

受賞講演

日本微生物資源学会学会賞

酵母の多様性および分類学的研究とそれに基づくゲノム情報の整備

高島昌子

理研 BRC-JCM

Upgrading knowledge bases for yeast classification systems based on taxonomic study focusing particularly on inter- or intra species diversity and genome analyses

Masako Takashima

RIKEN-BRC JCM

生物多様性条約の発効以降、生物の多様性の保全や生物資源の持続的利用のため、微生物の種の多様性の研究は特に盛んになった。株を分離・同定する研究も増加したが、バーコード遺伝子を用いて「環境」に存在する微生物の菌叢や何らかの要因によるその変化等の解析も多く行われるようになった。細菌ではメタ 16S 解析が進んだが、菌類では遅れている状況が長く続いた。その理由は、細菌では Ludwig らにより属の範囲を規定する sequence identity の指標が発表されていたのに対し、菌類ではこれが無いことと思われた。当時の酵母を含む高等菌類（子囊菌類と担子菌類）の分類は二重命名法の下にあり、また形態的な特徴の少ない酵母では分子系統学的に異質で未整理状態（多系統）の部分も多く、sequence identity を用いての規定には対応できないものであった。レファレンスとなるゲノム情報が少なく、メタゲノム解析への対応も遅れていた。そこで、メタ ITS やメタゲノム解析を含む菌類の種多様性解析に対応できる分類体系を構築するため、これらを整理して属の再分類を行い、また分類群に応じた新たな識別方法を得ることを目的に研究を行った。

種同定の基盤形成としては、同一の種内で heterogeneity が報告されていた種を中心に、sequence identity と DNA-DNA 交雑実験の結果を基に整理を行い、同一種でない場合は、結果を新種や新組み合わせ等として発表した。系統的に離れている株が同種とされていた例としては、現在では綱レベルで異なる株が同一種と同定されていたケースもあった。これらや新規分離株の同定を含めこれまでに 93 種の新種や新組み合わせの記載を行った。

公益財団法人発酵研究所の特定研究助成（代表 関

達治）では、西表島と利尻島の土壌や植物等から酵母を分離・多様性を報告した。分離株 1,021 株を 183 種に分類し、sequence identity によりそのうちの約半数が新種と推定した。西表島と利尻島で共通に分離された種はわずか 15 種で、塩基配列データを基に行った有為差検定でも地域により棲息する種は有意に異なることから、日本の酵母の多様性を示すことができた。また、属の範囲を想定し比較するため、Saccharomycetaceae 科をモデルとして塩基配列データを外挿したところ、属レベルでも地域差があることがわかるなど sequence identity による属の範囲も規定できた。

分類体系再構築のための系統樹作成に関しては、当時は rRNA 遺伝子を含む 6-7 個の遺伝子（部分配列）を連結しての系統樹作成が盛んであったが、一方でこの手法では系統枝の基部に位置する種などは解像度が悪いこともわかってきていた。そこで Trichosporonales 目のドラフトゲノム解析を行い、30 遺伝子を用いて系統樹を作成した。本系統樹は極めて品質がよく、数個の遺伝子ではあいまいであった *Trichosporon* 属の 3 つのクレード間の関係や、それまで明らかではなかった *Cryptococcus curvatus* の系統学的位置も解明した。

このドラフトゲノム解析で得た経験を基に、2014 年度の NBRP ゲノム情報整備プログラムにおいて約 130 株の菌類のドラフトゲノム解析を行った（代表大熊盛也）。これらはまだドラフトゲノムであるが、リソースの付随情報として研究コミュニティーに貢献することができる。現在、共同研究者により大規模解析が行われており、属の定義にゲノム分類の要素を加えていく予定である。

日本微生物資源学会奨励賞

昆虫病原性糸状菌 *Ophiocordyceps* 科の分類学的再編

伴 さやか

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)

Reclassification of *Ophiocordyceps* family, entomopathogenic fungi

Sayaka Ban

NITE Biological Resource Center (NBRC)

昆虫病原糸状菌 *Cordyceps* (広義) は多様な節足動物や他菌に感染することが知られている。子囊菌門 Sordariomycetes; Hypocreales に属し、近年 3 科に分割された。形態・生態・系統的に多様性が高く、微生物農薬や天然物創薬のシーズとして期待できる一方、テレオモルフ 9 属とアナモルフ 15 属が複雑に関係し、誤同定の多さ、ホロタイプ標本の未整理など分類学上の問題が山積している。本研究では、子嚢胞子の分離培養株からアナモルフを誘導してテレオモルフ-アナモルフ関係を明らかにすることで、*Ophiocordycipitaceae* の再分類に取り組んだ。

【*Ophiocordyceps* 属と *Purpureocillium* 属】

Ophiocordyceps の特徴は、比較的硬いワイヤー状の柄に暗色の子嚢殻を形成し、培地上での生育は遅く、宿主は概ね特異的である。SSU, LSU rRNA, RPB2, EF-1 α 遺伝子配列の結合データに基づく分子系統解析の結果から、本属の内部でテレオモルフ-アナモルフの形態的特徴を反映する 3 グループに細分されることが示唆された。その中で 3 新種 (*O. coenomyia*, *O. arborescens*, *O. macroacicularis*) を記載した。また、分生子又は子嚢胞子からの培養によって、アナモルフ *Isaria takamizusanense* のテレオモルフが *C. ryogamimontana* であることを証明し、現在の系統分類体系として *Purpureocillium* へ転属、統合名を提案した。

【*Polycephalomyces* 属】

Polycephalomyces は、当初はアナモルフ属として記載された。白色から薄い茶色の分生子柄束 (シンネマ) を形成し、その先端部は、粘性物質をまとった大量の垂球形の分生子及びフィアロ型で錐形の分生子形

成細胞 (A タイプ) が密集して膨らみ、頭状になる。種によってはシンネマ側部に、頸が細く基部の太い分生子形成細胞及び紡錘形の分生子を形成する (B タイプ)。2009 年に遺伝子 5 領域を用いた系統解析に基づき再編されたテレオモルフ 8 種のアナモルフは、シンネマ不形成の種 (*Pol. cuboideus* 他) や、シンネマ (柄) の中間部に A タイプが凝集する種 (*Pol. nipponicus* や新種候補) を含み、これまでの定義に当てはまらないため、属の再定義が必要である。日本各地で採取した 48 標本の系統解析から、14 系統が認められ、*Pol. formosus* 類似の (A タイプ分生子の大きさが原記載 [1.5-3 \times 1-1.5 μ m] より大きい [2.2-3.4 \times 1.2-2.2 μ m]) 7 標本が、本属の外側の姉妹群を形成した。また、先端は明瞭な頭状にはならないが、本属に特徴的なシンネマを形成する *C. pleuricapitata* も本クレードに隣接するため、この 2 系統種を含めた範囲を本属とすべきと提案する。この定義では他に 2 種の転属が必要である他、隠蔽種 1 種、新種候補 2 種を提案または記載予定である。14 系統の標本から宿主範囲を精査したところ、昆虫のみに寄生するグループと、昆虫と昆虫に寄生した系統的近縁種の両方に寄生するグループ、昆虫に寄生した他菌上のみ出現するグループに分類された。

Ophiocordycipitaceae の系統関係において、宿主昆虫・菌の系統との相関は認められないが、特異性の高い *Ophiocordyceps* と、腐生的で多犯性の *Cordycipitaceae* の中間的な系統群に *Polycephalomyces* が位置し、宿主の棲息場所とは比較的高い関係が認められた。

基調講演

ヨウ素代謝微生物：その生理と微生物資源としての活用

天知誠吾

千葉大学大学院園芸学研究科応用生命化学領域

Iodine-metabolizing microbes: Their physiology and application

Seigo Amachi

Graduate School of Horticulture, Chiba University

「微生物とヨウ素」と聞くと、うがい薬である「イソジン」しか思い浮かべない方がほとんどかもしれない。ヨウ素は甲状腺ホルモンの構成成分として高等動物に必須の元素だが、その環境中での循環機構（ヨウ素サイクル）については謎が多い。ヨウ素サイクルの解明は、原発事故や核燃料の再処理等により環境に放出される放射性ヨウ素 (^{129}I , ^{131}I) の安全性を評価する上でも重要である。我々はこれまで、ヨウ素サイクルに影響を与えうる微生物について研究を行い、その一端を明らかにしてきた。その結果、ヨウ素の酸化、還元（呼吸）、蓄積、揮発、さらには脱ヨード反応を触媒する微生物が自然界に広く分布することがわかった。本講演では、このような「ヨウ素代謝微生物」の系統や生理、さらにこれら微生物の機能を利用した応用研究について、ヨウ素酸化微生物の話題を中心に紹介したい。

日本各地には、天然ガスを産出する地層が存在し、ここから湧出する水（かん水）には海水の1,000倍以上のヨウ素が含まれることがある。特に房総半島のヨウ素埋蔵量は多く、この地域だけで世界の約3割のヨウ素を産出している。かん水から精製されたヨウ素は、レントゲンの造影剤や殺菌剤、医薬品、液晶関連など幅広い用途に用いられている。我々は以前、かん水からヨウ化物イオン (I^-) を分子状ヨウ素 (I_2) に酸化する細菌（ヨウ素酸化細菌）を分離することに成功した。ヨウ素酸化細菌はかん水や、人工的に I^- を添加した海水など、 I^- に富んだ環境からのみ分離された。この原因として、ヨウ素酸化細菌は通常の細菌では死滅する7~8 ppm程度の I_2 に対して耐性を持ち (I_2 には酸化力があり、イソジンの主成分である)、 I^- に富んだ環境下で積極的に I_2 を生産することで、他の細菌に優占して生育するためと考えられる。ヨウ素酸化細菌は系統的に *Alphaproteobacteria* の中で2つのグループに分かれ、1つは *Roseovarius* 属細菌に近縁であるが、もう1つは相同性の高い近縁種が存在せず、新属を形成すると考えられる。ヨウ素酸化細菌の

I^- 酸化反応を触媒する酵素（IOX）は分泌タンパクであり、内部アミノ酸配列やペプチド配列とドラフトゲノム情報との比較から、新規なマルチ銅オキシダーゼ（MCO）であることがわかった。過去に、糸状菌由来MCOにおいてヨウ素酸化能を持つものが2例報告されているが、IOXの触媒効率 (k_{cat}/K_m) はこれら酵素の $10^4 \sim 10^5$ 倍も高かった。IOXをコードする遺伝子ホモログは *Rhodanobacter* など土壌細菌のゲノムにも存在し、表現型としてヨウ素酸化能を示すことも確認している。

ヨウ素酸化能を持つMCOは、特に土壌環境における放射性ヨウ素の挙動や動態に大きく影響を与えている可能性がある。古くからヨウ素は土壌に吸着しやすいことが知られている。いくつかの既往研究から、 I^- の土壌吸着には微生物が直接的または間接的に関与していること、また I^- は I_2 に酸化された後、腐植質などの土壌有機物に結合すると考えられている。我々は ^{125}I を用いたトレーサ実験より、 I^- の土壌吸着が滅菌、嫌気処理、還元剤の添加、KCNや NaN_3 など酸化還元酵素の阻害剤により強く阻害されることを明らかにした。また土壌中MCO（ラッカーゼ）活性が I^- の吸着速度と強い正の相関を示すこともわかった。ヨウ素酸化微生物は、水に溶けやすく環境を移動しやすい I^- を、土壌に固定化しやすい I_2 に変換することで、結果的にヒトや農作物への放射性ヨウ素の移行を遅らせる働きをしているのかもしれない。

このような特異な微生物を、応用利用することはできないだろうか？ I_2 は細菌、糸状菌、酵母、一部の細菌芽胞に対しても殺菌力を示し、かつ金属腐食性が少ないことから、食品加工工場や医療現場等で需要がある。現在広く用いられているヨウ素系殺菌剤としてポビドンヨード（PVP-I）があるが、界面活性剤を含むため環境負荷が高い。天然由来酵素（ペルオキシダーゼ）からなる殺菌システムも実用化されているが、腐食性と毒性を持つ過酸化水素が必須である。これに対し、IOXは酸素と I^- さえあれば I_2 の生成が可能で、

従来型よりも安全かつ簡便な殺菌システムの構築が可能である。実際、IOX システムは幅広いグラム陽性・陰性細菌、酵母、糸状菌を5分以内に完全に殺菌でき、*Bacillus* や *Geobacillus* 属の芽胞に対しても PVP-I より優れた殺菌作用を示した。膜透過実験装置を用いた定量により、IOX システム中の遊離ヨウ素濃度 (42 ppm) は 0.1% PVP-I (25 ppm) よりも高いことが明

