

特別講演

生物資源としての担子菌の多様性

鈴木 彰

千葉大学教育学部

担子菌は系統分類上からみると、サビ菌類、クロボ菌類、菌茸類に大別され、サビ菌類、クロボ菌類ではかびと酵母が、菌茸類では、きのこ酵母が存在する。きのこは、担子菌に属するものが多く、きのこの生物資源としての研究は、担子菌のきのこを対象としたものが多く、子のう菌や不完全菌類のきのこを対象としたものはそれほど多くない。担子菌は、陸圏に生息するものが多いが、水圏に生息するものも知られており、陸圏及び水圏の様々な環境に適応して、子のう菌、接合菌、不完全菌類等と共に生息している。生物資源としての担子菌の多様性は、他の菌類の場合と同様に系統分類上の多様性と生態学的な多様性に基づいている。例えば、担子菌の毒きのこの子実体に含まれている毒成分には、かび毒と共通するものは知られていない。他方、子のう菌の毒きのこの子実体に含まれている毒成分には、かび毒と共通するものも報告されており、毒成分に関する限りは、生態的な特性よりも系統分類上の特性が優越すると推察される。一方、酵素の特性に関してみると、系統分類上の位置付けよりも生態上の位置付けが優越すると考えられる。

菌類は、栄養様式からみると、寄生、腐生に大別され、それぞれの栄養様式に応じて様々な生物資源として利用されてきた。その一例を示すと、腐生性の担子菌、特に白色腐朽菌は強いリグニン分解能を有しており、ダイオキシン等のバイオレメディエーションにおける有効な生物資源として、主な探索対象とされてきた。セルロース分解能の高い生物資源の探索では、探索対象は必ずしも担子菌に限られないが、腐生性の担子菌も主要な探索対象とされてきた。菌根菌は緑化やその生物濃縮能を用いてバイオレメディエーションに有効な生物資源等として様々な利用が試みられてきており、外生菌根菌が多い担子菌も重要な探索対象とされてきた。食用という観点からみると、担子菌のきのこは主要な生物資源であり、人工栽培法も多数の担子菌で確立されている。さらに担子菌の菌体の成分であるグルカンには、抗癌剤としての利用実績がある。

そこで、本講演では生物資源としての担子菌の多様性を、演者が研究してきた生態学的観点を交えて探ってみたい。

## 受賞講演

日本微生物資源学会学会賞

## 病原細菌の系統保存活動から見てきた菌種の再定義への課題

江崎孝行

岐阜大学大学院医学系研究科病態制御学分野

日本微生物資源学会に初めて参加させていただいたのは1982年頃で、研究室に教授として着任された故藪内英子先生に引き連れられて新しい分野に飛び込んだ。それまで研究室では故鈴木祥一郎教授の下で無芽胞嫌気性菌の分類学的研究に従事し、国際微生物連盟と分類命名の小委員会の存在しか知らなかった私にとって大きな刺激をうけ続けてきた学会でした。特に1980年代は表現形質の数値分類から化学分類指標が導入され、上位の分類についての活発な議論を拝聴できました。学会に参加するまでは患者から分離された菌株をどうやって同定するかが大きな悩みで、Bergey's manualを片手に表現形質をいくら調べても菌種の同定ができませんでした。この頃は分類体系を自分で提案するとか、変えるという発想は全くなく、Bergey's manualをバイブルのように信じていました。

1979年にVirginia工科大学に留学中に、隣の研究室でJ. Johnson博士がアイソトープを使ったメンブレンフィルター法で細菌のDNA-DNAハイブリッドの形成実験を行っているのを知り、帰国前に数週間博士に手ほどきをうけて、帰国しました。日本ではアイソトープを使った実験は困難なので、非アイソトープ法でELISAのようにマイクロプレートで相同性実験ができるようにしたいと思いだし、1980年代の後半にやっとこの思いを達成できました。

1990年代になるとゲノム解析が始まり、細菌の全

ゲノム解析がなされた株は1千株に到達しようとしている。この成果は細菌の分類方法にも大きく影響している。16S rDNAの配列情報からは系統情報は得られるが菌種を特定できないことが多いこともわかってきた。その結果、より多型のある遺伝子を多数調べて菌種を同定しようとする試みが行われており、IUMSの勧告が出て以来、多型のhouse keeping genesを多数調べて菌種を決めようという論文が多く発表されるようになってきました。選択する遺伝子には基準はなく、研究者、および菌群ごとに選択される遺伝子は異なるために、異なったデータセットで異なった結果が得られるようになりました。ちょうど数値分類学が登場した時の混乱と似ているように思えます。

このような中で米国の臨床微生物標準化委員会NCLSでは菌群ごとに菌種を識別に有効な遺伝子を選択し公表しています。この作業は現在、進行中です。我々も独自でシャペロン蛋白であるDnaJを使って種の多型についての知見を蓄積させてきました。現在まで3000株のデータの蓄積をおこない、様々な病原性菌種の多型情報が議論できるようになりました。これらのデータを基に病原微生物、特にバイオテロに使用される感染症法で規定される2種、3種病原体の種の分類課題に対する我々の長い挑戦について紹介し、種の再定義に対して会員の皆様が思いを巡らす機会を提供したいと思っています。

## 受賞講演

日本微生物資源学会奨励賞

## 嫌気性グラム陰性桿菌の分類学的研究

坂本光央

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室

嫌気性グラム陰性桿菌、特に *Bacteroides* 属は、ヒトおよび動物の腸管内の常在菌として多数棲息しており、また時としてヒトおよび動物に様々な疾患を起こさせる菌種を含み臨床細菌学上重要な細菌群である。従来、形態学的特徴や生理・生化学的性質に基づいてその分類が行われ、1980年代初めまでは本属の定義が曖昧であったため、*Fusobacterium* 属あるいは *Leptotrichia* 属に分類できない偏性嫌気性、無芽胞性のグラム陰性桿菌のほとんどが *Bacteroides* 属に分類されていた。その後、Shah と Collins (1989) によって *Bacteroides* 属の記載が修正され (*Bacteroides* 属は基準種 *B. fragilis* とその類縁種である *B. caccae*, *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. merdae*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* および *B. vulgatus* に限定された：狭義の *Bacteroides* 属)、多くの菌種が本属から *Porphyromonas* 属および *Prevotella* 属へと移籍された。細菌の分類に 16S rRNA 遺伝子配列の比較という手法が本格的に導入されていなかった当時、前述の新属は、主に終末代謝産物、DNA の G+C mol%, 各種脱水素酵素 (グルコース 6 リン酸脱水素酵素, 6 ホスホグルコン酸脱水素酵素, リンゴ酸脱水素酵素およびグルタミン酸脱水素酵素) の有無、菌体脂肪酸組成およびメナキノン組成などの違いに基づいて創設された。

本研究では、Shah と Collins による再分類後も長い間その分類学的位置付けが不明確であった *B. distasonis*, *B. merdae* および *B. forsythus* を 16S rRNA 遺伝子配列の比較のみならず、菌体脂肪酸組成やメナキノン組成などを詳細に比較検討した。さらに、ヒトおよびニワトリから分離された菌株について分類学的な考察をもとに新種提案を行った。

【新属の創設】*B. distasonis* および *B. merdae* は狭義の *Bacteroides* 属に含まれるものの、16S rRNA 遺伝子配列による解析から、その他の *Bacteroides* 属細菌とは系統学的に離れており、新属の可能性が示唆された。我々はこれら 2 菌種と研究中新種提案され、系統学的に近縁な *B. goldsteinii* を含め新属 *Parabacteroides* (*P. distasonis*, *P. goldsteinii* および *P. merdae*) として再分類した。*Parabacteroides* 属細菌は MK-9 および MK-10 を主要メナキノンとして有することを特徴とする (*Bacteroides* 属細菌の主要メナキ

ノンは MK-10 および MK-11)。また *P. merdae* 菌株の収集過程で、菌種特異的プライマーを用いた PCR 法によって *P. merdae* と同定できなかった菌株について分類学的な考察をもとに新種 *P. johnsonii* を提案した。

代表的な菌周病原性細菌である *B. forsythus* は、Shah と Collins の提案により狭義の *Bacteroides* 属から除外され、また 16S rRNA 遺伝子配列による解析から、系統学的に *Porphyromonas* クラスタに近い位置にあるが、それとは独立して新しいブランチを形成し、新属の可能性が示唆された。本細菌は菌体脂肪酸組成中の iso-C<sub>15:0</sub> に対する anteiso-C<sub>15:0</sub> の比率が狭義の *Bacteroides* 属とは著しく異なっているのが最大の特徴であった。我々は *B. forsythus* を新属 *Tannarella* (*T. forsythensis*) として再分類した。

さらに、ニワトリの盲腸内から分離された菌株について化学分類学的な考察をもとに *Porphyromonadaceae* 科内に属する新属新種 *Barnesiella viscericola* を提案した。本細菌は胆汁に対して感受性を示し、他属と異なり MK-11 および MK-12 を主要メナキノンとして有し、また、DNA の G+C mol% が 52% と高いのが特徴である。

【*Bacteroides* 属および *Prevotella* 属の多様性】近年、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法などの培養を介さない分子生物学的手法の応用により、腸内や口腔には未だ多くの *Bacteroides* 属や *Prevotella* 属に属する未知種が存在することが示唆された。我々はこのことを裏付けるかのように既知種とは異なる菌株を数多く分離し、これらについて分類学的な考察をもとに *Bacteroides* 属および *Prevotella* 属の新種として発表した (*Bacteroides* 属 9 種：*B. coprocola*, *B. coprophilus*, *B. barnesiae*, *B. dorei*, *B. finegoldii*, *B. gallinarum*, *B. intestinalis*, *B. plebeius* および *B. salanitronis*；*Prevotella* 属 7 種：*P. copri*, *P. multiformis*, *P. multisaccharivorax*, *P. pleuritidis*, *P. salivae*, *P. shahii* および *P. stercorea*)。

本研究は、近年汎用される 16S rRNA 遺伝子配列に基づく遺伝子レベルでの分類とともに、表現形質を含む分類学的データの蓄積が、嫌気性グラム陰性桿菌、特に *Bacteroides* 属とその類縁細菌群の分類体系を再構築するために極めて重要であることを示した。

## シンポジウム

## S-1 遺伝子組換え技術による乳酸菌の新しい機能の開発

五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所

乳酸菌の育種の方法としての遺伝子組換えは、やっと本格的に始まったところである。遺伝子組換え技術により、乳酸菌は経口ワクチンの抗原運搬体として機能し、いくつかの組換え体ではその免疫効果がマウスを用いた実験において確認されている。すなわち研究段階の検討はある程度積み重ねられてきていると言える。今後、乳酸菌組換えワクチンは、効果の高いものから、実用レベルの免疫効果が実際にヒトで期待できるかの検討に移行してゆくと思われる。乳酸菌組換えでは、経口粘膜ワクチンが最も期待されていたが、その他の新しい機能や利用方法も検討されている。たとえば、組換え乳酸菌を利用し免疫への効果を期待するものとして、アレルギー治療剤の開発研究が開始されている。大変ユニークな試みとしては、偏性嫌気性の組換え細菌を用いた癌治療が進められている。偏性嫌気性であるピフィズス菌が固形癌へ集積し増殖することを利用してのターゲット療法であるが、癌の病巣でのみ増殖した組換え体は、癌細胞を死滅させる機能に関連する遺伝子産物を産生し、癌細胞を効率よく破壊する。この研究は既にマウスで良好な結果を得たことからヒトの臨床実験を計画している。検討されている偏性嫌気性細菌は、ピフィズス菌の組換え体であるが、サルにおける投与実験で、当該菌が免疫系にあまり影響を与えないことが確認されている。乳酸菌に機能を持った物質をコードする遺伝子を組み込み、生体内での生産工場として利用するといった試みもされている。たとえば、炎症を抑えるサイトカインである IL-10 をコードする遺伝子を乳酸菌に組み込み腸管内

で発現させると炎症性腸疾患 (IBD) の症状が改善するといった研究である。その他、腸管への定着因子を組み込んだ乳酸菌を作出しプロバイオティクスとしての機能を強化する研究も行われている。

“ワクチンとしての免疫効果が充分得られる”、“癌への治療効果が認められる”、“腸内で機能性剤として治療効果が認められる”となると、生きた組換え体を人体や動物へ用いることに関する安全性に関する検討は必須となる。乳酸菌の発酵食品としての長い食経験の歴史は、乳酸菌が経口的に摂取した場合、安全であることを支持している。一方、宿主乳酸菌の安全性は確認されていると言っても、組換えにより機能が付与されていることから生きたままの組換え体を摂取あるいは体内に持ち込むことに関する安全性確認が必要である。組み込まれた機能が免疫に係わるものであれば、乳酸菌々体の免疫賦活作用との相乗効果が考えられるなどといった安全性の確認が必要である。ワクチンであれば病原体の病原性に係わる感染防御抗原を遺伝子組換えに用いていることから、乳酸菌が感染を起こしてしまうおそれが心配される。乳酸菌は遺伝子組換えにより、医薬品に相当する機能を持ちつつあり、その高い機能ゆえ、実用化には誰もが納得できる遺伝子組換え体の安全性の議論も必須である。今後は、ワクチンや機能性剤といった医薬品としての機能評価に関する研究に加え、生きた組換え微生物を用いることのヒトや動物への直接的なあるいは環境を介しての間接的な影響に関する安全性を考えながら、研究・開発が進められる必要がある。

## S-2 木質バイオマス変換における木材腐朽菌利用の可能性

鮫島正浩

東京大学大学院農学生命科学研究科

木材の腐朽に関与する糸状菌を木材腐朽菌と広く呼んでいるが、その大部分は分類学的に担子菌類に属している。しかしながら、木材腐朽菌による木材の腐朽様式は必ずしも一応ではなく、腐朽材の色調の差異によって、古くから木材腐朽菌は白色腐朽菌と褐色腐朽菌に大別されてきた。白色腐朽菌が木質バイオマスを構成する主要な化学成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンのいずれも完全分解することができるのに対して、褐色腐朽菌はヘミセルロースならびにセルロースの非結晶領域が選択的に分解し、セルロースの結晶領域ならびにリグニンについては部分的にのみ分解する。したがって、バイオプロセスに基づく木質バイオマス変換利用においては白色腐朽菌を利用することが有利と考えられてきたため、これらの化学成分の生分解に関わる研究についても主に白色腐朽菌を中心になされてきた。

このような中で、2004年には、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の全ゲノム配列情報が開示された<sup>1)</sup>。同菌の全長 35.1Mbp のゲノム配列の中には 10,048 種の遺伝子が存在するが、精密化された配列情報に基づくところ、このうちの 7.6% に相当する 769 種の遺伝子は菌体外への分泌タンパク質をコードしていると推定されている<sup>2)</sup>。白色腐朽菌が木質バイオマスを分解するために、このように多様な菌体外タンパク質の生産に関与する遺伝子を有していることは驚きに値するが、このうち 407 種（全体の 53%）の菌体外タンパク質については既知のタンパク質との相同性解析によって帰属が可能な遺伝子であるのに対して、残りの半分については帰属ができない遺伝子である。また、帰属された遺伝子数については、糖質加水分解酵素（87 種）、酸化還元酵素（84 種）、さらにプロテアーゼ（52 種）が群を抜いて多いが、一方で、リグニン分解に関与する特殊な酸化還元酵素として位置づけられるリグニンペルオキシダーゼ（10 種）、マンガン依存性ペルオキシダーゼ（5 種）と意外と少ない。いずれにしても、白色腐朽菌は木質バイオマス変

換を行うための酵素を利用したバイオプロセスを構築するための遺伝子資源として未知の部分も含めて多くの可能性を秘めていることが理解できる。

酵素工学的にバイオマス変換を行うためには、必要な分解酵素をライブラリー化して保有することが重要である。このような背景から、私のグループでは、白色腐朽菌 *P. chrysosporium* の全ゲノム配列情報に基づきプライマーを設計し、バイオマス変換に関わる酵素の産生遺伝子の cDNA クローニングを行い、得られた遺伝子をメタノール資化性酵母菌あるいは大腸菌の発現系を用いて組換えタンパク質として酵素生産を行っている<sup>3,4)</sup>。これまでの数年間で、30 種以上の関連酵素の遺伝子を cDNA として取得し、そのうち、17 種については組換え体として酵素生産を行い、それぞれについて機能解析を進めている。また、4 種の酵素については三次元構造の解析も完了している。さらに、 $\beta$ -グルコシダーゼならびにピラノース酸化酵素などについては、酵素分子の構造解析に基づく機能改変を行い、バイオマス変換利用に適した変異酵素の作出を試みている。

木材腐朽菌を木質バイオマス変換に利用していくという発想は、キノコの菌床栽培という形ですでに事業化されており、現在、大きなメーカーでは日産 100 トン以上のきのこが木質バイオマスなどを利用して工場生産されている。したがって、すでに述べてきたようなゲノム配列情報の利用と考え合わせることで、木材腐朽菌による木質バイオマス変換利用の可能性に大きく期待を寄せることができる。

- 1) Martinez *et al.* (2004). *Nature Biotechnol.* 22: 695-700.
- 2) Wymelenberg *et al.* (2006). *Fungal Gen. Biol.* 43: 343-356.
- 3) 鮫島正浩, 五十嵐圭日子 (2004). *木材学会誌* 50: 359-367.
- 4) 鮫島正浩 (2006). *バイオインダストリー* 23: 62-67.

