

受賞講演

日本微生物資源学会奨励賞

緑藻綱オオヒゲマワリ目の分類学的再編に必要なこと

仲田崇志^{1,2}

¹ 慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科先端生命科学プログラム,

² 慶應義塾大学先端生命科学研究所

Problems in the classification of Volvocales (Chlorophyceae)

Takashi Nakada^{1,2}

¹Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance,

²Institute for Advanced Biosciences, Keio University

オオヒゲマワリ目 (Volvocales; 緑藻綱 Chlorophyceae) は淡水環境に生息する主要な鞭毛藻類の一群であり、100属1,000種以上が記載されている。現在のオオヒゲマワリ目には従来の複数目の藻類がまとめられていて、1980年代までに構築された亜目や科、属の多くが多系統群であることが分子系統解析により示されている。さらにオオヒゲマワリ目の種は一部を除いて光学顕微鏡観察に基づき記載されてきたため種同定が困難で、種の範囲の判断も客観性を欠いていた。そこで本研究ではオオヒゲマワリ目の系統分類体系を再構築するため、高次系統群、属階級群、種階級群それぞれのレベルにおける分類学的な問題解決に取り組んだ。

【系統分類体系の枠組み作り】分子系統解析による伝統的な高次分類体系の否定は、オオヒゲマワリ目の中で特定の種の種類・系統上の位置を示す手段を無くしてしまった。そこでリンネ式分類体系が再構築されるまでの代替となる系統分類学的枠組みを作るため、2007年までに登録されていた18S rRNA 遺伝子配列の網羅的な系統樹を作製し、オオヒゲマワリ目の内部に21の系統群と所属不明の3配列を認めた。この内、既知の属に対応せず、3種以上を含んだ系統群をPhyloCodeの下で新たに定義・命名し、形態学的には整理できなかった分類群の再整理を可能とした。その後も、系統的な位置が知られていない属や種の解析を進め、上記の系統群に含まれない藻類も発見している。

【属の系統分類学的再編】オオヒゲマワリ目では多くの属が多系統群であることが知られていたが、単系

統の属への再分類は必ずしも進んでいなかった。そこで属分類の再編成の方法を確立するため、紡錘形単細胞鞭毛藻類のヤリミドリ属 *Chlorogonium* について複数遺伝子系統解析や光学・電子顕微鏡観察など複数の手法を取り入れた分類学的な見直しを行った。その結果ピレノイドの微細構造などを識別形質としてヤリミドリ属は4新属を含む5単系統属へと再整理された。この研究により分子系統解析による単系統群への分割と、微細構造などに基づく各単系統群の識別が属分類群の整理に有効であることが示唆され、他の多系統属や属内分類群に対しても同様の研究を進めると共に、有効な識別形質の探索を続けている。

【種認識の妥当性の検討】伝統的にオオヒゲマワリ目の種は光学顕微鏡観察により認識される形態種であった。しかしこれらの形態種と生物学的種との対応関係には疑問が呈されていたため、異なる地域より分離された複数株を用いていくつかの形態種の妥当性を検討した。例えばコナミドリムシ *Chlamydomonas reinhardtii* の米国産株と新規日本産培養株、近縁種を用いた研究からは、形態種の妥当性が系統、ITS二次構造、生殖隔離により裏付けられた。一方で *Chloromonas insignis* と同定されていた培養株を分子系統および光学顕微鏡観察により再検討したところ、*Chloromonas vernalis* と新種 *Gloeomonas anomalopyrenoides* に再同定された。他の種における同様の研究からも、培養株に対する形態・分子両側面からの研究が正確な種分類に不可欠かつ有効であることが示されている。

基調講演

微生物多様性の研究における培養性の意義

平石 明

豊橋技術科学大学環境・生命工学系

Appreciating biodiversity of microorganisms: implications of what they are culturable

Akira Hiraishi

Department of Environmental and Life Sciences, Toyohashi University of Technology

微生物分類学は基本的に生きた培養株の情報に基づいて構築されている。一方、よく知られているように環境中に存在する優占的な微生物群集に関してはほとんどが培養分離することができない。R. コッホ以来の固形平板培養法によって得られる colony-forming units (CFUs) としての培養分離株は、蛍光顕微鏡で数えることのできる全菌数のわずかな部分を反映しているに過ぎない。外洋や貧栄養の環境での培養性 (culturability) は 1% にも満たず、比較的 CFUs の割合が高い廃水処理系においても、それは 10% 台が上限である。したがって、これらのギャップを埋めるべく、微生物学者は非培養的な分子技法を駆使して微生物の生態や実体解明に注力している一方、培養法を改良しながら新規分類群の分離にも努力し続けている。

このような中、高性能のゲノムシーケンサー (次世代シーケンサー, NGS) の登場は、微生物多様性の研究と理解に多大なる影響をもたらしている。網羅的に大量の遺伝子アンプリコンの解析を可能とすることで、環境中に数万分の一以下程度にしか存在しないごく少数の分類群の動態も把握できるようになってい

る。ゲノム解析でみれば、細菌に関するプロジェクト数だけでも現在の細菌の全記載種数をはるかに上回っている。種々の環境から再構成されるメタゲノムの比較からは、微生物の進化と系統に関わる概念も変えるような成果も出てきている。たとえば最近の知見として、海底堆積物のメタゲノム解析から発見されたロキアキオータ門の系統樹が、真核生物がアーキアの系統から派生していること (すなわち、生物は 2 超界から成ること) を示す例がある。

非培養性の微生物の網羅的な解析が可能となった現在、逆に言えば、培養分離されてくる少数派の菌株の意義に何? という疑問が出てくる。実は、これに対する明解な答えはまだ得られていない。今回は廃水処理系などを対象とした NGS による rRNA 遺伝子アンプリコンの網羅的解析データと CFUs の検出データを比較しながら、培養可能な少数派の生態学的意義を考えてみたい。また、酸化還元指示薬を使った非培養法によってえられる生菌数と CFUs の関係も示しながら、培養性の意義を考える。

シンポジウム

S-1 シイタケの遺伝資源と品種開発

寺島和寿

一般財団法人日本きのこセンター菌茸研究所

Genetic resource and breeding in shiitake mushroom

Kazuhisa Terashima

The Tottori Mycological Institute

【遺伝資源】シイタケ (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) は我が国で最も生産額の多い食用きのこであり、世界的にもツクリタケ (*Agaricus bisporus* (J. Lange) Imbach) に次ぐ生産量を誇っている。一方、野生シイタケはアジア（日本、韓国、中国、タイ、インドネシア、ネパール、ブータン）からオーストラレーシア（パプアニューギニア、ニュージーランド、オーストラリア（タスマニア島））に分布しており (Hibbett *et al.* 1998)、形態的に多様な地理的集団を含んでいる (Pegler 1983)。これら地理的集団は *in vitro* において交配可能であったことから、同一の「種」(*L. edodes*) とみなされてきた (Shimomura *et al.* 1992) が、近年の研究において、パプアニューギニア内における2集団が相互に交配不能であることが示されている (Shimomura *et al.* 2009)。また一方で、核リボソームDNAのITS (internal transcribed spacer) 配列に基づく分子系統解析の結果、シイタケには遺伝的に異なる5系統が存在していることが明らかになっている (Hibbett *et al.* 1995, 1998)。このように、シイタケの地理的集団は、それぞれ独自の遺伝子プールを有しており、形態的にも多様であることから、シイタケの品種開発において重要な遺伝資源であると考えられる。

【品種開発】(一財)日本きのこセンター菌茸研究所では、上記の地理的集団を含む野生菌株および栽培品

種を広く収集しており、これを利用してシイタケの原木栽培用品種を39品種開発してきた。現在、当財団は、これらの品種の中で極厚肉・良食味を有する「菌興115号」のブランド化を進めており、石川県および広島県で一定の成果を上げている。また、鳥取県においても、「原木しいたけブランド化促進協議会」が設立され、ブランド化を支援する種々の施策が講じられている。一方、生産現場から①子実体発生の低温要求性が強い(低中温型)ため年内の収穫量が少ないこと、②ブランド規格に適合する大型の子実体の割合が低いこと、③成長温度が高いと菌柄が徒長しやすいこと等の「菌興115号」の問題点が指摘されており、現在、当研究所では、これらの点を改善し、ブランド力を強化した品種の開発を進めている。また、発生温度型、子実体の大きさ、菌柄の徒長に関連するDNAマーカーの開発も同時に進めており、これを利用した効率的な品種開発システムの構築を目指している。本品種開発事業は、農林水産業・食品産業科学技術推進事業「美味・厚肉で収穫期間が長くブランド力のある原木シイタケ品種の開発」の支援により実施している。本事業で開発した優良品種により原木シイタケの生産拡大を実現し、広葉樹林の保全、農山村の活性化、美味しいシイタケの消費者への安定供給に貢献していきたいと考えている。

S-2 マツタケなど菌根性きのこ類の人工栽培に向けた研究

山中高史

国立研究開発法人森林総合研究所

Researches for cultivation of ectomycorrhizal mushrooms

Takashi Yamanaka

Forestry and Forest Products Research Institute

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) は、秋の味覚として古くから我が国の食卓を賑わしてきたキノコである。マツタケは樹木の根との間で養分のやりとりに関する共生関係、つまり菌根共生関係を成立させた菌(菌根菌)であり、この菌根共生を野外において人工的に再現できないため、これまで人工栽培技術は確立されていない。マツタケは主にアカマツ林において発生するが、クロマツ、ハイマツ、ツガ、コメツガ、エゾマツおよびトドマツの林にも発生する。マツタケの人工栽培の形態としては、アカマツなどの林において栽培する方法、腐生性の食用菌のように栄養分を含んだ担体上で栽培(菌床栽培)する方法が考えられる。前者については、アカマツ以外の樹種の活用を視野に入れて、様々な樹種への接種試験が試みられてきており、野外より広範囲な樹種への感染が認められている。一方、後者について、マツタケは養分を共生相手である樹木から得ているため、腐生性の菌類が有するような高分子有機物の分解能は高くはないことが明らかになっている。このほか、人工栽培技術の開発を目標とした、これまでの研究の流れを紹介する。

マツタケ以外にも、我が国では菌根性の食用菌としてショウロやホンシメジがある。これらの種は、菌を

感染させた樹木苗を鉢などで育てるとキノコが発生する事例が紹介されているが、さらにホンシメジについては、菌根菌としては例外的に高いデンプン分解能を有して、菌床栽培での栽培技術が確立されている。

欧米においてもマツタケやその近縁種が発生することは知られているものの食材として珍重されてはならず、トリュフ、アンズタケおよびヤマドリタケなどが菌根性の食用菌として、古くより親しまれてきている。トリュフのうち、黒トリュフはキノコを砕いて作成した胞子液の接種や菌が感染した苗木の移植による人工的な栽培が古くから行われている。アンズタケは、スウェーデンの研究グループにより実験室レベルでのキノコ形成が報告されている。以上のように、国内外での菌根性食用菌の人工栽培技術開発に向けては、菌の生態生理特性の解明と、それに基づいた、その技術開発の進捗状況が種によって様々である。これら経済的価値の高い菌根性きのこの人工栽培技術の開発は山村地域を中心にした新たな市場を生むことが期待される。近年、分子生物学的手法の導入や各種技術の精度の向上に伴って、これら菌根菌の生態についての新たな知見が得られており、その目標の達成に向けて進んでいるものと考えられる。

S-3 きのか由来揮発性物質を利用した植物病害防除技術の開発

岡 久美子

鳥取大学農学部

Development of plant disease control methods by volatile compounds from the mushroom

