

NUMBER 24

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

RESEARCH  
COMMUNICATIONS

2010

# RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 24



2 0 1 0

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA (IFO)

Published by

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

17-85, JUSO-HONMACHI 2-CHOME

YODOGAWA-KU, OSAKA 532-8686, JAPAN

# 財団法人発酵研究所

理 事 長	波多野和徳		
常務理事	中濱 一雄		
理 事	大嶋 泰治	木村 光	
	武田 光子	富田 房男	
	中瀬 崇	古川 謙介	
	別府 輝彦	本田 武司	
監 事	岡田 将生	田浦 清	
評 議 員	今田 哲	魚住 武司	
	北本勝ひこ	下田 親	
	竹内 昌男	谷 吉樹	
	土屋 英子	豊島久真男	
	松原 謙一	吉田 敏臣	
顧 問	坂野 獻		

## 目 次

報告集の刊行によせて	波多野和徳	1
第4回助成研究報告会の開催		2
永久凍土・氷楔中に存在する微生物の網羅的単離・分類とその保存	浅野 行蔵	7
極小微生物(nanobes)の分離培養と系統分類に関する研究	長沼 育	17
難培養性放線菌類の分離と分類および生物活性物質探索への応用	高橋 洋子	31
昆虫共生酵母の系統分化と地理分布：シーズ開拓のためのフロラ解析	梶村 恒	43
国内亜熱帯地域に分布するコウヤクタケ類(担子菌門)の種多様性解析 および遺伝資源の保存	前川二太郎	59
有毒ラン藻 <i>Microcystis</i> における生物学的種認識に関する研究	田辺 雄彦	69
プロバイオティクス有用性の分子基盤解明・腸内細菌の自然免疫活性化因子の 単離と構造解析	藤本ゆかり	81
細菌およびウイルス感染を同時に防御する新手法に関する研究	度会 雅久	91
細胞表層の改良による有害重金属の吸着・回収が可能な 環境浄化酵母の創製	黒田 浩一	101

我が国における微生物の多様性解析とインベントリーデータベースの構築	
-亜熱帯域と冷温帯域の比較から-	関 達治…111
1) 日本の亜熱帯域および冷温帯域の糸状菌類相の多様性とその比較	景山 幸二…117
2) 日本の亜熱帯域および冷温帯域の酵母相の多様性とその比較	高島 昌子…157
3) 日本の亜熱帯域および冷温帯域の放線菌相の多様性とその比較	早川 正幸…169
琵琶湖の水質と環境浄化に関する研究-ヨシ帯とそこに生息する微生物が 果たす役割の解明-	森崎 久雄…187
1) 栄養物質の動態およびヨシのバイオフィルムをめぐる食物連鎖の解析	今井 一郎…193
2) ヨシ帯に由来するアオコ抑制微生物の生理生態学的研究	今井 一郎…201
3) 琵琶湖ヨシ帯の脱窒活性と脱窒細菌の分子生態学的研究	左子 芳彦…213
4) 琵琶湖におけるヨシ付着藻類の群落構造 -二次遷移と水質の影響に着目して-	大塚 泰介…223
5) ヨシ表面バイオフィルムの諸性質の解析および水浄化への応用	森崎 久雄…233

## 報告集の刊行によせて

財団法人発酵研究所  
理事長 波多野 和徳

ここに財団法人発酵研究所第4回助成研究報告集を発刊する運びとなった。当財団の研究助成事業に携わる一人として大変うれしく思っている。助成を受けて実施された今回の諸研究は、ますます多様性に富み、内容も極めて充実していて興味深いものになっている。これも研究者の方々がこの事業をよくご理解していただき、ご協力下さった賜であると心から感謝する次第である。

さて、財団法人発酵研究所は、1944年に政府（内閣技術院）と武田薬品工業株式会社が「有用微生物を収集、保存、配布の事業とこれらの微生物を利用して航空用燃料、食糧、医薬品の研究を進める」ことを目的として共同で設立した財団法人航空醸酵研究所が基になっている。以来、60年余りに渡って多様な微生物株を収集、保存、研究し、世界的に認められた微生物株保存機関を築き上げ、国内外の学術や産業における微生物研究の発展に寄与してきた。しかし、2002年に政府の要請を受け財団に保存されていた微生物株とその研究機能を木更津市に設立された独立行政法人製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源保存センター（NBRC）へ移管し当初の使命を終えた。

当財団は事業の継承を計るため2003年から新たに微生物の研究者に対する支援事業を開始した。これは、1961年に財団法人発酵研究所が応用研究部門を切り離し、微生物株保存事業に専念する際に掲げた「発酵に関する研究を行い、あわせて発酵菌を収集し、保存し、利用に供して学術および産業の発展に寄与する」という高い理念を受け継ぎ発展させたものである。研究支援の対象とした主たる分野は、1) 従来当財団が実施していた微生物の分離・分類・同定・保存などに関与する研究、2) 微生物の産業利用などへの道を拓く発酵生理に関する研究、および3) 微生物が関与する健康ならびに環境に関する研究である。さらにこの研究支援のみならず、微生物学を基礎から教育する場を広げるための寄付講座を大学に設置する助成事業も始めている。近年、ゲノム情報を用いた研究の進展はめざましい。種々の微生物の全ゲノムの解析が進み、これらのゲノム情報を利用した研究は膨大な量となってきた。当財団の研究支援はこの分野に対し充分な対応をしていないが、いずれこの進歩に見合った対応がされていくだろう。当面、研究支援の対象は生きた微生物の遺伝資源の解明と開発が主となり、ゲノム情報はその中で生かされ利用されるものと考えている。ともあれ、当財団からの研究支援が微生物研究者を勇気づけ、研究のさらなる発展の一助となるよう期待している。

## 第4回助成研究報告会の開催

第4回助成研究報告会を平成22年6月3日千里ライフサイエンスセンター5階サイエンスホールに於いて開催した。今回は平成19~21年度に一般助成を受けた9名の研究者とプロジェクト研究(特定研究)に対して助成を受けた2件の研究チームのリーダー2名がそれぞれ3年間に得た研究成果を講演した。参会者は145名であった。

開会にあたって本年6月に当財団理事会において選任された波多野和徳理事長から「森田から理事長を引き継ぎましたが、これまでと同様当財団にたいしてご支援を頂きたい。2003年に微生物の研究に対する助成事業を行なうことになってから7年を経過した。これまで3回の助成研究報告会が開催され、いずれの回においても有意義な成果が得られ、この研究助成が無駄ではなかったと自負している。ここに第4回の助成研究の成果報告会を開催いたしますが、報告される内容はますます多岐にわたり、充実したものになっていると確信いたしております。また本報告会には多様な研究分野のエキスパートに参加していただいておりますから、単に研究成果を発表するだけでなく、広くいろんな面からの質疑と議論を頂きたくプログラムを立てております。是非とも活発な論議がなされますようお願いを申し上げます。」との挨拶があった。

次いで、助成を受けた研究者からそれぞれの研究成果が報告された。研究課題『(1) 微生物の分類学的研究および培養株の保存に関する研究』について、7題のうち、1. 永久凍土・氷楔中に存在する微生物の網羅的単離・分類とその保存(浅野行蔵)、2. 微生物(microbes)より小さい微小微生物(nanobes)の単離・系統分類・保存に関する研究(長沼 肇)、3. 難培養性放線菌の分離、分類及び保存法の研究(高橋洋子)の3題は関 達治 大阪大学名誉教授の座長のもとで、4. 昆虫共生酵母の系統分化と地理分布: シーズ開拓のためのフロラ解析(梶村 恒)、5. 国内亜熱帯地域に分布するコウヤクタケ類(担子菌門)の種多様性解析および遺伝資源の保存(前川二太郎)、6. 有毒ラン藻 *Microcystis* における生物学的種認識に関する研究(田辺雄彦)、および7. 特定研究: 我が国における微生物の多様性解析とインベントリーデータベースの構築-亜熱帯地域と冷温帯地域の比較から-(関 達治)の4題が中瀬 崇理事(理化学研究所名誉研究員)の座長の下に発表された。次いで研究課題『(2) 健康や環境に関する微生物の研究』については木村 光理事(京都大学名誉教授)の座長の下に8. プロバイオティクス有用性の分子基盤解明 -腸内細菌の自然免疫活性化因子の単離と構造解析(藤本ゆかり)、9. 細菌およびウイルス感染を同時に防御する新手法に関する研究(度会雅久)、10. 細菌表層の改良による有害重金属の吸着・回収が可能な環境浄化酵母の創製(黒田浩一)、11. 特定研究: 琵琶湖の水質と環境浄化に関する研究 -ヨシ帯とそこに生息する微生物が果たす役割の解明 - (森崎久雄) 4題の発表が行なわれた。各演者の報告内容は本助成研究報告集に掲載されている。それぞれの報告について多方面の分野から正鶴をえた質疑と討議がなされ、若い研究者からの発言も活発にだされて、有意義で充実した報告会となった。

このあと、懇親会が催され報告会出席者の殆どが参加した。別府輝彦理事(東京大学名誉教授)の挨拶に続いて、大嶋泰治理事(大阪大学名誉教授)の発声で乾杯をして、立食式のパーティーが行なわれた。報告会の内容についての追加の質疑討論もなされ、また当財団の助成により3大学に開設された寄附講座の担当教員(京都大学、島 純特定教授; 北海道大学、鎌形洋一客員教授; 九州大学、河原林裕客員教授)の紹介と挨拶もあって、話題が盛り上がった。さらに各分野の微生物研究者の間で和やかな歓談と交流が見られた。本報告会と懇親会が異なる分野の微生物科学の研究者の交流の場としても役立っているようで、主催者として真に有難く思っている。

なお、来年度の第5回助成研究報告会は平成23年6月8日を予定している。

報告会と懇親会の模様の一部を以下の写真で紹介します。

(文) 坂野 熊



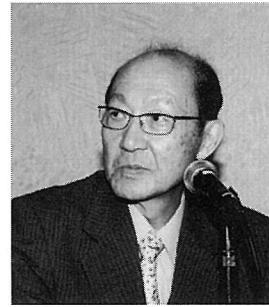
波多野和徳 理事長



座長 関 達治  
大阪大学名誉教授



座長 中瀬 崇 理事



座長 木村 光 理事



浅野 行蔵 氏



長沼 豊氏



高橋 洋子 氏



栗村 恒 氏



報告会



前川二太郎 氏



田辺 雄彦 氏



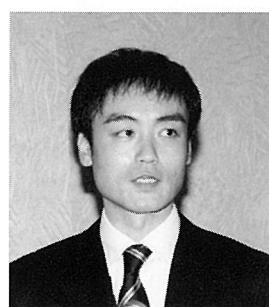
関 達治 氏



藤本ゆかり 氏



度会 雅久 氏



黒田 浩一 氏



森崎 久雄 氏



挨拶 別府輝彦 理事



乾杯 大嶋泰治 理事



懇親会

# 平成19年度研究助成の研究報告

助成期間：平成19年4月～平成22年3月

# 永久凍土・氷楔中に存在する微生物の網羅的単離・分類とその保存

## 浅野行蔵

北海道大学大学院農学研究院  
〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

### Exhaustive isolation, identification and preservation of microorganisms from a permafrost ice wedge

Kozo Asano

Research faculty of Agriculture, Hokkaido University  
N9W9, Kita-ku, Sapporo, 060-8589, Hokkaido

Heterotrophic bacteria and fungi from a permafrost ice wedge were revived to their active state after being preserved for thousands of years under subzero temperature and starving condition. Most of the isolated bacteria were non-spore forming and were affiliated with *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Firmicutes*. Two groups of novel strains, which can grow at  $-5^{\circ}\text{C}$  by changing their cell wall fatty acid compositions, were isolated on diluted or mineral agar plates and were proposed as a novel genus and species. The phylogenetic profiles of partial 16S rRNA genes from the isolates were different from those of clones from the ice wedge DNA. Most fungal isolates from Alaskan ice wedges belong to genus *Geomyces*, an anamorph state of *Pseudogymnoascus* sp. and *Rhodotorula glacialis*, whose sequences are related to those of isolates from cryopeg in Russia and Alpine glaciers, respectively.

Key words: permafrost ice wedge, adaptation to sub-zero temperature, phylogenetic analysis

## 緒 言

地盤などが2年間以上凍結した状態を保つのを永久凍土と定義するが、地球上の陸地に分布する永久凍土の面積は、氷河・氷床よりも広く14%を占める（福田ら、1997）。

氷楔（ice wedge）という地形は温度の低い冬の永久凍土層に亀裂が生じ、春、夏、秋の間に新たに堆積した又は融けた最上層から水や雪、土の一部が流れ込み、凍土層内部で凍結するというサイクルを繰り返して成長すると考えられている（Mackay, 1972）。何万年あるいは何十万年というような長い期間に渡って形成され、永久凍土層ではごく普通に観察される地形である

(French, 1976)。氷に葉脈構造を持つことで (Fig. 1)，形成後一度も融解していないことが推測される。もし、土などと共に閉じ込められ生きている微生物がいるとしたら、測定された氷の年代から現在までの間

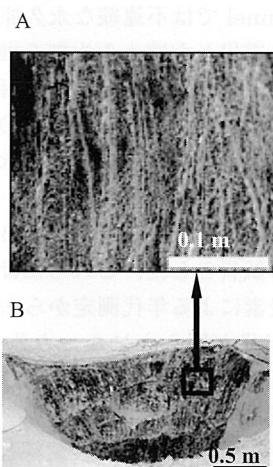


Fig. 1 Fabrics of ice wedge in the Fox permafrost tunnel.  
A. Foliation of ice indicating annual veinlets.  
B. Exposed part of the ice wedge.

E-mail: asanok@chem.agr.hokudai.ac.jp

共同研究者：Thomas A. Douglas (Cold Regions Research and Engineering Laboratory, USA), Anatoli Brouchkov (Geocryology Department, Moscow State University) 福田正巳 (International Arctic Research Center, University Alaska), 田中みち子 (北海道大学大学院農学研究院)

氷点下でずっと生き残っていたことになる。

シベリア、アラスカの永久凍土や南極・北極からは、クローンや単離株として真菌、真正細菌、古細菌が見つかり新種提案されているものもある (Gilichinsky *et al.*, 1995; Gilichinsky, 2002; Gilichinsky *et al.*, 2005; Steven *et al.*, 2006; Sheridan *et al.*, 2003a; Bowman & Nichols, 2005; Pikuta *et al.*, 2005). 氷河にも多くの低温適応細菌が存在し、これまでに新属新種の微生物が数多く単離された (Sheridan *et al.*, 2003b; Miteva *et al.*, 2004; Xiang *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2008).

これら低温凍結環境における微生物の存在や単離方法、生存戦略に対する関心は、火星やエウロパ (Europa, Jupiter II) での氷の存在の可能性が話題になると共に高まってきた。また、永久凍土層に形成される氷構造のうち、比較的混入物の少ない状態で何万年もの間凍り続けた氷楔は、時代を追い長期にわたって保存された微生物の宝庫、即ちタイムカプセルであると考えられる。この氷楔中で何万年もの間生き残ることができる微生物の網羅的単離解析を行った例はこれまでになく、私たちはこれを研究対象とした。本報告では、できるだけ多様な微生物を氷から単離するために筆者らが取った方法とその結果、単離株の中から得られた新属新種放線菌 2 株について報告する。

## 実験方法

**氷楔の採取** 氷楔試料は、2007年から2009年にかけ、アラスカ (N64°57., W147°37.) 及びシベリア (N62°59., W133°58.) で採取した。アラスカ州フェアバンクス市中心から 15 Km のところにある Fox Permafrost Tunnel では不連続な永久凍土中に掘ったトンネル内に、露出した凍土や氷楔を融かすことなくおよそ -4°C に保ち、科学的調査に利用している (Johansen *et al.*, 1988)。トンネル内の凍土層に含まれる有機物の年代測定によりこれらの氷楔を含む堆積層は 31000 年前から 14000 年前の物と推定された (Sellmann, 1967)。その凍土層に露出した 6 つの氷楔をアラスカの試料とした。これらには氷楔内に含まれるメタンの炭素による年代測定から 25000 年前及び 16200 年前と年代が明らかになった氷楔を含む。また、同様な緯度の不連続永久凍土層に位置するシベリア、アルダン川流域のマンモスマウンテンに露出したいくつかの氷楔をシベリアからの試料とした。殺菌したドリルの歯・斧・鋸を用い、露出した表面の氷をのぞいた後に、100 g~3 kg の氷塊試料を切り出し、凍ったまま研究室に運んだ。

### ▶ Complex media

1. Luria-Bertani medium (LB)
2. LB + 1% D-glucose (LBG)
3. 4 x conc. R2A medium (R2B)

\*Minimal Medium (per liter)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mg

### ▶ Diluted complex media

4. 100-fold diluted LB (1/100 LB)
5. 100-fold diluted LBG (1/100 LBG)
6. Hickey-tresner diluted medium with antibiotics (HTDA)

Trace elements \*\*

Agar; 2.0% pH 7.0

### ▶ Defined media

7. Minimal medium (MM) \*
8. MM + 0.5% D-glucose (MMG)
9. MM + 1% the supernatant of melted ice, filter- sterilized (MME1)
10. MM + 10% the supernatant of melted ice, filter-sterilized (MME2)

\*\* Trace elements (per liter)

MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 µg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 µg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10 µg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 µg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 µg

Fig. 2 Isolation media.

**微生物単離法** できるだけ多くの異なる好気性従属栄養細菌を単離するため、以下の点について考慮した。①平板上に出てきたコロニーを観察し、色、大きさ、形、コロニーが形成されるまでの時間の異なるものをまず選んだ。コロニー PCR 法で 16S rRNA 遺伝子の部分配列を読み、その配列に基づいて分類し、グリセロールストックとした。真菌は表現形質の異なるコロニーを複数選びすべてグリセロールストックとした。②平板培地として 10 種の栄養寒天培地を用いた。③低温で培養後、1 週間ごとにプレートを観察し、長い培養時間を必要とするコロニーも選択した。④参考として同じ氷楔サンプルからの DNA を用い、非培養法による微生物の解析を行った。

アラスカ氷楔試料は、氷塊試料を成分分析用と微生物分析用に分けた。微生物分析用には氷表面の微生物をのぞくため、エタノールと火炎により表面殺菌し融かした後、一部を滅菌済み生理的食塩水にけん濁し、寒天培地上に広げた。残りの大部分の融解物を遠心処理 (×8000 g, 4°C, 15 分間) 後に、上清は一部の培地成分として、沈殿部は DNA 抽出用に供した。培地成分を Fig. 2 に示した。3 種の天然培地の他に、100 倍・10 倍希釈培地、抗生物質添加ヒッキートレスナー希釀培地、無機塩培地に氷の上清をフィルター滅菌し、培地成分に加えたものを使用した。15°C で培養後、約 1 ヶ月にわたり、各培地から、細菌、酵母、糸状菌を単離した。

**塩基配列の解析** 単離株のコロニーを鋳型とし、細菌 16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマー 27F 及び 520R を用いて增幅後、塩基配列は Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction kit

(Applied Biosystems) を用い、ABI model 3100 (Applied Biosystems) にて読んだ。得られた塩基配列から DOTUR プログラム (Schloss *et al.*, 2005) を用い、分類操作単位 (OTU) の数を求め、それぞれの OTU 配列は BLAST を利用し GenBank データベースにて相同検索を行った。OTU 配列とそれぞれの相同配列は、分子系統解析ソフト ARB (Ludwig *et al.*, 2004) を用いてアライメントを行い、MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) を利用して、近隣結合法 (Saitou & Nei., 1987) により系統樹を作成した。トポロジーの信頼性はブーツストラップ解析 (Felsenstein, 1985) により確かめた。真菌の染色体 DNA からは、5.8S rRNA 遺伝子を含む Internal transcribed spacer (ITS) 領域及び 26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域の塩基配列を読み、細菌と同様に相同性検索を行った。得られた相同配列と共に ClustalW (Thompson, *et al.*, 1994) でアライメント後、細菌と同様系統解析を行った。

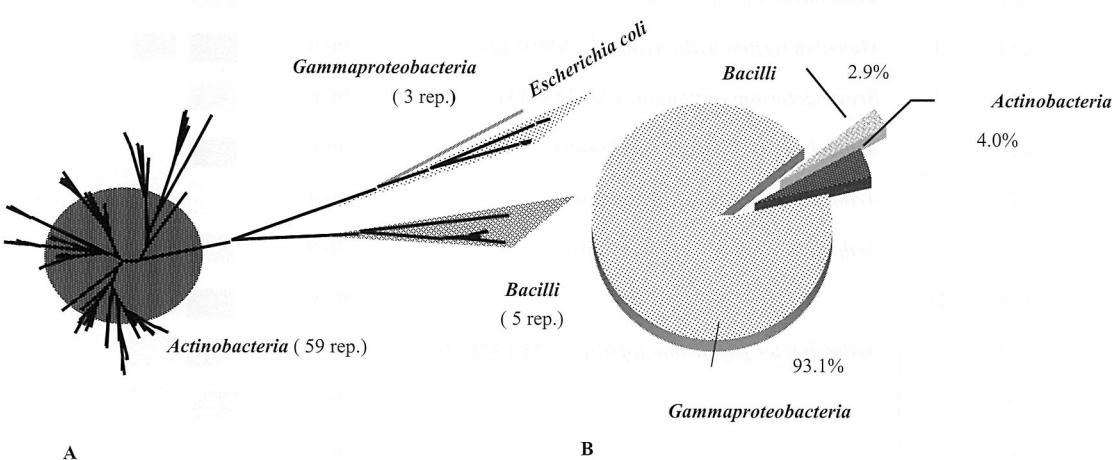
**クローンライブラリーの作成と DGGE 解析** 氷楔融解物遠心後の沈殿からニッポンジーン社製 ISOIL を用いて抽出した DNA をもとに、16S rRNA 遺伝子の部分配列クローンライブラリーを作成した。27F 及び 520R で増幅した PCR 断片は pGEM<sup>®</sup>-T Easy ベクター (Promega) 及び *Escherichia coli* JM109 を用いてクローン化しクローンライブラリーを作成した。また、Basitias ら (2006) の方法を参考に、ITS 領域の ITS1FGC (40 mer)-ITS2 約 300 bps を PCR で増幅し、20%-50% の濃度勾配ゲルで流し DGGE 解析を行った。

**氷楔成分分析** 融解した氷楔中の溶存態有機炭素、全溶存窒素、全溶存リン含量、pH、硫酸塩、重炭酸塩、フッ化物、塩化物、硝酸塩、比導電率、などが現地の共同研究者により調べられた。

**新属新種細菌分類同定** ISOPLANT II (ニッポンジーン) を用いて染色体 DNA の抽出後これを鋳型とし、27F 及び 1522R, 27F 及び 1500R を用いて増幅後、16S rRNA 遺伝子全長の塩基配列を読み相同配列とともに詳細な系統解析を行った。培養及び生理生化学性状を調べ、GC 含量を測定し、更に最も近縁な標準株と共にメナキノン、細胞壁アミノ酸組成、ペプチドグリカンアシル型、脂肪酸組成、リン脂質、ミコール酸などの分析を行った。必要な際は、ハウスキーピング遺伝子である、gyrB, rpoB, recA, などの塩基配列を読みこれを比較した。方法の詳細は片山らの報告 (Katayama *et al.*, 2009, 2010) を参照のこと。

## 結果と考察

**単離された細菌群とその特徴** 成分分析の結果、氷楔の溶存態有機炭素、全溶存窒素、全溶存リン含量は、非常に低く、ほぼ、近辺の河川表層水における濃度に匹敵した。氷楔形成過程で多くの物質が取り除かれるだろうという予想と一致し、腐生菌の生存に好適な条件とはいい難かった。用いた希釀培地も無機塩培地の C, N, P やその他の塩濃度は、氷楔中の濃度の約 10 倍から 100 倍であった。これらの分離培地から単離されたアラスカ氷楔単離株 270 株と氷楔 DNA 由来 273 クローンの、共に 16S rRNA 遺伝子の部分配列をもとにした系統関係を Fig. 3A 及び 3B に示した。单



**Fig. 3** Phylogenetic relationships of 67 isolates from Alaskan ice wedge (A) and 273 clones from the partial 16S rRNA gene library (B).

離された好気及び通性嫌気細菌は67の異なるグループ(OTUs)に別れ、そのほとんどが胞子を形成しないものであった。*Actinobacteria*に属する59グループ(OTU)245株、*Bacilli*に属する5グループ14株(*Carnobacterium*, *Planococcus*に近縁)、*Gammaproteobacteria*(*Lysobacter*に近縁)に属する3グループ11株に分かれた。Table 1は*Actinobacteria*に属するグループの代表株のうち、近縁の標準株と16S rRNA 遺伝子の部分配列で97%以下の相同性を持つものをそれらが分離された培地と共にまとめたものである。多くが希釀培地や無機塩培地から分離され

ており、選択する培地として複合培地よりは希釀培地や無機塩培地が適当であったと言える。Table 1に挙げた23株のうち*Actinobacteria*に属する氷楔单離株とその近縁の基準株の配列との系統関係を16S rRNA 遺伝子全長配列に基づいて調べた結果、单離株は放線菌目のうち*Propionibacteriaceae*, *Nocardioidaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Microbacteriaceae*と*Nocardiaceae*に近縁な科に分かれた。特に*Nocardiaceae*に近縁なグループと、*Microbacteriaceae*, *Propionibacteriaceae*に属するグループは新規の可能性が高く、それぞれの科の中で、あるいは近縁の科とは

Table 1 List of isolates showed less than 97% similarity in partial 16S rRNA gene

Rep.	No. of	Closest relatives (accession no.)	Similarity (%)	Medium isolated
137	1	<i>Tessaracoccus bendigoensis</i> <sup>T</sup> (AJ132334)	93.5	[●●●]
j4	1	<i>Aeromicrobium fastidiosum</i> <sup>T</sup> (X76862)	95.6	[●●●]
12	8	<i>Aeromicrobium panaciterrae</i> <sup>T</sup> (AB245387)	96.6	[●●●] [●●●]
120	1	<i>Nocardoides jensenii</i> <sup>T</sup> (Z78210)	96.4	[●●●]
j2	5	<i>Rhodococcus coprophilus</i> <sup>T</sup> (X80615)	95.8	[●●●] [●●●]
m9	2		94.9	[●●●]
j18	1		96.2	[●●●]
j21	1	<i>Frigoribacterium faeni</i> <sup>T</sup> (Y18807)	95.5	[●●●]
j22	1		96.4	[●●●]
o3	1		96.4	[●●●]
o9	1		96.6	[●●●]
m15	3	<i>Agreia pratensis</i> <sup>T</sup> (AJ310412)	94.2	[●●●] [●●●] [●●●]
h51	1	<i>Salinibacterium amurskyense</i> <sup>T</sup> (AF539697)	95.1	[●●●]
g13	1	<i>Microbacterium hydroxydans</i> <sup>T</sup> (AJ698726)	96.9	[●●●] [●●●]
h47	1	<i>Brevibacterium antiquum</i> <sup>T</sup> (AY243344)	96.6	[●●●]
c12	1	<i>Arthrobacter sulfureus</i> <sup>T</sup> (X83409)	96.6	[●●●]
o11	1	<i>Arthrobacter oxydans</i> <sup>T</sup> (X83408)	96.4	[●●●]
j34	1	<i>Arthrobacter pascens</i> <sup>T</sup> (X80740)	96.9	[●●●]
125	11		97.0	[●●●] [●●●] [●●●]
o21	3	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> <sup>T</sup> (AF134179)	96.9	[●●●] [●●●]
l4	2		96.8	[●●●] [●●●]
143	1		96.5	[●●●]



Complex media



Diluted media



Defined media

独立したクラスターを形成するものであった (Fig. 4). *Microbacteriaceae* に属し, *Subtercola*, *Agreia* 属と違う分岐を示した AHU1791, AHU1810 は系統的に属として新規の可能性が高かった (Fig. 4). ハウスキーピング遺伝子 *gyrB*, *rpoB*, *recA* 遺伝子の相同性を調べた結果, ほぼ同じ (95% 以上相同) であったことからこの 2 株は同種とした. 共にグラム陽性, 好気的, 無芽胞, 不規則短桿菌, 気菌糸形成せず, -5°C から 27°C で生育する低温菌で至適温度は 20°C であった. 細胞壁 B2γ型で DAB を有し, 主要メナキノンは MK-12, 13 あるいは 11, 主要リン脂質としてホスファチジルグリセロール, ジホスファチジルグリセロールを有し, DNA G+C 含量は 65.3–65.4 mol% であった. 1,1-

dimethoxy alkanes の有無を含め, *Microbacteriaceae* 科におけるこれらの重要な分類指標が近縁の *Subtercola*, *Agreia* 属と異なることが明らかとなった (Table 2) ため,これを *Glaciibacter superstes* gen. nov., sp. nov. AHU1791<sup>T</sup>=NBRC104264<sup>T</sup>=DSM 21135<sup>T</sup> として新属新種を提案した (Katayama et al., 2009). 長い間氷の中で生き続けたこの細菌は -5°C ~ 25°C で増殖可能であり, 20°C で最適な発育を示した. (アレニウスプロットを取ると 25°C から 20°C, 20°C から 10°C までと 10°C から -5°C までの間に生体内の反応速度が異なり, 特に 10°C から -5°C までの間は温度依存的に一定に変化することが明らかとなった. (Fig. 5). 又, TSB+2% D-glucose 培地中で培養したとき 温度の低下に伴って, 不飽和脂肪酸, 及び短鎖脂肪酸の割合が増加し, これらはこの菌株の低温における適応反応のひとつと考えられた (Katayama et al., 2009).

*Nocardiaceae* に近縁なグループは, 16S rRNA 遺伝子全長配列の系統関係から *Corynebacterineae* 亜目に帰属することが判明し, *gyrB* 遺伝子に基づく系統樹においても同じトポロジーが得られた. ミコール酸含有菌群の他の属と独立した分岐を示し, 最も近縁な *Rhodococcus* 属との相同性は 95.6% 以下で, 新規である可能性が高かった. そこで生理活性, 細胞壁成分の分析を行った結果, グラム陽性, 好気的, 無芽胞, 不規則短桿菌, 気菌糸形成せず, -5°C から 27°C で生育する低温菌で至適温度は 20°C であった. D-フルクト

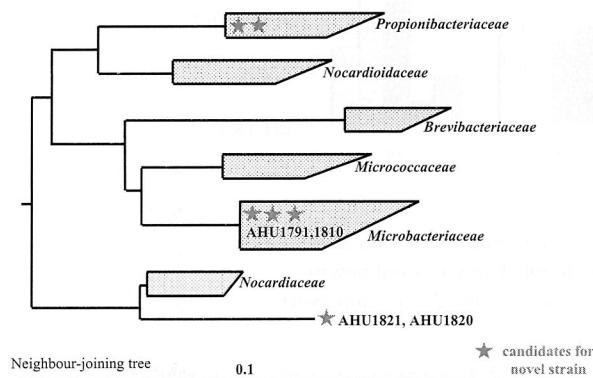
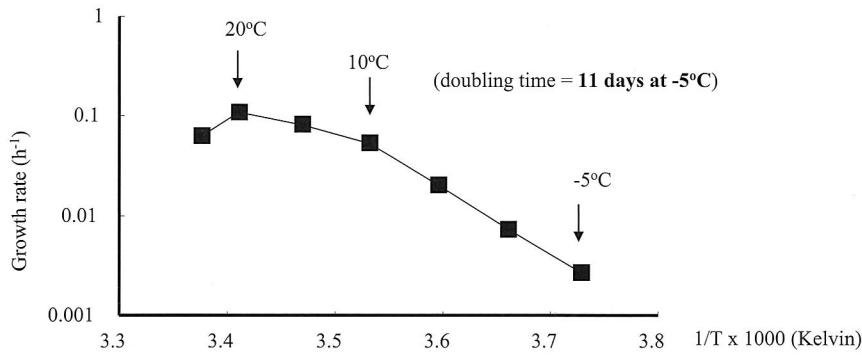
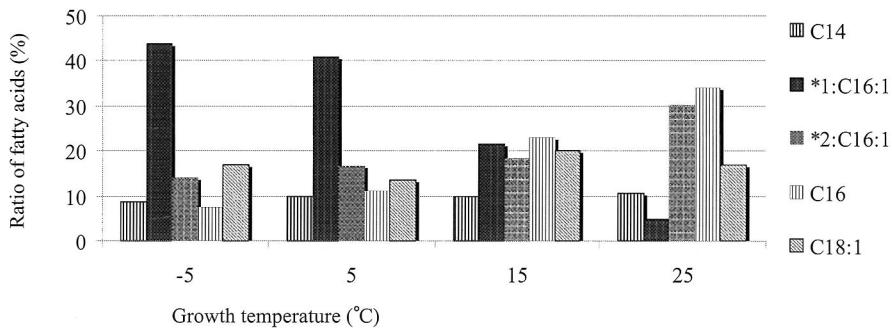


Fig. 4 Phylogeny of candidates for novel strain

Table 2 Salient characteristics that differentiate strains AHU1791<sup>T</sup> and AHU1810 from *Subtercola boreus* and two species of genus *Agreia*

Strain or genus	Peptidoglycan amino acid(s)	Predominant menaquinones	Major DMA
Strain AHU1791 <sup>T</sup>	DAB	MK-12, 13	Not detectable
Strain AHU1810		MK-11, 12	
<i>Subtercola boreus</i>	DAB, Hyg	MK-9, 10	a-C <sub>15:0</sub> & i-C <sub>16:0</sub> DMA
<i>Agreia bicolorata</i>		MK-10	
	DAB, Orn, Hyg		a-C <sub>15:0</sub> DMA
<i>Agreia pratensis</i>		MK-10, 11	

DAB; 2,4-diaminobutyric acid Hyg; threo-3-hydroxyglutamic acid Orn; ornithine  
DMA; 1,1-dimethoxy alkanes a; anteiso-branched i; iso-branched

Fig. 5 Arrhenius plot of growth rates from  $-5^{\circ}\text{C}$  to  $23^{\circ}\text{C}$ .Fig. 6 Temperature dependence of the fatty acids profile in strain AHU1821<sup>T</sup>.\*1: *cis*-hexadecenoic acid (position of double bond was unknown)\*2: *trans*-hexadecenoic acid (position of double bond was unknown)

ース, グリセロール, エタノールを資化し, DNA G + C含量は 69.4 - 71.6 mol%, 主要リン脂質として, ジホスファチジルグリセロール, ホスファチジルエタノールアミン, ホスファチジルイノシトール, ホスファチジルイノシトールポリマンノシドを有した。主要メナキノンは MK-9(H<sub>2</sub>), ペプチドグリカンは *meso*-ジアミノピメリン酸, アラビノース, ガラクトースを含む (Chemotype IV), ムラミン酸はグリコリル型, 主要脂肪酸は C16:1, C16:0, C18:0 & C14:0, tuberculostearic acid はほとんど含まず, 16S rRNA 遺伝子相同性の点で近縁な *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Tsukamurella* 属とメナキノン組成, 主要脂肪酸組成の点で相違があることが明らかになったため, この株を *Tomitella bifomata* gen. nov., sp. nov. AHU1821<sup>T</sup>=NBRC 106253<sup>T</sup>=DSM 45403<sup>T</sup> として提案した (Katayama *et al.*, 2010)。この株の特徴として, 生育温度の低下に伴い, C16:1 のうち一方のピークの割合が増加 C16 及び C16:1 の他方ピークの割合が減少した。先の *Glaciibacter superstes* では低温下での膜流動性を保つため, 低融点の脂肪酸(短鎖脂肪酸, 不飽和脂肪酸)を増加させたが, この株においては, 同じ不飽和脂肪酸においても相転移温度の低い

*cis* 型を低温下で増加させていると予想される (Fig. 6)。

これらの株を含め, ア拉斯カの氷楔から 77 株の細菌を AHU のカルチャーコレクションとして保存した。シベリアの氷楔からは抗菌物質のスクリーニングのために単離しグリセロール中に保存した細菌 73 株のうち, 16S rRNA 遺伝子の部分配列により, *Proteobacteria* に属する 27 株 *Actinobacteria* に属する 15 株, *Firmicutes* に属する 14 株が簡易同定されたが, その属構成はアラスカ氷楔単離株とは大きく異なっていた。

**単離された真菌群とその特徴** ア拉斯カ氷楔から単離された 170 株の糸状菌は, すべての寒天切片をグリセロール溶液中  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。表現形で分けたグループを代表する 55 株の rRNA 遺伝子 ITS 領域の塩基配列で相同検索した結果, 配列に相違があるものほとんどが *Geomyces* 属であった。同 74 株の酵母は細胞をグリセロール溶液中  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し, それぞれの培養上清も凍結保存した。代表的な 23 株について, 26S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域の相同性検索の結果, その多くは *Rhodotorula psychrophila* であったが,

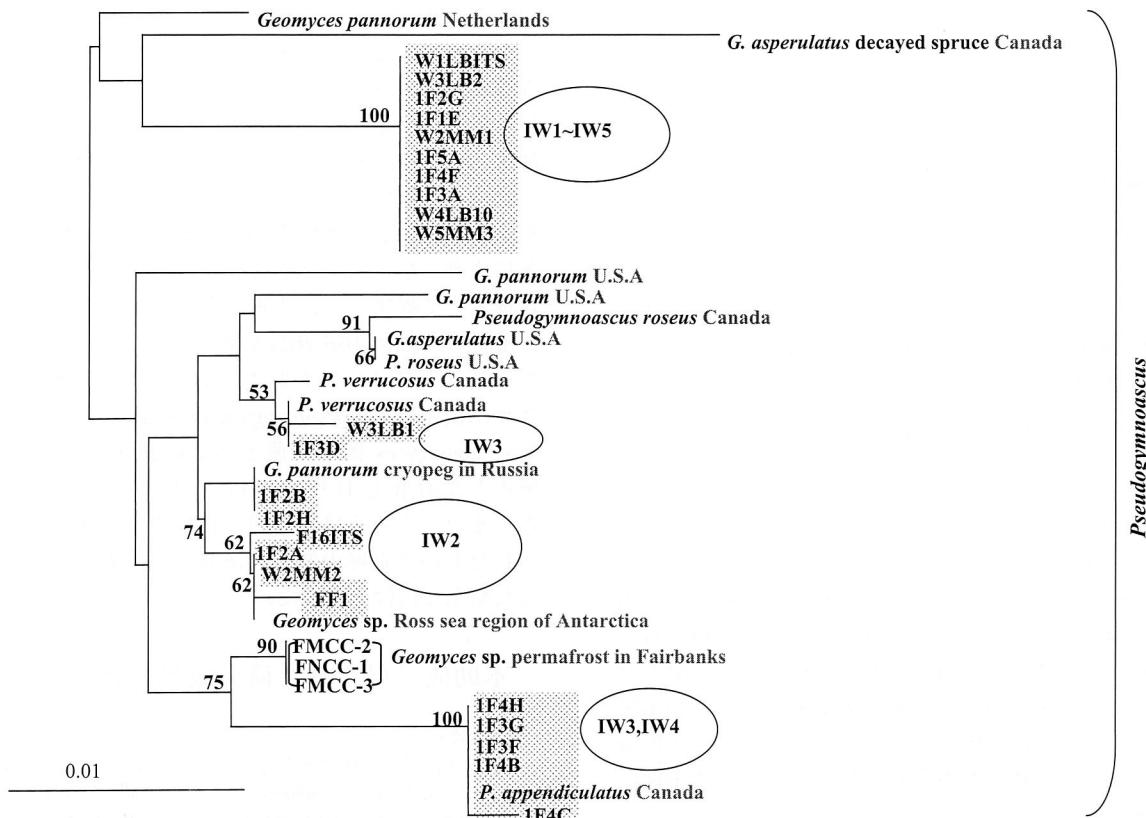


Fig. 7 Evolutionary relationships of fungal isolates from 5 ice wedges.

IW1~IW5 represent five different exposures of ice wedge in Fox Tunnel.

Isolates in parenthesis were isolated from the other part of permafrost in Fairbanks.

*Phaeococcomyces nigricans*, *Leucosporidium antarcticum* に相同なものも存在した。各氷楔から分離し保存していた *Geomyces* 属のうち 23 の代表的な rRNA 遺伝子 ITS 領域塩基配列及びそれらに相同な、これまでデータベースに登録されている *Geomyces* 属の様々な種の同配列をもとに得られた系統関係を Fig. 7 に示した。最尤法、最節約法でも同様なトポロジーが得られた。*Geomyces* 属はこれまで、*Gymnostellatpsora* と *Pseudogymnoascus* 属の無性世代（アナモルフ）として位置づけられ（Rice & Currah, 2006），どちらの有性世代を持つかは、その子囊殻に違いを見るまで不明であった。氷楔から分離された *Geomyces* spp. はすべて系統的に *Pseudogymnoascus* 属の無性世代であることが系統樹から明らかとなったが、子囊殻の形成は今だ決定的に確かめられていない。また、各々の異なる氷楔に閉じ込められていた *Geomyces* 属は氷楔ごとに夫々、*G. pannorum*, *P. verrucosus*, *P. appendiculatus* が含まれる独立したクラスターを形成し、異なる種であることが予想された。これらのクラスターは同じフェアバンクスにある永久凍土層から分離された

*Geomyces* 属からも独立し、氷楔ごとに異なる種が保存されている可能性が高い (Fig. 7).

培養に依存しない形で、各氷楔中の真菌類を見た結果、各氷に閉じ込められた DNA からの増幅物は非常に単純なバンドパターンを示し、単離株の結果と同様、他の永久凍土層の分離株やクローンに比べ非常に限られた種しか存在していないと思われた。主なバンドの塩基配列から相同性検索を行った結果、氷楔の優占種は、多少の配列の違いがあるもののほとんどが *Geomyces* sp. であった。*Rhodotorula* sp., *Buellia* sp. に相同的 DNA を含む氷楔もあった。酵母、糸状菌の氷楔分離株 DNA を鋳型として同様に PCR で増幅しこれを流すと氷楔内のバンドも同様な位置であることから、これらの優占種は生きている状態で氷に閉じ込められていたと考えられた (Fig. 8).

一方、培養非依存的に DNA からアラスカ氷楔内の細菌叢を調べるとその多くが *Gamma proteobacteria* であり、*Actinobacteria* は 4% に過ぎなかった。しかし単離株はその多くが *Actinobacteria* であった (Fig. 3A, B)。一方、シベリアの氷からは十分な数のクロー-

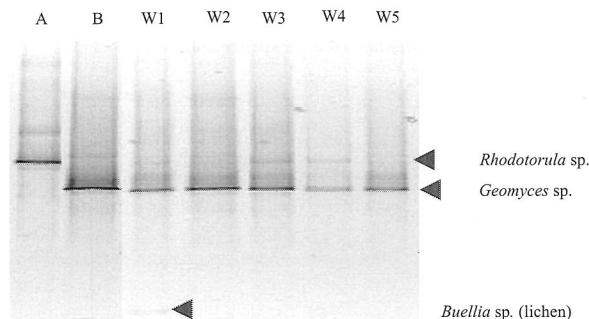


Fig. 8 DGGE profile for partial fungal ITS sequences from DNA extracted from, A: isolated yeast, B: isolated fungi.  
W1, W2, W3, W4, and W5: Alaskan ice wedges

ン及び単離株を得たうえでの結果ではないのでデータを示さないが、クローナーでは *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroides* その他を含むのに対し、単離株では *Gammaproteobacteria* が半分以上を占め、凍土層により細菌叢が異なることが示唆された。従って、氷楔は、新規微生物のみならず低温凍結環境下での新たな微生物活性の宝庫として未踏の地であるともいえる。

氷点下、極微量の栄養下、あるいは空気量制限下で何万年間もの間存在するために、細菌は様々な戦略をとっていたに違いないと思われる。細菌の場合、氷楔の中の存在状態として、分裂可能な栄養細胞、胞子、生きてはいるが分裂できない (VBNC) 状態の細胞及び死に至る細胞が考えられる。今回の研究で得られた単離株の多くは胞子を作らないと現在は考えられていることから、16S rRNA 遺伝子の部分配列クローナーライブライアリーや、栄養細胞、VBNC 状態の細胞あるいは死細胞と細胞外 DNA を反映すると考えるのが妥当であろう。本研究においてコロニーとして単離された新属新種を含む多くの単離株のうち、-5°C で発育するものは、氷楔内でも分裂細胞であった可能性を残した。氷楔環境に近い状況が提供されれば分裂を始め、コロニー形成が可能となる場合もあれば、VBNC 状態の細菌が、研究室で用意された寒天培地上で、コロニー形成可能になる場合も考えられた。氷楔からさらに多様な微生物資源を取り出しこれらを利用するには、コロニーを形成させるための新たな方法に目を向ける必要があるだろう。

## 要 約

氷点下、貧栄養下条件の氷楔中で何万年という長い

間閉じ込められていたにも関わらず、再び分裂を始めることができる好気性・通性嫌気性従属栄養細菌及び真菌が氷楔には存在した。低温長期培養の結果、得られた単離株の多くは胞子を形成しない *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* に属した。無機栄養培地や希釀培地からは多くの新規微生物候補株がアラスカ氷楔から単離され、細胞壁の脂肪酸組成を変化させることにより -5°C で生育を続ける 2 つのグループを新属新種として提案した。氷楔においては、培養非依存的に解析した細菌 16S rRNA 遺伝子のクローナーと単離株のそれらのプロファイルは異なっていた。また、アラスカ氷楔中には、*Pseudogymnoascus* 属の無性世代である *Geomyces* 属糸状菌と *Rhodotorula glacialis* が優占して存在しており、-5°C で生育するものがあった。また、これらは、氷河、南極や永久凍土から分離されたものと近縁の関係にあり、培養非依存的に解析した結果とほぼ一致した。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 片山泰樹, 田中みち子, Anatoli Brouchkov, 福田正巳, 富田房雄, 浅野行蔵, アラスカ永久凍土氷楔中の細菌の分離と 16S rRNA 遺伝子に基づいた系統解析, 日本微生物資源学会14回大会, 2007年 6月 25日~27日, 学術交流会館, 札幌。
- 田中みち子, 片山泰樹, Douglas Thomas, Yihua Cai, 浅野行蔵, 福田正巳, 富田房雄, アラスカ永久凍土氷楔及び氷中の真菌類, 日本農芸化学会2008年度大会, 2008年 3月 26日~29日, 名城大学, 名古屋。
- 加藤知子, 片山泰樹, 田中みち子, 富田房雄, 浅野行蔵, アラスカ永久凍土氷楔中から分離された放線菌の新属提案, 日本微生物資源学会第15回大会, 2008年 6月 30日~7月 2日, 千葉大学・けやき会館, 千葉。
- Taiki Katayama, Michiko Tanaka, Thomas A. Douglas, Yihua Cai, Fusao Tomita, Kozo Asano & Masami Fukuda, Microorganisms trapped within permafrost ice in the Fox Permafrost Tunnel, Alaska, AGU 2008 Fall Meeting, 15-19, December, The Moscone Center, San Francisco.
- 片山泰樹, 加藤知子, 田中みち子, 富田房雄, 浅野行蔵, アラスカ永久凍土氷楔中から単離された新属放線菌について, 日本農芸化学会2009年度大会, 2009年 3月 27日~29日, 福岡国際会議場, 福岡。
- 片山泰樹, 加藤知子, 田中みち子, 富田房雄, 浅野行蔵, アラスカ永久凍土氷楔中から単離された放線菌の新属提案 II, 日本微生物資源学会第16回大会, 2009年 6月 24日~26日, 大阪大学, 銀杏会館, 大阪。

### 原著論文

- Katayama, T., Tanaka, M., Moriizumi, J., Nakamura, T., Brouchkov, A., Douglas, T. A., Fukuda, M., Tomita, F., & Asano K. (2007),

- Phylogenetic Analysis of Bacteria Preserved in a Permafrost Ice Wedge for 25,000 Years, Appl. Environ. Microbiol. 73: 2360-2363.
2. 片山泰樹 (2009), アラスカ永久凍土中の微生物に関する研究, 北海道大学大学院博士論文.
3. 加藤知子 (2009), アラスカ永久凍土の氷楔から単離された細菌について, 北海道大学大学院修士論文.
4. Katayama, T., Kato, T., Tanaka, M., Douglas, T. A., Brouckov, A., Fukuda, M., Tomita, F. & Asano, K. (2009), *Glaciibacter superstes* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Microbacteriaceae* isolated from a permafrost ice wedge, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59: 482-486.
5. Katayama, T., Kato, T., Tanaka, M., Douglas, T.A., Brouckov, A., Abe, A., Sone, T., Fukuda, M., & Asano, K. (2010), *Tomitella biformata* gen. nov., sp. nov., a novel member of the suborder *Corynebacterineae* isolated from a permafrost ice wedge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. under submitting. Published January 15, 2010 as doi: 10.1099/ijis.017962-0.

### 保存機関に寄託した菌株

本研究を通じて分離した菌株は以下の菌株保存機関に寄託した.

(保存機関名)

北海道大学農学部応用菌学菌株保存室 (AHU)

生物遺伝資源部門 (NBRC)

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

(菌株名・番号)

*Glaciibacter superstes* gen. nov., sp. nov.  
AHU1791<sup>T</sup> (=DSM21135<sup>T</sup>=NBRC104264<sup>T</sup>)

*Glaciibacter superstes* gen. nov., sp. nov. AHU1810  
(=NBRC104265)

*Tomitella biformata* (AHU1820) NBRC106252

*Tomitella biformata* (AHU1821<sup>T</sup>)= NBRC106253<sup>T</sup>=  
DSM 45403<sup>T</sup>

各クラスターの代表株である計77株は 16S rRNA 遺伝子 (部分あるいは全体配列) の塩基配列データおよびそれらに基づく簡易同定結果と共に AHU1765 から AHU1837, AHU1876 から AHU1880 として寄託された.

### 謝 辞

本研究は 3 年間にわたる(財)発酵研究所の研究助成により遂行されました. 関係者の方々に厚くお礼申しあげます. 本研究の一部はそれぞれ北海道大学大学院農学研究院の大学生であった片山泰樹博士の学位論

文, 加藤知子さんの修士論文の研究として行われました. また本研究では, 氷楔試料の採取・運搬や氷成分分析など多くの方々のご協力いただきました. 深くお礼申し上げます.

### 文 献

- Basitias, B.A., Huang, Z.Q., Blumfield, T., Xu, Z. & Cairney, J.W.G. (2006). Influence of repeated prescribed burning on the soil fungal community in an Eastern Australian wet sclerophyll forest. Soil Biology & Biochemistry 38: 3492-3501.
- Bowman, J.P. & Nichols, D.S. (2005). Novel members of the family *Flavobacteriaceae* from Antarctic maritime habitats including *Subsaximicrobium wynnwilliamsii* gen. nov., sp. nov., *Subsaximicrobium saxinquilinus* sp. nov., *Subsaxibacter broadyi* gen. nov., sp. nov., *Lacinutrix copepodicola* gen. nov., sp. nov., and novel species of the genera *Bizionia*, *Gelidibacter* and *Gillisia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1471-1486.
- 福田正己, 香内 晃, 高橋修平 (1997). 極地の科学—地球環境センターからの警告, p. 55-56. 北海道大学図書刊行会, 北海道.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- French, H.M. (1976). In The Periglacial Environment, p. 84-87. Longman, London and New York, N.Y.
- Gilichinsky, D.A., Wagener, S. & Vishnivetskaya, T.A. (1995). Permafrost microbiology. Permafrost Periglacial Process. 6: 281-291.
- Gilichinsky, D.A. (2002). Permafrost model of extraterrestrial habitats, p. 125-142. In Horneck, G. & Baumstark-Khan, C. (eds.), Astrobiology:the quest for the conditions of life. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Gilichinsky, D., Rivkina, E., Bakermans, C., Shcherbakova, V., Petrovskaya, L., Ozerskaya, S., Ivanushkina, N., Kochkina, G., Laurinavichuis, K., Pecheritsina, S., Fattakhova, R. & Tiedje, J.M. (2005). Biodiversity of cryopegs in permafrost. FEMS Microbiol. Ecol. 53: 117-128.
- Johansen, N.I., Huang, S. L. & Aughinbaugh, N.B. (1988). Alaska's CRREL permafrost tunnel. Tunn. Undergr. Sp. Tech. 3: 19-24.
- Katayama, T., Kato, T., Tanaka, M., Douglas, T.A., Brouckov, A., Fukuda, M., Tomita, F. & Asano, K. (2009). *Glaciibacter superstes* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Microbacteriaceae* isolated from a permafrost ice wedge, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 482-486.
- Katayama, T., Kato, T., Tanaka, M., Douglas, T.A., Brouckov, A., Abe, A., Sone, T., Fukuda, M., & Asano, K. (2010). *Tomitella biformata* gen. nov., sp. nov., a novel member of the suborder *Corynebacterineae* isolated from a permafrost ice wedge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. under submitting. Published January 15, 2010 as doi: 10.1099/ijis.017962-0.

017962-0.

- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., M. May, B. Nonhoff, B., Reichel, R., Strehlow, A., Stamatakis, N., Stuckmann, A., Vilbig, Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K.-H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1363-1371.
- Mackay, J.R. (1972). The world underground ice. *Ann. Assoc. Am. Geogr.* **62**: 1-22.
- Miteva, V.I., Sheridan, P.P. & Brenchley, J.E. (2004). Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1-7.
- Pikuta, V.E., Marsic, D., Bej, A., Tang, J., Krader, P. & R.B. Hoover. (2005). *Carnobacterium pleistocenium* sp. nov., a novel psychrotolerant, facultative anaerobe isolated from permafrost of the Fox tunnel in Alaska. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 473-478.
- Rice, A.V. & Currah, R.S. (2006). Two new species of *Pseudogymnoascus* with *Geomyces* anamorphs and their phylogenetic relationship with *Gymnostellatospora*. *Mycologia*. **98**: 307-318.
- Reddy, G.S., Prabagaran, S.R., & Shivaji, S. (2008). *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolated from the Pindari glacier of the Indian Himalayas, and emended description of the genus *Leifsonia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1471-1486.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Schloss, P.D. & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microb.* **71**: 1501-1506.
- Sellmann, P.V. (1967). Geology of the USA CRREL permafrost tunnel, Fairbanks, Alaska. U.S. Army CRREL, Hanover, New Hampshire, Technical Report 199, pp. 22.
- Sheridan, P.P., Loveland-Curtze, J., Miteva, V.I., & Brenchley, J.E. (2003a). *Rhodoglobus vestalii* gen. nov., sp. nov., a novel psychrophilic organism isolated from an Antarctic Dry Valley lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 985-994.
- Sheridan, P.P., Miteva, V.I., and Brenchley, J.E. (2003b). Phylogenetic analysis of anaerobic psychrophilic enrichment cultures obtained from a Greenland glacier ice core. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2153-2160.
- Steven, B., Léveillé, R., Pollard, W.H., and Whyte, L.G. (2006). Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles* **10**: 259-267.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Xiang, S., Yao, T., An, L., Xu, B., and Wang, J. (2005). 16S rRNA sequences and differences in bacteria isolated from the Muztag Ata glacier at increasing depths. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4619-4627.

# 極小微生物 (nanobes) の分離培養と系統分類に関する研究

長 沼 裕

広島大学大学院生物圏科学研究所  
〒739-8528 広島県東広島市鏡山 1-4-4

Isolation and phylogenetic characterization of nano-organisms (nanobes)

Takeshi Naganuma

School of Biosphere Science, Hiroshima University  
Kagamiyama 1-4-4, Higashi-hiroshima 739-8528, Japan

Microorganisms, particularly archaea and bacteria, are micrometer-sized and are also referred to as "microbes." In general, the smallest free-living microorganisms are 0.2  $\mu\text{m}$  in diameter. Therefore, sterile filtration with a 0.2- $\mu\text{m}$ -pore-size filter is presently used in the medicine/food industry and in the field of microbiology. Recently, however, the existence of nano-organisms (also known as ultramicrobacteria and "nanobes") that can pass through a 0.2- $\mu\text{m}$ -pore-size filter has been presumed, but little is known about their ecology or phylogeny. Our previous studies based on non-culture-dependent methods have revealed that some nanobes are novel and deep-branching species that are phylogenetically important. In this study, to obtain an inventory of nanobes, we isolated 53 strains that passed through 0.2- $\mu\text{m}$ -pore-size filters from various environmental samples, including samples from the Arctic, Antarctic, and deserts. Based on 16S rRNA gene analyses, the gene sequences of 15 of the 53 strains (28%) exhibited less than 97% similarity to known culturable strains. One strain isolated from a river sample was closely related to a known obligate ultramicrobacterium from the class Actinobacteria. The genome size of this strain was small (ranging from 1.59 Mb to 1.74 Mb), as estimated using pulsed-field gel electrophoresis. The findings of this study suggested that obligate ultramicrobacteria may have the smallest genome of all organisms.

Key words: nano-organism, ultramicrobacteria, culture, molecular phylogeny, genome size

## 緒 言

微生物という小さな生き物を対象としている以上、その最小サイズは本質的な問題である。長い間、微生物学の基礎研究および応用研究における経験によって、0.2  $\mu\text{m}$  より小さい極微小微生物、すなわち nanobes とでも呼ぶべき微生物は実在しないと考えられてきた (Sieburth *et al.*, 1978)。また、理論的な考察として、生きていくのに最低限必要な道具一式—ゲノム DNA, リボソーム, タンパク質, 細胞膜などを含む最小体積という観点からも、“0.2  $\mu\text{m}$ ”が微生

物の最小サイズであるという見方が支持されている。代謝や複製など“平時”的生命活動を営むには、ゲノム DNA やある程度の数量以上のリボソーム、タンパク質などの生体高分子を、細胞内の小さな空間に詰め込まなければならない。また、周囲の環境条件が大きく変動するような“有事”に際し、細胞内環境の恒常性を保つための仕組み、たとえば、いろいろな環境ストレスに応答する転写因子や各種修復酵素などとその遺伝子も必要である。一般的な細胞膜すなわち脂質二重膜の厚さは 8~10 nm, 直径の両端に膜があるのでその膜厚(二枚分)が 16~20 nm, リボソームの直径は約 20~30 nm, アデノシン三リン酸(ATP)分子の大きさは約 2.5 nm, 分子量が一万~十数万のタンパク質の大きさは数~十数 nm である。これ以外にも細胞内には種々の“道具”(分子)があり、それらのサイ

E-mail: takn@hiroshima-u.ac.jp

共同研究者: 中井亮佑・渋谷絵里 (広島大学大学院生物圏科学研究所)

ズを考慮して、微生物は直径  $0.2\mu\text{m}$  より小さくなりえないと計算された (Maniloff, 1997)。一方で、寄生性細菌である *Mycoplasma genitalium*などを参考にし、「微生物の細胞は直径  $0.14\mu\text{m}$  まで小さくなりうる」とする計算もあり (Mushegian & Koonin, 1996)，微生物細胞の最小サイズの議論にはまだ決着がついていない。

また、理論的考察と並行して、“小さな微生物”を探す試みもなされてきた。具体的には、孔径  $0.2\mu\text{m}$  のフィルターを通過する極微小微生物 ( $0.2\mu\text{m}$  通過菌) の研究例が1970年代からある。例えば、海水中の全菌数に占める  $0.2\mu\text{m}$  通過菌の割合は、1~10%である (Hobbie *et al.*, 1977; Watson *et al.*, 1997; Zimmerman, 1977)。さらに、全菌数測定で  $10^8\sim 10^9$  cells l<sup>-1</sup> であるような沿岸海水において、 $0.2\mu\text{m}$  通過菌の生菌数 (培養できる菌数) は  $10^0\sim 10^1$  cells l<sup>-1</sup> であるとの報告がなされた (Fukuba *et al.*, 2002)。また、これら培養に基づく研究の一端として、1981年には孔径  $0.2\mu\text{m}$  のフィルターを通過する生きた二種類の微生物が分離された (Torella & Morita, 1981)。一つは培養後に  $0.2\mu\text{m}$  より大きくなつたが、もう一つは培養後も  $0.2\mu\text{m}$  より小さいものあり、ウルトラミクロバクテリアと命名された。その後、世界各地の海水や淡水、土壤や氷河からさまざまなウルトラミクロバクテリアが分離あるいは系統解析されている (MacDonell & Hood, 1982; Hood & MacDonell, 1987; Haller *et al.*, 1999; Elsaied *et al.*, 2001; Duda *et al.*, 2007; Miteva & Brenchley, 2005)。これらの研究の  $0.2\mu\text{m}$  通過菌には、「生きているのに培養できない」という “viable but non-culturable”

(VBNC) 状態の細菌、および、生活史の一部に矮小細胞の時期を持つ *Cytophaga* や *Microsilla*などの滑走細菌が含まれている。一方で、Hahnらが単離した *Actinobacteria*, *Polynucleobacter* Cluster (Betaproteobacteria 細胞) は、富栄養な培養条件下でも  $0.2\mu\text{m}$  前後の極小サイズのままであり (Hahn, 2003; Hahn *et al.*, 2003)，このようなものは obligate ultramicrobacteria (偏性ウルトラミクロバクテリア) と呼ばれている。また、これらの偏性ウルトラミクロバクテリアは淡水域に普遍的に存在するとも報告されている。

近年では、深部地下水や深海熱水噴出域などの極限環境中の  $0.2\mu\text{m}$  通過菌 (かつ  $0.1\mu\text{m}$  捕集菌) の群集が注目され、non-culture-dependent な手法により 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析が行われた (Miyoshi *et al.*, 2005; Naganuma *et al.*, 2007)。Naganuma *et al.* (2007) は、マリアナトラフの熱水

噴出孔から得た熱水の  $0.2\mu\text{m}$  通過菌群集のみに特異的にみられる真正細菌と古細菌の系統群を検出した。さらに、従来通りにフィルター捕集されたふつうの微生物 ( $0.2\mu\text{m}$  “捕集” 菌) が既知の分類群に属したのに対し、 $0.2\mu\text{m}$  通過菌のいくつかは系統樹の根元に近いところで深い枝分かれ (deep-branching) していることがわかった。このように、 $0.2\mu\text{m}$  通過菌群集には系統分類学的に重要な微生物が存在することが明らかとなりつつあり、 $0.2\mu\text{m}$  通過菌すなわちウルトラミクロバクテリアの分離株コレクションの拡充が必要とされる。

ウルトラミクロバクテリアは細胞最小サイズだけでなく、ゲノムの最小サイズを考えるうえで非常に重要である。細胞サイズが小さくあるためには、それを場とする諸々の生命機能は出来る限りシンプルでなくてはならないと考えられるからである。生存のために必要最小限な細胞サイズを算出した Mushegian & Koonin (1996) は、寄生性である *Mycoplasma genitalium* と *Haemophilus influenzae* のゲノムを参考にして寄生生活に生存に必要な最小ゲノムセットを計算し、 $0.32\text{ Mb}$  であると算出した。この例のように、既知の微生物の中で細胞サイズもゲノムサイズも小さいのは、しばしば寄生性あるいは共生性の微生物である。これらは本来不可欠なその生存機能の一部 (細胞分裂装置など) を宿主のそれで代用しうるからである (Moran, 1996)。たとえば、アブラムシ (*Acythosiphon pisum*) の細胞内共生菌である *Buchnera aphidicola* は細胞サイズが直径  $0.2\mu\text{m}$  前後、ゲノムサイズは  $0.64\text{ Mb}$  である (Nakabachi *et al.*, 2006)。

また、現在自由生活性の中でもっともゲノムサイズが小さいとされている深海の好熱性古細菌 *Ignicoccus* sp. も、細胞内に古細菌 *Nanoarchaeum equitans* を共生させている (Waters *et al.*, 2003)。*Ignicoccus* sp. のゲノムサイズは  $1.30\text{ Mb}$ 、*N. equitans* のゲノムは  $0.48\text{ Mb}$  である (Waters *et al.*, 2003)。この宿主と共生菌とのゲノムサイズの合計は  $1.8\text{ Mb}$  以下しかなく、ゲノムレベルの共生が非常に進化していると考えられる。現在、自由生活性のウルトラミクロバクテリアでは、3種についてゲノムサイズが求められている。海洋ウルトラミクロバクテリアである *Pelagibacter ubique* のゲノムは  $1,308,759\text{ bp}$  と非常に小さく (Giovannoni *et al.*, 2005)、また、淡水ウルトラミクロバクテリアである *Polynucleobacter* 属の1株もゲノムサイズが  $1.9\text{ Mb}$  と比較的小さいことがわかっている (GENOME ATLAS DATABASE, <http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas>)。

3.0%). しかし、超純水 (ultrapure water, UPW) から単離された *Minibacterium massiliensis* は、生活史の一部のみが  $0.2\mu\text{m}$  より小さく、そのゲノムサイズは  $4.1\text{ Mb}$  と大きいことも知られている (Audic *et al.*, 2007). このように、細胞の矮小化とゲノムサイズの縮小の関連を論ずるにはデータの蓄積がまだ不十分である。

そこで本研究では、ウルトラミクロバクテリアの分離株コレクション (nanobes collection) を構築するとともに、それらゲノムサイズの情報を取得することも目的とした。

### 実験方法

**試料採取地点** 土壤、砂礫、海水または淡水を、世界各地の多様な環境から集めた (Table 1). 北極のサンプルはノルウェー王国領スヴァールバル諸島スピツベルゲン島の約  $79.4^\circ\text{N}$   $13.4^\circ\text{W}$  地点、Troll hot spring から採取した。これは氷河が融解して地下水となつたものが地熱で熱されてできた、世界最北に位置する温泉である (Jamtveit *et al.*, 2006). 南極のサンプルは約  $62.6^\circ\text{S}$ ,  $61.0^\circ\text{W}$  から2008年12月に採取した。中国では、ゴビ砂漠とそのオアシスなどから砂礫を採取した。アフリカ大陸北部にあるチュニジアでは、世界最大の砂漠であるサハラ砂漠とそのオアシスから砂礫を採取した。また、2004年9月に、地下水のサンプルを約  $35.4^\circ\text{N}$ ,  $137.2^\circ\text{W}$ , 岐阜県土岐市泉町河合賤ヶ洞に位置する東濃鉱山から採取した。東濃鉱山は日本最大のウラン鉱床として知られており、Miyoshi *et al.* (2005) は、その地下水の  $0.2\mu\text{m}$  通過画分に新規系統群に属する 16S rRNA 遺伝子を多数検出している。河川のサンプルは2008年7月に広島県東広島市黒瀬川流域から、約  $34.2^\circ\text{N}$   $132.6^\circ\text{E}$ , 約  $34.8^\circ\text{N}$   $132.6^\circ\text{E}$ , 約  $34.4^\circ\text{N}$   $124.7^\circ\text{E}$  の3点を、また、2009年3月に島根県雲南市吉田町約  $35.2^\circ\text{N}$   $132.9^\circ\text{E}$  地点より土壤とともに採取した。湖沼のサンプルは鹿児島県上甑島約  $31.9^\circ\text{N}$ ,  $130.0^\circ\text{E}$  地点に位置する汽水湖貝池、広島県東広島市黒瀬川上流域の約  $34.5^\circ\text{N}$   $132.7^\circ\text{E}$  に位置する並滝池、および島根県出雲市出雲大社内浄の池の表層水を、所有者の協力を得て土壤とともに採取した。広島県並滝池と島根県浄の池は富栄養な淡水湖である。貝池は酸化的な淡水の表層と、還元的な海水の下層の二層湖であることが知られている。海水のサンプルは瀬戸内海の広島県呉市約  $34.2^\circ\text{N}$   $132.6^\circ\text{E}$  地点と同竹原市約  $34.3^\circ\text{N}$   $132.9^\circ\text{E}$  地点、関門海峡である福岡県門司区門司約  $33.9^\circ\text{N}$   $130.9^\circ\text{E}$  地点と山口県宇都市約  $33.8^\circ\text{N}$

$131.4^\circ\text{E}$  地点、九州近海の大分県国東市約  $33.6^\circ\text{N}$   $131.2^\circ\text{E}$  地点と長崎市壱岐市約  $33.9^\circ\text{N}$   $129.6^\circ\text{E}$  地点の表層水を採取した。また、大韓民国釜山広域市約  $35.2^\circ\text{N}$   $129.1^\circ\text{E}$  地点、およびチュニジア共和国チュニス約  $35.9^\circ\text{N}$   $10.6^\circ\text{E}$  地点の海水も採取された。これらのサンプルは無菌の手袋を用いて、無菌のプラスチックボトルに採取され、数時間から数ヵ月後の単離試験まで暗所で保存された。

### 極小微生物の単離

単離には Elsaiied *et al.* (2001) の方法を改変して用いた。液体サンプルは三連に重ねた孔径  $0.2\mu\text{m}$  フィルター (Advantec, Tokyo, Japan) でろ過し、R2A 培地 (Massa *et al.*, 1998) を添加した。土壤や砂礫などの固体サンプルは、リン酸緩衝食塩水に懸濁し、同様に処理した。リン酸緩衝食塩水の組成は以下の通りである;  $\text{NaCl}$  ( $8\text{ g/l}$ ) ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $1.1\text{ g/l}$ ) ,  $\text{KCl}$  ( $0.2\text{ g/l}$ ) ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0.2\text{ g/l}$ ) 。それらは濁るまで室温で培養した。集積培養後、液体培地と同じ組成の  $1.5\%$  寒天培地にその培養液を塗布し、引き続き培養した。寒天に生えた単コロニーを拾い、純化するために、少なくとも3世代培養した。

### 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅および系統解析

単離した株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定するために、ゲノム DNA の抽出を行った。DNA 抽出の方法は、Aljanabi & Martinez (1997) の方法を用いた。抽出したゲノム DNA から 16S rRNA 遺伝子の全長約 1600 塩基のうち、約 1500 塩基増幅するような、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子特異的プライマーセット 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') を用いて PCR 法により増幅した (DeLong, 1992)。PCR 反応に用いる DNA ポリメラーゼには、*TaKaRa Ex Taq* polymerase (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) を用い、PCR 増幅装置には Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (Takara) を使用した。PCR 反応は最初に熱変性を  $96^\circ\text{C}$  (3 分) で 1 サイクル行った後、 $95^\circ\text{C}$  の熱変性を 40 秒、 $56^\circ\text{C}$  のアニーリングを 60 秒、 $72^\circ\text{C}$  の伸長を 60 秒のサイクルを 35 サイクル行い、最後に  $72^\circ\text{C}$  での伸長を 5 分間行った。PCR 産物は  $1.5\%$  アガロースゲル電気泳動で目的サイズ (約 1500 塩基) のフラグメントの特異的増幅を確認後、QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN Science, Maryland, USA) を用いて精製した。塩基配列の決定は、Macrogen (<http://www.macrogen.com>) あるいは SolGent Co., Ltd. (<http://www.solgent.com>) に委託

し、BioDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、DNA シークエンサー ABI 3730XL automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, USA) を使用して決定した。

得られた遺伝子配列は、BLAST (Karlin & Altsul, 1990) による相同性検索を GenBank/EMBL/DDBJ のデータベースで行った。得られた 16S rRNA 遺伝子配列および、それらと高い相同性を示した基準株の塩基配列について、CLUSTALX multiple alignment program (Larkin *et al.*, 2007) を用いてアライメントを行った。アライメント後の配列は、MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) を用いて NJ 法により系統樹を作成した。決定した遺伝子配列は GenBank/EMBL/DDBJ に登録した (Accession No. AB539970-AB540022)。

**菌体の観察と細胞サイズの確認** 単離した株の細胞の形状は、超高分解能電界放出型走査電子顕微鏡装置 (FE-SEM, 日立ハイテクノロジーズ製 S-5200) にて観察した。菌体は 1/20 の 25% グルタルアルデヒドで固定し、適量を孔径 0.1 μm フィルターにて捕集した。サンプルに含まれる水分が蒸発する際の表面張力で細胞が破壊されるのを防ぐため、このフィルターは孔径 0.1 μm フィルターでろ過された 50%, 70%, 90%, 95%, 97.5% のエタノールシリーズにて脱水のうえ、乾燥された。電子顕微鏡観察時に際しては、帶電を防ぎ明瞭な像を得るために、フィルターをイオンスパッタ (日立ハイテクノロジーズ製 E-1030) を用いて約 100 Å (0.01 μm) 以下の厚さに Pt 蒸着した。

また、電子顕微鏡での観察では固定・脱水時の細胞の変形が避けられないため、培養条件下の細胞サイズはフィルターの通過によって確認した。十分に濁った液体培養液 10 ml を、直接に接続した三つの孔径 0.2 μm フィルター (Advantec, Tokyo, Japan) でろ過した後、そのろ液に新たな R2A 培地 (Massa *et al.*, 1998) を添加した。ろ過に使用するフィルターのろ過孔は中性子線の照射により作られるが、一部のろ過孔はオーバーラップしており、フィルター上には規格孔径以上のろ過孔が少数存在している。今回はそのようなろ過孔で菌が通過するのを防ぐため、フィルターは三連にして試料および培養液をろ過した。これらのろ液培養液は三週間以上培養され、増殖が見られるかどうか観察した。

**ゲノムサイズの推定** ゲノムサイズの測定にはパルスフィールド電気泳動 (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE) 法を用いた。PFGE 用のプ

ラグはメーカー推奨の標準プロトコルで作成された (BIO-RAD, Richmond, CA)。作成したプラグは 100 μl の 50 U/ml 制限酵素 *AscI*, *NotI*, *FseI*, *SfiI*, *ApaI*, *DraI*, *SspI*, *XbaI*, *SpeI*, *XhoI*, *ClaI*, *I-CeuI* (New England Biolabs Inc., Beverly, USA) で消化した。PFGE は CHEF-DR II Pulse Field Gel Electrophoresis Systems (BIO-RAD) を用いて行われた。PFGE は *I-CeuI* で消化されたプラグと制限酵素処理をしていないプラグに対しては、3 V で 250 秒から 900 秒のパルスタイムで 50 時間行われた。他の制限酵素で消化されたプラグは、6 V で 6.7 秒から 54.2 秒のパルスタイムで 24 時間と、6 V で 0.2 秒から 8.6 秒のパルスタイムで 15 時間泳動された。菌のゲノムサイズは、CHEF Size Standard - Lambda ladder および CHEF Size Markers - Yeast Chromosomal (BIO-RAD) を参照して推定されたフラグメントの塩基長を合計することによって算出された。なお、算出されたゲノム長は、Genome Atlas 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas/>) および Prokaryote Genome Size Database (<http://www.genomesize.com/prokaryotes/>) 上の近縁種のゲノムサイズと比較した。

## 結果と考察

**単離された極小微生物の系統分類** 23 地点 47 つのサンプルから、合計 53 株のウルトラミクロバクテリアが単離された (Table 1)。その内訳は、*Proteobacteria* 門が 34 株、*Bacteroidetes* 門が 11 株、*Actinobacteria* 門が 5 株、*Spirochaetes* 門が 2 株、その他が 1 株であった (Table 1)。*Proteobacteria* 門 34 株のうち、15 株は *Alphaproteobacteria* 級、12 株は *Betaproteobacteria* 級、7 株は *Gammaproteobacteria* 級であった。サンプルは保存されている間にその微生物量と種組成が変化しうるため、それら定量・定性的な側面はこの研究の対象外であるが、CFB group (*Bacteroidetes* 門) と *Hylemonella* 属 (*Betaproteobacteria* 級) の株が全単離株のそれぞれ 20.7% (11 株) と 18.9% (10 株) と多くを占めていた。一般的に、これらの細菌群は生育が非常に早いことが知られており、本研究においても他の生育の遅いバクテリアに比べて検出されやすかった可能性がある。CFB group や *Hylemonella* 属など、糸状の形態を持つ filamentous bacteria は、先行研究においても孔径 0.2-μm フィルターのろ液から検出されている (Hood & MacDonell 1987; Schut *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 2004)。また、Elsaiied *et al.* (2001) の単離した

## 極小微生物 (nanobes) の分離培養と系統分類に関する研究

Table 1 Phylogenetic affiliation of isolated ultramicrobacteria and culturability of the filtrates

group	isolate	origin	location	sample	closest organism	accession number	similarity (%)	culturability of the filtrate <sup>a</sup>
<i>Alphaproteobacteria</i>								
KNA-P	AB539973	35.4 N	137.2 E	Gifu, Japan	<i>Phaeospirillum fahyvum</i> isolate S3	AF508113	98.0	-
I23	AB539970	35.4 N	132.7 E	Shimane, Japan	<i>Phaeospirillum</i> sp.	FJ529718	99.9	-
GB9	AB539976	40.1 N	94.7 E	Gobi desert, China	<i>Phaeospirillum fahyvum</i> isolate S3	AF50813.1	98.3	-
NP1	AB539983	79.4 N	13.4 E	the Arctic, Norway	<i>Phaeospirillum fahyvum</i> isolate S3	AF50813.1	99.7	-
NP3	AB539984	79.4 N	13.4 E	the Arctic, Norway	<i>Phaeospirillum fahyvum</i> isolate S3	AF50813.1	99.6	-
I26	AB539980	35.2 N	132.9 E	Shimane, Japan	<i>Rhizobium huailense</i> strain CCNWNNX0087	EU697955	92.6	+
I212	AB539981	35.2 N	132.9 E	Shimane, Japan	<i>Rhizobium huailense</i> strain CCNWNNX0087	EU697955	92.5	+
I216	AB539982	35.2 N	132.9 E	Shimane, Japan	<i>Rhizobium huailense</i> strain CCNWNNX0087	EU697955	92.6	-
GB6	AB539977	40.0 N	94.8 E	Gobi desert, China	<i>Rhizobium</i> sp. CCBaU 43060	DQ10062	92.7	+
NP9	AB540022	79.4 N	104.1 E	the Arctic, Norway	<i>Rhizobium huailense</i> strain CCNWNNX0087	EU697955	92.6	-
GB3	AB539978	36.0 N	104.1 E	Gobi desert, China	<i>Rhizobium huailense</i> strain CCNWNNX0087	EU697955	92.3	-
GB10	AB539979	40.1 N	94.7 E	Gobi desert, China	<i>Mycoplana</i> sp. ZS1-12	FJ889671.1	99.8	-
An19	AB539971	62.7 S	61.0 W	The Antarctic	<i>Mycoplana</i> sp. ZS1-12	FJ889671.1	99.8	no data
S-42	AB539972	62.7 S	61.0 W	The Antarctic	<i>Afipia felis</i>	AF538177.2	99.8	-
I217	AB539973	35.2 N	132.9 E	Shimane, Japan	<i>Hylenomella gracilis</i> isolate WQP1	AJ565423.1	99.2	+
I29-1	AB539986	35.2 N	132.9 E	Shimane, Japan	<i>Hylenomella gracilis</i> isolate WQP1	AJ565423.1	99.1	+
I210	AB539987	35.2 N	132.9 E	Shimane, Japan	<i>Hylenomella gracilis</i> isolate WQP1	AJ565423.1	99.9	+
I219-2	AB539988	35.4 N	132.7 E	Shimane, Japan	<i>Hylenomella gracilis</i> isolate WQP1	AJ565423.1	99.6	+
I220-1	AB539989	35.4 N	132.7 E	Shimane, Japan	<i>Hylenomella gracilis</i> isolate WQP1	AJ565423.1	99.9	+
KNG	AB539993	34.3 N	132.6 E	Hiroshima, Japan	<i>Hylenomella gracilis</i> isolate WQP1	AJ565423	99.9	+
I27-1	AB539992	35.2 N	132.9 E	Shimane, Japan	<i>Hylenomella sp.</i> WQH1	AJ565430.1	99.9	-
Kha	AB539994	34.2 N	132.6 E	Hiroshima, Japan	<i>Hylenomella gracilis</i> isolate LL	DQ861290.1	99.9	+
Shi9	AB539995	34.4 N	8.0 E	Sahara desert, Tunisia	<i>Hylenomella gracilis</i> isolate LL	DQ861290.1	99.7	+
I25-1	AB539991	35.2 N	132.9 E	Shimane, Japan	<i>Hylenomella gracilis</i> isolate WQT2	AJ565424.1	100.0	-
I28	AB539990	35.2 N	132.9 E	Shimane, Japan	<i>Hylenomella gracilis</i> RR	DQ861289.1	99.2	+
I24	AB539996	35.4 N	132.7 E	Shimane, Japan	Beta proteobacterium KF034	AB376632.1	98.4	+
KNA-A	AB539974	35.4 N	137.2 E	Gifu, Japan	<i>Acidovorax</i> sp. G3DM-83	EU697287	99.4	-
K1Y	AB540000	34.4 N	124.7 E	Hiroshima, Japan	<i>Bacteroides</i> bacterium 3B-2	GU17702	94.4	no data
N2	AB540001	34.5 N	132.7 E	Hiroshima, Japan	Bacterium TG141	AB308367	93.0	no data
ArSB	AB539997	79.4 N	13.4 E	the Arctic, Norway	Troll Hot Spring	AB308367	93.4	no data
GS	AB539998	78.2 N	15.5 E	the Arctic, Norway	<i>Bacteroides</i> bacterium 3B-2	GU17702	93.7	-
THS	AB539999	79.4 N	13.4 E	the Arctic, Norway	Bacterium TG141	AB308367	95.3	+
K1P	AB540002	31.9 N	130.0 E	Koshiki island, Japan	<i>Gracilimonas tropica</i> strain CL-CBa62	EF988655	96.5	+
K1Y	AB540003	31.9 N	130.0 E	Koshiki island, Japan	<i>Flexibacter eggogens</i> , strain IFO 15974	AB078038	96.6	+
YMK	AB540004	33.6 N	132.0 E	Olitia, Japan	<i>Flexibacteraceae</i> bacterium DG1232	DQ486479.1	99.3	+
KoR	AB540005	33.9 N	130.9 E	Yamaguchi, Japan	<i>Flexibacteraceae</i> bacterium MOLA_398	AM99075.1	97.0	-
T1	AB540006	33.9 N	129.6 E	Hiroshima, Japan	<i>Pseudomonas</i> sp. coprodearum	AB078044	96.4	+
Kim	AB540007	33.5 N	131.1 E	Yamaguchi, Japan	<i>Cytophaga</i> sp. I-377	AB078044	98.9	+
kure	AB540008	34.2 N	132.6 E	Hiroshima, Japan	<i>Saccharospirillum impatiens</i> strain EL-105	AJ1315984	96.7	+
NOW	AB540009	29.5 N	124.2 E	Okinawa, Japan	<i>Arhodanomas</i> sp. El-201	AJ1315984	96.0	+
I22	AB540010	35.4 N	132.7 E	Shimane, Japan	<i>Pseudomonas pseudodenigrigenes</i>	EU815035.1	98.1	+
ArSA	AB540011	79.4 N	13.4 E	the Arctic, Norway	<i>Pseudomonas</i> sp. PSA_A44	DQ62869	99.9	no data
F9	AB540012	34.3 N	132.7 E	Hiroshima, Japan	<i>Reinekea blandensis</i> MED297	DQ403810	99.0	no data
KE	AB540013	35.2 N	129.1 E	Yamaguchi, Japan	<i>Vibrio</i> sp. BLI-41	AJ1565413	99.7	no data
ShrSW	AB540014	35.9 N	10.6 E	Tunisia	<i>Oceanispirillum halophilus</i>	AY21772.1	99.2	+
GB1	AB540015	40.1 N	94.4 E	Gobi desert, China	<i>Blastococcus</i> sp.	AM747817.1	98.5	+
GB5	AB540016	40.1 N	94.7 E	Gobi desert, China	<i>Blastococcus jejuniensis</i>	FJ214361.1	99.3	+
KNA-M	AB539975	35.4 N	137.2 E	Gifu, Japan	<i>Micracteace luteus</i> strain INBL-1	DQ209983	98.5	+
KNC	AB540017	34.3 N	132.6 E	Hiroshima, Japan	<i>Microbacteriaceae</i> bacterium MW-H-Vie1	EU438932	99.9	+
NP3-12	AB540018	79.4 N	13.4 E	the Arctic, Norway	<i>Blastococcus</i> sp. YM 65287	FJ214361	99.7	+
I219-1	AB540020	35.4 N	132.7 E	Shimane, Japan	<i>Spirochaeta</i> sp. MW-H-HuV24	AJ365434.1	97.3	no data
I220-2	AB540019	35.4 N	132.7 E	Shimane, Japan	<i>Spirochaeta</i> sp. MW-H-HuV24	AJ365434.1	97.4	no data
Sir3	AB540021	33.5 N	10.0 E	Tunisia	<i>Dokdonella</i> sp. Ram5-2	AM981200	83.2	no data

<sup>a</sup> Liquid cultures of each isolate were filtered through three 0.2-μm-pore-size filters. The filtrates were added to R2A medium and observed after 3 weeks. +: Growth was observed. -: No growth was observed.

*Cytophaga-like bacteria* は、飢餓条件化において 0.2- $\mu\text{m}$ -通過細胞を放出することも報告されている。

一方、*Rhizobiales* 目 (*Alphaproteobacteria* 細) (Fig. 1) と *Blastococcus* 属 (*Actinobacteria* 門) は、これまでウルトラミクロバクテリアとしての報告がなかったものであり、今回矮小細胞は確認できなかつたが、今後、生活史の各段階における詳細な形態観察などが必要である。また、*Rhizobiales* 目 (*Alphaproteobacteria* 細) 7 株と *Bacteroidetes* 門 7 株、および Shr 3 株 (Fig. 2) は、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析の結果、既知の培養株との相同性が 97% 以下と、非常に低い値を示した (Table 1)。これはろ過によって生育の早いものが効率的に除かれ、生育が遅く今まで検出できなかつた株を取得しやすくなつたことに起因するかもしれない (Hahn, 2004)。さらに、北極や日本で取得された新規 *Bacteroidetes* 門 7 株同士が互いに近縁ではなかつた (77.4% to 93.0% similarity) のに対し、北極や日本、中国から単離された新規 *Rhizobiales* 目 7 株は互いに近縁であり (97.2% to 100% similarity)，陸域に普遍的に存在するウルトラミクロバクテリアであると考えられる。

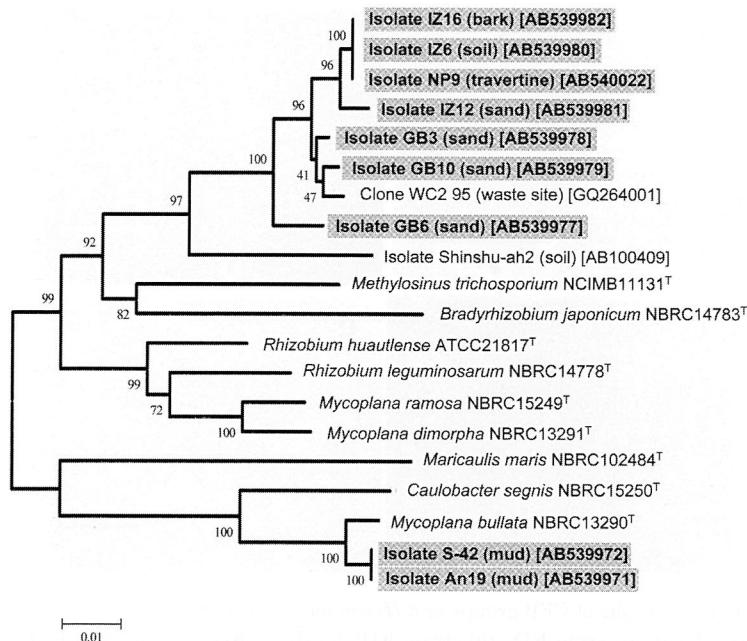
広島県の黒瀬川から単離された KNC 株 (Accession No. AB540017) は Hahn et al. (2003) が単離した Luna Cluster に属する細菌 (*Actinobacteria* 門) に非常に近縁だった (99.7% similarity)。Luna Cluster はヨーロッパおよび中国のさまざまな湖沼から単離されたユビキタスな obligate ultramicrobacteria cluster (偏性ウルトラミクロバクテリア群) である。

**培養条件における細胞サイズ** FE-SEM による菌体観察の結果、CFB group に属する KIP 株、KIY 株、KOr 株、および *Hylemonella* 属 (*Betaproteobacteria* 細) に属する IZ19-2 株は長径 1.5-3.0  $\mu\text{m}$  の細い長桿菌であった (Fig. 3)。これらに目立つた矮小細胞は認められなかつた。細胞の固定・脱水などにより細胞のサイズは変化する可能性があるものの、これらの株ではいずれも 0.2-0.3  $\mu\text{m}$  前後と比較的細い短径が観察され、矮小細胞としてではなく長桿菌として孔径 0.2  $\mu\text{m}$  フィルターを通過する可能性が考えられた。*Vibrio* 属である KE 株は短径も約 0.15  $\mu\text{m}$  前後と非常に小さかつた (Fig. 4)。これらの系統は以前から 0.2  $\mu\text{m}$  通過菌として報告があり (Hahn et al., 2003; Schut et al., 1997), 0.2  $\mu\text{m}$  通過画分に遍在する系統群といえるだろう。また、*Betaproteobacteria* 細に属する IZ4 株、*Afipia* 属 (*Alphaproteobacteria* 細) に属する IZ17 株、および *Oceaniserpentilla* 属 (*Gammaproteobacteria*

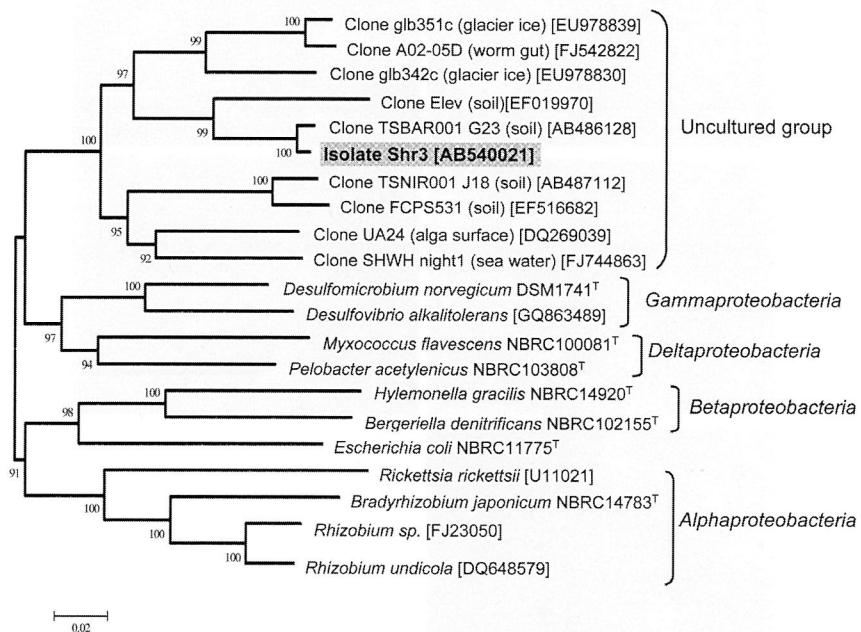
細) に属する ShrSW 株なども短径が 0.2-0.3  $\mu\text{m}$  前後と比較的小さい桿菌であった (Fig. 4)。また、*Rhizobiales* 目 (*Alphaproteobacteria* 細) に属する GB3 株、S-42 株、IZ6 株および *Phaeospirillum* 属 (*Alphaproteobacteria* 細) に属する NP1 株、NP3 株は短径約 0.3-0.4  $\mu\text{m}$  と比較的太い短桿菌であった (Fig. 5)。系統解析の結果、既知の偏性ウルトラミクロバクテリアに 99.7% と非常に近縁であった KNC 株は C 字型の形状をしていた (Fig. 6d)。

一方、*Rhizobiales* 目 GB10 株、*Phaeospirillum* 属 GB9 株、および *Actinomycetales* 目 KNA-M 株は、短径が 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  と前述した单離株に比べて大きかった (data not shown)。このような巨大な細胞が孔径 0.2  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過後の培養液に存在している原因として、細胞の多形が考えられる。本研究では、これらの株を再び孔径 0.2  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過 (再ろ過) した培養液中に増殖活性はみられたものの、矮小細胞が観察されなかつた。これは培養条件下で 0.2  $\mu\text{m}$  以上の大きさを持つ菌でも、一時的に細胞が直径 0.2  $\mu\text{m}$  以下に縮小しており、フィルターを通過した可能性が考えられる。なお、CFB group の单離株が富栄養条件といえる培養液のろ液に培養活性を示したという事実は、このグループが生活史の一部に矮小細胞を持つとされる報告 (Elsaiied et al., 2001) を裏付けている。また、顕微鏡観察時に比較的大きな細胞サイズを確認され、再ろ過後に増殖活性がみられなかつた NP9 株、GB3 株、および IZ16 株などは、生活史の一部で矮小化するがその数が少なく、ろ液に矮小細胞が到達しなかつた可能性がある。

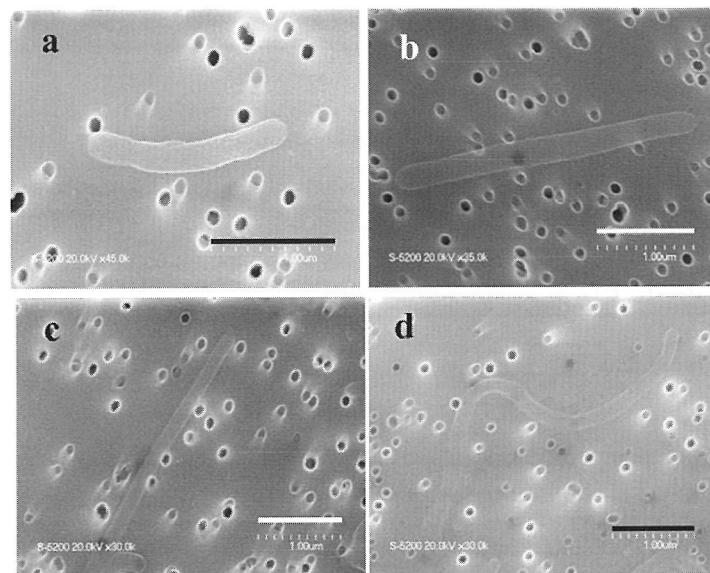
**極小微生物のゲノムサイズ** 単離した 53 株のうち、16 株のゲノムサイズを PFGE によって算出した。それらの制限酵素処理断片の数と長さを Table 2 と Table 3 に示した。本研究では、断片長の合計をもってゲノムサイズの推定根拠とした。その結果、16 株のゲノムサイズは 1.6 Mb から 4.8 Mb の間にあることがわかつた。残りの 37 株については、細胞数の不足や泳動像におけるスマアの発生などにより、ゲノムサイズを算出することができなかつた。通常、PFGE には約  $5 \times 10^8$  cells/ml の細胞数が必要であるが (BIORAD)，一部の株では非常に増殖が遅く、必要な菌体量を確保することができなかつた。なお、ウルトラミクロバクテリアの一部は非常に増殖が遅いことが知られている (Hahn et al., 2003)。ゲノムを算出した株について、その近縁種とのゲノムサイズを比較した結果、CFB group である THS 株と T1 株は、既に全塩基長が解読されている CFB group 42 株の中で小さい



**Fig. 1** Neighbor-joining tree showing the relationship between isolated *Rhizobiales* strains and other clones/phylotypes. Names in bold indicate strains isolated in this study. There were a total of 1268 positions of the 16S rRNA gene in the final dataset. Phylogenetic analyses were performed in MEGA4. Bootstrap values of 1000 replications greater than 50% are shown at the nodes. Origins of the clones are in round brackets, and 16S rRNA gene sequence accession numbers are in square brackets. Scale bar: 0.01 nucleotide substitution per site.

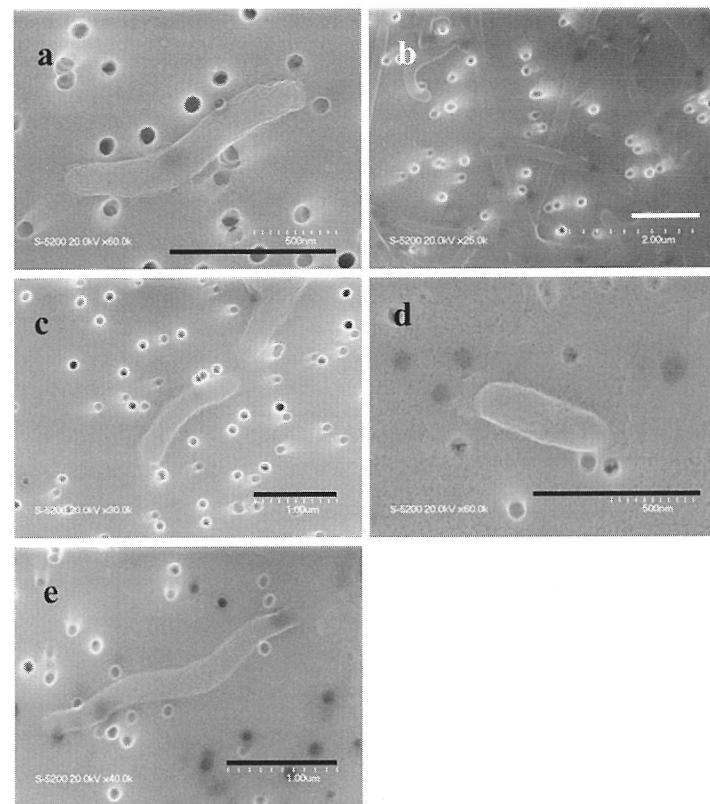


**Fig. 2** Neighbor-joining tree showing the relationship between isolated Shr3 strain and other clones/phylotypes. Names in bold indicate strains isolated in this study. There were a total of 1226 positions of the 16S rRNA gene in the final dataset. Phylogenetic analyses were performed in MEGA4. Bootstrap values of 1000 replications greater than 50% are shown at the nodes. Origins of the clones are in round brackets, and 16S rRNA gene sequence accession numbers are in square brackets. Scale bar: 0.02 nucleotide substitution per site.



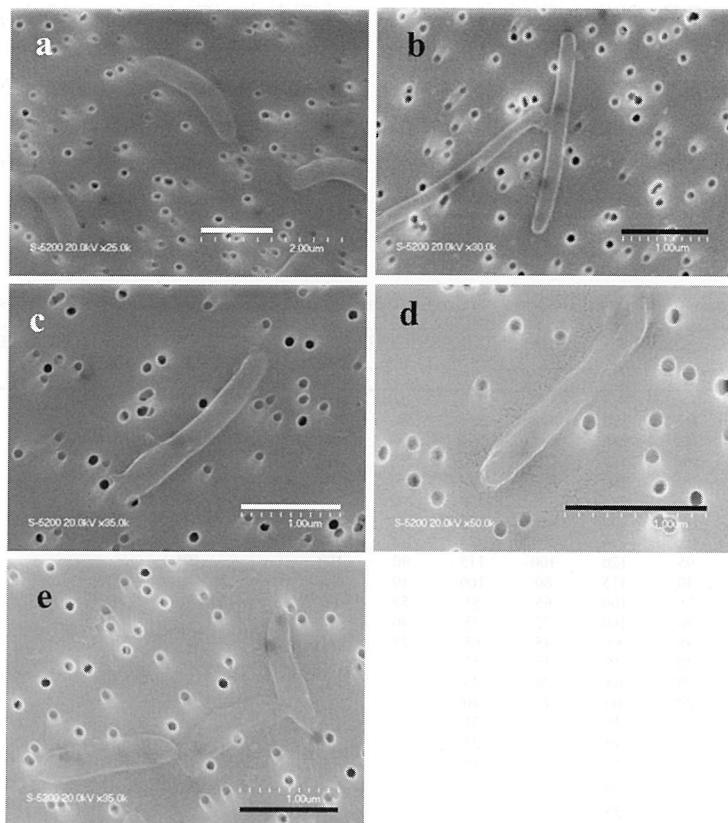
**Fig. 3** Scanning electron micrographs of CFB groups and *Hylemonella* strains.

Thin filamentous cells of (a) strain KIY, (b) strain KIP, (c) strain KOr, and (d) strain IZ19-2. Diameters of these cells are about  $0.2\text{ }\mu\text{m}$ . Scale bars =  $1\text{ }\mu\text{m}$ , pore sizes =  $0.1\text{ }\mu\text{m}$  in diameter.



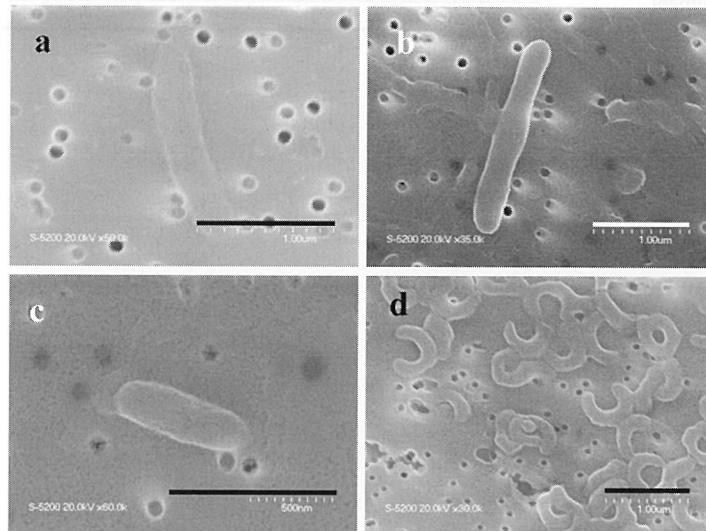
**Fig. 4** Scanning electron micrographs of other relatively small strains.

(a) Rod cells of strain IZ4. (b) Thin filamentous cells of strain KE. (c) (d) Short rod cells of strain IZ17. (e) Rod cells of strain ShrSW. Scale bars =  $1\text{ }\mu\text{m}$ , pore sizes =  $0.1\text{ }\mu\text{m}$  in diameter.



**Fig. 5** Scanning electron micrographs of *Phaeospirillum* and *Rhizobiales* strains.

Short rod cells of (a) strain NP1 and long rod cells of (b) strain NP3. Rod cells of (c) strain GB3, (d) strain IZ6, and (e) strain S-42. These cells are about 1.5-2.0  $\mu\text{m}$  in length and 0.3-0.4  $\mu\text{m}$  in width. Scale bars = 1  $\mu\text{m}$ , pore sizes = 0.1  $\mu\text{m}$  in diameter.



**Fig. 6** Scanning electron micrographs of other isolated strains.

(a) Short rod cells of strain Shr3, (b) rod cells of strain IZ2, (c) short rod cells of strain GB1, and (d) C-shaped cells of KNC. Scale bars = 1  $\mu\text{m}$ , pore sizes = 0.1  $\mu\text{m}$  in diameter.

方からそれぞれ34番目と24番目であり、目立ったゲノムの小ささは認められなかった (Fig. 7a)。*Actinobacteria* 門に属する KNA-M 株は 2.6 Mb のゲノムをもち、127 株中35番目と比較的小さいゲノムを示した (Fig. 7b)。また、*Betaproteobacteria* 級では IZ4 株が 129 株中 4 番目と非常に小さいゲノムサイズ

を示した (Fig. 7c)。*Alphaproteobacteria* 級では 203 株中 KNA-P 株が 122 番目、GB10 株が 96 番目、S-42 株と NP9 株が 85 番目、NP3 株と IZ3 株が 81 番目、IZ6 株が 72 番目であった (Fig. 7d)。

また、KNC 株 (*Actinobacteria* 門) については、その制限酵素処理断片の数と長さを Table 3 に示し

**Table 2** Genome sizes of isolated strains estimated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

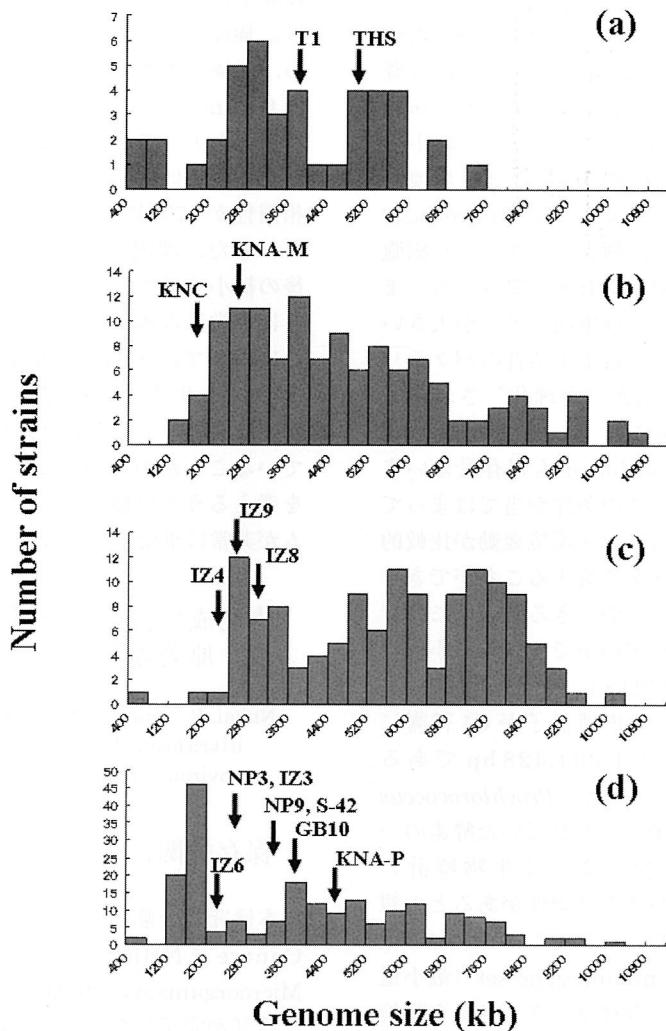
Fragment	Fragment size (kb) for restriction enzymes										Fragment size (kb) for intact genomes				
	IZ6 <i>Spe</i> I	IZ4 <i>Swa</i> I	IZ9 <i>Xba</i> I	IZ8 <i>Xba</i> I	NP1 <i>Xba</i> I	IZ3 <i>Xba</i> I	An19 <i>Dra</i> I	NP9 <i>Ssp</i> I	S-42 <i>I-Ceu</i> I	GB10 <i>Xba</i> I	KNA-M	T1	kure	KNA-P	THS
1	630	365	440	475	525	370	650	600	3100	650	2600	3500	4000	4120	4800
2	365	310	410	310	440	330	500	520		630					
3	260	300	310	210	415	305	380	450		530					
4	230	240	200	165	225	270	365	420		435					
5	195	225	185	160	200	235	250	300		365					
6	120	160	160	145	185	210	240	290		280					
7		105	140	130	150	185	220	145		170					
8		85	105	125	135	135	105	120		145					
9		65	95	120	100	115	90	100		105					
10			90	115	80	100	80	85							
11			75	100	65	85	55	60							
12			50	100	55	75	40								
13			45	85	45	65	25								
14			30	75	35	55									
15			25	65	25	45									
16			20	60	15	40									
17					45	35									
18					40	25									
19					35	15									
20					30										
21					25										
22					20										
Total	1800	1855	2380	2635	2695	2695	3000	3090	3100	3310	2600	3500	4000	4120	4800

Chromosomal DNA from each isolate was digested with the proper enzymes and electrophoresed to resolve each restriction fragment. The fragment lengths of 15 strains were calculated to be 1800–4800 kb.

**Table 3** Genome size of strain KNC estimated by PFGE

Fragment	Fragment size (kb) for restriction enzymes			
	<i>Asc</i> I	<i>Fse</i> I	<i>Not</i> I	<i>I-Ceu</i> I
1	570	720	420	1700
2	250	610	200	
3	240	290	150	
4	220	120	100	
5	130		90	
6	120		85	
7	60		80	
8		75		
9		60		
10			50	
11			45	
12			40	
13			40	
14			30	
15			25	
16			20	
Total	1590	1740	1510	1700
Average: 1635 kb				

Chromosomal DNA of strain KNC was digested with 4 restriction enzymes. The fragments were separated by PFGE and their number and sizes were estimated. The lengths of the restriction fragments were between 1590 and 1740 kb (average 1635 kb).



**Fig. 7** Distribution of genome sizes of known culturable strains and strains isolated in this study.

(a) Known CFB group and strains T1 and THS. Data of 42 strains were obtained from the Genome Atlas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas-3.0/>) and Prokaryote Genome Size Database(<http://www.genomesize.com/prokaryotes/>). (b) Known actinobacterial strains and strains KNC and KNA-M. Data of 127 strains was obtained. (c) Known betaproteobacterial strains and strains IZ4, IZ8, and IZ9. Data of 129 strains was obtained. (d) Known alphaproteobacterial strains and strain GB10, IZ3, IZ6, KNA-P, NP3, NP9, and S-42. Data of 203 strains was obtained.

た。断片長の合計は、ゲノム長の合計を 1.51 Mb から 1.74 Mb（平均 1.64 Mb）に近似した。また、制限酵素処理されていない intact DNA は約 1.70 Mb の位置に泳動された。これは2009年12月現在、ゲノムの解読されている *Bacteria* 界の 938 株 (Genome Atlas) の中で 5 番目に小さい。KNC 株が属する Luna Claster は、他の偏性ウルトラミクロバクテリアである *Pelagibacter ubique* (Giovannoni *et al.*, 2005) より *Polynucleobacter necessarius* cluster (Hahn *et*

*al.*, 2009) との間に二つの共通点を持っている。第一の共通点は前述した C 字型の偏性ウルトラミクロバクテリアであること (Fig. 6d)，第二の共通点は水系にユビキタスに存在することである。そして、今回の実験結果はここに小さなゲノムを持つ、という三つ目の共通点を与える。ゲノムサイズが小さいものは必ずしもウルトラミクロバクテリアとは限らない (Waters *et al.*, 2003, Giovannoni *et al.*, 2008) が、その中でも偏性ウルトラミクロバクテリアは高確率で小さいゲノム

をもつ、と言う事ができるだろう。

自由生活性の微生物のゲノム縮小に関する研究例はほとんどない (Marais *et al.*, 2008)。海洋に最も豊富な光合成原核生物である *Prochlorococcus marinus* はその数少ない例の一つであり、そのゲノム縮小は DNA 修復酵素の破壊による変異率の増加と、環境による強い選択力によって起こされていた (Dufresne *et al.*, 2005)。ゲノムの縮小は、物質や空間という細胞内の資源を節約し、集団の繁栄に有利に働きうる。また、こうした環境による選択圧は集団サイズが大きいほど効果的になる。だからこそ自由生活性のバクテリオプランクトンで特にゲノムが“合理化”されうる (Giovannoni *et al.*, 2005)。Luna Cluster と *Polynucleobacter necessarius* cluster も現存量はいまだ解明されていないものの、この条件が当てはまっている。さらに、水系では陸域に比べ環境変動が比較的小ないため、代謝能の多様性を放棄することができ、これはゲノムの一部を省くことができるということであろう。たとえば、バクテリアの中で現在最も小さいゲノムを持つ HTCC2181 (OM43 clade, *Betaproteobacteria* 細胞) は、その遺伝子が C1 代謝に特化しており、ゲノム長は 1,304,428 bp である (Giovannoni *et al.*, 2008)。また、*Prochlorococcus marinus* も概日リズムに必須といわれていた酵素の一つを欠き、ゲノムの合理化によって生物時計の robustness (頑健性) が失われた可能性があるとの報告がある (Holzendorff, 2008)。このように、どの環境に特化するかによって minimum gene set (最小遺伝子セット) は変化しうる。今後は、さまざまな環境から偏性ウルトラミクロバクテリアを単離し、それらゲノムを比較することが最小遺伝子セットの解明に肝要であろう。

## 要 約

微生物、特にバクテリアやアーキアなどの原核微生物は  $\mu\text{m}$  サイズであり microbes と呼ばれている。寄生性 (病原性) や共生性の微生物を除いて、自由生活を営める微生物の最小サイズは一般に  $0.2\mu\text{m}$  とされ、医薬・食品業界や微生物学諸分野で孔径  $0.2\mu\text{m}$  のフィルターによる濾過滅菌 (除菌) が広く用いられている。しかし、近年になって、孔径  $0.2\mu\text{m}$  のフィルターを通過する微生物、いわゆるウルトラミクロバクテリアと呼ばれる極小微生物の存在が確実視されるようになってきたが、その生態や系統に関する知見はまだ乏しい。しかし、数少ない (筆者らの) 先行研究により、極小微生物には今までと全く系統の異なる分

類群が含まれることが分かってきた。そこで本研究では、極微小生物の分離株コレクションを構築するため、南極・北極・砂漠を含む多様な環境試料から、孔径  $0.2\mu\text{m}$  のフィルターを通過する 58 株のウルトラミクロバクテリアを分離した。16S rRNA 遺伝子に基づいた系統解析の結果、15 株 (28%) が既知培養株との相同性が 97% 以下となり、新種であることが分かった。また、湖沼に遍在するとされ、終生を  $0.2\mu\text{m}$  前後の極小サイズで過ごす偏性ウルトラミクロバクテリアに非常に近縁な株が河川試料より単離された。この株について、Pulse Field Gel Electrophoresis 法によりゲノムサイズの推定を行ったところ、それが約  $1.59\text{ Mb}$  から  $1.74\text{ Mb}$  と、比較的小さなゲノムをもっていることが明らかになった。この結果は最小ゲノムを考えるうえで偏性ウルトラミクロバクテリアのゲノムが非常に重要であることを示している。

## 本助成で得られた研究成果の報告（口頭発表、原著論文）

Nakai, R., Shibuya, E., & Naganuma, T. Genome sizes of ultramicrobacteria isolated from natural environments. (投稿準備中)

## 保存機関に寄託した菌株

本研究で分離した菌株を NITE Biological Resource Centre (NBRC) および Japan Collection of Microorganisms (JCM) に寄託した。そのうち、既に寄託が完了したものは以下の通りである。

*Hylemonella* sp. KNG = NBRC 105390  
*Hylemonella* sp. Kha = NBRC 105391  
*Microbacteriaceae* sp. KNC = NBRC 105389  
*Acidvorax* sp. KNA6 (A) = NBRC 105509  
*Phaeospirillum* sp. KNA6 (P) = NBRC 105510  
*Arhodomonas* sp. Kure = NBRC 105621  
*Arhodomonas* sp. NOW = NBRC 105622  
*Arhodomonas* sp. Takehara = NBRC 105623  
*Flavobacterium* sp. T1 = NBRC 105624  
*Sphingomonas* bacterium KJY = NBRC 105625  
*Blastococcus* sp. GB = NBRC 106559

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なる助成を賜りました財團法人発酵研究所の関係者各位に心より感謝いたし

ます。また、貴重なサンプルを提供していただきました核燃料サイクル開発機構 東濃地科学センターの皆様に深く御礼申し上げます。

## 文 献

- Aljanabi, S. M. & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* **25**: 4692-4693.
- Audic, S., Robert, C., Campagna, B., Parinello, H., Claverie, J. M., Raoult, D. & Drancourt, M. (2007). Genome analysis of *Minibacterium massiliensis* highlights convergent evolution of water-living bacteria. *PloS Genetics* **3**: 1454-1463.
- DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5865-5869.
- Duda, V. I., Suzina, N. E., Akimov, V. N., Vainshtein, M. B., Dmitriev, V. V., Baranova, E. S., Abashina, T. N., Oleynikov, R. R., Esikova, T. Z. & Boronin, A. M. (2007). Ultrastructural organization and development cycle of soil ultramicrobacteria belonging to the class *Alphaproteobacteria*. *Microbiol.* **76**: 575-584.
- Dufresne, A., Garczarek, L. & Partensky, F. (2005). Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. *Genome Biology* **6**: R14.
- Elsayed, H. E., Sato, M. & Naganuma, T. (2001). Viable *Cytophaga*-like bacterium in the 0.2 μm-filtrate seawater. *System. Appl. Microbiol.* **24**: 618-622.
- Fukuba, T., Sato, M., Elsayed, H. E. & Naganuma, T. (2002). Overlooked microbial agents in aquaculture: Nanobacteria. In: Lee, C. S. & O'Bryen, P. (eds). *Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp 99-107.
- Giovannoni, S. J., Tripp, H. J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K. L., Baptista, D., Bibbs, L., Eads, J., Richardson, T. H., Noordewier, M., Rappé, M. S., Short, J. M., Carrington, J. C. & Mathur, E. J. (2005). Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* **309**: 1242-1245.
- Giovannoni, S. J., Hayakawa, D. H., Tripp, H. J., Stingl, U., Givan, S. A., Cho, J. C., Oh, H. M., Kitner, J. B., Vergin, K. L. & Rappé, M. S. (2008). The small genome of an abundant coastal ocean methylotroph. *Environ. Microbiol.* **10**: 1771-1782.
- Haller, C. M., Rölleke, S., Vybiral, D., Witte, A. & Velimirov, B. (1999). Investigation of 0.2 μm filterable bacteria from the western Mediterranean Sea using a molecular approach: dominance of potential starvation forms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 153-161.
- Hahn, M. W. (2003). Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessaries* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5248-5254.
- Hahn, M. W., Lünsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Höfle, M. G., Boenigk, J. & Stadler, P. (2003). Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1442-1451.
- Hahn, M. W., Stadler, P., Wu, Q., & Pöckl, M. (2004). The filtration-acclimatization method for isolating of an important fraction of the not readily cultivated bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **57**: 379-390.
- Hahn, M. W. (2004). Broad diversity of viable bacteria in 'sterile' (0.2 μm) filtered water. *Res. Microbiol.* **155**: 688-691.
- Hahn, M. W., Lang, E., Brandt, U., Wu, Q. L. & Scheuerl, T. (2009). Emended description of the genus *Polynucleobacter* and the species *Polynucleobacter necessarius* and proposal of two subspecies, *P. necessarius* subsp. *necessarius* subsp. nov. and *P. necessarius* subsp. *asymbioticus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 2002-2009.
- Holzendorff, J. (2008). Genome streamlining results in loss of robustness of the circadian clock in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* PCC 9511. *Journal of Biological Rhythms* **23**: 187-199.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J. & Jasper, S. (1977). Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 123-127.
- Hood, M. A. & MacDonell, M. T. (1987). Distribution of ultramicrobacteria in a gulf coast estuary and induction of ultramicrobacteria. *Microb. Ecol.* **14**: 113-127.
- Jamtveit, V., Hammer, Ø., Andersson, C., Dysthe, D. K., Heldman, J. & Fofel, M. L. (2006). Travertines from the Troll thermal springs, Svalbard. *Norwegian Journal of Geology* **86**: 387-395.
- Karlin, S. & Altsul, S. F. (1990). Method for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2264-2268.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., & Wilm, A. (2007). ClustalW and ClustalX version 2.0 Bioinformatics **23**: 2947-2948.
- MacDonell, M. T. & Hood, M. A. (1982). Isolation and characterization of ultramicrobacteria gulf coast estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 566-571.
- Maniloff, J. (1997). Nanobacteria: size limits and evidence. *Science* **276**: 1776.
- Massa, S., Caruso, M., Trovatelli, F. & Tosques, M. (1998). Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. *World Journal of Microbiol. and Biotechnol.* **14**: 727-730.
- Marais, G. A. B., Calteau, A. & Tenaillon, O. (2008). Mutation rate and genome reduction in endosymbiotic and free-living bacteria. *Genetica* **134**: 205-210.
- Miteva, V. I. & Brenchley, J. E. (2005). Detection and isolation of ultrasmall microorganisms from a 12,000-

- year-old Greenland glacier ice core. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7806-7818.
- Miyoshi, T., Iwatsuki, T. & Naganuma, T. (2005). Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1084-1088.
- Moran, N. A. (2002). Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* **108**: 583-586.
- Mushegian, A. R. & Koonin, E. V. (1996). A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10268-10273.
- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., Moran, N. A. & Hattori, M. (2006). The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science* **314**: 267.
- Naganuma, T., Miyoshi, T. & Kimura, H. (2007). Phylotype diversity of deep-sea hydrothermal vent prokaryotes trapped by 0.2- and 0.1-microm-pore-size filters. *Extremophiles* **11**: 637-646.
- Schut, F., Gottschal, J. C. & Prins, R. A. (1997). Isolation and characterization of marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *FEMS Microbiol. Reviews* **20**: 363-369.
- Sieburth, J. M., Smetacek, V. & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartment of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 1256-1263.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Torella, F. & Morita, R. Y. (1981). Microcultural study of bacteria size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 518-527.
- Watson, S. W., Novitsky, T. J., Quinby, H. L., & Vilois, F. W. (1997). Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 940-946.
- Waters, E., Hohn, M. J., Ahel, I., Graham, D. E., Adams, M. D., Barnstead, M., Beeson, K. Y., Bibbs, L., Bolanos, R., Keller, M., Kertz, K., Lin, X., Mathuer, E., Ni, J., Podar, M., Richardson, T., Sutton, G. G., Simon, M., Söll, D., Stetter, K. O., Short, J. M., & Noordewier, M. (2003). The genome of *Nanoarchaeum equitans* insight into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 12984-12988.
- Zimmermann, R. (1977). Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. In: Rheinheimer G (eds) *Microbial ecology of a brackish water environment*. Springer-Verlag, Berlin, pp 103-120.

## 難培養性放線菌類の分離と分類および生物活性物質探索への応用

高橋洋子

北里大学 北里生命科学研究所 微生物機能研究室  
〒108-8641 東京都港区白金5-9-1

### Isolation of new actinobacterial strains for the screening of new bioactive compounds

Yōko Takahashi

Laboratory of Microbial Functions, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University  
5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

One of the more efficient ways of discovering novel bioactive metabolites from microorganisms is through the isolation of new microorganisms. About 60% of novel bioactive metabolites have been derived from actinomycete strains.

In order to get new microorganisms, we tried to isolate actinomycete strains from plant roots. Eighty actinomycete strains were isolated from the root of *Goodyera procera* collected in Iriomote Island. The majority was rare actinomycetes, *Micromonospora* (18.8%), *Polymorphospora* (16.3%), *Sphaerisporangium* (11.3%) and others. Furthermore, the new genus *Phytohabitans suffuscus* was proposed for 9 strains (11.3%) in this study.

We previously reported that superoxide anion ( $O_2^-$ ) was generated from glucose-peptone-meat extract (GPM) medium and novel actinobacterial strains were isolated using GPM medium supplemented with superoxide dismutase (SOD) and catalase. The specific types of reactive oxygen species generated from GPM medium were investigated in this study. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) were also detected. Among components of GPM medium, the meat extract showed the highest  $O_2^-$  generation. Novel actinobacteria strains, 4 new genera and 8 new species, were isolated using radical scavengers, SOD, catalase, ascorbic acid and rutin.

Key words: *Actinobacteria*, Endophyte, Reactive oxygen species, Radical scavengers, Bioactive metabolites

### 緒 言

これまでに発見された新規生物活性物質の約60%は放線菌の二次代謝産物から発見されている。多くの放線菌が土壤試料から分離され、新規天然物の探索に用いられてきた。また、微生物資源の開拓のために様々な工夫がなされてきており、われわれの研究室でも新しい微生物資源を得るために様々な試みを行なってきた (Matsumoto *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 2003;

E-mail: ytakaha@lisci.kitasato-u.ac.jp

共同研究者：松本厚子（北里大学北里生命科学研究所）

中島琢自（北里大学感染制御研究機構）

Takahashi & Ōmura, 2003; Takahashi, 2004; 高橋, 2004; Matsumoto *et al.*, 2006). 分離法の工夫では抗生素耐性を利用した希少放線菌の分離、走化性を利用して運動性放線菌の分離、超音波処理による土壤団粒内部からの放線菌の分離、固形剤としてのゲランガムの利用、さらに、分離に用いる試料の多様性を得るべく、植物の葉や砂漠の砂からの放線菌の分離を行なった。これら分離株の培養液から多くの新規化合物が見出された (Ōmura, 2008).

一方、これまでに分離された微生物種は自然環境中の数%程度であり、多くの未利用微生物が環境中に眠っているといわれている。我々は、これら未利用微生物の分離法を開発すべく検討を行なってきた。この研究

の過程で、研究室で一般に用いられる寒天培地から活性酸素（スーパーオキシドアニオン、 $O_2^-$ ）が発生することを見出した。さらに、この除去のためにスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）やカタラーゼを添加すると新規微生物が分離されることを見出し報告してきた（Takahashi *et al.*, 2003）。分離された新規 *Actinobacteria*, *Patulibacter minatonensis* KV-614<sup>T</sup> (Takahashi *et al.*, 2006) は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による系統樹の根元に位置し分離例が極めて少ない一群に位置している。また、本菌株は、一般に微生物分離に用いられる培地成分の 200 倍希釀寒天培地で 3 ヶ月間培養して得られた菌株 (Janssen *et al.*, 2002) や土壤中の DNA クローンのみが知られている一群 (Sait *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2003) に高い相同意を示す。

本研究では、生物活性物質探索のための新たな微生物資源を得るために、植物の根に注目し放線菌の分離を行ない、種レベルのフローラを調べるとともに、新規性の高い菌株は分類学的研究を進めた。また、これら分離菌株を物質生産培地で培養し、培養液からの生物活性物質探索を行った。

難培養性の微生物分離のために SOD やカタラーゼの他に、活性酸素除去効果の期待できる低分子化合物であるアスコルビン酸とルチンを用いて分離を行なった。また、特定の微生物を効率よく分離するために、試料の選択、分離プレート、コロニーの選択までを PCR 法を有効に利用した目的微生物の迅速分離法の開発を試みた。

## 実験方法

**植物の根からの放線菌の分離** 埼玉県本庄市および神奈川県横浜市のリュウノヒゲやスイバ、沖縄県西表島キンギンソウなどで計 10 種類の植物を採取した。採取した植物の根を洗浄、乾燥後 70% エタノール、1% 次亜塩素酸ソーダで各 1 分間表面殺菌した。その後、滅菌水ですすぎ乾燥させ、乳鉢ですり潰した後に寒天培地 (CMC asparagine agar, Water proline agar) に混合し 27°C で 6 週間培養した。根の表面殺菌を確認するためにすすぎ液も同様の培地で培養した。

**分離菌株の属および種の推定と分類** 植物分離においては、出現したコロニーを全て分離し、16S rRNA 遺伝子塩基配列解析による属および種の推定を行なった。分類は 16S rRNA 遺伝子塩基配列による分子系統解析、および形態、菌体中の細胞壁アミノ酸組成、全菌体糖組成、脂肪酸組成、リン脂質タイプ、主要メナ

キノンおよび G+C 含量等の表現型により行った。必要に応じて各種生理学的性状試験も追加した。

**生物活性の評価とアルカロイドの検出** 生産培地 (Starch-yeast extract broth, V8 juice-sucrose broth) で 27°C、7 日間培養した培養液について生物活性試験を行なうと同時に、ドラーゲンドルフ反応によるアルカロイド検出を行なった。

**生産物質の単離と同定** 高速液体クロマトグラフィーによる化合物の単離を行なうとともに、新規性の高い物質については各種機器分析により構造決定を行なった。

**分離培地中の活性酸素の除去による *Actinobacteria* の分離** *Actinobacteria* 菌株の分離には Glucose-peptone-meat extract (GPM) 培地 (1% glucose, 0.5% peptone, 0.5% meat extract, 0.3% NaCl, 1.2% agar, pH 7) を用いた。培地から発生する活性酸素の除去には SOD (39 units), カタラーゼ (300 units), SOD+カタラーゼ (単独の場合と同じ濃度), アスコルビン酸 (8.8 μg), ルチン (12 μg) を 20 ml の寒天培地上に塗布して、その後、土壤希釀液を塗布し 27°C で培養して、無添加の場合とコロニーの数と種類を比較した。無添加では分離されなかった菌株について定法に従い分類学的研究を行った。

**培地から発生する活性酸素の検出と定量** GPM 培地, Nutrient Broth (Difco), Tryptic Soy Broth

### Soil samples

| PowerSoil DNA (Isolation Kit, MO BIO)

### Bacterial DNA

| PCR using specific primer set

| Detection of specific band (590 bp)

### Selected soil samples

| Media supplemented with radical scavengers

### Isolating plates

### Replica plates

| Plate washed PCR

### Selected plate

| Colony PCR

### Target strains

Fig. 1 Efficient isolation method for target bacteria.