らかになった。I₂によりタンパク質、脂質、核酸など微生物菌体成分が酸化されると I⁻ が生成するが、IOX がこれを速やかに再酸化することで、システム中の高い遊離ヨウ素濃度を維持しているものと考えられる。我々は現在、IOX と I⁻ を用いた色素脱色システムの構築にも成功しており、今後ヨウ素代謝能を持つ微生物のさらなる応用が期待される。

シンポジウム

S-1 カンジダ・グラブラータの体系的且つ網羅的遺伝子組換え体コレクションを用いた病原性研究と抗真菌薬の開発

知花博治

千葉大学真菌医学研究センター

Study of pathogenicity and development of anti-fungal drug using systematic and genome wide gene-manipulated strains in *Candida glabrata*

Hiroji Chibana

Medical Mycology Research Center, Chiba University

【背景と目的】病原性カンジダは、主に腸管粘膜に常在する真菌であり、健常者には罹患しないが、免疫力の低下した高齢者、エイズ患者、抗がん治療患者、臓器移植患者等の易感染患者に対して重篤な全身感染を起こす。細菌類を含む全血流感染症原因菌のうちカンジダは第4位、全体の7-8%を占め、致死率20-50%に達し、国内で約200人/年の死亡数が報告されている。超高齢社会における易感染患者の増加は不可避であり、感染メカニズムの研究は重要な課題である。また、抗真菌薬については、全身投与が可能な薬剤が4系統と少なく副作用や耐性菌並びに耐性株の問題が生じている。更に選択枝の少なさと患者数の増加のために、抗真菌薬の世界市場は、現在1.6兆円と10年間で2倍以上に急増している。このため、特に途上国に対して新たな抗真菌薬の開発は急務である。そこで我々は、病原性真菌の中で耐性株の増加で、特に注目されているカンジダ・グラブラータについて、全5,200遺伝子の体系的且つ網羅的遺伝子組換え体の作製を進め、下記に示すような本コレクションを用いた抗真菌薬の開発と感染メカニズムの解明を目指して研究を進めている。

【全遺伝子組換え体の構築】ヒスチジン合成系遺伝子 *HIS3* をマーカーとして標的遺伝子の前後塩基配列を含むDNAカセットをPCR法によって増幅し、ヒスチジン要求性株に形質転換することにより相同組み換えを誘導し、標的遺伝子の欠損株を作製した。欠損株が作製できない遺伝子に対しては、テトラサイクリンにより転写を抑制することが可能な Tet-off プロモーターを標的遺伝子上流に挿入した組換え体、Tet-off 株を作製した。

【ショウジョウバエを用いた感染実験】野生株と比較し YPD 寒天培地上で生育状態が良い 2,026 の遺伝子欠損株を一群 20 匹の Toll 経路変異系統、合計 7 万匹のショウジョウバエに接種し、ハエの生存率に影響を与えた遺伝子をスクリーニングした。その結果、殺傷力が低下した 57 遺伝子欠損株が見出された。現在、

これらの遺伝子について病原性に対する解析を進めている。

【抗真菌薬分子標的の探索】Tet-off 株をテトラサイクリン存在下で培養し、(*in vitro*) 生育必須遺伝子か否かの評価とマウスやカイコを用いた病原性 (*in vivo*) に必須か否かの判定を進めている。これまでに、培地上で生育必須と評価した約 1,000 遺伝子を見出しており、これらの結果を基に抗真菌薬の標的として適切な標的分子の「順位づけ」を進めている。

【ステロール合成経路上の抗真菌薬分子標的の評価】カンジダ・グラブラータのエルゴステロール合成経路には外用薬を含めて4系統の抗真菌薬の分子標的が含まれている。本経路には21遺伝子が直接的に関与しており、潜在的な抗真菌薬の標的も含まれていると考えられる。そこで、組換え体コレクションに含まれる株を用いて本経路における新たな分子標的の探索を行った。更に、分子標的が未同定であったモルフォリン系抗真菌薬標的解析を組換え体コレクションを用いて進めている。

【化合物のスクリーニング】千葉大学の保有するオリジナル合成化合物のうち450種類についてカンジダ・グラブラータの最小生育阻止濃度(MIC)を測定し、活性が見られた化合物については、主要な病原真菌に対するMICを測定し、さらに副作用の可能性を検討するために、マウスの培養細胞を用いて呼吸阻害活性および生育阻害活性を測定した。その結果、6種類の化合物にカンジダ・グラブラータの阻害活性が確認された。5種類の化合物において主要な病原真菌に対する抗真菌活性が確認された。また3種類の化合物は動物細胞に対する毒性が確認されなかった。主要病原真菌に対して阻害活性があり、動物細胞には阻害活性が確認されなかった化合物を1種類見出すことに成功し、これを「抗真菌薬シーズ」とした。

今後対象化合物を追加しスクリーニングと分子標的の同定を進め、抗真菌薬の標的として適切な標的分子の「順位づけ」上位に該当する化合物の取得を目指す。

S-2 病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* とその関連種の比較ゲノム解析

楠屋陽子

千葉大学真菌医学研究センター

Comparative genome analysis among *Aspergillus fumigatus* and its related species

Yoko Kusuya

Medical Mycology Research Center, Chiba University

真菌による感染症は年々増加傾向にあり、特に *Aspergillus* 属真菌により発症するアスペルギルス症は、しばしば重篤な症状を引き起こす。アスペルギルス症を引き起こす主要原因菌の一つは *Aspergillus fumigatus* である。分類学的研究の発展により *A. fumigatus* と類似の形態を示すが、分子系統的に異なる関連種、*A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. viridinutans* の単離と識別が可能となった。それらもアスペルギルス症の原因菌となることが明らかにされたが、アスペルギルス症の第一選択薬として用いられるアゾール系薬剤に対して *A. fumigatus* よりも高い耐性を示す。関連種における高い薬剤耐性能の解明、ならびに新規抗真菌薬の開発に向けて、ゲノム配列の基盤情報の整備が欠かせない。そこで我々は、真菌医学研究センターが保有する関連種の複数菌株を対象に、次世代シーケンサー、MiSeq, HiSeq, PacBio を用いてドラフトゲノム配列を整備してきた。取得したゲノム

配列を調べた結果、*A. fumigatus* で既知のアゾール系薬剤の標的遺伝子 Cyp51A が、関連種 *A. lentulus*, *A. udagawae* と *A. viridinutans* にも高度に保存されていることを確認した。*A. fumigatus* では、Cyp51A 遺伝子内の点変異が、アゾール系薬剤耐性獲得の一因であることが報告されている。関連種の Cyp51A のアミノ酸配列の比較解析によって、*A. fumigatus* では報告のなかった点変異が関連種間に共通して見出された。それらのアミノ酸残基が、関連種の高い薬剤耐性能を付与している可能性が考えられる。また、機能は明らかにされていないが、*A. fumigatus* で報告されている遺伝子 Cyp51B も関連種に存在することが確認でき、薬剤耐性機構の詳細な知見を得る手掛かりとなることが期待される。関連種と *A. fumigatus* の比較ゲノム解析により推定される薬剤耐性機構等、新たな知見を報告したい。

S-3 細菌 病原細菌コレクション JNBP とその活用例

飯田哲也

大阪大学微生物病研究所感染症国際研究センター

Bacteria — JNBP, a culture collection of pathogenic bacteria

Tetsuya Iida

International Research Center for Infectious Diseases, Research Institute
for Microbial Diseases, Osaka University

文部科学省が支援するナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) では、病原微生物のうち細菌を岐阜大学と大阪大学が分担し、協調して保存・分譲事業を行っている。病原細菌に関しては、昨年より統合データベース JNBP (Japan National Collection of Bacterial Pathogens) が立ち上がり、一括した菌株検索が可能となっている。これまで病原細菌のコレクションについては、岐阜大学が気道感染症を起こす病原体を、大阪大学が腸管感染症関連病原体を中心に、おもに感染症法の疾患や日和見感染を起こす病原体について収集保存を行ってきた。これらに加え今後は、近年の社会的な要望に対応し、新興・再興感染症で問題になることが多い人獣共通感染症病原体や薬剤耐性菌についても体系的に収集を行い、分譲できる体制を整えていく計画である。

大阪大学微生物病研究所における菌株保存事業の歴史は古く、1934 年、研究所設立と同時に細菌血清学部門内でスタートし、約 40 年後に文部省から研究所附置施設として認可を受けた。2002 年からは文部科学省の NBRP に参画し、2005 年、研究所に新設された感染症国際研究センター内の病原微生物資源室として位置づけられた。現在、約 1400 株の病原細菌を分

譲可能菌株として公開している。歴史的な経緯からこれまでは腸管感染細菌を中心に病原細菌の収集・保存・分譲を行ってきたが、昨年からは岐阜大との相補的な役割分担を積極的に進め、JNBP として、重要な病原細菌の網羅的な収集を目指している。感染症法の改正に伴って臨床分離株を保存しない国内の施設が増えたことなどから、JNBP はその受け皿となる病原細菌カルチャーコレクションの機能を担うことが期待されている。ユーザーとしては、大学などの微生物関係の研究機関のほか、食品や検査関係の企業や機関が検査の際の陽性対照としてリクエストしてくるケースが多い。感染症法の対象となるような病原細菌については病原体の取扱い施設がない研究機関や一般企業などでは取扱いが難しい場合も多いが、ゲノム DNA での提供も行うことで需要に対応している。さらに医療機関や民間企業、警察などからの相談や依頼に応じて原因病原体の同定や型別解析などの支援も行い現場へのフィードバックを行っているほか、菌株の保存法についての情報提供も行っている。

本講演では、病原細菌コレクション JNBP について解説するとともに、JNBP から分譲された菌株を用いて得られた研究成果の例について紹介したい。

S-4 原虫 シャーガス病治療薬開発への応用

平山謙二

長崎大学熱帯医学研究所

Protozoan parasites — Research and development of anti-Chagas drug
by Private Public Partnership (PPP)

Kenji Hirayama

Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University

シャーガス病は中南米を中心とするラテンアメリカの風土病で、サシガメという吸血性の昆虫により媒介される原虫クルーズトリパノソーマ *T. cruzi* による人獣共通感染症である。流行地ではサシガメによる自然感染や母親からの経胎盤感染などにより5歳ぐらいまでに30%の人が感染しその多くは慢性感染へと移行する。数年から数十年の無症候の期間ののち、約半数が何らかの合併症を呈する。南米ボリビアではその6割が心筋障害や不整脈を伴う心臓シャーガス、残りが結腸の神経叢破壊を伴う巨大結腸症を伴う消化管シャーガスという病型を呈し、40代からの死亡率を高めていることが推測されている。WHOの推計では、中南米の2010年の年間新規感染者が38,600人、慢性感染者が574万人となっている。シャーガス病の分布域は合衆国の南部からアルゼンチンやチリに至るアメリカ大陸に広がっているため、原虫や媒介昆虫に種内

変異が著明に認められ、患者の合併症にも中米と南米大陸の間に地域差が認められる。

シャーガス病は途上国とりわけ農村部の貧困層で蔓延しているため、その対策が著しく遅れている、いわゆる顧みられない熱帯病 Neglected Tropical Diseases (NTD) の代表格とされている。そのため治療薬の開発が十分に進んでいない。現在有効とされているのは、ベンズニダゾールとニフルティモックスという薬剤であるが、乳幼児期以降の年長児や成人では発疹や吐き気などの副作用が強く、また投与期間も2か月間毎日服用が必要で十分な治療も困難で放置されている。ここでは、アステラス製薬が中心となり、複数の大学、研究機関及び臨床開発NPOが協力して行った抗シャーガス病薬の開発コンソーシアムにおける研究の経緯をご紹介します。薬剤開発におけるリソースの重要性について考察する。

一般講演

O-1 病原性放線菌 *Nocardia pseudobrasiliensis* における nocardithiocin 誘導体作製の試み

○酒井香奈江¹, 小牧久幸², 五ノ井 透¹

¹千葉大学真菌医学研究センター, 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)

Production of nocardithiocin derivatives in *Nocardia pseudobrasiliensis* by gene replacement

○Kanae Sakai¹, Hisayuki Komaki², Tohru Gono¹

¹Medical Mycology Research Center, Chiba University, ²NITE Biological Resource Center (NBRC)

【目的】 Nocardithiocin は病原性放線菌である *Nocardia pseudobrasiliensis* から多剤耐性の結核菌にも有効に作用する抗菌物質として発見された物質である [1]。有用な活性を持っている nocardithiocin は新たな治療薬として期待される化合物であるが、光感受性や水への溶解度が低いことなどから、物質の改良が求められている。

Thiopeptide 化合物である nocardithiocin はリボソームで合成されたペプチドが骨格となり、様々な修飾を受けて最終産物が合成されている。そのため、変異導入により骨格ペプチド (precursor peptide) 内のアミノ酸を置換すれば様々な誘導体を作ることができると考えた。我々は既に nocardithiocin の生合成遺伝子クラスターを同定し [2], nocardithiocin 生合成に関与する遺伝子クラスターの情報を有している。本研究ではこの情報を利用して遺伝子組換えを行うことで、効率的な nocardithiocin の誘導体作製を試みた。

【結果および考察】 アミノ酸置換を行う前に、precursor peptide 遺伝子 (*notG*) の欠損株を作製し、欠損株が nocardithiocin を生産しないことを確認した。次に、ペプチド骨格の環化反応に影響が少ないと考えられる位置のアミノ酸を置換した 19 種類の *notG* 変異 vector と相補用の vector を作製した。作製した vector をそれぞれ *notG* 欠損株に導入し、nocardithiocin あるいはその誘導体の生産を確認した。

notG の発現にあたって、放線菌でよく使用されている高発現プロモーター *PermE* を使用したが nocardithiocin およびその誘導体は生産されなかった。しかし自身のプロモーターを使うことで、nocardithiocin 誘導体と思われる物質の生産が確認された。現在、構造決定や活性測定に必要な量の nocardithiocin とその誘導体を単離・精製しているところである。

【文献】 [1] A Mukai, T Fukai et al. J Antibiot. 2009.