### S-3 深海底堆積物環境の微生物資源

#### —資源量・多様性・培養の試み—

井町寛之

独立行政法人海洋研究開発機構・極限環境生物圏研究センター

深海底堆積物環境を含めた「海底下微生物圏」は地球上で最大のバイオマスで存在するにも関わらず、地球上で最も未知のベールに包まれた生命圏である。それは、(1) 海底下を含めた地殻内環境には約  $10^{30}$  個レベルで微生物は存在し、その総炭素量は地球上の植物の総炭素量に匹敵するといった試算、加えて、(2) 16S rRNA 遺伝子等に基づいた分子遺伝学的微生物同定・検出技術を用いた多くの研究結果—海底下に生息するほぼすべての微生物が人為的に純粋分離なされたことがない機能未知な系統分類群に属する—がはっきりと示している。海底下微生物圏が地球最大のバイオマスにして最も未知という事実は、多くの研究者の科学的探求心や好奇心を強く刺激するとともに、産業上・学術上有用かつレアな微生物資源・遺伝子資源を獲得するチャンスが多く残された地球最後のフロンティアといっても過言ではないであろう。本講演では、微生物を純粋分離することで海底下微生物圏を理解していきたいと考えている私の立場から、深海底堆積物環境に生息する微生物の資源量・多様性そして培養の試みについて紹介させていただきたい。

自然環境中から微生物資源・遺伝子資源の獲得する方法を簡単に大別してしまえば、「環境ゲノム解析」と「純粋分離株の取得」の2つであろう。現在、環境ゲノム解析（メタゲノム解析）は近年の分子遺伝学的手法の急速な発展、膨大な配列情報を処理可能なコンピュータや解析ソフトの技術革新、そしてバイオインフォマティクスという新しい学問分野の発展に支えられ、様々な環境を対象に精力的に行われている。深海底堆積物環境を対象とした環境ゲノム解析はまだ件数は少ないものの研究例はすでにあり、海底下からメタンが供給されている深海底堆積物環境にほぼ普遍的に見られる嫌氣的メタン酸化反応を担う古細菌対象とした解析や多金属団塊（polymetallic nodule）が多く含まれている深海底堆積物を対象としたものがある。さらに現在進行形のものとして、私が所属する海洋研究開発機構においても地球深部探査船「ちきゅう」によって採取した下北半島東方沖の地下深部 348 m までのコアサンプルを対象に環境ゲノム解析が進められている。

では深海底堆積物環境からの純粋菌株の取得について

はどうだろうか？ 現在まで、深海底堆積物環境から分離され記載・命名されている菌株の報告はあるが、16S rRNA 遺伝子等に基づいた微生物群集構造解析から推定される深海底堆積物に存在する優占種の純粋分離の成功は皆無である。加えて、深海底堆積物環境から莫大な量のメタンが放出されているが、深海底堆積物環境から分離されたメタン生成古細菌は僅か 2 種、一方メタンを酸化する微生物について分離成功例はない。このような状況を打破するには従来の培養法だけでなく新規な技術開発あるいは異分野の技術を積極的に導入することが必要であると私は考えており、現在、私は深海底堆積物環境中に存在する未知微生物を分離培養するためにいくつかのアイデアを持って研究に取り組んでいる。その中の 1 つとして、環境工学分野の微生物学的廃水処理技術であるリアクターシステムを参考にした新規な微生物培養リアクターシステムを用いて深海底堆積物から微生物の培養を開始している。参考にしたのはスポンジを固定担体とした散水ろ床方式の生物膜法である下降流懸垂型スポンジ（DHS：downflow hanging sponge）リアクターである。リアクターシステムそして DHS リアクターを選択した理由は、まずスポンジを固定担体として使用するため、リアクター内部に増殖の極度に遅い海底下微生物群を保持することが可能であること、そして微生物と基質の接触する表面積を大きくすることができるため、菌大量を稼ぐことができることである。またリアクターで培養を行えば連続でかつ低濃度の基質を供給できることから、比較的実環境に近い条件で培養ができる等のメリットがある。実際に、DHS リアクターを参考にしたリアクターシステムを使うことで、南海トラフで採取した深海底堆積物や下北半島東方沖で採取されたコアサンプルを植種源にして嫌氣的メタン酸化古細菌やメタン生成菌等の培養を試みているところである。現在、誰も培養できなかった嫌氣的メタン酸化古細菌をリアクターの中で培養ができている証拠を掴みつつある。本リアクターシステムを用いた培養法が誰も手に行うことができなかった深海底堆積物環境からの微生物資源・遺伝子資源を生み出す可能性が見えてきた。

## S-4 ヨウ素と微生物—新規機能を有する微生物の分離とその応用—

天知誠吾

千葉大学大学院園芸学研究科応用生命化学領域

ヨウ素は一般に殺菌剤としての印象が強く、微生物にとって有害なものと認識されている。しかしながら、ヨウ素の化学形態のうち殺菌力を持つのは分子状ヨウ素 ( $I_2$ ) や次亜ヨウ素酸 (HIO) であり、環境中での主たる存在形態であるヨウ化物イオン ( $I^-$ ) やヨウ素酸イオン ( $IO_3^-$ ) と微生物の関係については不明な点が多い。我々はこれまで、人類の必須元素であるヨウ素のサイクルの解明、また原子力施設等から放出される放射性ヨウ素の環境挙動の予測を目的として、ヨウ素と interaction する微生物について研究を行ってきた。本講演では、演者らの研究の過程で見つかったいくつかの細菌と、その応用の可能性について紹介する。

ヨウ素酸化細菌は、ヨウ化物イオンを分子状ヨウ素に酸化する細菌で、千葉県を初めとする各地のガス鹹水から分離された。鹹水には高濃度のヨウ素が含まれることはよく知られている。特に房総半島の南関東ガス田のヨウ素埋蔵量は多く、この地域だけで世界の約3割のヨウ素を産出している。ヨウ素酸化細菌は  $\alpha$ -Proteobacteria の *Roseovarius tolerans* あるいは *Rhodothalassium salaxigens* に近縁で、細胞外に分泌されるオキシダーゼによりヨウ化物イオンを酸化した。興味深いことに、ヨウ素酸化細菌は通常の海水からは分離できないが、海水に鹹水と同程度のヨウ素を添加すると容易に分離可能となる。この原因を明らかにするため PCR-DGGE、およびヨウ素酸化細菌に特異的な PCR プライマーを用いた Real-time PCR を行った。その結果、通常の海水中にヨウ素酸化細菌はごくわずか (Bacteria 全体の 0.01% 以下) しか存在しないが、高濃度のヨウ素存在下では 20% 以上に増殖することが明らかになった。おそらくヨウ素酸化細菌は、自身が生産する分子状ヨウ素により他の競合細菌

を駆逐 (殺菌) し、生態的地位を獲得しているものと考えられる。

現在我々は、ヨウ素酸化細菌の有する酵素を用いた新規殺菌剤の開発に取り組んでいる。ヨウ素はカビや酵母、一部の芽胞に対しても殺菌力があり、かつ金属腐食性が少ないことから、食品工場や医療現場等における除菌剤として需要がある。現在広く普及しているヨウ素殺菌剤は PVP に包接されたヨウ素 (ヨードフォル) であり、殺菌力の本体である遊離ヨウ素 (包接体と結合しない  $I_2$ ) 濃度は必ずしも高くはなく環境負荷も高い。ヨウ素酸化細菌の有するヨウ素酸化酵素はオキシダーゼのため、分子状ヨウ素を生産するための酸化剤 (例えば過酸化水素や塩素) や包接体が必要ない。また、ほぼ全ての分子状ヨウ素が遊離型のため殺菌力も強いことが期待できる。

ヨウ素蓄積細菌は、細胞内に高濃度のヨウ素を蓄積する細菌で、駿河湾の表層堆積物より分離された。Flavobacteriaceae の *Arenibacter troitsensis* に近縁なこの細菌は、海水レベルのヨウ化物イオン存在下で生育させると、約 5,500 倍にヨウ素を濃縮したが、ヨウ素酸イオンの濃縮能は持たなかった。ヨウ素の取り込みには過酸化水素が関与しており、これによりヨウ化物イオンを次亜ヨウ素酸に酸化して細胞内に輸送していると考えられた。現在、生物によるヨウ素の取り込み形式は甲状腺と海藻で詳細が明らかになっているが、ヨウ素蓄積細菌の取り込み様式は海藻と酷似している。しかしながら、細菌のヨウ素取り込み・濃縮の生理学的な意義については未だ不明である。今後ヨウ素蓄積細菌を応用することで、海水やヨウ素含有廃水からのヨウ素の回収・リサイクルが可能となるかもしれない。

## S-5 環境バイオテクノロジーへの微生物資源の活用

加藤純一

広島大学大学院先端物質科学研究科

生物機能は、汚れた環境の浄化、環境汚染の防止・環境負荷の低減、環境モニタリングに活用することができる。このように、生物機能を活用して種々の環境問題を解決する技術の開発/確立に資する学術・技術を環境バイオテクノロジーと呼ぶ。バイオサイエンスでは高等動物や高等植物が主役であるが、環境バイオテクノロジーで主役を張っているのはこうした高等生物ではなくもっぱら微生物である。環境バイオテクノロジーを実地に適用するには、生態学、化学工学、土壌学、水文学、地質学なども必要となる。しかし、微生物が主役を演じている以上、環境バイオテクノロジーの重要な要素は応用微生物学であるといっておいて間違いない。

応用微生物学のプリンシプル、したがって環境バイオテクノロジーのプリンシプルは次項のとおりであると考えている。

- 優れた生物機能を有する微生物を**発見**する。
- その生物機能をとことん**解明**する。
- 得られた知見をもとに、生物機能（もしくは微生物そのもの）を**育て上げる**。
- 合理的な制御をかけ、生物機能を**活用**する。

つまり環境バイオテクノロジーはいかに優れた微生物をスクリーニングするか、言い換えれば微生物資源に大きく依存していると言える。わが国の農業資源、鉱業資源やエネルギー資源は極めて乏しい。しかし、こと微生物資源では、豊かな資源国である。微生物資源国であればこそ、坂口謹一郎先生の有名な言葉「微

生物は決して裏切らない」が出てきたのだと考える。環境バイオテクノロジーの基礎研究/開発研究を展開するにあたり、律速となっているのは微生物資源ではない。どのような生物機能を求めるのか、どのように微生物を見つけ出すのかについてアイデアが出せるのかが律速になっていると考える。本講演では、環境バイオテクノロジー研究で我々がどのように微生物資源を活用したかについて紹介したい。紹介するのは次の事項である。

環境適合型生産プロセスの開発：持続可能な社会の構築のためには、環境適合型生産プロセス性を確立する必要がある。バイオプロダクション技術は生産プロセスの環境適合性を向上する有力なツールである。これまでバイオが非常に不得意としてきた疎水性の世界における物質生産を実現するために、有機溶媒耐性細菌を新たに取得し、それをを用いた生産プロセスの開発研究を行った。

赤潮殺藻細菌の活用：海洋には赤潮藻類を殺藻する能力を持つ細菌が存在する。その赤潮殺藻細菌を分離するとともに、赤潮殺藻細菌を活用した赤潮防除技術の開発のため、赤潮殺藻分子機構の解明を行った。

リンの再資源化：農業に必須なリンを日本は100%海外に依存している。しかし、土壌にはバイオアベイラビリティが低いリンが著量蓄積している。それらリンを利用可能にするために、不溶性リン化合物を溶解し利用できる微生物を自然界からスクリーニングし、その機能を解析した。



教育講演

日本学術振興会における科研費，特別研究員，国際交流の諸事業における  
審査・評価システムについて

渡邊 信

筑波大学大学院生命環境科学研究科，

日本学術振興会学術システム研究センター主任研究員（総合・複合新領域担当）

日本学術振興会は研究者の自由な発想に基づく研究（ボトムアップ研究）を支援している。

本会は、研究者支援として、「研究助成」、「人材育成」、「国際交流」の諸事業を実施し、また、大学改革支援として、「グローバルCOEプログラム」、「大学院教育改革支援プログラム」、「大学国際戦略本部強化事業」などの審査・評価を含む関連業務を行っている。これらの事業における公平・公正で透明性の高い審査・評価の実施のために、本会にプログラムオフィサー制度として、学術システム研究センターが平成15年7月に設置された。大学等研究教育機関から、第一線の研究者がセンターの研究員となっており、これらの事業の健全な実施のため、審査員の選定、審査結果の妥当性の検証等の重要な業務を行っている。

科研費の応募件数は年々増加し、10万件をこえている。科学研究費補助金の審査は、透明性・公平性を

確保するため、複数の研究者のピアレビューによる2段階審査（書面審査及び委員会形式の合議審査）により行っている。具体的には、第1段（書面審査）審査委員の審査結果について、第2段（合議審査）審査委員がチェックし、総合的な調整を行うことにより、採否を決定している。学術システム研究センター研究員は、第2段審査会の司会進行を行っており、第2段審査委員の審査結果に疑問がある場合は、理由説明を求め、他の審査委員がその適切性を確認する（センター研究員は評価に関与しない。）ことにより、恣意的な審査が行われないようにしている。同様のことは、特別研究員、国際交流事業においても実施している。

今回は科研費、特別研究員、国際事業に中心をおいて、その事業内容や審査システム及び日本微生物資源学会に関わる分科・細目についての現状について説明する。

## 一般講演

## O-1 酸性硫酸塩土壌地帯に生息する植物より単離したアルミニウム耐性菌について

○相澤朋子<sup>1</sup>, 木本健一郎<sup>1</sup>, Nguyen Bao Ve<sup>2</sup>, 佐々木恵彦<sup>3</sup>, 鈴木健一郎<sup>4</sup>, 中嶋陸安<sup>1,3</sup>, 砂入道夫<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>日大・生物資源科学, <sup>2</sup>CanTho 大・農学, <sup>3</sup>日大・総合科学研究科, <sup>4</sup>NBRC

東南アジアには pH 1.5 ~ 4 を示す酸性硫酸塩土壌 (AASS) が広く存在する。AASS では、強酸性だけでなく、酸性により溶出する  $Al^{3+}$  や重金属の毒性、土壌中のリン酸がアルミニウム、鉄などと結合し不溶化することによる低リンストレス、窒素固定菌の活性低下などが複合して植物の生育阻害が起こり、環境が荒廃するとともに、特に人口密集地であるアジア地域では食物生産の観点からも問題となっている。

AASS の諸問題を挙げていくと、生物、特に植物にとって非常に過酷な環境であり、あたかも AASS は不毛の大地のように思われる。しかし、限られた種類ではあるが植物が繁茂しており、これら植物およびその共生微生物は、様々な方法で環境に適応していると考えられる。この環境適応機能を活用するバイオリメディエーションは経済的で、かつ環境に対する負荷の少ない手法として、AASS の修復、利用に有効である可能性がある。

我々はこれまでに、ベトナム社会主義国およびタイ王国の研究機関と共同で、AASS の植生回復に応用可能な植物および共生微生物を探索してきた。本発表では、ベトナムの pH 3 以下、 $Al^{3+}$  濃度 2 mM 以上という、強酸性かつ高濃度の  $Al^{3+}$  存在下で生息する植物である *Eleocharis dulcis* および *Panicum repens* の表面に生息する微生物群集を、培養法および非培養法により解析した。非培養法による解析は 16S rDNA の V3 領域を用いた PCR-DGGE 法による微生物群集構造の解析を行い、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  プロテオバクテリアに属するものが優占して検出された。次に、これら植物表面から、アルミニウムを含む pH 3.0 の硫酸酸性培地を用いて微生物を単離したところ、アルミニウム濃度 150 mM 以上に耐性を示し、同時にリン酸アルミニウムやリン酸鉄などの不溶性リン酸の可溶化能も持つ *Acidocella* 属細菌を単離したので報告する。

本研究は、文部科学省選定 21 世紀 COE プログラム「環境適応生物を活用する環境修復技術の開発」の一環として行われ、相澤は財団法人発酵研究所 (IFO) からの助成を受けた。