(Difco), Mueller Hinton Broth (Difco)についてチトクローム C 法 (Cohen & Chovaniec, 1978) によりスパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) の定量を行なった。GPM 培地の各成分の  $O_2^-$  発生は WST-1 法 (Ueda *et al.*, 1999) により検出した。発生する活性酸素分子種の特定のための検出用プローブとして、 $O_2^-$  には WST-1 法、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) には Fuluoro  $H_2O_2^{\text{TM}}$  Kit, ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) には Hydroxyphenyl Fluorescein を用いた。

土壤試料からの特定微生物の検出と迅速分離法の検討全体の流れと方法を Fig. 1 に示した。まず、土壤試料中に目的微生物が存在しているかどうかを知るために土壤から直接抽出した DNA を用いて PCR により検出した。1 例として著者らが開発した活性酸素除去法で分離され、新科新属として提唱した *Patulibacter* 属 (Takahashi *et al.*, 2006) の検出を試みた。本属に近縁で分離例の少ない *Conexibacter* 属と *Solirubrobacter* 属の菌株も検出できるよう特異プライマーを設計した (Fig. 2)。

選択された土壤希釈液を活性酸素除去培地に塗抹して、27°C で 3 週間培養し各プレートのレプリカを作製した。次いで、このレプリカプレート上の全コロニーを対象に上記特異プライマーを用いて Plate washed PCR 法 (Stevenson *et al.*, 2004) で検出した。目的バンドが検出されたプレート上のコロニーについてコロニー PCR を行い目的菌株のみ分離した。

## 結果と考察

植物の根からの放線菌の分離と生物活性物質探索あたらしい分離源として植物の根を用いた。10種類の植物の根を採取し、表面殺菌後、すり潰して試料とし、内生放線菌を分離した。出現したコロニーを全て分離し、16S rRNA 遺伝子配列解析による簡易同定を行なった。その結果、土壤とは異なるフローラを示した。沖縄県西表島で採取したキンギンソウの根の例を Fig. 3 に示した。計80株分離され、属と種別の推定を行なった。それぞれの属内での同一色は同一種を示している。*Micromonospora* 属 28.8% (23株, 8種), *Polymorphospora* 属 16.3% (13株, 1種), *Sphaerisporangium* 属 11.3% (9株, 2種) の順で多数を占め、土壤中で最も頻度の高い *Streptomyces* 属は 4 株のみであった。さらに、このなかに、新属で、しかもお互いが同一種である菌株が 9 株含まれており、*Phytohabitans suffuscus* と命名し公表した (Inahashi *et al.*, 2010)。*Phytohabitans suffuscus* K07-0523<sup>T</sup> の 16S rRNA 遺伝子配列による系統解析より、本属は、*Micromonosporaceae* 科に属し近縁属には、*Asanoa* 属、*Catenuloplanes* 属および *Verrucosispora* 属が選択された。これらの属との形態および化学組成の比較を Table 1 に示した。*Phytohabitans* 属の最も大きな特徴は細胞壁ジアミノ酸として meso-ジアミノピメリン酸と L-リシンの 2 種

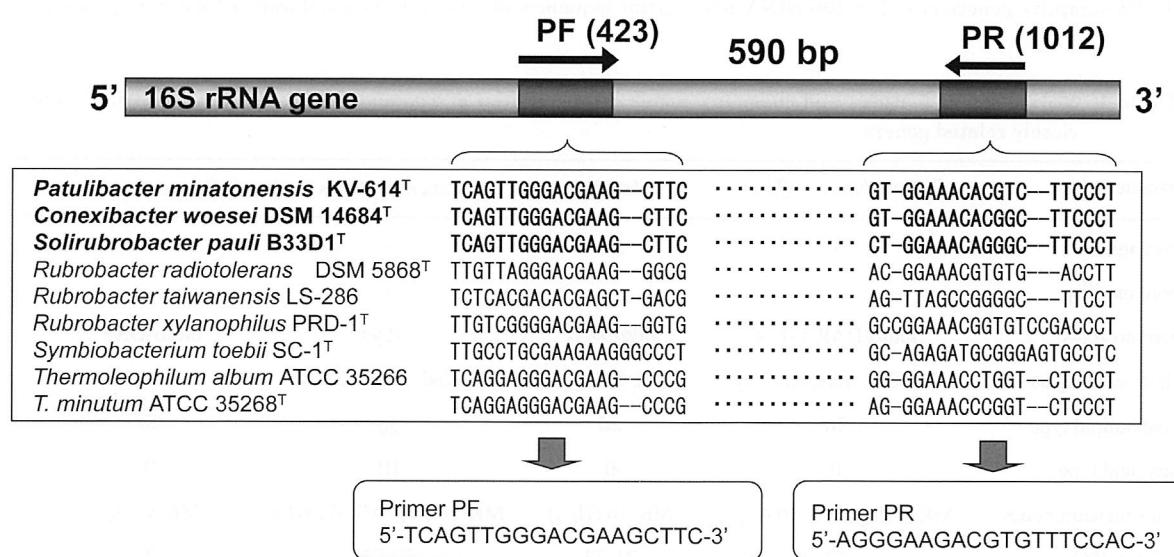


Fig. 2 Specific primers for *Patulibacter* and related genera.

類を含んでいることである。

他の植物についても同様の調査を行なった結果、植物ごとに特有の優占種放線菌が存在することが示唆された。

植物の根から分離された放線菌 132 株の培養液代謝産物について各種生物活性試験とドラーゲンドルフ反応試験を行なった。その結果を Fig. 4 に示した。生物活性評価系では Dinactin, Sinefungin, Streptazolin あ

るいは Aranciamycin が、ドラーゲンドルフ検出では Streptazone B1 および Juvenimicin A3 が既知物質として同定された。*Streptosporangium* sp. K07-0460 のドラーゲンドルフ陽性物質の単離精製を進めたところ、Spoxazomicin と命名した新物質が単離された (Fig. 4)。本物質は抗トリパノソーマ活性を有し、既存薬エフロチニンおよびスラミンに比較し 14~21 倍の強い活性を示した。

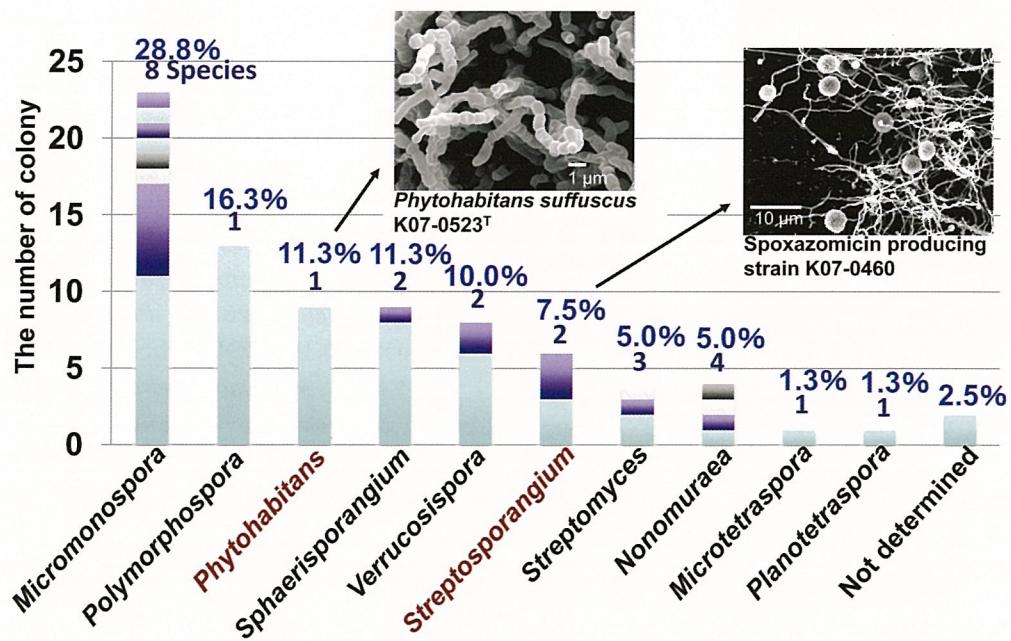


Fig. 3 Presumptive genera based on 16S rRNA gene partial sequences of 80 strains isolated from a "Goodyera procera" root.

Table 1 Morphological features and chemotaxonomic characteristics of *Phytohabitans suffuscus* K07-0523<sup>T</sup> and closely related genera

Characteristics	<i>Phytohabitans suffuscus</i>	<i>Asanoa</i>	<i>Catenuloplanes</i>	<i>Verrucospora</i>
Sporangium	-	-	-	-
Spore motility	-	-	+	-
Diamino acids	meso-DAP, L-Lys	meso-DAP	L-Lys	meso-DAP
Whole-cell sugars	Gal, Glc, Man, Rib, Xyl	Ara, Gal, Xyl	Gal, Man, Xyl	Man, Xyl
Phospholipid type	2d	2d	2c	2b
Fatty acid type	II	II	III	II
Major menaquinones	MK-9 (H <sub>6</sub> ), MK-10 (H <sub>4,6</sub> )	MK-10 (H <sub>6,8</sub> )	MK-10 (H <sub>4</sub> ), MK-11 (H <sub>4</sub> )	MK-9 (H <sub>4</sub> )
G+C (mol%)	73	71-72	70-73	70

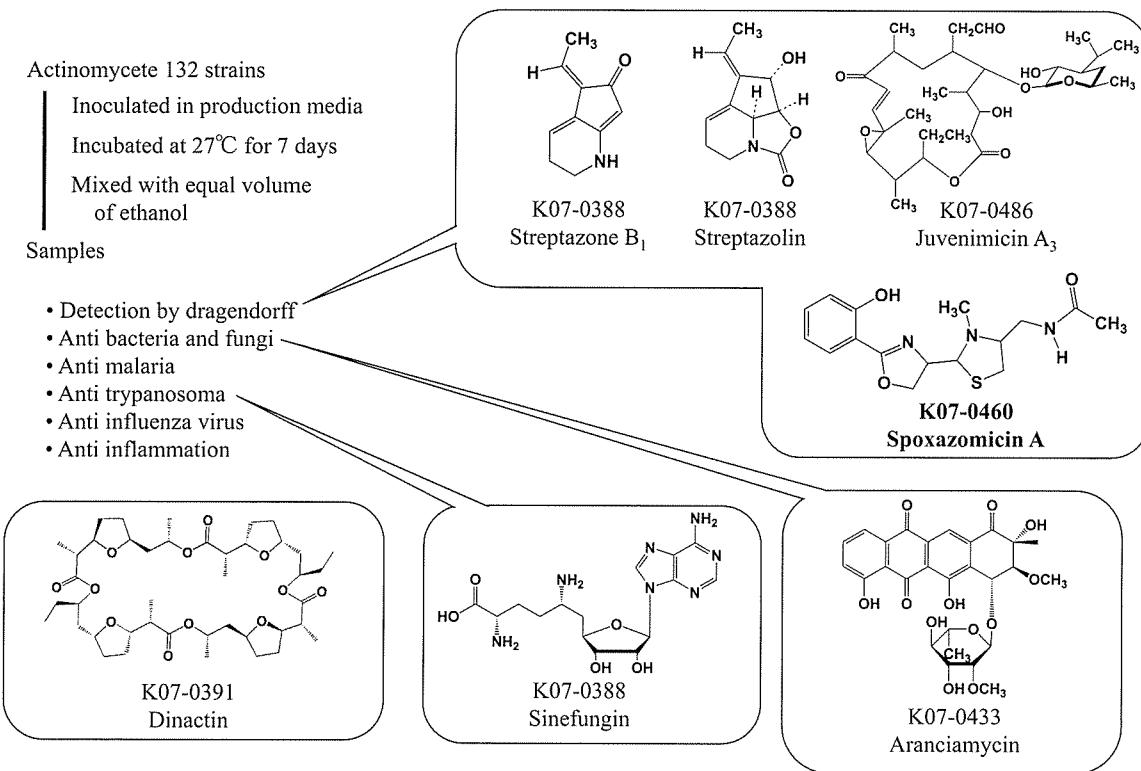


Fig. 4 Search for bioactive compounds from cultured broths of strains isolated from plant roots.

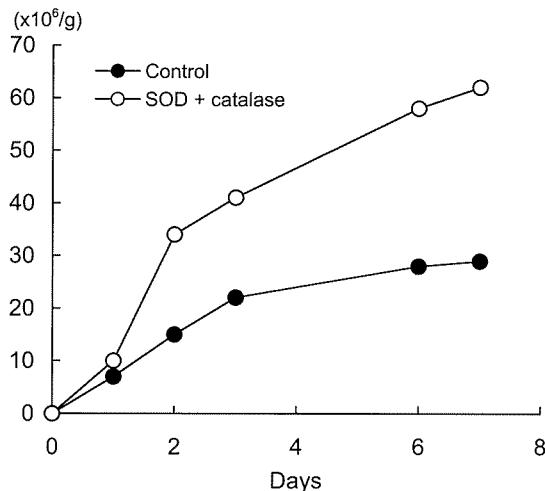


Fig. 5 Comparison of the bacterial colony numbers between the GPM supplemented with and without SOD + catalase. The soil sample was collected at paddy field in Saitama Prefecture, Japan.

上記研究によって、植物から分離された放線菌は生物活性物質探索のための新たな微生物資源として有用

であることが示唆された。

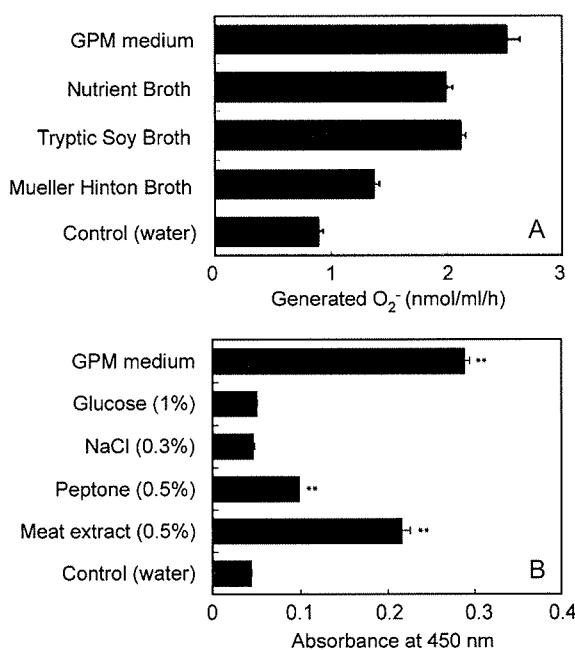
活性酸素除去による *Actinobacteria* 菌株の分離と分類微生物の分離に用いられる寒天培地から活性酸素が発生することを見いだし、この培地に SOD やカタラーゼを添加することによって新規微生物を分離できることをすでに発表してきた (Takahashi *et al.*, 2003)。今回実験を行った中の埼玉県の水田土壌を用いた場合の SOD とカタラーゼ添加による添加効果を Fig. 5 に示した。無添加の約 2 倍のコロニー数が得られた。分離菌株を比較したところ無添加では 8 種類、添加では 14 種類とその種類においても活性酸素除去効果が得られた。

埼玉県水田土壌、東京の青山墓地、奄美大島などで採取した計 8 種類の土壌試料を用いて GPM 培地に SOD、カタラーゼ、SOD + カタラーゼ、さらに、今回新たに活性酸素除去効果が期待される低分子物質のアスコルビン酸やルチンを添加して *Actinobacteria* 菌株を分離した。その結果、これら低分子物質にも効果があることを見出した。Table 2 には、無添加では分離されなかった菌株の分類学的研究から新分類群の提唱に至った菌株を示した。本方法によって、1 新科を含

**Table 2** New taxa isolated by agar media supplemented with scavengers of reactive oxygen species

Scavenger New taxon	Number of strains					Reference
	SOD	Catalase	SOD +catalase	Ascorbic acid	Rutin	
<b>New Family</b>						
<i>Patulibacter minatonensis</i> KV-614 <sup>T</sup>	1					Takahashi <i>et al.</i> , 2006
<b>New genus</b>						
<i>Oryzihumus leptocrescens</i> KV-628 <sup>T</sup> , KV-647, KV-656	1	1	1			Kageyama <i>et al.</i> , 2005
<i>Humihabitans oryzae</i> KV-657 <sup>T</sup>	1					Kageyama <i>et al.</i> , 2007a
<i>Humibacillus xanthopallidus</i> KV-663 <sup>T</sup>	1					Kageyama <i>et al.</i> , 2008a
<b>New species</b>						
<i>Arthrobacter humicola</i> KV-651 <sup>T</sup>			1			Kageyama <i>et al.</i> , 2008b
<i>Arthrobacter oryzae</i> KV-653 <sup>T</sup>	1					Kageyama <i>et al.</i> , 2008b
<i>Microbacterium deminutum</i> KV-483 <sup>T</sup>			1			Kageyama <i>et al.</i> , 2006
<i>Microbacterium pumilum</i> KV-488 <sup>T</sup>			1			Kageyama <i>et al.</i> , 2006
<i>Microbacterium aoyamense</i> KV-492 <sup>T</sup>			1			Kageyama <i>et al.</i> , 2006
<i>Microbacterium terricola</i> KV-448 <sup>T</sup>	1					Kageyama <i>et al.</i> , 2007b
<i>Microbacterium pygmaeum</i> KV-490 <sup>T</sup>			1			Kageyama <i>et al.</i> , 2008c
<i>Demequina salsinemoris</i> KV-810 <sup>T</sup> , KV-811, KV-816				2	1	Matsumoto <i>et al.</i> , 2010

Soil samples; Paddy field in Saitama Pref., Aoyama in Tokyo and Amami island



**Fig. 6** (A) Levels of O<sub>2</sub> generated from conventional laboratory media by means of the cytochrome c method. After the reaction mixture, which consisting of 20 μM cytochrome c and each medium in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, was incubated for 1 hours at 25°C, the appearance of reduced cytochrome c was measured at 550 nm by spectrophotometry. The control consisted of 20 μM cytochrome c in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6. Experiments were performed in triplicate. Error bars represent SD.

(B) Identification of the medium components generating O<sub>2</sub>. The O<sub>2</sub> generated from GPM medium and its components were measured by means of WST-1 method. The WST-1 assay was performed in volumes of 20 μl of various concentrations of GPM medium or its components, 10 μl of WST-1 (at a final concentration of 350 μM), and 170 μl of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2). After incubation for 3 h at 25°C, the absorbance of the reactive solution was recorded at 450 nm using a spectrophotometer. Experiments were performed in triplicate. Error bars represent SD. Significant differences between the groups are indicated: \*\*P < 0.01 vs. control.

む4新属、8新種の提案に至った。このTable 2には、本研究助成以前に得られた同方法による成果も含まれていることを申し添える。

培地から発生する活性酸素の検出と定量 GPM 培地の他に Nutrient Broth や Tryptic Soy Broth からも  $O_2^-$  の発生が見られた (Fig. 6A)。また、発生源を特定するために GPM 培地の各成分について分析を行なったところ天然成分である肉エキスに  $O_2^-$  の高い発生が見られた (Fig. 6B)。さらに、GPM 培地から発生する活性酸素分子種を特定したところスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) が検出された。一重項酸素は検出されなかつた。各種活性酸素分子種の中で最も毒性が高いと考えられる  $\cdot OH$  が培地から検出された例は始めて

の知見である (Fig. 7) (Nakashima et al., 2010)。

**土壤試料からの特定微生物の検出と迅速分離** 上述の活性酸素除去法により分離された新科新属の *Patulibacter minatonensis* KV-614<sup>T</sup> は、これまで、ほとんど分離例のない、いわゆる uncultured *Actinobacteria* に近縁であることが分っていた。そこで、本菌株の土壤中における分布を調べることを目的に、本属および近縁属に特異なプライマーを設計し、土壤から直接 DNA を抽出して PCR を行なった。その結果、23土壤中16試料から本菌株近縁菌由来の PCR 産物が検出された。

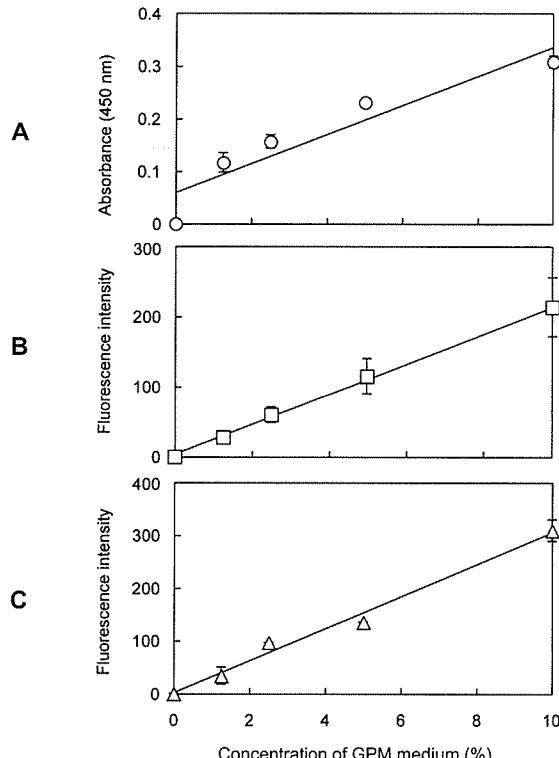
さらに、バンドが検出された土壤試料を用いて目的微生物の迅速分離法の開発を試みた。すなわち、分離には活性酸素除去物質添加培地を用い、各種希釀段階の土壤懸濁液を塗抹し培養した。この分離プレートの選択には Plate washed PCR 法を応用して、25枚の分離プレートから確実に目的微生物のコロニーが存在しているプレート 1 枚を選択した。次いでこの 1 枚に出現した 91 個のコロニーについてコロニー PCR を行ったところ、7 コロニーが目的とした *Patulibacter* 近縁菌であった。16S rRNA 遺伝子配列解析より 5 コロニーが *Patulibacter minatonensis* と同種で、2 コロニーは *Conexibacter* 属の新種と考えられ現在詳細な検討を行っている。

これらの結果は、これまで分離されなかつた菌株が実は自然界に広く分布しており、方法を工夫することによって分離可能になることを示している。また、土壤からの微生物 DNA 抽出と PCR、Plate washed PCR 法、さらにはコロニー PCR などを組み合わせることによって目的とする微生物を簡便に分離できることを立証できた。この方法は、目的とする生合成遺伝子を有する微生物の迅速分離等への応用も期待できる。

## まとめ

本研究助成の課題として取り組んだ、「植物の根からの放線菌の分離」と「培地から発生する活性酸素種の除去」によって分離され新たに承認名となった菌株を、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく *Actinobacteria* の系統樹で示した (Fig. 8)。

この研究の過程でラジカルスカベンジャー無添加のいわゆるコントロール培地で分離された *Microterricola* 属を含めて 6 新属 8 新種を提唱した。植物の根からは *Phytohabitans suffuscus* K07-0523<sup>T</sup> を、活性酸素種除去法によっては *Patulibacter*



**Fig. 7** Generation of specific type of reactive oxygen species from GPM medium. A)  $O_2^-$  by WST-1; B)  $H_2O_2$  by Fluoro  $H_2O_2$ ™ kit; C)  $\cdot OH$  by Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF). After incubation at 25°C for 3 h, the absorbance or fluorescence intensities were measured. The GPM medium diluted in sterile water was used at final concentrations ranging from 0 to 10%. Experiments were performed in triplicate. Error bars represent SD.

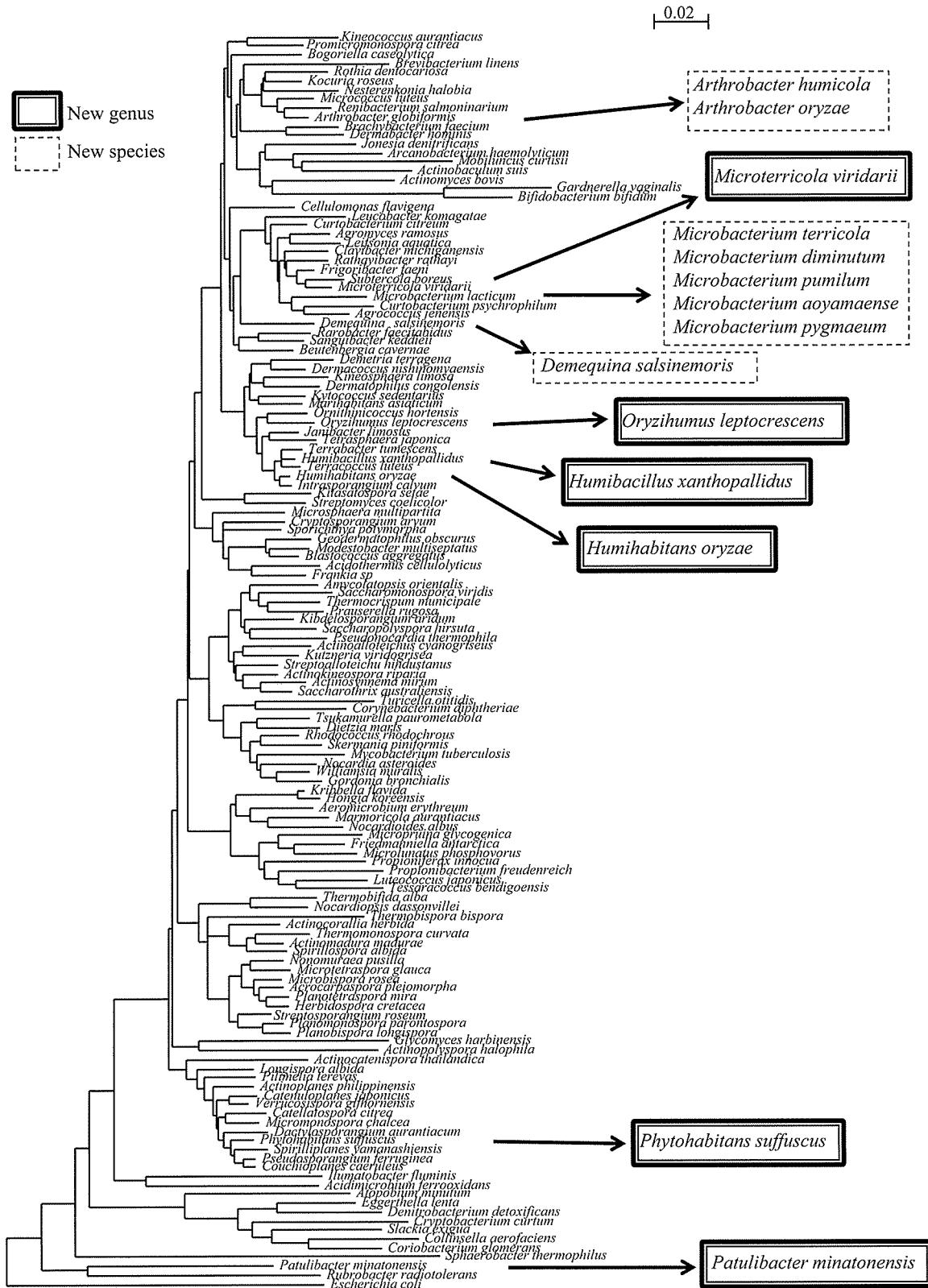


Fig. 8 Phylogenetic tree of new genera and new species isolated in this study based on 16S rRNA gene sequences.

*minatonensis* KV-614<sup>T</sup>, *Oryzihumus leptocrescens* KV-628<sup>T</sup>, *Humibacillus xanthopallidus* KV-663<sup>T</sup>, *Humihabitans oryzae* KV-657<sup>T</sup> の 4 属を提唱し、系統的に多様な分類群に位置する菌株を分離できることを示している。新種で見てみると、これらは全てラジカルスカベンジャーを用いた分離によるものであるが *Arthrobacter* 属と *Microbacterium* 属に偏っている傾向がみられ、特に *Microbacterium* 属の 6 新種は、データとして示していないが現在知られている本属の 68 種との系統樹を作製してみたところ、ある一定のクラスターに位置づけられた。この一群は、活性酸素に対する感受性が他と比べて高いのではないかと考え現在検討中である。

## 要 約

本研究では、生物活性物質探索研究のための新たな微生物資源を得ることを目的に以下の 3 つの研究テーマを遂行した。

- (1) 植物の根から放線菌を分離し、探索資源としての有用性を検討した。植物根の表面を殺菌し、すり潰した試料から放線菌を分離し、16S rRNA 遺伝子塩基配列から属と種の推定を行った。分離菌株の培養液抽出物からドーラーゲンドルフ陽性物質を単離精製した。キンギンソウの根から分離した放線菌 80 株の 95% が *Streptomyces* 属以外の希少放線菌であった。これらの菌株から、新属 *Phytohabitans suffuscus* K07-0523<sup>T</sup> を提唱し、さらに *Streptosporangium* sp. K07-0460 の代謝産物から新規抗トリパノソーマ活性物質 Spoxazomicin A を発見することができた。
- (2) 難培養性微生物分離の過程で、寒天培地から活性酸素が発生することを見いだし、特に本研究では培地に低分子の活性酸素種除去剤を添加する分離法を検討し、アスコルビン酸とルチンにもコロニー増加効果があることを見出した。また、培地から発生する活性酸素分子種を調べたところ、O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の他に ·OH を発生するという新たな知見を得ることができた。さらに、活性酸素種除去剤添加で分離された *Actinobacteria* 菌株の分類を行い、1 新科を含む 4 新属、8 新種を提案した。
- (3) 目的微生物の迅速分離法を検討した。SOD とカタラーゼ添加で分離され、新科新属の提唱に至った *Patulibacter* 属近縁菌のための特異プライマーを作製し、PCR により土壤中の分布頻度を調べた。また、Plate washed PCR 法やコロニー

PCR を用いた迅速分離法の検討を行った。23 土壤試料中 16 試料の DNA から標的フラグメントが検出され、分離報告例の少ない *Patulibacter* 属近縁菌が土壤中に広く棲息していることが示唆された。選択した 1 土壤の分離プレート 25 枚から Plate washed PCR 法によって 1 枚のプレートを選択し、出現コロニー 91 個のコロニー PCR によって、*Patulibacter minatonensis* と同種 5 株、*Conexibacter* 属の新種と考えられる 2 株が分離された。

分離法の工夫や分離源の開拓によって、未知微生物分離の可能性が拡大することが裏付けられた。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 松本厚子, 福本 恵, 高橋洋子, 大村 智 (2007). 長期培養法を用いて土壤より分離した新規 *Nocardioides* 属菌株の分類学的研究. 2007 年度日本放線菌学会大会 (尾道) .
- 2) 高橋洋子, 林 伸行, 松本厚子, 山田真由子, 大村 智 (2007). 土壤より分離した新規アクチノバクテリア菌株の分類学的研究. 2007 年度日本放線菌学会大会 (尾道) .
- 3) 福本 敦, 金 容必, 松本厚子, 高橋洋子, 塩見和朗, 供田 洋, 大村 智 (2007). 放線菌の生産する新規化合物 *Cyslabdan* とその MRSA に対するイミペネム活性増強作用. 2007 年度日本放線菌学会大会 (尾道) .
- 4) 内田龍児, 金 容必, 岩月正人, 松本厚子, 高橋洋子, 供田 洋, 大村 智 (2007). *Streptomyces* sp. K04-0144 株の生産する新規抗生物質 nosokomycin 類の抗 MRSA 活性. 2007 年度日本放線菌学会大会 (尾道) .
- 5) Ismet Ara, Yōko Takahashi, Atsuko Matsumoto, Takuji Kudo & Satoshi Ōmura (2007). Distribution of novel genera of rare actinomycetes and polyphasic taxonomy of *Pseudosporangium ferruginea* gen. nov. sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. 2007 年度日本放線菌学会大会 (尾道) .
- 6) Yōko Takahashi, Akiko Kageyama, Atsuko Matsumoto, Kurimi Morisaki, Mayuko Yamada & Satoshi Ōmura (2007). Diversity of *Actinobacteria* strains isolated from soil samples using agar medium supplemented with SOD and/or catalase. 14th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (Newcastle, UK).
- 7) Ismet Ara, Yōko Takahashi, Atsuko Matsumoto, Takuji Kudo & Satoshi Ōmura (2007). Proposal of *Luedemannella*, *Krasilnikovia*, *Sphaerisporangium*, and *Pseudosporangium*, as new genera under the rare actinomycetes isolated from marine and

- mangrove rhizosphere of Bangladesh. 11th International Conference on Culture Collections (Goslar, Germany).
- 8) 稲橋佑起, 松本厚子, 壇原宏文, 大村智, 高橋洋子 (2008). 植物からの放線菌の分離と分類及び生物活性物質の探索. 2008年度日本放線菌学会大会(山梨).
  - 9) 高橋洋子, 中井健豪, 松本厚子, 森崎くりみ, 大村智 (2008). 活性酸素除去物質添加培地を用いて分離した *Actinobacteria* 菌株の分類研究. 2008年度日本放線菌学会大会(山梨).
  - 10) 高橋洋子, 関珠枝, 松本厚子, 影山亜紀子, 森崎くりみ, 大村智 (2008). 土壤からの希少 *Actinobacteria* 菌株の検出法の検討. 2008年度日本放線菌学会大会(山梨).
  - 11) 関珠枝, 松本厚子, 影山亜紀子, 森崎くりみ, 大村智, 高橋洋子 (2009). 土壤からの特定微生物の検出および分離法の検討. 日本農芸化学会2009年度大会(福岡).
  - 12) 中丸康太, 三浦広美, 大村智, 高橋洋子 (2009). *Microbacterium* sp. KV-932 の生育を促進する物質の単離精製とその応用. 2009年度日本放線菌学会大会(秋田).
  - 13) 関珠枝, 松本厚子, 大村智, 高橋洋子 (2009). 土壤からの特定微生物の検出および分離法の検討. 2009年度日本放線菌学会大会(秋田).
  - 14) 中島琢自, 関珠枝, 松本厚子, 三浦広美, 大村智, 高橋洋子 (2009). 微生物増殖培地から発生する活性酸素種に関する研究. 2009年度日本放線菌学会大会(秋田).
  - 15) Yuki Inahashi, Atsuko Matsumoto, Hirofumi Danbara, Satoshi Ōmura & Yōko Takahashi (2009). Taxonomy of a new actinomycete from plant roots and potential of endophytes. 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (Shanghai, China).
  - 16) Atsuko Matsumoto, Tamae Seki, Satoshi Ōmura & Yōko Takahashi (2009). Efficient detection and isolation of rare *Actinobacteria* strains from soil samples using PCR. 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (Shanghai, China).
  - 17) 福田麻美, 稲橋佑起, 松本厚子, 大村智, 高橋洋子 (2010). 植物の根からの放線菌の分離とその多様性. 日本農芸化学会2010年度大会(東京).
- 原著論文
- 1) Kageyama, A., Takahashi, Y. & Ōmura, S. (2007). *Humihabitans oryzae* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 2163-2166.
  - 2) Matsumoto, A., Takahashi, Y., Fukumoto, M. & Ōmura, S. (2007). *Actinocatenispora sera* sp. nov., isolated by long-term culturing. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 2651-2654.
  - 3) Kageyama, A., Morisaki, K., Takahashi, Y. & Ōmura, S. (2008). *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 53-56.
  - 4) Matsumoto, A., Yamada, M., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008). *Microterricola viridarii* gen. nov., sp. nov., a new genus of the family *Microbacteriaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 1019-1023.
  - 5) Kageyama, A., Matsumoto, A., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008). *Humibacillus xanthopallidus* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 1547-1551.
  - 6) Ara, I., Matsumoto, A., Kudo, T., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008). *Pseudosporangium* gen. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae* and description of *Pseudosporangium ferruginea* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 1644-1652.
  - 7) Ara, I., Matsumoto, A., Kudo, T., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008). *Actinomadura bangladeshensis* sp. nov. and *Actinomadura chokorensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 1653-1659.
  - 8) Kageyama, A., Matsuo, Y., Kasai, H., Shizuri, Y., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008). *Microbacterium awajiense* sp. nov., *Microbacterium fluvii* sp. nov. and *Microbacterium pygmaeum* sp. nov. Actinomycetologica **22**: 1-5.
  - 9) Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Ara, I., Matsumoto, A. & Takahashi, Y. (2008). *Kineococcus gynuriae* sp. nov., isolated from Thai medicinal Plant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 2439-2442.
  - 10) Ara, I., Matsumoto, A., Bakir, A., Kudo, T., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008). *Actinomadura maheshkhaliensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from mangrove rhizosphere soil of Maheshkhali, Bangladesh. J. Gen. Appl. Microbiol. **54**: 335-342.
  - 11) Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A. & Takahashi, Y. (2009). *Pseudonocardia acaciae* sp. nov., isolated from roots of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: 1487-1491.
  - 12) Matsumoto, A., Nakai, K., Morisaki, K., Ōmura S. & Takahashi, Y. (2010). *Demequina salsinemoris* sp. nov., isolated by agar media supplemented with ascorbic acid or rutin. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 1206-1209.
  - 13) Indananda, C., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Takahashi, Y., Duangmal, K. & Thamchaipenet, A. (2010). *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pseudonocardiaceae* isolated from roots of Thai glutinous rice plants. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 1141-1146.
  - 14) Thamchaipenet, A., Indananda, C., Bunyoo, C., Duangmal, K., Matsumoto, A. & Takahashi, Y. (2010). *Actinoallomurus acaciae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 554-559.
  - 15) Nakashima, T., Seki, T., Matsumoto, A., Miura, H., Sato, E., Niwano, Y., Kohno, M., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2010). Generation of reactive oxygen species from conventional laboratory media. J.

- Biosci. Bioeng. 110: 304-307.
- 16) Duangmal, K., Mingma, R., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A. & Takahashi, Y. *Saccharopolyspora phatthalungensis* sp. nov., isolated from rhizospheric soil of *Hevea brasiliensis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press)
  - 17) Indananda, C., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A., Duangmal, K. & Takahashi, Y. *Actinoallomurus oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from root of Thai jasmine rice plant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press)
  - 18) Inahashi, Y., Matsumoto, A., Danbara, H., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2010). *Phytohabitans suffuscus* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of the family Micromonosporaceae isolated from a plant root. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 2652-2658.

### 保存機関に寄託した菌株

<i>Actinocatenispora sera</i>	KV-744 <sup>T</sup> =NBRC
101916 <sup>T</sup> =NRRL B-24477 <sup>T</sup>	
<i>Microbacterium terricola</i>	KV-446 <sup>T</sup> =NBRC
101801 <sup>T</sup> =NRRL B-24469 <sup>T</sup>	
<i>Microterricola viridarii</i>	KV-677 <sup>T</sup> =NBRC
1021123 <sup>T</sup> =NRRL B-24468 <sup>T</sup>	
<i>Humihabitans oryzae</i>	KV-657 <sup>T</sup> =NBRC-
101802 <sup>T</sup> =NRRL B-24470 <sup>T</sup>	
<i>Humibacillus xanthopallidus</i>	KV-663 <sup>T</sup> =NBRC
101803 <sup>T</sup> =NRRL B-24471 <sup>T</sup>	
<i>Arthrobacter oryzae</i>	KV-651 <sup>T</sup> =NBRC 102055 <sup>T</sup> =NRRL
B-24478 <sup>T</sup>	
<i>Arthrobacter humicola</i>	KV-653 <sup>T</sup> =NBRC
102056 <sup>T</sup> =NRRL B-24479 <sup>T</sup>	
<i>Microbacterium pygmaeum</i>	KV-490 <sup>T</sup> =NBRC
101800 <sup>T</sup> =NRRL B-24469 <sup>T</sup>	
<i>Demequina salsinemoris</i>	KV-810 <sup>T</sup> =NBRC
105323 <sup>T</sup> =DSM 22060 <sup>T</sup>	
<i>Phytohabitans suffuscus</i>	K07-0523 <sup>T</sup> =NBRC 105367 <sup>T</sup> =
DSM 45306 <sup>T</sup>	
<i>Conexibacter</i> sp.	KV-962=NBRC 106558=DSM
23288	

### 謝 辞

本研究に対し、3年間研究助成を頂いた財団法人発酵研究所に深く感謝いたします。また、本研究にご指導、ご助言を賜った大村 智 学校法人北里研究所名誉理事長に感謝申し上げます。また、北里生命科学研究所 影山亜紀子元研究員に深謝いたします。

本研究の一部は、北里大学大学院感染制御科学府の

学生、稻橋悠起君（博士課程）、および修士課程の関珠枝、森崎くりみ、山田真由子、林 伸行、福本恵、中井健豪、福田麻美の諸氏によりなされたものであります。また、Spoxazomicin の構造決定にあたっては北里生命科学研究所の塩見和朗教授、岩月正人研究員に、Spoxazomicin の抗トリパノソーマ活性評価は熱帯病研究センター長の乙黒一彦部長に大変お世話になりました。

### 文 献

- Cohen, H. J. & Chovaniec, M. E. (1978). Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes. J. Clin. Invest. 61: 1081-1087.
- Inahashi, Y., Matsumoto, A., Danbara, H., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2010). *Phytohabitans suffuscus* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of the family Micromonosporaceae isolated from a plant root. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 2652-2658.
- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M. & Sait, M. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria and Verrucomicrobia. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2391-2396.
- Joseph, S. J., Hugenholtz, P., Sangawan, P., Osborne, C. A. & Janssen, P. H. (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7210-7215.
- Kageyama, A., Takahashi, Y., Seki, T., Tomoda, H. & Ōmura, S. (2005). *Oryzihumus leptocrescens* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 2555-2559.
- Kageyama, A., Takahashi, Y. & Ōmura, S. (2006). *Microbacterium deminutum* sp. nov., *Microbacterium pumilum* sp. nov. and *Microbacterium aoyamense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2113-2117.
- Kageyama, A., Takahashi, Y. & Ōmura, S. (2007a). *Humihabitans oryzae* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2163-2166.
- Kageyama, A., Takahashi, Y. & Ōmura, S. (2007b). *Microbacterium terricola* sp. nov., isolated from soil in Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 53: 1-5.
- Kageyama, A., Matsumoto, A., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008a). *Humibacillus xanthopallidus* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 1547-1551.
- Kageyama, A., Morisaki, K., Takahashi, Y. & Ōmura, S. (2008b). *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 53-56.
- Kageyama, A., Matsuo, Y., Kasai, H., Shizuri, Y., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2008c). *Microbacterium awajiense* sp. nov., *Microbacterium fluvii* sp. nov. and *Microbacterium pygmaeum* sp. nov. Actinomycetologica 22: 1-5.
- Matsumoto, A., Takahashi, Y., Mochizuki, M., Seino, A.,

- Iwai, Y. & Ōmura, S. (1998). Characterization of actinomycetes isolated from fallen leaves. *Actinomycetologica* **12**: 46-48.
- Matsumoto, A., Takahashi, Y., Seino, A., Iwai, Y. & Ōmura, S. (2003). *Longispora albida* gen. nov. sp. nov., a new genus of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1553-1559.
- Matsumoto, A., Takahashi, Y., Iwai, Y. & Ōmura, S. (2006). Isolation of Gram-positive bacteria with high G + C from inside soil aggregates. *Actinomycetologica* **20**: 30-34.
- Matsumoto, A., Nakai, K., Morisaki, K., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2010). *Demequina salsinemoris* sp. nov., isolated by agar media supplemented with ascorbic acid or rutin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1206-1209.
- Nakashima, T., Seki, T., Matsumoto, A., Miura, H., Sato, E., Niwano, Y., Kohno, M., Ōmura, S. & Takahashi, Y. (2010). Generation of reactive oxygen species from conventional laboratory media. *J. Biosci. Bioeng.* **110**: 304-307.
- Ōmura, S. (2008). Splendid gifts from Microorganisms -The Achievements of Satoshi Ōmura and collaborators-. fourth edition.
- Sait, M., Hugenholtz, P. & Janssen, P. H. (2002). Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineage previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* **4**: 653-666.
- Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M. & Breznak, J. A. (2004). New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4748-4755.
- Takahashi, Y. (2004). Exploitation of new microbial resources for bioactive compounds and discovery of new actinomycetes. *Actinomycetologica* **18**: 54-61.
- Takahashi, Y. & Ōmura, S. (2003). Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Int. J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**: 141-154.
- Takahashi, Y., Katoh, S., Shikura, N., Tomoda, H. & Ōmura, S. (2003). Superoxide dismutase produced by soil bacteria increases bacterial colony growth from soil samples. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**: 263-266.
- Takahashi, Y., Matsumoto, A., Morisaki, K. & Ōmura, S. (2006). *Patulibacter minatonensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated using an agar medium supplemented with superoxide dismutase, and proposal of *Patulibacteraceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 401-406.
- 高橋洋子 (2004) . 新物質生産菌としての放線菌の多様性—未知の微生物を探るー. *日本農芸化学会誌* **78**: 1063-1066.
- Ueda, H., Kawana, D., Maeda, S. & Sawamura, S. (1999). Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **3**: 485-488.

# 昆虫共生酵母の系統分化と地理分布：シーズ開拓のための フロラ解析

梶 村 恒

名古屋大学大学院生命農学研究科  
〒464-8601 名古屋市千種区不老町

Phylogeny and biogeography of yeasts associated with insects:  
flora survey for discovering biological seeds  
Hisashi Kajimura

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University  
Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

We surveyed insect-associated yeast flora intensively to contribute to a better understanding and conservation of biodiversity. A total of 295 strains (27 groups) of the yeasts, all of which belong to Ascomycetes, were isolated from galleries, frass, excrement (larvae, mother adults), mycangia (mother adults) and/or body surfaces (larvae, new adults, mother adults) of a total of 8 beetle species (Scolytinae and Platypodinae) in 6 sampling localities. Phylogenetic analysis of the strains based on the D1/D2 domain of 26S rDNA revealed that 12 groups, associated with 7 beetle species, were clearly differentiated from described species, suggesting the presence of novel species. Beetles and their habitats will continue to be a hyper-diverse source of previously undescribed yeasts. *Candida* sp. 1 was mainly isolated from *Scolytus tycon*, and *Pichia* sp. 1 was frequently found in its mycangia. *Pichia porticicola* was isolated from all the growing stages (boring, egg, larva, pupa, new adult, overwintering adult) of *Xylodendrus (=Cnestus) mutilatus* life history, and was detected in several localities. This yeast species was also associated with two other beetle species. These results suggest that *P. porticicola* is quite common among some beetles. In this study, the yeasts were isolated from the body surface, even if larva and adult were rinsed with ethanol, as well as from egg galleries. They were also isolated from excrement, clearly showing intake by beetles. The yeasts' role in this association with beetles has yet to be fully elucidated. At the conclusion of this study, 112 strains including the novel species were deposited with NBRC (NITE Biological Resource Center).

Key words: ambrosia beetles, ambrosia fungi, insect-fungus association, seed-boring beetle, yeast species diversity

## 緒 言

昆虫と密接な関係を持つ酵母は、その発酵能などの機能においても、大きな可能性を秘めている。しかし、分離源となる昆虫の確保が容易でなかったことなどから、本格的なフロラ調査はあまり行なわれていない。

共生関係は生物多様性を創出する原動力となり、昆

E-mail: kajimura@agr.nagoya-u.ac.jp

共同研究者：川崎浩子，二宮真也，今西由巳，中桐 昭  
(NITE・NBRC)

虫と菌類の組み合わせで言えば、その代表的なモデルはキクイムシ類である（梶村, 2009）。ゾウムシ科の甲虫で、キクイムシ亜科 (Scolytinae) とナガキクイムシ亜科 (Platypodinae) に分かれ、日本産は、それぞれ、51属 302種と3属 18種が知られている (Nobuchi, 1985a, b; Beaver et al., 2008; 後藤, 2009)。キクイムシ類の成虫は、植物体に坑道（巣）を形成して産卵する。その食性・生息場所から、食材穿孔性キクイムシ、樹皮下穿孔性（内樹皮を摂食する）キクイムシ（bark beetle）、髓穿孔性キクイムシ、種子穿孔性キクイムシ、養菌性キクイムシ（ambrosia beetle）に大別されている (Farrell et al.,

2001; 梶村, 2002). この中で養菌性キクイムシは、辺材部で菌を栽培して摂食するという、特異な習性を持ち (Beaver, 1989; 梶村, 2003, 2006), そのために, mycangia と呼ばれる、共生菌の胞子を貯蔵・運搬する器官を備えている。キクイムシ亜科の約半数、ナガキクイムシ亜科のほぼ全種、世界で合計約3400種が養菌性とされる (Wood & Bright, 1992; Farrell *et al.*, 2001).

養菌性キクイムシと関係する菌類は、アンブロシア菌類 (*ambrosia fungi*) と総称されている (Batra, 1963, 1966; 梶村, 1998). この中で、キクイムシの成育に不可欠な菌類は、主要アンブロシア菌類 (primary ambrosia fungi: PAF) と呼ばれ、無性世代として、*Ambrosiella* 属や *Raffaelea* 属などがある (Batra, 1967). また、キクイムシの成育時期によつては、坑道や mycangia 内で酵母も共存するが (Kinuura *et al.*, 1991; Kajimura & Hijii, 1992; 梶村, 2000), これらの研究では、分離された酵母の同定が不完全である。一方で、坑道内の酵母をターゲットにした、先駆的なフロラ調査が行なわれている (Banno *et al.*, 1983). 彼らは188株を *Debaryomyces* 属1種, *Hansenula* 属6種, *Hornoascus* 属1種, *Kluyveromyces* 属1種, *Pichia* 属6種に同定した。その一部については、その後再分類が行なわれ、*Ogataea paradorogensis* (Nakase *et al.*, 2008) や *Pichia porticicola* (Ninomiya *et al.*, 2010) のように、新種として記載されている。ところが、この貴重な調査も、キクイムシの種や成育段階が不明の場合があり、両者の関係を十分に考察できない。最近では、カシノナガキクイムシと関係する酵母が同定されているものの (Endoh *et al.*, 2008a, b, c), キクイムシ亜科も含めた、全体像の把握が必要である。世界的にみると、樹皮下穿孔性キクイムシも加えて、かなりの種類の酵母がキクイムシから得られているが (Ganter, 2006), やはり分離源の情報が不足している。

そこで、本研究では、キクイムシ共生酵母の探索と分類を集約的に進め、その種の多様性の解明と保全に貢献しようとした。同時に、培養株の適切な保存に取り組み、有用資源の持続的利用を図ろうとした。すなわち、キクイムシ採集ネットワークと飼育・菌分離マニュアル、酵母の分類・保存技術を融合させて、重要な生物研究素材を開拓することを目的とした。

## 実験方法

**分離試料の採取** 北海道富良野市でハウチワカエデ (*Acer japonicum*), 山形県鶴岡市でハウチワカエ

デ, 愛知県豊田市でウリハダカエデ (*Acer rufinerve*) とシロモジ (*Lindera triloba*), 和歌山県田辺市でイロハモミジ (*Acer palmatum*), 京都府舞鶴市でウリハダカエデとイヌシデ (*Carpinus tschonoskii*) を伐採し、昆虫に穿孔させる餌木とした。森林内に静置した後、餌木を定期的に回収し、適当なサイズに割材してキクイムシの坑道を確認した。この際、キクイムシの成育段階を記録するとともに、幼虫や新成虫、親成虫、フラス (幼虫の摂食に伴って排出される固形物。キクイムシの場合、木屑が主体で、糞も混じる。), 糞も採集した。愛知県名古屋市では、コナラ (*Quercus serrata*) およびアベマキ (*Quercus variabilis*) の堅果を調査対象とした。また、沖縄県宮古島では、餌木が用意できなかったため、名大式キクイムシトラップ (生け捕り型) (伊藤、梶村, 2006) で飛翔成虫を捕獲し、人工飼料 (Mizuno & Kajimura, 2009) に投入して坑道を形成させた。

**酵母の分離** キクイムシの坑道内の菌体、フラス、糞は、滅菌したピンセットで採取し、ポテト・デキストローズ寒天培地あるいはYM寒天培地に静置した。15°Cあるいは25°Cの全暗条件で画線培養による単コロニー分離を行ない、純粹培養した。mycangiaについては、滅菌した昆虫針などを用いて摘出し、その後の手順や条件は、坑道の場合と同じである。さらに、幼虫や新成虫、親成虫を培地上で歩行させて、酵母を分離した。この際、幼虫と新成虫には、滅菌水あるいはエタノールで洗浄する前処理も加えた。菌株はすべて-80°Cフリーザーに保存し、凍結標品とした。

**形態観察** 栄養細胞はYM寒天培地に菌を接種し25°Cで3日間、子囊胞子はYM寒天培地、5%麦芽エキス寒天培地、1.7%コーンミール寒天培地に菌を接種し25°Cで7日間、偽菌糸はDalmau plateコーンミール寒天培地に菌を接種し25°Cで7日間培養し、光学顕微鏡で観察した。

**生理学的性状試験** Yarrow (1998) の方法に従い、発酵性および炭素源の資化性試験を行った。

**26S rDNAのD1/D2領域の塩基配列決定** 凍結標品をYM液体培地で培養し、集菌した。DNAの抽出には、Dr. GenTLE (Takara) のキットfを使用した。26S rDNAのD1/D2領域は、プライマーセットNL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') と NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTG AAG ACG G-

3<sup>1</sup>) , TaKaRa Ex Taq (Takara Bio) を用い, Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) で増幅した。PCR の条件は以下のとおりである。鑄型 DNA の最初の熱変性を 95°C 3 分間行なった後, 热変性 94°C 30秒, プライマーアニーリング 55°C 30秒, 伸長反応 72°C 45秒の 3 段階を 30 サイクル行い, 最終伸長反応を 72°C 5 分間行った。増幅した PCR 産物から, 上記のプライマーおよび ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いて, 直接的にシーケンスを行なった。ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析し, 得られた塩基配列は ATGC ver.4 (Genetyx) で連結, 決定した。

**分子系統解析** 決定した塩基配列は, DDBJ から得た近縁種の既知配列とともにアライメントを行い, 比較した。ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997) を用いて系統解析を行い, 木村の二変数法 (Kimura, 1980) および近隣結合法 (Saitou & Nei, 1987) により系統樹を推定するとともに, 1000回の試行によって bootstrap 確率 (Felsenstein, 1985) を計算した。Kurtzman & Robnett (1998) および Kurtzman et al. (2008) に従い, 既知種と 98% 以下の相同性をもつグループを新規分類群と判断した。

## 結果と考察

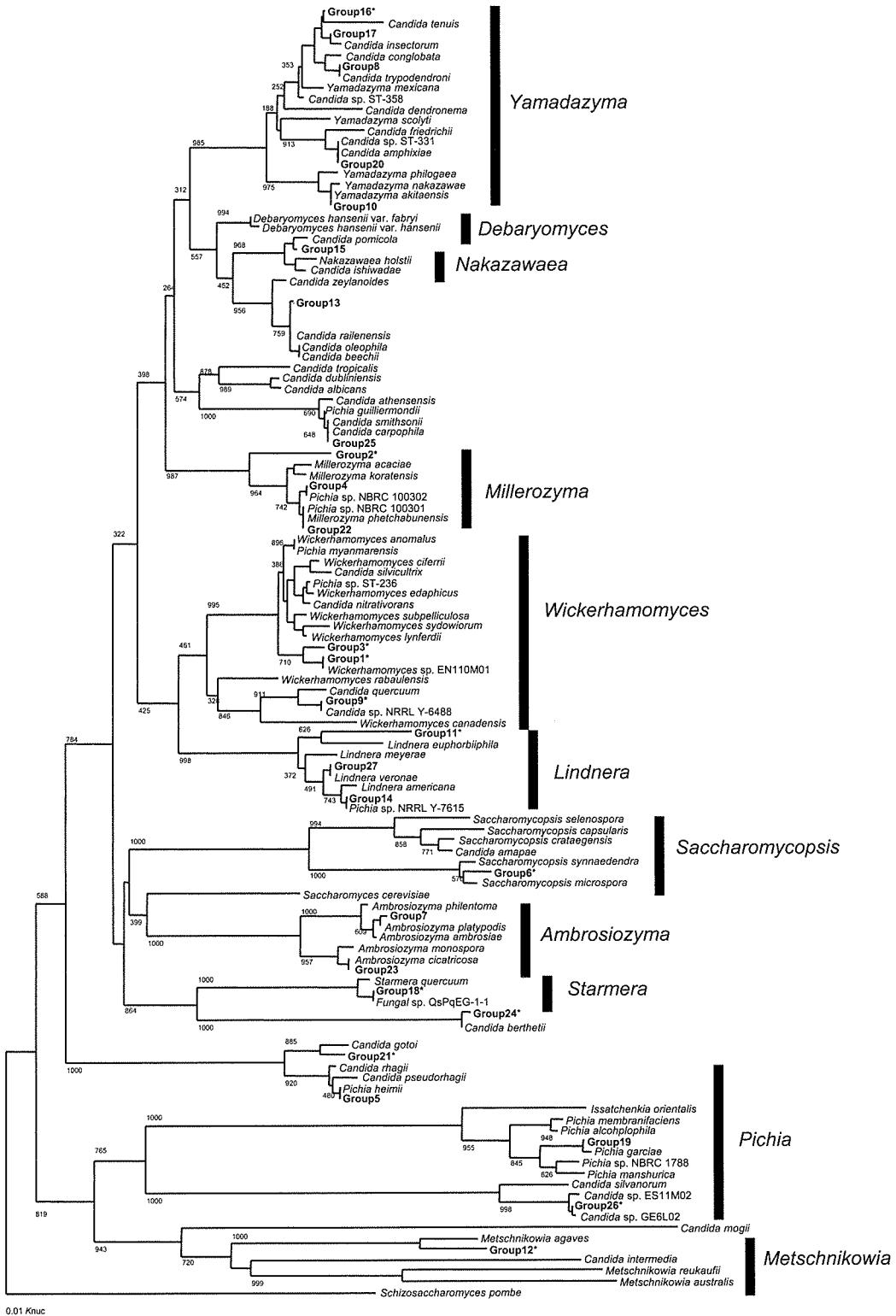
クスノオオキクイムシ (*Xylosandrus*(=*Cnestus*) *mutilatus*), ハネミジカキクイムシ (*Xylosandrus brevis*), サクキクイムシ (*Xylosandrus crassiusculus*), ユズリハノキクイムシ (*Xyleborus volvulus*), タイコンキクイムシ (*Scolytus platypus tycon*), ミカドキクイムシ (*Scolytus platypus mikado*), クリノミキクイムシ (*Coccotrypes cardamomi*), ヤチダモノナガキクイムシ (*Crossotarsus niponicus*) の坑道, フラス, 粪 (幼虫, 親成虫), mycangia (親成虫) あるいは体表 (幼虫, 新成虫, 親成虫) から, 合計 295 株の酵母を得た (Table 1)。成育段階は, 穿入期, 幼虫期, 蛹期, 新成虫期あるいは越冬期であった。分離されたすべての酵母が子嚢菌に属し, これらは 27 グループに分けられ, そのうちの 12 グループが新種候補と考えられた (Fig. 1)。酵母の多様性を明らかにする上で, キクイムシが有力な分離源であることが実証された。

新種候補の酵母グループは, ハネミジカキクイムシでは確認されなかつたが, 7 種のキクイムシ (クスノオオキクイムシ, サクキクイムシ, ユズリハノキクイ

ムシ, タイコンキクイムシ, ミカドキクイムシ, クリノミキクイムシ, ヤチダモノナガキクイムシ) から検出された。とくに, タイコンキクイムシ関連酵母は, mycangia から 13 株, 母孔 (雌成虫が産卵のために形成する坑道) から 26 株, 幼虫孔 (母孔周辺で幼虫によって拡張された坑道) から 13 株, 合計 52 株のうち, 2 つの新規分類群で 96% を占めた (Table 1)。*Candida* sp. 1 (グループ 3) は, タイコンキクイムシ以外のキクイムシからほとんど分離されていない (Table 1)。近縁種の *Pichia* (*Wickerhamomyces*) *myanmarensis* とは, 偽菌糸を形成し, L-ラムノースを資化し, 37°C で生育しない点で異なった。また, *Pichia* sp. 1 (グループ 2) は, mycangia から高頻度に分離された (Table 1)。近縁種の *Pichia porticicola* とは, マルトースを発酵せず, 硝酸塩を資化し, 35°C で生育しない点で異なった。

愛知県のシロモジから採集されたクスノオオキクイムシは, 3 系統の *Pichia* 属酵母と関係していた (Table 1)。すなわち, 24 株 (穿入期 6 株, 幼虫期 6 株, 蛹期 4 株, 新成虫期 3 株, 越冬期 5 株) が *Pichia porticicola* と 98% (563/570 bp), 越冬期の 1 株が *Pichia veronae* と 99% (565/570 bp), 新成虫期の 2 株が *Pichia nakazawai var. akitaensis* と 100% (530/530 bp) の相同性を示した。これらの結果より, *Pichia porticicola* は坑道内に常在することが明らかになった。なお, 坑道は, まず年輪に沿った形で作られ (水平坑道), 途中から纖維 (軸) 方向に拡張されるが (垂直坑道), どの部位からも酵母が分離された。

*Pichia porticicola* は, 他地域に生息するクスノオオキクイムシの坑道, それ以外の分離源, 異なるキクイムシ種の坑道からも得られた。例えば, 山形県のハウチワカエデから採集されたクスノオオキクイムシでは, 坑道 (幼虫～新成虫期) から 80% (32 株/40 株), mycangia から 100% (4 株/4 株), 幼虫の糞から 100% (10 株/10 株) の高頻度で分離された (Table 1)。また, 和歌山県のイロハモジから採集されたクスノオオキクイムシでは, 坑道 (新成虫期) から 47% (9 株/19 株) の分離頻度で得られた (Table 1)。これらの結果から, この酵母が地理的に離れてても存在することが示された。さらに, *Pichia porticicola* は, ハネミジカキクイムシ (愛知県, シロモジ) の坑道 (幼虫期) 内に 100% (14 株/14 株) 存在した (Table 1)。サクキクイムシにおいても, ウリハダカエデ (京都府) の坑道 (穿入期) で 83% (5 株/6 株), ハウチワカエデ (山形県) の坑道 (蛹期) で 100% (2 株/2 株) と優占的であった (Table 1)。



**Fig. 1** Neighbor-joining tree showing phylogenetic relationship of 27 groups of ambrosia and seed-boring beetle-associated yeasts and some related species in the genera *Yamadazyma*, *Debaryomyces*, *Nakazawaea*, *Millerozyma*, *Wickerhamomyces*, *Lindnera*, *Saccharomyopsis*, *Ambrosiozyma*, *Starmera*, *Pichia*, *Metschnikowia* based on sequences in D1/D2 domain of 26S rDNA. \* Novel group (Sequence similarity<98%)

## 昆虫共生酵母の系統分化と地理分布：シーズ開拓のためのフロラ解析

Table 1 Results of species identification of ambrosia and seed-boring beetle-associated yeasts based on sequences in D1/D2 domain of 26S rDNA

No.	Strain No.	Yeast species	Group No.	Beetle species	Sampling locality	Boring material	Isolation site	Growing stage
1	Cca-1R	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Egg
2	Cca-1S	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Egg
3	Cca-2R	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Boring
4	Cca-2S	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Boring
5	Cca-3R	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Egg
6	Cca-3S	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Egg
7	Cca-5R	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Boring
8	Cca-5S	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Boring
9	Cca-6R	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Frass	Larva
10	Cca-6S	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Frass	Larva
11	Cca-7	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Frass	Boring
12	Cca-8R	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Frass	Larva
13	Cca-8S	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Frass	Larva
14	Cca-9	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Larva
15	Cca-10	<i>Candida</i> sp. 2	14	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Boring
16	Cca-11a	<i>Candida</i> sp. 4	16*	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	New adult	New adult
17	Cca-11b	<i>Candida</i> sp. 4	16*	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	New adult	New adult
18	Cca-12a	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	Boring
19	Cca-12b	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Mother adult	Boring
20	Cca-13a	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	New adult	New adult
21	Cca-13b	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Frass	New adult
22	Cca-14a	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Mother adult	Larva
23	Cca-14b	<i>Candida pomicola</i>	15	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Larva w	Larva
24	Cca-14c	<i>Candida pomicola</i>	15	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Larva w	Larva
25	Cca-14d	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Larva E	Larva
26	Cca-14e	<i>Candida pomicola</i>	15	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Larva E	Larva
27	Cca-14f	<i>Candida pomicola</i>	15	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Larva E	Larva
28	Cca-15a	<i>Candida</i> sp. 2	14	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	New adult
29	Cca-15b	<i>Candida</i> sp. 2	14	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Gallery	New adult
30	Cca-16a	<i>Candida</i> sp. 2	14	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Mother adult	Larva
31	Cca-16b	<i>Candida</i> sp. 2	14	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	Larva w	Larva
32	Cca-17	<i>Candida railenensis</i>	13	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus serrata</i> acorn	New adult	New adult
33	Cca-18	<i>Candida fukuyamaensis</i>	25	<i>Coccophyes cardamomi</i>	Nagoya, Aichi	<i>Quercus variabilis</i> acorn	Gallery M	Boring
34	CnK-1	<i>Meischnikovia agaveae</i>	12*	<i>Crossotarsus niponicus</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Carpinus tschonoskii</i> tree	Gallery M	Boring
35	CnK-2a	<i>Ambrosiozyma ambrosiae</i>	7	<i>Crossotarsus niponicus</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Carpinus tschonoskii</i> tree	Gallery M	Pupa
36	CnK-2b	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	7	<i>Crossotarsus niponicus</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery J	Boring
37	SmH-1a	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery J	Larva
38	SmH-1b	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery J	Egg
39	SmH-2a	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery M	(New adult)
40	SmH-2b	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery J	Larva
41	SmH-3	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery J	Larva
42	SmH-4	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery J	Egg
43	SmH-5a	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery M	(New adult)
44	SmH-5b	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery M	(New adult)

Table 1 continued 1.

No.	Strain No.	Yeast species	Group No.	Beetle species	Sampling locality	Boring material	Isolation site	Growing stage
45	SmH-5c	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(New adult)
46	SmH-5d	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Pupa
47	SmH-5eR	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	New adult
48	SmH-5eS	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	New adult
49	SmH-6a	<i>Pichia</i> sp. 2	18*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
50	SmH-6b	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
51	SmH-6c	<i>Pichia</i> sp. 2	18*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
52	SmH-7a	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	New adult
53	SmH-7b	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(New adult)
54	SmH-7c	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	New adult
55	SmH-8a	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Egg
56	SmH-8b	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Egg
57	SmH-9a	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
58	SmH-9b	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
59	SmH-9c	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Larva)
60	SmH-9d	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Larva
61	SmK-1R	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
62	SmK-1S	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus mikado</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
63	SIA-1	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Mycangia	Boring
64	SIA-2	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Mycangia	Boring
65	SH-1	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Pupa)
66	SH-2	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Lava)
67	SH-3a	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
68	SH-3b	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
69	SH-4R	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Egg)
70	SH-4S	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Egg)
71	SH-5a	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Egg)
72	SH-5b	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	None
73	SH-6aR	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
74	SH-6aS	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
75	SH-6b	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
76	SH-7aR	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Boring
77	SH-7aS	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
78	SH-7b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Boring
79	SH-8a	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
80	SH-8b	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Boring
81	SH-9a	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
82	SH-9b	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Boring
83	SH-10a	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Boring
84	SH-10b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
85	SH-10c	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Boring
86	SH-10d	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Boring

昆虫共生酵母の系統分化と地理分布：シーズ開拓のためのフロラ解析

Table 1 continued 2.

No.	Strain No.	Yeast species	Group No.	Beetle species	Sampling locality	Boring material	Isolation site	Growing stage
87	SH-11	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
88	SH-12	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
89	SH-13b	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Egg	
90	SH-13c	<i>Pichia nakazawai var. aktensis</i>	10	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Egg
91	SH-14aR	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
92	SH-14aS	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
93	SH-14b	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Boring
94	SH-14c	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Boring
95	SH-16a	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
96	SH-16b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	
97	SH-17a	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	New adult
98	SH-17bR	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	New adult <sup>w</sup>
99	SH-17bS	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	New adult <sup>w</sup>
100	SH-17c	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	New adult <sup>w</sup>
101	SH-18	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Furano, Hokkaido	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	New adult <sup>E</sup>
102	SIK-1a	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Mycangia	Boring
103	SIK-1bR	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Mycangia	Boring
104	SIK-1bS	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Mycangia	Boring
105	SIK-1c	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
106	SIK-1d	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
107	SIK-2	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
108	SIK-3	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
109	SIK-4	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Myangia	Boring
110	SIK-5	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
111	SIK-6a	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
112	SIK-6b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
113	SIK-7aR	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Egg)
114	SIK-7aS	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Larva
115	SIK-7b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Larva
116	SIK-8a	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Larva
117	SIK-8b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Larva
118	SIK-8cW	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Boring
119	SIK-8cS	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
120	SIK-9a	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
121	SIK-9b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Egg
122	SIY-1a	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
123	SIY-1b	<i>Candida trypodendroni</i>	8	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	Boring
124	SIY-2	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Boring
125	SIY-3a	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
126	SIY-3b	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Egg
127	SIY-4	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva
128	SIY-5	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Mycangia	Larva

Table 1 continued 3.

No.	Strain No.	Yeast species	Group No.	Beetle species	Sampling locality	Boring material	Isolation site	Growing stage
129	SY-6a	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Lava)
130	SY-6b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Lava)
131	SY-6c	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Lava)
132	SY-6d	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Larva
133	SY-6e	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Larva
134	SY-6f	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Larva
135	SY-7R	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Lava)
136	SY-7S	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Lava)
137	SY-8a	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Lava)
138	SY-8b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Lava)
139	SY-8c	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Larva
140	SY-8d	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Larva
141	SY-9	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	New adult
142	SY-10a	<i>Candida</i> sp. 3	9*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>M</sup>	(Lava)
143	SY-10b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Scolytoplatypus tycon</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>L</sup>	Larva
144	XbA-1	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Larva
145	XbA-2	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Larva
146	XbA-3R	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Larva
147	XbA-3S	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Larva
148	XbA-4	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Larva
149	XbA-5	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Larva
150	XbA-6	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Larva
151	XbA-7	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Larva
152	XbA-8	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Larva
153	XbA-9	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Larva
154	XcA-1a	<i>Saccharomyces mikrospora</i>	6*	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Toyota, Aichi	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Larva
155	XcA-1b	<i>Saccharomyces mikrospora</i>	6*	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Larva
156	XcK-1	<i>Lindera</i> sp.	11*	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
157	XcK-2	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
158	XcK-3	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
159	XcK-4	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
160	XcK-5	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
161	XcK-6	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Maiduru, Kyoto	<i>Acer rufinerve</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
162	XcW-1	<i>Candida</i> sp. 3	9*	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	New adult <sup>W</sup>	New adult
163	XcW-2a	<i>Pichia garciniae</i>	19	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult
164	XcW-2b	<i>Pichia garciniae</i>	19	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	New adult
165	XcY-1a	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Pupa
166	XcY-1b	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus crassiusculus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Pupa
167	XmW-1a	<i>Candida amphixiae</i>	20	<i>Xylosandrus (Cnestus) mulitatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult

Table 1 continued 4.

No.	Strain No.	Yeast species	Group No.	Beetle species	Sampling locality	Boring material	Isolation site	Growing stage
168 XmW-1b	<i>Candida amphixiae</i>	20	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult	
169 XmW-2a	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
170 XmW-2b	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult	
171 XmW-3	<i>Candida</i> sp. 6	21*	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
172 XmW-4a	<i>Candida amphixiae</i>	20	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
173 XmW-4b	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
174 XmW-4c	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
175 XmW-4d	<i>Candida amphixiae</i>	20	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
176 XmW-5	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
177 XmW-6aR	<i>Candida</i> sp. 5	17	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
178 XmW-6aP	<i>Candida</i> sp. 5	17	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
179 XmW-6bR	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult	
180 XmW-6bS	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult	
181 XmW-7aR	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
182 XmW-7aS	<i>Pichia pechabunensis</i>	22	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
183 XmW-7bR	<i>Pichia pechabunensis</i>	22	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult	
184 XmW-7bS	<i>Pichia pechabunensis</i>	22	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult	
185 XmW-7c	<i>Pichia pechabunensis</i>	22	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult	
186 XmW-8	<i>Candida</i> sp. 6	21*	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult	
187 XmW-9	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult	
188 XmW-10	<i>Candida</i> sp. 7	26*	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tanabe, Wakayama	<i>Acer palmatum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult	
189 XmY-1	<i>Pichia nakaizae var. akitensis</i>	10	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva	
190 XmY-2	<i>Pichia</i> sp. 1	2*	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva	
191 XmY-3a	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Larva	
192 XmY-3b	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva	
193 XmY-3c	<i>Candida</i> sp. 1	3*	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Larva	
194 XmY-4a	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Pupa	
195 XmY-4b	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
196 XmY-4c	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
197 XmY-5a	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
198 XmY-5b	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
199 XmY-6a	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
200 XmY-6b	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
201 XmY-6c	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
202 XmY-6d	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
203 XmY-6e	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
204 XmY-6f	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Pupa	
205 XmY-7a	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Larva	
206 XmY-7b	<i>Pichia portoricola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Crestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>L</sup>	Larva	

Table 1 continued 5.

No.	Strain No.	Yeast species	Group No.	Beetle species	Sampling locality	Boring material	Isolation site	Growing stage
207	XmY-7c	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
208	XmY-7d	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
209	XmY-7e	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
210	XmY-8a	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
211	XmY-8b	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>l</sup>	Larva
212	XmY-9a	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
213	XmY-9b	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
214	XmY-10	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
215	XmY-11a	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
216	XmY-11b	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
217	XmY-11c	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
218	XmY-12a	<i>Pichia heimii</i>	5	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult
219	XmY-12b	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult
220	XmY-12c	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
221	XmY-12d	<i>Pichia heimii</i>	5	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
222	XmY-13	<i>Pichia heimii</i>	5	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
223	XmY-14aR	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Myrcanga	New adult
224	XmY-14aS	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Myrcanga	New adult
225	XmY-14b	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult
226	XmY-14c	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
227	XmY-14dR	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	New adult
228	XmY-14dS	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	New adult
229	XmY-15aR	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Larva
230	XmY-15aS	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
231	XmY-15bR	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
232	XmY-15bS	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>l</sup>	Larva
233	XmY-15cR	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>l</sup>	Larva
234	XmY-15cS	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>l</sup>	Larva
235	XmY-15dR	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>l</sup>	Larva
236	XmY-15dS	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>l</sup>	Larva
237	XmY-15eR	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>A</sup>	Larva
238	XmY-15eS	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Excrement <sup>A</sup>	Larva
239	XmY-16aR	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Myrcanga	Larva
240	XmY-16aS	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Myrcanga	Larva
241	XmY-16b	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Larva
242	XmY-17R	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>E</sup>	Larva
243	XmY-17S	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>E</sup>	Larva
244	XmY-18a	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>E</sup>	Larva
245	XmY-18b	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>E</sup>	Larva
246	XmY-19aR	<i>Pichia portunicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Crestus</i> ) <i>mutilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>E</sup>	Larva

Table 1 continued 6.

No.	Strain No.	Yeast species	Group No.	Beetle species	Sampling locality	Boring material	Isolation site	Growing stage
247	XmY-19aS	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>E</sup>	Larva
248	XmY-19b	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>E</sup>	Larva
249	XmY-20R	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
250	XmY-20S	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
251	XmY-21	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
252	XmY-22R	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
253	XmY-22S	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
254	XmY-23a	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
255	XmY-23b	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
256	XmY-24	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
257	XmY-25a	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
258	XmY-25b	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
259	XmY-26	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Tsuruoka, Yamagata	<i>Acer japonicum</i> tree	Larva <sup>V</sup>	Larva
260	XvB-1a	<i>Ambrosiozyma cicuticosa</i>	23	<i>Xyleborus volvulus</i>	Miyakojima Is., Okinawa	Semi-artificial diet <sup>#</sup>	Gallery <sup>V</sup>	Larva
261	XvB-1b	<i>Ambrosiozyma cicuticosa</i>	23	<i>Xyleborus volvulus</i>	Miyakojima Is., Okinawa	Semi-artificial diet <sup>#</sup>	Gallery <sup>V</sup>	Larva
262	XvB-1c	<i>Ambrosiozyma cicuticosa</i>	23	<i>Xyleborus volvulus</i>	Miyakojima Is., Okinawa	Semi-artificial diet <sup>#</sup>	Gallery <sup>V</sup>	Larva
263	XvB-2a	<i>Candida berthetii</i>	24*	<i>Xyleborus volvulus</i>	Miyakojima Is., Okinawa	Semi-artificial diet <sup>#</sup>	Gallery <sup>V</sup>	Larva
264	XvB-2b	<i>Candida berthetii</i>	24*	<i>Xyleborus volvulus</i>	Miyakojima Is., Okinawa	Semi-artificial diet <sup>#</sup>	Gallery <sup>V</sup>	Larva
265	Xm-A1	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	New adult
266	Xm-A2	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	New adult
267	Xm-A3	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
268	Xm-A4a	<i>Pichia nakazawae var. akitaensis</i>	10	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
269	Xm-A4b	<i>Pichia nakazawae var. akitaensis</i>	10	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
270	Xm-B1	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
271	Xm-B2a	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
272	Xm-B2b	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
273	Xm-B3	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
274	Xm-B4a	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
275	Xm-B4b	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>H</sup>	Boring
276	Xm-O1	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Overwintering adult
277	Xm-O2a	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Overwintering adult
278	Xm-O2b	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Overwintering adult
279	Xm-O2c	<i>Pichia veronae</i>	27	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Overwintering adult
280	Xm-O3	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Overwintering adult
281	Xm-O4	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Overwintering adult
282	Xm-P1	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Pupa
283	Xm-P2	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Pupa
284	Xm-P3	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Pupa
285	Xm-P4	<i>Pichia porticicola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (=Cnestus) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera triloba</i> tree	Gallery <sup>V</sup>	Pupa

Table 1 continued 7.

No.	Strain No.	Yeast species	Group No.	Beetle species	Sampling locality	Boring material	Isolation site	Growing stage
286	Xm-L1	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Cneshus</i> ) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
287	Xm-L2a	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Cneshus</i> ) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
288	Xm-L2b	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Cneshus</i> ) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
289	Xm-L3	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Cneshus</i> ) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
290	Xm-L4a	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Cneshus</i> ) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
291	Xm-L4a	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus</i> (= <i>Cneshus</i> ) <i>multilatus</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
292	Xb-L1	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
293	Xb-L2	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
294	Xb-L3	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva
295	Xb-L4	<i>Pichia poriticola</i>	4	<i>Xylosandrus brevis</i>	Toyota, Aichi	<i>Lindera trioba</i> tree	Gallery <sup>v</sup>	Larva

\* Novel group (Sequence similarity&lt;98%)

# Mizuno &amp; Kajimura (2009)

Gallery<sup>M</sup>=Mother gallery, Gallery<sup>L</sup>=Larval gallery, Gallery<sup>H</sup>=Horizontal gallery, Gallery<sup>V</sup>=Vertical galleryLarva<sup>w</sup>= Larva rinsed with sterilized water, Larva<sup>E</sup>= Larva rinsed with ethanol, New adult<sup>w</sup>= New adult rinsed with ethanol  
Excrement<sup>L</sup>= Larval excrement, Excrement<sup>A</sup>= Adult excrement

Banno *et al.* (1983) も、キクイムシ 7 種（12 県、穿孔樹木 8 種）の坑道から、本種を分離している。したがって、*Pichia porticicola* は、多種のキクイムシと関係する、きわめて一般的な酵母であるものと推察される。

今回の調査では、餌木の樹種を採集地間で統一できなかつたため、厳密に言えば、分離された酵母の地理的分布に関する検討は不十分かもしれない。一方、同一地域で複数の樹種を餌木とすれば、酵母相と樹種の関係を比較できたであろう。また、8 種のキクイムシを供試するにとどまったが、日本だけでも 320 種のキクイムシが存在することから、今後さらに多種のキクイムシを分離源に加えて酵母の収集を進めていく必要がある。同時に、分離方法も変えていけば、新規酵母をさらに検出できるであろう。

キクイムシから特異的に分離される酵母があることは実証されたが、どのような役割があるのかは不明である。すなわち、クスノオオキクイムシの孵化幼虫に各種の共生菌を与えた飼育実験によると、*Ambrosiella sp.* は食物となるが、酵母 (*Pichia porticicola*) では幼虫は発育できない（梶村、2000）。人工培養した共生菌の繁殖状態が実際の坑道内と異なることが、その理由かもしれない。しかし、今回の調査で示されたように、酵母は坑道内だけでなく、幼虫や成虫の体表から、たとえエタノールで洗浄しても分離できた (Table 1)。そして、糞からも酵母が得られた (Table 1)。事実は、キクイムシの体内に間違いなく酵母が取り入れられていることを示唆する。したがって、直接的な餌としての役割以外も考慮すべきかもしれない。微量栄養素（ビタミン類など）を供給する、*Ambrosiella sp.* の生育を補助する、フェロモン生産に関与する、熱源として坑道内の環境を調節するなど、様々な仮説を挙げることができる。その生態・機能の探求は大変興味深く、複雑多岐にわたる昆虫と菌類の関係 (Vega & Blackwell, 2005; 梶村ら, 2007) を考える重要な鍵となろう。

## 要 約

昆虫と共生する酵母に着目し、その探索と分類を集約的に進め、種多様性の解明と保全に貢献しようとした。6 地点で採集した 8 種のキクイムシの坑道、プラス、糞（幼虫、親成虫）、mycangia（親成虫）あるいは体表（幼虫、新成虫、親成虫）から、合計 27 グループ 295 株の酵母を分離した。すべての菌株が子囊菌系酵母であり、26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列に基づく系統解析により、12 グループが新種と判断され

た。酵母の多様性を明らかにする上で、キクイムシが有力な分離源であることが実証された。

新種候補の酵母グループは 7 種のキクイムシから発見され、とくに、タイコンキクイムシ関連酵母は 2 つの新規分類群で分離株の 96% を占めた。このうち、*Candida* sp. 1 はタイコンキクイムシ以外のキクイムシからほとんど分離されず、*Pichia* sp. 1 は mycangia から高頻度に分離された。

*Pichia porticicola* は、クスノオオキクイムシの全成長段階の坑道内から検出され、常に存在することが明らかになった。また、地理的に離れてても存在し、他の 2 種のキクイムシとも関係することから、きわめて一般的な酵母であるものと推察された。

酵母は坑道内だけでなく、幼虫や成虫の体表から、たとえエタノールで洗浄しても分離できた。そして、糞からも酵母が得られた事実は、キクイムシの体内に酵母が間違いなく取り入れられていることを示唆した。今後、キクイムシ特異的酵母の役割を探求することが重要であると思われた。

新種候補を中心に、112 株を NBRC に寄託した。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 梶村恒、二宮真也、今西由巳、中桐昭 (2008)。森林昆虫と菌類の共進化：クスノオオキクイムシは坑道内で特定の酵母と共生している。第52回日本応用動物昆虫学会大会、宇都宮大学農学部（宇都宮），2008年3月26日。
- 2) 梶村恒、川崎浩子、二宮真也、今西由巳、中桐昭 (2009)。クスノオオキクイムシと共生する酵母の種類は成育段階や採集地で異なるのか？。第120回日本森林学会大会、京都大学農学部（京都），2009年3月27日。
- 3) 二宮真也、梶村恒、中桐昭、鈴木健一朗、川崎浩子 (2010)。養菌性キクイムシ（タイコンキクイムシ）から分離した新規酵母の分類学的研究。日本農芸化学会2010年度大会、東京大学駒場キャンパス（東京），2010年3月28日。

### ポスター発表

- 1) Kajimura, H., Ninomiya, S., Imanishi, Y. & Nakagiri, A. (2007). Yeasts isolated from galleries of ambrosia beetles in relation to their life history. Asian Mycology Congress 2007, Penang, Malaysia, December 3, 2007. \*The 1st prize poster presentation award.
- 2) 梶村恒、二宮真也、今西由巳、中桐昭 (2008)。昆虫共生菌の生態－アンブロシア菌としての *Pichia* 属酵母－。日本菌学会第52回大会、三重大学三翠ホール（津），2008年6月1日。

## 保存機関に寄託した菌株

本研究で得られた以下の 112 菌株を NBRC に寄託した。

菌株名	学名	NBRC番号		
SmH-1a	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	106860	SmH-7a	<i>Wickerhamomyces</i> sp. 107490
SmH-2a	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	106861	SmH-7b	<i>Wickerhamomyces</i> sp. 107491
SmH-3	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	106862	SmH-8a	<i>Wickerhamomyces</i> sp. 107492
SmH-5a	<i>Wickerhamomyces</i> sp.	106863	SmH-8b	<i>Wickerhamomyces</i> sp. 107493
SmH-4	<i>Pichia</i> sp.	106864	SmH-9a	<i>Wickerhamomyces</i> sp. 107494
StH-1	<i>Pichia</i> sp.	106865	SmH-9b	<i>Wickerhamomyces</i> sp. 107495
StH-5b	<i>Pichia</i> sp.	106866	SmH-9c	<i>Wickerhamomyces</i> sp. 107496
StY-1a	<i>Pichia</i> sp.	106867	SmH-6b	<i>Pichia</i> sp. 107497
StY-2	<i>Pichia</i> sp.	106868	StH-8b	<i>Pichia</i> sp. 107498
StY-3a	<i>Pichia</i> sp.	106869	StH-10a	<i>Pichia</i> sp. 107499
StY-3b	<i>Pichia</i> sp.	106870	StH-13b	<i>Pichia</i> sp. 107500
StY-4	<i>Pichia</i> sp.	106871	StH-16a	<i>Pichia</i> sp. 107501
StY-5	<i>Pichia</i> sp.	106872	StH-7a	<i>Candida</i> sp. 107502
StK-2	<i>Pichia</i> sp.	106873	StH-8a	<i>Candida</i> sp. 107503
StK-4	<i>Pichia</i> sp.	106874	StH-10b	<i>Candida</i> sp. 107504
StK-6a	<i>Pichia</i> sp.	106875	StH-14c	<i>Candida</i> sp. 107505
XmY-2	<i>Pichia</i> sp.	106876	StH-17a	<i>Candida</i> sp. 107506
SmH-5e	<i>Candida</i> sp.	106877	StH-17b	<i>Candida</i> sp. 107507
SmK-1	<i>Candida</i> sp.	106878	StH-17c	<i>Candida</i> sp. 107508
StH-2	<i>Candida</i> sp.	106879	XcY-1a	<i>Pichia porticicola</i> 107509
StH-4	<i>Candida</i> sp.	106880	XmW-2a	<i>Pichia porticicola</i> 107510
StY-6a	<i>Candida</i> sp.	106881	XmY-14a	<i>Pichia porticicola</i> 107511
StY-9	<i>Candida</i> sp.	106882	XmY-16a	<i>Pichia porticicola</i> 107512
StK-1a	<i>Candida</i> sp.	106883	XmY-18a	<i>Pichia porticicola</i> 107513
StK-3	<i>Candida</i> sp.	106884	XcW-1	<i>Candida</i> sp. 107514
StK-8b	<i>Candida</i> sp.	106885	StH-13c	<i>Pichia nakazawae</i> 107515
StA-1	<i>Candida</i> sp.	106886	CcA-1	<i>Candida railenensis</i> 107516
XmY-3a	<i>Candida</i> sp.	106887	CcA-3	<i>Candida railenensis</i> 107517
XmY-4c	<i>Pichia porticicola</i>	106888	CcA-5	<i>Candida railenensis</i> 107518
XcK-2	<i>Pichia porticicola</i>	106889	CcA-6	<i>Candida railenensis</i> 107519
XbA-1	<i>Pichia porticicola</i>	106890	CcA-8	<i>Candida railenensis</i> 107520
XmY-12a	<i>Pichia heimii</i>	106891	CcA-9	<i>Candida railenensis</i> 107521
XmY-13	<i>Pichia heimii</i>	106892	CcA-12a	<i>Candida railenensis</i> 107522
XcA-1a	<i>Saccharomyopsis</i> sp.	106893	CcA-13a	<i>Candida railenensis</i> 107523
XcA-1b	<i>Saccharomyopsis</i> sp.	106894	CcA-13b	<i>Candida railenensis</i> 107524
CnK-2a	<i>Ambrosiozyma ambrosiae</i>	106895	CcA-14d	<i>Candida railenensis</i> 107525
CnK-2b	<i>Ambrosiozyma ambrosiae</i>	106896	CcA-17	<i>Candida railenensis</i> 107526
CnK-3b	<i>Candida trypodendroni</i>	106897	CcA-10	<i>Candida</i> sp. 107527
CnK-4b	<i>Candida</i> sp.	106898	CcA-15a	<i>Candida</i> sp. 107528
CnK-5b	<i>Pichia nakazawae</i>	106899	CcA-15b	<i>Candida</i> sp. 107529
CnK-6b	<i>Lindnera</i> sp.	106900	CcA-16a	<i>Candida</i> sp. 107530
CnK-7b	<i>Metschnikowia</i> sp.	106901	CcA-16b	<i>Candida</i> sp. 107531
			CcA-14b	<i>Candida pomicola</i> 107532
			CcA-14c	<i>Candida pomicola</i> 107533
			CcA-14e	<i>Candida pomicola</i> 107534
			CcA-14f	<i>Candida pomicola</i> 107535
			CcA-11a	<i>Candida</i> sp. 107536

CcA-11b	<i>Candida</i> sp.	107537
XmW-6aR	<i>Candida</i> sp.	107538
XmW-6aP	<i>Candida</i> sp.	107539
SmH-6a	<i>Pichia</i> sp.	107540
SmH-6c	<i>Pichia</i> sp.	107541
XcW-2a	<i>Pichia garciniae</i>	107542
XcW-2b	<i>Pichia garciniae</i>	107543
XmW-1a	<i>Candida</i> sp.	107544
XmW-1b	<i>Candida</i> sp.	107545
XmW-4a	<i>Candida</i> sp.	107546
XmW-4d	<i>Candida</i> sp.	107547
XmW-3	<i>Candida</i> sp.	107548
XmW-8	<i>Candida</i> sp.	107549
XmW-7aS	<i>Pichia</i> sp.	107550
XmW-7b	<i>Pichia</i> sp.	107551
XmW-7c	<i>Pichia</i> sp.	107552
XvB-1a	<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i>	107553
XvB-1b	<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i>	107554
XvB-1c	<i>Ambrosiozyma cicatricosa</i>	107555
XvB-2a	<i>Candida berthetii</i>	107556
XvB-2b	<i>Candida berthetii</i>	107557
CcA-18	<i>Candida fukuyamaensis</i>	107558
XmW-10	<i>Candida</i> sp.	107559

## 謝　　辞

本研究に対し、3年間の助成をいただいた財団法人発酵研究所に心より感謝申し上げます。東京大学大学院農学生命科学研究所附属科学の森教育研究センター・北海道演習林の井口和信氏、松井理生氏、山形県森林研究研修センターの齊藤正一氏、京都府林業試験場の小林正秀氏、野崎愛氏、和歌山県農林水産総合技術センター林業試験場の法眼利幸氏の皆様には、餌木の伐採や回収にご協力いただきました。深謝いたします。

## 文　　献

- Banno, I., Mikata, K. & Kodama, K. (1983). Ascomycetous yeasts isolated from galleries of the ambrosia beetles in Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **24**: 441-450.
- Batra, L. A. (1963). Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. *Trans. Kansas Acad. Sci.* **66**: 213-236.
- Batra, L. A. (1966). Ambrosia fungi: extent of specificity to ambrosia beetles. *Science* **153**: 193-195.
- Batra, L. A. (1967). Ambrosia fungi: a taxonomic revision, and nutritional studies of some species. *Mycologia* **59**: 976-1017.
- Beaver, R. A. (1989). Insect-fungus relationships in the

- bark and ambrosia beetles, *In* Wilding, N., Collins, N. M., Hammond, P. M. & Webber, J. F. (eds.), *Insect-Fungus Interactions*, p. 121-143, Academic Press, London.
- Beaver, R. A., Kajimura, H. & Goto, H. (2008). Taxonomic changes and new records of Japanese bark and ambrosia beetles (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae). *Elytra* **36**: 231-239.
- Endoh, R., Suzuki, M. & Benno, Y. (2008a). *Pichia rarassimilans* sp. nov., a novel yeast species isolated from body surface of the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **54**: 181-186.
- Endoh, R., Suzuki, M. & Benno, Y. (2008b). *Ambrosiozyma kamigamensis* sp. nov. and *A. neoplatypodis* sp. nov., two new ascomycetous yeasts from ambrosia beetle galleries. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**: 365-376.
- Endoh, R., Suzuki, M., Benno, Y. & Futai, K. (2008c). *Candida kashinagacola* sp. nov., *C. pseudovanderkliftii* sp. nov. and *C. vanderkliftii* sp. nov., three new yeasts from ambrosia beetle-associated sources. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**: 389-402.
- Farrell, B. D., Sequeira, A. S., O'Meara, B. C., Normark, B. B., Chung, J. H. & Jordal, B. H. (2001). The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae : Scolytinae and Platypodinae). *Evolution* **55**: 2011-2027.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Ganter, P. F. (2006). Yeast and invertebrate associations, *In* Rosa, C. A. & Péter, G. (eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, p. 303-370, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 後藤秀章 (2009). 日本産キクイムシ類分類学研究の歴史と種のリスト. *森林学会誌* **91**: 479-485.
- 伊藤昌明, 梶村恒 (2006). 養菌性キクイムシの生け捕りを目的としたトラップの開発. *中部森林研究* **54**: 227-230.
- Kajimura, H. & Hijii, N. (1992). Dynamics of the fungal symbionts in the gallery system and the mycangia of the ambrosia beetle, *Xylosandrus multilatus* (BLANDFORD) (Coleoptera: Scolytidae) in relation to its life history. *Ecol. Res.* **7**: 107-117.
- 梶村恒 (1998). 森林昆虫の共生菌－アンブロシア菌－. *植物防疫* **52**: 491-495.
- 梶村恒 (2000). 微生物を“栽培”する繁殖戦略－養菌性キクイムシとアンブロシア菌－, 二井一禎, 脇井直樹 (編著), *森林微生物生態学*, p. 179-195, 朝倉書店, 東京.
- 梶村恒 (2002). キクイムシ類の穿孔様式と繁殖特性：養菌性グループを中心に. *日本生態学会誌* **52**: 81-88.
- 梶村恒 (2003). 養菌性キクイムシ, 巍佐庸, 松本忠夫, 菊沢喜八郎 (編著), *生態学事典*, p. 542-543, 共立出版, 東京.
- 梶村恒 (2006). 養菌性キクイムシ類の生態－昆虫が営む樹内農園－, 柴田叡式, 富樫一巳 (編著), *樹の中の虫の不思議な生活－穿孔性昆虫研究への招待－*, p. 161-186, 東海大学出版会, 秦野.
- 梶村恒, 升屋勇人, 佐藤大樹 (2007). 昆虫と菌類の関係－その生態と進化－ (原著書名: Vega, F. E. & Blackwell,

- M. (2005). Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution, 352pp., Oxford Univ. Press, New York.) , 394pp, 共立出版, 東京.
- 梶村恒 (2009) . 森林における生物多様性の創出モデルとしてのキクイムシ: 多様化の原動力は共生である. 森林学会誌 **91**: 421-423.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. **16**: 111-120.
- Kinuura, H., Hijii, N. & Kanamitsu, K. (1991). Symbiotic fungi associated with the ambrosia beetle, *Scolytoplatypus mikado* BLANDFORD (Coleoptera: Scolytidae) – succession of the flora and fungal phases in the gallery system and the mycangium in relation to the developmental stages of the beetle-. J. Jpn. For. Soc. **73**: 197-205.
- Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek **73**: 331-371.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. & Basehoar-Powers, E. (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkovia*, and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. FEMS Yeast Res. **8**: 939-954.
- Mizuno, T. & Kajimura, H. (2009). Effects of ingredients and structure of semi-artificial diet on the reproduction of an ambrosia beetle, *Xyleborus pfeili* (Ratzeburg)(Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Appl. Entomol. Zool. **44**: 363-370.
- Nakase, T., Ninomiya, S., Imanishi, Y., Nakagiri, A., Kawasaki, H. & Limtong, S. (2008). *Ogataea paradorogensis* sp. nov., a novel methylotrophic ascomycetous yeast species isolated from galleries of ambrosia beetles in Japan, with a close relation to *Pichia dorogensis*. J. Gen. Appl. Microbiol. **54**: 377-383.
- Ninomiya, S., Mikata, K., Nakagiri, A., Nakase, T. & Kawasaki, H. (2010). *Pichia porticicola* sp. nov., a novel ascomycetous yeast related to *Pichia acaciae* isolated from galleries of ambrosia beetles in Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. **56**: 281-286.
- Nobuchi, A. (1985a). Family Platypodidae. Check-list of Coleoptera of Japan **29**: 1-3.
- Nobuchi, A. (1985b). Family Scolytidae. Check-list of Coleoptera of Japan **30**: 1-32.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**: 406-425.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The Clustal X windows interfaces: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. **24**: 4876-4882.
- Vega, F. E. & Blackwell, M. (2005). Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution, 352pp., Oxford Univ. Press, New York.
- Wood, S. L. & Bright, D. (1992). A catalog of Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera), part 2: Taxonomic index. Great Basin Nat. Mem. **13**: 1-1553.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, In Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. (eds.), The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th ed, p. 77-100, Elsevier, Amsterdam.

## 国内亜熱帯地域に分布するコウヤクタケ類（担子菌門）の種多様性 解析および遺伝資源の保存

前川 二太郎

鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター  
〒680-8553 鳥取市湖山町南4-101

### Species diversity of corticioid fungi (Basidiomycota) in the subtropical regions of Japan

Nitaro Maekawa

Fungus/Mushroom Resource and Research Center, Faculty of Agriculture, Tottori University  
4-101 Koyama-minami, Tottori-shi 680-5338, Japan

We reported 101 corticioid taxa belonging to 44 genera (Basidiomycota, Agaricomycetes) based on the 680 specimens collected from the Nansei Islands and the Ogasawara Islands, both located in subtropical regions of Japan. Among them, fifteen species are assignable to new records from Japan. These were *Asterostroma andinum*, *A. muscicola*, *Kavinia vivantii*, *Lindtneria thujatsugina*, *L. trachyspora*, *Peniophorella pertenuis*, *Phanerochaete australis*, *Ramaricium albo-ochraceum*, *Repetobasidium mirificum*, *Scytinostroma africanogalactinum*, *S. alutum*, *S. duriusculum*, *Theloporus calcicolor*, *Tubulicium vermiculare* and *Vararia gittonii*. Furthermore, 15 species of six genera were recognized as new taxa based on the morphological and/or phylogenetic analyses. Phylogenetic analyses of nucleotide sequence data from the nuclear large subunit ribosomal DNA (nLSU-rDNA) revealed that *Sistotrema* is polyphyletic and divided into at least six clades and that *Grammothele* is closely related to *Epithele*. During this study, 583 isolates of the corticioid taxa were obtained from the 583 specimens and cryopreserved in liquid nitrogen as genetic resources.

Key words: Agaricomycetes, cryopreservation, distribution, molecular phylogeny, taxonomy

### 緒 言

コウヤクタケ類は担子菌門 (Basidiomycota), ハラタケ綱 (Agaricomycetes) に所属し, 主に林内の倒木, 落枝あるいは落葉上などにごく普通に見られる菌群であり, これらの基質上に背着生からわずかに子実体周縁部が反転する半背生の膏葉 (こうやく) 状の子実体 (きのこ) を形成することによって特徴付けられる。このような子実体を形成する分類群として 250 属 1,700 種が知られている (Larsson *et al.*, 2004)。我が国では1994年までにコウヤクタケ科 (Corticiaceae, 広義) に所属する分類群として 203 種が報告され

(Maekawa, 1993, 1994), その後現在までに同科に 53 種が追加報告された (Maekawa, 1997, 1998, 1999, 2000, 2003; 前川, 2000; Maekawa & Hasebe, 2002; Maekawa & Nordén, 2002; Maekawa *et al.*, 2003; Suhara *et al.*, 2002, 2005, 2010)。さらに, イドタケ科 (Coniophoraceae), ラクノクラジウム科 (Lachnocladiaceae), ウロコタケ科 (Stereaceae) などの分類群と併せて, コウヤクタケ類として現在およそ 300 種が報告されている。コウヤクタケ類のほとんどは腐生性であり, その多くは木材腐朽力を持ち, 森林生態系における還元者として重要な役割を演じている。中には植物に菌根を形成し, 宿主植物との共生関係が認められる分類群や植物病原菌も含まれている。また, 本菌群には有用な酵素生産菌 (Hatakka, 1994; Hofrichter, 2002) やダイオキシン類分解菌 (Kamei *et al.*, 2005; Kamei & Kondo, 2005) なども見出されており, 将来的には遺伝資源として注目され

E-mail: kin-maek@muses.tottori-u.ac.jp

共同研究者: 須原弘登 (鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター)

る可能性が高い。

従来、コウヤクタケ類は、そのほとんどがヒダナシタケ目 (Aphyllophorales) のコウヤクタケ科 (Corticiaceae) に含まれていた (Talbot, 1973). 1990年代より分子生物学的手法を用いた rDNA 解析に基づく系統関係に関する情報が増すにつれ、コウヤクタケ類は多系統であり (Binder *et al.*, 2005; Hibbett *et al.*, 2007; Larsson, 2007), Hibbett *et al.* (2007) の示した複数遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹によれば、コウヤクタケ類は少なくとも12のクレード(目)に分散することが明らかとなった。

本研究は、著しく調査が遅れている国内亜熱帯地域に焦点を絞り、コウヤクタケ科および類縁科菌類の種多様性を解析し、これら分類群の亜熱帯地域における菌類相を明らかにするとともに、遺伝資源として分離株を恒久的に保存することを目的とする。

## 実験方法

**子実体の収集および分離株の取得** 亜熱帯地域に位置する南西諸島（奄美大島、沖縄本島、石垣島および西表島）および小笠原諸島（父島、母島および兄島）において現地調査を行い、コウヤクタケ類子実体を採取し、各子実体について子実層面の形状および色彩を記録した後、乾燥標本を作製した。乾燥標本は鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター標本室 (TUMH) に保存した。

分離株は子実体を乾燥する前に、ナイフまたはカミソリ刃を用いて、各子実体の新鮮な部位から基質の材とともに小片（子実体表面積がおよそ 15 mm<sup>2</sup>の四角形）を切り出し、直径 90 mm の滅菌シャーレに分注したマルトエキス寒天平板培地 (MA 培地) の蓋内面に子実層面が下方になるように白色ワセリンを用いて貼付け、パラフィルムでシャーレを封じた。その後 20-25°C に置き、落下した担子胞子を培地ごと MA 培地（斜面培地）に移植し、多胞子分離株を得た。各子実体から得た分離株は純粋培養後、凍害保護剤として 10% グリセロールを用い、プログラムフリーザーを使用して、前川 (2010) の方法に準じて液体窒素凍結保存（気相保存）を行なった。

**子実体の形態観察** 子実層面および子実体周縁部は実体顕微鏡 (10-20 倍) を用いて観察を行った。また、子実体の組織構造および構成要素を観察するために、乾燥子実体より薄切片を作製、またはカミソリ刃で基質より剥ぎ取った子実体片を、メルツァー氏液（抱水クロラール 20 g, ヨウ化カリウム 20 g, ヨウ素

0.5 g, 蒸留水 20 ml), 3% 水酸化カリウム水溶液、または蒸留水でマウントし、微分干渉顕微鏡を用いて観察 (400-1,000 倍) を行い、顕微鏡的特徴を記録した。

**DNA 抽出、PCR およびシークエンス反応** MA 培地あるいは Modified Melin-Norkrans 培地に貼付した滅菌済みのセロハン膜上で 2-3 週間培養した菌糸体 50 mg から、改変 CTAB 法によりゲノム DNA 抽出を行った。得られたゲノム DNA を鋸型とし、核の LSU rDNA の D1/D2 領域の一部を PCR 反応により増幅した。プライマーは LR0R および LR5 を用いた (Vilgalys & Hester, 1990). PCR 反応は Ex-Taq (TaKaRa) を用い、全液量 50 μl で行った。反応条件は、初めに 94°C 1 分間変性させ、変性 9°C 30 秒間、アニーリング 47°C 30 秒間、伸長 72°C 70 秒間を 30 サイクル繰り返した。最後に 72°C で 4 分間伸長させた。PCR 増幅産物の精製は、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用い、製品のプロトコルに従って精製した。PCR 精製産物を 10 ng/μl に調整して鋸型とし、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて、ダイレクトシークエンスを行った。シークエンス反応は PCR 反応と同様のプライマーを用い、反応条件は、初めに 94°C で 1 分間変性させ、変性 94°C 10 秒間、アニーリング 47°C 5 秒間、伸長 60°C 4 分間を 27 サイクル行った。反応生成物は、エタノール沈殿により精製し、ABI Prism 3130x/Genetic Analyzers (Applied Biosystems) を用いてシークエンスした。得られた塩基配列は、GENETYX v8.2.1 (GENETYX) により、両方向の配列を照合させ、塩基配列を決定し使用した。

**分子系統解析** 決定した塩基配列および GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から入手した塩基配列を系統解析のデータセットとして作成した。ソフトウェア MEGA4.0 (Tamura *et al.*, 2007) を用いてアライメントおよび系統樹 [近隣結合法 (Neighbour-Joining method: 以下、NJ 法と略す, Saitou & Nei, 1987) および最節約法 (Maximum Parsimony method: 以下、MP 法と略す, Eck & Dayhoff, 1966)] を作成した。枝の信頼性を検定するためにランダムサンプリングを 1,000 回反復し、ブートストラップ検定を行った。ブートストラップ値 (BP 値) は 50 以上の枝を示した。

## 結果

形態形質による分類学的同定 南西諸島および小笠

国内亜熱帯地域に分布するコウヤクタケ類（担子菌門）の種多様性解析および遺伝資源の保存

原諸島において収集したコウヤクタケ類子実体乾燥標本680点について、形態形質に基づく分類学的研究を行った結果、Table 1に示した44属101種を同定した。これらには日本未報告種として、*Asterostroma andinum*, *A. muscicola*, *Kavinia vivantii*, *Lindtneria thujatsugina*, *L. trachyspora*, *Peniophorella pertenuis*, *Phanerochaete australis*, *Ramaricium albo-ochraceum*, *Repetobasidium mirificum*, *Scytinostroma africanogalactinum*, *S. alutum*, *S. duriusculum*, *Theleporus calcicolor*, *Tubulicium vermiculare* および *Vararia gittonii* の11属15種を見

出した。さらに、形態学的形質に基づき *Asterostroma* および *Grammothele* に所属する新種と推定される以下の4種を検出した。

*Asterostroma sp. 1*：本種（標本4点）は西表島のマングローブ林においてオヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*) およびヤエヤマヒルギ (*Rhizophora mucronata*) の枯枝上に発生し、子実体は背生で、子実層面は平滑からややいぼ状を呈し、淡褐色から褐色で、子実体周縁部は白色から淡褐色を呈する。担子胞子はいぼ状突起を有する球形で、大きさが 8.5-11×7.5-9 μm (突起を除く)，アミロイド性。担子器

Table 1 Corticioid fungi collected in Nansei Islands and Ogasawara Islands

Scientific name	Nansei Islands	Ogasawara Islands	Scientific name	Nansei Islands	Ogasawara Islands
<i>Amphinema byssoides</i>		+	<i>Merulipopsis corium</i>		+
<i>Asterostroma andinum</i>		+	<i>Peniophora bicornis</i>		+
<i>Asterostroma cervicolor</i>		+	<i>Peniophora cinerea</i>		
<i>Asterostroma macrosporum</i>	+		<i>Phanerochaete australis</i>		
<i>Asterostroma muscicola</i>	+		<i>Phanerochaete brunnea</i>		
<i>Boidinia borbonica</i>	+		<i>Phanerochaete chrysorhiza</i>		
<i>Botryobasidium candicans</i>		+	<i>Phanerochaete leptoderma</i>		
<i>Botryobasidium conspersum</i>	+		<i>Phanerochaete magnoliae</i>		+
<i>Botryobasidium globosporum</i>	+		<i>Phanerochaete sordida</i>	+	+
<i>Botryobasidium pruinatum</i>	+		<i>Phanerochaete stereoides</i>		
<i>Candelabrochaete langloisi</i>		+	<i>Phanerochaete tropica</i>		
<i>Cerocorticium molle</i>	+		<i>Phlebia acanthocystis</i>		
<i>Dacryobolus karstenii</i>	+		<i>Phlebia aurea</i>	+	+
<i>Dendrocorticium nasti</i>	+		<i>Phlebia chrysocreas</i>		
<i>Dendrothele bispora</i>	+		<i>Phlebia georgica</i>		
<i>Dendrothele cyathea</i>	+	+	<i>Phlebia livida</i>	+	+
<i>Erythromyces crocicreas</i>	+		<i>Phlebiella tulasnellioidea</i>		
<i>Gloeocystidiellum porosum</i>		+	<i>Phlebiopsis ravenelii</i>		+
<i>Gloeocystidiellum wakullum</i>	+		<i>Pseudolagarobasidium calcareum</i>		
<i>Gloeodontia discolor</i>		+	<i>Radulomyces confluens</i>		
<i>Grammothele fuligo</i>	+	+	<i>Ramaricium albo-ochraceum</i>		+
<i>Haloaleurodiscus mangrovei</i>	+		<i>Repetobasidium mirificum</i>		+
<i>Hypodermia argillaceum</i>		+	<i>Resinicium bicolor</i>	+	+
<i>Hypodermia ayresii</i>	+		<i>Resinicium friabile</i>		
<i>Hypodermia definitum</i>	+		<i>Scopuloides hydnoides</i>		
<i>Hypodermia litschaueri</i>	+		<i>Scopuloides rimosa</i>		+
<i>Hypodermia microcystidium</i>	+		<i>Scytinostromella nannfeldtii</i>		+
<i>Hypodermia praetermissum</i>		+	<i>Scytinostroma africanogalactinum</i>		+
<i>Hypodermia puberum</i>	+	+	<i>Scytinostroma alutum</i>		+
<i>Hypodermia rude</i>	+	+	<i>Scytinostroma duriusculum</i>		+
<i>Hypodermia setigerum</i>	+	+	<i>Scytinostroma portentosum</i>	+	
<i>Hypodonta barbajovis</i>	+		<i>Sistotrema coronilla</i>		
<i>Hypodonta boninensis</i>	+	+	<i>Sistotrema diademiferum</i>		
<i>Hypodonta crustosa</i>	+		<i>Sistotremastrum niveocremeum</i>		
<i>Hypodonta flavipora</i>	+		<i>Subulicystidium brachysporum</i>	+	+
<i>Hypodonta gossypina</i>	+	+	<i>Subulicystidium longisporum</i>	+	+
<i>Hypodonta griseolinae</i>	+		<i>Subulicystidium meridense</i>	+	+
<i>Hypodonta microsporum</i>		+	<i>Subulicystidium nikau</i>		
<i>Hypodonta nespori</i>	+		<i>Tofispora repetospora</i>		+
<i>Hypodonta niemelaei</i>		+	<i>Theleporus calcicolor</i>	+	+
<i>Hypodonta nudiseta</i>		+	<i>Trechispora alnicola</i>		
<i>Hypodonta ovispora</i>	+		<i>Trechispora cohaerens</i>	+	+
<i>Hypodonta sambuci</i>		+	<i>Trechispora dimitrica</i>		
<i>Hypodonta subglobose</i>	+		<i>Trechispora farinacea</i>	+	+
<i>Jacksonomyces surirellus</i>	+		<i>Trechispora nivea</i>	+	+
<i>Kavinia vivantii</i>		+	<i>Trechispora praefocata</i>	+	+
<i>Lindtneria thujatsugina</i>		+	<i>Trechispora stevensonii</i>		
<i>Lindtneria trachyspora</i>		+	<i>Tubulicium rapidosporum</i>	+	+
<i>Litschauerella clematitis var. macrospora</i>	+		<i>Tubulicium vermiculare</i>		+
<i>Lopharia spadicea</i>		+	<i>Tylospora fibrillosa</i>		+
			<i>Vararia gittonii</i>		+

は円筒形、4胞子性で、大きさが $38\text{-}65\times8\text{-}9.5\mu\text{m}$ 。

**Asterostroma sp. 2**：本種（標本4点）は小笠原諸島（父島、母島および兄島）においてオガサワラビロウ (*Livistona chinensis* var. *boninensis*)、タコノキ (*Pandanus boninensis*) およびノヤシ (*Clinostigma savoryanum*) の枯枝および枯幹上に発生し、子実体は背着生で、子実層面は平滑、淡褐色からやや褐色で、子実体周縁部は褐色から暗褐色を呈し、しばしば同色の菌糸束を形成する。担子胞子はいぼ状突起を有する球形で、大きさが $7\text{-}8\times6\text{-}7.5\mu\text{m}$

（突起を除く）、アミロイド性。担子器は円筒形、4胞子性で、大きさが $40\text{-}60\times6.5\text{-}8.5\mu\text{m}$ 。

**Grammothele sp. 1**：本種（標本4点）は南西諸島（奄美大島、石垣島および西表島）において広葉樹枯枝に発生し、子実体は背着生で、子実層面は灰白色から淡褐色で、不定形の浅い孔状から歯牙状を呈する。孔壁および子実層から hyphal peg が突出する。菌糸構成は三菌糸型であり、原菌糸にはクランプを有する。Hyphal peg は褐色で結晶に覆われており、5%水酸化ナトリウム水溶液およびメルツァー氏液中で変色



**Fig. 1** Neighbor-joining tree derived from nLSU-rDNA sequences of *Grammothele* and its related genera. Confidence values from 1,000 bootstrap replications that are higher given than 50% are given at branches. Bar indicates 0.01 Knuc in nucleotide sequences.

しない。樹枝状糸状体は子実層と hyphal peg の先端および孔壁の先端に形成される。担子器はこん棒状、4本の小柄を有し、大きさが  $11\text{-}25 \times 4\text{-}6 \mu\text{m}$  である。担子胞子は無色、平滑、薄壁、橢円形で、大きさが  $5.5\text{-}8 \times 2.5\text{-}4 \mu\text{m}$  であり、非アミロイド性である。

**Grammothele sp. 2**：本種（標本 2 点）は南西諸島（西表島）において広葉樹枯枝に発生し、子実体は背着生で、子実層面は淡黄色で、針状、薄歯状から不連続な浅い孔状を呈する。孔壁および子実層から hyphal peg が突出する。菌糸構成は三菌糸型であり、原菌糸

にはクランプを有する。Hyphal peg は無色で結晶に覆われており、メルツァー氏液中でデキストリノイド反応を示す。樹枝状糸状体は子実層に多数形成される。担子器はこん棒状、4本の小柄を有し、大きさが  $18\text{-}27 \times 5\text{-}7 \mu\text{m}$  である。担子胞子は無色、平滑、薄壁、橢円形で、大きさが  $8\text{-}10 \times 3\text{-}4 \mu\text{m}$  であり、非アミロイド性である。

上記の 4 種に加え、*Hyphoderma* 2 種、*Peniophorella* 2 種、*Sistotrema* 2 種および *Trechispora* 5 種の新種と考えられる 11 種を見出した。

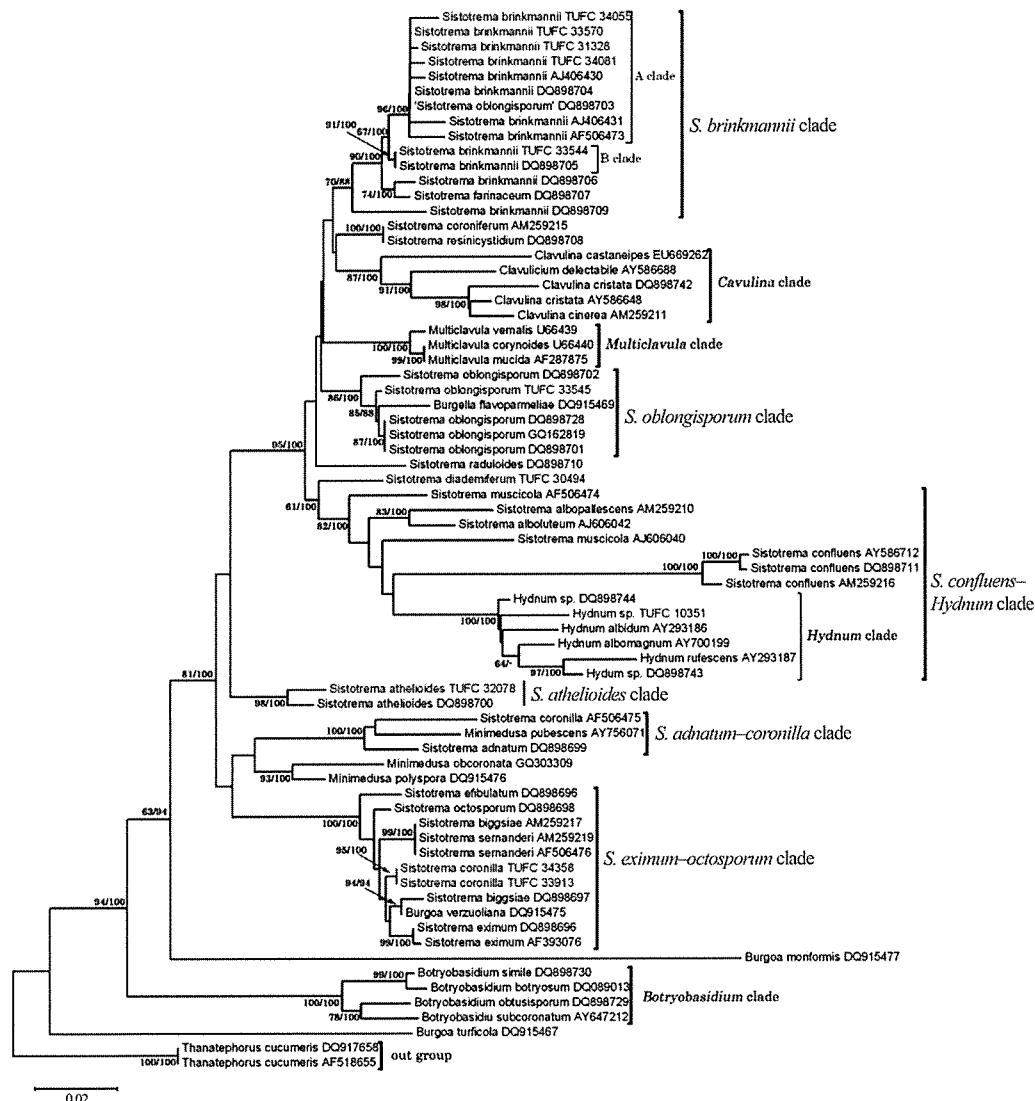


Fig. 2 Neighbour-joining tree derived from nLSU-rDNA sequences of *Sistotrema* and its related genera. NJ/MP confidence values from 1,000 bootstrap replications that are higher given than 50% are given at branches. Bar indicates 0.02 Knuc in nucleotide sequences.

