

## 特別講演

## 日本の微生物資源の現状と将来

富田房男

北海道大学名誉教授, 放送大学北海道学習センター所長, 日本学会議連携会員, 国際微生物連合 (IUMS) アジア大使

最近の化石燃料資源について持てる国と持たざる国との格差は、極めて大きなものになりそうであることは誰もがさまざまな意味で懸念しているところである。不幸にしてこれらの資源は、偏在していることとわが国は極めて恵まれていない国の一つであることを痛切に感じているこのごろである。また一方、これらの資源利用は、文字どおりこれまでの蓄積を利用することであり、地球温暖化の見地から大きな問題を抱えている。

そこで、最近では、バイオマスエネルギーが大きく取り上げられてきている。これは、まだ完成された技術ではないのであるが、これからを考えるとどうしても必要なものである。ここでは、いかにして食糧と競合することなくバイオマスをエネルギー化するかが問題である。そうすると微生物資源の重要性が脚光を浴びることになる。

微生物およびその利用に関しては、わが国が得意とする分野の一つであり、実績もある。わが国は天然資源には恵まれていないが人的資源および微生物資源をうまく活用してきたといえる。微生物は、文字どおり肉眼では見えない小さな生物を指す。微生物の多様性は生物の中で最も大きく、深海底や高温、高塩類耐性の微生物のように極限環境にまでさまざまな形態で存在する。微生物は、極めて特殊な能力を持っている職人といえる。

しかも微生物の特徴は、それを増殖できること、また意図的に改良することができることにある。天然資源は、消費するとそこで消えてしまうものであるが、微生物資源は、消えるどころか増殖するものである。

しかしながらここで考慮しなければならないのは、微生物資源についての原産地保護政策である。つまり生物多様性条約 (Convention on Biological Diversity=CBD) の中にある、遺伝資源へのアクセスと利益配分の考え方をよく考慮しなければならない。微生物資源は、利益を生む潜在的な可能性を秘めているが、決して持っているだけでは何も利益をもたらさない。これは先の化石燃料と大きく異なることである。つまり、何時、どんな形でその微生物資源が役に立つようになるのかは分からないということになる。従って、微生物資源を集め、保存し、いつでも利用できるよう

にするためには、一企業で行えるものではなく、国家事業として行うべきものである。また、第三者から購入などで手に入れようとするのではなく、とても対応できる問題ではない。この見地から、発酵研究所 (IFO) がその事業を (独) 製品評価基盤技術機構に、NBRC (NITE Biological Resource Center) に移行したことは極めて重要且つ適切なことであったと評価している。

NBRC がわが国を代表する微生物資源の保存および活用を図る中心機関として取り組むことによって、世界的な評価を得ることができるし、現にブタペスト条約で規定した保存機関にも制定され、特許菌株の寄託を受けることができるようになった。また、集めた菌株数も予定を上回るものであり、微生物集団や DNA としての保存手法も開発されつつあることは、世界をリードする動きにあると評価できる。また、これと併行している独立行政法人 理化学研究所微生物系統保存事業 (Japan Collection of Microorganisms =JCM) の存在も大きなものである。

また、世界的ネットワーク構築の基盤として、Asian Consortium for Microorganisms (ACM) の設立と運営は、将来を見越した重要な施策である。わが国が、微生物の世界でリーダーシップをとって活躍するには、自ら微生物の収集保存を行うとともに世界中にネットワークをそのために巡らすことは重要であり、まず足元を固める意味での ACM での主導的活躍が極めて将来を見越した最善の策である。

上記のような施策の下で NBRC (NITE Biological Resource Center) が活動を続け、わが国に微生物産業の基盤を作ることが、天然資源の乏しいわが国のこれからの産業基盤を強固にする微生物学、微生物産業のルネッサンスをもたらすものである。

この分野においては、「資源なくして研究および研究開発はありえない」ものであることを重ねて主張したい。特に、我々が手にしている微生物は地球上に存在しているもののわずか数%に過ぎないことを認識し、大きな未知の世界を開くことができるこの分野に、あらゆる資源を投入すべきときであり、これがわが国に大きな発展をもたらすものと信じている。

受賞講演

## シアノバクテリアとカルチャーコレクション

渡邊 信

筑波大学生命環境科学研究科

### 1. シアノバクテリア

原始大気の主成分は二酸化炭素であった。原始地球に海が誕生したことで、大気中の二酸化炭素が海にとけ、空は青く晴れ上がり、太陽光が地球表面にふんだんにふりそそいだと考えられている。太陽光、二酸化炭素及び水を利用して、酸素を発生する光合成生物、シアノバクテリア（藍藻類）が出現した時期については、27億年前、27億年より前、35億年前、38億年前と、意見がわかれる。しかしながら、シアノバクテリアは、光合成による大気中の二酸化炭素の減少と遊離酸素の増加をもたらした。さらに植物の葉緑体の起源となったことについては多くの研究者が一致するところである。今は有毒アオコ形成で環境分野では忌み嫌われている存在であるが、多様な生物が育む地球環境の創成と生命の進化に大きな役割を果たした微生物である。

アオコに関する研究は、多くの優秀な共同研究者や学生にめぐまれ、純粋培養法の確立からはじまり、毒素の抽出・構造決定・自然界での動態解明を行い、化学分類を展開し、現在集団遺伝学研究と発展してきている。7つのハウスキーピング遺伝子を使ってのMLST解析からは、アオコの一つである *Microcystis aeruginosa* の遺伝的多様性が非常に高いこと、少なくとも5つ以上の遺伝的クラスターに分化していること、クラスターによっては内部個体間では遺伝子組み換えがおこっているが、クラスター間ではほとんどおこらないこと等があらかとなってきている。

### 2. カルチャーコレクション (CC)

昭和の最後の年である63年、日本微生物株保存連盟会誌第4巻2号に「保存学論：保存を保存学として体系化させるための方策的課題」と題し、主に下記

のような提案・意見書を掲載させていただいた。

- ・日本微生物株保存連盟から日本微生物保存学会へ—JFCC総会に一般講演を！
- ・日本でのメインバンクの設立と各機関のCCとのネットワーク構築の必要性
- ・保存研究者の処遇上の問題
- ・人材交流の活発化：JFCC機関連絡会議の改革
- ・遺伝子資源の確保方策の実行を科学技術庁へ要求

この提案内容のほとんどは実現している。日本微生物資源学会 (JSCC) へ発展し、そこにはカルチャーコレクション委員会と実務担当者会議、一般講演、学会賞等が設けられた。また、科学技術振興調整費「アジア微生物研究ネットワーク」において、アジア地域における基礎・応用微生物研究とCCのネットワークが構築された。現在、CCのネットワークはNBRC (製品評価技術基盤機構微生物資源センター) と国立環境研究所によって一層の展開が図られている。

2000年には、JSCCでの討議を経て、「これからのカルチャーコレクションの基本的あり方に対する日本微生物資源学会の提言」として「我が国における中核的生物資源センター設立に関する提言」を作成し、日本学術会議の報告書としてまとめ上げることができた。これにより、NBRCの設立やナショナルバイオリソースプロジェクトが展開されることとなり、大きな影響を及ぼした。2004年にはICCC-10をつくばで開催することができ、一回目と同様に、参加者全員に大きな感動をもたらした。いつまでも記憶にのこる大会となった。

このようにJSCCは我が国のバイオリソースの発展と国際的ステータスの向上に大きな役割を果たしている。JSCCの会員であることに大きな誇りをもっている。

## シンポジウム

## S-1 植物共生細菌の微生物資源とゲノム解析

南澤 究

東北大学大学院生命科学研究科・生態システム生命科学専攻

根粒菌や細菌エンドファイトなどの植物共生細菌は、微生物-植物の相互作用機構として学問的に興味深いだけでなく、農業利用という視点からも重要である。近年、モデルとなる植物共生細菌のゲノム解析が進められている。しかし、宿主相互作用や機能は植物共生細菌によって異なり、その多様性を意識した微生物資源の保存とゲノム解析が今後求められている。

**根粒菌株のゲノム比較と共生窒素固定：**ダイズ根粒菌株には遺伝的多様性が見られ、共生窒素固定能も異なる<sup>1)</sup>。そこで、それらの菌株間のゲノム構造の可変領域と共生窒素固定能の相関解析を行った。全ゲノムが決定されているダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 株の DNA マクロアレイを使用し、供試株の全 DNA をプローブとした DNA ハイブリダイゼーションを行った。供試株ゲノムには共通した機能未知遺伝子を含んだ欠損領域が多数見られ、その大部分が Small Genomic Island (Small GIs) という転移因子の構造であった。供試菌株接種ダイズの窒素固定量および生育のパラメータとゲノム欠損領域の相関係数を求め、線形モデル解析を行ったところ、Small GIs などの可変領域が栽培ダイズへの共生窒素固定能を高めているという結果が得られた。まだ解析数が少ないながら、ダイズ根粒菌は Small GIs をゲノムに取り込みながらダイズ栽培種へ適応してきた可能性がある。