## O-2 新規 D-乳酸生産菌の探索 1) D-乳酸を生成する細菌の分離

星野美奈子<sup>1</sup>, 石原宏則<sup>1</sup>, 加藤沙江子<sup>1</sup>, 鈴木 玲<sup>2</sup>, 内村 泰<sup>2</sup>, ○小玉健太郎<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>(株) 武蔵野化学研究所, <sup>2</sup>東京農大・生物応用化学科

D-乳酸は、バイオマスからのプラスチック特にポリ D-乳酸とポリ L-乳酸から構成されるステレオコンプレックスの原料として、また農薬の原料としての需要が高まっている。しかし、D-乳酸を生成する微生物の種類は少なく、これらの培養には高価な酵母エキスやペプトンが必要とされている。そこで、酵母エキスやペプトンを削減した培地で、効率良く D-乳酸を生産する細菌を自然界に求めた。

分離試料には、主に東北、関東地方で採取した植物根、芋、球根等を供試した。分離は、分離試料に付着している土壌を振り落としした後、その 100 ~ 200 mg を集積培地 (デンプン溶性 10 g, 酵母エキス (Difco) 5 g, トマトジュース (カゴメ) ろ液 50 ml, サイクロヘキシミド 10 mg, 蒸留水 950 ml, pH 6.8) 8 ml に入れ、嫌気条件下で 30°C, 3 日間の集積培養を行った。集積培養後、集積用の培地に炭酸カルシウム 2.5 g と寒天 20 g を添加した培地を用い、純化を行った。分離した株の生産する乳酸の旋光性は、分離株をグルコース 30 g, 酵母エキス 5 g, トマトジュースろ液 50 ml, 炭酸カルシウム 15 g, 蒸留水 950 ml, pH 6.8 の培地に接種し、30°C で 3 日培養後、遠心上清について HPLC で測定した。また、D-乳酸を生成した株の初期評価は、酵母エキス 5 g, 硫酸マグネシウム 200 mg, 硫酸マンガン 10 mg, 硫酸第一鉄 10 mg, 塩化ナトリウム 10 mg, 蒸留水 1,000 ml, pH 6.8 を基本培地とし、炭素源とその量、炭酸カルシウム量を変え培養、生産された D-乳酸量から行った。

288 点の試料を分離に供試し、8 株の D-乳酸生成菌を得た。これらは、胞子を形成するグラム陽性の桿菌であった。16S rRNA の遺伝子塩基配列に基づいた分子系統解析では、*Sporolactobacillus* 属に属したが、複数のクラスターに分かれた。また、生産された D-乳酸量は菌株間で大きく異なった。この中にはグルコースから多量の D-乳酸を生産する株や液化コーンスターチを発酵する株があり、これらの株については高次の評価を実施することにした。

### 0-3 新規 D-乳酸生産菌の探索 2) *Sporolactobacillus* 属の新種について

○鈴木 玲<sup>1</sup>, 内村 泰<sup>1</sup>, 星野美奈子<sup>2</sup>, 小玉健太郎<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東京農大・生物応用化学科, <sup>2</sup>(株)武蔵野化学研究所

*Sporolactobacillus* 属は、一般的にホモ発酵を行う有胞子乳酸菌として知られ、現在、6種2亜種で構成されている。

われわれは工業利用に向けた D-乳酸生産菌探索の結果、288 試料から 8 株の D-乳酸生産菌を分離した。16S rRNA 遺伝子塩基配列系統解析の結果、これら分離菌株は *Sporolactobacillus* 属内に位置した。分離菌株 8 株のうち 6 株は、既知種基準株と 16S rRNA との相同性も高く、系統的に近い場所に位置した。しかし、分離菌株 MB-025, MB-051 株は既知種基準株とそれぞれ系統的に異なる場所に位置した。本属種基準株との 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性はそれぞれ 97.3-99.1%, 95.5-96.4% であり、系統的位置とあわせると新種の可能性が考えられた。そこで、分離菌株 MB-025, MB-051 株の分類学的位置を明らかにすることにした。

分離菌株 2 株の G+C 含量 (mol%) 測定、入手することができなかった *Sporolactobacillus lactosus* を除く *Sporolactobacillus* 属種基準株との DNA-DNA 相同性試験、表現性状ならびに生理・生化学的試験を行った。DNA-DNA 相同性試験の結果、*Sporolactobacillus* 属種基準株とは、ともに 70% 以下の低い値を示した。また、*Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* と *S. nakayamae* subsp. *racemicus* の DNA-DNA 相同性も 70% 以下であった。表現性状・生理生化学的試験において、分離菌株は属特異的性質を示したが、種を区別するための性状は見出せなかった。さまざまな条件下での D-乳酸生産量は、種間に差が認められたことより、種もしくは菌株レベルでその差があると考えられる。

DNA-DNA 相同性の結果より、分離菌株 MB-025, MB-051 株はそれぞれ新種と同定した。さらに、*S. nakayamae* subsp. *racemicus* を *S. nakayamae* と別種とし、“*S. racemicus*”として提唱する。

### 0-4 タイ原産酢酸菌の系統的多様性

○村松由貴<sup>1</sup>, Pattaraporn Yukphan<sup>2</sup>, 高橋麻衣<sup>1</sup>, 金安美香<sup>1</sup>, Taweesak Malimas<sup>2</sup>, Wanchern Potacharoen<sup>2</sup>, 山田雄三<sup>2</sup>, 中川恭好<sup>1</sup>, Morakot Tanticharoen<sup>2</sup>, 鈴木健一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(独)製品評価技術基盤機構・NBRC, <sup>2</sup>BIOTEC, タイ

日本とタイにおける生物遺伝資源の保全と持続可能な利用のため、製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部は平成 17 年よりタイの国立遺伝子工学バイオテクノロジーセンター (BIOTEC) との間で包括的覚書を締結して共同研究を行っている。過去 3 年間の酢酸菌に関する共同研究成果を報告する。

タイ国各地で分離された酢酸菌 304 株について 16S rDNA 塩基配列を決定し系統関係の解析を行った。分離株の多くは *Acetobacter* 属, *Asaia* 属, *Gluconacetobacter* 属あるいは *Gluconobacter* 属に含まれたが、5 株は既知属から系統的に独立していることが明らかとなった。これらの株は 2 つのクラスターに分かれており、それぞれについて新属新種 *Tanticharoenia sakaeratensis*, *Ameyamaea chiangmaiensis* を提案中である<sup>1)</sup>。

*Acetobacter* 属に含まれた 17 株は、16S rDNA 塩基配列相同性から 8 つのシーケンスタイプ (AB1-8), *Asaia* 属に含まれた 68 株は 11 タイプ (AS1-11) に分かれ、*Gluconobacter* 属に含まれた 121 株は 13 タイプ (GB1-13) に分かれた。これらの中で、*Acetobacter* 属の 4 タイプ, *Asaia* 属の 2 タイプ, *Gluconobacter* 属の 4 タイプは系統的に既知種から離れていたため、新種である可能性が示唆された。すでに AS4 については新種 *Asaia lannaensis* を提案したが<sup>2)</sup>、今後は新種と考えられた他のシーケンスタイプについても順次分類学的検討を行う計画である。

これらのタイ産酢酸菌のうち 155 株は NBRC に寄託されており、既知種と近縁な *Acetobacter* 属 4 株, *Asaia* 属 65 株, *Gluconacetobacter* 属 3 株, *Gluconobacter* 属 59 株については既にオンラインカタログ上で公開している。

1) Yukphan *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. in press.

2) Malimas *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. in press.

### O-5 箱根大涌谷から分離した新規鉄還元細菌の系統分類学的研究

○山野井薫<sup>1,2</sup>, 工藤卓二<sup>1</sup>, 高品知典<sup>2</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 理研 BRC-JCM, <sup>2</sup> 東洋大学大学院生命科学研究所, <sup>3</sup> 東洋大学生命科学部

火山周辺の温泉及び硫黄孔地帯から、これまでにさまざまな好熱性微生物が分離されてきた。しかし、その多くは硫黄を代謝することが示されているのに対し、鉄を代謝する微生物としての分離例はあまり多くない。伊藤らによって神奈川県箱根・大涌谷の高温酸性土壌より MPN/PCR 法を用いて分離された IC-180 株は 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析により鉄酸化能を有する *Acidimicrobium* 属に関連した新規な好熱好酸性細菌株であることが示唆された<sup>1)</sup>。本研究では IC-180 株について系統分類学的検討及び鉄代謝能の検討を行った。

IC-180 株はグラム陽性短桿菌で、生育至適温度は 50°C、生育至適 pH は 3.0 であった。また、周毛性鞭毛を有し運動性を示した。好気条件下では、鉄化合物の存在にかかわらず従属栄養的に生育し、Fe<sup>2+</sup> の酸化は見られなかった。嫌気条件下においては Fe<sup>3+</sup> の存在下でのみ従属栄養的及び独立栄養的な生育が見られ、さらに Fe<sup>3+</sup> の減少が見られた。DNA の G+C 含量値は 73.8% であった。16S rRNA 遺伝子塩基配列についてはほぼ全塩基配列を決定し、本菌株に関する系統樹を作成した結果、IC-180 株は *Acidimicrobidae* 亜綱に位置し、本亜綱で唯一承認されている *Acidimicrobium ferrooxidans* とは 94.0% の相同性しか示さなかった。

*A. ferrooxidans* は DNA の G+C 含量値が 67 ~ 69% であり、IC-180 株と同様に好熱好酸性を示す。しかし、IC-180 株は鉄化合物酸化能を有しておらず、また Fe<sup>3+</sup> の存在下では Fe<sup>3+</sup> を利用して嫌氣的に生育することなどから、*A. ferrooxidans* とは異なる鉄代謝様式を持っていることが示唆された。以上の系統学的位置の関係や鉄代謝様式の相違から、IC-180 株は *Acidimicrobium* 属とは異なる新属に属することが妥当であると考えられた。

1) Itoh *et al.* (2007). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 : 2557-2561.

### O-6 アラスカ永久凍土氷楔中から分離された放線菌の新属提案

○加藤知子<sup>1</sup>, 片山泰樹<sup>1</sup>, 田中みち子<sup>1</sup>, 富田房男<sup>2</sup>, 浅野行蔵<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北大院農, <sup>2</sup> 放送大学北海道センター

当研究室では、アラスカ永久凍土中の 2 万 5 千年前の氷楔から、多くの真正細菌を単離した<sup>1)</sup>。氷楔分離株のうち、AHU1791, AHU1810 の 2 株は、好気性、無芽胞のグラム陽性桿菌で、-5°C ~ 25°C で生育する低温菌であった。また、極鞭毛を有し、運動性があった。

16S rRNA 遺伝子全長配列に基づく系統解析を行った結果、これらの分離株は *Microbacteriaceae* 科において、既存の 25 属とは明らかに独立したクラスターを形成した。この 2 株の 16S rRNA 遺伝子配列は、*Agreia pratensis*, *Subtercola boreus* との相同性が最も高く、それぞれ 95.9% 及び 95.7-95.8% であった。また、DNA の G+C 含量は AHU1791 が 65.3 mol%, AHU1810 が 65.4 mol% であった。

細胞壁ペプチドグリカン は B2 $\gamma$  型で、キープアミノ酸としてジアミノ酪酸を有していた。*Agreia* 属及び *Subtercola* 属細菌ではペプチドグリカン を構成するグルタミン酸がヒドロキシ化されているのに対し、氷楔分離株のグルタミン酸はヒドロキシ化されていなかった。主要メナキノン は AHU1791 では MK-12 及び MK-13, AHU1810 では MK-11 及び MK-12 であった。主な脂肪酸組成は 2 株共に *Agreia*, *Subtercola* のものとは異なり、さらに *Agreia*, *Subtercola* には存在する 1,1-ジメトキシアルカンを持たなかった。

以上の結果から、分類指標となる細胞成分も、系統的に最も近縁な *Agreia* 属, *Subtercola* 属のものとは明らかに異なり、この 2 株を新属・新種であると判断した。*Glaciibacter superstes* (基準株 AHU1791) として命名提案している。

1) Katayama *et al.* (2007). *Appl. Environ. Microbiol.* 73 : 2360-2363.

### O-7 緑藻ボルボックス目 *Eudorina unicocca* に関する分類学的再検討

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

<sup>1</sup> 東大大学院理学系研究科, <sup>2</sup> 東邦大学・理学部

*Eudorina* 属は *Volvox*, *Pleodorina* などとともに雌雄の配偶子が分化した異型配偶・卵生殖の有性生殖を行うことを特徴としている。一方 *Yamagishiella* は Nozaki and Kuroiwa (1992) によって設立された属で, *Yamagishiella unicocca* 1 種を含む。本属は, 栄養形態は *Eudorina* と類似するが同型配偶の有性生殖で異なり (Nozaki and Kuroiwa 1992, Phycologia), 分子データによっても両属は識別される (Nozaki *et al.* 1997, J. Phycol.). 特に *Eudorina unicocca* はピレノイドを 1 個持っており, 栄養形態では *Y. unicocca* との識別ができない。Goldstein (1964, J. Protozool.) が *E. unicocca* として同定した無性的に休眠胞子を形成する有性生殖が不明の株があるが, これらは分子データもなく, *Yamagishiella* である可能性も考えられる。しかし, これらの株は保存されておらず, 属レベルの同定を検証することができない。従って, 栄養形態で *E. unicocca* または *Y. unicocca* と同定される生物群のより明確な形態的認識と自然な種レベルの分類体系の確立のためには新たな株, および分子系統解析結果に基づいた新たな識別形質の探索が必要である。

最近, 神奈川県相模湖および津久井湖より分離・培養した株から, 栄養形態では *E. unicocca* または *Y. unicocca* と同定できるものが得られた。本研究ではこれらの株の詳細な比較形態観察と分子系統解析に基づいて分類学的研究を行った。神奈川県産の株の群体は回転楕円形で, 32 個または 16 個の等長 2 鞭毛型の細胞が寒天状基質の中に中空の構造として配列している。細胞表面に多数の収縮胞をもつ。葉緑体は大きな杯状で, 底部に大きなピレノイドを基本的に 1 個もつ。メチレンブルーで染色すると群体の細胞間に仕切り構造が明瞭となる。有性生殖が観察されず, 無性的に休眠胞子を形成した。

本藻は葉緑体に大きなピレノイドを 1 個もつ点で, *Y. unicocca* または *E. unicocca* と同定されるが, 有性生殖が不明のため形態的同定ができなかった。従って, *rbcL* 遺伝子を用いた分子系統解析を実施した結果, Goldstein (1964) の用いた *E. unicocca* 3 株とともに単系統群を形成したので, *E. unicocca* として同定した。さらに *E. unicocca* の内部で, 群体の仕切り構造の有無と一致する 2 つの系統が示された。また, 核コード ITS 領域配列の解析も両者の系統的独立性を支持した。同様の仕切り構造は *Pleodorina* でも種レベルの識別基準となっている (Nozaki *et al.* 1989, 2006)。従って *E. unicocca* の 2 つの系統はそれぞれ別種とすべきであると結論された。また, 多くの株を比較形態学的に調査した結果, 細胞の収縮胞の数と分布が *Eudorina* と *Yamagishiella* の識別基準に示された。

### O-8 ヤリミドリ属 (緑藻綱オオヒゲマワリ目) および近縁鞭毛藻類の属階級の分類学的再検討

○仲田崇志<sup>1,2</sup>, 野崎久義<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東大大学院・理学系研究科, <sup>2</sup> 慶応義塾大学先端生命科学研

緑藻綱オオヒゲマワリ目 (*Volvocales*, *Chlorophyceae*) は主に淡水産の鞭毛藻類からなり, 1000–2000 種を含む多様性の高い群であるが, その分類体系と分子系統との矛盾が問題になっている。近年, 培養株を用いて分子系統と微細構造などを比較することにより種階級の分類は進展しているが, 種より上位の科や属のレベルでは研究が遅れている。本研究では特に紡錘形の細胞形態を持った生物に着目し, その代表であるヤリミドリ属 (*Chlorogonium*) およびヤリミドリ属に近縁な紡錘形藻類 (併せてヤリミドリ様藻類とする) の分類学的再検討を行った。研究にはヤリミドリ様藻類の培養株を用い, これらは国内外の培養株保存機関から入手もしくは野外より分離したものである。ヤリミドリ様藻類の系統的位を明らかにするに当たって, これまでのオオヒゲマワリ目の分類は系統を反映していなかったことから, まずデータベース中よりオオヒゲマワリ目の 18S *rRNA* 遺伝子配列を網羅的に収集し, その系統解析に基づいてオオヒゲマワリ目内部の複数の系統群を識別した。そして各系統群は PhyloCode に基づき定義された。さらに系統解析の結果, 全てのヤリミドリ様藻類が *Caudivolvox* と命名した系統群に含まれることが明らかとなったため, この群について 18S *rRNA*, *rbcL* および *psaB* 遺伝子の結合系統解析を行った。その結果, ヤリミドリ様藻類が 6 以上の系統群からなることが示された。さらに光学・蛍光・電子顕微鏡を用いた形態比較を行ったところ, それぞれの系統群は栄養細胞の色素体の様式 (葉緑体か白色体か), 収縮胞の数と配置, ピレノイドの個数, ピレノイドに陥入するチラコイド膜の有無と形態, ピレノイドを包むデンプン鞘の形態, 眼点の顆粒の層の数, ミトコンドリアの配置, などの特徴に着目することで互いに識別可能であることが明らかとなった。これらの結果に基づき, ヤリミドリ属などの紡錘形藻類は 8 属へと再整理することが妥当であると考えられた。

