

NUMBER 21

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

RESEARCH  
COMMUNICATIONS

2007

# RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 21



2 0 0 7

**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	森田 桂			
理 事	岡田 善雄	岡見 吉郎		
	杉野 幸夫	中濱 一雄		
	波多野和徳	早石 修		
	別府 輝彦	山田 秀明		
監 事	磯野 正雄	大嶋 泰治		
評議員	木村 光	駒形 和男		
	竹内 昌男	武田 光子		
	富田 房男	豊島久真男		
	中瀬 崇	古川 謙介		
	本田 武司	松原 謙一		
顧 問	坂野 獻			

## 目 次

復刊にあたって	森田 桂	1
発酵研究所助成研究報告集について	中濱 一雄	2
第1回助成研究報告会の開催		4
日本・東南アジア産酢酸菌の分離・分類に関する研究	内村 泰	7
新規な微生物資源としての耐熱性酢酸菌の分離・分類・保存および機能解析	松下 一信	19
発酵食品に生息する生育緩慢乳酸菌（難培養・難分離乳酸菌）の存在確認とその分離	岡田 早苗	31
菌糸形菌体の長期保存法の開発および保存株の品質評価	横山 耕治	39
緑藻ボルボックス目の培養株を用いた種レベルの分類学的研究と新規培養株を 用いた雄特異的遺伝子の発見	野崎 久義	51
肺 <i>Mycobacterium avium</i> complex (MAC) 症患者の家庭内MAC分布	西内由紀子	61
バイオフィルム状微生物の遺伝子転移に関する研究	前田 純夫	71

## 復刊にあたって

財団法人発酵研究所  
理事長 森田 桂

当財団の創設は、60年以上も前の昭和19年（1944年）の（財）航空醸酵研究所の設立に遡る。当時、日本は中国での戦争に加えて米国との戦争も止む無きに至り、航空燃料の調達が待った無しの喫緊の状態で、文部省の要請を受ける形で微生物の力を借りて航空燃料を生産するという途方もない夢のような目標の下に“航空醸酵研究所”が武田薬品工業株式会社の工場ならび研究所の所在地であった大阪市淀川区十三に設立されたと伝えられている。

戦争の終結によって航空燃料を作るという目標は自然消滅したが、この頃アメリカから齊らされたペニシリン発酵生産技術によって微生物の酵素を利用して新規な物質を生産するという概念が一躍脚光を浴びバイオ生産時代の幕開けを迎えた。このような営利的目標とは一線を画し、微生物学本来の分類・同定ならびに微生物株の保存という非営利分野で微生物学発展の基盤を支える事業の必要性を痛感した武田長兵衛、長谷川武治らはカルチャー・コレクションを主体とする（財）発酵研究所を発足させ、以来、年を追って業績を積み上げてきた。その研究業績は本誌“IFO Research Communications,”で報告され、発酵研究所は国内外からその存在が注目を浴びるユニークな研究所（研究者数約20名）として発展した。

一方、微生物を利用する応用研究は年を追って活発になり、数多くの有用な抗生物質が発見されて医療に供せられていることは周知の通りである。更に微生物酵素の応用はアミノ酸や核酸調味料の分野に裾野を広げ、医薬品分野では1950年初め頃から始まった副腎皮質ステロイド類の製造には欠くことの出来ないテクノロジーを提供し、最近では、スタチンの名称で知られる多数の抗コレステロール薬も微生物の二次代謝産物の存在なくしては考えられない薬剤である。このように微生物が重要な生物資源であるとの認識が高まってきた。

当財団は従来から、その設立の趣旨に則り、応用研究に直接手を染めることを避け、専ら微生物の菌株保存センターとして役割に徹し、その研究成果はIFO Research Communicationsとして刊行を重ねてきた。このようにして創設され、運営してきた（財）発酵研究所に対して独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）が新たに微生物の菌株収集と保存・同定ならびに頒布に汎る事業を千葉県内のかずさアカデミアパーク内に集結して国立の機関として運営するため、当研究所の保有する微生物株コレクションならびに研究者の培ってきたノウハウ技術の移管についての要請があり、当財団は理事会・評議員会の承認を得てコレクションおよび大部分の研究者とともにすべての研究資材をNITEに移管した。以後、契約によって寄託者から預かった菌株の保全のほか、新しく微生物関連研究に対する助成を行うという方向で再発足した（平成14年6月7日）。

以後5年を経て、平成19年5月25日に千里ライフサイエンスセンターで第1回助成研究報告会を開催し、活発な質疑応答が多くの参加者の目を惹いた。

上述のような当財団の変遷を受けて、一時中断の止むなきに至ったIFO Research Communicationsを（財）発酵研究所助成研究の研究成果収録のために復刊することとした。

## 発酵研究所助成研究報告集について

財団法人発酵研究所  
常務理事 中濱一雄

財団法人発酵研究所は、60余年にわたって学術および産業に有用な微生物の収集・保存・分譲業務を行い、国内外の微生物の研究を支援してきたが、平成14年7月に約15,000株の微生物株および営々と築き上げてきた保存機関としての業務に必要なノウハウを研究者と共に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）に無償で提供し微生物株保存機関としての使命を終了した。

近年、微生物の研究者は少なくなり、研究費も減少しつつある。また、科研費やその他の助成金も獲得しにくい状況にある。微生物学的研究はバイオ技術の根幹となる分野であり、その重要性が見直されつつある。従ってその研究を財政的に支援することは大きな意義があると考える。発酵研究所は、これまで培ってきた微生物保存事業の精神と経験を生かし、微生物の基礎および応用研究に寄与する目的で、平成15年度から新事業として微生物の研究者を対象とする研究助成を開始した。この研究助成には2つの研究課題がある。1つは発酵研究所がこれまで行ってきた「微生物の分離・分類・保存に関する研究」（研究課題1）であり、1つはこれを発展させた形で「健康や環境に関与する微生物の研究」（研究課題2）である。

微生物の研究には多額の研究費と長い期間が必要であるので、これに応えるため本研究助成では助成金額を他の財団に比べて高くし、助成期間を最長3年とした。ただし、評価委員会において年度ごとに厳正に評価し、次年度における助成の可否および助成金額の増減を決定している。これまで4年間に30名の研究者に助成金を交付し、今後もこの研究助成事業を継続する計画である。募集要項は当財団のホームページに掲載している。

発酵研究所は、1961年にIFO Annual Reportという名称で機関誌の刊行を開始し、1971年からはIFO Research Communicationsに改称して、隔年で発行してきた。その主な内容は、保存業務についての報告ならびに微生物の分離、分類および保存法に関する研究成果であった。平成14年に保存事業と研究を終了するに伴い、20号（1999-2000年）を最後に休刊していたが、平成19年度（2007年）から研究助成の助成対象者に助成によって得られた研究成果を発表する助成研究報告集として本機関誌を復刊することになった。この21号は平成15年度（第1回）研究助成の助成対象者7名による約3年間の研究成果をまとめたものであり、これ以後も研究助成の研究成果を毎年掲載する計画である。

この機関誌IFO Research Communicationsでは助成研究で得られた成果のみならず、Negative dataも盛りこむようにしている。学術論文ではNegative dataを掲載することはないが、この機関誌ではNegative dataであっても記録として残しておく価値のあるものは記載するように執筆者にお願いしている。

なお、21号刊行に先立ち、平成15年度研究助成の助成対象者による約3年間の研究成果を口演発表するための第1回助成研究報告会を平成19年5月25日に千里ライフサイエンスセンターで開催した。初回にもかかわらず、約80名が参加し、7題の講演について非常に活発な質疑・応答があった。報告会後の懇親会では異なる分野の微生物研究者の交流があり、盛会であった。

20号までのIFO Research Communicationsと同様、21号以後も微生物関係者に広く配布し、微生物学の進歩、発展に寄与できることを願っている。

## 第1回助成研究報告会の開催

平成15年度の研究助成の助成対象者7名が3年間で得た研究成果を口演発表する第1回助成研究報告会を平成19年5月25日（13：30～17：00）に千里ライフサイエンスセンター（大阪府豊中市千里東町）5階サイエンスホールで開催した。約80名の参加があった。

最初に森田桂理事長の開会の挨拶があり、続いて助成対象者による研究報告がなされた。2つの研究課題のうち「微生物の分離・分類・保存に関する研究（研究課題1）」は駒形和男評議員（東京大学名誉教授）の座長の下に、1. 日本・東南アジア産酢酸菌の分離・分類に関する研究（内村 泰）、2. 新規な微生物資源としての耐熱性酢酸菌の分離・分類・保存および機能解析（松下一信）、3. 発酵食品に生息する難培養・難分離乳酸菌（生育緩慢乳酸菌）の存在確認とそれらの分離（岡田早苗）、4. 菌糸形菌体の長期保存法の開発および保存株の品質評価（横山耕治）、5. 緑藻ボルボックス目の種レベルの系統分類学的研究（野崎久義）の5題の講演があり。「健康や環境に関与する微生物の研究（研究課題2）」については豊島久真男評議員（理化学研究所研究顧問）が座長で、6. 非結核性抗酸菌感染症（特に、肺 *Mycobacterium avium-intracellulare complex* 症）の感染源および感染経路の特定（西内由紀子）、7. バイオフィルム状微生物の遺伝子転移に関する研究（前田純夫）の2題の講演がなされた。各演者の報告内容は本研究報告集に述べられているが、7題の研究報告其々について活発な質疑応答がなされ、有意義な報告会となった。

報告会の後、報告会参加者の殆どの出席を得て同所で懇親会がもたれた。立食式のパーティーで、岡見吉郎理事（環境バイオ工学研究所所長）の挨拶、岡田善雄理事（大阪大学名誉教授）の乾杯で始まり、異なる分野の微生物研究者の活発な交流と懇談が見られ、料理もお酒もふんだんにあり誠に盛会であった。

研究報告会および懇親会の模様の一部を以下に写真で紹介します。

（文：坂野 熱、写真：波多野和徳）



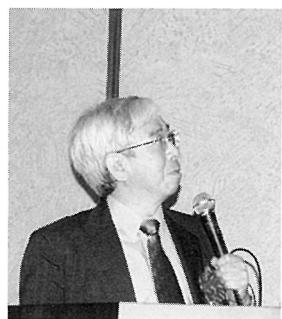
報告会



内村 泰氏



松下 一信氏



岡田 早苗氏



横山 耕治氏



野崎 久義氏



西内由紀子氏



前田 純夫氏



懇親会

# 日本・東南アジア産酢酸菌の分離・同定に関する研究

内 村 泰

微生物学研究室

東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

## Isolation and identification of acetic acid bacteria from sources collected in Japan and Southeast Asia

Tai Uchimura

Laboratory of General and Applied Microbiology

Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka 1-1-1, Setagaya-ku,  
Tokyo 156-8502, Japan

Acetic acid bacteria were isolated from samples collected in Japan, Indonesia, Thailand, and the Philippines from 1994 to 2005. About 800 samples targeted for fermented foods, fruits, flowers, and other materials were used for the isolation of acetic acid bacteria. A total of 514 isolates were identified as those belonging to 7 genera and 35 species, including 2 new genera and 12 new species. This study revealed a wide distribution of acetic acid bacteria in Japan and the Southeast Asia, and would indicate a rich flora of acetic acid bacteria in the regions.

Key words: acetic acid bacteria, *Asaia*, *Kozakia*, Okinawa, Southeast Asia

## 緒 言

酢の歴史は紀元前5000年のバビロニア時代に始まり、現在、世界には4000種類もの酢が存在すると言われている。我が国でも、5世紀初頭には食酢が存在していたという記録があり、古くから、主に米酢などの穀物酢が製造してきた。酒粕を利用した粕酢、一つの壺で醸酵工程が行われる黒酢など、日本独特の醸酵法も知られている。

1864年のパストールの研究により、食酢醸造に酢酸菌がかかわることが明らかになり、その後、酢酸菌は食酢醸造のみならず、グルコン酸、ビタミンCの中間体であるソルボースの生産にも用いられている。

一方、酢酸菌の分類学的研究は、分離試料が醸酵食

E-mail: tai@nodai.ac.jp

共同研究者：鈴木 玲（東京農業大学生物応用化学科微生物学研究室）、Puspita Lisdiyanti（同上、現 Research and Development Center for Biotechnology, Indonesian Institute of Science (LIPI), Bogor, Cibinong, Indonesia）

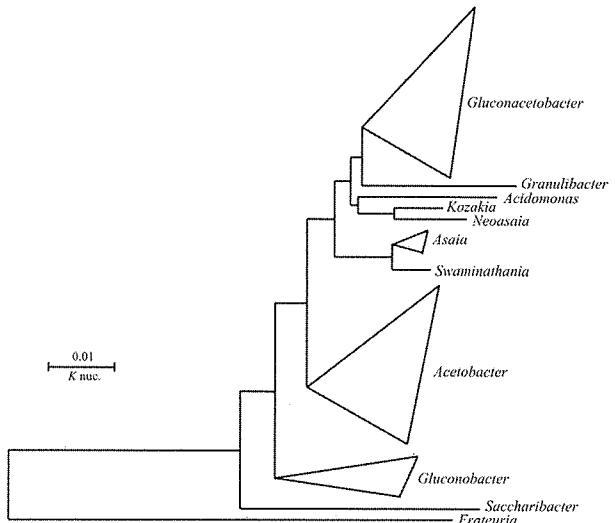


Fig. 1 Phylogenetic relationships of acetic acid bacteria deduced from 16S rRNA gene sequence clustering by neighbor-joining. The scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position. Numerals indicate the bootstrap value derived from 1000 replications. *Frateuria aurantia* IFO 3245 (J010481) was used as an outgroup.

品に偏り、試料採取地も限られていた。しかし、近年、様々な試料から酢酸菌が分離されるとともに新属の記載、また、酢酸菌の属の再編成が行われ、現在、酢酸菌は系統的に  $\alpha$ -Proteobacteria の *Acetobacteraceae* 科に属する10属、 $\gamma$ -Proteobacteria に属する *Frateuria* の計11属で構成されている (Fig. 1)。また、最近、慢性肉芽腫の病巣より病原性を示す *Granulibacter* が分離・同定され、注目をあびている (Greenberg *et al.*, 2006)。

次々に酢酸菌の新属・新種が提唱される一方、気候帯、生息域 (niche) などと分布との関係はまだ十分解明されていない。そこで、本研究は日本の様々な試料から酢酸菌の分離・同定を行い、その分布を明らかにすることを目的とした。また、東南アジアの試料から分離・同定した *Frateuria*、さらに、*Gluconacetobacter nataicola* sp. nov., *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. の2新種の記載についても述べる。なお、本報告では、酢酸菌の分布に関する理解のために、現在までわれわれが行ってきた東南アジア（インドネシア、タイ、フィリピン）の酢酸菌の分離・同定および分布の研究もあわせて述べることとする。

## 実験方法

**試料採取と集積培養** 热帯に属する東南アジアからの試料採取は1994～1999年にわたり行った。インドネシアのバリ、ジョグジャカルタ、ボゴール、タイのバンコク、フィリピンのロスバニヨスを採集地とした。亜熱帯に属する沖縄（沖縄本島、宮古島、石垣島、波照間島）での採集は2004、2005年に、そして、2005年に温帶に属する本州、四国、九州の30都府県において広く試料の採取を行った。試料は食酢もろみ、ナタデココをはじめとする醸酵食品、ランタナ、マンゴーな

どの花や果物である。

採取した試料は直接、集積培地を用いて培養を行った。集積培地には酵母エキス、ペプトン、シクロヘキシミドなどを添加し、pH を3.5に調整し、オートクレーブで121°C、15分滅菌した。集積培地組成を Table 1 に示した。

東南アジアの試料からの分離には、集積培地 I ~V、日本試料からの分離には分離の効率化を図るために集積培地 I, II, および VI を用いた。集積培地 VI は、主に *Asaia* 属細菌の分離を目的として作成した培地である。

**酢酸菌の分離** 集積培養で生育がみられた試料から GYP 培地 (1.0 % D-グルコース、1.0 % グリセロール、1.0 % ペプトン、0.5 % 酵母エキス、0.7 % CaCO<sub>3</sub>、および1.5 % agar) を用いて細菌を分離し、CaCO<sub>3</sub>を溶解しているコロニーを釣菌し、さらに細胞形態、カタラーゼ、オキシダーゼを観察し、KOH 試験（簡便なグラム染色に相当する）、pH 3.5 での生育試験を行い、酢酸菌と見なされる菌株を選抜した。

**属特異的生理試験による属の同定** 選抜した菌株について、属特異的生理試験（エタノール、グリセロール、乳酸の酸化、さらに、0.35 % 酢酸、30 % グルコース、ズルシトール存在下での生育）により属を大まかに推定した。属特異的生理試験については Table 2 に示した。

**16S rRNA 遺伝子系統解析** 16S rRNA 遺伝子系統解析により最終的な属を推定した (Lisdiyanti *et al.*, 2000)。

**DNA-DNA 類似度による同定** DNA はフェノール法 (Saito & Miura, 1963) で抽出し、G+C %含量の測定は

Table 1 Enrichment media used in this study.

Composition	Enrichment media at pH 3.5					
	I	II	III	IV	V	VI
D-Glucose	1.0	-	-	-	0.15	-
D-Sorbitol	-	2.0	-	-	-	1.0
D-Mannitol	-	-	2.0	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	2.0	-	1.0
Methanol	-	-	-	-	2.0	-
Ethanol	0.5	-	-	-	-	-
Peptone	1.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Yeast extract	0.8	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Acetic acid	0.3	-	0.2	-	-	-
Cycloheximide	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

The concentration of ingredients is expressed in (w/v) % or (v/v) %.

HPLC 法 (Tamaoka & Komagata, 1983) によった。系統解析の結果から分離菌株と近縁な種基準株をプローブとし、フォトビオチン標識法 (Ezaki *et al.*, 1989) により DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った。

## 結果と考察

試料採取 東南アジアでは約 400 点、日本では 403 点、総数約 800 点の試料を採取した。

分離菌株の同定 グラム陰性の好気性桿菌であり、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、そして、pH 3.5 で生育した分離菌株を酢酸菌として選抜した。次に、属特異的生理試験を行い、Table 2 に示した各属の性状、16S rRNA 遺伝子系統解析に基づき属を推定した。さらに、DNA 類似度により分離菌株 514 株を 7 属 35 種に同定した。分離菌株 514 株のうち、*Acetobacter* 属は 224 株、*Gluconobacter* 属 83 株、*Gluconacetobacter* 属 43 株、*Asaia* 属 141 株、*Kozakia* 属 4 株、*Saccharibacter* 属 1 株、*Frateuria* 属 18 株である。

集積培地と分離菌株数の関係 *Acetobacter* 属は酢酸とエタノールを添加した集積培地 I から多く分離された。*Gluconobacter* 属は集積培地 I, II から多く分離され、*Gluconacetobacter* 属のほとんどは集積培地 I から分離された。また、*Asaia* 属は集積培地 II, IV から分離され、さらに集積培地 II, IV に含まれる D-ソルビトールと D-ズルシトールの炭素源を両方含む集積培地 VI からも多く分離された。これまで、6 種類の集積培地を用いて様々な試料から分離を行ってきたが、集積培地 I は *Asaia* 属以外の酢酸菌を分離する培地として有効であり、集積培地 VI は *Asaia* 属の分離に有効であった。その他の属については、分離菌株数が少なく、関連性を

述べるにはいたっていないが、現段階では集積培地 I, VI の 2 種類の培地を用いることで、酢酸菌を網羅的に分離できると考えられる。集積培地の組成により選択的に酢酸菌の属を分離することができることから、自然界から目的の微生物を分離するには、目的微生物の性状や特徴を考慮した集積培地を用いることが有効である。集積培地と分離菌株数の関係を Table 3 に示した。

分離源と分離菌株数の関係 日本および東南アジアの醸酵食品、花や果実の約 800 点の試料から分離・同定した 514 株の酢酸菌のうち、*Acetobacter* 属と *Gluconacetobacter* 属は食酢もろみや東南アジア特有のナタデココなどの醸酵食品から多く分離された。特に、*Acetobacter pasteurianus* は酢のもろみから多く分離され、*Acetobacter pasteurianus* 以外の *Acetobacter* 属の種は果物からも分離された。これらの種はココナツやプラムなどの果実や果物を醸酵させた食品から多く分離されているので、果物などに生息していた酢酸菌がそのまま醸酵食品に移行した可能性が考えられる。*Gluconobacter* 属は醸酵食品に比べ、ハイビスカスやオレンジなどの花や果実に多く生息している傾向が見られた。さらに、*Asaia* 属は醸酵食品、果実からほとんど分離されず、様々な花に生息していると考えられる。したがって、分離源により分離される属や種が異なると考えられる。分離源と分離菌株の関係を Table 4 に示した。

国内試料から分離した酢酸菌 日本国の試料から、6 属 28 種の酢酸菌が分離・同定された。日本で唯一亜熱帯に属する沖縄では、国内で分離された 6 属すべてが分離された。中でも、沖縄のサトウキビ、パパイヤから分離した菌株に *Acetobacter* の 2 新種が認めら

Table 2 Phenotypic characterization at the genus level.

genus	oxidation of				growth on	
	acetate	lactate	ethanol	0.35% HAc	dulcitol	30% glucose
<i>Acetobacter</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Gluconobacter</i>	-	-	+	+	++	-
<i>Acidomonas</i>	+	-	+	+	+	+
<i>Gluconacetobacter</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Asaia</i>	w	w	-	-	-	+
<i>Kozakia</i>	w	w	+	+	+	-
<i>Saccharibacter</i>	-	w	-	-	+	+
<i>Swaminathania</i>	w	w	+	+	+/-	+
<i>Frateuria</i>	+	+	+	+	-	-

Abbreviation: HAc; acetic acid

れた。それぞれを分離採取地の沖縄にちなみ “*Acetobacter okinawensis*”, 分離源のパパイヤに由来する菌株を “*Acetobacter papayaee*”と命名し、新種の記載を行う予定である。

*Asaia* 属は東南アジアで分離されて以来、国内での

分離報告はなく、熱帯地方固有の酢酸菌と考えていたが、国内にも生息していることが明らかになった。さらに、好濃性の *Saccharibacter* 属の分離は 2 例目である。結果を Table 5 に示した。

Table 3 Diversity of acetic acid bacteria referring to enrichment media used.

genera	species	Enrichment Media						Total
		I	II	III	IV	V	VI	
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>	8 <sup>a)</sup>	3	-	-	-	-	11
	<i>A. pasteurianus</i>	43	20	12	-	-	1	76
	<i>A. peroxydans</i>	1	-	-	-	-	-	1
	<i>A. orleanensis</i>	21	1	4	-	-	-	26
	<i>A. loveniensis</i>	18	7	7	-	1	-	33
	<i>A. indonesiensis</i>	15	8	4	-	-	2	29
	<i>A. tropicalis</i>	12	1	2	-	-	-	15
	<i>A. syzygii</i>	10	2	1	-	-	-	13
	<i>A. cibinongensis</i>	1	-	1	-	-	-	2
	<i>A. orientalis</i>	1	6	2	-	-	-	9
	<i>A. cerevisiae</i>	2	-	-	-	-	1	3
	<i>A. oeni</i>	1	-	-	-	-	-	1
	“ <i>A. papayaee</i> ”	2	-	-	-	-	-	2
	“ <i>A. okinawensis</i> ”	2	-	-	-	-	-	2
	<i>Acetobacter sp.</i>	-	-	-	-	-	1	1
		137	48	33	0	1	5	224
<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i>	13	8	2	-	-	1	24
	<i>G. frateurii</i>	13	24	3	6	3	2	51
	<i>G. cerinus</i>	5	-	-	-	-	1	6
	<i>G. albidus</i>	-	-	-	-	-	1	1
	<i>G. thailandicus</i>	-	-	-	-	-	1	1
		31	32	5	6	3	6	83
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Ga. xylinus</i>	8	-	-	-	-	-	8
	<i>Ga. hansenii</i>	6	-	-	-	-	1	7
	<i>Ga. liquefaciens</i>	1	-	-	-	-	-	1
	<i>Ga. swingsii</i>	6	2	-	-	-	-	8
	<i>Ga. saccharivorans</i>	3	-	-	-	-	3	6
	<i>Gluconacetobacter sp. 1</i>	3	1	-	-	-	-	4
	<i>Gluconacetobacter sp. 2</i>	2	-	-	-	-	-	2
	<i>Gluconacetobacter sp. 3</i>	1	-	-	-	-	-	1
	<i>Gluconacetobacter sp. 4</i>	6	-	-	-	-	-	6
		36	3	0	0	0	4	43
<i>Asaia</i>	<i>As. bogorensis</i>	3	32	-	17	2	41	95
	<i>As. siamensis</i>	2	5	-	6	2	19	34
	<i>As. krunthepensis</i>	2	2	-	1	-	5	10
		7	39	0	24	4	67	141
<i>Kozakia</i>	<i>K. baliensis</i>	4	-	-	-	-	-	4
		4	0	0	0	0	0	4
<i>Saccharibacter</i>	<i>Saccharibacter sp.</i>	1	-	-	-	-	-	1
		1	0	0	0	0	0	1
<i>Frateuria</i>	<i>F. aurantia</i>	-	3	-	4	9	2	18
		0	3	0	4	9	2	18
total		216	125	38	34	17	84	514

<sup>a)</sup>; Numerals indicate the number of strains.

Abbreviations: A., *Acetobacter*; G., *Gluconobacter*; Ga., *Gluconacetobacter*; As., *Asaia*; K., *Kozakia*; F., *Frateuria*.

東南アジア試料から分離した酢酸菌　これまで分離源にされてこなかった熱帯特有の醸酵食品、花や果実を分離の対象として酢酸菌の分離を行った。その結果、インドネシア試料のランタナやイキソラの花から分離した*Asaia* 属と、同じくインドネシアの醸酵食品のス

ターターのラギーから分離した *Kozakia* 属の2新属を報告した (Lisdiyanti *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2000)。さらに、*Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter cibinongensis*, *Acetobacter orientalis*, *Gluconacetobacter saccharivorans*,

**Table 4** Diversity of acetic acid bacteria referring to isolation sources.

genera	species	Sources				Total
		Fermented foods	Fruits	Flowers	Others	
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>	11 <sup>a)</sup>	-	-	-	11
	<i>A. pasteurianus</i>	73	1	2	-	76
	<i>A. peroxydans</i>	-	1	-	-	1
	<i>A. orleanensis</i>	9	16	1	-	26
	<i>A. loveniensis</i>	14	17	-	2	33
	<i>A. indonesiensis</i>	8	14	6	1	29
	<i>A. tropicalis</i>	7	7	-	1	15
	<i>A. syzygii</i>	8	2	3	-	13
	<i>A. cibinongensis</i>	-	1	-	1	2
	<i>A. orientalis</i>	2	5	1	1	9
	<i>A. cerevisiae</i>	-	-	3	-	3
	<i>A. oeni</i>	1	-	-	-	1
	" <i>A. papayae</i> "	-	-	2	-	2
	" <i>A. okinawensis</i> "	-	-	-	2	2
	<i>Acetobacter sp.</i>	-	1	-	-	1
		133	65	18	8	224
<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i>	2	11	9	2	24
	<i>G. frateurii</i>	12	20	15	4	51
	<i>G. cereus</i>	-	5	1	-	6
	<i>G. albidus</i>	-	1	-	-	1
	<i>G. thailandicus</i>	-	-	1	-	1
		14	37	26	6	83
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Ga. xylinus</i>	8	-	-	-	8
	<i>Ga. hansenii</i>	5	2	-	-	7
	<i>Ga. liquefaciens</i>	-	1	-	-	1
	<i>Ga. swingii</i>	8	-	-	-	8
	<i>Ga. saccharivorans</i>	-	3	3	-	6
	<i>Gluconacetobacter sp. 1</i>	4	-	-	-	4
	<i>Gluconacetobacter sp. 2</i>	2	-	-	-	2
	<i>Gluconacetobacter sp. 3</i>	1	-	-	-	1
	<i>Gluconacetobacter sp. 4</i>	6	-	-	-	6
		34	6	3	0	43
<i>Asaia</i>	<i>As. bogorensis</i>	2	-	95	-	97
	<i>As. siamensis</i>	-	2	32	-	34
	<i>As. krunthepensis</i>	-	-	10	-	10
		2	2	137	0	141
<i>Kozakia</i>	<i>K. baliensis</i>	-	-	-	4	4
		0	0	0	4	4
<i>Saccheribacter</i>	<i>Saccharibacter sp.</i>	-	1	-	-	1
		0	1	0	0	1
<i>Frateuria</i>	<i>F. aurantia</i>	-	13	5	-	18
		0	13	5	-	18
total		183	124	189	18	514

<sup>a)</sup>; Numerals indicate the number of strains.

Abbreviations: *A.*, *Acetobacter*; *G.*, *Gluconobacter*; *Ga.*, *Gluconacetobacter*; *As.*, *Asaia*; *K.*, *Kozakia*; *F.*, *Frateuria*.

*Gluconacetobacter nataicola*, *Asaia bogorensis*, *Asaia siamensis*, そして, *Kozakia baliensis* の新種10種を記載した (Katsura et al., 2001; Lisdiyanti et al., 2000; Lisdiyanti et al., 2001; Lisdiyanti et al. 2006).

中でも, *Asaia* 属に属する菌株は, エタノールから

酢酸を生成せず, 0.35 %酢酸存在下で生育が阻害され, さらに35%もの高濃度のグルコース存在下に生育する. また, グルコン酸などの中間代謝物をほとんど蓄積しない. これらの性質は, これまでの酢酸菌に見られない性質であるとともに高い糖の酸化能を示すものであ

Table 5 Diversity of acetic acid bacteria referring to country origins.

genera	species	Sources				Total
		Japan	Indonesia	Thailand	The Philippines	
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>	11 <sup>a)</sup>	-	-	-	11
	<i>A. pasteurianus</i>	35	9	11	21	76
	<i>A. peroxydans</i>	1	-	-	-	1
	<i>A. orleanensis</i>	-	11	3	12	26
	<i>A. loveniensis</i>	2	27	-	4	33
	<i>A. indonesiensis</i>	2	20	-	7	29
	<i>A. tropicalis</i>	-	9	6	-	15
	<i>A. syzygii</i>	7	4	-	2	13
	<i>A. cibinongensis</i>	-	2	-	-	2
	<i>A. orientalis</i>	-	9	-	-	9
	<i>A. cerevisiae</i>	3	-	-	-	3
	<i>A. oeni</i>	1	-	-	-	1
	" <i>A. papayae</i> "	2	-	-	-	2
	" <i>A. okinawensis</i> "	2	-	-	-	2
<i>Acetobacter</i> sp.	<i>Acetobacter</i> sp.	1	-	-	-	1
		67	91	20	46	224
<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i>	3	17	4	-	24
	<i>G. frateurii</i>	5	35	8	3	51
	<i>G. cereus</i>	6	-	-	-	6
	<i>G. albidus</i>	1	-	-	-	1
	<i>G. thailandicus</i>	1	-	-	-	1
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Ga. xylinus</i>	-	8	-	3	11
	<i>Ga. hansenii</i>	1	-	-	6	7
	<i>Ga. liquefaciens</i>	1	-	-	-	1
	<i>Ga. swingsii</i>	8	-	-	-	8
	<i>Ga. saccharivorans</i>	6	-	-	-	6
	<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	4	-	-	-	4
	<i>Gluconacetobacter</i> sp. 2	2	-	-	-	2
	<i>Gluconacetobacter</i> sp. 3	1	-	-	-	1
	<i>Gluconacetobacter</i> sp. 4	-	-	-	3	3
		23	8	0	12	43
<i>Asaia</i>	<i>As. bogorensis</i>	46	25	17	9	97
	<i>As. siamensis</i>	21	9	2	2	34
	<i>As. krunthepensis</i>	7	3	-	-	10
		74	37	19	11	141
<i>Kozakia</i>	<i>K. baliensis</i>	-	4	-	-	4
		0	4	0	0	4
<i>Saccheribacter</i>	<i>Saccharibacter</i> sp.	1	-	-	-	1
		1	0	0	0	1
<i>Frateuria</i>	<i>F. aurantia</i>	2	16	-	-	18
		2	16	0	0	18
total		183	208	51	72	514

<sup>a)</sup>; Numerals indicate the number of strains.

Abbreviations: *A.*, *Acetobacter*; *G.*, *Gluconobacter*; *Ga.*, *Gluconacetobacter*; *As.*, *Asaia*; *K.*, *Kozakia*; *F.*, *Frateuria*.

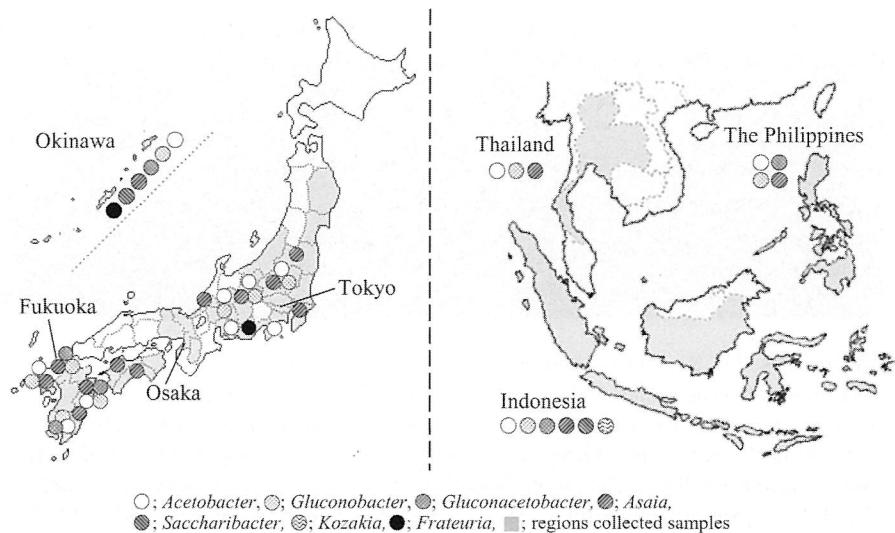


Fig. 2 Distribution of acetic acid bacteria in Japan and Southeast Asia.

る。また、*Kozakia*は、フルクトースやスクロースから多糖を生成する特徴がある。しかし、分離菌株が4株と少ないので、今後、本属の分離が課題である。国別の酢酸菌の分布をTable 5、日本国内の都府県別、東南アジアの国別の酢酸菌の分布をFig. 2に示した。

日本・東南アジアにおける酢酸菌の分布 热帯に属する東南アジアのインドネシア試料から6属16種208株、タイ試料から3属7種51株、フィリピン試料から4属11種72株、計7属18種331株を分離・同定した(Lisdiyanti *et al.*, 2003b)。一方、日本国内からは、亜熱帯に属する沖縄試料から6属10種、温帶試料から5属22種、計6属28種183株の酢酸菌を分離・同定した。東南アジアの国々の酢酸菌の分布と国内の分布を比較しても、各属とも温帶から热帯にわたるアジア地域全般より7属35種514株の酢酸菌が分離され、酢酸菌は広範囲にわたり生息していることが明らかになった。現時点では、酢酸菌の分布に気候带や地域による特異性はないものと考えられる。

前述のように、日本の試料から分離された酢酸菌の種の数は東南アジアの試料より分離した種の数より多かった。一般に、生物の多様性は热帯・亜热帯に見られると言われているが、日本から6属28種分離されていることから、温帶に属する日本の酢酸菌の多様性が示唆された。今後、分離培地・分離方法の改良により新規酢酸菌の分離も期待出来るので、さらなる調査が必要である。国別の分離菌株の数をTable 5に示した。

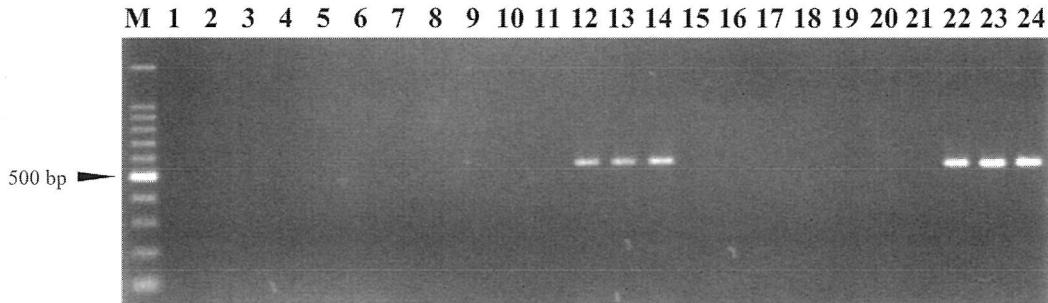
#### 新種の記載

Description of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov.

*Gluconacetobacter saccharivorans* (sac.cha.ri.vo'rans. L. neut. n. *saccharum* sugar; L. part. adj. *vorauns* devouring; N.L. masc. adj: *saccharivorans* sugar-devouring).