[2] K Sakai, H Komaki, T Gono. PLOS ONE. 2015.

O-2 原油からの *Prolixibacter denitrificans* の分離および鉄腐食能の解析

○飯野隆夫¹, 伊藤公夫², 大熊盛也¹

¹理研 BRC-JCM, ²新日鐵住金

Isolation of *Prolixibacter denitrificans* from crude oil and determination of iron-corroding ability

○Takao Iino¹, Kimio Ito², Moriya Ohkuma¹

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

【目的】 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、微生物腐食の関与が疑われている。微生物腐食の主な原因菌は硫酸塩還元菌とされてきたが、実際には、十分に原因菌が特定されておらず、有効な防食方法がない実情である。本背景の下、筆者らは、過去に未培養であった新種の細菌 *Prolixibacter denitrificans* MIC1-1 株が亜硝酸生成を伴う硝酸還元により金属鉄 (Fe⁰) を腐食させることを明らかにした^{1,2)}。一方で、本属内の金属腐食菌の多様性や実環境への影響は定かでない。そこで、本研究では、*Prolixibacter* 属に属する鉄腐食性細菌の探索を行うことを目的とした。

【実験材料および方法】 石油備蓄基地から原油を収集し、酵母エキスとポリペプトンを含む人工海水培地¹⁾ で集積培養を行った後、同組成の寒天培地を用いて、単一の分離株を取得した。分離株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列解析を行った後、BLAST 解析を行うと共に、近隣結合法 (NJ 法) を用いて系統解析を行った。鉄腐食能の解析のために、金属鉄、10 mM 硝酸塩、0.05% 酵母エキスを含む人工海水培地で、25°C、30 日間、分離株を培養した。培養後、 α -フェナントレン法にて試験液中の溶出鉄量を定量した。

【結果および考察】 収集した原油から、2 株を純粋分離した。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析の結果、分離株 2 株は *Prolixibacter denitrificans* に近縁で、相同性は 99.1-99.2% であった。このことから、暫定的に分離株 2 株を *P. denitrificans* と同定した。分離株 2 株は、硝酸塩を電子受容体として金属鉄から鉄イオンを溶出した。電

子受容体として硫酸塩を使用した時、両株とも鉄イオンの溶出はみられなかった。これらのことから、分離株2株はMIC1-1株と同様、鉄腐食性の硝酸塩還元菌であり、*P. denitrificans*には鉄腐食性細菌が多数含まれるものと考えられる。

- 1) Iino, T. et al. 2015. Appl. Environ. Microbiol., 81: 1839-1846.
- 2) Iino, T. et al. 2015. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 64: 2865-2869.

O-3 インドネシア塩田由来高度好塩性古細菌の網羅的な分離培養

○森 浩二¹, Dian Alfian Nurcahyanto², Puspita Lisdiyanti², 川崎浩子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 Indonesian Institute of Sciences (LIPI)
Isolation of halophilic archaea from Indonesian solar salterns

○Koji Mori¹, Dian Alfian Nurcahyanto², Puspita Lisdiyanti², Hiroko Kawasaki¹

¹NITE Biological Resource Center (NBRC), ²Indonesian Institute of Sciences (LIPI)

高度好塩性古細菌は1.5 M (9%)以上のNaClをその増殖に要求し、系統的に*Halobacteria*綱に分類される微生物群である。本菌群は、これまでに世界中の高塩環境等から分離され、40属以上が報告されている。インドネシアでは、古くから各地の海岸で塩が作られており、その多くは小規模な手作業によるものである。その製法は画一化されていないため多様な高度好塩性古細菌が生息している可能性が高いと考えられる。本研究では、インドネシアの塩田試料から網羅的に高度好塩性古細菌を分離することで、その多様性を検証するとともに、新規な高度好塩性古細菌の獲得を目的として実施した。

ジャワ島東部及びバリ島において、塩田試料を採集し、高度好塩性古細菌の分離源とした。8地点で採取した28試料を用い、培養は15%または20%のNaClを含む培地を用いて30℃にて実施した。この結果、71株の高度好塩性古細菌を獲得した。分離した菌株について16S rRNA遺伝子の部分配列を決定することで簡易同定を行った。簡易同定した結果から、分離した71株は2つの新属と少なくとも6新種を含む16属32種に分類することができた。本結果から、インドネシアにおける高度好塩性古細菌の多様性の一端を示すことができた。新規系統については現在性状解析を実施しており、そのいくつかについては新しい学名の提案をしている。本公演ではその一部を紹介する。

本研究は、(独)科学技術振興機構(JST)と(独)国際協力機構(JICA)が共同で実施している地球規模課題対応国際科学技術協力プログラムの助成を受け、課題名「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」で実施した。

O-4 *Corynebacterineae* 亜目に属する2属の分類学的再検討

○浜田盛之¹, 柴田千代¹, 田村朋彦¹, 桜井健太¹, 細山 哲¹, 黄地祥子¹, 寺本華奈江², 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 日本電子株式会社

Reclassification of two actinobacterial genera belonging to the suborder *Corynebacterineae*

○Moriyuki Hamada¹, Chiyo Shibata¹, Tomohiko Tamura¹, Kenta Sakurai¹, Akira Hosoyama¹, Syoko Oji¹, Kanae Teramoto², Ken-ichiro Suzuki¹

¹NITE Biological Resource Center (NBRC), ²JEOL Ltd.

【目的】*Corynebacterineae* 亜目には、結核菌やジフテリア菌等の古くから知られる病原菌が含まれるが、グルタミン酸生産菌や難分解物質分解菌等の有用菌も数多く知られており、医学のみならず産業上においても重要な菌群である。本分類群は放線菌綱に含まれるが、多くの属は菌糸状の形態を示さず、ごく一部の例外を除き細胞壁にミコール酸を含有するという共通の特徴的な性質をもつ。

NBRCカルチャーコレクションにおける基準株の収集・保存の過程で、近年提唱された*Corynebacterineae* 亜目に属する2つの属の基準種、*Hoyosella altamirensis* NBRC 109631^Tと*Amycolicococcus subflavus* NBRC 109087^Tが99.8%という非常に高い16S rRNA遺伝子塩基配列の相同性を有していることを見いだした。本研究は、これら2つの属の分類学的関係性を明らかにするために、多相分類学的手法を用いて同一条件下で再特徴付けを行い、両者の再分類の必要性を検討した。

【方法および結果】*H. altamirensis* NBRC 109631^Tと*A. subflavus* NBRC 109087^Tは共にペプチドグリカンタイプはメソジアミノピメリン酸を含むA1γ型、主要メナキノンMK-8、主要脂肪酸はC_{16:0}およびC_{17:1 ω9c}、主要な極性脂質はジフォスファチジルグリセロール、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルイノシ

トールであった。 *Hoyosella* 属と *Amycolicicoccus* 属の原記載論文では、両属ともミコール酸を含まないと報告されていたが、本研究において MALDI spiral-TOFMS を用いた高感度分析により、両株とも総炭素数 32 から 36 のミコール酸を含有していることが明らかとなった。これらの化学分類学的特徴の一致と高い 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性により、両株は同一属に所属させるべきであることが示唆された。一方、*A. subflavus* のコンプライートゲノムが公開されているため、本研究において *H. altamirensis* のドラフトゲノム解析を実施し、*A. subflavus* との間で *in silico* ハイブリダイゼーションを行ったところ、average nucleotide identity (ANIb) 値は 92.34% で、種の閾値とされる 96% より低いことが明らかになった。さらに、生育 pH 範囲や糖の資化性能等の表現性状においてもいくつかの差異が見られたため、両株は別種とすべきであることが示された。属名の優先権は *Hoyosella* 属にあることから、細菌命名規約 Rule 38 および 41a に基づき、*Amycolicicoccus subflavus* を新組合せ *Hoyosella subflava* として再分類することを提唱する。

O-5 白癬菌における FLP site-specific recombinase を用いた薬剤耐性マーカーリサイクルシステムの構築とモデル白癬菌 *Arthroderma benhamiae* (*Trichophyton mentagrophytes*) マーカーフリー *Ku70* 破壊株の作出
山田 剛

帝京大学医真菌研究センター

Development of FLP site-specific recombinase-mediated drug resistance marker recycling in the model dermatophyte, *Arthroderma benhamiae* and production of the *Ku70* recessive mutant strain devoid of any selectable markers

Tsuyoshi Yamada

Teikyo University Institute of Medical Mycology, TIMM

近年、白癬およびその原因菌である皮膚糸状菌（白癬菌）の研究分野においても、動物好性白癬菌である *Arthroderma benhamiae* が研究の効率（合理）化を推進するためのモデル生物として認識されつつある。微生物感染のメカニズムの解明、病原因子の同定などを進める上で、原因微生物の遺伝子操作は有用かつ必須の手段であり、*A. benhamiae* においてもそれは可能である。しかしながら、現時点では非生育必須遺伝子に対する相同組換えを介した遺伝子破壊が可能な状況にあるに過ぎない。また形質転換実験における形質転換体のスクリーニングを行う際に必要となる選択マーカーの不足など、他のモデル病原真菌に比べ、遺伝子操作技術が十分に整備されておらず、創薬に役立つ生育必須遺伝子の他、白癬菌のゲノム中に豊富に含まれている多重遺伝子族の機能解析が困難な状況にある。

そこで今回我々は、*A. benhamiae* に対し、多重遺伝子族の機能解析への貢献が期待できる FLP site-specific recombinase を利用した選択マーカーのポップアウト（リサイクル）システムの導入およびマーカーフリー *Ku70* 破壊株の作出を試みた。本研究では、非相同末端結合経路の主要分子の 1 つ、KU70 (AbKU70) をターゲットに、*Penicillium chrysogenum* におけるコドン使用頻度を基に人工合成された *flp* 遺伝子 (*Pcflp*) ならびに形質転換体の選択マーカーとして使用するネオマイシン耐性遺伝子 (*nptII*) を含む遺伝子破壊用モジュールを有するバイナリーベクターを構築し、アグロバクテリウム法を用いて *A. benhamiae* に導入した。得られた形質転換体の一部を解析した結果、遺伝子破壊用モジュールの *AbKu70* 遺伝子座への挿入およびその後のポップアウトによる *AbKu70* 破壊株の存在が明らかになり、本菌において PcFLP 活性を介した選択マーカーのリサイクルシステムが機能することが証明された。

O-6 ケニアのアフラトキシン汚染のホットスポットで栽培されたトウモロコシから分離された *Aspergillus section Nigri* の分類について

○松澤哲宏¹, 堀江義一², Olga Mashedi³, Christine Bii³, 五ノ井 透²

¹長崎県立大学看護栄養学部, ²千葉大学真菌医学研究センター, ³Medical Mycology Kenya Medical Research Institute, Kenya

Identification and characterization of black *Aspergillus* isolated from maize in aflatoxin hot spots in Kenya

○Tetsuhiro Matsuzawa¹, Yoshikazu Horie², Olga Mashedi³, Christine Bii³, Tohru Gono²