Kumiko Oka

Faculty of Agriculture, Tottori University

自然界における微生物（菌類，細菌など）は抗菌物質を生産するなどして，他の微生物と競争・拮抗して生息している．微生物が生産する抗菌物質は，我々の生活の中で抗生物質として農薬や医薬品等で利用されている．殆どの抗生物質は非揮発性のものであるが，我々はこれまでに，菌類であるきのこ類が周囲に広く拡散する揮発性の抗菌物質を生産していることを明らかにし，きのこ類が産出する揮発性抗菌物質を植物病害防除に利用することを目的とした研究に取り組んできた．

まず，鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センターに保有されている多種多様なきのこ類の中から植物病原菌に対して抗菌活性を示す揮発性物質を産出するきのこを選抜した．その結果，数種のきのこが抗菌活性のある揮発性物質を産出していることが示され，その中でも，食用きのこであるブナハリタケやブナシメジの揮発性物質は多数の植物病原菌に対して安定した抗菌活性を示した．また，これらの抗菌物質の活性は殺菌的な作用ではなく，病原菌の生育や増殖を抑える静菌的な作用を示した．

次に，ブナハリタケやブナシメジが放出する揮発性抗菌物質の単離および構造決定を行った結果，ブナハリタケから1-フェニル-3-ペンタノン，またブナシメジからは1-tert-ブチル-2-メチル-1,3-プロパンジオール

1-イソブチラートを同定した．なお，これらは既知物質であるが，植物病原菌に対して抗菌活性を示すことは今回，初めて明らかにされた．1-フェニル-3-ペンタノンの抗菌スペクトラムおよび有効濃度について検討したところ，9種類の植物病原菌の菌糸生育や胞子発芽を気中濃度5-10 ppm (w/v) の低濃度で抑制した．さらに，キャベツ黒すす病菌の胞子を接種したキャベツ葉に濃度5-10 ppm を処理すると，病斑形成が著しく抑制された．これらのことより，きのこ類，特に食用きのこが生産する揮発性物質は，健康への被害が少ないこと，閉鎖室内で隔々まで行き渡って活性を示し，通気によって容易に消失することなどから，安全・安心な病害防除資材として利用できるのではないかと考えている．

食用きのこのブナシメジは菌床栽培が行われているが，きのこを収穫後の菌床（廃菌床）はゴミとして大量に廃棄されている．廃菌床には揮発性抗菌物質が多く含まれていることが予想されることより，廃菌床の有効利用を目的に，廃菌床を利用した植物病害防除効果について検討を行った．その結果，密閉室内での廃菌床処理により病害の発生が抑制されることが明らかとなった．現在，きのこ由来の揮発性抗菌物質を用いた植物病害防除と廃菌床のリサイクルという一石二鳥の技術の実用化を目指し，研究を行っている．

S-4 キノコやカビの酵素探索からの或る考察

紙野 圭

独・製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター産業連携推進課

Obstacles found in investigation of fungal & mushroom enzymes

Kei Kamino

Bio-technology Center, National Institute of Technology and Evaluation

リグノセルロースの糖化酵素を例に、“有用”な酵素の探索におけるキノコやカビについて考えてみたいと思う。

非可食性のリグノセルロース系バイオマスの利用技術は、カーボンニュートラルの観点から重要であり、低炭素社会へ向けた最も現実的なバイオの技術のひとつである。低い生産コストと生産時の低い投入エネルギー/低いCO₂排出が求められており、具体的なベンチマークに向けて研究開発が行われている。その鍵を握るのがリグノセルロース系多糖質を分解して糖を得る酵素糖化技術の高効率化/低コスト化であり、その最も現実的な選択肢としてカビやキノコの酵素群が研究されている。なぜそこでカビやキノコかと言えば、ある種のカビの菌体外タンパク質生産性に関する異常とも言える高いポテンシャルがその理由の根幹である。効率化のために、個々の酵素の改良や置き換えが進められており、リグノセルロースを完全に分解できるキノコの酵素群にも期待の目が向けられている。

多糖質を分解することは生物の化学エネルギー獲得の面で最も本質的であり、それらの酵素は生物に普遍

的に存在して多くの研究があるが、リグノセルロース系多糖質の分解の“定量的な研究”は群を抜いて難しい。基質としてのリグノセルロースのヘテロさと、酵素分解が系として、固-液界面で起こるということに起因する研究の難しさに、カビやキノコの研究の難しさが掛け合わさっているためである。求められているのは有用な酵素であり、有用性にはいくつかの面があるが、いずれにせよ遺伝子情報やシミュレーションでは予測できないwetでかつ定量的な評価に基づく研究分野である。

演者らは、NBRC保有および新たに単離したカビやキノコからのリグノセルロース糖化酵素の選抜を進めてきた。誠にwetでmuddyな現場であるが、難しいことは相変わらずそのままなのだということを強く感じており、その底上げなくして、飛び道具のみでカビやキノコの研究や実用化が益々盛んになるということもないのではないかと考えている。ひとつの例としてそれらについての実際を紹介しながら展望について考えてみたい。

一般講演

O-1 鉄腐食を引き起こす水素非資化性硝酸塩還元菌 *Prolixibacter denitrificans*

○飯野隆夫¹, 伊藤公夫², 坂本光央¹, 大熊盛也¹

¹ 理研 BRC-JCM, ² 新日鐵住金

Nonhydrogenotrophic nitrate-reducing *Prolixibacter denitrificans* induced metallic iron corrosion

○Takao Iino¹, Kimio Ito², Mitsuo Sakamoto¹, Moriya Ohkuma¹

¹RIKEN-BRC JCM, ²Nippon Steel and Sumitomo Metal Corporation

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、硫酸塩還元細菌が主な原因菌として頻りに研究されているが、我々は *Bacteroidales* 目に属する *Prolixibacter* sp. MIC1-1 株が硝酸塩存在下で鉄腐食を引き起こすことを見出した¹⁾。 *Bacteroidales* 目の細菌による微生物腐食の事例は過去に無く、その鉄腐食機構は不明である。また、MIC1-1 株は系統的に *Prolixibacter bellariivorans* と近縁であったが、16S rRNA 遺伝子の相同性が 97.5% と低く、分類学的にも未知と言える。本研究では *Prolixibacter* sp. MIC1-1 株の分類学的性質と鉄腐食現象の解析を目的とした。

MIC1-1 株はグラム陰性、無芽胞、非運動性、通性好気性の桿菌であった。至適生育温度、pH、塩濃度はそれぞれ 37°C、7.0、2% であった。MIC1-1 株は炭素源 (有機酸や酵母エキスなど) を必須に要求する従属栄養細菌で、電子受容体として硝酸塩と酸素を利用し、電子供与体として金属鉄 (Fe⁰)、第一鉄 (Fe²⁺) を利用した。興味深いことに、既報の金属腐食菌とは異なり MIC1-1 株は水素を利用できなかった。金属鉄、硝酸塩、乳酸塩存在下で MIC1-1 株は無菌区の 6 倍の鉄イオンを溶出した。培養液中の硝酸は減少し、亜硝酸とアンモニアが検出された。腐食鉄片の構造解析を行った結果、鉄片は減肉し、腐食生成物として炭酸鉄 (FeCO₃) とリン酸鉄 (FePO₄) が付着していた。 *P. bellariivorans* JCM 13498^T は同培養条件において鉄腐食を起こさなかった。したがって、MIC1-1 株の鉄腐食能は菌株固有もしくは種レベルの特徴と考えられる。MIC1-1 株は細胞の大きさや硝酸還元能、系統位置が *P. bellariivorans* と異なることから、MIC1-1 株を新種として独立させることが妥当であると考え、新種 *Prolixibacter denitrificans* を提唱する。

1) Iino, T. *et al.* 2015. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81: 1839-1846.

O-2 琵琶湖深層で優占する *Chloroflexi* 門細菌の生態学的特性および単離手法の検討

○岡崎友輔, 程木義邦, 中野伸一

京大大学生態学研究センター

Ecology and cultivability of a dominant bacterioplankton (Phylum *Chloroflexi*) in the hypolimnion of Lake Biwa

○Yusuke Okazaki, Yoshikuni Hodoki, Shin-ichi Nakano

Center for Ecological Research, Kyoto University

Chloroflexi 門 *Anaerolineae* 綱の細菌系統である CL500-11 クラスタは、琵琶湖全域の好気的深水層 (水深約 30 m 以深の水塊) において、浮遊細菌群集の約 15% を占める優占系統である。CL500-11 は、平均的な浮遊細菌よりも大型 (長さ 1-2 μm のコマ状桿菌) であり、細胞体積比では細菌群集全体の約 30% を占めることから、琵琶湖の物質循環および生態系において重要な役割を担っていると考えられる。さらに CL500-11 は、湖沼の浮遊細菌の優占系統としては *Chloroflexi* 門から初めて報告された系統である一方、これまで *Anaerolineae* 綱で得られている単離株に共通する特徴 (嫌気性・中〜好温性・糸状細胞) をいずれも欠いている。従って、新規な生理的性質を有している可能性が高いと考えられる。また 16S rRNA 遺伝子データベースの検索によれば、CL500-11 は有酸素深水層を有する複数の淡水湖沼のクローンライブラリーから報告されていることから、本系統が有酸素深水層をニッチとして、世界的に分布する系統であることが示唆されている。しかし、現状では CL500-11 に注目した研究は琵琶湖以外では例がなく、本系統の生態的・生理的な特性は明らかになっていない。そこで本研究では、様々な湖沼における CL500-11 の分布を明らかにし、湖沼間の比較から、CL500-11 の生育に必要な要因を絞り込み、最終的に CL500-11 を単離培養することを目的とし、国内の複数湖沼の実地調査および、データベース検索による海外も含めた湖沼間の比較分析を行った。中禅寺湖・西湖・本栖湖で行った国内調査では、CARD-FISH 法を用

いた蛍光顕微鏡下での直接計数により、いずれの湖沼でも CL500-11 が有酸素深水層で優占し、最大で全細菌数の 14.4% を占めることが明らかになった。データベース調査では、従来のデータベースである GenBank に加え、近年急速に普及している次世代シーケンサーのデータベースである Sequence Read Archive (SRA) も含めて検索を行い、CL500-11 の 16S rRNA 遺伝子配列が有酸素深水層を有する淡水湖沼で世界的に見つかる一方、有酸素深水層を有しながら配列が検出されない湖沼も存在することが明らかとなった。これらの結果から、CL500-11 は有酸素深水層に適応し、広く分布する系統であるが、何らかの湖沼ごとに異なる環境要因がその生育に必要なであることが示唆された。本発表では、分析結果を用いた湖沼間の比較により、CL500-11 の生育に必要な条件を検討するとともに、単離培養に向けた、CL500-11 の集積実験の経過についても報告する。

O-3 植物根圏の *Flavobacterium* および *Chryseobacterium* の分離培地の開発

○西岡友樹¹, 須賀晴久², 景山幸二³, 百町満朗¹, 清水将文¹

¹ 岐阜大学大学院応用生物科学研究科, ² 岐阜大学生命科学総合研究支援センター, ³ 岐阜大学流域圏科学研究センター

Optimized medium for isolation of *Flavobacterium* and *Chryseobacterium* from rhizosphere soil

○Tomoki Nishioka¹, Haruhisa Suga², Koji Kageyama³, Mitsuro Hyakumachi¹, Masafumi Shimizu¹

¹ Graduate School of Applied Biological Sciences, ² Life Science Research Center, ³ River Basin Research Center, Gifu University

【目的】非培養法による解析から、植物根圏にはバクテロイデス門フラボバクテリウム科の *Flavobacterium* (以下 F 菌) 及び *Chryseobacterium* (以下 C 菌) が多数生息していることが明らかとなってきた。F 菌及び C 菌が植物に如何なる影響を及ぼしているのか興味を持たれるところであるが、根圏からの選択的分離法が考案されておらず、それら細菌群の機能解析が難しかった。そこで本研究では、根圏から F 菌及び C 菌を分離するための培地を開発することとした。