### O-9 イタドリ葉内に生息する糸状菌相の解析

○黒瀬大介<sup>1</sup>, 井上優子<sup>1</sup>, 古屋成人<sup>1</sup>, 松元 賢<sup>1</sup>, D.H. Djeddour<sup>2</sup>, H.C. Evans<sup>2</sup>, 土屋健一<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>九大院農, <sup>2</sup>CABI Europe-UK

西欧や北米では、日本起源のタデ科植物であるイタドリが大繁殖し重大な被害を与えており、我々は本雑草を生物的に防除するための研究を国際生物的防除研究所（CABI Europe-UK）とともに展開している。研究の過程でイタドリ葉には植物病原菌を含む多種多様な糸状菌が生息することが明らかとなったことから糸状菌相の解析を行った。

まず、イタドリに寄生性を示す糸状菌として5種の病原菌が認められ、このうち2種のさび病菌（*Puccinia polygoni-amphibii* var. *tovariae* Arthur, *Aecidium polygoni-cuspidati* Dietel）および1種の斑点病菌（*Mycosphaerella polygoni-cuspidatii* Hara）が、日本のイタドリ群落に優先的に分布していることを明らかにした。これら3種の病原菌は、本雑草が侵入して150年しか経過していない英国のイタドリ群落には分布していないことが明らかとなった。

次に表面殺菌した健全葉から内生糸状菌の分離を試みたところ、日本産イタドリ葉内には多くの糸状菌が年間を通じて生息していることが明らかとなった。一方、英国産イタドリ葉内からは全く糸状菌が分離できない群落の存在が認められ、イタドリ葉内に生息する糸状菌には両国間で顕著な差異があることが推察された。そこで両国において複数の調査地点から分離した総計279菌株について、それらの形態的特徴ならびにrDNA-ITS領域の塩基配列の情報に基づき同定を行い、糸状菌相の解析を行った。その結果、日本産イタドリ葉からは常に内生糸状菌が分離され、それらは10属以上に及び、*Phomopsis* 属菌や *Colletotrichum* 属菌、*Pestalotiopsis* 属菌が優先進種であることが示された。一方、英国産イタドリ葉からの糸状菌分離頻度は約60%であり、その属数は日本産のそれと比較すると著しく少ないことが明らかとなった。また英国産イタドリ葉内に生息する糸状菌の多様性は、郊外からの試料で都市部のそれより大きい傾向が認められた。さらに、英国産糸状菌株においては *Colletotrichum* 属菌や *Phomopsis* 属菌、*Phoma* 属菌の分離頻度が高かった。以上のようにイタドリ葉と分離される糸状菌との間には共進化的な関係が深く関与していることが推察された。

### O-10 DMSO と糖類の凍結保護剤としての効果の相違について

○百瀬祐子, 丸山明彦, 山岡正和  
 (独) 産総研・特許寄託センター

【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、凍結保存の効率を向上す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* (BY4743) を用いて、凍結保護効果の見られた trehalose と DMSO について、凍結に対する効果を検証した。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の相違について報告する。

【材料と方法】対数増殖期 (A660=1.0) の酵母を、DMSO (0.2 M, 1 M) と trehalose (0.125 M, 0.25 M, 0.5 M) に置換し、-1°C/min で -80°C 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調べた。

【結果と考察】DMSO と trehalose をそれぞれ凍結前に BY4743 株に処理したところ、DMSO 1 M と trehalose 0.5 M がコントロールに比べて高い生存率を示し、遺伝子発現解析ソフト GeneSpring および SGD (*Saccharomyces genome database*) の GO slim mapper によって解析した。DMSO, trehalose どちらも ribosome biogenesis and assembly の遺伝子、細胞膜の脂質である ergosterol の合成系の遺伝子が共通に誘導され、Glycerol metabolism and transport の関連の遺伝子では生合成系が誘導、分解系が抑制され、cosmopolite であり、細胞内の蓄積が凍結耐性に関連するとされている Glycerol や proline の細胞内蓄積を示唆するような遺伝子の誘導や抑制も見られた。

また、DMSO では methionine 合成、細胞膜への ER を介したタンパク輸送、また、trehalose ではリボゾームタンパク質の合成は少なく、rRNA, tRNA の合成、修飾やクロマチンのサイレンシングや胞子の細胞壁に関する遺伝子などが誘導され、2つの保護剤の誘導する遺伝子には共通部分も多いが、部分的に相違があることが判明したのでこれを報告する。

ポスター発表

**P-1 NBRP・ナショナルバイオリソースプロジェクト藻類—活動と展望**

○笠井文絵<sup>1</sup>, 川井浩史<sup>1</sup>, 井上 勲<sup>3</sup>, 中山 剛<sup>3</sup>, 石田健一郎<sup>3</sup>, 山岸隆博<sup>2</sup>, 平林周一<sup>1</sup>, 田辺雄彦<sup>1</sup>, 河地正伸<sup>1</sup>, 渡邊 信<sup>3</sup>

<sup>1</sup>国立環境研・生物, <sup>2</sup>神戸大・内海域環境教育研究セ, <sup>3</sup>筑波大・生命環境科学

「藻類」は、酸素発生型の光合成を行う生物から陸上植物を除いたものと定義されている。この定義が示すように、「藻類」は原核生物、植物、原生生物など広範な生物がもつ遺伝的要素を含んでおり、生息域も多様であり、きわめて多彩な生物的機能が期待される生物群である。藻類を用いた研究では、多くの場合、培養株を必要とする。そのためには専門化集団による体系的な収集、保存、および提供体制を構築し、研究開発を行う研究者が、研究材料となる培養株に容易にアクセスできる体制の整備が必要である。

ナショナルバイオリソースプロジェクト第1期（平成14～18年度）では、藻類リソースについては国立環境研究所が中核機関となり、神戸大学、筑波大学、国立科学博物館、東京大学、北海道大学の5機関がサブ機関として参加した。最終的に東大IAMコレクションの微細藻類株が中核機関に、北大の大型海藻株が神戸大に寄託され、それぞれ微細藻類および大型海藻の保存・提供体制が整った。

第2期（平成19～23年度）では、国立環境研が引き続き中核機関となり、神戸大学（大型海藻の収集・保存）と筑波大学（重要種の収集と分類学）がサブ機関として参加し、新たな重要種の収集に加え、ゲノムDNAの収集・提供、保存株の付加価値の向上と情報整備、品質管理体制の整備を行い、世界最高水準の藻類リソース整備をめざす。また、国内およびアジアにおける藻類リソースネットワークの中核としても活動する。

第2期1年目の平成19年度は、約150株のゲノムDNAを抽出し、世界各地の藻類コレクションが協力して推進しているプロテスタのバーコードプロジェクトに提供した。また、ゲノム解読が終了した有毒アオコ形成シアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* NIES-843株のゲノムDNAを抽出し、提供に資するために保存した。

**P-2 NIES コレクション：2007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および原生動物の収集・保存・分譲業務を行ってきた。本発表では2007年度の本施設の活動内容について報告し、併せて2008年度以降の活動計画等について紹介する。

現在の公開株数は、2008年3月現在で2,099株であり、このうち微細藻類は1,794株、絶滅危惧種藻類は305株である。また、昨年3月に東京大学IAMカルチャーコレクションより移管された株のうち199株が含まれている。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：藍藻（616株）、灰色藻（7株）、紅藻（275株；うち251株は淡水産大形紅藻）、クリプト藻（47株）、黄金色藻（1株）、ラフィド藻（6株）、ディクチオカ藻（6株）、珪藻（54株）、褐藻（1株）、黄緑色藻（6株）、真正眼点藻（4株）、ペラゴ藻（5株）、ピングイオ藻（2株）、シゾクラディオ藻（1株）、クリソメリス藻（1株）、所属不明不等毛藻（2株）、プリムネシウム藻（51株）、パプロバ藻（8株）、渦鞭毛藻（96株）、ミドリムシ藻（9株）、クロラクニオン藻（2株）、ブラシノ藻（58株）、ペディノ藻（3株）、アオサ藻（10株）、トレボウキシア藻（108株）、緑藻（415株）、車軸藻（210株；うち54株はシャジクモ類）、原生動物（門）（19株）。2007年度の方譲は3月半ば時点で233件603株であった。

NIESコレクションでは、最新の株情報へのアクセスをより容易にするため、2008年度初めにHPの大幅な改訂を行ない、オンラインで株情報の検索や分譲依頼の申し込みを行なうことのできる体制を整えた。また近日中に4年ぶりとなる保存株カタログの出版を予定している。これらのことを通じてコレクションや保有株への認知度が高まるとともに、結果として分譲件数・株数の増加につながるものと期待している。

### P-3 NBRP 酵母遺伝資源センターとしての活動

○金子嘉信, 多田 晶, 原島 俊  
阪大・大学院工学研究科生命先端

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻での微生物保存事業のルーツをさかのぼると1917年頃に大阪高等工業学校時代の学生実験に使用していた微生物株の保存にたどりつく。正式な保存事業の始まりは1929年南満州鉄道中央研究所の保存株を主としたもので、1953年には再整備されて日本微生物株保存機関連盟の一員として活動し、現在も保存菌株の種類は変わりながらも事業の継続を行っている。2002年7月からは文科省ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)に大阪市立大学理学研究科を中核機関とした酵母の収集・保存・提供事業に採用され、2007年4月からNBRP第2期にも引き続き採用された。現在はこのNBRP事業が主とした活動であり、出芽酵母を担当した酵母遺伝資源センターの状況を紹介する。2008年2月末でその出芽酵母リソースの保存は菌株が約12,000株で、DNAが約2,500クローンとなっている。このうち、菌株約9,500とDNA約1,400はNBRP情報センターの協力によりインターネットで情報公開しており、Webページ(<http://yeast.lab.nig.ac.jp/nig/>)にアクセスして、利用者による検索および提供の申込が可能となっている。出芽酵母の細胞周期関連変異株を始めとした各種突然変異株や出芽酵母ベクターおよび出芽酵母クローン化遺伝子などのリソースを保存している。2007年度の提供は2月末で136件に達し、送付したリソース数は505(菌株272, DNA233)であった。リソース提供時にユーザー登録をしてもらい、登録ユーザーにはリソースの更新情報を発信することも2007年10月から開始した。

### P-4 NBRP・病原性細菌保存機関からのメッセージ—研究・教育に活用して下さい&永久保存のためにデポジットしてください—

○余 明順<sup>1</sup>, 本田武司<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 阪大・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, <sup>2</sup> 阪大・微生物病研究所感染症国際研究センター細菌感染分野

当施設では、感染症研究・教育に必須の材料である病原微生物のうち、病原性細菌の収集・保存・分与を行っている。分離時期・分離地域などに関して系統的な収集、エマージング・リエマージング感染症の集団あるいは散发事例からの菌株収集、興味ある論文発表(ゲノム解析を含む)からの個別収集、院内感染事例からの収集等感染症の研究に将来ともに必要と思われる菌株を広くカバーできるような方向で収集を進めている。また、研究室や検査室では研究に使用している菌株、患者から分離された菌株を保存しているが、責任者の交替によってこれらの菌株の保管が困難になったり(そのために処分されることも多々ある)、あるいは責任者が交替しなくても、昨年の感染症法改正に伴って生じた規制をクリアすることが困難なため、保存を維持できなくなり放棄するという例も見受けられ、文科省の認可を受けた菌株保存施設であり、NBRPの支援を受けている当施設では、これらの受け皿になるべく、積極的に譲り受けている。

収集した菌株については、入手した情報をもとに、性状確認(生化学的性状のみならず、血清型別、病原因子等)を行い、必要な情報を添付してリストを作成し、ホームページに公開している。

保存のための届け出や申請が必要とされない4種および指定外の病原体であっても、的確に(死滅・変性させず、尚且つバイオセーフティ・バイオセキュリティを考慮して)永久保存することや、分与依頼に対して適正な方法で輸送することは、煩雑且つ経費の負担が大きいことを考えると、貴重な菌株は永続性のある保存機関にデポジットすることが得策と考えられる。

分与サービスに関する要望(リストに加えてほしい菌株等)とともに、デポジットの申し出をお待ちしています。

### P-5 NBRP・病原性原虫の収集、保存、提供基地としての長崎大学熱帯医学研究所

○柳 哲雄, 丈下真紀, 安波道郎, 平山謙二

長崎大熱帯医学研ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)・病原微生物・原虫株班

単細胞生物である原生動物には自然界で自由生活する種類と動物やヒトに寄生するのがあるが、後者の方を一般に原虫と呼んでいる。その寄生原虫には宿主に対して障害を与える種類とそうでないのがあり、前者を病原性原虫と呼び、マラリア原虫や赤痢アメーバ原虫がその一例である。後者には大腸アメーバ原虫やディスパー・アメーバ原虫などがあり、寄生はするものの非病原性である。一般に病原性原虫は宿主組織に対して侵襲性がある。



真核生物である原虫は1個1個の細胞が一個体であり、外界の環境に対する適応、栄養、増殖などの個体として備えていなければならない機能を一細胞がすべて保有している点で単細胞でありながら細胞として高等複雑化している。たとえば、マラリア原虫には昆虫の蚊と、ヒトを含めた哺乳動物に感染する二つの生活場所があり、両者を巡る間にマラリア原虫が生活する環境は大きく異なるため、形態一つをとってみてもめまぐるしく変化させるし、栄養の摂取方法も生理も両者間で異なり、さらに蚊と動物体内で無性生殖と有性生殖をそれぞれにこなしてしまう。

高等動物の組織を形成する細胞はすでに分化しきっており、活動している遺伝子は限局しているのに対し、原虫は1個の細胞ですべての機能を果たす必要があり、遺伝子はつねに活性化可能な状態にある。幹細胞もしくは万能細胞が今後の可能性を秘めた状態であるのに対し、原虫はその可能性を現在具現化している、もしくは表現しているといえる。再生医療では幹細胞や万能細胞は今後さらに注目を集め、応用段階へと進むが、原虫にも遺伝子レベルで万能細胞と似かよったところがあり、研究材料として目を向けられるだろう。

当研究所内にはNBRP病原微生物原虫株班の事務所を置き、国内の医療研究機関や医学教育機関が保有し、しかも分与提供が可能な病原性原虫株の有無を各機関へ照会し、それらの情報を収集してウェブサイトに公開している。また、熟研内にもマラリア原虫、アフリカ・トリパノソーマ原虫、アメリカ・トリパノソーマ原虫、内臓リーシュマニア症原虫、皮膚粘膜リーシュマニア症原虫、腸管内寄生アメーバ原虫、トリコモナス原虫、トキソプラズマ原虫など多岐にわたり保存しており、研究材料や教育のために要望があれば、それらを提供するサービス業務をおこなっている。最近の例としてたんぱく質発現用に原虫を使用したいという要望があり、ランブル鞭毛虫のDNAを提供した。また、寄生虫学教室の後継者不足から原虫株を今後保存維持できない場合は、当方へ原虫株を移送し、保存と提供の代行業務もおこなう。当原虫株班では医療機関や上水道事業者からの原虫感染症や原虫の検査診断の依頼にも対応している。原虫株の収集は国内だけに限らず、海外へ定期的に赴き、原虫感染症の流行地での患者からの新鮮株の分離もおこなっており、これら新鮮分離株の提供にもすぐさま対応している。

#### **P-6 NBRP・ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」—真菌・放線菌**

○田中玲子, 亀井克彦, 五ノ井透, 横山耕治, 矢口貴志, 三上 襄

千葉大・真菌医学研究センター・高分子活性分野

【研究目的】細胞性病原微生物（細菌、放線菌、真菌、原虫）による感染症の教育、研究とバイオテロ対策の基礎研究のための基盤としてそれら菌株の収集・保存・遺伝資源化をはかり、データベース (<http://pathogenic.lab.nig.ac.jp/db/index.jsp>) を構築し、菌株供給体制を整備することを目的としている。