**アイアナタケ属および類縁属の系統解析** アイアナタケ属 (*Grammothele*) はテレポルス属 (*Theleporus*)とともに背生の子実体を枯枝や枯幹上に形成し、子実層面が浅い管孔状から迷路状を呈し、子実層が管孔壁面には形成されず、管孔の底部に形成されることによって特徴付けられる分類群であり、その多くは亜熱帯から熱帯域に分布し、日本では *G. fuligo* (アイアナタケ) のみが知られている。本研究では国内の亜熱帯地域から収集した *G. fuligo* を含む23標本から得られた分離菌株および顕微鏡的特徴に類似性が認められる針状の子実層面を持つ *Epithele* 種も併せて 25S rDNA 塩基配列に基づく分子系統解析を行なった。その結果、*Grammothele* および類縁属菌はサルノコシカケ目 (Polyporales) のコア・クレード (core polyporoid clade) 内に位置し、*Epithele-Grammothele* クレードを形成した (Fig. 1)。NJ 法および MP 法で解析した系統樹を比較したところ、両系統樹はほぼ一致し、*Epithele-Grammothele* クレードは、さらにクレード 1, クレード 2, クレード 3, クレード 4 および *Epithele* クレードに分かれた。

**ヒメハリタケモドキ属および類縁属の系統解析** ヒメハリタケモドキ属 (*Sistotrema*) はアンズタケ目に所属し、既知種として50種が知られ、本属基準種 *S. confluens* は有柄有傘の子実体を形成するが、大部分の種は背生子実体を形成する。しかし、2-8本の小柄を有するつぼ型の担子器を持つことによって本属は特徴付けられている。本研究では国内亜熱帯地域から収集した子実体標本 (分離菌株) を含む国内産 *Sistotrema* および類縁属菌を用いて、25S rDNA 塩基配列に基づく分子系統解析を行なった。その結果、*Sistotrema* は6つのクレード、すなわち *S. adnatum-coronilla* クレード、*S. atheloides* クレード、*S. brinkmannii* クレード、*S. confluens-Hydnnum* クレード、*S. eximum-octosporum* クレードおよび *S. oblongisporum* クレードに分かれた (Fig. 2)。

**分離株の取得と保存** 小笠原諸島および南西諸島から収集したコウヤクタケ類子実体から分離株として583株を得た。これらの菌株は純粋培養後、液体窒素凍結保存を行なった。1か月後に各保存菌株の中から凍結保存チューブ1本を取り出し、急速解凍を行なった後、MA 培地で再生率と菌叢形態を調査した結果、供試したすべての菌株において 100% の再生率が得られるとともに、再生菌糸体の菌叢形態も保存前のそれらと同様であった。

## 考 察

**ホシゲタケ属分類群について** 従来ホシゲタケ属 (*Asterostroma*) として *A. cervicolor* の1種のみが我が国から報告されていたが (青島ら、1963)，本研究において、本種以外に *A. andinum* および *A. muscicola* の日本未報告種が認められ (Table 1)，さらに、西表島マングローブ林のヤエヤマヒルギおよびオヒルギの枯枝上より得られた *Asterostroma* sp. 1 は、いぼ状突起を有する球形、アミロイド性の担子胞子を形成する点において既存種の中では *A. muscicola* に類似するが、担子胞子および担子器が後者と比較して明らかに大型である点において、*A. muscicolora* とは形態的に異なり、さらに、ITS 領域を用いた系統解析においても別種であることが示唆された。さらに、*Asterostroma* sp. 1 は西表島のマングローブ樹種のみから得られているのに対し、*A. muscicola* はマングローブ林を含む亜熱帯地域から暖温帯地域にかけて広く分布が認められている (Suhara et al., 2010)。したがって、*Asterostroma* sp. 1 は形態学的、分子系統分類学的および生態学的に *A. muscicola* とは異なり、新種と認め、*A. macrosporum* として報告した (Suhara et al., 2010)。

小笠原諸島の兄島、父島および母島において収集した *Asterostroma* sp. 2 の担子胞子の形態および大きさは *A. muscicola* のそれらの範疇に入るが、担子器の大きさが *A. muscicola* と比較して明らかに大きく、さらに担子器の小柄は常に4本であるのに対し、*A. muscicola* の小柄は2-4本と変異に富む。また、*Asterostroma* sp. 2 は小笠原諸島の単子葉植物固有種であるタコノキ、ノヤシおよびオガサワラビロウ上からのみ採集されているが、*A. muscicola* は被子植物だけでなく裸子植物の樹種にも発生するとともに (Gilbertson et al., 1974; Gilbertson & Blackwell, 1987)，前述したように分布域も広い。これらの形態学的および生態学差異より、*Asterostroma* sp. 2 は新種と考えられる。

**アイアナタケ属とその類縁属について** アイアナタケ属 (*Grammothele*) およびその類縁属菌の系統解析の結果、得られた4つのクレードのうち、*Grammothele* sp. 1 は褐色を呈する hyphal peg を持ち、既知種の *G. lineata* と類似するが、前者が 5% 水酸化ナトリウム水溶液で変色せず、またメルツァー氏液中でデキストリノイド反応を示し、担子胞子の大きさが  $5.5-8 \times 2.5-4 \mu\text{m}$  であるのに対し、Ryvarden

(1979)によれば後者は hyphal peg が5%水酸化ナトリウム水溶液中で黒色を呈し、デキストリノイド反応を示し、担子胞子の大きさが $4.5\text{-}6 \times 1.5\text{-}2.5 \mu\text{m}$ であると記載した。このように *Grammothele* sp. 1 は明らかに *G. lineata* とは区別でき、新種と考えられる。

*Grammothele* sp. 1 は広葉樹に発生し、灰白色から淡褐色であり、子実体表面は薄刃状または不定形、多角の孔を形成し、子実層面に円錐形、褐色の hyphal peg が突出する。これらの特徴は *G. lineata* に類似するが、担子胞子の大きさが異なることから *Grammothele* sp. 1 は新種と考えられる。*Grammothele* sp. 2 は広葉樹に発生し、子実体表面が淡黄色で、円筒形の針状から断続する壁を形成する。また、本種は *Grammothele* sp. 1 と同様に hyphal peg を形成するが、担子胞子の大きさおよび hyphal peg が無色であることから新種と考えられる。*Theleporus calcicolor* は日本未報告種であり、主に広葉樹に発生し、白色からクリーム色であり、孔は不定形で多角を呈する。孔壁を構成する菌糸にはクランプがあり、デキストリノイド反応を示さず、菌糸先端には樹状糸状体をもつ。

25S rDNA 塩基配列に基づく分子系統解析の結果、日本産アイアナタケ属およびその類縁属菌はサルノコシカケ目のコア・クレード (core polyporoid clade) 内に位置し、*Epithele*とともに *Epithele-Grammothele* clade を形成した (Fig. 1)。さらに本クレードは4つのクレード (クレード1, 2, 3 および4) に分かれた。クレード1は *G. fuligo*、クレード2は *Grammothele* sp. 1、クレード3は *Grammothele* sp. 2、また、クレード4は *T. calcicolor* にそれぞれ対応した。また、系統解析の結果において、*Grammothele* 属の種が複数のクレードに認められたこと、さらに *Grammothele* および類縁属に加えて *Epithele* との類縁性が認められたことより、今後 *Epithele-Grammothele* clade 内の属レベルの分類群における検討が必要である。

ヒメハリタケモドキ属およびその類縁属分類群について 日本産標本を用いた nLSU-rDNA の NJ 法によって作成した系統樹は、Nilsson *et al.* (2006) の報告と同様に、*S. confluens-Hydnum* クレード、*S. brinkmannii* クレードおよび *S. oblongisporum* クレードが入るグループの中に棍棒型の担子器を形成する *Multiclavula* クレード、*Clavulina* クレードおよび *Hydnum* が入れ子状に位置することが明らかとなった (Fig. 2)。*S. confluens-Hydnum* クレードには、外生菌根を形成する本属の基準種ヒメハリタケモドキ (*S. confluens*) および同様に外生菌根の形成が認め

られている *S. alboluteum*, *S. albopallens* および *S. muscicola*, さらに *Sistotrema* と姉妹関係にある外生菌根形成種である *Hydnum* が所属した。一方、残りの5つのクレードに所属する *Sistotrema* 種はすべて腐生性として知られている分類群であった。また、腐生性として報告されている *S. diademiferum* は外生菌根性の分類群が所属する *Sistotrema-Hydnum* クレードと 61/100 の BS 値で姉妹群を形成した。日本産 *S. brinkmannii* は少なくとも2つの異なるクレード、A クレード (BS 値 96/100) および B クレード (BS 値 91/100) に分かれた。また、北アメリカおよびヨーロッパから報告されている子実体に付随して小菌核を形成する *S. coronilla* は小菌核を形成するアナモルフ属である *Minimedusa* とともに *S. adnatum-coronilla* クレードに所属したが、濃褐色の小菌核を形成する *S. coronilla* と同定されている日本産の2標本 (TUFC34358 および TUFC33913) は、濃褐色の小菌核を形成する *Burgoa verzuoliana* とともに *S. eximum-octosporum* クレードに含まれた。これらの結果は日本産の2標本は *S. coronilla* とは異なる別種 (新種) であることが示唆された。なお、*S. oblongisporum* (DQ898703) は *S. brinkmannii* クレード内に認められたことから誤同定と考えられた。

南西諸島と小笠原諸島間におけるコウヤクタケ類菌類相の比較 南西諸島（奄美大島、沖縄本島、石垣島および西表島）および小笠原諸島（父島、母島および兄島）におけるコウヤクタケ類標本 680 標本のうち、分類学的研究によって種レベルで同定した44属 101種について両諸島間における菌類相を比較したところ、南西諸島には30属66種、小笠原諸島には31属56種の分布がそれぞれ認められた。また、両諸島ともに分布が認められた種は12属20種であり、比較的少ない種数であった (Table 1)。これは (1) 南西諸島が大陸島であるのに対し、小笠原諸島は大洋島であり、両諸島の成立要因が異なること、(2) 両諸島はほぼ同緯度に位置するが東西に約 1,600 km の隔たりがあること、また (3) 南西諸島にはマンゴロープ林が分布するが小笠原諸島に分布しない、などに起因するものと考えられる。しかし、南西諸島および小笠原諸島のコウヤクタケ類菌類相を解明するためには、両諸島とともに新種と考えられる標本を含む多くの未同定標本があり、今後これら標本の分類学的研究の進展を待つ必要がある。

## 要 約

本研究は、国内亜熱帯地域におけるコウヤクタケ類

菌類相を明らかにすることを目的とし、南西諸島および小笠原諸島から収集した当該菌類標本680点について形態学的形質に基づく分類学的研究を行なった。その結果、11属15種の日本未報告種を含む44属101種を同定した。これらの種のうち、南西諸島および小笠原諸島において分布が認められた種数は、それぞれ30属66種および31属56種であった。両諸島間ともに分布が認められた種数は12属20種であった。さらに、*Asterostroma*属2種、*Grammothele*属2種、*Hyphoderma*属1種、*Peniophorella*属2種、*Sistotrema*属5種および*Trechispora*属3種を新種として認めた。また、分離培養株を用いたrDNA解析（25SおよびITS領域）を行なった結果、*Grammothele*属および*Sistotrema*属が多系統であることが明らかになり、それぞれ少なくとも2つ以上の属に分割すべきであることが示唆された。本研究をおおして583菌株の分離株が得られ、これらについては培養特性を調べた後、液体窒素凍結保存を行なった。

### 保存機関に寄託した菌株

本研究において得られた分離株583株は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て保存している。これらのうち分類学上重要な分離株についてはNBRCに寄託予定である。

### 本助成で得られた研究成果の報告

#### 口頭発表

- 1) 牛島秀爾、前川二太郎、須原弘登（2007）。小笠原諸島産コウヤクタケ類（担子菌門）の分類学的研究。日本菌学会第51回大会（つくば）。
- 2) 彌永このみ、須原弘登、霜村典宏、前川二太郎（2008）。日本産*Peniophorella praetermissa*集合種の分類と系統。日本菌学会第52回大会（三重）。
- 3) 彌永このみ、須原弘登、霜村典宏、前川二太郎（2009）。*Sistotrema*属および類縁属菌における菌糸隔壁部の超微細構造と系統。日本菌学会第53回大会（鳥取）。
- 4) 伊藤大志、須原弘登、前川二太郎（2009）。日本産*Phanerochaete*属およびその類縁属の分類群の再検討。日本菌学会第53回大会（鳥取）。
- 5) Yanaga, K., Suhara, H., Shimomura, N. & Maekawa, N. (2009). Taxonomic evaluation of septal pore ultrastructure in the Cantharellales (Basidiomycota, Fungi). 第25回医学生物学電子顕微鏡技術学会（第6回医学生物学国際電子顕微鏡シンポジウム）（神戸）。

#### 原著論文

- 1) Suhara, H., Maekawa, N. & Ushijima, S. (2010). A new *Asterostroma* species (Basidiomycota) from a

subtropical region in Japan. *Mycotaxon* 114 (in press).

### 謝 辞

本研究に対して3年間にわたり研究助成いただきました財団法人発酵研究所の関係各位に心から御礼申し上げます。本研究における形態学的解析および分子系統解析を実施した鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター・菌類分類学研究室の牛島秀爾君、彌永このみさん、生田知帆さん、菌類分子系統学研究室の伊藤大志君をはじめとする両研究室の学生諸氏に厚くお礼申し上げます。

### 文 献

- 青島清雄、古川久彦、林康夫（1963）。*Asterodon*（ホシゲハリタケ属 - 新称）および*Asterostroma*（ホシゲタケ属）について。日菌報 4: 136-140.
- Binder, M., Hibbett, D.S., Larsson, K.H., Larsson, E., Langer, E. & Langer, G. (2005). The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Syst. Biodivers.* 3: 1-45.
- Eck, R.V. & Dayhoff, M.O. (1966). Atlas of protein sequence and structure. 215p. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland.
- Gilbertson, R.L. & Blackwell, M. (1987). Notes on wood-rotting fungi on Junipers in the Gulf Coast region. II. *Mycotaxon* 28: 369-402.
- Gilbertson R.L., Martin, K.J. & Lindsey, J.P. (1974). Annotated check list and host index for Arizona wood-rotting fungi. *Univ. Arizona Agaric. Exp. Sta. Techn. Bull.* 209: 1-48.
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 125-135.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., H. Lumbsch, T., Lutzoni, F., Brandon, M.P., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., M. Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, D.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside J.E., Köljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüller, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J. & Zhang, N. (2007).

- A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycol. Res. **111**: 509-547.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme Microb. Technol. **30**: 454-466.
- Kamei, I. & Kondo, R. (2005). Biotransformation of dichloro-, trichloro-, and tetrachlorodibenzo-p-dioxin by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **68**: 560-566.
- Kamei, I., Suhara, H. & Kondo, R. (2005). Phylogenetical approach for the isolation of the white rot fungi which can degrade polychlorinated dibenzo-p-dioxin. Appl. Microbiol. Biot. **69**: 358-366.
- Larsson, K.H. (2007). Re-thinking the classification of corticioid fungi. Mycol. Res. **111**: 1040-1063.
- Larsson, K.H., Larsson, E. & Köljalg, U. (2004). High phylogenetic diversity among corticioid homobasidiomycetes. Mycol. Res. **108**: 983-1002.
- Maekawa, N. (1993). Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphyllophorales) I. Rep. Tottori Mycol. Inst. **31**: 1-149.
- Maekawa, N. (1994). Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphyllophorales) II. Rep. Tottori Mycol. Inst. **32**: 1-123.
- Maekawa, N. (1997). Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphyllophorales) III. Rep. Tottori Mycol. Inst. **35**: 29-38.
- Maekawa, N. (1998). Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphyllophorales) IV. Rep. Tottori Mycol. Inst. **36**: 1-12.
- Maekawa, N. (1999). Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphyllophorales) V. Rep. Tottori Mycol. Inst. **37**: 7-20.
- 前川二太郎 (2000). 皇居吹上御苑のコウヤクタケ科（担子菌門）。科博専報**34**: 299-303.
- Maekawa, N. (2000). Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphyllophorales) VI. Rep. Tottori Mycol. Inst. **38**: 14-22.
- Maekawa, N. (2003). Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphyllophorales) VIII. Rep. Tottori Mycol. Inst. **41**: 13-19.
- 前川二太郎 (2010) 近年の我が国における菌株保存の最新技術。最新きのこ栽培技術（2010年度版きのこ年鑑別冊），p. 21-26，特産情報，東京。
- Maekawa, N. & Hasebe, K. (2002). *Pseudolagarobasidium calcarem*: Japanese records and cultural characters. Mycoscience **43**: 271-275.
- Maekawa, N. & Nordén, B. (2002). Taxonomic study of Japanese Corticiaceae (Aphyllophorales) VII. Mycoscience **43**: 363-365.
- Maekawa, N., Suhara, H., Kinjo, K. & Kondo, R. (2003). Corticioid fungi (Basidiomycota) in mangrove forests of the islands of Iriomote and Okinawa, Japan. Mycoscience **44**: 403-409.
- Nilsson, R.H., Larsson, K.H., Larsson, E. & Köljalg, U. (2006). Fruiting body-guided molecular identification of root-tip mantle mycelia proves strong indications of ectomycorrhizal associations in two species of *Sistotrema* (Basidiomycota). Mycol. Res. **110**: 1426-1432.
- Ryvarden, L. (1979). *Porogramme* and related genera. Trans. Br. Mycol. Soc. **73**: 9-19.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**: 406-425.
- Suhara, H., Maekawa, N., Kubayashi, T., Sakai, K. & Kondo, R. (2002). Identification of the basidiomycetous fungus isolated from butt rot of the Japanese cypress. Mycoscience **43**: 477-481.
- Suhara, H., Maekawa, N., Kubayashi, T. & Kondo, R. (2005). Specific detection of a basidiomycete, *Phlebia brevispora* associated with butt rot of *Chamaecyparis obtusa*, by PCR-based analysis. J. Wood Sci. **51**: 83-88.
- Suhara, H., Maekawa, N., Ushijima, S., Kinjo, K. & Hoshi, Y. (2010). *Asterostroma* species (Basidiomycota) from mangrove forests in Japan. Mycoscience **51**: 75-80.
- Talbot, P.H.B. (1973). Aphyllophorales I: general characteristics; thelephoroid and cupuloid families. In Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. & Sussman, A.S. (eds.), The Fungi, an Advanced Treatise Vol. IVB, p.327-349, Academic Press, New York & London.
- Tamura K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.
- Vilgalys, R. & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J. Bacteriol. **172**: 4238-4246.

# 有毒ラン藻 *Microcystis* における生物学的種認識に関する研究

田辺 雄彦

(独) 国立環境研究所  
茨城県つくば市小野川 16-2

"Biological species recognition" within the toxic cyanobacterium *Microcystis*  
Yuuhiko Tanabe

National Institute for Environmental Studies  
16-2 Onogawa, Tsukuba, Japan

*Microcystis aeruginosa* is a unicellular cyanobacterium that forms water blooms in eutrophic lakes, reservoirs and ponds worldwide. This cyanobacterium has been the cause of increasing public health concern due to the production of hepatotoxic cyanotoxins called microcystins. Although within-species phenotypic and chemotypic variations of *M. aeruginosa* are substantial enough to differentiate it as a distinct species, efforts to subdivide this species taxonomically on the basis of genetic variation have been unsuccessful. The aim of this study was to investigate the possible utility of "biological species recognition" in the within-species diversity of *M. aeruginosa* by measuring differing levels of impact of genetic exchange (e.g., recombination) within and between lineages. Using multilocus sequence typing (MLST) analyses of both housekeeping genes and the microcystin synthetase genes (*mcy*), we identified several panmictic clusters with much more frequent within-lineage recombination than between-lineage recombination. Biogeographic analysis of *M. aeruginosa* in the Tone River basin also indicated that strains belonging to different panmictic clusters often coexist in a single water body, suggesting the presence of barriers to genetic exchange between clusters. Taken together, the results presented here suggest that within-species clusters of *M. aeruginosa* may be comparable to the biological species in higher eukaryotes, opening new avenues for the future application of the biological species concept in revising the taxonomy of *M. aeruginosa*.

Key words: *Microcystis*, MLST, microcystin synthetase, recombination, biological species recognition

## 緒 言

種とは安定した形質を共有する生物群の最小の分類単位であり、これは高等動物からバクテリアまであらゆる生物群について当てはまる。しかしながら、高等動物の種の違いが直感的に理解可能なケースが多いのに対し、バクテリアの種の違いを明快に説明することはバクテリアの分類学者にとってすら容易でない場合が多い。現在のバクテリアの分類学においては、バクテリアの種は形態的・生化学的・生態的形質の共有に加えて、DNA-DNA 交雑実験で 70% 以上の相同性が

E-mail: y\_tanabe@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

現) 筑波大学大学院 生命環境科学研究所

〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

見られる、あるいは 16S rDNA の配列比較において 97% 以上の相同性が見られる、という基準を満たす遺伝的に近縁なグループとして定義される (Vandamme et al., 1996)。これらの遺伝的近縁性の閾値に理論的根拠はなく、これらの閾値で識別したグループには一般的に形質にも違いがあるという経験的根拠に基づいている。このため、現在のバクテリアの種分類は、自然分類の認識を念頭におきつつも、一方で人為的な措置という側面がある感は否めない。バクテリアの種分類は、形態的特徴の乏しさ、系統的に離れた種間の遺伝子水平移動、代謝能力の可塑性等の理由のため、必然的にそのバクテリアの持つ生物学的属性と、人にとっての操作上の利便性との間の折衷案とならざるを得ないのである。

バクテリアに比べると、高等動物の種は非常に明瞭

である。例えばゴリラとチンパンジー、rDNAの配列で見るとほとんど違いがない（バクテリアの分類基準では同種として分類されてしまう）のにも関わらず、両者を間違える人はいないであろう。ネコと鳥が交配した結果、生まれたネコが空を飛ぶようなことは万が一にもない。これは高等動物の形質及び形質発現の基礎となるゲノムが安定しているからである。その安定性の源泉として、種を考える上で特に重要なものが有性生殖と生殖隔離である。高等動物は雌雄が交配する有性生殖によって子孫を残すが、異なる種間には生殖隔離があり、仮に交配があったとしても子はできない。これにより、近縁の生物集団を交配と生殖隔離によって境界を定めることができるとなるが、これがいわゆる「生物学的種」の定義である（Mayr, 1942）。有性生殖には、両親の異なる遺伝子の組み合わせをつくることによって新しい形質を生み出すという効果もあるが、両親に由来する相同染色体間の組み換えによって突然変異を除去することにより、遺伝子を均一に保つ効果（homogenizing effect）もある。この後者の効果はゲノムに安定性をもたらし、安定なゲノムは安定した形質を発現し、結果、それは種の遺伝的・形質的同一性を保つ力（cohesive force）として機能する。要するに、互いに交配を行うグループは、形質的にも遺伝的にも安定することになり、そのグループ固有の属性を維持することになる。このことは、「生物学的種認識」が自然分類群の認識として極めて妥当であるとの根拠となっている。

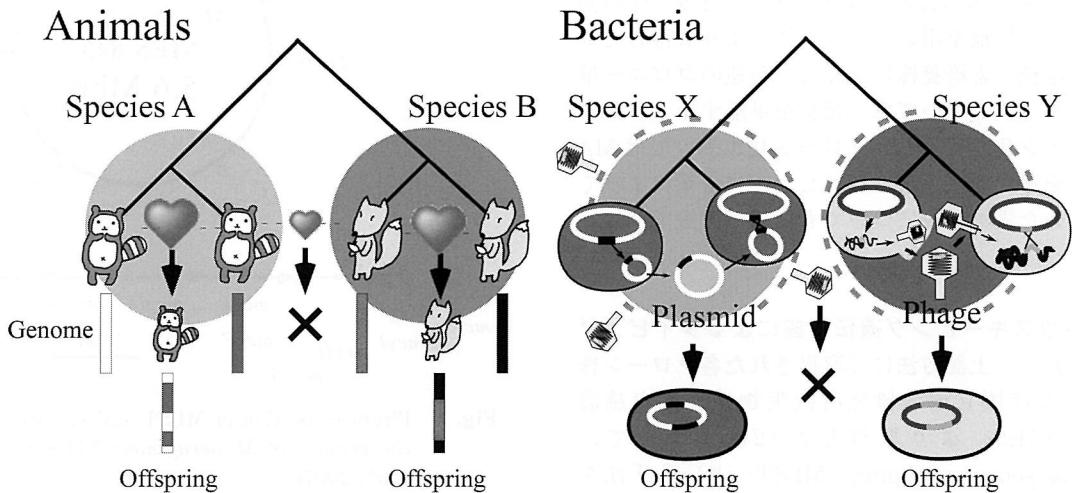
一方、バクテリアには有性生殖が存在しないため、遺伝子は突然変異などによって変化し続ける。バクテリアには外来遺伝子を取りこむ機構が発達しているため、時に系統的に遠く離れた生物の遺伝子を獲得することもある。このようにバクテリアではゲノムが不安定であるため、遺伝子によってコードされる形質も不安定になる。例えば、昨日獲得した薬剤耐性遺伝子によって、今日のバクテリアには抗生素質が効かないという事態が起こりうる。ゲノムと形質の安定性が担保されず、これらが絶えず変わり続けていくバクテリアにおいては、種の境界が曖昧になるはずである。そのような生物群において、種を明瞭な自然分類群として認識することはそもそも無理にすら思える。果たしてバクテリアの種分類から、実践を念頭においた人為的措置という側面を拭い去ることはできないのであろうか？

しかしながら、バクテリアには有性生殖こそ存在しないが、外来遺伝子を取り込む機構があることは既に述べた。実験系において、ファージやプラスミド等の染色体外遺伝因子に組み込まれたある個体（ドナー）

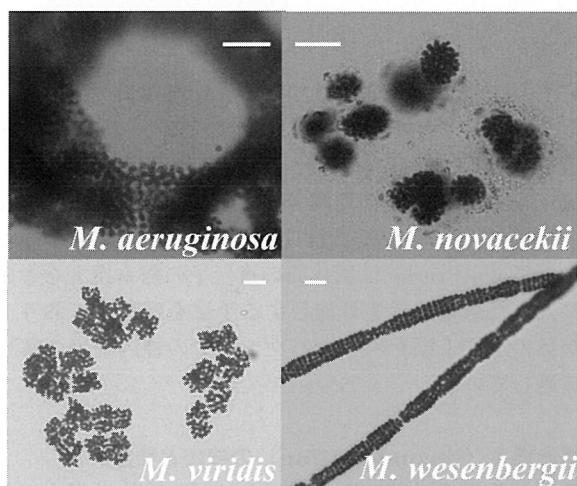
に由来するゲノム断片が、水平伝播した先の個体（受け手）のゲノムとの間で組み換え（recombination）を起こすことは古くから知られている現象であり、例えば遺伝子工学は他ならぬこの現象の利用によって発展してきた。近年、バクテリアの自然集団においても、種によっては個体間での遺伝子の組み換えが高頻度で起こっていることが明らかとなった（Smith et al., 1993）。一方、その個体間の組み換えの頻度は、双方の遺伝子の違いに比して指数関数的に減少することも明らかとなってきている（Vulić et al., 1999）。これらの観察結果は、バクテリアにおいても生物学的種認識が可能であることを意味する。なぜならば、高頻度で起こる組み換えは、組み換え後に生じた「子」のゲノムが「両親」（ドナーと受け手側のバクテリア）のモザイク構造になる頻度が高いことを意味し、また遺伝子の相同性依存的な頻度で起こる組み換えは生殖隔離の存在を意味するからである。つまり、ゲノムレベルで考えれば、バクテリアにおけるファージやプラスミドを介した組み換えは、高等動物の有性生殖とほぼ同じ効果をもたらすことになるからである（Fig. 1）。高頻度の組み換えと生殖隔離の存在は、バクテリアの種に予期していなかった安定性を付与することになる。そしてそれは、バクテリアの分類から人為的措置という側面を排除し、バクテリアの分類学に自然分類への道を拓く可能性を秘めている。

本研究においては、有毒ラン藻 *Microcystis aeruginosa* をモデルとして、本種内系統群における生物学的種認識の可能性を模索した。本種は主に夏季に富栄養化した湖沼・ダム等において大量発生することによっていわゆるアオコ（青粉）を形成し、生態系破壊や悪臭等の環境問題を引き起こすラン藻（シアノバクテリア）として知られている。また、本種はミクロシスチンという急性肝炎を引き起こすアオコ毒素を放出することが知られている。実際、本種アオコ含有水の誤飲による中毒事故が世界各地で散発的に報告されていることから、1995年にWHO（世界保健機関）がミクロシスチンの飲料水における含有率の暫定的なガイドライン（ $1\mu\text{g/l}$  以下）を設けるなど、現在も世界中の飲料水源において、同種アオコのつくるミクロシスチンの監視が続けられている。形態的には *Microcystis* 属は  $3\text{-}8\mu\text{m}$  程度の細胞サイズを示す単細胞性のシアノバクテリアであるが、一般的には寒天質に包まれた群体（コロニー）を形成する。本種はコロニー形態が非常に多様であるため（Fig. 2），以前はその違いに基づき少なくとも 5 種 (*Microcystis aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*) に分類されていた

## Biological species recognition



**Fig. 1** Conceptual diagram of the biological species recognition in animals and bacteria. In animals, the genome of offspring is the mosaic of those of parents as a result of sexual reproduction. In bacteria, the genome of offspring are the same as those of the parent due to asexual reproduction, but plasmids and phages can mediate the genetic exchange (recombination) more frequently between closely related individuals than distantly related ones. Note that the impact of bacterial recombination on the genome of offspring is similar to that of animals, allowing us to recognize a freely recombining lineage in bacteria as a "biological species"



**Fig. 2** Micrograph of four of the five major morphospecies of *Microcystis*. Note that all of these species are currently classified as a single species *M. aeruginosa* (Otsuka et al., 2001). Scale bar, 40 μm.

(Komárek, 1991).近年、コロニー形態が培養条件によって相互に入れ替わることが発見され (Otsuka et al., 2000), さらに上記 5 種間で 16S rDNA の違いがほとんどないことが明らかとなったために、現在は分類学上は *M. aeruginosa* 一種として扱われている

(Otsuka et al., 2001)。しかしながら、複数のタンパクをコードする遺伝子 (MLST, 後述) に基づく系統解析を行った最近の研究において、本種は複数の明瞭な種内系統群に分かれることが示された (Tanabe et al., 2007)。それにもかかわらず、上述のコロニー形態やアオコ毒性の違いはこの系統を反映しておらず、また、これまでにこの系統と一致した他のいかなる形質を見出すことにも成功していない。一方、一部のバクテリアと同様に、本種の自然集団の個体においても組み換えが高頻度で起こっていることがわかつている (Tanabe et al., 2004)。この知見は、*M. aeruginosa* に見出された種内系統群について、組み換えの頻度を指標とした生物学的種認識の適用可能性を示唆する。本研究においては、この可能性について検討することを目的とし、*M. aeruginosa* の株を自然界より大量に分離培養し、これらについてハウスキーピング遺伝子及びアオコ毒素遺伝子データを用いて系統・集団解析を行った。

## 実験方法

**Microcystis** の単離 日本各地の湖沼よりアオコを採取し、マイクロピペットを用いて倒立顕微鏡下で *M. aeruginosa* のコロニーの単離を行った。対象サン

プルを含んだ湖沼の水を口径  $0.22\mu\text{m}$  のフィルターを用いてろ過し、これをさらにオートクレーブで滅菌したものと MA 培地 (Kasai *et al.*, 2004) とを 1:1 の割合で混合した培地を用いた。本操作により取得したコロニー単離株（素培養株）を元に、前述のコロニー単離と同様の方法を用いて單一細胞を単離することによってクローニングを行った。クローニングにおいては MA 培地のみを用いた。以前に取得し、継代培養によって保持していた素培養株についても同様の方法でクローニングを行った。

**複数のハウスキーピング遺伝子座によるタイピング(MLST)** 上記方法にて取得された各クローニング株 235 株、及び国立環境研究所微生物系保存施設 (MCC-NIES) より取得した 12 株について、Multilocus sequence typing (MLST) という手法を用いて遺伝子タイピングを行った。本法はバクテリアの種内変異の解析手法として汎用されている手法であり、ゲノムに散在する複数の（一般的には 7 箇所の）ハウスキーピング遺伝子断片（各 500 塩基弱）を、特異的プライマーを用いた PCR 法により取得し、これらの塩基配列を決定し、その違いに基づいて個体識別を行うものである (Maiden *et al.*, 1998)。本研究では、筆者らが先行研究において確立した 7 つのハウスキーピング遺伝子座 (*ftsZ*, *glnA*, *gltX*, *gyrB*, *pgi*, *recA*, *tpi*) に基づいた *M. aeruginosa* の MLST スキーム (Tanabe *et al.*, 2007) を用い、分離株の遺伝子タイピングを行った。Fig. 3 に全ゲノム配列が決定されている *M. aeruginosa* NIES-843 株のゲノム上における各 MLST 遺伝子座の位置を示す。

**アオコ毒素遺伝子座による遺伝子タイピング(mcyMLST)** アオコ毒素ミクロシスチンは 7 つのアミノ酸からなる環状のポリペプチドである。様々な種のラン藻がミクロシスチンをつくることが知られているが、*Microcystis* においては 10 個の遺伝子から成るミクロシスチン生合成遺伝子 (*mcy*) クラスターがミクロシスチンの生合成を行っている (Fig. 3) (Tillet *et al.*, 2000)。*Microcystis* においてはアオコ毒素ミクロシスチンをつくる株とつくらない株が存在することが知られている。このため、アオコ毒素ミクロシスチン生合成遺伝子は、MLST で採用したハウスキーピング遺伝子とは異なる進化史を有している可能性がある。今回の研究では、*mcy* を遺伝子マーカーとした解析を行うことにより、MLST によって得られた解析結果と比較することを試みた。この目的のため、本遺伝子の系統解析マーカーとして有用であることが

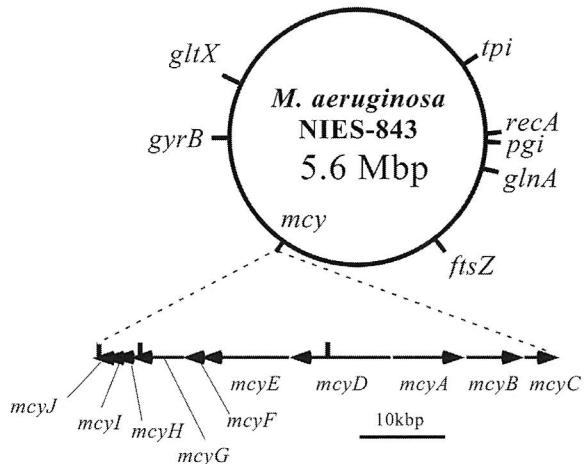


Fig. 3 Physical location of MLST and *mcy*MLST loci on the genome of *M. aeruginosa* NIES-843 (Kaneko *et al.*, 2007).

示されている *mcyD*, *mcyG*, *mcyJ* の 3 遺伝子座（それぞれ 550 塩基、Fig. 3）(Tanabe *et al.*, 2004) を選択し、これらによるタイピングを MLST と同様の手法を踏襲して行った。本遺伝子による解析を MLST による解析と区別するため、*mcy*MLST と称することにする。

**分子系統解析** MLST で得られた配列については、7 つの遺伝子座配列を繋げた上で MEGA (Tamura *et al.*, 2007) を用いて分子系統解析を行った。*mcy*MLST で得られた配列については ClonalFrame (Didelot & Falush, 2007) を用いて系統解析を行った。ClonalFrame は個体間の遺伝子の組み換えを考慮に入れた系統解析を可能とする手法を採用しており、複数の遺伝子座を用いたバクテリアの種内変異の解析に適している。

**組み換え (recombination) の検出と頻度評価** 遺伝子の個体間組み換え頻度を二つの手法を用いて評価した。双方とも遺伝子座間で見られる組み換えを検出する方法であるが、一つ目の方法は、クローニングが異なる遺伝子座の対立遺伝子に連鎖をもたらすこと（連鎖不平衛）に着目した方法である。逆に、ある種内系統群内でランダム交配に匹敵する頻度で組み換えが起こっている場合、遺伝子座間で特定の対立遺伝子の連鎖がないことが期待される（連鎖平衡）。この理論に基づいて考案された  $I_A^S$  (Haubold & Hudson, 2000) という指標を用いて、帰無仮説  $I_A^S = 0$ （ランダム交配）に対して対立仮説  $I_A^S > 0$ （組み換えがない

クローン構造) を統計的に検定する。理論的には組み換えが全く起こらない場合、 $I_A^s$ は最大値として1を示す。本検定は START (Jolley *et al.*, 2001) を用いて行った。もう一つの方法は、遺伝子座間で見られる組み換えが各遺伝子座の系統樹の樹形の不一致をもたらすことに着目し、この矛盾の有意性を最尤法を用いて統計的に評価する手法である (Feil *et al.*, 2001)。この方法は PAUP (Swofford, 2002) を用いて行った。

## 結 果

### MLST による *Microcystis* 分離株のタイピング

日本及び東南アジア各地から採集したアオコサンプルから *M. aeruginosa* の単離・クローニングを行ったことにより、計 214 株を新規クローニングとして確立し、これらの全株について MLST による遺伝子タイピングを行った。既存のプライマーを用いた PCR 法によって全ての株から MLST 遺伝子配列を取得することができたが、シークエンスデータにノイズが見られるケースが散見された *pgi* については、新たにフォワードプライマーとして *pgi*FB (5'-ggTgCgATCgCAAATCCCgA-3') を設計し、これを PCR 増幅、シークエンシングに使用することで問題を解決した。

**MLST による系統解析** 今回取得した 214 株の遺伝子データに既存の 198 株の遺伝子データを加え、計 412 株の遺伝子データを用いて系統解析を行った。これら 412 株の MLST データは 237 のユニークな遺伝子型に分類されることがわかったため、系統解析にはこの 237 の遺伝子型のみを用いた。その結果、*M. aeruginosa* の種内にはグループ A～G と仮称する明瞭な系統群が見出され、それらに属さないサテライトクローニングも少なからず見出された (Fig. 4)。グループ A～F の 6 群は既に先行研究で見出されていたが (Tanabe *et al.*, 2007)，グループ G は今回初めて発見された。興味深いことに、グループ G に属する菌株は、最外群に位置するネパール産の一株、八郎潟産の一株を除いては、全て霞ヶ浦水系（霞ヶ浦、北浦）から取得された株であった。

**MLST に基づく *M. aeruginosa* における組み換えの検出と頻度評価** バクテリアの生物学的種認識に際しては、各系統群内外での個体間で起こった遺伝子の組み換えを検出し、その頻度を評価することが最も重要な作業となる。この際、系統解析で見出された明瞭な種内系統群グループ A～G を「生物学的種」の候補と考えることは、合理的なアプローチであると思われ

る。そこで本研究においては、種内全体の組み換え頻度と各種内系統群内の組み換え頻度に差があるかについて調べた。仮に各グループ内の組み換え頻度が十分に高く、かつ種内全体の組み換え頻度より顕著に大きいようであれば、種内系統群間に生殖隔離があると考えることができる。方法の項で説明した 2 つの手法により、MLST データから組み換え頻度を評価した結果を Table 1 に示す。全ての系統において  $I_A^s$  の値が 1 にならなかったことから、いずれの系統においても組み換えは起こっていると考えられた。とくにグループ C～F においては、 $I_A^s$  の値が有意に 0 より大きくならなかったことから、MLST 遺伝子座間で観察される組み換えは、ランダム交配に匹敵するほど高い頻度で起こっていることが明らかとなった。グループ B は Feil *et al.* (2001) の検定によれば、ランダム交配ほどではないが組み換えの頻度は低くはない、またグループ A については同検定の結果からも、組み換えの頻度がかなり低く抑えられていることが示唆された。グループ全体では高い  $I_A^s$  の値、及び Feil *et al.* (2001) の検定結果が示すように、組み換えの頻度は低いことがわかった。この結果は種内系統群の間の交配隔離の存在を示唆する。

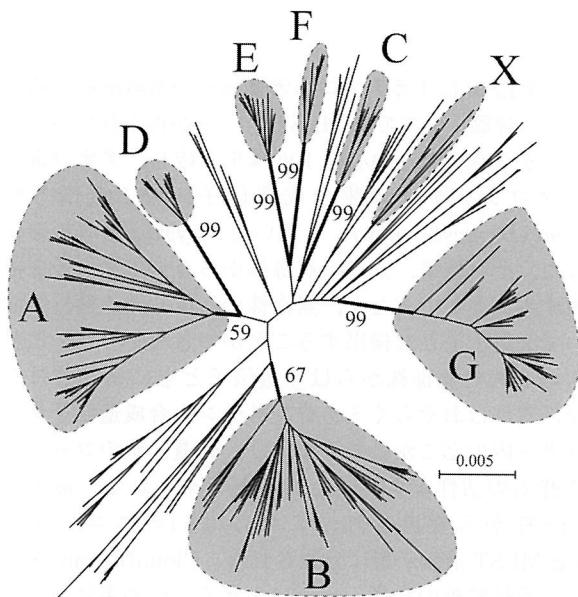


Fig. 4 MLST phylogeny within *M. aeruginosa* based on the concatenated sequences of the seven MLST loci (2,992 bps). Tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method implemented in MEGA. Bootstrap statistical values for the major groups are shown at the respective nodes. The scale bar represents substitutions per site.

**Table 1** Analyses of recombination between MLST loci

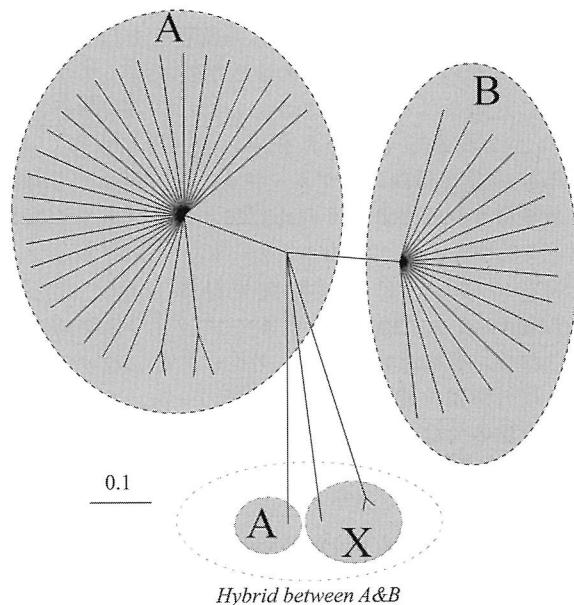
Group	<i>N</i> <sup>a</sup>	<i>n</i> <sup>b</sup>	$I_A^S$ <sup>c</sup>	Portion of significant congruence <sup>d</sup>
A	111	50	0.274*	42/42
B	69	54	0.123*	29/42
C	33	6	-0.023	5/25
D	31	12	0.056	1/16
E	29	13	0.010	1/25
F	11	6	-0.024	4/36
G	70	44	0.089*	12/42
Total	412	237	0.279*	42/42

a. Number of isolates.

b. Number of MLST genotypes (ST).

c. Standardized index of association calculated using unique STs. Null hypothesis of panmixia ( $I_A^S = 0$ ) is tested against significant linkage disequilibrium ( $I_A^S > 0$ ). \*,  $P < 0.001$ d. Maximum likelihood analysis of tree topology congruence based on Feil *et al.* (2001). The log-likelihood's of 200 random trees were calculated based on the sequence data of each locus, and compared to those of the ML tree topologies of the other two loci. Log likelihood scores higher than those of 99th percentile of 200 random tree topologies are "significantly congruent" ( $P < 0.01$ ), suggesting the low rate or lack of recombination. Thus, the lower value of the portion of significant congruence indicate the higher rate of recombination.

**mcyMLST**によるアオコ毒素遺伝子の系統解析と組み換えの評価 すでにMLSTデータが得られている株の中から有毒株を中心に196株を選抜し、アオコ毒素ミクロシスチンの生合成遺伝子内の3遺伝子座(*mcyD*, *mcyG*, *mcyJ*)を用いたmcyMLST解析を行った。その結果、全ての有毒株から3つの遺伝子を検出することができたが、無毒株からは5株の例外を除いて3遺伝子とも検出することができなかった。これらの5株の無毒株からは3遺伝子ともに検出されたが、これはおそらくミクロシスチン生合成遺伝子クラスター内のどこかに変異があり、同遺伝子のコードする酵素の活性が失われたためと考えられる。*mcy*は118株から検出され、これらは51のユニークなmcyMLST遺伝子型に分類された。ClonalFrameを用いた系統解析の結果、*mcy*は大きく二つの系統に分かれることがわかり、さらにこの二つの系統はそれぞれMLSTのグループAとBに一致した(Fig. 5)。MLSTとは異なり、二つの系統に属さないサテライトクローニングの数はmcyMLST遺伝子型で4と非常に少なかった。これらはMLSTの系統樹(Fig. 4)ではAとXに属した。興味深いことに、これらの4つのmcyMLST遺伝子型は、*mcyD*, *mcyG*, *mcyJ*の個々



**Fig. 5** ClonalFrame genealogy of three mcyMLST loci (1,651 bps in total). All branches are highly supported by Bayesian posterior probability (> 95%). The scale bar represents time in coalescent units.

系統樹では異なるグループ（A もしくは B）に属したため、グループ A と B の群間交雑によって生じたハイブリッド遺伝子型と考えられる。mcyMLSTについても、MLST と同様の手法を用いて組み換えの検出・評価を行った (Table 2)。その結果、グループ B については、ランダム交配に匹敵する頻度で組み換えが起こっていることが示唆された。また、MLST の結果と同様に、mcyMLSTにおいても、グループ A の組み換え頻度は低く抑えられていること、またグループ全体の組み換えの頻度は低いことがわかった。本結果は mcy 遺伝子においても種内系統群間に交配隔離が存在することを示唆する。

**生物地理解析** 本種の種内系統間に「交配隔離」が存在することが示唆されたが、この結果には注意を要する。なぜならば、それぞれのグループが異所的に存在しているため、組み換え可能であるにもかかわらず、「接点がないために」遺伝子の組み換えが起こらなかった可能性があるからである。つまり、これらのグループが同所的に存在したときに組み換えが高頻度で起こるようであるならば、これらの種内系統はもはや生物学的種とは言えなくなってしまうということである。この問題に取り組むためには、厳密には異なる系統群間の遺伝子組み換えの頻度を実験的に評価する

Table 2 Analyses of recombination between mcyMLST loci

Group	N <sup>a</sup>	n <sup>b</sup>	I <sub>A</sub> <sup>c</sup>	Portion of significant congruence <sup>d</sup>
A	118	30	0.193*	6/6
B	84	17	0.064	0/6
Total	29	51	0.188*	6/6

a. Number of isolates.

b. Number of mcyMLST genotypes (mcyST).

c. Standardized index of association calculated using unique mcySTs. \*, P < 0.001

d. Maximum likelihood analysis of tree topology congruence based on Feil *et al.* (2001) as in Table 1.

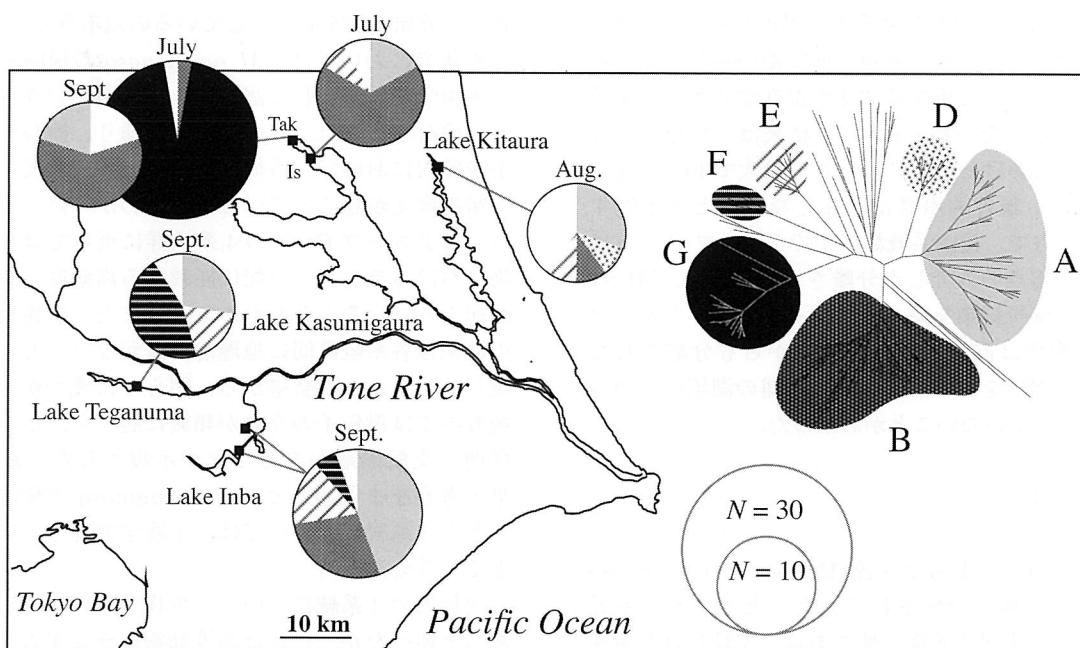


Fig. 6 Distribution of MLST genotypes in Tone River Basin in 2005. The proportions of strains at each sampling location are indicated as pie charts, the size of each being proportional to the numbers of strains. Note that a single bloom sample contained multiple MLST phylogenetic groups. Abbreviations for sampling points are as follows: Is, Iseki; Tk, Takasaki.

必要があるが、遺伝子操作が難しい本種についてそれを行うことは現実的でない。そこで、本種の個体群間に「地理的隔離」が存在するか否かを確認するという、間接的なアプローチを採用することにした。このアプローチにおいては、仮に異なる交配グループ（グループ C～F）が同一地点で共存していれば、接点があるにもかかわらず交配が検出されないことから、生殖隔離がある、と判断できるわけである。この方法においては、各地の個体群の遺伝的組成をなるべく正確に把握する必要があるため、比較する各採集地点よりそれぞれ大量に遺伝子データが入手可能であることが望ましい。また、長期間に渡って採集された株を全てプールして比較してしまうと、個体群組成に時間的変化があった場合、その影響を受けてしまう可能性があるため、なるべく短期に集中的に採集した個体群間の比較をすることが望ましい。筆者らが MLST によって遺伝子タイピングした株には、2005年夏季に利根川水系に属する複数の湖沼より分離した株が大量に含まれていた。利根川水系とは、上越国境に水源を持ち、関東平野を縦断して銚子沖で太平洋に注ぐ利根川の下流域に発達した一群の湖沼であり、本邦第2位の面積を誇る霞ヶ浦もこれに含まれる。これらの湖沼においては富栄養化が進んだ結果、アオコ発生が頻繁に観察されるため、比較的小さい地理スケールでの本種の地理的隔離を調べるモデル湖沼としては好都合である。MLST 系統樹上に2005年夏季の利根川水系のデータをマッピングしたところ、各地の同時期の個体群には複数の交配グループに属する個体が混在するケースが多いことがわかった (Fig. 6)。本結果は、少なくとも利根川水系における地理スケール（最大で60キロ弱）においては、地理的隔離は存在しないことを示唆する。その一方で、種内系統群の中でグループ G のみは霞ヶ浦の一地点のみでしか分離されなかった。MLST 全データの解析結果を調べてみたところ、本グループに属する個体は霞ヶ浦の他の地点からも分離されたが、二つの例外を除いて霞ヶ浦・北浦の湖沼のみからしか分離されていないことがわかった。

## 考 察

本研究で扱った有毒ラン藻 *Microcystis aeruginosa* は、以前は5種に分類されていたことからわかる通り、形態的に非常に多様な種である。本種には有毒株と無毒株が知られており、さらに株によって異なる化学構造のミクロスチンを作ることが知られているなど、生化学的に見ても多様な種である。本種は、16S rDNA の配列解析結果から遺伝的に均一であると判断

されて一種に統合された経緯こそあるものの、その後に行われたタンパクをコードする遺伝子（MLST）の解析結果からは、本種は遺伝的にも想像されていた以上に多様であることがわかっている。この事実は、同種を改めて細分類することを試みる研究の動機となつた。しかしながら、筆者らが先行研究で行った本種の MLST 解析の結果は、細分化分類の土台となりうる幾つかの種内系統群を発見するに至ったものの、これらの種内系統群は現在入手不可能となる共有形質とも合致しなかつた。バクテリアの様々な分類群で成功している、形態・生理・生態等のデータと遺伝子データの一致により導かれる分類、いわゆる “Polyphasic taxonomy” は、本種を細分化する試みにおいてはその時点では無力であった。分類という枠組みの中でのみ本種の扱いを考えるならば、細分化できないこと、つまり、「本種は形態的・生化学的・遺伝的に多様であるが、それでもやはり一種である」、という従来の結果を支持することを一つの結論とすればよいのかもしれない。しかしそれでは、本種内に見出された7つの明瞭な系統群の存在をどのように理解すればよいのだろうか？という本質的な問題は残されたままである。分子系統の支持を礎として現代のバクテリアの分類体系が構築されている以上、やはりこの問題は分類学においても避けて通れないのではないだろうか？あるいはバクテリアの種分類は、形質データ以外の何か新しい分類指標を必要としているのだろうか？

本研究においては、*M. aeruginosa* の種内系統群を「生物学的種」として認識できないかという点に着目し、検討を行った。期待していた通り、概ねすべての系統群内において、系統群間よりも高い頻度で遺伝子の組み換えが起こっていることがわかった。この中でさらにグループ C～F の4系統群に至っては、高等動物におけるランダム交配に匹敵する高頻度で組み換えが起こっていることがわかった。また、生物地理解析の結果は各系統群間に地理的隔離がないことを強く示唆した。これらの結果から、明らかに幾つかの種内系統群内では遺伝子の交換が頻繁に起こり、かつ各系統群間に交配隔離があることが示唆された。以上の結果・考察をまとめると、*M. aeruginosa* の種内の少なくとも4系統群については、生物学的種として認識できると言えよう。

同種内の4系統について、生物学的種認識が可能であると述べたが、これは高等動物のランダム交配に匹敵するほどの高頻度で組み換えが起こっているという、控えめ (conservative) な基準に基づいた判断である。このように厳しい基準を設けた背景には、バクテリアには系統的に離れた生物との間で遺伝子を交換

するという性質があるため、完全な交配隔離は期待できないという事情がある。完全な交配隔離をバクテリアの種認識に適用してしまうと、全てのバクテリアを一種として認識せざるを得ない、という状況に陥ってしまうからである。実際は、Table 1 にて Feil *et al.* (2001) による統計的検定の評価が示しているように、少なくともグループ B 及び G においては相当に高頻度で組み換えが起こっていることが示唆される。実際、*mcy* の解析ではグループ B はランダム交配に匹敵する組み換え頻度が得られている。グループ B 及び G の二つのグループを生物学的種として認識することの可否については現時点では判断しかねるが、例えばグループ内での組み換え頻度を数値化し、それと理論から導き出した閾値を比較することによって生物学的種が否か判断を下す、という方法は可能かもしれない。実際、最近このアイディアに基づいたシミュレーションによる研究がなされ、系統群における組み換え率と突然変異率の比 ( $\rho/\theta$ ) が 0.53 より大きくなると組み換えは系統群を維持する力として機能する、という結果が得られている (Fraser *et al.*, 2009)。ここでの閾値は、自然選択が存在しない等の理想化された条件の下での推定値であるため、バクテリア一般に適用することはできない。しかしながら、研究対象とする種について実験的に複数のパラメーターを決定することにより、客観的な指標に基づいた生物学的種認識が可能になる、ということを示した意義は大きい。このための実験は決して容易ではないが、今後の主にモデル微生物を対象として進展していくであろうこの類の研究の進展は、バクテリアの生物学的種の概要を着実に明らかにしていくだろう。

本種内の複数の系統を生物学的種として認識することによって、本種の細分化による分類学的再編への道が開かれた。しかしながら、本種の全ての種内系統が生物学的種として認識できたわけではないことには注意すべきである。例えばグループ A については、MLST で見るかぎり組み換えの影響はかなり小さく、遺伝的多様性の主たる形成要因は突然変異であるようである。このようなグループ間での進化プロセスの相違は別に驚くべきことでも何でもない。一般的にバクテリアの種、あるいは種内系統群の形成過程は種によって異なり、多様であることがわかっているからである。例えば、歴史的にはバクテリアの種分化は主として自然選択（淘汰）によって生じると考えられていた。バクテリアには地理的隔離が存在しないと考えられていたため、高等動物に見られる異所的種分化の可能性が排除されていたためである。これは微生物は細胞サイズが小さく、また個体群サイズが途方もなく大

きいことから、長距離移動が頻繁かつ容易に起こるという想定による（いわゆる “Everything is everywhere” 仮説、Baas Becking, 1934）。しかしながら、最近、微生物の同種内に地域固有系統群が発見され (Papke *et al.*, 2003; Whitaker *et al.*, 2003)、バクテリアにおいても異所的種分化は考慮すべき問題として見直されている (Papke & Ward, 2004)。この観点から今回見出された *M. aeruginosa* の 7 つの種内系統を見た場合、グループ G はわずかな例外を除いて、霞ヶ浦・北浦という連結した二つの湖沼からのみ分離されているという事実は特筆に値する。なぜならば、このことはグループ G が地理的隔離によって生じた可能性を示唆するからである。他の系統群（グループ A～F）においては地理的隔離が検出できなかった同種において、グループ G のみが地理的隔離によって生じたという相反する結果を解釈するためには、このグループがその地域固有の自然選択によって生じたという可能性を検討しなければならない。勿論、例外的にグループ G が見出されたネバール、八郎潟からのサンプルが十分ではないため、地理的隔離の議論には注意を要する。しかしながら、グループ G が 2005 年の高崎（霞ヶ浦）のアオコにおいて高度に優占することと、この観察結果が、複数のグループが同一のアオコ内に適度な比率で混在するという他地点のデータと好対照を成すこと (Fig. 6) を併せて考えると、本グループが適応的な系統群である可能性は十分に検討の価値があると思われる。いずれにしても、*M. aeruginosa* といったかだか 1 種のバクテリアの種内の分化パターンですら、組み換え、自然選択、地理的隔離、遺伝的浮動（子を残したり残せなかったりと言ったような、偶然要因による個体群の遺伝子型組成の変化）などの複数のファクターが、単独にあるいは相互に同種個体群に作用した結果として形成されているのであろう。それはつまり、生物学的種認識のみでは、同種内の遺伝的多様性の本質を理解する上でも、同種の分類学的再編を行う上でも、不十分であるということである。今回見出された特異な系統群グループ G は、状況証拠からは今までに見出せなかった生理・生態的形質を共有している可能性が高いため、同種の分類学的な再編を計る上でも、同種の種分化プロセスを理解する上でも、貴重な研究材料となるであろう。

## 要 約

有毒ラン藻 *Microcystis aeruginosa* はアオコを形成することで知られ、水環境の保全という観点から世界中で問題になっている種である。複数のハウスキーピ

ング遺伝子座配列に基づく高分解能遺伝子タイピング手法（MLST）を利用することにより、同種が少なくとも7つの明瞭な種内系統群を有していることがわかった。これらの系統群内外での個体間での遺伝子の組み換え（recombination）頻度を評価したところ、少なくとも4系統群については、高等動物の有性生殖に匹敵するほどの高頻度で組み換えが起こっていることが示唆された。その一方、これらの系統群間の組み換え頻度は、系統群内の組み換えより顕著に低かった。同様の傾向はアオコ毒素遺伝子（mcy）の解析においても支持された。また、生物地理解析の結果、異なる系統群に属する個体が同所的に生息していることが明らかとなった。「地理的隔離」が存在しないにもかかわらず、系統群間で組み換え頻度が低く抑えられていることから、系統群間に「生殖隔離」が存在することが強く示唆された。これらの結果から、*M. aeruginosa* の種内の複数の系統を「生物学的種」として認識できることがわかった。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 田辺雄彦、笠井文絵、渡邊信 利根川水系におけるアオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の遺伝的分化 日本進化学会第9回大会（京都）2007年9月1日。
- 2) 田辺雄彦、笠井文絵、渡邊信 ClonalFrame を用いたアオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の種内系統解析 日本藻類学会第32回大会（東京）2008年3月22日。
- 3) 田辺雄彦、佐野友春、笠井文絵、渡邊信 ラン藻 *Microcystis aeruginosa* におけるアオコ毒素生合成遺伝子の中立進化 日本藻類学会第33回大会（那覇）2009年3月27日。
- 4) 田辺雄彦、渡邊信 アオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* における霞ヶ浦水系固有系統群の発見 日本藻類学会第34回大会（つくば）2010年3月20日。

### 原著論文

- 1) Tanabe, Y., Sano, T., Kasai, F & Watanabe, M.M. (2009). Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (mcy) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evol. Biol.* 9: 115.
- 2) Tanabe, Y., Kasai, F. & Watanabe, M.M. (2009) Fine-scale spatial and temporal genetic differentiation of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: revealed by multilocus sequence typing. *Environ. Microbiol. Reports* 1: 575-582.

## 保存機関に寄託した菌株

本研究で分離した *Microcystis aeruginosa* の菌株の

うち、新規の MLST 遺伝子型を有する96株を（独）国立環境研究所微生物系保存施設（MCC-NIES）に寄託した。このうち47株（NIES-2465～2496, 2547～2561）については、MCC-NIES のウェブサイト (<http://mcc.nies.go.jp/>) より既に入手可能である。残り49株についても順次公開・入手可能となる予定である。

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、3年間研究費の助成を行つていただいた（財）発酵研究所の関係者各位に深く御礼申し上げます。研究環境を提供していただいた渡邊信教授（筑波大学），笠井文絵博士（国立環境研）に深く感謝いたします。アオコ毒素の化学分析にお力添えいただいた佐野友春博士（国立環境研），菌株の維持に協力いただいた池田啓二氏（筑波大学・大学院生）に深く感謝いたします。菌株の寄託に際してご協力をいただいた MCC-NIES の保存スタッフの皆様に深く感謝いたします。

## 文 献

- Baas Becking, L.G.M. (1934). Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. W.P. Van Stockum & Zoon, The Hague, the Netherlands (in Dutch).
- Didelot, X. & Falush, D. (2007). Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics* 175: 1251-1266.
- Feil, E.J., Holmes, E.C., Bessen, D.E., Chan, M.S., Day, N.P., Enright, M.C., Goldstein, R., Hood, D.W., Kalia, A., Moore, C.E., Zhou, J. & Spratt B.G. (2001). Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 182-187.
- Fraser, C., Alm, E.J., Polz, M.F., Spratt, B.G. & Hanage W.P. (2009). The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science* 323: 741-746.
- Haubold, B. & Hudson, R.R. (2000). LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Linkage Analysis. Bioinformatics* 16: 847-848.
- Jolley, K.A., Feil, E.J., Chan, M.S. & Maiden, M.C. (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17: 1230-1231.
- Kaneko, T., Nakajima, N., Okamoto, S., Suzuki, I., Tanabe, Y., Tamaoki, M., Nakamura, Y., Kasai, F., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Ono, A., Shimizu, Y., Takahashi, C., Minami, C., Fujishiro, T., Kohara, M., Katoh, M., Nakazaki, N., Nakayama, S., Yamada, M., Tabata, S. & Watanabe, M.M. (2007). Complete

有毒ラン藻 *Microcystis* における生物学的種認識に関する研究

- genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. DNA Res. 14: 247-256.
- Kasai, F., Kawachi, M., Erata, M. & Watanabe, M.M. (2004). NIES-Collection, List of strains, microalgae and protozoa, 7th edition. National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan.
- Komárek, J. (1991). A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud. 64: 115-127.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. & Spratt, B.G.. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3140-3145.
- Mayr, E. (1942). Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York, NY.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (2000). Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. J. Gen. Appl. Microbiol. 46: 39-50.
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (2001). A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzning ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 873-879.
- Papke, R.T., Ramsing, N.B., Bateson, M.M. & Ward, D.M. (2003). Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. Environ. Microbiol. 5: 650-659.
- Papke, R.T. & Ward, D.M. (2004). The importance of physical isolation to microbial diversification. FEMS Microbiol. Ecol. 48: 293-303.
- Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M. & Spratt, B.G.. (1993). How clonal are bacteria? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4384-4388.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP\* - Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), version 4. Sianuer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- Tanabe, Y., Kaya, K. & Watanabe, M.M. (2004). Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. J. Mol. Evol. 58: 633-641.
- Tanabe, Y., Kasai F. & Watanabe, M.M. (2007). Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Microbiology 153: 3695-3703.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Dohren, H., Borner, T. & Neilan, B.A. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. Chem. Biol. 7: 753-764.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60: 407-438.
- Vulić, M., Lenski, R.E. & Radman, M. (1999). Mutation, recombination, and incipient speciation of bacteria in the laboratory. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7348-7351.
- Whitaker, R.J., Grogan, D.W. & Taylor, J.W. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. Science 301: 976-978.

## プロバイオティクス有用性の分子基盤解明

－腸内細菌の自然免疫活性化因子の単離と構造解析－

藤本 ゆかり

大阪大学大学院理学研究科化学専攻

〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

Molecular basis for probiotics beneficial effects; Isolation and structure elucidation of innate immunostimulants from intestinal bacteria

Yukari Fujimoto

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University  
Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

We have a long history of taking fermented food in our diet for our health. "Probiotics" are live microorganisms, which are considered to have beneficial effects for the host organism when they were taken as a part of the diet. However, the molecular basis of the beneficial effect of probiotics has not really known. Recent progresses on the understanding of innate immunity have revealed that common molecules in microorganisms activate the receptor protein in host organisms, and stimulate the immune system. The bacterial cell wall component, peptidoglycan, is one of the common components in bacteria, and recognized with intracellular proteins, nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 (Nod1) and Nod2. This recognition event induces a host defense response to eliminate invading pathogens. The genetic variation of Nod1 has been linked to several inflammatory diseases and allergies that are strongly affected by environmental factors. We have found that many bacteria having DAP-type peptidoglycan release Nod1 ligands into the environment. However, the structures of natural Nod1 ligands in the environment are not well understood. Herein we report the isolation and structural elucidation of natural human Nod1 (hNod1) ligands from the *Escherichia coli* K-12 culture supernatant. The supernatant was fractionated with reverse phase HPLC, resulting in the isolation of several hNod1 stimulatory fractions. Structural characterization studies demonstrated that the molecular structure of the most active fraction was the native hNod1 ligand GlcNAc-( $\beta$ 1-4)-(anhydro)MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-meso-DAP. We also found other peptidoglycan (PGN) fragments using the 7-(diethylamino)coumarin-3-carbonyl (DEAC) labeling method to enhance the sensitivity in mass spectroscopy studies. These results suggested that DAP-containing bacteria release certain hNod1 ligands to the environment, and these ligands would accumulate in the environment and regulate the immune system through Nod1.

Key words: probiotics, peptidoglycan, Nod1, tracheal cytotoxin (TCT), innate immunity

### 緒 言

人類は、経験的に体に有用な細菌あるいは発酵生成物を摂取してきたが、近年、人体に有用な影響を与える

E-mail: yukarif@chem.sci.osaka-u.ac.jp

共同研究者：猪原直弘（ミシガン大学医学部）

微生物としての“プロバイオティクス”が注目を浴びている。プロバイオティクスは、特に腸内細菌叢あるいは腸内フローラと呼ばれる消化器官（特に腸）に存在する細菌の構成に影響を及ぼしていると考えられるが、その分子レベルにおける役割については未解明であった。腸内細菌叢の細菌構成について遺伝子を用いた網羅的解析が行われるようになったのも比較的最近のことであり（Eckburg *et al.*, 2005），宿主に対し有用な作

用を引き起こす微生物由来物質あるいはその機能についても、多くが未だ解明されていない。

一方、微生物由来物質の分子パターン認識によって宿主の自然免疫が活性化されることが、1996年のショウジョウバエの真菌防御に関わる Toll の発見 (Lemaitre *et al.*, 1996) をきっかけに知られることとなり、ここ10余年の間に、自然免疫が多細胞生物の生体防御において大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた (Janeway & Medzhitov, 2002; Sansonetti, 2006; Akira *et al.*, 2006; Medzhitov, 2007). 自然免疫は、感染防御の第一線を担っており、主として微生物特有の共通分子構造を受容体が認識する事によって活性化されるが、進化的に古い起源を持ち、植物、昆虫からヒトを含む哺乳類に至るまで広く多細胞生物において類似の機構を持つ事が明らかになっている。高等脊椎動物においては、リンパ球を主体とした抗体抗原反応等の遺伝子の再編成を伴う防御機構である“獲得免疫”的活性化・制御にも重要な役割を果たしている。

我々のグループでは、これまで化学的な手法による免疫刺激細菌由来分子ライブラリの構築と、それを用いた種々の受容体タンパク質・認識タンパク質群の探索、認識部位の解析および認識タンパク質の機能の解析を行っており、有機化学合成を基盤として生体防御機構の解明を行っている。その中で、細胞壁成分のペプチドグリカン (PGN) は受容体 Nod1, Nod2 による認識によって自然免疫を活性化すること、またその最小リガンドを初めて明らかにしている (Inohara *et al.*, 2003; Chamaillard *et al.*, 2003). 同時期にフランスのグループも同様の結果を発表している (Girardin *et al.*, 2003a; 2003b). Nod1 の遺伝子変異は喘息などのアレルギー疾患等のリスクを上昇させる事が明らかになっている等 (Hysi *et al.*, 2005; Eder *et al.*, 2006), アレルギー疾患の抑制に何らかの関係があることを示唆する結果が得られているものの、詳細は未だ明らかとなっていない。Nod1/Nod2 刺激の起こる主な部位の一つは、数多くの細菌が生息する腸内フローラであるが、実際の被認識分子構造は未解明である。

我々は、種々の腸内細菌を含む常在菌、発酵菌の培養液および菌体について、ミシガン大の猪原らとともに、菌体および上清の、Nod1, Nod2 あるいは TLR4-MD2 受容体の刺激活性が測定され、特に Nod1 リガンドについては菌体に比べ上清に強い活性を示すものが存在することを明らかにするとともに、安定に環境中に残存していることを示した (Hasegawa *et al.*, 2006).

本研究では腸内細菌や発酵菌由来の免疫制御分子として培養上清に多く含まれる Nod1 リガンドの構造解

析を行うとともに、発酵食品の免疫調節作用に関連すると考えられる PGN フラグメント構造について分子レベルで解析した。また、その構造を化学合成することにより、天然由来成分の構造を確認するとともに詳細な生物活性を明らかにした。

## 実験方法

**細菌株と培養条件** *Escherichia coli* (大腸菌) K-12 株は、NBRP 大腸菌事業 (国立遺伝学研究所; NIG) より入手した。*E. coli* は 20% グルコース含有 M9 最少培地 1.5 L(x2) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 g/L; NaCl, 0.5 g/L;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g/L;  $\text{CaCl}_2$ , 3 mg/liter;  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM, pH 7.0) 中、37°C で 24 時間振盪したものを種培養として用いた。60 L 発酵槽において 40 L の M9 最少培地中に上記の種培養を加え、30°C で 40 時間培養を行った。培養液は遠心して菌体を取り除いた後、0.22 μm のフィルター (Steritop-GV; Millipore, MA) でろ過することにより、培養上清を得た。

**ヒト Nod1 (hNod1) 活性画分の単離** 大腸菌培養上清 (22 L) は、まず逆相のオープンカラム (Cosmosil 75C<sub>18</sub>-OPN, Nakalai Tesque, Kyoto) を通し脱塩を行った。溶出は、0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液 (移動相 A) および 0.1% TFA アセトニトリル (移動相 B) で行い、A 液/B 液を次の比率 (量は、上清 5 L に対する溶出液の量) で溶出した。: 100/0 (3 L), 90/10 (2 L), 70/30 (2.5 L) および 30/70. 全ての画分は、凍結乾燥を行い、hNod1 刺激活性試験を行った。活性画分は、A 液/B 液: 90/10 の画分であった。活性画分の凍結乾燥粉末 (53.7 mg) を水に溶解し、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) で 3 回精製を行った。分離条件: Column: Cosmosil 5C<sub>18</sub> AR300 (Nakalai tesque Inc., Kyoto) 10 x 250 mm; Mobile phase A: 0.1% TFA in Water; B: 0.1% TFA in MeCN; UV detection: 220 nm. 1 回目の RP-HPLC 分画では、次の条件で (0% B 液 (10 min 間溶出) 後、保持時間 50 分まで直線濃度勾配で 30% B 液とし溶出。流速: 4 mL/min) 分画し、活性画分を保持時間 27-32 分に得た。得られた活性画分の 2 回目の RP-HPLC 分画では、次の条件で (9% B 液で溶出。流速: 3.5 mL/min) 分画し、活性画分を保持時間 6-9 分に得た。続く 3 回目の RP-HPLC 分画では、次の条件で (9% B 液で溶出。流速: 3.5 mL/min) 分画し、活性画分を保持時間 7.34-7.69 分に得た。

**質量分析 (LC ESI-QTOF MS)** 質量分析は、ナノ液体クロマトグラフィーシステム CapLC system

(Waters, Milford, MA) を接続した ESI-quadrupole / time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (Q-tof micro; Micromass, Manchester, UK) を用い、Mass-Lynx software を用いて LC 部および質量分析部の制御を行った。サンプル導入には PicoTip needle (New Objective Inc., Woburn, MA) を用いた。LC 分離用のカラムとして、Atlantis dC18 column (Waters, C18, 3 μm, 75 μm x 150 mm) をトラップカラム Atlantis™ dC18 Trap column (Waters, C18, 5 μm particles, 0.18 x 23.5 mm) とともに用いた。較正用化合物として [Glu1] fibrinopeptide B (Sigma) を用いた。LC/MS 分析においては、20 μL のサンプルをトラップカラムに導入後 0.1% ギ酸で 4 分間 (15 μL/min) 洗浄後、主カラムに導入し濃度勾配を用い溶出した。(分析条件 移動相 A: 5% アセトニトリル, 95% 水, 0.1% ギ酸; 移動相 B: 95% アセトニトリル, 5% 水, 0.1% ギ酸; 濃度勾配: 0 to 4 min (5% B); 4 to 45 min (to 40%) B; 45 to 53 min (to 70% B); 53 to 58 min (to 95% B); 58 to 60 min (at 95%); 60 to 70 min (to 5% B)。Q-TOF パラメータ設定: source temperature, 100°C; electrospray voltage, 1.8 kV; cone voltage, 30 V。ナノスプレーイオン化システム使用時は次の設定を用いた: source temperature, 80°C; electrospray voltage, 3.1 kV; cone voltage, 45 V。

**hNod1 刺激活性試験** hNod1 刺激活性試験は、Nod1 (0.17 ng of pCMV-SPORT6-Nod1) のプラスミドおよびリポータープラスミドとして NF-κB dependent pBxIV-luc および control pEF1BOS-β-gal を組み込んだ HEK 293T ( $0.5 \times 10^5$ ) の NF-κB 活性化を指標として行った (担当: ミシガン大学・猪原博士) (Inohara *et al.*, 2003)。すなわち、リン酸カルシウム法によりプラスミドを導入した HEK 293T について、導入後 8 時間後にサンプルを加えた培地を加え培養し、遺伝子導入 24 時間後のリガンド依存 NF-κB 活性化をルシフェラーゼ・リポーターアッセイ法により決定した。

**DEAC (diethylamino coumarin) タグ法を用いた ESI-QTOF 質量分析** ペプチドグリカン由来化合物のアミノ基の DEAC タグによる修飾は次の方法により行った; 2 回目の RP-HPLC により得られた活性画分 (750 μg) を 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (6 μL) に溶かし、7-diethylamino coumarin-3-carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen, USA) のジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (2.5 μL) を加え 23°C で 17 h 反応することにより、タグの導入を行った。得られた溶液をアセトニトリルで 100 倍に希釈し、LC/ESI-QTOF

MS により分析を行った。

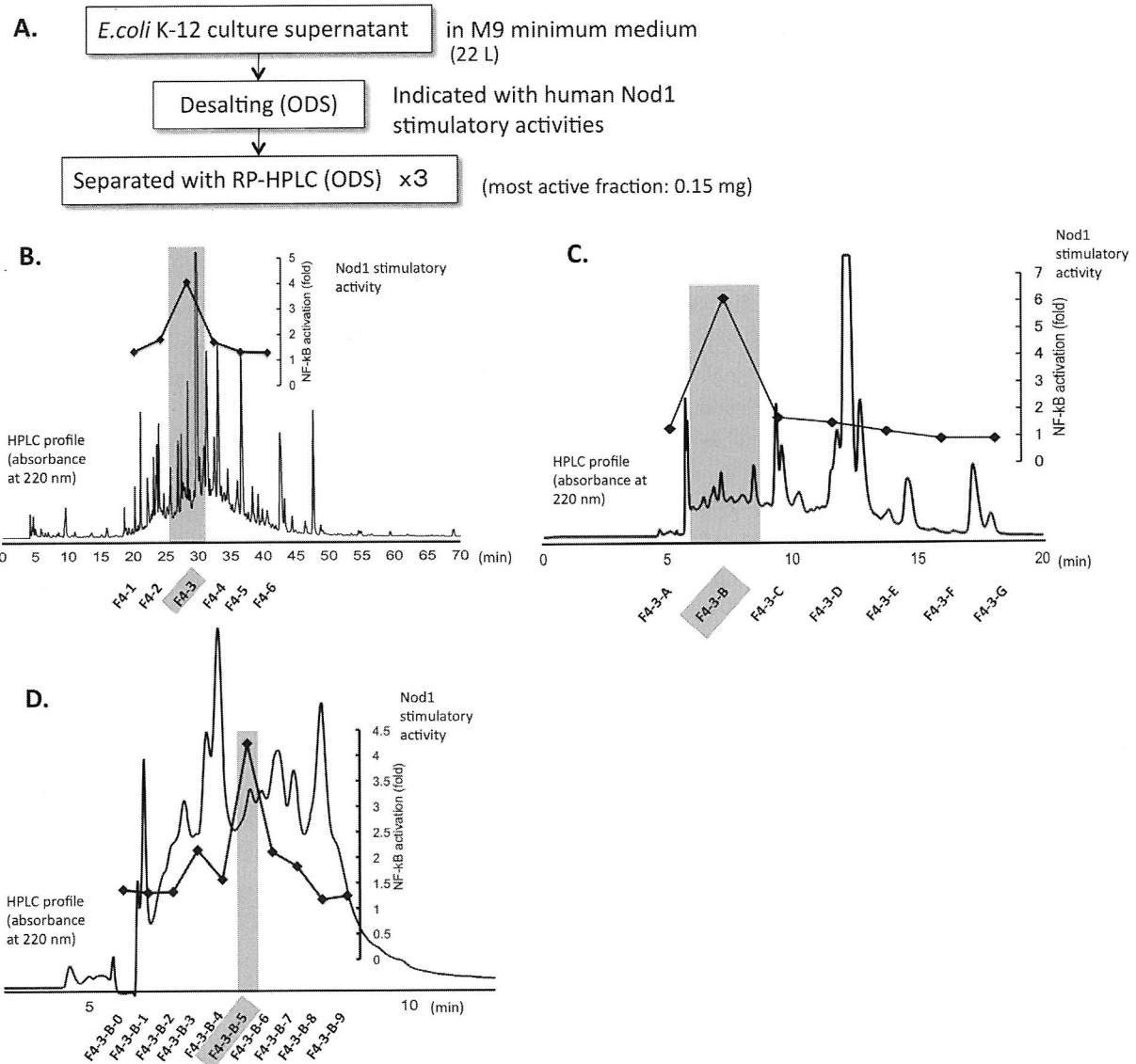
**NMR 分析** NMR スペクトルは Varian INOVA 600 spectrometer (Varian, USA) を用いて、<sup>1</sup>H: 599.48 MHz において 5 mm Varian 1H (13C/15N) XYZ PFG triple resonance probe を用い 30°C で行った。<sup>1</sup>H-1D-NMR および二次元 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H gradient enhanced COSY (gCOSY) は、Varian 標準パルスプログラムを用いて行った。活性画分のサンプルは、D<sub>2</sub>O に溶解し、5-mm microcell NMR tubes (Shigemi Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した。D<sub>2</sub>O 中でのケミカルシフトは HDO signal ( $\delta = 4.718$  ppm at 30°C) を基準として  $\delta$  値で示した。

ペプチドグリカン (PGN) 化学合成と RP-HPLC 分析標品として用いた PGN 部分構造は、我々のこれまでに報告した方法によって行い (Inohara *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2007; Inamura *et al.*, 2006, Fujimoto *et al.*, 2007, Kawasaki *et al.*, 2008)，次の化合物を合成した。iE-DAP (Inohara *et al.*, 2003), A-iE-DAP (Hasegawa *et al.*, 2007), MS-3P(DAP), MS-4P(DAP), MS-5P(DAP), DS-3P(DAP), DS-4P(DAP), DS(anh)-3P, DS(anh)-4P (Kawasaki *et al.*, 2008)。RP-HPLC による分析は次の方法を用いた; Column: Cosmosil 5C<sub>18</sub> AR300 (Nakalai tesque Inc., Kyoto) 10 x 250 mm; Mobile phase A: 0.1% TFA in Water; B: 0.1% TFA in CH<sub>3</sub>CN; isocratic 9% mobile phase B solution at 3.5 mL/min; UV detection: 220 nm.

## 結果・考察

大腸菌 (*Escherichia coli* K-12) について、培養上清中の Nod1 リガンドを解析した。まず培養上清中の物質解析を簡単にするため、M9 最小培地での培養が可能な *E. coli* K-12 について培養を行い上清の解析を行った。培養条件については、種々の細菌について菌体と上清中の Nod1/Nod2 活性を測定した際の条件と同様とした (Hasegawa, *et al.*, 2006)。

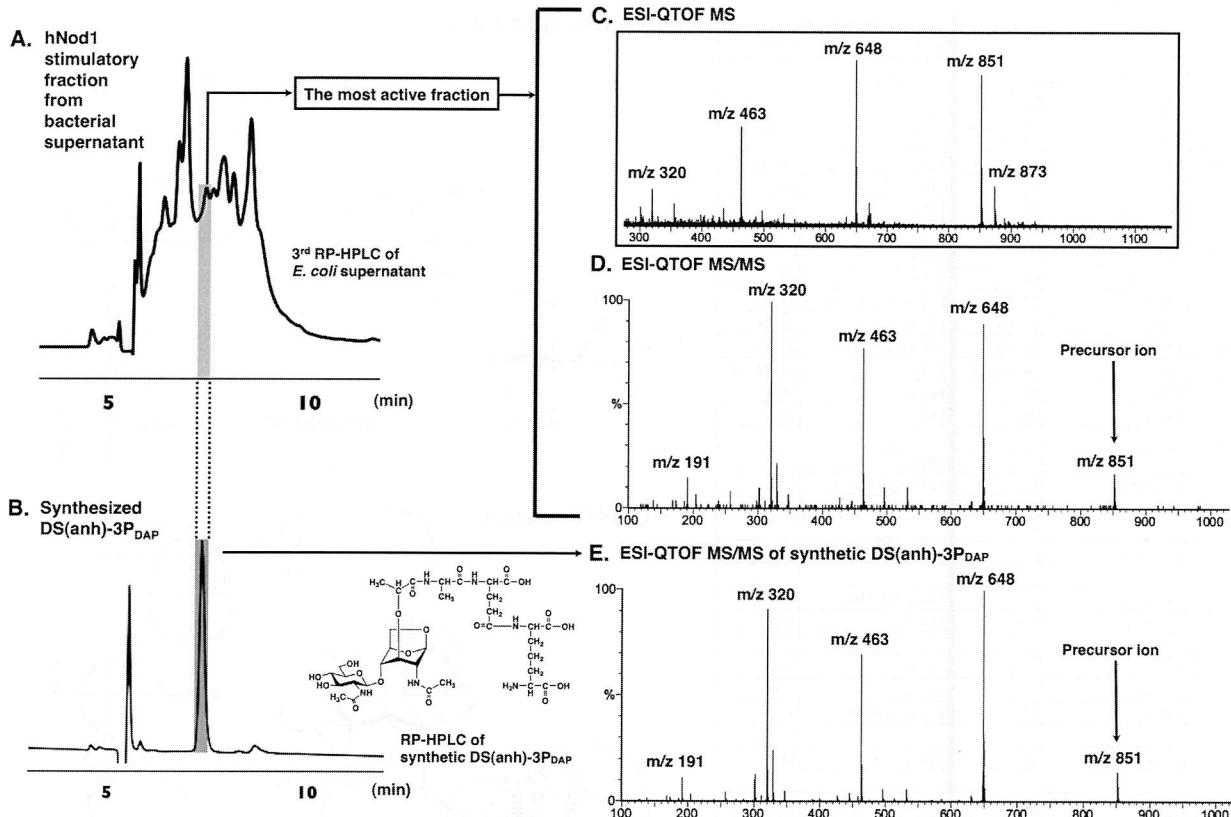
解析については、培養上清を Nod1 活性を指標に分画・精製し、活性成分を得た (Fig. 1)。すなわち、培養上清をまず逆相のオープンカラム (ODS) で脱塩し凍結乾燥した後、逆相 HPLC (RP-HPLC) で分画した。全ての画分の hNod1 活性を測定し、活性画分についてさらに HPLC 分画を行った (Figure 1B, 1C, 1D)。3 回目の HPLC 分画により強い hNod1 活性を持つ画分を得、その活性画分について、ESI-QTOF MS 分析 (Fig. 2A, 2C) および MS/MS 分析 (Fig. 2D) を行った。得



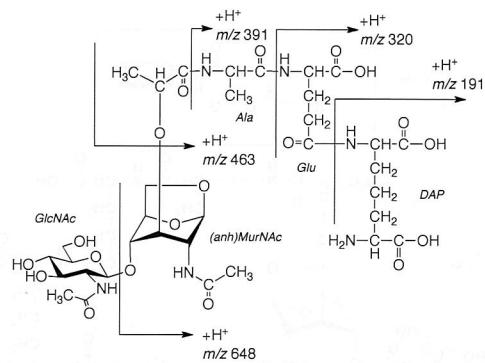
**Fig. 1** A) Isolation of fractions with Nod1 stimulatory activity from *Escherichia coli* K-12 culture supernatant (M9 minimum medium). B) The HPLC profile and Nod1 stimulatory activities of fractions from the first cycle of RP-HPLC separation. Nod1 stimulatory activities were measured by using a 10 µg/mL sample prepared from lyophilized residues (F4-3: 8 mg in total). C) The second cycle of RP-HPLC separation. The dark colored fraction from the first RP-HPLC separation was further separated with a second RP-HPLC purification. Nod1 stimulatory activities were measured by using a 5 µg/mL sample prepared from lyophilized residues (F4-3-B: 3.6 mg in total). D) The third cycle of RP-HPLC separation. The dark colored fraction from the second RP-HPLC separation was further separated with the third RP-HPLC condition. Nod1 stimulatory activities were measured by using a 0.1 µg/mL sample prepared from the lyophilized residues (F4-3-B-5: 0.15 mg in total). The dark colored fraction was corrected and analyzed with ESI-QTOF MS, MS/MS, and NMR. Details on the HPLC conditions are provided in the Experimental Section.

られた HPLC 保持時間, ESI-QTOF MS/MS は, 合成した PGN フラグメント化合物である DS(anh)-3P(DAP) (GlcNAc-( $\beta$ 1-4)-(anhydro) MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-meso-DAP (Kawasaki *et al.*, 2008) と HPLC 保持時間

(Fig. 2B), ESI-QTOF MS/MS (Fig. 2E) ともに同一であった。MS フラグメンテーションパターンの分析については, Fig. 3 に示した。NMR スペクトル ( $^1$ H-1D-NMR and H-H COSY) についても測定を行い, 天然由



**Fig. 2** The HPLC profiles of A) the natural fractions (the third cycle of RP-HPLC) from the *E. coli* K-12 culture supernatant, and B) synthesized DS(anh)-3P(DAP) (26). C) ESI-QTOF MS and D) ESI-QTOF MS/MS of the most active fraction (F4-3-B-5) from the *E. coli* K-12 culture supernatant. E) ESI-QTOF MS/MS of synthesized DS(anh)-3P(DAP).



**Fig. 3** The MS/MS fragment ion analysis of the most active fraction for human Nod1 stimulatory activity (Figure 2D).

来の活性画分および化学合成品が同一であることを確認した (Fig. 4). 二度目の RP-HPLC 分画で得られた活性画分 F4-B についてはアミノ酸分析を行い、ジアミノピメリン酸が存在することも確認した。ジアミノピメリン酸は、Nod1 の認識構造として必須と考えられるア

ミノ酸である (Chamaillard *et al.*, 2003). 最終の RP-HPLC により分画された画分は hNod1 を強く刺激したが、マウス Nod1 (mNod1) は刺激しなかった。これは、mNod1 が DS(anh)-3P(DAP) によって活性化されないという報告 (Magalhaes *et al.*, 2005) を支持する結果であった。

活性画分の分画の際に、幾つかの PGN フラグメント構造が観測されたが、感度が低く網羅的に観測することが困難であったため、質量分析の際の感度向上を目的に、蛍光標識基である 7-(diethylamino)coumarin-3-carbonyl (DEAC) タグを導入した (Meesters *et al.*, 2008)。PGN フラグメントのアミノ基に、N-hydroxysuccinimidyl ester 型の DEAC タグを用いてアミド形成による導入を行った (Fig. 5)。

DEAC タグを活性画分 F-3-B と反応させ、タグの導入後、ESI-QTOF MS を測定した (Fig. 6)。質量分析の結果、次のイオンピークが確認された; m/z 1183 (DEAC-DS-4P(DAP)), 1094 (DEAC-DS(anh)-3P(DAP)), 1081 (DEAC-DS-5P(DAP)), 962 (DEAC-

Atom	Natural Compound		Synthetic Compound	
	<sup>1</sup> H ( $\delta$ in ppm; $J$ in Hz) COSY		<sup>1</sup> H ( $\delta$ in ppm; $J$ in Hz) COSY	
A1	5.43 s (1H)	A2	5.43 s (1H)	A2
A2	3.98 m	A1, A3	3.98 s (1H)	A1, A3
A3	3.60 m	A2, A4	3.59 s (1H)	A2, A4
A4	3.95 m	A3, A5	3.96 s (1H)	A3, A5
A5	3.87 m	A4, A6, A6'	3.88 d (12) (1H)	A4, A6, A6'
A6	3.41 m	A5	3.44 m	A5
A6'	3.70 m	A5	3.74 m	A5
A7	-	-	-	-
A8	2.05 s	-	2.05 s	-
G1	4.27 d (7.2)	G2	4.26 m	G2
G2	3.80 m	G1, G3	3.79 dd (6, 2.4) (1H)	G1, G3
G3	3.70 m	G2, G4	3.72 m	G2, G4
G4	3.55 m	G3, G5	3.55 dd (9, 1.2) (1H)	G3, G5
G5	3.74 m	G4, G6, G6'	3.76 m	G4, G6, G6'
G6	4.63 m	G5	4.63 s	G5
G6'	4.69 m	G5	4.65 s	G5
G7	-	-	-	-
G8	2.03 s	-	2.03 s	-
1	1.37 d (6.6)	2	1.36 d (7.2) (3H)	2
2	4.16 m	1	4.16 q (7.2) (1H)	1
3	-	-	-	-
4	4.39 q (7.2)	6	4.38 q (7.2) (1H)	6
5	-	-	-	-
6	1.41 d (7.2)	4	1.41 d (7.2) (3H)	4
7	4.15 m	9, 9'	4.24 m	9, 9'
8	-	-	-	-
9	1.98 m	7, 10	1.97 m	7, 10
9'	2.10 m	7, 10	2.13 m	7, 10
10	2.26 m	9, 9'	2.32 t (7.2) (2H)	9, 9'
11	-	-	-	-
12	4.13 m	14	4.23 m	14
13	-	-	-	-
14	1.67 m	12, 15	1.72 m	12, 15
15	1.41 m	14, 16	1.44 m	14, 16
16	1.79 m	15, 17	1.85 m	15, 17
17	3.70 m	16	3.72 m	16
18	-	-	-	-

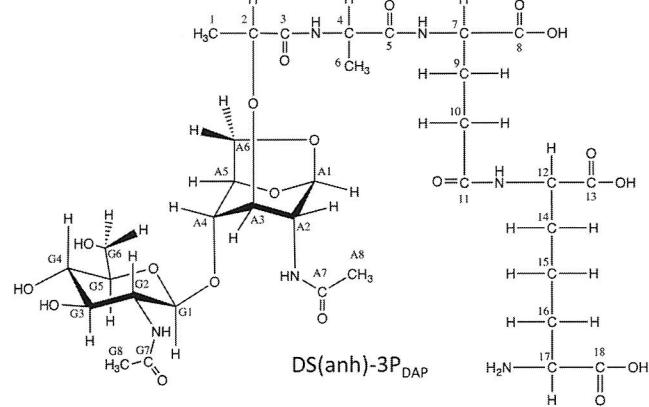
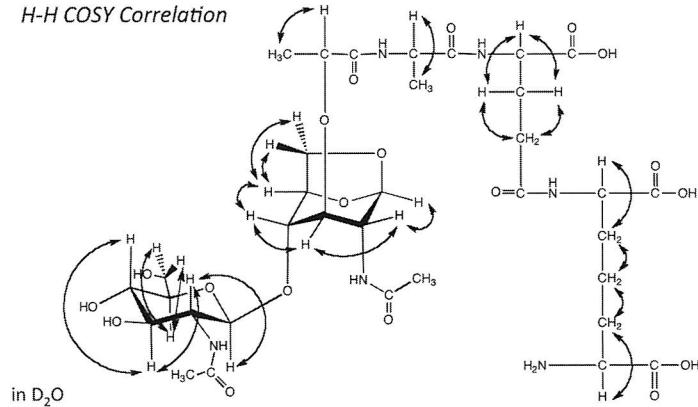
**NMR Analysis of F4-3-B-5****H-H COSY Correlation**

Fig. 4 NMR of DS(anh)-3P(DAP) from naturally obtained and chemical synthesized.

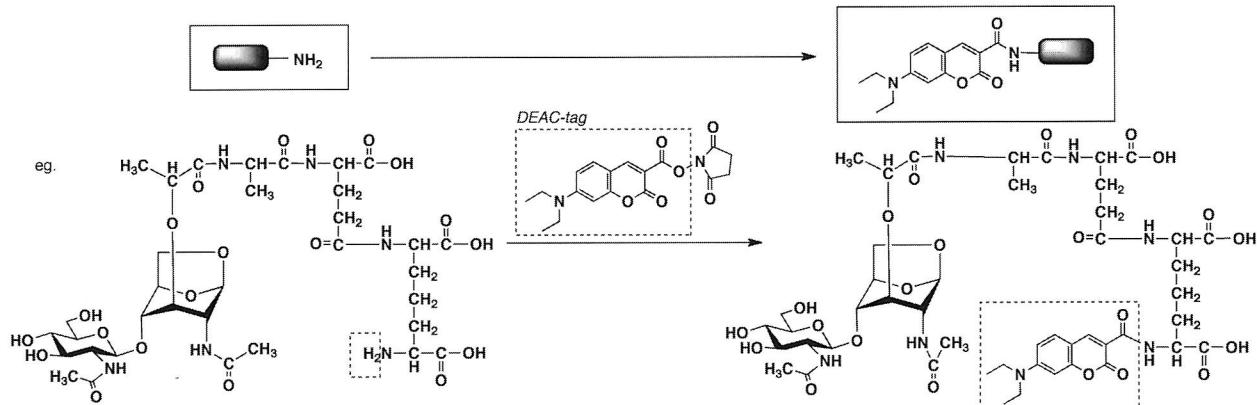


Fig. 5 DEAC labeling reaction of amino groups in the Nod1 stimulatory fraction.

MS(anh)-4P(DAP)), and 909 (DEAC-MS-3P(DAP)).タグによる標識化を行わない場合は, *m/z* 851 (DS(anh)-3P(DAP)) および *m/z* 1011 (DS-4P(DAP))のみが観測されたことから、標識化による感度向上が

見出された。また, DS(anh)-4P(DAP) (Tracheal cytotoxin (TCT); 気管上皮細胞毒素) は、無標識の条件において F4-3-C 画分中に検出された。

標識化後の分析結果から、活性画分に含まれる PGN

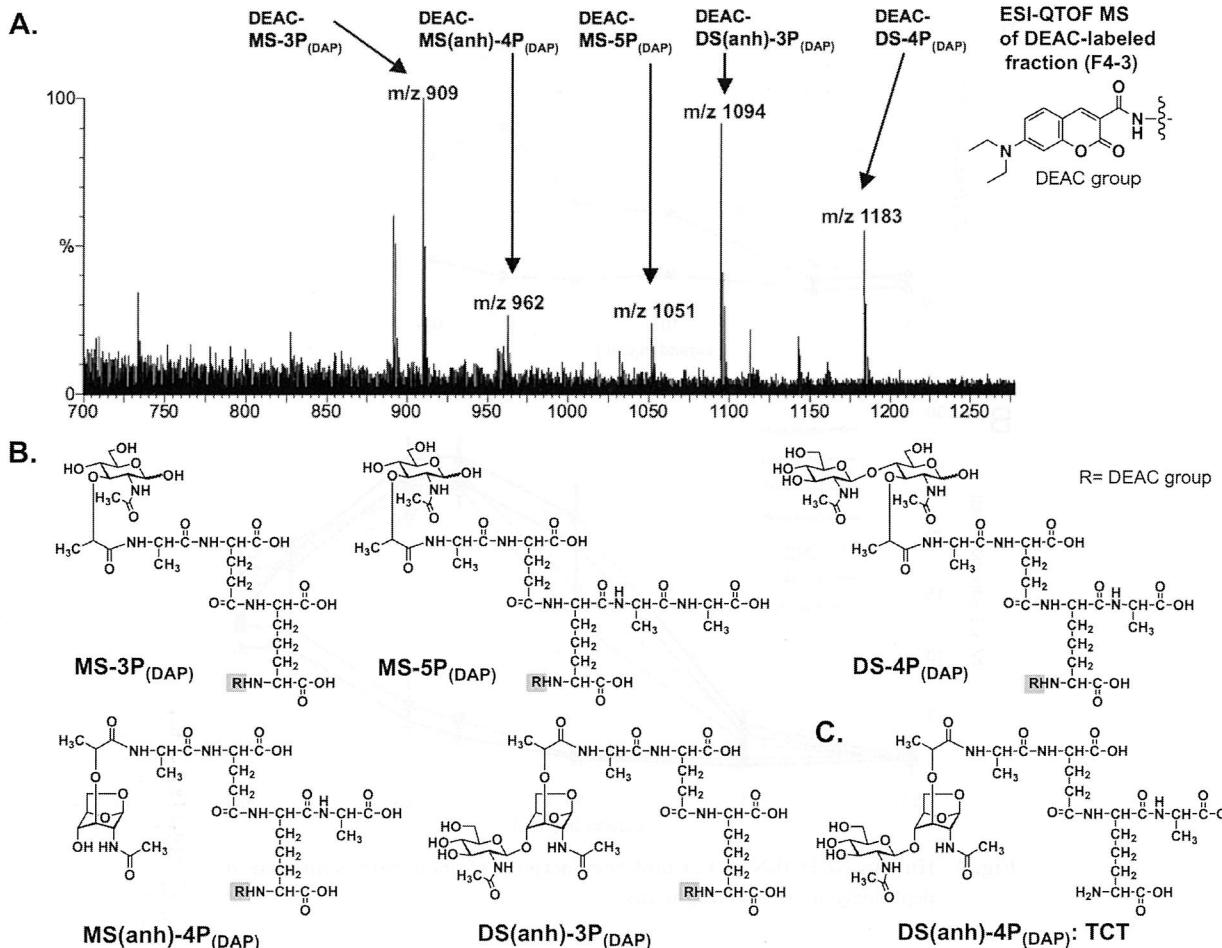


Fig. 6 A) ESI-QTOF MS spectrum of DEAC labeled fraction (F4-3-B in Figure 1C) from *E. coli* K-12 culture supernatant. B) The observed structures with DEAC labeling. C) DS(anh)-4P(DAP) (TCT) was also observed in the F4-3-C in Figure 1C.

フラグメントは糖部分の構造として GlcNAc および 1-6 アンヒドロ型の GlcNAc(anh) の両方を含むことが明らかとなった。合成化合物を用いた hNod1 活性の詳細な検討より (Fig. 7) (Kawasaki *et al.*, 2008), MS-3P(DAP) および DS(anh)-3P(DAP) が、強い hNod1 活性をもつ天然型リガンドと考えられた。

また、納豆菌 (*Bacillus subtilis natto* NI146a) についても培養上清中の培養上清中の Nod1 リガンドを解析し、大腸菌と類似の結果を得た。一部異なる成分について、現在化学合成を行い詳細を検討中である。

以上の結果より、我々は、腸内細菌である大腸菌の培養上清中に存在するヒト型の細胞内自然免疫受容体 Nod1 刺激活性を持つ化合物を単離し、その化学構造が DS(anh)-3P(DAP) (GlcNAc-( $\beta$  1-4)-(anhdro) MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-meso-DAP) であることを決定した。また、化学的に合成した DS(anh)-3P(DAP) と

天然由来化合物のスペクトル、生物活性が一致することを示した。

本結果より、ジアミノピメリン酸型ペプチドグリカンを持つ細菌の培養上清中に強い hNod1 刺激を持つ化合物が存在しており、その主な構造を明らかにした。細菌は細胞分裂に伴う細胞壁再形成の際の代謝産物として、TCT 構造を生成し細胞壁形成のため再利用しているが、その過程で培養上清中に TCT 類似構造を持つ化合物が出てきたのではないかと考えている。hNod1 リガンドは環境中でも比較的安定に存在していることから、我々は常にその刺激を受けていると考えられる。Nod1 については、現在社会問題ともなっているアレルギー疾患と遺伝子変異の関連が見出されていること、特に乳幼児期の免疫系の正常な発達に関係があると示唆されていること、また癌を含めた他の疾患との関連について多くの研究が行われており、免疫制御における

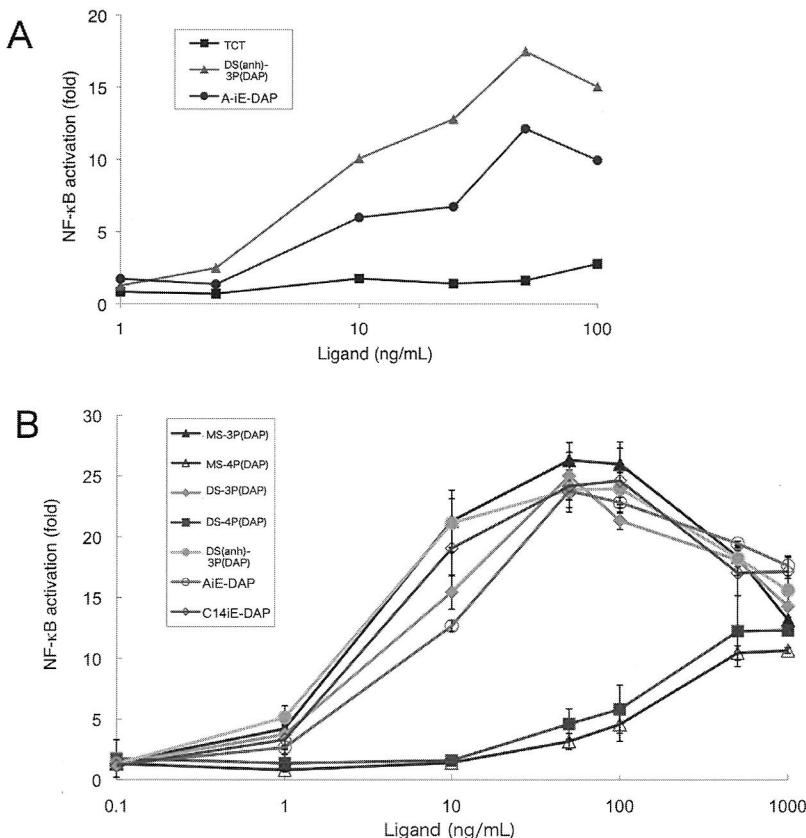


Fig. 7 Human Nod1 (hNod1) stimulatory activity of chemically synthesized peptidoglycan (PGN) fragments.

重要な因子の一つであると考えられるが、本研究による天然型の Nod1 リガンド構造解明により、今後その生体内での機能解明、あるいは疾患の治療等応用に繋がる分子レベルでの理解の基盤を築いたと考えている。

## 要 約

本研究において、腸内細菌として大腸菌の培養上清中に含まれるヒト型 Nod1 リガンドに注目し解析を行った。Nod1 は、その遺伝子変異と喘息等のアレルギー疾患との関連が報告されており、生体の免疫系の恒常性において重要な役割を果たしていると考えられている。M9 最小培地での培養が可能な *Escherichia coli* K-12 について培養を行い上清の解析を行った。強い hNod1 刺激活性を示す画分を得るとともに、その LC/MS および NMR により天然 Nod1 リガンドの構造解析に成功した。また、感度向上のため化学的に DEAC タグを導入し、網羅的解析を可能とした。納豆菌 *B. subtilis natto* についても同様に解析し特徴的な構造を見出した。一方、天然由来リガンドの解析のため、

種々の PGN 部分構造、および PGN 由来フラグメントである気管上皮細胞毒素 (TCT) の化学合成を行った。得られた化合物については hNod1 刺激活性の測定を行うとともに、培養上清中の解析データと比較することにより、数種のフラグメント構造を上清中に見出し、活性についても天然物と同様の傾向を示した。本研究により、特に腸内、食物における天然の細菌由来免疫刺激活性本体としての Nod1 リガンドの構造解明に成功し、分子レベルにおける研究の基盤を築いた。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Shimoyama, A., Inohara, N. & Fukase, K. (2007). Synthesis of immunostimulating peptidoglycan fragments recognized by intracellular receptor. The 216th American Chemical Society (ACS) National Meeting. (Boston, USA).
- Fujimoto, Y. (2008). Synthetic study of bacterial glycoconjugates for understanding the molecular basis of innate immune system. The 10th International Symposium on Biotechnology, Metal

- Complexes and Catalysis (BMC-X). (Zhengzhou, China).
3. Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Pradipta, A. R., Karasudani, Y., Inohara, N. & Fukase, K. (2008). Synthesis of immunostimulatory peptidoglycan fragments recognized by the intracellular receptors. The International Conference on Biodiversity and Natural Products (IUPAC) ICOB-6 and ISCNP-26). (Charlottetown, Canada).
  4. Fujimoto, Y. (2009). Synthesis and Biofunction of Innate Immunostimulating Glycoconjugates from Bacteria. Seminar at Institut de chimie des Substances Naturelles, (Jean-Yves, France).
  5. Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Pradipta, A. R., Karasudani, Y., Otsuka, Y., Fujiki, K., Ito, Y., Hasegawa, M., Inohara, N. & Fukase, K. (2009) Synthesis and Biofunction of Nod1 Ligands of Peptidoglycan; Innate Immunostimulating Glycoconjugates from Bacteria. The 15th European Carbohydrate Symposium (Eurocarb2009). (Viena, Austria).
  6. Fujimoto, Y. (2009). Synthesis and Biofunction of Innate Immunostimulating Glycoconjugates from Bacteria. Combinatorial Chemistry and Chemical Biology toward A New Paradigm for Drug Discovery (CCCB), (Osaka).
  7. Fujimoto, Y. (2009). Synthesis and Biofunction of Innate Immunostimulating Glycoconjugates from Bacteria. KAIST Chemistry Seminar (Korea Advanced Institute of Science & Technology), (Daejeon, Koria).
  8. 川崎彰子, 藤本ゆかり, 稲村誠一, 塩川善右, 烏谷幸枝, 小西康子, 橋本 崇, 楠本正一, 猪原直弘, 深瀬浩一 (2007). 免疫活性化機構解明を目指した細菌細胞壁ペプチドグリカン部分構造の合成. 第27回日本糖質学会年会 (博多).
  9. 小西康子, 久保修, 稲村誠一, 藤本ゆかり, 猪原直弘, 楠本正一, 深瀬浩一 (2007). 免疫活性化機構解明を目指した細菌細胞壁ペプチドグリカン部分構造の合成. 第40回若手ペプチド夏の勉強会 (小樽).
  10. 藤本ゆか (2007). 生体内の情報伝達に関わる鍵化合物の合成と機能解析. 第24回 有機合成化学セミナー (淡路).
  11. 藤本ゆかり (2008). 自然免疫を活性化するバクテリア由来複合糖質の合成と機能. 第6回糖質科学コンソーシアム (JCGG) シンポジウム (東京).
  12. 藤本ゆかり, 深瀬浩一, 川崎彰子, 下山敦史 (2009). 細胞内自然免疫受容体 Nod1 に対するリガンドの合成と免疫増強作用. 日本化学会第89春季年会 (舟橋).
  13. 大塚祐治, 藤本ゆかり, 烏谷幸枝, 深瀬浩一 (2009). ランチオニン含有細菌細胞壁ペプチドグリカン部分構造の合成. 日本化学会第89春季年会 (舟橋).
  14. 小西康子, 藤本ゆかり, 久保 修, 猪原直弘, 深瀬浩一 (2009). 架橋構造を持つ Lys 型細菌細胞壁ペプチドグリカン部分構造の合成と生物活性. 日本化学会第89春季年会 (舟橋).
  15. 烏谷幸枝, 藤本ゆかり, 上原亜希子, 高田春比古, 深瀬浩一 (2009). ランチオニン含有細菌細胞壁ペプチドグリカン部分構造の合成と生物活性. 日本化学会第89春季年会 (舟橋).
  16. 藤本ゆかり, 川崎彰子, Pradipta A. R., 大塚祐治, 長谷川瑞穂, 猪原直弘, 深瀬浩一 (2009). 自然免疫を活性化する細菌細胞壁ペプチドグリカン・フラグメントの構造解析, 合成と機能. 第51回 天然有機化合物討論会 (名古屋).
  17. 大塚祐治, 川崎彰子, 烏谷幸枝, 伊東陽子, 長谷川瑞穂, 猪原直弘, 藤本ゆかり, 深瀬浩一 (2010). ランチオニン含有細菌細胞壁ペプチドグリカン部分構造の合成. 日本化学会第90春季年会 (東大阪).
  18. Pradipta A. R., 川崎彰子, 長谷川瑞穂, 猪原直弘, 藤本ゆかり, 深瀬浩一 (2010). 細菌細胞壁ペプチドグリカン受容体 Nod1 の天然型リガンドの同定. 日本化学会第90春季年会 (東大阪).
  19. 藤木勝将, 伊東陽子, Heine, H., 長谷川瑞穂, 猪原直弘, 藤本ゆかり, 深瀬浩一 (2010). 免疫活性化機構解明を目指したペプチドグリカン蛍光標識体の合成研究. 日本化学会第90春季年会 (東大阪).

## 原著論文

1. Fujimoto, Y., Inamura, S., Kawasaki, A., Shiokawa, Z., Shimoyama, A., Hashimoto, T., Kusumoto, S. & Fukase, K. (2007). Chemical synthesis of peptidoglycan fragments for elucidation of the immunostimulating mechanism. *J. Endotoxin Research* 13: 189-196.
2. Kawasaki, A., Karasudani, Y., Otsuka, Y., Hasegawa, M., Inohara, N., Fujimoto, Y. & Fukase, K. (2008). Synthesis of diaminopimelic acid-containing peptidoglycan fragments and tracheal cytotoxin (TCT) for investigation of their biological functions. *Chem. Eur. J.* 14: 10318-10330.
3. Fukase, K. & Fujimoto, Y. (2009). Synthesis and biofunctional studies of bacterial immunostimulating glycoconjugates. In *Progress in the synthesis of complex carbohydrate chains of plant and microbial polysaccharides*. Nikolay E. Nifantiev Ed. Research Signpost and Transworld Research Network, 279-308.
4. Pradipta, A. R., Fujimoto, Y., Hasegawa, M., Inohara, N. & Fukase, K. (2010). Characterization of natural human nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 (NOD1) ligands from bacterial culture supernatant for elucidation of immune modulators in the environment. *J. Biol. Chem.* 285: 23607-23613.
5. Fujimoto, Y., Tanaka, K., Shimoyama, A. & Fukase, K. (2010). Self and Nonself Recognition with Bacterial and Animal Glycans, Surveys by Synthetic Chemistry. In *Methods in Enzymol*, Vol 478. Minoru Fukuda Ed. Elsevier, pp. 323-342.

## 謝 辞

本研究遂行に際し助成を賜りました財団法人発酵研究所および関係者各位に厚く御礼申し上げます。本研

究は、ミシガン大学医学部猪原直弘博士との共同研究であり、また、所属する大阪大学大学院理学研究科化学専攻天然物化学研究室の深瀬浩一教授、また大学生院生のAmbara. R. Pradipta君、川崎彰子さん、小西康子さん、鳥谷幸枝さん、大塚祐治君の学生諸氏に感謝します。また、ファーメンター使用に関しご協力頂いた大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻の倉光成紀教授、大山礼雅君に感謝致します。

## 文 献

- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783-801.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M. A., Foster, S. J., Mak, T. W., Nuñez, G. & Inohara, N. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* **4**: 702-707.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. & Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635-1638.
- Eder, W., Klimecki, W., Yu, L., von Mutius, E., Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Nowak, D., Holst, O., Martinez, F. D. & ALEX-Team (2006). Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in CARD4/NOD1. *Allergy* **61**: 1117-1124.
- Fujimoto, Y., Inamura, S., Kawasaki, A., Shiokawa, Z., Shimoyama, A., Hashimoto, T., Kusumoto, S. & Fukase, K. (2007). Chemical synthesis of peptidoglycan fragments for elucidation of the immunostimulating mechanism. *J. Endotoxin Research* **13**: 189-196.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J. & Philpott, D. J. (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**: 1584-1587.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. & Sansonetti, P. J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* **278**: 8869-8872.
- Hasegawa, M., Yang, K., Hashimoto, M., Park, J. H., Kim, Y. G., Fujimoto, Y., Nuñez, G., Fukase, K. & Inohara, N. (2006). Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J. Biol. Chem.* **281**: 29054-29063.
- Hasegawa, M., Kawasaki, A., Yang, K., Fujimoto, Y., Masumoto, J., Breukink, E., Nunez, G., Fukase, K. & Inohara, N. (2007). A role of lipophilic peptidoglycan-related molecules in induction of Nod1-mediated immune responses. *J. Biol. Chem.* **282**: 11757-11764.
- Hysi, P., Kabesch, M., Moffatt, M. F., Schedel, M., Carr, D., Zhang, Y., Boardman, B., von Mutius, E., Weiland, S. K., Leupold, W., Fritzsch, C., Klopp, N., Musk, A. W., James, A., Nuñez, G., Inohara, N. & Cookson, W. O. (2005). NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum. Mol. Genet.* **14**: 935-941.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L. & Nuñez, G. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* **278**: 5509-5512.
- Inamura, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Shiokawa, Z., Woelk, E., Heine, H., Lindner, B., Inohara, N., Kusumoto, S. & Fukase, K. (2006). Synthesis of peptidoglycan fragments and evaluation of their biological activity. *Org. Biomol. Chem.* **4**: 232-242.
- Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 197-216.
- Kawasaki, A., Karasudani, Y., Otsuka, Y., Hasegawa, M., Inohara, N., Fujimoto, Y. & Fukase, K. (2008). Synthesis of diaminopimelic acid-containing peptidoglycan fragments and tracheal cytotoxin (TCT) for investigation of their biological functions. *Chem. Eur. J.* **14**: 10318-10330.
- Lemaître, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-983.
- Magalhaes, J. G., Philpott, D. J., Nahori, M. A., Jehanno, M., Fritz, J., Le Bourhis, L., Viala, J., Hugot, J., P., Giovannini, M., Bertin, J., Lepoivre, M., Mengin-Lecreux, D., Sansonetti, P. J., Girardin, S. E., (2005). Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO Rep.* **6**: 1201-1207.
- Meesters, R. J. W., Duisken, M., Jahnigen, H. & Hollender, J. (2008). Sensitive determination of monoterpene alcohols in urine by HPLC-FLD combined with ESI-MS detection after online-solid phase extraction of the monoterpene-coumarincarbamate derivatives. *J. Chromatogr. B* **875**: 444-450.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**: 819-826.
- Sansonetti, P. J. (2006). The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat. Immunol.* **7**: 1237-1242.

## 細菌およびウイルス感染を同時に防御する新手法に関する研究

度 会 雅 久

帯広畜産大学畜産学部

〒080-0834 帯広市稻田町西2線11

### Study of a new approach to prevent bacterial and viral infection simultaneously

Masahisa Watarai

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-0834, Japan

The uptake of pathogens by host cells is a key event in infectious diseases. Heat shock cognate protein 70 (Hsc70) contributes to *Brucella* and rotavirus uptake by host cells. In this study we investigated the role of Hsc70 in infection by these pathogens. The monoclonal antibody that inhibited bacterial uptake by trophoblast giant (TG) cells reacted with the EEVD motif of Hsc70. Bacterial tetratrico-peptide repeat (TPR) domains containing proteins bound to the C-terminal of Hsc70 through its EEVD motif, and this binding inhibited bacterial uptake by TG cells. Infectious abortion was also prevented by blocking the EEVD motif of Hsc70. In the mutants, genes encoding protein containing TPR domains had been deleted and were designated as *Brucella* anti-virulence (Bav), because these mutants showed hypervirulent phenotypes. The monoclonal antibody that inhibited bacterial uptake did not prevent rotavirus infection into MA104 cells. Our results demonstrate that Hsc70 on the surface of host cells mediated the uptake of pathogenic bacteria and viruses, but the functions are different from one another.

Key words: *Brucella*, rotavirus, heat shock cognate protein 70, infection

## 緒 言

病原細菌の多くは宿主細胞へ侵入する能力を持っている。サルモネラ、リステリア、赤痢菌などは、上皮細胞や食細胞へ自ら侵入する (Ashida *et al.*, 2009)。結核菌、レジオネラ、クラミジア、リケッチャなど食細胞の中で増殖することができる細胞内寄生細菌も上皮細胞への侵入能をもっている (Kumar & Valdivia, 2009)。A群溶血性レンサ球菌、黄色ブドウ球菌、腸管病原性大腸菌、百日咳菌などは、上皮細胞へ付着すると同時に、付着因子を利用してさらに細胞へ侵入する (Sinha & Fraunholz, 2010)。宿主の免疫監視機構を回避するために、病原細菌は上皮細胞をはじめとしたさまざまな宿主細胞へ侵入するものと考えられる。一方、ウイルスは細菌と異なり、単独では

増殖できず、宿主細胞に感染して初めて増殖可能となる。細菌、ウイルス共に増殖の場として宿主細胞内を利用している。これらの病原体の細胞内増殖機構は異なるが、細胞内への侵入機構には共通点が認められる。細菌、ウイルス、原虫の宿主細胞侵入において、細胞膜上に存在するミクロドメイン “リピドラフト (lipid raft)” が共通に関与することが知られている (Duncan *et al.*, 2002)。リピドラフトの形成機構および機能は未だ不明な点が多いが、病原微生物の細胞侵入部位にリピドラフトの凝集が共通して観察されることから、現在までに知られていない新たな生命現象が存在することが予想される。リピドラフトの集積を阻害することによって多くの病原体の感染を阻止できることから、リピドラフトが細胞内に寄生する病原体のゲートウェイとしての役割を持つ可能性が考えられる。しかし、この手法は宿主への負担が大きく、感染阻止法への応用は現時点では困難である。これを打開するためには各病原体の感染に共通に関与する因子の同定が必要である。

このように細胞レベルで見た場合、リピドラフトは病原体の侵入門戸になると考えられる。一方、個体レベルで見た場合、病原微生物には特定の組織あるいは臓器において増殖する組織・臓器特異性が認められる。これはおそらく病原体に対するレセプターがその臓器を構成する細胞に多量に発現しているか、あるいは増殖に必要な物質がその臓器に多く存在する等が考えられるが詳細は不明である。病気の発症メカニズムを解明し感染防御法を構築するためには、感染の臓器特異性の解明が重要な鍵となる。しかしながら、感染の病態を個体レベルで解析する研究はマウスあるいはラット等の実験動物を用いたモデル系の作成から始める必要があり、これまであまり進展していなかった。

ブルセラ属菌は胎盤に感染し、家畜、ペット動物および人に流産を引き起こすことが知られている。我々はブルセラ属菌感染による流産の発生メカニズムを解明するためにマウスを用いた流産モデルを構築した (Kim, et al., 2005.)。このマウスモデルを用いた解析により、ブルセラ属菌は胎盤中に存在する栄養膜巨細胞 (trophoblast giant cell: TGC) に特異的に感染し、これによって流産が引き起こされることを見出した。ブルセラ属菌の TGC への感染に関与するレセプターの検索を行ったところ菌は TGC の細胞膜上リピドラフトに存在する Hsc70 (heat shock cognate protein 70) を介して感染することが明らかとなった (Watanabe et al., 2008)。Hsc70 は腸管感染するロタウイルスのレセプターであることも報告されている (López & Arias, 2006)。本研究では病原体の產生する病原因子とレセプターとして機能する Hsc70 の相互作用を分子レベルで解析し、その成果を基にして両病原体の感染を同時に制御する手法の検討を試みる。

## 実験方法

**菌とウイルスの培養** *Brucella abortus* 544 株 (ATCC23448) および *Listeria monocytogenes* EGD 株 (ATCC19115) を用いた。菌株は凍結グリセロール保存し、ブルセラ培地あるいは brain heart infusion (BHI) 培地を用いて 37°C, 18時間培養した。ロタウイルス Wa 株 (ATCC VR-2018) は MA104 細胞を用いて培養した。

**細胞の培養** 栄養膜幹細胞 (trophoblast stem cell: TSC) は FGF4, ヘパリン、マウス胎児由来線維芽細胞の培養上清を加えた TS 培地に培養した (Tanaka et al., 1998)。無添加 TS 培地を用いて TGC へ分化させた。MA104 細胞は MEM 培地を用いて培養し

た。細胞は 5% 炭酸ガス存在下において、37°C で培養した。

**リコンビナント蛋白質の作製と性状解析** 図 1A に示した Hsc70 および tetratrico-peptide repeat (TPR) ドメイン蛋白質のリコンビナント蛋白質は、PCR 法により増幅した遺伝子を pCold TF ベクター (TAKARA Bio) にクローニングし、低温で蛋白質を発現させ精製を行った。

R2-25 抗体および作製した Hsc70 のリコンビナント蛋白質を用いたウエスタンブロッティングは 10%SDS-PAGE を用いた常法により行った。図 1C に示したペプチド (10 μg/mL) を合成し、マイクロタイタープレートにコーティングし、R2-25 抗体との反応性を Bio-Rad ELISA reader (490 nm) によって検出した。リコンビナント蛋白質を用いた蛋白質一蛋白質の結合試験は、ELISA および pull-down assay を用いた常法により行った (Watarai et al., 2003)。

**bavA, bavB, bavC 遺伝子欠損株の作製** *bavA, bavB, bavC* 遺伝子の上流および下流の領域 1 kbp を PCR 法により増幅し、それぞれの DNA 断片を pSR47s ベクターにクローニングし、相同組換えによって欠損株を作出した (Watarai et al., 2002)。

**TGC を用いた感染実験** 培養した菌液を TGC へ MOI (multiplicity of infection) 100 になるように添加し、150 x g で 10 分間遠心することにより、菌と細胞を密着させ感染させた。30 分間培養した後、培地に gentamicin (30 μg/ml) を添加してさらに 30 分間あるいは 24 時間培養し、細胞外に存在する菌を死滅させた。PBS を用いて 3 回洗浄した後、冷却した DW を用いて TGC を溶解させ、寒天培地に塗布した後培養した。寒天培地上に形成されたコロニー数を計測し、菌数とした (Watanabe et al., 2008)。精製した抗体、リコンビナント蛋白質は感染の 2 時間前に添加した。

**ロタウイルスの感染実験** ウイルスを 2,000 focus-forming units になるように添加し、1 時間培養した。MEM 培地で洗浄した後、さらに 14 時間培養した。蛍光抗体法により、感染細胞の計測を行った。

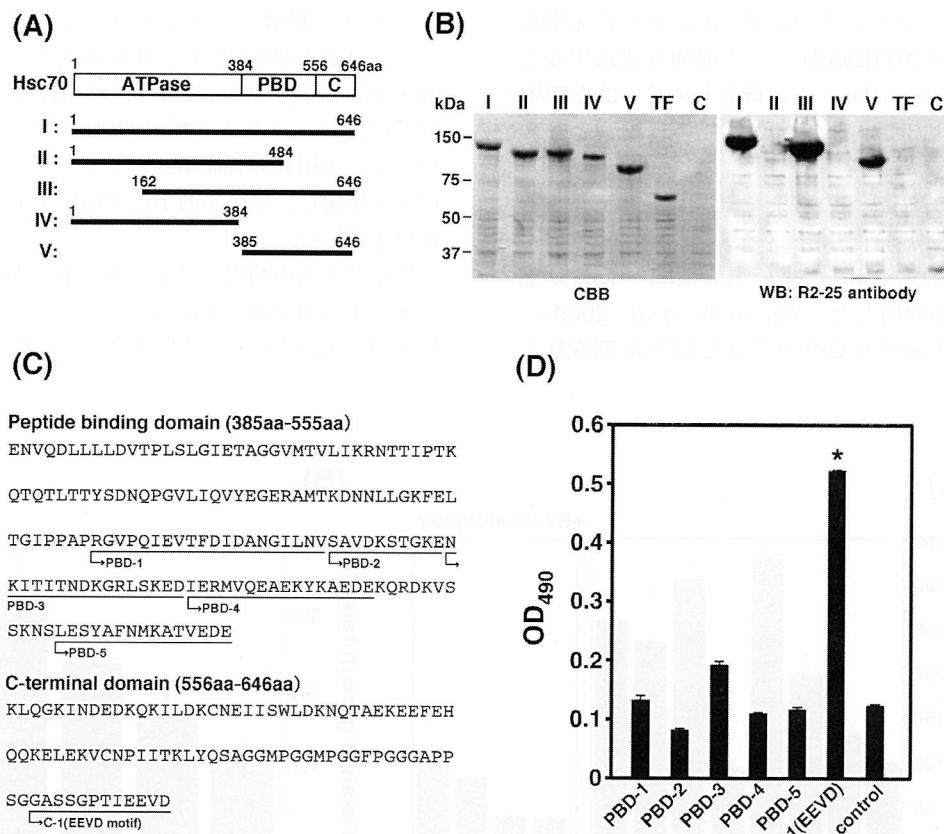
**妊娠マウスを用いた感染実験** 雌のマウスに菌の感染を阻害するモノクローナル抗体 R2-25 の投与したもの、EEVD ペプチドを用いて免疫したもの、BavC 蛋白質を投与したものを用意し、雄と交配させた。妊娠

確認後、4.5日後に菌を感染させ、流産の発生頻度を測定した (Kim *et al.*, 2005)。KLH (Keyhole limpet hemocyanin) とコンジュゲートした EEVD ペプチドを Titer-Max Gold アジュバントを用いて免疫を行った。ELISA により免疫前の血清と比較し、抗体価の上昇を確認した。

## 結果と考察

**Hsc70 の機能ドメインの確定** Hsc70 は熱ショック蛋白質 (heat shock proteins : Hsp) 70ファミリーに属する蛋白質で、分子シャペロンとしての機能を持

っている。Hsc70 ファミリーは N 末端側に ATPase ドメインと、C 末端側に基質認識 (ペプチド結合) ドメインを持っている。ATPase ドメインは高度に保存されており生物種による違いはほとんどないが、基質認識ドメインには違いが認められ、それぞれの基質に対応しているものと想像されている。C 末端側は基質認識ドメインとあまり機能が明確ではない C 末端領域にさらに分けることができる。これまでの研究により、ブルセラ菌の TGC への感染を阻害するモノクローナル抗体は、Hsc70 を 2 つに分けた場合、ATPase ドメイン側ではなく基質認識ドメイン側と反応することが示されていた。さらに詳細な解析を行い、ブルセ



**Fig. 1** Epitope mapping of monoclonal antibody R2-25. (A) Schematic diagram of truncation constructs of Hsc70. A linear diagram of full-length Hsc70 is shown at the top, numbers indicate the corresponding amino acid position. The ATPase domain (ATPase), peptide binding domain (PBD), and C-terminal region (C) are shown. The truncation constructs generated are illustrated below and aligned corresponding to the full-length protein. The name of each construct is listed to the left of the illustration and all have an N-terminal trigger factor (TF). (B) Immunoblot analysis of Hsc70 truncation constructs. Purified proteins separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue (CBB) (left panel), and the same samples were analyzed by immunoblotting with R2-25 antibody. TF, trigger factor; C, loading buffer. (C) Sequence of Hsc70 from 385 to 646 amino acids. Six synthesized peptides are shown underlined (PBD-1 to -5, and C-1). (D) Reaction activity of each synthetic peptide was measured by ELISA. Statistically significant differences between control (BSA) and C-1 (EEVD) peptides are indicated by asterisks (\*, P < 0.01).