**イネエンドファイトのゲノム解析：**エンドファイトとは、特に病徴を示すことなく植物体内に生息してい

る微生物の総称である。細菌エンドファイトは、植物の細胞間隙に定着し、窒素固定・生育促進・耐病性などを与える場合がある。しかし、植物体内での生息を支える相互作用因子や植物体内における機能については不明な点が多い。

イネエンドファイトを分離し、広範な分類群 (Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroides) から 21 株を選抜し、ドラフトゲノム解析を行い、細菌エンドファイトとしての相互作用、機能、環境応答等に関わる候補遺伝子を探索した。その結果、植物細胞壁成分の分解酵素、Type IV 分泌系、Type IV 繊毛、クオラムセンシングのホモログ遺伝子などが比較的共通するものとして見いだされた。また、複数の菌株に、窒素固定、エチレン中間体分解酵素、オーキシン合成遺伝子、鉄吸収系など興味深い遺伝子ホモログが見いだされた。昨年末報告された *Azoarcus* sp. BH72 株ゲノムとの比較から遺伝子レパートリーの共通性や新規の機能が見つかることを期待している<sup>2)</sup>。

- 1) Minamisawa, K. and H. Mitsui. 2000. Genetic ecology of soybean bradyrhizobia. *In* Soil Biochemistry Vol. 10, pp. 349-377. Marcel Dekker, New York.
- 2) Minamisawa, K. 2006. A milestone for endophyte biotechnology. *Nature Biotechnology* 24: 1357-1358.

## S-2 絶対共生性糸状菌 Glomeromycota (アーバスキュラー菌根菌) における環境適応戦略 — generalist と specialist への種分化 —

江沢辰広

北海道大学大学院農学研究院

原始的な植物が海から陸域に進出したおよそ4億年前、貧弱な根しか持っていなかった植物は、先に定着していた糸状菌を利用することにより、無機養分—特にリン酸—を獲得する戦略を身につけた。それが現在までほとんど変わらない形で存在し続けているアーバスキュラー菌根と呼ばれる共生体の始まりである。Glomeromycota 門に属するこの糸状菌は、ほとんどの陸上植物と共生関係を構築し、土壌から吸収・濃縮したリン酸を宿主に供給する機能を持つことから、農業的に有用な菌として位置づけられている。しかし、これまで人工培養の成功例のない絶対生体栄養菌 (obligate biotroph) であるために、その生態・生理・遺伝システムには不明な点が多い。

この植物へのリン酸供給機能は、多量のリン酸施肥を行う近代農業の中では、菌根菌の感染自体が植物側の制御により抑制されてしまうため、うまく働かない。一方、強酸性や貧栄養が原因で荒廃した土地—火山噴火跡や採掘・採土跡地など—に最初に侵入するパイオニア植物は、共生微生物を効果的に利用することで土壌中の希薄な養分を獲得し、厳しい環境に適応することができる。代表的なパイオニア植物であるススキで

は、森林などの安定した生態系に棲息しているものと比べると、荒廃地に自生しているものでは菌根形成率が高く、この菌への依存度が高いと予想される。我々はこの菌を荒廃地の緑化修復に利用するための基礎的知見を得る目的で、北海道～沖縄の酸性硫酸塩土壌に自生しているススキ根圏のアーバスキュラー菌根菌の群集構造を調べると共に、植物を使ってそれら菌の分離を試みた。酸性硫酸塩土壌にはイオウ含量と風化の度合いにより、強酸性 (pH 3 以下) から中性まで様々なものが各地に分布しているが、これら土壌におけるアーバスキュラー菌根菌の群集構造は、気候や周囲の植生などの影響をほとんど受けず、その主要な決定因子は土壌 pH であると結論された。また、これら菌群は、広い pH 範囲に適応する generalist と酸性土壌で優占する low-pH specialist、中性土壌で優占する neutral specialist に分類された。分離される菌には generalist が多く、強酸性～中性域の広い pH 範囲において宿主の生長を促進した。Generalist が柔軟な環境適応能を示すメカニズムは不明であるが、種内の遺伝的多様性が高いことも要因の一つと考えられる。

### S-3 イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) の病原性変異の分子遺伝学的解析

曾根輝雄

北海道大学大学院農学研究院

イネの最重要病害であるいもち病の防除のために、抵抗性品種や農薬の導入が行われてきた。しかしながら、しばしば抵抗性品種を侵す能力や、薬剤耐性を獲得した病原菌が出現し、その効力を無力化することが問題となっている。

どの遺伝子に変異したときに、抵抗性品種を侵す能力が獲得されるのだろうか。植物病原菌の宿主特異性を説明する「遺伝子対遺伝子説 (Gene-for-Gene theory)」では、病原菌側の「非病原性遺伝子」産物と宿主側の「抵抗性遺伝子」産物が相互作用したとき、植物の抵抗性反応が誘導される、と説明されている。病原菌の非病原性遺伝子に変異が生じると、抵抗性遺伝子による認識が起こらず、病原菌は抵抗性反応が起きない宿主細胞に感染することができるようになる。非病原性遺伝子が病原性変異解析のターゲットとなる。

これらの遺伝子は、どのようなタンパク質をコードしているのだろうか。イネのいもち病抵抗性遺伝子は、他の植物のものと類似しており、NBS-LRR と呼ばれるタンパク質ファミリーに属すると報告されている。一方、非病原性遺伝子の解析例は少なく、その遺伝子の構造が明らかにされているのはわずかに3例しかない。さらに、その構造に共通性は全く見られない。そこで、我々は日本のイネ品種に用いられている抵抗性遺伝子に対応する非病原性遺伝子を日本産菌株よりクローニングすることを試みた。これまでは、本菌が子

したポジショナルクローニングにより達成されているが、イネいもち病菌は交配能を持たないものが多く、また、そのゲノムにはトランスポゾンなどの反復配列が多く含まれていることもポジショナルクローニングを阻む一因となっている。当研究室においても日本産菌株を用いて非病原性遺伝子解析のための交配系の作出が試みられたが、交配は可能なものの、精密な遺伝子地図の作製はできなかった。そこで、宿主特異性変異株を作出し、その変異点近傍から非病原性遺伝子をクローニングすることにした。日本産いもち病菌株 Ina168 はイネ品種愛知旭 (抵抗性遺伝子 *Pi-a* を持つ) に非病原性であり、非病原性遺伝子 *AVR-pia* を持つ。Ina168 の愛知旭に病原性を獲得した変異株に特異的に欠失している DNA 断片 PM1 を含むクローンを Ina168 コスミドゲノムライブラリーよりスクリーニングし、Ina168m95-1 に導入したところ、クローン 46F3 による非病原性の相補が確認された。さらに 46F3 に含まれる DNA からの絞り込みを行った結果、細菌由来 cytochrome 様タンパク質への相同性を示すタンパクをコードする 255bp の ORF が *AVR-pia* であると考えられた。圃場分離株におけるこの配列を解析したところ、愛知旭に病原性を示す菌株はこの ORF を欠失しており、点変異よりもむしろ遺伝子全体を失うことで愛知旭への病原性を獲得したと予想された。

## S-4 遺伝的多様性の解析で垣間見えてきたムギ類赤かび病菌の進化・生態

須賀晴久

岐阜大学生命科学総合研究支援センター

ムギ類赤かび病は各種 *Fusarium* 属菌や *Microdochium nivale* によりムギ類の穂が侵される病気である。本病による被害は単に収量の低下に留まらない。一部を除く病原菌はマイコトキシン（かび毒）を産生するため、収穫されたムギの安全性に大きな問題を起こすことになる。今回のシンポジウムでは、本病の主要病原菌である *Fusarium graminearum* の進化・生態について、日本産菌の解析で分かってきたことを中心に紹介する。

近年、*F. graminearum* は分子系統学的研究によって少なくとも9種からなる種複合体であることが明らかにされた。新たな分類にもとづいて日本各地の菌種を調べたところ、南部には *F. asiaticum* が、北部には *F. graminearum* s. str. (狭義) が優先的に分布しており、東北地方で両種が顕著に混在していることが分かった。その後、これら2種は *in vitro* で雑種の形成が可能と分かったため、フィールドにおいて雑種の存在が疑われることとなった。そこで、両種の混在地域となっている東北地方を中心に分離菌が雑種かどうかの検定を行ってきたが、これまで雑種と考えられる菌は検出されていない。更に、これら2種におけるトリコセシン系マイコトキシンタイプの構成比が明確に異なっていることも雑種形成が頻繁には起きていないことを示唆している。現在のところ、フィールドにおけ

るこれら2種の隔離要因は不明である。

一方、本菌は比較的小さい圃場から分離される菌集団ですら遺伝的多様性が高いことから、種内における異菌株間での交配が起きていると予想されている。本菌がホモタリック（自殖可能な）菌であることは以前から知られていたが、近年、異菌株間の交配も可能なことが特殊な方法で明らかにされた。私達は本菌の種子伝染の可能性を調べるために、種子中の菌集団とそれを播種した際に自然発病した穂の菌集団の遺伝的多様性を同一圃場で2年にわたって解析したが、同一クローンと判定されたのは圃場内の近傍のムギ穂から分離されたごくわずかな菌株のみで、約200菌株のほとんど全てが別個体であった。日本だけでなく米国や中国の菌集団についても一様に遺伝的多様性が高いことが示されている。但し、フィールドにおける異菌株の交配を直接的に証明した報告はこれまで見当たらず、また、交配が認められないにもかかわらず、遺伝的多様性が高い *Fusarium* 属菌があることも知られている。

*F. graminearum* の遺伝的多様性解析は、本菌の進化・生態を少しずつ明らかにしてきている一方で、フィールドにおける種間の隔離要因や遺伝的多様性の産出機構など新たな謎も投げかけている。

## 一般講演

O-1 新属 *Barnesiella* の提唱

○坂本光央, Pham Thi Ngoc Lan, 辨野義己  
理研 BRC・JCM

ニワトリの盲腸内細菌叢の研究の過程で, *Bacteroides* 様菌株が多数分離され, 我々はそのうちのいくつかを *Bacteroides* 属の新菌種として既に発表した<sup>1), 2)</sup>. 今回我々は, ニワトリ盲腸内から分離され, *Bacteroides* 属の既知種に同定できなかった2株について, その分類学的位置付けを明確にしたので報告する.