¹Faculty of Nursing and Nutrition, University of Nagasaki, ²Medical Mycology Research Center, Chiba University, ³Medical Mycology Kenya Medical Research Institute, Kenya

Aspergillus 属は我が国においては「麹」として伝統的な発酵食品である醤油・味噌・清酒などの醸造に用いられており、発酵工業においても有機酸、酵素の製造に用いられ、我々の生活にとって重要な菌である。その一方で、一部の菌ではアフラトキシンやオクラトキシンといったカビ毒を生産するため、穀物などにおいて深刻な汚染菌としての一面も有している。また、ヒトの真菌症原因菌としての報告もあり、*Aspergillus* 属は我々の生活に非常に身近でかつとても重要な菌とされている。*Aspergillus* 属は多くの種が報告されているが、その中でもアフラトキシン産生菌として *A. flavus* および *A. parasiticus* を含む section *Flavi*, オクラトキシン産生菌として *A. niger* および *A. carbonarius* を含む section *Nigri* に属する菌が食品汚染菌として非常に重要視されている。

アフラトキシンによる穀類の汚染は特にケニアで深刻であり、2004年にはアフラトキシンに汚染されたトウモロコシが原因で急性食中毒患者317名中、125名が死亡する大規模な集団食中毒事故が発生している。この事故以降、国際的な調査機関によってケニアには土壤中にアフラトキシン産生菌が極めて高頻度で分布するホットスポットがある事が明らかにされ、アフラトキシンの汚染リスクが高い地域での農作物の管理が重要な課題となっている。一方、ケニアにおけるオクラトキシン汚染についてはコーヒーや小麦といった、代表的な農作物における報告しかなくされていない。近年、ココアやチョコレート小麦、ヘーゼルナッツなどでアフラトキシンとオクラトキシンのクロスコンタミネーションに関する報告が行われており、1つの農作物に対して2つのカビ毒の汚染状況を調査する重要性が増してきている。トウモロコシにおけるカビ毒のクロスコンタミネーションに関する報告はほとんど行われておらず、ケニアにおいてトウモロコシのオクラトキシン汚染の実態を把握する事は、カビ毒の汚染リスク管理において非常に重要である。そこで本研究では、アフラトキシン汚染のホットスポットであるマクエニおよびキトゥイ地域から採取したトウモロコシからオクラトキシン産生菌の分離を試み、菌種同定およびオクラトキシンの生産性を検討し、ケニアのトウモロコシ汚染の実態を明らかにすることを試みた。

O-7 MCC-NIES が保有するシアノバクテリア株のゲノム情報整備

○志村遥平¹, 広瀬 侑², 三澤直美², 藤澤貴智³, 兼崎 友⁴, 森 史⁵, 山口晴代¹, 河地正伸¹

¹国立環境研究所, ²豊橋技術科学大学, ³国立遺伝学研究所, ⁴東京農業大学, ⁵地球・人間環境フォーラム

Development of genomic information on cyanobacterial strains in MCC-NIES

○Yohei Shimura¹, Yuu Hirose², Naomi Misawa², Takatomo Fujisawa³, Yu Kanesaki⁴, Fumi Mori⁵, Haruyo Yamaguchi¹, Masanobu Kawachi¹

¹National Institute for Environmental Studies, ²Toyohashi University of Technology, ³National Institute of Genetics, ⁴Tokyo University of Agriculture, ⁵Global Environmental Forum

酸素発生型光合成を行う原核生物であるシアノバクテリアは、光合成メカニズム等の基礎研究やバイオ燃料生産等の応用研究に、実験材料として広く利用されている。また、湖沼におけるシアノバクテリアの大増殖（アオコ）は、水質の低下を引き起こすため大きな社会問題となっており、シアノバクテリアの保存株は、アオコの研究やモニタリング等にも利用されている。ナショナルバイオリソースプロジェクト藻類の中核機関である国立環境研究所 微生物系統保存施設（MCC-NIES）は、国内最大のシアノバクテリアリソースを保有しており、現在48属731株の多種多様なシアノバクテリアが、研究・開発・教育のために利用可能な状態にある。

最近の次世代シーケンサーの普及により、カルチャーコレクションに保存された微生物株のゲノムを網羅的に解析する取り組みが各国で盛んに行われている。シアノバクテリアのゲノム情報は、基礎・応用研究に加えて、アオコのモニタリング等においても有用な情報となるため、我々は現在、MCC-NIESのシアノバクテリアコレクションについて、ゲノム配列決定とゲノム情報整備を進めている。これまでに、アオコを引き起こすことで知られる *Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Cylindrospermopsis* の他、海洋に広く分布する

Synechococcus, 分子系統学的に新奇なシアノバクテリア等, 多数の株からゲノム配列を得た. これらのうち, アオコの原因となるシアノバクテリアのいくつかの株では, 完全なゲノム配列を決定することができた. *Planktothrix* 属のタイプ株である *P. agardhii* NIES-204 株の完全なゲノム配列からは, 二次代謝産物合成遺伝子に関して, *Microcystis* 属のシアノバクテリアと類似する配列を見いだすこともできた. 本発表では, こうしたこれまでに解析を行ったシアノバクテリアのゲノム情報と, 我々の取り組みについて紹介する.

O-8 真核微生物リソースの付随情報と菌株オンラインカタログの充実に向けて

○遠藤力也¹, 鈴 幸二¹, 金城幸宏^{1,2}, 岡田 元¹, 高島昌子¹, 眞鍋理一郎³, 大熊盛也¹

¹理研 BRC-JCM, ²東工大 院・生命理工, ³理研 CLST-DGT

Toward further enrichment of strain information and enhancement of search facility of the JCM online catalogue for eukaryotic microbial bioresources

○Rikiya Endoh¹, Koji Suzu¹, Yukihiro Kinjo^{1,2}, Gen Okada¹, Masako Takashima¹, Ri-ichiroh Manabe³, Moriya Ohkuma¹

¹RIKEN BRC-JCM, ²Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, ³RIKEN CLST-DGT

カルチャーコレクションにおける菌株オンラインカタログ (以下, カタログ) は, ユーザーとの最も重要な接点の一つである. カタログに掲載される菌株情報とその検索機能を充実させることは, カルチャーコレクションの利便性向上に直結する.

理研 BRC-JCM のカタログでは従来から, 菌株の由来・分離源や採集地・分類の指標となる生化学的性状・DNA バーコード領域の塩基配列に関する情報などを掲載してきた. 系統分類の知識がある一部の専門家にとって収載されている情報は有用であったであろうが, カタログの想定ユーザーが偏っているきらいがあった. 一方, JCM におけるカタログでは学名検索・菌株番号検索・キーワードによる菌株データ検索・培地検索 (培地の組成) が可能である. しかし, ターゲットを特に絞らず “広く見渡す” ような検索機能は充実していなかった.

上記の問題点を解決すべく, 演者らが理研 BRC-JCM で最近実施した菌株付随情報の追加やカタログ検索機能の追加について, 以下の [1] ~ [3] の3項目を中心に本発表で紹介する.

[1] 高次分類群情報とコロニー形態写真の追加

[2] 菌株の特性に基づいた酵母菌株のリストとその検索機能

[3] NBRP ゲノム情報等整備プログラムによる酵母・糸状菌ゲノム情報整備と菌株リストの公開

上記 [2]・[3] のリストに掲載される情報は, カタログ上の菌株ごとのデータとひも付けされている. 本リストを活用することにより, 菌株付随情報を介したリソースの横断的な検索が容易になった.

かつて分厚い冊子体だったカルチャーコレクションの公開菌株リストでは「どんなリソースがどれだけ収集されているか」が比較的容易に (直感的に) 把握できた. 情報が電子化されオンラインで検索できるようになった現在, 個々の情報へのアクセスは容易になったが, コレクションの全容はユーザーからは把握しがたく, むしろブラックボックス化している. 多様化していくニーズに対応できるより充実したカタログを構築するために, どのような情報が有用か, どのような点に着目した菌株リストや検索機能が有用かについて議論したい.

参照サイト:

菌株の特性に基づいた酵母株一覧

http://www.jcm.riken.jp/JCM/yeast_search

NBRP プログラムで解読した JCM 株のゲノム情報 (真核微生物)

http://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/nbrp/nbrp_list.cgi

ポスター発表

P-1 シロアリ腸内の難培養性細菌のシングルセルゲノム解析○大熊盛也^{1,2}, 雪 真弘², David Starns^{1,3}, 桑原宏和⁴, 本郷裕一^{1,4}¹理研 BRC-JCM, ²理研 CSRS-BMEP, ³リバプール大, ⁴東工大生命理工

Single-cell genome analyses of yet-uncultured bacteria in the termite guts

○Moriya Ohkuma^{1,2}, Masahiro Yuki², David Starns^{1,3}, Hirokazu Kuwahara⁴, Yuichi Hongoh^{1,4}¹RIKEN BRC-JCM, ²Biomass Research Platform Team, RIKEN Center for Sustainable Resource Science,³Institute of Integrative Biology, Liverpool University, ⁴School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Technology Institute

【目的】自然界には多種多様な微生物が生息しているが、多くのものは難培養性である。メタゲノム解析など、近年の微生物分子生態学的な研究の進展により、微生物群集の構造や機能の解明がなされている。微生物リソースセンターでは、自然界の微生物の多様性を域外保全する貢献が求められているが、純粋培養された微生物株を整備対象としており、分子生態学研究の進展がもたらした成果を十分に反映できていない¹⁾。また、メタゲノム解析では、ゲノム配列情報が莫大に生み出されるが、多くの配列の由来生物種が不明であり、分離培養株などの比較対照となるゲノム配列に対する要望は高まっている。このような状況下、難培養でも特定種のゲノム DNA とそのゲノム情報があれば学術研究上に有用と考え、シングルセルゲノム解析技術の開発と適用をめざしてきた。

【方法と結果】安定した微生物群集が再現性良く得られ、解明が進んでいるシロアリ腸内の共生微生物を材料とした。フローサイトメトリーによって、腸内共生細菌を1細胞ずつ分離し、全ゲノムを増幅後、細菌の16S rRNA 遺伝子配列をPCR増幅して系統情報を解析し、増幅ゲノムを用いてゲノム概要配列を決定した。これまでに解析したシングルセルゲノムのなかには、完全ゲノムの8-9割程度に相当すると推定されるものもみられた。腸内のセルロース分解性の原生生物に細胞内共生する *Treponema* 属細菌と原生生物の細胞表層で共生する *Bacteroidales* 目細菌について、それぞれシングルセルゲノム解析情報から代謝機能と宿主原生生物との共生機構を推定した^{2,3)}。また、原生生物がないタイプのシロアリにおいて、腸内で優占する *Spirochaeta* 門, *Fibrobacteres* 門, 未培養新門として提唱された TG3 門の3門のそれぞれ最も優占する種についてシングルセルゲノム解析を行って、腸内での役割分担を考察した。

1) Emerson D, Wilson W. Nat Rev Microbiol 7: 758 (2009)

2) Ohkuma M. et al. Proc Natl Acad Sci USA 112: 10224-10230 (2015)

3) Yuki M. et al. Environ Microbiol 17: 4942-4953 (2015)

P-2 農大乳酸菌株の多様性と有用性○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), 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

東京農業大学菌株保存室 (NRIC) ではこれまで多種多様な試料から約 5,000 の乳酸菌株を分離・同定し保存してきた。当機関ではこの保存乳酸菌株を有効活用するため、ヒトに有益な効果をもたらす機能的な性状データを収集している。そして「食の安全」「健康」「おいしさ」に関連する性状の解析によって保存菌株の多様性と有用性が明らかとなってきた。これらの性状データはデータベース化されており、web 上で保存株の中から目的の機能を有する菌株を検索可能である (<http://www.ps.noda.tus.ac.jp/labdb/jsps/index.jsp>)。

これまでにデータベース化した性状項目は以下の通りである。

食の安全：バクテリオシン産生能

おいしさ：バニリン合成, n-ヘキサナール分解

健康：プロバイオティクス特性（酸耐性, 胆汁酸耐性, ムチン接着, IL-12誘導）, 多糖産生（菌体外, 莢膜, テイコ酸）, GABA産生

発表ではデータベースを紹介すると共に, これらのデータ解析によって見いだされた保存乳酸菌株の多様性と有用性について報告する。

P-3 奥塩原温泉から分離した新規好熱性アーキアの系統分類学的研究

長森麻衣^{1,2}, 大西真史^{1,2}, 加藤真悟¹, 高品知典², 大熊盛也¹, ○伊藤 隆¹

¹理研 BRC-JCM, ²東洋大学大学院生命科学

Systematic study on a novel thermophilic archaeon isolated from a hot spring in Okushiobara