【概要】微生物及び感染症の研究には、本来の性質や病原性を維持した菌株を用いることが必須であり、また、遺伝子資源や有用物質探索といった観点からも菌株保存の重要性はますます高まっている。当センターでは、腐敗研究所、生物活性研究所、真核微生物研究センターといった幾多の変遷を経ながら、一貫して病原真菌と病原放線菌の研究を主要な研究テーマの一つとしており、そのコレクションは当センターの特色の一つとなっている。事実、当センターの病原真菌コレクションは、我が国随一であるのみならず、この種のものとしては欧米各国の代表的微生物保存機関と充分比肩し得る存在といえる。保存されている菌株には、日本国内に限らず、中国、台湾、韓国、タイ、南北アメリカ大陸、北ヨーロッパなど世界各地の患者あるいは環境から分離された菌株も含まれており、ごく一部の特殊な菌種を除けば、事実上、病原真菌のすべての菌種が揃っているといっても過言ではない。このような実績が認められ、当センターは、2002年に文部科学省による「National Bioresource Project—病原微生物」の中核的機関となり、真菌・放線菌の遺伝資源保存施設として各方面を支援している。

#### **P-7 NBRP・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、病原細菌の系統保存と教育・研究支援**

○江崎孝行, 大楠清文

岐阜大・大学院医学系研究科

【現状】第2期ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)の支援の中でGTC(Gifu Type Culture Collection)の今後の活動目標を紹介する。第2期NBRPでは感染症法のもとで病原体のカルチャーコレクションの今後のあり方が問われている。岐阜大学の場合、菌株保存施設はなく、微生物学講座の研究活動の一つとして菌株を保有、分譲サービスと行っているため、保存分譲の専門の職員がいない状況でサービスを行っている。そのため設備も大学からスペースを賃貸をうけて使用しており、恒久的な保存機関ではない。研究室では2種、3種

および4種の細菌性病原体のほとんどを保有し、研究・教育活動に利用してきたが、感染症法の改正に伴い、法律に指定された病原体が約3000株が法律の監視下にある。指定病原体以外では15000の保有株が保存されており、歴史的には1950年代から前任の鈴木祥一郎教授、および藪内英子教授が保存蓄積してきた菌株で分類学的にも貴重な標準株が保存されている。

【保存株の遺伝情報の蓄積と再保存】研究室に保存されている菌株は、各時代の分類方法で菌名が決定されているため、保存株の情報を最新の遺伝子情報に基づいて16S rDNA, dnaJ 遺伝子情報を蓄積している。第二期NBRPの支援下でも、この作業は推進していくが、第二期NBRPが終了する5年後には独立採算で活動ができるように体制を整備することが要求されている。GTCの現状では国の支援なしには存続が不可能なので下記の対策をとり、NBRP終了後の体制に備えている。

【危険分散と供給のための凍結乾燥の促進】GTC保有株の多くは凍結保存であり、これらの株を凍結乾燥保存に切り替え、菌株の維持ができなくなった場合の対応を準備している。感染症法の指定病原体や疾病類系にリストされた病原体の凍結乾燥作業は従来、危険を伴うため十分な推進ができなかった。NBRP第2期の初年度の支援で、完全に密閉方式の全自動凍結乾燥装置を導入することができ作業が加速されると期待している。

【菌株の分譲と利用促進】2種、3種病原体の実験にあたっては菌株を使った実験の届出、分譲では輸送の届出があるため、スムーズに分譲活動ができにくくなったので、現状では分譲活動は体制の整理が完了するまで一時的に中止、その代わりに、当面、利用促進を図るため、共同利用場所の提供とDNAの供給サービスを開始する。この作業の対象となる病原体は：炭疽菌、類鼻疽菌、鼻疽菌、野兎病菌、ペスト菌、多剤耐性結核菌、チフス菌、ボツリヌス菌など2種、3種病原体が中心となる。研究者が菌株を入手する場合、多くは基準株、血清型の標準株、病原因子保有株、あるいは弱毒株等であるが、現在のNBRPのデータサーバーからの情報量ではこれらの情報を十分な搭載できない。そこで研究室独自のデータサーバーを立ち上げ、属レベル、菌種レベル、株レベルで細かい情報を公開し、利用促進をおこなう計画でいる。時に弱毒株の情報は教育機関には重要で、感染症法のもとで安全に実験ができる菌株の整備と供給を行う体制を重点的に整備する。

#### P-8 NBRP・BRC-JCMにおけるバイオセーフティレベル2 (BSL2) 株の収集・保存・提供業務について

○小迫芳正, 辨野義己

(独) 理化学研究所バイオリソースセンター

新興感染症や再興感染症の出現によって社会ではバイオセーフティレベル2 (以下、BSL2) 株への関心が高まっている。理化学研究所微生物系統保存施設 (JCM) は1980年に設立され微生物の収集・保存・提供業務を行ってきた。2003年に理化学研究所において微生物等取扱規定が発効し、JCM内における病原体の取り扱いが明確化された。2004年には「健康」と「環境」の研究に資する研究基盤用微生物の収集・保存・品質管理・提供業務遂行のために理研バイオリソースセンター JCMとして再出発し、本格的にBSL2株の提供を開始した。

2005年からは微生物株の寄託および提供時にMTAを導入し、さらにBSL2微生物株の誓約書を提供の際の必須書類とした。2007年8月には品質マネジメントシステムの国際規格となるISO 9001を取得し、その手順書の中にBSL2微生物株の収集・保存・提供業務について明記した。我々はBSL2株を網羅的に収集し提供できる機関となるべく努力している。

BSL2株は通常の寄託での収集の他に著名な医学微生物学者の貴重な微生物株の大量寄託また提供することで社会に貢献できるような微生物株を積極的に収集している。

その保存方法は主に凍結および凍結乾燥であるが、*Enterobacteriaceae*に属する菌株など室温保存可能な微生物株は室温でも保存している。2008年3月現在で約2000株のBSL2微生物株を保存・提供している。

提供の際は誓約書で提供が可能か否かを判断している。すなわち、提供先に微生物の取扱いと管理に関する規定があり、かつ提供先の微生物等安全管理委員会が当該菌株の使用を承認しているか、取扱者のBSL2株取扱い経験年数および取扱ってきた菌種名を記入の上、安全キャビネットとオートクレーブの所有等を確認した上で提供している。

昨年よりBSL2菌株のゲノムDNAを提供することを可能とした。現在8株のゲノムDNAを提供しており今後提供依頼に従って提供菌株数を増加させていく予定である。

本学会では理研バイオリソースセンター JCMにおけるBSL2微生物株の収集・保存・提供業務における課題を明らかにする。

## P-9 NBRP・微生物リソースの移転に関わる問題点—理研バイオリソースセンター JCMの Material Transfer Agreement (MTA) の実績から

○高島昌子, 辨野義己

(独) 理化学研究所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、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。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。平成19年度までの3年間に約800件の「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」の締結を行った。また約2000件の「生物遺伝資源提供同意書」のもとで提供を行った。

同意書の締結に関しては研究コミュニティの間で理解を得たが、一方、いくつかの問題も明らかになってきた。そのひとつはカルチャーコレクションの間で微生物材料の機関間の交換である。現在のところ、理研BRC-JCMはカルチャーコレクションの交換は従来どおりキュレーター間のメールや手紙のやり取りでこれを行っているが、知的財産権に対する取り扱いが機関によって異なるため、JCMから他機関に機関間交換として移転した場合に、JCMと寄託者の間に締結したMTAでの知的財産権の保護が他機関では必ずしもそのままの形で伝わらない可能性がある。そこで、現在、JCMでは機関間交換におけるMTAの導入を検討中である。

## P-10 (独) 酒類総合研究所遺伝子資源のご紹介

○山田 修, 三上重明

(独) 酒類総合研究所

酒類総合研究所では、酒類醸造に関係の深い微生物を中心に、糸状菌(297株)、酵母(203株)、細菌(53株)、麹菌ESTクローン(約10,000)などの遺伝子資源を保存・分譲しています。糸状菌は1950~60年代にかけて清酒・味噌・醤油の醸造現場などから収集された黄麹菌(*A. oryzae*)が中心ですが、焼酎製造に利用されている黒麹菌(*A. awamori*)の収集・充実にも努めています。また、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ます。細菌としては、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を保存しています。これらの菌株は、いずれも酒類醸造研究において貴重な菌株ですが、近年のゲノム解析の進展やバイオエタノールへの関心の高まりなどから、大学、企業など醸造関係以外の研究者からの分譲依頼が増えてきています。

保有遺伝子資源は、当研究所Webサイト(<http://www.nrib.go.jp/>)でリストを公開するとともに、糸状菌についてはジャイアントコロニーの写真や生理的性質なども掲載しています。

また、黄麹菌のEST解析、ゲノム解析には当所保存株のRIB40株が用いられたことから、麹菌EST解析データやゲノムデータをWeb上で公開しています。さらに清酒酵母の代表株である協会7号酵母や火落菌(*Lactobacillus fructivorans* H-1)のゲノム解析にも取り組んでいます。今後は、これらの清酒酵母や火落菌のゲノム解析データ等も公開していく予定であり、醸造関連遺伝子資源の総合的なデータベースの構築を目指しています。

## P-11 NBRC 平成19年度事業報告

○府川仁恵, 山崎敦史, 鬼頭茂芳, 与儀重雄, 鈴木健一郎

(独) 製品評価技術基盤機構・NBRC

NBRCの微生物系統保存事業は平成14年に財団法人発酵研究所(IFO)の事業を引き継いでから6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19年度に実施した事業と得られた成果について報告する。

### 【収集・分譲】

1) 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19年度では、その合計が41,348株(2月末現在)となった。NBRCとして公開している微生物株は14,577株である(2月末現在)。

DNA も生物遺伝資源として収集しており、ヒト cDNA クローン 約 57,000 個、微生物クローン 約 40,000 個を保存している。ユーザーの利便性を考慮し、ゲノム DNA での分譲も開始し、現在 6 株の細菌及び古細菌を対象としているが、今後追加していく予定である。

2) 微生物株分譲は国内 6,209 株、海外 440 株、計 6,649 株（2 月末現在）であった。

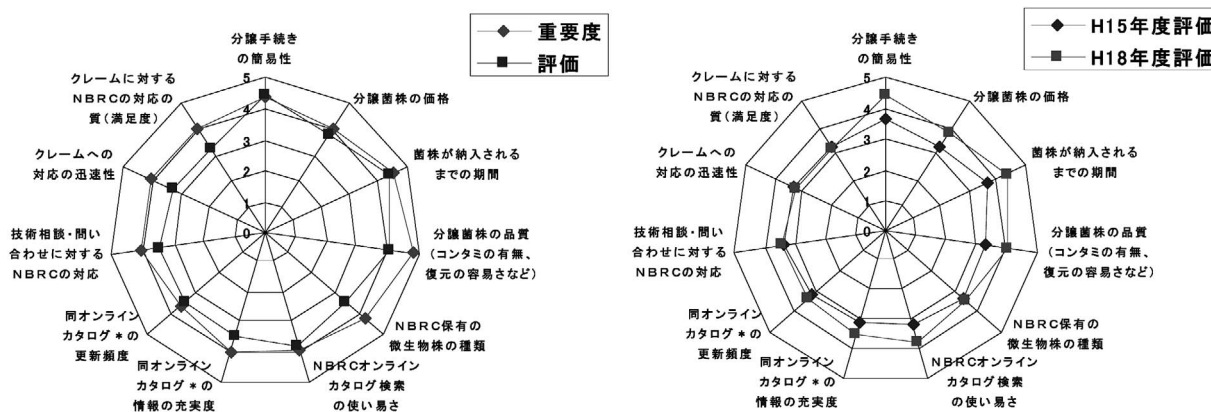
分譲業務においては、平成 19 年 11 月より 10 株以上の依頼に対し 1 割引のディスカウント分譲を開始した。

DNA についても微生物株同様に分譲業務をおこなっている。

#### 【ISO9001：2000 認証継続】

平成 18 年 12 月に品質マネジメントシステム ISO9001 の認証を取得した後、引き続き品質管理維持の向上に努めている。昨年度、顧客満足度ををはかるため、顧客に対しアンケートをおこなった結果を以下に示す。

顧客満足度調査結果



## P-12 NBRCにおけるDNAの分譲と品質管理

○藤田克利, 横山 宏, 鈴木健一朗  
(独) 製品評価技術基盤機構・NBRC

近年のバイオテクノロジー分野の研究・開発ではDNAやDNAクローンを微生物株と同様、継続的に保存・分譲する体制を整備することの重要性は増大している。NBRCでは開所以来ゲノム解析部門(NGAC)が全ゲノム解析に用いた微生物DNAクローンを分譲してきた。さらにNEDOプロジェクト『完全長cDNA構造解析』および『タンパク質機能解析・活用プロジェクト』により取得されたヒトcDNAクローンは寄託を受け分譲対象としている。現在保有しているDNAクローンの種類は、ヒトcDNAクローン約5万7千個(未公開分含む)、微生物DNAクローン約4万個である。ゲノム情報が得られる微生物には、通常の分子遺伝学や生化学の研究室では培養が難しい菌株があるため、ゲノムDNAの形での分譲を昨年秋より試験的に開始している。ゲノムDNAは今後研究者から要望の多い株を対象として追加していく予定である。また、情報については、分譲可能なヒトcDNAクローンと分譲に必要なMTAをNBRCホームページ上で提供している。さらに微生物DNAクローンは、NGACが提供しているゲノム情報データベースDOGAN(Database Of the Genome Analyzed at NITE)においても提供可能なクローン情報を検索可能としている。

保存体制としては、NBRC内部で個別チューブと96穴プレート、もしくは、96穴プレートとクローンサーバー™の組み合わせでDNAクローンを二重保管するとともに、微生物株同様にNITE東北支所にバックアップを行う地理的二重保管も実施している。

DNAクローン、ゲノムDNA共に依頼毎に調製し、品質確認後分譲しており、現在のところ遺伝子組換え体での分譲は行っていない。品質管理のための検査項目として、DNAの収量、電気泳動パターンもしくは末端シーケンスを行っており、ゲノムDNAにおいてはPCRによるrDNA遺伝子増幅も確認し、品質管理に努めている。NBRCは平成18年12月にISO9001を取得しており、これら品質管理の結果をISO基準に則り、記録・管理している。

今後引き続き、国内プロジェクトで作製されたDNAクローンを積極的に収集するとともに、NBRC独自の生物遺伝資源の整備を目指している。また随時公開される微生物DNAクローンは、DOGANとの連携を進め、研究者に利用しやすい基盤整備を行っていく予定である。

### P-13 特許微生物寄託センター (NPMD) の平成19年度業務報告

○吉田和子, 佐藤真則, 資延淳二, 小杉みどり, 小松泰彦, 居関昭夫  
(独) 製品評価技術基盤機構・特許微生物寄託センター

独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) 特許微生物寄託センター (NPMD) は、特許庁長官の指定を受け、2004年4月1日から微生物に係る発明について特許出願する際の微生物の寄託機関として、またブダペスト条約に基づく国際寄託当局 (IDA) として微生物の受託業務を行っている。そして昨年2月には、これまでの受託範囲である細菌、放線菌、古細菌、糸状菌、酵母、プラスミド、バクテリオファージに加え、新たに動物細胞と受精卵の受託を開始した。今回はNPMDの主に平成19年の業務実績について報告する。まずこれまでの年間受領件数 (平成16年は4月から12月で、平成17年以降は1月から12月まで) の推移について示す。年間受領件数開始年度の平成16年が59 (45, 14) 件、その後112 (92, 20) 件、147 (116, 31) 件となり、平成19年では184 (166, 18) 件と順調に受託件数が増加していることがわかる。なお、括弧内の数字は国内寄託、国際寄託の内訳で、前が国内寄託で後が国際寄託の受領件数である。次に平成19年度の受領件数の内訳について報告する。種別受託件数について、細菌は101 (86, 15) 件、放線菌が5 (5, 0) 件、酵母が24 (17, 7) 件、糸状菌が26 (24, 2) 件、プラスミドが6 (6, 0) 件、バクテリオファージが1 (1, 0) 件であった。また、昨年2月から受託を開始した動物細胞は21 (15, 6) 件であった。受領件数に対する種別を割合で示すと細菌が56%ともっとも高く、以下糸状菌の14%、酵母13%、動物細胞11%、プラスミド3%、放線菌3%となった。次に、形態別受領件数 (動物細胞、移管除く) については凍結乾燥 (L-乾燥) 標品が24件であったのに対して、凍結標品が127件となり8割以上の寄託が凍結でなされていた。