分離株2株 (C46 および C47) はいずれも, 偏性嫌気性, 無芽胞のグラム陰性桿菌であり, *Bacteroides* 属と異なり, 20%の胆汁を含む培地に生育しなかった. これら菌株は, 16S rRNA 遺伝子配列による解析から, *Bacteroides* 属とは異なり *Porphyromonadaceae* 科内に既存の属とは独立したクラスターを形成した. 最も近縁な菌種は *Parabacteroides distasonis* であった (塩基配列の類似度が86%). また他属と異なり (*Parabacteroides* 属, MK-9 および MK-10; *Porphyromonas* 属, MK-9 および MK-10; *Tannerella* 属, MK-10 および MK-11), MK-11 および MK-12 を主要メナキノンとして有しており, このことが本菌種を既存の属から分類する重要な化学分類学的性状と考えられた. さらにDNAのG+C mol%が52.0%と高いのが特徴であった.

以上の結果より, これら分離株を新属・新菌種 *Barnesiella viscericola* (基準株 C46=JCM 13660) として命名提案した<sup>3)</sup>. 近年の大規模なヒト腸内細菌叢の解析によって得られた16S rRNA 遺伝子配列の中で, 本菌種と96%の類似度を示す塩基配列が多数存在し, 本属に新たな菌種が存在することが示唆されている. 今後の検討が必要である.

- 1) Lan *et al.* (2002) Microbiol. Immunol., 46, 371-382.
- 2) Lan *et al.* (2006) Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 2853-2859.
- 3) Sakamoto *et al.* (2007) Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57, 342-346.

O-2 *Bradyrhizobium iriomotensis* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote island in Japan

○ Muhammad Saiful Islam<sup>1</sup>, Hiroko Kawasaki<sup>1</sup>, Yuki Muramatsu<sup>2</sup>, Yasuyoshi Nakagawa<sup>2</sup> and Tatsuji Seki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The International Center for Biotechnology, Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita-city, Osaka 565-0871, Japan, <sup>2</sup>Biological Resource Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation (NITE), 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan

A polyphasic study was performed to determine the taxonomic position of strain EK05<sup>T</sup> isolated from a root-outgrowth of *Entada koshunensis*, a legume available in Okinawa, Japan. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene showed that the strain belongs to the genus *Bradyrhizobium*. Subsequent multilocus sequence analysis (MLSA) with ITS, *atpD*, *glnII*, *recA* and *gyrB* sequences using NJ and MP methods revealed that the isolate represents a distinct evolutionary lineage within the genus *Bradyrhizobium*. DNA-DNA hybridization indicated that strain EK05<sup>T</sup> shares <56% DNA relatedness with the type strains of all the six recognized species of *Bradyrhizobium*, confirming the strain to be a novel species within the genus. Phylogenetic trees constructed on the basis of three symbiotic loci, *nifH*, *nodC* and *nodA*, also placed strain EK05<sup>T</sup> clearly in a novel branch demonstrating an independent history of its symbiotic gene cluster. Chemotaxonomic characteristics (DNA G+C content 61.2 mol%; major fatty acid 18:17c) were similar to those of the genus *Bradyrhizobium*. On the basis of the phylogenetic distinctiveness we propose *Bradyrhizobium iriomotensis* sp. nov. for strain EK05<sup>T</sup>. The type strain is EK05<sup>T</sup> (=NBRC 102520<sup>T</sup>).

### 0-3 高温の陸上温泉からの新規嫌気性菌の分離

○飯野隆夫, 鈴木健一郎

(独) 製品評価技術基盤機構 (NITE) バイオテクノロジー本部 NBRC

【目的】 高温の陸上温泉には、微生物マットやストリームが発達しており、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。しかし、採取地へのアクセスや培養技術の困難さから、実際に分離された微生物は極めて少ない。NITE-BRC では、自然界から微生物を広く分離し、微生物資源・遺伝資源として利用できる基盤整備を進めている。本研究は、高温の陸上温泉から新規の微生物、その中でも、特に嫌気性菌を分離することを目的とした。

【方法】 日本各地の陸上温泉郷から熱水やバイオマットなど計 20 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 にて嫌気性菌の集積培養もしくは直接平板培養を行った。微生物の増殖がみられた培養物から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子シーケンス解析を行った。新規と考えられた嫌気性菌については純粋分離を試みた。

【結果および考察】 収集した試料から集積培養を行った結果、*Methanobacteria*, *Methanomicrobia* に含まれる古細菌や *Aquificae*, *Thermotogae*, *Nitrospirae*, *Deferribacteres*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* などに含まれる細菌の増殖が確認された。これらの中から、新規分類群に属すると考えられる嫌気性菌 25 株を純粋分離した。その中で、既知種に対する 16Sr RNA 遺伝子に基づく系統解析を行った結果、塩基配列の類似度が最も低かった好熱性硝酸塩還元菌 Yu37-1 株は 1 目 1 科 4 属のみで構成される *Deferribacteres* 門に含まれた。しかし、近縁の微生物とは 83.8-86.2% の相同性しかなく、全く新規の微生物であると考えられた。分類学的性状について詳細に検討を行った結果、Yu37-1 株はジブリオ状の高度嫌気性細菌で、至適生育温度および pH は、それぞれ 55°C と 7.0-7.5 であった。電子供与体には、硝酸塩のみを利用し、電子受容体には、酢酸、ピルビン酸、乳酸などを利用することができた。発酵能は有していなかった。

このように、高温の陸上温泉には多様な嫌気性菌が存在し、多くの嫌気性菌を純粋分離できることが示唆された。また、これら嫌気性菌の中には、全く未知の嫌気性菌が存在することも示された。

### 0-4 60 種の *Nocardia* 属菌が産生するシデロフォアの多様性解析

○五ノ井透, 矢澤勝清, 矢口貴志, 三上 襄

千葉大学・真菌医学研究センター

鉄は、微生物からヒトまでの総ての細胞生物において、エネルギー産生などの生命維持活動で中心的な役割を果たす必須のイオンである。病原微生物や自然環境中の微生物は寄生する生体や周囲の環境中から、鉄イオンを自身の細胞内に取り込むために、様々な工夫をしていると考えられる。なかでもシデロフォアは、微生物によって産生・放出される小分子であり、環境中の鉄イオンをキレート結合し、鉄を結合したまま微生物細胞膜の受容体などを介して細胞内に取り込まれ、鉄イオンを遊離して細胞酵素などの利用に当てる重要な役割を果たしていると考えられる。シデロフォアは、微生物の非リボソーム型ペプチド合成酵素や酵素群によって産生され、分子構造は微生物により多様性に富んでいる。

近年、病原性放線菌 *Nocardia farcinica* やその近縁菌のゲノム配列が解読され、同時にこれらの菌におけるシデロフォア合成酵素遺伝子のクラスターが予測された。我々はこれらのゲノム情報を基に、現在報告されている 60 種の *Nocardia* 全菌種について、シデロフォア産生遺伝子の存在の有無、およびそれらの多様性についての検討を開始した。さらに crome azurol S (CAS) 培地を用いた培養や、薄層クロマトグラフィーを用いて、シデロフォア産生の有無とその多様性についても検討を行った。

その結果、60 種ほぼ総ての *Nocardia* 菌種が、シデロフォア様の脂溶性低分子を産生し、また各菌種の産生するシデロフォア様分子は菌種に応じ、薄層クロマトグラフィー上での移動度 (Rf 値) が異なるなど、顕著な多様性を示すことが明らかとなった。さらにその産生量は、培養液中の鉄イオンの有無によって大きく変動した。

現在、これらの多様性についての分子生物学的な解析を継続中であり、*Nocardia* 属菌種の産生するシデロフォアの多様性について、化学的な解析を行い、分子生物学的な基盤を解明することによって、*Nocardia* 属菌の引き起こす各種の疾病の治療・克服や予防に役立て、一方、鉄のキレート以外にも様々な生理活性を持つと期待される新規のシデロフォアの探索、遺伝子工学的改変法などを用いた新規なシデロフォアの創薬の可能性を検討したい。



### O-5 *Vulcanisaeta* 属菌株における生息地の分布と遺伝学的多様性に関する考察

關 祐太<sup>1,2</sup>, 高品知典<sup>2</sup>, ○伊藤 隆<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 理研 BRC-JCM, <sup>2</sup> 東洋大生命科学

我々が日本各地の温泉地から分離した超好熱性アーキア *Vulcanisaeta distributa*, *V. souniana* 及び関連菌株を含めた 15 株は分離地域に対応して 16S rRNA 遺伝子塩基配列の多様化が見られ, 地理的要因により種内・種間分化が進んでいる可能性が示されている (1). 本研究はこうした分化の過程を遺伝学的多様性の面から検証していくことを目的としている. 本講演では DNA-DNA 交雑値, 16S rRNA 遺伝子及び *radA* 遺伝子の比較解析について報告する.

