. *et al.*: *J. Appl. Glycosci.*, **46**, 199-206 (1999)
- 8) Hagihara, H. *et al.*: *Eur. J. Biochem.* **268**, 3974-3982 (2001)

## 6. 可逆的脱炭酸酵素の特性解析と芳香族カルボン酸の合成について

吉田豊和, 長澤 透

岐阜大学工学部

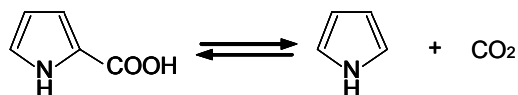
はじめに

経済発展の枠組みのなかに CO<sub>2</sub> 排出量の規制など環境への配慮を具体的に盛り込むことが求められる近況である。一方、グリーンケミストリーを目指し、高純度、高品質の製品を得るために、微生物反応を用いた高度の精密分子変換技術が期待されている。このような状況下、我々は、CO<sub>2</sub> の資源化を目指し、微生物の芳香族カルボン酸脱炭酸酵素の CO<sub>2</sub> 固定活性に注目した研究に取り組んで来た。

種々の脱炭酸酵素が動植物・微生物に存在し、多くの生化学的・酵素化学的知見が蓄積されており、脱炭酸酵素は一般的に逆反応によって炭酸固定反応を触媒しないとされてきた。しかし、我々は、可逆的脱炭酸・炭酸固定反応を触媒する新規酵素として“ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素”を見出した。本酵素は反応条件を制御すると効率良くピロールへの炭酸固定を触媒する。さらに類似した酵素活性の存在を予想し、スクリーニングを行うことにより、我々は新規酵素“インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素”を発見した。これらの酵素の反応特性を解析することにより、これらは脱炭酸酵素でありながら、それぞれピロール、インドールの複素環に CO<sub>2</sub> を固定する新しいタイプの脱炭酸酵素であることを明らかにした。最近、ドイツのグループにより、*Clostridium* 属細菌によるフェノールやカテコールの嫌氣的代謝の過程で、芳香環がカルボキシル化 (CO<sub>2</sub> 固定) されて分解代謝される経路が明らかにされた。即ち、これまで脱炭酸反応は不可逆とされてきたが、可逆的脱炭酸反応を触媒する酵素群の存在とその生理的な役割が明らかになってきた。

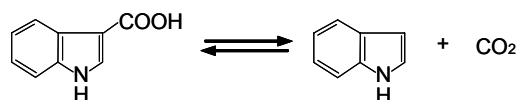
これらの成果は、他にも効率良く炭酸固定を触媒する酵素群が微生物界に潜在する可能性を強く示唆するものであり、CO<sub>2</sub> を資源とした物質変換プロセスに応用できると期待される。我々は、可逆的脱炭酸酵素群の炭酸固定機能を利用した様々な芳香族化合物への位置選択的なカルボキシル基導入法を検討し、機能性ポリマーなどの合成に利用される種々の芳香族ヒドロキシカルボン酸の生産法を開発することを目指している。

## (1) ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素



ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素は土壌分離菌 *Bacillus megaterium* PYR2910 の他に *Serratia* 属細菌にも酵素活性が分布しており、*B. megaterium* PYR2910, *S. grimesii* IFO 13537 を用い、本酵素を精製単離して反応特性を検討した。これらの脱炭酸酵素は 52kDa のサブユニットからなる 2 量体酵素 (分子量 98kDa) であった。これらの酵素は酸素感受性が強く、活性の安定化には高濃度の還元剤の添加が不可欠であった。*B. megaterium* PYR2910 の酵素は反応因子として有機酸を要求し、酢酸、ギ酸などが存在しないと活性は認められなかった。一方、*S. grimesii* IFO 13537 の酵素は有機酸を必要とせず、酵素タンパク質に内在するカルボキシル基が代替して、反応を触媒することが推定された。いずれの酵素においても脱炭酸反応だけでなく、ピロールと KHCO<sub>3</sub> を炭酸源とした炭酸固定反応が進行し、反応平衡が存在していた。炭酸固定反応は密閉容器内で炭酸ガスの漏出を防いだ条件下 (容器内圧力は 1.38 atm) で効率的に進行し、炭酸ガスの反応液への溶解度と関連する。*B. megaterium* PYR2910 の休止菌体および酵素を用いて、3 M KHCO<sub>3</sub> を炭酸源とし、400 mM のピロールから 81% のモル変換率で 325 mM (36.1 g/L) のピロール-2-カルボン酸の合成が可能であった。*S. grimesii* IFO 13537 を用いた場合も同様 (モル変換率、約 80%) であった。

## (2) インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素



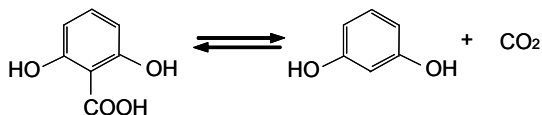
インドール-3-カルボン酸の脱炭酸活性を有する土壌分離菌を得た。高活性を示す菌株を *Arthrobacter nicotianae* FI1612, *Fusarium subglutinans* FI31 と同定した。インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素は 60kDa のサブユニットからなる 4 量体酵素 (分子量 258kDa) であった。ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素と極めて似通った反応特性を示し、インドールへの炭酸固定活性を示した。炭酸固定反応によって 20 mM のインドールから 5 mM のインドール-3-カルボン酸が生成したが、ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素に比べると炭酸固定効率は劣り、これは、インドールの溶解度が低いことが原因であると考えられる。*A. nicotianae* FI1612 の酵素はインドール以外に 2-メチルインドールの 3 位、キノキサリンの 2 位への炭酸固定反応も触媒した。

## (3) 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素



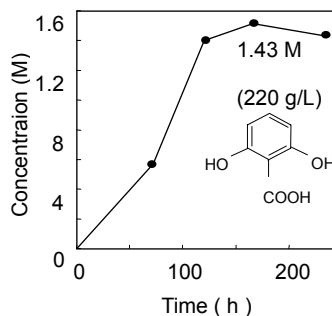
嫌気条件下で高活性を示す 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素生成菌を土壌より 86 株分離し、その中で最も高活性を示した *Enterobacter cloacae* P240 を選択した。嫌気条件下で分離した菌株であるが、振とう培養条件下で高い脱炭酸酵素活性を示した。本酵素は強い酸素感受性を示し、速やかに失活したが、還元剤を添加することによって安定化させた。精製酵素は 60 kDa の同一のサブユニットからなる 6 量体(分子量 372 kDa)と推定された。基質特異性を検討したところ、4-ヒドロキシ安息香酸の他に、3,4-ジヒドロキシ安息香酸に対して僅かな(相対活性 3%)脱炭酸反応を触媒した。フェノール 20 mM, CO<sub>2</sub> 源として 3M KHCO<sub>3</sub> を添加して炭酸固定反応を pH 7.0, 20°C で検討したところ、フェノールへの炭酸固定反応は変換率 12% で進行した。基質フェノールは、酵素タンパク質の失活を引き起こすため、添加濃度の上昇に伴い活性は減少した。カテコールへの炭酸固定反応は 18% 変換率で進行した。

## (4) 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素



集積培養および研究室保存菌を用いたスクリーニングによって *Agrobacterium tumefaciens* IAM12048 と *Pandoraea* 属菌株に 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を見いだした。これらの酵素は酸素感受性を示さず、精製酵素は 37.4kDa の同一のサブユニットからなり(分子量 100kDa)、上述の脱炭酸酵素に比べて、サブユニット

分子量に大きな差違が認められた。精製酵素は 2,6-および 2,3-ジヒドロキシ安息香酸の脱炭酸反応とその逆反応を触媒した。活性菌体を用いて炭酸固定反応を最適化した結果、1,3-ジヒドロキシベンゼンへの炭酸固定反応が変換率 48% で進行し、220 g/L の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸の生成蓄積を認めた。



## (5) 可逆的脱炭酸酵素の一次構造解析

酵素遺伝子をクローニングし、一次構造の比較解析を進めた。可逆的脱炭酸酵素は脱炭酸および炭酸固定反応のみを触媒する既知酵素とは相同性を示さない。ピロール-2-カルボン酸、インドール-3-カルボン酸、4-ヒドロキシ安息香酸の脱炭酸酵素間では、一次構造上での相関が認められるが、2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素との類似性は見られず、2つの酵素群に大別される。微生物由来の機能未同定タンパク質の中には、可逆的脱炭酸酵素と有意な相同性を示すものが数多く見られ、幅広い微生物種が芳香族カルボン酸に作用する可逆的脱炭酸酵素を持つと考えられる。

本研究の一部は、経済産業省の産業科学技術プロジェクト『生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発』の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から委託を受けて実施したものである。

一般講演

1. *Labrys okinawaensis* sp. nov., a plant root associated bacterium isolated from *Entada phaseoloides*

○Muhammad Saiful Islam, Hiroko Kawasaki, and Tatsuji Seki  
Int. Center for Biotech., Osaka University

A strain assumed to be a new species under the genus *Labrys*, for which the name *Labrys okinawaensis* sp. nov. is proposed, was isolated from the root of the legume *Entada phaseoloides*. The strain was characterized and compared with the type species (*L. monachus* DSM 5896<sup>T</sup>) of the genus *Labrys* through polyphasic approaches. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA revealed that the isolate belongs to the  $\alpha$ -*Proteobacteria* and forms a distinct monophyletic group with *L. monachus*, *L. methylaminiphilus*, *Labrys* sp. AMS5 and some similar reported strains. The 16S rDNA sequence is 97.4% and 95.59% similar to that of *L. monachus*, and *L. methylaminiphilus* respectively. The DNA-DNA relatedness is less than 22% with *L. monachus* DSM5896<sup>T</sup>. Cells were aerobic, Gram-negative, motile, non-sporulating, spherical to short rods, multiplied by budding, produced much exo-polysaccharides and formed visible colonies on YMA in 3-4 days. The strain utilized a wide variety of monosaccharides, disaccharides, and sugar alcohols as sole carbon and energy source but did not utilize salicin, D-melezitose, mono, di or trimethylamine. The strain could not grow on NA, LA, TSB, and TGY and was inhibited by 10mM DL- $\alpha$ -alanine or glycine. Growth factors were not required although yeast extract stimulated the growth. Both oxidase and catalase activities were positive and the major cellular fatty acids were C19:0cyclo  $\omega$ 8cis, C16:0, C18:1 $\omega$ 7c, and C18:0. The strain contained ubiquinone Q10 and the G+C content was 62.32 mol%. All these morphological, physiological and chemotaxonomic characteristics justify the proposal of a new genomespecies under *Labrys*. The type strain of the novel species is MAFF 210191<sup>T</sup>.

2. ゲノム情報に基づいた *gyrB* プライマーの評価

○笠井宏朗  
海洋バイオテクノロジー研究所・MBI

1995年に山本と原山によって開発されたDNA ジャイレース B サブユニットをコードする遺伝子 (*gyrB*) に基づく細菌の分類同定法は 16S rDNA 遺伝子よりも詳細な解析が可能であり、その系統分類結果が DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果や性状に基づく分類結果とよく一致することから、系統分類マーカーのひとつとして多くの研究者に使われるようになってきた。最近では、*gyrB* 遺伝子配列を利用した同定用の DNA チップや検査キットが開発されるケースもある。こうした背景のもと、2005年4月、MBI では、*gyrB* 遺伝子の利用をさらに促進するために、基準株あるいはメタゲノムも含めたゲノム情報から得られる *gyrB* 塩基配列を中心に、約 2,000 の *gyrB* 遺伝子の塩基配列をデータベース上に公開した (<http://www.mbio.jp/icb/>)。普及する一方で、これまで公開しているプライマーでは *gyrB* 遺伝子断片が増幅されない、もしくは、増幅されてもうまく塩基配列決定を行うことができないなどといった問題点も指摘されている。現在、*gyrB* 遺伝子の増幅に最もよく用いられているのは、山本と原山が発表した UP1 と UP2r と呼ばれるユニバーサルプライマーである。そこで、これまでに公開した 3,000 の *gyrB* 塩基配列と MBI で行ってきた *gyrB* 断片の増幅試験結果をもとに、ユニバーサルプライマーを再評価した。その結果、分類群によっては、UP1 および UP2r では *gyrB* 遺伝子断片が増幅されないか、もしくは増幅されても似た遺伝子も同時に増幅されてしまう直接塩基配列決定ができないことが明らかとなった。本発表では、問題点の詳細ならびに解決法も含めて紹介する。

本研究の一部は「ゲノム情報に基づいた未知微生物遺伝資源ライブラリーの構築」プロジェクトの一環として(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構より委託を受けて実施したものである。

3. 病原性酵母 *Candida glabrata* における全ゲノム機能解析について

○知花博治<sup>1)</sup>, 上野圭吾<sup>1)</sup>, 伊藤桂子<sup>1)</sup>, 笹本 要<sup>1)</sup>, 青山俊弘<sup>2)</sup>, 中山浩伸<sup>2)</sup>, 三上襄<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>千葉大学真菌医学研究センター, <sup>2)</sup>鈴鹿工業高等専門学校