ラ菌のTGCへの感染を阻害するモノクローナル抗体は、Hsc70のアミノ酸配列のどの部分を認識するか確定した。

ブルセラ菌のTGCへの感染を阻害するモノクローナル抗体がHsc70のアミノ酸配列のどの部分を認識するか確かめるために、Hsc70をいくつかの部分に分けたリコンビナント蛋白質を作製し(Fig. 1A)，このリコンビナント蛋白質への抗体の反応性を検討した。その結果、Hsc70のC末端側1/4(基質認識ドメインの一部とC末端領域を含む)を認識することが示された(Fig. 1B)。

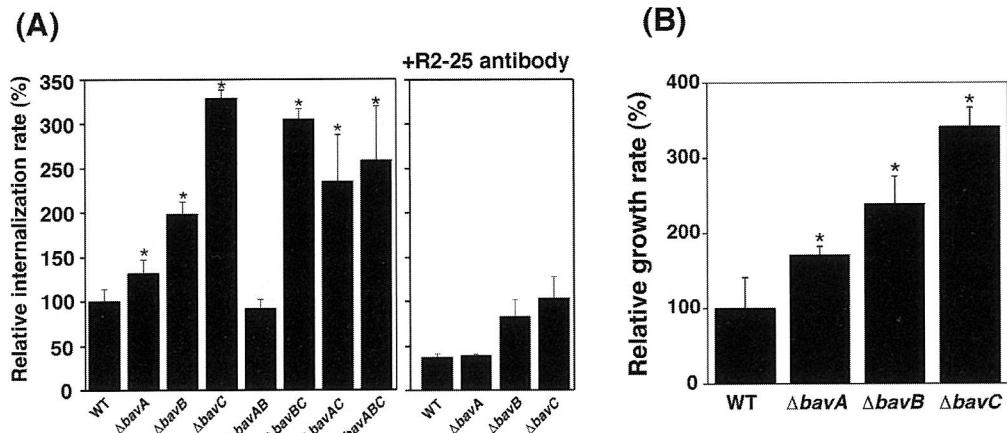
さらに詳細な解析を行うために、C末端側1/4を10程度のペプチドに分けて合成し(Fig. 1C)，この合成ペプチドへの抗体の反応性をELISAによって検討し、モノクローナル抗体の認識するアミノ酸配列を絞り込んだ。その結果、Hsc70のC末端領域部分のGASSGPTIEEV(EEVD)という配列を認識することが判明した(Fig. 1D)。この機能ドメインはEEVDという配列を含んでいるため以後EEVD配列と呼ぶことにした。

ブルセラ菌のTGCへの感染を阻害するモノクローナル抗体は、当初基質認識ドメインを認識するものと推測されていたが、実際にはC末端領域のEEVD配列であることが判明した(Watanabe et al., 2009)。Hsc70のC末端領域のEEVDを含む配列はEEVDモ

チーフと呼ばれ、tetra-trico-peptide repeat (TPR) ドメインを認識して蛋白質と結合することが報告されている(Hirano et al., 1990)。TPR ドメインは約34アミノ酸からなる配列で、TPR ドメインを含む蛋白質は種々の蛋白質-蛋白質の相互作用に関与すると考えられているが、その詳細な機能については未だ不明な点が多い。本研究により、Hsc70の機能ドメインがEEVD配列であることが示唆されたため、Hsc70に結合する菌側因子はTPR ドメインを含む蛋白質であることが予測された。

**Hsc70**が認識する因子検索 Hsc70の機能ドメインの解析結果から、菌側因子はTPR ドメインを含む蛋白質であることが推測された。そこでゲノムデータベースからTPR ドメインを含む蛋白質を検索したところ、3種の蛋白質がそれに該当した(遺伝子No. 269, No. 425, No. 1732)(GenBank AE017223, AE017224)。これら3種のTPR ドメイン蛋白質を発現しない欠損株の性状解析、およびリコンビナント蛋白質を作製し、生化学的手法を用いてHsc70との結合性を検討した。

ブルセラ菌のTPR ドメイン蛋白質とTGCの細胞膜上に発現するHsc70が結合することによってブルセラ菌はTGC内に侵入すると推測される。TPR ドメイン蛋

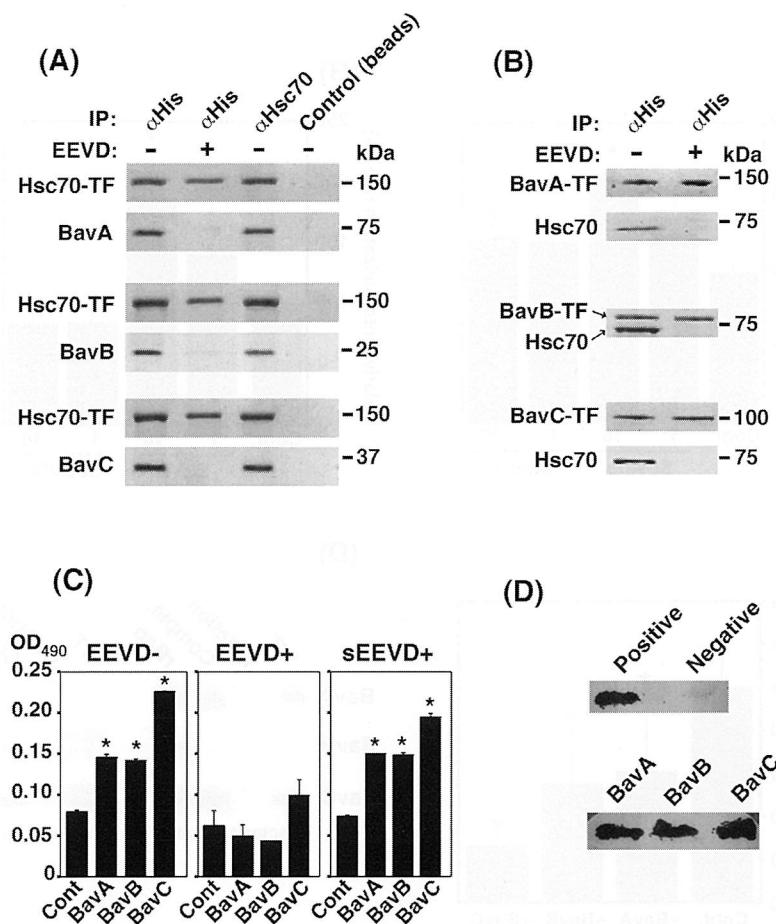


**Fig. 2** *bav* mutants of *B. abortus* have hypervirulent phenotypes. (A) Internalization into TG cells. Bacteria were deposited onto the TG cells which were then incubated at 37°C for 30 min. Bacterial internalization efficiency was determined by evaluating the protection of internalized bacteria from gentamicin killing. WT, wild-type strain;  $\Delta bavA$ , *bavA* (No. 425) mutant;  $\Delta bavB$ , *bavB* (No. 1732) mutant;  $\Delta bavC$ , *bavC* (No. 269) mutant;  $\Delta bavAB$ , *bavA* and *bavB* mutant;  $\Delta bavBC$ , *bavB* and *bavC* mutant;  $\Delta bavAC$ , *bavA* and *bavC* mutant;  $\Delta bavABC$ , *bavA*, *bavB*, and *bavC* mutant. Right panel shows R2-25 antibody treated TG cells. (B) Intracellular replication in TG cells at 24 h. WT, wild-type strain;  $\Delta bavA$ , *bavA* mutant;  $\Delta bavB$ , *bavB* mutant;  $\Delta bavC$ , *bavC* mutant. Data are the averages of triplicate samples from three identical experiments, and the error bars represent standard deviations. Statistically significant differences between wild-type and *bav* mutants are indicated by asterisks (\*, P < 0.01).

白質と Hsc70 の結合を介した菌の細胞侵入を解析するために、3種の TPR ドメイン蛋白質を産生しない欠損株を作製した。これらの欠損株は細胞侵入の効率が低下することが予測されたが、結果はその逆であった。欠損株は TGC への細胞侵入効率が有為に上昇し、特に遺伝子 No. 269 の欠損株が最も増加した (Fig. 2A)。これらの遺伝子を二重あるいは三重に欠損させた変異株を作製し、細胞侵入効率を検討したが、単一の遺伝子の欠損と差は認められなかった。これらの変異株の細胞侵入は Hsc70 に対するモノクローナル抗体によって阻害された。同様に、これらの変異

株の細胞内増殖能を検討したところ、いずれも野生株に比べ高い細胞内増殖性を示した (Fig. 2B)。これら TPR ドメイン蛋白質の欠損株の病原性が高くなっていることが考えられたため、これらの因子を Bav (Brucella anti-virulence) と名付けることとし、遺伝子 No. 425 を *bavA*, No. 1732 を *bavB*, No. 269 を *bavC* とした。

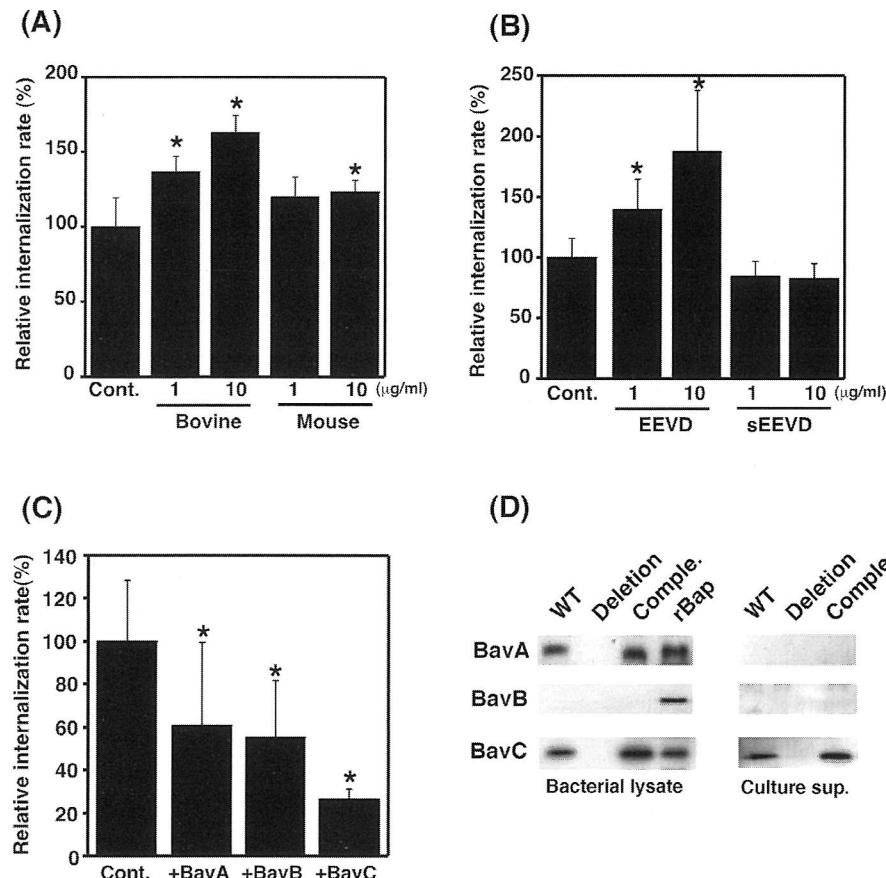
ブルセラ菌の3種の TPR ドメイン蛋白質 (BavA, BavB, BavC) のリコンビナント蛋白質を作製し、trigger factor (TF) と融合させた Hsc70-TF と混合し、pull-down assay によってそれぞれの蛋白質の結



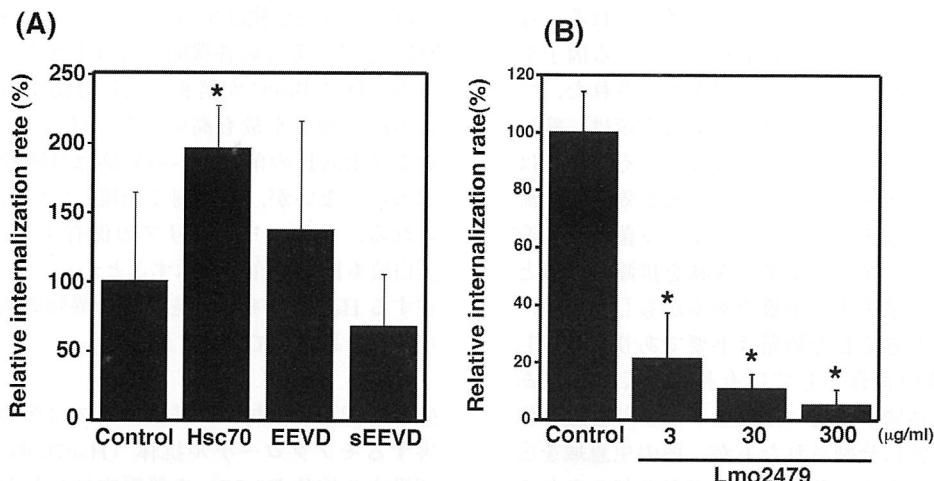
**Fig. 3** Binding of Bav proteins to Hsc70. (A) Affinity of Bav proteins for Hsc70 shown by a pull-down assay with Hsc70-TF fusion protein with or without EEVD peptide. Samples were immunoprecipitated by anti-His tag antibody ( $\alpha$  His), anti-Hsc70 antibody ( $\alpha$  Hsc70), or beads only (control). Interaction between Hsc70 and Bav proteins was indicated by co-precipitation. (B) Pull-down assay with Bav-TF fusion proteins. (C) Bav proteins binding capacity for Hsc70 with or without EEVD peptides as measured by ELISA. BavA, BavB, or BavC proteins were coated on immunoplates and then Hsc70 was added. Data are the averages of triplicate samples from three identical experiments, and the error bars represent standard deviations. Statistically significant differences between control and Bav are indicated by asterisks (\*,  $P < 0.01$ ). (D) Two-hybrid interaction between Bav proteins and Hsc70. The upper panel shows positive and negative controls, while the lower panel shows Hsc70 and Bav protein binding activity for BavA, BavB, and BavC.

合性を検討した。その結果、どの蛋白質も Hsc70 に特異的に結合することが示された (Fig. 3A, B)。さらに、この Hsc70 と TPR ドメイン蛋白質の結合が、EEVD 配列介した結合であるか否か検討するために、反応液中に EEVD 配列の合成ペプチドを添加し、その結合に与える影響を ELISA によって検討した。その結果、EEVD 配列を加えたものは、無添加対照および sEEVD 配列 (EEVD 配列をランダムに変更した配列) を加えたものに比べて有為に結合が阻害された (Fig. 3C)。また、酵母を用いた two-hybrid システムによる解析においても、Hsc70 と TPR ドメイン蛋白質の結合が認められた (Fig. 3D)。

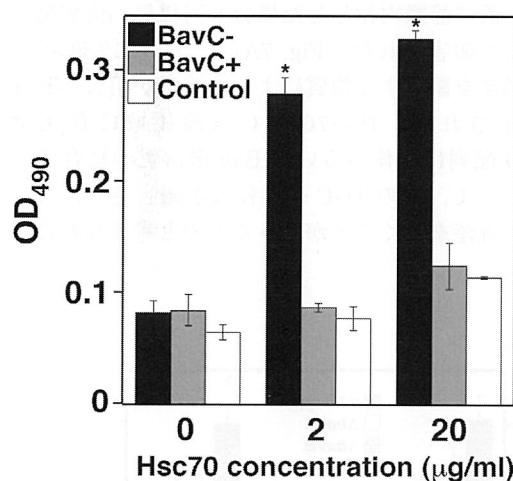
**Bav 蛋白質の機能解析** 次に Hsc70 と Bav 蛋白質の相互作用による菌の細胞侵入に与える影響を検討した。ウシあるいはマウス由来のリコンビナント Hsc70 を TGC の培養液中に加えたところ、ブルセラ菌の細胞侵入効率が増加した (Fig. 4A)。合成した EEVD ペプチドを加えた場合も同様の結果が得られた (Fig. 4B)。逆に、リコンビナント Bav 蛋白質を加えたところ、菌の細胞侵入効率の低下が認められた (Fig. 4C)。特に BavC 蛋白質添加により、著しい細胞侵入阻害が示された。これらの結果により、Bav 蛋白質が菌体外あるいは菌体表層に分泌していることが予測された。これを確かめるために Bav 蛋白質に対する抗体を作製し、ウエスタンブロッティングにより Bav 蛋白



**Fig. 4** Interaction between Bav proteins and Hsc70 interferes with bacterial uptake by TG cells. Bovine or mouse Hsc70 (A), synthetic EEVD and scrambled EEVD (sEEVD) peptides (B) or Bav proteins (C) were added in the culture medium of TG cells at the indicated concentration and then bacteria were deposited onto TG cells. Data are the averages of triplicate samples from three identical experiments, and the error bars represent standard deviations. Statistically significant differences between control and Hsc70, EEVD peptides, or Bav proteins are indicated by asterisks (\*, P < 0.01). (D) Expression and secretion of Bav proteins. Bacterial lysate from in vitro culture and its culture supernatant (Culture sup.) were tested by immunoblotting with anti-BavA, BavB or BavC antibody. WT, wild type-strain; Deletion, deletion mutants of each gene; Comple., complemented strains of each mutant; rBav, each recombinant Bav protein.



**Fig. 5** Interaction between *Listeria* TPR proteins (Lmo2479) and Hsc70 interferes with bacterial uptake by TG cells. Bovine or mouse Hsc70, synthetic EEVD and scrambled EEVD (sEEVD) peptides (A) or Lmo2479 proteins (B) were added in the culture medium of TG cells at the indicated concentration and then bacteria were deposited onto TG cells. Data are the averages of triplicate samples from three identical experiments, and the error bars represent standard deviations. Statistically significant differences between control and Hsc70, EEVD peptides, or Lmo2479 proteins are indicated by asterisks (\*, P < 0.01).



**Fig. 6** Binding of bacteria and Hsc70. *B. abortus* binding capacity for Hsc70 with or without BavC protein as measured by ELISA. Bacteria were coated on immunoplates and then Hsc70 was added. Bacterial binding to Hsc70 was inhibited by addition of BavC protein. Control is BSA coated immunoplate. Data are the averages of triplicate samples from three identical experiments, and the error bars represent standard deviations. Statistically significant differences between control and BavC are indicated by asterisks (\*, P < 0.01).

質の発現を検討した。ブルセラ培地に培養した菌の全菌体を解析したところ、BavA と BavC の発現は認め

られたが、BavB は認められなかった。培養上清へ分泌は BavC のみ認められた (Fig. 4D)。

ブルセラ菌と同様に流産を引き起こすことが知られているリストリアも TPR ドメイン蛋白質を 6 種保有していることがゲノムデータベースの検索により明らかとなった (GenBank AL591824)。そこで、そのうちの 1 種である Lmo2479 のリコンビナント蛋白質を作製し、ブルセラ菌と同様の解析を行った。リストリアの TGC への細胞侵入もリコンビナント Hsc70 の添加により促進された (Fig. 5A)。一方、Lmo2479 の添加により、菌の細胞侵入は阻害された (Fig. 5B)。

Hsc70 が菌体と結合するかどうか ELISA によって検討した。その結果、Hsc70 とブルセラ菌の結合が確認された。また、反応液中に BavC 蛋白質を加えることによって、その結合は阻害された (Fig. 6)。

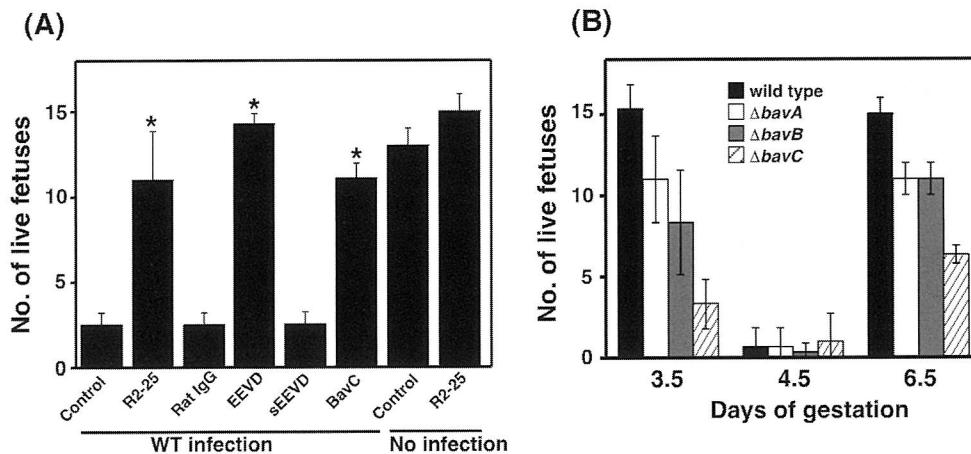
*bav* 遺伝子の欠損株が流産を引き起こすか否か妊娠マウスモデルを用いて検討したところ、野生株では妊娠 4.5 日後に菌を接種した場合にのみ流産が認められた。一方、*bav* 遺伝子の欠損株では妊娠 4.5 日以外の日に菌を接種した場合でも流産が認められ、流産の効率が増加することが示された (Fig. 7B)。

Hsc70 に結合するブルセラ菌側の因子として、TPR ドメイン蛋白質 (BavA, BavB, BavC) を同定した。当初、Hsc70 に結合する菌側因子は菌の細胞侵入を促進するものと考えていたが、実際はその逆で細胞侵入を阻害する作用を持つことが認められた。菌の細胞侵入を阻害するモノクローナル抗体はブルセラ菌の Bav

蛋白質と同様の働きをしているものと考えられる。なぜブルセラ菌は TGC への細胞侵入を阻害する因子を保有しているのかという新たな疑問が提示された。ブルセラ菌を含めた病原細菌の感染による流産は、病原体の感染時に必ず認められる訳ではなく、その頻度は事例により様々である。病原性の高い株が効率よく流産を引き起こすと考えていたが、ブルセラ菌には流産を回避する機構が存在し、流産は異物を排除しようとする生体反応の結果生ずる現象であるかもしれない。母体側から見ると感染した胎児は不要であり、流産し排除した方が種の保存としては有利に働く場合もある。一方、病原体側から見れば流産するよりも菌を保有した胎児が正常に分娩された方が、菌の生息域を広めるために有効である。胎盤の粘膜で引き起こされる細菌と宿主の攻防において、菌自体が宿主細胞への感染を制御するシステムを保有していると考えられる。おそらく、ブルセラ菌は Hsc70 のペプチド結合ドメインに結合し、TGC へ取り込まれる。これは IFN- $\gamma$  によって増強される。取り込まれたブルセラ菌は TGC 内で増殖し、TGC の細胞死が誘導され、その結果胎盤の形成阻害および流産が引き起こされるものと考えられる。ブルセラ菌は流産が引き起こされるのを阻止するために、TGC へ取込まれないように Bav 蛋白質を発現する。Bav 蛋白質は Hsc70 の C 末端ドメインに結合し、ペプチド結合ドメインの機能を阻害する。これによって菌は Hsc70 へ結合できなくなり、Hsc70 を介した菌の取り込みも阻害される。

以上の仮説を検証するために Bav 蛋白質を用いて、TGC が持つ免疫応答機能の解析をさらに進める予定である。特に BavC が培養上清に分泌すること、細胞侵入の阻害効果が最も高いことに注目している。BavA および BavB の菌体外への分泌は試験管内の環境では認められないが、生体内で発現している可能性を考えられる。また、リステリアの保有する TPR ドメイン蛋白質も同様の作用を示すことから、TGC の膜上に存在する Hsc70 が病原体を含めた異物の取り込みに重要な役割を果たしていると思われる。

**感染制御法の検討** 妊娠マウスに菌の細胞侵入を阻害するモノクローナル抗体 (Hsc70 の EEVD 配列を認識する抗体 R2-25) を静脈内投与した後、ブルセラ菌を感染させた場合、流産が阻害されることが示された (Fig. 7A)。また、合成した EEVD ペプチドを用いてマウスを免疫し、抗体価の上昇を確認した後妊娠させ、これにブルセラ菌を感染させた。モノクローナル抗体 R2-25 を投与した場合と同様に、流産の効率が低下した。さらに、リコンビナント BavC 蛋白質を菌感染の前に静脈内投与した場合も同様に、菌感染による流産が阻害された (Fig. 7A)。ブルセラ菌の TGC への感染を阻害する物質によって流産が阻害されることが示された。Hsc70 の C 末端領域に存在する EEVD 配列に抗体あるいは Bav 蛋白質が結合することによって、菌の TGC への侵入が阻害され、これによって流産を防ぐことができるものと考えられる。こ



**Fig. 7** Control of infectious abortion by protein interaction via EEVD motif of Hsc70. (A) Infectious abortion prevented by blocking EEVD motif of Hsc70. Pregnant mice were inoculated with R2-25, rat IgG (control) or BavC protein and immunized with EEVD or sEEVD (control) peptides. Control received no treatment. Statistically significant differences between the untreated control and antibody treated mice are indicated by asterisks (\*, P < 0.01). (B) Abortion induced by *bav* mutants. Pregnant mice were infected with the wild-type (black bars), *bavA* mutant (white bars), *bavB* mutant (grey bars), or *bavC* mutant (crosshatched bars).

これらの因子は細菌感染によって引き起こされる流産を予防するために有用な物質であると考えられる。

ブルセラ菌感染の解析により得られた成果をロタウイルスの感染制御に応用できるかどうか検討を行った。ブルセラ菌の感染を阻害するモノクローナル抗体は、ロタウイルスの感染を有為に阻害しなかった (Fig. 8)。Hsc70に対するポリクローナル抗体では感染が阻害される。ロタウイルスのVP5蛋白質がHsc70の基質認識ドメインに結合することが報告されている (Zárate *et al.*, 2003)。ブルセラ菌の感染を阻害するモノクローナル抗体はHsc70のC末端ドメインに存在するEEVD配列を認識し、基質認識ドメインの機能を負に調節していることが考えられるが、Hsc70とVP5の結合には影響を与えないものと推察された。

ブルセラ菌とロタウイルスの細胞侵入機構には共通点が認められるが、Hsc70の役割は異なると考えられる。ブルセラ菌もロタウイルスも細胞侵入部位にリピドラフトと呼ばれる脂質に富むミクロドメインを形成する (López & Arias, 2004, Watarai *et al.*, 2002)。

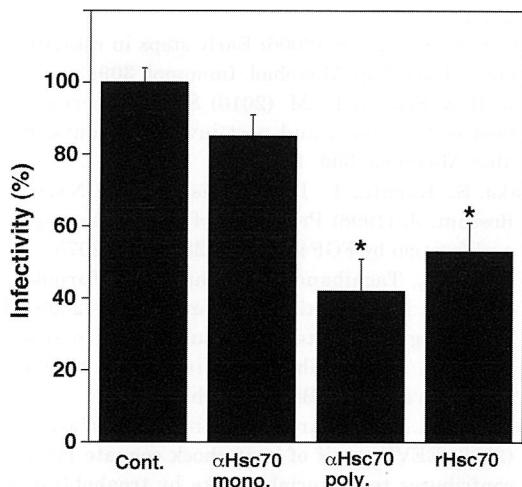


Fig. 8 Effect of anti-Hsc70 antibody R2-25 that inhibits bacterial infection on infectivity of rotavirus. Confluent monolayers of MA104 cells grown in 96-well plates were incubated with the indicated antibody or recombinant Hsc70 for 30 min 37°C, and then rotavirus was added. Data are expressed as percentages of the virus infectivity obtained when the cells were preincubated with PBS as a control. Data are the averages of triplicate samples from three identical experiments, and the error bars represent standard deviations. Statistically significant differences between control and antibody treatment are indicated by asterisks (\*, P < 0.01).

ここに集積してきた因子を利用して細胞侵入しているものと考えられる。そのうちの一つがHsc70であるが、ロタウイルスの場合は単にレセプターとして利用している。一方、ブルセラ菌の場合はHsc70の機能を調節し、菌自体が感染を制御しているものと推察される。しかし、この現象の菌感染における意義はまだ不明確である。今後、さらに研究を進めることによって、明らかにされることが期待される。

## 要 約

細胞内寄生菌と病原ウイルスは宿主細胞の中で増殖するという現象においては共通性が認められるが、感染機構は異なると考えられてきた。しかし、個々の病原体の病原因子の解析により、病原体の宿主細胞侵入に共通して認められる現象が知られるようになった。本研究は細菌とウイルスの細胞侵入に共通して関与する宿主細胞側因子の機能を利用して、両病原体の感染防御法を検討した。ブルセラ菌とロタウイルスは宿主細胞上に発現するHsc70を介して細胞侵入する。Hsc70の病原因子認識部位を解析し、機能ドメインを明らかにした。その情報をもとに、両病原体の感染を阻止する物質の検索を行った。ブルセラ菌の感染を阻害するモノクローナル抗体はHsc70のC末端領域に存在するEEVD配列を認識することが判明した。この情報をもとにHsc70に結合する菌側因子を3種同定した。これらの菌側因子のTPRドメインがEEVD配列を認識し、Hsc70と結合することが認められた。この菌側因子 (TPRドメイン蛋白質) の働きにより菌は宿主細胞へ侵入するものと予測されたが、結果はその逆であった。TPRドメイン蛋白質は菌とHsc70の結合、および菌の細胞侵入を阻害する機能を持つことが示された。菌の感染を阻害するモノクローナル抗体、および菌の産生するTPRドメイン蛋白質はHsc70の機能を負に調節し、菌の取り込みを阻害するものと考えられる。この現象の細菌感染における意義は未だ明確ではないが、細胞内寄生菌自体が感染を制御する因子を産生していることが示唆され、感染防御法構築に有用な知見であると考えられた。同様な現象がリストリア菌にも認められ、細胞内寄生菌全般に応用できるものと期待された。一方、菌の感染を阻害するモノクローナル抗体は、ロタウイルスの感染を有為に阻害しないことが認められた。ロタウイルスはHsc70を単純に受容体として利用しているが、細菌はHsc70の機能を巧みに調節し、宿主細胞への侵入効率を制御している。これらの細菌とウイルスは同一の宿主因子を介して感染しているが、その機構は異なると考えられる。

## 本助成で得られた研究成果の報告

## 口頭発表

- 1) 渡邊健太, 橋理人, 度会雅久 (2008). Hsc70 を介したブルセラ属菌の胎盤感染機構の解析. 第81回日本細菌学会総会 (名古屋).
- 2) 渡邊健太, 度会雅久 (2009a). EEVD motif of Hsc70 contributes to *Brucella abortus* infection in trophoblast giant cells. 第82回日本細菌学会総会 (京都).
- 3) 渡邊健太, 度会雅久 (2009b). Hsc70 を介したブルセラ属菌の胎盤感染時におけるTPR蛋白質の機能解析. 第148回日本獣医学会学術集会 (鳥取).
- 4) 申恩京, 渡邊健太, 度会雅久 (2010). マウスTG細胞におけるTLR2ならびにSR-B1の機能解析. 第149回日本獣医学会学術集会 (東京).
- 5) 渡邊健太, 度会雅久 (2010). Participation of ezrin in bacterial uptake by trophoblast giant cells. 第83回日本細菌学会総会 (横浜).

## 原著論文

- 1) Tachibana, M., Watanabe, K., Yamasaki, Y., Suzuki, H. & Watarai, M. (2008) Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *Microb. Pathog.* **45**: 105-109.
- 2) Watanabe, K., Tachibana, M., Tanaka, S., Furuoka, H., Horiuchi, M., Suzuki, H. & Watarai, M. (2008) Heat shock cognate protein 70 contributes to *Brucella* invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol.* **8**: 212.
- 3) Watanabe, K., Tachibana, M., Kim, S. & Watarai, M. (2009a) Participation of ezrin in bacterial uptake by trophoblast giant cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **7**: 95.
- 4) Watanabe, K., Tachibana, M., Kim, S. & Watarai, M. (2009b) EEVD motif of heat shock cognate protein 70 contributes to bacterial uptake by trophoblast giant cells. *J. Biomed. Sci.* **16**: 113.
- 5) Watanabe, K., Shin E. K., Hashino, M., Tachibana, M. & Watarai, M. (2010) Toll-like receptor 2 and class B scavenger receptor type I are required for bacterial uptake by trophoblast giant cells. *Mol. Immunol.* **47**: 1989-1996.

## 保存機関に寄託した菌株

ブルセラ菌はバイオセーフティーレベル3に属する細菌であるため、保存機関への寄託は難しい。

## 謝辞

本研究に対し3年間にもわたり助成して頂いた財団法人発酵研究所の関係者各位に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の一部を行ってくれた渡邊健太博士、申恩京博士、橋理人君に御礼申し上げます。

## 文献

- Ashida, H., Ogawa, M., Mimuro, H. & Sasakawa, C. (2009) *Shigella* infection of intestinal epithelium and circumvention of the host innate defense system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **337**: 231-255.
- Duncan, M.J., Shin, J.S. & Abraham, S.N. (2002) Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cell. Microbiol.* **4**: 783-791.
- Hirano, T., Kinoshita, N., Morikawa, K. & Yanagida, M. (1990) Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein nuc2+. *Cell* **60**: 319-328.
- Kim, S., Lee, D.S., Watanabe, K., Furuoka, H., Suzuki, H. & Watarai, M. (2005) Interferon-gamma promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiol.* **5**: 22.
- Kumar, Y. & Valdivia, R.H. (2009) Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe.* **5**: 593-601.
- López, S. & Arias, C.F. (2004) Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* **12**: 271-278.
- López, S. & Arias, C.F. (2006) Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **309**: 39-66.
- Sinha, B. & Fraunholz, M. (2010) *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 170-175.
- Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A. & Rossant, J. (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* **282**: 2072-2075.
- Watanabe, K., Tachibana, M., Tanaka, S., Furuoka, H., Horiuchi, M., Suzuki, H. & Watarai, M. (2008) Heat shock cognate protein 70 contributes to *Brucella* invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol.* **8**: 212.
- Watanabe, K., Tachibana, M., Kim, S. & Watarai, M. (2009) EEVD motif of heat shock cognate protein 70 contributes to bacterial uptake by trophoblast giant cells. *J. Biomed. Sci.* **16**: 113.
- Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S. & Katamine, S. (2003) Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J. Exp. Med.* **198**: 5-17.
- Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K. & Shirahata, T. (2002) Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell. Microbiol.* **4**: 341-355.
- Zárate, S., Cuadras, M.A., Espinosa, R., Romero, P., Juárez, K.O., Camacho-Nuez, M., Arias, C.F. & López, S. (2003) Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J. Virol.* **77**: 7254-60.

## 細胞表層の改良による有害重金属の吸着・回収が可能な 環境浄化酵母の創製

黒田 浩一

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Construction of yeast for bioremediation with the ability to adsorb and  
recover toxic heavy metals by improving the cell surface

Kouichi Kuroda

Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University  
Kitashirakawaiwake, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Metals are important materials that are frequently involved with our daily life in diverse ways. Environmental pollution by toxic heavy metals and reserves of rare metals essential as part of high-tech products has become a global issue. To solve the pollution problem, researchers are examining ways to adsorb and recover metals. One area of research is bioadsorption, in which microorganisms are used as metal adsorbents. Unlike conventional accumulation of metals in cells, cell surface adsorption by cell surface engineering is a unique and effective strategy for the construction of a novel bioadsorbent. In this study, arsenic-binding proteins from *Escherichia coli*, ArsA, ArsR, and ArsC mutants, were displayed on the yeast cell surface by fusion with the C-terminal consisting of 320 amino acids of  $\alpha$ -agglutinin. Displays of arsenic-binding proteins were confirmed by immunofluorescence labeling of cells. ArsR-displaying yeast, cultured in bufferized medium (pH 6.8) with 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES), showed enhanced adsorption of arsenite (III). For the adsorption of molybdenum, the cell surface display of ModE protein, which is a molybdate-binding transcriptional regulator from *E. coli*, was performed. Yeast cells displaying the C-terminal molybdate-binding domain of ModE could adsorb molybdate. Treatment of the cells with papain allowed the recovery of the molybdate that was adsorbed by the C-terminal domain of ModE on the cell surface. Furthermore, the substitution of amino acids involved in the metal recognition of ModE led to improved binding selectivity between molybdate and tungstate.

Key words: cell surface engineering, bioadsorption, metal recovery, arsenic, molybdate

### 緒 言

金属は生物にとって重要な物質であり、我々人間にとっても日常生活の様々な点で密接に関わっている。金属と生物との関わりから、金属は大きく分けて生体に必須なものと非必須なもの2つに分類することができる。すなわち、生物にとって必須な微量元素が存在し、食物などから積極的に摂取しなければならないものがある一方で、産業の発展に伴って環境汚染

有害金属が環境中に放出され、食物連鎖によって受動的に体内へ蓄積していくことにより毒性を示すものも存在する。しかし、必須な金属であってもそれが過剰に存在すれば毒性を示し、有害金属であってもわずかであれば毒性を示さない。銅や亜鉛は生体内の様々な反応を司る酵素の補因子として必須の金属であるが、高濃度存在すると酵素と無差別に結合し、本来の金属イオン補因子が結合できなくなることによって機能が阻害される。また、製品中に用いる素材としても重要であり、特にレアメタルは「産業のビタミン」とも呼ばれ、様々なハイテク製品に欠かせない金属となっており、国際価格が大きく上昇するなど、その確

保が困難になりつつある。また、大量に使われるようになつた結果、レアメタルによる新たな環境汚染も懸念されている。

このような状況の中、金属の吸着・回収は環境浄化やレアメタル資源の確保において大きな貢献が期待できる。金属吸着の方法としては従来、物理化学的手法がよく用いられてきたが、コスト面や特異性、低濃度でも吸着可能であることから、生体機能を用いたバイオ技術による吸着が近年注目を集めており、特に水圈中の金属吸着に関しては微生物を吸着剤とするバイオアドソーベント（生物吸着剤）が有望視されている（Gadd & White, 1993）。

生物は環境中の金属イオン濃度に関わらず、生体内の金属イオン濃度を有毒となる一定の範囲に維持するシステムを有している。そのシステムにおいて様々な金属結合タンパク質が働いており、バイオアドソーベントの開発においては、こういった生体内の金属結合タンパク質の金属認識・結合能を有効利用するのである。微生物による金属イオン吸着は（1）細胞表層での吸着、（2）細胞内への取り込みと蓄積、といった2つの機構に分けることができる。これまでの研究では後者に着目したものがほとんどであり、金属結合タンパク質を細胞内に過剰生産させることによって、細胞内への蓄積能を向上させるというものであった（Pazirandeh *et al.*, 1995）。しかし、蓄積した金属イオンを回収するためには細胞を破碎する必要があり、蓄積・回収後の細胞の再利用

は不可能である。一方、細胞表層での吸着は、吸着に要する時間も短く、回収の際にも細胞を破碎する必要がないため、一度吸着・回収に用いた細胞を再利用することも可能である。そのため、細胞表層に金属イオン吸着・回収能を付与することによって、より魅力的なバイオアドソーベントの創製が期待できる（Fig. 1）。

様々な機能性タンパク質・ペプチドの細胞表層提示により細胞表層をデザインする「細胞表層工学」によって、細胞表層への金属イオン吸着・回収能の付与が可能となった。細胞表層工学では、細胞表層に局在するタンパク質の分子情報を利用し、これを提示する目的タンパク質に融合して発現させることによって、細胞表層上に集積させる。筆者らの開発してきた酵母ディスプレイ法では、酵母の性凝集に関わる $\alpha$ -アグルチニンという細胞壁タンパク質の、N末端の分泌シグナルとC末端のGPIアンカー付着シグナルを含む細胞壁アンカリングドメインを目的タンパク質にN末端とC末端にそれぞれ融合することによって、様々なタンパク質が細胞表層提示されている（Fig. 2）（Ueda & Tanaka, 2000a; Ueda & Tanaka, 2000b）。実際、筆者らは酵母ディスプレイ法によって酵母の細胞表層に重金属イオン結合タンパク質・ペプチドを提示することにより、細胞表層上で重金属イオンの吸着が可能な環境浄化酵母の創製に成功してきた（Kuroda *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 2002; Kuroda & Ueda, 2003；

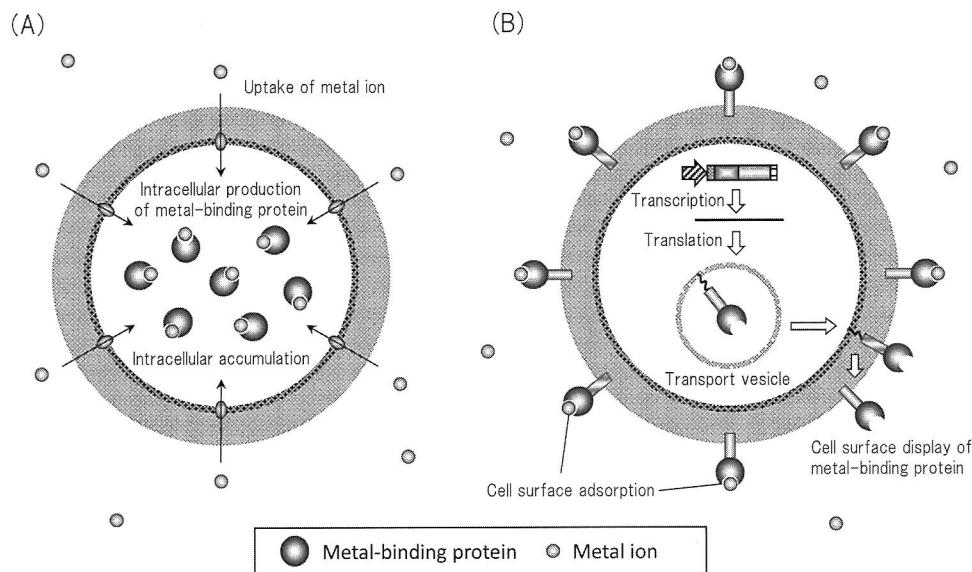


Fig. 1 Two-types of microbial adsorption of metal ions toward the construction of a novel bioadsorbent: (A) intracellular accumulation and (B) cell surface adsorption.

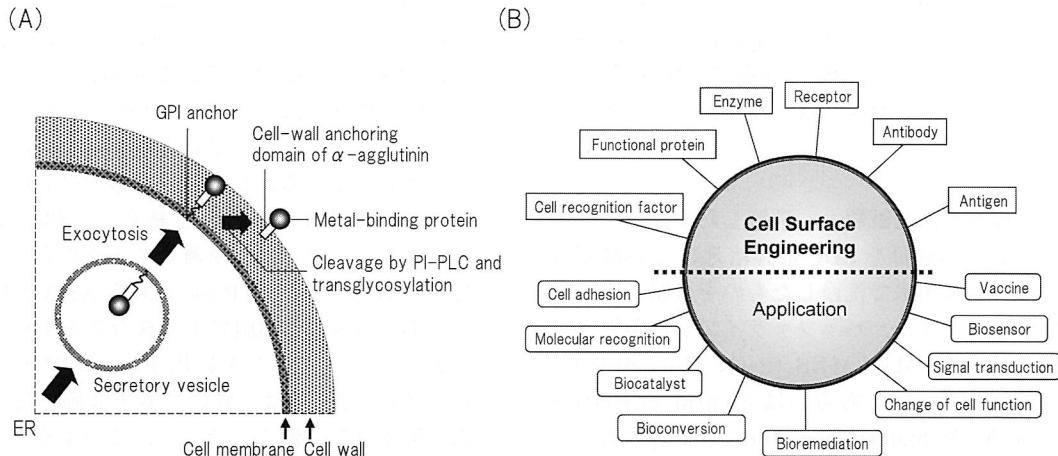


Fig. 2 (A) Mechanism of yeast cell surface display system and (B) its application.

Kuroda & Ueda, 2006). そこで本研究では、金属の中でも特に人体への毒性が大きな問題となっているヒ素や、近年レアメタルの1つとして需要が増大しているモリブデンをターゲットとし、金属を吸着・除去しながら回収までを視野に入れた金属除去・回収酵母の創製を試みた。

### 実験方法

**菌株と培地** *Saccharomyces cerevisiae* BY4741/Δ<sup>sed1</sup>株 (*MATA*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*, *sed1::kan MX4*) (Euroscarf, Frankfurt, Germany) を細胞表層提示するホスト株として用いた。この株に発現プラスミドを導入した形質転換体は SDC 培地 (0.67%yeast nitrogen base without amino acids, 2% グルコース, 0.5% カザミノ酸, 0.002% ヒスチジン, 0.003% ロイシン, 0.003% メチオニン) にて培養した。遺伝子構築には *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  株を用い, 100 μg/ml のアンピシリンを含む LB 培地 (1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 0.5%NaCl) にて培養した。また、ヒ素耐性を示す *E. coli* J53/R46 株は LB 培地にて培養した。

**細胞表層提示のための融合遺伝子構築** ヒ素耐性を示す *E. coli* J53/R46 株の保持する R46 プラスミド上に存在する *ars* オペロン (Bruhn et al., 1996) を鋳型とし、PCR によって *ArsA*, *ArsR*, *ArsC* をコードする遺伝子をそれぞれクローニングした。また *E. coli* DH5 $\alpha$  株のゲノムを鋳型とし、PCR によって *ModE* をコードする遺伝子の ORF をクローニングした。ク

ローニングした各々の金属結合タンパク質をコードする遺伝子は、細胞表層提示用カセットベクター pULD1 (Kuroda et al., 2009) 上の *Rhizopus oryzae* 由来グルコアミラーゼの分泌シグナルと *S. cerevisiae* 由来  $\alpha$ -アグルチニンの C 末端 320 アミノ酸残基の間に存在するマルチクローニングサイト (*Bgl* II, *Xho* I) に挿入した。その結果できたプラスミド上にはグルコース存在下にて構成的に発現する *GAPDH* プロモーターの下流に、N 末端側から分泌シグナル、金属結合タンパク質、FLAG タグ、 $\alpha$ -アグルチニンの C 末端 320 アミノ酸残基をコードする塩基配列が連結した融合遺伝子を含む (Fig. 3)。さらに *ArsC* をコードする遺伝子を組み込んだものについては、1 アミノ酸の置換変異をもった *ArsC* (R60K) を提示するため、site-directed mutagenesis 法によって該当するアミノ酸をコードする塩基配列に変異を導入した。DNA シーケンサーにて構築した融合遺伝子の配列を確認したのち、酢酸リチウム法 (Ito et al., 1983) にて酵母に導入し、SDC 寒天培地上にて形質転換体を選抜した。

**蛍光抗体染色による提示の確認** SDC 液体培地にて生育させた形質転換体 PBS バッファー (pH 7.4) で洗浄し、3.7% のホルムアルデヒドを含む PBS バッファー (pH 7.4) 中に懸濁してホルムアルデヒド固定を行った。次に細胞を PBS バッファー (pH 7.4) にて 3 回洗浄したのち、1% の牛血清アルブミンを含む PBS バッファー (pH 7.4) 中に懸濁して 30 min プロッキングを行った。その後 1 次抗体として mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody を加え、室温で 1.5 h 反応させた。さらに PBS バッファー (pH 7.4)

で洗浄後、2次抗体として蛍光標識した抗 IgG 抗体 (Alexa Fluor488-goat anti mouse IgG) と室温で 1.5 h 反応させた。反応後の細胞を PBS buffer (pH 7.4) にて洗浄した後、蛍光顕微鏡による観察を行った。

**金属イオン吸着・回収試験** 構築した金属イオン結合タンパク質提示酵母を SDC 液体培地にて48時間培養し、集菌して滅菌水で洗浄したものを金属イオン吸着試験に供した。また、バッファライズした条件下での培養には、50 mM の MES [2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid] あるいは 50 mM の PIPES [piperazine-N, N'-bis(ethanesulfonic acid)] を加え、pH をそれぞれ 6.8 と 7.2 に調整した培地にて培養を行った。100 μM のターゲット金属を含む金属水溶液中に、構築した金属イオン結合タンパク質提示酵母を OD<sub>600</sub>=20 となるように添加し、振とうさせながら 30°C にて 2 時間吸着反応を行った。反応後の溶液を遠心分離して細胞を除き、上清中に含まれる残存金属イオンを ICP-MS によって定量した。また、細胞表層にて吸着した金属イオンを回収するため、吸着反応を行った酵母を PBS バッファー (pH7.4), 50 mM PIPES [piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid)] バッファー (pH 7.5), 50 mM TAPS [N-tris (hydroxymethyl) methyl-3-aminopropanesulfonic acid] バッファー (pH 9.0) などの各種バッファー中に懸濁し、5 mg/ml のパパインで 30°C, 2 h 処理した。処理後、バッファー中に遊離した金属イオンを ICP-MS により定量し、吸着した金属イオンの回収を評価した。

## 結果

**各種ヒ素結合タンパク質の細胞表層提示** ヒ素耐性を示す大腸菌にはヒ素耐性オペロン (*ars* オペロン) が備わっており、ヒ素を細胞内に取り込むとこれを検知してヒ素排出システムが誘導され、ヒ素を細胞外に排出する。この *ars* オペロンは 2つの調節遺伝子

(*arsR*, *arsD*) と 3つの構造遺伝子 (*arsA*, *arsB*, *arsC*) から構成されている (Carlin *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1998)。調節因子である ArsR タンパク質はヒ素のない環境下ではオペロンのオペレーター/プロモーター部位に結合することで *arsA*, *arsB*, *arsC* 遺伝子の発現を抑制している。しかし、細胞内に 3 倍のヒ素が入ると ArsR は 3 倍のヒ素と結合して構造変化を起こし、オペレーターから解離して下流の各 *ars* 遺伝子の発現を誘導する。ATPase である ArsA と膜タンパク質である ArsB は細胞膜上で複合体を形成し、3 倍のヒ素オキシアニオンを排出するポンプとして機能する。また、ArsC は 5 倍のヒ素を 3 倍に還元するヒ素還元酵素として働く。そこで、このようなヒ素耐性システムにおいて機能しているタンパク質のヒ素認識・結合能に着目し、酵母細胞表層提示を試みた。

水圈中でヒ素は最も毒性の高い無機ヒ素として主に存在しており、3 倍と 5 倍の 2種類の化学形態をとる。ArsA, ArsR はともに 3 倍のヒ素に対して結合能を示すタンパク質であるが、5 倍のヒ素にも対応するため ArsC 変異体の利用も試みた。ArsC は 4ヶ所のアミノ酸残基で 5 倍のヒ素を結合し、60番目のアルギニンが還元反応に関与しているが、この ArsC 変異体は 60 番目のアルギニンをリシンに変異させたもの (R60K) であり、結合能は保持したまま還元能のみが失われた変異体である (DeMel *et al.*, 2004)。ヒ素耐性を与えるプラスミド R46 から PCR により *arsA*, *arsR*, *arsC* 遺伝子をクローニングし、細胞表層提示用カセットベクター pULD1 に組み込んで融合遺伝子を構築した (Fig. 3)。*arsC* を組み込んだものについては ArsC (R60K) を発現するよう、さらに変異を導入した。構築したプラスミドを酵母に導入して発現を行い、細胞表層提示を確認するため、目的タンパク質の C 末端にあらかじめ融合しておいた FLAG タグに対する抗体を用いた蛍光抗体染色を行った。その結果、融合遺伝子をもたないコントロールプラスミドを導入した細胞では蛍光が見られなかったのに対し、今回作製した細胞は細胞表層部分において 2次抗体によ

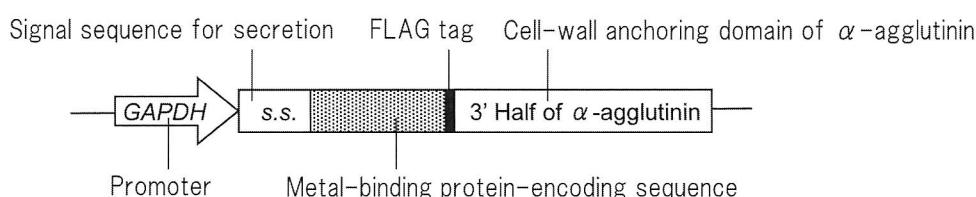
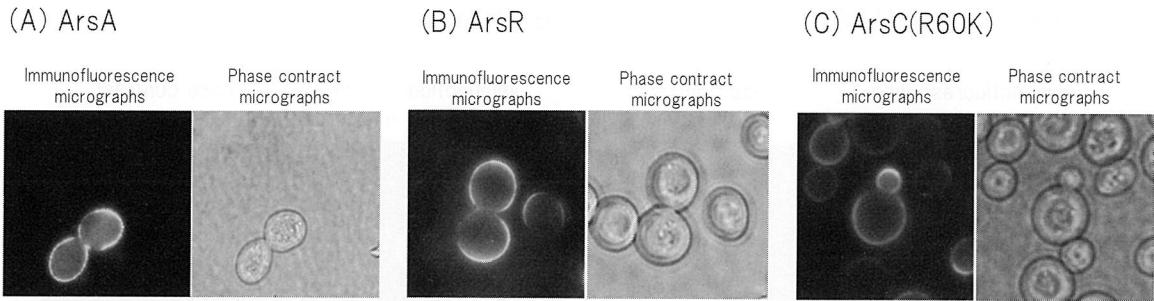


Fig. 3 Structure of fusion gene for cell surface display of metal-binding protein on yeast cell surface.



**Fig. 4** Confirmation of cell surface display of arsenic-binding proteins by immunofluorescence labeling using anti-FLAG antibody. (A) ArsA display, (B) ArsR display, (C) ArsC(R60K) display.

**Table 1** Adsorption of arsenite ( $\text{As}^{3+}$ ) by ArsR-displaying yeast in  $100\mu\text{M}$  arsenite solution (pH 6.5)

Samples	Non-buffered		MES		PIPES	
	Control	Displayed ArsR	Control	Displayed ArsR	Control	Displayed ArsR
Adsorption ( $\times 10^7 \text{ As (III) / cell}$ )	0.96	0.67	3.03	5.87	0.82	2.57

る蛍光が観察され、ArsA, ArsR, ArsC (R60K) といった目的タンパク質の細胞表層提示を確認することができた (Fig. 4).

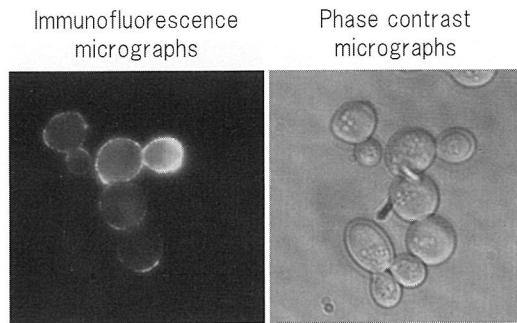
ヒ素結合タンパク質提示酵母のヒ素吸着能 蛍光抗体染色によって提示が確認された ArsA, ArsR 提示酵母を用いて、亜ヒ酸溶液 (pH 6.5) に懸濁し、吸着試験を行った。ArsA 提示酵母については期待したような吸着能の増大は見られなかった。ArsR 提示酵母についても吸着能の増大は見られず、培養中に提示した ArsR が失活している可能性が考えられたため、MES バッファーあるいは PIPES バッファーでそれぞれ pH 6.8, pH 7.2 にバッファリングした培地にて培養し、吸着試験に供した。その結果、バッファリングしていない通常の培地で培養した場合には吸着量の増大が見られなかつたのに対し、MES でバッファリングした培地で培養した場合には亜ヒ酸吸着量の増大が見られた (Table 1)。したがって、細胞表層提示した ArsR が亜ヒ酸結合活性を保持しており、酵母に亜ヒ酸吸着能を付与することができた。

モリブデン結合タンパク質 **ModE** の細胞表層提示ヒトや植物をはじめとする様々な生物においてモリブ

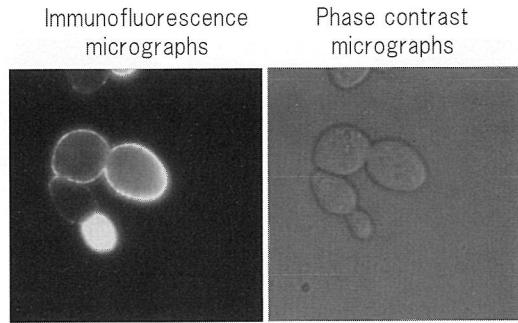
デンを補因子として機能するモリブデン結合タンパク質が存在するため、これらのタンパク質のもつモリブデン認識・結合能力に着目した。大腸菌には、環境中のモリブデンを取り込むためのトランスポーターが備わっており、ペリプラズム結合タンパク質である ModA、膜タンパク質である ModB、ATPase である ModC からなる (Self *et al.*, 2001)。このようなモリブデンの取り込みに関わる遺伝子は *modABCD* と呼ばれるオペロンを形成しているが、その発現制御は ModE が行っており、ModE とモリブデン酸イオンが結合すると発現が誘導される。また ModE は 262 アミノ酸のタンパク質であり、N 末端から DNA 結合ドメイン、リンカードメイン、モリブデン酸結合ドメインの 3 種類のドメインから構成されている (Schuttelkopf *et al.*, 2003)。そこでこのタンパク質のモリブデン酸イオン結合能を利用し、ModE 全長のほかに C 末端のモリブデン酸結合ドメインのみといった 2 種類の細胞表層提示を試みた (Nishitani *et al.*, 2010)。

ModE を細胞表層提示するため、大腸菌ゲノムから *modE* 遺伝子をクローニングし、その全長と C 末端ドメイン（モリブデン酸結合ドメイン）をコードする配列を pULD1 に組み込んで発現させ、 $\alpha$ -アグルチニン

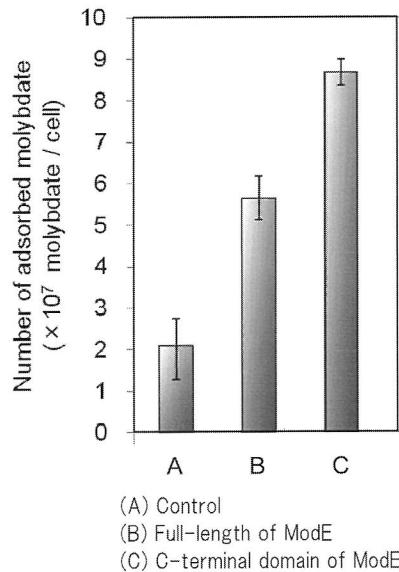
(A) Full-length of ModE



(B) C-terminal domain of ModE



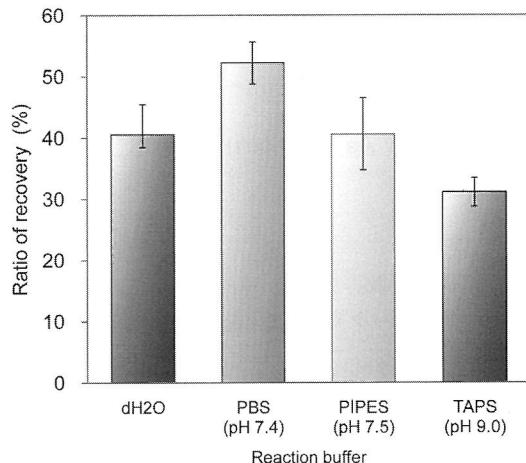
**Fig. 5** Confirmation of cell surface display of ModE proteins by immunofluorescence labeling using anti-FLAG antibody. (A) Display of full-length of ModE, (B) Display of C-terminal domain of ModE. These data are the averages  $\pm$  standard deviations of three independent data.



**Fig. 6** Adsorption of molybdate by ModE-displaying yeasts in 100  $\mu$ M molybdate solution (pH3.0)  
(A) Control, (B) Display of full-length of ModE, (C) Display of C-terminal domain of ModE.

との融合タンパク質として細胞表層提示を行った。FLAG タグに対する抗体を用いた蛍光抗体染色の結果、ModE の全長、C 末端ドメインとともに細胞表層提示を確認することができた (Fig. 5)。

**ModE** 提示酵母のモリブデン吸着能と回収 ModE 全長および ModE の C 末端ドメインを提示した酵母を用いてモリブデン酸イオン吸着試験を行った。その結果、コントロール酵母と比べて吸着量の増大が見ら



**Fig. 7** Recovery of adsorbed molybdate by papain treatment in various buffers. These data are the averages  $\pm$  standard deviations of three independent data.

れ、特に C 末端ドメインのみを提示した場合に最も吸着能が高いことが分かった (Fig. 6)。次に、ModE の C 末端ドメイン提示酵母に吸着したモリブデン酸イオンをどれだけ回収することができるか検討を行った。具体的には、パパインを用いて細胞表層上の ModE を切断することでモリブデン酸イオンのリリースを試みた。パパイン処理に用いるバッファーを 4 種類検討したところ、PBS バッファーを用いたときに約 50% の回収効率が得られた (Fig. 7)。また、パパイン処理した細胞を再培養したところ、正常に生育して細胞表層に再び ModE が提示され、先ほどと同様の吸着能が確認された。そのため、ModE の細胞表層提示によって

モリブデン酸イオンを吸着・回収することのできる新たな酵母を分子育種することができた。

**選択的吸着に向けた改変** ModE はモリブデン酸イオンだけでなく、同属元素であるタングステン酸イオンに対しても結合能を示す。構築した ModE 提示酵母もタングステン酸イオン吸着能を示した。実際の現場での利用を考えた際、回収先では様々な金属が混在している場合が多く、選択的吸着能が求められる。そこで ModE を改変することにより、結合選択性の向上を試みた。ModE は 6 つのアミノ酸残基を介してモリブデン酸イオン、タングステン酸イオンと結合するため、これらのアミノ酸に変異を導入し、結合選択性への影響を調べた。その結果、モリブデン酸イオンに対する吸着能が ModE を提示していないコントロール酵母と同程度にまで低下するが、タングステン酸イオンに対する吸着能は維持されるといった、選択的吸着能を示す ModE 変異体提示酵母も創製することができた。

## 考 察

以上のように、生物のもつ金属結合タンパク質の金属認識・結合能を利用し、細胞に金属イオン吸着能を付与する新たなストラテジーとして、細胞表層を吸着の場と考え、細胞表層工学によって金属結合タンパク質を提示した。これによって、従来の細胞内蓄積の系では達成することのできなかった吸着後の回収や、細胞の再利用など新たな可能性を見い出すことができた。環境浄化を目指したヒ素吸着能の付与では、ArsR の提示によって吸着能を増大させることができた。しかし、吸着能を発揮するためには培養中の pH に制限が必要であり、当初吸着能が見られなかった ArsA 提示酵母に関しても培地 pH の調整により改善できる可能性が示唆された。また、このことは ArsR が pH による影響を受けやすく、実際の現場に応用していくのに際して、このタンパク質自体の pH 安定性を向上するべく改変していく必要があると考えられた。ArsC (R60K) については今回、細胞表層提示をするにどまつたが、今後解析を進めていき 5 倍のヒ素に対する吸着能を確認することができれば、1 つの細胞表層上に 3 倍のヒ素を吸着する ArsR と 5 倍のヒ素吸着する ArsC (R60K) とを同時に提示することによって、自然界に存在する 3 倍、5 倍の両方のヒ素に対応できるバイオアドソーベントになると考えられる。

近年の需要増大、またそれによる新たな環境汚染も懸念されているレアメタルの 1 つであるモリブデンを

ターゲットとし、ModE を細胞表層提示することによって、モリブデン吸着能を示す新たな酵母を分子育種することができた。ModE の全長を提示したもの、C 末端ドメインのみを提示したものを比較すると後者のほうが高い吸着能を示した。蛍光抗体染色後の細胞の蛍光強度を測定し、その提示数を見積もったところ、C 末端ドメインのみの方が多い提示されていることが分かり、このことが吸着能に差異を生じた原因になっていると考えられた。また、吸着後の細胞をパパインで処理することにより、吸着したモリブデンのうち約 50% を回収することができ、細胞の再利用も可能であった。今後、より簡便で高効率な回収方法をさらに検討していく余地はあるものの、この結果は有害重金属の除去だけでなく、有用金属の回収においても細胞表層を吸着の場とした系が有効であるということを意味する。ModE はモリブデン酸イオンだけでなくタングステン酸イオンも結合することが知られているが、ModE の金属認識・結合に関与するアミノ酸残基に変異を導入することによって、選択的吸着を達成することもできた。実際の回収ターゲットとなる金属溶液中には目的の金属以外の様々な金属が混在している場合が多く、このような選択的吸着は今後非常に重要なようである。

本研究で採用した細胞表層での吸着が従来の細胞内蓄積型と大きく異なる点は、吸着した金属の回収が容易であること、吸着に用いた細胞の再利用が可能であること、そしてさらに注目すべき点は選択的吸着能の付与が可能になるという点である。細胞表層工学は、細胞表層へ新機能を付与する手法としてだけではなく、変異を導入したタンパク質が提示された細胞を 1 つの支持体として、タンパク質の精製・濃縮操作を必要とせず、提示したタンパク質の機能（選択的金属結合能）を解析することのできる有用な分子ツールでもある。すなわち、金属イオン結合タンパク質の改変と金属イオン吸着酵母の分子育種が同時に達成できるのである。したがって、今回 ModE の改変によって実現できたように、各種金属イオンを選択的に結合する新しいタンパク質の創製も可能であり、目的の金属に応じて細胞表層提示するタンパク質を付け替えることによって、多様な有害金属や金属資源に対してフレキシブルに対応することができるため、金属循環型社会システムの構築にも貢献できると思われる。

## 要 約

金属は私たちの日常生活に様々な意味で密接に関わり合っている重要な物質である。有害重金属による環

境汚染や、ハイテク製品に欠かせないレアメタルの確保が世界的な問題となっている。その解決に向け、金属の吸着・回収技術、中でも微生物を吸着剤として用いるバイオアドソープションが注目されている。微生物による吸着はこれまで細胞内への蓄積が主流であったが、本研究では細胞表層を吸着の場と捉え、細胞表層工学により金属イオン結合タンパク質を酵母の細胞表層に提示することによって新たな酵母の分子育種を行った。有害重金属であるヒ素を吸着する酵母を構築するため、ヒ素耐性を示す大腸菌から3価のヒ素結合能をもつArsA及びArsRタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、細胞表層提示を行った。ArsA提示酵母では吸着能の増大は見られなかったものの、ArsR提示酵母では培地中のpHを中性付近に保ちながら培養することにより、野生株と比べて亜ヒ酸吸着量の増大が見られた。ヒ素は自然界の水圏で3価だけでなく5価としても存在するため、5価のヒ素結合能をもつArsC(R60K)変異体を作製し、これを細胞表層に提示した。また、レアメタルの1つであるモリブデンを吸着ターゲットとし、大腸菌由来のモリブデン酸結合タンパク質ModEの全長及びC末端のモリブデン酸結合ドメインを細胞表層提示した。その結果、ModE提示酵母は野生株と比べて吸着量の増大が見られ、特にC末端ドメインのみを提示した場合に最も高い吸着能を示した。さらに、ModE提示酵母はモリブデン酸イオンだけでなくタングステン酸イオンも吸着するが、ModEの金属認識・結合に関わっているアミノ酸残基に変異を導入することによって、タングステン酸イオンのみを吸着するといった選択的吸着能の付与にも成功した。

### 本助成で得られた研究成果の報告

#### 口頭発表

- 1) Kuroda, K. & Ueda, M. (2007). Bioremediation of metal pollution - adsorption of metal ions by cell surface design and its application to metal recovery. II Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007) (Seville, Spain).
- 2) 黒田浩一、植田充美（2008）. 細胞表層を利用した金属イオンの吸着・回収－アーミング技術による細胞表層デザイン－. メタルバイオテクノロジー研究部会シンポジウム（大阪）.
- 3) 植田充美、黒田浩一（2008）. 細胞表層を利用した金属イオンの吸着・回収－アーミング技術による細胞表層デザイン－. 第60回日本生物工学会大会（仙台）.
- 4) 植田充美、黒田浩一（2009）. アーミング技術によるメタルバイオテクノロジー：レアメタル資源の選別回収への展開. 2009年度日本農芸化学会大会（福岡）.

- 5) 西谷崇、島田まり子、黒田浩一、植田充美（2009）. モリブデンの選別集積回収をめざした酵母の分子育種. 第61回日本生物工学会大会（名古屋）.
- 6) 黒田浩一、西谷崇、島田まり子、植田充美（2010）. タンパク質分子改変により選択性を付与したレアメタル吸着・回収酵母の創製. 2010年度日本農芸化学会大会（東京）.
- 7) Kuroda, K. & Ueda, M. (2010). Construction of bioadsorbent for rare metal ion recovery by cell surface design. 110th General Meeting of American Society for Microbiology (San Diego, USA).

#### 原著論文

- 1) 黒田浩一、島田まり子、植田充美（2007）. 細胞表層デザインによる金属の高効率回収バイオ技術. 工業材料 55: 66-70.
- 2) 黒田浩一（2008）. レアメタルや重金属を吸着・回収するバイオアドソーベント. 微生物によるものづくり－化学法に代わるホワイトバイオテクノロジーの全て－（第6章、第5節），pp.324-332，シーエムシー出版、東京.
- 3) 黒田浩一、三浦夏子（2008）. 金属イオン吸着・回収に向けた細胞表層デザインと吸着分子の創製. 日本生物工学会誌 86: 280-282.
- 4) 植田充美、黒田浩一（2008）. アーミング技術による細胞表層デザインの展開－環境浄化からレアメタル・レアアース資源の選別回収へ－. 日本生物工学会誌 86: 617-619.
- 5) 植田充美、黒田浩一（2009）. アーミング技術によるメタルバイオテクノロジー：レアメタル資源の選別回収への展開. J. Environ. Biotechnol. 9: 17-24.
- 6) 黒田浩一、植田充美（2009）. 細胞表層工学による新しいバイオアドソーベント－細胞表層を利用した金属イオンの吸着・回収リサイクル－.“メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収”（第4章、第1節），pp.97-103，シーエムシー出版、東京.
- 7) 植田充美、黒田浩一（2009）. 多様なレアメタル・レアアースを個別に選別して特異的に回収することを可能にするアーミング技術の戦略.“メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収”（第6章、第1節），pp.201-207，シーエムシー出版、東京.
- 8) Nishitani, T., Shimada, M., Kuroda, K. & Ueda, M. (2010). Molecular design of yeast cell surface for adsorption and recovery of molybdenum, one of rare metals. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86: 641-648.
- 9) Kuroda, K. & Ueda, M. (2010). Engineering of microorganism towards recovery of rare metal ions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 53-60.

#### 謝 辞

本研究に対し、3年間多大なる助成を賜りました財團法人発酵研究所に厚く御礼申し上げます。また、私とともに研究の遂行に協力してくれた、大学院生の島田まり子さん、西谷崇君に深謝いたします。

## 文 献

- Bruhn, D. F., Li, J., Silver, S., Roberto, F. & Rosen, B. P. (1996). The arsenical resistance operon of IncN plasmid R46. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**: 149-153.
- Carlin, A., Shi, W., Dey, S. & Rosen, B. P. (1995). The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimicrobial resistance. *J. Bacteriol.* **177**: 981-986.
- DeMel, S., Shi, J., Martin, P., Rosen, B. P. & Edwards, B. F. (2004). Arginine 60 in the ArsC arsenate reductase of *E. coli* plasmid R773 determines the chemical nature of the bound As (III) product. *Protein Sci.* **13**: 2330-2340.
- Gadd, G. M. & White, C. (1993). Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology? *Trends Biotechnol.* **11**: 353-359.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.
- Kuroda, K., Shibasaki, S., Ueda, M. & Tanaka, A. (2001). Cell surface-engineered yeast displaying a histidine oligopeptide (hexa-His) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 697-701.
- Kuroda, K., Ueda, M., Shibasaki, S. & Tanaka, A. (2002). Cell surface-engineered yeast with ability to bind, and self-aggregate in response to, copper ion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 259-264.
- Kuroda, K. & Ueda, M. (2003). Bioadsorption of cadmium ion by cell surface-engineered yeasts displaying metallothionein and hexa-His. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 182-186.
- Kuroda, K. & Ueda, M. (2006). Effective display of metallothionein tandem repeats on the bioadsorption of cadmium ion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**: 458-463.
- Kuroda, K., Matsui, K., Higuchi, S., Kotaka, A., Sahara, H., Hata, Y. & Ueda, M. (2009). Enhancement of display efficiency in yeast display system by vector engineering and gene disruption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**: 713-719.
- Nishitani, T., Shimada, M., Kuroda, K. & Ueda, M. (2010). Molecular design of yeast cell surface for adsorption and recovery of molybdenum, one of rare metals. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 641-648.
- Pazirandeh, M., Chrisey, L. A., Mauro, J. M., Campbell, J. R. & Gaber, B. P. (1995). Expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene in *Escherichia coli* and its effect on heavy-metal uptake. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 1112-1117.
- Schuttelkopf, A. W., Boxer, D. H. & Hunter, W. N. (2003). Crystal structure of activated ModE reveals conformational changes involving both oxyanion and DNA-binding domains. *J. Mol. Biol.* **326**: 761-767.
- Self, W. T., Grunden, A. M., Hasona, A. & Shanmugam, K. T. (2001). Molybdate transport. *Res. Microbiol.* **152**: 311-321.
- Ueda, M. & Tanaka, A. (2000a). Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface. *Biotechnol. Adv.* **18**: 121-140.
- Ueda, M. & Tanaka, A. (2000b). Cell surface engineering of yeast: construction of arming yeast with biocatalyst. *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 125-136.
- Xu, C., Zhou, T., Kuroda, M. & Rosen, B. P. (1998). Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. *J. Biochem.* **123**: 16-23.

## 特定研究助成の研究報告

助成期間：平成19年4月～平成22年3月

## 我が国における微生物の多様性解析とインベントリー データベースの構築

—亜熱帯域と冷温帯域の比較から—

関 達 治

大阪大学生物工学国際交流センター  
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

Comparing the microbial diversity in subtropical and cold latitudes in Japan with the goal of establishing a database for microbial inventory

Tatsuji Seki

International Center for Biotechnology, Osaka University  
2-1 Yamada-oka, Suitashi, Osaka 565-0871, Japan

Elucidation of the microbial diversity is essential not only for their protection but also to ensure the sustainable use of microorganisms in our life. The research, which was consisted of three projects was focused on the diversity analyses of mycobionta, yeasts and actinomycetes in two distinct zones of Japan, Iriomote Island as a subtropical latitude and Rishiri Island as a cold latitude, to establish a database for microbial inventory. The fungal flora was studied exhaustively by isolating strains belonging to a wide range of two pseudofungi in stramenopiles, and Zygomycota, Ascomycota, and Basidiomycota in Kingdom Fungi. According to the analysis of the more than 500 species identified, including new species candidates and newly known species in Japan, it was noted that the subtropical and the cold latitude, respectively, hold its own diversity, denying the conventional idea that the species diversity in subtropical latitude was wider than that in the cold latitude. Diversity analysis of the yeast was carried out using 1,528 isolates, which were identified as 278 species. Out of these species, 143 species were recognized as new species. It is noteworthy that the number of species isolated in two zones corresponded to 20% of 1,500 species cited in the new edition (fifth edition) of *The Yeasts, A Taxonomic Study* (2010). In the analysis of the actinomycetes, 1,770 isolates were classified into 328 species. According to the estimation using 16S rDNA analysis, it was conclude that 164 of those species may be proposed as new species. The variety of the actinomycetes genus and species among the isolated strains in Iriomote Island was found to be wider meaningfully than that in Rishiri Island. However, it was noteworthy that the actinomycete flora at cold zone in Japan is significantly diverged with wide variety likely as that at subtropical zone, though the numbers of overlapped genus and species in the both island were limited. Conclusively it was suggested strongly that the microbiological diversity in Japan might be wide enough, and the more variety of microorganisms was expected to be isolated according to application of various resource and methods. Moreover, the collaborative research might contribute in the establishment of microbial inventory by depositing 955 strains (794 fungi, 50 yeasts, and 111 actinomycetes) at the NITE (National Institute of Technology and Evaluation) Biological Resource Center (NBRC), Japan Collection of Microorganisms (JCM, RIKEN) and/or appropriate organizations for microbial culture collection.

Key words: microbial inventory, fungi, yeast, actinomycetes

---

E-mail: t3seki@icb.osaka-u.ac.jp

共同研究者：景山幸二（岐阜大学流域研科学研究センター），高島昌子（独立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），早川正幸（山梨大学大学院医学工学総合研究部）

### はじめに

生物多様性条約の発効（1993年）を契機として生物資源の多面にわたる重要性が認識されその保全が社会的に認識されるようになった。その中にあって微生物

は、自然環境における物質循環での重要性が再認識されるとともに、医薬や食料など工業生産における資源としての重要性が再認識されるようになった。我が国では国家戦略の一環として独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）に生物遺伝資源センターが設立（2002年4月）され、国内の微生物資源の収集、保存、提供を行うとともに、国際戦略としての海外との資源利用に関する取り組みをアジア諸国中心に行っており、微生物資源の確保と利用促進を積極的に行っている。さらに、新たな微生物資源を求めて、日本とは自然環境の異なる諸外国においても多様性研究と生物種の確保に関する研究が精力的に試みられている。

微生物を含む生物の多様性の議論において、世界の生物種数が予測されることが多い。大型の動植物においてはおおよそその種数は把握されているが、微小な生物についてはその種数は不明であると云っても過言ではない。Dictionary of the Fungi 9版 (Kirk et al. eds., 2001) では菌類の既知種は約8万、推定される種は100万から150万と考えている。また、細菌については既知種4000に対して推定される種は40万から300万と考えられている (Groombridge, 1992)。すなわち既知種とのおおよその割合は細菌で1%以下、菌類は5%以下となる。この推定値は微生物のインベントリー作成が極めて遅れていること、また同時に未知の機能を備えた微生物がまだ多く存在している可能性を強く示唆していると考えられている (杉山, 2005)。菌類は毎年約800種が新たに提案されているといわれている。これは、形態学的、生理学的性質に大きく依存していた分類学から、Woese (1987) によって提唱されたリボゾームRNAの部分塩基配列による系統解析手法により詳しい体系化が可能になったことによると考えられる。しかし、同時に分離源や分離手法の多様化によるところも大きいと思われる。

このような多様な微生物について、インベントリーの観点からの研究は少なく、我が国の微生物相を広く解析した研究は少ない。最近では徳増 (2009) が長野県上田市菅平高原の筑波大学菅平高原実験センター付近を調査地点として微小菌類の種多様性を網羅的に研究し、小地域であっても多様な菌類が存在していることを示した。また、Muramatsuら (2003) は、東京都奥多摩地区の森林土壤中の放線菌フロラを検討し、22属207種を認めた。同時に解析したマレーシアのBukit Lagong 森林保護区土壤では23属185種が分離されたことから、日本の森林土壤の放線菌類の多様性は熱帯雨林の多様性に優るとも劣らないと結論づけた。

本研究では、我が国の微生物の多様性を考えるために、我が国の亜熱帯域および冷温帶域において網羅的

に微生物を分離し、その微生物相の多様性を、分子系統学的解析手法を用いて推定し評価することを目的とした。また、得られた多様性情報をインベントリーデータベース構築に資することを目的とした。

微生物の分離地帯は、亜熱帯域として西表島（西表石垣国立公園内：24.2°N, 123.5°E）を、冷温帶域として利尻島（利尻礼文サロベツ国立公園内：45.1°N, 141.1°E）を選び、2007年と2008年に試料を採取した。また、調査対象としては、いわゆる菌類の範疇にはいる糸状菌類相と酵母相を、細菌では放線菌相に絞り、多数の菌株の分離を試み、分離株の多様性とその特徴の比較を行った。また、分離株は、(独) 製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門 (NBRC) 並びに(独) 理化学研究所バイオリソースセンター (JCM) 等の公的保存機関に寄託し、我が国の遺伝資源の確保に努めた。本稿では、三つのサブグループの研究（景山による菌類相、高島による酵母相、早川による放線菌に関する多様性とその比較に関する研究）を総括して報告する。

#### 日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較（景山, 2010）

糸状菌相分担チームは、景山サブリーダーを含む16名の共同研究者で構成された。今世紀初頭に菌界から独立したストラメノパイル界 (Patterson, 1999; Kirk et al, 2008) に属するラビリンチュラ類およびPythium属菌の2菌群と、菌界のはば全体にわたる接合菌門、子囊菌門、担子菌門、アナモルフ菌門に属する12菌群（接合菌類、植物内生菌類、海生菌類、小房子のう菌類・アナモルフ菌類、冬虫夏草類、Penicillium属菌類、リグニン分解菌類、核菌類、Aspergillus関連菌類、半水生菌類、軟質担子菌類、硬質菌類）について、亜熱帯域の西表島およびその周辺、並びに冷温帶域の利尻島における菌類の多様性を調べた。サンプリング試料は菌群により異なるが、陸上では植物の葉、茎、幹、根、枯れ葉、倒木、昆虫、土壤、淡水、汽水、海浜では貝類、海藻、波打ち際の海泡、海水と多岐にわたり、網羅的に菌類相を調べた。全菌群の分離菌株総数は3000以上に上り、同定された種は約500種以上であり、この中には日本新産種、未記載種も多く、新属や新科になるものも発見された。収集した糸状菌類から794株がNBRCなどに寄託された（一部は寄託準備中）。

ストラメノパイル界のラビリンチュラ (Labyrinthula) 類およびPythium属菌については、我が国のみならず世界的にも多様性に関する研究は少ないが、炭素循環や動植物の病原菌としても重要

である。今回分離されたラビリンチュラ類では、冷温帯と亜熱帯で出現した種に重複はなかったが、本州で分離が報告されている種もあり、種の地域独自性を議論するには至らなかった。*Pythium* 属菌については1,197株を分離し、両地域における種の多様性を検討したところ、西表島での分離株の方が多様性が高かった。

接合菌門 (Zygomycota) は、Hibbettら (2007) によって4つの亜門に再編成されたが、利尻島、西表島のいずれもから4亜門に属する株が分離された。Kirk (1993) は接合菌類の分離地理について検討しコスモポリタン種のほかに大きく熱帶性・温帶性が識別されると報告した。本研究でも両島において域帶特異的な種がコスモポリタン種とともに分離され同様な結果が得られた。子囊菌門 (Ascomycota) については、種別の分離と機能的分離が試みられた。例えばベニシリウム属菌では、分離種は分子系統樹上では混在していたが、両島での重複出現種は2種で種群の独自性が認められた。分離種71種のうち既知種は28種で、その他は未記載種と考えられ、探せば新種はまだまだ存在すると思われた。また、植物寄生という機能的な分離株では、分離された87属132種のうち、両島で共通属は9属であったが共通する種は4種のみであった。近縁である植物からであっても、分離構成種は異なり、寒冷帯域と亜熱帯域の構成種の独自性が示唆された。担子菌としては、利尻島からはユーラシアを含めた寒冷帯域に生息すると知られているものが、また西表島からは東南アジア熱帯域と共通であるものが見つかり、これは当然の結果かと考えられた。

この研究を通して、冷温帯および亜熱帯における広範囲にわたる菌類相を我が国で始めて明らかにしたが、各域帶で独自の種が存在する傾向にあり、また、亜熱帯域の方が冷温帯域よりも種の種類が多いことが示されたが、ラビリンチュラ類、接合菌類、海生菌、植物内生菌では大きな差はなかった。

また、分離菌株の分離情報、同定情報、遺伝子情報、管理情報などを記録し、NBRC菌株寄託シートへのデータ移転などが可能な菌株データベース構築プログラムを作成し菌株の整理に使用した。

#### 日本の亜熱帯域および冷温帯域の酵母相の多様性との比較（高島、2010）

酵母相分担チームは高島サブリーダーを含む3名の共同研究者と4名の研究協力者で構成された。酵母相については、1998年に発行されたThe Yeasts, A Taxonomic Study, 4th ed. (Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. 備, 1998) では合計100属722種（テレオモル

フ・アナモルフの重複を含む）が掲載されていた。年間の酵母の新種登録数は、Index of fungi (CABI) によると2006年-2007年の間で79であった。近々発売されるThe Yeast, A Taxonomic Study, 5th ed. では148属、約1500種が記載される予定である。

亜熱帯域の西表島、および冷温帯域の利尻島の土壤、植物および水を含む各種サンプルから1,528株を分離した。同定の結果、利尻島から分離された酵母は177種で、うち86種が新種候補株であり、西表島からは98種が分離され、うち57種が新種候補株であった。新種候補株の割合は約50%と非常に高い割合であった。なお、両採集地から共通に分離されたのは14種で、2種が新種候補であった。これらのうち、分類学的に整理された50株がNBRCとJCMに寄託された。

種の内訳は、利尻島の場合、子囊菌系酵母が37%，担子菌系酵母が63%であった。また西表島の場合は、子囊菌系酵母が18%，担子菌系酵母が82%で、両方とも子囊菌系酵母より担子菌系酵母が多く分離された。種レベルでは、利尻島からは、日本国内や欧米等で分離が既に報告されている *Trichosporon porosum*, *Cryptococcus terricola*, *C. podzolicus*, *Sporobolomyces roseus* とその類縁菌が分離され、西表島からは、屋久島や小笠原諸島でも分離されている *Kazachstania yakushimaensis* や *Sporobolomyces ogasawarensis* などが分離され、また、*Rhodotorula bogoriensis* など熱帯地域で分離が報告されている種を分離できた。

本プロジェクトにおいて分離した種はThe yeasts第5版掲載予定数（約1500種）の約2割弱、新種候補数だけでも1割弱にあたる。今回はわずか4回のサンプリングであったがこのような成果が得られたことから、日本にはさらに多くの種に属する酵母が棲息していると推定された。これは、過去から現在までに内外の科学者により記載してきた種に対して、その1割相当の種を新規に見出したことを意味しており、本研究が対象とした場所は、他とは異なる多様性に富んだ酵母相有していることが示され、我が国に棲息する酵母のインベントリー作成に大きく貢献することができた。

#### 日本の亜熱帯域および冷温帯域の放線菌相の多様性との比較（早川、2010）

放線菌相分担チームは早川サブリーダーを含む4名の共同研究者と3名の協力研究者で構成された。Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(Braunschweig, Germany)のデータベースである Bacterial Nomenclature up to date 2010

([http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft\\_id=14](http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14))によれば、現在の細菌の属数は1816属で、うち放線菌（Class Actinobacteria）の属数は249属（13.7%）である。また、細菌の種数は近年大幅に増加し、8,665種で、うち放線菌は2,113種（24.4%）となっている。今回、西表島および利尻島から総計409点（土壤225点、樹皮29点、地衣類45点、その他110点）の天然試料を採取し、各種選択分離法を駆使することで総計1,770株の放線菌分離株を得た。16S rDNAの相同性および系統解析により簡易同定を行ったところ、西表島分離株881株は24科63属240種に、利尻島分離株889株は20科50属166種にされ、両地域とも極めて多様な放線菌属種が分布していることがわかった。今回の分離では、放線菌は73属328種が分離されたので種のレベルで既知種の16%（323/2113）が分離できたと推定された。なお、16S rDNA塩基配列の相同値が98.5%未満の分離株を便宜的に新種放線菌とするとき西表島分離株173株（89種）、利尻島分離株172株（75種）が該当した。これらの分離株のうち111株がNBRCに寄託された。

西表島、利尻島で検出された属種について比較をしたところ、属レベルでは総計73属中40属（55%）、また種レベルでは総計328種中78種（24%）しか重複しておらず、放線菌の種類分布は両地域で大きく異なっていることが示された。両方の地域で共通して検出された主要属の分離頻度（各地域の全分離株中に占める割合）についてみると、*Streptomyces*属の分離頻度は西表島では33%（287株）、利尻島では48%（423株）であり、利尻島の方で明らかに高かった。

また、分離源の種類によっても放線菌の種類分布は異なっていた。例えば西表島の地衣類から19属40種の放線菌が検出されたが、その内、同地域の土壤に生息する放線菌種との重複種は7種（18%）と少なかった。また、土壤分離株に比べ、地衣類や樹皮からの放線菌分離株はカビに対して抗菌活性を示す株の割合が顕著に高いといった生理的特徴の差も見られた。

新規分離株の一部については詳細な分類試験を行い、2新属2新種（*Angustibacter luteus*, *Luteimicrobium subarcticum*）および*Georgenia thermotolerans*をはじめとする10新種の提案をした。

## おわりに

我が国における微生物の多様性解析とインベントリーデータベースの構築に向けて、西表島（亜熱帯域）と利尻島（冷温帶域）の微生物相の相違について調査研究を行った。糸状菌類相の解析では、ストラメノパイル界のラビリンチュラ類および*Pythium*属菌、菌界の接合菌門、子囊菌門、担子菌門について3,000株以上が網羅的に分離され、500以上の種の存在が示され多様性が検討された。酵母相の多様性解析においては、1,500株以上が分離され、284種の存在が示され多様性が検討された。放線菌相では1,770株が分離され、328種に同定され多様性が検討された。菌株保存施設への寄託は、合計で955株となり、インベントリー構築に寄与できたと考えられた。

一般的に、糸状菌類、酵母、放線菌にかかわらず冷温帶域と亜熱帯域で分離される種の種類は重複が少なく帶域の独自性が認められた。しかし、西表島から分離した種と利尻島から分離した種は分子系統樹上では混在し、どちらかの帶域に特徴的な系統枝は見いだせないことが多かった。このことから、日本の全土を対象とした場合も非常に特異的な系統枝があるとは考えにくいが、多くの新種が提案されることから、日本においても微生物相の多様性は大きく、新しい種は分離源や分離方法を工夫することによってまだ多く発見できると強く期待された。このことは、Muramatsuら（2003）の東京都多摩地区のとマレーシアのBukit Lagong森林保護区からの分離される放線菌類の多様性比較からも支持され、日本の微生物相の多様性が熱帶地域に劣らないと期待された。

インベントリーデーターの構築には、網羅的分離と多様性解析の努力を継続する必要があるが、また、これらの分離株について利用し得る有用な性質の選択がされることもインベントリーの確立を継続するためには望まれる。なお、本研究を通して19編の学術論文が発表され、34の学術発表が学会等で実施され、微生物分野への学術貢献がなされた。

## 要 約

生物種の多様性研究は、その保全のみならず、持続的利用にとって重要な課題である。我が国における微生物の多様性解析とインベントリーデータベースの構築に向けて、西表島（亜熱帯域）と利尻島（冷温帶域）において、菌類、酵母、および放線菌に属する微生物株を分離しその種を同定することにより、微生物相の相違についての調査研究を行った。調査研究は3研究班（景山, 2010; 高島, 2010; 早川, 2010）によって実施された。糸状菌類相の解析では、ストラメノパイル界のラビリンチュラ類および*Pythium*属菌の2菌群と菌界の接合菌門、子囊菌門、担子菌門にわたる13菌群に属する3,000菌株以上が網羅的に分離され、多様性が検討された。分離株は500種以上に分類され、

その中には新属や新科になるものも発見されたが、亜熱帯域の菌相が大きいとは限らず、亜熱帯域あるいは寒冷帯域に特有な菌相が存在することが明らかとなつた。酵母相の多様性解析では、1,528株以上が分離され、278種を同定し、うち143種が新種と推定された。また、分離された種数は、新しいThe Yeasts, A Taxonomic Study 第5版に記載される約1,500種の20%を占めることは注目に値する。放線菌相の解析では、1,770株が分離され、16S rDNSの塩基配列の相同意性や系統解析に基づく属種の簡易同定により328種が同定された。また、164種が新種と推定された。西表島の属種の多様性の方が、利尻島のそれよりも有意に高いことが示された。一方ではそれぞれの帶域で重複する属種は少なく、日本の寒冷帯の放線菌多様性は亜熱帯域のそれに劣らず多様であることが明らかとなつた。以上のように、多くの新種が提案されことから、日本においても微生物相の多様性は大きく、新しい種は分離源や分離方法を工夫することによってまだ多く発見できると強く期待された。なお、分離した糸状菌類794株、酵母50株、放線菌111株、合計955株は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門（NBRC; NITE Biological Resource Center）、独立行政法人理化研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（JCM; Japan Collection of Microorganisms）または他の保存期間に寄託され、インベントリー構築に寄与できたと考えられた。

## 文 献

- Groombridge, B., ed. (1992) Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources. World Monitoring Centre, Chapman Hall, London.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Köljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R.W., Longcore, J., Miąlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., & Zhang, N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509-547.
- 早川正幸 (2010) 日本の亜熱帯域および冷温帯域の放線菌相の多様性とその比較. *IFO Res. Commun.* 24: 169-186.
- 景山幸二 (2010) 亜熱帯域および寒冷帯域の糸状菌の多様性とその比較. *IFO Res. Commun.* 24: 117-156.
- Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. (eds.) (1998). The Yeasts, A Taxonomic Study (4th ed.). Elsevier Science.
- Kirk, P. M. (1993) Distribution of Zygomycetes - the tropical connection. In (Isaac, S., Frankland, J. C., Watling, R. & Whalley, A. J. S. (eds.), Aspects of Tropical Mycology, p.91-102, Cambridge University Press. Cambridge.
- Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C., & Stalper J. A. (2001) Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th Ed. CAB International, Wallingford.
- Muramatsu, H., Shahab, N., Tsurumi, Y. & Hino, M. (2003). A comparative study of Malaysian and Japanese actinomycetes using a simple identification method based on partial 16S rDNA sequence. *Actinomycetologica*. 17: 33-43.
- Patterson, D.J. (1999) The Diversity of Eukaryotes. The American Naturalist 154 (Supplement): S96-S124.
- 杉山純多 (2005) 微生物としての細菌と菌類、杉山純多（編）菌類・細菌・ウイルスの多様性と系統、p. 2-27、裳華房、東京。
- 高島昌子 (2010) 我が国における酵母叢のインベントリーデータベースの構築のための多様性解析とその比較—亜熱帯域と冷温帯域の比較から. *IFO Res. Commun.* 24: 157-168.
- 徳増征二 (2009) 小地域における微小菌類の種多様性に関する集中的研究. *IFO Res. Commun.*, 23: 73-97.
- Woese C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbial Rev.*, 51: 221-227.

# 日本の亜熱帯域および冷温帯域の糸状菌類相の多様性とその比較

景山幸二

岐阜大学流域圈科学研究中心

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1

## Mycobiota in the subtropical and cool temperate areas in Japan

Koji Kageyama

River Basin Research Center, Gifu University

1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

We examined the mycobiota of almost all the fungi belonging to pseudofungi in stramenopiles, zygomycetes, ascomycetes, basidiomycetes, and anamorphic fungi in the subtropical and cool temperate areas and compared the diversity between the two areas. Seventeen researchers investigated a wide range of functional fungal groups such as labyrinthulomycetes, oomycetes, zygomycetes, *Penicillium* species, endophytes, loculoascomycetes, anamorphic fungi, marine fungi, *Cordyceps*-related fungi, *Aspergillus* species, aero-aquatic fungi, lignin-degrading fungi, pyrenomycetes, agarics, and polypores. A variety of specimens were collected from terrestrial and seashore habitats from leaves, stems, trunks, roots, litter, insects, shells, sea weeds, bubbles of sea water, soil, fresh water, brackish water, sea water, and so on. The number of isolated species in each fungal group was not commonly greater in the subtropical area than in the cool temperate area, depending on the fungal group. Loculoascomycetes and agarics were more diverse in the cool temperate area, while oomycetes, *Cordyceps*-related fungi, *Penicillium* species, lignin-degrading fungi, aero-aquatic fungi, and polypores were more diverse in the subtropical area. Although most fungal groups have no distinct border in the habitat areas, it seems that they have mycobiota specific to each climatic area. In all fungal groups, new species candidates or newly known species in Japan were recorded in both the subtropical and cool temperate areas. More than 500 species in total including new species candidates were identified. A database was developed to manage the information, such as origin and location of the isolates and their official accession numbers. The fungal isolate database facilitates searches for individual isolates and provides a place to compile the mycobiota information for each area. The present study will contribute to clarifying the mycobiota in the subtropical and the cool temperate areas of Japan. Information about 766 potential useful new biological resources is now available.

Key words: fungul inventory, mycobiota, species diversity, cool temperate area, subtropical area

E-mail: kageyama@green.gifu-u.ac.jp

共同研究者：本多大輔（甲南大学理工学部），出川洋介（筑波大学農業実験センター），稲葉重樹（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部），岡根 泉（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部），田中和明（弘前大学農学生命科学部），中桐 昭（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部），伴 さやか（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部），廣岡裕吏（農業生物資源研究所ジーンバンク，現 USDA, ARS, Beltsville），佐藤豊三（農業生物資源研究所ジーンバンク），升屋勇人（森林総合研究所），矢口貴志（千葉大学真菌医学研究センター），山口 薫（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部），大園享司（京都大学生態学研究センター），山田明義（信州大学農学部），服部 力（森林総合研究所），本橋慶一（岐阜大学流域圈科学研究中心，現東京農業大学地域環境科学部）

## 緒 言

微生物は、動植物に比較して環境変化に対する応答能力は高く、地球温暖化など環境変動により微生物相が多様に変化することが考えられる。このような微生物の多様性を評価し保全することは重要である。菌類は、数の上では細菌・古細菌より少ないが、大きさはそれらの数十倍、数百倍あり、環境微生物の中で大きな部分を占めている。また、その役割は、物質循環における分解者として自然生態系を維持する上で必要不可欠である。一方、ペニシリンのような抗生物質を生産するもの、酒類や味噌・醤油のような発酵食品を生

産するものなど多くの有用菌類が人間社会で利用されている。近年、DHAのような不飽和脂肪酸産生能あるいは植物の病害抵抗性誘導能を持ったものなど（百町, 2008），これまで知られていなかった新しい機能を持った菌類も発見され（Nagano *et al.*, 2010），菌類資源の重要性が再認識されてきている。しかし、わが国の菌類相については一部の菌群を除きほとんど研究がされておらず、菌類の多様性を調べるとともに遺伝資源として保存することは重要な課題である。

そこで、本研究ではラビリンツラ菌類、卵菌類、接合菌類、*Penicillium* 属菌類、植物内生菌類、小房子囊菌類およびアナモルフ菌類、海生菌類、冬虫夏草類、核菌類、*Aspergillus* 菌類、半水生菌類、リグニン分解菌類、軟質担子菌類、硬質菌類を対象として、i) わが国の両極端の気候である冷温帯と亜熱帯に調査地点を設定し、糸状菌類の各分類群の菌類相を調査してインベントリーデータをまとめ、日本の菌類相の多様性を明らかにする；ii) 利尻島周辺のデータをもとに、日本の冷温帯域の菌類相の特徴を把握する；iii) 西表島周辺のデータをもとに、日本の亜熱帯の菌類相の特徴を把握する；iv) 菌類の標本および分離株を博物館および微生物保存機関に寄託し、分類学的資料を蓄積するとともに、公共に公開し、研究資源とすることを目的としている。具体的にはそれぞれの菌群について、以下の点について検討した。

ラビリンツラ菌類および卵菌類は、形態的特徴に加え分子情報に基づいてストラメノパイル類として菌界（菌類界、Kingdom Fungi）からはずされている。これらの菌類は研究も少なく、わが国だけでなく世界的にみても菌類相に関する情報は少ない。しかし、これらの菌類には有用物質生産や炭素循環に関与するもの（Kumon *et al.*, 2008），各種動植物の病原菌など様々な機能を持つもの（Erwin & Ribeiro, 1996）が多く含まれており、菌類相を調べることは重要である。そこで、利尻島周辺および西表島周辺における分布を調査するとともに菌株保存を行った。

接合菌類は、従来、独立門として扱われてきた約1000種を含む小さな菌群だが、発生基質や栄養摂取方法など生態的に著しい多様性が認められる。近年、その多系統性が指摘され、接合菌門は4つの亜門（ケカビ亜門 *Mucromycotina*, ハエカビ亜門 *Entomophthoromycotina*, トリモチカビ亜門 *Zoopagomycotina*, キクセラ亜門 *Kickxellomycotina*）に解体された（Hibbett *et al.*, 2007）。本調査では、これら4亜門のうち培養可能な菌について、多岐にわたる分類群、生態群を網羅するよう分離株の収集に努めた。

*Penicillium* 属菌類は、西表島および利尻島の土壤菌類相の中で違があるのかどうかを大まかに推定することを目的に両島の土壤試料から分離・同定し、その菌類相の比較を試みた。

植物内生菌は、宿主植物に直接的で顕在的な影響を与えることなく組織内に無病徵で生息する菌類である。植物と共生（共存）関係（symbiotic (coexistent) interaction）にあってこのような挙動を示す菌類の多くが内生菌類に包含されることとなる（Stone *et al.*, 2004）。本研究では、地理的にも隔たり気候と植生も異なる利尻島および西表島に生育する植物の生葉から分離される内生菌類を比較し、両島における内生菌相の多様性とその異同を明らかにすることとした。

小房子囊菌類およびアナモルフ菌類（不完全菌類）については植物病原菌を対象として、日本の南西諸島における菌類相が小林（1997）および小林ら（2009）によって詳細に調査され、その知見が蓄積されつつある。しかし、腐生的なあるいは非病原性の小房子囊菌類・アナモルフ菌類に関する情報はほとんどない。またこれらの調査結果と北日本における菌類相との比較は、これまでされてこなかった。よって、利尻島および西表島（与那国島）において、特にササ・タケ類寄生菌類と淡水生子囊菌類の菌類相を調査し、その比較を行った。

海生菌類（好砂海生菌類）は、砂浜を主な生息場所として打ち上げられた流木や海藻を分解して生活している。その胞子は付属物（appendage）を備えるなど特徴的な形態をしており、海岸に打ち寄せる波によってできる泡（海泡）に吸着、集積されるため、海泡を採取して観察することにより、その海岸の好砂海生菌類の菌類相を把握するとともに、含まれる胞子から菌株を分離することができる。利尻島および西表島の海浜から海泡を採取し、菌株を分離し、好砂海生菌類相の比較を行った。

冬虫夏草類は、子囊菌門バッカクキン科（Clavicipitaceae）*Cordyceps* 属（広義の）に関連する菌類の総称で、昆虫の遺体に生じる。温帯域から熱帯域まで普遍的に分布するが、特に東～東南アジアでの多様性に富む（Kobayasi, 1941; Sung *et al.*, 2007）。本菌群に所属するアナモルフは30属近くが挙げられるが、テレオモルフ—アナモルフの関係が明瞭に報告される例は比較的少なく、冬虫夏草類全体の系統分類を考える上で情報不足であり、この系統群の同定を困難にしている。これはこれまで標本に基づく研究が主体で培養による研究例が少ないと、タイプ由来菌株が保存されていないことの影響が大きい。本

研究では、日本列島の南北の島における冬虫夏草類（テレオモルフおよびアナモルフ）の多様性を比較するとともに、培養株の分離を行い、菌株を微生物株保存機関に寄託した。

核菌類は、子囊菌亜門ボタンタケ目に属し、直径約0.3 mmの鮮色時に白色の子囊殻（子実体）内に、一重膜の子囊および多細胞性の子囊胞子を形成する菌群である。農作物や樹木に被害をもたらす植物病原菌として農業上重要であるばかりでなく、非植物病原性核菌類として、植物病原菌に寄生する菌寄生菌やカイガラムシ・アブラムシ等の害虫に寄生する昆虫寄生菌、さらにはジベレリンを生産する *Gibberella fujikuroi* のような様々な有用生理活性物質や毒性物質を生産する菌類も含み経済的に重要である（Rossman *et al.*, 1999）。しかし、日本をはじめとするアジア各国においては、本菌群の研究に取組む研究者は少なく、欧米に比べてたち遅れた状態にある。こうした状況の中で、日本の南北における本菌群の調査は未知な領域である。さらに調査は、植物病原菌類の探索も合わせて行った。採集地として選んだ利尻島、西表島、石垣島、宮古島は、固有の植物が多く自生し、そのうち熱帯果実など有用なものは商業的に栽培されている。こうした植物の病害調査を行うことにより、特色のある菌類相を明らかにするだけでなく、南北特有の作物の病害を早期に発見することができ、今後の防除に大きく貢献できると考えられる。

*Aspergillus* 属菌類は、土壤やハウスダストをはじめとする生活環境中にきわめて多く棲息する。その中でも、ヒト、動物に対して感染症（真菌症）を引き起こす主な原因菌種 *Fumigati*, *Nigri*, *Flavi*, *Terrei*, *Nidulantes* の各節（Section）において、西表、利尻島の土壤からの分離頻度を比較した。真菌症原因菌のうち最も重要な種は *A. fumigatus* である。近年、*A. fumigatus* と形態的に非常に類似するが分子系統的には区別可能な *A. lentulus*, *A. udagawae* (*Neosartorya udagawae* のアナモルフ) などは薬剤感受性の違いから臨床的に重要視され、正確な同定が求められている（Balajee *et al.*, 2005; Katz *et al.*, 2005）。これら非典型的 *A. fumigatus* に着目し分離を実施した。

半水生菌類は、水辺の浸水した材や落葉上に生息し、これら基質が気中の湿度の高い状態にさらされた時に、空気を抱き込む構造の水に浮く胞子を形成して分散を行う。主に水辺の材や落葉の分解菌として働く。一方、この菌群の生活環や地理的分布の研究例は少なく、解明が進んでいない。徳増（2009）により本州の中央に位置する冷温帯の長野県上田市菅平高原にある筑波大学菅平高原実験センター内における菌類相

調査で、半水生菌類の多様な菌類相が明らかにされている。本調査では、わが国の両極端に位置する利尻島（冷温帯）と西表島（亜熱帯）において、そこに生育する半水生菌類の多様性を明らかにするとともに、北と南の菌類相の比較を行った。

リグニン分解菌類（植物腐朽菌類）は陸上生態系における分解者として生物界のなかでも独特の生態的役割を担っている（Osono, 2007）。本研究では、利尻島と西表島において特異的な生態的、機能的な特性を有する落葉分解菌類の多様性の程度を明らかにし比較することを目的として、標高に沿った菌類多様性のパターン解析、およびリグニン分解活性を有する菌類の多様性解析を行った。

軟質担子菌類については、国内の北限・南限に位置づけられる利尻島と西表島では、それらの特異的な気候・植生帶のもとでのきのこ類相を解明するための調査研究がこれまでにも幾つか行われている（佐藤ら, 1998; 佐藤, 佐藤, 1999; 沖縄県文化環境部自然保護課, 2006）。しかし、それらの調査研究は、分類学的観点を主とした標本収集であり、培養株を得るための資源探索は殆ど行われていない。本研究では、両島に生息する軟質担子菌きのこ類について幅広く培養株を分離収集し、菌類相解明の一助とすることを目的としている。

「硬質菌類」とは旧来ヒダナシタケ目に含められていた「サルノコシカケ型」、「ウロコタケ型」などの硬質のきのこ類をさし、そのほとんどが木材腐朽菌である。近年分子系統学的研究からこれらは多系統群であることが明らかにされている（Binder *et al.*, 2005）。しかし、形態的に類似していること、重要な木材腐朽菌を多数含むなど類似した生態を有することから、依然まとめて扱われることが多い。硬質菌類には重要な樹木病原菌が含まれる一方、酵素利用・薬用・食用に用いられる等経済的に重要な種が多く、菌株収集の意義が高い菌群である。利尻島産硬質菌類については、過去に数回北海道のアマチュアグループによる調査が行われているが、新産種報告等は行われていない。西表産硬質菌類については、青島・大宜見（1974）によってこれまで国内からは未記録だった種が多数報告された。その後も調査は行われているものの、まとめた報告は行われていない。

以上、調査した菌群について標本および菌株の同定情報、遺伝子情報、分離場所などを一括して管理し、第三者が検索利用できることを目指してソフトウェアを開発した。開発したソフトに本研究で得られた菌株の情報を入力し、研究成果を容易に利用できるよう整備した。

## 材料および方法

**材料採集** 本研究を遂行するに当たり冷温帯地域については利尻島、亜熱帯地域については西表島を中心となる調査地点として設定した。利尻島、西表島ともに国立公園に指定された場所を含むことから、利尻島に関しては環境省北海道地方環境事務所稚内自然保護官事務所および林野庁北海道森林管理局宗谷森林管理署、西表島に関しては環境省那覇自然環境事務所石垣自然保護官事務所および林野庁九州森林管理局沖縄森林管理署に調査用試料の採集許可を事前に得て調査を行った。本申請は、岡根 泉が担当した。

**ラビリンツラ菌類** 利尻島では、2007年7月に以下のような場所でサンプリングを行った。仙法志地区海岸、大磯地区海岸、鶴泊地区海岸。西表島では2008年7月に以下のような場所でサンプリングを行った。上原地区海岸、仲間川河口、古見地区海岸、ヒナイ川河口、浦内川河口、クイラ川河口。いずれも海水および海砂、海泥を採取した。菌の分離はクロマツ花粉を釣り餌とする釣菌法で行った。採取した海水のみ、あるいは海砂や海泥を少量加えた海水試料約10mlにマツ花粉を浮かべ、採取された現場に近い温度で1週間ほど放置した。水面近くに浮かんだマツ花粉を、抗生素質を添加したd-GPY寒天培地上に塗布し、マツ花粉周辺に形成されたラビリンツラ菌類のコロニーをキャピラリーで取り出してd-GPY液体培地に植え継ぐことで純粋培養株を確立した。菌の同定は形態、連続観察による生活史観察、18S rDNA遺伝子配列に基づく分子同定により行った。なお、d-GPY培地は、0.2%グルコース、0.1%ポリペプトン、0.5%酵母エキスを自然海水と蒸留水を1:1に混ぜたものに溶解してオートクレーブして作製した。本菌類の研究は本多大輔が担当した。

**卵菌類** 2007年、2008年に北海道利尻島・礼文島および沖縄県西表・石垣島にて土壤試料および水試料を採取した。2007年利尻島では土壤試料を10ヶ所から、水試料は7ヶ所、2008年利尻島・礼文島では土壤試料8ヶ所、水試料18ヶ所、2007年西表島では土壤および水試料をそれぞれ10ヶ所、2008年西表・石垣島では土壤試料12ヶ所、水試料17ヶ所の合計92ヶ所で採集した。2007年、利尻島で採取された土壤からは芝草およびエゴマを釣り餌とした捕捉法を用いて分離を行った。9cmシャーレに入れた土壤に滅菌水を添加し、その中へ釣り餌として滅菌した芝草またはエゴマを浮か

べ、室温で5-7日間放置した。捕捉基質からの分離は、*Pythium*選択培地を用いた(Narita & Tojo, 2007)。その他の土壤試料については、*Pythium*選択培地を用いた希釈平板法により分離を行った。水試料の分離には捕捉法を用いた分離を試みた。2007年利尻島からの水試料には芝草およびフィルターペーパーを、その他の試料には芝草のみを捕捉基質とした。採取された水試料の中にそれぞれ滅菌した捕捉基質を入れ、室温、1-3日間放置した。その後、捕捉基質を回収し、選択培地に移植し、暗黒下、25°C、1-3日間培養し、生育した菌叢から単菌糸分離によって菌株を確立した。種の同定は形態的特長およびrDNA ITS領域の塩基配列に基づいて行った。本菌類の研究は景山幸二および本橋慶一が担当した。

**接合菌類** 利尻島(2007年8月、2008年7~8月)、西表島(2009年9月)とその近隣地域で現地調査を実施した。西表島については栗原祐子博士から提供をうけた土壤(2009年8月、12月に採集)も検討した。調査ではフィールドで直接、天然基質上に発生している菌類を野外採集するとともに、原生林、草原等の自然植生下と、市街地、耕作地等の攪乱環境下で、土壤、リター、動物糞、小動物遺骸等の試料を採集し、培養、分離、同定した。土壤試料は温室釣菌法(ベイトはサクラエビおよびミカン果実を使用)、直接平板法、土壤平板法により培養(コーンミール培地(CMA)、1%エビオス培地)し、分離・同定には、三浦培地、エマーソンYpSs培地、CMA、1%バブルム培地を用いた。キクセラ亞門およびトリモチカビ亞門の菌については改変MEYE培地、0.3%サクラエビ培地で胞子発芽を誘導した。後者のうち菌寄生菌は発芽後、YpSs上で宿主と二員培養し、線虫捕食菌はEllis(1963)に従い、強アルカリ環境下で胞子発芽を誘導後、レバー、油脂を用いて培養を確立した。糞生菌類の胞子発芽誘導には10%馬糞培地を用いた。本菌類の研究は出川洋介が担当した。

**Penicillium 属菌類** 2008年7月に利尻島、2008年9月に西表島でそれぞれ12土壤試料を採取し、希釈平板法による糸状菌類の分離を行った。1000倍、5000倍および10000倍に希釈した土壤懸濁液を、細菌および成長速度の速いカビの増殖を抑制するためクロラムフェニコール0.2gとローズベンガル0.03gを添加した分離用培地(コーンミールアガール(日水製薬)5g、麦芽寒天培地(日水製薬)12g、寒天12g、蒸留水1L)に塗布し、約23°Cで培養した。平板は培養開始後約1週間、2週間、4週間に光学顕微鏡観察

し、出現した土壤菌類を網羅的に分離した。分離・同定用の培地には LCA 培地 (Miura & Kudo, 1970) を用いた。形態観察による出現した菌類の同定を行い、*Penicillium* 属を選別した。選別された *Penicillium* 属分離株はすべて核リボソーム DNA の 5.8S rDNA 遺伝子を含む ITS1, 2 領域と 28S rDNA の D1/D2 領域の結合配列 (ID 領域; Peterson, 2000) にもとづく系統解析と、Pitt (1979, 2000) の方法を用いた詳細な形態観察を行い、種レベルの同定を試みた。本菌類の研究は稻葉重樹が担当した。

**植物内生菌類** 利尻島では2007年7月および2008年7月に、西表島では2007年9月および2009年2月に調査をおこない、利尻島産25種および西表島産28種の植物生葉を採集した。採集した生葉は過度な湿気と乾燥を防ぐために新聞紙に挟み野冊で束ねた上でビニル袋に入れ、実験室に持ち帰った。その後、健全な試料葉各10枚について、葉組織内に生息する内生菌を分離するために表面殺菌処理を施した。表面殺菌は70% エタノール：1分～20% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液（有効塩素濃度1%）：2分 減菌蒸留水洗浄：1分×2回 乾燥：減菌ペーパータオルに挟み4時間、以上の手順でおこなった (Okane *et al.*, 2003)。表面殺菌した試料葉は5-15 mm 角程度に分割し、1/2濃度麦芽エキス寒天培地に接種後、17°Cで培養した。そして試料葉片から伸張してきた菌糸あるいは形成された胞子を分離し培養株を確立した。次に、内生菌分離株（利尻島174株および西表島190株）について形態観察をおこなうと同時に rDNA・ITS および 28S rDNA・D1/D2 領域の塩基配列を定法により決定し、それらの情報に基づき種の同定を試みた。胞子形成が誘導できず形態学的な検討が十分におこなえなかった分離株については、塩基配列情報を基に BLAST 検索および近隣結合法によるクラスター解析をおこなうことで種を推定し、両島における内生菌の種構成について比較検討した。本菌群の研究は岡根 泉が担当した。

**小房子囊菌類およびアナモルフ菌類（不完全菌類）** 2007年に2回（利尻島7月、西表島9月）、また翌2008年に2回（利尻島7月、西表島11月）の採集調査を行った。陸生の植物寄生菌・腐生菌を得るために、主にササ・タケ類や、各種樹木の腐朽木等を無作為に採集した。また淡水生子のう菌類を得るために、河川・湖沼から回収した沈水植物基質を25°C、湿潤条件下のプラスチックケース内にて1ヶ月程度まで保ち、菌の生育を促した。これらの植物基質を実体顕微鏡にて観察し、目的とする菌体が見られた場合には微分干

渉顕微鏡にて詳細な形態観察を行った。また減菌水に胞子懸濁液を作成し、これを素寒天培地へ塗布した後、発芽した単胞子を釣り上げてジャガイモ・ショ糖寒天培地で培養し純粋培養株を得た。さらに必要に応じて培養株から DNA を抽出した後、nrDNA 18S・28S・ITS 領域、 $\beta$ -tubulin, TEF, RPB2 の塩基配列データを取得し、分子系統解析を行った。本菌類の研究は田中和明が担当した。

**海生菌類（好砂海生菌類）** 利尻島においては2008年8月、2009年7月に、石崎、大磯、沼浦の海浜から、西表島においては星砂浜、月ヶ浜の海浜から海泡を採取した。海泡試料に含まれる海生菌の胞子をスカーマン式マイクロマニピュレーターを用いて単胞子分離し、培養株を得た。同定は、種に特徴的な胞子の形態に基づいて行った。利尻島から分離され、未記載種と判断された菌類については、培養性状（菌糸成長、胞子形成に対する温度、塩分濃度の影響）について調べた。本菌類の研究は中桐 昭が担当した。

**冬虫夏草類** 利尻島での2007年7月、2008年7月の2回、西表島での2007年9月、2008年6月、2009年2月の3回の採集において、主に菌類に感染した昆虫・クモの死骸入手した。これらの試料の上に形成された胞子（分生子または子嚢胞子）を実体顕微鏡下で分離し、TrePY 培地（トレハロース 20 g, ペプトン 3 g, 酵母エキス 1 g, 寒天 15 g, 水 1 L, Ban *et al.*, 2009）に接種、培養した。さらに、シロアリの巣から発生していたオオシロアリタケについては、子実体組織を分離し、PCA 培地（ジャガイモ 20 g, ニンジン 20 g, 寒天 20 g, 水 1 L）で培養した。菌種の同定は、天然および培養基上の胞子形成構造の形態および ITS, 28S rDNA D1/D2 領域の DNA シーケンス情報に基づいて行った。標本は全て乾燥標本とし、NBRC 標本庫に保存した。本菌類の研究は伴さやかが担当した。

**核菌類** 菌の分離は、それぞれ標本の状態ごとに区別しておこなった。宿主組織からの分離は、約 0.5～1.0 cm 角の組織片を流水下で 10～20 分間洗浄し、素寒天培地 (WA) 上に置いた後、そこから伸長した菌糸を単菌糸分離することで得た。宿主から胞子を噴出しているものは分生子塊を直接白金耳でかき取り、胞子懸濁液を作成、素寒天培地 (WA) 上に広げ、室温で管理した。子実体内部の胞子は柄付き針で直接中身を取り出して WA 上に広げた。その後は、発芽した分生子のみを単胞子分離して分離菌株を得た。培養には

ジャガイモ・デキストロース寒天培地 (PDA), 合成貧栄養培地 (SNA), オートミール寒天培地 (OA) (Kirk *et al.*, 2001) を用いた。Hypocreales の同定は, Rossman *et al.* (1999) の分類体系を用いた。植物病原菌については主に, 小林ら (1992) や Ellis (1971, 1976) の分類体系を用いた。本菌類の研究は廣岡裕吏および佐藤豊三が担当した。

また, Ophiostomatales, Diaportales 等木材基質に依存する分類群についても調査した。各調査地から特に木材基質を中心にサンプリングを行ったが, 一部キクイムシ類の孔道も採取し分離に供試した。子実体が形成されている基質を実験室に持ち帰り, 形態観察と分離を行った。分離には 1% 麦芽エキス寒天培地を用い, 生育してきた菌糸を 2% 麦芽エキス寒天培地に移植し, 純粹培養菌株を確立した。本菌類の研究は升屋勇人が担当した。

*Aspergillus* 関連属菌類 土壤平版法により *Aspergillus* 関連菌類の分離を行った。すなわち, ペトリ皿に乾燥させた少量の土壤試料を分注し, 1/4 に希釀したポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地 (寒天濃度 2%, chloramphenicol 50 mg/l 添加) を滅菌後, 45℃ 程度に冷却したものを 25 ml 流し込み, よく混合後, 37℃ で 7 日間培養した。1 様体につき 3 枚の寒天培地を使用した。同定は, 顕微鏡観察による形態的特徴で行った。必要に応じて,  $\beta$ -tubulin 遺伝子の部分塩基配列を Glass & Donaldson (1995) の方法に準じて決定した。本菌類の研究は矢口貴志が担当した。

半水生菌類 利尻島では2007年7月, 2008年7月に姫沼, 甘露泉水, メヌショロ沼, オタトマリ沼を含む10カ所にて, 西表島では2007年9月, 2008年2月に前良川, 後良川, 大富, 浦内川を含む18カ所にて浸水した材, 枝, 枯葉および泡を探集した。探集地の水温は利尻島で 7.5-24°C (平均 13°C), 西表島で 26-34°C (平均 28°C) であった。探集した試料は湿室法により, 利尻島試料は生息環境に合わせて 15°C で, 西表島試料は 25°C で培養し, 適時検鏡して形成されてきた胞子を細い針を用いて釣りあげ, 分離培地 (酵母・麦芽エキス寒天培地 YMA + テトラサイクリン塩酸塩 50 mg/L) に移植, 20-25°C で培養した。発芽した胞子は培養培地 (ジャガイモ・ショ糖寒天培地 PSA およびジャガイモ・ニンジン寒天培地 PCA) で培養し菌株を確立した。泡試料はマイクロマニピュレーターを用いて胞子を釣りあげ, 培養培地で培養し, 発芽した胞子はさらに培養培地に継代して菌株を得た。菌の同定

は, 孢子の形態および分子情報 [28S (D1/D2 領域) および 5.8S-ITS rDNA] に基づいて行い, この分子情報に基づいて系統解析を行った。本菌類の研究は山口 薫が担当した。

リグニン分解菌類 (植物腐朽菌類) 2007年7月に, 利尻山北面の登山道に沿った標高 300, 600, 900, 1200, 1500 m の 5 地点で, 林床よりダケカンバ落葉を各地点で20枚ずつ, 5 地点で合計 100 枚を採取した。実験室にて直径 5.5 mm の葉片をコルクボーラーで落葉 1 枚あたり 1 片を打ち抜き, 計 100 葉片から洗浄法で微小菌類を分離した。また, 2007年7月に北海道利尻町の姫沼周辺において漂白を受けたミズナラ落葉を 20 枚, 2007 年 9 月に沖縄県西表島の大原林道周辺において漂白を受けたスマジイ落葉を 20 枚, それぞれ採取した。実験室にて直径 5.5 mm の葉片をコルクボーラーで落葉 1 枚の漂白部と非漂白部からそれぞれ 1 片を打ち抜き, 計 80 葉片から表面殺菌法により菌類を分離した。分離菌株については, 微小形態の観察とともに, rDNA ITS 領域および 28SrDNA D1-D2 領域の塩基配列を決定し同定を行った。分離菌株の落葉漂白力は, 2% 麦芽エキス寒天培地上で前培養した菌類コロニーに, 120℃ で 20 分間オートクレーブ滅菌したミズナラ (*Quercus crispula*) ないしスマジイ (*Castanopsis sieboldii*) 落葉の葉片を置き, 室温で 2 ヶ月程度培養して確かめた。本菌類の研究は大園享司が担当した。

軟質担子菌類 利尻島では, 2007 年 7 月 26-30 日, 2008 年 9 月 2-4 日, 同年 9 月 19-21 日の計 3 回の調査を行い, 西表島では, 2008 年 7 月 1-2 日の 1 回のみ調査を行った。主な調査地点は次の通りである: (利尻島) 利尻富士町: 鴛泊登山道周辺, ポン山周辺, 姫沼周辺, 豊仙沢川周辺, オタドマリ沼周辺, 南浜湿原周辺; (利尻島) 利尻町: 脊形登山道周辺, スキー場周辺; (西表島) 竹富町: 仲間川流域, 前良川河口周辺, 古見集落周辺, マーレ川周辺, ウシク森周辺。

上記の各地点において, 林床や腐朽材上などより, 軟質担子菌類の新鮮な子実体 (きのこ) を収集し, 当日のうちに担子胞子分離と組織分離により菌の分離を行った。主に小型の子実体を形成する菌種では担子胞子分離を行い, 大型肉質の種では組織分離を行った。担子胞子分離では, 数ミリ片に切り取った子実体傘を粘着テープでプラスチックシャーレの蓋に貼付け, 寒天平板培地 [抗生素質添加 MNC 培地 (山田, 2001), 素寒天培地] 上に担子胞子を落下させた。数日後, 培地上の胞子塊の一部を新たな MNC 寒天平板

培地に移植し、純粹培養株を確立した。組織分離では常法（山田, 2001）に従い、MNC 寒天平板培地上で純粹培養株を確立した。利尻島で収集した菌根についても、常法に従って菌根分離（山田, 2001）を行い、MNC 寒天平板培地上で純粹培養株を確立した。純粹培養株については、クランプコネクションの有無と担子胞子形成の有無を観察するとともに、核 rDNA ITS 領域の塩基配列を決定し、培養株の同定を行った。本菌類の研究は山田明義が担当した。

**硬質菌類** 利尻島：姫沼、ポン山、鬼脇、沓形、見返台および西表島：仲間川流域、後良川流域、浦内川流域、相良川流域、白浜地区などにおいて調査を行った。子実体およびその腐朽材を採取、子実体組織、担子胞子（落下胞子）または子実体直下の材から菌の分離を行った。分離・培養培地としては PDA 培地を使用した。採取した子実体の肉眼的外部形態および顕微鏡的特徴を観察、種または属までの同定を行った。本菌類の研究は服部 力が担当した。

**菌株データベース** Microsoft Access を基にして、同定情報、標本情報、菌株情報、採集情報、遺伝子情報、写真等を管理し、菌株寄託用シートへの印刷機能を持たせた。また、全情報について、検索する機能を付与した。また、開発ソフトを用いて、本研究で得られた菌類標本および菌株のデータを入力し、第三者が利用できるようデータベースを構築した。本研究は本橋慶一と景山幸二が担当した。

## 結果および考察

**ラビリンツラ菌類** 西表島から分離された13株について、18S rDNA 遺伝子配列の分子系統解析、光学顕微鏡による形態観察、および連続観察による生活史観察を行った。Schizochytrium 属（10株）、Botryochytrium 属（2株）、Sicyoidochytrium 属（1株）として同定した。一方、利尻島から分離された17株についても同様に、Ulkenia 属（10株）、Thraustochytrium aureum（6株）、Thraustochytrium sp.（1株）として同定した。

利尻島から分離された Thraustochytrium sp.（1株）について、18S rDNA 塩基配列を分子系統解析したところ、これまでに遺伝子データベースに登録されている生物の配列とは特に系統群を形成せず、独立した系統を形成した。連続観察から Ulkenia 属で見られるようなアーベ状の細胞も見られ、属レベルでも同定できたとは言えず、暫定的に Thraustochytrium sp.

