

受賞講演

日本微生物資源学会学会賞

厄介な菌株の保存に取り組んで—真菌類培養株の保存法の改良—

中桐 昭

鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター (FMRC)

Struggling with troublesome fungal strains for preservation
— Improvement of preservation methods for various fungal cultures —

Akira Nakagiri

Fungus/Mushroom Resource and Research Center (FMRC), Faculty of Agriculture, Tottori University

私は1988年に財団法人発酵研究所(IFO)に入所して以来、NBRCそして現在の鳥取大学FMRCと所属する組織は変わったが、真菌類の菌株保存業務にずっとたずさわってきた。この間、私がコレクションの保存担当者として預かった菌株は、接合菌、担子菌、鞭毛菌(卵菌、ツボカビ)であった。接合菌類の菌株は主にL-乾燥法で、担子菌類と鞭毛菌類の菌株は凍結法で保存していたが、担子菌類と鞭毛菌類の中には、他の菌類で一般的に用いられる方法では凍結保存が困難な菌株が多く、寄託者から預かった菌株をうまく保存できなかったり、復元培養に失敗して分譲依頼者に迷惑をかけたりしたこともあった。また、業務のかたわら自分自身の菌類研究(海生菌類、水生菌類の分類、生態、進化に関する研究)で分離した菌株をコレクションに加える際にも、同様な問題に直面した。このような状況を少しでも改善しようと、保存法の改良に取り組んで自分なりにあがいてきたが、正直言って、まだ道半ばという状況である。このたび、まったく思いもかけず学会賞という栄誉ある賞をいただけることとなり、受賞講演の機会をいただいた。私がこれまで厄介な菌株を相手に、その保存法の改良に取り組んだ経験を紹介することで、現在カルチャーコレクションで、また、研究者自身の実験室で菌株保存に取り組んでいる方々に少しでも役に立てることがあるならばこれ以上の喜びはない。

凍結保存法の改良

担子菌類の中でも特に菌根性の担子菌類(マツタケのように植物と共生する菌群)は、その培養株の凍結保存が困難な場合が多い。寒天培地上では、腐朽(腐生)性の担子菌類よりは生育がかなり遅いものの、十分培養することができるのに、いざ保存しようと、腐朽性担子菌類と同様な方法で凍結すると、死滅しており復元できないことが多い。腐朽性担子菌類のほとんどが容易に凍結保存できることと比べると対照的である。一方、卵菌類やツボカビ類は多核嚢状体と呼ばれる体制で菌糸に隔壁がなく、菌糸のどこかが切断され

ると細胞質が流出してしまうなど物理的障害に弱いことが影響するのか、それとも細胞の体積が大きいか、凍結保存が困難な種が多い。私はこれらの凍結保存困難株の保存法の改良に取り組むにあたって、まず凍結保存の作業過程ごとに菌株の生残を左右すると考えられる要因を区分し、要因それぞれの最良の条件(正確には、多くの菌株に適用できる良い条件)を見つけ出し、それらを組み合わせることで良好な保存法の開発にたどり着けるのではないかと考えて取り組んだ。以下に、その要因と見出した改善策をまとめた。

冷却速度: 菌種、菌株によって好適な冷却速度は異なるが、多種多様な菌株に広く適用できる速度として1℃/分で冷却して凍結する方法を選んだ。また、凍結の際に用いるフリージングボックス内の外縁部と中央部との冷却速度の違いを緩和するために、フリージングボックスに紙の内張りをする工夫を加えた(西井、中桐、1991)。

凍結保護剤: さまざまな菌類の凍結保存に凍結保護剤として汎用されている10%グリセリン水溶液では、卵菌類の一部の生残率が低いが、5(or 10%)トレハロースとの混合液を用いると改善した。

前培養(基質): 菌種によってさまざまな天然基質を前培養培地に用いることにより、通常の寒天培地よりも凍結後の生残率が大幅に改善した。また、菌寄生菌などでは、宿主(エサ)となる生物との生育バランスを考慮して前培養する必要がある。

細胞のサイズ: 菌糸成長に不適な培地を用いて、菌糸の直径ができるだけ小さくなるように前培養する方が、凍結時の生残性が上がった(生育良培地≠保存良培地)。

生育期: 菌種、菌株により生残性が高い生育期が異なることがわかり、便法としてコロニーの内側と外側の両方の菌糸体を凍結保存することとし

た。遊走子で増殖するツボカビでは同調培養して、凍結に適したサイズの菌体にそろえて凍結することが有効。

保存温度：−80℃での担子菌株の保存において、菌群、菌種によっては長期保存中にわずかながら生残率の低下が見られることから (Ito & Nakagiri, 1996), 液体窒素など、より低温での保存が望ましい。

解凍温度：凍結標本を温水で急速解凍する際の温度は40℃よりも30℃の方がやや良い結果が得られ、しかも安全であると判断した。

復元培養：解凍して接種した菌体に含まれる凍結保護剤が乾燥によって高濃度化する影響を減じる効果がある液体培養が望ましいと判断した。

上に示した各要因の好適条件を組み合わせて凍結保存をすることにより、保存が可能となった菌株はあるが、依然問題が解決されない菌株も多い。特に、菌根性担子菌類や、鞭毛菌類（ツボカビ、卵菌）の中でも他の生物に寄生する菌の保存は難しいが、Sato et al. (2012)が前培養にパーライトを用いる凍結法の改良によって難保存性の担子菌株の保存に成功したように、まだまだ改良の余地はあると考えている。

“株”を保存する

菌株保存の実務を担当していて、もう一つの厄介な問題と感じていたのは、菌株の同一性の保証、確認をどうするかということである。このことが現実の問題となってしまったのが、2009年のJIS試験指定菌株の入れ替わり事件であった。これは、JIS Z 2911カビ抵抗性試験およびこれを準用する他のJIS規格で指定されている *Aspergillus niger* の2菌株 NBRC 6341 および NBRC 6342 が50年以上も昔に入れ替わっていたことが判明したもので、当時社会的な影響の大きさから重大な問題となり、その対応に追われた。その事実の発見から、調査、対応、収拾に至る過程の詳細は、すでに日本微生物資源学会誌に公表した (中桐, 岡根, 2009)。この事件で改めて実感したことは、まったく当たり前のことなのだが、菌株保存担当者が保存しているのは“株”であり、同一株を正確に次代につない

でいかなければならないということ、また、同一株であるかどうかを検証するのは容易ではなく、菌株の系譜をたどり、他機関に保存されている菌株と比較するなど、膨大な労力が必要であるということである。一方で、調査の過程でわかったことだが、IFO → NBRCと50年間にわたって何代もロット更新された菌株が間違いなく受け継がれてきたことは、これまでの実務担当者の努力と業務に対する誠意を証明することになった。

保存業務を続けるモチベーション

菌株保存業務は地味で、地道さが要求される仕事である。菌株にかかわるさまざまな厄介な問題（上述したのはその一部にすぎない）に取り組みながら業務を続けていく意志、誠意を持ち続けるには、この仕事の意義を自分なりに見出すことが必要だと思う。それは人それぞれに異なると思うが、恐らく、もしそれがなければ早晚担当菌株の品質は怪しいものとなり、その結果、コレクションの信用を失うことになりかねない。振り返ると、私の場合は、“Culture（菌株）はCulture（文化）”（菌株は文化であり、歴史であり、科学を支えるもので、育てて、次代につないでいくべきもの）と自分に言い聞かせてきたような気がしている。

文献

- Ito, T. & Nakagiri, A. 1996. Viability of frozen cultures of Basidiomycetes after fifteen-year storage. *Microbiol. Cult. Coll.* 12: 67-78.
- 中桐 昭, 岡根 泉 2009. JIS Z 2911カビ抵抗性試験菌株の入れ替わりについて. *Microbiol. Cult. Coll.* 25: 115-124.
- 西井忠止, 中桐 昭 1991. 卵菌類の液体窒素保存法の検討—冷却速度の検討および凍結用チューブケースの改良—. *Bull. JFCC* 7: 90-96.
- Sato, M., Sukenobe, J. & Nakagiri, A. 2012. Cryopreservation of cryosensitive basidiomycete cultures by application and modification of perlite protocol. *CryoLetters* 33: 86-94.

日本微生物資源学会奨励賞

Phylum *Bacteroidetes* と酢酸菌に関する分類学的研究

村松由貴

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター

Taxonomic studies of the phylum *Bacteroidetes* and acetic acid bacteria

Yuki Muramatsu

NITE Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation (NITE)

NBRC は、2002 年の設立以来 IFO から移管された株に加え、国内外研究者からの寄託、NBRC 職員による収集や海外との共同事業を行って、保存微生物株の充実を行ってきた。本講演では、私がこれらの業務に携わる中で見つかった Phylum *Bacteroidetes* に属する 1 新属及び 1 新種とタイ国との共同事業で収集した酢酸菌に関する分類学的研究について述べる。

【Phylum *Bacteroidetes* に関する分類学的研究】

Phylum *Bacteroidetes* は、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* (CFB) グループとも呼ばれ、2014 年 3 月時点では 18 科 265 属が記載されている。CFB グループは、表現性状に基づく分類が困難であり、属の境界がきわめて曖昧であったが、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた再分類が進められ、分類学的混乱はおおむね解決されてきた。また、分離株に基づく系統解析では、本菌群は従来考えられていたよりも多様性が大きいことが示唆されており¹⁾、近年はこのグループに属する新属や新種が多数報告されている。本研究では、NBRC に保存されている未知微生物資源に情報を付加するため、国内から分離された CFB グループの菌株に注目し分類学的研究を行った。

AM11-6^T 株は、沖縄県奄美大島の海水から分離された。2004 年以降に提案された新属新種を考慮して 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統関係を調べたところ、*Cryomorphaceae* 科に属する *Wandonia haliotis* Haldis-1^T と *Fluviicola taffensis* RW262^T とクラスタリングされ、それぞれとの 16S rRNA 遺伝子配列の類似度は、93.7% 及び 91.8% を示した。*Wandonia* 属および *Fluviicola* 属と生理・生化学的性状を比較したところ、両属は、生育に NaCl を要求しないが、AM11-6^T 株は、NaCl だけでなく MgCl₂ の要求性も見られた点が異なっていた。その他の性状においても違いが見られたことから、AM11-6^T 株を *Cryomorphaceae* 科の新属新種 *Salinirepens amamiensis* に分類することを提案した。

また、千葉と神奈川県で採集した貝から分離された 3 株について、*Flammeovirgaceae* 科に属する *Persicobacter* 属の新種 *Persicobacter psychrovidus* の提案を行った。*Persicobacter* 属は、1997 年に [*Cytophaga*] *diffluence* について設立された新属で、*Persicobacter diffluens* 1 種のみが記載されたが、近年に至るまで近縁株の報告例はない²⁾。*Persicobacter psychrovidus* は、既知種 *Persicobacter diffluens* が

15℃ 以下で生育が見られないのに対し、5℃ でも生育するという特徴を持つ。その他の特徴としては、CMC や Yeast cell 分解能の有無に違いが見られた。

【酢酸菌に関する分類学的研究】

本研究は、タイ及び日本における生物遺伝資源の保全と持続的な利用を目的として、タイの National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) との共同研究として実施した。タイ各地の様々な果実や花から分離した酢酸菌 302 株について 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定し、系統解析を行った。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、既知属から系統的に独立している 5 株が見つかり、これらについて 2 つの新属新種 *Tanticharoenia sakaeratensis*、*Ameyamaea chiangmaiensis* として提案した。また、*Acetobacter* 属、*Asaia* 属、*Gluconacetobacter* 属あるいは *Gluconobacter* 属に含まれた 197 株は 16S rRNA 遺伝子配列相同性から 33 シーケンスタイプに分けられたが、*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おり、新種である可能性が示唆された。その後、*Gluconobacter* 属 2 タイプの株に対して、*Gluconobacter kanchanaburiensis* と *Gluconobacter wancherniae* の 2 新種を提案した。

Acetobacteraceae 科は、2009 年の時点では 10 属が含まれていたが、2013 年には 33 属となっている。上記 2 新属新種その他、タイで分離した酢酸菌の 2 つの新属新種、*Neokomagataea thailandica* 及び *Swingsia samuiensis* と 3 つの新種、*Asaia spathodeae*、*Gluconobacter uchimurae* 及び *Acetobacter farinalis* を報告した。また NBRC に保存されている日本産酢酸菌の再分類を行い、*Gluconobacter oxydans* として公開されていた NBRC 3990 と、*Gluconobacter fraetorii* NBRC 3271、NBRC 3272、NBRC 3263、NBRC 3260、NBRC 3269 に対して、新種 *Gluconobacter roseus* と *Gluconobacter japonicus* を提案した。これらの報告については、共同研究先である BIOTEC 等で精力的に進められたものである。自身が共著となっているこれらの株に焦点を当てて述べる。

1) 中川ら。Microbiol. Cult. Coll., 20 (2): 41-51, 2004.

2) Nakagawa *et al.*, Int. J. Syst. Bacteriol., 47: 220-223, 1997.