【方法・結果】ネギの根圏土壌の希釈液を R2A, 1/4-strength TSA, 1/10-strength TSA, soilextract 寒天及びシェドラーアナエロブ寒天に塗抹して培養した後、フラボバクテリウム科の特徴である黄～オレンジ色を呈する細菌のみを分離し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき同定した。その結果、R2A からのみバクテロイデス門の細菌が検出されたことから、本培地を基礎培地として選んだ。ただし、R2A 上にはプロテオバクテリアと糸状菌も多数出現した。そこで、これら混入菌の増殖を抑制するトブラマイシンとシクロヘキシミドを添加した R2A (R2A-C/T) を作成し、再度ネギの根圏細菌を分離した。出現した黄～オレンジ菌は全てバクテロイデス門の細菌だったが、いずれもフラボバクテリウム科ではなかった。リン酸化合物と寒天と一緒に高圧滅菌した培地上では *Flavobacterium* の生育が阻害されるとの報告に基づき、両成分を別々に高圧滅菌した R2A に上記抗生物質を加えた培地 (PSR2A-C/T) を調製した。さらに、F 菌及び C 菌は海水からの分離例が多いことから、PSR2A-C/T に NaCl を添加した培地も作成した。両培地を用いてネギの根圏細菌を分離した結果、PSR2A-C/T からのみ F 菌及び C 菌が分離された。なお、同培地から分離した黄～オレンジ色の菌株に占める F 菌及び C 菌の割合は、それぞれ 25% 及び 30% であった。同培地でタマネギの根圏細菌も分離したところ、やはり両属の細菌が分離できた。以上から、PSR2A-C/T は、根圏生息性の *Flavobacterium* 及び *Chryseobacterium* の分離に有効な培地であると考えられた。

O-4 プロバイオティクス乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* FSCM2-12 株の胃酸耐性機構の解明

○平岡吏佳子¹, 宇田 勲², 仲野翔太³, 霜村典宏⁴, 会見忠則⁴

¹鳥取大学大学院農学研究科, ²おしどり調剤薬局株式会社, ³鳥取大学大学院連合農学研究科, ⁴鳥取大学農学部

Mechanism of gastric acid resistance in probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* FSCM2-12

○Rikako Hiraoka¹, Isao Uda², Shota Nakano³, Norihiro Shimomura⁴, Tadanori Aimi⁴

¹Graduate School of Agriculture, Tottori University, ²Oshidori-Pharmacy Co., Ltd., ³United Graduate School of Agricultural Sciences, ⁴Faculty of Agriculture, Tottori University

【背景・目的】これまでの研究で、人工胃液3時間処理後の生存率が70%以上あるプロバイオティクス乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* FSCM2-12 株を分離し、機能性発酵食品の開発を行ってきた。しかし、この FSCM2-12 株が、なぜ、高い胃酸耐性をもつのかどうかについては、全く知見がないことから、本菌株の胃酸耐性機構を調べることにした。胃酸耐性株である FSCM2-12 株と胃酸感受性株である *Lactobacillus brevis* FSCT-2 株の形態観察を行ったところ、FSCM2-12 株は、MRS 寒天培地上にムコイド状のコロニーを形成し、多糖のような物質をつくっており、FSCT-2 株のコロニーとは、形状が大きく異なっていた。そこで、この二つの菌株の違いについて詳細に検討した。

【実験方法】両菌株における、バイオフィーム形成能と莢膜の有無について、定法に従い、検討を行った。次に、MRS 培地を基本とした炭素源の異なる培地で培養した FSCM2-12 株の胃酸耐性を検討した。また、その時の細胞の微細な構造を調べるため、透過型電子顕微鏡観察を行った。また、その微細構造の違いと胃酸耐性との関係について考察を行った。

【結果・考察】両菌株共にバイオフィームは形成しなかったが、莢膜染色では、FSCM2-12 株において、細胞壁の周りに明瞭なクリアゾーンが観察でき、莢膜を形成していると考えられた。一方、FSCT-2 株においては、莢膜と思われるものは観察されなかったことから、FSCM2-12 株における胃酸耐性は、莢膜に由来すると考えられた。次に、炭素源の異なる培地で培養し、FSCM2-12 株の人工胃液耐性試験を行った結果、炭素源としてグルコース、フルクトース、スクロースでは、平均生存率が70%以上、グリセロールや炭素源を加えない培地では、生存率が低かったため、炭素源の有無とその種類が、胃酸耐性に影響していると考えられた。両菌株の細胞断面を電子顕微鏡により観察したところ、FSCM2-12 株では、培養液中の炭素源の有無により、莢膜の厚さに違いを確認することができたが、FSCT-2 株においては、炭素源の有無による、細胞壁外側の構造に変化がなかった。以上のことから、胃酸耐性と莢膜形成、莢膜形成と炭素源の種類には、密接な繋がりがあることが分かった。現在、*L. plantarum* NBRC109604 株と NBRC101975 株において同様の検討を行っている。

O-5 耐塩性を具備するシヨウロ交雑 F₁ 菌株の育成

○仲野翔太¹, 高 琪¹, 会見忠則², 霜村典宏²

¹鳥取大学大学院連合農学研究科, ²鳥取大学農学部

Production of a salt-tolerant hybrid strain of the ectomycorrhizal mushroom *Rhizopogon roseolus* (= *R. rubescens*)

○Shota Nakano¹, Qi Gao¹, Tadanori Aimi², Norihiro Shimomura²

¹United Graduate School of Agricultural Science, ²Faculty of Agriculture, Tottori University

【背景】シヨウロ *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. M. Fr. (= *R. rubescens* Tul. & Tul.) は、海岸砂地において主にクロマツの根に外生菌根を作り共生する外生菌根菌であり、耐塩性を具備するきのこ種だと考えられている。本きのこの種の耐塩性は種内変異に富むことから、我々のこれまでの研究では、自然界で採取した子実体から分離した野生系統（野生二次菌糸）の中から耐塩性を具備する菌株系統を探索してきた。一方、子実体から採取した胞子を発芽させ分離した一次菌糸を交配させることで、耐塩性を具備する交雑 F₁ 菌株（交雑二次菌糸）を人為的に育成することも可能であると考えられている。しかしながら、耐塩性を具備する交雑 F₁ 菌株（交雑二次菌糸）の育成に向けた研究例が著しく乏しいのが現状であり、基礎的知見の蓄積が望まれる。そこで本研究では、単胞子分離菌株（一次菌糸）を交配させることで、耐塩性を具備する交雑 F₁ 菌株（交雑二次菌糸）を人為的に育成することが可能であるか検討した。

【実験方法】供試菌株には NaCl ストレス条件下で胞子発芽しコロニー形成した単胞子分離菌株（一次菌糸）とそれら単胞子分離菌株を交雑し育成した交雑 F₁ 菌株（二次菌糸）、また、これら菌株の分離元である組織分離菌

株を用いた。所定量の NaCl を添加した 1/5 濃度 MMN 寒天培地に、上記菌株を接種し、25℃、暗黒下で 20 日間培養後、菌糸体直径を測定した。本研究では NaCl ストレス培地において菌糸体成長量が大きい菌株を耐塩性菌株と定義した。

【結果と考察】 NaCl ストレス条件下において分離した単孢子分離菌株は耐塩性の種内変異に富んでおり、耐塩性を示す菌株が確認された一方で、塩感受性を示す菌株も確認された。また、耐塩性の種内変異は交雑 F₁ 菌株においても認められ、NaCl ストレス条件下においても旺盛な菌糸体成長量を示す耐塩性菌株が確認された。さらに、孢子分離元の組織分離菌株よりも強い耐塩性を示す交雑 F₁ 菌株も確認された。これらの結果より、耐塩性を具備する菌株系統を単孢子分離菌株の交雑により育成可能であることが示唆された。

O-6 バーミキュライトを担体として用いた NBRC 担子菌株に対する凍結保存法の開発

○佐藤真則¹、野口麻里子^{1*}、井上竜太郎¹、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 (*平成 26 年度当時)、² 同機構生物資源利用促進課、

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 (FMRC)

Cryopreservation by using vermiculite as carrier for NBRC basidiomycete culture

○Masanori Sato¹, Mariko Noguchi¹, Ryutarou Inoue¹, Shigeki Inaba², Akira Nakagiri³

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

現在我々は担子菌の長期保存法の候補としてパーライト法の改良による担子菌の凍結保存法の開発を行っている。パーライト法が担子菌の凍結保存に非常に効果的であることは明らかであるが、その効果の作用機序においては残念ながら現在のところ全くわかっていない。そこでパーライト法の作用機序の検証に関する試行錯誤を重ねているところであるが、その中でパーライトと同様に多孔性担体であるバーミキュライトにも保護効果があることがわかった。バーミキュライトはパーライトと同様岩石を高温で焼いて発泡させて作成した多孔性担体であり、例えば園芸分野において苗等の代用土として使用されるなどよく知られている。そしてその原料およびその性質についてはどちらも保水性と保気性に優れていることが共通している一方原料が蛭石であることをはじめいくつかの違いがある。そこでまずバーミキュライトがパーライト同様に菌糸の培養用担体として使用可能かどうか増殖能について検証したところ、パーライトを担体として用いた場合の増殖と同様かさらに良好であることがわかった。次に担体自体の凍結保護効果を確認するために、4 株のモデル担子菌株 (*Amanita pantherina* NBRC 32788, *Sarcodon aspratus* NBRC 32814, *Volvariella volvacea* NBRC 31104, *Phallus hadriani* NBRC 105520) を用いて凍結保護剤を添加しないで凍結処理を行いその生残性を検証したところ、興味深いことにこの担体自体にもパーライトと同様に一定の凍害防御効果がありそれはパーライトよりも優れていることがわかった。さらにモデル菌株を 10 株 (*Amanita citrina* NBRC 8261, *Amanita rubescens* NBRC 8266, *Amanita pantherina* NBRC 32788, *Sarcodon aspratus* NBRC 32814 & NBRC 32815, *Lactarius akahatsu* NBRC 33156 & NBRC 33157, *Lactarius hatsudake* NBRC 32794, NBRC 33155, *Tricholoma flavovirens* NBRC 33143) に増やし凍結保護剤 (Glycerol 12% (v/v), Trehalose 10% (w/v)) を添加した場合の生残性について検証した。結果はバーミキュライトを担体として使用した場合の方がパーライトを担体として使用した場合にくらべ 9 株について生残性が向上することがわかった。以上のことからバーミキュライトを担体として使用することはパーライト法よりも汎用性ならびに凍結保護効果が高い凍結保存法である可能性が示唆された。発表では現在データ取得を行っている別の凍結保護剤の組合せの効果についても報告する予定である。

ポスター発表

P-1 色々な細菌の分離と分類・同定

○畑山耕太¹, 久野輝昭², 牛田絢子³

¹相模中央化学研究所, ²北里大学理学部, ³玉川大学農学部

Isolation and identification of colorful bacteria

○Kouta Hatayama¹, Teruaki Kuno², Ayako Ushida³

¹Sagami Chemical Research Institute, ²School of Science, Kitasato University, ³College of Agriculture, Tamagawa University

細菌の中には色素を産生するものが多く存在する。細菌にとって色素は、色としてではなく細菌自身の生存に貢献する化学物質である可能性が高い。また、既知の細菌由来色素は抗生物質活性や抗酸化作用などを示すものも多く、人類にとって有用性が高い。一方、自然界には未知細菌が多く存在しており、人類に有用な細菌由来色素も手つかずのまま眠っている可能性があった。そこで本研究は、新規有用色素産生の可能性がある細菌の探索を行った。土壌や河川水などの自然環境サンプルから、独自の培地を用いて色のついたコロニーなどを形成する細菌を98株分離した。分離された細菌は、16S rRNA 遺伝子の部分配列(約500 bp)を基に同定を行い、文献等から産生色素に関する情報を調査した。その結果、一部の分離株については既知色素を産生する可能性が示唆されたが、多くの分離株が産生する色素の詳細は不明であった。一方、分離株の中には分類学的に新規性の高いものが存在した。そのうちのZYfla3株とMSd3株と命名した2株に関して、さらに系統分類学的な研究を行った。