*Candida* はヒト腸管常在菌であるが、免疫力の低下した患者に対して重篤な日和見感染症を起こす病原真菌である。*Candida* の病原因子は多数存在すると考えられており、病原性のメカニズムは未解明である。抗真菌薬の種類は少なく、副作用、耐性株などが存在するため新規抗真菌薬の開発が急務であるが、抗真菌活性を示す物質の多くは人に対して毒性を有しており、開発が難しい状況である。我々はゲノムワイドな機能解析を進め、*Candida* の病原性解明と抗真菌薬の開発をめざしている。カンジダ症の主な原因菌である *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsirosis* などのうちゲノム配列が全読されているのは *C. albicans* (16Mb) と *C. glabrata* (13Mb) である。*C. albicans* は、異数体であり相

同染色体が 2 本あるいは 3 本存在し、その数も一定ではないためゲノム構造が複雑であり遺伝子操作に多くの労力を要する。一方、*C. glabrata* は一倍体であり、*C. albicans* より *Saccharomyces cerevisiae* に近縁であるので、*S. cerevisiae* において蓄積されたゲノム情報と種々のベクター、その他ツールなどの応用が容易である。これらの理由によって、*C. glabrata* はゲノムワイドな遺伝子機能解析に適していると我々は判断した。*C. glabrata* においては制御型プロモーター (Tet-P) を用いた実験系が構築されている (Nakayama et al, 1998)。この系では各遺伝子の ORF 上流に Tet-P を挿入することにより標的遺伝子について in vitro 並びに in vivo での転写を制御、標的遺伝子の機能を解析することができる。我々は、この系に改良を加えハイスループット化に成功し、*C. glabrata* の全遺伝子約 5,300 に対して、体系的かつ網羅的な Tet-P 導入を進めている。本計画名は CGRP (*Candida glabrata* Genome Regulation Project)。

#### 4. Molecular identification of yeasts from tropical rain forest of Gunung Halimun National Park, West Java, Indonesia

○ Wellyzar Sjamsuridzal, Ariyanti Oetari, Ahmad Syauqi, Anita Musfira, Fita Kurniasari, Fitrianingih, Dinar Prasetyowati, Vilya Syafriana, and Yang Wi Supandi

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Indonesia, Depok 16424, Indonesia

This study reports the yeasts diversity in tropical rain forest of Gunung Halimun National Park (GHNP), West Java. The yeast diversity in GHNP was investigated by molecular approach and based on three types of forest vegetation at different altitudes (500 m, 1,000 m, and 1,500 m). Yeasts were isolated from plants, water, soil, litter, sediment, and gastropods. Molecular approach based on D1/D2 of LSU rDNA or ITS regions was carried out on seventy eight of representative isolates from a total of 642. This study shows that tropical rain forest of Gunung Halimun National Park harbors high yeast species diversity. Molecular identification of the representative isolates revealed 18 genera and 38 species of yeasts and yeast-like fungi which are phylogenetically diverse (e.g., *Aureobasidium*, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Saccharomycete*, *Sporidiobolus*, *Sporisorium*, *Thyridium*, *Trichosporon*, *Ustilago*, and *Williopsis*). Forty five percent from a total of 78 isolates sequenced were new taxa, which reflect the richness of this area in fungal diversity. Our study showed that collin forest of GHNP (500 m) has the richest yeast diversity compared to the submontane forest (1,000 m) and montane forest (1,500 m).

#### 5. タイ国の自然環境に棲息する酵母の多様性

○ 中瀬崇<sup>1)\*</sup>, S. Jindamorakot<sup>1)</sup>, S. Am-in<sup>1)</sup>, W. Potacharoen<sup>1)</sup>, H. Kawasaki<sup>2)</sup>, and M. Tanticharoen<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>BIOTEC, Thailand, <sup>2)</sup>阪大 ICBiotech, \*現在, NBRC

タイ国に棲息する酵母については、醗酵食品及びその製造工程に見出される酵母の研究はなされていたが、自然界に棲息する酵母の研究は遅れていた。演者の研究グループは 1987 年からタイ国の植物葉圏に棲息する射出胞子形成酵母の分類学的研究を開始し、未知種が著しく多い事を認め、現在までに 18 新種を記載した。この結果は子囊菌酵母及び射出胞子形成酵母以外の担子菌系酵母においても自然界の酵母種の多様性は高いことを示唆していると考えられたので、酵母の一般的選択分離法により、このグループの酵母の種多様性解明を試みた。

タイ国で採集した各種試料(昆虫の木屑, 花, 野生キノコ, コケなど)から直接劃線法及び酵母集積培養法により 680 株の酵母を分離し BIOTEC Culture Collection に凍結保存した。このうち 283 株について 26SrDNA の D1/D2 領域の塩基配列を決定し、形態学的, 生化学的, 化学分類学的研究により同定を試みた。

上記 283 株のうち 252 株は 159 種に区別された(既知種 58 種 137 株, 未知種 101 種 115 株)。残り 31 株は 26 種に区別されたが、正確な同定には DNA 相同性実験が必要と思われた。このグループについてはさらなる検討が必要であるが、経験上、その 50% 以上は未知種と推定される。すなわち、分離株の 50% 近くは未知種に属するものであり、同定した種の 60% 以上は未知種であることが明らかになった。タイの醗酵食品及び関連基質から分離される酵母は殆どが既知種であり、欧州諸国や日本と共通種が多いが、自然環境の酵母はこれとは全く異なっていた。未知種のうち、4 種を新種として発表した(*Candida easanensis*, *C. pattaniensis*, *C. nakhonratchasimensis*, *Pichia nongkratonensis*)。残りの未知種も順次、新種として記載する予定である。

## 6. 微細緑藻類 *Asterococcus* 属の比較形態と分子系統に基づく種レベルの再同定

中沢敦, ○野崎久義

東京大・大学院理学系研究科・生物科学専攻

*Asterococcus* 属(緑藻綱)は伝統的にはヨツメモ目(Tetrasporales)に分類される不動性の微細緑藻で, 星形の葉緑体と群体を取り囲む膨潤した寒天状皮層を持つことで特徴付けられる. 本属は多くの培養株を用いた比較形態に基づく分類学的研究がなされていないため, 認識される種数が研究者によって異なり, 種分類の識別基準も曖昧である. 今回, 演者らは世界各地のカルチャーコレクション(IAM, NIES, SAG, ACOI, CAUP)に保有されている *Asterococcus* 属計8株について, 光学顕微鏡と電子顕微鏡, 及び DNA の塩基配列データを用いた分類学的研究を行った. 同一培養条件下での比較形態観察と葉緑体タンパク質コード *rbcL* 遺伝子の塩基配列 1128 塩基対に基づく系統解析の結果, 用いられた株は寒天状皮層とピレノイドの構造, 細胞前端部のパピラ状突起の有無によって明瞭に3種(*A. superbus*, *A. korschikoffii*, *A. papillatus* sp. nov.)に識別できることができた. *A. superbus* と *A. papillatus* は共に球状の群体を形成するが, *A. papillatus* は細胞前端にパピラ状突起をもつ点で *A. superbus* と明瞭に区別された. また Ettl & Gärtner (1988) は *A. korschikoffii* を *A. superbus* の異名としたが, *A. korschikoffii* は樹状の群体を形成することで *A. superbus* と区別される独立した種であることが今回の研究で示された. これら3種の間では群体の体制に大きな違い(球状と樹状)が見られ, 伝統的には別属に分類すべきレベルであった. しかし, 細胞の電子顕微鏡レベルの構造は基本的な点で一致し, 塩基配列データはこれら3種が緑藻綱の中で単系統であることを示したので, 1属 *Asterococcus* に所属させた.

## 7. 酵母の凍結保存の保護剤の効果

○百瀬祐子, 松本玲奈, 中原東郎, 山岡正和

(独)産業技術総合研究所

凍結保存は生物を保存する上で, 簡便かつ経済的な方法ではあるが, 凍結融解のストレスに弱い生物種も存在する. 我々の所属する特許生物寄託センターでは, 微生物以外にも動物細胞, 植物なども保存しているが, どの場合も手間と費用のかかる継代を必要とするものがあり, より多くの生物種が凍結保存で保存できるようになることが望ましい. そこで汎用的な凍結保存の効率を上げる手法を開発するため, モデル生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (S288C と BY4743)を用いて, いろいろな凍結保護剤による効果を検証した.

以前まで生死判定に用いていた CFU (colony forming unit) では判定までに時間がかかる上, 数多くの凍結保護剤のスクリーニングには不適切なため, より迅速に結果のわかるフローサイトメトリーを導入した. 蛍光色素による生死判定では, Oxonol, Bacterial Viability kits (Molecular probes) と Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Sigma) を比較検討した結果, Annexin V-FITC apoptosis detection kit を用いることとした.

液体培養した対数増殖期(A660=1.0)の酵母を, 集菌後, 各保護剤を加え, 1°C/min で-20°Cまで下げてから凍結1週間後, 生死判定を行った. 酵母では保護剤として通常グリセロールを用いることが多いが, Trehalose, Ficoll, Sucrose, ethylene glycol(EG), DMSO も単独で, 同様またはそれ以上の効果があることがわかった. 特に, S288C より凍結に弱い BY4743 は, Ficoll や EG 存在下で S288C より著しく凍結保護効果がみられた. このことから, これまで凍結が不可能とされた生物でも保護剤を工夫すれば生存率が上がる可能性が示唆された.

今後はこの各種保護剤の組み合わせの効果を検討するとともに, 各保護剤の作用機構についてさらに研究を深めていきたい.

## 8. 理研バイオリソースセンターJCMにおける Material Transfer Agreement (MTA) への取り組み

○高島昌子<sup>1)</sup>, 辨野義己<sup>1)</sup>, 小幡裕一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>理研バイオリソースセンター微生物材料開発室, <sup>2)</sup>理研バイオリソースセンター

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター(以下理研 BRC)は我が国におけるライフサイエンスの分野における研究開発およびその実用化の発展のため, 生物遺伝資源(バイオリソース)の寄託を受け, これを収集・維持・保存・増殖ならびに研究者に対する提供を行っている. 理研 BRC-JCM では, 平成 16 年度は 495 株国内外の研究者から寄託を受けた.

この大勢の寄託者の権利を保護するため, 平成 17 年度からリソースの寄託の際には「新規寄託申込書」と共に, 「生物遺伝資源譲渡同意書」もしくは「生物遺伝資源寄託同意書」を取り交わすことを始めた. 同意書は譲渡者または寄託者の権利を明確化するためのもので, 従来, カルチャーコレクションに一般寄託された株は提供の対象となっていたが, 本同意書の施行により, 当該リソースの提供にあたっては, 利用者が研究発表する際には指定文献を引用する等の条件で利用することに同意した場合のみ提供を行う等の条件等を理研 BRC との同意の上, 付加することも可能である.

またリソースの提供にあたっては, 「微生物材料提供依頼書」と共に, 依頼者と当センターとの間で「生物遺伝資源提供同意書」を取り交わし, リソースの利用における権利と義務の関係を明確化することを始めた. また, 提供同意書には, 当該のリソースを扱う際に必要な環境が整っていること, ヒトへの直接使用の禁止等も含まれている.

各同意書はそれぞれ正本を2部ずつ作成し、「生物遺伝資源譲渡同意書」もしくは「生物遺伝資源寄託同意書」の場合は譲渡者または寄託者と理研 BRC が、または「生物遺伝資源提供同意書」の場合は利用者と理研 BRC が各1部を所持することになっている。

## ポスター発表（一般）

### P-1. 卵菌類の長期保存法の検討

○竹内香純, 飯田元子\*, 富岡啓介, 永井利郎, 佐藤豊三  
(独)ジーンバンク・農業生物資源研究所, \*現在, 農林水産消費技術センター

農業生物資源ジーンバンク微生物部門では数多くの植物病原菌を微生物資源として登録保存している。*Phytophthora* 属菌など重要な植物病原系状菌を含む卵菌類は、それらによる病害の診断・同定対照菌株として有用であるにも関わらず、保存が難しいことが知られている。これらの有用微生物をいかにして死滅させないかという観点のみならず、保存中に変異を誘発しないという観点から長期保存法を開発することが求められている。本発表では、卵菌類の菌株を段階凍結などの工夫により変異を最小限に留めて長期間安定的に保存する方法について検討した結果を報告する。

ジーンバンクに登録保存されている卵菌類のうち、凍結保存されていない *Phytophthora* 属 6 種 17 菌株および *Pythium* 属 10 種 20 菌株を供試した。麻の実寒天培地平板で培養して得た各菌株の菌叢ディスク(直径 6 mm)を凍害防止剤(10%スキムミルク+10%グリセリン)とともに凍結チューブに入れた。市販のフリージングコンテナに収納し、5°Cの冷蔵庫中で24時間予冷し、次いで-70°Cのディープフリーザー中で2~5日間保った後、液体窒素(気相)タンクに収納した。収納後、1ヶ月および5年経過した凍結チューブを直ちに温水中にて急速に解凍し、融解した各菌株の菌叢ディスクからコロニーが再生するかを調査した。

その結果供試した *Phytophthora* 属 6 種 17 菌株のうち、5 種 13 菌株は1ヶ月および5年後のいずれにおいても生残していた。*Pythium* 属菌では1菌株が5年後死滅したのみで、その他全ての供試菌が生残していた。1ヶ月後に再生した菌株のほとんどが5年後においても生残していた。また、比較的多数の有性器官形成が認められた。概して *Pythium* 属菌の方が高い耐凍性を示したが、*Phytophthora* 属菌にも十分適用できることが明らかとなった。以上から、本試験で採用した保存条件が供試菌の生残に好適であったと推定された。