シンポジウム

S1-1 微細藻類ユーグレナによる有用物質生産の現状と将来の可能性

鈴木健吾

株式会社ユーグレナ

The current state and future possibilities of useful material production
from the microalga *Euglena*

Kengo Suzuki

euglena Co., Ltd

微細藻類による生産されたバイオマスについては、一般的なバイオマス利用の考え方が変わらず、食品 (Food)、繊維 (Fiber)、飼料 (Feed)、肥料 (Fertilizer)、燃料 (Fuel) という順で基本的に付加価値が高く、上位からの利用を試みることで、環境負荷の軽減と高い事業性を同時に実現することが可能である。微細藻類の中でも当社が扱うユーグレナを例として、このバイオマスの 5F の考え方にあてはめると、付加価値の高い Food は機能性食品としての利用など多様な展開が可能で、現在はサプリメントやクッキーの形で実際に市場への供給が行われ流通している。Fiber は化粧品のエキスなどが一部実用化されているほか、生分解性プラスチックなどへの応用が期待されている。Feed においては、高機能性飼料としてたんぱく飼料などの代替物として市場を満たしていくことが考えられ、海洋資源の減少に伴う良質な飼料である魚粉価格の値上がりを抑えることができる可能性がある。Fertilizer としては、ユーグレナをそのまま肥料として施肥することで、窒素やリンを補うと同時に、土壌中の微生物活性を高めることができる可能性がある。Fuel に関してはユーグレナが生成するワックスエステルを取り出して利用することが考えられる。事業性を考慮すると、このような高付加価値の需要から満たしていくカスケード方式での展開を鑑みて、培養スケールを決定することが重要となる。

ユーグレナを含む微細藻類の大量培養は古くから研

究が行われて将来性に関しても期待される点が多いものの、コスト面や生産方法などを中心にいまだ議論・検証の余地があり、環境技術として社会に大きく寄与する形での実用化には至っていない。また、二酸化炭素固定を目的として藻類を培養する際のエネルギーバランスや二酸化炭素を吸収させて育てた微細藻類の有効利用などの研究は発展途上とされる点が多く、今後の重要な検討課題となっている。

一方、微細藻類を利用したバイオ燃料化技術の開発は世界中で急速に進展している。ビルゲイツが所有する投資会社が米国の藻類ベンチャー企業 Sapphire Energy 社に 100 億円規模の出資をしたこと、ヒトゲノムの解読に貢献した著名科学者クレイグ・ベンター博士が藻類を用いたバイオ燃料の量産化を行なうベンチャー企業 Synthetic Genomics 社を設立し、米石油最大手企業のエクソンモービルが 6 億ドル規模の投資を行なうことを決定したという事実からも、その注目度の高さがうかがえる。日本においては、土地や資源などに関する優位性が大きくないことから、短期的な視点から藻類培養による二酸化炭素固定技術や単なる燃料生産の技術として一面から見て取り組むのではなく、物質生産の新しい方法として、微細藻類の生産と利用を確立していくことが肝要である。

本講演では、株式会社ユーグレナが取り組む微細藻類の一種であるユーグレナを中心とした物質生産を軸とする事業と将来の可能性について言及する。

S1-2 伝統発酵漬物（すんき漬）の機能性乳酸菌を用いた発酵豆乳の作製

保井久子

木曾町地域資源研究所

Production of fermented soymilk using functional lactic acid bacteria isolated from traditional fermented vegetable pickle, the 'Sunki pickle'

Hisako Yasui

Kiso town area resource institute

1. はじめに

すんき漬は木曾地域に古来から伝わる伝統発酵漬物です。塩を使わず、赤蕪の蕪葉を湯通した後、ズミや山葡萄などを入れて漬物にしました。この漬け汁には多種多様の乳酸菌が多数（約 10^8 /ml）棲息しています。

乳酸菌の保健機能については、ヨーグルト乳酸菌を中心に様々な報告があり、大別すると、整腸機能、免疫調節機能そして生活習慣病予防機能になります。この中で、現在増加の一途をたどり、国民の1/3が罹患しているといわれているアレルギー疾患は、免疫機能が過剰になって発症する疾病です。この免疫機能を調節する乳酸菌株をすんき漬から選抜し、これを使って抗アレルギー発酵豆乳を作製することを試みました。

2. 抗アレルギー機能を有する乳酸菌株の選抜

現在、増加している花粉症、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー性下痢症、喘息などは、I型アレルギーに分類され、IgE抗体が関与して発症します。

そこで、すんき漬の漬け汁から分離した乳酸菌から、IgE産生を抑制する菌株を、マウスの脾臓細胞を用いて選抜しました。その結果、*Pediococcus pentosaceus* Sn26 (Sn26) が選抜されました。

次に、食物アレルギー性下痢症マウスを用いて、Sn26の抗アレルギー機能を検証しました。Sn26 (1 mg/日) を5日間/週、約7週間経口投与すると、下痢発症率は有意に減少し、血中IgE量も有意に低下しました^{1,2)}。この投与量をヒトに換算(表面積換算)すると、約100 mg/日(約 10^{11} 個/ml)の摂取量となりました。

3. *Pediococcus pentosaceus* Sn26の発酵豆乳への応用

豆乳の各種成分には様々な機能があることが報告されています。イソフラボンはがん予防機能や骨粗しょう症予防機能などが報告されています。そこで、豆乳の様々な機能にSn26の抗アレルギー機能およびSn26の代謝産物による機能性の付加を期待して、Sn26を用いた発酵豆乳を作製しました。

各種大豆から作製した豆乳を、グルコース添加または無添加条件で、Sn26を接種して30℃、24時間培養し、生菌数、pHおよび凝固の有無などを測定・観察しました。その結果、木曾産芝霧種の豆乳では、グルコース添加で生菌数は約 10^9 個/mlになり、pHは4.3-4.6で、凝固しました。グルコース無添加においても、生菌数が約 10^9 個/mlでしたが、pHは6.3-6.8

と低下せず、非凝固の形状でした。以上のことから、「地域おこし」および「地産地消」という観点から、木曾産芝霧種豆乳とSn26を用いた発酵豆乳を作製しました。

通常「飲むヨーグルト・飲む発酵豆乳」は、凝固したものを破碎して作製するので、酸味が強く、酸味を消去することは困難という欠点があります。しかし、Sn26をグルコース無添加で培養すると、凝固せず、酸味のない、そして多量の生菌数をもつ「飲む発酵豆乳」ができることがわかりました。この現象は、同菌種の標準株および他の乳酸菌種では認められなかったことから、Sn26特異的であることがわかりました。これは、Sn26の代謝機構の違いと考えられます。

次に、グルコース無添加条件下でのイソフラボンの変化を測定すると、Sn26は、グリコシド型イソフラボン（ゲニスチンおよびダイジン）をアグリコン（ゲニステインおよびダイゼイン）にすることがわかりました。以上のことから、Sn26はβ-グルコシダーゼをもち、グリコシド型イソフラボンを吸収の良いアグリコンにすることが考えられました。

さらに、官能試験により、グルコース無添加発酵豆乳は、豆乳やグルコース添加発酵豆乳に比べ、おいしく、豆臭さが減少したとの評価が得られました³⁾。

4. おわりに

すんき漬に棲息していた抗アレルギー機能を有する乳酸菌株(Sn26)と木曾産芝霧種の大豆の豆乳を用いて発酵豆乳を作製しました。そして、グルコース添加培養で「酸味のある食べる発酵豆乳」、グルコース無添加培養で「酸味のない飲む発酵豆乳」ができました。Sn26の培養条件による代謝機構の違いについては現在研究中です。

また、官能試験により、「飲む発酵豆乳」は、「豆乳や食べる発酵豆乳」に比べて、おいしく、豆臭さが減少しているとの評価を得ました。

さらに、このSn26は、豆乳中の配糖体イソフラボンをアグリコン化することがわかり、腸からの吸収を良くし、がん予防や骨粗しょう症予防にも役立つと思われる。

5. 参考文献

- 1) Biosci. Biotech. Biochem. 74: 329-335, 2010
- 2) 日本乳酸菌学会誌 21: 42-49, 2010
- 3) 特願 2013-271226: 発酵豆乳飲料及びその製造法

S1-3 発電微生物

渡邊一哉

東京薬科大学生命科学部応用生命科学科

Electricity-generating microbes

Kazuya Watanabe

School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

発電微生物とは、代謝の過程で発生する還元力を電子として細胞外に放出する微生物のことで、電極を電子受容体としてエネルギーを獲得する。このようなエネルギー代謝を行う微生物が自然界に存在することが知られるようになったのは 21 世紀になってからであるが、すでに広く社会の関心を集めている。例えば、昨年発行された「ドラえもん ふしぎのサイエンス」という小学生向けの本では、「食べ物を分解するとき電気を作る電流生成菌を使えば、ごはんを食べて動くロボットだって夢じゃない」と発電微生物のことが紹介されている。また、昨年発行された朝日新聞 Globe の「菌のちから」という微生物に関する特集では、「土でケータイを充電、微生物電池がアフリカを変える」、および「污水处理をしながら発電」という発電微生物に関する 2 つの記事がトップに掲載された。このように注目を集める理由としては、第一にその生産物が電気ということだろう。これは、それまでに知られている微生物産物とは大きく異なるものであり、さらに東日本大震災後の電力問題への関心の高まりとも関連する。現在、このような状況を背景に、発電微生物を利用したエネルギー回収装置“微生物燃料電池”の実用化を目指す研究が精力的に行われている。

ここ数年の研究において、土や底泥など、嫌気環境のいたるところに発電微生物が生息することが示されている。ところで、“電極”など存在しない自然環境

中に、なぜ発電微生物が広く生息しているのだろうか。この問いの答えとして我々が新しく提唱したエネルギー代謝が、異種微生物が電流を介してエネルギーをやり取りする“電気共生”である (Kato *et al.* 2012 PNAS)。微生物に限らず、あらゆる生物はほかの生物種とエネルギーをやり取りしながら生きている (共生)。植物が太陽エネルギーを化学エネルギー (有機物) に変え、それを食べることで動物たちは生育・繁殖し、使い切れなかったエネルギー (排泄物) や遺体は微生物たちのエネルギー源となる。このような共生関係はすでによく知られているが、他種微生物と電子をやり取りする共生 (すなわち電気共生) が土壌細菌の混合培養モデル共生系を用いた実験によりはじめて実証された (Kato *et al.* 2012 PNAS)。さらに、モデル共生系だけではなく、水田土壌や海洋底泥中の微生物群集においても電気共生がおこることが示唆されてきている。つまり、環境中の様々な細菌が“マイクロな送電網”を利用して共生しているといえよう (渡邊, 加藤 現代化学 2013)。

微生物燃料電池は、21 世紀になるまで環境中の微生物に秘められていた営みを利用したバイオプロセスである。微生物燃料電池の研究を行っている、環境中にはまだまだ未知の有用微生物機能が眠っていることに、あらためて気付かされる。

SI-4 草木材からエタノールをつくる触媒技術の実用化展開

市川 勝

北海道大学名誉教授

Industrial development of catalytic technology for direct ethanol production from non-food biomass

Masaru Ichikawa

Emeritus Professor of Hokkaido University

1. はじめに

これまでの微生物や醗酵菌を利用する生物資源化技術とは異なる、バイオマスを原料に用いて触媒変換技術で燃料、医薬農薬や石油化学製品をつくりだす“バイオマスリファイナリー技術”に関心が高まっている。最近米国では、化学製品用の石油消費量を抑制して、需要増加分をバイオマス由来のもので補い、2050年の化学品生産量の50%をバイオマス由来のものにする計画を進めている。わが国においても、“バイオマス日本21戦略”でこれまでの醗酵技術と平行して、バイオマスからプラスチックなどの石油化学製品や燃料（ガソリンやアルコールなど）を製造するバイオリファイナリー技術の研究開発が重点課題とされている。ここでは、木質バイオマスの改質ガスからエタノールを直接合成する触媒技術とその実用化展開について紹介する。

2. バイオマスのガス化・エタノール直接合成技術

30年ほど前に、通産省工技院委託プロジェクト「一酸化炭素を原料とする基礎化学品の製造法」において「合成ガスからの直接エタノール合成触媒技術開発」が実施された。石炭や天然ガス由来の合成ガスを用いてエタノールを直接合成する触媒技術($2\text{CO}+4\text{H}_2\rightarrow\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$)の研究開発がなされた。その後、エタノール直接合成の反応機構や触媒開発など基盤研究が国内外で展開された¹⁻³⁾。最近には、高温水蒸気による外熱式ガス化技術（農林バイオマス3号機）が長崎総合科学大学 坂井教授により開発されて、草木バイオマスから高効率（<75%）で改質ガスの製造が可能になった。2009-2010年にこのガス化技術とエタノール直接合成触媒技術と組み合わせた実証試験が東京農業大学、積水化学、長崎総合科学大学の共同開発で行われた^{4,5)}。杉、ソルガム、バガス、稲わらを原料にして改質ガス化で得られたバイオマスガス（COとH₂混合ガス）を用いて、エタノール直接合成装置でバイオエタノールをエタノール転化率10-35%、エタノール選択率70-85%（主副生物はメタン）で直接合成できる。出口採取の粗エタノール濃度は50~60 vol%であった。エタノール合成反応は、バイオマスガスを加圧（1-3 MPa）条件で反応温度（260-280℃）、SV: 3000~9000 h⁻¹で行う。実用化エタノール合成プラントでは、1 tの木質バイオマスから得られる1500 Nm³の改質ガスから99%エタノール410 kgとメタン100 Nm³が得られるプロセス設計である。これまでの研究開発と実証試験結果から、総合エネルギー効率および製造コストの検討を行い、木質バイオマス原料からバイオエタノールを製造原価60-80円/Lで生産できるコスト試算がなされている。

現状の発酵法技術でのエタノール製造原価目標（120-150円/L）に比べて、ガス化・エタノール直接合成プロセスの経済性が評価されている^{6,7)}。また、産業廃棄物、例えばパルプ、古紙や衣類繊維などをバイオマス原料としたガス化・エタノール直接合成についても実用化に向けた検討が現在企業間で進められている。これらバイオマスからのエタノール合成を基点として、エチレン、プロピレンやブタジエンに触媒変換して、バイオの冠を付けたポリエチレン、ポリプロピレン、塩化ビニル樹脂や合成ゴムなどの石油化学製品の市場への登場が期待される。

3. まとめ

バイオマスリファイナリー触媒技術の実用化の要件を考えてみよう。まず、同一スペックでバイオマス由来のガス原料を経済的で安定に大規模供給する工業原料化技術の開発が必要である。決まったスペックの原料ガスであれば、アルコール合成やFT合成などの触媒プロセスで、基幹化学原料（ケミカルズ）が生産される。これにより、バイオプラスチック、アルコールやDiesel燃料について、コスト面での経済性や、石油由来製品に対する競争力など経済性評価ができる。一方、バイオマスの生産体制と原料コスト試算や流通システムの整備も重要な課題である。これまでの“食と住”に軸足を置いた農林産業分野においては、草木バイオマスの“エネルギー作物”に向けての新たな育種開発が求められる。バイオマス由来の燃料や化学製品の生産拡大が促進されて、石油消費を減らし、CO₂排出削減など低炭素社会に向けた“豊かで安心な暮らし”の実現を期待したい。

参考文献

- 1) 市川 勝, C1化学技術集成, pp 220-247, サイエンスフォーラム出版 (1980); M. Ichikawa, Chem. Tech., 674 (1982); J. Phys. Chem., 90, 4752 (1986).
- 2) シーワン化学技術研究組合, シーワン化学成果総合報告 (1987)
- 3) 市川 勝, 監修「天然ガス高度利用技術一開発研究の最前線」エヌ・テーエス出版 (2001)
- 4) 農水省委託プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」平成21年度研究成果報告書, pp 258-263
- 5) 市川 勝, 資源環境対策, 86 (2005), 週刊農林, 1914号4-7 (2005)
- 6) 市川 勝, 監修「バイオマスリファイナリー触媒技術の新展開」シーエムシー出版 (2011)
- 7) 市川 勝, 日本エネルギー学会誌, 86, 466 (2009), 日本農業新聞: 12.8.2010 掲載

S2-1 Application of MALDI-TOF MS in the quality control of culture collections

Peter Schumann

Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany

Since the introduction of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for classification and identification of bacteria, yeasts and fungi approximately twenty years ago this technique has proven its superiority over classical phenotypic methods and is even challenging technologies based on nucleic acid sequences by its exceptionally favourable ratio of analytical turn-around time to costs. MALDI-TOF MS has found increasing application in medical diagnostics, pharmaceutical quality control and environmental research as well as in veterinary medicine and the food industry. Biological Resource Centres are introducing this high-throughput technique for internal quality control of their large strain holdings. MALDI-TOF MS has the potential of being an automated analytical tool for confirmation of the identity of strains obtained from the depositor, for control of conservation steps and for supplying customers with strains of guaranteed identity. Application-oriented culture collections use MALDI-TOF MS for rapid and efficient de-replication of isolates before

subjecting them to complex screening programs.