Mai Nagamori^{1,2}, Masafumi Onishi^{1,2}, Shingo Kato¹, Tomonori Takashina², Moriya Ohkuma¹, ○Takashi Itoh¹

¹RIKEN BRC-JCM, ²Graduate School of Life Sciences, Toyo University

アーキアは系統学的に極めて多様な生物群であるが, これまでに分離培養されているほぼ全てのアーキアは *Euryarchaeota* または *Crenarchaeota* に属し, それ以外では中温性 *Thaumarchaeota* のアーキアが数株分離されているに過ぎない。一方, 近年のメタゲノム解析や一細胞ゲノム増幅など遺伝学的技術の発展によって, 環境中の未培養アーキアでも非培養下で代謝特性や全ゲノム解析なども行われるようになってきた。しかしながらこうした解析から推定される機能を実証し, さらに詳細に解析するためには培養株の確立が必要である。

我々はこれまで日本の陸上温泉に生息している好熱性アーキアの探索研究を行ってきたが, 分離培養できた菌株はいずれも *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* に属するものであった。しかし新たに栃木県奥塩原から採取した温泉試料について新規アーキアの分離を試みたところ両クレードにも属さない NAS-02 株を分離培養することに成功した。本報告では本菌株の系統及び培養性状について報告する。

本菌株は上記試料を従属栄養・鉄還元条件下・pH 5.0・70°C で集積培養したカルチャーより分離した菌株である。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析の結果, *Thaumarchaeota* と *Aigarchaeota* のほぼ中間に位置する, 未だ分離株が存在しない HTC2 (Hot Thaumarchaeota-related Clade2) に属するアーキアであることが明確となった。本菌株は直径約 0.5 μm の不整形球菌で鞭毛の存在は確認されていない。生育至適温度 65°C, 生育至適 pH 5.0 で従属栄養性・嫌気性を示し, さらに硫黄や硫酸, チオ硫酸, Fe(III) 化合物を電子受容体として利用していると思われる。至適培養条件下における最小倍加時間はおよそ 36 時間であった。

P-4 *Flavobacterium* sp. TMd3a3 株の系統分類学的研究

○畑山耕太¹, 牛田絢子², 久野輝昭³

¹相模中央化学研究所, ²玉川大学農学部, ³北里大学理学部

Strain TMd3a3, a novel member of the genus *Flavobacterium*

○Kouta Hatayama¹, Ayako Ushida², Teruaki Kuno³

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

これまでに本研究では自然環境中から色素産生バクテリアの分離を行ってきた。16S rRNA 遺伝子部分配列（約 500 bp）の解析により分離バクテリアの同定を試みた結果, 神奈川県厚木市の玉川から分離された淡黄色のコロニーを形成する TMd3a3 株は *Flavobacterium* 属の既知種と異なる可能性があった。そこで, TMd3a3 株について系統分類学的な研究を行った。

TMd3a3 株の 16S rRNA 遺伝子配列（1436 bp）を決定するために PCR ダイレクトシーケンスを行ったが, 複数の塩基でダブルピークが認められた。そのため 16S rRNA 遺伝子をクローニングして配列を決定した結果, TMd3a3 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 98.9-99.7%）。これらの配列の相同性検索の結果, TMd3a3 株は *Flavobacterium tructae* 435-08^T（相同性：97.2-97.4%）と *F. resistens* BD-b365^T（96.7-97.4%）, *F. maotaiense* T9^T（97.0-97.3%）, *F. limicola* ST-82^T（96.5-97.3%）, *F. aquidurensense* WB 1.1-56^T（96.9-97.2%）, *F. spartansii* T16^T（96.9-97.2%）, *F. psychrolimnae* LMG 22018^T（96.4-97.0%）に近縁であること

が示唆された。

TMd3a3 株は脱窒能があり, NO₃ 存在下で嫌気増殖可能な点で近縁種基準株と区別可能であった。TMd3a3 株は、唯一の呼吸鎖キノンとして menaquinone 6, 主要な脂肪酸として iso-C_{15:0} と summed feature 3 (C_{16:1}ω7c and/or C_{16:1}ω6c), 主要なリン脂質として phosphatidylethanolamine を有し, DNA G+C 含量は 36.5 mol% であった。これらは *Flavobacterium* 属の諸性質と一致した。また, TMd3a3 株と近縁 7 種の DNA-DNA 相同値はいずれも 13% を下回り, 別種であることが強く示唆された。これらの結果から, TMd3a3 株は *Flavobacterium* 属の新種であることが示唆された。

P-5 納豆菌ファージの凍結保存における安定性

○永井利郎, 澤田宏之, 一木 (植原) 珠樹, 埋橋志穂美, 中島比呂美, 熊谷みどり, 青木孝之
農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源センター (NARO-MAFF)

Stability of *Bacillus subtilis* (natto) phages during cryopreservation

○Toshirou Nagai, Hiroyuki Sawada, Tamaki Uehara-Ichiki, Shihomi Uzuhashi, Hiromi Nakajima, Midori Kumagai, Takayuki Aoki

National Agriculture and Food Research Organization, Genetic Resources Center (NARO-MAFF)

【目的】 これまでに国内で発見された納豆菌 [*Bacillus subtilis* (natto)] ファージは, ゲノム DNA 及び形態が全く異なる, JNDMP 株を代表とするグループと ONPA 株を代表とするグループに分類される。納豆菌ファージの安定な凍結保存, そして最終的には凍結乾燥保存に資する目的で, 生残率および粒子形態に対する凍結の影響について調べたので報告する。

【方法】 実験には JNDMP (MAFF 270105) と ONPA (MAFF 270115) の 2 種類の納豆菌ファージを用いた。1 時間凍結後, 冷蔵庫内 (4°C) で解凍し, 生残ファージ数を調べた。電顕観察は, 限外ろ過膜 (分画分子量 20 kDa) により低分子の夾雑物を取り除いたファージ懸濁液について実施した。

【結果と考察】 JNDMP と ONPA の懸濁液を -20°C で凍結させたところ, JNDMP の生残率はほぼ 100% であったが, ONPA は検出限界 (10⁻⁸%) 近くまで生残率は低下した。凍結温度を -80 ~ -160°C に下げて実験を行ったところ, ONPA の生残率は上昇したが, それでも JNDMP ほどの生残率は得られなかった。以上のことから, JNDMP は保護剤が添加されていないバッファ中でも高い凍結耐性を有するのに対し, ONPA はほとんど凍結に耐えられないことが明らかとなった。-80°C で一旦凍結した ONPA を -20°C のフリーザに移して生残率を調べたが, その場合でも生残率は著しく低下した。生残率が高くなる条件下で凍結した場合でも -20°C に置かれると ONPA は失活することを示しており, 単に懸濁液から凍結状態に変化していく過程でのみ障害を受けているわけではないことが示唆された。凍結障害を受けたファージを電顕で観察すると, 凍結前は伸長していた尾部の鞘が, ほぼすべてのファージについて収縮した形態に変化していた。また, ファージ頭部については形態的な変化は認められず, 頭部にパッケージされている DNA にも変化は認められなかった。凍結保護剤であるスキムミルク-GluNa またはグリセリンをファージ懸濁液に加えた場合, ONPA の耐凍性の向上が見られ, 特に, スキムミルク-GluNa 添加でほぼ 100% 近い生残率に達した。今後, 保護剤存在下で凍結した場合の形態変化や凍結乾燥時における生残性や粒子構造の変化も確かめる予定である。

P-6 *Colletotrichum gloeosporioides* 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, 青木孝之, 根本 博

農業生物資源研究所

Molecular re-identification of MAFF (NIAS Genebank) strains belonging to the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex

○Toyozo Sato, Takayuki Aoki, Hiroshi Nemoto

National Institute of Agrobiological Sciences

近年, 分子系統解析により *Colletotrichum* 属菌 (植物炭疽病菌) では少なくとも 9 群の種複合体が明らかにされ, 主な種複合体内の分類と種分割が進んだ。最も多くの「構成種」を含む *C. gloeosporioides* 種複合体 (CGSC) では, 現在 27 「種」・1 「変種」が明らかにされている (Weir et al., 2012; Peng et al., 2013; Liu et al., 2015)。これまで, 農業生物資源センターが保有する *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. dematium*, *C. destructivum*, *C. orbiculare*, *C. spaethianum* および *C. truncatum* 種複合体の菌株について分子再同定を行い, 表示学名を更新した (Sato

et al., 2013a, b; 佐藤ら, 2014, 2015a, b). 今回, 同機関保有の CGSC に所属する 343 菌株の分子再同定を行った. Weir et al. (2012) の用いた Internal transcribed spacer 1 & 2 & 5.8S rDNA (ITS), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Calmodulin (CAL), β -Tubulin 2 (TUB2), Actin (ACT), Chitin synthase (CHS-1), Glutamine synthetase (GS), Manganese-superoxide dismutase (SOD) のうち, 各「構成種」の識別に有効な 1~8 遺伝子・領域 (Weir et al., 2012) の塩基配列を用いて各菌株の BLAST 検索を行い, 最も類似度の高い「構成種」に再同定した. その結果, 供試菌株は 18「種」に類別された. 内訳は *C. aenigma*:36 株, *C. alienum*:1 株, *C. aotearoa*:2 株, *C. asianum*:4 株, *C. camelliae*:30 株, *C. fructicola*:75 株, *C. gloeosporioides sensu stricto*:16 株, *C. henanense*:1 株, *C. horii*:7 株, *C. kahawae*:18 株, *C. musae*:6 株, *C. psidii*:1 株, *C. queenslandicum*:2 株, *C. salsolae*:1 株, *C. siamense*:68 株, *C. theobromicola*:12 株, *C. tropicale*:62 株, *C. viniferum*:1 株であった. この中には寄託時の学名が別の *Colletotrichum* 属種複合体に属する 8 種および別属 1 種となっていた 39 株が含まれる. また, 上記供試菌株とは別に, 寄託時の学名が *C. gloeosporioides* であった 48 株は他の同属種複合体 13 種に再同定された. Arx (1957) や Sutton (1980) が定義した広義の *C. gloeosporioides* は形態の変異が極めて広いため, 多くの菌株の誤同定を引き起こしてきたものと推測された. なお, 上記 CGSC 「構成種」のうち, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C. asianum*, *C. camelliae*, *C. gloeosporioides* s. str., *C. henanense*, *C. psidii*, *C. queenslandicum*, *C. salsolae* および *C. viniferum* は新たに国内分布が明らかとなった. 今後は, これら 18「構成種」に再同定された菌株の表現形質を調べ, CGSC の種分割の妥当性を評価するとともに, それらの種間差を簡易同定に役立てたい.

参考文献

- Lima, N.B., Batista, M.V.A., Morais, Jr M.A., Barbosa, M.A.G., Michereff, S.J., Hyde, K.D., Câmara, M.P.S. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 61: 75-88.
- Peng, L.-J., Sun, T., Yang, Y.-L., Cai, L., Hyde, K.D., Bahkali, A.H., Liu, Z.-Y. 2013. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience* 54: 29-41.
- Weir, B., Johnston, P.R., Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.

P-7 深在性皮膚真菌症原因菌 *Sporothrix schenckii*, *S. globosa* の迅速同定法の開発

○アリム・イケラム¹, 鈴木瑠美^{1,2}, 田中玲子¹, 矢口貴志¹

¹千葉大学真菌医学研究センター, ²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

Development of rapid identification of *Sporothrix schenckii* and *S. globosa*

○Alimu Yikelamu¹, Rumi Suzuki^{1,2}, Reiko Tanaka¹, Takashi Yaguchi¹

¹Medical Mycology Research Center, Chiba University, ²Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

【目的】代表的な深在性皮膚真菌症スポロトリクス症の起因菌は *Sporothrix schenckii* 1 種と考えられていたが, 分子系統学の発展により, 新たに *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei* が新種として報告され, 現在では *S. schenckii sensu stricto* を加えて *S. schenckii complex* と認識されている. 千葉大学真菌医学研究センターに保存されているスポロトリクス症起因菌 300 株の同定を見直すにあたり, 種特異的なプライマーを新たに設計し, PCR による迅速同定法の開発を試みた. この方法を用いて, 形態的に *S. schenckii* と同定されていた菌株の再同定を実施した.

【方法】*S. schenckii complex* の分類に用いられている calmodulin 遺伝子の塩基配列の相同性を解析し, 種特異的に保存された塩基配列を見出し, プライマーを設計した. 設計したプライマー PCR 反応条件を検討し, 判定は電気泳動で行った.