### P-2. 緑藻 *Botryococcus* の系統と分類

河地正伸, ○田野井孝子, 渡邊信  
(独)国立環境研究所

*Botryococcus* は世界各地の湖沼に生息し、100 $\mu$ m前後のコロニーを形成する緑色の藻類である。光合成によって二酸化炭素を固定し、炭化水素(炭素数23~40, 窒素含有率が低く原油やオイルシェールと同等品)を生産する。生産された炭化水素は細胞内や細胞外マトリックスに蓄積され、その量は乾重量の75%にも達する。*Botryococcus* の作り出す炭化水素は、燃料、潤滑油、ワセリンなど、石油製品の代替原料となり得ること、そして人間活動の結果、大気中に放出され、地球温暖化問題の一つにもなっている二酸化炭素を固定し、エネルギー資源として再生する手段となりうることから、重要な生物であり、基礎から応用に至る様々な方面からの研究が必要とされている。

(独) 国立環境研究所では、2004年度より *Botryococcus* および関連藻類を対象として、化石燃料の代替として、実用化に必要とされる基盤技術開発に着手した。本プロジェクトについて概説するとともに、収集した *Botryococcus* 培養株の系統解析の結果について報告する。日本各地から独自に分離した *Botryococcus* 15株について18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、既知の5つの *Botryococcus* と他の関連種を含めて系統解析を行った。炭化水素を生産する *Botryococcus* は全てトレボキシア藻綱の中の一つの系統にまとまること、大きく3つのクレードに大別されることが判明した。*Botryococcus* では3つのタイプの炭化水素が知られ、それらは race A, race B, race L として区別されている。Senousyら(2004)は、これら3つの race と系統的な関連性について示唆したが、本研究では、3つのクレードの1つで race A, B, L が一つにまとまること示され、*Botryococcus* の系統と炭化水素の代謝系との間の関係は、必ずしも一対一に対応するのではないことが明らかとなった。



### P-3. 日本産 *Gonium* (緑藻綱・ボルボックス目) 2 種の新規培養株について

○山田敏寛<sup>1)</sup>, 宮地和幸<sup>2)</sup>, 野崎久義<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東京大・理・生物科学, <sup>2)</sup>東邦大・理・生物

*Gonium* は 8, 16, または 32 個の等長 2 鞭毛型の細胞が一層に配列する平板状の群体をもつことを特徴とし, 主に淡水の池沼や水田より採集される. 世界各地より 7 種, 日本からは 3 種(*G. pectorale*, *G. viridistellatum*, *G. formosum*) が報告されており, 日本産の *G. pectorale* と *G. viridistellatum* の保存株が国立環境研究所の微生物系統保存施設にあり, *rbcL* 遺伝子データが公開されている.

今回, 福岡県朝倉郡と北海道北広島市の水田土壌より得られた *Gonium* の新規培養株を確立した. これらの株の光学顕微鏡による形態観察と葉緑体 *rbcL* 遺伝子 1128 塩基対を解読した結果, これまでに日本から報告がないものであった.

福岡県産の株は 8, 16 だけでなく, 32 細胞性の群体をつくり, 葉緑体の中に 7-8 個のピレノイドをもつ点で日本産の報告されている 3 種とは異なっており, *G. multicoecum* と同定された. 有性生殖は雌雄同株(homothallic)であり, 接合培地に変換後 2 日以内に休眠接合子を形成した. 成熟した接合子は平滑で肥厚した細胞壁をもち, その周囲は寒天状の基質によって覆われており, *G. pectorale* とは異なり一次細胞壁を脱ぎ捨てることはなかった. また *rbcL* 遺伝子の塩基配列を比較したところ, ネパール産の *G. multicoecum* と最も近縁であった. 北海道産の株は 8, 16 細胞性の群体をつくり, 8 細胞性群体の細胞配列と 1 個のピレノイドをもつ点, 及び接合子が一次細胞壁を脱ぎ捨てることで *G. pectorale* と一致した. しかし, 本藻は承名変種 *G. pectorale* var. *pectorale* に比べて細胞・群体のサイズが小さく, これまでに日本から報告のなかった *G. pectorale* var. *praecox* と同定された. *rbcL* 遺伝子の配列は日本産の *G. pectorale* var. *pectorale* と 97% 一致し, 単系統群を形成した.

### P-4. 炭化水素を産生する新規微細藻類の収集および解析

○関口弘志, 熱海美香, 佐藤明, 土橋幸子, 松田諭, 足立恭子, 藏野憲秀

海洋バイオテクノロジー研究所

海洋バイオテクノロジー研究所カルチャーコレクション(MBIC)では様々な環境からバクテリア・微細藻類を収集し, 培養株を維持・公開・分譲している. そのうち我々のグループでは微細藻類を対象に活動を行っており, 今回興味深い微細藻類を得ることができたので報告する.

アルカリ性の温泉から緑色の葉緑体を有する単細胞藻類を得た(MBIC11204 株). 本生物は不動性, 長さおよそ 3-5 $\mu$ m の楕円形で, 細胞長軸方向にピレノイドを欠く 1 枚の葉緑体を持つ. 細胞増殖は 2 分裂および 2 $\cdot$ 4 細胞性の自生孢子形成によって行われる. これらの形態的特徴から本種は緑色植物トレボキシア藻綱の *Choricystis* 属の生物に酷似していると考えられた. しかし, 18S rDNA および *rbcL* による分子系統解析は既知の *Choricystis* に分類されている生物と明確に区別される事を示した. 以上の結果から本種をトレボキシア藻の新属新種であると判断し, 現在 *Pseudochoricystis ellipsoidea* として記載準備中である.

更に本種はある条件下で, 細胞内にナイルレッドで染色される巨大な小胞を有することが認められた. 細胞を抽出し, GC-MS による内容物の分析を行ったところ, 炭素数 17-20 の脂肪族炭化水素であることが明らかとなった.

炭化水素を産生する微細藻類としては *Botryococcus* が広く知られている(炭素数 23-31 の直鎖状炭化水素を産生). 18S rDNA に基づく系統関係は *Ps. ellipsoidea* が *Botryococcus* に近縁かつ原始的な生物であることを示唆している. *Ps. ellipsoidea* は微細藻類が有する炭化水素産生能力の系統進化を考える上でも非常に興味深い生物である.

### P-5. 病原性 *Aspergillus* section *Fumigati* の分類について

○矢口貴志<sup>1)</sup>, 堀江義一<sup>2)</sup>, 田中玲子<sup>1)</sup>, 松澤哲宏<sup>1)</sup>, 西村和子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>千葉大真菌センター, <sup>2)</sup>千葉県中央博

目的: アスペルギルス症は近年増加傾向にあり, その原因菌として最重要な菌は *Aspergillus fumigatus* である. ヒト及び動物の真菌症原因菌, もしくは土壌など環境由来菌として千葉大真菌センターに保存されている *A. fumigatus* 約 300 株の同定を見直し, 併せて section *Fumigati* の分類の再検討を試みた.

方法: 全体像を RAPD 解析による電気泳動パターンで分類し, 通常の *A. fumigatus* とは異なるパターンを示すものについて  $\beta$ -tubulin 遺伝子, hydrophobin 遺伝子, ITS 領域の塩基配列を決定した. そして, *Neosartorya* 属や関連菌と合わせて系統解析を実施した. さらに SEM による分生子表面構造の詳細な形態的知見と系統との相関性を検討した.

結果・考察: 実験に供した 3 領域ともほぼ同様の系統樹を示した. *A. fumigatus* の分生子の表面構造は, ほぼ滑面から刺状突起まで多様性を示したが, 本種は系統的には 1 つの clade を形成した. *A. neoellipticus* は, *A. fumigatus* とは 3 領域で塩基配列はほぼ一致し, 系統的には同種であることが示唆された. 形態的には, 分生子が楕円形である点が異なる. また, *A. arvirii* も同様に, *A. fumigatus* と 3 領域でほぼ同じ塩基配列を示したが, コロニーが茶褐色となる点が異なる. よって, この 2 種は *A. fumigatus* の変種とするのが妥当と考えられた.

今回検討した菌株の中に、*A. fumigatus* とは別系統で形態の異なる 2 つの菌群が見出された。その 1 つには、*A. lentulus* (Balajee et al., 2005) と考えられる株、シンネマ形成を特徴とする *A. fumisynnematus* が含まれていた。分生子は楕円形、表面構造は小コブ状となった。もう 1 つは、*Neosartorya udagawae* と系統的に近縁で、分生子は球形、表面構造は小コブ状となった。本菌群に含まれる株は *N. udagawae* との交配試験では、反応を示さなかった。また、新種と考えられるヘテロトリックな *Neosartorya* 属菌が見出されたので合わせて報告する。

#### P-6. イヌの口腔内より分離された本邦初の *Arthrographis kalrae* について

○佐野文子, 村田佳輝, 亀井克彦, 西村和子  
千葉大学真菌医学研究センター

*Arthrographis kalrae* (Tewari et Macpherson) Sigler et Carmichael 1976 は世界的に環境中に棲息し、爪、皮膚および角膜などの表在性感染にとどまらず、副鼻腔炎、肺炎、骨髄炎、脳炎などの深在性真菌症を発症させる人獣共通新興真菌症の原因菌である(ヒト、イヌ、ウマ、ワラビーなど)。現在までにアメリカ合衆国、カナダ、ニュージーランド、オーストラリア、フランス、イタリア、モロッコ、南アフリカ共和国、インド、中国などで症例および環境分離が確認されている。我々は 2004 年 4-6 月に家庭内で飼育されているイヌ(329 頭)およびネコ(95 頭)の口腔内真菌叢を調査したところ、11 歳避妊雌イヌの口腔内から本菌種と思われる 1 株を分離した。ポテト・デキストロース寒天培地上の集落表面は白色綿毛状、中心部はやや褐色を帯び菌糸は平滑、裏面は淡黄色を帯びていた。顕微鏡的には隔壁のある無色透明な菌糸と分節型および出芽型分生子を確認した。37°C 1 週間培養で発育したが、42°C では死滅した。リボゾーム RNA 遺伝子の ITS および D1/D2 領域の配列は GenBank に登録されている *A. kalrae* の配列 AB116536 および AB116544 と 98 および 99% 以上で相同を示した。また、当センターで保存されている本菌種ならびに類縁菌の *Pithoascus langeronii*, *A. alba*, *A. cuboidea*, *A. lignicola*, *A. pinicola* の同領域配列を比較したところ、ITS 領域では *A. kalrae* と同一クラスターに、D1/D2 領域では *A. kalrae* の有性型と言われている *P. langeronii* と *A. kalrae* の中間に位置し、両菌種で形成されるクラスターに属していた。以上より本分離株は我が国初の *A. kalrae* と考えられる。現在までに我が国でヒト症例は記録されていないが、本菌株の遺伝子型は、イヌ特有か日本固有かは不明である。

#### P-7. MAFF ジーンバンクに保存されている *Fusarium* 属種複合体菌株の Histone H3 遺伝子領域 DNA 塩基配列に基づく分類学的再検討

○青木孝之, 佐藤豊三  
(独)農業生物資源研究所・NIAS-MAFF

近年、*Fusarium* 属菌では DNA 塩基配列の比較解析に基づく系統分類学的考察が進み、本属菌の多くの種が複数種を内在する種複合体であることが明らかにされている。また、種の分割・再定義も進められている。特に、従来の曖昧な種の定義に基づいた *F. moniliforme* については、それが極端に広い種の範囲を指し示しており、狭義の *F. moniliforme* が *F. verticillioides* の後参の異名であることも明らかにされたため、ISPP/ICTF 傘下の *Fusarium* 分類系統小委員会によってその使用中止が勧告された(Seifert ら, 2003)。*Fusarium graminearum* についても、多遺伝子領域の DNA 塩基配列の比較解析と GCPSR (Taylor ら, 2000) に基づく考察により、最近になり 9 つの分子系統学的種に分割された(O'Donnell ら, 2004)。

そこで、MAFF ジーンバンク保存および登録予定の *Gibberella fujikuroi* (GF) 種複合体(旧 *F. moniliforme*) 70 菌株と *F. graminearum* (FG) 種複合体 75 菌株について Histone H3 遺伝子領域の DNA 塩基配列を決定し、これら菌株の分類学的位置づけを再検討した。比較の為の標準菌株の塩基配列は GenBank の登録データ及び O'Donnell ら(2004)の公開データを用いた。Histone H3 領域の増幅には、GF 種複合体には H3-1a と H3-1b (Steenkamp ら, 2000)の、FG 種複合体には H3F1 と H3R1 (O'Donnell ら, 2004)の PCR プライマーセットを用いた。

その結果、GF 種複合体の 70 菌株からは 56 菌株の *F. fujikuroi*, 7 菌株の *F. proliferatum*, 4 菌株の *F. subglutinans* が再同定され、FG 種複合体の 75 菌株からは 18 菌株の *F. graminearum* s. str. と 57 菌株の *F. asiaticum* が再同定された。また、日本産 *F. asiaticum* は Histone H3 領域の塩基配列の分子系統解析から大きく 2 つの小群に類別された。これら菌株の MAFF ジーンバンクにおける表示学名については、現在更新中である。