MALDI-TOF MS applications in microbiology have had a high impact on the scientific literature and various procedures for specific applications have been proposed. However, there is still a need for proven and tested protocols for how to prepare samples under consideration of problematic organisms, for suggestions on how to optimise measurement conditions in order to record high-quality spectra and for guidelines on how to create customized databases that guarantee reliable identification.

While MALDI-TOF MS (unlike sequence analyses of conservative genes) appears to be inappropriate for information on the relationship of distantly related genera or even higher taxonomic ranks, it is perfectly suited for differentiation and identification of taxonomically soundly defined bacterial species. A taxonomic resolution high enough for subspecies or even strains can usually not be achieved by MALDI-TOF MS as applied in routine identification but requires sophisticated measures for increasing the discriminatory power of this technique.

S2-2 Nuances on the application of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the microbial identification

Cledir Santos and Nelson Lima

Micoteca da Universidade do Minho, Centre of Biological Engineering, Braga, Portugal

Post-Graduate Programme in Agricultural Microbiology, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight (MALDI-TOF) is a soft ionisation based Mass Spectrometry (MS) technology suitable for application on large biomolecules. It has emerged in the late of 80s as techniques for the ionisation of large proteins (Tanaka et al. 1988). The 2002 Nobel Prize for chemistry was awarded to Koichi Tanaka for the use of MALDI-TOF with biological macromolecules. This technique has been experimentally used for discriminating microorganisms based upon chemical compositional information alone, or by the use of multiple characters (the polyphasic approach). MALDI-TOF for the identification and classification of microorganisms needs statistical tools to enable comparisons of the unknown biomarkers with reference molecular masses. Ribosomal proteins are used normally as reference molecular masses as they are conserved and abundant biomarkers in the cells. Recent studies using MALDI-TOF for rapid and reliable microbial identification, show considerable promise (Santos et al. 2010; Rodrigues et al. 2011; Passarini et al. 2013; Nicolau et al. 2014; Pereira et al. 2014). Furthermore, the technique is rapid, reliable and inexpensive in terms of labour and consumables when compared with other biological techniques. The full impact of this approach has been now appreciated once more diverse species have been studied in detail. Currently, based on the acquired knowledge of

MALDI-TOF application on the microbial identification, it is a sound technique that adds an additional step for polyphasic microbial identification. MALDI-TOF is essential when there is a paucity of characters for defining many species. Nevertheless, even with the best polyphasic system, identification of some microbial taxa remains time-consuming and determining what represents a species remains subjective. This communication will focus on the nuances of the application of MALDI-TOF MS for the microbial identification. Potentialities and applications of the technique from the chemical to the life sciences fields with particular attention to the microbial identification and microbial proteomics will be discussed.

References

- Nicolau, A., Sequeira, L., Santos, C., Mota, M. 2014. *Aquatic Biology*, 20: 139-144.
- Passarini, M.R.Z., Santos, C., Lima, N., Berlinck, R.G.S., Sette, L.D. 2013. *Arch. Microbiol.* 195: 99-111.
- Pereira, L., Dias, N., Santos, C., Lima, N. 2014. *Enferm. Infecç. Microbiol. Clin.* 32: 11-17.
- Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., Lima, N. 2011. *J. App. Microbiol.* 111: 877-892.
- Santos, C., Paterson, R.M.R., Venâncio, A., Lima, N. 2010. *J. App. Microbiol.* 108: 375-385.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. 1988. *Mass Spectr.* 2: 151-153.

S2-3 Next-generation of omics for microbial identification and characterization: what is needed?

Nelson Lima and Cledir Santos

**Micoteca da Universidade do Minho, Centre of Biological Engineering, Braga, Portugal
Post-Graduate Programme in Agricultural Microbiology, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil**

The rapid development in technologies (e.g., DNA sequencing and mass spectrometry) allows very high-definition and quantity of data concerning DNA sequences, and transcriptome, proteome and metabolome profiles. These will, undoubtedly, significantly increase our knowledge about microorganisms. All these data only will have utility if endowed with bioinformatics tools to improve structural and functional annotation mechanisms to correctly assign the data. For microbial identification and characterisation, the next-generation of omics, with integrated data systems, will give an unprecedented opportunity to go beyond the current boundaries of (a) species identification, (b) the strain level with specific profiles, such as multiple-drug resistance, different expressions to environmental stimuli (epigenetics), (c) complex multi-operon pathways and, (d) genome level modifications. Besides these achievements, the concept of some microbial species remains ambiguous and the delineation of new species, such as in some filamentous fungi, can be controversial. Our workable fungal species definition incorporates the phylogenetic species concepts of population, lineage, and phenotype, assuming that the genotype of the

species is only an indirect indication of phenotype and ecological adaptation. Taking this into consideration, the current authors use the polyphasic approach for identification and characterisation of filamentous fungal strains (Simões et al., 2013). Integrated and sound information about each fungus (e.g., morphological and molecular descriptions, including modern spectral data from MALDI-TOF mass spectrometry, physiological and biochemical features, ecological roles, and societal risks or benefits) are the key elements in fungal identifications. To enrich our knowledge of microbial diversity, and to solve the problems encountered in fungal identification and characterisation, the next-generation of omic technologies will be presented and discussed.

Reference

Simões, M.F., Pereira, L., Santos, C. and Lima, N. 2013. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: Concepts and applications. In: *Management of Microbial Resources in the Environment* (Malik, A., Grohmann, E. & Alves, M., Eds.), Chap. 5, pp. 91-117. Springer, Dordrecht. ISBN 978-94-007-5930-5.

S2-4 The challenge to proteotyping of bacteria based upon the *SIO*-GERMS method

Hiroto Tamura

Meijo University, Nagoya, Japan

Whole-cell (or intact cell) matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) based on intact protein profiling (so-called fingerprint) has been introduced for reliable identification of microbes as an alternative approach for their rapid and cost-effective identification, especially in diagnostic laboratories, though its microbial discrimination below the species level was rarely approached. While MALDI-TOF MS shows better correlation to 16S rRNA gene sequencing than morphological classification the reproducibility of MALDI-TOF MS has been a major concern. Moreover, this technique is not effective when there is no available database like especially in environmental microbes. Therefore, our research has been focused on the standardization of the strain level discrimination method for environmental microbes with the reproducibility. Since the majority of the detected MS peaks is composed of highly conserved proteins with house-keeping functions such as ribosomal proteins the *SIO-spc-alpha* operon, of which more than half of the ribosomal subunit proteins are encoded and highly conserved among eubacterial genomes, was selected for biomarker mines. Construction of the working database for MALDI-TOF MS analysis is as follows; first, MALDI-TOF MS analysis of the genome-sequenced strains are performed to have the observed m/z values. Second, the theoretical m/z values of ribosomal proteins in this operon are calculated by sequence data from NCBI databank for genome-sequenced strains or determination of the DNA sequence by using designed primers against the consensus DNA sequences, and then the candidate biomarkers are selected by comparison

with the theoretical m/z values of each ribosomal proteins *in silico*. Third, the reliable m/z values of candidate biomarkers are corrected by comparing the observed m/z values of the selected biomarkers with their *in silico*-calculated m/z values (working database). Then, our standardized method, designated '*SIO*-GERMS (*SIO-spc-alpha* operon Gene-Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum) method', was applied to the discrimination of environmental isolates and others.

The *SIO*-GERMS method successfully discriminated *Pseudomonas putida* at the strain level and *Pseudomonas syringae* at the pathovar level by using 14 and 8 ribosomal proteins, respectively. Similarly, the selected biomarkers could distinguish the surfactant degrader of the genera *Bacillus* and *Sphingopyxis* despite only two and one base difference in the 16S rRNA gene sequence, respectively. The selected 14 biomarkers discriminated *Lactobacillus casei* into four major clusters precisely at (sub)species level. Furthermore, the *SIO*-GERMS method could discriminate enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157, O26 and O111 serovars with a high level of confidence.

As the *SIO*-GERMS method reflects different evolutionary lineages for ribosomal proteins backed the multi-gene sequence information the *SIO*-GERMS method, similar to multilocus sequence typing (MLST), provides an accurate means to discriminate the bacteria below the species level across the microbial kingdom with the reproducibility. In the near future, the computer-aided discrimination scheme based upon the *SIO*-GERMS method will be developed as Strain Solution.

一般講演

O-1 ナガキクイムシ複合共生系から微生物資源を獲る

○遠藤力也¹, 升屋勇人², 大熊盛也¹

¹理研 BRC-JCM, ²森林総合研究所

Exploring microbial resources from the multi-partite symbiotic system of platypodid beetles

○Rikiya Endoh¹, Hayato Masuya², Moriya Ohkuma¹

¹RIKEN BRC-JCM, ²Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

1990年代以降、劇症型樹木病害の一つであるブナ科樹木萎凋病（ナラ枯れ）の被害拡大に伴って、本病害のベクターであるナガキクイムシ科養菌性クイムシの生態解明が喫緊の課題となっている。養菌性クイムシは樹体内に営巣し、その巣壁（坑道, Beetle gallery）で共生菌を育てて餌にするといわれるが、特にナガキクイムシ科についてその菌類群集構造や構成菌種に関する知見は乏しかった。ナガキクイムシ科養菌性クイムシの坑道の菌類群集を解析したところ、未同定の酵母が多数分離された。しかし蛹室を含む坑道奥部の菌類群集は極めて安定しており、3種の菌類 *Raffaelea quercivora*, *Ambrosiozyma kashinagacola* および *Candida* sp. が宿主虫の生態に密接に関係していることが強く示唆された (Endoh *et al.*, 2011)。先行研究では関連菌類のみを解析対象としており、ナガキクイムシの生態に密接に関わる原核微生物については全く知見が無かった。共生系の構成要員として原核微生物も重要な役割を果たしている可能性は十分想定されるが、この点を検討するためにはまずナガキクイムシの生活史に密接に関連する原核微生物種を特定することが課題であった。

和歌山県白浜市内に岡木丸太を設置し、そこに穿孔したナガキクイムシの坑道壁の微生物群集構造を次世代シーケンサーにより解析した。16S rRNA 遺伝子部分塩基配列の相同性検索の結果から、供試した6検体（坑道）全てで放線菌および酢酸菌の一種と推定される菌種が坑道壁に棲息していた可能性が示唆された。

共生菌を育てて餌にする菌栽培昆虫（Fungus-farming insects）としてハキリアリ（Attine ants）がよく知られているが、ハキリアリの共生系は少なくとも6者の微生物が関与する複合共生系であるといわれる。ナガキクイムシも菌栽培昆虫の一群であり、ハキリアリの共生系と同様、複数の共生微生物群が関与した複合共生系を有する可能性が今回の結果から考えられた。今後、共生系の中で重要なニッチを占めると予想される原核微生物にターゲットを絞り、ナガキクイムシ関連基質からの分離・培養を試みる予定である。培養株を確立してリソース化することで、国産のユニークな微生物資源のラインアップを整備することに貢献できるだろう。

O-2 木曾町土壌からの枯草菌の分離とその特性調査

○青島一紀¹, 稲垣秀一郎¹, 保井久子²

¹信州大学大学院機能性食料開発学専攻, ²木曾町地域資源研究所

Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* from soil of Kiso town

○Kazuki Aosima¹, Shyuichiro Inagaki¹, Hisako Yasui²

¹Department of Sciences of Functional Foods, Graduate School of Agriculture, Shinshu University, ²Kiso town area resources institute

【目的】グラム陽性の芽胞形成細菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は土壌や空气中に普遍的に存在する常在菌の一種である。近年、本菌種の安全性や抗菌物質生産能からさまざまな農業分野での利用が検討されており、微生物資源の一つとして有望視されているが、その効果の科学的根拠に関して深く検証された例は少ない。本研究では、生ゴミの腐敗による環境汚染に着目し、木曾町土壌から分離した枯草菌株の3種の腐敗菌に対する抗菌作用及び生育抑制能を評価した。

【方法】木曾町内で採取した土壌サンプルを煮大豆に添加して一晩置き、大豆の表面で生育した菌膜を滅菌水に懸濁、希釈し、希釈液をプレートに塗布した。生育したコロニーから枯草菌のコロニーの特徴である不透明、乳白色、非光沢のコロニーを爪楊枝にて採取して単離し、実験に用いた。枯草菌の腐敗菌に対する抗菌活性及び生育抑制能を評価するために、実際に腐敗生ゴミから単離した *Enterobacter* sp., 製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー部門より購入した *Morganella morganii* subsp. *morganii* NBRC 105691, *Enterococcus faecalis* NBRC 12965 の3種の菌を用いた。枯草菌の抗菌活性は、腐敗菌を過剰に塗抹したSCD寒天培地に枯草菌の前培養液を10 μL滴下し、37°Cで24時間保温後、形成された阻止円の大きさを測定することにより評価した。また、枯草菌