Cells are Gram-negative and rod-shaped, measure 0.5-0.8 by 1.0-1.5  $\mu\text{m}$ , occur singly or in pairs and are non-motile. Strictly aerobic, catalase-positive and oxidase-negative. Cellulose and a water-soluble brown pigment are not produced. Acetate and lactate are oxidized to  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$ . Acetic acid is produced from ethanol. Growth occurs in the presence of 0.35 % acetic acid in AG medium, but not at 1 or 5 % acetic acid in AE broth. D-Glucose and D-mannitol are assimilated in Hoyer-Frater medium, Frater's modified Hoyer's medium and Asai's broth, but ethanol is not. Dihydroxyacetone is produced from glycerol and growth occurs on mannitol agar and glutamate agar. D-Gluconate and 2-keto-D-gluconate are produced from D-glucose, but 5-keto-gluconate and 2,5-diketogluconate are not. Acid is produced from L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, glycerol, ethanol, propan-1-ol, butan-1-ol and butan-2-ol, but not from D-fructose, L-sorbose, lactose, maltose, sucrose, raffinose, galactitol, D-mannitol, D-sorbitol or starch.

The major quinone is Q-10 and the minor quinone is Q-9. The type strain is LMG 1582<sup>T</sup> (=NRIC 0614<sup>T</sup>) and its G+C content is 61 mol %. Isolated from beet juice in Germany in 1927.



**Fig. 3** Profiles of PCR products of *mxaF* gene.

Abbreviations: M, 100 bp ladder; 1, *Acetobacter aceti* IFO 1481<sup>T</sup>; 2, *Acetobacter pasteurianus* LMG 1262<sup>T</sup>; 3, *Acetobacter pasteurianus* LMG 1698; 4, *Acetobacter pasteurianus* LMG 1701; 5, *Acetobacter pasteurianus* LMG 1803; 6, *Acetobacter pasteurianus* LMG 1805; 7, *Acetobacter pomorum* LTH 2458<sup>T</sup>; 8, *Acetobacter lovaniensis* IFO 13753<sup>T</sup>; 9, *Acetobacter lovaniensis* AJ 2414; 10, *Acetobacter malorum* DSM 14337<sup>T</sup>; 11, *Gluconobacter oxydans* IFO 14819<sup>T</sup>; 12, *Acidomonas methanolica* NRIC 0498<sup>T</sup>; 13, *Acidomonas methanolica* LMG 1667; 14, *Acidomonas methanolica* NRIC 0554; 15, *Gluconacetobacter liquefacience* IFO 12288<sup>T</sup>; 16, *Asaia bogorensis* NBRC 16594<sup>T</sup>; 17, *Kozakia baliensis* NBRC 16664<sup>T</sup>; 18, *Swaminathania salitolerans* LMG 21291<sup>T</sup>; 19, *Saccharibacter floricola* JCM 12116<sup>T</sup>; 20, *Neoasaia chiangmaiensis* NBRC 101099<sup>T</sup>; 21, *Frateuria aurantia* IFO 3245<sup>T</sup>; 22, *Methylobacterium extroquens* NRIC 0601<sup>T</sup>; 23, *Methylobacterium organophilum* NRIC 0602<sup>T</sup>; 24, *Ancylobacter aquaticus* IAM 12364<sup>T</sup>. Lanes from 22 to 24 were used as positive controls.

#### Description of *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov.

*Gluconacetobacter nataicola* (na.ta.i'co.la. N.L. neut. n. *nataum* nata (a food composed of cellulose produced by acetic acid bacteria in Southeast Asia); L. masc. suff. -cola inhabitant; N.L. masc. n. *nataicola* nata inhabitant, referring to the isolation source, nata de coco, of the type strain).

Cells are Gram-negative and rod-shaped, measure 0.5–0.8 by 1.0–1.5  $\mu\text{m}$ , occur singly or in pairs and are non-motile. Strictly aerobic, catalase-positive and oxidase-negative. Cellulose is produced, but water-soluble brown pigment is not. Acetate and lactate are oxidized to  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$ . Acetic acid is produced from ethanol. Growth occurs in the presence of 0.35 % acetic acid in AG medium, but not at 1 or 5 % acetic acid in AE broth. D-Mannitol is assimilated in Hoyer-Frateur medium, Frateur's modified Hoyer's medium and Asai's broth, but D-glucose or ethanol is not. Dihydroxyacetone is produced from glycerol and growth occurs on mannitol agar and glutamate agar. D-Gluconate, 2-keto-D-gluconate and 5-D-keto-gluconate are produced from D-glucose, but 2,5-diketogluconate is not. Acid is produced from L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, ethanol, butan-1-ol and butan-2-ol, but not from D-fructose, L-sorbose, lactose, maltose, sucrose,

raffinose, glycerol, galactitol, D-mannitol, D-sorbitol, propan-1-ol, or starch. The major quinone is Q-10 and the minor quinone is Q-9.

The type strain is LMG 1536<sup>T</sup> (=NRIC 0616<sup>T</sup>) and its G+C content is 62 mol %. Isolated from nata de coco in the Philippines.

**インドネシア試料より分離した *Frateuria aurantia* の同定** 热帯地域の酢酸菌分離の過程で、インドネシアの果物と花より水溶性褐色色素を生成する酢酸菌16株を分離した。代表株2株の16S rRNA 遺伝子全塩基配列解析と形態学的、生理・生化学的性状に基づき、両株を  $\gamma$ -Proteobacteria の *Frateuria* 属と同定した (Lisdiyanti *et al.*, 2003a)。分離株は好気性、グラム陰性桿菌で、単一極鞭毛により運動性を示した。またpH 3.5で生育し、エタノールから酢酸を生成、乳酸を酸化したが酢酸は酸化しなかった。0.35%の酢酸の存在下では生育せず、硫化水素を生成しなかった。グルコースからグルコン酸、2-ケトグルコン酸、2,5-ジケトグルコン酸を生成した。ユビキノン Q-8 を有し、主要菌体脂肪酸は iso-C15: 0 であり、G+C 含量は 62-63% であった。本研究は *F. aurantia* の4回目の分離例であり、この種が日本のみならず熱帯地域にも生息していることを明らかにした。

*Acidomonas* 属細菌について *Acidomonas* 属細菌は本研究の中で分離することができなかったが、われわれの一連の酢酸菌の研究のなかで汚水処理場の活性汚泥などから分離することができた。また、本属細菌を中心とした酢酸菌のメタノール資化性についても研究した。

*Acidomonas* は、他の酢酸菌と異なり、醸酵食品、果実や花から分離することはできなかった。1属1種のこの属に属する菌株は、本研究を開始する以前、世界の菌株保存機関に4株しか存在しなかった。しかし、われわれの研究により新たに16株を分離し、この属の修正を行うとともに、分離菌株を微生物株保存機関に寄託した (Yamashita *et al.*, 2004)。

酢酸菌のメタノール資化性については古くから報告があるが、供試菌株のメタノール資化性培地での生育は微弱で、その資化性も疑問視されていた。そこで、過去にメタノールを炭素源とする培地に生育できると報告されている菌株、および酢酸菌の各属基準株の21株の酢酸菌について、メタノール培地での生育、メタノール資化性にかかるメタノール脱水素酵素、それをコードする *mxaF* 遺伝子から、メタノール資化性の有無を検討した。その結果、*Acidomonas* 属以外の酢酸菌の中で、メタノール培地で生育すると報告されていた菌株は全て偽陽性の生育 (false positive growth) であり、酢酸菌のなかでメタノールを資化するのは *Acidomonas* のみであること明らかにした (鈴木ほか, 2007)。*mxaF* 特異的プライマーによる遺伝子の検出を行った結果を Fig. 3 に示した。

## 要 約

われわれは、1994年から東南アジアをはじめ、沖縄、九州、四国、本州の醸酵食品、花や果実の約800点の試料から514株の酢酸菌を分離し、7属、35種と同定した。このことから、酢酸菌は、東南アジアから日本にわたり広い範囲に分布していることが明らかになった。さらに、集積培地の特徴や分離源により分離される属や種にも差異があることが認められた。これまで、本研究のように広範囲にわたる様々な、しかも多数の試料から酢酸菌を分離し、その分布や生息域を明らかにした報告はない。また、本研究は、2新属12新種を含む広範囲の酢酸菌の分類学的研究にかかわり、その成果から新しい酢酸菌の分類体系の構築に貢献した。

また、*Asaia* 属細菌のように非典型的な酢酸菌の性質を有する酢酸菌も分離された。これまで酢酸菌は、糖類や糖アルコールの酸化などの生理・生化学的性状に基づいて分類されてきた。しかし、現在では 16S

rRNA 遺伝子の系統解析、その他の遺伝子レベルでの解析から細菌の分類が論じられている。その結果、従来から知られている *Acetobacter*, *Gluconobacter* とともに非典型的な *Asaia* も *Acetobacteraceae* 科に含まれることになり、酢酸菌の概念も拡大していることを理解しなければならない。

## 本研究助成による研究発表

- 1) Lisdiyanti, P., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2003). Identification of *Frateuria aurantia* strains isolated from Indonesian sources. *Microbiol. Cult. Coll.* **19**: 81-90.
- 2) Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2003). Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiol. Cult. Coll.* **19**: 91-99.
- 3) Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2004). Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Proceedings of the Tenth International Congress for Culture Collections (ICCC-10)*, Tsukuba, Japan. p.541.
- 4) Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2005). Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Vinegars and Acetic Acid Bacteria International Symposium*. Book of Abstracts, Reggio Emilia, Italy. p.89.
- 5) Suzuki, R., Komagata, K. & Uchimura, T. (2005). Isolation and Identification of *Asaia* Strains and Other Acetic Acid Bacteria from Flowers in the Subtropical Region Okinawa in Japan. *Vinegars and Acetic Acid Bacteria International Symposium*. Book of Abstracts, Reggio Emilia, Italy. p.113.
- 6) Lisdiyanti, P., Navarro, R.R., Uchimura, T. & Komagata, K. (2005). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov., *Gluconacetobacter maltaceti* sp. nov., and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Vinegars and Acetic Acid Bacteria International Symposium*. Book of Abstracts, Reggio Emilia, Italy. p.112.
- 7) 鈴木玲、駒形和男、内村泰 (2005). 沖縄の花、果実より分離した酢酸菌の同定. 日本農芸化学会2005年度大会札幌 要旨集 p.45.
- 8) 鈴木玲、駒形和男、内村泰 (2005). 沖縄の花、果実より分離した酢酸菌の同定. 日本微生物系統分類研究会 東京
- 9) Lisdiyanti, P., Navarro, R.R., Uchimura, T. & Komagata, K. (2006). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2101-2111.
- 10) 鈴木玲、Lisdiyanti, P., 駒形和男、内村泰 (2006). 酢酸菌のメタノール資化性について. 日本微生物系統分類研究会岐阜

- 11) 鈴木玲, Lisdiyanti, P., 駒形和男, 内村泰 (2007). 酢酸菌のメタノール資化性. 日本農芸化学会2007年度大会 東京 要旨集. p.163

## 分離菌株の寄託・保存

本研究で分離した菌株を財団法人発酵研究所 (IFO), 東京農業大学菌株保存室 (NRIC), 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 (JCM), Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (LMG), German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) などの菌株保存機関におよそ200株寄託した. 代表的な菌株を下に記した.

*Acetobacter indonesiensis* 5H-1<sup>T</sup> (=NRIC 0313<sup>T</sup> = JCM 10948<sup>T</sup> = IFO 16471<sup>T</sup>)

*Acetobacter tropicalis* Ni-6b<sup>T</sup> (=NRIC 0312<sup>T</sup> = JCM 10947<sup>T</sup> = IFO 16470<sup>T</sup>)

*Acetobacter syzygii* 9H-2<sup>T</sup> (=NRIC 0483<sup>T</sup> = JCM 11197<sup>T</sup> = IFO 16604<sup>T</sup>)

*Acetobacter cibinongensis* 4H-1<sup>T</sup> (=NRIC 0482<sup>T</sup> = JCM 11196<sup>T</sup> = IFO 16605<sup>T</sup>)

*Acetobacter orientalis* 21F-2<sup>T</sup> (=NRIC 0481<sup>T</sup> = JCM 11195<sup>T</sup> = IFO 16606<sup>T</sup>)

*Acidomonas methanolica* TS 0101 (=NRIC 0548)

*Acidomonas methanolica* TS 0114 (=NRIC 0549)

*Gluconacetobacter saccharivorans* LMG 1582<sup>T</sup> → NRIC 0614<sup>T</sup>

*Gluconacetobacter nataicola* LMG 1536<sup>T</sup> → NRIC 0616<sup>T</sup>

*Asaia bogorensis* 71<sup>T</sup> (=NRIC 0311<sup>T</sup> = JCM 10569<sup>T</sup>)

*Asaia siamensis* S60-1<sup>T</sup> (=NRIC 0323<sup>T</sup> = JCM 10715<sup>T</sup> = IFO 16457<sup>T</sup>)

*Kozakia baliensis* Yo-3<sup>T</sup> (=NRIC 0448<sup>T</sup> = JCM 11301<sup>T</sup> = IFO 16664<sup>T</sup> = DSM 14400<sup>T</sup>)

*Frateuria aurantia* B71D-1 (=NRIC 0567)

*Frateuria aurantia* B71D-3 (=NRIC 0568)

## 謝 辞

この研究に対し、3年間助成していただ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。また研究を進めるにあたり、貴重なご助言を賜りました東京大学名誉教授駒形和男先生に感謝申し上げます。本研究の遂行にあたりご協力戴いた那覇市識名酒造(有) 識名研二氏、試料採取の協力者である山岡育子氏に感謝いたします。この研究の一部は学部生の卒

業論文研究として金岡裕美君、杉田磨理子君、白土泰彦君、小関かずさ君、濱田綾乃君たちに実験を担当していただきました。

## 文 献

- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**: 224-229.
- Greenberg, D.E., Porcella, S.F., Stock, F., Wong, A., Conville, P.S., Murray, P.R., Holland, S.M. & Zelazny, A.M. (2006). *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 2609-2616.
- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**: 559-563.
- Lisdiyanti, P., Yamada, Y., Uchimura, T., & Komagata, K. (2003a). Identification of *Frateuria aurantia* strains isolated from Indonesian sources. Microbiol. Cult. Coll. **19**: 81-90.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R.R., Uchimura, T. & Komagata, K. (2006). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 2101-2111.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2000). Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov. and *Acetobacter estunensis* (Carr 1963) comb. nov. J. Gen. Appl. Microbiol. **46**: 147-165.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolates from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. J. Gen. Appl. Microbiol. **47**: 119-131.
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2003b). Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. Microbiol. Cult. Coll. **19**: 91-99.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widayastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2002). *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 813-818.
- Saito, H. & Miura, K. (1963). Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochim.

日本・東南アジア産酢酸菌の分離・分類に関する研究

- Biophys. Acta. **72**: 619-629.
- 鈴木玲, Lisdiyanti, P., 駒形和男, 内村泰 (2007). 酢酸菌のメタノール資化性. 日本農芸化学会2007年度大会 東京 要旨集 p.163
- Tamaoka, J. & Komagata, K. (1983). Determination of DNA base composition by reverse-phase high-performance liquid chromatography. FEMS Microbiol. Lett. **25**: 125-128.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widayastuti, Y., Saono, S.,
- Seki, T., Uchimura, T. & Komagata, K. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**: 823-829.
- Yamashita, S., Uchimura, T. & Komagata, K. (2004). Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**: 865-870.

## 新規な微生物資源としての耐熱性酢酸菌の 分離・分類・保存および機能解析

松 下 一 信

山口大学農学部

〒753-8515 山口市吉田1677-1

### Isolation of Thermotolerant Acetic Acid Bacteria and Functional Analysis for its Utilization as Novel Microbial Resources

Kazunobu Matsushita

Yamaguchi University, Yoshida 1677-1, Yamaguchi, Yamaguchi 753-8515, Japan

Several hundreds of thermotolerant acetic acid bacteria were isolated from fruits or flowers of Thailand by collaboration with Thai researchers. Many of them were able to well grow at 37°C or more, while mesophilic IFO strains exhibited a poor growth at the same conditions. In order to utilize such the thermotolerant acetic acid bacteria, several typical strains were selected and developed to utilize them for production of useful products.

*Acetobacter pasteurianus* SKU1108 (NBRC 101655) was established as a high temperature acetic acid fermenter, which can produce acetic acid stably at 37°C, and further improved to be capable of the fermentation at 39°C or more. *Acetobacter tropicalis* SKU1100 (NBRC 101654) was established as a high temperature pellicle-polysaccharide producer, which can produce a stable pellicle at 40°C and more. This pellicle was composed of hetero-polysaccharide consisting of glucose, rhamnose, and galactose. We have also found other thermotolerant strains producing different types of pellicle composed of glucose/rhamnose-type and glucose/rhamnose/xylose-type polysaccharides as well as cellulose-homopolymer. *Gluconobacter frateurii* CHM54 (NBRC 101660) was isolated as a high temperature sorbose producer, which is not stable and thus now trying to obtain an adaptive strain exhibiting a stable productivity at 37°C. In addition, one strain (not classified yet) was selected to be able to produce 5-ketogluconate at 37°C.

Thus, we have established the occurrence of thermotolerant acetic acid bacteria, and also demonstrated their usefulness for the product fermentation at higher temperature. The findings and technology would be very important to overcome the problem caused by global green house effect.

Key words: Acetic acid bacteria, Thermotolerant, Acetic acid fermentation, Oxidative fermentation, Pellicle polysaccharide

酢酸菌の研究の歴史は古く19世紀後半の Pasteur や Beijerinck による *Acetobacter* の研究にさかのぼる。国内でも、朝井の *Gluconobacter* 研究 (Asai, 1968) に始まる古い伝統を有しており、近藤・飴山・山田・駒形へと続く分類・系統学的研究と朝井・相田、さらには飴山・足立へと引き継がれてきた生理・生化学的研究へと発展を続けている。

このような酢酸菌研究の流れの中で、私たちは酢酸

菌の生理学的特性の解明とその特性を利用した応用微生物学研究を展開している (Adachi *et al.*, 2003; Matsushita *et al.*, 1994; Matsushita *et al.*, 2002)。最近になって、その「酢酸菌の生理学とバイオテクノロジー」研究に、タイとの共同研究をベースにした新しい酢酸菌研究の方向を加えようとしている。それは「耐熱性」概念であり、耐熱性を有する酢酸菌を分離し、その分類およびその耐熱性原理の解明に加えて、その応用・利用に関する研究を志向するものである。

酢酸菌を始めとする多くの発酵微生物は比較的低温を好み、その発酵の温度管理が発酵生産能に決定的に重要である。それ故、耐熱性を有する酢酸菌をはじめ

E-mail: kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp

共同研究者：外山博英（山口大学農学部助教授；現・琉球大  
教授）、足立収生（山口大学名誉教授）

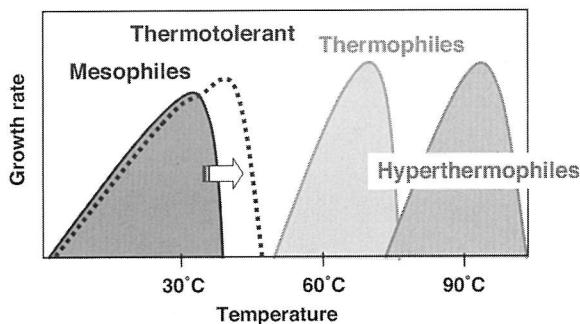


Fig. 1 Thermotolerant microorganisms; their relation with mesophiles, thermophiles, and hyperthermophiles.

発酵微生物の開発は国内の発酵産業へ大きな貢献となる。加えて、地球温暖化が進行する中、発酵プロセスの冷却コストの削減とそれに付随する CO<sub>2</sub> の削減は社会的な要請「京都議定書の遵守」に発酵分野から貢献することとなるとともに、もともと外気温が高温のため醸造が脆弱であった東南アジアにおける発酵産業の育成につなげることも可能になる。

発酵微生物はそもそも高度に進化したバクテリアもしくは真核微生物である常温性微生物であり、進化系統的視点から好熱性・超好熱性のものは期待できない。そのため、高温下で適応によって 10~20°C その生育温度の上昇した微生物を分離していくことが合理的である (Fig. 1)。そこで、本研究では、(亜)熱帯地方であるタイの花果実から、共同研究者によって分離された酢酸菌を基に、その「耐熱性」の検索と得られた耐熱性酢酸菌の分類、その耐熱性を有する生理学機能の特定をすすめるとともに、その有効利用をめざした開発的研究も目的に加えて、すすめられた。

## 実験方法

**耐熱性酢酸菌の分離法** *Acetobacter* 属酢酸菌の分離には以下の方法が使われた。まづ、酢酸 (2~4%) およびエタノール (4~6%) を添加した滅菌水あるいは滅菌したココナッツジュースに、種々の果実の断片および花を入れ、ガーゼでカバーして 30°C および 37°C で 3~7 日間、静置培養した。その後、それらの集積培養から、4% エタノールを含む YPG 寒天培地 (0.5% 酵母エキス, 0.5% ポリペプトン, 1% グリセロール, 0.5% 炭酸カルシウム, 1.5% 寒天) もしくは 4% エタノールおよび 3 mg/100 mL のプロモクレゾール・パープルを含むココナッツジュース寒天プレート上にストリークし、YPG 寒天培地でハローをつくるか、ココナッツジ

ュース寒天で黄色になるコロニーとして分離した (Kanchanara *et al.*, 2002; Saeki *et al.*, 1997)。

一方、*Gluconobacter* 属酢酸菌の分離では、以下のように異なる集積培地を含むボトルに、花および果実を入れて、30°C および 37°C で 5~7 日間、静置培養した。この時の集積培地は、1% D-ソルビトール (もしくは D-マンニトール), 0.1% 酵母エキス, 0.1% ポリペプトンを含む溶液に 1 M グルコン酸を添加して pH を 4.0 に調節したものである。集積培養の後、3 mg/100 mL のプロモクレゾール・パープルを加えた同じ組成の寒天プレート上にストリークし、コロニーが黄色になったものを分離して以降の実験に供した (Moonmangmee *et al.*, 2000)。

得られた菌株はポテト培地 (1% 酵母エキス, 1% ポリペプトン, 2% グリセロール, 0.5% グルコース, 20 mL/100 mL ポテトエキス, 1.5% 寒天) で作製したスラント上に生育させ、4°C で 1~2 ヶ月保存した。長期保存の場合には、新たに開発した 50% グリセロール (滅菌グリセロールと培養液を 1 対 1 で混合したもの) ・ストックを作製し、-80°C で保存した。

**分離菌株の培養方法** スラント保存株から、白金針で 5 mL のポテト培地 (上述のポテト培地から寒天を除いたもの) に植菌し、一晩 30°C で振とう培養して種培養とした。本培養は、エーレンマイヤーフラスコに目的に応じて 100 mL の培地を入れ、この種培養液を 0.1~0.5% のイノキュラムで添加し、種々の温度、種々の培養法 (振とう培養もしくは静置培養) で培養した (Moonmangmee *et al.*, 2000; Saeki *et al.*, 1997)。用いられた培養培地は、*Acetobacter* 属酢酸菌の場合は、YPGD 培地 (0.2% 酵母エキス, 0.2% ポリペプトン, 0.5% グリセロール, 0.5% グルコース) を基本培地とし、それにエタノールや酢酸を添加して培養した。一方、*Gluconobacter* 属酢酸菌の場合は、ソルビトール培地 (1~5% ソルビトール, 0.2% 酵母エキス, 0.2% ポリペプトン) や SGG 培地 (0.3% 酵母エキス, 0.3% ポリペプトン, 0.3% グリセロール, 0.5% グルコース, 2% グルコン酸) のいずれかを基本培地として用いた。

**菌株の同定方法** 分離した菌株の同定は、Bergey's Manual Systematic Bacteriology に従った生理学的解析 (Moonmangmee *et al.*, 2000) (グラム染色、運動性、色素生成、エタノールからの酸生成、酢酸や乳酸の酸化能、グリセロールからのジヒドロキシアセトン生成能、種々の糖アルコールの酸化能、ビタミン要求性、カタラーゼ生成能、ユビキノン種の特定など)、そして一部、16S rRNA 配列の解析を行い、その配列の BLAST 解析に基づく同定も行われた。

**酵素活性の測定法** 種々の酵素活性の測定のために、菌体を遠心によって集菌し、集めた菌体を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) もしくは 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で洗浄し、同じ緩衝液に懸濁してフレンチプレス (16,000 psi) で2回破碎し、低速遠心 (9000 X g, 10 min) で除沈した後、高速遠心 (100,000 X g for 90 min) によって、細胞膜画分と細胞質画分に分離した。細胞膜に存在する種々の脱水素酵素（アルコール、アルデヒド、グルコース、グリセロール、ソルビトール、アラビトール、またはグルコン酸脱水素酵素など）はフェリシアニドもしくは PMS-DCIP を電子受容体として、常法により測定した (Chinnawirotisan *et al.*, 2003; Moonmangmee *et al.*, 2002a)。また、細胞質の NAD(P) 依存の脱水素酵素（アルコール、アルデヒド、またはソルビトール脱水素酵素など、ソルボース、2-ケトグルコン酸、または5-ケトグルコン酸還元酵素など）は NAD(P)H の吸収の増大を常法に従って分光光度計で測定した (Moonmangmee *et al.*, 2002a)。

**菌膜多糖成分の分析法** 種々の菌膜多糖の分析のためには、遠心によって集めた菌体を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で洗浄し、同じ緩衝液に懸濁して超音波処理（最大出力、20 min）を行った。その後、遠心分離 (9000 X g, 10 min), さらに超遠心分離 (150,000 X g, 90 min) を行い、その上澄みを調製した。この上澄みを DNase およびプロテアーゼで処理した後に、0.1% SDS を含む 25mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) に対して透析した。この透析液を同じ緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose にアプライし、さらに同じ緩衝液でカラムから溶出することによって、タンパク質および脂質成分を含む不純物と分離した。得られた溶出画分は 2倍量のイソプロピルアルコールで沈殿・濃縮して、粗多糖画分とした (Moonmangmee *et al.*, 2002b)。得られた多糖は、2N TFA で加水分解した後、シリカゲル薄層クロマトグラムによって分析された。

**その他の分析方法** 酢酸濃度（酸度）はフェノールフタレンを指示薬として 0.5N NaOH による滴定で行われた。その他の酸化生成物は酵素法もしくはシリカゲル薄層クロマトグラムによって測定された (Moonmangmee *et al.*, 2002a; Toyama *et al.*, 2005)。

## 結果および考察

**タイの果実および花からの耐熱性酢酸菌の分離とそれらの分類** タイ・カセサート大のグループによって、種々の果実の断片からの集積培養によって、主に *Acetobacter* 属酢酸菌 129 株 (SKU1001~SKU1129株) が分離された (Saeki *et al.*, 1997)。マハサラカーン大の

共同研究者によても、タイの果実と花から、同様な手法で *Acetobacter* 属酢酸菌 22 株 (MSU01~MSU22 株) (Kanchanara *et al.*, 2002) および他の 149 株 (HKK001~HKK149: 未発表) が分離された。また、キンモンクト工科大の共同研究者によって、タイの花および果実の集積培養（この場合は、1% ソルビトールを添加し、グルコン酸で pH を 4.0 に調節して行われた。）から、主に *Gluconobacter* 属酢酸菌 CHM 株および TDH 株がそれぞれ 54 株 (CHM 01~CHM54 株) (Moonmangmee *et al.*, 2000) および 44 株 (TDH-B, TDH-C, TDH-D, TDH-E, TDH-F, TDH-G 株など: 未発表) が分離された。

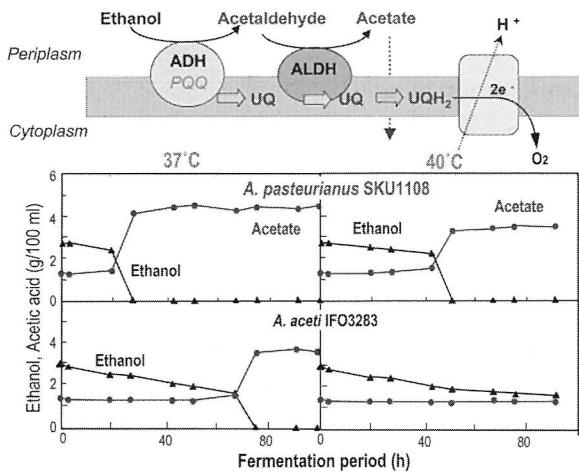
これらのタイでの分離株のほとんどについて、形態学的および生理・生化学的分類をすすめると並行して、その生育温度の特性が調べられた。結果、IFO 所有の多くの酢酸菌株が 37°C での生育が不良であるのに対し、タイから分離された *Acetobacter* 属酢酸菌の多くの株が 37°C で良好な生育を示し、かなりの菌株が 40°C での生育が可能であった。SKU 129 株では、その 38% が 40°C で生育可能であり、3% 酢酸存在下でもその 37% の株が 37°C で良好な生育を示した（文献 (Saeki *et al.*, 1997) および未発表）。一方、分離された *Gluconobacter* 属酢酸菌は、*Acetobacter* 属酢酸菌に比べ、耐熱性を示すものが比較的少なく、CHM 54 株のうち、37°C で良好に生育できるものは 8 株であり (Moonmangmee *et al.*, 2000)，調べられた TDH 株 39 株のなかでも 37°C では 24 株が生育できるが、良好な生育を示すのは 4 株しかない（未発表）。

それらの形態学的・生理学的解析と 16S rDNA 解析に基づいて、その属および種が特定されたものは、*Acetobacter aceti* 30 株, *A. tropicalis* 10 株, *Gluconobacter frateurii* 9 株, *Acetobacter rancens* 7 株, *Acetobacter lovaniensis* 6 株, *Acetobacter pasteurianus* 3 株, *Gluconacetobacter xylinus* 2 株, *Acetobacter syzygii* 1 株であり、その他の株については引き続き解析をすすめているところである（未発表）。

### 耐熱性酢酸菌の有用な生理機能について得られた知見

耐熱性酢酸菌の有用な生理機能として以下の 5 つの項目について、分離菌の調査・検討をすすめ、現在までに以下のような結果が得られている。

1. エタノール酸化能及び酢酸耐性能：分離された耐熱性 *Acetobacter* 属菌（調査 151 株）のうち 38 株が 37°C で良好に 8% エタノールを酸化することができ、同じく 38 株が 3% 酢酸存在下でも 37°C で良好な生育を示した。しかし、このような高温下でのエタノール酸化能と酢酸耐性能は必ずしもパラレルではなく、両能力を同時に示すものは 11 株であった。これらの中で、もっとも良好な酢酸発酵能（エタノール酸化能）を示

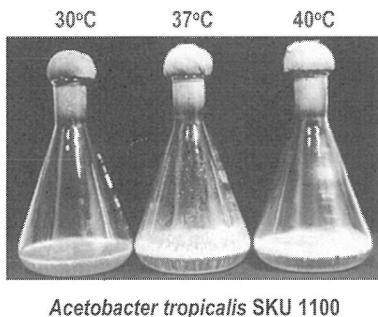


**Fig. 2** Comparison of acetic acid fermentation at high temperature between *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 and *Acetobacter pasteurianus* IFO3283, and its enzyme system for acetic acid fermentation.

*A. pasteurianus* SKU1108 was able to oxidize ethanol rapidly and to produce acetate at 37°C, and more slowly at 40°C. Whereas, in *A. pasteurianus* IFO3283, these ability was very much reduced at such the high temperatures. Ethanol is oxidized by two sequential enzyme reactions of quinoprotein alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) located on the periplasmic side of the cytoplasmic membrane. The reducing equivalents from ethanol are transferred to terminal oxidase via ubiquinone.

すものは、*A. pasteurianus* SKU 1108株であり、37°Cで常温菌*A. aceti* (*A. pasteurianus*と再同定) IFO 3283株の発酵能が低下するのに対し、SKU 株は良好な発酵を行うことが明らかになっている (Saeki *et al.*, 1997) (Fig. 2). このエタノール酸化反応は酢酸菌細胞膜表層に結合して存在するアルコール脱水素酵素 (ADH) とアルデヒド脱水素酵素が呼吸鎖末端のユビキノール・オキシダーゼとリンクして起こる呼吸鎖酸化反応であり、ADH の欠損は酢酸生成能を失うだけでなく、エタノールの資化に伴う著しい生育の増加をもたらすことも明らかになっている (Chinnawirotisan *et al.*, 2003). この SKU 1108 株を高温 (37°C および 39°C) で培養を繰り返すことによって、39°Cでも安定に酢酸発酵する能力をもつ菌株に育種できることを明らかにした (未発表).

2. 菌膜多糖生成能：分離された耐熱性 *Acetobacter* 属菌（一部 *Gluconacetobacter* 属菌を含む調査された 114 株）のうち、ほぼ 50% のものが 30°C での静置培養において菌膜を形成し生育したが、37°C でも良好に菌膜を形成できる株は 22 株であった。その内の 8 株は 40°C でも安定な菌膜を形成して生育することができた (Fig. 3)。その中でも、代表的な菌膜生成能を有する耐熱性酢酸菌は、*Acetobacter tropicalis* SKU 1100 株であり、40°C でも 37°C 以上に安定した菌膜を形成する能力を有している (Fig. 3)。この *A. tropicalis* SKU 1100 株



**Fig. 3** Pellicle formation in *Acetobacter tropicalis* SKU1100 and some other thermotolerant acetic acid bacteria at different temperatures.

*A. tropicalis* SKU1100 could produce a stable pellicle on the medium surface at 37°C and 40°C more than at 30°C. Other thermotolerant SKU or HKK strains also could do the pellicle formation at 37°C and 40°C, but not in mesophilic NBRC and MB strains. *Gluconacetobacter xylinus* G9 was also isolated as a thermotolerant cellulose producer.

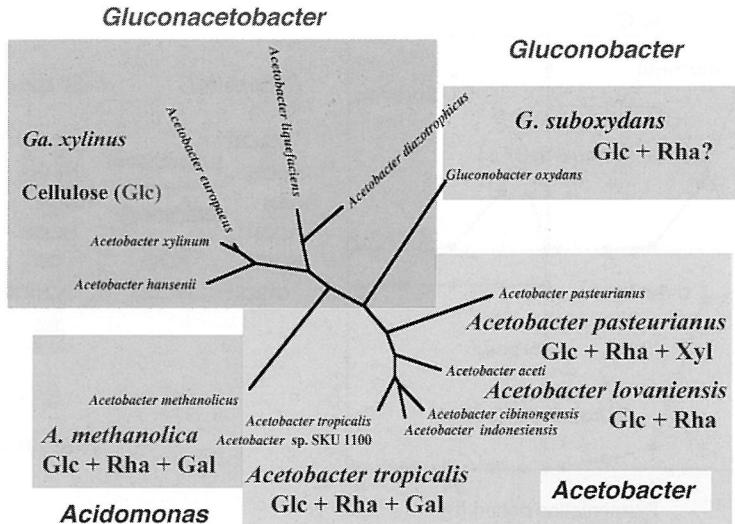


Fig. 4 Pellicle polysaccharides produced from different acetic acid bacteria.

Several different pellicle producers were isolated; cellulose producer from *Gluconacetobacter* sp., polysaccharide consisting of glucose and rhamnose produced in *Gluconobacter* sp. and *Acetobacter lovaniensis*, polysaccharide consisting of glucose, rhamnose, and xylose produced in *Acetobacter pasteurianus*, and also polysaccharide consisting of glucose, rhamnose, and galactose produced in *Acidomonas* sp. and *Acetobacter tropicalis*.