#### P-8. ベトナム北部で分離された糸状菌類

○栗原祐子<sup>1)</sup>, 朴 珠英<sup>1)</sup>, Le Thi Hoang Yen<sup>2)</sup>, Nguyen Kim Nu Thao<sup>2)</sup>, Duong Van Hop<sup>2)</sup>, 安藤勝彦<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>(独)製品評価技術基盤機構・NBRC, <sup>2)</sup>Cent. of Biotechnology, Vietnam National Univ., Hanoi

ベトナム社会主義共和国(ベトナム)は熱帯モンスーン気候に属し、面積は約 33 万 km<sup>2</sup>(日本の 87%)であり、最北部の緯度は日本最南部付近、最南部の緯度はマレーシア最北部付近に相当する。ベトナムは動植物の種多様性が高く、約 12,000 種の植物、275 種の哺乳類、800 種の鳥類、5,500 種の昆虫が報告されている。同様に、微生物の種多様性も高いと考えられるが、同国の微生物については未だ十分に調査されていない。そこで、NITE-DOB とベトナム国家大学ハノイ校は、2004 年度よりベトナム産新規有用微生物探索の共同研究を開始した。今回はその結果に基づき同国北部から得られた糸状菌類について報告する。

2004 年 4 月～7 月にベトナム北部の 4 地域で土壌 46 試料、生葉 34 試料、リター 14 試料を採集し、これらを希釈平板法、希釈平板法+UV 照射法、表面殺菌法、湿室法+単孢子分離、洗浄法+直接接種法で処理して糸状菌の分離を試みた。その結果、547 株を分離し、67 属を認めた。そのなかには *Zakatoshia* 属と *Veronaea* 属の未記載種各 1 種が含まれており、さらに *Isthmolongispora minima*, *Septomyrothecium uniseptatum*, *Wiesneriomyces laurinus* のような熱帯性の稀産種や、*Gongronella butleri*, *Conioscypha* sp. のような日本では温暖な地域でしか分離されない種が多く出現した。また、24 属 25 種がベトナム新産種であった。このように、ベトナムは微生物の種多様性が高いことが示唆された。それゆえ、ベトナムは新規有用微生物の探索地として有望であると考えられる。

#### P-9. 環境保全に関わる酵母リソースの開発(1)、ミズからの酵母の分離・同定

○井手美世香<sup>1)2)</sup>, 鈴木基文<sup>1)</sup>, 吉川幸江<sup>1)2)</sup>, 宇佐美論<sup>2)</sup>, 辨野義己<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>理研 BRC・JCM, <sup>2)</sup>東洋大・工

環形動物門、貧毛類に属するミズは、土壌動物の 1 つであり、土壌の肥沃土形成に重要な働きをしている。また、ミズはミズコンポスト、廃棄物処理利用などの環境保全の面からも注目されている。土壌は酵母の主要な分離源の 1 つであるが、ミズと土壌酵母との関連については研究されていない。そこで、我々は、環境保全に関連する酵母の新規リソースの探索の一環として、ミズおよび関連土壌から酵母の分離研究を行っている。本大会では、ミズから初めて分離された担子菌酵母 *Cryptococcus* 属の一新種および子嚢菌酵母 3 種について報告する。理研和光研究所内土壌から採集したミズを用いた。ミズを平板培地上で這わせる方法およびミズをつぶした懸濁液から希釈法を用いて酵母の分離を行った。分類学的性状は *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 第4版, (1998)に準拠して調べた。分子系統解析は D1D2 領域の塩基配列に基づいて行った。*Cryptococcus* 属の一新種 3 株は *Cryptococcus macerans* を含む *Cystofilobasidium* 系統群に隣接した独自の系統枝を形成した。土星型の子嚢胞子を形成した 1 株は *Williopsis saturnus* に近縁であった。9 株は *Tetrapisispora iriomotensis* に近縁であった。2 株は *Hanseniaspora uvarum* (anamorph: *Kloeckera apiculata*) に近縁であった。以上のことから、酵母がミズを介して土壌中で伝播されている可能性が示唆された。また、糖の発酵性がある子嚢菌酵母が分離されたことは、これらの酵母がミズの消化管内で生息している可能性があることを示唆している。

#### P-10. *Saccharomyces sinensis* NBRC 10111 について

○坂本俊一, 見方洪三郎

(独)製品評価技術基盤機構・NBRC

NBRC においては品質管理として、保有株の rDNA 塩基配列の決定を現在進めている。その中で *Saccharomyces sinensis* NBRC 10111 の 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列の決定を行ったところ、起源が同じ NRRL Y-12797 として登録されているデータ (U94946) とは異なっていた。NBRC 10111 は本種の基準株であり、中国科学院微生物研究所 AS 2.1395 に由来するものである。

*The Yeast, a taxonomic study*, 4ed. では *Saccharomyces sinensis* を NRRL Y-12797 株の 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列が *Nadsonia fulvescens* var. *elongata* と同一であることから *Nadsonia fulvescens* var. *elongata* の synonym としているが、*Saccharomyces sinensis* NBRC 10111 の細胞形態、生理学的性状等の試験を行った結果は *Nadsonia fulvescens* var. *elongata* とは異なるものであった。

そこで、*Saccharomyces sinensis* の塩基配列の登録に用いられた菌株 (NRRL Y-12797) 及び他の保存機関の菌株 (BCRC 22324) を入手し、NBRC 10111 を加えた 3 株を用いて細胞形態、子嚢胞子の形状、生理学的性状、26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列等の比較を行った。

これらの 3 株はいずれも *Saccharomyces sinensis* の基準株とされているが、NRRL Y-12797 のみ他の 2 株とは異なっていた。これらの結果を原記載とも比較し、*Saccharomyces sinensis* の分類学的地位を議論する。

**P-11. Proposals of *Sphaerosporangium* gen. nov. in the family *Streptosporangiaceae*, *Krasilnikovia* gen. nov. and *Luedemannella* gen. nov. in the family *Micromonosporaceae* including five new species which were isolated from marine and mangrove rhizosphere soils of Bangladesh**

○Ismet Ara and Takuji Kudo

Microbe Division / Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center

Classification of actinomycetes based on DNA relatedness at the species level, 16S rDNA sequences and characteristic patterns of signature nucleotides at the genus and family have proved to be very useful for distinguishing and differentiating members of actinomycetes. We propose three new genera and five new species of actinomycetes using polyphasic approach. The taxonomic status of five actinomycete strains 3-28(8)<sup>T</sup>, 3D-72(35)<sup>T</sup>, 3-54(41)<sup>T</sup>, 3-9(24)<sup>T</sup> and 7-40(26)<sup>T</sup> isolated from sandy soil in Bangladesh was studied. Strains 3-28(8)<sup>T</sup> and 3D-72(35)<sup>T</sup> produced branching substrate mycelia, developed sporangia on aerial hyphae containing non-motile spores. On the other hand, strains 3-54(41)<sup>T</sup>, 3-9(24)<sup>T</sup> and 7-40(26)<sup>T</sup> formed sporangia on short sporangiophores directly developed from the substrate mycelia. On the basis of phylogenetic analysis, DNA-DNA hybridization and signature nucleotides, the name *Sphaerosporangium* under the family *Streptosporangiaceae* is proposed for a new genus containing *S. melleum* sp. nov., with type strain 3-28(8)<sup>T</sup> (=JCM 13064<sup>T</sup>), and *S. rubeum* sp. nov., with type strain 3D-72(35)<sup>T</sup> (=JCM 13067<sup>T</sup>). On the basis of morphological, chemotaxonomic properties, phylogenetic analysis and signature nucleotides, it is proposed that strains 3-54(41)<sup>T</sup>, 3-9(24)<sup>T</sup> and 7-40(26)<sup>T</sup> should be classified in two new genera *Krasilnikovia* gen. nov. containing *K. cinnamoneum* sp. nov., with type strain 3-54(41)<sup>T</sup> (=JCM 13252<sup>T</sup>) and *Luedemannella* gen. nov. containing *L. helvata* sp. nov., for strain 3-9(24)<sup>T</sup> (=JCM 13249<sup>T</sup>) and *L. flava* sp. nov., for strain 7-40(26)<sup>T</sup> (=JCM 13250<sup>T</sup>) in the family *Micromonosporaceae*.

**P-12. 本邦におけるヒト病巣由来 *Nocardia* の新種について**

○矢沢勝清<sup>1)</sup>, 影山亜紀子<sup>2)</sup>, 西村和子<sup>1)</sup>, 三上襄<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>千葉大真菌センター, <sup>2)</sup>北里大生命研

近年, 細菌の分類において, 16S rDNA の塩基配列の情報に基づいた分類基準が用いられ, 多数の新種が報告されている。*Nocardia* も例外ではなく 1990 年まで 10 種が種として確立されていたが, 1995 年から 2003 年までに 19 種の新種が報告されて, このうち 15 種が 2000 年以降に報告されている。2004 年には 21 種の新種が報告され, さらに今年はずでに 2 種の新種が報告された結果, *Nocardia* の種の総数は 52 種になった。我々は十数年にわたり, 日本やタイなどの臨床由来の *Nocardia* をはじめとする病原性放線菌の同定依頼を受け, 分類学的な検討も行ってきた。これら研究に *N. otitidiscaviarum* と生理生化学的に近縁で, 分類学的に異なると思われる 4 菌株を見いだしたので報告する。

使用菌株

IFM 0354 株は 1991 年に手背肉芽腫から, IFM 0384 株は 1993 年前腕膿瘍から, IFM 0576 株は 1995 年腕皮下結節から, また IFM 0953 株は 2000 年手背膿瘍からそれぞれ分離された本邦の患者由来の菌株である。

結果

これら菌株は生理生化学的性状が *N. otitidiscaviarum* に似ていることから, 最初は *N. otitidiscaviarum* として同定されていたが, その後 16S rDNA および DNA-DNA 相同試験の結果 *N. otitidiscaviarum* とは別種であることが明らかになった。さらに, IFM 0354 と IFM 0576 および IFM 0384 と IFM 0953 はそれぞれ同種であったが, お互いに別種と考えられる結果が得られた。

**P-13. 国内特殊環境からの好アルカリ・好塩放線菌の分離**

○荒井千夏, 原山重明

(独)製品評価技術基盤機構・資源開発部門

これまで放線菌の分離において, 日本国内の土壌環境がやや酸性に傾いている事やアルカリ性環境が少ない事から, アルカリ性放線菌の分離が希にしか行われていなかった。また汽水環境から放線菌の分離は既に試みられているが, 主に *Micromonospora* 属が分離され, 他の放線菌を分離することは難しかった。

そこで, 国内のアルカリ環境 (例えば, 水鳥や鹿など動物の糞が蓄積している環境) や汽水に生息する動物 (例えば, 底生生物やヤマトシジミなど) を分離源とし, 好アルカリ・好塩放線菌を分離した。

試料を滅菌水に懸濁し (水環境試料はそのまま使用した) ショ糖密度勾配遠心法を用いて分画した。これを, 人工海水 (Wako 製), ベタイン, カルニチンをそれぞれ様々な濃度で添加した HVA 培地に 0.1ml ずつ塗抹し, 28°C で培養した。

その結果, 国内のアルカリ性・汽水環境 43 試料より, 好アルカリ・好塩放線菌を 372 株分離した。このうち 144 株を 16S rDNA を用いて塩基配列を決定した。

分離株の 8 割が *Streptomyces* 属であった。それ以外では, *Micromonospora* 属, *Nocardia* 属, *Kitasatospora* 属が分離で

きた。これは土壌中の放線菌の9割が *Streptomyces* 属であること、汽水で分離される菌株に *Micromonospora* 属が多い事、またシヨ糖密度勾配遠心法は *Nocardia* 属の選択分離法であることを考えると妥当な結果であると言える。

一方既知株との相同性が98%以下の株は50株であった。分離株約3割が未知微生物であったことから、分離源と分離法を工夫することによって、未知微生物を効率よく取得出来る可能性が示唆された。

#### P-14. DNA マイクロアレイを用いた放線菌の遺伝子解析

○小牧久幸<sup>1)</sup>, 伴文彦<sup>2)</sup>, 仁村幹彦<sup>2)</sup>, 井上匡人<sup>2)</sup>, 原山重明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>(独)製品評価技術基盤機構・資源開発部門, <sup>2)</sup>ジーンフロンティア

【目的】放線菌は抗生物質等の探索源として重要な微生物資源であり、多様な二次代謝に関わる遺伝子を有している。近年、DNA マイクロアレイ技術を利用した Comparative Genomic Hybridization (CGH アレイ)により、微生物に対してもゲノムレベルで遺伝子の欠失や変異を網羅的に解析する研究が盛んになっている。本研究では CGH アレイを放線菌の二次代謝関連遺伝子の解析に応用する事を目的とした。

【方法】CGH アレイの設計には二次代謝遺伝子が豊富な *Streptomyces avermitilis* MA-4680 のゲノム情報を使用した。 *S. avermitilis* (Reference sample), *S. coelicolor* A3(2), *S. hygroscopicus* NBRC 13981 (Test samples)からゲノム DNA を調製し、試験に供した。アレイの設計や作製、ハイブリダイゼーション、蛍光シグナルの測定はジーンフロンティア社が提供する解析サービスに従った。