*V. distributa* の基準株 IC-017<sup>T</sup>(=JCM 11212<sup>T</sup>) は箱根・大涌谷 (神奈川) より分離されているが, 本温泉地より分離された他の菌株や奥塩原 (栃木) から分離した菌株は 16S rRNA 遺伝子, *radA* 遺伝子の系統解析によっても IC-017<sup>T</sup> と同一のクラスターに入り, また代表株間の DNA-DNA 交雑値も 70% 以上と高く遺伝学的に同一種と見なすことができる. 一方, 後生掛温泉 (近隣の温泉も含む, 秋田), 玉川温泉 (秋田), 雲仙 (長崎) からの分離株は 16S rRNA 遺伝子では IC-017<sup>T</sup> を含むクラスター内に含まれるが, その中で別々のサブクラスターを形成し, 各サブクラスターの代表株は IC-017<sup>T</sup> と 41-44%, 49-60%, 35-38% の DNA-DNA 交雑値しか示さなかった. *radA* 遺伝子においても分離地域ごとにサブクラスターを形成したが, 雲仙からの分離株は *V. souniana* を含めた他の分離株とはやや離れた位置に存在した. しかし RadA タンパク質アミノ酸として比較を行うと, 分離株の多くは同一のアミノ酸配列を示すことから *radA* 遺伝子では同義的遺伝子置換が頻繁に起こっていることが推定できた. これらの系統解析に基づいて, 本属菌株における種内・種間分化の過程について考察を試みる予定である.

(1) Itoh *et al.*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1097-1104 (2002)

### O-6 Fungal community analysis within bamboo tissues by PCR-based molecular method

○Dounporn Morakotkarn, Hiroko Kawasaki and Tatsuji Seki

The International Center for Biotechnology, Osaka University

Bamboo is a plant belonging to Poaceae family that are very useful and high diverse of species. Until now, it has been gaining much record about bamboo-associated fungi cultures from bamboo tissues in several past decades. However, some fungi might be uncultivable and existence only in environmental sample which is still mysterious. Fungal endophytic community and their host association are still unknown in ecosystem. Recently, molecular methodology has been applied for several investigations in microbial community and diversity studies as well as traditional method. To study on dynamic of fungal colonization in bamboo tissues, PCR-based method and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was utilized to investigate fungal community by using ITS region as a primer to indicate species/genus level. The result of DGGE band pattern showed a variety of endophytes and pattern of colonization inside tissues. Number of band is also very much refer on how much diverse of endophytes living in bamboos. Not only pattern of fungal community was shown, it is also giving some idea on a role of fungal endophytes involve in plant-fungal association. Consequently, PCR-based and DGGE analysis is highly advantages to display whole community of endophytes living in bamboos that would be a prior screening and gain more the understanding on a role of fungal community in environmental system.

### O-7 *Stenotrophomonas maltophilia* における $\beta$ -lactam 系抗生物質耐性の多様性

○田中尚人<sup>1</sup>, 宮崎 智<sup>2</sup>, 菅原秀明<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 東農大・応生科, <sup>2</sup> 東理大・薬, <sup>3</sup> 遺伝研生命情報・DDBJ

*Stenotrophomonas maltophilia* は様々な抗生物質に対する耐性の強い日和見感染菌として一般に知られており, また土壌などの自然環境にも生息している. 本菌は他の耐性菌同様に  $\beta$ -lactam 系抗生物質を分解する  $\beta$ -lactamase (L1: 亜鉛型, L2: セリン型) を産生するが, 多くの耐性菌とは異なり染色体上にその遺伝子がコードされており, 水平伝播などの報告はない. そのため, 本酵素は他とは異なる多くの特徴的な性質を持ち, 独自の進化を経てきたと考えられる. しかし, 抗生物質耐性は株によって異なり, また, *S. maltophilia* は系統的に多様な種 (ゲノム多様, genomic group) としても報告されている<sup>1)</sup>. そこで本研究では, *S. maltophilia* の  $\beta$ -lactam 系抗生物質耐性と種内の系統的多様性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。MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 試験や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ところ、耐性の強さは様々であった。次に、16S rDNA および L1 と L2  $\beta$ -lactamase 遺伝子の配列決定および系統解析を INSDC からの公開配列とともに行った。その結果、Haubenらにより報告された genomic group による分類と、16S rDNA 配列による系統関係には一定の相関が認められた。耐性の強い臨床株は2種の  $\beta$ -lactamase 遺伝子による系統樹でも、genomic group のクラスタを形成したが、そのクラスタには16S rDNA 配列による系統関係では遠い group の一部の耐性の強い株が混在した。また、各系統樹の間で他の group との系統関係が全く異なる genomic group もあった。したがって、*S. maltophilia* 種内の  $\beta$ -lactam 系抗生物質耐性の多様性は16S rDNA 配列が示すそれとは異なり、 $\beta$ -lactamase 遺伝子の多様化がその一因と考えられた。

1) Hauben *et al.* (1999) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1749-60.

### 0-8 *Rhizopus delemar* の再発見

○阿部 歩, 浅野行蔵, 曾根輝雄  
北大院農・応用菌学

*Rhizopus oryzae* は古くから発酵食品に使用されており、近年では乳酸の生産プロセスにも用いられている。歴史的に見ると、*Rhizopus* 属はそれまで多種多様に分類されていたが、1984年に Schipper が再分類し<sup>\*</sup>、いくつもの種が統合されて *R. oryzae* となったことが知られている。我々は、これまでに、*Rhizopus oryzae* の中に、乳酸生成型菌株とフマル酸-リンゴ酸生産型菌株の2群があることを示してきた。本研究では、酸生成能により、*Rhizopus oryzae* の再分類が可能であるかを試みた。CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) より現在 *R. oryzae* に分類されている旧分類の各種菌株29株を取り寄せ、HPLCによる有機酸生成能、rDNA-ITS、*ldhB* (lactate dehydrogenase)、*act-1* (actin)、*tef-1* (translation elongation factor 1- $\alpha$ ) の塩基配列、AFLP解析を行い、酸生成能によるグルーピングと、分子系統分類との比較を行った。その結果、いずれの分子系統樹でも、酸生成によるグルーピングと一致する信頼度の高いクラスターが現れ、有機酸生成能による再分類が分子系統学的に支持されることが示された。現在の *R. oryzae* のタイプカルチャーである CBS112.07<sup>T</sup> は乳酸生成型であり、乳酸生成型菌株群を *R. oryzae* とし、フマル酸-リンゴ酸生成型菌株群を、その最も古い命名に基づき *R. delemar* Wehmer & Hanzawa とすることを提案する。

Schipper (1984) *Stud. Mycol.*, 25, 1-19

### 0-9 *Trichosporon* 属の系統分類学的再評価

○今西由巳<sup>1</sup>, 二宮真也<sup>1</sup>, 中桐 昭<sup>1</sup>, 田中玲子<sup>2</sup>, 矢口貴志<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>NBRC, <sup>2</sup>千葉大学真菌医学研究センター