の菌膜多糖は菌体から超音波による分離もしくは細胞膜からの可溶化によって分離され、精製された。その分子量は120kでグルコース/ラムノース/ガラクトースが等モル含まれるヘテロ多糖であることが明らかになっている (Moonmangmee *et al.*, 2002b)。最近、その多糖の生合成に関連して、構成糖であるラムノースを供給する酵素系をコードする遺伝子群 *polABCDE* (Deeraksa *et al.*, 2005) とガラクトースを供給する酵素遺伝子 *galE* (Deeraksa *et al.*, 2006) が、SKU 1100 株の菌膜多糖合成に必須であることが明らかになった。

耐熱性酢酸菌も含め、他の多くの酢酸菌の菌膜についてその多糖の組成を解析した結果、*A. tropicalis* SKU 1100 株と同様に、グルコース/ラムノース/ガラクトースから成るヘテロ多糖を生成するもの、グルコースとラムノースの 2 つの糖からなるヘテロ多糖を生成するもの (*Acetobacter lovaniensis* IFO 3284 株など)、さらにグルコース/ラムノース/ガラクトースから成るヘテロ多糖を生成するもの (*Acetobacter pasteurianus* NP2503 など) に分類された (Moonmangmee *et al.*, 2004b) (Fig. 4)。加えて、これら耐熱性酢酸菌のなかに、*Gluconacetobacter xylinus* と同様にセルロース (グ

ルコース・ホモ多糖) を生成するものも数少ないが認められた。中でも、*Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) G9 は42°Cでも生育可能なセルロース生成菌であることが明らかになった (Phowan *et al.*, 2006)。

3. ソルボース生成能：分離された耐熱性 *Gluconobacter* 属菌（調査54株）のうち、37°Cでも良好なソルボース生産性を示す菌株が8株（全て *Gluconobacter frateurii*）見つかっており、その生化学的な性質を解析した。その結果、*G. frateurii* CHM 54 株は特に、常温性の *G. frateurii* IFO 3264 株と違い、30°Cと同様、37°Cでも良好にソルビトールを酸化してソルボースを生産することが可能であった (Moonmangmee *et al.*, 2000)。しかしながら、この高温での酸化能は比較的不安定で、37°Cでの培養を繰り返すと、その能力が低下する傾向が見られ、37°Cでの生育過程で生育の良好な菌株と悪い菌株が現れることが明らかになった。そこで、現在、酢酸発酵耐熱性菌である SKU 1108 株と同様に、その安定株の適応的分離が試みられている。いずれにしても、*Gluconobacter* 属酢酸菌におけるソルビトールからソルボースへの酸化に関与する酵素は現在

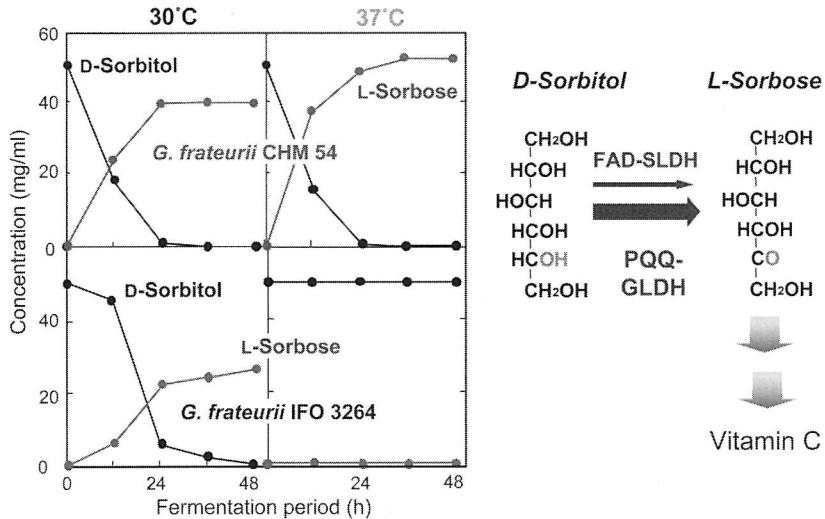


Fig. 5 Sorbose fermentation with thermotolerant and mesophilic *Gluconobacter frateurii* and its enzyme systems.

*G. frateurii* CHM54 (upper panel) was able to oxidize D-sorbitol to L-sorbose at 37°C, while *G. frateurii* IFO3264 (Lower panel) had no ability to do so at such the high temperature. Sorbitol is oxidized to sorbose by two different membrane-bound enzymes, quinoprotein glycerol dehydrogenase (PQQ-GLDH) and flavoprotein sorbitol dehydrogenase (FAD-SLDH). Sorbose thus produced could be converted to vitamin C by chemical or microbial reaction.

2種類知られている (Adachi et al., 2003; Matsushita et al., 2002). それらは、2, 3位が *erythro* 配位をもつ多価アルコールの2位OHを広く酸化できるPQQを補酵素とするキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素(GLDH) (Matsushita et al., 2003)とソルビトールに選択的に作用するFADを補酵素とするフラボプロテイン・ソルビトール脱水素酵素(SLDH) (Toyama et al., 2005)である (Fig. 5). 最近の研究で、酢酸菌のソルボース生成に関与する酵素は、SLDHではなく、GLDHであることが明らかになってきた (未発表). それ故、高温化でのソルボース発酵を実現するためには、熱耐性をもつGLDHを有する酢酸菌をスクリーニングもしくは開発することが必要であることが明らかになっている。

4. ケトグルコン酸生成能：分離された耐熱性 *Gluconobacter* 属菌（調査74株）のうち、37°Cでも良好なケトグルコン酸生産性を示す菌株は4株見出されている（未発表）。これらはすべて2-ケトグルコン酸主生産菌 (THE, THF, THG 株およびCHM株, いずれも未同定) である。これらの耐熱性ケトグルコン酸生産株は、常温性の高5-ケトグルコン酸生産株である

*Glucono-bacter suboxydans* IFO 12528が37°Cで生産だけでなく生育が全くできないのに対し、37°Cでも30°Cとほぼ同等に生育することが可能で、2-ケトグルコン酸主生菌のTHF株の場合は30°Cとほぼ同等の生産量を示す (Fig. 6). 一方、CHM株は30°Cでは2-ケトグルコン酸主生株であるが、37°Cでは2-ケトグルコン酸の生産能が失われるのに対し、5-ケトグルコン酸の生成能は維持されるという特異な性質を示す。しかし、これらの場合でも、培養の炭素源を変化させると、その生産性が変わることも分かってきており、今後、これらの耐熱性菌の温度特性とともに、培養条件と酵素の発現調節についての解析が必要である。ちなみに、このグルコン酸から2-ケトグルコン酸および5-ケトグルコン酸を生成する酵素は、それぞれFADを補酵素とするフラボプロテイン・グルコン酸脱水素酵素(GADH) (未発表) および前述のPQQを補酵素とするキノプロテイン・GLDHである。この場合も、ソルボース生成反応と同様に、FAD・GADHがグルコン酸に特異的に反応するのに対して、PQQ・GLDHはその広い基質特異性の1つとしてグルコン酸の5位を酸化し、5-ケトグルコン酸を生成することが明になった。

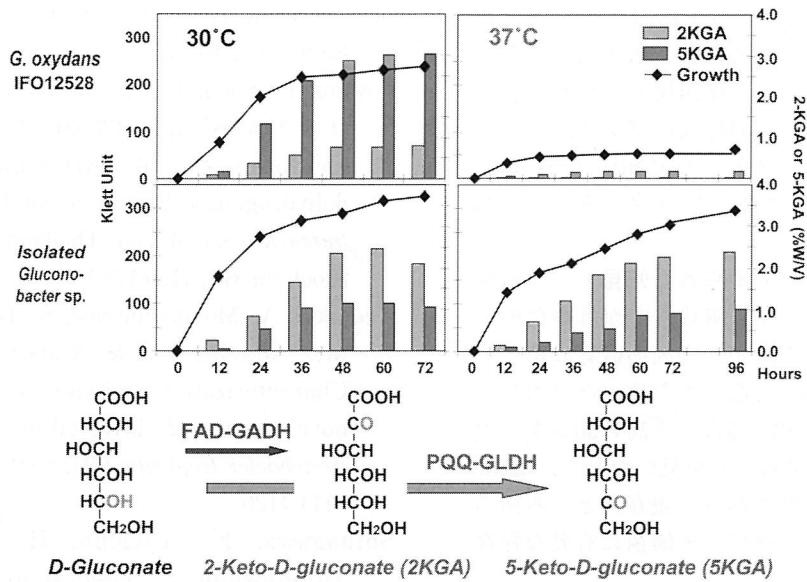


Fig. 6 Ketogluconate fermentation in thermotolerant and mesophilic *Gluconobacter* sp. and its enzyme systems.

Thermotolerant *Gluconobacter* sp. was able to grow and to produce ketogluconates at 37°C, while *Gluconobacter suboxydans* IFO12528 unable to grow and thus not to produce any ketogluconates at the same high temperature. D-Gluconate is oxidized to 2-ketogluconate and 5-ketogluconate by two different membrane-bound enzymes, flavoprotein gluconate dehydrogenase (FAD-GADH) and PQQ-GLDH, respectively.

それ故、高温5-ケトグルコン酸発酵においても、PQQ・GLDHの耐熱性の向上が重要である。

5. その他の酸化能力：その他に、分離された耐熱性酢酸菌の中に、メゾエリスリトールを酸化してエリスリロース生成能を有するもの8株（いずれも *G. frateurii* であり、代表株は *G. frateurii* CHM43）(Moonmangmee et al., 2002a), 環状アルコールを酸化するもの1株 (*G. frateurii* CHM 9株) (Moonmangmee et al., 2001), グルコサミンを酸化する能力をもつものの3株 (*G. frateurii*, *A. tropicalis*, *A. pasteurianus*) (Moonmangmee et al., 2004a), ギ酸を酸化するもの1株 (*Acetobacter* sp. SKU株) (Shinagawa et al., 2006)などが見つかっている。

酢酸菌の「耐熱性」について得られた知見 これまでに分離・分類された耐熱性酢酸菌から判断すると、「耐熱性」を有する酢酸菌は一部の種もしくは属に限定されることはなく *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* 属に広く存在しているが、一般に以下に示すような特徴がある。

1) *Gluconobacter* や *Gluconacetobacter* 属菌では今のところ強い耐熱性を示す酢酸菌は少数しか得られていない。

ない。

2) *Gluconobacter* 属よりも *Acetobacter* 属でより高い温度（40°C以上）で生育できるものが多い。

3) *Gluconobacter* 属菌で耐熱性を示すものは、今のところ *G. frateurii* に限定されている。

今後、本研究を通して「耐熱性」を有する酢酸菌の分類上の特徴を明らかにするとともに、耐熱性菌と常温菌との機能特性、特に酢酸耐性能・菌膜形成能、における違いを明らかにする必要がある。上述したように、耐熱性酢酸菌は一定の種もしくは属に限定されず普遍的に酢酸菌全般に存在することが明らかになってきたので、分離・分類された耐熱性酢酸菌の中から *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* 各属の代表的な耐熱性酢酸菌を確立して、それらの菌株が「耐熱性」を獲得した原理を理解するために、将来的なゲノム解析も展望しながら、それらの基本的生理学をその生理機能解析と関連させながら整理していくなければならない。

今回、分離・分類された菌株の学術的および産業的有効利用を図るために、それらの菌株の中の特徴的・代表的な菌株の生理学的特性、特に酢酸生成能（エタ

ノール酸化能), 酢酸耐性能, 各種糖酸化能(種々のPQQ酵素およびFAD酵素に依存した糖酸化系活性), 菌膜生成能(多糖生成能および糖鎖構造の差異)を整理し, それらのデータベースの作成中である. これらのデータは, 私たちのホームページ<<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~oubi/>>上にアップする予定である.

**耐熱性酢酸菌の保存について得られた知見** 当研究室では, これまでスラントでの継代培養が酢酸菌の主保存法として用いられてきたが, 今回の研究にあたって多数の菌株の保存が必要となったため, グリセロール保存法を検討した. 結果, 通常より高い50%グリセロールでの保存が有効であることを見いだした. 現在, すべてこの条件で保存されており, 現在のところ何らの問題も生じておらず, すべての酢酸菌に有効な保存方法と考えている.

## 要 約

タイに生息する花・果実から数多くの耐熱性酢酸菌が分離された. これらの中には, 常温性のIFO株が生育に適さない37°Cもしくはそれ以上の高温で良好に生育することが可能であった. 私たちは, これらの耐熱性酢酸菌の有効利用を図る目的で, 酸化発酵能や菌膜形成能に優れた菌株を選別・分離した. これらの内の代表的なものは, 高温酢酸発酵能を有する *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 (NBRC101655), 高温菌膜形成能を有する *Acetobacter tropicalis* SKU1100 (NBRC 101654), 高温ソルボース発酵能を有する *Gluconobacter frateurii* CHM54 (NBRC 101660)である. また, 高温で5-ケトグルコン酸生成能を示す菌株も見つかっている. これらの耐熱性酢酸菌の分離とその開発は, 地球温暖化が進行する現在, 将来的に有用な微生物技術を提供する可能性を秘めている.

## 本助成で得られた成果の報告一覧

### 論文発表

- Moonmangmee, S., Moonmangmee, D., Toyama, H., Adachi, O., Toyama, H. & Matsushita, K. (2004). Classification of *Acetobacter* species based on cell-attached polysaccharides. Proc. of the 1st KMITL International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development, Bangkok, Thailand. pp. 318-323
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Toyama, H. & Matsushita, K. (2004). d-Hexosaminic acid production

by oxidative fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **66**: 253-258.

- Toyama, H., Soemphol, W., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. (2005). Molecular properties of membrane-bound FAD-containing D-sorbitol dehydrogenase from thermotolerant *Gluconobacter frateurii* isolated from Thailand. Biosci. Biotechnol. Biochem. **69**: 1120-1129.
- Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Yamada, M., Adachi, O. & Matsushita, K. (2005). Characterization and spontaneous mutation of a novel gene, *pole*, involved in pellicle formation in *Acetobacter tropicalis* SKU1100. Microbiology **151**: 4111-4120.
- Shinagawa, E., Toyama, H., Matsushita, K., Tuitemwong, P., Theeragool, G. & Adachi, O. (2006). A novel type of formaldehyde-oxidizing enzyme from the membrane of *Acetobacter* sp. SKU 14. Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**: 850-857.
- Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2006). Conversion of capsular polysaccharide, involved in pellicle formation, to extracellular polysaccharide by *galE* deletion in *Acetobacter tropicalis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**: 2536-2539.

### 口頭発表

- Theeragool, G., Chinnawirotisan, P., Sintuprapa, W., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2004). Adaptive responses to high temperature, ethanol, and acetic acid in *Acetobacter* species. 日本農芸化学会2004年度大会2004年3月(広島)
- Adachi, O., Moonmangmee, D., Tanasupawat, S., Toyama, H. & Matsushita, K. (2004). Development of thermotolerant *Gluconobacter* and their applications to oxidative fermentation. 日本農芸化学会2004年度大会2004年3月(広島)
- Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2004). Genes involved in pellicle formation of thermotolerant *Acetobacter tropicalis* SKU1100. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, Fukuoka, Japan, November 7-10.
- Soemphol, W., Toyama, H., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. (2004). Properties of FAD-dependent D-sorbitol dehydrogenase from

- thermotolerant *Gluconobacter frateurii*. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, Fukuoka, Japan, November 7-10.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Toyama, H. & Matsushita, K. (2004). Biotechnological production of d-hexosaminates with thermotolerant acetic acid bacteria. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, Fukuoka, Japan, November 7-10.
- Theeragool, G., Sintuprapa, W., Yongmantchai, W., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2004). Alcohol dehydrogenase and adaptive response to ethanol and acetic acid in thermotolerant acetic acid bacteria. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, Fukuoka, Japan, November 7-10.
- Moonmangmee, S., Moonmangmee, D., Kanchanarach, W., Adachi, O., Toyama, H. & Matsushita, K. (2004). Diversity of pellicle polysaccharide from thermotolerant *Acetobacter* species. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, Fukuoka, Japan, November 7-10.
- Snihagawa, E., Toyama, H., Matsushita, K., Tuitemwong, P., Theeragool, G. & Adachi, O. (2004). Membrane-bound formaldehyde dehydrogenase from a thermotolerant strain of *Acetobacter* sp. SKU 14. The 4th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications, Fukuoka, Japan, November 7-10.
- Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2005). Functional analysis of pellicle-producing genes in thermotolerant *Acetobacter tropicalis* SKU1100. 日本農芸化学会2005年度大会2005年3月（札幌）
- Soemphol, W., Toyama, H., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. (2005). Physiological role of FAD-dependent D-sorbitol dehydrogenase in thermotolerant *Gluconobacter frateurii*. 日本農芸化学会2005年度大会2005年3月（札幌）
- Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2006). GalE is involved in pellicle (biofilm) formation in *Acetobacter tropicalis* SKU 1100. 日本農芸化学会2006年度大会2006年3月（京都）
- Saichana, I., Toyama, H., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. (2006). Production of 5-keto-D-gluconic acid by thermotolerant *Gluconobacter* strain. 日本農芸化学会2006年度大会2006年3月（京都）
- Soemphol, W., Toyama, H., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. (2006). Novel L-sorbose reductase and its transcriptional regulator from thermotolerant *Gluconobacter frateurii*. 日本農芸化学会2006年度大会 2006年3月（京都）
- Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2006). Generation of different kinds of polysaccharide from *Acetobacter tropicalis* SKU1100 by genetic approach. The 5th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Application. Pattaya, Thailand, November 7-10.
- Saichana, I., Toyama, H., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. (2006). Production of 5-keto-D-gluconic acid: Screening of thermotolerant *Gluconobacter* strains which produce 5-keto-D-gluconic acid at higher temperature. The 5th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Application. Pattaya, Thailand, November 7-10.
- Soemphol, W., Toyama, H., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. (2006). Characterization of NADPH-dependent L-sorbose reductase and its transcriptional regulator responsible for L-sorbose utilization from thermotolerant *Gluconobacter frateurii*. The 5th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Application. Pattaya, Thailand, November 7-10.
- Phowan, P., Adachi, O., Matsushita, K., Toyama, H. & Tantratian, S. (2006). Effect of tea extract fractions on the production of cellulose from thermotolerant *Acetobacter xylinum*. The 5th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Application. Pattaya, Thailand, November 7-10.
- Soemphol W., Toyama H., Moonmangmee D., Matsushita K. & Adachi O. (2007). Analysis on physiologically roles of two different membrane-bound D-sorbitol dehydrogenases in thermotolerant

Table 1 Thermotolerant acetic acid bacteria deposited to NBRC

Strains Original names	NBRC names	Maximum growth temp	
<i>Acetobacter tropicalis</i> SKU1100	NBRC 101654	Pellicle production	40°C
<i>Acetobacter pasteurianus</i> SKU1108	NBRC 101655	Acetate fermentation	39°C
<i>Gluconobacter frateurii</i> THD32	NBRC 101656	Sorbose production	37°C
<i>Gluconobacter frateurii</i> CHM9	NBRC 101657	Cyclicalcohol oxidation	33°C
<i>Gluconobacter frateurii</i> CHM16	NBRC 101658	Mannitol oxidation	37°C
<i>Gluconobacter frateurii</i> CHM43	NBRC 101659	Erythrulose production	37°C
<i>Gluconobacter frateurii</i> CHM54	NBRC 101660	Sorbose production	37°C

*Gluconobacter frateurii*. 日本農芸化学会2007年度大会 2007年3月（東京）

### 保存機関に寄託した菌株一覧

研究で分離され、その具体的利用法が確立された菌株の一部については、既に NBRC に寄託しており、いつでも利用可能である (Table 1)。

### 謝 辞

本文に記載された研究の大部分は、大学院生（当時）の Arpaporn Deeraksa, Soemphol Wichai, Ittipon Saichana 君と行われたものである。また、本研究の一部は、品川恵美子教授(宇部高専), 故 Napha Lotong 名誉教授(Kasetsart University), Ganjana Theeragool 助教授(Kasetsart University), Duantip Moonmangmee 講師(King Mongkut's University of Technology Thonburi), Somporn Moonmangmee 研究員(TISTR), Wachara Kanchanarach 講師(Mahasarakham University), Sumate Tantratian 助教授(Chulalongkorn University)との共同研究によるものである。

本研究は、発酵研究所研究助成（2003年11月～2007年3月）による多大の支援のもとにすすめられた。また、本研究における人的交流は JSPS-NRCT 拠点大学事業（1989.4~2008.3）に負うところが多い。ここに、その謝意を示したい。

### 文 献

Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., Shinagawa, E. & Matsushita, K. (2003). New developments in oxidative fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 643-653.

Asai, T. (1968) *Acetic Acid Bacteria. Classification and*

- Biochemical activities. University of Tokyo Press.*
- Chinnawirotisan, P., Theeragool, G., Limtong, S., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2003). Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *J. Biosci. Bioeng.* **96**: 564-571.
- Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Yamada, M., Adachi, O. & Matsushita, K. (2005). Characterization and spontaneous mutation of a novel gene, *polE*, involved in pellicle formation in *Acetobacter tropicalis* SKU1100. *Microbiology* **151**: 4111-4120.
- Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2006). Conversion of capsular polysaccharide, involved in pellicle formation, to extracellular polysaccharide by *gale* deletion in *Acetobacter tropicalis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 2536-2539.
- Kanchanara, W., Theeragool, G., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2002). Characterization and purification of thermostable membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter* sp. MSU 10. In 3rd JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Application. Chaing Mai, Thailand.
- Matsushita, K., Toyama, H. & Adachi, O. (1994). Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **36**: 247-301.
- Matsushita, K., Toyama, H., Yamada, M. & Adachi, O. (2002). Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 13-22.
- Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y. & other authors (2003). 5-keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1959-1966.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Ano, Y., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N. &

- Matsushita, K. (2000). Isolation and characterization of thermotolerant *Gluconobacter* strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64**: 2306-2315.
- Moonmangmee, D., Fujii, Y., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N., Matsushita, K. & Adachi, O. (2001). Purification and characterization of membrane-bound quinoprotein cyclic alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter frateurii* CHM 9. Biosci. Biotechnol. Biochem. **65**: 2763-2772.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N. & Matsushita, K. (2002a). L-Erythrulose production by oxidative fermentation is catalyzed by PQQ-containing membrane-bound dehydrogenase. Biosci. Biotechnol. Biochem. **66**: 307-318.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Toyama, H. & Matsushita, K. (2004a). D-Hexosaminate production by oxidative fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **66**: 253-258.
- Moonmangmee, S., Kawabata, K., Tanaka, S., Toyama, H., Adachi, O. & Matsushita, K. (2002b). A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *Acetobacter aceti*. J. Biosci. Bioeng. **93**, 192-200.
- Moonmangmee, S., Moonmangmee, D., Toyama, H., Adachi, O., Toyama, H. & Matsushita, K. (2004b). Classification of *Acetobacter* species based on cell-attached polysaccharides. Proc of the 1st KMITL International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development (Bangkok), pp. 318-323.
- Phowan, P., Adachi, O., Matsushita, K., Toyama, H. & Tantratian, S. (2006). Effect of tea extract fractions on the production of cellulose from thermotolerant *Acetobacter xylinum*. In The 5th JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Application. Pattaya, Thailand.
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N. & Adachi, O. (1997). Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. Biosci. Biotechnol. Biochem. **61**: 138-145.
- Shinagawa, E., Toyama, H., Matsushita, K., Tuitemwong, P., Theeragool, G. & Adachi, O. (2006). A novel type of formaldehyde-oxidizing enzyme from the membrane of *Acetobacter* sp. SKU 14. Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**: 850-857.
- Toyama, H., Soemphol, W., Moonmangmee, D., Adachi, O. & Matsushita, K. (2005). Molecular properties of membrane-bound FAD-containing D-sorbitol dehydrogenase from thermotolerant *Gluconobacter frateurii* isolated from Thailand. Biosci. Biotechnol. Biochem. **69**: 1120-1129.

## 発酵食品に生息する生育緩慢乳酸菌（難培養・難分離乳酸菌）の存在確認とその分離

岡田早苗

東京農業大学応用生物科学部菌株保存室

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

### Establishment of a Method for Isolation of Slow-Growing Lactic Acid Bacteria (LAB) intermingled with Fast Growing LAB by Using Antibiotics

Sanae Okada

NODAI Culture Collection Center, Faculty of Applied Bioscience,  
Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku,  
Tokyo 156-8502, Japan

Slow-growing lactic acid bacteria inhabit widely together with fast growing LAB in the fermented materials including fermented foods. It is difficult to isolate slow-growing LAB intermingled with fast growing LAB due to the rapid growth of the latter. We established a method to isolate just slow-growing LAB by using the combination of  $\beta$ -lactam and aminoglycoside antibiotics. As effective disinfectant inhibitors, we determined the following three combinations of antibiotics and their concentrations in 1 ml of a growing broth for LAB; ① Ampicillin 500  $\mu$ g + Gentamicin 500  $\mu$ g, ② Ampicillin 500  $\mu$ g + Kanamycin 500  $\mu$ g, and ③ Ampicillin 500  $\mu$ g + Isepamycin 500  $\mu$ g. When both of slow-growing LAB and fast growing LAB were cultivated for 3 days in a growing broth including one of these combined antibiotics, the growth of the latter was reduced and that of the former was not.

Key words: lactic acid bacteria, isolation method, antibiotics

### 緒 言

天然物からの微生物の分離は、Kochらによって確立された固体培養法が現在でも主に用いられている。固体培養法は栄養成分を含む寒天培地をペトリ皿中に平板状に固め、その上あるいは寒天中に微生物の集落(コロニー)を形成させ、微生物の単離を行う。しかし、このような方法で培養できる微生物種は自然界に存在する微生物のうち、1%程度とされ、99%が未だ分離あるいは培養できないとされている(Amann *et al.*, 1995)。

乳酸菌の仲間は現在20属約270種が記録されているが(岡田, 2002), まだ未分離の乳酸菌の存在が予測されている。その中には生育の緩慢な乳酸菌(難培養,

難分離である乳酸菌)も存在するであろうし(岡田, 1999), それらの発見は微生物学的に重要である。また既に分離され属・種が命名された乳酸菌であっても、分離源や環境が異なることで緩慢乳酸菌状態に陥っている乳酸菌の存在も考えられている。

我々日常生活の中で、生育緩慢乳酸菌による加工食品の汚染事故が起きている。生育緩慢乳酸菌自体は人に病変を引き起こすことはないが、製品が濁る(フィルター滅菌されたビール), 発生したガスで容器が膨張する(調味味噌など), 開封時にガスの噴出(滋養強壮剤など)するなどである。このような生育緩慢乳酸菌による汚染事故は、出荷前の事前検査でその存在を示せずに市場に流通させてしまい、数日たった流通過程で生育緩慢乳酸菌の増殖が起こり、商品の異常が確認され発覚することがほとんどである。商品価値の喪失による大きな損失ばかりでなく、商品の回収や廃棄などにも多額の経費が伴い、企業として損失は莫大

なものとなる。

また中山ら（2006）は、漬け物を家庭で作るための糠床に寒天平板培地では分離できない乳酸菌の存在を、最近の遺伝子解析手段（DGGE 法）で明らかにしているが、今だ分離に成功していない例がある。

このような生育緩慢乳酸菌が我々の身の回りの自然界全般にどれだけ分布し、またそれらの生化学的特徴やそれらの自然界での分布や生態も全く明らかにされていない。これらを明らかにするためには、生育緩慢乳酸菌そのものを純粋分離して培養できる状態にして、それらの特性を明らかにする必要がある。

我々がこれまで経験した生育緩慢乳酸菌の分離の成功例では、汚染食品自体に生育緩慢乳酸菌が幸運にも単独で存在していたために、他菌を排除しながらの分離法は必要がなかった（岡田、1999）。それらの経験から、生育緩慢乳酸菌は一般に用いられるペトリ皿による寒天平板法ではコロニー形成がなく、5 cm 以上にした寒天層の底部にコロニーを形成する特性を把握している。

自然界各所にいるであろう生育緩慢乳酸菌の分布や分離取得するためには、多数存在することが予測される共存微生物（カビ、酵母、好気性細菌、そして生育の良好な乳酸菌など）をいかに排除するかの工夫が必要である。

これまでの著者らの研究で、分離源に共存する真菌類（カビや酵母）および好気性細菌は、薬剤（Sodium azide と Cycloheximide）を添加することによってほぼ完全に排除できることを明らかにし、乳酸菌分離に一般的に使用されている（岡田、1992）。しかし生育良好な乳酸菌と生育緩慢乳酸菌が混在した場合、概ね生育良好な乳酸菌だけが分離培地に生育し、生育緩慢乳酸菌の生育する余地がなくなり、それらが分離できないことが考えられる。

すなわち、生育良好な乳酸菌の存在のために分離時に最も困難さを伴うことが予測される生育緩慢乳酸菌は見逃されがちである。そこで本研究では生育良好な乳酸菌の生育を排除しながら生育緩慢乳酸菌を分離する手法を確立することを目的とした。

本実験の基本戦略として、生育良好乳酸菌と生育緩慢乳酸菌の生育速度差を利用し、生育の速い生育良好乳酸菌だけを生育阻害物質で死滅させ、分裂増殖をせずにまんじりとしている生育緩慢乳酸菌だけを生き残らせる戦略を考案した。戦略として、殺菌的に作用する生育阻害剤として抗生物質（西野、1986）の活用を考えた。以下に確立した方法について述べる。

## 実験方法

### I ガス膨張事故を起こした調味味噌より、生育緩慢乳酸菌の分離

**高層寒天培地分離法** 調味味噌一人用小袋が流通過程でガス膨張を起こした製品を試料とした。試料 0.5 g を生理食塩水にて10倍希釀を繰り返し 8 段階の希釀液 ( $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ ) を調製した。一方、オートクレーブ滅菌後 60°C に保たれた MRS 寒天培地（炭酸カルシウム含まない）の 5 ml が入ったスクリューキャップ付試験管（φ15 mm × 85 mm）を複数本準備した。8 段階の希釀液各 0.5 ml を MRS 寒天培地中に加注し、攪拌後寒天が固まるのを待ち、30°C にて 7 日間培養した。

**単一コロニーからの分離取得と同定** 高層寒天培地中に形成されたコロニーより純粋分離を行い、分離培地と同組成の高層寒天培地にて穿刺保存した。分離株の同定は 16S rDNA の塩基配列により簡易同定を行った。

### II 糠床に生息する乳酸菌相の解析

**糠床試料** 神奈川県内において、長期間にわたり使われている糠床を使用した。

### 糠床試料を用いた DGGE 解析による乳酸菌相の解析

糠床の DGGE 解析による乳酸菌相解析は Endo & Okada (2005) の方法に従った。

**糠床試料からの乳酸菌の分離** 糠床から乳酸菌の分離は常法に従いペトリ皿に混釀法で作成した MRS 白亜寒天平板培地を用いた。

### III 抗生物質を活用した生育緩慢乳酸菌分離の試み

**供試菌株** 死滅の有無および死滅のための条件を調べるため、生育良好乳酸菌としての供試菌として 8 株 (*Enterococcus firae* NRIC 1140, *Enterococcus faecalis* NRIC 1142, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* NRIC 0644, *Lactococcus lactis* NRIC 1540, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NRIC 1149, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NRIC 1541, *Weissella cibaria* NRIC 0527, *Pediococcus pentosaceus* NRIC 0099) を用いた。また生育良好乳酸菌－生育緩慢乳酸菌の混合実験において、前者として *P. pentosaceus* NRIC 0099、後者として *Lactobacillus vaccinostercus* NRIC 1075 を用いた。

**培地および培地組成** GYP 液体培地；グルコース 20 g, 酵母エキス 10 g, ペプトン 10 g, sodium acetate· $3\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10 mg,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg, NaCl 10 mg, 蒸留水 1,000 ml, pH 6.8. GYP 白亜寒天培地は GYP 液体培地に  $\text{CaCO}_3$  10 g および寒天 15 g を添加した. Xylose-YP 白亜寒天培地は GYP 白亜寒天培地の組成のうち, グルコースを D-xylose に置き換えたものである. MRS 培地（組成: proteose peptone No.3 10.0 g, 肉エキス 10.0 g, 酵母エキス 5.0 g, グルコース 20.0 g, polysolbate 80 1.0 g, クエン酸アンモニウム 2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0 g / 1 L, pH 6.8）は Difco 社製既成培地を用いた. Mannose-YP 液体培地は GYP 液体培地のグルコースをマンノースに置き換えた組成である.

抗生素質および原液の調製  $\beta$ -Lactam 系抗生物質として Ampicillin [Am] (SIGMA Co Ltd.), Aminoglycoside 系抗生物質として, Gentamicin [Gm] (gentamicin sulfate, Cslbiochem Co Ltd.), Kanamycin [Km] (kanamycin monosulfate, SIGMA Co Ltd.), Isepamicin [Im] (Asahi Kasei Pharma Co. Ltd.) を用いた. 原液として, それぞれ 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように水溶液を調製し, 0.2  $\mu\text{m}$  フィルター (Advantec Co. Ltd) を用いて除菌後マイクロチューブに分注し, -20°C にて保存した.

抗生素質含有培地および培養方法 オートクレーブ滅菌 (121°C, 15分) した GYP 液体培地に抗生物質を目的濃度になるように抗生物質原液を添加した.  $\beta$ -Lactam 系抗生物質と Aminoglycoside 系抗生物質の併用実験に対しての組み合わせおよび各抗生物質の含有濃度を Table 1 に示した. 供試する乳酸菌株は GYP 液体培地にて24時間の前培養をし, 活性のある状態で各試験培地に接種した. 抗生物質添加培地での培養は, 供試菌株をそれぞれの抗生物質添加培地 1 ml あたり  $10^7$  個となるように接種し, 30°C で 5 日間培養した.

生残菌数の測定 抗生物質含有培地による培養液より 1 ml を採取し, 供試菌細胞に付着する抗生物質を除く目的で, 生理食塩水で 4 回の洗浄を行った. 洗浄後, 適宜 10倍希釈を行い, GYP 白亜寒天培地を用い混液法により平板を作成した. 30°C で 5 日間培養した. 24 時

間ごとに試験培地を採取し, 生菌数として GYP 白亜寒天培地に出現したコロニーを数え生残菌数とした.

モデル実験系による生育緩慢乳酸菌の生残確認実験 生育緩慢乳酸菌として *M. luteus* を発酵できない *L. vaccinostercus* NRIC 1075, 生育良好な乳酸菌として *M. luteus* を良好に発酵する *P. pentosaceus* NRIC 0099 を用いた. 抗生物質（併用）含有培地として Mannose-YP 液体培地を用い,  $\beta$ -Lactam 系抗生物質と Aminoglycoside 系抗生物質を Table 1 の組み合わせで, それぞれ 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加した. 抗生物質含有 Mannose-YP 液体培地 1 ml あたり *L. vaccinostercus* NRIC 1075 および *P. pentosaceus* NRIC 0099 の菌数が  $10^4$  個となるように接種した. 培養は 30°C で 3 日間行った. 生残菌数の計測は 24 時間ごとに行った. なお, *L. vaccinostercus* NRIC 1075 (本菌は xylose を良好に発酵するが, glucose は微弱にしか発酵できない) については Xylose-YP 白亜寒天培地を, *P. pentosaceus* NRIC 0099 については GYP 白亜寒天培地を用いた.

糠床から生育緩慢乳酸菌の分離実験 本実験には, Table 1 に示した 3 通りの組み合わせの抗生物質をそれぞれ 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で含有させた MRS 培地 (Difco Co Ltd.) を用いた. また好気性微生物および真核微生物の生育を抑えるために, Sodium azide 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と Cycloheximide 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含有させた. 比較のために抗生物質含有しない MRS 培地 (Sodium azide 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と Cycloheximide 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含有) での実験も行った. それぞれの培地 5 ml に糠床サンプル (0.5 g)を入れ, 30°C で 3 日間培養した. 24 時間目から 72 時間目まで 24 時間ごとに, 培地中に生残する乳酸菌を分離し, 16S rDNA の塩基配列により簡易同定を行った.