とした。

西表島から 3 属、利尻島から 3 属が分離されたが、両島いずれからも分離される系統群は存在しなかった。冷温帶と亜熱帶域の水塊の違いや、温度による増殖特性の違いによって、属レベルで分布域が分かれている可能性がある。一方で、*Botryochytrium*, *Schizochytrium*, *Ulkenia* 各属の系統群については、大阪湾でも分離される株もあるため、これらの系統群の分布域は、重なっている可能性もある。海流などの影響を含めて、細かな分布の検討が不可欠であると思われる。さらに、種のレベルでは温度に対する特性も重要な形質になる可能性もあるが、ラビリンツラ類の種分類は基準となる培養株も多くは失われており、種の同定が簡単ではないため、すぐに適用するのは難しいと思われる。

**卵菌類** 92ヶ所で土壤・水試料を採集した結果、利尻島・礼文島では 494 菌株、西表島・石垣島では 703 菌株の合計 1197 菌株の *Pythium* 属菌類が分離された。形態的特徴および rDNA ITS 領域の塩基配列による補助データを用いてそれらの菌株の同定を行った結果、利尻・礼文島では日本新産種 1 種 *Pythium litorale* を含む、既知種 15 種を同定し、7 種の未記載種を見出した。土壤試料 258 菌株のうち、既知種 5 種・256 菌株、未記載種 2 種・2 菌株で、水試料 236 菌株のうち、既知種 12 種・203 菌株、未記載種 5 種・33 菌株であった。一方、西表・石垣島では日本新産種 2 種 *P. minus* および *P. purvum* を含む、既知種 14 種を同定し、16 種の未記載種を見出した。土壤試料 506 菌株のうち、既知種 12 種・455 菌株、未記載種 6 種・51 菌株で、水試料 197 菌株のうち、既知種 3 種・48 菌株、未記載種 12 種・149 菌株であった。それぞれの未記載種は rDNA ITS 領域の塩基配列に基づく予備的な系統解析の結果、それらは系統的に他の既知種とは異なり単系統を示した。これら結果から、北の利尻・礼文島よりも南の西表・石垣島で分離される種数が多いことが明らかとなった。加えて、土壤試料よりも水試料からは種数が多く多様性に富んでおり、未記載種が多く存在することが今回の調査で明らかとなった。なお、両島において共通する種は *P. catenulatum*, *P. heterothallicum*, *P. intermedium*, *P. torulosum*, *P. helicoides* の 5 種で、未記載種 2 種であったが、それらの種や両島でのみ分離された種との地域的な特異性は見出せなかった。

2007 年西表島の河川から分離された *P. helicoides*, *P. myriotylum* を用いて、キュウリ・ハクサイ・トマトに接種試験を行ったところ、それぞれ発芽前苗立枯

および発芽後苗立枯を引き起こし、病原性が確認された。

日本における *Pythium* 属菌類相の調査は Watanabe (1981, 1988, 1989a, b) によって報告され、多くの種が分離・同定されてきた。しかしながら、それらの研究は日本や他国においても農耕地中の植物病原菌を対象としており、非農耕地や河川・湖沼などの環境中に生息する *Pythium* 属菌を対象にした研究報告はほとんどない。本研究では環境中から *Pythium* 属菌を分離し、特に水試料から多くの未記載種を見出すことができ、日本における *Pythium* 属菌類相の解明に大きく寄与すると考えられた。今後も *Pythium* 属菌の菌類相を把握するため、また、未利用生物資源の確保のために継続した調査が必要である。また、本属菌の分離を行うに当たり、土壤試料からは希釈平板法が、水試料では芝草を用いた捕捉法と選択培地の使用が有効であると考える。

接種試験の結果から河川や湖沼に生息する *Pythium* 属菌が病原性を有することを初めて明らかにした。河川や湖沼を利用した作物への灌漑について、本属菌による作物への進入経路の可能性があることを示唆している。

**接合菌類** 本調査では、両島より、合計 4 亜門 7 目 14科25属55種の接合菌類が分離同定された（石垣島産 2種を含む）。利尻島からは 4 亜門 6 目 9 科15属34種（未記載属 1 属、未記載種 2 種）が得られた。このうち利尻富士山腹の落葉樹林より温室釣菌法により分離されたキクセラ科 Kickxellaceae の未記載属は長野県菅平高原よりも得られており冷温帶性の可能性がある。また、土壤試料を 5°C で長期培養した結果、*Chaetocladium brefeldii*, *Kickxella alabastrina* 等の低温嗜好性菌類が得られた。西表島からは 4 亜門 6 目 11科18属31種（日本新産属 4 属、新産種 7 種を含む）が得られた。うち、ケカビ目 Mucorales の日本新産 3 属はいずれも、国外の熱帯域からのみ知られてきたものである。マレー半島より記載された *Kirkiana ramosa* は本調査が原記載以後の初記録となる。*Phascolomyces articulosus* は熱帯域の動物糞から稀に報告されていた種だが石灰岩鍾乳洞のコウモリの糞より得られた。*Hyphomucor assamensis* はスリランカ、マレーシア等、熱帯域の森林土壤に普通といわれる。トリモチカビ目 Zoopagales シグモイデオミケス科 Sigmoideomycetaceae の *Thamnocephalid quadrupedata* は台湾などからわずかに知られていた日本新産属だが、ハエカビ亜門の *Basidiobolus* 属を宿主として二員培養を確立することに成功した。

Kirk (1993) は接合菌類の分布地理について論じ、コスモポリタン種のほかに、大きく熱帶性・温帶性の 2群が識別できることを指摘した。利尻島から分離された幾つかの好冷性菌は、温帶性群に属するものである。Carreiro & Koske (1992) は、ロードアイランドの土壤を低温長期培養 (0°C で数カ月にわたり) し、多様な菌群を検出したが、利尻富士の高標高地の夏季残雪域の土壤等について集中的な長期低温培養を実施すれば、更に多くの好冷性菌が得られるものと期待される。他方、西表島からは、従来、熱帶域のみに分布すると考えられてきた種が複数得られた。Loh et al. (2001) はマレーシア産の接合菌類のモノグラフ中でケカビ目の 3 新属17新種を発表し、熱帶域のケカビ目の多様性研究が未だ十分でないことを示したが、そこで記載された 1 新属は本調査で初めて再発見された。本邦の南北両端での調査の結果、日本は熱帶性・温帶性両群を擁する接合菌類資源上、恵まれた立地にあると判断できる。両島に共通な 3 亜門 4 目 5 科10種は汎世界的に分布するコスモポリタン種とみなされるが、トリモチカビ目の菌寄生菌 *Syncephalis depressa* では利尻島より西表島産の方が形態的に大型になる傾向が認められ、気候帶に応じて種内群が分化している可能性があり今後の検討が必要である。また、両島の野外調査でいくつかの共通基質に着目した観察を行ったところ、クワの落果上において、利尻島では *Rhizopus sexualis* が、西表島では *R. oryzae* が得られた。これらは本州中部にも分布するが、種間で温度適性に顕著な差があり、各々、冷温帶、亜熱帶に分布中心がある同属内の生態的同位種である可能性がある。

**Penicillium 属菌類** 両島で採取された24土壤試料から計 391 菌株（西表島 191 菌株・利尻島 200 菌株）の糸状菌類が分離され、その内 *Penicillium* 属菌類は計 107 菌株（西表島44菌株・利尻島63菌株）であった。*Penicillium* 属菌類分離株を ID 領域塩基配列と形態観察によって同定したところ、少なくとも 60 種が確認された。それらの内、既知種と同定しうる菌株は 29 種に留まり (Table 1)，その他は塩基配列情報と形態観察結果のいずれか一方もしくは両方が既知種と一致しなかった。なお、同定できた31菌株（29種）を NBRC に寄託した。未同定株は分類学的研究の後、今後順次 NBRC に寄託する予定である。

*Penicillium* 属菌のテレオモルフとしては *Eupenicillium* 属と *Talaromyces* 属が知られており、両属は系統的にも区別しうる。ID 領域の解析により、テレオモルフを形成しない菌株においてもいずれの系統群に属するかを推定することが可能である

(Fig. 1). 両島の分離菌株を比較したところ、西表島から分離された菌株は比較的 *Talaromyces* 系統群に含まれるものが多く、かつそれらの ID 領域塩基配列の多様性が高いのに対し、利尻島から分離された菌株は *Eupenicillium* 系統群に含まれるもののが大部分を占め、かつ多様性が高い傾向が認められた (Fig. 1)。また、既知種の内で両島に共通して出現した種は 2 種のみ (*P. adametzii* および *Talaromyces* 属の 1 種 *T. trachyspermus*) であった。

本邦からは多くの *Penicillium* 属菌類が報告されて

**Table 1** Species of *Penicillium* and its teleomorph genera isolated from Iriomote and Rishiri Islands

Species	Locality <sup>a</sup>	
	Iriomote	Rishiri
<i>Penicillium adametzii</i>	+	+
<i>P. asperosporum</i>	-	+
<i>P. biourgeianum</i>	-	+
<i>P. citreonigrum</i>	-	+
<i>P. citrinum</i>	+	-
<i>P. decaturense</i>	-	+
<i>P. cf. daleae</i>	+	-
<i>P. herquei</i>	+	-
<i>P. janczewskii</i>	-	+
<i>P. janthinellum</i>	-	+
<i>P. lividum</i>	-	+
<i>P. manginii</i>	-	+
<i>P. meleagrinum</i>	+	-
<i>P. cf. multicolor</i>	+	-
<i>P. oxalicum</i>	+	-
<i>P. paxilli</i>	+	-
<i>P. piceum</i>	+	-
<i>P. pinophilum</i>	+	-
<i>P. cf. raperi</i>	+	-
<i>P. roseopurpureum</i>	-	+
<i>P. sclerotiorum</i>	+	-
<i>P. simplicissimum</i>	-	+
<i>P. soppii</i>	-	+
<i>P. cf. swiecicikii</i>	-	+
<i>P. thomii</i>	-	+
<i>P. verruculosum</i>	-	+
<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	+	-
<i>Talaromyces cf. stipitatus</i>	+	-
<i>T. trachyspermus</i>	+	+

a: + isolated; - not isolated.

いるが、同一地域で分離された菌株を形態観察と塩基配列情報にもとづいて詳細に同定した例は少ない。徳増 (2009) による菅平高原 (長野県) での菌類相調査において、土壤生 *Penicillium* 属菌類に種レベルの同定が困難な株が多く含まれることが報告されているが、本研究でも形態的特徴や塩基配列情報が既知種と一致しない菌株が多数得られた。したがって、本邦には未記載の *Penicillium* 属菌類が多く存在する可能性が示唆される。また、両島に共通して出現した種は 2 種のみであることから、両島に生息する *Penicillium* 属菌の基本的な種組成は異なるものと推測される。出現種の多くは汎世界的に分布する普通種であるが、西表島から分離された *P. oxalicum* と *Eupenicillium brefeldianum* (*P. dodgei* のテレオモルフ) は比較的温暖な地域に、利尻島から分離した *P. janczewskii* と *P. thomii* は比較的寒冷な地域に分布することが知られている (Domsch *et al.*, 2007)。今後は、出現種組成に土壤採集環境による差異や季節変化がある可能性などを考慮して、今回とは異なる採集場所や季節で試料採取を行い、出現種組成を比較する必要がある。

**植物内生菌類** 全ての採集試料から何らかの菌類が分離された。分離・培養に成功した 364 菌株の分類学的検討をおこなった結果、両島から合計 87 属 132 種が認識され、利尻島からは 52 属 65 種、西表島からは 44 属 71 種が認識された。両島の共通種としては *Anthostomella cf. eucalyptorum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Diaporthe cf. phaseolorum* および *Glomerella acutata* の 4 種のみであった。両島に共通する属としては *Anthostomella*, *Arthrinium*, *Cladosporium*, *Glomerella*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Phomopsis*, *Mycosphaerella*, *Phyllosticta* の 9 属であった。西表島では *Biscogniauxia*, *Nemania*, *Xylaria* といったクロサイワイタケ科 Xylariaceae 菌類、ボトリオスフェリア科 Botryosphaeriaceae に所属する *Neofusicoccum mangiferae* と同科所属の汎世界的宿主範囲も広いとされる *Guignardia endophylllicola* (= *G. mangiferae*; アナモルフ: *Phyllosticta capitalensis*) がさまざまな植物から分離された。しかしこれらの菌は利尻島の試料からはほとんど分離されなかった。一方、利尻島の複数の植物から分離された *Mycosphaerella berberidis*, *Venturia ditricha* および *Alternaria* sp. は、西表島の試料からは分離されなかつた。両島に複数の種が生育するツツジ属 (*Rhododendron*) 植物から分離された内生菌の比較では、共通種は *Diaporthe cf. phaseolorum* の 1 種の

みであった。分離された菌の種数を植物の種ごとにみると、西表島産の植物では2-11種、利尻島産の植物（ダケカンバを除く）については1-9種が分離された。利尻島産のダケカンバ (*Betula ermanii*) については、利尻山の異なる標高ごとに内生菌の種構成を比較するために試料を採集し、供試した（2008年調査）。その結果、ダケカンバ生葉からは17種の内生菌

が分離されたが、標高1000 m以上で採取した試料からのみ分離されたのは *Venturia ditricha*, *Gnomonia cf. tridentensis*, *Mycosphaerella berberidis* および *Plagiostoma* sp. であった。

利尻島と西表島の共通種が *Anthostomella cf. eucalyptorum*, *C. cladosporioides*, *D. cf. phaseolorum* および *G. acutata* の4種に限られたことは予想を超えた。

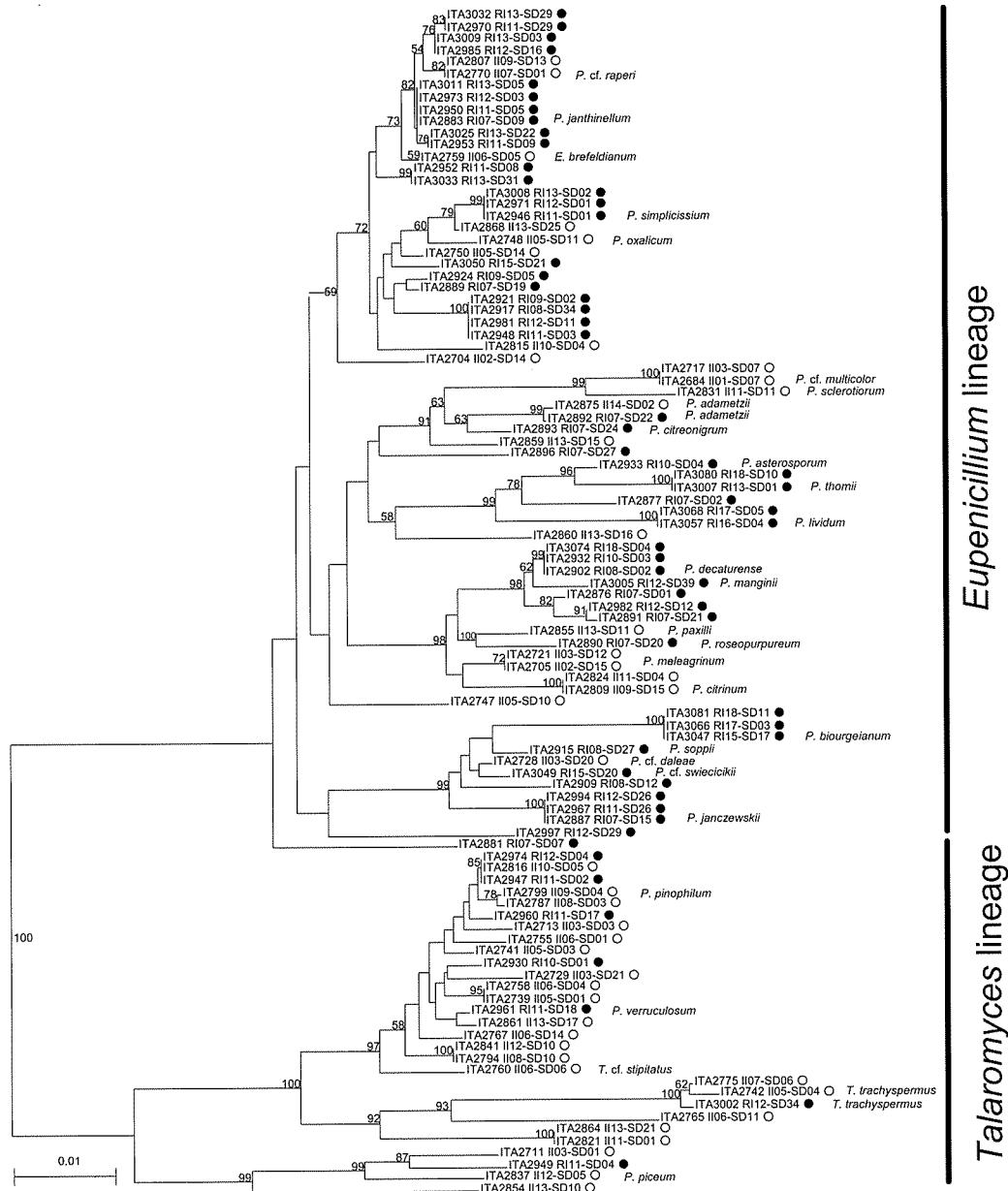


Fig. 1 Phylogenetic tree based on ID region sequences (neighbor-joining method). The scale bar indicates substitutions per nucleotide position. Numbers on the branches indicate the bootstrap percentages (1000 replicates). Open (○) and closed (●) circles indicate isolates from Iriomote Is. and Rishiri Is., respectively.

るものであった。植物相が大きく異なることと菌の宿主特異性を考慮し、両島から採集したツツジ属植物間で内生菌の比較をおこなったが、その結果も *D. cf. phaseolorum* の1種のみが共通であった。これより内生菌の構成種は利尻島と西表島で大きく異なることが示唆された。クロサイワイタケ科菌類はセルロースやリグニン分解能を有し、従来、木材腐朽性の分解菌類としての生態的機能をもつことが知られているが、内生菌としての生態的機能も獲得していると考えられている。今回の調査においては、西表島の試料から *Nemania*, *Xylaria* 属と推定される種を主体にクロサイワイタケ科菌類15種が分離されたが、利尻島の試料からはわずか2種 (*Anthostomella cf. eucalyptorum* および *Daldinia loculata*) が分離されたのみだった。Okane et al. (2008) はタイ産の植物内生性クロサイワイタケ科菌類として21種を認識し、熱帯産クロサイワイタケ科菌類の内生菌類としての高い多様性について報告した。今回の調査からも、多様な常緑広葉樹が生育する熱帯から亜熱帯域では、冷温帯域に比べてより多様なクロサイワイタケ科菌が生息していることが示唆された。西表島からのみ分離された *Neofusicoccum mangiferae* と *Guignardia endophylllicola* は、冷温帯よりも温帯域から熱帯域にかけて広く分布する種であると推察される。一方、*Mycosphaerella berberidis*, *Venturia ditricha* および *Alternaria* sp. は利尻島からのみ分離された。ダケカンバに関する調査から、標高1000m以上で採集した試料のみから分離されたのが *Venturia ditricha*, *Gnomonia cf. trientensis*, *Mycosphaerella berberidis* および *Plagiostoma* sp. であったが、これらの結果から、少なくとも *Mycosphaerella berberidis*, *Venturia ditricha* は、より冷涼な環境を好む種であることが推察される (de Hoog et al., 2000; Okane et al., 2003)。両島に共通する属として認識されたものの中で、特に *Cladosporium*, *Glomerella*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Phomopsis*, *Mycosphaerella*, *Phyllosticta* 各属は、内生菌類相の主要な構成種として報告されている菌種を含むグループである (Stone et al., 2004)。今回の調査からもその普遍性は示唆されたものの、両島間における種レベルでの共通性は高くないことがわかった。

内生菌類は宿主植物を介してその生活環を全うしている。気候と植生が大きく異なる利尻島および西表島では、各植物から分離される菌類の種数には大きな違いは認められなかったが、内生菌類相の構成種は顕著に異なるものと示唆された。

小房子囊菌類およびアナモルフ菌類（不完全菌類）植物寄生性・腐生性の小房子囊菌類および不完全菌類を採集し、分離・同定を行った。利尻島では計210点（子囊菌類118点、アナモルフ菌類92点）の菌類標本を採集し、120点より培養株を得た（うち8株をNBRCに寄託）。西表島では計216点（子囊菌類112点、アナモルフ菌類104点）の菌類標本を採集し、81点より培養株を得た（7株をNBRCに寄託）（Table 2）。

本研究において淡水生子囊菌類である広義 *Massarina ingoldiana* が利尻島・西表島の両島から見いだされた (Hirayama et al., 2010)。本種は水中にて肥大化する粘質膜を子囊胞子周辺に有することで特徴付けられ、原記載 (Shearer & Hyde, 1997) の後、温帯・熱帯の各地から報告してきた (Raja et al., 2009; Shearer, 2001; Shearer et al., 2007; Tsui et al., 2000)。その広い分布は本種が木本・草本の両植物基質に生育できることと、流水域および止水域の両方に生息可能であることに起因するものと解釈されてきたが (Shearer, 2001)，実際は2属4種以上からなる複合種であることが本研究の分子系統解析から判明した (Hirayama et al., 2010)。利尻島の “*M. ingoldiana*” は *M. ingoldiana* の基準種系統とは科レベルで大きく異なる新属 *Tingoldiago* に所属し、西表島の “*M. ingoldiana*” は本種の基準菌株系統に一致することが明らかとなった（新属 *Lindgomycetes* に *L. ingoldianus* として収容）。以上のことは、従来本種を特徴付けてきた胞子の粘質膜が、水環境において収斂進化してきたものであることを示唆している (Hirayama et al., 2010)。これらの種は従来種内変異とみなされてきた微小な形態的差異によって区別可能であることから、*M. ingoldiana* として世界中から報告してきた本種についても、形態的再調査と分子系統解析により再同定を行うべきと考えられた。

また、本研究で得られたタケ類寄生菌の分類を通じ、*Tetraplosphaeria*, *Triplosphaeria*, *Polyplosphaeria*, *Pseudotetraploa*, *Quadricrura* の5属を設立し新科 *Tetraplosphaeriaceae* に収めた (Tanaka et al., 2009)。*Quadricrura* 属では、北日本においてチシマザサ上に高頻度でみられた *Q. septentorialis* と与那国島にてタケ類上にみられた *Q. meridionalis* を新種記載した (Tanaka et al., 2009)。

*Astrosphaeriella aosimensis*, *Byssosphaeria schiedermayeriana*, *Massarina thalassioidea*, *Morosphaeria ramunculicola*, *Morosphaeria velatispora*, *Quintaria lignatilis*, *Trematosphaeria confusa*, *Verruculina enalia* などの種は西表島からの

Table 2 Dothideomycetes and anamorphic fungi collected in Rishiri and Iriomote islands

Taxon	No. of specimens collected	
	Rishiri	Iriomote
<b>Dothideomycetes</b>		
<i>Ascocratera manglicola</i>	1	
<i>Astrosphaeriella aosimensis</i>	3	
<i>Astrosphaeriella trochus</i>	1	
<i>Byssosphaeria schiedermayeriana</i>		1
<i>Didymosphaeria</i> sp.	1	1
<i>Glonium</i> spp.	1	10
<i>Hysterium puricale</i>	1	3
<i>Kalmusia brevispora</i>	1	
<i>Karstenula</i> sp.	1	
<i>Leptosphaeria doliolum</i>	5	
<i>Leptosphaeria fuckeloides</i>	2	
<i>Leptosphaeria</i> spp.	4	
<i>Lindgomyces ingoldianus</i>		1
<i>Lindgomyces</i> sp.		1
<i>Lophiostoma</i> cf. <i>bipolare</i>		5
<i>Lophiostoma caulinum</i>	1	
<i>Lophiostoma compressum</i>	6	
<i>Lophiostoma fuckelii</i>	3	
<i>Lophiostoma macrostomum</i>	3	
<i>Lophiostoma</i> spp.	4	7
<i>Lophiotrema arundinariae</i>	1	
<i>Lophiotrema</i> cf. <i>vagabundum</i>	2	
<i>Lophiotrema</i> sp.	1	
<i>Massarina arundinacea</i>	4	
<i>Massarina thalassioidea</i>		1
<i>Massarina</i> spp.	11	9
<i>Massariosphaeria typhicola</i>	2	
<i>Melanomma</i> sp.	1	
<i>Morosphaeria ramunculicola</i>		3
<i>Morosphaeria velatispora</i>		2
<i>Ophiobolus</i> sp.	2	
<i>Ophiosphaerella</i> sp.	1	
<i>Phaeosphaeria fuckeloides</i>	2	
<i>Phaeosphaeria</i> cf. <i>luctuosa</i>	2	
<i>Phaeosphaeria vagans</i>	2	
<i>Phaeosphaeria</i> spp.	1	2
<i>Pleospora</i> sp.	3	
<i>Quintaria lignatilis</i>		2
<i>Roussoella</i> sp.	2	2
<i>Salsuginea ramicola</i>		2
<i>Splanchnonema mori</i>	1	
<i>Tingoldiago graminicola</i>	2	
<i>Trematosphaeria confusa</i>		5
<i>Trichometasphaeria culmifida</i>	2	
<i>Trichometasphaeria</i> cf. <i>gloeospora</i>	1	
<i>Trichometasphaeria taminensis</i>		1
<i>Trichometasphaeria</i> sp.		1
<i>Triplosphaeria cylindrica</i>	1	
<i>Venturia</i> sp.	1	
<i>Verruculina enalia</i>		9
other hystericeous fungi	5	8
<b>Other Ascomycota</b>	<b>34</b>	<b>32</b>

日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較

Table 2 Dothideomycetes and anamorphic fungi collected in Rishiri and Iriomote (Continued)

Taxon	No. of specimens collected	
	Rishiri	Iriomote
<b>Anamorphic fungi</b>		
<i>Bactorodesmium</i> sp.	1	1
<i>Bahustrabeja</i> sp.		2
<i>Beltrania</i> spp.		2
<i>Berkleasmium</i> spp.		4
<i>Brachysporiella</i> sp.	2	
<i>Canalisporium</i> spp.		9
<i>Corynespora</i> sp.		2
<i>Cryptophiale</i> sp.		2
<i>Dictyosporium</i> spp.	1	8
<i>Dinemasporium</i> sp.	4	3
<i>Ellisembia</i> sp.	3	3
<i>Endophragmiella</i> sp.	1	1
<i>Exserticlava</i> sp.		3
<i>Koorchaloma</i> sp.	2	2
<i>Megacapitula</i> sp.		1
<i>Monodictys</i> sp.	1	
<i>Periconia byssoides</i>	2	
<i>Phialosporostilbe</i> sp.	4	
<i>Piricauda</i> spp.	5	4
<i>Pseudoacrodictys</i> spp.		2
<i>Pseudolachnea</i> sp.	1	
<i>Pseudolachnella</i> spp.	4	
<i>Pseudotetraploa curviappendiculata</i>	1	
<i>Quadricrura meridionalis</i>		1
<i>Quadricrura septentorionalis</i>	4	
<i>Spegazzinia</i> spp.		2
<i>Sporidesmium</i> sp.	1	2
<i>Sporoschisma</i> sp.		2
<i>Tetraploa</i> spp.	2	4
<i>Tretopileus</i> sp.		2
<b>Other anamorphic fungi</b>	<b>53</b>	<b>42</b>
<b>Total</b>	<b>210</b>	<b>216</b>

み確認できたが、これらはいずれもヤシ類やマンゴープ類上に見られた子のう菌類であり、宿主植物に対応した分布結果であると考えられる。一方、*Leptosphaeria*, *Ophiobolus*, *Phaeosphaeria* 各属などは一般に広範な宿主域をもつ種で構成される属であるが (Shoemaker, 1984; Shoemaker & Babcock, 1989), 本研究では利尻島の方で比較的多様であった。この結果が自然の分布を反映したものか否かは、本研究の限定的な調査からは不明であるが、今後再検討すべき興味深い結果であると思われる。

以上のほか日本新産種である *Salsuginea ramicola* を西表島にて確認し、18S および 28S nrDNA, TEF, RPB2 の分子データから本菌の系統学的所属を初めて明らかにした (Suetrong et al., 2009)。また、利尻島産の *Phaeosphaeria brevispora* について新組合せ

*Kalmusia brevispora* を提案した (Zhang et al., 2009)。

なお、本研究を通じて 200 株以上の培養株が得られたがその大部分は未同定であり、寄託したものは 15 株に過ぎない。残りの菌株については形態観察および分子系統解析によって種同定を行い寄託を進める予定である。

海生菌類（好砂海生菌類） 利尻島からは、7 種 32 菌株を分離した。そのうち、冷温帶海域のみから分布が報告されているのは未記載種 1 種を含む 3 種 (*Lindra obtusa*, *Halosigmoidea parvula*, *Halosigmoidea* sp.) であった (Nakagiri & Tubaki, 1983; Nakagiri 1989)。西表島からは 5 種 8 株を分離したが、そのうち 1 種（日本新産種 *Savoryella*

*appendiculata*) は、熱帯域からのみ報告されている種であった (Table 3). 分離株の内、27株を NBRC に寄託した。利尻島から分離された未記載種は、形態および LSU rDNA による系統解析の結果、子囊菌ハロスフェリア目 Halosphaeriales のアナモルフ *Halosigmoidea* 属に属する種であることが明らかになった。また、培養性状を調べたところ、分生子形成の適温が 15-20°C、塩分濃度は 10-20% であることから、冷温帶域の海岸に適応した性状を持つことがわかった。また、培養により、子囊殻様の菌核構造 (sclerocarp) が形成されるが、内部は成熟しないことがわかった。

利尻島では、温帶域を中心に広く分布する種に加えて冷温帶域分布種が、一方、西表島では、広域分布種に加えて熱帶域分布種が付加した菌類相であることが分かった。利尻島から発見された未記載種 *Halosigmoidea* sp. は、LSU rDNA による系統解析の結果、海生子囊菌 *Corollospora* 属のアナモルフであることが明らかになったが、有性生殖能を失った種であることも明らかになった。分布域と生活環の分化との関係を探る上でも興味深い菌種である。

**冬虫夏草類** 本調査では、アナモルフ菌類（不完全菌類）6属13種、子囊菌門5属5種（他に、担子菌門1属1種）、合計19種（利尻島6種、西表島15種）が認識され、そのうち17種28菌株を確立した (Table 4)。両島の共通種は *Beauveria bassiana*, *Isaria tenuipes*, *Gibellula* spp. であった。*Gibellula* 属種では未熟または過熟により本属の特徴的な形態を示さない標本もあり、種レベルの同定は困難であったが、分子情報 (ITS 領域) によるといずれも *G. pulchra* に近縁であった。その一方で、ITS 領域の塩基配列に地域によるまとまりがみられた。

*Metarhizium* sp. 1 は土壤中の鱗翅目蛹から赤色の分生子柄束様の構造体を形成し、その上にフィアライドがさく状に配列しており、当初 *Akanthomyces* 属と推察されたが、ITS および 28S rDNA D1/D2 領域による分子系統解析の結果、*Metarhizium* 属に近縁であることがわかった。本種は本州でも既に採取しており、新種の可能性がある。*Simplicillium* 属は ITS 領域で種が同定できるが、*Simplicillium* sp. は DNA データバンクに登録された既知種との配列とは一致しなかった。しかしながら同じく *Simplicillium* sp. として登録されている菌株と高い相同性を示しており、これらと合わせて解析することで新種として提唱できるものと考える。*Torrubiella* cf. *ryukyuensis* とした標本は、小型のクモが白色菌糸に覆われており、菌糸に

埋没するように微小で黄色の子囊殻が形成されていた。未熟個体であり、DNA データバンクにも登録されていない種であるため、確かな同定にはさらに検討が必要である。

これまでに利尻島では、*C. militaris*, *Ophiocordyceps heteropoda*, *O. sphecocephala*, *Elaphocordyceps toriharamontana*, *Isaria tenuipes*, *Cordyceps* 属未記載種 1 種の発見記録がある（利尻町立博物館、1999）。一方、西表島では、*O. dipterigena*, *O. elateridicola*, *O. sphecocephala*, *C. pseudolongissima*, *C. pleuricapitata*, *C. kanzeshiana*, *C. rubiginosostipitata*, *Nomuraea atypicola*, *G. pulchra*, *I. tenuipes*, 未記載種 2 種が採取されており（宇梶、2006），その他に *O. fasciculatostromata*, *C. termitophila*, *C. iriomoteana*, *C. polycephala*, *C. sakishimensis*, *C. ramosostipitata*, *T. iriomoteana*, *T. ryukyuensis*, *T. plana*, *T. minuta* が西表から採集された標本に基づいて学名記載が行われた（Kobayasi & Shimizu, 1978, 1982a, 1982b, 1983）。

*Cordyceps* 属（広義の）と *Torrubiella* 属（広義の）は近年、複数の遺伝子領域を用いた分子系統解析によって、*Cordycipitaceae*, *Ophiocordycipitaceae*, *Clavicipitaceae*（狭義の）の 3 科に再分類された（Sung et al., 2007）。今回の調査では、西表島では Clavicipitaceae に属する種が 7 種採取されたが、利尻島では採取されなかった。全体の採取種数も利尻島より西表島の方が多く、南西諸島固有種の *Ophiocordyceps elateridicola* も発見することができた。このことから亜熱帶地域である西表島の方が、冬虫夏草菌類および昆虫と関係する菌類がより多様であることが示唆された。

冬虫夏草類は多種多様の昆虫・クモに寄生するが、森林内の沢沿いのような高温多湿の場所で発見されることが多い。利尻島で採取される *Cordyceps* 属（広義の）は、セミの幼虫のように地中カリター中に生息する昆虫から生ずる種である。今回利尻島で採取された *O. sphecocephala* も朽木内のハチ成虫から生じていた。外気に曝される葉裏からは、生育の早い種類のアナモルフだけが採取された。その一方で、西表島では葉裏の表面に生息する昆虫に生じたテレオモルフ (*Conoideocrella*, *Torrubiella* 両属) も採取され、過去の記録からも外気に曝される地上部に生じる種が多い。これは、Kobayasi (1941) が記述した地理的分布及び生息場所の傾向の記述に合致する。おそらく本菌群は高温多湿を好む傾向にあることと、寄主となる昆虫も亜熱帶域の方が多様性に富むことにより、西表島からの採取種類が多いという結果になったものと示

日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較

Table 3 Marine fungi isolated from sea foam collected at Rishiri Island and Iriomote Islands

Strain no.	Fungus name	Source & Locality	Deposited to NBRC
<b>Rishiri Island, 2008/07/28<sup>a</sup></b>			
AN-1775	<i>Lindra obtusa</i>	sea foam, Ishizaki	○
1776	<i>Lindra obtusa</i>	sea foam, Ishizaki	
1777	<i>Lindra obtusa</i>	sea foam, Ooiso	○
1778	<i>Lindra obtusa</i>	sea foam, Ooiso	
1779	<i>Halosigmoidea</i> sp.	sea foam, Ooiso	○
1780	<i>Halosigmoidea</i> sp.	sea foam, Ooiso	○
1781	<i>Halosigmoidea</i> sp.	sea foam, Ooiso	○
1782	<i>Halosigmoidea</i> sp.	sea foam, Ooiso	
1783	<i>Halosigmoidea parvula</i>	sea foam, Ooiso	
1784	<i>Halosigmoidea parvula</i>	sea foam, Ooiso	○
1785	<i>Halosigmoidea parvula</i>	sea foam, Ishizaki	○
1786	<i>Halosigmoidea parvula</i>	sea foam, Ishizaki	
1787	<i>Trailia ascophylli</i>	sea foam, Ooiso	○
1788	<i>Trailia ascophylli</i>	sea foam, Ooiso	○
1789	<i>Trailia ascophylli</i>	sea foam, Ooiso	
1790	<i>Trailia ascophylli</i>	sea foam, Ooiso	
1791	<i>Corollospora maritima</i>	sea foam, Ooiso	○
1792	<i>Corollospora maritima</i>	sea foam, Ooiso	○
1793	<i>Corollospora pseudopulchella</i>	sea foam, Ooiso	○
1794	<i>Corollospora pseudopulchella</i>	sea foam, Ooiso	○
1795	<i>Corollospora pseudopulchella</i>	sea foam, Ooiso	
<b>Rishiri Island, 2009/07/16<sup>a</sup></b>			
1803	<i>Halosigmoidea</i> sp.	sea foam, Numaura	○
1804	<i>Halosigmoidea</i> sp.	sea foam, Numaura	○
1805	<i>Halosigmoidea</i> sp.	sea foam, Numaura	
1806	<i>Halosigmoidea</i> sp.	sea foam, Numaura	
1807	<i>Halosigmoidea parvula</i>	sea foam, Numaura	○
1808	<i>Halosigmoidea parvula</i>	sea foam, Numaura	○
1809	<i>Halosigmoidea parvula</i>	sea foam, Numaura	
1810	<i>Halosigmoidea parvula</i>	sea foam, Numaura	
1811	<i>Dendryphiella salina</i>	sea foam, Numaura	○
1812	<i>Trailia ascophylli</i>	sea foam, Numaura	○
1813	<i>Trailia ascophylli</i>	sea foam, Numaura	○
<b>Iriomote Island, 2007/09/26<sup>a</sup></b>			
1796	<i>Lindra thalassiae</i>	Hoshizuna-hama	○
1797	<i>Lindra thalassiae</i>	Hoshizuna-hama	○
1798	<i>Lindra thalassiae</i>	Hoshizuna-hama	
<b>Iriomote Island, 2009/02/11<sup>a</sup></b>			
1815	<i>Carbosphaerella leptosphaerioides</i>	sea foam, Tsukigahama	○
1816	<i>Carbosphaerella leptosphaerioides</i>	sea foam, Tsukigahama	○
1817	<i>Savoryella appendiculata</i>	sea foam, Tsukigahama	○
1818	<i>Corollospora colossa</i>	sea foam, Tsukigahama	○
1819	<i>Corollospora maritima</i>	sea foam, Tsukigahama	○

<sup>a</sup>: Sampling date

**Table 4** Specimens and isolates of insect fungi collected from Iriomote Island and Rishiri Island, and BLAST results from their ITS region sequences

Species	Specimen no.	Strain no.	Host	Highly matched taxon in DNA databank	Similarity
Iriomote Is.					
<i>Beauveria bassiana</i>	NBRC H-12700	SB-208	adult of Coleoptera	<i>Cordyceps bassiana</i> AY532060	551/551 (100%), Gaps = 0
<i>Conoideocrella luteorstrata</i>	NBRC H-12704	SB-209	unknown	<i>Torrubiella luteostrata</i> AY624206	509/542 (93%), Gaps = 28
<i>Conoideocrella luteorstrata</i>	NBRC H-12704	SB-210	unknown	<i>Torrubiella luteostrata</i> AY624206	509/542 (93%), Gaps = 28
<i>Cordyceps cicada</i>	NBRC H-12714		larva of Cicadidae		
<i>Gibellula</i> sp.	SB-204	unknown		<i>Gibellula</i> sp. BCMU GP01 AB237661	591/600 (98%), Gaps = 1
<i>Gibellula</i> sp.	NBRC H-12707	SB-214	spider	<i>Akanthomyces novoguineensis</i> EU369032	533/566 (94%), Gaps = 4
<i>Isaria</i> cf. <i>tenuipes</i>	SB-217	cocoon		<i>Isaria tenuipes</i> EU828664	568/569 (99%), Gaps = 0
<i>Isaria</i> sp.	NBRC H-12697	SB-205	unknown	<i>Torrubiella flava</i> AB100609	324/333 (82%), Gaps = 27
<i>Isaria takamizusanensis</i>	NBRC H-12664	SSB-188-1	<i>Cryptotympana</i> sp.	<i>Paecilomyces lilacinus</i> AB124670	578/579 (99%), Gaps = 0
<i>Isaria tenuipes</i>	NBRC H-12699	SB-207	unknown	<i>Cordyceps takaomontana strain</i> BCC 1409	569/569 (100%), Gaps = 0
<i>Isaria tenuipes</i>	NBRC H-12706	SB-213	larva of Lepidoptera	<i>Isaria tenuipes</i> AB086213	566/569 (99%), Gaps = 0
<i>Metarhizium</i> sp. 1	SB-215	cocoon of Lepidoptera		<i>Metarhizium flavoviride</i> AY646394	534/607 (87%), Gaps = 37
<i>Metarhizium</i> sp. 2	SB-216	gadfly		<i>Metarhizium flavoviride</i> AY251267	538/541 (99%), Gaps = 2
<i>Nomuraea atypicola</i>	SB-212	<i>Spinosa</i> sp.		<i>Cordyceps cylindrica</i> AB099942	578/588 (98%), Gaps = 4
<i>Ophiocordyceps elateridicola</i>	NBRC H-12713	SB-261-1	larva of Coleoptera	<i>Simplicillium</i> sp. KYK00024 AB378539	553/559 (98%), Gaps = 0
<i>Simplicillium</i> sp.	NBRC H-12715	SB-218	termite nest	<i>Termitomyces</i> sp. Type B AB0511890	472/472 (100%), Gaps = 0
<i>Termitomyces</i> sp.	NBRC H-12717	SB-219	spider	<i>Pochonia suchlasporia</i> FI439582	501/604 (82%), Gaps = 63
Rishiri Is.					
<i>Beauveria bassiana</i>	NBRC H-12636	NSB-176-1	gadfly	<i>Cordyceps bassiana</i> AB079609	551/551 (100%), Gaps = 0
<i>Gibellula</i> cf. <i>pulchra</i>	NBRC H-12722	SB-251-1	spider	<i>Gibellula</i> sp. BCMU GP01 AB237661	514/621 (82%), Gaps = 56
<i>Gibellula pulchra</i>	NBRC H-12768	SB-252	spider	<i>Gibellula</i> sp. BCMU GP01 AB237661	573/620 (92%), Gaps = 22
<i>Gibellula pulchra</i>	NBRC H-12768	SB-253	spider	<i>Gibellula</i> sp. BCMU GP01 AB237661	573/620 (92%), Gaps = 22
<i>Gibellula pulchra</i>	NBRC H-12724	SB-254	spider	<i>Gibellula</i> sp. BCMU GP01 AB237661	514/621 (82%), Gaps = 56
<i>Gibellula pulchra</i>	NBRC H-12724	SB-255	spider	<i>Gibellula</i> sp. BCMU GP01 AB237661	514/621 (82%), Gaps = 56
<i>Isaria</i> cf. <i>tenuipes</i>	NBRC H-12635	NSB-181-1	larva of Lepidoptera	<i>Paecilomyces cicadae</i> IFO 33259	568/569 (99%), Gaps = 0
<i>Isaria fumosoroea</i>	NBRC H-12634	NSB-175-1	larva of Lepidoptera	<i>Paecilomyces fumosoroeus</i> AF461744	570/570 (100%), Gaps = 0
<i>Isaria fumosoroea</i>	NBRC H-12723	SB-220	longicorn	<i>Paecilomyces fumosoroeus</i> AF461744	570/570 (100%), Gaps = 0
<i>Ophiocordyceps sphacelophaga</i>	NBRC H-12725	SB-256-1	wasp		

唆される。

**核菌類およびアナモルフ菌類（不完全菌類）** 今回の採集で合計 122 標本を採集し、134 菌株の分離に成功した。内わけは、利尻島の沼・川・湿原・森林・畑など 11ヶ所から、合計 51 標本を採集しその結果、核菌類 2 科 5 属 22 菌株を分離し、新種と思われる 1 種を確認した。また、核菌類とは別に植物病原糸状菌類と思われる 11 菌株も得た。西表島では、川・森林・農園などの 13ヶ所から、合計 33 標本を採集した。その結果、核菌類 3 科 9 属 13 菌株を分離した。また、核菌類とは別に植物病原糸状菌類と思われる 24 菌株も得た。さらに、石垣島、宮古島の 10ヶ所から、合計 38 標本を採集し植物病原菌類と思われる 64 菌株を得た。なお、現在種まで同定できた株は、合計 90 株 (Table 5) であり、そのうち *Cosmospora* 属菌の 1 新種と、*Bionectria grammicosporopsis* (*Clonostachys grammicosporopsis*)、*Hypocrea strictipilosa* (*Trichoderma strictipile*)、*Hypocrea cf. atroviridis* (*Trichoderma atroviride*) の日本新産 3 種が含まれていた。

種まで同定ができた核菌類は、北で 5 種、南で 10 種であった。この結果から、わが国の亜熱帯地域における核菌類の多様性は高いと考えられ、Samuels et al. (2002) による見解と一致していた。北部の種については、南部と比べて分離率が低かったものの、新種と思われる *Cosmospora* sp. を利尻島全域で多数分離した。これは、利尻島における核菌類の調査が全く行われていなかつたためだと考えられる。

核菌類は、植物寄生性だけでなく昆虫寄生性や菌寄生性を持つ種が多く存在し、今回の調査においても担子菌類の子実体上から *Hypocrea pachybasioides* (*Trichoderma polysporum*) と *Hypocrea strictipilosa* (*Trichoderma strictipile*) を、Xylariales の子囊殼孔口部上から *Bionectria byssicola* (*Clonostachys byssicola*) を観察した。これらは、今後農業分野などにおける生物防除資材としての可能性が期待される。

また、Ophiostomatales および Diaporitales 等木材基質に依存する分類群について利尻島では 6ヶ所で採集を行い、120 菌株を得ることができた。そのうち、種数は 11 種あったが、未記載種が 1 種含まれていた。トドマツキクイムシ (*Euwallacea validus*) からは *Ophiostoma* 属 3 種と *Leptographium* 属 1 種が分離された。未記載種を含んでいたが、これらは全て本州のトドマツキクイムシから分離される種類と同じであった。一方、西表島では 3 か所から 65 菌株を確立し、7 種を同定した。未記載種が 1 種含まれていた。特に

ブナ科広葉樹に特有の菌類が採取された。

利尻島と西表島における核菌類の種類相の比較は単純にはできないが、それぞれの植生、ハビタット、宿主を反映した種類相であると考えられた。特に *Ophiostoma* 属菌は日本固有種のみ検出できた。オフィオストマ目 Ophiostomatales については、キクイムシ隨伴性種は利尻島では高頻度に検出できるが、西表島ではほとんど採取できなかった。逆に木口面に生じる種類は利尻島ではあまり検出されていない。このことは地域によって分散戦略に違いがあることを示唆しているのかもしれない。この点については、今後より広範な採集と生態調査が必要である。

植物病原菌においても核菌類と同様、亜熱帯地域において多数の菌類を分離した。今回の調査では、ミズバショウ (*Lysichiton camtschatcense*) から分離した *Stemphylium vesicarium*、リシリオダマキ (*Aquilegia flabellata* var. *pumila* f. *konoii*)、セイヨウオダマキ (*Aquilegia vulgaris*) から分離した *Stemphylium lycopersici*、シンゴニウム (*Syngonium podophyllum*) から分離した *Colletotrichum capsici*、トックリヤシモドキ (*Mascarena verschaffeltii*)、センダン (*Melia azedarach*) から分離した *Fusicoccum aesculi*、カキバカンコノキ (*Glochidion zeylanicum*) から分離した *Colletotrichum gloeosporioides*、ヒイラギズイナ (*Itea oldhamii*) から分離した *Discosella cylindrospora*、アダン (*Pandanus odoratissimus*) から分離した *Fusicoccum aesculi*、コガネモンビン (*Spomdias lutea*) から分離した *Zygophiala jamaicensis*、デンドロビウム (*Dendrobium* sp.)、バンダ (*Vanda* sp.) から分離した *Colletotrichum boninense*、ニガウリ (*Momordica charantia*) から分離した *Geotrichum candidum* および *Corynespora cassiicola*、ドラゴンフルーツ (*Hylocereus undatus*)、カブ (*Brassica rapa* var. *glabra*) から分離した *Colletotrichum capsici*、アロエ・ベラ (*Aloe vera*) から分離した *Lasiodiplodia theobromae* は、未記録の病害であると考えられる。の中でもニガウリやドラゴンフルーツ、アロエ・ベラなどは、商業的に重要な作物であるため、今後これら作物に対する分離菌を使った接種試験を行い、病害防除に役立てたい。

**Aspergillus** 関連属菌類 西表島、利尻島の土壤（森林、畑、河川流域など）各 100 検体からの **Aspergillus** 関連菌類の出現頻度はそれぞれ、*Fumigati* 節 32%，33%（このうち非典型的な *A.*

Table 5 List of pyrenomycete isolates

Species	Location <sup>b</sup>	MAFF no.
<i>Cosmospora</i> sp. ( <i>Fusarium</i> sp.) <sup>a</sup>	Rishiri	240564
<i>Alternaria alternata</i>	Rishiri	240565
<i>Stemphylium vesicarium</i>	Rishiri	240566
<i>Hypocrea pachybasiodoides</i> ( <i>Trichoderma polysporum</i> )	Rishiri	240567
<i>Stemphylium lycopersici</i>	Rishiri	240450
<i>Stemphylium lycopersici</i>	Rishiri	240449
<i>Hypocrea strictipilosa</i> ( <i>Trichoderma strictipile</i> )	Rishiri	240568
<i>Cosmospora</i> sp. ( <i>Fusarium</i> sp.)	Rishiri	240569
<i>Cosmospora</i> sp. ( <i>Fusarium</i> sp.)	Rishiri	240570
<i>Cosmospora</i> sp. ( <i>Fusarium</i> sp.)	Rishiri	240571
<i>Cosmospora</i> sp. ( <i>Fusarium</i> sp.)	Rishiri	240572
<i>Hypocrea cf. atroviridis</i> ( <i>Trichoderma atroviride</i> )	Rishiri	240573
<i>Hypocrea cf. atroviridis</i> ( <i>Trichoderma atroviride</i> )	Rishiri	240574
<i>Cosmospora</i> sp. ( <i>Fusarium</i> sp.)	Rishiri	240575
<i>Cosmospora</i> sp. ( <i>Fusarium</i> sp.)	Rishiri	240576
<i>Cosmospora</i> sp. ( <i>Fusarium</i> sp.)	Rishiri	240577
<i>Cosmospora</i> sp. ( <i>Fusarium</i> sp.)	Rishiri	240578
<i>Botrytis cinerea</i>	Rishiri	240447
<i>Pleospora herbarum</i> ( <i>Stemphylium</i> sp.)	Rishiri	240448
<i>Neonectria coccinea</i> ( <i>Cylindrocarpon candidum</i> )	Rishiri	240579
<i>Pseudozyma aphidis</i>	Rishiri	230058
<i>Lasionectria sylvana</i> ( <i>Acremonium</i> sp.)	Iriomote	240580
<i>Nectria pseudotrichia</i> ( <i>Tubercularia lateritia</i> )	Iriomote	240581
<i>Trichoderma</i> cf. <i>harzianum</i>	Iriomote	240582
<i>Bionectria grammicosporopsis</i> ( <i>Clonostachys grammicosporopsis</i> )	Iriomote	240583
<i>Haematonectria haematococca</i> ( <i>Fusarium</i> sp.)	Iriomote	240584
<i>Nectria pseudotrichia</i> ( <i>Tubercularia lateritia</i> )	Iriomote	240585
<i>Arachnocrea scabrida</i> ( <i>Verticillium</i> -like)	Iriomote	240586
<i>Bionectria byssicola</i> ( <i>Clonostachys byssicola</i> )	Iriomote	240587
<i>Nectria pseudotrichia</i> ( <i>Tubercularia lateritia</i> )	Iriomote	240588
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Iriomote	240452
<i>Colletotrichum capsici</i>	Iriomote	240453
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Iriomote	240454
<i>Fusicoccum aesculi</i>	Iriomote	240457
<i>Fusicoccum aesculi</i>	Iriomote	240463
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Iriomote	240464

日本の亜熱帯域および冷温帯域の糸状菌類相の多様性とその比較

Table 5 List of pyrenomycte isolates (Continued)

<i>Stemphylium vesicarium</i>	Iriomote	240465
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Iriomote	240467
<i>Meira nashicola</i>	Iriomote	240471
<i>Discosia cylindrospora</i>	Iriomote	240473
<i>Discosia cylindrospora</i>	Iriomote	240474
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Iriomote	240475
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Iriomote	240476
<i>Fusicoccum aesculi</i>	Iriomote	240478
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sensu lato (RG2)	Ishigaki	240480
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Ishigaki	240482
<i>Zygomphala jamaicensis</i>	Ishigaki	240485
<i>Zygomphala jamaicensis</i>	Ishigaki	240486
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Ishigaki	240489
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ishigaki	240490
<i>Colletotrichum capsici</i>	Ishigaki	240492
<i>Colletotrichum capsici</i>	Ishigaki	240494
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ishigaki	240495
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Ishigaki	240499
<i>Colletotrichum boninense</i>	Ishigaki	240501
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sensu lato (RG2)	Ishigaki	240503
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sensu lato (RG2)	Ishigaki	240504
<i>Colletotrichum boninense</i>	Ishigaki	240505
<i>Auricularia polytricha</i>	Ishigaki	240508
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ishigaki	240510
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sensu lato (RG6)	Miyako	240513
<i>Corynespora cassiicola</i>	Miyako	240443
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Miyako	240515
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Miyako	240516
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> sensu lato (RG2)	Miyako	240517
<i>Fusarium solani</i>	Miyako	240518
<i>Geotrichum candidum</i>	Miyako	240519
<i>Choanephora cucurbitarum</i>	Miyako	240520
<i>Corynespora cassiicola</i>	Miyako	240444
<i>Cercospora citrullina</i>	Miyako	240522
<i>Corynespora cassiicola</i>	Miyako	240445
<i>Colletotrichum capsici</i>	Miyako	240523
<i>Colletotrichum capsici</i>	Miyako	240525
<i>Colletotrichum boninense</i>	Miyako	240528

Table 5 List of pyrenomycete isolates (Continued)

<i>Macrophomina phaseolina</i>	Miyako	240530
<i>Bipolaris cactivora</i>	Miyako	240531
<i>Colletotrichum capsici</i>	Miyako	240532
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Miyako	240533
<i>Stemphylium vesicarium</i>	Miyako	240534
<i>Choanephora cucurbitarum</i>	Miyako	240536
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Miyako	240537
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Miyako	240538
<i>Stemphylium vesicarium</i>	Miyako	240539
<i>Colletotrichum capsici</i>	Miyako	240540
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Miyako	240542
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Miyako	240543
<i>Haematonectria haematococca</i> ( <i>Fusarium</i> sp.)	Miyako	240589
<i>Haematonectria haematococca</i> ( <i>Fusarium</i> sp.)	Miyako	240590
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Miyako	240591
<i>Pseudozyma aphidis</i>	Miyako	230059

<sup>a</sup> ( ): Anamorphic name.<sup>b</sup> Rishiri: Rishiri Island; Iriomote: Iriomote Island; Ishigaki: Ishigaki Island; Miyake: Miyake Island.

Table 6 Isolation rates of Aspergillus species

	Rishiri Is. (100 soil samples)	Iriomote Is. (100 soil samples)	Xinjiang, China <sup>a</sup> (376 soil samples)
<i>Sect. Fumigati</i>			
<i>A. fumigatus</i> s. str.	33%	32%	14%
Atypical <i>A. fumigatus</i>	1%	0%	7%
<i>Sect. Nigri</i>	11%	45%	50%
<i>Sect. Flavi</i>	1%	4%	10%
<i>Sect. Terrei</i>	6%	21%	19%
<i>Sect. Nidulantes</i>	1%	4%	14%

<sup>a</sup> It is not the data on this project, but listed to clarify the distinction of microbiota among Iriomote and Rishiri Islands, and dry area.

*fumigatus* 0%, 1%) , *Nigri* 節 45%, 11%, *Flavi* 節 4%, 1%, *Terrei* 節 21%, 6%, *Nidulantes* 節 4%, 1% であった。利尻島より分離された非典型的な *A. fumigatus* は、 $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列による検討の結果、*A. viridinutans* と同定した。利尻島よりも西表島は、*Fumigati* 節を除き病原性を示す *Aspergillus* 属の分離頻度が高かった。対照とした中

国乾燥地帯である新疆自治区の土壤とは、*Aspergillus* 属各節によって分離頻度が異なった。また、非典型的 *A. fumigatus* に着目し分離を行ったが、その頻度は極めて低かった (Table 6)。

亜熱帯域と冷温帶域の違いに関係なく、*Fumigati* 節が高頻度に分離されたのに対して、他の節では明らかに亜熱帯域での分離頻度が高かった。その要因は、

冷温帶域からは *Aspergillus* 属と比較すると好冷な傾向を示す *Penicillium* 属が高頻度に分離されたことからも両地域での気温の違いと考えられる。 *Fumigati* 節においては、湿潤な気候である利尻島、西表島からは典型的な *A. fumigatus* が高頻度に分離されるのにに対して、中国新疆自治区の土壤からは非典型的な *A. fumigatus* の分離頻度が高かった。乾燥地帯であるオーストラリアでは非典型的 *A. fumigatus* である *A. viridinutans* が高頻度で分離されていた (Varga *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2005)。また、スペインでは *Aspergillus* 関連菌類による真菌症のうち、非典型的な *A. fumigatus* である *A. lentulus* が原因となる比率が高くなっていた (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008)。これらは非典型的な *A. fumigatus* は乾燥地帯での分布が高いという同様の結果である。

**半水生菌類** 本研究で92菌株を分離した。その内訳は、利尻島から45菌株（11属13種、うち1属1種水生菌類を含む）、西表島から47菌株（14属21種、うち3属3種水生菌類を含む）であった。最終的に72菌株（21属30種、うち4属4種水生菌類を含む）をNBRCへ寄託した。また、西表島分離株は2種の未記載種を含んでいた。得られた分離株を比較すると、利尻島では *Aegerita candida*, *Pseudaegerita corticalis* が多くの採集場所で分離されたことから、これらの種が利尻島での優占種であることが示唆された。一方で、西表島では、これら2種は分離されず、*Candelabrum brocchiatum*, *Helicomycetes* 属, *Helicosporium* 属多くの採集場所で分離された。また、利尻分離株と西表分離株の種はほとんど一致しなかった (Table 7)。

利尻島と西表島は、それぞれに多様な半水生菌類が生息していることが明らかになった。また、冷温帶に位置する利尻島と亜熱帶に位置する西表島の分離株の菌類相は、ほとんどが一致せず、採集場所の水温が利尻島では7.5-24°C、西表島では26-34°Cと異なることから、温度域（気候区分）による菌類相の違いが示唆された。また、28S rDNA (D1/D2領域) 塩基配列に基づく系統解析より、利尻島分離株は担子菌類や子囊菌類の Leotiomycetidae (Helotiales) に所属するものが多く、西表島分離株は子囊菌類の Sordariomycetidae や Dothideomycetidae に所属するものが多かった。

**リグニン分解菌類（植物腐朽菌類）** 標高に沿った菌類多様性のパターン解析 菌類の多様性は気候条件の変化にともなって変化することから、人為起源の環境変化の指標となることが知られている。特に高緯

度・高標高の寒冷地では、地球温暖化にともなう温度条件の変化が大きいと予想されている。このことから、標高にともなった菌類多様性の変化パターンとその律速要因を知ることは、将来的な菌類多様性の変化を予測する上で必要不可欠な予備情報となる。本研究では、ダケカンバ (*Betula ermanii*) 落葉に生息する微小菌類の分布を、北海道北部の利尻島にある利尻山（標高1721m）の標高に沿って調べた (Osono & Hirose, 2009)。

その結果、全体で35種の微小菌類が出現した。うち *Trichoderma viride*, *T. hamatum*, *T. polysporum*, *Mucor hiemalis*, *M. genevensis*, *Penicillium soppi*, *P. thomii* および *Cladosporium cladosporioides*, *Mortierella cf. polycephala*, *Paecilomyces* sp., *Piliidiella* sp., *Phoma* sp. の12種が高頻度で出現した。微小菌類の種の豊かさ、多様度指数、均衡度は1500m地点において他の4地点よりも低かった。種組成の類似度は300, 600, 900mの3地点間で比較的高かったが、これら3地点とより高い標高の2地点（1200, 1500m）とで種組成の類似度は低かった。また1200m地点と1500m地点の類似度は低かった。優占する12種は、標高に沿った出現パターンから、600m, 900m, 1200m, 1500m地点でそれぞれ出現頻度が最大となる4群に区分された。以上の結果から、ダケカンバ落葉上の微小菌類の多様性と種組成は利尻山の標高にともなう環境の変化に対して変化しており、その変化は特に1200mより高い標高の地点で顕著であった。

**リグニン分解活性を有する菌類の多様性解析** 菌類は難分解性の構造性有機物であるリグニンを効率的に分解する能力を有しており、森林土壤における落葉の分解において中心的な役割を担う。リグニン分解性菌類の定着を受けた落葉組織は白色化することが知られており、落葉の漂白とよばれる。落葉の漂白現象は、冷温帶林のブナ、暖温帶林のヤブツバキ、亜熱帶林のスダジイ、ダグラスモミ林のツツジ科の下層植生、熱帶季節林のフタバガキ科樹種などでこれまで報告があり、担子菌類や子囊菌類が漂白に関与していることが明らかにされている。本研究では、利尻島で観察されたブナ科樹種であるミズナラ (*Quercus crispula*) の漂白を受けた落葉と、西表島で観察された同じくブナ科のスダジイ (*Castanopsis sieboldii*) の漂白を受けた落葉を材料として、漂白に関与する菌類の多様性を比較調査した (大園, 広瀬, 2009)。

その結果、ミズナラ落葉では分離された47菌株中、漂白部から分離された白色の胞子未形成菌株 (RQ-BL-21), 暗色の胞子未形成菌株 (RQ-BL-151), お

Table 7 Aero-aquatic and aquatic fungi isolated from Rishiri Is. and Iriomote Islands

Sampling site/Fungus	Substrate
Rishiri Island.	
Hime-numa	
<i>Aegerita candida</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicoon sessile</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicoon</i> sp.	Submerged decaying twigs
<i>Pseudaegerita corticalis</i>	Submerged decaying twigs
<i>Spirospheara carici-graminis</i>	Submerged decaying twigs
River near Hime-numa	
<i>Candelabrum japonense</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicomycetes</i> sp.	Submerged decaying twigs
<i>Pseudaegerita corticalis</i>	Submerged decaying twigs
Kanrosensui	
<i>Aegerita candida</i>	Submerged decaying twigs
<i>Aegerita tortuosa</i>	Submerged decaying twigs
<i>Clathrosporium olivatrum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicosporium griseum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicosporium</i> ?	Submerged decaying twigs
<i>Pseudaegerita corticalis</i>	Submerged decaying twigs
Kutsugata	
<i>Pseudaegerita corticalis</i>	Submerged decaying twigs
<i>Pseudaegerita</i> sp.	Submerged decaying twigs
<i>Varicosporium elodeae</i>	Submerged decaying litter
Menushoro-numa, Minamihama-shitsugen	
<i>Spirospheara dimorpha</i>	Submerged decaying litter ( <i>Sasa veitchii</i> ?)
Otatomari-numa	
<i>Aegerita candida</i>	Submerged decaying twigs
<i>Aegerita</i> sp.	Submerged decaying twigs
<i>Clathrosphearinazalewskii</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicoon sessile</i>	Submerged decaying twigs
<i>Pseudaegerita corticalis</i>	Submerged decaying twigs
<i>Pseudaegerita corticalis</i> ?	Submerged decaying twigs
<i>Pseudoclathrosphearinavamariae</i>	Submerged decaying twigs
<i>Spirospheara dimorpha</i>	Submerged decaying litter ( <i>Phragmites australis</i> ?)
Under Kokusei-bashi	
<i>Aegerita candida</i>	Submerged decaying twig

## 日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較

Table 7 Aero-aquatic and aquatic fungi isolated from Rishiri Is. and Iriomote Islands (Continued)

## Iriomote Island

Maera-river	
Tetraploa sp.	Foam
Nodake	
<i>Candelabrum brocchiatum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Dendrosporium lobatum</i>	Submerged decaying litter
<i>Helicoma viridis</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicomycetes roseus</i>	Foam
<i>Helicosporium virescens</i>	Submerged decaying twigs
<i>Peyronelina glomerulata</i>	Submerged decaying twigs
Shiira-river	
<i>Candelabrum brocchiatum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Candelabrum cf. brocchiatum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Dendrosporium lobatum</i>	Submerged decaying litter
<i>Helicoma limpidum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicomycetes torquatus</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicosporium panacheum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicosporium talbotii</i>	Submerged decaying twigs
<i>Peyronelina glomerulata</i>	Submerged decaying twigs
Unidentified fungus	Submerged decaying twigs
Subtropical trees exhibition wood, Ootomi	
<i>Candelabrum brocchiatum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Candelabrum brocchiatum?</i>	Submerged decaying twigs
<i>Candelabrum cf. brocchiatum</i>	Submerged decaying litter
<i>Helicosporium griseum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicosporium panacheum</i>	Submerged decaying twigs
<i>Helicosporium</i> sp.	Submerged decaying twigs
Urauchi-river	
<i>Candelabrum brocchiatum</i>	Submerged decaying twigs, submerged decaying litter
<i>Diplocladiella cf. alta</i>	Foam
<i>Diplocladiella taurina</i>	Foam
<i>Helicomycetes torquatus</i>	Submerged decaying twigs
Helicosporous fungi	Submerged decaying litter
<i>Isthmotrichidia cf. laeensis</i> <sup>a</sup>	Foam
<i>Polylobatispore deltoidea</i>	Foam
<i>Polylobatispore</i> sp.	Foam
<i>Scutisporus brunneus</i>	Foam
<i>Tetracladium</i> sp. <sup>a</sup>	Foam
<i>Triscelophorus acuminatus</i> ? <sup>a</sup>	Foam
Waterfall, Urauchi-river	
Helicosporous fungi	Foam
<i>Triscelophorus acuminatus</i> ? <sup>a</sup>	Foam

<sup>a</sup> Aquatic fungus.

より非漂白部から分離され滅菌落葉上でシンネマを形成して *Xylaria* sp. と同定された菌株 (RQ-NB-31) , の 3 菌株 (全47菌株の 6%) で落葉の漂白力が認められた。DNA 塩基配列の解析から、これら 3 菌株は子囊菌門に属し、RQ-BL-21 はズキンタケ綱 (Leotiomycetes) , RQ-NB-31 はクロサイワイタケ科 Xylariaceae の *Xylaria* sp. , そして RQ-BL-151 はクロチャワンタケ科 Sarcosomataceae に属する菌類と、それぞれ最も DNA 塩基配列の相同性が高かった。スタジイ落葉では分離された52菌株中、主に漂白部から分離された未同定の担子菌類 (IR-BL-11, IR-BL-41, IR-BL-181) , *Marasmius* spp. (IR-BL-23, IR-BL-101) , および子囊菌類の *Xylaria* 属菌 (IR-BL-121) , *Geniculosporium* spp. (IR-BL-151, IR-NB-33) , 白色の胞子未形成菌株 (IR-BL-21, IR-NB-171) など15菌株 (全52菌株の 29%) で落葉の漂白力が認められた。

**軟質担子菌類** 利尻島の調査では、計 263 試料 (2007年, 58試料; 2008年, 205試料) を供試した結果、38属68種からなる計 103 株 (2007年, 27株; 2008年, 76株) を確立できた (Table 8)。西表島の調査では、31試料を供試した結果、12属13種からなる21株を確立できた (Table 9)。およそ半分の試料では、菌糸伸長が全く見られない場合や雑菌汚染を生ずる場合があり、培養株の確立に至らなかった。

利尻島の培養株には、周極要素種である *Lactarius flavidulus*, *Leccinum scabrum*, *Lentinellus flabelliformis*, *Paxillus involutus*, *Pleurotus abieticola*, *Suillus grevillei*, *Suillus pictus*, *Tricholoma portentosum*, *Tricholomopsis decora* などが見いだされた。また、リター分解菌類や木材腐朽菌類とともに、外生菌根性の分類群が比較的多く見いだされた。一方、西表島の培養株には、東南アジアにかけても分布する *Campanella junghuhnii*, *Lentinus velutinus*, *Tetrapyrgos nigripes* などが見いだされ、ほとんどがリター分解菌類や木材腐朽菌類であった。両島で共通する種は確認できなかった。なお、DNA の BLAST 検索で高い相同意を示さない培養株が多く得られ、新規性の高い多様な遺伝資源が収集できた。

きのこ形成軟質担子菌類は、きわめて広範な分類群を含むため、本調査によりその全貌を解明できたとは言い難い。しかし、利尻島と西表島では、全く異なる種が見いだされ、それぞれ気候帶の特性を反映すると考えられる種が数多く見いだされた。利尻島で見いだされた周極要素種は、国内では中部山岳域や北海道を中心に分布する種であり、外生菌根菌を多く含む傾向

にあった。したがって、利尻島の軟質担子菌類のこ類は、同島の気候・植生と強く関連した、特異な菌類相であると考えられた。一方、西表島では調査回数が少ないため必ずしも全般的な傾向は明らかに出来なかつたが、幾つかの菌種は、東南アジアに分布中心を持つと考えられるものであり、亜熱帯域の菌類相を主体とすることが推察された。

きのこ形成軟質担子菌は、子実体発生が年ごとの雨量や温度推移に大きく左右されるため、実際に生息する菌類相を正確に把握するためには数年間に及ぶ定期的な調査 (数十回程度) が必要であるとされている。また、培養の比較的容易なリター分解菌や木材腐朽菌とともに、培養の困難な外生菌根菌が多数含まれている。さらに、きのこ形成軟質担子菌は全般的に子実体組織の劣化が早いため、試料収集と同時に現地で分離操作を行わなければならない。このため、特定の地域を対象としたきのこ形成軟質担子菌の調査では、子実体標本収集を主とした菌類相調査に対して、培養株を得るための資源探査調査は極端に件数が少ない。したがって、今後、きのこ形成軟質担子菌の培養株をより多くかつ遺伝資源として幅広く得るためにには、現地での長期滞在 (数週間) や、より長期間 (5-10 年) にわたる継続調査が強く望まれる。

**硬質菌類** 利尻島からは約 100 点、西表島からは約 180 点の標本が得られた。これらから、利尻島産約 50 菌株、西表島産約 100 菌株を分離した。利尻島から採集された種の多くは国内の冷温帯以北に広く分布する種であった。利尻島の森林においてはトドマツ、エゾマツといった北方針葉樹が顕著であるが、これらに発生する種の多くは冷温帯以南においてモミやアカマツ等にも発生する種であった。しかしながら以下の 6 種は国内未記録種であり、その多くはユーラシアの亜寒帯を中心と分布する種と考えられる：*Anomoporia kamtschatica*, *Antrodia odora*, *Junghuhnia separabilima*, *Postia ptychogaster*, *P. rancida*, *Trechispora candidissima*。

一方、西表島において採集された種のうち一部は国内暖温帯との共通種であったが、種まで同定されたもののほとんどが東南アジア熱帯地域との共通種であった。*Echinochaete* 属の一種は未記載種と判断され、*E. maximipora* として記載した (Sotome et al., 2009)。また以下の国内未記録種が採集されたが、これらはいずれも東南アジアとの共通種である：*Coriolopsis badia*, *C. polyzona*, *Dichomitus cavernulosa*, *Gloeoporos croceopallens*, *Hyphodontia ovispora*, *Phellinus ferrugineovelutinus*, *P.*

日本の亜熱帯域および冷温帯域の糸状菌類相の多様性とその比較

Table 8 List of cultures of basidiomycetous mushrooms obtained in Rishiri Island

Taxon (genus)	Number of	
	Species	Culture
<i>Agrocybe</i>	1	2
<i>Amanita</i>	3	3
<i>Ampulloclitocybe</i>	1	1
<i>Armillaria</i>	2-3	7
<i>Artomyces</i>	1	1
<i>Chalciporus</i>	1	2
<i>Clitocybe</i>	1	2
<i>Coprinopsis</i>	1	1
<i>Cortinarius</i>	1	1
<i>Crucibulum</i>	1	1
<i>Cystoderma</i>	1	1
<i>Dictyophora</i>	1	2
<i>Galerina</i>	1	2
<i>Gymnopilus</i>	2	3
<i>Gymnopus</i>	5	7
<i>Hebeloma</i>	2	2
<i>Hygrophoropsis</i>	1	1
<i>Lactarius</i>	4-5	6
<i>Leccinum</i>	1	4
<i>Lentinellus</i>	2	2
<i>Lepista</i>	1	1
<i>Lycoperdon</i>	2	5
<i>Lyophyllum</i>	1	1
<i>Marasmiellus</i>	1	1
<i>Marasmius</i>	3-4	8
<i>Melanoleuca</i>	1	1
<i>Mycena</i>	6	9
<i>Paxillus</i>	1	2
<i>Phallus</i>	1	1
<i>Pleurotus</i>	2-3	3
<i>Psathyrella</i>	1	1
<i>Russula</i>	2-3	3
<i>Stropharia</i>	2	2
<i>Suillus</i>	3	3
<i>Tricholoma</i>	4	6
<i>Tricholomopsis</i>	1	1
<i>Xeromphalina</i>	2	3
<i>Xerula</i>	1	1
Total	68-73	103

Table 9 List of cultures of basidiomycetous mushrooms obtained in Iriomote Island

Taxon (genus)	Number of	
	Species	Culture
<i>Campanella</i>	1	1
<i>Coprinopsis</i>	1	1
<i>Hohenbuehelia</i>	1	1
<i>Lentinus</i>	1	1
<i>Marasmiellus</i>	1-2	2
<i>Micromphale</i>	1	1
<i>Mycena</i>	1	1
<i>Parasola</i>	1	1
<i>Pleurotus</i>	1	1
<i>Psathyrella</i>	2-3	7
<i>Schizophyllum</i>	1	2
<i>Tetrapyrgos</i>	1	2
Total	13-15	21

*glaucescens*, *P. tricolor*, *Trichaptum brastagii*. さらに, *Ceriporia*, *Ceriporiopsis*, *Dichomitus*, *Pachykytospora*, *Phellinus*, *Postia* 各属などに属する未同定種が多数採集されているが、少なくともその一部は未記載種と考えられる。

利尻島において採集された種のほとんどは国内既知種であったが、ユーラシア亜寒帯に分布する種も一部含まれていた。一方、西表島において採集された種の多くは東南アジアとの共通種であり、西表島は東南アジア熱帯地域に分布する硬質菌類のうちかなりの種が採集可能な貴重な地域といえる。さらに西表島において採集された標本には依然種名の明らかでないものも多く、未記載種も含まれていると考えられ、これらについては分類学的検討の継続が必要である。熱帯地域との共通種や未記載種の探索という点から西表島は極めて重要であり、今後も調査の継続が望ましい。

**菌類データベース** 各標本および菌株に関するすべての情報を管理し、菌株寄託用シートに差し込み印刷する機能を付与し、菌株を寄託する作業の簡易化を図った。また、すべての菌群についてデータを入力し、検索機能により各採取地や分離源ごとに菌類相を調べることができるようなインベントリーデータベースを

構築した。開発したソフトおよび本研究で得られた菌株情報を入力したCDを作製した。

**総合考察** 本研究では、わが国における網羅的な菌類相を調べる研究の初めての試みとして、ストラメノパイル類2菌群、菌界12菌群、合計14菌群について、亜熱帯域として西表島周辺、冷温帶域として利尻島周辺を選び、調査を行った。両地域とも国立公園に指定された区域を含んでおり、環境省等からの許可を申請して調査を進めた。それぞれの気候域について島を中心の場所に選定した。これは、菌類相を網羅的に調査することを目的としたためである。すなわち、森林や草地などの陸上だけでなく、海生の菌群も対象として調査した。具体的には、分離材料として陸系では土壤、葉、幹、落葉、落木・落枝、きのこ、昆虫など小動物の遺骸、動物の糞など、水系では河川水、湖水、水中の植物遺体など、海浜では海水、海砂、海泡などの材料を採取し、標本の作製、菌類の分離培養を行った。初年度は研究グループほぼ全員が一同にサンプリングを行い、同時期の各気候域における菌類相を詳細に調べた。このデータは、今後地球環境の変動により菌類相がどのように変化するかを調べるために基礎データを整備したことを意味しており、これからのおよびの研究へ繋

がる大きな成果である。

今回対象とした菌群を機能的側面から見ると、セルロース分解能、リグニン分解能、糖分解能、生理活性物質産生能、抗生物質産生能などを持つ種の有用物質生産への利用、昆虫寄生性および菌寄生性を持つ種あるいは菌根菌などの害虫や植物病原菌の生物的防除への利用、植物内生菌の植物病害に対する抵抗性誘導能による病害防除への利用など多くの可能性を持つものがある。本研究では、ラビリンツラ類、卵菌類、接合菌類の中でも培養の困難な属、海生菌類、リグニン分解菌類、軟質担子菌類などこれまで菌株として保存されていないものも含めて600菌株以上を公的な微生物株保存機関に寄託した。今後、これらの菌株の機能の詳細な研究から有用なものが見つかることが期待される。

本研究をインベントリー構築の面からみると、対象とした14菌群中ラビリンツラ類、卵菌類、海生菌類、植物内生菌類は自然生態系中の分布についてわが国だけでなく世界的にみても研究は少なく、またその他の菌群についても亜熱帯域での研究は多いが、冷温帶域での分布に関する研究はほとんどない。さらに、亜熱帯域と冷温帶域での菌相の比較についてはほとんどない。各菌群で亜熱帯域と冷温帶域の種数を比較すると、当初予想していた亜熱帯域で必ずしも多くはなく、小房子囊菌類、軟質担子菌類では冷温帶域のほうが多く、ラビリンツラ類、接合菌類、*Aspergillus* 属菌類、植物内生菌類、海生菌類、核菌類の一部ではほとんど異ならなかった。亜熱帯地域で多かった菌群は全体の半数の7菌群であった。菌相を比較すると、共通種が少しでもみられる菌群は、卵菌類、接合菌類、*Aspergillus* 属菌類、植物内生菌類、冬虫夏草類と5菌群で、その他の9菌群では共通種が認められなかつた。ほとんどの菌群についてはっきりとした境界はないもののそれぞれの気候域に固有の種が生息していることが明らかになった。また、すべての菌群において、新産種あるいは未記載種が両地域からみつかっており、既知種を含めると500種以上も同定した。わが国における菌類相を記載すると言う意味でも大きな貢献ができた。

本研究では、菌類標本および菌類分離株の収集とともに両者のデータベースソフトの開発を行い、本研究で得られた菌株データを容易に検索・閲覧できるようにした。標本および分離株は維持・管理するだけではなく、種別の生息地、分離源などの検索、あるいはそれらとは逆に生息地からの菌種の検索など検索機能を持たせることにより、インベントリーとしての利用価値を高めた。また、種の同定には形態観察に加え塩基

配列データも有用な分子情報であり、これらのデータも一元管理できるようにした。本ソフトは、本研究の成果だけでなくこれからのデータの蓄積にも有効なものである。最終的にはインターネット上で利用できるようなシステムが構築できることが望まれる。

## 要 約

近年分類学上菌界から分離されたストラメノパイル類のラビリンツラ類および卵菌類、菌界のほぼ全体にわたる接合菌門、子囊菌門、担子菌門、不完全菌門に属する12菌群（接合菌類、植物内生菌類、海生菌類、小房子囊菌類・アナモルフ菌類、冬虫夏草類、*Penicillium* 属菌類、リグニン分解菌類、核菌類、*Aspergillus* 関連属菌類、半水生菌類、軟質担子菌類、硬質菌類）について冷温帶の利尻島、亜熱帯の西表島およびその周辺における菌類の多様性を調査した。サンプリング試料の基質は菌群により異なるが、陸上では葉、茎、幹、根、枯れ葉、倒木、昆虫、土壤、淡水、汽水、海浜では貝類、海藻、波打ち際の海泡、海水と多岐にわたった。亜熱帯域と冷温帶域での菌類相を比較すると、種数は必ずしも亜熱帯域で多くはなく、小房子囊菌類、軟質担子菌類では冷温帶域のほうが多く、ラビリンツラ類、接合菌類、*Aspergillus* 属菌類、植物内生菌類、海生菌類、核菌類の一部ではほとんど同じであった。一方、その他の6菌群は、亜熱帯で種数が多い傾向にあった。菌類相を比較すると、共通種は少しでもみられる菌群は、卵菌類、接合菌類、*Aspergillus* 属菌類、植物内生菌類、冬虫夏草類と5菌群で、その他9菌群では共通種が認められなかつた。しかし、ほとんどの菌群についてはっきりとした境界はないもののそれぞれの気候域に固有の種が生息していることが明らかになった。また、すべての菌群において、新産種あるいは未記載種が両地域からみつかっており、既知種を含めると500種以上を同定した。また、菌株のデータベースソフトを開発し、本研究で得られた菌株データを容易に検索・閲覧できるようにした。以上、本研究では冷温帶および亜熱帯における広範囲にわたる菌類相をわが国で初めて明らかにするとともに、得られた766菌株を公的な微生物株保存機関に寄託し、広く研究者に利用できるよう整備した。

## 本研究助成で得られた研究成果の報告

### 学会口頭発表

- 1) Osono, T. & Hirose, D. (2008). Altitudinal

- distribution of microfungi associated with *Betula ermanii* leaf litter on Mt. Rishiri, northern Hokkaido. XXXI Symposium on Polar Biology. December 2008, National Institute of Polar Research, Tokyo, Japan.
- 2) Yaguchi, T., Horie, Y., Matsuzawa, T., Tanaka, R. & Abliz, H.P. (2008). Polyphasic taxonomy of pathogenic *Aspergillus fumigatus* and related species in Japan and Xinjiang, China. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Changchun, China.
  - 3) 本橋慶一, Abderzaher, H. M. A., 千田昌子, 須賀晴久, 景山幸二 (2009) . 北海道利尻島で分離された *Pythium* 属菌の 2 新種について. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
  - 4) 平山和幸, 田中和明 (2009) . 分子系統解析により明らかとなった淡水生子のう菌類 *Massarina ingoldiana* の収斂進化. 第11回日本進化学会 (札幌).
  - 5) 中桐 昭, 外山香子 (2009) . 利尻島の解法より分離された海生不完全菌 *Varicosporina* 様未記載種. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
  - 6) 佐藤豊三, 廣岡裕吏, 森脇丈治, 伴さやか, 富岡啓介, 青木孝之, 澤田宏之, 永井利郎, 井垣善美 (2009). 沖縄諸島の植物寄生菌類フロラ -先島諸島(1)-. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
  - 7) 本橋慶一, 李明珠, 千田昌子, 須賀晴久, 景山幸二 (2009) . 沖縄県西表島の河川から分離される *Pythium* 属菌. 日植病報 75: 186.
  - 8) 佐藤豊三, 伴さやか, 廣岡裕吏, 米本仁巳, 大藤泰雄, 河辺邦正, 小沢聖 (2009). *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers [*Fusicoccum dimidiatum* (Penz.) D.F. Farr] によるピタヤ (ドラゴンフルーツ) 乾腐病 (新称). 日植病報 75: 206.
  - 9) 大園享司, 広瀬大 (2010) . 利尻島においてミズナラ落葉の漂白に関わる子囊菌類. 第121回日本森林学会大会 (茨城).
  - 10) 山田明義, 遠藤直樹 (2010) . タマゴタケ類の菌根合形成. 日本森林学会第121回大会 (茨城).
  - 11) 本多大輔 (2010) . ラビリンチュラ類の系統と属の分類学的再構成. 第54回日本菌学会シンポジウム 下等菌類分類学最前線-真核生物 8 大系統群のひとつストラメノパイル類の鞭毛菌たち- (東京).
  - 12) 出川洋介 (2010) . 解体された“接合菌類”的ゆくえ～何が問題なのか？ 第54回日本菌学会シンポジウム 下等菌類分類学最前線-下等菌類から高等菌類への道のり- (東京).
  - 13) 平山和幸, 田中和明 (2010) . プレオスボラ目における *Lophiostoma* 属と *Lophiotrema* 属の再定義および新科 *Lophiotremataceae* の設立. 日本菌学会第54回大会 (東京).
  - 14) 遠藤直樹, 山田明義 (2010) . タマゴタケ類の菌根合形成. 日本菌学会第54回大会 (東京).
  - 15) Degawa, Y. (2010). Systematics of Zygomycetes, Evolution and systematics of basal lineages of fungi, Special Interest Group (SIG) meeting at IMC9, 1 Aug. 2010, Edinburgh, UK.
- Massarina ingoldiana* の分子系統学的研究. 日本菌学会第52回大会 (三重).
- 2) Kageyama, K., Abdelzaher, H. M. A., Motohashi, K., Senda, M. & Suga, H. (2008). *Pythium* Flora in Rishiri Island, Japan. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Changchun, China.
  - 3) 佐藤豊三, 廣岡裕吏, 森脇丈治, 山口薰, 廣岡裕吏, 青木孝之, 富岡啓介, 澤田宏之, 永井利郎, 井垣善美, 中島比呂美 (2009) . 農業生物資源ジーンバンクに登録された新規植物病原菌類等. 日本微生物資源学会第17回大会 (岐阜).
  - 4) Motohashi, K., Abdelzaher, H. M. A., Kageyama, K. & Suga, H. (2009). Two new species of genus *Pythium* isolated from water and soil of Rishiri Island. Asian Mycological Congress, Taiwan.
  - 5) Kageyama, K., Motohashi, K., Senda, M. & Suga, H. (2009). *Pythium* species isolated from river water in Iriomote Island located in subtropical area of Japan. Asian Mycological Congress, Taiwan.
  - 6) 平山和幸, 田中和明 (2009) . 分子系統解析と形態比較に基づく *Lophiostoma bipolare* よびその関連菌の特徴付け. 日本菌学会第53回大会 (鳥取).
  - 7) 本多大輔, 上田真由美, 木戸明香, 緒方美佐江 (2010) . 西表島と利尻島におけるラビリンチュラ菌類の分布比較. 日本菌学会第54回大会 (東京).
  - 8) 岡根泉, 外山香子, 田渕由希子, 山口薰, 伴さやか, 中桐昭 (2010) . 利尻島と西表島の植物内生菌相の比較. 日本菌学会第54回大会 (東京).
  - 9) 出川洋介, 栗原祐子 (2010) . 八重山諸島より得られた日本新産の熱帶性接合菌類」日本菌学会第54回大会 (東京).

## 原著論文

- 1) Suzuki, Y., Hatakeyama, S., Harada, Y. & Tanaka, K. (2008). *Polystigma fulvum*, a red leaf blotch pathogen on leaves of *Prunus* spp., has the *Polystigmmina pallescens* anamorph/andromorph. Mycoscience 49: 395-398.
- 2) Schoch, C. L., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Boehm, E. W. A., Burgess, T. I., de Gruyter, J., de Hoog, G. S., Dixon, L. J., Grube, M., Gueidan, C., Harada, Y., Hatakeyama, S., Hirayama, K., Hosoya, T., Huhndorf, S. M., Hyde, K. D., Jones, E. B. G., Kohlmeyer, J., Kruys, Å., Li, Y. M., Lücking, R., Lumbsch, H. T., Marvanová, L., Mbatchou, J. S., McVay, A. H., Miller, A. N., Mugambi, G. K., Muggia, L., Nelsen, M. P., Nelson, P., Owensesby, C. A., Phillips, A. J. L., Phongpaichit, S., Pointing, S. B., Pujade-Renaud, V., Raja, H. A., Rivas Plata, E., Robbertse, B., Ruibal, C., Sakayaroj, J., Sano, T., Selbmann, L., Shearer, C. A., Shirouzu, T., Slippers, B., Suetrong, S., Tanaka, K., Volkmann-Kohlmeyer, B., Wingfield, M. J., Wood, A. R., Woudenberg, J. H. C., Yonezawa, H., Zhang, Y. & Spatafora, J. W. (2009). A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. Stud. Mycol. 64: 1-15.
- 3) Zhang, Y., Schoch, C. L., Fournier, J., Crous, P. W., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Hirayama, K.,

## 学会ポスター発表

- 1) 平山和幸・田中和明 (2008) . 淡水生子のう菌類:

## 日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較

- Tanaka, K., Pointing, S. B., Spatafora, J. W. & Hyde, K. D. (2009). Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Stud. Mycol.* **64**: 85-102.
- 4) Shearer, C. A., Raja, H. A., Miller, A. N., Nelson, P., Tanaka, K., Hirayama, K., Marvanová, L., Hyde, K. D. & Zhang, Y. (2009). The molecular phylogeny of freshwater Dothideomycetes. *Stud. Mycol.* **64**: 145-153.
- 5) Suetrong, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Sakayaroj, J., Phongpaichit, S., Tanaka, K., Hirayama, K. & Jones, E. B. G. (2009). Molecular systematics of the marine Dothideomycetes. *Stud. Mycol.* **64**: 155-173.
- 6) Tanaka, K., Hirayama, K., Yonezawa, H., Hatakeyama, S., Harada, Y., Sano, T., Shirouzu, T. & Hosoya, T. (2009). Molecular taxonomy of bambusicolous fungi: Tetraplosphaeriaceae, a new pleosporalean family with *Tetraploa*-like anamorphs. *Stud. Mycol.* **64**: 175-209.
- 7) Osono, T. & Hirose, D. (2009). Altitudinal distribution of microfungi associated with *Betula ermanii* leaf litter on Mt. Rishiri, northern Japan. *Can. J. Microbiol.* **55**: 783-789.
- 8) 大園享司, 広瀬 大 (2009) . 利尻島においてミズナラ落葉の漂白に関わる子囊菌類. 利尻研究 **28**: 51-56.
- 9) Saotome, K., Hattori, T., Ota, Y., Lee, S. S., Vikineswary, S., Abdullah, N. & Kakishima, M. (2009). Taxonomic study of Asian species of *Echinochaete* (Polyporaceae, Basidiomycota) and description of *E. maximipora* sp. nov. *Mycol. Prog.* **8**: 123-132.
- 10) Yamaguchi, K., Degawa, Y. & Nakagiri, A. (2009). An aero-aquatic fungus, *Peyronelina glomerulata*, is shown to have teleomorphic affinities with cypelloid basidiomycetes. *Mycoscience* **50**: 156-164.
- 11) Hirayama, K., Tanaka, K., Raja, H. A., Miller, A. N. & Shearer, C. A. (2010). A molecular phylogenetic assessment of *Massarina ingoldiana* sensu lato. *Mycologia* **102**: 729-746.
- 保存機関に寄託した菌株**
- 本研究において得られた菌株のうち、種まで同定できた菌株、日本新産種、新種、合計 794 菌株を公的な微生物株保存機関に寄託および寄託予定である。
- NBRC：独立行政法人 製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門
- MAFF：独立行政法人 農業生物資源研究所ジーンバンク
- IFM：国立大学法人 千葉大学真菌医学研究センター
- ラビリンツラ菌類（本多）  
*Botryochytrium* sp. NBRC 107460
- Botryochytrium* sp. NBRC 107461  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107462  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107463  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107464  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107465  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107466  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107467  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107468  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107469  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107470  
*Schizochytrium* sp. NBRC 107471  
*Sicyoidochytrium* sp. NBRC 107472  
*Thraustochytrium aureum* NBRC 107473  
*Thraustochytrium aureum* NBRC 107474  
*Thraustochytrium aureum* NBRC 107475  
*Thraustochytrium aureum* NBRC 107476  
*Thraustochytrium aureum* NBRC 107477  
*Thraustochytrium aureum* NBRC 107478  
*Ulkenia* sp. NBRC 107479  
*Ulkenia* sp. NBRC 107480  
*Ulkenia* sp. NBRC 107481  
*Ulkenia* sp. NBRC 107482  
*Ulkenia* sp. NBRC 107483  
*Ulkenia* sp. NBRC 107484  
*Ulkenia* sp. NBRC 107485  
*Ulkenia* sp. NBRC 107486  
*Ulkenia* sp. NBRC 107487  
*Ulkenia* sp. NBRC 107488  
*Ulkenia* sp. NBRC 107489
- 卵菌類（景山・本橋）**
- Pythium intermedium* NBRC 107360  
*Pythium macrosporum* NBRC 107361  
*Pythium catenulatum* NBRC 107362  
*Pythium undulatum* NBRC 107363  
*Pythium* sp. NBRC 107364  
*Pythium pyriliobum* NBRC 107365  
*Pythium dissotocum* NBRC 107366  
*Pythium* sp. NBRC 107367  
*Pythium* sp. NBRC 107368  
*Aphanomyces cladogamus* NBRC 107369  
*Pythium helicoides* NBRC 107370  
*Pythium helicoides* NBRC 107371  
*Pythium* sp. NBRC 107372  
*Pythium* sp. NBRC 107373  
*Pythium helicoides* NBRC 107374  
*Pythium* sp. NBRC 107375

- Pythium* sp. NBRC 107376  
*Pythium* sp. NBRC 107377  
*Pythium* sp. NBRC 107378  
*Pythium* sp. NBRC 107379  
*Pythium* sp. NBRC 107380  
*Pythium* sp. NBRC 107381  
*Pythium* sp. NBRC 107382  
*Pythium* sp. NBRC 107383  
*Pythium* sp. NBRC 107384  
*Pythium* sp. NBRC 107385  
*Pythium* sp. NBRC 107386  
*Pythium* sp. NBRC 107387  
*Pythium* sp. NBRC 107388  
*Pythium* sp. NBRC 107389  
*Aphanomyces* sp. NBRC 107390  
*Pythium* sp. NBRC 107391  
*Pythium* sp. NBRC 107392  
*Pythium* sp. NBRC 107393  
*Pythium* sp. NBRC 107394  
*Pythium* sp. NBRC 107395  
*Pythium catenulatum* NBRC 107396  
*Pythium* sp. NBRC 107397  
*Pythium* sp. NBRC 107398  
*Pythium* sp. NBRC 107399  
*Pythium* sp. NBRC 107400  
*Pythium* sp. NBRC 107401  
*Pythium aphanidermatum* NBRC 107402  
*Pythium* sp. NBRC 107403  
*Pythium spinosum* NBRC 107404  
*Pythium parvum* NBRC 107405  
*Pythium* sp. NBRC 107406  
*Pythium torulosum* NBRC 107407  
*Pythium arrhenomanes* NBRC 107408  
*Pythium aphanidermatum* NBRC 107409  
*Pythium arrhenomanes* NBRC 107410  
*Pythium inflatum* NBRC 107411  
*Pythium takayamanum* NBRC 107412  
*Pythium torulosum* NBRC 107413  
*Pythium heterothallicum* NBRC 107414  
*Pythium heterothallicum* NBRC 107415  
*Pythium intermedium* NBRC 107416  
*Pythium minus* NBRC 107417  
*Pythium parvum* NBRC 107418  
*Pythium spinosum* NBRC 107419  
*Pythium takayamanum* NBRC 107420  
*Pythium vexans* NBRC 107421  
*Pythium* sp. NBRC 107422  
*Pythium* sp. NBRC 107423  
*Pythium heterothallicum* NBRC 107424  
*Pythium heterothallicum* NBRC 107425  
*Pythium helicoides* NBRC 107426  
*Pythium helicoides* NBRC 107427  
*Pythium myriotylum* NBRC 107428  
*Pythium* sp. NBRC 107429  
*Pythium* sp. NBRC 107430  
*Pythium* sp. NBRC 107431  
*Pythium* sp. NBRC 107432  
*Pythium* sp. NBRC 107433  
*Pythium* sp. NBRC 107434  
*Pythium* sp. NBRC 107435  
*Pythium* sp. NBRC 107436  
*Pythium* sp. NBRC 107437  
*Pythium* sp. NBRC 107438  
*Pythium* sp. NBRC 107439  
*Pythium* sp. NBRC 107440  
*Pythium* sp. NBRC 107441  
*Pythium* sp. NBRC 107442  
*Pythium heterothallicum* NBRC 107443  
*Pythium heterothallicum* NBRC 107444  
*Pythium heterothallicum* NBRC 107445  
*Pythium macrosporum* NBRC 107446  
*Pythium macrosporum* NBRC 107447  
*Pythium sylvaticum* NBRC 107448  
*Pythium apleroticum* NBRC 107449  
*Pythium aquatile* NBRC 107450  
*Pythium litorale* NBRC 107451  
*Pythium oligandrum* NBRC 107452  
*Pythium dissotocum* NBRC 107453  
*Pythium* sp. NBRC 107454  
*Pythium helicoides* NBRC 107455  
*Pythium helicoides* NBRC 107456  
*Pythium* sp. NBRC 107457  
*Pythium* sp. NBRC 107458  
*Pythium* sp. NBRC 107459
- 接合菌類（出川）  
*Absidia cylindrospora* DS0Z139  
*Absidia glauca* DK9Z4-DS0Z113  
*Actinomucor elegans* DS0Z73  
*Backusella lamprospora* DS0Z126  
*Basidiobolus haptosporus* DS0Z66  
*Basidiobolus meristosporus* DS0Z71  
*Chaetocladium brefeldii* DS0Z114  
*Coemansia aciculifera* DS0Z64

日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較

<i>Coemansia aciculifera</i> DS0Z70	<i>Rhizopus oryzae</i> DS0Z131
<i>Coemansia erecta</i> DS0Z72	<i>Rhizopus sexualis</i> DK9Z8-DS0Z99
<i>Coemansia furcata</i> DS0Z76	<i>Rhizopus stolonifer</i> DS0Z130
<i>Conidiobolus coronatus</i> DK9Z12-DS0Z123	<i>Rhizopus stolonifer</i> DS0Z50
<i>Cunninghamella echinulata</i> DS0Z146	<i>Rhopalomyces elegans</i> DS0Z170
<i>Cunninghamella echinulata</i> DS0Z55	<i>Syncephalis depressa</i> DS0Z62
<i>Cunninghamella elegans</i> DS0Z148	<i>Syncephalis depressa</i> DS0Z92
<i>Cunninghamella elegans</i> DS0Z57	<i>Syncephalis formosana</i> DS0Z63
<i>Dimargaris arida</i> DS0Z91	<i>Thamnocephalis quadrupedata</i> DS0Z51
<i>Gongronella butleri</i> DS0Z128	<i>Umbelopsis isabellina</i> DS0Z115
<i>Hyphomucor assamensis</i> DS0Z17	<i>Umbelopsis ramanniana</i> DS0Z117
<i>Hyphomucor assamensis</i> DS0Z18	<i>Umbelopsis vinacea</i> DS0Z118
<i>Kickxella alabastrina</i> DS0Z125	
<i>Kickxellaceae</i> gen. et sp. nov. DK9Z24-DS0Z58	<i>Penicillium</i> 属菌類（稻葉）
<i>Kirkiana ramosa</i> DS0Z19	<i>Penicillium</i> cf. <i>multicolor</i> NBRC 106902
<i>Mortierella alpina</i> DS0Z119	<i>Penicillium meleagrinum</i> NBRC 106903
<i>Mortierella alpina</i> DS0Z132	<i>Penicillium</i> cf. <i>daleae</i> NBRC 106904
<i>Mortierella ambigua</i> DS0Z133	<i>Penicillium oxalicum</i> NBRC 106905
<i>Mortierella bainieri</i> DS0Z54	<i>Penicillium</i> cf. <i>raperi</i> NBRC 106906
<i>Mortierella bisporalis</i> DS0Z134	<i>Penicillium pinophilum</i> NBRC 106907
<i>Mortierella elongata</i> DS0Z135	<i>Penicillium citrinum</i> NBRC 106908
<i>Mortierella elongata</i> DK9Z16	<i>Penicillium sclerotiorum</i> NBRC 106909
<i>Mortierella exigua</i> DS0Z120	<i>Penicillium piceum</i> NBRC 106910
<i>Mortierella exigua</i> DS0Z136	<i>Penicillium paxilli</i> NBRC 106911
<i>Mortierella fimbriostyli</i> DK9Z14-DS0Z100	<i>Penicillium herquei</i> NBRC 106912
<i>Mortierella globulifera</i> DS0Z121	<i>Penicillium adametzii</i> NBRC 106913
<i>Mortierella humilis</i> DS0Z82	<i>Penicillium janthinellum</i> NBRC 106914
<i>Mortierella hyalina</i> DS0Z122	<i>Penicillium janczewskii</i> NBRC 106915
<i>Mortierella oligospora</i> DS0Z171	<i>Penicillium roseopurpureum</i> NBRC 106916
<i>Mortierella selenospora</i> DS0Z74	<i>Penicillium adametzii</i> NBRC 106917
<i>Mortierella simplex</i> DS0Z75	<i>Penicillium citreonigrum</i> NBRC 106918
<i>Mortierella</i> sp. DS0Z104	<i>Penicillium decaturense</i> NBRC 106919
<i>Mortierella vesiculosa</i> DS0Z86	<i>Penicillium soppii</i> NBRC 106920
<i>Mortierella vesiculosa</i> DS0Z87	<i>Penicillium asperosporum</i> NBRC 106921
<i>Mortierella wuyishanensis</i> DS0Z137	<i>Penicillium simplicissimum</i> NBRC 106922
<i>Mortierella zychae</i> DS0Z102	<i>Penicillium verruculosum</i> NBRC 106923
<i>Mucor circinelloides</i> DS0Z13	<i>Penicillium manginii</i> NBRC 106924
<i>Mucor circinelloides</i> DS0Z42	<i>Penicillium thomii</i> NBRC 106925
<i>Mucor hiemalis</i> DS0Z11	<i>Penicillium biourgeianum</i> NBRC 106926
<i>Mucor hiemalis</i> DS0Z41	<i>Penicillium</i> cf. <i>swiecicikii</i> NBRC 106927
<i>Mucor hiemalis</i> DS0Z12	<i>Penicillium lividum</i> NBRC 106928
<i>Mucor plasmaticus</i> DK9Z1-DS0Z112	<i>Eupenicillium brefeldianum</i> NBRC 106929
<i>Mucor racemosus</i> DS0Z46	<i>Talaromyces</i> cf. <i>stipitatus</i> NBRC 106930
<i>Phascolomyces articulosus</i> DS0Z165	<i>Talaromyces trachyspermus</i> NBRC 106931
<i>Pilobolus crystallinus</i> DS0Z129	<i>Talaromyces trachyspermus</i> NBRC 106932
<i>Piptocephalis xenophila</i> DS0Z60	
<i>Ramicandelaber brevisporus</i> DK9Z11-DS0Z59	植物内生菌類（岡根）

- Annulohypoxylon stygium* NBRC 106994  
*Annulohypoxylon stygium* NBRC 106995  
*Arthrinium phaeospermum* NBRC 106986  
*Aureobasidium pullulans* NBRC 106987  
*Botryotinia fuckeliana* NBRC 106996  
*Botryotinia fuckeliana* NBRC 106997  
*Botryotinia porri* NBRC 106998  
*Botryotinia porri* NBRC 106999  
*Glomerella cingulata* NBRC 107000  
*Glomerella cingulata* NBRC 107001  
*Glomerella cingulata* NBRC 107002  
*Coniozyma leucospermi* NBRC 107003  
*Cryptosporiopsis actinidiae* NBRC 106988  
*Daldinia eschscholzii* NBRC 107024  
*Daldinia eschscholzii* NBRC 107025  
*Glomerella acutata* NBRC 106989  
*Glomerella acutata* NBRC 106990  
*Glomerella cingulata* NBRC 107004  
*Glomerella cingulata* NBRC 107005  
*Melanconis alni* NBRC 107006  
*Melanconis alni* NBRC 107007  
*Melanconis alni* NBRC 107008  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107009  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107010  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107011  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107012  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107013  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107014  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107015  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107016  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107017  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107018  
*Neofusicoccum mangiferae* NBRC 107019  
*Pezicula sporulosa* NBRC 107020  
*Phaeoacremonium griseorubrum* NBRC 106991  
*Phaeoacremonium griseorubrum* NBRC 106992  
*Phaeosphaeriopsis musae* NBRC 107021  
*Phomopsis bougainvilleicola* NBRC 106993  
*Rhytidhysteron rufulum* NBRC 107022  
*Rhytidhysteron rufulum* NBRC 107023  
*Sydiowia polyspora* NBRC 107026  
*Sydiowia polyspora* NBRC 107027  
*Sydiowia polyspora* NBRC 107028
- Kalmusia brevispora* NBRC 106240  
*Lindgomyces ingoldianus* NBRC 106126  
*Lindgomyces* sp. NBRC 106130  
*Pseudotetraploa curviappendiculata* NBRC 106241  
*Quadricrura meridionalis* NBRC 106242  
*Quadricrura septentorionalis* NBRC 106243  
*Quadricrura septentorionalis* NBRC 106244  
*Roussella* sp. NBRC 106245  
*Salsuginea ramicola* NBRC 106256  
*Salsuginea ramicola* NBRC 106257  
*Tetraploa* sp. NBRC 106251  
*Tingoldiago graminicola* NBRC 106132  
*Triplosphaeria cylindrica* NBRC 106247  
*Triplosphaeria* sp. NBRC 106249
- 海生菌類（好砂海生菌類）（中桐）  
*Carbosphaerella leptosphaerioides* NBRC 106647  
*Carbosphaerella leptosphaerioides* NBRC 106648  
*Corollospora colossa* NBRC 106650  
*Corollospora maritima* NBRC 106639  
*Corollospora maritima* NBRC 106640  
*Corollospora maritima* NBRC 106651  
*Corollospora pseudopulchella* NBRC 106641  
*Corollospora pseudopulchella* NBRC 106642  
*Dendryphiella salina* NBRC 106661  
*Halosigmoidea parvula* NBRC 106655  
*Halosigmoidea parvula* NBRC 106656  
*Halosigmoidea parvula* NBRC 106659  
*Halosigmoidea parvula* NBRC 106660  
*Halosigmoidea* sp. NBRC 106652  
*Halosigmoidea* sp. NBRC 106653  
*Halosigmoidea* sp. NBRC 106654  
*Halosigmoidea* sp. NBRC 106657  
*Halosigmoidea* sp. NBRC 106658  
*Lindra obtusa* NBRC 106635  
*Lindra obtusa* NBRC 106636  
*Lindra thalassiae* NBRC 106645  
*Lindra thalassiae* NBRC 106646  
*Savoryella appendiculata* NBRC 106649  
*Trailia ascophylli* NBRC 106637  
*Trailia ascophylli* NBRC 106638  
*Trailia ascophylli* NBRC 106643  
*Trailia ascophylli* NBRC 106644
- 小房子囊菌類およびアナモルフ菌類（不完全菌類）  
 (田中)  
*Ascocratera manglicola* NBRC 106250
- 冬虫夏草類（伴）  
*Isaria fumosorocea* NBRC 106942  
*Isaria cf. tenuipes* NSB-181-1

日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較

<i>Isaria takamizusanensis</i> SSB-188-1	<i>Colletotrichum boninense</i> MAFF 240528
<i>Gibellula</i> sp. SB-204	<i>Colletotrichum capsici</i> MAFF 240453
<i>Isaria</i> sp. SB-205	<i>Colletotrichum capsici</i> MAFF 240492
<i>Isaria tenuipes</i> SB-207	<i>Colletotrichum capsici</i> MAFF 240494
<i>Conoideocrella luteorostrata</i> NBRC 106950	<i>Colletotrichum capsici</i> MAFF 240523
<i>Conoideocrella luteorostrata</i> SB-210	<i>Colletotrichum capsici</i> MAFF 240525
<i>Nomuraea atypicola</i> NBRC 106945	<i>Colletotrichum capsici</i> MAFF 240532
<i>Isaria tenuipes</i> SB-213	<i>Colletotrichum capsici</i> MAFF 240540
<i>Gibellula</i> sp. SB-214	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240452
<i>Metarhizium</i> sp. SB-215	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240454
<i>Metarhizium</i> sp. SB-216	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240464
<i>Isaria</i> cf. <i>tenuipes</i> SB-217	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240475
<i>Termitomyces</i> sp. NBRC 106973	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240476
<i>Torrubiella</i> cf. <i>ryukyuensis</i> SB-219	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240480
<i>Isaria fumosorocea</i> SB-220	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240490
<i>Gibellula</i> cf. <i>pulchra</i> SB-251-1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240495
<i>Gibellula pulchra</i> SB-252	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240503
<i>Gibellula pulchra</i> SB-253	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240504
<i>Gibellula pulchra</i> SB-254	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240510
<i>Gibellula pulchra</i> SB-255	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240513
<i>Ophiocordyceps sphecocephala</i> SB-256-1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240517
<i>Simplicillium</i> sp. SB-261-1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240533
核菌類（廣岡・佐藤・升屋）	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240537
<i>Alternaria alternata</i> MAFF 240565	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240542
<i>Aphanoeladia</i> sp. SR 26	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240543
<i>Aphanoeladia</i> sp. SR 27	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> MAFF 240467
<i>Aphanoeladia</i> sp. SR 28	<i>Cordyceps</i> sp. SR 29
<i>Arachnocrea scabrida</i> MAFF 240586	<i>Cordyceps</i> sp. SR 30
<i>Auricularia polytricha</i> MAFF 240508	<i>Cordyceps</i> sp. SR 31
<i>Bionectria byssicola</i> MAFF 240587	<i>Corynespora cassiicola</i> MAFF 240443
<i>Bionectria grammicosporopsis</i> MAFF 240583	<i>Corynespora cassiicola</i> MAFF 240444
<i>Bipolaris cactivora</i> MAFF 240531	<i>Corynespora cassiicola</i> MAFF 240445
<i>Botryosphaeria dothidea</i> IR-1	<i>Cosmospora</i> sp. MAFF 240564
<i>Botryosphaeria dothidea</i> IR-2	<i>Cosmospora</i> sp. MAFF 240569
<i>Botryosphaeria dothidea</i> IR-3	<i>Cosmospora</i> sp. MAFF 240570
<i>Botrytis cinerea</i> MAFF 240447	<i>Cosmospora</i> sp. MAFF 240571
<i>Byssostilbe</i> sp. SR 24	<i>Cosmospora</i> sp. MAFF 240572
<i>Byssostilbe</i> sp. SR 25	<i>Cosmospora</i> sp. MAFF 240575
<i>Ceratocystis moniliformis</i> IR-4	<i>Cosmospora</i> sp. MAFF 240576
<i>Ceratocystis moniliformis</i> IR-5	<i>Cosmospora</i> sp. MAFF 240577
<i>Ceratocystis moniliformis</i> IR-6	<i>Cosmospora</i> sp. MAFF 240578
<i>Cercospora citrullina</i> MAFF 240522	<i>Cryphonectria macrospora</i> IR-10
<i>Choanephora cucurbitarum</i> MAFF 240520	<i>Cryphonectria macrospora</i> IR-11
<i>Choanephora cucurbitarum</i> MAFF 240536	<i>Cryphonectria macrospora</i> IR-12
<i>Colletotrichum boninense</i> MAFF 240501	<i>Discospora cylindrospora</i> MAFF 240471
<i>Colletotrichum boninense</i> MAFF 240505	<i>Discospora cylindrospora</i> MAFF 240473
	<i>Meira nashicola</i> MAFF 240474

<i>Fusarium solani</i> MAFF 240518	<i>Ophiostoma aoshimae</i> SR 6
<i>Fusicoccum aesculi</i> MAFF 240478	<i>Ophiostoma longicollum</i> IR-16
<i>Fusicoccum aesculi</i> MAFF 240457	<i>Ophiostoma longicollum</i> IR-17
<i>Fusicoccum aesculi</i> MAFF 240463	<i>Ophiostoma longicollum</i> IR-18
<i>Geotrichum candidum</i> MAFF 240519	<i>Ophiostoma</i> sp. SR 7
<i>Gibberella</i> sp. SR 34	<i>Ophiostoma</i> sp. SR 8
<i>Gibberella</i> sp. SR 38	<i>Ophiostoma</i> sp. SR 9
<i>Haematonectria haematoxocca</i> MAFF 240584	<i>Pleospora herbarum</i> MAFF 240448
<i>Haematonectria haematoxocca</i> MAFF 240589	<i>Pseudozyma aphidis</i> MAFF 230058
<i>Haematonectria haematoxocca</i> MAFF 240590	<i>Pseudozyma aphidis</i> MAFF 230059
<i>Hypocrea</i> cf. <i>atroviridis</i> MAFF 240573	<i>Raffaelea</i> sp. IR-13
<i>Hypocrea</i> cf. <i>atroviridis</i> MAFF 240574	<i>Raffaelea</i> sp. IR-14
<i>Hypocrea</i> sp. SR 35	<i>Raffaelea</i> sp. IR-15
<i>Hypocrea</i> sp. SR 36	<i>Stemphylium lycopersici</i> MAFF 240450
<i>Hypocrea</i> sp. SR 37	<i>Stemphylium lycopersici</i> MAFF 240449
<i>Hypocrea pachybasiodoides</i> MAFF 240567	<i>Stemphylium vesicarium</i> MAFF 240566
<i>Hypocrea strictipilosa</i> MAFF 240568	<i>Stemphylium vesicarium</i> MAFF 240539
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> MAFF 240489	<i>Stemphylium vesicarium</i> MAFF 240465
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> MAFF 240499	<i>Stemphylium vesicarium</i> MAFF 240534
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> MAFF 240515	<i>Trichoderma</i> cf. <i>harzianum</i> MAFF 240582
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> MAFF 240516	<i>Valsa ceratosperma</i> SR1
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> MAFF 240538	<i>Valsa ceratosperma</i> SR2
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> MAFF 240591	<i>Valsa ceratosperma</i> SR3
<i>Lasionectria sylvana</i> MAFF 240580	<i>Valsella diatrypa</i> SR22
<i>Leptographium</i> sp. SR 10	<i>Valsella diatrypa</i> SR23
<i>Leptographium</i> sp. SR 11	<i>Zygophiala jamaicensis</i> MAFF 240485
<i>Leptographium</i> sp. SR 12	<i>Zygophiala jamaicensis</i> MAFF 240486
<i>Lasiosphaeria punctata</i> SR18	<i>Aspergillus</i> 関連属菌類（矢印）
<i>Lasiosphaeria punctata</i> SR19	<i>Talaromyces</i> sp. IFM 58209
<i>Lasiosphaeria punctata</i> SR20	<i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 58210
<i>Lasiosphaeria ovensa</i> SR21	<i>Eupenicillium</i> sp. IFM 58211
<i>Macrophomina phaseolina</i> MAFF 240530	<i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 58212
<i>Macrophomina phaseolina</i> MAFF 240482	<i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 58213
<i>Nectria pseudotrichia</i> MAFF 240581	<i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 58214
<i>Nectria pseudotrichia</i> MAFF 240585	<i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 58215
<i>Nectria pseudotrichia</i> MAFF 240588	<i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 58216
<i>Nectria pseudotrichia</i> IR-7	<i>Eupenicillium</i> sp. IFM 58217
<i>Nectria pseudotrichia</i> IR-8	<i>Eupenicillium</i> sp. IFM 58218
<i>Nectria pseudotrichia</i> IR-9	<i>Neosartorya spinosa</i> IFM 58219
<i>Nectria</i> sp. IR-19	<i>Eupenicillium brefeldianum</i> IFM 58220
<i>Nectria</i> sp. IR-20	<i>Eupenicillium</i> sp. IFM 58221
<i>Nectria</i> sp. IR-21	<i>Talaromyces</i> sp. IFM 58227
<i>Neonectria coccinea</i> MAFF 240579	<i>Neosartorya</i> sp. IFM 58228
<i>Nomuraea atypicola</i> SR 32	<i>Talaromyces</i> sp. IFM 58229
<i>Nomuraea atypicola</i> SR 33	<i>Neosartorya quadricincta</i> IFM 58230
<i>Ophiostoma aoshimae</i> SR 4	<i>Talaromyces</i> sp. IFM 58233
<i>Ophiostoma aoshimae</i> SR 5	

日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較

<i>Dichotomomyces cepii</i> IFM 58234	<i>Helicosporium griseum</i> NBRC 106785
<i>Talaromyces</i> sp. IFM 58235	<i>Helicosporium panacheum</i> NBRC 106814
<i>Eupenicillium</i> sp. IFM 58392	<i>Helicosporium panacheum</i> NBRC 106787
<i>Neosartorya quadricincta</i> IFM 58393	<i>Helicosporium talbotii</i> NBRC 106809
<i>Neosartorya</i> sp. IFM 58394	<i>Helicosporium virescens</i> NBRC 106793
<i>Eupenicillium</i> sp. IFM 58395	<i>Isthmotrichladia</i> cf. <i>laeensis</i> NBRC 106796
<i>Neosartorya fischeri</i> IFM 58396	<i>Peyronelina glomerulata</i> NBRC 104523
<i>Talaromyces trachyspermus</i> IFM 58397	<i>Peyronelina glomerulata</i> NBRC 104522
<i>Talaromyces</i> sp. IFM 59438	<i>Polylobatisporella deltoidea</i> NBRC 106820
<i>Eupenicillium</i> sp. IFM 59439	<i>Polylobatisporella deltoidea</i> NBRC 106821
<i>Talaromyces</i> sp. IFM 59440	<i>Polylobatisporella deltoidea</i> NBRC 106822
<i>Neosartorya</i> sp. IFM 59441	<i>Polylobatisporella</i> sp. NBRC 106823
<i>Eupenicillium</i> sp. IFM 59442	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106770
半水生菌類（山口）	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106754
<i>Aegerita candida</i> NBRC 106769	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106762
<i>Aegerita candida</i> NBRC 106759	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106756
<i>Aegerita candida</i> NBRC 106782	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106758
<i>Aegerita candida</i> NBRC 106784	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106763
<i>Aegerita candida</i> NBRC 106774	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106765
<i>Aegerita tortuosa</i> NBRC 106768	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106781
<i>Candelabrum brocchiatum</i> NBRC 106802	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106771
<i>Candelabrum brocchiatum</i> NBRC 106803	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106772
<i>Candelabrum brocchiatum</i> NBRC 106805	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106773
<i>Candelabrum brocchiatum</i> NBRC 106808	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106776
<i>Candelabrum brocchiatum</i> NBRC 106813	<i>Pseudaegerita corticalis</i> NBRC 106778
<i>Candelabrum brocchiatum</i> NBRC 106788	<i>Pseudoclathrosphaerina evamariae</i> NBRC 106755
<i>Candelabrum brocchiatum</i> NBRC 106791	<i>Scutisporus brunneus</i> NBRC 106816
<i>Candelabrum brocchiatum</i> NBRC 106792	<i>Scutisporus brunneus</i> NBRC 106817
<i>Candelabrum brocchiatum</i> NBRC 106799	<i>Scutisporus brunneus</i> NBRC 106818
<i>Candelabrum</i> cf. <i>brocchiatum</i> NBRC 106810	<i>Scutisporus brunneus</i> NBRC 106819
<i>Candelabrum japonense</i> NBRC 106777	<i>Spirosphaera carici-graminis</i> NBRC 106764
<i>Clathrosphaerina zalewskii</i> NBRC 106761	<i>Spirosphaera dimorpha</i> NBRC 106783
<i>Clathrosphaerina zalewskii</i> NBRC 106760	<i>Tetracladium</i> sp. NBRC 106797
<i>Clathrosphaerina zalewskii</i> NBRC 106779	<i>Tetraploa</i> sp. NBRC 106789
<i>Clathrosporium olivatrum</i> NBRC 106767	<i>Triscelophorus</i> sp. NBRC 106806
<i>Diplocladiella</i> cf. <i>alta</i> NBRC 106795	<i>Triscelophorus</i> sp. NBRC 106794
<i>Diplocladiella taurina</i> NBRC 106815	<i>Triscelophorus</i> sp. NBRC 106798
<i>Helicoma limpidum</i> NBRC 106811	<i>Unidentified fungus</i> NBRC 106812
<i>Helicomyces roseus</i> NBRC 106790	<i>Varicosporium elodeae</i> NBRC 106753
<i>Helicomyces</i> sp. NBRC 106766	リグニン分解菌類（植物腐朽菌類）（大菌）
<i>Helicomyces torquatus</i> NBRC 106804	<i>Absidia glauca</i> B3-32
<i>Helicomyces torquatus</i> NBRC 106807	<i>Apiospora montagnei</i> B8-193
<i>Helicomyces torquatus</i> NBRC 106800	<i>Cladosporium cladosporioides</i> RQ-BL-21
<i>Helicoon sessile</i> NBRC 106757	<i>Cladosporium herbarum</i> B7-112
<i>Helicoon sessile</i> NBRC 106775	<i>Epicoccum nigrum</i> B8-122
<i>Helicosporium griseum</i> NBRC 106786	

<i>Geniculosporium</i> sp. C4-23	<i>Armillaria</i> sp. AT-0854
<i>Geniculosporium</i> sp. C6-21	<i>Armillaria</i> sp. AT-0867
<i>Geniculosporium</i> sp. D2-11	<i>Armillaria</i> sp. AT-0868
<i>Geniculosporium</i> sp. D2-21	<i>Artomyces pyxidatus</i> AT-0882
<i>Geniculosporium</i> sp. IR-BL-151	<i>Campanella junghuhnii</i> AT-0820
<i>Geniculosporium</i> sp. IR-NB-33	<i>Chalciporus piperatus</i> AT-1005
<i>Lecanicillium psalliotae</i> B3-42	<i>Chalciporus piperatus</i> AT-1081
<i>Marasmius</i> sp. C4-11	<i>Clitocybe catinus</i> AT-1009
<i>Marasmius</i> sp. IR-BL-101	<i>Coprinopsis</i> sp. AT-0806
<i>Marasmius</i> sp. IR-BL-23	<i>Cortinarius tenuipes</i> AT-0884
<i>Mucor genevensis</i> RQ-NB-91	<i>Crucibulum laeve</i> AT-0851
<i>Nigrospora sphaerica</i> RQ-BL-101	<i>Cystoderma amianthinum</i> AT-1010
<i>Penicillium citrinum</i> B7 11-3	<i>Dictyophora duplicata</i> AT-0833
<i>Penicillium janthinellum</i> B6 12-5	<i>Dictyophora duplicata</i> AT-0855
<i>Penicillium micynskii</i> B3 12-4	<i>Galerina helvoliceps</i> AT-0782
<i>Penicillium soppi</i> B7 6-7	<i>Galerina helvoliceps</i> AT-0899
<i>Penicillium thomii</i> B8 19-1	<i>Gymnopilus liquiritiae</i> AT-0858
<i>Phoma</i> sp. B9-21	<i>Gymnopilus liquiritiae</i> AT-0895
<i>Pilidiella</i> sp. B8-71	<i>Gymnopilus penetrans</i> AT-1022
<i>Trichoderma polysporum</i> RQ-BL-151	<i>Gymnopus dryophilus</i> AT-0776
<i>Trichoderma viride</i> B6-183	<i>Gymnopus dryophilus</i> AT-0790
<i>Umbelopsis gibberispora</i> B8-33	<i>Gymnopus</i> sp. AT-0774
<i>Umbelopsis nana</i> RQ-BL-182	<i>Gymnopus</i> sp. AT-0786
<i>Umbelopsis ramanniana</i> B3-11	<i>Gymnopus</i> sp. AT-0881
<i>Xylaria</i> sp. C4-22	<i>Gymnopus confluens</i> AT-0886
<i>Xylaria</i> sp. IR-BL-121	<i>Gymnopus confluens</i> AT-1019
<i>Xylaria</i> sp. RQ-NB-31	<i>Hebeloma velutipes</i> AT-0840
Unidentified fungus D1-11	<i>Hebeloma</i> sp. AT-1015
Unidentified fungus D6-11	<i>Hohenbuehelia</i> sp. AT-0814
Unidentified fungus IR-BL-11	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i> AT-0893
Unidentified fungus IR-BL-181	<i>Lactarius laeticolor</i> AT-1004
Unidentified fungus IR-BL-21	<i>Lactarius</i> sp. AT-0834
Unidentified fungus IR-BL-41	<i>Lactarius</i> sp. AT-0842
Unidentified fungus IR-BL-51	<i>Lactarius</i> sp. AT-0872
Unidentified fungus IR-BL-61	<i>Lactarius</i> sp. AT-0878
Unidentified fungus IR-NB-171	<i>Lactarius flavidulus</i> AT-1003
軟質担子菌類（山田）	<i>Leccinum scabrum</i> AT-0848
<i>Agrocybe praecox</i> AT-0785	<i>Leccinum scabrum</i> AT-0877
<i>Agrocybe praecox</i> AT-0788	<i>Leccinum scabrum</i> AT-0885
<i>Amanita rubescens</i> AT-0847	<i>Leccinum scabrum</i> AT-0888
<i>Amanita</i> sp. AT-0843	<i>Lentinellus ursinus</i> AT-0784
<i>Ampulloclitocybe clavipes</i> AT-0865	<i>Lentinellus flabelliformis</i> AT-0768
<i>Armillaria</i> sp. AT-0771	<i>Lentinus velutinus</i> AT-0828
<i>Armillaria</i> sp. AT-0845	<i>Lycoperdon perlatum</i> AT-0832
<i>Armillaria</i> sp. AT-0849	<i>Lycoperdon perlatum</i> AT-0860
<i>Armillaria</i> sp. AT-0850	<i>Lycoperdon spadiceum</i> AT-0861
	<i>Lycoperdon perlatum</i> AT-1014

日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較

<i>Lycoperdon perlatum</i> AT-1034	<i>Stropharia aeruginosa</i> f. <i>brruneola</i> AT-0841
<i>Lyophyllum connatum</i> AT-0846	<i>Stropharia aeruginosa</i> AT-1007
<i>Lyophyllum connatum</i> AT-1018	<i>Suillus luteus</i> AT-1008
<i>Marasmiellus</i> sp. AT-0772	<i>Suillus pictus</i> AT-0800
<i>Marasmiellus</i> sp. AT-0822	<i>Suillus grevillei</i> AT-1030
<i>Marasmiellus</i> sp. AT-0825	<i>Tetrapyrgos nigripes</i> AT-0827
<i>Marasmius bulliardii</i> AT-0777	<i>Tetrapyrgos nigripes</i> AT-0830
<i>Marasmius pulcherripes</i> AT-0787	<i>Tricholoma portentosum</i> AT-0864
<i>Marasmius scorodonium</i> AT-0775	<i>Tricholoma portentosum</i> AT-0889
<i>Marasmius scorodonium</i> AT-0778	<i>Tricholoma</i> sp. AT-0799
<i>Marasmius scorodonium</i> AT-0781	<i>Tricholoma stans</i> AT-0863
<i>Marasmius scorodonium</i> AT-0796	<i>Tricholoma orirubens</i> AT-1011
<i>Marasmius scorodonium</i> AT-0844	<i>Tricholoma saponaceum</i> AT-1033
<i>Marasmius</i> sp. AT-1026	<i>Xeromphalina</i> sp. AT-0869
<i>Melanoleuca</i> sp. AT-1032	<i>Xeromphalina campanella</i> AT-1023
<i>Micromphale</i> sp. AT-0808	<i>Xeromphalina</i> sp. AT-1000
<i>Mycena cinerella</i> AT-0773	<i>Xerula radicata</i> AT-0896
<i>Mycena cinerella</i> AT-0783	硬質菌類（服部）
<i>Mycena haematopus</i> AT-0862	<i>Auricularia auricula-judae</i> MAFF435191
<i>Mycena polygramma</i> AT-0789	<i>Auricularia auricula-judae</i> MAFF435195
<i>Mycena polygramma</i> AT-0793	<i>Bjerkandera adusta</i> NBRC106826
<i>Mycena pura</i> AT-0838	<i>Ceriporia reticulata</i> NBRC106851
<i>Mycena pura</i> AT-0839	<i>Daedaleopsis confragosa</i> NBRC106854
<i>Mycena</i> sp. AT-0795	<i>Daedaleopsis tricolor</i> NBRC106855
<i>Mycena</i> sp. AT-0826	<i>Erythromyces crocicreas</i> NBRC106847
<i>Mycena</i> sp. AT-1027	<i>Fomes fomentarius</i> NBRC106857
<i>Parasola</i> sp. AT-0805	<i>Fomitopsis pinicola</i> NBRC106830
<i>Paxillus involutus</i> AT-0852	<i>Ganoderma applanatum</i> NBRC106825
<i>Paxillus involutus</i> AT-0853	<i>Ganoderma mastoporum</i> NBRC106849
<i>Phallus impudicus</i> AT-0891	<i>Gloeophyllum sepiarium</i> NBRC106831
<i>Pleurotus abieticola</i> AT-0780	<i>Grammothele fuligo</i> NBRC106848
<i>Pleurotus djamor</i> AT-0818	<i>Hapalopilus nidulans</i> NBRC106858
<i>Pleurotus pulmonarius</i> AT-0770	<i>Heterobasidion orientale</i> NBRC106850
<i>Pleutotus ostreatus</i> AT-0897	<i>Hypholoma fasciculare</i> MAFF435197
<i>Psathyrella candolleana</i> AT-0769	<i>Irpea lacteus</i> NBRC106829
<i>Psathyrella candolleana</i> AT-0807	<i>Junghuhnia nitida</i> NBRC106838
<i>Psathyrella</i> sp. AT-0811	<i>Junghuhnia separabilima</i> NBRC106833
<i>Psathyrella</i> sp. AT-0813	<i>Lactocollybia cycadicola</i> MAFF435201
<i>Psathyrella</i> sp. AT-0815	<i>Laetiporus montanus</i> NBRC106842
<i>Psathyrella</i> sp. AT-0817	<i>Lentinus squarrosulus</i> MAFF435190
<i>Psathyrella</i> sp. AT-0821	<i>Lentinus squarrosulus</i> MAFF435196
<i>Psathyrella</i> sp. AT-0824	<i>Lentinus squarrosulus</i> MAFF435198
<i>Russula cyanoxantha</i> AT-0875	<i>Lentinus squarrosulus</i> MAFF435199
<i>Russula mariae</i> AT-0857	<i>Microporus affinis</i> NBRC106845
<i>Russula</i> sp. AT-1017	<i>Nigroporus vinosus</i> NBRC106844
<i>Schizophyllum commune</i> AT-0823	<i>Oudemansiella canarii</i> MAFF435193
<i>Schizophyllum commune</i> AT-0829	

*Oudemansiella canarii* MAFF435200  
*Perenniporia tephropora* NBRC106846  
*Phaeolus schweinitzii* NBRC106852  
*Phellinus ferreus* NBRC106828  
*Phellinus hartigii* NBRC106832  
*Phellinus laevigatus* NBRC106834  
*Pleurotus citrinopileatus* NBRC106859  
*Pleurotus djamor* MAFF435194  
*Pleurotus djamor* NBRC106837  
*Pleurotus pulmonarius* MAFF435192  
*Polyporus alveolaris* NBRC106836  
*Postia balsamea* NBRC106841  
*Rigidoporus lineatus* NBRC106843  
*Schizophyllum commune* MAFF435202  
*Stereum rugosum* NBRC106856  
*Tapinella panuoides* NBRC106853  
*Trametes hirsuta* NBRC106840  
*Trametes versicolor* NBRC106839  
*Trichaptum abietinum* NBRC106835  
*Trichaptum fuscoviolaceum* NBRC106827

- Marr, K. (2005). *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 4: 625-632.
- Ban, S., Sakane, T., Toyama, K. & Nakagiri, A. (2009). Teleomorph-anamorph relationships and reclassification of *Cordyceps cuboidea* and its allied species. *Mycoscience* 50: 261-272.
- Carreiro, M. M. & Koske, R. E. (1992). Room temperature isolations can bias against selection of low temperature microfungi in temperate forest soils. *Mycologia* 84: 886-900.
- de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M. J. (2000). *Atlas of clinical fungi* 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, pp 329-331.
- Domsch, K. H., Gams, W. & Anderson, T. H. (2007). *Compendium of Soil Fungi*. IHW-Verlag, Eching.
- Ellis, J. J. (1963). A Study of *Rhopalomyces elegans* in pure culture. *Mycologia* 55: 183-198.
- Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 608 p.
- Ellis, M. B. (1976). More Dematiaceous Hyphomycetes, Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England, 507p.
- Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. St. Paul MIN, APS Press.
- Glass, N. L. & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1323-1330.
- 百町満朗 (2008) . 植物生育促進菌類による植物への全身抵抗性誘導の機構. 日本植物病理学会土壤病談話会レポート 24: 59-69.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Köljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R. W., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J. & Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 122: 509-547.
- Hirayama, K., Tanaka, K., Raja, H. A., Miller, A. N. & Shearer, C. A. (2010). A molecular phylogenetic assessment of *Massarina ingoldiana* sensu lato. *Mycologia* 102: in press; DOI: 10.3852/09-230.
- Katz, M. E., Dougall, A. M., Weeks, K. & Cheetham, B. F.