水田土壌から分離され、サフランイエローのコロニーを形成するZYfla3株は、少なくとも3種類の16S rRNA 遺伝子配列を有していた(相同性は99.8-99.9%, そのうちの1つは1塩基欠失)。その配列に基づく系統解析から、ZYfla3株は*Geothermomicrobium*属(相同性は92.8-92.9%)や*Shimazuella*属(90.7-90.9%)などに近縁な*Thermoactinomycetaceae*科の新属新種である可能性が示唆された。諸性質の解析結果もZYfla3株が新属新種であることを支持する結果となった。

河川水から分離され、クロムイエローのコロニーを形成するMSd3株は、16S rRNA 遺伝子配列解析の結果から*Spirosoma linguale* DSM 74^T(相同性は97.6%)に近縁であることが示唆された。DNA-DNA hybridization や諸性質の解析結果から、MSd3株は*S. linguale*とは別種であることが示唆され、*Spirosoma*属の新種であると考えられた。

P-2 各種環境中のクテドノ細菌叢の解明

○矢部修平^{1,2}, 酒井康輝^{1,2}, 横田 明³

¹東北大院・農・生物産業創成, ²ハザカ研究所, ³インドネシア大学

Analysis of *Ktedonobacteria* communities in various environmental samples

○Shuhe Yabe^{1,2}, Yasuteru Sakai^{1,2}, Akira Yokota³

¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Hazaka. Res. Cent., ³Univ. Indonesia

【目的】2007年に初めて発見され樹立された系統であるクテドノ細菌(綱)は放線菌とは分子系統的に大きく異なり、より深い分岐の系統であるクロロフレクサス門に属するにも拘わらず、共通して放線菌様の孢子・菌糸形成能を示し、3科5種のみで構成される未解明でユニークな分類群である。これら5種のうち4種は地熱地帯や堆肥などの特殊な高温環境から分離された好熱菌好気性であり、その生息環境は未知である。一方、この系統に属する*Thermosporothrix hazakensis*のゲノムからは23個の二次代謝関連遺伝子と、その培養物からは4つの新規構造の化合物が発見されており、魅力的な微生物資源でもある。従って、この系統の生息環境と叢を把握し分離株を得る事は新たな微生物資源の開拓として重要である。そこで本研究では各種環境中のクテドノ細菌叢を解明し、分離を試み、分離株は系統分類する事とした。

【方法・結果及び考察】各地の土壌や腐葉土、樹皮、葉、砂、各種堆肥、地熱堆積物など計25サンプルからDNAを抽出し、RDPのデータベースを利用して作成したクテドノ細菌特異的プライマーを用いてPCRを行った。その結果、土壌など14サンプルにおいて特異的バンドが検出された事から堆肥や地熱地帯だけでなく土壌など身近な環境においても本系統が棲息する事が明らかとなった。現在、全14サンプル中のクテドノ細菌

ア叢を網羅的に解析するため、PCR増幅産物を次世代シーケンサーにて解析中である。

クテドノバクテリアの分離を試みるため、ゲランガムを固化剤とした培地を用い地熱地帯堆積物を分離源として、直接接種法により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、MYC株を単離した。MYC株の16S rRNA遺伝子配列は*T. hazakensis* SK20-1株と98.7%の相同性を示した。この株は既報のSK20-1とは抗生物質耐性やコロニーの形状などの表現形質が異なったことから、新種として区別される可能性があるかと推察し、現在系統分類学的試験を行っている。各種環境中のクテドノバクテリア叢の結果と併せて報告する。

P-3 ヒト腸内からの難培養性微生物の単離とバイオリソース整備

○坂本光央¹, 田中良紀^{2,3}, 辨野義己³, 大熊盛也¹

¹ 理研 BRC-JCM, ² ビオフェルミン製薬神戸研究所, ³ 理研イノベーション推進センター-辨野特別研究室

Isolation of yet-uncultured microorganisms from the human gut and maintenance of microbial resources

○Mitsuo Sakamoto¹, Yoshiki Tanaka^{2,3}, Yoshimi Benno³, Moriya Ohkuma¹

¹ Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, ² Biofermin Kobe Research Institute, ³ Benno Laboratory, RIKEN Innovation Center

【目的】本研究では、ヒト腸内から共生関係にあるような難培養性の微生物を単離し、その分類学的研究を行うとともに、微生物資源の確保およびその利用の観点からバイオリソースの整備を行うことを目的とした。

【材料および方法】ヒト腸内における微生物同士の共生関係を再現する目的で考案された簡易培養法である「メンブランフィルター法」¹⁾を用いて、ヒト糞便材料から新規な微生物株を単離した。すなわち通常の1.5%寒天平板培地層上に0.4%軟寒天培地層(下層)を重層し、その上に底部が孔径0.22 μmのフィルターのリングを乗せ、リング内に0.4%軟寒天培地層(上層)を作製した。各上下の軟寒天培地層へ、予め菌を混釈することで両微生物の共生関係を再現した。

【結果および考察】我々が分離した新規菌株 *Parabacteroides* sp. 157株は、分離当初の継代培養が困難であったが、本システムを用いてフィルター上層寒天培地に本菌株を、下層にはヒト糞便由来腸内常在菌懸濁液を混釈し共培養を行ったところ、肉眼で確認可能な大きさのコロニー形成が認められた¹⁾。現在、本菌を含め単離された菌株は、その分類学的帰属を明確にし^{2,3)}、公的なカルチャーコレクションに寄託して各々の研究者が容易にアクセスできるようにバイオリソースの整備を順次行っている。

本研究の一部は公益財団法人発酵研究所 (IFO) の助成によって行われた。

1) Tanaka and Benno (2015) Microbiol. Immunol., 59, 63-70.

2) Sakamoto *et al.* (2014) Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 64, 2992-2997.

3) Sakamoto *et al.* (2015) Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 65, 1342-1346.

P-4 *Colletotrichum orbiculare* および *C. destructivum* 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, 青木孝之¹, 根本 博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 orbiculare* and *C. destructivum* species complex

○Toyozo Sato¹, Jouji Moriwaki², Takayuki Aoki¹, Hiroshi Nemoto¹

¹ National Institute of Agrobiological Sciences, ² NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center

近年、分子系統解析により *Colletotrichum* 属菌 (植物炭疽病菌) には少なくとも9種複合体の存在が明らかにされ、主な種複合体内の分類と種分割が進んだ。昨年、*C. boninense* 種複合体については NIAS Genebank 保有菌株 (MAFF 菌株) が4既知種および3未記載種に再同定され、また、森脇ら (2002) が類別した同属の鎌型分子形成種 (Ribosomal group 9-13) については MAFF 菌株が9既知種および4未記載種に再同定された (佐藤ら, 2014)。今回、同機関保有の *C. orbiculare* 種複合体 (COSC) 22菌株および *C. destructivum* 種複合体 (CVSC) 21菌株の分子再同定を行った。COSC 菌株については Damm *et al.* (2013) の用いた7遺伝子・領域のうち、ITS, GAPDH, ACT, TUB2を用いて BLAST 検索を行い、最尤法による分子系統樹を作成した。その結果、各菌株はカタログの表示学名通り、*C. orbiculare* (14株)、*C. trifolii* (7株)、*C. lindemuthianum* (1株) の3種に

再同定された。CVSC 菌株については Damm et al. (2014) の用いた6 遺伝子・領域のうち、上記4 遺伝子・領域を用いて同様に BLAST 検索を行い、分子系統樹を作成した。その結果、21 株は *C. destructivum* s. str. (4 株)、*C. higginsianum* (6 株)、*C. tabacum* (3 株) の3 種に再同定された。残りの8 株は機知種の対照菌株とは単系統にならなかった。それらのうち、アジサイ由来4 菌株は単一のクレードを形成し、ホオズキ、シソ、オミナエシあるいはストック各由来菌株はそれぞれ系統に位置付けることができなかった。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、暫定的に (COSC) や (CVSC) 等の略称を更新学名に付記した。

(MAFF 推奨菌株：http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_approved.php#colletotrichum)

参考文献

Damm U, Cannon PF, Liu F, Barreto R.W., Guatimosim E. & Crous P.W. 2013. Fungal Diversity 61: 29-59.

Damm U, O'Connell R.J., Groenewald J.Z. & Crous P.W. 2014. Stud. Mycol. 73: 1-36.

佐藤豊三, 森脇丈治, 澤田宏之, 永井利郎, 一木(植原)珠樹, 青木孝之 2014. 微生物資源学会誌 30: 148.

P-5 ホウレンソウとダイコンに病原性を有する *Colletotrichum dematium* (Persoon) Grove の菌株 MAFF238704 から作出した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, 伊藤陽子, 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 generated from MAFF238704, a strain of *Colletotrichum dematium* (Persoon) Grove pathogenic to spinach and radish

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

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

Colletotrichum spinaciae Ellis & Halsted によるホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L., ヒユ科) の炭疽病 (anthracnose) が我が国において記録されている (西田, 1912; 逸見, 1921)。現在、本菌は *Colletotrichum dematium* (Persoon) Grove のシノニムとされている (Index Fungorum)。演者らは以前、ダイコン (*Raphanus sativus* L. Daikon Group, アブラナ科) の炭疽病を引き起こす *C. dematium* の菌株 MAFF238704 (Sato et al., 2005) の分生子懸濁液をホウレンソウに噴霧接種することによって、同菌株がホウレンソウに対しても葉に強い病原性を有して炭疽病を引き起こすことを確認した (富岡ら, 2014)。ホウレンソウとダイコンの炭疽病の発生病態については不明な点が多い。そこで今回、MAFF238704 を基に、病原の発生病態ほか、分化型、類縁関係等の解析用マーカーとして有効とされる硝酸塩利用能欠損変異株を作出した。塩素酸塩 (potassium chlorate) に耐性を示す単菌糸分離株を得て、それらを硝酸態窒素 (sodium nitrate)、亜硝酸態窒素 (sodium nitrite)、アンモニア態窒素 (ammonium tartrate)、ヒポキサンチン態窒素 (hypoxanthine) および尿酸態窒素 (uric acid) 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、硝酸態窒素が利用できない表現型 *nitI*、硝酸態窒素と亜硝酸態窒素が利用できない表現型 *Nit3* ならびに硝酸態窒素とヒポキサンチン態窒素が利用できない表現型 *NitM* の変異株がそれぞれ数菌株得られた。それらの内、胞子形成能、菌叢生育およびホウレンソウに対する病原性が野生株 MAFF238704 と同等の変異株を、各表現型について1 菌株 (計3 菌株) スクリーニングした。今後、これら3 菌株は、農業生物資源ジーンバンクに登録するとともに、ダイコンに対する病原性を確認する予定である。

P-6 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**(2) ククモウイルスの外被タンパク質遺伝子の効率塩基配列決定**

○一木 (植原) 珠樹, 青木孝之, 澤田宏之, 永井利郎, 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

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

(2) Sequencing of capsid/coat proteins of cucumoviruses in the NIAS Genebank

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

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。2015年6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330点を公開している。現在ウイルスの登録株数を増やすとともに、登録済みの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を解読中である。今回は球状の粒子構造を持ち、4分節の+鎖RNAから構成されるククモウイルス属に所属するウイルス株の解析を行った。プライマーはククモウイルス属の外被タンパク質遺伝子領域を増幅できるとされる共通プライマーを用いた(Choi et al. (1999))。その結果、ククモウイルス属の3種のウイルスすなわち Cucumber mosaic virus, Peanut stunt virus, Tomato aspermy virus のすべての株の遺伝子を増幅し解析することができた。ククモウイルス属は80種以上のアブラムシで非持続伝搬され、特に Cucumber mosaic virus は85科以上の植物を宿主とする農業上重要な植物ウイルスであり、今回Choiらのプライマーの有効性と外被タンパク質の塩基配列を明らかにしたことで、ユーザーがジーンバンクのククモウイルスを解析する際の一助になると期待される。