【結果・考察】新たに設計したプライマーによる PCR 反応は, *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa* を種特異的に識別できた. 偽陽性はなく, 極めて特異性が高いことが示された. *S. globosa* は分子系統的に 2 つの group I, II に細分されることが報告されているため, group I, II を識別できるプライマーも設計した. スポロトリクス症起因菌 300 株の再同定の結果, *S. schenckii sensu stricto* は 9 株, *S. globosa* 291 株 (subgroup I 241 株, subgroup II 50 株) であった. *S. brasiliensis*, *S. luriei* は見出されなかった. *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa* の抗真菌剤に対する薬剤感受性および生育速度の検討も実施した. *S. schenckii sensu stricto* は 37°C で生育したが, *S. globosa* は 37°C で生育は認められなかった. *S. globosa* の一部の菌株で itraconazole に対して低感受性を示したが,

subgroup I と II では相違は認められなかった。

P-8 コーヒー生豆から分離される *Aspergillus* section *Nigri* の迅速同定とオクラトキシン A 生産性

○清水由巳¹, 細谷幸一², 富山大輔², 矢口貴志³

¹ 関東学院大学理工学部, ² 花王 (株) 安全性科学研究所, ³ 千葉大学真菌医学研究センター

Development of rapid identification of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* from coffee beans and their productivities of ochratoxin A

○Yumi Shimizu¹, Kouichi Hosoya², Daisuke Tomiyama², Takashi Yaguchi³

¹College of Engineering, Kanto Gakuin University, ²Global R & D-Safety Science, Kao Co., ³Medical Mycology Research Center, Chiba University

【目的】日本国内においてもコーヒーは消費量の多さからその危害菌について注目されている。コーヒー生豆には1~2%のカフェインが含有されているが、コーヒー生豆には *Aspergillus* section *Nigri* に属する菌種が汚染し、ヒト体内で蓄積性のあるカビ毒であるオクラトキシン A (OTA) を産生することが報告されている。本研究では、生コーヒー豆3検体から分離した菌株を同定し、OTAの産生量を測定した。さらに、コーヒー生豆の主要な危害菌種 *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* を迅速に同定する方法を開発した。

【方法】コーヒー豆検体分離株から *Aspergillus* section *Nigri* の株を選別した。分離株から分生子懸濁液を調整し、新しい滅菌済みコーヒー豆に植菌した。25℃, 14日間培養後OTA産生量を測定した。OTAの検出はVeratox for Ochratoxin (Neogen)を使用した。また、分離株の同定は、Suscaら(2007)の方法、あるいは分離菌株のβ-tubulin 遺伝子配列を決定し配列情報に基づいた菌種の同定法を用いた。*Aspergillus* section *Nigri* の迅速同定の開発には、進化速度が早い遺伝子であるカルモジュリン遺伝子に着目し、*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* に特異的な塩基配列を有する領域を検索した。それらの増幅が可能なプライマーを設計しそのPCR反応における条件検討を行った。識別は電気泳動によって行った。

【結果および考察】生コーヒー豆3検体から分離した *Aspergillus* section *Nigri* (コロニー形態で同定) 53株のOTA産生量を測定したところ、OTA産生していた23株はすべて *A. niger* であり、*A. tubingensis*, *A. carbonarius* は検出されなかった。

Suscaら(2007)が報告した *A. niger*, *A. tubingensis* 特異的プライマーを用いたPCR法では、一度のPCR反応で複数種を同定することは行っていない。今回、*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* それぞれにサイズの異なる特異的な泳動バンドを検出するようプライマーを設計した。これにより3組のプライマーを混合して使用することも可能とした。これらの反応は特異性、検出感度が極めて高く、本プライマーを用いた section *Nigri* に属する菌種の同定に非常に有効である。

P-9 マングローブに生育するカビのリグニン分解酵素の特性解析

○伊藤将広¹, 田中尚人¹, 梶川揚申², 岡田早苗²

¹ 東京農業大学菌株保存室, ² 東京農業大学応用生物科学部

Characterization of the lignin degrading enzyme of the fungi derived from a Mangrove

○Masahiro Ito¹, Naoto Tanaka¹, Akinobu Kajikawa², Sanae Okada²

¹NODAI Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture, ²Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture

【目的】現在、リグニン分解酵素は環境浄化への利用が期待されている。これは汚染物質である農薬の Dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) 等が、リグニンを構成している化合物と構造が類似しており、リグニン分解酵素の一部によって分解できるためである。また沿岸域、海洋環境では高濃度の塩が存在しているため、耐塩性酵素での環境浄化が求められている。しかし、市販されている高活性である *Trametes versicolor* 由来のラッカーゼでは塩濃度が1%で活性が20%以下まで落ちてしまう¹⁾。そのため本研究室では汽水域に生育しており、周辺には落葉などリグニンが存在しているマングローブに注目し、そこから分離されたカビが産生するリグニン分解酵素の特性解析を目的とした。

【方法・結果】本研究ではマングローブから分離した173株を供試菌株とした。初めにリグニン分解菌のスクリーニングを行った。液体培地に培養した後、培養上清に基質である2,2-azino-bis (3-ethybenz-thiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) を反応させ、吸光度測定 (540 nm) により判定した。結果、173株の内、67株

がリグニン分解酵素を産生していることが明らかになった。

次に、スクリーニングを行った67株のうち、最も分解活性の高かった *Phlebia* sp. 14-1-A 株のリグニン分解酵素を用い、耐塩性試験を行った。培養上清から硫酸沈殿によって得たタンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーによって分画し、塩濃度をそれぞれ1%から7%とした基質と反応させ活性を測定した。その結果、*Phlebia* sp. 14-1-A 株は塩濃度3%でも活性が60%以上であった。このことから、*Phlebia* sp. 14-1-A 株が産生するリグニン分解酵素は塩に対する高い安定性を示した。

1) 濱田奈保子 (2005). 耐塩性微生物を利用した沿岸環境の浄化と当該微生物の耐塩性機構の解明. 財団法人ソルト・サイエンス研究財団助成研究報告集, 179-186.

P-10 生活環境から分離された *Cladosporium* 属菌株と NBRC 保有株の再同定

○伴 さやか, 田淵由希子, 島村具仁子, 稲葉重樹
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)

Cladosporium strains isolated from human living environment and re-identification of strains preserved at NBRC

○Sayaka Ban, Yukiko Tabuchi, Kuniko Shimamura, Shigeki Inaba
NITE Biological Resource Center (NBRC)

Cladosporium (Link) 属は生活環境から普遍的に高頻度で分離され、空調機等の工業製品にも発生することで一般にも知名度が高く、抗カビ試験等に供するための菌株としての需要も高い。試験菌株は、以前までは、普遍的な種で、菌株は基本的な性質を有していれば分離源は問わない考えが主流であったが、近年では、対象製品の汚染実績がある種や菌株が求められる傾向にある。しかし、汚染現場や住宅環境での検出例では形態観察による属レベルの同定にとどまる報告がほとんどで、種レベルまで精査された報告はほとんど見当たらない。

一方、NBRC では *Cladosporium* 属を53株保有している。ほとんどが土壌や植物等の自然環境由来で、同定は形態に基づくため、最新の分類体系に基づく再同定を必要とする。以上の需要と供給双方の課題を包括的に解決するため、1) 生活環境等からの新たな菌株の収集、2) ITS 領域、伸長因子 (EF-1 α)、アクチン遺伝子の3領域を用いた系統解析を行った。

その結果、NBRC 保有株のうち11株は種名変更の必要があると判断された。特筆事項としては、JIS Z2911 抗カビ抵抗性試験に規定される "*C. cladosporioides*" NBRC 6348 は *C. sphaerospermum* と再同定された。また2株は不確定であった；"*C. cladosporioides*" NBRC 6535 と "*C. variabile*" NBRC 31380 は、2つの蛋白質領域による同源性検索の結果と3領域結合での系統的位置が一致せず、既知種に同定するには培養性状等の追加試験の必要があるか、新種の可能性もある。

今回新たに収集したのは、合板製筆筒、エアコン内部、風呂場、廊下の壁 (石膏ボード)、味噌樽からの6菌株で、3株は *C. halotorelans* と同定され、残りは *C. sphaerospermum*, *C. australiense*, *C. pseudocladosporioides* が1株ずつであった。NBRC 保有株のうち生活環境由来の5株とあわせると、生活環境においては *C. halotorelans*, *C. sphaerospermum* が優先していることが伺えた。

P-11 担子菌系酵母の The Yeasts 第5版以降の分類体系変更の概要

○高島昌子, 遠藤力也, 大熊盛也
理研 BRC-JCM

Outline of basidiomycetous yeast name changes after "The Yeasts, A Taxonomic Study" 5th ed. (2011)

○Masako Takashima, Rikiya Endoh, Moriya Ohkuma
RIKEN BRC-JCM

担子菌系酵母の分類体系の整理は子囊菌系酵母に比べて遅れていたが、最近、下記の3報の論文によりほとんどの担子菌系酵母の分類が整理された。遅れていた原因としては、*Filobasidiella* 属や *Rhodospiridium* 属などテレオモルフと *Cryptococcus* 属や *Rhodotorula* 属などのアナモルフの属の範囲が大きく異なっていたことや、アナモルフの学名が多くテレオモルフの学名と系統樹上で混在していたことに加え、形態学的特徴に乏しいため多くの属の定義や識別を行うことが難しかったことが挙げられる。多遺伝子 (主として AFTOL1 遺伝子) の塩基配列を用いて解析した分子系統に基づいて担子菌系酵母の再分類を行ったのが下記論文であり、多くの新科や新属の提唱はもとより、過去に発表されていた属も多く再記載され、300以上の新組み合わせが発表された。これらの発表は

今後表現型の観点から議論されると思われるが、本発表では下記論文発表を基に、リソースセンターの運営に必要な不可欠な学名の変更に焦点をあてて概説する。

Wang et al. Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina. *Studies in Mycology* 81: 55–83.

Liu et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Studies in Mycology* 81: 85–147.

Wang et al. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. *Studies in Mycology* 81: 149–189.

P-12 *Aspergillus* section *Nigri* における薬剤感受性と耐性原因の検討

○橋本亜希, 萩原大祐, 八尋真希, 渡辺 哲, 矢口貴志, 亀井克彦
千葉大学真菌医学研究センター

Investigation of drug sensitivity and azole resistance in *Aspergillus* section *Nigri*

○Aki Hashimoto, Daisuke Hagiwara, Maki Yahiro, Akira Watanabe, Takashi Yaguchi, Katsuhiko Kamei
Medical Mycology Research Center, Chiba University

背景：*Aspergillus niger* とその近縁種 (*Aspergillus* section *Nigri*) は環境中に遍在し、臨床検体からもしばしば分離される真菌である。海外では *Aspergillus* section *Nigri* の薬剤感受性を調査した報告があるが、国内のまとまったデータは示されていない。

目的：日本国内の *Aspergillus* section *Nigri* の薬剤感受性とアゾール系薬剤への耐性原因を検討する。

方法：当センターが保存している *Aspergillus* section *Nigri* 臨床分離株と環境分離株、計 103 株を用い、 β -tubulin 遺伝子領域から詳細な菌種を同定し、各種抗真菌薬に対する MIC を測定した。また、全ての株で *cyp51A* 遺伝子配列を解析し、変異と薬剤耐性の関連を検討した。

結果：試験株の菌種は *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* の 3 菌種だったが、MIC 測定の結果 *A. tubingensis* は他の 2 菌種に比べアゾール系薬剤への自然耐性傾向があることが認められた。どの菌種においてもアゾール系薬剤耐性と *cyp51A* 遺伝子変異の明らかな関連は認められなかった。

考察：今回、国内で初めて *Aspergillus* section *Nigri* のまとまった薬剤感受性データが明らかとなった。*Aspergillus* section *Nigri* は *A. fumigatus* と異なり、アゾール系薬剤への耐性が *cyp51A* 遺伝子変異とは関連がない可能性が示された。現在、他の耐性原因の 1 つとして、薬剤排出ポンプ *cdr1B* の発現増加の差をアゾール感受性株と耐性株で比較するために、Real-time PCR を用いて解析している。この結果も合わせて提示する予定である。

P-13 霞ヶ浦における *Microcystis aeruginosa* の *ftsZ* 遺伝子を用いた種内系統群の動態解析

○山口晴代¹, 田辺雄彦², 片岡剛文¹, 富岡典子¹, 河地正伸¹

¹ 国立環境研究所, ² 筑波大学

Intraspecific dynamics of *Microcystis aeruginosa* based on *ftsZ* gene in Lake Kasumigaura, Japan