の腐敗菌に対する生育抑制能は、枯草菌および腐敗菌の前培養液 10 μ L を SCD 液体培地 1 mL 中で 48 時間攪拌培養し、適宜希釈した培養液を SCD 寒天培地に塗抹、37°C で 24 時間保温後、培地中に生育した枯草菌と腐敗菌のコロニー数の割合を指標に求めた。3 種の腐敗菌全てに対して抗菌活性および生育抑制能が認められた枯草菌株を 16S rRNA 系統解析を行い、菌の同定を行なった。

【結果】単離した枯草菌 314 株の腐敗菌抑制試験および抗菌試験を行なった結果、全菌株のうち 7 株において、3 種の腐敗菌に対する抗菌活性および生育抑制能の両方を有していた。また、16S rRNA 系統解析の結果、7 株全てが枯草菌である *Bacillus subtilis* もしくはその近縁種である *Bacillus amyloliquefaciens* と高い相同性を有していた。

今後、本研究において選抜をした 7 株について、産業における有用な利用法を検討していく予定である。

0-3 西表島からの *Demequinaceae* 科放線菌の分離とゲノム情報を利用した分類研究

○浜田盛之、柴田千代、市川夏子、細山 哲、小牧久幸、田村朋彦、藤田信之、鈴木健一朗
独・製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC)

Isolation of actinobacteria belonging to the family *Demequinaceae* from Iriomote Island and their taxonomic study using the genome information

○Moriyuki Hamada, Chiyo Shibata, Natsuko Ichikawa, Akira Hosoyama, Hisayuki Komaki, Tomohiko Tamura, Nobuyuki Fujita, Ken-ichiro Suzuki

NITE Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NBRC)

【目的】*Micrococcineae* 亜目は、放線菌の中でも菌糸状の形態を示さない分類群に含まれ、酵素生産菌や難分解性物質分解菌などの有用菌が知られる分類群である。我々は 5% NaCl を添加した 5 倍希釈 NBRC 802 培地を分離培地として海洋サンプルから分離を行うことにより、効率的に *Micrococcineae* 亜目に属する分離株が得られることを報告し¹⁾、得られた分離株から *Demequinaceae* 科の新属新種 *Lysinimicrobium mangrovi* を提唱した^{1,2)}。しかしながら、*Demequinaceae* 科はこれまでに *Demequina* 属および *Lysinimicrobium* 属の 2 属しか報告が無く、特に *Lysinimicrobium* 属は 1 種 1 株のデータのみに基づいて新属提唱したため、属レベルの分類学的多様性の解明には至っていない。本研究では、*Demequinaceae* 科の多様性を明らかにすることを目的として、*Demequinaceae* 科に近縁な菌株の分離を試みるとともに、得られた分離株について多相分類学的研究を行い、科および属レベルの分類学的多様性および各分離株の分類学的位置を検討した。

【方法および結果】これまでに *Lysinimicrobium* 属の株が唯一分離されている西表島のマングローブ域を中心にサンプリングを行い、5% NaCl および抗生物質を添加した 5 倍希釈 NBRC 802 培地を用いて希釈平板法により分離を行った。14 試料から 150 株を分離し 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定したところ、全分離株の 39% にあたる 58 株が *Demequinaceae* 科に近縁であった。これらの株は 16S rRNA 遺伝子塩基配列が重複している株を除くと *Lysinimicrobium* 属に近縁なものは 13 種類、*Demequina* 属に近縁なものは 7 種類に絞ることができ、*Demequinaceae* 科の既知種と高いブートストラップ値で支持される単系統のクラスターを形成した。各分離株の各種化学分類学的性状を調査したところ、全ての株が *Demequinaceae* 科の主要メナキノンであるデメチルメナキノン DMK-9 (H_4) を有していた。また、*Lysinimicrobium* 属は *Demequina* 属とペプチドグリカンタイプが異なることから別属として提唱したが、本研究で分離した各属に近縁な株のペプチドグリカンもそれぞれ既報と一致しており、ペプチドグリカンタイプが *Demequinaceae* 科の属レベルの分類指標として極めて有効であることが立証された。続いて、各分離株の培養性状や生理生化学的性状を詳細に調査したところ、分離株間でいくつかの差異が認められ、*Lysinimicrobium* 属および *Demequina* 属のいくつかの新種であることが示唆された。現在、各分離株の遺伝子レベルでの違いを明らかにするために、既知種および分離株の代表株についてゲノムを解読して *in silico* ハイブリダイゼーションおよび MLSA (Multilocus sequence analysis) を進めている。

1) 浜田ら、2012 年度日本放線菌学会大会講演要旨集, p. 49.

2) Hamada, M. et al. (2012). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62, 1731-1735.

O-4 *Bacteroidales* 目に属する鉄腐食細菌およびその関連菌

○飯野隆夫¹, 森 浩二², 伊藤 隆¹, 工藤卓二¹, 鈴木健一朗², 大熊盛也¹

¹ 理研 BRC-JCM, ² 独・製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC)

Iron-corroding bacteria and phylogenetically related bacteria belonging to the order *Bacteroidales*

○Takao Iino¹, Koji Mori², Takashi Itoh¹, Takuji Kudo¹, Ken-ichiro Suzuki², Moriya Ohkuma¹

¹RIKEN-BRC JCM, ²NITE Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NBRC)

石油備蓄基地施設や天然ガス・パイプラインなどで問題視される金属腐食において、急速な腐食の進行や局所的な腐食現象が確認されることから、微生物による金属腐食 (= 微生物腐食) の関与が疑われている。この問題に対して、硫酸塩還元菌が主な原因菌として頻繁に研究されているが、我々は *Bacteroidales* 目に属する硝酸塩還元菌 MIC1-1 株が鉄腐食を引き起こすことを見出した。 *Bacteroidales* 目の細菌による微生物腐食の事例は過去にないが、一方で分離株数が少なく本目内の鉄腐食菌の分布は不明である。本研究では原油や干潟土壌から *Bacteroidales* 目に属する鉄腐食細菌およびその関連菌を分離することを目的とした。

2003-2004 年に、石油備蓄基地から原油を、富津海岸から干潟土壌を収集した。本試料を嫌気置換した人工海水培地に接種し、25°C で集積培養を行った。集積培養を数回繰り返した後、同組成の寒天培地を用いて新規細菌 4 株を新たに純粋分離した。

鉄腐食細菌 MIC1-1 株を含む分離株 5 株は通性好気性、非運動性、無芽胞、カタラーゼ陰性のグラム陰性桿菌であった。炭素源 (D-グルコースや有機酸など) を増殖に必須要求し、MIC1-1 株と MIC1-4 株は硝酸塩還元と鉄酸化を、Fu11-1 株と MIC3-8 株は鉄還元を行った。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析の結果、全 5 株は *Bacteroidales* 目 *Prolixibacteraceae* 科に属した。分離株のうち、MIC1-1 株と MIC1-4 株は *Prolixibacter* 属に、Fu11-1 株と MIC3-8 株は *Draconibacterium* 属に近縁だったが、残る Fu11-5 株はいずれの属にも属さず、近縁種との塩基配列の相同性は 87-91% であった。Fu11-5 株は系統的に独立することに加え、細胞形態、生育指摘温度、利用できる糖など複数の点で既知種と異なった。以上から、Fu11-5 株に対し、新属新種 *Mariniphaga anaerophila* を提唱する。また、Fu11-5 株近傍の 16S rRNA 遺伝子塩基配列解析に基づいて、*Draconibacteriaceae* 科を *Prolixibacteraceae* 科に統合し、既存の科に属さない *Marinifilum* 属の系統に対し、新科 *Marinifilaceae* 科を設置することを提唱する。

O-5 緑藻群体系ボルボックス目の新属 2 種の分類と分布

○野崎久義¹, 山田敏寛¹, 高橋文雄², 松崎 令¹, 仲田崇志³

¹ 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻, ² 立命館大学生命科学部, ³ 慶應義塾大学政策・メディア研究科先端生命科学研究プログラム/先端生命科学研究科

Taxonomy and distribution of two species of a new genus in the colonial Volvocales

○Hisayoshi Nozaki¹, Toshihiro K. Yamada¹, Fumio Takahashi², Ryo Matsuzaki¹, Takashi Nakada³

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo, ²College of Life Sciences, Ritsumeikan University, ³Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance/Institute for Advanced Biosciences, Keio University

群体系ボルボックス目は単細胞・同型配偶のクラミドモナス様の祖先から約 2 億年前に進化し、4 細胞・同型配偶のシアワセモ (*Tetrabaena*) から >500 細胞・卵生殖のボルボックス (*Volvox*) に至るまでの中間段階の種が現存する。従って、本生物群は多細胞化や有性生殖の進化を研究する格好の生物群である。この中のボルボックス科は娘群体形成初期に典型的な反転 (inversion) を行うことと群体全体を包む連続した細胞壁構造をもつことを特徴とし、16 細胞・同型配偶のパンドリナ (*Pandorina*) やボルボックス (*Volvox*) 等のように群体は回転楕円体であるが、1 属プラチドリナ (*Platydorina*) だけが平板状の群体をもつ。2000 年から開始した葉緑体 5 遺伝子系統解析は群体系ボルボックス目の基本的な系統関係を明らかにしたが、プラチドリナの姉妹群は不明のままであった (Nozaki et al. 2000, MPE; Herron et al. 2008, PNAS)。

今回我々は埼玉県川越市伊佐沼より採取したサンプルからボルボックス科の新属 *Colemanosphaera* 2 種を分離培養した。両種は 32 細胞性で非生殖細胞の分化の認められない回転楕円体の栄養群体をもつ点でユードリナ (*Eudorina*)、ヤマギシエラ (*Yamagishiella*) と類似したが、細胞の形態的特徴で区別された。葉緑体 5 遺伝子系統解析では新属の 2 種は姉妹種となり、プラチドリナと強固な単系統群を形成した。また、新属の細胞形態と 1

種で明らかになった特異な異形配偶の接合過程はプラチドリナと類似した。

これらの結果から、今回の新属は、プラチドリナが平板群体に進化する直前の祖先的な形態を保持している“ミッシングリンク”であると考えられる。*Colemanosphaera* は稀産であるが、過去のデータと比較したところ、ヨーロッパにも2種分布することが明らかになった。1種はウクライナから *Pandorina charkowiensis* として記載されたものであり (Korshikov 1932, Arkh. Russk. Protistol. Obshch.), 他種は核リボゾーム ITS 領域の配列情報が登録されているオーストリア産 *Eudorina* sp. と同種と考えられた (Angeler et al. 2002, J. Phycol.). 前者は形態的観察から判断したものであり、後者はウィーン大学の藻類カルチャーコレクション番号 ASW05157 で表示されているが、現在入手不可能で絶滅していると考えられる。

O-6 氷雪性緑藻クロロモナス属の培養株のみを用いた種の識別

○松崎 令¹, 原 慶明², 野崎久義¹

¹ 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻, ² 山形大学基盤教育院

Species identification of green algae genus *Chloromonas* growing on snow, based on only culture strains

○Ryo Matsuzaki¹, Yoshiaki Hara², Hisayoshi Nozaki¹

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo, ²Institute of Arts and Sciences, Yamagata University

微細藻類には極度に寒冷適応し、雪や氷河中の融雪水にのみ生息するものがある。それらは氷雪藻 (snow algae) と呼ばれ、高密度に繁殖すると雪が緑や赤などに染まったように見える。この現象は彩雪 (colored snow) と呼ばれ、紀元前のアリストテレスの「動物誌」や平安時代の「続日本記」にも記述されている。

野外でみつかる氷雪藻の多くは2鞭毛性の微細緑藻であるクロロモナス属 (*Chloromonas*) に分類され、一般的に緑雪には遊泳細胞が、赤雪には赤い色素を細胞内に蓄積した休眠接合子が優占している (e.g. Hoham & Mullet 1978, *Phycologia*; Hoham et al. 1979, *Phycologia*). 氷雪性のクロロモナス属は現在までに約10種が知られており (Muramoto et al. 2010, *Eur. J. Phycol.*), 伝統的に休眠接合子の細胞壁にみられる襞や刺などの形態が重要な種の識別形質とされている (Remias et al. 2010, *Protoplasma*). 現在までに日本・北米・欧州・南極から120以上の培養株が確立され、培養株保存施設から利用可能となっているが、培養条件下で休眠接合子の形成を人為的に誘導することが困難なため、正確に種が識別された培養株は非常に限られている (Hoham et al. 2002, 2006, *Phycologia*; Muramoto et al. 2010; Remias et al. 2010).