NBRC が保有する *Trichosporon* 属の菌株の品質管理と本属の種の判別形質を明らかにする目的で、千葉大学真菌医学研究センターと協力して保有株の再同定を行った。NBRC の *Trichosporon* 属15株とNBRCに受け入れ予定の IFM 株16株を対象として26S rDNA の D1/D2 領域と IGS 領域の2種類の塩基配列を決定し Blast 検索及び系統解析を行った。Blast 検索の結果、タイプ株の塩基配列と2つの領域とも99%以上一致した株は、NBRC 株5株、IFM 株13株あった。これら18株は菌名が正しいことが確認できた。また、*T. faecale* (IFM 51597) は、Blast 検索により D1/D2 領域では type 株の塩基配列と99%一致したが、IGS 領域では type 株が第1位に検索されたが94%の相同性であった。この株の種名は *T. faecale* であり同定には問題ないが、タイプ株とは異なる種内系統群に属すると考えられる。一方、NBRC 株2株、IFM 株2株は Blast 検索の結果、登録種名とは異なるタイプ株の塩基配列と99%以上一致した。さらにNBRC 株5株に関しては、登録種名は *Trichosporon* sp. であるが、既知種のタイプ株の塩基配列と99%以上一致した。これら9株のうちNBRC 174, NBRC 1202 と NBRC 1500 は、表現型をタイプ株と比較したところ、それぞれ *T. asteroides*, *T. asahii*, *T. dermatis* であると判明した。また、*Trichosporon* sp. (NBRC 10466) は、IGS 領域を用いた Blast 検索の結果、第一位に検索されてきた *T. faecale* のタイプ株の塩基配列と94%の相同性であった。これは上述の IFM 51597 の IGS 領域の配列と100%一致した。この度の D1/D2 領域と IGS 領域の塩基配列を用いた Blast 検索による再同定により、21株について種名の確認および未同定種の種名決定が出来た。また、*T. faecale* に関しては少なくとも2つの系統群が存在することが判明した。一方で、Blast 検索により検索されてきた種のタイプ株と表現型、特に生理生化学的性状が一致しない株があることが判明したので、これらについては、種を判別する指標の検討を今後とも継続して行っていく。

**O-10 *Microbacteriaceae* 科の *Rhodoglobus* 属および *Leifsonia* 属細菌の分類に関する研究**

○安 善榮, 横田 明

東大分生研・バイオリソーシス

16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果, *Leifsonia aurea* と *Leifsonia rubra* は *Leifsonia* 属より *Salinibacterium* 属と *Rhodoglobus* 属に近縁であることが判明した. これは *Leifsonia aurea*, *Leifsonia rubra*, *Salinibacterium amurskyense*, *Rhodoglobus vestalii* が同時期に発表されたため比較研究が行なわれなかったためである. そこで, 本研究では *Leifsonia* 属の2種 *Leifsonia aurea* と *Leifsonia rubra* について分類学的位置を再検討した. さらに, *Leifsonia rubra* とラベルされていた MTCC 4210<sup>T</sup> 株の系統的位置を調べた.

比較研究のためにさまざまな菌株保存機関 (MTCC, CIP, DSMZ, JCM) および分離者から *Leifsonia rubra* の基準株の分譲を受けたが, これらの株はいずれも記載の *Leifsonia rubra* とは異なるものであった. CMS 76r<sup>T</sup> (分離者からの株), DSMZ 15304<sup>T</sup>, CIP 107783<sup>T</sup> は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が *Arthrobacter roseus* と 99.9% の相同値を示し, MTCC 4210<sup>T</sup> および JCM 12417<sup>T</sup> は *Gammaproteobacteria* である *Ignatzschineria larvae* と 94.0% の相同値を示した. このように, *Leifsonia rubra* の正当な基準株はどの菌株保存機関にも存在しないことから本菌種を廃棄名とすることを提案する. さらに, MTCC 4210<sup>T</sup> と JCM 12417<sup>T</sup> は生理試験及び系統解析に基づき, IAM 15137<sup>T</sup> 株を基準株として *Ignatzschineria* 属の新種 *Ignatzschineria aurantiaca* とすることを提案する.

系統解析及び生理学的特徴を比較した結果, *Leifsonia aurea* は *Rhodoglobus* 属と細胞壁のジアミノ酸組成が一致し, 16S rRNA 遺伝子に 13-bp の挿入配列を持つなど *Rhodoglobus* 属の記載と一致することから *Leifsonia aurea* を *Rhodoglobus* 属に移して *Rhodoglobus aureus* とすることを提案する.

**O-11 アラスカ永久凍土氷楔中の細菌の分離と 16S rRNA 遺伝子に基づいた系統解析**○片山泰樹<sup>1</sup>, 田中みち子<sup>1</sup>, Anatoli Brouchkov<sup>2</sup>, 福田正己<sup>3</sup>, 富田房男<sup>4</sup>, 浅野行蔵<sup>1</sup><sup>1</sup> 北大院農, <sup>2</sup> チュメイン大学, ロシア, <sup>3</sup> 北大低温科学研, <sup>4</sup> 放送大学北海道センター

氷楔 (ひょうせつ) とは楔状の氷で, シベリア, アラスカなどの永久凍土層に広く分布している. 氷楔は地面の裂け目に雪解け水が土砂と混ざって入り込み凍結する, その繰り返しによって形成される. この過程で土砂などととも閉じ込められたと考えられる微生物が, 何万年も凍り続けている環境で生きた状態であるのかどうかを調べるために, アラスカ Fox tunnel 内に保存されている 2 万 5 千年前の氷楔から平板培養法を用いて細菌の分離を行った.

分離用培地として一般的な複合培地とそれを希釈したもの, また, 最少培地に氷の上清を加えたものなどを用い, 溶かした氷の平板培養を 15°C で行った. 顕微鏡観察などで選択した 270 のコロニーを単離し, 16S rRNA 遺伝子の V1 から V3 領域を含む部分的配列を読み, 系統解析を行った.

その結果, 270 株は 67 の OTU に分けられ, それらは *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Gammaproteobacteria* の 3 つの綱に属する好気あるいは通性嫌気性の細菌であった. 最も多く分離されたのは 59 の OTU が属する放線菌目で, そのほとんどが孢子形成能を持たない細菌であった. このうち, 23 の OTU が既存の基準株と部分的 16S の配列で 97% 以下の相同性を示し, それらの多くは貧栄養培地から分離されたものだった. また, *Gammaproteobacteria* に属する 3 つの OTU は貧栄養培地のみから分離された細菌であった. 一方, 富栄養培地と貧栄養培地の種レベルでの OUT の数を Rarefaction 解析で比較したところ, 大きな差は認められなかった. 基準株と 97% 以下の相同性を示した株について, 16S rRNA 遺伝子の全長配列を読み, 詳細な系統解析を行った. その結果, 全長配列において基準株と 97% 以下の相同性を示したのは 7 つの OTU のみであったが, それら以外でも基準株と独立したクラスターを形成した OTU が見出された. また, 属レベルで分岐した OTU も見出され, これらの株が属あるいは種レベルで新規な細菌である可能性が示唆された.

**O-12 凍結保護剤としてのトレハロース, DMSO の機能について**

○百瀬祐子, 松本玲奈, 小谷 峰, 山岡正和

(独) 産総研・寄託センター

**目的:** 凍結保存は生物を保存する簡便かつ経済的な方法であり, 凍結保存の効率を上げる手法を開発する目的で, 我々は, モデル生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (S288C) を用いて, 凍結保護で組み合わせ効果の見られたトレハロースと DMSO について, 凍結に対する効果を検証してきた. また, 一遺伝子欠損株の中から凍結スト

レスに弱い株を選抜した。これらの欠損株の遺伝子の情報や凍結前保護剤処理後の細胞の total RNA を用いたマイクロアレイ解析によって推定される保護剤の機能について報告する。

**材料と方法**：対数増殖期 (A660=1.0) の酵母を、DMSO (2.5%, 7.5%) とトレハロース (10%)、単独と組み合わせにそれぞれ置換し、1℃/min で -80℃ まで下げてから凍結 1 日後、生存率を測定した。また保護剤処理後凍結前の細胞の total RNA を抽出し、マイクロアレイにより保護剤の効果を調べた。

**結果と考察**：DMSO 7.5% とトレハロース 10% を添加すると、同程度の高い生存率を示したので、この二つに共通するものと、単独で変化するものについて、遺伝子発現解析ソフト GeneSpring で CYGD (comprehensive yeast genome database) のカテゴリーに分け、解析した。共通部分では多種多様なカテゴリーの遺伝子の発現が誘導されたが、保護剤それぞれ単独で誘導された遺伝子の多く含まれるカテゴリーを調べると、DMSO ではタンパク合成系、トレハロースでは、ミトコンドリアやエネルギー系などが多かった。また、ストレス応答遺伝子としては、トレハロースが浸透圧ストレスや酸化ストレスに関連する遺伝子を多く誘導しており、DMSO では ER ストレスが強く誘導されていた。また、浸透圧ストレスに関係する Hog 1 経路の遺伝子の誘導が見られたのでさらに調べたところ、リン酸化を検出した。凍結保護剤の影響によって、浸透圧ストレス応答がおきていることが、凍結保護剤の機能のひとつであることが示唆された。さらに、Hog 1 を欠損した株でも DMSO とトレハロースの効果が確認できたことから、Hog 1 経路以外にも作用していることが示唆された。

## ポスター発表

P-1 日本産 *Fonsecaea* 属の系統解析について○矢口貴志<sup>1</sup>, 田中玲子<sup>1</sup>, 松澤哲宏<sup>1</sup>, 西村和子<sup>1</sup>, 宇田川俊一<sup>2</sup><sup>1</sup>千葉大・真菌医学研究センター, <sup>2</sup>日本食品分析センター多摩研究所