○Haruyo Yamaguchi¹, Yuuhiko Tanabe², Takafumi Kataoka¹, Noriko Tomioka¹, Masanobu Kawachi¹

¹National Institute for Environmental Studies, ²University of Tsukuba

シアノバクテリアの一種である *Microcystis aeruginosa* は特に富栄養化した湖沼で大規模なブルームを形成することによって悪臭や湖底の酸素欠乏の原因となるのみでなく、一部はミクロキスチンと呼ばれる毒素を生成するなど、環境問題の原因となる藻類として知られている。これまでに、Tanabe et al. (2007) による 7 つのハウスケーピング遺伝子を用いた *M. aeruginosa* 種内系統群の判別法によって、*M. aeruginosa* には遺伝的に分化した 11 のグループが存在し、このうち、グループ A、グループ B の一部、グループ X のみがミクロキスチン合成酵素遺伝子群を持つことがわかってきた。つまり、この方法を用いることで、ミクロキスチン合成酵素遺伝子群を持った種内系統群を判別することが可能である。しかしながら、この方法は 7 つの遺伝子配列を必要としており、多数の湖沼試料分析を必要とする湖沼の定期モニタリング調査に適用するには作業量が多いと思われる。そこで、本研究では湖沼の定期モニタリングに適用する目的で、7 つの遺伝子のうち、11 のグループ分けに対して最も系統的シグナルが高いと思われる *ftsZ* 遺伝子のみを用いて、*M. aeruginosa* 種内系統群の判別を試みた。

国立環境研究所が約 40 年間定期モニタリング調査を行っている霞ヶ浦の Station 1, Station 2, Station 3 において、2015 年 6 月、7 月、8 月に湖水試料を採集した。Station 3 については、7 月と 8 月に一回ずつの試料採集を追

加した。サンプリングした湖水からトータルDNAを抽出し、各DNA試料中の*ftsZ*遺伝子の増幅を行った後、次世代シーケンサーで塩基配列の取得を行った。

その結果、Station間で多少存在比は異なるものの、主としてすべてのStationで毒性の報告のない3つの系統群(グループ不明、グループG、グループI)が優占していたことがわかった。また、優占する系統群の存在比は1ヶ月以内にダイナミックに変化していたこともわかった。加えて、次世代シーケンサーから得られた種内系統群の存在比のデータに、リアルタイムPCRによる16S rRNA遺伝子のコピー数から得られた*M. aeruginosa*全体の存在量を加えることで、種内系統群の存在量をだまかに推定できることが示唆された。

P-14 農業生物資源ジーンバンクの微生物株カタログに菌類画像をリンクする

○山崎福容, 金子 繁, 小林ゆかり, 中島比呂美, 佐藤豊三, 竹谷 勝, 青木孝之, 根本 博
農業生物資源研究所

Fungal pictures have been linked to catalogue information of microbial strains in the NIAS Genebank

○Fukuhiro Yamasaki¹, Shigeru Kaneko², Yukari Kobayashi¹, Hiromi Nakajima¹, Toyozo Sato¹, Masaru Takeya¹, Takayuki Aoki¹, Hiroshi Nemoto¹

¹National Institute of Agrobiological Sciences, ²formerly National Institute of Agrobiological Sciences

2016年1月現在、農業生物資源ジーンバンクの微生物株オンラインカタログでは約25,100株が公開されている。これまで、同カタログ情報では、6,880株に約11,000のDNA塩基配列データ、約12,500株に約2,000植物病名の情報をリンク(そのうち3,200株は580病害と相互リンク)した。また、11,322株に延べ19,741編の文献情報をリンクし、ユーザーの利便性向上と微生物株の利用促進を図ってきた。

同ジーンバンクでは、菌類株の定期検査の際に顕微鏡で観察された孢子などの子実体やその種に特徴的な菌体を、DNA塩基配列を解析するための培養の際に寒天培地平板上のコロニーを撮り貯めてきた。これらの画像は、検査により異常が見つかったとき、あるいは塩基配列データによる同定結果と当該菌株の学名表示が食い違った場合に内部で検討・確認するための資料として蓄積してきたが、研究・教育にも有用な情報であるため、検査に合格した株については公開してユーザーの利用に供することとした。

今回、菌類約800株について1,000点以上の顕微鏡写真およびコロニー写真の裏表約7,000組をデータベース化し、各株のカタログ詳細情報にリンクした。画像はそれぞれ単独で検索エンジンに登録されたり、転載されてしまうこともありうるため、MAFF番号および学名を動的に合成し表示するようにした。この画像公開により、形態的特徴が分類同定の目安となっている菌類の重要情報をユーザーが得ることが容易となった。DNA塩基配列データだけではなく、孢子形成能や菌叢の特徴などが一目で判るため、分譲菌株を選ぶ場合大いに参考になる。また、すでに植物病原菌株は日本植物病名データベースとリンクしているが(佐藤ら, 2013)、菌類病の病原菌の形態が容易に閲覧できるため、病害の診断にも利用できる。そのほか、大学や専門学校等における教育において図鑑的な利用も考えられる。

参考文献

1. 農業生物資源ジーンバンク 2016. 微生物遺伝資源の検索.
http://www.gene.affrc.go.jp/?db_mc
2. 農業生物資源ジーンバンク 2016. 日本植物病名データベース.
http://www.gene.affrc.go.jp/?db_pldis
3. 佐藤豊三・山崎福容・竹谷 勝 2013. 進化を続ける日本植物病名データベース. 植物防疫 67 (1) : 39-43.

P-15 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 2015 年の活動と成果

○澤田宏之, 永井利郎, 一木 (植原) 珠樹, 埋橋志穂美, 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 FY2015

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

【収集・保存と特性評価】 農業や食品産業等に係る 1,224 株の微生物を新規登録し, 保存株数は 32,525 株 (公開率: 79.9%) となった。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 1,788 点の特性データを集積した。さらに, 植物病原糸状菌・酵母の rDNA ITS 領域や, 植物病原細菌の 16S rRNA 遺伝子等, 計 1,437 点の DNA 塩基配列の網羅的整備を行った。植物ウイルスについては, 289 株の外被タンパク質遺伝子の配列を決定・公開するとともに, その配列に基づいて分類検証を実施し, *Tobamovirus*, *Necrovirus* および *Fabavirus* に属する保存株の表示学名を更新した。また, 以下の分類検証 (①, ②) と特性評価 (③, ④) を外部委託により実施した: ①窒素固定細菌 (東京農工大学), ② *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* および *Exserohilum* 属菌 (農研機構・畜産草地研究所), ③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), ④キウイフルーツかいよう病菌の比較ゲノム解析 (農研機構・果樹研究所)。なお, オンラインでの微生物株データ登録システムについては, 現在, ジーンバンク内部で順調に運用されている。また, 画像, 表, 配列データ等も取り扱い可能な特性データ入力システムに関しては, 早期のオンライン化を目指して開発を進めている。

【ユーザーへの提供】 国内外へ 1,457 株 (申込 306 件) を配布し, それらは分類・同定, 薬剤感受性, 病害診断等に関わる試験研究・教育に利用された。また, 「微生物遺伝資源データベース」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, 864 保存株と 211 病名を新たにリンクさせた。ウェブ上での特性データ公開システムについてはプロトタイプの開発が完了し, 一般公開に向けて検証作業を進めている。また, 保存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 37 号「もやしとその原料の腐敗・汚損菌類」, 38 号「イネいもち病真性抵抗性遺伝子型の推定とその供試菌系」の 2 編を刊行し, 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#micro_manual)。

P-16 NBRC カルチャーコレクション 平成 27 年度事業報告

○崎山弥生, 小林美穂, 江頭博子, 西村美恵子, 川崎 恵, 藤田克利, 鎌田 幸, 中川恭好, 山崎秀司, 鈴木健一朗, 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 FY2015

○Yayoi Sakiyama, Miho Kobayashi, Hiroko Egashira, Mieko Nishimura, Megumi Kawasaki, Katsutoshi Fujita, Sachi Kamata, Yasuyoshi Nakagawa, Shuji Yamazaki, Ken-ichiro Suzuki, Yasushi Noto
NITE Biological Resource Center (NBRC)

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, DNA クローンのほか, NBRC 株のゲノム DNA の提供も行っている。以下に平成 27 年度に実施した事業の実績について報告する。

1. 収集実績

I. 微生物株 新たに 791 株に NBRC 番号を付与した。NBRC 株としての保有数は, 30,800 株で, 平成 27 年末 19,175 株を公開・分譲している。

II. DNA リソース 微生物ゲノム DNA は主にゲノム解析株や BSL2・難培養微生物を対象に選定し, 4 株を追加した。また, ヒト Gateway エントリークローンは糖鎖関連クローン 150 個を公開した。現在, 微生物ゲノム DNA 85 種類, 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 43,567 種類等を公開・分譲している。

2. 分譲実績

- I. 微生物株 国内 7,774 株, 海外 518 株, 計 8,292 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 57 個, ヒト cDNA クローン 57 個, ヒト Gateway エントリークローン 62 個の計 178 個であった。

P-17 NIES 藻類コレクションの 2015 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地球・人間環境フォーラム, ²国立環境研究所

NIES Collection activity report for 2015

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, 環境研究のみならず, ライフサイエンス研究に重要なモデル生物や応用利用に有用な保存株の整備が進められてきた。現在では, 様々な研究に利用可能な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 2016 年 3 月現在で 3,542 株であり, そのうち 2,604 株を公開している。

2015 年度の方譲数は 2016 年 2 月末において, 354 件で国内 808 株, 国外 161 株, 合計 969 株である。国内の民間企業向けの方譲と教育用方譲の増加が目立っている。方譲目的別には, バイオマスよりも有用物質を目的とする方譲が増加傾向にある。また培地方譲は, 昨年度の 60 件から 81 件に増加した。

2015 年度の新規寄託株は, 現在のところ 170 株となっている。新規記載種 11 株, ゲノム解読株 4 株, 寒冷適応株の 11 株が含まれている。その他, 国立環境研が行う霞ヶ浦の長期モニタリング事業に関連するプロジェクトにおいて, 霞ヶ浦産微細藻 56 株が確立され, 遺伝子情報とともに寄託が行われた。

長期保存に関しては, 新規に 59 株の凍結保存移行を進めるとともに, 凍結困難なプラシノ藻や珪藻株の凍結保存条件の検討, そしてラビリンチュラ類の L-乾燥保存の検討等を行った。

広報活動としては, 2016 年 1 月末にメールニュース第 1 号の配信を行い, 今後, 年 3 回の頻度で利用者への配信を行う予定である。また藍藻の分子生物学大会と日本藻類学会大会 (予定) において, アンケートを実施し, 新規顧客開拓のためのニーズ調査を進めている。さらに 2016 年度には, 新たなホームページデザインに改訂する予定である。

保存株の付加情報の整備として, 保存株の地理情報の収集と GBIF への登録 (2015 年度 536 件), 成果発表論文の収集と公表 (78 報), 光合成色素組成 (34 株) と有用脂肪酸 (15 株) のデータ整備, そしてシアノバクテリア株 (8 株) のゲノム情報整備を行った。

P-18 NBRC における RD 株の提供事業の紹介

○近藤 詞, 安齋こずえ, 江頭博子, 稲葉重樹, 中川恭好, 山崎秀司, 鶴海泰久, 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)

Introduction of the RD strains in NBRC

○Tsukasa Kondo, Kozue Anzai, Hiroko Egashira, Shigeki Inaba, Yasuyoshi Nakagawa, Shuji Yamazaki, Yasuhisa Tsurumi, Yasushi Noto

NITE Biological Resource Center (NBRC)

RD 株 (スクリーニング株) は, 基礎研究や新製品開発のためのスクリーニング材料として, 国内の企業や大学の研究者に向けて NBRC が提供している菌株コレクションである。RD 株は NBRC 株と異なり, 種レベルの学名や菌株性状などの情報は一部を除き付与されおらず, 形態観察および遺伝子の塩基配列情報によって, 属レベルまで同定された菌株である。提供方法は利用者が 1 年毎に利用料を支払う方法をとっている。利用料は 1 株あたり年間 500 円もしくは 1,000 円であり, 一部の菌株の利用料は 2 年目以降に減額となる。RD 株の提供事業は 2004 年より行ってきた。