本研究は、培養株から得られる情報のみで氷雪性のクロロモナス属の種を識別することを目的とし、日本産と米国産の10培養株を用いて、光学・蛍光・透過型電子顕微鏡観察による遊泳栄養細胞と無性生殖ステージの詳細な比較解析と、3遺伝子の配列情報に基づく分子系統解析を実施した。その結果、葉緑体形状や娘細胞の最大数などの差から、2新形態種 (日本産1種, 米国産1種) を含む6形態種を識別できた。分子系統ではそのうち4形態種が強い支持でクレードを形成したが、それらの独立性は核 ribosomal DNA ITS2 二次構造の比較 (Coleman 2009, *MPE*), および核と葉緑体にコードされた複数遺伝子の遺伝的距離の比較 (Matsuzaki et al. 2013, *Phycologia*) によって支持された。なお、日本産の氷雪藻としては50年ぶりの新種の報告となる。

O-7 担子菌に関する L-乾燥法の研究その 1

○佐藤真則¹, 猪野悠梨佳¹, 資延淳二², 稲葉重樹², 中桐 昭³

¹独・製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター, ²独・製品評価技術基盤機構生物資源課, ³鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター

L-Drying of basidiomycetes culture (I)

○Masanori Sato¹, Yurika Ino¹, Junji Sukenobe², Shigeki Inaba², Akira Nakagiri³

¹NITE Patent Microorganisms Depository, ²NITE Biological Resource Center, ³Fungus/Mushroom Resource and Research Center, Faculty of Agriculture, Tottori University

凍結乾燥法や L-乾燥法といった乾燥保存法は数多くの微生物に適用可能で長期保存性に優れるのはもちろんのこと、ある程度常温での保管にも耐えうるため、災害や停電にも大切なサンプルを損なう危険性が他の保管法に比べて低いこと、また、分譲業務においてコスト面や簡便性に優れることが大きな特長である。しかしながら、担子菌のように通常培養では胞子を作らない糸状菌については非常に限られた凍結乾燥法の先行研究の報告はあるが残念ながら他の微生物のような十分な長期保存性に関する報告はない。このような菌株について有効な乾燥保存法を開発することは、長期保存法の選択肢が広がるとともに、上記のような特長を活用出来ることから、カルチャーコレクション業務にとって非常に意義があると考えられる。そこで我々はこれまでの情報を参考に実験系を立ち上げ担子菌株の乾燥保存法の開発に着手することとした。先行研究では凍結乾燥法を行っていたが、当センターでは凍結感受性の菌株にも適用可能で凍結乾燥法に比べ作業工程が一つ簡便な L-乾燥法による保存法の開発を目指すこととした。

まず今年度は比較的生育の早く先行研究によりある程度乾燥耐性が予想された食用、薬用、バイオマス変換等に有効な木材腐朽菌株 18 種 (*Auricularia auricula-judae*, *Flammulina velutipes*, *Fomitopsis palustris*, *Ganoderma lucidum*, *Gloeophyllum trabeum*, *Grifola frondosa*, *Heterobasidion orientale*, *Hypsizygus marmoreus*, *Lentinula edodes*, *Phellinus linteus*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus coccineus*, *Schizophyllum commune*, *Serpula lacrymans*, *Sparassis crispa*, *Trametes versicolor*) をモデル菌体として使用した。菌株は培地と菌株をアンプル内に直接入れて培養し十分量の菌糸を得られる菌株はその状態で、また、アンプル内での生育が悪い菌株は振盪培養で増殖させた菌株塊をアンプルに入れ、分散媒 (SM1) を添加した後に L-乾燥処理を行った。乾燥後開封まで 4℃ で保管したアンプルを 2 週間以内に開封し復元率を調べたところ、18 株中 12 株で 100%、3 株で 86% の復元率を得ることが出来た。さらに分散媒や L-乾燥前後の培養法によってより復元率が向上すること、これらの菌株の半年後の復元率についてもあわせて発表する予定である。今回の方法では多くの菌株で乾燥処理後に復元可能であったが、一部の菌株で復元を認められなかったため各種条件検討によるさらなる改良が今後の課題である。

ポスター発表

P-1 醤油諸味から分離されたヒスタミン生成乳酸菌の性質○辻 聡¹, 松中佑也², 牧田紗知¹, 館 博¹¹東京農業大学短期大学部醸造学科, ²東京農業大学応用生物科学部醸造科学科

Characterization of histamine producing lactic acid bacteria isolated from soy sauce mashe

○Akira Tsuji¹, Yuya Matsunaka², Sachi Makita¹, Hiroshi Tachi¹¹Department of Brewing and Fermentation, Junior College of Tokyo University of Agriculture,²Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture

【目的】近年、国内の醤油から過剰に摂取することでアレルギー様症状を引き起こすヒスタミンが検出された。食の安全性への関心が高まる中で、ヒスタミンの含有は醤油の信頼に大きな影響を与える要因となるため問題視され始めている。食品中のヒスタミンは微生物が持つヒスチジン脱炭酸酵素により、食品由来のL-ヒスチジンが脱炭酸されることで生成される。この反応を行う微生物の一種として魚醬中から *Tetragenococcus halophilus* が分離されている。本菌は醤油醸造に関与する乳酸菌としても知られており、味に深みを与え香りを引き立てる役割を担っている。また本菌は、一般的にヒスタミンを生成しないため、後天的にヒスタミン生成能を獲得した変異株であると考えられる。そこで本研究では、醤油諸味から分離したヒスタミン生成乳酸菌の性質を明らかにすると共に、簡便なヒスタミン生成抑制法の構築を目的とした。

【方法・結果】当研究室にて醤油諸味より分離したヒスタミン生成能の異なる2種の乳酸菌株 (No. 4, No. 12) を供試菌株とし、生理試験により菌種の推定を行った。その結果、ヒスタミン生成乳酸菌2株は耐塩性試験、初発pH試験、グラム染色、形態観察により *T. halophilus* であると推定した。次に、東京農業大学菌株保存室より分譲された11株の *T. halophilus* のヒスタミン生成量を測定した。本試験はヒスチジン培地 (MRS (Difco) 5.5%, ヒスチジン 0.5%, NaCl 10%) を用いて供試菌株を培養し、チェックカラーヒスタミン (キッコーマンバイオケミファ株式会社) によりヒスタミン濃度を計測した。各株のヒスタミン生成量を測定したところ、菌株保存室に保存された11株の *T. halophilus* は全てヒスタミンを生成しなかった。従って、これらの菌株を培養環境中で優勢種とすることで、ヒスタミン生成の抑制が期待できると考えた。そこで *T. halophilus* NRIC 0098^T を各ヒスタミン生成乳酸菌の1000倍濃度になるようにヒスチジン培地に添加し、競合培養することでヒスタミン生成の抑制を試みた。その結果、生成能の低いNo. 4株との競合培養ではヒスタミン生成を抑制したが、生成能の高いNo. 12株を用いた試験では少量のヒスタミンが生成された。そのため、優勢種とする菌株の選抜や菌体の添加濃度の検討など競合培養方法の改良が必要だと考えられる。

P-2 宮古島のマングローブに生息するカビの分布とセルロース分解能の検討○菊地淳史¹, 田中尚人², 梶川揚申¹, 佐藤英一¹, 岡田早苗^{1,2}¹東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科, ²東京農業大学菌株保存室

Isolation and characterization of molds from mangrove ecosystems in Miyako Island

○Atsushi Kikuchi¹, Naoto Tanaka², Akinobu Kajikawa¹, Eiichi Satoh¹, Sanae Okada^{1,2}¹Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, ²NODAI Culture Collection Center (NRIC), Tokyo University of Agriculture

【目的】マングローブの生態系において微生物は分解者として重要な役割を担っているとされる。高温、汽水域という特殊な環境に生息し、強固な構造の葉を分解する性質はバイオマス利用に有用であると考えられる。しかし、マングローブに生息するカビに関する報告は少ない。そこで、カビの菌叢解析、セルロース分解能の検討を行うことで環境中での分布と微生物資源としての有用性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】試料として宮古島のマングローブの葉、土壌に加え、カビの菌叢を比較するため、比較試料として宮古島の森林の土壌、タブの樹皮や葉、浦底の海水、淡水を用い以下の実験を行った。各試料よりPDA, DG18, DRBC, Marineの各種培地にクロラムフェニコールを添加し25℃で1週間培養、生菌数測定及び分離を行った。その結果、マングローブの土壌より104株、葉より43株の計147株を分離しこれらをマングローブ分離株とした。森林の土より52株、タブの樹皮や葉より41株、海水より10株の計103株を分離しこれらを比較環境分離株とした。

両分離株をジャイアントコロニーの形態観察によりグルーピングを行い、マングローブ分離株を49グループ、比較環境分離株を36グループに分け、各グループの代表株を選抜した。各代表株は26S rDNAに基づき簡易同定した。その結果、マングローブ分離株と比較環境分離株では菌叢は異なる傾向にあることが示唆された。

次に、セルロース分解能を検討するため1% Carboxymethylcellulose (以下 CMC) 含有 LCA 培地に各代表株を5日間培養後、DNS 法により還元糖量を測定し CMC 分解能の有無を判定した。また、結晶性セルロース分解能を検討するため濾紙崩壊性を行った。LCA 培地 3 ml を長試験管に分注し、1 cm×3 cm に切った濾紙を培地に浸かるように中に入れ、121°C、15分オートクレーブ滅菌し各代表株を接種、4週間振盪培養を行い結晶性セルロース崩壊能の有無を判定した。その結果、マングローブ分離株に結晶性セルロース分解能を有する株の存在が確認された。

P-3 *Armadillidium vulgare* (オカダンゴムシ) 排泄物を分離源とした細菌の分離と解析

○飯田敏也, 國則成史, 工藤卓二, 大熊盛也

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 (理研 BRC-JCM)

Isolation and characterization of bacteria from the feces of *Armadillidium vulgare*

○Toshiya Iida, Masafumi Kuninori, Takuji Kudo, Moriya Ohkuma

Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center

【目的】 土壤表層に生息する陸生の等脚目 (Isopoda) は、土壤生態系における腐食連鎖において落葉等のリター変換者として大きな役割を担っている。*Armadillidium vulgare* (オカダンゴムシ) は世界各地で広く見出される陸生等脚目の一種であり、土壤環境において主に落葉等の植物遺体を摂食する。一般に落葉食者における枯死植物の消化率は低いとされており、その排泄物には落葉に由来する未消化の有機物が多く含まれていると推察され、土壤微生物による有機物分解活動の場として重要と考えられる。我々は、サクラ (ソメイヨシノ) 落葉を摂食した *A. vulgare* 排泄物の細菌群集を解析し、昨年度の本大会で発表した。その結果、排泄物の細菌群集構造が土壤やサクラ落葉のものとは大きく異なること、*Proteobacteria*, *Mollicutes*, *Actinobacteria* が主要な構成細菌群として見出されること、*A. vulgare* 中腸腺の共生細菌が大きな存在比を示すことなどを明らかにした。本発表では、落葉を摂食した *A. vulgare* 排泄物を分離源として細菌の分離培養を試みたので、報告する。

【方法と結果】 実験に用いた *A. vulgare* は、埼玉県和光市の理化学研究所構内で採取した。同構内でサクラを主とする落葉を採取し、表面に付着する土壤を水で濯ぎ落とししたものを飼料として、実験室内で飼育した。飼育箱に設置したコンクリート製ブロック上に排出された排泄物を採取し、*A. vulgare* 排泄物以外のものを目視で除去して、分離源とした。*A. vulgare* 排泄物はマイクロチューブ中にて滅菌水に浮遊させ、ペレットミキサーですりつぶした後、ボルテックスミキサーで10分間攪拌して懸濁し、希釈後に各種培地に塗布した。定法に従い分離された細菌の16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を解析し、分離株の属種を推定した。多数の分離株のうち、16S rRNA 遺伝子配列から *Conexibacter* 属または *Solirubrobacter* 属に近縁と推測される菌株 (Avf-M12) を見出した。現在本株について分類学的な解析を行っている。

P-4 インドネシア産のニワトリ盲腸内から分離した嫌気性細菌の分類学的研究

○入澤友啓¹, Sugiyono Saputra², 坂本光央¹, 北原真樹¹, Sulistiani², Titin Yulinery², Achmad Dinoto², 大熊盛也¹

¹ 理研 BRC-JCM, ² Microbiology Division, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI)

Taxonomic study on anaerobic bacteria isolated from cecum of Indonesian chicken

○Tomohiro Irisawa¹, Sugiyono Saputra², Mitsuo Sakamoto¹, Maki Kitahara¹, Sulistiani², Titin Yulinery², Achmad Dinoto², Moriya Ohkuma¹

¹ Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, ² Microbiology Division, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI)

インドネシアにおいてニワトリは主要な家禽動物であり、日常的に食されている。動物の消化管に棲息する細菌は動物の健康や成長 (生産性) に影響することからも、その菌叢を明らかにすることは非常に重要である。2013年にインドネシア産のニワトリの盲腸 (9日齢, 12日齢, 19日齢, 90日齢) を試料として嫌気性細菌を分離した。分離菌株の16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列から既存種の他に19属34種の新規分類群候補の細菌を得た。

そこで、分離菌株中で全体の約 23% を占めた *Bacteroides* 属の中から新規分離群候補株 9 菌株について、詳細な分類学的研究を行い、その性状を明らかにしたので、これを報告する。

分離株 9 株はグラム陰性、桿菌であった。16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果から 3 つの独立したクラスターを形成した。グループ 1 (3 株) は *B. coprocola* JCM 17929^T と 94.1% 以下、グループ 2 (2 株) とグループ 3 (4 株) は *B. salanitronis* JCM 13657^T とそれぞれ 91.5%、87.9% の相同性を示した。また、これらの菌株は一般的に *Bacteroides* 属内でみられる胆汁酸耐性がないという特徴を有していた。DNA-DNA hybridization においても既知種との相同性が 70% 以下であった。この他にも GC 含量、菌体脂肪酸組成、メナキノン組成、表現性状、生理性化学性状試験など種々の試験により近縁種との鑑別性状を明らかにした。以上の結果から、9 株を 3 つの新種に分類し、それぞれ '*Bacteroides caecigallinarum*' (グループ 1)、'*Bacteroides caecicola*' (グループ 2)、'*Bacteroides gallinaceum*' (グループ 3) と命名した。

*本研究は地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (独立行政法人科学技術振興機構 (JST) と独立行政法人国際協力機構 (JICA) 共同プロジェクト: 生命科学研究及びバイオテクノロジー促進のための国際標準の微生物資源センターの構築) の助成をもとに行われた。

P-5 *Chloroflexi* 門・*Ktedonobacteria* 綱に属する *Thermosporothrix* 属の分離

○矢部修平¹, 酒井康輝¹, Ricky Karta Atmadja², Abinubli Tariswafi Mawarid², 葉坂 勝¹, 横田 明²

¹株式会社東南衛生工業ハザカプラント研究所, ²Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Indonesia

Isolation of *Thermosporothrix* sp. belonging to the class *Ktedonobacteria* in the phylum *Chloroflexi*

○Shuhe Yabe¹, Yasuteru Sakai¹, Ricky Karta Atmadja², Abinubli Tariswafi Mawarid², Masaru Hazaka¹

¹Kennan Eisei Kogyo, Co., Ltd., Hazaka Plant Research Center, ²Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Indonesia

Chloroflexi 門に属する細菌は嫌気性を示すものが多く、培養が難しいとされているが、*Thermosporothrix hazakensis* SK20-1 株は好気性で培養が極めて容易であり、分岐気菌糸に出芽胞子を着生する放線菌様のユニークな形態分化を示す。この株からは新規二次代謝物が発見されており¹⁾、工業微生物として知られる放線菌と同様、*Thermosporothrix* 属は有用な微生物資源となる可能性を秘めている。しかしながら、培養株は 1 種しか提唱されていない。そこで本研究では、この系統の株の分離を試み、その性質を調べることにした。