【結果及び考察】*S. avermitilis* と *S. coelicolor* のゲノム情報を確認した結果、本アレイ実験により得られたデータは両株で配列が異なる領域を高感度に検出していた。各種二次代謝遺伝子に関して、*S. hygroscopicus* のアレイデータを調べた結果、テルペン合成に関与する *tpc1* や *crt* 等の存在が推定された。更に I 型 polyketide synthase (*pks*)に着目すると、*olmA* や *aveA* に相当(類似)する *pks* は存在しないが、*pteA* の orthologue を有する可能性が示唆された。これを検証する為に *S. hygroscopicus* から *pks* の一部を PCR クローニングしたところ、ポリエンマクロライドの合成に関与する *pteA* や *nys* 等と相同性が高い配列が見出された。*S. hygroscopicus* NBRC 13981 株が生産するポリエンマクロライドの報告は未だ無いので、今後、同株より全長ポリエンマクロライド遺伝子の取得や生産物の確認を行い、DNA マイクロアレイによる機能推定の有効性を実証していきたい。以上の結果から、CGH アレイは放線菌からの二次代謝遺伝子の探索に有用であると考えられた。

#### P-15. Seven novel *Alicyclobacillus* species isolated from beverages and soil in Japan

○K. Goto<sup>1)</sup>, Y. Kato<sup>1)</sup>, K. Mochida<sup>1)</sup>, M. Asahara<sup>1)</sup>, R. Fujita<sup>1)</sup>, S.-Y. An<sup>3)</sup>, H. Kasai<sup>2)</sup> and A. Yokota<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Mitsui Norin, <sup>2)</sup>Marine Biotechnology Institute, <sup>3)</sup>The University of Tokyo

Recently, spoilages of beverages by *Alicyclobacillus* (ALB) have occurred sporadically, yet world-wide. Some ALB often grow in beverages with odor, so ALB have been regarded as target bacteria for quality control of beverages. During the course of a survey on the distribution of ALB, we have isolated unusual ALB-like bacteria from spoiled beverages and soil. We have already reported three of these isolates as new ALB, and in this report we describe more novel ALB. Six strains have been isolated from soil in Shizuoka. Three strains have been isolated from spoiled beverages. DSM 11985 was obtained from DSMZ. According to the results of phylogenetic analyses based on 16S rDNA sequence, 10 isolates fell within the cluster composed of ALB species. In addition to the phylogenetic data, some properties suggested that these isolates are new member of genus ALB. Though STAB showed a close relationship with *A. acidoterrestris* in phylogenetic trees, DNA similarities (DDH values) between STAB and *A. acidoterrestris* ATCC 49025<sup>T</sup> were very low, and STAB did not produce guaiacol. 3A191 and E8 clustered with *A. pomorum*, but they showed low DDH values with *A. pomorum*. RB718 and DSM 11985 clustered with *A. hesperidum*, but RB718 showed low DDH values to *A. hesperidum*. On the other hand, DSM 11985 showed intermediate DDH values to *A. hesperidum*. 5A83J, 5A167N, 4A336 and 5A2392Oher clustered with *A. herbarius*. 4A336 showed low DDH values to the strains of the *A. herbarius* cluster. 5A2392OA did not show a close relationship with any other ALB species. On the basis of obtained data, we propose *A. fujiedaensis* (5A2392OA<sup>T</sup>), *A. shizuokaensis* (4A336<sup>T</sup>), *A. fujiiensis* (3A191<sup>T</sup>), *A. hesperidum* subsp. *aigle* (DSM 11985<sup>T</sup>), *A. saccharis* (RB718<sup>T</sup>), *A. fastidiosus* (S-TAB<sup>T</sup>), *A. kakegawaensis* (5A83J<sup>T</sup>).

**P-16. ヒト糞便より分離された *Bacteroides* 属の新菌種の提唱**

北原真樹, ○坂田慎治, 坂本光央, 辨野義己  
理研 BRC・JCM

近年の分子生物学的手法によるヒト腸内細菌群集の多様性解析の結果から, いまだ分離培養されていない腸内細菌が多数存在することが明らかにされた. ヒト腸内細菌の構成を解明する研究の一環として, 新鮮排泄便から菌株の分離を試みたところ, 糞便1グラムあたり $10^9$ 以上存在する*Bacteroides* 属に属する未分類株が分離されたので報告する.

グラム陰性無芽胞桿菌分離株 50 株について 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定した結果, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. uniformis*, *B. merdae*, *B. massiliensis* とそれぞれ 97%以上の相同性を示した菌株が 25 株存在した. 残り 25 株については *B. vulgatus* と近縁であったが *B. vulgatus* との相同性は 91%以下であり, 既存の菌種とは一致しないことが明らかとなった. さらにこれらの菌株は 2 つのファイロタイプに分けられ, 2 つのファイロタイプ間の相同性は 95%以下であった. それぞれのファイロタイプから代表株 9 株を用いて, 近縁種である *B. vulgatus* JCM 5826<sup>T</sup>, *B. helcogenes* JCM 6927<sup>T</sup>とともに, 生理生化学性状試験, 菌体脂肪酸測定, DNA-DNA 相同性試験を行った. 生理生化学性状試験の結果, 分離株 9 株は系統樹で示された結果と同様に 2 グループに分けられ, 既存の 2 菌種とは異なる性状パターンを示した. 菌体脂肪酸測定の結果においても 9 株は既存の 2 菌種と識別可能であった. さらに DNA-DNA 相同性試験の結果から 9 株は 2 菌種に分けられ, *B. vulgatus* JCM 5826<sup>T</sup>, *B. helcogenes* JCM 6927<sup>T</sup>とはそれぞれ 10%以下の低い相同性を示した. 以上の結果より, 分離株は *Bacteroides* 属の新菌種であると考え, それぞれ *B. plebeius* および *B. coprocola* と命名提案した. 基準株はそれぞれ JCM 12973<sup>T</sup> および JCM 12979<sup>T</sup> とした.

**P-17. Identification of *Pseudomonas* strains; a polyphasic approach**

○Mohammad Abdul Bakir, Shinji Sakata, Maki Kitahara and Yoshimi Benno  
Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Centre

A total of 53 strains isolated from clinical, environmental and animal source were taken for identification at the species level. All the studied strains were deposited to JCM by Professor R. Hugh (George Washington Univ., USA) and primarily identified as *Pseudomonas* species. Partial sequence (approximately 500 nucleotides) of 16S rRNA gene of these strains was determined and analyzed. The studied strains showed 98% similarity with 20 different species under the genus *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Shewanella* in the BLAST search. However, 36 strains (68%) showed  $\geq 98\%$  similarity with more than one species in the BLAST search. Both the partial and nearly complete 16S rDNA sequence analysis of the 20 matched species in the BLAST search revealed that most of the species share  $\geq 97\%$  sequence homology. Phylogenetic analysis showed that 1 strain grouped with *P. veronii*, 3 with *P. kilonensis*, 12 with *P. plecoglossicida*, 15 with *P. aeruginosa*, 1 with *P. stutzeri*, 13 with *P. pseudoalcaligenes*, 2 with *P. alcaliphila*, 2 with *S. algae* and 4 with *Burkholderia cepacia*. All the 15 strains of *P. aeruginosa* produced pigment on King A medium and were able to grow at 41°C. All the 53 strains were characterized by API 20 NE kit (Biomérieux, France). However, API 20 NE database contains only 6 species of the 20 matched species in the BLAST search. All the type strains of the matched species will be collected and compared with the studied strains by biochemical test and ribotyping.

**P-18. *Stenotrophomonas maltophilia* の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性について**

○田中尚人<sup>1)2)</sup>, 宮崎智<sup>3)</sup>, 菅原秀明<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>JST・BIRD, <sup>2)</sup>遺伝研生命情報・DDBJ, <sup>3)</sup>東京理科大・薬

*Stenotrophomonas maltophilia* は自然環境や臨床に幅広く生息している. 臨床株では幅広いスペクトラムの  $\beta$ -lactam 系抗生物質の耐性細菌として報告があり, 本細菌特有の  $\beta$ -lactamase (L1: 亜鉛型, L2: セリン型) がその耐性に関与している. また, 我々は以前に *S. maltophilia* が細胞内に亜鉛を顆粒状に吸蔵することを見出した. そこで, 環境および臨床由来の *S. maltophilia* 株の, 特に亜鉛依存性 L1 型  $\beta$ -lactamase に注目し, 薬剤耐性と亜鉛吸蔵との関連について検討した.

供試菌株には環境由来 3 株, 臨床由来 3 株を使用した. 環境株 1 株 (IAM 12672) を除き, 5 株は 5 mM 以上の亜鉛に対して耐性を示し, 定常期には乾燥菌体 1 mg あたり約 10  $\mu$ g の亜鉛を顆粒状に吸蔵することを ICP 発光分光分析および EDS 付透過型電子顕微鏡で確認した.

次に, ディスク拡散法により供試菌株の 6 種類の抗生物質に対する耐性を検討した. その結果, 臨床株は多くの薬剤に強い耐性を示し, 逆に環境株は多くに感受性を示した. しかし環境株のうち 2 株は, 亜鉛を吸蔵させると L1 型  $\beta$ -lactamase の好適基質であるカルバペネム系に対して耐性を示すようになった. そこで, 環境株の本酵素の活性をカルバペネム系のメロペネムの分解測定により検討したところ, 3 株とも本酵素の活性があり, IAM 12672 株は反応液に亜鉛を加えることで大幅に活性が上昇した. したがって, 亜鉛の蓄積能を持つ 2 株は細胞内亜鉛濃度が L1 型

$\beta$ -lactamase 活性に十分となり耐性を示すが、蓄積能のない IAM 12672 株は潜在的に耐性機能がありながら、細胞内亜鉛濃度が不十分であるため感受性を示すと考えられた。よって、*S. maltophilia* の亜鉛の吸蔵は L1 型  $\beta$ -lactamase 活性に効果的であると考えられた。

#### P-19. 高温環境からの新規嫌気性菌の探索

○飯野隆夫, 原山重明, 鈴木健一朗  
(独)製品評価技術基盤機構・NBRC

【目的】高温環境や嫌気環境には、様々な微生物が様々なエネルギー獲得様式で生息している。我々は、自然界から微生物を広く収集し、利用できる生物遺伝資源の充実をはかることを目的としている。本研究では、高温環境から新規の嫌気性菌を探索した。

【方法】日本各地から熱水、活性汚泥、バイオマットなど計 24 試料を採取した。これら試料から各種嫌気培地を用いて、37~75°Cにおいて嫌気性菌の集積培養もしくは直接平板培養を行った。培養後、培養菌体の 16S rDNA シーケンス解析を行った。未知と考えられた嫌気性菌の純粋分離も試みた。

【結果および考察】収集した試料から、*Methanobacteria*, *Methanomicrobia*, *Aquificae*, *Nitrospira*, *Firmicutes*, *Deferribacteres*, *Bacteroidetes*, *Propionibacteria* などの増殖が確認された。この中で、活性汚泥からは、既知の古細菌と 16S rDNA の相同性を示さない全く未知の古細菌の増殖が見られた。湯俣温泉の熱水からは *Deferribacteraceae* に属する未知の鉄還元菌が、活性汚泥と那須温泉の熱水からは *Porphyromonadaceae* に属する未知の嫌気性菌の増殖が見られた。前者は 1 目 1 科 4 属 6 種、後者は 3 属しか存在しない嫌気性菌群であり、希少な嫌気性菌の存在が明らかになった。また、多くの試料から *Thermoanaerobacteriales* に属する嫌気性菌の増殖が見られた。それらの多くは同目の既知の微生物と 16S rDNA の相同性が低く、系統的にも独立したクラスターを形成した。一方、*Clostridiales*, *Thermoanaerobacteriaceae*, *Thermodesulfovibrio* などに属する嫌気性菌 13 株を純粋分離し、8 株が新規と考えられた。以上より、これらの高温環境には多様な嫌気性菌が存在し、多くの新規嫌気性菌を純粋分離できることが示唆された。

#### P-20. ゲルマイクロドロップ・フローサイトメトリー法による高温生育菌の取得

○早川敦<sup>1)</sup>, 土田隆康<sup>1)</sup>, 不藤亮介<sup>1)</sup>, 原山重明<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>味の素・ライフサイエンス研, <sup>2)</sup>NITE

【背景と目的】近年、微生物検出技術は著しく向上した。その結果、自然界の多くの微生物が、難培養性微生物であることが明らかとなった。これら難培養性微生物の中には、産業上有用な生物機能を有するものが、多数存在すると予測される。我々は難培養性微生物の分離技術として、ゲルマイクロドロップ・フローサイトメトリー法を開発している。そこで、本方法を用い、堆肥から新規高温生育菌を取得することを目的として、本研究を行った。

【方法】堆肥中の微生物を寒天粒子(ゲルマイクロドロップ)で内包し、50°Cにて培養後、蛍光染色した。それから、蛍光強度の弱い粒子を、難培養性微生物が内包された粒子とし、フローサイトメトリーによって分離した。その後、可培養化の操作として、カタラーゼを添加した培地にこれらゲルマイクロドロップを塗布し、50°Cにて培養した。