P-7 PCR—核酸クロマト法を使った保存株病原因子の迅速検証法の作成

○吉田 茂¹, 金沢 泉¹, 林 佐代子², 林 将大³, イブラヒム・エルデソーキー¹, 福永 肇¹, 江崎孝行¹
¹岐阜大学医学部病原微生物遺伝資源保存センター, ²岐阜医療科学大学, ³岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野

Cocktail PCR and DNA-chromatography for quick screening of multiple pathogenic factors of pathogenic stock culture

○Shigeru Yoshida¹, Izumi Kanazawa¹, Sayoko Hayashi², Masahiro Hayashi³, Ibrahim Eldesoky¹, Hajime Fukunaga¹, Takayuki Ezaki¹

¹Genetic Resource Stock Center of Pathogenic Bacteria, Gifu University School of Medicine, ²Gifu University of Medical Science, ³Division of Anaerobe Research, Life Science Research Center, Gifu University

高度病原体および弱毒株の系統保存と分譲では保存株に病原因子が保有されているか、あるいは弱毒株の病原因子の欠損を検証し、分譲する業務は極めて重要な作業になる。多数の病原体の病原因子の保有の有無を少数の人数で管理することは難しいので、共通の手順で簡便に病原因子をチェックする手法が必要になる。

この目的にはPCR法が簡便であるが、保有する病原因子が複数あるため、最大6種類のプライマーを混合したカクテルプライマーを作成し、さらに増幅産物を目視で識別する核酸クロマト法を開発した。各プライマーには6種類の異なったTagがついており、30分で遺伝子を増幅し、増幅産物は核酸クロマトろ紙にプリントされたアンチTagと反応し、肉眼で増幅結果を10分で確認できる。

PCR増幅から核酸クロマト終了まで40分で実験が完了するため、病原体ごとにカクテル試薬を作成しておけば、分譲の際に迅速に検証ができる。病原因子がプラスミッド上に存在する炭疽菌、ペスト菌、赤痢菌、病原性大腸菌では効力を発揮した。また染色体上に存在するチフス菌やボツリヌス菌の病原因子も外来遺伝子によりもたらされ、不安定であり、病原因子の脱落の確認が迅速にできるようになった。この方法で赤痢菌の血清型標準株を検査した結果、侵入病原因子を保持している株は4割しかなかった。

P-8 宮崎県で採集された *Oudemansiella* 属の未記載種について

○牛島秀爾, 前川二太郎

鳥取大学農学部附属菌類きのご遺伝資源研究センター (FMRC)

An undescribed species of the genus *Oudemansiella* (s.l.) collected from Miyazaki Pref.

○Shuji Ushijima, Nitaro Maekawa

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

鳥取大学農学部附属菌類きのご遺伝資源研究センター (FMRC) では、菌類きのご類の遺伝資源の収集を行い、TUFIC コレクションの拡充を進めている。2013年11月に、宮崎県での収集活動において、収集した分離源標本の肉眼および顕微鏡的形態を調査した。その結果、タマバリタケ科、*Oudemansiella* 属 (広義) の既知種とは一致しない未記載種が見いだされた。さらに、本未記載種の分離菌株より得られた rDNA の ITS 領域の塩基配列を用いてブラスト検索を行った結果、*Oudemansiella* 属 (広義) の近縁な種であることが示唆された。加えて本未記載種の塩基配列および GenBank に登録されている近縁種の塩基配列を用いた分子系統学的解析を行った結果、本未記載種は供試した分類群とも異なる系統であることが示された。以上の形態学および分子系統学的解析結果により、本未記載種を新種と示唆し、以下にその特徴を記述する。子実体はナラタケ形、傘の中心部は濃褐色、周辺にしたがって淡褐色あるいはクリーム色となる。傘の表面は中心部より著しい放射状のシワがあり、表面は褐色の微細な粒点がある。ひだはクリーム色、幅広く、褐色の縁取りがあり、柄に対して直生する。柄は繊維質、上部はひだと同色あるいはやや淡褐色、中心部から基部にかけて小鱗片と縦線があり、柄の根元は茶褐色の小鱗片で覆われる。つばを欠く。傘とひだの周縁部、および柄の表面には褐色の内容物を有する細胞が認められる。担子胞子は広アーモンド形、大きさは 14-15×9-10 μm、やや厚壁、無色。

P-9 殺線虫活性を持つ小型木材腐朽菌の探索

○石崎孝之^{1,2}, 鈴木健人¹

¹玉川大学農学部, ²玉川大学学術研究所

Screening of pleurotoid and cyphelloid mushroom for nematicidal activity

○Takayuki Ishizaki^{1,2}, Kento Suzuki¹

¹College of Agriculture, Tamagawa University, ²Tamagawa University Research Institute

マツ材線虫病は、アカマツ、クロマツなどの樹木組織内において、外来種であるマツノザイセンチュウが増殖することによって引き起こされる萎凋病であり、生態系への影響やマツタケの減産など多大な損失を伴うことから、その防除は不可欠である。本病の防除法として、感染木の伐倒駆除や化学合成農薬の散布等が挙げられるが、線虫捕食菌、すなわち線虫を捕捉したり、線虫に寄生したりしてこれを資化する能力を持つ真菌を利用した生物防除も期待されている。

本学学術研究所菌学応用研究センターでは、日本産試料からの分離菌株を中心とした多様性の高い菌類バンクの構築を継続的に行っている。その保有数はカビで約 12,000 株、きのこで約 3,000 株にのぼり、一部は TAMA 株として外部の研究機関に供与されている。きのこ菌株バンクには、子実体の大きさが 1 cm 以下で、肉眼における判別が困難なヒラタケ型～フウリタケ型の木材腐朽菌菌株も含まれているが、これらの菌群についての詳細な分類学的研究が進んでいないことから、同定が不十分な状態で保存されているものが数多く存在する。一方で、これらの菌群のうち、*Resupinatus silvanus* (ナガミノシジミタケ) については、線虫捕食菌としての報告があるものの、その類縁菌の線虫捕食の研究例は極めて乏しい。本研究では、当センターが保有するこれらの菌群の未同定株のなかに、産業上有用な線虫捕食能を有するものが存在するのではないかと考え、マツノザイセンチュウ捕食活性を指標とした探索を行った。

当センター保有の菌株コレクションのうち、ヒラタケ型～フウリタケ型の小型木材腐朽菌未同定株 21 菌株について、寒天培地上で培養した菌糸性状の観察およびマツノザイセンチュウに対する殺線虫効果を調査した。その結果、6 菌株に殺線虫活性が確認され、中でも FM 647, FM 794 および FT 183 菌株は、線虫捕食菌として知られている *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) と同等の活性の強さであった。また、ITS-5.8S rDNA 領域の塩基配列を用いた分子系統解析の結果、FM 647, FM 794 は *Resupinatus* 属、FT 183 は *Chaetocalathus* 属の菌と高い相同性を示した。

現在、これらの菌について、別の遺伝子領域を用いた分子系統解析および標本の形態学的解析を進めており、この結果を踏まえ菌株を選抜し、TAMA コレクションへの追加を行う予定である。

P-10 微生物ライブラリーを用いた殺線虫活性の探索○伊沢貴文¹, 渡辺京子^{1,2}, 石崎孝之^{1,2}¹玉川大学農学部, ²玉川大学学術研究所

Screening of fungal library for nematocidal activity

○Takafumi Izawa¹, Kyoko Watanabe^{1,2}, Takayuki Ishizaki^{1,2}¹College of Agriculture, Tamagawa University, ²Tamagawa University Research Institute

世界四大樹木病害の一つにマツ枯れ病があり, 日本でも経済や生態系への影響が問題となっている. この樹病の病原体はマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) であり, これがマツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus*) を介してマツに感染して増殖することでマツの仮道管や樹脂道を閉塞させ, 生理障害やマツの過敏感反応を引き起こし, マツ枯れ病が発生すると考えられている.

マツ枯れ病の防除法には感染マツの伐倒駆除, 化学合成農薬の散布や生物由来の化合物を樹幹注入する方法が知られている. しかしながら, どの防除法も経済や労力の面で負担が大きく, さらに化学合成農薬の使用は環境への負荷が懸念されている.

本研究の目的は, 殺線虫活性化合物を産生する微生物を見だし, 環境への影響が比較的少ない生物防除に活用することである. そこで玉川大学学術研究所菌学応用センターが保有する微生物ライブラリーを用いて殺線虫活性を有する真菌の探索を行った. スクリーニングの対象とした真菌は, 全国から採集された試料から分離された土壌菌, 腐朽菌, 内生菌, 菌寄生菌, 昆虫寄生菌などである. これらの菌株を, 4種の固体培地または4種の液体培地で培養し, ブタノール抽出物を得た. 計2,500菌株から調製された10,000サンプルの抽出物を, マツノザイセンチュウに対する殺線虫活性試験に供した. スクリーニングは96穴マイクロプレートに線虫と抽出物を添加して, 24時間後の線虫の生存を実体顕微鏡下で観察することにより行った. その結果50サンプルに殺線虫活性が見出され, さらにこれらのサンプル濃度を3段階に設定し殺線虫試験を行い44サンプルから濃度依存的な活性を確認した. 活性が確認された抽出物サンプルは未同定株4菌株を含む10属23菌株から構成されていた. これらの菌株は, 分離源がきのこ, 腐朽材, 土壌であり, この内少なくとも3菌株は殺線虫活性が報告されていない種であった.

現在, 分子系統解析により殺線虫活性が見出された未同定菌株について詳細な解析を進めている.

P-11 土壌内外生菌根の核相検定—シヨウロホモカリオンを用いた交配検定—○高 琪¹, 仲野翔太¹, 会見忠則², 霜村典宏²¹鳥取大学大学院連合農学研究科, ²鳥取大学農学部Nuclear phase assay for the ectomycorrhizal mycelium in soil—Mating test using homokaryotic isolates from *Rhizopogon roseolus*—○Qi Gao¹, Shota Nakano¹, Tadanori Aimi², Norihiro Shimomura²¹United Graduate School of Agricultural Science, ²Faculty of Agriculture, Tottori University

【目的】シヨウロ *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. M. Fr. (= *R. rubescens* Tul. & C. Tul.) は, 海岸砂地という特殊な環境でマツ科の樹木の根に外生菌根を作り共生する典型的な外生菌根菌であるが, 本菌の生活環については不明な点が多い. そこで本研究では, 土壌中におけるシヨウロとクロマツの相互作用を調査することを目的とし, 外生菌根組織から分離した菌株のクランプ形成能力やシヨウロ一次菌糸体との交配能力を調査することで外生菌根の核相を検定した.

【材料と方法】野外クロマツ由来の外生菌根および野外採取土壌で生育させたクロマツ実生において形成された外生菌根, さらに, シヨウロ胞子接種後1年間生育させたクロマツ実生に形成させた外生菌根から菌糸体を分離した. そして, 分離した菌糸体をクランプ検定培地に接種してコロニーを光学顕微鏡で観察し, クランプ結合の有無を調査した.

【結果と考察】クロマツ林で採取した外生菌根および胞子接種により形成した外生菌根から菌糸体を分離し分離菌株のコロニー周辺を顕微鏡で観察するクランプ結合が認められた. 一方, 野外採取土壌で育成したクロマツ実生由来の外生菌根より分離した菌糸体40菌株全てにおいてクランプ結合は認められなかった. さらに, クランプ結合が認められなかった菌株をシヨウロ単胞子分離菌株と交配させた結果, クランプ結合が認められた. これらのことより, 野外採取土壌で分離された菌株体は一次菌糸体である可能性が考えられた.