## 謝 辞

本研究は財団法人発酵研究所の特定研究助成により3年間の研究費を頂き遂行したものである。深く感謝の意を表します。

調査にご協力いただいたOPバイオファクトリー栗原祐子博士、利尻島採集を行うに当たり多大の協力をいただいた利尻町立博物館の佐藤雅彦氏、宮古島採集を行うに当たり多大の協力をいただいた東京農業大学宮古亜熱帯農業研修センターの中西康博博士および沖縄県病害虫防除技術センターの上里卓己氏にお礼申し上げます。

*Aspergillus* 属研究における土壌試料の採集、菌株分離、塩基配列の決定などご協力いただいた千葉大学真菌医学研究センターの松澤哲宏博士、今西由巳博士、弘佑介氏に心より感謝いたします。

植物腐朽菌類の分子系統学的解析については、日本大学の広瀬大博士との共同研究として行った。

## 引用文献

- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M. & Rodriguez-Tudela, G. L. (2008). *Aspergillus* Section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob. Agents Chemother* 52: 1244-1252.
- Balajee, S. A., Gribskov, J. L., Hanley, E., Nickle, D. &

日本の亜熱帯域および冷温帶域の糸状菌類相の多様性とその比較

- (2005). Multiple genetically distinct group revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 551-555.
- Kirk, P. M. (1993). Distribution of Zygomycetes – the tropical connection. In (Isaac, S., Frankland, J. C., Watling, R. & Whalley, A. J. S. (eds.), *Aspects of Tropical Mycology*, p. 91-102, Cambridge University Press. Cambridge.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalper, J. A. (eds.) (2001). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*, 9th edition. CAB International, Wallingford.
- Kobayasi, Y. (1941). The genus *Cordyceps* and its allies. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 23: 329-364.
- 小林享夫 (1997) . 日本および熱帯・亜熱帯地域における樹木病原菌類の分類・同定に関する研究. *日菌報* 38:159-165.
- 小林享夫・勝本謙ら編 (1992) . 植物病原菌類図説, 685 p., 全国農村教育協会, 東京.
- 小林享夫, 大宜見朝栄, 亀山統一, 矢口行雄, 具志堅允一 (2009) . 沖縄本島の樹木病害と病原微生物 – 1988, 1990, 1994, 1995年の調査のまとめ. *植物防疫* 58: 14-28.
- Kobayasi, Y. & Shimizu, D. (1978). *Cordyceps* species from Japan. *Bull. Natn. Sci. Mus., Ser. B* 4: 43-63.
- Kobayasi, Y. & Shimizu, D. (1982a). Monograph of the genus *Torrubiella*. *Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B* 8: 43-78.
- Kobayasi, Y. & Shimizu, D. (1982b). *Cordyceps* species from Japan 4. *Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B* 8: 79-91.
- Kobayasi, Y. & Shimizu, D. (1983). *Cordyceps* species from Japan 6. *Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B* 9: 1-21.
- Kumon, Y., Kamisaka, Y., Tomita, N., Kimura, K., Uemura, H., Yokochi, T., Yokoyama, R. & Honda, D. (2008). Isolation and characterization of a Δ5-desaturase from *Oblongichytrium* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 2224-2227.
- Loh, L. S., Nawawi, A. & Kuthubutheen, A. J. (2001). Mucoraceous fungi from Malaysia. Institute of biological sciences, University of Malaya, Kuala Lumpur.
- Miura, K. & Kudo, M. (1970). An agar-medium for aquatic hyphomycetes. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 11: 116-118.
- Nagano, N., Matsumoto, S., Kuramura, T., Taoka, Y., Honda, D. & Hayashi, M. (2010). The distribution of extracellular cellulase activity in marine eukaryotes, thraustochytrids. *Marine Biotech.* (in press)
- Nakagiri, A. (1989). Marine fungi in sea foam from Japanese coast. *IFO Res. Commun.* 14: 52-79.
- Nakagiri, A. & Tubaki, K. (1983). *Lindra obtusa*, a new marine ascomycete and its *Anguillospora* anamorph. *Mycologia* 75: 487-497.
- Narita, Y. & Tojo, M. (2007). Modifications of PARP medium using fluazinam, miconazole, and nystatin for detection of *Pythium* spp. in soil. *Plant Disease* 91:1591-1599.
- Okane, I., Lumyong, S., Nakagiri, A. & Ito, T. (2003). Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophylllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). *Mycoscience* 44: 353-363.
- Okane, I., Srikitkulchai, P., Toyama, K., Læssøe, T., Sivichai, S., Hywel-Jones, N., Nakargiri, A., Potacharoen, W. & Suzuki, K. (2008). Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. *Mycoscience* 49: 359-372.
- 沖縄県文化環境部自然保護課 (2006) . 改訂・沖縄県の絶滅のおそれのある野生生物（菌類編・植物編）-レッドデータおきなわ-. 沖縄県文化環境部自然保護課, 沖縄県, 那覇市.
- Osono, T. (2007). Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecol. Res.* 22: 955-974.
- 大園享司, 広瀬大 (2009) . 利尻島においてミズナラ落葉の漂白に関する子囊菌類. *利尻研究* 28: 51-56.
- Osono, T. & Hirose, D. (2009). Altitudinal distribution of microfungi associated with *Betula ermanii* leaf litter on Mt. Rishiri, northern Japan. *Can. J. Microbiol.* 55: 783-789.
- Peterson, S. W. (2000). Phylogenetic analysis of *Penicillium* based on ITS and LSU rDNA sequences. *In Classification of *Penicillium* and *Aspergillus*: Integration of Modern Taxonomic Methods*, Samson, P. A. & Pitt, J. I. (eds.), p. 163-178, Harwood Publishers, Reading.
- Pitt, J. I. (1979). *The Genus Penicillium and Its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press, London.
- Pitt, J. I. (2000). *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*, 3rd. edition, Food Science Australia, North Ryde.
- Raja, H. A., Schmit, J. P. & Shearer, C. A. (2009). Latitudinal, habitat and substrate distribution patterns of freshwater ascomycetes in the Florida Peninsula. *Biodivers. Conserv.* 18: 419-455.
- 利尻町立博物館 (1999) . 利尻産キノコ目録, 利尻町立博物館, 利尻郡.
- Rossman, A. Y., Samuels, G. J., Rogerson, C. T. & Lowen, R. (1999). Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). *Stud. Mycol.* 42: 1-248.
- Samuels, G. J., Rossman, A. & Schroers, Y. (2002). Key to tropical species of *Nectria*-like fungi. In Watling, R., Frankland, J., Ainsworth, M., Isaac, S. & Robinson, C. H. (eds.), *Tropical Mycology* vol. 2, *Mycromycetes*, p. 3-31, CABI Publishing, Oxfordshire.
- Saotome, K., Hattori, T., Ota, Y., Lee, S. S., Vikineswary, S., Abdullah, N. & Kakishima, M. (2009). Taxonomic study of Asian species of *Echinochaete* (Polyporaceae, Basidiomycota) and description of *E. maximipora* sp. nov. *Mycological Progress* 8: 123-132.
- 佐藤清吉, 山晋, 佐藤雅彦 (1998) 利尻島のキノコ (1) . *利尻研究* 17: 11-26.
- 佐藤清吉, 佐藤雅彦 (1999) . 利尻島のキノコ (2) . *利尻研究* 18: 63-67.
- Shearer, C. A. (2001). The distribution of freshwater filamentous ascomycetes. In Misra, J. K. & Horn, B.

- W. (eds.), Trichomycetes and Other Fungal Groups, p. 73-98, Science Publishing, Enfield.
- Shearer, C. A. & Hyde, K. D. (1997). *Massarina ingoldiana*, a new ascomycete from freshwater habitats. *Mycologia* **89**: 114-119.
- Shearer, C. A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H. A., Schmit, J. P., Thornton, H. A. & Voglmayr, H. (2007). Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodivers. Conserv.* **16**: 49-67.
- Shoemaker, R. A. (1984). Canadian and some extrazonal *Leptosphaeria* species. *Can. J. Bot.* **62**: 2688-2729.
- Shoemaker, R. A. & Babcock, C. E. (1989). *Phaeosphaeria*. *Can. J. Bot.* **67**: 1500-1599.
- Stone, J. K., Polishook, J. D. & White, J. F., Jr. (2004). Endophytic fungi. In Mueller, G. M., Bills, G. F. & Foster, M. S. (eds). *Biodiversity of Fungi*. p. 231-270, Elsevier Academic Press, MA.
- Suetrong, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Sakayaroj, J., Phongpaichit, S., Tanaka, K., Hirayama, K. & Jones, E.G. B. (2009). Molecular systematics of the marine Dothideomycetes. *Stud. Mycol.* **64**: 155-173.
- Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-Ard, J. J., Shrestha, B. & Spatafora, J. W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.* **57**: 5-59.
- Tanaka, K., Hirayama, K., Yonezawa, H., Hatakeyama, S., Harada, Y., Sano, T., Shirouzu, T. & Hosoya, T. (2009). Molecular taxonomy of bambusicolous fungi: Tetraplosphaeriaceae, a new pleosporalean family with *Tetraploa*-like anamorphs. *Stud. Mycol.* **64**: 175-209.
- 徳増征二 (2009) . 小地域における微小菌類の種多様性に関する集中的研究. *IFO Res. Commun.* **23**: 73-97.
- Tsui, C. K. M., Hyde, K. D. & Hodgkiss, I. J. (2000). Biodiversity of fungi on submerged wood in Hong Kong streams. *Aquat. Microb. Ecol.* **21**: 289-298.
- 宇梶清一 (2006) . 日本冬虫夏草の会25周年記念事業第28次 西表島調査報告. 冬虫夏草 No. 26, p. 19-24.
- Varga, J., Toth, B., Rigo, K., Debets, F. & Kozakiewicz, Z. (2000). Genetic variety within the *Aspergillus viridinutans* species. *Folia Microbiol.* **45**: 423-428.
- Watanabe, T. (1981). Distribution and populations of *Pythium* species in the northern and southern parts of Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **47**: 449-456.
- Watanabe, T. (1988). Kinds, distribution, and pathogenicity of *Pythium* species isolated from soils in Shikoku island. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **54**: 523-528.
- Watanabe, T. (1989a). Kinds, distribution, and pathogenicity of *Pythium* species isolated from soil of Kyushu Island in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **55**: 32-40.
- Watanabe, T. (1989b). Further study on *Pythium* species isolated from soils in the Ryukyu Islands. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **55**: 349-352.
- 山田明義 (2001) . 菌類の検出と分離：外生菌根菌（III） 分離培養法ならびに釣菌法. *日本菌学会会報* **42**: 177-187.
- Zhang, Y., Schoch, C. L., Fournier, J., Crous, P. W., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Hirayama, K., Tanaka, K., Pointing, D. B., Spatafora, J. W. & Hyde, K. D. (2009). Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Stud. Mycol.* **64**: 85-102.

## 日本の亜熱帯域および冷温帯域の酵母相の多様性とその比較

高島 昌子

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室

〒351-0198 和光市広沢2-1

### Species diversity of yeasts: a comparison of subtropical and cool temperate areas of Japan

Masako Takashima

Microbe Division / Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center  
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

This project was undertaken to study the species diversity of yeasts in Japan, and thereby to understand the diversity of microbiota of the country by comparing it with those of the USA and European and Asian countries, thus contributing to the construction of an inventory database. Iriomote Island in Okinawa and Rishiri Island in Hokkaido were selected as the sampling sites to compare the microbiota between the southern (subtropical zone) and northern (cool temperate zone) parts of Japan. A total of 427 and 1101 strains were isolated from soil samples and plant materials collected from Iriomote Island and Rishiri Island, respectively. Based on the sequence analyses of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene, these were tentatively classified into 98 (including 57 new species candidates) and 177 (including 86 new species candidates) species, respectively, indicating that new species candidates accounted for approximately half of the total species isolated. Basidiomycetous yeasts were isolated more frequently than ascomycetous yeasts in both sampling sites; however, since only 14 species (5% of the number of species isolated) were commonly isolated from each site, the microbiota were assumed to be quite different between the sites. From Iriomote Island, we isolated *Kazachstania yakushimaensis* and *Sporobolomyces ogasawarensis*, which were also found on Yakushima and the Ogasawara Islands, and *Rhodotorula bogoriensis* was isolated from tropical areas. Species previously reported from other areas of Japan, European countries, and the USA, such as *Trichosporon porosum*, *Cryptococcus terricola*, and *C. podzoricus*, were also isolated from Rishiri Island.

The number of species isolated in this project corresponded to 20% of the number of species included in *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 5th edition, which will be published in 2011 (around 1500 species). Furthermore, the number of our new species candidates was around 10% of the total species described by scientists to date, indicating that each of the sampling sites used in this study showed distinctive yeast diversity from that of other areas. The results of this study also contributed to the construction of an inventory of yeasts of Japan.

Key words: species diversity, yeast, inventory, Iriomote Island, Rishiri Island

### 緒 言

#### 生物の多様性の保全や生物資源の持続的利用のた

E-mail: masako@jcm.riken.jp

共同研究者：杉田 隆（明治薬科大学・微生物学教室）、今西由己（独立行政法人製品評価技術基盤機構・バイオテクノロジー本部・生物遺伝資源部門・遺伝資源保存課（現：千葉大学真菌医学研究センター）

め、微生物の種の多様性の研究は、1992年の生物多様性条約（Convention on Biological Diversity, CBD）の発効以降極めて盛んになった。酵母の場合も同様である。近年、細菌では年間に500種が新種として発表されているといわれている。酵母ではこのような統計は発表されていないが、Index of fungiの2008年分に記載された酵母の種の数は79であった。これは我々が知らない酵母が非常に多く存在することを示している。

日本は北海道、本州、四国および九州の4大島を含む、大小様々な6852の島からなり、北東から南西にむかって(45°N148°E - 24°N122°E)，亜寒帯から亜熱帯までを含む列島である。地域により植生が異なることからそこに棲息する微生物も極めて多様であると推測される。近年は、微生物資源を求めて海外からの入手も多く試みられているが、我が国もこれらの国々に劣らず豊かな微生物資源国であろうと推定される。

本研究の目的は、我が国の微生物叢を種多様性について調査し、欧米やアジア地域との共通性と異質性を認識することにより、日本の微生物叢の多様性を把握することである。またこれらを資源として役立てるための基盤となるインベントリー構築も目的に含んでいる。そのため、特に南北の比較を目的として調査地として選定した西表石垣国立公園内の西表島および利尻礼文サロベツ国立公園内の利尻島の植物や土壤を分離源として採集し、酵母の分離・同定を行って多様性について考察を行った。

## 実験方法

**試料の採取と酵母の分離・保存** サンプリングは両地域とも環境省の許可を得て行った。土壤、植物および水を含む各種のサンプルを自然界から採集し、これらから酵母を分離した。採集は、利尻島は2007年8月および2008年9月、西表島は2007年10月および2008年11月の各2回行なった。分離培地には汎用培地であるYM平板培地、DRBC寒天培地（両者ともBD-Difco）や、M3C平板培地（Vishniac, 1983）等を用いた。基本的には、基礎培地に懸濁したサンプルを抗生素質を添加した分離培地に塗布し、生育してきたコロニーを釣菌を行ったが、できるだけ多くの酵母を得られるよう、集積培養の期間や温度条件等を調整して、分離方法を策定した。分離した酵母は純化の後、-80°Cにて保存した。

**塩基配列の決定と簡易同定** 分離株のDNAからLSU rRNA遺伝子のD1/D2領域（約600塩基）をPCRによって增幅し、塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Kurtzman & Robnett (1997) に従い、プロジェクト参加者は同一のプライマーを用いておこなった。同定は、DDBJ/GenBank/EMBLのデータベースを用いて類似度の高い塩基配列を検索し、本領域の塩基配列の類似度が既知種のものと3塩基以下の場合を同種として簡易同定を行った (Kurtzman & Robnett, 1998; Scorzetti et al., 2002)。

尚、本プロジェクトにおいては、同定は本塩基配列

の類似度のみによって行っており、形態学的特徴や生理生化学性状の比較などは行っていない。簡易同定の結果、テレオモルフの学名を有する種と同種と推定された場合は、その学名を使用した。また、分離株のうち、*Aureobasidium pullulans*などチャワンタケ亜門(Pezizomycotina)に位置する菌群については本結果には含めなかった。

**系統樹の作成** 得られた配列をClustal W (Thompson et al., 1994)によってアラインメントの後、目視によって修正をおこなった。遺伝学的距離はKimura (1980)に従って計算し、Neighbor-joining法 (Saitou & Nei, 1987)により系統樹を作成した。枝の信頼性の検定にはブートストラップ法 (Felsenstein, 1985)を用いた。

## 結果と考察

**分離した種の数** 両サンプリングサイトからの分離結果をTable 1に示した。西表島のサンプルから427株、また利尻島のサンプルから1101株を分離した。西表島のサンプルは、分離温度に15°C程度を用いても糸状菌の成長が早く、酵母の分離を行いにくいことが多かった。

分離株の簡易同定をおこなったところ、西表分離株は98種に、また利尻分離株は177種に分類された。またこれらのうち、57種および86種はそれぞれ新種であると推定された。新種の割合（新種の数／分離された種の数）は、西表島は58%，利尻島は47%であった。

分離された種の内訳は、西表島の場合は、子囊菌系酵母が18%（サッカロミケス亜門18%）担子菌系酵母が82%（クロボキン亜門12%，ハラタケ亜門46%，サビキン亜門23%）であった。また利尻島の場合、子囊菌系酵母が38%（サッカロミケス亜門37%，タフリナ亜門1%），担子菌系酵母が62%（クロボキン亜門4%，ハラタケ亜門37%，サビキン亜門20%）であり、いずれも子囊菌系酵母より担子菌系酵母が多く分離された。

**過去の国内外との分離株の比較** Table 2に分離株の内容、およびこれらの種の国内のバイオリソースセンターの保存の有無について示した。既知種については、基準株の分離地についても示した。

分離株のうち、既知種と同定されたものの中には、その基準株が日本産である種も複数あったが、これらは必ずしも西表島および利尻島の両方から分離され

日本の亜熱帯域および冷温帶域の酵母相の多様性とその比較

Table 1 Yeasts isolated from Iriomote Island and Rishiri Island

	Iriomote Island			Rishiri Island		
	Strains isolated	Number of species	Number of new species candidate	Strains isolated	Number of species	Number of new species candidate
<b>Ascomycetous yeasts</b>						
Saccharomycotina	59	18	8	475	66	24
Taphrinomycotina	0	0	0	2	2	0
<b>Basidiomycetous yeasts</b>						
Ustilaginomycotina	64	12	6	22	7	2
Agaricomycotina	219	45	31	365	66	36
Pucciniomycotina	85	23	12	237	36	24
Total	427	98	57	1101	177	86

ず、両地域の異質性が示された。同定された種から両地域に棲息する酵母の特徴を挙げると、西表島から分離されたものは *Kazachstania yakushimaensis* や *Sporobolomyces ogasawarensis* など屋久島や小笠原諸島と共に通な種や、*Rhodotorula bogoriensis* など熱帯地域の酵母と共に通な種が見いだせた。利尻島からは、*Trichosporon porosum* や *C. terricola*, *C. podzoricus*, *Sporobolomyces roseus* とその類縁菌など日本国内や欧米等から報告と共に通のものが分離された。*Leucosporidium scottii* など好冷性の種が分離された一方、国内や欧米、南米などから分離され生育最高温度が23°C程度である *Udeniomyces* 属酵母は分離されなかった。

西表島および利尻島の両採集地から共通に分離されたのは、*Barnetozyma californica*, *Candida boeticola*, *Lipomyces lipofer*, *Wickerhamomyces anomalus* (以上、子囊菌系酵母サッカロミケス亜門), *Cryptococcus flavescent*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus pseudolongus* (以上、担子菌系酵母ハラタケ亜門), *Sporobolomyces roseus* (担子菌系酵母サビキン亜門) 等12種、および2新種候補で、分離した種のわずか5%に過ぎなかった。これらのうち、*Candida boeticola*, *Cryptococcus flavescent* および *C. pseudolongus* はその基準株も日本で分離されていることから、我が国においてポピュラーな種と推定することができた。一方、他の5種も多くの場所で分離の報告がある種であった (Kurtzman & Fell, 1998)。これらの種を含め、本プ

ロジェクトで分離され既知種と同定された株については、今後は種内多様性の観点から議論を行うことが可能であると思われる。

また、本プロジェクトでは同一種が5株以上分離されたのは西表島21種(分離種数の21%)、利尻島49種(同26%) しかなく、1株や2株だけの分離の種が圧倒的多数を占めた(Fig. 1 および Fig. 2)。これは、供試したサンプルが少ないことも要因であろうが、分離を行うために策定した方法がチームによって異なっていたこともその理由と推定される。本プロジェクトでは西表島57種および利尻島86種の新種が推定されたが、両地域共に各2回のサンプリングであることから、分離することのできなかった種も極めて多いと推定される。近年は生物地理学や集団遺伝学的解析、ゲノムデータを用いた対立遺伝子等の解析等により、種内や種間の多様性の議論が行われている。例えば、本プロジェクトにおいては分離できなかったがその基準株が日本産である *Saccharomyces kudriavzevii* では、日本産とポルトガル産の株の GAL 遺伝子は全く異なるネットワークの状態で存在すると報告されている (Hittinger et al., 2010)。従って、本プロジェクトにおけるように複数のグループがチームとして活動し、より多くのサンプルから分離を行うことが、今後のこれらの研究分野の発展に貢献するとともに、インベントリー作成のためにより効果的であろうと推定された。

尚、本プロジェクトで分離した既知種はその約8割以上が国内のバイオリソースセンターに保存されてい

Table 2 Species isolated from Iriomote Island and Rishiri Island

Scientific name	Locality of the type/neotype strain	Iriomote Island	Rishiri Island	Already preserved at Biological Resource Centers in Japan*:
<b>Ascomycetous yeasts</b>				
<b>Saccharomycetales</b>				
<i>Arthroascus schoenii</i> (Nadson & Krasil'nikov) Bab'eva <i>et al.</i>	Russia	○		NBRC
<i>Barnetozyma californica</i> (Lodder) Kurtzman <i>et al.</i>	USA	○	○	-
<i>Barnetozyma pratensis</i> (Bab'eva & Reshetova) Kurtzman <i>et al.</i>	Russia	○		NBRC
<i>Candida boleticola</i> Nakase	Japan	○	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Candida bombi</i> Montrocher			○	IFM, JCM, MAFF, NBRC
<i>Candida chickasaworum</i> Suh & Blackwell	USA	○		-
<i>Candida coipomoensis</i> C. Ramírez & A. González	Chile	○		-
<i>Candida corydali</i> Nguyen <i>et al.</i>	USA	○		-
<i>Candida friedrichii</i> van Uden & Windisch	Germany	○		JCM, NBRC
<i>Candida intermedia</i> (Ciferri & Ashford) Langeron & Guerra	USA	○		IFM, JCM, MAFF, NBRC
<i>Candida kruisii</i> (Kocková-Kratochví & Ondrusová) S. A. Meyer & Yarrow			○	IFM, JCM, NBRC
<i>Candida kuniensis</i> Hong Soon Gyu <i>et al.</i>	Korea	○		-
<i>Candida oleophila</i> Montrocher			○	IFM, JCM, NBRC
<i>Candida sake</i> (Saito & Oda) van Uden & H. R. Buckley ex S. A. Meyer & Ahearn	Japan	○		IFM, JCM, MAFF, NBRC
<i>Candida solani</i> Lodder & Kreger-van Rij	Netherlands	○		JCM, NBRC
<i>Candida songklaensis</i> Y. Imanishi <i>et al.</i>	Thailand	○		NBRC
<i>Candida spandvensis</i> (Henninger & Windisch) S. A. Meyer & Yarrow	Germany	○		JCM, NBRC
<i>Candida tsuchiiae</i> Nakase & M. Suzuki	Japan	○		IFM, JCM, NBRC
<i>Candida variotioarae</i> (Capriotti) van Uden & H. R. Buckley ex S. A. Meyer & Ahearn	Finland	○		JCM, NBRC
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij		○	○	IFM, JCM, MAFF, NBRC
<i>Debaryomyces maramus</i> di Menna			○	JCM
<i>Debaryomyces polymorphus</i> (Klöcker) Price & Phaff	Denmark	○		IFM, JCM, NBRC
<i>Hanseniaspora vineae</i> van der Walt & Tscheuschner	South Africa	○		JCM, NBRC
<i>Issatchenkia orientalis</i> Kudryavtsev			○	NBRC
<i>Kazachstania aerobia</i> Bai & Cai	Japan	○		MAFF
<i>Kazachstania servazzii</i> (Capriotti) Kurtzman	Finland	○		MAFF, JCM, NBRC
<i>Kazachstania yakushimaensis</i> (Mikata & Ueda-Nishimura) Kurtzman	Japan	○		NBRC
<i>Kluyveromyces siamensis</i> S. Am-In <i>et al.</i>	Thailand	○		-
<i>Kuraishia capsulata</i> (Wickerham) Y. Yamada <i>et al.</i>	Canada	○		JCM, NBRC
<i>Lachancea waltii</i> (K. Kodama) Kurtzman	Japan	○		JCM, MAFF, NBRC
<i>Lindnera saturnus</i> (Klöcker) Kurtzman <i>et al.</i>			○	JCM, NBRC
<i>Lipomyces lipofer</i> Lodder & Kreger-van Rij ex Slooff	Netherlands	○	○	JCM, NBRC
<i>Metschnikowia koreensis</i> Hong <i>et al.</i>	Korea	○		NBRC
<i>Metschnikowia reukaufii</i> Pitt & Miller	Canada	○		IFM, JCM, NBRC
<i>Ogataea zsoltii</i> (Peter <i>et al.</i> ) Nagatsuka <i>et al.</i>	Hungary	○		-
<i>Pichia guilliermondii</i> Wickerham	USA	○		IFM, JCM, NBRC
<i>Pichia mandshurica</i> Saito			○	JCM, NBRC
<i>Pichia methanolica</i> Makiguchi	Japan	○		JCM, NBRC

日本の亜熱帯域および冷温帶域の酵母相の多様性とその比較

Table 2 continued 1.

<i>Saccharomyces paradoxus</i> Bachinskaya		○	IFM, NBRC
<i>Saturnispora dispila</i> (Dekker) Liu & Kurtzman		○	JCM, NBRC
<i>Saturnispora zaruensis</i> (Nakase & Komagata) Liu & Kurtzman	Japan	○	JCM, NBRC
<i>Schizoblastosporion starkeyihenricii</i> Ciferri		○	-
<i>Starmerella bombicola</i> Rosa & Lachance		○	IFM, JCM, NBRC
<i>Torulaspora microellipsoidea</i> (Osterwalder) van der Walt & Johannsen	Germany	○	NBRC
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (E. C. Hansen) Kurtzman <i>et al.</i>		○ ○	IFM, JCM, MAFF, NBRC
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (Boutroux) Yarrow		○	JCM, MAFF, NBRC
<i>Zygotorulaspora florentinus</i> (Castelli ex Kudriavzev) Kurtzman	Italy	○	JCM, NBRC
		8	24
New species candidate	species	species	
<hr/>			
Taphrinales			
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> Yukawa & Maki	Japan	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Taphrina</i> sp.		○	
<hr/>			
Basidiomycetous yeasts			
<hr/>			
Agaricomycotina			
<i>Bullera pseudoalba</i> Nakase & M. Suzuki	Japan	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Bullera pseudovariabilis</i> Bai <i>et al.</i>	China	○	JCM
<i>Bullera unica</i> Hamamoto & Nakase	New Zealand	○	JCM
<i>Bulleromyces albus</i> Bockhout & A. Fonseca		○	IFM, JCM, NBRC
<i>Cryptococcus bestiolae</i> Vu <i>et al.</i>	Vietnam	○	-
<i>Cryptococcus carnescens</i> (Verona & Luchetti) Takashima <i>et al.</i>	Italy	○	-
<i>Cryptococcus flavescens</i> (Saito) Skinner	Japan	○ ○	-
<i>Cryptococcus laurentii</i> (Kufferath) Skinner	Congo	○ ○	IFM, JCM, MAFF, NBRC
<i>Cryptococcus macerans</i> (Frederiksen) Phaff & Fell		○	IFM, JCM, NBRC
<i>Cryptococcus magnus</i> (Lodder & Kreger-van Rij) Baptist & Kurtzman	Netherlands	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Cryptococcus musci</i> Takashima <i>et al.</i>	Japan	○	JCM, NBRC
<i>Cryptococcus oeirensis</i> Fonseca <i>et al.</i>	Portugal	○	-
<i>Cryptococcus podzolicus</i> (Bab'eva & Reshetova) Golubev	Russia	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Cryptococcus pseudolongus</i> Takashima <i>et al.</i>	Japan	○ ○	JCM, NBRC
<i>Cryptococcus ramirezgomezianus</i> Takashima <i>et al.</i>	France	○	JCM, NBRC
<i>Cryptococcus skinneri</i> Phaff & do Carmo-Sousa	USA	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Cryptococcus tephrensis</i> Vischniac	Iceland	○	-
<i>Cryptococcus terricola</i> T. A. Pedersen	Norway	○	IFM
<i>Cryptococcus victoriae</i> Montes <i>et al.</i>	Antarctica	○	JCM
<i>Cryptococcus watticus</i> Gusslogg <i>et al.</i>	Antarctica	○	-
<i>Cryptococcus wieringae</i> Fonseca <i>et al.</i>	Netherlands	○	JCM
<i>Cystofilobasidium capitatum</i> (Fell <i>et al.</i> ) Oberwinkler & Bandoni	Antarctic Ocean	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Cystofilobasidium infirmominutum</i> (Fell <i>et al.</i> ) Hamamoto <i>et al.</i>		○	JCM, NBRC
<i>Derkomyces boninensis</i> (Sugita <i>et al.</i> ) Bai & Wang	Japan	○	JCM, NBRC
<i>Derkomyces komagatae</i> (Bai <i>et al.</i> ) Bai & Wang	Japan	○	JCM
<i>Derkomyces pseudohuiaensis</i> (Bai <i>et al.</i> ) Bai & Wang	Japan	○	JCM
<i>Derkomyces pseudoschimicola</i> (Bai <i>et al.</i> ) Bai & Wang	Canada	○	JCM
<i>Dioszegia szoltii</i> Bai <i>et al.</i>	China	○	JCM
<i>Fellomyces mexicanus</i> Lopandic <i>et al.</i>	Mexico	○	-

Table 2 continued 2.

<i>Guehomyces pullulans</i> (Lindner) Fell & Scorzetti	Germany	○	JCM, NBRC
<i>Hannaella luteola</i> (Saito) Bai & Wang	Japan	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Hannaella oryzae</i> (Nakase & M. Suzuki) Bai & Wang	Japan	○	JCM, NBRC
<i>Hannaella sinensis</i> (Li) Wang et al.	China	○	JCM, NBRC
<i>Hannaella surugaensis</i> (Nagahama et al.) Bai & Wang	Japan	○	JCM
<i>Kockovaella sacchari</i> Takashima & Nakase	Thailand	○	JCM
<i>Leucosporidium scottii</i> Fell et al.	Antarctic Ocean	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Makia frigida</i> (Fell et al.) Y. Yamada & Komagata	Antarctica	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Makia robertii</i> Thomas-Hall & Turchetti	Antarctica	○	-
<i>Trichosporon coprophilum</i> (in preparation)		○	IFM
<i>Trichosporon moniliiforme</i> (Weigmann & Wolff) Guého & M. Th. Smith		○	JCM
<i>Trichosporon porosum</i> (Stautz) Middelhoven et al.		○	JCM, NBRC
	30	35	
New species candidate	species	species	
Common new species candidate between both islands		1 species	
<hr/>			
Pucciniomycotina			
<i>Bensingtonia naganoensis</i> (Nakase & M. Suzuki) Nakase & Bockhout	Japan	○	JCM, NBRC
<i>Curvibasidium cygneicollum</i> Sampaio	Japan	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Rhodosporidium paludigenum</i> Fell & Statzell-Tallman	USA	○	JCM, NBRC
<i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i> Newell & Fell	Antarctic Ocean	○	JCM, NBRC
<i>Rhodosporidium toruloides</i> Banno		○	JCM, NBRC
<i>Rhodotorula bogoriensis</i> (Deinema) von Arx & Weijman	Indonesia	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Rhodotorula glutinis</i> (Fresenius) Harrison		○	IFM, JCM, NBRC
<i>Rhodotorula graminis</i> di Menna	New Zealand	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Rhodotorula ingeniosa</i> (di Menna) von Arx & Weijman	New Zealand	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Rhodotorula marina</i> Phaff et al.	Mexico	○	IFM, JCM, NBRC
<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) Harrison	Japan	○	IFM, JCM, MAFF, NBRC
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (Jørgensen) F. C. Harrison		○	IFM, JCM, MAFF, NBRC
<i>Sporidiobolus microsporus</i> Higham ex Fell et al.	Jamaica	○	JCM
<i>Sporobolomyces jilimensis</i> Bai & Wang	China	○	-
<i>Sporobolomyces koala</i> Satoh & Makimura	Japan	○	-
<i>Sporobolomyces magnisporus</i> Nakase et al.	Taiwan	○	JCM
<i>Sporobolomyces ogasawarensis</i> Hamamoto et al.	Japan	○	JCM
<i>Sporobolomyces phaffii</i> Bai et al.	China	○	JCM
<i>Sporobolomyces roseus</i> Kluyver & van Niel		○	IFM, MAFF, NBRC
<i>Sporobolomyces sasicola</i> Nakase & M. Suzuki	Japan	○	JCM, NBRC
<i>Sporobolomyces xanthus</i> (Nakase et al.) Bockhout	Japan	○	IFM, JCM, NBRC
	11	23	
New species candidate	species	species	
Common new species candidate between both islands		1 species	

Table 2 continued 3.

Ustilaginomycotina					
<i>Itersonilia perplexans</i> Derx	UK	○	NBRC		
<i>Pseudozyma antarctica</i> (S. Goto et al.) Boekhout	Antarctica	○	JCM, MAFF, NBRC		
<i>Pseudozyma aphidis</i> (Henninger & Windisch) Boekhout	Germany	○	JCM, NBRC		
<i>Pseudozyma flocculosa</i> (Traquair et al.) Boekhout & Traquair	Canada	○	IFM, JCM, NBRC		
<i>Pseudozyma fusiformata</i> (Buhagiari) Boekhout	UK	○	JCM, NBRC		
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> Bai & Wang		○			
<i>Sporisorium elionuri</i> (Henn. & Pole-Evans) Vankay		○			
<i>Tilletiopsis minor</i> Nyland	USA	○	JCM		
<i>Tilletiopsis pallescens</i> Gokhale		○	JCM		
New species candidate		6 species	2 species		

\* Information obtained from the JSCC online catalogue.

IFM, Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University; JCM, Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center; MAFF, Genebank, National Institute of Agrobiological Sciences; NBRC, Biological Resource Center, Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation.

No. of species

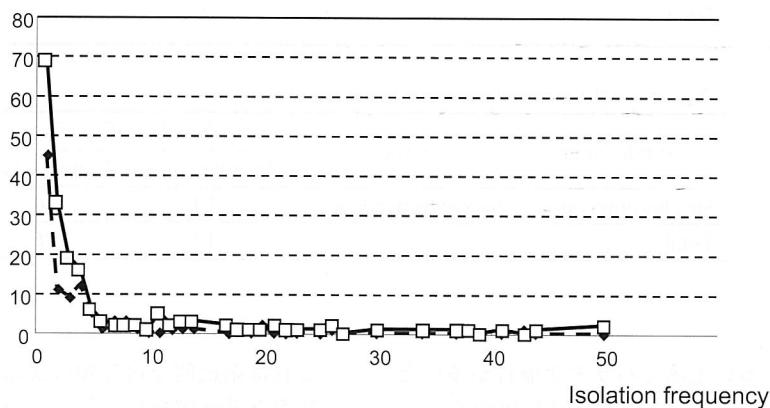


Fig. 1 Isolation frequency of each species.

◆Iriomote Island; □Rishiri Island.

たが、基準株のみの場合も多く、国内産の reference 株を多く得ることができた。

分離株は担子菌系酵母が多い一環境中には担子菌系酵母が多いのか サンプルとして土壤、植物および水を用いたが、そのうち、土壤からの分離結果を Table 3 に示した。今回の分離では、西表島および利尻島とも子囊菌系酵母より担子菌系酵母の方が多く得られた。また、担子菌系酵母の中ではハラタケ亜門に属する酵母が多く分離された。

Vishniac (2006) は土壤に棲息する酵母の分布と緯度の違い（南極、砂漠、ツンドラ、及び熱帯雨林）を比較して、種の分布に差が生まれる要因は、土壤の電気伝導率（electrical conductivity）、雨量、当該の酵母の最高生育温度及び貧栄養の度合い（degree of oligotrophy）の4つが42%を占め、残り58%は未知と報告している。また、その土壤の植生も分布と関係が深く、砂漠では *Cryptococcus albidus* とその近縁菌が、また草地では *Cystofilobasidiales* と関係が深いと述べている。この観点からみると、西表島および利尻

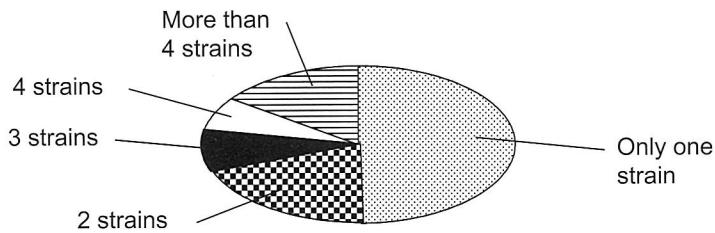


Fig. 2 Isolation frequency of new species candidates.

Table 3 Number of species isolated from soil samples of Iriomote Island and Rishiri Island

Basidiomycetous yeasts		Number of species	
Subdivision	Order	Iriomote Island	Rishiri Island
Agaricomycotina	Tremellales	21	15
	Trichosporonales	3	6
	Cystofilobasidiales	0	4
	Filobasidiales	0	5
Pucciniomycotina		5	7
Ustilaginomycotina		2	1
Total		31	38

Ascomycetous yeasts		Number of species	
Subdivision	Order	Iriomote Island	Rishiri Island
Saccharomycotina	Saccharomycetales	13	26
Total		13	26

島の両方とも樹木が多い土壌でハラタケ亜目が多いと推定され、本プロジェクトの結果も同じ傾向を示した。

しかし、前述したように西表島と利尻島に共通な種は極めて少なく、土壌サンプルそのもののデータをとっていないため、その要因についての解析を行うことができなかった。

#### インベントリー構築における分類体系の重要性

Table 4 に酵母分類学の成書といわれている「The Yeasts, A Taxonomic Study」の1998年発行の第4版と本年発行予定の第5版の酵母の数（予定）について記した。近年、子嚢菌系酵母ではテレオモルフを中心に行われた再分類がすすんだ。

一方、担子菌系酵母はこのような系統だった再分類は行われていない。テレオモルフの属が増えているが

これは系統的な再分類によるものではなく、形態的特徴と系統解析により、新たなテレオモルフが発見されたことによる。担子菌系酵母の場合は、多少乱暴な言い方であるが、一つの亜門の中に系統学的には散発的にテレオモルフが存在するが、アナモルフが一つしか存在しない状況に近い。すなわち、担子菌系酵母においては、シーケンスのデータが得られても共通の認識を与えるという点においては属レベルの同定ですら行いにくい状況にある。菌類のメタゲノム解析が遅れている原因の一つはここにあるのではないかと推定できる。従って、担子菌系酵母においては早急に分類体系の再構築が必要である。

過去においても、特に分離を中心に生態学的な研究は多く行われてきた。しかし、当時の研究は棲息している微生物数の把握が主たる目的であるため、同定を行っていない場合も多く、また同定のための手

Table 4 Number of species in "The Yeasts, A Taxonomic Study"

	4th ed. (Kurtzman & Fell, 1998)		5th ed. (will be published in 2011)*		Number of species described
	Teleomorph	Anamorph	Teleomorph	Anamorph	
Ascomycetous yeasts	45 genera 270 species 19 varieties	15 genera 230 species 4 varieties	72 genera 14 genera		1000 species (Kurtzman & Fell, 2006)
Basidiomycetous yeasts	19 genera species 1 varieties	51 171 species 1 varieties	21 genera 34 genera 28 genera		more than 500 species (Boekhout, personal communication)

\*: estimated data from the table of contents sent by the Publisher of "The Yeasts, A Taxonomic Study" 5th ed.

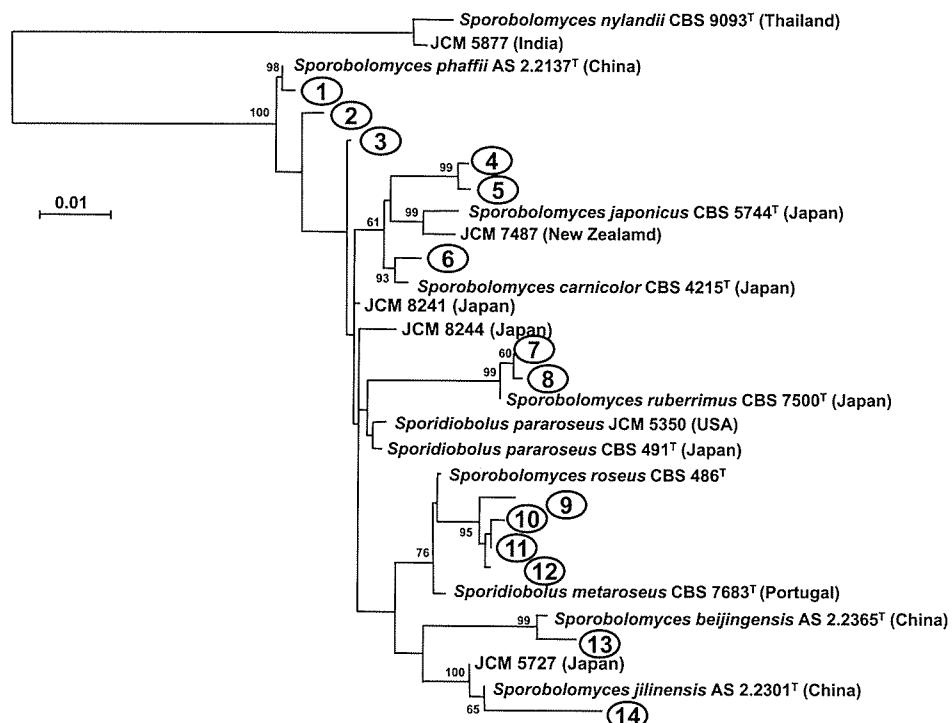


Fig. 3 A neighbor-joining tree of *Sporobolomyces roseus* and related species isolated from Rishiri Island. The evolutionary distance was calculated according to Kimura (1980). The numerals represent the percentages from 100 replicate bootstrap samplings (a frequency of less than 50% is not shown). The isolation locality of respective strain was shown in the bracket.

段として形態学的性状と生理生化学性状に基づくものであるため、現在の基準から見れば、再同定が必要と判断されるものも多い。例えば、本研究で分離した *Sporobolomyces roseus* と近縁な菌について、過去に

分離され当センター微生物材料開発室（理研 BRC-JCM）に保存されていた株と併せて解析を行ったところ、これらから14の新種候補を見いだすことができた（未発表、Fig. 3）。

“No ecology without taxonomy” (Phaff & Starmer, 1987)といわれており、解決しなければならない分類学的な問題は多いが、分子生物学的な手法の発展によりシーケンスの解析が容易となり、またこのデータが客観的情報として蓄積されてきた現在であるからこそ、インベントリー作成に取り組む価値があるといえるのではないだろうか。

本研究で分離した酵母の種の数は、酵母分類学の成書といわれている「The Yeasts, A Taxonomic Study」の第5版（上記、約1500種が収載予定）の収載予定数の約2割にあたり、また新種の割合は1割弱を占める。これは、過去から現在までに内外の科学者により記載してきた種に対して、その1割相当の種を新規に見出したことを意味しており、本研究が対象とした場所は、他とは異なった多様性に富んだ酵母叢を有していることが示された。また、我が国に棲息する酵母のインベントリー作成に大きく貢献することができた。加えて、わずか2回×2島のサンプリングの結果であることから推定して、我が国の酵母叢の多様性を把握するためには、更なる分離・研究の必要性が示された。

## 要 約

我が国に棲息する酵母の種多様性について調査し、欧米やアジア地域との共通性と異質性を認識することにより、日本の微生物叢の多様性を把握し、我が国の酵母叢のインベントリーデータベースの構築に寄与するため本研究を行った。特に南北の比較を目的として、亜熱帯域として西表島、冷温帶域として利尻島をサンプリング地として選定した。植物や土壤等を分離源として採集し、西表島のサンプルから427株、また利尻島のサンプルから1101株を分離した。LSU rRNA遺伝子のD1/D2ドメイン（約600塩基）の塩基配列に基づく同定を行ったところ、西表島の酵母は98種（うち57種が新種候補）に、また利尻島の酵母は177種（うち86種が新種候補）と推定され、新種候補の割合は約5割であった。両採集地ともに、子囊菌系酵母より担子菌系酵母が多く分離された。しかしながら、西表島および利尻島の両採集地から共通に分離されたのは、14種（12種は既知種および2新種候補）で、これは分離した種のわずか5%であったことから、西表島と利尻島の酵母はまったく異なる多様性を示すと推定された。種レベルでは、西表島からは *Kazachstania yakushimaensis* や *Sporobolomyces ogasawarensis* など屋久島や小笠原諸島からの分離種

などと共に通な種や、*Rhodotorula bogoriensis* など熱帯地域の酵母と共に点が、また利尻島からは、*Trichosporon porosum*, *Cryptococcus terricola*, *C. podzolicus* とその類縁菌など、既報の日本国内や欧米等で分離されたものが見いだせたが、生態学的な考察にまでは至らなかった。

本研究で分離した酵母の種の数は、酵母分類学の成書といわれている「The Yeasts, A Taxonomic Study」の第5版（2011年発刊予定、約1500種が収載予定）の収載予定数の約2割に相当する。また過去から現在までに内外の科学者により記載してきた種の1割相当の種を新規に見出したことを意味しており、本研究が対象とした場所は、他とは異なった多様性に富んだ酵母叢を有していることが示された。また本研究により、我が国に棲息する酵母のインベントリー作成に大きく貢献することができた。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 【原著論文】

- Nakase, T., Imanishi, Y., Ninomiya, S. & Takashima, M. (2010). *Candida rishirensis* sp. nov., a novel methylotrophic anamorphic yeast species isolated from soil on Rishiri Island in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**: 169-173.  
 Takashima, M., Van, B. H., An, K.-D. & Ohkuma, M. *Dioszegia rishirensis*, a novel yeast species from soil collected in Rishiri Island, Hokkaido, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010 Jul 23. [Epub ahead of print]

### 【口頭発表】

- Bui, H. V. & Takashima, M. Species diversity of yeast from soil collected at Rishiri Island, Hokkaido, Japan. 日本農芸化学会2008年度大会、講演要旨集 p.234, 名古屋, 3月, 2008.  
 Takashima, M., Imanishi, Y., Ikeda, R., Bui, H. V., Sugita, T., Suzuki, K., Benno, Y. & Seki, T. Species diversity of yeasts of Rishiri Island, Hokkaido: Toward construction of a yeast inventory in Japan. 12th International Congress on Yeasts, Abstract p. 26, Kiev, Ukraine, 11-15 August 2008.  
 Bui, H. V. & Takashima, M. Species diversity of *Sporobolomyces* group isolated from plant and soil samples collected at Rishiri Island, Hokkaido, Japan. 日本農芸化学会2009年度大会、講演要旨集 p. 85, 福岡, 3月, 2009.  
 Takashima, M. & Ohkuma, M. Microbial diversity and the role of RIKEN BRC-JCM. Proceedings of 1st ANRRC & Asian Chapter Meeting of ISBER, Abstract p. 105, Seoul, Korea, 22-25 September 2009.  
 高島昌子, 杉田隆, 今西由巳, 池田玲子, Bui Hong Van, 安光得, 鈴木健一朗, 辨野義己, 大熊盛也, 関達治. 利

## 日本の亜熱帯域および冷温帶域の酵母相の多様性とその比較

尻島および西表島の酵母の多様性：我が国の環境に棲息する酵母インベントリーの作成にむけて。日本微生物資源学会第17回大会。要旨集 p. 29, 岐阜, 6月, 2010.  
 Takashima, M., Sugita, T., An, K.-D. & Ohkuma, M. Species diversity of yeasts in the northern and southern areas of Japan. Proceedings of the 12th International Conference on Culture Collections, Abstract p. 31, Florianópolis, Brazil, 26 September - 01 October 2010.  
 高島昌子, 杉田隆. 日本の環境に棲息する酵母の多様性：自然からの分離. 第54回日本医真菌学会総会. 要旨集 p. 75, 東京, 10月, 2010.

### 保存機関に寄託した微生物株

学名	菌株番号	寄託番号
<i>Barnettozyma</i> sp.	Y07-301-10	NBRC 105021
<i>Barnettozyma</i> sp.	Y07-601-18	NBRC 105024
<i>Barnettozyma</i> sp.	Y07-601-13	NBRC 105025
<i>Barnettozyma</i> sp.	Y07-901-6	NBRC 105028
<i>Candida</i> sp.	Y07-1601-2	NBRC 105019
<i>Candida</i> sp.	Y07-503-6	NBRC 105023
<i>Candida rishirensis</i>	Y07-901-4	NBRC 105027
<i>Candida</i> sp.	Y07-102-6	NBRC 105030
<i>Candida</i> sp.	Y07-1002-5	NBRC 105031
<i>Candida rishirensis</i>	Y07-901-7	NBRC 106149
<i>Cryptococcus</i> sp.	Y07-1003-6	NBRC 105033
<i>Cryptococcus</i> sp.	Y07-1002-14	NBRC 105034
<i>Cryptococcus</i> sp.	Y07-806-4	NBRC 105036
<i>Cryptococcus</i> sp.	Y07-808-9	NBRC 105037
<i>Cryptococcus</i> sp.	Y07-1004-8	NBRC 105038
<i>Dioszegia</i> sp.	RS090	JCM 16282
<i>Dioszegia</i> sp.	RS092	JCM 16283
<i>Metschnikowia</i> sp.	Y07-1007-3	NBRC 105017
<i>Metschnikowia</i> sp.	Y07-1008-3	NBRC 105018
<i>Metschnikowia</i> sp.	Y07-204-2	NBRC 105020
<i>Metschnikowia</i> sp.	Y07-302-6	NBRC 105022
<i>Metschnikowia</i> sp.	Y07-803-2	NBRC 105026
<i>Metschnikowia</i> sp.	Y07-901-3	NBRC 105029
<i>Pseudozyma aphidis</i>	T. Sato 16-2	JCM 17033
<i>Pseudozyma aphidis</i>	T. Sato 116-2	JCM 17034
<i>Rhodotorula</i> sp.	Y07-1302-6	NBRC 105035
<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	RS045	JCM 16284
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP171	JCM 16285
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP172	JCM 16286
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RS004	JCM 16287
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP154	JCM 16288
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP022	JCM 16289

<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP198	JCM 16290
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP034	JCM 16291
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP008	JCM 16292
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP165	JCM 16293
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP046	JCM 16294
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP118	JCM 16295
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP160	JCM 16296
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RS031	JCM 16297
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RS050	JCM 16298
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP139	JCM 16299
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP173	JCM 16300
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP099	JCM 16301
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP196	JCM 16302
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP033	JCM 16303
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP066	JCM 16304
<i>Sporobolomyces</i> sp.	RP040	JCM 16305
<i>Tilletiopsis pallescens</i>	T. Sato 82-7	JCM 17035
Unidentified yeast	Y07-1202-5	NBRC 105032

### 謝　　辞

本研究の遂行にあたり、3年間助成していただいた財団法人発酵研究所に深く感謝いたします。分離株を寄託いただいた独立行政法人農業生物資源研究所シンバンク 佐藤豊三博士に感謝します。本研究を行うにあたり、最初から最後まで協力をいただいた、明治薬科大学微生物学教室 池田玲子教授、鈴木聰子氏、製品評価技術基盤機構・バイオテクノロジー本部・生物遺伝資源部門 鈴木健一朗参事官、理研バイオリソースセンター微生物材料開発室 大熊盛也室長、辨野義己室長（現：イノベーション推進センター辨野特別研究室）、Ms. Bui Hong Van の諸氏に心から感謝します。

### 文　　献

- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Hittinger, C.T., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., Dover, J., Johnston, M., Rokas, A. (2010). Remarkably ancient balanced polymorphisms in a multi-locus gene network. *Nature* **464**: 54-58.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on

- nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1216-1223.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (1998). *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn., Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (2006). Yeast systematics and phylogeny – Implications of molecular identification methods for studies in ecology. In Rosa, C.A. and Péter, G. (eds.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Springer, Berlin-Heidelberg, pp. 11-30.
- Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 331-371.
- Phaff, H. J. & Starmer, W. T. (1987). Yeasts associated with plants, insects and soil. In Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds) *The yeasts, biology of yeasts*, 2nd edn., vol. 1. Academic, London, pp. 123-180.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Scorzetti, G., Fell, J. W., Fonseca, A. & Statzell-Tallman, A. (2002). Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res.* **2**: 495-517.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Vishniac, H.S. (1983). An enation system for isolation of Antarctic yeasts inhibited by conventional media. *Can. J. Microbiol.* **29**: 90-95.
- Vishniac, H.S. (2006). A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Micobiol. Ecol.* **52**: 90-103.

## 日本の亜熱帯域および冷温帯域の放線菌相の 多様性とその比較

早川 正幸

山梨大学大学院医学工学総合研究部

〒400-8511 甲府市武田 4-3-11

Diversity analysis of actinomycete assemblages in subtropical and  
cool temperate areas of Japan

Masayuki Hayakawa

Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering,  
University of Yamanashi, Takeda-4, Kofu 400-8511, Japan

The taxonomic diversity of actinomycetes from natural substrates, including soil, plant, and lichen materials, in a subtropical area (206 samples from Iriomote Island) and a cool temperate area (203 samples from Rishiri Island) was compared. Pretreatment using five distinct methods and subsequent culturing on humic acid-vitamin agar of these samples resulted in the selective isolation of 1,770 actinomycete strains. These isolates were classified based on a combination of morphological characterization and 16S rDNA sequence analysis. We used the 16S rDNA sequence similarity values of  $\geq 97\%$  and  $\geq 99\%$  to identify isolates at the genus and species levels, respectively. The isolated actinomycete assemblages were composed of diverse species. Thus 881 of the Iriomote isolates fell into 24 families, 63 genera, and 240 species, and 889 of the Rishiri isolates belonged to 20 families, 50 genera, and 166 species. A diversity analysis based on the Shannon index revealed that the species diversity of the Iriomote isolates was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of the Rishiri isolates. There was little taxonomic overlap between the Rishiri isolates and the Iriomote isolates, as only 78 species occurred in both groups. Several species, reportedly isolated from other tropical areas, were found in the Iriomote isolates but not in the Rishiri isolates, suggesting that climate may influence the species types of soil-inhabiting actinomycetes.

Key words: actinomycetes, inventory, taxonomic diversity, ecology

### 緒 言

放線菌 (Actinomycetes) とは *Actinomycetales* 目に含まれる微生物群を指し (宮道, 2001), 属のランクでみるとこれまで約 200 属が記載されるところとな

E-mail: hayakawa@ab11.yamanashi.ac.jp

共同研究者: 飯野洋光 (山梨大学大学院医学工学総合研究部), 山村英樹 (山梨大学大学院医学工学総合研究部), 田村朋彦 (独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部), 乙黒美彩 (独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部), 浜田盛之 (独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部), 石田優美 (独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部)

っている。この分類群の特徴は形態的に極めて多様なことであり、例えば *Streptomyces* のように明確な菌糸体を形成し、基生菌糸から気中菌糸そして分節胞子へと複雑な形態分化を示す属から、*Arthrobacter* のように生活環の大部分を単細胞で過ごす属まで含んでいる (Cross, 1989)。また、生理学的な面からも、放線菌の構成種は好気性から嫌気性、腐生性から寄生性、また中温性から高温性と多様であり、その分離源は陸生土壤のみならず、陸水、植物材料、海洋 (海水、底泥) 等に広く求めることができる (Williams *et al.*, 1984)。さらに、地域的にも熱帯域から寒帯域まで地球上の至るところに広く生息していることが知られている (Goodfellow & Williams, 1983; Xu *et al.*, 1996)。

放線菌は重要な工業微生物群であり、1944年にスト

レプトマイシンが発見されて以来、抗生素質等の生理活性物質の生産菌として多種多様な菌株が世界各地で分離されてきた。近年では、生態学的な見地からアジアの熱帯域における放線菌相の集中的な解明が行われてきており、そこに生息する放線菌の分類学的多様性が解明されつつある。例えばWangら(1999)はシンガポールの熱帯雨林から約5千株の放線菌を分離、同定した結果、36属に配属されたことを報告している。また、Muramatsuら(2003)はマレーシアの土壤や落葉試料から分離した放線菌約1千株の同定試験を行った結果、23属を認めた。一方、我が国においては、これまで主として生理活性物質のスクリーニングの過程で各地の土壤等から多様な放線菌が分離されてきているが、総合的、網羅的な放線菌相の研究は行われていない。

自然界における微生物種、特に有用微生物の多様性を解明することは、地球生態系の保全のみならず、微生物機能の利用開発の面からも重要である。そこで本研究では、我が国に生息する放線菌相の網羅的研究のモデルとして、亜熱帯域および冷温帶域に位置する西表島および利尻島を選び、両島から多数の菌株を分離して分類・同定研究を行うことにより放線菌相の多様性を解明、比較し、インベントリーを構築することを目的とした。また、新規性の高い放線菌分離株については、詳細な分類学的研究を行い、新分類群として発表、記載するとともに、分類学的に重要性の高い菌株については公的な菌株保存機関に寄託することを目的とした。

## 実験方法

**分離源** 西表島および利尻島を採取地とした。西表島( $24.2^{\circ}\text{N}$ ,  $123.5^{\circ}\text{E}$ )は亜熱帯域に位置し、総面積は $289\text{ km}^2$ である。気象庁(<http://www.ima.go.jp/ima/index.html>)によると2007年の年平均気温は $24.2^{\circ}\text{C}$ 、年間総雨量は $2,485\text{ mm}$ であった。一方、利尻島( $45.1^{\circ}\text{N}$ ,  $141.1^{\circ}\text{E}$ )は冷温帶域に位置し、総面積は $182\text{ km}^2$ である。2007年の年平均気温は $7.4^{\circ}\text{C}$ 、年間総雨量は $859\text{ mm}$ であった。試料採取は2007年および2008年の7月から9月の間に行った。西表島からは総計206点(土壤129点、植物リター7点、樹皮12点、地衣類17点、花弁12点、その他29点)、また利尻島からは総計203点(土壤96点、植物リター19点、樹皮17点、地衣類28点、花弁14点、その他29点)の天然試料を採取した。各試料は採取後 $10^{\circ}\text{C}$ で保存し、概ね3ヶ月以内に放線菌の分離を行った。

土壤試料については孔径 $2\text{ mm}$ の篩を通し、室温で

1週間風乾したのち放線菌の分離に供試した。また、pHおよび有機物含量(灼熱損料)を定法に従って調べた。植物リターについてはホモジナザーで細かく切断後(Hayakawa et al., 2000)、土壤と同様に処理し、分離を行った。他方、樹皮、地衣類については試料を水道の流水および殺菌水で良く洗浄後、殺菌した乳鉢ですり潰してから分離に供試した。また、必要に応じ、 $30^{\circ}\text{C}$ 、2週間集積培養(Matsukawa et al., 2007)を行ってから分離を行った。

**分離法** 分離培地はHumic acid-vitamin agar(HV agar; Hayakawa & Nonomura, 1987)を基本培地とし、これに抗カビ剤としてシクロヘキシミド $50\text{ mg/l}$ 、抗細菌剤としてナリジキシン酸 $20\text{ mg/l}$ を添加したもの用いた。また、一部の菌株の分離には塩化ナトリウム $10\%$ (w/v)、またはソルビトール $30\%$ (w/v)を添加したHV agarを用いた。培養温度は $30^{\circ}\text{C}$ を基本とした。

土壤および植物リターからの放線菌の分離には、通常の希釈法、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)前処理法(Hayakawa & Nonomura, 1989)、乾熱処理法(Nonomura & Ohara, 1969; Hayakawa et al., 1991a)、再水和-遠心沈殿法(Hayakawa et al., 2000)、さらに化学走性法(Hayakawa et al., 1991b)を用いた。樹皮、地衣類からの分離には希釈法、SDS前処理法を用いた。

分離平板は $30^{\circ}\text{C}$ 、2週間培養した。平板上に出現した代表的な放線菌を釣菌しBennett's agar(Jones, 1949)またはHA agar(野々村ら, 1979)上で生育させて純化したのち、Oatmeal-YGG agar(早川ら, 1982)スラント上で培養して保存した。

**同定試験** 形態観察は、供試株をHA agarおよびOatmeal-YGG agar(Oatmeal agar 1,000 ml, Bact yeast extract 1 g, glucose 1 g, glycerol 1 g)上で培養し、光学顕微鏡下で行った。代表株については、既報に従って標本を作製し(Hayakawa et al., 1996)走査型電子顕微鏡(JSM-6500F, 日本電子)によって観察した。

各菌株のゲノムDNAの抽出はPrepMan<sup>®</sup> ultra reagent(Applied Biosystems, CA, USA)を用いる定法により行った。Tamura & Hatano(2001)の方法に従って16S rDNAのほぼ全長(1.5 Kb; *Escherichia coli* numbering systemにおける22-1528の位置; Brosius et al., 1978)をPCR增幅させ、ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit(Applied Biosystems)およびABI Model 3730 automatic

DNA sequencer によりダイレクトシーケンスを行った。

各菌株の 16S rDNA 塩基配列 (1,200 以上) は, EzTaxon tool (<http://www.eztaxon.org>) を用いることにより TYO16 database (Chun *et al.*, 2007) 中の既知株の塩基配列と相同性検索を行った。また, EMBL/GenBank/DDBJ database の BLAST 検索も確認のために行った。そして Drancourt *et al.* (2000) および Stackebrandt & Ebers (2006) の研究結果に準じ, 分離株の 16S rDNA 塩基配列の相同性が 97% および 99% 以上の場合, 便宜的に既知の属および種へ配属した。また形態観察, さらに分子系統解析によっても同定の評価を行った。即ち, 分離株の基生菌系, 気菌系, 孢子連鎖の形成の有無と形態等を確認するとともに, CLUSTAL\_X program (Thompson *et al.*, 1997) により分離株とデータベース中の 16S rDNA 塩基配列のアライメントを行い, NJ 法 (Saitou & Nei, 1987) によって分子系統樹を構築して解析した (Felsenstein, 1985)。

**多様性の解析** 同定された放線菌の種の多様性は多様度指数 (Shannon 指数; Shannon & Weaver, 1949) を算出することによって定量的に評価, 比較した。Shannon の多様度指数  $H'$  は群集に含まれる種の豊富さ (数) と均等度 (各種間の個体数の等しさ) を考慮に入れたもので, 次の式により表される。  

$$H' = - \sum P_i \ln P_i$$
 : ここで  $P_i$  は  $i$  番目の種の個体数が群集の全個体数に占める割合。Shannon 指数の評価は Wilcoxon 符号付順位和検定により行った (Flanagan *et al.*, 2007)。

## 結 果

**分離結果** 西表島および利尻島の天然試料から約3千株の放線菌を分離した。各菌株につき Oatmeal-

YGG agar 上における菌体表面, 裏面の色, 可溶性色素生産の有無と色によって重複株を排除し, 1,770 株 (西表島 881 株, 利尻島 889 株) を選抜して保存した。西表島 881 株の分離源別の内訳は土壤 646 株, 植物リター 19 株, 樹皮 39 株, 地衣類 108 株, 花弁 9 株, その他試料 60 株であった。一方, 利尻島 889 株の内訳は土壤 679 株, 植物リター 46 株, 樹皮 39 株, 地衣類 105 株, 花弁 9 株, その他試料 11 株であった。なお, 西表島の土壤試料は黄色土系で, 平均 pH 6.6, 有機物含量 10% であった。利尻島の土壤は黒褐色を呈する火山灰土系で平均 pH 5.4, 有機物含量 18% であった。

**同定結果** 各菌株につき, 16S rDNA 塩基配列の相同性  $\geq 97\%$  および  $\geq 99\%$  をそれぞれ属および種の同定基準として同定を行った。その結果全分離株 1,770 株中 1,747 株 (98.7%) および 1,125 株 (63.6%) がそれぞれ属および種へ配属された。

同定の結果, 西表島分離株 881 株は 24 科 63 属 240 種に, 利尻島分離株 889 株は 20 科, 50 属, 166 種に配属された (Table 1)。放線菌の種レベルの多様性 (豊富さと均等度) を定量的に比べるため, Shannon 指数を求めるとき, 西表島 7.46, 利尻島 6.69 となり, 西表島の方が有意 ( $P < 0.05$  Wilcoxon 符号付順位和検定) に高かった。なお, 16S rDNA 塩基配列の相同値が 98.5% 未満の分離株を便宜的に新種放線菌とすると西表島分離株 173 株 (89 種), 利尻島分離株 172 株 (75 種) が該当した。

**属種の比較** 西表島と利尻島で検出された放線菌の属種名, 株数, および分離源の種類を Table 2 に示した。また属種の重複について両地域間で比較をしたところ (Fig. 1), 属レベルでは総計 73 属中 40 属 (55%), また種レベルでは総計 328 種中 78 種 (24%) しか重複しておらず, 放線菌の種類分布は両

**Table 1** Diversity of actinomycetes found in Iriomote (a subtropical island) and Rishiri (a cool-temperate island)<sup>a)</sup>

Area	No. of isolates	No. of			Species diversity index <sup>b)</sup>
		Families	Genera	Species	
Iriomote Island	881	24	63	240	7.5*
Rishiri Island	889	20	50	166	6.7*

<sup>a)</sup> Isolates were identified using a phylogenetic analysis based on comparison of nearly complete 16S rDNA sequences (>1,200 bp).

<sup>b)</sup> Shannon & Weaver 1949.

\* Values were significantly different ( $p < 0.05$ ; Wilcoxon signed-rank test for paired samples).

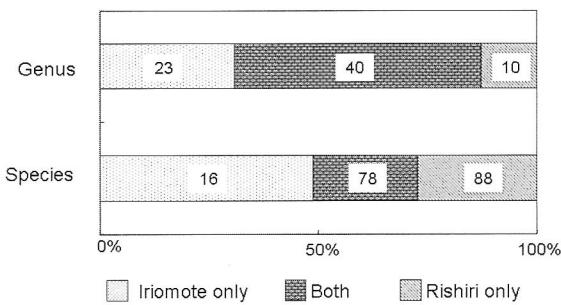


Fig. 1 Taxonomic overlaps between Iriomote isolates and Rishiri isolates. The arabic numerals on the graph are the numbers of taxa.

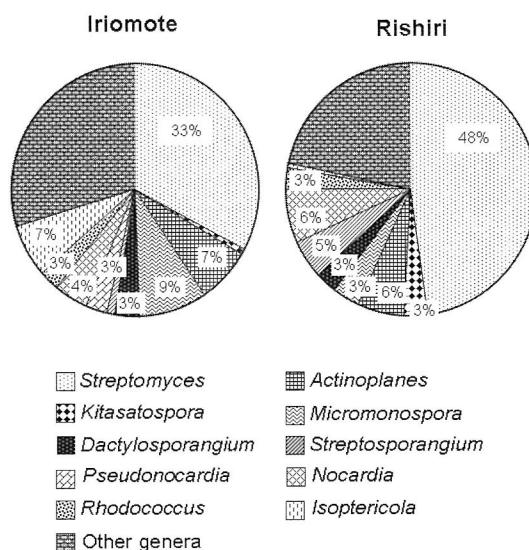


Fig. 2 Incidences of actinomycete genera in Iriomote Island and Rishiri Island. The percentages on the graphs are the frequencies of genera (above 3% are indicated).

地域で大きく異なっていることが示された。

両方の地域で共通して検出された主要属の分離頻度（各地域の全分離株中に占める割合）についてみると（Table 2, Fig. 2），*Streptomyces* 属が最も高く、西表島では 33%（287 株），利尻島では 48%（423 株）であり、両地域間の比較では利尻島の方が明らかに高かった。他の属で分離頻度の高かったのは順番に *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Isoptericola*, *Streptosporangium*, *Dactylosporangium*, *Rhodococcus*, *Pseudonocardia*, *Kitasatospora*，

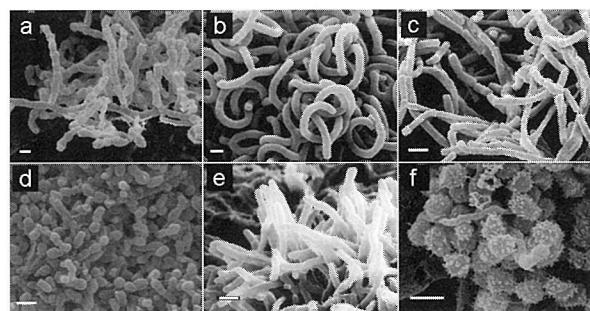


Fig. 3 Scanning electron micrographs of isolates from Iriomote Island (b-f) and Rishiri Island (a). a, *Actinocorallia* sp. RI50-DHHV301; b, *Catenuloplanes* sp. IR34-Co109; c, *Glycomyces* sp. IR8-RCA104; d, *Marmoricola* sp. IR-027S3; e, *Virgisporangium* sp. IR08-25; f, *Verrucosispora* sp. IR10-DHHV603. White bars, 1 μm.

*Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Microbispora*, *Agromyces* 等であった。これらの属の内、*Agromyces*, *Isoptericola*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia* の分離頻度は西表島で明らかに高く、逆に *Kitasatospora*, *Nocardia*, *Streptosporangium* の分離頻度は利尻島の方が高い特徴が見られた。各々の地域のみで出現した放線菌属は、西表島では *Actinomycetospora*, *Catenuloplanes*, *Cryptosporangium*, *Glycomyces*, *Krasilnikovia*, *Marmoricola*, *Planotetraspora*, *Verrucosispora*, *Virgisporangium* 等 23 属、利尻島では *Actinocorallia*, *Oerskovia* 等の 10 属であった。

種のレベルで比較を行うと、西表島では *Actinoplanes* (*Acpl.*) *brasiliensis* (Thiemann et al., 1969), *Acpl.* *philippinensis* (Couch, 1950), *Actinomadura bangladeshensis* (Ara et al., 2008), *Catellatospora bangladeshensis* (Ara & Kudo, 2006), *Dactylosporangium thailandense* (Thiemann et al., 1967), *Micromonospora* (*M.*) *chersina* (Tomita et al., 1992), *M.* *narathiwatensis* (Thawai et al., 2007) 等の熱帯域特有の種が特異的に見られた。また、西表島のマングローブ林や水田の土壤から *Isoptericola* (*I.*) *halotolerans* (30 株), *I.* *variabilis* (12 株)，さらに *Agromyces* の未同定種 (20 株) が多く分離される特徴が見られた。一方、利尻島には *Acpl.* *cyanus* (Terekhova et al., 1977) 等の寒帯域特有の種が特異的に見られた。また、利尻島からは *Streptomyces* (*S.*) *mauvecolor* (13 株), *S.* *mirabilis* (17 株), *S.* *olivochromogenes* (16 株) 等の *S.* *diastaticus* 種群 (species group; Williams et al.,

日本の亜熱帯域および冷温帯域の放線菌相の多様性とその比較

**Table 2** Species composition of actinomycetes found in Iriomote Island and Rishiri Island

Suborder	Family	Genus & Species <sup>a)</sup>	No. of strains		Isolation sources <sup>b)</sup>	
			Iriomote	Rishiri	Iriomote	Rishiri
<i>Catenulisporineae</i>	<i>Actinospicaceae</i>	<i>Actinospica</i> unidentified (Subtotal)	1 (1)	(0)	S	
		<i>Catenulisporeta</i> unidentified (Subtotal)	1 (1)	1 (1)	S	S
<i>Corynebacterineae</i>	<i>Gordoniaceae</i>	<i>Gordonia</i> <i>rubripertincta</i> unidentified (Subtotal)	1 2 (3)	7 (7)	S, PL	S
		<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>flavescens</i> <i>fortuitum</i> <i>insubricum</i> <i>lentiflavum</i> <i>neworleansense</i> <i>senegalense</i> <i>wolinskyi</i> unidentified (Subtotal)	1 1 1 1 3 1 1 (10)	1 1 1 O S S S (5)	S S PL S S PL
<i>Nocardiaceae</i>		<i>Nocardia</i> <i>amamiensis</i> <i>aobensis</i> <i>araoensis</i> <i>arthritidis</i> <i>beijingensis</i> <i>carnea</i> <i>cviaciogeorgica</i> <i>elegans</i> <i>higoensis</i> <i>jejuensis</i> <i>jiangxiensis</i> <i>niigatensis</i> <i>nova</i> <i>pneumoniae</i> <i>pseudovaccinii</i> <i>rhamnosiphila</i> <i>speluncae</i> <i>testacea</i> <i>vinacea</i> unidentified (Subtotal)	1 2 4 5 1 1 1 1 6 1 2 5 1 1 1 2 1 1 1 32 (35)		S S S S S O S S S S S S S S S S S S L (55)	S S S S S S S S S S S S S S S S S S S S, PL
		<i>Rhodococcus</i> <i>aetherivorans</i> <i>equi</i> <i>erythropolis</i> <i>jostii</i> <i>maanshanensis</i> <i>qingshengii</i> <i>tukisamuensis</i> <i>wratislaviensis</i> <i>zoppii</i> unidentified (Subtotal)	3 1 4 jostii 1 1 1 1 1 1 9 (20)	1 1 1 3 6 1 1 3 3 11 (26)	S S S S S S S S S S S S S S S S S S, PL	
<i>Tsukamurellaceae</i>		Unidentified genus (Subtotal)	1 (1)	(0)	S	
		<i>Tsukamurella</i> <i>pulmonis</i> (Subtotal)	1 (1)	(0)	S	
<i>Frankineae</i>	<i>Cryptosporangiaceae</i>	<i>Cryptosporangium</i> <i>minutisporangium</i> unidentified (Subtotal)	2 2 (4)	1 (1)	S, L	PL
<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Glycomyces</i> <i>lechevalierae</i> (Subtotal)	1 (1)	(0)	S	

Continued on the next page.

Table 2

Continued.

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains		Isolation sources	
			Iriomote	Rishiri	Iriomote	Rishiri
<i>Kineosporiineae</i>	<i>Kineosporiaceae</i>	<i>Kineosporia mesophila</i> unidentified (Subtotal)	4 (4)	6 (8)	S, L, PL	S, PL
		<i>Angustibacter luteus</i> (Subtotal)	(0)	1 (1)		S
<i>Micrococcineae</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (Subtotal)	1 (1)	(0)	S	
		<i>Cellulomonadaceae</i>				
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Humihabitans</i>	<i>Cellulomonas xylanolytica</i> <i>humilata</i> unidentified (Subtotal)		1 1 (1)	S	S
		<i>Demequina unidentified</i> (Subtotal)	(0)	2 (2)	O	
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Terrabacter</i>	<i>Oerskovia paurometabola</i> <i>turbata</i> (Subtotal)		1 4 (5)	S	S
		Unidentified genus (Subtotal)	1 (1)	5 (5)	S	O
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Intrasporangium</i>	<i>Humihabitans unidentified</i> (Subtotal)	5 (5)	1 (1)	S, TB	S
		<i>Intrasporangium unidentified</i> (Subtotal)	1 (1)	(0)	S	
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Janibacter</i>	<i>Janibacter unidentified</i> (Subtotal)	(0)	1 (1)	O	
		<i>Oryzihumus leptocrescens</i> (Subtotal)	2 (2)	(0)	S	
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Phycicoccus</i>	<i>Phycicoccus unidentified</i> (Subtotal)	1 (1)	(0)	S	
		<i>Terrabacter aerolatus</i> <i>lapilli</i> <i>terrae</i> <i>tumescens</i> unidentified (Subtotal)	1 1 (2)	2 1 3 1 (7)	S S S	S
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Agromyces</i>	<i>Agromyces aurantiacus</i> <i>cerinus</i> unidentified (Subtotal)	1 20 (21)	2 (2)	S S	S
		<i>Labeledella unidentified</i> (Subtotal)	1 (1)	(0)	S	
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Leifsonia</i>	<i>Leifsonia naganoensis</i> (Subtotal)	(0)	1 (1)	PL	
		<i>Microbacterium aquimaris</i> <i>deminutum</i> <i>maritypicum</i> <i>trichothecenolyticum</i>	3	2 1 1	S	S, PL

Continued on the next page.

## 日本の亜熱帯域および冷温帶域の放線菌相の多様性とその比較

Table 2

Continued.

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains		Isolation sources		
			Iriomote	Rishiri	Iriomote	Rishiri	
		unidentified (Subtotal)	5 (8)	3 (7)	S	L	
		Unidentified genus	1		S		
		(Subtotal)	(1)	(0)			
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>kerguelensis</i>		2			
		<i>ureafaciens</i>		1		S	
		unidentified (Subtotal)	1 (1)	4 (7)	S	S	
	<i>Citricoccus</i>	unidentified (Subtotal)	1 (1)	(0)	S		
<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Kocuria</i>	<i>kristinae</i> (Subtotal)	1 (1)	(0)	O		
	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>finkei</i>	1		S		
		unidentified (Subtotal)	(1)	2 (2)	S, L		
	<i>Isotericola</i>	<i>halotolerans</i>	30		S, L		
		<i>jiangsuensis</i>	7		S, L		
		<i>variabilis</i>	12	2	S, TB	S	
		unidentified (Subtotal)	12 (61)	2 (4)	S	S, O	
	<i>Myceligenans</i>	unidentified (Subtotal)	1 (1)	(0)	S		
	<i>Promicromonospora</i>	<i>aerolata</i>	1		O		
		<i>flava</i>	1		S		
		<i>kroppenstedtii</i>	3		S, L, O		
		<i>sukumoe</i> (Subtotal)	5 (10)	(0)	PL, O		
Genus incertae sedis	<i>Luteimicrobium</i>	<i>subarcticum</i> (Subtotal)	1 (1)	4 (4)	L	S, L	
<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Actinoplanes</i>					
		<i>brasiliensis</i>	1		L		
		<i>campanulatus</i>	1		S		
		<i>capillaceus</i>	2		S		
		<i>cyaneus</i>	1	7	S	S	
		<i>deccanensis</i>	1		L		
		<i>digitatis</i>	6	6	S	S, L	
		<i>durhamensis</i>		1	S		
		<i>ferrugineus</i>	1	1	L	S	
		<i>philippinensis</i>	1		S		
		<i>regularis</i>	1	1	S	S	
		unidentified (Subtotal)	45 (60)	37 (53)	S, L, PL, O	S, L, PL	
		<i>Asanoa</i>					
		<i>iriomotensis</i>	2		S		
		<i>ishikariensis</i>	8	4	S	S, PL	
		unidentified (Subtotal)	2 (12)	3 (7)	S	S	
		<i>Catellatospora</i>					
		<i>bangladeshensis</i>	6	1	S	S	
		<i>chokoriensis</i>		7	S, PL		
		<i>citreo</i>		1	S		
		<i>coxeensis</i>	1	1	O	S	
		<i>methionotrophica</i>		1	S		
		unidentified (Subtotal)	3 (10)	7 (18)	S	S, L	

Continued on the next page.

Table 2

Continued.

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains		Isolation sources	
			Iriomote	Rishiri	Iriomote	Rishiri
		<i>Catenuloplanes</i>				
		<i>japonicus</i>	4		S, PL	
		<i>niger</i>	2		S, PL	
		unidentified	4		S, PL	
		(Subtotal)	(10)	(0)		
		<i>Couchioplanes</i>				
		<i>caeruleus</i>	8	2	S	S
		unidentified	4	1	S, PL	L
		(Subtotal)	(12)	(3)		
		<i>Dactylosporangium</i>				
		<i>aurantiacum</i>	6	16	S	S, PL
		<i>fulvum</i>	7		S, O	
		<i>matsuzakiense</i>	6	2	S, L	S
		<i>roseum</i>	2		S	
		<i>thailandense</i>	1		S	
		unidentified	7	5	S	S
		(Subtotal)	(29)	(23)		
		<i>Hamadaea</i>				
		unidentified	1		S	
		(Subtotal)	(1)	(0)		
		<i>Krasilnikovia</i>				
		<i>cinnamomea</i>	2		S	
		unidentified	1		S	
		(Subtotal)	(3)	(0)		
		<i>Luedemannella</i>				
		<i>helvata</i>	2		S	
		unidentified	3	1	S	S
		(Subtotal)	(5)	(1)		
		<i>Micromonospora</i>				
		<i>aurantiaca</i>	3	1	S, L, O	S
		<i>auratinigra</i>	2	2	S	S
		<i>carbonacea</i>	7		S, PL	
		<i>chaiyaphumensis</i>	11	1	S	S
		<i>chalcea</i>	2	1	S	S
		<i>chersina</i>	5		S, O	
		<i>chokoriensis</i>	3	4	S	S
		<i>citrea</i>	2	1	S	S
		<i>coxensis</i>	10	2	S, L	
		<i>eburnea</i>	2		S, O	
		<i>echinaurantiaca</i>	1		S	
		<i>echinospora</i>	4		S, O	
		<i>endolithica</i>	2		S	
		<i>inositola</i>	1		S	
		<i>krabiensis</i>	2	2	S	S
		<i>marina</i>	3		O	
		<i>matsumotoense</i>	3	1	S	L
		<i>narathiwatensis</i>	2		S	
		<i>pattaloongensis</i>		3	S, L	
		<i>rosaria</i>	2		S	
		<i>saelicesensis</i>		4	S, L	
		<i>siamensis</i>		2	S	
		<i>viridifaciens</i>	1		S	
		unidentified	8	5	S, L, TB	S, L
		(Subtotal)	(76)	(29)		
		<i>Pseudosporangium</i>				
		<i>ferrugineum</i>	3	1	S	S
		(Subtotal)	(3)	(1)		
		<i>Spirilliplanes</i>				
		unidentified	1		S	
		(Subtotal)	(1)	(0)		
		<i>Verrucosispora</i>				
		<i>giffhornensis</i>	2		S	
		unidentified	1		S	
		(Subtotal)	(3)	(0)		
		<i>Virgisporangium</i>				
		<i>ochraceum</i>	1		S	
		unidentified	5		S, L	
		(Subtotal)	(6)	(0)		

Continued on the next page.

## 日本の亜熱帯域および冷温帶域の放線菌相の多様性とその比較

Table 2

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains		Isolation sources		<i>Continued.</i>
			Iriomote	Rishiri	Iriomote	Rishiri	
		Unidentified genus (Subtotal)	3 (3)	2 (2)	S, L	S	
<i>Propionibacterineae</i>	<i>Nocardioidaceae</i>	<i>Kribbella</i> <i>aluminosa</i> <i>hippodromi</i> <i>koreensis</i> <i>sancticalisti</i> <i>sandramycinina</i> <i>swartbergensis</i> (Subtotal)	1 2 1 3 4 1 (5)	1 1 2 3 4 1 (12)	S S S S S S	S	
		<i>Marmoricola</i> unidentified (Subtotal)	1 (1)	(0)		S	
		<i>Nocardoides</i> <i>albus</i> <i>luteus</i> unidentified (Subtotal)	1 1 2 (4)	4 (4)	S S S	S, PL	
		Unidentified genus (Subtotal)	1 (1)	(0)		S	
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Actinosynnemataceae</i>	<i>Alloactinosynema</i> unidentified (Subtotal)		1 (1)		S	
		<i>Lechevalieria</i> unidentified (Subtotal)	1 (1)	(0)		S	
		<i>Lentzea</i> <i>albida</i> <i>violacea</i> <i>waywayandensis</i> unidentified (Subtotal)	1 1 1 1 (3)	1 1 1 2 (2)	PL S S	S	
	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinomycetospora</i> <i>chiangmaiensis</i> unidentified (Subtotal)	2 8 (10)	6 (6)	S, L, O	S, L	
		<i>Amycolatopsis</i> <i>echigonensis</i> <i>pretoriensis</i> <i>rifamycinica</i> <i>vancoresmycina</i> unidentified (Subtotal)	1 1 1 1 3 (7)	4 4 4 5 (9)	S L S L S, L	S, L, PL	
		<i>Pseudonocardia</i> <i>ailaonensis</i> <i>ammonioxydans</i> <i>carboxydivorans</i> <i>endophytica</i> <i>halophobica</i> <i>oxyli</i> unidentified (Subtotal)	1 1 4 4 4 3 11 (28)	1 1 S, O L, PL S S, PL, O S, TB, L (5)	L S S, O L, PL S S, PL, O S, TB, L	S	
		<i>Saccharomonospora</i> <i>viridis</i> (Subtotal)	(0)	1 (1)		S	
		<i>Saccharopolyspora</i> <i>gregorii</i> <i>spinosa</i> (Subtotal)		2 (2)		S	
		Unidentified genus (Subtotal)	2 (2)	2 (2)	S	S	
<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Kitasatospora</i> <i>gansuensis</i>		1		S	

*Continued on the next page.*

Table 2

Continued.

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains		Isolation sources	
			Iriomote	Rishiri	Iriomote	Rishiri
		<i>griseola</i>	3		S	
		<i>mediocidica</i>		13		S
		<i>nipponensis</i>		4		S
		<i>paranensis</i>		2		S
		<i>phosalicinae</i>	4	1	TB	S
		unidentified		6		S
		(Subtotal)	(7)	(27)		
		<i>Streptacidiphilus</i>				
		<i>annyonensis</i>	1		S	
		<i>carbonis</i>		6		S
		unidentified	2		S, L	
		(Subtotal)	(3)	(6)		
		<i>Streptomyces</i>				
		<i>albixialis</i>		1		S
		<i>alni</i>	1		L	
		<i>althioticus</i>	2		S, O	
		<i>ambofaciens</i>		3		L
		<i>angustumycinicus</i>	3		S	
		<i>antibioticus</i>	2		L	
		<i>anulatus</i>	1	10	S	S, L, TB, FP
		<i>atratus</i>	1	12	S	S, L, PL
		<i>atroolivaceus</i>		1		S
		<i>aurantiacus</i>		2		PL, FP
		<i>aureus</i>	1	5	S	S
		<i>avermitilis</i>			S	
		<i>bacillaris</i>	2		TB, O	
		<i>bambergiensis</i>		1		S
		<i>beijingensis</i>		2		S
		<i>bungoensis</i>	5	5	S	S
		<i>caelestis</i>	2		L	
		<i>candidus</i>		1		S
		<i>capoamus</i>	2		S	
		<i>carpaticus</i>	3		S	
		<i>cavourensis</i>	1	9	FP	TB
		<i>cellostaticus</i>	3		S, O	
		<i>cellulosflavus</i>		7		TB
		<i>chartreusis</i>	2	1	L	L
		<i>chromofuscus</i>	2		S	
		<i>cinereorectus</i>		1	S	
		<i>cinereoruber</i>	1		L	
		<i>cinerochromogenes</i>	1			
		<i>coelescens</i>		1		S
		<i>coelicoflavus</i>	2	1	S	S
		<i>coeruleorubidus</i>	1		S	
		<i>coerulescens</i>	2		S	
		<i>cyaneofuscatus</i>		2		PL, TB
		<i>cyaneus</i>	2		S	
		<i>diastaticus</i>	6	2	S, FP	L, TB, O
		<i>drozdowiczii</i>	6	13	L, TB, FP	S, L, PL, TB, FP
		<i>durhamensis</i>	1		S	
		<i>echinatus</i>	1		S	
		<i>exfoliatus</i>	1	2	S	TB
		<i>filamentosus</i>	1			
		<i>filipinensis</i>	3		S	
		<i>fimicarius</i>	4	4	L, PL, O	L, TB, FP
		<i>flavotricini</i>	4		S, O	
		<i>flavovariabilis</i>	1		S	
		<i>flavovirens</i>		2		
		<i>flavoviridis</i>	1		S	
		<i>fragilis</i>	1		TB	
		<i>fulvorobeus</i>		1		L
		<i>fumigatiscleroticus</i>	1		L	
		<i>galbus</i>		2		S
		<i>ganicidicus</i>	2		S	
		<i>geysiriensis</i>	2		S	
		<i>glaucinginer</i>	3	5	S, O	S
		<i>glomeratus</i>	2		S	
		<i>glomeroaurantiacus</i>		1		FP
		<i>griseoaurantiacus</i>	1	2	S	S
		<i>griseochromogenes</i>	1		O	
		<i>griseoflavus</i>	1		S	
		<i>griseoplanus</i>		1		L
		<i>griseorubens</i>	2		S	
		<i>griseoruber</i>	1	3	S	S

Continued on the next page.

## 日本の亜熱帯域および冷温帶域の放線菌相の多様性とその比較

Table 2

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains		Isolation sources		<i>Continued.</i>
			Iriomote	Rishiri	Iriomote	Rishiri	
		<i>griseorubiginosus</i>	5	24	L	S, L, PL, TB, FP	
		<i>griseus</i>		2		L, PL	
		<i>halstedii</i>		5		S, L	
		<i>herbaricolor</i>		2		S	
		<i>hygroscopicus</i>	8	1	S, L	S	
		<i>indigoferus</i>		2		S	
		<i>intermedius</i>	1		O		
		<i>kunningensis</i>		1		S	
		<i>lateritius</i>	1		O		
		<i>levis</i>	1	1	S	S	
		<i>libani</i>	1	2	S	S	
		<i>lienomyctini</i>	1	1	S	S	
		<i>lomondensi</i>	2		S, L		
		<i>longisporus</i>	2		S, FP		
		<i>lydicus</i>	8	8	S	S	
		<i>malachitospinus</i>	1		S		
		<i>mauvecolor</i>	2	13	L	S	
		<i>mayteni</i>	2		O		
		<i>mexicanus</i>	1		S		
		<i>microflavus</i>		1		L	
		<i>mirabilis</i>	3	17	L, O	S, L	
		<i>misionensis</i>	9		L, TB, FP		
		<i>murinus</i>	4	4	L, TB	S, L	
		<i>nigrescens</i>	2		S		
		<i>nodosus</i>	2		TB		
		<i>olivochromogenes</i>		16		S, L, PL	
		<i>pactum</i>	1	1	L	S	
		<i>paradoxus</i>	1		L		
		<i>parvulus</i>	4		S, L, TB		
		<i>parvus</i>	2		TB		
		<i>paucisporeus</i>		2		S	
		<i>phaeoluteichromato-</i> <i>genes</i>	3	1	S	S	
		<i>phaeoluteigriseus</i>	3		S, TB, FP		
		<i>prasinoporus</i>	2		S		
		<i>prunicolor</i>	1	6	L	S, PL	
		<i>psammoticus</i>	5		S, O		
		<i>pseudovenezuelae</i>		2		S	
		<i>pulveraceus</i>		3		S	
		<i>puniceus</i>	1	2	O	L	
		<i>punicascabiei</i>	4		S		
		<i>purpureus</i>		2		S	
		<i>rameus</i>	2		S		
		<i>rapamycinicus</i>	2		S		
		<i>recifensis</i>	1		L		
		<i>resistomycificus</i>	1		TB		
		<i>rishiriensis</i>		9		S	
		<i>roseofulvus</i>	1		S	S	
		<i>rubidus</i>		1	O		
		<i>rubiginosohelvolus</i>	1			S	
		<i>rubrogriseus</i>		2		S	
		<i>sanglieri</i>	2	12	S	S, L	
		<i>scabrisporus</i>		1		S	
		<i>seoulensis</i>	2		L		
		<i>somaliensis</i>	4	1	S, TB	S	
		<i>sparsogenes</i>		3		S	
		<i>spinoverrucosus</i>	1		O		
		<i>spiralis</i>	1		S		
		<i>spiroverticillatus</i>		4		S	
		<i>sporocinereus</i>	2		S, TB		
		<i>sporoclivatus</i>		1		S	
		<i>spororaveus</i>		1		S	
		<i>sporoverrucosus</i>	1		L		
		<i>tanashiensis</i>	2	1	S	S	
		<i>tendae</i>	1		S		
		<i>tuirus</i>	1		S		
		<i>turgidiscabies</i>	1	2	S	S	
		<i>vietnamensis</i>	1		S		
		<i>vinaceus</i>		1		S	
		<i>violaceolatus</i>	1	2	S	S	
		<i>violaceorectus</i>	1		L		
		<i>violaceoruber</i>	1	3	S	S	
		<i>violaceus</i>	1		S		
		<i>violascens</i>		2		L	
		<i>viridochromogenes</i>	2		S		
		<i>viridiostatiticus</i>	2		S		
		<i>xanthochromogenes</i>	2	11	S	S, L, PL	

*Continued on the next page.*

Table 2

Continued.

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains		Isolation sources	
			Iriomote	Rishiri	Iriomote	Rishiri
		<i>xanthocidicus</i>	1		S	
		<i>xantholiticus</i>	2	5	S	S
		<i>xanthophaeus</i>		1	S	S
		<i>xiamensis</i>	2		L	
		<i>yanii</i>	1		L, TB	
		<i>zaomyceticus</i>	5		S, L, TB,	
		unidentified	66	135	FP, O	S, L, PL,
		(Subtotal)	(286)	(420)		TB
		Unidentified genus	1	3	O	S
		(Subtotal)	(1)	(3)		
<i>Streptosporangineae</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis</i>				
		<i>alba</i>		3		S
		<i>listeri</i>	1		S	
		<i>prasina</i>	1	3	S	S, O
		unidentified	2	3	S	S
		(Subtotal)	(4)	(9)		
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Acrocarspospora</i>	unidentified	3		S, L	
		(Subtotal)	(3)	(0)		
		<i>Microbispora</i>				
		<i>corallina</i>		1		S
		<i>rosea</i>	7	2	S	S
		unidentified	6	12	S, O	S
		(Subtotal)	(13)	(15)		
		<i>Microtetraspora</i>				
		<i>glauca</i>		2		S
		<i>malaysiensis</i>	4		S	
		(Subtotal)	(4)	(2)		
		<i>Nonomuraea</i>				
		<i>bangladeshensis</i>	1		S	
		<i>candida</i>	5		S, O	
		<i>dietziae</i>	1		S	
		<i>helvata</i>	1		S	
		<i>kuesteri</i>	2		S	
		<i>salmonea</i>	1		S	
		unidentified	11	7	S	S
		(Subtotal)	(22)	(7)		
		<i>Planotetraspora</i>			S	
		unidentified	3		S	
		(Subtotal)	(3)	(0)		
		<i>Sphaerisporangium</i>				
		<i>melleum</i>	8		S	
		unidentified	1	1	O	S
		(Subtotal)	(9)	(1)		
		<i>Streptosporangium</i>				
		<i>album</i>		3		S
		<i>amethystogenes</i>	3	7	S	S, PL
		<i>claviforme</i>	2		S	
		<i>pseudovulgare</i>		2	S	
		<i>vulgare</i>	1	17	S	S, PL
		unidentified	4	16	S	S, PL
		(Subtotal)	(10)	(45)		
		<i>Thermopolyspora</i>				
		unidentified		1		S
		(Subtotal)	(0)	(1)		
		Unidentified genus	1		O	
		(Subtotal)	(1)	(0)		
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinocorallia</i>					
		<i>libanotica</i>		1		S
		(Subtotal)	(0)	(1)		
		<i>Actinomadura</i>				
		<i>bangladeshensis</i>	2		S	

Continued on the next page.

Table 2

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains		Isolation sources		<i>Continued.</i>
			Iriomote	Rishiri	Iriomote	Rishiri	
		<i>citreata</i>		5			S, L
		<i>coerulea</i>		1			S
		<i>fulvescens</i>	2			S	
		<i>madurae</i>		1			S
		<i>maheshkhaliensis</i>	1	7	S		S
		<i>meyerae</i>	1		S		
		<i>nitrificans</i>	2		S		
		<i>viridis</i>	4		S		
		unidentified	3		S		
		(Subtotal)	(15)	(14)			
		Total	881	889			

<sup>a)</sup> 16S rDNA sequence similarity values of  $\geq 97.0\%$  and  $\geq 99.0\%$  were used as the criteria for identification at the genus and species levels, respectively.

<sup>b)</sup> S, Soil; PL, Plant litter; TB, Tree bark; L, Lichen; FP, Flower petal; O, Others.

1983) に属する種や *Kitasatospora mediocidica* (13 株) が多く分離される特徴があった。

西表島、利尻島から分離された代表的な菌株の走査型電子顕微鏡写真を Fig. 3 に示した。

**新属新種の提案** 新規性の高い分離株の一部については詳細な分類試験を行い、2新属2新種 (*Angustibacter luteus*, *Luteimicrobium subarcticum*) および10新種 (*Georgenia thermotolerans*, *Actinomycetospora chloros* 等) の提案を学術雑誌 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology および *Actinomycetologica* 上へ行うとともに、*Demequina* 属の2新種を国際会議 International Symposium on Biology of Actinomycetes 2009 にて発表した。

**データベースの構築と菌株の保存** 本研究で分離、同定、保存した放線菌総計1,770株について、属種名、分離源の採取場所と種類等が含まれるデータベースをMS-Excelにより構築した。また、新規性の高い分離株および最近記載された新属に属する分離株等、分類学上重要性の高い菌株総計111菌株については菌株保存機関 NITE Biological Resource Center (NBRC) へ寄託した。

## 考 察

土壤中における放線菌の菌数や種類組成は土壤pH、水分含量、有機物含量、植生といった生態因子によって異なることがこれまで明らかにされている。さらに、地域特有の土壤型を形づくるのは気候であり、したがって、気温や降雨量なども間接的、直接的に放線菌相を規定する重要な因子となり得ることが推定さ

れてきた (Williams *et al.*, 1984)。しかし、その証明のためには集中的で網羅的な分離・同定研究が必要となることから、気候と放線菌相の関係に関する系統だった研究はごく僅かしか行われていない。このことは、放線菌の属種の同定には形態や生理性状を含む各種の表現性状、化学分類学的性状、16S rDNA 塩基配列に基づく分子系統解析さらにゲノム DNA の交雑解析と複雑な実験が要求されることにも起因していると考えられる。

最近、多数の放線菌菌株の16S rDNA 塩基配列が解読されデータベースが充実してきたのに伴い、16S rDNA 塩基配列の相同性や系統解析に基づく属種の簡易同定が、多数の菌株の解析が要求される生態学的研究において使われるようになってきた (Muramatsu *et al.*, 2003; Iwai *et al.*, 2009)。本研究では16S rDNA 塩基配列の相同性  $\geq 97\%$  および  $\geq 99\%$  をそれぞれ属および種の便宜的な同定基準 (Stackebrandt & Ebers, 2006) として簡易同定を行った結果、98.7% および 63.6% の菌株がそれぞれ既知の属および種へ配属され、分類学的多様性に関する十分な解析が可能であった。

本研究では、多数の分離株の同定研究を基に、亜熱帯域の西表島、冷温帶域の利尻島それぞれで多様な放線菌相が形成されていることを明らかにした。ただし種の豊富さと均等度を加味した多様性指数により比較すると、西表島の多様性の方が有意に高く、温暖な気候が放線菌の多様性に影響を与えていていると考えられた。また、両地域で重複する放線菌分類群は属のランクで 55%，種のランクで僅か 24% と低く、それぞれで異なる放線菌相が構築されていることを示した。西表島では *Agromyces*, *Isoptericola*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia* の分離頻度が高かった。この内、*Micromonospora* 属については、これ

まで多くの研究者により水分含量の高い環境を好むことが明らかにされており (Williams *et al.*, 1984) , 年間降雨量が多い西表島の気候が生息に適していると推定される。*Agromyces* および *Isoptericola* についても、西表島の畑の他、水田やマングローブ林の土壤など水分含量の高い環境から多く分離されたことから、両属の分布と降雨量の関係が示唆された。一方、*Kitasatospora*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Streptomyces* 各属の分離頻度は利尻島で高かった。このうち、*Nocardia* および *Streptosporangium* については、黒色で酸性を示し有機物含量の高い土壤に多いことがこれまで報告されており (Lacey, 1973; Hayakawa *et al.*, 1988), 火山灰性で pH が低い利尻島の土壤が生息に適していることが推定される。また、*Streptomyces* については *S. diastaticus* 種群 (Williams *et al.*, 1983) が利尻島で多かったが、この種群は低温 (4~10°C) で生育できる種が多いことを一つの特徴とする。以上の結果に加え、西表島では熱帯特有の種が、また利尻島では寒帯特有の種がそれぞれ特異的に見られた点などを考慮すると、気候は放線菌の種類分布を規制する重要な因子であり、生理的に各地域の気候に適した放線菌属種が生息していることが示唆された。

本研究では離島という極めて狭い地域からの放線菌の分離を行ったにもかかわらず、分離された放線菌の属種の数は、例えば、西表島で63属 240種と、既存の東南アジア等における放線菌の集中的な多様性研究結果 (36属: Wang *et al.*, 1999; 23属 185種: Muramatsu *et al.*, 2003) と比べ高い数値を示した。この理由の一つには、本研究では各種の選択分離法を駆使したことが考えられる。しかし一方で、我が国には熱帯域の東南アジア諸国に優るとも劣らない多様な放線菌の属種が分布していることが明らかとなった。また、既知の種に配属できない新種と推定される菌株も多数分離されることがわかった。今後は、我が国本土における放線菌の多様性の解明が望まれるとともに、熱帯域の放線菌相との質的な比較研究を推進することが生態学的見地から重要である。

なお、本論文では分離源の種類の違いによる放線菌相の比較は行わなかったが、例えば、地衣類や樹皮由来の放線菌相は土壤と異なっていることが明らかとなっている。今後、土壤以外の試料からの分離株数を増やし、解析を行っていきたい。

## 要 約

亜熱帯域に位置する西表島および亜寒帯域の利尻島

それぞれから、土壤を中心とした天然試料約 200 点を採取し、放線菌相の網羅的な調査、研究を行った。放線菌の各試料からの分離には腐植酸寒天 (HV agar) を基本培地とし、通常の希釀法の他、乾熱や化学殺菌剤による前処理法など、数種類の選択分離法を駆使した。これらの方法により 1,770 株を分離、保存した。保存株は形態観察および 16S rDNA 塩基配列 (約 1,500 bp) に基づく相同性および系統解析により属種の簡易同定を行った。

同定の結果、西表島分離株 881 株は24科63属 240種に、利尻島分離株 889 株は20科50属 166種に配属され、両地域とも極めて多種類の放線菌属種が分布していることが明らかとなった。放線菌の種レベルの多様性 (豊富さと均等度) を定量的に比べるため、Shannon 指数を求めるとき、西表島 7.46、利尻島 6.69 となり、西表島の方が有意 ( $P < 0.05$  Wilcoxon 符号付順位和検定) に高かった。なお、16S rDNA 塩基配列の相同値が 98.5% 未満の分離株を便宜的に新種とするとき西表島分離株 173 株 (89種)、利尻島分離株 172 株 (75種) が該当した。

西表島、利尻島で検出された属種について比較をしたところ、属レベルでは総計73属中40属 (55%)、また種レベルでは総計 328 種中 78 種 (24%) しか重複しておらず、放線菌の種類分布は両地域で大きく異なることが示された。両方の地域で検出された主要属の分離頻度 (各地域の全分離株中に占める割合) についてみると、*Isoptericola*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia* 各属の分離頻度は西表島で高く、*Kitasatospora*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Streptosporangium* 各属の分離頻度は利尻島の方が高い特徴が見られた。各々の地域のみで出現した放線菌属は、西表島では *Catenuloplanes*, *Krasilnikovia* など 23 属、利尻島では *Actinocorallia*, *Oerskovia* などの 10 属であった。また、西表島では *Actinoplanes* (*Acpl.*) *philippinensis*, *Dactylosporangium thailandense* 等の熱帯域特有の種が見られ、利尻島には *Acpl. cyaneus* 等の寒帯域特有の種が見られる特徴があった。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭およびポスター発表

- 1) 櫻木裕也、広瀬新、乙黒美彩、石田優美、浜田盛之、田村朋彦、山村英樹、早川正幸 (2008)。我が国の冷温帯域及び亜熱帯域における放線菌相の多様性解析。日本放線菌学会2008年度大会 (山梨)。
- 2) 高橋優介、山内理紗、田村朋彦、山村英樹、早川正幸 (2008)。木質系試料からの放線菌分離と分離株の特

## 日本の亜熱帯域および冷温帶域の放線菌相の多様性とその比較

- 徵づけ. 日本放線菌学会2008年度大会（山梨）.
- 3) 大久保真哉, 戸田達昭, 田村朋彦, 山村英樹, 早川正幸 (2008). 浸透圧耐性希少放線菌の土壤からの選択分離とPCR法による簡易同定について. 日本放線菌学会2008年度大会（山梨）.
  - 4) 田村朋彦, 石田優美, 浜田盛之, 乙黒美彩, 山村英樹, 鈴木健一朗, 早川正幸 (2009). *Frankineae* 亜目に属する新規放線菌. 日本農芸化学会2009年度大会（福岡）.
  - 5) 櫻木裕也, 乙黒美彩, 石田優美, 浜田盛之, 田村朋彦, 山村英樹, 早川正幸 (2009). 冷温帶域及び亜熱帶域に生息する地衣類からの放線菌の分離と多様性解析. 日本放線菌学会2009年度大会（秋田）.
  - 6) 高橋優介, 乙黒美彩, 石田優美, 浜田盛之, 田村朋彦, 山村英樹, 早川正幸 (2009). 冷温帶域及び亜熱帶域より採取した樹皮からの放線菌の分離と多様性解析. 日本放線菌学会2009年度大会（秋田）.
  - 7) 浜田盛之, 田村朋彦, 石田優美, 乙黒美彩, 山村英樹, 鈴木健一朗, 早川正幸 (2009). 食塩添加培地を用いたアクチノバクテリアの分離と分類学的研究. 日本放線菌学会2009年度大会（秋田）.
  - 8) 田村朋彦, 石田優美, 乙黒美彩, 浜田盛之, 山村英樹, 早川正幸, 鈴木健一朗 (2009). 亜熱帯および温帶域から分離された *Actinomycetospora* 属分離株の分類学的位置の検討. 日本放線菌学会2009年度大会（秋田）.
  - 9) Tamura, T., Ishida, Y., Otoguro, M., Hamada, M., Yamamura, H., Hayakawa, M. & Suzuki, K. (2009). Novel species of the genus *Actinomycetospora*, isolated from subtropical and temperate zone. 15th International Symposium on Biology of Actinomycetes (Shanghai, China).
  - 10) Hamada, M., Tamura, T., Ishida, Y., Otoguro, M., Yamamura, H., Hayakawa M. & Suzuki, K. (2009). Isolation of actinobacteria using the medium containing 5% sodium chloride and proposal of two new species in the genus *Demequina*. 15th International Symposium on Biology of Actinomycetes (Shanghai, China).
- forest soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 2441-2445.
- 5) Motohashi, K., Takagi, M., Yamamura, H., Hayakawa, M. & Shin-ya, K. (2010) A new angucycline and a new butenolide isolated from lichen-derived *Streptomyces* spp. J. Antibiotics **63**: 545-548.
  - 6) Takagi, M., Ueda, J., Hashimoto, J., Yamamura, H., Hayakawa, M. & Shin-ya, K. (2010) A new 16-membered tetraene macrolide JBIR-100 from a newly identified *Streptomyces* species. J. Antibiotics **64**: 627-629.
  - 7) Tamura, T., Ishida, Y., Hamada, M., Otoguro, M., Yamamura, H., Hayakawa, M. & Suzuki, K. *Actinomycetospora chibensis* sp. nov., *Actinomycetospora chlorae* sp. nov., *Actinomycetospora cinnamomea* sp. nov., *Actinomycetospora corticicola* sp. nov., *Actinomycetospora lutea* sp. nov., *Actinomycetospora straminea* sp. nov. and *Actinomycetospora succinea* sp. nov. and emendation of the genus *Actinomycetospora*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press).
  - 8) Otoguro, M., Ishida, Y., Tamura, T., Yamamura, H., Suzuki, K. & Hayakawa, M. *Virgisporangium aliadipatigenes* sp. nov., isolated from soil in Iriomote Island and emended description of the genus *Virgisporangium*. Actinomycetologica (in press).
  - 9) Yamamura, H., Ohkubo S., Nakagawa Y., Ishida Y., Hamada M., Otoguro M., Tamura T. & Hayakawa, M. *Nocardiooides iriomotensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from a forest soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press).
  - 10) Yamamura, H., Ashizawa, H., Nakagawa, Y., Hamada, M., Ishida, Y., Otoguro, M., Tamura, T. & Hayakawa, M. *Actinomycetospora rishiriensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a lichen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press).

### 原著論文

- 1) Hamada, M., Tamura, T., Ishida Y. & Suzuki, K. (2009). *Georgenia thermotolerans* sp. nov., an actinobacterium isolated from forest soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: 1875-1879.
- 2) Hamada, M., Otoguro, M., Yamamura, H., Tamura, T., Suzuki, K. & Hayakawa, M. (2010). *Luteimicrobium subarcticum* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder *Micrococcineae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 796-800.
- 3) Hayakawa, M., Yamamura, H., Sakuraki, Y., Ishida, Y., Hamada, M., Otoguro, M. & Tamura, T. (2010). Diversity analysis of actinomycetes assemblages isolated from soils in cool-temperate and subtropical areas of Japan. Actinomycetologica **24**: 1-11.
- 4) Tamura, T., Ishida, Y., Otoguro, M., Yamamura, H., Hayakawa, M. & Suzuki, K. (2010) *Angustibacter luteus* gen. nov., sp. nov. isolated from subarctic

### 保存機関に寄託した菌株

本研究により分離した以下の菌株を NBRC に寄託した。

- Acrocarpospora* sp. NBRC 105343
- Acrocarpospora* sp. NBRC 106376
- Actinocorallia* sp. NBRC 105360
- Actinokineospora* sp. NBRC 105648
- Actinomycetospora* sp. NBRC 106356
- Actinomycetospora* sp. NBRC 106357
- Actinomycetospora* sp. NBRC 106359
- Actinomycetospora* sp. NBRC 106360
- Actinomycetospora* sp. NBRC 106365
- Actinomycetospora* sp. NBRC 106375

- Actinomycetospora* sp. NBRC 106378  
*Actinomycetospora* sp. NBRC 105527  
*Actinomycetospora* sp. NBRC 105528  
*Actinomycetospora* sp. NBRC 105900  
*Actinoplanes* sp. NBRC 105361  
*Actinoplanes* sp. NBRC 105337  
*Actinoplanes* sp. NBRC 105393  
*Actinoplanes* sp. NBRC 105336  
*Agromyces* sp. NBRC 106451  
*Agromyces* sp. NBRC 106452  
*Agromyces* sp. NBRC 106453  
*Agromyces* sp. NBRC 106454  
*Agromyces* sp. NBRC 106455  
*Amycolatopsis* sp. NBRC 105362  
*Amycolatopsis* sp. NBRC 106366  
*Amycolatopsis* sp. NBRC 106368  
*Amycolatopsis* sp. NBRC 106374  
*Asanoa iriomotensis* NBRC 105338  
*Catellatospora* sp. NBRC 105363  
*Catenuloplanes* sp. NBRC 105339  
*Couchioplanes* sp. NBRC 105340  
*Couchioplanes* sp. NBRC 106501  
*Cryptosporangium* sp. NBRC 105364  
*Dactylosporangium* sp. NBRC 105341  
*Demequina* sp. NBRC 105854  
*Demequina* sp. NBRC 105855  
*Demequina* sp. NBRC 105856  
*Glycomyces* sp. NBRC 105342  
*Gordonia* sp. NBRC 106352  
*Gordonia* sp. NBRC 106354  
*Herbidospora* sp. NBRC 105349  
*Humihabitans* sp. NBRC 106350  
*Intrasporangium* sp. NBRC 106456  
*Intrasporangium* sp. NBRC 106457  
*Kineosporia* sp. NBRC 105344  
*Kineosporiaceae* strain NBRC 105387  
*Krasilnikovia* sp. NBRC 105345  
*Leifsonia naganoensis* NBRC 106519  
*Lentzea* sp. NBRC 105346  
*Luteimicrobium subarcticum* NBRC 106521  
*Luteimicrobium subarcticum* NBRC 106458  
*Marmoricola* sp. NBRC 105384  
*Micromonospora* sp. NBRC 105347  
*Myceligerans* sp. NBRC 105348  
*Nocardia* sp. NBRC 106379  
*Nocardia* sp. NBRC 105645  
*Nocardia* sp. NBRC 105646
- Nocardioidaceae* strain NBRC 105388  
*Nonomuraea* sp. NBRC 105351  
*Nonomuraea* sp. NBRC 105350  
*Oerskovia* sp. NBRC 105647  
*Paraoerskovia* sp. NBRC 105853  
*Phycicoccus jejuensis* NBRC 106520  
*Promicromonospora* sp. NBRC 105352  
*Pseudonocardia ailaonensis* NBRC 106518  
*Pseudosporangium ferrugineum* NBRC 106351  
*Pseudonocardia* sp. NBRC 105365  
*Pseudonocardia* sp. NBRC 105353  
*Pseudonocardia* sp. NBRC 106517  
*Rhodococcus aetherivorans* NBRC 106353  
*Rhodococcus* sp. NBRC 105354  
*Saccharothrix* sp. NBRC 105355  
*Sphaerisporangium* sp. NBRC 105356  
*Streptomyces alni* NBRC 106367  
*Streptomyces antibioticus* NBRC 106515  
*Streptomyces antibioticus* NBRC 106369  
*Streptomyces anulatus* NBRC 106361  
*Streptomyces atratus* NBRC 106362  
*Streptomyces coeruleescens* NBRC 106504  
*Streptomyces corchorusii* NBRC 106502  
*Streptomyces flavoviridis* NBRC 106505  
*Streptomyces gelaticus* NBRC 106514  
*Streptomyces griseorubiginosus* NBRC 106509  
*Streptomyces griseorubiginosus* NBRC 106364  
*Streptomyces griseorubiginosus* NBRC 106511  
*Streptomyces hygroscopicus* NBRC 106377  
*Streptomyces misionensis* NBRC 106513  
*Streptomyces misionensis* NBRC 106512  
*Streptomyces murinus* NBRC 106355  
*Streptomyces psammoticus* NBRC 106508  
*Streptomyces seoulensis* NBRC 106516  
*Streptomyces* sp. NBRC 105369  
*Streptomyces* sp. NBRC 105370  
*Streptomyces* sp. NBRC 105373  
*Streptomyces* sp. NBRC 105383  
*Streptomyces* sp. NBRC 105371  
*Streptomyces* sp. NBRC 105368  
*Streptomyces sporoverrucosus* NBRC 106380  
*Streptomyces violaceolatus* NBRC 106507  
*Streptomyces violaceus* NBRC 106506  
*Streptomyces xanthochromogenes* NBRC 106503  
*Streptomyces xanthochromogenes* NBRC 106510  
*Streptomyces xanthochromogenes* NBRC 106358  
*Streptomyces xanthochromogenes* NBRC 106363

- Streptomyces yanii* NBRC 106370
- Streptosporangium* sp. NBRC 105366
- Tsukamurella pulmonis* NBRC 105357
- Verrucosispora gifhornensis* NBRC 105358
- Virgisporangium* sp. NBRC 105359
- Virgisporangium* sp. NBRC 105643
- Virgisporangium* sp. NBRC 105644

### 謝　　辞

本研究に対し、3年間研究助成を頂いた財団法人発酵研究所 (the Institute for Fermentation, OSAKA) に感謝申し上げます。

### 文　　献

- Ara, I. & Kudo, T. (2006). Three novel species of the genus *Catellatospora*, *Catellatospora chokoriensis* sp. nov., *Catellatospora coxensis* sp. nov. and *Catellatospora bangladeshensis* sp. nov., and transfer of *Catellatospora citrea* subsp. *methionotrophica* Asano and Kawamoto 1988 to *Catellatospora methionotrophica* sp. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 393-400.
- Ara, I., Matsumoto, A., Bakir, M.A., Kudo, T., Omura, S. & Takahashi, Y. (2008). *Actinomadura bangladeshensis* sp. nov. and *Actinomadura chokoriensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 1653-1659.
- Brosius, J., Palmer, J.L., Kennedy, J.P. & Noller, H.F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**: 4801-4805.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K. & Lim, Y.W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 2259-2261.
- Couch, J.N. (1950). *Actinoplanes* a new genus of the *Actinomycetales*. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. **66**: 8792.
- Cross, T. (1989). Growth and Examination of actinomycetes - some guidelines. In: Williams, S.T., Sharpe, M.E. & Holt, J.P. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4. pp.2340-2343. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.P. & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J. Clin. Microbiol. **38**: 3623-3630.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**: 783-791.
- Flanagan, J.L., Brodie, E.L., Weng, L., Lynch, S.V., Garcia, O., Brown, R., Hugenholtz, P., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Wiener-Kronish, J.P. & Bristow, J. (2007). Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. **45**: 1954-1962.
- Goodfellow, M & Williams, S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol. **37**: 189-216.
- Goodfellow, M. & Williams, E. (1986). New strategies for the selective isolation of industrially important bacteria. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. **4**: 213-262.
- Hayakawa, M. & Nonomura, H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J. Ferment. Technol. **65**: 501-509.
- Hayakawa, M. & Nonomura, H. (1989). A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil. Actinomycetologica **3**: 95-104.
- Hayakawa, M., Ishizawa, K. & Nonomura, H. (1988). Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. J. Ferment. Technol. **66**: 367-373.
- Hayakawa, M., Sadakata, T., Kajiura, T. & Nonomura, H. (1991a). New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. J. Ferment. Bioeng. **72**: 320-326.
- Hayakawa, M., Tamura, T. & Nonomura, H. (1991b). Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using  $\gamma$ -collidine as the chemoattractant. J. Ferment. Bioeng. **72**: 426-432.
- Hayakawa, M., Momose, Y., Yamazaki, T. & Nonomura, H. (1996). A method for the selective isolation of *Microtetraspera glauca* and related four-spored actinomycetes from soil. J. Appl. Bacteriol. **80**: 375-386.
- Hayakawa, M., Otoguro, M., Takeuchi, T., Yamazaki, T. & Iimura, Y. (2000). Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. Ant. Leeuwenhoek **78**: 171-185.
- 早川正幸, 飯野茂光, 野々村英夫 (1982). 銅汚染土壤における Streptomyces フローラの重金属耐性およびメラノイド色素生産性. 酸酵工学, **60**: 1-9.
- Iwai, K., Iwamoto, S., Aisaka, K. & Suzuki, M. (2009). Isolation of novel actinomycetes from spider materials. Actinomycetologica **23**: 8-15.
- Jones, K.L. (1949). Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelium is a fluctuating characteristic. J. Bacteriol. **57**: 141-145.
- Lacey, J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: Sykes, G., & Skinner, F.A. (eds), *Actinomycetales: Characteristics and Practical importance*. pp. 231-251. Academic Press, London.
- Matsukawa, E., Nakagawa, Y., Iimura, Y. & Hayakawa, M. (2007). A new enrichment method for the selective isolation of streptomycetes from the root surfaces of herbaceous plants. Actinomycetologica **21**: 66-69.
- 宮道慎二 (2001). 放線菌の基本的な特徴. "放線菌の分類と同定" (日本放線菌学会編), pp. 3-8, (財)日本学会事務センター, 東京.

- Muramatsu, H., Shahab, N., Tsurumi, Y. & Hino, M. (2003). A comparative study of Malaysian and Japanese actinomycetes using a simple identification method based on partial 16S rDNA sequence. *Actinomycetologica* 17: 33-43.
- Nonomura, H. & Ohara, Y. (1969). Distribution of actinomycetes in soil. VII. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil. (Part 1) Classification of the isolates. *J. Ferment. Technol.* 47: 463-469.
- 野々村英夫, 飯野茂光, 早川正幸 (1979) . わが国の土壤から分離した *Ampullariella* 属放線菌の分類. 酿酵工学, 57, 79-85.
- Olive, D.M. & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1661-1669.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Shannon, C.E. & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana, Ill.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today Nov* 06: 152-155.
- Tamura, T. & Hatano, K. (2001). Phylogenetic analysis of the genus *Actinoplanes* and transfer of *Actinoplanes minutisporangius* Ruan et al. 1986 and 'Actinoplanes aurantiacus' to *Cryptosporangium minutisporangium* comb. nov. and *Cryptosporangium aurantiacum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2119-2125.
- Terekhova, L.P., Sadikova, O.A. & Preobrazhenskaia, T.P. (1977). New species of *Actinoplanes cyaneus* sp. nov. and its antagonistic properties. *Antibiotiki* 22: 1059-1063.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Itoh, T. & Kudo, T. (2007). *Micromonospora narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soils. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53: 287-293.
- Thiemann, J.E., Pagani, H. & Beretta, G. (1967). A new genus of the *Actinoplanaceae*: *Dactylosporangium* gen. nov. *Arch. Mikrobiol.* 58: 42-52.
- Thieman, J.E., Beretta, G., Coronelli, C. & Pagani, H. (1969). Antibiotic production by new form-genera of the *Actinomycetales*, II. A/672 isolated from a new species of *Actinoplanes*: *Actinoplanes brasiliensis* nov. spec. *J. Antibiotics* 22: 119-125.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Tomita, K., Hoshino, Y., Ohkusa, N., Tsuno, T. & Miyaki, T. (1992). *Micromonospora chersina* sp. nov. *Actinomycetologica* 6: 21-28.
- Wang, Y., Zhang, Z.S., Ruan, J.S., Wang, Y.M. & Ali, S.M. (1999). Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 178-187.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A. & Sackin, M.J. (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1743-1813.
- Williams, S.T., Lanning, S. & Wellington, E.M.H. (1984). Ecology of actinomycetes. In: Goodfellow, M., Mordarski, M. & Williams, S.T. (eds.), *The Biology of Actinomycetes*. pp. 481-528, Academic Press, London.
- Xu, L.H., Li, Q.R. & Jiang, C.L. (1996). Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 244-248.