【結果】ゲルマイクロドロップ・フローサイトメトリー法では、微生物を 20 株取得し、その全てが、既知微生物との 16S rDNA の相同性が 97%以下の新規微生物であることが明らかとなった。この新規微生物取得効率は、通常の寒天平板培養法での取得効率(5%)と比較して非常に高かった。また、本方法で取得した  $\gamma$  プロテオバクテリアは、16S rDNA の相同性が最も高かった uncultured bacterium と 94.6%の相同性を有し、*Pseudoxanthomonas taiwanensis* とは 94.4%の相同性を有する新規性の高い微生物であることが明らかとなった。さらに、本菌は寒天培地での生育にカタラーゼの添加が必須であるという、上記類縁菌で報告されていない性質を有していることも明らかとなった。生化学試験の結果も踏まえ、本菌を *Pseudoxanthomonas* 属細菌の新種として考えている。なお本研究はナショナルプロジェクト「ゲノム情報に基づいた未知微生物遺伝資源ライブラリーの構築」の一環として、NEDO の委託を受け、当社と NITE の共同にて実施された。

#### P-21. 細菌毒素データベースの構築

○平島壮規<sup>1)2)</sup>, 田中尚人<sup>1)2)</sup>, 重元康昌<sup>3)</sup>, 阿部貴志<sup>1)4)</sup>, 菅原秀明<sup>1)4)</sup>  
<sup>1)</sup>遺伝研生命情報・DDBJ, <sup>2)</sup>JST・BIRD, <sup>3)</sup>富士通, <sup>4)</sup>総研大・遺伝

人類にとって感染症は太古から大きな脅威であったが、抗生物質の発明が治療手段に革命を起し、細菌感染症は克服されるかに見えた。しかしながら現実には、薬剤耐性菌の増加、新興感染症の流行、さらには病原菌を用いたバイオテロリズムなど、感染症は今なお人類にとって大きな脅威であり続けている。

近年の遺伝子解析などの手法の著しい進歩に伴い、感染症の病原因子となる細菌毒素の解明は急速に進んでおり、多くの知見が蓄積されてきている。感染症を研究する上で、これらの情報を網羅的に捉えられるシステムは有用であると思われるが、現在細菌毒素の情報を統合的に格納したデータベースはみられない。

われわれはこうした現状を踏まえ、細菌毒素データベースの構築を試みた。

細菌毒素ハンドブックは、細菌毒素研究にかかわる日本の多くの研究者が参加して網羅的記載がなされた書籍である。われわれは書籍中出现した毒素名を前後の付帯情報とともに抜き出してリスト化し、著者および微生物学研究者に査読を依頼した。この指摘を元にデータに修正を加え、われわれの研究室で開発したデータベース表示システム、O-InfoBIOを用いて Web 上に公開した。

本発表においてその内容および機能について紹介する。

## P-22. 海洋細菌ライブラリーの構築

○勝田麻津子, 笠井宏朗, 志津里芳一  
海洋バイオテクノロジー研究所

海洋バイオテクノロジー研究所(MBI)では、微生物の産業利用を促進するために、海洋環境を中心に、微生物資源の探索、分離、培養、分類・同定、維持、分譲活動を恒常的に行っている。本ポスターでは、平成14年度以降に新たに収集した菌株の分類・保存・分譲の状況と菌株の大量提供に向けた試みについて報告する。

MBIでは最近の3年間で、500以上の海洋サンプルから数十種類の培地を用いて約30,000株の微生物を分離培養した。そのうち約1/3について16S rDNA部分配列に基づいた網羅的な簡易同定を行い、本ライブラリーが、数多くの新規株を含んでいることが明らかになった。そこで、これらの微生物を、より効率的に産業利用につなげるための新たな試みとして、微生物株の大量提供を行っている。昨年度提供した菌株数は4機関、2,500株以上になる。提供する菌種及び形態は、ユーザーの希望に応じて様々であるが、主にグリセロールストックあるいは寒天プレート上に培養した形で提供している。すでに、新規機能発見につながる例も出ているが、その一方、提供サンプルの作成に手間がかかること、グリセロールストックの中には復元しない株があること、新鮮な培養菌体でない場合には適切なアッセイができないことなどの問題が生じている。そこで、より効率的かつ安定した菌株の大量提供法の開発のために、海洋環境から収集された *Pseudomonas* 近縁株を用いて培養・保存法の開発・検討を行っているので、その結果の一部についても紹介する。

大量提供した一部の菌株は MBI カルチャーコレクション(MBIC)から公開している。

なお本研究の一部は、「ゲノム情報に基づいた未知微生物遺伝資源ライブラリーの構築」プロジェクトの一環として独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構より委託を受けて、実施したものである。

## P-23. 自己組織化地図法(Self-Organizing Map)に基づいた環境由来 DNA 配列からの微生物多様性解明

○阿部貴志<sup>1)2)</sup>, 池村淑道<sup>1)2)</sup>, 金谷重彦<sup>3)</sup>, 木ノ内誠<sup>4)</sup>, 菅原秀明<sup>1)2)</sup>  
1)遺伝研・生命情報・DDBJ, 2)総研大, 3)奈良先端大・情報, 4)山形大・工

多様な環境に生息する多種類の生物種を対象にした、新しい視点でのゲノム解析技術が発展している。多様な環境で生育する微生物類については、培養が困難な例が大半を占めている。これらは新規な遺伝子類を豊富に保有する可能性が高く、注目を集めている。新しい解析技術として、環境中で生育する生物群を含有する試料から直接的にゲノムDNAの混合物を抽出し、配列決定を行う技術が開発され、普及の兆しを見せている。しかしながら、得られた環境由来のDNA断片配列の集合のみでは、その試料に存在する生物の種類、系統群、それらの新規性等を推定することは困難である。我々は、断片配列のオリゴヌクレオチド頻度から、生物種ごとの高精度な分類を可能にする自己組織化地図法(SOM)の開発を行っており(1)、国際塩基配列データベース中に含まれる約1500種の細菌由来の総計1.05Gbの配列を対象に5kbに断片化し、SOMマップを作成したところ、高い分類能を得ることができた。この知見に基づき、環境微生物ゲノムの多様性や新規性を推定するための新しい系統分類法、ならびに新規性の高い未知微生物ゲノムを効率的に探索する手法の開発を行った。Venterらが2004年3月に *Science* に発表したサルガッソー海由来のDNA断片配列を中心に解析を行い、培養が困難な環境微生物類の混合試料に由来する断片配列の系統推定や分類、ならびに新規性の高い断片配列の探索を行った。オルソログ配列セットや配列のアラインメントが不要であり、新規性の高い配列の系統推定が可能である。参考文献:1, Abe et al (2003) *Genome Res.* **13**, 693-702.

## P-24. NITE 特許微生物寄託センターの活動について

○佐藤真則, 小松泰彦, 吉田和子, 末田歩, 山本謙吾, 和唐末信  
(独)製品評価技術基盤機構・特許微生物寄託センター・NPMD

NITE 特許微生物寄託センター(NPMD)は、国内2番目となる特許庁長官の指定する寄託機関、またブダペスト条約に基づく国際寄託当局として、平成16年4月より業務を行っている。

NPMDの特長としては、併設されている生物遺伝資源部門(NBRC)の有する高度な技術と豊富な経験を背景にした確実な長期保存及び生存試験の実施が可能であり、NBRCによる安全寄託等の技術サービスを特許寄託と組み合わせることにより、寄託者にとって利便性の高い業務展開を図っている。また、取り下げ、寄託期間終了後の微生物については、



NBRCとの連携により有効活用が可能となっており、有用微生物を保護すると同時に、これら微生物を用いた研究活動等の促進を図ることにつながっている。微生物の保管については、火災等災害に対する危険分散のため、複数の保管庫及び地方支所でバックアップを行っており、寄託者から信頼のおける安全かつ確実な保管を実施している。

今後、NPMDは従来にも増す技術力や機能の高度化、永続性を担保するだけでなく、寄託者に対し、より高い行政サービスを提供できる我が国を代表する寄託機関として成長していくつもりである。

## ポスター発表（機関紹介）

### C-1. AHUの保存事業と*Rhizopus*属の分類学的研究

○阿部歩, 曾根輝雄, 浅野行蔵  
北海道大学大学院農学研究科・AHU

北海道大学大学院農学研究科(AHU)は、現在、1000株以上の菌株を保有している。微生物は植継ぎによる保存を繰り返すことにより、コンタミネーションや死滅、変異などが起こることが大きな問題となっている。そのため、保存期間を長くして植継ぎを少なくすることは大変重要である。当機関では、スラント(斜面培養)、グリセロールによる凍結保存(-80℃)、L-dry(減圧乾燥したアンプルによる保存、4℃)の3種類で保存している。長期保存にはL-dryを多用しているが、菌によっては減圧乾燥に耐えられず長期間の保存に向かない場合がある。そのため、グリセロール保存も同時に行い、死滅をなるべく減らすようにしている。

また、新たな種の発見や解析方法の発展により、今までの分類がさらに分けられたり統合されたりと現在も分類は変化しているため、保存菌株でも保存を始めた当時と名称が変わっていることも多々ある。特に近年の分子生物学的手法による分類法の発展はめざましく、細菌学の世界ではrRNAの配列が分類を行うにあたって必須の情報でもある。しかしながら、カビや酵母、きのこのいわゆる真菌類の世界ではまだまだ形態学的な情報や生理学的な情報での分類が主であり、分子生物学的手法との整合性を図ることが今後の課題となっている。

我々は乳酸を生成する糸状菌を探索するプロジェクトで*Rhizopus*属菌種について研究を行っているうちに、現在1種とされている*R. oryzae*が、発酵パターンやDNAレベルでの情報から2種に分けた方が良いのではないかと結論に至った。しかしながら、上記のような理由から真菌類において、分子生物学的手法のみから分類を再考するには難しく、現在も様々な情報を集めているところである。今回は新たに得られた情報についても紹介する。

### C-2. P3対応の新キャンパスとGTCライブラリーの新しい保存分譲環境の整備

○河村好章, 大楠清文, 江崎孝行  
岐阜大院・医・病原体制御学分野・GTC

本機関が属する岐阜大学医学部及び附属病院は2004年5月に新キャンパスに移転しました。これに伴い、新医学部研究棟内にP3レベル対応実験室および独立した菌株保存室を確保することができました。加えてナショナルバイオリソースプロジェクト中核的拠点整備プログラム「微生物—病原微生物」に参画することにより、菌株保存用超低温(-80℃)冷凍庫の増設、凍結乾燥機(多枝管仕様)及びアンプル融封機の導入をすることができ、インフラ整備を充実させることができつつあります。また液体窒素タンクの稼働も始めましたので、これまで凍結保存(-80℃保存)のみを常用してきましたが、凍結乾燥保存、液体窒素保存も日常的に行える環境がようやく整いました。

本機関は、ヒトに対する病原性細菌を中心として、現在約20,000株のコレクションを有しています。その内訳としてはバイオセーフティーレベル(BSL)3の細菌10菌種580株、BSL2細菌320菌種のほぼ全て(約10,000株)、BSL1細菌約600種9,000株となります。ヒトに対し病原性を有すると思われる菌種の8割以上を保有しており、病原性細菌の分類学上の基準株の保存に関しては国内最大であり、かつBSL3の微生物を扱える実験室を有し、その研究と保存および分譲が行える国内でも数少ない施設であると自負しています。

上述のごとく、系統保存機関として一定の環境整備ができたことから、これまで以上に多様な微生物を使った研究に積極的に取り組み、収集した微生物の保存分譲サービスを行いたいと思っています。

大会当日は本機関のこれまでの歩みとともに現状とその活動報告、さらに今後の予定についても紹介したいと思います。

### C-3. HUT カルチャーコレクションについて

土屋英子, ○川北龍司

広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻微生物遺伝資源保存室・HUT

広島大学に保存されている微生物株のカルチャーコレクション(HUT)は、前身である広島高等工業学校時代の1930年(昭和5年)に設置された歴史の有るコレクションです。

HUT は広島高等工業学校の長西広輔先生らが満州鉄道株式会社中央研究所から、保有微生物株(CLMR コレクション)の複製コレクションを譲り受け、それを核として発足しました。以来、1949年(昭和24年)に広島高等工業学校が広島大学工学部としてスタートした後は醗酵工学科に設置され、現在は先端物質科学研究科、分子生命機能科学専攻に設置されております。

HUT の発足当時は発酵・醸造に関する微生物が主でしたが、数多くの先生方の御尽力により、広く非病原性の微生物を1489株保有するまでに発展し、そのうち711株(糸状菌344株、放線菌182株、酵母168株、細菌17株)は分譲可能としてカタログおよびweb上<sup>1)</sup>にて公開しております。そして、広く国内外の研究者への菌株の分譲、寄託、保存を主な活動内容とし、国際微生物保存連盟(WFCC)に加盟すると共に、日本微生物資源学会(JSCC)の機関会員として活動、国際的なレベルで微生物株の分譲、寄託・保存に対応しております。しかしながら、菌株の品質保証に必須である分類スキルを持つ人材や研究費の不足のため、残りの糸状菌365株、放線菌136株、酵母268株、細菌9株の再同定も困難であり非公開とせざるを得ません。

当面は分譲・寄託、および維持管理に重点を置かざるを得ない状況ではありますが、今後、大学法人化による規制緩和も大いに利用できるよう考慮した上で、コレクションをさらに発展させるための方策を模索していきたいと考えています。