*Fonsecaea pedrosoi* は、クロモミコーシスの原因菌の一つで、皮膚病変の他、脳を含む内臓諸臓器の病変を惹起する事も知られており、本種を含む *Fonsecaea* 属は、病原性黒色真菌の中で最も重要な属である。2004年、de Hoog 等が ITS 領域の系統解析で本属を *F. pedrosoi* と新規提唱の *F. monophora* に分け、これまで *F. pedrosoi* と *F. compacta* とに分けていた伝統的な分類を分子系統的に検討し、*F. pedrosoi* と *F. compacta* は同一種であると報告した。そこで、千葉大学真菌医学研究センター保存の臨床および生活環境由来の *Fonsecaea* 属に含まれる菌株について、既存のデータと合わせ系統解析を実施した。

ITS 領域の系統解析の結果は、de Hoog らが示した系統樹、および Surash らの報告とほぼ一致し、日本産の分離株はすべて *F. monophora* と同じグループに類別された。このグループは、*F. pedrosoi*, *F. compacta* の代表株とは系統的に明確な違いを示し、Tanabe らの ITS 解析による“rDNA Type 2”, Kawasaki らのミトコンドリア DNA の RFLP 解析による“Fp 1”ともほぼ一致した。今回の結果では、さらにこのグループは3つのサブグループ、すなわち日本、中国由来の菌株、アフリカ、中南米由来の菌株、北米、欧州由来の菌株に細分された。また、チトクローム *b* 遺伝子においても、ITS 領域とほぼ同様の系統樹となったが、*F. monophora* のグループは系統的な差がなく1つのクラスターにまとまった。これらの結果から、日本産の *F. pedrosoi* は de Hoog らが提唱した *F. monophora* であり、本菌種には地域による多型があると考えられる。今回の検討では *F. compacta* に属する菌株は、ITS 領域、チトクローム *b* 遺伝子において *F. pedrosoi* の代表株と系統的に差がみられた。

P-2 *Pseudallescheria boydii* と関連アナモルフ種の臨床分離株について○西村和子, 矢口貴志, 佐野文子, 田中玲子, 伊藤純子, 松澤哲宏, 亀井克彦, 三上 襄  
千葉大学真菌医学研究センター

*Pseudallescheria boydii* は世界的に土壌、特に農耕土壌に分布する *Microascales* の菌種で、BSL-2 にランクされている。そのアナモルフは *Scedosporium apiospermum* (APIO と略す、以下同じ) である。共に以前から、菌腫、角膜真菌症、菌球型肺真菌症などの起因菌種として知られていたが、近年は侵襲性肺真菌症、関節炎、静脈内留置カテーテル関連菌血症、血行播種による脳の感染など日和見真菌症の起因菌として重要性が増し、近縁種 *S. prolificans* (PROL), 2005年に記載された *S. aurantiacum* (AURA) と共に薬剤抵抗性の点からも問題視されている。我々は1980年来これら菌種を26株、同定済みの寄託によって2株を蓄積してきた。最近数年の菌株を除き形態によって同定されたので、今回、これら28株に関する若干の疫学的データを整理し、形態、生育温度を再検討比較し、ITS 領域による系統解析を行った。分離源は菌球型肺真菌症、侵襲性肺真菌症など肺疾患13、皮膚真菌症6、角膜真菌症2、関節炎2、脳膿瘍1、眼窩内膿瘍1、副鼻腔炎1、不明2、である。APIO は24株、中で有性型を持つ *P. boydii* は6株 (25%)、PROL は3株、本邦初分離の AURA は1株である。APIO の集落は生育速度、集落は多様で大略、A. 気菌糸が発達し中心から灰色～灰褐色に変化、B. 扁平な灰色～灰黒色、C. 気菌糸が丘陵状に発達し灰褐色～黄灰褐色、の3型があり、BとCには黄色色素を産生する株があった。PROL は気菌糸の生育が悪く、やや湿性、灰色～黒色、AURA は APIO の C 型集落によく似ており、黄色色素産生が顕著である以外は顕微鏡形態も画然とは区別できなかつた。APIO の最高生育温度は40–42℃、PROL は42–45℃、AURA は42℃で、APIO と AURA を表現型だけで分けるのは困難であった。系統解析の結果、APIO は8サブクラスターに分かれ、日本の臨床分離株はその中の7つに分布し、PROL と AURA はそれぞれ別のクラスターに属していた。結論として、APIO はあらゆる病巣から、PROL は関節、副鼻腔、眼窩内膿瘍と深部病巣から分離される傾向があった。APIO の臨床分離株は表現型、遺伝子型共に多様、APIO と AURA は表現型では鑑別できなかつた。

### P-3 NIES コレクション：2006年度の活動と今後の展望

○恵良田真由美<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>

<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

(独)国立環境研究所微生物系統保存施設(以下NIESコレクションと表記)は1983年の開設以来、環境科学・環境問題に関わる種類を中心とした微細藻類の収集・保存・分譲業務を行ってきた。今回は2006年度の本施設の活動内容について報告し、併せて2007年度以降の活動計画等について紹介したい。

まず現在の保存株数に関して、2007年3月時点での藻類・原生動物の保有株数は非公開分も含めると合計2,039株となる。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網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(523)、灰色藻(5)、紅藻(210；うち199は淡水産大形紅藻)、クリプト藻(47)、黄金色藻(13)、ラフィド藻(50)、デイクチオカ藻(4)、珪藻(53)、褐藻(1)、黄緑色藻(5)、ペラゴ藻(5)、ピングイオ藻(2)、シゾクラディオ藻(1)、プリムネシオ藻(49)、パプロバ藻(7)、渦鞭毛藻(61)、ミドリムシ藻(8)、クロラクニオン藻(2)、ブラシノ藻(58)、ペディノ藻(3)、アオサ藻(10)、トレボウキシア藻(68)、緑藻(315)、車軸藻(201；うち54はシャジクモ)、所属不明群(2)、原生動物(門)(18)。

上記の株に加えて、東京大学IAMカルチャーコレクションの閉鎖に伴い、これまでIAM株として保存されてきた微細藻約400株が2006年度末をもってNIESコレクションに移管されることとなった。既に株自体の移動は終了し、現在それらのNIES株としての公開に向けて整理・準備作業に全力を傾けているところである。

一方、2006年度の方譲については所外・所内向けの合計が224件780株で、2005年度実績(216件752株)をわずかながら上回った。今年度はさらに利用しやすいコレクションを目指し、HPからオンラインで分譲依頼を行なえる体制を整える予定であり、それに伴う分譲件数・株数の増加にも期待している。

なお、本コレクションは2002年度よりナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)藻類の中核機関として活動した。第1期NBRP藻類では、サブ機関である筑波大、国立科博、東大分生研の微細藻類培養株を中核機関に、北大で収集した大型海藻株を神戸大学海藻類系統株コレクションに集約し、微細藻類と大型海藻の2つの拠点を整備した。

### P-4 新規海洋性細菌の収集

○勝田麻津子，笠井宏朗，志津里芳一

(株)海洋バイオテクノロジー研究所

海洋細菌の分離培養に最もよく用いられる培地に、Difco<sup>TM</sup> Marine agar 2216 (MA)がある。しかし、本培地を使用しただけでは、多様かつ新規な海洋細菌を収集することは難しい。そこで、我々は培地上で生育のいいコロニーを抑制することによって、新規海洋細菌を得ることを試みた。ここで試したのは、芳香族炭化水素の添加による生育の抑制と長期培養による選択である。すなわち、海水で1/10に希釈したMA平板培地あるいは、芳香族炭化水素を添加した寒天平板培地を用いて、塗布後3ヶ月以上経過した培地から釣菌・単菌化を行い、16S rRNA遺伝子の部分塩基配列解析を行った。その結果、DDBJに同遺伝子の配列登録がある培養株に対して、97%以下の相同性を示す新規海洋細菌を高い効率で得ることができた。この方法では、MAを用いて1-2週間培養した場合に高頻度で分離培養される *Gammaproteobacteria* 網 (*Vibrio* 属, *Pseudoalteromonas* 属等) は分離されず、*Actinobacteria* 網, *Alphaproteobacteria* 網, *Verrucomicrobiae* 網など、多様な分類群にわたっていた。中には、既存の配列と86%程度の相同性しか示さない新規性の高い分離株も得ることができた。

海洋バイオテクノロジー研究所では、5,000株の新規海洋細菌を分離培養するために、最近の5年間で1,300以上の海洋由来の分離源から、数十種類の培地を用いて約80,000株の微生物を分離培養した。得られた分離株について、これまでに約22,700株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列を決定し、DDBJに対して相同性検索を行った。その結果、4,710株が、DDBJに同遺伝子の配列登録がある培養株に対して、97%以下の相同性を示した。本ポスターでは、これら海洋環境から分離培養された細菌株について、分離方法・分離源等の付加情報に基づく海洋性細菌株の収集状況も合わせて報告する。

なお、本研究は「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-5 *Microbacterium hatanonis* sp. nov., isolated as a contaminant of hair mist**

○ Mohammad Abdul Bakir, Takuji Kudo and Yoshimi Benno

Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, Wako, Saitama 351-0198, Japan

**Purpose:** *Microbacterium* species described in the literature, so far have been isolated from soil, water, plants, milk products, catheter related bacteremia, blood cultures and bone marrow products. Report on the presence of *Microbacterium* species in the cosmetic products was not found. A yellow-pigmented bacterium was isolated during the course of identification studies on microbial hair mist contaminants. Morphological, biochemical and phylogenetic characteristics of the isolated strain were studied to determine the taxonomic position.