## 琵琶湖の水質と環境浄化に関する研究 －ヨシ帯とそこに生息する微生物が果たす役割の解明－

森 崎 久 雄

立命館大学生命科学部生物工学科  
〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

Studies on the quality and purification of water in Lake Biwa:  
the role of the reed belt and the microorganisms inhabiting it

Hisao Morisaki

College of Life Sciences, Ritsumeikan University  
1-1-1 Noji-higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577

We investigated the characteristics of biofilm formed on the surfaces of the reed *Phragmites australis* physico-chemically and microbiologically for 3 years (2007 to 2009) in the southern basin of Lake Biwa. Our study revealed that the reed biofilm can remove nutrient ions by adsorbing ions from surrounding water to result in water purification.

- 1) Inside the biofilm, a totally different environment from that of the lake water was found. Nutrient ion concentrations and bacterial density were much higher (by several hundreds to thousands of times) than in the surrounding lake water, and the bacterial community structure was totally different from that in the lake water. We deduced that nutrient ions were adsorbed by positive and negative electric charges in the biofilm polymer and that the high nutrient concentration caused a rapid biofilm formation (ca. 1-2 weeks).
- 2) The biofilm showed a high denitrification activity. Accumulated nitrate ions and an anaerobic environment inside the biofilm seem to be responsible for this activity. A denitrifying bacterial strain firmly attached to the surface of the reeds has been identified.
- 3) Both bacteria and algae increased their numbers during biofilm formation (diatoms were rich at an early formation stage of biofilm formation, while cyanobacteria were rich at a later stage).
- 4) Nutrient ions could be removed efficiently from the lake water by the reed biofilm, as revealed in a pilot experiment using an artificial reed colony planted in a waterway.
- 5) A high density of bacteria (thousands of times greater than the density in the lake water) capable of killing *Microcystis aeruginosa* and *Closterium aciculare* was found inside the biofilm. These bacteria seemed to actually depress the emergence of water bloom in Lake Biwa.

Based on the above findings, the application of reed biofilms was considered in two ways as follows. 1) In the northern basin of Lake Biwa, river water flowing into the lake can be maintained in a 'clean' state by removal of nutrient ions by the reed biofilms. 2) In the southern basin of Lake Biwa, the reed biofilm can be fed, as confirmed experimentally in the present study by using stable isotopes  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ , through the food web to maintain a rich ecological system.

Key words: biofilm, reed (*Phragmites australis*), Lake Biwa, removal of nutrient ions, water purification

---

E-mail: morisaki@sk.ritsumei.ac.jp

共同研究者：中原紘之（京都大学大学院農学研究科），今井一郎（北海道大学大学院水産科学研究院），左子芳彦（京都大学大学院農学研究科），大塚泰介（滋賀県立琵琶湖博物館）

琵琶湖の湖水中の栄養塩濃度は2004年から2008年の間， $\mu\text{M}$ のオーダー近傍で推移していた。これに比べ栄養塩濃度が千倍高い（ $\text{mM}$ オーダー）微視的環境がヨシBFに形成されていることが、本研究により明らかになった（Tsuchiya *et al.*, 2009）。

バイオフィルム (BF) の含水率は高く (90% 以上), 構造も柔軟性に富んでいる。従って, BF と周囲の水との間では, 水, 物質, および微生物の交換が十分に起こりうる。自然環境中では, BF の周囲の水は波, 水流により絶えず入れ替わっており, BF は広範囲の水に影響を及ぼすと考えられる。

本研究では, ヨシの茎の水中部分に形成される BF に着目し, BF の諸特性, および BF の形成過程を解析すること, さらに, 応用面も含め BF が周囲の環境にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

以下に「ヨシ BF の形成過程」, 「BF が周囲の環境に及ぼす影響」の順に本研究により得られた知見を整理し, 「ヨシ BF と琵琶湖の環境保全」と題し, 琵琶湖の環境浄化に果たすヨシ BF の役割について考察を加える。

## 1. ヨシ BF の諸特性および形成過程の解析

**1-1 BF の諸特性** 琵琶湖のヨシ茎の水中部分に形成される BF を採取し (針江浜, 木浜; 2005~2008 年), ヨシ BF 内の微視的環境について数年間, データを蓄積し, 次の諸点を明らかにした。

- 1) BF 中の栄養塩濃度は周囲湖水に比べ数百から数千倍高い。
- 2) BF 中の栄養塩濃度は季節により変動し (冬高く, 夏低い), その変動パターンは湖水のそれと類似している。
- 3) BF 中の細胞外物質 (EPS) は正, 負の両荷電を持っている。この荷電により周囲湖水から反対荷電のイオン (栄養塩イオンなど) が引き寄せられ, BF 内に濃縮される, と考えられる。
- 4) BF 中の細菌群集構造は, 湖水中のそれとは全く異なるパターンで季節変動する。晩春 (初夏) にヨシの新芽が出て, 茎が伸びるにつれ, その表面に BF が形成されるが, その中の細菌群集構造は季節とともに変遷し, 冬には春の群集構造に類似するようになる。しかし, 翌年春からの季節変動パターンは前年の変動パターン異なり, 年ごとに変動する。一方, 湖水中の細菌群集構造は BF 中のそれと大きく異なり, また季節変動パターンも全く異なる。
- 5) 季節によらず BF 中に棲息している特異的な細菌 (DGGE ゲルでヨシ BF に共通して見られるバンドに対応する細菌) の存在が示唆された。これらの特異的な細菌がヨシ BF 内の特異的な環境を形成, 維持している可能性が考えられる。

**1-2 バイオフィルムの形成過程** ヨシ BF がどのように形成されるのかを木浜のヨシ群落で集中的に調べ (2007年, 2008年の 5月上旬~7月下旬), 次の諸点を明らかにした。

- 1) ヨシ BF は, 1 週間という短期間のうちに形成され, 形成初期に直接計数による微生物数の急増 (コロニー形成率も高かった; 10% 程度), EPS (Extracellular Polymeric Substances) の急増, EPS による栄養塩の濃縮等が起こる (Hiraki *et al.*, 2009)。
- 2) BF ポリマーは形成過程を通じ, 同質の荷電特性 (EPM; Electrophoretic Mobility の pH 依存性が類似) を示した (Hiraki *et al.*, 2009)。
- 3) PCR-DGGE 法により解析したところ (週単位でサンプル採取), BF 内の細菌群集構造は, 形成過程を通じて属レベルで大きく変遷した。形成初期では「水」から, 中期では「植物」(特にイネ科植物) から, 後期では腐植や発酵産物から分離された細菌種に類似する菌の比率が高かった。一方, 湖水中的細菌群集構造は, BF のそれと異なり, かつ BF 形成期間中にほとんど変化しなかった (桐山, 2010)。
- 4) BF 形成過程のごく初期から常に検出される細菌群 (DGGE ゲルのバンドで形成過程初期に共通して見られるバンドに対応する菌) も存在した。これらの細菌群が BF の形成に深く関わっていると推測された。現在, これら細菌の分離を目指している (一部, 分離済み)。これら分離菌株の諸特性 (EPS 生産能, 付着特性等) を解析し, BF 形成との関連を解明していく予定である。

## 2. BF が周囲の環境に及ぼす影響

**2-1 BF の脱窒能** ヨシ水中茎に生成する BF 中の脱窒細菌群集の挙動を, <sup>15</sup>N-トレーサー法を用いた脱窒活性と, 脱窒機能遺伝子を標的とした分子生物学的手法によって解析し, 次の結果を得た (左子・吉永らの報告参照)。

- 1) 成熟ヨシ BF を拭き取った後に形成される「形成ヨシ BF」の潜在脱窒活性は形成 1 週間目で最大値を示し, その後は成熟 BF と同程度の値を示した。
- 2) 脱窒機能遺伝子である *nirS* と *nirK* を解析したところ, 「成熟ヨシ BF」試料に由来する脱窒細菌の種組成は2007年と2008年で類似していた。これより「ヨシ表面の BF はユニークな脱窒細菌が集積

- している脱窒ホットスポットではないか」という仮説が補強された。
- 3) 成熟ヨシ BF を除去した後のヨシ茎に脱窒活性が残存していた。ヨシ茎に強固に付着している脱窒細菌がヨシ BF 全体の脱窒活性に大きく寄与していると考えられる。
  - 4) 現在までに脱窒細菌として20株を分離した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析結果（11株）によると、*Pseudomonas* 属や *Acidovorax* 属、そして *Flexibacter* 属の既知の細菌種と 98~100% 相同であった。また、*Aquitalea magnusonii* (DQ018117) と 98% 相同な配列を持つ細菌株 (IBF1-42 株) が、上記 3) のヨシ茎に強固に付着している脱窒細菌群集で優占的に見られる *nirS* と相同な遺伝子を持っていた。今後、この菌株の性状解析を進める予定である。

**2.2 BF の水浄化能** BF ポリマーは正負の両荷電を持ち、反対荷電を持ったイオンを周囲の水中から静電的に引き寄せ、濃縮していると推測される。流れている水は次々と新しいヨシ BF に遭遇し、水中のイオンが BF 中に吸着されると思われる。硝酸イオンについては、BF 中に単に吸着、濃縮されるだけでなく、脱窒によりガスとして系外に放出され、水が浄化される期待される。

水路（長さ 18 m、幅 1.2 m、水深 0.3 m；滞留時間 6 時間；水路には葉山川の水を流した）を琵琶湖岸の Biyo センターの施設内に実際につくり、ヨシを植え、BF の水浄化能を実測し（2009/9/24；大嶋、2010），次の結果を得た。

- 1) 滞留時間が 6 時間と短いにも関わらず、ヨシがある場合、水路水中の  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  が約 30% 除去された。しかし、BF の有無により除去率に大きな違いは認められなかった。
- 2) 一方、 $\text{PO}_4^{3-}$  は除去されず、逆に増加する傾向にあった（約 3~10%）。

琵琶湖の水は窒素過多であり（2000年から2007年までの期間、N/P 比は 37~48 の範囲；琵琶湖環境科学研究所の公表値より計算），ヨシ群落を通過すると、Redfield 比 16 に近づくように水質が改善される可能性がある。

成長開始時期（2010年 3月 5日）のヨシ BF の水浄化能を調べたところ、栄養塩が BF により顕著に除去された ( $\text{NH}_4^+$  のおよそ 25% が成熟 BF によって除去され、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  もそれぞれ 5%，8% 程度が除去されていた)。しかし、リン酸イオンはあまり除去されなかつた。

不織布上に形成させた BF も周囲湖水から栄養塩を除去するが、その能力はヨシ BF の 1/10 以下と見積もられた。ヨシ BF の高い水浄化能が何に起因するのか、BF のポリマー、あるいは BF に棲息する微生物の特性の解明が待たれる。

**2-3 BF のアオコ抑制能** BF 中では湖水の千倍の密度で様々な細菌が共同体を形成している。ヨシ BF 中では微細藻類も多く見られ（石表面に形成される BF 中にはあまり見られない）、BF 形成初期にはケイ藻類、形成後期にラン藻類が優占してくることが解っている（大塚らによる 2007 年、2008 年の 5 月上旬～7 月下旬の BF 形成過程解析実験結果参照）。高密度で細菌と藻類が共存することにより、両者の間に相互作用が存在し、片方の生存・増殖が不利になる場合も考えられる。実際、ヨシ BF 中には高密度で殺藻細菌が存在することが解った（今井らの報告参照）。

木浜沿岸で自生するヨシの水面下の茎を切り出し、茎表面に形成された BF およびヨシ群落中の湖水中の藍藻ミクロキスティス (*Microcystis aeruginosa*) と緑藻クロステリウム (*Closterium aciculare*) の増殖阻害細菌（活性の強いものは殺藻細菌）を調べた。

- 1) ヨシ BF 中の増殖阻害・殺藻細菌密度は、 $10^6 \sim 10^7 / \text{g}$  ヨシ湿重量で、湖水中の千倍という高密度であった。
- 2) ヨシ群落中の水底に設置した石の表面に形成された BF についても調べたところ、増殖阻害・殺藻細菌密度はヨシ BF 中より一桁小さかった。石 BF 中の微細藻類数が少ないことが原因かも知れない。
- 3) ヨシ群落中の湖水には増殖阻害・殺藻細菌が  $10^3 \sim 10^4 / \text{mL}$  の密度で検出された。一方、ヨシのない湖岸（北山田漁港）近傍の水中の増殖阻害・殺藻細菌は木浜ヨシ群落湖水の 1/5~1/10 程度の密度であった。ヨシ BF 中の増殖阻害・殺藻細菌が周囲湖水に供給されていると思われる。
- 4) ヨシ群落中に設置した不織布に形成された BF にはヨシ BF よりもさらに高密度の（1 柄上）殺藻細菌が検出された。ヨシ群落中で殺藻細菌を涵養した不織布を、アオコ発生箇所（あるいは発生が予想される箇所）に設置し、アオコ発生を抑制するなどの応用が考えられる。

### 3. ヨシバイオフィルムと琵琶湖の環境保全

琵琶湖は近畿の水瓶であり、また固有種も含め貴重な生物種の宝庫でもある。琵琶湖には「きれいな湖」

と「豊かな湖」の両方が求められていると言える。これら両方を同時に満たすことは可能かどうかを、考察した。

**3-1 琵琶湖北湖と南湖** 琵琶湖は大きく北湖と南湖に分けられる。北湖は広さ、平均水深ともに南湖の10倍あり、25 km四方深さ40 mのプールを満たす水量を誇っている。水資源として、この水は清浄に保ち、将来にわたって保全される必要がある。一方、南湖には固有種、水産資源として重要な生物が多い。主なものを挙げると、温水性の動物プランクトン食魚類であるホンモロコ *Gnathopogon caerulescens*、植物プランクトンを濾過捕食するセタシジミ *Corbicula sandai*、また、水産資源として重要ではないものの、植物プランクトン食に特化した固有種のフナ、ゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri*などである。南湖には「豊かな湖」の役割が求められる。

**3.2 ヨシ群落の活用** 「きれいな湖」北湖と「豊かな湖」南湖の環境を将来にわたって保全するためにヨシ群落および、ヨシBFはどのように寄与出来るだろうか。

琵琶湖北湖の面積は南湖の10倍、容積では100倍程

度にもなるが、湖岸のヨシ群落の面積は、北湖の117 haに対して南湖は70 haと大差がない（滋賀県の行政資料；2000年時点）。ヨシ群落が発達するには砂質で水深の浅い湖底が必要であり、湖岸を離れると水深が急に深くなる北湖沿岸に広大なヨシ群落をつくることは難しい。むしろ、北湖に流入する河川にヨシ群落を定着させることが望まれる。ヨシ自身の生育のために長期的に栄養塩が除かれ、またヨシBFにより短期的に増加する栄養塩も吸収、除去されることが期待される（上述の水路を使ったパイロット実験の結果参照）。また、ヨシBF中の殺藻細菌が河川水とともに琵琶湖に流入し、アオコなどの発生を抑制することが期待される。

琵琶湖南湖にはかつて広大なヨシ群落が存在した。例えば、琵琶湖南湖東岸のヨシ群落は1981年以前、60 haを超えていた。1995年時点で、その面積は25 ha以下にまで減少した（大塚ら、1996）。ゲンゴロウブナは、ヨシ群落の前面を産卵および初期成長の場としており、稚魚は付着藻類や水生植物周辺の微小動物を食べて成長する（平井、1969）。他にも多くの魚類の稚魚が、水生植物群落周辺の小型動物を食べて成長することが知られている（平井、1971）。本研究では5月に、新しく伸びたヨシのシュート上に珪藻を骨格と

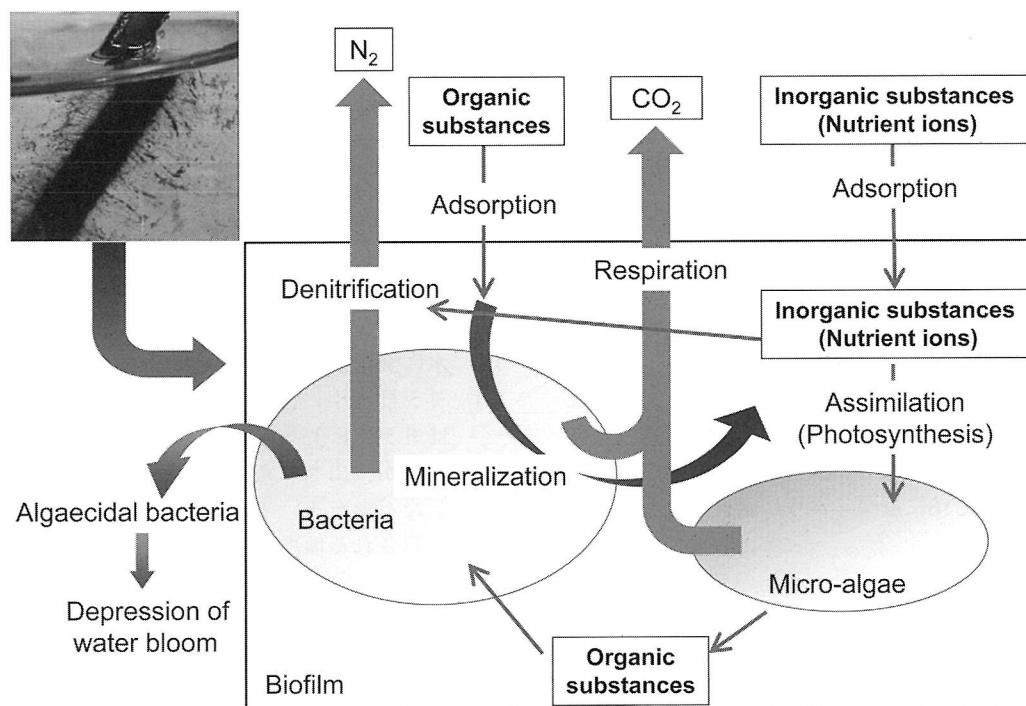


Fig. 1 A schematic illustration of the role of reed biofilm on the purification of water in Lake Biwa.

する新鮮な BF が発達し、これが多くの小型動物の餌になっていたことが示された。現在の琵琶湖ではフナ・コイの繁殖期のピークは 4~5 月なので、これに合わせてヨシの新しいシート上に BF が発達し、仔稚魚の餌を直接・間接に供給していることになる。南湖を「豊かな湖」とし保全するには、かつての広大なヨシ群落を南湖沿岸に回復させ、拡大することが望まれる。

### 3.3 ヨシバイオフィルムによる水質改善 琵琶湖北湖に流入する河川、琵琶湖南湖の沿岸にヨシ群落を定着、あるいは回復・拡大することができれば、ヨシ BF により水質をバランスのとれたものに改善できると思われる。

琵琶湖南湖では、富栄養化防止条例が制定された 1979 年以降、全リン濃度が減少傾向にあり、2000 年以降は条例制定時のおよそ半分のレベルで推移している（滋賀県琵琶湖環境部環境政策課、2009）。これに対して、全窒素濃度は 2000 年頃までほぼ横ばいで、その後も微減にとどまっている（滋賀県琵琶湖環境部環境政策課、2009）。これは、リンに比べて窒素は非点原負荷の占める割合が多く、負荷抑制が難しかったことの反映でもある。そのため、琵琶湖南湖における全窒素：全リンのモル比（以下 N/P 比とする）は、たいへん高くなっている。琵琶湖環境科学研究所が公表している各地点の年平均値から計算すると、2000 年から 2007 年までの期間、N/P 比は 37~48 の範囲にあった。この値は Redfield 比 16 よりもずっと大きい。我々の計測でも 2004 年から 2008 年の間、北湖（針江浜）、南湖（木浜）の湖水の N/P 比は 16 を超えていた（Tsuchiya *et al.*, 2009）。一方、ヨシ BF 中の N/P 比は 16 よりかなり小さかった（Tsuchiya *et al.*, 2009）。ヨシ BF は周囲からイオンを選択的に濃縮するか、あるいは濃縮されたイオンの一部を選択的に消費、除去することにより（脱窒等により）、イオンバランスを変化させる機能を持つと推測される。ヨシ BF により、N/P 比が Redfield 比 16 に近づくように水質が改善されると期待される。

以上のことから、ヨシ水中茎の BF に周辺の湖水中よりも高濃度の栄養塩が蓄積しており、細菌の生産す

る正負の荷電を有するポリマーが、周辺湖水より栄養塩類を濃縮していると推測される。BF が琵琶湖湖水環境において脱窒（水圈からの究極の窒素除去過程）、およびアオコ殺滅細菌増殖のホットスポットになっている可能性が示唆された。これら知見を基に、ヨシ群落が琵琶湖の環境浄化に果たす役割として Fig. 1 のモデルを考えることができる。

### 謝 辞

本研究に対し、3 年間研究助成を頂いた財團法人発酵研究所に感謝申し上げます。種々ご教示いただいた滋賀大学環境総合研究センターの中村正久教授に感謝申し上げます。また、先に列記した共同研究者の皆様およびその研究グループのメンバーの方々に御礼申し上げます。

### 文 献

- Hiraki, A., Tsuchiya, Y., Fukuda, Y., Yamamoto, T., Kurniawan, A. & Morisaki, H. (2009). Analysis of How a Biofilm Forms on the Surface of the Aquatic Macrophyte *Phragmites australis*. *Microbes and Environments* 24: 265-272.
- Tsuchiya, Y., Ikenaga, M., Kurniawan, A., Hiraki, A., Arakawa, T., Kusakabe, R. & Morisaki, H. (2009). Nutrient-Rich Microhabitats within Biofilms Are Synchronized with the External Environment. *Microbes and Environments* 24: 43-51.
- 大嶋 紫 (2010) . 立命館大学理工学部化学生物工学科 卒業論文.
- 大塚泰介・岩崎敬二・熊谷明生・小西民人 (1996) . 琵琶湖南湖東岸における抽水植物帯面積の減少について. 陸水雑 57: 261-266.
- 桐山智帆 (2010) . 立命館大学理工学部化学生物工学科 卒業論文.
- 滋賀県琵琶湖環境部環境政策課編 (2009) . 滋賀の環境 2009 (平成21年版環境白書) . 滋賀県琵琶湖環境部環境政策課.
- 平井賢一 (1969) . 滋びわ湖の水生植物帶におけるカワチブナとびわ湖産フナ幼魚の食性の比較. 金沢大学教育学部紀要 (自然科学編) 18: 123-131.
- 平井賢一 (1971) . びわ湖内湾の水生植物帶における仔稚魚の生態 II 水生植物帶にすむ仔稚魚の食性について. 金沢大学教育学部紀要 (自然科学編) 20: 59-71.

## 栄養物質の動態およびヨシのバイオフィルムを めぐる食物連鎖の解析

今井一郎

京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋環境微生物学分野  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

### Dynamics of inorganic nutrients and analysis of food webs around reed (*Phragmites australis*) communities

Ichiro Imai

Laboratory of Marine Environmental Microbiology, Division of Applied Biosciences,  
Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

Biofilm on submerged reed stems appear to play an important role in adsorbing nutrients such as inorganic nitrogen and phosphate, and biofilm itself is grazed by some animals such as snails and crustaceans. We investigated the adsorption of nitrate and phosphate by biofilm on submerged reed stems collected from Lake Biwa. Biofilm clearly adsorbed these nutrients, in particular, nitrate was entirely removed from water in our experiments. The reed shoots in containers clearly showed an ability to remove inorganic nutrients from water in pot experiments. Next, we investigated the fate of biofilm on the surface of submerged reed stems using a stable isotope tracer method. The test demonstrated that some snails and crustaceans actually grazed biofilm originated from the submerged reed stems. We noted that biofilm produced in spring was better used than that produced in summer. According to the results, the restoration of reed communities will be an environmentally-friendly strategy for restoring lake environments.

Key words: reed, biofilm, nutrients, adsorption, food web

### 緒 言

かつて琵琶湖の沿岸や内湖の広い部分を占めていたヨシ帯は、様々な機能を有していた（吉良, 1991）。その1つとして、ヨシ帯に流れ込んだ栄養塩（窒素やリン）および有機物を吸収することにより、水域の富栄養化を防ぐことが挙げられる（波多野, 1996; 西野・浜

端, 2005）。その一方で、ヨシ帯には様々な微生物が生息し、その中には種々の有用微生物群集が形成されている可能性が大きい。特に、水面下にあるヨシの茎表面にバイオフィルム（日本微生物生態学会, 2005）として構成される微生物群集は、その増殖過程で有機物や栄養塩を吸収し、さらには動物に捕食される事で食物連鎖を通じて水の浄化に寄与すると同時に、有用微生物群集の生育場として重要な機能を果たしていると考えられる。ところが、このバイオフィルムの機能に注目した研究は極めて少ない。

そこで本研究では、ヨシ帯におけるこれら有用微生物群集の生態に関する調査の一環で、バイオフィルム中の有用微生物群集による栄養塩の吸収の実態を調べる。そして、バイオフィルムを始まりとする食物網について、食物網解析に有効である安定同位体分析の手法（永田・宮島, 2008; 富永・高井, 2008）を用いて解

現所属：北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野  
浮遊生物学領域

現住所：〒041-8611 北海道函館市港町3-1-1

E-mail: imai1ro@fish.hokudai.ac.jp

共同研究者：中原紘之（京都大学名誉教授）、大塚泰介（滋賀県立琵琶湖博物館）、桑江朝比呂（独立行政法人港湾空港技術研究所）、山本芳正（中華民国中央研究院環境変遷研究センター）

析を試みた。

## 実験方法

**ヨシ茎バイオフィルムによる栄養塩の吸収** 2007年6月5日に、滋賀県守山市の木浜沿岸で水面下(10cm程度)からヨシの茎を切り出して持ち帰った。300ml容三角フラスコに1%濃度の改変CT培地(Table 1)を200ml入れ、そこにバイオフィルム(以後BFと称する)が付着したヨシの茎またはBFをブラシで除去したヨシの茎を収容した。ヨシの茎の長さは約2cmである。これらを温度25度、光強度 $50\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ および14hL:10hD明暗周期の光条件で培養し、培地中の硝酸態窒素およびリン酸態リン濃度の経時変化を測定した。

次に、2007年11月20日に同様にヨシ茎のサンプリングを行い、同様の栄養塩吸収実験を実施した。同時に、茎2cm分のBFをブラシで落として集めたもの、それを順次1/10、1/100に希釀したものを調製し、同じく栄養塩の変化を調べた。この時の実験温度

は15°Cと25°Cを設定し、栄養塩の吸収速度を比較した。

### ポット実験によるヨシBFの栄養塩吸収の検討

2007年7月25~31日および8月28~9月2日の2回、琵琶湖博物館においてポット中でヨシを水槽(530x350x280mm、約52リットル容)中に収容し(約500本/m<sup>2</sup>)、ヨシとBFによる栄養塩の吸収除去について検討を行った(Fig. 1)。ポットの中には径約5mmの砂利(オートクレーブ滅菌処理した)が詰められ、CT培地を入れた水槽中でヨシを3週間予備栽培しBFを形成させて実験に用いた。琵琶湖の水を砂濾過後、GF/Fガラス纖維濾紙で濾過して水を水槽に入れ、1/100濃度のCT培地の栄養塩濃度を設定した。設定した実験区はTable 2に示した。実験開始か

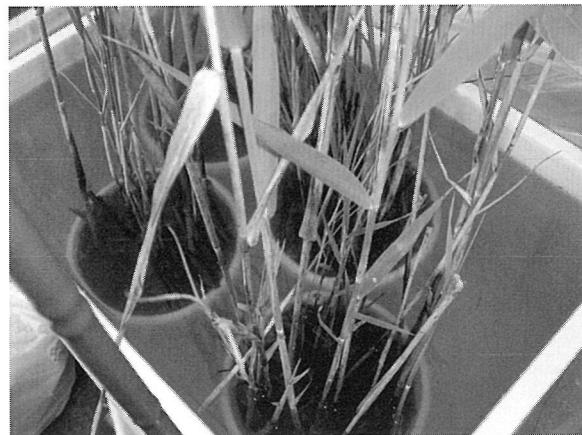


Fig. 1 A photograph of reeds (*Phragmites australis*) in pots.

Table 1 Composition of the CT medium for culturing microalgae

Contents	Weight and recipe
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	40mg
KNO <sub>3</sub>	100mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	62mg
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	150mg
TAPS	400mg
Vitamin mix	
Vitamin B <sub>1</sub>	10μg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.1μg
Biotin	0.1μg
PIV metals	
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.588mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.108mg
ZnCl <sub>2</sub>	0.0315mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.012mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.0075mg
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	3mg
Distilled water	1 liter
pH	8.2

Table 2 Experimental plots of pot experiment for examining effects of reed on cleaning up of inorganic nutrients (NO<sub>3</sub>-N and PO<sub>4</sub>-P)

Plots	Reeds	Biofilm	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Closterium aciculare</i>
Y1	+	+		
Y2	+			
Y3				
K1	+	+		+
K2	+			+
K3				+
K4	+	+		+

ら5日目まで毎日滅菌したヘラで水を均一にして水のサンプリングを行い、栄養塩濃度の変化を調べた。

#### 安定同位体分析を用いたヨシBFをめぐる食物網解析

木浜沿岸のヨシ群落において、2008年5月26日、6月30日、および8月29日にサンプリングを行った。湖水を目合い1000, 250, 63 $\mu\text{m}$ の篩で処理し、懸濁粒子（Particulate Organic Matter: POM）をサイズ分けした。次にヨシ茎からBFを採取し、ヨシ群落の湖底からは枯れたヨシを集めた。また、ネット（目合い100 $\mu\text{m}$ ）でヨシ群落内の水中に生息する動物を採取した。これらの試料について、各動物種についてソーティングし、必要な前処理後に、炭素と窒素の安定同位体比を測定した。さらにFig. 2に示したように、水面下のヨシ茎に径5cmの筒を被せて採取し、ヨシ茎表面と近傍に生息する生物を採取して、同様にソーティング後、試料に必要な前処理を施し質量分析計（Delta Plus Advantage, Thermo Electron）を用いて安定同位対比を測定した。炭素の標準物質としてはPeeDee Belemniteを、窒素の標準物質には大気中の窒素ガスを用いた。

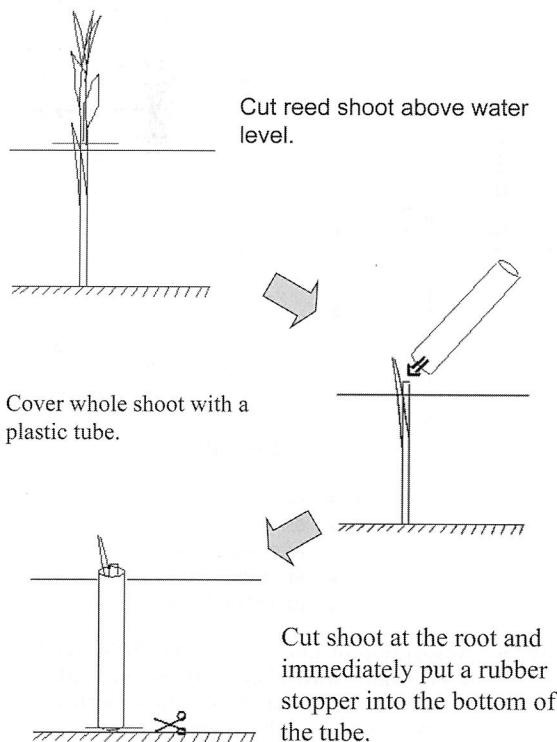


Fig. 2 The procedure for collecting the animals near and on the surface of reed shoot.

#### 結果と考察

ヨシ茎バイオフィルムによる栄養塩の吸収 2007年6月5日に採集したヨシの茎を用いた実験では、硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) 濃度およびリン酸態リン ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) 濃度が24時間以内に減少することが確認された（Figs. 3, 4）。Nはしばしば検出限界以下にまで低下したが、Pは検出限界以下にまでは低下せず、96時間後でも残存していた。ヨシ茎の表面からBFをふき取った場合でも、そのままよりも遅い速度ではあるが、栄養塩の吸収が起こった。またエタノール処理によって微生物を殺菌しても、栄養塩の吸収は起こった。さらにデータを示さないが、オートクレーブ滅菌したBF付きのヨシ茎は硝酸塩の吸収を行ったが、リン酸塩は逆にヨシから大量に放出された。

栄養塩類の吸収速度は11月のサンプリングのヨシ茎でも、6月よりも遅い速度ではあるが確認された（Figs. 5, 6）。また温度25°Cに比べ、15°Cのより低い温度条件では吸収速度の低下が確認された。また、BFはヨシの茎表面のものと剥離懸濁させた場合でも同様

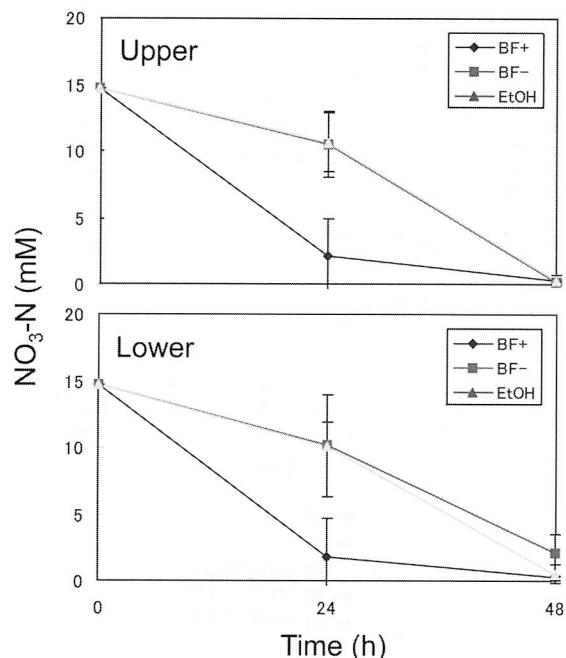
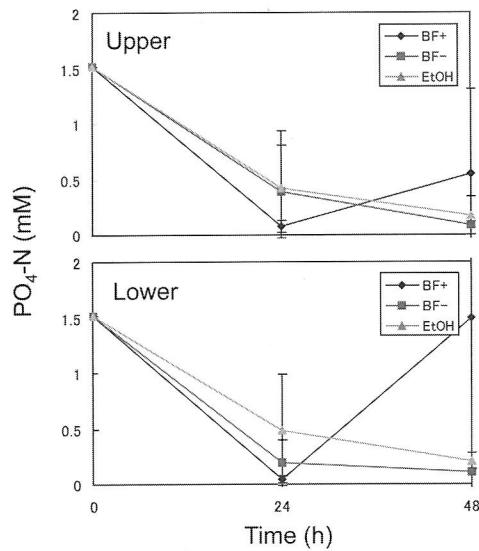
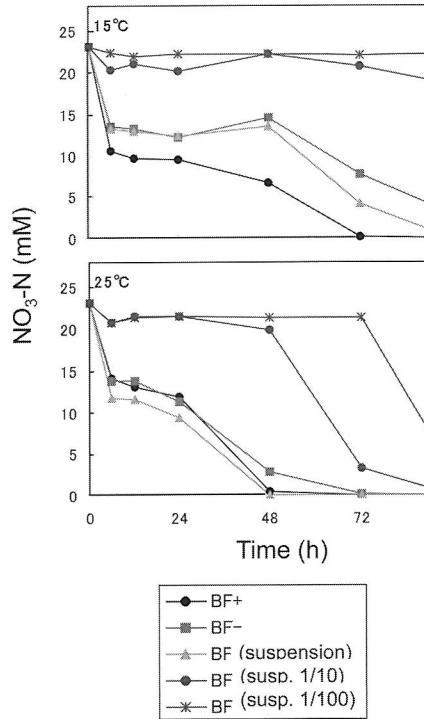


Fig. 3 Adsorption of nitrate ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) by reed stem (2cm length) with biofilm (BF+), with wiping treatment (BF-) and ethanol treatment (EtOH). The sampling was made on June 5, 2007. Upper: upper part of reed stem from 10cm depth, Lower: lower part of reed stem from 20cm depth.



**Fig. 4** Adsorption of phosphate ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) by reed stem (2cm length) with biofilm (BF+), with wiping treatment (BF-) and ethanol treatment (EtOH). The sampling was made on June 5, 2007. Upper: upper part of reed stem from 10cm depth, Lower: lower part of reed stem from 20cm depth.



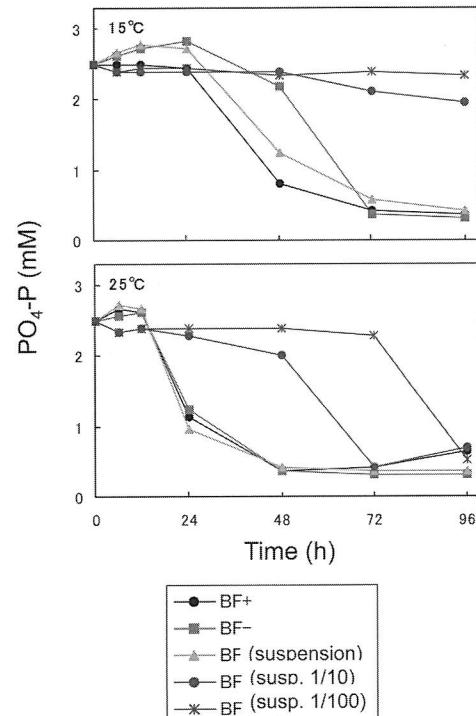
**Fig. 5** Adsorption of nitrate ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) by reed stem (2cm length) with biofilm (BF+) and with wiping treatment (BF-), and by biofilm with three levels of concentrations (whole amount from 2cm length reed stem, 1/10 dilution, and 1/100 dilution). The sampling was made on November 20, 2007. Upper: upper part of reed stem from 10cm depth, Lower: lower part of reed stem from 20cm depth.

の栄養塩吸収効果を示すが、BF懸濁液を希釀した場合は栄養塩吸収効果が低下した。さらに栄養塩類の吸収は暗条件でも起こることが示された（データ非表示）。

以上から、栄養塩の吸収がBFの作用であることが示された。また、温度25°Cにおける栄養塩の吸収速度は夏期（6月）のヨシ茎の方が冬期（11月）のものよりも高かったことから、夏期のBFは冬期のものよりも栄養塩の除去効果が大きかった。これは季節により、BFを構成する微生物の種構成やBF自身の栄養塩吸収活性が異なることを示唆する。

ヨシ茎表面のBF中の栄養塩濃度は、外部の水中の栄養塩濃度と並行的に変動するが、その濃度は1000倍程度BF中の方が高いことが確認されている

(Tsuchiya *et al.*, 2009)。この微生物起源のBFは電気的に荷電状態にあり、硝酸塩やリン酸塩を効率良くBF中に誘引し取り込んでしまう（Hiraki *et al.*, 2009）。今回の結果は、特に春～初夏のヨシが盛んに生長する時期のBFは活性が高いとされているこ



**Fig. 6** Adsorption of phosphate ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) by reed stem (2cm length) with biofilm (BF+) and with wiping treatment (BF-), and by biofilm with three levels of concentrations (whole amount from 2cm length reed stem, 1/10 dilution, and 1/100 dilution). The sampling was made on November 20, 2007. Upper: upper part of reed stem from 10cm depth, Lower: lower part of reed stem from 20cm depth.

とを裏付けている。

ポット実験によるヨシ BF の栄養塩吸収 水槽の中のポットのヨシに BF を形成させて付着させたままの

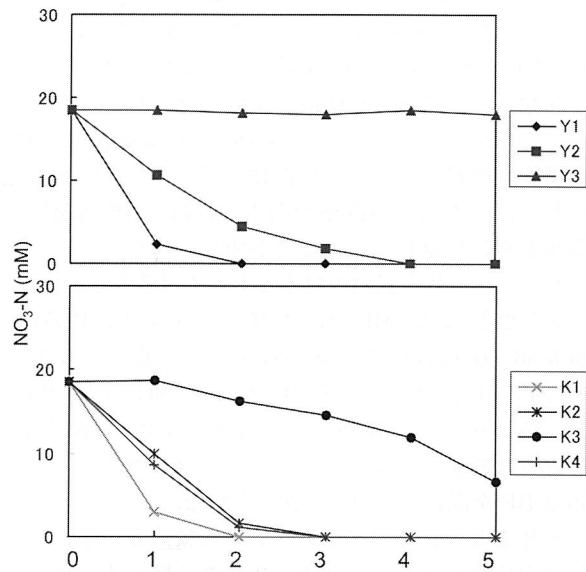


Fig. 7 Adsorption of nitrate ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) by reeds in the pot experiment with different conditions (see Table 2). Experiment was made from August 28 to September 2, 2007.

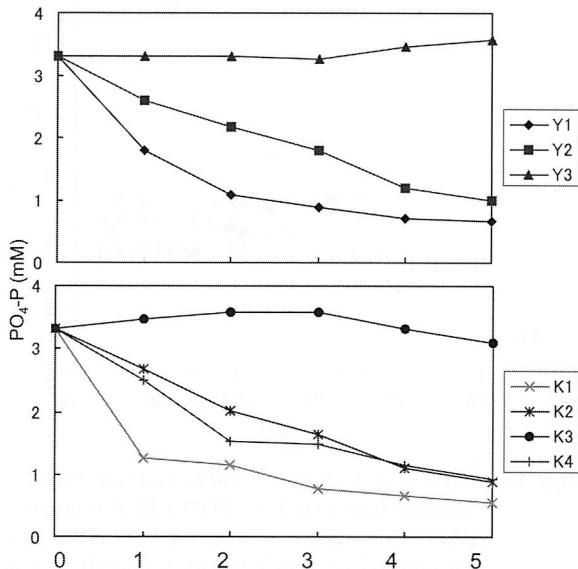


Fig. 8 Adsorption of phosphate ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) by reeds in the pot experiment with different conditions (see Table 2). Experiment was made from August 28 to September 2, 2007.

場合、添加した栄養塩（硝酸塩とリン酸塩）は最も速やかに除去され、特に N は 2 日で検出限界以下まで濃度が低下した (Figs. 7, 8)。ヨシ茎の BF をブラシで除去した場合、除去しなかった実験区に比べてやや遅く栄養塩濃度が低下した。このことは、ブラシで除去できなかった BF またはヨシ茎による栄養塩吸収と考えられた。ヨシを入れなかつた実験区 (BF も無い) では、栄養塩濃度の低下は観察されなかった。以上の実験結果は、フラスコを用いて行った実験結果と基本的には同じと見なすことができる。

排水処理場や内湖において、ヨシ帯は水の浄化の担い手として期待されている (倉田, 1984; 細見, 1994; 波多野, 1996; 国枝ら, 2005)。その機能の実態は、BF の貢献がかなり大きいものと考えられ、今後は BF に注目した機構解明の研究が必要であろう。

#### 安定同位体分析を用いたヨシ BF をめぐる食物網解析

ヨシの茎表面に BF として構成される微生物群集は、増殖過程で有機物や栄養塩類を吸収除去し、更には動物に捕食される事により食物連鎖を通じて湖水の環境浄化に寄与すると同時に、有用微生物群集の生育

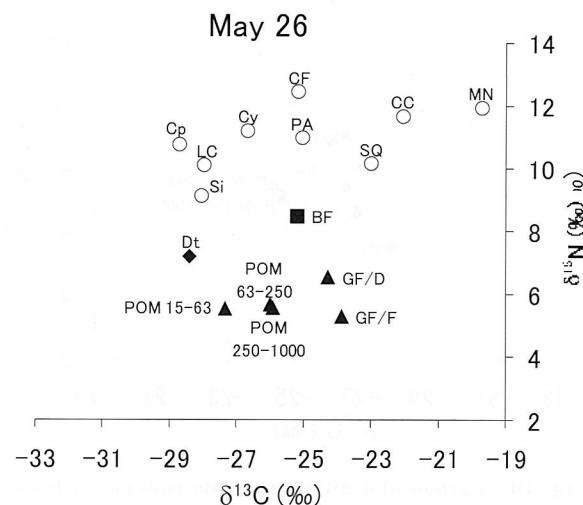


Fig. 9 Carbon and nitrogen stable isotopic ratios of animals (open circles), POM (filled triangles), BF (filled square), detritus derived from *Phragmites australis* (filled diamond) in reed community at the station of Konohama Beach in Lake Biwa on May 26, 2008. MN: *Macrobrachium nipponense*, CC: *Cercion calamorum*, SQ: *Sinotaia quadrata histricalis*, CF: *Crangonyx floridanus*, PA: *Physa acuta*, Cy: Cyclopoid copepods, Cp: *Cypridopsis* spp., LC: larval chironomidae, Si: *Simocephalus* spp., Dt: dead leaves of *P. australis*.

場として機能すると想定される。またBFを食べて成長増殖する微小動物（ミジンコや小型の巻き貝等）は、フナやモロコ等の有用魚類の稚仔魚にとって格好の餌となるであろう。このような観点から、BFを捕食している動物を特定するのを目的として、ヨシ群落内における食物連鎖の構造を、炭素と窒素の安定同位体比の分析によって解析推定することは、生態学的に大きな意味を持つ。

2008年5月26日の調査では（Fig. 9），BFの $\delta^{15}\text{N}$ 値は8.49%と、POMの値5.30～6.54%に比べて高かった。またBFの $\delta^{13}\text{C}$ 値は-25.20%で、枯れヨシの値-28.42%よりも高く、この差に基づいてデトリタス食者とBF食者を区別できることが示唆された。食物連鎖1段階毎の同位体分別は、 $\delta^{15}\text{N}$ で約3%， $\delta^{13}\text{C}$ で~1%の場合が多く、BFを専食する生物の推測値は、 $\delta^{15}\text{N}$ で約11.5%程度、 $\delta^{13}\text{C}$ で-24.2%程度ということになる。これに近い値を示したのはヒメタニシ (*Sinotaia quadrata histrica*)，サカマキガイ

(*Physa acuta*)，フロリダマミズヨコエビ (*Crangonyx floridanus*) の3種であり、BFを専食していた或いは混食していたと推定される。

6月30日の調査では、BFの $\delta^{15}\text{N}$ 値は8.98%であり、POMの値6.73～9.16%より高かった（Fig. 10）。またBFの $\delta^{13}\text{C}$ 値は-26.06%で、枯れヨシの値-27.92%よりも高く、前回調査と似た傾向であった。BFを専食する生物は明らかでなかったが、ミナミヌマエビ (*Neocaridina denticulata denticulata*)とゴミマルカイミジンコ類 (*Cypridopsis spp.*) はBFと植物枯死残渣由来の物を混食している可能性が認められた。またヨシ帯群落の湖水中には、BF起源の珪藻類が常に卓越していたことが明らかになったので、これらの珪藻類も混食の対象であった可能性が高い。

8月29日には、BFの $\delta^{15}\text{N}$ 値は7.20%と、POMの値5.66～6.94%や枯れヨシの3.13%に比べてやや高かった（Fig. 11）。またBFの $\delta^{13}\text{C}$ 値は-25.24%で、枯れヨシの-30.38%よりも高かった。今回もBF専食者は断定できなかったが、ゴミマルカイミジンコ類はBFを混食していると推定された。

全体として、5月にBF食者は比較的多いが、8月にはBFの餌としての位置は相対的に低下する傾向であり、これはBFを構成する微生物の中で珪藻類が減

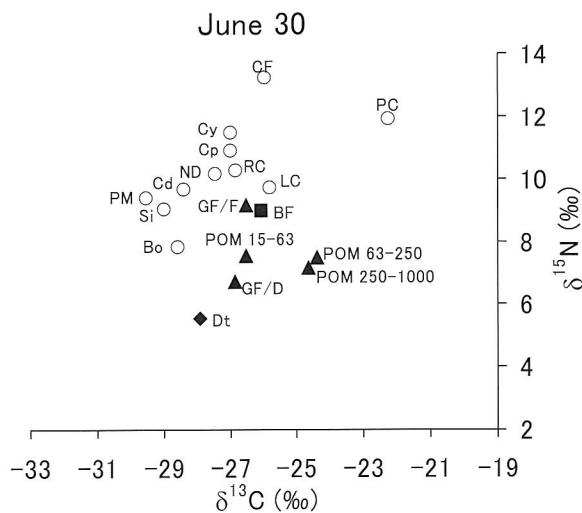


Fig. 10 Carbon and nitrogen stable isotopic ratios of animals (open circles), POM (filled triangles), BF (filled square), detritus derived from *Phragmites australis* (filled diamond) in reed community at the station of Konohama Beach in Lake Biwa on June 30, 2008. CF for *Crangonyx floridanus*, Cy for Cyclopoid copepods, Cp for *Cypridopsis spp.*, LC for larval chironomidae, Si for *Simocephalus spp.*, Bo for *Bosmina spp.*, Cd for *Chydorus spp.*, ND for *Neocaridina denticulata denticulata*, RC for *Rana catesbeiana* larvae, PM for *Pectinatella magnifica* and Dt for detritus.

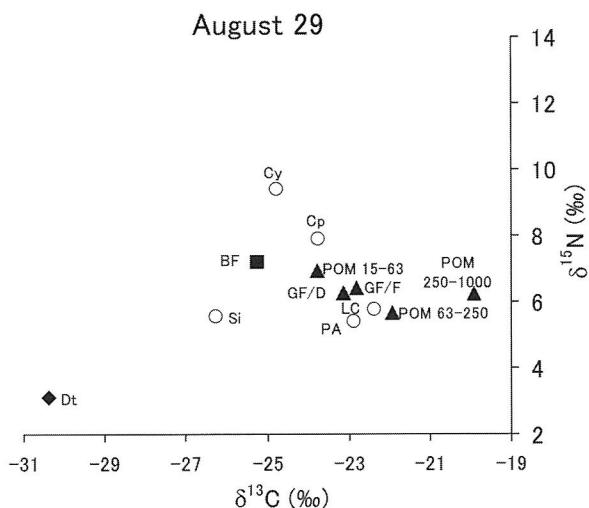


Fig. 11 Carbon and nitrogen stable isotopic ratios of animals (open circles), POM (filled triangles), BF (filled square), detritus derived from *Phragmites australis* (filled diamond) in reed community at Lake Biwa on August 29, 2008. PA for *Physa acuta*, Cy for Cyclopoid copepods, Cp for *Cypridopsis spp.*, LC for larval chironomidae, Si for *Simocephalus spp.*, and Dt for detritus.

**Table 3** Densities (individuals/L) of animals observed near and on the surface of reed shoots in Konohama Beach reed community

Animal group	May 26			June 30			August 29		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
Larval chironomidae	120	73	35	8	16	43	10	21	6
Tubificidae	3	11	13	5	0	4	3	0	19
Naididae	0	0	12	0	0	4	0	0	6
<i>Crangonyx floridanus</i>	0	0	0	41	3	0	0	0	0
<i>Asellus hilgendorfi</i>	0	0	0	0	0	5	0	0	0
<i>Cercion calamorum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chydorus</i> spp.	114	275	1599	3909	674	212	73	35	19
<i>Bosmina</i> spp.	132	9	30	3	24	19	0	0	0
<i>Simocephalus</i> spp.	5	8	5	7	50	8	0	7	0
<i>Ceriodaphnia</i> spp.	4	0	2	1	0	0	0	0	0
<i>Scapholeberis</i> spp.	0	0	0	0	101	8	0	0	0
<i>Alona</i> spp.	24	8	29	6	3	2	0	7	0
<i>Cypridopsis</i> spp.	5	53	14	96	18	53	55	71	58
Cyclopoid copepods	16	273	27	111	232	76	45	28	19

少したのと良い符合が認められた (Table 3)。また BF の  $\delta^{15}\text{N}$  値は高い傾向があったが、BF 中では高い脱窒活性が認められているので、脱窒で  $\delta^{15}\text{N}$  値の高い硝酸塩が蓄積していた可能性があり、この点を補正した研究が将来は必要になるかもしれない。

今回の研究により、ヨシ表面と近傍にはカイミジンコ類が多く生息している事実が明らかになったが、本年度の研究結果から、ヨシ茎の表面の BF は、カイミジンコを中心とする微生物や巻き貝類、およびヨコエビやヌマエビ等に摂食され、食物連鎖に参入していることが示唆された。

今回の研究により、ヨシの BF を含めた浄化能力があらためて明らかとなった。琵琶湖においては、ヨシ帯の大部分は内湖に存在している（西野・浜端、2005）。その意味で、内湖は湖水の浄化の場として大いなる潜在力を持つことを意味する。内湖は通常水深が浅いため、水草も繁茂している場合が多い。今回は水草に関しては、その栄養塩吸収力と BF の関係などについて研究がなされなかつたが、ヨシ帯と併せて水質浄化の担い手として注目し評価することは将来の重要な課題であろう。しかし、ヨシも水草も、人間が意識的にある程度関わりを持ちつつ管理して行かなければ、放置された場合はその場に栄養は留まり、真の環境改善に繋がらないと考えられ（牧野、2008），この

ような面からも関係する人の輪を如何に形成するかといった、自然科学だけでない市民活動の観点からの取り組みも必要となるであろう（琵琶湖総合保全学術委員会、2010）。

## 要 約

滋賀県草津市木浜のヨシ群落から得たヨシ茎を、栄養塩を添加した培養液に収容し、栄養塩 (N と P) の吸収実験を行った。ヨシ茎の入った実験区では、栄養塩濃度は速やかに低下し、特に N は著しかった。温度は25度の方が15度よりも栄養塩吸収速度は高かった。また、ヨシの BF をヨシ茎から剥離して調整し、希釀段階を設けて実験を行ったところ、BF のみの添加でもヨシ茎 + BF と同様の栄養塩吸収が確認され、さらに希釀した BF の場合は栄養塩吸収速度が希釀の度合いに応じて低下した。

琵琶湖博物館において水槽中でポットに栽培したヨシを用い（約 500 本/m<sup>2</sup> の密度）、ヨシと BF による湖水の浄化に関する水槽実験を夏季に実施した。その結果、水槽中に添加した栄養塩は著しく減少し、特に N は 2 日以内に検出限界以下まで濃度が低下した。ヨシが入らない場合には栄養塩濃度の変化は認められなかった。以上から、ヨシと茎の BF によって栄養塩が

除去されることが明らかになった。

木浜沿岸のヨシ群落において2008年5, 6, 8月に調査を行い、湖水は濾過捕集して種々のサイズの懸濁粒子画分を調製し、ヨシBFと枯れヨシを集め、またネットによってヨシ群落内の動物を採集して、炭素と窒素の安定同位体比を分析した。5月にはヒメタニシ、サカマキガイ、フロリダマミズヨコエビがBFを摂食していたと想定された。6月には、ミナミヌマエビとゴミマルカイミジンコがBFを一部摂食していたと示唆された。また8月の結果では、ゴミマルカイミジンコがやはりBF食者と推定された。以上から、ヨシ茎の表面のBFはカイミジンコを中心とする微生物や巻き貝類、およびヨコエビやヌマエビ等に摂食され、食物連鎖を通じて琵琶湖生態系の物質循環に参入していることが示唆された。

## 本研究助成で得られた研究成果の報告

### 【論文発表】

- 1) 今井一郎. 日本における里山・里海のサブ・グローバル評価（里山里海 SGA）第5回世界水産学会議（WFC2008 5th World Fisheries Congress）. 国連大学高等研究所（印刷中）.

### 【口頭発表】

- 1) Ohtsuka, T., Nakai, D., Nakamura, Y., Morisaki, H., Yoshinaga, I. & Imai, I. (2008). Algal assemblages on submerged reed stems and their influence on microbial activities. 5th International Conference of Interfaces Against Pollution 2008. 2 June, Kyoto University.

## 保存機関に寄託した菌株

本研究課題では、微生物の分離培養を実施していないので、菌株の寄託はない。

## 謝 辞

本研究は、財団法人発酵研究所第1回特定研究助成「琵琶湖の水質と環境浄化に関する研究－ヨシ帯とそこに生息する微生物が果たす役割の解明」の一環で行われたものであり、ご高配を賜った先生方および関係の皆様に厚く御礼を申し上げます。本研究を取りまとめるに当たり、ヨシ帯や琵琶湖に係わる研究の枠組みについてご教示を賜った京都大学名誉教授の石田祐三郎先生、滋賀大学環境総合研究センター長の中村正久教授、ならびに（財）琵琶湖・淀川水質保全機構の皆様方に深く感謝申し上げます。本研究を遂行する上

で、精一杯の努力で頑張って戴いた京都大学研究員の晏栄軍博士、京都大学大学院農学研究科海洋環境微生物学分野博士後期課程の中井大介氏、同修士課程の木原一樹、城戸祐の両氏、同資源生物科学科4回生田中克典氏に心より感謝致します。本研究が立命館大学、琵琶湖博物館、京都大学、北海道大学の共同で行われた結果、きわめて有意義なものになったことに対し、関係の皆様、学生諸氏に感謝致します。最後に、著者の北海道大学への異動に伴う研究リーダーの交替において、後継のリーダーを快くお引き受け戴き、献身的にご努力戴いた立命館大学教授の森崎久雄先生に深甚なる謝意を表します。

## 文 献

- 琵琶湖総合保全学術委員会（2010）。「マザーレイク21計画（琵琶湖総合保全整備計画）」第1期の評価と第2期以後の計画改訂の提言. 115p.
- 波多野和徳（1996）. 人工湿原：自然の浄化能力を利用した排水処理施設. バイオサイエンスとインダストリー 54: 23-25.
- Hiraki, A., Tsuchiya, Y., Fukuda, Y., Yamamoto, T., Kurniawan, A. & Morisaki, H. (2009). Analysis of how a biofilm forms on the surface of the aquatic macrophyte *Phragmites australis*. Microbes Environ. 24: 265-272.
- 細見正明（1994）. ヨシ人工湿地における水質浄化法. 用水と廃水 36: 40-43.
- 吉良竜夫（1991）. ヨシの生態おぼえがき. 滋賀県琵琶湖研究所所報 9: 29-37.
- 國枝晴子、李先寧、山田一裕、千葉信男、野村宗弘、中野和典、西村修、須藤隆一（2005）. 人工ヨシ湿地における植栽基盤が下水処理水の栄養塩除去に及ぼす影響. 日本国水処理生物学会誌 41: 93-101.
- 倉田亮（1984）. 内湖－その生態学的機能. 滋賀県琵琶湖研究所所報 2: 46-54.
- 牧野厚史（2008）. ヨシ帯保全における自然と人間との適度な関係. 滋賀大学環境総合研究センター研究年報 5: 1-12.
- 永田俊、宮島利宏（2008）. 流域環境評価と安定同位体－水循環から生態系まで. 京都大学学術出版会. 京都. 476p.
- 日本微生物生態学会バイオフィルム研究部会（2005）. バイオフィルム入門. 日科技連. 東京. 192p.
- 西野麻知子、浜端悦治（2005）. 内湖からのメッセージ. サンライズ出版. 彦根市. 253p.
- 富永修、高井則之（2008）. 安定同位体スコープで覗く海洋生物の生態－アサリからクジラまで. 水産学シリーズ 159. 恒星社厚生閣. 東京. 165p.
- Tsuchiya, Y., Ikenaga, M., Kurniawan, A., Hiraki, A., Arakawa, T., Kusakabe, R. & Morisaki, H. (2009). Nutrient-rich microhabitats within biofilms are synchronized with the external environment. Microbes Environ. 24: 43-51.

## ヨシ帯に由来するアオコ抑制微生物の生理生態学的研究

今井一郎

京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋環境微生物学分野  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

### Ecology and physiology of anti-*Microcystis* bacteria in reed (*Phragmites australis*) communities

Ichiro Imai

Laboratory of Marine Environmental Microbiology, Division of Applied Biosciences,  
Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

Toxic blooms of cyanobacteria such as *Microcystis* have increasingly had negative impacts on freshwater ecosystems and water resources used for human activity. Hence there is an urgent need for the development of useful tools for preventing occurrences or reducing negative impacts of cyanobacterial blooms. We investigated cyanobacteria-killer bacteria in biofilm on submerged reed stems of a reed community in Lake Biwa. Bacteria were isolated from the biofilm using nutrient agar plates, and the killing ability was examined for *Microcystis aeruginosa* by co-culture experiments. We found a huge number of *Microcystis*-killer bacteria (on the order of million per gram of reed stem) in the biofilm on reed in Konohama Beach. *Microcystis*-killer bacteria were also abundant, (on the order of 1000~10000/ml) in the water collected from around the reed community. Small-scale experiments using potted reeds and *M. aeruginosa* revealed a decrease of the cyanobacterial populations. In experiments conducted using artificial water channels, anti-*Microcystis* bacteria were confirmed and isolated. These bacteria belonged to the phyla Bacteroides and Proteobacteria ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ). Based on these new findings, we propose a possible mitigation strategy for cyanobacterial blooms, i.e. large-scale development of reed communities along the coasts of lakes with toxic cyanobacterial blooms.

Key words: reed, biofilm, *Microcystis*, bloom prevention, algicidal bacteria

### 緒 言

琵琶湖などの陸水域の環境悪化は主に陸域由來の有機・無機物質の流入負荷による。特に周囲を農村や住宅で囲まれた琵琶湖では、過去は内湖や沿岸域に形成されていたヨシ帯により、自然の浄化能が働き健全な生態系が保たれていたが（西野ほか, 2003; 西野・浜端, 2005; 牧野, 2008），内湖やヨシ帯が殆ど消失した現在では、リング状下水道システム（集水域で発生する下水全てを、湖を取り巻く下水道に取り込み処理後

現所属：北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野  
浮遊生物学領域

現住所：〒041-8611 北海道函館市港町3-1-1

E-mail: imai1ro@fish.hokudai.ac.jp

共同研究者：大塚泰介（滋賀県立琵琶湖博物館）

に下流河川に放流）を構築しない限り、人間活動に伴い、排水中に含まれる有機性の物質と共に富栄養物質の窒素やリンが流入する。窒素やリン等の無機栄養塩類は水域の生物生産に必要な物質であるが、過度に流入する状況では水域の生物生産で消化しきれず、水域に蓄積してアオコなどの有害微細藻の大量発生を引き起こす。これが富栄養化の象徴的な結果である。富栄養化による環境汚染を防ごうとする場合、陸域から供給される有機物および有機性・無機性の窒素やリンをいかにして水域から除くか、およびアオコ等の有害微細藻類の大量発生を如何に防止するかが大きな鍵となる。

海域においては、藻場に大量の殺藻細菌が生息しているという新しい事実を我々は発見し、赤潮の発生を予防している可能性の有る事を指摘した（Imai et al., 2002, 2006; 今井, 2007）。この事から、赤潮の発生予

防には、藻場の造成や海藻と魚類の混合養殖が有効な方法である事を提案している（今井, 2007）。また、藻場はデトライタスの供給源として大きな意味を持ち、デトライタスは活性の高い多くの微生物の住処となっている。藻場のデトライタスは、海藻が主たる起源となっている。

以上の様な背景から、ヨシ帯を沿岸海域における藻場と対比すると、多くのデトライタスの供給源として共通点が浮かび上がってくる。特に水面下の茎が重要と考えられる。琵琶湖におけるアオコの発生規模の増大と減少をみると、ヨシ帯の減少および近年の積極的な造成（滋賀県, 2009）とアオコの動向は軌を一にしているように思われる。また、アオコのメッカであった諏訪湖においても、環境修復（ヨシ帯の造成を含む）に勤めた結果、近年はアオコの発生が激減していると報じられている。ヨシ表面のバイオフィルムが剥離すれば、微生物が多数付着したデトライタスが大量に水中に常に供給される事になる。このような観点からのアオコ発生防止機構に関する研究は現時点では皆無であり、根本的な浄化機構の理解が出来れば、ヨシ帯の造成によるアオコ抑制の理論的評価が可能になり、今後大きな貢献が予想される。

そこで本研究では、ヨシ帯におけるこれらアオコ抑制に有用な微生物群集の生態に関する調査研究を主眼とした。まずポット実験によってヨシがアオコを抑制することを示し、次に現場沿岸のヨシ帯においてヨシ茎のバイオフィルム（Biofilm、後 BF と称する）や水中のアオコ抑制細菌を計数し、分離した。またヨシを植えた水路実験においては、水路の水がアオコを抑制することを示し、分離した細菌について同定を試みた。本研究により、ヨシ帯はアオコの発生予防に大きな力を発揮する可能性が示された。

## 実験方法

### ポット実験によるヨシ BF のアオコ抑制に関する検討

2007年 7月 25～31日および 8月 28～9月 2日の2回、琵琶湖博物館においてポット中でヨシを水槽（530 x 350 x 280 mm、約52リットル容）中に収容し（約 500 本 /m<sup>2</sup>）、ヨシと BF によるアオコ (*Microcystis aeruginosa*) の抑制について検討を行った（Fig. 1）。ポットの中には径約 5 mm の砂利（オートクレーブ滅菌処理した）が詰められ、CT 培地を入れた水槽中でヨシを 3 週間予備栽培し BF を形成させて実験に用いた。琵琶湖の水を砂濾過後、GF/F ガラス繊維濾紙で濾過して水を水槽中に入れ、1/100 濃度の CT 培地（Table 1）の栄養塩濃度を設定した。設

定した実験区は Table 2 に示した。実験開始から 5 日目まで毎日滅菌したヘラで水を均一にして水のサンプリングを行い、アオコと栄養塩濃度の変化を調べた。

### 湖岸ヨシ帯におけるアオコ抑制細菌の検出と計数

琵琶湖南湖畔の守山市木浜沿岸の造成ヨシ帯におい



Fig. 1 A photograph of reeds (*Phragmites australis*) in pots.

Table 1 Composition of the CT medium for culturing microalgae

Contents	Weight and recipe
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	40mg
KNO <sub>3</sub>	100mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	62mg
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	150mg
TAPS	400mg
Vitamin mix	
Vitamin B <sub>1</sub>	10μg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.1μg
Biotin	0.1μg
PIV metals	
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.588mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.108mg
ZnCl <sub>2</sub>	0.0315mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.012mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.0075mg
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	3mg
Distilled water	1 liter
pH	8.2

て (Fig. 2), 水面下から自生するヨシの茎を切り出し, 同所の湖水と共に持ち帰ってアオコ (*M. aeruginosa*) と緑藻ミカヅキモ (*Closterium aciculare*) の殺藻細菌を調べた。調査研究は2007年5月～6月, および2007年10月～2008年8月の期間に, 概ね月に1回の頻度で行った。比較として, ヨシ帯のない北山田漁港 (Fig. 2) においても湖水を採取し, 同様にアオコの抑制微生物の研究を実施した。

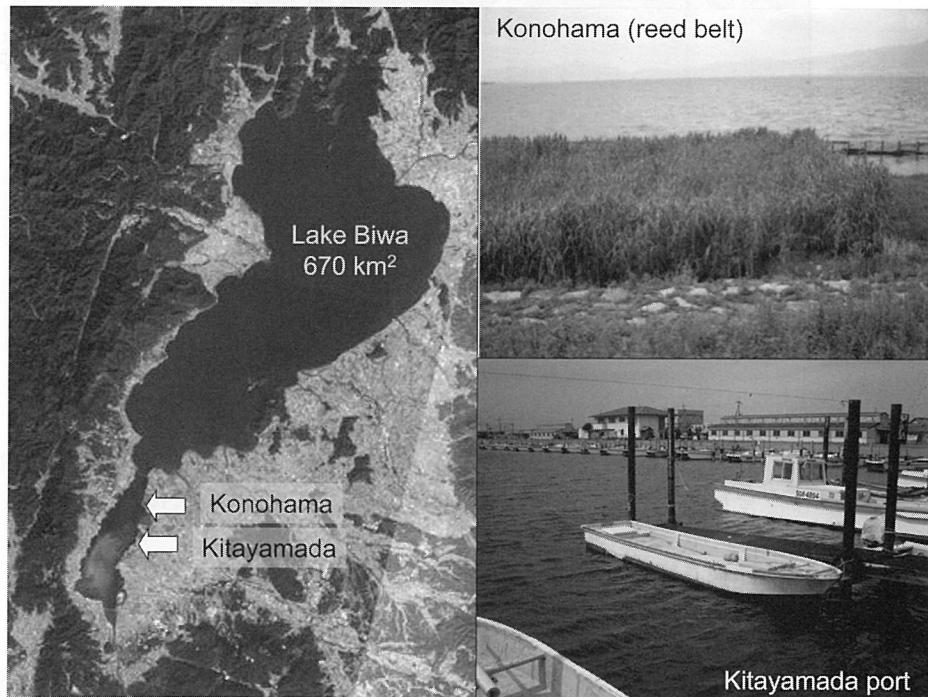
実験室に持ち帰ったヨシ茎と湖水について, 従属栄養細菌を寒天平板培養法によってコロニーを形成させ

て分離し, アオコとならびに比較として緑藻のミカヅキモに対する殺藻能や増殖阻害能を2者培養実験によって確認した (Fig. 3)。

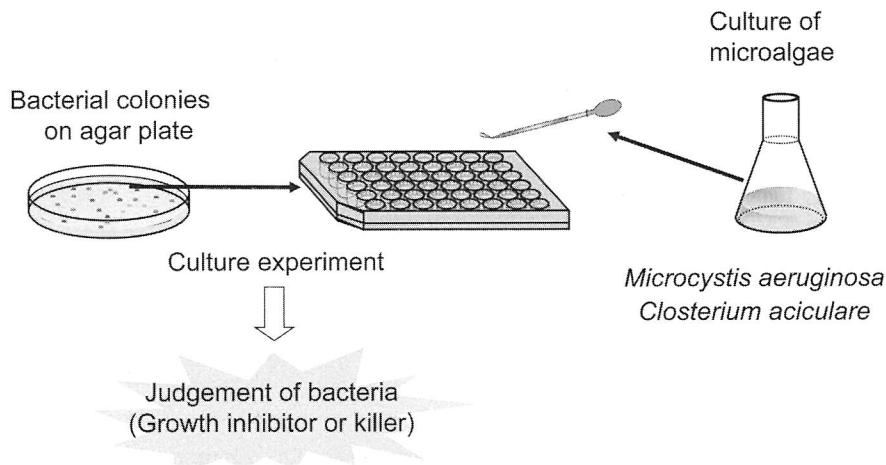
**水路実験** 水路を用いたモデル実験系により, 富栄養化の結果として引き起こされるアオコの阻害因子として, アオコ抑制細菌に着目し, この細菌の供給源としてのヨシ群落の重要性を評価した。滋賀県草津市にあるBIYOセンターにおいて実験水路を設け, ヨシ帯区, BF除去区, ヨシ除去区, コントロール (ヨシ

**Table 2** Experimental plots of pot experiment for examining effects of reed on cleaning up of inorganic nutrients ( $\text{NO}_3\text{-N}$  and  $\text{PO}_4\text{-P}$ )

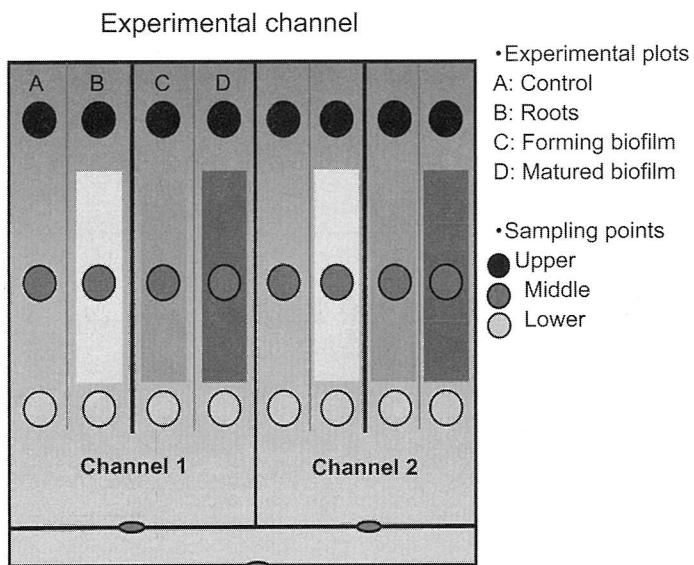
Plots	Reeds	Biofilm	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Closterium aciculare</i>
Y1	+	+		
Y2	+			
Y3				
K1	+	+	+	
K2	+		+	
K3			+	
K4	+	+		+



**Fig. 2** The sampling sites of Konohama Beach (reed belt) and Kitayamada Port in Lake Biwa.



**Fig. 3** Procedure for confirming anti-microalgae bacteria isolated from water and biofilm of reed stem collected from Lake Biwa.



**Fig. 4** Diagram of experimental channel for investigating anti-*Microcystis* bacteria.  
A: Control of no reeds, B: Roots of reeds, C: Reeds eliminating biofilm by wiping at the start of experiments, D: Reeds with biofilm.

無し)を各2本設け(計8本), 上流, 中流, 下流に採水点を設定してサンプリングを行った(Fig. 4). 流水の滞留時間は6時間に設定した. 水路の水の中に存在するアオコ抑制微生物のモニタリング実験は、2009年7月1日に開始し, MPN法(Imai *et al.*, 1998)により実施した.

次に, 各水路の上流, 中流, 下流から試水を採取し, 無処理区, 0.1μm濾過区, 1μm濾過区を設け, 各区にアオコ(*M. aeruginosa*)添加, ミカヅキモ

(*C. aciculare*)添加, 無添加の3実験区を設けて, アオコとアオコ抑制微生物の動向をモニターした.

### 結果と考察

ポット実験によるヨシBFのアオコ抑制に関する検討  
水槽の中のポットのヨシにBFを形成させて付着させたままの場合, アオコ形成藍藻ミクロキスティス(*M. aeruginosa*)を加えた実験区では, ミクロキス

ティスの増殖が阻害され、細胞数は著しく減少した (Fig. 5)。緑藻クロステリウム (*C. aciculare*) を加えた実験区でも同様に、クロステリウムの増殖が大きく阻害された (データ未掲載)。実験水槽中の湖水から殺藻細菌が実際に検出分離され、密度は  $10^6 \sim 10^7$  細胞/ml のオーダーに達した (Fig. 6)。またヨシ茎の BF からも  $10^6/cm^2$  ( $10^7/g$  ヨシ湿重) のオーダーの密

度でミクロキスティス殺藻細菌が検出された (Fig. 6)。分離された殺藻細菌の中には溶藻してしまう程に殺藻活性の高いものも多く認められた。

#### 湖岸ヨシ帯におけるアオコ抑制細菌の検出と計数

滋賀県守山市木浜のヨシ帯から分離した細菌と、アオコおよび緑藻の 2 者培養実験の 1 例を Fig. 7 に示し

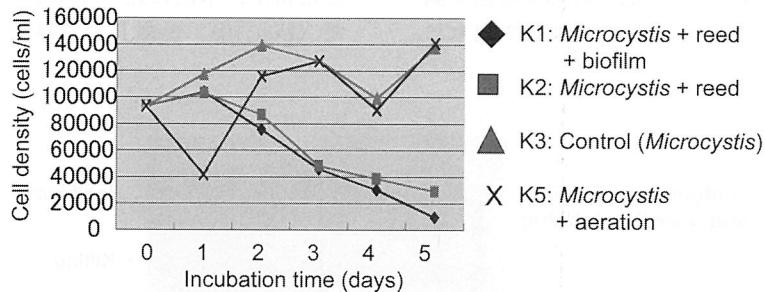


Fig. 5 Changes in cell densities of *Microcystis aeruginosa* in the pot experiment with different conditions (see Table 2). Experiment was made from August 28 to September 2, 2007.

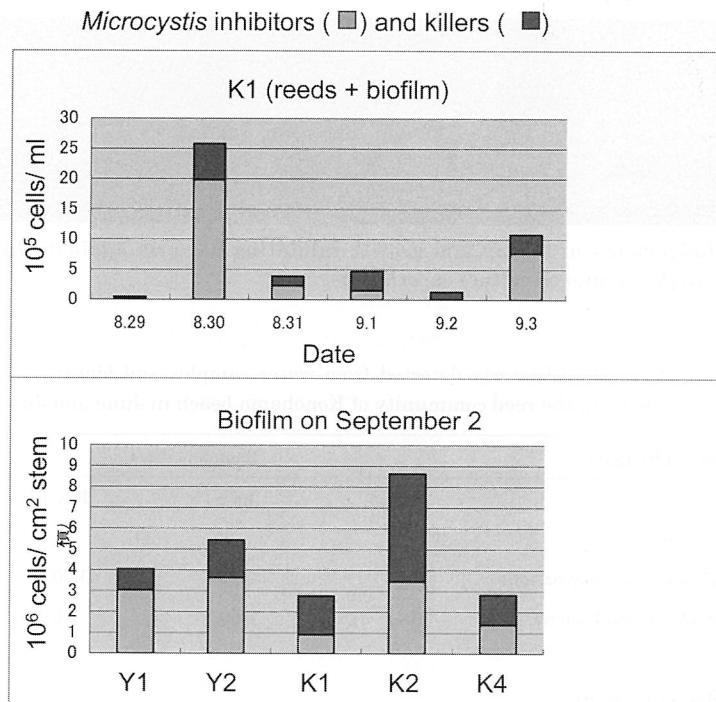


Fig. 6 Changes in cell densities of anti-*Microcystis aeruginosa* bacteria (killers and growth inhibitors) in the pot experiment of K1 plot (reeds and biofilm) during the period from August 28 to September 2, 2007, and those in biofilm of reeds in different conditions on September 2, 2007 (see Table 2).

た。マイクロプレートを用いていることから、色調を基準にして、増殖阻害あるいは殺藻や溶藻は比較的簡単に判別可能である。顕微鏡による観察を行えば、その差は歴然である (Fig. 6)。2007年6月と7月において、湖水中には殺藻細菌が $10^3\sim 10^4/\text{ml}$ の密度で検出され、ヨシ茎表面のBFからは $10^5/\text{cm}^2$  ( $10^6/\text{g}$  ヨシ湿重) のオーダーの密度で殺藻細菌が生息することが判明した (Table 3)。

2007年11月～2008年8月の期間、周年にわたって、木浜のヨシ帯の中のアオコと緑藻の抑制細菌を調べた結果を、BFについて Fig. 8 に、ヨシ帯の湖水に

関しては Fig. 9 に示した。ヨシ茎表面のBFからは $10^5\sim 10^6/\text{cm}^2$  ( $10^6\sim 10^7/\text{g}$  ヨシ湿重) のオーダーの密度で阻害細菌や殺藻細菌が生息することが判明した。中には *Microcystis* 阻害細菌が $10^3\sim 10^4/\text{ml}$  の密度で、*Closterium* 殺藻細菌は $10^3\sim 5\times 10^4/\text{ml}$  程度の密度で検出された。*Closterium* に対する阻害細菌や殺藻細菌はミクロキスティスの場合の5～10倍高い密度であった。比較として、ヨシの生えていない北山田港の水について *Microcystis* と *Closterium* の阻害細菌を検討した結果、木浜に比べて 1/5～1/10 程度の密度であった (Fig. 10)。分離した殺藻細菌や阻害細菌の活性を

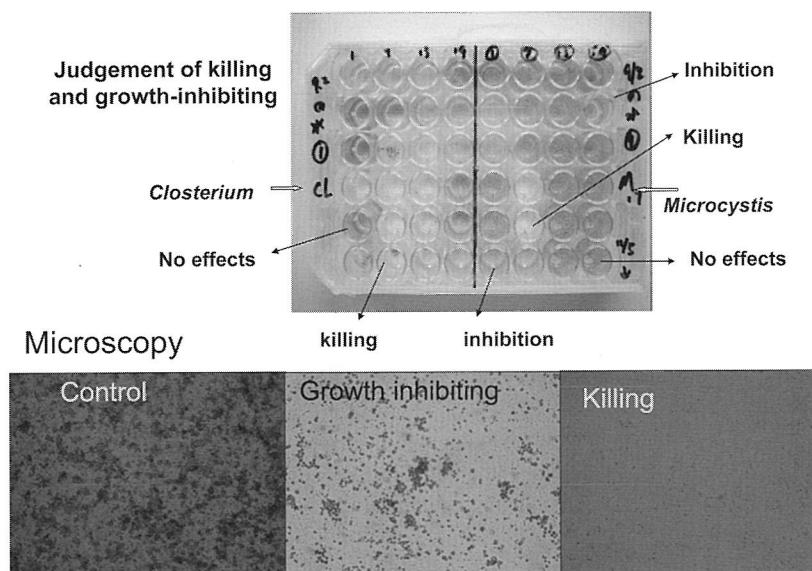


Fig. 7 Judgements of killing and growth-inhibiting bacteria against *Microcystis aeruginosa* after co-culture experiments.

Table 3 Number of bacteria detected from water samples and biofilm on the reed stems in the reed community of Konohama beach in June and July of 2007

Number of bacteria	Sampling dates		
	June 5	June 19	July 17
<i>Water (x10<sup>4</sup>/mL)</i>			
Total colony forming bacteria	1.7	6.2	32.0
Anti- <i>Microcystis</i> bacteria	0.11	0.39	2.0
<i>Biofilm (x10<sup>7</sup>/g reed)</i>			
Total colony forming bacteria	5.2	2.1	2.8
Anti- <i>Microcystis</i> bacteria	0.98	0.32	0.61

Percentages of anti-*Microcystis* bacteria occupied 6.3 – 21.8% of the total colony forming bacteria.

見ると、両方を殺滅するもの、片方だけ阻害等、バラエティーが高かった。ヨシ帯から得た石のBFについて殺藻細菌と阻害細菌を調べたところ、ヨシのBFに比べて概ね1桁低い密度であったが、これはミクロキスティスとクロステリウム共に共通した結果であった（データ未掲載）。さらに、ヨシの生えてない北山田港に不織布を設置したがアオコの抑制細菌は不織布に付着しなかったのに対し、ヨシ帯では $10^2\sim 5\times 10^3/\text{cm}^2$ 程度のアオコ抑制細菌が不織布に付着した。人工的なアオコの抑制を試みる場合、不織布を用いることが出

来る可能性が示された。

**水路実験** アオコ (*Microcystis*) を殺滅或いは増殖阻害する微生物は、ヨシの茎からBFを除去した実験区において最も多く見出された（約20~30 MPN/ml）。他の実験区においても、10 MPN/ml以下ではあるが検出された。比較対照として設定した緑藻 *C. aciculare* の殺藻あるいは阻害微生物は、約10 MPN/ml以下ではあるが、やはり検出された。ヨシの茎上に形成されているBFを除去してアオコの殺

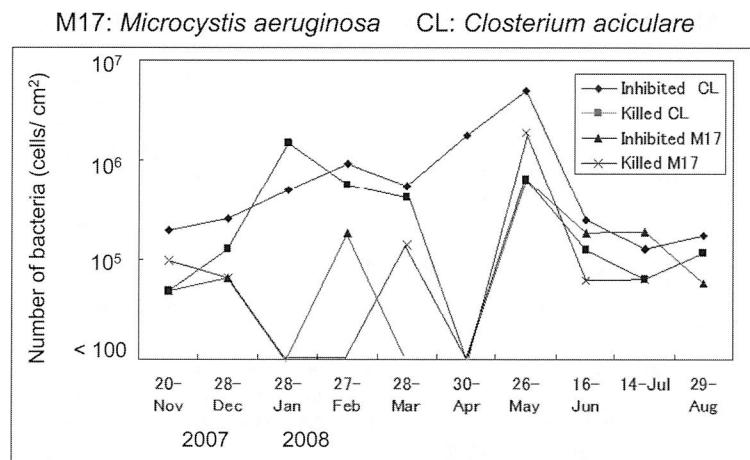


Fig. 8 Changes in cell densities of anti-*Microcystis aeruginosa* bacteria (killers and growth inhibitors) and anti-*Closterium aciculare* bacteria in biofilm of reed stems submerged in water in reed community of Konohama Beach from November 2007 to August 2008.

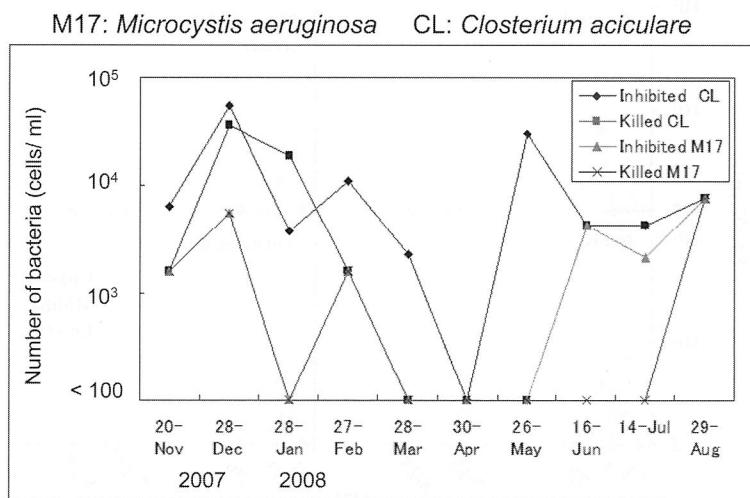


Fig. 9 Changes in cell densities of anti-*Microcystis aeruginosa* bacteria (killers and growth inhibitors) and anti-*Closterium aciculare* bacteria in water samples in reed community of Konohama Beach from November 2007 to August 2008.

藻細菌を調べたが、最高約300 MPN/g（湿重）の殺藻細菌が検出された（データ未掲載）。水とBFの試料と共にMPN法を用いて殺藻細菌や阻害細菌の数を評価したため、 $1\mu\text{m}$ 孔径の濾過処理を行っており、大部分の殺藻細菌が濾液区分に回収されなかった結果、過小評価になっていると考えられる（Imai *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2010）。しかし、水路やヨシBFに実際にアオコ抑制微生物が検出されており、アオコの抑制に寄与するものと期待される。

次に、各水路から試水を採取し、無処理区、 $0.1\mu\text{m}$ 濾過区、 $1\mu\text{m}$ 濾過区を設け、各区にアオコ（*M. aeruginosa*）添加、ミカヅキモ（*C. aciculare*）添加、無添加の3実験区を設けて、アオコとミカヅキモ抑制微生物の動向をモニターした。何れの実験区においても、 $0.1\mu\text{m}$ 濾過区ではアオコもミカヅキモも良好に増加した（Fig. 12）。一方で、他の実験区ではアオコ抑制微生物が出現確認された。細菌および従属栄養性微小鞭毛虫類（HNF）の動向も把握したが、先に細

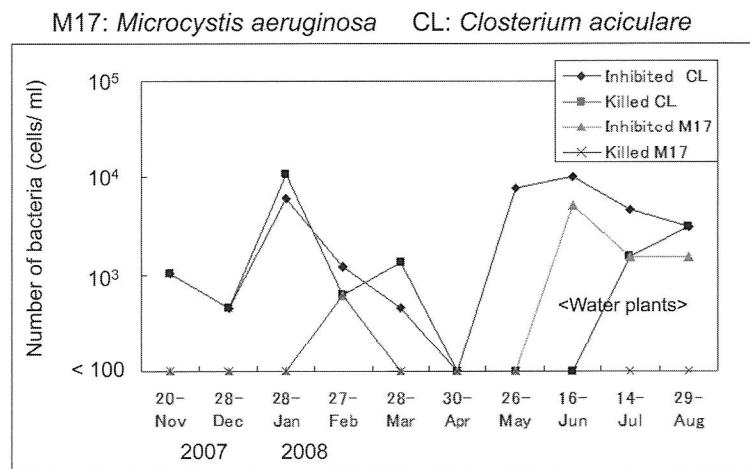


Fig. 10 Changes in cell densities of anti-*Microcystis aeruginosa* bacteria (killers and growth inhibitors) and anti-*Closterium aciculare* bacteria in water samples in Kitayamada Port from November 2007 to August 2008

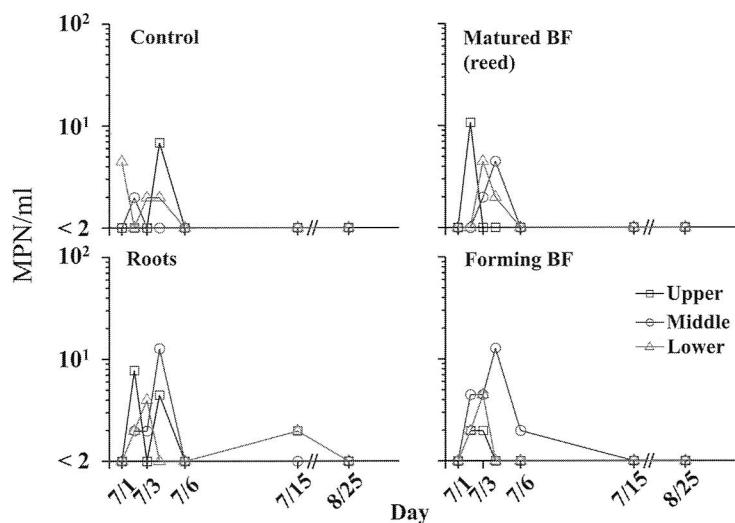


Fig. 11 Changes in densities of growth inhibiting bacteria against *Microcystis aeruginosa* estimated with MPN method in the water samples collected from the experiment of water channels.

菌が増加した後にHNFが細菌を捕食しつつ増加し、細菌は減少する傾向を示した(データ未掲載)。殺藻細菌は、このようなHNFによる細菌群集全体に対する捕食をものとせず、増殖しており、アオコ制御者として強い能力を有すると考えられた。また、アオコのような大量の有機物が殺藻細菌によって殺滅された

場合、従属栄養細菌にアオコ起源の有機物が利用され、さらにHNFに細菌が消費されることにより、微生物ループを通じて食物網へとアオコ起源の有機物が入っていくと予想され、アオコは殺藻細菌に殺滅される方が、湖底に沈殿する(分解により酸素が消費され貧酸素水塊が形成される)よりも環境に悪影響が少な

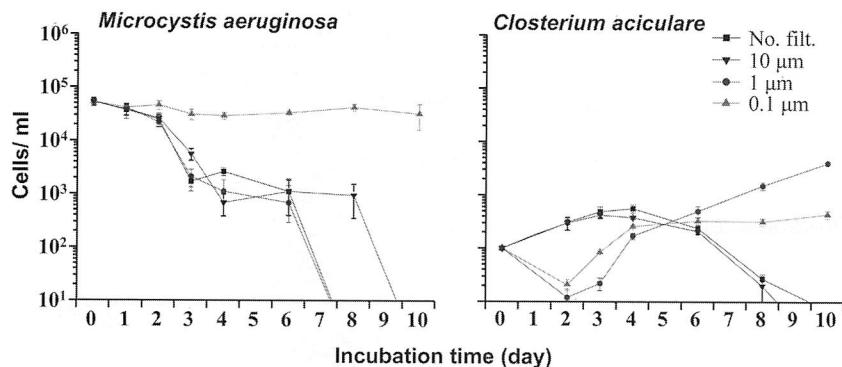


Fig. 12 Changes in the number of microalgal cells added to the freshwater of <0.1 μm (green line and ▲) fraction, 10 μm fraction (blue line and ▼) 1 μm fraction (red line and ●) and no filtration (black line and ■). Freshwater was collected from middle of water channel on July 30, 2009.

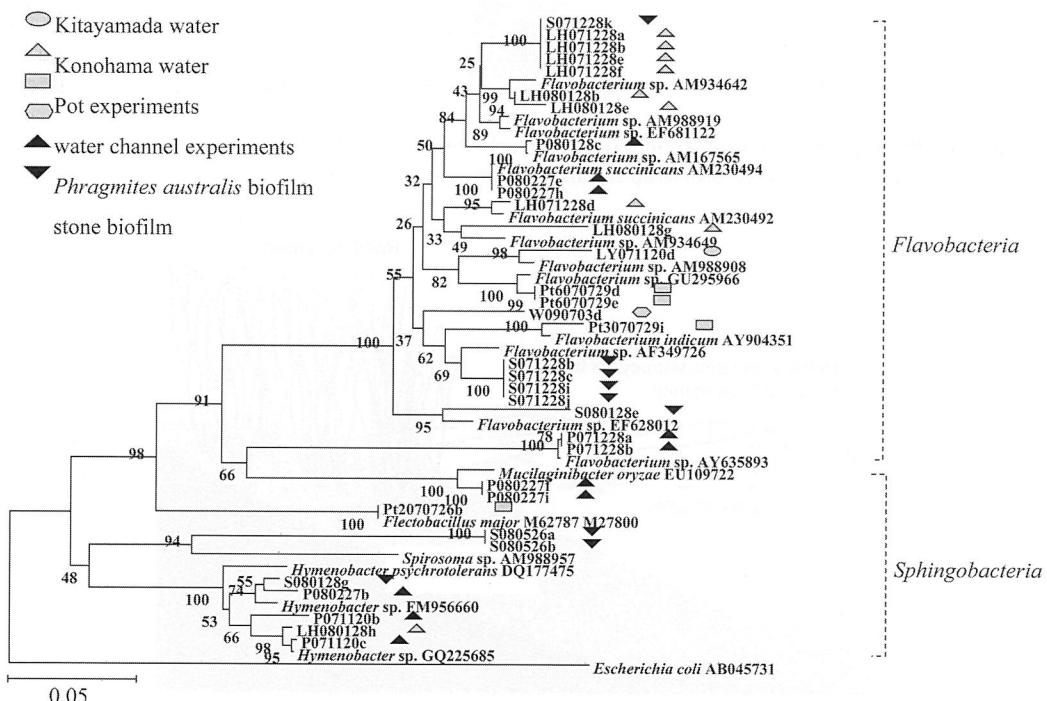


Fig. 13 Phylogenetic tree of algicidal bacteria belonging to the Bacteroides phylum. The percentages of 1000 bootstrap trials are shown at the nodes.

いと考えられた。

今回の研究によって分離培養されたアオコや緑藻ミカヅキモの殺藻細菌や増殖阻害細菌について、16S rDNAの解析を行い、簡易同定を行った。その結果、これらの細菌の大部分が、*Bacteroides*門や*Proteobacteria*グループ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ )に属することが

判明した(Figs. 13, 14)。瀬戸内海などの沿岸海域から分離培養された殺藻細菌も、同様の分類群のものが多いたことが報じられており(今井, 2002; Imai et al., 2006), 海の場合も陸水の場合でも同様な細菌が検出分離されたことは興味深い。

水面下にあるヨシ茎の表面には、多くの微生物が付

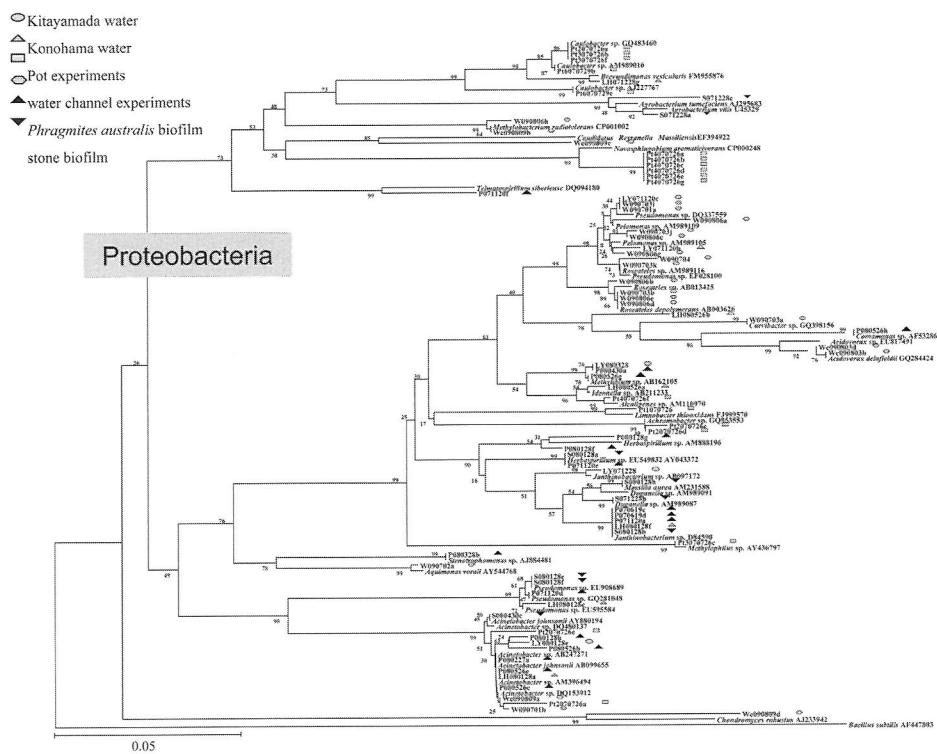


Fig. 14 Phylogenetic tree of algicidal bacteria belonging to the *Proteobacteria* phylum. The percentages of 1000 bootstrap trials are shown at the nodes.

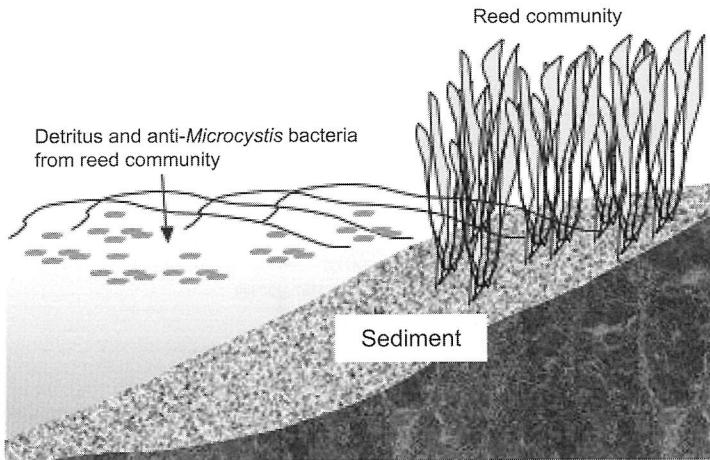


Fig. 15 A schematic presentation on the mechanism supplying anti-*Microcystis* bacteria from water and biofilm on reed stems in reed belts in the coasts of lake systems.

着してBFを形成しており、その中にはアオコの増殖を著しく阻害し、殺滅するものも多く認められた。これらの微生物によってアオコの発生を予防できる可能性が示された。ヨシ茎の表面からBFが剥離すれば、大量の微生物の付着したデトライタスが大量に水中に常に供給される事になる。このような観点から、ヨシ帯によるアオコの発生予防が期待される(Fig. 15)。ヨシ帯に関しては、その造成は環境修復の象徴であり、アオコ発生予防の能力をヨシ帯が持つことによって今後のヨシ帯造成の展開を後押しすることが望まれる。

## 要 約

琵琶湖博物館において水槽中でポットに栽培したヨシを用い(約500本/m<sup>2</sup>の密度), ヨシとBFによるアオコの抑制に関する水槽実験を夏季に実施した。その結果、水槽中に添加したアオコ生物(*Microcystis aeruginosa*)は著しく減少したことから、ヨシ茎のBFの微生物によってアオコが抑制されることが明らかになった。

滋賀県森山市木浜のヨシ群落から得たヨシ茎と湖水について、アオコを抑制する殺藻細菌や増殖阻害細菌の検出と計数を行った。その結果、湖水中には10<sup>3</sup>cells/mlのオーダーの密度で、ヨシ茎のBF中にはその1000倍程度の密度の殺藻細菌や阻害細菌が検出された。比較としてヨシ帯のない北山田港の湖水では、アオコ抑制細菌は木浜の1/10以下であった。

滋賀県草津市のBIYOセンターに人工水路を設置し、様々な条件を設定して実験を行った。滞留時間は6時間と高い回転率であったが、アオコ抑制細菌は水中から検出され、培養実験を行った結果、原因生物(*Microcystis aeruginosa*)を数日で殺滅する結果が得られた。

以上得られた成果から、ヨシ帯を造成することは、アオコの発生予防に貢献するものと期待される。

## 本研究助成で得られた研究成果の報告

### 【口頭発表】

- 1) 松澤優子・山本芳正・今井一郎・中原紘之(2007). 広沢池と大沢池のプランクトン群構成を引き起こす環境要因の検討. 平成19年度日本水産学会近畿支部後期例会(12月1日)京都大学.
- 2) 木原一樹・今井一郎(2008). ヨシのバイオフィルムにおけるアオコ形成藍藻*Microcystis aeruginosa*殺藻細菌の発見. 2008年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会in熊本(9月4~7日)熊本県立大学.

- 3) Imai, I., Yan, R., Kihara, K., Yamamoto, Y., Nakai, D. & Ohtsuka, T. (2008). Discovery of abundant existence of *Microcystis*-killer bacteria in biofilm on submerged reed stems in Lake Biwa: Possibility of reed community for control of *Microcystis* blooms. 13th International Conference on Harmful Algal Blooms (November 3-7) Hong Kong.
- 4) 今井一郎・晏 栄軍・木原一樹・山本芳正・吉永郁生・中井大介・大塚泰介(2009). ヨシ帯が有するアオコの発生予防機能の発見. 2009年度日本水産学会春季大会(3月27~31日)東京海洋大学(品川キャンパス).
- 5) 城戸 祐・今井一郎(2009). アオコ形成藍藻*Microcystis aeruginosa*に対して殺藻能を示す細菌の水草からの発見. 2009年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会(10月16~18日)北海道大学水産学部(函館).

## 保存機関に寄託した菌株

本研究課題で分離培養された殺藻細菌50株あまりは、現在北海道大学水産科学研究院プランクトン研究室にて保存している。現在、殺藻活性や性状等を検討中であり、整理のついたものから適宜寄託していく予定である。

## 謝 辞

本研究は、財団法人発酵研究所第1回特定研究助成「琵琶湖の水質と環境浄化に関する研究-ヨシ帯とそこに生息する微生物が果たす役割の解明」の一環で行われたものであり、ご高配を賜った先生方ならびに関係の皆様に厚く御礼を申し上げます。本研究の現場水路試験に当たり、ヨシ帯や琵琶湖に係わる研究の枠組みについてご教示を賜った京都大学名誉教授の石田祐三郎先生、滋賀大学環境総合研究センター長の中村正久教授、ならびに多大なご協力を戴いた(財)琵琶湖・淀川水質保全機構の皆様方に深く感謝申し上げます。本研究を遂行する上で、精一杯の努力で頑張って戴いた京都大学研究員の晏 栄軍博士、京都大学大学院農学研究科海洋環境微生物学分野博士後期課程の中井大介氏、同修士課程の木原一樹、城戸 祐の両氏、同資源生物科学科4回生田中克典氏、ならびに著者の新たな異動先である北海道大学大学院水産科学研究院浮遊生物学領域修士課程の扇 航平氏に心より感謝申し上げます。本研究が立命館大学、琵琶湖博物館、京都大学、北海道大学の共同で行われた結果、きわめて有意義なものになったことに対し、関係の皆様、学生諸氏に感謝致します。最後に、著者の北海道大学への異動に伴う研究リーダーの交替において、後継のリー

今井一郎

ダーオお引き受け戴き、最後の取りまとめまで献身的なご努力を戴いた立命館大学教授の森崎久雄先生に深甚なる謝意を表します。

文 献

今井一郎 (2002) . 赤潮の予防と駆除. 今中忠行監修, 微生物利用の大展開, pp.881-888, エヌ・ティー・エス, 東京.

今井一郎 (2007) . 微生物による赤潮防除. 藤井建夫・杉田治男・左子芳彦編, 水産学シリーズ155, 微生物の利用と制御・食の安全から環境保全まで, pp.110-123, 恒星社厚生閣, 東京.

Imai, I., Fujimaru, D. & Nishigakli, T. (2002). Co-culture of fish with macroalgae and associated bacteria: A possible mitigation strategy for noxious red tides in enclosed coastal sea. *Fisheries Sci.* **68** (Supplement): 493-496.

Imai, I., Fujimaru, D., Nishigaki, T., Kurosaki M. & Sugita H. (2006). Algicidal bacteria isolated from the surface

of seaweeds from the coast of Osaka Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Afr. J. Mar. Sci.* **28**: 319-323.

Imai, I., Kim, MC., Nagasaki, K., Itakura, S. & Ishida, Y. (1998). Detection and enumeration of microorganisms that are lethal to harmful phytoplankton in coastal waters. *Plankton Biol. Ecol.* **45**: 19-29.

牧野厚史 (2008) . ヨシ帶保全における自然と人間との適度な関係. 滋賀大学環境総合研究センター研究年報 **5**: 1-12.

西野麻知子, 浜端悦治 (2005) . 内湖からのメッセージ. サンライズ出版. 彦根市. 253p.

西野麻知子, 浜端悦治, 大高明史, 石田昭夫 (2003) . 内湖の特性と保全の方向性について. 琵琶湖研究所所報 **20**: 12-25.

Park, J. H., Yoshinaga, I., Nishikawa, T. & Imai, I. (2010). Algicidal bacteria in particle associated fraction and free-living fraction in Harima-Nada, the Seto Inland Sea. *Aquat. Micronb. Ecol.* **60**: 151-161.

滋賀県 (2009) . 滋賀の環境2009 (平成21年版環境白書). 61p.

## 琵琶湖ヨシ帯の脱窒活性と脱窒細菌の分子生態学的研究 左子芳彦

京都大学大学院農学研究科  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Denitrification in the biofilm developed on submerged reed surfaces  
Yoshihiko Sako

Laboratory of Marine Microbiology, Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Oiwake-cho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Denitrification is a key process for removing excess nitrogen compounds from aquatic environments through the N<sub>2</sub> gas production. In this study, we investigated the possibility that biofilm (BF) developed on reed (*Phragmites australis*) surfaces under the water can be a "hot spot" for denitrifying bacterial populations, given the micro-anaerobic conditions, rich nitrogen oxides, and abundant organic carbon sources available for the denitrifying bacteria. The submerged stems of reeds with biofilm were collected from a reed community in the southern basin of Lake Biwa, which is the biggest lake in Japan, and the denitrifying activities of the BF's on the reed surfaces were determined by a <sup>15</sup>N-tracer experiment. At the same time, total heterotrophic bacteria and denitrifying bacteria were enumerated through an MPN (Most Probable Number) method. There were generally more denitrifying activities in BF's on the reed surfaces than in the BF's on the stones and the sediments at the reed community, and denitrifying bacteria were detected in the heterotrophic bacterial population in the BF on the reed surfaces at a relatively high ratio. The denitrifying activity in the BF's on the reed surfaces was higher in May, when new reed stems grew and relatively fresh biofilm was forming on the reed surface, than in June or July. This observation suggests that the microbial community structure and physicochemical structure of BF on the reed surface might change seasonally and affect the denitrifying bacterial population and their activity. A culture-independent, clone library protocol targeting the nitrite reductase genes *nirS* (the component gene of cytochrome cd<sup>1</sup> type nitrite reductase) and *nirK* (the component gene of Cu-including type nitrite reductase) indicated that novel genes of *nirS* and *nirK* different from those in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database were abundantly retrieved. Furthermore, the compositions of both genes in reed BFs were different from those in the BF on stones and in sediment. These results suggest that BF on the submerged reed surface is a unique habitat for some denitrifying populations.

Key words: denitrifying bacteria, biofilm, *Phragmites australis*, *nirS*, *nirK*

### 緒 言

ヨシ (*Phragmites australis*) は世界中の温帯域の湖沼や河川において、陸域と水圏の境界域に普遍的に見られる植生である。ヨシ群落はさまざまな魚や鳥、そして昆虫などの生息場であり、またある種の魚類に

E-mail: sako@kais.kyoto-u.ac.jp  
共同研究者：吉永郁生（京都大学大学院農学研究科）

とっては、孵卵場としても重要である。しかし近年、湖岸や河岸からヨシ群落は消失する傾向にある。またヨシ群落は陸域の汚濁物質が水域に流入する前にトラップし、浄化する機能を持つとも言われている。産業の進歩に伴い、農業排水や産業廃水などによる水圏の窒素化合物の流入量が著しく増加しつつある日本では、富栄養化によるアオコや赤潮などの環境悪化が懸念されており、この過剰な窒素流入を防ぐ役割としてのヨシ群落の重要性も増している。

一般にヨシの環境浄化機構は、主にヨシによる活発

な栄養塩吸収とそれに伴う生物生産によると考えられてきた。しかし、ヨシのような抽水植物（茎の一部が水中に没している植物の総称）では、水中部にバイオフィルム（BF）が発達し、その内で旺盛に微生物が活動している事が予想できる。この微生物活動の一つとして脱窒がある。脱窒とは、一部の特殊な従属栄養細菌により、嫌気条件下で硝酸や亜硝酸を電子受容体として有機物を分解する反応である。硝酸や亜硝酸は、硝酸レダクターゼ（NapあるいはNar）、亜硝酸レダクターゼ（Nir）、酸化窒素レダクターゼ（Nor）、亜酸化窒素レダクターゼ（Nos）を触媒として連続的に還元され、最終的に分子状窒素（N<sub>2</sub>）となる。それゆえこの反応は水圈から窒素を除去するプロセスとして注目されている。この脱窒反応は嫌気呼吸反応の一種であることから（Knowles, 1982），これまで普遍的に酸素の供給が少なく、かつ硝酸態窒素の供給のある表層堆積物中が主な脱窒の場と考えられ、研究が行われてきた（Gale *et al.*, 1993）。

水中のさまざまな基盤表面に形成されるBFは、微細藻や細菌、またこれらの微生物が生産する化学物質などから構成される微細な構造物である。微小電極を用いた実験などによりこのBF内ではミクロンオーダーの微細な領域で嫌気環境が作られていることや、そこに多量の硝酸が存在することが近年報告されている（De Beer *et al.*, 1997; Tsuchiya *et al.*, 2009）。このことから、一見、嫌気的とは思われないBF内でも脱窒反応が進行している可能性がある（Christensen *et al.*, 1990; Triska & Oremland, 1981）。Toetら（2003）は湖沼の沿岸に多い沈水植物であるヨシ（*Phragmites australis*）の水中茎（submerged stem）の表面に形成されたBFにおいて堆積物よりもはるかに高い脱窒活性が存在することを報告しており、ヨシ茎のBFには脱窒細菌を集積し、湖沼環境の窒素除去に大きく寄与している可能性を示唆している。しかし、BF内の脱窒細菌群集に関する微生物生態学的な研究はこれまでなされていない。また、Toetら（2003）は、同じ研究によって、オオカナダモの表面のBFにおける脱窒活性がヨシ茎の表面のBFのそれに比べて低かったと報告しており、この結果は、さまざまな基盤に応じてBFの立体構造や微生物群集構造が異なることを示唆している。

そこで本研究では、脱窒反応の場としてヨシ茎の表面のBFが大きく貢献しているのではないかと考え、琵琶湖に自生するヨシ帯を主たる調査域として、ヨシ茎のBF内に脱窒細菌の大きなポピュレーションが存在するかどうか、そして高い脱窒活性を持っているかどうかを調べることを目的とした。複数年にわたりヨ

シや周辺の堆積物、あるいは石表面のBFや湖水を採取し、その脱窒活性を測定するとともにMPN法を用いて従属栄養細菌数と脱窒細菌数を計数し、比較した。また、環境試料から直接DNAを抽出し、それをテンプレートとしてnirSおよびnirK遺伝子の部分塩基配列のPCR增幅を試み、クローニングライブラリーを構築した後これらの遺伝子種の組成を解析することによって、生息域の異なる脱窒細菌群集構造を考察した。

## 実験方法

**試料の採取** 滋賀県守山市木原の琵琶湖南湖東岸のヨシ群落（Fig. 1）において、2007年および2008年の5月から7月にかけて複数回のサンプリングを行った。ヨシ群落の外側および内側に自生しているヨシを20本ほど無作為に選び、水に浸かっている部分（水中茎）を切除して湖水を充填したプラスチック容器（1.25 L）に入れた。ヨシ帯付近の石と堆積物はスコップ等を用いて採取し、スクリューカップ（200 ml）に入れて持ち帰った。湖水はヨシ帶でポリタンク（10 L）に充填し、いずれの試料も4°Cで保冷して実験室に持ち帰った。

**試料の前処理** 実験室に持ち帰ったヨシ茎は茎長、茎径および重量を計測したのち、ヨシ茎表面を歯ブラシでこすってバイオフィルム（BF）を採取した。石はのみを用いて表面を削り取り、得られた表面部分（Rock）の表面積と重量を測定したのち潜在脱窒活性

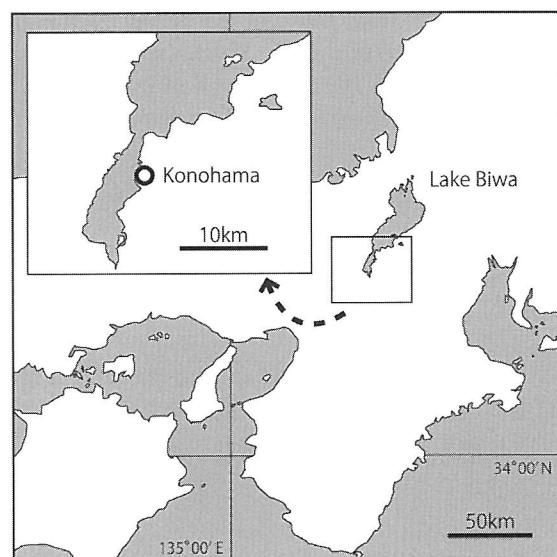


Fig. 1 Research site at Lake Biwa.

測定等の実験に供した。堆積物 (Sediment) と湖水 (LW) はそのまま潜在脱窒活性測定に供した。これらの前処理を行った試料は暗所、4°C 下で保存し、1週間以内に潜在脱窒活性測定に供した。

BF, Sediment および Rock の各試料の一部は -30°C で保存し、後日 DNA 抽出に供した。一方、LW は 3.0 μm 径の Nucleopore filter (Whatman) でろ過し、そのフィルターを 2 ml の NET buffer (400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) とともにハイブリッパックに封入したのち DNA 抽出用試料として -30°C で保存した (LW30)。さらにもろ液画分 (LW02) は 0.2 μm 径の Nucleopore filter でろ過し、同様にフィルターを保存した。

**潜在脱窒活性の測定** 潜在脱窒活性は窒素安定同位体 (<sup>15</sup>N) でラベルした脱窒反応基質 (Na<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>) を添加し、各試料を嫌気条件下で短時間培養することによって生成する <sup>30</sup>N<sub>2</sub> を経時的に定量することで測定した。各試料は 25 ml 容量のガラス製バイアル (GL sciences) に入れ、嫌気ボックス内であらかじめ Ar ガスでバージした Van De Graaf ら (1996) の改変無機培地 (NaHCO<sub>3</sub>, 600 mg; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27.2 mg; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 300 mg; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 180 mg; EDTA, 20 mg; FeSO<sub>4</sub>, 5 mg; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.43 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.24 mg; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.99 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.25 mg; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.22 mg; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.19 mg; NaSeO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O, 0.21 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 0.014 mg) を添加した後、密栓した。LW は Ar ガスでバージして無酸素化した後、同様に密栓した。さらに無酸素状態を担保するため、アスピレーターおよび無酸素ガス注入加圧装置を用いて排気と He ガスによるガス置換を繰り返し、最終的にバイアル内圧が 0.15 MPa となるよう加圧した。脱窒の反応基質として <sup>15</sup>N 標識 NaNO<sub>3</sub> (Na<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>) (<sup>15</sup>N atom% >99.99, 昭光通商) を 1 mM 添加した。一方、<sup>15</sup>N 標識 NH<sub>4</sub>Cl (<sup>15</sup>N NH<sub>4</sub>Cl) (<sup>15</sup>N atom% >99.99, 昭光通商) を硝化反応が生じていないコントロールとして 400 mM 添加した。

基質添加後、暗所、20°C とした低温恒温器内で培養した。経時的にプレッシャーロックシリングを用いてヘッドスペースガスを 100 ml 採取し、50 ml を四重極型 GC-MS (Agilent Technologies Inc. 6890 N/5973 N, GC/MSD) に導入した。インレット温度は 80°C、スプリット比は 50:1 に設定した。GC の分離カラムには外径 320 mm, 内径 5 mm, 長さ 25 m のキャピラリーカラム CP-PoraBONDQ (Varian Inc.)

を用い、オーブンの温度設定には 80°C で 1.3 分間固定の後、80°C/min で 100°C まで昇温し、100°C で 0.25 分固定する、計 1.8 分のプログラムを用いた。キャリアガスには高純度ヘリウムガス（純度 99.99995% 以上）を用い、ガス流量は 2.1 ml/min とした。また、MSD の温度は 250°C、スキャンを行う分子量の範囲は保持時間 1.08 分までは 27-34 m/z、それ以降は 29-47 m/z に設定した。重窒素標準ガス（昭光通商）を用いて検量線を作成し、それに基づいてサンプルガス中の <sup>30</sup>N<sub>2</sub> モル数を算出した。

20-80 時間培養し、5-10 時間毎にヘッドスペースガスを分析した。Bunsen の吸収係数を用いて、得られたガス中の <sup>30</sup>N<sub>2</sub> のモル数から懸濁液中の溶存ガス量を求め、バイアル内に存在する <sup>30</sup>N<sub>2</sub> の総モル数を算出した。さらに、添加した脱窒反応基質の <sup>15</sup>N 標識率に基づいて、脱窒によって生成した N<sub>2</sub> 量を算出し、その経時変化から潜在脱窒速度を求めた。

#### MPN法による従属栄養細菌および脱窒細菌の計数

各試料の従属栄養細菌数および脱窒細菌数を、LT+NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub> 液体培地を用いた MPN 法によって計数した。琵琶湖水を GF/F フィルターでろ過後、10 L のガラス容器に入れ、3 ヶ月以上暗所で静置して作製した熟成湖水 1 L を 0.2 μm 径のセルロースアセテートフィルターでろ過して細菌などを含む粒子を取り除き、そこに 5.0 g のトリプティカーゼペプトンと 0.5 g の酵母エキスを添加した液体培地 (LT 培地) に 0.3 g の NaNO<sub>3</sub> と 0.03 g の NaNO<sub>2</sub> を添加してこれを LT+NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub> 液体培地とした。13 mm × 150 mm のスクリューキャップ試験管に 5 ml ずつ分注した後、ダーラム管を転倒して各試験管に落とし込み、オートクレーブ滅菌後、ダーラム管内の空気を完全に除き、MPN 計数用培地とした。ヨシ茎表面の BF は歯ブラシを用いて採取し、ろ過熟成湖水 45 ml に懸濁し、石はそのままろ過熟成湖水 30 ml に懸濁した。堆積物は 1 g をろ過湖水 10 ml に懸濁した。各試料懸濁液 (原液、希釀段階 10<sup>-1</sup>) 1 ml を滅菌ずみのろ過熟成湖水 9 ml に添加後、よく攪拌することで 10 倍希釀 (希釀段階 10<sup>-2</sup>) とし、これを必要なだけ繰り返した。段階希釀した各試料を 0.1 ml ずつ 5 本の LT+NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub> 培地に接種し、20°C、暗所で静置培養した。一週間おきに目視によって、培地の濁り (濁度) の有無からを従属栄養細菌の増殖の有無を判断し、また脱窒活性の有無はダーラム管中の気泡の有無によって判断した。培養は三週間継続し、最終的に各試料の各希釀段階における従属栄養細菌および脱窒細菌の増殖が見られた試験管の本数から、MPN 値を求めた。MPN 値は自作

のコンピュータープログラムを用いて計算した。また、ダーラム管内に気泡の見られた試験管については、培養の一部（1 ml）を24穴マイクロプレート（ファルコン）に取り、GR試薬（グロースーロイミン試薬、和光純薬、大阪）を用いて、亜硝酸の消失を確認した。MPN法による細菌計数に用いた各試料の原液中の総細菌数はDAPI法により計数した。懸濁物などが多く、計数が困難な場合は、カラーチルドCCDカメラシステム（HAMAMATSU、C5810）を用いて画像を取得、保存し、その後コンピューター上で計数した。

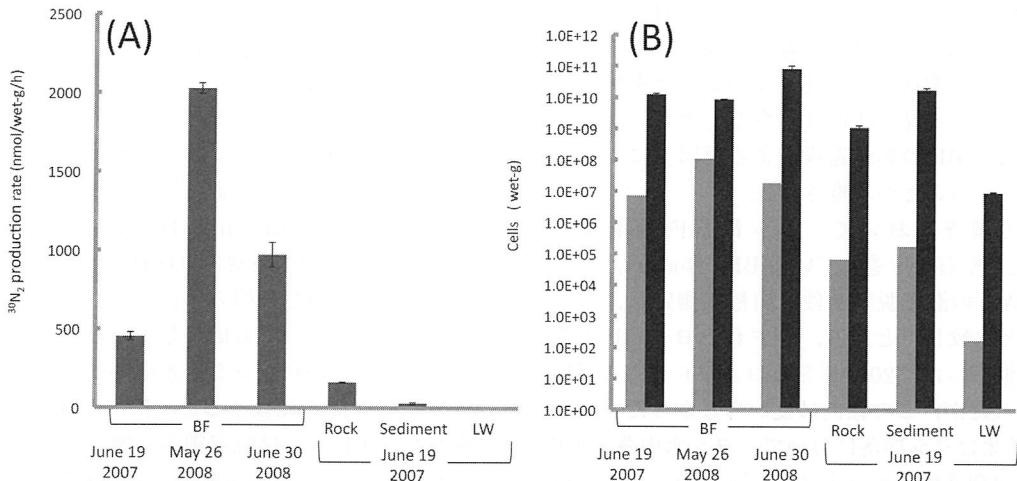
**DNA抽出とPCR** ヨシBFや石のBF、堆積物からISOIL for Beads Beating（ニッポンジーン）キットを用いて、添付のマニュアルに従い、全DNAを抽出した。いずれも50μlのTE bufferに溶解し-30℃で保存した。抽出したDNA試料について脱窒機能遺伝子（*nirS*および*nirK*）をコードしている塩基配列のPCR增幅を行った。用いたプライマーはそれぞれの遺伝子配列に関して特異的と考えられている（Braker *et al.*, 1998）*nirS* 1F-*nirS* 6Rおよび*nirK* 1F-*nirK* 5Rを用いた。また、嫌気的アンモニア酸化細菌（アナモックス細菌）の存在を確認するために、アナモックス細菌の16SrDNAに特異的なプライマーセット（Amano *et al.*, 2007）を用いてPCRを試みた。細菌の16SrDNAを標的としたPCRには27F-1392Rのプライマーセットを用いた。得られたPCR産物はWizard SV Gel and PCR Clean-Up System（Promega）を用いて精製した後、pGEM-T-Easyベクター（Promega）に結合後、*E. coli* INVaF'株（Invitrogen）に形質転換することで、クローンライブラリーを構築した。

**シーケンシングと系統解析** 各クローンライブラリーから、無作為に30クローン以上選び、インサートの塩基配列を決定した。シーケンシング作業はタカラバイオ株式会社 ドラゴンジェノミクスセンターに発注し、キャビラリー型DNAシーケンサ（3730xl, Applied Biosystems）および付属のベースコーラを用いて行われた。塩基配列を決定したクローンのうち、PCR反応の際に用いたプライマー配列を有さないクローンは以後の解析から除いた。また、得られた塩基配列をNCBI-BLAST 2.2.12に供して相同性検索を行い、対象の遺伝子断片（環境サンプルおよび真正細菌の*nirS*および*nirK*遺伝子、アナモックス細菌および真正細菌の16SrDNA）と明らかに異なる塩基配列も除いた。この後遺伝子解析ソフトのBioEdit 7.0.9を

用いて得られた遺伝子塩基配列を編集し、アミノ酸配列に変換した。この際、これまでに脱窒細菌分離株から得られたすべての*NirS*および*NirK*のアミノ酸配列に保存されており、これらの酵素の活性中心の構造に重要とされるHisを含んだ保存性の高い配列（*nirS*: HPEPRおよびLHDGG, *nirK*: HLIGGH）を含まないクローンに關しても以降の解析から除いた。得られた*nirS*および*nirK*様配列の塩基配列およびアミノ酸配列はDotur1.53を用いてOTU化した後、clustal X 1.8を用いてマルチプルアライメントを作成し、そこから挿入・欠失（ギャップ）部位を除いた後、近隣結合法によって系統樹を作成した。

## 結果

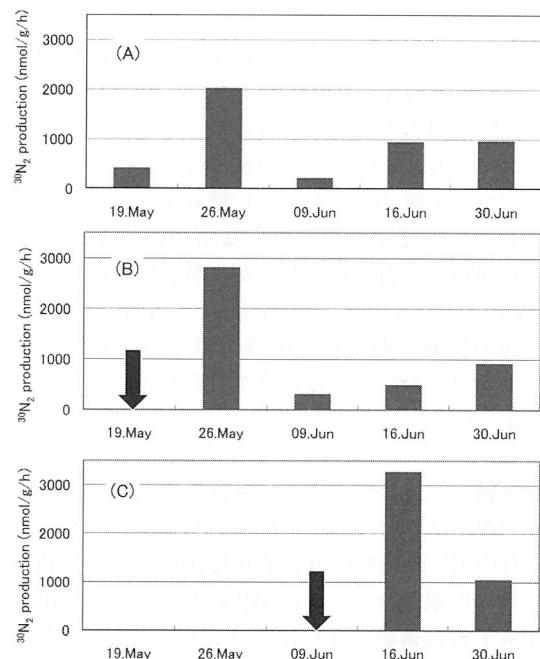
**潜在脱窒活性** これまでにNa<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>をトレーサーとして生成される<sup>30</sup>N<sub>2</sub>ガス量を定量することでヨシ水中茎に形成されるバイオフィルム（ヨシBF）の脱窒活性を推定した研究例はなく、本研究ではまず試料の調製法と活性測定条件の設定を行った。まず採取したヨシ茎を(i)そのまま、(ii)歯ブラシでかきとったBF(iii)GF/CフィルターでBFを採取し、そのGF/Cフィルターを細かく切断の三種の試料をバイアルに入れ、潜在脱窒活性を測定したところ、表面にBFを残したヨシの水中茎（OST）をそのまま試料とした場合(i)に最大の脱窒活性を検出できたことから、以降の実験ではintactのヨシ茎を潜在脱窒活性測定に供することとした。また、それぞれの試料によって培養系に持ち込まれたNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を定量したところ、全ての試料において非標識のNO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度は最大でも10μM程度であり、添加した脱窒基質（Na<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>）の1%程度でしかなかったため、本研究ではバイアル中の<sup>15</sup>N標識率は添加した試薬の標識率で近似した。この条件で嫌気培養した場合、少なくとも20時間以内はバイアル気相の<sup>30</sup>N<sub>2</sub>ガス量は直線的に増加したことから、本研究では20時間の培養の間に3点以上の測点をもうけて増加直線の傾きから<sup>30</sup>N<sub>2</sub>ガス生成速度を計算し、これを潜在脱窒活性とすることにした。一方、<sup>30</sup>N<sub>2</sub>ガスの蓄積が見られたintactのヨシ茎をオートクレーブ処理した場合には<sup>30</sup>N<sub>2</sub>ガスの蓄積は認められなかったことから、この<sup>30</sup>N<sub>2</sub>ガスの蓄積は脱窒細菌の活動によることが確認できた。また、同時に<sup>46</sup>N<sub>2</sub>O（脱窒による<sup>30</sup>N<sub>2</sub>生成の中間産物）を測定したところ、検出限界以下であったことから、ヨシBFにおける脱窒の最終産物は主としてN<sub>2</sub>であると考えた。さらに、コントロール区の<sup>14</sup>NH<sub>4</sub>Clを添加した実験区に非標識のNa<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>も添加し、<sup>28</sup>N<sub>2</sub>, <sup>29</sup>N<sub>2</sub>, <sup>30</sup>N<sub>2</sub>それぞれのアイソポトマーを定量し



**Fig. 2** (A) Potential denitrification rates ( $^{30}\text{N}_2$  production rates) and (B) abundances of total bacteria (light grey bars) and denitrifying bacteria (dark grey bars), in the biofilm formed on the submerged reed surface (BF), in the biofilm on rocks (Rock), in sediment and lake water (LW) at the reed community at Lake Biwa (Fig. 1). The total bacterial counts were determined with epifluorescent microscope after DAPI staining, and the cell numbers of denitrifying bacteria were estimated by a MPN method.