1) <http://home.hiroshima-u.ac.jp/hut/>

### C-4. IAM カルチャーコレクションの活動

○三浦義治, 降旗桂子, 倉橋みどり, 與口りお, 小林真理, 秋本由香, 宇波榮子, 横田明

東京大学分子細胞生物学研究所バイオリソース研究分野・IAM

近年、米国等で顕著になりつつある遺伝子資源としての微生物自体の特許化、世界的な傾向として生物資源としての微生物の利用制限、成果に対する利益配分の請求等に日本の学術研究、産業界にとって微生物株の国内での確保は非常に重要かつ緊急課題となっている。安定した研究環境、産業の維持のために日本国内のコレクションの役割は今後もますます重要となることは明白であり、必要性は増大していくと考えられる。

IAM カルチャーコレクション(IAM Culture Collection)は、昭和28年(1953年)に東京大学分子細胞生物学研究所の前身である東京大学応用微生物研究所の創立と共に活動を始め、国内の微生物株保存機関としては最も古い歴史を刻んでいる。

IAM カルチャーコレクションは創立の主旨に沿い微生物株の配布事業を行い安価な株の提供を行っている。収集、保存についても常に新しく分離報告された新株を保存株に加えている。

最近、「戦禍超えた黒こうじ菌、よみがえる幻の泡盛」として当コレクションの保存菌株(*Aspergillus awamori* var. *piceus* IAM 2351)が、新聞、テレビなどで大きく報道され、また東大グッズとしても話題になり全国的に注目された。

平成16年度時のコレクション保有菌株数は3,860株、分譲株数は1,754株である。分譲数は過去5~6年に渡り横ばいであったが、昨年から上昇傾向にある。

IAM カルチャーコレクションの人員は常勤職員3名、非常勤職員5名で、大学院生の研究、教育などの研究活動と共にカルチャーコレクションを担っている。博士学位取得保持者4名、助手、専門技術職をスタッフとして、専門的かつ充実した人的環境をととのえ、現行のコレクション業務を更に迅速、正確にし、より確実な微生物株の提供を進めている。

### C-5. 病原真菌・放線菌のカルチャーコレクション

○三上襄, 西村和子

千葉大学真菌医学研究センター・IFM

本カルチャーコレクションの菌株はIFM番号で記載されているが、その起源は、腐敗研究所(Institute of Food Microbiology, IFM; 1945~1973)時代の抗生物質やマイコキシン生産菌、さらには食中毒の原因菌の収集・保存に基づいている。その後、センターにおける医真菌学研究的進展に伴い、多くの病原真菌株が収集されたが、1987年に全国共同利用研究施設としてなり、国内外の研究者との共同研究がさらに活発となり、多くの菌株が収集され、現在では、約277菌属、1,400種の病原真菌と17菌属、95種の病原放線菌が保存され、2004年度では、病原真菌と放線菌株の総計は12,625株に達している。中でも病原性の放線菌については、保存株の検討が進み、この2年間で15種以上が新菌種として登録されている。

2002年には、文部科学省の「新世紀重点研究創生プラン: RR2002」の実施に伴い、国はライフサイエンス分野におい

で戦略的に整備することが必要なものについて、体系的な収集・保存・提供を行うための整備を目的に、「ナショナルバイオリソースプロジェクト」を立ち上げた。当センターは、病原微生物の中核的機関として選定され、阪大、東大、岐阜大(以上、細菌)、長崎大(原虫)の4大学、国立遺伝学研究所および理化学研究所 JCMと協力して、プロジェクトを進めている。近年、新興・再興感染症による脅威は益々大きな問題となっており、本カルチャーコレクションにおいても、レベル3の高度病原真菌株も含めて収集・保存・提供、DNAライブラリー、データベースの整備を積極的に進めている。(協力者:福島和貴、亀井克彦、横山耕治、知花博治、佐野文子、矢口貴志)

#### C-6. 財団法人発酵研究所の新事業

中濱一雄, ○佐藤邦子  
(財)発酵研究所・IFO

財団法人発酵研究所は、60年にわたって学術および産業に有用な微生物の収集・保存・分譲業務を行ってきたが、平成14年7月にその大部分の研究資源をNBRCに移転した。そこで当財団は、これまで培ってきた微生物保存事業の精神を生かす新事業として平成15年度から研究助成等を開始した。本ポスターでは、新事業の活動状況を紹介する。

#### C-7. 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

○山岡正和, 福田裕二, 宮本恭恵, 森田初恵, 中原東郎  
(独)産総研・特許生物寄託センター・IPOD

(独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(IPOD)は、特許法施行規則第27条の2に基づく特許庁長官の指定する寄託機関として(昭和43年に分譲を含めた総合的な寄託業務を開始)、また、世界知的所有権機関(WIPO)ブダペスト条約上の国際寄託当局として(昭和56年以来)、国内外から寄託される特許出願に関する微生物細胞等の受託・分譲業務を実施している。受託する細胞等の範囲は順次拡大され、現在では、微生物細胞(かび、酵母、細菌、放線菌、プラスミド(単独))、動物細胞(動物細胞、受精卵(胚)、原生動物)及び植物細胞(植物細胞、種子、藻類)を受託するに至っている。また、受託、保管、分譲業務の高度化を図るため、寄託に係る細胞等の保存、形質・機能の維持、BSL2微生物の識別、その他汚染検査、無菌化等に係る技術開発業務を行っている。

特許生物寄託センターの活動が他の生物資源保存機関と異なるのは以下の2点である。

(1)生物特許出願において明細書の記載では不十分な場合に、第三者による発明の実施の可能性を保証するために微生物細胞等が寄託されること。(2)寄託された微生物細胞等に係る発明を試験、または研究のために実施しようとする者の求めに応じてそれらの微生物細胞等が分譲されること。

寄託は特許出願前に行い、受託番号を出願時の明細書に記載する必要がある。一方、分譲は原則出願公告以後になる。しかし、特許庁が法令上の資格を認める場合には出願公告以前でも分譲は可能である。また、分譲において「業」を目的とすることは認められない。分譲された寄託生物を用いて発明が再現できなかった場合には、出願公告後であれば特許異議の申し立て、特許登録後であれば特許無効審判の請求が可能となる。因みに平成16年度末における特許生物寄託センターの全保有株数は14,296であり、分譲請求は152件(160株)であった。

#### C-8. 理研バイオリソースセンター・JCMにおける微生物保存・提供事業の展開

○辨野義己, 小迫芳正, 鈴木基文, 岡田元, 高島昌子, 工藤卓二, 伊藤隆, 大和田勉, 草桶佳代, 押田祐美, 都筑智子, 坂本光央, 林秀謙, 北原真樹, 坂田慎治  
(独)理研バイオリソースセンター・JCM

理化学研究所バイオリソースセンター・Japan Collection of Microorganisms (JCM) は1981年より微生物系統保存事業を推進し、世界で有数の微生物保存機関として認められている。昨年7月より、理研バイオリソースセンターの一員として、運営されるようになった。平成17年5月26日の保有菌株数は11,972株であり、その構成は細菌(62.5%)、アーキア(2.1)、酵母(20)、糸状菌(15.2)およびその他(0.2)となっている。その内、公開株数は7864株で、昨年度の提供株数は4,119株である。

主な事業内容は①微生物株の収集・保存・提供。②微生物株寄託同意書や提供同意者などのMTAの実施するとともに、③BSL2微生物株利用誓約書の提出を利用者に依頼している。さらに新種・新属提案による新規寄託が年々増加し、昨年新種・新属提案された菌種数(約400種)に対する認証(Certification)の発行比率は25%にまで達し、世界の保存機関の中でもその比率が年々高く成ってきている。また、新規寄託菌株の同定のため、寄託者が登録した16S rRNA遺伝子(部分)の確認も行っている。さらに、保存提供微生物の円滑な利用のために、①ホームページ(<http://www.jcm.riken.jp>)の公開、②BRC-JCMカタログの定期的発行、③BRC-JCMニュースレターの発行を実施している。本年度から難培養微生物株の取り扱い技術や微生物群集の多様性解析技術の研修事業を行う予定である。

今後も引き続き、国内外の微生物研究開発の動向を捉えながら、健康や環境に関与する微生物株の収集・保存および

その関連技術の開発を行い、これら微生物株を国内外の研究者や企業などに提供する。さらに極限微生物や難培養微生物を取り扱う技術、有用微生物とくに健康増進ならびに環境保全に関与する微生物の探索技術、複雑な微生物群集の多様性解析技術などの開発にも取り組んでいる。このような技術開発の展開と国内外の研究者・微生物保存機関の協力により、有用微生物の収集・保存・提供を進めている。

### C-9. 農業生物資源(MAFF)ジーンバンク

佐藤豊三, ○永井利郎, 富岡啓介, 竹内香純, 川田真佐枝  
(独)農業生物資源研究所・ジーンバンク・MAFF

農業生物資源(MAFF)ジーンバンク(GB, URL: <http://www.gene.affrc.go.jp/micro/>)は1985年、農林水産省ジーンバンク事業に基づいて設立された。GBは植物部門・動物部門・微生物部門・DNA部門の4つの部門からなり、本発表では、微生物部門について紹介する。

微生物部門は、1つのセンターバンク(農業生物資源研究所)と、12のサブバンクからなっており、センターバンクが主に保存・配布・情報管理を行っている。サブバンクは菌株寄託窓口として機能しているほか、センターバンクでは保存が困難な菌株の保存を行っている。GBの特徴は、農業関連微生物、特に植物病原微生物が多数保存されていることである。GB登録菌株は毎年500~800株増加しており、2004年末現在で糸状菌11,971株、細菌7,596株、酵母605株、他ウイルス、原・線虫、培養細胞など1,363株(総数21,535株)が、凍結乾燥法、凍結保存法などで保存されている。配布菌株数は年700~800株で、これらは分類・同定、病害診断、遺伝子解析、農業開発、動植物との相互作用の解明、生物防除資材の開発などに利用されている。他には次のような活動が行われている。

1. 毎年国内外に探索隊を派遣し、微生物の分布と変異の調査と遺伝資源の収集を行っている。この活動は探索収集調査報告書として公表している。
2. 保有菌株の来歴情報をデータベースに登録し、インターネットを通して公開している。保存菌株の更なる利用のために微生物利用マニュアルを作成し、公表している。
3. 保存菌株の特性情報の収集・公開のために、データシートを作成した。収集された特性情報を特性データベースに蓄積し、一部を公開している。
4. 3~4年おきに国際ワークショップを主催し、国内外の研究者の交流の場を提供している。2004年10月にはICCC10と共催で農業関連微生物に関するワークショップを開催した。

### C-10. MBICの最近の活動

○藏野憲秀, 笠井宏朗, 関口弘志, 勝田麻津子, 熱海美香  
海洋バイオテクノロジー研究所・MBIC

当研究所のカルチャーコレクション(MBIC)は2001年10月1日より、主に海洋環境から単離した株の公開と分譲を開始した。細菌約700株と微細藻類約300株でスタートしたが、2005年4月現在で、放線菌602株、細菌1,377株、微細藻類390株まで株数を増加させた。2004年度に分譲件数は56件、株数は2,474株であった。当研究所ではNEDOプロジェクト「ゲノム情報に基づいた未知微生物遺伝資源ライブラリーの構築」を受託しており、プロジェクトで得られた新規微生物をカルチャーコレクションに登録できるために急速な株数増加が可能となった。

現在、ウェブ上にMBICのstrain catalog (<http://www.mbio.jp/mbic/>)と*gyrB* (DNA gyrase beta-subunit)塩基配列を利用した細菌同定用(<http://www.mbio.jp/icb/>)の2つのデータベースを公開している。*gyrB* 遺伝子はハウスキーピングでありSSU rDNAよりも進化速度が速いので、細菌分類にはより適している。そこで、*gyrB* 塩基配列のデータベース(icb)を構築し、広く一般に利用して頂けるよう1,300あまりの配列を登録していたが、本年4月に配列数を3,066まで引き上げた。

微細藻類についても、本年4月に公開株数を312→390へと増加させた。今後も年に100株程度の増加を予定している。

上述したNEDOプロジェクトに基づいて収集した株に関する企業からの関心が高まっており、多数の株の培養物あるいは培養上清の凍結乾燥品を一括して分譲するケースが増えつつある。それぞれのサンプル調製には労力が必要であるが、当研究所の性格上、コレクションの産業利用は優先課題であり今後いっそうの利用促進を図っていく。

### C-11. NITE 生物遺伝資源部門 (NBRC) の微生物資源

鈴木健一朗, ○府川仁恵, 武井康之, 舟橋友道  
(独)製品評価技術基盤機構・NBRC

(独)製品評価技術基盤機構 (NITE) では、バイオテクノロジー分野の知的基盤整備のため、微生物を中心とした生物資源センター事業(BRC 事業)を展開している。NITE バイオテクノロジー本部(DOB)には、BRC 事業推進の中核として微生物の保存、分譲を実施する生物遺伝資源部門(NBRC)、独自性の高い新規微生物を探索して資源の充実に図ると共に、微生物資源の産業利用の促進のための共同研究事業を行う生物遺伝資源開発部門(NBDC)、微生物のゲノム解析を行い、資源の高度利用を支援するゲノム解析部門(NGAC)の3部門と、特許微生物寄託センター (NPMD)、および東北支所があり、相互に連携して有用な微生物資源と関連情報の収集・保存・提供を行っている。