## 結 果

I ガス膨張事故を起こした調味味噌より, 生育緩慢乳酸菌の分離  
ガス膨張を起こした調味味噌小袋中のガス本体を二酸化炭素と確認した後, ペトリ皿による寒天平板分離

Table 1 Combinations of antibiotics

$\beta$ -Lactam antibiotic		Aminoglycoside antibiotics	
① Ampicillin	+	Gentamicin	: [Am+Gm]
② Ampicillin	+	Kanamycin	: [Am+Km]
③ Ampicillin	+	Isepamicin	: [Am+Im]

法により酵母および乳酸菌の検出を試みたが、何れの存在も確認できなかった。そこで、生育緩慢乳酸菌の存在の可能性を考え、生育緩慢乳酸菌が比較的好成績で分離できる高層寒天培地分離法（未公表）を適用した。その結果、培養4日目から高層寒天培地の深部に小さなコロニーが形成はじめ、7日目には十分な大きさのコロニーに成長した（Fig. 1）。純粋分離した各菌株も、試験管底部の穿刺溝に沿って良好に生育した。分離株5株（TUA 4588L, TUA 4589L, TUA 4590L, TUA 4591L, TUA 4592L）は、16S rDNAの塩基配列による簡易同定の結果、*Lactobacillus rennini* (Chenoll et al., 2006) と99%の相同性を示した（なお、*L. rennini*はガス発生をしないホモ発酵型乳酸菌であるが、調味味噌に含まれるグルタミン酸ナトリウムを脱炭酸することを確認している）。高層寒天培地の深部に生育したことと生育に4日以上の日数を要したことから、分離株は生育緩慢乳酸菌と判断した。

## II 糕床に生息する乳酸菌相の解析

糕床試料より直接DNAを抽出し、PCR-DGGE法で乳酸菌相の解析を行った。その結果、いくつかの糕床試料に*Lactobacillus acetotorelans*と一致するDNAバンドを確認した（Fig. 2）。中山らの報告（中山ら, 2006）でも*L. acetotorelans*はPCR-DGGE法で存在は確認できるが分離ができない乳酸菌とされている。そこでDNAバンドが確認された糕床試料より、乳酸菌の分離をペトリ皿による分離法を試みたが、生育良好な*Lactobacillus curvatus*や*Pediococcus*属菌種が専ら生育したが、*L. acetotorelans*は分離できなかった。

## III 抗生物質を活用した生育緩慢乳酸菌分離の試み

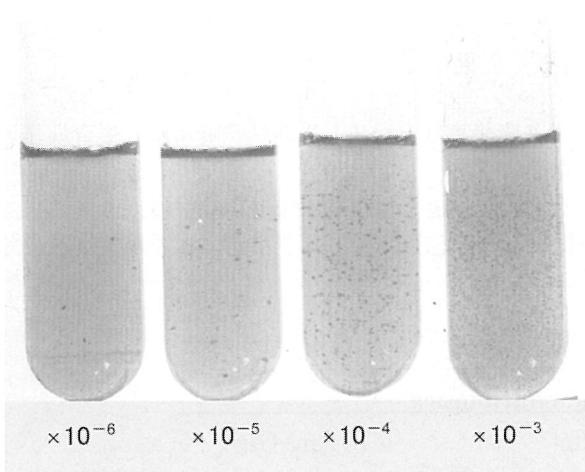


Fig. 1 Colonies formed at the bottom of thick layer agar medium

生育良好乳酸菌を死滅させる至適濃度 生育良好乳酸菌としての供試菌8株を用い、各供試菌株を死滅させるため条件設定を行った。まず、本実験で供試する4種類の抗生物質をそれぞれ単独使用（500 μg/ml）した場合では供試菌株8株いずれも死滅させることができないことを確認した。つぎに西野（1986）、川原（1987）に従い、 $\beta$ -Lactam系抗生物質とAminoglycoside系抗生物質の併用を試みた。 $\beta$ -Lactam系抗生物質とAminoglycoside系抗生物質の添加濃度をそれぞれ250 μg/mlで試みたが、供試8菌株のうち7株は72時間目までに死滅状態に至ることが確認できたが、*L. casei* subsp. *casei* NRIC 0644の1株は完全な死滅状態には至らなかった。また本実験では、3種類のAminoglycoside系抗生物質を用いているが、菌株(strain)によって、抗生物質に対する感受性が異なっていた（Fig. 3）。

*L. casei* subsp. *casei* NRIC 0644について、さらに各抗生物質濃度を濃くし、250 μg/mlおよび500 μg/mlの組み合わせで同上実験を試みた。その結果、両抗生物質各500 μg/mlの組み合わせにおいて、3日までに死滅状態に至ることを確認した（Fig. 4）。

モデル実験系による生育緩慢乳酸菌の生残確認実験抗生物質活用による生育良好乳酸菌を排除し、生育緩慢乳酸菌だけを生残させ、分離する方法を検討した。実験経過は次のようにある。

$\beta$ -Lactam系抗生物質とAminoglycoside系抗生物質を併用し、各抗生物質濃度を500 μg/mlとすることで、生育良好乳酸菌を3日以内に死滅に至らしめることが

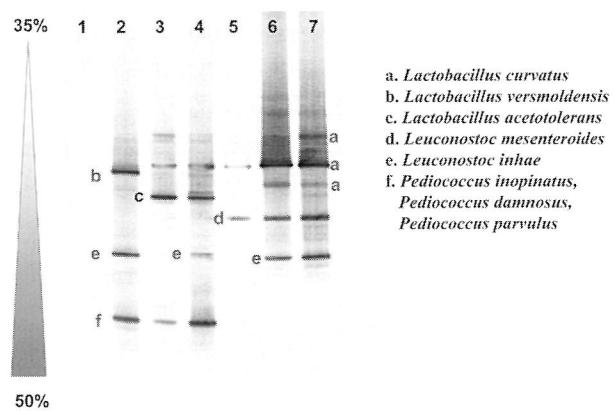


Fig. 2 Analysis of lactic acid bacteria flora of Nukadoko by PCR-DGGE

発酵食品に生息する生育緩慢乳酸菌の存在確認とその分離

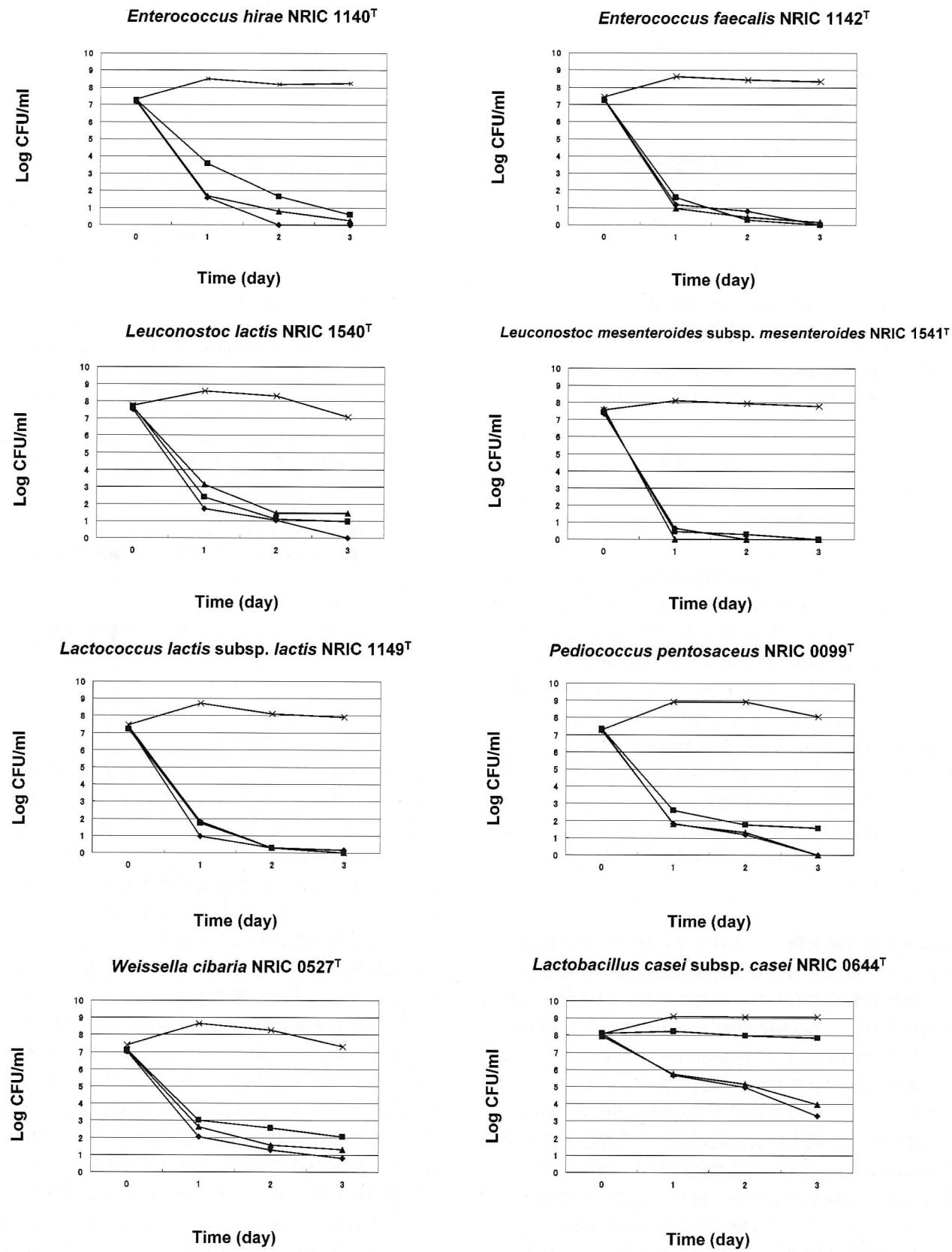


Fig. 3 Bacteriocidal Effect on Fast Growing Lactic Acid Bacteria by the Combination of Antibiotics (100  $\mu$ g each/ml-broth)  
 —◆— Amp+Gm    —■— Amp+Km    —▲— Amp+Im    —×— Control (without antibiotics)

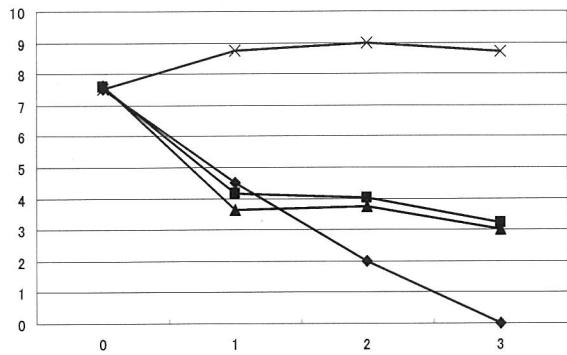


Fig. 4 Bacteriocidal Effect on *Lactobacillus casei* subsp. *casei* by the Combination of Antibiotics (each 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -broth)  
—◆— Amp+Gm —■— Amp+Km  
—▲— Amp+Im —×— Control (without antibiotics)

確認できた。しかし生育緩慢乳酸菌が、この条件で死ぬことがあってはならない。そこでここでは生育緩慢乳酸菌が本条件で死に至らないことの確認が重要である。

Fig. 5 には供試した両菌株混合培養で得られる生残総菌数の変化を、0時間目から72時間目まで24時間ごとに示した。さらに Fig. 6 には、24時間目ごとの *L. vaccinostercus* NRIC 1075 および *P. pentosaceus* NRIC 0099 両者の生残割合をグラフにした。本実験の結果、生育良好乳酸菌のモデルとして用いた *P. pentosaceus* NRIC 0099 は [Am+Km] や [Am+Im] において一部が生残した結果となったが、[Am+Gm] において48時間目までにほぼ完全に死滅した。*L. vaccinostercus* NRIC 1075 は相当数が生残しており、生育緩慢乳酸菌が本法において選択的に生残させることができることを確認した。

**糠床からの分離実験** これまでに確立した実験方法を利用し、糠床を用いて生育緩慢乳酸菌の分離を試みた。抗生物質を含有しない培地からは、24時間目と48時間目において *Lactobacillus curvatus* が、72時間目において *L. curvatus* と *P. pentosaceus* が分離された。一方、抗生物質含有培地からは24時間目、48時間目、72時間目、いずれの時間帯でも *Lactobacillus acidipiscis* が分離された。抗生物質を適用後、生育緩慢な乳酸菌 *L. acetotorelans* を様々な培地組成や培養条件を組み合わせながら分離を行ったが、何れの方法でも分離できなかった。またここで分離された *L. acidipiscis* は必ずしも生育緩慢乳酸菌ではないが、抗生物質の有無で分離される乳酸菌の種類が異なった結果を得たことから、抗生物質による乳酸菌の選択分離が機能したと考える。

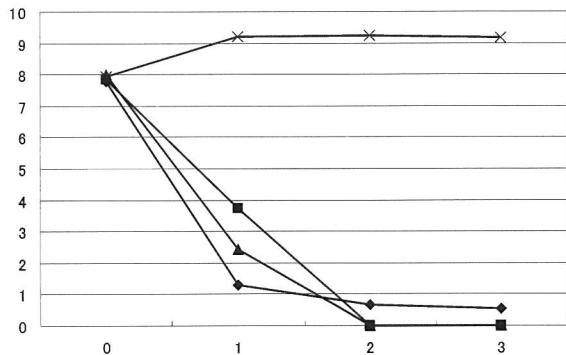


Fig. 5 Bacteriocidal Effect on Both Slow-Growing Lactic Acid Bacteria and Fast Growing Lactic Acid Bacteria by the Combination of Antibiotics (500  $\mu\text{g}$  each/ml-broth)

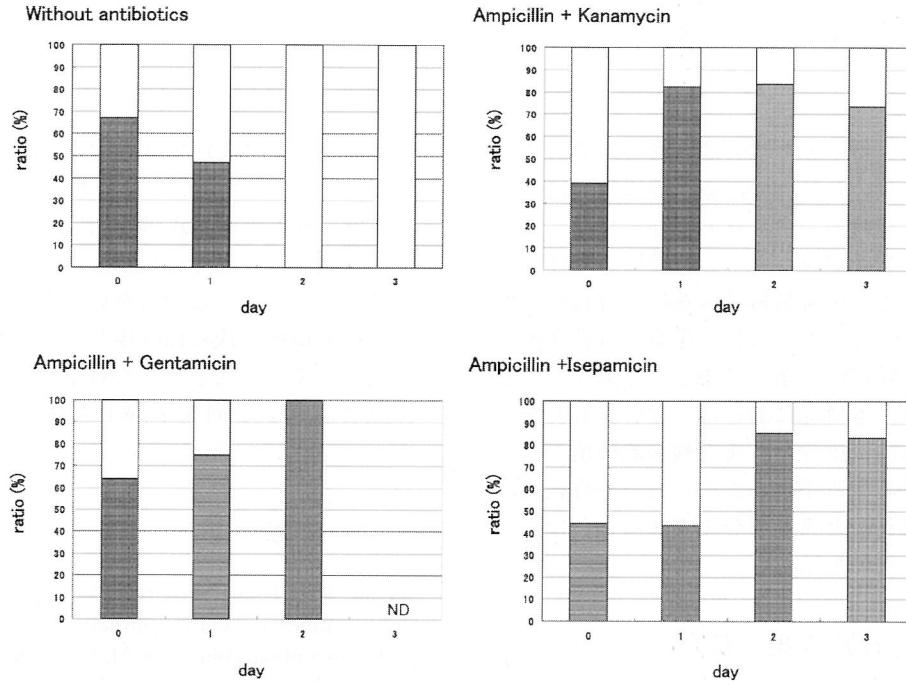
*Lactobacillus vaccinostercus* NRIC 1075 as a slow-growing lactic acid bacterium (SG-LAB) and *Pediococcus pentosaceus* NRIC 0099 as a fast growing lactic acid bacterium (OG-LAB) were used. Each CFU was based on the total cell count of both strains.

—◆— Amp+Gm —■— Amp+Km  
—▲— Amp+Im —×— Control (without antibiotics)

えられた。これらにより生育緩慢乳酸菌の分離に道が拓けたものと判断した。

## 考 察

乳酸菌の世界にも生育緩慢（難培養・難分離）の状態にある乳酸菌が存在することを確認した。本報告では膨張した調味味噌小袋製品に混入した乳酸菌 (*Lactobacillus rennini*) が、ペトリ皿を用いた寒天平板培地では生育せず、高層寒天培養法を適用して4日間以上かかって生育が見られたことから、これらの乳酸菌は生育緩慢状態にあったと考えた。したがって、これらは特殊な培養法を適用しなければ分離できなかつたことになる。また分離できたことにより、ガス発生をしないホモ発酵乳酸菌 (*L. rennini*) が、調味味噌に含まれるグルタミン酸ナトリウムを脱炭酸して膨張の原因となるガスを発生させるという、事故の根源を見極めることができたことになる。調味味噌より分離困難な生育緩慢乳酸菌が分離できたのは、加工過程で生育良好乳酸菌が排除され、たまたま単独で存在していた生育緩慢状態にあった *L. rennini* が分離できたと考えた。著者はこの他にも、ビール混濁事故や滋養強壮飲料のガス発生事故の原因微生物として、生育緩慢乳酸菌を分離している（未発表）。これらの知見により、自然界には生育緩慢乳酸菌が広く分布していることが



**Fig. 6** The Survival Ratio of Both Slow-Growing Lactic Acid Bacteria and Fast Growing Lactic Acid Bacteria by Combined Antibiotics (500 µg each/ml-broth)

*Lactobacillus vaccinostercus* NRIC 1075 as a slow-growing lactic acid bacterium (SG-LAB) (■) and *Pediococcus pentosaceus* NRIC 0099 as a fast growing lactic acid bacterium (OG-LAB) (□) were used. ND: not detected.

予測できる。一方、糠床には分離できない乳酸菌 *Lactobacillus acetotorelans* が生息していることが以前より確認されているが分離に至っていない。著者らも本研究において、PCR-DGGE 法で糠床中に *L. acetotorelans* が存在していることを確認すると同時に、現在我々が持ち合わせている分離方法を適用したが、何れの方法でも分離できないことも確認した。分離できない原因の一つとして、糠床には生育良好乳酸菌が多く存在し、それらの良好な生育のために生育の緩慢な乳酸菌 *L. acetotorelans* が分離できないと予測した。

以上の状況を受けて、生育良好乳酸菌を致死的に排除し、生育緩慢乳酸菌だけを生残するように設定した条件で、生育緩慢乳酸菌を効率よく分離する方法の確立を本研究において試みた。すなわち、抗生物質の使用において、 $\beta$ -Lactam 系抗生物質や Aminoglycoside 系抗生物質の単独使用では生育良好乳酸菌を致死的に排除することができなかったが、両抗生物質が含まれる培地中で培養することで生育良好乳酸菌を72時間で死滅に至ることを明らかにした。また72時間のうちでは分裂増殖を行わない生育緩慢乳酸菌には、同条件で

は抗生物質が作用せず生残することも明らかにした。また本実験では、3種類の Aminoglycoside 系抗生物質を用いているが、菌株によって、それぞれの感受性が異なる結果が得られている。従って、天然試料から生育緩慢乳酸菌を分離をするためには、本実験の通り3種類の Aminoglycoside 系抗生物質を用いることが必要と思われた。

そこで抗生物質を併用する方法を適用して、生育良好乳酸菌が多く存在する糠床より生育緩慢乳酸菌 *L. acetotorelans* の分離を、様々な培地組成や培養条件を組み合わせながら分離を行ったが、何れの方法でも分離できなかった。*L. acetotorelans* そのものの培養条件をさらに精査した上ででの培養条件の設定が必要と考えられた。

今後も生育緩慢乳酸菌による食品汚染事故等の発生が予測され、それらに敏速に対応する必要がある。生育緩慢乳酸菌の効率の良い分離は食品汚染ばかりでなく、食品微生物学的にも重要性が増すと考えられる。ここで確立した方法はまだまだ完璧なものではないが、乳酸菌ばかりでなく各種の細菌群の分離方法の一

つの方策として役立てていただければと考える。

## 要 約

生育緩慢乳酸菌（難培養、難分離を含む）は自然界に広く分布しており、食品への汚染事故の原因に関与することが多く見られる。またその存在を把握していないために食品の味覚形成などへの重要性も見逃されてきた可能性がある。生育緩慢乳酸菌は生育良好乳酸菌と混在して存在すると考えられ、生育良好乳酸菌を排除しながら生育緩慢乳酸菌を効率よく分離する手法の確立が望まれる。本研究において、生育良好乳酸菌を抗生物質で殺菌的に排除し、生育緩慢乳酸菌だけを生残させ、純粋分離する手法を確立した。生育緩慢乳酸菌本体の生育条件などまだ研究を進めなければならぬことも浮き彫りにされた。

## 本助成で得られた成果一覧

- ① 入澤友啓、遠藤明仁、浅尾弘明、岡田早苗（2007）。調味味噌から分離された乳酸菌の同定とその特性、2007年度日本農芸化学大会（東京）、要旨集 p. 21。
- ② 入澤友啓、遠藤明仁、浅尾弘明、岡田早苗（2007）。調味味噌から分離された乳酸菌の同定とその特性、2007年度日本乳酸菌学会大会、要旨集=日本乳酸菌学会誌 18：72。

## 保存機関に寄託した菌株一覧

- Lactobacillus rennini* (5株：膨張事故の調味味噌)  
：TUA 4588L, TUA 4589L, TUA 4590L, TUA  
4591L, TUA 4592L  
(「TUA」は東京農業大学菌株保存室内部での  
保存記号)
- Lactobacillus sakei* (10株：かぶらずし)  
：東京農業大学菌株保存室に保存準備中
- Leuconostoc gasicomitum* (8株：かぶらずし)

：東京農業大学菌株保存室に保存準備中

## 謝 辞

本研究は、平成15年度財団法人発酵研究所研究助成金によりなされた研究であります。

当財団法人理事長森田桂氏および同理事、同監事、同評議員各氏に深く御礼申し上げます。また本研究を進めるに当たり、ご助言をいただきました国立感染症研究所堀田国元氏に感謝申し上げます。さらに本実験を遂行していただきました東京農業大学大学院学生入澤友啓君および同大学副手遠藤明仁氏に感謝致します。

## 文 献

- Amann, R. I., Ludig, W. & Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Chenoll, E., Macian, M. C. & Aznar, R. (2006). *Lactobacillus rennini* sp. nov., isolated from rennin and associated with cheese spoilage, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **35** : 449-452.
- Endo, A. & Okada, S. (2005). Monitoring the lactic acid bacterial diversity during *Shochu* fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, *J. Biosci. Bioeng.* **99**: 216-221.
- 川原元司 (1987). *Chemotherapy* 35 : 803-816.
- 岡田早苗 (1992). 分離培地組成、小崎道雄（編）、乳酸菌実験マニュアル、p.15-17、朝倉書店、東京。
- 岡田早苗 (1999). 緩慢な生育をする乳酸菌の特性. 食品工業 **42** : 1-7.
- 岡田早苗 (2002). 乳酸菌の種類と菌学的諸性質、細野明義（編）、発酵乳の科学、p.187-191、アイ・ケイコーポレーション、神奈川。
- 中山二郎、星子浩之、田中英俊、田中重光、園元謙二 (2007). 糸床のミクロフローラ：緩慢乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* とその他の乳酸菌の生育挙動と代謝活性. 日本乳酸菌学会誌 **17** : 87.
- 西野武志 (1986). 抗菌薬の併用と形態変化. 臨床医 **12** : 161-168.

## 菌糸形菌体の長期保存法の開発および保存株の品質評価

横山 耕治

千葉大学真菌医学研究センター  
〒260-8673 千葉市中央区亥鼻1-8-1

Development of long-term conservation for mycelia, and quality evaluation  
of stock strains

Koji Yokoyama

Medical Mycology Research Center, Chiba University  
(Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University),  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

*Schizophyllum commune* is a pathogenic fungus in the Basidiomycota. It includes monokaryon strains that do not form spores. These strains can not survive long-term preservation with the conventional L-dry technique. We developed the DL-dry technique for these strains. This technique allowed long-term stable conservation. Most *Epidermophyton floccosum* strains do not form conidia. The L-dry technique can not be used for this species. We used the DL-dry technique with 69 strains and achieved long-term preservation of 63 strains (91.3%). A small DNA (approximately 400 bp) of the cytochrome *b* gene was sequenced for the strains in the genera *Cryptococcus* and *Trichosporon*. These sequences are specific for each species of these genera. Some DNA types are on the same species. The sequence analysis of cytochrome *b* gene is effective for identification and differentiation of the species in the genera *Cryptococcus* and *Trichosporon*.

Key words: mycelia, long-term stable conservation, DL-dry technique, cytochrome *b* gene

### はじめに

胞子を形成しない菌糸形菌株の保存は継代培養や凍結保存に依っていた。継代培養は植継ぎ時期や保存状態の観察など保存に手間がかかり、時間的、精神的な負担が大きい。凍結保存には、冷凍機の設置や保存スペースの確保維持に経費がかかり、停電などの事故によるリスクも高い。従って、L乾燥法（坂野, 1985; 坂根, 坂野, 1980）のように、アンプルで保存できれば保存スペースも確保でき、一時的に室温になんでも生存率を維持できる。菌糸形のみの菌株の場合、菌糸の懸濁液を用いたL乾燥法では全く生存が認められなかった。この困難を解決するため、菌糸形菌株を長期間安定的に保存する方法の開発を行った。

一方、保存菌株の品質評価は、保存施設として欠かすことが出来ない重要な事である。千葉大学真菌医学研究センターでは病原真菌の保存事業を行っている。

病原真菌の同定、保存依頼および保存菌株の品質を保ち分譲依頼に対応するために、遺伝子に基づいた品質管理と評価が必要である、我々は、真核生物に共通に存在するミトコンドリア・チトクローム *b* 遺伝子の塩基配列を解析し、病原真菌の同定、系統分類に活用し、真菌症の診断への応用を試みている。主な病原真菌 (Biswas *et.al.*, 2001a, 2001b, 2001c), (Wang *et.al.*, 1998, 2000, 2001; Yokoyama *et.al.*, 1999a, 1999b, 2000, 2001) については塩基配列データが揃いつつあるが、さらに病原真菌関連菌や環境分離菌などの充実を心がけている。本研究期間では、*Cryptococcus* 属 (Biswas *et.al.*, 2003), *Trichosporon* 属 (Biswas *et.al.*, 2005) の標準株のチトクローム *b* 遺伝子を解析し、保存株の品質評価を行うと共に、保存株の標準化を行った。

### 1. 菌糸形菌体の長期保存法

#### 実験方法

使用菌株：胞子を作らない担子菌の1核菌糸体を含む

病原真菌 *Schizophyllum commune* 11株を予備的に先行して行い、本方法の評価のために42株を使用した (Table 1 および 2)。また、大分生子と菌糸体のみで小分生子をほとんど形成しない皮膚糸状菌 *Epidermophyton floccosum* 16株を使用した (Table 3)。

**DL-乾燥法**：DL-乾燥法 (disk liquid dry)，本方法は著者が独自に考案した方法である。Fig. 1 に示すようにプレートに生育させた菌糸状菌体を直径 4 mm の自作のコルクボーラー (Fig. 1a) を用いて寒天ごと抜きとり、5 ディスクを内径 5 mm のガラスアンプルに入れる。乾燥補助剤 (5% グルタミン酸ナトリウム、5% ラクトース、5% PVP (ポリビニールポリビドン K-30)、0.1% ポリエーテルポリオール (Actocol : 消泡剤) リン酸緩衝液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13.6 g/L :  $\text{KHOPO}_4$  17.4 g/L = 4 : 6, pH7.0) を約 100  $\mu\text{l}$  アンプルに入れて菌体を浸す。約 1 時間後真空乾燥機で約 3 時間乾燥させ、真空のままアンプルを溶封する。アンプルは 5°C の部屋に保存した。

**アンプルの復元**：アンプル中央の綿栓部分にヤスリ、ガラス切り、アンプルカッターなどで傷を付け、アルコールで消毒し、割って開封する。綿栓を取り出し復元液 (PYS 培地: 0.5% ポリペプトン、0.2% 酵母エキス、0.2% コハク酸ナトリウム、0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH7.0) または PDB (ポテトデキストロース液体培地; DIFCO) などの液体培地を入れて復元し PDA 培地に移す。

**生存率の算定**：生存率の算出は、株ごとに 2 本のアンプル合計 10 ディスクを PDA 寒天培地に植えて 7 日後に生育の有無を確認し、生育が認められたディスクの数を 10 で割り 100 を掛けて生存率 (%) とした。

**経年生存率と過酷試験**：乾燥処理による生存率の変化を調べるために、乾燥後 1 日目に復元し生存率を調べた。Table 1 に示す菌株については、3 ヶ月、1 年、2 年、4 年後に復元して生存率を調べた。過酷試験は 37°C のインキュベーターに DL-乾燥法で作製したアンプルを保存し、乾燥後 1 日目と 1 年後に開封して生存率を調べた。

**生存率を高める方法の検討**：菌体の保護を目的に 0.5, 1.0, 1.5% 寒天およびデンプンを培養プレートに重層し、コルクボーラーにてくり抜き DL-乾燥を行った。乾燥後 1 日目にアンプルを開封し生存率を調べた。

### 結果および考察

病原真菌 *Schizophyllum commune* の DL-乾燥法による経年生存率および過酷試験の結果を菌株リストと共に Table 1 に示した。使用した 11 株について、5°C 保存では、2 年後の生存率が 80% に低下していた株もあったが全株生存していた。4 年後における生存率は、20% まで低下した 1 株が有ったが、全株生存は確認できた。なお、1 株はアンプルの真空度低下のため調査できなかった。

Table 1 Strains of *Schizophyllum commune* used in this study and survival rate

IFM No.	Survival rate (%) after DL-dry at 4°C storage					at 37°C storage	
	1 day	3 months	1 year	2 years	4 years	1 day	1 year
41942	80	100	100	100	100	100	60
45818	100	70	80	80	70	60	20
46098	80	100	100	100	100	100	70
46104	100	100	100	100	100	100	60
46184	100	100	80	80	70	100	50
46416	100	90	100	100	100	80	30
46581	90	80	80	80	20	80	50
46663	100	100	100	100	100	100	70
46788	100	100	100	100	NT*	100	50
47581	100	90	100	80	80	80	30
47582	100	100	100	100	90	100	60

NT\* : not tested

Table 2 Strains of *Schizophyllum commune* used in this study and survival rate

IFM No.	Survival rate (%)	
	1day	1year
46097	100	50
46099	100	80
46101	100	100
46103	100	80
46185	80	0
46186	100	100
46577	40	0
46578	100	0
46579	0	NT*
46580	0	NT*
46799	60	70
46800	80	60
46898	100	100
46911	100	100
47008	100	100
47009	80	80
47276	100	100
47458	100	100

IFM No.	Survival rate (%)	
	1day	1year
50234	100	
50235	100	
50236	100	
50237	80	
50238	100	
50239	100	
50240	100	
50241	100	
50242	100	
50243	80	
50244	100	
50245	100	
50246	60	
50247	100	
54711	100	
54713	80	
54715	80	
54716	0	
54717	0	
54718	100	
54719	100	
54720	20	
54721	100	
54722	100	

NT\* : not tested

過酷試験の結果は、Table 1 に示したように、37°Cで1年間保存後の生存率は、20%から70%と違いが認められたが全株の生存を確認した。37°Cの30日保存が5°Cの5年と推定できるため、37°Cの1年は5°Cの60年後の生存率に相当すると考えられ、本方法による *Schizophyllum commune* の長期保存の可能性が推定された。

さらに、当センター保存 *S. commune* 42株について、DL乾燥を試みた結果を Table 2 に示した。これらの42菌株中4株は乾燥後1日目の生存率が0%を示し、乾

燥時に障害を受けたと考えられた。

大分生子と菌糸体のみで、小分生子をほとんど作らず、菌の懸濁液のL-乾燥保存では生存できない皮膚糸状菌 *Epidermophyton floccosum* のDL-乾燥の結果を Table 3 に示した。当センター保存の16株中2株は生存していなかった。

DL-乾燥法において生存できなかった *S. commune*, *E. floccosum* の6株について菌体を保護し生存率を高める目的で、0.5, 1.0, 1.5% 寒天およびデンプンを培養プレートに重層し DL-乾燥を試みた。しかし、寒天、

**Table 3** Strains of *Epidermophyton floccosum* used in this study and survival rate

	Survival rate (%)
IFM No.	1 day
41070	100
41111	0
41132	100
41135	100
41734	0
46637	100
46794	100
46811	80
46923	100
46991	100
53345	100
53408	100
53504	100
53505	100
54154	100
54250	25

デンプンの何れの濃度においても生存率を高める事は出来なかった。

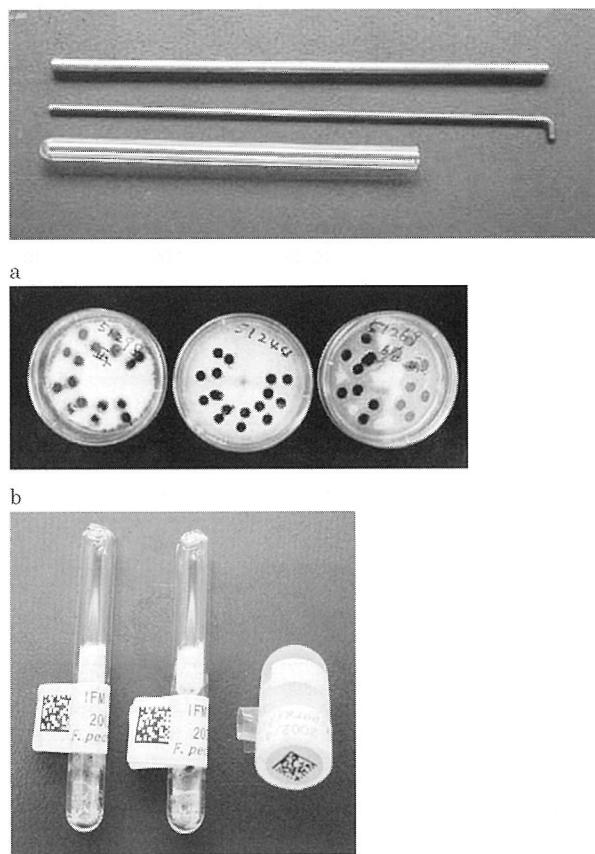
菌糸状菌体のみ形成する菌株の長期安定保存法として開発したDL乾燥法を用いて、従来のL乾燥法では生存できなかった胞子を作らない担子菌の1核菌糸体を含む病原真菌 *S. commune* と大分生子と菌糸体のみで、小分生子をほとんど作らない皮膚糸状菌 *E. floccosum* について検討した結果69株中63株(91.3%)が長期保存可能であることが明らかになった。DL乾燥法は胞子を着生する株にも有効であるので、DL乾燥法は真菌の保存に幅広く利用できる。

## 2. 保存菌株の品質評価

### 実験方法

使用菌株：使用菌株のリストは、Table 4 (*Cryptococcus* 属) および Table 5 (*Trichosporon* 属および担子菌系酵母、子囊菌系酵母の一部) に示した。

チトクローム b 遺伝子解析：供試菌株は PDA 培地に植菌後25℃で培養した。DNAは、生育菌体を75%エタノールで殺菌した後、DNA抽出キット（酵母用ジン



**Fig. 1** Used ampoule and a hand made cork borer.

Outside diameter of an ampoule is 7 mm. Inside diameter of the ampoule is 5 mm. Length of the ampoule is 120 mm. Outside diameter of the cork borer is 4 mm. Inside diameter of the cork borer is 3 mm. Length of the cork borer is 163 mm.

トルくん、TAKARAバイオ、滋賀）を使用して抽出した。チトクローム b 遺伝子は、特異的に増幅する共通プライマー (E1M4, rE2M4) を用いて増幅し、精製後、ダイターミネーター法を用いて蛍光ラベルし、ABI377 または3130を用いて塩基配列を決定した。

### 結果および考察

*Cryptococcus* 属菌のなかで病原性を示す *C. neoformans* には2変種 *C. neoformans* var. *neoformans* と *C. neoformans* var. *gattii* があり、また本菌種の血清型は A, B, C, D, AD の5種類が知られている。本菌種のチトクローム b 遺伝子を解析した結果、DNA type は、9種類に分けることが出来た。本遺伝子のアミノ酸配列を用いて解析すると *C. neoformans* var.

## 菌糸形菌体の長期保存法の開発および保存株の品質評価

Table 4 Strain list of *Cryptococcus neoformans* used in this study

(Biswas et. al. 2003)	Varieties	IFM no.	Sero- type	DNA type	AA	Exon	Source	Accession no.
<i>gattii</i>		5815	B	D-1	A-1	[1-46; 461-800]	Patient	AB105913
<i>gattii</i>		48634	B	D-1	A-1	[1-46; 461-800]	CBS 6289	AB105914
<i>gattii</i>		48636	B	D-1	A-1	[1-46; 454-793]	CBS 7229	AB105915
<i>gattii</i>		48819	B	D-1	A-1	[1-46; 461-800]	CBS 6998	AB105916
<i>gattii</i>		48820	B	D-1	A-1	[1-46; 461-800]	CBS 8273	AB105917
<i>gattii</i>		48821	B	D-1	A-1	[1-46; 454-793]	CBS 7749	AB105918
<i>gattii</i>		5856	C	D-2	A-1	[1-46; 317-632; 1148-1171]	NIH 18	AB105919
<i>gattii</i>		5873	C	D-2	A-1	[1-46; 317-632; 1148-1171]	Patient	AB105920
<i>gattii</i>		5875	C	D-2	A-1	[1-46; 317-632; 1148-1171]	Patient	AB105921
<i>gattii</i>		5878	B	D-2	A-1	[1-46; 317-632; 1121-1144]	Patient	AB105922
<i>gattii</i>		48635	C	D-3	A-1	[1-46; 317-632; 1162-1185]	CBS 6955T	AB105923
<i>gattii</i>		5855	B	D-4	A-1	[1-46; 317-632; 1162-1185]	NIH 112	AB105924
<i>gattii</i>		47258	B	D-5	A-1	[1-46; 1175-1514]	Patient	AB105925
<i>gattii</i>		48818	B	D-5	A-1	[1-46; 1175-1514]	CBS 6956	AB105926
<i>gattii</i>		48822	B	D-5	A-1	[1-46; 1175-1514]	CBS 7750	AB105927
<i>neoformans</i>		5844	D	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	Patient	AB105928
<i>neoformans</i>		5845	D	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	Patient	AB105929
<i>neoformans</i>		5857	D	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	NIH 52	AB105930
<i>neoformans</i>		5881	D	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	Patient	AB105931
<i>neoformans</i>		46082	D	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	Patient	AB105932
<i>neoformans</i>		46090	D	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	Patient	AB105933
<i>neoformans</i>		48640	D	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	CBS 6901	AB105934
<i>neoformans</i>		48641	D(A)	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	CBS 6995	AB105935
<i>neoformans</i>		48642	D	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	CBS 7697	AB105936
<i>neoformans</i>		48643	D	D-6	A-2	[1-46; 1190-1529]	CBS 7698	AB105937
<i>neoformans</i>		5889	AD	D-7	A-2	[1-46; 1190-1529]	Patient	AB105938
<i>neoformans</i>		5505	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Patient	AB105939
<i>neoformans</i>		5506	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Patient	AB105940
<i>neoformans</i>		5854	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	CDC 551	AB105941
<i>neoformans</i>		45708	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Patient	AB105942
<i>neoformans</i>		45737	AD	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Pigeon droppings	AB105943
<i>neoformans</i>		45756	AD	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Pigeon droppings	AB105944
<i>neoformans</i>		46132	AD	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Pigeon droppings	AB105945
<i>neoformans</i>		46554	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Patient	AB105946
<i>neoformans</i>		46572	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Patient	AB105947
<i>neoformans</i>		46729	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Pigeon droppings	AB105948
<i>neoformans</i>		46734	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	Pigeon droppings	AB105949
<i>neoformans</i>		48638	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	CBS 996	AB105950
<i>neoformans</i>		48639	A	D-8	A-2	[1-46; 1189-1528]	CBS 5756	AB105951
<i>neoformans</i>		48637	D	D-9	A-2	[1-386]	CBS 132T	AB040655

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; CDC, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA; IFM, Institute for Food Microbiology(at present, the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University), Chiba, Japan; NIH, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA. T: Type strain.