### P-14 農業生物資源ジーンバンク事業微生物部門 (MAFF) の2007年の活動と成果

○富岡啓介, 佐藤豊三, 青木孝之, 澤田宏之, 永井利郎, 竹谷 勝, 遠藤眞智子, 廣岡裕吏, 河瀬眞琴  
(独) 農業生物資源研究所ジーンバンク

【収集保存・特性評価】国内の大学、公設試験研究機関および企業からの寄託を含め、農林・食品産業に係る約1,130株の微生物 [細菌 (ファイトプラズマおよびマイコプラズマを含む)、菌類、ウイルス、ウイロイド、線虫および原虫] を新規登録した。2007.12.31現在、コレクション総数は24,982株 (公開率: 68%)。また、MAFF微生物株の分類学的性状のほか、動植物への病原性・拮抗性、物質生産性、薬剤感受性、環境耐性等、延べ約8,180点の特性情報を集積した。実施した公募委託課題は、①西南暖地における暗色内生菌類の採集と生態解明 (茨城大)、②西南暖地の未知植物病原性分生子果不完全菌の収集 (三重大)、③西南暖地のキクに感染するウイロイドの収集 (花き研)、④トマト青枯病菌感染ファージの特性評価 (名古屋大)。これらの成果は2009年公表に向けて取りまとめ中。なお、2008年の公募委託課題 (仮題) は、①国内産 *Pestalotiopsis* 属菌の系統分類と拮抗菌としての可能性評価 (玉川大)、②南西諸島の主要作物に発生する病原細菌の収集 (九州大)、③野菜・花卉類等の既知病害の病原の収集 (首都大)、④Phylotype決定に基づいた国内産青枯病菌株の系統再分類・インベントリー作成 (高知大)、⑤西南暖地で収集した落葉漂白菌類のリグニン分解特性の評価 (京都大)。

【ユーザーへの提供】主に国内の大学、公設試験研究機関および企業より約240件の配布申込があり、細菌 (放線菌を含む)、菌類、植物ウイルス、線虫等、約1,100点を配布した。特性情報を付与した配布株は、分類同定、物質生産・分解、遺伝子解析、病害診断・病原検出、生物間相互作用、新品種育成、薬剤感受性、農業開発・生物防除、木材耐久性・腐朽・加工、きのこ生産、生理・生態、培養・保存・増殖、発酵・食品加工等に係る試験研究・教育に広く活用された。なお、ユーザーへの情報提供の一環として、2006年公募委託課題成果等を取りまとめた微生物探索収集調査報告書第20巻 (ISSN 0915-2830) および微生物遺伝資源利用マニュアル21号・22号 (ISSN 1344-1159) を刊行し、これらを当ジーンバンクHP (<http://www.gene.affrc.go.jp/micro/publications.html>) にも掲載した。

## P-15 ISU コレクション：接合菌ヒゲカビの紹介と変異株の利用

○宮崎 厚<sup>1</sup>, 菊田恭子<sup>1</sup>, 大瀧 保<sup>2</sup>, 吉原 章<sup>1</sup>

<sup>1</sup>石巻専大・理工, <sup>2</sup>元東北大

【はじめに】ISU コレクションは、接合菌類の中でもヒゲカビ (*Phycomyces*) 野生株およびその標準株からの変異株を保存する希少なコレクションである。ヒゲカビは、いわゆる“カビ”において特に大型の種として知られ、直径約 100  $\mu\text{m}$ 、高さ 10 cm 以上にもなる直立無分枝の胞子囊柄を形成する。この胞子囊柄は隔壁のない単細胞性の多核体であるが、光や重力等に敏感に反応して屈性を示し、「刺激受容—情報伝達—応答反応」のモデルとして多くの研究に用いられてきた。また、+と-の性を持ち、一連のダイナミックな形態形成を伴う接合（有性生殖）を行うことでも知られる。

【系統の歴史的背景】大瀧の文献調査<sup>1)</sup>によると、ヒゲカビを最初に記載したのは Agardh (1817) である。彼はある油田の壁や木材の上に生育しているヒゲカビを見つけたが、緑がかった巨大な胞子囊柄を“カビ”と思わずに“緑藻”の一種として *Ulva nitens* と命名した。1823 年になり、Kunze が似た環境から同じような“緑藻”を見つけてカビであることを明らかにし *Phycomyces* 属を与えた。その後、1925 年に Burgeff は、それまで各地で使用されていたいわゆる *P. nitens* を再検討し、*P. nitens* Kunze と *P. blakesleeanus* Burgeff とに区別した。

【系統保存の変遷と特徴】現在のコレクションのほとんどは、*P. blakesleeanus* NRRL1555(-) 株由来の変異株であり、本コレクションの大きな特徴となっている。1904 年 Leonian が、Blakeslee の収集株を NRRL に移管し、続いてカリフォルニア工科大学の Delbrück の研究室で積極的に利用され、多数の変異株が生み出された。1977 年 Delbrück の定年退職に際し、文部省（当時）より系統維持費の支給が決まり大瀧ラボ（当時山形大学）にすべての菌株が移管された。その後、菌株は大瀧ラボとともに東北大学に移り、大瀧の定年退職を経て 2007 年正式に石巻専修大学に移管された。

【変異株の利用】変異株には大きく分けて、運動反応変異株、栄養要求性変異株、薬剤耐性変異株、形態的変異株等が知られる。大瀧ラボおよび宮崎ラボでは、主に形態的変異株を解析してきており、今回はミズタマカビ型変異株 *pil* の解析例を紹介したい。

【ゲノム解析と最近のトピック】ヒゲカビ研究の世界でもゲノム情報を解読するプロジェクトが発足し、2007 年 1 月には NRRL1555(-) 株のゲノムデータベースが公開された。これに前後して、大きな成果として、光屈性変異株 *madA* (PNAS, 103: 4546-4551, 2006) および性決定遺伝子座 (Nature, 451: 193-197, 2008) の遺伝子の特定が報告された。なお、前者の研究では当コレクションの変異株が利用された。

1) 大瀧 保 (1979). 系統生物, 4: 74-80.

## P-16 特性データベース管理システムの開発

梅原正道, 坪倉倫代, 山崎福容, 竹谷 勝, ○永井利郎, 青木孝之, 澤田宏之, 富岡啓介, 遠藤眞智子, 廣岡裕吏, 佐藤豊三

(独) 農業生物資源研究所・ジーンバンク (NIAS [MAFF])

農業生物資源ジーンバンク微生物遺伝資源部門では、保有する微生物遺伝資源の特性評価のためのフォーマットを 1985 年の事業開始当初から整備し、これをデータシートとして評価結果の記録に利用している。データシートの形式は必要に応じて改訂され、現在は第 5 版である。これまで、データシートの蓄積は行われてきたが、データ管理システムが未開発であったためにデータベースへの入力に滞っていた。そこで、データシートの内容をデータベースに移行し、より活用しやすい形で蓄積することを目的としてシステム開発を行った。今回は、特性データベース管理システムの概要について報告する。

植物病原性、物質生産など比較的多数（第 4 版で 69、第 5 版は 77）の特性種別の各バージョンのデータをリレーショナルデータベースで管理するため、特性種別の定義（項目名とデータ型）自体をメタデータとしてデータベース化した。そのデータベースを利用することにより、それぞれの特性種別ごとに異なる項目を持った特性データの入力が可能となる。また、データシートの改訂で項目の数や項目名が変化したとしても、特性種別の定義のテーブルにそれらのデータを追加することにより対応できる。

メタデータを利用して特性データを管理する方式自体は、植物遺伝資源の特性評価データ管理のため 1994 年から実施してきたものであるが、微生物遺伝資源を含めたより広範な対象を扱うことを目的として 2005 年に改良版に移行した。現在ジーンバンクのウェブサイト (<http://www.gene.affrc.go.jp/>) で公開している植物遺伝資源の特性評価データはこの方式で構築されたものである。微生物遺伝資源の特性評価データに適用するにあたって、1

つの項目に複数の値を入力しなければならない場合があり、これに対応すべく、非正規型データの管理手法を開発した。また、微生物部門独自の調査方式、記載項目に対応するユーザインタフェースを開発し、微生物特性データシート管理プログラムを作成した。

今後は蓄積した特性評価データを公開するためのシステム開発を行い、2009年にはジーンバンクのウェブサイトから利用可能になる予定である。

#### P-17 生物資源運搬・保存カード (NIG カード) による長期保存成績について

○富川宗博<sup>1</sup>, 加藤康子<sup>1</sup>, 西村昭子<sup>2</sup>, 成田貴則<sup>3</sup>

<sup>1</sup>BioRois 株式会社, <sup>2</sup>中部大学, <sup>3</sup>日本大学歯学部

昨年の本学会において、生物資源運搬・保存カード (NIG カード) が大腸菌、酵母、プラスミドの常温輸送並びに -80℃での保存に極めて有用である事を報告してきたが、今回は NIG カード 1 穴用と 96 穴用を使用して、大腸菌を 20%グリセロール存在下、-80℃で約 1.5 年間以上の長期保存が可能であり、生菌大腸菌数に変化がないことが判明した。また、プラスミドはグリセロール非存在下でプラスミド単独および大腸菌に組み込んだプラスミドを、-80℃で約 3 ヶ月間以上保存したが、プラスミドの分子量に変化がなく、もとのプラスミドと同様の形質転換能を有することが明らかになった。これらの保存期間はさらに引き続きフォローしている。

以上の結果は生物資源、特にグリセロールで安定化する生きた細菌類の長期保存のみならず -80℃冷凍庫の省スペース化にも有効であることが判明した。

また、グリセロールで安定化できなかった 2 種の菌 (インフルエンザ菌や肺炎球菌) について、牛血清による安定性を予備的に検討した結果、10 ~ 30%牛血清存在化で安定化が図れる傾向が認められた。さらに牛血清による上記菌の安定化作用を定量的に評価する予定である。これらの事実を基に NIG カードによる幅広い生物資源に対する常温輸送並びに -80℃での保存について、その有用性を明らかにする。

#### P-18 酵母サッカロミセス細胞のストラクトーム解析

○山口正視, 岡田 仁, 大楠美佐子, 川本 進

千葉大・真菌医学研究センター機能形態分野

ヒトの身体を構成する細胞の数は約 60 兆個、脳細胞の数は 150 億個であるといわれている。しかし、例えば一個の酵母細胞に何個のリボソームが存在するのか、また、小胞体はどれだけの体積を占め、どのように分布しているのかなどは知られていない。「ストラクトーム」とは、structure と -ome から成る造語であり、電子顕微鏡レベルにおける細胞の定量的、三次元的全構造情報を意味する<sup>1)</sup>。我々は、すでに、酵母エクソフィアラを材料として、細胞の定量的、三次元的解析を行い、いくつかの新しい情報を得ている<sup>2)</sup>。たとえば、1 個の細胞にリボソームは約 20 万個存在すること、ミトコンドリアは 17 ~ 52 個存在すること、微小管は 13 ~ 39 本存在すること、サイトゾルは細胞の体積の 48%を占めること、ミトコンドリアは細胞の体積の 10%を占めること、小胞体は細胞の体積のわずか 0.2%を占めるにすぎないこと、膜系は厚さと構造の違いから大きく 3 種類に分けられること、などがわかった。本研究では、急速凍結・置換固定法と連続超薄切片法により、サッカロミセス細胞のストラクトームを解析する。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C 株は、ゲノム解析に用いられた株であり、ストラクトームに理想の菌株であり、本研究ではこれを材料とした。急速凍結・置換固定法によって超薄切片を作製し、電子顕微鏡観察すると、本菌は、自然な細胞形態を呈し、膜系も明瞭に観察できることがわかった。現在、連続超薄切片を作製中である。

- 1) Yamaguchi, M. (2006). Structome of *Exophiala* yeast cells determined by freeze-substitution and serial ultrathin sectioning electron microscopy. *Current Trends Microbiol.* 2: 1-12.
- 2) Biswas, S.K., Yamaguchi, M. *et al.* (2003). *J. Electron Microsc.* 52: 133-143.

#### P-19 カンジダフェノームプロジェクトにおける網羅的遺伝子組換え株の構築

○知花博治<sup>1</sup>, 上野圭吾<sup>1</sup>, 笹本 要<sup>1</sup>, 木下妻智子<sup>1</sup>, 三谷宏樹<sup>1</sup>, 小暮高久<sup>1</sup>, 加藤直子<sup>1</sup>, 宇野 潤<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・真菌医学研究センター, <sup>2</sup>鈴鹿工専

カンジダ (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* など) は、人体の様々な部位に常在しており、健常者にとっ

てこれらの真菌は問題にはならないが、免疫力の低下した患者に対して重篤な感染症を起こすため、病原性や治療法について、病原性については、複数の因子が関与すると考えられているが、未解明な点が多く残されている。治療の第一選択としては、抗真菌薬が用いられるが、抗真菌薬には4タイプしか存在せず、選択肢の少なさ、副作用、スペクトラムの狭さ、耐性化などに問題があり、新しい抗真菌薬の開発は病原性の解明とともに重要な研究課題である。このような状況の中、*C. albicans* (PNAS 2004), *C. glabrata* (Nature 2004), *A. fumigatus* (Nature 2005) など数種の病原真菌のゲノムシーケンスが決定された(我々も *C. albicans* のゲノムプロジェクトに参加した。PNAS 2004, Genetics 2005, Genome Biol 2007)。現在ではこれらのゲノム情報を用いた遺伝子機能解析が進められているが、病原真菌の多くは遺伝子操作が煩雑なため網羅的な機能解析には、多大な費用と労力を要する。そこで、我々は病原真菌の中で比較的病原性が低く、最も遺伝子操作が簡便なカンジダ・グラブラータ (*C. glabrata*) に着目し、さらにより簡便な遺伝子操作方法を開発することによって大幅なコストダウンに成功した (Ueno *et al.* Eukaryotic Cell 2007)。この系によって我々は、5,300 全遺伝子に対する遺伝子組換え株の構築を進めており、これらの株を用いて抗真菌薬の開発、常在性と病原性の研究、エタノール醗酵などへの応用研究も平行して進めている。本大会においては、これらの組換え株構築の進捗状況の報告を行う。

#### P-20 NIAS (MAFF) ジーンバンク所蔵 *Plectosporium* および *Colletotrichum* 属関連菌株の DNA 分子系統解析による再同定

○佐藤豊三<sup>1</sup>, 根岸秀明<sup>2</sup>, 渡邊恒雄<sup>3</sup>, 森脇丈治<sup>4</sup>, 廣岡裕吏<sup>1</sup>, 青木孝之<sup>1</sup>, 澤田宏之<sup>1</sup>, 永井利郎<sup>1</sup>, 遠藤眞智子<sup>1</sup>, 富岡啓介<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 農業生物資源研究所 ジーンバンク, <sup>2</sup> 日本たばこ産業(株) 葉タバコ研, <sup>3</sup> 産業技術総研, <sup>4</sup> 中央農業総研

演者らは NIAS (MAFF) ジーンバンクに保存されている植物病原菌の中で、子のう菌に関連する菌株の分類学的所属を確認するため分子系統解析による再同定を進めてきた<sup>12)</sup>。今回新たに学名を変更あるいは特定した *Plectosporium* および *Colletotrichum* 属関連菌株を報告する。オモダカ斑点病菌は新種 *Cylindrocarpon sagittariae* (MAFF239928) とされ<sup>3)</sup>、また、ダイコン円形褐斑病菌は *Acremonium* 属の未同定種 (MAFF240260) として報告された<sup>4)</sup>。前者のタイプ由来菌株および後者の病原菌参考株について形態的特徴を再検討したところ、両菌株とも *Plectosporium tabacinum* の記載にほぼ一致した。そこで両菌株の rDNA ITS 領域塩基配列に基づく分子系統解析を行った結果、いずれの菌株も *P. tabacinum* の既知菌株と同一クレードを形成し、同種であることが支持された。以上より、オモダカ斑点病およびダイコン円形褐斑病の病原を *P. tabacinum* に改めることを提案する。植物炭疽病菌として重要な *Colletotrichum* 属は、形態の種内変異が大きい上、種間差の不明瞭な種を複数含むため、形態的同定が困難な場合が少なくない。そこで寄託された 14 菌株について上記の分子系統解析を行い、形態による同定結果を検証した。その結果、*C. fragariae* 1 株は *C. gloeosporioides* (MAFF744017) に、*C. destructivum* 1 株は *C. acutatum* (MAFF240237) に、*C. gloeosporioides* 2 株は *C. truncatum* (MAFF238875) と *C. destructivum* (MAFF240106) に、*C. fuscum* 1 株および *C. higginsianum* 3 株は *C. destructivum* (MAFF238340, MAFF305635, MAFF305968, MAFF305970) に、他の *C. higginsianum* 2 株は *C. capsici* (MAFF305969, MAFF305971) に、*C. dematium* 3 株は *C. truncatum* (MAFF240235, MAFF240236, MAFF240431) に、*C. capsici* 1 株は *C. capsici* (MAFF238500) にそれぞれ再同定された。他方、*Colletotrichum* 属の未同定 10 菌株についても同じく分子系統解析および形態に基づき種同定を行った。その結果、円筒形分生子形成種 6 株は *C. boninense* 1 株 (MAFF238644) および *C. gloeosporioides* 5 株 (MAFF 240432, MAFF240430, MAFF240429, MAFF240186, MAFF240428) に、また、湾曲分生子形成種 4 株は *C. capsici* 2 株 (MAFF238718, MAFF239536), *C. truncatum* 1 株 (MAFF306708) および *C. dematium* 1 株 (MAFF240433) にそれぞれ同定された。

- 1) Moriwaki, J., Tsukiboshi, T. and Sato, T. (2002). Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. J. Gen. Plant Pathol. 68: 307-320.
- 2) 佐藤豊三, 竹内 純, 長尾英幸, 富岡啓介 (2007). *Plectosporium tabacinum* と分子再同定した数種園芸植物由来の菌株. 日本菌学会第 51 回大会講演要旨集, p. 70.
- 3) Negishi, H. (1996). A new species of *Cylindrocarpon* causing leaf spot on old-world arrowhead (*Sagittaria trifolia*). Ann. Phytopath. Soc. JPN. 62: 495-497.
- 4) 大林延夫, 渡辺恒雄 (1988). 三浦半島のダイコンに最近発生した円形陥没症状の新病害. 日植病報 54: 68-69.