分離源は地熱地帯に堆積している腐植した枝葉や、各種コンポスト、キノコ廃床などを用いた。分離培地は固化剤としてゲランガムを用いた培地を使用し、直接接種法で、50℃、7～14 日間培養した。気菌糸が確認できたコロニーを Digital Microscope KH-8700 (HiRox 社製) を用いて、菌糸や胞子の形態からコロニーを選別し、単離した。単離した株は 16S rRNA 遺伝子を基に同定し、培養生理学的試験に供試した。

分離の結果、地熱地帯から 12 株、コンポストから 3 株、キノコ廃床から 3 株を単離し、それらの 16S rRNA 遺伝子は SK20-1 株と 98.5-99.6% の相同性を示した。これらの分子系統樹解析の結果、明確に *Thermosporothrix* 属に属し、その中でもコンポスト由来と地熱地帯由来の株ではクラスターが区別された。興味深い共通した性質として、これらの分離株は蒸留水とゲランガム、塩化カルシウムのみ含有したプレートで旺盛に生育し、固化剤を寒天に代えた場合では生育しなかった。従ってゲランガムがこの系統の細菌にとって重要な生育因子であることが示唆された。その他、各種抗生物質耐性試験や抗菌活性試験の結果についても併せて報告する。

1) Park, J.S. *et al.*, *Chembiochem*, 15, 527-532 (2014)

P-6 タイ発酵食品から分離した乳酸菌 3 新種について

○宮下美香¹, Pattaraporn Yukphan², Winai Chaipitakchonlatarn², Taweesak Malimas², 杉本昌子¹, 吉野真由美¹, 鎌倉由紀¹, Wanchern Potacharoen², Somboon Tanasupawat³, 田中尚人⁴, 中川恭好¹, 鈴木健一郎¹

¹ 独・製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC), ² National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), ³ Chulalongkorn University, ⁴ 東京農業大学菌株保存室
Three novel species of lactic acid bacteria isolated from fermented foods in Thailand

○Mika Miyashita¹, Pattaraporn Yukphan², Winai Chaipitakchonlatarn², Taweesak Malimas², Masako Sugimoto¹, Mayumi Yoshino¹, Yuki Kamakura¹, Wanchern Potacharoen², Somboon Tanasupawat³, Naoto Tanaka⁴, Yasuyoshi Nakagawa¹, Ken-ichiro Suzuki¹

¹ NITE Biological Resource Center (NBRC), ² National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), ³ Chulalongkorn University, ⁴ NODAI Culture Collection Center

NITE バイオテクノロジーセンター (NBRC) では、熱帯地域の微生物遺伝資源の保存と持続可能な利用のため、タイの BIOTEC との間で包括的覚え書きを締結して共同研究を行ってきた。年間を通じて高温多湿なタイ王国は食材が豊富で、様々な発酵食品が存在する。これらタイの発酵食品に由来する乳酸菌の多様性解析を進める中で、分類学的に新規と考えられる 4 株 (NB53, NB446, NB702, NB834) が見つかったので報告する。

分離株 4 株はそれぞれ異なる発酵食品 (Pla-jom, Pla-som, 魚の発酵食品; Tuaw jeaw, 大豆の発酵食品; Mum, 肉の発酵食品) から分離された。16S rRNA 遺伝子塩基配列の解析結果から、4 株ともに *Lactobacillus plantarum* に最も近縁で、NB53 と NB834 と *L. plantarum* の 16S rRNA 遺伝子塩基配列相同性は 98.9%、NB446 と NB702 とは 98.7% だった。また NB53 と NB834, NB446 と NB702 はそれぞれ同一の配列だった。*dnaK*, *rpoA*, および *pheS* 遺伝子配列では、分離株 4 株と近縁な既知種との相同性は低く、系統解析では独立した位置を占めた。NB446 と NB702 はこれらの遺伝子配列でも互いに高い相同値を示した (*dnaK*, 99.1%; *rpoA*, 100%; *pheS*, 99.7%)。一方 NB53 と NB834 では互いに比較的低い相同値を示した (*dnaK*, 96.3%; *rpoA*, 98.5%; *pheS*, 96.4%)。DNA-DNA 相同性試験の結果、4 株と近縁な既知種の相同性は全て 70% 以下だった。分離株同士では NB446 と NB702 は 85% の相同性を示したが、他の組み合わせでは全て 70% 以下の相同性だった。加えて MALDI-TOF MS 解析、化学分類学的性状および表現性状試験の結果において近縁種と識別することが可能だったことから、分離株 4 株を *Lactobacillus* 属の 3 新種、*Lactobacillus plajomii* sp. nov., *Lactobacillus modestosaltolerans* sp. nov., *Lactobacillus tuawjeawii* sp. nov. として提案する。

P-7 酸性飲料より分離された新規 *Alicyclobacillus* 属の分類学的研究

○中野千紗¹, 高橋尚人¹, 田中尚人², 岡田早苗^{2,3}

¹ カゴメ株式会社, ² 東京農業大学菌株保存室, ³ 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

Phylogenetic study of a new species of the genus *Alicyclobacillus* isolated from an acidic beverage

○Chisa Nakano¹, Naoto Takahashi¹, Naoto Tanaka², Sanae Okada^{2,3}

¹ KAGOME CO., LTD. Research & Development Division, ² NODAI Culture Collection Center (NRIC), Tokyo University of Agriculture, ³ Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture

Alicyclobacillus 属菌は低い pH かつ高温で発育する有芽胞菌であることから、好熱性好酸性菌や耐熱性好酸性菌と呼ばれ、果実飲料や野菜飲料などの酸性飲料の変敗菌として知られている。中でも *Alicyclobacillus acidoterrestris* は飲料製品の常温流通温度で発育し、グアイアコールの生成により薬品様の異臭を発生させることから、酸性飲料の重要な制御対象菌とされている。本研究では、酸性飲料より分離されたグアイアコールを生成する分離株 4F 株について分類学的研究を行い、*Alicyclobacillus* 属の新種であることを見出したのでその内容について報告する。

4F 株はグラム不定性の好気性桿菌であり、生育温度は 20-50°C (至適 40°C)、生育 pH は 3.0-6.0 (至適 pH 4.0) であった。16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果から、4F 株は *Alicyclobacillus* 属のクラスターに属しており、近縁種は *A. acidoterrestris* (97.4%) と *A. fastidiosus* (97.3%) であった。同様に *gyrB* 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析においても既知種とは低い類似度を示した。菌体脂肪酸組成分析では、*Alicyclobacillus* 属に特徴的な ω -alicyclic 脂肪酸を主要菌体脂肪酸として有し、その種類は *A. acidoterrestris* や *A. acidocaldarius*

と同様の ω -cyclohexane 脂肪酸であった。さらに GC 含量, メナキノン組成, 表現性状, 生理生化学性状試験についても実施し近縁種との鑑別性状を明らかにした。以上の結果より, 本研究で用いた 4F 株を *Alicyclobacillus* 属の新種として提唱する予定である。

P-8 北海道の温泉から分離した微好気性 *Thermus* 属菌株の分類学的研究

○伊藤 隆¹, 塚田真見^{1,2}, 佐野充佳^{1,2}, 高品知典², 工藤卓二¹, 大熊盛也¹

¹ 理研 BRC-JCM, ² 東洋大学生命科学部

Taxonomic characterization of a microaerophilic strain of the genus *Thermus* isolated from a hot spring in Hokkaido

○Takashi Itoh¹, Mami Tsukada^{1,2}, Mituyoshi Sano^{1,2}, Tomonori Takashina², Takuji Kudo¹, Moriya Ohkuma¹

¹Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, ²Faculty of Life Science, Toyo University

Thermus 属細菌は主として陸上の温泉や海底熱水孔等の地熱地帯から分離されている好熱性グラム陰性桿菌である。多くは絶対好気性であるが、一部に硝酸存在下に嫌氣的に生育する菌株が存在することが知られている。我々は北海道屈斜路湖和琴半島に湧出しているアルカリ性温泉水から好熱性微生物の分離を試み、これより通常的好気環境下では生育できないが微好気的環境下で生育する *Thermus* 属菌株 IC-236 (=JCM 17653) を分離することに成功した。本研究では本菌株の分類学的研究を行った。

IC-236 株は生育至適温度 70°C, 生育至適 pH 8.0 の非運動性桿菌で寒天平板上では黄色いコロニーを形成した。*Thermus* 培地を用いた培養では気相中の酸素濃度を 1~5% とすることで良好な生育を示したが、0% あるいは 10% 以上では生育することはできなかった (加圧培養試験管中)。カタラーゼ・オキシダーゼはともに陽性, α -ガラクトシダーゼ陰性, β -ガラクトシダーゼ陽性, カゼイン・エラスチン・フィブリン・ゼラチン・スターチ・アルブチンを分解するが, エスクリン・Tween80・DNA の分解は認められなかった。一方, 本菌株は硝酸あるいはクエン酸鉄 (III), 硫黄の存在下に嫌氣的に生育することが可能であった。DNA G+C 含量は 68.6 mol% で, isoC_{15:0}, isoC_{17:0} を主要成分とする菌体脂肪酸組成を持っていた。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析では本菌株は *T. islandicus*, *T. arciformis*, *T. composti* 及び未承認種の '*T. kawarayensis*' に最も近縁であり, それら基準株との相同性は 97.4~98.2% であった。*Thermus* 属ではこれまで微好気性の菌株の報告はなく, また鉄還元性は *T. scotoductus* に属する菌株について示されているに過ぎない。現在, 本菌株を帰属するべく分類学的研究を継続中であるが, さらに本菌株の鉄代謝能とその生態学的意義にも興味を持たれる。

P-9 多遺伝子座配列解析による嫌気性グラム陰性桿菌の分子系統

○坂本光央, 大熊盛也

理研 BRC-JCM

Multilocus sequence analysis (MLSA) of the genus *Bacteroides* and related taxa by using the *dnaJ*, *gyrB*, *hsp60*, *recA*, *rpoB*, and 16S rRNA genes

○Mitsuo Sakamoto, Moriya Ohkuma

Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center

【目的】我々は既に *Bacteroides* 属の分類・同定において複数のハウスキーピング遺伝子を使用した多遺伝子座配列解析 (Multilocus sequence analysis: MLSA) の有用性を報告して¹⁾。本研究ではさらに対象とする菌種の範囲を広げ, *Bacteroides* 属およびその類縁細菌群の分類において MLSA による分子系統解析を行った。

【材料および方法】供試菌として *Bacteroides* 属を中心に 10 属 (*Bacteroides* 属 38 種, *Barnesiella* 属 2 種, *Butyrivimonas* 属 2 種, *Dysgonomonas* 属 3 種, *Odoribacter* 属 2 種, *Parabacteroides* 属 5 種, *Paraprevotella* 属 2 種, *Porphyromonas* 属 13 種, *Prevotella* 属 39 種および *Tannerella* 属 1 種) 107 種を用いた。対象遺伝子として *dnaJ*, *gyrB*, *hsp60*, *recA* および *rpoB* の 5 つのハウスキーピング遺伝子とともに, 16S rRNA 遺伝子を加えて MLSA を行った。なお解析に用いた多くの遺伝子配列は, 各対象遺伝子を標的にプライマーを設計し, PCR 増幅後, シークエンスし塩基配列を決定したが, 一部は既に公開されているゲノム情報より取得し, 解析に用いた。

【結果および考察】各遺伝子の種間類似度を比較したところ, *dnaJ* 遺伝子が 51.7-98.5% (平均 65.6%) と最も低い種間類似度を示し, *rpoB* 遺伝子が 62.2-99.4% (平均 77.9%) と最も高かった。*dnaJ* 遺伝子に次いで, *gyrB* 遺伝子 (55.4-99.9%: 平均 67.7%), *hsp60* 遺伝子 (56.6-99.6%: 平均 72.6%) そして *recA* 遺伝子 (60.5-98.2%: 平均

72.9%)の順に類似度は低かった。以上の結果より、*Bacteroides*属およびその類縁細菌群の分類においてもハウスキーピング遺伝子の利用は16S rRNA 遺伝子 (77.1-99.2%:平均 85.6%)と比較して有用であることが示された。また、6つの遺伝子を連結した塩基配列を用いてMLSAを行った結果、単一遺伝子の塩基配列から作成された系統樹に比べてブートストラップ値が向上し、種間の近縁関係をより明確にすることができた。

本研究は公益財団法人発酵研究所 (IFO) の助成および科学研究費助成事業 (23580126) によって行われた。

1) Sakamoto & Ohkuma (2011) *Microbiology*, 157, 3388-3397.

P-10 *Colletotrichum boninense* および *C. dematium* 種複合体に所属する NIAS Genebank 保有菌株の分子再同定

○佐藤豊三¹, 森脇丈治², 澤田宏之¹, 永井利郎¹, 一木 (植原) 珠樹¹, 青木孝之¹

¹農業生物資源研究所, ²農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター

Molecular re-identification of MAFF (NIAS Genebank) strains belonging to the *Colletotrichum boninense* and *C. dematium* species complex

○Toyozo Sato¹, Jouji Moriwaki², Hiroyuki Sawada¹, Toshiro Nagai¹, Tamaki Uehara-Ichiki¹, Takayuki Aoki¹

¹National Institute of Agrobiological Sciences, ²Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization

近年、分子系統解析により炭疽病菌 (*Colletotrichum* spp.) の既知種には多系統のものがあることが明らかにされ、急速に種分割と再分類が進められている。*C. acutatum* 種複合体については Damm et al. (2012b) に準じて NIAS Genebank 保有菌株が7種に再同定された (Sato et al., 2013a, b)。今回、同機関保有の *C. boninense* 種複合体 (CBSC) 44 菌株および *C. dematium* 種複合体 (CDSC) 90 菌株の分子再同定を行った。CBSC 菌株については Damm et al. (2012a) に準じ、ITS, GAPDH, CHS-1, HIS3, ACT, TUB2 または CAL の複数塩基配列を用いて BLAST 検索を行い、代表的菌株について最尤法による分子系統樹を作成した。その結果、36 株は *C. boninense* s. str. (4 株), *C. cymbidiicola* (9 株), *C. karstii* (22 株), *C. phyllanthi* (1 株) の4種に再同定されたが、8 株はいずれの分割種とも同一クレードを形成しなかった。CDSC 菌株については Damm et al. (2009) に準じ、CAL 以外の上記6領域を用いて同様に代表的菌株の分子系統樹を作成し、TUB2 等による BLAST 検索を行った。その結果、72 株は *C. chlorophyti* (3 株), *C. circinans* (3 株), *C. dematium* s. str. (1 株), *C. lineola* (9 株), *C. liriopes* (6 株), *C. spaethianum* (12 株), *C. tofieldiae* (2 株), *C. trichellum* (8 株), *C. truncatum* (28 株) の9種に再同定された。残りの18株は分子系統解析あるいは BLAST 検索において該当する分割種が見当たらなかった。以上の再同定菌株の中から各種に典型的な形態を持つ数株を推奨菌株として公開した。なお、菌株利用者が分割種の所属種複合体を識別できるように、暫定的に (CBSC) や (CDSC) 等の略称を更新学名に付記した (http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_approved.php#colletotrichum)。

参考文献

Damm, U., Woudenberg, J.H.C., Cannon, P.F. & Crous, P.W. 2009. *Fungal Divers.* 39: 45-87.

Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Johnston, P.R., Weir, B.S., Tan, Y.P., Shivas, R.G. & Crous, P.W. 2012a. *Stud. Mycol.* 73: 1-36.

Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C. & Crous, P.W. 2012b. *Stud. Mycol.* 73: 37-113.

Sato, T. & Moriwaki, J. 2013a. *Microbiol. Cult. Collect.* 29: 13-23.

Sato, T., Moriwaki, J. & Misawa, T. 2013b. *JARQ* 47: 295-305.

P-11 NBRC 担子菌株に対するパーライト法の効果の検証その1

○佐藤真則¹, 佐々木友美¹, 井上竜太郎¹, 資延淳二², 稲葉重樹², 中桐 昭³

¹独・製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター, ²独・製品評価技術基盤機構生物資源課, ³鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター

Validation of perlite protocol for NBRC basidiomycetes strains (1)

○Masanori Sato¹, Tomomi Sasaki¹, Ryutaro Inoue¹, Junji Sukenobe², Sigeki Inaba², Akira Nakagiri³

¹NITE Patent Microorganisms Depository, ²NITE Biological Resource Center, ³Fungus/Mushroom Resource and Research Center, Faculty of Agriculture, Tottori University

担子菌は日本の産業において非常に身近で重要な産物の一つであることから重要な遺伝資源の一つである。一般的に微生物は凍結保存、又は乾燥保存によって長期にわたり安定に保存できるが、担子菌の中には汎用的な凍結保存法が適用できないグループが存在しこれらの菌株は継代培養によって保管している。しかしながら、継代培養はコストがかかるとともに、汚染の危険性の増大及び大切な形質変化の危険性があるため、担子菌の安定した長期保存法の開発がカルチャーコレクション業務として非常に重要である。

これまで特許センターでは担子菌の凍結保存法の一つとして開発されたオリジナルパーライト法についてモデル菌株を用いてその有効性と適用範囲について検討するとともに、オリジナル法に対して培養条件や凍結保護剤の濃度と添加時期、浸漬時間等の改良も行うことで、安定した長期保存方法の開発を目指してきた。今回は簡便性に非常に優れたオリジナルパーライト法の汎用性についてさらに検証するために、これまで行ったモデル菌株に加えさらに様々な凍結感受性を持つ菌株数を増やし（計126株）、オリジナルパーライト法の効果検証を行った。オリジナルパーライト法で凍結した菌株の直後（2週間以内に融解）と6ヶ月後の生残性について調べたところ、直後では現在NBRCで従来法（disk法）による保存に問題がある63株を含む126株のうち80%以上生残していた菌株は問題ある菌株55株を含む110株であり、大きくその生残性が改善される可能性を示した。一方、40-80%の生残性の菌株が5株、30%以下の生残性の菌株が6株あった。次に6ヶ月後の生残性もほぼ同様に多くの菌株で良好な結果を得たが一部生残性が悪くなった株があった。さらに今回の検証で生残性が80%に満たなかった菌株の一部について改良パーライト法の検討を行った。今回の検証ではGlycerolのみでなくTrehaloseを添加してその効果と有効濃度について検証するとともに、Glycerolの代わりにDMSOについても同様の有効濃度の検証を行うことで、改良パーライト法のさらなる最適化を試みたのでこれらについて報告する予定である。

P-12 L-乾燥アンプル作製に用いられる細胞保護剤の種類がゲノム配列に及ぼす影響

○下平 潤, 佐藤真則, 安樂 茜, 橋本麻衣子, 平方里美, 細山 哲, 内野佳仁, 山副敦司, 藤田信之
独・製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC)

Genome-wide comparison between *Escherichia coli* cultures, which were preserved by liquid drying methods using different cytoprotective agents

○Jun Shimodaira, Masanori Sato, Akane Anraku, Maiko Hashimoto, Satomi Hirakata, Akira Hosoyama, Yoshihito Uchino, Atsushi Yamoze, Nobuyuki Fujita

Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation

NBRCではバクテリアを安定的かつ長期間保存する方法としてL-乾燥保存法（Liquid drying method）を採用している。しかし、坂根らによる以前の研究で、L-乾燥アンプルの保存中に発生するラジカルにより、DNA一本鎖の切断、脱塩基、脱アミノ等による塩基変換などの損傷が起き、起菌中にこれらの損傷が各種DNA修復系により修復される際に、低頻度ではあるが突然変異が引き起こされることが示唆されている^{1,3)}。このことから、L-乾燥保存による細胞死および突然変異誘発を抑制するために、乾燥時に細胞を保護する保護剤の検討が行われ、種々の保護剤が開発されてきた⁴⁾。これまで、L-乾燥保存に起因する変異誘発を調べる実験は、アミノ酸合成系変異大腸菌株を用いて、制限培地における復帰変異の頻度を観察したものであった^{1,3)}。本研究では、*Escherichia coli* NBRC 3972株をモデル菌株として用い、各種保護剤でL-乾燥保存を行った場合に導入される変異をゲノム解析により比較し、それぞれの保護効果を再評価することを目的とした。

まず、保存前のNBRC 3972株のゲノム配列を取得するために、HiSeq 1000 (Illumina) を用いて全ゲノムシーケンスを行い、CLC genomic workbench ver. 6.5.1 (QIAGEN) により、同等株であるATCC 8739株のコンプリートゲノムにマッピングした。SNPs解析の結果、31ヶ所にSNPが検出され、その内23ヶ所がORF上に検出された。Insertion/deletion (InDel) 解析の結果、3箇所の削除領域と7箇所の組替え（再配列）候補領域が検出された。各種保護剤を用いてL-乾燥アンプルを作製し、LB液体培地で起菌後のCFUと増殖曲線を作製し、生残性と生育速度をそれぞれ調べたところ、保護剤の種類により、生残性に違いが見られたものの、増殖速度に大きな違いは観察されなかった。各アンプルから起菌した細胞の全ゲノムシーケンスを行い、保存前のゲノム配列にマッピングしてInDel解析及びSNPs解析を実施した結果、保護剤の種類によらず変異の導入は見られなかった。以上の結果より、短期的な保存において、栄養培地で起菌した場合、保護剤の種類が生菌数に影響するものの、ゲノム配列上の変異誘発は、保護剤の種類によらず極めて低いことが示唆された。

参考文献

- 1) Banno, I., T. Sakane, and T. Iijima., *Cryobiology* 15: 692-693, 1978.
- 2) 坂根 健, 坂野 勲, 飯島貞二, 凍結及び乾燥研究会会誌 25: 54-69, 1979.

- 3) 坂根 健, 今井 紘, 坂野 勲, 凍結及び乾燥研究会誌 31 : 27-35, 1985.
- 4) 坂根 健, 西井忠止, 伊藤忠義, 見方洪三郎, Microbial. Cult. Coll. 12 : 91-97, 1996.

P-13 *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体に属するニチニチソウ炭疽病菌の硝酸塩利用能欠損変異株

○富岡啓介, 野見山孝司, 関口博之, 大崎秀樹, 竹原利明

農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター

Nitrate non-utilizing mutants from the causal agents of Madagascar periwinkle anthracnose belonging to the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex

○Keisuke Tomioka, Koji Nomiyama, Hiroyuki Sekiguchi, Hideki Osaki, Toshiaki Takehara

Western Region Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization

観賞用のみならず抗がん剤生産にも利用されるニチニチソウ [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don; Apocynaceae (キョウチクトウ科)] に炭疽病を引き起こす MAFF 240311 と MAFF 240312 の両菌株は, *Colletotrichum gloeosporioides* 種複合体に属する (Tomioka *et al.*, 2013). 両菌株は形態的には *C. theobromicola* Delacroix に近いが, β -tubulin-2 遺伝子や rDNA-ITS 領域の塩基配列については, MAFF 240311 は *C. siamense* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde と, MAFF 240312 は *C. tropicale* Rojas, Rehner & Samuels に類似しており, いずれの菌株も特定の菌種同定には至っておらず, 本病の発生生態についても不明な点が多い. 今回, 各菌株をもとに, 発生生態, 栄養体親和性群, 病原性分化などの解析に有効なマーカーとなりうる硝酸塩利用能欠損変異株 (Brooker *et al.*, 1991; Correll *et al.*, 1987; Puhalla, 1985) を作出した. 塩素酸塩 (塩素酸カリウム) に耐性を示す単菌糸分離菌株を得て, それらを硝酸ナトリウム, 亜硝酸ナトリウム, 酒石酸アンモニウム, ヒポキサンチンおよび尿酸のそれぞれを窒素源として添加した培地で培養し表現型を判定した (Brooker *et al.*, 1991). その結果, MAFF 240311 からは表現型 *nitI* (硝酸ナトリウムのみ利用できない) と表現型 NitM (硝酸ナトリウムとヒポキサンチンが利用できない), MAFF 240312 からは表現型 *nitI* の変異株が得られた. いずれの変異株も孢子形成能, 菌叢生育およびニチニチソウに対する病原性が野生株と同等であった. 今後, これらの変異株を用いたニチニチソウ炭疽病の発生生態などに係る研究の進展が期待される. なお, 今回得た変異株は農業生物資源データベースに登録する予定である.

P-14 納豆菌ファージ JNDMP のクリアプラーク変異株

○永井利郎, 一木 (植原) 珠樹, 澤田宏之, 青木孝之, 佐藤豊三

農業生物資源研究所遺伝資源センター

Clear-plaque mutants of a *Bacillus subtilis* (*natto*) phage, JNDMP

○Toshirou Nagai, Tamaki Uehara-Ichiki, Hiroyuki Sawada

Genetic Resources Center, National Institute of Agrobiological Sciences

【目的】納豆菌 [*Bacillus subtilis* (*natto*)] バクテリオファージ JNDMP は, 形質導入能を有するファージであり, 宿主を含む軟寒天上で混濁した (turbid) プラークを形成する. 一般にフィルターで除菌処理したファージ懸濁液は保存性がよく, 実験室レベルでは懸濁液の冷蔵保存が簡便な保存法としてよく用いられている. JNDMP も懸濁液として冷蔵庫中で保存していたが, その中からクリアなプラークを形成する変異ファージが確認できた. この変異株の特性についていくつかの知見を得たので報告する.

【方法】ファージの宿主には研究室保存の *B. subtilis* (*natto*) HM 株を使用した. ファージ増殖のための下層培地には, 標準寒天培地 (10 mM MgSO₄ を含む) を用い, 上層寒天培地には 0.6% アガロースを用いた. 上層寒天培地中のファージの回収は, SM バッファを寒天表面に注ぎ, 室温で数時間放置後そのバッファを回収することにより行った. その他は常法に従った.

【結果と考察】冷蔵保存していた JNDMP ファージ懸濁液を常法にしたがって増殖させたところ, turbid のプラークに交じってクリアなプラークの形成を認めた. そこで, turbid プラークを単離しなおし, その懸濁液を再調製した. この懸濁液を調べたところ, 高い希釈段階では clear プラークは見つからなかったが, 低い希釈段階のものでは, 全面を覆った turbid プラークの中にピンホール状の clear プラークが検出された. 以上の実験で合計 54 個の変異株を収集した. その中から類似性の高いプラークを形成するものを取り除いた 25 株について特性を調べた. いずれの変異株も, JNDMP と同じ宿主域と Mg 要求性を有していた. また, それら変異株のプラークの透明性は, 非常に毒性が強く透明性の高いものから, 半透明のものまでいろいろ異なっていた. 温度感受性については, JNDMP よりも劇的に高温耐性または高温感受性を獲得しているものはいなかった. 吉本らの各県の納豆工場を対

象としたファージ調査で、同様のクリアプラーク変異株と考えられるファージが記録されている。クリアプラーク変異株は自然界（工場内）でも安定的に存在が可能なファージであることを示唆している。その他の特性については現在も引き続き調査中である。

P-15 農業生物資源ジーンバンクが保有する植物ウイルス株の特性評価

(1) コートプロテイン遺伝子の効率的シーケンシング

○一木（植原）珠樹，青木孝之，澤田宏之，永井利郎，佐藤豊三，花田 薫，藪中恭子，杉本るり子，大橋美保，中島比呂美，熊谷みどり，竹谷 勝，山崎福容，根本 博
農業生物資源研究所遺伝資源センター

Characterization of plant viral strains preserved in the NIAS Genebank (MAFF)

(1) Sequencing of viral capsid/coat proteins in NIAS Genebank

○Tamaki Uehara-Ichiki, Takayuki Aoki, Hiroyuki Sawada, Toshiro Nagai, Toyozo Sato, Kaoru Hanada, Kyoko Yabunaka, Ruriko Sugimoto, Miho Ohashi, Hiromi Nakajima, Midori Kumagai, Masaru Takeya, Fukuhiro Yamasaki, Hiroshi Nemoto