**Materials and Methods:** The isolate was cultured on trypticase soy agar for 72 h at 30°C. Morphological and biochemical analyses of the isolate were conducted following the methods as described previously (1 & 2). DNA G+C content was determined using HPLC (3). DNA-DNA hybridization was carried out using biotinylated DNA in microplates following the fluorometric hybridization method (4).

**Results and Discussion:** The isolate was aerobic, rod-shaped, Gram-positive, oxidase-negative and catalase-positive. The isolate demonstrated microaerophilic growth, however was not able to grow under anaerobic condition. The temperature range for growth is 10-37°C with optimal growth at 30°C. The pH range for growth was 6.0-9.0, with optimal growth at pH 7.0. No growth occurred at NaCl concentration of more than 2%, optimal growth was observed without addition of NaCl. The strain differed from all the closely related species for the utilization of arabinose, production of  $\beta$ -glucuronidase and  $\alpha$ -fucosidase. 16S rRNA gene sequence analysis revealed that the isolate belonged to the genus *Microbacterium* and represented an evolutionary lineage that was distinct from other recognized *Microbacterium* species. Cell-wall hydrolysate of the isolate contained ornithine. Cell-wall sugars were consisted of rhamnose and galactose. Main respiratory quinones were MK-12 and MK-11. The major cellular fatty acids were anteiso-C<sub>15:0</sub> (48%), anteiso-C<sub>17:0</sub> (35%) and iso-C<sub>16:0</sub> (11%). The DNA G+C content was 69 mol%. DNA-DNA reassociation values between the isolate and close phylogenetic relatives *Microbacterium schleiferi* JCM 9175<sup>T</sup>, *M. lacticum* JCM 1379<sup>T</sup>, *M. aurum* JCM 9179<sup>T</sup> and *M. terregens* JCM 1342<sup>T</sup> were  $\leq 23\%$ . Based on the evaluation of the morphological, physiological and chemotaxonomic characteristics, comparative 16S rRNA gene sequence analysis and DNA-DNA reassociation values, a novel species, *Microbacterium hatanonis* sp. nov., is proposed for this isolate. The type strain is JCM 14558<sup>T</sup>.

**References:**

1. Kageyama, A., Takahashi, Y. & Omura, S (2006). *Microbacterium deminutum* sp. nov., *Microbacterium pumilum* sp. nov. and *Microbacterium aoyamense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 2113-2117.
2. Park, H. Y., Kim, K. K., Jin, L. & Lee, S. T. (2006). *Microbacterium paludicola* sp. nov., a novel xylanolytic bacterium isolated from swamp forest. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 535-539.
3. Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed phase high-performance liquid chromatography. FEMS Microbiol. **25**: 125-128.
4. Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**: 224-229.

**P-6 微生物同定用 系統解析システム「アポロン」の開発**○小出知己<sup>1</sup>, 半田 豊<sup>1</sup>, 安 光得<sup>1</sup>, 永塚由佳<sup>1</sup>, 菅原秀明<sup>2</sup><sup>1</sup>株式会社テクノスルガ, <sup>2</sup>国立遺伝学研究所生命情報・DDBJ 研究センター

弊社は細菌、カビ・酵母といった微生物の同定試験受託サービスを行っている。現在の微生物同定においては、塩基配列解析はほぼ欠くことのできない必須項目となった。膨大な塩基配列データを有する国際塩基配列データベース (DDBJ/GenBank/EMBL) は世界最大のデータベースであり、インターネットを使用できる環境下であれば誰でも未知菌株の帰属分類群が推定可能である。しかし、実際にはある程度の専門知識がないとその評価が困難であるケースが大半であり、解析結果が誤同定のまま扱われるケースも決して珍しくない。特に系統分類学に基づく微生物同定に当たっては、相同性検索により得られた情報の吟味が不可欠となるが、専門知識がない人々

には吟味の術がない。また、解析手法では、専門知識のない人々においてもその手軽さから相同性検索は普及しているものの、分子系統解析は普及しておらず、その重要性についての認識も未だ低いままである。

このような状況を解消すべく、我々は国立遺伝学研究所との共同開発により、吟味された情報のみで構成されたデータベース「アポロン DB-BA (細菌・放線菌・古細菌)」および「アポロン DB-FU (カビ・酵母)」を構築した。また、それらのデータをもち、誰もが相同性検索から分子系統解析までを簡単に行える系統解析システム「アポロン」を開発した。以下にその特長を示す。

【データベース (2007年4月現在)】

- ・アポロン DB-BA (16S rDNA) : 収録データ数 約 5,250 種
- ・アポロン DB-FU (18S rDNA, ITS-5.8S, D1/D2 領域) : 収録データ数 約 9,000 データ
- ・登録がない菌種については弊社にてシーケンスし、データを随時蓄積
- ・1年に1回以上、データベースのバージョンアップ (新種登録や移籍を反映)

【系統解析システム アポロン】

- ・相同性検索結果を由来株名の情報とともに一覧表で出力
- ・自動解析は最短2ステップで系統樹作成まで可能
- ・系統樹はビットマップ形式での保存やメタファイルとしての利用が可能
- ・ユーザーデータベースの構築が可能

### P-7 NIES コレクションに保存されている緑藻類の分子系統

○湯本康盛<sup>1</sup>, 佐藤真由美<sup>1</sup>, 恵良田真由美<sup>1</sup>, 森 史<sup>1</sup>, 石本美和<sup>1</sup>, 河地正伸<sup>2</sup>, 笠井文絵<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

(独)国立環境研究所微生物系統保存施設(以下 NIES コレクションと表記)では、現在、プラシノ藻綱、ペディノ藻綱、アオサ藻綱、トレボウキシア藻綱、緑藻綱、車軸藻綱の6綱に属する、約700株余りの緑藻類を保存している。これらの株の中には、形態的特徴が乏しい上に、分子分類学的手法が現在のように一般的に用いられていない時期に寄託された株がある。特に、緑藻綱と、それから新たに設立されたトレボウキシア藻綱では、形態に認められる特徴が分子系統と必ずしも一致せず、科や属の中で多系統性を示す例が報告されており、分子系統が未解析の分類群では、どちらの綱に所属するのかさえ不明という問題に直面していた。NIES コレクションでは、それらの保存株の再分類をルーチンとして実施している。緑藻類のうち、再分類が必要と考えられた4綱82株について、18S リボソーム遺伝子の塩基配列を解析し、灰色植物を外群にとり、既存の配列データとともに分子系統樹(NJ法)を構築した。

その結果、緑藻綱57株、トレボウキシア藻綱25株の系統的な位置が調べられた(そのうち約30株については、既に本学会第9回大会で発表済み)。また、緑藻綱 *Characium* 属に所属すると考えられていた2種が、それぞれ緑藻綱の *Lobocharacium* 属とアオサ藻綱に所属することが判明するなど、誤同定も判明した。しかし、この例に見られるように、*Characium* 属そのものの分子系統解析が十分に行われていないなど、高度な分類学的処理が必要な場合も多い。藻類は非常に多様な生物の集合体であるため、1保存機関にそれぞれの分類の専門家を擁することは困難であることから、これらの問題について、保存株リスト等では、分子系統解析によって判明した確かな近縁種名、属名などを記載するにとどめているのが現状であり、今後はDNAデータや系統樹のホームページ上での公開などを予定している。

本課題では、ルーチン業務によって明らかになった緑藻保存株の系統的な位置を示すと同時に、保存機関としての課題についても言及する。

### P-8 湯俣温泉から分離された硫黄酸化細菌 *Thiomonas* 属の1新種について

○内野佳仁, 横山 宏, 鈴木健一郎

(独)製品評価技術基盤機構

Moreiraら(1997)は、好氣的に無機硫黄化合物を酸化しエネルギーを獲得する桿菌 *Thiobacillus* 属菌種のうち有機物資化能を有する *Betaproteobacteria* の Mixotroph 4菌種について、新属 *Thiomonas* を提唱し、*Thiomonas intermedia*, *T. perometabolis*, *T. cuprina*, *T. thermosulfata* として分類した。現在、*Thiomonas* 属には、Kellyら(2005)の提唱した *Thiomonas delicata* \*を含め5菌種が存在する。

我々は、チオアセトアミドの酸加水分解によりつくり出した嫌気的な条件下で、長野県湯俣温泉で採集した硫



黄花から1菌株 S06 を分離した。16S rDNA 塩基配列解析の結果、S06 株は *Thiomonas* 属 5 菌種とクラスターを形成し、最も近縁な *T. thermosulfata* に対し 96.7% の相同性を示した。これら系統的集合性は、硫黄酸化複合酵素の1つをコードする *soxB* 遺伝子に基づく系統においても支持された。