P-12 MTT還元力検定法を利用したシヨウロ培養菌糸体のバイアビリティ評価

○森本 萌¹, 笹本佳裕², 会見忠則¹, 霜村典宏¹

¹鳥取大学農学部, ²鳥取大学大学院農学研究科

Estimation of viability of cultured mycelia of *Rhizopogon roseolus*, using the MTT assay method

○Mei Morimoto¹, Yoshihiro Sasamoto², Tadanori Aimi¹, Norihiro Shimomura¹

¹Faculty of Agriculture, ²Graduate School of Agriculture, Tottori University

【背景】シヨウロ *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. M. Fr. (= *R. rubescens* Tul. & C. Tul.) は、海岸砂地において主にクロマツ *Pinus thunbergii* の根に外生菌根を作り共生する外生菌根菌である。これまで本きのこの人工栽培を目的とし、シヨウロ菌と共生した苗木育成に関する研究を進めてきた。特に、宿主クロマツ実生根にシヨウロ菌糸体粉碎液を効率よく接種する方法を開発してきた。しかしながら、接種する粉碎液の材料である菌糸体のバイアビリティに関する知見が乏しいのが現状である。本研究では、シヨウロ菌糸体のバイアビリティを定量的に評価するために、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) を利用することを試みた。

【実験方法】供試菌株には鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源センターに保存されているシヨウロ菌株 TUFC10010 を用いた。液体培地にシヨウロ菌を接種し、培養菌糸体を得た。コルクボラーで菌糸体の一部を切り抜きその断片を 100 µg/mL の MTT 溶液に浸漬した。MTT 還元能力の検定に最適な条件を確定するために、MTT 溶液との反応時間、MTT と反応して生成されるホルマザンを溶出するエタノール量と溶出時間を調査した。ホルマザンの形成量は溶出液の 570 nm における吸光度を分光光度計で測定することで算出した。次に、培養菌糸体を様々な条件下で冷蔵保存した後、菌糸体を MTT と反応させ組織内に形成したホルマザン量を計測した。また、同条件下で保存した菌糸体を用いて菌糸体粉碎液を作製し、寒天平板培地に塗布してコロニー形成数を調査した。

【結果と考察】シヨウロ菌糸体に適した MTT 還元力検定法の条件として MTT との反応時間を 24 時間、生成したホルマザンを溶出するエタノール量を 10 mL、そしてホルマザンの溶出時間は 60 分が最適であった。化学固定したシヨウロ菌糸体におけるホルマザン形成量は無固定菌糸体と比較して有意に低い値を示した。また様々な条件下で冷蔵保存した菌糸体において、ホルマザン形成量に変異が認められた。また、ホルマザン形成量の変動に同調してコロニー形成数も変動する傾向が確認された。以上の結果から、MTT 還元力検定法は培養菌糸体のバイアビリティを定量的に評価する有効な方法であると考えられた。

P-13 *Aspergillus luchuensis* 同一由来株の三機関による調査結果および対応

○伴 さやか¹, 稲葉重樹¹, 山田 修², 矢口貴志³, 鎗田響子³, 亀井克彦³

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独・酒類総合研究所 (RIB), ³千葉大学真菌医学研究センター

Re-identification of *Aspergillus luchuensis* strains derived from same origin that preserved at three culture collections

○Sayaka Ban¹, Shigeki Inaba¹, Osamu Yamada², Takashi Yaguchi³, Kyoko Yarita³, Katsuhiko Kamei³

¹NITE Biological Resource Center, NITE (NBRC), ²National Research Institute of Brewing, ³Medical Mycology Research Center, Chiba University

泡盛製造に用いられる黒麹菌は、乾環博士 (1901) により *Aspergillus luchuensis* と記載された。一方、中澤亮治博士 (1913) によって同様に泡盛黒麹菌に関わる生産菌として *A. awamori* が記載され、その後 Raper ら (1965) は *A. luchuensis* を *A. awamori* の同種異名とした。近年 Hong ら (2013) による多遺伝子領域を用いた系統解析の結果、学名 *A. luchuensis* が本来の泡盛黒麹菌の種名として復活し、*A. awamori sensu stricto* とは別の系統群だと示された (参考文献1)。これを受けて NBRC で保有する関連種 66 菌株の β -tubulin 遺伝子配列による菌株の再同定を実施し、それまで *A. awamori* としていた NBRC 4116, 4314, 6086 の 3 株を *A. luchuensis* として名称変更をすることとした。

ところがここで、参考文献 (1) に用いられた RIB の 2 株の配列が、同一由来の NBRC 株の解析結果と不一致となった。RIB 2601 と NBRC 4033 は中澤博士により、*A. awamori* としてそれぞれ酒類総研と NBRC に菌株を委管する前の IFO に寄託されていたが、RIB 2601 は *A. luchuensis* と同定された一方、NBRC 4033 は *A. awamori* s.s. となった。また、中澤博士から *A. aureus* var. *minor* (その後 Raper の分類体系に従って *A. foetidus* var. *pallidus* と変更) として寄託された NBRC 4118 と、RIB 2013 (醸造協会 NJK 2013, *A. awamori*) は、RIB と醸

造協会の菌株カタログに IFO 4118 から由来すると記載されていた。しかし RIB 2013 は *A. awamori* s.s., NBRC 4118 は *A. luchuensis* と再同定された。

一方で、臨床分離株の *Aspergillus* sect. *Nigri* を調査していた千葉大において、IFO (NBRC) より入手された IFM 46994 (← IFO 4033) と IFM 57760 (← NBRC 4118) は、どちらも *A. luchuensis* として再同定された。

IFO で菌株のバックアップ用に保管されていた凍結ラックから IFO 4033 を復元し再調査したところ、これは *A. luchuensis* と同定された。すなわち、保管中に菌株の取り違えが起こったと推定された。利用者への対応についても併せて紹介する。

参考文献 (1) Hong S.-B. et al. (2013) *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. Plos One 8: 1-9 doi: 10.1371/journal.pone.0063769

P-14 JCM における好塩性アーキア菌株の保存と品質管理について

○伊藤 隆, 飯田敏也, 大熊盛也

国立研究開発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)

Maintenance and quality control of *Halobacteriaceae* strains (Halobacteria) in the RIKEN BRC-JCM

○Takashi Itoh, Toshiya Iida, Moriya Ohkuma

Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center

理研バイオリソースセンター微生物材料開発室 (以下, JCM) では 1990 年に *Haloarcula japonica* TR1^T (= JCM 7785^T) を受託して以来、数多くの *Halobacteriaceae* 科アーキア (以下, 好塩性アーキア) を保有しており、その数 (公開株数 178 種 240 株, 2015 年 5 月末現在) は世界のカルチャーコレクションの中でも最大規模である。好塩性アーキアは *Euryarchaeota* 門の一目一科に過ぎないが、多様性が極めて大きく、現在でも多くの研究者によってその分離と系統分類学的研究が行われてきている。その一方で過去においては基準株の損失や置き換わりによる分類学的混乱もしばしば起きている。そこでコレクションにおける保有微生物株の保存と品質管理の一つのショーケースとして JCM における好塩性アーキアのリソース事業の現状について紹介したい。

JCM が好塩性アーキアの収集を始めたのはコレクションの中でも遅い方である。当初は他のコレクションとの菌株交換に頼っていたが、IJSEM 誌で新種発表時の寄託要件が徹底されるようになってくるとその寄託数が急増した。2013 年以降に JCM に寄託された好塩性アーキア菌株は 136 株 (再寄託を含む) である。しかし、このうち不生育 6 株・異なる菌株 11 株・汚染した菌株 2 株が含まれていた。好塩性アーキアは比較的分離が簡単のために分離時に数多くの菌株を得られることが多いが、一方でコロニー形態や細胞形態に多形性を示すことも多く、菌株間の判別が容易ではないこともこうした問題の一つの要因になっているかもしれない。また近年になって頻繁に分離されてくるようになった貧栄養性の好塩性アーキアはこれまで知られている菌種とは培養性・保存性が異なることが多く、寄託の際に不生育と判断されたものの多くが貧栄養性好塩性アーキアであったと思われる。一方、JCM では寄託菌株の正当性を検査するために細菌・アーキア菌株では 16S rRNA 塩基配列の比較を行うが、好塩性アーキアには 16S rRNA 遺伝子に複数の異なるコピーを有している菌株も多く、塩基配列決定のためにはクローニングなどの手順を必要とするケースも少なくない。

P-15 NBRC 担子菌株に対するパーライト法の効果の検証その 2

○佐藤真則¹, 井上竜太郎¹, 佐々木友美¹, 資延淳二², 稲葉重樹³, 中桐 昭⁴

¹ 独・製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター, ² 同機構安全・解析課, ³ 同機構生物資源利用促進課,

⁴ 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)

Validation of perlite protocol for NBRC basidiomycetes strains (2)

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

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

担子菌は食品をはじめ様々な分野で利用価値が高い生物遺伝資源の一つであるが、その中には有効な長期保存法が開発されていないものが少なくない。我々はこの問題を解決すべくオリジナルパーライト法 (HPP) の適用とその改良による担子菌の長期凍結保存法の開発に取り組んでいる。昨年度は HPP による凍結保存後の直後の生残性と半年後の生残性について報告したが、今年度は引き続き HPP による凍結保存から 1 年後の生残性を報告するとともに改良パーライト法に使用する凍結保護剤の改良について報告を行う。まず HPP で 1 年間凍結保存した

後の生残性は105株のうち86%にあたる90株で良好な結果(生残性80%以上)が得られた。次にこのHPPで凍結保存に問題がある菌株のうち10株(*Amanita citrina* NBRC 8261, *Amanita rubescens* NBRC 8266, *Amanita pantherina* NBRC 32788, *Sarcodon aspratus* NBRC 32814 & NBRC 32815, *Lactarius akahatsu* NBRC 33156 & NBRC 33157, *Lactarius hatsudake* NBRC 32794 & NBRC 33155, *Tricholoma flavovirens* NBRC 33143)を凍結感受性モデル菌株として選定してパーライト法の改良を行った。改良は組み合わせることで生残性向上が期待されるGlycerolとTrehaloseの組合せならびにDMSOとTrehaloseの各種濃度組合せで行った。GlycerolとTrehaloseの組合せの効果検証では、直後の生残性または増殖が確認されるまでの時間を比べると10株のうち8株において直後の生残性あるいは増殖が確認されるまでの時間において一定の改善が確認された。そして検証した組合せで最も効果の高かったのはGlycerol 5% (v/v), Trehalose 10% (w/v)の組合せであった。一方DMSOとTrehaloseの組合せの効果検証について上記の場合と同様に10株について各種組合せによる検証を行ったところ、最も効果が高い組合せでコタマゴテングタケ(NBRC 8261)で80%、残りの9株において100%と10株すべてで生残性が確認出来るという非常に良好な結果が得られた。この結果は、これまで様々な条件でほとんど生残性が得られなかったアカハツ(NBRC 33156)ではじめて100%の生残性となるなど、GlycerolとTrehaloseの組合せに比べて非常に大きく生残性を向上させるものであった。DMSO濃度は多くの株で5%、10%ともに有効であったが、より汎用性が高いのは5%であると思われた。以上のことより、MPP法に使用する凍結保護剤はDMSO 5% (v/v), Trehalose 10% (w/v)の組合せがよいと考えられた。発表では現在取得中の半年後の生残性データとともに発表を行う予定である。

P-16 活性炭を用いた難保存性担子菌株の凍結保存の試み

○梶原佳奈¹, 早乙女 梢², 牛島秀爾², 前川二郎², 中桐 昭²

¹鳥取大学大学院農学研究科, ²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)

Attempt to apply activated charcoal for freezing preservation of hard-to-preserve basidiomycete strains

○Kana Kajiwara¹, Kozue Sotome², Shuji Ushijima², Nitaro Maekawa², Akira Nakagiri²

¹Graduate School of Agriculture, ²Fungus/Mushroom Resource and Research Center (FMRC), Faculty of Agriculture, Tottori University