NBRC では、平成 14 年 7 月に(財)発酵研究所(IFO)のコレクション約 15,000 株の移管を受け、IFO の事業を発展的に継承して収集微生物の充実に図っている。平成 17 年 3 月末で、NITE-DOB の保有株数は 28,051 株、そのうち NBRC の分譲対象が 12,560 株である。平成 17 年 3 月にはカタログ第 1 版を出版したことから、NBRC 株の一層の普及が期待される。NBRC の分譲実績は平成 16 年度で 6,144 株 (国内分譲が 95%) であり、その約 6 割は民間企業に提供されている。NBRC 登録株の約 7 割が糸状菌と酵母であるのに対し、分譲では約半数が細菌となっている。

NITE-DOB は、特にアジアの微生物資源の保全と有効利用に重点を置き、アジアの 11 カ国とアジアコンソーシアム (ACM)の構築を行っている。現在 NBRC は、タイ(BIOTEC) および中国(IM-CAS)とそれぞれ生物資源センターの連携を軸にした微生物資源の相互移転や共同研究を推進している。また、人材育成や OECD の専門家会合における BRC 運営の標準化や国際ネットワーク構築にも積極的に取り組み、中核的 BRC として国内外の微生物利用環境の整備に努めている。

### C-12. 国立環境研究所微生物系統保存施設 — 微細藻類・原生動物・絶滅危惧藻類の系統保存

○恵良田眞由美<sup>1)</sup>, 森史<sup>1)</sup>, 湯本康盛<sup>1)</sup>, 佐藤真由美<sup>1)</sup>, 石本美和<sup>1)</sup>, 河地正伸<sup>2)</sup>, 笠井文絵<sup>2)</sup>, 渡邊信<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>(財)地球・人間環境フォーラム, <sup>2)</sup>(独)国立環境研究所・NIES

国立環境研究所微生物系統保存施設は、1983 年に設立され、広く環境問題・環境研究に関わる微細藻類の収集・維持・分譲業務に携わってきた。

本施設は国立環境研究所の前身である国立公害研究所の施設として発足したため当初は水の華や赤潮形成藻の培養株、バイオアッセイ供試株等がコレクションの主要な部分を占めていた。最近ではそうした括りに捉われず、生物多様性の観点からより様々な藻類、さらにそれらと系統的に切り離して考えることのできない原生動物株の収集に力を入れてきた。また昨年からは絶滅の恐れのある藻類、特に淡水産大型紅藻およびいわゆるシャジクモ類の収集・培養・保存にも着手し、環境保護・再生への寄与という、国立環境研究所附属施設ならではの方向性をも打ち出そうとしている。

現時点での藻類・原生動物の保有株数は非公開分も含めると 1,800 を超える。網別の内訳は以下のとおりで、これは現在設立されている藻綱の殆ど全てを網羅するものである(カッコ内は公開株数): 藍藻(518)、灰色藻(5)、紅藻(136;うち 129 は淡水産大型紅藻)、クリプト藻(46)、黄金色藻(9)、ラフィド藻(45)、ディクチオカ藻(3)、珪藻(54)、褐藻(1)、黄緑色藻(5)、ペラゴ藻(5)、ピングイオ藻(2)、シヅクラディオ藻(1)、プリムネシオ藻(47)、パプロバ藻(5)、渦鞭毛藻(60)、ミドリムシ藻(8)、クロララクニオン藻(2)、プラシノ藻(50)、ペディノ藻(1)、アオサ藻(6)、トレボウキシア藻(66)、緑藻(291)、車軸藻(200;うち 54 はシャジクモ類)、所属不明群(2)、原生動物(門)(15)。これらの中には、(微細藻類では新種記載の際のタイプ株寄託が未だに義務化されていないにもかかわらず)40 以上のタイプ株を始め、系統的に興味深い藻群、新綱として設立されて間もない藻群、詳細なゲノム解析が行なわれた株等が含まれ、国内外を問わず広く研究材料として分譲提供されている。

### C-13. 東京農業大学菌株保存室紹介と乳酸菌研究への取り組み

○岡田早苗\*, 遠藤明仁, 澁谷美佳  
東京農大菌株保存室・NRIC, \*現在, 生物応用化学科

東京農業大学菌株保存室は、世田谷キャンパス 11 号館4階にあり、占有面積は 280 平米である。発酵食品に関する微生物株を中心に約 6,800 株(カビ:458 株=凍結法, 酵母:1,535 株=L-乾燥法, 細菌:4,794 株=凍結乾燥法)を保存している。保存株のデータは PC (ACCESS)により管理を行っている。スタッフは室長1名, 助手1名, 副手1名の合計3名である。

保存株約 6,800 株のうち、1,190 株を東京農業大学菌株カタログ第三版 (2000) に掲載し、公開している。学内をはじめ、他大学、公的研究機関、民間企業などからの依頼に応じ分譲している。

東京農業大学菌株保存室の保存機関としての特徴は乳酸菌の保有である。現在保有株のうち 4,125 株(全保有細菌株数の 86%, 全保有微生物株数の 61%)が日本および東南アジアの伝統発酵食品などから分離した乳酸菌である。乳

酸菌株の収集は独自に行い、毎年 700~800 株の乳酸菌を分離収集している。その中から、150 株前後の代表株について、年に一度(夏の集中実験)学生を総動員して、各株の諸性質(項目:グラム染色、形態、生育温度、生育 pH、20 糖類の発酵性、発酵形式、乳酸異性体など)を調べている。これらの諸性質データは、同定や応用利用、さらには生態調査のための貴重な情報となる。従来は紙ベースのみでの記録であったが、数年前より国立遺伝学研究所の協力により、InfoBio によるデータベース化を進めている。さらに同研究所後押しにより、全保有乳酸菌株の 16S rDNA 塩基配列データを含めた総合的な乳酸菌データベースの構築を目指し、現在作業を進めている。

一方、農大菌株保存室保有の乳酸菌をアジア地域の伝統的発酵食品に生息する乳酸菌、すなわち植物性乳酸菌と位置づけ、発酵乳乳酸菌から区別し、免疫賦活、抗アレルギー、抗ウイルス、抗変異原性、抗過酸化などの活性を、他研究機関研究者と協力しながら調査し、植物性乳酸菌ならではの特徴的な機能性開発を目指している。

#### C-14. OUT の歴史と最近の活動

○金子嘉信, 多田 晶, 杉山峰崇, 原島 俊  
阪大院生命先端・OUT

大阪大学生命先端工学専攻の工業微生物株保存のルーツは、前身である大阪高等工業学校醸造科時代に主として学生実験に使用していた菌株の保存であると伝えられており、1929(昭和 4)年に大阪工業大学醸造科に昇格して、斎藤賢道先生が小田雅夫先生と共に南満州鉄道中央研究所の保存菌株を中心に正式に菌株保存事業を発足させた。1933(昭和 8)年の大阪帝国大学工学部醸造学科への昇格・改称、1943(昭和 18)年の醗酵工学科への改称、1949(昭和 24)年の新制大学への移行を経て、1953(昭和 28)年には照井堯造先生のもとに新たに菌株保存体制を整えた。1951(昭和 26)年の日本微生物株保存機関連盟設立時に照井堯造先生が理事として参加し、1955(昭和 30)年には加盟機関の1つとして記録されており、幹事として小田雅夫先生も参画していた。そして、1991(平成 3)年の応用生物工学科への、また 1995(平成 7)年の大学院重点化による大学院工学研究科応用生物工学専攻への改組・改称、昨年 4 月に国立大学法人大阪大学へ、さらに本年 4 月から物質・生命工学専攻と融合して生命先端工学専攻へという変遷の間に、OUT は小田雅夫先生、箕浦久兵衛先生、高田信男先生、高野光男先生へと引き継がれ、高野光男先生定年退官後もその活動を継続している。OUT 保存株は現在、糸状菌 55 属 186 種 355 株、酵母 17 属 46 種 3,800 株、細菌 7 属 22 種 799 株である。これら保存株は細菌の一部を除いてすべてグリセロールを保護剤として-80°Cで凍結保存されている。昨年度の方譲数は国内が 55 件 220 株であった。こうした中、文部科学省が平成 14 年度から開始した新世紀重点研究創生プランの委託事業の1つ、ナショナルバイオリソースプロジェクトにおいて大阪市立大学大学院理学研究科生物地球系専攻細胞生物学研究室を中核機関(代表者は下田 親先生)とした酵母の体系的な収集・保存・提供等の体制整備にサブ機関として参画し、OUT は保存株のうち *S. cerevisiae* 関連リソースを前面に押し出して、酵母遺伝資源センターへと変身中である。

#### C-15. (独)酒類総合研究所(RIB)の遺伝子資源保存事業の紹介

○秋田修, 山田修, 坂本和俊  
(独)酒類総合研究所・RIB

酒類醸造に関係の深い糸状菌(麹菌類 272 株)、酵母(206 株)、細菌(火落菌類他 186 株)を保存・分譲している。糸状菌は 1950~60 年代にかけて醸造現場から収集された麹菌からなる。麹菌(*A. oryzae*)の EST 解析、ゲノム解析には当所保存株の RIB40 株が用いられ、約 19000 の EST クローンを保存・分譲している。酵母は、清酒酵母、焼酎酵母、ワイン酵母、ワインキラー酵母、ビール酵母などやアルコール製造用酵母、ワインの仮性産膜酵母などを保有している。細菌は、清酒中で特異的に増殖する乳酸菌である火落菌類や腐造乳酸菌や、醸造排水の酵母処理槽から分離した新属新種と同定された酵母溶解菌 *Rarobacter faecitabidus* からなる。

以上の菌株はいずれも酒類醸造研究における貴重な菌株である。麹菌のゲノム解析が終了したことに伴い麹菌の方譲依頼が増加している。また、最近では醸造関係以外の研究者からの分譲依頼も多い。

保有菌株、分譲方法等をホームページ(<http://www.nrib.go.jp/>)で公開している。特に糸状菌についてはジャイアントコロニーと分生子の写真や生理的性質を掲載している。

すでに麹菌の EST 解析データを Web 上で公開しているが、今後はさらに麹菌のゲノム解析データ、麹菌 cDNA マイクロアレイ解析データ、清酒酵母のゲノム解析データ等を公開することにより、菌株保存事業にとどまらず、保存微生物の総合的なデータベースの構築を目指している。

### C-16. 山梨大学の保存事業と分類学的研究

○柳田藤寿, 陳奕伸, 篠原隆  
山梨大学・ワイン科学研究センター・RIFY

1 山梨大学のワイン科学研究センターの微生物保存は, 創設の頃(1947年)より, ワイン微生物学や酵母学の研究が行われており, 分離, 収集, 保存がされた. 現在の保存菌株は, 酵母680株, 細菌800株, 糸状菌40株, 放線菌2株の計1522菌株である. 酵母は, 後藤昭二名誉教授らが収集したワイン酵母を中心に保存している. また, 細菌は, ワイン仕込み工程から分離した乳酸菌を中心に土壌由来乳酸菌も保存している. 保存は, 主にディープフリーザー(-80℃)を使用している. 現在の研究は, ワイン醸造微生物(酵母と乳酸菌)の探索と利用などを行っている.

2 細菌の分類学的研究は, 乳酸菌の分離報告の少ない土壌に着目し, 分離を行った.

日本のブドウ園の土壌からは, *Enterococcus* 属と *Lactobacillus* 属が多く分離された. 日本および台湾の果物の根の土壌において, 日本の土壌は, 球菌が多く, 台湾の土壌には, 球菌および有孢子乳酸菌が多く分離された<sup>1)</sup>. 桑の木の根の周りの土壌を中心にサンプリングを行い, 分離を行った. その結果, *Lactococcus* 属が多かった.

さらに土壌由来乳酸菌の利用に関する研究から *E. durans* の生産するバクテリオシンについて解析を行ったところ, 新規であり, Durancin L28-1A と命名した<sup>2)</sup>. このように土壌には, まだ, 未知の可能性を持つ乳酸菌が多く存在している.

1) Chen, Y., et al., *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 195-200 (2005)

2) Yanagida, F., et al., *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 430-435 (2005)

### C-17. 阪大微研病原微生物資源室の活動状況

○余明順, 松山純子, 本田武司  
大阪大学微生物病研究所・感染症国際研究センター・病原微生物資源室・RIMD

当病原微生物資源室の歴史は古く, 1967年に微研の内部措置として菌株保存室の運営を開始し, 1973年, 正式に微研の一施設として発足した. さらに本年度より新たに設立された感染症国際研究センターの主要施設として位置づけられた. 菌株は当初より研究テーマと関連した腸管感染症原因菌を中心に収集してきた. 集団発生・散发事例で分離された菌株, 特徴ある患者分離株, 旅行者下痢症患者分離株, 論文発表された株(ゲノム解析された株, 特異的な性状を有する株, 変異株等)を中心に広くあるいは系統的に収集してきた. 収集株については再同定を行うとともに, 血清型, 病原因子(生物学的手法および遺伝子学的手法により)の解析を行いこれらの情報を付加することで, より利用価値の高いコレクションを目指し, また, ホームページで分譲リストを公開し, 利用者の便宜をはかっている. 一方, 当施設は古くから臨床現場と密接に連携してきたため, 感染症に関するコンサルタント活動を行ってきた. 患者分離株の同定, 患者材料からの病原因子の検出, 患者血清の抗体価測定等, 臨床現場からの依頼に応じてきた. 最近ではさらに食品に関する相談も含まれるようになってきた. また, 病原微生物に関する種々の手技の指導も行っている. 病原微生物資源を有効に利用するための研究支援を行うことを活動理念としている.