S06 株は、好熱性（至適生育温度、45℃）の桿菌で極鞭毛を持ち運動性を有する。また、TEM により細胞内に硫黄粒の蓄積が観察される。G+C 含量は 68%、キノンは Q-8 を有する。硫黄、チオ硫酸塩、テトラチオネートを呼吸の電子供与体とする培養条件下では炭酸固定と有機物資化による生育を示す。しかし、有機物を電子供与体とする培養条件下ではピルビン酸以外生育が認められなかった。また、硝酸呼吸による嫌気的な生育は確認できなかったが硝酸還元能は確認された。

我々は、S06 株を *Thiomonas* の新種とすべきと考え、*Thiomonas yumatensis* (NBRC 101989<sup>T</sup>) として提案する予定である。

さらに我々は、分離株を含む *Thiomonas* 属菌種に対して炭酸固定に関わる酵素 RubisCO formI をコードする *cbbL* 遺伝子配列について解析を行い、*Thiobacillus sajanensis* の RubisCO 遺伝子が *Thiomonas* 菌種から水平移動により得られた可能性を示した。

**\*参考文献：**

Yoko Katayama, Yoshihito Uchino, Ann P. Wood, and Donovan P. Kelly

Confirmation of *Thiomonas delicata* (formerly *Thiobacillus delicatus*) as a distinct species of the genus *Thiomonas* Moreira and Amils 1997 with comments on some species currently assigned to the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2006) 56: p2553-2557.

**P-9 遺伝研式 生物資源運搬・保存カード (NIG カード) の有用性について**

○富川宗博<sup>1</sup>, 加藤康子<sup>1</sup>, 西村昭子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>BioROIS 株式会社, <sup>2</sup>情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 元教授

ヒトゲノムの全塩基配列が解析され、生命科学研究はポストゲノム時代を迎えています。これまでのヒトゲノムの研究から、ヒト遺伝子が多くの生物（大腸菌、酵母、線虫、ショウジョウバエ、ラット、チンパンジー等）の遺伝子に類似していることが明らかになり、基礎研究のみならずヒトの病気解析・治療や新薬の開発に出来るだけ多くの生物情報を総合的に解析する必要が生じてきました。この目的で微生物や DNA 等をはじめとする多種多様な生物資源が開発され、研究者間で相互に利用されています。

現在、生物資源の運搬・保存に使用されているマイクロタイタープレート等は、これらの目的に対し、嵩張る、抽出方法が煩雑、超低温保存に向かない等の問題を抱えています。そこで、これらの欠点を全て補うことの出来る製品の開発を目指し、情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 西村昭子元教授の発案を基にして特許化し、NEDO の支援を受けて NIG カードが開発されました。

この製品の構造は三層のウレタン構造の中にろ紙を埋め込み、高周波溶着で厚さ 1 mm に圧縮し、表面には水分の蒸発を極力抑えたシートで本体をカバーする、さらに、本体の裏面には糊をつけて、試料抽出時にマイクロタイタープレートに貼り付けるように工夫がなされています。

NIG カードの特長は、①生きた生物（大腸菌、酵母等）や DNA 等を通常の封筒で、常温郵便輸送可能 ②抽出方法が簡便 ③-80℃の冷凍保存可能 ④超薄型で滅菌処理済 ⑤ロボットでの作業に対応できることです。また、NIG カードを用いた郵便輸送は現時点では、非病原微生物に限定していますが、今後、病原微生物にも対応できるように検討を開始しています。

これまでに、米国への大腸菌の空輸輸送の実績や大腸菌、酵母、プラスミド等の-80℃で最低6ヶ月間の保存が可能であり、現在、引き続き保存を継続していますが、超低温での長期の保存にも有用であると考えられます。

**P-10 JSCC オンラインカタログ編集作業を通して—各機関における菌株情報の相互補完—**

○伴さやか<sup>1</sup>, 市原正巳<sup>1</sup>, 伊藤 隆<sup>2</sup>, 岡田 元<sup>2</sup>, 岡根 泉<sup>1</sup>, 笠井文絵<sup>3</sup>, 工藤卓二<sup>2</sup>, 坂本俊一<sup>1</sup>, 佐藤豊三<sup>4</sup>, 鈴木基文<sup>2</sup>, 中川恭好<sup>1</sup>, 横田 明<sup>5</sup>, 鈴木健一朗<sup>1</sup>, 菅原秀明<sup>6</sup>

<sup>1</sup>製品評価技術基盤機構 (NBRC), <sup>2</sup>理化学研究所 (JCM), <sup>3</sup>国立環境研究所 (NIES), <sup>4</sup>農業生物資源研究所 (NIAS), <sup>5</sup>東京大学分子細胞生物学研究所 (IAM), <sup>6</sup>国立遺伝学研究所

2006年7月に公開されたJSCC オンラインカタログは、1998年発行の第6版の更新に留まらず、インターネットを通して微生物資源の利用者が国内資源に横断的に検索・アクセス可能なデータベースを目指して構築された。

専門性の異なる菌株やその情報を統合したデータベースとするためにJSCCカタログ編集小委員会での議論と、各機関でのデータ精査が必要であった。ここでは、その過程で見出された問題点を整理し、微生物株データベース構築での注意すべき点を紹介する。

**【データの連結方法】**微生物株データはそれぞれの「他機関番号」および「来歴」を比較し、同じ機関番号を持つ株は同一由来株と定義して連結した。次に、同一由来株について参加している二機関間で異なる学名を付けられている株を学名不一致の株としてリストアップし、検討対象とした。この不一致の原因は単なるスペルミスから分類体系に対する見解の相違までに及んだ。

**【データ融合の方針】**大分類の登録については、酵母と糸状菌類の区分など機関や利用者としての専門性によって異なる場合があった。学名に関しては、原核生物においてはinvalidの学名の取扱い、酵母においては「sake yeast」等の学名ではない名前が採用されていたりする例があった。こうした相違については編集小委員会において議論を尽くした上で、各機関の方針や用途に配慮して、差異をそのまま残す例も生じた。利用者には、JSCCオンラインカタログからリンクされている保有機関のデータベース上の菌株情報を照合していただきJSCCオンラインカタログ上の表記が異なっていることを理解していただくことを期待している。

**【今後の課題】**第6版には15機関が参加していたのに対し、現在のオンラインデータベースは5機関の参加でスタートした。参加機関を増やしたいが、事前アンケートから、それぞれの抱える問題点がある。これから、さらにユーザーフレンドリーな検索が可能になるようシステムの再構築を考え、なるべくデータ統合に際する個別機関の負担を減らすようにしたい。

なお本発表は、JSCCカルチャーコレクション委員会のもとに編成されたカタログ編集小委員会（委員長 菅原秀明）として発表するものである。

## P-11 NBRC 平成18年度事業報告

鈴木健一朗，○府川仁恵，浜田盛之，鬼頭茂芳，舟橋友道  
(独) 製品評価技術基盤機構 (NITE) NBRC

NBRCは平成14年以来、財団法人発酵研究所 (IFO) の事業を引き継いでから5年が経過した。その後、新しい事業展開も進め、微生物を材料として利用する研究者のニーズを満足させるサービスと品揃えを目指している。ここに平成18年度に実施した事業と得られた成果について報告する。

**1. 収集・分譲** 現在、NBRCの収集実績は、NITEバイオテクノロジー本部において、生物遺伝資源部門におけるNBRCに登録され保存されている株の総数と、生物遺伝資源開発部門から、探索用として外部に提供している微生物株の総数の合計として示している。平成18年度末では、その合計が40,043株となった。また、分譲は国内7,653株、海外366株、計8,019株であった。

**2. ISO9001:2000 認証取得** 昨年度の最も重要な課題であった品質マネジメントシステムISO9001の認証を平成18年12月に取得した。これは、微生物を対象とした生物遺伝資源センター業務としては、日本国内初となる。これは外部に対して顧客満足度を指標にした制度であるとともに、内部でも業務の管理に有効であるので、今後積極的に活用していきたいと考えている。

**3. 微細藻類コレクションの開始** 平成18年10月、(株)海洋バイオテクノロジー研究所から、微細藻類のコレクションが移管され、平成19年3月から約330株をNBRCから公開した。これに伴い、NBRCは微細藻類についても積極的に収集していくこととし、寄託も受け入れることになった。

**4. BRC間の国際連携の推進** NITEバイオテクノロジー本部では、アジアにおける微生物資源の利用環境の整備のため、12カ国の代表機関とともに「アジアにおける微生物資源の保全と持続的利用のためのコンソーシアム」を結成し、毎年会合を開催している。平成18年度は中国で開催し、意見交換とシンポジウムを行った。また、統合データベース構築を目ざし、4カ国でプロトタイプを作成した。

**5. 国際共同研究による微生物資源の充実** NBRCは、タイBIOTECと共同でタイ由来の未同定微生物株の分類学的研究を行い、コレクション間の交換ベースで双方の充実を進めている。現在対象としているのは、酢酸菌、酵母、およびXylariaceae糸状菌で、平成18年12月にバンコクで中間報告会を行った。