担子菌培養株のうち、菌根性担子菌の多くは凍結保存が困難なため、継代培養や流動パラフィン法で菌株が維持されており、長期間安全に保存できる保存法の開発が望まれている。Sato et al. (2012), 佐藤ら (2014) は、培養基材として多孔質のパーライトを用いる方法で、多くの菌根性担子菌培養株の凍結保存が可能であることを示した。しかし、パーライト法やその改良法でも凍結保存が不調な株が存在しており、さらなる改良が期待されている。そこで、菌類きのこ遺伝資源研究センターが保有している担子菌株を用いて、一般的な凍結保存方法である①寒天ディスク法, Homolka et al. (2001) による②パーライト法, そして、新たな試みとして、活性炭の多孔性と培養菌体の代謝産物を吸着除去する機能を利用することを意図して、パーライトの代わりに活性炭を用いる③活性炭法, さらに、活性炭を寒天培地中に混ぜ込んで菌株を培養する④活性炭添加寒天培地法の4つの方法によって菌株の凍結保存と復元を行い、活性炭の有効性を検討した。

【方法】流動パラフィン法で維持している凍結保存が困難な20菌株(主に菌根性担子菌)を供試菌株とした。それぞれの菌株を3種類の平板培地(Ebios, YGA, MMN培地)に移植して最も生育の良い培地を前培養に用いた。①~④の方法で前培養を行った後、Mr. Frosty[®]を用いて、-80℃フリーザー内で冷却速度約-1℃/minの緩慢凍結を行った。凍結保護剤は、①④では10% (w/v)グリセリンを、②③では5% (v/v)を用いた。凍結後、一晩おいて液体窒素タンクに移して1週間保存した。復元は30℃温水浴で急速解凍し、YGA液体培地で培養を行った。復元後の復元率は、[復元した標品数/供試した標品数]とした。

【結果および考察】復元試験の結果、寒天ディスク法では15菌株中7菌株、パーライト法では11菌株中8菌株、活性炭法は5菌株中3菌株、活性炭添加寒天培地法では4菌株中3菌株が80%以上の復元率を示した。復元培養に液体培地を用いたところ、供試株の約半数が寒天ディスク法でも復元でき、復元に液体培地を用いることの有効性が示唆された。一方、活性炭を用いる方法(③④)では、前培養中に菌の生育が停止したために凍結実験に供試できない株が多かった。これは活性炭がアルカリ性であるため、生育に影響した可能性が考えられた。また、全般的に③④での成績は②パーライト法より劣ったが、*Kobayasia nipponika*, *Laccaria amethystina*では③④の方が②よりも良好な結果を示すなど、一部の菌株において活性炭の有効性が確認された。

P-17 糸状菌に対する凍結保護剤の効果に関する事例

○岡田 元, 大熊盛也

国立研究開発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

A case study on the effects of cryoprotectants for filamentous fungi

○Gen Okada, Moriya Ohkuma

Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN BioResource Center

比較的広範囲の微生物株に対して用いられる安定した長期保存法の1つに凍結保存法がある¹⁾。糸状菌のうち、子囊菌や担子菌に属するものは凍結保存が比較的容易であるが、ツボカビなどのかつて鞭毛菌として扱われていたものでは困難なものが多い。糸状菌を凍結保存する際の条件として、凍結保護剤（以下、保護剤）は10% グリセロール（以下、Gly）、5%ジメチルスルホキシド（以下、DMSO）、10% Gly+5%トレハロース（以下、Tre）など、また保存温度は-80℃、-135℃、-150℃、-150℃以下（液体窒素の気相）などがある。JCMにおける糸状菌の凍結保存は、PDAなどの適当な寒天培地で生育したコロニーをディスク状（直径約6mm）に打ち抜き、10% Gly+5% Tre および 10% DMSO+5% Tre の2種類の保護剤を1株に対して同時に用い、-80℃および液体窒素の気相で各々行っている²⁾。通常、子囊菌のほとんどはこれらどちらの保護剤でも問題なく凍結保存できるが、希に保護剤の違いが凍結保存の成否に大きく影響する場合がある。

これまでの予備検討において、以下の種/株で保護剤と凍結保存結果に関して明確な差が認められた（括弧内に、供試菌の高次分類群ならびに保護剤の種類・生残率を示す）。

Massariosphaeria moricola JCM 13541（子囊菌門 *Lophiostomataceae* ; Gly 100%, DMSO 0%）*Macrospora scirpicola* JCM 13154（子囊菌門 *Pleosporaceae* ; Gly 90-100%, DMSO 0%）*Lyophyllum shimeji* JCM 30591（担子菌門 *Lyophyllaceae* ; Gly 0%, DMSO 100%）*Rhizophydium* sp. JCM 11505（ツボカビ門 *Rhizophydiaceae* ; Gly 0%, DMSO 100%）*Allomyces* sp. JCM 11504（コウマクノウキン門 *Blastocladiaceae* ; Gly 0%, DMSO 60-100%）

なお、本発表では、保護剤の種類と濃度・Treの有無・培地の種類などについてより詳細な結果を報告する予定である。現時点では、事例が少ないために特定の菌群などに対して推奨すべき保護剤の傾向は分からず、またこれらの凍結保存の成否に関係する機序についても不明である。しかし、これらGlyとDMSOの単純な組成の2つの保護剤を同時に用いることは、子囊菌などの糸状菌を簡便な方法でより安全に凍結保存する有効な手段である。

- 1) 農林水産省農林水産技術会議事務局・農林水産省農業環境技術研究所（編）1987. 微生物の長期保存法：農林水産関連. 農林水産省農林水産技術会議事務局（東京）・農林水産省農業環境技術研究所（筑波）.
- 2) 岡田 元 2006. Microbiol. Cult. Coll. 22: 105-110.

P-18 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2014年の活動と成果○永井利郎, 一木（植原）珠樹, 澤田宏之, 青木孝之, 竹谷 勝, 山崎福容, 中島比呂美, 熊谷みどり, 佐藤豊三, 根本 博
農業生物資源研究所

Activity of the Microorganism Section of the NIAS Genebank (MAFF) in FY2014

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

【収集保存・特性評価】農業や食品産業等に係る1,527株の微生物を新規登録し、2015年3月31日の時点で、保存株数は31,702株（公開率：79.4%）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1,818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2,637点のDNA塩基配列の網羅的整備を行った。植物病原細菌の分類検証の結果として、典型的な特徴を有する植物病原性*Rhizobium*属細菌を選定し、推奨菌株として公開した。植物病原糸状菌についても、分子再同定による*Colletotrichum*属菌の学名更新も進めるとともに、再同定された種に典型的な特徴を持つ12菌株を推奨株として追加公表した。植物ウイルスについては、186株の外被タンパク質遺伝子の塩基配列を決定し公開した。一方、4課題の分類検証を外部委託した：①*Botrytis*属菌等（国立科学博物館）、②*Erwinia*関連細菌（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 *Bipolaris* 属菌（農研機構・畜産草地研究所）. 特性評価については「質量スペクトルデータによる特性評価」（農業生物資源研究所）を実施した.

【ユーザーへの提供】2014年度, 国内外へ1,520株（申込286件）を配布し, それらは分類同定, 薬剤感受性, 農業開発等に関わる試験研究・教育に利用された. また, 「微生物遺伝資源の検索」と「日本植物病名データベース」のリンクについて再点検と更新を行い, 2014年9月末までに163微生物株と51病名を新たにリンクさせた. Web上での特性データベース公開システム（プロトタイプ）についてはその開発を終え, 一般公開に向け作業を進めている. また, 保有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の35号「ニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci*」, 36号「植物病原細菌の薬剤感受性」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/?pub>).

P-19 NBRC カルチャーコレクション 平成26年度事業報告

○崎山弥生, 黒原千里, 藤田克利, 鎌田 幸, 中川恭好, 山崎秀司, 鈴木健一郎, 能登 靖
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 FY2014

○Yayoi Sakiyama, Chisato Kurohara, Katsutoshi Fujita, Sachi Kamata, Yasuyoshi Nakagawa, Shuji Yamazaki, Ken-ichiro Suzuki, Yasushi Noto

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, ゲノムDNAの提供も行っている. 以下に平成26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837株にNBRC番号を付与した. NBRC株としての保有数は, 30,009株で, 平成26年度末18,691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, 7株追加した. 現在, 微生物DNAクローン4株由来, 微生物ゲノムDNA81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6,791株, 海外735株, 計7,526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DNA79個, ヒトcDNAクローン127個, ヒトGatewayエントリークローン147個の計355個であった.

P-20 NIES 藻類コレクションの2014年度活動報告

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

¹(一財)地球・人間環境フォーラム, ²国立研究開発法人国立環境研究所

NIES Collection activity report for 2014

○Fumi Mori¹, Kosei Yumoto¹, Miwa Ishimoto¹, Mary-Helene Noel², Mayumi Sato², Haruyo Yamaguchi², 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. 全保存株数は2015年6月現在で3,436株であり, そのうち2,505株を公開している.

2014年度に分譲数は398件で国内959株, 国外159株, 合計1,118株であった. 海外研究機関向けの分譲は2012年から増加した後安定しており, NIESコレクションは海外ユーザーにも定着しつつあると言える. また,

教育用利用も前年度に分譲依頼が2倍に増加した後、今年度も30件118株と多く、徐々に教育現場での藻類の利用も周知されてきている。

2014年度の新規寄託株数は、退官される研究者数名からの寄託を多く受けたため、過去最多の355株となった。継代培養株が増加し続けているが、2013年10月より運用している継代培養株管理システム（SOTAK）を活用し、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行うことで、効率的に培養管理を進めている。

保存株の付加情報の整備の一環としては、アオコ形成藻であるシアノバクテリア8株について、次世代シーケンサーを用いたゲノム情報の取得と解析を行い、ジーンバンクへのゲノム情報の登録作業を進めた。セルソーター等による無菌化に取り組むことで、新たに4株の無菌株を確立し、不等毛植物93株の脂肪酸組成分析も行った。

危険分散株に関してはNBRP分担機関と連携して、2014年度はバックアップ株の見直しと発送を行った。現在、神戸大学に凍結保存移行株1,134株と北海道大学に継代培養保存株436株をバックアップ保管している。

今年度は凍結保存の困難な株の生存率向上に取り組み、高等植物で有効なアルギンビーズ化法を取り入れた凍結保存の検討を行いたい。

P-21 2014年度のJCMの活動報告

大熊盛也, 岡田 元, 高島昌子, 工藤卓二, 伊藤 隆, 飯田敏也, 大和田 勉, 坂本光央, 飯野隆夫, 遠藤力也, 押田祐美, 草桶佳代, ○鈴 幸二

国立研究開発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

JCM activity report in FY2014

Moriya Ohkuma, Gen Okada, Masako Takashima, Takuji Kudo, Takashi Itoh, Toshiya Iida, Tsutomu Oowada, Mitsuo Sakamoto, Takao Iino, Rikiya Endoh, Yumi Oshida, Kayo Kusaoke, ○Koji Suzu

Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN BioResource Center

JCMは信頼性・継続性・先導性を標語に掲げ、環境と健康の研究に資する微生物に焦点をあてて、学術・研究基盤としての微生物株の収集・保存・品質管理・提供事業を実施している。文科省ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）「一般微生物」の中核的拠点機関としても活動し、国内外の研究開発の動向を把握しつつ世界最高水準の微生物リソースを整備して幅広い分野の研究に貢献することをめざしている。

多様な細菌・古細菌・真菌の微生物種を整備対象とし、2015年5月末現在、24,772株を保有し、15,434株を公開している。公開している微生物の種数は7,769種である。2014年度は22カ国から754株の寄託を受け、このうちの8割は海外からの寄託である。寄託受入時には品質検査を徹底して行っており、2014年度は約16%の寄託株において生育や混入、不一致等の不備があることが判明し、是正して高品質で正確な株のみが収集・保存されるように品質管理を行った。品質検査を実施した後、寄託者からの依頼により細菌・古細菌の新種等の記載に必要な「寄託及び公開の証明書」を2014年度は476株に対して発行した。