RD 株は国内由来の菌株と海外由来の菌株があり, 国内由来株はさらに, 外部機関より譲渡を受けた I 類と,

NBRC 職員が分離した II 類の 2 つの区分に分けられている。国内由来株は、日本各地の温泉などの特殊環境や、海水、海洋生物、原油、堆肥および伝統的な発酵食品などの分離源から収集した菌株である。海外由来株はインドネシア、モンゴル、ミャンマーおよびベトナムとの共同研究に基づいて収集した菌株である。なお、NBRC は生物多様性条約を遵守するため、これらの国と微生物資源の保全と持続可能な利用に関する覚書 (MOU) および共同研究契約 (PA) を締結している。海外由来株は、塩湖などの特殊環境や熱帯地域の土壌や植物、各国の伝統的な発酵食品などの分離源から収集した菌株である。これらの RD 株には分類学的に新規な菌株が多数含まれる。また、バイオレメディエーションやバイオマス利用の研究に有用な性状を有していることが明らかな RD 株も含まれている。RD 株は、2016 年 3 月現在で国内由来株 31,260 株、海外由来株 27,101 株の計 58,361 株を保有し、そのうち国内由来株 29,588 株、海外由来株 25,132 株の計 54,720 株を公開している。

NBRC はホームページにてインドネシア由来の菌株を除いた RD 株の菌株情報をリスト形式で提供しており、新規に追加された RD 株の菌株情報も随時公開している。

2016 年 3 月現在の新規利用者・継続利用者を合わせた RD 株の利用数は国内由来株が 77 件 6,106 株、海外由来株が 13 件 3,472 株である。

P-19 2015 年度 JCM 活動報告

○押田祐美, 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, 草桶佳代, 鈴 幸二, 大熊盛也

理研 BRC-JCM

JCM activity report in FY2015

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

RIKEN BRC-JCM

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、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。多様な細菌・アーキア・真菌の微生物種を整備対象とし、文部科学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ており、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目指している。2016 年 2 月末現在の保有株数は 25,123 株で、そのうち 15,459 株 (8,122 種) を公開している。以下、2015 年度の JCM の活動を報告する (2016 年 2 月末現在のデータ)。

寄託においては、21 カ国から 543 株の寄託を受け、このうち 83% が海外からの寄託であった。受託時の受入検査では、約 9% の寄託株において生育不良や汚染、性状ならびに遺伝子塩基配列の不一致等の不備が判明した。これらの不備は寄託者と協力しつつ可能な限り是正し、高品質で正確な株のみが収集・保存されるように努めている。適切な保存および品質検査を実施した後、寄託者からの依頼により細菌・アーキアの新種等の記載に必要な「寄託ならびに公開の証明書」を発行している。2015 年度の発行数は 346 通 (346 株分) であった。

提供事業では、33 カ国に 3,769 株を提供し、そのうち海外への提供は 37% であった。利用者の利便性向上を目的に、JCM 株の「ゲノム DNA での提供」およびユーザーからの依頼を受けて (アンプル等より) 培養する「依頼培養微生物株の提供」も実施している。ゲノム DNA は 179 株、依頼培養微生物株は 25 株を提供した。

JCM 株を利用した研究成果として、2015 年には基準株を JCM に寄託した新種記載論文を含め、原著論文 600 報以上が発表された。

保有株の付加価値向上への取り組みの主なものとしては、NBRP ゲノム情報等整備プログラムでの支援のもとに前年度より実施してきた JCM 保有の酵母・糸状菌のドラフトゲノム情報解析を終了した。2016 年 2 月より約 120 株のドラフトゲノム配列データを JCM の HP および DDBJ 等の公的データベースで公開を開始した。

P-20 2015年度のFMRC活動報告について

○早乙女 梢, 前川二太郎, 牛島秀爾, 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 FY2015

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

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

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。2012年6月以降、保有菌株 (TUFC株) の一部を公開し、それらの分譲提供サービスに加え、菌株の詳細をオンライン上のデータベースで公開するなど、菌株保存機関としての機能も果たしている。

2015年度は、継続的にTUFCコレクションの充実を進め、その結果、72属80種98株を新規登録し、総計菌株保有数は510属1,465種8,387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TUFC株の評価も進め、2016年4月までの分譲可能株数は総計284属594種1,231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計21件243株であった。

2014年度より開始しているTUFC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として、145属199種からなる486サンプルを作製し、創薬リード化合物や生物農薬の開発につながる有用生理活性物質の探索研究を実施した。同時に、TUFC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。

2015年度は、日本微生物資源学会第22回大会 (9月) を主催し、また、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は、鳥取県と東京都にて、計約230名が参加する一般向けの公開シンポジウム (11月・3月) や顕微鏡実習を含むきのこの観察講座 (7月) を一般公開講座として開催・実施した。

今後は、TUFCコレクションの充実と公開を進めていく一方で、今後は菌株寄託制度を整備するとともに、各菌株の特性・性状を付加するための基盤研究を実施することで、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-21 病原真菌・放線菌の収集、保存、分譲—いかなる感染症にも備えて

○矢口貴志, 田中玲子, 伊藤純子, 渡辺 哲, 五ノ井 透, 亀井克彦

千葉大学真菌医学研究センター

Collection, preservation and distribution of pathogenic fungi and actinomycetes-preparing any mycoses

Takashi Yaguchi, Reiko Tanaka, Junko Ito, Akira Watanabe, Tohru Gonoï, Katsuhiko Kamei

Medical Mycology Research Center, Chiba University

NBRP「病原微生物」では、第3期開始時に次の4点を目標として、今後いかなる感染症が起ってもそれに対応できる病原微生物株コレクションを目指してきた。

- (1) 基準株 (あるいは標準株) の充実
- (2) 二種、三種、四種の特定病原体と感染症法対象の病原菌の収集
- (3) これまで感染例の報告のある菌種の網羅的収集
- (4) 重要な菌株の遺伝子情報の整備

千葉大学真菌医学研究センターにおいては、これまで病原真菌・放線菌として報告された菌種を中心に標準株としての利用価値のある品揃えを目標とし、正確な臨床情報が付加された新鮮な臨床分離株を医療機関と連携して収集している。特に、近年、医真菌分野で着目されている菌種、例えば薬剤耐性を有する *Aspergillus* を重点的に収集した。

病原真菌は、かつては形態による同定のみが行われており、遺伝子情報の活用は細菌より遅れていた。現在では、全菌株において特定の遺伝子および形態情報により同定を実施し、正確性が向上した。一部の菌種では、菌種特異的プライマーを設計し、迅速な同定を実施している。

病原真菌・放線菌の基本的取り扱いの知識と技術を習得するために、実習を中心とした講習会を、年1回開催している。2015年度は29回目に当たり、例年、定員を大きく超える応募があり、大変好評を得ている。また、附属病院と連携し、日本で初めて真菌外来を開設し、全国から患者が診察を受けに来ている。さらに、医師に対して、真菌症の治療に関するコンサルタントを実施している。これらにより、医療機関との連携を強化し、菌株収集に繋

げている。現状、大学からはバイオリソース管理室として、独立した組織で菌株の収集、分譲を実施しており、スタッフも配置されている。

P-22 病原細菌コレクションの今後の展望

○林 将大¹, 江崎孝行¹, 田中香お里¹, 児玉年央², 飯田哲也²

¹ 岐阜大学微生物遺伝資源保存センター, ² 大阪大学微生物病研究所

Prospects for the future of pathogenic bacterial collection

○Masahiro Hayashi¹, Takayuki Ezaki¹, Kaori Tanaka¹, Toshio Kodama², Tetsuya Iida²

¹Center for Conservation of Microbial Genetic Resource, Gifu University, ²Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

グローバル化した社会での感染症研究の重要性が高まる中、微生物を使った教育や基礎研究、薬剤耐性を獲得し変貌し続ける微生物に対する新しい診断薬や治療薬の開発には、質の高い病原微生物の菌株を使用することが重要である。それら病原微生物の系統保存事業として National BioResource Project (NBRP) の支援の下、中核機関の千葉大学が真菌、長崎大学が原虫を取り扱い、病原細菌については、大阪大学微生物病研究所・病原微生物資源室および岐阜大学医学系研究科・医学部微生物遺伝資源保存センターが菌株の収集、保存、提供を行ってきた。

病原細菌では、基準株の充実、バイオセーフティーレベル 2, 3 の高度病原体、これまでに症例報告のある全ての菌種、感染症の動向調査や薬剤開発のために必要となる臨床分離株等を収集・保存・提供することを主たる目的としている。また、重要な菌株の遺伝子配列を決定し、その遺伝子情報、生化学的性状など、臨床情報等をデータベースとして公開している。しかしながら、細菌に要望される保有菌株情報は、病原性因子情報、薬剤耐性情報、血清型情報など、真核生物である真菌や原虫とは大きく異なり、データベースの構造も細菌に焦点を合わせた独自の構成が必要になってきている。

NBRP による本事業は平成 28 年度が第 3 期の最終年度である。そこで、平成 29 年度から始まる第 4 期に向けて、細菌の特色を生かした国際的にアピールできる保存事業の展開を求められていることから、細菌に特化した形での申請を見据え、さらなる事業拡大を目指し、岐阜大学では医学系研究科附属のセンターから岐阜大学附属の研究センターとして位置づけ、岐阜大学研究推進・社会連携機構微生物遺伝資源保存センターとして新たにスタートしていく。

既に細菌独自のデータ項目を追加したデータベースを構築し、JNBP (Japan National Bacterial Pathogen Data Base) として公開を開始している。本発表では、今後、新しい連携先として予定している各大学の特徴を生かし、第 4 期への申請に向けて構築している体制について報告する。

P-23 NEKKEN バイオリソースセンター (熱研生物資源室 NBRC) の病原性原虫コレクション

○森田公一¹, 平山謙二², 金子 修³, 濱野真二郎⁴, リチャード・カレトン⁵, 柳 哲雄⁶

長崎大学熱帯医学研究所¹ ウィルス学分野, ² 免疫遺伝学分野, ³ 原虫学分野, ⁴ 寄生虫学分野, ⁵ マラリア・ユニット, ⁶ 熱研生物資源室

Collection and supply of pathogenic protozoan resources by NEKKEN Bio-resource Center

○Kouichi Morita¹, Kenji Hirayama², Osamu Kaneko³, Shinjiro Hamano⁴, Richard Culleton Leighton⁵, Tetsuo Yanagi⁶

¹Dept. Virology, ²Dept. Immunogenetics, ³Dept. Protozoology, ⁴Dept. Parasitology, ⁵Malaria Unit, ⁶NBRC, Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University

熱研生物資源室 (NEKKEN バイオリソースセンター) では、主としてヒトに感染し、ヒト体内で増殖する結果、人体に障害を及ぼす病原性原虫を収集保存し、研究者や研究機関へ提供している。研究材料ばかりでなく、当室で製作した顕微鏡標本なども医療教育機関に供給する。ところで、ネグレリア症、アカントアメーバ症、アメーバ赤痢、マラリア、アフリカ睡眠病、シャガス病、カラザール、皮膚リーシュマニア症、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、トリコモナス症、イソスポーラ症、サイクロスポーラ症、肉胞子虫症、バランチジウム症、微胞子虫症、プラストシスチス症などの原因菌はみな原虫である。これらの感染方法も多様で、ヒトからヒトへ直接感染するものもあれば、昆虫によって媒介されるものも多い。後者では、昆虫体内と哺乳動物体内とで異なる環境に適応するために、原虫は相応の発育ステージに変化し、原虫のライフ・サイクルは非常に複雑になる。たとえば、シャガス病を引き起こすクルーズ・トリパノソーマ原虫をリソース・ユーザーに提供する場合は、まず株

を選択し、どの発育ステージが必要かをたずねる。昆虫ステージである①エピマスティゴート・フォームも②メタサイクリック・フォームも、哺乳動物ステージの③組織型アマスティゴートも、血液体液型の④スタンピー・トリポマスティゴートも⑤スレンダー・トリポマスティゴートもみなクルーズ・トリパノソーマ原虫でありながら、培養法がそれぞれ異なり、そのどれでもよいわけではなく、その中から利用者のリクエストに沿うのを準備する。この例では、1株について5種類の選択肢になる。最近、研究機関は生きた病原体をそのまま受け入れることを制限しているため、当方で培養増殖後に製品化して提供するケースが増えてきた。原虫リソースの収集・保存・提供のためには、原虫生物学、原虫感染症学、原虫培養法、核酸取り扱い等広汎な知識と技術が必要となっている。平成27年度の実績（平成28年2月末現在）は、オンラインによる原虫株情報公開数は111件、寄託も含めた収集数33株、累積保存数780株、提供数70株、標準基準株保有数45であった。下図は、NBRP HP オンライン上に公開中の原虫株リソースの種類である。