Genetic Resources Center, National Institute of Agrobiological Sciences

農業生物資源ジーンバンクの微生物部門は、食料・農業に係る微生物遺伝資源を扱う機関の中でも、国内で唯一植物ウイルスの収集・保存・配布を担っている。2014年4月現在、本部門では、我が国の農業生産現場で重要病害の発生要因となる植物病原ウイルスのうち、機械的接種が容易にできるウイルス12科26属306点を公開している。これらは、感染葉の細切片あるいは感染葉汁液としてガラスアンプルに格納・分注し、低温・真空条件下で十分に乾燥させた後、溶封したものを -80°C で保存し、冷蔵便で配布している。利用者はアンプル受領後、適切な緩衝液を用いて十分に磨砕し、感受性の高い植物に接種することによりウイルスを増殖させることができる。

ウイルスの利用目的の内訳は、病害診断や検定、次いで新品種開発や遺伝子解析が多く、配布先は国立・独法機関に次いで大学、民間企業となっている。これまで配布要望が多かったウイルスは、クモウイルス属、ポテトウイルス属、トバモウイルス属であり、最近の傾向として、近年問題となっている *Tomato spotted wilt virus* の配布申込が増えている。現在、ウイルスの登録株数を増やすとともに、既に登録されているウイルス株情報の高度化を目的として、検出や診断、分類時に重要な指標となるウイルスのコートプロテイン（外被タンパク質）を構成する主要タンパク質のコーディング領域部分の塩基配列の解読を開始した。対象となる植物ウイルスのほとんどはRNAウイルスであるため、まずウイルスの複数の塩基配列情報をデータベースで取得後、コーディング領域から約50 bp程度離れた相同性の高い部分でプライマー対を設計し、ONE-STEP RT-PCRを行った後、PCR産物を用いてダイレクトシーケンス法で塩基配列を解読した。これまで *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) 等の当該コーディング領域の塩基配列を決定し、現在日本で発見された *Cycas necrotic stunt virus* (CNSV) や *Konjac mosaic virus* (KoMV) について解析を進めている。

P-16 2013年度のFMRC活動報告と展望について

○中桐 昭，早乙女梢，前川二太郎，牛島秀爾，岡久美子

鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター

FMRC annual report 2013 f. y. and prospects

○Akira Nakagiri, Kozue Sotome, Nitaro Maekawa, Shuji Ushijima, Kumiko Oka

Fungus/Mushroom Resource and Research Center, Faculty of Agriculture, Tottori University

鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター（FMRC）では、2005年の設立以降、担子菌類や子囊菌類の中でも「きのこ」と呼ばれる大型の子実体を形成する菌群に着目し、きのこ類の菌株を収集・保存するとともに、それら遺伝資源の利活用推進を目的とした研究・教育に取り組んできた。2012年6月には、一部の保有株（TUFCC株・400株）の分譲提供サービスと菌株データベースのオンライン公開を開始し、菌株保存機関としての機能も整備した。また、FMRCは、2013年4月に従来の4研究部門体制から教員の増員を含めた5研究部門体制へと拡充し、遺伝資源の利活用に関する研究強化を図った。

2013年度は、継続的にTUFCCコレクションの充実を進め、きのこ類142属218種334株を新規登録し、保有菌

株総数は467属1,277種8,131株となった。また、分離源証拠標本の分類学的再検討や菌株の分子情報(ITS・核LSU領域)によるTUFCC株の評価も進め、2014年4月までに新たに145属229種312株を公開し、分譲可能株数は総計231属424種846株となった。民間企業を含む学内外への保存菌株提供数は10件230株であった。

FMRCの社会貢献事業として、鳥取県と東京都において一般向けの「公開シンポジウム」(11月、3月)を開催し、さらに、一般公開講座として、顕微鏡実習を含む「きのこの観察講座」(10月)や高校生を対象とした「サイエンス教室」(12月)を実施し、「遺伝資源としてのきのこ」の教育と啓発活動に幅広く取り組んだ。また、保有遺伝資源の更なる利活用を促進するため、培養株および子実体抽出物からの有用生理活性物質の探索研究を開始し、同時に、安定的な子実体発生技術の確立に向けた施設整備や基盤研究を実施した。

今後は、より多様なきのこの種の菌株を収集・保存し、TUFCCコレクションの充実と公開を進めるとともに、抽出物のライブラリー構築を新たな事業として展開し、様々な機関と連携しながら、きのこ類遺伝資源の新たな可能性を探索していく予定である。

P-17 農業生物資源ジーンバンク事業の微生物部門(MAFF)における2013年の活動と成果

○青木孝之、一木(植原)珠樹、澤田宏之、永井利郎、佐藤豊三、竹谷 勝、山崎福容、中島比呂美、熊谷みどり、根本 博

農業生物資源研究所遺伝資源センター

Activity of the Microorganism Section of the NIAS Genebank (MAFF) in FY 2013

○Takayuki Aoki, Tamaki Uehara-Ichiki, Hiroyuki Sawada, Toshiro Nagai, Toyozo Sato, Masaru Takeya, Fukuhiro Yamasaki, Hiromi Nakajima, Midori Kumagai, Hiroshi Nemoto
Genetic Resources Center, National Institute of Agrobiological Sciences

【収集保存・特性評価】農業や食品産業等に係る1,191株の微生物を新規登録し、2014年1月29日の時点で、保存株数は30,515株(公開率:78.4%)である。また、保存株の分類学的性状、病原性、物質生産性を始めとする延べ1,996点の特性情報を集積し、植物病原糸状菌・酵母のrDNA ITS領域や、植物病原細菌の16S rDNA等、計3,845点のDNA塩基配列の網羅的整備を行い、決定配列のジーンバンク・データベースへの格納を進めた。保存株の分類検証の結果として、これまで*Agrobacterium*属としていた保存菌244株の表示学名を全て*Rhizobium*属に変更・更新した。分子再同定による*Colletotrichum*属菌の学名更新も進めるとともに、これら2属の各種に典型的な特徴を持つ代表的菌株を選定して推奨株として公表した。一方、4課題の分類検証を外部委託した:①*Sclerotinia*, *Monilinia*および*Peziza*属菌等(国立科学博物館)、②*Erwinia carotovora*ユリ科およびキク科系統等(静岡大学)、③*Bradyrhizobium*属、*Rhizobium*属根粒菌及び*Azospirillum*属、*Herbaspirillum*属窒素固定菌(東京農工大学)、④*Curvularia*, *Drechslera*および*Exserohilum*属菌(畜産草地研究所)。

【ユーザーへの提供】2013年度、国内外へ1,880株(申込285件)を配布し、それらは分類同定、病害診断、農薬開発等に関わる試験研究・教育に利用された。また、「日本植物病名データベース」と「微生物遺伝資源データベース」のリンクについて再点検と更新を行い、566病名を2,816微生物株と新たにリンクさせた。従来の紙面のデータシートに基づく微生物株登録に替わるオンラインでの登録システムを構築し、ジーンバンク関係者用に本格稼働させた。また、保存微生物株の利用促進を図るため、「微生物遺伝資源利用マニュアル」33号「*Corynespora cassiicola*」、34号「アブラナ科黒腐病菌とそのファージ」の2編を刊行し、当ジーンバンクのウェブサイトにもPDF版を掲載した(<http://www.gene.affrc.go.jp/publications.php>)。

P-18 NBRCカルチャーコレクション平成25年度事業報告

○崎山弥生、藤田克利、鎌田 幸、中川恭好、山崎秀司、鈴木健一郎、中川純一
独・製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)

Annual report of NBRC culture collection in FY2013

○Yayoi Sakiyama, Katsutoshi Fujita, Sachi Kamata, Yasuyoshi Nakagawa, Shuji Yamazaki, Ken-ichiro Suzuki, Junichi Nakagawa

NITE Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation (NITE)

NBRCカルチャーコレクションは、微生物を中心とした生物遺伝資源を収集、保存、提供するとともにその利用基盤を整備し、微生物資源の研究、教育、産業への利用促進をはかっている。BSL2以下のアーキア、細菌、酵母、糸状菌、微細藻類、ファージ、DNAリソースなどが対象となっている。DNAリソースについては、寄託を

受けた DNA クローンのほか、NBRC 株から有用遺伝子をクローニングしたいが、特殊な培養装置等を必要とするために株を培養できないユーザーの要望に対応して、NBRC 株のゲノム DNA の提供も行っている。以下に平成 25 年度に実施した事業と実績について報告する。

1. 収集実績

- I. 微生物株：新たに 683 株に NBRC 番号を付与した。NBRC 株としての保有数は、29,176 株で、現在 18,404 株を公開・分譲している。
- II. DNA リソース：ゲノム DNA は主に NITE のゲノム解析株や BSL2・難培養微生物を対象に選定し、6 株追加した。現在、微生物 DNA クローン 21 株、ゲノム DNA 74 株、ヒト cDNA クローン 55,399 種類及びヒト Gateway エントリークローン 43,417 種類を公開・分譲している。

2. 分譲実績

- I. 微生物株：国内 7,255 株、海外 764 株、計 8,019 株であった。
- II. DNA リソース：微生物 DNA クローン 2 個、微生物ゲノム DNA 91 個、ヒト cDNA クローン 個別 102 個及びセット (30,021 個) が 1 セット、ヒト Gateway エントリークローン 164 個の計 30,380 個であった。

P-19 NIES 藻類コレクションの 2013 年度活動報告

○森 史¹、湯本康盛¹、石本美和¹、ノエル マリーエレン²、佐藤真由美²、河地正伸²

¹財・地球・人間環境フォーラム、²独・国立環境研究所

NIES Collection activity report for 2013

○Fumi Mori¹、Kosei Yumoto¹、Miwa Ishimoto¹、Mary-Helene Noel²、Mayumi Sato²、Masanobu Kawachi²

¹Global Environmental Forum、²National Institute for Environmental Studies

国立環境研究所微生物系統保存施設 (NIES コレクション) は、1983 年に環境研究に必要な藻類保存株の収集・保存・提供を目的として開設された。2002 年以降は文科省 NBRP における藻類リソースの中核機関としての活動にも携わるようになり、モデル生物や応用利用に有用な保存株を含む多様な藻類および藻類に系統的に類縁のある微生物株の収集・保存・提供を行っている。

2014 年 6 月現在の全保存株数は 3,343 株で、そのうち 2,442 株が公開されている。NIES コレクションの特徴は、①原核生物であるシアノバクテリアと真核生物全体に広がる系統的に多様な生物群 (20 門、55 綱) からなること、②約 70% が日本産株で、他の海外のコレクションには存在しない独自性の高い内容であること、③環境研究や基礎から応用までの様々な研究目的で利用されていること、④淡水産絶滅危惧藻類の保存に取り組んでいること等が挙げられる。

2013 年度に分譲株数は 411 件 1,113 株であり、2012 年度と比較して教育利用が 38 件 153 株と 2 倍以上に増加した。オイル産生藻類や食品利用されているユーグレナ等、メディアで取り上げられる藻類が多いことによるのか、微生物の取り扱いが未経験の新規利用者や問合せが増えている。これを受けて、微生物株の取り扱い手引き書の配布やホームページ上で写真や動画を用いた、初心者にもわかりやすいコンテンツの整備を進めている。また株発送時に利用者向けアンケートを同梱して、株利用に関わる意見や質問、要望等への対応を行うことで、利便性やサービス向上にも取り組んでいる。今後は、研究者にも有用な情報 (例えば分子系統情報や地理情報など) を充実させることで、更に利用者の拡大を目指したい。

2013 年度の新規寄託株数は 42 株となっている。年々増加する継代培養株を効率的に管理するため、2013 年度の新たな試みとして、植え継ぎ管理情報や生育状況の定期検査をタブレット端末上において入力、確認できるシステムを構築、2013 年 10 月より本格的に運用を開始した。培養条件検討や培養技術をリアルタイムで更新して、スタッフ間で共有することで、植え継ぎ作業等の効率化が図られるとともに、培養が不安定な株や生育不良株への対処が迅速に行われるようになった。この他、海外の藻類コレクションとの交流活動等について紹介したい。

P-20 乳酸菌株資源の高付加価値化に向けて

○田中尚人¹, 鈴木智典², 富田 理³, 梶川揚申⁴, 内野昌孝⁴, 佐藤英一⁴, 五十君静信⁵, 岡田早苗^{1,4}

¹東京農業大学菌株保存室 (NRIC), ²東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科, ³農研機構食品総合研究所, ⁴東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科, ⁵国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

Generation of value-added lactic acid bacterium strains as bio-resources

○Naoto Tanaka¹, Tomonori Suzuki², Satoru Tomita³, Akinobu Kajikawa⁴, Masataka Uchino⁴, Eiichi Satoh⁴, Shizunobu Igimi⁵, Sanae Okada^{1,4}

¹NODAI Culture Collection Center (NRIC), Tokyo University of Agriculture, ²Department of Nutritional Science and Food Safety, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, ³National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, ⁴Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, ⁵Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences

乳酸菌はヒトが食料とする諸原料にはほぼその生息が認められ、種レベルばかりでなく株レベルでの多様性の広さは過去の多くの研究で明らかにされてきた。乳酸菌の食品への応用利用は数多く、例えば酸性化やバクテリオシンによる保存性向上、プロバイオティクス効果による健康効果、物質生産による風味向上などがある。微生物資源として多様な乳酸菌だが、現在は伝統的に著名な乳酸菌が主に用いられ、また目的に応じた一面的な研究がなされ、一つの機能に関連する項目のみで資源としての評価がされている。しかし、一菌株に対して多様な機能を評価して潜在的な有用性を見だし、あらたな応用につなげることはこれまでなかった乳酸菌株の高付加価値化を生み出すことも期待できる。現在では乳酸菌の分離操作が一般化され、多様な乳酸菌の収集は比較的容易な時代であり、今後は分離株の多様性評価法やスクリーニング手法の開発が必要になる考えられる。

そこで本研究では、乳酸菌がもたらす食品の保存性、健康効果、風味向上に着目し、NRICに保存されている乳酸菌株のこれらに関連する性状を網羅的に解析し、保存株に高付加価値を付与するモデルケースの構築を目的とする。乳酸菌株の各種性状はデータベース化し、使用目的に則した性状を抽出し、適した菌株を提示できるシステムを開発する。さらにこのデータベースを一般に公開し乳酸菌株資源を応用利用する基盤を構築する予定である。