### P-21 ヒメマツタケ栽培用堆肥での細菌フロアの解析と微生物の分離・同定

多田有人<sup>1,2</sup>, ○菅原なつ美<sup>3</sup>, 川出光生<sup>2</sup>, 齋藤明広<sup>3</sup>, 安藤昭一<sup>3</sup>

<sup>1</sup>千葉大・大学院自然科学研究科, <sup>2</sup>(株)岩出菌学研究所, <sup>3</sup>千葉大・大学院融合科学研究科

【目的】ヒメマツタケやマッシュルームに代表されるハラタケ属のキノコは、堆肥を用いた栽培方法が主流である。しかしながら、堆肥の由来の見極めは、色、におい、触感など、従事者の経験と勘に頼っているのが現状である。本研究では、堆肥中で活躍する微生物が熟度を判定する為のひとつの指標になるのではないかと考え、発酵期間が異なる堆肥でのヒメマツタケ子実体収量と細菌フロアの解析を行った。また、完熟堆肥から、任意の微生物を分離・同定した。

【方法】(堆肥の製造)原料混合後、中4-5日の間隔で切り返し、45日目に床入れた。その後7日間の熟成期間を経て発酵終了とした。(子実体収量測定)発酵段階が異なる堆肥にヒメマツタケ(岩出101株)種菌を植えて子実体を発生させ、生キノコ収量を測定した。(細菌フロアの解析)堆肥からDNAを抽出し、DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis;変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)解析を行い、発酵段階ごとの細菌フロアを比較した。(微生物の分離)堆肥10gを滅菌水90mlに懸濁し、希釈液をローズベンガル培地(糸状菌検出用)およびHV培地(放線菌検出用)に塗布、あるいは、YG培地(一般細菌検出用)は混釈した。35℃、50℃および60℃で培養し、一般細菌と糸状菌は2日後、放線菌は5-10日後に、菌株を分離した。(細菌の同定)分離した細菌の16S rDNAの塩基配列に基づいて行った。

【結果】キノコ収量は、一次発酵30日以降ほぼ安定した。また、ほぼ同じ時期から細菌フロアも安定することが明らかとなった。これらの結果から、堆肥熟度の指標に細菌フロアを利用できることが示唆された。一方、熟した堆肥からは、*Microbispora*属や*Streptomyces*属などに属する放線菌や、*Bacillus*属や*Acinetobacter*属に属する細菌株が分離された。

### P-22 *Pichia pijperi* 及び類縁酵母の出芽様式とその分子系統

○今西由巳<sup>1</sup>, Sasitorn Jindamorakot<sup>2</sup>, 川崎浩子<sup>1</sup>, 中桐 昭<sup>1</sup>, Savitree Limtong<sup>3</sup>, Wanchern Potacharoen<sup>2</sup>, Morakot Tanticharoen<sup>3</sup>, 中瀬 崇<sup>1</sup>, 鈴木健一朗<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(独)製品評価技術基盤機構・NBRC, <sup>2</sup>BIOTEC, タイ, <sup>3</sup>Kasetsart University

1957年、van der Waltは南アフリカのバターミルクから1酵母を分離し*Pichia pijperi*と命名した。その後、DitlevsenとHjort(1964)は本種が両極出芽により増殖することを見だし、*Hanseniaspora*属に移すことを提唱した。しかし、The Yeasts, a taxonomic study 第二版(1970)において、Kreger-van Rijは透過型電子顕微鏡(TEM)を用いた細胞観察から、出芽痕は典型的な*Hanseniaspora*属より*Pichia*属に類似することを認め、本種を*Pichia*属に維持した。我々はタイ国において*P. pijperi*に類縁する5株を分離し、これらが両極出芽を行うことを認めた。そこで、CBSおよびNBRC保存の本種のすべての菌株について走査型電子顕微鏡(SEM)とキチン染色剤であるファンギフローラYによる出芽痕染色により出芽様式の形態学的観察を行った。

供試した*P. pijperi*類縁菌15株の26S rDNA D1/D2領域の塩基配列に基づく系統解析を行い、NJ法により系統樹を作成した結果、基準株を含む12株はまとまった系統枝を形成し、別の系統枝を形成したNBRC保存の3株と連結していた。続いて、それら15株の系統群は*Candida solani*と系統枝を形成した。この系統樹と出芽様式には相関関連が見いだされた。供試15株は出芽痕が細胞の両極の同じ位置から繰り返し出芽し出芽痕が層となる両極出芽型(Type I)、Type Iに類似するが二極出芽と二極出芽を行っている近傍(細胞の肩)にも出芽痕があるType IIに区別できることを認めた。*P. pijperi*群にもっとも近縁である*C. solani* NBRC 0762Tは多極出芽であり、出芽痕が重なることはなかった。出芽部位は両極に近い位置にあった(Type III)。

*Pichia*属は従来多極出芽酵母に位置づけられていたが、本研究により両極出芽を行う群があることが明らかになった。典型的な両極出芽酵母である*Hanseniaspora*属にも肩から出芽する菌株も見いだされることから*P. pijperi*群と*Hanseniaspora*属の出芽様式は本質的に同じと思われる。

### P-23 Epidemiology of dermatophyte infections in Cairo, Egypt

○S. Zaki<sup>1</sup>, N. Ibrahim<sup>1</sup>, K. Aoyama<sup>2</sup>, Y. Shetaia<sup>1</sup>, K. Abdel-Ghany<sup>1</sup>, Y. Mikami<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ain Shams University, Egypt, <sup>2</sup>MMRC, Chiba University

In the present study, we studied the dermatophyte infections in patients referred to the department of

Dermatology, EL-Houd El-Marsoud hospital, Cairo, during the period from March 2005 to June 2006. Of 506 patients enrolled in this investigation 403 (79.64%) were clinically diagnosed as having dermatophytoses (age range 6-73 years; males 240; females 163). Species identification determined by observation of their macro and microscopic characteristics complemented with sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region. The most common dermatophyte infection diagnosed was tinea capitis (76.42%), followed by tinea corporis (22.33%) and onychomycosis (1.24%). The most frequent dermatophyte species isolated was *Trichophyton violaceum* which accounted for (71.1%) of all dermatophytes recovered, followed by *Microsporum canis* (21.09), *Trichophyton rubrum* (6.20%), *M. boullardii* (0.49%), and both of *Epidermophyton floccosum* and *Trichophyton tonsurans* were rarely isolated (0.24%) each.

#### **P-24 Genotyping of *Candida albicans* isolated from AIDS patients in Xinjiang, China**

○ J. Mijiti<sup>1</sup>, R. Tanaka<sup>2</sup>, X.M. Pu<sup>1</sup>, A. Erfan<sup>1</sup>, T. Yaguchi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The People Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, China, <sup>2</sup>MMRC, Chiba University

It is well known that *Candida albicans* is one of important agents causing opportunistic fungal infection. McCullough *et al.* showed 4 genotypes in *C. albicans* (including *C. dubliniensis*) using 25S rRNA. There are many reports about genotyping of *C. albicans* in various countries. However this is the first report of genotyping of *C. albicans* isolated from Xinjiang Uygur Autonomous Region in China.

Thirty-nine isolates from 52 HIV/AIDS patients at a hospital in Xinjiang Uygur Autonomous Region were genotyped by the method of McCullough *et al.* At the same time, 100 isolates from non-AIDS patients at a hospital in Tokyo were also genotyped.

Results: Uighurian isolates were divided into genotypes A (51%), B (36%) and C (13%), Japanese were A (63%), B (28%) and C (9%). We compared these data with other countries'. The profile of Uighurian was similar to that of Turkish rather than Chinese (Chengdu). It is clear that the genotypes are characteristic in each area (geographical) and ethnic (ethnological).

The other hand, we refined on ALTS analysis aiming at identification strain level. Specifically we used a polyacrylamide gel (micro temperature-gradient gel electrophoresis= $\mu$ TGGE) instead of agarose gel. And to improve visibility, Cy-3 and Cy-5-labeled primers were used.

#### **P-25 Strain typing for *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* by analysis of multilocus microsatellites**

○ J. Zhu<sup>1</sup>, A. Hanafy<sup>1</sup>, T. Gono<sup>1</sup>, W. Meyer<sup>2</sup>, Y. Mikami<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MMRC, Chiba University, <sup>2</sup>University of Sydney Western Clinical School, Australia

*Cryptococcus* species are the causative agents of cryptococcosis, a life-threatening human disease affecting the lungs, central nervous systems and skin. To better understand the population genetic structure of *Cryptococcus* several molecular approaches have been applied for strain typing and epidemiological studies. However, most of those techniques have serious limitations in their inter-laboratory reproducibility, and some are only useful in distinguishing varieties or major molecular types, not individual strains. Microsatellite, also known as simple sequence repeats (SSR) or short tandem repeats (STRs), are highly polymorphic and spread throughout all genomes, including humans, lower eukaryotes and fungi. The aim of the present study was to identify, characterize and evaluate the genetic diversity of polymorphic microsatellite loci of each *Cryptococcus* strain from clinical and environmental sources in China and Brazil.

Three specific PCR primers (CNG1, CNG2 and CNG3) which have been found to be useful for the amplification of polymorphic SSR in our previous experiment (Med Mycol *in press*) were used to sequence SSR loci from more than 30 strains. Results showed strain-specific distribution of genotype in each country and suggested usefulness of SSR analysis for the epidemiological studies on infections due to *C. neoformans*.

## P-26 アゾ色素脱色能をもつ新規酵母リソースの探索

○鈴木基文, 辨野義己

(独) 理化学研究所バイオリソースセンター

アゾ色素はその種類も1千種以上にのぼり、繊維、食品、化粧品、液晶の誘電体、CD-Rなどに広く利用されている。着色などの水質汚濁と関わることからアゾ色素の脱色に関する技術開発は環境保全の観点から必要とされている。微生物によるアゾ色素の脱色については細菌や白色腐朽菌類を用いた研究は多いが、酵母を用いた研究は少ない。そこで、今回は、土壌や工場廃液などから酵母を分離・同定を行い、アゾ色素脱色能をもつ酵母を探索した。その結果、分離・同定した酵母株でアゾ色素の脱色能が確認された既知種は下記の通りであった。子囊菌酵母：*Geotrichum silvicola*, *Geotrichum vulgare*, *Candida boidinii*, *C. catenulata*, *C. intermedia*, *C. oleophila*, *C. parapsilosis*, *C. pseudolambica*, *C. sake*, *C. sophiaereginae*, *C. vartiovaarae*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces polysporus*, *Lodderomyces elongisporus*, *Torulaspora delbrueckii* および *Williopsis californica*。担子菌酵母：*Cryptococcus saitoi*, *Guehomyces pullulans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. fragaria*, *R. slooffiae*, *Rhodospidium paludigenum*, *R. toruloides*, *R. diobovatum*, *Trichosporon guehoae*, *T. jirovecii* および *T. loubieri*。また新種としては、*Geotrichum* 属の2新種、*Candida* 属の1新種、*Pseudozyma* 属の1新種および *Cryptococcus* 属の1新種が見いだされた。以上のことから、アゾ色素脱色能をもつ酵母には種多様性があることが示され、環境保全に関わる酵母リソースの一つとして重要であると考えられる。

## P-27 東丹沢のブナ葉食性害虫ブナハバチから分離された昆虫病原菌類

○栗原祐子<sup>1</sup>, 山上 明<sup>2</sup>, 伴野英雄<sup>3</sup>, 谷 晋<sup>2</sup>, 原山重明<sup>4</sup>

<sup>1</sup>オーピーバイオファクトリー 石垣ラボ, <sup>2</sup>東海大・総合教育センター, <sup>3</sup>桜美林大学自然科学系, <sup>4</sup>(独)製品評価技術基盤機構・NBRC

ブナハバチ (*Fagineura crenativora* Vikberg & Zinovjev) はしばしば大発生し、ブナの葉を著しく食害する。丹沢山地 (神奈川県) ではブナ林衰退の一因として問題になっており、2007年には同山地で10年ぶりの大発生が認められた。本種の幼虫はブナ葉の摂食後に地表に降りて終齢となり、地中に造った繭の中で前蛹になって1年～数年間休眠するが、その間にかなりの数の個体が昆虫病原菌や寄生蜂・寄生蠅によって死亡すると考えられている。そこで、ブナハバチの生活史の解明をめざした研究の一環として、本種の終齢幼虫・前蛹に寄生する病原性真菌類を調査した。調査に用いた個体は、2007年6月17日 (試料1～3)、11月23日 (試料4) に丹沢山堂平のブナ林で採集した。これらは (1) 採集地の土壌を用いて実験室内で繭を作らせ、飼育15日目に死亡を確認した終齢幼虫16個体、(2) 飼育2ヶ月後に死亡を確認し、体表に菌糸体の発生を認めた♀前蛹60個体、(3) 飼育6ヶ月後に菌糸束の発生を認めた3個体、(4) 野外において菌糸体や菌糸束の発生を認めた、地中から掘り出した5個体である。(1)(2)は湿室での前培養後直接分離法で、(3)(4)は直接接種法、もしくは表面殺菌法と直接接種法を組み合わせた方法で病原菌類の分離を行い、分離培地にはLCA培地を用いた。その結果、(1)からは腐敗のため昆虫病原菌が出現せず、(2)からは多犯性昆虫病原菌 *Paecilomyces lilacinus* 3株が分離された。(3)からは多犯性昆虫病原菌である *Isaria farinosa* 2株と *Beauveria blongniartii* 1株が、(4)からは *Isaria* sp. 1株のほか、一般に昆虫の目のレベルでの宿主特異性を示すことが多い *Hirsutella* 属 (2株) と *Tolyocladium* 属 (1株) の未同定種各1種が分離された。さらに、ブナハバチ前蛹に寄生していた寄生蠅の幼虫5個体からは、双翅目昆虫への寄生が知られる *I. fumosorosea* 1株が分離された。以上の結果から、ブナハバチの生活史には hyper parasite を含む多数の昆虫病原菌が関与することが示唆された。

## P-28 タイ産熱帯植物生葉における植物内生性クロサイワイタケ科菌類に関する研究

○岡根 泉<sup>1</sup>, P. Srikitikulchai<sup>2</sup>, 外山香子<sup>1</sup>, T. Laessøe<sup>3</sup>, S. Sivichai<sup>2</sup>, N. Hywel-Jones<sup>2</sup>, 中桐 昭<sup>1</sup>, W. Potacharoen<sup>2</sup>, M. Tanticharoen<sup>2</sup>, 鈴木健一朗<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(独)製品評価技術基盤機構・NBRC, <sup>2</sup>BIOTEC, タイ, <sup>3</sup>コペンハーゲン大学, デンマーク

クロサイワイタケ科 (Xylariaceae, 子囊菌門) 菌類は現在およそ50属400種を包含し、特に森林生態系における分解者として重要な生態的地位をもつ普遍的な子囊菌の一群として知られる。本科菌類には材や落葉の分解菌あるいは植物病原菌として知られる種が含まれるほか、宿主植物に対して病徴を示さない、いわゆる内生菌 (endophytic fungi) として検出される種も多く含まれる。本研究では、タイ産クロサイワイタケ科菌類の多様性