Table 5 Strain list of *Trichosporon species* used in this study

<i>Species</i>	IFM no.	Source	Exon position(s) (nt)	Accession no.
<i>Trichosporon aquatile</i>	48573	CBS 5973T	1-396	AB040664*
<i>Trichosporon aquatile</i>	48959	CBS 5988	1-396	AB175742
<i>Trichosporon asahii</i>	48429	CBS 2479T	1-46, 1252-1601	AB175743
<i>Trichosporon asahii</i>	48574	CBS 2497	1-46, 1252-1601	AB175744
<i>Trichosporon asahii</i>	48575	CBS 4829	1-46, 1252-1601	AB175745
<i>Trichosporon asteroides</i>	48559	JCM 2937T	1-46, 1253-1268, 2333-2666	AB175746
<i>Trichosporon asteroides</i>	48608	CBS 7623	1-396	AB175747
<i>Trichosporon asteroides</i>	48960	CBS 6183	1-46, 1253-1268, 2333-2666	AB175748
<i>Trichosporon asteroides</i>	48961	CBS 7624	1-396	AB175749
<i>Trichosporon brassicae</i>	48962	CBS 6382T	1-62, 1236-1569	AB175750
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	48963	CBS 2482T	1-46, 1254-1603	AB175751
<i>Trichosporon cutaneum</i>	5788	IFO 1198T	1-396	AB175752
<i>Trichosporon domesticum</i>	48565	JCM 9580T	1-396	AB175753
<i>Trichosporon dulcitum</i>	48561	JCM 2946T	1-46, 1125-1474	AB175754
<i>Trichosporon dulcitum</i>	48576	CBS 8257	1-46, 1125-1474	AB175755
<i>Trichosporon dulcitum</i>	48622	JCM 2945	1-46, 1125-1474	AB175756
<i>Trichosporon dulcitum</i>	49111	CBS 5785	1-46, 1125-1474	AB175757
<i>Trichosporon faecale</i>	48560	JCM 2941T	1-46, 1253-1602	AB175758
		Clinical		
<i>Trichosporon faecale</i>	48794	isolate	1-46, 1253-1602	AB175759
<i>Trichosporon gracile</i>	48564	JCM 3940	1-396	AB175760
<i>Trichosporon gracile</i>	48609	CBS 8189T	1-396	AB175761
<i>Trichosporon gracile</i>	48610	CBS 8193	1-396	AB175762
<i>Trichosporon guehoae</i>	50454	CBS 8521T	1-396	AB175763
<i>Trichosporon inkin</i>	48551	IFO 10131T	1-62, 1120-1453	AB175764
<i>Trichosporon jirovecii</i>	48577	CBS 6864T	1-46, 919-1268	AB175765
<i>Trichosporon jirovecii</i>	48578	CBS 6950	1-46, 919-1268	AB175766
<i>Trichosporon laibachii</i>	48562	JCM 2947	1-396	AB175767
<i>Trichosporon laibachii</i>	48579AUT	CBS 2495	1-396	AB175768
<i>Trichosporon laibachii</i>	48580	CBS 5790T	1-396	AB175769
<i>Trichosporon laibachii</i>	48623	JCM 9934	1-396	AB175770
<i>Trichosporon loubierii</i>	48563	JCM 3939T	1-396	AB175771
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	48558	JCM 2389T	1-376, 1280-1299	AB175772
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	48581	CBS 5959	1-376, 1280-1299	AB175773
<i>Trichosporon montevideense</i>	48582	CBS 6721T	1-396	AB175774
<i>Trichosporon mucoides</i>	48611	CBS 7625T	1-396	AB040665*
<i>Trichosporon multisporum</i>	50466	CBS 2495T	1-396	AB175775
<i>Trichosporon ovoides</i>	48612	CBS 7556T	1-46, 1245-1594	AB175776
<i>Trichosporon ovoides</i>	48613	CBS 5580	1-46, 1245-1594	AB175777
<i>Trichosporon pullulans</i>	48614	CBS 2535	1-46, 1249-1264, 2320-2653	AB175778
<i>Trichosporon pullulans</i>	48615	CBS 5581	1-46, 1249-1264, 2320-2653	AB175779
<i>Trichosporon sporotrichoides</i>	49226	JCM 9941T	1-396	AB175780

## 菌糸形菌体の長期保存法の開発および保存株の品質評価

<i>Trichosporon veenhuisii</i>	50456	CBS 7136T	1-396	AB175781
<i>Bensingtonia yuccicola</i>	49223T	JCM6251T	1-396	AB040648
<i>Bullera crocea</i>	49222T	JCM2961T	1-396	AB040649*
<i>Bulleromyces albus</i>	49221T	JCM2954T	1-396	AB040650*
<i>Cryptococcus curvatus</i>	45920T		1-396	
<i>Cryptococcus gastricus</i>	48669T		1-396	AB040652*
<i>Cryptococcus flavus</i>	48667T		1-396	AB040651*
<i>Cryptococcus humicolus</i>	48672	CBS 571T	1-396	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	48675T		1-396	AB040653*
<i>Candida glabrata</i>			1-396	X53862
<i>Erythrobasidium</i>				
<i>hasegawanum</i>	48186T		1-396	AB040666*
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	48657T		1-396	AB040654*
<i>Filobasidiella neoformans</i>	48637T		1-396	AB040655*
<i>Leucosporidium scottii</i>	49208T		1-396	AB040658*
<i>Malassezia furfur</i>	48585T		1-396	AB040656*
<i>Malassezia pachydermatis</i>	48555		1-396	AB040657*
<i>Rhodosporidium paludigerum</i>	48537T		1-396	AB040646*
<i>Rhodotorula glutinis</i> var.				
<i>glutinis</i>	48391T		1-396	AB040627*
<i>Saccharomyces douglasii</i>				X59280
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	48656		1-396	AB040659*
<i>Sporobolomyces xanthus</i>	48191		1-396	AB040660*
<i>Tremella foliacea</i>	48200		1-396	AB040661*
<i>Tsuchiyaea wingfieldii</i>	48554		1-396	AB040662*
<i>Ustilago maydis</i>	49220T		1-396	AB040663*

\*Reference 2 Biswas *et al.*(2001)

*neoformans* と *C. neoformans* var. *gattii* の変種がきれいに分かれた。血清型も *C. neoformans* var. *neoformans* は A, D, AD と *C. neoformans* var. *gattii* の B, C に分かれた。さらに、*C. neoformans* の type strain (IFM 48637) にはイントロンを含まなかったが、それ以外の株は、全てイントロンを含んでいた (Table 4, Figs. 2 and 3).

*Trichosporon* 属の42株23種についてチトクローム b 遺伝子を解析した。*Trichosporon* 属菌は、担子菌系酵母に属し、単一の系統を示した (Fig. 4). 23種の内、*T. domesticum* と *T. montevideense* は同一配列を示したが、22種はそれぞれ特異的な塩基配列を示し、種内変異も示された。42株中22株 (11種) にイントロンが含まれていた。

子囊菌系酵母および担子菌系酵母の系統樹をチトクローム b のアミノ酸配列を基に作成した Fig. 4 では、両酵母系が早期に分岐しているとともに、担子菌系酵

母の細胞壁成分にXyloseを含むグループと含まないグループに分かれた。このことは細胞壁合成過程が進化的意義を持つと推定される。

チトクローム b 遺伝子の解析から種、種内変異の特定が可能であり、保存株の品質評価に有効であることが明らかになった。

## 要 約

菌糸状菌体の長期安定保存法として開発した DL-乾燥法を用いて、従来の L-乾燥法では生存できなかった胞子を作らない担子菌の 1 核菌糸体を含む病原真菌 *S. commune* ならびに大分生子と菌糸体のみで小分生子をほとんど作らない皮膚糸状菌 *E. floccosum* について長期保存における生存率を調査した。その結果、69株中 63株 (91.3%) が長期保存可能であることが明らかになり、DL-乾燥法が菌糸状菌体の長期保存に適してい

		Intron I (all types)	
I	1	AATATGCTATCAGCTATTCTGGATTGGTACAGATTTCACACAATTGTATGGCTGGATTCTCTGTTAAATGTCAC	80
II	1		80
III	1		80
IV	1		80
V	1	.G.	80
VI	1		80
VII	1	.A.	80
VIII	1	.T.G.C.	80
IX	1	.T.C.G.T.	80
I	81	ACTTAACCGATTCTCTCACTTCACTATCTAC TACCAATTATTCTAGCAGCTCTAGCTCTAGTACATATGCTAACACTAC	160
II	81		160
III	81		160
IV	81		160
V	81	.G.	160
VI	81		T. 160
VII	81		T. 160
VIII	81		T. 160
IX	81	.T.C.	160
I	161	ACTCACATGGTAGTTCAARTCCTGAAGGTATTAGCTAAATGCAGAAAAGGCCAACATGCATCCATACTTTATCTTAAG	240
II	161		240
III	161		240
IV	161		240
V	161	.C.	240
VI	161	.A..C..C..C.	240
VII	161	.A..C..C..C.	240
VIII	161	.A..C..C..C.	240
IX	161	.A..C..C..C.	240
I	241	GATCTAGTAACATTATCCTTTCTTCATTGCTCTAACAGCTCTAGTAATGTATGCACCTAAATGCTAGGACACAGTGA	320
II	241		320
III	241		320
IV	241		320
V	241		T. 320
VI	241	.A.	C. 320
VII	241	.A.	C. 320
VIII	241	.A.	C. 320
IX	241	.A.	C. 320
I	321	CAATTACATTCTGCTAACCCAAATGCACACRCCACCTTCATTGTACCGGAATGGTATCTTCTACC	386
II	321	.G.	386
III	321	.T.G.	386
IV	321	.T.A.	386
V	321	.G.	386
VI	321	.C.T.	386
VII	321	.C.T.	386
VIII	321	.C.T.	386
IX	321	.C.G.	386

**Fig. 2** Comparison of coding sequences of the mt cytochrome *b* genes (*cyt b*) of various *C. neoformans* isolates. Dots, nucleotides that are identical to those of *C. neoformans* *cyt b* type I. Arrows indicate positions of introns. *cyt b* type is in parentheses. *Cyt b* type IX is type strain. (Biswas et al. 2003).

ることが明らかとなった。

チトクローム  $b$  遺伝子の塩基配列解析は、*Cryptococcus* 属および *Trichosporon* 属においても種に特異的な配列を示し、種内変異も解析できるので同定、分類、分布や生態および品質管理に有効であることが明らかになった。

## 本助成で得られた報告一覧

横山耕治(2005). *Malassezia* の対電子解析による系統分類と

同定の新展開 - ミトコンドリア・チトクローム b 遺伝子 - , 真菌誌 46: 151-156.

横山耕治(2005)真菌の保存法、化学療法の領域 21: 791-796.

Biswas, K. S., Wang, L., Yokoyama, K. & Nishimura, K. (2003). Molecular analysis of mitochondrial cytochrome b gene sequences of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 41: 5572-5576.

Biswas, K. S., Wang, L., Yokoyama, K. & Nishimura, K. (2005). Molecular Phylogenetics of the genus *Trichosporon* inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences. J. Clin. Microbiol. 43: 5171-5178.

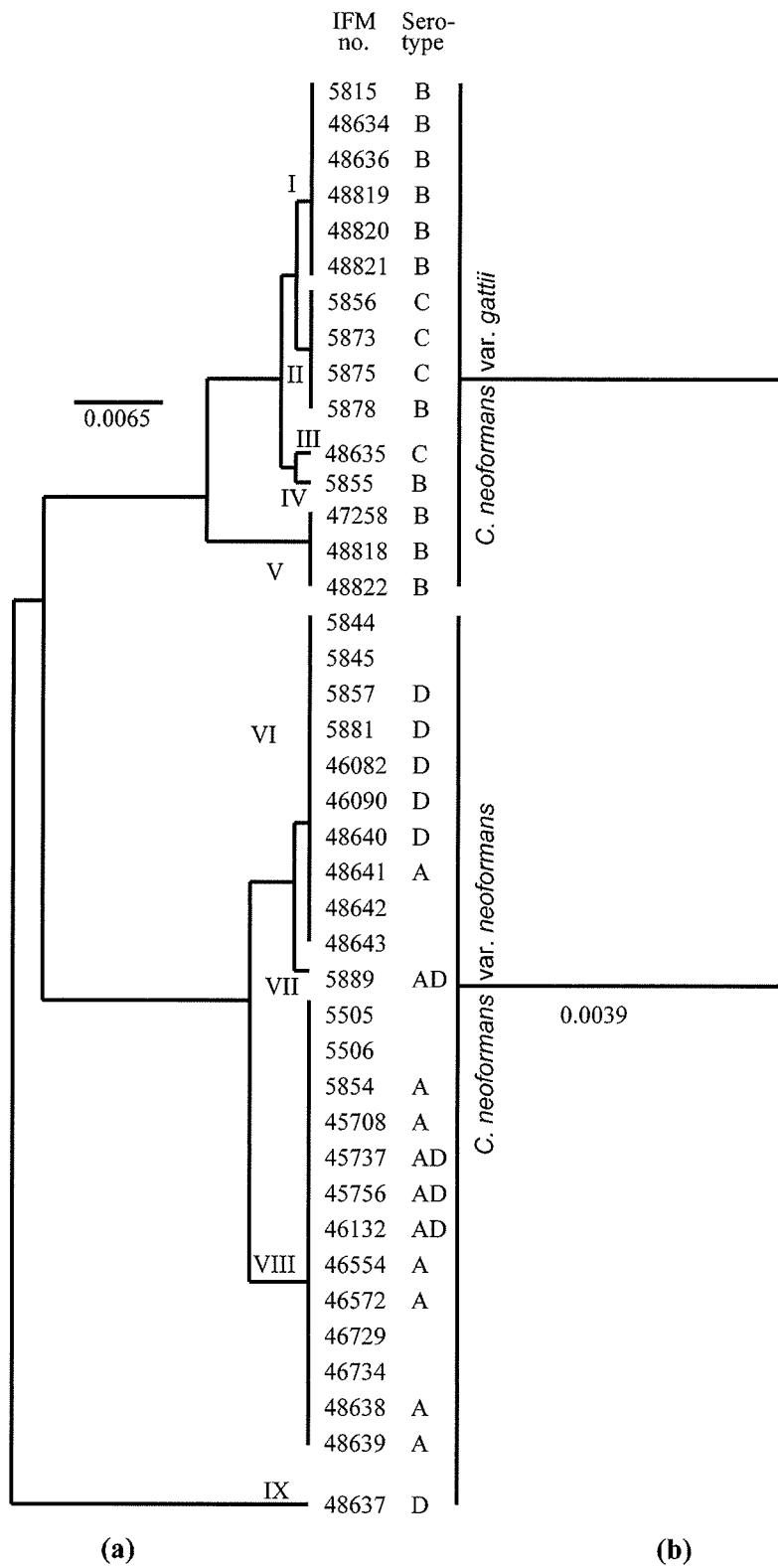


Fig. 3 UPGMA-tree showing the relationship of various *C. neoformans* isolates generated from nucleotide sequences of the *cyt b* gene (exon) (a) and deduced amino acid sequences (b). Bar indicates number of nucleotide and amino acid substitution per nucleotide site and amino acid site. (Biswas et. al. 2003)

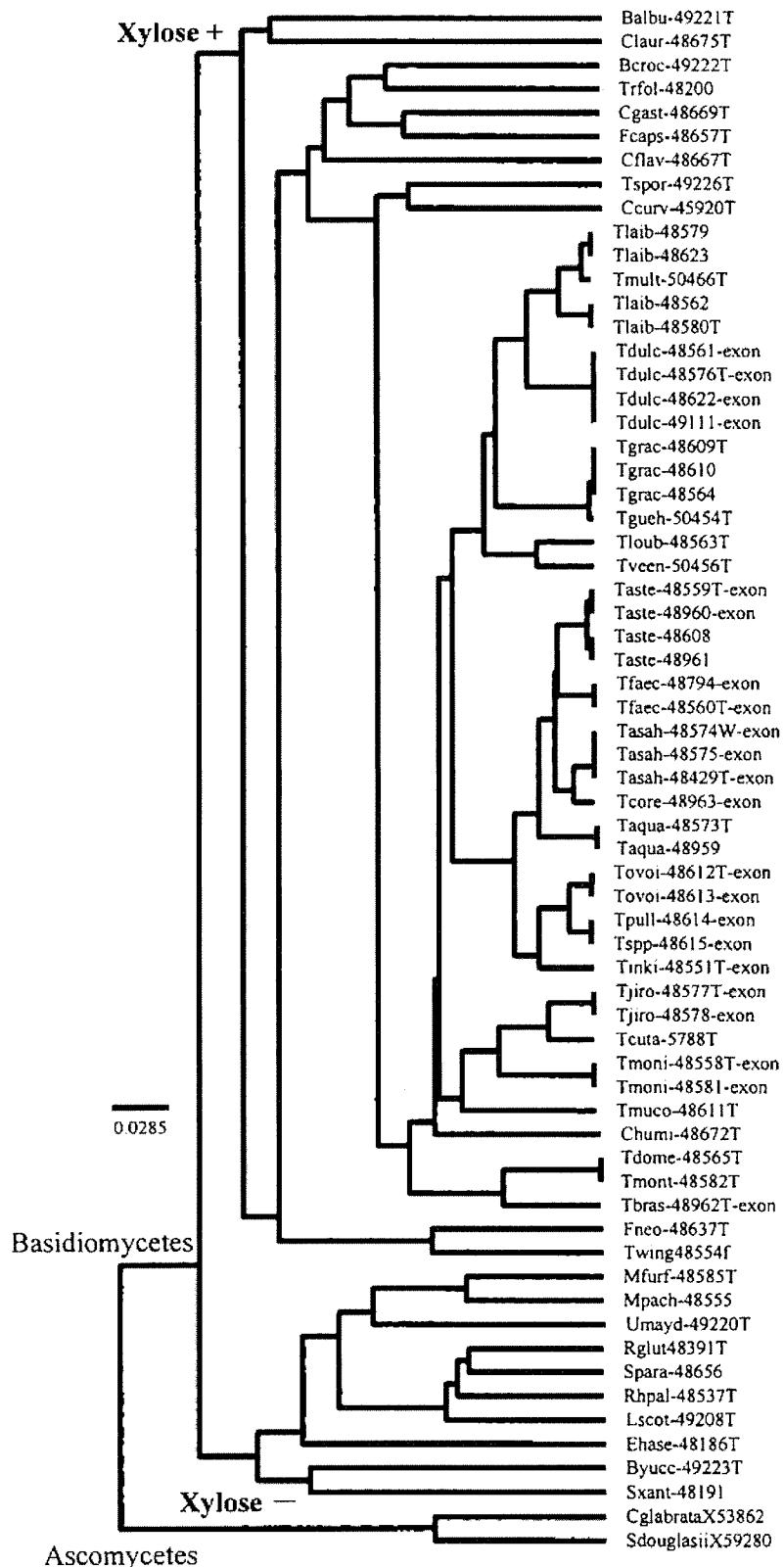


Fig. 4 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of the *cyt b* gene of *Trichosporon*. The tree was constructed by using UPGMA. Numbers indicate IFM strain numbers. T indicates type strain. Bar indicates number of nucleotide substitutions per nucleotide. (Biswas et.al. 2005)

## 保存機関に寄託した菌株一覧

IFM：千葉大学 真菌医学研究センター（属名・IFM番号）

*Aureobasidium* 属関連株 (IFM 54448-54450) 3 株,  
*Geotrichum* 属関連株 (IFM 54490-55505) 35 株,  
*Graphium* 属関連株 (IFM 54505-54526) 21 株,  
*Beauveria* 属菌 (IFM 55069-55146) 77 株.

合計 138 株

## 謝 辞

本研究の遂行には、千葉大学真菌医学研究センター伊藤純子、遠藤成朗（現在：三菱化学メヂエンス株式会社）、Biswas S.K.（ペンシルバニア州立医科大学）、王麗（吉林大学白求恩医学院）の協力により成し得ました。また、本研究の機会と助成を頂いた財団法人発酵研究所（大阪）に深く感謝いたします。

## 文 献

- 坂野 熊 (1985). 菌株保存法. 微生物 2: 97-108.
- Biswas, S. K., Yokoyama, K., Nishimura, K. & Miyaji, M. (2001a). Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from mitochondrial cytochrome b gene. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1191-1199.
- Biswas, S. K., Yokoyama, K., Wang, L., Nishimura, K. & Miyaji, M. (2001b). Typing of *Candida albicans* isolates by sequence analysis of the cytochrome b gene and differentiation from *C. stellatoidea*. J. Clin. Microbiol. 39: 1600-1603.
- Biswas, S. K., Yokoyama, K., Wang, L., Nishimura, K. & Miyaji, M. (2001c). Identification of *Candida dubliniensis* based on the specific amplification of mitochondrial cytochrome b gene. Japanese J. Med. Mycol. 42: 109-112.
- Biswas, K. S., Wang, L., Yokoyama, K. & Nishimura, K. (2003). Molecular analysis of mitochondrial cytochrome b gene sequences of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 41: 5572-5576.
- Biswas, K. S., Wang, L., Yokoyama, K. & Nishimura, K. (2005). Molecular Phylogenetics of the Genus *Trichosporon* Inferred from Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences. J. Clin. Microbiol. 43: 5171-5178.
- 板根 健、坂野 熊 (1980). L-乾燥標本の長期保存. 凍結および凍結乾燥研究会誌 26: 96-100.
- Wang, L., Yokoyama, K., Miyaji, M. & Nishimura, K. (1998). The identification and phylogenetic relationship of pathogenic species of *Aspergillus* based on the mitochondrial cytochrome b gene. Med. Mycol. 36: 153-164.
- Wang, L., Yokoyama, K., Miyaji M. & Nishimura, K. (2000). Mitochondrial cytochrome b gene analysis of *Aspergillus fumigatus* and related species. J. Clin. Microbiol. 38: 1352-1358.
- Wang, L., Yokoyama, K., Takahashi, H., Kase, N., Hanya, Y., Yashiro, K., Miyaji, M. & Nishimura K. (2001). Identification of species in *Aspergillus* section *Flavi* based on sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene. Int. J. Food Microbiol. 71: 75-86.
- Wang, L., Yokoyama, K., Miyaji, M. & Nishimura, K. (2001). Identification, classification and phylogeny of pathogenic species *Exophiala jeanselmei* and related species by mitochondrial cytochrome b gene analysis. J. Clin. Microbiol. 39: 4462-4467.
- Yokoyama, K., Wang, L., Biswas, S. K., Ito, J., Unno, H., Takahashi, H., Kase, N., Miyaji, M. & Nishimura, K. (1999a). Phylogenetic relationship and classification of mycotoxin producers using the cytochrome b gene. Mycotoxins supplement 21-27.
- Yokoyama, K., Wang, L., Takahashi, H., Kase, N., Miyaji, M. & Nishimura, K. (1999b). Molecular typing of *Aspergillus* section *Flavi* by mitochondrial cytochrome b gene analysis. Mycotoxins 49: 27-33.
- Yokoyama, K., Biswas, S., Miyaji, M. & Nishimura, K. (2000). Identification and phylogenetic relationship of the most common pathogenic *Candida* species inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. J. Clin. Microbiol. 38: 4503-4510.
- Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M. & Nishimura K. (2001). Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. FEMS Microbiol. Let. 200: 241-246.

# 緑藻ボルボックス目の培養株を用いた種レベルの分類学的研究と 新規培養株を用いた雄特異的遺伝子の発見

野崎久義

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Species Taxonomy Based on Cultured Material and Discovery of the Male-specific Gene from Newly Established Culture Strains in the Volvocales

(Chlorophyta)

Hisayoshi Nozaki

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo,  
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Taxonomic studies of the two volvocalean genera, *Astrococcus* and *Hafniomonas*, were carried out based on the comparative light and electron microscopy and molecular phylogenetic analyses of 16 strains that were newly isolated or sent from various culture collections of algae, in order to establish natural taxonomic systems at species level. The eight strains of *Astrococcus* were clearly delineated into three species based on differences in the structure of the gelatinous colonial matrix and pyrenoid, the presence or absence of a papilla-like protrusion at the anterior end of the cell, and a gene phylogeny based on the large Rubisco subunit (*rbcL*): *A. superbus*, *A. korschikoffii* and *A. papillatus* sp. nov. The *Hafniomonas* strains could be clearly delineated into five species: *H. reticulata*, *H. montana*, *H. laevis* sp. nov., *H. conica* stat. nov., and *H. turbinea* sp. nov. based on differences in cell shape, cell size, chloroplast surface, the number of contractile vacuoles, stigma ultrastructure, and muciferous vesicles at the periphery of protoplasts. Phylogenetic analyses of 18S rRNA and P700 chlorophyll apoprotein A2 (*psaB*) gene sequences demonstrated that all *Hafniomonas* species constituted a robust clade in which four strains of *H. reticulata* formed a monophyletic group. We also provided a Latin description of *H. heom* sp. nov. which was previously identified as *H. reticulata*. In addition, a new species of the colonial volvocalean genus *Pleodorina*, *P. starrii*, was described from culture strains that were newly established from water samples of Japanese lakes. Using these new strains, a new male specific gene "OTOKOGI" was isolated and its evolutionary significance is discussed.

Key words: comparative morphology, culture strains, molecular phylogeny, species taxonomy, Volvocales

## 緒言

### 緑藻ボルボックス（オオヒゲマワリ）目

E-mail: nozaki@biol.s.u-tokyo.ac.jp

共同研究者：中澤 敦（理化学研究所和光研究所），Frontier Research System, RIKEN  
仲田崇志（東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻），Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo  
須田彰一郎（琉球大学理学部海洋自然学科），Department of Chemistry, Biology and Marine Science, Faculty of Science, University of the Ryukyus

(Volvocales) は単細胞性～群体性の多様性に富む分類群である。このグループには単細胞から群体への進化系列のモデルと呼ばれている群体性のボルボックス科等の生物や、細胞生物学のモデル生物 *Chlamydomonas*, ベータカロチン生産性の *Dunaliella*, アスタキサンチン生産性の *Haematococcus*, 特異的な CO<sub>2</sub> 濃縮機構をもつ *Chloromonas* 等を含む。近年、主に 18S rRNA 遺伝子を用いた分子系統学的研究がこのグループで実施され、おおまかな系統と進化系列が明らかになった (Buchheim *et al.*, 1991, 1996; Nakayama *et al.*, 1996)。しかしながら、18S rRNA 遺伝子は保存的で本生物群の種レベルの分類には適当ではないと思われる。一方、本生物群における種レベルの系統分類学的研究は立ち

遅れており、コレクションの系統保存株は光学顕微鏡レベルの簡単な形態観察を基に同定されているのがほとんどである（野崎, 1995, 1998）。また、自然界から採集されたサンプルを光学顕微鏡で観察して記載されただけで培養されたことのない種も多く存在し、多くの未知の生物種が自然界から発見される可能性がある。我々は自然界から新たに分離した株と世界各地の系統保存株を同一培養条件下で光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて比較観察することと進化速度が比較的速く、アラインメントが容易な葉緑体コードタンパク質遺伝子の塩基配列情報を基に客観的かつ自然な種レベルの分類体系を構築することを目的として研究している（野崎, 1998）。本稿は財団法人発酵研究所研究助成を受けて行なった研究成果をまとめたもので、ボルボックス目の *Asterococcus*, *Hafniomonas* の 2 属における種レベルの分類学的研究（Nakazawa *et al.*, 2004; Nakada *et al.*, 2007），ならびに、神奈川県相模湖から分離培養した新種 *Pleodorina starrii* (Nozaki *et al.*, 2006b) について報告する。また、本研究助成から派生した重要な研究成果として *P. starrii* からオス特異的遺伝子 “OTOKOGI” (*PlestMID*) を単離することができた (Nozaki *et al.*, 2006a) のでその経緯について考察で述べる。

## 実験方法

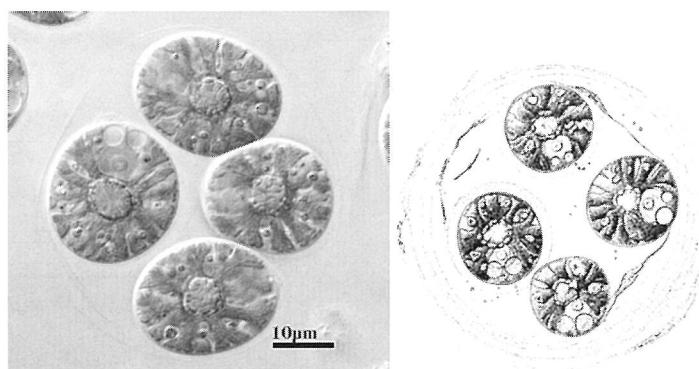
日本各地から採集した土壌または水のサンプルを用いて新規のクローニング株をピペット洗浄法で確立した (Nakazawa *et al.*, 2004; Nozaki *et al.*, 2006b; Nakada *et al.*, 2007)。また、世界各地の藻類カルチャーコレクションから *Asterococcus*, *Hafniomonas*, *Pleodorina* と同

定されている株もあわせて用いたが、種同定が文献等で形態と分子系統で客観的に示されていない場合は未同定株として新規培養株と同じレベルで種同定した。培地は基本的に合成培地で、同じ属であれば同一の培養条件下で増殖させた材料を用いて光学顕微鏡観察と電子顕微鏡の観察を実施した。分子系統解析には、*rbcL*, *psaB* 等の葉緑体コードタンパク質遺伝子の塩基配列情報を用いたが、*Hafniomonas*においては培養株は現在ないが 18S rRNA 遺伝子情報だけ登録されているものがあったので、比較の為に 18S rRNA 遺伝子を用いた系統解析もあわせて実施した。これら 3 属の新規培養株は以下に述べるような種同定結果を添えて国立環境研究所微生物系保存施設 (NIES) に寄託した。

## 結果と考察

1. *Asterococcus* 属の比較形態と分子系統に基づく種レベルの再同定 *Asterococcus* 属（緑藻綱）は伝統的にはヨツメモ目 (Tetrasporales) に分類される不動性の微細綠藻で、星形の葉緑体と群体を取り囲む膨潤した寒天状皮層を持つことで特徴付けられる (Fig. 1)。最近の我々の分子系統学的研究では单細胞性ボルボックス目の *Oogamochlamys* と *Lobochlamys* からなる单系統群と姉妹群を形成することが明らかになっている (Nakazawa & Nozaki, 2004) ので広義のボルボックス目であると言つてよい。

本属は多くの培養株を用いた比較形態に基づく分類学的研究がなされていないため、認識される種数が研究者によって異なり、種分類の識別基準も曖昧であった (Nakazawa *et al.*, 2004)。我々は世界各地のカルチ



**Fig. 1** Vegetative morphology of *Asterococcus superbus*. (From Nakazawa *et al.*, 2004; Copyright © (2004) International Phycological Society. Reproduced by permission of Allen Press Publishing Service)

ヤーコレクション (IAM, NIES, SAG, ACOI, CAUP) に保有されている *Asterococcus* 属計 8 株 (Fig. 2) について、光学顕微鏡と電子顕微鏡、及び DNA の塩基配列データを用いた分類学的研究を行った。同一培養条件下での比較形態観察と葉緑体タンパク質コード *rbcL* 遺伝子の塩基配列 1128 塩基対に基づく系統解析の結果、用いられた株は寒天状皮層と透過型電子顕微鏡によるピレノイドの微細形態、細胞前端部のパピラ状突起の有無によって明瞭に 3 種 (*A. superbus*, *A. korschikoffii* 及び新種 *A. papillatus*) に識別することができた (Fig.

•Designation of strains	•Source
•NIES-1331(Asteroco-4)	•Mie, Japan
•IAM C-299 “ <i>A. superbus</i> ”	•Amiens, France
•SAG 104.80 “ <i>A. superbus</i> ”	•peatbog, France
•ACOI 238 “ <i>A. superbus</i> ”	•Serra da Estrela, Portugal
•ACOI 326 “ <i>A. superbus</i> ”	•Serra do Gerês, Portugal
•ACOI 961 “ <i>A. superbus</i> ”	•Serra da Estrela, Portugal
•CAUP H3504 “ <i>A. superbus</i> ”	•Czech Republic
•SAG 20.85 “ <i>A. limeticus</i> ”	•Lake Windermere, England

Fig. 2 Strains of *Asterococcus* used for Nakazawa *et al.*, (2004).

3) (Nakazawa *et al.*, 2004). *A. superbus* と *A. papillatus* は共に球状の群体を形成するが、*A. papillatus* は細胞前端にパピラ状突起をもつ点で *A. superbus* と明瞭に区別された。また Ettl and Gärtner (1988) は *A. korschikoffii* を *A. superbus* の異名としたが、*A. korschikoffii* は樹状の群体を形成することで *A. superbus* と区別される独立した種であることがこの研究で示された。これら 3 種の間では群体の体制に大きな違い (球状と樹状) が見られ、従来の分類体系においては別属に分類すべきレベルであった。しかし、細胞の電子顕微鏡レベルの構造は基本的な点で一致し、塩基配列データはこれら 3 種が緑藻綱の中で単系統であることを示したので、1 属 *Asterococcus* に所属させた (Nakazawa *et al.*, 2004).