たところ、 $^{29}\text{N}_2$  と  $^{30}\text{N}_2$  の生成が見られなかったことから、この反応系では硝化やアナモックスは行われていないことが明らかになった。アナモックス細菌に関しては、選択的プライマーを用いた PCR (Amano *et al.*, 2007) によってもその存在は確認できなかったことから、ヨシ BF 内の窒素ガス生産にはアナモックス細菌は関与していないと考えられる。

2 年間の調査の結果、ヨシ BF 内には 1 g 湿重量あたり 200-3300 nmol N<sub>2</sub> を生成する脱窒活性が存在していることが明らかになった (Fig. 2)。またヨシ群落内の場所による潜在脱窒活性の違いは少なく、むしろ採取した季節が脱窒活性に影響していることも明らかになった。5 月に採取したヨシ BF からは比較的高い潜在脱窒活性が得られたのに対し、6 月に採取したヨシ BF の脱窒活性は比較的低く、これはヨシ BF の構造が季節により変化することを反映しているのではないかと考えた。この 5 月と 6 月の脱窒活性の違いが、季節に起因するものなのか、あるいは BF の形成プロセスに起因するものなのかを探るために、2008 年には人為的に BF を除去したヨシ試料群を用意し、BF が徐々に形成される過程で脱窒活性が変化するかどうか調べた。これは、ヨシは 5 月に地下茎から芽を出し、成長していくため、結果的にその水中茎に形成される BF は形成初期あるいは途上にある可能性が疑われたためである。その結果、時期を変えて二回にわたって BF を拭き取ったヨシでは、約一週後の比較的若い



**Fig. 3** Potential denitrification rates ( $^{30}\text{N}_2$  production rates) in the biofilm formed on the submerged reed surface, collected in 2008. (A) natural reed stem, (B) the reed stem from which biofilm was artificially removed on May 19, (C) the reed stem from which biofilm was artificially removed on June 9.

BF に高い潜在脱窒活性が見られることが明らかになった (Fig. 3)。まったく BF を除去しなかったヨシでも BF 内の潜在脱窒活性が変化していることを併せて考えると、BF 内の脱窒活性は、少なくとも「季節による要因」と「BF の形成過程による要因」によって影響を受けていることが示唆された。

2007年の調査において、ヨシ群落内の堆積物 (Sediment) や石に付着している BF (Rock)，そして湖水 (LW) の潜在脱窒活性を同様に測定し、ヨシ BF のそれと比較したところ、いずれもヨシ BF よりも明らかに低かった。2008年5月および6月にも同様の比較を行ったが、この傾向は変わらなかった (未発表)。この結果はヨシ群落において、ヨシ水中茎の BF が潜在的に脱窒活性のホットスポットになっている可能性を示唆する。今回得られた潜在脱窒活性は、これまでに測定されたヨシ BF の脱窒活性 (Seitzinger *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 2005) と同等かやや低い値であったが、これは測定法の違いに因るであろう。これまでの研究では脱窒活性はアセチレンを添加した嫌気下で培養し、アセチレンによって一連の脱窒関連酵素の中の  $N_2O$  還元酵素 (Nos) を阻害した結果生成する  $N_2O$  ガスを定量する方法 (アセチレンブロック法) で測定されている。この方法は我々が用いた  $^{15}N$  トレーサー法よりも感度が低く、また比較的長時間 (数日) の培養が必要であるうえ、メタノールなどの有機物を加えることで脱窒活性を促進している。つまり、やや過大評価につながる可能性がある。今回の実験でも、長期 (80時間以上) 培養すると、脱窒による  $^{30}N_2$  の生成速度がやや高くなる傾向があった。また、有機物を添加すると明らかに潜在脱窒活性の計算値は高くなった。今回の調査では、有機物を加えない短時間の培養で潜在脱窒活性を測定していることから、より現場の活性に近い値が得られたのではないかと考えられる。

**脱窒細菌** DAPI 法により直接計数したヨシ BF 内の総細菌数は  $5 \times 10^9 - 8 \times 10^{10}$  cells/g であった。この値は石の BF 内の総細菌数より約10倍高く、堆積物中のそれに匹敵した。一方、MPN 法によって算出した全従属栄養細菌数は  $2 \times 10^8 - 6 \times 10^9$  cells/g であり、総細菌数の 2–38% が活性を持つ細菌として計数できた。この値は石の BF や堆積物のそれと比較して数十倍高い値であり、ヨシ BF 内の従属栄養細菌が高い活性を維持していることを示唆する。また、全従属栄養細菌の 0.5–9% が脱窒細菌であり、この値も石の BF や堆積物のそれと比較して約10倍高い値であった。これらの結果は、ヨシ BF 内には高い活性を維持してい

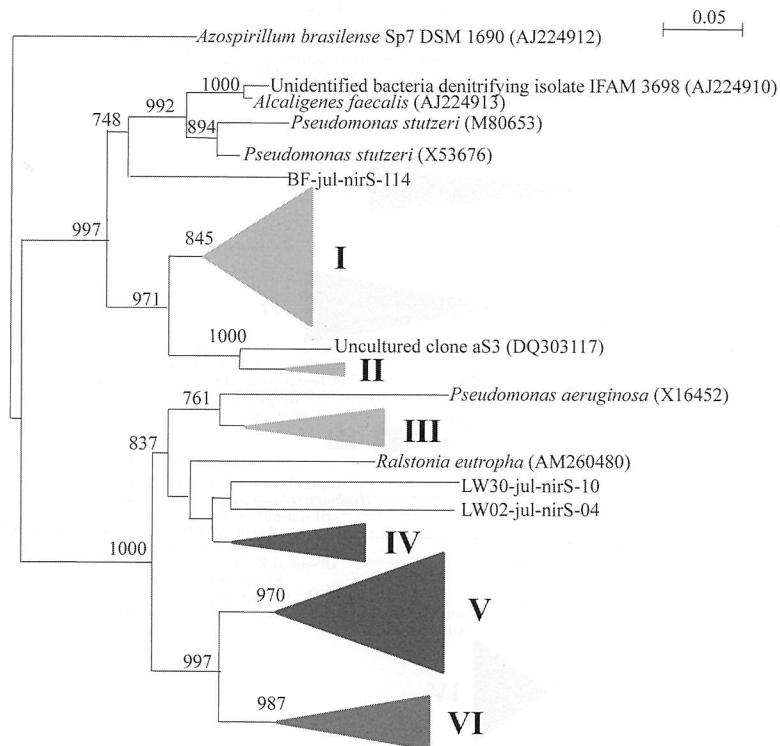
る脱窒細菌が集積していることを示す。しかし、上述したヨシ BF の潜在脱窒活性の高低と脱窒細菌計数値には明確な相関は見られなかった。おそらくこれは脱窒細菌計数値の誤差が大きく、脱窒活性の差異を説明するには精度が不十分であったからであろう。いずれにせよ、今回の調査を通してヨシの BF 内の全従属栄養細菌 (heterotroph, H) に占める脱窒細菌 (denitrifier, D) の割合 (D/H) は石の BF や堆積物のその値と比較して明らかに高かった。しかし同じヨシの水中茎であっても成長しているヨシの水中茎とヨシに散在する枯れたヨシの水中茎それぞれに形成される BF の D/H を比較すると、枯れたヨシの水中茎に形成された BF 内では脱窒細菌の割合が少ないことが明らかになった。今回の調査では充分な試料数が確保できていないため、より統計的にこの差異を解析することはできないが、成長しつつあるヨシや光合成をしている (枯れていない) ヨシには、脱窒細菌群集の生息場として好適な要因があることが考えられる。

**脱窒関連遺伝子 (*nirS*, *nirK*) による脱窒細菌群集の比較** これまでに分離されている脱窒細菌は 16SrDNA 情報による系統分類上きわめて多様な系統群に位置しており (Zumft, 1997)，16SrDNA を標的とした解析からは機能集団としての脱窒細菌の種組成を推定することはできない。そこで本研究では脱窒に関連する機能遺伝子に着目してヨシ BF 内の脱窒細菌群集構造を解析した。脱窒に関連する機能遺伝子群の中で亜硝酸還元酵素 (Nir) 構造遺伝子のデータベースは現在もっとも豊富であり、機能集団としての脱窒細菌の群集構造解析に利用可能である (Braker *et al.*, 1998)。Nir 構造遺伝子としては現在大きく *nirS* と *nirK* の 2 つが知られており、前者はチトクローム  $c_{d_1}$  タイプの Nir 構造遺伝子であり、後者は銅含有タイプの Nir 構造遺伝子である。これらは、構造が異なるだけで、その酵素の特性は変わらないと考えられており、現在知られている全ての細菌が *nirS* あるいは *nirK* のいずれか一方だけを有している (Braker *et al.*, 1998)。そのため *nirS* および *nirK* 遺伝子をターゲットとして PCR-クローンライブラー法を行うことによって環境中に存在する脱窒細菌のフローラを推測することが可能である。また、*nirS* および *nirK* は脱窒細菌の活性を推測する分子マーカーとしての機能も期待されており、これらの遺伝子を用いた定量的 PCR や RT-PCR, FISHなどを用いて脱窒細菌およびその活性をモニタリングした例もある (Smith *et al.*, 2007; Nogales *et al.*, 2002)。選択的 PCR の結果、今回の調査では二種類の亜硝酸レダクターゼ (cytochrome

*cd<sub>1</sub>* タイプと銅含有タイプ) の主要構造タンパク質の遺伝子である *nirS* および *nirK* のいずれもが検出できたため、それについて以下に記述する。

***nirS* 様遺伝子** *nirS* 1F-*nirS* 6R のプライマーセットを用いて選択的 PCR を行ったところ、2007年に採取したヨシ BF, 石 BF, 堆積物および湖水の粒子画分と浮遊細菌画分のいずれの試料からも標的の增幅産物長と予想される約 900 bp の遺伝子断片が確認された。これらの增幅産物のクローニングライブラリーから得られた塩基配列はいずれもデータベース中の *nirS* で保存され、活性発現に必要だと考えられるアミノ酸残基を持っており、またデータベース中の環境由来 *nirS* 遺伝子クローニングのいずれかと比較的類似した配列（アミノ酸配列相同性 80-99%）であった。これらの塩基配列および塩基配列から演繹されたアミノ酸配列のマルチプルアライメントを作成し、近隣結合法によって系統樹を作成した (Fig. 4)。その結果、本研究で得られた *nirS* 様配列は非常に多様で、また系統的に新規

な配列が多かった。これらは塩基配列およびアミノ酸配列による系統樹において、ともに高い bootstrap 値 (> 800) で支持される 6 つのクラスターに大別することができた。クラスター I には人工湿地から検出された *nirS* クローン (EF558473) や、活性汚泥から検出された *nirS* クローン (AB162299) などの様々な環境由来クローニングがこのクラスターに含まれていた。このクラスターには湖水由来のクローニングが特に多く検出されたものの、その他の試料由来のクローニングも含まれており、それらがモザイク状に位置していた。クラスター II は湿地帯の土壤から検出された *nirS* クローンと相同性が 90% と高く、このクラスターに含まれるクローニングはすべて湖水の粒子画分に由來した。クラスター III は人工湿地の *nirS* クローン (EF558478) やエスチュアリーの *nirS* クローン (DQ676108) と相同性が高く、様々な試料由来のクローニングがモザイク状に位置していた。ヨシ BF 由来の *nirS* クローンが特異的に多いクラスター IV はウラン鉱山の帶水層から得られた *nirS* クローン (EF177782) とクラスターを



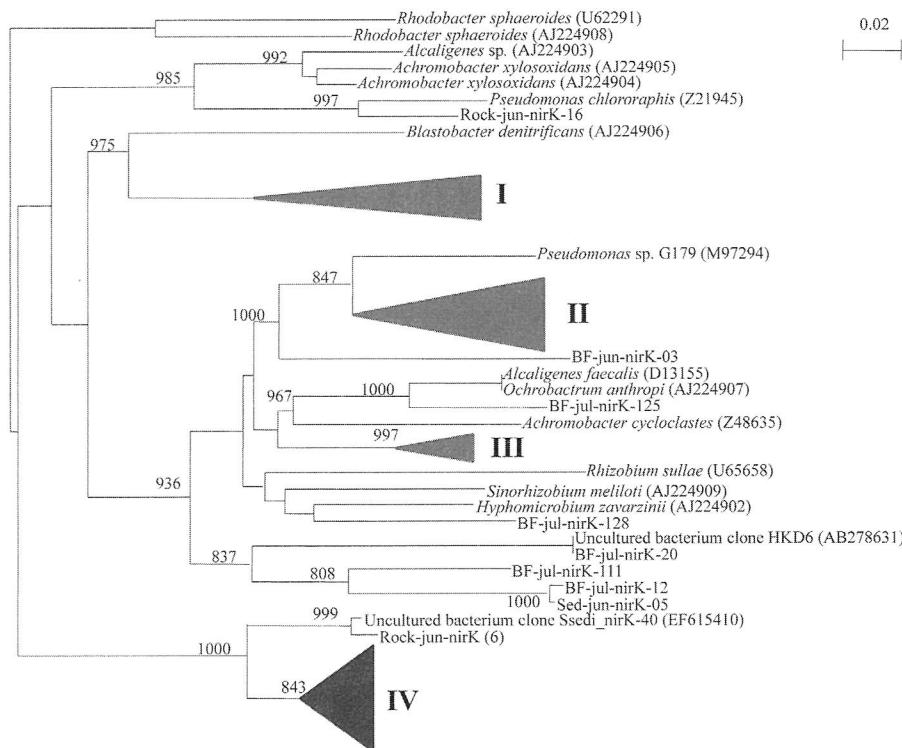
**Fig. 4** Phylogenetic relationship of *nirS*-like clones isolated from the biofilms on submerged reed surface (BF), the biofilms on rock (Rock), sediment (Sed), and the particle fraction (LW30) and free-floating fraction (LW02) of lake water. The phylogeny were inferred from the partial amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of fragments amplified by the selective PCR targeting *nirS*. Tentatively identified clusters (I to VI) are shown.

形成したもののそれらの相同性は80%程度であり、新規な遺伝子であると考えられた。多くのヨシBF由来のクローナンが含まれるクラスターVは、活性汚泥のnirSクローナン(AB162273)と相同性が高く、ヨシBFに特異的な脱窒細菌を反映する遺伝子クラスターであると推測した。クラスターVIはエスチュアリーのnirSクローナン(DQ676108)と最も相同性が高かったものの、80%程度であり、このクラスターに属する遺伝子クローナンもきわめて新規な配列であると考えられた。このクラスターには石表面のBF由来のnirSクローナンが多く含まれた。

各クラスター内の塩基配列の変異の多くは非同義置換であったことから、今回得られたnirS様配列は、偽遺伝子(pseudogene)化しておらず、実際に機能している遺伝子である可能性が強く示唆される。しかし、クラスターIおよびクラスターIIIは、クラスター内において非常に分岐が激しく、多様であることから実際の環境中で発現する機会は少なく、偽遺伝子へと移行しつつあるnirS様配列かもしれない。一方、

クラスターII、IV、V、VIに属するnirS様クローナンは各生息場(基盤)に特異的であり、分岐後の多様性は比較的低く、塩基配列およびアミノ酸配列としての保存性が高かった。このことは、これらのnirS様配列が、細菌にとって、それぞれが検出された環境(湖水中の懸濁粒子、ヨシBF、および岩の表面)で生存するために必要な遺伝子であり、また、これらがヨシ帶内における主要な脱窒反応の荷い手となっている可能性を示唆する。

**nirK様遺伝子** nirK 1F-nirK 5Rのプライマーセットを用いてPCRを行った結果、多くの試料からはnirK様配列クローナンが得られたのに対し、湖水からは全く増幅されなかった。このことは、nirKを持つ脱窒細菌が湖水中にはほとんど存在しておらず、したがってそれらが湖水を介して往来せずに、局所的に生息していることを示唆する。nirK様遺伝子クローナンのアミノ酸配列から系統解析したところ、データベースには存在しない新規な配列が多く見られた(Fig. 5)。今回



**Fig. 5** Phylogenetic relationship of nirK-like clones isolated from the biofilms on submerged reed surface (BF), the biofilms on rock (Rock), sediment (Sed) and the particle fraction (LW30) and free-floating fraction (LW02) of lake water. The phylogeny was inferred from the partial amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of fragments amplified by the selective PCR targeting nirK. Tentatively identified clusters (I to VI) are shown.

得られたすべての *nirK* 様配列も高い bootstrap 値 (> 800) で支持される特異な 4 つのクラスターに大別することができた。クラスター I に含まれるクローンは温帯土壤から検出された *nirK* クローン (AY249357) とアミノ酸配列における相同意が 89% と高く、大部分がヨシ BF 由来であった。湖水から検出された *nirK* クローン (EF615314) と相同意が高いクラスター II と農地由来の *nirK* クローン (DQ304147) と比較的相同意 (80%) なクラスター III は全てヨシ BF 由来であった。一方、クラスター IV は堆積物および岩の表面由来のクローンが大部分を占めており、得られた 48 クローンのうち 22 クローンが堆積物由来、21 クローンが岩表面の BF 由来であった。いずれのクラスターもその内部の多様性は低く、4 つのクラスターがそれぞれ生息場に特異的であった。このことから、*nirK* 遺伝子を有する脱窒細菌はそれぞれの生息場に良く適応しており、湖水を介して行き来をせずにそれぞれの生息場と強く結びついているのではないかという仮説を新たに提唱できるかもしれない。

## 要 約

ヨシ群落における窒素除去の場として、ヨシ水中茎に形成されるバイオフィルム (ヨシ BF) が重要であるという仮説のもとに、<sup>15</sup>N トレーサー法によって潜在脱窒活性を測定するとともに MPN 法によって脱窒細菌を計数した。その結果、ヨシ BF の潜在脱窒活性は周辺の石表面に形成される BF や堆積物のそれと比較して高く、また全細菌数あたりあるいは全従属栄養細菌数あたりの脱窒細菌数の割合も高いことが明らかになった。この結果から、高濃度の硝酸塩が蓄積し、還元物質としての有機物も豊富なヨシ水中茎の BF 環境が、水圈から窒素を除去する脱窒細菌群集にとって好適な「脱窒ホットスポット」になっている可能性が強く示唆された。また、この潜在脱窒細菌は季節により、また形成される BF の古さ (新しさ) により変動することがわかった。脱窒関連遺伝子のひとつである亜硝酸還元酵素の構造遺伝子、*nirS* と *nirK*、を用いて脱窒細菌群集の種組成を推測したところ、ヨシ BF にはこれまでには知られていたに新規な脱窒関連遺伝子を持つユニークな細菌群集が主要なメンバーとして存在していることが明らかになった。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- Yoshinaga, I., Nakamura, T., Amano, T., & Sako, Y.

(2008). Population analysis of denitrifiers inhabit the biofilm on submerged reed surface through molecular biological protocol targeting denitrifying genes, *nirS* and *nirK*. 5th International Conference Interfaces Against Pollution 2008. Kyoto.

- Nakamura, T., Amano, T., Yamagishi, T., Suwa, Y., Sako, Y., & Yoshinaga, I. (2008). Denitrification in the biofilm developed on submerged reed surface. 5th International Conference Interfaces Against Pollution 2008. Kyoto.
- 中村隆久、天野皓己、諏訪裕一、山岸昂夫、左子芳彦、吉永郁生 (2008)。ヨシの水中茎表面のバイオフィルムに形成される脱窒ホットスポット。第24回日本微生物生態学会 (札幌)。
- 吉永郁生、中村隆久 (2008)。水圈環境の脱窒 hotspot としてのバイオフィルム。第24回日本微生物生態学会 (札幌)。

## 保存機関に寄託した菌株

ヨシ BF 由来の脱窒細菌 22 株 : NBRC に登録準備中

## 謝 詞

本研究に対し、3 年間助成していただいた財團法人発酵研究所に感謝申し上げます。また、脱窒活性測定に際し、多くの助言をいただいた産業技術総合研究所の諏訪裕一博士（現中央大学理工学部教授）ならびに山岸昂夫氏に心より御礼申し上げます。また、琵琶湖におけるヨシ帯の調査に際していろいろな便宜をお図りくださいました、滋賀大学環境総合研究センター中村正久教授、ならびに財團法人琵琶湖・淀川水質保全機構の北澤賢治 BIYO センター所長と和田桂子主任研究員に感謝申し上げます。本研究は京都大学農学部資源生物科学科ならびに農学研究科応用生物科学専攻の学生である中村隆久氏、天野皓己氏、前田知巳氏の協力のもとで行われました。

## 文 献

- Amano, T., Yoshinaga, I., Okada, K., Yamagishi, T., Ueda, S., Obuchi, A., Sako, Y. & Suwa, Y. (2007). Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. *Microb. Environ.* **22**: 232-242.
- Braker, G., Fesefeldt, A. & Witzel, K.P. (1998). Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3769-3775.
- Christensen, P.B., Nielsen, L.P., Sørensen, J. & Revsbech,

- N.P. (1990). Denitrification in nitrate-rich streams: diurnal and seasonal variation related to benthic oxygen metabolism. Limnol. Oceanogr. **35**: 640-651.
- De Beer, D., Schramm, A., Santegoeds, C.M. & Kühl, M. (1997). A nitrite microsensor for profiling environmental biofilms. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 973-977.
- Gale, P.M., Dévai, J., Reddy, K.R. & Graetz, D.A. (1993). Denitrification potential of soils from constructed and natural wetlands. Ecol. Engin. **2**: 119-130.
- Hiraki, A., Tsuchiya, Y., Fukuda, Y., Yamamoto, T., Kurniawan, A., & Morisaki, H. (2009). Analysis of how a biofilm forms on the surface of the aquatic macrophyte *Phragmites australis*. Microb. Environ. **24**: 265-272.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. Microbiol. Rev. **46**: 43-70.
- Nogales, B., Timmis, K.N., Nedwell, D.B. & Osborn, A.M. (2002). Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 5017-5025.
- Seitzinger, S.P., Nielsen, L.P., Caffrey, J., & Christensen, P.B. (1993). Denitrification measurements in aquatic sediments: a comparison of the three methods. Biogeochemist. **23**: 147-167.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F. & Osborn, A.M. (2007). Diversity and abundance of nitrate reductase genes (narG and napA), Nitrite Reductase Genes (*nirS* and *nrfA*), and Their Transcripts in Estuarine Sediments. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 3612-3622.
- Triska, F.J. & Oremland, R.S. (1981). Denitrification associated with periphyton communities. Appl. Environ. Microbiol. **42**: 45-748.
- Toet, S., Huibers, L.H.F.A., Van Logtestijn, R.S.P. & Verhoeven, J.T.A. (2003). Denitrification in the periphyton associated with plant shoots and in the sediment of a wetland system supplied with sewage treatment plant effluent. Hydrobiologia **501**: 29-44.
- Tsuchiya, Y., Ikenaga, M., Kurniawan, A., Hiraki, A., Arakawa, T., Kusakabe, R. & Morisaki, H. (2009). Nutrient-rich microhabitats within biofilms are synchronized with the external environment. Microb. Environ. **24**: 43-51.
- Van De Graaf, A.A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. & Kuenen, J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. Microbiology **142**: 2187-2196.
- Yamamoto, M., Murai, H., Takeda, A., Okunishi, S. & Morisaki, H. (2005). Bacterial flora of the biofilm formed on the submerged surface of the reed *Phragmites australis*. Microb. Environ. **20**: 14-24.
- Zumft W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 533-616.

## 琵琶湖におけるヨシ付着藻類の群落構造

-二次遷移と水質の影響に着目して-

大塚 泰介

滋賀県立琵琶湖博物館

〒525-0001 滋賀県草津市下物町1091

Epiphytic algal community structure on the stem of *Phragmites australis* in Lake Biwa, with special references to the secondary succession and effects of water quality

Taisuke Ohtsuka

Lake Biwa Museum

1091 Oroshimo, Kusatsu-shi Shiga-ken 525-0001, Japan

We studied the community structure of epiphytic algae that form biofilm architecture, with special references to the secondary succession. Experiments took place in a reed community of Lake Biwa's Southern Basin from May to July 2007 and from May to June 2008. After biofilm was wiped off the reed stem, the population of the tube-dwelling diatom *Encyonema* and/or the chain-forming diatom *Staurosira* rapidly increased, and after 7-10 days, the algal abundance recovered to about half of what it was before wiping. In the meantime, understory algae recovered only slightly, and thus the algal community had gaps near the stem surface. The algal abundance became almost the same as that in the untreated stems after 21 days, and the understory algae such as *Achnanthidium* also recovered. After June, the community architecture became thin and flat on both wiped and untreated stems, with massive abiotic debris in/on it. Using principal component analysis we separated the temporal changes into two components, interpreted as secondary succession and seasonal change, respectively. Relationships between diatom assemblages and water quality of Lake Biwa's satellite lakes were examined by using canonical correspondence analysis. The first axis was constituted mainly of electric conductivity and PO<sub>4</sub>-P, suggesting that anthropogenic eutrophication chiefly affected the diatom species composition.

Key words: biofilm, community structure, epiphytic diatoms, *Phragmites australis*, secondary succession

### 緒 言

バイオフィルム (BF; 生物膜) は菌膜とも呼ばれるが、実際には細菌だけからなるのではなく、様々な微小生物 (藻類・細菌・菌類・原生動物など)、微小生物が分泌した粘質、および微小な鉱物・デトリタスなどからなる。有光環境下で発達した BF の立体構造は、主に藻類によって形作られていることが多い。BF を構成する藻類、特に珪藻は、分類群によって様々な生活型をとる (Fig. 1)。そのため、よく発達した BF

は、基質密着型の藻類が形成する基層、多種の藻類を含む粘質層、糸状藻類や長い柄をもつ藻類が形成する林冠 (canopy) からなる階層構造を示すことがある (Ohtsuka, 1999)。

BF の骨格をなす藻類は、BF 周辺の微小環境に時空間的な不均一性をもたらすことになる。Nakano *et al.* (2006) は、屋外水路に設置したタイル上に BF を発達させ、その近傍の溶存酸素濃度の鉛直プロファイルを調べた。すると溶存酸素濃度は BF の内部に入ったところで一旦上昇し、タイルの直上で急減した。しかし、スライドグラス上に発達したより薄い BF 上では、溶存酸素濃度はスライドグラス表面付近で急増したのみで、付着基物近傍での溶存酸素濃度の減少は見

られなかった。この研究では、いずれも日中に測定を行っている。夜間には光合成が停止するため、BF 内部では酸素が減少していたと思われる。こうした溶存酸素濃度の時空間的不均一は、BF を構成する藻類の光合成活性の影響を受けると考えられる。Underwood (2005) は BF の光合成活性に影響を及ぼす要因として、BF を構成する付着珪藻の種組成によるふるまい（運動性、生活型など；Fig. 1）や生理の違いを挙げている。このように、藻類がつくりだす BF の構造は溶存酸素濃度の時空間的不均一性に影響を及ぼし、さらには他の微生物、特に脱窒細菌など通性嫌気性細菌の活性に大きな影響を及ぼすことが予想される。

*Phragmites australis* (ヨシ)を中心とする抽水植物群落は、しばしば水質浄化の場として期待されており（例えば鈴木・琵琶湖環境県訴訟弁護団, 1988），その効果も実験系で実証してきた（例えば Wathugala et al., 1987）。しかしヨシは自らが利用する栄養塩のほとんどを底泥中から吸収するため、水質浄化機能を担っているのは主としてヨシの水中部や堆積物上の BF であると考えられる。BF によって吸収された栄養塩は、粒子状有機物として、最終的にはヨ

シ群落とその周辺に沈殿したり、動物に利用されたりすることによって、水中から除かれることになる。

ヨシ群落におけるもう 1 つの栄養塩除去の経路として、ヨシの茎の水中部表面で盛んに行われている脱窒が注目されつつある (Toet et al., 2003; Yamamoto et al., 2005)。一方、沈水植物表面では脱窒はほとんど起こらないとされている (Eriksson & Weisner, 1999; Toet et al., 2003)。この違いを生じる理由として、ヨシの方が沈水植物よりも付着基盤としての安定性が高いために、厚い BF が発達しやすく、その内部に脱窒に適した嫌気的な環境が形成されやすいと考えられる。

ヨシの茎の水中部表面で BF を構成する付着藻類について、これまでにも少なからず研究されてきた。琵琶湖では、Kusakabe (1988) が、ヨシ上に発達した付着藻類群落を 2 年間にわたって調べ、生ヨシ上では 6~10 月に付着藻類の著しい衰退が見られたのに対して、枯ヨシ上では衰退が顕著でなかったことを示している。

一方、ヨシ茎上に発達する付着藻類群落の構造が、どのような環境要因の影響を受けるかについては、必ずしも明らかになっていない。ヨシ茎上の BF を構成する藻類のうち、最も普遍的に出現するのは珪藻である。河川や湖沼の礫表生珪藻群落については、環境条件、特に水質によって大きく変化することが知られている（渡辺ら, 2005）。ヨシの茎上の付着珪藻群落も十分な水質指標性をもち (Stenger-Kovács et al., 2007)，したがって水質によって群落構造が変化することは確かである。しかしその知見は、礫表生珪藻群落のそれに比べるとたいへんに乏しい。珪藻の種組成には地域による違いがあるので、ヨシ茎上の BF の立体構造に対する水質の影響を論じるためにには、地域ごとにデータを蓄積する必要がある。

本研究では、様々な微生物活性との対応関係を検討する材料とするために、BF を構成する珪藻群落の種組成、現存量、および立体構造の二次遷移および季節的变化を調べた。また、琵琶湖内湖の付着珪藻試料と水質との関係を検討し、水質がヨシ茎上の珪藻群落の構造に及ぼす影響を考察した。

## 実験方法

BF を構成する付着藻類の二次遷移 滋賀県守山市木浜の琵琶南湖岸のヨシ群落 ( $35^{\circ}05'27''N$ ,  $135^{\circ}56'24''E$ ) で実験を行った。このヨシ群落は、琵琶湖総合開発で建設された湖岸堤の前面に再生されたもので、群落前面を石垣とフェンスで囲われている。

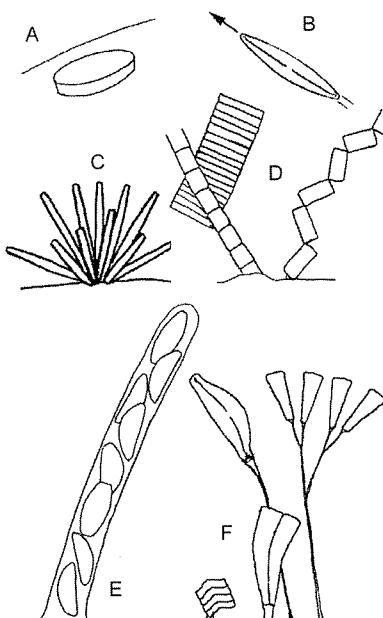


Fig. 1 Life forms of epiphytic diatoms. A: adnate, sessile (e.g. *Achnanthidium*, *Cocconeis*). B: adnate, motile (e.g. *Navicula*, *Nitzschia*). C: rosette-forming (e.g. *Eunotia*, *Fragilaria*). D: chain-forming (e.g. *Eunotia*, *Melosira*, *Staurosira*). E: tube-dwelling (e.g. *Encyonema*). F: stalked (e.g. *Achnanthidium*, *Cymbella*, *Gomphonema*, *Rhoicosphenia*).

2007年5月19日から7月17日まで、1年目の実験を行った。5月19日に、ヨシ群落の前面付近で、当年に新しく伸びた生ヨシの茎を採集した。続いて複数の生ヨシを選んで、茎上のBFをスポンジダワシでよく拭き取り、後に採集するために目印をつけた。そして、拭き取りから3日目（5月22日）、10日目（5月29日）、17日目（6月5日）、31日目（6月19日）、59日目（7月17日）に、それぞれ目印のついた茎を数本ずつ採集した。

2008年5月19日から6月30日まで、2年目の実験を行った。実験開始日（5月19日）、7日目（5月26日）、21日目（6月9日）、28日目（6月16日）、42日目（6月30日）に、当年に新しく伸びた生ヨシの茎を採集し、非処理試料とした。5月19日に前年と同様の方法でBFを拭き取ったヨシ茎を、非処理試料と同日に採集して、前期処理試料とした。6月9日にも新たにBFの拭き取りを行い、当日（6月9日）、7日目（6月16日）、21日目（6月30日）に採集して、後期処理試料とした。さらに5月19日と6月16日には、比較のために前年のシート（枯ヨシ）の茎からも試料を採集した。

採集した茎のうち一部は、走査電子顕微鏡観察(SEM)用の試料として、BFが容器に接触しないように水中で保持し、直ちに実験室へ持ち帰った。残りの茎を、硼砂で中性化した1%パラホルムアルデヒド水溶液によって固定し、藻類の現存量及び種組成の評価用とした。

実験室に戻って直ちに、SEM用の試料にグルタルアルデヒド（最終濃度7%）を加え、30分以上静置して固定した後、冷蔵庫内で保存した。観察に先だって、エタノール濃度が75%，85%，95%，99%以上となるように4段階に分けて100%エタノールを加え、それぞれの段階で20分静置して、徐々に脱水を行った。続いて100%t-ブタノールを2回に分けて加え、それぞれ30分静置して、エタノールからt-ブタノールへ置換した。置換の完了した試料を冷凍庫で凍結させた後、凍結乾燥機（Eyela FDU-830）で24時間乾燥させた。両刃剃刀で付着藻類群落をヨシの茎ごと切断して群落の断片を作り、アルミ製の試料台に両面テープで固定した。観察の直前にイオンスパッタコーティングを30秒行い、加速電圧15kVで低真空走査型電子顕微鏡による観察を行った。

藻類の現存量及び種組成の評価用試料については、まず実験室で歯ブラシを用いてヨシ茎表面のBFをこすり落とし、100mlポリビンに回収した。続いてノギスでヨシ茎の長さと直径を測定し、円柱近似により表面積を概算した。そして、BF懸濁物の試料が、ヨシ

茎の表面積1cm<sup>2</sup>あたり1mlに懸濁されるように、1%中性ホルムアルデヒド溶液を加えて調整した。

付着藻類群落の量的評価は被度指数（cover index）によって行った（Ohtsuka, 1999）。被度指数は付着藻類細胞の投影面積を付着基板面積で割った値である。被度指数は付着藻類群落の立体構造の指標になる。すなわち、群落の被度指数が0～1の範囲では藻類が付着基板表面を覆いつくしていない。一方、被度指数が1以上では必然的に、付着藻類どうしが重なりをもつ立体的な群落構造を形成していることになる。藻類各種および群落の被度指数を次の方法で評価した。まず、ヨシ茎の表面積1cm<sup>2</sup>あたり1mlに調整されたBF試料を、深さ1mmのプランクトン計数板（Matsunami MPC-200）に流し込み、倒立顕微鏡（Olympus IX70）を使用して×400の倍率で観察し、属レベルで同定した。続いて、10×10方眼（121格子目）の接眼ミクロメーターを用いて、直下に藻類細胞がある格子目数をその属ごとに計数し、視野を変えながら藻類がある格子目の総カウント数が概ね200になるまで繰り返した。ただし観察視野数が400を超えるてもカウント数が200に達しなかった場合には、その時点で計数を打ち切った。そして藻類各属について、その属が下にあった格子目数の、観察した全格子目数に対する比を求めた。この観察では、元のヨシ茎に付着していた藻類が、プランクトン計数版上で10倍に広げられていることになるので、この比の10倍が藻類各属の被度指数となる。そして、その全属にわたる合計が群落の被度指数である。

続いて、残ったBF懸濁試料の一部から、珪殼の永久プレパラートを作成した。まず試料をよく攪拌して全体の約2割を試験管にとり、約8mlに濃縮した。これに約2mlの濃塩酸を加えて加熱し、石灰質を溶解した後に、蒸留水で繰り返し洗浄した。続いて試料を濃硫酸中で加熱し、十分に炭化させた後、硝酸カリウムを加えて有機物を完全に酸化分解した。これを再び蒸留水で繰り返し洗浄して珪殼の洗浄標本を得た。珪殼の洗浄標本の一部を、プレウラックスで封入して永久プレパラートとした。

永久プレパラートに含まれる珪殼を、生物顕微鏡（Olympus BX 60）で、100倍の油浸対物レンズを用いて観察した。各試料それぞれ200殼を同定・計数し、それぞれの種の相対頻度を算出した。

2008年の実験で得られた珪藻の種組成について、主成分分析(PCA)によって、処理による違いと経時変化を図化した。ソフトウェアとしてCANOCO for Windows 4.5 (ter Braak & Šmilauer, 2002) を用い、相対頻度が平均0.5%以上の種のみを対象とし

て、平方根変換した相対頻度データの分散共分散行列に基づいて分析を行った。

内湖の水質がヨシ付着珪藻群落に及ぼす影響の検討  
琵琶湖博物館所蔵のヨシ付着珪藻群落のサンプルと、同時期に得られた水質のデータを用いて、内湖の水質がヨシ付着珪藻群落に及ぼす影響を検討した。

ヨシ付着珪藻のサンプルは、滋賀県琵琶湖研究所（当時）の巖靖子氏が、琵琶湖の21の内湖から採集し、琵琶湖博物館に提供したものを用いた。この試料は2003年5月21日から26日までの間に、生きたヨシの水没した茎表面から採集された。この試料から、前項で述べたのと同じ方法で珪殻の永久プレパラートを作成し、そこに含まれる200殻を同定・計数して、それぞれの種の相対頻度を算出した。

珪藻の種組成と水質との対応関係を調べるために、同じ内湖で、滋賀県立大学（当時）の石川雅量氏が5月13日から16日までの間に測定した水質データを用いた。測定された項目は、透視度、クロロフィルa濃度、水温、pH、電気伝導率(EC)、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P、溶存反応性珪素(SRSi)である。

珪藻の種組成と水質との関係を図化するために、正準対応分析(CCA)による分析を行った。ソフトウェアとしてCANOCO for Windows 4.5(ter Braak & Šmilauer, 2002)を用い、相対頻度が平均0.5%以上の種のみを対象として分析を行った。また、珪藻群落に有意な影響を及ぼしていたと考えられる水質項目を説明変数として選び出すために、モンテカルロ法(9999回の試行)に基づいた変数増加法により変数選択を行った。この際、サンプルサイズが小さいことを考慮し

て、 $p<0.1$ で有意な説明変数を選択した。

## 結 果

BFを構成する付着藻類の二次遷移(1年目)  
2007年5月19日の実験開始時、ヨシの茎の上では密着型の珪藻 *Cocconeis* および丈の低い *Achnanthidium* が優占していた。しかし、随所に叢生型の *Fragilaria*、鎖状群体をつくる *Staurosira*、チューブの中にすむ *Encyonema*、柄を伸ばす *Gomphonema*などの珪藻も見られ、SEM観察では全体として立体的な群落を形成していた(Table 1; Fig. 2A)。ただし被度指数は0.25で、茎表面の全てが藻類に覆われていたのではなかった(Fig. 3)。

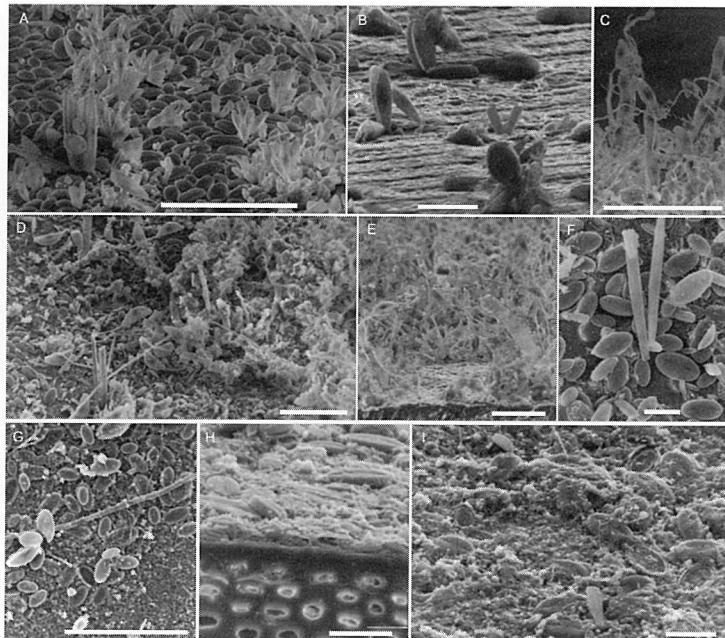
付着藻類拭き取りから3日後の被度指数は0.02で、拭き取り前の1/10以下であった(Fig. 3)。しかし *Encyonema*や、柄をつくる *Cymbella*、*Gomphonema*、*Gomphoneis*などの珪藻がパッチ上に生育しており、SEM観察では部分的には高さがある群落を形成していた(Table 1; Fig. 2B, C)。

10日後には、被度指数は0.17まで回復し、量的には拭き取り前に近いレベルまで回復した(Fig. 3)。*Encyonema*、*Cymbella*、および柄を形成する *Gomphoneis*などが拭き取り前よりも多くなった一方で、拭き取り前に優占していた *Cocconeis* および *Achnanthidium* がたいへん少なく、やはり拭き取り前に多かった密着型の緑藻 *Protoderma* が見られないなど、密着型あるいは短い叢生型の藻類が少ない傾向が見られた(Table 1)。他については拭き取り前と似た種組成になっていた(Fig. 2D)。

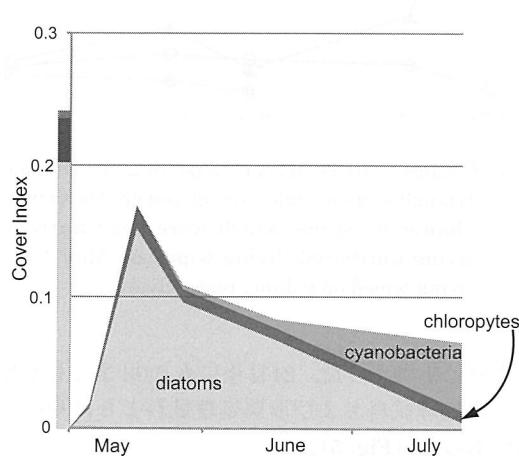
Table 1 Changes in species composition of epiphytic diatoms after wiping biofilm off the reed stem. Relative frequencies of abundant taxa more than 5% in any sample are shown.

date	19-May	22-May	29-May	5-Jun	19-Jun	17-Jul
elapsed days	0*	3	10	17	31	59
<i>Achnanthidium minutissimum</i>	30.5	2.5	3.5	10.0	22.5	10.5
<i>Aulacoseira granulata</i>						6.5
<i>Cocconeis euglypta</i>	22.5	2.0	1.5	10.5	31.0	9.5
<i>Cocconeis placentula</i>	2.5	1.0	0.5	0.5	1.5	8.5
<i>Encyonema simile</i>	1.5	24.0	13.5	12.0	1.0	6.5
<i>Encyonema caespitosum</i>	4.0	2.0	12.0	8.0	2.0	1.5
<i>Fragilaria vaucheriae</i>	1.0	5.5	12.0	3.0	1.0	2.0
<i>Fragilaria perminuta</i>		8.5	5.5	1.5		3.5
<i>Gomphoneis heterominuta</i>		13.5	9.5	6.5	1.5	0.5
<i>Gomphonema pumilum</i>	16.0	7.0	1.0	14.5	23.5	3.5
<i>Nitzschia fonticola</i>	3.5	4.5	6.0	13.0	3.0	1.0
<i>Punctastriata linearis</i>		2.0	5.5	3.0	2.5	6.0
<i>Staurosira venter</i> var. <i>binodis</i>	6.0	1.0	16.5	2.0	5.5	15.0
Others	12.5	26.5	13.0	15.5	5.0	25.5

\*before wiping



**Fig. 2** Change in epiphytic algal community architecture observed using SEM in 2007. A: the untreated biofilm just before wiping off (19 May); an adnate diatom, *Cocconeis* is dominant, and stalked diatoms were also abundant. B, C: three days after wiping the biofilm off (22 May); diatoms were usually scattered, but partly tube-dwelling diatom *Encyonema* gathered. D: 10 days after (29 May); stalked and tube-dwelling diatoms became more abundant than before the wiping, while adnate forms were not recovered enough. E, F: 17 days after (5 June); stalked and tube-dwelling diatoms were still dominant, but adnate ones also recovered. G, H: 31 days after (19 June); the community architecture dominated by *Cocconeis* were flat, and the top was mainly occupied by abiotic fouling. I: 59 days after (17 July); coccoid cyanobacteria became dominant, but they were not visible probably because they were buried in thick abiotic fouling. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  except for B, F, D, H (= 20  $\mu\text{m}$ ).

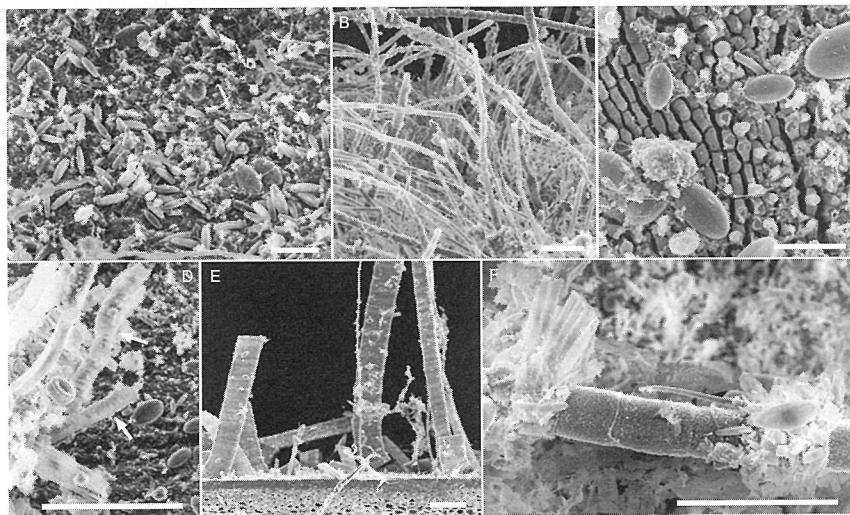


**Fig. 3** Change in cover indices of three algal groups after wiping biofilm off in 2007. The column shows those of untreated biofilm just before wiping off (19 May).

17日後には被度指数が0.11と、10日目よりやや減少した（Fig. 3）。ただし、*Cocconeis*および*Achnanthidium*はむしろ量的に回復する傾向が見られた（Table 1; Fig. 2E, F）。

31日後には被度指数が0.08まで減少し（Fig. 3）、再び*Cocconeis*が優占する群落となった（Table 1）。SEM観察ではこの頃から、珪藻の上面や周辺に、非生物性の付着物が多く見られるようになった（Fig. 2G, H）。

59日後の被度指数は0.07で、31日後とあまり違いがなかった。しかし藻類の種組成には大きな変化が見られた。珪藻は全体的に減少し、*Xenococcus*とみられる球形藍藻が優占するようになった（Fig. 3）。SEM観察では、BFの上を非生物性の付着物が一面に覆っており、上面からは藻類をほとんど観察できなかった（Fig. 2I）。



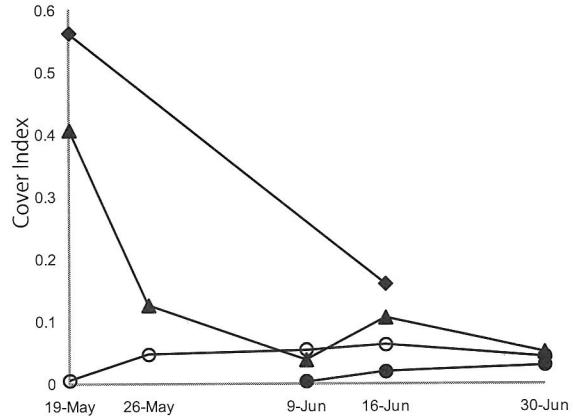
**Fig. 4** Epiphytic algal community architecture observed using SEM in 2008. A: dominance of *Achnanthidium minutissimum* complex (19 May, untreated live stem). B: bristling *Oedogonium* (19 May, untreated live stem). C: *Cocconeis* on *Protoderma* (19 May, untreated live stem). D: chain-forming *Staurosira* (arrows; 26 May, stem wiped a week ago). E: uprising ribbon-like colonies of *Eunotia formica* (16 June, stem wiped four weeks ago). F: diatoms attached to *Oedogonium* on dead reed stem (19 May). Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  except for A and C (= 20  $\mu\text{m}$ ).

#### BF を構成する付着藻類の二次遷移（2年目）

2008年5月19日の実験開始時、非処理の生ヨシ上での藻類の被度指数は0.41と、比較的高い値を示した。被度指数の63%を珪藻が占めており、最も多く見られたのは *Achnanthidium* であった (Fig. 4A)。他に *Protoderma* や糸状緑藻 *Oedogonium* なども多く見られた (Fig. 4B, C)。しかし、7日目には被度指数は0.13まで低下し、その後は0.1程度かそれ以下を推移した (Fig. 5)。

5月19日にBFの拭き取りを行った前期処理試料では、拭き取りの直後に既に *Staurosira*を中心とした藻類の付着が見られたが、被度指数は0.005とたいへん小さかった。7日後に被度指数は0.05まで増加し、その後もほぼ同程度の値で推移した (Fig. 4D)。7日目の時点では前期処理試料は未処理試料の半分以下の被度指数だった。しかし、21日目以降、未処理試料の藻類が減少したことにより、両者はほぼ同じ被度指数で推移した (Fig. 5)。6月には、2007年の二次遷移過程ではほとんど出現しなかった *Eunotia formica* が増加し、鎖状群体を形成して上方に長く伸びるのが観察された (Fig. 4E)。

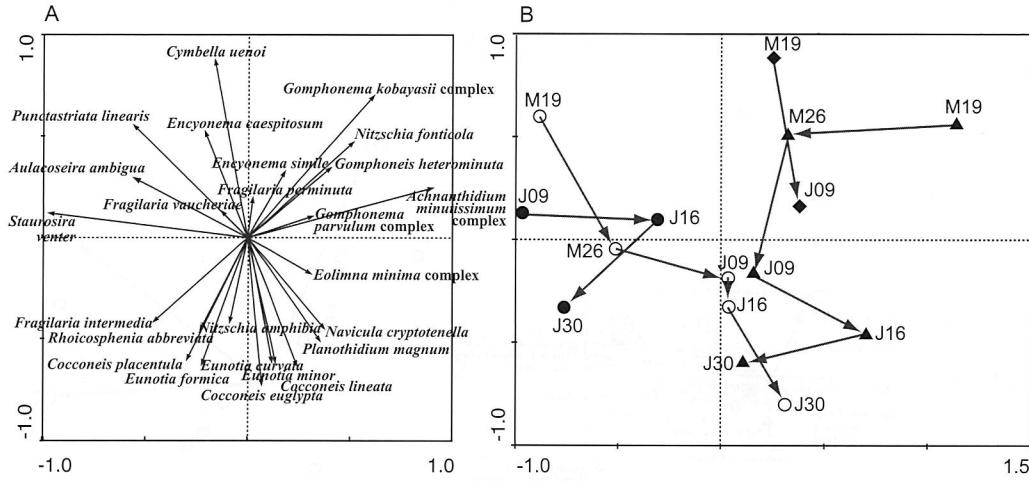
6月9日にBFの拭き取りを行った後期処理試料でも、拭き取りの直後に既に *Staurosira*を中心とした若干の藻類の付着が見られた（被度指数0.003）。被度指数は7日後に0.02で、未処理試料および前期処理



**Fig. 5** Change in cover index of algae in 2008. Diamonds, triangles, open circles and closed circles shows the change on stems which were dead-untreated, living-untreated, living-wiped on May 19, and living-wiped on 9 June, respectively.

試料よりは小さかった。21日後にも0.03までしか増加せず、未処理試料および前期処理試料よりはやや小さい値であった (Fig. 5)。

枯れヨシ上での藻類の被度指数は、常に他の試料よりも大きかった。しかし、生ヨシの試料と同様に、5月19日から6月16日にかけて被度指数の大幅な低下 (0.56→0.16) が見られた (Fig. 4F, 5)。



**Fig. 6** A principal component analysis for temporal change of diatom assemblages in 2008. A: factor loadings of each taxon. B: scores of each sample. Diamonds, triangles, open circles and closed circles shows the change on stems which were dead-untreated, living-untreated, living-wiped on May 19, and living-wiped on 9 June, respectively.

主成分分析は、第2主成分まで全分散の54.1%を表現した(Fig. 6)。第1主成分(寄与率32.6%)の主成分得点は未処理および枯ヨシの試料で全て正の値、拭き取り処理後7日目までの試料で全て負の値を示し、二次遷移の系列を示す軸と解釈される。*Staurosira venter*は第1主成分への負の負荷が大きく、二次遷移の初期に優占する種と解釈された。また、*Achnanthidium minutissimum*種群、*Gomphonema kobayasi*種群は第2主成分への正の負荷が大きく、二次遷移の後期、あるいは拭き取りをしていない群落で優占する種と解釈された。第2主成分(寄与率21.5%)の主成分得点は全ての系列で季節の進行とともに減少しており、5月から6月にかけての季節変動を表現していると解釈される。*Cymbella uenoi*、*G. kobayasi*種群などは第2主成分への正の負荷が大きく、早期ほど多い傾向が見られた。逆に*Cocconeis*(*C. euglypta*, *C. lineata*, *C. placentula*)および*Eunotia*(*E. curvata*, *E. formica*, *E. minor*)の各種は第2主成分への負の負荷が大きく、季節の進行とともに多くなった種と言える。

内湖の水質がヨシ付着藻類群落に及ぼす影響 計21地点の試料をそれぞれ200殻ずつ同定・計数したところ、1試料あたり11~47種の珪藻が見出された。全体では152種が計数された。光学顕微鏡下で区別しがたい種はまとめて種群として扱ったので、実際の種数はもっと多かったことになる。21地点のうち12地点で*A. minutissimum*種群が優占した。他の9試料の優占

種は全て異なっていた。なお、地点7(乙女が池)の試料は大部分が浮遊性珪藻からなり、付着性珪藻の群落が確立していないと判断されたため、以後の解析対象としなかった。

正準対応分析で変数選択を行った結果、有意な説明変数としてPO<sub>4</sub>-P、EC、クロロフィルa濃度の3つが選択された(Fig. 7)。第1軸は主としてECおよびPO<sub>4</sub>-P濃度によって形成された。軸の得点は、*G. kobayasi*種群、*Nitzschia amphibia*、*Gomphonema subclavatum*、*Rhoicosphenia abbreviata*、*Melosira varians*、*Cocconeis euglypta*、*Nitzschia fonticola*が大きな正の値を、*Eunotia minor*、*Gomphonema angustivalva*が大きな負の値を示した。第2軸は主としてクロロフィルa濃度およびPO<sub>4</sub>-P濃度によって形成された軸である。軸の得点は、*Eunotia curvata*および*E. minor*が大きな正の値を、*G. angustivalva*および*Gomphonema vastum* var. *attenuatum*が大きな負の値を示した。

## 考 察

ヨシ付着藻類の二次遷移 本研究で拭き取り処理をしたヨシ茎上での二次遷移初期に多く見られた属のうち、*Staurosira*は他の多くの群体性の無縫溝珪藻と同様、移入力の強いパイオニアである可能性が高い(Stevenson & Peterson, 1989; Ács & Kiss, 1993)。一方、*Encyonema*や*Cymbella*は、一般に、移入力が弱い後期移入者とされており(Stevenson &

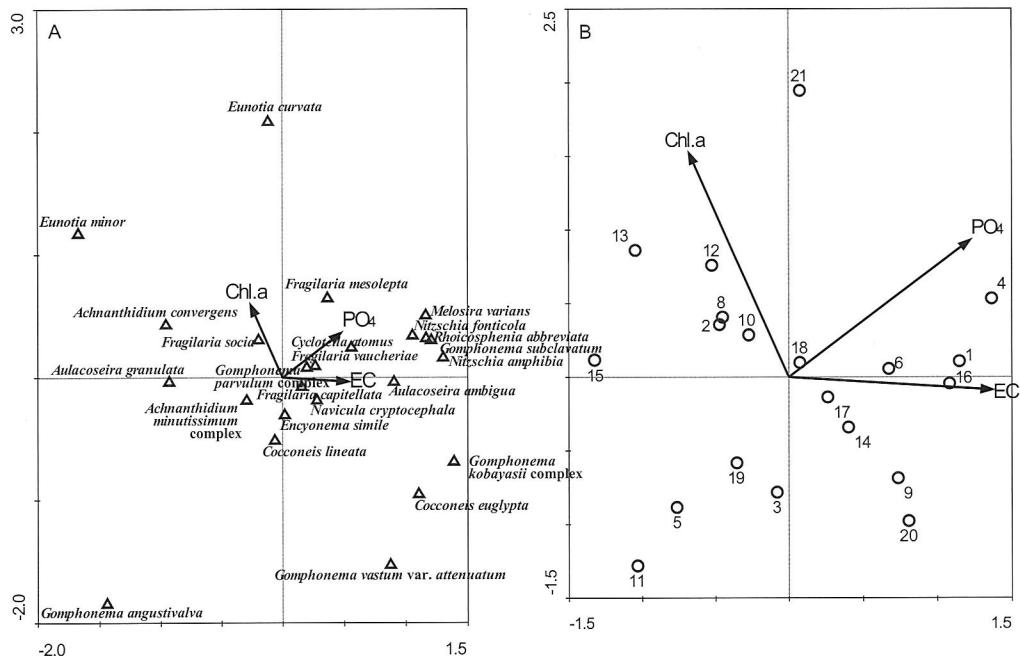


Fig. 7 A canonical correspondence analysis for diatom assemblages from satellite lakes of Lake Biwa in May 2003. A: biplot of each taxon and water quality. B: biplot of each sample and water quality. Parameters of water quality were selected by forward selection with a significance level of 90%. A sample (No. 7) was omitted because it mainly consists of plankton diatoms, not epiphytic ones.

Peterson, 1989; Ács & Kiss, 1993), 本研究の結果は従来の研究結果と必ずしも対応しない。従来の研究はほとんどが河川で人工付着基物を用いて行われているため、実験条件の違いがこのような結果の違いを引き起こした可能性がある。

2年間の結果に共通した傾向として、*Achmanthidium minutissimum*種群が、二次遷移の初期には非処理のヨシ茎上よりも少なかったことが挙げられる。*A. minutissimum*は遷移初期から現れることがあるが(Ács & Kiss, 1993), 一般には後期移入種とされており (Stevenson & Peterson, 1989; Lam & Li, 1999) 本研究の結果とよく対応する。

本研究で観察された二次遷移を群落の立体構造の観点から見ると、まず上方に伸びる珪藻が先に増加して群落の高さを回復し、その後に群落の下層を占める藻類が増加していくというパターンが共通している。一方、2008年に本研究と同時に行われた脱窒活性の試験では、拭き取り処理から7日目の試料で高い活性を示している(左子, 2010)。このことから遷移初期の、珪藻が上方に伸び、ヨシ茎の直上には藻類が少ないBFの構造が、好適な脱窒の場を提供していたことが示唆される。

ヨシ付着藻類の季節変化 2007年、2008年の実験とともに、5月から6月にかけて付着藻類量の著しい減少が観察された。Kusakabe (1988)は、琵琶湖のヨシ上に発達した付着藻類群落を2年間にわたって調べ、生ヨシ上では6~10月に付着藻類の著しい衰退が見られたのに対して、枯ヨシ上では衰退が顕著でなかったことを示した。そして、密着型の藻類はむしろ増加していたことから、その原因を巻貝による強い捕食圧に求めている。しかしそれだけでは、枯ヨシ上では藻類の減少が顕著でなかった理由が説明できない。また今井(2010)は安定同位体分析の結果から、本研究で調査したヨシ群落では6月以降、ヨシ茎上のBFを主な餌としていた大型生物が見当たらなくなったことを示している。したがって6月以降にも琵琶湖のヨシ茎上のBFに対して、巻貝による強い捕食圧がかかっていたことには疑いがある。

Ohtsuka (1999)は、京都市の賀茂川でツルヨシの匍匐茎上の付着藻類群落を3年間にわたって調べ、やはり5月から6月に立体的な群落から *Cocconeis*を中心とした平面的な群落に移行することが多かったことを示した。賀茂川では5月以降、水棲昆虫の羽化によってBFに対する大型動物の捕食圧はむしろ減少していたと考えられるので、もし平面的な群落への遷移が

琵琶湖のヨシ茎上と共に通の原因によって起こっていたとすれば、捕食圧以外の原因も考慮しなければならないことになる。

本研究では主成分分析によって、珪藻群落の経時的変化を、季節変動と遷移系列に分離できた。6月以降に非処理ヨシ、拭き取り処理をしたヨシで共通していた *Cocconeis* および *Eunotia* 各種の相対頻度の増加は、遷移ではなくむしろ季節変動であると解釈された。本研究で多かった *Cocconeis* の3種は、いずれも *C. placentula* およびその変種として扱われてきたものである。この種群は高温を好み (Hickman, 1982; Vinson & Rushforth, 1989)、弱光適応型 (Tippet, 1971; Tuji, 2000) であることが知られている。したがって5月から6月にかけての水温の上昇と、ヨシの成長による光量の減少が、*Cocconeis* が優占する群落への季節変化をもたらした可能性がある。一方、6月に *Eunotia* の3種が増加した原因については、これらの種の生態情報の不足により不明である。

**水質がヨシ付着珪藻群落に及ぼす影響** 正準対応分析で第1軸を構成した電気伝導率と  $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度が、ヨシ茎上の付着珪藻群落の種組成に強い影響を及ぼしていたと推定された。電気伝導率の上昇は主として排水中に含まれる無機イオンによって引き起こされるので、 $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度とともに人为的富栄養化の指標と言える。第1軸の正の得点が大きかった7種の有機汚濁指標性は、好清水性から好汚濁性まで様々であり (渡辺ら, 2005)，有機汚濁に対する指標性は認められなかった。一方、この7種のうち Van Dam *et al.* (1994) に記載がある6種について栄養状態の指標性を見ると、*C. euglypta*, *Melosira varians*, *Nitzschia amphibia*, *Rhoicosphenia abbreviata* の4種は富栄養性、残る *Nitzchia fonticola*, *Gomphonema subclavatum* の2種もそれの中～富栄養性、中栄養性とされている。すなわち琵琶湖内湖のヨシ付着珪藻群落には、栄養状態に対しては非生物上の付着珪藻群落と類似の指標性が認められたと言える。ただし Stenger-Kovács *et al.* (2007) がハンガリーの湖沼でヨシ付着珪藻群落を用いて構築したTPの指標モデルでは、上記のうち *M. varians*, *N. fonticola*, *N. amphibia*, *R. abbreviata* の4種のTP(全リン)最適点は比較的低い(0.156~0.239 mg/l)とされた。この不対応は、研究対象とした水域の栄養状態の違いによるものと思われるが、本研究ではTPを測定していないために確かではない。

以上の結果を珪藻各種の生活型とそれに規定される群落の立体構造の観点から見ると、同様の生活型でも

水質に対する反応性が異なる種が含まれており、5月には今回調査した範囲の水質であれば、常に立体的な群落構造を形成しうることが示唆された。ただし Stenger-Kovács *et al.* (2007) によれば、過栄養状態に最適点をもつ種はほとんどが水平付着型・運動性のものである。したがって過度の富栄養化はBFの立体構造を単純化し、その内部での脱窒活性を低下させるおそれがある。

## 要 約

*Phragmites australis* (ヨシ) の茎水中部の表面に発達し、BFの骨格をなす付着藻類群落の二次遷移を、琵琶湖南湖のヨシ群落で2007年5~7月と2008年5~6月に調べた。BFを拭き取り処理すると、まずチューブに入って上方に伸びる *Encyonema* や帶状群体を形成する *Staurosira* などの珪藻が急激に増加し、7~10日後には拭き取り前の半分程度の藻類量にまで回復した。ただし群落の下層を占める藻類は量的にあまり回復しなかったため、下部に隙間が多い群落構造となった。藻類量は21日後には未処理のBFとほぼ同程度に収斂するとともに、*Achnanthidium* など群落の下層を占める藻類の量が回復した。6月以降には未処理の茎上でも藻類量が著しく減少して平面的な群落構造となり、また非生物性の堆積物の蓄積が見られた。2008年の珪藻種組成を主成分分析にかけたところ、拭き取り後の二次遷移を示す軸(第1主成分)と、季節変化を示す軸(第2主成分)が検出され、遷移系列と季節変化を分離することができた。

琵琶湖博物館所蔵の試料を用いて、2003年5月の琵琶湖の各内湖におけるヨシ付着珪藻群落の種組成と、水質との対応関係を正準対応分析によって調べた。すると第1軸は主に電気伝導率と  $\text{PO}_4\text{-P}$  によって構成された。このことは珪藻の種組成が主として人为的富栄養化の影響を受けていたことを示唆する。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 中井大介・大塚泰介 (2007). ヨシのシュートに付着した珪藻群落の二次遷移. 日本珪藻学会第27回研究集会, 豊田.
- 2) Ohtsuka, T., Nakai, D., Nakamura, Y., Morisaki, H., Yoshinaga, I. & Imai, I. (2008). Algal assemblages on submerged reed stems and their influence on microbial activities. 5th International Conference Interfaces Against Pollution 2008, Kyoto.
- 3) Imai, I., Yan, R., Kihara, K., Yamamoto, Y., Nakai, D. & Ohtsuka, T. (2008). Discovery of abundant

existence of *Microcystis*-killer bacteria in biofilm on submerged reed stems in Lake Biwa: Possibility of reed community for control of *Microcystis* blooms. 13th International Conference on Harmful Algae, Hong Kong.

## 謝 辞

まず本研究に対し、3年間研究助成を下さった財団法人発酵研究所の皆様に感謝いたします。そして、研究の方向性についてご教示いただいた滋賀大学環境総合研究センターの中村正久教授、Biyoセンターでの水路設置および実験実施で多大なご協力を頂いた（財）琵琶湖・淀川水質保全機構の皆様に感謝いたします。2007年および2008年に試料の採集、電子顕微鏡写真の撮影などを下さった中井大介氏、珪藻のプレパラート作成および光学顕微鏡写真の撮影と整理をして下さった中村優介氏、2003年に採集した琵琶湖内湖のヨシ付着珪藻試料を琵琶湖博物館にご提供下さった巖靖子氏、同時期の水質データの使用をご快諾下さった石川雅量氏には、厚く御礼を申し上げるとともに、本来であれば共著者とすべきところ、叶わなかったことを陳謝いたします。そして本研究が、京都大学、立命館大学および北海道大学との共同によってはじめて有意義なものになったことを、関係者の皆様に感謝いたします。特に本研究の初代リーダーである今井一郎北海道大学教授、2代目リーダーの森崎久雄立命館大学教授には、様々お引き立ていただきましたことを厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- Ács, E. & Kiss, K.T. (1993). Effects of the water discharge on periphyton abundance and diversity in a large river (River Danube, Hungary). *Hydrobiologia* **249**: 125-133.
- Eriksson, P.G. & Weisner, S.E.B. (1999). An experimental study on effects of submersed macrophytes on nitrification and denitrification in ammonium-rich aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 1993-1999.
- Hickman, M. (1982). The removal of a heated water discharge from a lake and the effect upon an epiphytic algal community. *Hydrobiologia* **87**: 21-32.
- 今井一郎 (2010). 栄養物質の動態およびヨシのバイオフィルムをめぐる食物連鎖の解析. *IFO Res. Commun.* **24**: 193-200
- Kusakabe, A. (1988). Ecological study on epiphytic alge in Lake Biwa. *Lake Biwa Study Monographs* **4**: 1-61.
- Lam, P. K.-S. & Li, A. (1999). Colonization of periphytic algae on artificial substrates in a tropical stream. *Diatom Res.* **14**: 307-322.
- Nakano, S., Takeshita, A., Ohtsuka, T. & Nakai, D. (2006). Vertical profiles of current velocity and dissolved oxygen saturation in biofilms on artificial and natural substrates. *Limnology* **7**: 213-218.
- Ohtsuka, T. (1999). Diatom community structure and its seasonal change on the stolon of *Phragmites japonica*, In Mayama, S., Idei, M. & Koizumi, I. (eds.), *Proceedings of the 14th International Diatom Symposium*, p.327-343, Koeltz Scientific Books, Königstein.
- 左子芳彦 (2010). 琵琶湖ヨシ帶の脱窒活性と脱窒細菌の分子生態学的研究. *IFO Res. Commun.* **24**: 213-222.
- Stenger-Kovács, C., Padisák, J., Hajnal, É. & Buczkó, K. (2007). Epiphytic, littoral diatoms as bioindicators of shallow lake trophic status: Trophic Diatom Index for Lakes (TDIL) developed in Hungary. *Hydrobiologia* **589**: 141-154.
- Stevenson, R.J. & Peterson, C.G. (1989). Emigration and immigration can be important determinants of benthic diatom assemblages in streams. *Freshw. Biol.* **26**: 279-294.
- 鈴木紀雄・琵琶湖環境権訴訟弁護団 (1988). 飲める水と呑めない話—琵琶湖裁判のまとめと琵琶湖のゆくすえ. 市民文化社, 大津.
- ter Braak, C.F.J. & Šmilauer, P. (2002). CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide. Microcomputer Power, Ithaca.
- Tippett, R. (1971). Artificial surfaces as a method of studying populations of benthic micro-algae in freshwater. *Brit. Phycol. J.* **5**: 187-199.
- Toet, S., Huibers, L.H.F.A., Van Logtestijn, R.S.P. & Verhoeven, J.T.A. (2003). Denitrification in the periphyton associated with plant shoots and in the sediment of a wetland system supplied with sewage treatment plant effluent. *Hydrobiologia* **501**: 29-44.
- Tuji, A. (2000). The effect of irradiance on the growth of different forms of freshwater diatoms: implications for succession in attached diatom communities. *J. Phycol.* **36**: 659-661.
- Underwood, G.J.C. (2005). Microalgal (Microphytobenthic) biofilms in shallow coastal waters: How important are species? *Proc. Calif. Acad. Sci.* **56**: 162-169.
- Van Dam, H., Mertens, A. & Sinkeldam, J. (1994). A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Neth. J. Aquat. Ecol.* **28**: 117-133.
- Vinson, D.K. & Rushforth, S.R. (1989). Diatom species composition along a thermal gradient in the Portneuf River, Idaho, USA. *Hydrobiologia* **185**: 41-54.
- 渡辺仁治・浅井一視・大塚泰介・辻 彰洋・伯耆晶子 (2005). 淡水珪藻生態図鑑. 内田老鶴園, 東京.
- Wathugala, A.G., Suzuki, T. & Kurihara, Y. (1987). Removal of nitrogen, phosphorus and COD from waste water using sand filtration system with *Phragmites australis*. *Water Res.* **10**: 1217-1224.
- Yamamoto, M., Murai, H., Takeda, A., Okunishi, S. & Morisaki, H. (2005). Bacterial flora of the biofilm formed on the submerged surface of the reed *Phragmites australis*. *Microbes Environ.* **20**: 14-24.

## ヨシ表面バイオフィルムの諸性質の解析および水浄化への応用

森 崎 久 雄

立命館大学生命科学部生物工学科  
〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

### Analysis of biofilm properties formed on reed surfaces and their application for water purification

Hisao Morisaki

College of Life Sciences, Ritsumeikan University  
1-1-1 Noji-higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577

We investigated the biofilm formation process on reed (*Phragmites australis*) surfaces over a period of about 2 months on two occasions (from mid-May to late-July, 2007 and 2008) in Lake Biwa. We observed that biofilm formation was a fast process: in around 7 days, the wet weight of the biofilm per unit area reached that of mature biofilm. The speed of the process seemed to be due to the many active bacteria at the early stage of biofilm formation and the extracellular polymeric substances (EPS) produced by the bacteria. The EPS carried electric charges resulting in an accumulation inside the biofilm of nutrient ions from the surrounding lake water by an electrostatic interaction, resulting in a high concentration from an early stage (as early as day 7 of the formation process) that was maintained throughout the formation process. This rapid development seems to cause the biofilm bacterial community to differ greatly from that of the lake water, even at the beginning of formation. The biofilm bacterial community differed between the first and the second half of the formation process due to amorphous compounds of brown color (a complex of organic and inorganic substances) that covered the biofilm during the second half of the process.

The nutrient ion concentrations in the interstitial water of biofilms formed on reed surfaces were investigated in the northern and southern basins of Lake Biwa over several years. The following observations were made: 1) in the interstitial water of reed biofilm, the concentrations of ammonium, nitrate, nitrite, and phosphate ions were much higher than those in the surrounding lake water; 2) the nutrient ion concentrations in the biofilms changed seasonally, especially with respect to nitrate ions, being higher from winter to spring and lower from summer to autumn, in synchrony with the changes in the lake water; 3) the bacterial community structure of the biofilms formed on reeds was different from that in the lake water, with small seasonal variations.

Key words: biofilm, nutrient ion, ion adsorption, microbial community, water purification

### 緒 言

水と接している固体表面には、多種多様な微生物が付着、棲息している。表面に付着したこれら微生物は単独で存在しているのではなく、特徴ある構造の中での他の微生物との様々な相互作用を通じ共同体を形成し

ている。これら微生物共同体が「バイオフィルム」と呼ばれるものである。バイオフィルム（以後 BF と略記する）は、通常数十から数百  $\mu\text{m}$  の厚みを有している。人間から見れば 1 mm にも達しない薄いものに見えるが、微生物から見れば BF は細胞の大きさ ( $\mu\text{m}$  オーダー) の数十から数百倍の大きさを持つ巨大な構造物と言える。BF 中の環境はその中に生きる微生物の生存環境そのものであり、この環境の性質、そこに棲息する微生物の数、種類、活性、さらに微生物間の

相互作用の解明なくしては、BFを正しく理解できない。

BFは水と固体表面が接しているところに普遍的に見られる、温帯から亜寒帯の淡水や汽水域に広く分布している抽水植物であるヨシ (*Phragmites australis*) の茎の水中部分に形成されるBFは世界的な分布を持つ自然環境中のBFの代表例の一つと考えられる。しかし、意外なことに、自然環境中のBFに関する研究は数少なく、さらにヨシのBFに関する研究は極めて限られ、系統的研究は皆無と言える。

BF中には多数の多様な微生物が棲息している。これら微生物の増殖、生存を支えるため、BFと周囲環境の間でエネルギー、物質がやり取りされている。このやり取りを通して、BFは周囲環境中の有機物、栄養塩などの濃度を適正に保つ主要な場となっているのかもしれない。

本研究では、琵琶湖のヨシ群落に着目し、1) ヨシの茎の水中部分に形成されるBFの物理化学的・微生物学的特性を解析し、これら知見を基に、2) ヨシBFの水浄化能、その特性を明らかにすることを目的とした。

## 実験方法

### バイオフィルム形成過程

サンプリング地点及びサンプリング方法 琵琶湖南湖（滋賀県守山市木浜）のヨシ群落（広さ：約100m x 50m）において、ヨシ表面に形成されていくBFを約2ヶ月の間調べた。

まず、ヨシ茎に付着しているBFをスポンジでふき取り（2008/5/19；形成0日目）、以後7日目（5/26）、21日目（6/9）、28日目（6/16）、42日目（6/30）、および65日目（7/23）にサンプリングした（形成過程1：FP1（Formation Process 1））。また、実験開始時期を3週間ずらしてFP1と同様の操作を行った（FP2：形成0日目（6/9）、7日目（6/16）、21日目（6/30）、44日目（7/23））。BFが形成されたヨシ茎の水中部分（水面下約10cm）及びその周辺湖水（1m以内）を採取し、約4°Cで保存して、研究室に持ち帰った。

ヨシ表面に形成されたBFを、歯ブラシ（GUMデンタル歯ブラシ#191、サンスター）で擦り落とし、滅菌蒸留水に懸濁した。このBF懸濁液の一部を遠心し（8000g、4°C、10min），BF沈殿物を作製した。このBF沈殿物を用いて、BFポリマーの電気泳動移動度のpH依存性の解析を行った。さらに、BF懸濁液の一部をガラスフィルター（GF/F 47mmφ、Whatman International, Maidstone, England）で

ろ過し、BFろ過液（BF間隙水の希釈液）を作製した。湖水は、同様にろ過した後、30倍に濃縮した（Rotary Vacuum Evaporator, EYELA, Tokyo, Japan）。このBFろ過液、濃縮した湖水を用いて、栄養塩濃度測定を行った。残りのBF懸濁液及び湖水は、全菌数測定用及び細菌群集構造解析用に保存（それぞれ約4°C、-40°C）した。

**顕微鏡観察** 採取したヨシ表面を剃刀で薄くスライスし、ヨシ表面のBFを微分干渉顕微鏡（BX50, OLYMPUS, Tokyo, Japan）、SEM（VE-8800, KEYENCE, Osaka, Japan）で観察した。また、ヨシ表面を0.1%アルシンブルー8GX溶液で20分染色し、フィルター滅菌した蒸留水で洗浄した後、顕微鏡観察した。アルシンブルーは酸性多糖に結合し、BFポリマーを青く染色する。

**BF湿重量** ヨシのBF湿重量は、BF懸濁液を作製する際に、懸濁前の滅菌水とBF懸濁液の重量の差から求めた。

**BFポリマーの電気泳動移動度のpH依存性** BF沈殿物（BFポリマー）に10 mM NaCl水溶液40mlを加えて攪拌し、遠心分離（8000g、4°C、10min）した。この操作を3回行い、BFポリマーを洗浄した。BFポリマー0.03 wet-gを10 mM NaCl水溶液1mlに懸濁した。これをボルテックス（3000 rpm, 5 min, Voltex Genie 2, M&S Instruments, Osaka, Japan）で攪拌し、超音波処理後（42 kHz, 125 W, 10 min, 2510J-MT, Yamato Scientific, Tokyo, Japan），ボルテックスで10秒間攪拌した。このBFポリマー懸濁液と10 mM PBS（NaCl 0.526 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O（特級, Wako Pure Chemicals）0.358 g, 蒸留水11）を1:19の割合で混合し、EPM（Electrophoretic mobility；電気泳動移動度）を測定した（ZETASIZER Nano-Z, Malvern Instruments, Worcestershire, UK）。同様の操作を10 mM PBSのpHを変えて（pH 2~9）行い、各pHでのBFポリマーのEPMを測定した。（10 mM PBSのpHはイオン強度が変化しないよう、20 mM HCl aq., NaOH aq.で調節した。）

**不定形物質の燃焼実験** BF形成過程の後期に、茶色の不定形物質が見られた。この不定形物質が有機物か無機物かを調べるために、次の操作を行った。BFポリマー0.03 wet-gを10 mM NaCl水溶液1mlに懸濁し、スライドガラス上で風乾させた後、バーナーで

燃やし、燃焼前後の BF を微分干渉顕微鏡で観察した。

**BF 間隙水、湖水中の栄養塩イオン濃度** アンモニウムイオンはインドフェノール法 (Sagi, 1966) で定量した。リン酸イオンは Murphy and Riley 法 (1962) で定量した。

**全菌数測定** 各 BF 懸濁液、湖水にグルタルアルデヒドを加え（最終濃度 1%）固定した。これに DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, 最終濃度 : 1 mg/ml) を加え、メンブレンフィルター（孔径 0.20 μm, K020N025A, polycarbonate, ADVANTEC Toyo Roshi) 上に濾集し、落射蛍光顕微鏡 (BX50 BX-FLA, OLYMPUS, Tokyo, Japan) で菌数をカウントした。

**混釀培養（2007年のサンプルのみ）** BF 懸濁液、湖水を滅菌蒸留水で段階希釈し、各 1 ml を NB, DNB 培地 (NB 培地を水道水で 100 倍希釈したもの) で混釀培養した (20°C, 30 日)。（NB 培地組成：ポリペプトン 10 g (日本製薬), 肉エキス 10 g (和光純薬工業), NaCl 5 g, 水道水 1 l, pH 7.2)。

**PCR-DGGE 法による細菌群集構造解析** 凍結した BF 懸濁液および湖水 1 ml を凍結乾燥させた (12 h)。乾燥させた BF と湖水の残留物を用いて、DNA 抽出を行った (Quick Gene 800, FUJIFILM, Tokyo, Japan)。プライマー, 341f-GC (5'-CGCCCGCCGCCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3' (GC クランプ付き), (Kubota *et al.*, 2007) ) と 907r (5'-CCGTCAATTCCCTTGAGTTT-3', (Gurtner *et al.*, 2003) ) を用いて PCR で DNA を増幅した (iCycler, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)。反応条件 : 95°C (5 min), 80°C (1 min), 65°C (1 min), 72°C (1 min), 次の過程を 19 サイクル ; 95°C (1 min), 62°C (1 min) (温度を 1 サイクル毎に 0.8°C 下げる), 72°C (1 min), 次の過程を 9 サイクル ; 95°C (5 min), 52°C (1 min), 72°C (1 min), この後, 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (10 min)。

DGGE は、変性剤濃度勾配 30%~60% の 6% (w/v) アクリルアミドゲルを用いて行った (100 V, 14 h, 60°C) (Dcode Universal Mutation Detection System, BIO-RAD Laboratories)。泳動後, 1×SYBR Gold (Invitrogen, Eugene, OR, USA)

で 30 分間染色し、バンドパターンを確認した。

DGGE バンドパターンは、解析ソフトウェアを用いてクラスター解析及び multidimensional scaling (MDS : Torgerson, 1972) 解析した。なお、系統樹は、unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) により作図した (Sneath & Sokal, 1973)。また、類似度解析 (ANOSIM, (Clarke & Green, 1988) ) を行った。

#### BF の季節変動・年変動

**サンプリング地点及びサンプリング方法** 琵琶湖北湖 (針江浜), 南湖 (木浜) において、ヨシ、石に形成された BF を各月 (2004 年 8 月～2008 年 3 月) ごとに採取し、約 4°C で保存しながら研究室に持ち帰った。ヨシとヨシ周辺の湖水のサンプリング方法は上記と同じである。

上記と同様の方法でヨシの BF 懸濁液を作製した後、各サンプル (ヨシ、周辺湖水) を栄養塩濃度測定用、細菌群集構造解析用に処理した。

**BF 間隙水中、湖中の栄養塩イオン濃度** アンモニウムイオン、リン酸イオンは上記と同様の方法で定量した。硝酸イオン及び亜硝酸イオンは Bendschneider & Robinson 法 (1952) 及び Wood らの方法 (1967) で定量した。

**BF、湖水の酸塩基滴定** BF 懸濁液を遠心し、BF 沈殿物を全量 40 g になるように蒸留水に懸濁した。10 mM HCl aq., NaOH aq. を滴下し、pH の変化を測定した。湖水 40 ml も同様に測定した。

**PCR-DGGE 法を用いた細菌群集構造解析** 上記と同様の方法で解析した。

#### BF の水浄化能

**パイロット実験** 琵琶湖南湖にある Biyo センター (琵琶湖・淀川水質浄化共同実験センター) 浅池型浄化実験施設に 8 本の水路を設けた (各水路は幅 1.2 m, 長さ 18 m, 水深約 30 cm で滞留時間 6 時間になるよう葉山川から取水した水を通水した)。8 本の水路を 2 系統に分け (4 本の水路で 1 系統), 1 系統の 3 本の水路にヨシを植栽した (1 本の水路 (全長 18 m) 当たり、約 1800 本のヨシを植栽した; ヨシ 1 本につき水と接している茎の水中部分は平均 35 cm<sup>2</sup>)。3 本のうち 1 本の水路のヨシの根元部分を残し、刈り取った (水中の根部分からの栄養塩吸収を見積もるため)。残り 1 本の水路には何もせず滞留時間 6 時間で

通水した（コントロール用の水路）。このように水路設計をし、ヨシ BF が水中のどのような種類の栄養塩をどの程度除去できるのかを調べた（ヨシ植物体の成長時期の影響を見るため、ヨシの生長停止期（2009年9月24日）およびヨシの成長開始の時期（2010年3月5日）に実験を行った）。

取水した葉山川の水がそのまま流れている各水路で、経時的に水をサンプリングし、各水路の水浄化能を解析した。以下の方法で各水路の栄養塩の除去量、除去率を算出した。水路の滞留時間は6時間であり、水は上流から下流まで淀むことなく均等に流れたと仮定した。ある時刻の中流の水は3時間前の上流、下流の水は6時間前の上流の水に相当すると考えられる。従って、ある時刻の上流の水の栄養塩濃度と3時間後の中流、6時間後の下流の水の栄養塩濃度を比較すれば、上流から中流さらに下流まで水が流れる間にどれだけの栄養塩が除去（あるいは生産）されたかが解ると考えられる。水が上流から下流を流れる間に栄養塩が全く除去（あるいは生産）されなかった場合を100%とし、除去量から除去率を求めた。このように、各水路における除去量、除去率を算出した。

水路で採取した水は BF 間隙水と同様に濾過処理した。ただし、栄養塩の濃度はオートアナライザー（AACs-II, Bran and Luebbe, Norderstedt, Germany）で測定した。

**成長開始時期（2010年3月5日）のヨシの水浄化能および不織布 BF との比較** より厳密な比較を目指し、次のように同一水路を使い、BF の水浄化能を調べた。即ち、ヨシを植栽した水路（M）を2区画に分け、上流の区画のヨシ BF を実験2日前に拭き取り（実験当日は BF 形成過程の途中と見なせる）、下流の区画の BF はそのまま残した。また、ヨシ BF と、不織布（ポリプロプレン製、一枚あたり：大きさ 26 cm × 12 cm；水との接触面積（表裏を考慮して） $26 \times 12 \times 2 = 624 \text{ cm}^2$ ）BF の水浄化能を比較した。ヨシを植えていない1本の水路（N）で、上流から下流までを3区画とし、最上流1区画（長さ 6 m）には何も設置せず、次の区画（長さ 6 m）には形成過程の不織布 BF（実験二日前に不織布 720枚を取り付けた）、最下流（長さ 6 m）は成熟した不織布 BF（実験開始3週間前から不織布 720枚を取り付けて、成熟 BF を形成させた）がある区画とし、水浄化能を調べた。但し、両水路で滞留時間は前回実験と同じ6時間に設定した。水路で採取した水は BF 間隙水と同様に濾過処理した。ただし、栄養塩の濃度はオートアナライザー（AACs-II, Bran and Luebbe, Norderstedt,

Germany）で測定した。

## 結果および考察

**ヨシ BF の形成過程** 2007年と2008年の同時期（5月19日～7月23日）に琵琶湖南湖木浜のヨシ群落において、ヨシ BF の形成過程について調べ、両年でほぼ同様の結果を得た。2008年には季節変動の影響を考慮し、3週間ずらせて BF を拭き取り（5月19日および3週後の6月9日），以後の BF 形成過程を経時に追跡した（5月19日からの形成過程を FP1（Formation Process 1），6月9日からの形成過程を FP2 と略記する）。ここでは、2008年に得られた結果を中心に述べてゆく。

**BF の湿重量** BF の湿重量は形成初期に急速に増加し、1～2週間で周囲の成熟 BF（拭き取っていない BF）と同様の重量（約 5 mg/cm<sup>2</sup>、平均の厚みにして約 50 μm）に達した（Fig. 1）。後述するように、周囲湖水環境が比較的の貧栄養であるにもかかわらず、BF 内部が富栄養な環境であることが（BF の構成成分である細胞外ポリマーが栄養塩を濃縮すると思われる），BF の急速な形成をもたらしたと推測される。

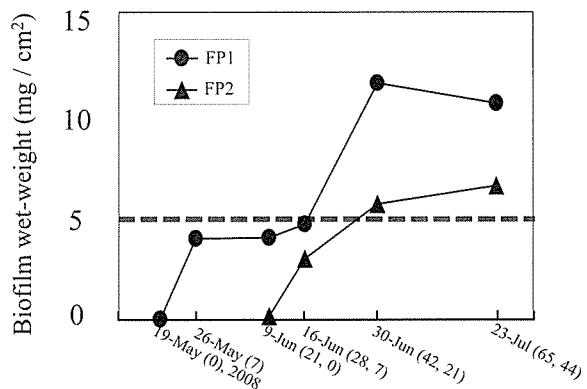
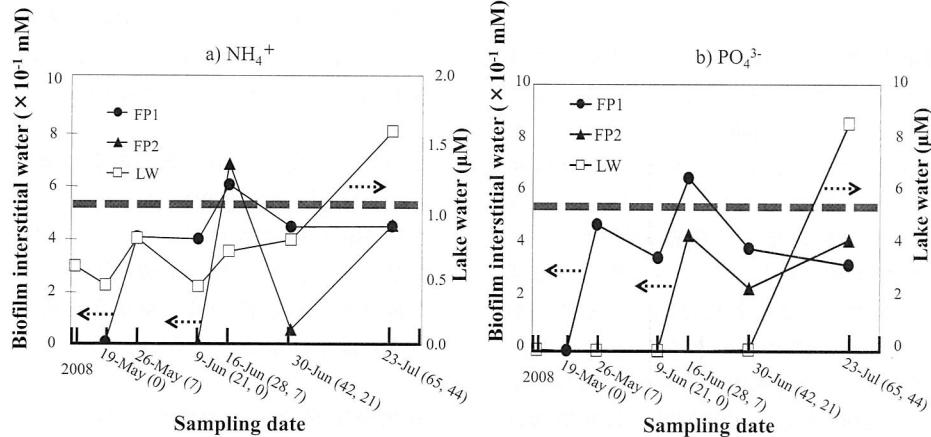


Fig. 1 The change in the biofilm wet weight with the biofilm formation process (● for FP1, ▲ for FP2); altered from Hiraki *et al.*, (2009). A broken line indicates the average wet weight of matured biofilms formed on the intact reed surfaces. The surface area of the reeds was calculated from the diameter and length of the portion of the reed where the samples were taken. The sampling dates were shown in X-axis with corresponding biofilm formation day for FP1 and FP2 in parenthesis, respectively.

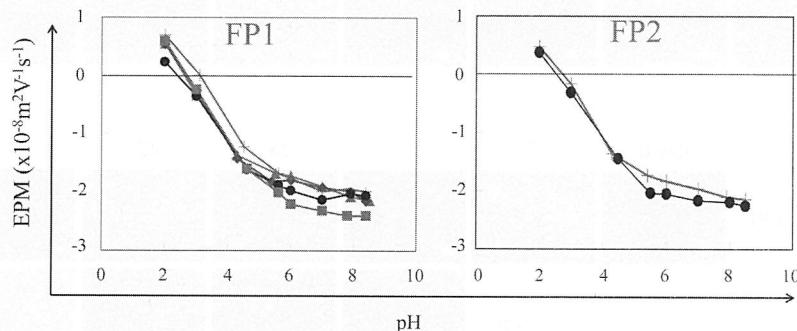
**BF 間隙水中の栄養塩濃度** BF 間隙水中の各種栄養塩濃度を比色法により測定した。その結果、形成過程 7 日目にアンモニウムイオン、リン酸イオンの濃度が BF 中では湖水中の数百倍程度にも達し、以後も高濃度が維持されることが明らかになった (Fig. 2)。湖水に比べ富栄養な微視的環境が、形成過程のごく初期の BF 内に形成されると推測され、急速な BF 形成、また BF の持つ高い脱窒活性（吉永らの知見、私信）と

関連していると推測される。

**BF ポリマーの荷電** BF ポリマーを緩衝液中に分散・懸濁し、電場中でのポリマー断片の電気泳動移動度 (Electrophoretic mobility; EPM) を様々な pH で測定した。形成過程のどの時期の BF ポリマーも、その EPM は各 pH で同様の値を示し、また EPM の pH 変化による変動パターンは類似していた (Fig. 3)。



**Fig. 2** The change in the ammonium (a) and phosphate (b) ion concentration in the biofilm interstitial water and the lake water with the biofilm formation process. Solid symbols (● for FP1, ▲ for FP2) and open symbols (□) indicate the biofilm samples and the lake water (LW) samples, respectively; altered from Hiraki *et al.*, (2009). Broken lines indicate the average ammonium and phosphate ion concentration in the interstitial water of biofilms formed on the intact reed surfaces. Each number in the parentheses shown after the sampling date in X-axis corresponds to the biofilm formation day for FP1 and FP2, respectively.



**Fig. 3** The change in the electrophoretic mobilities (EPM) of the biofilm fragments as a function of the pH; altered from Hiraki *et al.*, (2009). The samples of biofilm formed on different days of the formation process (different symbol corresponding to different formation day from 7 to 65) were used for measurements in 10 mM PBS at pH levels ranging from 2.0 to 9.0.

pH 7 では BF ポリマーは負荷電を有し、この荷電は pH 4 近傍で急に小さくなり、pH 2 ではポリマーは正荷電を有するようになった。この結果から、BF ポリマーは正荷電（アミノ基へのプロトンの付加によると思われる）および負荷電（カルボキシル基の解離によると思われる）を有し、自然環境中（pH 7）では負荷電の方が正荷電より多いため、全体として負の荷電を有している（負の EPM 値を示す）と考えられる。酸性の多糖類をよく染めるアルシンブルーで BF が良く染色されることもこの推測を支持する。

**SEM 観察** BF 拭き取り直後にはヨシ茎表面にはほとんど何も付いていないが、28日目までに珪藻類などの大型の微生物が数を増し、同時に不定形のポリマー様物質の量が増加した (Fig. 4)。しかし、形成後期 (FP1 の 42, 65 日目, FP2 の 21 日目, 44 日目) には茶色の非晶質の物質が BF を覆い、観察の妨げとなつた。この物質を燃焼実験に供したところ、燃え残る部分があること、また燃焼により茶色は消失することから、この物質は有機物と無機物の複合体と推測された。また、この時期の琵琶湖水中にも類似の物質が見られること、さらに 2007 年にもほぼ同時期に類似物質が出現したことから、この非晶質の茶色の物質は周囲河川からこの時期の琵琶湖に流入する腐食物質の一種ではないかと推測された。

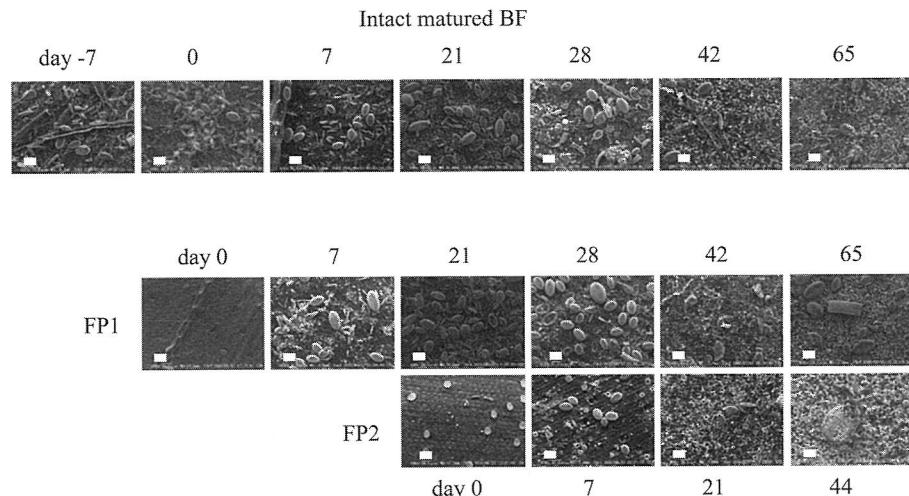
この時期に BF 中の全菌数ばかりでなくコロニー形

成率も減少することから（後述）、この非晶質の物質により表面が覆われると、光が遮られ、また物質交換も阻害され、BF 中の微生物活性は低下すると思われる。

**全菌数** BF 中の全菌数は BF 形成初期に急増し ( $10^9$  cells/wet-g BF のオーダー), FP1, FP2 両過程で形成 3 週間目に最高値 (約  $3 \times 10^9$  cells/wet-g BF) に達した。BF 内では周囲湖水中の菌密度 ( $10^6$  cells/mL のオーダー) の 1000 倍以上の高密度で細菌が棲息していることが解った。但し、BF の菌密度は、湖水より遥かに高いものの、BF 形成後期には減少した (形成 65 日目で約  $1 \times 10^9$  cells/wet-g BF)。

**コロニー形成率 (2007 年のみ実験実施)** 好気条件下、DNB 培地で混釀培養したところ、コロニー形成率は BF 形成過程 10 日目にはほぼ 10% にも達し、その後数 % まで減少した。全菌数のデータとあわせると、形成初期には活性の高い細菌が高密度で棲息するという BF 像が浮かび上がる。

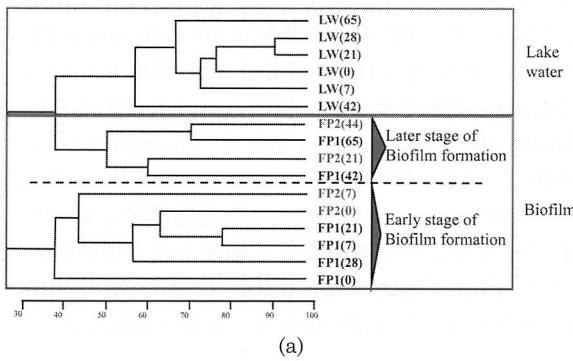
**細菌群集構造** BF から DNA を抽出し、細菌の 16S r-RNA 遺伝子を PCR-DGGE 法により解析した。Fig. 5 に示すように、BF 中の細菌群集構造は湖水と大きく異なり、また形成過程前期と後期の BF 中の細菌群集構造も異なった。BF 中の栄養塩濃度が周囲湖



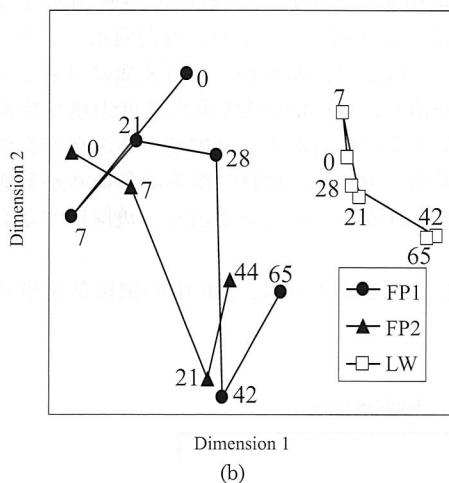
**Fig. 4** The biofilm formation process on the reed surface observed by SEM (bar: 10  $\mu$ m); altered from Hiraki *et al.*, (2009). The SEM images of biofilms of intact reeds (upper row), FP1 (middle row) and FP2 (lower row) were shown with indicating the corresponding formation day of biofilm (Note that for intact matured biofilms the number same with FP1 indicates the same sampling date with FP1).

水の数百倍以上であることが、BFと湖水の細菌群集構造の大きな違いに関連していると思われる。また、前述したように後期のBFは不定形物質で覆われ、その性状が前期と大きく異なった。このことが細菌群集構造を変化させたと推測されるが、確かな要因は今後解明する必要がある。

細菌群集構造は大きく変遷したが、BF形成過程の



(a)



(b)

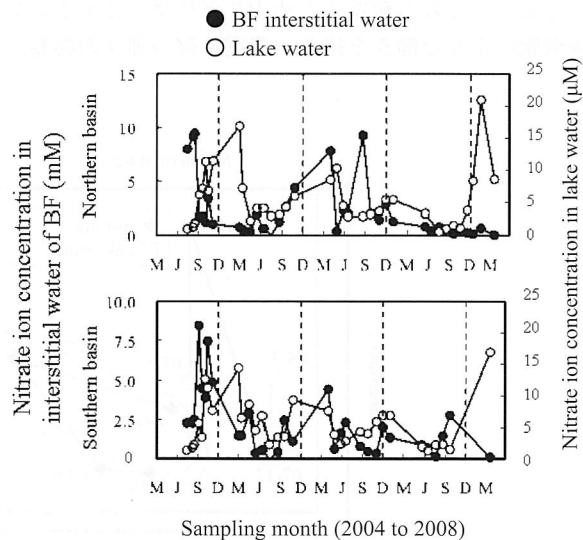
**Fig. 5** Analysis of the bacterial DGGE patterns of the biofilm and the lake water samples by a) cluster analysis and b) multidimensional scaling (MDS) analysis; altered from Hiraki *et al.*, (2009). The number attached to each cluster indicates the formation day in the biofilm formation process for FP1 and FP2, respectively: For LW the number same with FP1 indicates the same sampling date with FP1. In MDS analysis solid symbols (● for FP1, ▲ for FP2) and open symbols (□) indicate the biofilm samples and the lake water (LW) samples, respectively: The number attached to each symbol indicates the formation day in the biofilm formation process for FP1 and FP2, respectively: For LW the number same with FP1 indicates the same sampling date with FP1.

ごく初期から常に検出される細菌（DGGE ゲルのバンドで形成過程初期に共通して見られるバンドに対応する菌）も存在した。これらの細菌が BF の形成に深く関わっている可能性がある。2009年（2008年と同時期）に、木浜のヨシ BF からこれらバンドのシーケンスと類似のシーケンスを有する細菌（16S rRNA 遺伝子の類似度 100%；約 500 bp）を分離し、現在、この分離菌株の諸特性（EPS 生産能、付着特性等）を解析している。これにより、微生物学的な視点から BF の形成について、詳しく解明していく予定である。

#### BF 性状の季節変動、年変動

琵琶湖の北湖、南湖（針江浜、木浜）に定点を設け、およそ 1 月毎にヨシ BF を採取し、BF 内の微視的環境について数年間（2005～2008年），データを蓄積した。次に詳細を述べる。

湖水中および BF 間隙水中的イオン濃度 琵琶湖湖水（BF 外部の水）中の栄養塩濃度は、北湖、南湖両サンプリング地点の湖水とも、毎年同じパターンで季節変動していた（代表して Fig. 6 に硝酸イオンの変動パターンを示した）。冬から春先にかけて栄養塩濃度が高いが、夏になると低くなつた。これは、光が十分にある夏場にプランクトン等の活性が高まり栄養塩を



**Fig. 6** Seasonal variation of nitrate ion concentrations in the interstitial water of the BF on reed (●) and in lake water (○) collected from the sampling sites of the northern and the southern basins in Lake Biwa from April 2004 to March 2008; altered from Tsuchiya *et al.*, (2009).

取り込むためと考えられる。

BF 間隙水中の栄養塩濃度も毎年同じパターンで季節変動した (Fig. 6)。この変動パターンには二つの特徴が認められた。1) BF 間隙水中の栄養塩濃度は琵琶湖水中の栄養塩濃度とほとんど同じパターンで季節変動する。しかし、2) BF 間隙水中の栄養塩濃度は湖水に比べ、数百倍以上大きな値を示す。

次に述べるように、BF ポリマーの荷電特性がこれら特徴と深い関わりがあると推測される。

**BF 内の高い栄養塩濃度と BF を構成するポリマーの特性との関連** BF の形成過程の項で述べたように、BF 間隙水中の栄養塩濃度は湖水に比べ、BF 形成のごく初期（1 週間程度）から数百倍以上高かった。BF 形成のごく初期には棲息する微生物数も少なく、高い栄養塩濃度が BF 中の微生物の生産によるものとは考えにくい。即ち、BF 間隙水中の高い栄養塩濃度は、何らかの別の機構で外部（湖水中）の栄養塩が BF 内に濃縮されたためと考えられる。

一部のサンプルではあるが、BF ポリマーの電気泳動移動度 (EPM) を様々な pH で測定した。その結果、形成過程の BF ポリマーと同様の結果が得られた。この結果はカルボキシル基 ( $pK_a \sim 4$ ) やアミノ基 ( $pK_a \sim 10$ ) といった官能基が BF ポリマー中に存在することを示唆する。これらの官能基は pH 7 近傍では各々負荷電 ( $-COO^-$ )、正荷電 ( $-NH_3^+$ ) を有しており、これら荷電のため BF ポリマーはイオン交換樹脂のような働きを持ち、荷電を持つ種々の物質、

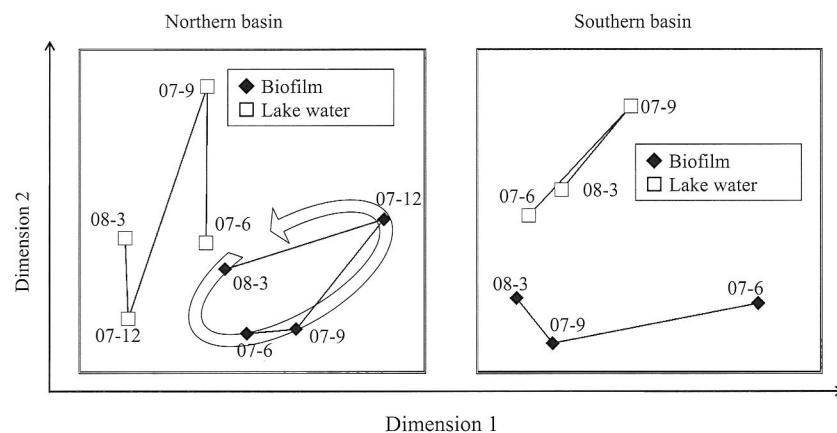
イオンなどを周囲湖水から BF 内に濃縮する働きを持つと推測される。

濃縮されたイオンの濃度は周囲湖水中的濃度より高いため、BF 中のイオンは周囲湖水に拡散する傾向があるが、この拡散と BF への濃縮が動的平衡関係にあり、BF 中のイオン濃度が決まると考えられる。

**全菌数** BF 内では栄養塩濃度が高い。そのためと思われるが、BF 中の細菌も湖水中よりはるかに高密度で存在した。BF 中の全菌数は  $10^9$  cells/wet-g BF、コロニー形成数 (DNB 培地上での形成数) は  $10^7$  cells/wet-g BF のオーダーに達し、それぞれ 1 mL の湖水中の数百倍以上の値を示した (Yamamoto *et al.*, 2005)。従来、BF 中の微生物は活性が低いと言われてきたが (Marshall, 2004)，琵琶湖環境で見られる BF ではコロニーを形成できる細菌も湖水中の数百倍以上の密度で存在することから、一概に BF 中の微生物の活性が低いとは言い切れないと考えられる。

**細菌群集構造** BF 内の細菌の群集構造を PCR-DGGE 法により調べたところ、周囲湖水と大きく異なっていた (Fig. 7)。湖水から基質表面に付着してきた特定の細菌が、BF 中の高栄養塩濃度環境で増殖し、それにより次に付着あるいは増殖する細菌が影響を受け、結果的に BF 内に独特の細菌群集構造が形成されたと推測されるが、詳しい要因を今後解明する必要がある。

Fig. 7 に示したように、BF 中の細菌群集構造は季



**Fig. 7** MDS analysis of bacterial DGGE patterns of the BF on reed surface and lake water samples collected from June 2007 to March 2008. The solid symbols (◆) and open symbols (□) correspond to the biofilm samples and the lake water samples, respectively; The number attached to each symbol indicates the sampling year and month.

節の進行とともに変遷した。しかし、その変動パターンは湖水中の細菌群集構造の季節変動パターンと大きく異なっていた。BF 内は栄養塩濃度が高く、また pH の変化も小さな微視的環境が形成されている。この微視的環境内では微生物の群集構造の季節変動パターンが湖水と異なるのかも知れない。アミノ基、カルボキシル基が緩衝作用を持つと考えられ、酸・塩基滴定においてもこれを確かめた（データは示していない）。

複数年度にまたがる細菌群集構造の季節変動を見ると、次の特徴があった（データは示していない）。ヨシ BF および周辺湖水とともに、細菌群集構造は季節変動していたが、両者の変動パターンは全く異なっていた。ヨシ BF 中の群集構造が湖水とは独立に季節変動していることが推測された。また、ヨシ BF 中の群集構造は、同じ年内で見ると毎年循環するように見えた。しかし、年が変わるとその循環パターンは大きく変わっていた。毎年、晩春（初夏）に起こるヨシの生え替わりによって、湖水中からのヨシ表面への細菌細胞の偶然的付着（ヨシ茎表面の近傍に浮遊していた細菌が付着すると思われるが、この浮遊細菌の種類は偶然的因素に支配され、付着細菌の多くは前年度と異なると思われる），その後の細菌の増殖により形成初期の BF 中の群集構造が毎年変化すると推測される。さらに、この初期の細菌群集構造がその後の BF 中の細菌群集構造の季節変動パターンを支配するかも知れない。一方、季節に関わらず DGGE ゲルでヨシ BF に共通して見られるバンドが認められ、ある種の細菌（付着能が高く初期の BF 形成時に増殖し、その後も BF 中での生残能の高い細菌が存在すると思われる）がヨシ BF 中に常に棲息していると推測された。前述した高細菌密度、高栄養塩濃度であるヨシ BF 内の特異的な環境のため、これらの細菌が常にヨシ BF 中に存在できるのか、もしくは、これらの細菌がヨシ BF 内の特異的な環境を形成、維持しているのか、今後の解明が必要である。現在、DGGE で得られ

たバンドを切り出してシーケンス解析し、どのような細菌が存在していたのか解明を進めている。

### バイオフィルムによる水浄化

上述したように、ヨシ水中茎の BF に周辺の湖水中よりも高濃度の栄養塩が蓄積していることが本研究により明らかになった。BF のこの機能を活用すれば、周囲環境水中の栄養塩を BF に取り込み、さらに脱窒、他の生物へのバイオマス変換の過程を通じ、水を浄化できると期待された。そこで成長時期の異なる（成長停止時期、および成長を開始した時期）ヨシを用い、実際に水浄化能を調べた。

生長停止期（2009年9月24日）のヨシ BF の水浄化能 Biyo センターに水路を設けた（幅 1.2 m、長さ 18 m、水深約 30 cm で滞留時間 6 時間になるように葉山川から取水した水を通水した）。1 本の水路（全長 18 m）当たり、約 1800 本のヨシを植栽した。ヨシ 1 本につき水と接している茎の水中部分は平均 35 cm<sup>2</sup>である。このような水路を 3 本設置した。そのうち 1 本の水路のヨシの BF を実験 2 日前に拭き取った（実験当日には BF が形成中と見なした；水路 F (Forming BF の意)）。他の 1 本の水路のヨシ BF は成熟させたまま残した（水路 M (Matured BF の意)）。残り 1 本の水路のヨシは根元部分を残し刈り取った（水中の根部分からの栄養塩吸収を見積もるため；水路 R (Roots の意)）。残り 1 本の水路には何もせず滞留時間 6 時間で通水した（コントロール用の水路 N (None の意)）。このように水路設計をし、ヨシ BF が水中のどのような種類の栄養塩をどの程度除去できるのかを調べた。

硝酸イオン、アンモニウムイオンに関しては、ヨシを植栽していないコントロールの水路 N（除去率：約 10%）と比較して水路 M（ヨシの茎部分に成熟 BF を付着させたままの水路）、水路 R（ヨシの根部分だけ

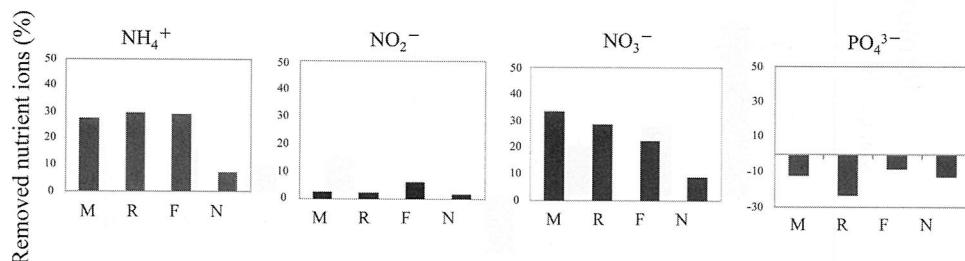


Fig. 8 Ratio of removed nutrient ions from water flowing down through waterways of M (reeds with matured biofilm), R (reeds of roots remained), F (reeds with biofilm of forming stage) and N (control).

を残した水路), 水路 F (ヨシの茎部分の BF を実験 2 日前に拭き取ってあり, BF が形成中の水路) の各水路の除去率 (約 30%) が高かった (Fig. 8). また, 亜硝酸イオンに関しては, 全体的に除去率は低かったが, 水路 M, R, N (一部除去率がマイナスであった (除去されずに増加した), 除去率: 約 -8~+2%) と比較して, 水路 F (除去率: 約 6%) の除去率が高かった. ヨシの根部分, 植物体全体, BF の付いたヨシを植栽した全ての水路で窒素関連の栄養塩除去能は同程度となり, ヨシ BF の栄養塩除去能はこの時期 (ヨシの生長停止期 (2009年 9月24日)) の実験では明瞭に認められなかった.

リン酸イオン (亜硝酸イオンも一部) に関しては, 全ての水路で除去されず増加する傾向があった. しかし, 水路 R, N (除去率: 約 -10~-20% = 約 10~20% 増加) と比較して, 水路 M, F (除去率: 約 -3~-10% = 約 3~10% 增加) の増加量が少なかった (水路 F では一部除去されていた (除去率: 13%)). 従って, ヨシ BF がこれらのイオンの増加を抑制 (除去) する働きを担っている可能性がある.

成長開始時期 (2010年3月5日) のヨシ BF の水浄化能 成長の止まったヨシの場合に比べ, 成長開始時期 (水路に植えたヨシの 2割程度が新芽を出していた) のヨシの水浄化能は高かった (Fig. 9). また, 成長を開始した時期の若いヨシでは Fig. 9 に示すよう

に, 形成過程の BF に比べ, 成熟した BF の水浄化能が高かった. アンモニウムイオンのおよそ 25% が成熟 BF によって除去され, 硝酸イオン, 亜硝酸イオンもそれぞれ 5%, 8% 程度が除去されていた. この時期の実験は, 滞留時間 6 時間で河川水が流れている全長 18 m の水路を 2つの区画に分けて実施したので, 9 m の水路の区画を 3 時間かけて水が流れる間にこれだけの栄養塩が除去されたことになる. リン酸イオンが前回の実験 (2009年 9月24日) と同様に少し増加しているが, 測定誤差も大きく, さらに確認する必要がある.

ヨシ BF に比べ, 不織布の BF では形成, 成熟いずれの段階のものも, 水浄化能が劣っていた (Fig. 9). 特に, アンモニウムイオンの除去能はヨシ BF に比べ, かなり低かった. 河川から取水された水が水路を流れる間に接触する BF 面積を比較すると, ヨシの場合  $3.15 \text{ m}^2$  (9 m の区画にあるヨシは 900 本でヨシ 1 本あたりの水との接触面積  $35 \text{ cm}^2$ ), 不織布の場合  $44.928 \text{ m}^2$  (6 m の区画に設置した不織布は 720 枚で不織布 1 枚あたりの水との接触面積は  $26 \times 12 \times 2 = 624 \text{ cm}^2$ ) とヨシ BF の方が不織布 BF の 1/10 以下の接触面積しか持たない. それにも関わらず, 除去された栄養塩はヨシ BF が不織布 BF を上回っており, ヨシ BF が高い栄養塩除去能を持っていることが解る. ヨシ BF と不織布 BF の水浄化能の違いが BF を構成するポリマーによるものなのか, あるいは BF に棲息

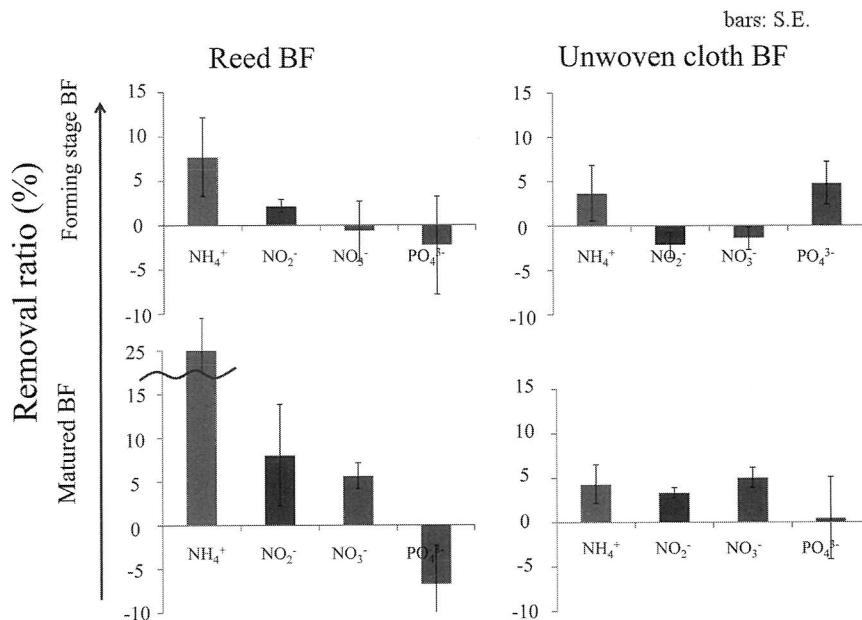


Fig. 9 Removal ratio of nutrient ions by biofilms formed on reed or unwoven cloth for more than 3 weeks (matured BF) or 2 days (forming stage BF).

する微生物の種類（群集構造），活性が異なるのか，現在解析を進めている。

## 要 約

ヨシ BF の形成過程の解析により，ヨシ BF 中では形成のごく初期から栄養塩が周辺湖水より数百倍以上高いことが解った。また，ヨシ BF が短期間のうちに形成され，形成初期に微生物の活性（増殖活性，EPS の生産等）が高いことも明らかになった。

自然環境中のヨシ BF は，季節や年によって，間隙水中の栄養塩濃度，細菌群集構造を大きく変えるものの，常にヨシ BF 内に存在する細菌があり，BF の特性の維持，栄養塩の濃縮に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

水路を用いたヨシ BF による水浄化能のモデル実験では，ヨシ群落が栄養塩を除去でき，また成長開始時期のヨシ BF が高い水浄化能を持つことが明らかになった。

## 本研究で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) Tsuchiya, Y., Hiraki, A., Arakawa, T., Kusakabe, R., Yamamoto, M. & Morisaki, H. (2008). Microscale Environment and Microbial Flora Inside of Biofilm. 5th International Conference on Interfaces Against Pollution (Kyoto, Japan).
- 2) Hiraki, A., Tsuchiya, Y., Arakawa, T., Kusakabe, R. & Morisaki, H. (2008). Analysis of Biofilm Formation Process on Reed Surface. 5th International Conference on Interfaces Against Pollution (Kyoto, Japan).
- 3) Tsuchiya, Y., Hiraki, A., Arakawa, T., Kusakabe, R. & Morisaki, H. (2008). Microscale Environment Inside of Biofilm. 3rd International Biofilm Conference (Munich, Germany).
- 4) 土屋雄揮，開文美，荒川高範，日下部理恵，池永誠，森崎久雄（2008）。バイオフィルム中の微生物フロラの季節変動－毎年繰り返されるのか－。日本微生物生態学会第24回大会（札幌）。
- 5) 土屋雄揮，開文美，福田康昭，山本達也，池永誠，森崎久雄（2008）。ヨシ表面でバイオフィルムはどのように形成されていくか。日本微生物生態学会第24回大会（札幌）。
- 6) 土屋雄揮，開文美，荒川高範，日下部理恵，森崎久雄（2009）。バイオフィルムの諸性質は季節によってどう変わるのであるか。日本微生物生態学会第25回大会（広島）。
- 7) 開文美，土屋雄揮，福田康昭，山本達也，森崎久雄（2009）。バイオフィルムは如何に形成されていくか－ヨシ（生物），石（無生物）表面での比較－。日本微生物生態学会第25回大会（広島）。

- 8) 福田康昭，開文美，土屋雄揮，森崎久雄（2009）。バイオフィルム間隙水は細菌の栄養基質となるか？。日本微生物生態学会第25回大会（広島）。
- 9) 山本達也，Kurniawan, A., 土屋雄揮，森崎久雄（2009）。バイオフィルムのイオン吸着能。日本微生物生態学会第25回大会（広島）。
- 10) 桐山智帆，土屋雄揮，開文美，福田康昭，山本達也，森崎久雄（2009）。ヨシ表面でバイオフィルムはどのように形成されていくか－細菌群集構造の変遷－。日本微生物生態学会第25回大会（広島）。

### 原著論文

- 1) Tsuchiya, Y., Ikenaga, M., Kurniawan, A., Hiraki, A., Arakawa, T., Kusakabe, R. & Morisaki, H. (2009). Nutrient-Rich Microhabitats within Biofilms Are Synchronized with the External Environment. *Microbes and Environments* 24: 43-51.
- 2) Morisaki, H. & Tabuchi, H. (2009). Bacterial Attachment over a Wide Range of Ionic Strengths. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74: 51-55.
- 3) Hiraki, A., Tsuchiya, Y., Fukuda, Y., Yamamoto, T., Kurniawan, A. & Morisaki, H. (2009). Analysis of How a Biofilm Forms on the Surface of the Aquatic Macrophyte *Phragmites australis*. *Microbes and Environments* 24: 265-272.

## 保存機関に寄託した菌株

ヨシバイオフィルムより現在25菌株を分離し，同定，保存済みである。今後，これら菌株のBF形成能，生理的特徴を解析し，重要菌株をNBRCに寄託する予定である。また，現在も分離作業を続けており，最終的な寄託菌株数も増やす予定である。

## 謝 辞

本研究に対し，3年間研究助成を頂いた財団法人発酵研究所に感謝申し上げます。種々ご教示いただいた滋賀大学環境総合研究センターの中村正久教授に感謝申し上げます。また，Biyoセンターでの水路設置，実験実施で多大なご協力を頂いた（財）琵琶湖・淀川水質保全機構に感謝申し上げます。本研究は立命館大学大学院理工学研究科の土屋雄揮君の博士論文研究の一部，開文美さんの修士論文研究の一部，また立命館大学生命科学部の大嶋紫さん，桐山智帆さんの卒業論文研究の一部である。

## 文 献

- Bendschneider, K. & Robinson, R. J. (1952). A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.* 11: 87-96.

- Clarke, K. R. & Green, R. H. (1988). Statistical design and analysis for a 'biological effects' study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **46**: 213-226.
- Gurtner, C. S., Lubitz, W. & Rölleke, S. (2003). Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *J. Microbiol. Methods* **52**: 251-260.
- Hiraki, A., Tsuchiya, Y., Fukuda, Y., Yamamoto, T., Kurniawan, A. & Morisaki, H. (2009). Analysis of How a Biofilm Forms on the Surface of the Aquatic Macrophyte *Phragmites australis*. *Microbes and Environments* **24**: 265-272.
- Kubota, N., Kanemori, M., Sasayama, Y., Aida, M. & Fukumori, Y. (2007). Identification of endosymbionts in *Oligobrachia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida). *Microbes and Environments* **22**: 136-144.
- Marshall, K. C. (2004) . BF 中の飢えた微生物と培養できない微生物（遠藤圭子訳・清水潮監訳） 培養できない微生物たち 学会出版センター, pp109-125, In: Nonculturable Microorganisms in the Environments. (eds. Colwell, R. R. & Grimes, D. J.).
- Murphy, J. & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Anal. Chim. Acta* **27**: 31-36.
- Sagi, T. 1966. Determination of ammonium in sea water by the indophenol method and its application to the coastal and off-shore waters. *Limnol. Oceanogr.* **13**: 440-447.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R. R. (1973). The principles and practice of numerical classification, p. 573. In W. H. Freeman (ed.), Numerical taxonomy, Freeman and Co., San Francisco, U.S..
- Torgerson, W. S. (1972). Multidimensional scaling: 1 Theory and method. *Psychometrika*. **17**: 401-419.
- Tsuchiya, Y., Ikenaga, M., Kurniawan, A., Hiraki, A., Arakawa, T., Kusakabe, R. & Morisaki, H. (2009). Nutrient-Rich Microhabitats within Biofilms Are Synchronized with the External Environment. *Microbes and Environments* **24**: 43-51.
- Wood, E.D., Armstrong, F.A.J. & Richards, F. A. (1967). Determination of nitrate in seawater by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **47**: 23-31.
- Yamamoto, M., Murai, H., Takeda, A., Okunishi, S. & Morisaki, H. (2005). Bacterial Flora of the Biofilm Formed on the Submerged Surface of the Reed *Phragmites australis*. *Microbes and Environments* **20**: 14-24.

発酵研究所助成研究報告 第24号【非売品】

平成22年12月10日 印刷

平成22年12月25日 発行

編集責任者 中瀬 崇

編集委員 石田祐三郎, 伊藤忠義, 木村 光

駒形和男, 杉山純多, 波多野和徳

本田武司, 山本憲二, 渡邊 信

発行人 中濱一雄

発行所 財団法人発酵研究所

大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

TEL. 06-6300-6555

FAX. 06-6300-6814

印刷所 日本印刷出版株式会社

大阪市福島区吉野1丁目2番7号