と生態的特徴を探るため、特に内生菌として見出される種の多様性を明らかにすることを目的として、熱帯植物の生葉中に生息する菌群に加え、腐朽木や落葉上に子実体を形成する腐生的な菌群の分離、培養を試みた。そして、これらの内生的菌群と子実体由来の腐生的菌群とを rDNA 塩基配列情報 (28S D1/D2 および ITS) に基づき比較検討した。その結果、およそ 20 種が内生菌として存在することが示唆された。調査地のカオヤイ国立公園 (バンコク北東部) ではこれまで 40 種を超える腐生的なクロサイワイタケ科菌類が報告されているが、それらのうち少なくとも 7 種については内生菌としても存在することが示唆された。rDNA 塩基配列による分子系統学的解析からは、それら 20 種の中には腐生的な既知種との同根性が不明な、内生菌として分離された菌株のみで形成される複数のクレイドが確認された。これらの内生菌クレイドについては既知種との精査がさらに必要である。一方、腐生的な種との同根性が明らかとなったものの中には、落葉上での子実体発生が確認されていない種も含まれる。内生菌としても生息するこれらの種の落葉上での定着と分解能、子実体の形成方法についても調査が必要である。以上、内生菌として見出される種は予想以上に多様であり、クロサイワイタケ科菌類の多様性を探る上での調査対象として重要な生態群といえる。その一方で、内生的に見出される種を多数含む本科菌類の生態的機能、生活環境など生態的特徴については不明な点も多く、今後の重要な研究課題である。

本研究は、NITE バイオテクノロジー本部とタイ国家遺伝子工学バイオテクノロジーセンター (BIOTEC) 双方のカルチャーコレクション (NBRC および BCC) のメンバーによる共同研究と、それによる遺伝資源の充実および研究者間交流を目指した共同研究プロジェクトの一環として実施された。

### P-29 RubisCO 遺伝子の系統進化について

○内野佳仁, 高橋麻衣, 島村具仁子, 鈴木健一郎  
(独) 製品評価技術基盤機構・NBRC

RubisCO は、Calvin-Benson-Basham (CBB) 経路による炭酸固定反応において、中心的な働きをする酵素である。この酵素はヘテロ 16 量体の Form I (真核生物, 細菌), ホモ 2 量体の Form II (細菌), ホモ 10 量体の Form III (アーキア) の 3 つの型が知られている。また、Form I RubisCO は Green-like RubisCO (form IA<sub>c</sub>, IA<sub>q</sub>, IB, IB<sub>c</sub>) と、Red-like RubisCO (form IC, ID) の大きく 2 つの型が知られている。細菌の場合は、Form IA<sub>c</sub>, IA<sub>q</sub>, IB<sub>c</sub>, IC, II の 5 つの型の RubisCO が 1 菌株に 1 つ、あるいは複数存在するとされる。各型の RubisCO は、酵素反応速度や O<sub>2</sub> による阻害の度合いなど酵素特性に傾向をもち、さらにその遺伝子は型特有のオペロン構成を持つ。RubisCO の型が細菌の生育特性、生息域などある程度限定していると考えられる。

近年、RubisCO 遺伝子が生物間で頻繁に水平移動していることが示唆されている。系統的に異なる細菌でも生息域を同じくするならば同型の RubisCO を有する、また、同じ菌種でも株間で異なる型の RubisCO を有する場合があります。細菌がオプション的に各型の RubisCO を獲得し機能を得、あるいは捨てて、生育環境を変えている姿が想像できて興味深い。

本研究は、各細菌が有する RubisCO の型を明らかにすることが進化学的、生態学的に意味があるだけでなく、難培養細菌の培養法を検討する上で有効な情報となり得ると考え、NBRC 保存株に対して RubisCO 遺伝子 (*cbbL*) について、各型に特異的なプライマーを用いた PCR、シーケンスの決定・系統解析を行った。

結果の 1 つとして、*Hyphomicrobiaceae* の *Blastochloris* sp. Yu03 (本研究の分離株) と *Blastochloris viridis* NBRC 102659, *Rhodobiaceae* の *Rhodobium marinum* が Form IA<sub>c</sub> と IC の 2 つの RubisCO を有していることが明らかとなった。この組合せは、演者らが 2003 年に *Rhodobacter azotoformans* について報告して以降、ゲノム解析株 *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17025 と *Rhodopseudomonas palustris* BisB5 にも存在することが明らかとなっている。系統の異なる複数の菌株が、独立して同型の RubisCO を獲得し保持させているということは、この組合せが細菌の生存にとって有利に働いていると考える。

### P-30 Molecular phylogenetic studies on *Gordonia* species based on *gyrB* gene analyses

○Y. Kang, K. Yazawa, Y. Mikami  
MMRC, Chiba University

Members of the genus *Gordonia* are placed in the suborder *Corynebacterineae* which belongs to the order *Actinomycetales*. There are 23 species in total in the genus, including the recently reported novel species *G. otitidis*, *G. effusa*, *G. araii* and *G. soli*. Recently both *gyrB* and *secA1* genes were introduced in the identification and characterization of the various species of bacteria. Housekeeping gene *gyrB* is rarely transmitted hori-

zontally, and it has been reported that its molecular evolution rate is greater than that of 16S rDNA. *SecA1* gene also has been used for identification at the species level, as sufficient sequence variability has been reported to exist in *Mycobacterium* and *Nocardia* species. In order to explore efficient, rapid and economical method of phylogenetic study for the reported 23 species of *Gordonia*, analyses of both the *gyrB* and *secA1* sequences of the type strains were performed in comparison to those of 16S rRNA sequences from GenBank. Phylogenies from *gyrB* and *secA1* sequences were in relative agreement with that constructed by 16S rRNA gene sequences. Degrees of divergences of the *gyrB* and *secA1* was approximately six and two times greater than that of 16S rRNA gene, respectively. The *gyrB* gene showed the most discriminatory power in comparison to *secA1* and 16S rRNA genes, facilitating clear differentiation of any two *Gordonia* species by *gyrB* gene analysis.

Benefits of both *gyrB* and *secA1* sequences for the phylogenetic characterization of *Gordonia* species are discussed.

### P-31 アゾール系抗真菌剤 clotrimazole の *Nocardia farcinica* における標的分子の探索

○志保沢里奈, 小暮高久, 三上 襄  
千葉大・真菌医学研究センター

現在, 既に多くの真菌症の治療薬として使われているアゾール系抗真菌剤が, 原核微生物である特殊な細菌, *Nocardia* や *Mycobacterium* 等の多くの病原菌に対して生育阻害作用を持つことが観察された。

本研究は, これらのアゾール感受性病原細菌の一つである抗酸性菌である *N. farcinica* を用い, 薬剤の標的及び作用機序を明らかにすることで, 真核微生物に固有の細胞膜の構成成分のエルゴステロールの合成阻害剤であるアゾール剤が, 何故にエルゴステロールを合成しない細菌にも活性を示すかを解明することを目的としている。*N. farcinica* はノカルジア症の原因菌としては最も重要な菌種で, 本菌種はもともと多くの薬剤に非感受性であるが, 現在, 耐性菌の出現が深刻な問題となっていることから, 最終的には, 耐性菌への治療薬, 特に抗真菌・抗細菌機能を兼ね備えた, 高い有用性を持った新薬の開発を目的として研究を進めている。

現在までに, アゾール剤に対する感受性測定により, *Nocardia* の多くの菌種は, 低い濃度で生育を阻害されるが, 長期培養しても耐性菌が全く出現しないという結果が得られており, 抗細菌剤としての有用性が実証された。まず, 真菌における標的と高い相同性を持つ酵素を, 標的であると仮定し, 関連遺伝子の過剰発現実験や遺伝子破壊実験を行ったが, 感受性に変化が見られず, 真菌とは異なるメカニズムであることが示唆された。

現在, 非感受性菌ではチトクローム P450 群を持たないことから, この酵素群のいずれかが標的である可能性が高いと考え, 遺伝子発現量, アゾール剤との親和性とを総合的に判断し, 標的と推測される酵素をコードする遺伝子の破壊を試みている。

### P-32 新たに臨床材料から分離された *Rothia* sp. について

○青山一紀, 矢沢勝清, 三上 襄  
千葉大・真菌医学研究センター

病原性の放線菌としては, *Nocardia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* などの菌種が多い。最近, これらの菌種に加えて循環器系の感染症の原因菌として, *Rothia* が報告されるようになってきた。*Rothia* は好気性のグラム陽性菌で, 生体内では, 特徴的な菌糸状の生育形態を示す放線菌である。本菌種は, *Nocardia* や *Rhodococcus*, *Gordonia* とは異なりミコール酸は含まない。発育は遅く, 分離には他の病原性の放線菌と異なり, BHI 寒天培地のような栄養豊富な培地で生育させても, 30°C で1週間ほど必要である。本菌は, 1967年にGeorgとBrownが *Rothia dentocariosa* として発表し, その形態学および化学分類学的特徴から放線菌に分類され, 1997年にStackebrandtらが16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析から, *Micrococcaceae* に帰属することが明らかにされた。*Rothia* は, 現在6菌種の存在が確認されており, そのうち病原性が確認されているのは3菌種だけである。

本研究では千葉大学真菌医学研究センターに全国から送られ, 生理生化学的な性状や化学分類学的な基準に基づいて, *Rothia* sp. と同定できた18株の臨床材料株について16S rRNA 領域の遺伝子配列を決定し, それに基づいて, 系統解析を実施した。並びに生理生化学的性状の検討も行ったので報告する。

今回検討した18株の中に, 既存の菌種では, *R. dentocariosa* の菌種が多く存在していたが, 16S rRNA 領域の相同性が既存の菌種と比べて低く, その他の生理生化学的な性状から, 新種として提案することが妥当と考えら

れる菌株の存在も確認もされたため、GC 含量の測定並びに近縁種とのハイブリダイゼーションによる相同性の比較などを行い、新菌種として報告するための検討を行ったので報告する。

### P-33 嫌気性細菌の生産する二次代謝産物の研究

○田中博子, 山本撰也, 三上 襄  
千葉大・真菌医学研究センター

医療の進歩に伴い数々の感染症の治療法が確立され、治療を可能にしてきた。そして、多くの感染症においては感染例が少なくなり制圧された感染症もある。それとは別に、新しく出現した感染症や薬剤に耐性を持って再び感染症を起こすようになった、いわゆる「新興・再興感染症」もあり、安全で安心な社会の構築には、新しい薬剤の開発は、現在でも検討すべき重要な問題となっている。

今回、日和見感染症の原因菌の一つである病原性真菌に対する新たな取り組みとして、昆虫の腸管や土壌などに生息する主に嫌気性細菌が生産する抗真菌活性物質の探索を行った。指標菌としては病原真菌の *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes* と *Cryptococcus neoformans* を用いた。

その結果、昆虫の腸管から分離した嫌気性の細菌の多くが生産している抗真菌活性物質、特に *A. fumigatus* や *C. albicans* への強い活性物質として、ジヒドロ桂皮酸とインドールプロピオン酸メチルエステルが単離され、その構造を確認することができた。さらに土壌分離株の中から抗 *Trichophyton* 活性を有する菌株 1 株、抗 *Cryptococcus* 活性を示す菌株 1 株を分離し、それぞれの菌株の 16S rRNA 遺伝子を解析した結果、抗 *Cryptococcus* 活性菌株は、*Bacillus* 属の類似菌、抗 *Trichophyton* 活性菌株は *Enterobacter* に属する細菌であることが明らかになった。現在、これらの細菌よりの抗真菌活性物質については、それらの抽出を試みている。

今後の展開として、目的化合物である抗真菌活性物質を単離精製し、その構造を決定する予定である。また、これらの抗真菌活性物質の作用機序の解明、既存の抗真菌活性物質との作用の比較、抗真菌活性以外の、抗微生物活性作用のような他の機能などについても検討している。

### P-34 オホーツク海から分離した *Flavobacterium* 属の 1 新種

○宮下美香<sup>1</sup>, 藤村朱喜<sup>2</sup>, 中川恭好<sup>1</sup>, 鈴木健一朗<sup>1</sup>, 冨塚 登<sup>2</sup>, 中川智行<sup>3</sup>, 中川純一<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>(独) 製品評価技術基盤機構・NBRC, <sup>2</sup>東京農業大・生物産業, <sup>3</sup>岐阜大・応用生物科学

海藻に最も多く含まれる炭水化物は、その大部分が海藻特有の多糖類から構成されている。この独特の海藻多糖類の機能性に着目し、近年多くの研究報告がなされている。ポルフィラン・フコイダン・アルギン酸などの海藻多糖では、抗腫瘍活性やコレステロール低下作用、整腸作用などが報告され、健康食品への応用が盛んに行われている。これら海藻多糖の食品加工への応用や人体内への速やかな吸収を助けるために、低分子化等の加工に役立つ微生物の獲得を期待して、オホーツク海に面する北海道網走港近辺から採取した海藻表面の粘性物質から TC2 株を分離した。

16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した結果、TC2 株は *Flavobacterium* 属に含まれ、*F. degerlachei*, *F. frigidarium*, *F. frigoris*, *F. limicola*, *F. psychrolimnae* と近縁であり、これら 5 種との 16S rRNA 塩基配列相同性は 97.1 ~ 97.3% であった。また、これら 5 種以外とは 96.9% 以下であり、TC2 株は新種である可能性が示唆されたため、さらなる検討を行った。16S rRNA 塩基配列相同性が 97% 以上であった上記 5 種との DNA-DNA 相同性は 28% 以下であったため、TC2 株は新種であることが明らかとなった。滑走運動性を示さず、嫌気条件下で生育せず、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応が陽性でフォスファターゼ活性を示すという *Flavobacterium* 属の特徴と一致する一方、主要菌体脂肪酸組成は 16:1 ω7c/2-OH i-15:0 が 21.0%, i-C15:0 が 17.1%, a-C15:0 が 12.5%, 3-OH i-C15:0 が 11.7% であり、25℃ で生育可能であること、カゼイン、DNA、チロシンを分解しないこと、*N*-acetyl-β-glucosaminidase 活性を有することなどから近縁種と識別できた。以上の結果から、分離株 TC2 に対して *Flavobacterium algicola* sp. nov. を提案する。

### P-35 耐熱性 *Talaromyces* 属および関連菌の系統分類と検出法の検討

○弘 佑介<sup>1</sup>, 松澤哲宏<sup>1</sup>, 細谷幸一<sup>2</sup>, 中山素一<sup>2</sup>, 徳田 一<sup>2</sup>, 矢口貴志<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>千葉大・真菌センター, <sup>2</sup>花王(株)・安全研

*Talaromyces* 属およびその関連菌である *Hamigera*, *Byssoschlamys* 属は、子嚢胞子が耐熱性を示すことから食品、

飲料などの製造過程における事故原因菌として重要である。

*Talaromyces* 属は、Pitt (1979) によれば *Talaromyces*, *Purpureus*, *Thermophilus* の 3 section に分けられ、タイプ種 *T. flavus* を含む sect. *Talaromyces* のみ series *Flavi*, *Lutei*, *Trachyspermi* に細分され、sect. *Purpureus*, *Thermophilus* はそれぞれ 1 種のみから構成されている。本属には *Penicillium* 以外に *Geosmithia*, *Paecilomyces* をアナモルフとする数種があり、これらは Stolk, Samson (1972) の sect. *Emersonii* が相当する。その後、Tayler 及び杉山らにより本属は分子系統的に多系統と指摘された。今回、最近追加された種を含む 42 種および関連菌の 28S rDNA D1/D2 領域、 $\beta$ -チューブリン遺伝子の塩基配列を決定し、NJ 法により系統解析を実施した。

その結果、2 遺伝子の解析からえられた系統樹はほぼ一致し、次の 5 群に再分類された。1) ser. *Flavi* の主要種から構成される菌群、2) ser. *Trachyspermi*, *Lutei* の一部から構成される菌群、3) ser. *Lutei* の一部を除いた種から構成される菌群、4) *T. luteus*, *T. ocotl*, *T. thermophilus* から構成される菌群、5) sect. *Emersonii* の一部の種から構成される菌群である。一方、*T. purpureus* は ser. *Flavi* と、*T. leycettanus*, *T. spectabilis*, *T. striatus* は *Hamigera*, *Byssochlamys* 属と系統的に近縁であった。全体として、ser. *Flavi* と 2) の *Trachyspermi*, 及び 3) の *Lutei* の一部からなる菌群が単系統的なまとまりを示した。

この結果を用いて、*Talaromyces* 属の各菌群、*Hamigera*, *Byssochlamys* 属それぞれの検出法を検討した。

### P-36 財団法人発酵研究所研究助成

○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・分譲業務を行い、国内外の微生物の研究を支援してきたが、平成14年7月にコレクションおよび研究者をNBRCに移し、微生物保存機関としての使命を終了した。

そこで、発酵研究所は、これまで培ってきた微生物保存事業の精神と経験を生かし、カルチャーコレクションを支援するため、平成15年度から新事業として研究助成を開始した。この研究助成は、微生物の分離・分類・保存の研究を行っている研究者を対象とするものである。本ポスターでは、平成15～20年度研究助成の助成対象者および平成21年度(第6回)研究助成募集について紹介する。