2. 培養株に基づく *Hafniomonas* 属の種レベルの分類学的再検討 *Hafniomonas* 属は細胞壁がない 4 鞭毛性の単細胞性のボルボックス目の 1 属で、特異な鞭毛装置構造を持つことから緑藻綱の原始的な藻類と位置づけられることがある。本属にはこれまで 10 種余りが記載されているが、過去の採集記録においては 1925

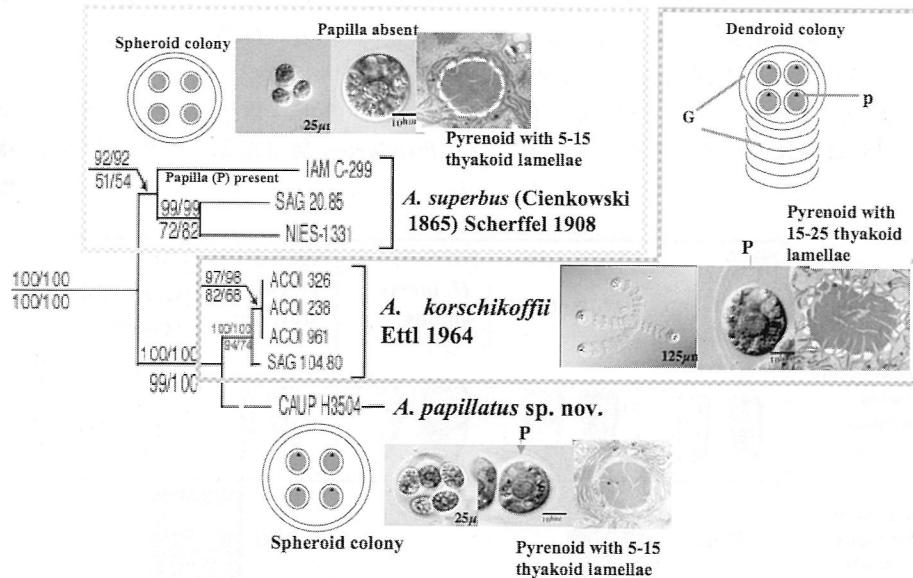


Fig. 3 Three species of *Asterococcus* clearly delineated based on comparative light and electron microscopy and *rbcL* gene phylogeny (Nakazawa *et al.*, 2004). Bootstrap values (50% or more) based on the Jukes-Cantor distances and HKY85 distances in the ME analysis (based on 1000 replications) are shown at the left and right, respectively, above the branches. Numbers at the left or right below the branches are bootstrap values (50% or more) resolved in MP analysis (based on 1000 replications) or ML analysis (based on 200 replications), respectively. G: gelatinous matrix of colonies. P: anterior papilla of vegetative cells. (From Nakazawa *et al.*, 2004; Copyright® (2004) International Phycological Society. Reproduced by permission of Allen Press Publishing Service)

年に記載されたタイプ種 *H. reticulata* (Korshikov, 1925) と同年に記載された *H. montana* (Geitler, 1925) の2種に同定されることが多かった。しかし、これらの論文の微細構造を比較してみると、*H. reticulata* と同定された生物の中に複数の異なる生物が含まれており、また、*H. montana* と同定されたものについても2種以上の生物が含まれている可能性が示唆された (Nakada et al., 2007)。従って、本属における種レベルの同定は混乱しており、多くの培養株を用いた種レベルの分類学的研究が必要であった。

我々は *Hafniomonas* に関して、日本の6地点から採取した土壌サンプルから新規培養株を得ることができた。新規培養株6株と国立環境研究所微生物系統保存施設の保有株2株 (NIES-257, NIES-656) を用い、比較形態的観察並びに色素体コード *psaB* 遺伝子と核コード 18S rRNA 遺伝子を用いた系統解析を実施した。その結果、収縮胞の数および透過型電子顕微鏡で観察した眼点と粘液胞の微細構造が *Hafniomonas* 属の種レベルの新しい識別形質であることが明らかとなり、8株は2新種を含む5種に識別された (Fig. 4) (Nakada et al., 2007)。日本産の新規株6株のうち4株は *Hafniomonas* 属の中で単系統群を形成し (Fig. 5)，互いに微細構造が類似しており、*H. reticulata* の原記載 (Korshikov, 1925) と光学顕微鏡レベルの形質がよく一致していた。しかし過去に Ettl & Moestrup (1980) 等によって “*H. reticulata*” と同定された生物の葉緑体のピレノイド構造は光学顕微鏡レベルでも明らかに原

記載の生物のもの (Korshikov, 1925) とは異なっていた。また、これらの生物の微細構造はピレノイドや眼点顆粒の層の数等で日本産の4株と明らかに異なっていた。従って、今回の4株を *H. reticulata* と同定し、Ettl & Moestrup (1980) によって “*H. reticulata*” と同定され、詳細な微細構造研究が行われた生物は、ピレノイドの構造などで特徴付けられる本属の新種 *H. heom* として記載した (Nakada et al., 2007)。幸いにも Ettl & Moestrup (1980) が使用した電子顕微鏡用の包埋資料をコペンハーゲン大学 (デンマーク) の Moestrup 博士が保有しており、同大学の標本庫に保管され、*H. heom* のホロタイプとなった (Nakada et al., 2007)。尚、新種の種小名 (*heom*) は H. Ettl と ϕ. Moestrup 両博士の頭文字に因んでつけられた。

*H. montana* と同定されていた NIES-257 株と NIES-656 株についても単系統群を形成したが、遺伝的にはやや離れており (Fig. 5)，葉緑体の表面構造、眼点の数、眼点顆粒の層構造の数が異なっていたことから、2種に分割されると考えられた (Fig. 6)。NIES-656 株がより原記載 (Geitler, 1925) に近い特徴をもっていたことから、NIES-257 株の所属について検討した結果、本種が過去に記載されたいずれの種とも異なる新種であることが示されたので *H. laevis* として記載した (Nakada et al., 2007)。

### 3. 群体性ボルボックス目の新種 *Pleodorina starrii*

*Pleodorina* 属は球形の群体に非生殖細胞をもち、有性

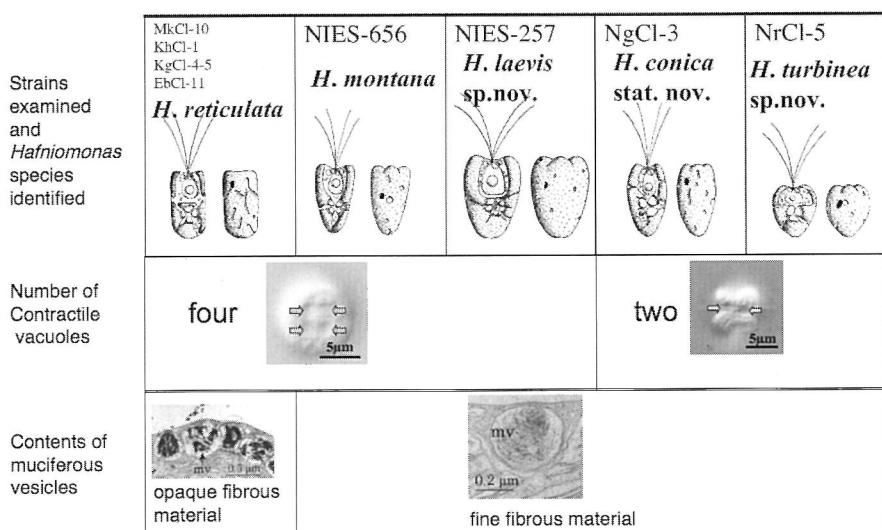


Fig. 4 Comparison of five species of *Hafniomonas* clearly delineated based on comparative light and electron microscopy and chloroplast *psaB* gene and nuclear 18S rRNA gene phylogeny (Nakada et al., 2007). (Based on Nakada et al., 2007; reproduced by permission of Phycological Society of America)

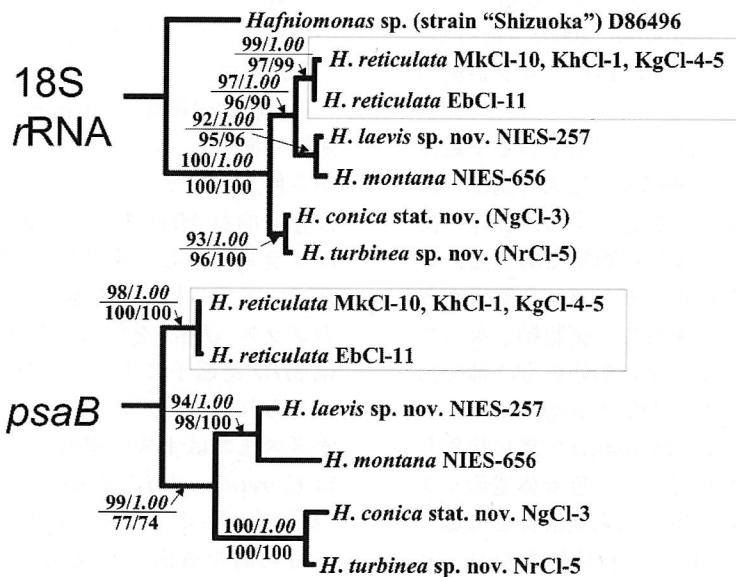


Fig. 5 Phylogenetic relationships between eight strains of *Hafniomonas*. Based on Nakada *et al.* (2007). Numbers above branches indicate the bootstrap values from ML analysis (left) and posterior probabilities from Bayesian (Bayes) analysis (right). Numbers below branches indicate the bootstrap values from maximum-parsimony (MP, left) and neighbor-joining (NJ, right) analyses. Only bootstrap values 50% or more and posterior probabilities 0.90 or more are shown. (Based on Nakada *et al.*, 2007; reproduced by permission of Phycological Society of America)

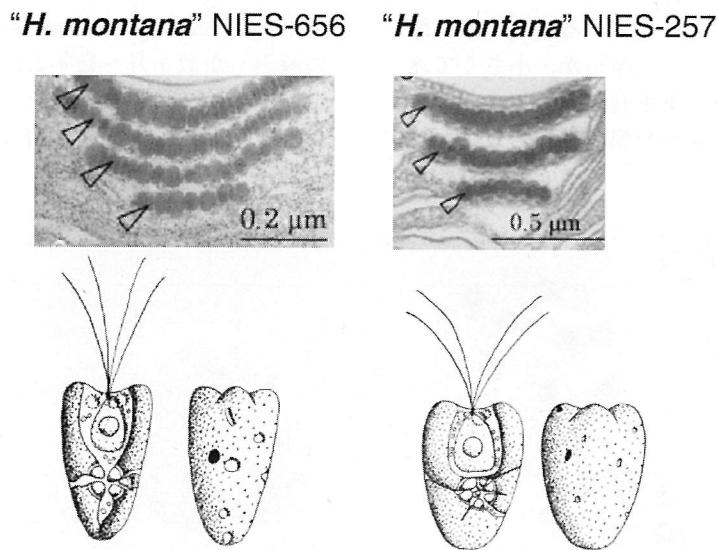


Fig. 6 Comparison of stigma ultrastructure and light microscopy in two NIES strains that were labeled "*Hafniomonas montana*." Based on Nakada *et al.*, (2007). (Based on Nakada *et al.*, 2007; reproduced by permission of Phycological Society of America)

生殖が異形配偶である事を特徴としているが、最近の分子系統学的研究から多系統群であることが解析されている (Coleman, 1999; Nozaki *et al.*, 2000)。従って、本属等の分類学的研究には形態学的観察と分子系統学的解析の両方が必須である。

我々は、形態的には *Pleodorina* と同定される 1 新種 *P. starrii* (Fig. 7) を神奈川県相模湖と津久井湖から採取した。本種は 32, 64 細胞性の群体をもち、群体の前方の 1/3 程度の細胞が小さく非生殖細胞であった。メチレンブルーで染色すると群体のゼラチン状基質が各細胞を包囲する球形のゆるく接着した細胞鞘となっていて、これまでに記載されていない形態をもつ種であった。このような細胞鞘はタイプ種 *P. californica* や *P. japonica* では観察されないが、*P. indica* で蜜に接着した亀甲状の細胞鞘が観察されている。色素体遺伝子 5 個を結合した 6021 塩基配列を用いた系統解析を実施した結果、*P. starrii* は *P. indica* と姉妹種となり、*P. californica* や *P. japonica* とは分離し、第二の種はこれらの 2 系統とは異なる基部の系統であることが判明した。*Pleodorina* は明らかに多系統群であり、同じく多系統の *Volvox*、側系統の *Eudorina* と共に、新しい識別形質で定義された单系統の属に再編する必要がある (Nozaki *et al.*, 2006b)。

以上の研究の派生的な成果として、*P. starrii* の新規培養株を用いてオス特異的遺伝子が発見された結果、メスとオスの配偶子が未分化な同型配偶から“メスとオス”への進化に関わる基本的で重大な問題が最近解き明かされはじめたので以下に紹介する。

メスとオスは生物界で広く認められる性であり、配偶子が大きくて運動能力がない（卵）か、小さくて運動する（精子）かで決まる。単細胞生物等ではメスとオスの区別ができない性（同型配偶）も知られ、同じ

ような配偶子が合体する。古くから同型配偶の生物からオスとメスの性をもつものが進化したと考えられていたが、これにかかわる遺伝子レベルの研究はまったくなかった。

単細胞性緑藻類の *Chlamydomonas reinhardtii* は同型配偶であり、マイナスの性（メス・オスが不明であるから便宜的にプラス・マイナスで異なる性を表す）は性特異的な MID 遺伝子によって決定され、マイナスはプラスに対して優性で、プラスは MID 遺伝子の存在でマイナスに性が転換する。従って、*C. reinhardtii* のプラス (MID を欠く) が性の原型であり、マイナスは MID 遺伝子によってプラス型から派生したものと考えられていた。しかし、プラス・マイナスのどちらがメスまたはオスに相当するかは不明であった。これは *C. reinhardtii* に近縁なメスとオスの性をもつ生物（群体性ボルボックス目の *Volvox*, *Pleodorina* 等）で性に特異的な遺伝子が発見されていなかったことによる。この原因のひとつが、性関連の遺伝子は進化速度が速くてつかまえられないという考え方である。Ferris *et al.* (1997) は群体性ボルボックス目のゴニウムとボルボックスで MID 遺伝子をサザンプロットで探索したが不成功であったとしている。もう一つの原因是群体性ボルボックス目では凍結保存法が確立していないので、継代培養法によってカルチャーコレクションで維持されていることからくる性発現能力の低下である。これらの生物は自然界から分離した直後の培養株は一般的に性が効率よく誘導されるが、長い間継代培養を続けると性発現能力が低下する。特に異型配偶や卵生殖の *Eudorina*, *Pleodorina*, *Volvox* では“性発現の減退”が数ヶ月～数年と早い。従って、過去の研究者が性の研究に使用したカルチャーコレクションの保存株を用いて新たに性の研究をしようとしても性が発

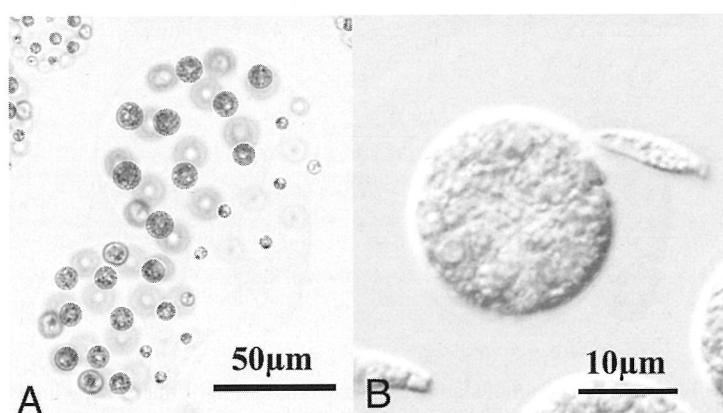


Fig. 7 *Pleodorina starrii*. A. Vegetative colonies. B. Female (large) and male (small) gametes. For details, see Nozaki *et al.*, 2006b.

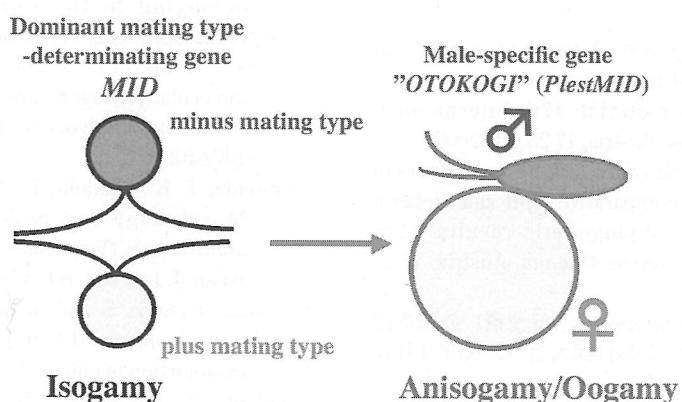
現しない場合がほとんどである。従って、新たに採集した新規培養株を用いて、サザンプロットではない方法で性関連の遺伝子を群体性ボルボックス目から探索出来るのではないかと考えた。

*Pleodorina starrii* はオスとメスの大きさと運動能力の異なる配偶子を作り (Fig. 7) (Nozaki et al., 2006b) オス株だけで大量に精子を形成するので、オス特異的遺伝子を探索する格好の材料と思われた (Nozaki et al., 2006a)。独自に開発した *MID* 遺伝子の縮重プライマーを用いて、様々な条件検討の結果、精子形成を誘導したオス株からオス特異的遺伝子 “OTOKOGI” (論文中では *PlestMID*) を単離した (Nozaki et al., 2006a)。

分子生物学的解析の結果、“OTOKOGI” はオスのゲノム中だけに存在し、精子形成が誘導された場合に強く発現することが明らかになった。抗 “OTOKOGI” 抗体を用いた蛍光染色は “OTOKOGI” タンパクが成熟した精子の核に局在することを明らかにした。従って、“OTOKOGI” は精子の成熟や行動にも関与していることが推測された。系統解析では “OTOKOGI” が *Chlamydomonas* の *MID* 遺伝子と共に祖先をもち、この系統の祖先で *MID* による性決定様式が誕生し、*MID* 遺伝子をもつ同型配偶のマイナスの優性交配型からオスが誕生したと結論された (Fig. 8) (Nozaki et al., 2006a)。即ち、配偶子の進化という観点で性 (sex) の原型はメスであり、オスは *MID* のような遺伝子をもつことで原型から派生している性であると理解される。“OTOKOGI”的発見は群体性ボルボックス目を用

いた性の進化生物学的研究のブレークスルーでもある (Kirk, 2006)。このきっかけが財団法人発酵研究所の研究助成によって実施された新規培養株を用いた新種 *Pleodorina starrii* の研究 (Nozaki et al., 2006a) であった。今後研究が進展し、メスとオスの起源がより具体的に遺伝子レベルで解明されることを期待する。

以上のような性の進化研究に用いる材料は自然界から分離後あまり時間が経過していない “性的能力の低下していない” ものが望まれる。従って、一般的にカルチャーコレクションに保存されている継代培養株は不向きな場合が多い。また、群体性ボルボックス目では凍結保存法が確立されておらず、これが確立されれば性的にアクティブな株の恒久的供給が可能になるものと思われる。現状では新たに現地採集にゆくか、F<sub>1</sub> 株を作成して、性的にアクティブな株の材料確保をしている。*Pleodorina starrii* の場合、自然界から分離後 2 年以上経ると性発現能力が減少した。最初の株は 2000 年 6 月に採集したものであり、数年後には精子形成が不可能となっていた。従って、新たに自然界から株を分離するか F<sub>1</sub> を作製する必要があった。2005 年の時点で 2001 年採集・分離の株が多少性発現したので接合子を形成させ、暗処理の後 F<sub>1</sub> 株を数株得た。この株が精子における抗体の局在の観察とウェスタンプロットのデータ (Nozaki et al., 2006a) に使用された。これら性的にまだアクティブと思われる F<sub>1</sub> 株も国立環境研究所微生物系保存施設に寄託しており、誰でも利用可能である。



**Fig. 8** Schematic representation of evolution from isogamy to anisogamy/oogamy based on the homologous relationship between *MID* in the *Chlamydomonas reinhardtii* minus mating type and “OTOKOGI” (*PlestMID*) in the male of *Pleodorina starrii*. (Based on Nozaki et al., 2006a)

## 要 約

日本各地から採取したサンプルからボルボックス目の50以上の新規培養株を確立し、カルチャコレクションの保存株と形態と遺伝子データで比較する分類学的研究を実施した。その中で、これまでに種レベルの分類に混乱があった *Asterococcus*, *Hafniomonas* で新たに種レベルの電子顕微鏡レベルの識別形質を見いだすことができ、分子データを組み合わせて種レベルの客観的な自然分類体系を構築した。特に単細胞性ボルボックス目の *Hafniomonas* に関しては、日本の6地点から採取・分離した新規株と NIES-257, -656 を用い、比較形態学的観察並びに色素体コード *psAB* 遺伝子と核コード 18S rRNA 遺伝子を用いた系統解析を実施した。その結果、収縮胞の数および眼点／粘液胞の微細構造が *Hafniomonas* 属の種レベルの新しい種レベルの識別形質であることが明らかとなり、8株は2新種を含む5種に識別された。また、神奈川県相模湖と津久井湖から新種 *Pleodorina starrii* を記載することができ、その派生した重要な研究成果として *P. starrii* からオス特異的遺伝子 “OTOKOGI” を単離することができたのでその経緯について考察した。

## 本助成で得られた成果の報告

## [口頭発表]

- 山田敏寛, 宮地和幸, 野崎久義(2005). 日本産 *Gonium* (緑藻綱・ボルボックス目) 2種の新規培養株について. 日本微生物資源学会第12回大会 (2005年6月20日~22日, かずさアカデミアホール, 木更津市)
- 中沢敦, 野崎久義(2005). 微細緑藻類 *Asterococcus* 属の比較形態と分子系統に基づく種レベルの再同定. 日本微生物資源学会第12回大会 (2005年6月20日~22日, かずさアカデミアホール, 木更津市)
- Nakada, T. and Nozaki, H. (2005). A taxonomic study of *Hafniomonas* (Chlorophyceae) based on comparative examination of cultured material. 17th International Botanical Congress (Vienna, Austria, 17-23 July 2005)
- Nozaki, H. (2005). Toward natural systems of species/genera of microalgae based on the comparative light and electron microscopy and robust phylogenetic results. 17th International Botanical Congress (Vienna, Austria, 17-23 July 2005)
- 仲田崇志, 野崎久義(2005). *Hafniomonas* (緑藻綱) の微細構造と分類. 日本植物形態学会第17回大会 (2005年9月20日, 富山大学, 富山市)
- 仲田崇志, 野崎久義(2005). 無色鞭毛緑藻 *Hyalogonium fusiforme* (Korshikov) Ettl (緑藻綱オオヒゲマワリ目) の形態と分子系統. 日本植物学会第69回大会 (2005年9月21日~23日, 富山大学, 富山市)
- Nozaki, H. (2005). Endemic species of volvocalean green algae in Asia, the Fourth Asian Pacific Phycological Forum.

(Bangkok, Thailand, 30 October -4 November 2005).

野崎久義, 三角修巳, 森稔幸, 松永幸大, 黒岩常祥(2006). 新種 *Pleodorina starrii* (緑藻・ボルボックス目) の分類と雄特異的遺伝子について. 日本微生物資源学会第13回大会 (2006年6月20日~21日, 理化学研究所鈴木梅太郎記念ホール, 和光市)

仲田崇志, 須田彰一郎, 野崎久義(2006). 培養株に基づく *Hafniomonas reticulata* および *H. montana* の分類学的再検討. 日本微生物資源学会第13回大会 (2006年6月20日~21日, 理化学研究所鈴木梅太郎記念ホール, 和光市)

仲田崇志, 野崎久義(2006). 18S リボソーマル RNA の遺伝子系統樹に基づくヤリミドリ属 (*Chlorogonium*; 緑藻綱オオヒゲマワリ目) 3種の再検討. 日本植物学会第70回大会 (2006年9月13日~16日, 熊本大学黒髪キャンパス, 熊本市)

仲田崇志, Krienitz, L., 野崎久義, Proeschold, T. (2007). 18S リボソーマル RNA と *rbcL* 遺伝子に基づく分子系統解析と、微細構造に基づくヤリミドリ属 (*Chlorogonium*) の分割. 日本植物分類学会第6回大会 (2007年3月14日~17日, 新潟大学, 新潟市)

山田敏寛, 宮地和幸, 野崎久義(2007). 群体性ボルボックス目 *Eudorina unicocca* および類似種に関する分類学的研究. 日本植物分類学会第6回大会 (2007年3月14日~17日, 新潟大学, 新潟市)

## [論文]

- Nakazawa, A. & Nozaki, H. (2004). Phylogenetic analysis of the tetrapsoralean genus *Asterococcus* (Chlorophyceae) based on 18S ribosomal RNA gene sequences. J. Jpn. Bot. **79**: 255-261.
- Nakazawa, A., Yamada, T. & Nozaki, H. (2004). Taxonomic study of *Asterococcus* (Chlorophyceae) based on comparative morphology and *rbcL* gene sequences. Phycologia **43**: 711-721.
- Nakada, T., Nakazawa, A. & Nozaki, H. (2005). Two species of *Chlorogonium* (Volvocales, Chlorophyceae) from Japan. J. Jpn. Bot. **80**: 197-207.
- Suda, S., Nozaki, H. & Watanabe, M. M. (2005). Morphology and sexual reproduction of *Carteria palmata* sp. nov. belonging to the *Carteria* group I sensu Lembi (Chlorophyceae, Volvocales). Phycologia **44**: 596-607.
- Nozaki, H., Ott, F. D. & Coleman, A. W. (2006). Morphology, molecular phylogeny and taxonomy of two new species of *Pleodorina* (Volvocales, Chlorophyceae). J. Phycol. **42**: 1072-1080.
- Yamada, T. K., Nakada, T., Miyaji, K. & Nozaki, H. (2006). Morphology and molecular phylogeny of *Gonium multicoccum* (Volvocales, Chlorophyceae) newly found in Japan. J. Jpn. Bot. **81**: 139-147.
- Nakada, T., Suda, S. and Nozaki, H. (2007). A taxonomic study of *Hafniomonas* (Chlorophyceae) based on a comparative examination of cultured material1. J. Phycol. **43**: 397-411.
- Nakada, T. and Nozaki, H. (2007). Re-evaluation of three *Chlorogonium* (Volvocales, Chlorophyceae) species based on 18S ribosomal RNA gene phylogeny. Eur. J. Phycol. **42**: 177-182.

## 保存機関に寄託した株

(保存機関名) 国立環境研究所 微生物系統保存施設  
(NIES-Collection)

(学名と株番号)

*Asterococcus superbus* NIES-1331*Carteria palmata* NIES-1336*Carteria palmata* NIES-1337*Carteria palmata* NIES-1338*Chlorogonium elongatum* NIES-1357*Chlorogonium elongatum* NIES-1358*Chlorogonium kasakii* NIES-1359*Chlorogonium kasakii* NIES-1360*Pleodorina starrii* NIES-1361*Pleodorina starrii* NIES-1362*Pleodorina starrii* NIES-1363*Pleodorina starrii* NIES-1364*Pleodorina starrii* NIES-1365*Pleodorina starrii* NIES-1366*Gonium multicoccum* NIES-1707*Gonium multicoccum* NIES-1708*Gonium multicoccum* NIES-1709*Gonium pectorale* NIES-1710*Gonium pectorale* NIES-1711*Gonium pectorale* NIES-1711*Gonium pectorale* NIES-1713*Hafniomonas conica* NIES-1714*Hafniomonas reticulata* NIES-1715*Hafniomonas reticulata* NIES-1716*Hafniomonas reticulata* NIES-1717*Hafniomonas reticulata* NIES-1718*Hafniomonas turbinea* NIES-1719*Hafniomonas turbinea* NIES-1720*Hafniomonas turbinea* NIES-1721*Chlamydomonas perpusilla* var. *perpusilla* NIES-1848*Chlamydomonas perpusilla* var. *perpusilla* NIES-1849*Chlamydomonas peumilio* var. *pumilio* NIES-1850*Gungnir breviciliatum* NIES-1851*Pleodorina starrii* NIES-1852*Pleodorina starrii* NIES-1853*Pleodorina starrii* NIES-1854*Eudorina unicocca* PS-2215*Eudorina unicocca* PS-2216*Eudorina unicocca* PS-2217*Eudorina unicocca* PS-2218*Yamagishiella unicocca* PS-2219*Yamagishiella unicocca* PS-2220*Yamagishiella unicocca* PS-2221

(保存機関名) アメリカテキサス大学オースチン校藻類培養株コレクション (UTEX)

(学名と株番号)

*Pleodorina starrii* UTEX 2804

## 謝 辞

本総説で紹介した内容の大部分は財団法人発酵研究所平成15年度研究助成を受けたものである。

## 文 献

Buchheim, M. A. & Chapman, R. L. (1991). Phylogeny of the colonial green flagellates: a study of 18S and 26S rRNA sequence data. Biosystems **25**: 85-100.Buchheim, M. A., Lemieux, C., Otis, C., Gutell, R. R., Chapman, R. L. & Turmel, M. (1996). Phylogeny of the Chlamydomonadales (Chlorophyceae): a comparison of ribosomal RNA gene sequences from the nucleus and the chloroplast. Mol. Phylogen. Evol. **5**: 391-402.Coleman, A. W. (1999). Phylogenetic analysis of "Volvocaceae" for comparative genetic studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 13892-13897.Ettl, H. & Moestrup, O. (1980). Light and electron microscopical studies on *Hafniomonas* gen. nov. (Chlorophyceae, Volvocales), a genus resembling *Pyramimonas* (Prasinophyceae). Pl. Syst. Evol. **135**: 177-210.Ferris, P. J., Pavlovic, G., Fabry, S. & Goodenough, U. W. (1997). Rapid evolution of sex-related genes in *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 8634-8639.Geitler, L. (1925). Zur Kenntnis der Gattung *Pyramidomonas*. Arch. Protistenkd. **52**: 356-370.Kirk, D. (2006). Oogamy: inventing the sexes. Curr. Biol. **16**: R1028-R1030.Korshikov, A. A. (1925). Beitrage zur Morphologie und Systematik der Volvocales. I. Russ. Arch. Protist. **4**: 153-197 (in Russian with German abstract).Nakada, T., Suda, S. & Nozaki, H. (2007). A taxonomic study of *Hafniomonas* (Chlorophyceae) based on a comparative examination of cultured material. J. Phycol. **43**: 397-411.Nakayama, T., Watanabe, S. & Inouye, I. (1996). Phylogeny of wall-less green flagellates inferred from 18SrDNA sequence data. Phycol. Res. **44**: 151-161.Nakazawa, A. & Nozaki, H. (2004). Phylogenetic analysis of the tetrasporalean genus *Asterococcus* (Chlorophyceae) based on 18S ribosomal RNA gene sequences. J. Jpn. Bot. **79**: 255-261.Nakazawa, A., Yamada, T. & Nozaki, H. (2004). Taxonomic study of *Asterococcus* (Chlorophyceae) based on comparative morphology and *rbcL* gene sequences.

- Phycologia **43**: 711-721.
- Nozaki, H., Misawa, K., Kajita, T., Kato, M., Nohara, S. & Watanabe, M. M. (2000). Origin and evolution of the colonial Volvocales (Chlorophyceae) as inferred from multiple, chloroplast gene sequences. Mol. Phylog. Evol. **17**: 256-268.
- Nozaki, H., Mori, T., Misumi, O., Matsunaga, S. & Kuroiwa, T. (2006a). Males evolved from the dominant isogametic mating type. Curr. Biol. **16**: R1018-R1020.
- Nozaki, H., Ott, F. D. & Coleman, A. W. (2006b). Morphology, molecular phylogeny and taxonomy of two new species of *Pleodorina* (Volvoceae, Chlorophyceae). J. Phycol. **42**: 1072-1080.
- 野崎久義. (1995). “凸型” のバビラをもつ *Carteria* (緑藻, オオヒゲマワリ目) の有性生殖と分類・系統. 藻類 **43**: 103-114.
- 野崎久義. (1998). 微細藻類の種レベルの自然分類体系に向けて：形態と DNA 塩基配列データを結合させた解析. Microbiol. Cult. Coll. **14**: 39-48.

## 肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者の 家庭内 MAC 分布 西 内 由 紀 子

大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所

〒560-8552 大阪府豊中市刀根山5-1-1

### The Distribution of *Mycobacterium avium* Complex (MAC) in the Residences of Patients with Pulmonary MAC infection

Yukiko Nishiuchi

Toneyama Institute for Tuberculosis Research Osaka City University Medical School,  
5-1-1 Toneyama, Toyonaka, Osaka 560-8552, Japan

Pulmonary *Mycobacterium avium* complex (MAC) disease is difficult to treat and frequently recurs. Its incidence has been increasing. The environmental MAC, that inhabits our living environment, is considered to be the reservoir for pulmonary MAC infections. Therefore, we examined a distribution of MAC in residences of 49 patients and 43 healthy volunteers by the culture method to clarify the source of infection. Furthermore, we evaluated the identity of MAC bacilli isolated from patients' residences compared with their respective sputum isolates using restriction fragment length polymorphism, variable numbers of tandem repeats, pulsed field gel electrophoresis, and serotyping. In spite of widespread distribution of other mycobacterial isolates in participants' residence, MAC was recovered only from specimens in bathrooms such as shower water (3 samples), showerheads (2 samples), bathtub water (4 samples) and bathroom drains (2 samples), but not from kitchens, washbasins, nor dust from air conditioners. The appearance ratio in the bathrooms of patients with pulmonary MAC was significantly higher than that in the bathrooms of healthy volunteers' ( $P < 0.05$ ). For 2 patients, the genotypes and phenotypes of environmental isolates were identical to their respective clinical isolates. Additionally, we recovered a lot of MAC colonies from the inside the bathtub inlets. That indicates that MAC inhabits the inside of the bathtub inlets. MAC bacilli seem to prefer bathrooms where are a likely reservoir for pulmonary MAC infections. To clarify the source of pulmonary MAC infection, prospective cohort study will be required. Furthermore, we assessed the direct detection methods of MAC in environmental samples. Loop-mediated isothermal amplification method is a rapid and convenient method and its sensitivity and reliability are almost comparable to those of the culture method.

Key words: *Mycobacterium avium* complex, bathroom, pulmonary infection, distribution, polymorphism

### 緒 言

*Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) は自然の河川、土壌、鳥や家畜、プール、屋外温水浴槽 (hot tub) などから分離され、世界中に広く分布している (Marras & Daley, 2002). また MAC は、基本的に日和見感染菌で、免疫抑制患者に播種性の感染をおこすだけでなく、基礎疾患のない高齢の女性にも肺感染症を起こす (坂谷, 2005). この肺 MAC 症は、難

治性で、排菌の持続する症例が少なくない (Field et al., 2004; 坂谷, 2005). また、化学療法で一旦菌が陰性化したのちに、再燃や新たに別の MAC 菌による再感染がおきることもわかつてき (Wallace Jr et al., 2002; Wallace et al., 1998). MAC は患者から直接感染するのではなく、環境から感染していると考えられているが (Field et al., 2004), 肺 MAC 症の感染源や感染経路は不明である。肺 MAC 症が、開発途上国より先進国、田舎より都市部において多い (Marras & Daley, 2002) ことから、近年の生活環境、様式が感染に関与していると考え、感染源や感染経路を解明するために、家庭内の MAC の分布を調べた。調査は、肺 MAC 症

患者と、肺疾患をもたない健康な人に協力していただき、家庭内の水系を中心に試料を採取し培養した。患者家庭試料から分離した MAC は、患者喀痰から分離した MAC と、遺伝子型および表現型を比較して同一の株由来であるかどうか検討した。比較に用いた方法は、restriction fragment length polymorphism (RFLP), variable numbers of tandem repeats (VNTR), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), 血清型、および薬剤感受性試験である。また、MAC は遅発菌で、培養法は時間、手間、経費もかかるので簡便で迅速な検出方法である polymerase chain reaction (PCR) 法や、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いて培養法の結果と比較・評価した。

## 実験方法

**試料採取と協力者** 協力者の家庭の水系から 7 試料（台所の水道水、浴室シャワー水、浴槽使用後の水各 200 ml, シャワーヘッドの外側、台所・洗面所・浴室の 3ヶ所の排水口を滅菌綿棒でぬぐったもの）を採取した。さらに、水系以外の試料としてエアコンのフィルターの埃も採取した。試料採取に協力していただいだのは、国立病院機構刀根山病院に通院している肺 MAC 症患者 49 名と肺に疾患をもたない健康なボランティア 43 名である。本試験に引き続いだ、MAC の浴室室内生息場所を特定するために、追加試験を行った。追加試験には、本試験の協力者とは別の肺 MAC 症患者 25 名に協力していただき、浴室のシャワー水、浴槽水、シャワーヘッドの外側、排水口の試料に加え、シャワーヘッドの内側ならびに浴槽内の出入水口から試料を採取した。

本試験の患者 49 名のうち 8 名は喫煙者で、アルコール依存者はいなかった。また、19 名は肺の基礎疾患（16 名は肺結核後遺症、3 名は慢性閉塞性肺疾患）をもっていた。胸部画像所見にて 8 例は Fibrocavity 型に、23 例は Nodular bronchiectasis 型に分類された。分類困難な症例は 18 例あった。47 例はクラリスロマイシンを含む多剤化学療法を受けたことがあり、30 例は菌陰性化することなく持続排菌していた。協力者の中に循環型風呂、いわゆる 24 時間風呂で以前に *Legionella* の汚染が報告されたタイプの風呂（Nakamura et al., 2003）を利用している者はいなかった。

この試験は刀根山病院の倫理審査委員会の承認を受けて実施し、インフォームドコンセントを試料採取前にすべての協力者から得た。

**試料の培養** 水試料のうち、水道水（台所水道水、シャワー水）は 4°C 11800 × g で 30 分間遠心した後、沈渣に 0.5 ml の 0.067 M リン酸緩衝液（pH 6.8）を加えて懸濁し、そのうち 200 μl をミドルブルック 7H11 平板（0.2% グリセロール、10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase enrichment medium (Becton Dickinson), 30 U/ml polymyxin B, 0.3% amphotericin B, 1.2% nalidixic acid, 0.3% trimethoprim, および 0.36% azlocillin を含有しているもの、7H11 PANTA 平板）に塗抹した。使用後の浴槽水は遠心後、アルカリ処理を行ってアルカリ感受性の雑菌を殺した。アルカリ処理は、沈渣に 3 ml の 2% 水酸化ナトリウム水溶液を加えて 10 分間静置し、その後 6 ml のリン酸緩衝液を加えて遠心した。沈渣はリン酸緩衝液で懸濁し塗抹試料とした。滅菌綿棒を用いて採取した試料は、1 ml の tryptic soy broth に懸濁し、25°C で 3 時間培養した。その後、アルカリ処理をして、遠心後の沈渣を 1 ml のリン酸緩衝液で懸濁し、塗抹試料とした。100~200 μl の試料を 7H 11PANTA 平板に塗抹後、37°C で 3 週間培養した。培養後得られたコロニーを釣菌して抗酸性染色を行い鏡検して抗酸菌であることを確認し、以後の研究に用いた。

**菌種の同定** 抗酸菌の同定は、16S-23S rRNA spacer 領域 (Roth et al., 2000) もしくは、hsp 65 領域 (Ringuet et al., 1999) における抗酸菌に特異的なプライマーを用いて增幅し、CEQ 2000 XL Genomic Analysis System (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) を用いてその遺伝子配列を求めた。得られた遺伝子配列から、BLAST 検索 (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) により同定した。

**遺伝子多型** RFLP は、Picardeau ら (1997), VNTR は、西森ら (2003) の方法に従って、PFGE は、Wallace ら (1998) の方法を少し改変しておこなった。変更点は lysis buffer の組成で、5 mg/ml lysozyme, 1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, 0.1 M EDTA (pH 8.0), 0.5% polyoxyethylene (20) cetyl ether, 0.5% deoxycholate および 0.5% N-lauroyl sarkosyl の混合液を用いた。

**表現型** 血清型、コロニー型の分析および薬剤感受性試験を行った。MAC は細胞壁表面の glycopeptidolipid (GPL) の糖鎖構造の違いにより 28 種類の血清型が知られている (Chatterjee & Khoo, 2001)。血清型は、西内ら (2004) の方法により液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いて GPL を分析して同定

## 肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者の家庭内 MAC 分布

した。また、コロニー型によって、病原性が異なる (Pedrosa et al., 1994) ことから、コロニーは透明 (T), 不透明 (O), スムーズ (Sm), ラフ (Rough) の観点から SmO, SmT, Rough の3種類に分類し、純培養時のコロニー型を記録した。MAC の薬剤感受性は BrothMIC NTM (極東製薬(株)) を用いて測定した。

**直接検出法** 培養に用いた試料の半量から FTA elute card (Whatman) を用いて DNA を抽出し、Chen ら (1996) の方法に従って polymerase chain reaction (PCR) を行い、鈴木ら (2003) の方法に従って LAMP 法を行った。

**統計解析** 分離した MAC の分布解析は Chi-square test を用い、P 値 0.05 未満を有意とした。

### 結果および考察

**家庭内 MAC 分布** 49人の肺 MAC 症患者ならびに43人の健康な協力者から合計 704 試料が得られ、このうち、10家庭の11試料から MAC を分離した (Table 1)。いずれも浴室からで、シャワー水 3 試料、シャワーヘッド 2 試料、浴槽水 4 試料、浴室排水口 2 試料であった。他の台所や、洗面所、エアコンの埃からは分離されなかった。MAC が分離された11試料のうち10試料は、患者9家庭 (18.4%) から得られたもので、健常人家庭からは、浴槽水から分離された 1 試料 (2.3%) のみであった。MAC は、健常人より、肺 MAC 症患者家庭から高頻度に分離され ( $P < 0.05$ , カイ二乗検定)，それらは家庭内の浴室に局在していた ( $P < 0.01$ , カイ二乗検定)。分離した MAC 11株のうち 8 株は *M. avium*, 3 株は *M. intracellulare* であった。この *M.*

*avium/M. intracellulare* 分離比率は大阪で得られる臨床分離株の分離比率と同じである (坂谷, 2005)。

**家庭内抗酸菌分布** MAC が患者浴室に局在していたのに比べ、その他多くの抗酸菌は患者、健常人のいずれの家庭からも満遍なく分離され、その分離場所も台所、洗面所、浴室と広範囲であった (Table 2)。中でも高頻度に分離された菌種は、*M. gordonae*, *M. mucogenicum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* であった。これらは、いずれも病原性を示すことがしられている。刀根山病院でも MAC 症に比べると頻度は低いが、*M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* がしばしば患者から分離されている (未発表)。

非結核性抗酸菌は、上水道内でバイオフィルムを形成して生息していることが知られており (September et al., 2004), MAC も上水道を介して浴室を汚染する可能性が考えられる。本研究で MAC はシャワー水からは分離されたが、同じ上水道を介している台所の水道水からは分離されなかったことから、上水道を介した汚染は考えにくい。また、病院などでみられる循環型の給湯設備は、播種性の MAC 症の感染源のひとつとして報告されている (von Reyn et al., 1994) が、家庭の給湯設備としては使われていない。私たちの結果は、家庭浴室が MAC にとって他の場所より生息しやすい場所であることを示している。MAC は塩素系消毒に強く (Taylor et al., 2000), 広範囲の温度 (Schulze-Robbecke & Buchholz, 1992) や pH (Bodmer et al., 2000) にも耐えられることが知られている。これらの知見と本研究の結果から、浴室の温度や湿度が MAC の発育にとって適した条件を提供しており、家庭内での MAC 感染源となりうることが示唆される。Archuleta et al. (2002) は、乾燥した条件下

**Table 1** Recovery of *M. avium* complex from different residential areas.

	Bathroom <sup>1)</sup>				Kitchen <sup>1)</sup>		Washbasin <sup>1)</sup>		Dust of air conditioner <sup>1)</sup>	Total
	Shower-head	Shower water	Bathtub water	Drain	Tap water	Drain	Drain	Drain		
Patients' residences	2/37	3/46	3/48	2/49	0/48	0/49	0/49	0/45	9/49 <sup>2)</sup>	
Healthy volunteers' residences	0/39	0/43	1/38	0/43	0/43	0/43	0/43	0/41	1/43	
Total	10/92 <sup>3)</sup>				0/92					

1). Data are represented as the number of MAC recovered residences /the number of test residences

2). P<0.05; statistically significant difference in participant groups between the patients' group and healthy volunteers' group.