2014年度は36カ国に4,123株を提供し、そのうち海外への提供は約3割であった。また、営利機関への提供は13%であった。利用者の利便性向上を目的に、微生物株のゲノムDNAの提供、および依頼を受けて培養（生株）での提供も実施している。新種などの発表論文を含め（基準株をJCMに寄託）、JCM株を利用した原著論文は2014年に500以上発表された。

微生物株のゲノム情報は研究コミュニティのニーズも高く、NBRPゲノム情報等整備プログラムでの支援を受けて、2012年度の細菌・古細菌の350以上の株のゲノム解析に引き続き、2014年度は酵母・糸状菌の140以上の株でドラフトゲノム情報解析を実施した。その他、各株のオンラインカタログにおいて、利用者の成果情報・コロニー/顕微鏡画像・高次分類情報・NCBI Taxonomy Browserの該当web pageへのリンクなどの情報を充実させて、付加価値の向上に努めている。

P-22 2014 年度の FMRC 活動報告について

○早乙女 梢, 前川二郎, 牛島秀爾, 岡 久美子, 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)

Report on the activity of FMRC in FY2014

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

Fungus/Mushroom Resource and Research Center (FMRC), 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、担子菌類や子囊菌類の中でも「きのこ」と呼ばれる菌群に着目し、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と教育に取り組んでいる。2011 年 6 月以降は、一部の保有菌株 (TUF C 株・400 株) の分譲提供サービスに加え、分譲菌株データベースのオンライン公開を開始するなど、菌株保存機関としての機能も果たしている。

2014 年度は、継続的に TUF C コレクションの充実を進め、その結果、122 属 168 種 196 株を新規登録し、総計菌株保有数は 487 属 1,365 種 8,293 株となった。また、分離源証拠標本の再検討や菌株の分子情報に基づく TUF C 株の評価も進め、2015 年 4 月までに 185 属 291 種 380 株を新規公開し、分譲可能株数は総計 284 属 594 種 1,231 株となった。このうち、9 株は分類学上のタイプ由来株であり、104 株は学術論文に使用された。また、民間企業を含む学内外への保存菌株提供数は計 15 件 324 株であった。

遺伝資源としての「きのこ」の教育・普及活動を目的とした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、顕微鏡実習を含むきのこの観察講座 (7 月) や高校生を対象とした「サイエンス教室」(12 月) を一般公開講座として実施した。また、2014 年度はセンターの新規事業として、TUF C 株の培養物由来および子実体由来の抽出物ライブラリーの構築を展開するとともに、それらの有用生理活性物質の探索研究を実施した。同時に、TUF C 株を活用し、安定的な子実体発生技術の確立に向けた基盤研究にも取り組んだ。

TUF C コレクションの充実と公開を進めていく一方で、今後は海外分譲や菌株寄託制度を整備し、さらには各菌株の特性・性状を付加情報として公表することで、きのこ類遺伝資源の分譲数の増加および利活用に資していく予定である。

P-23 石巻専修大学 (ISU) コレクション：東日本大震災後の現状 (中間報告 2)

○宮崎 厚, 阿部知顕

石巻専修大学理工学部生物科学科

Ishinomaki Senshu University (ISU) collection: Current situation after the Great East Japan Earthquake (interim report 2)

○Atsushi Miyazaki, Tomoaki Abe

Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University

ISU コレクションは、接合菌ケカビ亜門の中でもヒゲカビ (*Phycomyces* 属) 野生株およびその標準株からの変異株、それらの交配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 μm 、高さ 10 cm 以上にもなる直立無分枝の胞子囊柄を形成し頂端に 1 つの胞子囊を付ける (無性生殖)。胞子囊柄は隔壁のない単細胞性の多核体で、光や重力等に敏感に反応して屈性を示すことから、「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。

宮城県石巻市南境地区の旧北上川沿いに位置している石巻専修大学は、3・11 東日本大震災に見舞われたものの奇跡的に津波の直接波および浸水を免れた。また、4・7 余震にも耐え実験室にある超低温槽 (-80°C) で凍結保存されていた本コレクションの流失や破損はなかったが、ライフラインの分断により 11 日間に亘る電源の供給停止の状態を余儀なくされた。大震災および津波被害に際し、日本微生物資源学会の後援のもと、公益財団法人発酵研究所より支援を受けることになり、全株 (届け出菌株数 776 株) の培養試験が進行している。

本コレクションの保存・管理および分譲事業は、兼任スタッフ 1 名 (宮崎) で運営しているが、今回の支援によりアルバイト 1 名を確保して培養試験を行っている。今まで成長確認が行われていない胞子のみで保存されていたセビージャ株 (S 株) およびシラキユース株 (L 株) も含めた全株の 1 次培養試験の結果を中間報告 2 として紹介する。

P-24 OUTにおけるナショナルバイオリソースプロジェクト活動 2014年度

○金子嘉信, 周 瑩, 前川裕美

大阪大学大学院工学研究科酵母リソース工学寄附講座

Activity of National BioResource Project-Yeast 2014 in OUT

○Yoshinobu Kaneko, Ying Zhou, Hiromi Maekawa

Yeast Genetic Resources Lab., Graduate School of Engineering, Osaka University

大阪大学工学研究科での微生物保存の源は、大正時代までさかのぼり、日本のウイスキーづくりレジェンドの一人、ニッカウキスキー創始者の竹鶴政孝氏も学んだ大阪高等工業学校醸造科での学生実験用菌株の保存が始まりではないかと言われている。その後、大学に昇格し、南満州鉄道(株)中央試験所の菌株が加わって本格的な保存事業になったようである。太平洋戦争を経て新制大阪大学工学部醸酵工学科時代には日本微生物株保存連盟の一員として工業微生物株の保存体制が再整備され、2002年には文部科学省のライフサイエンス研究基盤整備のためのナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)に採択され、保存事業の軸足を酵母の遺伝研究株とその遺伝子クローンの収集・保存・提供に移してきた。そして、日本微生物資源学会への事業報告のうち、酵母と細菌の保存数は2007年度からNBRPで取り扱っている酵母と大腸菌の保存株数を報告している。現在の第3期NBRP事業は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成によって設置された酵母リソース工学寄附講座で推進している。2015年3月末での保有数は、酵母26,006、遺伝子クローン4,976である。2014年度にはUSA カルフォルニア大学アーバイン校の故野村真康研究室から1,600を超える出芽酵母リボソーム合成関連リソースの寄託があった。大災害に備えたバックアップ体制として保有菌株の一部(約8,000)を広島大学自然科学研究支援開発センター(NBRP分担機関)に保管している。2014年度提供数は菌株334、遺伝子クローン336で、2013年度より菌株で77、遺伝子クローンで205の減少であった。提供リソースの42%は海外研究者への送付で、提供国数としては22カ国であり、昨年度と同様な傾向であった。海外へのリソース提供では、安全保障輸出管理への対応も実施している。

P-25 有用乳酸菌株の情報公開○田中尚人¹, 鈴木智典², 富田 理³, 梶川揚申⁴, 内野昌孝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, Shizunobu Igimi⁵, Sanae Okada^{1,4}¹NODAI Culture Collection Center (NRIC), 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

【背景と目的】我々は長年に渡って独自に分離してきた微生物資源である乳酸菌株を保存している。この資源を活用するため、乳酸菌に対して社会的に期待される「食の安全」・「おいしさ」・「健康」に関連する性状を調べ、その情報を発信することでカルチャーコレクションとして資源を有効活用するモデルケースを構築することを目的とする。

【保存株の性状の解析】保存株に対して以下の情報収集を行っている。

食の安全：バクテリオシン産生能を対象とする。現在、多数の *L. sakei* 株において抗菌スペクトルの異なる株が認められている。

おいしさ：風味形成のファクターとしてバニリン合成と n-ヘキサナール分解に着目し、各性状を調べる。現段階ではバニリンの前駆体として供したフェルラ酸を分解する株が数多く認められている。

健康：プロバイオティクス特性、免疫調節作用と GABA 産生に着目した。プロバイオティクス特性の性状としては、酸耐性・胆汁酸耐性・ムチン接着性を検討する。すでに菌株間では酸・胆汁酸耐性およびムチン接着性に違いがみられ、各菌株における潜在的なプロバイオティクス特性の違いを示唆する結果が得られている。また、プロバイオティクスの安全性を評価する指標として薬剤耐性の判定も行っている。免疫調節作用を推定する指標

として IL-12 誘導能を調べたところ、全ての菌株に誘導能はあり、その活性はほぼ同等と考えられた。同時に免疫調節作用に影響すると考えられる細胞表層の細胞壁テイコ酸やその他多糖構造の情報も収集している。一方、GABA 産生能については供試菌株の約 20%に認められ、過去に報告のある菌株と同等の産生能の株も存在した。

【情報発信】保存菌株の性状項目は 84 件あり、データは数値データ及び文字データとし、Web でキーワード検索できる基本的なシステムを構築した。

今後、菌株の追加、試験項目の追加とともに各保存菌株の性状データに基づくクラスタリング解析およびその情報を付与し、利用目的に応じた検索可能なシステムへの改良を加えていく予定である。

URL : <http://www.ps.noda.tus.ac.jp/labdb/jsps/index.jsp>

P-26 基礎生物学研究所 IBBP の微生物遺伝資源のバックアップ保管

○田中大介

基礎生物学研究所 IBBP センター

Interuniversity bio-backup project for life science

○Daisuke Tanaka

IBBP Center, National Institutes for Basic Biology

大学連携バイオバックアッププロジェクト (IBBP) は国内全ての研究者が利用可能な生物遺伝資源のバックアップ拠点形成を目指した日本初のプロジェクトです。微生物遺伝資源は研究者の努力によって維持されており、研究成果として公開・寄託される菌株はごく一部です。また、近年、様々な生物種において標的遺伝子を人工ヌクレアーゼで改変する「ゲノム編集」が注目されています。手軽な細菌ゲノム編集技術の確立により増え続ける遺伝資源の維持は研究の質や方向性に直接影響を与えます。予期しない生物遺伝資源の喪失を防ぎ、我が国の生命科学の国際競争力を高めることを目的として、平成 24 年 6 月より開始された国家プロジェクトが IBBP です。中核施設である IBBP センターを基礎生物学研究所に設置し、連携する 7 大学（北海道大学、東北大学、東京大学、名古屋大学、京都大学、大阪大学、九州大学）とともにバックアップ保管を行います。IBBP は研究者が有する研究途上の生物遺伝資源のバックアップを目的としており、他のバンク事業と異なり第三者への配布は目的としていません。そのため、保管委託された生物遺伝資源に関する情報は同意なしに第三者に開示されることはありません。また、IBBP は文部科学省のサポートによって運営されているため、バックアップ保管にかかる費用を個々の研究者に直接負担していただくことはありません。IBBP センターでは、クロスコンタミネーションの危険がない液体窒素気相タンク（-185℃以下）に生物・サンプル種ごとに分けて保管します。輸送も同様に超低温状態を維持する専用容器（ドライシッパー）が利用できます。また、2D バーコード付きクライオチューブ（生物遺伝資源名のラベル発行も可能）やレプリカ作成用 384 穴プレートなどの保存容器も IBBP から無償提供します。ただし、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定「病原体等の BSL 分類等」に記載がある病原体および植物防疫法によって国内の移動が制限されている病原体は保管対象となりません。これまで IBBP は全国の大学及び公設研究機関に所属する研究者の生物遺伝資源バックアップ保管を行ってきました。すでに IBBP が研究者から保管委託されたサンプル数は 169 万サンプルを超える状況となっています。より多くの研究者に利用していただきたいと思えます。