3). P<0.01; statistically significant difference in isolate source (bathroom vs. other places).

Table 2 Recovered mycobacterial species from residential samples.

	Patients' residences						Healthy volunteers' residences						Total						
	SH	SW	BW	BD	KW	KD	WD	AF	SH	SW	BW	BD	KW	KD	WD	AF			
<i>M. avium</i>	3	3	1														8		
<i>M. intracellulare</i>	2			1													3		
<i>M. aichiensis</i>			1														1		
<i>M. chelonae</i>			6			7						7			6		26		
<i>M. farcinogenes</i>						1											1		
<i>M. flavescens</i>			1														1		
<i>M. fortuitum</i>			3			5	5					5		1	3		22		
<i>M. gilvum</i>			2														2		
<i>M. gordonaiae</i>	2		9	1	1	18		1		6	14		7	16			75		
<i>M. lentiflavum</i>			2			1							1				4		
<i>M. marinum</i>			2							1							3		
<i>M. mucogenicum</i>	1	1	9			12						1		2	2		28		
<i>M. paraffinicum</i>												1					1		
<i>M. porcinum</i>	1					1											2		
<i>M. scrofulaceum</i>			1														1		
<i>M. senegalense</i>												1					1		
<i>M. septicum</i>						1											1		
<i>M. szulgai</i>			1														1		
<i>M. sp.</i>	3	2	1	24	1	4	17		1	2	20	1	5	8	1	90			
Total	9	6	6	61	2	10	63	0	2	0	11	48	1	16	35	1	271		

The number represents the number of samples from which mycobacteria were recovered.

SH, shower head; SW, shower water; BW, bathtub water; BD, slime from the drain of the bathroom; KW, water from kitchen tap; KD, slime from the drain of the kitchen basin; WD, slime from the washbasin.

では *M. avium* の生存能力が一定の割合で失われていくことを示した（半減期 2.3 日）。また、エアコンの埃 86 試料からは、真菌や他の菌は多くみられた (data not shown) が、1 試料から得られた *Mycobacterium* sp. を除いて全く抗酸菌を分離しなかった (Table 2)。この事実も、抗酸菌が乾燥した埃中では生存できないことを示しているのかもしれない。これらのことから、浴室を乾燥させることが MAC による汚染を防ぐ手段のひとつとなると思われる。

浴室分離 MAC と患者喀痰分離 MAC の比較 MAC が肺 MAC 症の家庭浴室に局在していたことから、浴室は感染源のひとつである可能性が考えられた。このことをさらに評価するために、肺 MAC 症患者 9 例の家庭浴室から分離した MAC 10 株について患者喀痰分離株と表現型および遺伝子型を比較して両者の菌株が同一株由来であるかどうか検討した。表現型は血清型と薬剤感受性、コロニー型を調べ Table 3 にまとめた。遺伝子型は、VNTR の結果を Table 4 に、RFLP と PFGE の結果を Fig. 1 A, B に示した。患者 #37 の家庭では浴槽水から、患者 #49 の家庭では、浴槽水と排水口から MAC が分離され、その分離株は、表現型、および遺伝子型ともにそれぞれの喀痰分離株と一致した。このことから、2 例の患者浴室分離株はそれぞれの喀痰分離株と同一株由来であることがわかった。その他の患者浴室分離株のうち 4 例 (#17, 19, 29, 34)

は、喀痰分離株と同一菌種であったが、表現型および遺伝子型が異なっていた。また残りの 3 例では、浴室分離株と喀痰分離株の菌種が異なっていた。浴室分離株の血清型 4, 8, 14, 16 は、この地域の臨床分離株で高頻度に得られる血清型と一致していた (Maekura et al., 2005)。MAC はしばしば血清型特異的な GPL を產生せず、血清型特異的な糖鎖を欠いた GPL (Apolar GPL) 产生株や、GPL 欠損株がみられた。

浴室分離株の一部が患者喀痰分離株と同一株由来であることが示されたことから、家庭浴室は肺 MAC 症の感染源のひとつである可能性が示された。しかし、私たちの結果は、家庭浴室が感染源のひとつであることを十分には証明できなかった。すなわち、患者喀痰分離株と浴室分離株が同一株由来であることは、浴室が感染源で浴室の MAC が患者に感染した可能性と、患者が排菌した MAC が浴室で生息している可能性の両方を示しているからである。

一般の抗酸菌は健常者の家庭からも同等レベルで分離されるのに、MAC の分離は患者家庭に偏っていること、MAC を分離した患者 9 家庭のうち 7 家庭は患者喀痰分離株とは異なる MAC 菌株であったことは、MAC が生息しやすい浴室環境が患者の発生につながっている可能性を示唆している。また、浴室から分離された MAC の *M. avium/M. intracellulare* の菌種比率がこの地域の患者喀痰分離菌種比率と一致し、血清型分布も患者喀痰分離株の血清型分布と一致しているこ

肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者の家庭内 MAC 分布

**Table 3** Summary of phenotypic profiles of MAC strains isolated from patients<sup>1</sup> bathrooms and their respective clinical isolates

No of Patient	Sample	Species	Strain No.	Serovar	Colony	Susceptibility								
						SM	EB	KM	INH	RFP	LVFX	CAM	TH	AMK
37	Bathtub water	<i>M. avium</i>	OCU401	Apoliar	SmT	R	R	R	R	I	I	S	R	R
	Sputum	<i>M. avium</i>	OCU402	Apoliar	SmT	R	R	I	R	I	I	S	R	I
49	Bathtub water	<i>M. avium</i>	OCU433	8	SmO	R	R	R	R	S	R	S	I	R
	Drain	<i>M. avium</i>	OCU435	8	SmO	S	S	S	R	S	S	S	I	S
	Sputum	<i>M. avium</i>	OCU432	8	SmO	R	R	R	R	S	R	S	I	I
17	Showerhead	<i>M. intracellulare</i>	OCU436	16	SmO	S	S	S	R	S	S	S	R	S
	Sputum	<i>M. intracellulare</i>	OCU437	16	SmO	S	S	S	R	S	S	S	I	S
34	Shower water	<i>M. avium</i>	OCU399	4	SmO	S	I	S	R	S	S	S	I	S
	Sputum	<i>M. avium</i>	OCU400	Apoliar	SmO, T	I	I	R	R	I	R	S	R	I
29	Bathtub water	<i>M. avium</i>	OCU403	Apoliar	SmO, T	I	R	R	R	I	S	S	I	I
	Sputum	<i>M. avium</i>	OCU404	2	SmO, T	I	R	R	R	S	I	R	I	I
19	Shower water	<i>M. avium</i>	OCU438	8	SmT	I	R	R	R	I	S	S	I	I
	Sputum	<i>M. avium</i>	OCU439	Apoliar	SmO	R	I	R	R	I	S	S	R	I
5	Shower water	<i>M. avium</i>	OCU388	Apoliar	SmT	R	R	R	R	I	R	R	I	I
	Sputum	<i>M. intracellulare</i>	OCU390	7	SmO	S	S	S	R	S	S	R	I	S
20	Showerhead	<i>M. intracellulare</i>	OCU394	16	SmO	S	S	S	R	S	S	S	R	S
	Sputum	<i>M. avium</i>	OCU395	-	Rough	S	R	I	R	S	I	R	I	I
21	Drain	<i>M. intracellulare</i>	OCU396	14	SmO	S	I	S	R	S	S	S	I	S
	Sputum	<i>M. avium</i>	OCU397	-	Rough	R	R	R	R	I	I	R	I	R

SM, Streptomycin; EB, Ethambutol; KM, Kanamycin; INH, Isoniazide; REP, Rifampicin; LVFX, Levofuloxacin; CAM, Clarithromycin; TH, Ethionamide; AMK, Amikacin; R, Resistance; I, Intermediate; S, Sensitive to each antimicrobial drug; Apolar, apolar GRL; -, lack of GPL.

**Table 4** Genotypes of clinical and environmental MAC isolates by variable number of tandem repeats.

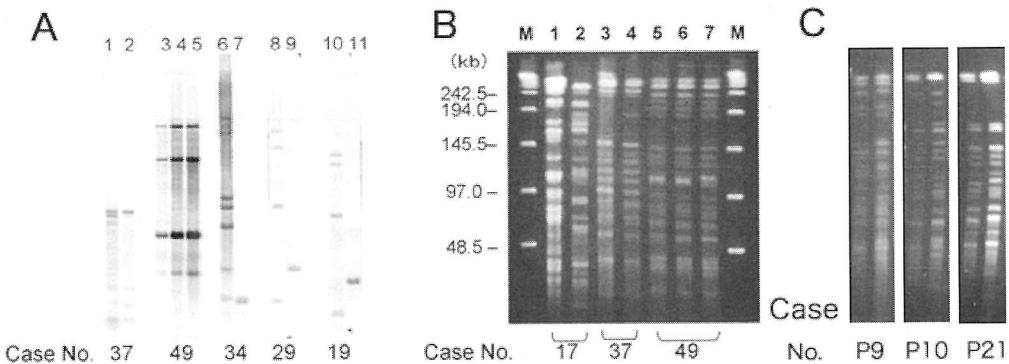
Case No.	Sample	No of tandem repeats															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
37	Bathtub water	2	0	5	2	2	1	6	1	2	3	2	3	0	2	2	3
	Sputum	2	0	5	2	2	1	6	1	2	3	2	3	0	2	2	3
49	Bathtub water	2	0	1	2	2	2	2	2	2	3	2	3	0	2	2	1
	Drain	2	0	1	2	2	2	2	2	2	3	2	3	0	2	2	1
34	Sputum	2	0	1	2	2	2	2	2	2	3	2	3	0	2	2	1
	Shower water	2	0	1	1	2	1	1	1	2	3	2	2	2	3	2	3
29	Sputum	1	1	1	2	2	1	1	1	2	3	1	2	0	3	2	2
	Bathtub water	1	0	1	2	2	1	1	2	2	3	1	2	0	3	2	2
19	Sputum	2	0	1	2	2	2	2	2	1	3	2	2	2	2	2	3
	Shower water	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	4	0	4	2	2

とも、浴室環境が患者発生につながっている可能性を示唆している。

MAC が生息しやすい浴室環境が患者の発生につながっている可能性を確かめるためには、前向きコホート研究が必要である。また、同一株由来であることが証明された患者分離株と浴室分離株のどちらが先かを

明らかにするためには、長期にわたって観察するか、現在の遺伝子多型の方法とは別の詳細な塩基配列の比較が必要だと思われる。

O'Brien ら (2000) は、肺 MAC 症の増加は、バスタブにつかるより、シャワーを良く利用するようになった生活習慣の変化と関係しているのではないかと仮説



**Fig. 1** Molecular typing of environmental and clinical MAC isolates. RFLP analyses were carried out with IS1245 (A). PFGE patterns of clinical and environmental *M. avium* complex isolates (B and C). Large restriction-fragment patterns of genomic DNA digested with *Xba*I. In each case, left lane shows the genotype from environmental isolate and right lane shows the genotype from clinical isolate. M, marker of lambda DNA standards.

をたてている。日本においても、近年シャワーの利用が増えていることを考え合わせると、私たちの結果は、O'Brien らの仮説を支持するものである。

今回、環境分離株と臨床分離株が同一株由来であるかどうか検討するために、遺伝子型の検出方法としてRFLP, VNTR, PFGE の3通りの方法を用いた。3通りの方法のうち、RFLPとVNTRは *M. avium*に対する解析方法で、PFGE 法はいずれの菌種にも応用できる。また、PFGE 法による MAC の解析や、RFLP 法による *M. avium* の解析は、その高い鑑別能が広く認められている (Guerrero *et al.*, 1995; Picardeau *et al.*, 1997; Wallace Jr *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 1998) が、新鮮な菌から得た大量のDNAを必要とし、時間がかかり、高い技術も必要である。VNTRは、PCR法を基にした方法で簡易かつ迅速で、異なる施設で行った結果も比較できることから有用性が高い。しかしながら、その *M. avium*に対する鑑別能は、未だ十分に検討されていない。今回の私たちの VNTR 法による解析結果は、RFLP や PFGE 法による解析結果と同様に各菌株を識別していた。VNTR 法の評価にはさらに多くの例数の検討が必要であるが、*M. avium*に対する遺伝子型別の方法として有望だと思われる。

MAC の浴室内生息場所 MAC が浴室内のどこに生息しているかを知るために、新たに25人の肺 MAC 症患者に協力を依頼し、シャワーヘッドの内側と浴槽内出入水口を従来の試料採取場所に追加して MAC を分離した。浴槽内出入水口は、風呂釜を備えている浴槽では、浴槽水をわかす時にお湯が風呂釜と循環するための連絡路で自然循環型の2穴のものと、強制循環型

の1穴のものがある。また、給湯型浴槽は、蛇口から給湯するタイプと、浴槽内の喫水線よりも下から給湯するタイプがある。この浴槽内の喫水線より下の給水口も対象とした。25家庭中21家庭の浴槽内出入水口から得た試料を培養した結果、12家庭から MAC を分離した (Table 5)。分離培養時、100 個以上の MAC のコロニーが培養平板中に認められたのは、12試料中 6 試料であり、多いものは1000個以上的小コロニーがみとめられた。これらの結果から、MAC は、浴槽内出入水口で増殖していると考えられる。

どのようなタイプの浴槽内出入水口で増殖するのか、浴室を乾燥・換気する方法で増殖が異なるのかを検討する目的で、協力者に浴槽のタイプや使用方法をアンケート調査し、培養法による MAC 検出の有無で違いを比較した (Table 6)。その結果、給湯型より風呂釜付の浴槽、殊に2穴の自然循環型の浴槽内出入水口から MAC をよく検出した。浴槽の水は、防災上の観点や洗濯に再利用するために翌日までおいておく家庭がある。MAC は翌日排水する浴室から頻度高く分離される傾向がみられた。浴室の換気も、乾燥設備や換気扇を使用しない、あるいは換気扇の使用時間の短い浴室から頻度高く分離される傾向がみられた。自然循環型風呂釜付の浴槽や、浴槽水を翌日排水する場合や、換気が不十分な浴室などが MAC にとって増殖しやすい環境であると思われる。

MAC は他の非結核性抗酸菌と同様にバイオフィルムを形成することが知られているが (Carter *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2006), 浴槽内出入水口でもバイオフィルムを形成して増殖していると思われる。また、一部の浴室分離株は喀痰分離株と一致した (Fig. 1C)。

肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者の家庭内 MAC 分布

Table 5 Recovery and detection of MAC from residential bathrooms by culture, PCR and LAMP method.

No. of samples	Sampling location						Total
	Surface of the shower head	Inside the shower head	Bathtub inlet	Drain	Shower water	Bathtub water	
24	20	21	25	25	22	137 (25)	
<i>M. avium</i>							
Culture positive	0	1	12*	6	0	5	24 (13)
PCR positive	0	1	7	1	1	0	10 (9)
LAMP positive	0	1	10	3	1	2	17 (13)
<i>M. intracellulare</i>							
Culture positive	0	0	0	1	0	0	1 (1)
PCR positive	0	0	0	0	0	0	0 (0)
LAMP positive	0	0	0	2	1	1	4 (3)

Data are represented as the number of MAC recovered samples.

Numbers in parenthesis represent the number of residences.

\*Over 100 colonies of *M. avium* bacilli in a primary isolation plate were recovered from six samples out of 12 culture positive samples

Table 6 Participants' residential bathtub type and ventilation method of bathrooms.

	Culture positive	Culture negative	Total
<b>Sort of bathtub</b>			
Hot-water supplied bathtub	2	9	11
Attached a bathtub to a bath boiler			
Natural circulation type (2 holes)	8	0	8
Forced circulation type (1 hole)	3	3	6
<b>The time of draining off water from bathtub after bathing</b>			
Just after bathing	2	4	6
Next day	10	8	18
Unknown	1	0	1
<b>Ventilation of bathroom</b>			
Using a bathroom dryer	0	2	2
Using a ventilating fan			
Regular use	0	1	1
1-8 h after bathing	2	2	4
0.5-1 h after bathing	3	2	5
Unused a bathroom dryer or a ventilating fan	8	5	13

直接検出法の評価 MAC は遅発育菌で培養に 3 週間ほどかかる。また、その分離培養には時間だけでなく、手間や経費もかかる。そこで、迅速かつ簡便に環境試料から MAC を検出する方法として、PCR 法と LAMP 法を検討した。まず、両方法の検出感度を比較したと

ころ、LAMP 法は *M. intracellulare* の DNA 数コピーから検出することができ、PCR 法や LAMP 法による *M. avium* の検出より 10 倍感度が高かった (Table 7)。

次に、前述の 25 人の肺 MAC 症患者家庭浴室から採取した環境試料を用いて PCR 法および LAMP 法を行い培養法の結果と比較した (Table 5)。LAMP 法は感

**Table 7** Detection limit of PCR and Lamp method using FTA elute card for DNA extraction

	<i>M. avium</i>		<i>M. intracellulare</i>	
	PCR	LAMP	PCR	LAMP
Detection			Detection	
$5 \times 10^4$ copies	○	○	$3 \times 10^4$ copies	○
$5 \times 10^3$ copies	○	○	$3 \times 10^3$ copies	○
$5 \times 10^2$ copies	○	○	$3 \times 10^2$ copies	○
$5 \times 10^1$ copies	○	○	$3 \times 10^1$ copies	○
$5 \times 10^0$ copies	×	×	$3 \times 10^0$ copies	○

**Table 8** Comparison of detection method for MAC, among culture, PCR, and LAMP methods from specimens in patients' residential bathrooms. —Culture positive and direct detection (PCR or LAMP) positive samples—

No of participant	Sampling location	Culture (No of colonies/plate)	PCR	LAMP
P6	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (>100)	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
	Drain	<i>M. avium</i> (6)	—	<i>M. avium</i>
P9	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (40)	—	<i>M. avium</i>
	Drain	<i>M. avium</i> (>100)	—	<i>M. avium</i>
P14	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (>1000)	—	<i>M. avium</i>
	Drain	<i>M. avium</i> (10)	—	<i>M. avium</i>
P17	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (4)	—	<i>M. avium</i>
P18	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (>100)	—	<i>M. avium</i>
P19	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (20)	—	<i>M. avium</i>
P21	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (>1000)	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
P22	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (>300)	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
P23	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (6)	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
P24	Bathtub inlet	<i>M. avium</i> (>200)	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
	Bathtub water	<i>M. avium</i> (6)	—	<i>M. avium</i>

度良く検出した。とくに培養法で40コロニー以上得られた試料はLAMP法でもすべて陽性となった(Table 8)。また、*M. intracellulare*に対する高い感度を反映して培養法で陰性の試料からもよく*M. intracellulare*を検出した。一般に培養法は、生存能力の高い菌がひとつでもあればコロニーを形成するため感度は高い。また、直接検出法は死菌も検出するので、培養法で陰性の場合でも陽性となりうる。このことから、LAMP法は環境試料中のMAC検出に有用であることがわかった。

## 要 約

*Mycobacterium avium* complex (MAC) は、播種性および肺感染症を起こすが、肺 MAC 症の感染源は知られていない。そこで感染源・感染経路を解明するために、家庭環境中の MAC 分布を調べた。肺 MAC 症の患者49人と健常人43人の家庭の水系（台所、洗面所、

浴室）およびエアコンの埃から試料を採取し、MAC および抗酸菌を培養法で分離した。多くの抗酸菌は家庭の水系から満遍なく分離されたのに比べ、MAC は浴室からのみ分離した。すなわち、家庭浴室のシャワー水（3試料）、シャワーヘッド（2試料）、浴槽水（4試料）、排水口（2試料）から*M. avium* 8株、*M. intracellulare* 3株を分離した。浴室以外の場所からは分離されなかった。また、患者9人の10試料から MAC が分離されたが、健常人の家庭からは浴槽水の1試料のみであった。MAC の分離頻度は患者浴室で有意に高かった ( $P < 0.05$ )。家庭から MAC が分離された9人の患者のうち2人の喀痰分離株がそれぞれの浴室分離株と表現型および遺伝子型が一致した。MAC の浴室生息場所を特定するために、新たに25人の肺 MAC 症の患者浴室から、シャワーヘッドの内側および浴槽出入水口の試料を加えて MAC を分離した。その結果12家庭の浴槽出入水口から多くの MAC を検出し、一部の MAC は臨床分離株と一致した。これらの

ことから MAC は患者家庭の浴室に局在し、なかでも浴槽出入水口に生息していることがわかった。MAC が患者浴室から頻度高く分離され、浴室分離株の一部がその患者の喀痰分離株と一致したことは、MAC が生息しやすい家庭環境が患者の発生につながっている可能性を示唆している。この可能性を確かめるためには、前向きコホート研究などさらに検討が必要である。また、直接検出法の LAMP 法は、迅速・簡便な方法であり、その検出能は、培養法と比べ遜色なかった。

### 本助成で得られた成果の報告一覧

#### 論文

Nishiuchi, Y., Maekura, R., Kitada, S., Tamaru, A., Taguri, T., Kira, Y., Hiraga, T., Hirotani, A., Yoshimura, K., Miki, M. & Ito, M. (2007). The recovery of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. Clin. Inf. Dis. 45: 347-351.

#### 口頭発表

1. 西内由紀子、前倉亮治、北田清悟、田栗貴博、田丸亜貴、平賀通、廣谷淳、好村研二、三木真理、伊藤正巳 (2006). *Mycobacterium avium* complex およびその他の非結核性抗酸菌の家庭環境内分布. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月29-31日 (金沢)
2. 西内由紀子、前倉亮治、北田清悟、田丸亜貴、田栗貴博、平賀通、廣谷淳、好村研二、三木真理、伊藤正巳 (2006). 肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者の家庭環境内における MAC の分布. 第81回日本結核病学会総会 2006年4月27-28日 (仙台)
3. 西内由紀子、松本壮吉、鈴木定彦；会員外共同研究者 前倉亮治、北田清悟、田丸亜貴(2007). 家庭浴室の *Mycobacterium avium* complex の検出－培養法、PCR 法および LAMP 法の比較. 第80回日本細菌学会総会 2007年3月26-28日 (大阪)
4. Maekura, R., Nishiuchi, Y., Kitada, S., Tamaru, A. & Ito, M. (2006). Residential bathroom is a candidate for source of pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection. European Respiratory Society Annual Congress 2006 September 2 - 6, (Munich, Germany).
5. 西内由紀子、田丸亜貴、北田清悟、田栗貴博、松本壮吉、鈴木定彦、前倉亮治(2007). 肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者の家庭浴室内における MAC の検出. 第82回日本結核病学会総会 2007年6月5-6日 (大阪)
6. 西内由紀子(2005). 肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者の家庭環境内における MAC の分布. 第35回 関西抗酸菌研究会 2005年6月10日 於：大阪スイスホテル (大阪)
7. 西内由紀子(2005). 肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者の家庭環境内における MAC の分布. 第34回 結核・非定型抗酸菌症治療研究会 2005年12月3日 (東京)

### 保存機関に寄託した菌株一覧

*Mycobacterium avium* OCU401, 402, 432, 433 の4株を理化学研究所に寄託する予定である。

### 謝 辞

本研究は、財団法人発酵研究所の研究助成を受けて行われた。

本研究の実施に当たり、浜田茂幸先生（日本大学大学院 総合科学研究科 生命科学専攻）、中川一路先生（東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター 感染制御部門）、田丸亜貴先生（大阪府立公衆衛生研究所微生物課）、松本壮吉先生（大阪市立大学大学院 医学研究科 感染防御学分野）、田栗貴博さん（国立病院機構 刀根山病院 研究検査課）、吉良幸美さん（大阪市立大学医学部 共同研究室）、鈴木定彦先生（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター）にご指導ならびにご協力していただいた。ここに深く感謝いたします。

また、試料採取に御協力してくださった協力者の方々、ならびに試験の遂行にご協力いただいた国立病院機構刀根山病院の医師、看護師、治験管理室、研究検査課の方々に深謝いたします。

### 文 献

- Archuleta, R. J., Mullens, P. & Primm, T. P. (2002). The relationship of temperature to desiccation and starvation tolerance of the *Mycobacterium avium* complex. Arch. Microbiol. 178: 311-314.
- Bodmer, T., Miltner, E. & Bermudez, L. E. (2000). *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. FEMS Microbiol. Lett. 182: 45-49.
- Carter, G., Wu, M., Drummond, D. C. & Bermudez, L. E. (2003). Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. J. Med. Microbiol. 52: 747-752.
- Chatterjee, D. & Khoo, K. H. (2001). The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. Cell Mol. Life Sci. 58: 2018-2042.
- Field, S. K., Fisher, D. & Cowie, R. L. (2004). *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. Chest 126: 566-581.
- Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer, T. & Telenti, A. (1995). A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. J. Clin. Microbiol. 33: 304-307.

- Maekura, R., Okuda, Y., Hirotani, A., Kitada, S., Hiraga, T., Yoshimura, K., Yano, I., Kobayashi, K. & Ito, M. (2005). Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3150-3158.
- Marras, T. K. & Daley, C. L. (2002). Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin. Chest Med.* **23**: 553-567.
- Nakamura, H., Yagyu, H., Kishi, K., Tsuchida, F., Oh-Ishi, S., Yamaguchi, K. & Matsuoka, T. (2003). A large outbreak of Legionnaires' disease due to an inadequate circulating and filtration system for bath water-epidemiologic manifestations. *Intern. Med.* **42**: 806-811.
- Nishimori, K., Uchida, I., Tanaka, K., Nishimori, T., Imai, K., Kashiwazaki, Y., Murata, N. & Jinma, K. (2003). Molecular epidemiological manual for *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* using VNTR (variable numbers of tandem repeats) typing. *Bull. Natl. Inst. Anim. Health* **109**: 25-32.
- Nishiuchi, Y., Kitada, S. & Maekura, R. (2004). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of small-scale glycopeptidolipid preparations to identify serovars of *Mycobacterium avium*-*intracellulare* complex. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 738-748.
- O'Brien, D. P., Currie, B. J. & Krause, V. L. (2000). Nontuberculous mycobacterial disease in northern Australia: a case series and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **31**: 958-967.
- Pedrosa, J., Florido, M., Kunze, Z. M., Castro, A. G., Portaels, F., McFadden, J., Silva, M. T. & Appelberg, R. (1994). Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) isolates in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **98**: 210-216.
- Picardeau, M., Varnerot, A., Lecompte, T., Brel, F., May, T. & Vincent, V. (1997). Use of different molecular typing techniques for bacteriological follow-up in a clinical trial with AIDS patients with *Mycobacterium avium* bacteraemia. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2503-2510.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J. L. & Pierre-Audigier, C. (1999). hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 852-857.
- Roth, A., Reischl, U., Streubel, A., Naumann, L., Kroppenstedt, R. M., Habicht, M., Fischer, M. & Mauch, H. (2000). Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1094-1104.
- 坂谷光則 (2005). 非定型抗酸菌症. *結核* **80**: 25-30.
- Schulze-Robbecke, R. & Buchholz, K. (1992). Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* **58**, 1869-1873.
- September, S. M., Brozel, V. S. & Venter, S. N. (2004). Diversity of nontuberculoid *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7571-7573.
- Taylor, R. H., Falkinham, J. O., 3rd, Norton, C. D. & LeChevallier, M. W. (2000). Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1702-1705.
- von Reyn, C. F., Maslow, J. N., Barber, T. W., Falkinham, J. O., 3rd & Arbeit, R. D. (1994). Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* **343**: 1137-1141.
- Wallace Jr, R. J., Zhang, Y., Brown-Elliott, B. A., Yakrus, M. A., Wilson, R. W., Mann, L., Couch, L., Girard, W. M. & Griffith, D. E. (2002). Repeat positive cultures in *Mycobacterium intracellulare* lung disease after macrolide therapy represent new infections in patients with nodular bronchiectasis. *J. Infect. Dis.* **186**: 266-273.
- Wallace, R. J., Jr., Zhang, Y., Brown, B. A., Dawson, D., Murphy, D. T., Wilson, R. & Griffith, D. E. (1998). Polyclonal *Mycobacterium avium* complex infections in patients with nodular bronchiectasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**: 1235-1244.
- Yamazaki, Y., Danelishvili, L., Wu, M., Hidaka, E., Katsuyama, T., Stang, B., Petrofsky, M., Bildfell, R. & Bermudez, L. E. (2006). The ability to form biofilm influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells. *Cell Microbiol.* **8**: 806-814.

## バイオフィルム状微生物の遺伝子転移に関する研究

前田 純夫

奈良女子大学 生活環境学部 食物栄養学科  
〒630-8506 奈良県奈良市北魚屋西町

### Study on Horizontal Gene Transfer in Microbial Biofilms

Sumio Maeda

Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University, Kitauoya-nishimachi, Nara 630-8506, Japan

Using an on-filter culture system on solid media, we tested the transformability of *Escherichia coli* in a colony biofilm. We found that colonial *E. coli* developed modest genetic competence on agar media and food samples. Next, we investigated the possibility of nonconjugative, nonviral lateral DNA transfer in a colony biofilm of mixed *E. coli* strains. By simply coculturing a plasmid-free F- strain and another F- strain harboring a nonconjugative plasmid in a colony biofilm on antibiotic-free agar media, transformed cells were produced within 2-18 h at the frequency of  $10^{-10}$ - $10^{-9}$  per recipient cell. PCR analysis of the transformed cells demonstrated the occurrence of lateral plasmid transfer. These cells survived until at least day 28 under antibiotic-free conditions. Liquid cultures of the same strains in Luria-Bertani broth produced no or few transformants, suggesting the importance of colony-biofilm formation for plasmid transfer. This is a novel line of evidence indicating that nonconjugative, nonviral horizontal gene transfer can occur between *E. coli* cells. The occurrence of this lateral plasmid transfer was also examined on food samples, and using mixed culture of *Bacillus subtilis* and *E. coli*.

Key words: colony biofilm, horizontal gene transfer, transformation, competence

### 緒 言

自然環境中の微生物の一部は、固体に付着したバイオフィルム状態にあり、液体浮遊培養時とは異なる特異な生理機能を顯すことが近年明らかとなりつつある (Davey & O'Toole, 2000; 日本微生物生態学会バイオフィルム研究部会, 2005)。バイオフィルムは、人に関わる諸環境中 (生活環境・人体環境・食品製造環境・医療環境、等) にも様々な形態で存在し、完全除去の困難な微生物供給源として、その制御が重要課題となっている (日本微生物生態学会バイオフィルム研究部会, 2005)。バイオフィルムの存在場所としては、液相-固相界面に形成されるものがよく知られているが、環境中には、気相-固相界面のもの (コロニーバイオフィルム (colony biofilm ; Stewart らの呼称に従って使用) (Mah *et al.*, 2003; Walters III *et al.*, 2003; Carmen *et al.*, 2004; Perez-Conesa *et al.*, 2006)) や液相-液相界面のもの (ペリクル (pellicle) (Kobayashi,

2007)) も多く存在している。例えば、台所などの水廻りのぬめりや歯垢などは、完全に液相に浸ったバイオフィルムというよりも、気相に曝される機会も頻繁にあるバイオフィルムであると考えられる。また、市販野菜の表面には、気相-固相界面のバイオフィルムが形成されているという報告もある (日本微生物生態学会バイオフィルム研究部会, 2005)。

一方、細菌細胞間の遺伝子転移は、抗生物質耐性や病原性の獲得など、人間生活にも影響の大きい細菌の性質変化を引き起こすため、その発生機序の解析が求められている (Bushman, 2002)。遺伝子転移の機構としては、教科書的には、接合・形質導入・形質転換の3つが知られているが、近年、膜小胞が関与する別種の機構の存在を示唆する報告もなされている (Yaron *et al.*, 2000; Renelli *et al.*, 2004)。

本研究では、バイオフィルム状の細菌が遺伝子転移においても特異な生理機能を發揮する可能性に着目し、諸条件下におけるバイオフィルム中の遺伝子転移 (特に *in situ* natural transformation) 発生の検証と、その発生機構の解明を目指した。特に本研究では、他での研究例の少ない固相-気相界面のコロニーバイオフ

イルムを対象として、on-filter バイオフィルム実験系 (Anderl *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2006)などを用い、遺伝子転移の解析を行った。

## 実験方法

**菌株・プラスミド** 大腸菌株, HB101, CAG18439 (an MG1655 derivative; F, *lacZ118(Oc)*, *lacI3042::Tn10*, *LAM*<sup>-</sup>, *rph-1*), DH5 $\alpha$ , ME8266 (MC4100 derivative; F, *araD139*, *cir::Tn10*,  $\Delta$  (*lacZYA-argF*)*U169*, *deoC1*, *ptsF25*, *relA1*, *rpsL150*), KF1225 (F, *lacY1*, *galK2*, *tsx-29*, *argE3*, *zdd-263::Tn5*, *uidA1*, *mtl-1*, *manA4*, *supE44*), MC4100 及びプラスミド pHSG299 (*kan*<sup>r</sup>; pUC-type high-copy plasmid; GenBank accession no. M19415), pGBM1 (*str*<sup>r</sup>; medium-copy plasmid containing the mutated pSC101 replicon) は国立遺伝学研究所から分譲を受けた。枯草菌株 ISW1214 及びプラスミド pHY300PLK は、(株)宝酒造より購入した。大腸菌株 KT1100 (Yamashino *et al.*, 1995) (MC4100 derivative; F, *rpoS::Tn10*, *araD139*,  $\Delta$  (*lacZYA-argF*)*U169*, *deoC1*, *ptsF25*, *thiA1*, *fblB5301*, *rbsR*, *relA1*, *rpsL150*) は名古屋大学大学院・水野猛教授より分与頂いた。

**食品サンプルの調製** 食品サンプルのうち、野菜・果物類は市販のものを滅菌したナイフでカットしカット面を菌の培養に用いた。肉類は包丁でカット後、表面をホットプレートで焼いた後用いた。食品抽出液は、以下の方法で調製した。ジャガイモ・玉ねぎ・トマトの 0.5 cm の角切り、ほうれん草のみじん切り、大豆、合い挽き肉、牛乳を各 50 g と蒸留水 400 ml を 1000 ml ピーカーに入れ、127°C, 30 分オートクレーブした。攪拌棒で試料をつぶしつつ攪拌し、20 分放置後、上清を 8000 g, 15 min 遠心分離し、その上清を採取した。上清に 2% になるようにショ糖を加え、121°C, 20 分オートクレーブし、食品抽出液として用いた。

**コロニーバイオフィルムの形成と遺伝子転移実験** コロニーバイオフィルムの形成と遺伝子転移実験は、文献 (Maeda *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2006) に記載の方法で行った。ただしコロニーバイオフィルムの生育は、Fig. 3-5, Table 4 の実験では Tryptic Soy broth Agar を用いた。大腸菌・枯草菌複合コロニーバイオフィルムからの大腸菌形質転換体の選択はアンピシリン (150  $\mu$ g · ml<sup>-1</sup>) を用い、枯草菌形質転換体の選択はテトラサイクリン (225  $\mu$ g · ml<sup>-1</sup>) を用いた。

**コロニーダイレクト PCR** コロニーダイレクト PCR

は、文献 (Maeda *et al.*, 2006) に記載の方法で行った。大腸菌と枯草菌の 16S rRNA 配列に対するプライマーは、Takara Bacteria Screening PCR キット中の対応プライマーを用いた。pHY300PLK に対するプライマー (C C A T C T T C A T C G G C T T T T T C, GCAATTGACGAAACTGCAA) は、(株)宝酒造で合成した。

## 結果

大腸菌コロニーバイオフィルムにおける形質転換 LB 寒天培地上で形成させた大腸菌コロニーバイオフィルムを各種サンプル上に移し、精製プラスミド DNA 溶液の添加により、形質転換能の発現を見た。その結果、CaCl<sub>2</sub> 寒天上のみでなく、LB 寒天培地上や各種食品切片上、さらには H<sub>2</sub>O 寒天培地上でも一定頻度の形質転換が起こりうることを見出した (Table 1)。この結果から、コロニーバイオフィルム上の大腸菌は、穏和な自然形質転換能を有することが示唆された。

**大腸菌コロニーバイオフィルムにおける細胞間遺伝子転移** 上記の結果を踏まえて、プラスミド保有／非保有の 2 種の大腸菌株をコロニーバイオフィルムとして共培養する実験を行った。予想として、もし死菌からのプラスミドの漏出と生菌の自然形質転換能の発現が同時に起これば、コロニーバイオフィルム内の自発的なプラスミド水平伝播が起こる可能性が考えられる。なお、この実験では、接合発生の可能性を排除するため、F<sup>-</sup>の大腸菌株、及び、非接合性プラスミド (*tra*<sup>-</sup>, *mob*<sup>-</sup>, *nic-bom*<sup>-</sup>) を用いた。その結果、pHSG299 を有する DH5 $\alpha$  (プラスミド供与菌) と CAG18439 (受容菌) を用いた系で Tet, Kan 両耐性菌の発生が認められた (Table 2)。この両耐性菌のコロニーダイレクト PCR およびプラスミド単離により、この両耐性菌が、プラスミド転移が起こった場合に発生が予想される形質転換体、pHSG299 を有する CAG18439 であることが実証された (Fig. 1)。なお Tet, Kan 両耐性菌は、供与菌、受容菌それぞれの菌株を単独で培養した場合には発生せず (Table 2)、変異や使用菌のコンタミネーションの結果ではないことが示された。また、前培養の供与菌と受容菌を混合した直後に、上記実験と同菌数をブレーティングしても形質転換体の発生は見られなかった (Table 2)。ことから、プラスミド転移はコロニーバイオフィルム生育時に起こっていることが示唆された。さらに上記と同様の共培養実験を液体培養で行ったところ、37°C の条件では全くプラスミド転移は発生せず、25°C の条件では少数の形質転換体が発生

Table 1 Transformation of colonial *E. coli* on foodstuffs, CaCl<sub>2</sub> agar, LB agar, and H<sub>2</sub>O agar.

Samples	Transformation frequencies	Samples	Transformation frequencies
<u>Vegetables</u>		<u>Raw meats and fishes</u>	
cucumber	+++	beef	+++
potato	++	chicken	+++
celery	-/+	pork	+++
onion	++	chicken liver	-/+
tomato	+	salmon	+
carrot	++	tuna	++
leek	++	scallop	-/+
radish	-/+	squid	-
<u>Fruits</u>		<u>Processed foods</u>	
orange	++	tofu	+++
pear	+++	orange gelatin	+
pineapple	++	strawberry jam	++
apple	++	pudding	+
melon	+	curry	++
banana	-	butter	++
grape	+	tomato ketchup	-
kiwi	-	mayonnaise	-
persimmon	++	mustard	-
		yoghurt	+
<u>Others</u>			
CaCl <sub>2</sub> agar	+++		
LB agar	+		
H <sub>2</sub> O agar	+		

-, -/+ , +, ++, and +++ denote transformation frequencies: no transformant, <1 x 10<sup>-8</sup>, 1-10 x 10<sup>-8</sup>, 1-10 x 10<sup>-7</sup>, and 1-5 x 10<sup>-6</sup>, respectively. (Reproduced with permission from Maeda *et al.*, 2004)

したが、コロニーバイオフィルム中に比べ少なかった (Fig. 2)。この結果から、プラスミド転移がコロニーバイオフィルム中で発生しやすくなることが示された。

上記の供与菌・受容菌・プラスミド以外の組み合わせも試したところ、複数の組み合わせでプラスミド転移が起こることが示され (Table 2)、本現象が特定の菌株やプラスミドに限定されない普遍的現象であることが示唆された。この中で、*rpoS*欠失変異株である KT1100 (Yamashino *et al.*, 1995) を受容菌としてもプラスミド転移が起こったことから、クオラム・センシングと関わりの深い定常期特異的シグマ因子は、少なくとも受容菌の生理機能としては必須ではないことも示唆された。また、プラスミドを保有せず、染色体上に異なる抗生物質耐性遺伝子を有する 2 つの菌株 (CAG18439 (Tn10), KF1225 (Tn5)) の組み合わせでは両耐性菌は生じなかった (data not shown) ことから、本実験条件下では染色体 DNA 上の抗生物質耐性遺伝

子の細胞間転移は起こらない（検出限界以下である）ことが示された。培地に関しては LB, Soy broth, Terrific broth, 2 x YT など、多くの富栄養倍地上でプラスミド転移が起こったが、M9-グルコース上では起こらなかった (Table 2)。

またタイムコース実験の結果から、プラスミド転移はコロニーバイオフィルム培養の 2-18 時間後までの間に発生することが示された (Fig. 3)。その後は、ほぼ一定の形質転換体数レベルが保たれたが、興味深いことにこの形質転換体は、抗生物質無しの培地上で少なくとも 28 日間保持された。このことからコロニーバイオフィルム中では、選択圧の無い条件下でもプラスミドが脱落せず長期間保持されることが示唆された。

食品サンプル上コロニーバイオフィルムでの遺伝子転移　上記プラスミド転移が実験室外でも起こりうるかを確かめる試みの一つとして、実験室外環境中で培

Table 2 Plasmid transfer in *E. coli* colony biofilms on agar media

Combination of strains and plasmid	Agar medium	Frequency of plasmid transfer (mean $\pm$ S.D.)
CAG18439 ( <i>tet'</i> ) + DH5 $\alpha$ harboring pHSG299 ( <i>kan'</i> )	LB	$3.3 \pm 1.9 \times 10^{-9}$
	2 x YT	$3.1 \pm 1.7 \times 10^{-9}$
	Terific broth	$4.0 \pm 6.5 \times 10^{-10}$
	LB + 100 mM CaCl <sub>2</sub>	$3.7 \pm 2.0 \times 10^{-9}$
	M9-glucose	$<1 \times 10^{-10}$
CAG18439 alone	LB	$<5 \times 10^{-11}$
DH5 $\alpha$ harboring pHSG299 alone	LB	$<5 \times 10^{-11}$
Mixing and plating of precultures of CAG18439 and DH5 $\alpha$ harboring pHSG299	LB	$<1 \times 10^{-10}$
ME8266 ( <i>tet'</i> ) + DH5 $\alpha$ harboring pHSG299	LB	$6.0 \pm 3.1 \times 10^{-9}$
KT1100 ( <i>tet'</i> ) + DH5 $\alpha$ harboring pHSG299	LB	$3.0 \pm 1.8 \times 10^{-9}$
KF1225 ( <i>kan'</i> ) + DH5 $\alpha$ harboring pGBM1 ( <i>str'</i> )	LB	$4.6 \pm 2.4 \times 10^{-9}$

Frequency of plasmid transfer = frequency of double-resistant colony appearance. The frequency of plasmid transfer was calculated as the ratio of the number of double-resistant colonies to the estimated number of recipient cells, which was regarded as half of the total cell number in each biofilm. S.D. = standard deviation. (Reproduced with permission from Maeda *et al.*, 2006)

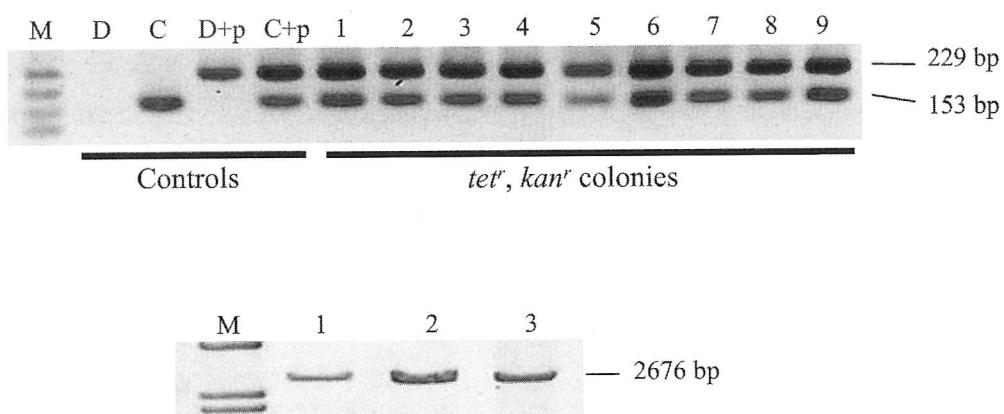
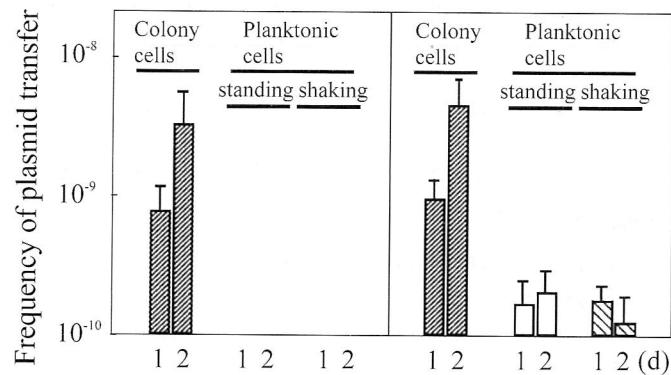
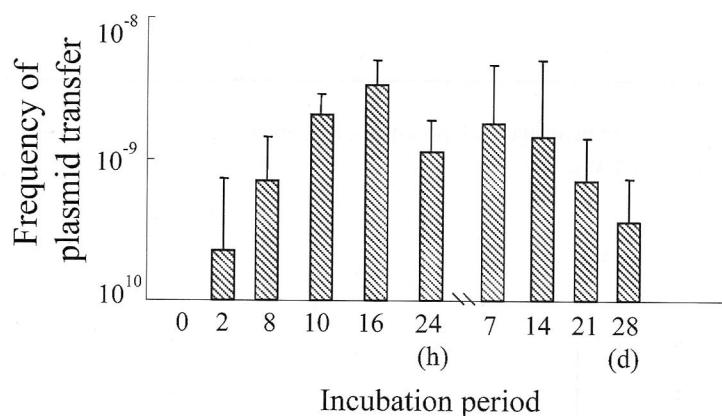


Fig. 1 Upper panel: Colony-direct PCR analysis of the tet-, kan- resistant colonies derived from colony biofilms of CAG18439 and DH5 $\alpha$  harboring pHSG299 (Reproduced with permission from Maeda *et al.*, 2006). Tet-, kan-resistant colonies were re-streaked and used as the PCR template. Lane M: size marker. Lane D: DH5 $\alpha$ , lane C: CAG18439, lane D+p: DH5 $\alpha$  harboring pHSG299, and lane C+p: CAG18439 harboring pHSG299. Lanes 1-9: tet-, kan-resistant colonies derived from colony biofilms. CAG18439-specific primers and the pHSG299-specific primers amplify a 153 bp fragment and a 229 bp fragment, respectively. Lower panel: Plasmid isolation from the tet-, kan- resistant colonies (lanes 1-3) described above. The size of pHSG299 is 2676 bp.



**Fig. 2** Frequency of horizontal plasmid transfer in colony biofilms or liquid cultures with standing or shaking (Reproduced with permission from Maeda *et al.*, 2006). Cells (CAG18439 and DH5 $\alpha$  harboring pHSG299) were grown on LB agar or in LB broth for 1 d or 2 d at 37° or 25°C constantly.



**Fig. 3** Time course of horizontal plasmid transfer in colony biofilm of *E. coli*. Cells (CAG18439 harboring pHSG299 and HB101) were cultured at 37°C.

地となりうる食物成分によるコロニーバイオフィルムの生育を行った。まず各種食品（肉類・牛乳・野菜類・果物類・糖）から調製した混合抽出液の寒天培地上での実験を行ったところ、プラスミド転移が確認された (Table 3)。この抽出液に海水や血液成分（血清）を混合してもほぼ同様の結果が得られた。また、食品そのものとして、肉類・野菜類・果物類の切片を用い、on filter法でコロニーバイオフィルムを形成させた場合にもプラスミド転移が起こることを見出した (Table 3)。これら実験で発生したプラスミド転移体は、コロニーダイレクトPCRにより、想定の形質転換体 (pHSG299 を有する CAG18439) であることも確認した (data not shown)。これらの結果から、本プラスミ

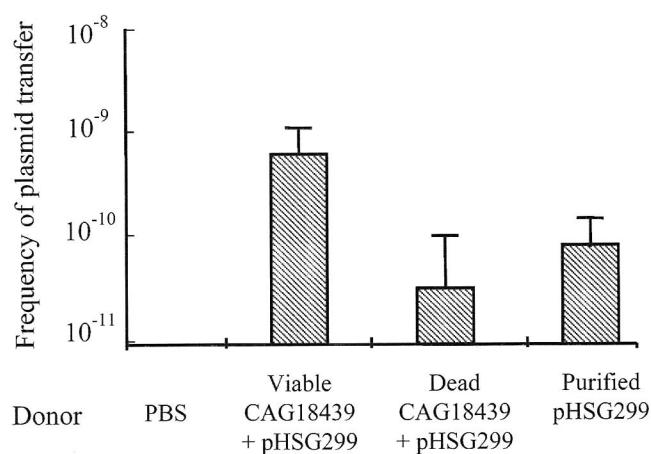
ド転移は、食物成分のような環境中でありうる栄養源による菌生育時にも起こりうることを示した。

**大腸菌コロニーバイオフィルムにおけるプラスミド転移のメカニズム** 上記現象が、当初の仮説通り、コロニーバイオフィルム内での死菌からのDNA供給→生菌の自然形質転換、というメカニズムによるものかどうかを確かめるため、以下の実験を行った。まず、形質転換ならばプラスミド供与菌細胞を全て死菌にしてもプラスミド転移が起こるはずである、という前提に基づいて、プラスミド供与菌細胞のみを全て死菌にした後、その上で受容菌のコロニーバイオフィルムを生育させる実験を試みた。その結果、この系でも形質

**Table 3** Plasmid transfer in *E. coli* colony biofilms on agar containing food extract and on foodstuffs.

Samples	Frequency of plasmid transfer
food extract	++
food extract + fetal calf serum (9 : 1)	++
food extract + marine water (1 : 1)	++
food extract + fetal calf serum + marine water (9 : 2 : 9)	+
fetal calf serum + water (1 : 9)	-
beef	+
tuna	+
chicken	+
pork	-/+
radish	-
cucumber	-
tomato	-
pear	-
grape	-

-, -/+ , +, and ++ denote transformation frequencies: no transformant,  $<1 \times 10^{-10}$ ,  $1-10 \times 10^{-10}$ , and  $1-10 \times 10^{-9}$ , respectively.



**Fig. 4** Horizontal plasmid transfer from dead donor cells. Donor cells (CAG18439 harboring pHSG299) were cultured in LB broth at 37°C overnight. Twenty  $\mu$ l of the cells ( $2 \times 10^9$  cells) were spotted on the nylon membrane filter, and killed by heat treatment (65°C, 60 min). Recipient cells (HB101,  $8 \times 10^7$  cells) were spotted on the killed cells, and cultured on tryptic soy broth agar at 37°C for 48 h. Viable donor cells ( $8 \times 10^7$  cells) and purified plasmid (10  $\mu$ g) were used as controls, instead of dead donor cells.

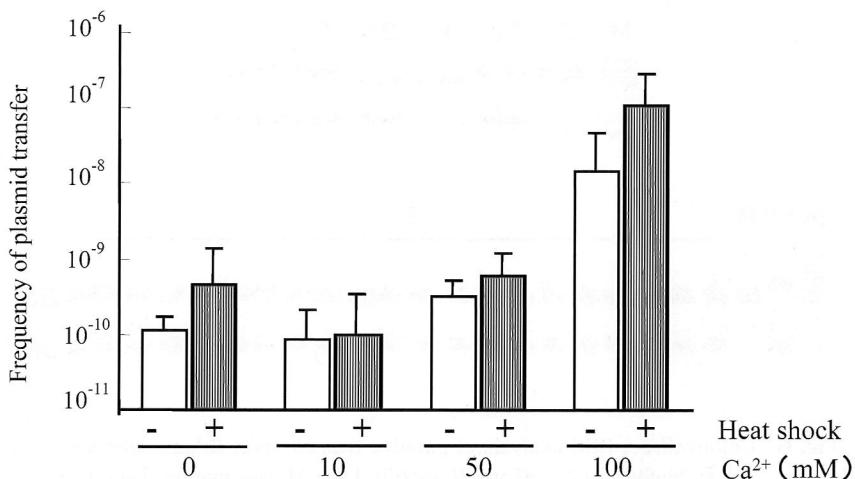


Fig. 5 Effects of Ca<sup>2+</sup> addition and heat shock on horizontal plasmid transfer. Cells (CAG18439 harboring pHSG299 and HB101) were cultured at 37°C for 24 h, and then heat shocked (4°C, 8 h in refrigerator, 37°C, 60 min in air incubator).

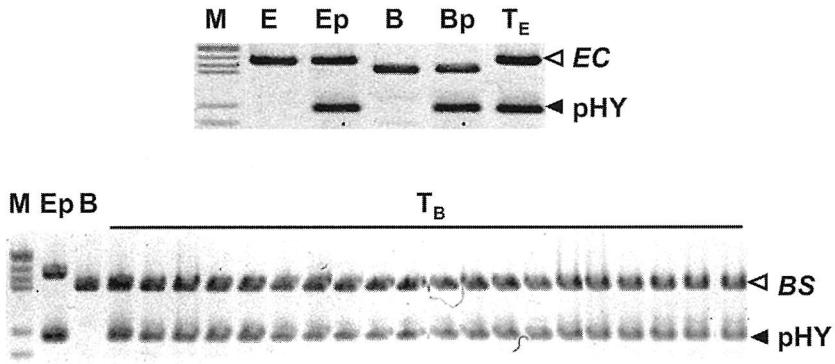
Table 4 Plasmid transfer in colony biofilms comprised of *E. coli* and *B. subtilis*.

Donor	Recipient	Frequency of plasmid transfer
<i>E. coli</i> (DH5α harboring pHY300PLK)	<i>B. subtilis</i> (ISW1214)	$\sim 1.2 \times 10^{-8}$
<i>B. subtilis</i> (ISW1214 harboring pHY300PLK)	<i>E. coli</i> (CAG18439)	$\leq 1.7 \times 10^{-9}$

転換体が出現することを確認できた (Fig. 4). また、形質転換ならば Ca<sup>2+</sup> の存在やヒートショックによって発生頻度が高くなるはずである、という予想に基づき、それらを与える実験を行ったところ、ヒートショックの効果はあまり見られなかったが、高濃度の Ca<sup>2+</sup> はプラスミド転移を促進する効果が見られた (Fig. 5). また、元々、接合や形質導入を起こさない菌株とプラスミドを選んで用いてはいるが、これらが偶発的な要因によって起こった可能性を否定するための確認実験を行い、予想通りこれらのメカニズムは関与しないことも実証した (data not shown). これらの結果から、大腸菌コロニーバイオフィルムにおけるプラスミド転移は、前述の、死菌からの DNA 供給→生菌の自然形質転換、というメカニズムによるという仮説が支持された. なお、死細胞の存在を確認するため、コロニーバイオフィルム内の大腸菌をサンプリングし、PI 染色による生死判定を蛍光顕微鏡下で行ったところ、プラスミド転移の起こる 2-18 時間の時期の死細胞率は概ね 5% 程度であることが判明した.

大腸菌一枯草菌複合コロニーバイオフィルムにおける

遺伝子転移 上記プラスミド転移が大腸菌間のみでなく、他細菌との間でも起こるかどうかを確かめるため、大腸菌と枯草菌から成る複合コロニーバイオフィルムを用いた実験を行った. プラスミドとしてシャトルベクターである pHY300PLK を用いた. 本プラスミドは大腸菌内でのみアンピシリン耐性遺伝子を発現する. テトラサイクリン耐性遺伝子は、大腸菌と枯草菌の両方で発現するが、予備実験の結果、枯草菌で発現した場合の方が大腸菌で発現した場合よりもテトラサイクリン耐性が高いことを見出した. したがって、これらの抗生物質の使い分けによって、複合コロニーバイオフィルムから大腸菌の形質転換体と枯草菌の形質転換体をそれぞれ特異的に選択することが可能である. 実験の結果、大腸菌から枯草菌へのプラスミド転移も枯草菌から大腸菌へのプラスミド転移も共に起こったが、その頻度は前者の方が高く、後者は検出限界付近の低い頻度にとどまった (Table 4). なおコロニーバイオフィルム中で生じた枯草菌の形質転換体は、抗生物質が無い条件下で少なくとも 7 日間はプラスミドを保持した (8 日以降は未確認). ここで得られたコロニーはコロニーダイレクト PCR により、それぞれ予



**Fig. 6** Colony-direct PCR analysis of putative transformant colonies derived from colony biofilms of *E. coli* and *B. subtilis*. Lane M: size marker. Lane E: *E. coli* (CAG18439), lanes Ep: *E. coli* harboring pHY300PLK (upper panel: CAG18439 harboring pHY300PLK; lower panel: DH5 $\alpha$  harboring pHY300PLK), lanes B: *B. subtilis* (ISW1214), lane Bp: *B. subtilis* harboring pHY300PLK (ISW1214 harboring pHY300PLK), lane  $T_E$ : putative *E. coli* transformant, and lanes  $T_B$ : putative *B. subtilis* transformants. The amplified products from *E. coli* genome (EC), *B. subtilis* genome (BS), and pHY300PLK (pHY) were indicated with arrow heads, respectively.

想された形質転換体であることを確認できた (Fig. 6). ただし、現在まだ予備的な結果であるが、大腸菌から枯草菌へのプラスミド転移は液体培養時にも起こるという結果が得られ、大腸菌単独の場合よりもコロニーバイオフィルム状態への依存度が低い可能性も示唆された。なお同様の実験を酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と大腸菌の複合コロニーバイオフィルム系でも行ったが、試した条件の範囲内ではプラスミドの転移は確認できなかった。

## 考 察

本研究では、コロニーバイオフィルム形成が大腸菌にとって自然形質転換能の発現をもたらすこと、また、大腸菌コロニーバイオフィルム内では外部から人為的にプラスミドを加えなくとも、内部のプラスミド保有菌からプラスミド非保有菌への自発的な非接合性・非ファージ性のプラスミド転移が起こることを見出した。これらの発見は共に、大腸菌の系では初めての事例である。なお前者に関しては、今回の実験系とはやや異なる固相培養実験系で、我々の発見を支持する結果が他研究者からも報告されつつある (Tsien *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006)。後者のバイオフィルム内での遺伝子転移促進に関しては、これまでに接合の例が複数報告されているが (Roberts *et al.*, 2001; Molin & Tolker-Nielsen, 2003; Sorensen *et al.*, 2005)、形質転換

では元来自然形質転換菌とされる口腔細菌の一例 (Wang *et al.*, 2002) があるのみである。今回の結果は、大腸菌などの非自然形質転換菌とされてきた細菌が非接合性プラスミドを環境中で水平伝播しうることを新たに示唆した初めての例となる。この結果は、従来からの環境中での非接合性プラスミドの拡散見積もりや、プラスミド保有遺伝子組換え大腸菌の実験室外バイオセイフティなどに関して、再検討を促すものである。なお、本現象の発生頻度は、今回の実験では、推定受容菌数当たりの頻度で概ね  $10^{-9}$  程度であり、同様の条件で実測した接合の発生頻度 ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$ ) よりもかなり低い数字であった。したがって、本現象の環境中での遺伝子水平伝播への寄与率は接合に比べると小さいと推定される。しかし、今回の実験では、発生頻度が  $10^{-9}$  程度の場合、厚さ 0.5-0.9 mm 程度、直径 10-20 mm 程度の大きさのコロニーバイオフィルム一つから、数個-十数個前後の形質転換体が現れたため、現実の環境中でも十分発生しうる頻度レベルにあると予想される。また Fig. 4 の結果で示したように、一度出現した大腸菌の形質転換体は、選択圧の無い条件下でもコロニーバイオフィルム中では少なくとも 1 ヶ月間は淘汰されずに生き延びることから、環境条件によっては形質転換体の累積や増殖も考えられる。さらに、形質転換は、主に細菌由来 DNA の転移に限定される接合や形質導入とは異なり、細胞外の「裸の DNA」を取り込むメカニズムであるため、環境中での「他生物

から細菌への遺伝子水平伝播」というプロセスにおいても、独自の寄与を果たしている可能性もある。

また、本研究では、食物成分上培養でのプラスミド転移や、大腸菌・枯草菌間でのプラスミド転移なども実証した。これらの結果も上記現象が実験室内的特殊状況下の大腸菌のみに限られた人工的な現象なのではなく、より普遍性のある現象であることを示唆する。現段階ではまだ他細菌に関する検討が十分行えていないが、最近、杉本ら（杉本ら、2006）により *Pseudomonas aeruginosa* で本研究と類似のバイオフィルム特異的な非接合性プラスミド転移が報告されている。また *Vibrio cholerae* においてもキチン上の固相培養での形質転換能の誘導が発見されている（Meibom *et al.*, 2005）。近年、バイオフィルム内の高分子マトリックス成分として多量のDNAが含まれることも明らかにされており（Whitchurch *et al.*, 2002），今後我々の発見した現象の普遍性が証明されていくことが期待される。

今回明らかにしたコロニーバイオフィルム中の非接合性・非ファージ性プラスミド水平伝播のメカニズムに関しては、現状では形質転換の可能性が最も高いと考えられる。これは、本研究でのaccidentalな接合や形質導入の否定、死んだ供与菌からのプラスミド転移、Ca<sup>2+</sup>添加による促進効果などの実験結果から示唆される。しかし、このプラスミド転移が1 mM以下のCa<sup>2+</sup>しか含まないLB寒天上でも起こることから、必ずしも従来から知られている形質転換メカニズムのみでは説明できない面もある。メカニズムに関しては、さらなる検証のため、コロニーバイオフィルム培養時にDNaseを加え（酵素活性発現のため各1 mMのCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>も添加）細胞外の裸のDNAを分解する実験も試みたが、予想に反してプラスミド転移頻度を下げる効果は見られなかった（data not shown）。この結果も通常の形質転換機構からの予想からは外れているように見える。しかし、この実験では、コロニーバイオフィルム内へのDNaseの浸透、培養時間中の酵素活性維持、細胞外多糖による酵素活性阻害などの点で実験方法にさらなる考慮が必要と考えられたため、現時点ではDNaseの添加が無効とまでは結論できない。結局、現在までのデータを総合的に考えた場合、いくつかの未解決部分はあるにせよ、コロニーバイオフィルム中のプラスミド転移は基本的には形質転換機構によると考えるのが最も妥当である。しかしそれ以外の可能性としてYaronら（Yaron *et al.*, 2000; Renelli *et al.*, 2004）によって提唱された膜小胞を介するDNA伝播機構や未知の新機構が関与している可能性も否定はできない。今後このような新たなメカニズムの関与の

可能性を含めてプラスミド転移発生機構についてさらに詳細に解析していく必要があるだろう。

## 要 約

本研究では、バイオフィルム状の細菌が遺伝子転移において特異な機能を發揮する可能性を、固相・気相界面のバイオフィルム（コロニーバイオフィルム）を対象として、on-filterバイオフィルム実験系などを用い、解析を行った。まず、大腸菌コロニーバイオフィルム系では、通常、自然形質転換能を持たないとされる大腸菌がLB寒天上や食品切片上のようなCa<sup>2+</sup>イオン極低濃度条件下でも穏和な形質転換能を発現しうることを見出した。また、2種のF-大腸菌株（+/- 非接合性プラスミド：*tra<sup>-</sup>*, *mob<sup>-</sup>*, *nic<sup>-</sup>*, *bom<sup>-</sup>*）の共培養（2–18時間）中に、受容菌数当たり10<sup>-10</sup>–10<sup>-9</sup>程度の頻度で自発的な非接合性・非ファージ性プラスミド水平伝播が起こる現象を明らかにした。この細胞間プラスミド転移は、液体培養ではほとんど起こらずコロニーバイオフィルム形成の重要性が示唆された。また、食品成分を栄養源とした培養、および諸環境中に存在しうる各種物質の添加効果、等を検討した。さらに、大腸菌と枯草菌から成る複合菌系バイオフィルム中の発生可能性も検討した。

## 成果報告一覧

### 論文

- Maeda, S., Sawamura, A. & Matsuda, A. (2004). Transformation of colonial *Escherichia coli* on solid media. FEMS Microbiol. Lett. **236**: 61-64.  
 Maeda, S., Ito, M., Ando, T., Ishimoto, Y., Fujisawa, Y., Takahashi, H., Matsuda, A., Sawamura, A. & Kato, S. (2006). Horizontal transfer of nonconjugative plasmids in a colony biofilm of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **255**: 115-120.
- 口頭発表  
 伊藤未来、安藤津矢子、石本裕子、藤澤友紀子、高橋瞳、松田明子、澤村亜希子、加藤志穂、前田純夫（2005）。大腸菌コロニー中の非接合性プラスミド水平伝播 第21回日本微生物生態学会  
 安藤津矢子、阿部弥生、前田純夫（2005）。PCR differential display法による大腸菌コロニー特異的遺伝子発現の解析 第21回日本微生物生態学会  
 Maeda, S., Ishimoto, Y., Matsuda, A., Sawamura, A. & Kato, S. (2005). Transformation and horizontal DNA transfer in colony biofilm of *Escherichia coli*. 2nd ASM conference on prokaryotic development.  
 Ito, M., Ando, T., Ishimoto, Y., Fujisawa, Y., Takahashi, H., Matsuda, A., Sawamura, A., Kato, S. & Maeda, S. (2006). Horizontal transfer of non-conjugative plasmids in a colony

- biofilm of *Escherichia coli*. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress.
- Ando, T., Abe, Y. & Maeda, S. (2006). Analysis of gene expression involved in nonconjugative, nonviral horizontal gene transfer in a colony biofilm of *Escherichia coli*. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress.
- Ando, T., Itakura, S., Uchii, K. & Maeda, S. (2006). Lateral plasmid transfer in a colony biofilm of *Escherichia coli* on food samples. 2nd FEMS congress of European microbiologists.
- Ito, M., Ando, T., Ishimoto, Y., Fujisawa, Y., Takahashi, H., Matsuda, A., Sawamura, A., Kato, S., Kitano, S., Shigi, F. & Maeda, S. (2006). Lateral transfer of non-conjugative plasmid in *Escherichia coli* colony. 2nd FEMS congress of European microbiologists.
- 伊藤未来, 北野聖子, 信貴富紀子, 藤澤友紀子, 高橋瞳, 石本裕子, 前田純夫 (2006). 大腸菌コロニーバイオフィルム中の非接合性プラスミド水平伝播の解析 第22回日本微生物生態学会
- 安藤津矢子, 板倉沙紀, 内井香里, 前田純夫 (2006). 食品成分上で培養した大腸菌コロニーバイオフィルムにおけるプラスミドの水平伝播 第22回日本微生物生態学会
- biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. J. Infect. Chemother. **10**: 193-199.
- Davey, M.E. & O'Toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbial Mol. Biol. Rev. **64**: 847-867.
- Kobayashi, K. (2007). *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. J. Bacteriol. **189**: 4920-4931.
- Maeda, S., Sawamura, A. & Matsuda, A. (2004). Transformation of colonial *Escherichia coli* on solid media. FEMS Microbiol. Lett. **236**: 61-64.
- Maeda, S., Ito, M., Ando, T., Ishimoto, Y., Fujisawa, Y., Takahashi, H., Matsuda, A., Sawamura, A. & Kato, S. (2006). Horizontal transfer of nonconjugative plasmids in a colony biofilm of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **255**: 115-120.
- Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walter, G.C., Stewart, P.S. & O'Toole, G.A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature **426**: 306-310.
- Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.Y. & Schoolnik, G.K. (2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. Science **310**: 1824-1827.
- Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Curr. Opin. Biotechnol. **14**: 255-261.
- 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.
- Perez-Conesa, D., McLandsborough, L. & Weiss, J. (2006). Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. J. Food Prot. **69**: 2947-2954.
- Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y. & Beveridge, T.J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. Microbiology **150**: 2161-2169.
- Roberts, A.P., Mullany, P. & Wilson, M. (2001). Gene transfer in bacterial biofilms. Methods Enzymol. **336**: 60-65.
- Sorensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N. & Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. Nat. Rev. Microbiol. **3**: 700-710.
- 杉本寛和, 野村暢彦, 中島敏明, 内山裕夫 (2006) *Pseudomonas aeruginosa* における自然形質転換能の検討. 第22回日本微生物生態学会講演要旨集 155.
- Sun, D., Zhang, Y., Mei, Y., Jiang, H., Xie, Z., Liu, H., Chen, X. & Shen, P. (2006). *Escherichia coli* is naturally transformable in a novel transformation system. FEMS Microbiol. Lett. **265**: 249-255.
- Tsen, S.D., Fang, S.S., Chen, M.J., Chien, J.Y., Lee, C.C. & Tsen, D.H. (2002). Natural plasmid transformation in *Escherichia coli*. J. Biomed. Sci. **9**: 246-252.
- Walters III, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J. & Stewart, P.S. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. Antimicrobial Agents.

## 寄託菌株一覧

特になし。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、その萌芽期より評価下さり、多大なる助成と種々のご助言を賜りました財団法人発酵研究所の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。また本研究の実験を担当した共同研究者の学生、石本裕子・安藤津矢子・伊藤未来・越中屋里香・祖父江里奈(以上、奈良女子大学大学院・人間文化研究科)、松田明子・澤村亜希子・加藤志穂・高橋瞳・藤澤友紀子・阿部弥生・板倉沙紀・内井香里・北野聖子・信貴富貴子・佐々木優美・三廉恵梨(以上、奈良女子大学生活環境学部)、諸氏の精謹・努力に感謝いたします。

## 文 献

- Anderl, J.N., Franklin, M.J. & Stewart, P.S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrobial Agents. Chemother. **44**: 1818-1824.
- Bushman, F. (2002). Lateral DNA Transfer. Cold Spring Harbor, New York.
- Carmen, J.C., Nelson, J.L., Beckstead, B.L., Runyan, C.M., Robinson, R.A., Scaalje, G.B. & Pitt, W.G. (2004). Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony

- Chemother. **47**: 317-323
- Wang, B.Y., Chi, B. & Kuramitsu, H.K. (2002). Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms. Oral Microbiol. Immunol. **17**: 108-112.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. & Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science **295**: 1487.
- Yamashino, T., Ueguchi, C. & Mizuno, T. (1995). Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. EMBO J. **14**: 594-602.
- Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L. & Matthews, K.R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 4414-4420.

発酵研究所研究報告 第21号【非売品】

平成20年2月22日 印刷

平成20年2月28日 発行

編集責任者 駒形和男

編集委員 豊島久真男, 波多野和徳

松原謙一, 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